

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-110002

(P2017-110002A)

(43) 公開日 平成29年6月22日(2017.6.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	4 C 0 8 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-243252 (P2016-243252)	(71) 出願人	500553659
(22) 出願日	平成28年12月15日 (2016.12.15)		アジェンシス、インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2013-531875 (P2013-531875) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン タモニカ スチュアート ストリート 1 8 0 0
原出願日	平成23年9月29日 (2011.9.29)	(71) 出願人	507154181
(31) 優先権主張番号	61/387, 933		シアトル ジェネティクス インコーポレ イティッド
(32) 優先日	平成22年9月29日 (2010.9.29)		アメリカ合衆国 ワシントン州 ボセル サウス イースト 30 ス ドライブ 2 1 8 2 3
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 191P4D12タンパク質に結合する抗体薬物結合体 (ADC)

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌を処置するため191P4D12タンパク質およびその変異体に結合する抗体薬物結合体(ADC)の提供。

【解決手段】 ある特定のアミノ酸配列に示された重鎖可変領域相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列を有するCDRを含む重鎖可変領域および別の特定のアミノ酸配列に示された軽鎖可変領域CDRのアミノ酸配列を有するCDRを含む軽鎖可変領域を含む、191P4D12抗体またはその抗原結合フラグメント。該抗体またはその抗原結合フラグメントは細胞傷害剤と結合体化されてよい。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO:7に示された重鎖可変領域相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列を有するCDRを含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:8に示された軽鎖可変領域CDRのアミノ酸配列を有するCDRを含む軽鎖可変領域を含む、191P4D12抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

SEQ ID NO:7の20番目のアミノ酸(グルタミン酸)～136番目のアミノ酸(セリン)の範囲のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域およびSEQ ID NO:8の23番目のアミノ酸(アスパラギン酸)～130番目のアミノ酸(アルギニン)の範囲のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、請求項1記載の抗体または抗原結合フラグメント。

10

【請求項 3】

SEQ ID NO:7の20番目のアミノ酸(グルタミン酸)～466番目のアミノ酸(リジン)の範囲のアミノ酸配列からなる重鎖およびSEQ ID NO:8の23番目のアミノ酸(アスパラギン酸)～236番目のアミノ酸(システイン)の範囲のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、請求項2記載の抗体。

【請求項 4】

Fab、F(ab')₂、Fv、またはscfvフラグメントである、請求項1または2記載の抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

完全ヒト抗体である、請求項1または2記載の抗体。

20

【請求項 6】

組換えにより産生された、請求項1～5のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 7】

American Type Culture Collection(ATCC)アクセッション番号PTA-11267で寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、およびATCCアクセッション番号PTA-11267で寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

ATCCアクセッション番号PTA-11267で寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体の重鎖のアミノ酸配列からなる重鎖、およびATCCアクセッション番号PTA-11267で寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体の軽鎖のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、請求項7記載の抗体。

30

【請求項 9】

細胞傷害剤と結合体化された前記請求項のいずれか一項記載の抗体または抗原結合フラグメントを含む、抗体薬物結合体。

【請求項 10】

前記細胞傷害剤がモノメチルアウリスタチンEである、請求項9記載の抗体薬物結合体。

【請求項 11】

癌治療において使用するための、請求項9または請求項10記載の抗体薬物結合体。

40

【請求項 12】

癌が膵臓癌、肺癌、膀胱癌、または乳癌である、請求項11記載の抗体薬物結合体。

【請求項 13】

放射線または化学療法剤と組み合わせて癌治療において使用するための、請求項9または請求項10記載の抗体薬物結合体。

【請求項 14】

請求項9または請求項10記載の抗体薬物結合体をヒト用単位剤形で含む、薬学的組成物。

【請求項 15】

癌治療において使用するための、請求項14記載の薬学的組成物。

50

【請求項 16】

癌が膵臓癌、肺癌、膀胱癌、または乳癌である、請求項15記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

請求項9または請求項10記載の抗体薬物結合体を対象に投与する工程を含む、対象において癌を治療するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は仮特許出願ではなく、2010年9月29日に本願された米国特許仮出願第61/387,933号からの優先権の恩典を主張する。本段落において列挙された、それぞれの出願の内容は参照により本明細書に完全に組み入れられる。

10

【0002】

EFS-WEBを介して提出された配列表の記載

MPEP § 1730 II.B.2(a)(C)において認可され、示されているように、USPTO EFS-WEBサーバを介した以下の配列表電子出願の全内容はその全体が、全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられる。配列表は、以下のように、電子出願されたテキストファイル上で特定される。

20

ファイル名	作成日	サイズ(バイト)
511582008250Seqlist.txt	2011年9月27日	41,949バイト

【0003】

連邦政府の支援による研究によってなされた発明に対する権利の記載

該当なし

【0004】

発明の分野

本明細書に記載の本発明は、191P4D12と称されるタンパク質に結合する抗体、その結合フラグメント、および抗体薬物結合体(ADC)に関する。本発明はさらに、191P4D12を発現する癌の処置において有用な、予後判定方法、予防方法および治療方法、ならびに組成物に関する。

30

【背景技術】

【0005】

発明の背景

癌は、冠動脈疾患に次いで第2の主要なヒトの死因である。世界中で、毎年何百万人もの人々が癌で亡くなっている。米国癌学会(American Cancer Society)によって報告されるように、米国内のみで、癌は、年間50万人を超える人々の死亡を引き起こし、1年に120万人を超える新規症例が診断されている。心疾患による死亡が大幅に減少している一方で、癌による死亡は概して増加している。次世紀の早い時期には、癌は第1の死因となることが予測される。

【0006】

40

世界的に、幾種かの癌が主要な死因として際立っている。特に、肺、前立腺、乳房、結腸、膵臓、卵巣および膀胱の癌腫は、主要な癌死因である。これらおよび実質的に全ての他の癌腫は、共通の致死性の特徴を共有する。ほとんど例外なく、癌腫からの転移疾患は致命的である。さらに、原発性癌から初期段階で生き残った癌患者でさえ共通体験として人生が劇的に変化すると示されている。多くの癌患者は、再発もしくは処置の失敗の可能性の認識によって強い不安が駆り立てられる。多くの癌患者は、処置後の身体的衰弱を経験する。さらに、多くの癌患者は再発を経験する。

【0007】

世界的に、前立腺癌は、男性において4番目に多い癌である。北米および北欧において、前立腺癌は、男性における圧倒的に最も一般的な癌であり、男性における第2の癌死因

50

である。米国内のみで、年間30,000人を有に超える男性が、この疾患で死亡する。肺癌に次いで第2位である。これらの数値の大きさにもかかわらず、転移性前立腺癌の有効な処置は未だ存在しない。外科的前立腺切除、放射線治療、ホルモン除去(hormone ablation)治療、外科的去勢および化学療法が主要な処置様式であり続けている。残念なことに、これらの処置は多くは有効でなく、しばしば、望ましくない結果を伴う。

【0008】

診断の最前線において、初期段階の限局性腫瘍を正確に検出することができる前立腺腫瘍マーカーがないことは、依然として、疾患の診断および管理における深刻な制限である。血清前立腺特異的抗原(PSA)アッセイが非常に有用なツールであり、その特異性および一般的有用性は、いくつかの重要な点を欠くと広くみなされている。

10

【0009】

さらなる前立腺癌特異的マーカーの同定における進歩は、マウスにおいて疾患の異なった段階を再現可能な前立腺癌異種移植片を作製することによって改善されてきた。LAPC(Los Angeles Prostate Cancer)異種移植片は、重症複合型免疫不全(SCID)マウスにおける継代から生き残った前立腺癌異種移植片であり、アンドロゲン依存からアンドロゲン非依存への移行を模倣する能力を示している(Klein, et al., 1997 Nat. Med. 3:402(非特許文献1))。つい最近同定された前立腺癌マーカーには、PCTA-1(Su, et al., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7252(非特許文献2))、前立腺特異的膜抗原(PSMA)(Pinto, et al., Clin. Cancer Res. 1996 Sep 2 (9):1445-51(非特許文献3))、STEAP(Hubert, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999 Dec 7; 96(25):14523-8(非特許文献4))、および前立腺幹細胞抗原(PSCA)(Reiter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998 95:1735(非特許文献5))が含まれる。

20

【0010】

PSAなどの以前に同定されているマーカーは、前立腺癌の診断および処置のための努力を促進してきたが、診断および治療のさらなる改善のために、前立腺癌および関連する癌のさらなるマーカーおよび治療標的の同定が必要とされている。2000年に米国において、推定130,200件の結腸直腸癌が、93,800件の結腸癌および36,400件の直腸癌を含めて発生した。

【0011】

結腸直腸癌は、男性および女性において3番目によく見られる癌である。発症率は1992～1996年の間に大幅に低下した(年-2.1%)。研究から、これらの低下は、スクリーニングおよびポリープ除去が増加して、ポリープから浸潤癌への進行を防いだことによるものと示唆されている。2000年には56,300人が死亡したと見積もられ(結腸癌により47,700人、直腸癌により8,600人)、これは、米国での癌死亡の約11%を占めている。

30

【0012】

現在、外科手術は、結腸直腸癌および広がっていない癌の最も一般的な治療の形であり、治癒可能なことが多い。化学療法または化学療法+放射線は、腸壁に深い穴が開いている癌またはリンパ節まで広がっている癌のあるほとんどの患者に対して、外科手術の前または後に行われる。永久的結腸瘻造設(身体廃棄物を排泄するための腹部開口部の作製)が結腸癌では時として必要であり、直腸癌ではめったに必要とされない。結腸直腸癌の有効な診断法および治療法が依然として必要とされている。

40

【0013】

米国における癌の全ての新規症例の中で、膀胱癌は男性において約5%に相当し(5番目に多い新生物)、女性において3%に相当する(8番目に多い新生物)。発症率は、高齢人口が増加すると同時に、ゆっくりと増加している。1998年には、男性39,500件および女性15,000件を含めて推定54,500件の症例が存在した。米国における年齢調整した発症率は、男性について100,000人あたり32件、女性において100,000人あたり8件である。過去の男性/女性比は3:1であったが、これは、女性の喫煙傾向に関連して減少しているかもしれない。1998年に、膀胱癌で推定11,000件(7,800人は男性であり、3,900人は女性である)の死亡が存在した。膀胱癌の発症率および死亡率は年齢に伴って急激に増加し、人口がより高齢

50

化するにつれて高まる問題である。

【0014】

ほとんどの膀胱癌は膀胱において再発する。膀胱癌は、膀胱の経尿道的切除(TUR)と膀胱内の化学療法もしくは免疫治療との組み合わせによって管理される。膀胱癌の多病巣性かつ再発性の性質はTURの限界を示す。ほとんどの筋肉浸潤癌はTURだけでは治癒しない。根治的膀胱切除および尿路変向は、癌を消滅させる最も有効な手段であるが、排尿機能および性機能に否定できない影響を有する。膀胱癌患者に有益な治療法が依然として極めて必要とされ続けている。

【0015】

2000年に、肺癌および気管支癌の推定164,100件の新規症例が存在し、米国の全ての癌診断の14%に相当する。肺癌および気管支癌の発症率は、男性において、1984年に100,000人あたり86.5件の高さから、1996年に70.0件と大幅に低下している。1990年代に、女性における増加の速度が遅くなり始めた。1996年には、女性における発症率は100,000人あたり42.3件であった。

【0016】

肺癌および気管支癌は、2000年に推定156,900件の死亡をもたらし、全ての癌死亡の28%に相当する。1992～1996年の間、肺癌の死亡率は、男性において大幅に低下した(年-1.7%)。一方で、女性の死亡率はなお大幅に増加していた(年0.9%)。1987年から毎年、40年以上にわたって女性の主要な癌死因であった乳癌よりも肺癌によって多くの女性が死亡している。肺癌の発症率および死亡率の減少は、ここ30年間にわたる喫煙率の低下に起因する可能性が最も高い。しかしながら、女性における喫煙傾向の減少は、男性におけるそれよりも大きく劣る。成人の煙草使用の低下は鈍化しているが、若年者における煙草使用が再び増加していることが懸念される。

【0017】

肺癌および気管支癌についての処置選択肢は、癌のタイプおよび段階によって決定され、外科手術、放射線治療、および化学療法が含まれる。多くの限局性癌について、外科手術は、通常、選り抜きの処置である。疾患は、通常、発見された時までには拡散しているので、放射線治療および化学療法は、しばしば外科手術と組み合わせられる必要がある。化学療法のみもしくは放射線と組み合わせた化学療法は、小細胞肺癌の選り抜きの処置である。このレジメンにおいて、患者の多くの割合は寛解を経験し、この寛解は場合によっては長く続く。しかし、肺癌および気管支癌に有効な処置および診断アプローチが必要とされ続けている。

【0018】

推定182,800件の浸潤性乳癌の新規症例が、2000年に米国内の女性の間で発症したと予測された。さらに、約1,400件の乳癌の新規症例が、2000年に男性において診断されたと予測された。女性における乳癌発症率は、1980年代に年約4%増加した後、1990年代には100,000人あたり約110.6件まで低下した。

【0019】

米国のみで、2000年に、乳癌に起因する推定41,200件の死亡(40,800件は女性、400件は男性)が存在した。乳癌は、女性における癌死亡の間で2番目のランクである。最も最近のデータによれば、死亡率は、白人および黒人の両方で、1992～1996年の間に大幅に低下しており、若い女性の間で最も大きく低下した。これらの低下は、おそらく、早期検出および処置の改善の結果であった。

【0020】

医学的状況および患者の好みを考慮して、乳癌の処置は、ランペクトミー(腫瘍の局所的除去)および腋下のリンパ節の除去；乳房切除(乳房の外科的除去)および腋下のリンパ節の除去；放射線治療；化学療法；またはホルモン療法を伴うことがある。しばしば、2つまたは以上の方法が併用される。多くの研究から、初期段階の疾患について、ランペクトミー＋放射線治療の後の長期生存率は、非定型的乳房切除術の後の生存率と類似することが分かっている。再建技術の顕著な進歩は、乳房切除後の乳房再建についてのいくつか

の選択肢を提供する。近年、このような再建は、乳房切除と同時になされている。

【0021】

十分な量の周囲の正常乳房組織を伴う、非浸潤性乳管癌(DCIS)の局所的切除は、DCISの局所的再発を予防することができる。乳房への放射線および/またはタモキシフェンは、残存する乳房組織におけるDCISの発症の確率を下げるができる。DCISが未処置のままである場合、浸潤性乳癌に発達することがあるので、このことは重要である。それにもかかわらず、これらの処置には、深刻な副作用または続発症が存在する。従って、有効な乳癌処置が必要とされている。

【0022】

推定23,100件の卵巣癌の新規症例が、2000年に米国において存在した。これは、女性間での全ての癌の4%に相当し、婦人科癌の間で2番目のランクである。1992~1996年の間に、卵巣癌発症率は大幅に低下した。卵巣癌の結果として、2000年に、推定14,000人が死亡した。卵巣癌は、女性生殖系のいかなる他の癌よりも多くの死亡を引き起こす。

【0023】

外科手術、放射線治療、および化学療法は、卵巣癌の処置の選択肢である。外科手術は、通常、1つもしくは両方の卵巣、ファローピウス管の除去(卵管卵巣摘出)、ならびに子宮の除去(子宮摘出)を含む。いくつかの非常に初期の腫瘍において、特に子供を持つことを望む若い女性においては、関与する卵巣のみを除去する。進行疾患においては、全ての腹内疾患を除去して、化学療法の効果を高める試みが行われる。卵巣癌についての有効な処置選択肢の重要な必要性が、存在し続ける。

【0024】

2000年に、推定28,300件の新規の膵臓癌の症例が米国において存在した。過去20年間にわたって、膵臓癌の割合は男性において低下している。女性における割合はおよそ一定にとどまっているが、低下し始めているかもしれない。膵臓癌は、2000年に米国内において、推定28,200件の死亡を引き起こした。過去20年にわたって、男性における死亡率はわずかなではあるが有意に低下し(年に約-0.9%)、一方、女性の割合はわずかに増加している。

【0025】

外科手術、放射線治療、および化学療法が膵臓癌についての処置選択肢である。これらの処置選択肢は、多くの患者において生存を延ばすことができる、および/または症状を緩和することができるが、ほとんどの場合、治癒しない可能性が高い。癌のさらなる治療および診断の選択肢がかなり必要とされている。これらの選択肢には、抗体、ワクチンおよび低分子の使用が処置法として含まれる。さらにまた、これらの方法を、診断、検出、モニタリングのための研究用ツール、さらに癌の処置および研究の全ての領域における最新技術として使用することも必要とされる。

【0026】

モノクローナル抗体(mAb)(G. Kohler and C. Milstein, Nature 256:495-497(1975)(非特許文献6))の治療有用性が認識されている。モノクローナル抗体は、現在、移植術、癌、感染性疾患、心臓血管疾患および炎症における治療として認められている。異なるアイソタイプは、異なるエフェクター機能を有する。このような機能の相違は、種々の免疫グロブリンアイソタイプの異なる3次元構造に反映される(P. M. Alzari, et al., Annual Rev. Immunol. 6:555-580(1988)(非特許文献7))。

