(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-509365
(P2025-509365A)
(43)公表日　令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/28	*(2006.01)*	C07K	16/28	ZNA	4B065
C12N 15/13	*(2006.01)*	C12N	15/13		4C076
C12N 15/62	*(2006.01)*	C12N	15/62		4C084
C12N 15/52	*(2006.01)*	C12N	15/52	Z	4C085
C12N 1/15	*(2006.01)*	C12N	1/15		4C086

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全134頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-553616(P2024-553616)
(86)(22)出願日　令和5年3月9日(2023.3.9)
(85)翻訳文提出日　令和6年11月11日(2024.11.11)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/056081
(87)国際公開番号　WO2023/170240
(87)国際公開日　令和5年9月14日(2023.9.14)
(31)優先権主張番号　22161191.6
(32)優先日　令和4年3月9日(2022.3.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　591032596
メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
Ｍｅｒｃｋ Ｐａｔｅｎｔ Ｇｅｓｅｌｌｓｃｈａｆｔ ｍｉｔ ｂｅｓｃｈｒａｅｎｋｔｅｒ Ｈａｆｔｕｎｇ
ドイツ連邦共和国 デー－６４２９３ ダルムシュタット フランクフルター シュトラーセ ２５０
Ｆｒａｎｋｆｕｒｔｅｒ Ｓｔｒ． ２５０，Ｄ－６４２９３ Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｆｅｄｅｒａｌ Ｒｅｐｕｂｌｉｃ ｏｆ Ｇｅｒｍａｎｙ
(74)代理人　110003971
弁理士法人葛和国際特許事務所
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗ＣＥＡＣＡＭ５抗体および抱合体ならびにその使用

(57)【要約】
本発明は、ヒトCEACAM5タンパク質に結合する抗体、ならびに該抗体をコードする配列を含む単離された核酸および宿主細胞を提供する。本発明はまた、成長阻害性薬剤へ連結された該抗体を含む免疫抱合体、および本発明の抗体または免疫抱合体を含む医薬組成物も提供する。また本発明は、がんの処置のためのまたは診断目的のための、本発明の抗体、免疫抱合体、および医薬組成物の使用も提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトCEACAM5タンパク質へ結合する、単離された抗体;
ならびにここで単離された抗体が、
(i)GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP、およびTLQSAからなる群から選択される配列を含む、少なくとも1つの軽鎖定常領域(CL)、好ましくはこの配列を該軽鎖定常領域のC末端にて含む;
および/または
(ii)以下のアミノ酸置換の1以上を含む、少なくとも1つの重鎖定常領域(CH):
(a)L234AおよびL235A(LALA突然変異);
(b)L234AおよびL235AおよびP329G(LALA-PG突然変異);
(c)L235AおよびG237A(LAGA突然変異);
(d)M252YおよびS254TおよびT256E(YTE突然変異);
(e)K222R
を含む;
ならびにここでEuナンバリングが、該アミノ酸置換のために使用される;
ならびにここで該単離された抗体が、配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR1-H、配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR2-H、配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR3-H、配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR1-L、配列番号7のアミノ酸配列からなるCDR2-L、および配列番号8のアミノ酸配列からなるCDR3-Lを含む、前記単離された抗体。
【請求項２】
該単離された抗体が、構造FR1 - CDR1-H - FR2 - CDR2-H - FR3 - CDR3-H - FR4、およびFR5 - CDR1-L - FR6 - CDR2-L - FR7 - CDR3-L - FR8を有するフレームワーク領域FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7、およびFR8を含む;ここでFR1が、配列番号54からなり、FR2が、配列番号55からなり、FR3が、配列番号56からなり、FR4が、配列番号57からなり、FR5が、配列番号58からなり、FR6が、配列番号59からなり、FR7が、配列番号60からなり、およびFR8が、配列番号61からなる、請求項1に記載の単離された抗体。
【請求項３】
ヒトCEACAM5タンパク質へ結合する、単離された抗体;
ならびに単離された抗体が、
(i)GGTLQSPP、TLQSPP、TLQSA、およびTLQSGからなる群から選択される配列を含む、少なくとも1つの軽鎖定常領域(CL)、好ましくはこの配列を該軽鎖定常領域のC末端にて含む;
および/または
(ii)以下のアミノ酸置換の1以上を含む、少なくとも1つの重鎖定常領域(CH):
(a)L234AおよびL235A(LALA突然変異);
(b)L234AおよびL235AおよびP329G(LALA-PG突然変異);
(c)L235AおよびG237A(LAGA突然変異);
(d)M252YおよびS254TおよびT256E(YTE突然変異);
(e)K222R
を含む;
ならびにここでEuナンバリングが、該アミノ酸置換のために使用される;
ならびにここで、好ましくは、該単離された抗体が、配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR1-H、配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR2-H、配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR3-H、配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR1-L、配列番号7のアミノ酸配列からなるCDR2-L、および配列番号8のアミノ酸配列からなるCDR3-Lを含む;
ならびにここで該単離された抗体が、構造FR1 - CDR1-H - FR2 - CDR2-H - FR3 - CDR3-H - FR4、およびFR5 - CDR1-L - FR6 - CDR2-L - FR7 - CDR3-L - FR8を有するフレームワーク領域FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7、およびFR8

を含む;ここでFR1が、配列番号54からなり、FR2が、配列番号55からなり、FR3が、配列番号56からなり、FR4が、配列番号57からなり、FR5が、配列番号58からなり、FR6が、配列番号59からなり、FR7が、配列番号60からなり、およびFR8が、配列番号61からなる、前記単離された抗体。

【請求項４】

両方の重鎖定常領域(CH)が、該アミノ酸置換(a)から(e)の1以上を含むか、および/または両方の軽鎖定常領域が、該配列GGTLQSPPを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項５】

少なくとも一方の重鎖定常領域(CH)が、配列番号31もしくは配列番号32のアミノ酸配列を含むか、および/または該軽鎖定常領域(CL)の少なくとも一方が、配列番号33のアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項６】

該重鎖定常領域(CH)および該軽鎖定常領域(CL)が、以下の配列:

(1)両方のCHが、配列番号31の配列を含み、かつ両方のCLが、配列番号12の配列を含む;または

(2)両方のCHが、配列番号31の配列を含み、かつ両方のCLが、配列番号33の配列を含む;または

(3)両方のCHが、配列番号32の配列を含み、かつ両方のCLが、配列番号33の配列を含む;または

(4)両方のCHが、配列番号50の配列を含み、かつ両方のCLが、配列番号12の配列を含む;または

(5)両方のCHが、配列番号50の配列を含み、かつ両方のCLが、配列番号33の配列を含む;または

(6)一方のCHが、配列番号31の配列を含み、かつ一方のCLが、配列番号12の配列を含む;または

(7)一方のCHが、配列番号31の配列を含み、かつ一方のCLが、配列番号33の配列を含む;または

(8)一方のCHが、配列番号32の配列を含み、かつ一方のCLが、配列番号33の配列を含む;または

(9)一方のCHが、配列番号50の配列を含み、かつ一方のCLが、配列番号12の配列を含む;または

(10)一方のCHが、配列番号50の配列を含み、かつ一方のCLが、配列番号33の配列を含む、

の組み合わせのいずれかを有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項７】

配列番号9のアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)、および配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項８】

配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む、請求項7に記載の抗体。

【請求項９】

(i)配列番号34のアミノ酸配列を含む重鎖(HC)および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖(LC);または

(ii)配列番号34のアミノ酸配列を含む重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列を含む軽鎖(LC);または

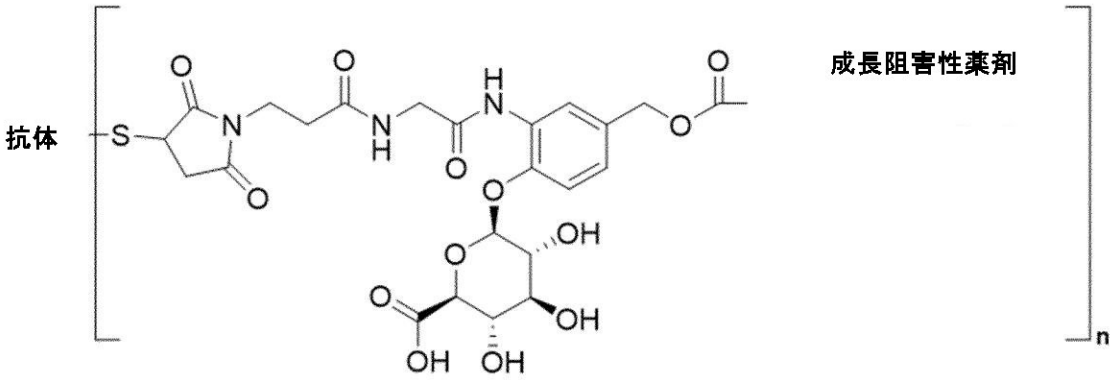
(iii)配列番号35のアミノ酸配列を含む重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列を含む軽鎖(LC);または

(iv)配列番号51のアミノ酸配列を含む重鎖(HC)および配列番号14のアミノ酸配列を

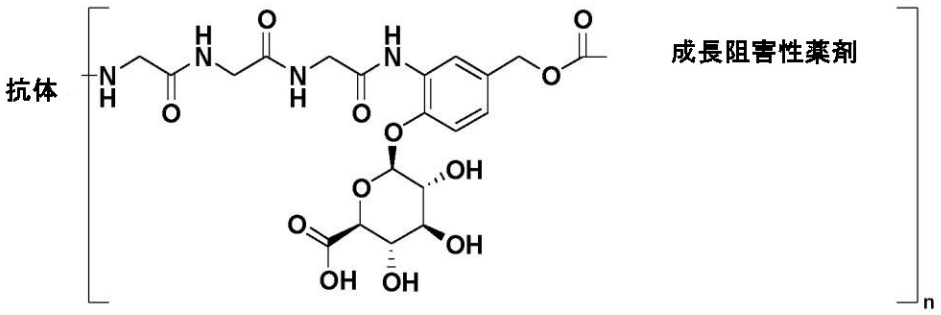
含む軽鎖(LC);または
(v)配列番号51のアミノ酸配列を含む重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列を含む軽鎖(LC)
を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体
【請求項１０】
ヒトCEACAM5タンパク質のA2-B2ドメインへの結合について、配列番号9のアミノ酸配列の重鎖可変領域(VH)と配列番号10のアミノ酸配列の軽鎖可変領域(VL)とを含む抗体と競合する、単離された抗体であって、ここで該重鎖定常領域(CH)および軽鎖定常領域(CL)が、請求項1～9のいずれか一項において定義されるとおりである、前記単離された抗体。
【請求項１１】
抗体が、Macaca fascicularis CEACAM5タンパク質のA2-B2ドメインへの結合についてもまた、配列番号9のアミノ酸配列の重鎖可変領域(VH)と配列番号10のアミノ酸配列の軽鎖可変領域(VL)とを含む抗体と競合し、ここで該重鎖定常領域(CH)および軽鎖定常領域(CL)が、請求項1～9のいずれか一項において定義されるとおりである、請求項10に記載の抗体。
【請求項１２】
抗体が、ヒトCEACAM1、ヒトCEACAM6、ヒトCEACAM7、ヒトCEACAM8、およびMacaca fascicularis CEACAM6と有意に交差反応しない、請求項1～11のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項１３】
抗体が、抗体フラグメントである、請求項1～12のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項１４】
抗体が、Fv、Fab、F(ab')2、Fab'、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2、およびダイアボディからなる群から選択される抗体フラグメントである、請求項13に記載の抗体。
【請求項１５】
二重特異性抗体または多重特異性抗体である、請求項1～14のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項１６】
ヒトCEACAM5タンパク質へ結合する、単離された抗体であって、かつ
これが、配列番号34のアミノ酸配列を含む2つの同一の重鎖(HC)および配列番号14のアミノ酸配列を含む2つの同一の軽鎖(LC)からなる;または
これが、配列番号34のアミノ酸配列を含む2つの同一の重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列を含む2つの同一の軽鎖(LC)からなる;または
これが、配列番号35のアミノ酸配列を含む2つの同一の重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列を含む2つの同一の軽鎖(LC)からなる;または
これが、配列番号51のアミノ酸配列を含む2つの同一の重鎖(HC)および配列番号14のアミノ酸配列を含む2つの同一の軽鎖(LC)からなる;または
これが、配列番号51のアミノ酸配列を含む2つの同一の重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列を含む2つの同一の軽鎖(LC)からなる、前記単離された抗体。
【請求項１７】
請求項1～16のいずれか一項に記載の抗体をコードする核酸配列を含む、単離された核酸。
【請求項１８】
請求項17に記載の核酸で形質転換されている、宿主細胞。
【請求項１９】
リンカーを介して少なくとも1つの成長阻害性薬剤へ共有結合的に連結された、請求項1～16のいずれか一項に記載の抗体を含む、免疫抱合体。
【請求項２０】
成長阻害性薬剤が、細胞傷害性薬物または放射性部分である、請求項19に記載の免疫

抱合体。
【請求項２１】
成長阻害性薬剤が、化学療法薬剤、酵素、抗生物質、毒素、たとえば小分子毒素または酵素的に活性な毒素、トキソイド、ビンカ、タキサン、メイタンシノイドまたはメイタンシノイド類似体、トマイマイシンまたはピロロベンゾジアゼピン誘導体、クリプトフィシン誘導体、レプトマイシン誘導体、アウリスタチンまたはドラスタチン類似体、プロドラッグ、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、DNAアルキル化剤、抗チューブリン薬剤、CC-1065およびCC-1065類似体からなる群から選択される、請求項19または20に記載の免疫抱合体。
【請求項２２】
成長阻害性薬剤が、エキサテカンである、請求項19～21のいずれか一項に記載の免疫抱合体。
【請求項２３】
リンカーが、切断可能なリンカーである、請求項19～22のいずれか一項に記載の免疫抱合体。
【請求項２４】
リンカーが、哺乳動物細胞のエンドソームにおいて切断可能なリンカーである、請求項19～23のいずれか一項に記載の免疫抱合体。
【請求項２５】
リンカーが、ヒト酵素グルクロニダーゼによって切断可能なリンカーである、請求項19～24のいずれか一項に記載の免疫抱合体。
【請求項２６】
免疫抱合体が、以下の式(II)または式(IIA)：

【化１】



(II),



(IIA),

を有する免疫抱合体であって、式中Sは、抗体の硫黄原子であり、および式中nは、抗体へ共有結合的に連結された[(リンカー)-(成長阻害性薬剤)]部分の数である、請求項１９～２５のいずれか一項に記載の免疫抱合体。

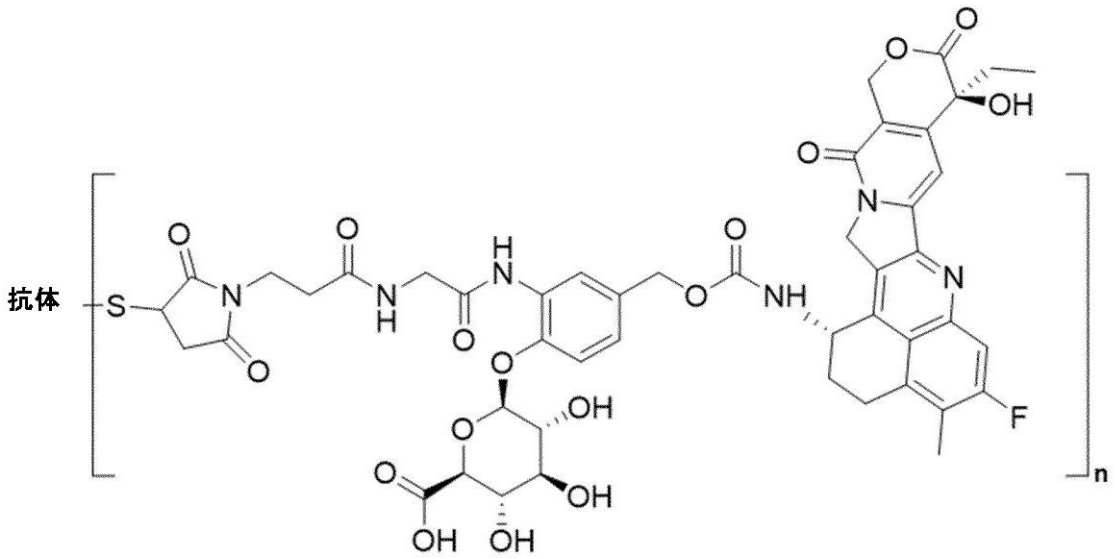
【請求項２７】

nが、1と10との間、好ましくは4である、請求項26に記載の免疫抱合体。

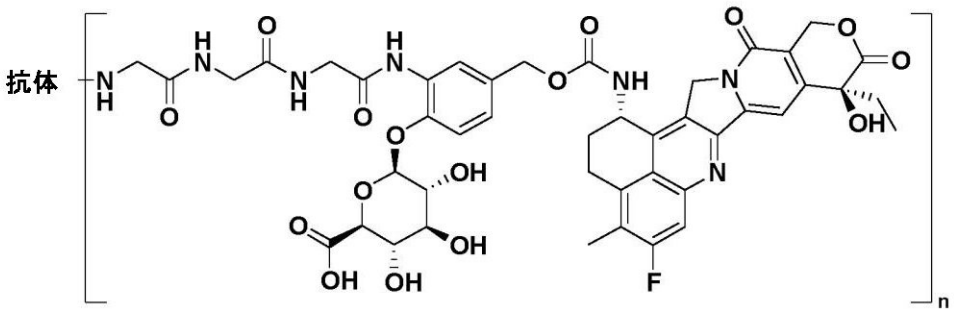
【請求項２８】

免疫抱合体が、以下の式(IV)または式(IVA)：

【化２】



(IV),



(IVA),

を有する免疫抱合体であって、式中Sは、抗体の硫黄原子であり、および式中nは、抗体へ共有結合的に連結された[(リンカー)-(エキサテカン)]部分の数である、請求項19～26のいずれか一項に記載の免疫抱合体

【請求項２９】

免疫抱合体が、式(IVA)を有し、およびnが、1と10との間、好ましくは4である、請求項28に記載の免疫抱合体。

【請求項３０】

Sが、抗体のシステインの硫黄原子である、請求項19～29のいずれか一項に記載の免疫抱合体。

【請求項３１】

抗体のシステインが、鎖間ジスルフィド結合を形成することが可能なシステインの1つである、請求項30に記載の免疫抱合体。

【請求項３２】

nが、式(II)および(IV)について、7と8との間である;ならびにnが、式(IIA)および(IVA)について、3と5との間である、請求項26～31のいずれか一項に記載の免疫抱合体。

【請求項３３】

nが、式(II)および(IV)について、7.5と8.0との間である;ならびにnが、式(IIA)およ

び(IVA)について、3.5と4.5との間であり、好ましくはnが、式(IIA)および(IVA)について、4である、請求項26～32のいずれか一項に記載の免疫抱合体。
【請求項３４】
薬学的に許容し得る担体、希釈剤、および/または賦形剤をさらに含む、請求項1～16のいずれか一項に記載の抗体または請求項19～33のいずれか一項に記載の免疫抱合体を含む、医薬組成物。
【請求項３５】
医薬としての使用のための、請求項1～16のいずれか一項に記載の抗体または請求項19～33のいずれか一項に記載の免疫抱合体または請求項34に記載の医薬組成物。
【請求項３６】
がんの処置における使用のための、請求項1～16のいずれか一項に記載の抗体または請求項19～33のいずれか一項に記載の免疫抱合体または請求項34に記載の医薬組成物。
【請求項３７】
がんが、CEACAM5発現がんである、請求項36に記載の使用のための抗体、免疫抱合体、または医薬組成物。
【請求項３８】
がんが、大腸がん、胃がん、肺がん、膵臓がん、食道がん、または前立腺がんである、請求項36または37に記載の使用のための抗体、免疫抱合体、または医薬組成物。
【請求項３９】
請求項1～16のいずれか一項に記載の抗体または請求項19～33のいずれか一項に記載の免疫抱合体または請求項34に記載の医薬組成物を対象へ投与することを含む、がんを処置する方法。
【請求項４０】
がんが、CEACAM5発現がんである、請求項39に記載の方法。
【請求項４１】
がんが、大腸がん、胃がん、肺がん、膵臓がん、食道がん、または前立腺がんである、請求項39または40に記載の方法。
【請求項４２】
請求項1～16のいずれか一項に記載の抗体を使用し、対象からの生体試料から、ex vivoでCEACAM5発現を検出するための方法。
【請求項４３】
抗体が、検出可能な分子で標識される、請求項42に記載の方法。
【請求項４４】
対象からの生体試料からex vivoでCEACAM5発現を検出するための、請求項1～16のいずれか一項に記載の抗体の使用。
【請求項４５】
抗体が、検出可能な分子で標識される、請求項44に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ヒトCEACAM5タンパク質に結合する抗体、ならびに前記抗体をコードする配列を含む単離された核酸および宿主細胞に関する。本発明は、成長阻害性の薬剤に連結された前記抗体を含む免疫抱合体に、および本発明の抗体または免疫抱合体を含む医薬組成物にもまた関する。本発明は、がんの処置のためのまたは診断目的のための本発明の抗体、免疫抱合体、および医薬組成物の使用にもまた関する。
【背景技術】
【０００２】
がん胎児性抗原(CEA)は細胞接着に関わる糖タンパク質である。CEAは、正常では妊娠の最初の6ヶ月の間に胎児の腸によって発現されるタンパク質として1965年に最初に同定され(Gold and Freedman,J Exp Med,121,439,1965)、大腸がんまたは膵臓

がんなどの多くのがんにおいて見出された。CEAファミリーは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。18個の遺伝子からなるCEAファミリーは、タンパク質の2つのサブグループ:がん胎児性抗原関連細胞接着分子(CEACAM)サブグループおよび妊娠特異的糖タンパク質サブグループに細分される(Kammerer & Zimmermann,BMC Biology 2010,8:12)。

【０００３】

ヒトにおいて、CEACAMサブグループは7つのメンバー:CEACAM1、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM5、CEACAM6、CEACAM7、およびCEACAM8からなる。元々同定されたCEAと同一のCEACAM5は、例えば、大腸、胃、肺、および膵臓腫瘍細胞などのがん細胞の表面に高度に発現されることが報告されており、正常組織における発現は、結腸および食道上皮細胞などの少数の正常上皮細胞に限定される。従って、CEACAM5は、免疫抱合体などの腫瘍特異的な標的化アプローチにとって好適な治療標的を構成し得る。

【０００４】

CEACAMファミリーメンバーの細胞外ドメインは繰り返しの免疫グロブリン様(Ig様)ドメインから構成され、これらは配列相同性に従って3つの型A、B、およびNに分類されている。CEACAM5は、7つのかかるドメイン、すなわちN、A1、B1、A2、B2、A3、およびB3を含有する。一方ではCEACAM5 A1、A2、およびA3ドメイン、他方ではB1、B2、およびB3ドメインは高い配列相同性を示し、ヒトCEACAM5のAドメインは84から87%までのペアワイズ配列類似性、Bドメインは69から80%までを提示する。さらにその上、それらの構造上のAおよび/またはBドメインを提示する他のヒトCEACAMメンバー、すなわちCEACAM1、CEACAM6、CEACAM7、およびCEACAM8は、ヒトCEACAM5との相同性を示す。特に、ヒトCEACAM6タンパク質のAおよびBドメインは、それぞれ、ヒトCEACAM5のA1およびA3ドメインおよびB1からB3ドメインのいずれかとの配列相同性を示し、これらは、ヒトCEACAM5のAドメインおよびBドメインの間で観察されるものよりもさらに高い。

【０００５】

抗CEA抗体が、CEAを標的化した診断または治療目的のために作製されている。関連抗原に対する特異性は、例えば、Sharkey et al(1990,Cancer Research 50,2823)によって、この技術分野における懸念として常に言及されている。上で言及された相同性を原因として、以前に記載された抗体のいくつかは、例えば、異なる免疫グロブリンドメイン上に存在するCEACAM5の繰り返しのエピトープに対する結合を実証し、CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7、またはCEACAM8などの他のCEACAMファミリーメンバーに対する交差反応性を示し、従って、CEACAM5に対する特異性を欠き得る。しかしながら、CEA標的化治療のためには、ヒトCEACAM5発現腫瘍細胞に結合するが他のCEACAMファミリーメンバーを発現するある種の正常組織には結合しないような抗CEACAM5抗体の特異性が望まれる。CEACAM1、CEACAM6およびCEACAM8は、ヒトおよび非ヒト霊長類の好中球によって発現されると記載されており(Ebrahimmnejad et al,2000,Exp Cell Res,260,365;Zhao et al,2004,J Immunol Methods 293,207;Strickland et al,2009 J Pathol,218,380)、そこで、それらは顆粒球形成を調節することおよび免疫応答において役割を果たすことが示されているということは注目に値する。治療目的では、CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7、またはCEACAM8との抗CEACAM5抗体の交差反応性は、従って、正常組織における増加した毒性を原因として、化合物の治療指数を減少させ得る。従って、例えば、抗体薬物抱合体(ADC)の一部としての使用のためのまたは標的細胞を死滅させることをもたらすいずれかの他のやり方での使用のための、CEACAMファミリーの他の分子と交差反応しないCEACAM5を特異的に指向する抗体の必要がある。

【０００６】

その上、CEACAM5はいくつかの正常細胞組織において発現されることが記載されているので、ヒトCEACAM5およびカニクイザル(Macaca fascicularis)CEACAM5に結

合することができる抗CEACAM5抗体を開発することが望ましい。なぜなら、かかる抗体はそれらの安全性プロファイルを評価するためにカニクイザルにおける前臨床毒性学研究において直ちに試験され得るからである。

【０００７】

a)種間交差反応性の必要を、b)ヒトおよびMacaca fascicularis CEACAM5に対する特異性と、すなわち他のMacaca fascicularisおよびヒトCEACAMファミリーメンバーとの交差反応性なしと組み合わせることは、特にヒトおよびMacaca fascicularis CEACAMタンパク質間の総体的な配列相同性に鑑みて、新規の抗CEACAM5抗体の開発にさらなる複雑度を追加する。

【０００８】

また、CEACAM5は、不良に内在化する表面タンパク質として文献に記載されており(Schmidt et al,2008,Cancer Immunol.Immunother.57,1879で総説されている)、この標的タンパク質を指向する抗体薬物抱合体のさらなる難しさを提示する。

【０００９】

公知の抗CEACAM5抗体は、Immunomedicsのラベツズマブ(hMN14としてもまた公知;Sharkey et al,1995,Cancer Research 55,5935)を包含する。この抗体は関連抗原には結合しないことが示されているが、Macaca fascicularisからのCEACAM5ともまた交差反応性ではない。ラベツズマブは、抗体-薬物抱合体(ADC)の一部として、すなわちラベツズマブゴビテカンとしてもまた使用されている。ラベツズマブゴビテカンは、pH感受性の炭酸および短いポリエチレングリコール(PEG)鎖を含むリンカー(CL2Aと呼ばれる)を介して抗CEACAM5抗体ラベツズマブに抱合された細胞傷害性薬物SN38から構成されるADCである。ラベツズマブゴビテカンは、使用されるリンカー構造の有意な不安定性によって特徴付けられ、非経口適用後には細胞傷害性ペイロードの早期の全身的喪失をもたらす。この分解プロセスは抗腫瘍活性を限定する場合があり、副作用のリスクを増加させる。別の公知の抗CEACAM5 ADCはSanofiのSAR408701(ツサミタマブラブタンシン)であり、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ブチレート(SPDB)リンカーを介して、強力な微小管不安定化メイタンシノイドの細胞傷害性薬剤DM4に共有結合的に連結された抗CEACAM5抗体SAR408377(ツサミタマブ。huMab2-3ともまた言われる)を含む。SAR408701は、眼の角膜を包含するいくつかの臓器および組織に対する毒性の副作用(角膜炎および角膜症を包含する)と関連している。また、微小管阻害剤に基づくADCの有効性は、大腸がんなどのある種のがん適応症では限定され得る。現在まで、抗CEACAM5抗体またはADCは、臨床におけるいずれかの治療上の使用のために承認されていない。一般的には、少数のADCしか固形腫瘍の処置について承認されていない。

【００１０】

いくつかのADCは、細胞異化による放出されるペイロードの副作用ゆえに、患者において用量が限定され、骨髄および循環血液細胞における毒性(例えば、好中球減少症、網状赤血球減少症、リンパ球減少症)をもたらし得る。

【００１１】

抗体に対する薬物カップリングゆえに、ADCは、高頻度で、循環において数日のみというヒトにおける最適ではない半減期を有する。これは、対応する抱合体されていない抗体の半減期と比較して有意に低い。これらのADCの比較的高いクリアランスは、標的非依存的な取り込み後の細胞分解に関係しており、副作用を誘発し得る毒性の薬物ペイロードの実質的な放出に至る。従って、不要の副作用を低減するためにそれらの半減期を改善することは、本明細書に開示されるADCの目的である。

【００１２】

上に鑑みて、がんの処置のための、例えば、例えば、例えばCRC、膵臓がん、胃がん、NSCLC、食道がん、および前立腺がんを包含する異なる固形腫瘍適応症のための、新たなかつ改善された治療薬剤の必要が尚ある。

【発明の概要】

【００１３】
本発明は、特に、(ヒトおよびMacaca fascicularisタンパク質の両方と反応性の)CEACAM5を指向するモノクローナル抗体を提供することと、前記抗体を含む免疫抱合体(本明細書では抗体-薬物抱合体(ADC)ともまた言われる)を提供することとによって、当該技術分野におけるこの必要および他の必要に対処する。これらの免疫抱合体は細胞傷害効果を有し、in vitroの腫瘍細胞を死滅させ、in vivoの腫瘍成長を阻害する。本発明は、特許請求の範囲に記載される態様、および本明細書の以下のさらなる記載に関する。
【００１４】
特に免疫抱合体のフォーマットで、治療目的のために最適な特性を有するCEACAM5に対する新たな抗体を生成するための試みにおいて、本発明者らは、有利なプロファイルを有する抗体を選択し、それに基づいて免疫抱合体を開発するために、鋭意の研究開発を行った。
【００１５】
本発明者らは、予想外に幾つかの所望される特色を含む最適化されたIgGを選択して産生することができた。これらの抗体はヒトCEACAM5のA2-B2ドメインに高い親和性で結合し、ヒトCEACAM1、CEACAM6、CEACAM7、およびCEACAM8タンパク質を認識しない。細胞の文脈では、これらの抗体はCEACAM5発現腫瘍細胞に対する高い親和性を示し、内在化される。その上、これらの抗体はMacaca fascicularis CEACAM5タンパク質にもまた結合し、互いに10倍以内のサルおよびヒトタンパク質に対する親和性を有する。本発明の抗体は、Macaca fascicularis CEACAM5のA2-B2ドメインに結合するが、それらは別のMacaca fascicularis CEACAMタンパク質CEACAM6を認識しない。
【００１６】
本発明者らは、それらが生成した抗体が、免疫抱合体として細胞傷害性薬物と組み合わせられたときに、in vitroの腫瘍細胞に対する細胞傷害効果を誘導することができるということをもまた示した。細胞傷害性薬物に抱合された抗体(すなわち、本発明の免疫抱合体)は、CEACAM5発現腫瘍を持つマウスにおいて腫瘍成長を著明に阻害することもまたできる。薬物および抗体を接続するリンカーは、非経口適用後の全身安定性を最大化するように設計された。標的細胞内での本発明の免疫抱合体からのエキサテカンの放出は、非常に高い力価および著しいバイスタンダー効果に至る。強力なバイスタンダー効果は、不均一な標的発現を有する患者の処置にとって有益であり得る。
【００１７】
一般的には、高い全身曝露が望まれる。ADC薬物の高い全身曝露は、より低い全身曝露を有する化合物と比較して、最終的には増強された腫瘍細胞死滅における有効な腫瘍標的化ならびに腫瘍組織および細胞への改善された細胞傷害性ペイロード配備に至る。
【００１８】
さらにその上、本発明の抗体-薬物-抱合体は、より低いクリアランス、より高い全身曝露および低減されたペイロード放出を有する分子に至る標的非依存的な細胞分解を低減するための分子改変を包含することによって、改善されている。
【００１９】
本発明は、かかるADCのオフターゲット細胞異化を有意に低減する抗体改変およびペイロード抱合戦略に関し、それによって、より高いADC曝露によって駆動される有効性を改善しながら、放出されるペイロードのレベルを低減する。したがって、これらの改変は、副作用の低減および抗腫瘍活性の増大によって、改善された治療濃度域を有する薬物を提供する。
本明細書に記載される通り、本発明に従うADCの曝露および半減期は、例えば、
(1)YTE突然変異を包含することおよび鎖間システイン抱合を使用して薬物にそれを連結することによる抗体重鎖の改変によって、あるいは
(2)YTE突然変異による抗体重鎖の改変、および薬物を抗体に付着させるために微生物トランスグルタミナーゼ(本明細書では「TGase」および「mTG」ともまた言われる)酵

素を使用する革新的な酵素的抱合法を使用することによって、改善されるであろう。
【００２０】
驚くべきことに、ヒト予測動物モデルにおいて低いクリアランス値に至る高い曝露が、上のアプローチ(2)によって得られた。かかる改変によって、ADCの曝露は、これらの改変を含まないバリアントと比較して約10×の係数だけ改善された。これは、結果的に、放出されるペイロードレベルの有意な低減および循環中の抗腫瘍活性のADC濃度の有意な増加をもたらす。改善されたADCは、薬物リンカーを含まない元のYTE抗体のPKプロファイルに似ており、従来技術のADCよりも改善された半減期を示す。
【００２１】
これらの結果は、従来技術の分子と比較して、臨床がん治療における毒性を低減し、有効性を改善する。
【図面の簡単な説明】
【００２２】
【図１】図1 ELISAアッセイにおける、組換えヒト(rh)CEACAM5 ECDまたはそのドメインN-A1-B1、A2-B2、A3-B3に対する、または組換えMacaca fascicularis(mf)CEACAM5 ECDに対するmAb1の結合である。
【図２】図2 MKN-45細胞に結合する抗CEACAM5抗体のEC50である。CEACAM5を発現するMKN45細胞株に対する、抗体huMab2-3およびhmn-14と比較したmAb1の細胞結合。
【図３】図3 細胞の後期エンドソームおよびリソソームへのpHrodo標識抗体の内在化である(細胞あたりの蛍光強度の総計、三反復の平均)。
【図４】図4 曲線の直線部分である700分から1200分までの時間の細胞あたりの蛍光強度である。直線の傾きを測定し、試料間で比較した(例1.6.5参照)。
【図５】図5 FFPEがん細胞株における抗体rb8G4によるIHC染色である。
【図６】図6 104がん細胞株についてのCEACAM5 mRNA発現およびIHC染色の相関である。
【図７】図7 正常ヒト組織における抗体rb8G4によるIHC染色である。
【図８】図8 正常ヒト組織におけるCEACAM5 mRNA発現である。
【図９】図9 ヒト大腸がん組織における抗体rb8G4によるIHC染色である。
【図１０】図10 ヒト胃がん組織における抗体rb8G4によるIHC染色である。
【図１１】図11 ヒト食道がん組織における抗体rb8G4によるIHC染色である。
【図１２】図12 ヒト非小細胞肺がん組織における抗体rb8G4によるIHC染色である。
【図１３－１】図13 ウエスタンブロット法で検討されたがん細胞株ライセート中のCEACAM5に対するmAb1(図13A)およびrb8G4(図13B)の結合である。
【図１３－２】図13 ウエスタンブロット法で検討されたがん細胞株ライセート中のCEACAM5に対するmAb1(図13A)およびrb8G4(図13B)の結合である。
【図１４】図14ストックmAb、UF後の抱合体、および最終的なバルク原薬(BDS)の純度を示す典型的なSECクロマトグラムである。
【図１５】図15 軽鎖および重鎖の分離を示す典型的なRP-HPLCクロマトグラムである。クロマトグラムは、ストックmAb、クルードなADC、および最終的なBDSの重ね合わせを示す。
【図１６】図16 NAC標準および最終的なBDSの遊離薬物レベルを示す典型的なクロマトグラムである。
【図１７】図17 ストックmAbおよび最終的なBDSの純度を示す典型的なSECクロマトグラムである。
【図１８】図18 軽鎖および重鎖の分離を示す典型的なRP-HPLCクロマトグラムである。クロマトグラムは、ストックmAbおよび最終BDSの重ね合わせを示す。
【図１９】図19 NAC標準および最終的なBDSの遊離薬物レベルを示す典型的なクロマトグラムである。
【図２０】図20 ヒト、マウス、およびカニクイ血清についてのADC安定性である。抱合

されたエキサテカン濃度を、遊離エキサテカンを使用して計算した(初期用量 大凡10μM)(正規化されたデータ)。
【図２１】図21 マウス血清および緩衝剤についてのADC3対照安定性である。抱合されたSN38濃度を、遊離SN38を使用して計算した(初期用量50μg/mLのADCタンパク質濃度)(正規化されていない)。
【図２２】図22 ヒト肝臓リソソーム(pH5.0)におけるADC1およびADC2のペイロード遊離プロファイルである。抱合された薬物濃度は、例えば、遊離エキサテカン(初期濃度大凡10μMエキサテカン)を使用して計算した。正規化されたデータ。
【図２３】図23はADC異化産物プロファイリングであり、リソソーム放出産物としての遊離エキサテカンを確認している。
【図２４－１】図24 抗原陰性MDA-MB-231(図24C)細胞株と比較した、抗原陽性SK-CO-1(図24A)およびSNU-16(図24B)細胞株に対するADC1、ADC2、および遊離ペイロードのin vitro力価である。1つの代表的な実験が示されている。三反復の平均±SD。図24Cに示されるそれぞれADC1、ADC2、およびペイロードに3つの異なる一連のデータ点を割り当てる凡例は、図24Aおよび図24Bにもまた適用される。
【図２４－２】図24 抗原陰性MDA-MB-231(図24C)細胞株と比較した、抗原陽性SK-CO-1(図24A)およびSNU-16(図24B)細胞株に対するADC1、ADC2、および遊離ペイロードのin vitro力価である。1つの代表的な実験が示されている。三反復の平均±SD。図24Cに示されるそれぞれADC1、ADC2、およびペイロードに3つの異なる一連のデータ点を割り当てる凡例は、図24Aおよび図24Bにもまた適用される。
【図２５】図25 SK-CO-1細胞株におけるそれぞれのアイソタイプ対照とのADC1およびADC2の比較である。1つの代表的な実験が示されている。三反復の平均±SD。
【図２６】図26 抗原陰性MDA-MB-231(図26B)細胞株と比較した、抗原陽性SK-CO-1(図26A)に対するADC1、ADC2、ADC SAR DM4、ADC mAb1 DM4、および遊離ペイロードのin vitro力価である。代表的な実験1つ(三反復の平均±SD)を示す;図26Bに示される凡例は、図26Aにもまた適用される。
【図２７】図27 抗原陽性SK-CO-1細胞との共培養における、抗原陰性MDA-MB-231細胞に対するADC1およびADC2の強力なバイスタンダー効果である(図27A)。MDA-MB-231細胞単独に対するADC1またはADC2の非特異的な効果はない(図27B)。代表的な実験1つ(重複実験の平均±SD)を示す。
【図２８－１】図28 抗原陽性SK-CO-1細胞との共培養における抗原陰性MDA-MB-231細胞に対するADC1およびADC2のバイスタンダー効果が、ADC SAR DM4よりも強力である(図28Aおよび図28B)。
【図２８－２】MDA-MB-231細胞単独では、試験されたADCの非特異的な効果はない(図28C)。代表的な実験1つ(重複実験の平均±SD)を示す。
【図２９】図29 単回処置後のCRC PDXモデル(COPF217)におけるADC1およびADC2の有効性である。
【図３０】図30 単回処置後のNSCLC PDXモデル(LUPF160151)におけるADC1の有効性である。
【図３１】図31 単回処置後の胃がんPDXモデル(GAX066)におけるADC1の有効性である。
【図３２】図32 膵臓ゼノグラフトモデル(HPAF-II)におけるADC3と比較したADC1の有効性である。
【図３３】図33 CRC PDXモデル(COPF230)におけるADC SAR DM4と比較したADC1の有効性である。
【図３４】図34 CRC PDXモデル(REPF210)におけるADC SAR DM4と比較したADC1の有効性である。
【図３５】図35 胃PDXモデルGAPF313におけるADC SAR DM4と比較したADC1の有効性である(進行中の実験の暫定的分析)。
【図３６】図36 mAb1-M/ADC1-Mについて、インプットmAbおよび最終的なBDSの

純度を示す典型的なSECクロマトグラムである。
【図３７】図37 mAb1-M/ADC1-Mについて、最終的なBDSのDAR決定を図解する典型的なRP-HPLCクロマトグラムである。
【図３８】図38 ADC7-M、ADC2-M、およびADC5-Mについて、インプットmAbおよび最終的なBDSの純度を示す典型的なSECクロマトグラムである。
【図３９】図39 ADC7-M、ADC2-M、およびADC5-Mについて、最終的なBDSのDAR決定を図解する典型的なRP-HPLCクロマトグラムである。
【図４０－１】図40 抗原陰性MDA-MB-231(図40e)細胞株と比較した、抗原陽性SK-CO-1(図40a)、SNU-16(図40b)、MKN-45(図40c)、およびLS174T(図40d)細胞株に対するADC1-M、ADC4-M、および遊離ペイロードのin vitroの力価である。代表的な実験1つ(重複実験の平均±SD)を示す。
【図４０－２】図40 抗原陰性MDA-MB-231(図40e)細胞株と比較した、抗原陽性SK-CO-1(図40a)、SNU-16(図40b)、MKN-45(図40c)、およびLS174T(図40d)細胞株に対するADC1-M、ADC4-M、および遊離ペイロードのin vitroの力価である。代表的な実験1つ(重複実験の平均±SD)を示す。
【図４０－３】図40 抗原陰性MDA-MB-231(図40e)細胞株と比較した、抗原陽性SK-CO-1(図40a)、SNU-16(図40b)、MKN-45(図40c)、およびLS174T(図40d)細胞株に対するADC1-M、ADC4-M、および遊離ペイロードのin vitroの力価である。代表的な実験1つ(重複実験の平均±SD)を示す。
【図４１－１】図41 抗原陰性MDA-MB-231(図41e)細胞株と比較した、抗原陽性SK-CO-1(図41a)、SNU-16(図41b)、MKN-45(図41c)、およびLS174T(図41d)細胞株に対するADC2-M、ADC5-M、および遊離ペイロードのin vitro力価である。代表的な実験1つ(重複実験の平均±SD)を示す。
【図４１－２】図41 抗原陰性MDA-MB-231(図41e)細胞株と比較した、抗原陽性SK-CO-1(図41a)、SNU-16(図41b)、MKN-45(図41c)、およびLS174T(図41d)細胞株に対するADC2-M、ADC5-M、および遊離ペイロードのin vitro力価である。代表的な実験1つ(重複実験の平均±SD)を示す。
【図４１－３】図41 抗原陰性MDA-MB-231(図41e)細胞株と比較した、抗原陽性SK-CO-1(図41a)、SNU-16(図41b)、MKN-45(図41c)、およびLS174T(図41d)細胞株に対するADC2-M、ADC5-M、および遊離ペイロードのin vitro力価である。代表的な実験1つ(重複実験の平均±SD)を示す。
【図４２】図42 ADC1、ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、およびADC7-MについてのhuFcRn Tg276マウスにおける薬物動態プロファイル(総抗体)である。
【図４３】図43 基剤対照に対して、ADC1-MおよびADC2-Mによる処置後の腫瘍体積変化である。
【図４４】図44 ADC SAR DM4と比較して、抗原陽性SK-CO-1細胞との共培養における抗原陰性MDA-MB-231細胞に対するADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、およびADC7-Mの強力なバイスタンダー効果である。代表的な実験1つ(重複実験の平均±SD)を示す。
【図４５】図45 HPAF-IIゼノグラフトモデルにおけるADC8と比較したADC1-M、およびADC3-Mの有効性である。
【図４６】図46 単回投与後のCRC PDXモデル(COPF230)におけるADC SAR DM4と比較したADC1-M、ADC3-Mの有効性である。
【図４７】図47 複数回処置後のGC PDXモデル(GAPF313)におけるADC SAR DM4と比較したADC1-M、ADC3-Mの有効性である。

【発明を実施するための形態】
【００２３】
定義
本明細書で使用される「CEACAM5」は、「CD66e」(分化クラスター66e)としてもまた公知の「がん胎児性抗原関連細胞接着分子5」を呼称する。CEACAM5は細胞接着に関わる糖タンパク質である。CEACAM5は、特に、例えば大腸がん、胃がん、非小細胞

肺がん、膵臓がん、食道がん、前立腺がん、および他の固形腫瘍の表面に高度に発現される。シグナルペプチド(位置1-34)およびプロペプチド(位置686-702)を包含する全長ヒトCEACAM5の参照配列は、アクセッション番号AAA51967.1でGenBankデータベースから利用可能である。このアミノ酸配列は次の通り読まれる:MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNLPQHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLLSVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI(配列番号1)。5つの非同義SNPが白人集団において2%よりも高い頻度で同定されている。それらの4つはヒトCEACAM5のNドメイン(位置80、83、112、113)に、最後の1つはA2ドメイン(位置398)に局在している。GenBank AAA51967.1は主要なハプロタイプ(I80、V83、I112、I113、およびE398)を含有する。

【００２４】

「ドメイン」または「領域」は、一般的には配列相同性に基づいて定められ、多くの場合特定の構造的または機能的実体に関係するタンパク質のいずれかの領域である。CEACAMファミリーメンバーはIg様ドメインから構成されることが公知である。用語「ドメイン」は、本文書においては、「Nドメイン」などの個々のIg様ドメインを呼称するために、または「A2-B2ドメイン」などの連続したドメインの群について、どちらかで使用される。

【００２５】

ヒトCEACAM5のドメイン構成は次の通りである(GenBank AAA51967.1配列に基づく;配列番号1):

【表Ａ】

ヒトCEACAM5ドメイン	配列番号1における位置
N	35-142
A1	143-237
B1	238-320
A2	321-415
B2	416-498
A3	499-593
B3	594-685

【００２６】

従って、ヒトCEACAM5のA2-B2ドメインは、配列番号1のアミノ酸321-498からなる。

【００２７】

Macaca fascicularis CEACAM5タンパク質の参照配列が利用可能であり(NCBI参照配列XP_005589491.1)、このアミノ酸配列は次の通り読まれる:

【数１】

*mgspsaplhrwcipwqtlllaslltfwnpptta*qltiesrpfnvaegkevlllahnvsqnlfgyiwykgervdasrrigscvirtqqitpg
pahsgretidfnaslIihnvtqsdtgsytiqvikedlvneeatgqfrvypelpkpyissnnsnpvedkdavaltcepetqdttylwwv
nnqslpvsprlelssdnrtltvfniprndttsykcetqnpvsvrrsdpvtlnvlygpdaptisplntpyragenlnlschaasnptaqyf
wfvngtfqqstqelfipnitvnnsgsymcqahnsatglnrttvtaitvya**elpkpyitsnnsnpiedkdavtltcepetqdttylw**
wvnnqslsvssrlelsndnrtltvfniprndttfyecetqnpvsvrrsdpvtlnvlygpdaptisplntpyragenlnlsch
aasnpaaqyswfvngtfqqstqelfipnitvnnsgsymcqahnsatglnrttvtaitvyvelpkpyissnnsnpiedkdav
tltcepvaenttylwwvnnqslsvsprlqlsngnriltllsvtrndtgpyecgiqnsesakrsdpvtlnvtygpdtpiisppdlsyrsgan
lnlschsdsnpspqyswlingtlrqhtqvlfiskitsnnngayacfvsnlatgrnnsivknisvssgdsapgssglsaratvgiiigmlv
gvalm

(配列番号2)(シグナルペプチドはイタリック;A2-B2ドメインは太字;GPIアンカーは下線付き;N-A1-B1ドメインは、シグナルペプチドとA2-B2ドメインとの間のレギュラーフォント;A3-B3ドメインは、A2-B2ドメインとGPIアンカーとの間のレギュラーフォント)。

【００２８】

ポリペプチド、タンパク質、または酵素などの発現産物を「コードする」配列または「コード配列」は、発現されるときに、そのポリペプチド、タンパク質、または酵素の生成をもたらすヌクレオチド配列であり、すなわち、ヌクレオチド配列は、そのポリペプチド、タンパク質、または酵素のアミノ酸配列をコードする。タンパク質のコード配列は、開始コドン(通常はATG)および終止コドンを包含する。

【００２９】

本明細書で使用される特定のタンパク質(例えば抗体)の基準は、天然アミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびにそれらの起源または調製のモードにかかわらず変異体および改変された形態を包含し得る。天然アミノ酸配列を有するタンパク質は、天然から得られるものと同じアミノ酸配列を有するタンパク質である。かかる天然配列のタンパク質は、天然から単離され得るか、または標準的な組換えおよび/または合成方法を使用して調製され得る。天然配列のタンパク質は、具体的には、天然起源のトランケーションされた、または可溶性の形態、天然起源の変異型形態(例えば、選択的スプライスされた形態)、天然起源の対立遺伝子変異型、および翻訳後修飾を包含する形態を包摂する。天然配列のタンパク質は、翻訳後修飾、例えばグリコシル化もしくはリン酸化、またはいくつかのアミノ酸残基の他の修飾を担持するタンパク質を包含する。

【００３０】

用語「遺伝子」は、1以上のタンパク質または酵素の全てまたは一部を含むアミノ酸の具体的な配列をコードするかまたはそれに対応するDNA配列を意味し、例えば遺伝子が発現される条件を決定するプロモーター配列などの制御DNA配列を包含しても、しなくてもよい。構造遺伝子ではないいくつかの遺伝子は、DNAからRNAに転写されるが、アミノ酸配列に翻訳されない。他の遺伝子は、構造遺伝子の制御因子としてまたはDNA転写の制御因子として機能する。特に、遺伝子という用語は、タンパク質をコードするゲノム配列、すなわち、制御因子、プロモーター、イントロン、およびエクソン配列を含む配列を意図する。

【００３１】

本明細書において、参照配列と「少なくとも85％同一の」配列は、その全長にわたって、参照配列の全長と85％以上、例えば90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％または99％の配列同一性を有する配列である。従って、「配列同一性」のパーセンテージは、Needleman and Wunsch(J.Mol.Biol.48:443 (1970))のアルゴリズムを使用するグローバルペアワイズアラインメントによって、それらの全長に

