

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7682798号
(P7682798)

(45)発行日 令和7年5月26日(2025.5.26)

(24)登録日 令和7年5月16日(2025.5.16)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30 Z N A
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
請求項の数 17 (全140頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-556712(P2021-556712)	(73)特許権者	506115514
(86)(22)出願日	令和2年3月20日(2020.3.20)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ
(65)公表番号	特表2022-527151(P2022-527151 A)		ィ オブ カリフォルニア
(43)公表日	令和4年5月31日(2022.5.31)		The Regents of the U
(86)国際出願番号	PCT/US2020/023981		niversity of Califo
(87)国際公開番号	WO2020/191342		rnia
(87)国際公開日	令和2年9月24日(2020.9.24)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
審査請求日	令和5年3月20日(2023.3.20)		4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フ
(31)優先権主張番号	62/821,391		ランクリン ストリート 1 1 1 1, 1 2
(32)優先日	平成31年3月20日(2019.3.20)	(74)代理人	番 フロア
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		110002572
			弁理士法人平木国際特許事務所
		(72)発明者	コンクリン, ディラン
			アメリカ合衆国 9 0 0 9 5 - 7 1 9 1
			カリフォルニア州, ロサンゼルス, ウィ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 クローディン6抗体及び薬物複合体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

クローディン6（CLDN6）に結合する単離された抗原結合タンパク質若しくはその抗原結合断片と、細胞毒性薬または化学療法薬と、リンカーとを含む複合体であって、前記抗原結合タンパク質が、以下の(i)及び(ii)、すなわち

(i) 以下のa.～f.を含む抗原結合タンパク質、

a. アミノ酸配列 F T F S X Y X（配列番号455）を含む、H C C D R 1であって、式中、5位のXがNであり、7位のXがWである、

b. アミノ酸配列 I R L K S D N Y A T（配列番号24）を含む、H C C D R 2、

c. アミノ酸配列 X D G P P S G X（配列番号：457）を含む、H C C D R 3であって、式中、1位のXがNであり、8位のXがSである、

d. アミノ酸配列 E N I Y S Y（配列番号14）を含む L C C D R 1、

e. アミノ酸配列 N A K（配列番号15）を含む、L C C D R 2、及び、

f. アミノ酸配列 Q H H Y T V P W T（配列番号16）を含む、L C C D R 3、並びに、

(ii) 配列番号23、24及び25の重鎖(HC)CDR1-3アミノ酸配列、及び、配列番号20、21及び22の軽鎖(LC)CDR1-3アミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質から選択され、

ここで前記リンカーは、前記抗体と前記細胞毒性薬または化学療法薬との間に存在し、かつ、前記リンカーは、VC-PAB、GGFG、及びCLA2からなる群から選択される、

前記複合体。

【請求項 2】

前記リンカーが V C - P A B を含む、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 3】

前記複合体が、V C - P A B - M M A E を含む、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 4】

前記抗原結合タンパク質が、抗体又はその抗原結合抗体断片である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 5】

前記抗原結合タンパク質が、モノクローナル抗体である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の複合体。

10

【請求項 6】

前記モノクローナル抗体が、IgG抗体である、請求項 5 に記載の複合体。

【請求項 7】

前記抗原結合タンパク質が、キメラ抗体、又はヒト化抗体である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 8】

前記抗原結合タンパク質は、配列番号 3 8 7 に記載の重鎖可変ドメインを含み、及び、配列番号 3 8 9 に記載の軽鎖可変ドメイン配列を含むか、または前記の参照されたアミノ酸配列の全長に対して少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有するバリエーションを含むヒト化抗体である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の複合体。

20

【請求項 9】

前記化学療法薬は、チューブリン重合を遮断することにより細胞分裂を阻害する抗有糸分裂剤である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 10】

前記抗有糸分裂剤はアウリスタチンである、請求項 9 に記載の複合体。

【請求項 11】

前記アウリスタチンは M M A E である、請求項 10 に記載の複合体。

【請求項 12】

30

前記複合体は、V C - P A B - M M A E 及び配列番号 3 8 7 及び配列番号 3 8 9 に記載のアミノ酸配列を含むヒト化抗体を含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の複合体、及び薬学的に許容される担体、希釈剤または添加剤を含む、医薬組成物。

【請求項 14】

がんの治療、腫瘍増殖の阻害、腫瘍サイズの縮小、またはがんの再発の予防において使用するための、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の複合体、または請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

40

がんの治療、腫瘍増殖の阻害、腫瘍サイズの縮小、またはがんの再発の予防のための医薬の製造における、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の複合体、または請求項 13 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 16】

試料中のクローディング 6 (C L D N 6) を検出する方法であって、
前記試料と、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の複合体又は請求項 13 に記載の医薬組成物とを接触させること、及び
前記 C L D N 6 に結合している複合体を含む免疫複合体について評価することを含む、前記方法。

【請求項 17】

50

対象におけるクローディン 6 (CLDN6) 陽性のがんを診断する方法に用いるための請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の複合体又は請求項 13 に記載の医薬組成物であって、前記診断方法が、
前記対象から取得した細胞または組織を含む生体試料と、前記複合体又は医薬組成物とを接触させること、及び
前記 CLDN6 に結合している複合体を含む免疫複合体について評価すること
を含む、前記請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の複合体又は請求項 13 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年3月20日に出願された米国仮出願第62/821,391号の利益を主張するものであり、前記出願の全内容は、この参照によりその全体が組み込まれる。

【0002】

電子的に提出された資料の参照による組み込み

参照によりその全体が組み込まれるのは、出願時に同時に提出された、2019年3月20日作成の「54086P1__Seqlisting.txt」というファイル名の338,714 ASCII (テキスト) ファイルとして識別される、コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド/アミノ酸の配列表である。

【背景技術】

【0003】

抗体は、それらが持つ、細胞、細菌、ウイルス、または毒素上の異なる抗原を特異的に標的とする能力のために副作用が限られていることを特徴とする、強力な治療剤を構成する。1986年、初の治療用モノクローナル抗体であるOrthoclone OKT3が市場に導入された。それ以来、このクラスのバイオ医薬品は大きく成長している。2014年後半、がん、ならびに炎症性疾患、心血管疾患、呼吸疾患、及び感染症を含む様々な疾患の治療について47品のモノクローナル抗体製品が米国または欧州で承認を受けた。

【0004】

12品を超えるモノクローナル抗体が現在がんを治療するために米国食品医薬品局 (U.S. Food and Drug administration) により承認されている。これらの薬剤の中には、慢性リンパ性白血病 (CLL) に適応となるアレムツズマブ (Campath (登録商標))、及び乳癌を治療するために使用されるトラスツズマブ (Herceptin (登録商標)) がある。一部の抗体は、例えば、ブレンツキシマブベドチン (Adcetris (登録商標)) 及びトラスツズマブエムタンシン (Kadcyla (登録商標)) 等、化学療法薬で標識されている。ブリナツモマブ (ビーリンサイト) 等の他の抗体製品は、2つの異なる抗原を認識して結合するよう設計されている。そのような抗体製品が市販されているにもかかわらず、現在のがん発生率及びがん死亡は依然として高い。がん発生率は、男女100,000人・年あたり450人超、及びがん死亡率は、男女100,000人・年あたり170人強であることが報告されている。

【発明の概要】

【0005】

本明細書では、クローディン 6 (CLDN6) に結合する抗原結合タンパク質が提供される。様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、ヒト CLDN6 に結合し、任意選択でマウス CLDN6 に結合する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、CLDN6 の細胞外ドメイン (ECD) に結合する。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、CLDN6 の ECD の細胞外ループ 2 (EL2) に結合する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、EL2 に結合し、CLDN6 の ECD の細胞外ループ 1 (EL1) には結合しない。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、ヒトクローディンファミリーの追加の

10

20

30

40

50

メンバー、例えば、クローディン3 (CLDN3)、クローディン4 (CLDN4)、及びクローディン9 (CLDN9) 等に結合する。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、CLDN6、及びCLDN4とCLDN9のうちの少なくとも1つに結合する。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、CLDN6に結合し、クローディンファミリーのいかなる他のメンバーとも結合しない。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、ヒト卵巣癌細胞、例えば、OVCA429細胞により内因的に発現されるCLDN6に結合し、OVCA429細胞を用いたFACS親和性アッセイでは、約1200 nM未満のIC50を示す。様々な場合には、本開示の抗原結合タンパク質は、この抗原結合タンパク質に結合しているいかなる他の部分も含まずに、対象、例えば、ヒトにおける腫瘍増殖を阻害する。

【0006】

10

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、(a) 配列番号504もしくは配列番号507の重鎖CDR1アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、(b) 配列番号505もしくは配列番号508の重鎖CDR2アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、(c) 配列番号506もしくは配列番号509の重鎖CDR3アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、(d) 配列番号449もしくは配列番号476の軽鎖CDR1アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、(e) 配列番号450もしくは配列番号477の軽鎖CDR2アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、(f) 配列番号451もしくは配列番号454の軽鎖CDR3アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、及び／または(g) (a)～(f)のうちいずれか2つ以上の組み合わせ、を含む。

20

【0007】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、(a) 配列番号490～503のうちのいずれか1つの重鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは図22でS1～S12として表示されている重鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、または(b) 配列番号380～383、388～390、479、及び481のうちのいずれか1つの軽鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは図22でS1～S12として表示されている軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、または(a)と(b)の両方、を含む。

30

【0008】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、(a) 配列番号389と490、(b) 配列番号389と491、(c) 配列番号389と492、(d) 配列番号389と493、(e) 配列番号389と494、(f) 配列番号389と495、(g) 配列番号383と496、(h) 配列番号383と497、(i) 配列番号383と498、(j) 配列番号383と499、(k) 配列番号383と500、(l) 配列番号383と501、(m) 配列番号383と503、(n) 配列番号389と502、(o) 図22でS1として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS1として表示されている軽鎖可変領域の配列、(p) 図22でS2として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS2として表示されている軽鎖可変領域の配列、(q) 図22でS3として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS3として表示されている軽鎖可変領域の配列、(r) 図22でS4として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS4として表示されている軽鎖可変領域の配列、(s) 図22でS5として表示されている重鎖可変領域の配列と

40

50

図 2 2 で S 5 として表示されている軽鎖可変領域の配列、(t) 図 2 2 で S 6 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 6 として表示されている軽鎖可変領域の配列、(u) 図 2 2 で S 7 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 7 として表示されている軽鎖可変領域の配列、(v) 図 2 2 で S 7 8 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 8 として表示されている軽鎖可変領域の配列、(w) 図 2 2 で S 8 9 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 9 として表示されている軽鎖可変領域の配列、(x) 図 2 2 で S 9 1 0 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 1 0 として表示されている軽鎖可変領域の配列、(y) 図 2 2 で S 1 1 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 1 1 として表示されている軽鎖可変領域の配列、または (z) 図 2 2 で S 1 2 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 1 2 として表示されている軽鎖可変領域の配列からなる群から選択される 1 対のアミノ酸配列を含む。

10

【0009】

様々な場合には、抗原結合タンパク質は、(a) 配列番号 5 1 0 もしくは 5 1 3 として記載されるかまたは図 2 3 もしくは図 2 5 に記載の重鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するもの、または (b) 配列番号 5 1 1 もしくは 5 1 2 として記載されるかまたは図 2 4 もしくは図 2 6 に記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するもの、または (c) (a) と (b) の両方、を含む。

20

【0010】

様々な場合には、抗原結合タンパク質は、1 対のアミノ酸配列を含み、かかる対は、(a) 配列番号 5 1 0 として記載の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号 5 1 1 として記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 ~ 5 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有し、任意選択で、異なっている 1 ~ 5 個のアミノ酸が、重鎖の場合は図 2 3 に示されているか、もしくは軽鎖の場合は図 2 4 に示されているもの、または (b) 配列番号 5 1 3 として記載の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号 5 1 2 として記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 ~ 5 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するか、または任意選択で、異なっている 1 ~ 5 個のアミノ酸が、重鎖の場合は図 2 5 に示されているか、もしくは軽鎖の場合は図 2 6 に示されているもの、を含む。

30

【0011】

本明細書では、対象、例えば、ヒトにおける腫瘍増殖を阻害する、異種部分に結合させた (例えば、任意の化学療法薬、薬物または毒性部分に結合させた) 抗原結合タンパク質がさらに提供される。様々な場合には、結合させた抗原結合タンパク質は、モノクローナル抗体である。様々な場合には、抗体を、微小管動態を変化させる薬剤、例えば、MMAE に結合させる。様々な場合には、複合体は、切断可能なリンカー、例えば、MC-VCPAB を含む。様々な態様では、複合体は、均一複合体または不均一複合体である。様々な態様では、異種部分を、抗原結合タンパク質の特定の部位にて結合させる。

40

【0012】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、ヒトがん細胞により発現される CLDN6 に結合する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、ヒト CLDN6 と抗 CLDN6 参照抗体との結合相互作用を阻害する。特定の理論に拘束されることなく、本明細書で提供される抗原結合タンパク質の阻害作用により、そのような実体が、腫瘍増殖を抑制し、腫瘍またはがんのある対象を治療する方法において有用となる。本明細書でさらに考察されるように、様々な態様では、抗原結合タンパク質は、抗体、その抗原結合性抗体断片、または抗体タンパク質産物である。

【0013】

50

本開示は、特定のアミノ酸配列群のうちの少なくとも3つ、4つ、5つ、またはすべてのアミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質も提供する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、本明細書に開示されるCLDN6抗体の少なくとも3つ、4つ、5つ、または6つの相補性決定領域(CDR)アミノ酸配列を含む。

【0014】

本開示はさらに、本明細書で詳述されているようなアミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質を提供する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、本明細書で詳述されるように、配列番号490～512のうちいずれか1つのアミノ酸配列、または図22～図26のうちいずれか1つに示されるアミノ酸配列、またはそれらの組み合わせを含む。

【0015】

関連するポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、及び複合体が、本明細書でさらに提供される。そのような実体を含むキット及び医薬組成物がさらに意図される。

【0016】

また、抗原結合タンパク質を作製する方法も提供される。様々な実施形態では、方法は、本明細書に記載されるような抗原結合タンパク質またはポリペプチドを発現するように、かかる抗原結合タンパク質またはポリペプチドをコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含む。

【0017】

がんを有する対象を治療する方法が本明細書でさらに提供される。様々な実施形態では、方法は、本開示の医薬組成物を、対象におけるがんを治療するのに有効な量で対象に投与することを含む。

【0018】

また、本明細書に記載される医薬組成物を対象に投与することを含む、CLDN6発現がんを有する対象を治療する方法も提供される。さらに、本明細書に記載される医薬組成物を対象に投与することを含む、対象における腫瘍増殖を阻害する方法が意図される。

【0019】

本明細書に記載される医薬組成物を対象に投与することを含む、対象における腫瘍サイズを縮小させるか、または対象におけるがんの再発を予防する方法。

【0020】

また、本明細書では、CLDN6の低過剰発現個体であると診断された対象におけるがんを治療する方法も提供され、本明細書に記載される医薬組成物を対象に投与することを含む。

【0021】

様々な実施形態では、投与することにより、腫瘍細胞、例えば、CLDN6発現細胞にアポトーシスが誘導される。様々な実施形態では、投与により、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)もしくは補体依存性細胞傷害(CDC)、腫瘍壊死及び細胞の死もしくは除去、及び／または腫瘍細胞接着の破壊が誘導され、その各々が腫瘍の退縮または腫瘍増殖の減速をもたらす。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】正常(非がん性)組織におけるCLDN6発現のグラフを表す。

【図2】Agilent44Kの方法で決定されたがん細胞株におけるCLDN6発現のグラフを表す。

【図3】RNASeqで決定されたがん細胞株におけるCLDN6発現のグラフを表す。

【図4】異なる細胞モデルにおけるCLDN6-GFPの局在を示す一連の蛍光画像を表す。

【図5】ヒトCLDN6、ヒトCLDN3、ヒトCLDN4、ヒトCLDN9、及びマウスCLDN6の配列アラインメントを表す。EL1及びEL2の配列が示されている。

【図6】Aは、対照IgG2抗体、AB3、参照Ab1、参照Ab2、参照Ab3、AB2、及びAB3による処置後の時間(日数)に応じた、子宮内膜腫瘍担がんマウスの腫瘍

10

20

30

40

50

の腫瘍体積 (mm^3) のグラフを表す。Bは、対照 Ig G 2 抗体、A B 3、参照 A b 1、参照 A b 2、参照 A b 3、A B 2、または A B 3 により処置された子宮内膜腫瘍担がんマウスの腫瘍の 14 日目における腫瘍体積 (mm^3) の平均変化のグラフを表す。

【図 7】Aは、対照 Ig G 2 抗体、A B 3、参照 A b 1、参照 A b 2、及び A B 3 による処置後の時間 (日数) に応じた、膀胱腫瘍担がんマウスの腫瘍の腫瘍体積 (mm^3) のグラフを表す。Bは、対照 Ig G 2 抗体、A B 3、参照 A b 1、参照 A b 2、または A B 3 により処置された膀胱腫瘍担がんマウスの腫瘍の 35 日目における腫瘍体積 (mm^3) の平均変化のグラフを表す。

【図 8】Aは、対照 Ig G 2 抗体、A B 3、参照 A b 1、A B 2、及び A B 3 による処置後の時間 (日数) に応じた、卵巢腫瘍担がんマウスの腫瘍の腫瘍体積 (mm^3) のグラフを表す。Bは、対照 Ig G 2 抗体、A B 3、参照 A b 1、A B 2、または A B 3 により処置された卵巢腫瘍担がんマウスの腫瘍の 20 日目における腫瘍体積 (mm^3) の平均変化のグラフを表す。

10

【図 9】Aは、対照 Ig G 2 抗体、A B 3、参照 A b 1、参照 A b 2、参照 A b 3、及び A B 3 による処置後の時間 (日数) に応じた、メラノーマ腫瘍担がんマウスの腫瘍の腫瘍体積 (mm^3) のグラフを表す。Bは、対照 Ig G 2 抗体、A B 3、参照 A b 1、参照 A b 2、参照 A b 3、または A B 3 により処置されたメラノーマ腫瘍担がんマウスの腫瘍の 21 日目における腫瘍体積 (mm^3) の平均変化のグラフを表す。

【図 10】Aは、対照抗体により処置されたマウスと比べて、A B 3 により処置された担がんマウスで達成された腫瘍増殖抑制 (%) のグラフを表す。Bは、子宮内膜癌細胞株 (A R K 2)、膀胱癌細胞株 (U M U C 4)、卵巢癌細胞株 (O V 9 0) 及びメラノーマ細胞株 (M 2 0 2) 及び対照細胞で異なるレベルの C L D N 6 i d を示すウエスタンブロットの画像を表す。α-チューブリンのレベルはほぼ同じであったことから、ロードしたタンパク質は同等であることが示される。

20

【図 11】ビヒクル対照、対照抗体、参照 A b 1、参照 A b 2、参照 A b 3、及び A B 3 により処置された担がんマウスの時間 (日数) に応じた体重変化 (%) のグラフを表す。

【図 12 A】ビヒクル対照、対照 Ig G 2 抗体、A B 3、参照 A b 1、または示されている抗 C L D N 6 抗体のうちの 1 つによる処置後の時間 (日数) に応じた、卵巢腫瘍担がんマウスの腫瘍の腫瘍体積 (mm^3) のグラフを表す。

【図 12 B】ビヒクル対照、対照 Ig G 2 抗体、A B 3、参照 A b 1、または示されている抗 C L D N 6 抗体のうちの 1 つにより処置された卵巢腫瘍担がんマウスの腫瘍の 28 日目における腫瘍体積 (mm^3) の平均変化のグラフを表す。

30

【図 13】ビヒクル対照、対照抗体、参照 A b 1、及び示されている抗 C L D N 6 抗体により処置された担がんマウスの時間 (日数) に応じた体重変化 (%) のグラフを表す。

【図 14】本発明のいくつかの抗 C L D N 6 抗体ならびに参照 A b 1 及び参照 2 の一連の用量反応曲線を表す。マウス Ig G は、対照として使用した。

【図 15】Aは、ビヒクル対照、対照 Ig G 抗体、A B 3 のマウス型、A B 3 の第 1 のヒト化型、及び A B 3 の第 2 のヒト化型により処置された膀胱腫瘍担がんマウスの腫瘍の 35 日目における腫瘍体積 (mm^3) の平均変化のグラフを表す。Bは、図 15 A の各群についての腫瘍体積 (mm^3) の変化のグラフを表す。

40

【図 16】Aは、ビヒクル対照、対照 Ig G 抗体、A B 3 のマウス型、A B 3 の第 1 のヒト化型、及び A B 3 の第 2 のヒト化型により処置された膀胱腫瘍担がんマウスの腫瘍の 35 日目における腫瘍体積 (mm^3) の平均変化のグラフを表す。2 つの対照抗体 (1 つはマウス、1 つはキメラ) もまた本実験で試験される。Bは、図 16 A の各群についての腫瘍体積 (mm^3) の変化のグラフを表す。

【図 17】Aは、ビヒクル対照、対照 Ig G 抗体、A B 1 のマウス型、及び A B 1 のヒト化型により処置された膀胱腫瘍担がんマウスの腫瘍の 35 日目における腫瘍体積 (mm^3) の平均変化のグラフを表す。Bは、図 17 A の各群についての腫瘍体積 (mm^3) の変化のグラフを表す。

【図 18】Aは、ビヒクル対照、対照 Ig G 抗体、A B 4 のマウス型、及び A B 4 のヒト

50

化型により処置された膀胱腫瘍担がんマウスの腫瘍の35日目における腫瘍体積 (mm^3) の平均変化のグラフを表す。Bは、図18Aの各群についての腫瘍体積 (mm^3) の変化のグラフを表す。

【図19】Aは、ビヒクル対照、対照IgG抗体、AB3のマウス型、AB3のキメラ型、AB3の第1のヒト化型、AB3の第2のヒト化型、Ab1のマウス型、AB1のヒト化型、AB4のマウス型、AB4のヒト化型により処置された膀胱腫瘍担がんマウスの腫瘍の35日目における腫瘍体積 (mm^3) の平均変化のグラフを表し、4つの対照抗体 (1つの抗体はマウス型またはキメラ型を有し、1つの抗体はマウス型またはヒト型を有する) もまた本実験で試験される。Bは、図19Aの各群についての腫瘍体積 (mm^3) の変化のグラフを表す。

10

【図20】図19Aに記載のように処置された膀胱腫瘍担がんマウスの腫瘍の55日目における腫瘍体積 (mm^3) の平均変化のグラフを表す。

【図21】図19Aに記載のように処置された32日目における処置された担がんマウスの体重変化 (%) のグラフを表す。

【図22】作製され、特徴付けされた、12のCLDN6抗体 (名称S1~S12) の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の配列の一覧である。S1~S6は、AB3のヒト化バージョン (ヒト化AB3-7) に基づき、S7~S12は、AB1のヒト化バージョン (ヒト化AB1-11) に基づいた。

【図23】次世代シーケンシング (NGS) で同定された、本開示のCLDN6抗体の例示的な体細胞超変異 (SHM) の概略図である。AB-3系抗体及び重鎖におけるNGSで同定されたSHMの例である。変異は、Chotthiaの番号付けで記載されている。

20

【図24】次世代シーケンシング (NGS) で同定された、本開示のCLDN6抗体の例示的な体細胞超変異 (SHM) の概略図である。AB-3系抗体及び軽鎖におけるNGSで同定されたSHMの例である。変異は、Chotthiaの番号付けで記載されている。

【図25】次世代シーケンシング (NGS) で同定された、本開示のCLDN6抗体の例示的な体細胞超変異 (SHM) の概略図である。AB-1系抗体及び重鎖におけるNGSで同定されたSHMの例である。変異は、Chotthiaの番号付けで記載されている。

【図26】次世代シーケンシング (NGS) で同定された、本開示のCLDN6抗体の例示的な体細胞超変異 (SHM) の概略図である。AB-1系抗体及び軽鎖におけるNGSで同定されたSHMの例である。変異は、Chotthiaの番号付けで記載されている。

30

【図27】ヒト化AB3-7 (ABS1~S6) またはヒト化AB1-11 (ABS7~S12) に基づいたS1~S12の抗体のFACS結合アッセイの結果の表である。試験した濃度は列Dに示されている。

【図28】様々な細胞株における異なる濃度でのS1~S12の抗体のFACS結合アッセイの結果の表である。

【図29】Aは、3種のN-グリカン (オリゴマンノース、複合体及びハイブリッド) 及びそのような糖で一般的に使用される符号の例である。Bは、フコース代謝のサルベージ経路及びデノボ経路の線図である。サルベージ経路では、遊離のL-フコースがGDP-フコースに変換されるが、デノボ経路では、GMD及びFXにより触媒される3つの反応を介してGDP-フコースが合成される。GDP-フコースはその後、GDP-フルクトランスフェラーゼによってサイトゾルからゴルジ体内腔へ輸送され、アクセプターオリゴ糖及びタンパク質に転移される。他の反応生成物であるGDPは、内腔のヌクレオチドジホスファターゼによりグアノシン5-リン酸 (GMP) と無機リン酸塩 (Pi) に変換される。前者は、サイトゾルへ (GDP-フコースの輸送と併せた対抗輸送系を介して) 搬出され、後者は、ゴルジ体アニオンチャネルGOLACを介してゴルジ体内腔を離れると考えられている。例えば、Nordeen et al. 2000; Hirschberg et al. 2001を参照のこと。

40

【図30】ヒトがん細胞の皮下注射に続いて本明細書に記載される処置を受けたマウスにおける腫瘍体積のグラフである。

【図31】ヒトがん細胞の皮下注射に続いて本明細書に記載される処置を受けたマウスに

50

における腫瘍体積のグラフである。

【図32】ヒトがん細胞の皮下注射に続いて本明細書に記載される処置を受けたマウスにおける腫瘍体積のグラフである。

【図33】ヒトがん細胞の皮下注射に続いて本明細書に記載される処置を受けたマウスにおける腫瘍体積のグラフである。

【図34A】AB3-7 (AB23とも呼ぶ) を含むCLDN6 抗体薬物複合体 (ADC) の生化学的特性解析を示す。CLDN6 ADCの生化学的性質をまとめた表である。

【図34B】AB3-7 (AB23とも呼ぶ) を含むCLDN6 抗体薬物複合体 (ADC) の生化学的特性解析を示す。異なる数の薬物と結合させた抗体の相対存在量を示すHIC-HPLCのクロマトグラムを表す。

【図34C】AB3-7 (AB23とも呼ぶ) を含むCLDN6 抗体薬物複合体 (ADC) の生化学的特性解析を示す。異なる数の薬物と結合させた抗体の相対存在量を示すHIC-HPLCのクロマトグラムを表す。

【図34D】AB3-7 (AB23とも呼ぶ) を含むCLDN6 抗体薬物複合体 (ADC) の生化学的特性解析を示す。異なる数の薬物と結合させた抗体の相対存在量を示すHIC-HPLCのクロマトグラムを表す。

【図34E】AB3-7 (AB23とも呼ぶ) を含むCLDN6 抗体薬物複合体 (ADC) の生化学的特性解析を示す。異なる数の薬物と結合させた抗体の相対存在量を示すHIC-HPLCのクロマトグラムを表す。

【図34F】AB3-7 (AB23とも呼ぶ) を含むCLDN6 抗体薬物複合体 (ADC) の生化学的特性解析を示す。異なる数の薬物と結合させた抗体の相対存在量を示すHIC-HPLCのクロマトグラムを表す。

【図34G】AB3-7 (AB23とも呼ぶ) を含むCLDN6 抗体薬物複合体 (ADC) の生化学的特性解析を示す。異なる数の薬物と結合させた抗体の相対存在量を示すHIC-HPLCのクロマトグラムを表す。

【図34H】AB3-7 (AB23とも呼ぶ) を含むCLDN6 抗体薬物複合体 (ADC) の生化学的特性解析を示す。異なる数の薬物と結合させた抗体の相対存在量を示すHIC-HPLCのクロマトグラムを表す。

【図35】Native PAGEにより分析した、AB3-7を含むCLDN6 ADCの分子完全性を示す。

【図36】天然CLDN6 陽性細胞またはCLDN6 を人工的に過剰発現させた細胞に対する、AB3-7を含むCLDN6 抗体薬物複合体 (ADC) の結合活性 (フローサイトメトリー) を示す。

【図37】AB3-7を含むCLDN6 ADCのCLDN6 発現細胞に対する結合親和性を示す。KD (解離定数) 測定は、HEK293T CLDN6-mGFP A11細胞を使用してKinExA 4000 (Sapidyne Instrument, Boise, Idaho) により行われた。

【図38】AB3-7を含むCLDN6 ADCのインビトロ特性解析を示す。パネルは、CLDN6 ADCの細胞内部移行を示す。H23-7はAB3-7を指す。

【図39A】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。AB-3-7を含むCLDN6 ADC、すなわち、MC-VC-PAB-MMAE (従来型) のがん細胞に対する二次元 (2D) 増殖抑制作用を示す。

【図39B】AB-3-7を含むCLDN6 ADC、すなわち、MC-VC-PAB-MMAE (D4技術) のがん細胞に対する二次元 (2D) 増殖抑制作用を示す。

【図39C】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。AB-3-7を含むCLDN6 ADC、すなわち、MC-GGFG-MMAE (D4技術) のがん細胞に対する二次元 (2D) 増殖抑制作用を示す。

【図39D】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。AB-3-7を含むCLDN6 ADC、すなわち、CL2A-SN38 (従来型) のがん細胞に対する二次元 (2D) 増殖抑制作用を示す。

10

20

30

40

50

【図39E】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。AB-3-7を含むCLDN6 ADC、すなわち、CL2A-SN38（D4技術）のがん細胞に対する二次元（2D）増殖抑制作用を示す。

【図39F】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。AB-3-7を含むCLDN6 ADC、すなわち、MC-GGF-G-DXDのがん細胞に対する二次元（2D）増殖抑制作用を示す。

【図39G】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。AB-3-7を含むCLDN6 ADC、すなわち、MC-VC-PAB-DXDのがん細胞に対する二次元（2D）増殖抑制作用を示す。

【図39H】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。がん細胞株、すなわち、ARK2に対する、CLDN6 ADC-11（VC-PAB-MMAEと結合させたAB1-11）の2D増殖抑制作用を示す。

10

【図39I】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。がん細胞株、すなわち、OVCA429に対する、CLDN6 ADC-11（VC-PAB-MMAEと結合させたAB1-11）の2D増殖抑制作用を示す。

【図39J】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。がん細胞株、すなわち、H841に対する、CLDN6 ADC-11（VC-PAB-MMAEと結合させたAB1-11）の2D増殖抑制作用を示す。

【図39K】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。がん細胞株、すなわち、OV90に対する、CLDN6 ADC-11（VC-PAB-MMAEと結合させたAB1-11）の2D増殖抑制作用を示す。

20

【図39L】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。がん細胞株、すなわち、H1693に対する、CLDN6 ADC-11（VC-PAB-MMAEと結合させたAB1-11）の2D増殖抑制作用を示す。

【図39M】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。がん細胞株、すなわち、M202に対する、CLDN6 ADC-11（VC-PAB-MMAEと結合させたAB1-11）の2D増殖抑制作用を示す。

【図39N】CLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。がん細胞株、すなわち、MCF7に対する、CLDN6 ADC-11（VC-PAB-MMAEと結合させたAB1-11）の2D増殖抑制作用を示す。

30

【図40】CLDN6 陽性卵巣癌細胞株（OV90）異種移植片に対するCLDN6 ADC-11のインビボ抗がん効果を示す。

【図41】A-Bは、CLDN6 陰性メラノーマがん細胞株（M202）異種移植片に対し、CLDN6 ADC-11は抗がん活性がないことを示す。

【図42A】がん細胞株異種移植片に対するCLDN6 ADC-23（AB3-7-VC-PAB-MMAE）のインビボ抗がん効果を示す。CLDN6 陽性膀胱細胞株（UMUC4）異種移植片に対するCLDN6 ADC-23の抗がん活性を示す。

【図42B】がん細胞株異種移植片に対するCLDN6 ADC-23（AB3-7-VC-PAB-MMAE）のインビボ抗がん効果を示す。対照抗体または5mg/kgのADC-23による処置後の示されている時点に採取した異種移植片組織のヘマトキシリン・エオシン（H&E）染色を示す。

40

【図43A】卵巣癌患者由来の異種移植片（PDX）に対するCLDN6 ADC-23のインビボ抗がん効果を示す。ウエスタンブロット法によりCLDN6 発現についてスクリーニングを行った卵巣PDX試料のパネルを示す。

【図43B】卵巣癌患者由来の異種移植片（PDX）に対するCLDN6 ADC-23のインビボ抗がん効果を示す。免疫不全マウス（NSG）の腹腔内への、ルシフェラーゼ酵素をトランスフェクトしたPDX卵巣癌細胞の注射を示す概略図である。

【図43C】卵巣癌患者由来の異種移植片（PDX）に対するCLDN6 ADC-23のインビボ抗がん効果を示す。本明細書に記載されるCLDN6 ADC-23により処置されたマウスの生存率を示す。

50

【図43D】 卵巣癌患者由来の異種移植片（PDX）に対するCLDN6 ADC-23のインビボ抗がん効果を示す。本明細書に記載されるCLDN6 ADC-23により処置されたマウスの生存率を示す。

【図43E】 卵巣癌患者由来の異種移植片（PDX）に対するCLDN6 ADC-23のインビボ抗がん効果を示す。本明細書に記載されるCLDN6 ADC-23により処置されたマウスの生存率を示す。

【図44】 Aは、CLDN6陽性卵巣癌細胞株（OV90）異種移植片に対するCLDN6 ADC-23の用量依存性の抗がん効果を示す。示されている用量及び時間での腫瘍サイズの縮小を示す。Bは、CLDN6陽性卵巣癌細胞株（OV90）異種移植片に対するCLDN6 ADC-23の用量依存性の抗がん効果を示す。示されている用量及び時間での腫瘍サイズの縮小を示す。Cは、CLDN6陽性卵巣癌細胞株（OV90）異種移植片に対するCLDN6 ADC-23の用量依存性の抗がん効果を示す。CLDN6 ADC-23を投与されたマウスの体重の変化（%）を示す。

【図45】 Aは、CLDN6陰性メラノーマがん細胞株（M202）異種移植片においてCLDN6 ADC-23のオフターゲット活性はないことを示す。腫瘍体積の変化を示す。Bは、CLDN6陰性メラノーマがん細胞株（M202）異種移植片においてCLDN6 ADC-23のオフターゲット活性はないことを示す。腫瘍体積の変化を示す。腫瘍体積は21日目に測定された。Cは、CLDN6陰性メラノーマがん細胞株（M202）異種移植片においてCLDN6 ADC-23のオフターゲット活性はないことを示す。CLDN6 ADC-23を投与されたマウスの体重の変化（%）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

クローディンファミリー

【0024】

タイトジャンクションは、閉鎖結合（occluding junction）または閉鎖帯（zonulae occludente）としても知られ、傍細胞透過性を制御し、上皮細胞シート及び内皮細胞シートでの細胞極性を維持する隣接する2つの細胞の間に位置する脊椎動物の構造である。クローディン（CLDN）ファミリーの遺伝子は、タイトジャンクションの重要構成成分である膜タンパク質をコードする。CLDNタンパク質は、4つの膜貫通（TM）ヘリックス（TM1、TM2、TM3、及びTM4）及び2つの細胞外ループ（EL1及びEL2）を含む。隣接する細胞のCLDNタンパク質の細胞外ループは、互いに相互作用して細胞シートを密着させ、内腔と側底間隙の間の傍細胞輸送を制御する。

【0025】

CLDNタンパク質は、ヒトの様々な疾患及び病理に関与している。例えば、CLDN1遺伝子の変異は、胆管の閉塞と共に皮膚の進行性鱗屑を引き起こすことが示されている。CLDN16遺伝子の変異体は、マグネシウム消耗障害を引き起こす。CLDN19の変異は、黄斑コロボマータ（macular colobomata）及び近視等の眼疾患をもたらす。CLDN14の変異は非症候性劣性難聴をもたらす。CLDN3及びCLDN4は、腸管内のClostridium perfringensエンテロトキシンの表面受容体であることが知られており、CLDN1、CLDN6、及びCLDN9は、C型肝炎ウイルス（HCV）の侵入に対する共受容体である。いくつかのCLDNタンパク質は、がんで異常に発現されることが示されている。例えば、CLDN1は、乳癌及び結腸癌で下方制御されているが、CLDN3及びCLDN4は多発性癌で高度に上方制御されている。

【0026】

クローディン6（CLDN6）はCLDNファミリーのメンバーである。ヒトCLDN6タンパク質をコードする遺伝子は、ヒトの16番染色体短腕上16p13.3に位置し、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、ウシ、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、及びカエルで保存されている。CLDN6は一般に、ヒトではアミノ酸が220個の前駆体タン

パク質として発現され、そのうち最初の21番目までのアミノ酸はシグナルペプチドを構成する。CLDN6前駆体タンパク質のアミノ酸配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のウェブサイトにてNCBI Reference Sequence NP_067018.2として公的に利用可能であり、本明細書では、配列番号1として提供されている。配列番号1の143位のアミノ酸はIleである。場合によっては、CLDN6をコードするDNA配列での一塩基多型 (SNP) のため、143位のアミノ酸はValである。143位にValを有するヒトCLDN6のアミノ酸配列は、本明細書では、配列番号178として提供されている。

【0027】

抗原結合タンパク質

【0028】

本明細書では、抗原結合タンパク質 that は、に結合するクローニン6 (CLDN6)、が提供される。本開示の抗原結合タンパク質は、当該技術分野で公知の抗原結合タンパク質の数ある形態のうちのいずれか1つの形態を取り得る。様々な実施形態では、本開示の抗原結合タンパク質は、抗体、もしくは抗原結合性抗体断片、または抗体タンパク質産物の形態を取る。

【0029】

本開示の様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、抗体を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。本明細書で使用される場合、用語「抗体」とは、通常型免疫グロブリンフォーマットを有するタンパク質を指し、重鎖及び軽鎖を含み、かつ可変領域及び定常領域を含む。例えば、抗体は、同一の2対のポリペプチド鎖が「Y字形」構造をし、各対が1本の「軽」鎖（典型的には分子量が約25kDaである）と1本の「重」鎖（典型的に分子量が約50～70kDaである）を有するIgGであり得る。抗体は、可変領域及び定常領域を有する。IgGフォーマットでは、可変領域は一般に、アミノ酸が約100～110個以上であり、3つの相補性決定領域 (CDR) を含み、主に抗原認識に関与し、異なる抗原に結合する他の抗体と実質的に異なる。定常領域は、抗体が免疫系の細胞及び分子を動員するのを可能にする。可変領域は、軽鎖及び重鎖それぞれのN末端領域でできており、定常領域は、重鎖及び軽鎖のそれぞれのC末端部分でできている。(Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. Elsevier Science Ltd. / Garland Publishing, (1999))。

【0030】

抗体のCDRの一般構造及び特性は当該技術分野で報告されている。簡単に言えば、抗体足場では、CDRは、重鎖及び軽鎖の可変領域のフレームワーク内に埋め込まれて、抗原の結合と認識に大きく関与する領域を構成する。可変領域は典型的には、重鎖または軽鎖の少なくとも3つのCDR (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N. I. H., Bethesda, Md., また Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917, Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883も参照のこと) を、フレームワーク領域内 (Kabat et al., 1991による指定フレームワーク領域1～4のFR1、FR2、FR3、及びFR4; 上掲 Chothia and Lesk, 1987も参照のこと) に含む。

【0031】

抗体は、当該技術分野で公知のいずれの定常領域でも含むことができる。ヒト軽鎖は、カッパ軽鎖とラムダ軽鎖に分類される。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンに分類され、それぞれ、抗体のアイソタイプをIgM、IgD、IgG、

10

20

30

40

50

I g A、及び I g E と定義する。I g G にはいくつかのサブクラスがあり、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4 が挙げられるが、これらに限定されない。I g M にはサブクラスがあり、I g M 1 及び I g M 2 が挙げられるが、これらに限定されない。本開示の実施形態には、抗体のそのようなクラスまたはアイソタイプすべてが含まれる。軽鎖定常領域は、例えば、カップ型またはラムダ型の軽鎖定常領域、例えば、ヒトのカップ型またはラムダ型の軽鎖定常領域であり得る。重鎖定常領域は、例えば、アルファ型、デルタ型、イプシロン型、ガンマ型、またはミュー型の重鎖定常領域、例えば、ヒトのアルファ型、デルタ型、イプシロン型、ガンマ型、またはミュー型の重鎖定常領域であり得る。したがって、様々な実施形態では、抗体は、アイソタイプ I g A、I g D、I g E、I g G、または I g M の抗体であり、これには I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 の任意の 1 つが含まれる。様々な態様では、抗体は、半減期／安定性を改善するため、または抗体を発現／製造性についてより好適なものにするために、天然に存在するアミノ酸と比べて 1 つ以上のアミノ酸修飾を含む定常領域を含む。様々な場合には、抗体は、天然に存在する定常領域には存在する C 末端 L y s 残基が除去またはクリッピングされている定常領域を含む。

【0032】

抗体はモノクローナル抗体であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は、哺乳類、例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ハムスター、ヒト等により産生される、天然に存在する抗体と実質的に同様の配列を含む。これに関し、抗体は、哺乳類の抗体、例えば、マウス抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ウマ抗体、ニワトリ抗体、ハムスター抗体、ヒト抗体等と見なされ得る。特定の態様では、抗原結合タンパク質は、ヒト抗体等の抗体である。特定の態様では、抗原結合タンパク質は、キメラ抗体またはヒト化抗体である。用語「キメラ抗体」とは、2 つ以上の異なる抗体からのドメインを含有する抗体を指す。キメラ抗体は、例えば、ある種からの定常ドメインと第 2 の種からの可変ドメインを含有することができるか、またはより一般的には、少なくとも 2 つの種からのアミノ酸配列の区間を含有することができる。A キメラ抗体はまた、同じ種内の 2 つ以上の異なる抗体のドメインを含有することができる。抗体との関連で使用される用語「ヒト化」とは、非ヒト材料からの C D R 領域を少なくとも有する抗体であって、元の供給源抗体よりも、真のヒト抗体に似ている構造及び免疫学的機能を有するよう操作されているものを指す。例えば、ヒト化させることには、マウス抗体等の非ヒト抗体からの C D R をヒト抗体に移植することを伴い得る。ヒト化させることにはまた、よりヒト配列に似た非ヒト配列を作るためにアミノ酸置換を選択することを伴い得る。ヒト抗体の重鎖及び軽鎖の定常領域についての配列情報等の情報は、抗体工学と生産の分野の当業者に周知の U n i p r o t データベース及び他のデータベースから公的に入手可能である。例えば、I g G 2 定常領域は、U n i p r o t データベースから U n i p r o t 番号 P 0 1 8 5 9 として入手可能であり、参照により本明細書に組み込まれる。

【0033】

抗体は、酵素、例えば、パパイン及びペプシン等により断片に切断され得る。パパインは、抗体を切断して 2 つの F a b 断片と単一 F c 断片を生成する。ペプシンは、抗体を切断して F (a b ')₂ 断片と p F c ' 断片を生成する。本開示の様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、抗体の抗原結合断片（抗原結合性抗体断片、抗原結合断片、抗原結合部分としても知られる）である。様々な場合には、抗原結合性抗体断片は、F a b 断片または F (a b ')₂ 断片である。

【0034】

抗体の構造は、分子量の範囲が少なくとも約 1 2 ～ 1 5 0 k D a に及び、結合価 (n) の範囲が単量体 (n = 1) をはじめ、二量体 (n = 2)、三量体 (n = 3)、四量体 (n = 4)、また可能性としてさらに高いものに至るまで、広がりつつある範囲の代替的抗体フォーマットを作製するために利用されてきており、そのような代替的抗体フォーマットは本明細書では「抗体タンパク質産物」と呼ばれる。抗体タンパク質産物には、完全な抗体構造に基づいたもの、ならびに完全な抗原結合能を保持する抗体断片、例えば、s c F

v、F a b及びV H H／V H（以下で考察）を模倣するものが含まれる。抗原結合断片で、その完全な抗原結合部位を保持する最小の抗原結合断片はF v断片であり、可変（V）領域のみからなる。分子の安定化のために可溶性で可動性のアミノ酸ペプチドリinkerを使用してV領域をs c F v（単鎖可変領域）断片に接続するか、または定常（C）ドメインをV領域に付加してF a b断片〔断片、抗原結合〕を生成する。s c F v及びF a bのいずれの断片も、宿主細胞、例えば、原核生物の宿主細胞中で容易に産生させることができる。他の抗体タンパク質産物としては、ジスルフィド結合で安定化されたs c F v（d s－s c F v）、一本鎖F a b（s c F a b）、ならびにオリゴマー形成ドメインに連結されたs c F vからなる各種フォーマットを含むダイアボディ、トリアボディ及びテトラボディ、またはミニボディ（mini A b）のような、二量体及び多量体の抗体フォーマットが含まれる。最小断片は、ラクダ類重鎖A bのV H H／V H、及び単一ドメインA b（s d A b）である。新規抗体フォーマットを作るために最も頻用される構成要素は一本鎖可変（V）ドメイン抗体断片（s c F v）であり、約15アミノ酸残基のペプチドリinkerで連結された、重鎖及び軽鎖からのVドメイン（V Hドメイン及びV Lドメイン）を含む。ペプチボディまたはペプチドーF c融合体は、さらに別の抗体タンパク質産物である。ペプチボディの構造は、F cドメインに移植された生物活性ペプチドからなる。ペプチボディは、当該技術分野で十分に記載されている。例えば、Shimamoto et al. , m A b s 4（5）：586－591（2012）を参照のこと。

【0035】

他の抗体タンパク質産物には、一本鎖抗体（S C A）、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異性または三重特異性抗体等が含まれる。二重特異性抗体は、5つの主要クラス、すなわち、B s I g G、付加のあるI g G、二重特異性抗体（B s A b）断片、二重特異性融合タンパク質、及びB s A b複合体に分けられる。例えば、Spie ss et al. , Molecular Immunology 67（2）Part A：97－106（2015）を参照のこと。

【0036】

様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、これらの抗体タンパク質産物のうちのいずれか1つを含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、s c F v、F a b V H H／V H、F v断片、d s－s c F v、s c F a b、二量体抗体、多量体抗体（例えば、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ）、mini A b、ラクダ類重鎖抗体のペプチボディV H H／V H、s d A b、ダイアボディ；トリアボディ；テトラボディ；二重特異性または三重特異性抗体、B s I g G、付加のあるI g G、B s A b断片、二重特異性融合タンパク質、及びB s A b複合体のうちのいずれか1つを含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。

【0037】

様々な場合には、本開示の抗原結合タンパク質は、単量体形態、または重合体、オリゴマー、もしくは多量体の形態にある抗体タンパク質産物である。抗体が、2つ以上の別個の抗原結合領域の断片を含む特定の実施形態では、抗体は、抗体が認識して結合する別個のエピトープの数に応じて、二重特異性、三重特異性、もしくは多重特異性、または二価、三価、または多価とされる。

【0038】

様々な実施形態では、抗C L D N 6抗体またはその変異抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、抗原結合性抗体断片、一本鎖抗体、単量体抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、F a b断片、I g G 1抗体、I g G 2抗体、I g G 3抗体、及びI g G 4抗体からなる群から選択される。

【0039】

様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、治療剤に連結されている。以下に記載のように、治療剤は、当該技術分野で公知のいずれであってもよく、これには化学療法薬、サイトカイン及び成長因子、細胞傷害性薬物等が含まれるが、これらに限定されない

10

20

30

40

50

。下記「複合体」を参照のこと。

【0040】

CLDN6及びエピトープ

【0041】

本開示の抗原結合タンパク質は、CLDN6に結合する。様々な態様では、CLDN6は、以下のアミノ酸配列を有するヒトCLDN6である。

MASAGMQILGVVLTLLGWVNGLVSCALPMWKVTAFIGNSIVVAQV
VWEGLWMSCVVQSTGQMCKVYDSLLALPQDLQAARALCVIAL
VALFGLLVYLAGAKCTTCVEEKDSKARLVLTSGIVFVISGVLTLIPVC
WTAHAXIRDFYNPLVAEAQKRELGLGWAASGLLLGGGLLC
CTCPSGGSQGPSHYMARYSTSAPAIRGPSEYPTKNYV

10

ここで、Xは、IleまたはValである（配列番号202）。

【0042】

様々な態様では、ヒトCLDN6は、配列番号1、178、及び200～202のうちいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0043】

様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、CLDN6のアミノ酸配列内のエピトープに結合する。様々な態様では、CLDN6はヒトCLDN6であり、本開示の抗原結合タンパク質は、ヒトCLDN6のアミノ酸配列内、例えば、配列番号1、178、及び200～202内のエピトープに結合する。「エピトープ」とは、抗原結合タンパク質が結合する、CLDN6の領域またはCLDN6内の領域を意味する。いくつかの実施形態では、エピトープは、線状エピトープである。「線状エピトープ」とは、抗原結合タンパク質が結合する、CLDN6の領域またはCLDN6内の領域であって、その領域が、CLDN6のアミノ酸配列の連続するアミノ酸で構成されるものを指す。線状エピトープのアミノ酸は、CLDN6の一次構造において互いに隣接している。したがって、線状エピトープは、抗原、すなわち、CLDN6のアミノ酸配列の断片または部分である。他の様々な実施形態では、エピトープは、立体構造エピトープまたは構造エピトープである。

20

「立体構造エピトープ」または「構造エピトープ」とは、CLDN6がその適切に折り畳まれた状態にある場合にのみ互いに近接して位置するアミノ酸で構成されるエピトープを意味する。線状エピトープとは異なり、立体構造エピトープまたは構造エピトープのアミノ酸は、CLDN6の一次構造（すなわち、アミノ酸配列）において互いに隣接していない。立体構造エピトープまたは構造エピトープは、抗原（CLDN6）のアミノ酸配列の連続するアミノ酸で作られていない。

30

【0044】

様々な態様では、エピトープは、CLDN6、例えば、ヒトCLDN6の細胞外ドメイン（ECD）内に位置する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、WTAHAIRDFYNPLVAEAQKRELのアミノ酸配列（配列番号2）を有する、CLDN6のECDの細胞外ループ2（EL2）に結合する。様々な態様では、抗原結合タンパク質が結合するエピトープは、配列番号2内にある。様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、配列番号2のN末端部分、例えば、TAHAIRDFYNPL（配列番号3）に結合する。様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、配列番号2のC末端部分、例えば、LVAEAQKREL（配列番号4）に結合する。様々な場合には、本開示の抗原結合タンパク質は、EL2に結合するが、CLDN6の細胞外ループ1（EL1）には結合しない。様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質が結合するエピトープ（複数可）は、配列番号185の配列を含む軽鎖可変領域と配列番号186の配列を含む重鎖可変領域とを含む抗CLDN6抗体が結合するエピトープとは異なる。様々な態様では、

40

50

本開示の抗原結合タンパク質が結合するエピトープ（複数可）は、配列番号 181 の配列を含む軽鎖可変領域と配列番号 182 の配列を含む重鎖可変領域とを含む抗 CLDN6 抗体が結合するエピトープとは異なる。

【0045】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、ヒト CLDN6 及び非ヒト CLDN6 に結合する。様々な場合には、非ヒト CLDN6 は、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、ウシ、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、またはカエルの CLDN6 である。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、ヒト CLDN6 及びマウス CLDN6 に結合する。

【0046】

親和性及び結合力

【0047】

本明細書で提供される抗原結合タンパク質は、非共有結合及び可逆的様態で CLDN6 に結合する。様々な実施形態では、CLDN6 に対する抗原結合タンパク質の結合強度は、抗原結合タンパク質の結合部位とエピトープ間の相互作用の強さの尺度である、その親和性で表され得る。様々な態様では、本明細書で提供される抗原結合タンパク質は、CLDN6 に対する高親和性を有しているため低親和性の抗原結合タンパク質よりも短期間で大量の CLDN6 と結合する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、平衡会合定数 K_A が少なくとも 10^5 mol^{-1} 、少なくとも 10^6 mol^{-1} 、少なくとも 10^7 mol^{-1} 、少なくとも 10^8 mol^{-1} 、少なくとも 10^9 mol^{-1} であるか、または少なくとも 10^{10} mol^{-1} であるか、または少なくとも 10^{10} mol^{-1} であるか、または最低でも 10^{10} mol^{-1} である。当業者には理解されるように、 K_A は、pH、温度及び緩衝液組成等の因子により影響され得る。

【0048】

様々な実施形態では、CLDN6 に対する抗原結合タンパク質の結合強度は、その感受性で表され得る。 K_D は、抗原結合タンパク質と CLDN6 間の k_{off}/k_{on} の比である平衡解離定数である。 K_D 及び K_A は逆相関する。 K_D 値は、抗原結合タンパク質の濃度（特定の実験に必要とされる抗原結合タンパク質の量）と関連するため、 K_D 値が低いほど（低い濃度）抗原結合タンパク質の親和性は高い。様々な態様では、CLDN6 に対する抗原結合タンパク質の結合強度は、 K_D で表され得る。様々な態様では、本明細書で提供される抗原結合タンパク質の K_D は、約 10^{-1} 、約 10^{-2} 、約 10^{-3} 、約 10^{-4} 、約 10^{-5} 、約 10^{-6} 、またはそれ以下である。様々な態様では、本明細書で提供される抗原結合タンパク質の K_D は、マイクロモル、ナノモル、ピコモル～またはフェムトモルである。様々な態様では、本明細書で提供される抗原結合タンパク質の K_D は、約 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ または $10^{-7} \sim 10^{-9}$ または $10^{-10} \sim 10^{-12}$ または $10^{-13} \sim 10^{-15}$ の範囲内である。様々な態様では、本明細書で提供される抗原結合タンパク質の K_D は、約 $1.0 \times 10^{-12} \text{ M} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ の範囲内である。様々な態様では、抗原結合タンパク質の K_D は、約 $1.0 \times 10^{-11} \text{ M} \sim 1.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ の範囲内である。

【0049】

様々な態様では、抗原結合タンパク質の親和性は、フローサイトメトリーまたは蛍光活性化細胞分類（FACS）に基づくアッセイを使用して測定または順位付けが行われる。フローサイトメトリー系の結合アッセイは当該技術分野で公知である。例えば、Cedeno-Arias et al., Sci Pharm 79 (3): 569-581 (2011)、Rathanaswami et al., Analytical Biochem 373: 52-60 (2008)、及び Geuijen et al., J Immunol Methods 302 (1-2): 68-77 (2005) を参照のこと。様々な態様では、抗原結合タンパク質の親和性は、Tripathi et al., Int J Cancer 110: 326-335 (2004) 及び Tam et al., Circulation 98 (11): 1085-1091 (1998)、ならびに以下に記載の競合アッセイを使用して測定または順位付けが行われる。下記「競合アッセイ」と