【0027】

マウスは免疫化に便利であり、かつ、ほとんどのヒト抗原を外来物質として認識するので、治療可能性のあるヒト標的に対するmAbは、典型的には、マウス起源である。しかし、マウスmAbにはヒト治療薬として固有の欠点がある。マウスmAbは頻繁な投薬を必要とする。なぜなら、ヒトにおけるmAbの循環半減期はヒト抗体よりも短いからである。より重要なことには、マウス抗体をヒト免疫系に繰り返し投与すると、ヒト免疫系がマウスタンパク質を外来物質として認識することによって応答が引き起こされ、ヒト抗マウス抗体(HAMA)応答が生じる。このようなHAMA応答は、アレルギー反応および系からのマウス抗体の迅速な排出をもたらすことがあり、それによって、マウス抗体による処置を役立たずにし

10

20

30

40

50

てしまう。このような影響を避けるために、マウス内でヒト免疫系を作り出す試みがなされてきた。

【0028】

最初の試みは、ヒト配列を有する抗体により抗原に応答可能であるトランスジェニックマウスを作り出すことをねらっていたが(Bruggemann, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:6709-6713(1989)(非特許文献8)を参照のこと)、入手可能なクローニングビヒクルによって安定的に維持できるDNAの量に限りがあった。酵母人工染色体(YAC)クローニングベクターの使用が、ヒトIg遺伝子座の大きな生殖系列フラグメントをトランスジェニック動物内に導入する道を開いた。本質的に、ヒトゲノム中に見出される同じ間隔で配置されるヒトのV領域遺伝子、D領域遺伝子、およびJ領域遺伝子の大部分、ならびにヒト定常領域が、YACを用いてマウス内に導入された。このようなトランスジェニックマウス系統の1つがXenoMouse(登録商標)マウスとして公知であり、Amgen Fremont, Inc.(Fremont CA)から市販されている。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0029】

【非特許文献1】 Klein, et al., 1997 Nat. Med. 3:402

【非特許文献2】 Su, et al., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7252

【非特許文献3】 Pinto, et al., Clin. Cancer Res. 1996 Sep 2 (9):1445-51

【非特許文献4】 Hubert, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999 Dec 7; 96(25):14 20
523-8

【非特許文献5】 Reiter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998 95:1735

【非特許文献6】 G. Kohler and C. Milstein, Nature 256:495-497(1975)

【非特許文献7】 P. M. Alzari, et al., Annual Rev. Immunol.6:555-580(1988)

【非特許文献8】 Bruggemann, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:6709-6713(1989)

【発明の概要】

【0030】

本発明は、191P4D12タンパク質および191P4D12タンパク質のポリペプチドフラグメントに結合する、抗体、その結合フラグメントおよび抗体薬物結合体(ADC)を提供する。いくつかの態様において、本発明は、治療剤と結合体化された完全ヒト抗体を含む。特定の態様において、図3の全核酸配列がコードされないこと、および/または図2の全アミノ酸配列が調製されないという条件が存在する。特定の態様において、図3の全核酸配列がコードされ、および/または図2のアミノ酸配列が調製され、いずれも、それぞれのヒト単位剤形の中にある。

30

【0031】

本発明はさらに、191P4D12を発現する癌、例えば、表Iに列挙した組織の癌を処置するための、免疫原性組成物または治療用組成物、例えば抗体薬物結合体、および戦略を提供する。

[本発明1001]

40

SEQ ID NO:7に示された重鎖可変領域相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列を有するCDRを含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:8に示された軽鎖可変領域CDRのアミノ酸配列を有するCDRを含む軽鎖可変領域を含む、191P4D12抗体またはその抗原結合フラグメント。

[本発明1002]

SEQ ID NO:7の20番目のアミノ酸(グルタミン酸)~136番目のアミノ酸(セリン)の範囲のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域およびSEQ ID NO:8の23番目のアミノ酸(アスパラギン酸)~130番目のアミノ酸(アルギニン)の範囲のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、本発明1001の抗体または抗原結合フラグメント。

[本発明1003]

SEQ ID NO:7の20番目のアミノ酸(グルタミン酸)~466番目のアミノ酸(リジン)の範囲の

50

アミノ酸配列からなる重鎖およびSEQ ID NO:8の23番目のアミノ酸(アスパラギン酸)～236番目のアミノ酸(システイン)の範囲のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、本発明1002の抗体。

[本発明1004]

Fab、F(ab')₂、Fv、またはscfvフラグメントである、本発明1001または1002の抗原結合フラグメント。

[本発明1005]

完全ヒト抗体である、本発明1001または1002の抗体。

[本発明1006]

組換えにより産生された、本発明1001～1005のいずれかの抗体。

10

[本発明1007]

American Type Culture Collection(ATCC)アクセッション番号PTA-11267で寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、およびATCCアクセッション番号PTA-11267で寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。

[本発明1008]

ATCCアクセッション番号PTA-11267で寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体の重鎖のアミノ酸配列からなる重鎖、およびATCCアクセッション番号PTA-11267で寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体の軽鎖のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、本発明1007の抗体。

20

[本発明1009]

細胞傷害剤と結合体化された前記本発明のいずれかの抗体または抗原結合フラグメントを含む、抗体薬物結合体。

[本発明1010]

前記細胞傷害剤がモノメチルアウリスタチンEである、本発明1009の抗体薬物結合体。

[本発明1011]

癌治療において使用するための、本発明1009または本発明1010の抗体薬物結合体。

[本発明1012]

癌が膵臓癌、肺癌、膀胱癌、または乳癌である、本発明1011の抗体薬物結合体。

30

[本発明1013]

放射線または化学療法剤と組み合わせて癌治療において使用するための、本発明1009または本発明1010の抗体薬物結合体。

[本発明1014]

本発明1009または本発明1010の抗体薬物結合体をヒト用単位剤形で含む、薬学的組成物。

[本発明1015]

癌治療において使用するための、本発明1014の薬学的組成物。

[本発明1016]

癌が膵臓癌、肺癌、膀胱癌、または乳癌である、本発明1015の薬学的組成物。

40

[本発明1017]

本発明1009または本発明1010の抗体薬物結合体を対象に投与する工程を含む、対象において癌を治療するための方法。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1-1】191P4D12のcDNA配列およびアミノ酸配列を示した。開始メチオニンに下線を引いた。オープンリーディングフレームは、停止コドンを含む核酸264～1796まで及んでいる。

【図1-2】図1-1の続きを示す。

【図2】191P4D12抗体の核酸配列およびアミノ酸配列。図2A.Ha22-2(2,4)6.1重鎖のcDNA

50

配列およびアミノ酸配列。リーダー配列に二重下線を引き、重鎖可変領域に下線を引き、ヒトIgG1定常領域に破線を引いた。図2B.Ha22-2(2,4)6.1軽鎖のcDNA配列およびアミノ酸配列。リーダー配列に二重下線を引き、軽鎖可変領域に下線を引き、ヒトκ定常領域に破線を引いた。

【図3】191P4D12抗体のアミノ酸配列。図3A.Ha22-2(2,4)6.1重鎖のアミノ酸配列。リーダー配列に二重下線を引き、重鎖可変領域に下線を引き、ヒトIgG1定常領域に破線を引いた。図3B.Ha22-2(2,4)6.1軽鎖のアミノ酸配列。リーダー配列に二重下線を引き、軽鎖可変領域に下線を引き、ヒトκ定常領域に破線を引いた。

【図4A-1】Ha22-2(2,4)6.1抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。Ha22-2(2,4)6.1重鎖とヒトIg生殖系列とのアラインメント。

【図4A-2】図4A-1の続きを示す。

【図4B】Ha22-2(2,4)6.1抗体とヒトIg生殖系列とのアラインメント。Ha22-2(2,4)6.1軽鎖とヒトIg生殖系列とのアラインメント。

【図5A】Ha22-2(2,4)6.1 MAb結合アッセイ。ラット-コントロールおよびラット-191P4D12細胞を、ハイブリドーマまたはCHO細胞いずれかからのHa22-2(2,4)6.1 MAbによって染色した。結合をフローサイトメトリーによって検出した。結果から、CHO細胞において組換えにより発現されたHa22-2(2,4)6.1 MAbは分泌型であり、細胞表面191P4D12に特異的に結合することが分かる。

【図5B】Ha22-2(2,4)6.1 MAb結合アッセイ。ハイブリドーマまたはCHO細胞いずれかからのHa22-2(2,4)6.1 MAbが組換え191P4D12精製細胞外タンパク質に結合するかどうかELISAによって試験した。結果から、CHO由来Ha22-2(2,4)6.1およびハイブリドーマ由来Ha22-2(2,4)6.1に結合する191P4D12タンパク質は同一であることが分かる。

【図6】PC3-ヒト-191P4D12細胞を用いたFACSによるHa22-2(2,4)6.1vcMMAE親和性の決定。親和性は0.69Kdである。

【図7】PC3-カニクイザル-191P4D12細胞を用いたFACSによるHa22-2(2,4)6.1vcMMAE親和性の決定。親和性は0.34Kdである。

【図8】PC3-ラット-191P4D12細胞を用いたFACSによるHa22-2(2,4)6.1vcMMAE親和性の決定。親和性は1.6Kdである。

【図9A】Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEにより媒介される細胞傷害性。PC3-ヒト-191P4D12細胞を用いた細胞傷害アッセイ。

【図9B】Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEにより媒介される細胞傷害性。PC3-カニクイザル-191P4D12細胞を用いた細胞傷害アッセイ。

【図9C】Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEにより媒介される細胞傷害性。PC3-ラット-191P4D12細胞を用いた細胞傷害アッセイ。

【図9D】Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEにより媒介される細胞傷害性。PC3-Neo細胞を用いた細胞傷害アッセイ。

【図10-1】FACSによるHa22-(2,4)6.1 MAbのドメインマッピング。

【図10-2】FACSによるHa22-(2,4)6.1 MAbのドメインマッピング。

【図10-3】FACSによるHa22-(2,4)6.1 MAbのドメインマッピング。

【図11】ウエスタンブロット分析によるHa22-2(2,4)6.1 MAbドメインマッピング。

【図12】SCIDマウス中のヒト肺癌異種移植片AG-L4の皮下腫瘍形成モデルにおけるHa22-2(2,4)6.1 MAbの評価。結果から、191P4D12 MAbは、SCIDマウスにおけるヒト肺癌異種移植片AG-L4中の腫瘍成長を有意に阻害しなかったことが分かる。

【図13】SCIDマウス中のヒト膵臓癌異種移植片HPACの皮下腫瘍形成モデルにおけるHa22-2(2,4)6.1 MAbの評価。結果から、191P4D12 MAbは、コントロール抗体と比較してSCIDマウス中のヒト膵臓異種移植片における腫瘍成長を阻害しなかったことが分かる。

【図14】SCIDマウス中のヒト膵臓癌異種移植片AG-Panc3の皮下腫瘍形成モデルにおけるHa22-2(2,4)6.1 MAbの評価。結果から、191P4D12 MAbは、コントロール抗体と比較してSCIDマウス中のヒト膵臓異種移植片における腫瘍成長を阻害しなかったことが分かる。

【図15】SCIDマウス中の皮下に確立されたヒト肺癌異種移植片AG-L4におけるHa22-2(2,

10

20

30

40

50

4)6.1-vcMMAEの効力。結果から、Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAEを用いた治療は、治療コントロールおよび未治療コントロールと比較して、ヌードマウスに皮下移植されたAG-L4肺癌異種移植片の成長を有意に阻害したことが分かる。

【図16】SCIDマウスの皮下に確立されたヒト乳癌異種移植片BT-483におけるHa22-2(2,4)6.1-vcMMAEの効力。結果から、Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAEを用いた治療は、治療コントロールADCおよび未治療コントロールADCと比較して、SCIDマウスに皮下移植されたBT-483乳腺腫瘍異種移植片の成長を有意に阻害したことが分かる。

【図17】SCIDマウスの皮下に確立されたヒト膀胱癌異種移植片AG-B1におけるHa22-2(2,4)6.1-vcMMAEの効力。結果から、Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAEを用いた治療は、コントロールADCと比較してAG-B1膀胱癌異種移植片の成長を有意に阻害したことが分かる。

【図18】SCIDマウスの皮下に確立されたヒト膵臓癌異種移植片AG-Panc2におけるHa22-2(2,4)6.1-vcMMAEの効力。結果から、Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAEを用いた治療は、コントロールADCと比較してAG-Panc2膵臓癌異種移植片の成長を有意に阻害したことが分かる。

【図19】SCIDマウスの皮下に確立されたヒト肺癌異種移植片AG-Panc4におけるHa22-2(2,4)6.1-vcMMAEの効力。結果から、Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAEを用いた治療は、コントロールADCと比較してAG-Panc4膵臓癌異種移植片の成長を有意に阻害したことが分かる。

【図20】SCIDマウスの皮下に確立されたヒト膀胱癌異種移植片AG-B8における比較投与量のHa22-2(2,4)6.1-vcMMAEの効力。結果から、10mg/kg Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEを用いた治療は、5mg/kgのHa22-2(2,4)6.1vcMMAEと比較してAG-B8膀胱癌異種移植片の成長を有意に阻害したことが分かる。

【図21-1】IHCによる癌患者標本中の191P4D12タンパク質の検出。図21A~Bは膀胱癌標本を示す。図21C~Dは乳癌標本を示す。

【図21-2】IHCによる癌患者標本中の191P4D12タンパク質の検出。図21E~Fは膵臓癌標本を示す。図21G~Hは肺癌標本を示す。図21I~Jは卵巣癌標本を示す。

【図21-3】IHCによる癌患者標本中の191P4D12タンパク質の検出。図21K~Lは食道癌標本を示す。図21M~Nは食道癌標本を示す。

【図22】精製組換え191P4D12(ECDアミノ酸1~348)に対するHa22-2(2,4)6.1 MabおよびHa22-2(2,4)6.1vcMMAEの親和性を決定するために用いられた結合曲線を示す。

【図23】Ha22-2(2,4)6.1と、191P4D12 (図23A)ならびにカニクイザル(図23B)、ラット(図23C)、およびマウス(図23D)に由来するオルソログを発現するPC3細胞との結合を示す。

【図24A】Ha22-2(2,4)6.1と二重変異体A76I,S91Nとの結合はマウスオルソログ結合に似ていることを示す。

【図24B】Ha22-2(2,4)6.1と二重変異体A76I,S91Nとの結合はマウスオルソログ結合に似ていることを示す。

【図24C】Ha22-2(2,4)6.1と二重変異体A76I,S91Nとの結合はマウスオルソログ結合に似ていることを示す。

【図24D】Ha22-2(2,4)6.1と二重変異体A76I,S91Nとの結合はマウスオルソログ結合に似ていることを示す。

【図25】PyMOLを用いた、191P4D12およびIgドメイン含有タンパク質からなるファミリーメンバーの公表された結晶構造データに基づく191P4D12 Vドメインのモデルを示す。Ala-76の位置(点描)の位置およびSer-91の位置(網掛け)を示した。

【図26A】Ha22-2(2,4)6.1の結合はVドメイン発現細胞(図26A)ならびに野生型191P4D12(図26B)に結合するが、以前に作製されたC1C2ドメイン発現細胞(図26C)に結合しないことを示す。

【図26B】Ha22-2(2,4)6.1の結合はVドメイン発現細胞(図26A)ならびに野生型191P4D12(図26B)に結合するが、以前に作製されたC1C2ドメイン発現細胞(図26C)に結合しないことを示す。

【図26C】Ha22-2(2,4)6.1の結合はVドメイン発現細胞(図26A)ならびに野生型191P4D12(図26B)に結合するが、以前に作製されたC1C2ドメイン発現細胞(図26C)に結合しないことを示す。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0033】

発明の詳細な説明節の概要

- I.) 定義
- II.) 191P4D12抗体
- III.) 抗体薬物結合体 総論
- III(A). マイタンシノイド
- III(B). アウリスタチンおよびドラスタチン
- III(C). カリチアマイシン
- III(D). 他の細胞傷害剤
- IV.) 191P4D12に結合する抗体薬物結合体
- V.) リンカーユニット
- VI.) ストレッチャーユニット
- VII.) アミノ酸ユニット
- VIII.) スペーサーユニット
- IX.) 薬物ユニット
- X.) 薬物ローディング
- XI) ADCの細胞傷害作用を確かめる方法
- XII.) 191P4D12を発現する癌の処置
- XIII.) 抗体ベースの療法の標的としての191P4D12
- XIV.) 191P4D12 ADCカクテル
- XV.) 併用療法
- XVI.) キット/製造物品

