

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-529656

(P2018-529656A)

(43) 公表日 平成30年10月11日(2018.10.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 5/00 (2006.01)	A 6 1 P 5/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 141 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-509504 (P2018-509504)	(71) 出願人	516250498 アッヴィ・ステムセントルクス・エル・エル・シー
(86) (22) 出願日	平成28年8月19日 (2016. 8. 19)		
(85) 翻訳文提出日	平成30年4月19日 (2018. 4. 19)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/047870		アメリカ合衆国、イリノイ・60064、 ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン・ロード・1
(87) 国際公開番号	W02017/031458	(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成29年2月23日 (2017. 2. 23)	(72) 発明者	ダイラ、スコット・ジェイ アメリカ合衆国、カリフォルニア・94062、 エメラルド・ヒルズ、ダンフォード・コート・25
(31) 優先権主張番号	62/207, 830		
(32) 優先日	平成27年8月20日 (2015. 8. 20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/323, 998		
(32) 優先日	平成28年4月18日 (2016. 4. 18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/373, 906		
(32) 優先日	平成28年8月11日 (2016. 8. 11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗DLL3抗体薬物コンジュゲートおよび使用方法

(57) 【要約】

新規の抗DLL3抗体および抗体薬物コンジュゲートならびに抗DLL3抗体および抗体薬物コンジュゲートを使用してがんを治療する方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

300ポイントスケール上の少なくとも90のDLL3 Hスコアおよび/または10%陽性染色DLL3細胞を示す腫瘍を有する対象を治療する方法であって、DLL3 ADCを投与する工程を含む、方法。

【請求項 2】

DLL3 ADCが、PBD、カリケマイシン、オーリスタチン、メイタンシノイドおよびデュオカルマイシンからなる群から選択される細胞毒を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

細胞毒がPBDを含む、請求項2に記載の方法。

10

【請求項 4】

PBDがPBD1を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

DLL3を発現する腫瘍開始細胞に結合するDLL3 ADCを含む、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

DLL3 ADCが、キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、ヒト抗体もしくはヒト化抗体またはそれらの断片である抗体を含む、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

抗体が内在化抗体である、請求項6に記載の方法。

20

【請求項 8】

腫瘍が300ポイントスケール上の少なくとも120のDLL3 Hスコアを示す、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

腫瘍が、300ポイントスケール上の少なくとも180のDLL3 Hスコアを示す、請求項1~8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

腫瘍が、神経内分泌腫瘍を含む、請求項1~9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

腫瘍が、小細胞肺癌(SCLC)腫瘍を含む、請求項1~10のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 12】

腫瘍が、大細胞神経内分泌がん(LCNEC)腫瘍を含む、請求項1~10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

腫瘍が、甲状腺髄様がん腫瘍を含む、請求項1~12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

対象が、0.2mg/kg Q3W x 3投与レジメンを含むDLL3 ADCレジメンにより治療される、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 15】

対象が、0.3mg/kg Q6W x 2投与レジメンを含むDLL3 ADCレジメンにより治療される、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

DLL3 ADCレジメンの後、対象が進行時に治療される、請求項14または15に記載の方法。

【請求項 17】

DLL3 ADCレジメンの後、対象がDLL3 ADC維持療法に移行する、請求項14または15に記載の方法。

【請求項 18】

50

- 対象が、フロントライン患者である、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 19】
対象が、セカンドライン患者である、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 20】
対象が、サードライン患者である、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 21】
DLL3 ADC が SC16LD.5 を含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 22】
DLL3 ADC が、hSC16.56ss1DL6 を含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。 10
- 【請求項 23】
腫瘍を有する対象を治療する方法であって、
腫瘍の試料を得る工程、
腫瘍試料を調査して、DLL3 Hスコアを計算するおよび/または陽性染色 DLL3 細胞のパーセンテージを決定する工程、
計算された DLL3 Hスコアが、300 ポイントスケール上の少なくとも 90 である、および/または陽性染色 DLL3 細胞が、腫瘍細胞の 10% を含む場合に、患者を DLL3 ADC により治療する工程を含む、方法。 20
- 【請求項 24】
調査する工程が、免疫組織化学を含む、請求項 23 に記載の方法。
- 【請求項 25】
式：Ab - [L - D]n の抗体薬物コンジュゲート (ADC) またはそれらの医薬として許容される塩を含む凍結乾燥組成物であって、
Ab が抗 DLL3 抗体を含み、
L が任意選択のリンカーを含み、
D が薬物を含み、
n が 1 ~ 20 の整数である、
凍結乾燥組成物。 30
- 【請求項 26】
D が PBD を含む、請求項 25 に記載の凍結乾燥組成物。
- 【請求項 27】
医薬として許容される糖をさらに含む、請求項 25 に記載の凍結乾燥組成物。
- 【請求項 28】
ADC が、SC16LD6.5 を含む、請求項 26 に記載の凍結乾燥組成物。
- 【請求項 29】
ADC が、hSC16.56ss1DL6 を含む、請求項 26 に記載の凍結乾燥組成物。
- 【請求項 30】 40
請求項 25 に記載の組成物を含む、DLL3 関連障害を診断または治療するために有用な製品。
- 【請求項 31】
がんを治療する方法であって、
請求項 25 に記載の凍結乾燥組成物を再構成して、液体医薬組成物を得る工程、および液体医薬組成物を、がんの治療を必要とする対象に投与する工程を含む、方法。
- 【請求項 32】
がんが神経内分泌の特徴を示す腫瘍を含む、請求項 31 に記載の方法。
- 【請求項 33】 50

がんが神経内分泌腫瘍を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

がんが小細胞肺癌を含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 5】

がんが大細胞神経内分泌がんを含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 6】

凍結乾燥 D L L 3 A D C を含むレセプタクルを含み、D L L 3 関連障害を治療または診断するのに製品を使用するための取扱説明資料を伴う、D L L 3 関連障害を治療または治療するのに有用な製品。

【請求項 3 7】

D L L 3 A D C が P B D を含む、請求項 3 6 に記載の製品。

【請求項 3 8】

腫瘍を有する対象を治療する方法であって、約 6 日を超える終末相半減期を有する D L L 3 A D C を投与する工程を含む、方法。

【請求項 3 9】

D L L 3 A D C が約 7 日を超える終末相半減期を有する、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

D L L 3 A D C が約 8 日を超える終末相半減期を有する、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

D L L 3 A D C が約 9 日を超える終末相半減期を有する、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 2】

D L L 3 A D C が約 1 0 日を超える終末相半減期を有する、請求項 3 8 に記載の方法

。

【請求項 4 3】

D L L 3 A D C が P B D、カリケアマイシン、オーリスタチン、メイタンシノイドおよびデュオカルマイシンからなる群から選択される細胞毒を含む、請求項 3 8 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

細胞毒が P B D を含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

P B D が P B D 1 を含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

D L L 3 A D C が、キメラ抗体、C D R グラフト化抗体、ヒト抗体もしくはヒト化抗体またはそれらの断片である抗体を含む、請求項 3 8 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法

。

【請求項 4 7】

抗体が内在化抗体である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

腫瘍が、神経内分泌の特徴を示す腫瘍を含む、請求項 3 8 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

腫瘍が、神経内分泌腫瘍を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 0】

腫瘍が、小細胞肺癌 (S C L C) 腫瘍を含む、請求項 3 8 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

腫瘍が、大細胞神経内分泌がん (L C N E C) 腫瘍を含む、請求項 3 8 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

対象が 0 . 2 m g / k g Q 3 W 投与レジメンを含む D L L 3 A D C レジメンにより

10

20

30

40

50

治療される、請求項 38 ~ 51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

対象が、0.2 mg / kg Q3W x 3 投与レジメンを含む D L L 3 ADC レジメンにより治療される、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

対象が 0.3 mg / kg Q6W 投与レジメンを含む D L L 3 ADC レジメンにより治療される、請求項 38 ~ 51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

対象が 0.3 mg / kg Q6W x 2 投与レジメンを含む D L L 3 ADC レジメンにより治療される、請求項 54 に記載の方法。

10

【請求項 56】

D L L 3 ADC レジメンの後、対象が進行時に治療される、請求項 52 ~ 55 に記載の方法。

【請求項 57】

D L L 3 ADC レジメンの後、対象が D L L 3 ADC 維持療法に移行する、請求項 52 ~ 55 に記載の方法。

【請求項 58】

対象が、フロントライン患者である、請求項 38 ~ 57 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

対象が、セカンドライン患者である、請求項 38 ~ 57 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 60】

対象が、サードライン患者である、請求項 38 ~ 57 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

D L L 3 ADC が、S C 1 6 L D . 5 を含む、請求項 38 ~ 60 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

D L L 3 ADC が、h S C 1 6 . 5 6 s s 1 D L 6 を含む、請求項 38 ~ 60 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 63】

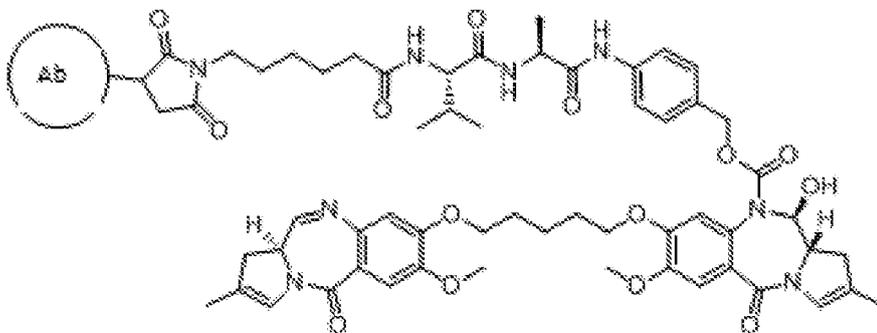
約 6 日を超える終末相半減期を有する D L L 3 ADC を投与する工程を含む、がん幹細胞の頻度の減少を必要とする対象におけるがん幹細胞の頻度を減少させる方法。

30

【請求項 64】

以下の式

【化 1】



40

ADC 6

(式中、Ab は、抗 D L L 3 抗体またはその免疫反応性断片を含む) を含む D L L 3 ADC。

【請求項 65】

抗 D L L 3 抗体が、部位特異的抗体を含む、請求項 64 に記載の D L L 3 ADC。

50

【請求項 66】

抗DLL3抗体が、hSC16.56ss1である、請求項64に記載のDLL3 ADC。

【請求項 67】

DLL3 ADCおよび抗PD-1抗体を投与する工程を含む、がん幹細胞の頻度の減少を必要とする対象におけるがん幹細胞の頻度を減少させる方法。

【請求項 68】

DLL3 ADCがSC16LD5を含む、請求項67に記載の方法。

【請求項 69】

DLL3 ADCが、hSC16.56ss1DL6を含む、請求項67に記載の方法 10

【請求項 70】

DLL3 ADCおよび抗PD-L1抗体を投与する工程を含む、がん幹細胞の頻度の減少を必要とする対象におけるがん幹細胞の頻度を減少させる方法。

【請求項 71】

DLL3 ADCがSC16LD5を含む、請求項70に記載の方法。

【請求項 72】

DLL3 ADCがhSC16.56ss1DL6を含む、請求項70に記載の方法。

【請求項 73】

DLL3 ADCおよび抗PD-1抗体を投与する工程を含む、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法。 20

【請求項 74】

DLL3 ADCが、SC16LD5を含む、請求項73に記載の方法。

【請求項 75】

DLL3 ADCが、hSC16.56ss1DL6を含む、請求項73に記載の方法 。

【請求項 76】

DLL3 ADCおよび抗PD-L1抗体を投与する工程を含む、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法。

【請求項 77】

DLL3 ADCがSC16LD5を含む、請求項76に記載の方法。 30

【請求項 78】

DLL3 ADCがhSC16.56ss1DL6を含む、請求項76に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる2015年8月20日に提出された米国仮出願第62/207,830号、2016年4月18日に提出された米国仮出願第62/323,998号および2016年8月11日に提出された米国仮出願第62/373,906号の利益を主張する。 40

【0002】

配列表

本出願は、EFS-Webを介してASCII形式で提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。前記ASCIIの写しは、2016年8月8日に作成され、sc1607__p3__Sequence__Listing__08082016と名付けられ、大きさが591KB(605,521バイト)である。

【0003】

発明の分野

本出願は、一般に、がんおよびがんの再発または転移の治療、診断または予防のための、新規の化合物および組成物、ならびに抗DLL3抗体またはこの免疫反応性断片、例え 50

ばそれを含む抗体薬物コンジュゲート（ADC）を、投与方法に関する。本発明の選択された実施形態は、腫瘍形成性細胞の出現頻度の減少を含むがんの治療のための、このような抗DLL3抗体または抗体薬物コンジュゲートの投与を提供する。

【背景技術】

【0004】

幹細胞および始原細胞の分化および増殖は、器官形成、細胞修復および細胞置換の間の組織成長を支援するために協調して働く通常の進行プロセスである。この機構は、生物の必要性に基づいて適切なシグナルのみが生成されることが確実となるように厳しく制御されている。細胞増殖および分化は、通常、損傷のある細胞もしくは瀕死の細胞の交替のためまたは成長のために必要なときにのみ生じる。しかしながら、これらのプロセスの破壊は、様々なシグナル伝達化学物質の過小な量もしくは過剰な量、微小環境の変化の存在、遺伝子変異またはそれらの組合せなどの、多くの要因によって引き起こされ得る。正常な細胞の増殖および/または分化の攪乱は、様々な障害、例えばがんのような増殖性疾患をもたらす得る。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

がんに対する従来の治療療法としては、化学療法、放射線療法および免疫療法が含まれる。これらの治療は効果を奏しないことも多く、外科的切除は有効な臨床的代替手段を提供しない場合がある。現行の標準治療の限界は、第1選択治療を行った後に再発した患者の場合に特に明白である。このような場合に、不応性腫瘍は、侵襲的で不治であることが多く、頻繁に発生する。多くの固形腫瘍の全体的な生存率は、長年にわたり大きく変化しておらず、少なくともこの原因の1部は、既存の治療法が、再発（relapse）、腫瘍の再発（tumor recurrence）および転移を防ぎそなっていることによる。したがって、増殖性障害に対するより標的化された効能の高い治療法を開発することが依然として強く必要とされている。本発明は、この必要性に対処する。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

（発明の要旨）

広い態様において、本発明は、ヒトDLL3決定因子に特異的に結合する、単離抗体および/または対応する抗体薬物コンジュゲートを含む新規の化合物および組成物を提供する。特定の実施形態において、DLL3決定因子は、腫瘍細胞上に発現するDLL3タンパク質であるが、他の実施形態において、DLL3決定因子は、腫瘍開始細胞上に発現する。選択された態様において、DLL3 ADC組成物は、凍結乾燥組成物を含む。他の態様において、本発明は、とりわけ有効な投与レジメンおよび本明細書で示すように同定された特定の患者部分集団の投与を含む、開示する化合物または組成物を投与する新規の方法を提供する。下記にさらに詳細に記載するように、患者選択および患者投与に関して開示する方法論がとりわけ効果的であることを、少なくとも一部は、得られる好ましい治療指数および治療感受性集団に基づいて、証明することができる。さらに他の実施形態において、本発明は、DLL3 ADCと、とりわけ効果的であると思われる、チェックポイント阻害剤を含む免疫療法化合物との組合せを含む、特定の治療レジメンを提供する。

30

40

【0007】

選択された態様において、本発明の抗体は、DLL3タンパク質に結合し、ヒトDLL3タンパク質上のエピトープに結合する参照抗体と結合について競合する。特定の実施形態において、本発明は、DLL3抗体またはADCを含み、抗体またはADC結合ドメインは、ヒトDLL3（hDLL3）に特異的に結合し、以下のものを含むかまたは以下のものを含む抗体と結合について競合する：配列番号21の軽鎖可変領域（VL）および配列番号23の重鎖可変領域（VH）；または配列番号25のVLおよび配列番号27のVH；または配列番号29のVLおよび配列番号31のVH；または配列番号33のVLおよび配列番号35のVH；または配列番号37のVLおよび配列番号39のVH；または

50

341のVLおよび配列番号343のVH；または配列番号345のVLおよび配列番号347のVH；または配列番号349のVLおよび配列番号351のVH；または配列番号353のVLおよび配列番号355のVH；または配列番号357のVLおよび配列番号359のVH；または配列番号361のVLおよび配列番号363のVH；または配列番号365のVLおよび配列番号367のVH；または配列番号369のVLおよび配列番号371のVH；または配列番号373のVLおよび配列番号375のVH；または配列番号377のVLおよび配列番号379のVH；または配列番号381のVLおよび配列番号383のVH；または配列番号385のVLおよび配列番号387のVH；または配列番号389のVLおよび配列番号391のVH；または配列番号393のVLおよび配列番号395のVH；または配列番号397のVLおよび配列番号399のVH；または配列番号401のVLおよび配列番号403のVH；または配列番号405のVLおよび配列番号407のVH。一態様において、本発明は、本発明の抗DLL3抗体またはその免疫反応性断片をコードする核酸を含む。他の実施形態において、本発明は、上記核酸の1つ以上を含むベクターおよび/または前記ベクターを含む宿主細胞を含む。

10

20

30

40

50

【0008】

本発明のいくつかの態様において、抗体は、キメラ抗体、CDRグラフト抗体、ヒト化抗体もしくはヒト抗体またはそれらの免疫反応性断片を含む。本発明の他の態様において、好ましくは前述の配列の全てまたは一部を含む、抗体は、内在化抗体である。さらに他の実施形態において、抗体は、部位特異的抗体を含む。他の選択された実施形態において、本発明は、前述の抗体のいずれかを組み込んだ抗体薬物コンジュゲートを含む。

【0009】

特定の実施形態において、本発明は、式： $Ab - [L - D]_n$ （式中、Abは、抗DLL3抗体を含み、Lは、任意選択のリンカーを含み、Dは、薬物を含み、nは、1から20の整数である）の抗体薬物コンジュゲートまたはそれらの医薬として許容される塩を含む。一態様において、本発明のADCは、上記の抗DLL3抗体のような抗DLL3抗体またはこの免疫反応性断片を含む。他の実施形態において、本発明のADCは、カリケアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、オーリスタチン、デュオカルマイシン、メイタンシノイドまたは本明細書に記載の適合治療成分のいずれか1つから選択される細胞毒性化合物を含む。特定の実施形態において、本発明は、上記のADCを含む医薬組成物を含む。

【0010】

さらに他の選択された実施形態において、本発明のADCは、治療指数の増加をもたらす、投与レジメンの最適化を可能にする改善された薬物動態特性および薬力学的特性を有する。この点に関して、本開示のADCは、本明細書で示すように測定する場合、6日を超える終末相半減期、7日より長い終末相半減期または8日より長い終末相半減期を有する。本発明のさらに他の態様は、9日より長い終末相半減期、10日より長い終末相半減期、11日より長い終末相半減期、12日より長い終末相半減期（それぞれヒト対象において測定された場合）を有するADCを含む。さらに他の実施形態において、本開示のADCは、ヒト対象において13日より長い終末相半減期、約14日より長い終末相半減期、15日より長い終末相半減期、約16日より長い終末相半減期、約17日より長い終末相半減期、18日より長い終末相半減期、約19日より長い終末相半減期、約20日より長い終末相半減期または3週間より長い終末相半減期を有する。さらに他の実施形態において、本発明のADCは、約6日の終末相半減期、約7日の終末相半減期、約8日の終末相半減期、約9日の終末相半減期、約10日の終末相半減期、約11日の終末相半減期、約12日の終末相半減期、約13日の終末相半減期、約14日の終末相半減期、約15日の終末相半減期、約16日の終末相半減期、約17日の終末相半減期、約18日の終末相半減期、約19日の終末相半減期、約20日の終末相半減期または約3週間の終末相半減期を示す。当業者は、このような長い半減期が、本開示のADCのより低い頻度の投与を可能にし、これにより、同様のまたは低い毒性を示しながら所望の有効性をもたらすことを十分理解する。

【0011】

この目的を達成するために、本発明の他の態様は、本明細書に記載されたような医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、がんの治療方法を対象とする。選択された実施形態において、該方法は、約6日より長い終末相半減期、約7日より長い終末相半減期、約8日より長い終末相半減期、約9日より長い終末相半減期、約10日より長い終末相半減期、約11日より長い終末相半減期、約12日より長い終末相半減期、約13日より長い終末相半減期、約14日より長い終末相半減期、約15日より長い終末相半減期、約16日より長い終末相半減期、約17日より長い終末相半減期、約18日より長い終末相半減期、約19日より長い終末相半減期、約20日より長い終末相半減期または約3週間より長い終末相半減期を有するADCを投与することを含む。

【0012】

他の特定の実施形態において、がんは、固形腫瘍、例えば、限定されないが、副腎、肝臓、腎臓、膀胱、乳房、胃、卵巣、子宮頸部、子宮、食道、結腸直腸、前立腺、膵臓、肺（小細胞および非小細胞の両方を含む）、甲状腺、癌腫、肉腫、神経膠芽腫および様々な頭頸部の腫瘍を含む。他の選択された態様において、がんは、肺がん（小細胞がんまたは大細胞神経内分泌癌）、前立腺がん、結腸直腸がんおよびメラノーマのような皮膚がん（例えば、野生型または変異型BRAFを発現する皮膚がん）を含む群から選択される。いくつかの実施形態において、上述のがんを治療する方法は、本開示の医薬組成物に加えて少なくとも1つの追加の治療成分を対象に投与することを含む。好ましい態様において、追加の治療成分は、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体を含む。

【0013】

上述の方法に関して、特定の実施形態において、本発明は、がんの治療に用いる抗DLL3抗体薬物コンジュゲートを提供するものであって、治療は、抗DLL3抗体薬物コンジュゲート（DLL3 ADC）の有効量を1週間毎（QW）に少なくとも1回、2週間毎（Q2W）に少なくとも1回、3週間毎（Q3W）に少なくとも1回、4週間毎（Q4W）に少なくとも1回、5週間毎（Q5W）に少なくとも1回、6週間毎（Q6W）に少なくとも1回、7週間毎（Q7W）に少なくとも1回、8週間毎（Q8W）に少なくとも1回、9週間毎（Q9W）に少なくとも1回、10週間毎（Q10W）に少なくとも1回、11週間毎（Q11W）に少なくとも1回または12週間毎（Q12W）に少なくとも1回投与することを含み得る。選択された実施形態において、DLL3 ADCは3週間毎（Q3W）に少なくとも1回、4週間毎（Q4W）に少なくとも1回、5週間毎（Q5W）に少なくとも1回または6週間毎（Q6W）に少なくとも1回投与される。他の選択された実施形態において、DLL3 ADCは約0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.25mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kgまたは1.0mg/kgの用量で投与される。選択された実施形態は、DLL3 ADCの単回投与により患者を治療することを含む。特定の他の実施形態は、規定の間隔（すなわち、Q2W、Q3W、Q4W、Q5W、Q6Wなど）で2サイクル（x2）、3サイクル（x3）、4サイクル（x4）、5サイクル（x5）、6サイクル（x6）、7サイクル（x7）、8サイクル（x8）、9サイクル（x9）または10サイクル（x10）患者を治療することを含む。他の実施形態において、初期DLL3 ADC治療（xサイクル数の治療）を完了させることができ、がんが進行の徴候を示すまでさらなるDLL3 ADC治療は、行われない（進行時治療）。さらに他の実施形態において、初期DLL3 ADC治療（xサイクル数の治療）を完了させることができ、次いで患者を維持療法（例えば、無期限に0.1mg/kg DLL3 ADC Q6W）のもとにおく。このような維持の状況において、DLL3 ADCは、蠕動ポンプを介して持続または定期（例えば、1時間毎）注入として比較的低いレベルで投与することができる。さらに他の実施形態において、患者は、初期DLL3 ADC治療（xサイクル数の治療）を受け、進行するまで同じがんまたは関連するがんについての（本開示のADCによるまたは他剤による）治療をされない（すなわち、進行時治療）。このような場合、第2の治療サ

10

20

30

40

50

イクル（例えば、DLL3 ADCによる）は、最初の治療サイクルの終了の4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15もしくは16週後またはそれ以上の週数の後まで実施されない。

【0014】

一実施形態において、本発明は、腫瘍細胞集団中の腫瘍開始細胞を減少させる方法であって、腫瘍開始細胞集団を本明細書に記載のADCと（例えば、インビトロまたはインビボで）接触させることを含み、それによって腫瘍開始細胞の出現頻度を減少させる、方法を含む。

【0015】

一態様において、本発明は、細胞毒を細胞に送達する方法であって、細胞を上記ADCのいずれかと接触させることを含み、方法を含む。

10

【0016】

他の態様において、本発明は、対象におけるがん（例えば、肺がん、前立腺がんまたはメラノーマ）を検出、診断またはモニタリングする方法であって、腫瘍細胞をDLL3検出剤と（例えば、インビトロまたはインビボで）接触させることおよび腫瘍細胞と会合したDLL3検出剤を検出することを含む、方法を含む。選択された実施形態において、検出剤は、抗DLL3抗体またはDLL3遺伝子型決定因子と関連する核酸プローブを含む。関連実施形態において、診断方法は、免疫組織化学（IHC）またはインサイチュハイブリダイゼーション（ISH）を含む。

【0017】

この目的を達成するために、本発明の特定の態様が、免疫組織化学のためのDLL3抗体の使用を含むことが理解される。より詳細には、DLL3 IHCは、様々な増殖性障害の診断の助けとなり、DLL3抗体療法を含む治療に対する潜在的な反応をモニタリングするための診断ツールとして用いることができる。これに関して、また下記の実施例で示すように、免疫組織化学手法は、当該技術分野で公知のようにHスコアを得るために用いることができる。このようなHスコア（すなわち、300ポイントスケール上の90およびそれ以上）は、どの患者が本発明の組成物による治療に適し得るかを示すために用いることができ、さらに治療の決定に対する道筋を立て、投与レジメンおよびタイミングを決定するために使用され得る。他の実施形態において、腫瘍における陽性染色DLL3細胞のパーセンテージは、どの患者が本開示のDLL3 ADCによる治療に対して感受性

20

30

【0018】

同様に、本発明は、がんのようなDLL3関連障害の診断、モニタリングまたは治療に有用であるキットまたは装置および関連する方法も提供する。この目的を達成するために、本発明は、好ましくは、DLL3 ADCを含むレセプタクルおよびDLL3関連障害を治療、モニタリング、または診断するのに前記DLL3 ADCを使用するための取扱説明資料を含む、DLL3関連障害を検出、診断または治療するのに有用な製品を提供する。選択された実施形態において、装置および関連する方法は、少なくとも1つの循環する腫瘍細胞を接触させることを含む。他の実施形態において、本開示のキットは、キットまたは装置がDLL3に関連するがんの診断、モニタリングまたは治療のために用いられることを示す取扱説明書、ラベル、添付文書、読本などを含む。

40

【0019】

上記は概要であり、したがって、必要により、単純化、一般化および詳細の省略を含む。結果として、当業者は、概要が例示にすぎず、決して限定を意図していないことを理解する。本明細書に記載の方法、組成物および/または装置および/または他の主題の他の態様、特徴および利点は、本明細書に記載の教示から明らかになる。概要は、以下で詳細な説明においてさらに説明される単純化された形態の概念の選択を紹介するために提供される。

【図面の簡単な説明】

【0020】

50

【図1 A - 1】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の軽鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 1 - 4 0 5；奇数）を示す図である。

【図1 A - 2】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の軽鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 1 - 4 0 5；奇数）を示す図である。

【図1 A - 3】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の軽鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 1 - 4 0 5；奇数）を示す図である。

10

【図1 A - 4】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の軽鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 1 - 4 0 5；奇数）を示す図である。

【図1 A - 5】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の軽鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 1 - 4 0 5；奇数）を示す図である。

20

【図1 A - 6】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の軽鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 1 - 4 0 5；奇数）を示す図である。

【図1 B - 1】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の重鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 3 - 4 0 7；奇数）を示す図である。

【図1 B - 2】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の重鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 3 - 4 0 7；奇数）を示す図である。

30

【図1 B - 3】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の重鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 3 - 4 0 7；奇数）を示す図である。

【図1 B - 4】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の重鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 3 - 4 0 7；奇数）を示す図である。

40

【図1 B - 5】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の重鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 3 - 4 0 7；奇数）を示す図である。

【図1 B - 6】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された、本開示の D L L 3 A D C と適合する多数の例示的マウスおよびヒト化 D L L 3 抗体の重鎖可変領域の表形式の連続したアミノ酸配列（配列番号：2 3 - 4 0 7；奇数）を示す図である。

【図2】本明細書における実施例に記載されるように単離され、クローニングされ、遺伝子操作された例示的 D L L 3 抗体のドメインレベルマッピング解析の結果を略図の形式で

50

示す図である。

【図 3 A】D L L 3 発現が標準的治療による療法の臨床転帰と相関しないことを示す免疫組織化学データを示すグラフである。

【図 3 B】D L L 3 発現がナイーブおよび化学療法抵抗性 S C L C 患者の両方において上昇していることを示す免疫組織化学データを示すグラフである。

【図 4 A】試験設計および結果を要約する、第 I 相試験に関するデータを示す図である。

【図 4 B】D L L 3 A D C の臨床薬物動態を示す、第 I 相試験に関するデータを示すグラフである。

【図 4 C】D L L 3 A D C によってもたらされた反応の持続時間を示す、第 I 相試験に関するデータを示す図である。

【図 4 D】全ての治療患者の反応を示す、第 I 相試験に関するデータを示す図である。

【図 4 E】D L L 3 + 陽性患者の反応を示す、第 I 相試験に関するデータを示す図である。

【図 4 F】報告された有害事象の表形式の要約を示す、第 I 相試験に関するデータを示す図である。

【図 5 A】本開示の D L L 3 A D C の凍結乾燥実施形態が 5 で安定であることを示す表形式のデータを示す。

【図 5 B】本開示の D L L 3 A D C の凍結乾燥実施形態が 2 5 で安定であることを示す表形式のデータを示す。

【図 5 C】本開示の D L L 3 A D C の凍結乾燥実施形態が 4 0 で安定であることを示す表形式のデータを示す。

【図 6 A】併用して投与した場合、D L L 3 A D C および抗 P D - 1 抗体が免疫能の正常なマウスにおける腫瘍成長を抑制するように作用することを示すグラフである。

【図 6 B】併用して投与した場合、D L L 3 A D C および抗 P D - 1 抗体が免疫能の正常なマウスにおける腫瘍成長を抑制するように作用することを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、多くの様々な形態で実施され得る。本明細書には、本発明の原理を例示する本発明の非限定的な説明的実施形態が開示されている。本明細書で使用されるいずれの項目の見出しも、まとめることを目的とするだけのものであり、記載されている主題を限定するものと解釈されるべきでない。本開示の目的に関して、全ての特定されている配列受託番号は、別途記載がない限り、N C B I 参照配列 (R e f S e q) データベースおよび/または N C B I G e n B a n k (登録商標) アーカイブ配列データベースで見出され得る。

【0022】

D L L 3 発現は、驚くべきことに、いくつかの腫瘍型と相関することが見出され、このような腫瘍の治療に、決定因子として利用され得る。さらに、D L L 3 発現が腫瘍形成性細胞に関連していること、したがってこのような細胞の阻害または除去に効果的に利用し得ることが、予想外に見出された。腫瘍形成性細胞は、下記にさらに詳細に記載されるが、従来の多くの治療に耐性を示すことが知られている。先行技術の教唆とは対照的に、本開示の化合物および方法は、この固有の耐性を効果的に克服する。

【0023】

本発明は、抗 D L L 3 抗体 (抗体薬物コンジュゲートを含む) を提供し、ならびに、特定の作用機構または特異的に標的化された細胞もしくは分子成分にかかわらず、様々な D L L 3 関連がんの予後診断、診断、診断治療、治療および/または予防における、抗 D L L 3 抗体の使用を提供する。驚くべきことに、本開示の特定の D L L 3 A D C が、予想外に強固な治療指数をもたらす新規の投与レジメンを可能にする、インビボでの比較的長い半減期を有することが見出された。さらに、特定のレベルの D L L 3 を発現する腫瘍に罹患している患者は、本明細書に添付の臨床試験データにより明らかのように、本抗体および A D C による治療に対し、特に感受性が高い。さらに他の実施形態は、腫瘍成長を抑

10

20

30

40

50

制するのに驚くほど有効であると思われるPD-1に対する抗体を含む、特定の免疫療法化合物と組み合わせた本開示のDLL3 ADCの使用を含む。さらに他の実施形態において、本開示のADCは、凍結乾燥形態において並はずれた安定性を示すことが見出された。このような利点は、一般的に、本開示の組成物のより有効な投与を可能にし、最終的に、標準的治療による療法によってもたらされるよりも良好な患者転帰をもたらすことが理解される。

【0024】

I. DLL3生理学

DLL3の表現型決定因子が、神経内分泌特性を示す新形成を含む様々な増殖性障害と臨床的に関連すること、ならびにDLL3タンパク質およびその変異体またはアイソフォームが関連する疾患の治療に利用することができる有用な腫瘍マーカーを提供することが見出された。これに関して、本発明は、抗DLL3抗体標的化剤およびペイロード（例えば、PBDワーヘッド（warhead）を含むペイロード）を含む多数の抗体薬物コンジュゲートを、提供する。下記でより詳細に議論されるようにおよび添付の実施例において示されるように、本開示の抗DLL3 ADCは、腫瘍形成性細胞を除去するのにとりわけ有効であり、したがって、特定の増殖性障害またはその進行もしくは再発の治療および予防に有用である。さらに、特定の本開示のADC組成物（例えば、部位特異的構築物）は、同じ成分を含む従来のADC組成物と比較した場合に改善された治療指数をもたらす得る比較的高いDAR = 2パーセンテージおよび予期しない安定性を示し得る。さらに、本開示のADCは、治療指数をさらに増加させ得る新規投与レジメンの使用を可能にする長い終末相半減期を示し得る。

10

20

【0025】

さらに、細胞表面DLL3タンパク質のようなDLL3マーカーまたは決定因子が、がん幹細胞（腫瘍永続細胞としても公知）と治療上関連していること、およびがん幹細胞を除去するかまたは無症状にするために効果的に利用することができることを見出された。本明細書で開示するような、使用によってがん幹細胞を選択的に減少させるまたは除去する抗DLL3コンジュゲートの能力は、このような細胞が一般的に多くの従来の治療に抵抗性であることが公知であることから、驚くべきことである。すなわち、伝統的治療方法および近年の標的治療方法の有効性は、これらの多様な治療方法を受けても腫瘍成長を永続させることができる抵抗性がん幹細胞の存在および/または発生によって、しばしば制限される。さらに、がん幹細胞と会合している決定因子は、低い発現もしくは一貫性のない発現ゆえにしばしば不十分な治療標的であり、腫瘍形成性細胞と会合した状態に留まることができないかまたは細胞表面上に存在することができない。従来技術の教示と極めて対照的に、本明細書に本開示のADCおよび方法は、この固有の抵抗性を効果的に克服し、このようながん幹細胞を特異的に除去させ、減少させ、消失させまたはその分化促進し、これにより、潜在する腫瘍成長を持続させるまたは再誘発するそれらの能力を無効にする。さらに、本明細書で示したように、本開示のADCによってもたらされた予期しない安定性および比較的均質なDAR調製物は、とりわけ効果的であり得る新規な投与レジメンを可能にする。

30

【0026】

したがって、本明細書で開示するようなDLL3コンジュゲートは、選択された増殖性（例えば、新生物）障害またはその進行もしくは再発の治療および/または予防に有利に用いることができる。本発明の好ましい実施形態は、とりわけ特定のドメイン、領域もしくはエピトープに関して、または神経内分泌特性を含むがん幹細胞もしくは腫瘍および本開示の抗体薬物コンジュゲートとのそれらの相互作用に関連して、下記に詳細に議論するが、本発明の範囲がこのような例示の実施形態によって限定されないことを、当業者は理解する。むしろ、本発明の最も広範囲の実施形態および添付の特許請求の範囲は、特定の作用機序または特に標的とされる腫瘍、細胞もしくは分子成分にかかわらず、本開示の抗DLL3コンジュゲートならびに新生物障害または細胞増殖性障害を含む様々なDLL3関連または媒介障害の治療および/または予防におけるそれらの使用を、広くおよび明示

40

50

的に対象とする。

【0027】

ドロソフィラ (*Drosophila*) において、Notchシグナル伝達は、1つのNotch受容体遺伝子、ならびにSerrateおよびDeltaとして公知の2つのリガンド遺伝子により、主として媒介される(Whartonら、1985年; Rebayら、1991年)。ヒトにおいて、4つの公知のNotch受容体ならびに5つのDSL(Delta-SerrateLAG2)リガンド(Jagged1およびJagged2として公知の、Serrateの2つのホモログ、ならびにデルタ様リガンドまたはDLL1、DLL3およびDLL4と称される、Deltaの3つのホモログ)が存在する。一般に、シグナル受信細胞の表面上のNotch受容体は、対向するシグナル送信細胞の表面上に発現するリガンドとの相互作用(トランス相互作用と称される)により活性化される。これらのトランス相互作用は、Notch受容体のプロテアーゼ媒介性分解の結果をもたらす。その結果、Notch受容体細胞内ドメインは、膜から核に自由に位置を移動し、転写因子のCSLファミリー(ヒトにおけるRBPJ)とパートナーになり、これらを転写リプレッサーからNotch応答性遺伝子のアクチベーターに転換する。

10

【0028】

ヒトNotchリガンドのうち、DLL3は、トランス相互作用によりNotch受容体を活性化することが不可能であると思われる点が、他とは異なっている(Ladiraら、2005年)。シス(同じ細胞上での)阻害の正確な機構は、依然として不明であり、リガンドによって異なり得る(例えば、Kleinら、1997年; Ladiraら、2005年; Glittenbergら、2006年参照)が、Notchリガンドは、シスでもNotch受容体と相互作用し得る。2つの想定された阻害機構は、トランス相互作用を妨げることにより、または受容体のプロセッシングを擾乱することもしくは小胞体もしくはゴルジ体における受容体の保持を物理的にもたすことを介して細胞の表面上のNotch受容体の量を減少させること(Sakamotoら、2002年; Dunwoodie、2009年)により、細胞表面におけるNotchシグナル伝達を調節することを含む。しかし、隣接細胞上のNotch受容体およびリガンドの発現の確率論的差は、転写過程および非転写過程の両方によって増幅され得るものであり、シスおよびトランス相互作用の微妙なバランスが、隣接組織における互いに異なる細胞運命のNotch媒介による線引きを微調整し得ることは、明らかである(Sprinzakら、2010年)。

20

30

【0029】

DLL3は、Notch DSLリガンドのDelta様ファミリーのメンバーである。代表的なDLL3タンパク質オルソログは、ヒト(受託番号NP__058637およびNP__982353)、チンパンジー(受託番号XP__003316395)、マウス(受託番号NP__031892)およびラット(受託番号NP__446118)を含むが、これらに限定されない。ヒトにおいて、DLL3遺伝子は、染色体19q13上に位置する9.5kbpに及ぶ8つのエクソンからなる。最後のエクソン内の選択的スプライシングにより、2つのプロセッシングされた転写物が生じる。これは、一方が2389塩基(受託番号NM__016941)であり、他方が2052塩基(受託番号NM__203486)である。前者の転写物は、618アミノ酸タンパク質(受託番号NP__058637; 配列番号1)をコードするのに対して、後者は、587アミノ酸タンパク質(受託番号NP__982353; 配列番号2)をコードする。DLL3のこれらの2つのタンパク質アイソフォームは、それらの細胞外ドメインおよびそれらの膜貫通ドメインにわたって全体的な100%の同一性を共有し、長い方のアイソフォームが、タンパク質のカルボキシ末端において32個のさらなる残基を含む延長した細胞質尾部を有する点のみにおいて、異なっている。両アイソフォームを腫瘍細胞において検出することができるが、アイソフォームの生物学的関連性は不明である。

40

【0030】

DLL3タンパク質の細胞外領域は、6つのEGF様ドメイン、単一のDSLドメインおよびN末端ドメインを含む。一般的に、EGFドメインは、アミノ酸残基216-24

50

9 (ドメイン1)、274 - 310 (ドメイン2)、312 - 351 (ドメイン3)、353 - 389 (ドメイン4)、391 - 427 (ドメイン5) および 429 - 465 (ドメイン6) あたりに、DSLドメインは、アミノ酸残基176 - 215あたりに、N末端ドメインは、hDLL3 (配列番号1および2) のアミノ酸残基27 - 175あたりに存在すると認識される。本明細書でより詳細に議論されるようにおよび下記実施例において示されるように、EGF様ドメイン、DSLドメインおよびN末端ドメインのそれぞれは、異なるアミノ酸配列により定義されるDLL3タンパク質の一部を含む。本開示の目的のために、それぞれのEGF様ドメインは、EGF1からEGF6と称することができ、EGF1がタンパク質のN末端部に最も近いことに留意されたい。タンパク質の構造組成に関して、本発明の1つの重要な態様は、本開示のDLL3モジュレーターを、選択されたドメイン、モチーフまたはエピトープと反応するように、生成するか、作製するか、遺伝子操作するかまたは選択することができることである。特定の場合において、このような抗体またはADCは、主要な作用機序によって反応性および/または有効性の増強をもたらす得る。とりわけ好ましい実施形態において、抗DLL3 ADCは、DSLドメインに結合し、より好ましい実施形態において、DSLドメイン内のG203、R205、P206を含むエピトープ (配列番号4) に結合する。

10

【0031】

II. がん幹細胞

現在のモデルによれば、腫瘍は、非腫瘍形成性細胞および腫瘍形成性細胞を含む。非腫瘍形成性細胞は、自己再生能力を有さず、免疫無防備状態マウスに過剰な細胞数で移植された場合でも腫瘍を再現的に形成することができない。腫瘍形成性細胞は、本明細書で「腫瘍開始細胞」 (tumor initiating cell、TIC) とも称され、腫瘍の細胞集団の0.1 ~ 40% (より典型的には0.1 ~ 10% または0.01 ~ 1.0%) を構成し、腫瘍を形成する能力を有する。腫瘍形成性細胞は、がん幹細胞 (CSC) と交換可能に参照される腫瘍永続化細胞 (tumor perpetuating cell、TPC) と、腫瘍始原細胞 (tumor progenitor cell、TProg) との両方を包含している。

20

【0032】

正常組織の細胞ヒエラルキーを支持する正常幹細胞と同様に、CSCは、多系列分化の能力を維持しながら、無限に自己複製することができる。これに関して、CSCは、腫瘍形成性子孫細胞と非腫瘍形成性子孫細胞の両方を生成することができ、連続的な単離および免疫無防備状態マウスへの少数の単離CSCの移植によって実証されるように、親腫瘍の異種性細胞組成物を完全に再現することができる。これらの「種細胞」が除去されない限り、腫瘍が転位しまたは再発して、疾患の再発および最終的な進行をもたらす可能性がずっと高いことが、証拠により示されている。

30

【0033】

TProgは、CSCと同様に、一次移植片において腫瘍成長を促進する能力を有する。しかしながら、CSCと異なり、TProgは、親腫瘍の細胞異種性を再現することができず、後続の移植片において腫瘍形成性を再開するには効率性が低い。なぜなら、TProgは、免疫無防備状態マウスへの少数の高精製TProgの連続移植により実証されるように、一般に、限定された数の細胞分裂しかできないからである。TProgはさらに、初期TProgと後期TProgとに分けることができ、これらは、表現型 (例えば、細胞表面マーカー) および腫瘍細胞構造を再現する能力の差異によって区別され得る。いずれもCSCと同程度に腫瘍を再現することはできないが、初期TProgの方が、後期TProgよりも、親腫瘍の特徴を再現する能力が高い。前述の区別にかかわらず、一部のTProg集団は稀に、CSCに通常属する性質である自己再生能力を獲得し、それ自体がCSCになることができる。

40

【0034】

CSCは、(i) TPreg (初期および後期TPregの両方) ならびに(ii) 腫瘍浸潤性細胞などの非腫瘍形成性細胞 (例えば、CSCから誘導されかつ通常はバルクの

50

腫瘍を含む、線維芽細胞/間質、内皮および造血性細胞)よりも高い腫瘍形成性を示し、比較的より静止状態に近い。従来の治療およびレジメンが、大部分は、腫瘍を減量させ、急速に増殖する細胞を攻撃するように設計されていることを考慮すると、CSCは、より急速に増殖するTPr o gおよび他のパルクな腫瘍細胞集団、例えば非腫瘍形成性細胞よりも、従来の治療およびレジメンに対して耐性が強い。CSCを従来の治療に対して相対的に化学療法耐性にし得る他の特徴は、多剤耐性トランスポーターの発現増加、DNA修復メカニズムおよび抗アポトーシス遺伝子発現の向上である。このようなCSCの特性は、進行した病期の新生物を有する患者に持続的な応答をもたらすための標準治療レジメンの失敗を示唆している。なぜなら、標準的化学療法では、継続的な腫瘍成長および再発を実際に促進しているCSCが、有効に標的とされていないためである。本開示の化合物および組成物は、これらの種細胞が腫瘍の成長および拡散を伝播する能力を抑制または除去する。

10

【0035】

驚くべきことに、DLL3発現が、本明細書に記載される治療に対して様々な腫瘍形成性細胞小集団を感受性にする形でこれらの細胞小集団と関連していることがわかった。本発明は、特に腫瘍形成性細胞を標的化するために有用であり、腫瘍形成性細胞を、機能鎮静化させる、敏感にする、中和する、出現頻度を減少させる、ブロックする、抑止する、干渉する、減少させる、妨害する、抑制する、制御する、枯渇させる、和らげる、媒介する、縮小させる、再プログラムする、排除する、殺傷するまたは他の方法で阻害する(集約して、「阻害する」)ために使用することができ、したがって増殖性障害(例えば、がん)の治療、管理および/または予防を容易にする抗DLL3抗体を提供する。好都合には、本発明の新規の抗DLL3抗体は、対象に投与した際に、DLL3の決定因子の型(例えば、表現型または遺伝子型)にかかわらず、腫瘍形成性細胞の出現頻度または腫瘍形成性を好ましくは減少させるように選択し得る。腫瘍形成性細胞の出現頻度の減少は、(i)腫瘍形成性細胞の阻害もしくは根絶、(ii)腫瘍形成性細胞の成長、拡大もしくは再発の制御、(iii)腫瘍形成性細胞の開始、伝播、維持または増殖の中断または(iv)これら以外の腫瘍形成性細胞の生存、再生および/もしくは転移を妨げることの、結果として生じ得る。いくつかの実施形態において、腫瘍形成性細胞の阻害は、1つ以上の生理学的経路の変化の結果として生じ得る。経路の変化は、腫瘍形成性細胞の阻害、腫瘍形成性細胞の能力の改変(例えば、分化もしくはニッチ破壊の誘導による)または腫瘍形成性細胞が腫瘍環境もしくは他の細胞に影響する能力に対する他の方法での干渉のいずれによるものであっても、腫瘍形成性、腫瘍の維持および/または転移ならびに再発の阻害により、より有効にDLL3関連障害を治療することを可能にする。本開示の抗体の同特徴は、標準治療レジメンに耐性または不応性であることが立証された再発性腫瘍の治療で、抗体を特に有効にすることがさらに認識される。

20

30

【0036】

腫瘍形成性細胞の出現頻度の減少を評価するために使用され得る方法としては、限定されないが、細胞数測定分析または免疫組織化学的分析、好ましくはインビトロまたはインビボ限界希釈分析(Dyllaら、2008、PMID:PMC2413402およびHoeyら、2009、PMID:19664991)が挙げられる。

40

【0037】

インビトロ限界希釈分析は、断片化または非断片化腫瘍細胞(例えば、それぞれ治療腫瘍由来または未治療腫瘍由来)を固体培地で培養してコロニーを形成させ、成長したコロニーを計数し、性質決定することにより行ってもよい。または腫瘍細胞を、液体培地を含有するウェルを有するプレート上に段階希釈し、各ウェルを、接種後、好ましくは接種から10日より後の任意の時点において、コロニー形成について陽性であるか陰性であるかでスコア化してもよい。

【0038】

インビボ限界希釈分析は、未治療対照または選択した治療剤に曝露した腫瘍のいずれかに由来する腫瘍細胞を、免疫無防備状態マウスに段階希釈で移植し、この後、各マウスの

50

腫瘍形成について陽性であるか陰性であるかをスコア化することによって実施される。スコア化は、移植した腫瘍が検出可能となった後の任意の時点で行ってよいが、好ましくは移植から60日以上経過した後で行う。腫瘍形成性細胞の出現頻度を決定するための限界希釈実験の結果の解析は、好ましくは、ポアソン分布統計を使用してまたは予め定義された確定事象（腫瘍がインピボで生成されるか否かの能力など）の出現頻度を評価することにより（Fazekasら、1982、PMID：7040548）、行われる。

【0039】

フローサイトメトリおよび免疫組織化学も、腫瘍形成性細胞の出現頻度を決定するために使用され得る。両方の技術が、当該技術分野で認識されている細胞表面タンパク質またはマーカーに結合する1つ以上の抗体または試薬を利用し、これらは、腫瘍形成性細胞を富化することが知られている（WO2012/031280参照）。当該技術分野で公知であるように、フローサイトメトリ（例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS））は、腫瘍形成性細胞を含む様々な細胞集団を性質決定、単離、精製、富化または分類するためにも使用され得る。フローサイトメトリは、細胞の混合集団が懸濁されている流体の流れを、最大毎秒で何千もの粒子の物理的および/または化学的特徴を測定できる電子的検出装置を通して通過させることによって、腫瘍形成性細胞のレベルを測定する。免疫組織化学は、腫瘍形成性細胞マーカーに結合する標識化抗体または試薬で組織試料を染色することにより、インサイチュ（例えば、組織切片内）で腫瘍形成性細胞の視覚化を可能にするという点で、さらなる情報を提供する。

10

【0040】

したがって、本発明の抗体は、例えば、フローサイトメトリ、磁気活性化細胞選別（MACS）、レーザー媒介の薄片化またはFACSなどの方法による、腫瘍形成性細胞の同定、性質決定、モニタリング、単離、薄片化または集団もしくは小集団の富化に有用であり得る。FACSは、特異的な細胞表面マーカーに基づいて99.5%を超える純度で細胞小集団を単離するために使用される信頼性のある方法である。CSCを含む腫瘍形成性細胞の性質決定および遺伝子操作のための他の適合技術は、例えば、U.S.P.N. 12/686,359、12/669,136および12/757,649において見ることができる。

20

【0041】

下記に列挙するのは、CSC集団に関連し、CSCを単離または性質決定するために使用されてきたマーカーである：ABCA1、ABCA3、ABCG2、ADAM9、ADCY9、ADORA2A、AFP、AXIN1、B7H3、BCL9、Bmi-1、BMP-4、C2orf52、C4.4A、カルボキシペプチダーゼM、CAV1、CAV2、CD105、CD133、CD14、CD16、CD166、CD16a、CD16b、CD2、CD20、CD24、CD29、CD3、CD31、CD324、CD325、CD34、CD38、CD44、CD45、CD46、CD49b、CD49f、CD56、CD64、CD74、CD9、CD90、CEACAM6、CELSR1、CPD、CRIM1、CX3CL1、CXCR4、DAF、デコリン、easyh1、easyh2、EDG3、eed、EGFR、ENPP1、EPCAM、EPHA1、EPHA2、FLJ10052、FLVCR、FZD1、FZD10、FZD2、FZD3、FZD4、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、GD2、GJA1、GLI1、GLI2、GPNMB、GPR54、GPRC5B、IL1R1、IL1RAP、JAM3、Lgr5、Lgr6、LRP3、LY6E、MCP、mf2、mlt3、MPZL1、MUC1、MUC16、MYC、N33、Nanog、NB84、ネスチン、NID2、NMA、NPC1、オンコスタチンM、OCT4、OPN3、PCDH7、PCDHA10、PCDHB2、PPAP2C、PTPN3、PATIENTS、RARRES1、SEMA4B、SLC19A2、SLC1A1、SLC39A1、SLC4A11、SLC6A14、SLC7A8、smarcd3、smarcd3、smarcd3、smarcd3、smarcd3、smarcd3、Sox1、STAT3、STEAP、TCF4、TEM8、TGFB3、TMEPAI、TMPRSS4、トランスフェリン受容体、TrkA、WNT10B、WNT1

30

40

50

6、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT5A、YY1およびβ-カテニン。例えば、Schulenburgら、2010、PMID:20185329、U.S.P.N.7,632,678ならびにU.S.P.N.2007/0292414、2008/0175870、2010/0275280、2010/0162416および2011/0020221参照。

【0042】

同様に、特定の腫瘍型のCSCに関連する細胞表面表現型の非限定的な例としては、CD44^{hi}CD24^{low}、ALDH⁺、CD133⁺、CD123⁺、CD34⁺CD38⁻、CD44⁺CD24⁻、CD46^{hi}CD324⁺CD66c⁻、CD133⁺CD34⁺CD10⁻CD19⁻、CD138⁻CD34⁻CD19⁺、CD133⁺RC2⁺、CD44⁺CD24⁺CD133⁺、CD44⁺CD24⁺ESA⁺、CD271⁺、ABC B5⁺ならびに当該技術分野で公知の他のCSC表面表現型が挙げられる。例えば、Schulenburgら、2010、前掲、Visvaderら、2008、PMID:18784658およびU.S.P.N.2008/0138313参照。本発明に関して特に関心がもたれるのは、CD46^{hi}CD324⁺表現型を含むCSC調製物である。

10

【0043】

「正」、「低」および「負」の発現レベルがマーカーまたはマーカー表現型に適用されるとき、以下のように定義される。負（つまり、「-」）の発現を有する細胞は、本明細書において、蛍光チャネル中のアイソタイプ対照抗体を、別の蛍光チャネルの目的の他のタンパク質を標識する完全抗体染色カクテルの存在下で観察した発現の95パーセント以下で発現する細胞として定義される。当業者は、この負の事象を定義するための手法が、「1を引いた蛍光(fluorescence minus one)」または「FMO」染色として参照されることを認識する。上記で述べたFMO染色手法を用いてアイソタイプ対照抗体で観察された発現の95パーセントを上回る発現を有する細胞は、「正」（つまり「+」）と定義される。本明細書で定義するとき、様々な細胞集団が広範に「正」と定義される。抗原の平均発現観測値が、上記のようにアイソタイプ対照抗体でFMO染色を用いて決定された95パーセントを上回る場合、細胞は正として定義される。正の細胞が、平均発現観測値がFMO染色によって決定された95パーセントを上回るが、95パーセントの1標準偏差以内である場合、「低発現」（つまり、「low」）の細胞と称され得る。あるいは、正の細胞が、平均発現観測値がFMO染色によって決定された95パーセントを上回り、95パーセントを上回る1標準偏差より大きい場合、「高発現」（つまり、「hi」）の細胞と称され得る。他の実施形態において、99パーセントは、好ましくは、負と正のFMO染色の間の分界点として使用することができ、いくつかの実施形態において、パーセントは99%より大きくなり得る。

20

30

【0044】

CD46^{hi}CD324⁺マーカー表現型およびすぐ上に例示された表現型は、標準的フローサイトメトリ解析ならびに細胞選別技術と組み合わせて、さらなる解析のためにTICおよび/またはTPC細胞または細胞集団を、性質決定、単離、精製または富化するために使用され得る。

40

【0045】

したがって、腫瘍形成性細胞の出現頻度を減少させる本発明の抗体の能力は、上記に記載の技術およびマーカーを使用して決定され得る。いくつかの場合には、抗DLL3抗体は、腫瘍形成性細胞の出現頻度を10%、15%、20%、25%、30%またはさらには35%減少させ得る。他の実施形態において、腫瘍形成性細胞の出現頻度の減少は、40%、45%、50%、55%、60%または65%程度であり得る。ある特定の実施形態において、本開示の化合物は、腫瘍形成性細胞の出現頻度を70%、75%、80%、85%、90%またはさらには95%減少させ得る。腫瘍形成性細胞の出現頻度の何らかの減少は、腫瘍形成能、残留性、再発性および新生物の悪性度における減少をもたらし得

50

ることが理解される。

【0046】

III. 抗体

A. 抗体の構造

抗体ならびにそのバリエーションおよび誘導体は、承認されている命名法および番号付けシステムを含め、例えば、Abbasら(2010)、Cellular and Molecular Immunology(第6版)、W.B. Saunders Company; またはMurpheyら(2011)、Janeway's Immunobiology(第8版)、Garland Scienceに詳細に記載されている。