10

20

30

40

50

題された項を参照のこと。T r i k h e t a l . では、抗原を発現する細胞がラジオアッセイで使用された。 ^{125}I 標識した抗原結合タンパク質（例えば、抗体）の細胞表面抗原への結合は、浮遊状態の細胞を用いて測定される。様々な態様では、C L D N 6 抗体の相対親和性は F A C S に基づくアッセイにより決定され、その場合、フルオロフォアに結合させた様々な濃度の C L D N 6 抗体を C L D N 6 発現細胞と共にインキュベートし、放たれる蛍光（抗体－抗原結合の直接の尺度である）を決定する。それぞれの用量または濃度をプロットする曲線を作成する。最大値は、蛍光が横ばいになるかまたは最大に達する際、すなわち、結合飽和が起こっている時の最低濃度である。最大値の半分を E C 5 0 または I C 5 0 と見なし、E C 5 0 / I C 5 0 が最も低い抗体は、同じ方法で試験した他の抗体と比べて最も高い親和性を有すると見なされる。そのようなアッセイは、本明細書で実施例 5 において記載されている。

10

【0050】

様々な態様では、競合的結合阻害アッセイで決定された I C 5 0 値は、抗原結合タンパク質の K_D に近似する。様々な場合には、以下に考察するように、競合アッセイは、参照抗体、フルオロフォア結合済み二次抗体、及び C L D N 6 を発現する細胞を用いて行われる F A C S に基づくアッセイである。様々な態様では、細胞は、C L D N 6 を過剰発現するよう遺伝子操作される。いくつかの態様では、細胞は、C L D N 6 を発現するようウイルスベクターで形質導入されている H E K 2 9 3 T 細胞である。代替的態様では、細胞は、C L D N 6 を内因的に発現する。F A C S に基づくアッセイを行う前に、いくつかの態様では、C L D N 6 を内因的に発現する細胞は、C L D N 6 低発現細胞または C L D N 6 高発現細胞であるとして事前に決定される。いくつかの態様では、細胞は、がんまたは腫瘍細胞である。様々な態様では、細胞は、細胞株、例えば、卵巣細胞株、子宮内膜細胞株、膀胱細胞株、肺細胞株、上部消化管（G I）細胞株、肝細胞株、肺細胞株等からの細胞である。様々な態様では、C L D N 6 を内因的に発現する細胞は、O V C A 4 2 9 卵巣細胞、A R K 2 子宮内膜細胞、O A W 2 8 卵巣細胞、U M U C - 4 膀胱細胞、P E O 1 4 卵巣細胞、O V 1 7 7 卵巣細胞、H 1 6 9 3 肺細胞、M K N 7 上部消化管細胞、O V - 9 0 卵巣細胞、H U H - 7 肝細胞、J H O S - 4 卵巣細胞、H 1 4 3 5 肺細胞、及び N U G C 3 上部消化管細胞からなる群から選択される。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、細胞により発現されるヒト C L D N 6 と参照抗体との結合相互作用を阻害し、ここで、参照抗体は C L D N 6 に結合することが既知であるが、本開示の抗原結合タンパク質ではない。様々な場合には、本開示の抗原結合タンパク質は、ヒト C L D N 6 への結合を参照抗体と競合し、それにより、インビトロ競合結合アッセイで決定される、参照抗体に結合しているヒト C L D N 6 の量を減少させる。様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、ヒト C L D N 6 と参照抗体との結合相互作用を阻害し、その阻害は、I C 5 0 により特徴付けられる。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、ヒト C L D N 6 と参照抗体との結合相互作用を阻害する場合に約 2 5 0 0 n M 未満の I C 5 0 を示す。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、約 2 0 0 0 n M 未満、約 1 5 0 0 n M 未満、約 1 0 0 0 n M 未満、約 9 0 0 n M 未満、約 8 0 0 n M 未満、約 7 0 0 n M 未満、約 6 0 0 n M 未満、約 5 0 0 n M 未満、約 4 0 0 n M 未満、約 3 0 0 n M 未満、約 2 0 0 n M 未満、または 1 0 0 n M 未満の I C 5 0 を示す。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、約 9 0 n M 未満、約 8 0 n M 未満、約 7 0 n M 未満、約 6 0 n M 未満、約 5 0 n M 未満、約 4 0 n M 未満、約 3 0 n M 未満、約 2 0 n M 未満、または 1 0 n M 未満の I C 5 0 を示す。様々な場合には、本開示の抗原結合タンパク質は、C L D N 6 に結合することが既知の参照抗体に対し（参照抗体は、本開示の抗原結合タンパク質のいずれとも異なる）、C L D N 6 への結合を競合する。詳細は、「競合アッセイ」下を参照のこと。

20

30

40

【0051】

結合力から、抗体－抗原複合体の全体的強さの尺度が得られる。これは、3つの主要パラメータ、すなわち、抗原結合タンパク質のエピトープに対する親和性、抗原結合タンパク質と C L D N 6 の両方の結合価、及び相互作用する部分の構造配置に応じて異なる。抗原結合タンパク質の結合価（抗原結合部位の数）が大きいほど、それが結合できる抗原（

50

CLDN6)の量は多くなる。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、CLDN6に対する結合力が強い。様々な態様では、抗原結合タンパク質は多価である。様々な態様では、抗原結合タンパク質は二価である。様々な場合には、抗原抗原結合タンパク質は一価である。

【0052】

交差反応性

【0053】

様々な実施形態では、本開示の抗原結合タンパク質は、CLDN6に結合し、CLDNファミリーのいかなる他のメンバーとも結合しない、例えば、CLDNファミリーのいかなる他のメンバーとも交差反応しない。様々な場合には、本開示の抗原結合タンパク質は、CLDN6特異的である。様々な実施形態では、本開示の抗原結合タンパク質はCLDN6に対する選択性を有し、抗原結合タンパク質のCLDN3、CLDN4、CLDN9、またはその組み合わせに対する選択性よりも少なくとも10倍、5倍、4倍、3倍、2倍大きい。様々な実施形態では、本開示の抗原結合タンパク質はCLDN6に対する選択性を有し、抗原結合タンパク質のCLDN3、CLDN4、及びCLDN9それぞれに対する選択性よりも少なくとも10倍、5倍、4倍、3倍、2倍大きい。選択性は、CLDN6またはCLDNファミリーメンバーに対して抗原結合タンパク質が示す K_D に基づいてよく、 K_D は、当該技術分野で公知の技術、例えば、表面プラズモン共鳴、FACSに基づく親和性アッセイにより決定され得る。

【0054】

様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質はCLDN6に結合し、クローディン3 (CLDN3)、クローディン4 (CLDN4)、及びクローディン9 (CLDN9)のいずれにも結合しない。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、CLDN3、CLDN4、及びCLDN9のいずれにも結合せず、CLDN6を内因的に発現するOVCA429細胞を用いたFACSに基づくアッセイにおいて約1200nM未満 (例えば、約1000nM未満、約750nM未満、約500nM未満、約250nM未満)の IC_{50} を示す。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、CLDN3、CLDN4、及びCLDN9のいずれにも結合せず、CLDN6を内因的に発現するOVCA429細胞で結合飽和の50%が達成される濃度は約1200nM未満 (例えば、約1000nM未満、約750nM未満、約500nM未満、約250nM未満)である。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、CLDN3、CLDN4、及びCLDN9に対する選択性よりも少なくとも5倍大きい選択性をCLDN6に対して示し、CLDN6を内因的に発現するOVCA429細胞で結合飽和の50%が達成される濃度は約1200nM未満 (例えば、約1000nM未満、約750nM未満、約500nM未満、約250nM未満)である。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、CLDN6の人工モデル及び内在性モデルに対して約1200nM未満 (例えば、約1000nM未満、約750nM未満、約500nM未満、約250nM未満)の IC_{50} を示し、CLDN6の IC_{50} と、CLDN3、CLDN4及び／またはCLDN9とを区別する約5倍超の比を示す。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、CLDN6に対して約1200nM未満 (例えば、約1000nM未満、約750nM未満、約500nM未満、約250nM未満)の IC_{50} を示し、その IC_{50} より少なくとも5倍大きい IC_{50} をCLDN3、CLDN4、及びCLDN9のいずれか1つに対して示す。

【0055】

様々な実施形態では、本開示の抗原結合タンパク質はCLDN6に結合し、CLDNファミリーの少なくとも1つの他のメンバーと交差反応する (例えば、結合する)。様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、CLDN6、ならびにCLDN3、CLDN4、及びCLDN9のうちの1つ以上に結合する。様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、CLDN6及びCLDN4またはCLDN9に結合するが、CLDN3には結合しない。様々な場合には、本開示の抗原結合タンパク質は、CLDN6及びCLDN4に結合するが、CLDN3にもCLDN9にも結合しない。様々な場合には、本開示の

抗原結合タンパク質は、CLDN6及びCLDN9に結合するが、CLDN3またはCLDN4のいずれにも結合しない。

【0056】

競合アッセイ

【0057】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、ヒトCLDN6と参照抗体との結合相互作用を阻害し、ここで、参照抗体はCLDN6に結合することが既知であるが、本開示の抗原結合タンパク質ではない。様々な場合には、本開示の抗原結合タンパク質は、ヒトCLDN6への結合を参照抗体と競合し、それにより、インビトロ競合結合アッセイで決定される、参照抗体に結合しているヒトCLDN6の量を減少させる。様々な実施形態では、参照抗体は、ヒトCLDN6の細胞外ドメインのアミノ酸配列内、任意選択で、EL2またはEL1内のエピトープに結合する。様々な態様では、参照抗体は、配列番号179によりコードされる軽鎖可変配列、及び配列番号180によりコードされる重鎖可変配列を含む。様々な態様では、参照抗体は、配列番号181の軽鎖可変配列、及び配列番号182の重鎖可変配列を含む。様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、ヒトCLDN6と参照抗体との結合相互作用を阻害し、その阻害は、IC₅₀により特徴付けられる。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、ヒトCLDN6と参照抗体との結合相互作用を阻害する場合に約2500nM未満のIC₅₀を示す。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、約2000nM未満、約1500nM未満、約1000nM未満、約900nm未満、約800nm未満、約700nm未満、約600nm未満、約500nm未満、約400nm未満、約300nm未満、約200nm未満、または100nm未満のIC₅₀を示す。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、約90nM未満、約80nM未満、約70nM未満、約60nM未満、約50nM未満、約40nM未満、約30nM未満、約20nM未満、または10nM未満のIC₅₀を示す。

【0058】

様々な場合には、本開示の抗原結合タンパク質は、ヒトCLDN6への結合を参照抗体と競合し、それにより、インビトロ競合結合アッセイで決定される、参照抗体に結合しているヒトCLDN6の量を減少させる。様々な態様では、インビトロでの競合結合アッセイはFACSに基づくアッセイであり、参照抗体のFcに結合するフルオロフォア結合済み二次抗体の蛍光を、特定量の本開示の抗原結合タンパク質の非存在下または存在下で測定する。そのようなFACSに基づくアッセイは、本明細書において実施例で記載されている。様々な態様では、FACSに基づくアッセイは、参照抗体、フルオロフォア結合済み二次抗体及びCLDN6を発現する細胞を用いて行われる。様々な態様では、細胞は、CLDN6を過剰発現するよう遺伝子操作される。いくつかの態様では、細胞は、CLDN6を発現するようウイルスベクターで形質導入されているHEK293T細胞である。代替的態様では、細胞は、CLDN6を内因的に発現する。FACSに基づくアッセイを行う前に、いくつかの態様では、CLDN6を内因的に発現する細胞は、CLDN6低発現細胞またはCLDN6高発現細胞であるとして事前に決定される。いくつかの態様では、細胞は、がんまたは腫瘍細胞である。様々な態様では、細胞は、細胞株、例えば、卵巣細胞株、子宮内膜細胞株、膀胱細胞株、肺細胞株、上部消化管（GI）細胞株、肝細胞株、肺細胞株等からの細胞である。様々な態様では、CLDN6を内因的に発現する細胞は、OVCA429卵巣細胞、ARK2子宮内膜細胞、OAW28卵巣細胞、UMUC-4膀胱細胞、PEO14卵巣細胞、OV177卵巣細胞、H1693肺細胞、MKN7上部消化管細胞、OV-90卵巣細胞、HUH-7肝細胞、JHOS-4卵巣細胞、H1435肺細胞、及びNUGC3上部消化管細胞からなる群から選択される。様々な場合には、本開示の抗原結合タンパク質は、ARK2細胞、OVCA429細胞、LS513細胞、またはMCF7細胞のうちの1つ以上により内因的に発現されるCLDN6に高い親和性で結合する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、ARK2細胞、OVCA429細胞、LS513細胞、またはMCF7細胞のうちの1つ以上を使用したFACSに基づく競合的結合阻害アッセイで決定されるIC₅₀が約3000nM未満を示す。様々な態様

10

20

30

40

50

では、抗原結合タンパク質は、ARK2細胞、OVCA429細胞、LS513細胞、またはMCF7細胞のうちの1つ以上を使用したFACSに基づく競合的結合阻害アッセイで決定されるIC₅₀が約2500nM未満、約2000nM未満、約1750nM未満、約1500nM未満、約1250nM未満、約1000nM未満、約750nM未満、または約500nM未満を示す。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、ARK2細胞、OVCA429細胞、LS513細胞、またはMCF7細胞のうちの1つ以上を使用したFACSに基づく競合的結合阻害アッセイで決定されるIC₅₀が約400nM未満、約300nM未満、約200nM未満、約100nM未満、約75nM未満、約50nM未満、約25nM未満、または約10nM未満を示す。

【0059】

抗体が、抗原またはそのエピトープへの結合を第2の抗体と競合する能力を試験する他の結合アッセイ、例えば、競合結合アッセイまたは競合アッセイは、当該技術分野で公知である。例えば、Trikha et al., Int J Cancer 110:326-335 (2004)、Tam et al., Circulation 98(11):1085-1091 (1998)を参照のこと。米国特許出願公開第US20140178905号、Chand et al., Biologicals 46:168-171 (2017)、Liu et al., Anal Biochem 525:89-91 (2017)、及びGoolia et al., J Vet Diagn Invest 29(2):250-253 (2017)。また、2つの抗体を比較する他の方法も当該技術分野で公知であり、これには、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)が含まれる。SPRは、抗体及び第2の抗体の結合定数を決定するために使用することができ、その2つの結合定数を比較することができる。

【0060】

抗体作製方法及び関連方法

【0061】

抗原結合タンパク質(例えば、抗体、抗原結合性抗体断片、及び抗体タンパク質産物)を作製する好適な方法は当該技術分野で公知である。例えば、抗体を作製するための標準的ハイブリドーマ法は、例えば、Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988)、及びCA. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001))に記載されている。本開示のCLDN6モノクローナル抗体を調製する様々な方法は、本明細書において実施例で提供されている。

【0062】

宿主種に応じて、宿主による大量の抗体産生をもたらす免疫学的応答を増大させるために様々なアジュバントを使用することができる。そのようなアジュバントとしては、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウム等のミネラルゲル、ならびにリゾレシチン、プルロニック系ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、及びジニトロフェノール等の界面活性物質が挙げられるが、これらに限定されない。BCG (bacilli Calmette-Guerin) 及びCorynebacterium parvumは、有用なヒトアジュバントである可能性がある。

【0063】

他の抗体作製方法を表1にまとめている。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

技術	各種参考文献
EBV-ハイブリドーマ法及びバクテリオファージベクター発現系	Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74 (2), 361-67 (1984), Roder et al., Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986)、及びHuse et al., Science, 246, 1275-81 (1989))。
非ヒト動物で抗体を産生させる方法	米国特許第5,545,806号、第5,569,825号、及び第5,714,352号、ならびに米国特許出願公開第2002/0197266号
リンパ球集団においてインビボでの産生を誘導するか、または高度に特異的な結合試薬の組換え免疫グロブリンライブラリーまたはパネルをスクリーニングすることによる	Orlandi et al (Proc Natl Acad Sci 86:3833-3837; 1989), and Winter G and Milstein C (Nature 349:293-299, 1991)。
組換えタンパク質を作製する方法	Protein production and purification” Nat Methods 5 (2):135-146 (2008)。
ファージディスプレイ	Janeway et al., 上記参照、Huse et al., 上記参照、及び米国特許第6,265,150号)。関連方法はまた、米国特許第5,403,484号、米国特許第5,571,698号、米国特許第5,837,500号、米国特許第5,702,892号に記載されている。米国特許第5,780,279号、米国特許第5,821,047号、米国特許第5,824,520号、米国特許第5,855,885号、米国特許第5,858,657号、米国特許第5,871,907号、米国特許第5,969,108号、米国特許第6,057,098号、及び米国特許第6,225,447号に記載の技術
抗体は、トランスジェニックマウスにより産生することができる	米国特許第5,545,806号及び第5,569,825号、及びJaneway et al. (上掲)。

【0064】

抗体がどのように産生されるかにかかわらず、抗体をCLDN6のエピトープに結合する能力について試験する方法は当該技術分野で公知であり、これには、任意の抗体-抗原結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ELISA、ウェスタンブロット、免疫沈降法、SPR、及び競合的阻害アッセイ等(例えば、Janeway et al., 下記、及び米国特許出願公開第2002/0197266号、ならびに競合アッセイに関連する上記の項を参照のこと)が含まれる。

【0065】

配列／構造

【0066】

本明細書では、(a)表Aに記載の重鎖(HC)相補性決定領域(CDR)1のアミノ酸配列、もしくは配列番号11、17、23、29、35、41、47、53、59、65、71、77、83、89、95、101、107、113、119、125、及び131からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%(例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%)の配列同一性を有するもの、(b)表Aに記載のHC CDR2のアミノ酸配列、もしくは配列番号12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、86、102、108、114、120、126、及び132からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%(例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%)の配列同一性を有するもの、(c)表Aに記載のHC CDR3のアミノ酸配列、もしくは配列番号13、19、25、31、37、43、49、55、61、67、73、79、85、91、97、103、109、115、121、127、及び133からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%(例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%)の配列同一性を有するもの、(d)表Aに記載の軽鎖(LC)CDR1のアミノ酸配列、もしくは配列番号8、14、20、32、38、44、50、56、62、68、74、80、86、92、98、104、110、116、122、及び128からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%(例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%)の配列同一性を有するもの、(e)表Aに記載のLC CDR2のアミノ酸配列、もしくは配列番号9、15、21、27、33、39、45、51、57、63、69、75、81、87、93、99、105、111、117、123、及び129からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%(例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%)の配列同一性を有するもの、(f)表Aに記載のLC CDR3のアミノ酸配列、もしくは配列番号10、16、22、28、34、40、46、52、58、64、70、76、82、88、94、100、106、112、118、124、及び130からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%(例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%)の配列同一性を有するもの、あるいは(g)(a)～(f)のうちいずれか2つ以上の組み合わせを含む抗原結合タンパク質が提供される。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 A

	L C C D R 1	L C C D R 2	L C C D R 3	H C C D R 1	H C C D R 2	H C C D R 3
A B 1	8	9	1 0	1 1	1 2	1 3
A B 2	1 4	1 5	1 6	1 7	1 8	1 9
A B 3	2 0	2 1	2 2	2 3	2 4	2 5
A B 4	2 6	2 7	2 8	2 9	3 0	3 1
A B 5	3 2	3 3	3 4	3 5	3 6	3 7
A B 6	3 8	3 9	4 0	4 1	4 2	4 3
A B 7	4 4	4 5	4 6	4 7	4 8	4 9
A B 8	5 0	5 1	5 2	5 3	5 4	5 5
A B 9	5 6	5 7	5 8	5 9	6 0	6 1
A B 1 0	6 2	6 3	6 4	6 5	6 6	6 7
A B 1 1	6 8	6 9	7 0	7 1	7 2	7 3
A B 1 2	7 4	7 5	7 6	7 7	7 8	7 9
A B 1 3	8 0	8 1	8 2	8 3	8 4	8 5
A B 1 4	8 6	8 7	8 8	8 9	9 0	9 1
A B 1 5	9 2	9 3	9 4	9 5	9 6	9 7
A B 1 6	9 8	9 9	1 0 0	1 0 1	1 0 2	1 0 3
A B 1 7	1 0 4	1 0 5	1 0 6	1 0 7	1 0 8	1 0 9
A B 1 8	1 1 0	1 1 1	1 1 2	1 1 3	1 1 4	1 1 5
A B 1 9	1 1 6	1 1 7	1 1 8	1 1 9	1 2 0	1 2 1
A B 2 0	1 2 2	1 2 3	1 2 4	1 2 5	1 2 6	1 2 7
A B 2 1	1 2 8	1 2 9	1 3 0	1 3 1	1 3 2	1 3 3

【0067】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表 A に記載の L C C D R 1 アミノ酸配列、L C C D R 2 アミノ酸配列、及び L C C D R 3 アミノ酸配列と、表 A に記載の H C C D R アミノ酸配列のうち少なくとも 1 つまたは 2 つを含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表 A に記載の H C C D R 1 アミノ酸配列、H C C D R 2 アミノ酸配列、及び H C C D R 3 アミノ酸配列と、表 A に記載の L C C D R アミノ酸配列のうち少なくとも 1 つまたは 2 つを含む。

【0068】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、表 A で横 1 列にある配列番号により指定

されるアミノ酸配列のうち少なくとも3つ、4つ、または5つを含む。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、表Aの横1列にある配列番号により指定されるLC CDRアミノ酸配列の各々と、表Aの横1列内の配列番号により指定されるHC CDRアミノ酸配列のうち少なくとも1つまたは2つを含む。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、表Aの横1列にある配列番号により指定されるLC CDRアミノ酸配列の各々と、表Aの横1列にある配列番号により指定されるLC CDRアミノ酸配列のうち少なくとも1つまたは2つを含む。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、表Aの横1列にある配列番号により指定されるCDRアミノ酸配列の全6配列を含む。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、(a) 配列番号74～79、(b) 配列番号50～55、(c) 配列番号122～127、(d) 配列番号26～31、(e) 配列番号128～133、(f) 配列番号38～43、(g) 配列番号62～67、(h) 配列番号80～85、(i) 配列番号44～49、(j) 配列番号86～91、(k) 配列番号104～109、(l) 配列番号56～61、(m) 配列番号32～37、(n) 配列番号110～115、(o) 配列番号98～103、(p) 配列番号92～97、(q) 配列番号116～121、(r) 配列番号8～13、(s) 配列番号68～73、(t) 配列番号14～19、及び(u) 配列番号20～25からなる群から選択される6つのCDRアミノ酸配列を含む。

【0069】

様々な場合には、表Aのアミノ酸配列は、少なくとも1個以上（例えば、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上）の介在アミノ酸（複数可）によって区切られる。様々な場合には、LC CDR1とLC CDR2の配列の間には約10～約20個のアミノ酸があり、LC CDR2とLC CDR3の配列の間には約25～約40個のアミノ酸がある。様々な場合には、LC CDR1とLC CDR2の配列の間には約14～約16個のアミノ酸があり、LC CDR2とLC CDR3の配列の間には約30～約35個のアミノ酸がある。様々な場合には、HC CDR1とHC CDR2の配列の間には約10～約20個のアミノ酸があり、HC CDR2とHC CDR3の配列の間には約25～約40個のアミノ酸がある。様々な場合には、HC CDR1とHC CDR2の配列の間には約14～約16個のアミノ酸があり、HC CDR2とHC CDR3の配列の間には約30～約35個のアミノ酸がある。

【0070】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、(a) 表Bに記載の重鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは配列番号135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、及び175からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%（例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%）の配列同一性を有するもの、あるいは(b) 表Bに記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは配列番号134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、及び176からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%（例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%）の配列同一性を有するもの、あるいは(c) (a) と(b) の両方、を含む。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 B

	軽鎖可変 領域	重鎖可変 領域
A B 1	1 3 4	1 3 5
A B 2	1 3 6	1 3 7
A B 3	1 3 8	1 3 9
A B 4	1 4 0	1 4 1
A B 5	1 4 2	1 4 3
A B 6	1 4 4	1 4 5
A B 7	1 4 6	1 4 7
A B 8	1 4 8	1 4 9
A B 9	1 5 0	1 5 1
A B 1 0	1 5 2	1 5 3
A B 1 1	1 5 4	1 5 5
A B 1 2	1 5 6	1 5 7
A B 1 3	1 5 8	1 5 9
A B 1 4	1 6 0	1 6 1
A B 1 5	1 6 2	1 6 3
A B 1 6	1 6 4	1 6 5
A B 1 7	1 6 6	1 6 7
A B 1 8	1 6 8	1 6 9
A B 1 9	1 7 0	1 7 1
A B 2 0	1 7 2	1 7 3
A B 2 1	1 7 4	1 7 5

10

20

30

40

【0071】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、(a) 配列番号156と157、(b) 配列番号148と149、(c) 配列番号172と173、(d) 配列番号140と141、(e) 配列番号174と175、(f) 配列番号144と145、(g) 配列番号152と153、(h) 配列番号158と159、(i) 配列番号146と147、(j) 配列番号160と161、(k) 配列番号166と167、(l) 配列番号150と151、(m) 配列番号142と143、(n) 配列番号168と169、(o) 配列番号164と165、(p) 配列番号162と163、(q) 配列番号170と171、(r) 配列番号134と135、(s) 配列番号154と155、(t) 配列番号136と13

50

7、及び（u）配列番号138と139からなる群から選択される1対のアミノ酸配列を含む。

【0072】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号179と180の配列によりコードされる1対のアミノ酸配列を含まない。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号181と182の1対のアミノ酸配列を含まない。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号183と184の配列によりコードされる1対のアミノ酸配列を含まない。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号185と186の1対のアミノ酸配列を含まない。

【0073】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、前述のアミノ酸配列と類似するアミノ酸配列を含むが、抗原結合タンパク質はなおも、その生物学的機能、例えば、ヒトCLDN6に結合し、腫瘍増殖を低下させ、がんを治療するその能力を実質的に保持する。

【0074】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、前述のアミノ酸配列（複数可）と比べて1個、2個、3個、4個、5個、6個、またはそれ以上のアミノ酸のみが異なるアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、言及されている配列の変異配列を含み、その変異配列は、言及されている配列と比べて1個か2個のアミノ酸のみが異なる。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、CDRの外側で生じる1つ以上のアミノ酸置換、例えば、重鎖または軽鎖のフレームワーク領域（複数可）内部で生じる1つ以上のアミノ酸置換を含んでいる。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、1つ以上のアミノ酸置換を含んでいるが、抗原結合タンパク質はなおも6つのCDRのアミノ酸配列を保持する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、前述のアミノ酸配列（複数可）と比べて1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、またはそれ以上の保存的アミノ酸置換のみを有するアミノ酸配列を含む。本明細書で使用される場合、用語「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸の、同様の特性、例えば、サイズ、電荷、疎水性、親水性、及び／または芳香族性を有する別のアミノ酸での置換を指し、これには、以下の5群のうちの1群の内部での交換が含まれる。

I. 小さい非極性またはわずかに極性の脂肪族残基：

Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；

II. 負の電荷を帯びた極性残基及びそれらのアミドとエステル：

Asp、Asn、Glu、Gln、システイン酸及びホモシステイン酸；

III. 正の電荷を帯びた極性残基：

His、Arg、Lys；オルニチン（Orn）

IV. 大きい脂肪族非極性残基：

Met、Leu、Ile、Val、Cys、ノルロイシン（Nle）、ホモシステイン

V. 大きい芳香族残基：

Phe、Tyr、Trp、アセチルフェニルアラニン

【0075】

様々な態様では、保存的アミノ酸置換は、以下のアミノ酸群のうちの1群の内部での交換である。

10

20

30

40

50

I.	脂肪族アミノ酸：G l y、A l a、V a l、L e u、I l e
II.	側鎖にヒドロキシルを含む非芳香族アミノ酸：S e r、C h r
III.	イオウの側鎖を含むアミノ酸：C y s、M e t
IV.	側鎖に芳香環を含むアミノ酸：P h e、T y r、T r p
V.	酸性アミノ酸：G l u；A s p
VI.	塩基性アミノ酸：A r g；L y s
VII.	側鎖にアミドを含むアミノ酸：G l n、A s n
VIII.	側鎖にイミダゾールを含むアミノ酸：H i s、アルファ ージメチルイミダゾール酢酸（D M I A）
IX.	イミノ酸：P r o、4-ヒドロキシ-P r o、4-アミ ノ-P r o

10

【0076】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、前述のアミノ酸配列に対する約30%もしくはそれより高い、約50%もしくはそれより高い、または約70%もしくはそれより高い配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、前述のアミノ酸配列に対する少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、もしくは90%より高い配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、前述のアミノ酸配列の全長に沿って少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、もしくは90%より高い配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、前述のアミノ酸配列の全長に沿って少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

30

【0077】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、言及されている配列の変異配列を含み、その変異配列は、前述の配列に対する約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、言及されている配列の変異配列を含み、その変異配列は、前述の配列に対する約もしくは少なくとも80%の配列同一性を有する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、言及されている配列の変異配列を含み、その変異配列は、前述の配列に対する約もしくは少なくとも90%の配列同一性を有する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、言及されている配列の変異配列を含み、その変異配列は、前述の配列に対する約もしくは少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0078】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、表Aの横1列内の配列番号のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの配列、及び配列番号8～133のいずれかに対する約もしくは少なくとも70%（例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%）の配列同一性を有する少なくとも1つの変異配列を含む。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は（a）配列番号74～79、（b）配列番号50～55、（c）配列番号122～127、（d）配列番号26～31、（e）配列番号128～133、（f）配列番号38～43、（g）配列番号62～67、（h）配列番号80～85、（i）配列番号44～49、（j）配列番号86～91、（k）配列番号104～109、（l）配列番号56～61、（m）配列番号32～37、（n）配列番号110～115、（o）配列番号98～103、（p）配列番号92～97、

40

50

(q) 配列番号 116～121、(r) 配列番号 8～13、(s) 配列番号 68～73、(t) 配列番号 14～19、及び (u) 配列番号 20～25 から選択される配列セットのうちの 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つの配列を含み、かかる抗原結合タンパク質はさらに、そのセットの配列のうちの少なくとも 1 つに対する約もしくは少なくとも 70 % (例えば、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %) の配列同一性を有する少なくとも 1 つの変異配列を含む。例えば、様々な態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号 74～79 のうち 4 つの配列、すなわち、配列番号 74～77 を含み、ここで、抗原結合タンパク質は 2 つの変異配列を含み、1 つは、配列番号 78 に対する約もしくは少なくとも 70 % (例えば、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %) の配列同一性を有する変異配列、もう 1 つは、配列番号 79 に対する約もしくは少なくとも 70 % (例えば、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %) の配列同一性を有する変異配列である。

【0079】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号 134～175 のいずれかに対する約もしくは少なくとも 70 % (例えば、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %) の配列同一性を有する 1 対の変異配列を含む。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、(a) 配列番号 156 と 157、(b) 配列番号 148 と 149、(c) 配列番号 172 と 173、(d) 配列番号 140 と 141、(e) 配列番号 174 と 175、(f) 配列番号 144 と 145、(g) 配列番号 152 と 153、(h) 配列番号 158 と 159、(i) 配列番号 146 と 147、(j) 配列番号 160 と 161、(k) 配列番号 166 と 167、(l) 配列番号 150 と 151、(m) 配列番号 142 と 143、(n) 配列番号 168 と 169、(o) 配列番号 164 と 165、(p) 配列番号 162 と 163、(q) 配列番号 170 と 171、(r) 配列番号 134 と 135、(s) 配列番号 154 と 155、(t) 配列番号 136 と 137、及び (u) 配列番号 138 と 139 に対する約もしくは少なくとも 70 % (例えば、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %) の配列同一性を有する 1 対の変異配列を含む。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は 1 対の配列を含み、1 つは表 B の配列であり、もう 1 つの配列は、配列番号 134～175 のいずれかに対する約もしくは少なくとも 70 % (例えば、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %) の配列同一性を有する変異配列である。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は 1 対の配列を含み、1 つは、(a) 配列番号 156 と 157、(b) 配列番号 148 と 149、(c) 配列番号 172 と 173、(d) 配列番号 140 と 141、(e) 配列番号 174 と 175、(f) 配列番号 144 と 145、(g) 配列番号 152 と 153、(h) 配列番号 158 と 159、(i) 配列番号 146 と 147、(j) 配列番号 160 と 161、(k) 配列番号 166 と 167、(l) 配列番号 150 と 151、(m) 配列番号 142 と 143、(n) 配列番号 168 と 169、(o) 配列番号 164 と 165、(p) 配列番号 162 と 163、(q) 配列番号 170 と 171、(r) 配列番号 134 と 135、(s) 配列番号 154 と 155、(t) 配列番号 136 と 137、及び (u) 配列番号 138 と 139 から選択される配列であり、もう 1 つの配列は、(a)～(u) の配列に対する約もしくは少なくとも 70 % (例えば、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %) の配列同一性を有する変異配列である。例えば、様々な態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号 134 の配列を含み、かかる抗原結合タンパク質はさらに、配列番号 135 に対する約もしくは少なくとも 70 % (例えば、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %) の配列同一性を有する変異配列を含む。

【0080】

様々な場合には、抗原結合タンパク質は、前述のアミノ酸配列のアミノ酸配列を含み、望ましくない側鎖反応を低下させるかまたは防ぐよう、反応性アミノ酸を減少させるかま

10

20

30

40

50

たは除去するための1つ以上のアミノ酸置換を持つ。例えば、抗原結合タンパク質は、前述のアミノ酸配列のアミノ酸配列を含み、1つ以上の、(i) Trp残基がHis、Tyr、またはPheで置換されている、(ii) Asn残基がGln、Ser、Ala、またはAspで置換されている、(iii) Pro残基の直前にあるAsp残基がAla、Ser、またはGluで置換されている、(iv) Asn残基がGln、Ser、またはAlaで置換されている、及び／または(v) Cys残基がTyr、Ser、またはAlaで置換されている。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、前述のアミノ酸配列のアミノ酸配列を含み、より高い結合親和性、より高い安定性、またはSHM事象に基づくかもしくは他の同様の多数の抗体配列の統計解析に基づく他の有益な特性を有することが予測されるアミノ酸置換を持つ。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、(a) 表A 1に記載のHC CDR1アミノ酸配列、もしくは配列番号452、455、461、465、71、及び472からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70% (例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%) の配列同一性を有するもの、(b) 表A 1に記載のHC CDR2アミノ酸配列、もしくは配列番号475、456、462、466、468、及び473からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70% (例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%) の配列同一性を有するもの、(c) 表A 1に記載のHC CDR3アミノ酸配列、もしくは配列番号453、457、463、467、469、及び474からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70% (例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%) の配列同一性を有するもの、(d) 表A 1に記載のLC CDR1アミノ酸配列、もしくは配列番号449、476、458、464、68、及び470からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70% (例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%) の配列同一性を有するもの、(e) 表A 1に記載のLC CDR2アミノ酸配列、もしくは配列番号450、477、459、57、69、及び471からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70% (例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%) の配列同一性を有するもの、(f) 表A 1に記載のLC CDR3アミノ酸配列、もしくは配列番号451、454、460、58、70、及び112からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70% (例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%) の配列同一性を有するもの、あるいは(g) (a) ~ (f) のうちいずれか2つ以上の組み合わせ、を含む。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 A 1

	L C C D R 1	L C C D R 2	L C C D R 3	H C C D R 1	H C C D R 2	H C C D R 3
A B 1 *	4 4 9	4 5 0	4 5 1	4 5 2	4 7 5	4 5 3
A B 3 *	4 7 6	4 7 7	4 5 4	4 5 5	4 5 6	4 5 7
A B 4 *	4 5 8	4 5 9	4 6 0	4 6 1	4 6 2	4 6 3
A B 9 *	4 6 4	5 7	5 8	4 6 5	4 6 6	4 6 7
A B 1 1 *	6 8	6 9	7 0	7 1	4 6 8	4 6 9
A B 1 8 *	4 7 0	4 7 1	1 1 2	4 7 2	4 7 3	4 7 4

10

20

【0081】

いくつかの態様では、H C C D R 1 は、配列番号 4 5 2 の N 末端のすぐ隣に G l y を含み、任意選択で、いくつかの態様では、H C C D R 1 は、配列番号 4 5 2 の C 末端のすぐ隣に M X を含み、ここで、X は、H、N、または S である。様々な態様では、H C C D R 3 は、配列番号 4 5 3 の N 末端のすぐ隣に A l a を含む。様々な態様では、L C C D R 1 はさらに、配列番号 4 4 9 の N 末端のすぐ隣に T A S を含み、任意選択で、配列番号 4 4 9 の C 末端のすぐ隣に X H を含み、ここで、X は、H、S、Y、または Q である。いくつかの態様では、以下に記載されるように、配列番号 4 4 9 の第 1 のアミノ酸は、S または Q である。いくつかの態様では、以下に記載されるように、配列番号 4 5 1 の第 1 のアミノ酸は、S または Q である。

30

【0082】

様々な態様では、H C C D R 1 は、配列番号 4 5 5 の N 末端のすぐ隣に G l y を含み、任意選択で、様々な態様では、H C C D R 1 は、配列番号 4 5 5 の C 末端のすぐ隣に M X を含み、ここで、X は、N、S、または H である。いくつかの態様では、H C C D R 2 は、配列番号 4 5 6 の N 末端のすぐ隣に G l n を、また任意選択で、配列番号 4 5 6 の C 末端のすぐ隣に H を含む。様々な態様では、L C C D R 1 は、配列番号 4 7 6 の N 末端のすぐ隣に R I S を含み、任意選択で、配列番号 4 7 6 の C 末端のすぐ隣に L A を含む。様々な態様では、L C C D R 2 は、配列番号 4 7 7 の C 末端のすぐ隣に X L V E を含み、ここで、X は、I または S である。

40

【0083】

様々な態様では、H C C D R 1 は、配列番号 4 6 1 の C 末端のすぐ隣に M H を含む。様々な態様では、H C C D R 2 は、配列番号 4 6 2 の N 末端のすぐ隣に T y r を、また任意選択で、配列番号 4 6 2 の C 末端のすぐ隣に T H を含む。例示的態様では、H C C D R 3 は、配列番号 4 6 3 の最初の 2 つのアミノ酸を含まない。様々な態様では、L C C D R 1 は、配列番号 4 5 8 の N 末端のすぐ隣に R S S を、また任意選択で、配列番号 4 5 8 の C 末端のすぐ隣に L N を含む。様々な態様では、L C C D R 2 は、配列番号 4 5 9 の C 末端のすぐ隣に X R F S を含み、ここで、X は、Q、S、A、または D である。

【0084】

様々な態様では、H C C D R 1 は、配列番号 4 6 5 の C 末端のすぐ隣に M H を含む。

50

様々な態様では、H C C D R 2は、配列番号466のN末端のすぐ隣にY Iを、また任意選択で、配列番号466のC末端のすぐ隣にX a aを含み、ここで、X a aは、N、S、Q、またはAである。様々な態様では、L C C D R 1は、配列番号464のN末端のすぐ隣にL A Sを、また任意選択で、配列番号464のC末端のすぐ隣にL Aを含む。様々な態様では、L C C D R 2は、配列番号57のC末端のすぐ隣にS L A Dを含む。

【0085】

様々な態様では、H C C D R 1は、配列番号71のC末端のすぐ隣にM Hを含む。様々な態様では、H C C D R 2は、配列番号468のN末端のすぐ隣にT y rを、また任意選択で、配列番号468のC末端のすぐ隣にI Yを含む。様々な態様では、L C C D R 1は、配列番号68のN末端のすぐ隣にR A Sを、また任意選択で、配列番号68のC末端のすぐ隣にS Y I Hを含む。様々な態様では、L C C D R 2は、配列番号69のC末端のすぐ隣にX L E Sを含み、ここで、Xは、N、Q、S、A、またはDである。

【0086】

様々な態様では、L C C D R 1は、配列番号470のN末端のすぐ隣にK S Sを、また任意選択で、配列番号470のC末端のすぐ隣にY L Aを含む。様々な態様では、L C C D R 2は、配列番号471のC末端のすぐ隣にT R E Sを含む。様々な態様では、H C C D R 1は、配列番号472のC末端のすぐ隣にM Nを含む。様々な態様では、H C C D R 2は、配列番号473のN末端のすぐ隣にX a aを含み、ここで、X a aは、N、Q、S、またはAであり、また任意選択で、配列番号473のC末端のすぐ隣にT h rを含む。

【0087】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表A1に記載のL C C D R 1アミノ酸配列、L C C D R 2アミノ酸配列、及びL C C D R 3アミノ酸配列と、表A1に記載のH C C D R アミノ酸配列のうち少なくとも1つまたは2つを含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表A1に記載のH C C D R 1アミノ酸配列、H C C D R 2アミノ酸配列、及びH C C D R 3アミノ酸配列と、表A1に記載のL C C D R アミノ酸配列のうち少なくとも1つまたは2つを含む。

【0088】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、表A1で横1列にある配列番号により指定されるアミノ酸配列のうち少なくとも3つ、4つ、または5つ、を含む。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、表A1の横1列にある配列番号により指定されるL C C D R アミノ酸配列の各々と、表A1の横1列内の配列番号により指定されるH C C D R アミノ酸配列のうち少なくとも1つまたは2つを含む。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、表A1の横1列にある配列番号により指定されるH C C D R アミノ酸配列の各々と、表A1の横1列にある配列番号により指定されるL C C D R アミノ酸配列のうち少なくとも1つまたは2つを含む。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、表A1の横1列にある配列番号により指定されるC D R アミノ酸配列の全6配列を含む。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、(a) 配列番号449～453及び475、(b) 配列番号476～477、454～457、(c) 配列番号458～463、(d) 配列番号57、58、464～467、(e) 配列番号68～71及び468～469、ならびに(f) 配列番号112、及び470～474からなる群から選択される6つのC D R アミノ酸配列を含む。

【0089】

様々な場合には、表A1のアミノ酸配列は、少なくとも1個以上（例えば、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上）の介在アミノ酸（複数可）によって区切られる。様々な場合には、L C C D R 1とL C C D R 2の配列の間には約10～約20個のアミノ酸があり、L C C D R 2とL C C D R 3の配列の間には約25～約40個のアミノ酸がある。様々な場合には、L C C D R 1とL C C D R 2の配列の間には約14～約16個のアミノ酸があり、L C C D R 2とL C C D R 3の配列の間には約30～約35個のアミノ酸がある。様々な場合には、H C C D R

10

20

30

40

50

1とHC CDR2の配列の間には約10～約20個のアミノ酸があり、HC CDR2とHC CDR3の配列の間には約25～約40個のアミノ酸がある。様々な場合には、HC CDR1とHC CDR2の配列の間には約14～約16個のアミノ酸があり、HC CDR2とHC CDR3の配列の間には約30～約35個のアミノ酸がある。

【0090】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、(a)表B1に記載の重鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは配列番号478、480、482、484、486、及び488からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%（例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%）の配列同一性を有するもの、あるいは(b)表B1に記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは配列番号479、481、483、485、487、及び489からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%（例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%）の配列同一性を有するもの、あるいは(c)(a)と(b)の両方、を含む。

【表5】

表B1

	HC可変	LC可変
AB1*	478	479
AB3*	480	481
AB4*	482	483
AB9*	488	489
AB11 *	486	487
AB18 *	484	485

【0091】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、(a)配列番号478と479、(b)配列番号480と481、(c)配列番号482と483、(d)配列番号484と485、(e)配列番号486と487、及び(f)配列番号488と489からなる群から選択される1対のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表B1に記載されている配列番号を有する配列の変異配列を含み、これは、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%（例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%）の配列同一性を有し、ここで、異なっているアミノ酸（複数可）は、以下の「ヒト化抗体」で記載されている位置に存在する。

【0092】

ヒト化抗体

【0093】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表A、表A1、表B、または表B1に記載の抗原結合タンパク質のヒト化バージョンである。

【0094】

ヒト化AB1

【0095】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表BまたはB1に記載されているAB1のヒト化バージョンであり、重鎖可変領域内に以下の位置：5、8、11、12、13、20

、 3 1、 3 3、 3 5、 3 8、 4 0、 4 8、 5 0、 5 5、 5 7、 5 9、 6 1、 6 5、 6 6、 6 7、 6 8、 7 0、 7 2、 7 4、 7 6、 7 9、 8 0、 8 2、 8 7、 9 0、 9 1、 9 8、 1 0 1、 及び 1 1 6 のうちの 1 つ以上における 1 つ以上（例えば、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 1 0、 1 1、 1 2、 1 3、 1 4、 1 5、 1 6、 1 7、 1 8、 1 9、 2 0、 2 1、 2 2、 2 3、 2 4、 2 5、 2 6、 2 7、 2 8、 2 9、 3 0、 3 1、 3 2、 3 3、 3 4、 または 3 5）のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号 4 2 8 のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表 B または B 1 に記載されている A B 1 のヒト化バージョンであり、重鎖可変領域内に以下の位置： 2 0、 3 1、 3 5、 4 8、 5 0、 5 9、 6 7、 7 0、 7 4、 7 9、 9 8、 1 0 1 のうちの 1 つ以上（例えば、 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 1 0、 1 1、 または 1 2）における 1 つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号 4 2 9 のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

【表 6】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
5	Q、V	8	A、G	1 1	L、V
1 2	A、K	1 3	R、K	2 0	M、V
3 1	S、T、V、 D	3 3	Y、T	3 5	H、N、S
3 8	K、R	4 0	R、A	4 8	I、M
5 0	F、V、T、 Y、I	5 5	G、S	5 7	S、Y
5 9	D、E、N、 S	6 1	N、A	6 5	K、Q
6 6	D、G	6 7	R、Q、N、 K	6 8	T、V
7 0	L、M	7 2	R、A	7 4	K、T
		7 9	V、D、S、 A	8 2	Q、E
8 7	T、R	9 1	S、T	9 8	N、Q、H、 D、R
1 0 1	Y	7 6	S T	1 1 6	A、S

【0 0 9 6】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表 B または B 1 に記載されている A B 1 のヒト化バージョンであり、軽鎖可変領域内に以下の位置： 1、 3、 4、 9、 1 0、 1 1、 1 5、 1 7、 2 1、 2 4、 2 7、 2 9、 3 2、 3 4、 3 5、 4 3、 4 4、 4 8、 5 1、 5 2、 5 3、 5 4、 5 5、 5 6、 6 1、 6 7、 7 1、 7 2、 7 3、 7 9、 8 0、 8 1、 8 4、 9 0、 9 2、 9 3、 9 4、 9 5、 9 6、 1 0 1、 1 0 7 のうちの 1 つ以上、例えば、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 1 0、 1 1、 1 2、 1 3、 1 4、 1 5、 1 6、 1 7、 1 8、 1 9、 2 0、 2 1、 2 2、 2 3、 2 4、 2 5、 2 6、 2 7、 2 8、 2 9、 3 0、 3 1、 3 2、 3 3、 3 4、 3 5、 3 6、 3 7、 3 8、 3 9、 4 0、 または 4 1）における 1 つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号 4 3 0 のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表 B または B 1 に記載されている A B 1 のヒト化バージョンであり、軽鎖可変領域内に以下の位置： 4、 2 1、 3 2、 3 4、 4 8、 5 1、 5 3、 6 1、 6 7、 7 9、 8 4、 9 1、 及び 9 3 のうちの 1 つ以上

(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13)における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号431のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

【表7】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
1	Q、D	3	V、Q	4	L、M
9	A、S	10	I、S	11	M、L
15	L、V	17	E、D	21	M、I
24	T、R	27	S、Q	32	T、V、F、 D、S
34	F、L	35	H、S、Y、 Q、N	43	S、K
44	S、A	48	W、L	51	S、T、Q、 A
52	T、A	53	S、T、D、 Q	54	N、S
		56	A、Q	61	R、Q、S、 D、
67	A、S、T、 G	71	S、D	72	Y、F
73	S、T	79	M、L	80	E、Q
81	A、P	84	A、F	90	H、Q
91	Q、H、S	93	H、Q、S、 Y	94	R、S
97	L、P	101	A、Q	107	L、I
29	V、I	92	Y、S	95	S、T

【0097】

ヒト化AB3

【0098】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表BまたはB1に記載されているAB3のヒト化バージョンであり、重鎖可変領域内に以下の位置：3、5、18、19、23、31、33、35、40、42、49、50、52、53、54、55、56、57、58、59、61、64、76、79、80、81、87、94、95、99、106、112、114のうちの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、または33）における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号432のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表BまたはB1に記載されているAB3のヒト化バージョンであり、重鎖可変領域内に以下の位置：31、35、50、55、79、99、106のうちの1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7）における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号433のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

【表 8】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
3	K、Q	5	E、L	18	M、L
19	K、R	23	V、A	31	N、S、R
33	W、A	35	N、S、H	40	S、A
42	E、G	49	A、S	50	Q、S、N、 H、A
		52	R、S	53	L、G
54	K、S	55	S、N、T、 A、G	56	D、G
				59	A、S
61	H、Y	64	E、D	76	D、N
79	R、N、Q、 D、S	80	S、T	81	V、L
87	N、S	94	G、A	95	T、V、I
99	N、D、T、 K、A	106	C、Y、A、 S、T	112	T、L
114	I、T				

10

20

【0099】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表BまたはB1に記載されているAB3のヒト化バージョンであり、軽鎖可変領域内に以下の位置：9、17、18、25、27、28、30、34、40、43、45、48、50、52、53、55、56、70、72、74、76、84、85、90、91、93、94、97、及び100のうちの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29）における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号434のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表BまたはB1に記載されているAB3のヒト化バージョンであり、軽鎖可変領域内に以下の位置：25、34、48、53、55、84、85、90、及び93のうちの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、または9）における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号435のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

30

40

50

【表 9】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
9	A、S	1 7	E、D	1 8	T、R
2 5	I、V、L、 T、A	3 4	A、S、N	4 0	Q、P
4 3	S、A	4 5	Q、K	4 8	V、I
5 3	I、V、L、 T、S	5 5	V、T、L、 A、Q	7 0	Q、D
7 2	S、T	7 4	K、T	7 6	N、S
8 4	G、A	8 5	N、Q、S、 T	9 0	H、Q、S、 T
9 3	T、S、N、 G	1 0 0	G、Q	2 7	E、Q
2 8	N、S	3 0	Y、S	5 0	N、A
5 2	K、S	5 6	E、S	9 1	H、S
9 4	V、T	9 7	T、P		

【0100】

ヒト化AB4

【0101】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表BまたはB1に記載されているAB4のヒト化バージョンであり、重鎖可変領域内に以下の位置：5、11、12、13、20、29、31、33、37、38、40、45、48、50、55、56、57、59、61、62、65、66、67、68、70、72、74、76、79、82、84、87、91、97、101、117のうちの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、または36）における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号436のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表BまたはB1に記載されているAB4のヒト化バージョンであり、重鎖可変領域内に以下の位置：20、29、31、37、45、48、56、59、61、62、65、66、68、70、74、79、84、97、及び101のうちの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または19）における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号437のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

10

20

30

40

50

【表 10】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
5	Q、V	1 1	L、V	1 2	A、K
1 3	R、K	2 0	M、V	3 3	T、Y
3 7	I、V、F、Y	3 8	K、R	4 0	R、A
4 5	Q、L、V、T、N	4 8	I、M	5 0	Y、I
5 5	S、G	5 6	T、G、S、V、D	5 7	Y、S
5 9	H、K、S、Q、N	6 1	I、A、N、F、Y、V	6 2	K、Q
6 5	K、Q	6 6	D、G	6 7	K、R
6 8	A、V	7 0	L、M	7 2	A、R
7 4	T、K	7 6	S、T	7 9	A、V
8 2	Q、E	8 4	R、S、Q、D	8 7	T、R
9 1	S、T	9 7	S、A、T、V	1 0 1	L、V、F
1 1 7	A、S	2 9	F、Y、S、T	3 1	S、T、Y、D

【0102】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表BまたはB1に記載されているAB4のヒト化バージョンであり、軽鎖可変領域内に以下の位置：7、14、17、18、31、33、39、41、42、44、50、51、55、57、60、81、88、92、94、95、96、99、100、105のうちの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24）における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号438のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表BまたはB1に記載されているAB4のヒト化バージョンであり、軽鎖可変領域内に以下の位置：33、39、55、57、81、95、及び96のうちの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、または7）における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号439のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

10

20

30

40

50

【表 1 1】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
7	T、S	1 4	S、T	1 7	D、Q
1 8	Q、P	3 1	Y、H	3 3	D、N、E、 Q
3 9	H、N、Q、 D	4 1	F、Y	4 2	L、Q
4 4	K、R	5 0	K、R	5 1	R、L
5 5	K、R、Q	5 7	S、T、V	6 0	D、F
8 1	R、S、N、 D	8 8	L、V	9 2	F、Y
9 4	M、S	9 5	Q、H、T	9 6	S、T、G、 D
9 9	W、V	1 0 5	G、Q		

10

【0 1 0 3】

ヒト化 A B 1 8

20

【0 1 0 4】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表 B または B 1 に記載されている A B 1 8 のヒト化バージョンであり、重鎖可変領域内に以下の位置：5、9、11、12、20、38、40、41、43、44、48、61、65、67、68、70、72、74、76、79、82、84、87、91、及び116のうちの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25）、任意選択で、以下の位置：20、48、68、70、79のうちの1つ以上（例えば、1、2、3、4、または5）における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号440または441のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

30

【表 1 2】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
5	K、V	9	P、A	1 1	L、V
1 2	E、K	2 0	I、V	3 8	K、R
4 0	S、A	4 1	N、P	4 3	K、Q
4 4	S、G	4 8	I、V、M	6 1	N、A
6 5	T、Q	6 7	K、R	6 8	A、V
7 0	L、M	7 2	V、R	7 4	K、T
7 6	S、T	7 9	A、V	8 2	Q、E
8 4	K、S	8 7	T、R	9 1	S、T
1 1 6	S、L				

40

【0 1 0 5】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表 B または B 1 に記載されている A B 1 8 のヒト化バージョンであり、軽鎖可変領域内に以下の位置：1、3、9、15、18、19、21、22、49、51、69、93、84、78、105、及び111のうちの1つ

50

以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、または１６）、任意選択で、以下の位置：１９、２１、または８４のうちの１つ以上（例えば、１、２、または３）における１つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号４４２または４４３のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

【表１３】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
１	N、D	３	M、V	９	S、D
１５	A、L	１８	K、R	１９	V、A
２１	M、I	２２	S、N	４９	S、P
５１	R、K	６９	T、S	８３	N、S
８４	V、L	８９	L、V	１０５	A、Q
１１１	L、I				