10

20

【0034】

I.) 定義

特別の定義のない限り、本明細書において使用される全ての技術用語、記号、および他の科学用語もしくは専門用語は、本発明の属する当業者によって一般に理解される意味を有することが意図される。場合によっては、一般に理解される意味を有する用語が、明確さのため、および/またはすぐに参照するために本明細書において定義される。本明細書においてこのような定義を含めることは、当技術分野において一般に理解されるとの実質的な差異を示すと解釈しなければならないとは限らない。本明細書において記載または参照される技術および手順のうちの多くは、当業者によって十分に理解され、当業者によって従来の方法論、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載される広く使用されている分子クローニング方法論を使用して一般的に使用される。適宜、一般的には、市販のキットおよび試薬の使用を含む手順が、特別の記載のない限りは製造業者が規定したプロトコールおよび/またはパラメーターに従って実行される。

30

【0035】

商品名が本明細書において用いられる場合、商品名についての言及は、文脈によって特に定めのない限り、製品製剤、後発医薬、および商品名の製品の活性のある薬学的成分についても言及している。

40

【0036】

「進行型癌」、「局所進行型癌」、「進行型疾患」および「局所進行型疾患」という用語は、関連する組織被膜を突き破って拡大した癌を意味し、この用語は、米泌尿器学会(American Urological Association (AUA))のシステムでステージCの疾患、Whitmore-JewettのシステムでステージC1~C2の疾患、およびTNM(腫瘍、結節、転移)システムでステージT3~T4およびN+の疾患を含むと意図される。一般的に、局所進行型疾患を有する患者に対して、手術は勧められない。これらの患者は、臨床的に限局化した(器官限定的な)癌を有する患者と比較して、実質的に好ましくない結果を有する。

50

【0037】

「AFP」という略語は、ジメチルバリン-バリン-ドライソロイン(dolaisoleuine)-ドラプロイン(dolaproine)-フェニルアラニン-p-フェニレンジアミンを指す(下記の式XVIを参照されたい)。

【0038】

「MMAE」という略語は、モノメチルアウリスタチンEを指す(下記の式XIを参照されたい)。

【0039】

「AEB」という略語は、アウリスタチンEとパラアセチル安息香酸を反応させることによって生成されたエステルを指す(下記の式XXを参照されたい)。

10

【0040】

「AEVB」という略語は、アウリスタチンEとベンゾイル吉草酸を反応させることによって生成されたエステルを指す(下記の式XXIを参照されたい)。

【0041】

「MMAF」という略語は、ドバリン(dovaline)-バリン-ドライソロイン-ドラプロイン-フェニルアラニンを指す(下記の式XIVを参照されたい)。

【0042】

特別の記載のない限りは、「アルキル」という用語は、約1～約20個の炭素原子(ならびに、この中の範囲および特定の数の炭素原子の全ての組み合わせおよび部分的組み合わせ)を有する直鎖または分枝鎖の飽和炭化水素を指し、約1～約8個の炭素原子が好ましい。アルキル基の例は、メチル、エチル、n-プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、イソ-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル、n-ノニル、n-デシル、3-メチル-2-ブチル、3-メチル-1-ブチル、2-メチル-1-ブチル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、2-メチル-2-ペンチル、3-メチル-2-ペンチル、4-メチル-2-ペンチル、3-メチル-3-ペンチル、2-メチル-3-ペンチル、2,3-ジメチル-2-ブチル、および3,3-ジメチル-2-ブチルである。

20

【0043】

アルキル基は単独でも別の基の一部でも、-ハロゲン、-O-(C₁～C₈アルキル)、-O-(C₂～C₈アルケニル)、-O-(C₂～C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂、および-CNを含むが、これに限定されない1個または複数の基、好ましくは、1個～3個の基(およびハロゲンより選択される任意のさらなる置換基)によって置換されてもよく、それぞれのR'は独立して、-H、-C₁～C₈アルキル、-C₂～C₈アルケニル、-C₂～C₈アルキニル、または-アリールより選択され、前記の-O-(C₁～C₈アルキル)、-O-(C₂～C₈アルケニル)、-O-(C₂～C₈アルキニル)、-アリール、-C₁～C₈アルキル、-C₂～C₈アルケニル、および-C₂～C₈アルキニル基は、-C₁～C₈アルキル、-C₂～C₈アルケニル、-C₂～C₈アルキニル、-ハロゲン、-O-(C₁～C₈アルキル)、-O-(C₂～C₈アルケニル)、-O-(C₂～C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂、および-CNを含むが、これに限定されない1個または複数の基によってさらに置換されてもよく、それぞれのR''は独立して、-H、-C₁～C₈アルキル、-C₂～C₈アルケニル、-C₂～C₈アルキニル、または-アリールより選択される。

30

40

【0044】

特別の記載のない限りは、「アルケニル」および「アルキニル」という用語は、約2～約20個の炭素原子(ならびに、この中の範囲および特定の数の炭素原子の全ての組み合わせおよび部分的組み合わせ)を有する直鎖および分枝鎖の炭素鎖を指し、約2～約8個の炭素原子が好ましい。アルケニル鎖は、鎖の中に少なくとも1つの二重結合を有し、アルキニル鎖は、鎖の中に少なくとも1つの三重結合を有する。アルケニル基の例には、エチレンまたはビニル、アリル、-1-ブテニル、-2-ブテニル、-イソブチレニル、-1-ペンテニル、-2-ペンテニル、-3-メチル-1-ブテニル、-2-メチル-2-ブテニル、および-2,3-ジメチル

50

-2-ブテニルが含まれるが、これに限定されない。アルキニル基の例には、アセチレニク、プロパルギル、アセチレニル、プロピニル、-1-ブチニル、-2-ブチニル、-1-ペンチニル、-2-ペンチニル、および-3-メチル-1ブチニルが含まれるが、これに限定されない。

【0045】

アルケニル基およびアルキニル基は単独でも別の基の一部でも、-ハロゲン、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂、および-CNを含むが、これに限定されない1個または複数の基、好ましくは、1個~3個の基(およびハロゲンより選択される任意のさらなる置換基)によって置換されてもよく、それぞれのR'は独立して、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールより選択され、前記の-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、および-C₂~C₈アルキニル基は、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、-ハロゲン、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂、および-CNを含むが、これに限定されない1個または複数の置換基によってさらに置換されてもよく、それぞれのR''は独立して、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールより選択される。

【0046】

特別の記載のない限りは、「アルキレン」という用語は、約1個~約20個の炭素原子(ならびに、この中の範囲および特定の数の炭素原子の全ての組み合わせおよび部分的組み合わせ)を有し、親アルカンの同じ炭素原子または2個の異なる炭素原子から2個の水素原子が取り除かれることによって得られる2個の一価ラジカル中心を有する、分枝鎖または直鎖の飽和炭化水素ラジカルを指し、約1~約8個の炭素原子が好ましい。代表的なアルキレンには、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレン、デカレン、1,4-シクロヘキシレンなどが含まれるが、これに限定されない。アルキレン基は単独でも別の基の一部でも、-ハロゲン、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂、および-CNを含むが、これに限定されない1個または複数の基、好ましくは、1個~3個の基(およびハロゲンより選択される任意のさらなる置換基)によって置換されてもよく、それぞれのR'は独立して、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールより選択され、前記の-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、および-C₂~C₈アルキニル基は、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、-ハロゲン、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂、および-CNを含むが、これに限定されない1個または複数の置換基によってさらに置換されてもよく、それぞれのR''は独立して、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールより選択される。

【0047】

特別の記載のない限りは、「アルケニレン」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含有する、置換されてもよいアルキレン基を指す。例示的なアルケニレン基には、例えば、エテニレン(-CH=CH-)およびプロペニレン(-CH=CHCH₂-)が含まれる。

【0048】

特別の記載のない限りは、「アルキニレン」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素

三重結合を含有する、置換されてもよいアルキレン基を指す。例示的なアルキニレン基には、例えば、アセチレン(-C≡C-)、プロパルギル(-CH₂C≡C-)、および4-ペンチニル(-CH₂CH₂CH₂C≡CH-)が含まれる。

【0049】

特別の記載のない限りは、「アリール」という用語は、親芳香環構造の1個の炭素原子から1個の水素原子が取り除かれることによって得られる、6~20個の炭素原子(ならびに、この中の範囲および特定の数の炭素原子の全ての組み合わせおよび部分的組み合わせ)からなる一価の芳香族炭化水素ラジカルを指す。アリール基の中には、例示的な構造において「Ar」で示されるものもある。代表的なアリール基には、ベンゼン、置換ベンゼン、フェニル、ナフタレン、アントラセン、ビフェニルなどから得られるラジカルが含まれるが、これに限定されない。

10

【0050】

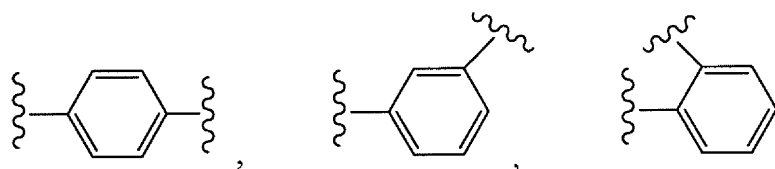
アリール基は単独でも別の基の一部でも、-ハロゲン、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-NO₂、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂、および-CNを含むが、これに限定されない、1個または複数の、好ましくは、1個~5個、さらには1個~2個の基によって置換されてもよく、それぞれのR'は独立して、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールより選択され、前記の-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、および-アリール基は、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、-ハロゲン、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂、および-CNを含むが、これに限定されない1個または複数の置換基によってさらに置換されてもよく、それぞれのR'は独立して、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールより選択される。

20

【0051】

特別の記載のない限りは、「アリーレン」という用語は、二価の(すなわち、親芳香環構造の同じ炭素原子または2個の異なる炭素原子から2個の水素原子が取り除かれることによって得られた)置換されてもよいアリール基を指し、例示的なアリール基としてフェニルを用いて以下の構造に示したように、オルト、メタ、またはパラの構造でもよい。

30



代表的な「-(C₁~C₈アルキレン)アリール」、「-(C₂~C₈アルケニレン)アリール」、および「-(C₂~C₈アルキニレン)アリール」基には、ベンジル、2-フェニルエタン-1-イル、2-フェニルエテン-1-イル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-ナフチルエテン-1-イル、ナフトベンジル、2-ナフトフェニルエタン-1-イルなどが含まれるが、これに限定されない。

40

【0052】

特別の記載のない限りは、「複素環」という用語は、3個~14個の環原子(環員(ring member)とも呼ばれる)を有する、単環式、二環式、または多環式の環構造を指す。ここで、少なくとも1つの環の中にある少なくとも1個の環原子は、N、O、P、またはSより選択されるヘテロ原子(ならびに、この中の範囲および特定の数の炭素原子およびヘテロ原子の全ての組み合わせおよび部分的組み合わせ)である。複素環は、N、O、P、またはSより独立

50

して選択される1個～4個の環ヘテロ原子を有してもよい。複素環の中にある1個または複数のN、C、またはS原子が酸化されてもよい。単環式複素環は、好ましくは、3個～7個の環員(例えば、2個～6個の炭素原子、およびN、O、P、またはSより独立して選択される1個～3個のヘテロ原子)を有し、二環式の複素環は、好ましくは、5個～10個の環員(例えば、4個～9個の炭素原子、およびN、O、P、またはSより独立して選択される1個～3個のヘテロ原子)を有する。ヘテロ原子を含む環は芳香族でもよく、非芳香族でもよい。特別の記載のない限りは、複素環の任意のヘテロ原子または炭素原子がそのペンダント基に取り付けられて、安定した構造となる。

【0053】

複素環は、Paquette, 「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W.A. Benjamin, New York, 1968)、特に、1章、3章、4章、6章、7章、および9章、; 「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950～現在)、特に、13巻、14巻、16巻、19巻、および28巻;ならびにJ. Am. Chem. Soc. 82:5566(1960)に記載されている。

【0054】

「複素環」基の例には、例として、かつ非限定的に、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(ピペリジル)、チアゾリル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、bis-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、bis-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾシニル(azocinyl)、トリアジニル、6H-1,2,5-チアジージニル、2H,6H-1,5,2-ジチアジニル、チエニル、チアントレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサントニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-イミダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテリジニル、4H-カルバゾリル、カルバゾリル、β-カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシインドリル、ベンゾキサゾリニル、およびイサチノイル(isatinoyl)が含まれる。好ましい「複素環」基には、ベンゾフラニル、ベンゾチオフエニル、インドリル、ベンゾピラゾリル、クマリニル、イソキノリニル、ピロリル、チオフエニル、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、ピリミジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、およびテトラゾリルが含まれるが、これに限定されない。

【0055】

複素環基は単独でも別の基の一部でも、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、 $-ハロゲン$ 、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、 $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')$ 、および $-CN$ を含むが、これに限定されない1個または複数の基、好ましくは、1個～2個の基によって置換されてもよく、それぞれの R' は独立して、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、または $-アリール$ より選択され、前記の $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、および $-アリール$ 基は、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、 $-ハロゲン$ 、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)

、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂、および-CNを含むが、これに限定されない1個または複数の置換基によってさらに置換されてもよく、それぞれのR'は独立して、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、またはアリールより選択される。

【0056】

例として、かつ非限定的に、炭素結合複素環は、ピリジンの2位、3位、4位、5位、もしくは6位;ピリダジンの3位、4位、5位、もしくは6位;ピリミジンの2位、4位、5位、もしくは6位;ピラジンの2位、3位、5位、もしくは6位;フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフエン、ピロール、もしくはテトラヒドロピロールの2位、3位、4位、もしくは5位;オキサゾール、イミダゾール、もしくはチアゾールの2位、4位、もしくは5位;イソキサゾール、ピラゾール、もしくはイソチアゾールの3位、4位、もしくは5位;アジリジンの2位もしくは3位;アゼチジンの2位、3位、もしくは4位;キノリンの2位、3位、4位、5位、6位、7位、もしくは8位;またはイソキノリンの1位、3位、4位、5位、6位、7位、もしくは8位において結合されてもよい。なおさらに典型的には、炭素結合複素環には、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、5-ピリジル、6-ピリジル、3-ピリダジニル、4-ピリダジニル、5-ピリダジニル、6-ピリダジニル、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、5-ピリミジニル、6-ピリミジニル、2-ピラジニル、3-ピラジニル、5-ピラジニル、6-ピラジニル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、または5-チアゾリルが含まれる。

【0057】

例として、かつ非限定的に、窒素結合複素環は、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、2-ピロリン、3-ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2-イミダゾリン、3-イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2-ピラゾリン、3-ピラゾリン、ペペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、または1H-インダゾールの1位;イソインドールまたはイソインドリンの2位;モルホリンの4位;およびカルバゾールまたはβ-カルボリンの9位において結合されてもよい。なおさらに典型的には、窒素結合複素環には、1-アジリジル、1-アゼテジル、1-ピロリル、1-イミダゾリル、1-ピラゾリル、および1-ピペリジニルが含まれる。

【0058】

特別の記載のない限りは、「カルボサイクル」という用語は、3個~14個の環原子(ならびに、この中の範囲および特定の数の炭素原子の全ての組み合わせおよび部分的組み合わせ)を有し、環原子の全てが炭素原子である、飽和または不飽和の、非芳香族の、単環式、二環式、または多環式の環構造を指す。単環式のカルボサイクルは、好ましくは、3個~6個の環原子、さらにより好ましくは、5個または6個の環原子を有する。二環式のカルボサイクルは、好ましくは、例えば、ビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、もしくは[6,6]構造として配置される7個~12個の環原子を有するか、またはビシクロ[5,6]もしくは[6,6]構造として配置される9個もしくは10個の環原子を有する。「カルボサイクル」という用語は、例えば、アリール環と融合した単環式のカルボサイクル(例えば、ベンゼン環と融合した単環式のカルボサイクル)を含む。カルボサイクルは、好ましくは、3~8個のカルボサイクル原子を有する。

【0059】

カルボサイクル基は単独でも別の基の一部でも、例えば、-ハロゲン、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂、および-CNを含むが、これに限定されない1個または複数の基、好ましくは、1個または2個の基(およびハロゲンより選択される任意のさらなる置換基)によって置換されてもよく、それぞれのR'は独立して、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールより選択され、前記の-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)

、-O-(C₂~C₈アルキニル)、および-アリール基は、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、-ハロゲン、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂、および-CNを含むが、これに限定されない1個または複数の置換基によってさらに置換されてもよく、それぞれのR'は独立して、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールより選択される。

【0060】

単環式カルボサイクル置換基の例には、-シクロプロピル、-シクロブチル、-シクロペンチル、-1-シクルペンチ-1-enyl、-1-シクルペンチ-2-enyl、-1-シクルペンチ-3-enyl、シクロヘキシル、-1-シクロヘキシ-1-enyl、-1-シクロヘキシ-2-enyl、-1-シクロヘキシ-3-enyl、-シクロヘプチル、-シクロオクチル、-1,3-シクロヘキサジエニル、-1,4-シクロヘキサジエニル、-1,3-シクロヘプタジエニル、-1,3,5-シクロヘプタトリエニル、および-シクロオクタジエニルが含まれる。