【0047】

10

「抗体」または「無傷(intact)な抗体」は、通常、ジスルフィド共有結合および非共有結合性相互作用により一緒に保持された2つの重鎖(H)ポリペプチド鎖と2つの軽鎖(L)ポリペプチド鎖とを含むY字型4量体タンパク質を指す。各軽鎖は、1つの可変ドメイン(VL)と1つの定常ドメイン(CL)とで構成される。各重鎖は、1つの可変ドメイン(VH)と、IgG抗体、IgA抗体およびIgD抗体の場合にはCH1、CH2およびCH3と称される3つのドメインを含む(IgMおよびIgEは第4のドメインCH4を含む)定常領域とを、含む。IgG、IgAおよびIgDクラスにおいて、CH1およびCH2ドメインは、可変長(様々なIgGサブクラスにおいて約10から約60のアミノ酸長)のプロリンおよびシステインリッチなセグメントであるフレキシブルなヒンジ領域によって分離されている。軽鎖および重鎖の両方の可変ドメインは、約12

20

【0048】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、マルチクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化および霊長類化抗体、CDRグラフト化抗体、ヒト抗体(組換え産生ヒト抗体を含む)、組換え産生抗体、細胞内抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体、一価抗体、多価抗体、抗イデオタイプ抗体、ならびにこれらのムテインおよびバリエーションを含む合成抗体、Fd、Fab、F(ab')₂、F(ab')断片および単鎖断片(例えば、ScFvおよびScFvFc)などの免疫特異的抗体断片を含み、そして決定因子との優先的会合または結合を示す限り、Fc融合および他の修飾を含むそれらの誘導体ならびにあらゆる他の免疫反応分子を、含む。さらに、文脈上の制約によって他に指示されない限り、用語はさらに全ての抗体のクラス(つまり、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM)ならびに全てのサブクラス(つまり、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)を含む。様々な抗体のクラスに対応する重鎖定常領域は、通常、対応するギリシャ語の小文字、 κ 、 λ 、および μ でそれぞれ示される。いずれかの脊椎動物種からの抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ(κ)およびラムダ(λ)と呼ばれる2つの明確に異なる種類の1つに割り当てることができる。

30

【0049】

40

抗体の可変ドメインは、抗体毎にアミノ酸組成にかなりの違いを示し、主に抗原認識および結合の役割を担っている。各軽鎖/重鎖対の可変領域は抗体結合部位を形成しており、したがって無傷なIgG抗体は2つの結合部位を有する(すなわち、これは2価である)。VHおよびVLドメインは、非常に可変性のある3つの領域を含み、これらの領域は超可変領域、またはより一般的には相補性決定領域(CDR)と称され、フレームワーク領域(FR)として知られる4つの可変性の少ない領域によって囲まれ分離されている。VH領域とVL領域との間の非共有結合性の会合は、抗体の2つの抗原結合部位の1つを含有するFv断片(「可変部断片」を表す)を形成している。ScFv断片(一本鎖可変部断片の場合)は、遺伝子操作によって得ることができ、単一のポリペプチド鎖中でペプチドリンカーによって分離された抗体のVHおよびVL領域と会合している。

50

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用される場合、アミノ酸の各ドメイン、フレームワーク領域およびCDRに対する割り付けは、他に記載がない限り、Kabatら(1991) *Sequence of Proteins of Immunological Interest* (第5版)、米国保健福祉省、PHS、NIH、NIH公開番号91-3242; Chothiaら、1987、PMID:3681981; Chothiaら、1989、PMID:2687698; MacCallumら、1996、PMID:8876650; またはDubel編(2007) *Handbook of Therapeutic Antibodies*、第3版、Wiley-VCH Verlag GmbH and Co またはAbM (Oxford Molecular/MSI Pharmacopia) によって提供されるスキームの1つに従い得る。当該技術分野で周知のように、可変領域残基の番号付けは、典型的にはChothiaまたはKabatに示されている通りである。Abyssisウェブサイトデータベース(下記)から取得されるKabat、Chothia、MacCallum(Contactとしても知られる)およびAbMによって定義される、CDRを含むアミノ酸残基を下の表1に示す。MacCallumは、Chothia番号付けシステムを用いていることに留意されたい。

10

【 0 0 5 1 】

【表1】

表1

	Kabat	Chothia	MacCallum	AbM
VH CDR1	31-35	26-32	30-35	26-35
VH CDR2	50-65	52-56	47-58	50-58
VH CDR3	95-102	95-102	93-101	95-102
VL CDR1	24-34	24-34	30-36	24-34
VL CDR2	50-56	50-56	46-55	50-56
VL CDR3	89-97	89-97	89-96	89-97

20

30

【 0 0 5 2 】

抗体配列における可変領域およびCDRは、当該技術分野で展開されている一般的法則(上記に示したものの、例えば、Kabat命名システム)に従って、または既知の可変領域のデータベースに対して配列を整列させることにより同定され得る。これらの領域を同定するための方法は、Kontermann and Dubel編、*Antibody Engineering*、Springer、New York、NY、2001およびDinarellora、*Current Protocols in Immunology*、John Wiley and Sons Inc.、Hoboken、NJ、2000に記載されている。抗体配列の例示的なデータベースは、www.bioinf.org.uk/absの「Abyssis」ウェブサイト(英国、ロンドン、ロンドン大学の生化学・分子生物学(Biochemistry & Molecular Biology)部門のA.C. Martinによって保持)およびwww.vbase2.orgのVBASE2ウェブサイト(Retterら、*Nucl. Acids Res.*、33(データベース号):D671-D674(2005)に記載されている)に記載されているか、またはこれらを通じてアクセスされ得る。好ましくは、配列は、Kabat、IMGTおよびタンパク質データベース(PDB)からの配列データを、PDBからの構造データと統合したAbyssisデータベースを使用して解析される。Dr. Andrew C.R. Martin's book chapter *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody V*

40

50

variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (編集: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg, ISBN-13: 978-3540413547、ウェブサイトの bioinform.org/absでも利用可能)参照。Abyssisデータベースウェブサイトは、本明細書の教示に従って使用され得る、CDRを同定するために展開された一般的な規則をさらに含む。他に示さない限り、本明細書に示す全てのCDRは、Kabatraに従ってAbyssisデータベースウェブサイトにより導き出されたものである。

【0053】

本発明で議論される重鎖定常領域アミノ酸位置について、番号付けは、Euインデックスに従う。このインデックスは、最初にEdelmanら、1969、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85において記載された。この文献は骨髄腫タンパク質Euのアミノ酸配列を記載しており、この配列は最初に配列決定されたヒトIgG1であると報告されている。EdelmanのEuインデックスは、Kabatra、1991(前掲)にも示されている。したがって、重鎖の文脈における用語「Kabataに記載のEuインデックス」または「KabataのEuインデックス」または「Euインデックス」または「Eu番号付け」は、Kabatra、1991(前掲)に示されたEdelmanらのヒトIgG1 Eu抗体に基づく残基番号付けシステムを指す。軽鎖定常領域アミノ酸配列で使用される番号付けシステムは、同様に、Kabatra(前掲)に示されている。本発明に適合する例示的なカップ軽鎖定常領域アミノ酸配列を直下に示す：

【0054】

【化1】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 :5)

【0055】

同様に、本発明に適合する例示的なIgG1重鎖定常領域アミノ酸配列を直下に示す：

【0056】

【化2】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (配列番号 :6)

【0057】

本開示の定常領域配列またはそれらの当該技術分野で公知の変形もしくは誘導体は、本開示の重鎖可変領域および軽鎖可変領域と、標準的な分子生物学技術を使用して作動可能に会合されて、本発明の抗DLL3 ADCでそのまま使用され得るかまたはそれに組み込まれ得る全長抗体を提供し得る。これに関して、また例示の目的のために、例示的抗体hSC16.56の全長重鎖アミノ酸配列(配列番号7)および軽鎖アミノ酸配列(配列番号8)を直下に示す。

【0058】

10

20

30

40

【化3】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYGMNWRQAPGGGLEWMGWINTYTGPEPTYAD
DFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARIGDSSPSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
EVTQVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

(配列番号 :7)

【0059】

【化4】

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVSNDVWYQQKPGQAPRLLIYYASNRYTGIPARFSGS
GSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQDYTSPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 :8)

20

【0060】

本発明の抗体または免疫グロブリン(およびADC)は、任意のDLL3決定因子を特異的に認識するまたはこれと会合する抗体から生成されることが理解される。本明細書で使用される場合「決定因子」または「標的」は、特定の細胞、細胞集団または組織においてもしくはこれらの上で、同定可能的に会合するかまたは特異的に見出される、任意の検出可能な形質、特性、マーカーまたは因子を意味する。決定因子または標的は、形態学的性質、機能的性質または生化学的性質であってもよく、好ましくは表現型である。いくつかの実施形態において、決定因子は、特定の細胞型またはある特定の条件下の細胞(例えば、細胞周期の特定の点におけるまたは特定の微小環境における細胞)によって異なって発現(過剰発現または過小発現)されるタンパク質である。本発明の目的のために、決定因子は、好ましくは、異常ながん細胞上で異なって発現され、DLL3タンパク質またはそのスプライスパリアント、アイソフォーム、ホモログもしくはファミリーメンバーまたはこれらの特異的ドメイン、領域もしくはエピトープのいずれかを含み得る。「抗原」、「免疫原性決定因子」、「抗原性決定因子」または「免疫原」は、免疫適格性の動物に導入されたときに免疫応答を刺激できかつ免疫応答により生じる抗体によって認識される、任意のタンパク質または任意の断片、領域もしくはドメインを意味する。本明細書で検討されるDLL3決定因子の存在または不在は、細胞、細胞小集団または組織(例えば、腫瘍、腫瘍形成性細胞またはCSC)を同定するために使用され得る。

30

【0061】

免疫グロブリン分子内には、2種類のジスルフィド架橋すなわち結合、つまり鎖間および鎖内のジスルフィド結合がある。当該分野で周知のように、鎖間ジスルフィド結合の位置および数は、免疫グロブリンのクラスおよび種類によって変化する。本発明は、抗体の任意のクラスまたは特定のサブクラスに限定されるものではないが、IgG1免疫グロブリンが、例示のために、本開示を通して使用される。野生型IgG1分子には、12の鎖内ジスルフィド結合(それぞれ重鎖に4つとそれぞれ軽鎖に2つ)と、4つの鎖間ジスルフィド結合がある。鎖内ジスルフィド結合は、一般にやや保護されており、鎖間結合よりも相対的に還元されにくい。逆に、鎖間ジスルフィド結合は、免疫グロブリンの表面に位置しており、溶媒に接触可能で、通常は比較的還元されやすい。2つの鎖間ジスルフィド結合が重鎖間に存在し、さらに各重鎖からそれぞれの軽鎖に対しても1つずつ鎖間ジスルフィド結合が存在する。鎖間ジスルフィド結合は、鎖の会合に必須ではないことが実証された。IgG1ヒンジ領域は、重鎖に鎖間ジスルフィド結合を形成するシステインを含有

40

50

しており、これらのシステインが、構造的な支えとともにFabの動きを容易にする柔軟性をもたらす。重/重IgG1鎖間ジスルフィド結合は、残基C226およびC229（Eunambリング）に位置し、一方でIgG1の軽鎖と重鎖との間（重/軽）のIgG1鎖間ジスルフィド結合は、カッパまたはラムダ軽鎖のC214と、重鎖の上流ヒンジ領域のC220との間に形成される。

【0062】

B．抗体生成および産生

本発明の抗体は、当該技術分野で公知の様々な方法を使用して産生され得る。

【0063】

1．宿主動物におけるポリクローナル抗体の生成

様々な宿主動物におけるポリクローナル抗体の産生は、当該技術分野において周知である（例えば、Harlow and Lane（編集）（1988）Antibodies：A Laboratory Manual、CSH Press；およびHarlowら（1989）Antibodies、NY、Cold Spring Harbor Press参照）。ポリクローナル抗体を生成するために、免疫適格性の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、非ヒト霊長類など）は抗原性タンパク質または抗原性タンパク質を含む細胞もしくは調製物によって免疫化される。一定時間後に、ポリクローナル抗体含有血清を、動物を出血させるかまたは屠殺することにより得る。血清は動物から得た形態で使用されてもよく、または抗体を部分的もしくは完全に精製して免疫グロブリン画分もしくは単離された抗体調製物を得てもよい。

10

20

30

40

50

【0064】

任意の形態の抗原または抗原を含有する細胞もしくは調製物を、決定因子に特異的な抗体を生成するために使用することができる。用語「抗原」は、広義で使用され、任意の免疫原性断片または選択された標的の決定因子、例えば、単一のエピトープ、複数のエピトープ、単一もしくは複数のドメインまたは全細胞外ドメイン（ECD）を含み得る。抗原は、単離された完全長タンパク質、細胞表面タンパク質（例えば、抗原の少なくとも一部をその表面上で発現している細胞による免疫化）または可溶性タンパク質（例えば、タンパク質のECD部分のみによる免疫化）であってもよい。抗原は、遺伝子修飾された細胞において産生されてもよい。前述の抗原のいずれかが単独で使用されてもよく、当該技術分野で公知の1つ以上の免疫原性増強アジュバントと組み合わせて使用されてもよい。抗原をコードしているDNAは、ゲノムDNAであっても非ゲノムDNA（例えば、cDNA）であってもよく、免疫原性応答を誘発するのに十分なECDの少なくとも一部をコードしていてもよい。任意のベクターを使用して、抗原が発現される細胞を形質転換してもよく、例えばベクターとして、これらに限定されないが、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、プラスミドおよびカチオン性脂質などの非ウイルス性ベクターが挙げられる。

【0065】

2．モノクローナル抗体

選択された実施形態において、本発明では、モノクローナル抗体の使用を検討する。当該技術分野で公知であるように、用語「モノクローナル抗体」または「mAb」は、実質的に均一な抗体の集団、すなわち、微量に存在し得る可能性のある変異（例えば、天然に生じる変異）を除いて同一である集団を構成する個別の抗体から取得される抗体を指す。

【0066】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、組換え技術、ファージディスプレイ技術、トランスジェニック動物（例えば、Xenomouse（登録商標））またはこれらの何らかの組合せを含む、当該技術分野で公知の様々な技術を使用して調製され得る。例えば、モノクローナル抗体は、例えば、An, Zhigiang（編集）Therapeutic Monoclonal Antibodies：From Bench to Clinic、John Wiley and Sons、第1版 2009；Shireら、（編集）Current Trends in Monoclonal Anti

body Development and Manufacturing, Springer Science+Business Media LLC、第1版 2010; Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版 1988; Hammerlingら、in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)により詳細に記載されているハイブリドーマおよび生化学的遺伝子操作技術を使用して産生され得る。決定因子に特異的に結合する複数のモノクローナル抗体の産生後、特に有効な抗体を、様々なスクリーニングプロセスを通じて、例えば、決定因子に対するそれらの親和性または内在化速度に基づいて、選択してもよい。本明細書に記載されるように産生される抗体を、「ソース (source)」抗体として使用することができ、さらに、例えば、標的への親和性を改善するため、細胞培養における産生性を向上させるため、インビボでの免疫原性を減少させるため、多重特異性構築物を生成するために改変してもよい。モノクローナル抗体の産生およびスクリーニングのより詳細な説明は、下記および添付の実施例に示される。

10

20

30

40

50

【0067】

3. ヒト抗体

別の実施形態において、抗体は、完全ヒト抗体を含み得る。語「ヒト抗体」は、ヒトによって産生される抗体のアミノ配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体および/または下記に記載のヒト抗体を作製する技術のいずれかを使用して作製された抗体（好ましくはモノクローナル抗体）を指す。

【0068】

ヒト抗体は、当該技術分野で既知の様々な技術を使用して産生され得る。一実施形態において、組換えヒト抗体は、ファージディスプレイを使用して調製された組換えコンビナトリアル抗体ライブラリをスクリーニングすることによって単離され得る。一実施形態において、ライブラリは、B細胞から単離されたmRNAから調製されたヒトVLおよびVH cDNAを使用して生成されたscFvファージまたは酵母ディスプレイライブラリである。このような技術は、多数の候補抗体のスクリーニングを有利にも可能にし、候補配列の比較的簡単な操作を提供する（例えば、親和性成熟または組換えシャッフリングによる）。

【0069】

ヒト抗体は、トランスジェニック動物、例えば、内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化され、ヒト免疫グロブリン遺伝子が導入されているマウスに、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することにより作製することもできる。チャレンジすると、ヒト抗体産生が観察され、この産生は、遺伝子再配列、アセンブリおよび完全ヒト抗体レパートリーを含む全ての点において、ヒトで見られるものと緊密に類似している。このアプローチは、例えば、U.S.P.N. 5, 545, 807; 5, 545, 806; 5, 569, 825; 5, 625, 126; 5, 633, 425; 5, 661, 016ならびにXenomouse（登録商標）技術に関するU.S.P.N. 6, 075, 181および6, 150, 584;ならびにLonberg and Huszar、1995、PMID: 7494109）に記載されている。あるいは、ヒト抗体は、標的抗原に対する抗体を産生するヒトBリンパ球の不死化を介して調製され得る（このようなBリンパ球は、新生物障害に罹患している個体から回収し得るかまたはインビボで免疫化され得る）。例えば、Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、p. 77 (1985); Boernerら、1991、PMID: 2051030; およびU.S.P.N. 5, 750, 373を参照。他のモノクローナル抗体と同様に、このようなヒト抗体は、ソース抗体として使用され得る。

【0070】

さらに、このような抗体は、選択された宿主細胞を所望のヒト重鎖および軽鎖をコード

する（すぐ上で述べた任意の供給源からの）遺伝物質を用いて形質転換またはトランスフェクトした後に、組換えにより産生させることができる。このような非天然型の組換えにより製造された完全ヒト抗体組成物は、明確に本発明の範囲内にあり、開示の抗DLL3ADCを得るために用いることができる。

【0071】

4. 誘導された抗体

ソース抗体は、上記のように生成され、選択され、単離された後、改善された医薬的特徴を有する抗DLL3抗体となるようにさらに改変されてもよい。好ましくは、ソース抗体は、所望の治療学的特性を有する誘導抗体をもたらすように既知の分子遺伝子操作技術を使用して修飾または改変されてもよい。

10

【0072】

4.1. キメラおよびヒト化抗体

本発明の選択された実施形態は、免疫特異的にDLL3に結合するマウスモノクローナル抗体を含み、この抗体は、「ソース」抗体と考えることができる。ある特定の実施形態において、本発明の抗体は、このような「ソース」抗体から、ソース抗体の定常領域および/またはエピトープ結合アミノ酸配列の任意選択の修飾を通じて誘導され得る。様々な実施形態では、抗体は、ソース抗体の選択されたアミノ酸が、欠失、変異、置換、統合または組合せを通じて変化する場合、ソース抗体から「誘導される」。別の実施形態において、「誘導された」抗体は、ソース抗体の断片（例えば、1つ以上のCDRまたは全重鎖および軽鎖可変領域）がアクセプター抗体配列と組み合わせられるまたはアクセプター抗体配列に組み込まれて、誘導抗体（例えば、キメラまたはヒト化抗体）を提供する抗体である。これらの「誘導された」抗体は、標準的な分子生物学的技術を使用して、下記に記載されるように、例えば、決定因子に対する親和性を改善するために、抗体安定性を向上させるために、細胞培養における産生および収率を向上させるために、インビボにおける免疫原性を下げるために、毒性を下げるために、活性部分のコンジュゲーションを容易にするためにまたは多重特異的抗体を作製するために生成され得る。このような抗体は、ソース抗体から、化学的手段または翻訳後修飾による成熟分子の修飾（例えば、グリコシル化パターンまたはペグ化）を通じて、誘導されてもよい。

20

【0073】

一実施形態において、本発明の抗体は、少なくとも2つの異なる抗体の種またはクラス由来の共有結合したタンパク質セグメントから誘導された、キメラ抗体を含み得る。用語「キメラ」抗体は、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であるが、鎖の残りは、別の種に由来するかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体ならびにこのような抗体の断片の対応する配列と同一または相同である構築物を指す（U.S.P.N. 4,816,567; Morrisonら、1984、PMID: 6436822）。いくつかの好ましい実施形態において、本発明のキメラ抗体は、ヒト軽鎖および重鎖定常領域に作動可能に連結されている選択されたマウス重鎖および軽鎖可変領域の全てまたはほとんどを含んでもよい。他の選択された実施形態において、キメラ抗DLL3抗体は、本明細書に開示のマウス抗体から「誘導された」ものであり得る。

30

40

【0074】

他の実施形態において、本発明のキメラ抗体は、「CDRグラフト化」抗体であり、この場合に、CDR（Kabata、Chothia、McCullumなどを使用して定義される）は、特定の種から誘導されるかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属しており、抗体の残りは、主に別の種から誘導されるかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属している。ヒトで使用するために、1つ以上の選択されたげっ歯類CDR（例えば、マウスCDR）は、ヒトアクセプター抗体にグラフト化され、天然に存在するヒト抗体のCDRの1つ以上と置き換えられ得る。これらの構築物は、一般的に、対象による抗体に対する望ましくない免疫応答を低減しながら、十分な強度のヒト抗体機能、例えば、補体依存細胞傷害性（CDC）および抗体依存細胞媒介細胞傷害性（ADCC）をも

50

たらずという利点を有する。一実施形態において、CDRグラフト化抗体は、ヒトフレームワーク配列に組み込まれたマウスから取得される1つ以上のCDRを含む。

【0075】

CDRグラフト化抗体に類似しているのが「ヒト化」抗体である。本明細書で使用する
とき、「ヒト化」抗体は、1つ以上の非ヒト抗体（ドナーまたはソース抗体）から誘導され
た1つ以上のアミノ酸配列（例えば、CDR配列）を含むヒト抗体（アクセプター抗体）
である。ある特定の実施形態では、「逆変異（back mutation）」が、ヒト化抗体に導入
されていてもよい。この逆変異では、レシピエントのヒト抗体の可変領域の1つ以上
のフレームワークドメイン（FR）が、非ヒト種ドナー抗体の対応する残基によって置
換されている。このような逆変異は、グラフト化CDRの適切な三次元立体配置の維持
を補助し、それにより親和性および抗体安定性を改善し得る。様々なドナー種由来
の抗体を使用することができ、例えば、限定されないが、マウス、ラット、ウサギまた
は非ヒト霊長類が挙げられる。さらに、ヒト化抗体は、例えば、抗体の性能をさらに
向上させるために、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない新たな残基
を含んでもよい。ソース抗体由来のマウス成分およびアクセプター抗体由来のヒト
成分を含む、本発明に適合するCDRグラフト化およびヒト化抗体は、下記実施例に
示すように提示される。

10

【0076】

当該技術分野で認識されている様々な技術を使用して、どのヒト配列をアクセプター
抗体として使用するかを決定し、本発明に従ってヒト化構築物を提供することができる。
適合するヒト生殖系列配列の編纂およびそれらのアクセプター配列としての適性を
決定するための方法は、例えば、Dubel and Reichert（編）（2014）Handbook of
Therapeutic Antibodies、第2版、Wiley-Blackwell GmbH；Tomlinson、I. A.ら
（1992）J. Mol. Biol. 227：776-798；Cook、G. P.ら（1995）Immunol.
Today 16：237-242；Chothia、D.ら（1992）J. Mol. Biol. 227：799-817；
およびTomlinsonら（1995）EMBO J 14：4628-4638）に開示されている。V-BASE
ディレクトリ（VBASE2- Retterら、Nucleic Acid Res. 33；671-674、2005）は、
ヒト免疫グロブリン可変領域配列の網羅的なディレクトリを提供しており（Tomlinson、
I. A.ら、MRC Centre for Protein Engineering、Cambridge、UKにより編集）、
これを使用して適合するアクセプター配列を同定してもよい。さらに、例えばU.S.P.
N. 6,300,064に記載されているコンセンサスヒトフレームワーク配列もまた、
適合するアクセプター配列であり得、本教示に従って使用し得る。一般に、ヒト
フレームワークアクセプター配列は、マウス由来フレームワーク配列との相同性と、
ソース抗体およびアクセプター抗体のCDR古典的構造の解析とに基づいて選択
される。次いで、誘導された抗体の重鎖および軽鎖可変領域の誘導された配列が、
当該技術分野で認識されている技術を使用して合成され得る。

20

30

【0077】

例として、CDRグラフト化抗体およびヒト化抗体ならびに関連する方法は、U.S.
P. N. 6,180,370および5,693,762に記載されている。さらなる詳細は、
例えば、Jonesら、1986、（PMID：3713831）；ならびにU.S. P. N. 6,
982,321および7,087,409を参照されたい。

40

【0078】

CDRグラフト化またはヒト化抗体の可変領域のヒトアクセプター可変領域の配列同一
性またはホモロジーは、本明細書で議論したように決定され、本明細書で議論した
ように測定されるとき、好ましくは少なくとも60%または65%の配列同一性、より
好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%または90%の配列同一性、さら
により好ましくは少なくとも93%、95%、98%または99%の配列同一性を共有
する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換により異なる。「
保存的アミノ酸置

50

換」は、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）の側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されている置換である。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変化させない。2つ以上のアミノ酸配列が保存的置換によって互いに異なる場合、配列同一性パーセントまたは類似度を上方調節させて置換の保存的性質を正しくしてもよい。

【0079】

添付の図1Aおよび1Bに示される注釈の付されたCDRおよびフレームワーク配列は、著作権のあるAbysisデータベースを使用して、Kabatraに従って定義されていることが理解される。しかしながら、本明細書で説明されるように、当業者は、Chothiaら、ABMまたはMacCallumらによって提供される定義に従って、CDRを、Kabatraと同様に容易に同定し得る。このように、前述のシステムのいずれかに従って誘導された1つ以上のCDRを含む抗DLL3ヒト化抗体は、本発明の範囲内に明確に保持される。

10

【0080】

4.2. 部位特異的抗体

本発明の抗体は、細胞毒または他の抗がん剤へのコンジュゲーションを容易にするために（下記でより詳細に議論されるように）遺伝子操作されてもよい。抗体薬物コンジュゲート調製にとって、抗体上の細胞毒の位置および薬物抗体比（DAR）の観点から、均質なADC分子集団を含むことが有利である。本発明に基づいて、当業者は本明細書に記載されるような部位特異的遺伝子操作構築物を容易に作製することができる。本明細書で使用するとき、「部位特異的抗体」または「部位特異的構築物」は、重鎖または軽鎖のいずれかの少なくとも1つのアミノ酸が、欠失、改変または（好ましくは別のアミノ酸で）置換されて少なくとも1つの遊離システインを与えている抗体またはその免疫反応性断片を意味する。同様に、「部位特異的コンジュゲート」は、部位特異的抗体と、不對システインまたは遊離システインにコンジュゲートした少なくとも1つの細胞毒または他の化合物とを含むADCを意味する。ある特定の実施形態において、不對システイン残基は、不對鎖内システイン残基を含む。他の実施形態において、遊離システイン残基は、不對鎖間システイン残基を含む。さらに他の実施形態において、遊離システインは、抗体のアミノ酸配列内（例えば、CH3ドメイン内）へと改変されてもよい。いずれにしても、部位特異的抗体は、様々なアイソタイプの抗体、例えば、IgG、IgE、IgAまたはIgDであることができ；これらのクラス内で、抗体は、様々なサブクラスの抗体、例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4であることができる。IgG構築物に関して、抗体の軽鎖は、C214がそれぞれ組み込まれたカップまたはラムダのいずれかのアイソタイプを含んでもよく、選択された実施形態において、C214は、IgG1重鎖のC220残基がないことにより、不對であってもよい。

20

30

【0081】

したがって、本明細書で使用されるとき、用語「遊離システイン」または「不對システイン」は、他に文脈で指示されていない限り、相互に交換可能に使用することができ、天然に存在しているかまたは分子遺伝子操作技術を使用して選択された残基位置に特別に組み込まれたかにかかわらず、抗体の任意のシステイン（またはチオール含有）成分を意味し得る。ある特定の選択された実施形態において、遊離システインは、天然の鎖内または鎖間ジスルフィド架橋パートナーが置換され、除去されまたは他の方法で変化することにより生理学的条件下で天然に存在しているジスルフィド架橋が破壊され、それによって部位特異的コンジュゲーションに適切な不對システインとなっている、天然のシステインを含み得る。他の好ましい実施形態において、遊離または不對システインは、抗体の重鎖または軽鎖アミノ酸配列内の所定の部位に選択的に配置されているシステイン残基を含む。コンジュゲーションの前に、遊離または不對システインが、チオール（還元されたシステイン）として、キャッピングされたシステイン（酸化されている）としてまたは系の酸化状態に依存した同じ抗体上の別の遊離システインとの非天然分子内ジスルフィド結合（酸化されている）として、存在してもよいことが認識される。下記でより詳細に説明するよ

40

50

うに、この抗体構築物の穏やかな還元は、部位特異的コンジュゲーションに利用可能なチオールを提供する。特に好ましい実施形態において、遊離または不對システインは（天然に存在するものかまたは組み込まれたものかにかかわらず）、選択的還元とこの後のコンジュゲーションを受けて、均一なDARの組成物を提供する。

【0082】

本開示の改変コンジュゲート調製物により示される好ましい特性は、コンジュゲーションの位置および組成物の絶対的DARの観点からコンジュゲーションを詳細に指定し、作製されたコンジュゲートを大きく限定する能力に基づき、少なくとも部分的に、予測されるものであることが理解される。従来多くのADC調製物と異なり、本発明は、ランダムコンジュゲーション部位および比較的制御されていないDAR種を生成する抗体の部分10
的または完全な還元完全に依拠する必要はない。むしろ、特定の態様において、本発明は、好ましくは、標的化抗体を改変して天然に存在する（つまり「未処理の(native)」）鎖内または鎖間ジスルフィド架橋の1つ以上を破壊することによりまたは任意の位置にシステイン残基を導入することにより、1つ以上の所定の不對（または遊離の）システイン部位を用意する。この目的のために、選択された実施形態において、システイン残基は、標準的分子遺伝子操作技術を使用して、抗体（またはそれらの免疫反応性断片）の重鎖もしくは軽鎖のいずれの場所に組み込まれてもよくまたは付加されてもよいことが理解される。他の好ましい実施形態において、天然ジスルフィド結合の破壊は、後にコンジュゲーション部位として使用され得る非天然システインの導入（後に遊離システインを含む）との組み合わせで行われ得る。20

【0083】

一実施形態において、遺伝子操作された抗体は、鎖内または鎖間システイン残基に少なくとも1つのアミノ酸欠失または置換を含む。本明細書で使用するとき、「鎖間システイン残基」は、抗体の軽鎖と重鎖との間または抗体の2つの重鎖間のいずれかの天然のジスルフィド結合に含まれるシステイン残基を意味し、一方で、「鎖内システイン残基」は、同じ重鎖または軽鎖内の別のシステインと天然に対をなしているシステイン残基である。一実施形態において、鎖間システイン残基の欠失または置換は、軽鎖と重鎖との間のジスルフィド結合の形成に関与している。別の実施形態において、システイン残基の置換または欠失は、2つの重鎖間のジスルフィド結合に関与している。典型的な実施形態において、軽鎖が重鎖のVHおよびCH1ドメインと対形成しており、1つの重鎖のCH2および30
CH3ドメインが相補的重鎖のCH2およびCH3ドメインと対形成している抗体の相補的な構造により、いずれかの軽鎖または重鎖の単一のシステインの変異または欠失によって、遺伝子操作された抗体における2つの不對システイン残基が生じる。

【0084】

いくつかの実施形態において、鎖間システイン残基は欠失している。他の実施形態において、鎖間システインは、別のアミノ酸（例えば、天然アミノ酸）で置換されている。例えば、アミノ酸置換は、鎖間システインの、中性残基（例えば、セリン、スレオニンもしくはグリシン）または親水性残基（例えば、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシンもしくはイソロイシン）での置き換えを生じ得る。一実施形態において、鎖間システインは、セリンと置き換えられている。40

【0085】

本発明で意図されるいくつかの実施形態において、欠失または置換システイン残基は、軽鎖（カッパまたはラムダのいずれか）上にあり、したがって重鎖上に遊離システインが残る。他の実施形態において、欠失または置換システイン残基は重鎖上にあり、軽鎖定常領域上に遊離のシステインを残す。アセンブリにおける無傷な抗体の軽鎖または重鎖のいずれかの単一システインの欠失または置換は、2つの不對システイン残基を有する部位特異的抗体をもたらすことが理解される。

【0086】

一実施形態において、IgG軽鎖（カッパまたはラムダ）の214位のシステイン（C214）が欠失または置換されている。別の実施形態において、IgG重鎖の220位の50

システイン (C 2 2 0) が欠失または置換されている。さらなる実施形態において、重鎖の 2 2 6 位または 2 2 9 位のシステインが欠失または置換されている。一実施形態において、重鎖の C 2 2 0 がセリンに置換されて (C 2 2 0 S)、軽鎖に好ましい遊離システインをもたらす。別の実施形態において、軽鎖の C 2 1 4 がセリンに置換されて (C 2 1 4 S)、重鎖に好ましい遊離システインをもたらす。実施例 1 5 においてこのような部位特異的構築物を示す。これらの構築物の概要を直下の表 2 に示す。ここで、ナンバリングは一般的に K a b a t に示される E _u インデックスに従い、W T は、「野生型」または天然の改変のない定常領域配列を表し、デルタ (Δ) はアミノ酸残基の欠失を指す (例えば、C 2 1 4 Δ は、2 1 4 位のシステインが欠失していることを示す)。

【 0 0 8 7 】

【 表 2 】

10

表 2

命名	抗体成分	改変
ss1	重鎖 軽鎖	C220S WT
ss2	重鎖 軽鎖	C220 Δ WT
ss3	重鎖 軽鎖	WT C214 Δ
ss4	重鎖 軽鎖	WT C214S

20

【 0 0 8 8 】

これに関して、また例示の目的のために、例示的抗体 h S C 1 6 . 5 6 s s 1 の全長重鎖 (配列番号 9) および軽鎖 (配列番号 8) アミノ酸配列を直下に示す。カッパ軽鎖は、h S C 1 6 . 5 6 抗体に見出される軽鎖と同一であるが、h S C 1 6 . 5 6 s s 1 重鎖 (配列番号 9) は、以下の配列において下線および太字で示される C 2 2 0 S 突然変異を含む点が h S C 1 6 . 5 6 抗体における重鎖 (配列番号 7) と異なる。

30

【 0 0 8 9 】

【 化 5 】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGPEPTYAD
DFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARIGDSSPSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

40

(配列番号 : 9)

【 0 0 9 0 】

【化6】

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVSNDVWYQQKPGQAPRLLIYYASNRYTGIPARFSGS
 GSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQDYTSPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 :8)

【0091】

システイン残基または遊離システインを提供するための残基を導入または付加する（天然のジスルフィド結合を破壊することとは対照的に）ことに関して、抗体または抗体断片上の適合する位置は、当業者によって容易に判別され得る。したがって、選択された実施形態において、システインは、所望のDAR、抗体構築物、選択されたペイロードおよび抗体標的に応じて、CH1ドメイン、CH2ドメインもしくはCH3ドメインまたはそれらの任意の組合せに導入され得る。他の好ましい実施形態において、システインは、カップまたはラムダCLドメイン内に導入されてもよく、特に好ましい実施形態において、CLドメインのc末端領域に導入されてもよい。それぞれの場合において、システインの挿入部位に近位の他のアミノ酸残基を変更、除去または置換して、分子の安定性、コンジュゲーションの効率性を促進させてもよくまたは一度付加されたペイロードに保護的環境を与えてもよい。特定の実施形態において、置換される残基は、抗体の任意の接触可能部位にある。このような表面残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基は、抗体が容易に接触可能な部位に配置され、本明細書でさらに記載されているように選択的に還元され得る。ある特定の実施形態において、置換される残基は、抗体の接触可能部位にある。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基は、抗体が接触可能な部位に配置され、抗体と選択的にコンジュゲートするために使用され得る。ある特定の実施形態において、以下の残基の任意の1つ以上が、システインで置換され得る：軽鎖のV205（Kabata番号付け）；重鎖のA118（Eu番号付け）；および重鎖Fc領域のS400（Eu番号付け）。さらなる置換位置および適合する部位特異的抗体の作製方法は、その全体が本明細書に組み込まれるU.S.P.N.7,521,541に記載されている。

【0092】

本明細書に記載されるような、定義された部位で抗体薬物コンジュゲートを生成するためのストラテジーと薬物負荷の化学量論は、抗体の保存された定常領域の遺伝子操作に主に関わるので、全ての抗DLL3抗体に広く適用可能である。抗体の各クラスおよびサブクラスのアミノ酸配列および天然のジスルフィド結合は十分に文献に記載されているので、当業者は、様々なDLL3抗体の遺伝子操作された構築物を、過度の実験を必要とせず容易に作製することができ、したがってこのような構築物は、本発明の範囲内にあるとして明確に意図されている。これは、本開示において示す重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む部位特異的構築物について特に当てはまる。

【0093】

4.3. 定常領域の修飾または改変された糖鎖結合

本発明の選択された実施形態は、定常領域（つまりFc領域）の置換または修飾、例えば、限定されないが、アミノ酸残基の置換、変異および/または修飾を含んでもよく、この置換または修飾により、化合物に特徴、例えば、限定されないが、薬物動態の変化、血清半減期の延長、結合親和性の増加、免疫原性の減少、生産増加、FcリガンドのFc受容体（FcR）への結合の変化、ADCCまたはCDCの増強または減少、糖鎖結合および/またはジスルフィド結合の変化ならびに結合特異性の変更がもたらされる。

【0094】

改善されたFcエフェクター機能を有する化合物は、例えば、FcドメインとFc受容体との間の相互作用（例えば、FcRI、FcRIIAおよびB、FcRIIIおよびFcRn）に関与するアミノ酸残基の変化を通じて生成することができ、これにより

、細胞毒性の増加および/または薬物動態の変化(血清半減期の延長など)が導かれ得る(例えば、Ravetch and Kinet、Annu. Rev. Immunol 9: 457-92(1991); Capella、Immunomethods 4: 25-34(1994);およびde Haasら、J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41(1995)を参照されたい。

【0095】

選択された実施形態において、インビボ半減期が延長された抗体は、FcドメインとFcRn受容体との間の相互作用に關与することが同定されたアミノ酸残基を修飾(例えば、置換、欠失または付加)することにより生成することができる(例えば、WO97/34631; WO04/029207; U.S.P.N. 6,737,056およびU.S.P.N. 2003/0190311を参照)。このような実施形態に關して、Fcバリエーションは、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、5日より長い、10日より長い、15日より長い、好ましくは20日より長い、25日より長い、30日より長い、35日より長い、40日より長い、45日より長い、2カ月より長い、3カ月より長い、4カ月より長いまたは5カ月より長い、半減期を与え得る。延長された半減期により血清力価が高くなり、従って、抗体の投与頻度を減少させるおよび/または投与される抗体の濃度を減少させる。インビボにおけるヒトFcRnへの結合およびヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えば、ヒトFcRnを発現しているトランスジェニックマウスもしくはトランスフェクトされたヒト細胞株またはバリエーションFc領域を有するポリペプチドが投与された霊長類でアッセイされ得る。WO2000/42072は、FcRnへの結合が向上したまたは減少した抗体バリエーションを記載している。さらに、例えば、Shieldsら J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604(2001)を参照。驚くべきことに、本発明の特定のADCは、任意選択の部位特異的コンジュゲートを得るために用いたもの以外の抗体定常領域の修飾なしに長い終末相半減期(例えば、2週間程度)を示す。

【0096】

他の実施形態において、Fc改変により、ADCCまたはCDC活性の増強または低下が導かれ得る。当該分野で既知のように、CDCは、補体の存在下での標的細胞の溶解を指し、ADCCは、細胞毒性の1形態を指し、ある特定の細胞毒性細胞(例えば、ナチュラルキラー細胞、好中球およびマクロファージ)に存在するFcRへ分泌Igが結合すると、これらの細胞毒性エフェクター細胞が抗原保有標的細胞に特異的に結合可能となり、この後、細胞毒により標的細胞が殺傷される。本発明の文脈において、抗体バリエーションは、「改変された」FcR結合親和性を有し、親もしくは非修飾抗体または天然のFcR配列を含む抗体と比較して、結合が増強または減少している。低下した結合を示すこのようなバリエーションは、明らかな結合をほとんどまたは全く有さず、例えば、FcRに対する結合は、例えば当該技術分野で周知の技術で決定するとき、天然配列と比較して0~20%であり得る。他の実施形態において、バリエーションは、天然の免疫グロブリンFcドメインと比較して増強された結合を示す。これらの種類のFcバリエーションは、本開示の抗体の有効な抗新生物特性を増強するために有利に使用し得ることが理解される。さらに他の実施形態において、このような改変は、結合親和性の増加、免疫原性の減少、生産増加、糖鎖結合および/もしくはジスルフィド結合の変化(例えば、コンジュゲーション部位に対して)、結合特異性の変更、ファゴサイトーシスの増加および/または細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体; BCR)の下方制御などを導く。

【0097】

さらに他の実施形態は、1つ以上の遺伝子操作されたグリコフォーム、例えば、タンパク質(例えばFcドメイン中の)に共有結合されている改変された糖鎖結合パターンまたは改変された炭化水素組成を含む部位特異的抗体を含む。例えば、Shields、R.L.ら(2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740を参照。遺伝子操作されたグリコフォームは、様々な目的、例えば、これらに限定されないが、エフェクター機能の増強または減少、標的に対する抗体の親和性の増加または抗体の産生促

10

20

30

40

50

進のために有用であり得る。ある特定の実施形態において、エフェクター機能の減少が所望される場合、分子を遺伝子操作してアグリコシル化された形態を発現させ得る。1つ以上の可変領域フレームワーク糖鎖結合部位の消去に至り得る置換、したがってこの部位での糖鎖結合を消去し得る置換は、周知である（例えば、U.S.P.N.5,714,350および6,350,861参照）。逆に、増強されたエフェクター機能または改善された結合が、1つ以上のさらなる糖鎖結合部位の遺伝子操作によって、Fc含有分子に付与されてもよい。

【0098】

他の実施形態としては、改変された糖鎖組成を有するFcバリエーション、例えば、フコシル残基の量が減少している低フコシル化抗体または二分化GlcNAc構造が増加している抗体が挙げられる。このような改変された糖鎖結合パターンは、抗体のADCC能力を向上させることが実証されている。遺伝子操作されたグリコフォームは、当業者に公知の任意の方法により、例えば、遺伝子操作されたまたはバリエーション発現システムを使用することにより、1つ以上の酵素（例えば、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII（GnTII））の共発現により、様々な生物または様々な生物由来の細胞株にFc領域を含む分子を発現させることにより、またはFc領域を含む分子を発現させた後で炭水化物を修飾することにより（例えば、WO2012/117002参照）、生成され得る。

10

【0099】

4.4.断片

本発明の実施のためにどの形態の抗体（例えば、キメラ、ヒト化など）を選択したかにかかわらず、免疫反応断片を、それ自体でまたは抗体薬物コンジュゲートの一部として、本明細書の教示に従って使用し得ることが理解される。「抗体断片」は、無傷な抗体の少なくとも1部を含む。本明細書で使用するとき、抗体分子の「断片」という用語は、抗体の抗原結合断片を含んでおり、用語「抗原結合断片」は、選択された抗原またはこの免疫原性断片に免疫特異的に結合または反応し、この断片が由来する無傷抗体と特異的な抗原結合について競合する免疫グロブリンまたは抗体のポリペプチド断片を指す。

20

【0100】

例示的な部位特異的断片としては、可変軽鎖断片（VL）、可変重鎖断片（VH）、scFv、F(ab')₂断片、Fab断片、Fd断片、Fv断片、単ドメイン抗体断片、ダイアボディ、直鎖状抗体、一本鎖抗体分子および抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。さらに、活性部位特異的断片は、抗原/基質または受容体と相互作用する能力を維持し、無傷抗体と同様の様式でそれらを修飾する（ただしおそらくはやや効率が劣る）、抗体の部分を含む。このような抗体断片は、本明細書に記載されるような1つ以上の遊離システインを含むようにさらに遺伝子操作されてもよい。

30

【0101】

他の実施形態において、抗体断片は、Fc領域を含む断片であって、Fc領域が無傷抗体に存在しているときに通常伴われる少なくとも1つの生物学的機能、例えばFcRn結合、抗体半減期調節、ADCC機能および補体結合を維持している断片である。一実施形態において、抗体断片は、無傷抗体と実質的に同様のインビボ半減期を有する一価抗体である。例えば、このような抗体断片は、断片にインビボ安定性を付与することが可能な少なくとも1つの遊離システインを含むFc配列に連結された抗原結合アームを含んでもよい。

40

【0102】

当業者であれば十分に認識されるように、断片は、分子遺伝子操作技術によりまたは無傷のもしくは完全な抗体または抗体鎖の、化学的処理もしくは酵素的処理（例えばパイプインもしくはペプシン）を介して、あるいは組み換え手段により、取得することができる。抗体断片のより詳細な説明は、例えばFundamental Immunology、W.E.Paul編、Raven Press、N.Y.（1999）を参照。

【0103】

50

4.5. 多価構築物

他の実施形態において、本発明の抗体およびコンジュゲートは、一価または多価（例えば、二価、三価など）であり得る。本明細書で使用するとき、用語「価数」は、抗体に関連した可能な標的結合部位の数を指す。各標的結合部位は、標的分子上の1つの標的分子または特異的位置もしくは座位（locus）に特異的に結合する。抗体が一価であるとき、分子の各結合部位は、単一抗原位置またはエピトープで特異的に結合する。抗体が2つ以上の標的結合部位（多価）を含むとき、各標的結合部位は同じまたは異なる分子に特異的に結合してもよい（例えば、異なるリガンドもしくは異なる抗原または同じ抗原上の異なるエピトープもしくは位置に結合してもよい）。例えば、U.S.P.N. 2009/0130105を参照。

10

【0104】

一実施形態において、抗体は、二重特異的抗体であり、2つの鎖が、Millssteinら、1983、Nature、305:537-539に記載されるように、異なる特異性を有している。他の実施形態には、さらなる特異性を有する抗体、例えば三重特異的抗体が含まれる。他のより精巧な適合する多重特異的構築物およびそれらの作製方法は、U.S.P.N. 2009/0155255ならびにWO94/04690; Sureshら、1986、Methods in Enzymology、121:210およびWO96/27011に記載されている。

【0105】

多価抗体は、所望の標的分子の異なるエピトープに免疫特異的に結合することができるか、または異種性ポリペプチドもしくは固形支持材料のような標的分子と異種性エピトープとの両方に免疫特異的に結合することができる。選択された実施形態は2つの抗原にのみ結合することができる（つまり、二重特異的抗体である）が、さらなる特異性を有する抗体、例えば三重特異的抗体も本発明に包含される。二重特異的抗体には、架橋または「ヘテロコンジュゲート」抗体も含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の1つはアビジンに結合することができ、他方はビオチンに結合することができる。このような抗体は、例えば、不要な細胞に対して免疫系細胞を標的化させるために（U.S.P.N. 4,676,980）およびHIV感染の治療のために（WO91/00360、WO92/200373およびEP03089）提唱されてきた。ヘテロコンジュゲート抗体は、いずれかの都合のよい架橋方法を使用して作製することができる。適切な架橋剤は当該技術分野で周知であり、いくつかの架橋技術と共にU.S.P.N. 4,676,980に開示されている。

20

30

【0106】

5. 抗体の組換え産生

抗体およびそれらの断片は、抗体産生細胞および組換え技術から得られた遺伝子材料を使用して作製または修飾されてもよい（例えば、Dubel and Reichert（編）（2014）Handbook of Therapeutic Antibodies、第2版、Wiley-Blackwell GmbH; Sambrook and Russell（編）（2000）Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第3版）、NY、Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubelら（2002）Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、John & Sons、Inc. およびU.S.P.N. 7,709,611を参照）。

40

【0107】

本発明の別の態様は、本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、全細胞、細胞溶解物または部分的に精製されたもしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、他の細胞成分または他の混入物、例えば、他の細胞核酸もしくはタンパク質から、標準技術、例えば、アルカリ/SDS処理、CsClバンド形成、カラムクロマトグラフィー

50

、アガロースゲル電気泳動および当該技術分野で周知の他のものを使用して分離されるとき、「単離される」または実質的に純粋にされる。本発明の核酸は、例えば、DNA（例えば、ゲノムDNA、cDNA）、RNAおよびこの人為的バリエーション（例えば、ペプチド核酸）であり得、一本鎖もしくは二本鎖またはRNA、RNAであってもよく、イントロンを含んでも含まなくてもよい。選択された実施形態において、核酸はcDNA分子である。

【0108】

本発明の核酸は、標準的な分子生物学的技術を使用して得られ得る。ハイブリドーマ（例えば、下記実施例に記載された調製されるハイブリドーマ）により発現される抗体については、抗体の軽鎖および重鎖をコードしているcDNAは、標準的PCR増幅またはcDNAクローニング技術によって得られ得る。免疫グロブリン遺伝子ライブラリから（例えば、ファージディスプレイ技術を使用して）得られる抗体については、抗体をコードしている核酸が、ライブラリから収集され得る。

10

【0109】

VHおよびVLセグメントをコードしているDNA断片は、標準的組換えDNA技術によりさらに操作され、例えば、可変領域遺伝子を、完全長抗体鎖遺伝子、Fab断片遺伝子またはscFv遺伝子に変換することができる。これらの操作において、VLまたはVHをコードしているDNA断片は、別のタンパク質またはタンパク質断片、例えば、抗体定常領域またはフレキシブルリンカーをコードしている別のDNA断片に作動可能に連結される。用語「作動可能に連結される」は、この文脈で使用される場合、2つのDNA断片によってコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように2つのDNA断片が連結されていることを意味する。

20

【0110】

VH領域をコードしている単離されたDNAは、重鎖定常領域（IgG1の場合は、CH1、CH2およびCH3）をコードする別のDNA分子にVHコードDNAを作動可能に連結することによって、完全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術分野で公知であり（例えば、Kabataら、（1991）（前掲））、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的PCR増幅により取得され得る。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgMまたはIgD定常領域であり得るが、最も好ましくはIgG1またはIgG4定常領域である。例示的IgG1定常領域は、配列番号2に示される。Fab断片重鎖遺伝子に関して、VHコードDNAは、重鎖CH1定常領域のみをコードしている別のDNA分子に作動可能に連結され得る。

30

【0111】

VL領域をコードしている単離されたDNAは、軽鎖定常領域CLをコードしている別のDNA分子にVLコードDNAを作動可能に連結することによって、完全長軽鎖遺伝子（ならびにFab軽鎖遺伝子）に変換され得る。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当該技術分野で公知であり（例えば、Kabataら、（1991）（前掲））、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的PCR増幅によって取得され得る。軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ定常領域であり得るが、最も好ましくはカッパ定常領域である。例示的な適合するカッパ軽鎖定常領域は、配列番号5に示されている。

40

【0112】

本明細書において、本発明のポリペプチドに対する「配列同一性」、「配列類似性」または「配列相同性」を示すある特定のポリペプチド（例えば、抗原または抗体）が検討される。例えば、誘導されたヒト化抗体VHまたはVLDメインは、ソース（例えば、マウス）またはアクセプター（例えば、ヒト）VHまたはVLDメインと配列類似性を示し得る。「相同」ポリペプチドは、65%、70%、75%、80%、85%または90%の配列同一性を示し得る。他の実施形態において、「相同」ポリペプチドは、93%、95%または98%の配列同一性を示し得る。他の実施形態において、「相同」ポリペプチドは、93%、95%または98%の配列同一性を示し得る。本明細書で使用するとき、2

50

つのアミノ酸配列間の相同性パーセントは、2つの配列間の同一性パーセントと同等である。2つの配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一の位置の数の関数であり（つまり、%相同性 = 同一位置の数 / 位置の合計数 × 100）、2つの配列の最適な整列のために導入することが必要なギャップの数と各ギャップの長さが考慮に入れられる。配列の比較および2つの配列間の同一性パーセントの決定は、下記の非限定的実施例に記載されるように、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。

【0113】

2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているE. MeyersおよびW. Millerのアルゴリズム（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17（1988））を使用し、PAM 120ウェイト残基テーブル（weight residue table）、12のギャップ・レングス・ペナルティ、4のギャップペナルティを使用して決定され得る。さらに、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラム（www.gcg.comで利用可能）に組み込まれているNeedlemanおよびWunschのアルゴリズム（J. Mol. Biol. 48:444-453（1970））を使用し、Blossum 62マトリックスまたはPAM 250マトリックスならびに16、14、12、10、8、6または4のギャップ・ウェイトおよび1、2、3、4、5または6のレングス・ウェイトを使用して決定され得る。

【0114】

さらに、またはあるいは、本発明のタンパク質配列を、例えば関連する配列を同定するために、「クエリー配列」として使用して、公的データベースに対して検索を行ってもよい。このような検索は、Altschulら、（1990）J. Mol. Biol. 215:403-10のXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して実施され得る。BLASTタンパク質検索は、本発明の抗体分子に相同なアミノ酸配列を取得するために、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワードレングス = 3を用いて実施されてもよい。比較のためのギャップありアラインメントを取得するために、Gapped BLASTが、Altschulら、（1997）Nucleic Acids Res. 25（17）:3389-3402に記載されているように利用されてもよい。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを使用するときは、対応するプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータが使用されてもよい。

【0115】

同一でない残基の位置は、保存的アミノ酸置換また非保存的アミノ酸置換によって異なり得る。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）の側鎖を有する別のアミノ酸残基によって置換されている置換である。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変化させない。2つ以上のアミノ酸配列が保存的置換によって互いに異なる場合、置換の保存的性質について訂正するために、配列同一性パーセントまたは類似度を上昇するように調整してもよい。ポリペプチドが配列同一性を示す実施形態において、非保存的アミノ酸による置換が存在する場合、これは、本発明のポリペプチド（例えば、抗体）の所望の機能または活性を保持する。

【0116】

本発明の核酸に対して「配列同一性」、「配列類似性」または「配列相同性」を示す核酸も、本明細書で検討される。「相同配列」は、少なくとも約65%、70%、75%、80%、85%または90%の配列同一性を示す核酸分子の配列を意味する。他の実施形態において、核酸の「相同配列」は、参照核酸に対して、93%、95%または98%の配列同一性を示し得る。

【0117】

本発明は、プロモーターに作動可能に連結されていてもよい上記に記載されたこのような核酸（例えば、WO 86/05807；WO 89/01036；およびU.S.P.N

10

20

30

40

50

． 5 ， 1 2 2 ， 4 6 4 参照) と、真核生物分泌経路の他の転写調節およびプロセッシング制御エレメントとを含むベクターも提供する。本発明は、これらのベクターを包含する宿主細胞および宿主発現系も提供する。

【 0 1 1 8 】

本明細書で使用される場合、用語「宿主発現系」は、本発明の核酸、またはポリペプチドおよび抗体のいずれかを生成するように遺伝子操作することができる任意のタイプの細胞系を含む。このような宿主発現系としては、これらに限定されないが、組換えバクテリオファージ DNA またはプラスミド DNA で形質転換またはトランスフェクトされた微生物 (例えば、E . コリ (E . c o l i) または B . サブチリス (B . s u b t i l i s)) ; 組換え酵母発現ベクターでトランスフェクトされた酵母 (例えば、サッカロマイセス (S a c c h a r o m y c e s)) または哺乳動物細胞もしくはウイルス (例えば、アデノウイルス後期プロモーター) のゲノムに由来するプロモーターを含有する組換え発現構築物を包含する哺乳動物細胞 (例えば、COS、CHO-S、HEK-293T、3T3細胞) が挙げられる。宿主細胞は、2つの発現ベクター、例えば、重鎖由来ポリペプチドをコードしている第1のベクターおよび軽鎖由来ポリペプチドをコードしている第2のベクターでコトランスフェクトされていてもよい。本発明のとりわけ好ましい態様において、本開示の抗体は、遺伝子操作された CHO 細胞を用いて産生される。

10

【 0 1 1 9 】

哺乳動物細胞を形質転換する方法は当該技術分野で周知である。例えば、U . S . P . N . 4 , 3 9 9 , 2 1 6 、 4 , 9 1 2 , 0 4 0 、 4 , 7 4 0 , 4 6 1 および 4 , 9 5 9 , 4 5 5 参照。宿主細胞は、様々な特徴を有する抗原結合分子の産生を可能にするように遺伝子操作されていてもよい (例えば、修飾グリコフォームまたは G n T I I I 活性を有するタンパク質)。