10

【０１０６】

ヒト化ＡＢ９

【０１０７】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表ＢまたはＢ１に記載されているＡＢ９のヒト化バージョンであり、重鎖可変領域内に以下の位置：１、５、９、１１、１２、２０、３８、４０、４１、４３、４４、４８、６１、６３、６５、６７、６９、７０、７２、７３、７４、７６、７９、８４、８７、９１、９３、１１２、及び１１３のうちの１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、または２９）における１つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号４４４のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

【表１４】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
１	E、Q	５	Q、V	９	P、A
１１	L、V	１２	V、K	２０	M、V
３８	K、R	４０	S、A	４１	H、P
４３	K、Q	４４	S、G	４８	I、M
６１	N、A	６３	N、K	６５	K、Q
６７	K、R	６９	A、V	７０	L、M
７２	V、R	７３	N、D	７４	K、T
７６	S、T	７９	A、V	８４	R、S
８７	T、R	９１	S、T	９３	A、V
１１２	T、L	１１３	L、V		

20

30

40

【０１０８】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表ＢまたはＢ１に記載されているＡＢ９のヒト化バージョンであり、軽鎖可変領域内に以下の位置：９、１１、１５、１７、１８、４３、４５、７０、７２、７３、７４、８０、８４、８５、及び１００のうちの１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または

50

15)における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号445のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

【表15】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
9	A、S	11	Q、L	15	L、V
17	E、D	18	S、R	43	S、A
45	Q、K	70	R、D	72	S、T
73	F、L	74	K、R	80	A、P
84	V、A	85	S、T	100	G、Q

10

【0109】

ヒト化AB11

【0110】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表BまたはB1に記載されているAB11のヒト化バージョンであり、重鎖可変領域内に以下の位置：1、15、18、19、42、49、63、75、76、78、80、84、88、及び93のうちの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15）における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号446のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

20

【表16】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
1	D、E	15	R、G	18	R、L
19	K、R	42	E、G	49	A、S
63	T、S	75	P、A	76	T、K
78	T、S	80	F、Y	84	T、N
88	S、A	93	M、V		

30

【0111】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表BまたはB1に記載されているAB11のヒト化バージョンであり、軽鎖可変領域内に以下の位置：4、9、17、22、64、78、80、81、82、83、84、87、89、104、及び110のうちの1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15）、任意選択で、以下の位置：4、82、110のうちの1つ以上における1つ以上のアミノ酸置換を持つ。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号447または448のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、上記で列挙されている位置におけるアミノ酸は、下表に従ったアミノ酸から選択される。

40

50

【表 17】

位置	アミノ酸	位置	アミノ酸	位置	アミノ酸
4	L、M	9	A、D	17	Q、E
22	S、N	64	A、D	78	N、T
80	H、S	81	P、S	82	V、L
83	E、Q	84	E、A	87	A、V
89	T、V	104	A、Q	110	L、I

10

【0112】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、（a）表Cに記載の重鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは376～379、384～387、391～396、403～408、412、413、416～419、及び422～427からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%、もしくは約80%、もしくは約85%、もしくは約90%、もしくは約95%の配列同一性を有するもの、あるいは（b）表Cに記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは380～383、388～390、397～402、409～411、414、415、420、及び421からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%、もしくは約80%、もしくは約85%、もしくは約90%、もしくは約95%の配列同一性を有するもの、あるいは（c）（a）と（b）の両方、を含む。

20

30

40

50

【表 18】

表 C

	ヒト化軽鎖可変領域	ヒト化重鎖可変領域
A B 1	3 8 0、 3 8 1、 3 8 2、 3 8 3	3 7 6、 3 7 7、 3 7 8、 3 7 9
A B 3	3 8 8、 3 8 9、 3 9 0	3 8 4、 3 8 5、 3 8 6、 3 8 7、 4 2 2
A B 4	3 9 7、 3 9 8、 3 9 9、 4 0 0、 4 0 1、 4 0 2	3 9 1、 3 9 2、 3 9 2、 3 9 4、 3 9 5、 3 9 6、 4 2 3、 4 2 4、 4 2 5、 4 2 6、 4 2 7
A B 9	4 0 9、 4 1 0、 4 1 1、	4 0 3、 4 0 4、 4 0 5、 4 0 6、 4 0 7、 4 0 8
A B 1 1	4 1 4、 4 1 5	4 1 2、 4 1 3
A B 1 8	4 2 0、 4 2 1	4 1 6、 4 1 7、 4 1 8、 4 1 9

10

20

30

40

【0113】

様々な実施形態では、ヒト化抗原結合タンパク質は、表 D に示される 1 対のアミノ酸配列を含む。

50

【表 19】

表D

ヒト化 A B	H C	L C
1 - 1	3 7 6	3 8 0
1 - 2	3 7 7	3 8 0
1 - 3	3 7 7	3 8 1
1 - 4	3 7 7	3 8 2
1 - 5	3 7 7	3 8 3
1 - 6	3 7 8	3 8 1
1 - 7	3 7 8	3 8 2
1 - 8	3 7 8	3 8 3
1 - 9	3 7 9	3 8 1
1 - 1 0	3 7 9	3 8 2
1 - 1 1	3 7 9	3 8 3
3 - 1	3 8 4	3 8 8
3 - 2	3 8 5	3 8 8
3 - 3	3 8 5	3 8 9
3 - 4	3 8 6	3 8 8
3 - 5	3 8 6	3 8 9
3 - 6	3 8 7	3 8 8
3 - 7	3 8 7	3 8 9
3 - 9	4 2 2	3 8 9
4 - 1	3 9 1	3 9 7
4 - 2	3 9 2	3 9 7
4 - 3	3 9 2	3 9 8
4 - 4	3 9 3	3 9 8
4 - 5	3 9 4	3 9 8
4 - 6	3 9 5	3 9 8
4 - 7	3 9 6	3 9 8
4 - 8	4 2 3	3 9 8
4 - 9	4 2 4	3 9 8
4 - 1 0	4 2 5	3 9 8
4 - 1 1	4 2 6	3 9 8
4 - 1 2	4 2 7	3 9 8
9 - 1	4 0 3	4 0 9
9 - 2	4 0 4	4 0 9
9 - 3	4 0 5	4 1 0
9 - 4	4 0 5	4 1 1
9 - 5	4 0 6	4 1 0
9 - 6	4 0 6	4 1 1

10

20

30

40

50

ヒト化 A B	H C	L C
9-7	4 0 7	4 1 0
9-8	4 0 7	4 1 1
9-9	4 0 8	4 1 0
9-10	4 0 8	4 1 1
1-11	4 1 2	4 1 4
11-2	4 1 3	4 1 4
11-3	4 1 3	4 1 5
18-1	4 1 6	4 2 0
18-2	4 1 7	4 2 0
18-3	4 1 7	4 2 0
18-4	4 1 7	4 2 1
18-5	4 1 8	4 2 0
18-6	4 1 8	4 2 1
18-7	4 1 9	4 2 0
18-8	4 1 9	4 2 1

【0114】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は1対の変異配列を含み、それぞれ表Cに記載されている配列番号に対する約または少なくとも70%（例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%）の配列同一性を有する。様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は1対の配列を含み、1つは、表Cに記載されている配列番号から選択される配列であり、もう1つの配列は、表Dに記載されている配列番号を有する配列、表Cに記載されている配列番号を有する配列に対する約もしくは少なくとも70%（例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%）の配列同一性を有する変異配列である。

【0115】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は1対の配列を含み、1つは、表Dに記載されている配列番号から選択される配列であり、もう1つの配列は、表Dに記載されている配列番号を有する配列に対する約もしくは少なくとも70%（例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%）の配列同一性を有する変異配列である。例えば、様々な態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号419の配列を含み、かかる抗原結合タンパク質はさらに、配列番号421に対する約もしくは少なくとも70%（例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%）の配列同一性を有する変異配列を含む。

【0116】

様々な場合には、抗原結合タンパク質は、表Dに記載されている、重鎖（H C）可変領域内もしくは軽鎖（L C）可変領域内、または両方に1つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または35）のアミノ酸置換を持つヒト化抗原結合タンパク質である。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、H C可変領域、L C可変領域、または両方に1つ以上のアミノ酸置換を持つA B 1-11というヒト化抗原結合タンパク質である。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号379のH Cを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つのアミノ酸置換を持つ。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号504のH C C D R 1、配列番号505のH C C D R 2、配列番号506のH C C D R 3、またはそれらの組み合わせを含む。例示の場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号

503のHCを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号496～501のいずれか1つのHCを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、図22でS7～S12として表示されているHC配列を含む。様々な場合には、軽鎖可変領域は、配列番号449のLC CDR1、配列番号450のLC CDR2、配列番号451のLC CDR3、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号380～383、及び479のいずれか1つのLCを含む。例示の場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号383のLCを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、図22でS7～S12として表示されているLC配列を含む。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、HC可変領域、LC可変領域、または両方に1つ以上のアミノ酸置換を持つAB3-7というヒト化抗原結合タンパク質である。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号387のHCを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアミノ酸置換を持つ。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号507のHC CDR1、配列番号508のHC CDR2、配列番号509のHC CDR3、またはそれらの組み合わせを含む。例示の場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号502のHCを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号490～495のいずれか1つのHCを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、図22でS1～S6として表示されているHC配列を含む。様々な場合には、軽鎖可変領域は、配列番号476のLC CDR1、配列番号477のLC CDR2、配列番号454のLC CDR3、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号388～390、及び481のいずれか1つのLCを含む。例示の場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号389のLCを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、図22でS1～S6として表示されているLC配列を含む。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、AB3のヒト化抗原結合タンパク質であり、HC可変領域、LC可変領域、または両方に1つ以上のアミノ酸置換を持つ。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号139のHCを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ（またはそれ以上）のアミノ酸置換を持つ。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号510のいずれか1つのHCを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号510のHC配列を含み、図23に示されるようなアミノ酸置換を1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ（またはそれ以上）持つ。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号138のHCを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ（またはそれ以上）のアミノ酸置換を持つ。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号511のいずれか1つのHCを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号511のHC配列を含み、図24に示されるようなアミノ酸置換を1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ（またはそれ以上）持つ。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、AB1のヒト化抗原結合タンパク質であり、HC可変領域、LC可変領域、または両方に1つ以上のアミノ酸置換を持つ。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号135のHCを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ（またはそれ以上）のアミノ酸置換を持つ。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号513のいずれか1つのHCを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号513のHC配列を含み、図25に示されるようなアミノ酸置換を1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ（またはそれ以上）持つ。例示的態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号134のHCを含み、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ（またはそれ以上）のアミノ酸置換を持つ。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号512のいずれか1つのHCを含む。いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号512のHC配列を含み、図26に示されるようなアミノ酸置換を1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ（またはそれ以上）持つ。

【0117】

脱フコシル化抗体

【0118】

多くの分泌タンパク質は、タンパク質の特定のアミノ酸に糖部分（例えば、グリカン、

10

20

30

40

50

糖) が共有結合で結合される過程である翻訳後グリコシル化を受ける。真核細胞では、2つの型のグリコシル化反応、すなわち、(1) グリカンが、「X」がプロリン以外の任意のアミノ酸である認識配列 $Asn-X-Thr/Ser$ のアスパラギンに結合しているN-結合型グリコシル化、及び(2) グリカンが、セリンまたはトレオニンに結合しているO-結合型グリコシル化が起こる。グリコシル化の型(N-結合型[グリコシル化]またはO-結合型[グリコシル化])にかかわらず、各部位(OまたはN)と会合するグリカン構造の範囲が大きいためにタンパク質のグリコフォームの微小不均一性が存在する。

【0119】

すべてのN-グリカンは、共通のコア糖配列: $Man\alpha 1-6(Man\alpha 1-3)Man\beta 1-4GlcNAc\beta 1-4GlcNAc\beta 1-Asn-X-Ser/Thr(Mann_3GlcNAc_2Asn)$ を有し、3つの型、すなわち、(A) 2つのN-アセチルグルコサミン($GalNAc$)部分と多数(例えば、5、6、7、8または9)のマンノース(Man)残基とからなる高マンノース(HM)またはオリゴマンノース(OM)型、(B) 2つを超える $GlcNAc$ 部分と任意の数の他の種類の糖とを含む複合型、または(C) 一方の分岐に Man 残基を、また複合分岐の基部に $GlcNAc$ を含むハイブリッド型のうちの1つに分類される。図1A(Stanley et al., Chapter 8: N-Glycans, Essentials of Glycobiology, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009より入手)は、3つの型のN-グリカンを示す。

【0120】

N-結合型グリカンは典型的には、ガラクトース(Gal)、N-アセチルガラクトサミン($GalNAc$)、ガラクトサミン($GalN$)、グルコース(GLc)、N-アセチルグルコサミン($GLcNAc$)、グルコサミン($GLcN$)、マンノース(Man)、N-アセチルマンノサミン($ManNAc$)、マンノサミン($ManN$)、キシロース(Xyl)、N-アセチルノイラミン酸($Neu5Ac$)、N-グリコリルノイラミン酸($Neu5Gc$)、2-ケト-3-ドキシノノン酸(2-keto-3-doxynonic acid)(Kdn)、フコース(Fuc)、グルクロン酸($GLcA$)、イズロン酸($IdoA$)、ガラクトツロン酸($GalA$)、マンヌロン酸($ManA$)の1つ以上の単糖を含む。そのような糖に一般に使用される符号を図29Aに示す。

【0121】

N-結合型グリコシル化は小胞体(ER)で始まり、複雑な一連の反応により、本質的に2つの $GlcNAc$ 残基と3つの Man 残基でできているコアグリカン構造の結合がもたらされる。ERで形成されたグリカン複合体は、ゴルジ装置内の酵素の作用により修飾される。糖が、酵素にとって相対的に接近不可能である場合、糖は典型的には元のHM形態のまま留まる。酵素が糖に接近することができる場合には、 Man 残基の多くが切断され、糖がさらに修飾されて、複合型N-グリカン構造が生じる。例えば、シスゴルジに位置するマンノシダーゼ-1はHMグリカンを切断または加水分解することができ、メディアアルゴジに位置するフコシルトランスフェラーゼFUT-8はグリカンをフコシル化する(Hanrue Imai-Nishiya(2007), BMC Biotechnology, 7: 84)。

【0122】

したがって、グリカン構造の糖組成及び構造的立体配置は、他の要因の中でも特に、ER内のグリコシル化機構とゴルジ装置、機構の酵素のグリカン構造への接近可能性、各酵素の作用順序、及びタンパク質がグリコシル化機構から放出される段階に応じて異なる。

【0123】

本開示の例示的な実施形態では、抗原結合タンパク質はFcポリペプチドを含む。本明細書で使用される用語「Fcポリペプチド」には、抗体のFc領域に由来する天然形態及び変異タンパク質形態のポリペプチドが含まれる。例示的態様では、本願で開示される抗原結合タンパク質のFcポリペプチドは、グリカンを含む。様々な場合には、グリカンは、フコースを欠くかまたは脱フコシル化されている。例示的態様では、抗原結合タンパク

10

20

30

40

50

質は、脱フコシル化グリカンを含む。本明細書で使用される場合、用語「脱フコシル化グリカン」または「a f u c oグリカン」または「脱フコシル化グリコフォーム」または「A f u c」とは、コアフコース、例えば、N-グリコシル化部位のA s nとのアミド結合に参与するG l c N A c残基上の α 1, 6結合フコースを欠くグリコフォームを指す。脱フコシル化グリコフォームとしては、A1G0、A2G0、A2G1a、A2G1b、A2G2、及びA1G1M5が挙げられるが、これらに限定されない。追加の脱フコシル化グリカンとしては、例えば、A1G1a、G0[H3N4]、G0[H4N4]、G0[H5N4]、FO-N[H3N3]が挙げられる。例えば、Reusch and Tejada, Glycobiology 25(12):1325-1334(2015)を参照のこと。

【0124】

本開示は、脱フコシル化グリカンを含むFcポリペプチドを含む抗原結合タンパク質を含む組成物、例えば、医薬組成物も提供する。例示的態様では、組成物中に存在する抗原結合タンパク質の約もしくは少なくとも25%は、脱フコシル化グリカンを含むFcポリペプチドを含む抗原結合タンパク質である。例示的態様では、組成物中に存在する抗原結合タンパク質の約もしくは少なくとも25%は、脱フコシル化されている。任意選択で、組成物中に存在する抗原結合タンパク質の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%またはそれ以上は、脱フコシル化されている。特定の糖プロファイル(glycoprofile)の抗原結合タンパク質を含む組成物を製造する方法は当該技術分野で公知である。例示的な実施形態では、抗原結合タンパク質は、デノボ経路またはサルベージ経路の酵素の活性を変化させるよう遺伝子が組み換えられている細胞で産生される組換え型である。これらの2つのフコース代謝経路を図29Bに示す。例示的な実施形態では、細胞は、フコシルトランスフェラーゼ(FUT、例えば、FUT1、FUT2、FUT3、FUT4、FUT5、FUT6、FUT7、FUT8、FUT9)、フコースキナーゼ、GDP-フコースピロホスホリラーゼ、GDP-D-マンノース-4, 6-デヒドラターゼ(GMD)、及びGDP-ケト-6-デオキシマンノース-3, 5-エピメラーゼ、4-レダクターゼ(FX)のうちのいずれか1つ以上の活性を変化させるよう遺伝子が組み換えられている。例示的な実施形態では、細胞は、FXをコードする遺伝子をノックアウトするよう遺伝子が組み換えられている。例えば、国際特許公開第WO2017/079165A1号、Kanda et al., J Biotechnol 130, 2007, 300-310、Yamane-Ohunuki et al., Biotechnol Bioeng 87, 2004, 614-622、Malphettes et al., Biotechnol Bioeng 106, 2010, 774-783を参照のこと。

【0125】

核酸

【0126】

本開示はさらに、本開示の抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。本明細書で使用される場合、「核酸」には、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、及び「核酸分子」が含まれ、一般に、DNAもしくはRNAのポリマー、またはその修飾された形態を意味し、一本鎖もしくは二本鎖、合成、もしくは天然由来物質から得られた(例えば、単離及び/または精製された)ものであり得、天然、非天然または改変されたヌクレオチドを含有し得、また未修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間に見られるホスホジエステルの代わりに天然、非天然または改変されたヌクレオチド間結合、例えば、ホスホロアミダート結合もしくはホスホロチオアート結合等を含有し得る。核酸は、本開示の抗原結合タンパク質のいずれかをコードするあらゆるヌクレオチド配列を含むことができる。様々な態様では、核酸は、(a)表AまたはA1に記載の重鎖(HC)相補性決定領域(CDR)1のアミノ酸配列、もしくは配列番号11、17、23、29、35、41、47、53、59、65、71、77、83、89、95、101、107、113、119、125、131、452、455、461、465、

及び 472 からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 %（例えば、約または少なくとも 80 %、約もしくは少なくとも 85 %、約もしくは少なくとも 90 %、約もしくは少なくとも 95 %）の配列同一性を有するもの、（b）表 A または A 1 に記載の H C C D R 2 アミノ酸配列、もしくは配列番号 12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、86、102、108、114、120、126、132、475、456、462、466、468、及び 473 からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 %（例えば、約または少なくとも 80 %、約もしくは少なくとも 85 %、約もしくは少なくとも 90 %、約もしくは少なくとも 95 %）の配列同一性を有するもの、（c）表 A または A 1 に記載の H C C D R 3 アミノ酸配列、もしくは配列番号 13、19、25、31、37、43、49、55、61、67、73、79、85、91、97、103、109、115、121、127、133、453、457、463、467、469、及び 474 からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 %（例えば、約または少なくとも 80 %、約もしくは少なくとも 85 %、約もしくは少なくとも 90 %、約もしくは少なくとも 95 %）の配列同一性を有するもの、（d）表 A または A 1 に記載の軽鎖（L C）C D R 1 アミノ酸配列、もしくは配列番号 8、14、20、32、38、44、50、56、62、68、74、80、86、92、98、104、110、116、122、128、449、476、458、464、及び 470 からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 %（例えば、約または少なくとも 80 %、約もしくは少なくとも 85 %、約もしくは少なくとも 90 %、約もしくは少なくとも 95 %）の配列同一性を有するもの、（e）表 A または A 1 に記載の L C C D R 2 アミノ酸配列、もしくは配列番号 9、15、21、27、33、39、45、51、57、63、69、75、81、87、93、99、105、111、117、123、129、450、477、459、及び 471 からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 %（例えば、約または少なくとも 80 %、約もしくは少なくとも 85 %、約もしくは少なくとも 90 %、約もしくは少なくとも 95 %）の配列同一性を有するもの、（f）表 A に記載の L C C D R 3 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 10、16、22、28、34、40、46、52、58、64、70、76、82、88、94、100、106、112、118、124、130、451、454、及び 460 からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 %（例えば、約または少なくとも 80 %、約もしくは少なくとも 85 %、約もしくは少なくとも 90 %、約もしくは少なくとも 95 %）の配列同一性を有するもの、あるいは（g）（a）～（f）のうちいずれか 2 つ以上の組み合わせ、を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な態様では、核酸は、表 A または A 1 に記載の L C C D R 1 アミノ酸配列、L C C D R 2 アミノ酸配列、及び L C C D R 3 アミノ酸配列と、表 A または A 1 に記載の H C C D R アミノ酸配列のうち少なくとも 1 つまたは 2 つとを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な態様では、核酸は、表 A または A 1 に記載の H C C D R 1 アミノ酸配列、H C C D R 2 アミノ酸配列、及び H C C D R 3 アミノ酸配列と、表 A または A 1 に記載の L C C D R アミノ酸配列のうち少なくとも 1 つまたは 2 つとを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な実施形態では、核酸は、（a）表 A または A 1 で横 1 列にある配列番号により指定されるアミノ酸配列のうち少なくとも 3 つ、4 つ、もしくは 5 つ、（b）表 A または A 1 の横 1 列にある配列番号により指定される L C C D R アミノ酸配列の各々と、表 A または A 1 の横 1 列内の配列番号により指定される H C C D R アミノ酸配列のうち少なくとも 1 つもしくは 2 つ、（c）表 A または A 1 の横 1 列にある配列番号により指定される H C C

10

20

30

40

50

D R アミノ酸配列の各々と、表 A または A 1 の横 1 列にある配列番号により指定される L C C D R アミノ酸配列のうち少なくとも 1 つもしくは 2 つ、(d) 表 A の横 1 列にある配列番号により指定される C D R アミノ酸配列の全 6 配列、及び／または (e) (a) 配列番号 7 4 ～ 7 9、(b) 配列番号 5 0 ～ 5 5、(c) 配列番号 1 2 2 ～ 1 2 7、(d) 配列番号 2 6 ～ 3 1、(e) 配列番号 1 2 8 ～ 1 3 3、(f) 配列番号 3 8 ～ 4 3、(g) 配列番号 6 2 ～ 6 7、(h) 配列番号 8 0 ～ 8 5、(i) 配列番号 4 4 ～ 4 9、(j) 配列番号 8 6 ～ 9 1、(k) 配列番号 1 0 4 ～ 1 0 9、(l) 配列番号 5 6 ～ 6 1、(m) 配列番号 3 2 ～ 3 7、(n) 配列番号 1 1 0 ～ 1 1 5、(o) 配列番号 9 8 ～ 1 0 3、(p) 配列番号 9 2 ～ 9 7、(q) 配列番号 1 1 6 ～ 1 2 1、(r) 配列番号 8 ～ 1 3、(s) 配列番号 6 8 ～ 7 3、(t) 配列番号 1 4 ～ 1 9、(u) 配列番号 2 0 ～ 2 5、(v) 配列番号 4 4 9 ～ 4 5 3 及び 4 7 5、(w) 配列番号 4 7 6 ～ 4 7 7、4 5 4 ～ 4 5 7、(x) 配列番号 4 5 8 ～ 4 6 3、(y) 配列番号 5 7、5 8、4 6 4 ～ 4 6 7、(z) 配列番号 6 8 ～ 7 1 及び 4 6 8 ～ 4 6 9、ならびに (a a) 配列番号 1 1 2、及び 4 7 0 ～ 4 7 4 からなる群から選択される 6 つの C D R アミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な実施形態では、核酸は、(a) 表 B または B 1 に記載の重鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは 1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 1、1 4 3、1 4 5、1 4 7、1 4 9、1 5 1、1 5 3、1 5 5、1 5 7、1 5 9、1 6 1、1 6 3、1 6 5、1 6 7、1 6 9、1 7 1、1 7 3、1 7 5、4 7 8、4 8 0、4 8 2、4 8 4、4 8 6 及び 4 8 8 からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % (例えば、約または少なくとも 8 0 %、約もしくは少なくとも 8 5 %、約もしくは少なくとも 9 0 %、約もしくは少なくとも 9 5 %) の配列同一性を有するもの、あるいは (b) 表 B または B 1 に記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは 1 3 4、1 3 6、1 3 8、1 4 0、1 4 2、1 4 4、1 4 6、1 4 8、1 5 0、1 5 2、1 5 4、1 5 6、1 5 8、1 6 0、1 6 2、1 6 4、1 6 6、1 6 8、1 7 0、1 7 2、1 7 4、1 7 6、4 7 9、4 8 1、4 8 3、4 8 5、4 8 7、及び 4 8 9 からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % (例えば、約または少なくとも 8 0 %、約もしくは少なくとも 8 5 %、約もしくは少なくとも 9 0 %、約もしくは少なくとも 9 5 %) の配列同一性を有するもの、あるいは (c) (a) と (b) の両方、を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な実施形態では、核酸は、(a) 配列番号 1 5 6 と 1 5 7、(b) 配列番号 1 4 8 と 1 4 9、(c) 配列番号 1 7 2 と 1 7 3、(d) 配列番号 1 4 0 と 1 4 1、(e) 配列番号 1 7 4 と 1 7 5、(f) 配列番号 1 4 4 と 1 4 5、(g) 配列番号 1 5 2 と 1 5 3、(h) 配列番号 1 5 8 と 1 5 9、(i) 配列番号 1 4 6 と 1 4 7、(j) 配列番号 1 6 0 と 1 6 1、(k) 配列番号 1 6 6 と 1 6 7、(l) 配列番号 1 5 0 と 1 5 1、(m) 配列番号 1 4 2 と 1 4 3、(n) 配列番号 1 6 8 と 1 6 9、(o) 配列番号 1 6 4 と 1 6 5、(p) 配列番号 1 6 2 と 1 6 3、(q) 配列番号 1 7 0 と 1 7 1、(r) 配列番号 1 3 4 と 1 3 5、(s) 配列番号 1 5 4 と 1 5 5、(t) 配列番号 1 3 6 と 1 3 7、及び (u) 配列番号 1 3 8 と 1 3 9 からなる群から選択される 1 対のアミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な実施形態では、核酸は、表 D に記載されている対からなる群から選択される 1 対のアミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な態様では、核酸は、配列番号 2 0 8 ～ 3 7 5 のうちのいずれか 1 つ以上のうちの配列を含むヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、いかなる挿入、欠失、逆位、及び／または置換も含まない。他の実施形態では、核酸は、1 つ以上の挿入、欠失、逆位、及び／または置換を含む。

【0127】

様々な態様では、核酸は、表 D に記載されている、重鎖 (H C) 可変領域内もしくは軽鎖 (L C) 可変領域内、または両方に 1 つ以上 (例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22

、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または35)のアミノ酸置換を持つヒト化抗原結合タンパク質である抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示的態様では、核酸は、HC可変領域、LC可変領域、または両方に1つ以上のアミノ酸置換を持つAB1-11というヒト化抗原結合タンパク質である抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示的態様では、核酸は、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つのアミノ酸置換を持つ配列番号379のHCを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示的態様では、核酸は、配列番号504のHC CDR1、配列番号505のHC CDR2、配列番号506のHC CDR3、またはそれらの組み合わせを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示の場合には、核酸は、配列番号503のHCを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号496~501のうちいずれか1つのHCを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、図22でS7~S12として表示されているHC配列を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な場合には、核酸は、配列番号449のLC CDR1、配列番号450のLC CDR2、配列番号451のLC CDR3、またはそれらの組み合わせを含む軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号380~383、及び479のうちいずれか1つのLCを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示の場合には、核酸は、配列番号383のLCを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、図22でS7~S12として表示されているLC配列を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示的態様では、核酸は、HC可変領域、LC可変領域、または両方に1つ以上のアミノ酸置換を持つAB3-7というヒト化抗原結合タンパク質である抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示的態様では、核酸は、配列番号387のHCを含む、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアミノ酸置換を持つ抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示的態様では、核酸は、配列番号507のHC CDR1、配列番号508のHC CDR2、配列番号509のHC CDR3、またはそれらの組み合わせを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示の場合には、核酸は、配列番号502のHCを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号490~495のうちいずれか1つのHCを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、図22でS1~S6として表示されているHC配列を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な場合には、核酸は、配列番号476のLC CDR1、配列番号477のLC CDR2、配列番号454のLC CDR3、またはそれらの組み合わせを含む軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号388~390、及び481のうちいずれか1つのLCを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示の場合には、核酸は、配列番号389のLCを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、図22でS1~S6として表示されているLC配列を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0128】

例示的態様では、核酸は、HC可変領域、LC可変領域、または両方に1つ以上のアミノ酸置換を持つ、AB3のヒト化抗原結合タンパク質である抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示的態様では、核酸は、配列番号139のHCを含む、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ（またはそれ以上）のアミノ酸置換を持つ抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号510のうちいずれか1つのHCを含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号510のHC配列を含む、図23に示されるようなアミノ酸置換を1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ（またはそれ以上）

10

20

30

40

50

持つ抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示的態様では、核酸は、配列番号 138 の HC を含む、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つ（またはそれ以上）のアミノ酸置換を持つ抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号 511 のうちいずれか 1 つの HC を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号 511 の HC 配列を含む、図 24 に示されるようなアミノ酸置換を 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つ（またはそれ以上）持つ抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示的態様では、核酸は、HC 可変領域、LC 可変領域、または両方に 1 つ以上のアミノ酸置換を持つ、AB1 のヒト化抗原結合タンパク質である抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示的態様では、核酸は、配列番号 135 の HC を含む、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つ（またはそれ以上）のアミノ酸置換を持つ抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号 513 のうちいずれか 1 つの HC を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号 513 の HC 配列を含む、図 25 に示されるようなアミノ酸置換を 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つ（またはそれ以上）持つ抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。例示的態様では、核酸は、配列番号 134 の HC を含む、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つ（またはそれ以上）のアミノ酸置換を持つ抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号 512 のうちいずれか 1 つの HC を含む抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様では、核酸は、配列番号 512 の HC 配列を含む、図 26 に示されるようなアミノ酸置換を 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つ（またはそれ以上）持つ抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、いかなる挿入、欠失、逆位、及び／または置換も含まない。他の実施形態では、核酸は、1 つ以上の挿入、欠失、逆位、及び／または置換を含む。

【0129】

いくつかの態様では、本開示の核酸は組換え型である。本明細書で使用される場合、用語「組換え型」とは、(i) 生細胞の外側で、天然または合成の核酸セグメントを、生細胞内で複製することができる核酸分子につなぎ合わせることによって構築される分子、または (ii) 上記 (i) で記載される分子の複製から得られる分子を指す。ここでの目的の場合、複製は、インビトロでの複製またはインビボでの複製いずれでもあり得る。

【0130】

いくつかの態様での核酸は、当該技術分野で公知の手順を使用する化学合成及び／または酵素的ライゲーション反応に基づいて構築される。例えば、Sambrook et al. (上掲)、及び Ausubel et al. (上掲) を参照のこと。例えば、核酸は、天然に存在するヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を高めるよう、もしくはハイブリダイゼーション時に形成される二重鎖の物理的安定性を高めるよう設計された様々な修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオアート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチド）を使用して化学合成することができる。核酸を生成させるために使用することができる修飾ヌクレオチドの例としては、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベター-D-ガラクトシルキユエオシン、イノシン、N⁶-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N-置換アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアンモメチルウラシル (5-methylammomethyluracil)、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベター-D-マンノシルキユエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸 (v

)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キュエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシピロピル)ウラシル、及び2,6-ジアミノプリンが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、本開示の核酸のうち1つ以上は、Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) and SyntheGen (Houston, TX) 等の企業から購入することができる。

【0131】

ベクター

【0132】

いくつかの態様での本開示の核酸はベクターに組み込まれる。これに関し、本開示は、本願で開示される核酸のいずれかを含むベクターを提供する。様々な態様では、ベクターは、組換え発現ベクターである。ここでの目的の場合、用語「組換え発現ベクター」とは、宿主細胞によるmRNA、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの発現を可能にする、遺伝子が組み換えられているオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのコンストラクトを意味し、その場合、コンストラクトは、かかるmRNA、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、ベクターは、細胞内でmRNA、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを発現させるのに十分な条件下で細胞と接触する。本開示のベクターは、概して天然に存在しない。ただし、ベクターの部分は天然に存在し得る。本願で開示されるベクターは、DNA及びRNAが含まれるがこれらに限定されない、いかなる種類のヌクレオチドでも含むことができ、それらは、一本鎖もしくは二本鎖、合成、または天然由来物質から部分的に取得されたものであり得、また天然、非天然または改変されたヌクレオチドを含有することができる。ベクターは、天然に存在するヌクレオチド間結合もしくは天然には存在しないヌクレオチド間結合、または両方の型の結合を含むことができる。いくつかの態様では、改変ヌクレオチドまたは天然には存在しないヌクレオチド間結合は、ベクターの転写または複製を妨げない。

【0133】

本開示のベクターは、あらゆる好適なベクターであってよく、また任意の好適な宿主の形質導入、形質転換またはトランスフェクトを行うために使用することができる。好適なベクターには、増殖(propagation)と増殖(expansion)のため、もしくは発現のため、またはその両方のために設計されているもの、例えば、プラスミド及びウイルス等が含まれる。ベクターは、プラスミドを用いる発現ベクターであり得る。様々な態様では、ベクターは、pUC系(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系(Stratagene, La Jolla, CA)、pET系(Novagen, Madison, WI)、pGEX系(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)、及びpEX系(Clontech, Palo Alto, CA)からなる群から選択される。バクテリオファージベクター、例えば、λGT10、λGT11、λZapII(Stratagene)、λEMBL4、及びλNML149等もまた使用することができる。植物発現ベクターの例としては、pBIOL、pBI101.2、pBI101.3、pBI121及びpBIN19(Clontech)が挙げられる。動物発現ベクターの例としては、pEUK-Cl、pMAM及びpMAMneo(Clontech)が挙げられる。いくつかの態様では、ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターである。様々な態様では、ベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクター、水疱性口内炎ウイルス(VSV)ベクター、ワクシニアウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターである。例えば、Howarth et al., Cell Biol. Toxicol. 26(1):1-20(2010)を参照のこと。様々な態様では、ベクターは、節足動物、例えば、昆虫類に感染させるバキュロウイルスベクターである。様々な態様では、バキュロウイルスベクターは、Autographa californica multiple nuclearウイルス

10

20

30

40

50

(AcMNPV) または *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis (BmNPV) である。例えば、Khan, Adv Pharm Bull 3 (2) : 257-263 (2013)、Miller, Bioessays 11 (4) : 91-96 (1989)、Atkinson et al., Pestic Sci 28 : 215-224 (1990) を参照のこと。

【0134】

本開示のベクターは、例えば、Sambrook et al. (上掲)、及び Ausubel et al. (上掲) に記載される、標準的組換えDNA技術を使用して調製することができる。環状または線状である発現ベクターのコンストラクトは、宿主原核細胞または宿主真核細胞で機能する複製系を含有するよう調製することができる。複製系は、例えば、CoIE1、2 μ プラスミド、 λ 、SV40、ウシパピローマウイルス等に由来し得る。

10

【0135】

いくつかの態様では、ベクターは、ベクター導入対象の宿主の種類（例えば、バクテリア、真菌、植物、または動物）に特異的な、転写と翻訳の開始コドン及び終止コドン等の制御配列を含み、必要に応じてそのベクターがDNA系なのかRNA系なのかが考慮されている。

【0136】

ベクターには、形質転換またはトランスフェクトされた宿主の選択を可能にする1つ以上のマーカー遺伝子を含めることができる。マーカー遺伝子には、殺生物剤耐性、例えば、抗生物質、重金属等への耐性、原栄養性を与えるための栄養要求性宿主における相補性等が含まれる。本願で開示される発現ベクター用の好適なマーカー遺伝子としては、例えば、ネオマイシン/G418耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ヒスチジノール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、及びアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。

20

【0137】

ベクターは、ポリペプチド（その機能性部分及び機能性変異型を含む）をコードするヌクレオチド配列、またはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に相補的であるかもしくはそれにハイブリダイズするヌクレオチド配列に機能的に連結されている、天然もしくは標準的なプロモーターを含むことができる。プロモーターの選択、例えば、強い、弱い、誘導性、組織特異的及び発生特異的等は、当業者の通常の技能の範囲内である。同様に、ヌクレオチド配列とプロモーターを合わせることもまた当業者の技能の範囲内である。プロモーターは、非ウイルスプロモーターまたはウイルスプロモーター、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、SV40 プロモーター、RSV プロモーター、及び murine stem cell virus の長い末端反復に見られるプロモーターであり得る。

30

【0138】

宿主細胞

【0139】

本明細書では、本開示の核酸またはベクターを含む宿主細胞が提供される。本明細書で使用される場合、用語「宿主細胞」とは、本願で開示されるベクターを含有することができる、また核酸（例えば、mRNA、タンパク質）によりコードされる発現産物を産生することができる、いかなる種類の細胞も指す。いくつかの態様での宿主細胞は、接着細胞であるかまたは浮遊細胞、すなわち、浮遊状態で生育する細胞である。様々な態様では宿主細胞は、培養細胞であるかまたは初代細胞、すなわち、生物、例えば、ヒトから直接分離された細胞である。宿主細胞はどの細胞型であってもよく、あらゆる種類の組織に由来し得、またどの発生段階のものでもよい。

40

【0140】

様々な態様では、抗原結合タンパク質はグリコシル化タンパク質であり、宿主細胞はグリコシル化能を有する細胞である。様々な態様では、グリコシル化能を有する細胞は真核細胞であり、これには、酵母細胞、糸状菌細胞、原虫類細胞、藻類細胞、昆虫細胞、また

50

は哺乳類細胞が含まれるが、これらに限定されない。そのような宿主細胞は当該技術分野で報告されている。例えば、Frenzel, et al., Front Immunol 4:217 (2013) を参照のこと。様々な態様では、真核細胞は、哺乳類細胞である。様々な態様では、哺乳類細胞は、非ヒト哺乳類細胞である。いくつかの態様では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞とそれに由来する細胞 (例えば、CHO-K1、CHO pro-3)、マウス骨髄腫細胞 (例えば、NS0、GS-NS0、Sp2/0)、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 活性が欠損するよう操作されている細胞 (例えば、DUKX-X11、DG44)、ヒト胎児由来腎臓293 (HEK293) 細胞またはそれに由来する細胞 (例えば、HEK293T、HEK293-EBNA)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (例えば、COS細胞、VERO細胞)、ヒト子宮頸癌細胞 (例えば、HeLa)、ヒト骨骨肉腫上皮細胞U2-OS、ヒト肺基底上皮腺癌細胞A549、ヒト線維肉腫細胞HT1080、マウス脳腫瘍細胞CAD、胚性癌腫細胞P19、マウス胚線維芽細胞NIH 3T3、マウス線維芽細胞L929、マウス神経芽細胞腫細胞N2a、ヒト乳癌細胞MCF-7、網膜芽細胞腫細胞Y79、ヒト網膜芽細胞腫細胞SO-Rb50、ヒト肝癌細胞Hep G2、マウス骨髄腫B細胞J558L、またはベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞 (Gaillet et al. 2007; Khan, Adv Pharm Bull 3(2):257-263 (2013)) である。

【0141】

ベクターを増幅させるかまたは複製させる目的の場合、いくつかの態様での宿主細胞は、原核細胞、例えば、細菌細胞である。

【0142】

また本開示では、本明細書に記載される少なくとも1つの宿主細胞を含む細胞集団が提供される。いくつかの態様での細胞集団は、ベクターのうちいずれをも含まない少なくとも1つの他の細胞に加え、記載されているベクターを含む宿主細胞を含む不均一な集団である。別法として、いくつかの態様では、細胞集団は、実質的に均一な集団であり、集団は、ベクターを含む宿主細胞を主に含む (例えば、本質的にそれらからなる)。いくつかの態様での集団は、細胞のクローン集団であり、その集団の細胞はすべて、ベクターを含む単一宿主細胞のクローンであり、集団のすべての細胞がベクターを含む。本開示の様々な実施形態では、細胞集団は、本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞を含むクローン集団である。

【0143】

製造方法

【0144】

また、本明細書では、CLDN6に結合する抗原結合タンパク質を生産する方法も提供される。様々な実施形態では、方法は、抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む宿主細胞を、本明細書に記載されるように細胞培養培地中で培養すること、及び細胞培養培地から抗原結合タンパク質を回収することを含む。宿主細胞は、本明細書に記載される宿主細胞のいずれでもあり得る。様々な態様では、宿主細胞は、CHO細胞、NS0細胞、COS細胞、VERO細胞、及びBHK細胞からなる群から選択される。様々な態様では、宿主細胞を培養するステップは、宿主細胞の生育と増殖を支持するため増殖培地中で宿主細胞を培養することを含む。様々な態様では、増殖培地により、細胞の密度、培養時生存率と生産性が適切な時機に増大する。様々な態様では、増殖培地は、成長因子、ホルモン、及び接着因子の供給源としてアミノ酸、ビタミン、無機塩類、グルコース、及び血清を含む。様々な態様では、増殖培地は、アミノ酸、ビタミン、微量元素、無機塩類、脂質及びインスリンまたはインスリン様成長因子からなる完全合成培地である。栄養に加え、増殖培地はまた、pH及び浸透圧の維持にも役立つ。いくつかの増殖培地は市販されており、当該技術分野で報告されている。例えば、Arora, "Cell Culture Media: A Review" MATER METHODS 3:175 (2013) を参照のこと。

【0145】

様々な態様では、方法は、宿主細胞を流加培地中で培養することを含む。様々な態様では、方法は、流加培養法で流加培地中にて培養することを含む。組換えタンパク質生産の方法は当該技術分野で公知である。例えば、Li et al., “Cell culture processes for monoclonal antibody production” MAbs 2 (5): 466–477 (2010) を参照のこと。

【0146】

抗原結合タンパク質の作製方法は、細胞培養物またはその上清からタンパク質を精製し、好ましくは精製したタンパク質を回収するための1つ以上のステップを含むことができる。様々な態様では、方法は、1つ以上のクロマトグラフィーステップ、例えば、アフィニティクロマトグラフィー（例えば、プロテインAアフィニティクロマトグラフィー）、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィーを含む。様々な態様では、方法は、プロテインAアフィニティクロマトグラフィー樹脂を使用してタンパク質を精製することを含む。

【0147】

様々な実施形態では、方法はさらに、精製タンパク質等を製剤化し、それにより精製タンパク質を含む製剤を得るためのステップを含む。そのようなステップは、Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing, eds. Jameel and Hershenon, John Wiley & Sons, Inc. (Hoboken, NJ), 2010に記載されている。

【0148】

様々な態様では、ポリペプチドに連結された抗原結合タンパク質及び抗原結合タンパク質は、融合タンパク質の一部である。したがって、本開示はさらに、CLDN6に結合する抗原結合タンパク質を含む融合タンパク質を生産する方法を提供する。様々な実施形態では、方法は、融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む宿主細胞を、本明細書に記載されるように細胞培養培地中で培養すること、及び細胞培養培地から融合タンパク質を回収することを含む。

【0149】

複合体

【0150】

本開示は、抗原結合タンパク質であって、第2の部分（例えば、異種部分、複合体部分）に結合（attached）、連結または結合（conjugated）されている抗原結合タンパク質も提供する。したがって、本開示は、抗原結合タンパク質と異種部分とを含む複合体を提供する。本明細書で使用される場合、用語「異種部分」は、「複合体部分」と同義であり、本開示の抗原結合タンパク質とは異なるあらゆる分子（化学的もしくは生化学的分子、天然に存在する分子、またはコードされていない分子）を指す。様々な異種部分としては、ポリマー、炭水化物、脂質、核酸、オリゴヌクレオチド、DNAもしくはRNA、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、治療剤、（例えば、細胞傷害性薬物、サイトカイン）、または診断用薬が挙げられるが、これらに限定されない。

【0151】

いくつかの実施形態では、異種部分はポリマーである。ポリマーは、分岐であっても非分岐であってもよい。ポリマーは、あらゆる分子量であり得る。いくつかの実施形態でのポリマーは、平均分子量が約2 kDa～約100 kDaである（用語「約」は、水溶性ポリマーの調製物において、記述されている分子量よりも多い分子もあれば、それより少ない分子もあることを示す）。ポリマーの平均分子量は、いくつかの態様では、約5 kDa～約50 kDa、約12 kDa～約40 kDaまたは約20 kDa～約35 kDaである。

【0152】

いくつかの実施形態では、ポリマーは、重合度を制御することができるよう、単一反応性基、例えば、アシル化用の活性エステルまたはアルキル化用のアルデヒド等を有するよう修飾される。いくつかの実施形態でのポリマーは、それが結合するタンパク質が生理学

10

20

30

40

50

的環境等の水性環境において沈殿しないよう、水溶性である。いくつかの実施形態では、例えば、組成物が治療用に用いられる場合、ポリマーは薬学的に許容される。さらに、いくつかの態様では、ポリマーは、ポリマーの混合物、例えば、共重合体、ブロック共重合体である。

【0153】

いくつかの実施形態では、ポリマーは、ポリアミド、ポリカルボナート、ポリアルキレンとその誘導体（ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレートを含む）、アクリル酸エステル及びメタクリル酸エステルのポリマー（ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリ（メタクリル酸エチル）、ポリ（メタクリル酸ブチル）、ポリ（メタクリル酸イソブチル）、ポリ（メタクリル酸ヘキシル）、ポリ（メタクリル酸イソデシル）、ポリ（メタクリル酸ラウリル）、ポリ（メタクリル酸フェニル）、ポリ（アクリル酸メチル）、ポリ（アクリル酸イソプロピル）、ポリ（アクリル酸イソブチル）、及びポリ（アクリル酸オクタデシル）を含む）、ポリビニルポリマー（ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ハロゲン化ポリビニル、ポリ（酢酸ビニル）、及びポリビニルピロリドンを含む）、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタンとその共重合体、セルロース（アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシエチルセルロース、三酢酸セルロース、及び硫酸セルロースナトリウム塩を含む）、ポリプロピレン、ポリエチレン（ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、及びポリ（エチレンテレフタレート）を含む）、及びポリスチレンからなる群から選択される。

【0154】

本明細書での使用に特に好ましい水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）である。本明細書で使用される場合、ポリエチレングリコールは、モノ（C1-C10）アルコキシーまたはアリーロキシのポリエチレングリコール等、他のタンパク質を誘導体化するために使用することができるPEGの形態のいずれも包含されることが意図される。PEGは、広範な分子量で利用可能な直鎖または分岐の中性ポリエーテルであり、水及び大部分の有機溶媒に可溶性である。

【0155】

いくつかの実施形態では、異種部分は、炭水化物である。いくつかの実施形態では、炭水化物は、単糖（例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトース）、二糖（例えば、スクロース、ラクトース、マルトース）、オリゴ糖（例えば、ラフィノース、スタキオース）、多糖（デンプン、アミラーゼ、アミロペクチン、セルロース、キチン、カロース、ラミナリン、キシラン、マンナン、フコイダン、ガラクトマンナンである。

【0156】

いくつかの実施形態では、異種部分は、脂質である。いくつかの実施形態では、脂質は、脂肪酸、エイコサノイド、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、N-アシルエタノールアミン）、グリセロ脂質（例えば、一置換、二置換、三置換のグリセロール）、グリセロリン脂質（例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン）、スフィンゴ脂質（例えば、スフィンゴシン、セラミド）、ステロール脂質（例えば、ステロイド、コレステロール）、プレノール脂質、糖脂質、またはポリケチド、油、ワックス、コレステロール、ステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質である。

【0157】

いくつかの実施形態では、異種部分は、治療剤である。治療剤は、当該技術分野で公知の治療剤のいずれでもあり得る。本明細書で意図される治療剤の例としては、天然酵素、天然由来物質に由来するタンパク質、組換えタンパク質、天然ペプチド、合成ペプチド、

環状ペプチド、抗体、受容体作動薬、細胞傷害性薬物、イムノグロビン、ベータアドレナリン遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、冠血管拡張薬、強心配糖体、抗不整脈薬、心臓支配交感神経作用薬、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、利尿薬、強心薬、コレステロール及びトリグリセリドの低下薬、胆汁酸捕捉薬、フィブラート、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル（HMG）-CoA還元酵素阻害剤、ナイアシン誘導体、抗アドレナリン作動薬、アルファアドレナリン遮断薬、中枢性抗アドレナリン作動薬、血管拡張薬、カリウム保持性薬剤、チアジド系薬と関連薬剤、アンジオテンシンII受容体拮抗薬、末梢血管拡張薬、抗アンドロゲン薬、エストロゲン、抗生物質、レチノイド、インスリンと類似体、アルファグルコシダーゼ阻害薬、ビグアナイド系薬剤、メグリチニド、スルホニル尿素、チオアゾリジンジオン、アンドロゲン、プロゲステロン、骨代謝調節物質、下垂体前葉ホルモン、視床下部ホルモン、下垂体後葉ホルモン、ゴナドトロピン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン拮抗薬、排卵刺激剤、選択的エストロゲン受容体調節薬、抗甲状腺薬、甲状腺ホルモン、膨張性薬剤、下剤、蠕動抑制薬、細菌叢修飾物質、腸内吸着剤、腸管抗感染薬、食欲不振用薬剤（*antianorexics*）、悪液質用薬剤（*anticachexics*）、過食症用薬剤（*antibulimics*）、食欲抑制剤、抗肥満薬、制酸剤、上部消化管用薬剤、抗コリン剤、アミノサリチル酸誘導体、生体応答調節剤、コルチコステロイド、鎮痙剤、5-HT₄部分作動薬、抗ヒスタミン薬、カンナビノイド、ドーパミン拮抗薬、セロトニン拮抗薬、細胞保護剤、ヒスタミンH₂-受容体拮抗薬、粘膜保護剤、プロトンポンプ阻害薬、*H. pylori*除菌療法、赤血球生成促進剤、造血剤、貧血用薬剤、ヘパリン、抗線溶薬、止血剤、血液凝固因子、アデノシン二リン酸阻害剤、糖タンパク質受容体阻害剤、フィブリノゲン-血小板結合阻害剤、トロンボキサン-A₂阻害剤、プラスミノゲン活性化因子、抗血栓薬、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、コルチコステロイド、選択的免疫抑制剤、抗真菌薬、予防治療に伴う薬物、AIDS関連感染症、サイトメガロウイルス、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害薬、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害薬、プロテアーゼ阻害薬、貧血、カポジ肉腫（特発性多発性出血性肉腫）、アミノグリコシド系薬剤、カルバペネム系薬剤、セファロスポリン系薬剤、グリコペプチド、リンコサミド系薬剤、マクロライド系薬剤、オキサゾリジノン系薬剤、ペニシリン系薬剤、ストレプトグラミン系薬剤、スルホンアミド、トリメトプリムと誘導体、テトラサイクリン系薬剤、駆虫薬、抗アメーバ薬、ビグアナイド系薬剤、キナアルカロイド、葉酸拮抗薬、キノリン誘導体、ニューモシスチス-カリニ治療薬、ヒドラジド、イミダゾール、トリアゾール、ニトロイミダゾール、環状アミン、ノイラミニダーゼ阻害薬、ヌクレオシド、リン吸着剤、抗コリンエステラーゼ薬、補助療法薬、バルビツール酸系と誘導体、ベンゾジアゼピン、ガンマアミノ酪酸誘導体、ヒダントイン誘導体、イミノスチルベン誘導体、スクシンイミド誘導体、抗痙攣薬、麦角系アルカロイド、抗片頭痛薬調製物、生体応答調節剤、カルバミン酸イーター（*carbamate acid eater*）、三環式誘導体、脱分極薬、非脱分極薬、神経筋麻痺性薬、中枢神経刺激薬、ドーパミン作動薬、モノアミン酸化酵素阻害薬、COMT阻害薬、スルホン酸アルキル、エチレンイミン、イミダゾテトラジン、ナイトロジェンマスタード類似体、ニトロソウレア、白金含有化合物、代謝拮抗剤、プリン類似体、ピリミジン類似体、尿素誘導体、アントラサイクリン系薬剤、アクチノマイシンd、カンプトテシン誘導体、エピボドフィロトキシン、タキサン、ビンカアルカロイドと類似体、抗アンドロゲン薬、抗エストロゲン薬、非ステロイド性アロマトラーゼ阻害薬、プロテインキナーゼ阻害剤抗悪性腫瘍薬、アザスピロデカンジオン誘導体、抗不安薬、覚せい剤、モノアミン再取り込み阻害薬、選択的セロトニン再取り込み阻害薬、抗うつ薬、ベンゾイソオキサゾール誘導体、ブチロフェノン系誘導体、ジベンゾジアゼピン誘導体、ジベンゾチアゼピン誘導体、ジフェニルブチルピペラジン誘導体、フェノチアジン、チエノベンゾジアゼピン誘導体、チオキサンテン誘導体、アレルゲン抽出物、非ステロイド薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬、キサンチン、エンドセリン受容体拮抗薬、プロスタグランジン、肺サーファクタント、粘液溶解薬、抗有糸分裂薬、尿酸排泄薬、キサンチンオキシダーゼ阻害薬、ホスホジエステラーゼ阻害薬、メテアミン（*metheamine*）塩、ニトロフラン誘導体、キノロン系

10

20

30

40

50

薬剤、平滑筋弛緩薬、副交感神経作動薬、ハロゲン化炭化水素、アミノ安息香酸のエステル、アミド（例えば、リドカイン、アルチカイン塩酸塩、ブピバカイン塩酸塩）、解熱薬、催眠薬と鎮静剤、シクロピロロン、ピラゾロピリミジン、非ステロイド性抗炎症薬、オピオイド、パラアミノフェノール誘導体、アルコール脱水素酵素阻害剤、ヘパリン拮抗薬、吸着剤、催吐薬、オピオイド拮抗薬、コリンエステラーゼ再賦活薬、ニコチン補充療法薬、ビタミンA類似体と拮抗薬、ビタミンB類似体と拮抗薬、ビタミンC類似体と拮抗薬、ビタミンD類似体と拮抗薬、ビタミンE類似体と拮抗薬、ビタミンK類似体と拮抗薬が挙げられるが、これらに限定されない。