10

【0061】

「カルボシクロ」は単独でも別の基の一部でも、二価の(すなわち、親カルボサイクル構造の同じ炭素原子または2個の異なる炭素原子から2個の水素原子が取り除かれることによって得られた)前記で定義された、置換されてもよいカルボサイクル基を指す。

【0062】

文脈によって特に定めのない限り、ハイフン(-)は、ペンダント分子に取り付けられる点を指定する。従って、「-(C₁~C₈アルキレン)アリール」または「-C₁~C₈アルキレン(アリール)」という用語は、アルキレンラジカルの任意の炭素原子がペンダント分子に取り付けられ、アルキレンラジカルの炭素原子に結合している水素原子の1つが、本明細書において定義されたアリールラジカルによって置換されている、本明細書において定義されたC₁~C₈アルキレンラジカルを指す。

20

【0063】

特定の基が「置換される」場合、この基は、置換基リストより独立して選択される1個または複数の置換基、好ましくは、1個~5個の置換基、より好ましくは、1個~3個の置換基、最も好ましくは、1個~2個の置換基を有してもよい。しかしながら、この基は、一般的に、ハロゲンより選択される任意の数の置換基を有してもよい。置換される複数の基もこのように示される。

30

【0064】

分子内の特定の場所における任意の置換基または変化の定義は、その分子の他の場所にある定義とは無関係であることが意図される。当業者であれば、化学的に安定であり、かつ当技術分野において公知の技法ならびに本明細書において示された方法によって容易に合成することができる化合物を提供するように、本発明の化合物上にある置換基および置換パターンを選択できることが理解される。

【0065】

本明細書において使用される場合、保護基は、一過的または持続的に、多官能性化合物にある1つの反応部位を選択的にブロックする基を指す。本発明において使用するための適切なヒドロキシ保護基は薬学的に許容されるものであり、化合物が活性になるために、対象に投与された後に親化合物から切断される必要があるものでもよく、切断される必要がないものでもよい。切断は、体内の正常な代謝プロセスを介したものである。ヒドロキシ保護基は当技術分野において周知であり、例えば、エーテル(例えば、ジアルキルシリルエーテル、トリアルキルシリルエーテル、ジアルキルアルコキシシリルエーテルを含む、アルキルエーテルおよびシリルエーテル)、エステル、カーボネート、カルバメート、スルホネート、ならびにホスフェート保護基を含む。その全体が、および全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられる、Protective Groups in Organic Synthesis by T. W. Greene and P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3rd Edition)を参照されたい。ヒドロキシ保護基の例には、メチルエーテル;メトキシメチルエーテル、メチルチオメ

40

50

チルエーテル、(フェニルジメチルシリル)メトキシメチルエーテル、ベンジルオキシメチルエーテル、p-メトキシベンジルオキシメチルエーテル、p-ニトロベンジルオキシメチルエーテル、o-ニトロベンジルオキシメチルエーテル、(4-メトキシフェノキシ)メチルエーテル、グアイアコールメチルエーテル、t-ブトキシメチルエーテル、4-ペンテニルオキシメチルエーテル、シロキシメチルエーテル、2-メトキシエトキシメチルエーテル、2,2,2-トリクロロエトキシメチルエーテル、bis(2-クロロエトキシ)メチルエーテル、2-(トリメチルシリル)エトキシメチルエーテル、メトキシメチルエーテル、テトラヒドロピラニルエーテル、1-メトキシシクロヘキシルエーテル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルエーテル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルエーテルS,S-ジオキシド、1-[(2-クロロ-4-メチル)フェニル]-4-メトキシピペリジン-4-イルエーテル、1-(2-フルオロフェニル)-4-メトキシピペリジン-4-イルエーテル、1,4-ジオキササン-2-イルエーテル、テトラヒドロフラニルエーテル、テトラヒドロチオフラニルエーテル;置換エチルエーテル、例えば、1-エトキシエチルエーテル、1-(2-クロロエトキシ)エチルエーテル、1-[2-(トリメチルシリル)エトキシ]エチルエーテル、1-メチル-1-メトキシエチルエーテル、1-メチル-1-ベンジルオキシエチルエーテル、1-メチル-1-ベンジルオキシ-2-フルオロエチルエーテル、1-メチル-1-フェノキシエチルエーテル、2-トリメチルシリルエーテル、t-ブチルエーテル、アリルエーテル、プロパルギルエーテル、p-クロロフェニルエーテル、p-メトキシフェニルエーテル、ベンジルエーテル、p-メトキシベンジルエーテル、3,4-ジメトキシベンジルエーテル、トリメチルシリルエーテル、トリエチルシリルエーテル、トリプロピルシリルエーテル、ジメチルイソプロピルシリルエーテル、ジエチルイソプロピルシリルエーテル、ジメチルヘキシルシリルエーテル、t-ブチルジメチルシリルエーテル、ジフェニルメチルシリルエーテル、ベンゾイルギ酸エステル、酢酸エステル、クロロ酢酸エステル、ジクロロ酢酸エステル、トリクロロ酢酸エステル、トリフルオロ酢酸エステル、メトキシ酢酸エステル、トリフェニルメトキシ酢酸エステル、フェニル酢酸エステル、安息香酸エステル、炭酸アルキルメチル、炭酸アルキル9-フルオレニルメチル、炭酸アルキルエチル、炭酸アルキル2,2,2,-トリクロロエチル、炭酸1,1,-ジメチル-2,2,2-トリクロロエチル、アルキルスルホネート、メタンスルホネート、ベンジルスルホネート、トシレート、メチレンアセタール、エチリデンアセタール、およびt-ブチルメチリデンケタールが含まれるが、これに限定されない。好ましい保護基は、式- R^a 、 $-Si(R^a)(R^a)(R^a)$ 、 $-C(O)R^a$ 、 $-C(O)OR^a$ 、 $-C(O)NH(R^a)$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $P(O)(OH)_2$ 、および $-P(O)(OH)OR^a$ によって表され、式中、 R^a は、 $C_1\sim C_{20}$ アルキル、 $C_2\sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2\sim C_{20}$ アルキニル、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキレン(カルボサイクル)、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニレン(カルボサイクル)、 $-C_2\sim C_{20}$ アルキニレン(カルボサイクル)、 $-C_6\sim C_{10}$ アリール、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキレン(アリール)、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニレン(アリール)、 $-C_2\sim C_{20}$ アルキニレン(アリール)、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)、または $-C_2\sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)であり、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、カルボサイクル、および複素環ラジカルは単独でも別の基の一部でも、置換されてもよい。

10

20

30

40

50

【0066】

「ネイティブなグリコシル化パターンの変化」とは、ネイティブ配列の191P4D12において見出される1つまたはそれ以上の糖質部分を(基礎となるグリコシル化部位を除去すること、または化学的手段および/もしくは酵素的手段によってグリコシル化を欠失させることのいずれかによって)欠失させること、ならびに/あるいは、そのネイティブ配列の191P4D12中には存在しない1つまたはそれ以上のグリコシル化部位を付加することを意味することが本明細書における目的のために意図される。さらに、前記の句は、ネイティブタンパク質のグリコシル化の質的变化を、存在する種々の糖質部分の性質および比率の変化を含めて含む。

【0067】

「アナログ」という用語は、別の分子(例えば、191P4D12関連タンパク質)と構造的に類似する、または類似もしくは対応する属性を共有する、分子を指す。例えば、191P4D12タ

ンパク質のアナログは、191P4D12に特異的に結合する抗体もしくはT細胞に特異的に結合することができる。

【0068】

「抗体」という用語は、特別の明確な定めがない限りは、その最も広い意味で使用される。従って、「抗体」は天然のものでもよく、従来のハイブリドーマ技術によって生成されたモノクローナル抗体など人工生成されてもよい。191P4D12抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにこれらの抗体の抗原結合ドメインおよび/または1つまたはそれ以上の相補性決定領域を含むフラグメントを含む。本明細書において使用される「抗体」という用語は、191P4D12に特異的に結合し、かつ/または望ましい生物学的活性を示す、任意の形態の抗体もしくはそのフラグメントを指す。「抗体」という用語は、具体的には、モノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、および抗体フラグメントを、それらが191P4D12に特異的に結合し、かつ/または望ましい生物学的活性を示す限り含む。本明細書において提供される方法および組成物において、任意の特異的抗体を使用することができる。従って、一態様において、「抗体」という用語は、組み合わされると標的抗原の特異的結合部位を形成する、軽鎖免疫グロブリン分子由来の少なくとも1つの可変領域と、重鎖分子由来の少なくとも1つの可変領域とを含む分子を含む。一態様において、抗体は、IgG抗体である。例えば、抗体は、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、またはIgG4抗体である。本方法および組成物において有用な抗体は、細胞培養物、ファージ、またはウシ、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ヒツジ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジー、および類人猿が含まれるが、これに限定されない種々の動物において作製することができる。従って、一態様において、本発明の抗体は、哺乳動物抗体である。ファージ技術を用いて、最初の抗体を単離するすることができ、または特異性特徴が変化したもしくはアビディティ特徴が変化した変異体を生成することができる。このような技術は日常的であり、当技術分野で周知である。一態様において、抗体は、当技術分野で公知である組換え手段によって生成される。例えば、組換え抗体は、宿主細胞を、その抗体をコードするDNA配列を含むベクターでトランスフェクトすることによって生成することができる。少なくとも1つのVL領域および1つのVH領域を発現するDNA配列を宿主細胞においてトランスフェクトするために、1つまたはそれ以上のベクターを使用することができる。抗体作製および抗体生成するための組換え手段の例示的記載には、Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (Wiley, 1997); Shephard, et al., MONOCLONAL ANTIBODIES (Oxford University Press, 2000); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (Academic Press, 1993); CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons, 最新版)が含まれる。本発明の抗体は、望ましい機能の媒介における抗体の効力を高めるように組換え手段によって改変することができる。従って、組換え手段を使用して置換によって抗体を改変できることは本発明の範囲内にある。典型的には、置換は保存的置換である。例えば、抗体の定常領域中の少なくとも1つのアミノ酸を、異なる残基で置換することができる。例えば、米国特許第5,624,821号、米国特許第6,194,551号、出願番号W09958572; および Angal, et al., Mol. Immunol. 30:105-08(1993)を参照のこと。アミノ酸における改変には、アミノ酸の欠失、付加、および置換が含まれる。場合によっては、このような変化は、望ましくない活性、例えば、補体依存性細胞傷害性を低減するためになされる。頻繁に、抗体は、検出可能なシグナルを提供する物質を共有結合または非共有結合のいずれかで結合することによって標識される。多種多様な標識および結合体化技術が公知であり、科学文献および特許文献の両方において広範に報告されている。これらの抗体は、正常な191P4D12または欠損型191P4D12に対する結合についてスクリーニングすることができる。例えば、Antibody Engineering: A Practical Approach (Oxford University Press, 1996)を参照のこと。望ましい生物学的活性を有する適切な抗体は、以下のインビトロアッセイ、増殖、遊走、接着、軟寒天増殖、脈管形成、細胞間連絡、アポトーシス、輸送、シグナル伝達が含まれるが、これに限定されない、および以下のインビボアッセイ、例えば、腫瘍増殖の阻害を用いて同定することができる。本明細書において提供される抗体は

10

20

30

40

50

また診断用途においても有用であり得る。捕捉抗体または非中和抗体として、これらの抗体は、特定の抗原に、その抗原の受容体結合も生物学的活性も阻害することなく結合する能力について、スクリーニングすることができる。中和抗体として、抗体は、競合的結合アッセイにおいて有用であり得る。これらの抗体はまた、191P4D12またはその受容体を定量するために使用することができる。

【0069】

本明細書で使用する抗体の「抗原結合部分」または「抗体フラグメント」(または単に「抗体部分」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する191P4D12抗体の1つまたは複数のフラグメントを意味する(例えば、191P4D12および変異体;図1)。抗体の抗原結合機能は完全長抗体のフラグメントによって働くことが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語の中に含まれる結合フラグメントの例には、(i)Fabフラグメント、 V_L 、 V_H 、 C_L および C_{H1} ドメインからなる一価フラグメント;(ii) $F(ab')_2$ フラグメント、2つのFabフラグメントがジスルフィド架橋によってヒンジ領域で連結されている二価フラグメント;(iii) V_H および C_{H1} ドメインからなるFdフラグメント;(iv)抗体の1本のアームの V_L および V_H ドメインからなるFvフラグメント、(v) V_H ドメインからなるdAbフラグメント(Ward, et al., (1989) Nature 341:544-546);ならびに(vi)単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。さらに、Fvフラグメントの2つのドメインである V_L および V_H は別々の遺伝子によってコードされているが、組換え法を用いると、一価分子(単鎖Fv(scFv))として知られる;例えば、Bird, et al., (1988) Science 242:423-426;およびHuston, et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)を参照のこと)を形成するように、 V_L 領域および V_H 領域が対となった1本のタンパク質鎖として作製されるのを可能にする合成リンカーによって接続することができる。このような単鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」という用語の中に含まれることが意図される。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来の技法を用いて得られ、フラグメントは、インタクトな抗体と同様に有用性についてスクリーニングされる。

【0070】

本明細書において使用される場合、「抗原」の任意の形態が、191P4D12に特異的な抗体を作製するために使用することができる。従って、惹起抗原は、1つのエピトープであってもよく、複数のエピトープであってもよく、またはタンパク質全体であってもよく、これらは単独であっても、当技術分野で公知の1つまたはそれ以上の免疫原性増強薬剤と組み合わせてもよい。惹起抗原は、単離された全長タンパク質であっても、細胞表面タンパク質(例えば、その抗原の少なくとも一部でトランスフェクトされた細胞で免疫する)であってもよく、可溶性タンパク質(例えば、そのタンパク質の細胞外ドメイン部分のみで免疫する)であってもよい。抗原は、遺伝子組換え細胞において生成することができる。抗原をコードするDNAは、ゲノムDNAであっても、非ゲノムDNA(例えば、cDNA)であってもよく、細胞外ドメインの少なくとも一部をコードする。本明細書において使用される場合、「部分」という用語は、適宜、関心対象の抗原の免疫原性エピトープを構成する最小限の数のアミノ酸または核酸を指す。関心対象の細胞の形質転換のために適切な任意の遺伝子ベクターを使用することができる。遺伝子ベクターには、アデノウイルスベクター、プラスミド、および非ウイルスベクター、例えば、カチオン性脂質が含まれるが、これに限定されない。一態様において、本明細書における方法および組成物の抗体は、関心対象の191P4D12の細胞外ドメインの少なくとも一部に特異的に結合する。

【0071】

本明細書において提供される、抗体またはその抗原結合フラグメントは、「生物活性薬剤」に結合体化することができる。本明細書において使用される場合、「生物活性薬剤」という用語は、抗原に結合し、かつ/または細胞死滅毒素を増強するために望ましい生物学的効果を増強もしくは媒介する、任意の合成化合物または天然化合物を指す。一態様において、本発明において有用な結合フラグメントは、生物学的に活性なフラグメントである。本明細書において使用される場合、「生物学的に活性な」という用語は、望ましい抗原性エピトープに結合可能であり、かつ生物学的効果を直接的もしくは間接的に発揮可能

である、抗体もしくは抗体フラグメントを指す。直接的効果には、増殖シグナルの調節、刺激、および/もしくは阻害；抗アポトーシスシグナルの調節、刺激、および/もしくは阻害；アポトーシスシグナルもしくは壊死シグナルの調節、刺激、および/もしくは阻害；A DCCカスケードの調節、刺激、および/もしくは阻害；ならびにCDCカスケードの調節、刺激、および/もしくは阻害が含まれるが、これに限定されない。

【0072】

「二重特異性」抗体もまた本方法および組成物において有用である。本明細書において使用される場合、「二重特異性抗体」という用語は、少なくとも2つの異なる抗原性エピトープに対する結合特異性を有する抗体、典型的には、モノクローナル抗体を指す。一態様において、エピトープは同じ抗原に由来する。別の態様において、エピトープは、2つの異なる抗原に由来する。二重特異性抗体を生成する方法は当技術分野で公知である。例えば、二重特異性抗体は、2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現を使用して組換え生成することができる。例えば、Milstein, et al., Nature 305:537-39(1983)を参照のこと。または、二重特異性抗体は、化学的結合を使用して調製することができる。例えば、Brennan, et al., Science 229:81(1985)を参照のこと。二重特異性抗体は、二重特異性抗体フラグメントを含む。例えば、Hollinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-48(1993), Gruber, et al., J. Immunol. 152:5368(1994)を参照のこと。

【0073】

本明細書に記載のモノクローナル抗体は、具体的には、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスもしくは抗体サブクラスに属する抗体中の対応配列と同一または相同であるが、その鎖の残りが、別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくは抗体サブクラスに属する抗体中の対応配列と同一または相同である「キメラ」抗体、ならびにこのような抗体のフラグメントを、それらが標的抗原に特異的に結合し、かつ/または望ましい生物学的活性を示す限り含む。(米国特許第4,816,567号；およびMorrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。