わたって2つのかかる配列を比較することによって決定され得る。例えば、プログラムNeedle(EMBOSS)を、BLOSUM62マトリックスおよび次のパラメータで使用する:ギャップオープン=10、ギャップ伸長=0.5、エンドギャップペナルティ=該当なし、エンドギャップオープン=10、エンドギャップ伸長=0.5(これらは標準的な設定である)。

【００３２】

「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、サイズまたは疎水性)を有する側鎖を有する別のアミノ酸残基によって置換されるものである。一般的に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させない。類似の化学的特性を有する側鎖を有するアミノ酸の群の例は、1)脂肪族側鎖:グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン、2)脂肪族ヒドロキシル側鎖:セリンおよびトレオニン、3)アミド含有側鎖:アスパラギンおよびグルタミン、4)芳香族側鎖:フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、5)塩基性側鎖:リジン、アルギニン、およびヒスチジン、6)酸性側鎖:アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに7)硫黄含有側鎖:システインおよびメチオニンを包含する。保存的アミノ酸置換基はアミノ酸サイズに基づいてもまた定められ得る。

【００３３】

「抗体」(「免疫グロブリン」ともまた称する)は、例えば、2つの重鎖がジスルフィド結合によって互いに連結され、各重鎖がジスルフィド結合によって軽鎖に連結されている、天然のまたは従来の型の抗体である。ラムダ(l)およびカッパ(k)という軽鎖の2つの型がある。抗体分子の機能的な活性の側面を決定する5つの主な重鎖クラス(またはアイソタイプ):IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEがある。各抗体鎖は別個の配列ドメイン(または領域)を含む。典型的なIgG抗体の軽鎖は、可変領域(VL)および定常領域(CL)という2つの領域を包含する。典型的なIgG抗体の重鎖は、4つの領域、すなわち可変領域(VH)および定常領域(CH)を包含し、残りは3つの定常ドメイン(CH1、CH2、およびCH3)から成る。軽鎖および重鎖の両方の可変領域は、抗原に対する結合および特異性を決定する。軽鎖および重鎖の定常領域は、抗体鎖会合、分泌、経胎盤移動性、補体結合、およびFc受容体(FcR)に対する結合などの重要な生物学的特性を授け得る。Fvフラグメントは抗体のFabフラグメントのN末端部であり、1つの軽鎖および1つの重鎖の可変部分から成る。

【００３４】

抗体の特異性は、抗体の結合部位と抗原決定基との間の構造的相補性にある。抗体の結合部位は、主として、いわゆる超可変または相補性決定領域(CDR)からのものである残基からできている。相補性決定領域(CDR)は、したがって、抗体のFv領域の結合親和性および特異性を共に定めるアミノ酸配列を指す。抗体の軽(L)および重(H)鎖は、それぞれCDR1-L、CDR2-L、CDR3-L、およびCDR1-H、CDR2-H、CDR3-Hと呼称される3つのCDRを有する。したがって、従来の抗体の抗原結合部位は、重鎖および軽鎖可変領域のそれぞれからのCDRセットを含む6つのCDRを包含する。

【００３５】

「フレームワーク領域」(FR)は、CDR間に挿入されたアミノ酸配列、すなわち、単一種の異なる免疫グロブリン間で比較的保存されている免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域の部分を言う。免疫グロブリンの軽鎖および重鎖はそれぞれが、FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L、およびFR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-Hと呼称される4つのFRをそれぞれ有する。本明細書で使用される「ヒトフレームワーク領域」は、天然起源のヒト抗体のフレームワーク領域と実質的に(約85％以上、例えば90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％または99％)同一であるフレームワーク領域である。

【００３６】

本発明の文脈において、免疫グロブリン軽または重鎖におけるCDR/FRの定義は、IMGTの定義に基づいて決定される(Lefranc et al.Dev.Comp.Immunol.,2003,27(1):55-77;www.imgt.org)。

【００３７】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、従来の抗体およびそのフラグメント、ならびに単一ドメイン抗体およびそのフラグメント、例えば単一ドメイン抗体の可変重鎖を包含する。本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、キメラ、ヒト化、二重特異性または多重特異性抗体、ならびに他の型の操作された抗体をもまた包含する。用語「抗体」はモノクローナル抗体を包含する。

【００３８】

用語「モノクローナル抗体」または「mAb」は、本明細書で使用されるとき、特異的な抗原に対する単一のアミノ酸配列の抗体分子を言い、いずれかの特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されるべきではない。モノクローナル抗体は、例えば、B細胞またはハイブリドーマの単一クローンによって生成され得るが、組換え、例えば、遺伝子またはタンパク質工学を含む方法によって生成される。

【００３９】

用語「キメラ抗体」は、その最も広い意味においては、1つの抗体からの1以上の領域と、1以上の他の抗体からの1以上の領域とを含有する操作された抗体を言う。ある態様において、キメラ抗体は、非ヒト動物に由来する抗体のVHおよびVLを、いくつかの態様においてヒト抗体である別の抗体のCHおよびCLと共に含む。非ヒト動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどのいずれかの動物が使用され得る。キメラ抗体とは、少なくとも2つの異なる抗原に対して特異性を有する多重特異性抗体をもまた指す。

【００４０】

用語「ヒト化抗体」は、完全にまたは部分的に非ヒト起源であり、例えば、ヒトにおける免疫応答を回避または最小化するためにVHおよびVLのフレームワーク領域において、ある種のアミノ酸を置き換えるように改変されている抗体を言う。ヒト化抗体の定常領域は典型的にはヒトCHおよびCL領域である。

【００４１】

抗体の(例えば従来の抗体の)「フラグメント」は、IgGなどのインタクトな抗体のある部分、特に、インタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの例は、Fv、Fab、F(ab')2、Fab'、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2、ダイアボディ、ならびに抗体フラグメントから形成される二重特異性および多重特異性抗体を包含する。従来の抗体のフラグメントは、重鎖抗体またはVHHなどの単一ドメイン抗体でもある。

【００４２】

用語「Fab」は、重鎖のN末端側の約半分および軽鎖全体がジスルフィド結合を介して結合されている約50,000Daの分子量および抗原結合活性を有する抗体フラグメントを指す。通常は、プロテアーゼであるパパインでIgGを処置することによってフラグメントの中から得られる。

【００４３】

用語「F(ab')2」は、約100,000Daの分子量および抗原結合活性を有する抗体フラグメントを言い、これは、ヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合された2つの同一のFabフラグメントよりもやや大きい。通常は、プロテアーゼであるペプシンでIgGを処置することによってフラグメントの中から得られる。

【００４４】

用語「Fab」は、F(ab')2のヒンジ領域のジスルフィド結合を切ることによって得られる、約50,000Daの分子量および抗原結合活性を有する抗体フラグメントを指す。

【００４５】

一本鎖Fv(「scFv」)は、共有結合的に連結されたVH::VLヘテロ二量体であり、これは通常、ペプチドをコードするリンカーによって連結されたVHおよびVLをコードする遺伝子を包含する遺伝子融合体から発現される。本発明のヒトscFvフラグメントは、例えば遺伝子組換え技術を使用することによって、適当な形態に保たれるCDRを包含する。二価および多価抗体フラグメントは、一価scFvの会合によって自発的に形成するか、または二価sc(Fv)2のように、ペプチドリンカーによって一価scFvをカップリングするこ

とによって生成される。「dsFv」は、ジスルフィド結合によって安定化されたVH::VLヘテロ二量体である。「(dsFv)2」は、ペプチドリンカーによって連結された2つのdsFvを指す。

【００４６】

用語「二重特異性抗体」または「BsAb」は、2つの異なる抗原結合部位を含む抗体を指す。したがって、BsAbは例えば2つの異なる抗原に同時に結合する能力がある。遺伝子工学は、例えばEP 2 050 764 A1に記載されている通り、結合特性およびエフェクター機能の所望のセットを有する抗体または抗体誘導体を設計、改変、および生成するために、頻繁に使用されている。

【００４７】

用語「多重特異性抗体」は、2以上の異なる抗原結合部位を含む抗体を指す。

【００４８】

用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を有する小さい抗体フラグメントを指し、これらのフラグメントは、同じポリペプチド鎖(VH-VL)上の軽鎖可変ドメイン(VL)に接続された重鎖可変ドメイン(VH)を含む。同じ鎖の2つのドメイン間のペアリングを可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは別の鎖の相補的なドメインとペアリングし、2つの抗原結合部位を作り出すことを強いられる。

【００４９】

用語「ハイブリドーマ」は、非ヒト哺乳動物を抗原で免疫することによって調製されたB細胞をマウスなどに由来する骨髄腫細胞との細胞融合に付すことによって得られる細胞を指し、これが、抗原特異性を有する所望のモノクローナル抗体を生成する。

【００５０】

「精製された」または「単離された」とは、ポリペプチド(例えば抗体)またはヌクレオチド配列を指すときに、示された分子が、同じ型の他の生物学的高分子が実質的に存在しない中で存在するということを意味する。本明細書で使用される用語「精製された」は、重量で少なくとも75％、85％、95％、96％、97％、または98％の同じ型の生物学的高分子が存在するということを意味する。ある具体的なポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子は、対象のポリペプチドをコードしない他の核酸分子が実質的にない核酸分子を指す;しかしながら、分子は、組成物の基本的特徴に有害な影響を及ぼさないいくつかの追加の塩基または部分を包含していてもよい。

【００５１】

本明細書に使用されるとき、用語「対象」は、齧歯動物、ネコ、イヌ、霊長目の動物、またはヒトなどの哺乳動物を指す。本発明の態様において、対象(またはペイシェント)は、ヒトである。

【００５２】

本発明の抗体

本発明者らは、特異的抗CEACAM5抗体を作製し、スクリーニングし、選択することに成功し、驚くべきことに、それらをがん治療への使用にとって、特に免疫抱合体(抗体-薬物抱合体)の一部として、理想的に適したものにするいくつかの特性の組み合わせを示した。例えば、本発明の抗体はヒトおよびMacaca fascicularis CEACAM5タンパク質の両方に対して高い親和性を示し、それらは、ヒトCEACAM1、CEACAM6、CEACAM7、およびCEACAM8タンパク質も、Macaca fascicularis CEACAM6タンパク質も有意に交差反応しない。本発明者らは、本発明に従うかかるモノクローナル抗体のアミノ酸配列を決定した。

本発明は、ヒトCEACAM5タンパク質に結合する単離された抗体を提供し;

単離された抗体は以下を含み、

(i)GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPPおよびTLQSAからなる群から選択される配列(好ましくはGGTLQSPP)を含み、好ましくは軽鎖定常領域のC末端にこの配列を含む、少なくとも1つの軽鎖定常領域(CL);

および/または、

【００５３】
(ii)次のアミノ酸置換の1以上を含む少なくとも1つの重鎖定常領域(CH):
(a)L234AおよびL235A(LALA突然変異);
(b)L234AおよびL235AおよびP329G(LALA-PG突然変異);
(c)L235AおよびG237A(LAGA突然変異);
(d)M252YおよびS254TおよびT256E(YTE突然変異);
(e)K222R;
Euナンバリングが前記アミノ酸置換に使用される。
ここで、前記単離された抗体は、配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR1-H、配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR2-H、配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR3-H、配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR1-L、配列番号7のアミノ酸配列からなるCDR2-L、および配列番号8のアミノ酸配列からなるCDR3-Lを含む。
本発明は、さらに、ヒトCEACAM5タンパク質に結合する単離された抗体を提供し;ここで、単離された抗体は以下を含む:
(i)GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPPおよびTLQSAからなる群から選択される配列(好ましくはGGTLQSPP)を含み、好ましくは軽鎖定常領域のC末端にこの配列を含む、少なくとも1つの軽鎖定常領域(CL);
ならびに
(ii)次のアミノ酸置換の1以上を含む少なくとも1つの重鎖定常領域(CH):
(a)L234AおよびL235A(LALA突然変異);
(b)L234AおよびL235AおよびP329G(LALA-PG突然変異);
(c)L235AおよびG237A(LAGA突然変異);
(d)M252YおよびS254TおよびT256E(YTE突然変異);
(e)K222R;
Euナンバリングが前記アミノ酸置換に使用される。
ここで、前記単離された抗体は、配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR1-H、配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR2-H、配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR3-H、配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR1-L、配列番号7のアミノ酸配列からなるCDR2-L、および配列番号8のアミノ酸配列からなるCDR3-Lを含む。
【００５４】
好ましくは、本発明の単離された抗体は、構造FR1-CDR1-H-FR2-CDR2-H-FR3-CDR3-H-FR4、およびFR5-CDR1-L-FR6-CDR2-L-FR7-CDR3-L-FR8を有するフレームワーク領域FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7、およびFR8を含み;ここで、FR1は配列番号54からなり、FR2は配列番号55からなり、FR3は配列番号56からなり、FR4は配列番号57からなり、FR5は配列番号58からなり、FR6は配列番号59からなり、FR7は配列番号60からなり、FR8は配列番号61からなる。
本発明は、さらに、ヒトCEACAM5タンパク質に結合する単離された抗体を提供し、
ここで、前記単離された抗体は、好ましくは、配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR1-H、配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR2-H、配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR3-H、配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR1-L、配列番号7のアミノ酸配列からなるCDR2-L、および配列番号8のアミノ酸配列からなるCDR3-Lを含み:
ここで、前記単離された抗体は、構造FR1-CDR1-H-FR2-CDR2-H-FR3-CDR3-H-FR4、およびFR5-CDR1-L-FR6-CDR2-L-FR7-CDR3-L-FR8を有するフレームワーク領域FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7、およびFR8を含み、ここで、FR1は配列番号54からなり(EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS)、FR2は配列番号55からなり(LTWIRQHPGKGLEWIGY)、FR3は配列番号56からなり(YFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC)、FR4は配列番号57からなり(WGQGTLVTVSS)、FR5は配列番号58からなり(EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTS)、FR6は配列番号59からなり(LAWYQQKPGQAPRLLIY)、FR7は配列番号60からなり(TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC)、FR8は配列番号61からなる(FGPGTKVDIK)。

また、本発明はヒトCEACAM5タンパク質に結合する単離された抗体を提供し、ここで、単離された抗体は以下を含む:

(i)GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP、およびTLQSAからなる群から選択される配列、最も好ましくは配列GGTLQSPPを含み、好ましくは軽鎖定常領域のC末端にこの配列を含む、少なくとも1つの軽鎖定常領域(CL);

および/または、

(ii)次のアミノ酸置換の1以上を含む少なくとも1つの重鎖定常領域(CH):

(a)L234AおよびL235A(LALA突然変異);

(b)L234AおよびL235AおよびP329G(LALA-PG突然変異);

(c)L235AおよびG237A(LAGA突然変異);

(d)M252YおよびS254TおよびT256E(YTE突然変異);

(e)K222R;

ここで、Euナンバリングが前記アミノ酸置換について使用される;

ここで、好ましくは、前記単離された抗体は、配列番号3のアミノ酸配列からなるCDR1-H、配列番号4のアミノ酸配列からなるCDR2-H、配列番号5のアミノ酸配列からなるCDR3-H、配列番号6のアミノ酸配列からなるCDR1-L、配列番号7のアミノ酸配列からなるCDR2-L、および配列番号8のアミノ酸配列からなるCDR3-Lを含み:

ここで、好ましくは、前記単離された抗体は、構造FR1-CDR1-H-FR2-CDR2-H-FR3-CDR3-H-FR4、およびFR5-CDR1-L-FR6-CDR2-L-FR7-CDR3-L-FR8を有するフレームワーク領域FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7、およびFR8を含み、ここで、FR1は配列番号54からなり、FR2は配列番号55からなり、FR3は配列番号56からなり、FR4は配列番号57からなり、FR5は配列番号58からなり、FR6は配列番号59からなり、FR7は配列番号60からなり、FR8は配列番号61からなる。

また、本発明は単離された抗体を提供し、これはヒトCEACAM5タンパク質に結合し、これは、アミノ酸配列DGSVSRGGYY(配列番号3)からなるCDR1-H、アミノ酸配列IYYSGST(配列番号4)からなるCDR2-H、アミノ酸配列ARGIAVAPFDY(配列番号5)からなるCDR3-H、アミノ酸配列QSVRSN(配列番号6)からなるCDR1-L、アミノ酸配列AAS(配列番号7)からなるCDR2-L、およびアミノ酸配列QQYTNWPFT(配列番号8)からなるCDR3-Lを含み、ここで、単離された抗体は以下を含む:

(i)次のアミノ酸置換の1以上を含む少なくとも1つの重鎖定常領域(CH):

(a)L234AおよびL235A(LALA突然変異);

(b)L234AおよびL235AおよびP329G(LALA-PG突然変異);

(c)L235AおよびG237A(LAGA突然変異);

(d)M252YおよびS254TおよびT256E(YTE突然変異);

(e)K222R;

および/または、

(ii)配列GGTLQSPPを含み、好ましくはそのC末端にこの配列を含む、少なくとも1つの軽鎖定常領域(CL)。

Euナンバリングが前記アミノ酸置換に使用される。Euナンバリングシステムは周知であり(Edelman et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1969,63,78-85およびKabat,E.A.et al.,National Institutes of Health (U.S.)Office of the Director.Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th ed.;DIANE Publishing: Collingdale,PA,USA,1991参照)、指示されるアミノ酸置換の位置はこのナンバリングシステムに従う。アミノ酸置換は1文字アミノ酸コードを使用して規定される。また、GGTLQSPPは軽鎖定常領域(CL)に複数回含まれ得、代替的に、または加えて、重鎖定常領域(CH)にも含まれ得る。好ましくは、GGTLQSPPは、本発明の抗体の両方の軽鎖定常領域(CL)において、軽鎖定常領域(CL)あたり1回含まれる。

【００５５】

本発明の抗体は、好ましくは、Macaca fascicularis CEACAM5タンパク質にもまた結合し得る。

【００５６】
本発明の単離された抗体のある態様においては、両方の重鎖定常領域(CH)が前記アミノ酸置換(a)から(e)の1以上を含み、および/または、ここで、両方の軽鎖定常領域が前記配列GGTLQSPPを含む。CLおよびCH鎖の改変の好ましい組合せが下の表4に概説されている。これは、抗体mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M、およびmAb7-Mの改変の組合せを示す。好ましくは、本発明の抗体は、次の重鎖定常領域(CH)および軽鎖定常領域(CL)の改変のいずれかを含む:
(a)CHは、アミノ酸置換L234A、L235A(LALA突然変異)ならびにM252Y、S254T、およびT256E(YTE突然変異)を含み、;または
(b)CHは、アミノ酸置換L234A、L235A(LALA突然変異)ならびにM252Y、S254T、およびT256E(YTE突然変異)、ならびに、(好ましくはC末端に)配列GGTLQSPPを含む軽鎖定常領域(CL)を含み、または
(c)CHは、アミノ酸置換L234A、L235A(LALA突然変異)ならびにM252Y、S254T、およびT256E(YTE突然変異)ならびにK222R、ならびに、(好ましくはC末端に)配列GGTLQSPPを含む軽鎖定常領域(CL)を含み、または
(d)CHは、アミノ酸置換L234A、L235A(LALA突然変異)を含み、または
(e)CHは、アミノ酸置換L234A、L235A(LALA突然変異、ならびに、(好ましくはC末端に)配列GGTLQSPPを含む軽鎖定常領域(CL))を含む。
【００５７】
好ましくは、本発明の抗体の両方のCLおよび両方のCH領域は、上の(a)から(e)に概説される改変を含む。
【００５８】
本発明の単離された抗体のさらなる態様において、少なくとも1つの重鎖定常領域(CH)は、アミノ酸配列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号31)、もしくはASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDRTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号32)を含み、および/または、前記軽鎖定常領域(CL)の少なくとも1つは、アミノ酸配列RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGTLQSPP(配列番号33)を含む。
【００５９】
本発明の単離された抗体のなおさらなる態様において、前記重鎖定常領域(CH)および軽鎖定常領域(CL)は、次の配列の組合せのいずれかを有する:
(1)両方のCHは配列番号31の配列を含み、両方のCLは配列番号12の配列を含む;または
(2)両方のCHは配列番号31の配列を含み、両方のCLは配列番号33の配列を含む;または
(3)両方のCHは配列番号32の配列を含み、両方のCLは配列番号33の配列を含む;または
(4)両方のCHは、ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK

SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG(配列番号50)の配列を含み、両方のCLは配列番号12の配列を含む;または

(5)両方のCHは配列番号50の配列を含み、両方のCLは配列番号33の配列を含む;または

(6)少なくとも1つのCHは配列番号31の配列を含み、1つのCLは配列番号12の配列を含む;または

(7)少なくとも1つのCHは配列番号31の配列を含み、1つのCLは配列番号33の配列を含む;または

(8)少なくとも1つのCHは配列番号32の配列を含み、1つのCLは配列番号33の配列を含む;または

(9)少なくとも1つのCHは配列番号50の配列を含み、1つのCLは配列番号12の配列を含む;または

10)少なくとも1つのCHは配列番号50の配列を含み、1つのCLは配列番号33の配列を含む。

【００６０】

本発明の態様において、上で言及された6つのCDR配列を有する抗体は、アミノ酸配列

【数２】

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**DGSVSRGGYY**LTWIRQHPGKGLEWIGY**IYYSGST**YF
NPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC**ARGIAVAPFDY**WGQGTLVTVSS

(配列番号9)(CDRは太字で示されている)と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)、およびアミノ酸配列

【数３】

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTS**QSVRSN**LAWYQQKPGQAPRLLIY**AAS**TRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC**QQYTNWPFT**FGPGTKVDIK

(配列番号10)(CDRは太字で示されている)と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む。

【００６１】

本発明の態様において、上で言及された6つのCDR配列を有する抗体は、配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)と、配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)とを含む。

【００６２】

本発明の態様において、抗体は、さらに、アミノ酸配列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号11)と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域(CH)、およびアミノ酸配列RTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号12)と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域(CL)を含む。

【００６３】

本発明の態様において、抗体は、配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域(CH)と、配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域(CL)とを含む。

【００６４】

抗体の重鎖定常領域(CH)は、いずれかの結合機能性を失うことなしにC末端リジン(K)を含み得るということが公知である。従って、本発明の抗体について本明細書に記載される配列では、重鎖定常領域(CH)はC末端に追加のリジン(K)を任意に含み得る。リジンなしの重鎖定常領域(CH)が、本明細書に開示される抗体-薬物抱合体にとって好ましい。

より具体的な態様において、本発明の抗体は単離された抗体であり、これがヒトCEACAM5タンパク質に結合し、これが、アミノ酸配列EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号13)と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖(HC)、およびアミノ酸配列EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号14)と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖(LC)を含む。本発明のさらにより具体的な態様において、抗体は以下を含む:(i)配列番号34のアミノ酸配列を含む重鎖(HC)および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖(LC);または(ii)アミノ酸配列EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号34)を含む重鎖(HC)およびアミノ酸配列(配列番号36)を含む軽鎖(LC);または

(iii)アミノ酸配列EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDRTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(配列番号35)を含む重鎖(HC)およびアミノ酸配列EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGTLQSPP(配列番号36)を含む軽鎖(LC);または

(iv)アミノ酸配列EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIA

VAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG(配列番号51)を含む重鎖(HC)および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖(LC);または

(v)配列番号51のアミノ酸配列を含む重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列を含む軽鎖(LC)。

【００６５】

本発明のさらにより具体的な態様において、抗体は以下からなる:(i)配列番号34のアミノ酸配列を含む2つの同一の重鎖(HC)および配列番号14のアミノ酸配列を含む2つの同一の軽鎖(LC);または(ii)配列番号34のアミノ酸配列を含む2つの同一の重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列を含む2つの同一の軽鎖(LC);または(iii)配列番号35のアミノ酸配列を含む2つの同一の重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列を含む2つの同一の軽鎖(LC);または(iv)配列番号51のアミノ酸配列を含む2つの同一の重鎖(HC)および配列番号14のアミノ酸配列を含む2つの同一の軽鎖(LC);または(v)配列番号51のアミノ酸配列を含む2つの同一の重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列を含む2つの同一の軽鎖(LC)。いくつかの態様において、本発明の抗体の1以上の個々のアミノ酸は、置換によって、特に保存的置換によって、CDR配列を包含する上で言及された配列の1以上において変調させられ得る。かかる変調は、例えば、例えば抗体のヒト化に関連してグリコシル化部位または脱アミド化部位を除去することを意図され得る。

【００６６】

いくつかの態様において、本発明の抗体は単離された抗体であり、これがヒトCEACAM5タンパク質に結合し、これが、配列番号13のアミノ酸配列からなる2つの同一の重鎖(HC)および配列番号14のアミノ酸配列からなる2つの同一の軽鎖(LC)からなる。この特定の抗体は本明細書において「mAb1」ともまた言われる。

【００６７】

いくつかの態様において、本発明の抗体は単離された抗体であり、これがヒトCEACAM5タンパク質に結合し、これが、配列番号34のアミノ酸配列からなる2つの同一の重鎖(HC)および配列番号14のアミノ酸配列からなる2つの同一の軽鎖(LC)からなる。この特定の抗体は本明細書において「mAb1-M」ともまた言われる。

【００６８】

いくつかの態様において、本発明の抗体は単離された抗体であり、これがヒトCEACAM5タンパク質に結合し、これが、配列番号34のアミノ酸配列からなる2つの同一の重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列からなる2つの同一の軽鎖(LC)からなる。この特定の抗体は本明細書において「mAb2-M」ともまた言われる。

【００６９】

いくつかの態様において、本発明の抗体は単離された抗体であり、これがヒトCEACAM5タンパク質に結合し、これが、配列番号35のアミノ酸配列からなる2つの同一の重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列からなる2つの同一の軽鎖(LC)からなる。この特定の抗体は、本明細書において「mAb3-M」ともまた言われる。

【００７０】

いくつかの態様において、本発明の抗体は単離された抗体であり、これがヒトCEACAM5タンパク質に結合し、これが、配列番号51のアミノ酸配列からなる2つの同一の重鎖(HC)および配列番号14のアミノ酸配列からなる2つの同一の軽鎖(LC)からなる。この特定の抗体は本明細書において「mAb6-M」ともまた言われる。

【００７１】

いくつかの態様において、本発明の抗体は単離された抗体であり、これがヒトCEACA

M5タンパク質に結合し、これが、配列番号51のアミノ酸配列からなる2つの同一の重鎖(HC)および配列番号36のアミノ酸配列からなる2つの同一の軽鎖(LC)からなる。この特定の抗体は本明細書において「mAb7-M」ともまた言われる。

【００７２】

いくつかの態様において、本発明の抗体はヒトおよびMacaca fascicularis CEACAM5のA2-B2ドメインに結合する。本発明は、ヒトおよび/またはMacaca fascicularis CEACAM5タンパク質のA2-B2ドメインに対する結合について、mAb1の重鎖および軽鎖可変領域(すなわち、それぞれ配列番号9および10に対応するVHおよびVL)とmAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-MまたはmAb7-Mのいずれかからの重鎖定常領域(CH)および軽鎖定常領域(CL)とを含む抗体と競合する抗体をもまた提供する。

【００７３】

ヒトおよび/またはMacaca fascicularis CEACAM5タンパク質のA2-B2ドメインに対する結合について、mAb1(以降では、候補抗体との競合の文脈においては「参照」抗体と言われる)のVHおよびVLを含む抗体と競合する候補抗体の能力は、例えば競合ELISAによって直ちにアッセイされ得る。ここで、抗原(すなわち、ヒトもしくはMacaca fascicularis CEACAM5のA2-B2ドメイン、またはA2-B2ドメインを包含するヒトもしくはMacaca fascicularis CEACAM5のフラグメントを含むかもしくはそれからなるポリペプチド、特にヒトもしくはMacaca fascicularis CEACAM5の細胞外ドメイン)は、固体の支持体に結合され、それぞれ候補抗体および参照抗体を含有する2つの溶液が追加され、抗体は、抗原への結合について競合することを許される。それから、抗原に結合した参照抗体の量が測定され、負の対照(例えば、抗体を含有しない溶液)に対して測定されたときの抗原に結合した参照抗体の量と比較され得る。負の対照の存在下の結合した参照抗体の量と比較して減少した候補抗体の存在下の結合した参照抗体の量は、候補抗体が参照抗体と競合したということを指示している。便利には、参照抗体は、結合した参照抗体の検出を容易にするために(例えば蛍光)標識され得る。繰り返しの測定は、候補および/または参照抗体の段階希釈物によって行われ得る。

【００７４】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、ヒトCEACAM1、ヒトCEACAM6、ヒトCEACAM7、ヒトCEACAM8、Macaca fascicularis CEACAM6タンパク質のいずれとも結合しないかまたは有意に交差反応しない。いくつかの態様において、抗体は、CEACAM5以外の上で言及されたヒトおよびMacaca fascicularis CEACAMタンパク質の細胞外ドメインとは結合しないかまたは有意に交差反応しない。

【００７５】

「親和性」は、理論上は、全抗体と抗原との間の平衡会合によって定められる。それは、種々の公知の方法、例えば、会合および解離速度を表面プラズモン共鳴によって測定すること、または免疫化学アッセイ(ELISA、FACS)でEC_{50}(または見かけ上のK_D)を測定することによって、実験的に評価され得る。これらのアッセイでは、EC_{50}は、何らかの規定された曝露期間後に、定められた濃度の抗原においてELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)によってまたは抗原を発現する細胞においてFACS(蛍光活性化セルソーティング)によって、ベースラインと最大との間の中間の応答を誘導する抗体の濃度である。

【００７６】

抗原1(Ag1)に結合するモノクローナル抗体は、EC_{50}が両方の抗原について類似の範囲である場合には、抗原2(Ag2)に対して「交差反応性」である。本願において、Ag1に結合するモノクローナル抗体は、Ag2に対するその親和性がAg1のその親和性の10倍以下以内(例えば5倍以内)であるときには、Ag2に対して交差反応性である。親和性は両方の抗原について同じ方法で測定される。

【００７７】

Ag1に結合するモノクローナル抗体は、2つの抗原について親和性が非常に異なるときには、Ag2に対して「有意に交差反応性ではない」。結合応答が低すぎる場合には、Ag2に対する親和性は測定可能でない場合がある。本願において、Ag1に結合するモノクロ

ーナル抗体は、Ag2に対するモノクローナル抗体の結合応答が、同じ実験設定および同じ抗体濃度におけるAg1に対する同じモノクローナル抗体の結合応答の5％未満であるときには、Ag2に対して有意に交差反応性ではない。実際には、使用される抗体濃度は、Ag1で得られるEC_{50}または飽和プラトーに到達するために要求される濃度であり得る。モノクローナル抗体は、Ag2に対して有意に交差反応性ではないときには、Ag1に「特異的に結合する」(または「特異的である」)。

【００７８】

いくつかの態様において、本発明に従う抗体は、ヒトCEACAM5に対するその親和性の10倍以下以内(例えば5倍以内)であるMacaca fascicularis CEACAM5に対する親和性を有する。従って、本発明に従う抗体はサルで行われる毒性学的研究に使用され得る。なぜなら、サルで観察される毒性プロファイルはヒトにおける潜在的な有害作用を予測するために妥当するであろうからである。

【００７９】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、≦10nMであるヒトCEACAM5もしくはMacaca fascicularis CEACAM5または両方に対する親和性を有する。例えば、本発明の抗体は、1nMと10nMとの間であるヒトCEACAM5に対する親和性、例えば、約6nMのヒトCEACAM5に対する親和性を有し得る。

【００８０】

ヒトCEACAM5またはMacaca fascicularis CEACAM5に対する親和性は、例えば、捕捉抗原として可溶性組換えCEACAM5を使用するELISAにおいてEC50値として決定され得る。

【００８１】

代替的には、本発明の抗体では、見かけ上の解離定数(見かけ上のKD)は、例えば腫瘍細胞株MKN45(DSMZ、ACC409)によるFACS分析によって決定され得る。

【００８２】

さらに、本発明に従う抗体は、例えば、凍結およびホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織切片から、免疫組織化学によってCEACAM5発現を検出することができることが示されている。

【００８３】

本明細書の上記および下記の態様のいずれかの組み合わせは、本発明の一部を形成する。

【００８４】

いくつかの態様において、本発明に従う抗体は、従来の抗体、例えば従来のモノクローナル抗体、または抗体フラグメント、二重特異性もしくは多重特異性抗体である。

【００８５】

いくつかの態様において、本発明に従う抗体は、IgGまたはそのフラグメントを含むかまたはそれからなる。

【００８６】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、例えば、ネズミ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体であり得る。抗体配列のヒト化のための多数の方法が当該技術分野において知られているる。例えば、Almagro & Fransson (2008)Front Biosci.13:1619-1633による総説を参照。1つの普通に使用される方法はCDRグラフトまたは抗体リシェイピングであり、これには、異なる特異性のヒト抗体のフレームワーク骨格上への、ドナー抗体、一般的にはマウス抗体のCDR配列のグラフトが関わる。CDRグラフトは、CDRグラフトされた非ヒト抗体の結合特異性および親和性、したがって生物学的活性を低減するので、親抗体の結合特異性および親和性を保持するために、CDRグラフトされた抗体の選択された位置に復帰変異が導入される。可能な復帰変異の位置の同定は、文献および抗体データベースから利用可能な情報を使用して行われ得る。復帰変異の候補であるアミノ酸残基は、典型的には、抗体分子の表面に位置するものであり、埋め込まれている、または表面露出度が低い残基は通常は変化されないであろう。復帰変異の候補であ

るアミノ酸残基は、典型的には、抗体分子の表面に位置するものであり、埋め込まれている、または表面露出度が低い残基は通常は変化されないであろう。別の代替的な技術は「ガイド選択」として公知であり(Jespers et al.(1994)Biotechnology 12,899)、親抗体のエピトープおよび結合特性を保存する完全ヒト抗体をネズミ抗体から誘導するために使用され得る。

【００８７】

キメラ抗体については、ヒト化には典型的には可変領域配列のフレームワーク領域の改変が関わる。

【００８８】

CDRの一部であるアミノ酸残基は、典型的にはヒト化に関連して変化させられないが、ある種のケースでは、個々のCDRアミノ酸残基を変化させて、例えばグリコシル化部位、脱アミド化部位または望まれないシステイン残基を除去することが望ましい場合がある。N-結合型グリコシル化は、トリペプチド配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thr中のアスパラギン残基に対するオリゴ糖鎖の付着によって起こり、ここでは、XはPro以外のいずれかのアミノ酸である。N-グリコシル化部位の除去は、例えば保存的置換によってAsnまたはSer/Thr残基どちらかを異なる残基に変異させることによって達成される。アスパラギンおよびグルタミン残基の脱アミド化は、pHおよび表面露出などの因子に依存して起こり得る。アスパラギン残基は、主として配列Asn-Gly中に存在するときには特に脱アミド化を受けやすく、Asn-Alaなどの他のジペプチド配列中では程度はより少ない。したがって、かかる脱アミド化部位、例えばAsn-GlyがCDR配列中に存在するときには、典型的には関与する残基の1つを除去するための保存的置換によってその部位を除去することが望ましい。関与する残基の1つを除去するためのCDR配列上の置換もまた本発明に含まれることが意図される。

【００８９】

ヒト化抗体またはそのフラグメントにおいて、重鎖および軽鎖の可変ドメインは、ヒト受容体フレームワーク領域を含む。ヒト化抗体は、存在するところでは、ヒト定常重鎖および軽鎖ドメインをさらに含む。

【００９０】

いくつかの態様において、本発明に従う抗体は、Fv、Fab、F(ab')2、Fab'、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2、およびダイアボディからなる群から選択される抗体フラグメント(例えばヒト化抗体フラグメント)であり得る。

【００９１】

いくつかの態様において、本発明に従う抗体は、抗体フラグメントから形成される二重特異性または多重特異性抗体であり得、少なくとも1つの抗体フラグメントは、本発明に従う抗体のフラグメントである。多重特異性抗体は、例えばEP 2 050 764 A1またはUS 2005/0003403 A1に記載されている多価タンパク質複合体である。

【００９２】

本発明に従う二重特異性または多重特異性抗体は、(a)ヒトおよびMacaca fascicularis CEACAM5タンパク質および(b)少なくとも1つの他の抗原に対して特異性を有し得る。いくつかの態様において、少なくとも1つの他の抗原は、ヒトでもMacaca fascicularis CEACAMファミリーメンバーでもない。他の態様において、少なくとも1つの他の抗原は、mAb1によって標的化されるエピトープ以外のヒトまたはMacaca fascicularis CEACAM5上のエピトープであり得る。

【００９３】

本発明の抗体は、当該技術分野において知られているいずれかの技術によって生成され得る。本発明に従う抗体は、例えば単離された(例えば精製された)形態で使用され得るか、または膜もしくは脂質ベシクル(例えばリポソーム)などのベクターに含有され得る。

【００９４】

本発明の核酸および宿主細胞

本発明のさらなる側面は、上で定められた本発明の抗体をコードする核酸配列を含むか

またはそれからなる単離された核酸に関する。
【００９５】
典型的には、前記核酸はDNAまたはRNA分子であり、これが、プラスミド、コスミド、エピソーム、人工染色体、ファージまたはウイルスベクターなどのいずれかの好適なベクター上に包含される。
【００９６】
用語「ベクター」、「クローニングベクター」および「発現ベクター」は、DNAまたはRNA配列(例えば外来遺伝子)を宿主細胞に導入して、宿主を形質転換し、導入された配列の発現(例えば転写および翻訳)を促進する基剤を意味する。
【００９７】
従って、本発明のさらなる側面は、上で定められた本発明の核酸を含むベクターに関する。
【００９８】
かかるベクターは、対象への投与によって前記ポリペプチドの発現を引き起こす、または導くための制御エレメント、例えばプロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどを含む。動物細胞のための発現ベクターに使用されるプロモーターおよびエンハンサーの例は、SV40の初期プロモーターおよびエンハンサー(Mizukami T.et al.1987)、モロニーマウス白血病ウイルスのLTRプロモーターおよびエンハンサー(Kuwana Y et al.1987)、免疫グロブリンH鎖のプロモーター(Mason JO et al.1985)およびエンハンサー(Gillies SD et al.1983)などを包含する。
【００９９】
ヒト抗体C領域をコードする遺伝子が挿入および発現され得る限り、動物細胞のためのいずれかの発現ベクターが使用される。好適なベクターの例は、pAGE107(Miyaji H et al.1990)、pAGE103(Mizukami T et al.1987)、pHSG274(Brady G et al.1984)、pKCR(O'Hare K et al.1981)、pSG1 beta d2-4-(Miyaji H et al.1990)などを包含する。
【０１００】
プラスミドの他の例は、複製起点を含む複製型プラスミド、またはインテグレーション型プラスミド、例えばpUC、pcDNA、pBRなどを包含する。
【０１０１】
ウイルスベクターの他の例は、アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスおよびAAVベクターを包含する。かかる組換えウイルスは、例えばパッケージング細胞をトランスフェクションすることによってまたはヘルパープラスミドもしくはウイルスによる一過性トランスフェクションによって、当該技術分野において知られている技術によって生成される。ウイルスパッケージング細胞の典型的な例は、PA317細胞、PsiCRIP細胞、GPenv+細胞、293細胞などを包含する。かかる複製欠損組換えウイルスを生成するための詳細なプロトコールは、例えば、WO 95/14785、WO 96/22378、US 5,882,877、US 6,013,516、US 4,861,719、US 5,278,056、およびWO 94/19478にある。
【０１０２】
本発明のさらなる目的は、本発明に従う核酸および/またはベクターによってトランスフェクション、感染または形質転換された宿主細胞に関する。
【０１０３】
用語「形質転換」は、宿主細胞への「外来」(すなわち外的な)遺伝子、DNAまたはRNA配列の導入を意味し、宿主細胞は導入された遺伝子または配列を発現して、所望の物質、典型的には、導入された遺伝子または配列によってコードされるタンパク質または酵素を生成する。導入されたDNAまたはRNAを受容および発現する宿主細胞は、「形質転換」されている。
【０１０４】
本発明の核酸は、好適な発現系において本発明の抗体を生成するために使用され得る。

用語「発現系」は、例えば、ベクターによって担持され、宿主細胞に導入される外来DNAによってコードされるタンパク質の発現のための、好適な条件下の宿主細胞および適合性のベクターを意味する。

【０１０５】

通常の発現系は、E.coli宿主細胞およびプラスミドベクター、昆虫宿主細胞およびバキュロウイルスベクター、ならびに哺乳動物宿主細胞およびベクターを包含する。宿主細胞の他の例は、限定なく、原核細胞(細菌など)および真核細胞(酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など)を包含する。具体的な例は、E.coli、KluyveromycesまたはSaccharomyces酵母、哺乳動物細胞株(例えば、Vero細胞、CHO細胞、3T3細胞、COS細胞など)、ならびに初代のまたは樹立された哺乳動物細胞培養(例えば、リンパ芽球、線維芽細胞、胚細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞などから生成される)を包含する。例は、マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子(以降は「DHFR遺伝子」と言われる)が欠損しているCHO細胞(Urlaub G et al;1980)、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC CRL1662、以降は「YB2/0細胞」と言われる)などをもまた包含する。いくつかの態様において、キメラまたはヒト化抗体のADCC活性はYB2/0細胞で発現されるときに増強されるので、YB2/0細胞が使用される。

【０１０６】

ヒト化抗体の発現のためには、発現ベクターは、抗体重鎖をコードする遺伝子および抗体軽鎖をコードする遺伝子が別々のベクター上に存在する型、または両方の遺伝子が同じベクター上に存在する型(タンデム型)のいずれかである。ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、および動物細胞における抗体HおよびL鎖の発現レベルのバランスからは、ヒト化抗体発現ベクターはタンデム型である。Shitara K et al.J Immunol Methods.1994 Jan 3;167(1-2):271-8)。タンデム型ヒト化抗体発現ベクターの例はpKANTEX93(WO 97/10354)、pEE18などを包含する。

【０１０７】

本発明は、本発明に従う抗体を発現する組換え宿主細胞を生成する方法にもまた関し、前記方法は、次のステップを含む:(i)コンピテント宿主細胞に上で記載された組換え核酸またはベクターをin vitroまたはex vivoで導入すること、(ii)得られた組換え宿主細胞をin vitroまたはex vivoで培養すること、ならびに(iii)任意に、前記抗体を発現および/または分泌する細胞を選択すること。

【０１０８】

かかる組換え宿主細胞は、本発明の抗体の生成のために使用され得る。

【０１０９】

本発明の抗体を生成する方法

本発明の抗体は、当該技術分野において知られているいずれかの技術、例えば、限定なしに、単独または組み合わせどちらかのいずれかの化学的、生物学的、遺伝学的または酵素的技術によって生成され得る。

【０１１０】

所望の抗体のアミノ酸配列を知ると、当業者は、ポリペプチドの生成のための標準的な技術を使用して、前記抗体または免疫グロブリン鎖を直ちに生成し得る。例えば、それらは、周知の固相法を使用して、市販のペプチド合成装置(Applied Biosystems(Foster City,California)によって作製されたものなど)を使用し、製造者の指示に従って、合成され得る。代替的には、本発明の抗体および免疫グロブリン鎖は、当該技術分野において知られている組換えDNA技術によって生成され得る。例えば、これらのポリペプチド(例えば抗体)は、発現ベクター上への所望のポリペプチドをコードするDNA配列の組み込みと、所望のポリペプチドを発現するであろう好適な真核または原核宿主へのかかるベクターの導入との後に、DNA発現産物として得られ、これらから、その後周知の技術を使用して単離され得る。

【０１１１】

例えば、本発明は、抗体mAb1をコードする次のDNA配列を提供する:
mAb1重鎖ヌクレオチド配列
ここで、mVkシグナルペプチドは下線付き、
開始および終止コドンはイタリック、
VH領域配列は太字体、
CDRは二重下線で指示されている:
【数４】

*ATG*GAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGGTCGACC
GGTGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCT
GTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGATGGCTCCGTCAGCAGGGGTGGTTACTACTTGACC
TGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGT
GGGAGCACCTACTTCAACCCGTCCCTCAGGAGTCGGGTTACCATGTCAGTAGACACG
TCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTG
TATTACTGTGCGAGAGGGATAGCAGTGGCTCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCTTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCA
GCAGCAAGTCCACAAGCGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACT
TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACA
CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAG
TGCCAAGCAGCAGCCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCATACCTGT
CCACCCTGCCCAGCCCCCCCAGTGGCCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGC
CCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACG
TGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAATTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
CAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCC
GTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAGGCCCTGCCCTCCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC
ACGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCCCCATCTCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAG
GTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTTTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGA
CGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGC
AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACACAGAAGA
GCCTGAGCCTGTCCCCCGGC*TGA*

(配列番号15)
mAb1軽鎖ヌクレオチド配列
ここで、uPAシグナルペプチドは下線付き、
開始および終止コドンはイタリック、
VL領域配列は太字体、
CDRは二重下線で指示されている:
【数５】

*ATG*AGGGCCCTGCTGGCTAGACTGCTGCTGTGCGTGCTGGTCGTGTCCGACAGCAAGG
GCGAAATCGTACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGGACCAGTCAGAGTGTTCGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGC
AGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTGCATCCACCAGGGCCACTG
GTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCA
GCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATACTAACTGGCC
ATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGACATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCT
GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTG
CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCC
TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA
CAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGT*TGATAG*

(配列番号16)

【０１１２】

本発明は、抗体mAb1-M、mAb2-M、およびmAb3-M、mAb6-M、mAb7-Mをコードする次のDNA配列をもまた提供する:

配列番号37:HC mAb1-MおよびmAb2-M(HC-LALA-YTE)(ヌクレオチド)

シグナルペプチドは下線付き、

開始および終止コドンはイタリック、

VH領域配列は太字体、

CDRは二重下線で指示されている:

【数６】

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCTCTCTGTCCGA
GGTCCAGCTGCAAGAATCTGGCCCTGGACTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGTCTCT
GACCTGCACCGTGTCTGACGGCTCTGTTTCTAGAGGCGGCTACTACCTGACCTGGATC
AGACAGCATCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCTCC
ACCTACTTCAACCCCAGCCTGAGATCCAGAGTGACCATGTCCGTGGACACCTCCAAG
AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGTACTACT
GCGCCAGAGGAATCGCCGTGGCTCCCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCA
CCGTGTCCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAG
TCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGC
CTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCT
GTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCTTCTAGCT
CTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTG
GACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTG
CTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACC
CTGTACATCACCCGCGAGCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGG
ACCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGAC
CAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG
CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCC
TGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCA
GGTTTACACCCTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGGGAGAGCAATGGCC
AGCCAGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTC
CTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCT
GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGTCTGTCCCTGTC
TCCTGGC*TGATGA*

配列番号38:HC mAb3-M(HC-K222R-LALA-YTE)(ヌクレオチド)
シグナルペプチドは下線付き、
開始および終止コドンはイタリック、
VH領域配列は太字体、
CDRは二重下線で指示されている:

【数７】

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCTCTCTGTCCGA
GGTCCAGCTGCAAGAATCTGGCCCTGGACTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGTCTCT
GACCTGCACCGTGTCTGACGGCTCTGTTTCTAGAGGCGGCTACTACCTGACCTGGATC
AGACAGCATCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCTCC
ACCTACTTCAACCCCAGCCTGAGATCCAGAGTGACCATGTCCGTGGACACCTCCAAG
AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGTACTACT
GCGCCAGAGGAATCGCCGTGGCTCCCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCA
CCGTGTCCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAG
TCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGC
CTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCT
GTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCTTCTAGCT
CTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTG
GACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAGAACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTG
CTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACC
CTGTACATCACCCGCGAGCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGG
ACCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGAC
CAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG
CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCC
TGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCA
GGTTTACACCCTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGGGAGAGCAATGGCC
AGCCAGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTC
CTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCT
GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGTCTGTCCCTGTC
TCCTGGC*TGATGA*

配列番号39:LC mAb2-M、mAb3-MおよびmAb7-M(LC-タグ)(ヌクレオチド)
シグナルペプチドは下線付き、
開始および終止コドンはイタリック、
VL領域配列は太字体、
CDRは二重下線で指示されている:

【数８】

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCAGCCTGTCCG
AGATCGTGCTGACTCAATCTCCCGCCACACTGTCTGTGTCTCCCGGCGAAAGAGCTAC
CCTGTCTTGCCGGACATCTCAGTCCGTGCGGTCTAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG
CCTGGACAGGCTCCTCGGCTGCTGATCTACGCTGCTTCTACCAGAGCCACAGGCATC
CCCGCCAGATTTTCTGGCTCTGGATCTGGCACCGAGTTTACCCTGACCATCTCCAGCC
TGCAGTCCGAGGATTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTATACCAACTGGCCCTTCAC
CTTCGGACCCGGCACAAAGGTGGACATCAAGAGAACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTT
CATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCGTGTGCCTG
CTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTGC
AGAGCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAG
CCTGAGCAGCACCCTGACACTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCC
TGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACAGAGGCG
AGTGCGGCGGCACCTTGCAGTCTCCACCT*TGATAA*

配列番号52:HC mAb6-MおよびHC mAb7-M(ヌクレオチド)
シグナルペプチドは下線付き、
開始および終止コドンはイタリック、

VL領域配列は太字体、
CDRは二重下線で指示されている:

【数９】

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCTCTCTGTCC**GA**
GGTCCAGCTGCAAGAATCTGGCCCTGGACTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGTCTCT
GACCTGCACCGTGTCTGACGGCTCTGTTTCTAGAGGCGGCTACTAC**CTGACCTGGATC**
AGACAGCATCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCTCC
ACCTACTTCAACCCCAGCCTGAGATCCAGAGTGACCATGTCCGTGGACACCTCCAAG
AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGTACTACT
GCGCCAGAGGAATCGCCGTGGCTCCCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCA
CCGTGTCCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAG
TCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGC
CTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCT
GTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCTTCTAGCT
CTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTG
GACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTG
CTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACC
CTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGG
ACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGAC
CAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG
CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCC
TGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCA
GGTTTACACCCTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGGGAGAGCAATGGCC
AGCCAGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTC
CTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCT
GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGAGTCTGTCCCTGTCT
CCTGGC*TGATGA*

配列番号53:LC mAb1-MおよびLC mAb6-M(ヌクレオチド)
シグナルペプチドは下線付き、
開始および終止コドンはイタリック、
VL領域配列は太字体、
CDRは二重下線で指示されている:

【数１０】

*ATG*GAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGGTCGACC
GGT**GAAATCGTACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGA**
GCCACCCTCTCCTGCAGGACCAGTCAGAGTGTTCGCAGCAAC**TTAGCCTGGTACCAG**
CAGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTGCATCC**ACCAGGGCCACT**
GGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATACTAACTGGC
CATTCACT**TTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGACATCAAA**CGTACGGTGGCAGCACCATC
TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTG
CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCC
TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA
CAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGT*TGATAG*