【0158】

本開示の抗原結合タンパク質は、腫瘍転移の阻害に有効である1つ以上のサイトカイン及び成長因子に結合させることができ、ここで、サイトカインまたは成長因子は、少なくとも1つの細胞集団に対する抗増殖作用を有することが示されているものである。そのようなサイトカイン、リンホカイン、成長因子、または他の造血因子としては、M-CSF、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IFN、TNF α 、TNF1、TNF2、G-CSF、Meg-CSF、GM-CSF、トロンプオエチン、幹細胞因子、及びエリスロポエチンが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書での使用のための追加の成長因子には、アンジオゲニン、骨形成タンパク質-1、骨形成タンパク質-2、骨形成タンパク質-3、骨形成タンパク質-4、骨形成タンパク質-5、骨形成タンパク質-6、骨形成タンパク質-7、骨形成タンパク質-8、骨形成タンパク質-9、骨形成タンパク質-10、骨形成タンパク質-11、骨形成タンパク質-12、骨形成タンパク質-13、骨形成タンパク質-14、骨形成タンパク質-15、骨形成タンパク質受容体IA、骨形成タンパク質受容体IB、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、毛様体神経栄養因子受容体 α 、サイトカイン誘導性好中球走化性因子1、サイトカイン誘導性好中球、走化性因子2 α 、サイトカイン誘導性好中球走化性因子2 β 、 β 内皮細胞成長因子、エンドセリン1、上皮由来好中球誘引物質、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体 α 1、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体 α 2、成長関連タンパク質、成長関連タンパク質 α 、成長関連タンパク質 β 、成長関連タンパク質 γ 、ヘパリン結合上皮成長因子、肝細胞成長因子、肝細胞成長因子受容体、インスリン様成長因子I、インスリン様成長因子受容体、インスリン様成長因子II、インスリン様成長因子結合タンパク質、ケラチノサイト成長因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受容体 α 、神経成長因子 神経成長因子受容体、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、プレB細胞成長刺激因子、幹細胞因子、幹細胞因子受容体、トランスフォーミング成長因子 α 、トランスフォーミング成長因子 β 、トランスフォーミング成長因子 β 1、トランスフォーミング成長因子 β 1.2、トランスフォーミング成長因子 β 2、トランスフォーミング成長因子 β 3、トランスフォーミング成長因子 β 5、潜在型トランスフォーミング成長因子 β 1、トランスフォーミング成長因子 β 結合タンパク質I、トランスフォーミング成長因子 β 結合タンパク質II、トランスフォーミング成長因子 β 結合タンパク質III、腫瘍壊死因子受容体I型、腫瘍壊死因子受容体II型、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体、及びキメラタンパク質とその生物学または免疫学的活性断片が含まれる。

【0159】

いくつかの実施形態では、複合体は、本明細書に記載される化合物と細胞毒性薬とを含む。細胞毒性薬は、細胞に対して毒性を示すあらゆる分子（化学的または生化学的）である。いくつかの態様では、本発明の化合物に細胞毒性薬を結合させる場合、得られる結果は相乗的である。換言すると、化合物と細胞毒性薬の併用療法の有効性は相乗的である、すなわち、有効性は、それぞれの個別の相加的作用から予測される有効性よりも大きい。したがって、細胞毒性薬の投与量を減量することができ、そのため、毒性上の問題及び他の副作用というリスクが同時に低減される。いくつかの実施形態では、細胞毒性薬は、化学療法薬である。化学療法薬は当該技術分野で公知であり、米国特許第6,630,12

10

20

30

40

50

4号に記載されるような白金配位化合物、トポイソメラーゼ阻害剤、抗生物質、抗有糸分裂アルカロイド及びジフルオロヌクレオシドが含まれるが、これらに限定されない。

【0160】

いくつかの実施形態では、化学療法薬は、白金配位化合物である。用語「白金配位化合物」とは、白金をイオンの形態で与える、腫瘍細胞増殖を阻害するあらゆる白金配位化合物を指す。いくつかの実施形態では、白金配位化合物は、シス-ジアミンジアカ白金（II）-イオン；クロロ（ジエチレントリアミン）-白金（II）塩化物；ジクロロ（エチレンジアミン）-白金（II）、ジアミン（1, 1-シクロブタンジカルボキシラト）白金（II）（カルボプラチン）；スピロプラチン；イプロプラチン；ジアミン（2-エチルマロナト）-白金（II）；エチレンジアミンマロナト白金（II）；アクア（1, 2-ジアミノシクロヘキサン）-スルファト白金（II）；（1, 2-ジアミノシクロヘキサン）マロナト白金（II）；（4-カロキシフタラート）（1, 2-ジアミノシクロヘキサン）白金（II）；（1, 2-ジアミノシクロヘキサン）-（イソシトラト）白金（II）；（1, 2-ジアミノシクロヘキサン）シス（ピルバト）白金（II）；（1, 2-ジアミノシクロヘキサン）オキサラト白金（II）；オルマプラチン；及びテトラプラチンである。

【0161】

いくつかの実施形態では、シスプラチンは、本発明の組成物及び方法で用いられる白金配位化合物である。シスプラチンは、PLATINOL（商標）の一般名で Bristol Myers-Squibb Corporationから市販されており、水、滅菌生理食塩水または他の好適なビヒクルを用いた構成用の粉末として入手可能である。本発明での使用に好適な他の白金配位化合物は公知であり、市販のものを利用すること、及び／または従来技術により調製することができる。シスプラチン、またはシス-ジクロロジアンミン白金IIは、様々なヒト悪性固形腫瘍の治療において化学療法薬として長年使用されており、好成績を収めている。より最近では、他のジアミノ-白金錯体もまた、様々なヒト悪性固形腫瘍の治療における化学療法薬として有効性が示されている。そのようなジアミノ-白金錯体としては、スピロ白金及びカルボ白金が挙げられるが、これらに限定されない。シスプラチン及び他のジアミノ-白金錯体はヒトでの化学療法薬として広く使用されているが、腎障害等の毒性の問題をもたらし得る高投与量での送達が必要であった。

【0162】

いくつかの実施形態では、化学療法薬は、トポイソメラーゼ阻害剤である。トポイソメラーゼは、真核細胞のDNAトポロジーを変化させることができる酵素である。それらは、細胞の機能及び細胞増殖にとって重要である。一般に、真核細胞では、I型とII型の2つのクラスのトポイソメラーゼがある。トポイソメラーゼIは、分子量が約100,000の単量体酵素である。この酵素は、DNAに結合し、一過性の一本鎖切断を導入して、二重らせんを巻き戻し（または巻き戻すのを可能にし）、その後、切断部を、DNA鎖から解離しないうちに再結合させる。様々なトポイソメラーゼ阻害剤で、最近、卵巣、がん、食道癌または非小細胞肺癌で苦しむヒトの治療における臨床的有效性が示されている。

【0163】

いくつかの態様では、トポイソメラーゼ阻害剤は、カンプトテシンまたはカンプトテシン類似体である。カンプトテシンは、中国在来種 *Campthotheca acuminata* の木、及びインド在来種 *Nothapodytes foetida* の木により産生される水不溶性の細胞傷害性アルカロイドである。カンプトテシンは、いくつかの腫瘍細胞に対して腫瘍細胞増殖阻害活性を示す。カンプトテシン類似体クラス化合物は典型的に、DNAトポイソメラーゼIの特異的阻害剤である。「トポイソメラーゼ阻害剤」という用語は、カンプトテシンに構造的に関連した、あらゆる腫瘍細胞増殖阻害化合物を意味する。カンプトテシン類似体クラス化合物としては、トポテカン、イリノテカン及び9-アミノ-カンプトテシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0164】

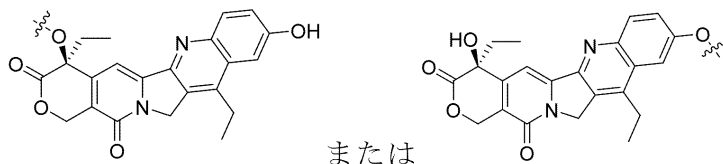
追加の実施形態では、細胞毒性薬は、1991年4月2日に交付された米国特許第5,

004, 758号及び20'公開第EP0321122号として1989年6月21日に公開された欧州特許出願第88311366.4号; 1986年8月5日に交付された米国特許第4,604,463号及び1985年4月17日に公開された欧州特許出願公開第EP0137145号; 1984年9月25日に交付された米国特許第4,473,692号及び1983年3月16日に公開された欧州特許出願公開第EP0074256号; 1985年10月8日に交付された米国特許第4,545,880号及び1983年3月16日に公開された欧州特許出願公開第EP0074256号; 1983年9月14日に公開された欧州特許出願公開第EP0088642号; Wani et al., J. Med. Chem., 29, 2358-2363 (1986)、Nitta et al., Proc. 14th International Congr. Chemotherapy, Kyoto, 1985, Tokyo Press, Anticancer Section 1, p. 28-30 (特にCPT-11と呼ばれる化合物)において特許請求または記載されている、任意の腫瘍細胞増殖阻害カンプトテシン類似体である。CPT-11は、10-ヒドロキシ-7-エチルカンプトテシンのC-10におけるカルバマート結合を介して連結されている4-(ピペリジノ)-ピペリジン側鎖を持つカンプトテシン類似体である。CPT-11は現在、ヒトでの臨床試験が行われており、イリノテカンとも呼ばれる。Wani et al., J. Med. Chem., 23, 554 (1980)、Wani et al., J. Med. Chem., 30, 1774 (1987)、1982年8月3日に交付された米国特許第4,342,776号; 1990年9月13日に出版された米国特許出願第581,916号及び1991年3月20日に公開された欧州特許出願公開第EP418099号; 1985年4月23日に交付された米国特許第4,513,138号及び1983年3月23日に公開された欧州特許出願公開第EP0074770号; 1983年8月16日に交付された米国特許第4,399,276号及び1982年7月28日に公開された欧州特許出願公開第0056692号; その各々の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。上記で挙げたカンプトテシン類似体クラス化合物のいずれも、市販のものを利用すること、及び/または上記で挙げた参考文献に記載のものを含めた従来の技術により調製することができる。トポイソメラーゼ阻害剤は、トポテカン、イリノテカン及び9-アミノカンプトテシンからなる群から選択され得る。

【0165】

いくつかの実施形態では、カンプトテシン類似体は、イリノテカン(CPT-11)の活性代謝物である。そのようないくつかの実施形態では、カンプトテシン類似体は、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン(SN-38)である。代謝物として、SN-38は、カルボキシルエステラーゼによるイリノテカンの加水分解により形成される。いくつかの実施形態では、SN-38は、以下の構造のうちの1つを有する。

【化1】



SN-38は、米国特許出願第7,999,083号、米国特許出願第8,080,250号、米国特許出願第8,759,496号、米国特許出願第8,999,344号、米国特許出願第10,195,288号、及び米国特許出願第9,808,537号に記載されている。

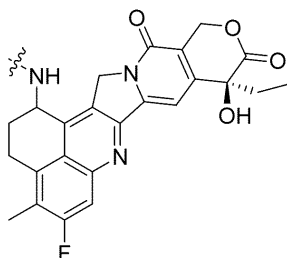
【0166】

いくつかの実施形態では、カンプトテシン類似体は、エキサテカンメタンズルホン酸である。エキサテカンメタンズルホン酸は、水溶性カンプトテシン(CPT)、他のCPT類似体よりもさらに強力なトポイソメラーゼI阻害活性及び抗腫瘍活性を示す。さらに、エキサテカンは、p-糖タンパク(P-gp)媒介性の多剤耐性細胞に対して有効である。

【0167】

いくつかの実施形態では、カンプトテシン類似体は、エキサテカンの強力な誘導体であるデルクステカン（Dxd）であり、SN-38よりも10倍高いトポイソメラーゼⅠ阻害能を有する。いくつかの実施形態では、Dxdは、以下の構造を有する。

【化2】



10

【0168】

Dxdは、米国特許出願第6,407,115号、米国特許出願第10,195,288号、米国特許出願第9,808,537号、及び米国特許出願第6,407,115号に記載されている。

【0169】

多数のカンプトテシン類似体クラス化合物の調製物（薬学的に許容される塩、その水和物と溶媒和物を含む）ならびにそのようなカンプトテシン類似体クラス化合物と不活性な薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む経口及び非経口の医薬組成物の調製物は、1991年4月2日に交付された米国特許第5,004,758号及び1989年6月21日に公開第EP0321122号として公開された欧州特許出願第88311366.4号に詳しく記載されており、それらの教示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0170】

本発明のなおさらなる他の実施形態では、化学療法薬は、複合抗生物質である。好適な抗生物質としては、ドキソルビシン、マイトマイシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン及びストレプトゾシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0171】

いくつかの実施形態では、化学療法薬は、抗有糸分裂アルカロイドである。一般に、抗有糸分裂アルカロイドは、*Cantharanthus roseus*から抽出することができ、また、抗がん化学療法剤として有効であることが示されている。多数の半合成誘導体が化学的にも薬理的にも研究されている（O. Van Tellingen et al, *Anticancer Research*, 12, 1699-1716 (1992)を参照のこと）。本発明の抗有糸分裂アルカロイドとしては、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、タキソール及びビノレルビンが挙げられるが、これらに限定されない。後の2つの抗有糸分裂アルカロイドはそれぞれ、Eli Lilly and Company、及びPierre Fabre Laboratoriesから市販されている（米国特許第5,620,985号を参照のこと）。一実施形態では、抗有糸分裂アルカロイドは、ビノレルビンである。

30

40

【0172】

本発明の他の実施形態では、化学療法薬は、ジフルオロヌクレオシドである。2'-デオキシ-2', 2'-ジフルオロヌクレオシドは、抗ウイルス活性を有するとして当該技術分野で知られている。そのような化合物は、米国特許第4,526,988号及び第4,808,614号に開示及び教示されている。欧州特許出願公開第184,365号には、これらの同じジフルオロヌクレオシドが腫瘍溶解活性を有することが開示されている。特定の態様では、本発明の組成物及び方法に使用される2'-デオキシ-2', 2'-ジフルオロヌクレオシドは、ゲムシタビン塩酸塩としても知られる2'-デオキシ-2', 2'-ジフルオロシチジン塩酸塩である。ゲムシタビンは、市販のものを利用するか、またはその教示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,526,988号、第4,808,

50

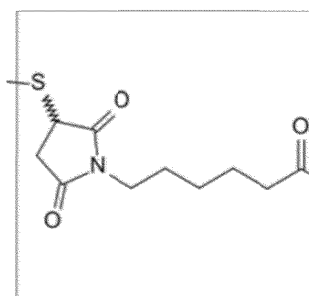
614号及び第5, 223, 608号に開示及び教示されているように多段階過程で合成することができる。

【0173】

様々な態様では、化学療法薬は、チューブリンの重合を遮断すること、微小管を不安定化させること、または微小管動態を変化させることにより細胞分裂を阻害する抗有糸分裂剤であり、例えば、メイタンシノイドまたはその誘導体（例えば、DM1またはDM4）、アウリスタチンまたはその誘導体である。様々な場合には、化学療法薬は、アウリスタチンである。例えば、いくつかの態様では、アウリスタチンは、ドラスタチン、モノメチルアウリスタチンE（MMAE）、モノメチルアウリスタチンE（MMAE）、またはPF-06380101である。アウリスタチンは、当該技術分野で報告されている。例えば、Maderna, A.; et al., *Mol Pharmaceutics* 12(6): 1798-1812 (2015)を参照のこと。様々な態様では、複合体は、本開示の抗体をMMAEと組み合わせて含む。任意選択で、複合体は、リンカーを含む。いくつかの態様では、リンカーは、切断可能な連結部分を含む。様々な場合には、複合体は、カテプシンで切断可能なリンカーに連結されている結合基に連結された本開示の抗体であって、MMAEに連結されているスペーサーに連結されているものを含む。態様では、結合基は、抗体のFc領域のCys残基を介して抗体に結合している。例示的態様では、結合基は、式Iの構造を含む。

10

【化3】



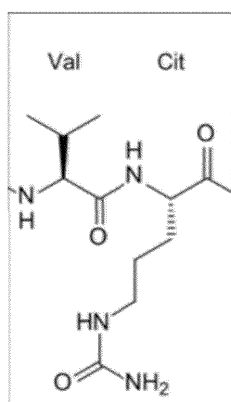
20

〔式 I〕

例示的態様では、カテプシンで切断可能なリンカーは、式IIの構造を含む。

30

【化4】



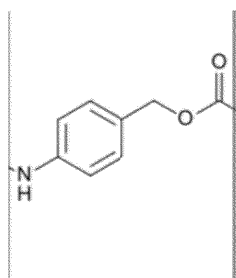
40

〔式 II〕

例示的な態様では、スペーサーは、式IIIの構造を含む。

50

【化 5】



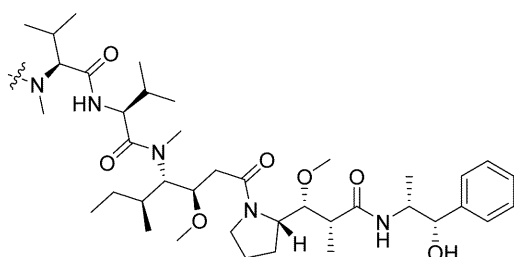
〔式 I I I〕

10

【0174】

いくつかの実施形態では、MMAEは、以下の構造を有する。

【化 6】



20

【0175】

本開示は、ポリペプチドに連結された本開示の抗原結合タンパク質を含む複合体も提供し、複合体が融合タンパク質であるようにしている。したがって、本開示は、ポリペプチドに連結された本開示の抗原結合タンパク質を含む融合タンパク質を提供する。様々な実施形態では、ポリペプチドは、診断的標識、例えば、緑色蛍光タンパク質等の蛍光タンパク質、または他のタグ、例えば、Mycタグである。様々な態様では、ポリペプチドは、サイトカイン、リンホカイン、成長因子、または上記で挙げた他の造血因子のうちの1つである。

30

【0176】

リンカー

【0177】

いくつかの実施形態では、複合体は、異種部分に直接連結されている。代替的实施形態では、複合体は、本開示の化合物を異種部分に連結するリンカーを含む。いくつかの態様では、リンカーは、原子が1～約60個、または1～30個の原子もしくはそれ以上、2～5個の原子、2～10個の原子、5～10個の原子、または10～20個の原子長の鎖を含む。いくつかの実施形態では、鎖原子はすべて炭素原子である。いくつかの実施形態では、リンカー骨格内の鎖原子は、C、O、N、及びSからなる群から選択される。鎖原子及びリンカーは、より可溶性の複合体が提供されるよう、それらの予測溶解度（親水性）に従って選択することができる。いくつかの実施形態では、リンカーは、酵素もしくは他の触媒による切断、または標的とする組織もしくは器官もしくは細胞において見られる加水分解条件による切断を受ける官能基を提供する。いくつかの実施形態では、リンカーの長さは、立体障害の可能性を低減するのに十分な長さである。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸またはペプチジルリンカーである。そのようなペプチジルリンカーは、いかなる長さであってもよい。様々なリンカーは、約1～50のアミノ酸長であり、5～50、3～5、5～10、5～15、または10～30のアミノ酸長である。

40

【0178】

多種多様な好適なリンカーが当該技術分野で公知である。リンカーは、例えば、生理学的条件下、例えば、細胞内条件下で切断可能であり得（切断可能リンカー）、リンカーの

50

切断により細胞内環境に薬物が放出されるようにする。別法として、リンカーは、切断可能であり得、細胞外条件、例えば、腫瘍細胞外側または腫瘍近傍で、リンカーの切断により、腫瘍細胞内側に選択的に透過する薬物が放出されるようにする。他の実施形態では、リンカーは、切断可能ではなく（切断不可能リンカー）、薬物が放出されるのは、例えば、抗体の分解によってである。

【0179】

リンカーは、抗体部分上の化学的反応性基、例えば、遊離のアミノ基、イミノ基、ヒドロキシル基、チオール基、またはカルボキシル基に（例えば、N末端もしくはC末端、1つ以上のリジン残基のイプシロンアミノ基、1つ以上のグルタミン酸残基もしくはアスパラギン酸残基の遊離カルボン酸基、1つ以上のシステニル残基のスルフヒドリル基、または1つ以上のセリン残基もしくはトレオニン残基のヒドロキシル基に）に結合させることができる。リンカーを結合させる部位は、抗体部分のアミノ酸配列内の天然残基であり得、また、抗体部分内に、例えば、DNA組換え技術により導入する（例えば、アミノ酸配列内にシステインまたはプロテアーゼ切断部位を導入することによる）かまたはタンパク質生化学（例えば、還元、pH調節、またはタンパク質分解）により導入することもできる。リンカーを結合させる部位は、非天然型アミノ酸でもあり得る。リンカーを結合させる部位は、抗体上のグリカンでもあり得る。

【0180】

典型的には、リンカーは、それが接続している2つの基が連結されている条件下で実質的に不活性である。用語「二官能性架橋剤」、「二官能性リンカー」または「架橋剤」とは、2つの反応性基をリンカーの各末端で有する修飾剤であって、1つの反応性基を最初に細胞傷害性化合物と反応させてリンカー部分担持化合物を提供することができるようにし、その後、第2の反応性基が抗体と反応することができるようにしたものを指す。別法として、二官能性架橋剤の一端を最初に抗体と反応させてリンカー部分と第2の反応性基とを担持する抗体を提供することができ、その後、これが細胞傷害性化合物と反応することができる。連結部分は、特定の部位での細胞傷害性部分の放出を可能にする化学結合を含有し得る。好適な化学結合は当該技術分野において周知であり、これには、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、酸不安定結合、光不安定結合、プロテアーゼ／ペプチダーゼ不安定結合、及びエステラーゼ不安定結合が含まれる。例えば、米国特許第5,208,020号、第5,475,092号、第6,441,163号、第6,716,821号、第6,913,748号、第7,276,497号、第7,276,499号、第7,368,565号、第7,388,026号、及び第7,414,073号を参照のこと。いくつかの実施形態では、結合は、ジスルフィド結合、チオエーテル、及び／またはプロテアーゼ／ペプチダーゼ不安定結合。本発明で使用できる他のリンカーには、その各々が参照により明白に本明細書に組み込まれる、US20050169933に詳述されているもの等の切断不可能リンカー、US2009/0274713、US2010/0129314、及びWO2009/134976に記載されているもの等の荷電リンカーまたは親水性リンカーが含まれる。

【0181】

いくつかの実施形態では、リンカーは、複合体に親水性を付与する親水性リンカーである。いくつかの実施形態では、親水性リンカーは、ポリエチレングリコール（PEG）を含む。いくつかの実施形態では、親水性リンカーは、CLA2である。いくつかの実施形態では、CLA2リンカーは、以下の構造を有する。

10

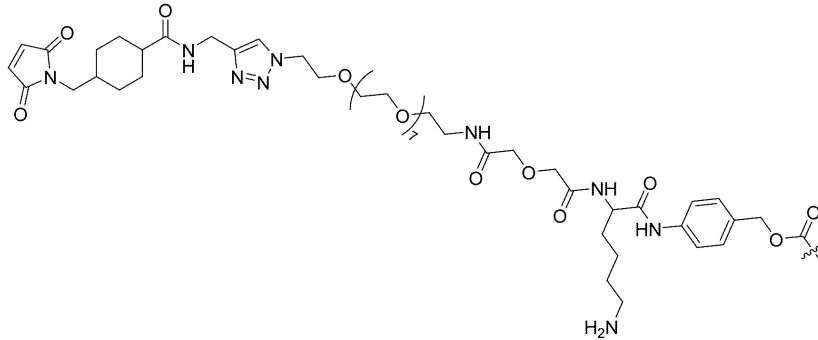
20

30

40

50

【化 7】



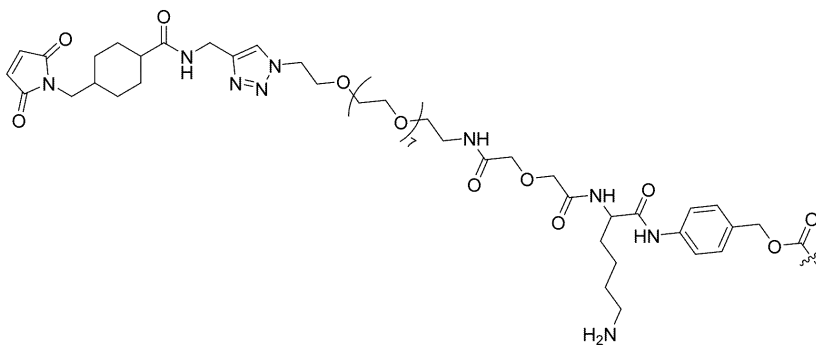
10

CLA 2 は、米国特許第 8,080,250 号、第 8,759,496 号、及び第 10,195,288 号に記載されている。

【0182】

いくつかの実施形態では、親水性リンカーは、CL 2 E である。いくつかの実施形態では、CL 2 E は、以下の構造を有する。

【化 8】



20

CL 2 E は、米国特許第 8,080,250 号、第 8,759,496 号、及び第 10,195,288 号に記載されている。

【0183】

いくつかの実施形態では、リンカーは、細胞内環境（例えば、リソソームもしくはエンドソームまたはカベオラの内部）中に存在する切断物質により切断可能である。リンカーは、例えば、リソソームまたはエンドソームのプロテアーゼが含まれるがこれらに限定されない細胞内または細胞外のペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断されるペプチドリンカーであり得る。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、少なくとも 2 アミノ酸長、少なくとも 3 アミノ酸長、少なくとも 4 アミノ酸長、または少なくとも 5 アミノ酸長を含む。

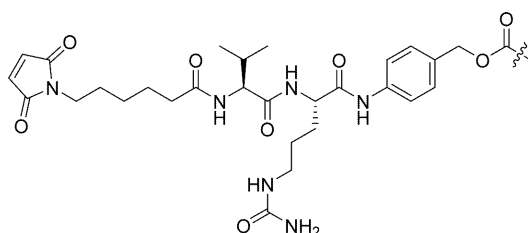
30

【0184】

いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、バリン残基とシトルリン残基とを含む MC-V C-P A B である。いくつかの実施形態では、MC-V C-P A B リンカーは、以下の構造を有する。

40

【化 9】



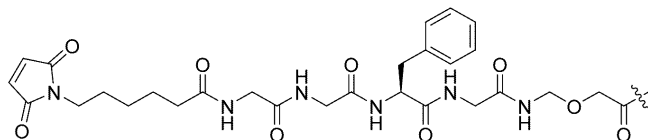
50

MC-VC-PABは、米国特許第7,659,241号、第7,829,531号、第6,884,869号、第6,214,345号、及び第6,214,345号に記載されている。

【0185】

いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、マレイミドカプロイル グリシン-グリシン-フェニルアラニン-グリシン (MC-GGGG) である。いくつかの実施形態では、MC-GGGG リンカーは、以下の構造を有する。

【化10】



10

MC-GGGGは、米国特許第9,808,537号及び第10,195,288号に記載されている。

【0186】

他の実施形態では、切断可能なリンカーは、pH感受性、すなわち、特定のpH値において加水分解に感受性である。いくつかの実施形態では、pH感受性リンカーは、酸性条件下で加水分解性である。例えば、リソソーム内で加水分解性の酸不安定リンカー（例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シス-アコニットアミド、オルトエステル、アセタール、ケタール等）を使用することができる（例えば、米国特許第5,122,368号、第5,824,805号、第5,622,929号、Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123, Neville et al, 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661を参照のこと）。そのようなリンカーは、血液中等の中性pH条件下で比較的安定であるが、リソソームの近似pHである5.5または5.0を下回るpHでは不安定である。特定の実施形態では、加水分解性リンカーは、チオエーテルリンカーである（例えば、アシルヒドラゾン結合を介して治療剤に結合しているチオエーテル等（例えば、米国特許第5,622,929号を参照のこと））。

20

【0187】

他の実施形態では、リンカーは、還元条件下で切断可能である（例えば、ジスルフィドリンカー）。ジスルフィド結合を介して抗体と細胞傷害性化合物との結合を可能にする二官能性架橋剤としては、N-スクシンイミジル-4-(4-ニトロピリジル-2-ジチオ)ブタノアート、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート (SPDP)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノアート (SPP)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ブタノアート (SPDB)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホブタノアート (スルホ-SPDB) が挙げられるが、これらに限定されない。スルホ-SPDBは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,236,319号に記載されている。別法として、2-イミノチオラン、ホモシステインチオラクトン、または無水S-アセチルコハク酸等のチオール基を導入する架橋剤を使用することができる。他の実施形態では、リンカーは、前述のペプチドリンカー、pH感受性リンカー、またはジスルフィドリンカーのうちの1つ以上の組み合わせを含有し得る。

30

【0188】

「ヘテロ二官能性架橋剤」は、2つの異なる反応性基を有する二官能性架橋剤である。アミン反応性N-ヒドロキシスクシンイミド基 (NHS基) とカルボニル反応性ヒドラジン基の両方を含有するヘテロ二官能性架橋剤もまた、細胞傷害性化合物と抗体を連結させるために使用することができる。そのような市販のヘテロ二官能性架橋剤の例としては、スクシンイミジル6-ヒドラジノニコチンアミドアセトンヒドラゾン (SANH)、スクシンイミジル4-ヒドラジドテレフタレート塩酸塩 (SHTH) 及びスクシンイミジルヒ

40

50

ドラジニウムニコチナート塩酸塩（S H N H）が挙げられる。酸不安定結合を持つ複合体はまた、本発明のヒドラジン担持ベンゾジアゼピン誘導体を使用して調製することもできる。使用することができる二官能性架橋剤の例としては、スクシンイミジル-p-ホルミルベンゾアート（S F B）及びスクシンイミジル-p-ホルミルフェノキシアセタート（S F P A）が挙げられる。

【0189】

本明細書に記載されるリンカーは、本明細書に記載される異種部分と任意の組み合わせで使用してよい。上記で挙げた本明細書に記載のリンカー及び異種部分はいずれも、市販のものを利用すること、及び／または上記で挙げた参考文献に記載のものを含めた従来の技術により調製することができる。

【0190】

複合体化

【0191】

異種部分と抗原結合タンパク質の比（H A R）は、抗原結合分子あたりの連結されている異種部分数を表す。いくつかの実施形態では、H A Rは、1～15、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、または1～2の範囲である。いくつかの実施形態では、H A Rは、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4または2～3の範囲である。他の実施形態では、H A Rは、約2、約2.5、約3、約4、約5、または約6である。いくつかの実施形態では、H A Rは、約2～約4の範囲である。H A Rは、質量分析、U V／V i s分光法、E L I S Aアッセイ、及び／またはH P L C等の従来の手段により特徴付けられ得る。

【0192】

いくつかの実施形態では、複合体は、不均一複合体（「従来型」とも呼ばれる）であり、抗原結合タンパク質は、異なる数の異種部分に結合される。いくつかの実施形態では、不均一複合体は、複合体のガウス分布または準ガウス分布（*q u a s i - G a u s s i a n d i s t r i b u t i o n*）に従っており、その場合、一部の抗原結合タンパク質は平均より高値で結合し、一部の抗原結合タンパク質は平均より低値で結合している、異種部分搭載平均値に分布の中心がくる。

【0193】

いくつかの実施形態では、複合体は、均一複合体であり、その場合、かなりの割合の抗原結合タンパク質が所定の数の異種部分に結合されている。いくつかの実施形態では、均一複合体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のH A Rを含む。いくつかの実施形態では、均一複合体は、2、4、6、または8のH A Rを含む。好ましい実施形態では、均一複合体は、4のH A Rを含む。他の好ましい実施形態では、均一複合体は、2のH A Rを含む。いくつかの実施形態では、均一複合体は、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100パーセント以上の、定義されたH A Rを有する複合体を含む。いくつかの実施形態では、均一複合体は、約70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100パーセントの、定義されたH A Rを有する複合体を含む。いくつかの実施形態では、均一複合体は、少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100パーセントの、定義されたH A Rを有する複合体を含む。いくつかの実施形態では、均一複合体は、ガウス分布でも準ガウス分布（*q u a s i - G a u s s i a n d i s t r i b u t i o n*）でもないH A R分布を含む。いくつかの実施形態では、均一複合体の均一性は、クロマトグラム、例えば、H P L Cまたは好適な任意のクロマトグラフィーにより決定される。いくつかの実施形態では、クロマトグラムは、H I Cクロマトグラムである。均一複合体は、部位特異的な複合体化により生成され

得る。

【0194】

いくつかの実施形態では、異種部分を、部位特異的に抗原結合タンパク質（例えば、抗体）に結合させる。部位特異的な複合体化の様々な方法が当該技術分野で公知であり、例えば、チオマブ（thiomab）またはTDCまたは不對システイン残基での複合体化（Junutula et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26:925-932、Dimasi et al. (2017) Mol. Pharm. 14:1501-1516、Shen et al. (2012) Nat. Biotechnol. 30:184-9）、チオール架橋リンカー（Behrens et al. (2015) Mol. Pharm. 12:3986-98）、トランスグルタミナーゼを使用したグルタミンでの複合体化（Dennler et al. (2013) Methods Mol. Bio. 1045:205-15、Dennler et al. (2014) Bioconjug Chem. 25:569-78）、操作された非天然アミノ酸残基での複合体化（Axup et al. (2012) Proc Natl Acad Sci U. S. A. 104-16101-6、Tian et al. (2014) Proc Natl Acad Sci U. S. A. 111:1766-71、VanBrunt et al. (2015) Bioconjug Chem 26:2249-60、Zimmerman et al. (2014) Bioconjug Chem 25:351-61）、セレノシステイン複合体化（Li et al. (2017) Cell Chem Biol 24:433-442）、グリカン媒介性の複合体化（Okeley et al. (2013) Bioconjug Chem 24:1650-5）、ガラクトースまたはGalNAcアナログでの複合体化（Ramakrishnan and Qasba (2002) J Biol Chem 277:20833-9、van Geel et al. (2015) Bioconjug Chem 26:2233-42）、糖鎖工学によるものZhou et al. (2014) Bioconjug Chem 25:510-20、Tang et al. (2017) Nat Protoc 12:1702-1721）、グルタミントグの操作もしくはソルターゼA媒介性ペプチド転移等の短鎖ペプチドタグによるもの（Strop et al. (2013) Chem Biol 20:161-7、Beerli et al. (2015) PLoS One 10:e0131177）、及びアルデヒドタグによるもの（Wu et al. (2009) Proc Natl Acad Sci U. S. A. 106:3000-5）がある。

【0195】

複合体（例えば、ADC）の予測不可能性

【0196】

抗体プロファイル、または薬物ペイロードプロファイルに基づくだけでは、臨床応用などの抗体薬物複合体が十分に安全かつ有効であるかを事前に予測することは不可能である。例えば、特定の薬物ペイロードは、1つの標的に指向させる抗体に結合させた場合には完全にうまく機能し得るが、異なる標的に指向させる抗体に結合させた場合、または同じ標的に指向させる異なる抗体に結合させた場合はほぼ、作用するとは言えない場合がある。異なる抗体薬物複合体がインビボで異なる抗腫瘍活性を示す理由は十分に解明されていないため、新たな抗体薬物複合体の設計において正確な予測ができない。多くの因子の予測不可能な相互作用が影響していることが推測される。これらの因子には、例えば、標的抗原に対する抗体薬物複合体の結合親和性、複合体の固形腫瘍浸透能、及び毒性を引き起こさない、腫瘍への適切な曝露のための循環血中半減期が含まれ得る。

【0197】

複雑さ及び予測不可能性は、抗体の親和性単独により十分に示される。親和性の高い抗体または抗体薬物複合体は、細胞内へより良好に取り込まれて、より高レベルの細胞傷害性ペイロードを細胞内部で放出させるという跡を残す。高親和性はまた、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を増強させることが知られている。これらすべての属性が、抗体薬物複合体の殺細胞特性に好都合である。しかしながら、抗体または抗体薬物複合体の高親和性

は、効率的な腫瘍浸透を「抗原障壁効果」により妨げ得ることもまた知られており、このことは、インビボでの強い抗腫瘍活性を達成するためには、抗体薬物複合体の親和性は、高過ぎも低過ぎもせず、ちょうど良い親和性でなければならないことを示唆している。現在までのところ、ある抗体薬物複合体について、最も効率的または有効なレベルの親和性はどれなのかを予測する方法はわかっていない。

【0198】

さらに、インビボでの抗腫瘍活性は、リンカー及びペイロードの機序単独からでは予測することができない。例えば、O. Ab et al, Mol. Cancer Ther. 14 (&) : 1605-1613 (2015) では、前臨床がんモデルで試験した際、同じ抗体を同じ抗チューブリン毒素に異なるリンカーにより結合させたところ、劇的に異なる抗腫瘍活性が示されることを実証した。2つのリンカーの化学構造は非常に類似しているため、この例は特に驚くべきことである。さらに、優位な複合体中に存在するリンカーには、親水性部分が含有されていた。親水性代謝物は一般に膜透過性が低く、リソソーム（複合体が分解される部位）からの流出がより緩徐であり、放出されるペイロードの抗チューブリン活性の遅延をもたらすと考えられている。この知見は、ペイロード送達の「理想的な」動態を主張するものであるが、現在のところ、何がそのような動態を構成するのかということに関する洞察はない。これをさらに複雑にしているものが、ペイロード送達の理想的な動態は、特定の細胞型については定義されても、それがすべての細胞型に適用されるのかという未解決の問題である。したがって、単にリンカーまたはペイロードの化学組成から最も有効なインビボ抗腫瘍活性を予測することは不可能である。

【0199】

組成物、医薬組成物及び製剤

【0200】

本願で開示されているような抗原結合タンパク質、核酸、ベクター、宿主細胞、または複合体を含む組成物が本明細書で提供される。いくつかの態様での組成物は、抗原結合タンパク質を単離及び／または精製された形態で含む。いくつかの態様では、組成物は、本開示の抗原結合タンパク質の単一種類（例えば、構造）を含むか、または、2つ以上の本開示の抗原結合タンパク質の組み合わせを含み、かかる組み合わせは、種類（例えば、構造）の異なる2つ以上の抗原結合タンパク質を含む。

【0201】

いくつかの態様では、組成物は、抗原結合タンパク質の化学物理的特徴を増強させる薬剤を含み、例えば、特定の温度、例えば、室温で抗原結合タンパク質を安定化させること、有効期間を延長すること、分解、例えば、酸化プロテアーゼによる分解を低下させること、抗原結合タンパク質の半減期を延長させること等により増強させる。いくつかの態様では、組成物は、本明細書に開示される薬剤のいずれかを異種部分または複合体部分として含み、任意選択で、本開示の抗原結合タンパク質との混合剤にするか、またはかかる抗原結合タンパク質に結合させて含む。

【0202】

本開示の様々な態様では、組成物は、薬学的に許容される担体、希釈剤、または添加剤を追加で含む。いくつかの実施形態では、本願で開示されているような抗原結合タンパク質、核酸、ベクター、宿主細胞、または複合体は（以下、「活性物質と呼ぶ」）、薬学的に許容される担体、希釈剤、または添加剤と共に活性物質を含む医薬組成物に製剤化される。これに関し、本開示はさらに、対象、例えば、哺乳類への投与が意図される活性物質を含む医薬組成物を提供する。

【0203】

いくつかの実施形態では、活性物質は、患者への投与に好適な純度レベルで医薬組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、活性物質は、少なくとも約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%の純度レベル、及び薬学的に許容される希釈剤、担体または添加剤を有する。いくつかの実施形態では、組成物は、活性物質を約0.001〜約30.0mg/mLの濃度で含

有する。

【0204】

様々な態様では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される担体」には、リン酸緩衝食塩液、水、油／水型または水／油型エマルジョン等のエマルジョン、及び各種の湿潤剤等、いずれの標準的医薬担体も含まれる。用語はまた、米国連邦政府の規制当局により承認されている薬剤、またはヒトを含めた動物での使用のための米国薬局方収載の薬剤のいずれをも包含する。

【0205】

医薬組成物は、薬学的に許容されるいかなる成分も含むことができ、それらには、例えば、酸性化剤、添加物、吸着剤、エアロゾル噴霧剤、空気置換剤、アルカリ化剤、凝結防止剤、抗凝固剤、抗菌性保存剤、抗酸化剤、消毒剤、基剤、結合剤、緩衝剤、キレート剤、コーティング剤、着色剤、乾燥剤、洗浄剤、希釈剤、殺菌剤、崩壊剤、分散剤、溶解促進剤、色素、軟化剤、乳化剤、エマルジョン安定化剤、賦形剤、膜形成剤、調味料、香味剤、流動促進剤、ゲル化剤、造粒剤、保潤剤、滑沢剤、粘膜付着剤、軟膏基剤、軟膏、油脂性ビヒクル、有機基剤、香錠基剤、色素、可塑剤、光沢剤、保存剤、封鎖剤、皮膚浸透剤、可溶化剤、溶媒、安定化剤、坐剤基材、表面活性剤、界面活性剤、懸濁剤、甘味剤、治療剤、濃稠化剤、等張化剤、毒性薬剤、増粘剤、吸水性薬剤、水混和性共溶媒、水軟化剤、または湿潤剤が挙げられる。例えば、参照によりその全体が組み込まれる *Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition*, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000) を参照のこと。参照によりその全体が組み込まれる *Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition*, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)。

【0206】

様々な態様では、医薬組成物は、用いられる投与量及び濃度にてレシピエントに無毒性である製剤材料を含む。具体的な実施形態では、活性物質、及び1つ以上の薬学的に許容される塩、ポリオール、界面活性剤、浸透圧平衡維持剤、等張化剤、抗酸化剤、抗生物質、抗真菌剤、増量剤、凍結乾燥保護剤、消泡剤、キレート剤、保存剤、着色剤、鎮痛薬、または追加の医薬剤を含む医薬組成物。様々な態様では、医薬組成物は、1つ以上のポリオール及び／または1つ以上の界面活性剤を含み、任意選択で、その他に1つ以上の添加剤を含み、これには、薬学的に許容される塩、浸透圧平衡維持剤（等張化剤）、抗酸化剤、抗生物質、抗真菌剤、増量剤、凍結乾燥保護剤、消泡剤、キレート剤、保存剤、着色剤、及び鎮痛薬が含まれるが、これらに限定されない。

【0207】

特定の実施形態では、医薬組成物は、組成物の、例えば、pH、浸透圧、粘度、澄明性、色、等張性、臭い、無菌性、安定性、溶出もしくは放出の速度、吸着、または浸透を、変更、維持もしくは保存するための製剤材料を含有することができる。そのような実施形態では、好適な製剤材料としては、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン等）；抗菌薬；抗酸化剤（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム等）；緩衝剤（ホウ酸塩、重炭酸塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩または他の有機酸等）；増量剤（マンニトールまたはグリシン等）；キレート剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA）等）；錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベーターシクロデキストリンまたはヒドロキシプロピルベーターシクロデキストリン等）；賦形剤；単糖；二糖；及び他の炭水化物（グルコース、マンノースまたはデキストリン等）；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン等）；coloring、矯味剤及び希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドン等）；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（ナトリウム等）；保存剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素等）；溶媒（グ

リセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール等）；糖アルコール（マンニトールまたはソルビトール等）；懸濁剤；界面活性剤もしくは湿潤剤（プルロニック、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート20等のポリソルベート、とりとん、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパル（tyloxapal）等）；安定性向上物質（スクロースまたはソルビトール等）；等張性増強剤（アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトールソルビトール等）；送達ビヒクル；希釈剤；添加剤及び／または医薬アジュバントが挙げられるが、これらに限定されない。REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18" Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Companyを参照のこと。

10

【0208】

医薬組成物は、生理学的に適合性のあるpHを達成するよう製剤化することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物のpHは、例えば、約4もしくは約5から約8.0の間、または約4.5から約7.5の間、または約5.0から約7.5の間であり得る。様々な実施形態では、医薬組成物のpHは5.5～7.5である。

【0209】

本開示は、医薬組成物を生産する方法を提供する。様々な態様では、方法は、抗原結合タンパク質、複合体、融合タンパク質、核酸、ベクター、宿主細胞、またはそれらの組み合わせと、薬学的に許容される担体、希釈剤、もしくは添加剤とを合わせることを含む。

【0210】

20

投与経路

【0211】

本開示に関して、活性物質、またはそれを含む医薬組成物は、任意の好適な投与経路を介して対象に投与され得る。例えば、活性物質は、非経口投与、経鼻投与、経口投与、経肺投与、局所投与、腔内投与、または直腸内投与で対象に投与され得る。投与経路に関する以下の考察は、様々な実施形態を例示するために提供されるにすぎず、どのような形でも範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【0212】

非経口投与に好適な製剤には、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、及び意図されるレシピエントの血液と等張性の製剤にする溶質を含有することができる、水性及び非水性の等張性無菌注射液、ならびに、懸濁剤、可溶化剤、濃稠化剤、安定化剤、及び保存剤が含まれ得る、水性及び非水性無菌懸濁剤が含まれる。用語「非経口」とは、消化管を介してではなく、皮下、筋肉内、脊髄内、または静脈内等の何らかの他の経路を介することを意味する。本開示の活性物質は、無菌の液体または液体混合物等の生理学的に許容される希釈剤の入った医薬担体を用いて投与することができ、これには、水、生理食塩水、水性デキストロースと関連糖溶液、エタノールもしくはヘキサデシルアルコール等のアルコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコール等のグリコール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、2,2-ジメチル-1,5,3-ジオキサラン-4-メタノール等のケタール、エーテル、ポリ（エチレングリコール）400、油、脂肪酸、脂肪酸エステルもしくはグリセリド、もしくはアセチル化脂肪酸グリセリド（石けんもしくは洗浄剤等の薬学的に許容される界面活性剤の付加の有無を問わない）、ペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、もしくはカルボキシメチルセルロース等の懸濁剤、または乳化剤、及び他の医薬アジュバントが含まれる。

30

40

【0213】

非経口製剤に使用することができる油としては、石油、動物、植物、または合成油が挙げられる。油の具体例としては、ピーナツ、大豆、ゴマ、綿実、トウモロコシ、オリーブ、ワセリン、及びミネラルが挙げられる。非経口製剤での使用のための好適な脂肪酸としては、オレイン酸、ステアリン酸、及びイソステアリン酸が挙げられる。オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルは、好適な脂肪酸エステルの例である。

【0214】

50

非経口製剤での使用のための好適な石けんとしては、脂肪族のアルカリ金属、アンモニウム、及びトリエタノールアミンの塩が挙げられ、好適な洗浄剤としては、(a)陽イオン洗浄剤、例えば、ジメチルジアルキルアンモニウムハロゲン化物及びアルキルピリジニウムハロゲン化物等、(b)陰イオン洗浄剤、例えば、アルキルスルホン酸塩、アリールスルホン酸塩、オレフィンスルホン酸塩、アルキル硫酸塩、オレフィン硫酸塩、エーテル硫酸塩、モノグリセリド硫酸塩、及びスルホコハク酸塩等、(c)非イオン性洗浄剤、例えば、脂肪族アミノオキシド、脂肪酸アルカノールアミド、及びポリオキシエチレンとポリプロピレンの共重合体等、(d)両性洗浄剤、例えば、アルキル-β-アミノプロピオン酸塩、及び2-アルキル-イミダゾリン第四級アンモニウム塩等、ならびに(e)それらの混合物が挙げられる。

10

【0215】

いくつかの実施形態での非経口製剤は、約0.5重量%～約25重量%の本開示の活性物質溶液を含有する。保存剤及び緩衝剤を使用することができる。注射部位の刺激を最小限に抑えるかまたは消失させるために、そのような組成物は、約12～約17の親水性-親油性バランス(HLB)を有する1つ以上の非イオン性界面活性剤を含有することができる。そのような製剤中の界面活性剤の量は、典型的には約5重量%～約15重量%の範囲である。好適な界面活性剤としては、ソルビタンモノオレアート等のポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル、及びプロピレンオキシドとプロピレングリコールの縮合により形成される、疎水性塩基を持つエチレンオキシドの高分子量付加物が挙げられる。いくつかの態様での非経口製剤は、アンプル及びバイアル等の単回用量または多回用量の密封容器に入っており、注射用の無菌液体添加剤、例えば、水を使用直前に加えるだけで済むフリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存することができる。いくつかの態様での用時注射用の溶液及び懸濁液は、先に記載した種類の無菌粉末、顆粒及び錠剤から調製される。

20

【0216】

注射用製剤は本願開示に従っている。注射用組成物用の有効な医薬担体のための要件は、当業者に周知である(例えば、Pharmaceuticals and Pharmacy Practice, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982)、及びASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)を参照のこと)。

30

【0217】

投与量

【0218】

開示の活性物質は、腫瘍増殖を阻害する方法、ならびにがんを治療または予防する方法を含めた、本明細書で詳述されるような他の方法において有用であると考えられている。開示に関する目的の場合、投与される活性物質の量または用量は、妥当な時間枠にわたり、対象または動物における効果、例えば、治療反応もしくは予防的反応にとって十分であるべきである。例えば、本開示の活性物質の用量は、投与時から、約1～4分、1～4時間、または1～4週間、またはそれ以上の期間、例えば、5～20週間、もしくはそれ以上の週の期間に、本明細書に記載されるがんを治療するのに十分であるべきである。特定の実施形態では、時間的期間はより長くなる場合もあり得る。用量は、特定の活性物質の有効性及び動物(例えば、ヒト)の状態、ならびに処置されるべき動物(例えば、ヒト)の体重により決定される。

40

【0219】

投与用量を決定するための多くのアッセイが当該技術分野で公知である。ここでの目的の場合、群ごとに異なる用量の活性物質が投与される哺乳類の群間で、哺乳類に対する所定用量の本開示の活性物質投与時にがんが治療される程度を比較することを含むアッセイであれば、哺乳類に投与されるべき開始用量を決定するために使用可能と考えられる。特

50

定用量の投与時にがんが治療される程度は、例えば、マウス異種移植モデルでの活性物質により達成された腫瘍退縮の程度により表すことができる。腫瘍退縮を評価する方法は当該技術分野で公知であり、本明細書において実施例で記載されている。

【0220】

本開示の活性物質の用量はまた、本開示の特定の活性物質の投与に伴い得ると考えられる任意の有害な副作用の存在、性質及び程度により決定される。典型的には、年齢、体重、全体的健康状態、食事、性別、投与されるべき本開示の活性物質、投与経路、及び治療される状態の重症度等、様々な因子を考慮に入れて、主治医が、各個々の患者を治療するための本開示の活性物質の投与量を決定する。本開示を制限することは意図せずに、例としては、本開示の活性物質の用量は、約0.0001～約1g/kg体重（治療される対象の体重）/日、約0.0001～約0.001g/kg体重/日、または約0.01mg～約1g/kg体重/日であり得る。

10

【0221】

放出制御製剤

【0222】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性物質は、デポ形態に変更して、本開示の活性物質が、それを投与した体内に放出される様式が時間及び体内の位置に関して制御されるようにすることができる（例えば、米国特許第4,450,150号を参照のこと）。本開示の活性物質のデポ形態は、例えば、活性物質と、ポリマー等の多孔性または非多孔性材料とを含む植え込み型組成物であり得、活性物質は、かかる材料により封入されるか、あるいは材料全体にわたり拡散される、及び／または非多孔性材料の分解を通じて拡散される。次いで、デポは、対象の体内の所望の位置に植え込まれ、植え込み錠から活性物質が所定の速度で放出される。

20

【0223】

特定の態様での、活性物質を含む医薬組成物は、任意の種類のインビボ放出プロフィール有するよう修飾される。いくつかの態様では、医薬組成物は、速放型放出、制御放出、徐放、持続放出、遅延放出、または二相性放出の製剤である。放出制御用ペプチドを製剤化する方法は当該技術分野で公知である。例えば、Qian et al., J Pharm 374:46-52 (2009) ならびに国際特許出願公開第WO2008/130158号、第WO2004/033036号、第WO2000/032218号、及び第WO1999/040942号を参照のこと。

30

【0224】

本組成物はさらに、例えば、ミセルもしくはリポソーム、または他の一部の封入形態を含むことができ、また、長期の貯蔵及び／または送達効果が得られるよう持続放出形態で投与することもできる。

【0225】

使用

【0226】

本開示の抗原結合タンパク質は、腫瘍増殖を阻害するのに有用である。特定の理論に拘束されることなく、本明細書で提供される抗原結合タンパク質の阻害作用により、そのような実体がんを治療する方法において有用となる。

40

【0227】

したがって、本明細書では、対象における腫瘍増殖を阻害する方法及び対象における腫瘍サイズを縮小する方法を提供する。様々な実施形態では、方法は、本開示の医薬組成物を、対象における腫瘍増殖を阻害するかまたは腫瘍サイズを縮小するのに有効な量で対象に投与することを含む。様々な態様では、卵巣腫瘍、メラノーマ腫瘍、膀胱腫瘍、または子宮内膜腫瘍の増殖が阻害される。様々な態様では、卵巣腫瘍、メラノーマ腫瘍、膀胱腫瘍、または子宮内膜腫瘍のサイズが縮小される。

【0228】

本明細書で使用される場合、用語「阻害する」または「縮小」及びそこから生じる語は

50

、100%または完全な阻害または低減でない場合がある。むしろ、潜在的な有益性または治療効果を有するとして当業者が認識する阻害または縮小の程度は様々である。これに関し、本開示の抗原結合タンパク質は、任意の量またはレベルまで腫瘍増殖を阻害するかまたは腫瘍サイズを縮小し得る。様々な実施形態では、本開示の方法により提供される阻害は、約または少なくとも10%阻害（例えば、約または少なくとも20%阻害、約または少なくとも30%阻害、約または少なくとも40%阻害、約または少なくとも50%阻害、約または少なくとも60%阻害、約または少なくとも70%阻害、約または少なくとも80%阻害、約または少なくとも90%阻害、約または少なくとも95%阻害、約または少なくとも98%阻害）である。様々な実施形態では、本開示の方法により提供される低減は、約または少なくとも10%縮小（例えば、約または少なくとも20%縮小、約または少なくとも30%縮小、約または少なくとも40%縮小、約または少なくとも50%縮小、約または少なくとも60%縮小、約または少なくとも70%縮小、約または少なくとも80%縮小、約または少なくとも90%縮小、約または少なくとも95%縮小、約または少なくとも98%縮小）である。

【0229】

本明細書ではさらに、がん、例えば、CLDN6発現がんを有する対象を治療する方法を提供する。様々な実施形態では、方法は、本開示の医薬組成物を、対象におけるがんを治療するのに有効な量で対象に投与することを含む。