【0074】

「化学療法剤」という用語は、腫瘍増殖の阻害において有効な全ての化合物を指す。化学療法剤の非限定的例には、アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン化合物、およびアルキルスルホネート、代謝拮抗物質、例えば、葉酸、プリンアンタゴニストもしくはピリミジンアンタゴニスト；有糸分裂インヒビター、例えば、ビンカアルカロイド、アウリスタチン、およびポドフィロトキシン誘導体等の抗チューブリン剤、細胞傷害性抗生物質、DNA発現または複製を損なうかまたは阻害する化合物、例えば、DNA副溝結合剤、ならびに増殖因子受容体アンタゴニストが含まれる。さらに、化学療法剤には、細胞傷害剤(本明細書に定義のもの)、抗体、生物学的分子および低分子が含まれる。

【0075】

「化合物」という用語は、化合物それ自体を指し、かつ化合物それ自体を含み、ならびに明記されても明記されなくても、かつ文脈によって以下のものが排除されると明らかにされていない限り、以下のものを指し、かつ以下のものを含む：多形型を含む、化合物の非結晶型および結晶型。これらの型は混合物の一部でもよく、分離されていてもよい；典型的には本明細書において提供される構造で示される型である、化合物の遊離酸型および遊離塩基型；光学異性体および互変異性体を指す、化合物の異性体。光学異性体には鏡像異性体およびジアステレオマー、キラル異性体および非キラル異性体が含まれる。光学異性体には、単離された光学異性体、ならびにラセミ混合物および非ラセミ混合物を含む光学異性体の混合物が含まれる；異性体は分離された型でもよく、1つまたは複数の他の異性体との混合物に含まれてもよい；ジュウテリウムを含有する化合物およびトリチウムを含有する化合物を含む、ならびに治療および診断に有効な放射性同位体を含む放射性同位体を含有する化合物を含む、化合物の同位体；二量体、三量体などを含む、化合物の多量体型；酸添加塩および塩基添加塩を含む、化合物の塩、好ましくは、薬学的に許容される塩。有機対イオンおよび無機対イオンを有する塩を含む、化合物の塩、好ましくは、薬学的

に許容される塩。双性イオン型を含む、化合物の塩、好ましくは、薬学的に許容される塩。この場合、化合物が2種類以上の対イオンと結合するのであれば、2種類以上の対イオンは同じでもよく異なってもよい；ならびにヘミソルベート(hemisolvate)、モノソルベート(monosolvate)、ジソルベート(disolvate)などを含む、化合物の溶媒和化合物。溶媒和化合物には、有機溶媒和化合物および無機溶媒和化合物が含まれ、前記の無機溶媒和化合物には水和物が含まれる；化合物が2種類以上の溶媒分子と結合しているであれば、2種類以上の溶媒分子は同じでもよく、異なってもよい。場合によっては、本明細書において本発明の化合物についてなされる言及は、前記の型、例えば、塩および/または溶媒和化合物の1つについての明示的な言及を含む。しかしながら、この言及は強調にすぎず、前記で特定されたような前記の他の型を除外すると解釈してはならない。

10

【0076】

本明細書において使用される場合、「保存的置換」という用語は、当業者にとって公知であるアミノ酸置換を指し、一般的には、生じる分子の生物学的活性を変えなく行うことができる。当業者であれば、一般的に、ポリペプチドの非必須領域におけるアミノ酸置換は、生物学的活性を実質的には変えないことを認識する(例えば、Watson, et al., MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224(4th Edition 1987)を参照のこと)。このような例示的置換は、好ましくは、表IIおよび表III(a-b)に示される置換に従ってなされる。例えば、このような変化には、イソロイシン(I)、バリン(V)、およびロイシン(L)のうちのいずれかを、これらの疎水性アミノ酸のうちの他のいずれかで置換すること；グルタミン酸(E)をアスパラギン酸(D)で置換することおよびその逆；アスパラギン(N)をグルタミン(Q)で置換することおよびその逆；ならびにスレオニン(T)をセリン(S)で置換することおよびその逆が含まれる。他の置換もまた、特定のアミノ酸の環境およびタンパク質の三次構造におけるそのアミノ酸の役割に応じて保存的であると考えられ得る。例えば、グリシン(G)およびアラニン(A)は、頻繁に交換可能である。アラニン(A)およびバリン(V)も同様であり得る。比較的疎水性のメチオニン(M)は、ロイシンおよびイソロイシンと頻繁に交換可能であり、時には、バリンで交換可能である。リジン(K)およびアルギニン(R)は、そのアミノ酸残基の大きな特徴が電荷であり、かつこれらの2つのアミノ酸残基の異なるpKが重要でない位置において、頻繁に交換可能である。なお他の変化が、特定の環境においては「保存的」であると考えられ得る(例えば、本明細書中の表III(a)；第13-15頁「Biochemistry」2nd ED.Lubert Stryer編(Stanford University)；Henikoff, et al., PNAS 1992 Vol 89 10915-10919；Lei, et al., J Biol Chem 1995 May19；270(20):11882-11886を参照のこと)。他の置換もまた許容可能であり、経験的に、または公知の保存的置換に従って決定することができる。

20

30

【0077】

「細胞傷害剤」という用語は、細胞の発現活性、細胞の機能を阻害もしくは防止し、かつ/または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位体、化学療法剤、および毒素、例えば、細菌起源、真菌起源、植物起源、または動物起源の低分子毒素もしくは酵素活性毒素を、そのフラグメントおよび/または変異体を含めて、含むことが意図される。細胞傷害剤の例には、アウリスタチン(例えば、アウリスタチンE、アウリスタチンF、MMAE、およびMMAF)、アウロマイシン(auromycin)、マイタンシノイド、リシンA鎖、コンプレスタチン(combrestatin)、デュオカルマイシン、ドラスタチン、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、シスプラチン、cc1065、エチジウムブロミド、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン、ジフテリア毒素、シェードモナス属(Pseudomonas)外毒素(PE)A、PE40、アブリン、アブリンA鎖、モデクシン(modectin)A鎖、 α -サルシン、ゲロニン、マイトジェリン(mitogellin)、レトストリクトシン(retstrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)、キュリシン(curicin)、クロチン、カリチアマイシン、サパオナリオア・オフィシナリス(Sapaonar ia officinalis)インヒビター、および糖質コルチコイド、ならびに他の化学療法剤、ならびに放射性同位体、例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} ま

40

50

たはBi²¹³、P³²、およびLu¹⁷⁷を含むLuの放射性同位体が含まれるが、これに限定されない。抗体はまた、プロドラッグをその活性形態へと変換可能である抗癌プロドラッグ活性化酵素に結合体化することができる。

【0078】

本明細書において使用される場合、「ダイアボディ(diabody)」という用語は、2つの抗原結合部位を含む小さい抗体フラグメントを指し、このフラグメントは、同じポリペプチド鎖中に軽鎖可変ドメイン(V_L)に接続している重鎖可変ドメイン(V_H)を含む(V_H-V_L)。同じ鎖の2つのドメイン間での対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、それらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合させられ、2つの抗原結合部位を作り出す。ダイアボディは、例えば、EP404,097；W093/11161；およびHollinger, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-48(1993)において、より完全に記載される。 10

【0079】

191P4D12発現細胞に対する191P4D12結合剤の作用に関して「枯渇させる」という用語は、191P4D12発現細胞の数の減少または191P4D12発現細胞の排除を指す。

【0080】

「遺伝子産物」という用語は、ペプチド/タンパク質またはmRNAを示すために本明細書において使用される。例えば、「本発明の遺伝子産物」は、時には、本明細書において、「癌アミノ酸配列」、「癌タンパク質」、「表Iに列挙した癌のタンパク質」、「癌mRNA」、「表Iに列挙した癌のmRNA」などとも呼ばれる。一態様において、癌タンパク質は、図1の核酸によってコードされる。癌タンパク質は、フラグメント、あるいは図1の核酸によってコードされる全長タンパク質でもよい。一態様において、癌アミノ酸配列は、配列同一性または配列類似性を決定するために使用される。別の態様において、配列は、図1の核酸によってコードされるタンパク質の天然の対立遺伝子変異体である。別の態様において、配列は、本明細書中にさらに記載されるような、配列変異体である。 20

【0081】

「ヘテロ結合体」抗体は、本方法および組成物において有用である。本明細書において使用される場合、「ヘテロ結合体抗体」という用語は、共有結合した2つの抗体を指す。このような抗体は、架橋剤の使用を含む合成タンパク質化学における公知方法を使用して調製することができる。例えば、米国特許第4,676,980号を参照のこと。

【0082】

「ホモログ」という用語は、例えば、対応する位置において同じである、または類似する化学残基の配列を有することによって、別の分子に対して相同性を示す分子を指す。

【0083】

一態様において、本明細書において提供される抗体は、「ヒト抗体」である。本明細書において使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、相補性決定領域(CDR)を含む、軽鎖配列および重鎖配列の本質的に全ての配列がヒト遺伝子由来である、抗体を指す。一態様において、ヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ技術、ヒトB細胞技術(例えば、Kozbor, et al., Immunol.Today 4:72(1983)を参照のこと)、EBV形質転換技術(例えば、Cole et al., Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy 77-96(1985)を参照のこと)によって、またはファージディスプレイ(例えば、Marks, et al., J.Mol.Biol.222:581(1991)を参照のこと)によって調製される。特定の態様において、ヒト抗体は、トランスジェニックマウスにおいて産生される。このような部分的または完全なヒトの抗体を作るための技術は当技術分野において公知であり、このような任意の技術を使用することができる。1つの特定の好ましい態様によれば、完全ヒト抗体配列が、ヒト重鎖抗体遺伝子およびヒト軽鎖抗体遺伝子を発現するように操作されたトランスジェニックマウスにおいて作られる。ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスおよびその子孫を調製することに関する例示的記載は、出願番号W002/43478および米国特許第6,657,103号(Abgenix)において見出される。次いで、望ましい抗体を産生するトランスジェニックマウス由来のB細胞が、その抗体の連続的産生のためのハイブリドーマ細胞株を作るために融合することができる。例えば、米国特許第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号； 40 50

および同第5,545,806号；ならびにJakobovits, Adv.Drug Del.Rev.31:33-42(1998)；Green, et al., J.Exp.Med.188:483-95(1998)を参照のこと。

【0084】

本明細書において使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト(例えば、マウス)抗体由来の配列ならびにヒト抗体由来の配列を含む、抗体の形態を指す。このような抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含む、キメラ抗体である。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインのうちの実質的に全てを含み、その超可変ループのうちの全てまたは実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域のうちの全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、任意で、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンのものを含む。例えば、Cabilly, 米国特許第4,816,567号；Queen, et al., (1989)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033；およびAntibody Engineering: A Practical Approach (Oxford University Press 1996)を参照のこと。

【0085】

本明細書において使用される場合、「阻害する」または「阻害」という用語は、測定可能な量だけ低減すること、または完全に阻止することを意味する。

【0086】

「単離された」または「生物学的に純粋な」という句は、ある物質のネイティブ状態において見出される、通常はその物質に付随する成分を実質的または本質的に含まない、物質を指す。従って、本発明による単離されたペプチドは、好ましくはそのペプチドのインサイチュ環境においてそのペプチドに通常は付随する物質を含まない。例えば、ポリヌクレオチドは、191P4D12遺伝子以外の遺伝子に対応するかもしくは相補的であるか、またはその191P4D12遺伝子産物以外のポリペプチドもしくはそのフラグメントをコードする、汚染ポリヌクレオチドから実質的に分離されている場合に「単離された」と言われる。当業者であれば、単離された191P4D12ポリヌクレオチドを得るために核酸単離手順を容易に使用することができる。タンパク質は、例えば、191P4D12タンパク質に通常は付随する細胞構成物から191P4D12タンパク質を取り出すために物理的方法、機械的方法、または化学的方法が使用される場合に「単離された」と言われる。当業者であれば、単離された191P4D12タンパク質を得るために、標準的な精製方法を容易に使用することができる。または、単離されたタンパク質は化学的手段によって調製することができる。

【0087】

適切な「標識」には、放射性核種、酵素、基質、補因子、インヒビター、蛍光部分、化学発光部分、磁気粒子などが含まれる。このような標識の使用を開示する特許には、米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号；および同第4,366,241号が含まれる。さらに、本明細書において提供される抗体は、フルオロボディ(fluorobody)の抗原結合成分として有用であり得る。例えば、Zeytun et al., Nat.Biotechnol.21:1473-79(2003)を参照のこと。

【0088】

「哺乳動物」という用語は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、およびヒトを含む、哺乳動物として分類される任意の生物を指す。本発明の一態様において、哺乳動物はマウスである。本発明の別の態様において、哺乳動物はヒトである。

【0089】

「転移癌」および「転移疾患」という用語は、局所的リンパ節または遠位部位に広がっている癌を意味し、AUAシステムにおけるステージDの疾患およびTNMシステムにおけるステージTxNxM+を含むことを意味する。

【0090】

「モジュレーター」もしくは「試験化合物」もしくは「薬物候補」という用語または文法的等価物は、本明細書において使用される場合、癌の表現型または癌配列、例えば、核酸配列もしくはタンパク質配列の発現または癌配列の効果、例えば、シグナル伝達、遺伝子発現、タンパク質相互作用などを直接的もしくは間接的に変える能力について試験しよ

10

20

30

40

50

うとする任意の分子、例えば、タンパク質、オリゴペプチド、有機低分子、多糖、ポリヌクレオチドなどを指す。一局面において、モジュレーターは、本発明の癌タンパク質の効果を中和する。「中和する」とは、タンパク質の活性が、細胞に対する結果として生じる効果とともに阻害もしくはブロックされることを意味する。別の局面において、モジュレーターは、本発明の遺伝子およびその対応するタンパク質の効果を、そのタンパク質のレベルを規準化することによって中和する。好ましい態様において、モジュレーターは、発現プロファイル、本明細書において提供される核酸またはタンパク質の発現プロファイル、または下流エフェクター経路を変える。一態様において、モジュレーターは、癌の表現型を、例えば、正常な組織フィンガープリントへと抑制する。別の態様において、モジュレーターは、癌の表現型を誘導した。一般的に、複数のアッセイ混合物が、種々の薬剤濃度を用いて並行して実施されて、その種々の濃度に対する応答の差が得られる。典型的には、これらの濃度のうちの1つは、ネガティブコントロール、すなわち、ゼロ濃度または検出レベル未満として役立つ。

【0091】

モジュレーター、薬物候補、または試験化合物は、多数の化学物質のクラスを含むが、典型的には、これらは、有機分子、好ましくは、100ダルトン超および約2,500ダルトン未満の分子量を有する有機低分子化合物である。好ましい低分子は、2000D未満または1500D未満または1000D未満または500D未満である。候補薬剤は、タンパク質との構造的相互作用、特に、水素結合のために必要な官能基を含み、典型的には、少なくともアミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基、またはカルボキシル基を含み、好ましくは、これらの官能化学基のうちの少なくとも2つを含む。この候補因子は、しばしば、前記の官能基のうちの1つまたはそれ以上で置換された環状炭素構造もしくは複素環式構造、および/または芳香環構造もしくは多芳香環構造を含む。モジュレーターはまた、生体分子、例えば、ペプチド、糖、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、それらの誘導体、それらの構造アナログ、もしくはそれらの組み合わせを含む。特に好ましいのは、ペプチドである。ある種類のモジュレーターは、ペプチドであり、例えば、約5アミノ酸～約35アミノ酸であり、約5アミノ酸～約20アミノ酸が好ましく、約7アミノ酸～約15アミノ酸が特に好ましい。好ましくは、癌調節タンパク質は可溶性であり、非膜貫通領域を含み、かつ/または溶解性を補助するためのN末端Cysを有する。一態様において、フラグメントのC末端は遊離酸として維持され、そのN末端は、カップリング、すなわち、システインに対するカップリングを補助するための遊離アミンである。一態様において、本発明の癌タンパク質は、本明細書において考察されるような免疫原性薬剤に結合体化される。一態様において、癌タンパク質はBSAに結合体化される。例えば、好ましい長さの本発明のペプチドは、それよりも長いペプチド/タンパク質を作り出すために互いに、または他のアミノ酸に連結することができる。調節ペプチドは、前記で概説されるような天然のタンパク質の消化物、ランダムペプチド、または「偏りのある(biased)」ランダムペプチドでもよい。好ましい態様において、ペプチド/タンパク質ベースのモジュレーターは、本明細書において定義されるような抗体およびそのフラグメントである。

【0092】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書において使用される場合、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体、すなわち、その集団を含む個々の抗体は、微量で存在し得る、起こり得る天然の変異以外は同じである、を指す。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、1つの抗原性エピトープに対する。対照的に、従来の(ポリクローナル)抗体調製物は、典型的には、異なるエピトープに対する(すなわち、それに特異的な)複数の抗体を含む。一態様において、ポリクローナル抗体は、複数の抗原性エピトープを含む1つの抗原との異なるエピトープ特異性、親和性、またはアビディティを有する、複数のモノクローナル抗体を含む。修飾語「モノクローナル」とは、実質的に均一な抗体集団から得られている抗体の特徴を示し、これは、特定の何らかの方法により抗体を産生することを必要とすると解釈すべきではない。例えば、本発明に従って使用されるべきモノクローナル抗体は、Kohler, et al., Nature 256:495(1975)によって最初に記載されたハイブリ