CD20アイソタイプ対照

配列番号40:HC mAb5-M(抗CD20-HC)

【数１１】

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTS
YNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTV
SAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号41:mLC Ab5-M(抗CD20-LC)

【数１２】

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFS
GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**GGTLQSPP**

配列番号42:HC mAb5-M(抗CD20-HC)(ヌクレオチド)

シグナルペプチドは下線付き、

開始および終止コドンはイタリック:

【数１３】

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCAGCCTGTCTCA
GGTCCAGTTGCAACAACCTGGCGCCGAGCTTGTGAAGCCTGGCGCTTCTGTGAAGATG
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACAACATGCACTGGGTCAAGCAGA
CCCCTGGCAGAGGCCTGGAATGGATCGGCGCTATCTATCCTGGCAACGGCGACACCTC
CTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAAGCTACCCTGACCGCCGACAAGTCCTCTTCCACC
GCTTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCTCTGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCC
GGTCTACCTATTATGGCGGCGACTGGTACTTCAACGTGTGGGGCGCTGGCACCACCGT
GACAGTTTCTGCCGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCA
AGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGA
GCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCTGGCGTGCACACCTTTCCA
GCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCCTCTGTCGTGACCGTGCCTTCCAG
CTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCC
TGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACA
CCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGA
GGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCG
TGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC
CCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC
CAGGTTTACACCCTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA
CCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGG
CCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCT
TCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTC
CTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGT
CCCCTGGCAAG*TGATGA*

配列番号43:LC mAb5-M(抗CD20-LC)(ヌクレオチド)
シグナルペプチドは下線付き、
開始および終止コドンはイタリック:
【数１４】
*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCTCTCTGTCCCA
GATCGTGCTGTCTCAGTCTCCCGCCATCCTGAGTGCTAGCCCTGGCGAGAAAGTGACA
ATGACCTGCAGAGCCTCCTCCTCCGTGTCCTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCTG
GCAGCTCCCCTAAGCCTTGGATCTACGCCACCTCCAATCTGGCCTCTGGCGTGCCAGT
CAGATTCTCCGGATCTGGCTCCGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCTAGAGTGGAA
GCCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTGGACCAGCAATCCTCCTACCTTTG
GCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTT
CCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAAC
AACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCTCTGCAGTCCG
GCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTCTCTGAG
CAGCACCCTGACACTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAA
GTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACAGAGGCGAGTGTG
GCGGCACCCTGCAGTCTCCACCT*TGATAA*

配列番号64:リツキシマブHC
QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGN
GDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVW
GAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号65:リツキシマブLC
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP
VRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
【０１１３】
本発明はさらに本発明の抗体を生成する方法に関し、この方法は次のステップを含む:(i)本発明に従う形質転換された宿主細胞を培養すること;(ii)抗体を発現すること;および(iii)発現された抗体を回収すること。
【０１１４】
本発明の抗体は、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって培養培地から好適に分離され得る。
【０１１５】
いくつかの態様において、本発明のヒト化キメラ抗体は、先に記載された通りヒト化VLおよびVH領域をコードする核酸配列を得て、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞のための発現ベクターにそれらを挿入することによってヒトキメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞に発現ベクターを導入することによってコード配列を発現させて、生成され得る。

【０１１６】
ヒトキメラ抗体のCHドメインとしては、ヒト免疫グロブリン重鎖に属するいずれかの領域が使用される。例えば、IgGクラスのものが好適であり、IgGクラスに属するサブクラス、例えばlgG1、lgG2、lgG3、およびlgG4のいずれか1つが使用され得る。また、ヒトキメラ抗体のCLとしては、ヒト免疫グロブリン軽鎖に属するいずれかの領域が使用され、カッパクラスまたはラムダクラスのものが使用され得る。
【０１１７】
ヒト化またはキメラ抗体を生成するための方法には、従来の組換えDNAおよび遺伝子トランスフェクション技術が関わり得、当該技術分野において知られている(例として、Morrison SL.et al.(1984)ならびに特許文献US5,202,238;およびUS5,204,244を見よ)。
【０１１８】
従来の組換えDNAおよび遺伝子トランスフェクション技術に基づいてヒト化抗体を生成するための方法は、当該技術分野において周知である(例えば、Riechmann L.et al.1988;Neuberger MS.et al.1985参照。抗体は当該技術分野において知られている種々の技術を使用してヒト化され得る。例えば、出願WO2009/032661に開示されている技術、CDRグラフト(EP 239,400;PCT公開WO91/09967;米国特許第5,225,539号;第5,530,101号;および第5,585,089号)、ベニアリングまたはリサーフェシング(EP 592,106;EP 519,596;Padlan EA (1991);Studnicka GM et al.(1994);Roguska MA.et al.(1994))、およびチェインシャッフリング(米国特許第5,565,332号)を包含する。かかる抗体の調製のための一般的な組換えDNA技術もまた公知である(欧州特許出願EP 125023および国際特許出願WO 96/02576を見よ)。
【０１１９】
本発明のFabは、本発明の抗体(例えばIgG)をパパインなどのプロテアーゼで処置することによって得られ得る。また、Fabは、原核生物発現または真核生物発現のためのベクターに抗体のFabの両鎖をコードするDNA配列を挿入すること、ベクターを(適宜)原核または真核細胞に導入してFabを発現させることによって生成され得る。
【０１２０】
本発明のF(ab')2は、本発明の抗体(例えばIgG)をプロテアーゼのペプシンで処置して得られ得る。F(ab')2は、以下に記載されるFab'をチオエーテル結合またはジスルフィド結合によって結合させることによってもまた生成され得る。
【０１２１】
本発明のFab'は、本発明のF(ab')2をジチオトレイトールなどの還元剤で処置することによって得られ得る。また、Fab'は、原核生物発現のためのベクターまたは真核生物発現のためのベクターに抗体のFab'鎖をコードするDNA配列を挿入すること、ベクターを(適宜)原核または真核細胞に導入してその発現を行うことによって生成され得る。
【０１２２】
本発明のscFvは、本発明の抗体について先に記載された通りCDRまたはVHおよびVLドメインの配列を取り、それから、scFvフラグメントをコードするDNAを構築すること、DNAを原核または真核生物発現ベクターに挿入し、それから、発現ベクターを(適宜)原核または真核細胞に導入してscFvを発現させることによって生成され得る。ヒト化scFvフラグメントを作製するためには、CDRグラフトと呼ばれる周知の技術が使用される。これには、本発明に従う相補性決定領域(CDR)を選択することと、それらを公知の三次元構造のヒトscFvフラグメントフレームワーク上にグラフトすることとが関わる(例として、WO98/45322;WO 87/02671;US5,859,205;US5,585,089;US4,816,567;EP0173494を見よ)。
【０１２３】
本発明の抗体の改変
本明細書に記載される抗体のアミノ酸配列の改変が企図される。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが望ましい。

【０１２４】
改変および変更が、本発明の抗体の構造およびそれらをコードするＤＮＡ配列になされることにより、所望の特性を有する機能的な抗体またはポリペプチドをもたらし得る。
【０１２５】
ポリペプチドのアミノ酸配列の変更をなす際には、アミノ酸のハイドロパシー指数が考慮される。タンパク質の相互作用的な生物学的機能にとってのハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該技術分野において一般的に理解されている。アミノ酸の相対的なハイドロパシーの性質は、もたらされるタンパク質の二次構造に寄与し、これが、翻って、他の分子、例えば酵素、基質、受容体、ＤＮＡ、抗体、抗原などとのタンパク質の相互作用を定めるということが受け入れられている。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷特性に基づいてハイドロパシー指数が割り当てられている。それらは以下である:イソロイシン(+4.5);バリン(+4.2);ロイシン(+3.8);フェニルアラニン(+2.8);システイン(+2.5);メチオニン(+1.9);アラニン(+1.8);グリシン(-0.4);トレオニン(-0.7);セリン(-0.8);トリプトファン(-0.9);チロシン(-1.3);プロリン(-1.6);ヒスチジン(-3.2);グルタミン酸(-3.5);グルタミン(-3.5);アスパラギン酸(-3.5);アスパラギン酸(-3.5);リジン(-3.9);およびアルギニン(-4.5)。
【０１２６】
本発明のさらなる側面は、本発明のポリペプチドの機能保存的な変異体をもまた包摂する。
【０１２７】
例えば、ある種のアミノ酸は、活性のはっきりした損失なしにタンパク質構造上で他のアミノ酸によって置換される。タンパク質の相互作用的なキャパシティおよび性質はその生物学的な機能的活性を定めるので、ある種のアミノ酸置換が、タンパク質配列および当然のことながらそのコードＤＮＡ配列になされながら、それでもやはり同様の特性を有するタンパク質を得ることができる。したがって、本発明の抗体配列、または前記ポリペプチドをコードする対応するＤＮＡ配列において、それらの生物学的活性のはっきりした損失なしに、種々の変更がなされるということが考えられる。
【０１２８】
ある種のアミノ酸が、類似のハイドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸によって置換されることにより、類似の生物学的活性を有するタンパク質をもたらし、すなわち、生物学的機能的に同等のタンパク質を得ることができるということは、当該技術分野において知られている。本発明の抗体またはポリペプチドにおいて、抗原に対する結合の有意な損失なしに置換され得る全てのアミノ酸を同定するために、アラニンスキャンアプローチなどの良好に確立された技術を使用することもまた可能である。抗原結合にまたは抗体の構造を維持することに関わらないので、かかる残基は中立的とみなされる。これらの中立的な位置の1以上は、本発明の抗体またはポリペプチドの主な特性を変化させることなく、アラニンまたは別のアミノ酸によって置換され得る。
【０１２９】
中立的な位置は、いずれかのアミノ酸置換が組み込まれ得る位置として見られ得る。実際、アラニンスキャンの原理において、アラニンは、この残基が特定の構造的特色も化学的特色も持たないので選ばれる。アラニンが、タンパク質の特性を変化させることなく特定のアミノ酸に置換され得る場合、すべてではないとしても多くの他のアミノ酸置換もまた、中立的である蓋然性が高いことが一般的に認められている。アラニンが野生型アミノ酸である反対のケースでは、特定の置換が中立的として示され得る場合には、他の置換もまた中立的であろうという可能性が高い。
【０１３０】
以上概説された通り、アミノ酸置換は、一般的には、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。前述の特性のいずれかを考慮に入れる例示的な置換は当業者に周知であり、アルギニンおよびリジン;グルタミン酸およびアスパラギン酸;セリンおよびトレオニン;グルタミンおよびアスパラギン;

ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシンを包含する。

【０１３１】

例えば、抗体の抗原依存性の細胞によって媒介される細胞傷害(ＡＤＣＣ)および/または補体依存性細胞傷害(ＣＤＣ)を増強するようにして、または例えばＦｃ受容体に対する結合を変更させるようにして、エフェクター機能について本発明の抗体を改変することもまた望ましい。これは、抗体のＦｃ領域に1以上のアミノ酸置換を導入することによって達成される。代替的に、または加えて、システイン残基(単数または複数)がＦｃ領域に導入され、それによってこの領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能にする。このようにして生成されたホモ二量体抗体は、内在化能が改善され、および/または補体によって媒介される細胞死滅および/または抗体依存性細胞傷害(ＡＤＣＣ)が増加する(Ｃａｒｏｎ ＰＣ.ｅｔ ａｌ.1992;およびＳｈｏｐｅｓ Ｂ.1992)。いくつかの態様において、本発明の抗体は、ほとんどのＦｃγ受容体に対する低減または消失した結合をもたらす改変されたアミノ酸配列を有する抗体であり得る。これは、かかる受容体を発現する正常な細胞および組織、例えばマクロファージ、肝類洞細胞などにおける取り込みおよび毒性を低減し得る。かかる抗体の例は、位置234および235の2つのロイシン(Ｌ)残基からアラニン(Ａ)への置換を包含するものである(すなわちＬＡＬＡ)。この二重置換は、ＦｃγＲに対するＦｃ結合を低減し、結果的に、ＡＤＣＣも減少させて補体結合/活性化を低減することが実証されている。かかる抗体の別の例は、ＬＡＬＡ二重置換に加えて置換Ｐ329Ｇを包含するものである(すなわちＰＧ-ＬＡＬＡ;例えば、Ｓｃｈｌｏｔｈａｕｅｒ ｅｔ ａｌ.,Ｎｏｖｅｌ ｈｕｍａｎ ＩｇＧ1 ａｎｄ ＩｇＧ4 Ｆｃ-ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｗｉｔｈ ｃｏｍｐｌｅｔｅｌｙ ａｂｏｌｉｓｈｅｄ ｉｍｍｕｎｅ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｆｕｎｃｔｉｏｎｓ,Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ,Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ,Ｖｏｌｕｍｅ 29,Ｉｓｓｕｅ 10,Ｏｃｔｏｂｅｒ 2016,ｐ.457-466参照)。いくつかの態様において、本発明の抗体は、したがって、(i)例えば置換のＬＡＬＡまたはＰＧ-ＬＡＬＡセットを含有し、(ii)そうでなければ、それぞれの配列番号を参照して本明細書の上に記載された本発明の抗体の1つのアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を有する抗体である。

【０１３２】

本発明の抗体の別の型のアミノ酸改変は、抗体の元のグリコシル化パターンを変更させるために有用であり、すなわち、抗体上に見出される1以上の炭水化物部分を欠失させることおよび/または抗体上に存在しない1以上のグリコシル化部位を追加することによる。Ｘがプロリン以外のいずれかのアミノ酸であるトリペプチド配列アスパラギン-Ｘ-セリンおよびアスパラギン-Ｘ-トレオニンのいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を作り出す。抗体のグリコシル化部位の追加または欠失は、好都合なことに、(Ｎ-結合型グリコシル化部位について)上述のトリペプチド配列の1以上を含有するようにアミノ酸配列を変更することによって達成され得る。

【０１３３】

別の型の改変には、潜在的に抗体調製物の分解産物または不均一性をもたらすような、ｉｎ ｓｉｌｉｃｏ で、または実験的に同定された配列の除去が関わる。例として、アスパラギンおよびグルタミン残基の脱アミド化が、ｐＨおよび表面露出などの因子に依存して起こり得る。アスパラギン残基は、主として配列Ａｓｎ-Ｇｌｙ中に存在するときには特に脱アミド化を受けやすく、Ａｓｎ-Ａｌａなどの他のジペプチド配列中では程度はより少ない。したがって、かかる脱アミド化部位、特にＡｓｎ-Ｇｌｙが抗体またはポリペプチドに存在するときには、典型的には関与する残基の1つを除去する保存的置換によって部位を除去することが考慮される。関与する残基の1以上を除去するための配列上のかかる置換もまた、本発明によって包摂されることを意図する。

【０１３４】

別の型の共有結合的な改変には、グリコシドを抗体へ化学的または酵素的に結合することが関わる。これらの手順は、Ｎ-またはＯ-結合型グリコシル化のためのグリコシル化能を有する宿主細胞における抗体の生成を必要としないという点で有利である。使用される結合モードに依存して、糖(単数または複数)は、(ａ)アルギニンおよびヒスチジン、(ｂ)遊離カルボキシル基、(ｃ)システインなどにある、遊離スルフヒドリル基、(ｄ)セリン、

トレオニン、またはヒドロキシプロリンなどにある、自由なヒドロキシル基、(e)フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンなどにある、芳香族残基あるいは(f)グルタミンのアミド基に付着される。例えば、かかる方法はWO87/05330に記載されている。

【０１３５】

抗体上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的または酵素的に達成される。化学的脱グリコシル化は、化合物のトリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物に対する抗体の曝露を要求する。この処置は、連結している糖(N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン)以外のほとんどまたは全ての糖の切断をもたらすが、抗体は無傷で残す。

化学的脱グリコシル化は、Sojahr H.et al.(1987)およびEdge,AS.et al.(1981)に記載されている。抗体上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura,NR.et al.(1987)に記載されている種々のエンドおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成され得る。

【０１３６】

抗体の別の型の共有結合的な修飾は、例えば米国特許第4,640,835号;第4,496,689号;第4,301,144号;第4,670,417号;第4,791,192号または第4,179,337号に記載されている様式で、抗体を種々の非タンパク質性ポリマーの1つ、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンに連結することを含む。

【０１３７】

当該技術分野において知られている他のアミノ酸配列改変もまた本発明の抗体に適用される。

【０１３８】

本発明の免疫抱合体

本発明は、本明細書においては抗体-薬物抱合体、またはより簡潔に抱合体ともまた言われる免疫抱合体を提供する。本明細書で使用される全てのこれらの用語は同じ意味を有し、言い換えが可能である。免疫抱合体を調製するための好適な方法は当該技術分野において知られている。本発明の免疫抱合体は、例えば本明細書に記載されるin vitroの方法によって調製され得る。

【０１３９】

本発明は、少なくとも1つの成長阻害性の薬剤にリンカーを介して共有結合的に連結された本発明の抗体(例えば、mAb1、またはmAb1と同じ6つのCDRを有する抗体など)を含む免疫抱合体を提供する。

【０１４０】

用語「成長阻害性の薬剤」(「抗増殖薬剤」ともまた言われる)は、in vitroおよび/またはin vivoで、腫瘍細胞などの細胞の成長を阻害する分子または化合物または組成物を言う。

【０１４１】

いくつかの態様において、成長阻害性の薬剤は、細胞傷害性薬物(細胞傷害性薬剤ともまた言われる)である。いくつかの態様において、成長阻害性の薬剤は放射性部分である。

【０１４２】

用語「細胞傷害性の薬物」は、本明細書で使用されとき、直接的または間接的に細胞の機能を阻害もしくは妨害する、および/または細胞の破壊を引き起こす物質を言う。用語「細胞傷害性の薬物」は、例えば、化学療法薬剤、酵素、抗生物質、毒素、例えば低分子毒素または酵素的に活性な毒素、トキソイド、ビンカ、タキサン、メイタンシノイドまたはメイタンシノイド類似体、トマイマイシンまたはピロロベンゾジアゼピン誘導体、クリプトフィシン誘導体、レプトマイシン誘導体、アウリスタチンまたはドラスタチン類似体、プロドラッグ、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、DNAアルキル

化剤、抗チューブリン剤、CC-1065、およびCC-1065類似体を包含する。

【０１４３】

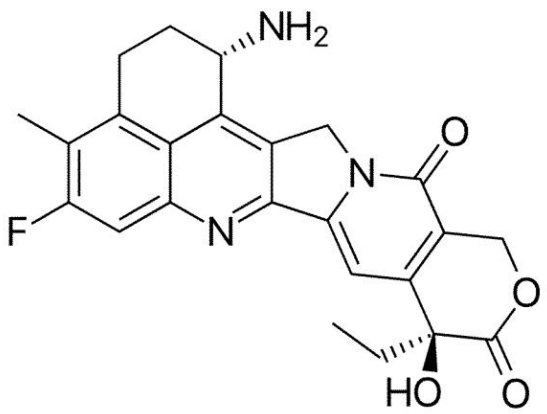
トポイソメラーゼI阻害剤は、DNAの一本鎖の一過性の破断および再連結を触媒することによってDNAのトポロジーを変更させることに関わるヒト酵素トポイソメラーゼIを阻害する分子または化合物である。トポイソメラーゼI阻害剤は、例えば哺乳動物の細胞の分裂に対して高度に毒性である。好適なトポイソメラーゼI阻害剤の例は、カンプトテシン(CPT)およびその類似体、例えばトポテカン、イリノテカン、シラテカン、コシテカン、エキサテカン、ルートテカン、ギマテカン、ベロテカン、およびルビテカンを包含する。

【０１４４】

いくつかの態様において、本発明の免疫抱合体は、成長阻害性の薬剤として細胞傷害性薬物エキサテカンを含む。エキサテカンは、化学名(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-1,2,3,9,12,15-ヘキサヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10H,13H-ベンゾ(de)ピラノ(3',4':6,7)インドリジノ(1,2-b)キノリン-10,13-ジオンを有する。エキサテカンは、以下の構造式(I):

【０１４５】

【化１】



(I)

によって表される。

【０１４６】

本発明のさらなる態様において、例えば上に列挙された通り、他のCPT類似体および他の細胞傷害性の薬物が使用される。いくつかの細胞傷害性の薬物および抱合の方法の例は、参照によって組み込まれる出願WO2008/010101でさらに説明される。

【０１４７】

用語「放射性部分」は、At^{211}、Bi^{212}、Er^{169}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、In^{111}、P^{32}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Sr^{89}、またはLuの放射性同位体などの、がんの処置に好適な放射性同位体を含む、またはそれからなる化学的実体(分子、化合物または組成物など)を言う。かかる放射性同位体は一般的には主にベータ放射線を発する。いくつかの態様において、放射性同位体は、アルファ放射体同位体、例えば、アルファ放射線を発するトリウム227である。免疫抱合体は例えば出願WO2004/091668に記載されているように調製され得る。

【０１４８】

本発明の免疫抱合体において、本発明の抗体は、リンカーを介して少なくとも1つの成長阻害性の薬剤に共有結合的に連結される。本明細書で使用される「リンカー」は、成長阻害性の薬剤を抗体に共有結合的に付着させる共有結合および/またはいずれかの原子鎖を含む化学的な部分を意味する。リンカーは当該技術分野において知られており、例えば

、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性の基、光不安定性の基、ペプチダーゼ不安定性の基およびエステラーゼ不安定性の基を包含する。細胞傷害性の薬物または他の成長阻害性の薬剤との本発明の抗体の抱合は、例えば、以下を包含するがこれらに限定されない種々の二官能性タンパク質カップリング剤を使用して行われる:N-スクシンイミジルピリジルジチオブチレート(SPDB)、ブタン酸4-[(5-ニトロ-2-ピリジニル)ジチオ]-2,5-ジオキソ-1-ピロリジニルエステル(ニトロ-SPDB)、4-(ピリジン-2-イルジスルファニル)-2-スルホ-酪酸(スルホ-SPDB)、N-スクシンイミジル(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCLなど)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレートなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)-ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(トルエン2,6-ジイソシアネートなど)、およびビス-活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al (1987)に記載されているように調製され得る。炭素標識された1-イソチオシアナトベンジルメチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)は、抗体に対する放射性ヌクレオチドの抱合のための例示的なキレート剤である(WO 94/11026)。

【０１４９】

本発明の態様において、リンカーは「切断可能なリンカー」である。これは、細胞、例えば腫瘍細胞の内部または近傍における細胞傷害性の薬物または他の成長阻害性の薬剤の放出を容易にする。いくつかの態様において、リンカーは、哺乳動物細胞のエンドソームにおいて切断可能なリンカーである。例えば、酸不安定性のリンカー、ペプチダーゼ感受性のリンカー、エステラーゼ不安定性のリンカー、光不安定性のリンカー、またはジスルフィド含有リンカーが使用される(例えばU.S.特許No.5,208,020参照)。

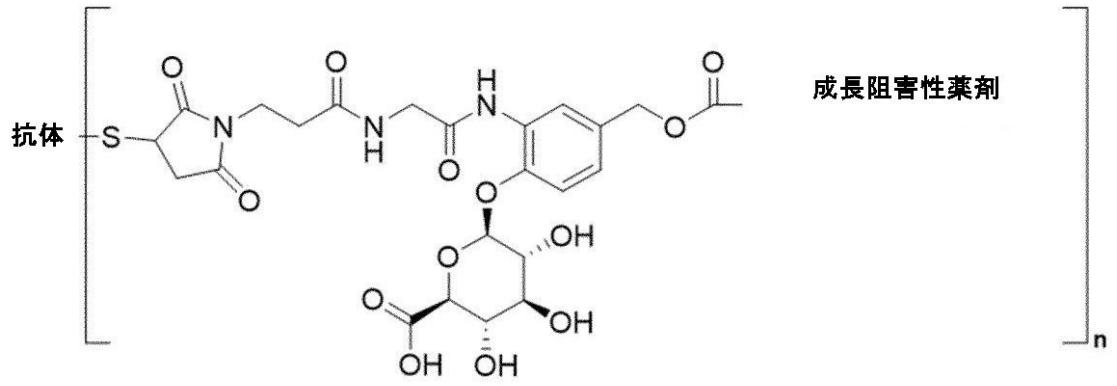
【０１５０】

免疫抱合体を表す構造式を参照するときには、次の命名法もまた本明細書で使用され、成長阻害性の薬剤およびリンカーを組み合わせて、[(リンカー)-(成長阻害性の薬剤)]部分ともまた称し、例えば、エキサテカン分子およびリンカーを組み合わせて、[(リンカー)-(エキサテカン)]部分ともまた称する。

【０１５１】

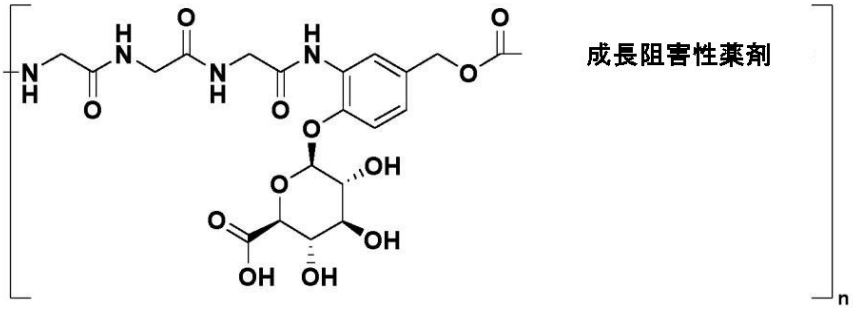
本発明のいくつかの特定の態様において、リンカーは、ヒトの酵素のグルクロニダーゼによって切断可能なリンカーである。従って、例えば、本発明の免疫抱合体は、グルクロニダーゼによって切断可能なリンカーを包含する、以下の式(II)または式(IIA):

【化２】



(II)

【化３】

抗体  成長阻害性薬剤

(IIA)

を有していてもよく、式中、抗体は本発明の抗体であり、ここで、Sは抗体の硫黄原子であり、ここで、nは抗体に共有結合的に連結された[(リンカー)-(成長阻害性の薬剤)]部分の数である。数nは例えば1と10との間であり得る。上の式(II)を含むより具体的な態様において、nは7と8との間であり;上の式(II)を使用するさらにより具体的な態様において、nは7.5と8.0との間(すなわち約8)である。上述の式IIAを使用する態様において、nは、好ましくは3と4との間、最も好ましくは3.5と4.0との間(すなわち約4)である。いくつかの態様において、Sは抗体のシステインの硫黄原子である。いくつかの態様において、抗体は、mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-MまたはmAb7-Mである。

【０１５２】

数nは「薬物対抗体比」(または「DAR」)とも言われる。この数nは、常に、いずれかの所与の免疫抱合体(の調製物)の平均数として理解されるべきである。

【０１５３】

上の式(II)において、抗体の硫黄原子と成長阻害性の薬剤との間の化学構造はリンカーである。これらのリンカーの1つは、下にさらに示される式(IV)から(VIIIA)のそれぞれにもまた含有される。

【０１５４】

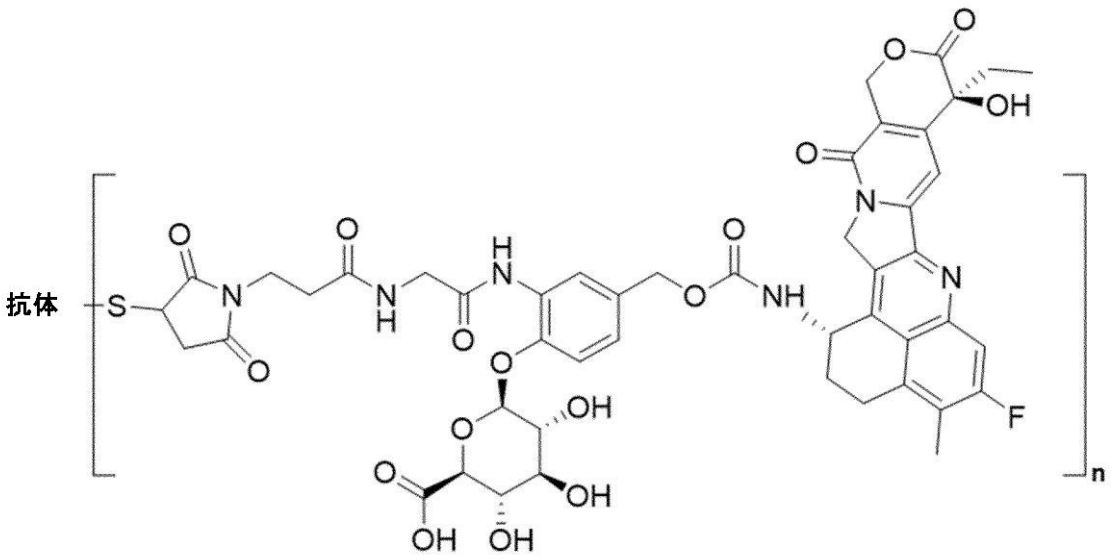
グルクロニダーゼによって切断可能なリンカーを有する態様のいずれか1つにおいて、上述のように、成長阻害性の薬剤は例えばエキセテカンである。

【０１５５】

従って、いくつかの態様において、本発明は、エキサテカンにリンカーを介して共有結合的に連結された本発明に従う抗体を含む免疫抱合体を提供し、ここで抱合体は、以下の式(IV)または式(IVA):

【０１５６】

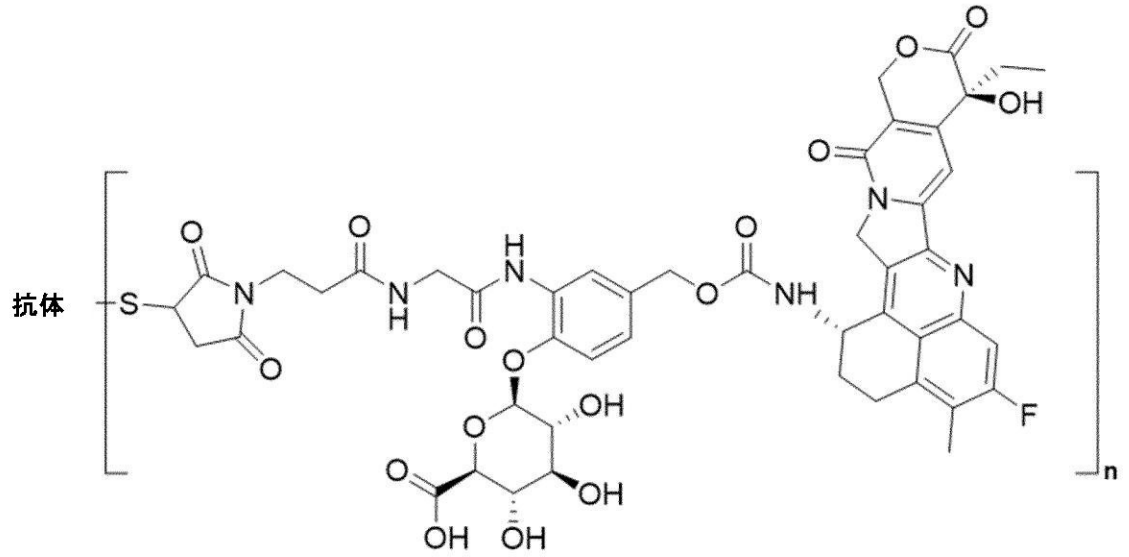
【化４】


抗体
S
O
N
O
O
N
H
O
O
O

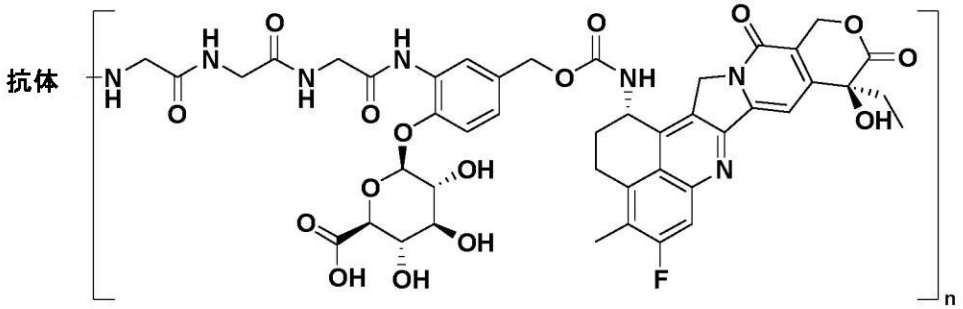
従って、いくつかの態様において、本発明は、リンカーを介してエキセカンに共有結合的に連結された本発明に従う抗体を含む免疫抱合体を提供し、ここで、抱合体は次の式(VI)または式(VIA)を有する:

【０１５９】

【化５】



(VI)



(VIA)

式中Sは抗体のシステインの硫黄原子であり、ここで、nは抗体に共有結合的に連結された[(リンカー)-(エキサテカン)]部分の数である。数n(DARともまた言われる)は例えば1と10との間であり得る。上の式VIに基づくより具体的な態様において、nは7と8との間であり;式VIを使用するさらにより具体的な態様において、nは7.5と8.5との間(好ましくは8)である。上の式VIAを使用する態様において、nは、好ましくは3と5との間、より好ましくは3.5と4.5との間、最も好ましくは4である。

【０１６０】

上に記載されている免疫抱合体のいずれかにおいては、本発明のいずれかの抗体(本明細書で上および下に記載される通り)が使用され得る。いくつかの態様において、本発明の免疫抱合体は、抗体としてmAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-MまたはmAb7-Mを含む。

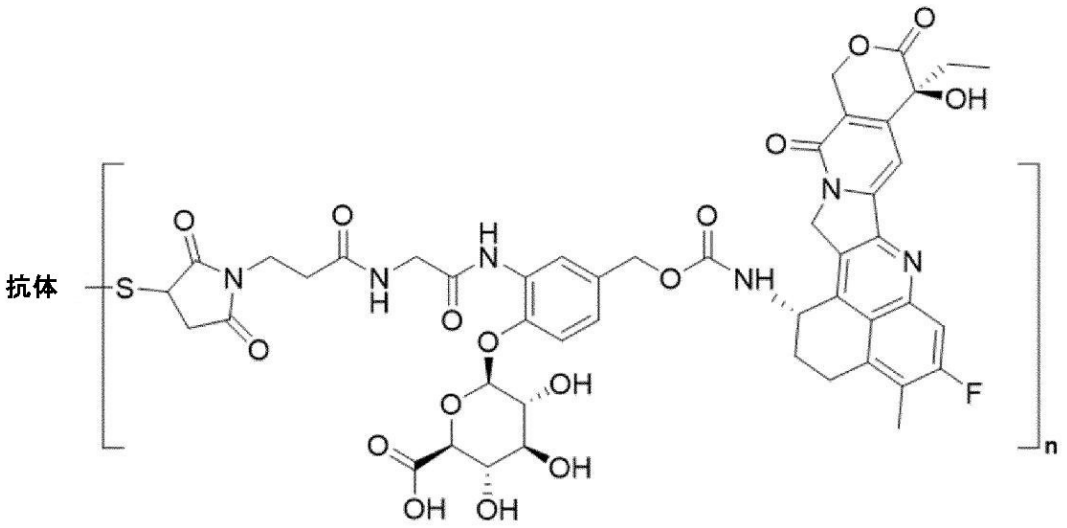
【０１６１】

従って、いくつかの態様において、本発明は、リンカーを介してエキセカンに共有結合的に連結された本発明に従う抗体(好ましくは、mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb

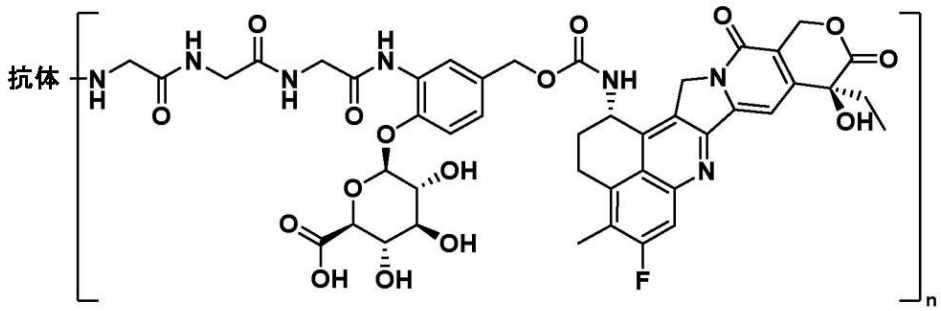
6-M、およびmAb7-Mからなる群から選択される)を含む免疫抱合体を提供し、ここで抱合体は、以下の式(VIII)または式(VIIIA):

【０１６２】

【化６】



(VIII)



(VIIIA)

を有し、式中Sは抗体(好ましくは、mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-MまたはmAb7-M)のシステインの硫黄原子であり、ここで、nは、抗体(好ましくは、mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-MまたはmAb7-M)に共有結合的に連結された[(リンカー)-(エキサテカン)]部分の数である。数n(DARともまた言われる)は例えば1と10との間であり得る。より具体的な態様において、nは7と8との間であり;さらにより具体的な態様において、nは7.5と8.0との間(すなわち約8)である。いくつかの態様において、Sは、鎖間ジスルフィド架橋を形成することができる抗体(好ましくは、mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-MまたはmAb7-M)のシステインの硫黄原子であり、DARは約8である。かかる免疫抱合体の例(すなわち「ADC1」)は、実施例にさらに記載されている。本発明の好ましい免疫抱合体が下に列挙されている:

【表Ｂ】

免疫抱合体名称	抱合体は以下の式を有する	抱合体中の抗体	DAR
A1	VIII	抗CEACAM5 mAb LALA 突然変異 YTE 突然変異	7.5と8.0との間
A2	VIIIA	抗CEACAM5 mAb LALA 突然変異 YTE 突然変異 MTG タグ	3.5と4.5との間
A3	VIIIA	抗CEACAM5 mAb LALA 突然変異 YTE 突然変異 K222R 突然変異 (MTG 最適化) MTG タグ	3.5と4.5との間
A4	VIII	抗CEACAM5 mAb LALA 突然変異	7.5と8.0との間
A5	VIIIA	抗CEACAM5 mAb LALA 突然変異 MTG タグ	3.5と4.5との間
A6	VIII	mAb1-M	8
A7	VIIIA	mAb2-M	4
A8	VIIIA	mAb3-M	4
A9	VIII	mAb6-M	8
A10	VIIIA	mAb7-M	4

【０１６３】

さらに好ましい態様において、本発明は抗体-薬物抱合体を提供し、ここで、薬物はエキサテカンであり、ここで、抗体-薬物抱合体は次の(i)～(v)のいずれか1つを含む:

(i)配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖と配列番号34のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗CEACAM5モノクローナル抗体。ここで、表4においてADC1-Mについて示されるリンカー型および抱合型によってエキサテカンが前記抗体に連結される;または

(ii)配列番号36のアミノ酸配列を含む軽鎖と配列番号34のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗CEACAM5モノクローナル抗体。ここで、表4においてADC2-Mについて示されるリンカー型および抱合型によってエキサテカンが前記抗体に連結される;または

(iii)配列番号36のアミノ酸配列を含む軽鎖と配列番号35のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗CEACAM5モノクローナル抗体。ここで、表4にADC3-Mについて示されるリンカー型および抱合型によってエキサテカンが前記抗体に連結される;または

(iv)配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖と配列番号51のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗CEACAM5モノクローナル抗体。ここで、表4にADC6-Mについて示されるリンカー型および抱合型によってエキサテカンが前記抗体に連結される;または
(v)配列番号36のアミノ酸配列を含む軽鎖と配列番号51のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む抗CEACAM5モノクローナル抗体。ここで、表4にADC7-Mについて示されるリンカー型および抱合型によってエキサテカンが前記抗体に連結される。

【0164】

さらに好ましい態様において、本発明は、ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M、およびADC7-Mから選択される抗体-薬物抱合体を提供し、表4に示されるそれぞれのDARを包含する表4に概説されるそれぞれのADCの全ての特性を有する。

【0165】

本発明の他の態様において、リンカーは、「非切断可能なリンカー」(例えばSMCCリンカー)であり得る。抗体からの成長阻害性の薬剤の放出は、抗体のリソソーム分解によって起こり得る。

【0166】

本発明の他の態様において、免疫抱合体は、本発明の抗体と(成長阻害性の薬剤として)細胞傷害性または成長阻害性のポリペプチドとを含む融合タンパク質である。かかる融合タンパク質は、組換え技術またはペプチド合成、すなわち当該技術分野において知られている方法によって作られる。コードDNAの分子は、互いに隣接した、またはリンカーペプチドをコードする領域によって分離された、どちらかの、抱合体の2つの部分(それぞれ、抗体および細胞傷害性または成長阻害性のポリペプチド)をコードするそれぞれの領域を含む。

【0167】

本発明の抗体は、プロドラッグ(例として、ペプチジル化学療法薬剤。WO81/01145参照を見よ)を活性な細胞傷害性の薬物に変換するプロドラッグ活性化酵素に抗体を抱合することによって、抗体指向型酵素プロドラッグ治療などの指向型酵素プロドラッグ治療にもまた使用される(例えば、WO 88/07378および米国特許第4,975,278号を見よ)。ADEPTに有用な免疫抱合体の酵素構成要素は、より活性な細胞傷害性の形態に変換するようにプロドラッグに作用することができるいずれかの酵素を包含する。この文脈において有用である酵素は以下を包含するが、これらに限定されない:リン酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ;硫酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアリールスルファターゼ;非毒性のフルオロシトシンを抗がん剤5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ;ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用であるセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、およびカテプシン(例えばカテプシンBおよびL)などのプロテアーゼ;D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを変換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ;グリコシル化プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なO-ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼなどの炭水化物切断酵素;P-ラクタムで誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するのに有用なP-ラクタマーゼ;ならびにそれらのアミン窒素をそれぞれフェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基で誘導体化した薬物を遊離薬物に変換するのに有用な、ペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼなどのペニシリンアミダーゼ。酵素は、当該技術分野において知られている技術、例えば上で論じられたリンカーの使用によって、本発明の抗体に共有結合し得る。

【0168】

本発明の免疫抱合体を調製するための好適な方法は当該技術分野において知られている(例として、Hermanson G.T.,Bioconjugate Techniques,Third Edition,2013,Academic Pressを見よ)。例えば、抗体の鎖間ジスルフィド架橋のシステイン残基に共有結合的に付着するリンカーを介して抗体へ細胞傷害性の薬物を抱合する方法は、周知である。

【0169】

一般的に、本発明の免疫抱合体は、例えば次のステップを含むプロセスによって得られ得る:

(i)本明細書では「薬物-リンカー化合物」ともまた言われる、リンカーおよび成長阻害性の薬剤(例えば細胞傷害性の薬物)を含む化合物を調製すること;

(ii)本発明に従う抗体の任意に緩衝された水溶液を、薬物-リンカー化合物の溶液と接触させること;

(iii)その後、任意に、(ii)で形成された抱合体を、未反応の抗体および/または薬物-リンカー化合物から分離すること。

【０１７０】

抗体の水溶液は、例えばヒスチジン、リン酸カリウム、酢酸、クエン酸、またはN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(Hepes緩衝剤)などの緩衝剤によって緩衝され得る。緩衝剤は抗体の性質に依存して選ばれる。薬物-リンカー化合物は、例えば、ジメチルスルホキシド(DMSO)またはジメチルアセトアミド(DMA)などの有機極性溶媒に溶解され得る。

【０１７１】

抗体のシステイン残基に対する抱合のためには、抗体は、ステップ(ii)の前に(例えばTCEPを使用する)還元に付される。鎖間ジスルフィド結合のみを還元するための好適な還元条件は当該技術分野において知られている。

【０１７２】

抱合の反応温度は通常は20℃と40℃との間である。反応時間は変動し得、典型的には1から24時間までである。抗体と薬物-リンカー化合物との間の反応は、屈折率測定および/またはUV検出器によるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によってモニターされ得る。抱合体収量が低すぎる場合には、反応時間を延長できる。

【０１７３】

多数の異なるクロマトグラフィー法が、ステップ(iii)の分離を行うために当業者によって使用され得る。抱合体は、例えば、SEC、吸着クロマトグラフィー(例えばイオン交換クロマトグラフィーIEC)、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーなどの混合担体クロマトグラフィー、または逆相HPLCなどの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって精製され得る。透析または濾過またはダイアフィルトレーションによる精製もまた使用され得る。

【０１７４】

ステップ(ii)および/または(iii)の後に、抱合体含有溶液は、例えばクロマトグラフィー、限外濾過および/またはダイアフィルトレーションによる精製の追加のステップ(iv)に付され得る。例えばクロマトグラフィー、限外濾過および/またはダイアフィルトレーションによる精製のかかる追加のステップは、還元が抱合に先立って行われるケースでは、還元反応後の抗体含有溶液でもまた行われ得る。

【０１７５】

抱合体はかかるプロセスの終わりに水溶液中で回収される。薬物対抗体比(DAR)は、抱合に使用される実験条件(例えば、比(薬物-リンカー化合物)/(抗体)、反応時間、溶媒、およびもしあれば共溶媒の性質)と併せて、使用される抗体および薬物-リンカー化合物の性質によって変動し得る数である。したがって、抗体と薬物-リンカー化合物との間の接触は、異なる薬物対抗体比によって互いに異なるいくつかの抱合体を含む混合物に至り得る。したがって、決定されるDARは平均値である。

【０１７６】

4つの鎖間ジスルフィド架橋を有する抗体(例えば、mAb1またはいずれかのIgG1抗体)を使用して鎖間ジスルフィド架橋のシステイン残基における抱合を行うことは、当該技術分野において知られている方法であり、抱合が完了(または少なくとも完了に近く)まで進むことを許す反応条件を選ぶことによって、約8の比較的均一なDARが達成され得るという利点を提供する。

【０１７７】
DARを決定するために使用され得る例示的な方法は、λDおよび280nmにおける精製された抱合体の溶液の吸光度の比を分光測色法的に測定することからなる。280nmは、抗体濃度などのタンパク質濃度を測定するために一般的に使用される波長である。波長λDは、薬物を抗体から識別することを可能にして、すなわち当業者には直ちに公知であるように選択され、λDは薬物が高い吸光度を有する波長であり、λDは、薬物および抗体の吸光度ピークの実質的な重複を回避するために280nmから十分に離れている。例えば、λDは、エキサテカン(またはカンプトテシンもしくは他のカンプトテシン類似体)では370nm、またはメイタンシノイド分子では252nmとして選択され得る。
【０１７８】
DAR計算の方法は、例えば、Antony S.Dimitrov (ed),LLC,2009,Therapeutic Antibodies and Protocols,vol 525,445,Springer Scienceに由来する。λD(AλD)および280nm(A280)における抱合体の吸光度は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析(「DAR(SEC)」パラメータを計算して)の単量体ピークで、または古典的な分光光度計機器を使用して(「DAR(UV)」パラメータを計算して)測定される。吸光度は以下のように表現され得る:

$$A_{\lambda D}=(C_D\times\varepsilon_{D\lambda D})+(C_A\times\varepsilon_{A\lambda D})$$
$$A_{280}=(C_D\times\varepsilon_{D280})+(C_A\times\varepsilon_{A280})$$

式中:
・C_DおよびC_Aは、それぞれ、薬物および抗体の溶液中の濃度であり、
・$\varepsilon_{D\lambda D}$およびε_{D280}は、それぞれλ_Dおよび280nmにおける薬物のモル吸光係数であり、
・$\varepsilon_{A\lambda D}$およびε_{A280}は、それぞれλ_Dおよび280nmにおける抗体のモル吸光係数である。
2つの未知数を有するこれらの2つの方程式を解くことは、次の方程式に至る:

$$C_D=[(\varepsilon_{A280}\times A_{\lambda D})-(\varepsilon_{A\lambda D}\times A_{280})]/[(\varepsilon_{D\lambda D}\times\varepsilon_{A280})-(\varepsilon_{A\lambda D}\times\varepsilon_{D280})]$$
$$C_A=[A_{280}-(C_D\times\varepsilon_{D280})]/\varepsilon_{A280}$$

【０１７９】
ついで、平均DARが、薬物濃度対抗体のそれの比から算出される:$DAR=C_D/C_A$。
【０１８０】
本発明の免疫抱合体を調製するための代替的な方法が次に記載される。この方法は、とりわけ、GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP、およびTLQSAからなる群から選択されるアミノ酸配列を、その軽鎖定常領域(CL)の少なくとも1つおよび/またはその重鎖定常領域(CH)の少なくとも1つに含む抗体のために使用され得る。よって、本発明のさらなる側面は、次のステップを含む抗体-リンカー抱合体を産生するための方法に関する:
(1)その軽鎖定常領域(CL)の少なくとも1つ、好ましくは両方に、および/またはその重鎖定常領域(CH)の少なくとも1つ、好ましくは両方に、GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP、およびTLQSAからなる群から選択されるアミノ酸配列、より好ましくはアミノ酸配列TLQSPPまたはGGTLQSPP(最も好ましくは配列GGTLQSPP)を含む抗体を提供すること:
(2)少なくとも次の構成要素を反応緩衝剤中で一緒に混合すること:
(a)ステップ(1)において提供された前記抗体;
(b)微生物トランスグルタミナーゼ、好ましくは、以下のアミノ酸配列を含むトランスグルタミナーゼ:
【数１５】

MGSGSGSGTGEEKRSYAETHRLTADDVDDINALNESAPAASSAGPSFRAPDSDE
RVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQRE
WLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRV
AKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDA
RSPFYSALRNTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDP
EAFRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTH
GNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVT
QGWP

(配列番号44);またはFRAPDSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQ
QVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNEL
KNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNL
KKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQ
DRSGSSDKRKYGDPEAFRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQT
EADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSDGYSDFDRGAYVVTFVPKS
WNTAPDKVTQGWPLE(配列番号47);またはFRAPDSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPS
YGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTWVNSGQYPTN
RLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVASVMN
KALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKDRNGGNHDP
SKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSP
GESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSDG
YSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWP(配列番号45);または
DSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQ
REWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRV
AKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARS
PFYSALRNTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFR
PDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYH
APNGSLGAMHVYESKFRNWSDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWPLE(
配列番号48);または
DSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQ
REWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRV
AKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARS
PFYSALRNTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFR
PDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYH
APNGSLGAMHVYESKFRNWSDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWP(配
列番号49);ならびに

(c)前記トランスグルタミナーゼの存在下でステップ(1)からの抗体と反応することができるH_2N部分を含み、ここで、リンカーが好ましくは薬物-リンカーであり、ここで、前記リンカーは薬物に共有結合的に付着させられる、リンカー:

(3)ステップ(2)で生成された抗体-リンカー抱合体を、未反応のリンカーおよび前記トランスグルタミナーゼから、好ましくはステップ(2)からの前記混合物をサイズ排除クロマトグラフィーに付すことによって分離すること。