【0230】

ここでの目的の場合、本明細書に開示される方法のがんは、例えば、リンパ系または血流を介して体の他の部分に広がり得る異常かつ制御されない細胞分裂によって生じる任意の悪性増殖または腫瘍等、あらゆるがんであり得る。いくつかの態様でのがんは、急性リンパ性癌、急性骨髄性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、骨癌、脳腫瘍、乳癌、肛門、肛門管、または肛門直腸のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢、または胸膜のがん、鼻、鼻腔、または中耳のがん、口腔のがん、外陰のがん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性のがん、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、消化管カルチノイド腫瘍、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、肝癌、肺癌、悪性中皮腫、メラノーマ、多発性骨髄腫、鼻咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、膀胱癌、腹膜、大網、及び腸間膜のがん、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌（例えば、腎細胞癌（RCC））、小腸癌、軟組織のがん、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌、及び膀胱癌からなる群から選択されるがんである。特定の態様では、がんは、頭頸部癌、卵巣癌、子宮頸癌、膀胱癌及び食道癌、膀胱癌、消化管癌、胃癌、乳癌、子宮内膜癌及び大腸癌、肝細胞癌、膠芽腫、膀胱癌、肺癌、例えば、非小細胞肺癌（NSCLC）、細気管支肺胞上皮癌からなる群から選択される。様々な態様では、がんは、卵巣癌、メラノーマ、膀胱癌、肺癌、肝癌、子宮内膜癌である。様々な態様では、がんは、CLDN6の中～高発現により特徴付けられる任意のがんである。例えば、図1～図3を参照のこと。様々な態様では、がんは、急性骨髄性白血病、大細胞型B細胞リンパ腫、胃癌、前立腺癌、メラノーマ、結腸癌、直腸癌、膀胱癌、子宮頸癌、肝癌、乳癌、腎明細胞癌、頭頸部癌、肉腫、腎臓の嫌色素性のがん、低悪性度神経膠腫、副腎皮質癌、膠芽腫、乳頭状腎細胞癌、肺扁平上皮癌、甲状腺癌、肺腺癌、膀胱癌、卵巣類内膜癌、子宮癌肉腫、または卵巣癌である。様々な態様では、がんは、卵巣癌、類内膜癌、子宮癌、肺癌、胃癌、乳癌頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、子宮頸癌、及び膀胱癌から選択される。

【0231】

本明細書で使用される場合、用語「治療する」、及びそれに関連する語は、必ずしも100%または完全な治療を意味しない。むしろ、潜在的な有益性または治療効果を有するとして当業者が認識する治療の程度は様々である。これに関し、本開示のがんを治療する方法では、いかなる量またはいかなるレベルの治療も提供することができる。さらに、本開示の方法により提供される治療には、治療されるがんの1つ以上の状態または症状または徴候の治療が含まれ得る。また、本開示の方法により提供される治療は、がんの進行を減速させることも包含し得る。例えば、方法は、T細胞活性またはがんに対する免疫応答

を増強させる、腫瘍またはがんの増殖を抑制する、腫瘍細胞の転移を低減する、腫瘍またはがんの細胞の細胞死を増大させる等の点で、がんを治療することができる。様々な態様では、方法は、がんの発症または再発を少なくとも1日、2日、4日、6日、8日、10日、15日、30日、2か月、3か月、4か月、6か月、1年、2年、3年、4年、またはそれ以上遅延させることにより治療する。様々な態様では、方法は、対象の生存を延長させることにより治療する。

【0232】

本開示の抗原結合タンパク質はまた、試料中のCLDN6を検出するため、またはCLDN6陽性がんを診断するためにも使用され得る。したがって、本開示は、試料中のクロロディン6（CLDN6）を検出する方法を提供する。様々な実施形態では、方法は、試料と、抗原結合タンパク質、複合体、または融合タンパク質とを本明細書に記載されるように接触させること、及びCLDN6に結合している抗原結合タンパク質、複合体または融合タンパク質を含む免疫複合体について評価することを含む。本開示はまた、対象のクロロディン6（CLDN6）陽性のがんを診断する方法も提供する。様々な実施形態では、方法は、対象から取得した細胞または組織を含む生体試料と、抗原結合タンパク質、複合体、または融合タンパク質とを本明細書に記載されるように接触させること、及びCLDN6に結合している抗原結合タンパク質、複合体または融合タンパク質を含む免疫複合体について評価することを含む。

【0233】

対象

【0234】

本開示のいくつかの実施形態では、対象は哺乳類であり、これには、マウス及びハムスター等のげっ歯目の哺乳類、ならびにウサギ等のウサギ目の哺乳類、ネコ科（ネコ）及びイヌ科（イヌ）を含む食肉目からの哺乳類、ウシ科（雌ウシ）及びイノシシ科（ブタ）偶蹄目からの哺乳類、またはウマ科（ウマ）を含む奇蹄目の哺乳類が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様では、哺乳類は、霊長目の哺乳類、オマキザル上科、もしくはSimoid（サル）または真猿亜目の哺乳類（ヒト及び類人猿）である。いくつかの態様では、哺乳類はヒトである。

【0235】

キット

【0236】

いくつかの実施形態では、本開示の抗原結合タンパク質はキットで提供される。様々な態様では、キットは、抗原結合タンパク質（複数可）を単位用量として含む。ここでの目的の場合、「単位用量」とは、好適な担体中に分散されている個別の量を指す。様々な態様では、単位用量は、対象に所望の効果、例えば、腫瘍増殖の阻害、腫瘍サイズの縮小、がんの治療を提供するのに十分な量である。したがって、本明細書では、任意選択で単位用量で提供される本開示の抗原結合タンパク質を含むキットを提供する。様々な態様では、キットは、いくつかの単位用量、例えば、単位用量の1週間分または1か月分を含み、任意選択で、その各々が個包装されているか、そうでなければ他の単位用量と区別されているものを含む。いくつかの実施形態では、キット／単位用量の構成要素は、患者への投与のための指示書と共に包装されている。いくつかの実施形態では、キットは、患者への投与用の1つ以上のデバイス、例えば、針及びシリンジ等を含む。いくつかの態様では、本開示の抗原結合タンパク質、その薬学的に許容される塩、抗原結合タンパク質を含む複合体、または抗原結合タンパク質を含む多量体もしくは二量体は、即時使用形態、例えば、シリンジ、静注用バッグ等に包装済みである。いくつかの態様では、キットはさらに、本明細書に記載されているものを含め、他の治療用もしくは診断用薬または薬学的に許容される担体（例えば、溶媒、緩衝液、希釈液等）を含む。特定の態様では、キットは、本開示の抗原結合タンパク質を、化学療法または放射線療法で使用される薬剤、例えば、治療剤と共に含む。

【0237】

様々な実施形態

【0238】

本開示の様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、ヒトクローディン6 (CLDN6) タンパク質 (配列番号200) に結合し、(a) 抗原結合タンパク質は、CLDN6の細胞外ドメイン (ECD) の細胞外ループ2 (EL2) に結合し、CLDN6のECDの細胞外ループ1 (EL1) には結合しないか、または (b) クローディン3 (CLDN3)、クローディン4 (CLDN4)、及びクローディン9 (CLDN9) のいずれにも結合せず、OVCA429細胞により内因的に発現されるCLDN6への参照抗体の結合を約1200nM未満で阻害するか、または (c) その組み合わせである。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、WTAHAIRDFYNPLVAEAQKRELのアミノ酸配列 (配列番号2) 内のエピトープに結合するか、またはCLDN6のTAHAIRDFYNPLのアミノ酸配列 (配列番号3) もしくはLVAEAQKRELのアミノ酸配列 (配列番号4) に結合する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、クローディン3 (CLDN3)、クローディン4 (CLDN4)、及びクローディン9 (CLDN9) のうちの1つにも複数にも結合しない。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、CLDN3に結合しない。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、CLDN6、CLDN4、及びCLDN9に結合するが、CLDN3には結合しない。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、CLDN6及びCLDN4に結合するが、CLDN3またはCLDN9には結合しない。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、CLDN6及びCLDN9に結合するが、CLDN3またはCLDN4には結合しない。

【0239】

様々な場合には、本開示の抗原結合タンパク質は、OVCA429細胞により内因的に発現されるCLDN6への参照抗体の結合を約1200nM未満で阻害し、参照抗体は、配列番号181の軽鎖可変配列及び配列番号182の重鎖可変配列または配列番号185の軽鎖可変配列及び配列番号186の重鎖可変配列を含む。様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、OVCA429細胞により内因的に発現されるCLDN6への参照抗体の結合を1000nM未満もしくは750nM未満 (例えば、500nM未満、250nM未満、約100nM未満) で阻害し、参照抗体は、配列番号181の軽鎖可変配列及び配列番号182の重鎖可変配列または配列番号185の軽鎖可変配列及び配列番号186の重鎖可変配列を含む。

【0240】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、(a) 表AまたはA1に記載の重鎖CDR1のアミノ酸配列、もしくは配列番号11、17、23、29、35、41、47、53、59、65、71、77、83、89、95、101、107、113、119、125、131、452、455、461、465、及び472からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70% (例えば、約または少なくとも85%、約または少なくとも90%) の配列同一性を有するもの、(b) 表AまたはA1に記載の重鎖CDR2のアミノ酸配列、もしくは配列番号12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、86、102、108、114、120、126、132、475、456、462、466、468、及び473からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70% (例えば、約または少なくとも85%、約または少なくとも90%) の配列同一性を有するもの、(c) 表AまたはA1に記載の重鎖CDR3のアミノ酸配列、もしくは配列番号13、19、25、31、37、43、49、55、61、67、73、79、85、91、97、103、109、115、121、127、133、453、457、463、467、469、及び474からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70% (例えば、約または少なくとも85%、約または少なくとも90%) の配列同一性を有するもの、(d) 表AまたはA1に記載の軽鎖CDR

1のアミノ酸配列、もしくは配列番号8、14、20、32、38、44、50、56、62、68、74、80、86、92、98、104、110、116、122、128、449、476、458、464、及び470からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%（例えば、約または少なくとも85%、約または少なくとも90%）の配列同一性を有するもの、（e）表AまたはA1に記載の軽鎖CDR2のアミノ酸配列、もしくは配列番号9、15、21、27、33、39、45、51、57、63、69、75、81、87、93、99、105、111、117、123、129、450、477、459、及び471からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%（例えば、約または少なくとも85%、約または少なくとも90%）の配列同一性を有するもの、（f）表AまたはA1に記載の軽鎖CDR3のアミノ酸配列、もしくは配列番号10、16、22、28、34、40、46、52、58、64、70、76、82、88、94、100、106、112、118、124、130、451、454、及び460からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%（例えば、約または少なくとも85%、約または少なくとも90%）の配列同一性を有するもの、（g）（a）～（f）のうちいずれか2つ以上の組み合わせ、を含む。

10

【0241】

様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表AまたはA1に記載の軽鎖CDR1アミノ酸配列、軽鎖CDR2アミノ酸配列、及び軽鎖CDR3アミノ酸配列と、表AまたはA1に記載の重鎖CDRアミノ酸配列のうちの1つまたは2つとを含む。場合によっては、抗原結合タンパク質は、表AまたはA1に記載の重鎖CDR1アミノ酸配列、重鎖CDR2アミノ酸配列、及び重鎖CDR3アミノ酸配列と、表AまたはA1に記載の軽鎖CDRアミノ酸配列のうちの1つまたは2つとを含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、（a）配列番号74～79、（b）配列番号50～55、（c）配列番号122～127、（d）配列番号26～31、（e）配列番号128～133、（f）配列番号38～43、（g）配列番号62～67、（h）配列番号80～85、（i）配列番号44～49、（j）配列番号86～91、（k）配列番号104～109、（l）配列番号56～61、（m）配列番号32～37、（n）配列番号110～115、（o）配列番号98～103、（p）配列番号92～97、（q）配列番号116～121、（r）配列番号8～13、（t）配列番号68～73、（u）配列番号14～19、（v）配列番号20～25、（v）配列番号449～453及び475、（w）配列番号476～477、454～457、（x）配列番号458～463、（y）配列番号57、58、464～467、（z）配列番号68～71及び468～469、ならびに（aa）配列番号112、及び470～474からなる群から選択される6つのCDRアミノ酸配列を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、（a）表Bに記載の重鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは配列番号135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、及び175からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%（例えば、約または少なくとも85%、約または少なくとも90%）の配列同一性を有するもの、または（b）表Bに記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは配列番号134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、及び176からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%（例えば、約または少なくとも85%、約または少なくとも90%）の配列同一性を有するもの、または（a）と（b）の両方、を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、（a）配列番号156と157、（b）配列番号148と149、（c）配列番号172と173、（d）

20

30

40

50

配列番号140と141、(e)配列番号174と175、(f)配列番号144と145、(g)配列番号152と153、(h)配列番号158と159、(i)配列番号146と147、(j)配列番号160と161、(k)配列番号166と167、(l)配列番号150と151、(m)配列番号142と143、(n)配列番号168と169、(o)配列番号164と165、(p)配列番号162と163、(q)配列番号170と171、(r)配列番号134と135、(s)配列番号154と155、(t)配列番号136と137、及び(u)配列番号138と139からなる群から選択される1対のアミノ酸配列を含む。

【0242】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、(a)表B1またはCに記載の重鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは配列番号376～379、384～387、391～396、403～408、412、413、416～419、422～427、478、480、482、484、486、及び488からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%、もしくは約80%、もしくは約90%、もしくは約95%の配列同一性を有するもの、または(b)表B1またはCに記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは配列番号380～383、388～390、397～402、409～411、414、415、420、421、及び479、481、483、485、487、及び489からなる群から選択される配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%、もしくは約80%、もしくは約90%、もしくは約95%の配列同一性を有するもの、または(c)(a)と(b)の両方、を含む。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、表Dに記載されている1対のアミノ酸配列を含む。

【0243】

本開示は、(A)HC CDR1であって、YTF TXY Tのアミノ酸配列を含み、ここで、Xは、T、V、D、またはS(配列番号452)であり、任意選択で、YTF TTY Tのアミノ酸配列(配列番号11)を含む、HC CDR1、(B)HC CDR2であって、IXPSSGY Tのアミノ酸配列を含み、ここで、Xは、Q、S、A、またはN(配列番号475)であり、任意選択で、INPSSGY Tのアミノ酸配列(配列番号12)配列を含む、HC CDR2、(C)HC CDR3であって、AXGDYYVAYのアミノ酸配列を含み、ここで、Xは、N、Q、H、またはD(配列番号453)であり、任意選択で、ANGDYYVAYのアミノ酸配列(配列番号13)を含む、HC CDR3、(D)LC CDR1であって、SSVSSXYのアミノ酸配列を含み、ここで、Xは、T、V、F、またはD(配列番号449)であり、任意選択で、SSVSSSTYのアミノ酸配列(配列番号8)を含む、LC CDR1、(E)LC CDR2であって、XTXのアミノ酸配列を含み、ここで、1位のXは、S、T、Q、またはAであり、3位のXは、S、T、D、またはQであり(配列番号450)、任意選択で、STSのアミノ酸配列(配列番号9)を含む、LC CDR2、及び(F)LC CDR3であって、HXYXR SPLTのアミノ酸配列を含み、ここで、2位のXは、Q、H、またはSであり、4位のXは、H、Y、Q、またはSであり(配列番号451)、任意選択で、HQYHR SPLTのアミノ酸配列(配列番号10)を含む、LC CDR3、を含む抗原結合タンパク質を提供する。

【0244】

(A)HC CDR1であって、FTFSXYXのアミノ酸配列を含み、ここで、5位のXは、N、S、R、Q、またはAであり、7位のXは、W、H、Y、Fであり(配列番号455)、任意選択で、FTFSNYWのアミノ酸配列(配列番号23)を含む、HC CDR1、(B)HC CDR2であって、IRLKXDX YATのアミノ酸配列を含み、ここで、5位のXは、S、N、A、またはTであり、7位のXは、Q、S、A、Nであり(配列番号456)、任意選択で、IRLKSDNYATのアミノ酸配列(配列番号24)を含む、HC CDR2、(C)HC CDR3であって、XDGP P SGXのアミノ

酸配列を含み、ここで、1位のXは、N、D、またはTであり、8位のXは、S、T、A、C、またはYであり（配列番号457）、任意選択で、NDGPPSGCのアミノ酸配列（配列番号25）を含む、HC CDR3、（D）LC CDR1であって、EXIYSYのアミノ酸配列を含み、ここで、Xは、Q、S、A、D、またはN（配列番号476）であり、任意選択で、ENIYSYのアミノ酸配列（配列番号20）を含む、LC CDR1、（E）LC CDR2であって、XAKのアミノ酸配列を含み、ここで、1位のXは、Q、S、A、D、またはNであり（配列番号477）、任意選択で、NAKのアミノ酸配列（配列番号21）を含む、LC CDR2、及び（F）LC CDR3であって、QXHYXVPWTのアミノ酸配列を含み、ここで、2位のXは、H、Q、S、またはTであり、5位のXは、T、S、N、またはGであり（配列番号454）、任意選択で、QH
HYTVPWTのアミノ酸配列（配列番号22）を含む、LC CDR3、を含む抗原結合タンパク質。

10

【0245】

（A）HC CDR1であって、YTXTXYTのアミノ酸配列を含み、ここで、3位のXは、F、Y、S、またはTであり、5位のXは、S、T、Y、またはDであり（配列番号461）、任意選択で、YTF TSYTのアミノ酸配列（配列番号29）を含む、HC CDR1、（B）HC CDR2であって、IXPSSXYTのアミノ酸配列を含み、ここで、2位のXは、Q、S、A、またはNであり、6位のXは、T、S、V、D、またはGであり（配列番号462）、任意選択で、INPSS TYTのアミノ酸配列（配列番号30）を含む、HC CDR2、（C）HC CDR3であって、XRGEXGGFAY
のアミノ酸配列を含み、ここで、1位のXは、S、A、T、またはVであり、5位のXは、L、V、またはFであり（配列番号463）、任意選択で、SRGELGGFAYのアミノ酸配列（配列番号31）を含む、HC CDR3、（D）LC CDR1であって、QSLVHSXGXTYTのアミノ酸配列を含み、ここで、7位のXは、D、N、E、Q、S、またはAであり、9位のXは、Q、S、A、D、またはNであり（配列番号458）、任意選択で、QSLVHSDGNTYTのアミノ酸配列（配列番号26）を含む、LC CDR1、（E）LC CDR2であって、XVXのアミノ酸配列を含み、ここで、1位のXは、K、Q、またはRであり、3位のXは、S、T、またはVであり（配列番号459）、任意選択で、KVSのアミノ酸配列（配列番号27）を含む、LC CDR2、及び
（F）LC CDR3であって、SXXT HVPYTのアミノ酸配列を含み、ここで、2位のXは、Q、H、またはTであり、3位のXは、S、G、T、またはDであり（配列番号460）、任意選択で、SQST HVPYTのアミノ酸配列（配列番号28）を含む、LC CDR3、を含む抗原結合タンパク質。

20

30

【0246】

様々な実施形態では、抗原結合タンパク質は、以下を含む。

（a）配列番号504もしくは配列番号507の重鎖CDR1アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、

（b）配列番号505もしくは配列番号508の重鎖CDR2アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、

40

（c）配列番号506もしくは配列番号509の重鎖CDR3アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、

（d）配列番号449もしくは配列番号476の軽鎖CDR1アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、

（e）配列番号450もしくは配列番号477の軽鎖CDR2アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、

50

(f) 配列番号 451 もしくは配列番号 454 の軽鎖 CDR3 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70% の配列同一性を有するもの、

(g) (a) ~ (f) のうちいずれか 2 つ以上の組み合わせ。

【0247】

任意選択で、変異配列は、少なくとも約 80%、約もしくは少なくとも 85%、約もしくは少なくとも 90% または約もしくは少なくとも 95% の配列同一性を有する。

【0248】

例示的態様では、抗原結合タンパク質は、配列番号 449 の軽鎖 CDR1 アミノ酸配列、軽鎖 CDR2 アミノ酸配列または配列番号 450、及び軽鎖 CDR3 アミノ酸配列または配列番号 451 と、配列番号 504 の重鎖 CDR1 アミノ酸配列、重鎖 CDR2 アミノ酸配列または配列番号 505、及び重鎖 CDR3 アミノ酸配列または配列番号 506 のうちの 1 つまたは 2 つとを含む。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、配列番号 476 の軽鎖 CDR1 アミノ酸配列、軽鎖 CDR2 アミノ酸配列または配列番号 477、及び軽鎖 CDR3 アミノ酸配列または配列番号 454 と、配列番号 507 の重鎖 CDR1 アミノ酸配列、重鎖 CDR2 アミノ酸配列または配列番号 508、及び重鎖 CDR3 アミノ酸配列または配列番号 509 のうちの 1 つまたは 2 つとを含む。任意選択で、抗原結合タンパク質は、配列番号 449 ~ 451 及び 504 ~ 506、ならびに配列番号 476、477、454 及び 507 ~ 509 からなる群から選択される 6 つの CDR アミノ酸配列を含む。

【0249】

例示的態様では、抗原結合タンパク質は、(a) 配列番号 490 ~ 503 のうちのいずれか 1 つの重鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは図 22 で S1 ~ S12 として表示されている重鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70% の配列同一性を有するもの、または (b) 配列番号 380 ~ 383、388 ~ 390、479、及び 481 のうちのいずれか 1 つの軽鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは図 22 で S1 ~ S12 として表示されている軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70% の配列同一性を有するもの、または (c) (a) と (b) の両方、を含む。いくつかの態様では、変異配列は少なくとも約 80% もしくは少なくとも約 85% の配列同一性を有するか、または変異配列は少なくとも約 90% もしくは少なくとも約 95% の配列同一性を有する。

【0250】

例示の場合には、抗原結合タンパク質は、以下の 1 対のアミノ酸配列を含む。

配列番号 389 と 490、

配列番号 389 と 491、

配列番号 389 と 492、

配列番号 389 と 493、

配列番号 389 と 494、

配列番号 389 と 495、

配列番号 383 と 496、

配列番号 383 と 497、

配列番号 383 と 498、

配列番号 383 と 499、

配列番号 383 と 500、

配列番号 383 と 501、

配列番号 383 と 503、

配列番号 389 と 502、

図 22 で S1 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 22 で S1 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図 22 で S2 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 22 で S2 として表示されて

いる軽鎖可変領域の配列、

図 2 2 で S 3 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 3 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図 2 2 で S 4 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 4 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図 2 2 で S 5 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 5 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図 2 2 で S 6 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 6 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図 2 2 で S 7 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 7 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

10

図 2 2 で S 8 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 8 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図 2 2 で S 9 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 9 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図 2 2 で S 1 0 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 1 0 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図 2 2 で S 1 1 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 1 1 として表示されている軽鎖可変領域の配列、または

図 2 2 で S 1 2 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 1 2 として表示されている軽鎖可変領域の配列。

20

【 0 2 5 1 】

いくつかの態様では、抗原結合タンパク質は、抗体、例えば、モノクローナル抗体である。様々な態様では、抗体は、I g G である。任意選択で、抗原結合タンパク質は、軟寒天 3 D 増殖アッセイにおいて少なくとも約 5 0 % のコロニー増殖を阻害するか、ヒトがん細胞を注射された異種移植マウスにおいて腫瘍増殖を阻害するか、卵巣癌細胞、メラノーマがん細胞、膀胱癌細胞、もしくは子宮内膜癌細胞を注射された異種移植マウスにおいて腫瘍増殖を阻害するか、または卵巣癌細胞、膀胱癌細胞、もしくは子宮内膜癌細胞を注射された異種移植マウスにおいて少なくとも 5 0 % の腫瘍増殖を阻害する。

【 0 2 5 2 】

30

したがって、様々な実施形態は、本開示は、以下を含む抗原結合タンパク質を提供する。

(a) 配列番号 5 0 4 もしくは配列番号 5 0 7 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するもの、

(b) 配列番号 5 0 5 もしくは配列番号 5 0 8 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するもの、

(c) 配列番号 5 0 6 もしくは配列番号 5 0 9 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するもの、

40

(d) 配列番号 4 4 9 もしくは配列番号 4 7 6 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するもの、

(e) 配列番号 4 5 0 もしくは配列番号 4 7 7 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するもの、

(f) 配列番号 4 5 1 もしくは配列番号 4 5 4 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するもの、または

(g) (a) ~ (f) のうちいずれか 2 つ以上の組み合わせ。

50

【0253】

また、配列番号449～451及び504～506、ならびに配列番号476、477、454及び507～509からなる群から選択される6つのCDRアミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質も提供される。

【0254】

本開示は、以下を含む抗原結合タンパク質を提供する。

(a) 配列番号490～503のうちのいずれか1つの重鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは図22でS1～S12として表示されている重鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、または

(b) 配列番号380～383、388～390、479、及び481のうちのいずれか1つの軽鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは図22でS1～S12として表示されている軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、または
(c) (a)と(b)の両方。

【0255】

様々な態様では、変異配列は、少なくとも約85%の配列同一性または約90%もしくは約95%の配列同一性を有する。

【0256】

本開示は、以下からなる群から選択される、1対のアミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質も提供する。

配列番号389と490、

配列番号389と491、

配列番号389と492、

配列番号389と493、

配列番号389と494、

配列番号389と495、

配列番号383と496、

配列番号383と497、

配列番号383と498、

配列番号383と499、

配列番号383と500、

配列番号383と501、

配列番号383と503、

配列番号389と502、

図22でS1として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS1として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図22でS2として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS2として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図22でS3として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS3として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図22でS4として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS4として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図22でS5として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS5として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図22でS6として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS6として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図22でS7として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS7として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図22でS8として表示されている重鎖可変領域の配列と図22でS8として表示されて

10

20

30

40

50

いる軽鎖可変領域の配列、

図 2 2 で S 9 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 9 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図 2 2 で S 1 0 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 1 0 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

図 2 2 で S 1 1 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 1 1 として表示されている軽鎖可変領域の配列、または

図 2 2 で S 1 2 として表示されている重鎖可変領域の配列と図 2 2 で S 1 2 として表示されている軽鎖可変領域の配列。

【0 2 5 7】

本明細書では、以下を含む抗原結合タンパク質を提供する。

(a) 配列番号 5 1 0 もしくは 5 1 3 として記載されるかまたは図 2 3 もしくは図 2 5 に記載の重鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するもの、または

(b) 配列番号 5 1 1 もしくは 5 1 2 として記載されるかまたは図 2 4 もしくは図 2 6 に記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するもの、または

(c) (a) と (b) の両方。

【0 2 5 8】

本開示は、1 対のアミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質も提供し、かかる対は以下を含む。

(a) 配列番号 5 1 0 として記載の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号 5 1 1 として記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 ～ 5 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有し、任意選択で、異なっている 1 ～ 5 個のアミノ酸が、重鎖の場合は図 2 3 に示されているか、もしくは軽鎖の場合は図 2 4 に示されているもの、または

(b) 配列番号 5 1 3 として記載の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号 5 1 2 として記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 ～ 5 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 7 0 % の配列同一性を有するもの、または任意選択で、異なっている 1 ～ 5 個のアミノ酸が、重鎖の場合は図 2 5 に示されているか、もしくは軽鎖の場合は図 2 6 に示されているもの。

【0 2 5 9】

様々な態様では、本願で開示される抗原結合タンパク質は、脱フコシル化グリカンを含む F c ポリペプチドを含む。

【0 2 6 0】

様々な態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、抗体、例えば、モノクローナル抗体である。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、I g G である。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、軟寒天 3 D 増殖アッセイにおいて少なくとも約 5 0 % のコロニー増殖を阻害するか、またはヒトがん細胞を注射された異種移植マウスにおいて腫瘍増殖を阻害する。様々な態様では、抗原結合タンパク質は、卵巣癌細胞、メラノーマがん細胞、膀胱癌細胞、または子宮内膜癌細胞を注射された異種移植マウスにおいて腫瘍増殖を阻害する。様々な場合には、抗原結合タンパク質は、卵巣癌細胞、膀胱癌細胞、または子宮内膜癌細胞を注射された異種移植マウスにおいて少なくとも 5 0 % の腫瘍増殖を阻害する。

【0 2 6 1】

本開示は、本明細書に記載される抗原結合タンパク質と異種部分とを含む複合体を提供する。例示的態様では、複合体は、例えば、本明細書に記載される任意のもの等、細胞毒性薬または化学療法薬を含む。様々な態様での化学療法薬は、チューブリン重合を遮断することにより細胞分裂を阻害する抗有糸分裂剤である。場合によっては、抗有糸分裂剤は

10

20

30

40

50

、アウリスタチンであり、任意選択でMMAEである。

【0262】

本開示は、本明細書に記載される抗原結合タンパク質を含む融合タンパク質も提供する。本開示はさらに、本開示の抗原結合タンパク質、複合体、または融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。本開示は、本開示の抗原結合タンパク質、複合体、または融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むベクターを提供する。本開示は、本開示の核酸またはベクターを含む宿主細胞を追加で提供する。

【0263】

本開示は、クローディン6 (CLDN6) タンパク質に結合する抗原結合タンパク質を生産する方法を提供し、(i) 細胞培養培地中の本開示の宿主細胞を培養することであって、宿主細胞が、先行請求項のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む、培養すること、及び(ii) 細胞培養培地から抗原結合タンパク質を採取すること、を含む。また、クローディン6 (CLDN6) タンパク質に結合する抗原結合タンパク質を含む融合タンパク質を生産する方法も提供し、(i) 細胞培養培地中の本開示の宿主細胞を培養することであって、宿主細胞が、本開示の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む、培養すること、及び(ii) 細胞培養培地から融合タンパク質を採取すること、を含む。

【0264】

本開示はさらに、本開示の、抗原結合タンパク質、複合体、融合タンパク質、核酸、ベクター、宿主細胞、またはそれらの組み合わせ、及び薬学的に許容される担体、希釈剤もしくは添加剤を合わせることを含む、医薬組成物を生産する方法を提供する。また、本開示の、抗原結合タンパク質、複合体、融合タンパク質、核酸、ベクター、宿主細胞、またはそれらの組み合わせと、薬学的に許容される担体、希釈剤もしくは添加剤とを含む医薬組成物も提供される。

【0265】

本明細書では、本明細書に記載される医薬組成物を、がんを治療するのに有効な量で対象に投与することを含む、CLDN6発現がんを有する対象を治療する方法が提供される。また、本明細書に記載される医薬組成物を、腫瘍増殖を阻害するのに有効な量で対象に投与することを含む、対象における腫瘍増殖を阻害する方法も提供される。本開示は、対象における腫瘍サイズを縮小させる方法を提供し、本明細書に記載される医薬組成物を、腫瘍サイズを縮小するのに有効な量で対象に投与することを含む。さらに、対象におけるがんの再発を予防する方法を提供し、本明細書に記載される医薬組成物を、がんの再発を予防するのに有効な量で対象に投与することを含む。

【0266】

本開示は、試料中のクローディン6 (CLDN6) を検出する方法を提供し、試料と、本開示の、抗原結合タンパク質、複合体、または融合タンパク質とを接触させること、及びCLDN6に結合している抗原結合タンパク質、複合体または融合タンパク質を含む免疫複合体について評価することを含む。また、本明細書では、対象におけるクローディン6 (CLDN6) 陽性のがんを診断する方法も提供され、対象から取得した細胞または組織を含む生体試料と、本開示の、抗原結合タンパク質、複合体、または融合タンパク質とを接触させること、及びCLDN6に結合している抗原結合タンパク質、複合体または融合タンパク質を含む免疫複合体について評価することを含む。

【0267】

本開示は、CLDN6の低過剰発現個体であると診断された対象におけるがんを治療する方法も提供する。様々な実施形態では、方法は、本願で開示されている医薬組成物を、がんの再発を予防するのに有効な量で対象に投与することを含む。いくつかの態様では、投与することにより、腫瘍細胞にアポトーシスが誘導され、任意選択で、投与することにより、CLDN6発現細胞にアポトーシスが誘導される。様々な態様では、対象は腫瘍を有し、腫瘍は、半定量的に4つの群、すなわち、高発現個体、中程度の発現個体、低発現個体、及び非発現個体のうちの1つに分類される。様々な場合には、高発現個体は、12

log Fragments Per Kilobase Million (FPKM) を超えるCLDN6 RNAと定義され、CLDN6 RNAはRNASeqにより測定されるか、またはCLDN6タンパク質レベルが、免疫組織染色 (IHC) により測定した場合に3+を超える。様々な場合には、中程度の発現個体は、10 log FPKMより大きいCLDN6 RNAと定義され、CLDN6 RNAはRNASeqにより測定されるか、またはCLDN6タンパク質レベルが、IHCにより測定した場合に2+を超える。様々な場合には、低発現個体は、6 log FPKMより大きいCLDN6 RNAと定義され、CLDN6 RNAはRNASeqにより測定されるか、またはCLDN6タンパク質レベルが、IHCにより測定した場合に1+を超える。様々な場合には、非発現個体は、6 log FPKM未満のCLDN6 RNAと定義され、CLDN6 RNAはRNASeqにより測定されるか、またはCLDN6タンパク質レベルがIHC検出限界を下回る。様々な態様では、前記腫瘍を有する対象は、CLDN6の高発現個体、中程度の発現個体、低発現個体、または非発現個体として同様に説明される。

10

【0268】

以下の実施例は、単に本開示を例示するためだけに提供され、どのような形でもその範囲を制限するためのものではない。

【実施例】

【0269】

実施例 1

本実施例は、各種の細胞供給源及び組織供給源でのCLDN6 RNAレベルの分析を示す。

20

【0270】

各種供給源材料でのCLDN6の発現についてベースラインを確立するため、患者試料、正常組織、及びTranslational Oncology Research Laboratory (TORL) により創製された細胞株におけるCLDN6発現の発現レベルをアッセイした。

【0271】

患者試料のCLDN6 RNAのレベルを、National Cancer Institute (NCI) が管理するThe Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースに含まれる情報を使用して測定した。正常組織のCLDN6レベルを、Common Fundが維持するGenotype-Tissue Expression (GTEx) データベースの情報を使用して測定した。GTExデータベースからの組織分析では、CLDN6が、組織の中でも特に、脳、下垂体、脾臓、腎臓、肺、甲状腺、及び頸部を含めた様々な部位で検出可能であることを示した (図1)。

30

【0272】

Agilent 44Kマイクロアレイ (4x44Kアレイチップ、Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 及びRNAシーケンシング (RNA-Seq) アッセイを使用してTORLがん細胞株でCLDN6発現レベルを測定した。RNASeqは、BGI Americas (Cambridge, MA) による「定量化のためのRNASeq (RNASeq for quantification)」サービスを利用し、同社により実施された。図2及び図3に示されるように、卵巣癌、頭頸部癌、肺癌、及び膀胱癌の細胞は、最も高いレベルのCLDN6を発現していたが、CLDN6発現レベルは、乳癌、腎臓癌、結腸癌、肉腫及び肝癌の細胞で検出可能であった。

40

【0273】

実施例 2

本実施例は、CLDN6を過剰発現するよう操作された細胞の生産を示す。

【0274】

CLDN6を過剰発現するよう操作されたモデルを樹立した。これらのモデルは、実施例5に記載のCLDN6抗体の有効性を決定するために使用した。簡単に言えば、CMV

50

プロモーター、及び脳心筋炎ウイルス（EMCV）の減弱化させた配列内リボソーム進入部位（IRES）を有するバイシストロン性ベクター内にCLDN6をコードするヌクレオチド配列を操作した。IRESは、目的遺伝子（GOI）cDNA（CLDN6）とピューロマイシンcDNAの間に位置させた。ウッドチャック転写後調節エレメント（WPRE）をピューロマイシンcDNAの下流に位置させた。ベクターはまた、GFPマーカ配列またはMycDDKタグも発現した。GFPを含有する発現ベクターの配列は、本明細書では配列番号189として提供されている。

【0275】

発現ベクターは、ウイルスによりHEK293T細胞（スクリーニング用）及びNIH3T3細胞（免疫化用）に形質導入された。正の形質導入細胞を、ピューロマイシン含有培地（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）での生存に基づいて選択した。正選択された細胞をサブクロニングして、安定した均一な、CLDN6過剰発現細胞のクローン集団を得た。

【0276】

サブクローンCLDN6の発現は、BD Biosciences Accuri（商標）フローサイトメーター（San Jose, CA）で、参照CLDN6モノクローナル抗体（mAb）を使用したフローサイトメトリーにより確認された。二次抗体及び複合体：ヤギ抗マウスIgG（最小限の交差反応性）抗体Alexa Fluor（登録商標）647（Biolegend, San Diego, CA；カタログ番号405322）を使用して、参照CLDN6 mAbとサブクローンにより発現されるCLDN6間の結合活性を検出した。

【0277】

CLDN6の細胞内局在は、CLDN6-緑色蛍光タンパク質（GFP）融合タンパク質を発現する細胞を用いてCellavista（登録商標）イメージングシステム（SynGene, Mountain View, CA）を使用して蛍光顕微鏡で決定した。図4に示されるように、細胞膜でGFPの蛍光が検出され、CLDN6が細胞膜に局在することを証明している。

【0278】

実験例3

本実施例は、参照抗体及び対照抗体の生産を示す。

【0279】

ベンチマーク（基準）のCLDN6特異的抗体及び対照抗体は、組換え型マウスIgG2Aキメラ抗体を産生するよう抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域をExp CHO（商標）発現系（ThermoFisher Scientific, Waltham, MA）にクローニングすることにより作製した。これらの抗体を、実施例5に記載の新たに作製したCLDN6特異的抗体と並行して試験した。

【0280】

簡単に言えば、Exp CHO（商標）発現系（カタログ番号：A29133、ThermoFisher Scientific, USA）を製造者の操作手順に従って使用して対照抗体の配列及びベンチマーク抗体の配列を含有するプラスミドをトランスフェクトした。細胞を 37°C 、 $8\%\text{CO}_2$ にて1日目に培養し、次いで、トランスフェクション後はキットで提供されている培地で 32°C 、 $5\%\text{CO}_2$ にて培養した。抗体を、 $1,000\text{g}$ にて10分間、次いで $5,000\text{g}$ にて30分間の遠心分離にかけてExp CHO（商標）培地を清澄にすることにより精製した。その後、上清を、 $0.45\mu\text{m}$ フィルター、次いで $0.22\mu\text{m}$ フィルターを使用してろ過した。続いて、上清を、プロテインA/G樹脂（Life Technologies, Carlsbad, CA；カタログ番号20424）を製造者の操作手順に従って使用したアフィニティ精製に供した。ELISA精製に先立ち、投入培地量が占めているのが樹脂の結合容量の 80% 未満であることを保証するため、培地中の抗体価を大まかに決定した。インキュベーション後、樹脂をPBSで洗浄し、溶出緩衝液（Life Technologies、カタログ番号21004）で溶出させた。溶出画分は、 $\text{pH}8.0$ のTris緩衝液を加えて生理学的 pH に

10

20

30

40

50

直ちに調整した。精製した抗体はその後、Amicon Ultra-15 遠心式フィルターユニット (Life Technologies、カタログ番号 UFC900324) を PBS 緩衝液中で使用して緩衝液交換及びタンパク質濃縮に供した。BCA タンパク質アッセイで抗体濃度を決定した。抗体純度を試験するため SDS-PAGE 及びクマシー染色を行った。精製タンパク質を等量分割し、長期保存用に -80°C で保存するか、または即時使用のために 4°C で維持した。

【0281】

抗体の完全性を、SDS-PAGE、続くクマシー染色により非還元条件下と還元条件下を対比させて評価し、非還元条件下では、支配的なバンドが 150 kDa 付近に 1 本、還元条件下では、2 本のバンドが 50 kDa と 25 kDa で観察された。

10

【0282】

配列類似性を有する他の CLDN ファミリーメンバー (図 5)、すなわち、CLDN3、CLDN4、及び CLDN9 に特異的な抗体は、プラスミドに含有された抗体配列が CLDN3、CLDN4、または CLDN9 に特異的な抗体配列であることを除いては、本質的に同様に作製された。

【0283】

実施例 4

本実施例は、内因的 CLDN6 発現の高い細胞株の特性解析を示す。

【0284】

がん細胞株パネルをその内因的な CLDN6 発現について FACS 及びウエスタンブロットにより分析した。簡単に言えば、標的に対する抗体の結合を、CLDN6 を過剰発現する細胞 (例えば、実施例 2 に記載の、CLDN6 を過剰発現する HEK293T 細胞)、及び実施例 1 で決定された、CLDN6 を高レベルまたは低レベルで内因的に発現する細胞株を使用して FACS により評価した。CLDN6 発現細胞を、参照抗体または対照抗体 (実施例 3 に記載) と共に、氷上で 30 分間インキュベートし、洗浄後、Alexa Fluor (登録商標) 647 結合ヤギ抗マウス IgG (最小限の交差反応性) 抗体 (Biolegend カタログ番号 405322) と共に氷上で 30 分間インキュベートした。蛍光を BD Biosciences Accuri (商標) フローサイトメーター (San Jose, CA) で読み取った。

20

【0285】

参照抗体及び対照抗体を用いてニトロセルロースでウエスタンブロットを行った。簡単に言えば、細胞ライセートからの試料を沸騰させ、タンパク質含有物を変性させた。SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) を使用して、変性タンパク質をポリペプチド長により分離した。分離されたタンパク質をその後、アクリルアミドゲルからニトロセルロースメンブレンに転写した。2% ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液を使用してメンブレンをブロックし、非特異的抗体結合を最小限に抑えた。メンブレンを参照抗体または対照抗体と共にインキュベートした。メンブレンを、参照抗体または対照抗体を認識するホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合済み二次抗体で染色し、二次抗体の検出を化学発光により行った。

30

【0286】

過剰発現株を使用して対照抗体及び参照抗体を評価し、評価された時点で、その対照抗体及び参照抗体を使用して内因的細胞株の特徴付けを行った。CLDN6 を過剰発現する細胞は、陽性対照としてこれらのアッセイに含めた。

40

【0287】

FACS アッセイでは、子宮内膜癌細胞株に加え、4 つの卵巣癌細胞株、膀胱癌細胞株、肺癌細胞株、及び上部消化管がん細胞株が、CLDN6 を表面に高レベルで発現することが示された。高レベルの CLDN6 発現はウエスタンブロットでも検出された。追加の 2 つの卵巣癌細胞株、追加の肝癌細胞株、追加の肺癌細胞株、及び追加の上部消化管がん細胞株では、ウエスタンブロットで検出した際、CLDN6 を表面に中程度レベルで発現することが示された。子宮内膜腫瘍細胞及び膀胱腫瘍細胞はまた、インビボでの異種移植

50

片としても高レベルのCLDN6を発現していた。試験したがん細胞株によるCLDN6の内因的発現レベルを表2にまとめている。

【表20】

表2

細胞株 名称	原発の 組織型	CLDN6 RNA Seq	群	FACS による表 面発現	WB（細 胞株）に よるタン パク質発 現	WB（異 種移植 片）によ るタン パク質発 現	造腫瘍皮 下注射	造腫瘍IP （ヌード）	造腫瘍IP （SCID）
OVC A429	卵巣	393. 99	陽性 対照	++++	++++		なし	緩徐	TBD
ARK 2	子宮内 膜	335. 06	陽性 対照	++++	++++	+++	有り		
OAW 28	卵巣	273. 78	陽性 対照	++++	++++		なし	TBD	TBD
UMUC -4	膀胱	242. 93	陽性 対照	++++	++++	++	有り	緩徐	TBD
PEO 14	卵巣	196. 63	陽性 対照	++++	+++		なし	TBD	TBD
OV1 77	卵巣	195. 53	陽性 対照	++++	+		なし	TBD	TBD
H16 93	肺	184. 12	陽性 対照	++++	+++		TBD		
MKN 7	上部消 化管	118. 6	陽性 対照	+++	++		TBD		
OV- 90	卵巣	108. 23	陽性 対照	++	++	+	有り		
HUH -7	肝臓	93.5 2	陽性	++	+		有り		

10

20

30

40

50

			対 照						
J H O S - 4	卵巣	6 9 . 3	陽 性 対 照	++	+		なし	T B D	T B D
H 1 4 3 5	肺	4 2 . 8	陽 性 対 照	++	+ / -		T B D		
N U G C 3	上部消 化管	4 1 . 1 1	陽 性 対 照	++	++	+	有り		
R M G - 1	卵巣	0 . 6 3	陰 性 対 照	-	-	-	有り	T B D	T B D
C O L O 7 0 4	卵巣	0 . 4 4	陰 性 対 照	-	-	-	有り	T B D	T B D
M C F - 7	乳房	0	陰 性 対 照	-	-	-	有り		
L S 5 1 3	結腸	0	陰 性 対 照	-	-	-	有り		
M 2 0 2	メラノ ーマ	0	陰 性 対 照	-	-	-	有り		
M 2 7 5	メラノ ーマ	0	陰 性 対 照	-	-		有り		
K O C - 7 C	卵巣	0	陰 性 対 照	-	-	-	有り	有り	T B D

【 0 2 8 8 】

実施例 5

本実施例は、C L D N 6 特異的抗体を産生させるためのマウスの免疫化を示す。

【 0 2 8 9 】

Fred Hutchinson Cancer Research Center の手法に従って3つの異なるペプチド免疫原の混合物を用いてB a l b / c 及びC D 1 マウスを免疫することによりC L D N 6 特異的抗体を産生させた。3つのペプチドは、C L D N 6 細胞外ドメインの第2ループ（すなわち、E L 2）に及んでいた。ペプチドには、E L 2 の全長、E L 2 の最初の（N末端）半分までのペプチド、及びE L 2 の残りの（C末端

）半分までのペプチドが含まれる。表 3 に 3 つのペプチドの配列を記載する。

【表 2 1】

表 3

ペプチド免疫原	E L 2	配列番号
A c - C W T A H A I I R D F Y N P L V A E A Q K R E L - アミド	E L 2 全長	2
A c - C T A H A I I R D F Y N P L - アミド	N 末端側半分	3
A c - L V A E A Q K R E L G C - アミ ド	C 末端側半分	4

10

【0 2 9 0】

マウスはまた、ヒト C L D N 6 - m y c - D D K 発現ベクターを含むプラスミドを使用して、完全長 C L D N 6 を過剰発現する 3 T 3 細胞で免疫された。

【0 2 9 1】

免疫したマウスから脾細胞を採取し、B T X E l e c t r o f u s i o n (B T X , H o l l i s t o n , M A) で骨髄腫株と融合させてハイブリドーマを作製した。7 6 8 0 の初代ハイブリドーマ培養物を作製し、3 8 4 ウェルプレートで培養した。抗体がペプチドと結合する能力を、3 つの異なるペプチド標的を発現しているビーズを使用したビーズアレイにより評価した。1 9 2 0 の潜在的抗体を再度 9 6 ウェルプレートに整列させ、内因的細胞株モデルと人工細胞株モデルに対してフローサイトメトリーでさらにスクリーニングを行った。

20

【0 2 9 2】

その後、陽性ハイブリドーマの上清を、標的領域との配列類似性を有するタンパク質（例えば、他の C L D N タンパク質）の内因的モデルと人工モデルに対してフローサイトメトリーでカウンタースクリーニングを行った。二次スクリーニング及びカウンタースクリーニングから、約 2 0 の C L D N 6 特異的抗体が追加試験用に選択された。これらの抗体をサブクロニングし、可変重鎖配列及び可変軽鎖配列を決定した。表 B 及び配列表を参照のこと。

30

【0 2 9 3】

E x p i C H O (商 標) 発 現 を 使 用 し て C L D N 6 抗 体 を 完 全 長 I g G 抗 体 と し て フォーマットした。抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域を、p c D N A (商 標) 3 . 4 - T O P O (登 録 商 標) ベ ク ター (カ タ ロ グ 番 号 : A 1 4 6 9 7 , T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , U S A) に 基 づ い て 研 究 室 で 操 作 さ れ た 抗 体 発 現 ベ ク ター 内 に ク ロ ー ニングし、C H O 細胞にトランスフェクトした (キット (E x p i C H O (商 標) E x p r e s s i o n S y s t e m , カ タ ロ グ 番 号 : A 2 9 1 3 3 , T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , U S A) で 提 供 さ れ た 操 作 手 順 に 従 っ た) 。 抗 体 を 精 製 し 、 抗 体の C L D N 6 への細胞表面結合及び抗体の I C 5 0 を F A C S により決定し、C L D N 6 抗体と、A l e x a F l u o r (登 録 商 標) 6 4 7 N H S エステル (スクシンイミジル エステル) 、カ タ ロ グ 番 号 A 2 0 1 0 6 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) と を 製 造 者 の 操 作 手 順 に 従 っ て 直 接 結 合 さ せ た 。 C L D N 6 抗 体 を 、 1 5 0 , 0 0 0 細胞の系を用いた 5 0 μ l の体積で 0 . 3 2 n M から 1 0 0 0 n M まで (系列希釈 1 : 5 、 6 段階) 試験した。

40

【0 2 9 4】

C L D N 6 抗体が細胞表面の C L D N 6 に結合し、他の C L D N ファミリーメンバーと交差反応する能力を決定するため、C L D N 6 発現細胞を F A C S アッセイで使用した。G F P と 融 合 し た ヒ ト C L D N 6 、 G F P と 融 合 し た マ ウ ス C L D N 6 、 C L D N 9 - G F P 、 C L D N 4 - G F P 、 も し く は C L D N 3 - G F P 、 ま た は G F P 単 独 (C L D N

50

6なし)を発現するよう操作されているHEK293T細胞をCLDN6発現の人工モデルとして使用した。ARK2、OVCA429、LS513及びMCF7の細胞をCLDN6発現の内因的モデル、ならびにCLDN3/4発現のモデルとして使用した。

【0295】

試験したそれぞれの細胞型及びそれぞれのmAbについて、細胞表面タンパク質を保護するために、EDTA(トリプシンの代わり)で細胞を培養フラスコ表面から剥離させた。その後、剥離した細胞をAlexa Fluor(登録商標)で標識したCLDN6 mAbと共に予め設定した濃度にて暗所、氷上で30分間インキュベートした。CLDN6 mAbは、Alexa Fluor(登録商標)647 NHSエステル(スクシンイミジルエステル)で直接標識した。洗浄後、チャネルFL4Hでの抗体-抗原タンパク質の結合を検出するため、BD Accuri(商標)フローサイトメーターC6で細胞を読み取った。各抗体を様々な濃度で試験し、用量-蛍光曲線を作成した。生物学的用量反応データをプロットして曲線の種類に適合させ、EC50/IC50を得ることができる、オンラインで利用可能なVery Simple IC50 Toolキットを使用して、FL4Hの値(一重項の生細胞でゲーティング)に基づいて抗体のEC50/IC50(最大値の半分の抗体濃度)を計算した。最大値は、蛍光が最大限に達する、抗体の最低濃度とした。抗体はまた、それらがCLDN9、CLDN3、及びCLDN4等の他のCLDNタンパク質と交差反応する能力についてスクリーニングが行われた。これらの値を使用して、試験した一連の抗体の各抗体の相対親和性を決定した。交差反応性データは同様の方法を使用して取得されたが、細胞は、CLDN6、CLDN3、CLDN4及びCLDN9に対する発現プロファイルが異なるものを用いた。

【0296】

このようにして決定された相対親和性データ及び交差反応性データを表4及び表5に記載する。

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 4

A B 番 号	順位	HE K 2 9 3 T - C L D N 6 - m G F P 人 工 C L D N 6 +	HE K 2 9 3 T - C L D N 6 - m G F P 人 工 C L D N 6 + (マ ウス)	HE K 2 9 3 T C L D N 9 - m G F P 人 工 C L D N 9 +	HE K 2 9 3 T C L D N 4 - m G F P 人 工 C L D N 4 +	HE K 2 9 3 T C L D N 3 - m G F P 人 工 C L D N 3 +	HE K 2 9 3 T - m G F P 親
1	1	1 0 9	7 2	2 7 6 5	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
2	2	1 8 2	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
3	3	6 0 4	2 4 8 7	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
4	4	1 7	5 0 0 0	1 8 6 0	7 3 9	5 0 0 0	5 0 0 0
5	5	1 0	1 1	2 5	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
6	6	1 4 2 7	2 2 2 2	2 7 6 9	2 6	5 0 0 0	5 0 0 0
7	7	5 7 9	1 5 4 8	1 9 3 8	2 0 8 8	5 0 0 0	5 0 0 0
8	8	1 9 1 8	5 0 0 0	2 7 6 9	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
9	9	2 6 7 1	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
1 0	1 0	2 7 5 7	5 0 0 0	2 4 6	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
1 1	1 1	1 6 9 6 . 2 9	2 3 7 5	5 0 0 0	2 2 3 8	5 0 0 0	5 0 0 0
1 2	陰性	5 0 0 0	5 0 0 0	2 4 6 8	2 0 8 7	5 0 0 0	5 0 0 0
1 3	陰性	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
1 4	陰性	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0

10

20

30

40

50

1 6	陰性	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
1 7	陰性	2, 6 4 5. 9 5	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
1 8	陰性	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
1 5	陰性	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
1 9	陰性	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
参照 A b 2	0	1 2 2	4 6	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
参照 A b 1	0	5 7	6 5 1	2 9 4 3	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0

10

A B 番号は、表 A 及び表 B に記載の A B 番号に対応している。

20

30

40

50

【表 2 3】

表 5

A B 番号	ARK 2 内因的C LDN 6 +	OVC A 4 2 9 内因的C LDN 6 +	LS 5 1 3 内因的C LDN 3 ／ 4 +	MCF 7 内因的C LDN 3 ／ 4 +
1	1 0 5	8 4	5 0 0 0	5 0 0 0
2	1 3 6 5	9 1 2	5 0 0 0	5 0 0 0
3	1 6 5 3	1 0 9 6	5 0 0 0	5 0 0 0
4	4 8	1 6 8	7 3 0	6 5 3
5	8	5	7 8 1	1 4 8 5
6	7 6 5	3 9 4	1 3 3	1 1 3 5
7	3 5 3	5 3 1	6 3 5	9 7 9
8	1 1 3 6	1 0 9 0	1 1 2 6	1 0 6 3
9	1 1 4 0	1 1 6 5	1 0 4 0	5 0 0 0
1 0	2 1 4 3	2 4 7 3	1 9 4 7	5 0 0 0
1 1	3 6 2 . 8 1	8 3 4 . 6 5	4 9 2 . 5 6 7	4 2 7 . 0 3 1
1 2	1 2 9 7	2 2 9 4	2 2 6 6	5 0 0 0
1 3	1 1 4 7	2 2 8 7	1 5 9 4	5 0 0 0
1 4	1 3 0 4	1 6 6 1	1 1 6 1	5 4 6
1 6	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
1 7	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
1 8	1 , 3 5 4 . 8 0	2 , 4 3 5 . 1 8	5 0 0 0	5 0 0 0
1 5	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
1 9	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0	5 0 0 0
参照 A b 2	1 1 1 5	1 2 8 3	2 2 2 2	5 0 0 0
参照 A b 1	1 6 2	6 2	5 0 0 0	5 0 0 0