20

【 0 1 2 0 】

組換えタンパク質の長期的な高収率生産のために、安定な発現が好ましい。したがって、選択された抗体を安定に発現する細胞株は、当該技術分野で認識されている標準技術を使用して遺伝子操作されてもよく、本発明の一部を形成する。ウイルス複製起源を含有する発現ベクターを使用せずに、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント (例えば、プロモーターまたはエンハンサー配列、転写ターミネータ、ポリアデニル化部位など) および選択可能マーカーにより制御された DNA で形質転換されてもよい。当該技術分野で周知の選択系のいずれも使用することができ、例えば、選択された条件下で発現を増強する効率的なアプローチを提供するグルタミン合成酵素遺伝子発現系 (GS系) を使用してもよい。GS系は、全体的または部分的に、EP0216846、EP0256055、EP0323997 および EP0338841 ならびに U . S . P . N . 5 , 5 9 1 , 6 3 9 および 5 , 8 7 9 , 9 3 6 に関連して述べられている。安定な細胞株の開発のための別の適合する発現系は、Freedom (商標) CHO-S キット (Life Technologies) である。

30

【 0 1 2 1 】

本発明の抗体が、組換え発現または任意の他の本開示の技術で産生されたら、当該技術分野で公知の方法で精製または単離してもよく、これにより抗体は、同定され、それらの天然環境から分離および / もしくは回収され、抗体または関連 ADC の診断的または治療的用途に干渉する混入物から分離される。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイチュの抗体が含まれる。

40

【 0 1 2 2 】

これらの単離された調製物は、当該技術分野で認識されている様々な技術、例えば、イオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィー、透析、ダイアフィルトレーションおよび親和性クロマトグラフィー、特にタンパク質 A またはタンパク質 G 親和性クロマトグラフィーを使用して精製されてもよい。下記の実施例において、適合する方法をより詳細に説明する。

【 0 1 2 3 】

50

6. 産生後選択

得られる方法にかかわらず、抗体産生細胞（例えば、ハイブリドーマ、酵母コロニーなど）は選択され、クローン化され、所望の特徴、例えば、堅固な成長、抗体高産生および目的の抗原に対する高い親和性などの望ましい抗体特徴のためにさらにスクリーニングされてもよい。ハイブリドーマは、細胞培養においてインビトロでまたは同系遺伝子免疫無防備状態動物においてインビボで拡大増殖させることができる。ハイブリドーマおよび/またはコロニーを選択、クローニングおよび拡大増殖する方法は、当業者に周知である。所望の抗体が同定されたら、当該技術分野で認識されている一般的な分子生物学および生化学的技術を使用して、関連する遺伝子材料を単離、操作および発現させてもよい。

【0124】

ナイーブなライブラリ（天然または合成のいずれか）で産生された抗体は、中程度の親和性（約 10^6 から 10^7 M^{-1} の K_d ）を有する抗体であり得る。親和性を増加させるために、親和性成熟が、抗体ライブラリの構築（例えば、エラープロンポリメラーゼを使用したインビトロでのランダム変異の導入による）および抗原に対して高親和性を有する抗体の第2ライブラリからの再選択（例えば、ファージまたは酵母ディスプレイの使用による）により、インビトロで模倣されてもよい。WO9607754は、軽鎖遺伝子のライブラリを作成するために、免疫グロブリン軽鎖のCDRに変異誘発を誘導する方法を記載している。

【0125】

様々な技術が、抗体を選択するために使用され得、例えば、これらに限定されないが、ヒトコンビナトリアル抗体またはscFv断片のライブラリがファージまたは酵母で合成されるファージまたは酵母ディスプレイを使用でき、このライブラリを、目的の抗原またはその抗体結合部分でスクリーニングし、この抗原に結合するファージまたは酵母を単離して、これらから抗体または免疫反応性断片を得てもよい（Vaughanら、1996、PMID: 9630891; Sheetsら、1998、PMID: 9600934; Boderら、1997、PMID: 9181578; Pepperら、2008、PMID: 18336206）。ファージまたは酵母ディスプレイライブラリを生成するためのキットは市販されている。抗体ディスプレイライブラリの生成およびスクリーニングに使用され得る他の方法および試薬もある（U.S.P.N. 5, 223, 409; WO92/18619、WO91/17271、WO92/20791、WO92/15679、WO93/01288、WO92/01047、WO92/09690; およびBarbasら、1991、PMID: 1896445参照）。このような技術は、好都合にも、多数の候補抗体のスクリーニングを可能にし、配列の比較的簡単な操作を提供する（例えば、組換えシャッフリングによる）。

【0126】

IV. 抗体の特徴

ある特定の実施形態において、抗体産生細胞（例えば、ハイブリドーマ、酵母コロニーなど）は、選択され、クローン化され、ならびに好ましい特性、例えば、堅固な成長、抗体高産生および下記に詳細に記載されるような望ましい部位特異的抗体特徴のために、さらにスクリーニングされてもよい。他の場合において、抗体の特徴は、動物への接種のために、特定の抗原（例えば、特異的DLL3アイソフォーム）または標的抗原の免疫応答性断片を選択することによって付与されてもよい。さらに他の実施形態において、選択された抗体を、上記のように遺伝子操作して、免疫化学的特徴、例えば親和性または薬物動態を増強または向上させてもよい。

【0127】

A. 中和抗体

特定の実施形態において、コンジュゲートは、「中和」抗体またはそれらの誘導体もしくは断片を含む。すなわち、本発明は、特異的ドメイン、モチーフまたはエピトープに結合し、DLL3の生物学的活性をブロックするか、低下させるかまたは阻害することができる抗体分子を含み得る。より一般的には、「中和抗体」という用語は、標的分子または

10

20

30

40

50

リガンドに結合するかまたは相互作用し、受容体または基質のような結合パートナーへの標的分子の結合または会合を妨げ、これにより、中和抗体がなければ分子の相互作用から生じるはずの生物学的反応を中断する抗体を意味する。

【0128】

当該技術分野で公知の競合結合アッセイを用いて、抗体またはこの免疫学的に機能的な断片もしくは誘導体の結合および特異性を評価することができることが理解される。本発明に関して、過剰量の抗体が、DLL3に結合する結合パートナーの量を、（例えばNotch受容体活性によりまたはインビトロ競合結合アッセイにより測定した場合に）少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%またはより多く減少させる場合、この抗体または断片は、DLL3が結合パートナーまたは基質に結合することを阻害し続けるかまたは減少させ続ける。例えば、DLL3に対する抗体の場合、中和抗体またはアンタゴニストは、好ましくはNotch受容体活性を少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%またはそれ以上変化させる。この修飾された活性は、当該技術分野で認識されている技術を使用して直接的に測定され得るか、または変化した活性が下流で有する影響（例えば、腫瘍形成、細胞生存またはNotch応答性遺伝子の活性化もしくは抑制）により測定され得ることが、理解される。好ましくは、DLL3活性を中和する抗体の能力は、Notch受容体へのDLL3の結合の阻害によりまたはNotchシグナル伝達のDLL3媒介抑制を解除する抗体の能力を評価することにより評価される。

10

20

【0129】

B. 内在化抗体

ある特定の実施形態において、抗体は、抗体が決定因子と結合し、腫瘍形成性細胞のような選択された標的細胞に内在化される（任意のコンジュゲートされた医薬活性成分を伴う）ような、内在化抗体を含み得る。内在化する抗体分子の数は、抗原発現細胞、特に、抗原発現腫瘍形成性細胞を殺傷するのに十分であり得る。抗体または一部の場合には抗体薬物コンジュゲートの効力に応じて、単一抗体分子の細胞への取込みが、抗体が結合する標的細胞を殺傷するために十分であり得る。本発明に関連して、発現されたDLL3タンパク質の実質的な部分が腫瘍形成性細胞表面に会合して残り、それにより本開示の抗体またはADCの局在化および内在化を可能にしているという証拠がある。選択された実施形態において、このような抗体は、内在化に際して細胞を殺傷する1つ以上の薬物と会合するかまたはコンジュゲートする。いくつかの実施形態において、本発明のADCは、内在化部位特異的ADCを含む。

30

【0130】

本明細書で使用されるとき、「内在化する」抗体は、関連する決定因子に結合する際に、標的細胞によって（任意のコンジュゲートされた細胞毒と共に）取り込まれる抗体を指す。このような内在化するADCの数は、決定因子発現細胞、特に、決定因子発現がん幹細胞を殺傷するのに十分であることが好ましい。細胞毒またはADCの全体としての効力に応じて、一部の場合に、抗体の数分子の細胞内への取込みが、抗体が結合する標的細胞を殺傷するために十分である。例えば、PBDまたはカリケアマイシンのようなある特定の薬物は強力であるため、抗体にコンジュゲートされた毒素の数分子の内在化が、腫瘍細胞を殺傷するために十分である。抗体が哺乳類細胞に結合して内在化するかどうかは、当該技術分野で認識されている様々なアッセイ（例えば、Mab-ZapおよびFab-Zapのようなサポリンアッセイ；アドバンストターゲットングシステム）により決定され得る。抗体が細胞に内在化するかどうかを検出する方法は、U.S.P.N. 7,619,068にも記載されている。

40

【0131】

C. 枯渇抗体

他の実施形態において、本発明の抗体は枯渇抗体である。用語「枯渇」抗体は、好ましくは細胞表面上または細胞表面近傍で抗原に結合し、（例えば、CDC、ADCCまたは

50

細胞毒性剤の導入により)細胞の死を誘導するか、促進するかまたは生じさせる抗体を指す。実施形態において、選択された枯渴抗体は、細胞毒にコンジュゲートされている。

【0132】

好ましくは、枯渴抗体は、定義された細胞集団におけるDLL3発現細胞の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%または99%を殺傷することができる。いくつかの実施形態において、細胞集団は、富化されたか、区分されたか、精製されたかまたは単離された腫瘍形成性細胞、例えば、がん幹細胞を含み得る。他の実施形態において、細胞集団は、全腫瘍試料またはがん幹細胞を含む異種性腫瘍抽出物を含み得る。標準的な生化学的技術が使用され、腫瘍形成性細胞の枯渴が、本明細書に記載の技術に従ってモニタリングおよび定量されてもよい。

10

【0133】

D. 結合親和性

本明細書において、特定の決定因子、例えば、DLL3に対して高い結合親和性を有する抗体が開示される。用語「 K_D 」は、特定の抗体-抗原相互作用の解離定数または見かけの親和性を指す。本発明の抗体は、解離定数 K_D (k_{off}/k_{on})が 10^{-7} Mであるとき、その標的抗原に免疫特異的に結合することができる。抗体は、 K_D が 5×10^{-9} Mであるとき、高親和性で抗原に特異的に結合し、 K_D が 5×10^{-10} Mであるとき、非常に高い親和性で抗原に特異的に結合する。本発明の一実施形態において、抗体は、 10^{-9} Mの K_D と、約 1×10^{-4} /秒の解離速度(off-rate)を有する。本発明の一実施形態において、解離速度は、 $< 1 \times 10^{-5}$ /秒である。本発明の他の実施形態において、抗体は、約 10^{-7} Mから 10^{-10} Mの K_D で決定因子に結合し、さらに別の実施形態において、 K_D 2×10^{-10} Mで決定因子に結合する。本発明のさらに他の選択された実施形態は、 10^{-6} M未満、 5×10^{-6} M未満、 10^{-7} M未満、 5×10^{-7} M未満、 10^{-8} M未満、 5×10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満、 5×10^{-9} M未満、 10^{-10} M未満、 5×10^{-10} M未満、 10^{-11} M未満、 5×10^{-11} M未満、 10^{-12} M未満、 5×10^{-12} M未満、 10^{-13} M未満、 5×10^{-13} M未満、 10^{-14} M未満、 5×10^{-14} M未満、 10^{-15} M未満または 5×10^{-15} M未満の K_D (k_{off}/k_{on})を有する抗体を含む。

20

【0134】

ある特定の実施形態において、決定因子、例えば、DLL3に免疫特異的に結合する本発明の抗体は、少なくとも 10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、少なくとも 2×10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、少なくとも 5×10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、少なくとも 10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、少なくとも 5×10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、少なくとも 10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、少なくとも 5×10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$ または少なくとも 10^8 M $^{-1}$ s $^{-1}$ の会合速度定数または k_{on} (または k_a)速度(抗体+抗原(Ag) $^k_{on}$ 抗体-Ag)を有し得る。

30

【0135】

別の実施形態において、決定因子、例えば、DLL3に免疫特異的に結合する本発明の抗体は、 10^{-1} s $^{-1}$ 未満、 5×10^{-1} s $^{-1}$ 未満、 10^{-2} s $^{-1}$ 未満、 5×10^{-2} s $^{-1}$ 未満、 10^{-3} s $^{-1}$ 未満、 5×10^{-3} s $^{-1}$ 未満、 10^{-4} s $^{-1}$ 未満、 5×10^{-4} s $^{-1}$ 未満、 10^{-5} s $^{-1}$ 未満、 5×10^{-5} s $^{-1}$ 未満、 10^{-6} s $^{-1}$ 未満、 5×10^{-6} s $^{-1}$ 未満、 10^{-7} s $^{-1}$ 未満、 5×10^{-7} s $^{-1}$ 未満、 10^{-8} s $^{-1}$ 未満、 5×10^{-8} s $^{-1}$ 未満、 10^{-9} s $^{-1}$ 未満、 5×10^{-9} s $^{-1}$ 未満または 10^{-10} s $^{-1}$ 未満の解離速度定数または k_{off} (または k_d)速度(抗体+抗原(Ag) $^k_{off}$ 抗体-Ag)を有し得る。

40

【0136】

結合親和性は、当該技術分野で公知の様々な技術、例えば、表面プラズモン共鳴、バイオレイヤー干渉法、二面偏波式干渉法、静的光散乱法、動的光散乱法、等温滴定型カロリメトリー、ELISA、超遠心分析法およびフローサイトメトリーを使用して決定され得る。

【0137】

50

E. ビニング (B i n n i n g) およびエピトープマッピング

本明細書に本開示の抗体は、それらが会合する個別のエピトープの観点で性質決定することができる。「エピトープ」は、抗体または免疫反応性断片が特異的に結合する決定因子の部分である。免疫特異的結合は、上記の結合親和性に基づいてまたはタンパク質および/もしくは巨大分子の複雑な混合物における(例えば、競合アッセイにおける)その標的抗原の抗体による優先的な認識により、確認し、定義することができる。「線形エピトープ」は、抗体の免疫特異的結合を可能にする、抗原における連続的アミノ酸により形成される。線形エピトープに優先的に結合する能力は、一般に、抗原が変性されたときでも維持される。逆に、「立体エピトープ」は、通常、抗原のアミノ酸配列における非連続的アミノ酸であるが、抗原の二次的、三次的または四次的構造の概念において、単一の抗体に同時に結合されるために十分に近接している非連続的アミノ酸を含む。立体エピトープを有する抗原が変性されたとき、抗体は通常、もはや抗原を認識しない。エピトープ(連続的または非連続的)は、特有の空間的立体配置に、通常少なくとも3個、より一般的には少なくとも5個または8~10個または12~20個のアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0138】

本発明の抗体は、それらが属する群または「ピン (b i n)」の観点で性質決定することもできる。「ピンニング」は、免疫原性決定因子に同時に結合することができない抗体の対を同定し、それによって結合について「競合する」抗体を同定する、競合的抗体結合アッセイの使用を指す。抗体の競合は、試験される抗体または免疫学的に機能的な断片が、共通の抗原に対する参照抗体の特異的結合を予防または阻害するアッセイによって決定され得る。そのようなアッセイは典型的には、固体表面または細胞、非標識試験抗体および標識参照抗体に結合した精製抗原(例えば、DLL3またはこのドメインもしくは断片)の使用が含まれる。競合阻害は、試験抗体の存在下に固体表面または細胞に結合したラベルの量を決定することにより測定される。競合的結合を決定するための方法に関するさらなる詳細は、本明細書に記載の実施例で提供される。通常、競合抗体が過剰に存在するとき、競合抗体は、参照抗体の共通抗原に対する特異的な結合を、少なくとも30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%または75%阻害する。いくつかの例において、結合は、少なくとも80%、85%、90%、95%または97%以上阻害される。逆に、参照抗体が結合しているとき、参照抗体は、後で添加する試験抗体(つまり、DLL3抗体)の結合を、好ましくは、少なくとも、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%または75%阻害する。いくつかの例において、試験抗体の結合は、少なくとも80%、85%、90%、95%または97%以上阻害される。

【0139】

一般に、ピンニングまたは競合結合は、当該技術分野で認識されている様々な技術、例えば、イムノアッセイ、例えば、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量測定アッセイ、蛍光イムノアッセイおよびタンパク質Aイムノアッセイを使用して決定され得る。このようなイムノアッセイは慣用されており、当該技術分野で周知である(Ausubelら編(1994)Current Protocols in Molecular Biology、1巻、John Wiley & Son, Inc.、New York参照)。さらに、交差ブロックアッセイを使用することができる(例えば、WO2003/48731;およびHarlowら(1988)Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Ed Harlow and David Lane参照)。

【0140】

競合的阻害(したがって「ピン」)を決定するために使用される他の技術としては、例えば、BIAcore(商標)2000システム(GE Healthcare)を使用した表面プラズモン共鳴;例えば、ForteBio(登録商標)Octet RED(

ForteBio)を使用したバイオレイヤー干渉法;または、例えば、FACSCanto II (BD Biosciences)もしくはマルチプレックスLUMINEX (商標)検出アッセイ(Luminex)を使用したフローサイトメトリビーズアレイが挙げられる。

【0141】

Luminexは、大規模マルチプレックス抗体対合を可能にするビーズベースのイムノアッセイプラットフォームである。アッセイは、抗体の対の標的抗原への同時結合パターンを比較する。抗体の対の1つ(捕捉mAb)がLuminexビーズに結合し、一方でそれぞれの捕捉mAbは異なる色のビーズに結合する。他の抗体(検出因子mAb)は、蛍光シグナル(例えば、フィコエリトリン(PE))に結合する。アッセイは、抗原に対する抗体の同時結合(対合)を解析し、同様の対合プロファイルを有する抗体とともに群分けする。検出因子mAbと捕捉mAbの同様のプロファイルは、2つの抗体が同じまたは密接に関連したエピトープに結合することを示す。一実施形態において、対合プロファイルは、Pearson相関係数を使用して決定され、試験される一連の抗体の任意の特定の抗体に最も密接に関連する抗体を同定することができる。実施形態において、抗体の対のPearson相関係数が少なくとも0.9である場合、試験/検出因子mAbは、参照/捕捉mAbと同じピンにあると決定される。他の実施形態において、Pearson相関係数は、少なくとも0.8、0.85、0.87または0.89である。さらなる実施形態において、Pearson相関係数は、少なくとも0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99または1である。Luminexアッセイから得られたデータを解析する他の方法は、U.S.P.N.8,568,992に記載されている。同時に100種類(またはそれ以上)の異なるビーズを解析するLuminexの能力により、ほぼ無制限の抗原および/または抗体表面が用意され、バイオセンサーアッセイ上の抗体エピトーププロファイリングにおいて改善された処理能力および解像度がもたらされる(Millerら、2011、PMID:21223970)。

10

20

【0142】

同様に、表面プラズモン共鳴を含むピニング技術は、本発明に適合する。本明細書で使用されるとき、「表面プラズモン共鳴」は、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することにより、特異的相互作用のリアルタイム解析を可能にする光学的現象を指す。BIAcore(商標)2000システムのような市販の機器を使用して、選択された抗体が、定義された抗原に対する結合に関して互いに競合するかを容易に決定することができる。

30

【0143】

他の実施形態において、試験抗体が結合に関して参照抗体と「競合する」かを決定するために使用し得る技術は「バイオレイヤー干渉法」である。この干渉法は、2つの表面、つまりバイオセンサーチップ上に固定化されたタンパク質の層および内部参照層から反射される白色光の干渉パターンを解析する光学的解析技術である。バイオセンサーチップに結合した分子の数の任意の変化は、リアルタイムで測定され得る干渉パターンのシフトを引き起こす。このようなバイオレイヤー干渉法アッセイは、ForteBio(登録商標)Octet RED機器を使用して以下のように実施され得る。参照抗体(Ab1)を、抗マウス捕捉チップ上に捕捉させ、次いで、高濃度の非結合抗体を使用して、チップをブロックし、ベースラインを収集する。単量体の組換え標的タンパク質を、次いで特異的抗体(Ab1)に捕捉させ、チップを対照と同じ抗体(Ab1)を含むウェル中または異なる試験抗体(Ab2)を含むウェル中に浸漬させる。結合レベルを対照Ab1と比較して決定して、さらなる結合が生じない場合、Ab1およびAb2は「競合する」抗体と決定される。Ab2でさらなる結合が観察された場合、Ab1およびAb2は互いに競合しないと決定される。このプロセスは、固有のピンを示す96ウェルのプレート中の抗体の完全な列を使用して、固有の抗体の大きなライブラリをスクリーニングするために拡大され得る。実施形態において、参照抗体が共通の抗原に対する試験抗体の特異的結合を少な

40

50

くとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%または75%阻害する場合、試験抗体は参照抗体と競合する。他の実施形態において、結合は、少なくとも80%、85%、90%、95%または97%以上阻害される。

【0144】

競合抗体の群を包含するピンが定義されたら、この抗体の群が結合する抗原上の特異的ドメインまたはエピトープを決定するために、さらなる性質決定を実施してもよい。ドメイン-レベルエピトープマッピングは、Cochranら、2004、PMID:15099763に記載されているプロトコルを改変して使用することにより実施され得る。ファインエピトープマッピングは、抗体が結合する決定因子のエピトープを含む抗原上の特異的アミノ酸を決定するプロセスである。

10

【0145】

ある特定の実施形態において、ファインエピトープマッピングは、ファージまたは酵母ディスプレイを使用して実施することができる。他の適合エピトープマッピング技術としては、アラニンスキャニング変異体、ペプチドプロット(Reineke、2004、PMID:14970513)またはペプチド切断解析が挙げられる。さらに、エピトープ除去、エピトープ抽出および抗原の化学的修飾のような方法(Tomer、2000、PMID:10752610)も、タンパク分解酵素のような酵素(例えば、トリプシン、エンドプロテイナーゼGlu-C、エンドプロテイナーゼAsp-N、キモトリプシンなど);スクシンイミジルエステルおよびそれらの誘導体、一級アミン含有化合物、ヒドラジンおよびカルボヒドラジン、遊離アミノ酸のような化学物質を使用して利用することができる。別の実施形態において、抗原構造ベースの抗体プロファイリング(Antigen Structure-based Antibody Profiling、ASAP)としても公知の修飾補助プロファイリング(Modification Assisted Profiling)を使用して、化学的または酵素的に修飾された抗原表面に対する各抗体の結合プロファイルの類似性に従って、同じ抗原に向かう多数のモノクローナル抗体を分類することができる(U.S.P.N.2004/0101920)。

20

【0146】

抗原上の所望のエピトープが決定されたら、このエピトープに対するさらなる抗体を、例えば、本明細書に記載の技術を使用して、選択されたエピトープを含むペプチドで免疫化することにより、生成することができる。

30

【0147】

V. 抗体コンジュゲート

いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、医薬として活性なまたは診断的成分とコンジュゲートして、「抗体薬物コンジュゲート」(antibody drug conjugate、ADC)または「抗体コンジュゲート」を形成し得る。用語「コンジュゲート」は広義に使用され、会合の方法に関わらず、任意の医薬として活性なまたは診断的成分と本発明の抗体との共有結合的または非共有結合的会合を意味する。ある特定の実施形態において、この会合は、抗体のリシンまたはシステイン残基を通じて達成される。いくつかの実施形態において、医薬として活性なまたは診断的成分は、1つ以上の部位特異的な遊離システインを介して抗体にコンジュゲーションされ得る。本開示のADCは、治療および診断目的のために使用され得る。

40

【0148】

本発明のADCを使用して、細胞毒または他のペイロードを、標的位置(例えば、腫瘍形成性細胞および/またはDLL3を発現している細胞)に送達し得る。本明細書で使用される場合、用語「薬物」または「ワーヘッド(warhead)」は相互に交換可能に使用でき、生物学的に活性なまたは検出可能な分子もしくは薬物、例えば、下記に記載された抗がん剤および細胞毒を意味する。「ペイロード」は、任意選択のリンカー化合物と組み合わせた薬物または「ワーヘッド」を含み得る。コンジュゲート上の「ワーヘッド」は、ペプチド、タンパク質またはインピボで代謝されて活性薬剤となるプロドラッグ、ポリマー、核酸分子、小分子、結合剤、模倣剤、合成薬物、無機分子、有機分子および放射

50

性同位体を含み得る。有利な実施形態において、本開示のADCは、結合したペイロードを、ワーヘッドの放出および活性化の前に、比較的非反応性の非毒性の状態では標的部位に向かわせる。ワーヘッドのこの標的化放出は、好ましくは、ペイロードの安定なコンジュゲーション（例えば、抗体上の1つ以上のシステインを介して）および過剰にコンジュゲートされた毒性ADC種を最小にするADC調製物の比較的均質な組成物を通じて達成される。ワーヘッドを大量に放出するように設計された薬物リンカーと結合されて腫瘍部位に送達されると、本発明のコンジュゲートは、望ましくない非特異的な毒性を実質的に低減し得る。これにより、腫瘍部位で比較的高レベルの活性な細胞毒が、非標的化細胞および組織への曝露を最小にしつつ有利に提供され、これにより増強した治療指数が提供される。

10

【0149】

本発明のいくつかの実施形態は、治療成分（例えば、細胞毒）が組み込まれたペイロードを含むが、診断剤および生体適合性修飾剤が組み込まれた他のペイロードも、本開示のコンジュゲートにより、提供される標的化放出から利益を得る場合があることが理解される。したがって、例示的な治療的ペイロードに関する任意の開示は、文脈による他の指示がない限り、本明細書に述べられている診断剤または生体適合性修飾剤を含むペイロードにも適用可能である。選択されたペイロードは、共有結合的にまたは非共有結合的に抗体に連結することができ、少なくとも部分的にコンジュゲーションを達成するために使用される方法に依存して、様々な化学量論的モル比率を示し得る。本発明のコンジュゲートは一般的に、式：

20



（式中、

- a) Abは、抗DLL3抗体を含み、
- b) Lは、任意選択のリンカーを含み、
- c) Dは、薬物を含み、
- d) nは、約1から約20の整数である）

またはその医薬として許容される塩によって表され得る。

【0150】

当業者は、前述の式によるコンジュゲートは、いくつかの異なるリンカーおよび薬物を使用して作製することができ、コンジュゲーション方法は、成分の選択により様々であることを理解する。このように、本開示の抗体の反応性残基（例えば、システインまたはリシン）と会合する任意の薬物または薬物リンカー化合物は、本明細書における教示と適合する。同様に、選択される薬物の抗体に対するコンジュゲーション（部位特異的コンジュゲーションを含む）を可能にする任意の反応条件は、本発明の範囲内である。前記にかかわらず、本発明のいくつかの実施形態は、薬物または薬物リンカーの遊離システインとの、本明細書に記載の穏やかな還元剤と組み合わせた安定化剤を使用した選択的なコンジュゲーションを含む。このような反応条件は、非特異的コンジュゲーションおよび混入物により少なく、対応して毒性が少ない、より均質な調製物を提供する傾向がある。

30

【0151】

A. ペイロードおよびワーヘッド

40

1. 治療剤

本発明の抗体は、治療成分または抗がん剤のような薬物である、医薬として活性な成分、例えば、これらに限定されないが、細胞毒性剤（または細胞毒）、細胞分裂停止剤、抗血管新生剤、減量剤、化学治療剤、放射性治療剤、標的化抗がん剤、生物学的応答修飾剤、がんワクチン、サイトカイン、ホルモン療法、抗転移剤および免疫療法剤と、コンジュゲート、連結、融合または他の方法で会合されてもよい。

【0152】

例示的な抗がん剤または細胞毒（それらのホモログおよび誘導体を含む）としては、1-デヒドロテストステロン、アントラマイシン、アクチノマイシンD、プレオマイシン、カリケアマイシン（n-アセチルカリケアマイシンを含む）、コルヒチン、シクロホスフ

50

アミド、サイトカラシンB、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ジヒドロキシアントラシン、ジオン、デュオカルマイシン、エメチン、エピルピシン、臭化エチジウム、エトポシド、グルココルチコイド、グラミシジンD、リドカイン、DM-1およびDM-4（免疫原）のようなマイタンシノイド、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、パクリタキセル、プロカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、テニポシド（tenoposide）、テトラカインならびに上記のいずれかの医薬として許容される塩もしくは溶媒和物、酸、もしくは誘導体が挙げられる。

【0153】

さらなる適合細胞毒は、ドラスタチンおよびオーリスタチン類、例えば、モノメチルオーリスタチンE（MMAE）およびモノメチルオーリスタチンF（MMAF）（Seattle Genetics）、アマニチン類、例えば、 α -アマニチン、 β -アマニチン、 γ -アマニチンまたは δ -アマニチン（Heidelberg Pharma）、DNA副溝結合剤、例えば、デュオカルマイシン誘導体（Syntarga）、アルキル化剤、例えば、修飾もしくは二量体ピロロベンゾジアゼピン類（PBD）、メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCおよびシスジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン、スプライシング阻害剤、例えば、メアヤマインシン類似体または誘導体（例えば、U.S.P.N. 7,825,267に示されるFR901464）、チューブ（tubular）結合剤、例えば、エポチロン類似体およびチューブリシン、パクリタキセルおよびDNA損傷剤、例えば、カリケアマイシンおよびエスペラミシン、抗代謝物質、例えば、メトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピンおよび5-フルオロウラシル デカルバジン、抗有糸分裂剤、例えば、ビンブラスチンおよびピンクリスチンおよびアントラサイクリン類、例えば、ダウノルピシン（以前のダウノマイシン）およびドキシソルピシンならびに上記のいずれかの医薬として許容される塩または溶媒和物、酸または誘導体を含む。

【0154】

選択された実施形態において、本発明の抗体は、細胞傷害性T細胞を動員し、腫瘍形成性細胞に標的化させるために、抗CD3結合分子と会合され得る（BiTE technology；例えば、Fuhrmannら、（2010）Annual Meeting of AACR要約番号5625を参照）。

【0155】

さらなる実施形態において、本発明のADCは、適切なリンカーを使用してコンジュゲートされる治療用放射性同位体を含む細胞毒を含んでもよい。このような実施形態に適合し得る例示的な放射性同位体としては、これらに限定されないが、ヨウ素（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I ）、炭素（ ^{14}C ）、銅（ ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu ）、硫黄（ ^{35}S ）、ラジウム（ ^{223}Rn ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In ）、ビスマス（ ^{212}Bi 、 ^{213}Bi ）、テクネチウム（ ^{99}Tc ）、タリウム（ ^{201}Tl ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、キセノン（ ^{133}Xe ）、フッ素（ ^{18}F ）、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、 ^{117}Sn 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br および ^{211}At が挙げられる。他の放射性核種も診断剤および治療剤として利用可能であり、特にエネルギー範囲60から4,000keVのものを利用し得る。

【0156】

他の選択された実施形態において、本発明のADCは、細胞毒性ベンゾジアゼピン誘導体ワーヘッドにコンジュゲートされる。本開示の抗体にコンジュゲートされ得る適合ベンゾジアゼピン誘導体（および任意選択のリンカー）は、例えば、U.S.P.N. 8,4

10

20

30

40

50

26, 402ならびにPCT出願WO2012/128868およびWO2014/031566に記載されている。下記で議論されるPBDと同様に、適合ベンゾジアゼピン誘導体は、DNAの副溝に結合し、核酸合成を阻害すると考えられる。このような化合物は、強力な抗腫瘍特性を有することが報告され、したがって、本発明のADCに用いるのにとりわけ適している。

【0157】

ある特定の実施形態において、本発明のADCは、PBDおよびその医薬として許容される塩または溶媒和物、酸または誘導体を、ワーヘッドとして含み得る。PBDは、DNAの副溝に共有結合することにより抗腫瘍活性を発揮し、核酸合成を阻害するアルキル化剤である。PBDは、強力な抗腫瘍特性を有する一方で、最小の骨髄抑制を示すことが示されてきた。本発明に適合するPBDは、いくつかの種類のリンカー（例えば、遊離のスルフヒドリルを有するマレイミド部分を含むペプチジルリンカー）を使用して抗体に連結されてもよく、ある特定の実施形態では二量体の形態である（すなわち、PBD二量体）。本開示の抗体にコンジュゲートさせ得る適合PBD（および任意選択のリンカー）は、例えば、U.S.P.N. 6,362,331、7,049,311、7,189,710、7,429,658、7,407,951、7,741,319、7,557,099、8,034,808、8,163,736、2011/0256157およびPCT出願WO2011/130613、WO2011/128650、WO2011/130616、WO2014/057073およびWO2014/057074に記載されている。以下に本発明に適合するPBD化合物の例を示す。

10

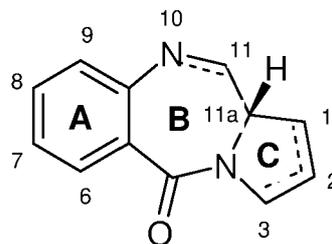
20

【0158】

これに関して、PBDは、強力な抗腫瘍特性を有する一方で、最小の骨髄抑制を示すことが示されてきた。本発明に適合するPBDは、いくつかの種類のリンカーのうちのいずれか1つ（例えば、遊離のスルフヒドリルを有するマレイミド部分を含むペプチジルリンカー）を用いてDLL3モジュレーターに連結されてもよく、特定の実施形態において、二量体の形態である（すなわち、PBD二量体）。PBDは、以下の一般構造のものである。

【0159】

【化7】



30

【0160】

これらは、芳香族A環およびピロロC環の両方における置換基の数、種類および位置ならびにC環の飽和の程度が異なる。B環において、DNAのアルキル化に関する求電子中心であるN10-C11位にイミン(N=C)、カルビノールアミン(NH-CH(OH))またはカルビノールアミンメチルエーテル(NH-CH(OMe))のいずれかが存在する。全ての公知の天然産物は、C環からA環の方を見るときに右回りのねじれをもたらすキラルC11a位における(S)-立体配置を有する。これは、B型DNAの副溝に対してイソらせん性となるための適切な三次元形状を天然産物に付与して、結合部位におけるぴったりとした結合をもたらす(Kohn, In Antibiotics I I I, Springer-Verlag, New York, 3-11頁(1975); HurleyおよびNeedham-Vandevanter, Acc. Chem. Res., 19巻、230-237頁(1986))。副溝における付加体を形成する天然産物の能力は、DNAプロセッシングを妨害することであり、したがって細胞毒性剤としてのこれらの使用を可能にする。上で言及したように、これらの効力を増大させるために

40

50

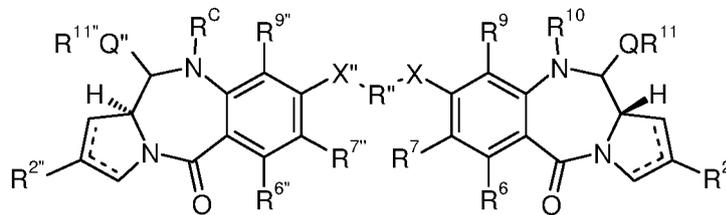
、PBDは、本明細書で述べたように抗DLL3抗体にコンジュゲートされ得る二量体の形態でしばしば用いられる。

【0161】

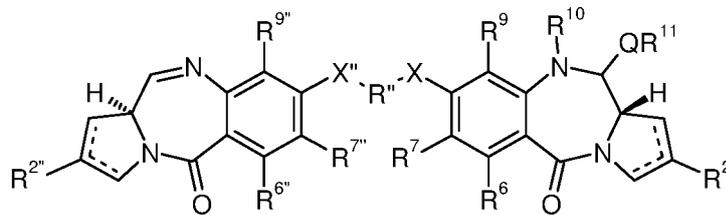
とりわけ好ましい実施形態において、本開示のモジュレーターにコンジュゲートされ得る適合PBDは、U.S.P.N. 2011/0256157に記載されている。この開示において、PBD二量体、すなわち、2つのPBD部分を含むものが好ましいことがあり得る。したがって、本発明の好ましいコンジュゲートは、式(AB)または(AC)を有するものである。

【0162】

【化8】



AB



AC

(式中、

点線は、C1とC2との間またはC2とC3との間の二重結合の任意選択の存在を示し、

R²は、H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂RおよびCORから独立に選択され、八口またはジ八口から任意選択的にさらに選択され、

R^Dは、R、CO₂R、COR、CHO、CO₂Hおよび八口から独立に選択され、

R⁶およびR⁹は、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Snおよび八口から独立に選択され、

R⁷は、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Snおよび八口から独立に選択され、

R¹⁰は、本明細書で述べたように、DLL3抗体またはこの断片もしくは誘導体に結合されたリンカーであり、

Qは、O、SおよびNHから独立に選択され、

R¹¹は、Hであり、もしくはRであり、またはQがOである場合、R¹¹は、SO₃Mであってもよく、Mは、金属陽イオンであり、

Xは、O、SまたはN(H)から選択され、選択された実施形態において、Oを含み、

R''は、鎖が、1個以上のヘテロ原子(例えば、O、S、N(H)、NMe)および/または環が任意選択的に置換されていてもよい芳香環(例えば、ベンゼンもしくはピリジン)により中断されていてもよい、C₃₋₁₂アルキル基であり、

RおよびR'は、任意選択的に置換されたC₁₋₁₂アルキル基、C₃₋₂₀ヘテロシクリル基およびC₅₋₂₀アリール基から独立に選択され、そして任意選択的に、NRR'基に関連して、RおよびR'は、これらが結合している窒素原子と一緒に任意選択的に置換された4、5、6または7員ヘテロ環を形成し、

10

20

40

50

$R^{2'}$ 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 、 $R^{9'}$ 、 X' 、 Q' および $R^{1'1'}$ (存在する場合) は、それぞれ R^2 、 R^6 、 R^7 、 R^9 、 X 、 Q および $R^{1'1}$ に従って定義され、 R^c は、キャッピング基である)。

【0163】

前述の構造を含む選択された実施形態を直下により詳細に記載する。

【0164】

二重結合

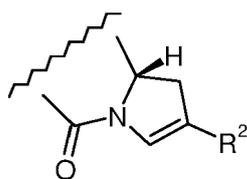
一実施形態において、 C_1 と C_2 との間および C_2 と C_3 との間に二重結合は存在しない。

【0165】

一実施形態において、点線は、以下に示すように、 C_2 と C_3 との間の二重結合の任意選択的な存在を示す。

【0166】

【化9】



10

【0167】

一実施形態において、二重結合は、 R^2 が C_{5-20} アリールまたは C_{1-12} アルキルである場合に、 C_2 と C_3 との間に存在する。

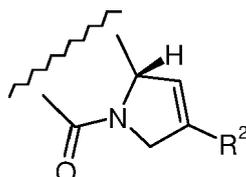
20

【0168】

一実施形態において、点線は、以下に示すように、 C_1 と C_2 との間の二重結合の任意選択の存在を示す。

【0169】

【化10】



30

【0170】

一実施形態において、二重結合は、 R^2 が C_{5-20} アリールまたは C_{1-12} アルキルである場合に、 C_1 と C_2 との間に存在する。

【0171】

R^2

一実施形態において、 R^2 は、 H 、 OH 、 $=O$ 、 $=CH_2$ 、 CN 、 R 、 OR 、 $=CH-R^D$ 、 $=C(R^D)_2$ 、 $O-SO_2-R$ 、 CO_2R および COR から独立に選択され、八口またはジハ口から任意選択的にさらに選択される。

40

【0172】

一実施形態において、 R^2 は、 H 、 OH 、 $=O$ 、 $=CH_2$ 、 CN 、 R 、 OR 、 $=CH-R^D$ 、 $=C(R^D)_2$ 、 $O-SO_2-R$ 、 CO_2R および COR から独立に選択される。

【0173】

一実施形態において、 R^2 は、 H 、 $=O$ 、 $=CH_2$ 、 R 、 $=CH-R^D$ および $=C(R^D)_2$ から独立に選択される。

【0174】

一実施形態において、 R^2 は、独立に H である。

【0175】

一実施形態において、 R^2 は、独立に R であり、 R は、 CH_3 を含む。

50

【0176】

一実施形態において、 R^2 は、独立に $=O$ である。

【0177】

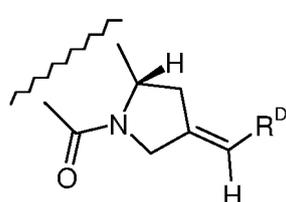
一実施形態において、 R^2 は、独立に $=CH_2$ である。

【0178】

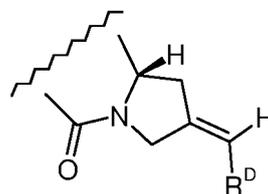
一実施形態において、 R^2 は、独立に $CH-R^D$ である。PBD化合物内において、 $=CH-R^D$ 基は、下に示すいずれかの立体配置を有し得る。

【0179】

【化11】



(I)



(II)

10

【0180】

一実施形態において、立体配置は、立体配置 (I) である。

【0181】

一実施形態において、 R^2 は、独立に $=C(R^D)_2$ である。

20

【0182】

一実施形態において、 R^2 は、独立に CF_2 である。

【0183】

一実施形態において、 R^2 は、独立に R である。

【0184】

一実施形態において、 R^2 は、独立に、置換されていてもよい C_{5-20} アリールである。

【0185】

一実施形態において、 R^2 は、独立に、置換されていてもよい C_{1-12} アリールである。

30

【0186】

一実施形態において、 R^2 は、独立に、置換されていてもよい C_{5-20} アリールである。

【0187】

一実施形態において、 R^2 は、独立に、置換されていてもよい C_{5-7} アリールである。

【0188】

一実施形態において、 R^2 は、独立に、置換されていてもよい C_{8-10} アリールである。

40

【0189】

一実施形態において、 R^2 は、独立に、置換されていてもよいフェニルである。

【0190】

一実施形態において、 R^2 は、独立に、置換されていてもよいナフチルである。

【0191】

一実施形態において、 R^2 は、独立に、置換されていてもよいピリジルである。

【0192】

一実施形態において、 R^2 は、独立に、置換されていてもよいキノリニルまたはイソキノリニルである。

【0193】

50

一実施形態において、 R^2 は、1つから3つの置換基を有し、1つおよび2つがより好ましく、一置換基が最も好ましい。置換基は、いずれの位置にあってもよい。

【0194】

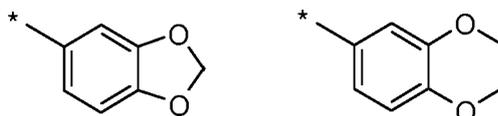
R^2 が C_{5-7} アリール基である場合、単一置換基は、好ましくは化合物の残余部分に対する結合に隣接しない環原子上にある。すなわち、単一置換基は、好ましくは化合物の残余部分に対する結合に対して または である。したがって、 C_{5-7} アリール基がフェニルである場合、置換基は、好ましくはメタ位またはパラ位にある、より好ましくはパラ位にある。

【0195】

一実施形態において、 R^2 は、

【0196】

【化12】



(式中、アスタリスクは、結合点を示す) から選択される。

【0197】

R^2 が C_{8-10} アリール基、例えば、キノリニルまたはイソキノリニルである場合、 R^2 は、キノリニル環またはイソキノリニル環のいかなる位置におけるいかなる数の置換基も有し得る。いくつかの実施形態において、 R^2 は、1つ、2つまたは3つの置換基を有し、これらは、近位および遠位の環のいずれかまたは両方(2つ以上の置換基の場合)に存在し得る。

【0198】

一実施形態において、 R^2 が置換されていてもよい場合、置換基は、下の置換基の項に示す置換基から選択される。

【0199】

R が置換されていてもよい場合、置換基は、好ましくは以下から選択される：

ハロ、ヒドロキシル、エーテル、ホルミル、アシル、カルボキシ、エステル、アシルオキシ、アミノ、アミド、アシルアミド、アミノカルボニルオキシ、ウレイド、ニトロ、シアノおよびチオエーテル。

【0200】

一実施形態において、 R または R^2 が置換されていてもよい場合、置換基は、 R 、 OR 、 SR 、 NRR' 、 NO_2 、ハロ、 CO_2R 、 COR 、 $CONH_2$ 、 $CONHR$ および $ONRR'$ からなる群から選択される。

【0201】

R^2 が C_{1-12} アルキルである場合、任意選択の置換基は、 C_{3-20} ヘテロシクリル基および C_{5-20} アリール基をさらに含み得る。

【0202】

R^2 が C_{3-20} ヘテロシクリルである場合、任意選択の置換基は、 C_{1-12} アルキル基および C_{5-20} アリール基をさらに含み得る。

【0203】

R^2 が C_{5-20} アリール基である場合、任意選択の置換基は、 C_{3-20} ヘテロシクリル基および C_{1-12} アルキル基をさらに含み得る。

【0204】

「アルキル」という用語がアルケニルサブクラスおよびアルキニルサブクラスならびにシクロアルキルを含むことが理解される。したがって、 R^2 が置換されていてもよい C_{1-12} アルキルである場合、アルキル基が、コンジュゲートした系の一部をなし得る、1つ以上の炭素-炭素二重または三重結合を任意選択的に含むことが理解される。一実施形態において、置換されていてもよい C_{1-12} アルキル基は、少なくとも1つの炭素-炭

10

20

30

40

50

素二重または三重結合を含み、この結合は、C 1 と C 2 との間または C 2 と C 3 との間に存在する二重結合とコンジュゲートしている。一実施形態において、C₁₋₁₂ アルキル基は、飽和 C₁₋₁₂ アルキル、C₂₋₁₂ アルケニル、C₂₋₁₂ アルキニルおよび C₃₋₁₂ シクロアルキルから選択される基である。

【0205】

R² 上の置換基がハロである場合、置換基は、好ましくは F または Cl、より好ましくは Cl である。

【0206】

R² 上の置換基がエーテルである場合、置換基は、いくつかの実施形態において、アルコキシ基、例えば、C₁₋₇ アルコキシ基（例えば、メトキシ、エトキシ）であり得るかまたは、いくつかの実施形態において、C₅₋₇ アリールオキシ基（例えば、フェノキシ、ピリジルオキシ、フラニルオキシ）であり得る。

10

【0207】

R² 上の置換基が C₁₋₇ アルキルである場合、置換基は、好ましくは C₁₋₄ アルキル基（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル）であり得る。

【0208】

R² 上の置換基が C₃₋₇ ヘテロシクリルである場合、置換基は、いくつかの実施形態において、C₆ 窒素含有ヘテロシクリル基、例えば、モルホリノ、チオモルホリノ、ピペリジニル、ピペラジニルであり得る。これらの基は、窒素原子を介して PBD 部分の残余部分に結合することができる。これらの基は、例えば、C₁₋₄ アルキル基によりさらに置換することができる。

20

【0209】

R² 上の置換基がビス - オキシ - C₁₋₃ アルキレンである場合、これは、好ましくはビス - オキシ - メチレンまたはビス - オキシ - エチレンである。

【0210】

R² のとりわけ好ましい置換基は、メトキシ、エトキシ、フルオロ、クロロ、シアノ、ビス - オキシ - メチレン、メチル - ピペラジニル、モルホリノおよびメチルチエニルを含む。

【0211】

とりわけ好ましい置換 R² 基は、4 - メトキシ - フェニル、3 - メトキシ - フェニル、4 - エトキシ - フェニル、3 - エトキシ - フェニル、4 - フルオロ - フェニル、4 - クロロ - フェニル、3, 4 - ビスオキシメチレン - フェニル、4 - メチルチエニル、4 - シアノフェニル、4 - フェノキシフェニル、キノリン - 3 - イルおよびキノリン - 6 - イル、イソキノリン - 3 - イルおよびイソキノリン - 6 - イル、2 - チエニル、2 - フラニル、メトキシナフチルおよびナフチルを含むが、これらに限定されない。

30

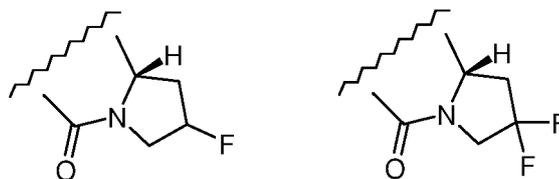
【0212】

一実施形態において、R² は、ハロまたはジハロである。一実施形態において、R² は、置換基がそれぞれ (III) および (IV) として下に例示されている、- F または - F₂ である。

【0213】

40

【化13】



(III)

(IV)

【0214】

50

R^D

一実施形態において、 R^D は、 R 、 CO_2R 、 COR 、 CHO 、 CO_2H および八口から独立に選択される。

【0215】

一実施形態において、 R^D は、独立に R である。

【0216】

一実施形態において、 R^D は、独立に八口である。

【0217】

R^6

一実施形態において、 R^6 は、 H 、 R 、 OH 、 OR 、 SH 、 SR 、 NH_2 、 NHR 、 NRR' 、 NO_2 、 Me_3Sn および八口から独立に選択される。 10

【0218】

一実施形態において、 R^6 は、 H 、 OH 、 OR 、 SH 、 NH_2 、 NO_2 および八口から独立に選択される。

【0219】

一実施形態において、 R^6 は、 H および八口から独立に選択される。

【0220】

一実施形態において、 R^6 は、独立に H である。

【0221】

一実施形態において、 R^6 および R^7 は、一緒になって $-O-(CH_2)_p-O-$ 基を形成しており、 p は、1 または 2 である。 20

【0222】

R^7

R^7 は、 H 、 R 、 OH 、 OR 、 SH 、 SR 、 NH_2 、 NHR 、 NRR' 、 NO_2 、 Me_3Sn および八口から独立に選択される。

【0223】

一実施形態において、 R^7 は、独立に OR である。

【0224】

一実施形態において、 R^7 は、独立に OR^{7A} であり、 R^{7A} は、独立に、置換されていてもよい C_{1-6} アルキルである。 30

【0225】

一実施形態において、 R^{7A} は、独立に、置換されていてもよい飽和 C_{1-6} アルキルである。

【0226】

一実施形態において、 R^{7A} は、独立に CH_3 である。

【0227】

一実施形態において、 R^{7A} は、独立に、置換されていてもよい C_{2-4} アルケニルである。

【0228】

一実施形態において、 R^{7A} は、独立に Me である。 40

【0229】

一実施形態において、 R^{7A} は、独立に CH_2Ph である。

【0230】

一実施形態において、 R^{7A} は、独立にアリルである。

【0231】

一実施形態において、化合物は、二量体であって、各単量体の R^7 基が一緒になって、単量体を連結する式 $X-R''-X$ を有する二量体架橋を形成している。

【0232】

R^9

一実施形態において、 R^9 は、 H 、 R 、 OH 、 OR 、 SH 、 SR 、 NH_2 、 NHR 、 N 50

$R R'$ 、 NO_2 、 Me_3Sn - およびハロゲンから独立に選択される。

【0233】

一実施形態において、 R^9 は、独立にHである。

【0234】

一実施形態において、 R^9 は、独立にRまたはORである。

【0235】

R^{10}

好ましくは、本明細書に記載されるような適合リンカーは、 R^{10} 位（すなわち、N10）における共有結合によりDLL3抗体をPBD薬物部分に結合させる。

【0236】

Q

特定の実施形態において、Qは、O、SおよびNHから独立に選択される。

【0237】

一実施形態において、Qは、独立にOである。

【0238】

一実施形態において、Qは、独立にSである。

【0239】

一実施形態において、Qは、独立にNHである。

【0240】

R^{11}

選択された実施形態において、 R^{11} は、HもしくはRであり、またはQがOである場合、 R^{11} は、 SO_3M であり得、Mは、金属陽イオンである。陽イオンは、 Na^+ であり得る。

【0241】

特定の実施形態において、 R^{11} は、Hである。

【0242】

特定の実施形態において、 R^{11} は、Rである。

【0243】

特定の実施形態において、QがOである場合、 R^{11} は、 SO_3M であり、Mは、金属陽イオンである。陽イオンは、 Na^+ であり得る。

【0244】

特定の実施形態において、QがOである場合、 R^{11} は、Hである。

【0245】

特定の実施形態において、QがOである場合、 R^{11} は、Rである。

【0246】

X

一実施形態において、Xは、O、SまたはN(H)から選択される。

【0247】

好ましくは、Xは、Oである。

【0248】

R''

R'' は、鎖が1つ以上のヘテロ原子、例えば、O、S、N(H)、NMeおよび/または環が置換されていてもよい、芳香環、例えば、ベンゼンもしくはピリジンによって中断されていてよい、 C_{3-12} アルキレン基である。

【0249】

一実施形態において、 R'' は、鎖が1つ以上のヘテロ原子および/または芳香環、例えば、ベンゼンまたはピリジンによって中断されていてよい、 C_{3-12} アルキレン基である。

【0250】

一実施形態において、該アルキレン基は、O、SおよびNMeから選択される1つ以上

10

20

30

40

50

のヘテロ原子ならびに / または環が置換されていてもよい、芳香環によって任意選択的に中断されている。

【0251】

一実施形態において、芳香環は、 C_{5-20} アリレン基であり、アリレンは、芳香族化合物の2個の芳香環原子から2個の水素原子を除去することにより得られた二価部分に関し、この部分は、5から20個の環原子を有する。

【0252】

一実施形態において、 R'' は、鎖が1つ以上のヘテロ原子、例えば、O、S、N(H)、NMe および / または環が NH_2 により置換されていてもよい、芳香環、例えば、ベンゼンもしくはピリジンによって中断されていてもよい、 C_{3-12} アルキレン基である。

10

【0253】

一実施形態において、 R'' は、 C_{3-12} アルキレン基である。

【0254】

一実施形態において、 R'' は、 C_3 、 C_5 、 C_7 、 C_9 および C_{11} アルキレン基から選択される。

【0255】

一実施形態において、 R'' は、 C_3 、 C_5 および C_7 アルキレン基から選択される。

【0256】

一実施形態において、 R'' は、 C_3 および C_5 アルキレン基から選択される。

【0257】

一実施形態において、 R'' は、 C_3 アルキレン基である。

20

【0258】

一実施形態において、 R'' は、 C_5 アルキレン基である。

【0259】

上に示したアルキレン基は、1つ以上のヘテロ原子および / または環が置換されていてもよい、芳香環、例えば、ベンゼンもしくはピリジンによって任意選択的に中断されていてもよい。

【0260】

上に示したアルキレン基は、1つ以上のヘテロ原子および / または芳香環、例えば、ベンゼンもしくはピリジンによって任意選択的に中断されていてもよい。

30

【0261】

上に示したアルキレン基は、非置換直鎖脂肪族アルキレン基であり得る。

【0262】

R および R'

一実施形態において、R は、置換されていてもよい C_{1-12} アルキル基、 C_{3-20} ヘテロシクリル基および C_{5-20} アリール基から独立に選択される。これらの基は、下の置換基の項においてそれぞれが定義されている。

【0263】

一実施形態において、R は、独立に、置換されていてもよい C_{1-12} アルキルである。

40

【0264】

一実施形態において、R は、独立に、置換されていてもよい C_{3-20} ヘテロシクリルである。

【0265】

一実施形態において、R は、独立に、置換されていてもよい C_{5-20} アリールである。

【0266】

一実施形態において、R は、独立に、置換されていてもよい C_{1-12} アルキルである。

【0267】

50

好ましいアルキル基およびアリール基ならびに任意選択の置換基の同一性および数に関する様々な実施形態を R^2 に関して上で述べた。 R^2 について示した選択は、それが R に適用されるとき、適切な場合、例えば、 R^6 、 R^7 、 R^8 または R^9 が R である場合、全ての他の基 R に適用できる。

【0268】

R についての選択は、 R' にも適用される。

【0269】

本発明のいくつかの実施形態において、 $-NRR'$ 置換基を有する化合物を提供する。いくつかの実施形態において、 R および R' は、これらが結合している窒素原子と一緒に、置換されていてもよい4、5、6または7員ヘテロ環を形成している。環は、さらなるヘテロ原子、例えば、 N 、 O または S を含み得る。