ドーマ方法によって作られてもよく、組換えDNA方法(例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと)によって作られてもよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson, et al., Nature 352:624-628(1991)およびMarks, et al., J.Mol.Biol.222:581-597(1991)に記載された技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから単離することができる。これらのモノクローナル抗体は、通常はELISAによって決定される、通常は少なくとも約1 μ M、より通常は少なくとも約300nM、典型的には少なくとも約30nM、好ましくは少なくとも約10nM、より好ましくは少なくとも約3nM以上のKdで結合する。

【0093】

「薬学的賦形剤」とは、アジュバント、担体、pH調整剤、および緩衝剤、張性調整剤、湿潤剤、防腐剤などの物質を含む。

【0094】

「薬学的に許容可能な」とは、ヒトまたは他の哺乳動物と生理学的に適合性である、非毒性および/または不活性の組成を指す。

【0095】

「ポリヌクレオチド」という用語は、長さが少なくとも10塩基もしくは10塩基対のヌクレオチド、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドのいずれか、またはいずれかの型のヌクレオチドの改変形態のポリマー形態を意味し、これは、一本鎖形態および二本鎖形態のDNAおよび/またはRNAを含む。当技術分野において、この用語は、しばしば、「オリゴヌクレオチド」と同義に用いられる。ポリヌクレオチドは、本明細書において開示される配列を含んでもよく、例えば、図1に示したように、チミジン(T)はまたウラシル(U)でもよい、この定義は、DNAとRNAとの間の化学構造の差、特に、RNAにおける4種の主要な塩基のうちの1つがチミジン(T)の代わりにウラシル(U)であるという観察に関係がある。

【0096】

「ポリペプチド」という用語は、少なくとも約4アミノ酸、少なくとも約5アミノ酸、少なくとも約6アミノ酸、少なくとも約7アミノ酸、または少なくとも約8アミノ酸のポリマーを意味する。本明細書全体を通して、アミノ酸に関する標準的な3文字または1文字の名称が、使用される。当技術分野において、この用語は、しばしば、「ペプチド」または「タンパク質」と同義である。

【0097】

「組換え」DNA分子またはRNA分子は、インビトロでの分子操作に供された、DNA分子またはRNA分子である。

【0098】

本明細書において使用される場合、「単鎖Fv」または「scFv」または「単鎖」抗体という用語は、抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインを含む抗体フラグメントを指し、これらのドメインは、一本のポリペプチド鎖中に存在する。一般的に、Fvポリペプチドは、V_HドメインとV_Lドメインとの間に、sFvが抗原結合のための望ましい構造を形成するのを可能にするポリペプチドリンカーをさらに含む。sFvの概説については、Pluckthun, The Pharmacology Of Monoclonal Antibodies, vol.113, RosenbergおよびMoore編、Springer-Verlag, New York, pp.269-315(1994)を参照のこと。

【0099】

本明細書において使用される場合、「特異的な」、「特異的に結合する(specifically binds)」、および「特異的に結合する(binds specifically)」という用語は、標的抗原エピトープに対する抗体の選択的結合を指す。抗体は、所定の条件の組の下で、適切な抗原に対する結合を、無関係の抗原または抗原混合物に対する結合と比較することによって、結合特異性について試験することができる。抗体は、その適切な抗原に対して、無関係の抗原もしくは抗原混合物よりも少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも7倍、好ましくは少なくとも10倍結合する場合に、その抗体は特異的であると考えられる。一態様において、特異的抗体は、191P4D12抗原にのみ結合するが無関係の抗原には結合しない抗体である。別の態様において、特異的抗体は、ヒト191P4D12抗原に結合するが、191P4D12抗原

と70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上のアミノ酸相同性を有する非ヒト191P4D12抗原とは結合しない、抗体である。別の態様において、特異的抗体は、ヒト191P4D12抗原に結合し、かつマウス191P4D12抗原に結合するが、ヒト抗原に対する結合の程度の方が高い、抗体である。別の態様において、特異的抗体は、ヒト191P4D12抗原に結合しかつ霊長類191P4D12抗原に結合するが、ヒト抗原に対する結合の程度の方が高い、抗体である。別の態様において、特異的抗体は、ヒト191P4D12抗原および任意の非ヒト191P4D12抗原に結合するが、ヒト抗原またはその任意の組み合わせに対する結合の程度の方が高い。

【0100】

本明細書において使用される場合、「処置するため」または「治療的」および文法的に関連する用語は、疾患の任意の結果についての任意の改善、例えば、生存の延長、罹患率の低下、および/または代替的治療様式の副産物である副作用の減弱を指す。当技術分野において容易に認識されるように、疾患の完全な根絶は、処置行為のための必要要件ではないにも関わらず、好ましい。

【0101】

「変異体」という用語は、記載された型または基準からの変化を示す分子、例えば、具体的に記載されるタンパク質(例えば、図1に示した191P4D12タンパク質)の対応する位置において1つまたはそれ以上の異なるアミノ酸残基を有するタンパク質を指す。アナログは、変異体タンパク質の一例である。スプライスアイソフォームおよび一塩基多型(SNP)が、変異体のさらなる例である。

【0102】

本発明の「191P4D12タンパク質」および/または「191P4D12関連タンパク質」は、本明細書において具体的に同定されるもの(図1を参照)、ならびに本明細書において概説される方法もしくは当技術分野で容易に利用可能な方法に従って過度な実験を行わずに単離/作製および特徴付けすることができる、対立遺伝子変異体、保存的置換変異体、アナログ、およびホモログを含む。異なる191P4D12タンパク質の部分またはそのフラグメントを合わせた融合タンパク質、ならびに191P4D12タンパク質と異種ポリペプチドとの融合タンパク質もまた包含される。このような191P4D12タンパク質は、総称して、191P4D12関連タンパク質、本発明のタンパク質、または191P4D12と呼ばれる。「191P4D12関連タンパク質」という用語は、4アミノ酸、5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、16アミノ酸、17アミノ酸、18アミノ酸、19アミノ酸、20アミノ酸、21アミノ酸、22アミノ酸、23アミノ酸、24アミノ酸、25アミノ酸、もしくは25アミノ酸よりも多くの191P4D12タンパク質配列のポリペプチドフラグメント；あるいは少なくとも30アミノ酸、少なくとも35アミノ酸、少なくとも40アミノ酸、少なくとも45アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、少なくとも55アミノ酸、少なくとも60アミノ酸、少なくとも65アミノ酸、少なくとも70アミノ酸、少なくとも80アミノ酸、少なくとも85アミノ酸、少なくとも90アミノ酸、少なくとも95アミノ酸、少なくとも100アミノ酸、少なくとも105アミノ酸、少なくとも110アミノ酸、少なくとも115アミノ酸、少なくとも120アミノ酸、少なくとも125アミノ酸、少なくとも130アミノ酸、少なくとも135アミノ酸、少なくとも140アミノ酸、少なくとも145アミノ酸、少なくとも150アミノ酸、少なくとも155アミノ酸、少なくとも160アミノ酸、少なくとも165アミノ酸、少なくとも170アミノ酸、少なくとも175アミノ酸、少なくとも180アミノ酸、少なくとも185アミノ酸、少なくとも190アミノ酸、少なくとも195アミノ酸、少なくとも200アミノ酸、少なくとも225アミノ酸、少なくとも250アミノ酸、少なくとも275アミノ酸、少なくとも300アミノ酸、少なくとも325アミノ酸、少なくとも330アミノ酸、少なくとも335アミノ酸、少なくとも339アミノ酸またはそれ以上の191P4D12タンパク質配列のポリペプチドフラグメントを指す。

【0103】

II.)191P4D12抗体

本発明の別の局面は、191P4D12関連タンパク質に結合する抗体を提供する(図1を参照さ

10

20

30

40

50

りたい)。1つの態様において、191P4D12関連タンパク質に結合する抗体は、SEQ ID NO.:2のアミノ酸配列を含む191P4D12タンパク質に特異的に結合する抗体である。SEQ ID NO.:2のアミノ酸配列を含む191P4D12タンパク質に特異的に結合する抗体には、他の191P4D12関連タンパク質に結合することができる抗体が含まれる。例えば、SEQ ID NO.:2のアミノ酸配列を含む191P4D12タンパク質に結合する抗体は、191P4D12変種およびそのホモログまたは類似体などの191P4D12関連タンパク質に結合することができる。

【0104】

本発明の191P4D12抗体は、特に、癌(例えば、表Iを参照のこと)の予後判定アッセイ、画像化および治療方法論において有用である。同様に、このような抗体は、結腸癌および他の癌の処置および/または予後判定において、191P4D12がこれらの他の癌においても発現または過剰発現している程度まで有用である。さらに、細胞内で発現される抗体(例えば、単鎖抗体)は、191P4D12の発現が関係する癌、例えば、進行したもしくは転移性の結腸癌または他の進行癌もしくは転移癌を処置することにおいて治療上有用である。

【0105】

抗体、特にモノクローナル抗体、を調製するための種々の方法が当技術分野で周知である。例えば、抗体は、単離されたまたは免疫結合体の形をした191P4D12関連タンパク質、ペプチド、またはフラグメントを使用して、適切な哺乳動物宿主を免疫することによって調製することができる(Antibodies:A Laboratory Manual, CSH Press編, Harlow and Lane(1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY(1989))。さらに、191P4D12 GST-融合タンパク質などの191P4D12融合タンパク質も使用することができる。特定の態様において、図1のアミノ酸配列の全てまたは大部分を含むGST融合タンパク質が作製され、次いで、適切な抗体を生成するために、免疫原として使用される。別の態様において、191P4D12関連タンパク質が合成され、免疫原として使用される。

【0106】

さらに、当技術分野で公知の裸のDNAでの免疫技術が、コードされる免疫原に対する免疫応答を発生させるために、(精製191P4D12関連タンパク質または191P4D12発現細胞ありまたはなしで)使用される(総説に関しては、Donnelly et al., 1997, Ann.Rev.Immunol.15:617-648を参照のこと)。

【0107】

図1に示した191P4D12タンパク質のアミノ酸配列は、抗体を作製するための191P4D12タンパク質の特定の領域を選択するために分析することができる。例えば、191P4D12アミノ酸配列の疎水性および親水性分析は、191P4D12構造における親水性領域を同定するために使用される。免疫原性構造を示す191P4D12タンパク質の領域、ならびに他の領域およびドメインは、当技術分野で公知の種々の他の方法、例えば、Chou-Fasman分析、Garnier-Robson分析、Kyte-Doolittle分析、Eisenberg分析、Karplus-Schultz分析またはJameson-Wolf分析を使用して容易に同定することができる。親水性プロファイルは、Hopp, T.P. and Woods, K.R., 1981, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:3824-3828の方法を使用して作製することができる。ハイドロパシープロファイルは、Kyte, J. and Doolittle, R.F., 1982, J.Mol.Biol.157:105-132の方法を使用して作製することができる。パーセント(%)接近可能残基プロファイルは、Janin J., 1979, Nature 277:491-492の方法を用いて作製することができる。平均可撓性プロファイルは、Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int.J.Pept.Protein Res.32:242-255の方法を使用して作製することができる。 β -ターンプロファイルは、Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294の方法を使用して作製することができる。従って、これらのプログラムまたは方法のいずれかによって同定される各領域は本発明の範囲内である。191P4D12抗体の作製のための好ましい方法は、本明細書で提供される実施例によってさらに例示される。免疫原として使用するためのタンパク質またはポリペプチドを調製する方法は、当技術分野で周知である。タンパク質と、担体、例えば、BSA、KLHまたは他の担体タンパク質との免疫原性結合体を調製する方法もまた、当技術分野で周知である。ある状況では、例えば、カルボジイミド試薬を用いた直接結合が使用される。他の場合において、連結試薬、例えば、Pierce Chemical Co

., Rockford, ILによって供給されるものが有効である。191P4D12免疫原の投与は、当技術分野で理解されるように、しばしば、適切なアジュバントの使用とともに、適切な期間にわたる注射によって行われる。免疫化スケジュールの間に、抗体形成の妥当性を確かめるために、抗体力価を調べることができる。

【0108】

191P4D12モノクローナル抗体は、当技術分野で周知の種々の手段によって生成することができる。例えば、望ましいモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株は、一般に知られるように、KohlerおよびMilsteinの標準的ハイブリドーマ技術または抗体産生B細胞を不死化する改変法を使用して調製される。望ましい抗体を分泌する不死化細胞株は、抗原が191P4D12関連タンパク質であるイムノアッセイによってスクリーニングされる。適切な不死化細胞培養物が同定された場合、その細胞を増殖させ、インビトロ培養物または腹水のいずれかから抗体を生成することができる。

10

【0109】

本発明の抗体またはフラグメントはまた、組換え手段によって生成することができる。キメラ領域または相補性決定領域(CDR)が接ぎ合わされた複数種由来の抗体の状況において、191P4D12タンパク質の望ましい領域に特異的に結合する領域も生成することができる。ヒト化またはヒトの191P4D12抗体も生成することができ、治療状況における使用に好ましい。非ヒト抗体CDRの1つまたは複数に対応するヒト抗体配列で置換することによって、マウスおよび他の非ヒト抗体をヒト化する方法は周知である(例えば、Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536を参照のこと)。Carter et al., 1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285およびSims et al., 1993, J.Immunol.151:2296もまた参照のこと。

20

【0110】

好ましい態様において、本発明の抗体は、完全ヒト191P4D12抗体(191P4D12 MAb)を含む。当技術分野における種々の方法は、完全ヒト191P4D12 MAbを生成する手段を提供する。例えば、好ましい態様は、Xenomouse(Amgen Fremont, Inc.)と呼ばれる、抗体産生が不活性化され、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座を用いて操作されたトランスジェニックマウスを使用した技法を提供する。ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスを作る例示的記載は、米国特許第6,657,103号に見られる。米国特許第5,569,825号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,661,016号;および同第5,545,806号;ならびにMendez, et al., Nature Genetics 15:146-156(1998); Kellerman, S. A. & Green, L. L., Curr. Opin. Biotechnol.13:593-597(2002)も参照されたい。

30

【0111】

さらに、本発明のヒト抗体は、再編成されないヒト重鎖(μ および γ)ならびに κ 軽鎖免疫グロブリン配列と、内因性 μ 鎖および κ 鎖遺伝子座を不活性化する標的化変異をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座(miniloci)を含有するHuMAbマウス(Medarex, Inc.)を使用して作製することができる(例えば、Lonberg, et al. (1994)Nature 368(6474):856-859を参照のこと)。

【0112】

別の態様において、本発明の完全ヒト抗体は、トランスジーンおよびトランスクロモソーム上にヒト免疫グロブリン配列を有するマウス、例えば、ヒト重鎖トランスジーンおよびヒト軽鎖トランスクロモソームを有するマウスを用いて産生することができる。このようなマウスは本明細書において「KM マウス」と呼ばれ、Tomizuka, et al. (2000)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727およびTomizukaらへのPCT公報W002/43478に記載されている。

40

【0113】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためにファージディスプレイ法を使用して調製することができる。ヒト抗体単離用の、このようなファージディスプレイ法は、当技術分野において確立されている。例えば、Ladner, et al.への米国特許第5,223,409号;同第5,403,484号;および同第

50

5,571,698号;Dower, et al.への米国特許第5,427,908号および同第5,580,717号;McCafferty, et al.への米国特許第5,969,108号および同第6,172,197号;ならびにGriffiths, et al.への米国特許第5,885,793号;同第6,521,404号;同第6,544,731号;同第6,555,313号;同第6,582,915号および同第6,593,081号を参照のこと。

【0114】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、免疫化の際にヒト抗体応答が発生するように、ヒト免疫細胞が再構成されているSCIDマウスを使用して作ることができる。このようなマウスは、例えば、Wilson, et al.への米国特許第5,476,996号および5,698,767号に記載されている。

【0115】

好ましい態様において、本発明の191P4D12 MAbは、American Type Culture Collection (ATCC) アクセッション番号:PTA-11267で寄託されたハイブリドーマによって産生され、Ha22-2(2,4)6.1と命名された抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域(図3を参照されたい)、またはHa22-2(2,4)6.1の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列と相同のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、ここで、抗体は、本発明の191P4D12 MAbの所望の機能特性を保持している。Ha22-2(2,4)6.1の重鎖可変領域は、SEQ ID NO:7の20番目のE残基から136番目のS残基のアミノ酸配列からなり、Ha22-2(2,4)6.1の軽鎖可変領域は、SEQ ID NO:8の23番目のD残基から130番目のR残基のアミノ酸配列からなる。本発明の抗体の定常領域として、任意の定常領域サブクラスを選択することができる。一態様において、重鎖定常領域としてヒトIgG1定常領域、軽鎖定常領域としてヒトIgκ定常領域を使用することができる。