A B 番号は、表 A 及び表 B に記載の A B 番号に対応している。

【0 2 9 7】

実施例 6

本実施例は、キメラマウスの I g G m A b の特性解析を示す。

【0 2 9 8】

実施例 5 に記載の m A b の特徴をさらに明らかにするため、軟寒天 3 D 増殖アッセイ及び異種移植結合アッセイを行った。簡単に言えば、4 8 ウェルプレートの各ウェルについて、0 . 6 % S e a P l a q u e アガロース含有 1 × R P M I 培地中に 1 0 , 0 0 0 細胞が含有された 2 5 0 μ L の上層混合液を、凝固した 0 . 6 % S e a P l a q u e アガロース含有 1 × R P M I 培地である 2 5 0 u L の底層の上部にプレーティングした。1 × R P

M I 培地を含有する 2 5 0 u L の液体フィーダーレイヤーを凝固した上層の上に入れた。軟寒天アッセイの全 3 層とも、トラスツズマブ、C l d n 6 m A b、もしくはマウス I g G 2 a 対照を含むかまたは含まない場合で調製し、1 5 0 n g / m L (1 u M) で開始し、1 . 5 n g / m L で終了した (1 : 1 0 で希釈) 。各試験条件は二連で実施した。細胞は、3 週間コロニーを形成させてから、0 . 0 5 % ニュートラルレッドで染色し、E V O S X L 倒立光学顕微鏡で画像化した。処理した場合と対照との対比においてコロニー数の減少が 2 0 % 以上の細胞株を感受性とした。

【 0 2 9 9 】

表 6 に示すように、示されている抗体で処理した場合、細胞株の多くがコロニー数の減少を示した。

【表 2 4】

表 6

	3 D インビトロ活性
参照 A b 1 *	
*	7 0 %
参照 A b 2 *	
*	5 0 %
A B 1	5 0 %
A B 2	5 0 %
A B 3	5 0 %
A B 4	7 0 %
A B 5	7 0 %
A B 6	7 0 %
A B 7	5 0 %
A B 8	0 %,
A B 9	0 %,
A B 1 0	5 0 %
A B 1 1	5 0 %
A B 1 2	0 %,
A B 1 3	5 0 %
A B 1 4	0 %,
A B 1 9	5 0 %
A B 1 6	2 5 %
A B 1 7	0 %,
A B 1 8	0 %,
A B 1 9	0 %,

【 0 3 0 0 】

ヒトがん細胞株を注射された異種移植マウスでインビボ結合試験を行った。簡単に言えば、ヒトがん細胞株の異種移植モデルを、6 週齢の C D - 1 胸腺欠損ヌードマウス (C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s) で樹立した。各細胞株の皮下注射では以下の条件に従った：ARK 2 0 . 7 5 × 1 0 7 細胞、UMUC 4 1 . 0 × 1 0 7 細胞、OV 9 0 1 . 0 × 1 0 7 細胞及びM 2 0 2 0 . 5 × 1 0 7 細胞で、で、いずれも 5 0 % マトリゲル (B D B i o s c i e n c e s) を用いた。処置群あたりのマウスが 8

匹になるよう十分な数のマウスに注射した。腫瘍が $150 \sim 300 \text{ mm}^3$ の平均サイズに達した時点で、マウスを処置群に無作為に分けた。処置のため、各治療用抗体（AB3、AB2、参照Ab1、参照Ab2、参照Ab3（トラスツズマブ）及び非標的指向性IgG2対照を、尾静脈の静脈内（IV）注射用に滅菌生理食塩水で作業濃度の 1 mg/ml まで希釈した。M202試験では、トラメチニブ（DMSO溶媒和物、MedChem Express）を、5日投与、2日休薬というスケジュールで週サイクルの1週目に 1.0 mg/kg （10%のCremaphor、10%のPEG400）で経口投与し、その後、残り2週間の投与では、 0.5 mg/kg まで減量した。腫瘍異種移植片をキャリパーで週3回測定し、高さ×幅×長さで乗算して腫瘍体積を mm^3 単位で求めた。マウスを2～7週間処置した。試験終了時、動物を安楽死させ、腫瘍組織を切除して、バイオマーカー分析用の瞬間凍結組織またはホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織として保存するために分割した。動物での作業はすべて、IACUC及びUniversity of California at Los Angeles Animal Research Committeeにより承認されている操作手順を基に行われた。Study Director（San Francisco, CA）製Study Logソフトウェアを使用してデータを分析した。結果は、各群の平均体積として表される。エラーバーは、その平均の標準誤差（SE）を表す。

【0301】

異種移植片アッセイの結果を図6～図10に示す。図6A及び図6Bに示されるように、子宮内膜腫瘍担がんマウスにおいて、AB2及びAB3のそれぞれは14日目に、対照IgG2抗体に対して腫瘍体積の実質的な平均変化をもたらした。図7A及び図7Bに示されるように、膀胱腫瘍担がんマウスにおいて、AB3は35日目に、対照IgG2抗体に対して腫瘍体積の実質的な平均変化をもたらした。図8A及び図8Bは、卵巣腫瘍担がんマウスにおいて、AB2及びAB3のそれぞれは20日目に、対照IgG2抗体に対して腫瘍体積の実質的な平均変化をもたらしたことを示す。図9A及び図9Bは、図9A及び図9Bで使用したモデルがCLDN6、CLDN3、CLDN4、及びCLDN9のいずれも発現せず、そのために、陰性対照として使用されたことから、AB3がCLDN特異的に機能することを示している。図9A及び図9Bのデータはまた、AB3が、参照Ab1及び参照Ab2よりもオフターゲット活性が少ないことを示唆している。図10Aでは図6～図9の結果をまとめている。図10Aに示されるように、AB3は、それぞれCLDN6を発現する子宮内膜腫瘍、膀胱腫瘍、及び卵巣腫瘍の担がんマウスにおいて、腫瘍増殖を顕著に抑制したが、CLDN6を発現していなかったメラノーマ腫瘍担がんマウスでは腫瘍増殖を抑制しなかった（図10B）。図11に示されるように、処置中のマウスの平均的な体重変化には顕著な変化はなく、処置の安全性を示唆している。

【0302】

ヒト卵巣癌細胞株OV90の異種移植モデルにおいて第2のセットの実験を行った。実施例5に記載の10のmAbのうちの1つか、もしくは対照抗体（マウスIgG2a抗体、参照CLDN6 ab）、またはPBSビヒクル対照をマウスに注射した。マウスは群あたり8匹で、各動物に 10 mg/kg の抗体を4日ごとに静脈内注射した。図12A及び図12Bに示されるように、実施例5に記載のいくつかの抗体は卵巣腫瘍担がんマウスの腫瘍体積を減少させた。そのうち成績が最も良好だったのはAB3、AB4、AB7、及びAB10であるが、試験した抗体はいずれも、ビヒクル対照と比べて腫瘍体積を減少させた。図13に示されるように、AB3、AB4、AB7、またはAB10により処置された動物の体重には顕著な変化はなく、それらの安全性を示唆している。

【0303】

実施例7

本実施例は、キメラマウスのIgG mAbのさらなる特性解析を示す。

【0304】

内部移行の定量化アッセイを行った。簡単に言えば、参照Ab1、AB3、またはAB4の結合により誘発されるCLDN6タンパク質の内部移行の試験を実施し、その際、抗

体結合後に内部移行する既知の細胞表面受容体であり、いたるところで発現しているトランスフェリン受容体 (TfR) を陽性対照に用いた。

【0305】

TfR及びCLDN6抗体をTexas Red (商標) -X、スクシンイミジルエステル、混合異性体、カタログ番号T6134 (ThermoFisher Scientific) で標識した。抗体処理の前日、 μ -スライド8ウェルチャンバー (カタログ番号80826、ibidi Cells In Focus Inc.) に細胞を播種し、細胞を接着及び増殖させた。細胞を、標識した抗体と共に暗所、氷上で30分間インキュベートした。その後、CLDN6またはTfRで標識された細胞の入ったチャンバーをEcho lab 蛍光顕微鏡で読み取り、内部移行前の画像を収集した。その後、チャンバーを37℃で40分間インキュベートして内部移行を進行させ、再度Echo lab 蛍光顕微鏡で画像を収集した。AB3及びAB4では、CLDN6内部移行の程度は、参照Ab1でもたらされたものと比較して大きかった (データ図示せず)。

【0306】

実施例8

本実施例は、キメラマウスのIgG mAbのさらなる特性解析を示す。

【0307】

実施例5に記載の選択抗体を用いて二次元 (2D) 増殖アッセイを以下のように行った：細胞を24ウェルプレートの1ウェルあたり5,000~20,000細胞で二連にて播種した。翌日、細胞を、1~5の6回希釈のmAb (100nMのトラスツズマブ、CLDN6 mAb、またはマウスIgG2A対照のいずれかで開始)、1ng/ μ Lの固定濃度のモノメチルアウリスタチンE (MMAE) 結合済み抗マウス二次抗体 (Mordac, LLC) で処理し、用量反応曲線を作成した。細胞増殖の範囲を決定するため、未処理ウェルの細胞を、抗体処理日である1日目と、その後の6日目に定量した。mAbで処理したウェルを6日目に定量し、各処理条件での増殖を、未処理細胞の増殖に対する正規化されたパーセント比として決定した。Z1 Particle Counter (Beckman Coulter, Inc) で定量を実施した。

【0308】

結果を図14に示す。AB2、AB3、AB4、及びAB5は、増殖阻害での最も高い有効性を示した。これらの抗体の各々のIC50は、0.1nM~1nMであった。AB7、AB10、AB11、及びAB15の各々もまた、AB2、AB3、AB4、及びAB5より程度は低いが本アッセイで増殖阻害能を示した。

【0309】

実施例9

本実施例は、本開示の抗体のヒト化を示す。

【0310】

表Aに記載の抗体のサブセットをヒト化分析用に選択した。AB1抗体、AB3抗体、AB4抗体、AB9抗体、AB11抗体及びAB18抗体の重鎖可変 (VH) 配列及び軽鎖可変 (VL) 配列を、ヒトVH遺伝子及びヒトVLカッパ遺伝子からの既知のヒト生殖細胞系列配列 (IMGT (登録商標) the international Immunogenetics information system (登録商標) www.imgt.org; 創設及び管理責任者: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France) のライブラリーと比較した (使用したデータベースはIMGTのヒトVH遺伝子 (F+ORF、273生殖細胞系列配列) 及びIMGTのヒトVLカッパ遺伝子 (F+ORF、74生殖細胞系列配列) であった)。親抗体に配列が最も近いものの中からアクセプターヒト生殖細胞系列を選択した。

【0311】

表7では、各抗体のVH及びVLそれぞれについて、アクセプター配列として選択したヒト生殖細胞系列配列及び選択したヒト重鎖連結領域 (J遺伝子) に関する情報を提供する。連結領域 (J遺伝子) は、IMGT (登録商標) the international

ImMuNoGeNeTiCs i n f o r m a t i o n s y s t e m (登録商標) [www. imgt. org](http://www.imgt.org) (創設及び管理責任者: **Marie-Paule Lefranc**, **Montpellier, France**) に蓄積されているヒト連結領域配列から選択した。

【表 2 5】

表 7

	ヒトHC生殖細胞系列	ヒトHC連結領域 (J 遺伝子)	ヒトLC生殖細胞系列	ヒトLC連結領域 (J 遺伝子)
AB 1	I G H V 1 - 4 6 (アレ ル 1)	I G H J 4 (アレル 1)	I G L V 1 - 3 9 (アレ ル 1)	I G K J 2 (アレル 1)
AB 3	I G H V 3 - 2 3 (アレ ル 1)	I G H J 4 (アレル 1)	I G L V 1 - 3 9 (アレ ル 1)	I G K J 2 (アレル 1)
AB 4	I G H V 1 - 4 6 (アレ ル 1)	I G H J 4 (アレル 1)	I G L V 2 - 3 0 (アレ ル 1)	I G K J 2 (アレル 1)
AB 9	I G H V 1 - 4 6 (アレ ル 1)	I G H J 4 (アレル 1)	I G L V 1 - 3 9 (アレ ル 1)	I G K J 2 (アレル 1)
AB 1 1	I G H V 3 - 4 8 (アレ ル 1)	I G H J 4 (アレル 1)	I G L V 4 - 1 (アレル 1)	I G K J 2 (アレル 1)
AB 1 8	I G H V 1 - 4 6 (アレ ル 1)	I G H J 4 (アレル 1)	I G L V 4 - 1 (アレル 1)	I G K J 2 (アレル 1)

【0 3 1 2】

CDRは、AbM定義に従って定義した (**Dr. Andrew C. R. Martin** のウェブサイト[www. bioinf. org. uk / abs /](http://www.bioinf.org.uk/abs/) のCDR定義対照表を参照のこと)。

【0 3 1 3】

対応するマウス親配列に対するヒト生殖細胞系列のフレームワーク (すなわち、VH及びVLの非CDR残基) 位置の変化が、ヒト化抗体の結合を最適化するために必要となる場合がある。ヒト化抗体のバージョンの配列は配列番号376～421として提供される。

【0 3 1 4】

AB1の場合、HCのCDR2のAsn52 (連続的番号付け) 及びLCのCDR2のAsn54のそれぞれは、配列とコンホメーションに基づいて脱アミド化の可能性が低いと決定された。

【0 3 1 5】

AB3の場合、HCのCDR1のAsn31 (連続的番号付け)、HCのCDR2のAsn57、LCのCDR1のAsn28、及びLCのCDR2のAsn50のそれぞれは、配列とコンホメーションに基づいて脱アミド化の可能性が低いと決定された。HCのCDR1のTrp33は、溶媒曝露の可能性があり、特にストレス条件下で、酸化の可能性があると決定された。HCのCDR3では、溶媒曝露の可能性のあることから抗体製造時

に問題となり得る C D R 内部の遊離 C y s 1 0 6 があると決定された。この C y s 残基は、T y r、S e r または A l a への改変が推奨された。これらの改変抗体の結合維持を試験した。L C の C D R 2 の I l e 5 3 は、溶媒曝露の可能性があると決定され、非特異的結合を引き起こす可能性があった。この I l e 残基は、S e r に改変することが提案された。この改変抗体の結合維持を試験する。

【 0 3 1 6 】

A B 4 の場合、H C の C D R 2 の A s n 5 2 （連続的番号付け）及び L C の C D R 2 の A s n 5 8 のそれぞれは、配列とコンホメーションに基づいて脱アミド化の可能性が低いと決定された。L C の C D R 1 内の配列 D G N T は、イソアルパラギン酸塩形成の可能性が高いこと（配列 D G）ならびに脱アミド化の可能性があると決定された。この配列は改変が推奨された。

【 0 3 1 7 】

A B 9 の場合、H C の C D R 1 内の A s n 3 3 （連続的番号付け）、及び H C の C D R 2 内の A s n 5 2 と A s n 5 9 は、配列とコンホメーションに基づいて脱アミド化の可能性が低いと判断された。A s n 5 4 は、配列及びコンホメーションに基づいて脱アミド化の可能性が中程度であると決定された。H C の C D R 2 内の N G G 配列は、イソアルパラギン酸塩形成に続く脱アミド化の可能性が高／中程度であると決定された。したがって、このアミノ酸配列が改変されることが推奨された。H C の C D R 3 内の遊離 C y s 1 0 6 は、溶媒曝露の可能性があると決定されていることから抗体製造時に問題となり得る。この C y s 残基は、T y r、S e r または A l a への改変が提案される。これらの改変抗体の結合維持を試験する。H C の C D R 1 内の A r g 2 8 は、ヒト抗体で見られることはあまりない。この残基は T h r に改変し、結合維持を試験する。A B 9 の場合、L C の C D R 1 内の T r p 3 2 （連続的番号付け）は、溶媒曝露の可能性があり、特にストレス条件下で、酸化を受け得ると決定された。同 C D R の L e u 2 4 は、ヒト抗体で見られることはあまりない。この残基を A r g に改変し、結合維持を試験する。

【 0 3 1 8 】

A B 1 1 の場合、H C の C D R 2 内の A s p 5 4 – S e r 5 5 （連続的番号付け）は、イソアルパラギン酸塩形成の可能性が低いと決定された。L C の C D R 2 内の A s n 5 7 は、配列及びコンホメーションに基づいて脱アミド化の可能性が低いと決定された。

【 0 3 1 9 】

A B 1 8 の場合、H C の C D R 1 内の A s n 3 3 及び C D R – H 2 A s n 5 0 （連続的番号付け）は、配列及びコンホメーションに基づいて脱アミド化の可能性が低いと決定された。H C の C D R 2 では、A s p – P r o （D P）配列は、酸性条件下で断片化を受ける可能性があると決定された。V L ドメインでは、L C の C D R 1 内の A s n 3 4 及び A s n 3 7 は、配列及びコンホメーションに基づいて脱アミド化の可能性が低いと決定された。L C の C D R 3 では、T r p 5 6 は、溶媒曝露の可能性があり、特にストレス条件下で、酸化を受け得ると決定された。

【 0 3 2 0 】

表 8 は、ヒト化された V H と V L を合わせるためのスキームを示す。ヒト化バージョンのいずれもキメラ m A b と同等ではない場合。好ましい対は下線付き太字のテキストで示されている。

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表 8

親	ヒト化 A b 番号	VH (配列番号)	VL (配列番号)
AB1	AB1-1	376	380
	AB1-2	377	380
	<u>AB1-3</u>	377	381
	<u>AB1-4</u>	377	382
	<u>AB1-5</u>	377	383
	<u>AB1-6</u>	378	381
AB3	AB3-1	384	h21G5-L1 (任意選択)
	<u>AB3-2</u>	385	388
	<u>AB3-3</u>	385	389
	<u>AB3-4</u>	386	388
	<u>AB3-5</u>	386	389
	AB3-6	387	388
	AB3-7 (A B 2 3 と呼ぶ)	387	389
AB4	AB4-1	391	397
	AB4-2	392	397
	<u>AB4-3</u>	392	398
	<u>AB4-4</u>	393	398
	<u>AB4-5</u>	394	398
	AB4-6	395	398
	AB4-7	396	398
AB9	AB9-1	403	409
	AB9-2	404	409
	<u>AB9-3</u>	405	410
	<u>AB9-4</u>	405	411

10

20

30

40

50

	AB9-5	406	410
	AB9-6	406	411
	AB9-7	407	410
	AB9-8	407	411
	AB9-9	408	410
	AB9-10	408	411
AB11	AB11-1	412	414
	<u>AB11-2</u>	413	414
	<u>AB11-3</u>	413	415
AB18	AB18-1	416	420
	AB18-2	417	420
	AB18-3	417	420
	AB18-4	417	421
	AB18-5	418	420
	AB18-6	418	421
	AB18-7	419	420

10

20

【 0 3 2 1 】

表 8 に記載のヒト化抗体を構築し、本質的には実施例 5 に記載のように表した。ヒト化抗体の相対的抗原結合強度を決定するため、F A C S アッセイを本質的には実施例 5 に記載のように行った。ヒト化抗体の 2 つの用量（1 . 5 μ g または 0 . 3 μ g）を、操作された 2 9 3 T クローンにより発現されたタンパク質のヒト C L D N 6 またはマウス C L D N 6 への結合について試験した。アッセイの結果を表 9 に記載する。

30

40

50

【表 27】

表 9

ヒト化 A b の呼称	ヒト C L D N 6 (1. 5 μ g A b)	ヒト C L D N 6 (0. 3 μ g A b)	マウス C L D N 6
第 2 の A b のみ	7 6 8. 0 7	7 6 8. 0 7	1 0 6 1. 7 2
6 4 A - c h i m	2 2 4 2 9 7. 7 7	1 2 4 4 6 3. 4 4	1 7 0 9 0 6. 1 3
h 6 4 A	2 3 3 9 3 2. 5 3	9 3 4 1 5. 0 6	1 8 8 5 7 7. 7 7
S C 2 7 - 1 0 8 - c h i m	3 2 0 3 8 1. 3 3	1 5 0 8 5 4. 9 8	2 8 4 3 2 6. 7 7
A B 1 - C h i m	3 6 4 4 1 6. 4 9	3 1 1 9 2 3. 0 2	5 1 3 6 6 5. 1 8
A B 1 - 3	1 4 2 1 8 2. 2	1 4 1 7 7 3. 5 7	8 9 2 9 2. 2 1
A B 1 - 4	1 9 7 1 4 2. 0 8	1 0 1 7 6 3. 7 1	7 5 8 6 0. 6
A B 1 - 5	2 1 3 2 3 3. 5 7	1 3 7 8 2 8. 0 5	1 2 8 4 9 8. 4 5
A B 1 - 6	2 2 7 1 5 2. 3 4	1 1 9 6 9 9. 9 7	7 7 5 6 1. 3 4
A B 1 - 7	2 0 7 0 0 9. 9 1	7 9 2 0 7. 9 4	9 9 7 4 0. 7 2
A B 1 - 8	2 0 9 9 7 1. 6 7	9 8 7 8 5. 9 7	1 2 1 7 1 7. 4 9
A B 1 - 1 1	1 1 2 9 2 3. 2 5	6 4 8 9 2. 0 4	1 0 1 3 8 6. 6 2
A B 3 - c h i m	4 5 9 3 7 3. 0 3	2 6 7 3 2 7. 8 3	6 7 9 2 7. 4 7
A B 3 - 2	3 9 5 8 1 3. 9 7	3 0 9 3 1 8. 8 9	3 1 7 4 1. 0 2
A B 3 - 3	3 3 9 5 1 0. 7 9	2 5 0 5 1 9. 4 5	2 3 0 3 8. 4 4
A B 3 - 4	5 5 8 4 5. 1 4	1 1 6 4 1. 7	1 5 2 1. 7 9
A B 3 - 5	4 8 5 5 0. 8 3	1 3 3 3 5. 9 3	7 8 3. 2 8
A B 3 - 7	1 6 9 2 0 9. 4 2	1 0 5 8 8 1. 9 3	5 6 0 7 1. 8 2
A B 3 - 8	1 5 1 5 1 9.	1 0 8 4 1 9.	2 1 5 0 9. 6

10

20

30

40

50

	5 1	6 4	3
A B 4 - c h i m	3 2 6 6 0 3 . 5 8	1 7 6 2 8 9 . 6 3	3 6 3 9 . 2 9
A B 4 - 3	4 7 7 6 0 . 0 8	1 4 3 0 9 . 7 8	6 7 1 . 0 8
A B 4 - 4	4 8 9 7 5 . 2 6	1 4 0 8 1 . 4 7	7 4 1 . 0 3
A B 4 - 5	4 3 3 8 5 . 3 4	1 6 7 6 5 . 4 4	2 0 0 3 . 9 5
A B 4 - 6	2 9 2 4 3 . 7 8	1 0 8 4 1 . 6 8	1 4 2 0 5 . 6
A B 4 - 7	3 3 3 4 2 . 1 7	1 9 2 1 5 . 2 8	6 6 3 5 . 9 1
A B 4 - 8	7 7 6 4 2 . 7 7	4 9 3 1 0 . 1 5	4 7 0 3 . 9 8
A B 4 - 9	5 6 8 5 4 . 1 1	3 7 2 3 1 . 1 3	1 7 7 8 . 4 1
A B 4 - 1 0	7 7 1 5 9 . 9 6 1 2 0 4 . 9	5 0 8 0 9 . 2 3 7 7 9 8 . 6	2 6 4 7 . 2 9
A B 4 - 1 1	2 8 6 1 8 9 . 8	9 7 1 1 2 1 . 1	1 2 2 7 . 8 6
A B 4 - 1 2	7 1 3 5 1 4 2 .	2 7 3 7 7 5 . 3	1 1 3 3 . 1 6
A B 1 8 - c h i m	7 6 5 8 9 4 8 . 5	9 3 0 3 5 7 . 2	4 2 5 1 2 . 7 7
A B 1 8 - 3	9 5 4 3 7 8 . 2	7 3 2 4 2 4 . 7	4 2 9 4 . 9 4
A B 1 8 - 4	4 5 1 8 7 1 . 1	6 2 9 4 4 8 . 6	8 1 9 1 . 1 3
A B 1 8 - 5	7 5 8 4 6 4 . 5	6 2 6 8 8 3 . 4	3 6 8 0 . 4 2
A B 1 8 - 6	4 7 2 0 3 6 . 2	7 4 6 6 9 4 . 7	6 7 4 5 . 5 8
A B 9 - c h i m	9 2 4 6 4 9 . 4	1 9 5 0 4 . 6	3 1 7 5 . 1 7
A B 9 - 3	3 3 4 3 0 9 . 8	1 1 5 3 3 1 . 5	1 7 0 9 . 2 5
A B 9 - 4	3 3 4 9 1 . 4	1 1 6 7 1 . 3 5	5 4 9 0 . 5 2
A B 1 1 - c h i m	3 4 9 1 . 4 2 5 5 7 . 3	1 6 7 1 . 3 5 1 2 8 9 . 1 7	5 4 9 0 . 5 2 7 1 6 0 . 1 5
A B 1 1 - 2	2 5 5 7 . 3 2 3 6 4 . 4 4	1 2 8 9 . 1 7 1 0 0 9 . 7	7 1 6 0 . 1 5 5 5 2 1 . 5 2
A B 1 1 - 3	2 3 6 4 . 4 4	1 0 0 9 . 7	5 5 2 1 . 5 2

10

20

30

40

【0322】

また、示されているがん細胞株により発現されるCLDN6への結合についてヒト化抗体の相対的抗原結合強度を決定するため（1.5 μgまたは0.3 μg）FACSアッセイを行った。アッセイの結果を表10に記載する。「第2のAbのみ」は陰性対照として使用した。64A-c h i m、h 6 4 A、及びSC27-108-c h i mは参照抗体として使用した。対応する親抗体（ヒト化前の抗体）は対照として使用し、「c h i m」で併記した。

50

【表 28】

表 10

ヒト化 A b の呼称	O V C A 4	A R K 2	A R K 2	M 2 O 2	M 2 O 2
	2 9	1. 5 μ g	0. 3 μ g	1. 5 μ g	0. 3 μ g
	1. 5 μ g				
第 2 の A b	8 8 5. 7	1 3 5 1.	1 3 5 1.	6 3 8. 8	6 3 8. 8
のみ	7	2 1	2 1	3	3
6 4 A - c	1 4 0 3 7	8 0 4 4	6 6 5 1	1 4 5 6.	6 2 8. 7
h i m	8. 5 5	9. 9 3	8. 5 2	2	2
h 6 4 A	1 6 1 1 6	6 9 1 1	9 0 3 4	3 0 9 3.	2 4 6 7.
	8. 8 7	8. 4 8	6. 6 6	6 9	6 3
S C 2 7 -	5 4 9 8	2 5 5 2	6 2 4 1	2 2 9 3.	7 4 2. 7
1 0 8 - c	7. 7 8	2. 8 6	0. 8 5	1	4
h i m					
A B 1 - C	1 7 6 8 3	5 1 9 1	5 8 7 6	2 3 3 7	9 4 2 6.
h i m	6. 1 6	3. 5 2	2. 0 1	7. 3 3	6 4
A B 1 - 3	2 7 5 3	1 0 7 7	2 8 2 9.	1 2 2 5.	6 9 4. 0
	5. 6 9	6. 6	2 5	7 8	8
A B 1 - 4	3 4 5 5	1 0 0 3	3 6 4 1.	9 7 0. 7	6 9 7. 9
	1. 9 9	9. 4 6	1 1		8
A B 1 - 5	5 4 3 3	2 2 3 5	7 4 9 4.	8 6 9. 0	6 8 4. 3
	1. 0 7	3. 6 7	8 6	6	
A B 1 - 6	2 9 9 4	7 7 4 3.	2 8 1 6.	8 8 0. 4	1 4 2 3.
	9. 9 1	1 9	1 5		5 3
A B 1 - 7	4 4 7 1	1 1 2 2	4 4 4 3.	8 7 6. 2	6 1 1. 1
	1. 8 9	4. 2 8	5 4	4	5
A B 1 - 8	6 5 9 7	1 7 6 4	5 8 0 5.	5 8 3. 5	1 8 8 6.
	4. 8 3	2. 9	3 5	4	8 4
A B 1 - 1		9 7 6 5	5 3 9 2	5 0 7 9.	9 7 8. 7
1	未試験	9. 6 2	6. 7 1	2 6	6
A B 3 - c	1 3 8 1 9	2 9 1 1	1 7 0 5	1 1 2 0.	8 4 3. 5
h i m	0. 1	4. 6 8	5. 3 3	3 9	
A B 3 - 2	8 5 9 4	3 3 6 1	1 4 6 5	1 4 8 3.	7 2 7. 9
	1. 6 9	8. 8 4	6. 4 9	1 7	8
A B 3 - 3	8 8 6 7	5 4 9 0	1 1 5 6.	8 0 1. 5	7 4 9. 9
	9. 6 1	1. 3 9	2 5	6	5
A B 3 - 4	2 9 5 5.	1 4 5 9.	1 3 1 5.	8 3 9. 7	5 6 3. 4
	8	4 6	3 6	5	1
A B 3 - 5	2 9 5 1.	2 9 0 9.	1 2 7 5.	7 1 3. 4	6 1 1. 6
	1 8	7 4	5 1	6	6
A B 3 - 7	未試験	9 0 4 2	3 5 9 9	7 8 4 1	1 7 4 2.

10

20

30

40

50

		0. 0 4	5. 7 3		3 4	
A B 3 - 8	未試験	2 3 2 5	1 1 8 5	1 9 0 3.	9 5 2. 7	
		9. 5 2	6. 4 8	0 5	1	
A B 4 - c	6 4 7 9	3 8 4 4	1 9 1 4	1 3 4 3.	1 0 0 7.	
h i m	6. 1 5	7. 8 3	2. 3 8	3 1	7 1	
A B 4 - 3	1 1 5 5.	1 5 2 2.	1 1 9 2.	7 0 8. 2	9 8 4. 9	
	9 5	9 8	9 6	5	5	
A B 4 - 4	1 2 0 3.	1 3 9 8.	1 0 4 8.	8 9 9. 2	6 1 8. 4	
	1 6	8 2	0 5	5	3	
A B 4 - 5	1 3 5 1.	1 1 9 8.	9 6 6. 6	1 2 0 3.	6 5 3. 4	10
	2 7	6 6	2	9 8	1	
A B 4 - 6	未試験	9 8 4 2.	3 3 0 3.	2 5 2 0.	1 2 8 1.	
		5 2	3 4	8 8	6 8	
A B 4 - 7	未試験	7 5 6 3.	2 7 6 5.	3 3 2 2.	1 4 4 4.	
		5 9	9 3	6 5	1 9	
A B 4 - 8	未試験	7 3 1 3.	3 1 1 8.	1 4 9 5.	9 7 4. 8	
		4 6	7 4	7 4	3	
A B 4 - 9	未試験	7 7 8 7.	3 0 5 8.	1 1 7 9.	8 2 5. 3	
		3 5	9 6	5	3	
A B 4 - 1	未試験	2 0 2 2	7 2 1 2.	1 3 9 2.	5 4 6. 6	20
0		7. 2 8	1	4 5	3	
A B 4 - 1	未試験	9 1 6 7.	6 3 9 2.	8 9 5. 7	5 4 9. 1	
1		6 1	0 4	7	9	
A B 4 - 1	未試験	2 4 2 2	9 6 9 0.	2 0 1 5.	1 5 0 6.	
2		1. 6 5	0 2	4	9 3	
A B 1 8 -	2 5 5 2	9 1 4 9.	3 4 4 2.	1 0 4 8.	8 9 5. 4	
c h i m	1. 3 7	1 9	7	6		
A B 1 8 -	2 7 0 3.	1 2 1 0.	1 0 7 9.	6 8 4. 3	5 9 2. 8	
3	4 1	4	3 2	3		
A B 1 8 -	3 2 2 0.	1 3 7 9.	1 1 3 4.	1 2 3 1.	7 6 2. 5	
4	0 8	1 1	2 2	3 1	1	30
A B 1 8 -	4 2 7 3.	1 3 3 0.	1 3 1 3.	1 0 0 1.	5 9 4. 4	
5	8 3	4 4	8 3	9 9	3	
A B 1 8 -	6 7 5 3.	1 9 3 6.	1 3 9 3.	9 1 4. 2	8 6 5. 4	
6	9 2	4 8	5 3		3	
A B 9 - c	3 5 6 9.	4 4 8 7.	3 5 0 8.	1 3 3 1.	6 8 0. 0	
h i m	6 9	5 5	7 5	4 4	3	
A B 9 - 3	1 2 5 7.	1 4 7 1.	1 1 3 9.	1 6 5 9.	1 1 1 1.	
	3	9 7	5 4	7 6	3 1	
A B 9 - 4	1 1 1 0.	1 5 5 3.	1 1 1 6.	1 1 4 9.	6 2 5. 3	
	9 3	6	7 8	5 5	8	
A B 1 1 -	2 4 4 0.	1 2 6 0.	1 3 1 5.	9 7 3. 4	6 1 0. 0	40
c h i m	6 3	9 7	2 8	8	5	
A B 1 1 -	2 6 9 4.	1 9 3 7.	1 4 0 0.	1 7 6 6.	8 7 2. 6	
2	8 1	5 1	4 3	0 7	8	
A B 1 1 -	2 2 0 1.	1 5 4 1.	1 3 2 0.	1 1 3 4.	9 4 0. 9	
3	3 2	4 7	3 8	3	2	

「c h i m」は、抗体のヒト化前形態である。

【0323】

インビトロでの抗原結合データに基づき、3つのヒト化抗体をさらなる試験及び開発用
に選択した。抗体は、AB1、AB3、及びAB4に由来した。

【0324】

本質的には実施例6に記載のように、膀胱癌細胞株UMUC4を注射された異種移植マ
ウスにおいてAB1、AB3、及びAB4のヒト化バージョンのインビボ結合試験を行っ
た。簡単に言えば、UMUC4の異種移植モデルを6週齢のCD-1胸腺欠損ヌードマウ
ス(Charles River Laboratories)で樹立した。腫瘍が150
~300mm³の平均サイズに達した後、マウスを処置群に無作為に分けた。ヒト化抗体
を、尾静脈の静脈内(IV)注射用に滅菌生理食塩水で作業濃度の1mg/mlまで希釈
した。腫瘍異種移植片をキャリパーで週3回測定し、高さ×幅×長さで乗算して腫瘍体積
をmm³単位で求めた。マウスを2~7週間処置した。試験終了時、動物を安楽死させ、
腫瘍組織を切除して、バイオマーカー分析用の瞬間凍結組織またはホルマリン固定パラフ
イン包埋(FFPE)組織として保存するために分割した。

【0325】

異種移植片アッセイの結果を図15~図21に示す。図15は、ヒト化AB3の2つの
バージョン(AB3-2及びAB3-4)の異種移植片アッセイの結果を示し、その際、
処置には10mg/kgの4日に1回の投与を伴った。対照には、ビヒクル対照(PBS)
)、ヒトIgG(10mg/kgを4日に1回)、及びAB3のマウスバージョン(10
mg/kgを4日に1回)を含めた。この図に示すように、ヒト化AB3-4は、35日
間の処置期間にわたり腫瘍体積の減少を示した。図16は、追加で2つの対照(64A
MSE及びそのキメラバージョン(64A-CHIM))に行ったこと以外は図15で示
した実験の場合と同じ処置での異種移植片アッセイの結果を示す。図15の場合と同様
、図16では、ヒト化AB3-4による処置時の腫瘍体積の顕著な減少を示す。

【0326】

図17は、ヒト化AB1-5の異種移植片アッセイの結果を示す。対照には、ビヒクル
対照(PBS)、ヒトIgG(10mg/kgを4日に1回)、及びAB1のマウスバー
ジョン(10mg/kgを4日に1回)を含めた。図17に示されるように、ヒト化AB
1-5により処置されたマウスは腫瘍体積の顕著な減少を示した。

【0327】

図18は、ヒト化AB4-3の異種移植片アッセイの結果を示す。対照には、ビヒクル
対照(PBS)、ヒトIgG(10mg/kgを4日に1回)、及びAB4のマウスバー
ジョン(10mg/kgを4日に1回)を含めた。ヒト化AB4-3により処置されたマ
ウスは、腫瘍体積の顕著な減少は示さなかった。

【0328】

図19~図21は、図15~図18の4つのヒト化抗体すべてを試験した異種移植片ア
ッセイの結果を示す。参照CLDN6抗体のマウス及びキメラバージョンは対照として使
用した。図19に示されるように、ヒト化AB3-4及びAB1-5により処置された
マウスは腫瘍体積の減少を示した。図20は、55日目までの経時的な腫瘍体積を示す。
アッセイでのマウスの体重を図21に示す。

【0329】

実施例10

AB1、AB3、及びAB4の異なる配列を用いてインシリコでの分析を行った。詳し
くは、各抗体について、(a)元の親クローンの配列、(b)最も近いマウス生殖細胞系
列配列、(c)最も近いヒト生殖細胞系列配列、及び(d)ヒト化配列を整列させた。親
和性成熟を受けたと考えられるアミノ酸にはアスタリスクで印を付け、抗体データベ
ース情報に従ったその位置でのアミノ酸とは異なるアミノ酸にはハッシュタグで印を付けた。
各配列のCDRは四角で囲まれている。この分析に基づき、いくつかのヒト化抗体は、表
10に記載されている配列を含んで作製される。

10

20

30

40

50

【表 29】

表 10

親クローン	コンセンサス配列 H C	コンセンサス配列 L C
A B 1	4 2 2	4 2 3
A B 3	4 2 4	4 2 5
A B 4	4 2 6	4 2 7

【0330】

これらのコンセンサス配列により定義される配列を有する抗体を、本質的には実施例 5 に記載のように倍数作製し、抗原結合については F A C S によりインビトロで（本質的には実施例 5 に記載のように）、またマウスで腫瘍体積を減少させる能力についてはインビボで（本質的には実施例 6 に記載のように）試験した。

【0331】

実施例 11

この実施例では、本開示の C L D N 6 抗体の次世代シーケンシング（N G S）分析を記載する。

【0332】

A B 1 及び A B 3 の配列は、各抗体について重鎖及び軽鎖の体細胞超変異（S H M）関連変異型を同定するため、N G S 分析に供した。N G S 分析により、各抗体の重鎖配列及び軽鎖配列の両方における S H M 点が同定された。分析により、A B 3 では、1 4 5 2 の異なる重鎖配列及び 3 2 6 の異なる軽鎖配列が、また A B 1 では、3 7 2 の異なる重鎖配列及び 3 0 8 1 の異なる軽鎖配列が明らかにされた。例としての結果を図 2 3 ～図 2 6 に示す。図 2 3 及び図 2 4 はそれぞれ、変異型 A B 3 の重鎖及び軽鎖に対して同定された変更を示し、図 2 5 及び図 2 6 はそれぞれ、変異型 A B 1 の重鎖及び軽鎖に対して同定された変更を示す。変異は各図下部に C h o t h i a の番号付けにより記載されている。

【0333】

N G S で同定された S H M を重鎖に持つ抗体を、結合関与の可能性に基づいて選択した。ヒト化 A B 3 - 7（A B S 1 ～ S 6）に基づいて 6 つの抗体を製造し、ヒト化 A B 1 - 11（A B S 7 ～ S 12）に基づいて 6 つの抗体を作製した後、表現型を評価した。図 2 2 は、軽鎖配列と対形成する親重鎖配列及び 1 2 の変異重鎖配列の一覧である。1 2 の抗体（A B S 1 ～ S 12）の F A C S 結合試験は本質的には本明細書に記載されるように行われ、その結果を図 2 7 に示す。

【0334】

F A C S 結合アッセイはまた、異なる量の A B S 1 ～ S 12 を用いて行われた。この限界希釈アッセイで試験された抗体濃度は、0.32 nM、1.6 nM、8 nM、40 nM、200 nM、及び 1000 nM であり、異なる細胞株の発現 C L D N 6 を使用した。結果を図 2 8 に示す。

【0335】

これらのデータは、新たに同定された抗体（S 1 ～ S 12）が、対応する親のヒト化抗体に対して結合増大を示すことを支持している。

【0336】

実施例 12

本実施例は、本明細書に記載されるヒト化抗体のインビボ分析を示す。

【0337】

インビボ試験は、ヒトがん細胞株を注射された異種移植マウスにおいて本質的には実施例 6 に記載のように行った。本試験では、C L D N 6 を強く発現する膀胱癌細胞株である U M U C 4 細胞株の細胞、及び C L D N 6 を発現する卵巣癌細胞株である O V - 90 細胞株の細胞を使用した。両細胞株は、マウスに皮下投与した場合に造腫瘍性である。簡単に

言えば、ヒトがん細胞株の異種移植モデルを、6週齢のCD-1胸腺欠損ヌードマウス（Charles River Laboratories）で樹立した。各細胞株の皮下注射では以下の条件に従った：UMUC4 1.0×10^7 及びOV90 1.0×10^7 で、いずれも50%マトリゲル（BD Biosciences）を用いた。CD-1ヌードマウス（群あたりマウス8匹）は、右側腹にUMUC4またはOV-90細胞株の皮下注射を受けた。腫瘍が $150 \sim 300 \text{ mm}^3$ の平均サイズに達した時点で、マウスを処置群に無作為に分けた。処置のため、各治療用抗体（ヒト化AB1-11、ヒト化AB3-7）及びヒトIgG対照抗体を滅菌生理食塩水で希釈し、 10 mg/kg を4日に1回（Q4D-図30）または週1回（QW-図31）、尾静脈（IV）注射により静脈内投与した。腫瘍異種移植片をキャリパーで週3回測定し、高さ×幅×長さで乗算して腫瘍体積を mm^3 単位で求めた。マウスを21～36日間処置した。試験終了時、動物を安楽死させ、腫瘍組織を切除して、バイオマーカー分析用の瞬間凍結組織またはホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織として保存するために分割した。動物での作業はすべて、IACUC及びUniversity of California at Los Angeles Animal Research Committeeにより承認されている操作手順を基に行われた。Study Director（San Francisco, CA）製Study Logソフトウェアを使用してデータを分析した。結果は、各群の平均体積として表される。エラーバーは、その平均の標準誤差（SE）を表す。

【0338】

異種移植片アッセイの結果を図30及び図31に示す。図30に示されるように、AB1-11またはAB3-7による4日に1回の処置は、対照処置マウスと比べ腫瘍体積またはUMUC4腫瘍の減少をもたらした。両ヒト化抗体とも、試験期間終了までに、対照マウスと比べて60%の腫瘍体積減少を達成した。

【0339】

図31に示されるように、いずれかのヒト化抗体により処置されたマウスのOV-90の腫瘍体積は、対照処置マウスの腫瘍体積よりも小さかった。試験終了までに、AB1-11は、対照マウスと比べて33%の腫瘍体積減少を達成し、AB3-7は16%の減少を達成した。

【0340】

これらのデータは、ヒト化抗体が、対応するマウス抗体で最初に観察された治療有効性を維持することを支持している。

【0341】

実施例13

本実施例は、インビボで試験した抗体薬物複合体を示す。

【0342】

MMAE及びヒト化AB1-11を含む複合体を作製し、OV-90卵巣癌細胞株発現CLDN6を注射された異種移植マウスを使用して、本質的には実施例6に記載のようにインビボで試験した。本実験では、CD-1ヌードマウス（群あたりマウス8匹）は、右側腹内にOV-90細胞の皮下注射を受けた。腫瘍が $150 \sim 300 \text{ mm}^3$ の平均サイズに達した時点で、マウスを処置群に無作為に分けた。処置のため、マウスには、（1） 10 mg/kg のヒト化AB1-11抗体、（2） 10 mg/kg のヒトIgG対照抗体、（3）AB1-11を用いずにMMAEを含む 5 mg/kg の非標的化複合体、及び（4）MMAEとAB1-11を含む 10 mg/kg の標的化抗体薬物複合体（ADC）を尾静脈注射により週に1回投与した。非標的化複合体は、非標的指向性ヒトIgG対照抗体に結合させたMMAEを含んだ。腫瘍異種移植片をキャリパーで週3回測定し、高さ×幅×長さで乗算して腫瘍体積を mm^3 単位で求めた。マウスを20～36日間処置した。試験終了時、動物を安楽死させ、腫瘍組織を切除して、バイオマーカー分析用の瞬間凍結組織またはホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織として保存するために分割した。動物での作業はすべて、IACUC及びUniversity of California at Los Angeles Animal Research Committee

eにより承認されている操作手順を基に行われた。Study Director (San Francisco, CA) 製 Study Log ソフトウェアを使用してデータを分析した。結果は、各群の平均体積として表される。エラーバーは、その平均の標準誤差 (SE) を表す。

【0343】

図32に示されるように、標的化ADCの投与により、腫瘍体積の実質的な減少がもたらされた。試験終了までに、標的化ADCにより処置されたマウスの腫瘍体積は、対照処置マウスと比べて70%より大きい減少を示した。

【0344】

同じインビボ分析を、OV-90細胞の代わりにUMUC4膀胱癌細胞を皮下注射されたマウスを用いて行い、治療剤は、(1) 10mg/kgのヒト化AB1-11抗体、(2) 10mg/kgのヒトIgG対照抗体、(3) AB1-11なしでMMAEを含む5mg/kgの非標的化複合体、及び(4) MMAEとAB1-11とを含む10mg/kgの標的化抗体薬物複合体(ADC)を、尾静脈注射により週1回投与した。非標的化複合体は、非標的指向性ヒトIgG対照抗体に結合させたMMAEを含んだ。標的化複合体は合計3回投与され、他の治療剤は週1回、合計5回投与された。腫瘍体積測定を上記のように行ったが、標的化ADC処置マウスの測定は最高で80日まで測定された。

【0345】

図33に示されるように、標的化ADCの投与は、ほぼ200mm³から、ほぼ0mm³まで腫瘍体積が減少することを実証している。効果は、試験の80日目または最終ADC処置後の約60日を超えて持続した。

【0346】

これらのデータは、本開示の抗体を含む抗体薬物複合体は、腫瘍サイズを縮小するのに、またがんを治療するのに有効であることを支持している。

【0347】

実施例14

本実施例は、CLDN6 ADCのインビトロ特性解析を示す。

【0348】

ヒト化AB3-7抗体(AB23とも呼び、例えば、表8を参照のこと)を用いて、リンカー-薬物の様々な組み合わせを含むADC、すなわち、(a) VC-PAB-MMAE、(b) GGFG-MMAE、(c) CL2A-SN38、(d) GGFG-Dxd、及び(e) VC-PAB-Dxdを作製した。ADCは、WuXi Biologics (Shanghai, China) にて調製された。

【0349】

図34A~図34Hは、AB3-7を含むCLDN6 ADCの生化学的特性解析を示す。図34Aは、AB3-7を含む7つのCLDN6 ADCの生化学的性質をまとめた表である。D4として表示されているADCは、抗体あたり4つの薬物が結合される(D4技術、WuXi Biologicsの技術)相当数の抗体を含む、実質的に均一な複合体を指す。CTRLとして表示されているADCは、抗体あたりガウス分布の薬物数を含む、従来型の不均一複合体(従来型)を指す。ADCは、低い割合の非複合体型抗体、高分子量(HMW)種、及び非複合体型遊離薬物を含んだ。ADCはまた、低レベルのエンドトキシンも含み、それらがインビボ試験に好適となるようにした。図34B~図34Hは、各ADCについて、異なる数の薬物と結合させた抗体の相対存在量を示すHIC-HPLCクロマトグラムを表す。例えば、D0下のピーク面積は、非複合体型AB3-7の相対存在量を示す。同様に、D1、D2、D3...D8の下でのピーク面積は、抗体あたり1つ、2つ、3つ...8つの薬物に結合させたAB3-7抗体の相対存在量を示す。

【0350】

図35は、AB3-7を含むCLDN6 ADCの分子の完全性は複合体化により変化することがなかったことを示す。CLDN6 ADC及び非複合体型AB3-7抗体の分子の完全性を、Native PAGE (Native PAGE 4~16%ビス-TRI

10

20

30

40

50

sタンパク質ゲル（カタログ番号BN1002BOX, ThermoFisher）により評価した。Native PAGEは、タンパク質の天然構造の実効電荷、サイズ、及び形状に従ってタンパク質を分離する。天然条件下、7つの全CLDN6 ADCは構造的に無傷のままであり、非複合体型AB3-7抗体と比較して分解の兆候を何ら示さなかった。したがって、複合体化がAB3-7抗体の分子の完全性を変化させることはない。

【0351】

図36は、複合体化が、AB3-7抗体の結合親和性に影響を与えることはないことを示す。フローサイトメトリーは、AB3-7を含むCLDN6 ADCが、CLDN6に対する特異的かつ高い結合親和性を保持することを示す。ADC結合活性を、(a) UMUC4膀胱癌細胞株（CLDN6を天然に発現する）、(b) HEK293T CLDN6-mGFP A11（CLDN6を人工的に過剰発現（OE）するよう操作されている）、及び(c) M202メラノーマ細胞株（CLDN6陰性細胞）の3つの細胞株についてフローサイトメトリーにより分析した。具体的には、ADCを、50µlの2% FBS/PBS中で約150,000細胞と共に4℃にて30分間インキュベートし、その後、2% FBS/PBSで洗浄した。その後、ADCをBiolegend（409320）製Alexa Fluor（登録商標）647抗ヒトIgG Fc抗体と共に4℃で30分間インキュベートした。BD Accuri（商標）C6フローサイトメーターで結合を測定した。7つの異なるCLDN6 ADCでは、それらの非複合体型抗体AB3-7とCLDN6陽性細胞株（UMUC4細胞及びHEK293T CLDN6-mGFP A11）の場合と比較して、同様の結合親和性がフローサイトメトリーにより示されたが、CLDN6陰性細胞株（M202）では結合は示されなかった。

【0352】

図37はさらに、複合体化が、AB3-7抗体の結合親和性に影響を与えることはないことを示す。解離定数（KD）の測定値から、AB3-7を含むCLDN6 ADCは、CLDN6に対する特異的かつ高い結合親和性を保持することが示された。CLDN6 ADCの細胞ベースの抗体親和性（KD）をKinExA 4000（Sapidyne Instrument, Boise, Idaho）により測定した。簡単に言えば、HEK293T CLDN6-mGFP A11細胞をverseneを使用して剥離させ、500pMまたは10nMの抗体含有2% FBS/DMEMで4℃にて一晩平衡化した。細胞濃度は、 5×10^6 細胞/mlで開始し、2倍系列希釈を最高10段階まで実施した。翌日、細胞を1500rpmで10分間の遠心分離にかけ、上清を保存した。PMMAビーズ（Sapidyne Instrument、カタログ番号440176）を、30µg/mlのヤギー抗ヒトIgG（Jackson ImmunoResearch Labs（カタログ番号109-005-003）でプレコートした。蛍光二次抗体Alexa Fluor（登録商標）647 AffiniPure Goat Anti-Human IgG（Jackson ImmunoResearch Labs、カタログ番号109-605-088）を1% BSA/PBSで0.5µg/mlにて希釈した。抗体溶液のみ（シグナル、100%）及び非特異的結合（NSB、緩衝液のみ）対照群も測定値に含めた。n-曲線分析で分析した2つの抗体の曲線を使用してKDを計算した。図37で示されるように、結合親和性（KD）は、すべてのADC及び非複合体型AB3-7全体を通して同様である。したがって、リンカー-薬物の様々な組み合わせへの複合体化が、HEK293T CLDN6-mGFP A11細胞上に発現されたCLDN6に対する抗体結合親和性を変化させることはなかった。

【0353】

図38は、AB3-7を含むCLDN6 ADCが、ADCの活性化において重要なステップであるがん細胞による内部移行を効率的に受けることを示す。具体的には、ARK2細胞（CLDN6を発現する子宮癌肉腫）は、核（青色）、リソソーム（緑）及びCLDN6 ADC（赤）が染色された。上段パネルの画像は初期段階（ADC/抗体染色後30分以内）で取得され、下段パネルの画像は後期段階（ADC/抗体染色後5～6時間）で取得されたものであり、ADCまたは非複合体型抗体と複合体を形成したCLDN6

の内部移行を示している。図38で示されるように、複合体化により、抗体の非複合体型抗体AB3-7の場合の内部移行速度と比較して、抗体の内部移行速度を変化させることはなかった。

【0354】

実施例15

本実施例は、がん細胞に対するCLDN6 ADCのインビトロでの抗がん活性を示す。

【0355】

図39A～図39Gは、AB3-7を含む異なるCLDN6 ADCのがん細胞に対する2D増殖抑制作用を示す。CLDN6 ADCの抗増殖活性を、4つのがん細胞株、すなわち、CLDN6陽性細胞株(UMUC4、OV90)及びCLDN6陰性細胞株(MCF7、M202)に対して試験した。各細胞株を、48ウェルプレートのウェル内にウェルあたり300～1000細胞の範囲で均一に播種した。48時間後、細胞株あたりのウェルあたり細胞数のベースライン値を測定した。残りのウェルの細胞を6つの薬物濃度の1:5の系列希釈で処理し、最終処理濃度を200nM(30ng/mL)～0.064nM(0.0096ng/mL)の範囲とした。7日後、抗増殖活性を、処理した場合と未処理の場合の細胞数を比較することにより評価した。

【0356】

図39A～図39Gで示されるように、MC-VC-PAB-MMAE(従来型)を含むCLDN6 ADC及びMC-VC-PAB-MMAE(D4技術)を含むCLDN6 ADCは、CLDN6陽性細胞(UMUC4)に対し、最も大きな抗増殖効力と特異性を示す点で比較可能であった。CL2A-SN38(従来型)を含むCLDN6 ADC及びCL2A-SN38(D4技術)を含むCLDN6 ADCは、同等に類似した抗増殖効力を示したが、非特異的であり、CLDN6陽性細胞とCLDN6陰性細胞とで区別せずに死滅させた。MC-GGFG-MMAEを含むCLDN6 ADCは、CLDN6陽性細胞(UMUC4)に対して特異性を伴う低い抗増殖効力を示した。MC-GGFG-DXDを含むCLDN6 ADC及びMC-VC-PAB-DXDを含むCLDN6 ADCは、どの細胞株に対しても増殖抑制作用を示さなかった。

【0357】

図39H～図39Nは、VC-PAB-MMAEと結合させたAB1-11(ADC-11)を含むCLDN6の、様々な細胞株に対する2D増殖抑制作用を示す。具体的には、4つの細胞株、すなわち、CLDN6陽性細胞株(ARK2、OVCA429、H841、OV90、H1693)及びCLDN6陰性細胞株(MCF7、M202)を試験した。各細胞株を、48ウェルプレートのウェル内にウェルあたり300～1000細胞の範囲で均一に播種した。48時間後、細胞株あたりのウェルあたり細胞数のベースライン値を測定した。残りのウェルの細胞を(a)CLDN6指向性ADC-11、(b)対照ADC(VC-PAB-MMAEに結合させた非標的指向性IgG)、(c)非複合体型非標的指向性IgG、及び(d)非複合体型AB1-11の1:5の系列希釈で処理し、最終処理濃度を1000nM(150ng/mL)～0.32nM(0.0048ng/mL)の範囲とした。7日後、抗増殖活性を、処理した対照の場合と未処理対照の場合とで細胞数を比較することにより評価した。