10

【0270】

一実施形態において、ヘテロ環は、それ自体 R 基で置換されている。さらなる N ヘテロ原子が存在する場合、置換基は、 N ヘテロ原子上に存在し得る。

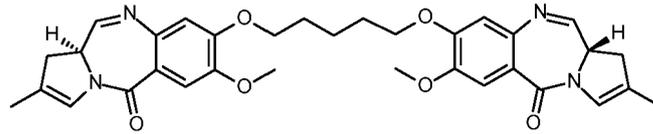
【0271】

前述の PBD に加えて、特定の二量体 PBD は、とりわけ活性であることが示され、本発明と共に用いることができる。この目的を達成するために、本発明の抗体薬物コンジュゲート（すなわち、本明細書で開示する $ADC1-6$ ）は、 $PBD1-5$ として直下に示すような PBD 化合物を含み得る。薬物-リンカー化合物の成分としての $PBD1-5$ のそれぞれの合成は、このような合成について参照により組み込む $WO2014/130879$ に極めて詳細に示されている。 $WO2014/130879$ を考慮すると、本発明の ADC の選択されたワーヘッドを含み得る細胞毒性化合物を、容易に作製して、本明細書で示すように用いることができる。したがって、リンカーの切断により本開示の ADC から放出させることができる選択された PBD 化合物を直下に示す。

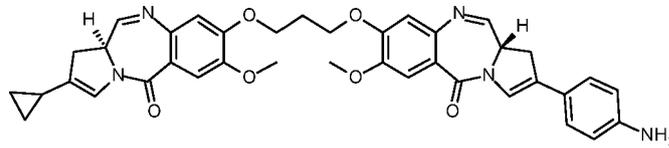
20

【0272】

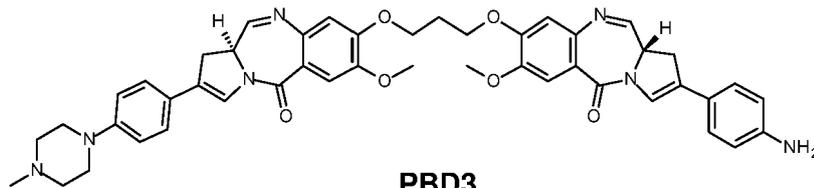
【化 1 4】



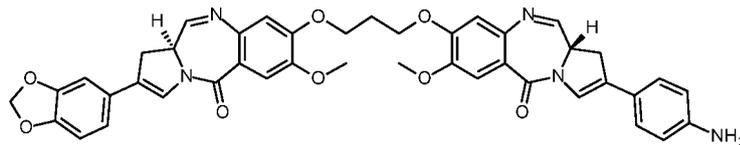
PBD1



PBD2

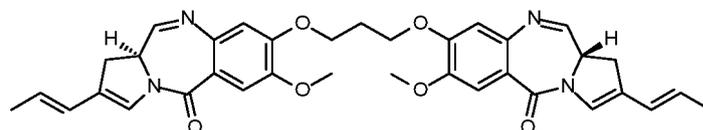


PBD3



PBD4

および



PBD5

【 0 2 7 3 】

前記二量体 P B D ワーヘッドのそれぞれが、好ましくは、標的細胞による内在化およびリンカーの破壊に際して放出されることが理解される。下記でさらに詳細に記載されているように、好ましいリンカーには、リンカーのいかなる部分も保持することなく活性な P B D ワーヘッドの放出を可能にする自己崩壊部分を組み込んだ切断可能リンカーが含まれる。放出に際し、P B D ワーヘッドは、標的細胞の D N A に結合および架橋する。このような結合は、標的がん細胞の分裂をその D N A ヘリックスを歪ませることなく、明らかに阻止することから、一般的な突発的な薬物耐性現象を潜在的に防ぐ。

【 0 2 7 4 】

腫瘍部位におけるこのような化合物の送達および放出は、本開示により増殖性障害を治療または管理するのに臨床的に有効であることが証明され得る。該化合物に関して、本開示の P B D のそれぞれが、各 C 環における 1 つの $s p^2$ 中心のみを有する化合物と比較し

10

20

30

40

50

て、DNAの副溝におけるより強い結合（したがってより大きい毒性）を可能にし得る、各C環における2つのsp²中心を有することが理解される。したがって、本明細書に示すDLL3 ADCに用いる場合、本開示のPBDは、増殖性障害の治療にとりわけ有効であることが証明され得る。

【0275】

前述のことは、本発明に適合する例示的PBD化合物をもたらし、このことは、本明細書における教示に従って抗DLL3コンジュゲートに首尾よく組み込まれ得る他のPBDを限定することを、決して意味しない。むしろ、本明細書で議論されるようにおよび下記実施例において示されるように、抗体にコンジュゲートされ得る任意のPBDは、本開示のコンジュゲートと適合し、明確に本発明の範囲内にある。

10

【0276】

前述の作用剤に加えて、本発明の抗体は、生物学的応答修飾剤にコンジュゲートされてもよい。例えば、いくつかの実施形態において、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、例えば、アブリン、リシンA、オンコナーゼ（Oncinase）（または別の細胞傷害性RNアーゼ）、シュードモナス菌体外毒素、コレラ毒素、ジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子（例えば、TNFまたはTNF α ）などのアポトーシス剤、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子、AIM I（WO97/33899）、AIM II（WO97/34911）、Fasリガンド（Takahashiら、1994、PMID：7826947）およびVEGI（WO99/23105）、血栓性物質（thrombotic agent）、抗血管新生剤（例えば、アンジオスタチンまたはエンドスタチン）、リンホカイン（例えば、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-6（IL-6））、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）および顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）または成長因子（例えば、成長ホルモン（GH））が挙げられ得る。

20

【0277】

2. 診断剤または検出剤

他の実施形態において、本発明の抗体またはその断片もしくは誘導体は、例えば、生物学的分子（例えば、ペプチドまたはヌクレオチド）、小分子、フルオロフォアまたは放射性同位体であり得る診断剤もしくは検出剤、マーカーまたはレポーターにコンジュゲートされる。標識化抗体は、過剰増殖障害の発生もしくは進行をモニタリングするために、または開示する抗体（すなわち診断治療薬）を含む特定の治療の有効性を決定するための臨床的試験手法もしくは治療の今後の方針を決定するための臨床的試験手法の一部として、有用であり得る。このようなマーカーまたはレポーターは、抗体分析（例えば、エピトープ結合または抗体ビニング）に使用するための選択された抗体を精製するために、腫瘍形成性細胞を分離もしくは単離するためにまたは前臨床的手法もしくは毒性研究においても、有用であり得る。

30

【0278】

このような診断、解析および/または検出は、抗体を検出可能な物質にカップリングすることによって行われ得、これらの物質は、これらに限定されないが、様々な酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼ；補欠分子族、例えば、これらに限定されないがストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチン；蛍光材料、例えば、これらに限定されないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（isothiocyanate）、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン、フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリン；発光材料、例えば、これらに限定されないが、ルミノール；生物発光材料、例えば、これらに限定されないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリン；放射活性材料、例えば、これらに限定されないが、ヨウ素（¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、¹²¹I）、炭素（¹⁴C）、硫黄（³⁵S）、トリ

40

50

チウム (^3H)、インジウム (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In) およびテクネチウム (^{99}Tc)、タリウム (^{201}Tl)、ガリウム (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム (^{103}Pd)、モリブデン (^{99}Mo)、キセノン (^{133}Xe)、フッ素 (^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{89}Zr 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn および ^{117}Tl ；様々なポジトロン放出トモグラフィを使用したポジトロン放出金属、非放射活性常磁性金属イオンおよび特定の放射性同位体に放射標識またはコンジュゲートした分子なのである。このような実施形態において、適切な検出方法は、当該技術分野で周知であり、多数の市販供給源から容易に利用可能である。

10

【0279】

他の実施形態において、抗体またはその断片は、マーカー配列または化合物、例えば、ペプチドまたはフルオロフォアに融合またはコンジュゲートされて、精製手法または診断手法または分析手法、例えば、免疫組織化学、バイオレイヤー干渉法、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリ、競合的ELISA、FACSなどを容易にすることができる。いくつかの実施形態において、マーカーは、ヒスチジンタグ、例えば、多くの市販品の中でもとりわけpQEベクター (Qiagen) によって提供されるヒスチジンタグを含む。精製のために有用な他のペプチドタグとしては、これらに限定されないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに対応するヘマグルチニン「HA」タグ (Wilsonら、1984、Cell 37:767) および「フラッグ」タグ (U.S.P.N. 4,703,004) が挙げられる。

20

【0280】

3. 生体適合性修飾因子

選択された実施形態において、本発明の抗体は、所望の通りに抗体特徴を調整するか、改変するか、改善するかまたは和らげるために使用され得る生体適合性修飾因子とコンジュゲートしてもよい。例えば、インビボ半減期が増加した抗体または融合構築物は、比較的分子量の大きいポリマー分子、例えば、市販のポリエチレングリコール (PEG) または同様の生体適合性ポリマーを結合することによって生成され得る。当業者は、PEGが、多くの様々な分子量および分子構造で得られ得、これらを選択して抗体に特定の特性を付与することができる (例えば半減期を調節し得る) ことを理解する。PEGは、PEGの前記抗体もしくは抗体断片のNもしくはC末端へのコンジュゲーションを通じてまたはリシン残基上に存在するアミノ基を介して、多機能リンカーありまたはなしで、抗体もしくは抗体断片または誘導体に結合し得る。生物学的活性の損失を最小にする直鎖状または分枝鎖状のポリマー誘導体を使用され得る。コンジュゲーションの度合いは、PEG分子の抗体分子への最適なコンジュゲーションを確実にするために、SDS-PAGEおよび質量分析により密接にモニタリングされ得る。未反応のPEGは、抗体-PEGコンジュゲートから、例えば、サイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィーにより分離され得る。同様の方法において、本開示の抗体は、抗体もしくは抗体断片をインビボでより安定にするためにまたはインビボでより長い半減期を有するためにアルブミンにコンジュゲートされ得る。この技術は、当該技術分野で周知である。例えば、WO93/15199、WO93/15200およびWO01/77137；およびEP0413,622を参照。他の生体適合性コンジュゲートは当業者にとって明らかであり、本明細書に記載の教示に従って容易に同定され得る。

30

40

【0281】

B. リンカー化合物

多数のリンカー化合物が、関連するワーヘッドに本発明の抗体をコンジュゲートするために使用され得る。リンカーは、抗体上の反応性残基 (好ましくはシステインまたはリシン) と選択された薬物化合物とを共有結合することのみを必要とする。したがって、選択された抗体残基と反応し、本発明の比較的安定なコンジュゲート (部位特異的またはそれ

50

以外のコンジュゲート)を提供するために使用され得る任意のリンカーは、本明細書の教示に適合する。

【0282】

適合リンカーは、求核性である還元されたシステインおよびリシンに有利に結合し得る。還元されたシステインおよびリシンに關与するコンジュゲーション反応としては、これらに限定されないが、チオール-マレイミド、チオールハロゲン(アシルハライド)、チオール-エン、チオール-イン、チオール-ビニルスルホン、チオール-ビスルホン、チオール-チオスルホネート、チオール-ピリジルジスルフィドおよびチオールパラフルオロ反応が挙げられる。本明細書でさらに議論されるように、チオール-マレイミド生体コンジュゲーションは、その速い反応速度と穏やかなコンジュゲーション条件により、最も広く使用されているアプローチの1つである。このアプローチの1つの問題点は、レトロミカエル反応の可能性、および抗体からのマレイミド連結ペイロードの損失すなわちその血漿中の他のタンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン)への移行である。しかしながら、いくつかの実施形態において、コンジュゲートを安定化し、この望ましくない移行を減少させるために、本明細書で示される選択的還元および部位特異的抗体の使用が使用され得る。チオール-アシルハライド反応は、レトロミカエル反応が起こり得ない生体コンジュゲートを提供し、それゆえさらに安定である。しかしながら、チオール-ハライド反応は、一般にマレイミドに基づくコンジュゲーションと比較して反応速度が遅いことから効率的でなく、所望しない薬物抗体比をもたらす。チオール-ピリジルジスルフィド反応は、よく使用される別の生体コンジュゲーション経路である。ピリジルジスルフィドは、遊離チオールとの速い交換が進行し、それにより混成のジスルフィドおよびピリジン-2-チオンの放出をもたらされる。混成のジスルフィドは還元的な細胞環境で切断され、ペイロードが放出され得る。生体コンジュゲーションにおいてさらに注目を集める他のアプローチは、チオール-ビニルスルホンおよびチオールビスルホン反応であり、これらのそれぞれが本明細書の教示に適合し、明確に本発明の範囲内に含まれる。

10

20

【0283】

いくつかの実施形態において適合リンカーは、細胞外環境においてADCに安定性を付与し、ADC分子の凝集を予防し、ADCの水性媒体および単量体状態における自由な可溶性を保持する。細胞への移動または送達の前において、ADCは、好ましくは安定でありかつ無傷(intact)のままであり、つまり、抗体は薬物部分に連結したままである。リンカーは、標的細胞外で安定であるが、細胞内でいくぶん効果的な速度で切断または分解されるように設計されている。したがって、効果的なリンカーは、(i)抗体の特異的結合特性を維持し、(ii)コンジュゲートまたは薬物部分の細胞内送達を可能にし、(iii)コンジュゲートがその標的部位に送達または輸送されるまで、安定および無傷のままである、すなわち切断も分解もされない;および(iv)薬物部分の細胞傷害性、細胞殺傷効果または細胞分裂停止効果(いくつかの場合には任意のバイスタンダー効果を含む)を維持する。ADCの安定性は、標準的な解析技術、例えば、HPLC/UPLC、質量分析、HPLCならびに分離/解析技術LC/MSおよびLC/MS/MSによって測定され得る。前述のように、抗体および薬物部分の共有結合は、リンカーに、2つの反応性官能基、すなわち反応性という意味において2価を有することを要求する。2つ以上の機能的または生物学的に活性な部分を結合するために有用である2価のリンカー試薬、例えば、MMAEおよび抗体は公知であり、それらの結果として生じるコンジュゲートを得るための方法が記載されてきた。

30

40

【0284】

本発明に適合するリンカーは、広義において、切断可能リンカーおよび切断不能リンカーとして分類され得る。切断可能リンカーは、酸不安定性リンカー(例えば、オキシムおよびヒドロゾン)プロテアーゼ切断可能リンカーおよびジスルフィドリンカーを含み得、標的細胞に内在化され、細胞内のエンドソーマル-リソソーマル経路において切断される。細胞毒の放出および活性化は、酸不安定性化学的連結、例えば、ヒドラゾンまたはオキシムの切断を容易にするエンドソーム/リソソーム酸性区画に依存する。リソソーマル特

50

異的なプロテアーゼ切断部位がリンカー内へと遺伝子操作される場合、細胞毒がそれらの細胞内標的の近傍で放出される。あるいは、混合ジスルフィドを含有するリンカーは、細胞傷害性ペイロードが、血流中の酸素リッチ環境ではなく細胞の還元環境内で選択的に切断されるときに細胞内に放出されるアプローチを提供する。対照的に、アミド連結ポリエチレングリコールまたはアルキルスペースを含有する適合性切断不能リンカーは、標的細胞内でADCがリソソーム分解される間に毒性ペイロードを解放する。いくつかの観点で、リンカーの選択は、コンジュゲートで使用される特定の薬物、特定の指標および抗体標的に依存する。

【0285】

したがって、本発明のある特定の実施形態は、細胞内環境（例えば、リソソーム内またはエンドソーム内またはカベオラ内）に存在する切断剤により切断可能であるリンカーを含む。リンカーは、例えば、細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素、例えば、これらに限定されないが、リソソームまたはエンドソームプロテアーゼによって切断されるペプチジルリンカーであり得る。いくつかの実施形態において、ペプチジルリンカーは、少なくとも2アミノ酸長または少なくとも3アミノ酸長である。切断剤は、カテプシンBおよびDならびにプラスミンを含むことができ、これらのそれぞれは、ジペプチド薬物誘導体を加水分解して標的細胞内に活性な薬物を放出することが知られている。カテプシン-Bは、がん性組織で高発現することが見出されているので、チオール-依存性プロテアーゼカテプシン-Bによって切断可能な例示的なペプチジルリンカーは、Phe-Leuを含むペプチドである。このようなリンカーの他の例は、例えば、U.S.P.N. 6, 214, 345に記載されている。特定の実施形態において、細胞内プロテアーゼにより切断可能なペプチジルリンカーは、Val-Citリンカー、Val-AlaリンカーまたはPhe-Lysリンカーである。治療剤の細胞内タンパク分解性放出を利用する1つの利点は、薬剤がコンジュゲートされている場合に通常は減弱化（attenuated）されること、およびコンジュゲートの血清安定性が比較的高いことである。

【0286】

他の実施形態において、切断可能なリンカーは、pH感受性である。通常、pH感受性リンカーは、酸性条件下で加水分解性である。例えば、リソソーム中で加水分解性である酸不安定性リンカー（例えば、ヒドラゾン、オキシム、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、cis-アコニットアミド、オルトエステル、アセタール、ケタールなど）を使用することができる（例えば、U.S.P.N. 5, 122, 368; 5, 824, 805; 5, 622, 929を参照）。このようなリンカーは、中性pH条件、例えば、血液のpH条件下で比較的安定であるが、ほぼリソソームのpHであるpH5.5または5.0未満で不安定（例えば、切断可能）である。

【0287】

さらに他の実施形態において、リンカーは、還元条件下で切断可能である（例えば、ジスルフィドリンカー）。様々なジスルフィドリンカーが当該技術分野で公知であり、例えば、SATA（N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート）、SPDP（N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート）、SPDB（N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート）およびSMPT（N-スクシンイミジル-オキシカルボニル-メチル-(2-ピリジル-ジチオ)トルエン）を使用して形成可能なものが挙げられる。さらに他の特定の実施形態において、リンカーは、マロネートリンカー（Johnsonら、1995、Anticancer Res. 15:1387-93）、マレイミドベンゾイルリンカー（Lauら、1995、Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304）または3'-N-アミドアナログ（Lauら、1995、Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12）である。

【0288】

選択された態様において、選択されたリンカーは、式

【0289】

10

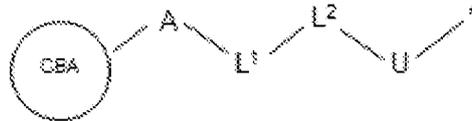
20

30

40

50

【化15】



(式中、アスタリスクは薬物への結合点を示し、CBA (cell binding agent、つまり細胞結合剤) は、抗DLL3抗体を含み、 L^1 は、リンカーおよび任意選択的に切断可能リンカーを含み、A は、 L^1 を抗体上の反応性残基に連結する (任意選択的にスペーサーを含む) 連結基であり、 L^2 は、好ましくは共有結合であり、U は、存在していてもしていなくてもよく、腫瘍部位におけるワーヘッドからのリンカーの完全な分離を促進する自己崩壊性単位の全てまたは一部を含み得る) の化合物を含む。

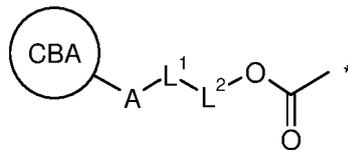
10

【0290】

いくつかの実施形態 (U.S.P.N. 2011/0256157 に示される形態など) において、適合リンカーは、

【0291】

【化16】



20

(式中、アスタリスクは薬物への結合点を示し、CBA (cell binding agent、つまり細胞結合剤) は、抗DLL3抗体を含み、 L^1 は、リンカーおよび任意選択的に切断可能リンカーを含み、A は、 L^1 を抗体上の反応性残基に連結する (任意選択的にスペーサーを含む) 連結基であり、 L^2 は、共有結合であるまたは $-OC(=O)-$ と一緒になって自己崩壊部分を形成する) を含み得る。

【0292】

L^1 および L^2 の性質は、存在する場合、広く変動し得ることが理解される。これらの基は、これらの切断特徴に基づき選択され、コンジュゲートが送達される部位の条件によって指示され得る。酵素の作用により切断されるリンカーが好ましいが、pH の変化 (例えば、酸もしくは塩基不安定性)、温度の変化または放射線照射 (例えば、感光性) によって切断可能なリンカーも使用され得る。還元または酸化条件下で切断可能であるリンカーも本発明で使用され得る。

30

【0293】

ある特定の実施形態において、 L^1 は、アミノ酸の連続配列を含んでもよい。アミノ酸配列は酵素切断の標的基質となり得、それにより薬物を放出し得る。

【0294】

一実施形態において、 L^1 は、酵素の作用により切断可能である。一実施形態において、酵素は、エステラーゼまたはペプチダーゼである。

【0295】

別の実施形態において、 L^1 は、カテプシン不安定性リンカーである。

40

【0296】

一実施形態において、 L^1 は、ジペプチドを含む。ジペプチドは、 $-NH-X_1-X_2-CO-$ として表される場合があり、ここで $-NH-$ および $-CO-$ は、それぞれアミノ酸基 X_1 および X_2 の N 末端および C 末端を表す。ジペプチドのアミノ酸は、天然アミノ酸の任意の組合せであり得る。リンカーがカテプシン不安定性リンカーである場合、ジペプチドは、カテプシン媒介切断の作用部位となり得る。

【0297】

さらに、カルボキシルまたはアミノ側鎖官能基を有するアミノ酸基、例えば、それぞれ Glu および Lys に対して、CO および NH が、この側鎖官能基であり得る。

50

【0298】

一実施形態において、ジペプチドである $-NH-X_1-X_2-CO-$ における基 $-X_1-X_2-$ は、 $-Phe-Lys-$ 、 $-Val-Ala-$ 、 $-Val-Lys-$ 、 $-Ala-Lys-$ 、 $-Val-Cit-$ 、 $-Phe-Cit-$ 、 $-Leu-Cit-$ 、 $-Ile-Cit-$ 、 $-Phe-Arg-$ および $-Trp-Cit-$ から選択され、ここで Cit はシトルリンである。

【0299】

好ましくは、ジペプチドである $-NH-X_1-X_2-CO-$ における基 $-X_1-X_2-$ は、 $-Phe-Lys-$ 、 $-Val-Ala-$ 、 $-Val-Lys-$ 、 $-Ala-Lys-$ および $-Val-Cit-$ から選択される。

10

【0300】

最も好ましくは、ジペプチドである $-NH-X_1-X_2-CO-$ における基 $-X_1-X_2-$ は、 $-Phe-Lys-$ または $-Val-Ala-$ または $Val-Cit$ である。特定の選択された実施形態において、このジペプチドは、 $-Val-Ala-$ を含む。

【0301】

一実施形態において、 L^2 は存在し、 $-C(=O)O-$ と一緒になって自己崩壊性リンカーを形成する。

【0302】

一実施形態において、 L^2 は、酵素活性の基質であり、これによりワーヘッドの放出を可能にする。

20

【0303】

一実施形態において、 L^1 が酵素の作用により切断可能であり、 L^2 が存在する場合、酵素は、 L^1 と L^2 との間の結合を切断する。

【0304】

L^1 および L^2 は、存在する場合、 $-C(=O)NH-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NHC(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NH-$ および $-NHC(=O)NH-$ から選択される結合によって連結されていてもよい。

【0305】

L^2 に連結されている L^1 のアミノ基は、アミノ酸の N 末端であってもよく、またはアミノ酸側鎖、例えば、リシンアミノ酸側鎖のアミノ基から誘導されてもよい。

30

【0306】

L^2 に連結されている L^1 のカルボキシル基は、アミノ酸の C 末端であってもよく、またはアミノ酸側鎖、例えば、グルタミン酸アミノ酸側鎖のカルボキシル基から誘導されてもよい。

【0307】

L^2 に連結されている L^1 のヒドロキシル基は、アミノ酸側鎖、例えば、セリンアミノ酸側鎖のヒドロキシル基から誘導され得る。

【0308】

用語「アミノ酸側鎖」は、(i) 天然に存在するアミノ酸、例えば、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリン；(ii) マイナーなアミノ酸、例えば、オルニチンおよびシトルリン；(iii) 非天然アミノ酸、ベータ-アミノ酸、合成類似体および天然に存在するアミノ酸の誘導體；ならびに(iv) 全てのエナンチオマー、ジアステレオマー、異性体的に濃縮された形態、同位体で標識された形態（例えば、 2H 、 3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N ）、保護された形態およびそれらのラセミ体混合物で見出されるそれらの基を含む。

40

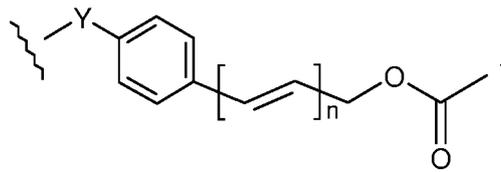
【0309】

一実施形態において、 $-C(=O)O-$ および L^2 は一緒になって基：

50

【0310】

【化17】



(式中、アスタリスクは、薬物または細胞毒性剤に対する結合点の位置を示し、波線は、リンカー-L¹への結合点を示し、Yは、-N(H)-、-O-、-C(=O)N(H)-または-C(=O)O-であり、nは0から3である)を形成する。フェニレン環は、1、2または3つの置換基で置換されていてもよい。一実施形態において、フェニレン基は、ハロ、NO₂、アルキルまたはヒドロキシアルキルで置換されていてもよい。

10

【0311】

一実施形態において、Yは、NHである。

【0312】

一実施形態において、nは0または1である。好ましくは、nは0である。

【0313】

YがNHであり、nが0である場合、自己崩壊性リンカーは、p-アミノベンジルカルボニルリンカー(PABC)と称され得る。

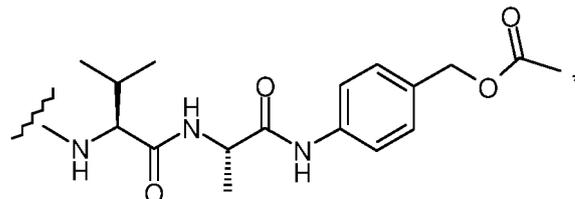
【0314】

他の実施形態において、リンカーは、自己崩壊性リンカーおよびジペプチドを含み、一緒になって、基-NH-Val-Cit-CO-NH-PABC-を形成してもよい。他の選択された実施形態において、リンカーは、下記に示すNH-Val-Ala-CO-NH-PABC基を含んでもよい：

20

【0315】

【化18】

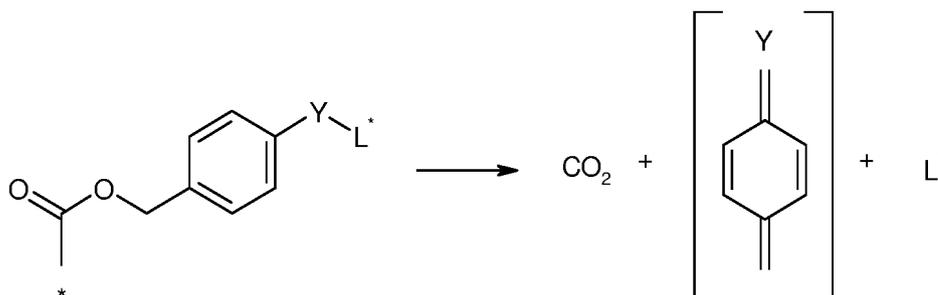


30

(式中、アスタリスクは、選択された細胞毒性部分に対する結合点を示し、波線は、抗体にコンジュゲートされ得るリンカーの残余部分(例えば、スペーサー-抗体結合セグメント)への結合点を示す)。ジペプチドの酵素切断に際し、自己崩壊性リンカーは遠位部位が活性化されるとき、以下に示す流れに沿って進み、保護された化合物(つまり、細胞毒)の明確な放出を可能にする：

【0316】

【化19】



40

(式中、アスタリスクは、選択された細胞毒性部分への結合点を示し、L^{*}は、切断されるペプチジル単位を含むリンカーの残余部分の活性化形態である)。ワーヘッドの明確な

50

放出は、所望の毒性活性の維持を確実にする。

【0317】

一実施形態において、Aは、共有結合である。したがって、L¹と抗体とは直接的に連結される。例えば、L¹が、連続するアミノ酸配列を含む場合、配列のN末端は、抗体残基に直接連結し得る。

【0318】

別の実施形態において、Aは、スペーサー基である。したがって、L¹と抗体は、間接的に連結する。

【0319】

ある特定の実施形態において、L¹およびAは、-C(=O)NH-、-C(=O)O-、-NHC(=O)-、-OC(=O)-、-OC(=O)O-、-NHC(=O)O-、-OC(=O)NH-および-NHC(=O)NH-から選択される結合によって連結され得る。

10

【0320】

下記にさらに詳細に述べられるように、本発明の薬物リンカーは、好ましくは、システイン、例えば、遊離システイン上の反応性チオール求核基に連結する。この目的のために、抗体のシステインは、様々な還元剤、例えば、DTTまたはTCEPまたは本明細書に記載の穏やかな還元剤での治療によってリンカー試薬とコンジュゲーションするために反応し得る。他の実施形態において、本発明の薬物リンカーは、好ましくはリシンに連結される。

20

【0321】

好ましくは、リンカーは、抗体上の求核性官能基と反応する求電子性官能基を含む。抗体上の求核性基としては、これらに限定されないが：(i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えば、リシン、(iii) 側鎖チオール基、例えば、システインおよび(iv) 抗体がグリコシル化されている、糖のヒドロキシルまたはアミノ基が挙げられる。アミン、チオールおよびヒドロキシル基は、求核性であり、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子性基と反応して共有結合を形成することができる。リンカー試薬としては、(i) マレイミド基、(ii) 活性化ジスルフィド、(iii) 活性エステル、例えば、NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)エステル、HOBT(N-ヒドロキシベンゾトリアゾール)エステル、ハロホルメートおよび酸ハロゲン化物；(iv) アルキルおよびベンジルハロゲン化物、例えば、ハロアセトアミド；および(v) アルデヒド、ケトン、およびカルボキシル基が挙げられる。

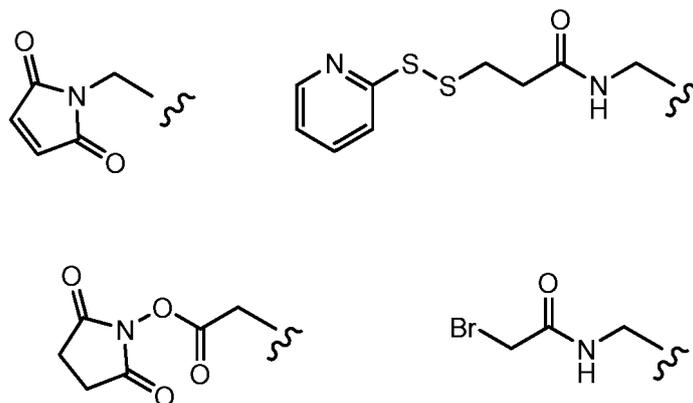
30

【0322】

本発明と適合する例示的な官能基を、直下に示す：

【0323】

【化20】



40

【0324】

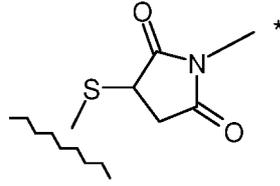
いくつかの実施形態において、システイン(部位特異的抗体の遊離システインを含む)と薬物-リンカー部分との間の結合は、リンカーに存在しているチオール残基および末端

50

マレイミド基を通じたものである。このような実施形態において、抗体と薬物 - リンカーとの連結は、

【0325】

【化21】



(式中、アスタリスクは、薬物 - リンカーの残余部分との結合点を示し、波線は、抗体の残余部分との結合点を示す)であることができる。この実施形態において、S原子は、好ましくは、部位特異的遊離システインから誘導される。

【0326】

他の適合リンカーに関して、結合部分は、抗体上の活性化残基と反応して所望のコンジュゲートを提供し得る末端ヨードアセトアミドを含んでもよい。いずれにしても、当業者は、本開示の薬物 - リンカー化合物のそれぞれと、適合する抗DLL3抗体(例えば、部位特異的抗体)とを、本開示に鑑みて、容易にコンジュゲートすることができる。

【0327】

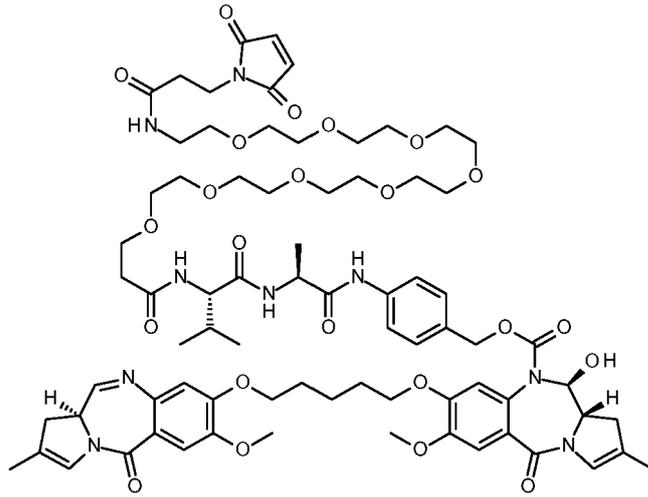
本開示によれば、本発明は、適合する抗体薬物コンジュゲートを作製する方法であって、抗DLL3抗体を下記からなる群から選択される薬物 - リンカー化合物にコンジュゲートすることを含む方法を提供する：

【0328】

10

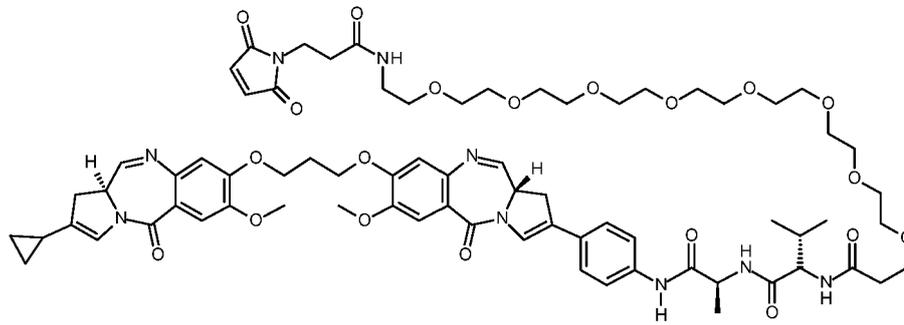
20

【化 2 2】



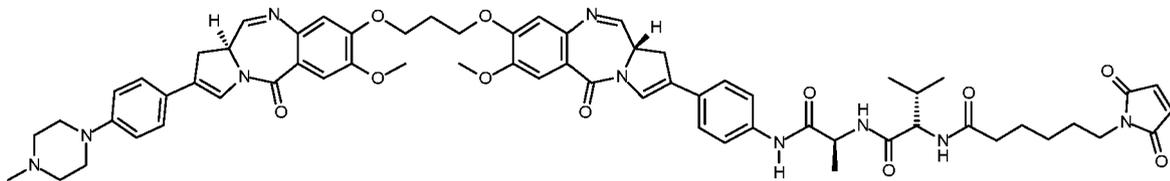
10

DL1



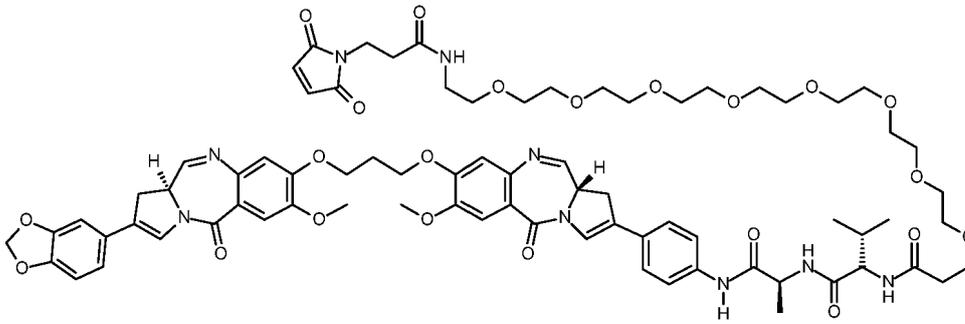
20

DL2



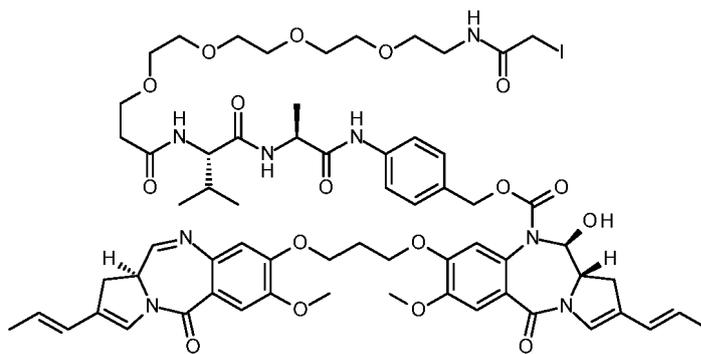
40

DL3



DL4

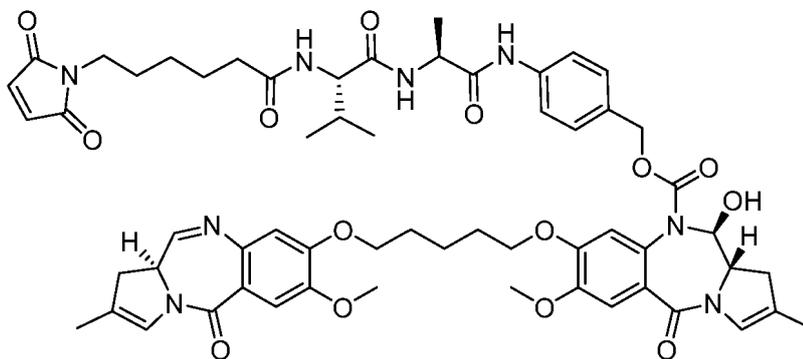
10



DL5

20

および



DL6

40

【0329】

本出願の目的に関し、DLは、「薬物-リンカー」の略称として使用され、上記に示す薬物リンカー1～6（つまり、DL1、DL2、DL3、DL4、DL5およびDL6）を含む。DL1およびDL6は、同じワーヘッドおよび同じジペプチドサブユニットを含むが、連結基スペーサーが異なることに注意されたい。したがって、リンカーの切断によりDL1およびDL6の両方がPBD1を放出する。

【0330】

末端マレイミド部分（DL1～DL4およびDL6）またはヨードアセトアミド部分（

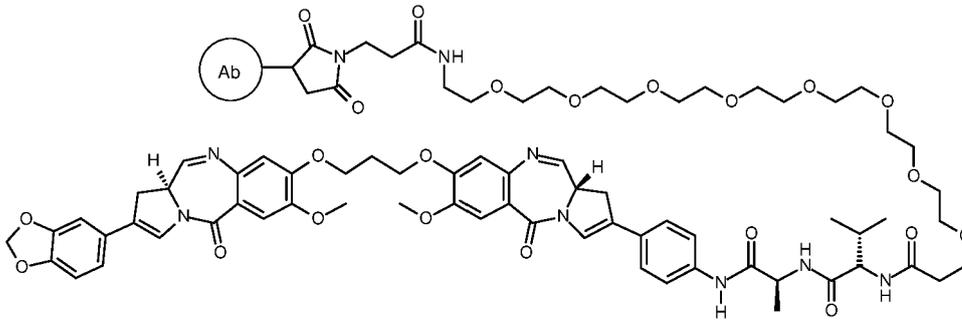
50

D L 5) が付されたリンカーは、当該分野で認識されている技術を使用して、選択された D L L 3 抗体の遊離スルフヒドリルにコンジュゲートしてもよいことが理解される。前記化合物の合成経路は、参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 1 4 / 1 3 0 8 7 9 に示されており、このような P B D をコンジュゲートする詳細な方法は、下記の実施例に示されている。

【 0 3 3 1 】

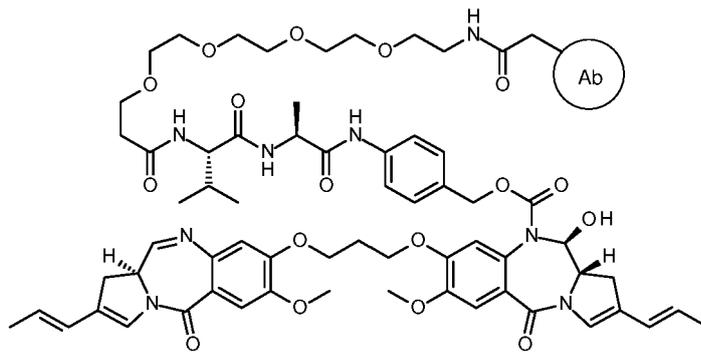
したがって、選択された態様において、本発明は、本開示のピロロベンゾジアゼピンにコンジュゲートされた D L L 3 抗体に関し、下記の A D C 1 - 6 で実質的に示される D L L 3 免疫コンジュゲートを提供する。したがって、ある特定の態様において、本発明は、

【 0 3 3 2 】



ADC 4

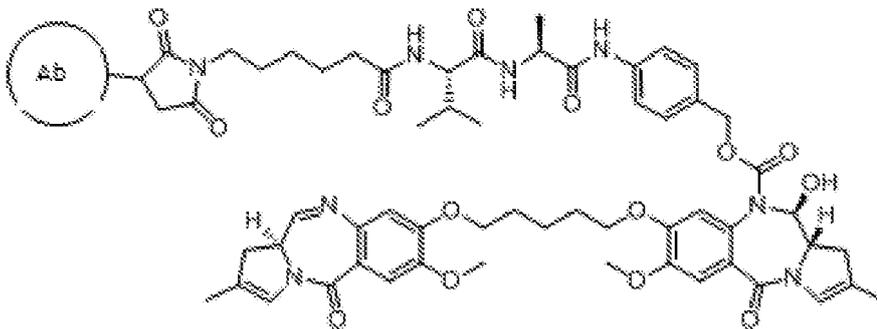
10



ADC 5

20

および



ADC 6

30

40

(式中、Abは、抗DLL3抗体またはそれらの免疫反応性断片を含む)からなる群から選択される抗体薬物コンjugateを対象とする。ADC1は、hSC16.56抗体(配列番号7および8)を含む場合、本開示の目的のためにSC16LD6.5もしくはhSC16.56PBD1(これはDL1もしくはDL6を含み得る)またはhSC16.56DL1もしくはロバルピツズマブ テシリン(Rova-T)と称され得ることに注意されたい。同様に、ADC6は、hSC16.56ss1抗体(配列番号8および9)を含む場合、本開示の目的のためにhSC16.56ss1PBD1(これはDL1もしくはDL6を含み得る)またはhSC16.56ss1DL6と称され得る。

【0333】

50

C. コンジュゲーション

いくつかの周知の様々な反応を使用して、薬物部分および/またはリンカーが選択された抗体に結合してもよいことが理解される。例えば、システインのスルフヒドリル基を活用する様々な反応が、所望の部分にコンジュゲートするために利用されてもよい。いくつかの実施形態は、下記に詳細に述べられた1つ以上の遊離システインを含む抗体のコンジュゲーションを含む。他の実施形態において、本発明のADCは、選択された抗体に存在するリシン残基の溶媒露出されたアミノ基への薬物のコンジュゲーションを通じて生成され得る。さらに他の実施形態は、N末端スレオニンおよびセリン残基の活性化を含み、この活性化が利用されて本開示のペイロードが抗体に連結され得る。選択されるコンジュゲーション方法は、好ましくは、抗体に結合する薬物の数を最適化し、比較的高い治療指数を得るために仕立てられる。

10

【0334】

治療化合物をシステイン残基にコンジュゲートさせるための様々な方法は、当該技術分野において公知であり、当業者に明らかである。塩基性条件下で、システイン残基を脱プロトン化すると、マレイミドおよびヨードアセトアミドなどのソフトな求電子剤と反応し得るチオレート求核剤が生成される。一般にこのようなコンジュゲーションのための試薬は、システインチオールと直接反応してコンジュゲート化タンパク質を形成してもよくまたはリンカー-薬物と直接反応してリンカー-薬物中間体を形成してもよい。リンカーの場合、有機化学反応、条件および試薬を用いる複数の経路が当業者に公知であり、例えば、(1)本発明のタンパク質のシステイン基をリンカー試薬と反応させて、共有結合を介してタンパク質-リンカー中間体を形成し、次いで、活性化化合物と反応させる経路；および(2)化合物の求核性基をリンカー試薬と反応させて、共有結合を介した薬物-リンカー中間体を形成し、次いで本発明のタンパク質のシステイン基と反応させる経路がある。前述の記載から当業者に明らかのように、二官能性(または二価)リンカーが本発明において有用である。例えば、二官能性リンカーは、システイン残基と共有結合するためのチオール修飾基、および化合物と共有または非共有結合するための少なくとも1つの結合部分(例えば、第2チオール修飾部分)を含み得る。

20

【0335】

コンジュゲーションの前に、抗体を、例えば、ジチオスレイトール(DTT)または(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP))を用いた治療により、リンカー試薬とのコンジュゲーションに対して反応性にしてもよい。他の実施形態において、抗体にさらなる求核性基を、リシンと試薬との反応により導入してもよく、試薬としては、これらに限定されないが、アミンをチオールに変換する2-イミノチオラン(Traut試薬)、SATA、SATPまたはSAT(PEG)4が挙げられる。

30

【0336】

このようなコンジュゲーションに関して、システインチオールまたはリシンアミノ基は求核性であり、リンカー試薬または化合物-リンカー中間体または薬物、例えば、(i)活性エステル、例えば、NHSEステル、HOBtエステル、ハロホルメートおよび酸ハロゲン化物；(ii)アルキルおよびベンジルハロゲン化物、例えば、ハロアセトアミド；(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド基；ならびに(iv)ジスルフィド、例えば、ピリジルジスルフィド、の求電子性基と、スルフィド交換を介して反応して共有結合を形成することができる。化合物またはリンカー上の求核性基としては、これらに限定されないが、リンカー部分またはリンカー試薬の求電子性基と反応して共有結合を形成することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレートおよびアリールヒドラジド基が挙げられる。

40

【0337】

コンジュゲーション試薬としては、マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシンイミジルエステル、イソチオシアネート、スルホニルクロリド、2,6-ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステルおよびホスホラミダイトが、一般に挙げ

50

られるが、他の官能基も使用され得る。ある特定の実施形態において、方法は、例えば、マレイミド類、ヨードアセトアミド類またはハロアセチル/アルキルハライド、アジリジン、アクリロイル誘導体を使用して、システインのチオールと反応させて、化合物と反応するチオエーテルを製造することを含む。遊離チオールと活性化されたピリジルスルフィドとのジスルフィド交換は、コンジュゲートの製造（例えば、5-チオ-2-ニトロ安息香酸（TNB）の使用）のためにも有用である。好ましくは、マレイミドが使用される。

【0338】

上述のように、リシンは、本明細書に示されるコンジュゲーションを達成する反応性残基としても使用することができる。求核性リシン残基は、一般に、アミン反応性スクシンイミジルエステルを通して標的化される。最適な数の脱プロトン化リシン残基を得るために、水溶液のpHは、リシンアンモニウム基のpKaである約10.5より低くすべきであり、したがって、反応の典型的なpHは約8および9である。カップリング反応のための一般的試薬は、リシンアシル化機構を介して求核性リシンと反応するNH₂-エステルである。同様の反応を行う他の適合試薬は、イソシアネートおよびイソチオシアネートを含むが、本明細書の教示と共に使用してADCを提供することもできる。リシンが活性化されたら、前述の連結基の多くが、ワーヘッドを抗体に共有結合させるために使用され得る。

10

【0339】

化合物をスレオニンまたはセリン残基（好ましくはN末端残基）にコンジュゲートさせるための方法も当該技術分野で公知である。例えば、カルボニル前駆体を、セリンまたはスレオニンの1,2-アミノアルコールから誘導し、過ヨウ素酸酸化により選択的におよび迅速にアルデヒド形態に変換させることができる方法が記載されている。アルデヒドを、本発明のタンパク質に結合する化合物におけるシステインの1,2-アミノチオールと反応させることにより、安定なチアゾリジン生成物が形成される。この方法は、N末端セリンまたはスレオニン残基でタンパク質を標識するために特に有用である。

20

【0340】

いくつかの実施形態において、反応性チオール基が、選択された抗体（またはその断片）に、1,2,3,4またはより多くの遊離システイン残基を導入することにより（例えば、1つ以上の遊離非天然システインアミノ酸残基を含む抗体を調製することにより）、導入され得る。本明細書に示す改変された遊離システイン部位および/または新規コンジュゲーション手法が提供されることに少なくとも部分的に起因して、このような部位特異的抗体または改変抗体は、コンジュゲート調製物が、向上した安定性および実質的な均一性を示すことを可能にする。鎖内または鎖間抗体ジスルフィド結合のそれぞれを完全または部分的に還元してコンジュゲーション部位を提供する従来のコンジュゲーション方法（本発明に完全に適合する）と異なり、本発明はある特定の調製された遊離システイン部位の選択的還元およびそれに対する薬物リンカーの方向をさらに提供する。

30

【0341】

これに関して、部位の改変および選択的還元により特異的に促進されたコンジュゲーションにより、所望の位置での部位特異的コンジュゲーションの割合が高くなるのを可能にすることが理解される。重大なことに、これらのコンジュゲーション部位の一部、例えば、軽鎖定常領域の末端領域に存在するコンジュゲーション部位は、他の遊離システインと交差反応しやすいために、一般に有効にコンジュゲートすることが困難である。しかしながら、得られた遊離システインの分子的遺伝子操作および選択的還元により、望ましくない高DAR混入物および非特異的毒性を大きく減少させる効率的なコンジュゲーション率が得られ得る。より一般的には、選択的還元を含む改変された構築物および本開示の新規コンジュゲーション方法は、改善された薬物動態および/または薬力学ならびに潜在的な改善された治療指数を有するADC調製物を提供する。

40

【0342】

ある特定の実施形態において、部位特異的構築物は、遊離システインを提示しており、

50

還元されると、上記で開示するようなリンカー部分の求電子性基と反応して共有結合を形成することができる求核性チオール基を含む。上記のように、本発明の抗体は、還元可能な不對の鎖間もしくは鎖内システインまたは導入された非天然システイン、つまりこのような求核性基を提供するシステインを有してもよい。したがって、ある特定の実施形態において、還元された遊離システインの遊離スルフヒドリル基と、本開示の薬物リンカーの末端マレイミドまたはハロアセトアミド基との反応により、所望のコンジュゲーションが提供される。このような場合に、抗体の遊離システインは、還元剤、例えば、ジチオスレイトール(DTT)または(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)での治療により、リンカー試薬とのコンジュゲーションに反応性にしてもよい。各遊離システインは、したがって論理的に、反応性チオール求核剤を提供する。このような試薬が適合する一方、部位特異的抗体のコンジュゲーションは、一般的に当業者に公知の様々な反応、条件および試薬を使用して達成され得ることが理解される。

10

【0343】

さらに、遺伝子操作された抗体の遊離システインは、選択的に還元されて、部位特異的コンジュゲーションの向上および望ましくない潜在的な毒性混入物の減少をもたらす得ることが見出された。より詳細には、アルギニンなどの「安定化剤」は、タンパク質中の分子内または分子間相互作用を調節することが見出され、選択された還元剤(好ましくは比較的穏やか)と組み合わせて使用され、遊離システインを選択的に還元し、本明細書に示される部位特異的コンジュゲーションを容易にし得る。本明細書で使用される場合、用語「選択的還元」または「選択的に還元される」は、相互に交換可能に使用され得、改変抗体に存在する天然ジスルフィド結合を実質的に破壊することのない遊離システインの還元を意味する。選択された実施形態において、この還元は、特定の還元剤によってのみ行うことができる。他の実施形態において、改変構築物の選択的還元は、還元剤(穏やかな還元剤を含む)と組み合わせた安定化剤の使用を含む。用語「選択的コンジュゲーション」は、本明細書に記載の細胞毒で選択的に還元された遺伝子操作された抗体のコンジュゲーションを意味することが理解される。この点に関して、選択された還元剤と組み合わせたこのような安定化剤の使用は、抗体重鎖および/または軽鎖の選択された部位におけるコンジュゲーションの程度ならびに調製物のDAR分布により決定される部位特異的コンジュゲーションの効率を顕著に改善し得る。適合する抗体構築物ならびに選択的コンジュゲーション技術および試薬は、その全体を本明細書に組み込むWO2015/031698

20

30

【0344】

特定の理論に制限されることは望まないが、このような安定化剤は、所望のコンジュゲーション部位で静電的微小環境を調節し、および/または立体配座変化を調節するように作用し得、それにより比較的穏やかな還元剤(無傷の天然のジスルフィド結合を実質的に還元しない)に、所望の遊離システイン部位でのコンジュゲーションを促進させる。このような物質(例えば、ある特定のアミノ酸)は、塩橋を(水素結合および静電相互作用を介して)形成することが知られており、好ましい構造変化を生じさせ得るおよび/または好ましくないタンパク質-タンパク質相互作用を減少させる安定化効果を付与するようにタンパク質-タンパク質相互作用を調節し得る。さらに、このような物質は、還元後の望ましくない分子内(および分子間)システイン-システイン結合の形成を阻害するように作用し得、したがって、改変された部位特異的システインが、薬物に(好ましくはリンカーを介して)結合する所望のコンジュゲーション反応が促進される。選択的還元条件は、無傷の天然のジスルフィド結合を顕著に還元しないので、後のコンジュゲーション反応は自然に、遊離システイン上の比較的反応性の少ないチオール(例えば、好ましくは抗体あたり2つの遊離チオール)に向かう。先に言及したように、このような技術は、本開示に従って作製されるコンジュゲート調製物における非特異的コンジュゲーションおよび対応する不純物のレベルを相当に減少させるために使用され得る。結果として、これらの部位特異的ADC組成物は、低い毒性を示し得る。

40

【0345】

50

選択された実施形態において、本発明に適合する安定化剤は、一般的に、塩基性 p K a を有する少なくとも 1 つの成分を有する化合物を含む。ある特定の実施形態において、この成分は、一級アミンを含むが、他の実施形態において、アミン部分は、二級アミンを含む。さらに他の実施形態において、アミン部分は、三級アミンまたはグアニジニウム基を含む。他の選択された実施形態において、アミン部分は、アミノ酸を含み、他の適合する実施形態において、アミン部分は、アミノ酸側鎖を含む。さらに他の実施形態において、アミン部分は、タンパク質性アミノ酸を含む。さらに他の実施形態において、アミン部分は、非タンパク質性アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、適合する安定化剤は、アルギニン、リシン、プロリンおよびシステインを含み得る。さらに適合安定化剤は、グアニジンおよび塩基性 p K a を有する窒素含有複素環を含み得る。

10

【0346】

ある特定の実施形態において、適合安定化剤は、約 7.5 より大きい p K a を有する少なくとも 1 つのアミン部分を有する化合物を含む。他の実施形態において、対象アミン部分は、約 8.0 より大きい p K a を有し、さらに他の実施形態において、アミン部分は、約 8.5 より大きい p K a を有し、さらに他の実施形態において、安定化剤は、約 9.0 より大きい p K a を有するアミン部分を含む。他の実施形態は、アミン部分が約 9.5 より大きい p K a を有する安定化剤を含み、一方で、ある特定の他の実施形態は、約 10.0 より大きい p K a を有する少なくとも 1 つのアミン部分を有する安定化剤を含む。さらに他の実施形態において、安定化剤は、約 10.5 より大きい p K a を有するアミン部分を有する化合物を含み、他の実施形態において、安定化剤は、約 11.0 より大きい p K a

20

【0347】

本開示の安定化剤は、ある特定の還元剤と組み合わせられるときに、遊離の部位特異的システインに対するコンジュゲーションの標的化において特に有効であることが示される。本発明の目的に関して、適合する還元剤は、改変抗体の天然ジスルフィド結合を顕著に破壊することなく、コンジュゲーションについて部位特異的な還元された遊離のシステインを生じさせる、任意の化合物を含み得る。好ましくは、このような選択された安定化剤と還元剤との組合せによりもたらされる条件下において、活性化薬物リンカーは、所望の遊離の部位特異的システイン部位に結合するよう大きく制限されることになる。比較的低濃度で使用され、穏やかな条件を与える比較的穏やかな還元剤または還元剤が、特に好ましい。本明細書で使用される場合、用語「穏やかな還元剤」または「穏やかな還元条件」は、改変抗体に存在する天然ジスルフィド結合を実質的に破壊することなく、遊離システイン部位でチオールを提供する還元剤により（任意選択的に安定化剤の存在下で）もたらされる任意の物質または条件を意味することが支持される。つまり、穏やかな還元剤または