【0116】

例えば、本発明は、単離されたモノクローナル抗体、または重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、その抗原結合部分を提供する：

- (a) 重鎖可変領域は、図3に示した重鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも80%相同のアミノ酸配列を含み、かつ
- (b) 軽鎖可変領域は、図3に示した軽鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも80%相同のアミノ酸配列を含む。

【0117】

他の態様において、 V_H および/または V_L アミノ酸配列は、図3に示した V_H および V_L 配列と85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%相同でもよい。

【0118】

別の態様において、本発明は、単離されたモノクローナル抗体、またはヒト化重鎖可変領域およびヒト化軽鎖可変領域を含む、その抗原結合部分を提供する、ここで、

- (a) 重鎖可変領域は、図3に示した重鎖可変領域CDRのアミノ酸配列を有する相補性決定領域(CDR)を含み、
- (b) 軽鎖可変領域は、図3に示した軽鎖可変領域CDRのアミノ酸配列を有するCDRを含む。

【0119】

本発明の操作された抗体には、(例えば、抗体の特性を改善するために) V_H および/または V_L の中のフレームワーク残基が改変されているものが含まれる。典型的に、このようなフレームワークの改変は、抗体の免疫原性を下げるためになされる。例えば、1つのアプローチは、1つまたは複数のフレームワーク残基を、対応する生殖系列配列に「復帰突然変異(backmutate)」させることである。より具体的には、体細胞変異を経ている抗体は、抗体の元となった生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有することがある。このような残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体の元となった生殖系列配列と比較することによって同定することができる。フレームワーク領域配列をその生殖系列配置に戻すために、例えば、部位特異的変異誘発またはPCRを介した変異誘発によって、体細胞変異を生殖系列配列に「復帰突然変異」させることができる(例えば、ロイシンをメチオニンに「復帰突然変異」させる)。このような「復帰突然変異」抗体もまた本発明に含まれる

と意図される。

【0120】

別の型のフレームワーク改変は、T細胞エピトープを取り除くために、フレームワーク領域の中の1つまたは複数の残基、または1つまたは複数のCDR領域の中の1つまたは複数の残基さえも変異させて、抗体の潜在的な免疫原性を少なくすることを伴う。このアプローチは、「脱免疫化(deimmunization)」とも呼ばれ、Carr, et al.による米国特許公開公報第2003/0153043号にさらに詳しく説明される。

【0121】

フレームワークまたはCDR領域の中になされる改変に加えて、またはその代わりとして、本発明の抗体は、典型的には、抗体の1つまたは複数の機能特性、例えば、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/または抗原依存性細胞傷害性を変えるために、Fc領域内の改変を含むように操作されてもよい。さらに、本発明の191P4D12 MAbは化学的に改変されてもよく(例えば、1つまたは複数の化学的部分が抗体に取り付けられてもよく)、グリコシル化を変えるように改変されてもよく、また、MAbの1つまたは複数の機能特性を変えるように改変されてもよい。これらの態様はそれぞれ以下でさらに詳しく説明される。

10

【0122】

一態様において、ヒンジ領域内のシステイン残基の数に変化、例えば、増加または減少するように、CH1のヒンジ領域が改変される。このアプローチは、Bodmer, et al.への米国特許第5,677,425号にさらに説明されている。CH1のヒンジ領域内のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖の組み立てを容易にするために、または191P4D12 MAbの安定性を上げる、もしくは下げるために変えられる。

20

【0123】

別の態様において、抗体のFcヒンジ領域は、191P4D12 MAbの生物学的半減期を短くするように変異される。より具体的には、抗体のスタフィロコッカス(*Staphylococcyll*)プロテインA(SpA)結合がネイティブなFc-ヒンジドメインSpA結合と比べて低下するように、1つまたは複数のアミノ酸変異が、Fc-ヒンジフラグメントのCH2-CH3ドメイン界面領域に導入される。このアプローチは、Ward, et al.による米国特許第6,165,745号にさらに詳しく説明されている。

【0124】

別の態様において、生物学的半減期が長くなるように、191P4D12 MAbが改変される。様々なアプローチが可能である。例えば、Wardへの米国特許第6,277,375号に記載のように変異を導入することができる。または、生物学的半減期を長くするために、Presta, et al.による米国特許第5,869,046号および同第6,121,022号に記載のように、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから取られたサルベージ(salvage)受容体結合エピトープを含有するように、抗体のCH1領域内またはCL領域内を変えることができる。

30

【0125】

さらに他の態様では、Fc領域は、191P4D12 MAbのエフェクター機能を変えるために、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することによって変えられる。例えば、エフェクターリガンドに対する抗体の親和性が変化しているが、親抗体の抗原結合能を保持しているように、アミノ酸特異的残基より選択される1つまたは複数のアミノ酸を、異なるアミノ酸残基で置換することができる。親和性が変えられるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分でもよい。このアプローチは、Winter, et al.による米国特許第5,624,821号および同第5,648,260号にさらに詳しく説明されている。

40

【0126】

191P4D12抗体と191P4D12関連タンパク質との反応性は、適宜、191P4D12関連タンパク質、191P4D12発現細胞またはその抽出物を用いて、ウエスタンブロット、免疫沈降、ELISA、およびFACS分析を含む多くの周知の手段によって確立することができる。191P4D12抗体またはそのフラグメントは、検出可能なマーカーで標識されてもよく、第2の分子に結合

50

体化されてもよい。適切な検出可能なマーカーには、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素が含まれるが、これに限定されない。さらに、2つまたはそれ以上の191P4D12エピトープに特異的な二重特異性抗体は、当技術分野で一般に公知の方法を使用して作製される。ホモ二量体抗体もまた、当技術分野で公知の架橋技術(例えば、Wolff et al., Cancer Res. 53:2560-2565)によって作製することができる。

【0127】

さらに別の好ましい態様において、本発明の191P4D12 MAbは、Ha22-2(2,4)6.1と命名された抗体の重鎖および軽鎖を含む抗体である。Ha22-2(2,4)6.1の重鎖は、SEQ ID NO:7の20番目のE残基から466番目のK残基のアミノ酸配列からなり、Ha22-2(2,4)6.1の軽鎖は、SEQ ID NO:8配列の23番目のD残基から236番目のC残基のアミノ酸配列からなる。この配列を図2および図3に示した。好ましい態様において、Ha22-2(2,4)6.1は細胞傷害剤と結合体化している。

【0128】

Ha22-2(2,4)6.1と命名された抗体を産生するハイブリドーマは、2010年8月18日に(Federal Expressを介して)American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108に送られ、アクセッション番号PTA-11267が割り当てられた。

【0129】

III.) 抗体薬物結合体 総論

別の局面において、本発明は、抗体が、細胞傷害剤、例えば、化学療法剤、薬物、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物に由来する酵素活性を有する毒素、またはその断片)に結合体化している、あるいは放射性同位体に結合体化している(すなわち、放射性結合体(radioconjugate))、抗体薬物結合体(ADC)を提供する。別の局面において、さらに、本発明は、ADCを使用する方法を提供する。1つの局面において、ADCは、細胞傷害剤または検出可能な薬剤に共有結合した本明細書記載の191P4D12 MAbを含む。

【0130】

癌処置において、細胞傷害剤または細胞分裂阻害剤、すなわち、腫瘍細胞を死滅または阻害する薬物を局所送達するために抗体薬物結合体を用いると(Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; 米国特許第4,975,278号)、薬物部分を腫瘍に標的送達し、腫瘍内で細胞内蓄積させることが可能になる。この場合、これらの非結合体化薬物を全身送達すると、正常細胞に対して容認できないレベルの毒性が生じることがあり、腫瘍細胞が排除されることも求められる(Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506)。それにより、最小の毒性で最大の効力が求められる。これらの戦略において、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体がどちらも有用であると報告されている(Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。これらの方法において用いられる薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキセート、およびビンデシン(Rowland et al., (1986)前記)が含まれる。抗体毒素結合体において用いられる毒素には、細菌毒素、例えば、ジフテリア毒素、植物毒素、例えば、リシン、低分子毒素、例えば、ゲルダナマイシン(Mandler et al (2000) Jour, of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、マイタンシノイド(EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 93:8618-8623)、およびカリチアマイシン (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342)が含まれる。これらの毒素は、チューブリン結合、DNA結合、またはトポイソメラーゼ阻害を含む機構によって細胞傷害作用および細胞分裂阻害作用を発揮することができる。一部の細胞傷害薬物は、大きな抗体またはタンパク質受容体リガンドと結合体化した時に不活性になる、または活性が低くなる傾

向がある。

【0131】

抗体薬物結合体の例は、正常Bリンパ球および悪性Bリンパ球の表面上に見出されるCD20抗原に対するマウスIgG1κモノクローナル抗体と¹¹¹Inまたは⁹⁰Y放射性同位体がチオ尿素リンカー-キレート剤によって結合している抗体放射性同位体結合体であるZEVALIN(登録商標)(イブリツモマブチウキセタン、Biogen/Idec)である(Wiseman et al (2000) Eur. J. our. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。

【0132】

さらに、2000年に、huCD33抗体とカリチアマイシンが連結した抗体薬物結合体であるMY LOTARG(商標)(ゲムツズマブオゾガマイシン、Wyeth Pharmaceuticals)が、注射による急性骨髄性白血病処置のために認可された(Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 米国特許第4970198号; 同第5079233号; 同第5585089号; 同第5606040号; 同第5693762号; 同第5739116号; 同第5767285号; 同第5773001号)。

【0133】

さらに、CanAgを発現する癌、例えば、結腸癌、膵臓癌、胃癌、およびその他の癌を処置するために、huC242抗体がジスルフィドリンカー-SPPを介してマイタンシノイド薬物部分、DM1に連結している抗体薬物結合体であるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)が第II相臨床試験に進んでいる。

【0134】

さらに、前立腺腫瘍の有望な処置のために、抗前立腺特異的膜抗原(PSMA)モノクローナル抗体とマイタンシノイド薬物部分、DM1が連結している抗体薬物結合体であるMLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)が開発中である。

【0135】

最後に、ドラスタチンの合成類似体である、アウリスタチンペプチド、アウリスタチンE(AE)、およびモノメチルアウリスタチン(MMAE)が、キメラモノクローナル抗体cBR96(癌腫上にあるLewis Yに特異的)およびcAC10(血液悪性腫瘍上にあるCD30に特異的)と結合体化され(Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)、治療開発中である。

【0136】

さらに、ADCの作製において有用な化学療法剤が本明細書に記載されている。使用することができる、酵素活性を有する毒素およびその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、エキソトキシンA鎖(緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)に由来する)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、α-サルシン(sarcin)、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、アメリカヤマゴボウ(*Phytolaca americana*)タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ニガウリ(*momordica charantia*)阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ(*sapaonaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、およびエノマイシン(enomycin)、ならびにトリコテセンが含まれる。例えば、1993年10月28日に公開されたW093/21232を参照されたい。放射性結合体化抗体を作製するために、様々な放射性核種を利用することができる。例には、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y、および¹⁸⁶Reが含まれる。抗体および細胞傷害剤の結合体は、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、ジメチルアジピミデートHCl)、活性エステル(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、bis-アジド化合物(例えば、bis(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、bis-ジアゾニウム誘導体(例えば、bis-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート)、およびbis-活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を用い

10

20

30

40

50

て作られる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al (1987) Science, 238:1098に記載のように調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチド(radionucleotide)を抗体に結合体化するための例示的なキレート剤である(WO94/11026)。

【0137】

抗体と、1つまたは複数の低分子毒素、例えば、カリチアマイシン、マイタンシノイド、ドラスタチン、アウリスタチン、トリコテセン、およびCC1065、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体との結合体も本明細書において意図される。

【0138】

III(A).マイタンシノイド

マイタンシノイド薬物部分として使用するのに適したマイタンシン化合物は当技術分野において周知であり、公知の方法に従って天然源から単離することができ、または遺伝子工学法を用いて作製することができる(Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973を参照されたい)。または、公知の方法に従って、マイタンシノールおよびマイタンシノール類似体を合成により調製することができる。

【0139】

例示的なマイタンシノイド薬物部分には、修飾された芳香環を有するもの、例えば、C-19-デクロロ(US4256746)(アンサマイトシン(ansamycin)P2の水素化アルミニウムリチウム還元によって調製);C-20-ヒドロキシ(またはC-20-デメチル)+/-C-19-デクロロ(米国特許第4,361,650号および同第4,307,016号)(ストレプトマイセス属(*Streptomyces*)もしくは放線菌属(*Actinomyces*)を用いた脱メチル、またはLAHを用いた脱塩素によって調製);ならびにC-20-デメトキシ、C-20-アシルオキシ(-OCOR)、+/-デクロロ(米国特許第4,294,757号)(塩化アシルを用いたアシル化によって調製)、ならびに他の位置に修飾を有するものが含まれる。

【0140】

例示的なマイタンシノイド薬物部分には、修飾を有するもの、例えば、C-9-SH(US4,424,219)(マイタンシノールとH₂SまたはP₂S₅との反応によって調製);C-14-アルコキシメチル(デメトキシ/CH₂OR)(US4331598);C-14-ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル(CH₂OHまたはCH₂OAc)(US4450254)(*Nocardia*から調製);C-15-ヒドロキシ/アシルオキシ(US4,364,866)(ストレプトマイセス属によるマイタンシノール変換によって調製);C-15-メトキシ(米国特許第4,313,946号および同第4,315,929号)(トレウィア・ヌドルフローラ(*Trewia nudiflora*)から単離);C-18-N-デメチル(米国特許第4,362,663号および同第4,322,348号)(ストレプトマイセス属によるマイタンシノールの脱メチルによって調製);ならびに4,5-デオキシ(US4,371,533)(マイタンシノールの三塩化チタン/LAH還元によって調製)も含まれる。

【0141】

マイタンシノイドを含有するADC、これを作る方法、およびこの治療上の使用は、例えば、米国特許第5,208,020号;同第5,416,064号;同第6,441,163および欧州特許第EP0425235 B1号に開示されている。これらの開示は参照により本明細書にはっきりと組み入れられる。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)は、DM1と命名されたマイタンシノイドと、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242が連結したADCについて説明した。この結合体は、結腸癌培養細胞に対して高度に細胞傷害性であることが見出され、インビボ腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)は、ジスルフィドリンカーを介して、マイタンシノイドが、ヒト結腸癌細胞株上にある抗原に結合するマウス抗体A7、またはHER-2/neu癌遺伝子に結合する別のマウスモノクローナル抗体TA.1と結合体化しているADCについて述べている。細胞1個につき3x10⁵個のHER-2表面抗原を発現するヒト乳癌細胞株SK-BR-3に対して、TA.1-マイタンシノイド(maytansonoid)結合体の細胞傷害性がインビトロで試験された。この薬物結合体は、遊離マイタンシノイド薬物とほぼ同じ程度の細胞傷害性を実現した。抗体分子1個あたりのマイタンシノイド分子の数を増やすことによって細胞傷害性を高

10

20

30

40

50

めることができた。マウスにおけるA7-マイタンシノイド結合体の全身細胞傷害性は低かった。

【0142】

III(B).アウリスタチンおよびドラスタチン

一部の態様において、ADCは、ドラスタチンまたはドラスタチンのペプチド類似体および誘導体であるアウリスタチン(米国特許第5,635,483号;同第5,780,588号)と結合体化した本発明の抗体を含む。ドラスタチンおよびアウリスタチンは、微小管の動態、GTP加水分解、ならびに核分裂および細胞分裂を妨害することが示されており(Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)、抗癌活性(US5,663,149)および抗真菌活性(Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有する。ドラスタチンまたはアウリスタチン薬物部分は、ペプチド薬物部分のN(アミノ)末端またはC(カルボキシル)末端を介して抗体に取り付けることができる(W002/088172)。

10

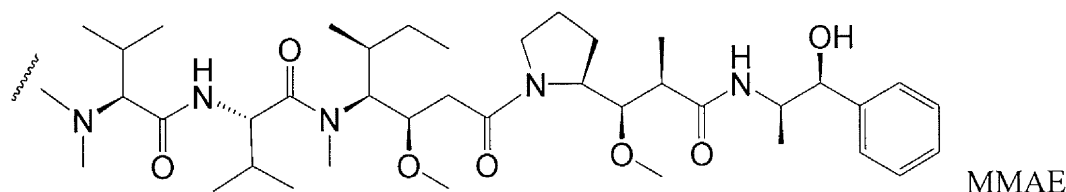
【0143】

例示的なアウリスタチン態様には、2004年5月28日に発表されたSenter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示され、米国特許出願公開第2005/0238649号において説明された、N末端結合モノメチルアウリスタチン薬物部分DEおよびDFが含まれる。これらの開示は、その全体が参照によりはっきりと組み入れられる。