【０１８１】

1つの態様において、トランスグルタミナーゼは、ポリヌクレオチド

【数１６】

*ATG*GGTAGCGGTAGCGGTTCAGGCACCGGTGAAGAAAAACGTAGCTATGCAGAAACC
CATCGTCTGACCGCAGATGATGTTGATGATATTAATGCACTGAATGAAAGCGCACCGG
CAGCAAGCAGCGCAGGTCCGAGCTTTCGTGCACCGGATAGTGATGAACGTGTTACCCC
TCCGGCAGAACCGCTGGATCGTATGCCGGATCCGTATCGTCCGAGCTATGGTCGTGCC
GAAACCATTGTTAATAACTATATTCGTAAGTGGCAGCAGGTTTATAGCCATCGTGATGGT
CGTAAACAGCAGATGACCGAAGAACAGCGTGAATGGCTGAGTTATGGTTGTGTTGGTGT
TACCTGGGTTAATAGCGGTCAGTATCCGACCAATCGTCTGGCATTTGCATTTTTCGATGA
GGACAAATACAAGAACGAGCTGAAAAATGGTCGTCCGCGTAGCGGTGAAACCCGTGCA
GAATTTGAAGGTCGTGTTGCAAAAGATAGCTTTGATGAAGCAAAAGGTTTTCAGCGTGC
ACGTGATGTTGCAAGCGTTATGAATAAAGCACTGGAAAATGCACATGATGAAGGTGCCT
ATCTGGACAACCTGAAAAAAGAACTGGCAAATGGTAATGATGCCCTGCGTAATGAAGAT
GCACGTAGCCCGTTTTATAGCGCACTGCGTAATACCCCGAGCTTTAAAGATCGTAATGG
TGGTAATCATGACCCGAGCAAAATGAAAGCAGTGATCTATAGCAAACACTTTTGGAGCG
GTCAGGATCGTAGTGGTAGCAGCGATAAACGTAAATATGGTGATCCGGAAGCATTTCGT
CCGGATCGTGGCACCGGTCTGGTTGATATGAGCCGTGATCGTAATATTCCGCGTAGTC
CGACCAGTCCGGGTGAAAGCTTTGTTAATTTTGATTATGGTTGGTTTGGCGCACAGACC
GAAGCAGATGCAGATAAAACCGTTTGGACCCATGGCAATCATTATCATGCACCGAATGG
TAGCCTGGGTGCAATGCATGTTTATGAAAGCAAATTTCGCAATTGGAGCGACGGCTATA
GCGATTTTGATCGTGGTGCCTATGTTGTTACCTTTGTTCCGAAAAGCTGGAATACCGCTC
CGGATAAAGTTACCCAAGGTTGGCCG*TAA*

(配列番号46)によってコードされる。

【０１８２】

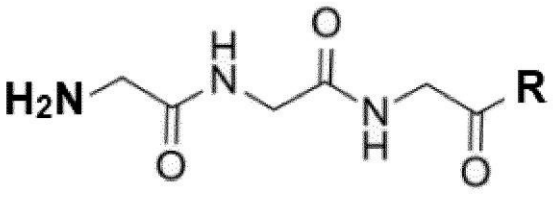
該方法の好ましい態様において、前記反応緩衝剤は、7％DMSO、24mM HEPES、pH7.0である。

【０１８３】

好ましくは、本発明の方法に使用される抗体は、さらに、その軽鎖定常領域(CL)の少なくとも1つおよび/またはその重鎖定常領域(CH)の少なくとも1つにLLQGAおよび/またはGGLLQGPP配列を含む。

本発明の方法において、該リンカーは以下の式：

【化７】

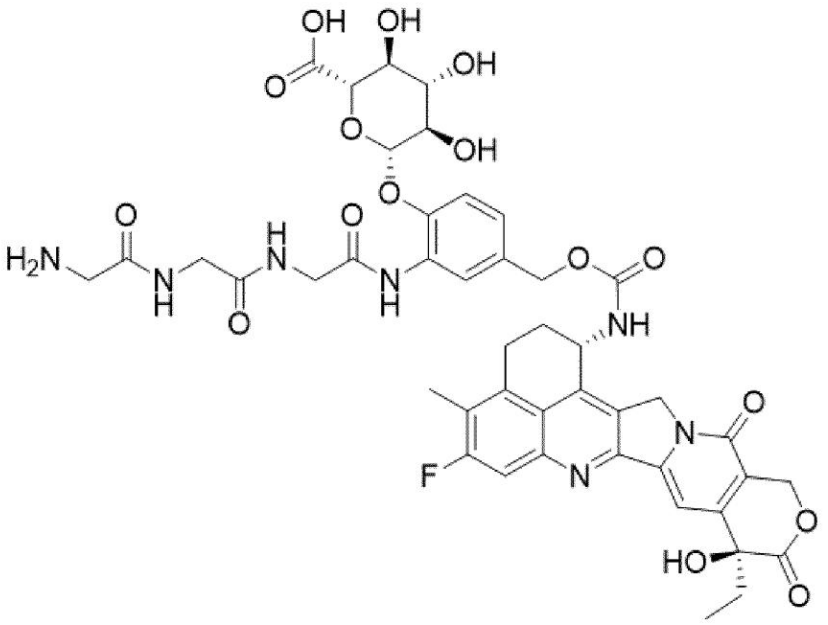


を有するリンカーである;式中Rはリンカーの残りであり、任意に薬物をもまた含み得る。それによると、薬物は好ましくはエキサテカンである。本発明の方法のより好ましい態様において、リンカーはNH2-GGG-ベータ-グルクロニドである。

【０１８４】

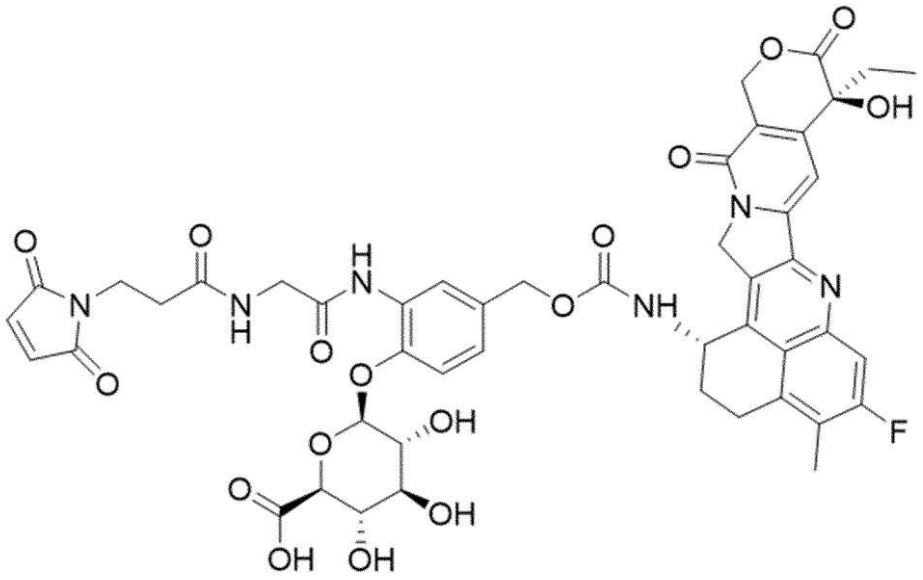
本発明の方法の好ましい態様において、ステップ(2)において、混合物は以下の薬物-

リンカー:
【化８】



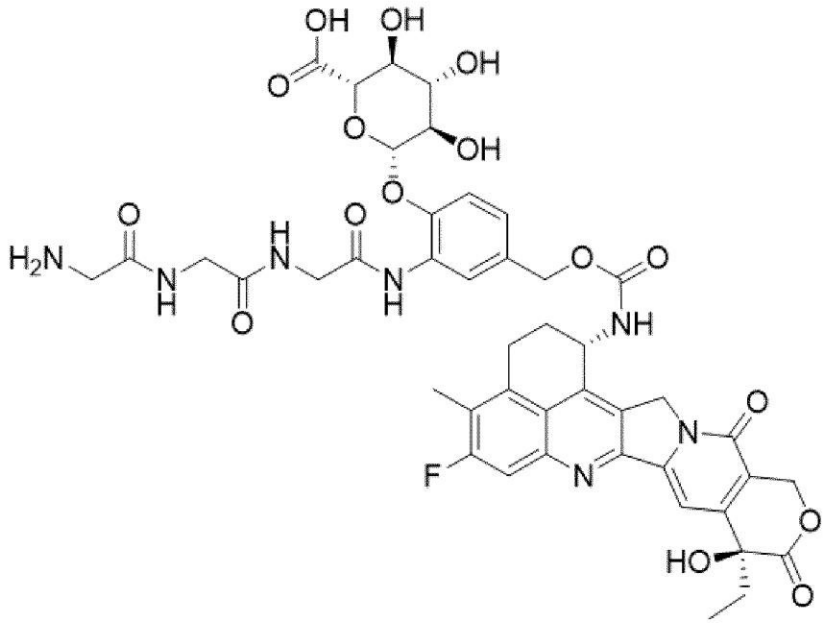
を含む。
【０１８５】
本発明の方法のさらなる態様において、ステップ(2)の混合物は、抱合部位あたりそれぞれ5モル当量のリンカーまたは薬物-リンカーを含み、ここで、抱合部位は、前記抗体の軽鎖定常領域(CL)および/または重鎖定常領域(CH)に含まれる配列LLQGA、GGLLQGPP、GGTLQSPP、TLQSG、TLQSPPまたはTLQSAである。
【０１８６】
本発明の方法のさらなる態様において、抗体は本明細書に記載される本発明の抗CEACAM5抗体であり、および/または薬物は本明細書において定義される成長阻害性の薬剤である。
【０１８７】
本発明のさらなる側面は、本発明の方法に従って生成可能な抗体-リンカー抱合体に関し、ここで、リンカーは、好ましくは、本発明のADCの文脈において本明細書に記載されるリンカーまたは薬物リンカーである。
【０１８８】
本発明の免疫抱合体を調製するための例示的な方法は実施例に記載されている。
【０１８９】
薬物-リンカー化合物
本発明は、リンカーおよび成長阻害性の薬剤(例えば細胞傷害性薬物)を含む化合物をもまた提供する。本明細書では「薬物-リンカー化合物」ともまた言われる。例えば、本発明は以下の式(X)または式(XA):
【０１９０】

【化９】



(X)

【化１０】



(XA)

で表される化合物、またはその生理学的に許容し得る塩を提供する。

式Xにしたがう化合物は本明細書では「薬物-リンカー化合物1」、「化合物DL1」または「DL1」ともまた言われ、式XAに従う化合物は本明細書では「薬物-リンカー化合物1-M」、「化合物DL1-M」または「DL1-M」ともまた言われる。

【０１９１】

これらの薬物-リンカー化合物は、本明細書の上および下に記載される通り本発明の免疫抱合体を調製するために使用され得る。

【０１９２】

本発明の薬物-リンカー化合物(例えば、上で図示されている式(X)または(XA)のもの)は、例えば下の実施例にさらに記載される通り化学合成によって調製され得る。

【０１９３】

医薬組成物

本発明の抗体または免疫抱合体は、薬学的に許容し得る担体、希釈剤および/または賦形剤、任意に、生分解性ポリマー、非生分解性ポリマー、脂質または糖を包含するがこれらに限定されないクラスの徐放性マトリックスと組み合わせられて、医薬組成物を形成する。

【０１９４】

したがって、本発明の別の側面は、本発明の抗体または免疫抱合体と、薬学的に許容し得る担体、希釈剤および/または賦形剤とを含む医薬組成物に関する。

【０１９５】

用語「医薬」または「薬学的に許容し得る」は、適宜、哺乳動物、特にヒトへ投与されるときに、有害な、アレルギー性の、または他の不要の反応を生成しない分子実体および組成物を言う。薬学的に許容し得る担体、希釈剤または賦形剤は、いずれかの型の非毒性の固体、半固体または液体フィラー、希釈剤、カプセル化材料または製剤補助剤を言う。

【０１９６】

用語「薬学的に許容し得る担体」は、本明細書で使用されるとき、生理学的に適合性であるいずれかのおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌および抗真菌剤などを包含する。好適な担体、希釈剤ならびに/または賦形剤の例は、水、アミノ酸、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、緩衝剤のリン酸、酢酸、クエン酸、コハク酸;ヒスチジン、アルギニン、グリシン、プロリン、グリシルグリシンなどのアミノ酸および誘導体;NaClまたは塩化カルシウムなどの無機塩;デキストロース、グリセロール、エタノール、スクロース、トレハロース、マンニトールなどの糖またはポリアルコール;ポリソルベート80、ポリソルベート20、ポロキサマー188などの界面活性剤;など、ならびにこれらの組み合わせの1以上を包含するが、これらに限定されない。多くのケースでは、医薬組成物中に糖、ポリアルコール、または塩化ナトリウムなどの等張化剤を包含することが有用であろう。製剤は、トリプタミンなどの抗酸化剤および/またはTween 20などの安定化剤をもまた含有し得る。

【０１９７】

医薬組成物の形態、投与経路、投与量およびレジメンは、処置されるべき状態、病気の重症度、患者の年齢、体重、および性別などに当然依存する。

【０１９８】

本発明の医薬組成物は、局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下または眼内投与などのために製剤され得る。

【０１９９】

ある態様において、医薬組成物は、注射のための製剤にとって薬学的に許容し得る基剤を含有する。これらは、等張の無菌生理食塩水溶液(リン酸一ナトリウムもしくは二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウムもしくはマグネシウムなど、またはかかる塩の混合物)、または乾燥した特に凍結乾燥された組成物であり得る。これは、ケースに依存して、滅菌水または生理食塩水の追加によって注射用溶液の構成を許す。

【０２００】

医薬組成物は薬物コンビネーションデバイスから投与され得る。

【０２０１】

投与のために使用される用量は、種々のパラメータの関数として、例えば、使用される投与モード、妥当する病理学、または代替的には所望の処置期間の関数として適合させられ得る。

【０２０２】

医薬組成物を調製するためには、有効量の本発明の抗体または免疫抱合体が、薬学的に許容し得る担体または水性媒体中に溶解または分散させられ得る。

【０２０３】
注射用の使用に好適な医薬形態は、無菌の水溶液または分散液;ゴマ油、落花生油または水性プロピレングリコールを包含する製剤;および無菌の注射用溶液または分散液の即時調製のための無菌粉末を包含する。全てのかかるケースにおいて、形態は、無菌でありかつ分解なしの送達のための適当なデバイスまたはシステムによって注射可能でなければならず、それは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物のコンタミネーション作用から守られなければならない。
【０２０４】
遊離の塩基または薬理学的に許容し得る塩としての活性化合物の溶液は、界面活性剤と好適に混合された水中に調製され得る。分散液もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中に、ならびに油中に調製され得る。保存および使用の通常の条件下では、これらの調製物は微生物の成長を防止するための保存料を含有し得る。
【０２０５】
本発明の抗体または免疫抱合体は、中性または塩形態で医薬組成物に製剤され得る。薬学的に許容し得る塩は酸付加塩(タンパク質の自由なアミノ基によって形成される)を包含し、これらは、例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、もしくはマンデル酸などの有機酸によって形成される。自由なカルボキシル基によって形成される塩もまた、例えば水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、もしくは第二鉄などの無機塩基、および例えばイソプロピルアミン、トリメチルアミン、グリシン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基に由来し得る。
【０２０６】
担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、それらの好適な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒でもまたあり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液のケースでは要求される粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによって成し遂げられ得る。いくつかのケースでは、等張化剤、例えば糖または塩化ナトリウムを包含することが望ましい場合がある。注射用組成物の持続的な吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物への使用によって成し遂げられ得る。
【０２０７】
無菌の注射用溶液は、要求される上に列挙された他の成分のいずれかと共に、適当な溶媒中に要求される量の活性化合物を組み込むこと、次に濾過滅菌によって調製され得る。一般的に、分散液は、基本的な分散媒と上に列挙されたものからの要求される他の成分とを含有する無菌の基剤中に、種々の滅菌された活性成分を組み込むことによって調製され得る。無菌の注射用溶液の調製のための無菌粉末のケースでは、調製の方法は真空乾燥および凍結乾燥技術を包含する。これらは、以前に無菌濾過されたその溶液から、活性成分プラスいずれかの追加の所望の成分の粉末を生ずる。
【０２０８】
直接注射のためのより濃縮されたまたは高度に濃縮された溶液の調製もまた企図される。ここでは、溶媒としてのＤＭＳＯの使用が、極めて迅速な透過をもたらし、高い濃度の活性薬剤を小さい腫瘍エリアに送達することが想定される。
【０２０９】
製剤によって、溶液は、投与量の製剤と適合性の様式で、かつ治療上有効であるような量で投与され得る。製剤は、種々の剤形、例えば、上に記載された注射用溶液の型で容易に投与されるが、薬物放出カプセルなどもまた採用され得る。
【０２１０】
水溶液による非経口投与では、例えば、溶液は必要に応じて好適に緩衝され、液体希釈

剤が最初に十分な生理食塩水またはグルコースによって等張にされ得る。これらの水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与に特に好適である。これに関連して、採用され得る無菌の水性媒体は、本開示に照らして当業者には公知であろう。例えば、1回の投与量が1mlの等張NaCl溶液に溶解され、1000mlの皮下点滴液に追加されるかまたは提案される点滴部位に注射されるかどちらかであり得る(例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition,p.1035-1038および1570-1580参照)。投与量の何らかの変動が、処置されようとする対象の状態に依存して必然的に起こるであろう。投与の担当者は、いずれにせよ、個々の対象のための適当な用量を決定するであろう。

【０２１１】

本発明の抗体または免疫抱合体は、例えば、用量あたり約0.01から100ミリグラムくらいを含むように、治療薬混合物中に製剤され得る。

【０２１２】

静脈内または筋肉内注射などの非経口投与のために製剤された抗体または免疫抱合体に加えて、他の薬学的に許容し得る形態は、例えば、経口投与のための錠剤または他の固体、タイムリリースカプセル、および現在使用されているいずれかの他の形態を包含する。

【０２１３】

いくつかの態様において、リポソームおよび/またはナノ粒子の使用が、宿主細胞へのポリペプチドの導入のために企図される。リポソームおよび/またはナノ粒子の形成および使用は、当業者に公知である。

【０２１４】

ナノカプセルは、一般的に、安定かつ再現可能なやり方で化合物をトラップし得る。細胞内ポリマー過多を原因とする副作用を回避するために、かかる超微粒子(大体0.1μmのサイズである)は、一般的には、in vivoで分解されることができるポリマーを使用して設計される。これらの要件を満たす生分解性ポリアルキル-シアノアクリレートナノ粒子または生分解性ポリラクチドもしくはポリラクチドコグリコリドナノ粒子は、本発明への使用を企図され、かかる粒子は当業者によって容易に作られ得る。

【０２１５】

リポソームは、水性媒体中に分散され、自発的にマルチラメラ同心二重層ベシクル(マルチラメラベシクル(MLV)ともまた称される)を形成するリン脂質から形成され得る。MLVは一般的に25nmから4μmまでの直径を有する。MLVの超音波処理は、コアに水溶液を含有する200から500Aの範囲の直径を有するスモールユニラメラベシクル(SUV)の形成をもたらす。リポソームの物理的特性は、pH、イオン強度、および二価カチオンの存在に依存する。

【０２１６】

上で言及された例以外に、ナノ粒子、マイクロ粒子およびカプセル、インプラント(例えば脂質インプラント)、または自己固化もしくは自己乳化系などのさらなる医薬形態もまた企図される。

【０２１７】

治療上の方法および使用

本発明者らは、本発明の抗体(例えばmAb1)が、結合後にCEACAM5-抗体複合体の一部として内在化することができるということを見出した。さらにその上、それらは、細胞傷害性薬物(エキサテカン)に抱合されたかかる抗体が、in vitroの腫瘍細胞に対する細胞傷害効果を媒介するということを示した。本発明者らはまた、本発明のこれらの免疫抱合体が、in vivoで、例として患者由来のヒト大腸癌のマウス異種移植モデルにおいて、10mg/kgの用量にて使用されるとき、単回注射で著明な抗腫瘍活性を誘導するということをも示している。事実、本発明の免疫抱合体は、in vitroおよびin vivoモデルの大きいセットにおいて幅広い活性を示す。細胞傷害性の力価は標的(CEACAM5)発現と良く相関し、標的陰性細胞でははるかに低い。異なるがんの型のいくつかの細胞株由来ゼノグラフト(CDX)および患者由来ゼノグラフト(PDX)モデルにおいて、非常に良い抗腫瘍

活性が実証された。免疫抱合体は、非ヒト霊長類の用量範囲探索研究において良く忍容され、トポイソメラーゼ-I阻害剤化学療法に典型的である副作用プロファイルを有した。前臨床データは、後の臨床試験のための良い治療ウインドウを指示している。従って、本発明の抗体、免疫抱合体および医薬組成物は、がんを処置することに有用であり得る。

【０２１８】

従って、本発明は、医薬としての使用のための本発明の抗体、免疫抱合体または医薬組成物を提供する。例えば、本発明は、がんの処置への使用のための本発明の抗体、免疫抱合体または医薬組成物を提供する。本発明はさらに、がんを処置する方法を提供するが、前記方法は、本発明の抗体、免疫抱合体、または医薬組成物を、これを必要とする対象へ投与することを含む。

【０２１９】

本発明の抗体、免疫抱合体、または医薬組成物によって処置されるべきがんは、好ましくはCEACAM5を発現するがん、より好ましくは、同じ組織起源の正常(すなわち非腫瘍)細胞と比較してCEACAM5を過剰発現するがんである。細胞によるCEACAM5の発現は、例えば、本発明に従う抗体(または市販の抗CEACAM5抗体)を使用することによって、例えば次の項「診断上の使用」に記載される通り、例えば免疫組織化学的方法によって、直ちにアッセイされ得る。

【０２２０】

いくつかの態様において、本発明の抗体、免疫抱合体、または医薬組成物で処置されるべきがんは、大腸がん、非小細胞肺癌、膵臓がん、胃がん、子宮頸がん、食道がん(例として、食道腺癌)、胆管癌、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、尿路上皮がん、膀胱がん、または胃、子宮、子宮内膜、甲状腺、もしくは皮膚のがんである。いくつかの特定の態様において、本発明の抗体、免疫抱合体、または医薬組成物によって治療されるべきがんは、大腸がん、胃がん、非小細胞肺がん、膵臓がん、食道がん、または前立腺がんである。

【０２２１】

本発明の抗体または免疫抱合体は、単独でまたはいずれかの好適な成長阻害性の薬剤と組み合わせて、がん治療に使用され得る。

【０２２２】

本発明の抗体は、上に記載されているとおり、成長阻害性の薬剤に抱合(連結)され得る。従って、本発明の抗体は、それらの表面にCEACAM5を発現または過剰発現するがん性細胞に前記成長阻害性の薬剤を標的化することに有用であり得る。

【０２２３】

治療用モノクローナル抗体が、抗体によって特異的に認識される抗原を持つ細胞の枯渇に至り得るということもまた周知である。この枯渇は、少なくとも3つの機構:抗体によって媒介される細胞傷害(ADCC)、補体依存的なリシス、および抗体によって標的化された抗原によって媒介されるシグナルを介する腫瘍成長の直接的阻害によって媒介され得る。

【０２２４】

「抗体依存的な細胞によって媒介される細胞傷害」または「ADCC」は、ある種の細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、およびマクロファージ)上に存在するFc受容体(FcR)に結合した抗体が、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原を持つ標的細胞に特異的に結合し、続いて標的細胞を死滅させることを可能にする、細胞傷害の形態を言う。目当ての分子のADCC活性を評価するために、US特許No.5,500,362または5,821,337に記載されているものなどのin vitroADCCアッセイが行われ得る。

【０２２５】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」は、補体の存在下の標的細胞のリシスを指す。古典的な補体経路の活性化は、それらの対応する抗原に結合している抗体に対する補体系の第1構成要素の結合によって開始される。補体活性化を評価するためには、例えばGazzano-Santoro et al.(Journal of Immunological Methods.1997 Mar;202(

2):163-171)に記載されているCDCアッセイが行われ得る。

【０２２６】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、ほとんどのFcγ受容体に対する低減または消失した結合をもたらす改変されたアミノ酸配列を有する抗体であり得る。これは、かかる受容体を発現する正常な細胞および組織、例えばマクロファージ、肝類洞細胞などにおける取り込みおよび毒性を低減し得る。

【０２２７】

本発明のある側面は、治療上有効量の本発明の抗体、免疫抱合体または医薬組成物をそれを必要とする対象へ投与することを含む、がんを処置する方法に関する。

【０２２８】

本発明の文脈において、本明細書で使用される用語「処置すること」または「処置」は、かかる用語が適用される障害もしくは状態、またはかかる障害もしくは状態の1以上の症状を逆転させること、緩和すること、その進行を阻害すること、または防止することを意味する。用語「がんを処置すること」は、本明細書で使用されるとき、腫瘍の悪性細胞の成長および/または前記腫瘍からの転移の進行の阻害を意味する。かかる処置は、腫瘍成長の退縮、すなわち測定可能な腫瘍のサイズの減少にもまた至り得る。例えば、かかる処置は腫瘍または転移の完全な退縮に至り得る。

【０２２９】

本発明の治療上の適用の文脈において、用語「対象」または「患者」または「それを必要とする対象」または「それを必要とする患者」は、腫瘍に罹患しているかまたは罹患していることが蓋然的な対象(例えばヒトまたは非ヒト哺乳動物)を言う。例えば、前記患者は、CEACAM5を標的化する治療薬剤、特に本発明に従う抗体または免疫抱合体に対して、例えば本明細書において下に記載される方法に従って感受性であることが決定された患者であり得る。

【０２３０】

「治療上有効量」は、いずれかの医学的処置に適用可能な妥当なベネフィット/リスク比で前記がん疾患を処置するために十分な量を意味する。しかしながら、本発明の抗体、免疫抱合体および医薬組成物(集合的に「治療薬剤」と言われる)の1日の総使用量は、健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決められるであろうということが理解されるであろう。いずれかの特定の患者のための具体的な治療上有効な用量レベルは、種々の因子に依存するであろう。処置されようとする障害および障害の重症度;採用される具体的な治療薬剤の活性;患者の年齢、体重、全般的な健康、性別および食事;採用される具体的な治療薬剤の投与時間、投与経路、および排泄速度;処置の期間;採用される具体的な治療薬剤と組み合わせてまたは同時に使用される薬物;ならびに医学分野で周知の同種の因子を包含する。例えば、所望の治療効果を達成するために要求されるものよりも低いレベルで化合物の用量を開始することと、所望の効果が達成されるまで投与量を徐々に増加させることとが、当分野の技能範囲内で周知である。

【０２３１】

本発明の抗体、免疫抱合体または医薬組成物は、がんの転移の進行を阻害するためにもまた使用され得る。

【０２３２】

本発明の抗体、免疫抱合体または医薬組成物は、がんを処置するための(例えばアジュバント療法)および/または転移がんの成長を低減するためのいずれかの他の治療的介入と組み合わせてもまた使用され得る。例えば、かかる組み合わせのための他の治療的介入は、治療されるべきがんのための標準治療(SOC)の治療薬剤であり得る。

【０２３３】

本発明に従う抗体または免疫抱合体または医薬組成物による処置の有効性は、in vivoで、例えばがんのマウスモデルにおいて、例えば、処置群および対照群の間の腫瘍体積の変化、%腫瘍退縮、部分退縮または完全退縮を測定することによって、直ちに分析され得る。

【０２３４】
診断上の使用
CEACAM5は、例えば大腸、胃、肺、および膵臓腫瘍細胞などのがん細胞の表面に高度に発現されることが報告されており、正常組織における発現は、結腸および食道上皮細胞などの少数の正常上皮細胞に限定される。
【０２３５】
従って、CEACAM5はがんマーカーを構成し、例えば抗がん治療の有効性を指示するためにまたは疾患の再発を検出するために使用されるポテンシャルを有する。
【０２３６】
ある態様において、本発明の抗体は、治療薬剤に対する患者の感受性を決定するために、抗がん治療の有効性をモニタリングするために、または処置後の疾患の再発を検出するために、CEACAM5発現腫瘍を標的化する治療の文脈におけるアッセイの構成要素として使用され得る。いくつかの態様において、本発明の同じ抗体が、治療薬剤の構成要素としておよび診断アッセイの構成要素として両方で使用され得る。
【０２３７】
従って、本発明のさらなる側面は、対象からの生体試料からex vivoでCEACAM5発現を検出するための本発明に従う抗体の使用に関する。本発明の別の側面は、対象におけるin vivoのCEACAM5発現を検出するための本発明の抗体の使用に関する。CEACAM5の検出のために使用されるときに、抗体は、例えばフルオロフォアまたは酵素などの検出可能な分子によって標識され得る。
【０２３８】
CEACAM5の検出は例えば以下を意図され得る:
a)対象におけるがんの存在を診断すること、または
b)CEACAM5を標的化する治療薬剤、特に本発明に従う抗体もしくは免疫抱合体に対するがんを有する患者の感受性を決定すること、または
c)抗CEACAM5がん治療の有効性をモニタリングもしくは抗CEACAM5がん治療後のがん再燃を検出し、特に、ここで、前記治療は本発明に従う抗体もしくは免疫抱合体による治療であること:
腫瘍細胞上の表面タンパク質CEACAM5の発現を検出することによる。
【０２３９】
態様において、抗体はin vitroまたはex vivoの診断上の使用を意図される。例えば、CEACAM5は、本発明の抗体を使用して、in vitroでまたはex vivoで、対象から得られた生体試料から検出され得る。本発明に従う使用はin vivoでの使用でもまたあり得る。例えば、本発明に従う抗体が対象に投与され、抗体-細胞複合体が検出および/または定量され得る。それによる前記複合体の検出はがんの指標である。
【０２４０】
本発明はさらに、次のステップを含む対象におけるがんの存在を検出するin vitroまたはex vivoの方法に関する:
(a)対象からの生体試料を、本発明に従う抗体と、特に抗体が前記生体試料と複合体を形成するための好適な条件下で接触させること;
(b)前記生物学的試料に結合した抗体のレベルを測定すること;および
(c)測定された結合した抗体のレベルを対照と比較することによってがんの存在を検出すること。対照と比較して増加した結合した抗体のレベルはがんの指標である。
【０２４１】
本発明は、CEACAM5を標的化する治療薬剤、特に本発明に従う抗体または免疫抱合体に対するがんを有する患者の感受性を決定するin vitroまたはex vivoの方法にもまた関し、この方法は次のステップを含む:
(a)がんを有する患者からの生物学的試料を、本発明に従う抗体と、特に抗体が前記生物学的試料と複合体を形成するための好適な条件下で接触させること;
(b)前記生物学的試料に結合した抗体のレベルを測定すること;および

(c)前記生物学的試料に対する結合した抗体の測定されたレベルを、対照に結合した抗体のレベルと比較すること:

ここで、対照と比較して、前記生物学的試料に対する結合した抗体の増加したレベルは、CEACAM5を標的化する治療薬剤に感受性の患者の指標である。

【０２４２】

上の方法において、前記対照は、同じ型の正常な非がん性の生物学的試料、または同じ型の正常な生物学的試料における抗体結合レベルを代表するとして決定された参照値であり得る。

【０２４３】

ある態様において、本発明の抗体は、CEACAM5発現がん、例えば大腸がん、胃がん、非小細胞肺がん、膵臓がん、食道がん、前立腺がんまたはCEACAM5を発現する他の固形腫瘍を診断することに有用である。

【０２４４】

本発明は、さらに、次のステップを含む抗CEACAM5がん治療の有効性をモニタリングするin vitroまたはex vivoの方法に関する:

(a)抗CEACAM5がん治療を経過している対象からの生体試料を、本発明に従う抗体と、特に抗体が前記生体試料と複合体を形成するための好適な状態下で接触させること;

(b)前記生物学的試料に結合した抗体のレベルを測定すること;および

(c)測定された結合した抗体のレベルを、対照に結合した抗体のレベルと比較すること:

ここで、対照と比較して、前記生物学的試料に対する結合した抗体の減少したレベルは、前記抗CEACAM5がん治療の有効性の指標である。前記方法において、対照と比較して、前記生物学的試料に対する結合した抗体の増加したレベルは、前記抗CEACAM5がん治療の無効性の指標である。有効性をモニタリングするこの方法のある態様において、前記対照は、分析に付された生体試料と同じ型だが、抗CEACAM5がん治療の過程のより早期の時点で対象から得られた生体試料である。

【０２４５】

本発明は、さらに、次のステップを含む抗CEACAM5がん治療後のがん再燃を検出するin vitroまたはex vivoの方法に関する:

(a)対象からの生体試料を、本発明に従う抗体と、特に抗体が前記生体試料と複合体を形成するための好適な条件下で接触させ、対象は抗CEACAM5がん治療を完了していること;

(b)前記生物学的試料に結合した抗体のレベルを測定すること;および

(c)測定された結合した抗体のレベルを、対照に結合した抗体のレベルと比較すること:

ここで、対照と比較して、前記生物学的試料に対する結合した抗体の増加したレベルは、抗CEACAM5がん治療後のがん再燃の指標である。前記対照は、特に、分析に付された生体試料と同じ型だが、以前に、すなわち、抗CEACAM5がん治療の完了の際にまたは後に対象から得られた生体試料であり得る。

【０２４６】

前記抗CEACAM5がん治療は、例えば、本発明に従う抗体または免疫抱合体を使用する治療である。前記抗CEACAM5がん治療は、CEACAM5発現がん、例えば大腸がん、胃がん、非小細胞肺がん、膵臓がん、食道がん、前立腺がんまたはCEACAM5を発現する他の固形腫瘍を標的化する。

【０２４７】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、検出可能な分子または物質、例えば、蛍光分子またはフルオロフォア、放射性分子、酵素、またはシグナルを(直接的または間接的どちらかで)提供する当該技術分野において知られているいずれかの他の標識によって標識され得る。

【０２４８】

本発明に従う抗体について、用語「標識された」は、本明細書で使用されるとき、ポリペプチドに放射性の薬剤またはフルオロフォア(例えばフルオレセインイソチオシアネー

ト(FITC)またはフィコエリトリン(PE)またはインドシアニン(Cy5))などの検出可能な物質をカップリング(すなわち物理的に連結)することによる抗体の直接的な標識、ならびに検出可能な物質との反応性によるポリペプチドの間接的な標識を包摂することが意図される。

【０２４９】

本発明の抗体当該技術分野において知られているいずれかの方法によって放射性分子によって標識され得る。例えば、放射性分子は、I^{123}、I^{124}、In^{111}、Re^{186}、Re^{188}、Tc^{99}などのシンチグラフィー研究のための放射性原子を包含するが、これらに限定されない。本発明の抗体は、核磁気共鳴(NMR)イメージング(磁気共鳴イメージングMRIとしてもまた公知)のためのスピン標識、例えばヨウ素-123、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガンまたは鉄によってもまた標識され得る。

【０２５０】

「生体試料」は、診断またはモニタリングアッセイに使用され得る対象から得られた種々の試料の型を包摂する。生物学的試料は、血液および生物学的起源の他の液体試料、固形組織試料、例えば、生検標本もしくは組織培養物またはそれに由来する細胞、ならびにその子孫を包含するが、これらに限定されない。従って、生物学的試料は、臨床試料、培養による細胞、細胞上清、細胞ライセート、血清、血漿、生体液、および腫瘍試料などの組織試料を包摂する。

【０２５１】

いくつかの態様において、生物学的試料は、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織試料であり得る。

【０２５２】

本発明はまた、次のステップを含む対象におけるがんの存在を検出するin vivoの方法に関する:

a)本発明に従う抗体を患者に投与し、ここで、抗体は検出可能な分子によって標識されていること:

b)イメージングによって、例えば検出可能な分子を検出することによって、患者における前記抗体の局在を検出すること。

【０２５３】

前記方法において、がんは、CEACAM5発現がん、例えば大腸がん、胃がん、非小細胞肺がん、膵臓がん、食道がん、前立腺がんまたはCEACAM5を発現する他の固形腫瘍であり得る。

【０２５４】

本発明の抗体は、がんのステージ分類(例えば放射線イメージングによる)にもまた有用であり得る。それらは、単独でまたは他のがんマーカーと組み合わせて使用され得る。

【０２５５】

本明細書で使用される用語「検出」または「検出される」とは、対照への参照の有無にかかわらず、定性的および/または定量的検出(すなわちレベルを測定すること)を包含する。

【０２５６】

本発明の文脈において、用語「診断すること」は、本明細書で使用されるとき、医学的状態の性質の決定を意味し、いくつもの収集されたデータに基づいて対象が罹患する病状を同定することを意図される。

【０２５７】

キット

最後に、本発明は、本発明の少なくとも1つの抗体または免疫抱合体を含むキットをもまた提供する。本発明の抗体を含有するキットは、表面タンパク質CEACAM5を検出することへの、または治療もしくは診断アッセイへの使用を見出し得る。本発明のキットは、固体支持体、例えば組織培養プレートまたはビーズ(例えばセファロースビーズ)にカッ

プリングされた抗体を含有し得る。例えばELISAまたはウエスタンブロットによるin vitroの表面タンパク質CEACAM5の検出および定量のための抗体を含有するキットが提供され得る。検出に有用なかかる抗体は、蛍光または放射性標識などの標識を提供され得る。

【０２５８】

配列の簡単な記載

アミノ酸配列:

配列番号１　GenBankアクセッション番号AAA51967.1に従うヒトCEACAM5タンパク質配列

配列番号２　Macaca fascicularis CEACAM5タンパク質配列(NCBI参照配列XP_005589491.1)

配列番号３　mAb1のCDR1-H

配列番号４　mAb1のCDR2-H

配列番号５　mAb1のCDR3-H

配列番号６　mAb1のCDR1-L

配列番号７　mAb1のCDR2-L

配列番号８　mAb1のCDR3-L

配列番号９　mAb1のVH

配列番号１０　mAb1のVL

配列番号１１　mAb1のCH

配列番号１２　mAb1、mAb1-MおよびmAb6-MのCL

配列番号１３　mAb1のHC

配列番号１４　mAb1、mAb1-MおよびmAb6-MのLC

【０２５９】

核酸配列:

配列番号１５　mAb1のHCをコードするDNA配列

配列番号１６　mAb1のLCをコードするDNA配列

【０２６０】

アミノ酸配列:

配列番号１７　抗体hu8G4のHC

配列番号１８　抗体hu8G4のLC

配列番号１９　最適化された抗体バリアント１のHC

配列番号２０　最適化された抗体バリアント１のLC

配列番号２１　最適化された抗体バリアント２のLC

配列番号２２　最適化された抗体バリアント４のLC

配列番号２３　最適化された抗体バリアント５のLC

配列番号２４　最適化された抗体バリアント６のHC

配列番号２５　huMab2-3(アロタイプ)のHC

配列番号２６　huMab2-3のLC

配列番号２７　hmn-14のHC

配列番号２８　hmn-14のLC

配列番号２９　rb8G4のHC

配列番号３０　rb8G4のLC

配列番号３１　mAb1-MおよびmAb2-MのCH(CH-LALA-YTE)

配列番号３２　mAb3-MのCH(CH-K222R-LALA-YTE)

配列番号３３　mAb2-M、mAb3-M、およびmAb7-MのCL(CL-タグ)

配列番号３４　mAb1-MおよびmAb2-MのHC(HC-LALA-YTE)

配列番号３５　mAb3-MのHC(HC-K222R-LALA-YTE)

配列番号３６　mAb2-M、mAb3-M、およびmAb7-MのLC(LC-タグ)

配列番号４０　mAb5-MのHC(抗CD20-HC)

配列番号41　mAb5-MのLC(抗CD20-LC)
配列番号44　トランスグルタミナーゼ
配列番号45　トランスグルタミナーゼ(活性化型、バージョン1)
配列番号47　トランスグルタミナーゼ(活性化型、バージョン2)
配列番号48　トランスグルタミナーゼ(活性化型、バージョン3)
配列番号49　トランスグルタミナーゼ(活性化型、バージョン4)
配列番号50　mAb6-MおよびmAb7-MのCH(CH-LALA)
配列番号51　mAb6-MおよびmAb7-MのHC(HC-LALA)
配列番号54　フレームワーク領域FR1
配列番号55　フレームワーク領域FR2
配列番号56　フレームワーク領域FR3
配列番号57　フレームワーク領域FR4
配列番号58　フレームワーク領域FR5
配列番号59　フレームワーク領域FR6
配列番号60　フレームワーク領域FR7
配列番号61　フレームワーク領域FR8

【０２６１】

核酸配列:

配列番号37　mAb1-MおよびmAb2-MのHC(HC-LALA-YTE)をコードするDNA配列
配列番号38　mAb3-MのHC(LC-K222R-LALA-YTE)をコードするDNA配列
配列番号39　mAb2-M、mAb3-M、およびmAb7-MのLC(LC-タグ)をコードするDNA配列
配列番号42　mAb5-MのHC(抗CD20-HC)をコードするDNA配列
配列番号43　mAb5-MのLC(抗CD20-LC)をコードするDNA配列
配列番号46　トランスグルタミナーゼをコードするDNA配列
配列番号52　mAb6-MおよびmAb7-MのHC(HC-LALA)をコードするDNA配列
配列番号53　mAb1-MおよびmAb6-MのLCをコードするDNA配列

【０２６２】

アミノ酸配列:

配列番号62　ラベツズマブ重鎖
配列番号63　ラベツズマブ軽鎖
配列番号64　リツキシマブHC
配列番号65　リツキシマブLC

【０２６３】

例

<u>例1:抗CEACAM5抗体</u>

1.1 トランスジェニックラットの免疫化およびハイブリドーマの単離

ヒトCEACAM5蛋白質(がん胎児性抗原関連細胞接着分子5;CD66e)に対するモノクローナル抗体を作製するために、ヒト免疫グロブリン遺伝子トランスジェニックラット(OmniRat(商標))を、CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL INC.(ウィルミントン、MA)から得た。5匹を、Aldevron独自の免疫化ベクター(pB8-CEA-hum-MC)にクローニングされたCEACAM5 cDNA(UniProt ID no.P06731を有するヒトCEACAM5タンパク質配列のアミノ酸35-675をコードする。P06731の配列は、K398による配列番号1のE398の置換以外は配列番号1と同一である)で4回免疫化し、遺伝子銃を使用してOMTラット細胞に一過性トランスフェクションした。

【０２６４】

抗CEACAM5力価を、それらの細胞膜上にCEACAM5を発現する細胞を使用する細胞に基づくELISA(CELISA)アッセイによって評価した(力価結果は下に提示する)。免疫化された動物の血清を、4ラウンドの遺伝物質免疫化(IS31d-4)後に、免疫化プロトコールの31日目に取った。PBS+3%FBSで希釈した血清を、Aldevron独自の発現ベクター(p

B1-CEA-hum-MC)にクローニングしたCEACAM5 cDNAで一過性トランスフェクションされた哺乳動物細胞に対して、フローサイトメトリーによって試験した。ヤギ抗ラットIgG R-フィコエリトリン抱合体(Southern Biotech、#3030-09)を、10μg/mlで二次抗体として使用した。

【０２６５】

全ての動物を　　殺し、リンパ節からのリンパ球をプールし、将来の使用のために凍結保存した。細胞をAg8マウス骨髄腫細胞株と融合させて、バイアブルなハイブリドーマを作出した。それから、この融合体からのハイブリドーマ細胞を10個の96ウェルプレートに移した。

【０２６６】

1.2 CEACAM5特異性

CEACAM1(BGP)、CEACAM3(CGM1a)、CEACAM4(CGM7)、CEACAM6(NCA)、およびCEACAM8(NCA-95)に結合しなかった抗CEACAM5抗体の検出のために、細胞に基づくELISA(CELISA)アッセイを使用してハイブリドーマ上清をスクリーニングした。ヤギ抗ラットIgG R-フィコエリトリン抱合体(Southern Biotech、#3030-09)を、10μg/mlで二次抗体として使用した。

【０２６７】

ヒトCEACAM5に対して特異性を示し、その関連タンパク質に対してはしないクローンを、1つの96ウェルプレートに移し、ハイブリドーマ上清を特異性および交差反応性についてELISAアッセイで評価した。この分析において、8G4ハイブリドーマクローンおよびそのサブクローンは、ヒトCEACAM5に対する特異性およびMacaca fascicularis CEACAM5に対する交差反応性を示した。

【０２６８】

1.3 抗体配列の検出およびクローニング

トータルRNAを、RNeasy 96プロトコール、Qiagenに従って各ハイブリドーマクローンから調製した。続いて、ランダムヘキサマーおよびSuperScript(登録商標)IIIを使用して、トータルRNAをcDNAに転写した。

【０２６９】

もたらされたcDNAをqPCRによって品質管理し、VHおよびVkをPCRによって増幅した。PCR生成物を、KingFisher装置と組み合わせたAMpure XP PCRクリーンアップキットを使用して精製した。

【０２７０】

8G4サブクローンのVHおよびVk遺伝子を、相同組換えの手続き(いわゆる「Lucigenクローニング」)を使用して、それぞれデスティネーションベクターhi00_pTT5_VH_ccdBおよびhh00_pTT5_Vk_ccdBにクローニングした。反応ミックスをOne Shot(登録商標)Mach1(商標)T1Rケミカルコンピテント E.coliに形質転換した。正しく組換えられたクローンを、サンガーシーケンシングによって確認した。

【０２７１】

1.4 ヒットのヒト化および生化学的キャラクタリゼーション、ならびに候補選択

8G4および他のクローンを再フォーマットし、ヒトIgG1分子として発現した。それらをSDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、選択性、親和性、細胞結合および力価によって評価した。結果に基づいて、hu8G4と呼称される1つのヒト化候補抗体をアミノ酸配列最適化のために選択して、製造性および親和性を改善した。

【０２７２】

ヒト化された候補抗体hu8G4のアミノ酸配列は次の通りである:

重鎖:

EVQLVESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFNPSLRSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC

PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列
番号17)

【0273】

軽鎖:

ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGI
PARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号18)

【0274】

1.5 特にmAb1に至るhu8G4のための生物物理学的改善戦略

hu8G4の可変領域配列の評価は、軽鎖フレームワーク上の6つの非生殖系列アミノ酸残基および重鎖フレームワーク上の2つの非生殖系列アミノ酸残基を同定した。潜在的に翻訳後修飾をしがちなアミノ酸および配列モチーフ、例えば脱アミド化モチーフ、表面アクセス可能なメチオニン、および自由なシステインの評価は、増加した性向を有するいずれかのアミノ酸残基を同定しなかった。ある種のアミノ酸がその位置の生殖系列関連アミノ酸によって置き換えられたいくつかの設計された抗体配列を作製した。それから、異なるVHおよびVL最適化設計を、Fabおよび全長IgG1分子としてHEK293 6E細胞において共発現し、精製し、試験した(例えば、下の最適化されたバリアント1～10参照)。

【0275】

全長IgG1フォーマットの10個の最適化された抗体バリアントのアミノ酸配列は次の通りであった:

バリアント1(VH1.00/VL1.00)

【0276】

HC:

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSG
STYFNPSLRSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列
番号19)

【0277】

LC:

ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGI
PARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号20)

バリアント2(VH1.00/VL1.01)

HC:配列番号19

【0278】

LC:

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGI
PARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号21)

バリアント3(VH1.00/VL1.02)
HC:配列番号19
LC:配列番号14
バリアント4(VH1.00/VL1.03)
HC:配列番号19
【0279】
LC:
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATG
IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号22)
バリアント5(VH1.00/VL1.04)
HC:配列番号19
【0280】
LC:
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATG
IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号23)
バリアント6(VH1.02/VL1.00)
【0281】
HC:
EVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCTVSDGSVS RGGYYLTWIR QHPGKGLEWI GYIY
YSGSTY FNPSLRSRVT MSVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCARG IAVAPFDY
WG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW N
SGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDK
RVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVS
H EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGF
YPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSC
SVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK(配列番号24)
LC:配列番号20
バリアント7(VH1.02/VL1.01)
HC:配列番号24
LC:配列番号21
バリアント8(VH1.02/VL1.02)
HC:配列番号24
LC:配列番号14
バリアント9(VH1.02/VL1.03)
HC:配列番号24
LC:配列番号22
バリアント10(VH1.02/VL1.04)
HC:配列番号24
LC:配列番号23
【0282】
最適化されたバリアント1から10の全ては、サイズ排除クロマトグラフィーによって凝集体のパーセントでアッセイされる品質の維持の点で、類似の良い性能であり、蛍光によってモニタリングされる熱的アンフォールディング(FMTU)に基づく安定性を維持し、MKN-45がん細胞株に対する結合を保持し、標的に対する選択性を維持した。バリアント8(すなわち、VH1.02およびVL1.02を包含するバリアント)を、生殖系列に特に類似

の配列を有する最適化されたバリアントとして、さらなる開発のために選択した。
【０２８３】
それから、選択されたバリアント8のさらなる配列最適化を、特にIgG Fcエフェクター機能を低減するために行った。親クローンと比較して、so8G4(本明細書ではmAb1ともまた言われる)と呼称されるもたらされた最終的な配列最適化された(so)クローンは、改善された親和性および改善された製造性を示し、また、CEACAM5およびFcRnに対する親和性を維持しながら、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIa/複合体、C1q、FcγRIIb、およびFcγRIIIbに対する結合を示さないかまたは低減された結合を示す。この最終的な配列最適化された抗体so8G4(本明細書ではmAb1ともまた言われる)のアミノ酸配列は次の通りである:
重鎖(HC):配列番号13(本明細書において上で定められている通り)
軽鎖(LC):配列番号14(本明細書において上で定められている通り)
【０２８４】
1.6 mAb1のin vitroキャラクタリゼーション
抗体mAb1を、結合親和性、選択性、および内在化を包含するいくつかの特性についてin vitroアッセイによってキャラクタリゼーションした。
【０２８５】
1.6.1 結合親和性
・捕捉された標的タンパク質CEACAM5(ヒトまたはカニクイザルMacaca fascicularis)に対する可溶性抗体アナライトの結合親和性を決定すること。次の実験条件をOctet Red装置で使用した:
・ストレプトアビジンでコーティングされたバイオセンサー。
・ビオチン化された標的タンパク質濃度(ここでは、ECDは細胞外ドメインの意味である):
・R&D Systemsヒト_CEACAM5_ECD-his-ビオチン(常法を使用してビオチン化された)を2.5μg/mlで900秒間1000rpmで捕捉した。
・Syngeneから得られた組換えMacaca fascicularis CEACAM5_ECD-His-ビオチン(常法を使用してビオチン化された)を5μg/mlで900秒間1000rpmで捕捉した。
・アナライト抗体濃度:200、100、50、25、12.5、6.25、0nM。
・結合親和性KD(平衡解離定数)値は、測定された結合速度論会合(ka)および解離(kd)速度定数から、Octet評価ソフトウェアを使用して決定した。ここでは、KD=kd/ka。
・抗体をFabフォーマットで使用した。
mAb1から作製されたFabの結果:
ヒトCEACAM5に対する結合親和性KDは6.3±1.98nMであった。
カニクイザルCEACAM5に対する結合親和性KDは14.1±2.53nMであった。
【０２８６】
1.6.2. 選択性
a)種およびドメイン
4nMから0.25pMまで抗体をタイトレーションすることと、全てSyngeneから得られた1μg/mlの結合した組換えヒト(rh)CEACAM5 ECDまたはそのドメインN-A1-B1、A2-B2、A3-B3もしくは結合した組換えMacaca fascicularis(mf)CEACAM5 ECDにそれを適用することとによって、ELISAアッセイでmAb1の選択性決定をした。結果を図1に示し、下にまとめる:
rhCEACAM5に対する結合EC50は153.4pMである。
rhA2-B2ドメインに対する結合EC50は166.9pMである。
mfCEACAM5に対する結合EC50は324.3pMである。
rhN-A1-B1またはrhA3-B3またはBSA(ウシ血清アルブミン。負の対照としての用をなす)に対する結合は検出されなかった。
【０２８７】
b)異なるCEACAMタンパク質