30

40

【0348】

50

上記に示される選択的還元プロセスは、遊離のシステインに対する標的化コンジュゲーションで特に効果的であることが理解される。この点に関して、部位特異的抗体における、所望の標的部位に対するコンジュゲーションの程度（ここでは「コンジュゲーション効率」として定義する）は、当該技術分野で受け入れられている様々な技術により決定され得る。抗体に対する薬物の部位特異的コンジュゲーション効率は、全ての他のコンジュゲーション部位に対する標的コンジュゲーション部位（例えば、各軽鎖のc末端の遊離システイン）のコンジュゲーションのパーセンテージを評価することによって決定され得る。ある特定の実施形態において、本明細書における方法は、遊離システインを含む抗体に薬物を効率的にコンジュゲートすることを提供する。いくつかの実施形態において、コンジュゲーション効率は、全ての他のコンジュゲーション部位に対する標的コンジュゲーションのパーセンテージにより測定して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%またはそれ以上である。

10

20

30

40

50

【0349】

コンジュゲーション可能な改変抗体は、抗体が産生または保存されるときに、阻止またはキャップされるスルフヒドリル基を含む遊離システイン残基を含有し得ることがさらに理解される。このようなキャップとしては、小分子、タンパク質、ペプチド、イオンおよびスルフヒドリル基と相互作用し、コンジュゲート形成を予防または阻害する他の物質が挙げられる。いくつかの場合において、コンジュゲートしていない改変抗体は、同じまたは異なる抗体上の他の遊離システインに結合する遊離システインを含んでもよい。本明細書で述べられているように、このような交差反応性は、作製手順の間に様々な混入物を導き得る。いくつかの実施形態において、改変抗体は、コンジュゲーション反応の前にキャップ除去（uncap）されることを必要とし得る。特定の実施形態において、本明細書の抗体は、キャップ除去されており、コンジュゲーション可能な遊離スルフヒドリル基を提示する。特定の実施形態において、本明細書の抗体は、天然に存在するジスルフィド結合を破壊も再配列もしない、キャップ除去反応にかけられる。ほとんどの場合において、キャップ除去反応は通常の還元反応（還元または選択的還元）中に生じることが理解される。

【0350】

D・DAR分布および精製

選択された実施形態において、本発明に適合するコンジュゲーションおよび精製方法は、狭いDAR分布を含む比較的均質なADC調製物を生成する能力を有利にもたらし。この点に関して、本開示の構築物（例えば、部位特異的構築物）および/または選択的コンジュゲーションは、薬物と改変抗体との間の化学量論比の観点および毒素の位置に関して、試料内のADC種の均質性を提供する。上記で簡単に述べたように、用語「薬物対抗体比」または「DAR」は、抗体に対する薬物のモル比を指す。ある特定の実施形態において、コンジュゲート調製物は、そのDAR分布に関して実質的に均質であり得、このことは、ADC調製物の内で、特定のDAR（例えば、2または4のDAR）を有する部位特異的ADCが主要な種であり、この種はまた、ローディングの部位（すなわち、遊離システイン上）に関して均一であることを意味する。本発明の他のある特定の実施形態において、部位特異的抗体および/または選択的還元ならびにコンジュゲーションの使用を通じて、所望の均質性を達成することができる。他の実施形態において、所望の均質性は、選択的還元と組み合わせた部位特異的構築物の使用を通じて達成し得る。さらに他の実施形態において、適合する調製物は、所望の均質性を得るために分析的または分取クロマトグラフィー技術を使用してさらに精製され得る。これらの実施形態のそれぞれにおいて、ADC試料の均質性は、当該技術分野で公知の様々な技術、例えば、これらに限定されないが、質量分析、HPLC（例えば、サイズ排除HPLC、RP-HPLC、HIC-HPLCなど）またはキャピラリー電気泳動を使用して解析され得る。

【0351】

A D C調製物の精製に関して、所望の純度を得るために、標準的医薬調製方法が使用されることが理解される。本明細書において述べられているように、液体クロマトグラフィー方法、例えば、逆相(RP)クロマトグラフィーおよび疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)は、薬物負荷値により混合物中の化合物を分離することができる。一部の場合に、イオン交換(IEC)または混合モードクロマトグラフィー(MMC)を使用して、特異的薬物負荷を有する種を単離してもよい。

【0352】

本開示のA D Cおよびその調製物は、抗体の構成および少なくとも部分的にコンジュゲーションを達成するために使用される方法に依存して、様々な化学量論モル比の薬物部分および抗体成分を含むことができる。ある特定の実施形態において、A D Cあたりの薬物負荷は、1から20のワーヘッドを含み得る(すなわち、nは1~20である)。他の選択された実施形態は、1から15のワーヘッドの薬物負荷を有するA D Cを含む。さらに他の実施形態において、A D Cは、1から12のワーヘッド、またはより好ましくは1から10のワーヘッドを含み得る。いくつかの実施形態において、A D Cは、1から8のワーヘッドを含む。

10

【0353】

理論的薬物負荷は比較的高くてもよいが、遊離システイン交差反応性およびワーヘッド疎水性などの実際上の限定により、このようなD A Rを含む均質な調製物の生成は、凝集物および他の混入物により限定される傾向がある。つまり、高い薬物負荷、例えば、>6または8は、ペイロードによって、凝集、不溶性、毒性またはある特定の抗体薬物コンジュゲートの細胞透過性の消失を引き起こし得る。このような懸念の観点から、本発明により提供される実際の薬物負荷は、好ましくは、コンジュゲートあたり1から8個の薬物の範囲であり、すなわち各抗体に1、2、3、4、5、6、7または8個の薬物が共有結合している(例えば、I g G 1の場合には、他の抗体が、ジスルフィド結合の数に応じて異なる負荷許容量を有し得る)。好ましくは、本発明の組成物のD A Rは、およそ2、4または6であり、いくつかの実施形態において、D A Rはおよそ2である。

20

【0354】

本発明により提供される比較的高いレベルの均質性にかかわらず、本開示の組成物は、ある範囲の(例えば、I g G 1の場合は1から8の範囲の)薬物化合物を有するコンジュゲートの混合物を実際を含む。このように、本開示のA D C組成物は、コンジュゲートの混合物を含み、ここで構成要素の抗体のほとんどは、1つ以上の薬物部分に共有結合的に連結されており、(改変された構築物および選択的還元によりもたらされる相対的なコンジュゲート特異性にもかかわらず)、薬物部分は様々なチオール基により抗体に結合されていてもよい。つまり、以下の本発明のコンジュゲートA D C組成物は、様々な濃度の異なる薬物負荷(例えば、I g G 1抗体あたり1から8の薬物)を有するコンジュゲートの混合物を含む(遊離システインの交差反応性によって主に引き起こされる一定の反応混入物を含む)。しかしながら選択的還元および作製後の精製を使用して、コンジュゲート組成物は、単一の主要な所望のA D C種(例えば、2の薬物負荷を有する)を大量に含み、他のA D C種(例えば、1、4、6などの薬物負荷を有する)は比較的低レベルとなる点に導かれ得る。平均D A R値は、組成物全体(すなわち、全てのA D C種をまとめたもの)に対する薬物負荷の加重平均を表す。用いられる定量法の固有の不確実性と商業的状况において非優勢A D C種を完全に除去することの困難性により、許容可能なD A R値または特異度、平均値、範囲または分布として表されることが多い(すなわち、平均D A Rが2 + / - 0 . 5)。好ましくは、範囲内(すなわち、1 . 5から2 . 5)に測定された平均D A Rを含む組成物が、医薬的状况において使用される。

30

40

【0355】

したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、1、2、3、4、5、6、7または8でそれぞれ+ / - 0 . 5の平均D A Rを有する組成物を含む。他の実施形態において、本発明は、2、4、6または8 + / - 0 . 5の平均D A Rを含む。最終的に、選択さ

50

れた実施形態において、本発明は、 $2 + / - 0.5$ または $4 + / - 0.5$ の平均DARを含む。この範囲または偏差は、いくつかの実施形態において、 0.4 未満であり得ることが理解される。したがって、他の実施形態において、組成物は、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 もしくは 8 でそれぞれ $+ / - 0.3$ の平均DAR、 2 、 4 、 6 もしくは $8 + / - 0.3$ の平均DAR、さらにより好ましくは 2 もしくは $4 + / - 0.3$ の平均DAR、またはさらには $2 + / - 0.3$ の平均DARを含む。他の実施形態において、IgG1コンジュゲート組成物は、好ましくは、平均DARが 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 または 8 でそれぞれ $+ / - 0.4$ で、非優勢ADC種が比較的低いレベル（すなわち、 30% 未満）である組成物を含む。他の実施形態において、ADC組成物は、 2 、 4 、 6 または 8 でそれぞれ $+ / - 0.4$ の平均DARを含み、非優勢ADC種を比較的低いレベル（ $< 30\%$ ）で含む。いくつかの実施形態において、ADC組成物は、 $2 + / - 0.4$ の平均DARを含み、非優勢ADC種を比較的低いレベル（ $< 30\%$ ）で含む。さらに他の実施形態において、優勢ADC種（例えば、DARが 2 またはDARが 4 ）は、他のDAR種に対して測定するとき、 65% 超の濃度、 70% 超の濃度、 75% 超の濃度、 80% 超の濃度、 85% 超の濃度、 90% 超の濃度、 93% 超の濃度、 95% 超の濃度またはさらに 97% 超の濃度で存在する。

【0356】

当業者は、コンジュゲーション反応由来のADCの調製物における抗体あたりの薬物の分布は、従来手段、例えば、UV-Vis分光光度法、逆相HPLC、HIC、質量分析、ELISAおよび電気泳動法により性質決定され得ることを理解する。例として、抗体あたりの薬物の観点でADCの定量的分布も、HICおよびRPクロマトグラフィーの組合せを使用して決定され得る。同様に、ADCの特定の調製物における抗体あたりの薬物の平均値がELISAを使用して決定され得るが、抗体あたりの薬物の分布の値は、抗体-抗原結合および検出限界のため、容易には識別できない。さらに、ELISAアッセイは、薬物部分が抗体上に結合する場所に関する情報を提供しない。しかし、上で言及したように、このようなデータは、当該技術分野で周知の様々なクロマトグラフィーおよび電気泳動技術を用いて容易に得ることができる。

【0357】

VI. 診断およびスクリーニング

A. 診断

本発明は、増殖性障害を検出、診断またはモニタリングするためのインビトロおよびインビボの方法ならびに患者からの細胞をスクリーニングして、腫瘍形成性細胞を含む腫瘍細胞を同定するための方法を提供する。このような方法は、がんを有する個体を治療のために特定することまたはがんの進行をモニタリングする方法であって、DLL3決定因子を特異的に認識し、会合することができる検出剤（例えば、抗体または核酸プローブ）と、患者または患者から得られた試料とを、（インビボまたはインビトロのいずれかで）接触させることおよび試料における検出剤の存在もしくは不在または会合のレベルを検出することを含む、方法を含む。選択された実施形態において、検出剤は、本明細書に記載の検出可能な標識またはレポーター分子と会合した抗体を含む。特定の他の実施形態において、DLL3抗体は、投与され、二次標識抗体（例えば、抗マウス抗体）を用いて検出される。さらに他の実施形態（例えば、インサイチュハイブリダイゼーションまたはISH）において、ゲノムDLL3決定因子と反応する核酸プローブは、増殖性障害の検出、診断またはモニタリングに使用される。

【0358】

より一般的に、DLL3決定因子の存在および/またはレベルは、タンパク質または核酸解析のために当業者に利用可能ないくつかの任意の技術、例えば、直接的物理学的測定（例えば、質量分析）、結合アッセイ（例えば、イムノアッセイ、凝集アッセイおよびイムノクロマトグラフィーアッセイ）、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR、RT-PCR；RT-qPCR）技術、分枝鎖オリゴヌクレオチド技術、ノザンプロット技術、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション技術ならびにインサイチュハイブリダイゼーション技術

を使用して測定されてもよい。方法には、化学反応、例えば、光学的吸光度の変化、蛍光の変化、化学発光もしくは電気化学発光の生成、反射率、屈折率もしくは光散乱の変化、検出可能標識の蓄積もしくは表面からの放出、酸化もしくは還元もしくは酸化還元種、電流もしくは電位、磁場の变化などから生じるシグナルの測定を含んでもよい。適切な検出技術は、光発光（例えば、蛍光、時間分解蛍光、エバネッセント波蛍光、アップコンバート性リン、多光子蛍光の測定を介して）、化学発光、電気化学発光、光散乱、光吸収、放射能、磁場、酵素活性（例えば、光吸収もしくは蛍光の変化を生じさせるまたは化学発光の放射を生じさせる酵素反応を通じた酵素活性の測定による）を介した標識の測定を通じて、標識された結合試薬の参加を測定することにより、結合事象を検出してよい。代替的に、標識の使用を必要としない検出技術、例えば、質量（例えば、表面弾性波測定）、屈折率（例えば、表面プラズモン共鳴測定）または分析物の固有の発光の測定に基づく技術を使用してよい。

10

【0359】

いくつかの実施形態において、検出剤と試料中の特定の細胞または細胞成分との会合は、試料が腫瘍形成性細胞を含む可能性があることを示しており、したがって、がんを有する個体を本明細書に記載の抗体またはADCを用いて効果的に治療し得ることを示している。

【0360】

ある特定の好ましい実施形態において、アッセイには、免疫組織化学（IHC）アッセイもしくはこの変形（例えば、蛍光、色素生産性、標準ABC、標準LSABなど）、免疫細胞化学もしくはこの変形（例えば、直接、間接、蛍光、色素生産性など）またはインサイチュハイブリダイゼーション（ISH）もしくはこの変形（例えば、色素生産性インサイチュハイブリダイゼーション（CISH）もしくは蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（DNA-FISHまたはRNA-FISH））が含まれてもよい。

20

【0361】

この点に関して、本発明のある特定の態様は、免疫組織化学（IHC）のための標識されたDLL3抗体の使用を含む。他の実施形態において、DLL3抗体は、二次標識抗体を用いて検出される。より詳細にはDLL3 IHCは、様々な増殖性障害の診断を補助するためおよびDLL3抗体療法を含む治療に対する潜在的な応答をモニタリングするための診断ツールとして使用され得る。本明細書で議論するようにおよび下記実施例において示されるように、適合する診断アッセイは、化学的に固定された（適合技術としては、これらに限定されないが、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド（gluteraldehyde）、四酸化オスミウム、重クロム酸カリウム、酢酸、アルコール、亜鉛塩、塩化第二水銀、四酸化クロムおよびピクリン酸が挙げられる）ならびに包埋された（適合技術としては、これらに限定されないが、グリコールメタクリレート、パラフィンおよび樹脂が挙げられる）または凍結を介して保存された組織に対して実施され得る。このようなアッセイは、治療の決定に対する道筋を立て、投与レジメンおよびタイミングを決定するために使用され得る。

30

【0362】

下記実施例において示されるように、免疫組織化学技術を用いて、当該技術分野で公知のHスコアを得ることができる。このようなHスコアは、どの患者が本発明の組成物による治療に適し得るかを示すために用いることができる。下記実施例に基づいて、300ポイントスケール上の約90、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190もしくは約200またはそれ以上のHスコアを、どの患者が本発明の治療方法に好ましく反応し得るかを示すために、選択された実施形態において、用いることができる。したがって、一実施形態において、本発明のDLL3 ADCにより治療される患者は、300ポイントスケール上の少なくとも90のHスコア（すなわち、腫瘍がDLL3+）を有する。他の実施形態において、本発明のDLL3 ADCにより治療される患者は、少なくとも120のHスコアを有する。さらに他の実施形態において、本発明のDLL3 ADCにより治療される患者は、少なくとも

40

50

180のHスコアを有する。本開示の目的のために300ポイントスケール上の90またはそれ以上のHスコアを示す任意の腫瘍は、DLL3+腫瘍とみなされ、本開示の抗体またはADCによる治療の対象となる。

【0363】

他の実施形態において、患者の選択は、腫瘍試料中の陽性染色DLL3細胞のパーセンテージのより単純な測定に基づき得る。この点に関して、抗DLL3抗体を用いて調査した場合にIHC試料中の特定のパーセンテージの陽性染色細胞を示す患者は、DLL3+とみなされ、本明細書における教示に従って治療に選択される。このような実施形態において、10%超、20%超、30%超、40%超または50%超の陽性細胞染色を示す腫瘍試料は、DLL3+と分類することができる。他の実施形態において、60%超、70%超、80%超、90%超または95%超の陽性細胞染色を示す腫瘍試料は、DLL3+と分類することができる。特定の好ましい態様において、DLL3+腫瘍は、構成細胞の50%においてDLL3を発現する。前述の実施形態のそれぞれにおいて、DLL3+陽性腫瘍に罹患している患者は、本明細書で示す本開示の組成物により治療され得る。

10

【0364】

他の特に適合する本発明の態様は、DLL3決定因子を検出またはモニタリングするためのインサイチュハイブリダイゼーションの使用を含む。インサイチュハイブリダイゼーション技術またはISHは、当業者にとって周知である。簡潔には、細胞を固定し、特定のヌクレオチド配列を含有する検出可能なプローブを固定した細胞に加える。細胞が相補的ヌクレオチド配列を含有する場合には、検出され得るプローブは、それらの配列にハイブリダイズする。本明細書に示す配列情報を使用して、遺伝子型DLL3決定因子を発現する細胞を特定するようにプローブを設計することができる。プローブは、好ましくは、そのような決定因子に対応するヌクレオチド配列にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション条件は、不完全な相補的ハイブリダイゼーションによるバックグラウンドシグナルを最小化するように慣用的に最適化することができるが、好ましくは、プローブは、選択されたDLL3決定因子に完全に相補的であることが好ましい。選択された実施形態において、プローブは、プローブに付された蛍光色素で標識されており、つまり標準的蛍光方法により容易に検出可能である。

20

【0365】

インビボの診断治療または診断に適合するアッセイには、当業者に公知の磁気共鳴画像、コンピュータ断層撮影（例えば、CATスキャン）、陽電子放射断層撮影（例えば、PETスキャン）、X線撮影、超音波のような当該分野で認識されている画像化またはモニタリング技術を含めてもよい。

30

【0366】

ある特定の実施形態において、本発明の抗体は、患者試料（例えば、血漿または血液）中の特定の決定因子（例えば、DLL3タンパク質）のレベルを検出および定量するために使用することができ、同様に、関連する決定因子が関与する増殖性障害を検出、診断またはモニタリングするために使用することができる。関連する実施形態において、本発明の抗体は、循環腫瘍細胞をインビボまたはインビトロのいずれかで検出、モニタリングおよび/または定量するために使用され得る（WO2012/0128801）。さらに他の実施形態において、循環腫瘍細胞は、腫瘍形成性細胞を含み得る。

40

【0367】

本発明のある特定の実施形態において、対象または対象由来の試料における腫瘍形成性細胞は、治療またはレジメンのベースラインが確立される前に、本開示の抗体を使用して評価または性質決定され得る。他の例において、腫瘍形成性細胞は、治療された対象から誘導される試料から評価され得る。

【0368】

別の実施形態において、本発明は、がんの進行および/または病因をインビボで分析する方法を提供する。別の実施形態において、がんの進行および/または病因のインビボでの解析は、腫瘍の進行の程度を決定することを含む。別の実施形態において、解析は、腫

50

瘍の同定を含む。別の実施形態において、腫瘍の進行の解析が、原発性腫瘍に対して行われる。別の実施形態において、解析は、当業者にとって公知のように、がんの種類に応じて経時的に行われる。別の実施形態において、原発性腫瘍の転移性細胞に起因する二次性腫瘍の解析が、さらにインピボで行われる。別の実施形態において、二次性腫瘍の大きさと形状が解析される。いくつかの実施形態において、さらにエクスピボの解析が行われる。

【0369】

別の実施形態において、本発明は、がんの進行および/または病因をインピボで解析する方法であって、細胞の転移を決定することまたは循環腫瘍細胞のレベルを検出することおよび定量することを含む方法を提供する。さらに別の実施形態において、細胞転移の解析は原発性腫瘍から不連続の部位において、細胞の進行性成長を測定することを含む。いくつかの実施形態において、手法は、血管、リンパ、体腔内またはそれらの組合せを通じて分散する腫瘍細胞をモニタリングするために行うことができる。別の実施形態において、細胞転移解析は、細胞遊走、播種、血管外漏出、増殖またはそれらの組合せの結果として行われる。

10

【0370】

ある特定の例において、対象または対象由来の試料における腫瘍形成性細胞は、治療の前にベースラインを確立するために、本開示の抗体を使用して評価または性質決定されてもよい。他の例において、試料は、治療された対象から誘導される。いくつかの例において、試料は、対象が治療を開始または終了してから少なくとも約1、2、4、6、7、8、10、12、14、15、16、18、20、30、60、90日、6カ月、9カ月、12カ月または12カ月よりも後の対象から得られる。ある特定の実施例において、腫瘍形成性細胞は、一定数の投与の後（例えば、治療の2、5、10、20、30回以上の投与の後）に、評価または性質決定される。他の例において、腫瘍形成性細胞は、1回以上の治療を受けてから1週、2週、1カ月、2カ月、1年、2年、3年、4年以上後に、性質決定または評価される。

20

【0371】

B. スクリーニング

ある特定の実施形態において、本発明の抗体は、決定因子との相互作用により腫瘍細胞の機能または活性を変化させる化合物または作用因子（例えば、抗体またはADC）を同定するために、試料のスクリーニングに使用することができる。一実施形態において、腫瘍細胞は、抗体またはADCと接触させられ、この抗体またはADCは、ある特定の標的（例えばDLL3）を発現する細胞について腫瘍をスクリーニングするために使用され、このような細胞を例えば限定されないが診断目的などの目的のために同定すること、このような細胞をモニタリングして治療の有効性を決定することまたはこのような標的発現細胞のための細胞集団を濃縮することができる。

30

【0372】

さらに別の実施形態において、方法は、腫瘍細胞を試験薬剤または化合物に直接的または間接的に接触させることと、試験薬剤または化合物が、決定因子会合腫瘍細胞の活性または機能を調節するかどうか、例えば、細胞の形態または生存性の変化、マーカーの発現、分化または脱分化、細胞の呼吸作用、ミトコンドリア活性、膜完全性、成熟性、増殖性、生存性、アポトーシスまたは細胞死を調節するかどうかを決定することを含む。直接的相互作用の一例は物理的相互作用であり、一方で、間接的相互作用としては、例えば、参照実体（例えば、細胞または細胞培養物）に順に作用する中間的分子に対する組成物の作用が挙げられる。

40

【0373】

スクリーニング方法は、ハイスループットスクリーニングを含み、この方法は、例えば、培養皿、チューブ、フラスコ、ローラボトルまたはプレート上に、任意選択的に所定の位置において、配置されたまたは置かれた細胞のアレイ（例えば、マイクロアレイ）を含み得る。ハイスループットのロボットまたは手作業による方法は、化学的相互作用を調べ

50

、短期間に多くの遺伝子の発現レベルを決定することができる。分子シグナルを利用する、例えば、フルオロフォアまたはマイクロアレイを介する技術 (Mocellini and Rossi, 2007, PMID: 17265713) が開発され、さらに情報を非常に迅速に処理する解析 (例えば、Pinhasovら, 2004, PMID: 15032660 参照) が自動化されてきた。スクリーニングされ得るライブラリは、例えば、小分子ライブラリ、ファージディスプレイライブラリ、全ヒト抗体酵母ディスプレイライブラリ (Adimab)、siRNAライブラリおよびアデノウイルストランスフェクションベクターを含む。

【0374】

VII. 医薬調製物および治療的使用

A. 製剤および投与経路

本発明の抗体またはADCは、当該技術分野で認識されている技術を使用して様々な方法で製剤化され得る。いくつかの実施形態において、本発明の治療組成物は、そのまままたは最小量の付加的成分と共に投与することができ、他方で任意選択的に適切な医薬として許容される担体を含むように製剤化してもよい。本明細書で使用される場合、「医薬として許容される担体」は、当該技術分野で周知であり、医薬調製物で使用するために商業的供給源から入手可能である、賦形剤、ビヒクル、アジュバントおよび希釈剤を含む (例えば、Gennaro (2003) Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drug Facts Plus, 第20版、Mack Publishing; Anselら (2004) Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第7版、Lippencott Williams and Wilkins; Kibbeら (2000) Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版、Pharmaceutical Pressを参照)。

【0375】

適切な医薬として許容される担体は、比較的不活性である物質を含み、抗体またはADCの投与を容易にすることができるかまたは活性化を作用部位に送達するために医薬として最適化された調製物に処理することを補助し得る。

【0376】

このような医薬として許容される担体は、製剤の形態、一貫性、粘度、pH、張度、安定性、浸透圧、薬物動態、タンパク質凝集または溶解度を変えることができる薬剤を含み、緩衝剤、湿潤剤、乳化剤、希釈剤、カプセル剤および皮膚浸透促進剤を含む。担体のある特定の非限定的例は、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、アルギニン、シヨ糖、水、グリセロール、エタノール、ソルビトール、デキストラン、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよびこれらの組合せを含む。全身投与のための抗体は、経腸的、非経口的または局所的投与のために製剤化され得る。特定の実施形態において、本開示の組成物は、静脈内投与用に製剤化され、好ましくはIV容器 (例えば、IV点滴バッグ) を用いて注入される。実際、3種類の製剤全てが、活性成分の全身投与を達成するために同時に使用され得る。非経口的および経口的薬物送達のための賦形剤および製剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) 第20版、Mack Publishingに示されている。

【0377】

経腸投与のために適切な製剤は、硬または軟ゼラチンカプセル剤、丸剤、錠剤、例えば、被覆錠剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップまたは吸入剤およびこれらの制御放出形態を含む。

【0378】

非経口投与 (例えば、注射または注入による) に適切な製剤としては、活性成分が、溶解、懸濁化または他の方法で (例えば、リポソームまたは他の微小粒子系で) 提供される水性または非水性、等張性、発熱物質不含、滅菌液 (例えば、溶液、懸濁液) が挙げられ

10

20

30

40

50

る。このような液体は、他の医薬として許容される抗体、例えば、抗酸化剤、緩衝剤、保存剤、安定化剤、静菌剤、懸濁化剤、増粘剤および製剤を対象とするレシピエントの血液（または他の関連する体液）と等張にする溶質をさらに含んでもよい。賦形剤の例としては、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセロール、植物油などが挙げられる。このような製剤に使用するための適切な等張の医薬として許容される担体の例は、塩化ナトリウム注射剤、リンゲル液または乳酸リンゲル注射剤を含む。

【0379】

特に好ましい実施形態において、本発明の製剤化された組成物は、凍結乾燥して、投与前に再構成することができる粉末形態の抗体またはADCを提供することができる。注射用溶液の調製のための滅菌粉末は、有効成分を任意選択の共可溶化生体適合性成分と共に含む粉末を生成するために本開示の抗体またはADCを含む溶液を凍結乾燥することによって得ることができる。一般的に、分散体または溶液は、塩基性分散媒または溶媒（例えば、希釈剤）および任意選択的に他の生体適合性成分を含む滅菌媒体に活性化化合物を混入することによって調製される。適合する希釈剤は、医薬として許容されるもの（ヒトへの投与のために安全で、非毒性である）であり、凍結乾燥後に再構成される製剤のような、液体製剤の調製に有用である。例示的希釈剤は、滅菌水、注射用静菌水（BWF I）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩液、リンゲル液またはデキストロス溶液を含む。代替的な実施形態において、希釈剤は、塩および/または緩衝剤の水溶液を含み得る。

【0380】

特定の好ましい実施形態において、抗DLL3抗体またはADCは、医薬として許容される糖と組み合わせて凍結乾燥される。「医薬として許容される糖」は、目的のタンパク質と組み合わせた場合、保存時のタンパク質の化学的および/または物理的不安定性を著しく予防するまたは減少させる分子である。このような糖は、製剤が凍結乾燥され、次いで再構成されることが意図される場合、とりわけ適合する。本明細書で使用される場合、医薬として許容される糖は、「乾燥保護剤（lyoprotectant）」と称することもできる。例示的糖およびそれらの対応する糖アルコールは、グルタミン酸ナトリウムまたはヒスチジンのようなアミノ酸；ベタインのようなメチルアミン；硫酸マグネシウムのようなリオトロピック塩；三価またはより高い分子量の糖アルコール、例えば、グリセリン、デキストラン、エリスリトール、グリセロール、アラビトール、キシリトール、ソルビトールおよびマンニトールのようなポリオール；プロピレングリコール；ポリエチレングリコール；PLURONICS（登録商標）；ならびにそれらの組合せを含む。さらなる例示的乾燥保護剤は、グリセリンおよびゼラチンならびに糖メリビオース、メレジトース、ラフィノース、マンノトリオースおよびスタキオースを含む。還元糖の例は、グルコース、マルトース、ラクトース、マルツロース、イソマルツロースおよびラクツロースを含む。非還元糖の例は、糖アルコールおよび他の直鎖ポリアルコールから選択されるポリヒドロキシ化合物の非還元グリコシドを含む。好ましい糖アルコールは、モノグリコシド、とりわけ、ラクトース、マルトース、ラクツロースおよびマルツロースのような二糖の還元により得られる化合物である。グリコシド側基は、グルコシド側基またはガラクトシド側基であり得る。糖アルコールのさらなる例は、グルシトール、マルチトール、ラクチトールおよびイソマルツロースである。好ましい医薬として許容される糖は、非還元糖トレハロースまたはショ糖である。医薬として許容される糖は、タンパク質が保存中の物理的および化学的安定性および完全性を本質的に保持する（例えば、再構成および保存後）ことを意味する「保護量」（例えば、凍結乾燥前）で製剤に添加される。

【0381】

当業者は、適合乾燥保護剤は、約1 mMから約1000 mM、約25 mMから約750 mM、約50 mMから約500 mM、約100 mMから約300 mM、約125 mMから約250 mM、約150 mMから約200 mMまたは約165 mMから約185 mMの範囲の濃度で液体または凍結乾燥製剤に添加することができることを理解する。特定の実施形態において、乾燥保護剤は、約10 mM、約25 mM、約50 mM、約75 mM、約1

0 0 m M、約 1 2 5 m M、約 1 3 0 m M、約 1 4 0 m M、約 1 5 0 m M、約 1 6 0 m M、
1 6 5 m M、約 1 7 0 m M、1 7 5 m M、約 1 8 0 m M、約 1 8 5 m M、約 1 9 0 m M、
約 2 0 0 m M、約 2 2 5 m M、約 2 5 0 m M、約 3 0 0 m M、約 4 0 0 m M、約 5 0 0 m
M、約 6 0 0 m M、約 7 0 0 m M、約 8 0 0 m M、約 9 0 0 m M または約 1 0 0 0 m M の
濃度となるように添加することができる。特定の好ましい実施形態において、乾燥保護剤
は、医薬として許容される糖を含み得る。とりわけ好ましい態様において、医薬として許
容される糖は、トレハロースまたはショ糖を含む。

【0382】

他の選択された実施形態において、本発明の液体および凍結乾燥製剤は、安定化剤また
は緩衝剤として作用する、アミノ酸またはそれらの医薬として許容される塩を含む、特定
の化合物を含み得る。このような化合物は、約 1 m M から約 1 0 0 m M、約 5 m M から約
7 5 m M、約 5 m M から約 5 0 m M、約 1 0 m M から約 3 0 m M または約 1 5 m M から約
2 5 m M の範囲の濃度で添加することができる。特定の実施形態において、緩衝剤は、約
1 m M、約 5 m M、約 1 0 m M、約 1 5 m M、約 2 0 m M、約 2 5 m M、約 3 0 m M、約
3 5 m M、約 4 0 m M、約 5 0 m M、約 6 0 m M、約 7 0 m M、約 8 0 m M、約 9 0 m M
または約 1 0 0 m M の濃度となるように添加することができる。他の選択された実施形態
において、緩衝剤は、約 5 m M、約 1 0 m M、約 1 5 m M、約 2 0 m M、約 2 5 m M、約
3 0 m M、約 3 5 m M、約 4 0 m M、約 5 0 m M、約 6 0 m M、約 7 0 m M、約 8 0 m M
、約 9 0 m M または約 1 0 0 m M の濃度となるように添加することができる。特定の好ま
しい実施形態において、緩衝剤は、ヒスチジン塩酸塩（例えば、L - ヒスチジン H C L ）
を含む。

10

20

【0383】

さらに他の選択された実施形態において、本発明の液体および凍結乾燥製剤は、安定化
剤としてのポリソルベート 2 0、ポリソルベート 4 0、ポリソルベート 6 0 またはポリソ
ルベート 8 0 のような非イオン性界面活性剤を含み得る。このような化合物は、約 0 . 1
m g / m l から約 2 . 0 m g / m l、約 0 . 1 m g / m l から約 1 . 0 m g / m l、約 0
. 2 m g / m l から約 0 . 8 m g / m l、約 0 . 2 m g / m l から約 0 . 6 m g / m l m
または約 0 . 3 m g / m l から約 0 . 5 m g / m l の範囲の濃度で添加することができる
。特定の実施形態において、界面活性剤は、約 0 . 1 m g / m l、約 0 . 2 m g / m l、
約 0 . 3 m g / m l、約 0 . 4 m g / m l、約 0 . 5 m g / m l、約 0 . 6 m g / m l、
約 0 . 7 m g / m l、約 0 . 8 m g / m l、約 0 . 9 m g / m l または約 1 . 0 m g / m
l の濃度となるように添加することができる。他の選択された実施形態において、界面活
性剤は、約 1 . 1 m g / m l、約 1 . 2 m g / m l、約 1 . 3 m g / m l、約 1 . 4 m g
/ m l、約 1 . 5 m g / m l、約 1 . 6 m g / m l、約 1 . 7 m g / m l、約 1 . 8 m g
/ m l、約 1 . 9 m g / m l または約 2 . 0 m g / m l の濃度となるように添加すること
ができる。特定の好ましい実施形態において、界面活性剤は、ポリソルベート 2 0 または
ポリソルベート 4 0 を含む。とりわけ好ましい態様において、界面活性剤は、ポリソルベ
ート 2 0 を含む。

30

【0384】

凍結乾燥粉末から再構成されたか未処理の溶液かにかかわらず、非経口投与（例えば、
静脈内注射）用の本開示の抗体または A D C の適合する製剤は、約 1 0 μ g / m L から約
1 0 0 m g / m L の A D C または抗体濃度を含み得る。特定の選択された実施形態におい
て、抗体または A D C 濃度は、2 0 μ g / m L、4 0 μ g / m L、6 0 μ g / m L、8 0
 μ g / m L、1 0 0 μ g / m L、2 0 0 μ g / m L、3 0 0 μ g / m L、4 0 0 μ g / m
L、5 0 0 μ g / m L、6 0 0 μ g / m L、7 0 0 μ g / m L、8 0 0 μ g / m L、9 0
0 μ g / m L または 1 m g / m L を含む。他の実施形態において、A D C 濃度は、2 m g
/ m L、3 m g / m L、4 m g / m L、5 m g / m L、6 m g / m L、8 m g / m L、1
0 m g / m L、1 2 m g / m L、1 4 m g / m L、1 6 m g / m L、1 8 m g / m L、2
0 m g / m L、2 5 m g / m L、3 0 m g / m L、3 5 m g / m L、4 0 m g / m L、4
5 m g / m L、5 0 m g / m L、6 0 m g / m L、7 0 m g / m L、8 0 m g / m L、9

40

50

0 mg/mL または 100 mg/mL を含む。

【0385】

特定の好ましい態様において、本発明の組成物は、10 mg/mL の D L L 3 A D C (例えば、h S C 1 6 . 5 6 D L 1、h S C 1 6 . 5 6 s s 1 D L 6 など)、20 mM のヒスチジン塩酸塩、0 . 1 7 5 M のショ糖、p H 6 . 0 の 0 . 4 mg/mL のポリソルベート 20 を含む液体製剤を含む。一態様において、本発明の組成物は、10 mg/mL の h S C 1 6 . 5 6 D L 1 (すなわち、R o v a - T)、20 mM のヒスチジン塩酸塩、0 . 1 7 5 M のショ糖、p H 6 . 0 の 0 . 4 mg/mL のポリソルベート 20 を含む。別の態様において、本発明の組成物は、10 mg/mL の h S C 1 6 . 5 6 s s 1 D L 6、20 mM のヒスチジン塩酸塩、0 . 1 7 5 M のショ糖、p H 6 . 0 の 0 . 4 mg/mL のポリソルベート 20 を含む。本明細書で議論されるようにおよび下記実施例において示されるように、このような液体製剤は、凍結乾燥して、使用前に医薬として適合の (例えば、水性) 担体を用いて再構成することができる粉末状組成物を提供することができる。液体溶液である場合、このような組成物は、好ましくは - 7 0 で、遮光して保存すべきである。凍結乾燥した場合、D L L 3 A D C 粉末状製剤は、好ましくは 2 - 8 で、遮光して保存すべきである。前述の溶液または粉末のそれぞれは、好ましくは滅菌ガラスバイアル (例えば、U S P T y p e I 1 0 m l) に入れられ、規定の容積 (例えば、3 または 5 mL) の 1 0 mg/mL の D L L 3 A D C (未処理または再構成溶液) を一貫して供給するように構成することができる。

10

【0386】

凍結乾燥粉末から再構成したか否かにかかわらず、液体 D L L 3 A D C 製剤 (例えば、直上に示した) は、投与前にさらに希釈する (好ましくは水性担体中) ことができる。例えば、前述の液体製剤は、投与のための所望の用量レベルを達成するために、0 . 9 % 塩化ナトリウム注射剤、U S P または同等物 (必要な変更を加えた) を含む注入バッグ中にさらに希釈することができる。特定の態様において、十分に希釈された D L L 3 A D C 溶液は、I V 装置を用いて静脈内注入により投与される。好ましくは、投与される D L L 3 A D C 薬物溶液 (静脈内 (I V) 注入または注射にかかわらず) は、透明、無色および可視粒子状物質不含有である。

20

【0387】

より一般的には、本発明の化合物および組成物は、インピボで、それを必要とする対象に、様々な経路、例えば、これらに限定されないが、経口、静脈内、動脈内、皮下、非経口的、鼻腔内、筋肉内、心臓内、脳室内、気管内、パッカル、直腸、腹腔内、皮内、局所、経皮およびくも膜下内、またはそれ以外に移植もしくは吸入により投与され得る。本組成物は、固体、半固体、液体または気体形態の調製物に製剤化することができ、例えば、これらに限定されないが、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏、溶液、坐剤、浣腸剤、注射剤、吸入剤およびエアロゾルが挙げられる。適切な製剤および投与経路は、意図する適用および治療レジメンにより選択され得る。

30

【0388】

B . 投与量および投与レジメン

特定の投与レジメン、すなわち、用量、タイミングおよび反復は、個々の対象ならびに実験的検討事項、例えば、薬物動態 (例えば、半減期、クリアランス速度など) に依存する。投与の頻度の決定は、当業者、例えば、担当医により、状態および治療される状態の重症度、治療される対象の年齢および全体的健康状態などの検討事項に基づいて行われ得る。投与の頻度は、選択した組成物の効能および投与レジメンの評価に基づいて治療の過程を通じて調整され得る。このような評価は、特異的な疾患、障害もしくは状態のマーカ―または個体のウェルビーイング (生活の質評価、日常生活の活動などを用いて測定される) の評価に基づいて行われ得る。個体のがんを有する実施形態において、評価は、触診または視覚的観察を介した腫瘍サイズの直接的測定、X 線または他の画像化技術による腫瘍サイズの間接的測定、直接的な腫瘍生検によって評価される改善および腫瘍試料の顕微鏡検査、間接的な腫瘍マーカ― (例えば、前立腺がんに対する P S A) または本明細書に

40

50

記載の方法により特定された抗原、増殖性または腫瘍形成性細胞の数の減少、このような新生細胞の減少の維持、新生細胞の増殖の減少または転移の発生の遅延の測定を含む。

【0389】

本発明のDLL3 ADCは、様々な範囲で投与され得る。これらの範囲としては、1用量あたり約5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から約100 mg/kg 体重、1用量あたり約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から約5 mg/kg 体重、1用量あたり約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から約10 mg/kg 体重が挙げられる。他の範囲としては、1用量あたり約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から約20 mg/kg 体重および1用量あたり約0.5 mg/kg 体重から約20 mg/kg 体重が挙げられる。特定の実施形態において、投与量は、少なくとも約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、少なくとも約250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、少なくとも約750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、少なくとも約3 mg/kg 体重、少なくとも約5 mg/kg 体重、少なくとも約10 mg/kg 体重である。

10

【0390】

選択された実施形態において、DLL3抗体またはADCは、1用量あたりおよそ5、10、20、30、40、50、60、70、80、90または100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重で（好ましくは静脈内に）投与される。他の実施形態は、1用量あたり約200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900または2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重での抗体またはADCの投与を含む。他の実施形態において、本開示のコンジュゲートは、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、9または10 mg/kg で投与される。さらに他の実施形態において、コンジュゲートは、1用量あたり12、14、16、18または20 mg/kg 体重で投与され得る。さらに他の実施形態において、コンジュゲートは、1用量あたり25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90または100 mg/kg 体重で投与され得る。本明細書の教示を用い、当業者は、前臨床動物研究、臨床観察ならびに標準的な医学および生化学的技術および測定に基づいて、様々なDLL3抗体またはADCのための適切な投与量を容易に決定することができる。

20

【0391】

他の投与レジメンは、U.S.P.N. 7,744,877に開示されているような体表面積(BSA)計算に基づき、予測され得る。周知のように、BSAは、患者の身長および体重を使用して計算され、彼または彼女の身体の表面積によって表される対象の大きさの尺度を提供する。ある特定の実施形態において、コンジュゲートは、1 mg/m^2 から800 mg/m^2 、50 mg/m^2 から500 mg/m^2 の投与量および100 mg/m^2 、150 mg/m^2 、200 mg/m^2 、250 mg/m^2 、300 mg/m^2 、350 mg/m^2 、400 mg/m^2 または450 mg/m^2 の投与量で投与され得る。当該分野で認識されているまたは実験技術が適切な投与量を決定するために使用され得ることも理解される。

30

【0392】

他の実施形態において、抗DLL3抗体またはADCは、特別なスケジュールで投与されてもよい。一般に、DLL3コンジュゲートの有効量は、対象に1回以上投与される。より詳細には、抗体またはADCの有効量は、対象に、1週間に1回、2週間毎に1回、3週間毎に1回、1カ月に1回または1カ月に1回未満投与される。ある特定の実施形態において、DLL3抗体またはADCの有効量は、複数回、例えば少なくとも1カ月、少なくとも6カ月、少なくとも1年、少なくとも2年または数年間投与され得る。さらに他の実施形態において、数日(2、3、4、5、6もしくは7日)、数週間(1、2、3、4、5、6、7もしくは8週間)または数カ月間(1、2、3、4、5、6、7もしくは8カ月間)またさらには1もしくは数年間、本開示の抗体またはADCの投与間に経過し得る。

40

【0393】

50

いくつかの実施形態において、コンジュゲート抗体を含む治療の過程は、数週間または数力月の期間にわたり、選択された薬物製品を複数回投与すること（サイクル）を含む。より詳細には、本発明の抗体またはADCは、1日毎に1回、2日毎に1回、4日毎に1回、1週間毎に1回、10日毎に1回、2週間毎に1回、3週間毎に1回、4週間毎に1回、5週間毎に1回、6週間毎に1回、8週間毎に1回、10週間毎に1回または12週間毎に1回投与され得る。これに関して、患者の応答および診療に基づき、投与量を変化させてもよく、投与間隔を調整してもよいことが理解される。本発明には、不連続投与または数回の部分投与に分割された1日用量も包含される。本発明の組成物および抗がん剤は、交互に、隔日または隔週で投与されてもよくまたは一連の抗体治療を行って、この後に1つ以上の抗がん剤治療による治療を行ってもよい。いずれにしても、当業者であれば理解するように、化学療法剤の適切な用量は、一般に、化学療法剤が単独でまたは他の化学療法剤との併用で投与される臨床治療において既に採用されている用量程度である。

10

【0394】

特定の実施形態において、本発明は、がんの治療に用いる抗DLL3抗体薬物コンジュゲートを提供するものであって、治療は、抗DLL3抗体薬物コンジュゲート（DLL3 ADC）の有効量を1週間毎（QW）に少なくとも1回、2週間毎（Q2W）に少なくとも1回、3週間毎（Q3W）に少なくとも1回、4週間毎（Q4W）に少なくとも1回、5週間毎（Q5W）に少なくとも1回、6週間毎（Q6W）に少なくとも1回、7週間毎（Q7W）に少なくとも1回、8週間毎（Q8W）に少なくとも1回、9週間毎（Q9W）に少なくとも1回または10週間毎（Q10W）に少なくとも1回投与することを含み得る。選択された実施形態において、DLL3 ADCは、3週間毎（Q3W）に少なくとも1回、4週間毎（Q4W）に少なくとも1回、5週間毎（Q5W）に少なくとも1回または6週間毎（Q6W）に少なくとも1回投与される。特定の他の実施形態において、DLL3 ADCは、7週間毎（Q7W）に少なくとも1回、8週間毎（Q8W）に少なくとも1回、9週間毎（Q9W）に少なくとも1回または10週間毎（Q10W）に少なくとも1回投与される。他の選択された実施形態において、DLL3 ADCは、約0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kgまたは0.8 mg/kgの用量で投与される。特定の実施形態は、DLL3 ADCの単回投与により患者を治療することを含む。さらに他の実施形態は、規定の間隔（すなわち、Q2W、Q3W、Q4W、Q5W、Q6Wなど）で2サイクル（x2）、3サイクル（x3）、4サイクル（x4）、5サイクル（x5）、6サイクル（x6）、7サイクル（x7）、8サイクル（x8）、9サイクル（x9）または10サイクル（x10）患者を治療することを含む。本発明の他の態様は、患者の反応および任意の毒性によって限定されないサイクル数でDLL3 ADCを投与することを含む。他の実施形態において、初期DLL3 ADC治療（xサイクルの）を完了させることができ、がんが進行の徴候を示すまでさらなるDLL3 ADC治療は、行われぬ（進行時治療）。さらに他の実施形態において、初期DLL3 ADC治療（xサイクルの）を完了させることができ、次いで患者を維持療法（例えば、無期限に0.1 mg/kg DLL3 ADC Q6W）のもとにおく。

20

30

【0395】

本発明に適合する例示的投与レジメンを以下の表3に示す。以下でより詳細に議論するように、本開示の例示的投与レジメンは、単剤としてまたは他の治療剤もしくはがん治療（例えば、手術もしくはビーム照射）と併用してDLL3 ADCを用いることと適合することに注意されたい。

40

【0396】

【表 3】

表3

0.05 mg/kg Q1Wx2	0.05 mg/kg Q1Wx3	0.05 mg/kg Q1Wx4	0.05 mg/kg Q1Wx5	0.05 mg/kg Q1Wx6
0.05 mg/kg Q2Wx2	0.05 mg/kg Q2Wx3	0.05 mg/kg Q2Wx4	0.05 mg/kg Q2Wx5	0.05 mg/kg Q2Wx6
0.05 mg/kg Q3Wx2	0.05 mg/kg Q3Wx3	0.05 mg/kg Q3Wx4	0.05 mg/kg Q3Wx5	0.05 mg/kg Q3Wx6
0.05 mg/kg Q4Wx2	0.05 mg/kg Q4Wx3	0.05 mg/kg Q4Wx4	0.05 mg/kg Q4Wx5	0.05 mg/kg Q4Wx6
0.05 mg/kg Q5Wx2	0.05 mg/kg Q5Wx3	0.05 mg/kg Q5Wx4	0.05 mg/kg Q5Wx5	0.05 mg/kg Q5Wx6
0.05 mg/kg Q6Wx2	0.05 mg/kg Q6Wx3	0.05 mg/kg Q6Wx4	0.05 mg/kg Q6Wx5	0.05 mg/kg Q6Wx6
0.05 mg/kg Q7Wx2	0.05 mg/kg Q7Wx3	0.05 mg/kg Q7Wx4	0.05 mg/kg Q7Wx5	0.05 mg/kg Q7Wx6
0.05 mg/kg Q8Wx2	0.05 mg/kg Q8Wx3	0.05 mg/kg Q8Wx4	0.05 mg/kg Q8Wx5	0.05 mg/kg Q8Wx6
0.05 mg/kg Q9Wx2	0.05 mg/kg Q9Wx3	0.05 mg/kg Q9Wx4	0.05 mg/kg Q9Wx5	0.05 mg/kg Q9Wx6
0.05 mg/kg Q10Wx2	0.05 mg/kg Q10Wx3	0.05 mg/kg Q10Wx4	0.05 mg/kg Q10Wx5	0.05 mg/kg Q10Wx6
0.1 mg/kg Q1Wx2	0.1 mg/kg Q1Wx3	0.1 mg/kg Q1Wx4	0.1 mg/kg Q1Wx5	0.1 mg/kg Q1Wx6
0.1 mg/kg Q2Wx2	0.1 mg/kg Q2Wx3	0.1 mg/kg Q2Wx4	0.1 mg/kg Q2Wx5	0.1 mg/kg Q2Wx6
0.1 mg/kg Q3Wx2	0.1 mg/kg Q3Wx3	0.1 mg/kg Q3Wx4	0.1 mg/kg Q3Wx5	0.1 mg/kg Q3Wx6
0.1 mg/kg Q4Wx2	0.1 mg/kg Q4Wx3	0.1 mg/kg Q4Wx4	0.1 mg/kg Q4Wx5	0.1 mg/kg Q4Wx6
0.1 mg/kg Q5Wx2	0.1 mg/kg Q5Wx3	0.1 mg/kg Q5Wx4	0.1 mg/kg Q5Wx5	0.1 mg/kg Q5Wx6
0.1 mg/kg Q6Wx2	0.1 mg/kg Q6Wx3	0.1 mg/kg Q6Wx4	0.1 mg/kg Q6Wx5	0.1 mg/kg Q6Wx6
0.1 mg/kg Q7Wx2	0.1 mg/kg Q7Wx3	0.1 mg/kg Q7Wx4	0.1 mg/kg Q7Wx5	0.1 mg/kg Q7Wx6
0.1 mg/kg Q8Wx2	0.1 mg/kg Q8Wx3	0.1 mg/kg Q8Wx4	0.1 mg/kg Q8Wx5	0.1 mg/kg Q8Wx6
0.1 mg/kg Q9Wx2	0.1 mg/kg Q9Wx3	0.1 mg/kg Q9Wx4	0.1 mg/kg Q9Wx5	0.1 mg/kg Q9Wx6
0.1 mg/kg Q10Wx2	0.1 mg/kg Q10Wx3	0.1 mg/kg Q10Wx4	0.1 mg/kg Q10Wx5	0.1 mg/kg Q10Wx6
0.2 mg/kg Q1Wx2	0.2 mg/kg Q1Wx3	0.2 mg/kg Q1Wx4	0.2 mg/kg Q1Wx5	0.2 mg/kg Q1Wx6
0.2 mg/kg Q2Wx2	0.2 mg/kg Q2Wx3	0.2 mg/kg Q2Wx4	0.2 mg/kg Q2Wx5	0.2 mg/kg Q2Wx6
0.2 mg/kg Q3Wx2	0.2 mg/kg Q3Wx3	0.2 mg/kg Q3Wx4	0.2 mg/kg Q3Wx5	0.2 mg/kg Q3Wx6
0.2 mg/kg Q4Wx2	0.2 mg/kg Q4Wx3	0.2 mg/kg Q4Wx4	0.2 mg/kg Q4Wx5	0.2 mg/kg Q4Wx6
0.2 mg/kg Q5Wx2	0.2 mg/kg Q5Wx3	0.2 mg/kg Q5Wx4	0.2 mg/kg Q5Wx5	0.2 mg/kg Q5Wx6
0.2 mg/kg Q6Wx2	0.2 mg/kg Q6Wx3	0.2 mg/kg Q6Wx4	0.2 mg/kg Q6Wx5	0.2 mg/kg Q6Wx6
0.2 mg/kg Q7Wx2	0.2 mg/kg Q7Wx3	0.2 mg/kg Q7Wx4	0.2 mg/kg Q7Wx5	0.2 mg/kg Q7Wx6
0.2 mg/kg Q8Wx2	0.2 mg/kg Q8Wx3	0.2 mg/kg Q8Wx4	0.2 mg/kg Q8Wx5	0.2 mg/kg Q8Wx6
0.2 mg/kg Q9Wx2	0.2 mg/kg Q9Wx3	0.2 mg/kg Q9Wx4	0.2 mg/kg Q9Wx5	0.2 mg/kg Q9Wx6
0.2 mg/kg Q10Wx2	0.2 mg/kg Q10Wx3	0.2 mg/kg Q10Wx4	0.2 mg/kg Q10Wx5	0.2 mg/kg Q10Wx6
0.3 mg/kg Q1Wx2	0.3 mg/kg Q1Wx3	0.3 mg/kg Q1Wx4	0.3 mg/kg Q1Wx5	0.3 mg/kg Q1Wx6
0.3 mg/kg Q2Wx2	0.3 mg/kg Q2Wx3	0.3 mg/kg Q2Wx4	0.3 mg/kg Q2Wx5	0.3 mg/kg Q2Wx6
0.3 mg/kg Q3Wx2	0.3 mg/kg Q3Wx3	0.3 mg/kg Q3Wx4	0.3 mg/kg Q3Wx5	0.3 mg/kg Q3Wx6
0.3 mg/kg Q4Wx2	0.3 mg/kg Q4Wx3	0.3 mg/kg Q4Wx4	0.3 mg/kg Q4Wx5	0.3 mg/kg Q4Wx6
0.3 mg/kg Q5Wx2	0.3 mg/kg Q5Wx3	0.3 mg/kg Q5Wx4	0.3 mg/kg Q5Wx5	0.3 mg/kg Q5Wx6
0.3 mg/kg Q6Wx2	0.3 mg/kg Q6Wx3	0.3 mg/kg Q6Wx4	0.3 mg/kg Q6Wx5	0.3 mg/kg Q6Wx6

10

20

30

40

0.3 mg/kg Q7Wx2	0.3 mg/kg Q7Wx3	0.3 mg/kg Q7Wx4	0.3 mg/kg Q7Wx5	0.3 mg/kg Q7Wx6
0.3 mg/kg Q8Wx2	0.3 mg/kg Q8Wx3	0.3 mg/kg Q8Wx4	0.3 mg/kg Q8Wx5	0.3 mg/kg Q8Wx6
0.3 mg/kg Q9Wx2	0.3 mg/kg Q9Wx3	0.3 mg/kg Q9Wx4	0.3 mg/kg Q9Wx5	0.3 mg/kg Q9Wx6
0.3 mg/kg Q10Wx2	0.3 mg/kg Q10Wx3	0.3 mg/kg Q10Wx4	0.3 mg/kg Q10Wx5	0.3 mg/kg Q10Wx6
0.4 mg/kg Q1Wx2	0.4 mg/kg Q1Wx3	0.4 mg/kg Q1Wx4	0.4 mg/kg Q1Wx5	0.4 mg/kg Q1Wx6
0.4 mg/kg Q2Wx2	0.4 mg/kg Q2Wx3	0.4 mg/kg Q2Wx4	0.4 mg/kg Q2Wx5	0.4 mg/kg Q2Wx6
0.4 mg/kg Q3Wx2	0.4 mg/kg Q3Wx3	0.4 mg/kg Q3Wx4	0.4 mg/kg Q3Wx5	0.4 mg/kg Q3Wx6
0.4 mg/kg Q4Wx2	0.4 mg/kg Q4Wx3	0.4 mg/kg Q4Wx4	0.4 mg/kg Q4Wx5	0.4 mg/kg Q4Wx6
0.4 mg/kg Q5Wx2	0.4 mg/kg Q5Wx3	0.4 mg/kg Q5Wx4	0.4 mg/kg Q5Wx5	0.4 mg/kg Q5Wx6
0.4 mg/kg Q6Wx2	0.4 mg/kg Q6Wx3	0.4 mg/kg Q6Wx4	0.4 mg/kg Q6Wx5	0.4 mg/kg Q6Wx6
0.4 mg/kg Q7Wx2	0.4 mg/kg Q7Wx3	0.4 mg/kg Q7Wx4	0.4 mg/kg Q7Wx5	0.4 mg/kg Q7Wx6
0.4 mg/kg Q8Wx2	0.4 mg/kg Q8Wx3	0.4 mg/kg Q8Wx4	0.4 mg/kg Q8Wx5	0.4 mg/kg Q8Wx6
0.4 mg/kg Q9Wx2	0.4 mg/kg Q9Wx3	0.4 mg/kg Q9Wx4	0.4 mg/kg Q9Wx5	0.4 mg/kg Q9Wx6
0.4 mg/kg Q10Wx2	0.4 mg/kg Q10Wx3	0.4 mg/kg Q10Wx4	0.4 mg/kg Q10Wx5	0.4 mg/kg Q10Wx6
0.5 mg/kg Q1Wx2	0.5 mg/kg Q1Wx3	0.5 mg/kg Q1Wx4	0.5 mg/kg Q1Wx5	0.5 mg/kg Q1Wx6
0.5 mg/kg Q2Wx2	0.5 mg/kg Q2Wx3	0.5 mg/kg Q2Wx4	0.5 mg/kg Q2Wx5	0.5 mg/kg Q2Wx6
0.5 mg/kg Q3Wx2	0.5 mg/kg Q3Wx3	0.5 mg/kg Q3Wx4	0.5 mg/kg Q3Wx5	0.5 mg/kg Q3Wx6
0.5 mg/kg Q4Wx2	0.5 mg/kg Q4Wx3	0.5 mg/kg Q4Wx4	0.5 mg/kg Q4Wx5	0.5 mg/kg Q4Wx6
0.5 mg/kg Q5Wx2	0.5 mg/kg Q5Wx3	0.5 mg/kg Q5Wx4	0.5 mg/kg Q5Wx5	0.5 mg/kg Q5Wx6
0.5 mg/kg Q6Wx2	0.5 mg/kg Q6Wx3	0.5 mg/kg Q6Wx4	0.5 mg/kg Q6Wx5	0.5 mg/kg Q6Wx6
0.5 mg/kg Q7Wx2	0.5 mg/kg Q7Wx3	0.5 mg/kg Q7Wx4	0.5 mg/kg Q7Wx5	0.5 mg/kg Q7Wx6
0.5 mg/kg Q8Wx2	0.5 mg/kg Q8Wx3	0.5 mg/kg Q8Wx4	0.5 mg/kg Q8Wx5	0.5 mg/kg Q8Wx6
0.5 mg/kg Q9Wx2	0.5 mg/kg Q9Wx3	0.5 mg/kg Q9Wx4	0.5 mg/kg Q9Wx5	0.5 mg/kg Q9Wx6
0.5 mg/kg Q10Wx2	0.5 mg/kg Q10Wx3	0.5 mg/kg Q10Wx4	0.5 mg/kg Q10Wx5	0.5 mg/kg Q10Wx6