【0358】

図39H～図39Nで示されるように、ADC-11は、CLDN6陽性細胞株(ARK2、OVCA429、H841、OV90、H1693)に対して強い抗増殖活性を示し、CLDN6陰性細胞株(M202及びMCF7)に対しては活性を示さなかった。

【0359】

実施例16

この実施例は、がん細胞株異種移植片に対するCLDN6 ADCのインビボ抗がん効果を示す。

【0360】

インビボ試験ではいずれも、腫瘍異種移植片をキャリパーで週3回測定し、高さ×幅×

10

20

30

40

50

長さで乗算して腫瘍体積を mm^3 単位で求めた。動物での作業はすべて、IACUC及びUCLA Animal Research Committeeにより承認されている操作手順を基に行われた。Study Director (San Francisco, CA) 製StudyLogソフトウェアを使用してデータを分析した。

【0361】

図40は、CLDN6陽性卵巣癌細胞株(OV90)異種移植片に対するCLDN6 ADCの抗がん効果を示す。ここで試験したCLDN6 ADCは、VC-PAB-MM AEと結合させたヒト化AB1-11(ADC-11; 従来型)を含む。OV90卵巣癌細胞株異種移植片は、6週齢のCD-1胸腺欠損ヌードマウス(Charles River Laboratories)において、50%マトリゲル(BD Biosciences)を用いた 1.0×10^7 細胞の動物右側背への皮下注射により樹立した。腫瘍が $100 \sim 200 \text{mm}^3$ の平均サイズに達した時点で、マウス($n=8$)を、1) 非標的指向性ヒトIgG1対照抗体を 10mg/kg 、QW、IVで4週間、2) ヒト化CLDN6-AB1-11(HU-11)を 10mg/kg 、QW、IV(静脈内注射)で4週間、3) ADC-11を 5mg/kg 、QW、IVで3週間、及び4) 非標的指向性対照ADCを 5mg/kg 、QW、IVで3週間、のいずれかの処置群に無作為に分けた。異種移植片は、投与後、腫瘍の進行まで追跡された。CLDN6 ADCによる処置は、異種移植腫瘍の退縮をもたらした。CLDN6 ADCの活性は、非複合体型CLDN6 mAbまたは非標的指向性対照ADCで観察されたものより優っている。

【0362】

図41A及び図41Bは、CLDN6 ADC-11(従来型)がCLDN6陰性メラノーマがん細胞株(M202)異種移植片に対して抗がん活性がないことを示す。ADC-11は、CLDN6を発現しないM202細胞株異種移植片では何の抗がん活性も示さなかった。M202メラノーマがん細胞株異種移植片は、6週齢のCD-1胸腺欠損ヌードマウス(Charles River Laboratories)において、50%マトリゲル(BD Biosciences)を用いた 1.0×10^7 細胞の動物右側背への皮下注射により樹立した。腫瘍が $100 \sim 300 \text{mm}^3$ の平均サイズに達した時点で、マウス($n=8$)を、1) 非標的指向性ヒトIgG1対照抗体を 10mg/kg 、QW、IVで4週間、または2) ADC-11を 5mg/kg 、QW、IVで3週間、のいずれかの処置群に無作為に分けた。CLDN6陰性異種移植片に対するCLDN6 ADCの抗がん活性欠如は、CLDN6 ADC活性の特異性を示している。

【0363】

図42A及び図42Bは、がん細胞株異種移植片に対するCLDN6 ADC-23のインビボ抗がん効果を示す。ここで試験したCLDN6 ADCは、VC-PAB-MM AEと結合させたヒト化AB3-7(ADC-23; 従来型)を含む。図42Aは、CLDN6 ADC-23が、CLDN6陽性膀胱癌細胞株(UMUC4)異種移植片に対して有効であることを示す。具体的には、UMUC4膀胱癌細胞株異種移植片は、6週齢のCD-1胸腺欠損ヌードマウス(Charles River Laboratories)において、50%マトリゲル(BD Biosciences)を用いた 1.0×10^7 細胞の動物右側背への皮下注射により樹立した。腫瘍が $100 \sim 200 \text{mm}^3$ の平均サイズに達した時点で、マウス($n=8$)を、1) 非標的指向性ヒトIgG1(Hu-IgG1)対照抗体を 10mg/kg 、週1回(QW、IV)で4週間、2) ヒト化CLDN6 AB3-7抗体(HU23)を 10mg/kg 、QW、IVで4週間、3) ADC-23を 5mg/kg 、QW、IVで3週間、のいずれかの処置群に無作為に分けた。異種移植片は、投与後、腫瘍の進行まで、または処置開始後60日まで追跡された。図42Bは、Hu-IgG1対照抗体または 5mg/kg のADC-23による処置後の示されている時点で採取された異種移植片組織のヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色を示す。試験中に採取された異種移植片組織の組織病理学的分析では、上皮腫瘍細胞含有物がADC-23での処置マウスで消失したことが示された(図42B)。

【0364】

CLDN6 ADC-23による処置は、UMUC4 CLDN6陽性細胞株異種移植片において異種移植腫瘍の退縮をもたらした。図42A及び図42Bに示されたデータ及び上記で示されたデータは、両CLDN6 ADC (ADC-11及びADC-23)ともCLDN6陽性細胞株異種移植片に指向させるのに有効であることを示す。

【0365】

実施例17

この実施例は、患者由来異種移植片(PDX)に対するCLDN6 ADC-23のインビボ抗がん活性を示す。

【0366】

図43A～図43Eは、卵巣癌PDXモデルに対するCLDN6 ADC-23(従来型)のインビボ抗がん効果を示す。具体的には、卵巣PDX試料のパネルを、CLDN6タンパク質発現についてウエスタンブロット法でスクリーニングした(図43A)。2つのCLDN6陽性(DF189 & DF181)及び1つのCLDN6陰性(DF20)試料を試験用を選択した。各PDXからの卵巣癌細胞にルシフェラーゼ酵素をトランスフェクトしてから免疫不全マウス(NSG)の腹腔内への注射を行った(図43B)。図43C～図43Eは、(1)非標的指向性Hu-IgG1対照抗体を10mg/kg、QW、IVで4週間、(2)ヒト化CLDN6 AB3-7を10mg/kg、QW、IVで4週間、または(3)ADC-23を5mg/kg、QW、IVで3週間、により処置されたマウスで週1回測定されたルシフェラーゼ活性の結果を示す。Hu-IgG1対照またはCLDN6 AB3-7 mAbにより処置されたマウスは、試験したPDXモデルのそれぞれの場合で、マウスを安楽死させなければならないがん細胞移植後約43日目まで腹腔内での継続的な腫瘍量増加を示した。しかしながら、ADC-23により処置されたマウスでは、腫瘍量の顕著な減少及び全生存の顕著な改善が示された。これらの反応は、CLDN6陽性卵巣癌細胞を注射されたマウスに限定されていた(図43C及び図43D)。DF20 CLDN6陰性モデルでは、処置に対するわずかな有益性しか示されず、全生存に対する影響はなかった(図50E)。

【0367】

実施例18

この実施例は、CLDN6 ADC-23の用量依存性の活性を示す。

【0368】

図44A～図44Cは、CLDN6陽性卵巣癌細胞株(OV90)異種移植片に対するCLDN6 ADC-23(D4技術)の用量依存性抗がん活性を示す。OV90卵巣癌細胞株異種移植片は、6週齢のCD-1胸腺欠損ヌードマウス(Charles River Laboratories)において、50%マトリゲル(BD Biosciences)を用いた 1.0×10^7 細胞の動物右側背への皮下注射により樹立した。腫瘍が約200mm³の平均サイズに達した時点で、マウス(n=6)を処置群に無作為に分けた。OV90異種移植片を持つマウスを、0.1mg/kg～2.5mg/kg(IV、QWで3週間)の範囲の様々な用量で処置した。投与濃度の減少に伴い、抗腫瘍活性の低下が観察された。2.5mg/kgのCLDN6 ADC-23による処置で、均一な異種移植片の縮小が誘導された(図44A及び図44B)。CLDN6 ADC-23による処置に反応したマウス体重への影響は、投与したいずれの用量においても観察されなかった(図44C)。したがって、新規CLDN6 ADC-23の選択的かつ用量依存性の活性が、CLDN6陽性卵巣癌細胞株異種移植片で確認された。

【0369】

図45A～図45Cは、CLDN6陰性メラノーマがん細胞株(M202)異種移植片においてCLDN6 ADC-23(D4技術)のオフターゲット活性はないことを示す。M202メラノーマがん細胞株異種移植片は、6週齢のCD-1胸腺欠損ヌードマウス(Charles River Laboratories)において、50%マトリゲル(BD Biosciences)を用いた 1.0×10^7 細胞の動物右側背への皮下注射により樹立した。腫瘍が約200mm³の平均サイズに達した時点で、マウス(n=6

）を処置群に無作為に分けた。M202メラノーマ異種移植片担持マウスを、0.1mg/kg～2.5mg/kg（IV、QWで3週間）の範囲の様々な用量により処置した。CLDN6陰性M202異種移植片に対するCLDN6ADCの抗がん活性は、投与したいずれの用量においても観察されなかった（図45A及び図45B）。CLDN6ADCによる処置に反応したマウス体重への影響は、投与したいずれの用量においても観察されなかった（図45C）。

【0370】

刊行物、特許出願、及び特許を含めて、本明細書で引用されるすべての参考文献は、各々の参考文献が参照により組み込まれることが個々に具体的に示されているかの如く、また、その全体が本明細書に記載されているかの如く同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0371】

本開示を説明する文脈において（特に以下の請求項の文脈において）用語「a」及び「an」及び「the」及び同様の指示語の使用は、本明細書で他の意味が示されるか、または明らかに文脈と矛盾しない限り、単数及び複数の両方が含まれると解釈されるべきである。用語「含む（comprising）」、「有する」、「含む（including）」、及び「含有する」は、特に明記しない限り、非限定的用語（すなわち、「含まれるが、それらに限定されない」ことを意味する）として解釈されるべきである。

【0372】

本明細書における数値範囲の詳述は、本明細書中で特に明記しない限り、その範囲内に該当する別個の値及び端点それぞれに個々に言及する簡略な方法として使用されるものであり、別個の値及び端点それぞれは、それが個々に本明細書で引用されているかの如く明細書に組み込まれる。

20

【0373】

本明細書に記載される方法はすべて、本明細書で他の意味が示されるか、または明らかに文脈と矛盾しない限り、あらゆる好適な順序で実施可能である。本明細書に記載されるすべての例、または様々な言語（例えば、「等（such as）」）の使用は、本開示をより明確にすることのみを意図しており、特許請求の範囲に別段の記載がない限り、開示の範囲に制限を設けるものではない。本明細書内のいかなる言語も、特許請求されていない任意の要素を本開示の実施に不可欠な要素として示していると解釈されるべきではない。

30

【0374】

本明細書では本開示の好ましい実施形態が記載されており、開示を実施するための、本発明者らが知っている最良の方法が含まれる。それらの好ましい実施形態の変形は、前述の説明を一読した時点で、当業者に明らかとなり得る。本発明者らは、当業者がそのような変形を適宜採用することを予想しており、また本発明者らは、本開示が、本明細書に具体的に記載されている以外の方法で実施されることを意図している。したがって、本開示には、適用法令により許可されているように、本明細書に添付の特許請求の範囲で記述される主題のあらゆる変更及び均等物が含まれる。さらに、本明細書で他の意味が示されるか、または明らかに文脈と矛盾しない限り、上記要素について、その考えられるあらゆる変形のいかなる組み合わせも本開示に包含される。

40

本出願は以下を提供する。

1. a. 配列番号504もしくは配列番号507の重鎖CDR1アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、
- b. 配列番号505もしくは配列番号508の重鎖CDR2アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、
- c. 配列番号506もしくは配列番号509の重鎖CDR3アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少な

50

くとも70%の配列同一性を有するもの、

d. 配列番号449もしくは配列番号476の軽鎖CDR1アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、

e. 配列番号450もしくは配列番号477の軽鎖CDR2アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、

f. 配列番号451もしくは配列番号454の軽鎖CDR3アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、及び／または

g. (a)～(f)のうちいずれか2つ以上の組み合わせを含む、抗原結合タンパク質。

2. 前記変異配列は、少なくとも約80%または約もしくは少なくとも85%の配列同一性を有する、上記1に記載の抗原結合タンパク質。

3. 前記変異配列は、少なくとも約90%の配列同一性または約もしくは少なくとも95%の配列同一性を有する、上記2に記載の抗原結合タンパク質。

4. a. 前記抗原結合タンパク質は、ヒトクローディン6 (CLDN6) タンパク質 (配列番号200) に結合するか、

b. 前記抗原結合タンパク質は、CLDN6の細胞外ドメイン (ECD) の細胞外ループ2 (EL2) に結合し、前記CLDN6のECDの細胞外ループ1 (EL1) には結合しないか、

c. クローディン3 (CLDN3)、クローディン4 (CLDN4)、及びクローディン9 (CLDN9) のいずれにも結合せず、OVCA429細胞により内因的に発現されるCLDN6への参照抗体の結合を約1200nM未満で阻害するか、または

d. それらの組み合わせ

である、上記1～3のいずれかに記載の抗原結合タンパク質。

5. WTAHAIIIRDFYNPLVAEAQKREL (配列番号2) のアミノ酸配列内のエピトープに結合する、上記1～4のいずれかに記載の抗原結合タンパク質。

6. CLDN6のTAHAIIIRDFYNPL (配列番号3) またはLVAEAQKREL (配列番号4) のアミノ酸配列に結合する、上記5に記載の抗原結合タンパク質。

7. クローディン3 (CLDN3)、クローディン4 (CLDN4)、及びクローディン9 (CLDN9) のうちの1つにも複数にも結合しない、上記1～6のいずれかに記載の抗原結合タンパク質。

8. CLDN3に結合しない、上記7に記載の抗原結合タンパク質。

9. CLDN6、CLDN4、及びCLDN9に結合する、上記8に記載の抗原結合タンパク質。

10. CLDN9に結合しない、上記8に記載の抗原結合タンパク質。

11. CLDN6及びCLDN4に結合する、上記10に記載の抗原結合タンパク質。

12. CLDN4に結合しない、上記8に記載の抗原結合タンパク質。

13. CLDN6及びCLDN9に結合する、上記12に記載の抗原結合タンパク質。

14. 配列番号449の軽鎖CDR1アミノ酸配列、軽鎖CDR2アミノ酸配列または配列番号450、及び軽鎖CDR3アミノ酸配列または配列番号451と、配列番号504の重鎖CDR1アミノ酸配列、重鎖CDR2アミノ酸配列または配列番号505、及び重鎖CDR3アミノ酸配列または配列番号506のうちの1つまたは2つを含む、上記のいずれかに記載の抗原結合タンパク質。

15. 配列番号476の軽鎖CDR1アミノ酸配列、軽鎖CDR2アミノ酸配列または配列番号477、及び軽鎖CDR3アミノ酸配列または配列番号454と、配列番号507の重鎖CDR1アミノ酸配列、重鎖CDR2アミノ酸配列または配列番号508、及び重鎖CDR3アミノ酸配列または配列番号509のうちの1つまたは2つを含む、上記のいずれか1つに記載の抗原結合タンパク質。

10

20

30

40

50

16. a. 配列番号449～451及び504～506、ならびに
b. 配列番号476、477、454及び507～509からなる群から選択される6つのCDRアミノ酸配列

を含む、上記11～15のいずれかに記載の抗原結合タンパク質。

17. a. 配列番号490～503のうちのいずれか1つの重鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは図22でS1～S12として表示されている重鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、または

b. 配列番号380～383、388～390、479、及び481のうちのいずれか1つの軽鎖可変領域アミノ酸配列、または図22でS1～S12として表示されている軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1個か2個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、または

c. (a)と(b)の両方

を含む、上記11～16のいずれかに記載の抗原結合タンパク質。

18. 前記変異配列は、少なくとも約80%または少なくとも約85%の配列同一性を有する、上記17に記載の抗原結合タンパク質。

19. 前記変異配列は、少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有する、上記18に記載の抗原結合タンパク質。

20. 1対のアミノ酸配列、すなわち、

a. 配列番号389と490、

b. 配列番号389と491、

c. 配列番号389と492、

d. 配列番号389と493、

e. 配列番号389と494、

f. 配列番号389と495、

g. 配列番号383と496、

h. 配列番号383と497、

i. 配列番号383と498、

j. 配列番号383と499、

k. 配列番号383と500、

l. 配列番号383と501、

m. 配列番号383と503、

n. 配列番号389と502、

o. 前記図22でS1として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図22でS1として表示されている軽鎖可変領域の配列、

p. 前記図22でS2として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図22でS2として表示されている軽鎖可変領域の配列、

q. 前記図22でS3として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図22でS3として表示されている軽鎖可変領域の配列、

r. 前記図22でS4として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図22でS4として表示されている軽鎖可変領域の配列、

s. 前記図22でS5として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図22でS5として表示されている軽鎖可変領域の配列、

t. 前記図22でS6として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図22でS6として表示されている軽鎖可変領域の配列、

u. 前記図22でS7として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図22でS7として表示されている軽鎖可変領域の配列、

v. 前記図22でS78として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図22でS8として表示されている軽鎖可変領域の配列、

w. 前記図22でS89として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図22でS9と

10

20

30

40

50

して表示されている軽鎖可変領域の配列、

x．前記図 22 で S 9 1 0 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S 1 0 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

y．前記図 22 で S 1 1 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S 1 1 として表示されている軽鎖可変領域の配列、または

z．前記図 22 で S 1 2 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S 1 2 として表示されている軽鎖可変領域の配列

を含む、上記 17～19 のいずれかに記載の抗原結合タンパク質。

21．抗体である、上記のいずれかに記載の抗原結合タンパク質。

22．モノクローナル抗体である、上記 21 に記載の抗原結合タンパク質。

23．IgG である、上記 21 または 22 に記載の抗原結合タンパク質。

24．軟寒天 3 D 増殖アッセイにおいて少なくとも約 50 % のコロニー増殖を阻害する、上記のいずれかに記載の抗原結合タンパク質。

25．ヒトがん細胞を注射された異種移植マウスにおいて腫瘍増殖を阻害する、上記のいずれかに記載の抗原結合タンパク質。

26．卵巣癌細胞、メラノーマがん細胞、膀胱癌細胞、または子宮内膜癌細胞を注射された異種移植マウスにおいて腫瘍増殖を阻害する、上記 25 に記載の抗原結合タンパク質。

27．卵巣癌細胞、膀胱癌細胞、または子宮内膜癌細胞を注射された異種移植マウスにおいて少なくとも 50 % の腫瘍増殖を阻害する、上記 26 に記載の抗原結合タンパク質。

28．a．配列番号 504 もしくは配列番号 507 の重鎖 CDR1 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 % の配列同一性を有するもの、

b．配列番号 505 もしくは配列番号 508 の重鎖 CDR2 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 % の配列同一性を有するもの、

c．配列番号 506 もしくは配列番号 509 の重鎖 CDR3 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 % の配列同一性を有するもの、

d．配列番号 449 もしくは配列番号 476 の軽鎖 CDR1 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 % の配列同一性を有するもの、

e．配列番号 450 もしくは配列番号 477 の軽鎖 CDR2 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 % の配列同一性を有するもの、

f．配列番号 451 もしくは配列番号 454 の軽鎖 CDR3 アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 % の配列同一性を有するもの、または

g．(a)～(f) のうちいずれか 2 つ以上の組み合わせ

を含む、抗原結合タンパク質。

29．a．配列番号 449～451 及び 504～506、ならびに

b．配列番号 476、477、454 及び 507～509 からなる群から選択される 6 つの CDR アミノ酸配列

を含む、抗原結合タンパク質。

30．a．配列番号 490～503 のうちのいずれか 1 つの重鎖可変領域アミノ酸配列、もしくは図 22 で S1～S12 として表示されている重鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70 % の配列同一性を有するもの、または

b．配列番号 380～383、388～390、479、及び 481 のうちのいずれか 1 つの軽鎖可変領域アミノ酸配列、または図 22 で S1～S12 として表示されている軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異な

10

20

30

40

50

っているか、もしくは約もしくは少なくとも 70% の配列同一性を有するもの、または
 c. (a) と (b) の両方
 を含む、抗原結合タンパク質。

31. 前記変異配列は、少なくとも約 85% の配列同一性または約 90% もしくは約 95% の配列同一性を有する、上記 30 に記載の抗原結合タンパク質。

32. a. 配列番号 389 と 490、

b. 配列番号 389 と 491、

c. 配列番号 389 と 492、

d. 配列番号 389 と 493、

e. 配列番号 389 と 494、

f. 配列番号 389 と 495、

g. 配列番号 383 と 496、

h. 配列番号 383 と 497、

i. 配列番号 383 と 498、

j. 配列番号 383 と 499、

k. 配列番号 383 と 500、

l. 配列番号 383 と 501、

m. 配列番号 383 と 503、

n. 配列番号 389 と 502、

o. 前記図 22 で S1 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S1 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

p. 前記図 22 で S2 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S2 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

q. 前記図 22 で S3 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S3 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

r. 前記図 22 で S4 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S4 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

s. 前記図 22 で S5 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S5 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

t. 前記図 22 で S6 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S6 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

u. 前記図 22 で S7 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S7 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

v. 前記図 22 で S78 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S8 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

w. 前記図 22 で S89 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S9 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

x. 前記図 22 で S910 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S10 として表示されている軽鎖可変領域の配列、

y. 前記図 22 で S11 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S11 として表示されている軽鎖可変領域の配列、または

z. 前記図 22 で S12 として表示されている重鎖可変領域の配列と前記図 22 で S12 として表示されている軽鎖可変領域の配列

からなる群から選択される 1 対のアミノ酸配列を含む、抗原結合タンパク質。

33. a. 配列番号 510 もしくは 513 として記載されるかまたは図 23 もしくは図 25 に記載の重鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも 70% の配列同一性を有するもの、または

b. 配列番号 511 もしくは 512 として記載されるかまたは図 24 もしくは図 26 に記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1 個か 2 個のアミノ酸の

10

20

30

40

50

みが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、または

c. (a)と(b)の両方

を含む、抗原結合タンパク質。

34. 前記変異配列は、少なくとも約85%の配列同一性を有する、上記33に記載の抗原結合タンパク質。

35. 前記変異配列は、少なくとも約90%または約95%の配列同一性を有する、上記34に記載の抗原結合タンパク質。

36. 前記対は、

a. 配列番号510として記載の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号511として記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1～5個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有し、任意選択で、異なっている前記1～5個のアミノ酸が、前記重鎖の場合は図23に示されているか、もしくは前記軽鎖の場合は図24に示されているもの、または

b. 配列番号513として記載の重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号512として記載の軽鎖可変領域アミノ酸配列、またはその変異配列であって、1～5個のアミノ酸のみが異なっているか、もしくは約もしくは少なくとも70%の配列同一性を有するもの、または任意選択で、異なっている前記1～5個のアミノ酸が、前記重鎖の場合は図25に示されているか、もしくは前記軽鎖の場合は図26に示されているもの

を含む、1対のアミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質。

37. 脱フコシル化グリカンを含むFcポリペプチドを含む、上記のいずれかに記載の抗原結合タンパク質。

38. 上記のいずれかに記載されるかまたは本明細書に記載される抗原結合タンパク質を含む、複合体。

39. 前記抗原結合タンパク質は、配列番号387及び配列番号389に記載のアミノ酸配列を含む、上記38に記載の複合体。

40. 前記抗原結合タンパク質は、配列番号379及び配列番号383に記載のアミノ酸配列を含む、上記38に記載の複合体。

41. 細胞毒性薬または化学療法薬を含む、上記38～40のいずれかに記載の複合体。

42. 前記化学療法薬は、チューブリン重合を遮断することにより細胞分裂を阻害する抗有糸分裂剤である、上記41に記載の複合体。

43. 前記抗有糸分裂剤はアウリスタチンである、上記42に記載の複合体。

44. 前記アウリスタチンはMMAEである、上記43に記載の複合体。

45. 前記薬剤は、切断可能なリンカーを介して前記抗原結合タンパク質に結合されている、上記38～44のいずれかに記載の複合体。

46. 前記切断可能なリンカーは、VC-PAB-MMAEである、上記45に記載の複合体。

47. 前記抗原結合タンパク質は抗体である、上記38～46のいずれかに記載の複合体。

48. 前記抗体はモノクローナル抗体であり、任意選択で、前記モノクローナル抗体はIgG抗体である、上記47に記載の複合体。

49. 前記抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である、上記47または48に記載の複合体。

50. 抗体あたりの結合されている前記薬剤のユニットの平均数は1～8の範囲であり、好ましくは、抗体あたりの結合されている前記薬剤のユニットの前記平均数は3～8の範囲である、上記38～49のいずれかに記載の複合体。

51. 前記複合体は、不均一複合体である、上記38～50のいずれかに記載の複合体。

52. 前記複合体は、均一複合体である、上記38～50のいずれかに記載の複合体。

53. 前記薬剤を前記抗原結合タンパク質の特定の部位にて結合させる、上記38～50及び52のいずれかに記載の複合体。

10

20

30

40

50

54. 前記特異的部位は、不對システイン残基である、上記53に記載の複合体。
55. 前記複合体は、MC-VC-PAB-MMAEに結合された配列番号387及び配列番号389に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、上記47～54のいずれかに記載の複合体。
56. 前記複合体は、MC-VC-PAB-MMAEに結合された配列番号379及び配列番号383に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、上記47～54のいずれかに記載の複合体。
57. 上記のいずれかに記載の抗原結合タンパク質を含む、融合タンパク質。
58. 上記のいずれかに記載の抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列、上記38～56に記載の複合体、または上記57に記載の融合タンパク質を含む、核酸。
59. 上記58に記載の核酸を含む、ベクター。
60. 上記58に記載の核酸または上記59に記載のベクターを含む、宿主細胞。
61. クローディング6 (CLDN6) タンパク質に結合する抗原結合タンパク質を生産する方法であって、
(i) 上記60に記載の宿主細胞を細胞培養培地で培養することであって、前記宿主細胞が、上記のいずれかに記載の抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む、前記培養すること、及び
(ii) 前記細胞培養培地から前記抗原結合タンパク質を採取することを含む、前記方法。
62. クローディング6 (CLDN6) タンパク質に結合する抗原結合タンパク質を含む融合タンパク質を生産する方法であって、
(i) 上記60に記載の宿主細胞を細胞培養培地で培養することであって、前記宿主細胞が、上記43に記載の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む、前記培養すること、及び
(ii) 前記細胞培養培地から前記融合タンパク質を採取することを含む、前記方法。
63. 上記1～37のいずれかに記載の抗原結合タンパク質、上記38～56のいずれかに記載の複合体、上記57に記載の融合タンパク質、上記58に記載の核酸、上記59に記載のベクター、上記60に記載の宿主細胞、またはそれらの組み合わせ、及び薬学的に許容される担体、希釈剤もしくは添加剤を配合することを含む、医薬組成物を生産する方法。
64. 上記1～37のいずれかに記載の抗原結合タンパク質、上記38～56のいずれかに記載の複合体、上記57に記載の融合タンパク質、上記58に記載の核酸、上記59に記載のベクター、上記60に記載の宿主細胞、及び薬学的に許容される担体、希釈剤または添加剤を含む、医薬組成物。
65. CLDN6発現がんを有する対象を治療する方法であって、上記64に記載の医薬組成物を、前記がんを治療するのに有効な量で前記対象に投与することを含む、前記方法。
66. 対象における腫瘍増殖を阻害する方法であって、上記64に記載の医薬組成物を、腫瘍増殖を阻害するのに有効な量で前記対象に投与することを含む、前記方法。
67. 対象における腫瘍サイズを縮小させる方法であって、上記64に記載の医薬組成物を、腫瘍サイズを縮小するのに有効な量で前記対象に投与することを含む、前記方法。
68. 対象におけるがんの再発を予防する方法であって、上記64に記載の医薬組成物を、がんの再発を予防するのに有効な量で前記対象に投与することを含む、前記方法。
69. CLDN6の低過剰発現個体であると診断された対象におけるがんを治療する方法であって、上記64に記載の医薬組成物を、がんの再発を予防するのに有効な量で前記対象に投与することを含む、前記方法。
70. 前記投与することにより、腫瘍細胞にアポトーシスが誘導される、上記65～69のいずれかに記載の方法。
71. 前記投与することにより、CLDN6発現細胞にアポトーシスが誘導される、上

10

20

30

40

50

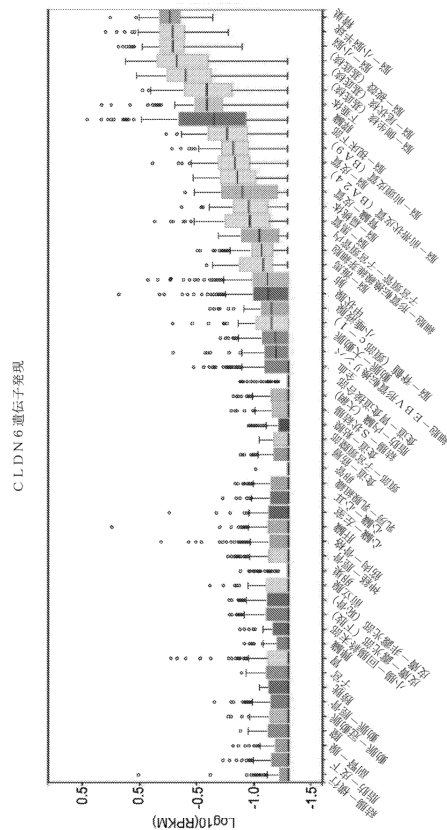
記 6 5 ～ 6 9 のいずれかに記載の方法。

7 2 . 試料中のクローディン 6 (C L D N 6) を検出する方法であって、
前記試料と、上記 1 ～ 3 7 のいずれかに記載の抗原結合タンパク質、上記 3 8 ～ 5 6 のい
ずれかに記載の複合体、または上記 5 7 に記載の融合タンパク質とを接触させること、及び
前記 C L D N 6 に結合している抗原結合タンパク質、複合体または融合タンパク質を含む
免疫複合体について評価すること
を含む、前記方法。

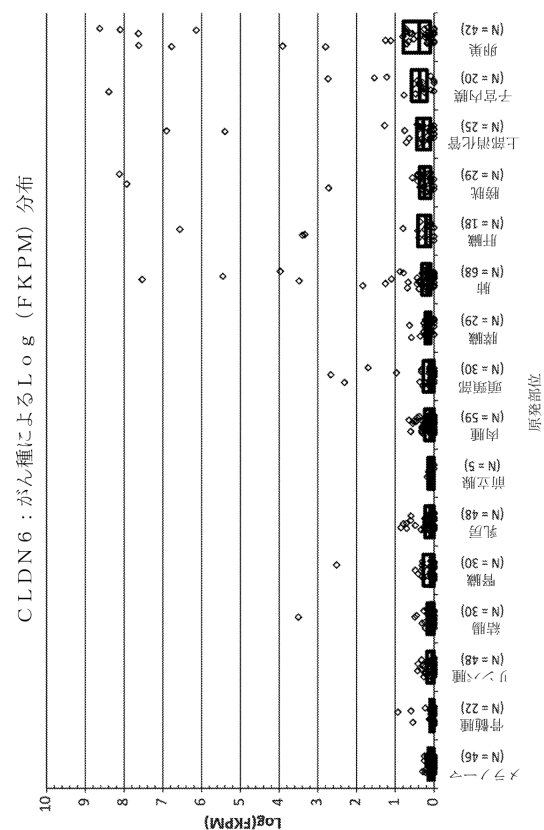
7 3 . 対象におけるクローディン 6 (C L D N 6) 陽性のがんを診断する方法であって、
前記対象から取得した細胞または組織を含む生体試料と、上記 1 ～ 3 7 のいずれかに記載
の抗原結合タンパク質、上記 3 8 ～ 5 6 のいずれかに記載の複合体、または上記 5 7 に記
載の融合タンパク質とを接触させること、及び
前記 C L D N 6 に結合している抗原結合タンパク質、複合体または融合タンパク質を含む
免疫複合体について評価すること
を含む、前記方法。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

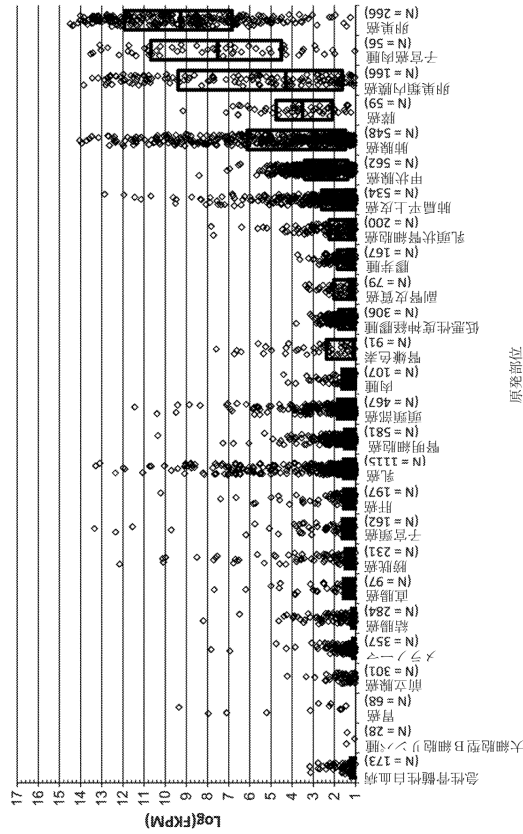
20

30

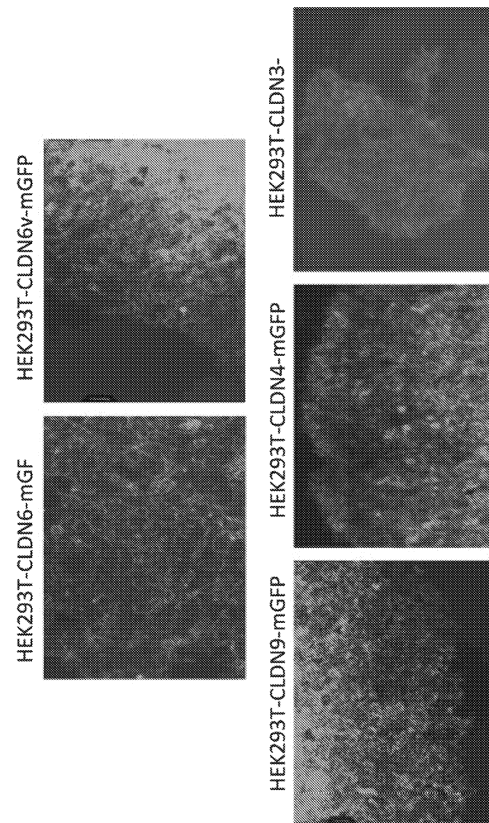
40

50

【図 3】



【図 4】



10

20

【図 5】

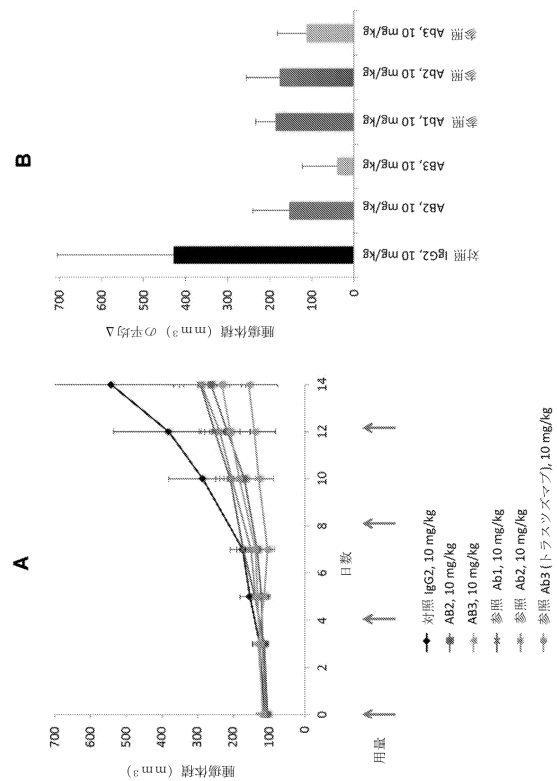
CLUSTAL 0 (1, 2, 1) 多重配列アラインメント

[illegible]

ECD ループ 1	配列番号 1 7 7
ECD ループ 2	配列番号 2

CLD6__ヒト=配列番号1
CLD3__ヒト=配列番号5
CLD4__ヒト=配列番号6
CLD9__ヒト=配列番号7
CLD6__マウス=配列番号176

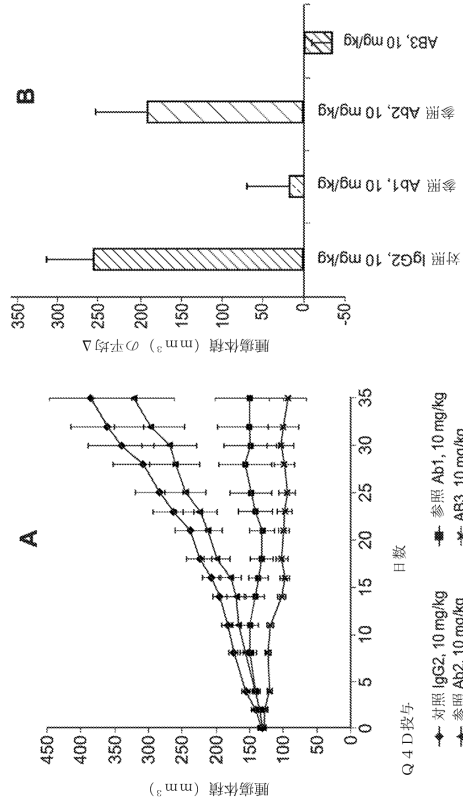
【図 6】



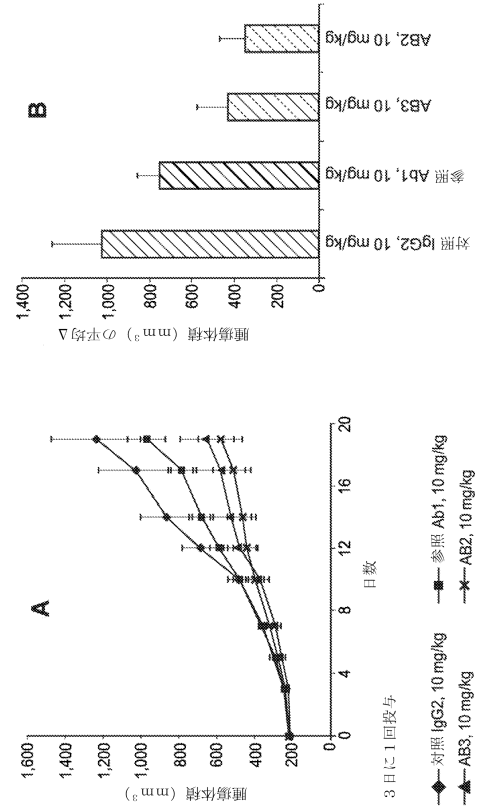
30

40

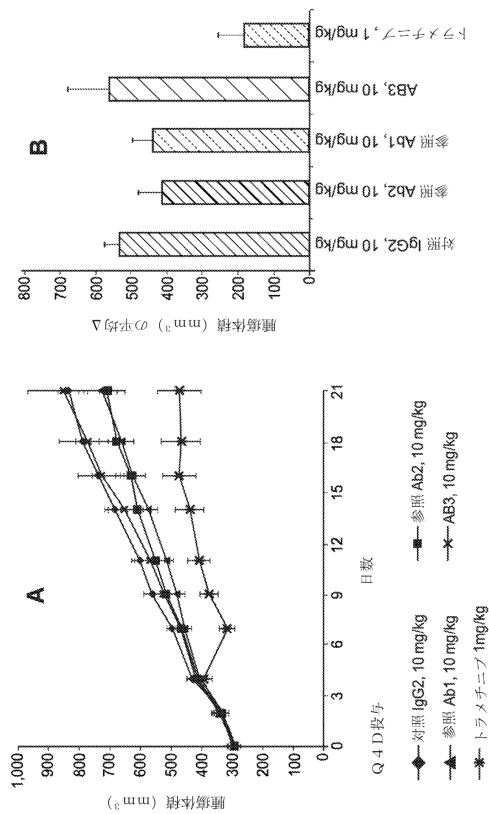
【図 7】



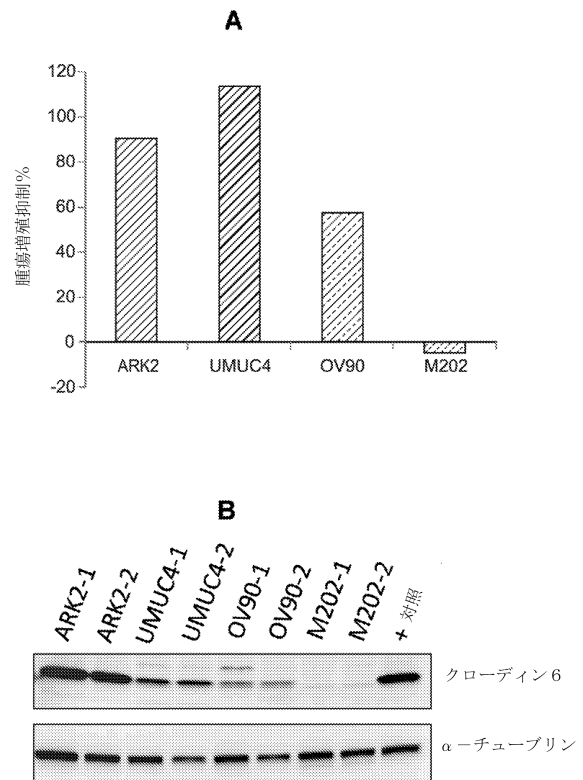
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

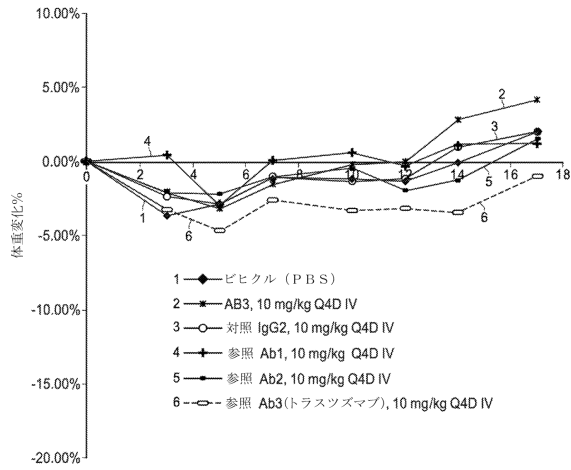
20

30

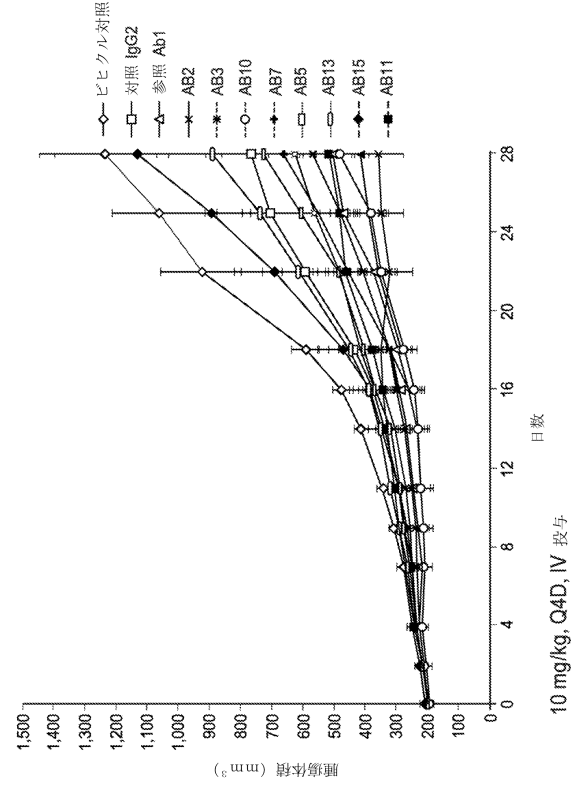
40

50

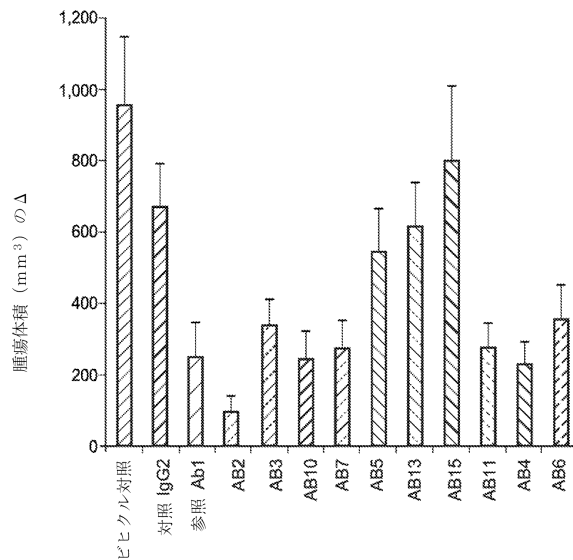
【図 1 1】



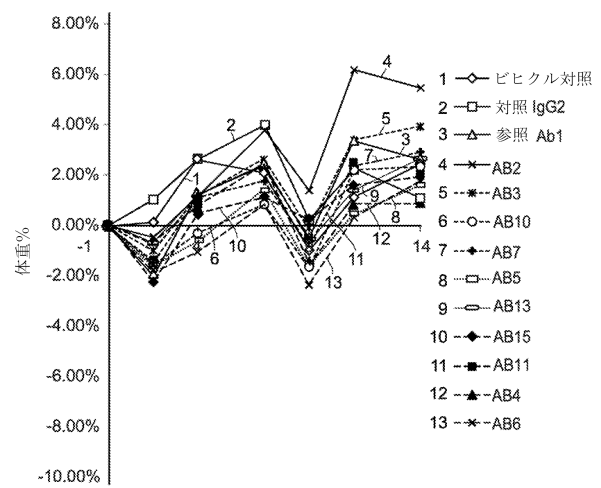
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 3】



10

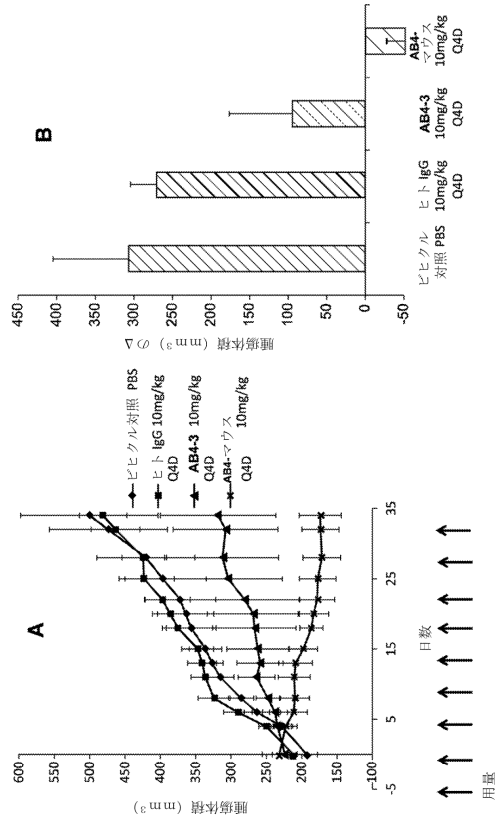
20

30

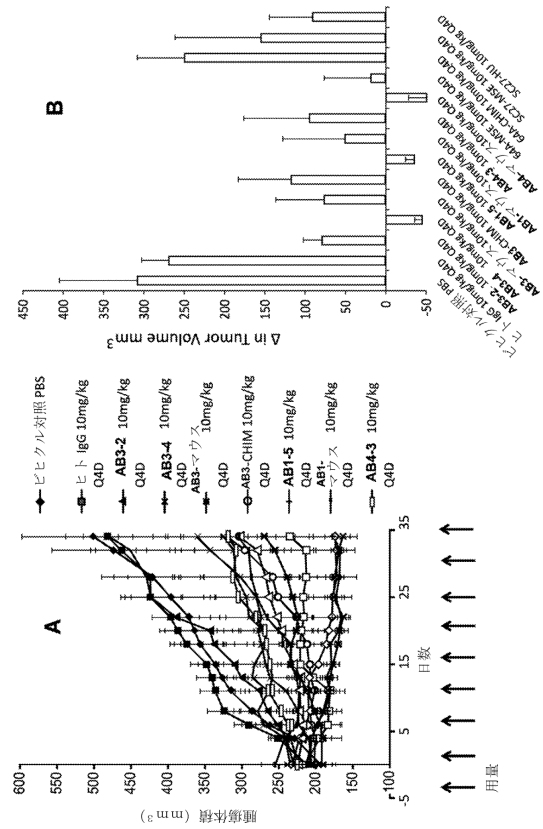
40

50

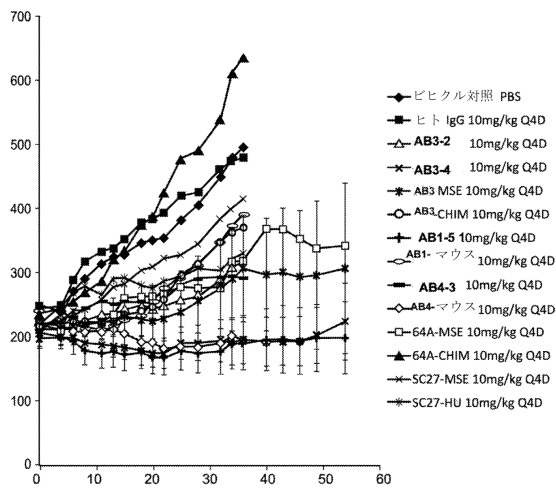
【図 18】



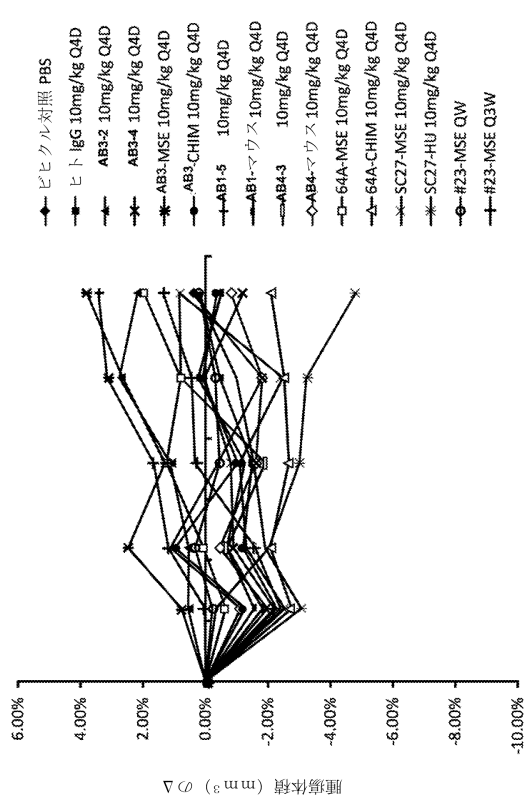
【図 19】



【図 20】



【図 21】



10

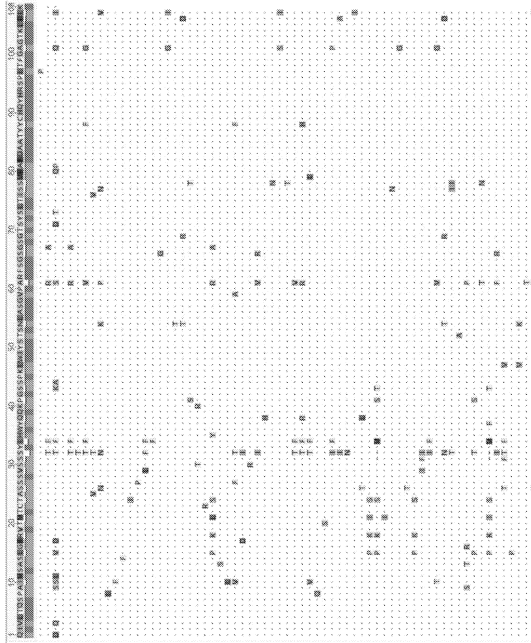
20

30

40

50

【図 2 6】



AB1 経路: S(L31)TIN, L(L33)FM, A(H60)RVPT, N(H53)TK

【図 2 7】

	D	E	F	G	H	I	J	K	L	N	O	P	Q
1	4.04	95	3.84	1.17	43.63	790.77	159.670.35	1.577.771	26.871.38	1.587.721	205.695.72	3.129.07	2.547.29
2	4.04	95	3.77	1.19	43.63	775.16	162.035.52	1.031.60	38.481.74	2.000.32	255.311.20	3.132.12	3.099.45
3	4.19	90	3.77	1.19	43.63	1.012.63	179.359.08	1.766.40	46.340.11	2.035.44	268.945.57	3.125.73	3.264.88
4	4.19	90	3.64	1.24	43.76	871.63	103.300.51	1.126.11	13.041.68	2.099.52	256.942.66	3.199.44	3.037.91
5	4.04	90	3.64	1.24	43.76	1.182.99	172.763.22	1.919.41	45.508.76	2.247.94	218.014.63	3.077.02	3.138.87
6	4.6	90	3.48	1.29	43.71	1.176.60	137.752.47	1.911.32	30.006.93	2.113.16	247.793.53	3.077.88	2.883.57
7	3.87	90	3.48	1.29	43.71	588.33	107.697.25	711.13	11.144.56	2.242.33	231.265.77	3.156.62	3.260.58
8	10	100	10.00	0.45	44.55	760.56	140.464.50	859.31	30.749.09	2.641.52	444.443.47	2.500.77	3.185.14
9	7.57	95	7.19	0.63	44.37	1.032.63	142.324.71	4.291.82	157.431.48	2.605.74	404.805.34	4.413.56	2.906.09
10	5.03	95	8.58	0.52	44.48	996.33	146.768.61	1.939.04	133.707.53	2.806.37	468.890.24	2.415.04	3.060.41
11	5.03	95	8.38	1.13	43.67	731.67	146.025.10	1.122.48	81.099.93	2.882.36	466.422.96	2.450.33	2.685.77
12	9.27	90	8.34	0.54	44.46	731.67	141.975.03	813.74	109.817.51	2.837.38	459.943.61	2.534.71	2.695.76
13	3.82	95	3.63	1.24	43.76	979.19	157.476.85	1.008.61	110.696.17	2.814.69	448.763.33	2.551.39	3.612.99
14	1.58	95	1.50	3.00	42.00	1.049.34	158.391.25	4.056.15	61.368.34	2.877.20	443.566.10	4.659.58	2.849.07
15	10	100	10.00	0.45	44.55								