ヒトCEACAM5および他のヒトCEACAMファミリーメンバーに対するmAb1のFabの選択性決定を、ELISAアッセイによってした。タンパク質を96ウェルアッセイプレートにコーティングした:huCEACAM5-His6(R&D Systems #4128-CM)、huCEACAM6-His6(3934-CM R&D Systems、およびSyngeneから得られた組換えタンパク質)、huCEACAM1-His6(2244-CM R&D Systems)、huCEACAM3-His6(C449 Novoprotein)、huCEACAM7-His6(C926 Novoprotein)、huCEACAM8-His6(C583 Novoprotein)、huPSG1-His6(CC66 Novoprotein)。各タンパク質は12nM濃度でプレートをコーティングしていた。

【０２８８】

結果:

mAb1のFabはヒトCEACAM5に結合したが(3.04nMのEC50)、ヒトCEACAM5に対する結合のEC50よりも300倍超高い濃度である1000nMのmAb1のFabを使用したときでさえも、ELISAアッセイにおいて他のヒトCEACAMファミリーメンバーには結合しなかった。

【０２８９】

mAb1のFabは、試験された全ての濃度において、ELISAアッセイでは無関係のタンパク質(BSA)にもまた結合しなかった。

【０２９０】

1.6.3 mAb1の細胞結合

細胞上のその標的タンパク質に結合する抗体の能力を、標的(例えばヒトCEACAM5)を発現する細胞に対して抗体をタイトレーションすることと、細胞の蛍光MFIを測定することとによって決定した。抗体結合比較のためのモデル細胞は、ヒトCEACAM5を発現するMKN45細胞株およびmfCEACAM5を発現するCHO細胞株であった。タイトレーションは、アッセイ緩衝剤(1%BSAを含有するPBS×1)による10点×4希釈、曲線開始濃度2000nMでした。

【０２９１】

例示的なデータ:

mAb1はヒトCEACAM5発現MKN-45細胞株にEC50=10.62±1.6nMで結合。

mAb1はmfCEACAM5発現CHO細胞株にEC50=4.8±0.6nMで結合。

【０２９２】

1.6.4 既知の抗体との細胞結合比較

本発明者らのリード抗体mAb1の細胞結合を、ADC関連の公知抗体huMab2-3(公知のADC SAR408701からのまま)およびhMN14(本明細書ではhmn-14ともまた言われる)(公知のADCラベツズマブゴビテカンまたはIMMU-130からのまま)と、CEACAM5を発現するMKN45細胞株について比較した。

【０２９３】

次のアミノ酸配列が、本明細書において下に記載される実験において、上で言及された公知の抗体に使用された:

【０２９４】

huMab2-3:

HC(アロタイプ):

EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSSYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSGGGITYAPSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDTAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号25)

LC:
DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEG
VPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号26)
【０２９５】
hmn-14:
HC:
EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWIGEIHPDSS
TINY
APSLKDRFTISRDNAKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCASLYFGFPWFAYWGQGTPVT
VSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号27)
LC:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWTSTRHTG
VPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号28)
【０２９６】
リツキシマブを対照として比較に包含した。細胞に結合する抗体の結果を図2に示し、下にまとめる:
mAb1(so8G4)=8.3nM
huMab2-3=6nM
hmn-14=11.8nM
【０２９７】
<u>いくつかの実験の平均(EC50):</u>
mAb1 (so8G4)=10.4nM±1.6nM(n=12)
huMab2-3=4.9nM±1.6nM(n=3)
hmn-14=16nM(n=2)
【０２９８】
MKN45細胞株に対する抗CEACAM5抗体の細胞結合は、mAb1および公知の抗体の結合が類似であるということを示している。
【０２９９】
1.6.5 Cell Discoverを使用した内在化アッセイ
ADCの妥当する特性は、標的発現細胞およびリソソームへのその内在化である。従って、内在化は、ADCの一部として使用されるべき抗体の妥当する特性である。後期エンドソームおよびリソソーム(低pHベシクル)への抗体内在化速度は、pH感受性色素(pHrodo)によって抗体を直接標識することによってモニタリングされ得る。これは励起によっ

て6.0未満のpHにおいて強い蛍光を発する。この蛍光がCell-Discoverer7(Zeiss)でイメージングされ、内在化速度が計算され得る。

【０３００】

いくつかの抗体の内在化速度を分析するために、MKN45細胞を、96ウェル暗色透明平底プレート(Cellvis)に25,000細胞/ウェルで播種した。細胞を、100μl/ウェルのRMPI-1640+10%FBS(Thermo)で一晩培養した。細胞培地を除去し、暗所で室温(RT)で15min、PBS×1で希釈された100μlの10μg/mlのHoechst色素によって細胞を染色した。それから、細胞をPBS×1で2回洗浄した。

【０３０１】

抗CEACAM5ヒトIgG抗体(so8G4(すなわちmAb1)、humab2-3、hmn-14)および抗MerTK抗体(Merck)をpHrodoによって直接標識し、フェノールレッドなしの加温したRPMI1640+10%FBSで100nMの濃度に希釈し、それらのそれぞれのウェルに追加した。プレートをCell Discovererで37℃、5%CO_2において20時間インキュベーションし、下にさらに記載される通り、20分毎に画像を取得した。

【０３０２】

細胞の後期エンドソームおよびリソソームへのpHrodo標識抗体の内在化を、567nmの励起および592/25nmの発光検出器で蛍光を使用してCell-Discoverer7(Zeiss)によってイメージングした。細胞核をHoechstで標識し、385nmの励起および425/30nmの発光検出器でイメージングした。

【０３０３】

各ウェルの蛍光を20min毎に20h記録した。細胞あたりの蛍光強度総計(SFI)の分析を、Zenソフトウェア(ZEN3.1)および線形回帰のExcel分析によって計算した。

【０３０４】

結果を図3および図4に示し、曲線の直線部分の傾き(図4を参照)もまた下の表にまとめる:

【表Ｃ】

試料	曲線の傾き	R^2
so8G4	28519	99.41
so8G4	29844	99.66
so8G4	28513	99.92
humab2-3	19154	99.42
humab2-3	17398	99.19
humab2-3	20201	99.68
hmn-14	24350	98.61
hmn-14	18754	99.56
hmn-14	23701	99.58

【０３０５】

結論:

1. so8G4(mAb1)は、humab2-3(18917±1416)およびhmn-14(22268±3060

)よりも高い平均結合速度(28958±766)を有する。
2. so8G4(mAb1)は、humab2-3およびhmn-14と比較して高い内在化強度をもまた有する。
3. mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M、およびmAb7-Mは、mAb1に対応する内在化特性を示すことが予想される。
【0306】
1.7 例えば薬物-リンカー化合物に対する抱合への使用のためにmAb1を生成する例示的な方法
抗CEACAM5抗体mAb1を組換えCHO-K1Sv細胞株によって生成した。細胞培養を200lのシングルユース・バイオリアクターでバッチモードで実施した。細胞を、37℃において、グルコースを足した独自のCHO流加培養成長培地で成長させた。接種後の3、5、7、および10日目に、独自のフィード構成要素の混合物を培養にフィードした。
【0307】
バイオリアクター実行回からのクルードな馴化培地を、3×1.1m^{2}のMillistak+Pod DOHC(Millipore MD0HC10FS1)および1.1m^{2}のMillistak+Pod XOHC(Millipore #MX0HC01 FS1)フィルターを使用して清澄化し、次に、Millipore Opticap XL3 0.5/0.2μmフィルター(Millipore #KHGES03HH3)による最終濾過をした。
【0308】
清澄化後に、抗体mAb1を、プロテインA捕捉ステップおよびイオン交換クロマトグラフィーステップからなる標準的な抗体精製プロセスを使用して精製した。抗CEACAM5抗体mAb1は、ADC分子の作製のための中間体としての用をなした。
【0309】
1.8 mAb1のヒト/ウサギキメラバリアントの発現および精製、ならびにホルムアルデヒド固定パラフィン包埋された細胞株およびヒト腫瘍組織における免疫組織化学(IHC)へのその使用
mAb1のヒト/ウサギキメラバリアントを常法の組換え方法によって作製した。mAb1のヒト/ウサギキメラバリアント(本明細書では「rb8G4」ともまた言われる)は次のアミノ酸配列を有した:
重鎖
VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGS
TYFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLV
TVSSQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFP
SVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELL
GGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLR
EQQFNSTIRVVSTLPIAHEDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYT
MGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSDGSYFLY
SKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK(配列番号29)
軽鎖
EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGI
PARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRDPVAPSVL
LFPPSKEELTTGTATIVCVANKFYPSDITVTWKVDGTTQQSGIENSKTPQSPEDNTYS
LSSTLSLTSAQYNSHSVYTCEVVQGSASPIVQSFNRGDC(配列番号30)
【0310】
抗体rb8G4を一過性トランスフェクションによってHEK細胞(Expi293懸濁細胞)から発現し、MabSelect SuReおよびクエン酸緩衝剤を使用して精製した。それから、rb8G4を、ホルムアルデヒド固定パラフィン包埋された細胞株およびヒト腫瘍組織のIHCに使用した。
【0311】
材料および方法
細胞株および組織

ヒトがん細胞株をMerck細胞バンクから培養し、4%緩衝ホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋した(FFPE)。パラフィン包埋細胞株を細胞株マイクロアレイ(CMA)(Zytomed)に配した。ヒト臓器による組織マイクロアレイ(TMA)のFFPE組織切片はamsbioから得た(FDA標準組織アレイ、T8234701)。FFPEヒト腫瘍試料は、BioIVTおよびIndivumed GmbHによって提供された。

【0312】

方法

抗CEACAM-5抗体rb8G4によるIHC染色のためには、ホルムアルデヒド固定パラフィン包埋(FFPE)されたがん細胞株マイクロアレイ(CMA)およびヒト腫瘍組織からの4μmの切片を、帯電スライド(SuperFrost Ultra Plus、Thermo Fisher ScientificまたはTOMO、Matsunami)にマウントした。染色手続きは、Discovery XT(Roche Diagnostics)染色プラットフォームを使用して行った。脱パラフィン後に、トリス-EDTA緩衝剤pH8(CC1、Roche Diagnostics)中で抗原賦活化のために切片を加熱した。切片を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)または抗体希釈緩衝剤(DCS)によって0.5または0.7μg/mlに希釈された一次モノクローナル抗体rb8G4とインキュベーションした。クローンDA1E(ウサギモノクローナルIgG、NEB)はアイソタイプ対照抗体としての用をなした。一次抗体の次に、HQ抗ウサギIgG検出キット(Roche Diagnostics)であった。スライドをヘマトキシリンで対比染色し、水道水で洗浄し、脱水し、Entellan Neu(VWR)永久マウントメディアでカバーガラスにマウントした。

CMAおよびヒト臓器組織によるTMAを染色し、0.46μm/ピクセルの解像度でNanoZoomer(Hamamatsu)でスキャンした。ヒト腫瘍切片を染色し、0.44μm/ピクセルの解像度でAxioScan.Z1(Zeiss)装置を使用してスキャンした。CMAのスキャンを画像分析ソフトウェアHALO(Indica Labs、USA)によって分析した。存在する抗原の量の決定のために、褐色の染色陽性エリアをバイアブルな組織のエリアの面積パーセントとして計算した。染色(任意単位)は以下の通り計算される:

抗体染色(AU)=陽性組織の面積%*褐色の平均光学濃度(ODは0から1の範囲である)

【0313】

抗体染色の最大値は、100=組織のエリアの100%が黒色である(グレースケールOD値は1である)。

【0314】

がん細胞株のCEACAM-5 mRNAデータはCancer Cell Line Encyclopedia(CCLE;Broad Institute of MIT & Harvard)から入手した。

【0315】

結果

がん細胞株およびヒト正常組織におけるバリデーション

抗体rb8G4は、FFPEがん細胞株では、細胞質および原形質膜においてシグナルを示した(図5)。

【0316】

FFPE組織/細胞に対する抗体rb8G4の特異性は、104個のがん細胞株の染色シグナルをこれらの細胞株のmRNA発現(CCLEデータセット)と比較することによって示された。もたらされたr=0.88というピアソン相関係数は、抗体rb8G4(SO8G4AB323ともまた言われる)がFFPE組織/細胞からCEACAM-5エピトープを検出するという結論を支持する(図6)。このがん細胞株マイクロアレイおよび個々に選択された陽性および陰性細胞株は、ヒト正常および腫瘍組織による染色実行回において対照マトリックスとしての用をなした。

【0317】

正常ヒト組織における抗体rb8G4による染色(図7)は、CEACAM-5 mRNA発現(図8)と合致しており(資料:http://www.proteinatlas.org/ENSG00000105388-CEACAM5/tissue)、CEACAM-5に対する抗体の特異性をさらに支持している。

【0318】

ヒト腫瘍組織

大腸がん(図9)、胃がん(図10)、食道がん(図11)、および非小細胞肺がん(図12)で示される通り、抗体rb8G4はいくつかのヒト腫瘍適応症において染色陽性であった。シグナルは細胞質および原形質膜に局在する。

【０３１９】

1.9 mAb1およびrb8G4を使用したフローサイトメトリーおよびウエスタンブロット

CEACAM5陽性および陰性細胞株に対するmAb1、rb8G4および市販の抗CEACAM5抗体の結合を比較した。

【０３２０】

使用された方法:5E5から1E6の細胞を、5mLポリスチレンチューブ中でBD FACSCanto II(BD Biosciences)を使用してフローサイトメトリー分析に使用した。10μg/mLの一次抗体(mAb1、rb8G4、マウスモノクローナルAgilent Dako #M7072クローン#IL7)およびそれぞれの蛍光標識二次抗体(ロバ抗ヒトIgG、Jackson-Dianova #709-116-149;ロバ抗マウスIgG、Jackson ImmunoResearch #715-116-150、ロバ抗ウサギIgG、Jackson-Dianova #711-116-152)による染色を、50μLの1%PBS/BSA中で4℃で20から30min実施した。染色ステップ間および後に、細胞を1%PBS/BSAで3回洗浄し、フローサイトメトリー分析のために500μLの1%PBS/BSA(生細胞ゲーティングのための0.2μg/mLのDAPIを包含する)に再懸濁した。データ評価には、FlowJoソフトウェア(BD Biosciences)を使用した。

【０３２１】

結果:mAb1およびrb8G4は、CEACAM5陽性細胞株のみにおいてmRNA発現レベルデータに対応する結合を示した(下の表1;MKN-45、NCI-H441)。対照的に、市販の抗体では、結合はより弱く、高CEACAM5細胞株に限定された(下の表1;MKN-45)。結論として、mAb1およびrb8G4はCEACAM5陽性がん細胞を特異的に検出し、検出剤として利用され得る。

【表１】

細胞株	MAB1	RB8G4	AGILENT/DAKO M7072クローンIL7
MKN-45	23.2	36.2	3.8
NCI-H441	2.2	3.2	1.1
A549	1.1	1.1	1.0
MDA-MB-468	1.1	1.0	1.0

【０３２２】

表1.CEACAM5陽性およびCEACAM5陰性細胞株に対する異なる抗体の結合。二次抗体のみ対照のMFIで割ったそれぞれの抗体の蛍光強度中央値(MFI)の商を、細胞株あたり列挙する。

【０３２３】

CEACAM5陽性および陰性細胞株ライセートに対するヒトmAb1およびrb8G4の結合をもまたウエスタンブロットによって検討した。

【０３２４】

使用された方法:ウエスタンブロットは標準的なプロトコールに従って行った(Sambro

ok,J.& Russell,D.W.,2001.Molecular Cloning: A Laboratory Manual,Volume 1,CSHL Press)。SDS-PAGE、次に膜のウェット式ブロッティングのために、BCAキット(Thermo Scientific、#23227)によって定量されたRIPA細胞ライセートの総タンパク質15μgをレーンあたりロードされた。MOPSランニング緩衝剤(Bio-Rad、#1610788)を使用するCriterion XT 4-12%ゲル(Bio-Rad、#3450125)を、Criterion電気泳動セル(Bio-Rad、#1656001)に使用した。ポンソー染色によって蛋白質のトランスファーを確認した。0.5μg/mLから1μg/mLの一次(mAb1またはrb8G4)および二次抗体(抗ヒトIgG、Jackson ImmunoResearch、#109-035-098または抗ウサギIgG、CellSignaling、#7074)による染色を実施する前および間には、膜を洗浄した。染色した膜を、Fusion FXイメージングシステム(Vilber)を使用してECL検出試薬によって可視化した。

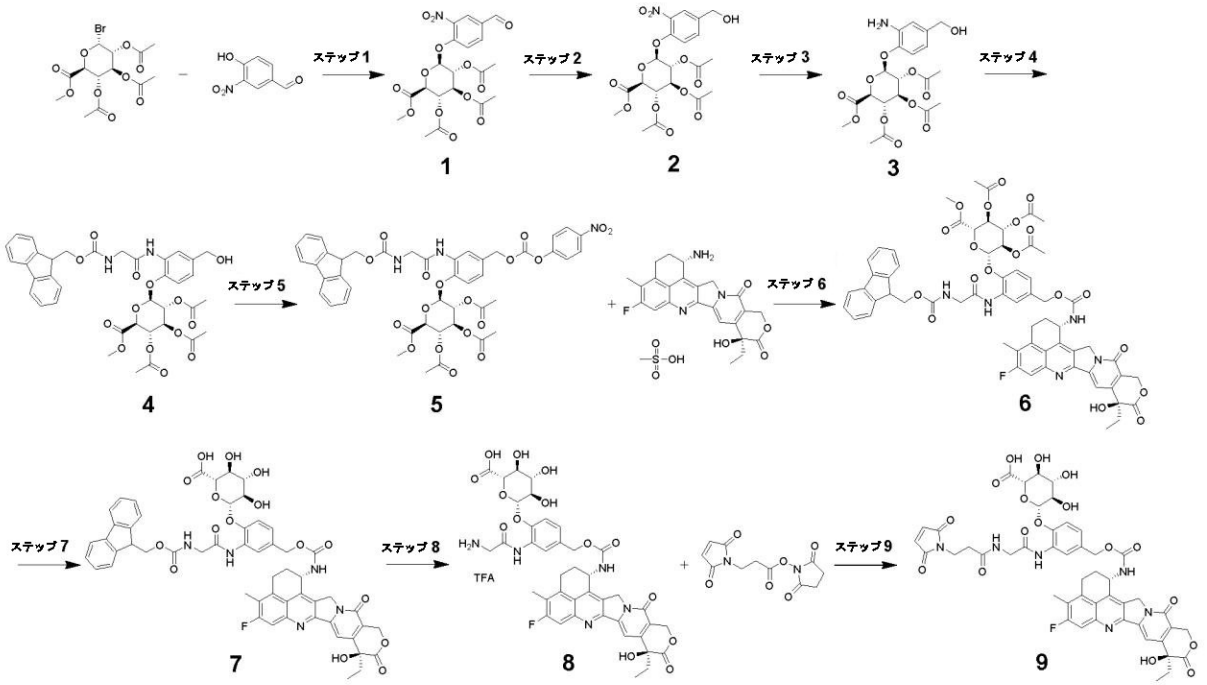
【０３２５】

結果を図13Aおよび図13Bに示す:両方の抗体は、高度にグリコシル化されたCEACAM5の予想される移動速度に対応する似通ったパターンで結合した。mAb1(図13A)およびrb8G4(図13B)によるCEACAM5検出はCEACAM5陽性細胞株に特異的であり、強度はmRNA発現レベルと相関した。より低い強度で観察される二次的なバンドは、以前に記載された潜在的な第2のアイソフォームに対応する(Hatakeyama et al.: Novel protein isoforms of carcinoembryonic antigen are secreted from pancreatic, gastric and colorectal cancer cells.BMC Research Notes 2013 6:381)。

【０３２６】

<u>例2:グルクロニドに基づくリンカーを有する薬物-リンカー化合物の合成:薬物-リンカー化合物1(DL1)および薬物-リンカー化合物1-M(DL1-M)</u>

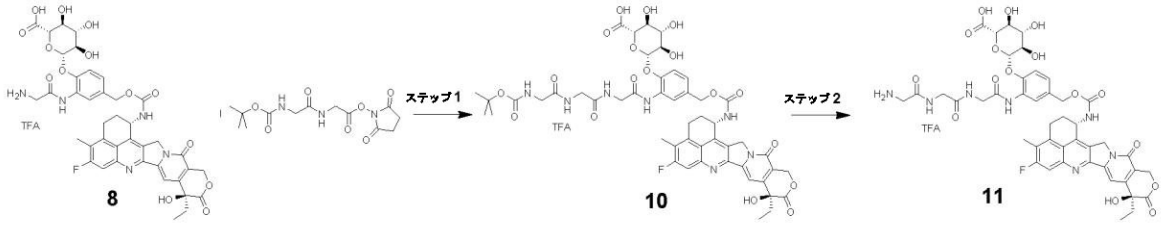
【化１１】



【０３２７】

化合物9(本明細書では薬物-リンカー化合物1(DL1)ともまた言われる)への合成経路。

【化１２】

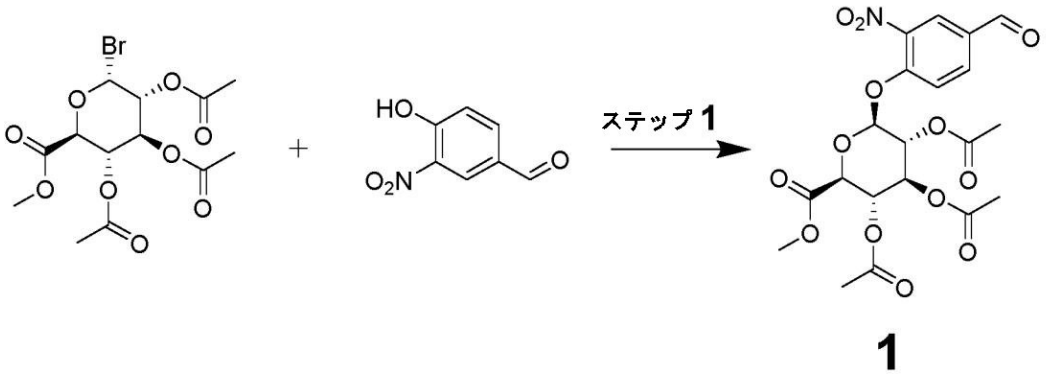


化合物11(本明細書では薬物-リンカー化合物1-M(DL1-Mともまた言われる)への合成経路

化合物9の化学的調製のプロトコール

ステップ1:化合物1

【化１３】



【０３２８】

アセトニトリル(83.00ml;10.00V)中の(2S,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-トリアセトキシ-6-ブロモ-テトラヒドロ-ピラン-2-カルボン酸メチルエステル(8.30g;20.90mmol;1.00eq.)および4-ヒドロキシ-3-ニトロ-ベンズアルデヒド(5.24g;31.35mmol;1.50eq.)の撹拌溶液に、酸化銀(I)(9.69g;41.80mmol;2.00eq.)を追加した。反応混合物をRTで16h撹拌した。反応混合物をセライトで濾過した。濾液を真空下で濃縮して固体を入手した。固体をEtOAcに溶解し、10%NaHCO3水溶液で洗浄して、過剰な4-ヒドロキシ-3-ニトロ-ベンズアルデヒドを除去した。有機層を真空下で濃縮して、化合物1をサンドカラーの固体として入手した。

収量:9.0g

収率:89.1%

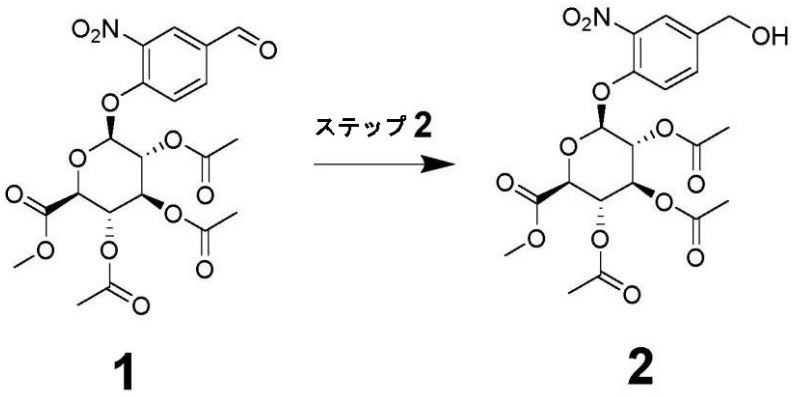
【０３２９】

分析データ:

NMR:^{1}H-NMR (400 MHz,DMSO-d6): 9.98 (s,1H),8.46 (s,1H),8.25-8.21 (m,1H),7.64 (d,J = 11.60Hz,1H),5.94 (d,J= 10.00 Hz,1H),5.51-5.44 (m,1H),5.20-5.09 (m,2H),4.80 (d,J = 13.20 Hz,1H),3.64 (s,3H),2.09 (s,9H).

ステップ2:化合物2

【化１４】



1 2

【０３３０】

プロパン-2-オール(33.00ml;3.67V)およびCHCl3(167.00ml;18.56V)中の化合物1(9.00g;18.62mmol;1.00eq.)の撹拌溶液に、シリカゲル60-120(3.60g;112.09mmol;6.02eq.)、次に水素化ホウ素ナトリウム(1.80g;46.55mmol;2.50eq.)を追加した。反応混合物をRTで1h撹拌した。完了後に、反応混合物を冷却したH_2Oでクエンチし、セライトで濾過した。濾液をジクロロメタンで抽出し、Na_2SO_4で乾燥させた。溶媒を濃縮して、化合物2をオフホワイトの粉末として入手した。

収量:8.70g

収率:92.4%

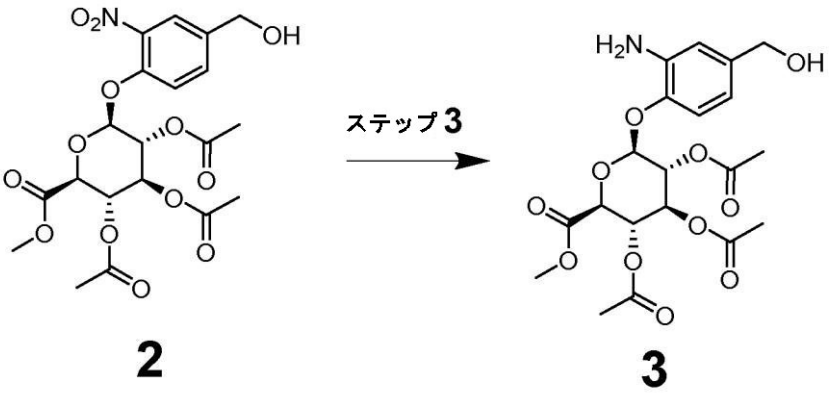
<u>分析データ</u>

LCMS:カラム:ATLANTIS dC18(50×4.6mm)5μm、移動相A:0.1%HCOOH、H2O中:ACN(95:5)、B:ACN

RT(min):2.05;M+H:503.2、純度:96.6%

ステップ3:化合物3

【化１５】



2 3

【０３３１】

酢酸エチル(100.00ml;11.49V)およびTHF(100.00ml;11.49V)中の化合物2(8.70g;17.21mmol;1.00eq.)の撹拌溶液に、パラジウム炭素(10%w/w)(2.50g;2.35mmol;0.14eq.)を追加した。反応混合物を水素雰囲気下でRTで3h撹拌した。完了後に、反応混合物をセライトで濾過した。溶媒を真空下で濃縮して、化合物3をオフホワイトの固体として入手した。

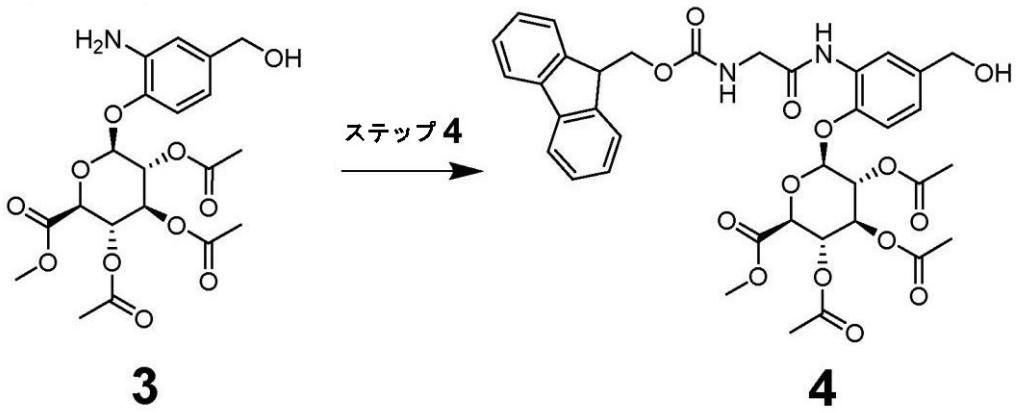
収量:8.5g

収率:100%

【０３３２】

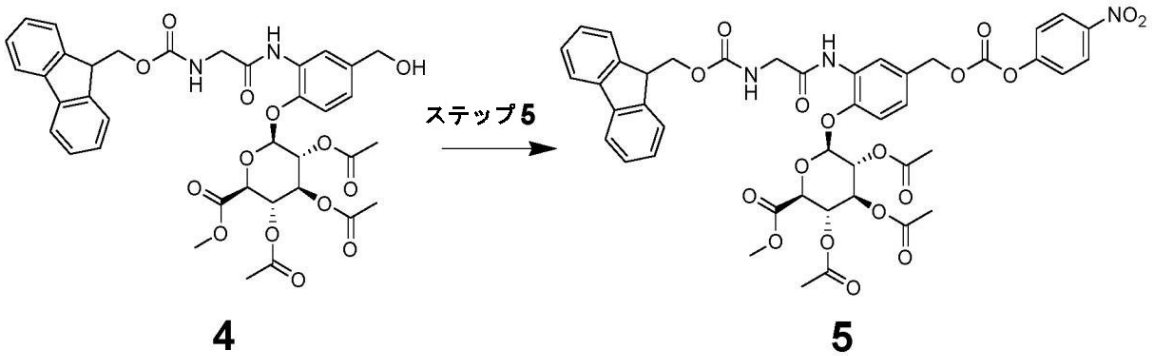
<u>分析データ</u>:

LCMS:カラム:ATLANTIS dC18(50×4.6mm)5μm、移動相A:0.1%HCOOH、H2O中:ACN(95:5)、B:ACN
RT(min):1.73;M+H:456.10、純度:95.1%
ステップ4:化合物4
【化１６】



3 4

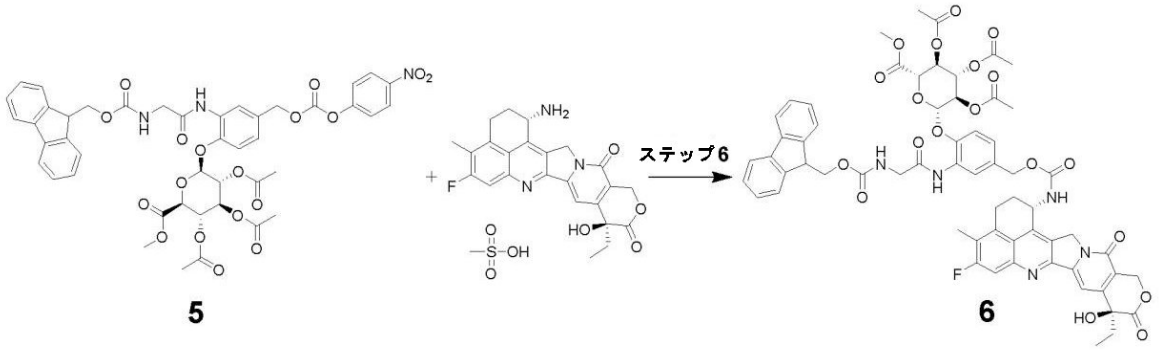
【０３３３】
DCM(250.00ml;25.00V)中の化合物3(10.00g;20.89mmol;1.00eq.)および(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-酢酸(7.60g;25.06mmol;1.20eq.)の撹拌溶液に、2-エトキシ-2H-キノリン-1-カルボン酸エチルエステル(15.65g;62.66mmol;3.00eq.)を0℃で追加した。反応混合物をRTで16h撹拌した。完了後に、溶媒を減圧下で除去してクルードな生成物を入手した。クルードな生成物をカラムクロマトグラフィー(56%EtOAc:石油エーテル)によって精製して、純度80%の化合物を入手した。化合物を30%EtOAcおよびPetエーテルによる洗浄によってさらに精製して、化合物4を白色固体として入手した。
収量:8.5g
収率:50.7%
【０３３４】
分析データ:
LCMS:カラム:ATLANTIS dC18(50×4.6mm)5μm、移動相A:0.1%HCOOH、H_2O中:ACN(95:5)、B:ACN
RT(min):3.03;M+H:735.2、純度:81.9%
ステップ5:化合物5
【化１７】



4 5

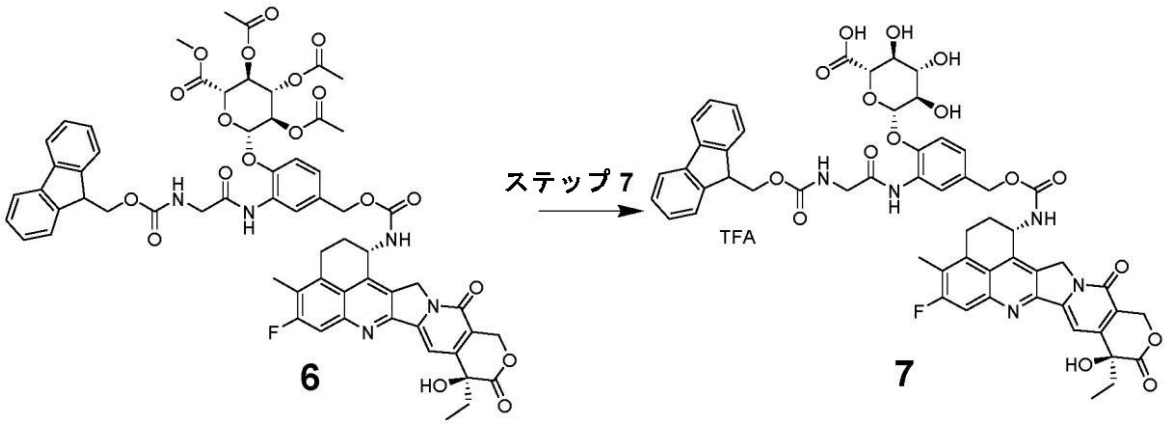
【０３３５】
THF(40.00ml;20.00V)中の化合物4(2.00g;2.49mmol;1.00eq.)の撹拌溶液に、

0℃で、炭酸ビス-(4-ニトロ-フェニル)エステル(3.06g;9.97mmol;4.00eq.)およびDIPEA(4.40ml;24.92mmol;10.00eq.)を追加した。反応混合物をRTで12h撹拌した。反応の完了後に、反応混合物を真空下で濃縮した。クルードな生成物を、シリカゲル(230-400)および溶離液としてのPetエーテル/酢酸エチルを使用するカラムクロマトグラフィーによって精製して、化合物5を淡黄色固体として与えた。
収量:2.0g
収率:84.6%
【0336】
分析データ:
LCMS:カラム:X-Bridge C8(50×4.6)mm、3.5μm;移動相:A:0.1%TFA、ミリQ水中;B:ACN
RT(min):3.24;M+H:900.20、純度:94.9%
ステップ6:化合物6
【化18】



【0337】
化合物5(1,369g;1,00eq.)をN,N-ジメチルホルムアミド(15,00ml)に溶解し、エキサテカンメシレート(679,7mg;1,00eq.)、合成のための4-メチルモルホリン(0,422ml;3,00eq.)および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(172,8mg;1,00eq.)を追加した。反応混合物を室温で一晩撹拌した。撹拌時間後に、反応懸濁液は褐色溶液に変化した。反応をLC-MSによってモニタリングし、これは出発材料の完全な変換を示した。反応混合物をRPフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。生成物含有画分を組み合わせ、真空下で濃縮し、一晩凍結乾燥して、化合物6を黄色固体として与えた。
収量:1.59g
収率:87.5%
【0338】
分析データ:
LCMS:カラム:クロモリスHR RP-18e(50-4,6mm);移動相A:0.05%HCOOH、H_2O中;B:0.04%HCOOHおよび1%H_2O、ACN中;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000、amuポジティブ;1%→100%B:0→2,0min;100%B:2,0→2,5min
【0339】
RT(min):1.95;M+H:1196.40、純度:84.4%.
ステップ7:化合物7

【化１９】



【０３４０】

化合物6(1,586g;1,00eq.)をテトラヒドロフラン(50,00ml)に溶解し、LiOHの溶液(0.1M)(水酸化リチウム水和物(281,77mg;6,00eq.)を水(67,100ml)中に含有する)を0℃で滴下した。追加の間はpH値をチェックした。pHは10を超えるべきではない。LiOHの溶液の追加は1.5時間後に完了した。反応をLC-MSによってモニタリングし、これは出発材料の完全な変換を示した。反応をクエン酸溶液でクエンチし、pHを5に調整した。反応混合物を減圧下で濃縮した。クルードを分取HPLCによって精製した。生成物含有画分を組み合わせ、凍結乾燥して、化合物7を暗黄色固体として与えた。

収量:728mg

収率:54.8%

【０３４１】

分析データ:

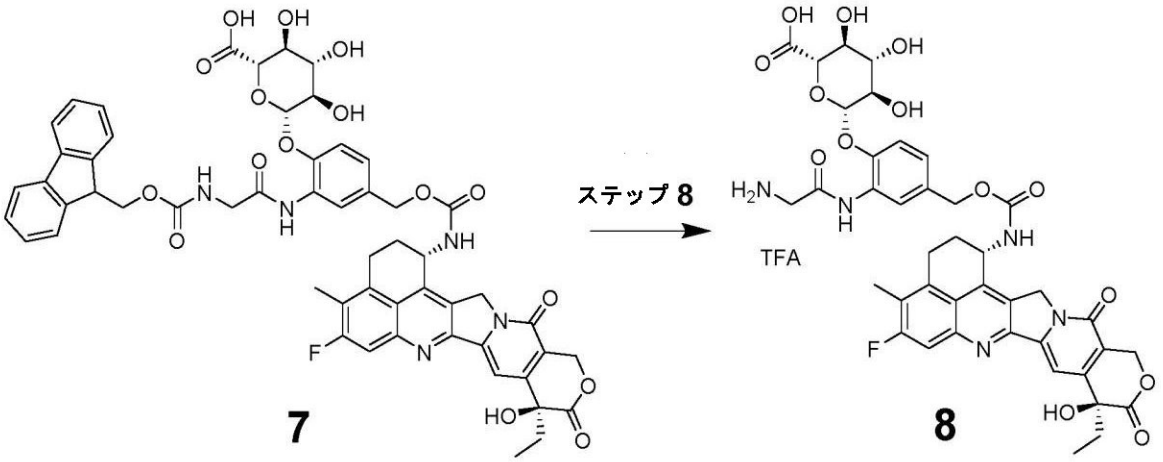
LCMS:カラム:クロモリスHR RP-18e(50-4,6mm);移動相A:0.05%HCOOH、H_2O中;B:0.04%HCOOHおよび1%H_2O、ACN中;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000、amuポジティブ;1%→100%B:0→2,0min;100%B:2,0→2,5min

【０３４２】

RT(min):1.68;M+H:1056.30、純度:98.5%.

ステップ8:化合物8

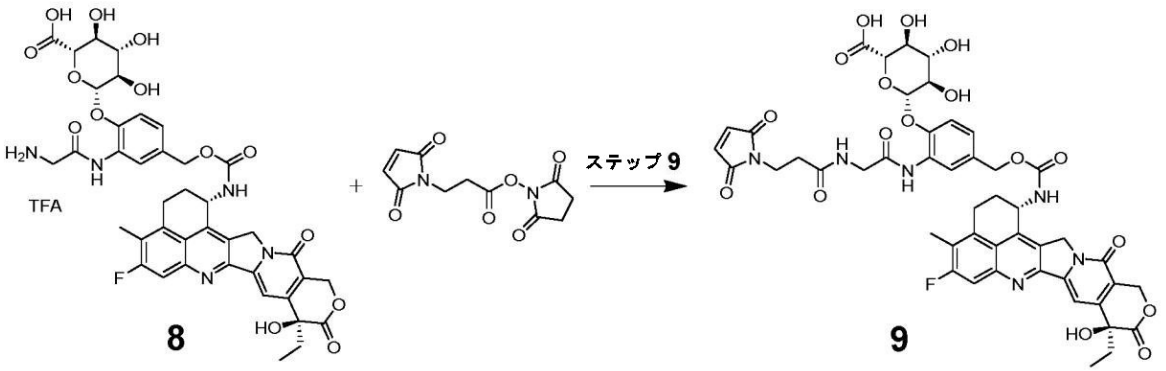
【化２０】



【０３４３】

化合物7(728,000mg;1,00eq.)をN,N-ジメチルホルムアミド(20,00ml)に溶解した。ピペリジン(136,513μl;2,00eq.)を追加し、溶液をRTで合計4時間撹拌した。反応をLC-MSによってモニタリングし、これは出発材料の完全な変換を示した。反応混合物

を減圧下で濃縮し、クルードな生成物をRPフラッシュクロマトグラフィーによって精製した。生成物含有画分を組み合わせ、溶媒を部分的に除去し、それを一晩凍結乾燥して、化合物8を黄色固体として与えた。
収量:706mg
収率:100%
【0344】
分析データ:
LCMS:カラム:クロモリスHR RP-18e(50-4,6mm);移動相A:0.05%HCOOH、H_2O中;B:0.04%HCOOHおよび1%H_2O、ACN中;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000、amuポジティブ;1%→100%B:0→2,0min;100%B:2,0→2,5min
【0345】
RT(min):1.22;M+H:834.30、純度:97.6%.
ステップ9:化合物9
【化21】



【0346】
ジメチルホルムアミド(30,00ml)中の化合物8(854mg;1,00eq.)の溶液に、N-エチルジイソプロピルアミン(149,234μl;1,00eq.)および3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-ピロール-1-イル)-プロピオン酸2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステル(233,61mg;1,00eq.)を追加した。反応混合物をRTで3時間撹拌した。反応をLC-MSによってモニタリングし、これは出発材料の完全な変換を示した。反応混合物を減圧下で濃縮し、クルードな生成物はRPフラッシュクロマトグラフィーによった。生成物含有画分を組み合わせ、濃縮し、凍結乾燥して、所望の生成物を91%の純度で与えた。この材料を再びRPクロマトグラフィーによって精製して、化合物9を黄色固体として与えた。
収量:580mg
収率:60.1%
【0347】
分析データ:
LCMS:カラム:クロモリスHR RP-18e(50-4,6mm);移動相A:0.05%HCOOH、H_2O中;B:0.04%HCOOHおよび1%H_2O、ACN中;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000、amuポジティブ;1%→100%B:0→2,0min;100%B:2,0→2,5min
RT(min):1.38;M+H:985.30、純度:90%(異性体の他方の10%はHPLCによって除去され得る)
【0348】
^{1}H NMR (500 MHz,DMSO-d_6) δ 13.10 - 12.44 (m,1H),9.08 (s,1H),8.32 (t, J = 5.8 Hz,1H),8.16 (s,1H),8.02 (d,J = 8.8 Hz,1H),7.76 (d,J = 10.9 Hz,1H),7.31 (s,1H),7.15 - 7.09 (m,2H),6.98 (s,2H),5.48 - 5.38 (m,2H),5.32 - 5.22 (m,3H),5.11 - 5.01 (m,2H),4.87 (d,J = 7.6 Hz,1H),3.92 - 3.88 (m,1H),3.89 - 3.84 (m,2H),3.65 - 3.61 (m,2H),3.46 - 3.41 (m,1H),3.42 - 3.37

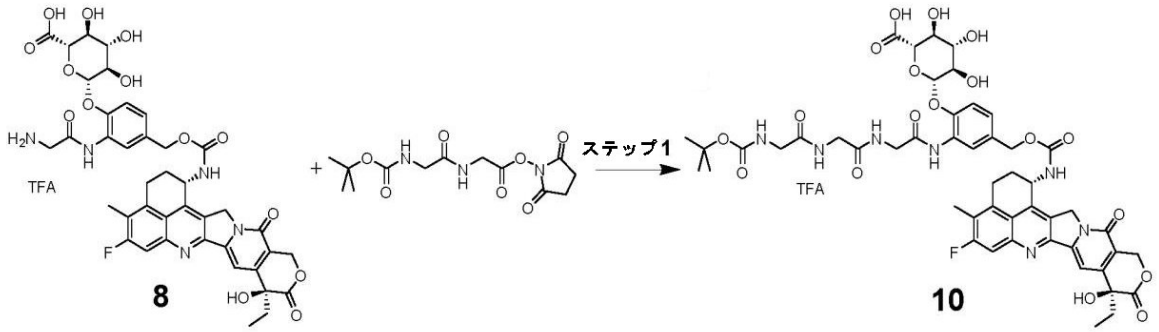
(m,1H),3.38 - 3.31 (m,1H),3.28 - 3.20 (m,1H),3.15 - 3.07 (m,1H),2.48 - 2.44 (m,2H),2.38 (s,3H),2.24 - 2.13 (m,2H),1.94 - 1.80 (m,2H),0.88 (t,J = 7.3 Hz,3H).

【０３４９】

化合物11への化学的調製のプロトコール

ステップ1:化合物10

【化２２】



ジメチルホルムアミド(10.00ml)中の化合物8(289.00mg;1.00eq)の溶液に、N-エチルジイソプロピルアミノ(0.104ml、2.00eq)および2,5-ジオキソピロリジン-1-イル(tert-ブトキシカルボニル)グリシルグリシネート(105.70mg;1.00eq)を追加した。反応混合物を室温にて1時間撹拌し、反応をLC-MSによって反映させた。完了後に、溶媒を真空下で除去し、クルードな生成物をSunfireカラムによる分取HPLCによって精製した。生成物を含有する画分を組み合わせ、凍結乾燥して、化合物10のトリフルオロ酢酸塩を黄色固体として与えた。

【０３５０】

収量:162.00mg、0.14mmol。

収率:44.8%

【０３５１】

<u>分析データ</u>:

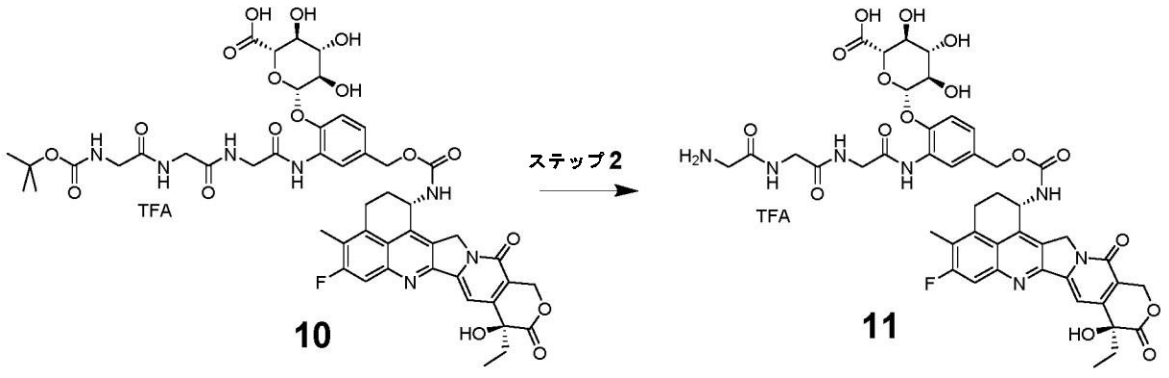
LCMS:カラム:クロモリスHR RP-18e(50-4,6mm);移動相A:0.05%HCOOH、H2O中;B:0.04%HCOOHおよび1%H2O、ACN中;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000、amuポジティブ;1%→100%B:0→2,0min;100%B:2,0→2,5min

RT(min):1.41;M+H:1048.1、純度:97.9%

【０３５２】

ステップ2:化合物11

【化２３】



ジクロロメタン(5.00ml)中の化合物10(162.00mg;1.00eq)の懸濁液に、1,4-ジオキサン(682.43µl、20.00eq)中の4.0M塩化水素溶液を追加し、それを室温で3.5時間撹拌し、反応をLC-MSによってモニタリングした。完了後に、反応混合物を真空下で

濃縮し、クルードな生成物を分取HPLCによって精製した。生成物を含有する画分を組み合わせ、凍結乾燥して、化合物11のトリフルオロ酢酸塩を黄色固体として与えた。

【０３５３】

収量:113mg;0.11mmol。

収率:77.0%

【０３５４】

分析データ:

LCMS:カラム:クロモリスHR RP-18e(50-4,6mm);移動相A:0.05%HCOOH、H2O中;B:0.04%HCOOHおよび1%H2O、ACN中;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000、amuポジティブ;1%→100%B:0→2,0min;100%B:2,0→2,5min

RT(min):1.22;M+H:948.0、M+2H:474.8;純度:98.8%

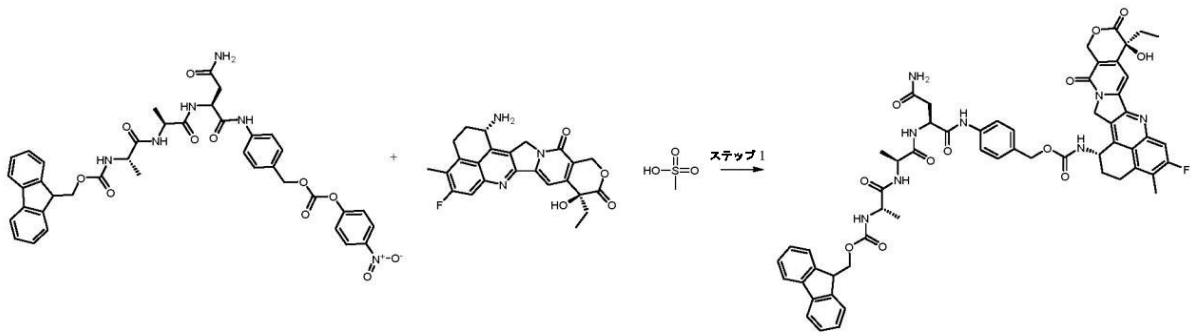
【０３５５】

^{1}H NMR (700 MHz,DMSO-d6)δ 12.93 - 12.79 (m,1H),9.14 (s,1H),8.61 (t,J = 5.8 Hz,1H),8.41 (t,J = 5.9 Hz,1H),8.14 (s,1H),8.05 (d,J = 8.8 Hz,1H),8.03 - 7.93 (m,3H),7.79 (d,J = 10.8 Hz,1H),7.31 (s,1H),7.13 (s,2H),6.58 - 6.47 (m,1H),5.80 - 5.61 (m,1H),5.48 - 5.40 (m,2H),5.31 - 5.24 (m,3H),5.08 (d,J = 12.2 Hz,1H),5.03 (d,J = 12.3 Hz,1H),4.91 (d,J = 7.7 Hz,1H),3.96 (d,J = 5.8 Hz,2H),3.95 - 3.86 (m,3H),3.62 (q,J = 5.8 Hz,2H),3.43 (t,J = 9.3 Hz,1H),3.41 (t,J = 8.5 Hz,1H),3.35 (t,J = 9.0 Hz,1H),3.27 - 3.20 (m,1H),3.15 - 3.09 (m,1H),2.38 (s,3H),2.23 - 2.13 (m,2H),1.93 - 1.81 (m,2H),0.88 (t,J = 7.3 Hz,3H).