10

20

30

40

50

【0397】

本発明のいくつかの態様において、DLL3 ADCは、PBDを含む。他の態様において、DLL3は、SC16LD6.5（例えば、hSC16.56DL1またはADC1）を含む。他の態様において、DLL3 ADCは、部位特異的ADCを含み、特定の好ましい態様において、hSC16.56ss1PBD1（例えば、hSC16.56ss1DL6またはADC6）を含む。さらに他の態様において、DLL3 ADCは、静脈内投与される。特定の他の態様において、治療されるがんは、神経内分泌腫瘍を含む。他の態様において、治療されるがんは、小細胞肺癌（SCLC）または大細胞神経内分泌がん（LCNEC）を含む。特定の実施形態は、フロントライン（front line）患者（すなわち、特定のがんについて治療されたことがない患者）を治療するために本開示の組成物を使用することを含む。選択された実施形態において、フロントライン患者は、広範囲の病期のSCLCまたは限定された病期のSCLCを示す。他の選択された態様において、治療されるがん患者は、セカンドライン（second line）患者（すなわち、以前に治療された患者）を含む。さらに他の実施形態において、治療されるがん患者は、サードライン（third line）患者（すなわち、以前に2回治療された患者）を含む。さらに他の実施形態において、がん患者は、フォースライン（fourth line）患者（すなわち、以前に3回治療された患者）を含む。

【0398】

本発明の特定の好ましい実施形態は、3サイクルにわたり3週間毎に0.2 mg/kgのDLL3 ADC（0.2 mg/kg Q3Wx3）により患者を治療することを含む。選択された実施形態において、0.2 mg/kg Q3Wx3で治療される患者は、S

CLCに罹患している。他の実施形態において、 0.2 mg/kg Q3W×3で治療される患者は、LCNECに罹患している。いくつかの態様において、患者は、がんについて治療されたことがない。特定の態様において、患者は、セカンドライン患者を含む。さらに他の実施形態において、患者は、サードライン患者を含む。他の態様において、患者は、 0.2 mg/kg Q3W×3治療サイクルの後、進行時に治療される。さらに他の態様において、患者は、 0.2 mg/kg Q3W×3治療サイクルの後、DLL3 ADC維持療法に移行する。さらに他の実施形態において、DLL3 ADCは、SC16LD6.5（例えば、ADC1）を含むが、さらに他の実施形態において、DLL3 ADCは、h16.56ss1DL6を含む。

【0399】

このような治療において（および下記でより詳細に議論されるように）、DLL3 ADCは、患者の反応を改善するために選択された抗がん剤と組み合わせることができる。特定の対象について、DLL3 ADCは、1つ以上の抗がん剤の投与の前または後に2サイクル以上にわたり3週間毎に投与され得る（例えば、 0.2 mg/kg Q3W×2または 0.2 mg/kg Q3W×3など）。選択された実施形態において、対象は、CLCに罹患しており、抗がん剤は、シスプラチン、カルボプラチンおよび/またはエトポシドである。したがって、1つの例示的投与レジメンは、 0.2 mg/kg Q3W×2または 0.2 mg/kg Q3W×3のDLL3 ADCとそれに続く、例えば、Q3W×4でそれぞれを投与することができる、シスプラチン（例えば、 80 mg/m^2 ）およびエトポシド（例えば、 100 mg/m^2 ）を含み得る。したがって、このような例において、1つのレジメンは、 0.2 mg/kg Q3W×2または 0.2 mg/kg Q3W×3のDLL3 ADC；Q3W×4のCDDPおよびETPを含むこととなり、CDDP/ETPレジメンは、DLL3 ADCサイクルの終了の1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後またはより遅く開始され得る。他の適合する実施形態において、CDDP/ETPは、DLL3 ADCによる治療の前に投与され得る（すなわち、Q3W×4のCDDP/ETP； 0.2 mg/kg Q3W×2または 0.2 mg/kg Q3W×3のDLL3 ADCであって、DLL3 ADCレジメンは、CDDP/ETPサイクルの終了の1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後またはより遅く開始され得る）。さらに他の実施形態において、CDDP/ETPレジメンおよびDLL3 ADCレジメン（実質的に上述の通りであるが、 0.1 mg/kg のDLL3 ADC投与量を任意選択的に用いる）は、同時に実施することができる（すなわち、これらの両方が1週目に始まる）。特定の実施形態において、前述のレジメンに従って治療される対象は、フロントライン患者である。他の好ましい実施形態において、フロントライン患者は、CLCまたはLCNECに罹患している。さらに他の実施形態において、シスプラチンは、 60 mg/m^2 で投与され、一方、さらに他の実施形態において、シスプラチン/エトポシド組合せは、3週間毎に投与され得る（白金D1、エトポシドD1、2、3、3週間毎×4または×6）。さらに他の実施形態において、カルボプラチン（5AUC）/エトポシドは、CDDP/E Q21d×4-6サイクルと同様の頻度で投与され得る。さらに他の実施形態において、DLL3 ADCは、感作薬として作用し、治療上の組合せの効果を増強させるための任意の化学療法剤（カルボプラチン、シスプラチンおよび/またはエトポシドを含む）の前に患者に投与され得る。

【0400】

上記で議論したように、本発明の選択された実施形態は、治療指数の増大をもたらし、投与レジメンの最適化を可能にする改善された薬物動態および薬力学的特性を有するADCを含む。この点に関して、本開示のADCは、本明細書で示したように測定した場合、6日を超える終末相半減期、7日を超える終末相半減期または8日を超える終末相半減期を有する。本発明のさらに他の態様は、9日を超える終末相半減期、10日を超える終末相半減期、11日を超える終末相半減期、12日を超える終末相半減期（それぞれがヒト対象において測定された）を有するADCを含む。さらに他の実施形態において、本開示のADCは、ヒト対象において、13日を超える終末相半減期、約14日を超える終末相

10

20

30

40

50

半減期、15日を超える終末相半減期、約16日を超える終末相半減期、約17日を超える終末相半減期、18日を超える終末相半減期、約19日を超える終末相半減期、約20日を超える終末相半減期または3週間を超える終末相半減期を有する。さらに他の実施形態において、本発明のADCは、約6日の終末相半減期、約7日の終末相半減期、約8日の終末相半減期、約9日の終末相半減期、約10日の終末相半減期、約11日の終末相半減期、約12日の終末相半減期、約13日の終末相半減期、約14日の終末相半減期、約15日の終末相半減期、約16日の終末相半減期、約17日の終末相半減期、約18日の終末相半減期、約19日の終末相半減期、約20日の終末相半減期または約3週間の終末相半減期を示す。当業者は、このような長い半減期は、本開示のADCのより低い頻度の投与を可能にし、これにより、同様または低い毒性を示しながら所望の有効性をもたらすことを理解する。

10

【0401】

したがって、本発明の特定の他の好ましい実施形態は、2サイクル以上にわたり6週間毎に0.3mg/kgのDLL3 ADC（例えば、0.3mg/kg Q6W×2）により患者を治療することを含む。下記実施例において示されるように、このようなレジメンは、本発明のDLL3 ADCの半減期が比較的長いため、とりわけ有効である（効果的な治療指数を示す）。選択された実施形態において、0.3mg/kg Q6W×2で治療される患者は、SCLCに罹患している。他の実施形態において、0.3mg/kg Q6W×2で治療される患者は、LCNECに罹患している。さらに他の実施形態は、3サイクル（×3）にわたり、4サイクル（×4）にわたり、5サイクル（×5）にわたり、6サイクル（×6）にわたりまたはそれ以上にわたり0.3mg/kg Q6WのDLL3 ADCを投与することを含む。このような実施形態において、サイクルは、連続的（6週間毎）または間欠的（第3のサイクル毎に抜かし、次いで再開する）であり得る。いくつかの態様において、患者は、がんについて治療されたことがない（フロントライン）。特定の態様において、患者は、セカンドライン患者を含む。さらに他の実施形態において、患者は、サードライン患者を含む。他の態様において、患者は、0.3mg/kg Q6W×2治療サイクルの後、進行時に治療される。さらに他の態様において、患者は、0.3mg/kg Q6W×2治療サイクルの後、DLL3 ADC維持療法に移行する。特定の実施形態において、DLL3 ADCは、SC16LD6.5（例えば、ADC1）を含み、一方、他の好ましい態様において、DLL3 ADCは、hSC16.56ss1DL6（例えば、ADC6）を含む。

20

30

【0402】

下記でより詳細に議論するように、DLL3 ADCは、患者の反応を改善するために選択された抗がん剤と組み合わせることができる。特定の患者について、DLL3 ADCは、1つ以上の抗がん剤の投与の前または後に2サイクルにわたり6週間毎に投与され得る（例えば、0.3mg/kg Q6W×2）。選択された実施形態において、対象は、SCLCに罹患しており、抗がん剤は、シスプラチン、カルボプラチンおよび/またはエトポシドである。したがって、1つの例示的投与レジメンは、0.3mg/kg Q6W×2のDLL3 ADCとそれに続く、それぞれが例えば、Q3W×4で投与される、シスプラチン（例えば、80mg/m²）およびエトポシド（例えば、100mg/m²）を含み得る。したがって、このような例において、1つのサイクルは、0.3mg/kg Q6W×2のDLL3 ADC；Q3W×4のCDDPおよびETPを含むこととなり、CDDP/ETPレジメンは、DLL3 ADCサイクルの終了の1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後またはより遅く開始され得る。他の適合する実施形態において、CDDP/ETPは、DLL3 ADCによる治療の前に投与され得る（すなわち、Q3W×4のCDDP/ETP；0.3mg/kg Q6W×2のDLL3 ADCであって、DLL3 ADCレジメンは、CDDP/ETPサイクルの終了の1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後またはより遅く開始され得る）。さらに他の実施形態において、CDDP/ETPレジメンおよびDLL3 ADCレジメン（実質的に上述の通りであるが、0.1mg/kgのDLL3 ADC投与

40

50

量を任意選択的に用いる)は、同時に実施することができる(すなわち、これらの両方が1週目に始まる)。特定の実施形態において、前述のレジメンに従って治療される対象は、フロントライン患者である。他の好ましい実施形態において、フロントライン患者は、SCLCまたはLCNECに罹患している。さらに他の実施形態において、シスプラチンは、 60 mg/m^2 で投与され、一方、さらに他の実施形態において、シスプラチン/エトポシド組合せは、3週間毎に投与され得る(白金D1、エトポシドD1、2、3、3週間毎 $\times 4$ または $\times 6$)。さらに他の実施形態において、カルボプラチン(5AUC)/エトポシドは、CDDP/E Q21d $\times 4-6$ サイクルと同様の頻度で投与され得る。さらに他の実施形態において、DLL3 ADCは、感作薬として作用し、治療上の組合せの効果を増強させるための任意の化学療法剤(カルボプラチン、シスプラチンおよび/またはエトポシドを含む)の前に患者に投与され得る。

10

【0403】

さらなる実施形態において、本発明のDLL3 ADCは、いずれか1つのサイクルにおいて異なる投与量で投与され得る。例えば、薬物を比較的高い用量(例えば、 0.5 mg/kg)で投与し(すなわち、負荷または薬物負荷)、その後、同じサイクルの一部として4週後(Q4W)により低い用量のDLL3 ADC(例えば、 0.2 mg/kg)を投与することができる。さらに、このようなサイクルを、反復する(2 \times 、3 \times など)かまたは進行まで遅延させる(進行時に治療する)またはDLL3 ADC維持(例えば、無期限に 0.1 mg/kg Q4Wもしくは無期限に 0.1 mg/kg Q6W)によりフォローアップすることができる。この点に関して、本発明のDLL3抗体またはADCは、疾患の初期症状後の腫瘍再発の確率を減少または無くするための維持療法の状況に使用されてもよい。最初の治療がDLL3 ADCによるものか別の抗新生物薬もしくは治療(例えば、放射線、手術、化学療法など)によるものかにかかわらず、このような維持療法を使用することができる。好ましくは、障害は、治療されたことがあり、最初の腫瘍塊は除去、減少または他の方法で緩和されており、患者は無症状であるかまたは寛解状態にある。このような場合、標準的診断手法を使用して疾患の徴候がほとんどまたは全くない場合でも、対象は、医薬として有効な量の本開示の抗体を1回以上投与されてもよい。好ましい実施形態において、DLL3 ADCは、PBDを含み、選択された実施形態において、SC16LD6.5またはSC16.56ss1DL6を含む。

20

【0404】

特定の実施形態において、維持療法は、標準治療(SOC)化学療法治療を含む化学療法治療の後のDLL3 ADCの投与を含む。選択された態様において、この維持療法は、最初にシスプラチン/エトポシドのようなSOC化学療法剤による治療を受け、その後、DLL3 ADC維持レジメンによる治療を受けるフロントライン患者を含む。例として、患者は、1サイクル以上のフロントライン化学療法(例えば、4サイクルの白金ベースの化学療法)とそれに続く1サイクル以上のDLL3 ADCの投与により治療され得る。特定の実施形態において、DLL3 ADCは、第3のサイクル毎に省略して 0.3 mg/kg Q6Wで投与することができる。このような維持レジメンは、患者が反応しており、疾患の進行または有害事象を示さない限り、継続され得ることが理解される。

30

【0405】

別の好ましい実施形態において、本発明の抗体またはADCは、予防的にまたは減量手法後の腫瘍転移の可能性を予防または減少させるためのアジュバント療法として使用され得る。本開示で使用するとき、「減量手法」は、腫瘍塊を減少させるまたは腫瘍負荷もしくは腫瘍増殖を緩和させる任意の手法、技術または方法を意味する。例示的減量手法としては、限定されないが、外科手術、放射線治療(つまり、ビーム照射)、化学療法、免疫療法またはアブレーションが挙げられる。本開示に鑑みて当業者により容易に決定される適切な時間に、本開示のADCは、臨床的、診断的または治療診断的手法により示唆されるように腫瘍転移および腫瘍再発の可能性を低減させるために投与されてもよい。

40

【0406】

本発明のさらに他の実施形態は、本開示の抗体またはADCを、無症状であるががんを

50

発症するリスクのある対象に投与することを含む。つまり、本発明の抗体またはADCは、真に予防的な意味において使用することができ、検査もしくは試験を受けて1つ以上の認められた危険因子（例えば、ゲノム指標、家族歴、インビボまたはインビトロ試験結果など）を有するが新生物を発症していない患者に投与されてもよい。

【0407】

投与量およびレジメンも、本開示の組成物を個体に1回以上投与して実験的に決定され得る。例えば、個体に、本明細書に記載されるように製造された治療組成物を漸増する投与量で与えてもよい。選択された実施形態において、投与量は、実験的に決定されたかまたは観察された副作用または毒性にそれぞれ基づいて、徐々に増加または減少または縮小（attenuated）されてもよい。選択された組成物の有効性を評価するために、特定の疾患、障害または状態のマーカーを前述のように伴ってもよい。がんに関して、これらには、触診または視覚的観察を介した腫瘍サイズの直接的測定、X線または他の画像化技術による腫瘍サイズの間接的測定、直接的な腫瘍生検によって評価される改善および腫瘍試料の顕微鏡検査；間接的な腫瘍マーカー（例えば、前立腺がんに対するPSA）または本明細書に記載の方法により特定された腫瘍形成性抗原、疼痛または麻痺の減少、会話、視力、呼吸もしくは他の腫瘍に関連する障害の改善、食欲の増加または容認された試験もしくは生存の延長によって測定される生活の質の向上の測定が挙げられる。当業者は、投与量が、個体、新生物状態の種類、新生物状態の病期、新生物状態の個体の他の位置への転移ならびに過去および現在に使用している治療に依存して変わることを認識する。

10

20

【0408】

C. 併用療法

上記において言及したように、併用療法は、望まない新生物細胞増殖を減少させるかもしくは抑制するか、がんの発生を減少させるか、がんの再発を低減させるかもしくは予防するか、またはがんの広がりもしくは転移を低減させるかもしくは予防するのに、とりわけ有用であり得る。このような場合、本発明の抗体またはADCは、除去しなければ腫瘍塊を出現させ存続させるであろうCSCを除去することにより感作剤または化学感作剤として機能し、これにより、現在の標準治療である減量剤または抗がん剤のより有効な使用を可能にする。すなわち、本開示の抗体またはADCは、特定の実施形態において、別の投与された治療剤の作用機序を強力にする効果の（例えば、事実上、相加的または相乗的な）増強をもたらし得る。本発明の文脈において、「併用療法」は、広く解釈するものとし、抗DLL3抗体またはADCと1つ以上の抗がん剤との投与を意味するものでしかなく、このような抗がん剤は、細胞毒性剤、細胞分裂停止剤、抗血管新生剤、減量剤、化学療法剤、放射線療法および放射線治療剤、標的化抗がん剤（モノクローナル抗体および小分子体の両方を含む）、BRM、治療抗体、がんワクチン、サイトカイン、ホルモン療法、放射線治療および抗転移剤ならびに特異的および非特異的アプローチを含む免疫療法剤を含むが、これらに限定されない。

30

40

【0409】

併用の結果が、各治療（例えば、DLL3 ADCおよび抗がん剤）が別個に行われる場合に認められる効果の相加的なものでなければならぬわけではない。少なくとも相加効果が一般的に望ましいが、1つの単独療法を上回る抗腫瘍効果の増大は有益である。さらに、本発明は、相乗効果を示すことを併用治療に要求しない。しかし、当業者は、好ましい実施形態を含む特定の選択された組合せにより、相乗効果が認められる可能性があることを理解する。

【0410】

したがって、特定の態様において、併用療法は、がんの治療において、(i)抗DLL3抗体もしくはADCの単独使用、(ii)治療成分の単独使用または(iii)抗DLL3抗体もADCも含まない別の治療成分と組み合わせた治療成分の使用を上回る、治療的相乗効果を有するか、または測定可能な治療効果を改善する。用語「治療的相乗作用」は、本明細書で使用される場合、抗DLL3抗体またはADCと1つ以上の治療成分との組合せの、相加的効果よりも大きい治療効果を有する、抗DLL3抗体またはADCと1

50

つ以上の治療成分との組合せを意味する。

【0411】

本開示の組合せの所望の転帰は、対照またはベースラインの測定に対する比較によって定量される。本明細書で使用される場合、相対的な用語、例えば、「改善する」、「増加する」または「減少させる」は、対照、例えば、本明細書に記載の治療の開始前の同じ個体の測定値または本明細書に記載の抗DLL3抗体もADCも不在であるが、標準治療などの他の治療成分の存在下における対照個体（もしくは複数の対照個体）の測定値に対する値を示す。代表的な対照個体は、治療されている個体と同じ形態のがんに罹患しており、治療されている個体とほぼ同じ年齢の個体である（治療される個体および対照個体の疾患の病期が同等であることを確実にするため）。

10

【0412】

治療に応答した変化または改善（相加的か相乗的にかかわらず）は、統計学的に有意であることが判明し得る。本明細書で使用される場合、用語「有意性」または「有意」は、2つ以上の測定された反応の間に非ランダムな関係がある確率についての統計学的解析に関する。関係が「有意」であるかまたは「有意性」を有するかどうかを決定するために「p値」が計算され得る。ユーザー定義のカットオフ点を下回るp値は、有意とみなされる。本発明の目的のために、0.1以下、0.05未満、0.01未満、0.005未満または0.001未満のp値は、有意とみなされ得る。

【0413】

相乗的治療効果は、一種類の治療成分または抗DLL3抗体もしくはADCにより誘発される治療効果、または所与の組合せの抗DLL3抗体もしくはADCまたは一種類の治療成分により誘発される治療効果の合計よりも、少なくとも約2倍大きいかまたは少なくとも約5倍大きいかまたは少なくとも約10倍大きいかまたは少なくとも約20倍大きいかまたは少なくとも約50倍大きいかまたは少なくとも約100倍大きい効果であり得る。また相乗的治療効果は、一種類の治療成分または抗DLL3抗体もしくはADCにより誘発される治療効果、または所与の組合せの抗DLL3抗体もしくはADCまたは一種類の治療成分により誘発される治療効果の合計と比較して、少なくとも10%または少なくとも20%または少なくとも30%または少なくとも40%または少なくとも50%または少なくとも60%または少なくとも70%または少なくとも80%または少なくとも90%または少なくとも100%以上の治療効果の増加として観察され得る。相乗的効果は、組合せで使用したときに、治療剤の投与量の減少を可能にする効果であってもよい。

20

30

【0414】

併用療法の実施において、抗DLL3抗体またはADCおよび治療成分は、単一の組成物または同じもしくは異なる投与経路を使用する2つ以上の別個の組成物において、対象に同時に投与することができる。代替的に、抗DLL3抗体またはADCでの治療は、例えば、数分から数週間の間隔で、治療成分による治療に先行または追隨してもよい。一実施形態において、治療成分と、抗体またはADCとの両方が互いに約5分から約2週間以内に投与される。さらに他の実施形態において、数日（2、3、4、5、6もしくは7）、数週間（1、2、3、4、5、6、7もしくは8）または数カ月間（1、2、3、4、5、6、7もしくは8）が、抗体と治療成分の投与の間に経過してもよい。

40

【0415】

併用療法は、状態が治療されるまで、緩和されるまで、または治癒されるまで、様々なスケジュールで、例えば、1日に1回、2回もしくは3回、2日毎に1回、3日毎に1回、1週間毎に1回、2週間毎に1回、1カ月毎に1回、2カ月毎に1回、3カ月毎に1回、6カ月毎に1回投与されてもよく、または連続的に投与されてもよい。抗体および治療成分は、1日おきにもしくは1週間おきに投与されてもよく、または一連の抗DLL3抗体もしくはADC治療を行い、後にさらなる治療成分で1回以上治療してもよい。一実施形態において、抗DLL3抗体またはADCは、1つ以上の治療成分と組み合わせて短期治療サイクルで投与される。他の実施形態において、組合せ治療は、長期治療サイクルでまたは維持療法型の状況で投与される。

50

【0416】

選択された実施形態において、本発明の化合物および組成物は、PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤のようなチェックポイント阻害剤と組み合わせて使用されてもよい。PD-1は、そのリガンドPD-L1と共に、抗腫瘍Tリンパ球応答の負の制御因子である。一実施形態において、併用療法は、抗PD-1抗体（例えば、ペンプロリズマブ、ニボルマブ、ピジリズマブ）および任意選択的に1つ以上の他の治療成分と共に抗DLL3抗体またはADCの投与を含んでもよい。別の実施形態において、併用療法は、抗PD-L1抗体（例えば、アベルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ）および任意選択的に1つ以上の他の治療成分と共に抗DLL3抗体またはADCの投与を含んでもよい。さらに別の実施形態において、併用療法は、チェックポイント阻害剤および/または標的化BR 10
RAF併用療法（例えば、ベムラフェニブまたはダブラフェニブ）での治療後に進行が続く患者に投与される抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体と共に抗DLL3抗体またはADCの投与を含んでもよい。本明細書でより詳細に議論するようにおよび下記実施例において示されるように、このような療法の併用は、腫瘍の成長および増殖の抑制に驚くほど効果的であることが証明され得る。

【0417】

特定の理論に制限されることは望まないが、本明細書に示す結果は、DLL3 ADCが、Tリンパ球を含む免疫適格性の細胞を、活性化しおよび/または腫瘍部位に誘引するようにDLL3発現腫瘍細胞に結合し、殺傷し得ることを示唆する。さらに、DLL3 20
ADCの投与によりDLL3+がん幹細胞を除去または破壊すること（例えば、細胞破壊により）は、対象の免疫応答を腫瘍の胚性「種細胞」に集中させるCSC特異抗原を放出させ得る。がん幹細胞に対するこの患者媒介集中免疫攻撃は、腫瘍形成性細胞の除去の増大の機構およびそれに対応する腫瘍の成長または維持の阻害をもたらし得ることが理解される。PD-1抗体の存在は、新たに活性化されたTリンパ球が表面上のPD-1受容体を介して抑制性シグナルを（例えば、PD-L1またはPD-L2リガンドを作動させることにより）受信することを妨げるようにおよび集中免疫反応を維持または増大させるように作用し得る。このように、DLL3 ADCによる治療は、腫瘍部位においてがん幹細胞を除去するように新たに活性化されるT細胞を発生させるかまたは誘引することによ 30
って、投与されたPD-1抗体の抗腫瘍形成作用を増強させ得るものであり、それと同時にまたはその後、PD-1抗体は、CSC活性化T細胞の抗腫瘍作用を増強させること 40
により、当該治療を行わない場合にチェックポイント阻害剤の非存在下において可能であるよりも、多くの腫瘍細胞を除去し得る。

【0418】

このようなDLL3 ADC/チェックポイント阻害剤（例えば、抗PD-1抗体）の併用は、特に有益な治療プロファイルをもたらすように、投与量および対応する投与レジ 40
メンを縮小させることを可能にすることが理解される。より詳細には、このような併用は、単剤としてのこれらの使用と比較した場合、いずれかまたは両方の薬物のより低い（またはより低頻度での）用量で、腫瘍形成性細胞の効果的な抑制または除去を可能にし得る。したがって、本発明の特定の態様において、本開示のDLL3 ADCと抗PD-1抗体の（単剤としての使用と比較して）比較的より低い用量を使用することおよび毒性がより 40
低い治療反応を得ることが可能であり得る。例えば、上記で議論した0.2 mg/kg Q3W x 3または0.3 mg/kg Q6W x 2の本開示のDLL3 ADC投与レジメンを用いるのではなく、PD-1抗体と併用してより低いDLL3 ADC投与量（例えば、0.1 mg/kg、0.05 mg/kgなど）を用いて、同等の治療結果を得ることが可能であり得る。同様に、より少ないDLL3 ADCサイクル数（例えば、0.2 mg/kg Q3W x 2）またはDLL3 ADC投与の間隔の延長（例えば、0.2 mg/kg Q4W x 2）のような、削減されたかまたは縮小されたレジメンでDLL3 ADC/抗PD-1の併用を用いて、有効な治療結果を得ることができる。それぞれのこの 50
ようなシナリオ（すなわち、より低い用量または投薬間隔延長）において、本開示の療法の併用によってもたらされた予期されない利益は、比較的低い毒性で患者の有効な治療を

可能にするものであることが理解される。これは、ひいては、必要な治療により十分に耐えることができ、そして/または治療レジメンをより十分に延長することができて、肯定的な反応 (positive response) の可能性を上げる、より健全な患者をもたらす。

【0419】

他の実施形態において、抗DLL3抗体またはADCは、がんの様々な承認済みの第一選択治療との組合せで使用されてもよい。選択された実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCならびにイホスファミド、マイトマイシン (mytomycin) C、ビンデシン、ピンプラスチン、エトポシド、イリノテカン (irinotecan)、ゲムシタピン、タキサン、ピノレルピン、メトトレキセートおよびペメトレキセドのような細胞毒性剤ならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。

10

【0420】

別の実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよび白金系薬剤 (例えば、カルボプラチンまたはシスプラチン) および任意選択的に1つ以上の他の治療成分 (例えば、ピノレルピン; ゲムシタピン; 例えばドセタキセルもしくはパクリタキセルのようなタキサン; イリノテカン (irinotecan); またはペメトレキセド) の使用を含む。

【0421】

ある特定の実施形態において、例えば、BR-ERPR、BR-ERまたはBR-PRがんの治療において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよび「ホルモン療法」として記載されている1つ以上の他の治療成分の使用を含む。「ホルモン療法」は、本明細書で使用されるとき、例えば、タモキシフェン; 性腺刺激ホルモンまたは黄体形成ホルモン放出ホルモン (lutetizing releasing hormone) (GnRHまたはLHRH); エベロリムスおよびエキセメスタン; トレミフェン; またはアロマターゼ阻害剤 (例えば、アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタンまたはフルベストラント) を指す。

20

【0422】

別の実施形態において、例えばBR-HER2の治療において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびトラスツズマブまたはトラスツズマブエムタンシン (ado-trastuzumab emtansine Kadcyla (登録商標)) および任意選択的に1つ以上の他の治療成分 (例えば、ペルツズマブおよび/またはドセタキセル) の使用を含む。

30

【0423】

いくつかの実施形態において、例えば転移性乳がんの治療において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCならびにタキサン (例えば、ドセタキセルまたはパクリタキセル) ならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分、例えば、アントラサイクリン (例えば、ドキソルピシンもしくはエピルピシン) および/またはエリプリンの使用を含む。

【0424】

別の実施形態において、例えば転移性または再発性乳がんまたはBRCA-変異乳がんの治療において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびメゲストロールおよび任意選択的にさらなる治療成分の使用を含む。

40

【0425】

さらなる実施形態において、例えばBR-TNBCの治療において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCならびにポリADPリボースポリメラーゼ (PARP) 阻害剤 (例えば、BMN-673、オラパリブ、ルカパリブおよびベリパリブ) ならびに任意選択的にさらなる治療成分の使用を含む。

【0426】

別の実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびPARP阻害剤および任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。

【0427】

50

別の実施形態において、例えば乳がんの治療において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCならびにシクロホスファミドならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分（例えば、ドキソルビシン、タキサン、エピルビシン、5-FUおよび/またはメトトレキサート）の使用を含む。

【0428】

別の実施形態において、EGFR陽性NSCLCの治療のための併用療法は、抗DLL3抗体またはADCならびにアファチニブならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分（例えば、エルロチニブおよび/またはベバシズマブ）の使用を含む。

【0429】

別の実施形態において、EGFR陽性NSCLCの治療のための併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびエルロチニブおよび任意選択的に1つ以上の他の治療成分（例えば、ベバシズマブ）の使用を含む。

10

【0430】

別の実施形態において、ALK陽性NSCLCの治療のための併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびセリチニブ（Zykadia）および任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。

【0431】

別の実施形態において、ALK陽性NSCLCの治療のための併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびクリゾチニブ（Xalcori）および任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。

20

【0432】

別の実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCならびにベバシズマブならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分（例えば、ドセタキセルもしくはパクリタキセルのようなゲムシタピンまたはタキサン；および/または白金アナログ）の使用を含む。

【0433】

別の実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびベバシズマブおよび任意選択的にシクロホスファミドの使用を含む。

【0434】

特定の実施形態において、白金製剤耐性腫瘍の治療のための併用療法は、抗DLL3抗体またはADCならびにドキソルビシンおよび/またはエトポシドおよび/またはゲムシタピンおよび/またはピノレルピンおよび/またはイホスファミドおよび/またはロイコボリン変調（leucovorin-modulated）5-フルオロウラシル（flourouracil）および/またはベバシズマブおよび/またはタモキシフェンならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。

30

【0435】

選択された実施形態において、本開示の抗体およびADCは、治療の過程を潜在的により有効にし、炎症、悪心および過敏性のような副作用を低減させるために特定のステロイドと併用して用いることができる。本発明のADCと併用して用いることができる例示的ステロイドは、ヒドロコルチゾン、デキサメタゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾンおよびプレドニゾロンを含むが、これらに限定されない。とりわけ好ましい態様において、ステロイドは、デキサメタゾンを含む。他の好ましい態様において、ステロイドは、プレドニゾンを含む。

40

【0436】

併用療法は、抗DLL3抗体またはADCと、変異したかまたは異常発現した遺伝子またはタンパク質（例えば、BRAF V600E）を含む腫瘍（例えば、メラノーマ）に有効な化学療法成分とを、含んでもよい。

【0437】

Tリンパ球（例えば、細胞毒性リンパ球（CTL））は、悪性腫瘍に対する宿主防御に重要な役割を果たす。CTLは、抗原提示細胞上の腫瘍関連抗原の提示によって活性化さ

50

れる。活性特異的免疫療法は、既知のがん関連抗原に由来するペプチドを患者にワクチン接種することによって、がんに対するＴリンパ球応答を増強するために使用することができる方法である。一実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCとがん関連抗原（例えば、メラノサイト系譜特異的抗原チロシナーゼ、gp100、Melan-A/MART-1またはgp75）に対するワクチンとを含んでもよい。他の実施形態において、併用療法は、自己CTLまたはナチュラルキラー細胞のインビトロ拡大増殖、活性化および養子性再導入を含んでもよい。CTL活性化は、抗原提示細胞による腫瘍抗原提示を増強する戦略によっても促進され得る。顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）は、樹状細胞の動員および樹状細胞交差プライミングの活性化を促進する。一実施形態において併用療法は、抗原提示細胞の単離、このような細胞の刺激性サイトカイン（例えば、GM-CSF）による活性化、腫瘍関連抗原を用いたプライミング、ならびにこその後の、抗DLL3抗体またはADCおよび任意選択的に1つ以上の異なる治療成分の使用と組み合わせた、患者への抗原提示細胞の養子性再導入を含んでもよい。

10

【0438】

いくつかの実施形態において、抗DLL3抗体またはADCは、メラノーマの様々な第一選択治療との組合せで使用されてもよい。一実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびダカルバジンならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。さらなる実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびテモゾロミドならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。別の実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよび白金系治療成分（例えば、カルボプラチンまたはシスプラチン）ならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。いくつかの実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびピンカアルカロイド治療成分（例えば、ピンラスチン、ピノレルピン、ピンクリスチンまたはピンデシン）ならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。一実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびインターロイキン2ならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。別の実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびインターフェロンならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。

20

【0439】

他の実施形態において、抗DLL3抗体またはADCは、メラノーマのアジュバント治療および/または外科的手法（例えば、腫瘍切除）との組合せで使用されてもよい。一実施形態において、併用療法は、抗DLL3抗体またはADCおよびインターフェロンならびに任意選択的に1つ以上の他の治療成分の使用を含む。

30

【0440】

本発明は、抗DLL3抗体またはADCと放射線療法との組合せも提供する。用語「放射線療法」は、本明細書で使用される場合、腫瘍細胞内で局所的にDNA損傷を誘導する任意の機構、例えば、ガンマ線照射、X線、UV照射、マイクロ波、電子放出などを意味する。放射性同位体の腫瘍細胞へ方向付けられた送達を使用する併用療法も検討され、本明細書に開示の抗DLL3抗体と組み合わせてまたは抗DLL3抗体のコンジュゲートとして使用され得る。典型的には、放射線療法は、約1から約2週間の期間にわたりパルスで投与される。任意選択的に、放射線療法は、単独用量としてまたは複数回の連続用量として投与されてもよい。

40

【0441】

他の実施形態において、抗DLL3抗体またはADCは、下記の抗がん剤の1つ以上と組み合わせて使用され得る。

【0442】

D. 抗がん剤

用語「抗がん剤」は、本明細書で使用される場合、「治療成分」の1つのサブセット、つまり、「医薬として活性な成分」として記載される薬剤のサブセットである。より詳細には、「抗がん剤」は、細胞増殖性障害、例えば、がんを治療するために使用することが

50

できる任意の薬剤（またはその医薬として許容される塩）を意味し、これらに限定されないが、細胞毒性剤、細胞分裂停止剤、抗血管新生剤、減量剤、化学療法剤、放射線治療剤、標的化抗がん剤、生物学的応答修飾剤、治療抗体、がんワクチン、サイトカイン、ホルモン療法、抗転移剤および免疫療法剤が挙げられる。抗がん剤の前述の分類は、互いに排他的なものではなく、選択された薬剤は、1つ以上のカテゴリーに分類され得ることに注意されたい。例えば、ある適合する抗がん剤が、細胞毒性剤かつ化学療法剤として分類することができる。したがって、前述の用語のそれぞれは、本開示を考慮し、次に医療分野におけるそれらの使用に応じて解釈すべきである。

【0443】

好ましい実施形態において、抗がん剤は、がん性細胞またはがん性になる可能性があるかもしくは腫瘍形成性子孫細胞（例えば、腫瘍形成性細胞）を生じる可能性がある細胞を抑制するかもしくは除去する化学剤（例えば、化学療法剤）、または抑制するかもしくは除去するように設計されている化学剤を含み得る。これに関して、選択された化学剤（細胞周期依存性薬剤）は、細胞の成長または分裂に必要な細胞内プロセスをしばしば対象とし、したがって、一般的に急速に成長し、分裂する、がん性細胞対して特に有効である。例えば、ビンクリスチンは、微小管を解重合し、したがって、急速に分裂しつつある細胞が有糸分裂に入ることを阻害する。他の場合において、選択された化学剤は、細胞のライフサイクルのあらゆる点における細胞生存を妨げる細胞周期非依存性薬剤であり、指向性療法（例えば、ADC）に有効であり得る。例として、特定のピロロベンゾジアゼピンは、細胞DNAの副溝に結合し、核への送達により転写を阻害する。併用療法またはADC成分の選択に関して、当業者は、本開示を考慮して適合する細胞周期依存性薬剤および細胞周期非依存性薬剤を容易に同定できることが理解される。

【0444】

いずれにしてもまた上記で言及したように、選択された抗がん剤は、本明細書で開示した抗DLL3抗体およびADCと互いに組み合わせて（例えば、CHOP療法）投与することができることが理解される。さらに、特定の実施形態において、このような抗がん剤は、コンジュゲートを含むことができ、投与前に抗体と会合していてもよいことがさらに理解される。いくつかの態様において、本開示の抗がん剤は、抗DLL3抗体と連結されて、本明細書に開示のADCを提供する。

【0445】

本明細書で使用される場合、用語「細胞毒性剤」（または細胞毒）は、一般的に、細胞に毒性がある物質、すなわち、細胞の機能を減少もしくは阻害しそして/または腫瘍細胞の破壊を引き起こす物質を意味する。特定の実施形態において、物質は、生存生物に由来する天然に存在する分子または（天然源から精製されたもしくは合成により調製された）その類似体である。細胞毒性剤の例としては、これらに限定されないが、小分子毒素または酵素的に活性な細菌毒素（例えば、カリケアマイシン、ジフテリア（Diphtheria）毒素、シュードモナス（Pseudomonas）菌体内毒素および菌体外毒素、ブドウ球菌（Staphylococcal）エンテロトキシンA）、菌類（例えば、サルシン、レストリクトシン）、植物（例えば、アプリン、リシン、モルデクシン、ピスクミン、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サポリン、ゲロニン、モモルジン（momoridin）、トリコサンチン、オオムギ毒素、アレウリテス・フォルジ（Aleuritescfordii）タンパク質、ジランチン（dianthin）タンパク質、フィトラッカ・メリカナ（Phytolacca americana）タンパク質 [PAPI、PAPIIおよびPAP-S]、モモルディカ・カラントニア（Momordica charantia）阻害剤、クルシン、クロチン、サポナリア・オフィキナリス（Saponaria officinalis）阻害剤、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、ネオマイシンおよびトリコテセン）または動物（例えば、細胞傷害性RNAアーゼ、例えば、細胞外膜RNAアーゼ；DNアーゼI、これらの断片および/またはバリエーションを含む）が挙げられる。放射性同位体、メイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチン、デュオカルマイトマイシン、アマニチンおよびピロロベンゾジアゼピンを含むさ

10

20

30

40

50

らなる適合する細胞毒性剤を本明細書に示す。

【0446】

より一般に本発明の抗体と組み合わせて（またはコンジュゲートして）使用し得る細胞毒性剤または抗がん剤の例は、限定されないが、アルキル化剤、アルキルスルホネート、アナストロゾール、アマニチン、アジリジン、エチレンイミンおよびメチルメラミン、アセトゲニン、カンプトテシン、BEZ-235、ボルテゾミブ、プリオスタチン、カリスチン (callystatin)、CC-1065、セリチニブ、クリゾチニブ、クリプトフィシン、ドラスチン、デュオカルマイシン、エリテロピン、エルロチニブ、パンクラチスタチン、サルコジクチン、スポンジスタチン、ナイトロジェンマスタード、抗生物質、エンジン ダイネマイシン、ビスホスホネート、エスペラミシン、色素タンパク質のエンジン抗生物質発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン (anthramycin)、アザセリン、プレオマイシン、アクチノマイシン (cactinomycin)、カンフォスファミド、カルピシン (carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、シクロホスファミド (cyclophosphamide)、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、トルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、エキセメスタン、フルオロウラシル、フルベストラント、ゲフィチニブ、イダルピシン、ラパチニブ、レトロゾール、ロナファーニブ、マルセロマイシン、酢酸メゲストロール、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリゴマイシン (olivomycin)、パゾパニブ、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfirmomycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン、ラバマイン、ロドルピシン、ゾラフェニブ、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、クエン酸タモキシフェン、テモゾロミド、テパディナ (tepodina)、チピファルニブ、ツベルシジン、ウベニメクス、バンデタニブ、ボロゾール、XL-147、ジノスタチン、ゾルピシン；抗代謝物質、葉酸アナログ、プリンアナログ、アンドロゲン、抗副腎物質、フォリン酸 (frolinic acid) のような葉酸補充薬、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレプリン酸、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル、ピサントレン、エダトレキサート、デフォファミン (defofamine)、デメコルチン、ジアジクオン、エフロルニチン (elfornithine)、酢酸エリブチニウム、エポチロン、エトグルシド、硝酸ガリウム、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダミン (lonidainine)、マイタンシノイド、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダモール (mopidanmol)、ニトラエリン (nitraerine)、ペントスタチン、フェナメット、ピラルピシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジド、プロカルバジン、多糖錯体、ラゾキサシン；リゾキサシン；SF-1126、シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2''-トリクロロエチルアミン；トリコテシン類 (T-2毒素、ベラキュリン (verracurin) A、ロリジンAおよびアンゲイジン)；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、クロラムブシル (chlorambucil)；ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金アナログ、ピンブラスチン；白金；エトポシド；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ノバントロン；テニボシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン、トポイソメラーゼ阻害剤 RFS2000；ジフルオロメチルホルニチン (difluoromethylornithine)；レチノイド；カペシタピン；コンプレタスタチン；ロイコボリン；オキサリプラチン；XL518、細胞増殖を減少させる PKC-、Raf、H-Ras、EGFR および VEGF-A の阻害剤、ならびに上記のいずれかの医薬的に許容される塩または溶媒和物、酸もしくは誘導体を含む。腫瘍に対するホルモンの作用を調節するかまたは阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば、抗エストロゲン剤および選択的エストロゲン受容体抗体、副腎におけるエストロゲン

10

20

30

40

50

の生成を調節する酵素であるアロマトラーゼを阻害するアロマトラーゼ阻害剤ならびに抗アンドロゲン剤ならびにトロキサシタピン(1, 3-ジオキサランヌクレオシドシトシン類似体)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、VEGF発現阻害剤およびHER2発現阻害剤などのリボザイム、ワクチン、PROLEUKIN(登録商標)rIL-2、LURTOTECAN(登録商標)トポイソメラーゼ1阻害剤、ABARELIX(登録商標)rmRH、ピノレルピンおよびエスペラミシンならびに上記のうちのいずれかの医薬として許容される塩または溶媒和物、酸または誘導体なども本定義に含まれる。

【0447】

適合する細胞毒性剤または抗がん剤は、商業的または臨床的に利用可能な化合物、例えば、エルロチニブ(TARCEVA(登録商標)、Genentech/OSI Pharm.)、ドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、Sanofi-Aventis)、5-FU(フルオロウラシル、5-フルオロウラシル、CAS番号51-21-8)、ゲムシタピン(GEMZAR(登録商標)、Lilly)、PD-0325901(CAS番号391210-10-9、Pfizer)、シスプラチン(cis-ジアミン、ジクロロ白金(II)、CAS番号15663-27-1)、カルボプラチン(CAS番号41575-94-4)、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、トラスツズマブ(HERCEPTIN(登録商標)、Genentech)、テモゾロミド(4-メチル-5-オキソ-2, 3, 4, 6, 8-ペンタアザピシクロ[4.3.0]ノナ-2, 7, 9-トリエン-9-カルボキサミド、CAS番号85622-93-1、TEMODAR(登録商標)、TEMODAL(登録商標)、Schering Plough)、タモキシフェン((Z)-2-[4-(1, 2-ジフェニルブタ-1-エニル)フェノキシ]-N, N-ジメチルエタンアミン、NOLVADEX(登録商標)、ISTUBAL(登録商標)、VALODEX(登録商標))およびドキシソルピシン(ADRIAMYCIN(登録商標))を含む。さらなる商業的または臨床的に利用可能な抗がん剤は、オキサリプラチン(ELOXATIN(登録商標)、Sanofi)、ボルテゾミブ(VELCADE(登録商標)、Millennium Pharm.)、スーテント(SUNITINIB(登録商標)、SU11248、Pfizer)、レトロゾール(FEMARA(登録商標)、Novartis)、メシル酸イマチニブ(GLEEVEC(登録商標)、Novartis)、XL-518(Mek阻害剤、Exelixis、WO2007/044515)、ARRY-886(Mek阻害剤、AZD6244、Array BioPharma, Astra Zeneca)、SF-1126(PI3K阻害剤、Semafore Pharmaceuticals)、BEZ-235(PI3K阻害剤、Novartis)、XL-147(PI3K阻害剤、Exelixis)、PTK787/ZK 222584(Novartis)、フルベストラント(FASLODEX(登録商標)、AstraZeneca)、リューコボリン(フォリン酸)、ラパマイシン(シロリムス、RAPAMUNE(登録商標)、Wyeth)、ラパチニブ(TYKERB(登録商標)、GSK572016、Glaxo Smith Kline)、ロナファーニブ(SARASAR(商標)、SCH 66336、Schering Plough)、ソラフェニブ(NEXAVAR(登録商標)、BAY43-9006、Bayer Labs)、ゲフィチニブ(IRESSA(登録商標)、AstraZeneca)、イリノテカン(CAMPTOSAR(登録商標)、CPT-11、Pfizer)、ティピファニブ(ZARNESTRA(商標)、Johnson & Johnson)、ABRAXANE(商標)(Cremophor-free)、パクリタキセルのアルブミン改変ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, IL)、バンデタニブ(rINN、ZD6474、ZACTIMA(登録商標)、AstraZeneca)、クロラムブシル、AG1478、AG1571(SU 5271; Sugen)、テムシロリムス(TORISEL(登録商標)、Wyeth)、パゾパニブ(GlaxoSmithKline)、カンフォスファミド(TELCYTA(登録商標)、Telik)、チオテパおよびシクロ

10

20

30

40

50

ホスファミド (CYTOXAN (登録商標)、NEOSAR (登録商標))、ピノレルビン (NAVELBINE (登録商標))、カペシタピン (XELODA (登録商標)、Roche)、タモキシフェン (例えば、NOLVADEX (登録商標)、クエン酸タモキシフェン、FARESTON (登録商標) (クエン酸トレミフェン (toremifine))、MEGASE (登録商標) (酢酸メゲストロール)、AROMASIN (登録商標) (エキセメスタン; Pfizer)、フォルメスタン (formestanie)、ファドロゾール、RIVISOR (登録商標) (ボロゾール)、FEMARA (登録商標) (レトロゾール; Novartis) および ARIMIDEX (登録商標) (アナストロゾール; AstraZeneca) を含み得る。

【0448】

用語「医薬として許容される塩」または「塩」は、分子または巨大分子の有機または無機塩を意味する。酸付加塩は、アミノ基と共に形成され得る。例示的な塩としては、これらに限定されないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、硫酸水素塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酸性酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチジン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカリン酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩およびパモ酸塩 (すなわち、1, 1'メチレンビス-(2-ヒドロキシ3-ナフトエート)) が挙げられる。医薬として許容される塩は、例えば、酢酸イオン、コハク酸イオンまたは他の対イオンなどの別の分子が包含されたものを含み得る。対イオンは、親化合物の電荷を安定化させる任意の有機または無機部分であり得る。さらに、医薬として許容される塩は、その構造内に2つ以上の荷電原子を有し得る。複数の荷電原子が医薬として許容される塩の一部である場合、この塩は複数の対イオンを有し得る。したがって、医薬として許容される塩は、1つ以上の荷電原子および/または1つ以上の対イオンを有し得る。

【0449】

同様に「医薬として許容される溶媒和物」または「溶媒和物」は、1つ以上の溶媒分子と分子または巨大分子との会合物を指す。医薬として許容される溶媒和物を形成する溶媒の例としては、これらに限定されないが、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、DMSO、酢酸エチル、酢酸およびエタノールアミンが挙げられる。

【0450】

他の実施形態において、本発明の抗体またはADCは、現在臨床試験にあるまたは市販のいくつかの抗体 (または免疫療法剤) のいずれか1つと組み合わせて使用し得る。開示されている抗体は、アバゴボマブ、アデカツムマブ、アフツズマブ、アテムツズマブ、アルツモマブ、アマツキシマブ、アナツモマブ、アルシツモマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、パビツキシマブ、ベクツモマブ、ベバシズマブ、ピバツズマブ、プリナツモマブ、ブレンツキシマブ、カンツズマブ、カツマキシマブ、セツキシマブ、シタツズマブ、シクストムマブ、クリバツズマブ、コナツムマブ、ダセツズマブ、ダロツズマブ、ダラツムマブ、デツモマブ、ドロジツマブ、デュリゴツマブ、ドゥルバルマブ、デュシギツマブ、エクロメキシマブ、エロツズマブ、エンシツキシマブ、エルツマキシマブ、エタラシズマブ、ファルレッツズマブ、フィクラツズマブ、フィギツムマブ、フランボツマブ、フツキシマブ、ガニツマブ、ゲムツズマブ、ギレンツキシマブ、グレムバツムマブ、イブリツモマブ、イゴボマブ、イムガツズマブ、インダツキシマブ、イノツズマブ、インテツムマブ、イピリムマブ、イラツムマブ、ラベツズマブ、ラムプロリズマブ、レクサツムマブ、リンツズマブ、ロルボツズマブ、ルカツムマブ、マバツムマブ、マツズマブ、ミラツズマブ、ミンレッツモマブ、ミツモマブ、モキセツモマブ、ナルナツマブ、ナブツモマブ、ネシツムマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノフェツモマブ (nofetumomabn)、オビヌツズマブ、オカラツズマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オラパリブ、オナルツズマブ、オボルツズマブ、オレゴボマブ、パニツムマブ、パーサツズマブ、パトリツマブ、ペ

10

20

30

40

50

ンプロリズムマブ、ペムツモマブ、パーツズマブ、ピジリズムマブ、ピンツモマブ、プリツムマブ、ラコツモマブ、ラドレッツマブ、ラムシルマブ、リロツムマブ、リツキシマブ、ロバツムマブ、サツモマブ、セルメチニブ、シプロツズマブ、シルツキシマブ、シムツズマブ、ソリトマブ、タカツズマブ、タブリツモマブ、テナツモマブ、テプロツムマブ、チガツズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、ツコツズマブ、ウブリツキシマブ、ベルツズマブ、ボルセツズマブ、ボツムマブ、ザルツムマブ、C C 4 9、3 F 8、M E D I 0 6 8 0、M D X - 1 1 0 5 およびこれらの組合せからなる群から選択される抗体と組み合わせて使用され得る。

【0451】

他の実施形態は、がん治療のために承認された抗体、例えば、これらに限定されないが、リツキシマブ、ゲムツズマブ オゾガマイシン、アレムツズマブ、イブリツモマブ チウキセタン、トシツモマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ (p a t i t u m u m a b)、オフアツムマブ、イピリムマブおよびブレンツキシマブベドチンの使用を含む。当業者は、本明細書の教示に適合するさらなる抗がん剤を容易に特定することができる。

10

【0452】

E . 放射線療法

上記で簡潔に説明したように、本発明は、抗体またはADCと、放射線療法（つまり、腫瘍細胞内で局所的にDNA損傷を誘導する任意の機構、例えば、ガンマ線照射、X線、UV照射、マイクロ波、電子放出など）との組み合わせも提供する。腫瘍細胞への放射性同位体の方向付けられた送達を使用する併用療法も検討され、本開示の抗体またはADCは、標的抗がん剤または他の標的化手段と結び付けて使用することができる。典型的には、放射線療法は、約1 - 約2週間の期間にわたりパルスで投与される。放射線療法は、頭頸部がんを有する対象に約6 - 7週間投与されてもよい。任意選択的に、放射線療法は、単回用量としてまたは複数回の連続用量として投与されてもよい。

20

【0453】

V I I I . 適応症

本発明は、本発明の抗体およびADCの、様々な障害、例えば、増殖性障害、新生物、炎症性、血管新生および免疫学的障害ならびに毒素によって引き起こされる障害の診断、診断治療、治療および/または予防のための使用を提供する。特定の実施形態において、治療される疾患は、新生物状態を含み、特定の他の態様において固形腫瘍を含む。他の実施形態において、治療される疾患は、血液悪性疾患を含む。さらに他の実施形態において、本発明の抗体またはADCは、DLL3決定因子を発現する腫瘍または腫瘍形成性細胞を治療するために使用される。好ましくは、治療される「対象」または「患者」はヒトであるが、本明細書で使用するとき、それらの用語は、あらゆる哺乳動物種を含むものとして表される。

30

【0454】

本発明の化合物および組成物は、疾患の様々な病期にあり、治療サイクルにおける種々の時点にある対象を治療するために用いることができることが理解される。したがって、特定の実施形態において、本発明の抗体およびADCは、フロントライン治療として使用され、がん性状態に関して以前に治療されたことがない対象に投与される。他の実施形態において、本発明の抗体およびADCは、セカンドライン患者およびサードライン患者（すなわち、同じ状態について以前にそれぞれ1および2回治療を受けた対象）を治療するために用いられる。さらに他の実施形態は、本開示のDLL3 ADCによりまたは異なる治療剤により3回以上同じまたは関連する状態について治療されたフォーライン患者またはこれより高次の患者（例えば、SCLC患者）の治療を含む。他の実施形態において、本発明の化合物および組成物は、以前に（本発明の抗体またはADCを用いてまたは他の抗がん剤を用いて）治療され、再燃した対象または以前の治療に対して不応性と判断された対象を治療するために使用される。選択された実施形態において、本発明の化合物および組成物は、再発性腫瘍を有する対象を治療するために使用され得る。