列 L: CLDN 6 を人工的に過剰
発現する細胞株
列 K: CLDN 6 発現のない細胞株
列 L: CLDN 6 の内因的
発現の高い細胞株

行 9: AB-S7
行 10: AB-S8
行 11: AB-S9
行 12: AB-S10
行 13: AB-S11
行 14: AB-S12
行 15: ヒト化 AB1-11

行 1: AB-S1
行 2: AB-S2
行 3: AB-S3
行 4: AB-S4
行 5: AB-S5
行 6: AB-S6
行 8: ヒト化 AB3-7

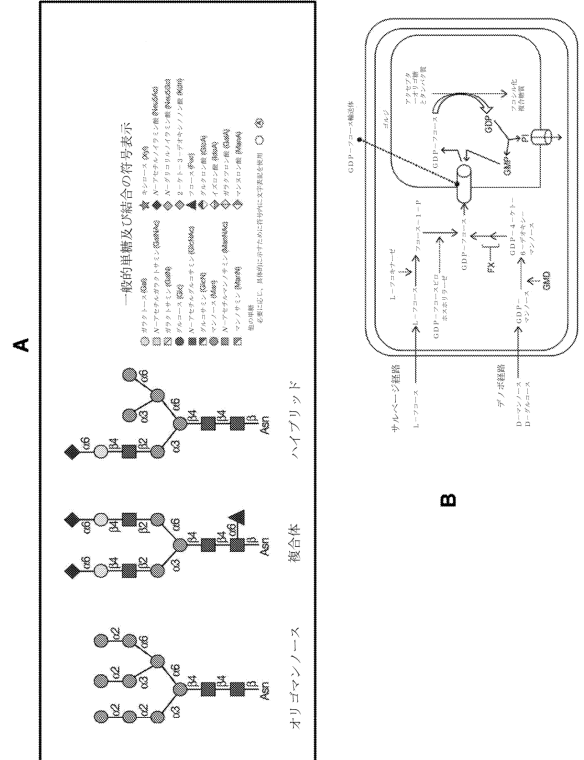
【図 2 8】

	AB-7	AB-51	AB-52	AB-53	AB-54	AB-55	AB-56	AB-11	AB-57	AB-58	AB-59	AB-510	AB-511	AB-512
1000	9,185.47	10,008.36	10,788.14	11,733.68	12,577.24	13,421.80	14,266.36	15,110.92	15,955.48	16,800.04	17,644.60	18,489.16	19,333.72	20,178.28
200	1,140.44	1,252.91	1,365.38	1,477.85	1,590.32	1,702.79	1,815.26	1,927.73	2,040.20	2,152.67	2,265.14	2,377.61	2,490.08	2,602.55
40	149.26	162.60	175.94	189.28	202.62	215.96	229.30	242.64	255.98	269.32	282.66	296.00	309.34	322.68
8	36.51	39.65	42.80	45.94	49.08	52.22	55.36	58.50	61.64	64.78	67.92	71.06	74.20	77.34
1.6	9.66	10.40	11.14	11.88	12.62	13.36	14.10	14.84	15.58	16.32	17.06	17.80	18.54	19.28
0.32	2.41	2.58	2.75	2.92	3.09	3.26	3.43	3.60	3.77	3.94	4.11	4.28	4.45	4.62

	AB-7	AB-51	AB-52	AB-53	AB-54	AB-55	AB-56	AB-11	AB-57	AB-58	AB-59	AB-510	AB-511	AB-512
1000	9,185.47	10,008.36	10,788.14	11,733.68	12,577.24	13,421.80	14,266.36	15,110.92	15,955.48	16,800.04	17,644.60	18,489.16	19,333.72	20,178.28
200	1,140.44	1,252.91	1,365.38	1,477.85	1,590.32	1,702.79	1,815.26	1,927.73	2,040.20	2,152.67	2,265.14	2,377.61	2,490.08	2,602.55
40	149.26	162.60	175.94	189.28	202.62	215.96	229.30	242.64	255.98	269.32	282.66	296.00	309.34	322.68
8	36.51	39.65	42.80	45.94	49.08	52.22	55.36	58.50	61.64	64.78	67.92	71.06	74.20	77.34
1.6	9.66	10.40	11.14	11.88	12.62	13.36	14.10	14.84	15.58	16.32	17.06	17.80	18.54	19.28
0.32	2.41	2.58	2.75	2.92	3.09	3.26	3.43	3.60	3.77	3.94	4.11	4.28	4.45	4.62

	AB-7	AB-51	AB-52	AB-53	AB-54	AB-55	AB-56	AB-11	AB-57	AB-58	AB-59	AB-510	AB-511	AB-512
1000	9,185.47	10,008.36	10,788.14	11,733.68	12,577.24	13,421.80	14,266.36	15,110.92	15,955.48	16,800.04	17,644.60	18,489.16	19,333.72	20,178.28
200	1,140.44	1,252.91	1,365.38	1,477.85	1,590.32	1,702.79	1,815.26	1,927.73	2,040.20	2,152.67	2,265.14	2,377.61	2,490.08	2,602.55
40	149.26	162.60	175.94	189.28	202.62	215.96	229.30	242.64	255.98	269.32	282.66	296.00	309.34	322.68
8	36.51	39.65	42.80	45.94	49.08	52.22	55.36	58.50	61.64	64.78	67.92	71.06	74.20	77.34
1.6	9.66	10.40	11.14	11.88	12.62	13.36	14.10	14.84	15.58	16.32	17.06	17.80	18.54	19.28
0.32	2.41	2.58	2.75	2.92	3.09	3.26	3.43	3.60	3.77	3.94	4.11	4.28	4.45	4.62

【図 2 9】



10

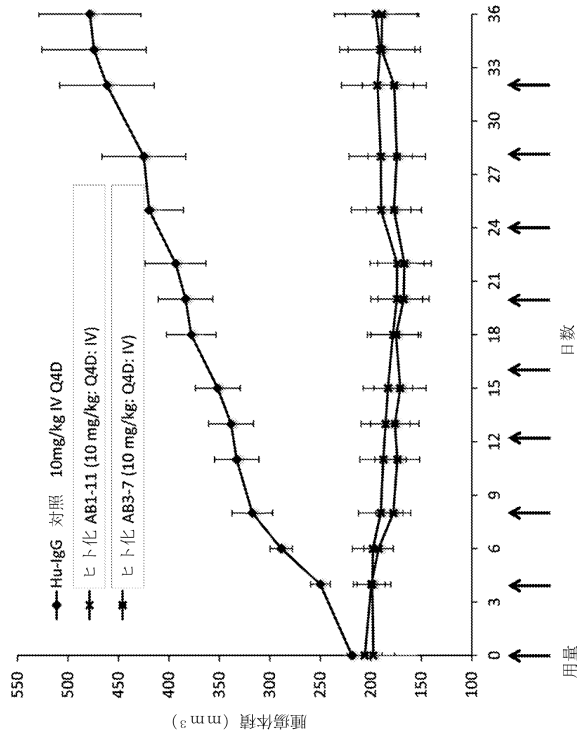
20

30

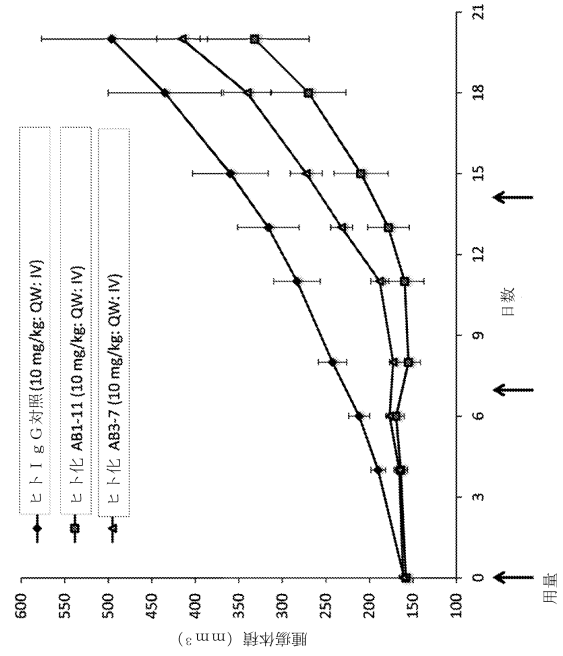
40

50

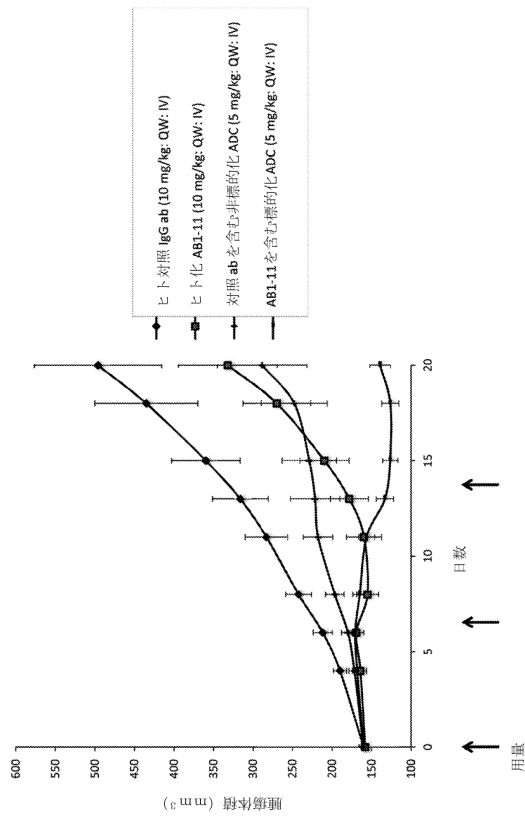
【図 30】



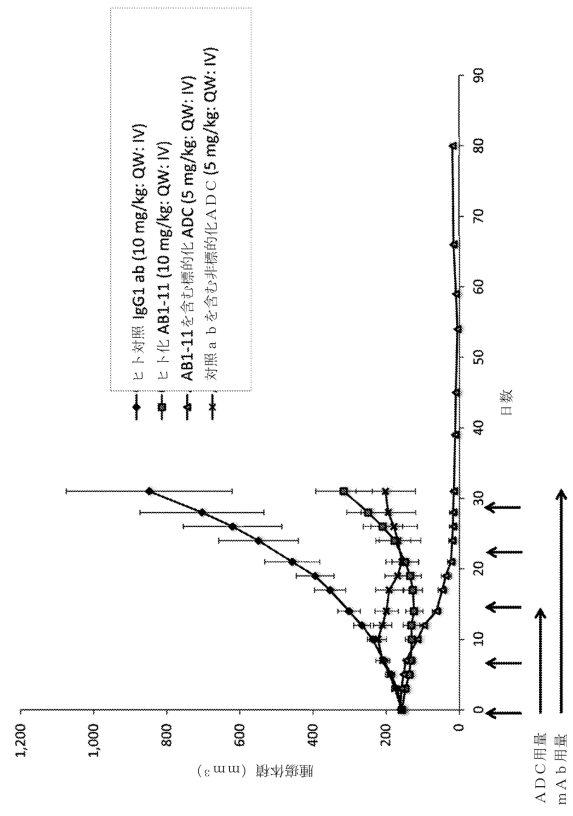
【図 31】



【図 32】



【図 33】



10

20

30

40

50

【図 3 4 A】

Wuxi Biologics
Sino Biological Inc.

概要表

ロット番号	HIC-DAR	SEC-DAR	D4 (%)	非複合体型 (%)	濃度 (mg/ml)	純度 (%)	HMWs (%)	遊離の抗体 (%)	エンドキシン (EU/mg)	収量 (mg)
WBP2227-20200120-23-7-ANC-vc-PAB-MMAE-CTRL	3.92	-	33.0	6.0	5.21	97.8	2.2	1.1	0.1	85
WBP2227-20200102-23-7-ANC-vc-PAB-MMAE-D4	4.06	-	74.9	2.4	4.15	96.8	3.2	<0.2	0.2	84
WBP2227-20200104-23-7-ANC-GGFG-MMAE-D4	3.91	-	71.6	3.0	3.90	98.2	1.8	0.4*	0.4*	55
WBP2227-20191231-23-7-CLZA-SN38-CTRL*	-	4.02	-	13.0	2.85	98.7	3.3	<1*	0.1*	52
WBP2227-20200113-23-7-CLZA-SN38-D4*	-	4.26	73.1	6.0	4.37	97.1	2.9	<1*	0.1*	62
WBP2227-20200102-23-7-ANC-GGFG-Dxd	3.90	-	64.1	6.2	3.22	97.1	2.9	0.4	0.1*	85
WBP2227-20200113-23-7-ANC-vc-PAB-Dxd†	3.90	-	61.4	10.3	4.25	97.9	2.1	1.87	0.2	86

機密資料

保管緩衝液及び温度：2.0mM L-ヒスチジン、pH5.5；-80℃

DAR及び非複合体型mAbはHIC-HPLCで決定

濃度はNanodrop Oneで決定；

純度及び遊離はSEC-HPLCで決定；

遊離抗体はC18カラムでRP-HPLCにより決定；

エンドキシンレベルはendosafe-PTS 9547で決定。

保管緩衝液及び温度：2.0mM コハク酸、pH6.0；-80℃

a. 保管緩衝液及び温度：2.0mM L-ヒスチジン、pH6.0；-80℃

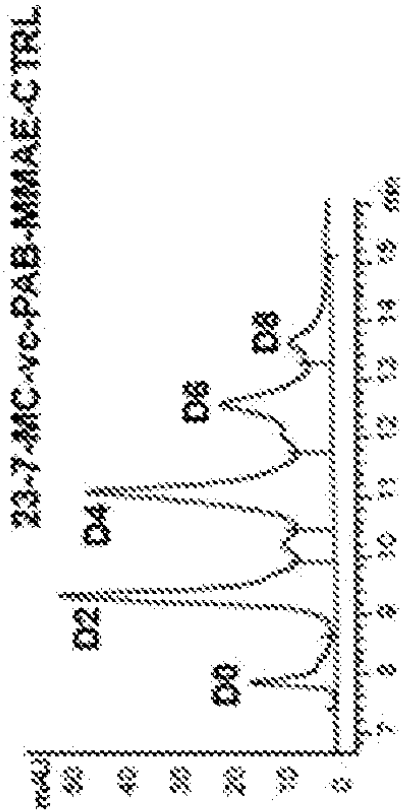
b. 遊離抗体はC4カラムでRP-HPLC-質量スペクトルにより決定；

c. 遊離抗体はC4カラムでRP-HPLC-質量スペクトルにより決定；

d. エンドキシンレベルは比濁時間分析リムルス試験で決定。

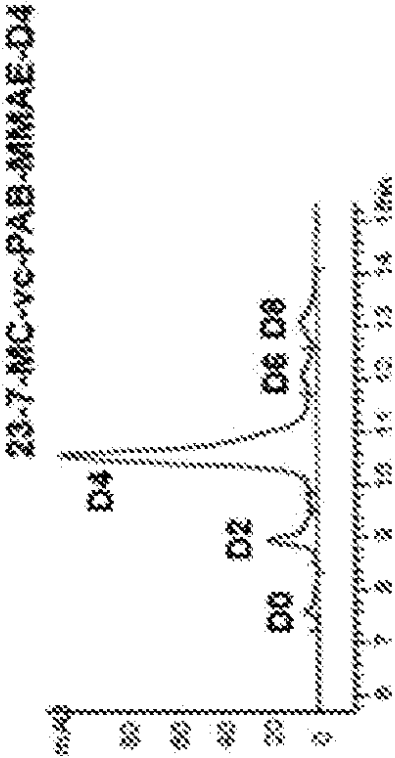
【図 3 4 B】

H I C - H P L C 産物



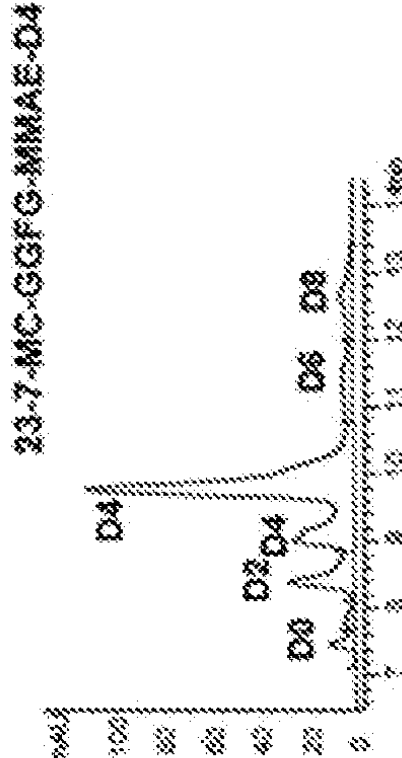
【図 3 4 C】

H I C - H P L C 産物



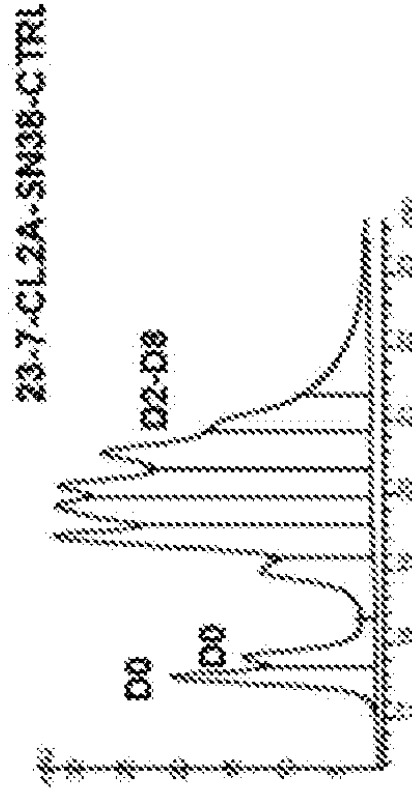
【図 3 4 D】

H I C - H P L C 産物



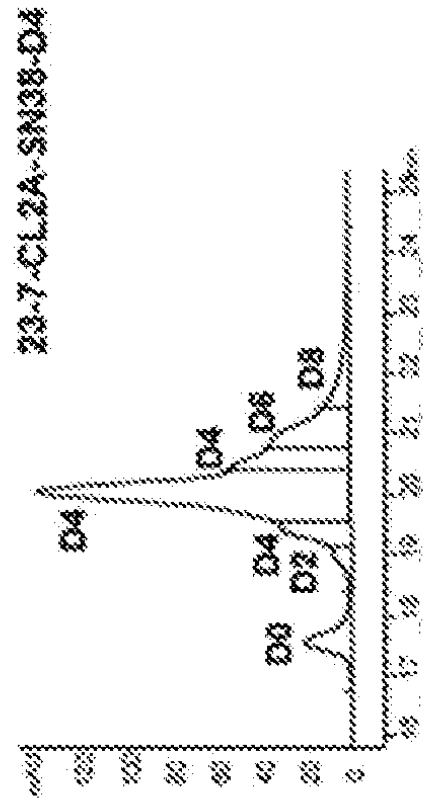
【図 3 4 E】

H I C - H P L C 産物



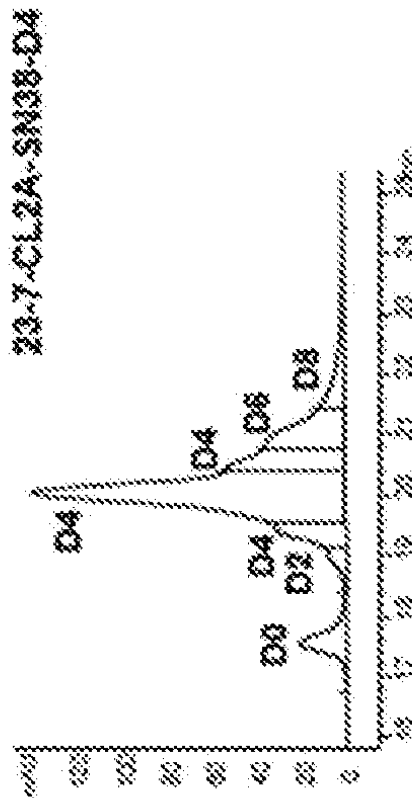
【図 3 4 F】

H I C - H P L C 産物



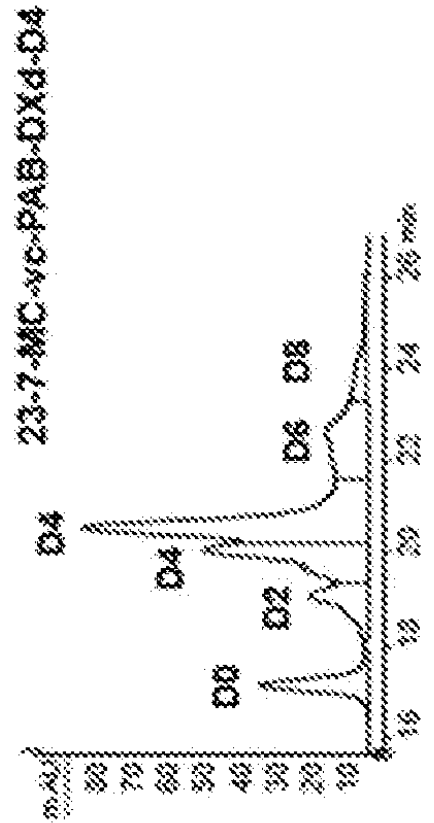
【図 3 4 G】

H I C - H P L C 産物



【図 3 4 H】

H I C - H P L C 産物



10

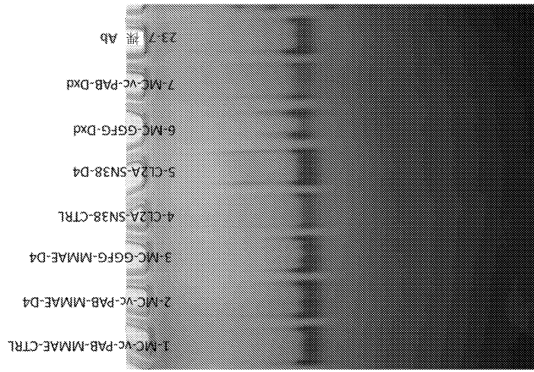
20

30

40

50

【図 3 5】



【図 3 6】

クローン-ADDS	フローでのラベル	0.1 μg Ab/試料				1 μg Ab/試料			
		陽性人工O/E細胞株	陰性細胞株	陽性細胞株	陰性細胞株	陽性人工O/E細胞株	陰性細胞株	陽性細胞株	陰性細胞株
		UM1C4	HEK293T CD19e-mGFP A1	M202	UM1C4	HEK293T CD19e-mGFP A1	M202	UM1C4	M202
1	WPB227-20191219-23-7-MC-vc-PAB-MMAE-CTRL	23-7-ADCl1	8,919.55	128,083.32	927.12	28,870.18	124,123.43	862.54	862.54
2	WPB227-20200102-23-7-MC-vc-PAB-MMAE-D4	23-7-ADCl2	9,446.99	126,605.78	893.31	26,899.61	247,005.61	913.31	913.31
3	WPB227-20200102-23-7-MC-GGFG-MMAE-D4	23-7-ADCl3	8,789.80	135,083.24	769.02	31,565.36	274,115.07	726.01	726.01
4	WPB227-20191231-23-7-G12A-SH8-CTRL	23-7-ADCl4	9,986.85	125,873.13	730.75	33,921.28	257,201.39	916.28	916.28
5	WPB227-20200113-23-7-G12A-SH8-D4	23-7-ADCl5	9,138.96	134,515.99	831.15	34,593.90	271,790.01	796.58	796.58
6	WPB227-20200107-23-7-MC-GGFG-D4	23-7-ADCl6	10,489.23	120,680.42	854.62	32,801.25	136,185.76	823.43	823.43
7	WPB227-20200113-23-7-MC-vc-PAB-D4d	23-7-ADCl7	10,793.44	110,404.22	741.90	32,637.45	134,073.99	939.43	939.43
8	CD19e #23-7 異体 A b (同一バッチ)	23-7-ADCl8	8,823.06	127,607.03	744.69	27,278.45	229,920.34	833.69	833.69
9	CD19e #23-7 異体 A b のみ	23-7-ADCl9	1,114.73	1,462.03	778.95	1,114.73	1,242.95	778.95	778.95

10

20

【図 37】

	CDLWG ADCs	KD						平衡曲線	細胞モザイク	細胞剥離剤
		KD (nM)	エー	%5%信頼区間(CI)	発見レベル	%5%信頼区間(CI)	発見レベル			
	PB9227-020119-23-7-MK-vc-PAB-MMAE-CTRIL	6.68	3.59	3.47 nM	14.99 nM	9.843<=0	5.714E-05	2.20E+06	500 pM, 10 nM	
	PB9227-02000102-23-7-MK-vc-PAB-MMAE-D4	5.34	2.89	1.59 nM	17.05 nM	9.154<=0	1.112E-05	1.47E+06	500 pM, 10 nM	
	PB9227-02000100-23-7-MK-GGFG-MMAE-D4	1.01	2.84	0.56 nM	1.65 nM	6.769<=0	5.015E-05	9.94E+05	500 pM, 10 nM	
	PB9227-019121-23-7-CJ2A-SN38-CTRIL	1.91	3.45	1.05 nM	3.38 nM	9.893<=0	7.024E-05	1.45E+06	500 pM, 10 nM	HEK293T CLUNG
	PB9227-02000103-23-7-CJ2A-SN38-D4	2.87	4.65	1.07 nM	7.74 nM	9.535<=0	4.935E-05	1.28E+06	500 pM, 10 nM	Venere
	PB9227-02000107-23-7-CJ2A-SN38-Ddd	3.01	3.05	1.46 nM	6.47 nM	9.922<=0	6.100E-05	2.00E+06	500 pM, 10 nM	mSP A11
	PB9227-02000120-23-7-MK-vc-PAB-Ddd	3.42	2.52	2.10 nM	5.42 nM	5.176E<=0	3.440E-05	7.64E+05	500 pM, 10 nM	
	JUNG lab P23-7 (現 A b)	1.13	2.57	0.53 nM	2.03 nM	4.821<=0	3.155E-05	6.99E+05	500 pM, 10 nM	

【図 38】

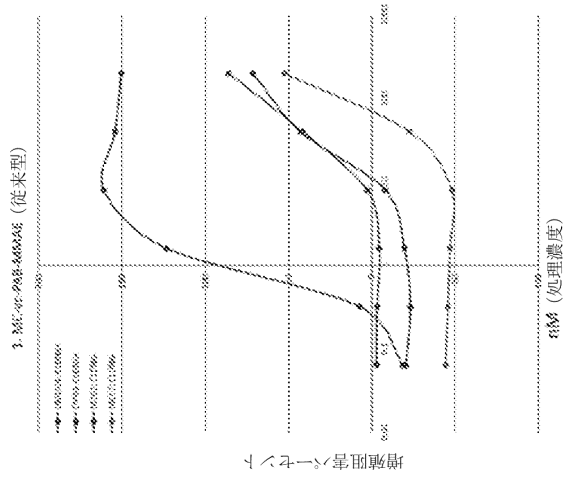
[illegible]

30

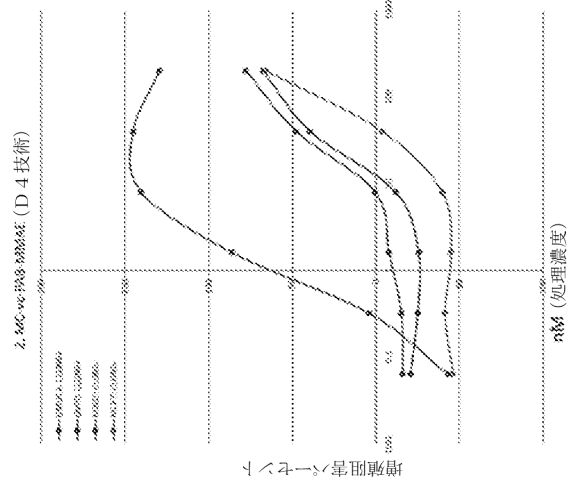
40

50

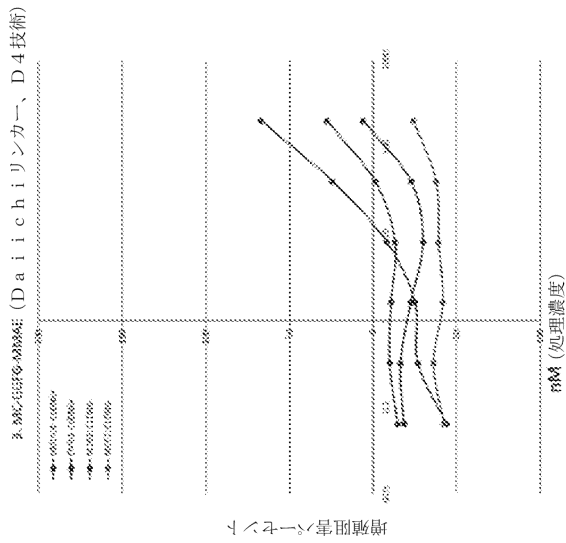
【図 3 9 A】



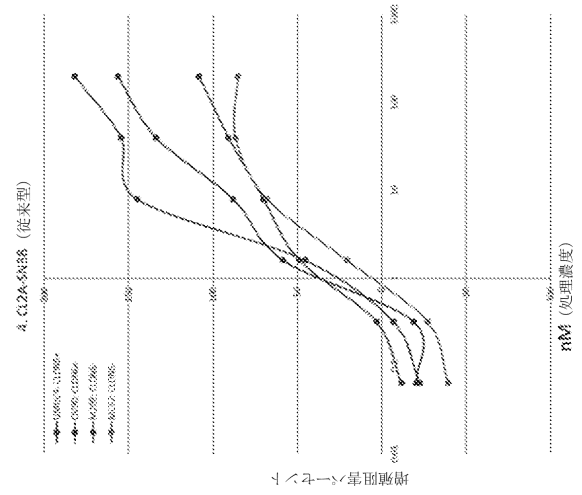
【図 3 9 B】



【図 3 9 C】



【図 3 9 D】



10

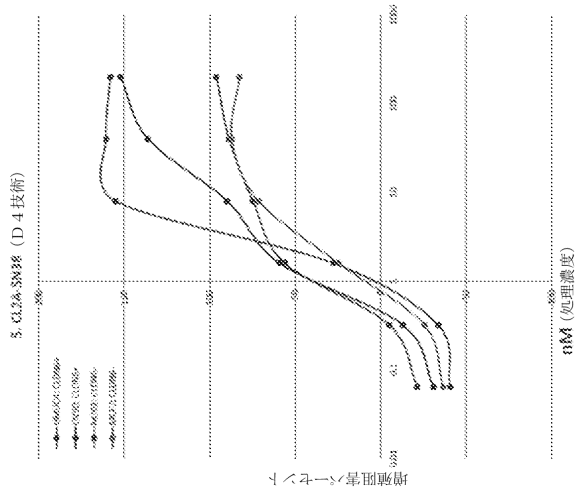
20

30

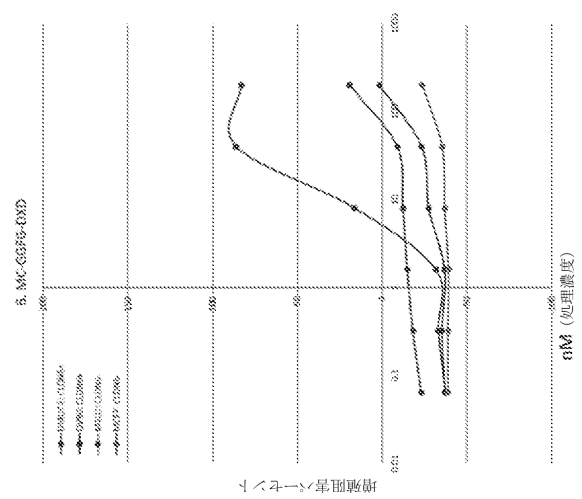
40

50

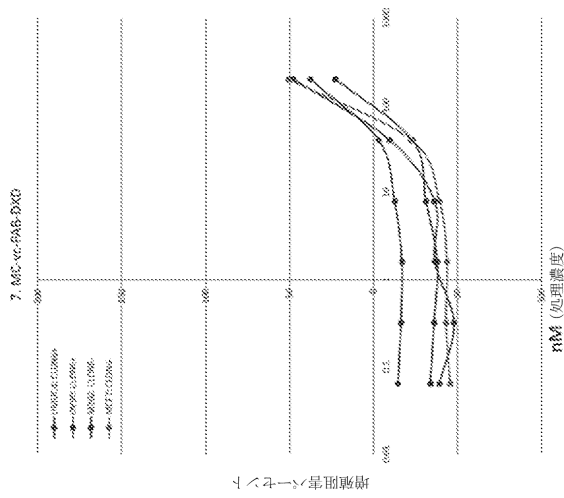
【図 3 9 E】



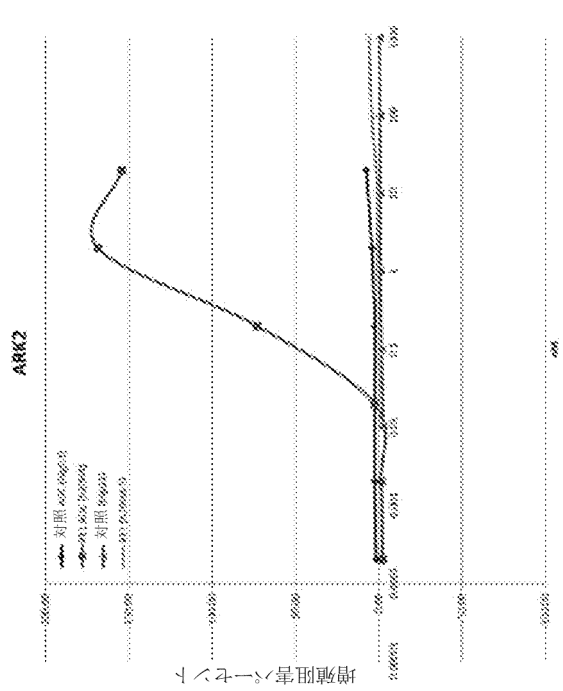
【図 3 9 F】



【図 3 9 G】



【図 3 9 H】



10

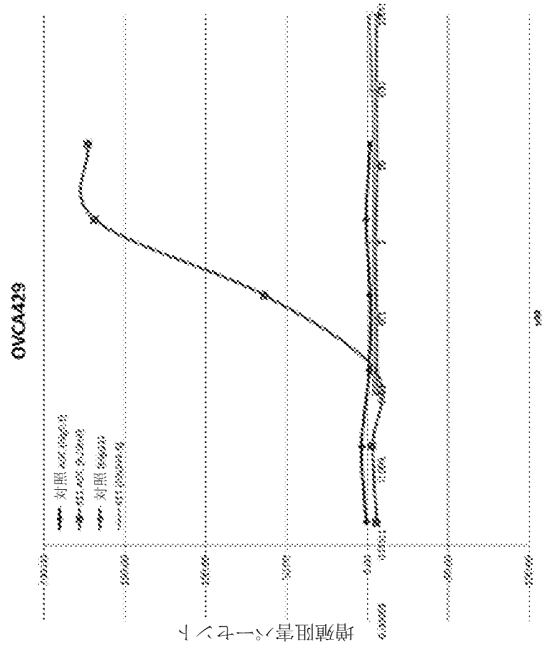
20

30

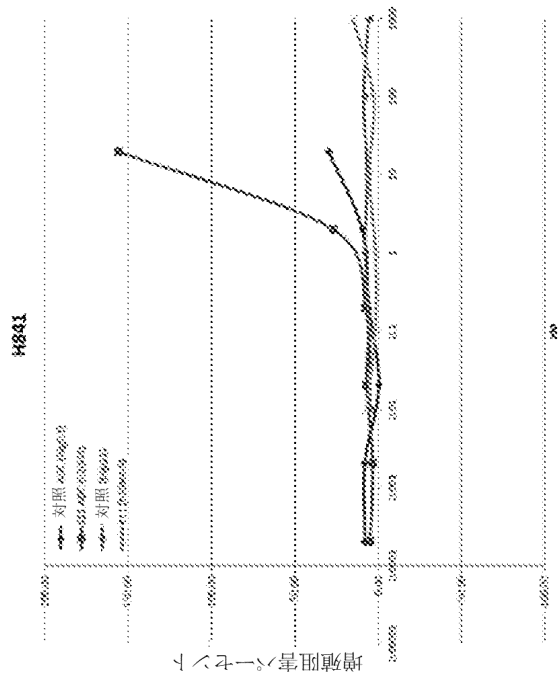
40

50

【図 3 9 I】



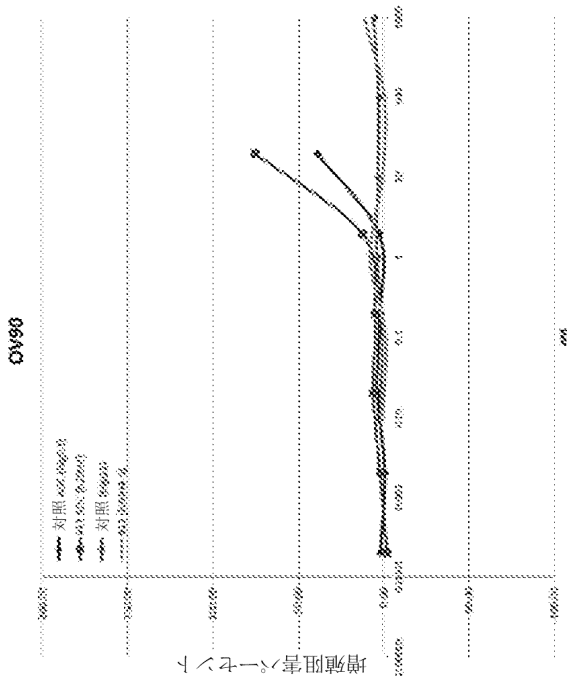
【図 3 9 J】



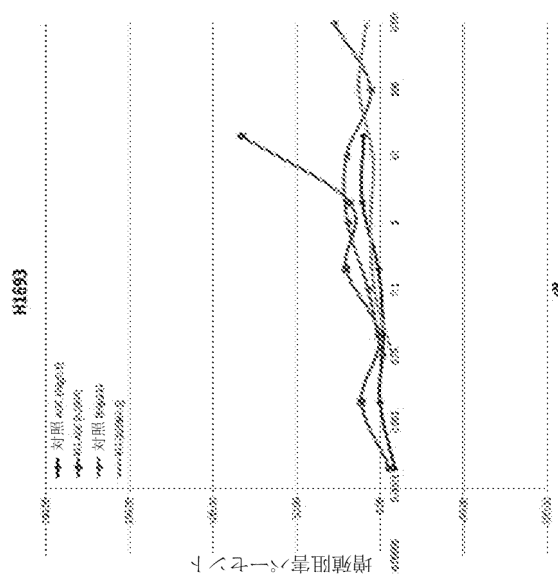
10

20

【図 3 9 K】



【図 3 9 L】

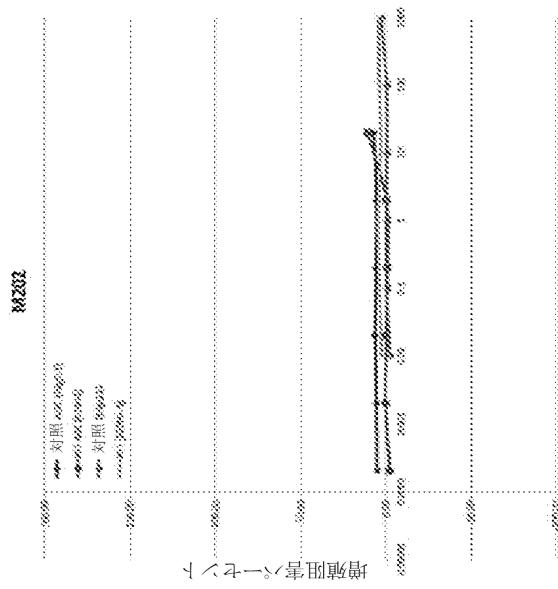


30

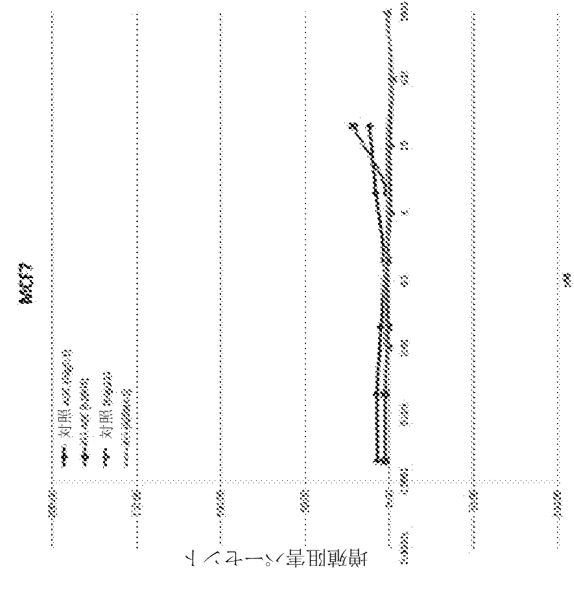
40

50

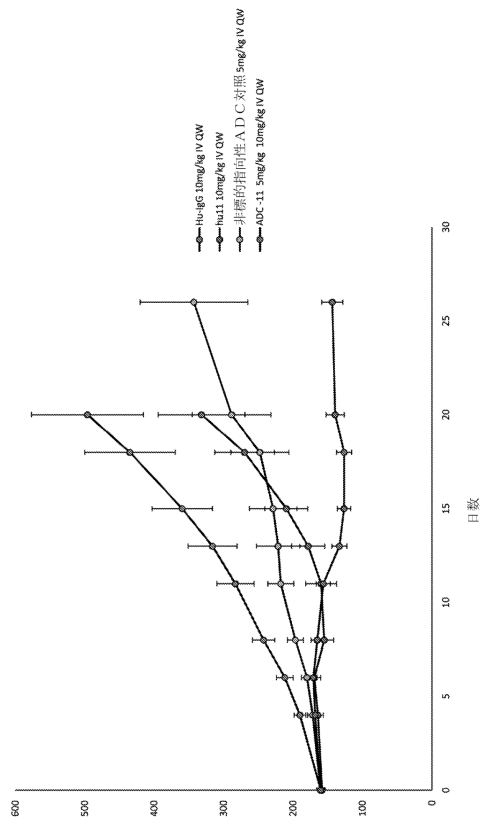
【図 3 9 M】



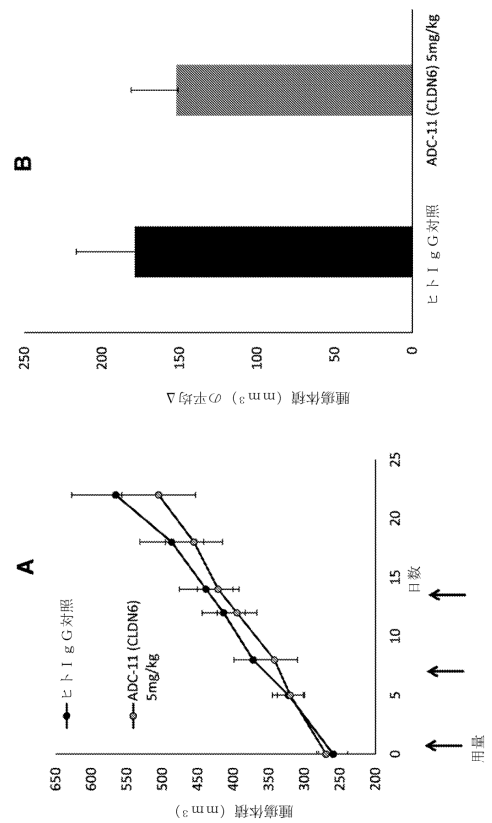
【図 3 9 N】



【図 4 0】



【図 4 1】



10

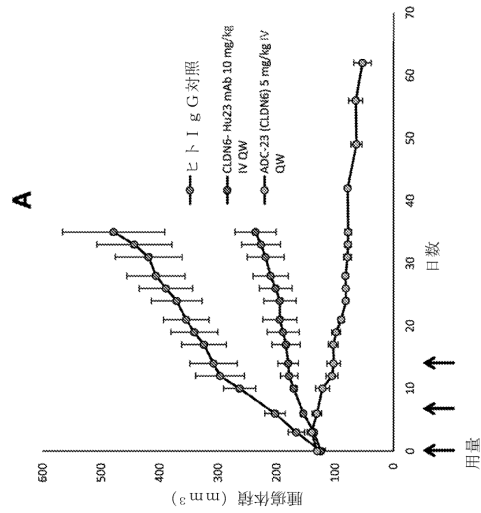
20

30

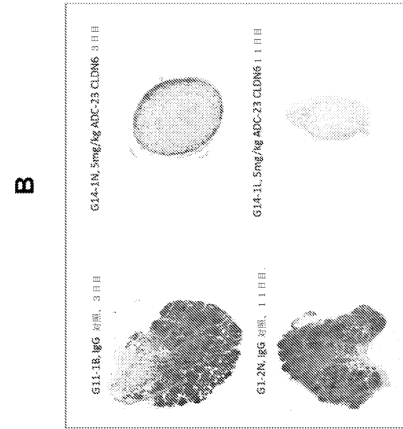
40

50

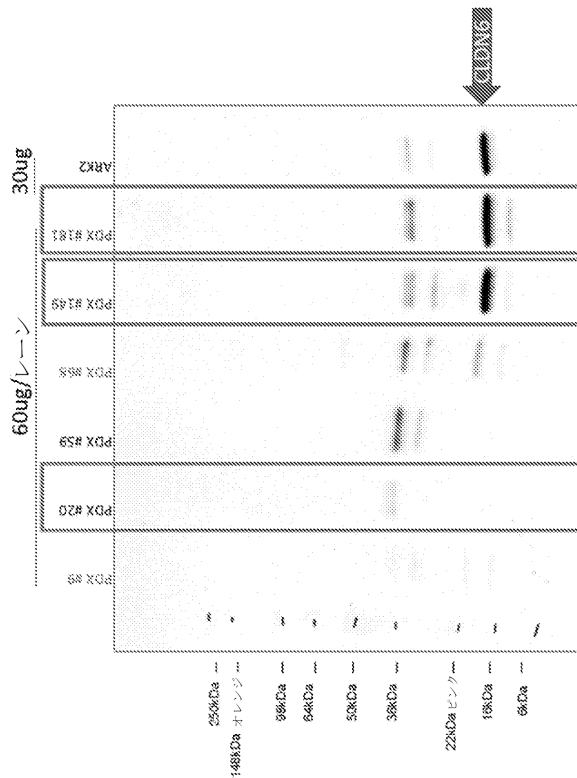
【図 4 2 A】



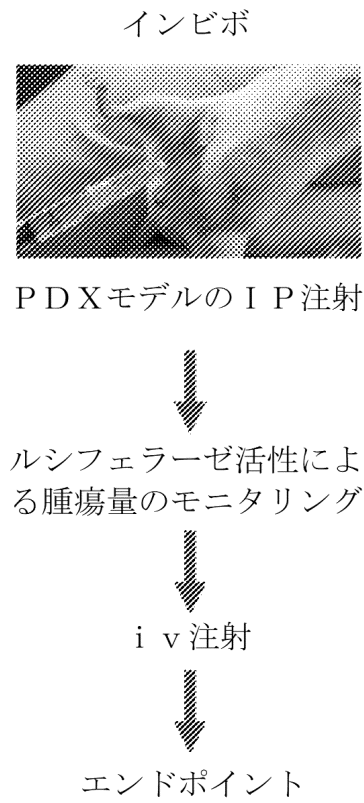
【図 4 2 B】



【図 4 3 A】



【図 4 3 B】



10

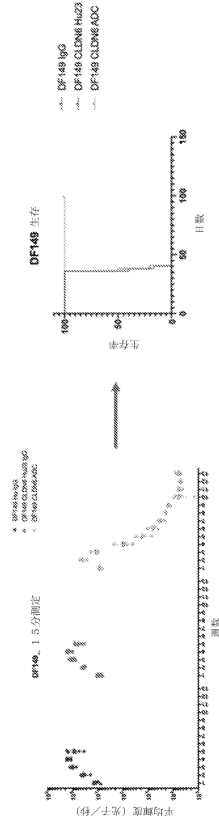
20

30

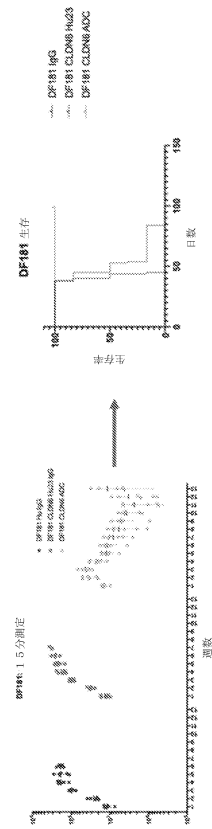
40

50

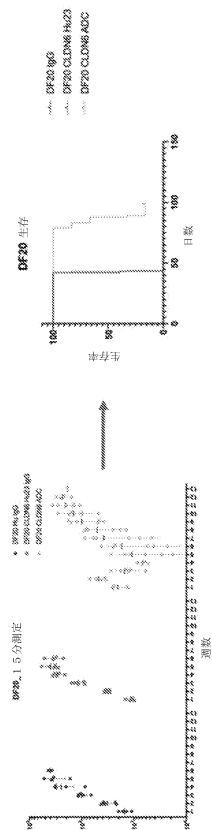
【図 4 3 C】



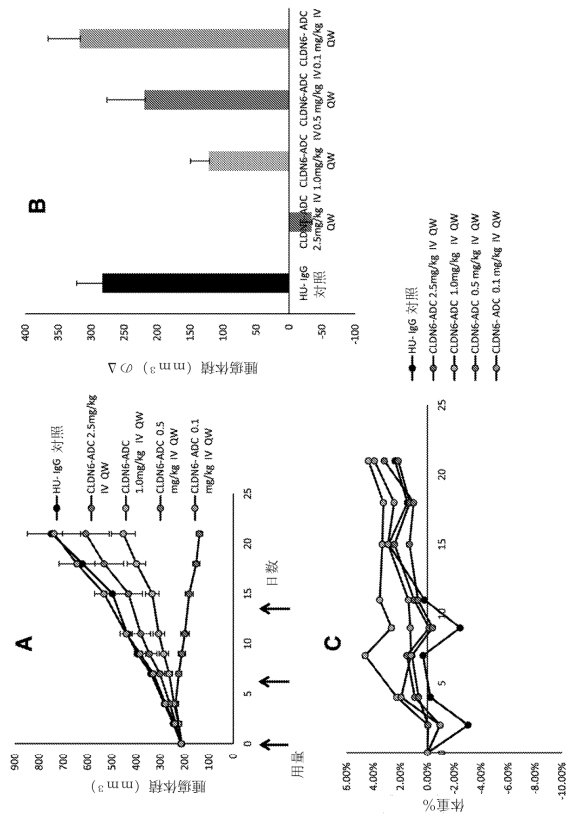
【図 4 3 D】



【図 4 3 E】



【図 4 4】



10

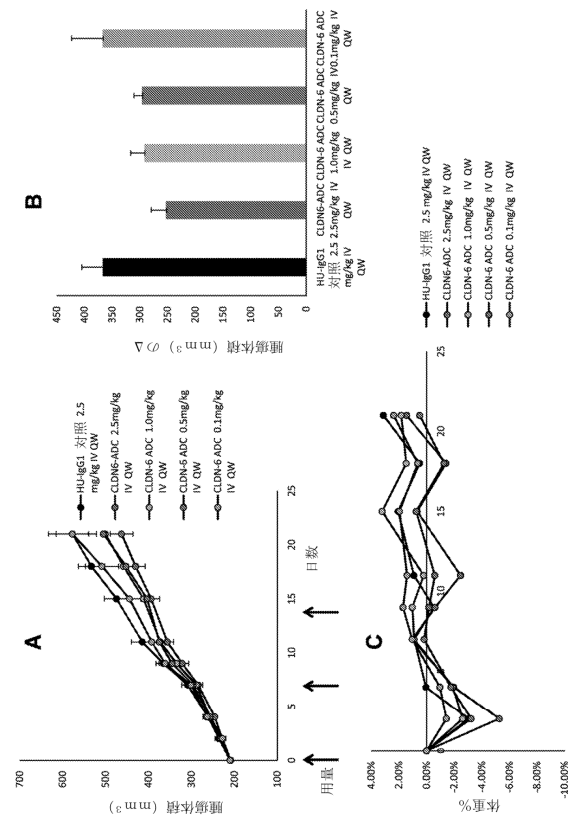
20

30

40

50

【図 4 5】



【配列表】

0007682798000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 P	35/00	
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	A 6 1 K	47/68	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
		C 1 2 N	15/13	

ルシャー ブールバード 1 0 8 8 9 スイート 9 2 0

(72)発明者 マクダーモット, マルティナ, エス.

アメリカ合衆国 9 0 0 9 5-7 1 9 1 カリフォルニア州, ロサンゼルス, ウィルシャー ブール
バード 1 0 8 8 9 スイート 9 2 0

(72)発明者 オブライエン, ニール, エー.

アメリカ合衆国 9 0 0 9 5-7 1 9 1 カリフォルニア州, ロサンゼルス, ウィルシャー ブール
バード 1 0 8 8 9 スイート 9 2 0

(72)発明者 パラッツォロ, マイケル, ジェイ.

アメリカ合衆国 9 0 0 9 5-7 1 9 1 カリフォルニア州, ロサンゼルス, ウィルシャー ブール
バード 1 0 8 8 9 スイート 9 2 0

(72)発明者 スレイモン, デニス

アメリカ合衆国 9 0 0 9 5-7 1 9 1 カリフォルニア州, ロサンゼルス, ウィルシャー ブール
バード 1 0 8 8 9 スイート 9 2 0

(72)発明者 ボン エウウ, エリカ

アメリカ合衆国 9 0 0 9 5-7 1 9 1 カリフォルニア州, ロサンゼルス, ウィルシャー ブール
バード 1 0 8 8 9 スイート 9 2 0

(72)発明者 バウワーズ, ピーター

アメリカ合衆国 9 0 0 9 5-7 1 9 1 カリフォルニア州, ロサンゼルス, ウィルシャー ブール
バード 1 0 8 8 9 スイート 9 2 0

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献 特表2016-533738 (JP, A)

特表2014-516956 (JP, A)

特表2019-500335 (JP, A)

特表2016-500059 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

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

C 0 7 K 1 9 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 6 8

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)