【０３５６】

例3:レグマインによって切断可能なリンカーを有する薬物-リンカー化合物の合成:薬物-リンカー化合物2(DL2)

【化２４】

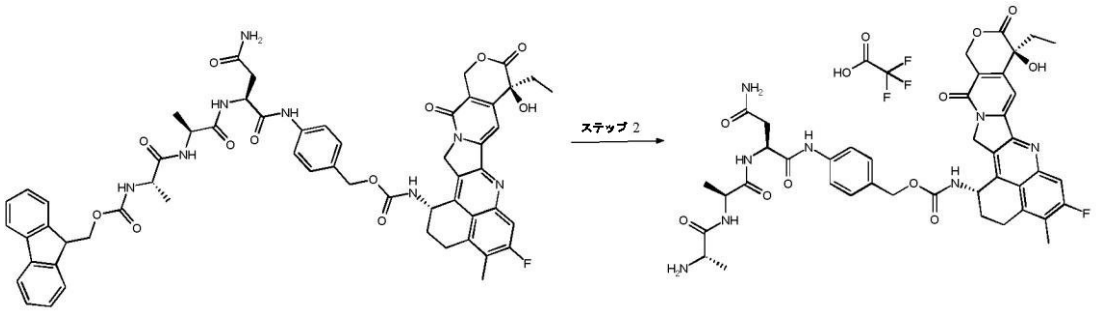


ステップ1

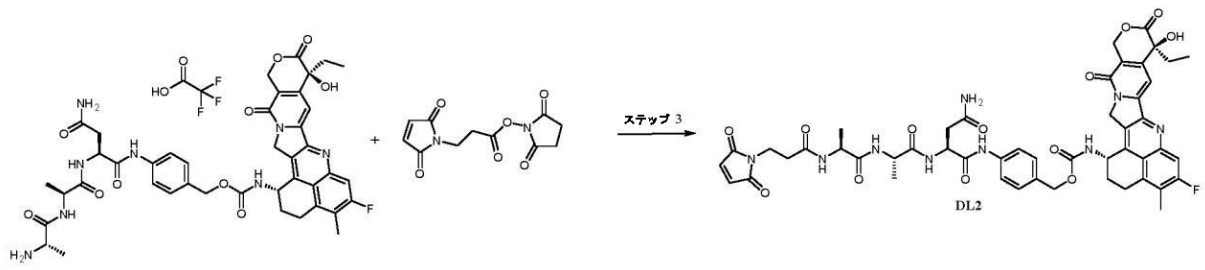
{4-[(2S)-3-カルバモイル-2-[(2S)-2-[(2S)-2-({[(9H-フルオレン-9-イル)メトキシ]カルボニル}アミノ)プロパンアミド]プロパンアミド]プロパンアミド]フェニル}メチル4-ニトロフェニルカーボネート(400mg;0,52mmol;1,00eq.)(Levena Biopharma USから市販)をN,N-ジメチルホルムアミド(5,00ml)に溶解した。エキサテカンメシレート(277,30mg;0,52mmol;1,00eq.)、N-エチルジイソプロピルアミン(0,27ml;1,57mmol;3,00eq.)および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)(3,52mg;0,03mmol;0,05eq.)を追加した。反応混合物を室温で一晩撹拌した。LC/MSは完全な変換を指示した。

クルードな反応混合物を分取HPLCによって精製し、凍結乾燥し、365mg(0.343mmol)の(9H-フルオレン-9-イル)メチル((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-アミノ-1-((4-((((((1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル)カルバモイル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-1,4-ジオキソブタン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)カルバメートを生

じた。
LC/MS:[M+H]=1064.2
【０３５７】
分取HPLC:
カラム:sunfire分取c18 obd - 75.0g(250bar)
溶媒A:水、0.1%TFA、溶媒C:
溶媒B:アセトニトリル、0.1%TFA
【化２５】



【０３５８】
ステップ2
(9H-フルオレン-9-イル)メチル((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-アミノ-1-((4-(((((1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル)カルバモイル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-1,4-ジオキソブタン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)カルバメート(365mg;0,34mmol;1,00eq.)をN,N-(4,00ml)に溶解した。合成のためのピペリジン(0,07ml;0,69mmol;2,00eq.)を追加し、反応溶液をrtで1h撹拌した。
【０３５９】
反応混合物を分取HPLCによって精製し、300mg(0.314mmol)の4-((S)-4-アミノ-2-((S)-2-((S)-2-アミノプロパンアミド)プロパンアミド)-4-オキソブタンアミド)ベンジル((1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル)カルバメートを生じた。
LC/MS:[M+H]:841.3
【０３６０】
精製のための分取HPLC:
RediSepカラム:C18 130g
SN:E0410A0D24BE1ロット:262118923W
流速:75ml/min
条件 - 体積:390.0ml
溶離液:A1 水、0.1%TFA
溶離液:B1 アセトニトリル、0.1%TFA
【化２６】



【０３６１】
ステップ3
N,N-ジメチルホルムアミド(20ml)中の4-((S)-4-アミノ-2-((S)-2-((S)-2-アミノプロパンアミド)プロパンアミド)-4-オキソブタンアミド)ベンジル((1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル)カルバメート(571mg;0,60mmol;1,00eq.)の溶液に、N-エチルジイソプロピルアミン(203μl;1,20mmol;2,00eq.)およびN-スクシンイミジル3-マレイミドプロピオネート(162mg;0,60mmol;1,00eq.)を追加した。それから、反応混合物を10min撹拌し、LC/MSによってモニタリングした。

【０３６２】
反応混合物を分取HPLCによって精製し、378mg(0.35mmol)のDL2を生じた。
LC/MS:[M+H]:992.4
精製のための分取HPLC:
RediSepカラム:C18 86g
SN:E0410A8B46130ロット:281729189W
流速:60ml/min
条件 - 体積:264,0ml
溶離液1:A1 水、0.1%TFA
溶離液2:B1 アセトニトリル、0.1%TFA

【０３６３】
シークエンスアナリティクス:
方法の情報:A:H2O+0,05%HCOOH ¦ B:MeCN+0,04%HCOOH+1%H2O
T:40℃ ¦ 流速:3,3ml/min ¦ MS:100-2000amuポジティブ
カラム:クロモリスHR RP-18e 50-4,6mm
0%→100%B:0→2.0min｜100%B:2,0→2,5min

【０３６４】
例4:免疫抱合体の調製:mAb1(ADC1と言われる)およびmAb1-M(もたらされる免疫抱合体はADC1-Mと言われる)、mAb4-M(もたらされる免疫抱合体はADC4-Mと言われる)、およびmAb6-M(もたらされる免疫抱合体はADC6-Mと言われる)のグルクロニドに基づく抱合体
次の方法はmAb1(もたらされる免疫抱合体はADC1と言われる)の文脈において記載するが、同じ方法を、mAb1-M(もたらされる免疫抱合体はADC1-Mと言われる)、mAb4-M(もたらされる免疫抱合体はADC4-Mと言われる)、およびmAb6-M(もたらされる免疫抱合体はADC6-Mと言われる)にもまた使用し得る。

【０３６５】
4.1 抱合プロセス
抗体調製
抗体mAb1(本明細書において上で定められている通り)を、抱合に先立つ3日まで2～8℃で解凍し、使用まで2～8℃で保存した。mAb(＞10g)を、使用に先立って、抱合の日に室温で平衡化した。mAb(9.6mg/mL)を小分けし(10.0g、1041.7mL)、抱合緩衝剤(200mMヒスチジン、pH6.5)を使用して5.59mg/mLに希釈した。mAb溶液を3LのChemglassジャケット反応器に追加し、50rpmで撹拌しながら25±2℃に設定した。

【０３６６】
抗体の還元
7.0mol eq.(9.7mL)の50mM TCEP溶液(抱合緩衝剤中の50mM TCEP)をmAb溶液バイアルに追加し、反応が25±2℃で3時間進むことを許した。

【０３６７】
抱合
式(X)の薬物-リンカー化合物1(DL1)を秤取し、DMSOに溶解して、20mM溶液を調

製した。90%(148.6mL)の要求されるDMSOを反応器に追加した。DMSO追加の直後に、10.0モル当量(38.2mL)の20mM薬物-リンカー溶液を反応器に追加した。それから、10%(18.2mL)の残りの要求されるDMSOを使用して、薬物-リンカーバイアルをすすいで、完全な移入を保証した。最終追加後に、反応が25±2℃で1時間進むことを許した。抱合の間の総体積は1997.0mLであった。

【0368】

注:反応物の総体的なDMSO濃度は10%(v/v)であった(DMSO+薬物リンカー溶液)。

【0369】

クエンチ

35mol eq.(48.5mL)の50mM NACを反応器に追加し、反応が25±2℃で30分間進むことを許した。

【0370】

濾過

濾過されたクルードな抱合体溶液を反応器から移し、それから、Millipak Gamma Gold 60(MPGL06GH2)を使用して濾過して、1993.6mL(フィルターロード:324.7g/m2[タンパク質]、66.5L/m2[溶液])の濾過されたクルードな抱合体を与えた。

【0371】

ダイアフィルトレーション

濾過されたクルードな抱合体溶液を、Pellicon 3(30kDa)Biomax膜(1×0.11m2、300LMH(550mL/min)、16psiのTMP、実際のローディング88.5g/m2)によって緩衝剤交換した(DV=1993.6mL)。ダイアフィルトレーション緩衝剤(10mMヒスチジン、pH5.5)を使用して、クルードな抱合体を16ダイアボリュームで緩衝剤交換した。緩衝剤交換後に、溶液を≧25mg/mLに濃縮し、ボトルに移し、膜をダイアフィルトレーション緩衝剤でフラッシュした。UF/DFから回収された総体積は361.5mLであった。

【0372】

製剤化

濃縮されたADC(すなわちADC1)を、112.1mLのダイアフィルトレーション緩衝剤(10mMヒスチジン、pH5.5)で20.0mg/mLに希釈した。もたらされた溶液を、157.6mLの4×製剤緩衝剤(10mMヒスチジン、12%(w/v)トレハロース二水和物、400mM NaCl、pH5.5)で15.0mg/mLに希釈し、最終的な標的バルク原薬(BDS)濃度の15.0mg/mLとした。

【0373】

濾過

最終的な製剤されたADCを、0.2μm Millipak Gamma Gold 40(MPGL04GH2)フィルターを使用して濾過して、619.6mL(フィルターロード:464.6g/m2[タンパク質]、31.0L/m2[溶液])のADC1 BDSを生じた。材料をHDPEボトルに詰め、≦-65℃で保存した。

【0374】

4.2 方法:原薬のキャラクタリゼーション:ADC1

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)法

SEC法パラメータ

波長　280nm

カラム　Tosoh TSKgel 7.8mm×300mm、5μm(P/N0008541)

移動相　0.14M一塩基性リン酸カリウム

50mM一塩基性リン酸ナトリウム

0.06M二塩基性リン酸カリウム

0.25M塩化カリウム

5%IPA

注入体積　20μL

温度　25℃

流速　0.5mL/min
実行時間　30min
ストックmAb、UF後の抱合体、および最終的なBDSの純度を示す典型的なSECクロマトグラム:図14。
【０３７５】
上で示されたBDS材料について、1.7％のHMWSおよび96.9％の単量体純度が報告された。
逆相HPLC(RP-HPLC)法
RP-HPLC法パラメータ
波長　280nm
カラム　PLRP-S 1000Å(50×2.1mm、8μm)カラム、Agilent(P/N PL1912-1802)
移動相A　0.1％ギ酸、0.01％TFAの水中
移動相B　0.1％ギ酸、0.01％TFAのACN中
勾配
【表Ｄ】

時間 (min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	80	20
3.00	80	20
20.00	0	100
22.00	80	20
26.00	0	100
80% A および 20% B まで4min平衡化		

注入体積　10μL
カラム温度　80℃
流速　1.0mL/min
実行時間　30min
【０３７６】
試料調製　試料を2mg/mLに希釈し、40μLをマイクロ遠心管に追加する。60μLの大凡8Mグアニジン HCl、大凡130mMトリス、大凡1mM EDTA、pH7.6の緩衝剤を追加する。2μLの500mM DTTを追加し、ボルテックスして混合する。試料を37±2℃で30±2minインキュベーションする。
【０３７７】
軽および重鎖の分離を示す典型的なRP-HPLCクロマトグラム:図15。クロマトグラムは、ストックmAb、クルードなADC、および最終的なBDSの重ね合わせを示す。
【０３７８】
上のADC1のBDS材料では、7.9のDARが報告された。
遊離薬物方法。
遊離薬物の方法のパラメータ
波長　254nm
カラム　Phenomenex Gemini、C18、2×150mm、3μm(P/N00F-4439-B0)
移動相A　0.1％ギ酸、水中
移動相B　0.1％ギ酸、アセトニトリル中
勾配

【表Ｅ】

時間 (min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
95% Aまで3min平衡化		

注入体積　10.00μL
カラム温度　50℃
流速　0.75mL/min
試料調製　タンパク質ドロップ:100μLの原薬+250μLの冷MeOH+50μLの3M $MgCl_2$。20,000rpmで10minスピン。

【０３７９】

標準の調製　20μLの20mM DL1(DMSO中の薬物-リンカー化合物1)+20μLのDMSO+40μLのMeOH+20μLの200mM NACを、ダイアフィルトレーション緩衝剤中で混合する。一晩インキュベーションして、4mM DL-NACを与える。MeOHによって4mM DL-NACを希釈して、4μM DL-NAC標準を与える。

【０３８０】

NAC標準および最終的なBDSの遊離薬物レベルを示す典型的なクロマトグラム:図16。

【０３８１】

上に示されたADC1のBDS材料では、2.4%(モル比)よりも下の残存する遊離薬物レベルが報告された。

【０３８２】

例5:免疫抱合体の調製:mAb1のペプチドに基づく抱合体(ADC2と言われる)

5.1 抱合プロセス

抗体調製

抗体mAb1(本明細書において上で定められている通り)を、抱合に先立つ3日まで2～8℃で解凍し、使用まで2～8℃で保存した。mAb(＞9.5g)を、使用に先立って抱合の日に室温で平衡化した。mAb(9.6mg/mL)を小分けし(9.5g、989.6mL)、抱合緩衝剤(200mMヒスチジン、pH6.5)を使用して5.59mg/mLに希釈した。mAb溶液を3LのChemglassジャケット反応器に追加し、50rpmで撹拌しながら25±2℃に設定した。

【０３８３】

抗体の還元

8.0mol eq.(10.5mL)の50mM TCEP溶液(抱合緩衝剤中の50mM TCEP)をmAb溶液バイアルに追加し、反応が25±2℃で3時間進むことを許した。

【０３８４】

ダイアフィルトレーション

還元されたmAb溶液を6DV(DV=1706.9mL)に対して緩衝剤交換した。Pellicon 3(30kDa)Biomax膜を使用した(1×0.11m2、300LMH(550mL/min)、16psiのTMP、実際のローディング86.3g/m2。抱合緩衝剤(200mMヒスチジン、pH6.5)を使用して、還元された抗体を緩衝剤交換した。緩衝剤交換後に、還元されたmAb溶液を反応器に再び回収し、膜を抱合緩衝剤でフラッシュした。

抱合

薬物-リンカー化合物2(DL2)を秤取し、DMSOに溶解して、20mM薬物-リンカー溶液を調製した。90%(142.6mL)の要求されるDMSOを反応器に追加した。DMSO追加の直後に、9.5モル当量(31.2mL)の20mM薬物-リンカー溶液を反応器に追加した。それから、10%(15.8mL)の残りの要求されるDMSOを使用して、薬物-リンカーバイアルを

すすいで、完全な移入を保証した。最終追加後に、反応が25±2℃で2時間進むことを許した。抱合反応の間の総体積は1894.5mLであった。
【０３８５】
クエンチ
35mol eq.(46mL)の50mM NACを反応器に追加し、反応が25±2℃で45分間進むことを許した。
【０３８６】
濾過
クルードな抱合体溶液を反応器から移し、Millipak Gamma Gold 60(MPGL06GH2)を使用して濾過して、1897.3mL(フィルターロード:308.9g/m2[タンパク質]、63.2L/m2[溶液])の濾過されたクルードな抱合体を生じた。
【０３８７】
ダイアフィルトレーション
濾過されたクルードな抱合体溶液を、Pellicon 3(30kDa)Biomax膜(1×0.11m2、300LMH(550mL/min)、16psiのTMP、実際のローディング84.2g/m2)によって緩衝剤交換した(DV=1897.3mL)。初期の12DVは抱合緩衝剤(200mMヒスチジン、pH6.5)を使用して行い、それから、追加の8DVでは標準ダイアフィルトレーション緩衝剤(10mMヒスチジン、pH5.5)に切り替えた。緩衝剤が緩衝剤交換を完了した後に、溶液を≧25mg/mLに濃縮し、ボトルに移し、膜をダイアフィルトレーション緩衝剤でフラッシュした。UF/DFから回収した総プール体積は335.7mLであった。
【０３８８】
製剤化
濃縮されたADC(すなわちADC2)を、84.7mLのダイアフィルトレーション緩衝剤(10mMヒスチジン、pH5.5)で20.0mg/mLに希釈した。もたらされた溶液を138.6mLの4×製剤緩衝剤(10mMヒスチジン、12%(w/v)トレハロース二水和物、400mM NaCl、pH5.5)で希釈し、最終的な標的BDS濃度の15.0mg/mLとした。
【０３８９】
濾過
最終的な製剤されたADCを、Millipak Gamma Gold 60(MPGL06GH2)を使用して無菌的に濾過して、549.3mL(フィルターロード:411.4g/m2[タンパク質]、27.5L/m2[溶液])のADC2 BDSを生じた。材料をHDPEボトルに詰め、≦-65℃で保存した。
5.2 方法:原薬のキャラクタリゼーション:ADC2
サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)法
SEC法パラメータ
波長　280nm
カラム　Tosoh TSKgel 7.8mm×300mm、5μm(P/N0008541)
移動相　50mM一塩基性リン酸ナトリウム
0.4M過塩素酸ナトリウム
pH　6.3
注入体積　1μL
カラム温度　25℃
流速　0.5mL/min
実行時間　30min
【０３９０】
ストックmAbおよび最終的なBDSの純度を示す典型的なSECクロマトグラム:図17。
【０３９１】
上で示されたADC2のBDS材料では、4.2%のHMWSおよび95.8%の単量体純度が報告された。
逆相HPLC(RP-HPLC)法
RP-HPLC法パラメータ

波長　280nm
カラム　PLRP-S 1000Å(50×2.1mm、8μm)カラム、Agilent(P/N PL1912-1802)
移動相A　0.1%ギ酸、0.01%TFAの水中
移動相B　0.1%ギ酸、0.01%TFAのACN中
勾配
【表F】

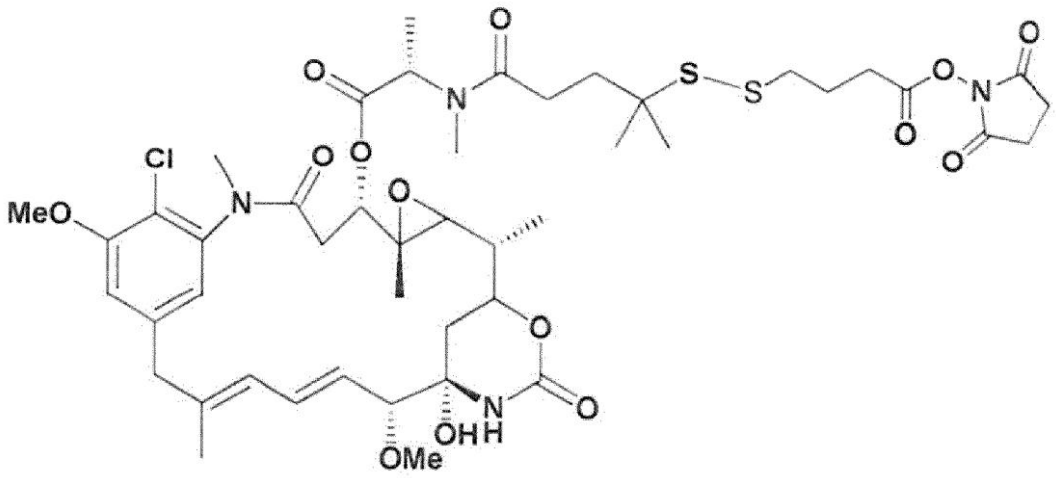
時間 (min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	80	20
3.00	80	20
20.00	0	100
22.00	80	20
26.00	0	100
80% A および 20% B まで4min平衡化		

注入体積　10μL
カラム温度　80℃
流速　1.0mL/min
実行時間　30min
【0392】
試料調製　試料を2mg/mLに希釈し、40μLをマイクロ遠心管に追加する。60μLの大凡8Mグアニジン HCl、大凡130mMトリス、大凡1mM EDTA、pH7.6の緩衝剤を追加する。2μLの500mM DTTを追加し、ボルテックスして混合する。試料を37±2℃で30±2minインキュベーションする。
【0393】
軽および重鎖の分離を示す典型的なRP-HPLCクロマトグラム:図18。クロマトグラムは、ストックmAbおよび最終BDSの重ね合わせを示す。
【0394】
上のADC2のBDS材料では、7.6のDARが報告された。
遊離薬物方法
遊離薬物の方法のパラメータ
波長　254nm
カラム　Phenomenex Gemini、C18、2×150mm、3μm(P/N00F-4439-B0)
移動相A　0.1%ギ酸、水中
移動相B　0.1%ギ酸、アセトニトリル中
勾配
【表G】

時間 (min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
95% A まで3min平衡化		

注入体積　10.00μL
カラム温度　50℃

流速　0.75mL/min
試料調製　タンパク質ドロップ:100μLの原薬+250μLの冷MeOH+50μLの3M $MgCl_2$。20,000rpmで10minスピン。
【0395】
標準の調製　20μLの20mM DL2(DMSO中の薬物-リンカー化合物2)+20μLのDMSO+40μLのMeOH+20μLの200mM NACを、ダイアフィルトレーション緩衝剤中で混合する。一晩インキュベーションして、4mM DL-NACを与える。MeOHによって4mM DL-NACを希釈して、4μM DL-NAC標準を与える。
【0396】
NAC標準および最終的なBDSの遊離薬物レベルを示す典型的なクロマトグラム:図19。
【0397】
上で示されたADC2のBDS材料では、1.9%(モル比)よりも下の残存する遊離薬物レベルが報告された。
【0398】
例6:ADC SAR408701の類似体
6.1 抗体
さらなる比較実験の目的で、Sanofiの抗CEACAM5 ADC SAR408701類似体を、次の配列を有するモノクローナル抗体に基づいて調製した:
重鎖:配列番号25
軽鎖:配列番号26
【0399】
6.2 薬物-リンカー化合物
上で言及された抗体に抱合される薬剤-リンカー分子として、SPDB-DM4(Levena Biopharmaから得られた)を使用した:
製品名:SPDB-DM4
構造:
【化27】



予想される質量:994.35
観察される平均質量:995.5 (Ms+H^+)
質量スペクトル分析:一貫し、正しいMWを見せた
HPLC分析:純度＞95%
外見:白色の粉末
【0400】
6.3 抱合
抗体を抱合に先立って3日まで2～8℃で解凍し、使用まで2～8℃で保存した。抗体(175mg)を、使用に先立って抱合の日に室温で平衡化した。抗体(7.9mg/mL)を、抱合緩

衝剤(PBS、pH7.4)およびSPDB-DM4(Levena Biopharma)の5mM DMSO溶液(抗体に対して相対的に8モル当量)を使用して5mg/mLに希釈した。反応溶液を混合し、25℃で4hインキュベーションした。

【０４０１】

6.4 分取サイズ排除クロマトグラフィー、脱塩および濾過

反応混合物を分取サイズ排除クロマトグラフィーを使用して精製した。Superdex 200pg(50/60)カラムをAkta Avant 25システム(GE Healthcare)に接続し、製造者の指示に従ってPBS、pH7.4によって平衡化した。続いて、反応混合物を注入し、10ml/minの流速でPBS、pH7.4をランニング緩衝剤としてカラムに流した。ADC含有画分を280nmのUV光吸収によって決定し、プールし、濃縮した。ADC材料を、製造者の指示に従って、15mlのAmicon Ultra 50kDaカットオフ遠心用デバイス(Merck Millipore)を使用して濃縮した。濃縮されたADC材料を、HiPrep 26/10脱塩カラム(GE Healthcare)を使用して、10ml/minの流速で、Akta Avant 25システム(GE Healthcare)によって、製造者の指示に従って、製剤緩衝剤(10mMヒスチジン、130mMグリシン、5%スクロース、pH5.5)に移した。もたらされたADC材料を0.2μmフィルター(Merck Millipore)を使用して濾過し、小分けし、続いて液体窒素中で急速凍結した。ADC材料の終濃度は5.82mg/mlであり、材料はさらなる使用まで-80℃に保たれた。この作業からもたらされるADCは、本明細書では「ADC SAR DM4」または簡潔に「ADC SAR」ともまた言われる。このADCはSAR408701の類似体である。

【０４０２】

例7:mAb1およびSPDB-DM4に基づくADC

別のADCを、抗体mAb1(本明細書において上に記載された通り)と、薬物-リンカー化合物SPDB-DM4、すなわち上に記載されたADC SAR DM4と同じ薬物-リンカー化合物とに基づいて調製した。この作業からもたらされるADCは、本明細書では「ADC mAb1 DM4」と言われ、次の通り調製された:

7.1 使用された材料:

・抗体:mAb1、1mg/mL、10mM HEPES、pH5.8中

・抱合緩衝剤:10mM HEPES、pH5.8

・薬物-リンカー化合物:SPDB-DM4、2mg/mL、DMF中

【０４０３】

7.2 方法:

・抱合:約30倍モル過剰の薬物-リンカー分子を抱合に使用し(75mL抗体+7.1mLのSPDB-DM4薬物-リンカー)、遅い揺動をしながら室温で5hインキュベーションした。

・精製:ADCを20mMヒスチジン、150mM NaCl、pH6.0に緩衝剤交換して、遊離薬物を除去した。

・製剤緩衝剤:20mMヒスチジン、150mM NaCl、pH6.0

【０４０４】

7.3 精製されたADC分析の詳細:

・最終収量:40mg

・濃度:2.2mg/mL

・DAR:4.4

【０４０５】

例8:ADC1およびADC2からの薬物放出のキャラクタリゼーション

8.1 材料および方法

8.1.1 試験品

【表Ｈ】

ADC番号	ADCの簡単な説明
ADC1	mAb1- グルクロニドーエキサテカン（上の例4もまた参照）
ADC2	mAb1-AAN- エキサテカン（上の例5もまた参照）
ADC3	抗 CEACAM5-CL2A-SN-38 ADC (Creative Biolabs, CAT#: ADC-091LCT。CL2Aリンカーを介してSN38に抱合化されたラベツズマブのようなヒト化IgG1モノクローナル抗CEACAM5抗体）

【０４０６】

8.1.2 材料

全ての試薬および緩衝剤は製造者の指示に従って保存し、バッチ有効期限前に使用した。

【表Ｉ】

略称	起源および内容
ヒト肝臓リソソーム	Sekisui Xenotech, H0610.L
レグメインアッセイ緩衝液	50mM MES, 250 mM NaCl
10 x 異化緩衝液	Sekisui Xenotech
ヒト血清	Biowest, S4200-100, Lot # S15594 S4200
マウス血清	Biowest, S2160-100, Lot # S18169 S2160
カニクイ血清	Abcam, cat: ab155109, lot: GR316568-1
HEPES	Sigma, cat: H3784-100g lot: SLBR6536V
PIC III	Calbiochem, プロテアーゼ阻害剤カクテルセットIII, EDTA不含 , #539134
メタノール	Merck, cat: 1060092500

【０４０７】

8.1.3 装置

【表Ｊ】

装置	サプライヤー
CO2インキュベーター	Heraeus
サーモミキサーコンパクト	Eppendorf
HTC PALオートサンプラー	CTCアナリティクス
1200 HPLC	Agilent Technologies
API4000トリプル四重極	Sciex

【０４０８】

8.1.4 手順

8.1.4.1 血清試料調製

2M HEPES溶液:52.1gのHEPESを75mLのミリQ水および15mLの25%HClに溶解し、pH7.55に調整し、100mLまで追加した。この溶液を15%v/vで血清と混合して、pH7.3～7.4の安定化された血清を得た。Biowestからのヒト血清(ロットno.S15594S4200)を解凍した。100mLの血清を15mLの2M HEPES緩衝剤と混合した。Biowestからのマウス血清(ロットno.S18169S2160)を解凍した。100mLの血清を15mLの2M HEPES緩衝剤と混合した。カニクイ血清を解凍し、8.5mLの血清を1.5mLの2M HEPES緩衝剤と混合した。pHを測定し(7.37)、血清を無菌濾過した。2mLのアリコートを-20℃で凍結した。

【０４０９】

調製された血清をRTで解凍した。続いてのLC-MSによる遊離ペイロードアナリティクスのために、所望のADCタンパク質濃度を180μg/mLで三反復で調製した。ADCを血清に追加した後に、個々のバッチを混合し、20μLのアリコートに分けた。加えて、各ADCについて20μLの1つの96h試料をピペット採取し、全体について回収率を測定するための精密分析に使用した。0h試料を-80℃で直接凍結し、残りの試料を37℃および5%CO2でインキュベーションし、反応を2/4/6/24/48/72、96時間インキュベーションにおいて-80℃への保存によって停止した。

【０４１０】

8.1.4.2 ヒト肝臓リソソーム試料調製

アッセイ緩衝剤を使用してpHをpH5.0またはpH4.0どちらかに調整した。リソソーム安定性調製物:80μLのヒト肝臓リソソームを、ADC1について例示的に示される通り三反復の測定(n=3)のために調製した:2.76μLのADC1+6μLヒト肝臓リソソーム+71.2μLレグメインアッセイ緩衝剤。MeOH+PIC(1:200)の調製: 10μLのPIC III+1990μLのMeOH。37℃に予熱されたThermomixにEppendorfチューブを移すことによって反応を開始した。続いて、10μLのアリコートを0、1、2、4、24および48時間後に抜き、40μLのPIC IIIと混合した(1:200)。

【０４１１】

8.2 結果

ヒト、マウスおよびカニクイ血清でのADCの安定性(図20).抱合されたエキサテカン濃度を、遊離エキサテカンを使用して計算した(初期用量 大凡10μM)(正規化されたデータ)。類似のプロファイルが、ヒト、カニクイ、およびマウス血清で得られた。軽微な弾頭放出のみが観察され、ADC2(96hで初期の抱合ペイロードを5.9%不含)およびADC1(

1.4%)のマウス血清で最も顕著であった。

【０４１２】

マウス血清および緩衝剤についてのADC3対照安定性(図21).抱合されたSN38濃度を、遊離SN38を使用して計算した(初期用量50μg/mLのADCタンパク質濃度)(正規化されていない)。両方のマトリックスについて、顕著なSN-38放出が観察された。

【０４１３】

ヒト肝臓リソソーム(pH5.0)におけるADC1およびADC2のペイロード遊離プロファイル(図22).抱合された薬物濃度は、例えば、遊離エキサテカン(初期濃度 大凡10μMエキサテカン)を使用して計算した。正規化されたデータ。ADC1-およびADC2の切断によって媒介されるペイロード遊離については、中間レベルのペイロード放出が観察された(両方とも初期総抱合ペイロードの 大凡40%)。

【０４１４】

ADC異化産物プロファイリングは、リソソーム放出産物としての遊離エキサテカンを確認している(図23)。主要な放出産物としてのエキサテカンを確認するために、ヒトリソソーム抽出物においてADC1異化産物プロファイリング研究を行った。これにおいては、種々の時点でのTIC-MSおよび抽出イオンクロマトグラムの比較が、予想されるエキサテカン異化産物がインキュベーションの間にADC1から続いて放出されるということを示した(0h、4h、24h)。保持時間9.33min、検出された質量m/z436.1671([M+H]$^+$、$C_{24}H_{23}O_4N_4F$)および検出された異化代謝産物のMS/MSスペクトルは、エキサテカンのものと整合する。

【０４１５】

例9:ADC1およびADC2は高い力価でin vitroのがん細胞を特異的に死滅させる

ヒトがん細胞株を使用して、ADC1およびADC2ががん細胞を死滅させるポテンシャルを評価した。ADC1およびADC2は、異なるCEACAM5陽性細胞株に対するサブナノモーラーのin vitro力価およびCEACAM5陰性細胞株に対する軽微な効果を示した(下の表2)。例示的な用量反応曲線(図24A/B)に示される通り、ADC1およびADC2は、CEACAM5陽性細胞株SK-CO-1およびSNU-16に対して非常に強力であった。対照的に、抗原陰性MDA-MB-231に対するADC1およびADC2の効果は、試験された最も高い濃度に限定された(図24C)。

【０４１６】

ADC1およびADC2と同様にそれぞれのリンカーおよびペイロードを利用するリツキシマブアイソタイプ対照ADCは、SK-CO-1細胞株に対してはるかに低い効果を示した(図25)。

【０４１７】

結論として、ADC1およびADC2は、in vitroのCEACAM5発現ヒトがん細胞株を高い力価で特異的に死滅させる。

【表２】

	MKN-45 IC50 [M]; N≥3	SNU-16 IC50 [M]; N≥3	SK-CO-1 IC50 [M]; N≥4	LS174T IC50 [M]; N≥3	MDA-MB-468 IC50 [M]; N≥2	MDA-MB-231 IC50 [M]; N≥3
ADC1	6.2E-10 (-78%)	3.2E-10 (-91%)	8.5E-11 (-97%)	3.8E-10 (-72%)	>1E-08 (-85%)	>1E-08 (-67%)
ADC2	4.7E-10 (-90%)	2.8E-10 (-96%)	6.9E-11 (-98%)	2.8E-10 (-81%)	6.7E-09 (-97%)	1.5E-08 (-84%)
ペイロード	8.9E-10 (-96%)	4.4E-10 (-99%)	2.5E-10 (-99%)	5.3E-10 (-88%)	2.1E-10 (-99%)	9.3E-10 (-92%)
CEACAM5	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性

【０４１８】
表2.複数のヒト細胞株に対するADC1、ADC2および遊離ペイロードの力価。最も高い試験された化合物濃度における無処置の対照と比較された最大の効果が括弧内に指示されている。各細胞株について、CEACAM5発現が指示されている。
【０４１９】
方法 - 生存率アッセイ:
がん細胞株に対するADCの細胞傷害効果を、細胞生存率アッセイによって測定した。処置の前日に、細胞を96ウェルプレートに90μLの体積で播種した。試験化合物(ADCまたは遊離ペイロード)を、細胞培養培地によって出発濃度の10倍で製剤した。試験化合物を段階希釈し(1:4)、10μLの各希釈物を三反復で細胞に追加した。プレートをCO2インキュベーターで37℃で6日間培養した。細胞生存率測定のためには、Cell Titer-Glo(登録商標)試薬(Promega(商標)Corp、マディソン、WI)を各ウェルに追加し、プレートを製造者の指示に従って処理した。ルミネッセンスシグナルをVarioskanプレートリーダー(Thermo Fisher)を使用して測定した。ルミネッセンス読み取り値を、無処置細胞に対して相対的な%生存率に変換した。GraphPad Prismを使用して、log(阻害剤)対応答、可変勾配、4パラメータフィット式を使用して、非線形回帰分析によってデータをフィットした。データは、相対的な細胞生存率%対化合物のモル濃度として示され、エラーバーは三反復の標準偏差(SD)を指示する。複数の実験に由来するIC50の幾何平均値を計算した。
【０４２０】
上と同じ方法を使用して、ADC1およびADC2を、抗原陽性SK-CO-1および抗原陰性MDA-MB-231細胞株に対するそれらの細胞傷害効果の点で、ADC SAR DM4ともまた比較した。ADC1およびADC2は、それぞれSK-CO-1がん細胞に対してADC SAR DM4よりも2.9および2.7倍高い力価を示した(図26A)。抗原陰性MDA-MB-231に対する非特異的な効果は、ADC SAR DM4ではADC1およびADC2と比較してやや高かった(図26B)。ADC SAR DM4およびADC mAb1 DM4は、SK-CO-1に対して似通った力価を示し、ADC mAb1 DM4のやや高い力価の傾向を有した(図26A)。
【０４２１】
例10:ADC1およびADC2は、抗原陽性細胞との共培養において、抗原陰性細胞に対する

強力なバイスタンダー効果を媒介する

抗原陽性細胞に近接した抗原陰性細胞に対するバイスタンダー効果を媒介するADC1およびADC2のポテンシャルを、バイスタンダーアッセイで評価した。ADC1およびADC2は、CEACAM5陽性SK-CO-1の存在下でCEACAM5陰性MDA-MB-231細胞に対して強力なバイスタンダー効果を示した(図27A)。共培養実験は1nMのADC濃度で行った。これは、ADC1では、CEACAM5陽性SK-CO-1細胞生存率の最大の阻害を引き起こすが(図26A)、CEACAM5陰性MDA-MB-231細胞に対する効果を引き起こさない(図26B)。これらの知見と一致して、ADC1またはADC2の非特異的な効果は、バイスタンダーアッセイセットアップにおいて、MDA-MB-231のみ対照では観察されなかった(図27B)。

【０４２２】

結論として、ADC1およびADC2は、抗原陽性細胞との共培養において、抗原陰性がん細胞に対する強力なバイスタンダー効果を媒介する。これらの知見は、不均一な標的発現を有する腫瘍を有効に標的化するポテンシャルを指示している。

【０４２３】

同じ薬物-リンカーおよびFv領域を利用することに鑑みて、ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ならびにADC6-MおよびADC7-Mは、ADC1およびADC2のような類似の強力なバイスタンダー効果を媒介するということが予想される。

【０４２４】

ADC SARと比較して、ADC1およびADC2は、抗原陽性細胞との共培養において、抗原陰性細胞に対してはるかに強力なバイスタンダー効果を媒介した(図28A、図28B)。ADC SAR DM4に利用される薬物-リンカー分子(すなわちSPDB-DM4)を有するADC1およびADC2と同じ抗体(すなわちmAb1)を利用するADC mAb1 DM4もまた、ADC SAR DM4よりも顕著なバイスタンダー効果を示した(図28A、図28B)。これは、mAb1が、異なる抗体を利用するADC SARと比較してADC1およびADC2で観察される高いバイスタンダー効果に寄与するということを指示した。従って、ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M、およびADC7-Mもまた、ADC SARよりも強力なバイスタンダー効果を媒介するということが予想される。

【０４２５】

試験された全てのADCについて、バイスタンダー効果の程度は、一定数の抗原陰性細胞に追加される抗原陽性細胞の数を増加させることによって増加した(図28Aおよび図28Bを比較)。理論によって拘束されようとすることなしに、これは、より多くのADCがより多数の抗原陽性細胞によってプロセシングされてより多くの遊離ペイロードを放出し、これが抗原陰性細胞に対するバイスタンダー効果を担うことの結果であり得る。

【０４２６】

MDA-MB-231細胞単独では、試験されたADCの非特異的な効果は観察されなかった(図28C)。

【０４２７】

方法 - バイスタンダーアッセイ

抗原陽性がん細胞株との共培養における抗原陰性がん細胞株に対するADCの細胞傷害効果を、バイスタンダーアッセイによって測定した。1,000個のCEACAM5陰性MDA-MB-231細胞を、共培養実験では、ウェルあたり750個または3000個のCEACAM5陽性SK-CO-1細胞と共に播種した。対照として、1000個のMDA-MB-231細胞のみを並行して播種した。処置の前日に、細胞を96ウェルプレートに90μLの総体積で播種した。試験化合物を細胞培養培地中の1E-9Mの終濃度の10倍で製剤し、10μLを二反復で細胞に追加した。プレートをCO2インキュベーターで37℃で6日間培養した。

【０４２８】

免疫蛍光染色に先立って、培地を除去し、細胞を100%メタノール(-20℃)で30分間処置した。メタノール除去および1回のPBS洗浄ステップの後に、細胞を、PBS中の0.2%Triton X-100の2.5%パラホルムアルデヒド(PFA)によって室温で15分間処置した。溶液除去および1回のPBS洗浄ステップの後に、細胞を、PBS中の1%BSA/0.1%Twe

en/0.1%アジ化ナトリウムによって室温で少なくとも1時間処置した。抗原陽性および抗原陰性細胞を、10μg/mLのヒト抗CEACAM5(mAb1)一次抗体および1:2000希釈のロバ抗ヒトIgG蛍光(フィコエリトリン)標識二次抗体(Jackson ImmunoResearch、#709-116-149)による免疫蛍光染色によって識別した。1μg/mLのHoechst33342(Life technologies、cat#H3570)色素を使用した核染色によって細胞を同定した。染色は、1%BSA/0.1%アジ化ナトリウムPBS溶液中で室温で30分間実施した。二次抗体染色をHoechst色素染色と組み合わせた。染色ステップ間および後に、細胞をPBSで3回洗浄した。

【0429】

プレートを、共焦点定量画像サイトメーターCQ1(Yokogawa(登録商標)Electric Corporation、東京、日本)でイメージングした。分析はCQ1ソフトウェア(Yokogawa)テンプレート「Nucleus and pseudo-Cell body」から適合させられ、FCSエクスポートファイルがFlowJo(BD)を使用して分析された。核の周りの蛍光標識抗体による染色または染色の非存在に基づいて、抗原陽性細胞および抗原陰性細胞を区別し、定量した。棒グラフは、処置条件あたりの同定された抗原陽性および抗原陰性細胞の数を示す。

【0430】

例11:大腸がん(CRC)患者由来ゼノグラフト(PDX)マウスモデルにおけるADC1およびADC2の有効性

in vivoの抗腫瘍有効性をヒト患者由来CRCゼノグラフトモデルCOPF217(Shanghai LideBiotech CO.,LTD)において評価した。COPF217腫瘍フラグメントを、6から8週齢の免疫不全雌マウス(NU-Foxn1nu、Charles River)の右側腹部に皮下移植した。腫瘍が平均体積165mm^{3}に到達したときに、6匹のマウス/群を基剤(生理食塩水溶液)またはADC1もしくはADC2(それぞれ10mg/kgの用量;0日目)によって1回静脈内処置した。腫瘍の長さ(L)および幅(W)をキャリパーで測定し、式L×(W^2)/2を使用して腫瘍体積を計算した。

【0431】

10mg/kgの用量でのADC1またはADC2による単回処置は、有意な抗腫瘍効果に至った。2つの物質は、腫瘍の停滞に至る似通った効果を示す(図29)。ADC1またはADC2による処置は、体重に対する有意なインパクトを有さなかった(データは示さない)。

【0432】

他のCRC PDXモデルによるさらなる実験:

COPF217について上で記載されたものに対応する追加の実験では、ADC1による単回処置は、高いCEACAM5発現を有する12個の他のCRC PDXモデルにおいてもまた腫瘍停滞または腫瘍退縮をもたらした。

【0433】

例12:非小細胞肺がん(NSCLC)PDXマウスモデルにおけるADC1の有効性

in vivoの抗腫瘍有効性を、ヒト患者由来NSCLCゼノグラフトモデルLUPF160151(Shanghai LideBiotech CO.,LTD)において評価した。LUPF160151腫瘍フラグメントを、6から8週齢の免疫不全雌マウス(NU-Foxn1nu、Charles River)の右側腹部に皮下移植した。腫瘍が180mm^{3}の平均体積に到達したときに、5匹のマウス/群を基剤(生理食塩水溶液)またはADC1(6mg/kg;0日目)によって1回静脈内処置した。腫瘍の長さ(L)および幅(W)をキャリパーで測定し、式L×(W^2)/2を使用して腫瘍体積を計算した。

【0434】

6mg/kgの用量のADC1による単回処置は、体重に対するインパクトなしに(データは示さない)、有意な抗腫瘍効果に至った(図30)。モデルLUPF160151は不均一なCEACAM5発現を示し、CEACAM5陰性腫瘍細胞がCEACAM5陽性腫瘍細胞に隣接した。従って、このモデルにおけるADC1の良い有効性は、ADCの強力なバイスタンダー効果を指示している。

【0435】

例13:胃がんPDXマウスモデルにおけるADC1の有効性

in vivoの抗腫瘍有効性を、ヒト患者由来胃がんゼノグラフトモデルGAX066において評価した(Shanghai ChemPartner Co.,Ltd)。腫瘍フラグメントを、免疫不全雌マウス(Nu/Nuマウス、Beijing Vital River Lab Animal Technology Co.Ltd、18-22g)の右側腹部に皮下移植した。腫瘍が平均体積220mm^{3}に到達したときに、6匹のマウス/群を基剤(生理食塩水溶液)またはADC1(3または10mg/kg;0日目)によって1回静脈内処置した。腫瘍の長さ(L)および幅(W)をキャリパーで測定し、式L×(W^2)/2を使用して腫瘍体積を計算した。

【０４３６】

3または10mg/kgのADC1による単回処置は、体重に対するインパクトなしに(データは示さない)、有意な抗腫瘍効果を引き起こした(図31)。6つの腫瘍の5つでは、10mg/kgによる処置は完全な腫瘍退縮をもたらした。

【０４３７】

例14:膵臓細胞株由来腫瘍モデルにおけるADC3と比較したADC1の有効性

ADC3と比較したADC1の有効性を、ヒト膵臓細胞株由来ゼノグラフトモデルHPAF-II(ATCC、CRL-1997)において評価した。5×10^{6}のHPAF-II細胞を、6から8週齢の免疫不全雌マウス(Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu、Envigo)の右側腹部に皮下注射した。腫瘍が平均体積150mm^{3}に到達したときに、10匹のマウス/群を、基剤(生理食塩水溶液)またはADC1(1mg/kgまたは6mg/kg;0日目)またはADC3(1mg/kgまたは6mg/kg;0日目)によって1回静脈内処置した。腫瘍の長さ(L)および幅(W)をキャリパーで測定し、腫瘍体積をL×(W ^ 2)/2を使用して計算した。

【０４３８】

6mg/kgの用量のADC1による単回処置は、有意な抗腫瘍効果に至った。1mg/kgによる単回処置は軽度だが有意な一過性の抗腫瘍効果のみをもたらしたので、効果は用量依存的である。対照的に、同じ用量のADC3による単回処置は、どちらの用量でも有意な抗腫瘍効果を示さなかった(図32)。全ての処置は体重に対する有意な効果を有さなかった(データは示さない)。ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M、およびADC7-Mは、この点で、ADC1のように、ADC3に良く優っているということが予想される。

【０４３９】

例15:2つのCRC PDXマウスモデルにおけるADC SAR DM4と比較したADC1の有効性

in vivoの抗腫瘍有効性を、ヒト患者由来CRCゼノグラフトモデルCOPF230およびREPF210において評価した(Shanghai LideBiotech CO.,LTD)。6から8週齢の免疫不全雌マウス(NU-Foxn1nu、Charles River)の右側腹部に腫瘍フラグメントを皮下移植した。腫瘍が約170mm^{3}の平均体積に到達したときに、6匹のマウス/群を、基剤(生理食塩水溶液)、ADC1(6mg/kg)またはADC SAR DM4(6mg/kg)で1回(0日目)静脈内処置した。腫瘍の長さ(L)および幅(W)をキャリパーで測定し、式L×(W^2)/2を使用して腫瘍体積を計算した。

【０４４０】

ADC1による単回処置は、PDXモデルCOPF230(図33)およびREPF210(図34)の両方において有意な抗腫瘍効果に至った。対照的に、同じ用量のADC SAR DM4による単回処置は、CRC PDXモデルのどちらでも抗腫瘍効果を示さなかった(図33、図34)。体重に対する有意な効果は処置群のいずれかにおいて観察されなかった(データは示さない)。ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M、およびADC7-Mは、ADC1と同様に、この点で、ADC SAR DM4に良く優るということが予想される。

【０４４１】

例16:胃PDXマウスモデル(GAPF313)におけるADC SAR DM4と比較したADC1の有効性

in vivoの抗腫瘍有効性を、ヒト患者由来胃ゼノグラフトモデルGAPF313において評価した(Shanghai LideBiotech CO.,LTD)。6から8週齢の免疫不全雌マウス(NU-Foxn1nu、Charles River)の右側腹部に腫瘍フラグメントを皮下移植した。腫瘍が平均

体積約180mm^{3}に到達したときに、6匹のマウス/群を、0日目から開始して1週間おきに3回、基剤(生理食塩水溶液)、ADC1(4mg/kgまたは7mg/kg、Q2W×3)またはADC SAR DM4(4.7mg/kg、Q2W×3)によって静脈内処置した。腫瘍の長さ(L)および幅(W)をキャリパーで測定し、式L×(W^2)/2を使用して腫瘍体積を計算した。

【0442】

進行中の実験の暫定的なデータ分析は、このモデルにおけるADC1の明確な抗腫瘍有効性を実証し、ADC SAR DM4の効果を実証しない(図35)。全ての処置は良く忍容された(データは示さない)。ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M、およびADC7-Mは、ADC1と同様に、この点で、ADC SAR DM4に良く優るということが予想される。

【0443】

例17:ADC1の安全性プロファイル - カニクイザルによるパイロット毒性試験

安全性プロファイルを検討するために、ADC1を、カニクイザルへの30minのi.v.点滴によって、3週間間隔で3回(1、22、および43日目)、0、3、10、および30mg/kgの投与量で投与し、肉眼的および組織病理学的検査のために動物を50日目に　　殺した。結果として、ADC1が公知のADCの毒性の副作用によって影響されるある種の臓器において毒性を欠くという点で、ADC1は比較的好ましい安全性プロファイルを有するということが見出された。

【0444】

例18:改変された抗体およびトランスグルタミナーゼの発現および精製

次では、改変された抗体の発現および精製を記載する。これらの改変された抗体は、それぞれの抗体-薬物抱合体の生成に使用され得る。改変された抗体mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb4-M、mAb5-M、mAb6-M、およびmAb7-Mの特色を以下の表4において概説する。

【表４－１】

抗体／抗体ー薬物抱合体名称	抗体の特徴	好ましい薬物対抗体比、リンカーの型および薬物を包含する抗体ー薬物抱合体の特徴	mAb抗体の重鎖(HC)および軽鎖(LC)のアミノ酸配列
mAb1-M, ADC1-M	抗CEACAM5 mAb LALA　突然変異 YTE　突然変異	鎖間システイン抱合体化 DAR=8 マレイミドーbーグルクロニドーエキサテカン (DL1)	HC = 配列番号 34 LC = 配列番号 14
mAb2-M, ADC2-M	抗CEACAM5 mAb LALA　突然変異 YTE　突然変異 MTG　タグ	MTG カップリング DAR=4 NH2-GGG-b-グルクロニドーエキサテカン (DL1-M)	HC = 配列番号 34 LC = 配列番号 36
mAb3-M, ADC3-M	抗CEACAM5 mAb LALA　突然変異 YTE　突然変異 K222R 突然変異 (MTG最適化) MTG　タグ	MTG カップリング DAR=4 NH2-GGG-b-グルクロニドーエキサテカン (DL1-M)	HC = 配列番号 35 LC = 配列番号 36
mAb4-M, ADC4-M	抗 CD20 リツキシマブに基づくアイソタイプ対照	鎖間システイン抱合体化 DAR=8 マレイミドーbーグルクロニドーエキサテカン (DL1)	HC = 配列番号 64 LC = 配列番号 65 (リツキシマブmAb)

【表４－２】

mAb5-M, ADC5-M	抗CD20リツキシマブに基づくアイソタイプ対照 LALA　突然変異 MTG　タグ	MTG カップリング DAR=4 NH2-GGG-b-グルクロニドーエキサテカン (DL1-M)	HC = 配列番号 40 LC = 配列番号 41
mAb6-M, ADC6-M	抗CEACAM5 mAb LALA　突然変異	鎖間システイン抱合体化 DAR=8 マレイミドーbーグルクロニドーエキサテカン (DL1)	HC = 配列番号 51 LC = 配列番号 14
mAb7-M, ADC7-M	抗CEACAM5 mAb LALA　突然変異 MTG　タグ	MTG カップリング DAR=4 NH2-GGG-b-グルクロニドーエキサテカン (DL1-M)	HC = 配列番号 51 LC = 配列番号 36

表4.