40

50

【0455】

上記で議論したようにおよび添付の実施例に示すように、本発明の化合物および組成物は、好ましくは本明細書に示したように得られるIHCおよび/またはHスコアを用いて判定されたDLL3+腫瘍(例えば、90以上のDLL3 Hスコアを有する腫瘍および/または細胞の20%においてDLL3を発現する腫瘍)に罹患している対象を治療するために用いことができる。この点に関して、本発明の一実施形態は、本開示のDLL3 ADCによる少なくとも90のHスコアを有する患者の治療を含む。他の実施形態において、本発明のDLL3 ADCにより治療される患者は、少なくとも120のDLL3 Hスコアを有する。さらに他の実施形態において、本発明のDLL3 ADCにより治療される患者は、少なくとも150のDLL3 Hスコアを有し、より好ましくは少なくとも180のDLL3 Hスコアを有する。さらに他の実施形態は、DLL3+腫瘍を含むものであって、腫瘍は、染色により測定された構成細胞の少なくとも20%、30%、40%または少なくとも50%においてDLL3を発現する。特定の好ましい実施形態において、Hスコアまたは染色された細胞のパーセンテージは、SCLC腫瘍から得られた試料を用いて測定される。他の実施形態において、Hスコアまたは染色された細胞のパーセンテージは、大細胞神経内分泌癌、神経膠芽腫、メラノーマまたは甲状腺髄様腫瘍から得られた試料を用いて測定される。さらに他の実施形態において、Hスコアまたは染色された細胞のパーセンテージは、神経内分泌の特徴を示す腫瘍から得られた試料を用いて測定される。

10

【0456】

特定の態様において、増殖性障害は、固形腫瘍、例えば、限定されないが、副腎、肝臓、腎臓、膀胱、乳房、胃、卵巣、子宮頸部、子宮、食道、結腸直腸、前立腺(例えば、前立腺腺がん)、膵臓、肺(小細胞および非小細胞の両方を含む)、甲状腺、癌腫、肉腫、神経膠芽腫および様々な頭頸部の腫瘍を含む。他の好ましい実施形態において、および下記実施例において示されるように、本開示のADCは、小細胞肺癌(SCLC)および非小細胞肺癌(NSCLC)(例えば、扁平上皮非小細胞肺癌および扁平上皮小細胞肺癌)を治療するのにとりわけ有効である。特定の実施形態において、肺癌は、白金ベースの薬剤(例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、トポテカン)および/またはタキサン(例えば、ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセルもしくはカルバジタキセル)に対して不応性、再発性または抵抗性である。さらに他の実施形態において、治療される対象は、大細胞神経内分泌癌(LCNEC)に罹患している。本発明のさらに他の態様において、本開示の抗体およびADCは、甲状腺髄様がん、神経膠芽腫、神経内分泌前立腺がん(NEPC)、高悪性度胃腸膵がん(GEP)および悪性黒色腫の治療に用いることができる。

20

30

【0457】

より一般的には、本発明に従った例示的な新生物状態の治療対象は、良性または悪性であっても、固形腫瘍および血液悪性疾患であってもよく、限定されないが、以下の群から選択され得る;副腎腫瘍、AIDS-関連がん、胞巣状軟部肉腫、星細胞系腫瘍、自律神経節腫瘍、膀胱がん(扁平上皮がんおよび移行上皮がん)、胞胚腔障害、骨がん(アダマンチノーマ、動脈瘤様骨のう腫(aneurismal bone cyst)、骨軟骨腫、骨肉腫)、脳および脊髄がん、転移性脳腫瘍、乳がん、頸動脈球腫瘍、子宮頸部がん、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞癌、腎明細胞癌、結腸がん、結腸直腸がん、深在性良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣腫、上皮障害、ユーイング腫瘍、骨格性粘液様軟骨肉腫、骨性線維形成不全症(fibrogenesis imperfecta ossium)、線維性骨異形成症、胆嚢および胆管がん、胃がん、胃腸、妊娠性絨毛性疾患、胚細胞腫瘍、腺障害、頭頸部がん、視床下部、腸がん、島細胞腫瘍、カポジ肉腫、腎臓がん(腎芽腫、乳頭状腎細胞がん)、白血病、脂肪腫/良性脂肪腫様腫瘍、脂肪肉腫/悪性脂肪腫様腫瘍、肝臓がん(肝芽腫、肝細胞がん)、リンパ腫、肺がん(小細胞がん、腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんなど)、マクロファージ障害(macrophagal disorder)、髄芽腫、メラノーマ、髄膜腫、甲状腺髄様がん、

40

50

多発性内分泌腺腫瘍症、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽細胞腫、神経内分泌腫瘍、卵巣がん、膵臓がん、甲状腺乳頭がん、副甲状腺腫瘍、小児科がん、末梢神経鞘腫瘍、褐色細胞腫、下垂体腫瘍腫瘍、前立腺がん、後ブドウ膜黒色腫、希少血液障害 (rare hematologic disorder)、腎性転移性がん、ラブドイド腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚がん、軟組織肉腫、扁平上皮がん、胃がん、間質性障害、滑膜肉腫、精巣がん、胸腺癌、胸腺腫、甲状腺転移性がんおよび子宮がん (子宮頸部癌、子宮内膜癌および平滑筋腫)。

【0458】

さらに他の好ましい実施形態において、化合物または組成物は、メラノーマに罹患している対象に投与される。より一般的に、本明細書に本開示の組成物および方法は、メラノーマを診断、モニタリング、治療または予防するために使用され得る。用語「メラノーマ」は、本明細書で使用されるとき、全ての種類のメラノーマ、例えば、限定されないが、原発性メラノーマ、悪性メラノーマ、皮膚メラノーマ、真皮外メラノーマ、表在拡大型メラノーマ、ポリープ状メラノーマ、黒色癌、黒色上皮腫、黒色肉腫、上皮内メラノーマ (melanoma in situ)、結節型悪性メラノーマ、悪性黒子型メラノーマ、黒子型メラノーマ、黒子型悪性メラノーマ、粘膜部黒子型メラノーマ、粘膜部メラノーマ、末端黒子型メラノーマ、軟組織メラノーマ、眼内メラノーマ、浸潤性メラノーマ、家族性異型母斑メラノーマ (FAM-M) 症候群、線維形成性悪性メラノーマまたはぶどう膜メラノーマを含む。

10

【0459】

転移性メラノーマは、メラノサイト、メラノサイト性母斑または異形成母斑に由来する可能性があり、腫瘍進行の様々な段階 (例えば、肥大成長段階または垂直成長段階) を通じて発展し得る。メラノーマは、染色体異常、変性成長および/または発達障害、分裂促進剤、紫外線照射、ウイルス感染、発癌物質、様々な遺伝子変異または遺伝子の異常発現によって生じる可能性がある。

20

【0460】

上記で言及したように、本開示の抗体およびADCは、肺がん、例えば、以下のサブタイプ：小細胞肺がんおよび非小細胞肺がん (例えば、扁平上皮非小細胞肺がんまたは扁平上皮小細胞肺がん) ならびに大細胞神経内分泌癌の治療に特に有効である。選択された実施形態において、抗体およびADCは、限定された病期の疾患または広範囲の病期の疾患を示す患者に投与され得る。他の実施形態において、本開示のコンジュゲート抗体は、不応性患者 (つまり、初期治療の全工程中または直後に疾患を再発する患者)、感受性のある患者 (つまり、再発が一次治療から2~3カ月後より長い患者) ; または白金系薬剤 (例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン) および/もしくはタキサン (例えば、ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセルもしくはカバジタキセル) に耐性を示す患者に投与される。特定の好ましい実施形態において、本発明のDLL3 ADCを、フロントライン患者 (すなわち、肺がんについて治療されたことがない患者) に投与することができる。他の実施形態において、本発明のDLL3 ADCを、セカンドライン肺がん患者に投与することができる。さらに他の実施形態において、本発明のDLL3 ADCを、サードラインまたはフォースライン肺がん患者に投与することができる。

30

40

【0461】

とりわけ好ましい実施形態において、本開示のADCは、小細胞肺がんを治療するために用いることができる。このような実施形態に関して、コンジュゲート抗体は、限定された病期の疾患を示す患者に投与することができる。他の実施形態において、本開示のADCは、広範囲の病期の疾患を示す患者に投与することができる。他の好ましい実施形態において、本開示のADCは、不応性患者 (すなわち、最初の療法の過程でもしくはその完了の直後に再発した患者) または再発小細胞肺がん患者に投与される。さらに他の実施形態は、感受性患者 (すなわち、再発がSCLCに対する一次療法の後2-3カ月より長い患者) への本開示のADCの投与を含む。それぞれの場合において、適合ADCは、選択された投与レジメンおよび臨床診断によって他の抗がん剤 (例えば、白金ベースの薬剤ま

50

たはタキサンまたはPD - 1もしくはPD - L1に対する抗体)と組み合わせて用いることができることが理解される。

【0462】

本明細書に示したように、本開示のADCは、神経内分泌腫瘍を含む神経内分泌特性または神経内分泌表現型を有する腫瘍を予防、治療または診断するためにさらに用いることができる。分散内分泌系から生じる真性または基準神経内分泌腫瘍(NET)は、比較的まれであり、100,000人あたり2-5人の発症率を有するが、非常に悪性が高い。神経内分泌腫瘍は、腎臓、尿生殖路(膀胱、前立腺、卵巣、子宮頸部および子宮内膜)、消化管(結腸、胃)、甲状腺(甲状腺髄様がん)および肺(小細胞肺癌および大細胞神経内分泌癌)において発生する。これらの腫瘍は、セロトニンおよび/またはカルチノイド症候群として公知の衰弱症状をもたらし得るクロモグラニンAを含むいくつかのホルモンを分泌し得る。このような腫瘍は、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE、ガンマエノラーゼとしても公知、遺伝子記号=ENO2)、CD56(またはNCAM1)、クロモグラニンA(CHGA)およびシナプトフィシン(SYP)のような陽性粘液組織化学的マーカーによってまたはASCL1のような発現の上昇を示すことを、公知の遺伝子によって表すことができる。残念ながら、伝統的な化学療法は、NETの治療に特に有効ではなく、肝臓転移が一般的な転帰である。

10

【0463】

本開示のADCは、神経内分泌腫瘍を治療するために有利に用いることができるが、これらは、古典的な神経内分泌腫瘍を、遺伝子型または表現型の面で模倣するか、またはそれらと共通の形質を示す、偽性神経内分泌腫瘍(pNET)を治療し、予防または診断するためにも、用いることができる。偽性神経内分泌腫瘍または神経内分泌の特徴を示す腫瘍は、散在性神経内分泌系の細胞から生じるか、または神経内分泌分化カスケードが腫瘍形成過程に異常に再活性化された細胞から生じる腫瘍である。このようなpNETは、一般的に、伝統的に定義された神経内分泌腫瘍(すなわち、これらは神経内分泌の特徴を示す)と、生物学的に活性なアミン、神経伝達物質およびペプチドホルモンのサブセットを産生する能力を含む、特定の表現型特徴または生化学的特徴を共有する。組織学的には、このような腫瘍(NETおよびpNET)は、多くの場合、無刺激性の(bland)細胞病理の最小限の細胞質と円形から楕円形の点状の核とを有する、高密度に結合した小細胞を示す、共通の外観を有する。本発明の目的のために、神経内分泌および偽性神経内分泌腫瘍を定義するために用いることができる、一般的に発現する組織学的マーカーまたは遺伝マーカーは、クロモグラニンA、CD56、シナプトフィシン、PGP9.5、ASCL1およびニューロン特異的エノラーゼ(NSE)を含むが、これらに限定されない。

20

30

【0464】

したがって、本発明のADCは、偽性神経内分泌腫瘍および基準の神経内分泌腫瘍の両方を治療するために、有益に用いることができる。この点に関して、ADCは、本明細書で述べたように、腎臓、尿生殖路(膀胱、前立腺、卵巣、子宮頸部および子宮内膜)、消化管(結腸、胃)、甲状腺(甲状腺髄様がん)および肺(小細胞肺癌および大細胞神経内分泌癌)に生じる神経内分泌腫瘍(NETおよびpNETの両方)を治療するために用いることができる。さらに、本発明のADCは、NSE、CD56、シナプトフィシン、クロモグラニンA、ASCL1およびPGP9.5(UCHL1)から選択される1つ以上のマーカーを発現する腫瘍を治療するために用いることができる。すなわち、本発明は、NSE+またはCD56+またはPGP9.5+またはASCL1+またはSYP+またはCHGA+またはそれらのいくつかの組合せである腫瘍に罹患している対象を治療するために、用いることができる。

40

【0465】

先に言及したように、本発明のDLL3 ADCは、特に患者が前述のマーカーを示す場合、1回または2回の治療の後に進行性疾患を有するSCLC患者(すなわち、セカンドラインSCLC患者またはサードラインSCLC患者)を治療するために用いることが

50

できる。

【0466】

血液悪性疾患に関して、本発明の化合物および方法は、様々な種類のB細胞性リンパ腫、例えば、低悪性度/NHL濾胞細胞リンパ腫(FCC)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、びまん性大細胞リンパ腫(DLCL)、小リンパ球性(SL)NHL、中悪性度/濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽球性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小非分割細胞NHL、巨大腫瘍病変NHL、ワルデンストレームマクログロブリン血症、リンパ形質細胞性リンパ腫(LPL)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、濾胞性リンパ腫(FL)、びまん性大細胞リンパ腫(DLCL)、パーキットリンパ腫(BL)、AIDS関連リンパ腫、単球B細胞リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ節症(angioimmunoblastic lymphadenopathy)、小リンパ球性、濾胞性、びまん性大細胞、びまん性小分割細胞型、大細胞免疫芽球性リンパ芽球腫、小非分割パーキットおよび非パーキット濾胞性優性大細胞；濾胞性優性小分割細胞；ならびに濾胞性混合小分割および大細胞リンパ腫を治療するために特に有効であり得ることがさらに認識される。Gaidonora、「Lymphomas」、IN CANCER: PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY、第2巻: 2131-2145 (Devitaら編、第5版、1997)を参照。これらのリンパ腫が分類体系の変更によってしばしば異なる名称を有し、異なる名称で分類されたリンパ腫を有する患者も本発明の組み合わせられた治療レジメンによって利益を得る場合があることは、当業者にとって明らかである。

10

20

【0467】

IX. 製品

本発明は、1つ以上の容器またはレセプタクルを含む医薬パックまたはキットを含み、ここで、容器は、1用量以上の本発明の抗体またはADCを含み得る。このようなキットまたはパックは、本質的に診断用または治療用である。特定の実施形態において、パックまたはキットは、単位用量を含み、これは、例えば、本発明の抗体またはADCを、1つ以上の追加の薬剤および任意選択的に1つ以上の抗がん剤と共に、またはこれらなしで含む、所定の量の組成物を意味する。特定の他の実施形態において、パックまたはキットは、検出可能な量の抗DLL3抗体またはADCを、がん性細胞の検出、定量化、染色および/または視覚化のための結合レポーター分子および任意選択的に1つ以上の追加の薬剤と共に、またはこれらなしで、含む。

30

【0468】

いずれにしても本発明のキットは、一般的に、医薬として許容される製剤を含む適切な容器またはレセプタクル内に、本発明の抗体またはADCを含み、任意選択に、同じまたは異なる容器に1つ以上の抗がん剤を含む。キットは、診断または併用療法用のいずれかのために、他の医薬として許容される製剤または装置を含んでもよい。診断装置または機器の例としては、細胞または増殖性障害に伴うマーカーの検出、調査、モニタリング、定量化またはプロファイルに使用し得るものを含む(このような例示的マーカーの列挙について、上記参照)。いくつかの実施形態において、装置は、インピボまたはインピトロのいずれかで、循環する腫瘍細胞を検出、モニタリング、および/または定量化するために使用することができる(例えば、WO2012/0128801を参照)。さらに他の実施形態において、循環する腫瘍細胞は、腫瘍形成性細胞を含んでもよい。本発明で検討されるキットは、本発明の抗体またはADCを抗がん剤または診断剤と組み合わせるための適切な試薬を含んでもよい。

40

【0469】

キットの成分が1つ以上の溶液で提供される場合、溶液は非水性であり得るが、典型的には水溶液が好ましく、滅菌水溶液が特に好ましい。キット内の製剤は、乾燥粉末として、または適切な液体の添加により再構成され得る凍結乾燥形態で提供されてもよい。再構成に使用される液体は、別個の容器に含有され得る。このような液体は、滅菌の医薬として許容されるバッファーまたは他の希釈剤、例えば、注射用静菌水、注射用滅菌水、リン

50

酸緩衝食塩水、リンゲル液またはデキストロース溶液を含み得る。キットが、本発明の抗体またはADCをさらなる治療薬または薬剤との組合せで含む場合、溶液はモル当量の組合せで、または一方の成分を他方より過剰にして、予め混合されていてもよい。代替的に、本発明の抗体またはADCおよびいずれかの任意選択の抗がん剤または他の薬剤は、患者への投与前は別個の容器内で別個に維持されていてもよい。

【0470】

特定の好ましい実施形態において、本発明のキットは、凍結乾燥DLL3 ADCを含むバイアルまたはボトルを含む。好ましくは、凍結乾燥ADCは、ADC1、ADC2、ADC3、ADC4、ADC5およびADC6からなる群から選択されるDLL3 ADCを含み、より好ましくは凍結乾燥DLL3 ADCは、hSC16.56DL1またはhSC16.56ss1DL6を含む。特定の実施形態において、凍結乾燥DLL3 ADCは、乾燥保護剤をさらに含む。他の態様において、他の態様において、キットは、凍結乾燥DLL3 ADCを再構成するために用いることができる水溶液を含む容器を任意選択的に含む。さらに他の実施形態において、キットは、凍結乾燥DLL3が2-8（例えば、4）で3カ月間、6カ月間、1年間、18カ月間、2年間、30カ月間または3年間安定のままであることを示す添付文書または使用説明書を含み得る。選択された好ましい実施形態において、添付文書または使用説明書は、凍結乾燥ADCが2-8（例えば、4）で2年間安定のままであることを示す。特定の好ましい実施形態において、凍結乾燥DLL3 ADCを含む前述のキットは、キットの内容物をがんの治療、予防および/または診断のために用いることができることを示す標識、マーカー、添付文書、バーコードおよび/または読本を含む。とりわけ好ましい態様において、標識、マーカー、添付文書、バーコードおよび/または読本は、キットの内容物を小細胞肺癌の治療、予防および/または診断のために用いることができることを示す。他のとりわけ好ましい態様において、標識、マーカー、添付文書、バーコードおよび/または読本は、キットの内容物を大細胞神経内分泌癌、メラノーマ、甲状腺がんまたは神経膠芽腫の治療、予防および/または診断のために用いることができることを示す。

【0471】

より一般的には、キットは、1つまたは複数の容器またはレセプタクルおよび封入される組成物が選択される疾患状態（例えば、がん）の診断または治療に使用されることを示す標識または添付文書を、容器内に、容器上にまたは容器に付随して含んでもよい。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、注入バッグ（IVバッグ）などが含まれる。容器は、様々な材料、例えば、ガラスまたは医薬として適合するプラスチックなどで形成することができる。特定の実施形態において、容器は、滅菌アクセスポートを含んでもよく、例えば、皮下注射針で穴を開けることができるストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってもよい。

【0472】

いくつかの実施形態において、キットは、抗体およびいずれかの任意選択の成分を患者に投与するための手段、例えば、中に含む製剤を対象に注射することもしくは導入すること、または身体の疾患領域に適用することができる、1つ以上の針またはシリンジ（充填済または空）、点眼器、ピペットまたは他の同様の装置を含んでもよい。本発明のキットは、典型的に、バイアルまたはそれと同様のもの、および市販のために厳重に密封された状態の他の要素、例えば、所望のバイアルおよび他の装置を配置および保持できる中空プラスチック容器を含有するための手段も含む。

【0473】

X. その他

本明細書において別段に定義されない限り、本発明に関連して使用される科学的用語および技術的用語は、当業者に一般に理解される意味を有する。さらに、文脈によって別途要求されない限り、単数形は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含む。さらに、本明細書および添付の特許請求の範囲において提供される範囲は、両終点および両終点間の全ての点を含む。したがって、2.0から3.0の範囲は、2.0、3.0および2.0と

10

20

30

40

50

3.0 との間全ての点を含む。

【0474】

一般的に、本明細書に記載の細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学および化学に関する技術は、当該技術分野において周知であり、一般に使用されているものである。本明細書で使用される命名法は、このような技術に関連して、当該技術分野でも一般に使用されている。他に指示されていない限り、本発明の方法および技術は、一般的に、当該技術分野で周知のおよび本明細書を通じて引用されている様々な参考文献に記載された通常の方法に従って実施される。

【0475】

XI. 参考文献

本明細書で引用されている全ての特許、特許出願および出版物ならびに電子工学的に利用可能な資料（例えば、GenBank および RefSeq におけるヌクレオチド配列提出物、ならびに例えば、SwissProt、PIR、PRF、PBD におけるアミノ酸配列提出物ならびに GenBank および RefSeq における注釈の付されたコード領域からの翻訳物を含む）の完全な開示は、「参照により組み込む」という文言が特定の参考文献に関連して使用されているか否かに関わらず、参照により組み込まれる。前述の詳細な説明および以下の実施例は、理解を明確にするためにのみ提供される。それによって不必要に限定されないことが理解されるものとする。本発明は、示され、記載されている正確な詳細に限定されない。当業者にとって明らかな変形は、特許請求の範囲によって定義された本発明に含まれる。本明細書で使用されるあらゆる標題は、まとめることを目的とするものにすぎず、記載の主題を限定するものとして解釈されるべきでない。

【0476】

XII. 配列

本出願には、いくつかの核酸配列およびアミノ酸配を含む図および配列表を添付している。以下の表 4 は、含まれる配列の概要を提供する。

【0477】

10

20

【表 4】

表 4

配列番号	説明
1	DLL3アイソフォーム1タンパク質
2	DLL3アイソフォーム2タンパク質
3	エピトープタンパク質-SC16.23
4	エピトープタンパク質-SC16.34&SC16.56
5	カッパ定常領域タンパク質
6	IgG1定常領域タンパク質
7	hSC16.56全長重鎖タンパク質
8	hSC16.56およびhSC16.56ss1全長軽鎖タンパク質
9	hSC16.56ss1全長重鎖タンパク質
10-19	保存
20	SC16.3VL DNA(コード化タンパク質と整列させた。)
21	SC16.3VLタンパク質
22	SC16.3VH DNA(コード化タンパク質と整列させた。)
23	SC16.3VHタンパク質
24-387	配列番号20-23と同様の付加的マウスクローン
388-407	配列番号20-23と同様のヒト化クローン
408, 409, 410	hSC16.13 CDRL1, CDRL2, CDRL3
411, 412, 413	hSC16.13 CDRH1, CDRH2, CDRH3
414, 415, 416	hSC16.15 CDRL1, CDRL2, CDRL3
417, 418, 419	hSC16.15 CDRH1, CDRH2, CDRH3
420, 421, 422	hSC16.25 CDRL1, CDRL2, CDRL3
423, 424, 425	hSC16.25 CDRH1, CDRH2, CDRH3
426, 427, 428	hSC16.34 CDRL1, CDRL2, CDRL3
429, 430, 431	hSC16.34 CDRH1, CDRH2, CDRH3
432, 433, 434	hSC16.56 CDRL1, CDRL2, CDRL3
435, 436, 437	hSC16.56 CDRH1, CDRH2, CDRH3

10

20

30

【0478】

下記実施例2において議論するように、上の表4は、図1Aおよび図1Bに示す例示的 Kabat CDRの配列番号を指定するためにさらに用いることができる。より詳細には図1Aおよび1Bに各重(CDRH)および軽(CDRL)鎖可変領域配列の3つの Kabat CDRを示し、上の表4に軽鎖の各CDRL1、CDRL2およびCDRL3ならびに重鎖の各CDRH1、CDRH2およびCDRH3に適用することができる配列番号の指定を挙示したものを示す。この方法を用いて、図1Aおよび1Bに示す各固有のCDRに配列番号を割り当てることができ、本発明の得られる抗体を提供するために用いることができる。

40

【0479】

XIII. 腫瘍一覧表

PDX腫瘍細胞のタイプは、特定の腫瘍細胞株を表す略称とそれに続く番号で示されて

50

いる。試験した試料の継代数は、試料の命名に付属した p 0 ~ p # で表され、ここで p 0 は患者腫瘍から直接取得された非継代の試料を示し、p # は試験前のマウスから腫瘍が継代された回数を示す。本明細書で使用される場合、腫瘍のタイプおよびサブタイプの略称が以下の通り表 5 に示される：

【 0 4 8 0 】

【 表 5 】

表 5

腫瘍の種類	略語	腫瘍サブタイプ	略語
乳	BR		
		エストロゲン受容体陽性およびまたは プロゲステロン受容体陽性	BR-ERPR
		ERBB2/Neu 陽性	BR- ERBB2/Neu
		HER2 陽性	BR-HER2
		三重陰性	TNBC
		三重陰性のクローディンサブタイプ	TNBC-CLDN
結腸直腸	CR		
子宮内膜	EN		
消化管	GA		
		びまん性腺癌	GA-Ad-Dif/Muc
		腸腺癌	GA-Ad-Int
		間質腫瘍	GA-GIST
神経膠芽腫	GB		
頭頸部	HN		

10

20

腎臓	KDY		
		明腎細胞癌	KDY-CC
		乳頭状腎細胞がん	KDY-PAP
		移行上皮または尿路上皮癌	KDY-URO
		不明	KDY-UNK
肝臓	LIV		
		肝細胞がん	LIV-HCC
		胆管癌	LIV-CHOL
リンパ腫	LN		
肺	LU		
		腺がん	LU-Ad
		カルチノイド	LU-CAR
		大細胞神経内分泌	LU-LCC
		非小細胞	NSCLC
		扁平上皮	LU-SCC
		小細胞	SCLC
		紡錘細胞	LU-SPC
メラノーマ	MEL		
卵巣	OV		
		明細胞	OV-CC
		子宮内膜様	OV-END
		混合サブタイプ	OV-MIX
		悪性混合中胚葉性	OV-MMMT
		粘液	OV-MUC
		神経内分泌	OV-NET
		漿液性乳頭	OV-PS
		漿液性	OV-S
		小細胞	OV-SC
		移行上皮癌	OV-TCC
膵臓	PA		
		膵房細胞癌	PA-ACC
		十二指腸癌	PA-DC
		膠様腺癌	PA-MAD
		神経内分泌	PA-NET
		腺がん	PA-PAC
		外分泌型腺癌	PA-PACe
		管状腺癌	PA-PDAC
		乳頭部腺癌	PA-AAC
前立腺	PR		
皮膚	SK		
		メラノーマ	MEL
		扁平上皮がん	SK-SCC

10

20

30

40

【実施例】

【0481】

このように上記で全体的に説明した本発明は、以下の実施例を参照することにより、さらに容易に理解される。以下の実施例は、例証として提供され、本発明を限定することを意図していない。実施例は、以下の実験が、実施される全てまたは唯一の実験であると表すことを意図していない。別途指示しない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧力は大気圧または大気圧近傍である。

【0482】

[実施例1]

マウス抗DLL3抗体の生成

50

抗DLL3マウス抗体を以下のように作製した。第1の免疫付与キャンペーンにおいて、3匹のマウス(次の系統のそれぞれから1匹: Balb/c、CD-1、FVB)に等量のTiterMax(登録商標)またはミョウバンアジュバントにより乳化したヒトDLL3-fcタンパク質(hDLL3-Fc)を接種した。hDLL3-Fc融合構築物を、Adipogen International(カタログ番号AG-40A-0113)から購入した。最初の免疫付与を、TiterMax中マウスあたり10 μ gのhDLL3-Fcの乳剤を用いて実施した。次いでマウスに、1匹あたりミョウバンアジュバント中5 μ gのhDLL3-Fcを週2回ブーストした。融合の前の最終注射は、PBS中マウスあたり5 μ gのhDLL3-Fcを用いた。

【0483】

第2の免疫付与キャンペーンにおいて、6匹のマウス(次の系統のそれぞれ2匹: Balb/c、CD-1、FVB)に等量のTiterMax(登録商標)またはミョウバンアジュバントにより乳化したヒトDLL3-Hisタンパク質(hDLL3-His)を接種した。組換えhDLL3-Hisタンパク質を、hDLL3-Hisを過剰発現するように遺伝子操作されたCHO-S細胞の上清から精製した。最初の免疫付与を、TiterMax中マウスあたり10 μ gのhDLL3-Hisの乳剤を用いて実施した。次いでマウスに、1匹あたりミョウバンアジュバント中5 μ gのhDLL3-Hisを週2回ブーストした。最終注射は、hDLL3を過剰発現するように遺伝子操作された2 \times 10⁵個のHEK-293T細胞を用いた。

【0484】

固相ELISAアッセイを用いて、ヒトDLL3に対して特異的なマウスIgG抗体についてマウス血清をスクリーニングした。バックグラウンド以上の陽性シグナルは、DLL3に対して特異的な抗体を示した。簡潔には、96ウェルプレート(VWR International、カタログ番号610744)を、ELISA被覆バッファー中0.5 μ g/mlの組換えDLL3-Hisで一晩被覆した。0.02%(容積/容積)のTween 20を含むPBSで洗浄した後、ウェルをPBS中3%(重量/容積)のBSA、200 μ L/ウェルで室温で1時間ブロックした。マウス血清を滴定し(1:100、1:200、1:400および1:800)、DLL3被覆プレートに50 μ L/ウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、次いでPBS中3%のBSA-PBSまたは2%のFCSで1:10,000に希釈した50 μ L/ウェルHRP標識ヤギ抗マウスIgGと共に、室温で1時間インキュベートした。再びプレートを洗浄し、40 μ L/ウェルのTMB基質溶液(Thermo Scientific 34028)を室温で15分間にわたり加えた。顕色後、等量の2NのH₂SO₄を加えて、基質の顕色を停止し、プレートを分光光度計によりOD450で解析した。

【0485】

血清陽性免疫付与マウスを屠殺し、流入リンパ節(膝窩、鼠径および内側腸骨)を切除し、抗体産生細胞源として使用した。B細胞(hDLL3-Fc免疫付与マウスからの約2.29 \times 10⁶細胞およびhDLL3-His免疫付与マウスからの5.10 \times 10⁶細胞)の細胞懸濁液を非分泌P3 \times 63Ag8.653骨髓腫細胞と、1:1の比率で、エレクトロセルフュージョンにより、モデルBTX Hybrid Immuneシステム(BTX Harvard Apparatus)モデルを使用して融合した。細胞を、アゼセリン、15%の胎性クローンI血清、10%のBM Condimed(Roche Applied Sciences)、1mMの非必須アミノ酸、1mMのHEPE、100IUのペニシリン-ストレプトマイシンおよび50 μ Mの2-メルカプトエタノールを補足したDMEM培地からなるハイブリドーマ選択培地に再懸濁し、フラスコあたり100mLの選択培地を含む4つのT225フラスコで培養した。フラスコを、5%CO₂および95%空気を含む加湿37 $^{\circ}$ Cインキュベータ内に6-7日間配設置した。

【0486】

融合後6または7日目にハイブリドーマライブラリ細胞を、フラスコから回収し、200 μ Lの補足ハイブリドーマ選択培地(上記の通り)中のウェルあたり1個の細胞(FA

10

20

30

40

50

C S A r i a I細胞ソーターを使用)で、64 Falcon 96ウェルのプレートおよびhD L L 3 - H i s免疫付与キャンペーン用の48 Falcon 96ウェルのプレートに蒔いた。残余のライブラリを、液体窒素中で保存した。

【0487】

ハイブリドーマを10日間培養し、以下の通りに実施したフローサイトメトリを使用してhD L L 3に特異的な抗体について上清をスクリーニングした。ヒトD L L 3、マウスD L L 3(染料で前染色した)またはカニクイザルD L L 3(D y l i g h t 8 0 0で前染色した)を過剰発現するように遺伝子操作されたウェルあたり 1×10^5 個のH E K 2 9 3 T細胞を、25 μ Lのハイブリドーマ上清と共に30分間インキュベートした。細胞を、P B S / 2 % F C Sで洗浄し、次いで試料あたり25 μ Lの、P B S / 2 % F C Sで1 : 3 0 0に希釈したF c断片二次特異的、D y e L i g h t 6 4 9標識化ヤギ-抗マウスI g Gとインキュベートした。15分間インキュベートした後、細胞をP B S / 2 % F C Sで2回洗浄し、D A P IのP B S / 2 % F C S中で再懸濁し、アイソタイプ対照抗体で染色した細胞の蛍光を超える蛍光についてフローサイトメトリにより分析した。未使用ハイブリドーマライブラリ細胞の残りを、今後のライブラリ試験およびスクリーニングのために、液体窒素中で凍結した。

10

【0488】

hD L L 3 - H i s免疫付与キャンペーンにより、約50個のマウス抗hD L L 3抗体が得られ、hD L L 3 - F c免疫付与キャンペーンにより、約90個のマウス抗hD L L 3抗体が得られた。

20

【0489】

[実施例2]

抗D L L 3抗体の配列決定

上記に基づいて、固定化ヒトD L L 3またはh 2 9 3 - h D L L 3細胞に明らかに高い親和性で結合する多数の異なる例示的モノクローナル抗体を、配列決定およびさらなる解析のために選択した。実施例1において得られた選択されたモノクローナル抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の配列の解析により、多くが新規の相補性決定領域を有し、しばしば新規のV D J配置を示したことが確認された。

【0490】

最初に所望の抗体を発現する選択されたハイブリドーマ細胞をT r i z o l (登録商標)試薬(T r i z o l (登録商標) P l u s R N A P u r i f i c a t i o n S y s t e m、L i f e T e c h n o l o g i e s)で溶解して、抗体をコードするRNAを調製した。 $10^4 - 10^5$ 個の細胞を1 mLのT r i z o lに再懸濁し、200 μ Lのクロロホルムを加えた後に激しく振盪した。次いで試料を4 で10分間遠心分離し、水性相を新たな小遠心管に移し、等容積の70%のエタノールを加えた。試料をR N e a s y M i n i スピンカラムに加え、2 mLの採取管に入れ、製造業者の指示に従って処理した。100 μ LのRNアーゼ不含有水を用いて全RNAを溶出によりスピンカラム膜に直接抽出した。3 μ Lを1%アガロースゲルで分画することによってRNA調製物の量を測定した後、使用するまで-80 で保存した。

30

【0491】

各ハイブリドーマのI g重鎖の可変領域を、完全マウスV Hレパートリーを標的とするように設計した32のマウス特異的リーダー配列プライマーを含む5'プライマーミックスと、全てのマウスI gアイソタイプに特異的な3'マウスC プライマーとを組合せて使用して増幅させた。同様に、V マウスファミリーのそれぞれを増幅するように設計した32の5'V リーダー配列を含むプライマーミックスを、マウスカッパ定常領域に特異的な単一リバースプライマーと組み合わせて使用し、カッパ軽鎖を増幅させ配列決定した。ラムダ軽鎖を含む抗体については、増幅は、3つの5'V Lリーダー配列をマウスラムダ定常領域に特異的な1つのリバースプライマーと組み合わせて使用して実施した。V HおよびV L転写産物は、100 ngの全RNAから、Q i a g e n O n e工程R T - P C Rキットを以下のように使用して増幅した。全部で8つのR T - P C R反応を各ハイ

40

50

ブリドーマについて実施し、4つはV 軽鎖について、4つはV 重鎖に対して行った。PCR反応混合物は、3 μLのRNA、0.5 μLの100 μMの重鎖またはカップ軽鎖いずれかのプライマー(Integrated Data Technologiesによりカスタム合成)、5 μLの5×RT-PCRバッファー、1 μLのdNTP、逆転写酵素およびDNAポリメラーゼを含有する1 μLの酵素ミックスならびに0.4 μLのリボヌクレアーゼ阻害剤RNasin(1単位)を含んでいた。サーマルサイクラープログラムは、50 で30分、95 で15分、続いて30サイクル×(95 で30秒、48 で30秒、72 で1分間)のRT工程であった。次いで最終インキュベーションを72 で10分間実施した。

【0492】

抽出されたPCR産物は、可変領域の増幅について上述したものと同一特異的可変領域プライマーを使用して配列決定した。直接DNA配列決定用のPCR産物を用意するために、PCR産物をQIAquick(商標)PCR Purification Kit(Qiagen)を用いて製造業者のプロトコールに従って精製した。DNAは、50 μLの滅菌水を用いてスピンカラムから溶出し、次いで両鎖から直接配列決定した(MCLAB)。

【0493】

選択されたヌクレオチド配列を、IMGT配列解析ツール(http://www.imgt.org/IMGTmedical/sequence_analysis.html)を使用して分析し、最も高い配列相同性を有する生殖系列V、DおよびJ遺伝子メンバーを同定した。これらの誘導した配列は、著作権のある抗体配列データベースを使用してVHおよびVL遺伝子をマウス生殖系列データベースにアラインメントすることにより、IgのV-およびJ-領域の既知の生殖系列DNA配列と比較した。

【0494】

図1Aは、抗DLL3抗体由来の多数の新規マウス軽鎖可変領域および代表的なマウス抗DLL3抗体の可変軽鎖から誘導される例示的ヒト化軽鎖可変領域の連続するアミノ酸配列(下記の実施例3による)を示す。図1Bは同じ抗DLL3抗体由来の新規マウス重鎖可変領域およびヒト化軽鎖を提供する同じマウス抗体由来のヒト化重鎖可変領域の連続するアミノ酸配列(下記の実施例3による)を示す。マウス軽および重鎖可変領域アミノ酸配列を、配列番号21~387、奇数、に示し、一方で、ヒト化軽鎖および重鎖可変領域アミノ酸配列を、配列番号389~407、奇数に示す。

【0495】

したがって、図1Aおよび1Bは共に、SC16.3、SC16.4、SC16.5、SC16.7、SC16.8、SC16.10、SC16.11、SC16.13、SC16.15、SC16.18、SC16.19、SC16.20、SC16.21、SC16.22、SC16.23、SC16.25、SC16.26、SC16.29、SC16.30、SC16.31、SC16.34、SC16.35、SC16.36、SC16.38、SC16.41、SC16.42、SC16.45、SC16.47、SC16.49、SC16.50、SC16.52、SC16.55、SC16.56、SC16.57、SC16.58、SC16.61、SC16.62、SC16.63、SC16.65、SC16.67、SC16.68、SC16.72、SC16.73、SC16.78、SC16.79、SC16.80、SC16.81、SC16.84、SC16.88、SC16.101、SC16.103、SC16.104、SC16.105、SC16.106、SC16.107、SC16.108、SC16.109、SC16.110、SC16.111、SC16.113、SC16.114、SC16.115、SC16.116、SC16.117、SC16.118、SC16.120、SC16.121、SC16.122、SC16.123、SC16.124、SC16.125、SC16.126、SC16.129、SC16.130、SC16.131、SC16.132、SC16.133、SC16.134、SC16.135、SC16.136、SC16.137、SC16.138、SC16.139、SC16.140

10

20

30

40

50

、SC16.141、SC16.142、SC16.143、SC16.144、SC16.147、SC16.148、SC16.149およびSC16.150と称される、多数のマウス抗DLL3結合または標的ドメインの注釈のついた配列、ならびにhSC16.13、hSC16.15、hSC16.25、hSC16.34 およびhSC16.56と称される、ヒト化抗体を示す。

【0496】

本発明の特定の態様において、ADC結合ドメインは、hDLL3に特異的に結合し、以下のものを含むかまたは以下のものを含む抗体と結合について競合する：配列番号21の軽鎖可変領域(VL)および配列番号23の重鎖可変領域(VH)；または配列番号25のVLおよび配列番号27のVH；または配列番号29のVLおよび配列番号31のVH；または配列番号33のVLおよび配列番号35のVH；または配列番号37のVLおよび配列番号39のVH；または配列番号41のVLおよび配列番号43のVH；または配列番号45のVLおよび配列番号47のVH；または配列番号49のVLおよび配列番号51のVH；または配列番号53のVLおよび配列番号55のVH；または配列番号57のVLおよび配列番号59のVH；または配列番号61のVLおよび配列番号63のVH；または配列番号65のVLおよび配列番号67のVH；または配列番号69のVLおよび配列番号71のVH；または配列番号73のVLおよび配列番号75のVH；または配列番号77のVLおよび配列番号79のVH；または配列番号81のVLおよび配列番号83のVH；または配列番号85のVLおよび配列番号87のVH；または配列番号89のVLおよび配列番号91のVH；または配列番号93のVLおよび配列番号95のVH；または配列番号97のVLおよび配列番号99のVH；または配列番号101のVLおよび配列番号103のVH；または番号105のVL配列および配列番号107のVH；または配列番号109のVLおよび配列番号111のVH；または配列番号113のVLおよび配列番号115のVH；または配列番号117のVLおよび配列番号119のVH；または配列番号121のVLおよび配列番号123のVH；または配列番号125のVLおよび配列番号127のVH；または配列番号129のVLおよび配列番号131のVH；または配列番号133のVLおよび配列番号135のVH；または配列番号137のVLおよび配列番号139のVH；または配列番号141のVLおよび配列番号143のVH；または配列番号145のVLおよび配列番号147のVH；または配列番号149のVLおよび配列番号151のVH；または配列番号153のVLおよび配列番号155のVH；または配列番号157のVLおよび配列番号159のVH；または配列番号161のVLおよび配列番号163のVH；または配列番号165のVLおよび配列番号167のVH；または配列番号169のVLおよび配列番号171のVH；または配列番号173のVLおよび配列番号175のVH；または配列番号177のVLおよび配列番号179のVH；または配列番号181のVLおよび配列番号183のVH；または配列番号185のVLおよび配列番号187のVH；または配列番号189のVLおよび配列番号191のVH；または配列番号193のVLおよび配列番号195のVH；または配列番号197のVLおよび配列番号199のVH；または配列番号201のVLおよび配列番号203のVH；または配列番号205のVLおよび配列番号207のVH；または配列番号209のVLおよび配列番号211のVH；または配列番号213のVLおよび配列番号215のVH；または配列番号217のVLおよび配列番号219のVH；または配列番号221のVLおよび配列番号223のVH；または配列番号225のVLおよび配列番号227のVH；または配列番号229のVLおよび配列番号231のVH；または配列番号233のVLおよび配列番号235のVH；または配列番号237のVLおよび配列番号239のVH；または配列番号241のVLおよび配列番号243のVH；または配列番号245のVLおよび配列番号247のVH；または配列番号249のVLおよび配列番号251のVH；または配列番号253のVLおよび配列番号255のVH；または配列番号257のVLおよび配列番号259のVH；または配列番号261のVLおよび配列番号263のVH；または配列番号265のVLおよび配列番号267のVH；または配列番号269のVLおよび配列番号271のVH；または配列番号273のV

10

20

30

40

50

L および配列番号 275 の V H ; または配列番号 277 の V L および配列番号 279 の V H ; または配列番号 281 の V L および配列番号 283 の V H ; または配列番号 285 の V L および配列番号 287 の V H ; または配列番号 289 の V L および配列番号 291 の V H ; または配列番号 293 の V L および配列番号 295 の V H ; または配列番号 297 の V L および配列番号 299 の V H ; または配列番号 301 の V L および配列番号 303 の V H ; または配列番号 305 の V L および配列番号 307 の V H ; または配列番号 309 の V L および配列番号 311 の V H ; または配列番号 313 の V L および配列番号 315 の V H ; または配列番号 317 の V L および配列番号 319 の V H ; または配列番号 321 の V L および配列番号 323 の V H ; または配列番号 325 の V L および配列番号 327 の V H ; または配列番号 329 の V L および配列番号 331 の V H ; または配列番号 333 の V L および配列番号 335 の V H ; または配列番号 337 の V L および配列番号 339 の V H ; または配列番号 341 の V L および配列番号 343 の V H ; または配列番号 345 の V L および配列番号 347 の V H ; または配列番号 349 の V L および配列番号 351 の V H ; または配列番号 353 の V L および配列番号 355 の V H ; または配列番号 357 の V L および配列番号 359 の V H ; または配列番号 361 の V L および配列番号 363 の V H ; または配列番号 365 の V L および配列番号 367 の V H ; または配列番号 369 の V L および配列番号 371 の V H ; または配列番号 373 の V L および配列番号 375 の V H ; または配列番号 377 の V L および配列番号 379 の V H ; または配列番号 381 の V L および配列番号 383 の V H ; または配列番号 385 の V L および配列番号 387 の V H ; または配列番号 389 の V L および配列番号 391 の V H ; または配列番号 393 の V L および配列番号 395 の V H ; または配列番号 397 の V L および配列番号 399 の V H ; または配列番号 401 の V L および配列番号 403 の V H ; または配列番号 405 の V L および配列番号 407 の V H 。

【0497】

本出願の目的のために、それぞれの特定の抗体の配列番号は、一連の奇数である。したがって、モノクローナル抗 D L L 3 抗体 S C 1 6 . 3 は、それぞれ軽鎖および重鎖可変領域のアミノ酸配列番号 21 および 23 を含み、S C 1 6 . 4 は、配列番号 25 および 27 を含み、S C 1 6 . 5 は、配列番号 29 および 31 を含み、他も同様である。各抗体のアミノ酸配列についての対応する核酸配列は、添付の配列表に含まれており、対応するアミノ酸の配列番号の直前の配列番号を有する。したがって、例えば、S C 1 6 . 3 抗体の V L および V H の配列番号は、それぞれ 21 および 23 であり、S C 1 6 . 3 抗体の V L および V H をコードする核酸配列の配列番号は、それぞれ配列番号 20 および 22 である。図 1 A および 1 B における C D R は、A b y s i s データベースの著作権のあるバージョンを用いて K a b a t ら (前掲) に従って定義されている。

【0498】

[実施例 3]

キメラおよびヒト化抗 D L L 3 抗体の生成

本発明に適合するヒト化結合ドメインの基準を得るために、キメラ抗 D L L 3 抗体を、当技術分野で認識されている技術を用いて以下のように生成した。実施例 1 で述べたように全 R N A をハイブリドーマから抽出し、増幅した。マウス抗体の V H および V L 鎖の V 、 D および J 遺伝子に関するデータを、誘導された核酸配列から取得した。抗体の V H および V L 鎖のリーダー配列に特異的なプライマーセットを、次の制限部位を使用して設計した：V H 断片に対して A g e I および X h o I ならびに V L 断片に対して X m a I および D r a I I I 。 P C R 産物を、Q I A q u i c k P C R 精製キット (Q i a g e n) で精製し、次いで V H 断片に対して制限酵素 A g e I および X h o I ならびに V L 断片に対して X m a I および D r a I I I を用いて消化した。V L および V H 消化 P C R 産物を精製し、それぞれカップ C L (配列番号 5) ヒト軽鎖定常領域発現ベクターまたは I g G 1 (配列番号 6) ヒト重鎖定常領域発現ベクターにライゲーションした。

【0499】

ライゲーション反応を、全体積 10 μ L の 200 U の T 4 - D N A リガーゼ (N e w

10

20

30

40

50

England Biolabs)、7.5 μ Lの消化および精製した遺伝子特異的PCR産物ならびに25 ngの直鎖状ベクターDNA中で実施した。形質転換受容性のある大腸菌(E. coli) DH10B細菌(Life Technologies)を、3 μ Lのライゲーション産物を用いて42 °Cでの熱ショックを介して形質転換し、濃度100 μ g/mLでアンピシリンを含むプレート上に蒔いた。増幅ライゲーション産物の精製および消化後、V_H断片を、pEE6.4HuIgG1発現ベクター(Lonza)のAgeI-XhoI制限部位にクローニングし、V_L断片を、pEE12.4Hu-カッパ発現ベクター(Lonza Ltd.)のXmaI-DraIII制限部位にクローニングした。

【0500】

キメラ抗体を、pEE6.4HuIgG1およびpEE12.4Hu-カッパ発現ベクターを用いてHEK-293T細胞に同時トランスフェクションすることにより発現させた。トランスフェクションの前に、HEK-293T細胞を、150 mmプレートにおいて、10%熱不活性化FCS、100 μ g/mLのストレプトマイシおよび100 U/mLのペニシリンGを補足したダルベッコ修正イーグル培地(DMEM)中で、標準的条件下で培養した。一過性トランスフェクションのために細胞を80%の集密度まで増殖させた。各12.5 μ gのpEE6.4HuIgG1およびpEE12.4Hu-カッパベクターDNAを、1.5 mLのOpti-MEM中50 μ LのHEK-293Tトランスフェクション試薬に加えた。混合物を室温で30分間インキュベートし、蒔いた。上清を、トランスフェクションから3から6日後に採取した。組換えキメラ抗体を含有する培養上清を、800 \times gで10分間遠心分離することにより細胞デブリから清澄化し、4 °Cで保存した。組換えキメラ抗体を、タンパク質Aアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

【0501】

同じマウス抗DLL3抗体(例えば、SC16.13、SC16.15、SC16.25、SC16.34およびSC16.56)を用いて、CDRグラフト化またはヒト化結合ドメインも得た。マウス抗体を、著作権のあるコンピュータ支援CDRグラフト化方法(Abyssis Database、UCL Business)と標準的な分子遺伝子操作技術を使用して、以下のようにヒト化した。可変領域のヒトフレームワーク領域を、ヒト生殖系列抗体配列のフレームワーク配列およびCDR古典的構造と、関連マウス抗体のフレームワーク配列およびCDRとの間の最も高い相同性に基つき設計した。解析のために、アミノ酸のCDRドメインのそれぞれに対する帰属をKabatraに従って行った。可変領域が選択されたら、それらを合成遺伝子セグメントから生成した(Integrated DNA Technologies)。ヒト化抗体をクローニングし、キメラ抗体について上述した分子的方法を使用して発現させた。

【0502】

選択されたヒトアクセプター可変領域の遺伝子構成をヒト化抗体のそれぞれについて直下の表6に示す。表6に示す配列は、配列番号389および391(hSC16.13)、配列番号393および395(hSC16.15)、配列番号397および399(hSC16.25)、配列番号401および403(hSC16.34)ならびに配列番号405および407(hSC16.56)に示す連続した可変領域配列に対応する。表6は、選択された抗体の好ましい結合特性を維持するためにフレームワークの変化または復帰変異が必要でないことを示す。

【0503】

10

20

30

40

【表 6】

表 6

mAb	ヒト VH	ヒト DH	ヒト JH	FW変化	ヒト VK	ヒト JK	FW変化
hSC16.13	IGHV2-5*01	IGHD1-1	JH6	なし	IGKV1-39*01	JK1	なし
hSC16.15	IGHV1-46*01	IGHD2-2	JH4	なし	IGKV1-13*02	JK4	なし
hSC16.25	IGHV2-5*01	IGHD3-16	JH6	なし	IGKV6-21*01	JK2	なし
hSC16.34	IGHV1-3*02	IGHD3-22	JH4	なし	IGKV1-27*01	JK1	なし
hSC16.56	IGHV1-18*01	IGHD2-21	JH4	なし	IGKV3-15*01	JK2	なし

10

【0504】

フレームワーク領域における残基は変化しなかったが、ヒト化クローンの1つ(hSC16.13)において、安定性の問題に対処するために変異を重鎖CDR2に導入した。結合親和性が対応するキメラ抗体またはマウス抗体のいずれかと同等であることを保証するために、改変されたCDRを有する抗体の結合親和性を確認した。

【0505】

ヒト化の後、得られたVLおよびVH鎖アミノ酸配列を解析して、マウスドナーおよびヒトアクセプター軽鎖および重鎖可変領域に関するそれらの相同性を判定した。直下の表7に示す結果は、ヒト化構築物が、マウスドナー配列に対するよりもヒトアクセプター配列に対して一貫して高い相同性を示したことを明らかにしている。マウス重鎖および軽鎖可変領域は、ヒト化抗体およびドナーハイブリドーマタンパク質配列の相同性(74% - 83%)と比較して、ヒト生殖系遺伝子との最良の一致と類似した全体的なパーセンテージの相同性(85% - 93%)を示す。

20

【0506】

【表 7】

表 7

mAb	ヒトとの相同性 (CDR アクセプター)	マウス親との相同性 (CDR ドナー)
hSC16.13 HC	93%	81%
hSC16.13 LC	87%	77%
hSC16.15 HC	85%	83%
hSC16.15 LC	85%	83%
hSC16.25 HC	91%	83%
hSC16.25 LC	85%	79%
hSC16.34 HC	87%	79%
hSC16.34 LC	85%	81%
hSC16.56 HC	87%	74%
hSC16.56 LC	87%	76%

30

【0507】

キメラ抗体と同様に、ヒト化VLおよびVH消化PCR産物を精製し、カップCL(配列番号5)ヒト軽鎖定常領域発現ベクターまたはIgG1(配列番号6)ヒト重鎖定常領域発現ベクター内にそれぞれライゲーションした。発現後、誘導されたヒト化構築物を、表面プラズモン共鳴を用いて解析して、CDRグラフト化過程により、DLL3タンパク質に対するそれらの外観上の親和性が、感知できるほどに変化したかどうかを判定した。ヒト化構築物を、マウス親(またはドナー)重鎖および軽鎖可変ドメインならびにヒト化構築物に用いたものと実質的に同等のヒト定常領域を含むキメラ抗体と、比較した。ヒト化抗DLL3抗体は、キメラ親抗体により示されたものとほぼ同等の結合特性を示した(データ示さず)。

40

50

【0508】

[実施例4]

部位特異的抗体の生成

天然の軽鎖(LC)定常領域および重鎖(HC)定常領域を含む遺伝子操作されたヒトIgG1/カッパ抗DLL3部位特異的抗体を構築した。この抗体において、LCのシステイン214(C214)と鎖間ジスルフィド結合を形成するHCの上方ヒンジ領域のシステイン220(C220)がセリンと置換されている(C220S)。構築されたとき、HCおよびLCは、治療剤とのコンジュゲーションに適切である2つの遊離システインを含む抗体を形成する。他に記載しない限り、定常領域残基の全ての番号付けは、Kabatraに示されるEU番号付けスキームに従っている。

10

【0509】

改変抗体を、以下のように生成した。全長ヒト化抗DLL3抗体hSC16.56をコードする発現ベクターを、PCR増殖および部位特異的変異誘発の鋳型として使用した。部位特異的変異誘発を、製造業者の指示書に従ってQuick-change(登録商標)システム(Agilent Technologies)を使用して実施した。

【0510】

hSC16.56の変異C220S重鎖をコードするベクターを、CHO-S細胞中で、天然全長カッパ軽鎖と同時トランスフェクションし、哺乳類一過性発現システムを使用して発現させた。C220S変異体を含む改変された抗DLL3部位特異的抗体を、hSC16.56ss1(配列番号8および9)と名付けた。過剰発現させた後、改変抗DLL3抗体をSDS-PAGEにより性質決定、正確な変異体が生成されていることを確認した。SDS-PAGEは、lifetechnologiesからのプレキャスト10%Tris-Glycineミニゲル上で、還元剤、例えば、DTT(ジチオスレイトール)の存在および不在下で実施した。電気泳動後、ゲルをクーマシーコロイド溶液で染色した。還元条件下、遊離LCおよび遊離HCに対応する2つのバンドを観察した(データ示さず)。このパターンは、還元条件のIgG分子に典型的である。非還元条件下では、バンドパターンは、HCとLCとの間のジスルフィド結合の不在を示す天然IgG分子とは異なる。HC-HCダイマーに対応する約98kDのバンドが観察された。さらに、遊離LCに対応するかすかなバンドと、LC-LCダイマーに対応する約48kDの顕著なバンドが観察された。若干量のLC-LC種の形成は、各LC上のC末端における遊離システインにより予測される。

20

30

【0511】

[実施例5]

抗DLL3抗体のドメインおよびエピトープマッピング

本開示の抗DLL3抗体が結合するエピトープを特徴づけ、位置づけるために、ドメインレベルエピトープマッピングを、Cochranら、2004(前掲)に記載されているプロトコルの修正版を使用して実施した。特定のアミノ酸配列を含むDLL3の個々のドメインを酵母の表面上で発現させ、各抗DLL3抗体による結合をフローサイトメトリにより測定した。

【0512】

酵母ディスプレイプラスミド構築物を、以下の構築物の発現のために作製した: DLL3細胞外ドメイン(アミノ酸27-466); N末端領域およびDLL3のEGF様ドメイン1-6(アミノ酸220-466)に融合したDLL1のDSLドメイン(アミノ酸22-225)からなる、DLL1-DLL3キメラ; N末端領域およびDLL1のEGF様ドメイン1-8(アミノ酸222-518)に融合したDLL3のDSLドメイン(アミノ酸27-214)からなる、DLL3-DLL1キメラ; EGF1(アミノ酸215-249); EGF2(アミノ酸274-310); EGF1およびEGF2(アミノ酸215-310); EGF3(アミノ酸312-351); EGF4(アミノ酸353-389); EGF5(アミノ酸391-427); ならびにEGF6(アミノ酸429-465)。ドメイン情報については、UniProtKB/Swiss-P