【０４４５】

抗体mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb5-M、mAb6-M、およびmAb7-Mをコードするdna配列を、GeneArt(Life Technologies)で合成し、組換え発現のためのpTT5プラスミドにクローニングした。生成したプラスミドを、一過性トランスフェクションおよび振盪フラスコ中での組換えタンパク質発現に用いた。ExpiCHO発現系(Gibco(商標)、Thermo Fisher Scientific Inc.)を使用した。トランスフェクションの7日後に、上清を収穫し、発現された抗体を精製した。プロテインAアフィニティークロマトグラフィー(HiTrap MabSelect SuReカラム、Cytiva)およびサイズ排除クロマトグラフィー(HiLoad Superdex 200pgカラム、Cytiva)を包含する標準的な段階的プロセスを使用した。

【０４４６】

mAb4-M/リツキシマブ(F.Hoffmann-La Roche Ltd.,Basel,Switzerland)を薬局グレード品質で購入した。

【０４４７】

<u>トランスグルタミナーゼの発現および精製</u>

トランスグルタミナーゼ酵素mTGをコードするDNA配列(配列番号46)をGeneArt(Life Technologies)で合成し、組換え発現のためのpET30aプラスミドにクローニングした。作製されたプラスミドで形質転換されたEscherichia coli BL21(DE3)株を、振盪フラスコ中において、5g/lのグルコース、10ml/100mlの10×リン酸緩衝生理食塩水および30mg/lカナマイシンを足した溶原ブロス培地によって、28℃および130rpm(50mm振盪径)で一晩培養した。この培養物を使用して、9.5lの成長培地(50g/l酵母エキス、10g/lペプトン、0.5g/lの$MgSO_4 \times 7H_2O$、および2mlの50％のDesmophen(Rhein Chemie Rheinauによる消泡剤)を含有する発酵器に、0.00002の光学密度で接種した。発酵器を28℃、800U/min回転、5Nl/minエアレーションおよびpH7.0～7.4で一晩(16h)実行した。OD5で、培養物を0.1mM IPTGで 大凡30のODに到達するまで(5～6時間)誘導した。発泡または2mg/mlよりも下の酸素濃度の低下のケースで

は、それぞれ、より多くのDesmophenを追加するかまたは回転を1000rpmに増加させた。細胞塊を連続フロースルー遠心分離によって収穫した。

【0448】

50gの細胞ペレットを250mlの50mM酢酸Na、1mM DTT、5mM MgCl2、25U/mlベンゾナーゼ(Millipore)pH5.5に再懸濁し、フレンチプレスを使用して破砕した。上清を遠心分離および濾過(0.8/0.2μmポアサイズ)によって清澄化し、pHを5.5に調整し、Fractogel(登録商標)SO3-(M)85mlカラム(Millipore)にロードされ、次に0～1MのNaClからの20CVの直線勾配で溶出をした。予想されるサイズの精製されたタンパク質を有する画分をSDS-PAGEによって同定し、プールし、50mMトリス/HCl、300mM NaCl、pH8.0に対して4℃で一晩透析した。それから、トランスグルタミナーゼを、0.5U/mlのディスパーゼ(登録商標)I(Sigma Aldrich)および2mM CaCl2を使用して、37℃で60min、2mg/mlの終濃度でプロテオリシス処理し、次に、5mM EDTAの追加をした。反応ミックスを50mMリン酸ナトリウム緩衝剤pH6.0に対して4℃で一晩透析し、Fractogel(登録商標)SO3-カラム(Millipore)にロードされ、0～1MNaClからの20CVの直線勾配で溶出した。効率的に切断および精製されたタンパク質を有する画分を、SDS-PAGEによって同定し、プールし、濃縮し、24 HEPES、pH7、100mM NaClをランニング緩衝剤としてHiLoad Superdex 75pgサイズ排除カラム(Cytiva)を使用して精製した。トランスグルタミナーゼ含有画分をプールし、＞20mg/mlに濃縮し、液体窒素で瞬間凍結し、-80℃で保存した。酵素活性は、ZediXclusive微生物トランスグルタミナーゼアッセイ(Zedira)を使用して決定した。

【0449】

例19:ADC1-M、ADC4-MおよびADC6-MのADC調製、抱合およびキャラクタリゼーション

19.1.抗体調製および抱合

50mMヒスチジン、100mM NaCl、pH6.5中に製剤したモノクローナル抗体(mAb)を-80℃で保存した。抱合に先立って、mAbをRTで解凍し、タンパク質濃度を、製剤緩衝剤による希釈によって5mg/mlに調整した。続いて、10～12モル当量の過剰(mAbに対して相対的に)のTCEPを追加してmAbを還元し、37℃で2～3hインキュベーションした。16～24モル当量(mAbに対して相対的に)のDL1(DMSO中の10mMストック溶液による)を追加し、25℃で60minインキュベーションした。反応ミックスを、25モル当量(mAbに対して相対的に)のN-アセチル-システイン(25mM DMSOストック溶液から)を追加してクエンチし、25℃で30minインキュベーションした。ADCを、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によってDL1および可能な高分子量種(HMWS)から分離した。SEC精製に先立って、試料を4000×gで2min遠心分離して、可能な沈殿を除去した。2.5ml/minの流速のAkta LCシステム(Cytiva)およびランニング緩衝剤としての50mMヒスチジン、100mM NaCl、pH6.5と組み合わせたHiLoad Superdex 200 26/60 Increaseカラムを使用して、SECを実施した。ADC材料を含有する分画された試料をプールし、Amicon Ultra 15 50K遠心用(Millipore)を使用して6mg/mlに濃縮し、次に、Akta LCシステム(Cytiva)と組み合わせてHiTrap脱塩カラムを使用して、10mMヒスチジン、40mM NaCl、6%トレハロース、0.05%TWEEN、pH5.5への最終的な緩衝剤交換をした。最終的なバルク原薬(BDS)を0.22μm無菌フィルターユニット(Millipore)で濾過し、さらなる使用まで液体窒素中で急速凍結した。

【0450】

19.2.品質属性

ADC1-M

【表Ｋ】

濃度[mg/ml]	6.0
薬物対抗体比	8.16
純度SEC [%]	98.9
遊離薬物含量[%]	0.08
エンドトキシン含量[EU/mg]	1.84

【０４５１】

ＡＤＣ６-Ｍ

【表Ｌ】

濃度[mg/ml]	7.09
薬物対抗体比	8.14
純度SEC [%]	100
遊離薬物含量[%]	0.01
エンドトキシン含量[EU/mg]	0.39

【０４５２】

ＡＤＣ４-Ｍ

【表Ｍ】

濃度[mg/ml]	5.82
薬物対抗体比	7.87
純度SEC [%]	97.8
遊離薬物含量[%]	0.03
エンドトキシン含量[EU/mg]	0.13

【０４５３】

9.3 原薬のキャラクタリゼーション

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)法

単量体含量および純度を、Waters Bio Resolve SEC mAbカラムによるサイズ排除クロマトグラフィーによって評価した。

波長　214nm

カラム　Waters Bio Resolve SEC mAbカラム、200Å、2.5μm、4.6×150mm

移動相　50mM一塩基性リン酸ナトリウム

0.4M過塩素酸ナトリウム、pH6.3

注入体積　5μL

カラム温度　25℃

流速　0.35mL/min

【０４５４】

インプットmAbおよび最終的なBDSの純度を示す典型的なSECクロマトグラムを図36に示す。

逆相HPLC(RP-HPLC)法

RP-HPLC法パラメータ

波長　214nm

カラム　PLRP-S 1000Å(50×2.1mm、8μm)カラム、Agilent

移動相A　Lichrosolv H2O+0.1%TFA

移動相B　100%AcN+0.1%TFA

勾配　30-45%B(7.5min)

注入体積　10μL
カラム温度　65℃
流速　1.0mL/min
【０４５５】
　試料調製　40μlの試料(2.2mg/ml)を4μlの0.5M TCEPと混合し、RTで5minインキュベーションした。その後、40μlの0.5Mヨードアセトアミドを加え、37℃で15minインキュベーションした。この反応物の10μlを注入した。
【０４５６】
　最終的なBDSのDAR決定を図解する典型的なRP-HPLCクロマトグラムを図37に示す。
遊離薬物方法
波長　254nm
カラム　Phenomenex Gemini、C18、2×150mm、3μm(P/N00F-4439-B0)
移動相A　0.1%ギ酸、水中
移動相B　0.1%ギ酸、アセトニトリル中
勾配
【表Ｎ】

時間(min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
95% A まで3min平衡化		

注入体積　10.00μL
カラム温度　50℃
流速　0.75mL/min
試料調製　タンパク質ドロップ:100μLの原薬+250μLの冷MeOH+50μLの3M MgCl2。20,000rpmで10minスピン。
【０４５７】
　標準の調製　20μLの20mM DL(DMSO中のMSC2702209A)+20μLのDMSO+40μLのMeOH+20μLの200mM NACをダイアフィルトレーション緩衝剤中で混合する。一晩インキュベーションして、4mM DL-NACを与える。MeOHによって4mM DL-NACを希釈して、4μM DL-NAC標準を与える。
【０４５８】
エンドトキシンの特徴付け
　エンドトキシンは、Endosafe PTSエンドトキシンシステム(Charles River)を使用するカイネティック発色LALアッセイによって決定した。緩衝剤および抗体をLAL試薬水によって10倍希釈した。ADCをLAL試薬水で10倍希釈した。全ての試料を0.01-1EU/mLカートリッジで分析した。EU/mL値をADC[P]mg/mLで割ることによってEU/mgに変換した。
【０４５９】
例20:ADC7-M、ADC2-M、ADC5-MおよびADC3-MのADC調製、抱合およびキャラクタリゼーション
20.1.抗体調製および抱合
　モノクローナル抗体(mAb)を-80℃で保存した。抱合に先立って、mAbをRTで解凍し、緩衝剤を、HiTrap脱塩カラムをAkta液体クロマトグラフィー(LC)システム(Cytiva)と組み合わせて使用して、24mM HEPES、pH7.0に交換した。薬物リンカー(DL)を抗体にカップリングするために、微生物トランスグルタミナーゼ(mTG)を使用した。反応のセットアップは次の通りであった:5mg/mlのmAb、抱合部位あたり5モル当量のDL1-M、20U/mlのmTG、7%DMSO、24mM HEPES、pH7.0。反応は37℃で18h実施した。ADCをサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によってDLおよびmTGから分離した。

SEC精製に先立って、試料のNaCl濃度を5M NaClストック溶液を使用して100mMに調整した。2.5ml/minの流速でAkta LCシステム(Cytiva)と組み合わせたHiLoad Superdex 200 26/60 Increaseカラム、およびランニング緩衝剤としての10mMヒスチジン、100mM NaCl、pH5.5を使用して、SECを実施した。ADC材料を含有する分画された試料をプールし、Amicon Ultra 15の50K遠心用(Millipore)を使用して8mg/mlに濃縮し、次に、Akta LCシステム(Cytiva)と組み合わせてHiTrap脱塩カラムを使用して、10mMヒスチジン、40mM NaCl、6%トレハロース、0.05%TWEEN、pH5.5への最終的な緩衝剤交換をした。最終的なバルク原薬(BDS)を0.22μm無菌フィルターユニット(Millipore)で濾過し、さらなる使用まで液体窒素中で急速凍結した。

【０４６０】

20.2 品質属性

ADC7-M

【表Ｏ】

濃度 [mg/ml]	7.11
薬物対抗体比	3.87
純度 SEC [%]	99.9
遊離薬物含量 [%]	0.12
エンドトキシン含量 [EU/mg]	0.34

【０４６１】

ADC2-M

【表Ｐ】

濃度 [mg/ml]	6.9
薬物対抗体比	3.86
純度SEC [%]	99.7
遊離薬物含量 [%]	0.03
エンドトキシン含量 [EU/mg]	0.19

【０４６２】

ADC3-M

【表Ｑ】

濃度 [mg/ml]	7.98
薬物対抗体比	4.2
純度 SEC [%]	100
遊離薬物含量 [%]	0.13
エンドトキシン含量 [EU/mg]	0.14

【０４６３】
ＡＤＣ５-Ｍ
【表Ｒ】

濃度 [mg/ml]	5.92
薬物対抗体比	3.88
純度 SEC [%]	99.8
遊離薬物含量 [%]	0.15
エンドトキシン含量 [EU/mg]	>0.5

【０４６４】
２０.３.方法:原薬のキャラクタリゼーション
サイズ排除クロマトグラフィー(ＳＥＣ)法
　単量体の含量および純度を、ＴＯＳＯＨ ＴＳＫｇｅｌカラムによるサイズ排除クロマトグラフィーによって評価した。注入体積は１～５μｌ(最高で１０μｇのタンパク質)からの範囲であった。
波長　２１４ｎｍ
カラム　Ｔｏｓｏｈ ＴＳＫｇｅｌ ７.８ｍｍ×３００ｍｍ、５μｍ
移動相　５０ｍＭ一塩基性リン酸ナトリウム、０.４Ｍ過塩素酸ナトリウム、ｐＨ６.３。
注入体積　１～５μＬ
カラム温度　２５℃
流速　０.５ｍＬ/ｍｉｎ
【０４６５】
　インプットｍＡｂおよび最終的なＢＤＳの純度を示す典型的なＳＥＣクロマトグラムを図３８に示す。
逆相ＨＰＬＣ(ＲＰ-ＨＰＬＣ)法
ＲＰ-ＨＰＬＣ法パラメータ。
波長　２１４ｎｍ
カラム　ＰＬＲＰ-Ｓ １０００Å(５０×２.１ｍｍ、８μｍ)カラム、Ａｇｉｌｅｎｔ
移動相Ａ　Ｌｉｃｈｒｏｓｏｌｖ Ｈ２Ｏ+０.１％ＴＦＡ
移動相Ｂ　１００％ＡｃＮ+０.１％ＴＦＡ
勾配　３０-４５％Ｂ(７.５ｍｉｎ)

注入体積　10μL
カラム温度　65℃
流速　1.0mL/min
【０４６６】
試料調製　40μlの試料(2.2mg/ml)を4μlの0.5M TCEPと混合し、RTで5minインキュベーションした。その後、40μlの0.5Mヨードアセトアミドを加え、37℃で15minインキュベーションした。この反応物の10μlを注入した。
【０４６７】
最終的なBDSのDAR決定を図解する典型的なRP-HPLCクロマトグラムを図39に示す。
遊離薬物方法。
波長　254nm
カラム　Phenomenex Gemini、C18、2×150mm、3μm(P/N00F-4439-B0)
移動相A　0.1%ギ酸、水中
移動相B　0.1%ギ酸、アセトニトリル中
勾配
【表Ｓ】

時間 (min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
95% Aまで3min平衡化		

注入体積　10.00μL
カラム温度　50℃
流速　0.75mL/min
試料調製　タンパク質ドロップ:100μLの原薬+250μLの冷MeOH+50μLの3M MgCl2。20,000rpmで10minスピン。
【０４６８】
標準の調製　20μLの20mM DL(DMSO中のMSC2702209A)+20μLのDMSO+40μLのMeOH+20μLの200mM NACをダイアフィルトレーション緩衝剤中で混合する。一晩インキュベーションして、4mM DL-NACを与える。MeOHによって4mM DL-NACを希釈して、4μM DL-NAC標準を与える。
【０４６９】
エンドトキシンの特徴付け
エンドトキシンは、Endosafe PTSエンドトキシンシステム(Charles River)を使用するカイネティック発色LALアッセイによって決定した。緩衝剤および抗体をLAL試薬水によって10倍希釈した。ADCをLAL試薬水で10倍希釈した。全ての試料を0.01-1EU/mLカートリッジで分析した。EU/mL値をADC[P]mg/mLで割ることによってEU/mgに変換した。
【０４７０】
例21:ADC1-MおよびADC2-Mは高い力価でin vitroのがん細胞を特異的に死滅させる
ヒトがん細胞株を使用して、ADC1-MおよびADC2-Mががん細胞を死滅させるポテンシャルを評価した。ADC1-MおよびADC2-Mは、それぞれ、異なるCEACAM5陽性細胞株に対して、サブナノモーラーおよびサブナノモーラーから1桁ナノモーラーのin vitro力価を示した(表3)。対照的に、ADC1-MおよびADC2-Mの効果は、CEACAM5陰性細胞株MDA-MB-231に対しては軽微であった(表3)。例示的な用量反応曲線に示される通り、ADC1-MおよびADC2-MはCEACAM5陽性細胞株SK-CO-1、SNU-16、MKN-45、およびLS174Tに対して非常に強力であった(図40a～dおよび図41a～d)。対照的に、ADC1-MおよびADC2-Mは、抗原陰性MDA-MB-231細胞生存率に対して軽微な効果のみを有した(図40eおよび図41e)。

ADC1-MおよびADC2-Mと同じリンカーペイロードを利用したアイソタイプ対照ADCは、試験されたCEACAM5陽性細胞株に対してはるかに低い効果を示した(図40および図41)。

【0471】

結論として、ADC1-MおよびADC2-Mは、in vitroのCEACAM5発現ヒトがん細胞株を高い力価で特異的に死滅させる。

【表3】

	SK-CO-1 IC50 [M]; n≥2	SNU-16 IC50 [M]; n≥2	MKN-45 IC50 [M]; n≥2	LS174T IC50 [M]; n≥2	MDA-MB-231 IC50 [M]; n≥3
ADC1-M	7.6E-11 (-95%)	3.6E-10 (-97%)	5.2E-10 (-96%)	6.0E-10 (-86%)	>1E-08 (-71%)
ADC2-M	1.1E-10 (-92%)	5.1E-9 (-78%)	1.2E-9 (-80%)	8.5E-10 (-67%)	n/a (-16%)
ペイロード	2.2E-10 (-97%)	2.9E-10 (-99%)	6.6E-10 (-100%)	3.0E-10 (-91%)	6.0E-10 (-91%)
CEACAM5	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性

【0472】

表3.複数のヒト細胞株に対するADC1-M、ADC2-Mおよび遊離ペイロードの力価。最も高い試験された化合物濃度における無処置の対照と比較された最大の効果が括弧内に指示されている。-50%の効果を報告する力価のカットオフ、さもなければ「n/a」を記す。各細胞株について、CEACAM5発現が指示されている。

【0473】

方法 - 生存率アッセイ:

がん細胞株に対するADCの細胞傷害効果を、細胞生存率アッセイによって測定した。処置の前日に、細胞を96ウェルプレートに90μLの体積で播種した。試験化合物(ADCまたは遊離ペイロード)を、細胞培養培地によって出発濃度の10倍で製剤した。試験化合物を段階希釈し(1:4)、10μLの各希釈物を三反復で細胞に追加した。プレートをCO2インキュベーターで37℃で6日間培養した。細胞生存率測定のためには、Cell Titer-Glo(登録商標)試薬(Promega(商標)Corp、マディソン、WI)を各ウェルに追加し、プレートを製造者の指示に従って処理した。ルミネッセンスシグナルをVarioskanプレートリーダー(Thermo Fisher)を使用して測定した。ルミネッセンス読み取り値を、無処置細胞に対して相対的な%生存率に変換した。Genedata ScreenerまたはGraphPad Prismを使用して、log(阻害剤)対応答、可変傾斜、4パラメータフィット式を使用して、非線形回帰分析によってデータをフィットした。データは化合物モル濃度に対する%の相対細胞生存率として示され、エラーバーは二反復または三反復の標準偏差(SD)を指示している。複数の実験に由来するIC50の幾何平均値を計算した。

【0474】

ADC1-MおよびADC2-Mを、抗原陽性SK-CO-1および抗原陰性MDA-MB-231細胞株に対するそれらの細胞傷害効果の点で、ADC SAR DM4ともまた比較した。ADC1-MおよびADC2-Mは、SK-CO-1がん細胞に対してADC SAR DM4と類似の力価を示した(図

26aと比較した図40aおよび図41a)。抗原陰性MDA-MB-231に対する非特異的な効果は、ADC SARDM4ではADC1-MおよびADC2-Mと比較して高く(図26bと比較した図40eおよび図41e)、違いはADC1-MよりもADC2-Mで顕著であった。

【0475】

ADC1-MおよびADC2-Mもまた、YTE突然変異を欠く抗体骨格を利用して生成した。これらのADC(ADC6-MおよびADC7-M)は両方とも、YTE突然変異を有するそれぞれのADC(ADC1-MおよびADC2-M)のような似通った結果を示した。

【0476】

例23:ADCの薬物動態研究

ヒトFcRnトランスジェニック(276ヘミ接合体モデル)マウスにおける薬物動態研究を、3mg/kgのADC1、ADC1-M、ADC6-M、ADC7-M、ADC2-Mの単回静脈内投与後に行った。試料を、ADC1-M、ADC6-M、ADC7-M、およびADC2-Mについては処置群あたり6匹から投薬後の1、24、48、72、144、168、240、336、および504hに、ADC1では9匹から投薬後の0.08(約5分)、4、24、48、72、168、240、336および504hに取った。データをPK分析のためにプールした。処置あたりの血漿中濃度は図42参照。時間0における血漿中濃度(C0)の逆外挿は、ADC1-M、ADC7-M、およびADC2-Mでは理論上の最大よりもやや低い、ADC6-MおよびADC1では理論上の最大値に近い濃度をもたらした(40mL/kgの血漿体積による希釈を仮定した)。血漿中濃度は二相性のプロファイルで減少した。急激な血漿中濃度の減少が24hまで観察され、次に、336hまで定量可能であったADC6-Mで処置された動物を例外として、全ての分子群において最後のサンプリング時間(504h)まではより遅い減少であった。

【0477】

最も長い終末相半減期(t1/2)値はDAR=4のLala-YTE変異体のADC2-M(190h)で計算され、次に、DAR=4のLala変異体のADC7-M(122h)、Lala-YTE変異体かつDAR=8のADC1-M(64.5h)、およびDAR=8のLala変異体のADC6-M(33.8h)、ならびに最後にDAR=8のIgG1.4のADC1(29.6h)であった。外挿されたAUCinfの%は20%よりも低く、AUC0-infおよび導出されるパラメータ(Cl、VzおよびVss)の信頼できる計算を許した。トランスジェニックマウスにおいて、最も高いAUC0-infおよび最も低いCl値はADC2-M(Lala-YTE変異体、DAR=4)で計算され、次にADC7-M、ADC6-M、ADC1-M、およびADC1であった。AUC0-infおよびCl値は、それぞれ1360000から10200000h*ng/mLおよび0.293から1.16mL/h/kgの範囲であった。妥当する分布容積(Vss)の違いは観察されず、Vssは49.8から113mL/kgの範囲であった。

【0478】

結論として、トランスジェニックマウスにおける3mg/kgの単回iv投与後に、最も良いPKプロファイルは、最も高い血漿曝露、最も低いClおよび最も長いt1/2を有するADC2-Mによって示された。PKプロファイルは、IgG1.4からLala変異体に移動することによって改善され、さらにYTE変異体を包含することによって、DARを8から4に低減することによって最も強い効果が観察された。

【0479】

表5:3mg/kgのi.v.投与後のCeacam5バックアップ分子のPKパラメータ。抗体-薬物抱合体(ADC)および薬物対抗体比(DAR)も指示されている。

【表５】

用量(mg/kg)	ADC	抗体/バックボーン	DAR	系統	t1/2 (h)	C0 (ng/mL)	Tlast (h)	Clast (ng/mL)	AUClast (h*ng/mL)	AUCinf (h*ng/mL)	%_Ext (%)	Vz (mL/kg)	Cl (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)
3	ADC 1	IgG1.4	8	HuFcRn	29.6	76800	240	74.4	1360000	1360000	0.2	93.9	2.20	65.8
3	ADC 1-M	Lala-YTE-変異体	8	HuFcRn	64.5	49900	504	1190	2580000	2590000	0.4	108	1.16	113
3	ADC 2-M	Lala-YTE-変異体	4	HuFcRn	190	56100	504	6810	8360000	10200000	18.4	80.2	0.293	87.7
3	ADC 6-M	Lala-変異体	8	HuFcRn	33.8	84100	336	52.0	2850000	2850000	0.1	51.3	1.05	49.8
3	ADC 7-M	Lala-変異体	4	HuFcRn	122	55800	504	2400	5720000	6140000	6.9	86.0	0.488	93.4

【０４８０】

例24:膵臓細胞株由来腫瘍モデルにおけるADC1-MおよびADC2-Mの有効性

ADC1-MおよびADC2-Mの有効性を、ヒト膵臓細胞株由来ゼノグラフトモデルBxPC3(ATCC、CRL-1687)において評価した。5×10^6のBxPC3細胞を、6から8週齢の免疫不全雌マウス(Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu、Envigo)の右側腹部に皮下注射した。腫瘍が85mm3の平均体積に到達したときに、10匹のマウス/群を、(生理食塩水溶液)もしくはADC1-M(5mg/kg;0日目)によって、またはADC2-M(5mg/kgもしくは10mg/kg;0日目)によって1回静脈内処置した。腫瘍の長さ(L)および幅(W)をキャリパーで測定し、腫瘍体積をL×(W ^ 2)/2を使用して計算した。

【０４８１】

5mg/kgの用量のADC1-Mおよび5mg/kgまたは10mg/kgの用量のADC2-Mによる単回処置は、有意な抗腫瘍効果に至った。両方のADCはこのモデルにおいて似通った有効性を有する(図43)。処置は体重に対する有意な効果を有さなかった(データは示さない)。

【０４８２】

例25:ADCラベツズマブゴビテカンの類似体ADC8の調製

25.1 抗体

さらなる比較実験の目的のために、ADCラベツズマブゴビテカンのさらなる類似体を、次の配列を有するモノクローナル抗体に基づいて調製した:

重鎖:DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVG TSVAWYQQKP GKAPKLLIYW TSTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YSLYRSFGQG TKVEI KRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNS QE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GE CEVQLVES GGGVVQPGRS LRLSCSASGF DFTTYWMSWV RQAPGKGLEW IGEIH PDSST INYAPSLKDR FTISRDNAKN TLFLQMDSLR PEDTGVYFCA SLYFGFPWFA YWGQGTPVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWN SGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDK RV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VS HEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEY

KCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFY PS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC S VMHEALHNH YTQKSLSLSP GK(配列番号62)
軽鎖:DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVG TSVAWYQQKP GKAPKLLIYW TSTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YSLYRSFGQG TKVEI KRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNS QE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GE C(配列番号63)

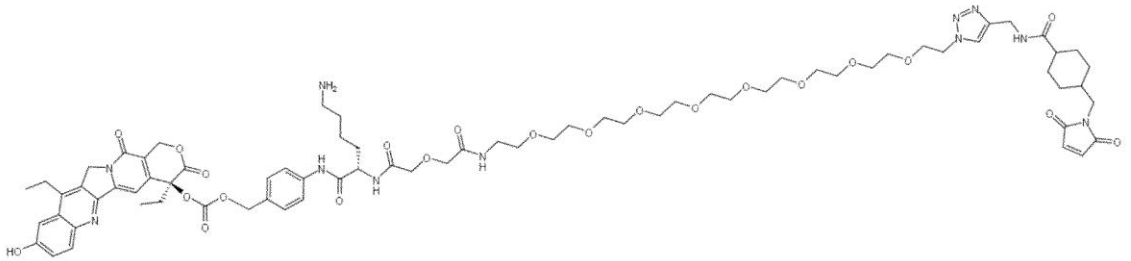
【０４８３】

25.2 薬物-リンカー化合物

上述の抗体に抱合されるべき薬物-リンカー分子として、次の構造の分子を使用した:

【０４８４】

【化２８】



【０４８５】

この薬物-リンカー分子は、SyntaBio LLC、10239 Flanders Ct,San Diego,CA 92121から購入した。ロットNo.S041070422。

【０４８６】

25.3 抱合

モノクローナル抗体(mAb)を、抱合に先立って3日まで2～8℃で解凍し、さらなる使用まではPBS、pH6.8中で2～8℃で保存した。抱合の日に、mAb溶液のpHを、0.5Mトリス、0.025M EDTA、pH8.5の追加によって5%(v/v)の終濃度に調整した。pH調整後に、10モル当量のTCEPおよび20℃での120minのインキュベーションを使用してmAbを還元した。続いて、mAb溶液を20mMヒスチジン、80mM NaCl、pH5.5で1:1希釈し、DMSO濃度を10%(v/v)に調整し、16モル当量の上で言及された薬物-リンカーを追加して反応を開始した。反応を20℃で60minインキュベーションし、最後に100mM NAC(n-アセチル-システイン)の追加によってクエンチした。その後に、抱合されたmAb(すなわちADC)を分取サイズ排除クロマトグラフィーによって処理した。

【０４８７】

25.4 分取サイズ排除クロマトグラフィー、脱塩および濾過

反応混合物を分取サイズ排除クロマトグラフィーを使用して精製した。GE HiLoad 26/60 Superdex S200カラムを、Akta Avant 25システム(GE Healthcare)に接続し、20mMヒスチジン、80mM NaCl、pH5.5によって、製造者の指示に従って平衡化した。続いて、反応混合物を注入し、20mMヒスチジン、80mM NaCl、pH5.5をランニング緩衝剤として使用して、5ml/minの流速でカラムに流した。ADC含有画分を、280nmにおけるUV光吸収によって決定し、プールし、濃縮した。ADC材料を、Vivaspin VS2022デバイス(Sartorius UK Ltd.)を使用して、製造者の指示に従って濃縮した。濃縮されたADC材料を、製剤緩衝剤(10mMヒスチジン、100mM NaCl、3%トレハロース、0.05%(w/v)PS20、pH5.5)に移した。製造者の指示に従って、Akta Avant 25システム(GE Healthcare)において10ml/minの流速でHiPrep 26/10脱塩カラム(GE Healthcare)を使用した。最終的なADC材料を、0.2μmフィルター(0.2μmのPESフィルター、Merck Millipore)を使用して濾過し、小分けし、続いて液体窒素中で急速凍結した。ADC材料(原薬)の終濃度は7.7mg/mlであった。さらなる使用までは、材

料を-80℃に保った。この作業からもたらされるADCは本明細書では「ADC8」と言われる。このADCはラベツズマブゴビテカンの類似体である。

【０４８８】

25.5 ADC8原薬のさらなるキャラクタリゼーション

上で得られたADC8原薬を、さらに(a)サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって分析し、これは99.3%の単量体純度を示し、(b)逆相HPLC(RP-HPLC)によって分析し、これは7.7のDARを示し、(c)RP HPLCに基づく遊離薬物の方法によって分析し、これは(モル比で)0.02%を下回る残存する遊離薬物レベルを示した。

【０４８９】

例26:ADC1-M、ADC2-M、ADC6-MおよびADC7-Mは、ADC SAR DM4およびADC8よりも高い特異性でがん細胞を死滅させる

例21に記載されているものと同じ方法を使用して、ヒトがん細胞株を使用して、CEACAM5発現を欠くがん細胞に対する効果に対して相対的な、CEACAM5発現を有するがん細胞に対するADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、およびADC7-M、ならびにADC SAR DM4およびADC8の効果を比較した。CEACAM5陰性のMDA-MB-231細胞に対するIC50を、各CEACAM5陽性細胞株に対するIC50で割ることによって、特異性指数として定義されるIC50の低減の倍数を計算した(表6参照)。特異性指数の値が大きいほど、試験されたADCはより特異的である。ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、およびADC7-Mは、CEACAM5陽性のSK-CO-1、SNU-16、およびMKN-45細胞において、CEACAM5陰性のMDA-MB-231細胞よりもはるかに低いIC50を示した。これらは、116から874の範囲の特異性指数をもたらした。ADC2-MおよびADC7-Mの特異性指数は、試験された濃度範囲におけるMDA-MB-231細胞に対する効果の欠如を原因として、蓋然的には過小評価されている(表3および図41eでADC2-Mについて示されている通り)。この理由から、ADC2-MおよびADC7-Mについてのみ、IC50を100nMという最も高い試験濃度に設定して、特異性指数を計算した。対照的に、ADC SAR DM4およびADC8は、それぞれ26から73および1.8から4.8の範囲のより低い特異性指数を示した。結論として、in vitroで、ADC SAR DM4およびADC8と比較して、ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、およびADC7-MによるCEACAM5陽性がん細胞のより選択的な死滅が示された。

【表６】

	SK-CO-1 n≥2	SNU-16 n≥2	MKN-45 n≥2	MDA-MB-231 n≥2
ADC1-M	874.4	241.9	201.2	1
ADC2-M	>631.9	>207.2	>166.6	1
ADC6-M	710.2	194.9	157.7	1
ADC7-M	>595.8	>178.9	>116.2	1
ADC SAR DM4	46.5	73.2	26.0	1
ADC8	4.8	1.8	2.5	1
CEACAM5	陽性	陽性	陽性	陰性

【０４９０】

表6.CEACAM5陰性のMDA-MB-231細胞株と比較したCEACAM5陽性細胞株におけるADCの相対的力価増加(特異性指数)。MDA-MB-231におけるIC50を、3つのCEACAM5

陽性細胞株のそれぞれにおけるIC50で割って、各ADCのそれぞれの特異性指数を計算した(MDA-MB-231の理論上の指数1は例示のためにのみ報告されている)。計算は2から4つの個々の実験のIC50幾何平均に基づいたものである。

【０４９１】

例27:ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-Mは、抗原陽性細胞との共培養の抗原陰性細胞に対してADC SAR DM4よりも強力なバイスタンダー効果を媒介する

例10と同じ方法を使用して、抗原陽性細胞に近接した抗原陰性細胞に対するバイスタンダー効果を媒介するADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-M、およびADC SAR DM4のポテンシャルを、バイスタンダーアッセイで評価した。ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、およびADC7-Mは、CEACAM5陽性のSK-CO-1の存在下で、CEACAM5陰性のMDA-MB-231細胞に対する強力なバイスタンダー効果を示した(図44)。共培養実験は1nMのADC濃度で行った。これは、ADC1では、CEACAM5陽性のSK-CO-1細胞生存率の最大阻害を引き起こすが(図26A)、CEACAM5陰性のMDA-MB-231細胞単独に対する効果はない(図26B)。これらの知見と一致して、ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-M、およびADC SAR DM4の非特異的な効果は、バイスタンダーアッセイセットアップにおいて、MDA-MB-231のみ対照では観察されなかった。

【０４９２】

結論として、ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-Mは、抗原陽性細胞との共培養においては、抗原陰性がん細胞に対する強力なバイスタンダー効果を媒介する。これらの知見は、不均一な標的発現を有する腫瘍を有効に標的化するポテンシャルを指示している。

【０４９３】

ADC SAR DM4と比較して、ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、およびADC7-Mは、抗原陽性細胞との共培養においては、抗原陰性細胞に対するはるかに強力なバイスタンダー効果を媒介した(図44)。

【０４９４】

試験された全てのADCについて、バイスタンダー効果の程度は、一定数の抗原陰性細胞に追加される抗原陽性細胞の数を増加させることによって増加した。理論によって拘束されようとすることなしに、これは、より多くのADCがより多数の抗原陽性細胞によってプロセシングされてより多くの遊離ペイロードを放出し、これが抗原陰性細胞に対するバイスタンダー効果を担うことの結果であり得る。

【０４９５】

試験されたADCの非特異的な効果は、バイスタンダー分析において、1E-9M試験濃度の全ての試験されたADCについて、MDA-MB-231細胞単独では観察されなかった。

【０４９６】

例28:ADC8と比較したADC1-MおよびADC3-Mの有効性

ADC8と比較したADC1-MおよびADC3-Mの有効性を、ヒト膵臓腺癌細胞株由来異種移植モデルHPAF-II(ATCC、CRL-1997)において評価した。6から8週齢の免疫不全雌マウス(Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu、Envigo)に、5×10^{6}のHPAF-II細胞を右側腹部に皮下注射した。腫瘍が150mm^{3}の平均体積に到達したときに、10匹のマウス/群を、ADC1-M(1mg/kgまたは6mg/kg)またはADC3-M(1mg/kgまたは6mg/kg)またはADC8(1mg/kgまたは6mg/kg)によって1回静脈内処置した。腫瘍の長さ(L)および幅(W)をキャリパーで測定し、腫瘍体積をL×W^2/2を使用して計算した。

【０４９７】

1または6mg/kgの用量のADC1-MまたはADC3-Mによる単回処置は、基剤対照と比較して有意な抗腫瘍効果に至った。1mg/kgによる単回処置は軽微なかつ一時的な抗腫瘍効果のみをもたらしたが、6mg/kgははるかに強い抗腫瘍効果を示したので、効果は用量依存的である。対照的に、ADC8による単回処置は、どちらの用量でも有意な抗腫瘍効果を示さなかった(図45)。全ての処置は体重に対する有意な効果を有さなかった(データは示さない)。

【０４９８】

例29:CRC PDXマウスモデルにおけるADC SAR DM4と比較したADC1-MおよびADC3-Mの有効性

ADC SAR DM4と比較したADC1-MおよびADC3-Mの抗腫瘍有効性は、ヒトCRCゼノグラフトモデルCOPF230によった。研究はLide Biotech(上海)で行った。6から8週齢の免疫不全雌マウス(Crl: NU-Foxn1nu)に、COPF230腫瘍フラグメントを右側腹部に皮下移植した。腫瘍が165mm^{3}の平均体積に到達したときに、6匹のマウス/群を、基剤(生理食塩水溶液)またはADC1-M、ADC3-MもしくはADC SAR DM4(各6mg/kg)で1回静脈内処置した。腫瘍の長さ(L)および幅(W)をキャリパーで測定し、腫瘍体積をL×W^2/2を使用して計算した。

【０４９９】

6mg/kgのADC1-MまたはADC3-Mによる単回処置は、基剤対照群と比較して、似通ったかつ有意な抗腫瘍効果に至った。対照的に、6mg/kgのADC SAR DM4による単回処置は、軽微な抗腫瘍効果のみを実証した(図46)。全ての処置は体重に対する有意なインパクトを有さなかった(データは示さない)。

【０５００】

例30:GC PDXマウスモデルにおけるADC SAR DM4と比較したADC1-MおよびADC3-Mの有効性

ADC SAR DM4と比較したADC1-MおよびADC3-Mの抗腫瘍有効性を、ヒトGCゼノグラフトモデルGAPF313において評価した。研究はLide Biotech(上海)で行った。6から8週齢の免疫不全雌マウス(Crl: NU-Foxn1nu)に、GAPF313腫瘍フラグメントを右側腹部に皮下移植した。腫瘍が平均体積176mm^{3}に到達したときに、6匹のマウス/群を、基剤(生理食塩水溶液)あるいは4mg/kgのADC1-MもしくはADC3-Mまたは4.7mg/kgのADC SAR DM4によって隔週で(3サイクル)静脈内処置した。腫瘍の長さ(L)および幅(W)をキャリパーで測定し、腫瘍体積をL×W^2/2を使用して計算した。

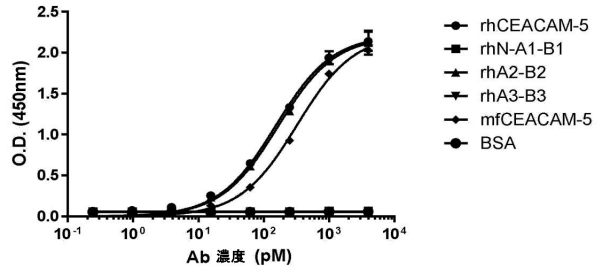
【０５０１】

ADC1-MまたはADC3-Mによる複数回処置は、基剤対照と比較して、似通ったかつ有意な抗腫瘍効果に至った。ADC SAR DM4はADC1-MおよびADC3-Mと比較して有意に有効でない(図47)。全ての処置は体重に対する有意なインパクトを有さなかった(データは示さない)。

【図面】

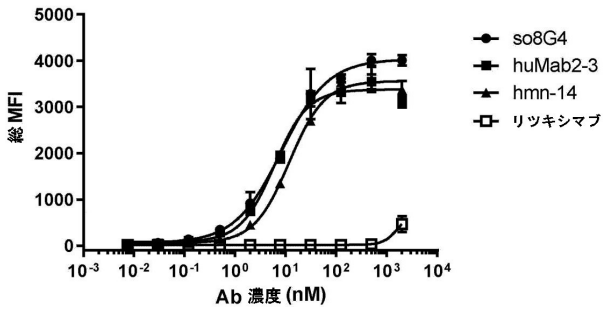
【図１】

図1:



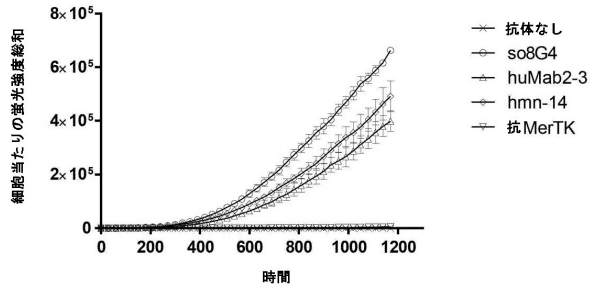
【図２】

図2:



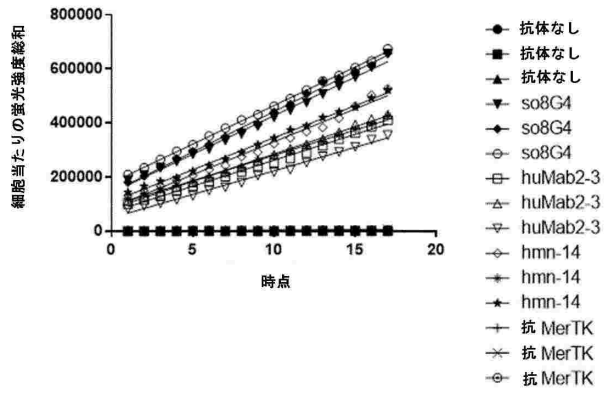
【図３】

図3:



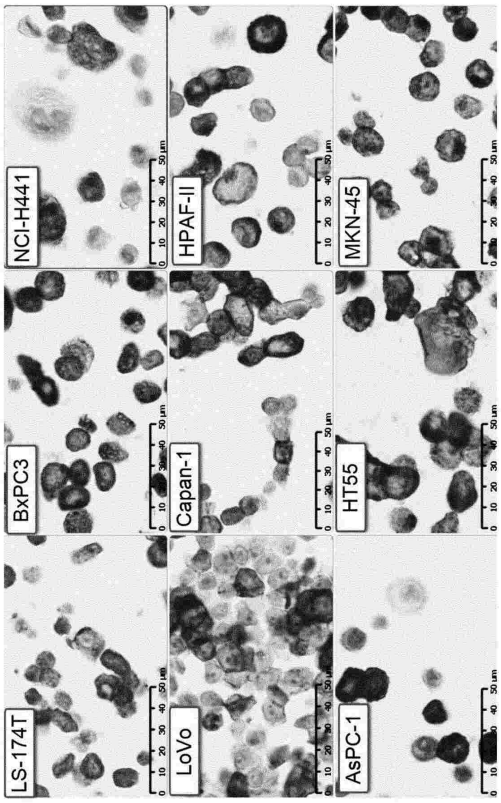
【図４】

図4:



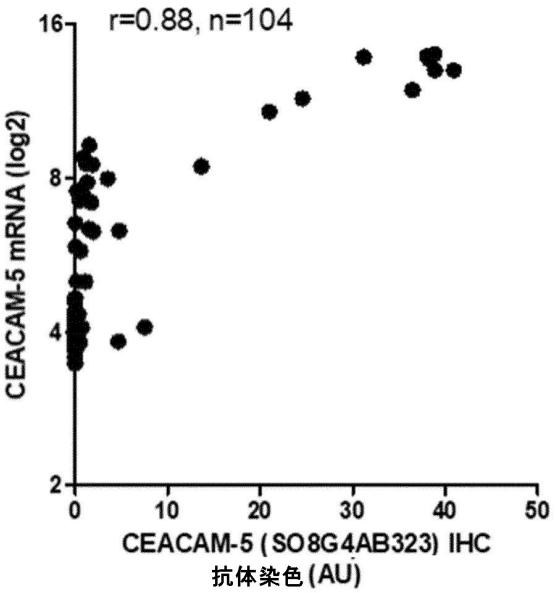
【図５】

図5:



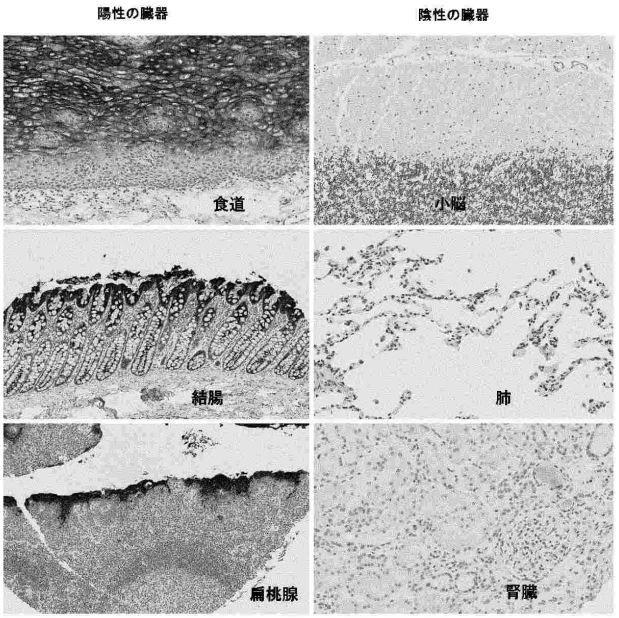
【図６】

図6:



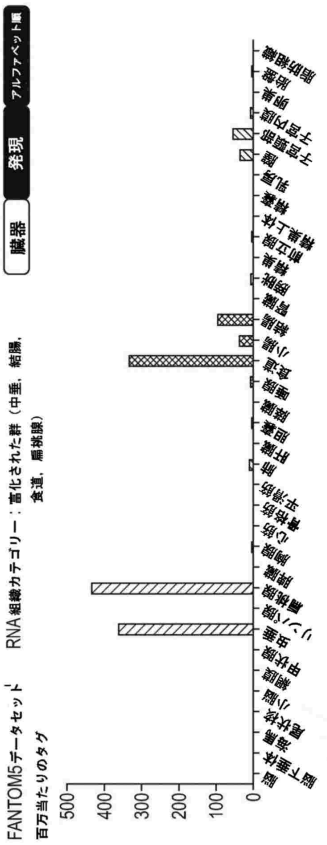
【図７】

図7:



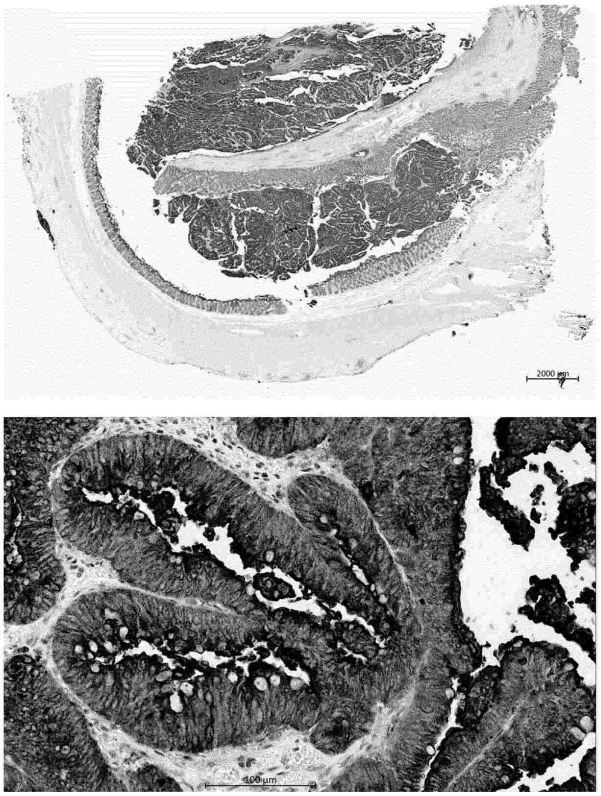
【図８】

図8



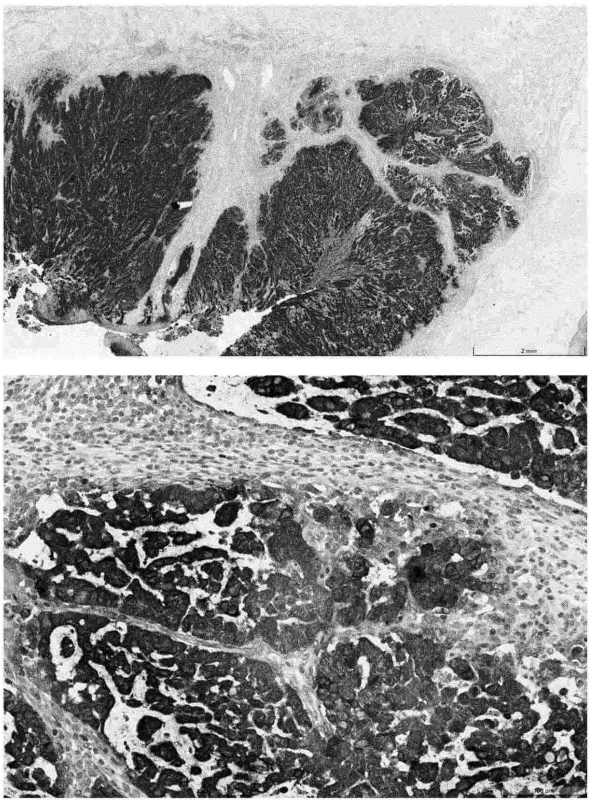
【図９】

図9:



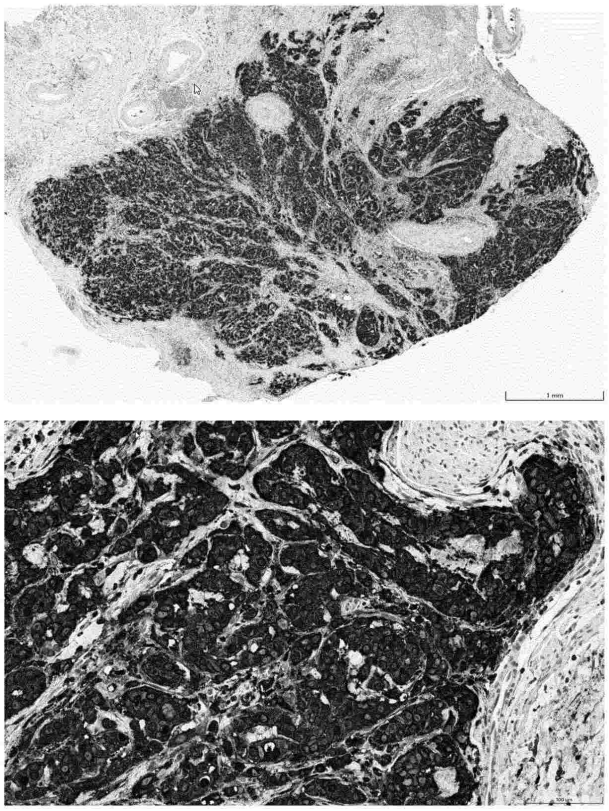
【図１０】

図10:



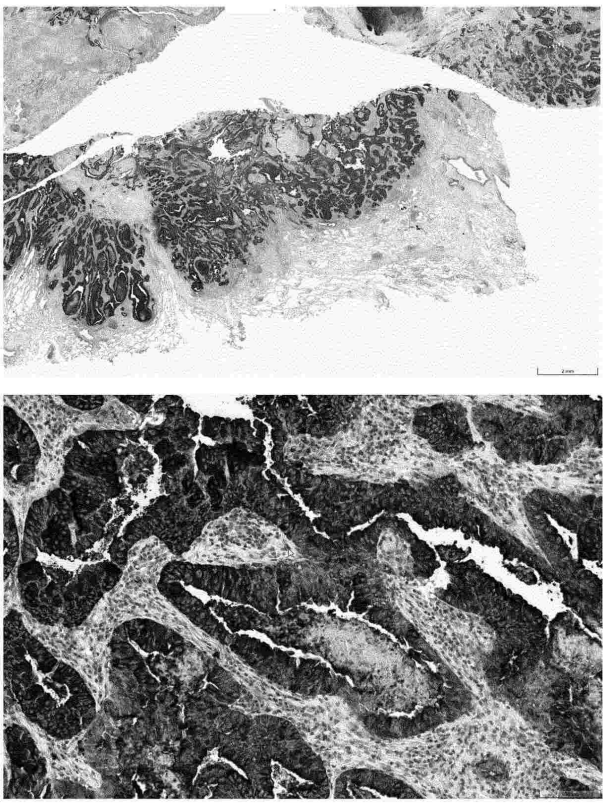
【図１１】

図11:



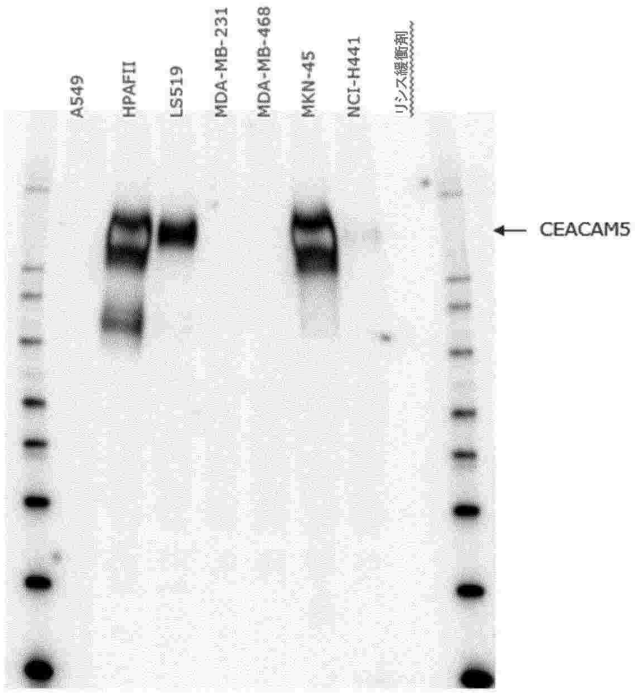
【図１２】

図12:



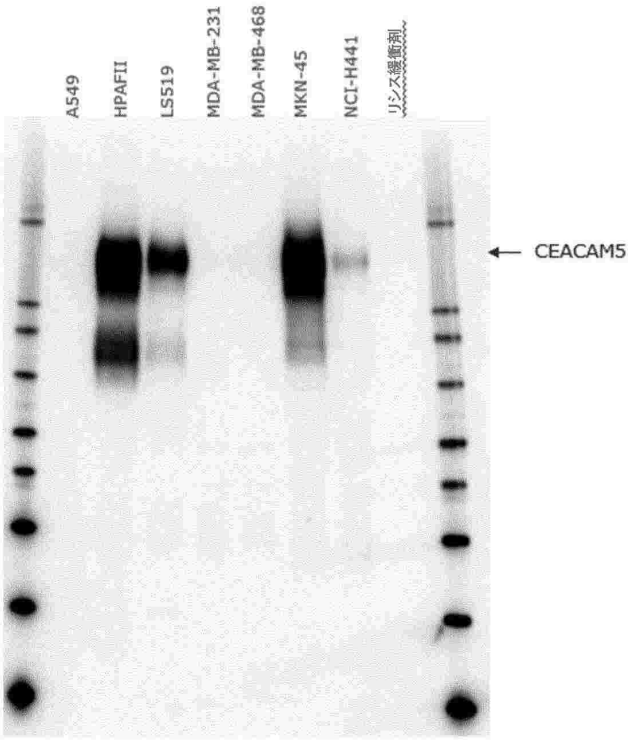
【図１３－１】

図13A:



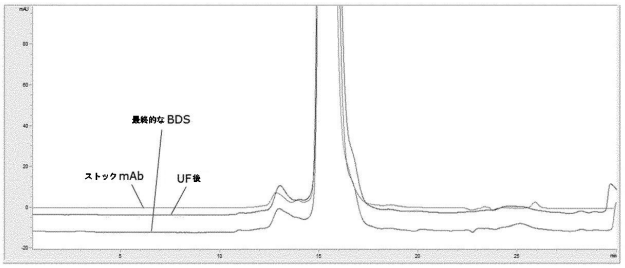
【図１３－２】

図13B:



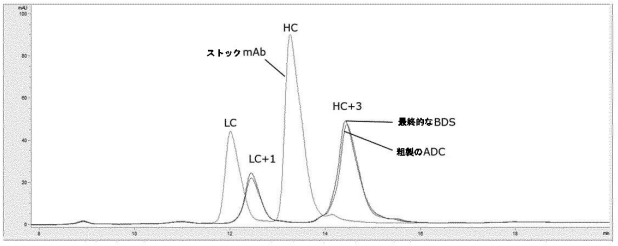
【図１４】

図14:



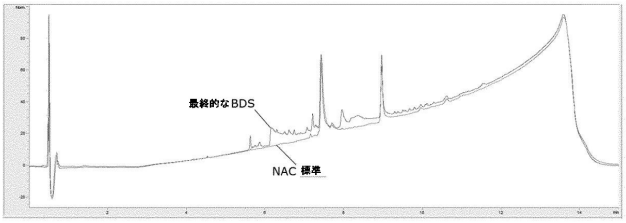
【図１５】

図15:



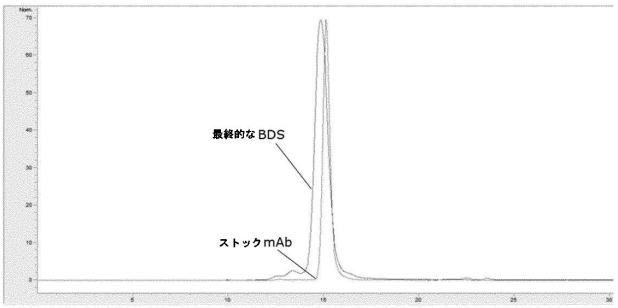
【図１６】

図16:



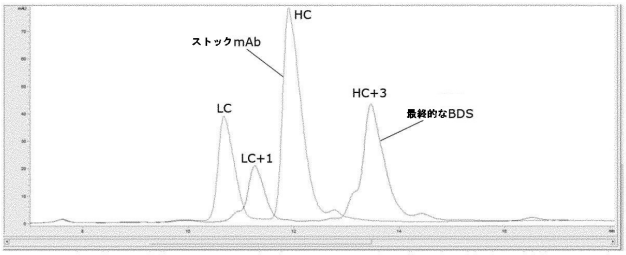
【図１７】

図17:



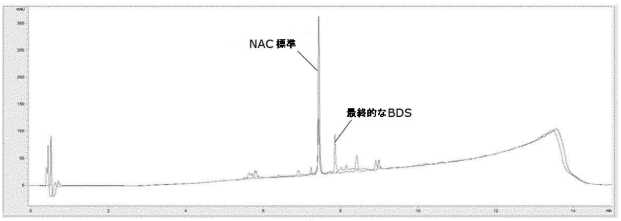
【図１８】

図18:



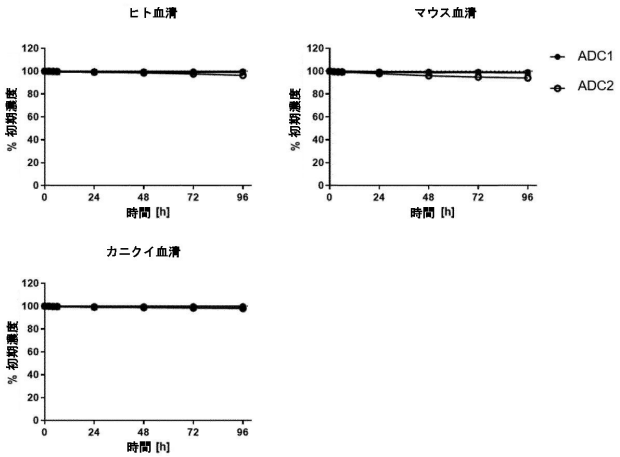
【図１９】

図19:



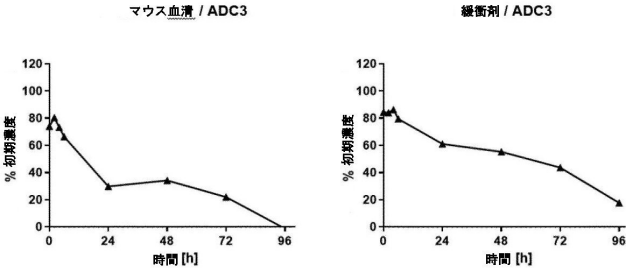
【図２０】

図20:



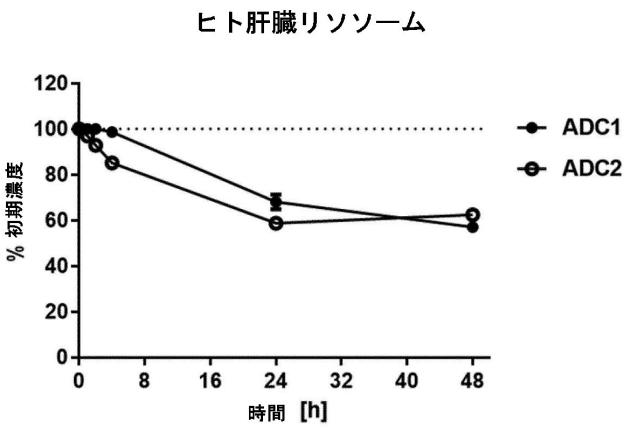
【図２１】

図21:



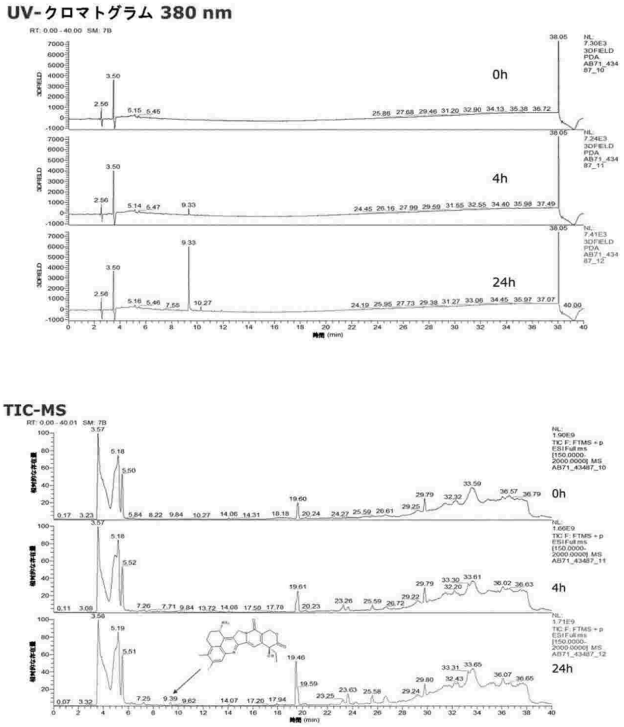
【図２２】

図22:



【図２３】

図23:



【図２４－１】

図24A:

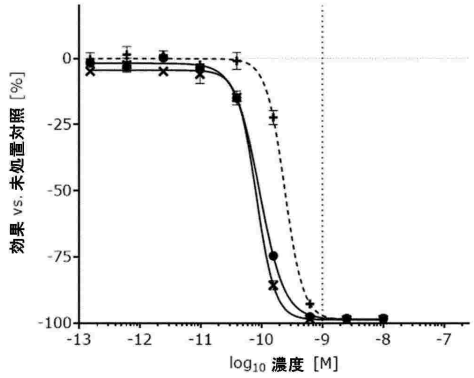
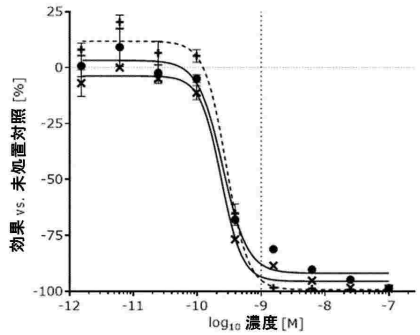
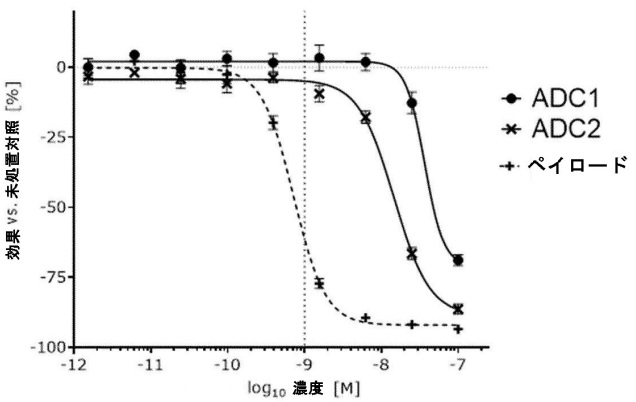


図24B:



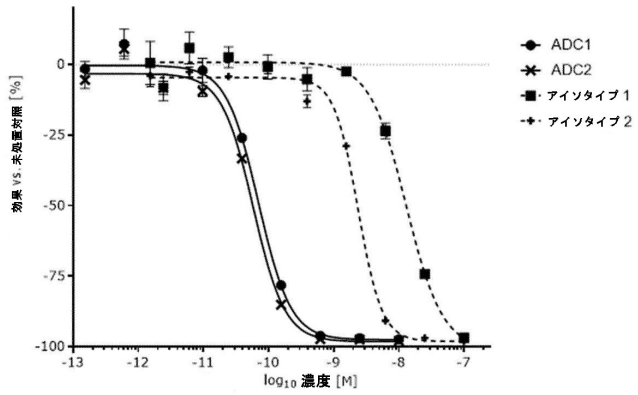
【図２４－２】

図24C:



【図２５】

図 25:



【図２６】

図 26A:

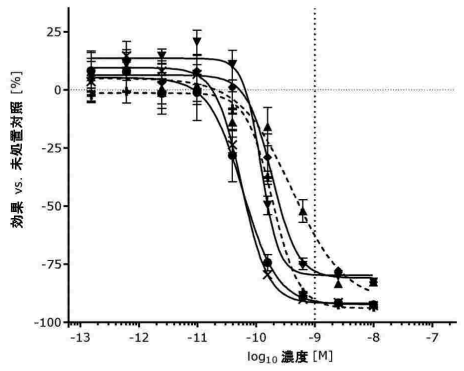
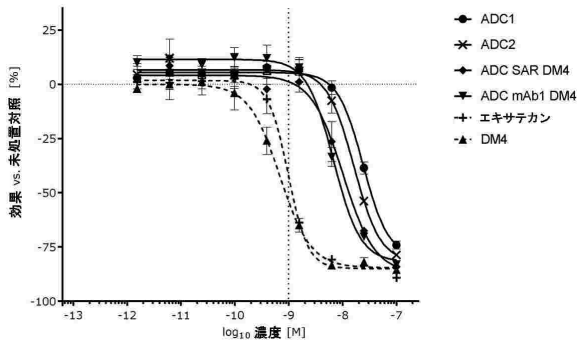


図 26B:



【図２７】

図 27A:

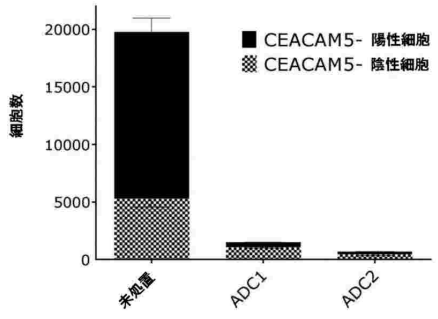
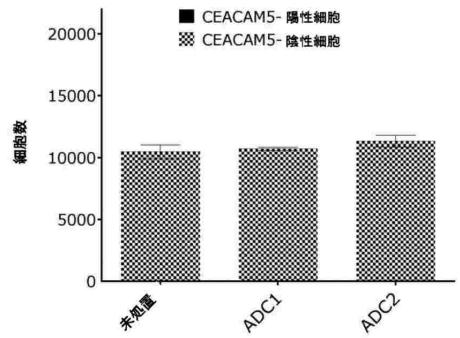


図 27B:



【図２８－１】

図 28A:

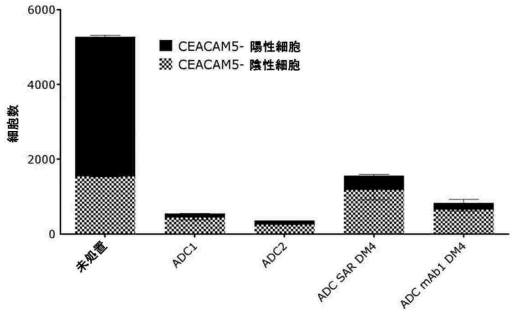
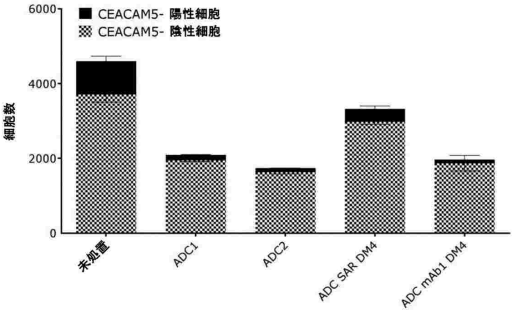
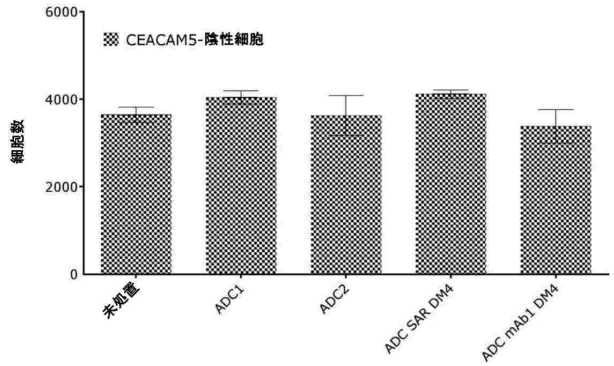


図 28B:



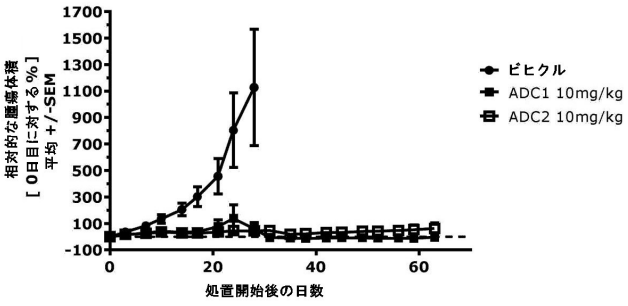
【図２８－２】

図 28C:



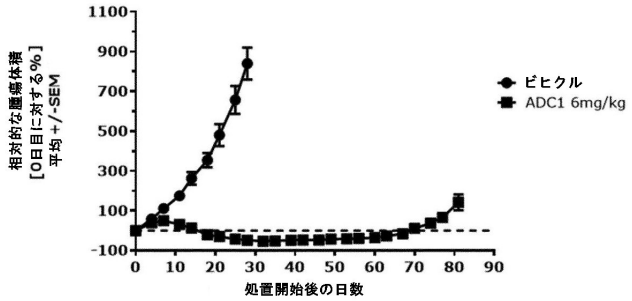
【図２９】

図 29:



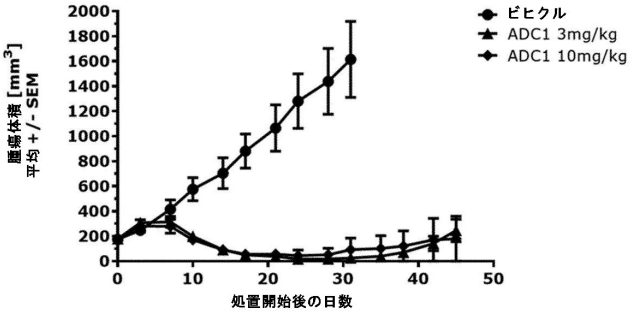
【図３０】

図30:



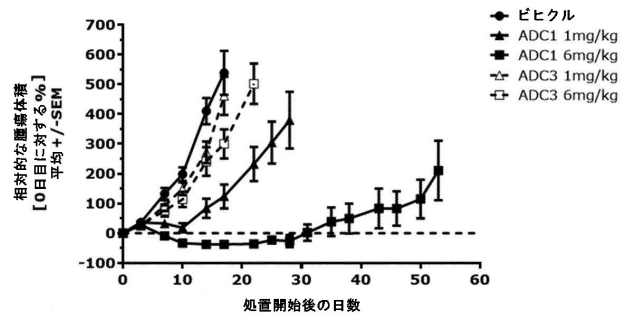
【図３１】

図31:



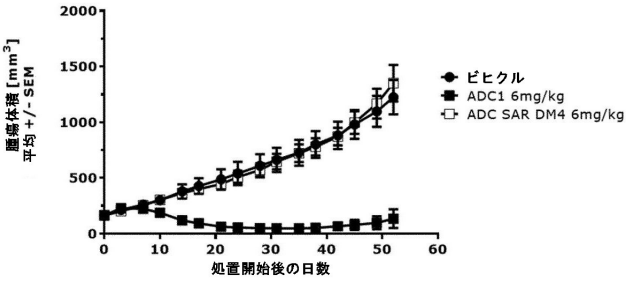
【図３２】

図32:



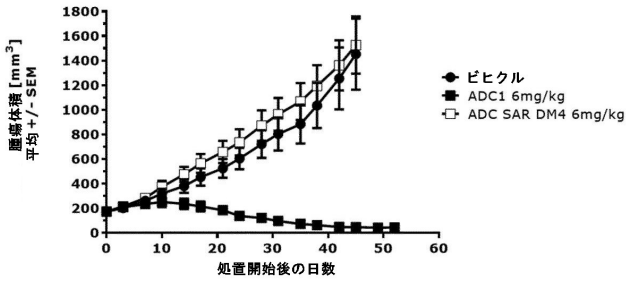
【図３３】

図33:



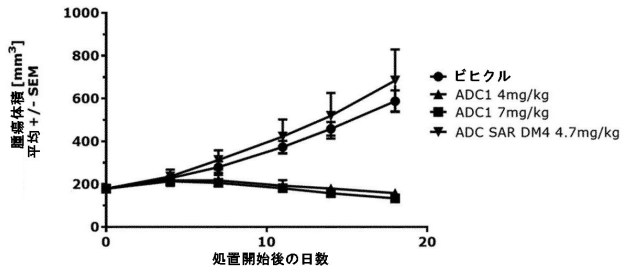
【図３４】

図34:



【図３５】

図35:

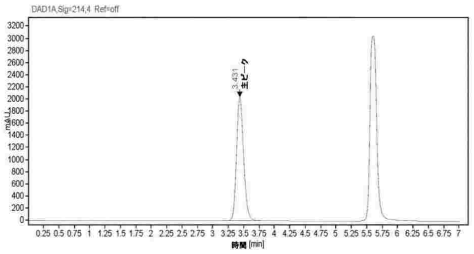


【図３６】

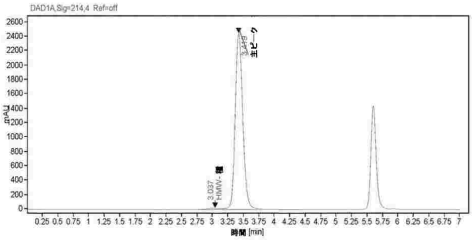
図36:

インプットmAbおよび最終的なBDSの純度を示す典型的なSECクロマトグラム

インプットmAb
純度：100.0%



ADC BDS
純度：98.9%

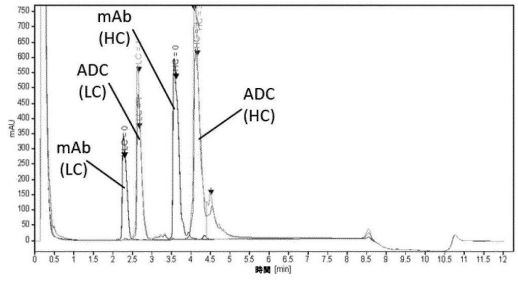


【図３７】

図37:

最終的なBDSのDAR決定を図解する典型的なRP-HPLCクロマトグラム

ADC BDS
DAR= 8.16

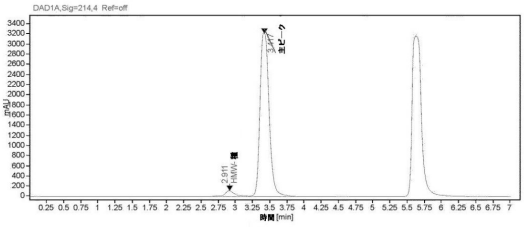


【図３８】

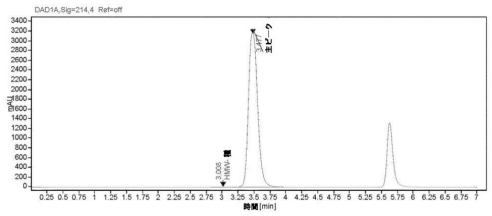
図38:

インプットmAbおよび最終的なBDSの純度を示す典型的なSECクロマトグラム

インプットmAb
純度：96,3%



ADC BDS
純度：99.9

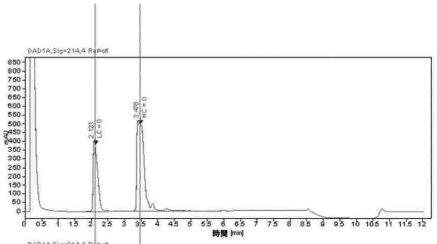


【図３９】

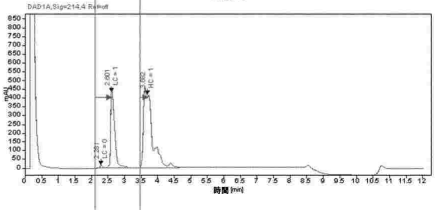
図39:

最終的なBDSのDAR決定を図解する典型的なRP-HPLCクロマトグラム

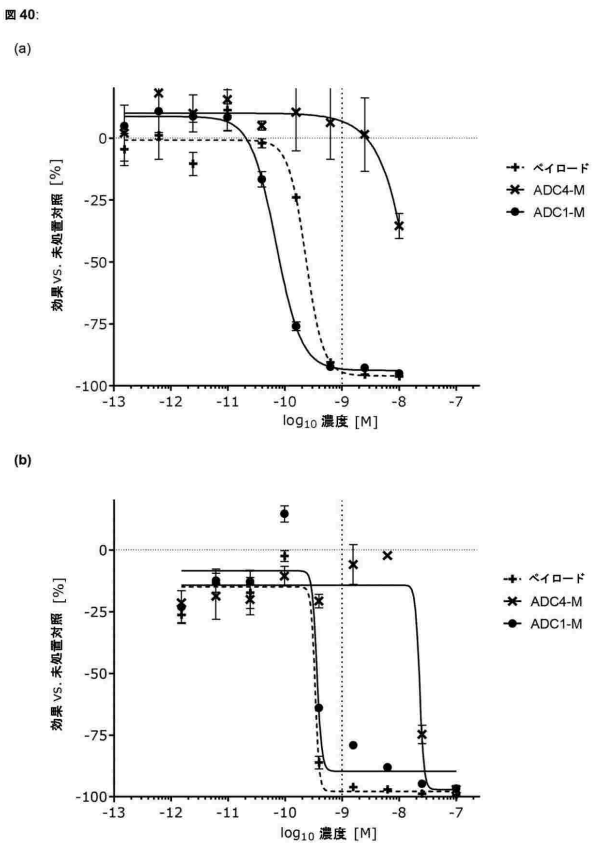
インプットmAb



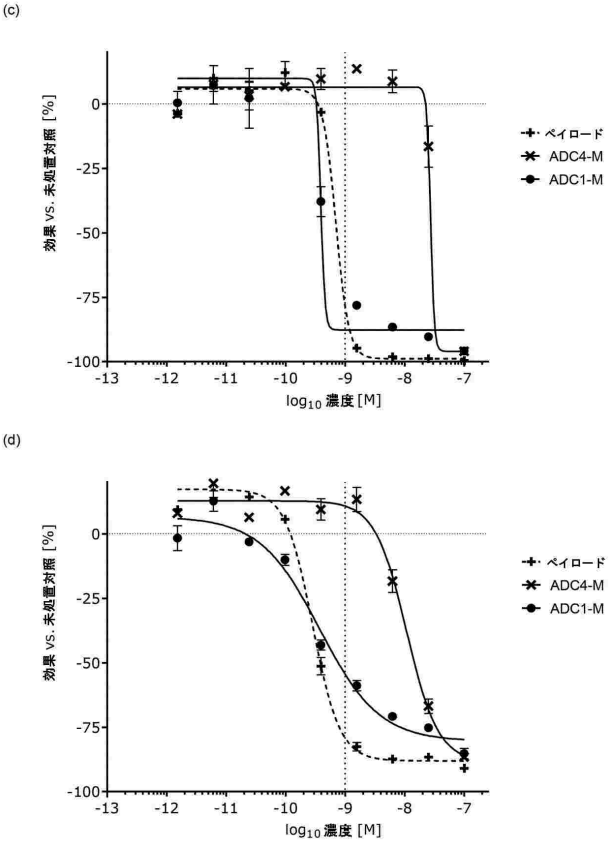
ADC BDS
DAR= 3.87



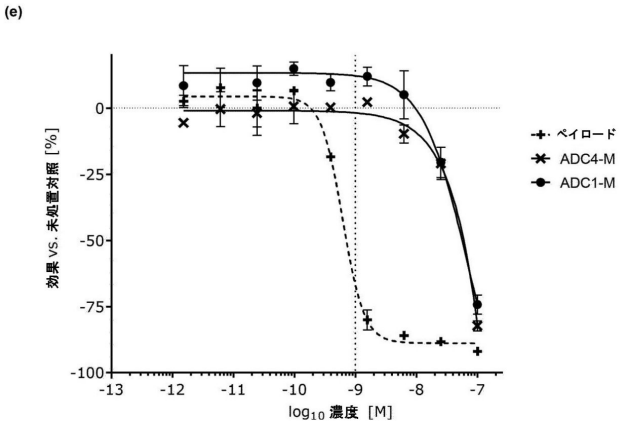
【図４０－１】



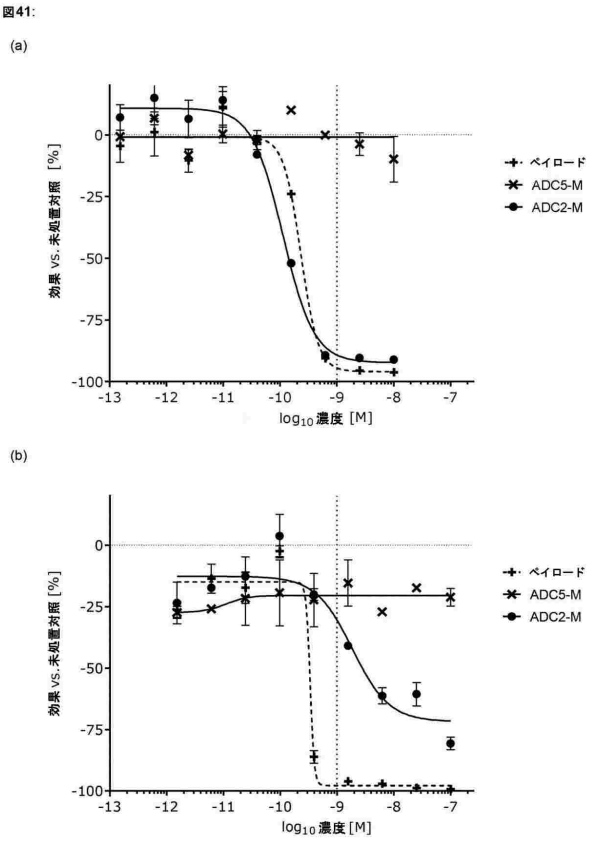
【図４０－２】



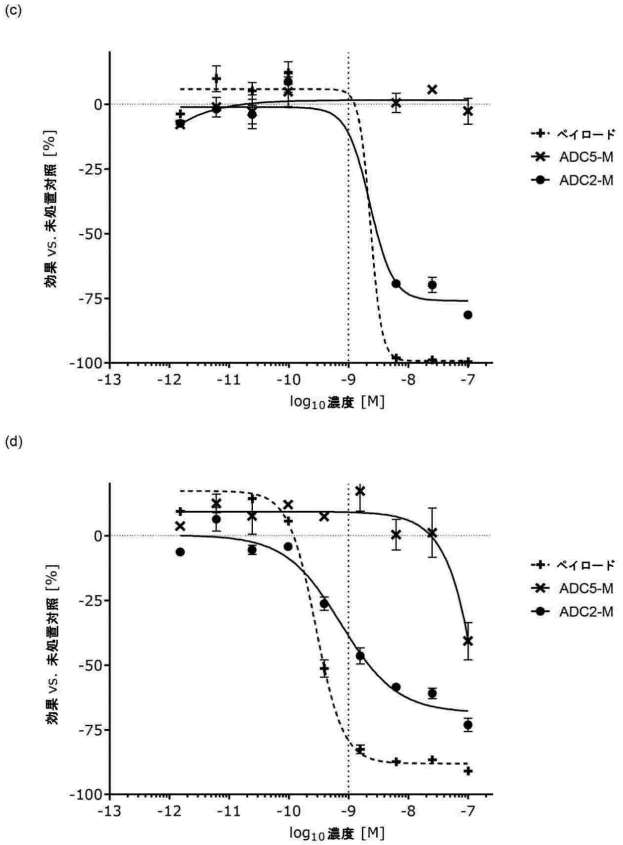
【図４０－３】



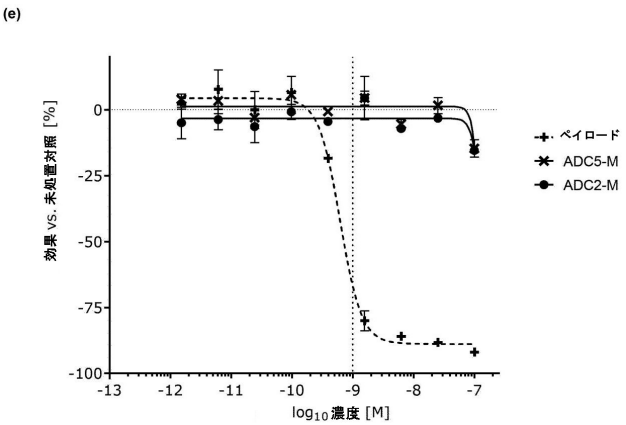
【図４１－１】



【図４１－２】

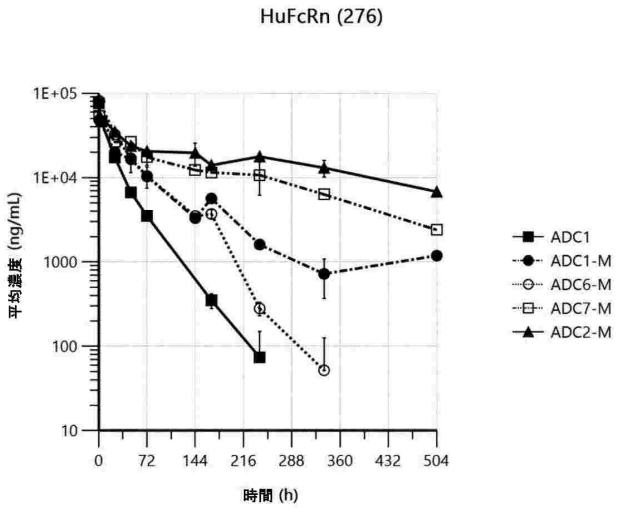


【図４１－３】



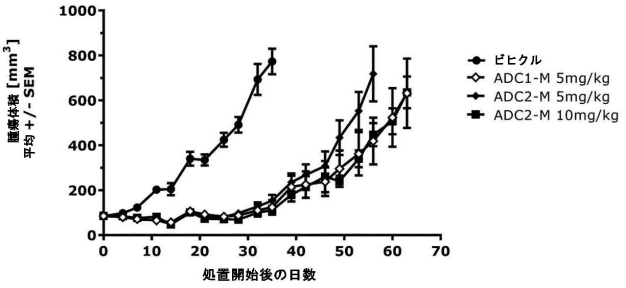
【図４２】

図 42



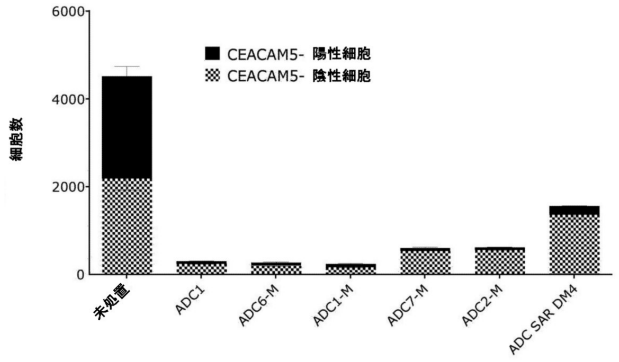
【図４３】

図 43



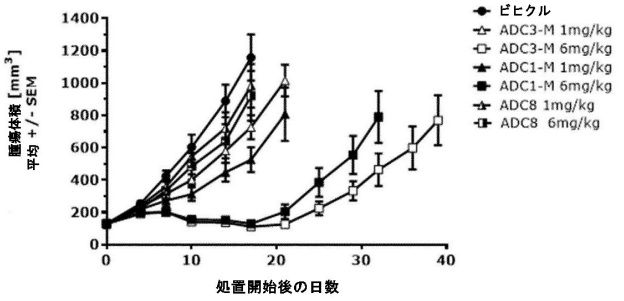
【図４４】

図44



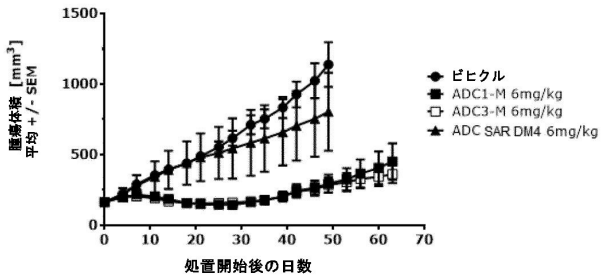
【図４５】

図45



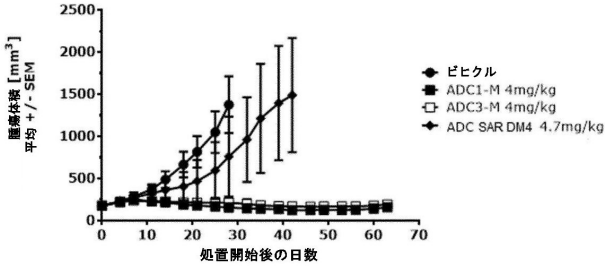
【図４６】

図46



【図４７】

図47



【配列表】

2025509365000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/056081

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. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

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

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/056081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P35/00 C07K16/30
ADD.

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)
A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/121204 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO [CN] ET AL.) 24 June 2021 (2021-06-24) Hu67-14-2-A; claim 20; example 7	1-45
A	WO 2014/079886 A1 (SANOFI SA [FR]) 30 May 2014 (2014-05-30) example all	1-45

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 May 2023	09/06/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fellows, Edward

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/056081

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021121204 A1	24-06-2021	AU 2020410460 A1	16-06-2022
		BR 112022011632 A2	04-10-2022
		CA 3163130 A1	24-06-2021
		CN 114729035 A	08-07-2022
		EP 4079761 A1	26-10-2022
		JP 2023506805 A	20-02-2023
		KR 20220113747 A	16-08-2022
		TW 202128228 A	01-08-2021
		US 2023055408 A1	23-02-2023
		WO 2021121204 A1	24-06-2021
WO 2014079886 A1	30-05-2014	AR 093557 A1	10-06-2015
		AU 2013349733 A1	11-06-2015
		AU 2018267636 A1	13-12-2018
		BR 112015010993 A2	22-08-2017
		CA 2889962 A1	30-05-2014
		CL 2015001321 A1	17-07-2015
		CN 104918958 A	16-09-2015
		CN 109180815 A	11-01-2019
		CR 20150258 A	11-06-2015
		CY 1119219 T1	14-02-2018
		DK 2922875 T3	06-06-2017
		DK 3199552 T3	30-03-2020
		DO P2015000110 A	16-08-2015
		EA 201590986 A1	31-05-2016
		EC SP15025845 A	29-01-2016
		EP 2922875 A1	30-09-2015
		EP 3199552 A1	02-08-2017
		EP 3594243 A1	15-01-2020
		ES 2625742 T3	20-07-2017
		ES 2778823 T3	12-08-2020
		HK 1215444 A1	26-08-2016
		HR P20170743 T1	28-07-2017
		HR P20200415 T1	26-06-2020
		HU E033369 T2	28-11-2017
		JP 6324399 B2	16-05-2018
		JP 2016506370 A	03-03-2016
		KR 20150085828 A	24-07-2015
		KR 20200143527 A	23-12-2020
		KR 20220084193 A	21-06-2022
		LT 2922875 T	12-06-2017
		LT 3199552 T	10-04-2020
		MA 38194 A1	28-02-2018
		MX 358321 B	14-08-2018
		MY 171100 A	25-09-2019
		NZ 708528 A	31-07-2020
		PE 20151180 A1	12-08-2015
		PH 12015501092 A1	27-07-2015
		PL 2922875 T3	31-08-2017
		PL 3199552 T3	01-06-2020
		PT 2922875 T	31-05-2017
		PT 3199552 T	25-03-2020
		SG 11201503285T A	28-05-2015
		SI 3199552 T1	30-06-2020
		TN 2015000177 A1	03-10-2016
		TW 201427997 A	16-07-2014
		TW 201940519 A	16-10-2019
		UA 120247 C2	11-11-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/056081

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2016108131 A1	21-04-2016
		US 2018022817 A1	25-01-2018
		US 2020102401 A1	02-04-2020
		US 2022340682 A1	27-10-2022
		UY 35147 A	30-06-2014
		WO 2014079886 A1	30-05-2014
		ZA 201502959 B	27-01-2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*1/19 (2006.01)*	C12N	1/19		4H045
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		
C07K	*19/00 (2006.01)*	C07K	19/00		
A61P	*35/00 (2006.01)*	A61P	35/00		
A61K	*31/4745(2006.01)*	A61K	31/4745		
A61K	*45/00 (2006.01)*	A61K	45/00		
A61K	*47/68 (2017.01)*	A61K	47/68		
A61K	*39/395(2006.01)*	A61K	39/395	C	
G01N	*33/574(2006.01)*	A61K	39/395	L	
G01N	*33/531(2006.01)*	A61K	39/395	E	
		A61K	39/395	T	
		A61K	39/395	Y	
		G01N	33/574	E	
		G01N	33/531	A	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

２．ＴＲＩＴＯＮ

(72)発明者　アンダール，ジャン
ドイツ連邦共和国　６４２９３　ダルムシュタット、フランクフルター　シュトラーセ　２５０、シー／オー　メルク　ヘルスケアー　カーゲーアーアー

(72)発明者　ヘクト，シュテファン
ドイツ連邦共和国　６４２９３　ダルムシュタット、フランクフルター　シュトラーセ　２５０、シー／オー　メルク　ヘルスケアー　カーゲーアーアー

(72)発明者　ラシェ，ニコラス
ドイツ連邦共和国　６４２９３　ダルムシュタット、フランクフルター　シュトラーセ　２５０、シー／オー　メルク　ヘルスケアー　カーゲーアーアー

(72)発明者　ディッキーザー，シュテファン
ドイツ連邦共和国　６４２９３　ダルムシュタット、フランクフルター　シュトラーセ　２５０、シー／オー　メルク　ヘルスケアー　カーゲーアーアー

(72)発明者　シャン，ミン
ドイツ連邦共和国　６４２９３　ダルムシュタット、フランクフルター　シュトラーセ　２５０、シー／オー　メルク　ヘルスケアー　カーゲーアーアー

(72)発明者　ドイチュ，カール
ドイツ連邦共和国　６４２９３　ダルムシュタット、フランクフルター　シュトラーセ　２５０、シー／オー　メルク　ヘルスケアー　カーゲーアーアー

(72)発明者　スルート，ウィレム
ドイツ連邦共和国　６４２９３　ダルムシュタット、フランクフルター　シュトラーセ　２５０、シー／オー　メルク　ヘルスケアー　カーゲーアーアー

(72)発明者　ラーブ－ウェストファール，ザビーネ
ドイツ連邦共和国　６４２９３　ダルムシュタット、フランクフルター　シュトラーセ　２５０、シー／オー　メルク　ヘルスケアー　カーゲーアーアー

(72)発明者　ハート，フェリックス

ドイツ連邦共和国 ６４２９３ ダルムシュタット、フランクフルター シュトラーセ ２５０、シー／オー メルク ヘルスケアー カーゲーアーアー
(72)発明者 トレイキス，ラーズ
ドイツ連邦共和国 ６４２９３ ダルムシュタット、フランクフルター シュトラーセ ２５０、シー／オー メルク ヘルスケアー カーゲーアーアー
(72)発明者 ベルガー，ニル
イスラエル国 ８１２２０ ヤブネ、ハキション ストリート １８、シー／オー インター－ラブ リミテッド

Ｆターム（参考） 4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA44 CA46
4C076 AA95 BB01 BB13 BB15 BB16 BB24 BB25 CC27 CC41 EE41 EE59 FF31
4C084 AA17 MA05 MA52 MA55 MA58 MA59 MA65 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 BB11 CC22 CC23 DD62 EE01 EE05 GG02 GG03 GG04 GG08
4C086 AA01 AA02 CB22 MA02 MA05 NA05 NA13 ZB26
4H045 AA10 AA30 BA09 BA41 CA40 DA76 DA89 EA20 EA50 FA74