40

50

rotデータベースエントリ-Q9NYJ7を参照。アミノ酸番号付けは、配列番号1に示されている配列に含まれるリーダー配列を有する非処理DLL3タンパク質を参照することに注意されたい。全体としてのN末端領域またはEGFドメインの解析のために、ファミリーメンバーDLL1を有するキメラ(DLL1-DLL3およびDLL3-DLL1)を、タンパク質フォールディングに関する潜在的問題を最小限にするために断片に対立するものとして用いた。ドメインマップ抗体がDLL1と交差反応しないことが以前に示されたことから、これらの構築物への任意の結合が構築物のDLL3部分との会合により起こったことがわかる。これらのプラスミドを、酵母に形質転換し、次いで増殖させ、Cochranらによって記載された通りに誘導した。

【0513】

特定の構築物に対する結合を試験するために、所望の構築物を発現する200,000個の誘導された酵母細胞を、PBS+1mg/mLのBSA(PBSA)で2回洗浄し、50 μ LのPBSA中で、0.1 μ g/mLのビオチニル化抗HAクローン3F10(Roche Diagnostics)および50nMの精製抗体または7日間培養したハイブリドーマからの未精製上清の1:2希釈物のいずれかと共にインキュベートした。細胞を氷上で90分間インキュベートした後、PBSAで2回洗浄した。次いで細胞を50 μ LのPBSA中で以下の適切な二次抗体と共にインキュベートした:マウス抗体については、Alexa 488コンジュゲートストレプトアビジンおよびAlexa 647コンジュゲートヤギ抗マウス(Life Technologies)をそれぞれ1 μ g/mLで加え;ヒト化またはキメラ抗体については、Alexa 647コンジュゲート

10

20

30

40

50

【0514】

エピトープを立体配座(例えば、不連続)または線形で分類するために、DLL3 ECDをディスプレイしている酵母を、80 $^{\circ}$ Cで30分間加熱処理して、DLL3 ECDを変性し、次いで氷冷PBSAで2回洗浄した。変性酵母に結合する抗DLL3抗体の能力は、上記と同じ染色プロトコルを用いてFACSにより試験した。変性および天然酵母の両方に結合する抗体を線形エピトープに結合するものとして分類し、一方で、天然酵母に結合するが変性酵母に結合しない抗体を立体配座的特異的として分類した。

【0515】

試験した抗体のドメインレベルエピトープマッピングデータの図式要約を図2に示し、線形エピトープに結合した抗体を下線付きで、決定された場合、対応するピンを括弧内に示す。図2を参照すると、抗DLL3抗体の大部分がDLL3またはEGF2のいずれかのN末端/D5L領域に見出されるエピトープにマップされる傾向があったことがわかる。図2に様々な抗DLL3抗体についてのピンの決定およびドメインマッピングに関する同様のデータを表形式で示す。

【0516】

ファインエピトープマッピングを、2つの方法のうちの1つを用いて、選択された抗体にさらに実施した。第1の方法では、製造業者の指示に従って用いたPh.D.-12ファージディスプレイペプチドライブラリキット(New England Biolabs)を用いた。エピトープマッピング用抗体を3mLの0.1M重炭酸ナトリウム溶液、pH8中50 μ g/mLでNunc MaxiSorp管(Nunc)上に一晚被覆した。管を重炭酸ナトリウム溶液中3%のBSA溶液でブロックした。次いで、PBS+0.1%のTween-20中10 11 個のインプットファージを結合させた後、0.1%のTween-20で10回連続洗浄して、非結合ファージを洗い流した。残存ファージを

緩やかに攪拌しながら 1 mL の 0.2 M グリシンで室温で 10 分間溶出した後、150 μ L の 1 M Tris-HCl、pH 9 で中和した。溶出ファージを増幅し、選択厳密性を増大させるために洗浄中 0.5 % の Tween-20 を用いて 10^{11} 個のインプットファージを用いて再び洗浄した。第 2 ラウンドの溶出ファージの 24 個のプラークからの DNA を Qiaprep M13 Spin キット (Qiagen) を用いて単離し、配列決定した。クローンファージの結合は、ELISA アッセイを用いて確認した。ここで、マッピングされた抗体または対照抗体を ELISA プレート上に被覆し、ブロックし、各ファージクローンに曝露した。ファージの結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗 M13 抗体 (GE Healthcare) および 1-Step Turbo TMB ELISA 溶液 (Pierce) を用いて検出した。Vector NTI (Life Technologies) を用いて、特異的に結合したファージのファージペプチド配列を抗原 ECD ペプチド配列に対してアラインメントして、結合するエピトープを決定した。

10

【0517】

代替的に、酵母ディスプレイ方法 (Chao ら、2007、PMID: 17406305) を用いて、選択された抗体のエピトープをマッピングした。DLL3 ECD 変異体のライブラリを、ヌクレオチドアナログ 8-オキソ-2'-デオキシグアノシン-5'-トリホスフェートおよび 2'-デオキシ-p-ヌクレオシド-5'-トリホスフェート (Trilink Bio) を使用して、クローンあたり 1 アミノ酸変異の標的変異誘発割合で、エラープロン PCR を用いて生成した。これらを酵母ディスプレイ形式に変換した。ドメインレベルのマッピングについて上記の技術を使用して、ライブラリを、HA および抗体結合に対して 50 nM で染色した。FACS Aria (BD) を使用して、野生型 DLL3 ECD と比較して結合の喪失を示したクローンを選別した。これらのクローンを再増殖させ、標的抗体に対する結合の喪失について別ラウンドの FACS 選別にかかった。Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep キット (Zymo Research) を使用して、個々の ECD クローンを単離し、配列決定した。必要であれば、変異を、Quikchange 部位特異的変異誘発キット (Agilent) を使用して単一変異体 ECD クローンに再編成した。

20

【0518】

次に、個々の ECD クローンをスクリーニングし、結合の喪失がエピトープ中の変異によるものかまたはミスフォーディングを生じた変異によるものかを決定した。システイン、プロリンおよびストップコドンが関与する変異は、ミスフォーディング変異の可能性が高いために自動的に廃棄した。次いで残りの ECD クローンを、非競合性の立体配座特異的抗体への結合についてスクリーニングした。非競合性の立体配座特異的抗体への結合が喪失した ECD クローンは、ミスフォーディング突然変異を含むと結論され、一方で、野生型 DLL3 ECD と等価な結合を保持した ECD クローンは、適切にフォールディングされていると結論された。後者のグループの ECD クローン中の変異は、エピトープ中にあると結論された。

30

【0519】

抗体結合に関与するアミノ酸残基を含む誘導されたエピトープを有する選択された抗体のまとめを以下の表 8 に示す。抗体 SC16.34 および SC16.56 は、図 2 に示すマッピング情報およびドメインマッピング結果と一致する共通アミノ酸残基と相互作用する。さらに、SC16.23 は、異なる隣接エピトープと相互作用することが見出され、SC16.34 または SC16.56 のファミリーに属さないことが見出された。添付の配列表の目的のために配列番号 4 は、204 位におけるブレースホルダアミノ酸を含むことに注意されたい。

40

【0520】

【表 8】

表 8

抗体クローン	エピトープ	配列番号
SC16.23	Q93, P94, G95, A96, P97	3
SC16.34	G203, R205, P206	4
SC16.56	G203, R205, P206	4

【0521】

10

[実施例 6]

ピロロベンゾジアゼピン (PBD) への抗 D L L 3 抗体のコンジュゲーション

ヒト化抗 D L L 3 抗体 (h S C 1 6 . 5 6) およびヒト化部位特異的抗 D L L 3 抗体 (h S C 1 6 . 5 6 s s 1) を、遊離スルフヒドリル基を有する末端マレイミド部分を介してピロロベンゾジアゼピン薬物リンカー (それぞれ D L 1 および D L 6、それぞれが P B D 1 を含む) にコンジュゲートさせ、h S C 1 6 . 5 6 D L 1 および h S C 1 6 . 5 6 s s 1 D L 6 と称する A D C を作製した。h S C 1 6 . 5 6 D L 1 (すなわち、S C 1 6 L D 6 . 5) および h S C 1 6 . 5 6 s s 1 D L 6 は、臨床試験における使用が意図されていたので、G M P 条件下で製造された。

【0522】

20

ヒト化 D L L 3 (h S C 1 6 . 5 6) 抗体薬物コンジュゲート (A D C) を、還元工程および P B D 1 (D L 1) を h S C 1 6 . 5 6 にコンジュゲートするためのコンジュゲーション工程の 2 つの異なる段階で調製した。次いで A D C は、陽イオン交換 (C E X) クロマトグラフィーとそれに続く、原薬を製造するためのダイアフィльтраーションおよび製剤化工程により処理された。このプロセスを下記に詳細に説明する。

【0523】

抗体を、200 mM のトリス塩基、32 mM の E D T A p H 8 . 5 を添加して p H 7 . 5 に調整した。次いで、p H 調整した D L L 3 抗体のシステイン結合を、抗体 1 m o l あたりトリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) の所定のモル数の添加により 20 で 90 分間部分的に還元させた。次いで、得られた部分還元調製物を、(上で示したように) 20 で最低 30 分間、マレイミドリンカーを介して P B D 1 とコンジュゲートした。次いで、水中で調製した 10 mM の原液を使用して、リンカー薬物と比較して過剰の N - アセチルシステイン (N A C) を添加することにより、反応をクエンチした。最低 20 分間クエンチした後、0 . 5 M の酢酸を添加して p H を 5 . 5 に調整した。次いで、A D C の調製物を、陽イオン交換 (C E X) クロマトグラフィーに供し、コンジュゲーション工程中に形成された凝集体を除去するための溶出工程を含む結合および溶出モードで処理した。次いで、C E X 精製 A D C を、30 k D a 膜を使用してダイアフィльтраーションによりダイアフィльтраーションバッファーにバッファー交換した。次いでダイアフィльтраーションした抗 D L L 3 A D C を、ショ糖およびポリソルベート 20 を用いて製剤化し、目的の最終濃度にして、原薬を製造した。

30

40

【0524】

部位特異的ヒト化抗 D L L 3 (h S C 1 6 . 5 6 s s 1) A D C を、改変された部分還元プロセスを使用して D L 6 とコンジュゲートした。これに関して、所望の生成物は、各 L C 定常領域上の不对システイン (C 2 1 4) に最大限にコンジュゲートし、2 より大きい (D A R > 2) 薬物対抗体比 (D A R) を有する A D C を最小化する一方で、D A R が 2 の (D A R = 2) A D C を最大化する、A D C である。コンジュゲーションの特異性をさらに改善するために、安定化剤 (例えば、L - アルギニン) および穏やかな還元剤 (例えば、グルタチオン) を含むプロセスを使用して抗体を選択的に還元し、この後、リンカー薬物を用いたコンジュゲーションを行った。次いで A D C を分取疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C)、続いて、原薬を製造するためのダイアフィльтраーションおよ

50

び製剤化工程により処理した。このプロセスを下記で詳細に説明する。

【0525】

部位特異的抗体構築物を、1 MのL-アルギニン/5 mMのEDTAを所定濃度の還元型グルタチオン(GSH)と共に含有するpH 8.0の緩衝液中で最低2時間、室温で部分的に還元させた。次いで全ての調製物を、30 kDa膜を用いて20 mMのTris/3.2 mMのEDTA、pH 7.0バッファーへとバッファー交換し、還元バッファーを除去した。次いで、得られた部分還元調製物を、20 で最低30分間、マレイミドリンカーを介してPBD1(上記で示したDL6)とコンジュゲートした。次いで水中で調製した10 mMの原液を使用して、リンカー薬物と比較して過剰のNACを添加することにより、反応をクエンチした。最低20分間クエンチした後、0.5 Mの酢酸を添加してpHを6.0に調整した。次いでpH調整したADCを、分取疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)(ブチルセファロースFF)によりDAR2種をさらに精製するための溶出工程を含む結合および溶出モードで処理した。次いで精製したADCを、30 kDa膜を用いてダイアフィルトレーションによりダイアフィルトレーションバッファーにバッファー交換した。次いでダイアフィルトレーションした抗DLL3 ADCを、ショ糖およびポリソルベート20を用いて製剤化し、目的の最終濃度にして、部位特異的原薬を製造した。

10

【0526】

[実施例7]

免疫組織化学

20

免疫組織化学(IHC)を、原発性ヒト腫瘍組織切片に実施し、腫瘍細胞におけるDLL3の発現および位置を評価した。

【0527】

IHC適合抗DLL3抗体を同定するために、本発明の多数の抗DLL3抗体を使用して、IHCをHEK293T親細胞ペレットまたはDLL3発現HEK293T細胞ペレットに実施した。いくつかのマウス抗DLL3抗体(SC16.65)は、試験した本発明の他の抗DLL3抗体よりも効果的にDLL3過剰発現HEK293T細胞ペレットを特異的に検出することができた(データ示さず)。これらの抗体がDLL3を特異的に検出する能力を、関連抗DLL3抗体を5xモル比の過剰のhDLL3-Hisタンパク質と混合し、次いでDLL3発現HEK293Tホルマリン固定およびパラフィン包埋(FFPE)切片と共にインキュベートする競合実験により確認した。陽性染色が存在しないことにより、hDLL3-Hisタンパク質が、DLL3過剰発現HEK293T細胞に対する抗DLL3抗体の結合に干渉していることが実証された(データ示さず)。

30

【0528】

IHCを、下記に記載するように、当技術分野の標準であるホルマリン固定およびパラフィン包埋(FFPE)組織に実施した。組織の平らな部分を切断し、顕微鏡スライドガラス上に載せた。キシレン脱パラフィン後、5 μmの切片を、抗原回収溶液(Dako)を用いて99 で20分間前処理し、75 に冷却し、次いで、0.3%過酸化水素を含むPBS、次いで、アビジン/ビオチンブロッキング溶液(Vector Laboratories)で処理した。この後、FFPEスライドを、3%BSAを含むPBSバッファー中10%ウマ血清でブロッキングし、3%BSA/PBS中で10 μg/mlに希釈した本発明の一次抗DLL3抗体と共に室温で30分間インキュベートした。FFPEスライドを、3%BSA/PBS中で2.5 μg/mlに希釈したビオチンコンジュゲート化ウマ抗マウス抗体(Vector Laboratories)と共に室温で30分間インキュベートした後、ストレプトアビジン-HRP(ABC Elite Kit; Vector Laboratories)中でインキュベートした。次いで、原発性ヒト腫瘍のFFPEスライドを、TSA増幅キット(TSA Amplification Kit; Perkin Elmer)の製造業者の指示書に従って、ビオチニルトリアミド中、次いでストレプトアビジン-HRP中でインキュベートした。発色性検出を、3,3'-ジアミノベンジジン(Thermo Scientific)を用いて5分間、

40

50

室温で展開させ、組織をMeyerヘマトキシリン(IHC World)で対比染色し、アルコールで洗浄し、キシレン中に浸漬した。PDX腫瘍は、TSA増幅を受けなかった。この後、切片を明視野観察法により観察し、腫瘍上皮上のDLL3膜発現をHスコアにより記した。Hスコアは、式： $3 \times$ 強く染色している膜状表面のパーセンテージ $+ 2 \times$ 中程度に染色している膜状表面のパーセンテージ $+ 弱く染色している膜状表面のパーセンテージ$ により得られ、0から300の範囲となる。試験の結果を図3Aおよび3Bに示す。

【0529】

図3Aおよび3BにDLL3タンパク質の発現対全生存(OS)ならびに限定対広範SCLC腫瘍における(図3A)または未処理腫瘍および化学療法不応性SCLC腫瘍におけるDLL3タンパク質の発現をグラフによって示す。図3Aの実験により、DLL3発現が全生存(従来技術の標準治療薬で治療した患者における)を示さず、限定SCLC腫瘍および広範SCLC腫瘍の両方がDLL3のレベルの変化を示すことがわかる。DLL3発現が患者生存と逆相関したメラノーマと異なり、神経内分泌の特徴を示す腫瘍におけるDLL3発現が、標準治療療法に関して死亡を示すものでないと思われる。同様に図3Bは、DLL3発現レベルが未処理腫瘍および標準治療腫瘍の両方でほぼ同じであることを示している。さらに図3Bは、300ポイントスケール上の約90(点線)および180(実線)の経験的に得られたDLL3 Hスコアを示す。90と180との間の他のDLL3 Hスコア(例えば、120)も得られた(図示せず)。これらのHスコアを実施例8に記載される第I相試験に従って検討したところ、本発明のDLL3 ADCによる治療に良好な反応を示し得る患者を示すことが見出された。したがって、一実施形態において、本発明のDLL3 ADCにより治療される患者は、少なくとも90のDLL3 Hスコアを有する。他の実施形態において、本発明のDLL3 ADCにより治療される患者は、少なくとも120のDLL3 Hスコアを有する。さらに他の実施形態において、本発明のDLL3 ADCにより治療される患者は、少なくとも150のDLL3 Hスコアを有し、より好ましくは少なくとも180のDLL3 Hスコアを有する。本開示の目的のために、90またはそれ以上のDLL3 Hスコアを示す任意の腫瘍(または、上記で議論したように、構成細胞の10%がDLL3を発現する場合)は、DLL3+であり、本開示の化合物および組成物により潜在的に治療可能であるとみなされる。

【0530】

他の試験において200ポイントスケールを有するHスコアも開発されたことに注意されたい。このような200Hスコアスケールにおいて、120のHスコアは、300Hスコアスケール上の180のHスコアとほぼ同等である。両方の場合(例えば、120/200または180/300)において、このようなHスコアを、バイオマーカー陽性(BM+)またはDLL3+(すなわち、これらの両方が300ポイントスケール上の90のHスコアを上回り、および/または構成細胞の10%がDLL3を発現する)と分類することができ、本発明の治療方法に良好な反応を示し得る患者を示唆する。

【0531】

[実施例8]

SC16.56PBD1(SC16LD6.5)試験の概要および結果

再発性小細胞肺癌(SCLC)および大細胞神経内分泌癌(LCNEC)を有する患者を治療するための、本開示のDLL3標的化ADCを用いる可能性を探究するために第I相臨床試験を実施した。該臨床試験の概要を図4Aに示す。

【0532】

背景：ロバルピツズマブ テシリン(Rovalpituzumab tesirine)(すなわち、Rova-T、本明細書に記載されるSC16LD6.5、hSC16.56PBD1またはhSC16.56DL1)は、2の薬物対抗体比を有する、ヒト化モノクローナル抗体、ジペプチドリンカーおよびピロロベンゾジアゼピン(PBD)二量体毒素からなるデルタ様タンパク質3(DLL3)標的化抗体薬物コンジュゲート(ADC)である。SC16LD6.5を、GMP条件下で実施例6で示した通りに実質的に調

製することができる。DLL3は、SCLCおよびLCNEC腫瘍の約3分の2を含む、ヒト神経内分泌腫瘍およびこれらの腫瘍開始細胞において、高度に発現する。DLL3タンパク質は、正常組織において検出可能なレベルで発現しない。ロバルピツズマブ テシリンは、腫瘍の退縮をもたらし、DLL3発現SCLCおよびLCNEC患者に由来する異種移植片(PDX)腫瘍モデルにおける進行までの時間をシスプラチン/エトポシドより著しく延長する。この有望な活性に基づいて、再発性SCLCを有する患者におけるヒトにおける最初の第I相試験(NCT01901653)を開始し、予備的結果を下記に報告する。

【0533】

方法：1回または2回の以前のラインの治療の後の進行性疾患を有する患者(すなわち、セカンドライン患者またはサードライン患者)が、用量制限毒性(DLT)が認められるまで1-3例の患者コホートにおいて3週間毎(Q3W)に1回の漸増用量の単剤としてのロバルピツズマブ テシリンの投与を受けた。用量は、0.05、0.1、0.2、0.4および0.8mg/kg Q3Wであった。途中に得られた薬物動態データ(図4Bおよび下記実施例9により詳細に記載する)から、Q6Wスケジュールの評価を促進する、約11日という予想より長いADCの半減期が明らかにされた。先の実施例で述べたように、保管腫瘍試料における抗原の発現を評価するために、DLL3抗体を開発し、利用した。本試験の目的のために、バイオマーカー陽性(BM+)腫瘍を、IHC膜関連Hスコア 120(200Hスコアスケール上)により定義した。

10

【0534】

結果：79例の患者を治療した：34 Q3Wおよび45 Q6W；33F/46M；年齢中央値、61歳(44-81)。血小板減少症の急性および慢性DLTならびに漿液性滲出液(毛細血管漏出症候群「CLS」と第I相試験における研究者らによって誤って注釈がつけられた専門家からなるデータモニタリング委員会による)がそれぞれ0.8および0.4mg/kg Q3Wで認められた。0.2mg/kg Q3W×3サイクルおよび0.3mg/kg Q6W×2サイクルの最大耐容量(MTD)を拡大コホートにおいてさらに評価した。全ての患者におけるあらゆるグレードの最も一般的な(20%)治療で発生したAEは、疲労(47%)、呼吸困難(24%)、悪心(24%)および食欲不振(22%)であった。最も一般的な関連性のある治療で発生したSAEは、それぞれ11例(14%)および3例(3%)の患者において報告された、漿液性滲出液および血小板減少症であった(図4F)。

20

30

【0535】

登録患者から受け取った49個の保管腫瘍試料のうち、34個(69%)がDLL3 BM+であった。MTDで治療された27例の確認されたDLL3 BM+患者のうち、11例の患者(41%)が部分奏効(PR)を有し、12例の患者(44%)が85%の複合臨床的有用率(CBR)の安定疾患(SD)を達成した(図4E)。DLL3バイオマーカー状態を考慮せずにMTDで治療された全ての評価可能な患者(n=59)において、ORRは20%(n=12PR)および80%のCBRで、SD59%(n=35)であった(図4D)。注目すべきことに、MTDで治療されたPRを有する全ての患者、および最も持続性の臨床ベネフィットを有する患者(最大569日OS)は、BM+であった。第一選択療法に対して感受性および不応性で、標準治療が現在存在しない第三選択の状況にある患者において類似の反応率が認められた。

40

【0536】

興味深いことに、ADCへの同様の全曝露にもかかわらず、0.3mg/kg Q6W×2は、0.2mg/kg Q3W×3コホートと比較した場合に優れた反応持続時間を示し(図4C)、それぞれ平均で>175日対88日であった。図4Cは、同じ0.3mg/kg Q6W×2コホートは、0.2mg/kg Q3W×3コホートより良好な平均OSを有していたことをさらに示す。

【0537】

結論：ファーストインクラスのDLL3標的化ASCであるロバルピツズマブ テシリ

50

ン (R o v a - T) は、管理可能な毒性を有し、再発性 D L L 3 B M + S C L C を有するセカンドライン患者およびサードライン患者において単剤として有意な抗腫瘍活性 (4 1 % O R R および 8 0 % C B R) を有することを実証した。

【 0 5 3 8 】

[実施例 9]

S C 1 6 . 5 6 P B D 1 (S C 1 6 L D 6 . 5) の薬物動態

先の実施例で言及したように、S C 1 6 L D 6 . 5 の薬物動態 (P K) を上述の第 1 a / 1 b 相臨床試験において評価した。ヒト血清中の S C 1 6 L D 6 . 5 の濃度を、S C L C または L C N E C を有する患者への予め規定された用量の S C 1 6 L D 6 . 5 の投与後に評価した。血清レベル用の血液試料は、試験に参加した全ての対象から S C 1 6 L D 6 . 5 の対象への最初の投与の直前および 1 日目の複数の時点 (1 日目は注入の当日である) に採取した。血清測定用の追加の血液をサイクル 1 の 2、3、5、8 および 1 5 日目にそれぞれ 1 回採取した。サイクル 2 および 3 において、1 日目における注入の直前 (トラフ) および後 (ピーク) に血液を採取した。推定された定常状態時またはこの近くにおいて (サイクル 4)、追加の試料を 1、8 および 1 5 日目に採取した。血液の採取後に、試料を血清まで処理し、凍結した。

10

【 0 5 3 9 】

S C 1 6 L D 6 . 5 の血清濃度を、mesoscale discovery (M S D) プラットフォーム上の化学発光検出による酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) で測定した。このアッセイでは、1 つ以上のコンジュゲート毒素を有する S C 1 6 L D 6 . 5 を特異的に捕捉し、検出する抗イディオパシック抗体の対を用いた。このアッセイは、S C 1 6 L D 6 . 5 上の毒素コンジュゲートの数を識別することはできない。これらの測定濃度に基づいて濃度 - 時間プロファイルを作成した (図 4 B)。

20

【 0 5 4 0 】

S C 1 6 L D 6 . 5 の血清濃度に基づいて、ソフトウェアパッケージ P h o e n i x W i n N o n l i n を用いて非コンパートメント分析により S C 1 6 L D 6 . 5 の P K を推定した。P K は、曝露の用量比例的増加に対して線形であった。終末相半減期は、終末速度係数 (ラムダ) を決定するための濃度 - 時間プロファイルの終末相の対数線形回帰により推定した。2 の自然対数とラムダとの比率を計算して、終末相半減期を推定した。S C 1 6 L D 6 . 5 の終末相半減期は、3 週間ごとの 0 . 2 m g / k g の S C 1 6 L D 6 . 5 の投与後に約 1 0 . 1 日、6 週間ごとの 0 . 3 m g / k g の S C 1 6 L D 6 . 5 の投与後に約 1 2 . 1 日と推定された。この推定半減期は、ブレンツキシマブドチンおよびトラスツズマブエムタンシン (a d o - t r a s t u z u m a b e m t a n s i n e) のような他の抗体薬物コンジュゲートの推定半減期を超えている。このような予期しないほど長い半減期は、新規の投与レジメン (例えば、0 . 2 m g / k g Q 3 W x 3 および 0 . 3 m g / k g Q 6 W x 2) を用いて着実な治療指数を達成することを可能にする。

30

【 0 5 4 1 】

[実施例 1 0]

抗 D L L 3 A D C の凍結乾燥

長期保存およびその後の商業活動の選択肢を用意するために、本発明の例示的 D L L 3 - A D C を凍結乾燥した。次いで、医薬として適合するバイアル中で保存された凍結乾燥試料を用いて安定性試験を行って、P B D を含む A D C への技術の適用可能性を判定した。P B D 薬物リンカーコンジュゲートは、大きく、比較的疎水性であるので、長期安定性を示すこのような凍結乾燥組成物を提供し得るかどうかは、不明であった。

40

【 0 5 4 2 】

本試験のために、S C 1 6 L D 6 . 5 抗体薬物コンジュゲート調製物 (上記の実施例 6 で示した通りに実質的に調製した) を 1 0 m g / m L の S C 1 6 L D 6 . 5、1 7 5 m M のショ糖、2 0 m M の L - ヒスチジン塩酸塩 (p H 6 . 0) および 0 . 4 m g / m L のポリソルベート 2 0 で製剤化した。この例示的製剤は、第 I / I I 相臨床試験の意図される条件である - 7 0 の凍結液体として長期保存に適し、適切な条件下で凍結乾燥形態で潜

50

在的に安定であるので選択した。同じ製剤を用いた冷蔵条件（2 - 8 ）下での保存を目的とした凍結乾燥剤形（30 mg / バイアル、10 mL ガラスバイアル中約3 mL ）を後の臨床試験および潜在的な商業的使用のために開発した。

【0543】

凍結乾燥プロセスおよび条件は、開発規模凍結乾燥機を用いて得られた。プロセスは、次の工程：凍結ランプ、凍結ホールド、一次乾燥および二次乾燥を含む。このプロセスを用いて、臨床材料の製造を目的とした装置において凍結乾燥バイアルのバッチを製造した。凍結乾燥後に、粉末状DLL3 - ADCを含む栓付きバイアルを種々の温度（5 、 25 および40 ）で長期間保存した。所定の時点に選択されたバイアルを再構成し、得られた製剤を出発製剤からの何らかの材料の逸脱について分析した。6 カ月までの時点の分析の結果を図5 A - 5 Cに示す。

10

【0544】

データを参照すると、凍結乾燥ADCが選択された温度のいずれにおいても劣化をほとんど示さなかったことが実証されている。したがって、開発規模で製造された凍結乾燥バイアルは、実時間、ストレスおよび加速保存条件下で安定であることが実証された。

【0545】

[実施例 1 1]

インビボでの小細胞肺がんの腫瘍成長を抑制する抗DLL3 ADCおよび抗PD - 1 抗体の併用

上記で議論したように、本発明のDLL3 ADCを、様々なDLL3 発現腫瘍を効果的に治療するために抗PD - 1 抗体と併用することができる。本発明の治療能力を実証するために、hSC16 . 56DL1 (R o v a - T) を、小細胞肺がん (S C L C) の同系インビボモデルにおいてPD - 1 とこのリガンドPD L 1 との間の相互作用を阻害する抗PD - 1 抗体と併用して試験した。

20

【0546】

R o v a - T は、本出願において実証されたように、臨床状況においてSCLCに対する活性を示したDLL3 特異的抗体薬物コンジュゲートである。活性化T細胞上に主として発現するPD - 1 とこのリガンドPD - L 1 およびPD - L 2 との間の相互作用を阻害する、PD - 1 に対する抗体は、多くのがん適応における臨床的有用性を示した。現在、抗PD - 1 抗体薬物O p d i v o (登録商標) (ニボルマブ) およびK e y t r u d a (登録商標) (ペンブロリズマブ) は、メラノーマ、非小細胞肺がん (N S C L C) 、頭頸部扁平上皮がんおよびホジキンリンパ腫を有する特定の患者における使用について承認されているが、SCLCを有する患者のサブセットにおいてもある程度の活性が実証された。併用して用いた場合にR o v a - T および抗PD - 1 抗体が抑制、中性、相加または相乗効果を有するかどうかを判定するために、単剤としてのおよび併用したこれらの活性をSCLCの動物モデルにおいて試験した。

30

【0547】

抗PD - 1 抗体の作用機序が免疫適格性の宿主を必要とするので、DLL3 発現マウス細胞株KP1を免疫適合性同系マウスと共に用いた。KP1細胞株は、RB1およびTP53 遺伝子を欠くマウスの肺に見出された自発小細胞肺がんから得られた (P M I D : 2 1 9 8 3 8 5 7) 。 R o v a - T は、ヒトおよびマウスDLL3 タンパク質に同等の親和性で結合することができ、インビトロでDLL3 発現細胞に対して細胞毒性活性を有するため、薬物をマウスモデルにおいて用いることができる。しかし、ニボルマブもペンブロリズマブもマウスPD - 1 と十分に相互作用しないので、抗マウスPD - 1 代用抗体クローンを選択した。これに関して、B i o L e g e n d (S a n D i e g o , U S A) からの抗マウスPD - 1 抗体クローンEH12 . 2 H 7 は、臨床状況で使用される抗ヒト抗体と同様に、PD - 1 とPD - L 1 との間の相互作用を阻害し、これらのT細胞増強および抗がん活性を模倣することが示された。

40

【0548】

K P 1 細胞を、B 6 1 2 9 S F 1 / J マウス (T h e J a c k s o n L a b o r a

50

tory #101043、USA)の側腹部における皮下腫瘍として成長させた。腫瘍体積は、キャリパーで週2回測定した。平均腫瘍体積が約200 mm³であった場合、マウスを各5匹のマウスのコホートに無作為化した。腹腔内注射により、マウスをSC16LD6.5(「Rova-T」、0.1 mg/kg、1日目の治療のみ)またはHuIgG1.DL1(「HuIgG1.PBD」、0.5 mg/kg、1日目の治療のみ)のいずれかにより治療し、同じマウスを抗マウスPD-1抗体(「抗PD-1」200 μg/マウス、1、3、7日目に治療; BioLegend、USA)またはラットIgG2a抗体(「Rat IgG2a」、200 μg/マウス、1、3、7日目に治療; BioLegend、USA)のいずれかによっても治療した。腫瘍体積を週2回測定し続け、腫瘍体積が1500 mm³を超えたとき、マウスを安楽死させた。試験の結果を本明細書に添付した図6Aおよび6Bに示す。

10

【0549】

図6Aに示すように、抗PD-1抗体およびHuIgG1.PBD対照の併用は、KP1腫瘍成長を有意に抑制しなかった。同様に、Rat IgG2a(抗PD-1のアイソタイプ対照)とHuIgG1.PBD対照またはRova-Tの併用は、かなりの時間にわたりインビポでKP1腫瘍の成長を実質的に抑制しない(図6A)。遅延は広範でなかったが、これらの投与量ではRova-Tが本質的に単剤として作用し、腫瘍成長のある程度の抑制を明らかに示したことが理解される。

【0550】

同様に、図6Bに示すように、対照治療HuIgG1.PBD+Rat IgG2aおよびHuIgG1.PBD+抗PD-1併用は、KP1腫瘍体積が300 mm³を超えて成長するまでの時間を実質的に延長しなかった。さらに、図6Bに示す用量では、Rova-T+アイソタイプ対照(Rat IgG2a)併用は、HuIgG1.PBDによる治療と比較してKP1腫瘍成長を有意に抑制しない。Rova-T(hSC16.56DL1)は、唯一の活性剤として本質的に作用して、0.5 mg/kgの用量でKP1腫瘍を完全に除去する(データ示さず)が、0.1 mg/kgの比較的低い用量は、この腫瘍細胞株に対してほとんど効果を示さない。

20

【0551】

対照併用と極めて対照的に、併用したRova-Tおよび抗PD-1抗体による治療は、2つの活性剤いずれかの単独による治療と比較して、インビポでのKP1腫瘍成長の有意な抑制をもたらした(図6Aおよび6B)。図6Aおよび6Bの両方に示すように、平均腫瘍成長は、高度に遅延した。併用対照治療群の全てのマウスが17日後に300 mm³より大きい腫瘍を有していたが、5匹のうち2匹のみ(40%)の併用群マウスが300 mm³より大きい腫瘍を有していた(図6B)。同様に、図6Aは、Rova-Tおよび抗PD-1抗体により治療したマウスにおける平均腫瘍体積は、Rova-T+アイソタイプ対照治療マウスの2倍を超える期間にわたり1000 mm³未満に留まっていたことを示している。さらに、Rova-T+抗PD-1により治療した群の腫瘍成長抑制パーセンテージの中央値(最小測定治療後腫瘍体積が開始腫瘍体積より小さかったパーセンテージ)は、69%であったのに対して「HuIgG1.PBD+Rat IgG2a」治療群で0%、「HuIgG1.PBD+抗PD-1」治療群で0%、「Rova-T+Rat IgG2a」治療群で0%であった。この腫瘍成長抑制データは、DLL3ADCおよび抗PD-1抗体の併用は、実際に相乗的であり得ることを強く示唆する。

30

40

【0552】

いずれにしてもこの実施例に示すデータは、DLL3ADCと抗PD-1抗体との併用が腫瘍体積を減少させ、腫瘍保有マウスの長く持続する生存を促進することによってSCLCに対する、相乗的効果でないとしても、少なくとも相加的効果を実証することを明確に示す。抗PD-1抗体と併用したアイソタイプPBDADCによる治療がビヒクル対照に対して有効性の改善を示さないことから、観察された効果は、特異的であり、Rova-TによるDLL3の認識に依存する。Rova-Tと併用したアイソタイプ対照Abが同じ結果を示さないことから、測定された効果は、少なくとも一部は、PD-1結合

50

および阻害にも起因する。

【0553】

まとめると、提示したデータは、R o v a - TによるD L L 3発現がんの標的化細胞の殺傷が、P D - 1および/またはP D - L 1抗体の使用を含む免疫療法を含む、免疫療法の効果をさらに増大させ得ることを示している。

【0554】

本明細書で引用されている全ての特許、特許出願、および出版物、ならびに電子工学的に利用可能な資料(例えば、GenBankおよびRefSeqにおけるヌクレオチド配列提出物、ならびに例えば、SwissProt、PIR、PRF、PBDにおけるアミノ酸配列提出物ならびにGenBankおよびRefSeqにおける注釈の付されたコード領域からの翻訳物を含む)の完全な開示は、参照により組み込まれる。前述の詳細な説明および実施例は、理解を明確にするためにのみ提供される。それによって不必要に限定されないことが理解されるものとする。当業者に明らかな変形が特許請求の範囲によって定義された本発明に含まれることから、本発明は、示され、記載されている正確な詳細に限定されない。

10

【図1A-1】

Table with 7 columns: mAb, FN1, CDR1, FN2, CDR2, FN3, CDR3, FN4, 配列番号. Lists antibody sequences for various mAbs.

例示的マブ抗DLL3抗体軽鎖可変領域のヌ/酸配列

【図1A-2】

Table with 7 columns: mAb, FN1, CDR1, FN2, CDR2, FN3, CDR3, FN4, 配列番号. Lists antibody sequences for various mAbs.

例示的マブ抗DLL3抗体軽鎖可変領域のヌ/酸配列

FIG. 1A

FIG. 1A 続き

【 図 3 B 】

DLL3発現は未処理腫瘍および化学療法不応性SCLC腫瘍の両方において上昇する

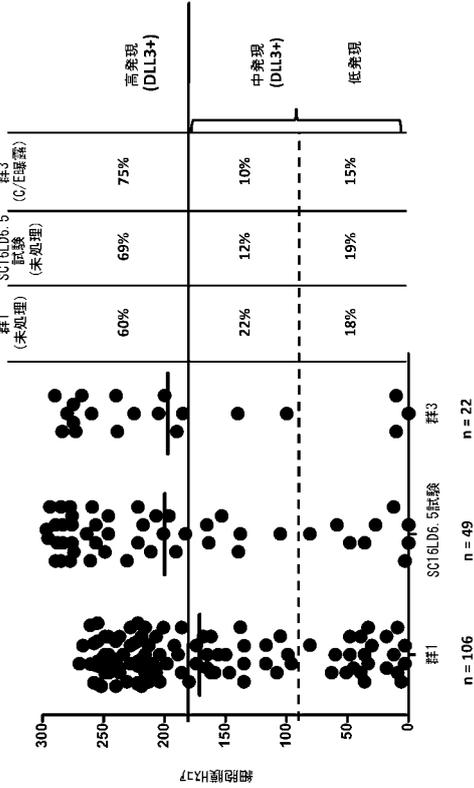


FIG. 3B

【 図 4 B 】

DLL3 ADCは比較的最長半減期を示す

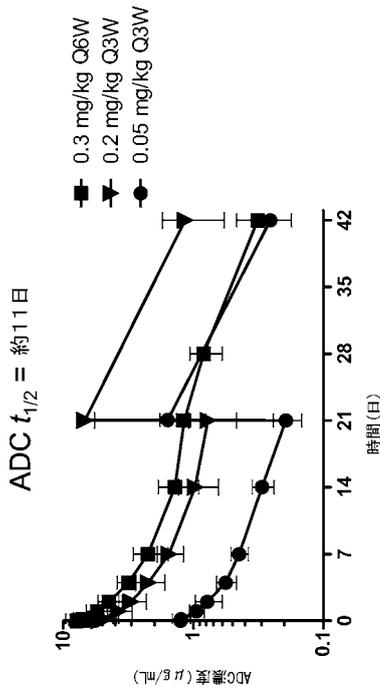


FIG. 4B

【 図 4 A 】

第1a/1b相臨床試験概要

80例の患者が試験に登録された

・73例(91%) SCLC、7例(9%) LCNEC

・41例(51%) 初ドライン、39例(49%) サードライン

・第一選択反応: 45例(58%) 感受性、33例(42%) 抵抗性*

・49例(61%) が保管腫瘍試料を提供した: 69%がDLL3の「高発現者」である

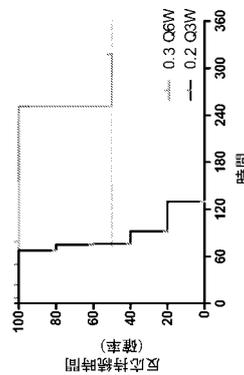
・0.3mg/kg Q6W & 0.2mg/kg Q3Wの拡大コホートにおける68例(85%)の患者

*2例の患者について情報が入手不能

FIG. 4A

【 図 4 C 】

0.3mg/kg Q6W DLL3 ADCは優れた反応の持続時間をもたらす



反応	無進行に留まった数	平均DOR (範囲)	#生存数	平均OS	
0.2 Q3W	5	0	88 (68-130)	1	181+
0.3 Q6W	7	6	175+ (50-318) [†]	7	213+
0.4 Q3W	2	0	164 [‡]	1	423+

[†] 未だ確認されなかった最後の30日以内に認められた3件の新たな反応を除いたDORおよびOS
[‡] 進行の徴候の前の後の化学療法のため検閲された1例の患者

FIG. 4C

【 図 4 D 】

SC16LD6.5: 評価可能な患者における最良反応率
0.2mg/kgQ3Wおよび0.3mg/kgQ6W併用 (n=59)

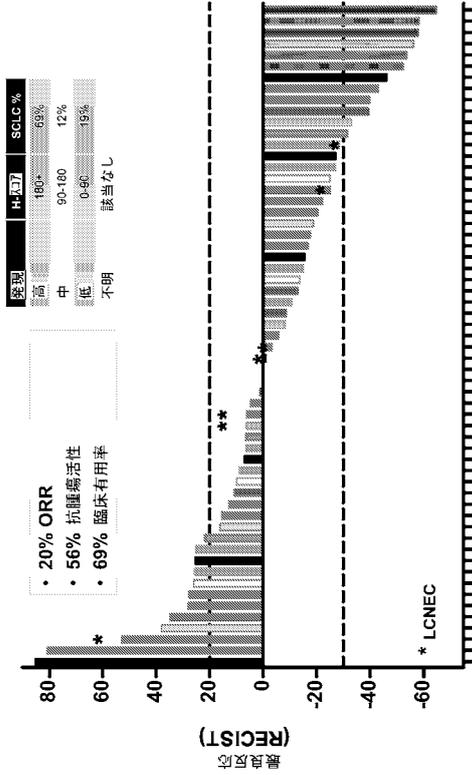


FIG. 4D

【 図 4 E 】

SC16LD6.5: 評価可能なDLL3+患者における反応
0.2mg/kgQ3Wおよび0.3mg/kgQ6W併用

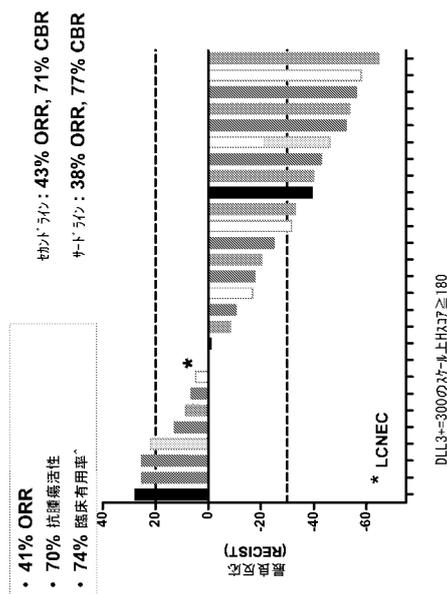


FIG. 4E

【 図 4 F 】

報告された有害事象

新1b相臨床試験

登録患者の数	0.05 Q3W		0.1 Q3W		0.2 Q3W		0.3 Q6W		0.4 Q3W		0.4 Q6W		0.8 Q3W	
	全体	Gr 3/4	全体	Gr 3/4	全体	Gr 3/4	全体	Gr 3/4	全体	Gr 3/4	全体	Gr 3/4	全体	Gr 3/4
用室/カプセル	67%	0%	24%	4%	28%	5%	33%	0%	100%	33%	100%	33%	100%	50%
疲労	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
血小小板減少症	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
食欲不振	67%	0%	0%	0%	4%	0%	4%	0%	33%	0%	33%	0%	0%	0%
斑丘疹状発疹	33%	0%	0%	0%	12%	0%	13%	5%	33%	0%	0%	0%	50%	0%
末梢浮腫	33%	0%	0%	0%	16%	0%	13%	3%	0%	0%	67%	0%	0%	0%
貧血	0%	0%	0%	0%	12%	0%	13%	0%	33%	0%	33%	0%	50%	0%
紅斑	0%	0%	0%	0%	8%	4%	13%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
薬液性滲出	0%	0%	16%	12%	10%	0%	10%	0%	67%	67%	67%	67%	50%	50%
悪心	33%	0%	0%	0%	20%	0%	10%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	0%
嘔吐	67%	0%	0%	0%	8%	0%	5%	0%	33%	0%	33%	0%	50%	0%

FIG. 4F

【 図 5 A 】

凍結乾燥DLL3 ADC -5°C安定性

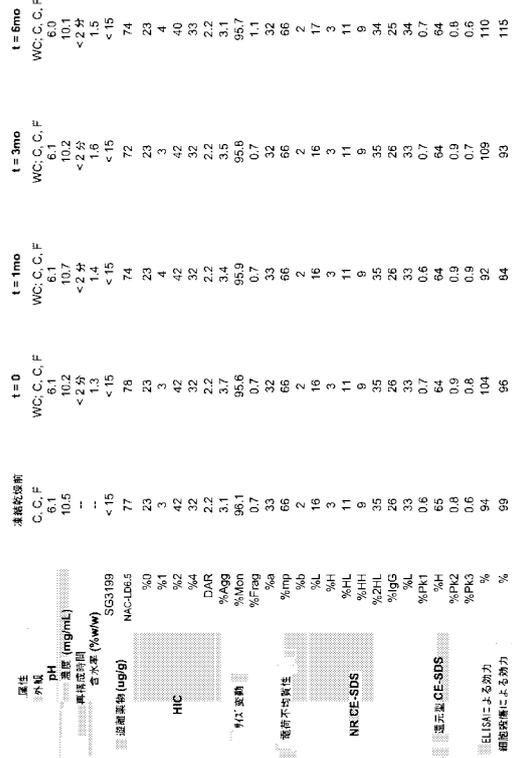


FIG. 5A

*RECISTにより標的病変がSDまたはより良好と認められた患者は臨床的進捗を有していた

DLL3+300のカテゴリ上Hx37 ≥ 180

* LCNEC

凍結乾燥DLL3 ADC -25°C安定性

【 図 5 B 】

凍結乾燥前	t = 0		t = 1mo		t = 3mo		t = 6mo	
	C, C, F	WC, C, C, F						
凍結乾燥前	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1
外観	10.5	10.6	10.4	10.4	10.4	10.4	10.0	10.0
濃度 (mg/mL)	< 2分	< 2分	< 2分	< 2分	< 2分	< 2分	< 2分	< 2分
凍結乾燥時間	1.7	1.3	1.7	1.7	1.7	1.7	2.0	2.0
再水率 (%w/w)	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15
凍結乾燥物 (ug/g)	77	78	79	70	70	70	70	70
SG3189	23	23	23	23	23	23	23	23
MACLD5	3	3	4	4	3	3	4	4
%0	42	41	42	41	41	40	40	40
%1	32	33	33	33	33	33	33	33
%2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
%3	3.1	3.4	3.5	3.5	3.5	3.3	3.3	3.3
%4	96.1	96.6	96.8	96.8	96.8	96.7	96.7	96.7
DAR	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6
%Agg	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
%Non	66	66	66	66	66	66	66	66
%F89	2	2	2	2	2	2	2	2
%a	16	16	16	16	16	16	16	16
%b	3	3	3	3	3	3	3	3
%HL	11	11	11	11	11	11	11	11
%HH	9	9	9	9	9	9	9	9
%2HL	35	35	35	35	35	35	35	35
%HL	26	26	26	26	25	25	25	25
%GG	33	33	33	33	33	33	34	34
%L	0.6	0.7	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6
%PK1	65	64	64	64	65	64	64	64
%H	0.6	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
%PK2	0.6	0.8	0.8	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6
%PK3	94	104	111	111	99	99	104	127
%	99	96	88	88	109	109	96	96

FIG. 5B

凍結乾燥DLL3 ADC -40°C安定性

【 図 5 C 】

凍結乾燥前	t = 0		t = 1mo		t = 3mo		t = 6mo	
	C, C, F	WC, C, C, F						
凍結乾燥前	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1
外観	10.5	10.2	11.0	10.9	10.9	10.9	10.8	10.8
濃度 (mg/mL)	< 2分	< 2分	< 2分	< 2分	< 2分	< 2分	< 2分	< 2分
凍結乾燥時間	1.3	1.3	2.5	2.3	2.3	2.3	2.2	2.2
再水率 (%w/w)	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15
凍結乾燥物 (ug/g)	77	78	74	61	61	61	58	58
SG3189	23	23	23	23	23	23	23	23
MACLD5	3	3	3	3	3	3	3	3
%0	42	41	41	40	40	39	39	39
%1	32	32	33	33	33	33	34	34
%2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
%3	3.1	3.7	3.5	3.7	3.7	3.6	3.6	3.6
%4	96.1	95.6	95.7	95.7	95.4	95.2	95.2	95.2
DAR	0.7	0.7	0.8	0.9	0.9	0.9	1.2	1.2
%Agg	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66
%Non	2	2	2	2	2	2	2	2
%F89	16	16	16	16	16	16	17	17
%a	3	3	3	3	3	3	3	3
%b	11	11	11	11	11	11	11	11
%HL	9	9	9	9	9	9	9	9
%HH	35	35	35	35	35	35	35	35
%2HL	26	26	26	26	26	26	26	26
%HL	33	33	33	33	33	33	33	33
%L	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
%PK1	64	64	64	64	64	64	64	64
%H	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
%PK2	0.6	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
%PK3	94	104	102	102	102	102	116	116
%	99	96	96	122	122	97	97	97

FIG. 5C

【 図 6 A 】

抗DLL3 ADCおよび抗PD1抗体は併用で腫瘍成長を抑制する

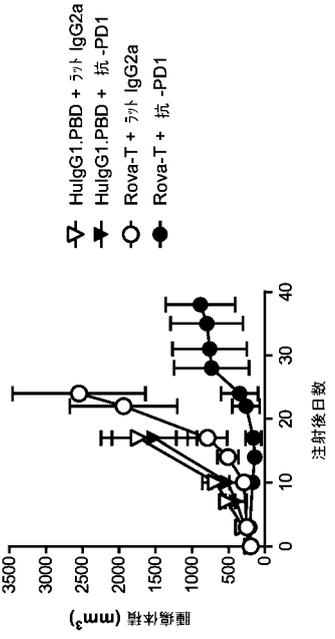


FIG. 6A

【 図 6 B 】

抗DLL3 ADCおよび抗PD1抗体は併用で腫瘍成長を抑制する

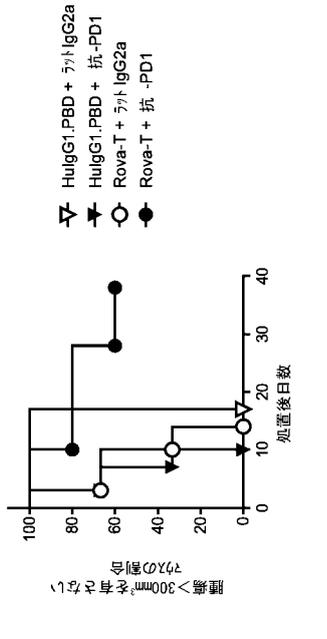


FIG. 6B

【配列表】

2018529656000001.app

【 国際調査報告 】

PCT/US2016/047870 06.02.2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/47870

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:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

PCT/US2016/047870 06.02.2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/47870

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(B) - A61K 47/48, C07K 16/00, C07K 16/30, C07K 16/28, A61K 39/395 (2016.01) CPC - C07K 16/30, C07K 16/3023, C07K 16/28, C07K 16/3069, C07K 16/18, C07K 16/2809, A61K 47/48384 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) IPC(B) - A61K 47/48, C07K 16/00, C07K 16/30, C07K 16/28, A61K 39/395 (2016.01) CPC - C07K 16/30, C07K 16/3023, C07K 16/28, C07K 16/3069, C07K 16/18, C07K 16/2809, A61K 47/48384		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 47/48469, A61K 47/48561, A61K 47/48538, A61K 47/481, A61K 47/48592, A61K 47/48715, A61K 47/48407, A61K 47/48723, A61K 31/5517, G01N 33/57423, G01N 33/57492, G01N 2333/70590, A61K 39/3955, A61K 51/1096, C07K 2317776		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGFP,USPT,USOC,EPAB,JPAB); PatBase, Google/Scholar: Pyrrolbenzodiazepine, PBD1, anti-PD-1 antibody, anti-PL-L1 antibody, pembrolizumab, nivolumab, pidlizumab, avelumab, atezolizumab, durvalumab, SNCA, alpha-synuclein, NACP, Non-A4 component of amyloid precursor, Non-A beta component of AD amyloid, PARK1, PARK4, PD1, PD-1		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/0370037 A1 (STEM CENTRX, INC.) 18 December 2014 (18.12.2014) claim 21, Fig16, para [0058], [0097]-[0099], [0936]-[0945]	1-5, 23, 24
X — Y	WO 2015/031693 A1 (STEM CENTRX INC., et al.) 05 March 2015 (05.03.2015) claim 15, pg 2, 6, 10, 40, 48, 49, 92, 100, 128	38-45, 63 67-78
Y	Spigel, et al. Rationale for chemotherapy, immunotherapy, and checkpoint blockade in SCLC: beyond traditional treatment approaches. J Thorac Oncol. 2013, 8(5):587-98; pg 594, col 2	67-69, 73-75
Y	Schalper, et al. Programmed death-1/programmed death-1 ligand axis as a therapeutic target in oncology: current insights. Journal of Receptor, Ligand and Channel Research ePub 23 December 2014:8 1-7; Abstract, pg 2, col 1; pg 4, Table 2; pg 5, col 2	70-72, 76-78
X,P	Saunders, et al. A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. Sci Transl Med. 26 August 2015, 7(302):302ra136; in entirety	1-5, 23, 24, 38-45, 63, 67-78
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
04 January 2017	06 FEB 2017	
Name and mailing address of the ISA/US	Authorized officer:	
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Lee W. Young	
	PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774	

PCT/US2016/047870 06.02.2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/47870

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 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.: 6-22, 46-62
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I: Claims 1-5, 23, 24, 38-45, 63, 67-78, directed to a method comprising administering an anti-DLL3 ADC.

Group II: Claims 25-37, 64-66, directed to a lyophilized composition comprising the antibody drug conjugate (ADC) of the formula Ab-[L-D]n (claims 25-37) and an anti-DLL3 ADC of the specified formula (claims 64-66).

***** See Supplemental Sheet to continue *****

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5, 23, 24, 38-45, 63, 67-78

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT/US2016/047870 06.02.2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/47870

***** Supplemental Sheet *****

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

The inventions of Group II do not include the shared or common technical feature of a method comprising administering an anti-DLL3 ADC, as required by Group I.

The inventions of Group I do not include the shared or common technical feature of a lyophilized composition comprising an anti-DLL3 ADC or an anti-DLL3 ADC of the specified formula, as required by Group II.

Common Technical Features

The inventions of Groups I and II share the technical feature of an anti-DLL3 ADC. The inventions of Group I and some inventions of Group II share the technical feature of a method for treating cancer by administering the anti-DLL3 ADC to the subject. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art as being anticipated by WO 2015/031693 A1 to STEM CENTRX INC [US], et al. (05 March 2015) (hereinafter "STEM CENTRX").

STEM CENTRX discloses an anti-DLL3 ADC (claim 1, Fig 4, pg 50, ADC 5) and a method for treating cancer by administering the anti-DLL3 ADC to the subject (pg 2, "the present invention provides novel delta-like ligand 3 (or DLL3) site specific conjugates comprising pyrrolbenzodiazepine ("PBD") payloads that effectively target tumor cells and/or cancer stem cells and may be used to treat patients suffering from a wide variety of malignancies"). As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K	9/19	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	

(81) 指定国 AP(BW, 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, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (72) 発明者 スリンガーランド, ブライアン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94080、サウス・サン・フランシスコ、イースト・ジェイミー・コート・450
- (72) 発明者 ハン, テ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94080、サウス・サン・フランシスコ、イースト・ジェイミー・コート・450
- (72) 発明者 ビーティー, ジョン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94110、サン・フランシスコ、トゥエンティセカンド・ストリート・2866
- (72) 発明者 カルスンキー, ホルガー
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94061、レッドウッド・シティ、デラウェア・アベニュー・2764
- (72) 発明者 アンダーソン, ウェイド・シー
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94534、フェアフィールド、ノースウッド・ドライブ・1420

F ターム(参考) 4C076 AA29 AA95 CC27 EE59
4C085 AA14 BB01
4H045 AA11 AA30 BA41 BA51 DA76 EA28