【0144】

例示的なアウリスタチン態様はMMAEである(式中、波線は、抗体薬物結合体のリンカー(L)との共有結合を示す)。

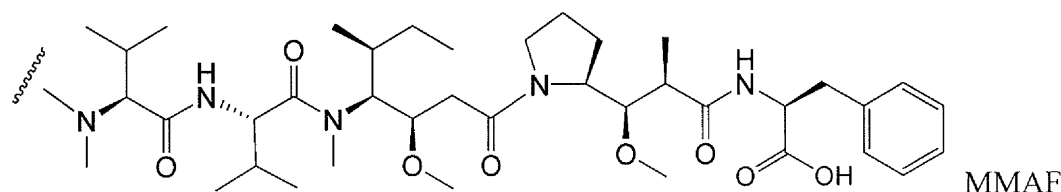
20



【0145】

別の例示的なアウリスタチン態様はMMAFである。式中、波線は、抗体薬物結合体のリンカー(L)との共有結合を示す(US2005/0238649)。

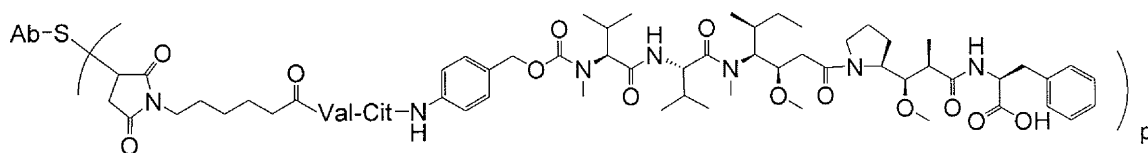
30



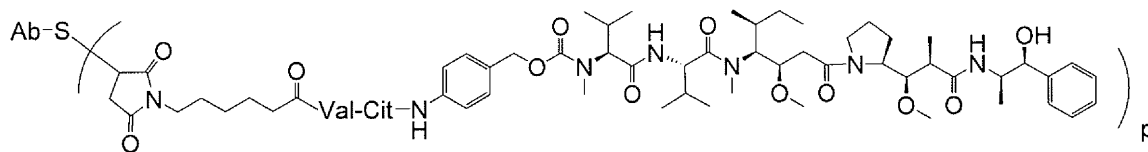
【0146】

MMAEまたはMMAFおよび様々なリンカー成分(本明細書においてさらに説明される)を含むさらなる例示的な態様は、以下の構造および略語を有する(Abは抗体を意味し、Sは抗体の硫黄であり、pは1~約8である)。

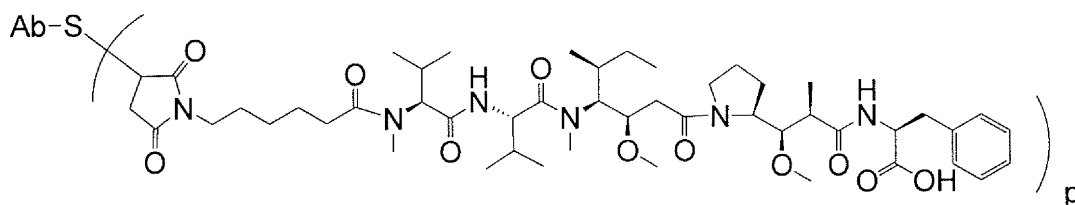
40



Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAF

10

20

【0147】

典型的には、ペプチドをベースとする薬物部分は、2個以上のアミノ酸および/またはペプチド断片の間でペプチド結合を形成することによって調製することができる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学分野において周知の液相合成法(E. Schroder and K. Lubke, 「The Peptides」, volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照されたい)に従って調製することができる。アウリスタチン/ドラスタチン薬物部分は、US5635483;US5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863;およびDoronica (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784の方法に従って調製されてもよい。

30

【0148】

III(C). カリチアマイシン

他の態様において、ADCは、1個または複数のカリチアマイシン分子と結合体化した本発明の抗体を含む。カリチアマイシン系抗生物質は、pM未満の濃度で二本鎖DNAを切断することができる。カリチアマイシン系の結合体の調製については、米国特許第5,712,374号、同第5,714,586号、同第5,739,116号、同第5,767,285号、同第5,770,701号、同第5,770,710号、同第5,773,001号、同第5,877,296号(全て、American Cyanamid Companyに対する)を参照されたい。使用することができるカリチアマイシンの構造類似体には、 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-アセチル- γ_1^I 、PSAG、および θ^I が含まれるが、これに限定されない(Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)、Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)、およびAmerican Cyanamidに対する前記の米国特許)。抗体を結合体化することができる別の抗腫瘍薬物は、葉酸代謝拮抗剤であるQFAである。カリチアマイシンおよびQFAはいずれも細胞内作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。従って、抗体を介した内部移行によって、これらの薬剤が細胞に取り込まれると、細胞傷害作用が大幅に高まる。

40

【0149】

III(D). 他の細胞傷害剤

本発明の抗体と結合体化することができる他の抗癌剤には、BCNU、ストレプトゾイシン(streptozocin)、ビンクリスチンおよび5-フルオロウラシル、米国特許第5,053,394号、

50

同第5,770,710号に記載のLL-E33288複合体と総称される薬剤ファミリー、ならびにエスペラミシン(米国特許第5,877,296号)が含まれる。

【0150】

使用することができる、酵素活性を有する毒素およびその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、エキソトキシンA鎖(緑膿菌に由来する)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチンタンパク質、アメリカヤマゴボウタンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ニガウリ阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、およびエノマイシン、ならびにトリコテセンが含まれる。例えば、1993年10月28日に公開されたW093/21232を参照されたい。

10

【0151】

さらに、本発明は、抗体と、核酸分解活性のある化合物(例えば、リボヌクレアーゼまたはDNAエンドヌクレアーゼ、例えば、デオキシリボヌクレアーゼ;DNアーゼ)との間に形成されたADCを意図する。

【0152】

腫瘍を選択的に破壊するために、抗体は高放射性原子を含んでもよい。放射性結合抗体を作製するために、様々な放射性同位体を利用することができる。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、およびLuの放射性同位体が含まれる。結合体が検出のために用いられる場合、シンチグラフィ研究用の放射性原子、例えば、 $\text{tc}^{99\text{m}}$ もしくは I^{123} 、または核磁気共鳴(NMR)イメージング(核磁気共鳴画像法、mriとも知られる)用のスピン標識、例えば、再度、ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、または鉄を含んでもよい。

20

【0153】

放射性標識または他の標識を公知のやり方で結合体に組み込むことができる。例えば、水素の代わりに、例えば、フッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を用いて、ペプチドを生合成してもよく、アミノ酸化学合成によって合成してもよい。ペプチド内のシステイン残基を介して、 $\text{tc}^{99\text{m}}$ または I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、および In^{111} などの標識を取り付けることができる。リジン残基を介してイットリウム-90を取り付けることができるIODOGEN法(Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)を用いて、ヨウ素-123を組み合わせることができる。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)は他の方法について詳述している。

30

【0154】

IV.)191P4D12に結合する抗体薬物結合体化合物

本発明は、特に、薬物を標的送達するための抗体薬物結合体化合物を提供する。本発明者らは、この抗体薬物結合体化合物が、191P4D12発現細胞に対して強力な細胞傷害活性および/または細胞分裂阻害活性を有することを発見した。この抗体薬物結合体化合物は、少なくとも1つの薬物ユニットと共有結合した抗体ユニットを含む。薬物ユニットは直接、共有結合してもよく、リンカーユニット(LU)を介して共有結合してもよい。

【0155】

一部の態様において、抗体薬物結合体化合物は、以下の式:

$\text{L}-(\text{LU}-\text{D})_p \quad (\text{I})$

を有するか、その薬学的に許容される塩または溶媒和化合物であり、式中、

Lは、抗体ユニット、例えば、本発明の191P4D12 MAbであり、

(LU-D)は、リンカーユニット-薬物ユニット部分であり、式中、

LU-はリンカーユニットであり、

-Dは、標的細胞に対する細胞分裂阻害活性または細胞傷害活性を有する薬物ユニットであり;

pは1~20の整数である。

40

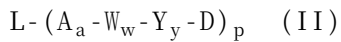
50

【0156】

一部の態様において、pは、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、または1～2である。一部の態様において、pは、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、または2～3である。他の態様において、pは、1、2、3、4、5、または6である。一部の態様において、pは2または4である。

【0157】

一部の態様において、抗体薬物結合体化合物は、以下の式：



を有するか、その薬学的に許容される塩または溶媒和化合物であり、
式中、

Lは、抗体ユニット、例えば、191P4D12 MAbであり；

-A_a-W_w-Y_y-はリンカーユニット(LU)であり、式中、

-A-はストレッチャーユニットであり、

aは0または1であり、

それぞれの-W-は独立してアミノ酸ユニットであり、

wは0～12の整数であり、

-Y-は自己犠牲(self-immolative)スペーサーユニットであり、

yは0、1、または2であり；

-Dは、標的細胞に対して細胞分裂阻害活性または細胞傷害活性を有する薬物ユニットであり；

pは1～20の整数である。

【0158】

一部の態様において、aは0または1であり、wは0または1であり、yは0、1、または2である。一部の態様において、aは0または1であり、wは0または1であり、yは0または1である。一部の態様において、pは1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、または1～2である。一部の態様において、pは2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、または2～3である。他の態様において、pは1、2、3、4、5、または6である。一部の態様において、pは2または4である。一部の態様において、wが0でない場合、yは1または2である。一部の態様において、wが1～12である場合、yは1または2である。一部の態様において、wは2～12であり、yは1または2である。一部の態様において、aは1であり、wおよびyは0である。

【0159】

複数の抗体を含む組成物の場合、抗体1個あたりの薬物分子の数の平均である薬物ローディング(drug loading)はpによって表される。薬物ローディングは、抗体1個あたり1～20個の薬物(D)でもよい。結合体化合物調製物中の抗体1個あたりの薬物の数の平均は、質量分析、ELISAアッセイ、およびHPLCなどの従来手段によって特徴付けることができる。pに関する抗体薬物結合体の定量分布も求めることができる。場合によっては、他の薬物ローディングを有する抗体薬物結合体からの、pがある特定の値の均一な抗体薬物結合体の分離、精製、および特徴付けは、逆相HPLCまたは電気泳動などの手段によって達成することができる。例示的な態様において、pは2～8である。

【0160】

抗体薬物結合体化合物の作製は、当業者に公知の任意の技法によって達成することができる。簡単に述べると、抗体薬物結合体化合物は、抗体ユニットとして191P4D12 MAb、薬物、任意で、薬物と結合剤をつなぐリンカーを含む。好ましい態様において、抗体は、前記のHa22-2(2,4)6.1と命名された抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む191P4D12 MAbである。より好ましい態様において、抗体は、前記のHa22-2(2,4)6.1と命名された抗体の重鎖および軽鎖を含む191P4D12 MAbである。薬物および/またはリンカーを結合剤に共有結合するために、多くの異なる反応を利用することができる。これは、多くの場合、リジンのアミン基、グルタミン酸およびアスパラギン酸の遊離カルボン酸基、システインのスルフヒドリル基、ならびに芳香族アミノ酸の様々な部分を含む、結合剤、例えば、抗体分子のアミノ酸残基の反応によって達成される。最も一般的に用いられる非特異的な共

10

20

30

40

50

有結合方法の1つは、化合物のカルボキシ(またはアミノ)基を抗体のアミノ(またはカルボキシ)基に連結するカルボジイミド反応である。さらに、化合物のアミノ基を抗体分子のアミノ基に連結するために、二官能性薬剤、例えば、ジアルデヒドまたはイミドエステルが用いられている。薬物を結合剤に取り付けるためにシッフ塩基反応も用いられる。この方法は、グリコールまたはヒドロキシ基を含有する薬物を過ヨウ素酸酸化してアルデヒドを形成し、次いで、このアルデヒドを結合剤と反応させることを伴う。結合剤のアミノ基を有するシッフ塩基の形成を介して取り付けが行われる。薬物を結合剤に共有結合するために、カップリング剤としてイソチオシアネートも使用することができる。他の技法が当業者に公知であり、本発明の範囲内である。

【0161】

ある特定の態様では、リンカーの前駆体である中間体を薬物と適切な条件下で反応させる。ある特定の態様では、薬物および/または中間体にある反応基が用いられる。その後、薬物と中間体とが反応した生成物、すなわち誘導体化薬物を、191P4D12 MAbと適切な条件下で反応させる。

【0162】

抗体薬物結合体化合物の特定のユニットがそれぞれ本明細書において詳述される。例示的なリンカーユニット、ストレッチャーユニット、アミノ酸ユニット、自己犠牲スペーサーユニット、および薬物ユニットの合成および構造は、米国特許出願公開第2003-0083263号、同第2005-0238649号、および同第2005-0009751号にも記載されている。これらはそれぞれ、その全体が、および全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられる。

【0163】

V.) リンカーユニット

典型的には、抗体薬物結合体化合物は、薬物ユニットと抗体ユニットとの間にリンカーユニットを含む。一部の態様では、細胞内環境においてリンカーが切断されると抗体から薬物ユニットが放出されるように、リンカーは細胞内条件下で切断可能である。さらに他の態様では、リンカーユニットは切断することができず、薬物は、例えば、抗体分解によって放出される。

【0164】

一部の態様において、リンカーは、細胞内環境に(例えば、リソソームまたはエンドソームまたはカベオラの中に)存在する切断剤によって切断可能である。リンカーは、例えば、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼを含むが、これに限定されない、細胞内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ジルリンカーでもよい。一部の態様において、ペプチジルリンカーは、少なくとも2アミノ酸長または少なくとも3アミノ酸長である。切断剤はカテプシンBおよびカテプシンDならびにプラスミンを含んでもよく、これらは全てジペプチド薬物誘導体を加水分解して、標的細胞内にある活性薬物を放出することが知られている(例えば、Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123を参照されたい)。最も代表的なものは、191P4D12発現細胞に存在する酵素によって切断可能なペプチジルリンカーである。例えば、癌組織において高発現しているチオール依存性プロテアーゼであるカテプシン-Bによって切断可能なペプチジルリンカー(例えば、Phe-LeuまたはGly-Phe-Leu-Glyリンカー(SEQ ID NO:9))を使用することができる。このようなリンカーの他の例は、例えば、その全体が、および全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,214,345号に記載されている。特定の態様では、細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチジルリンカーは、Val-CitリンカーまたはPhe-Lysリンカーである(例えば、Val-Citリンカーを有するドキソルビシンの合成について述べている米国特許第6,214,345号を参照されたい)。細胞内タンパク質分解による治療剤放出を用いる利点の1つは、薬剤が結合体化された時には典型的に弱毒化し、結合体の血清安定性が典型的に高いことである。

【0165】

他の態様において、切断可能なリンカーは、pH感受性、すなわち、ある特定のpH値での加水分解に対して感受性である。典型的に、pH感受性リンカーは酸性条件下で加水分解さ

10

20

30

40

50

れる。例えば、リソソーム内で加水分解される酸不安定性リンカー(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、ケタールなど)を使用することができる(例えば、米国特許第5,122,368号;同第5,824,805号;同第5,622,929号;Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661を参照されたい)。このようなリンカーは、中性pH条件下で、例えば、血中の中性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pH5.5未満またはpH5.0では不安定である。ある特定の態様では、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取り付けられるチオエーテル(例えば、米国特許第5,622,929号を参照されたい))。

10

【0166】

さらに他の態様では、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)。例えば、SATA(N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート)、SPDP(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)、SPDB(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート)、ならびにSMPT(N-スクシンイミジル-オキシカルボニル- α -メチル- α -(2-ピリジル-ジチオ)トルエン)、SPDB、およびSMPTを用いて形成することができるジスルフィドリンカーを含めて、様々なジスルフィドリンカーが当技術分野において公知である(例えば、Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987を参照されたい。米国特許第4,880,935号も参照されたい。))。

20

【0167】

さらに他の特定の態様において、リンカーは、マロネートリンカー(Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93)、マレイミドベンゾイルリンカー(Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304)、または3'-N-アミド類似体(Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12)である。

【0168】

さらに他の態様では、リンカーユニットは切断することができず、薬物は抗体分解によって放出される(その全体が、および全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第2005/0238649号を参照されたい)。

30

【0169】

典型的に、リンカーは、細胞外環境に対して実質的に感受性でない。リンカーに関して本明細書において使用される場合、「細胞外環境に対して実質的に感受性でない」とは、抗体薬物結合体化合物が細胞外環境に(例えば、血漿中に)存在している時に、抗体薬物結合体化合物の試料に含まれるリンカーの約20%以下、典型的には約15%以下、さらに典型的には約10%以下、さらにより典型的には約5%以下、約3%以下、または約1%以下が切断されることを意味する。リンカーが、細胞外環境に対して実質的に感受性でないかどうかは、例えば、抗体薬物結合体化合物を血漿と所定の時間(例えば、2時間、4時間、8時間、16時間、または24時間)インキュベートし、次いで、血漿中に存在する遊離薬物の量を定量することによって確かめることができる。

40

【0170】

相互排他的でない他の態様において、リンカーは細胞内部移行を促進する。ある特定の態様では、リンカーは治療剤と結合体化した時に(すなわち、本明細書に記載の抗体薬物結合体化合物のリンカー-治療剤部分の環境において)、細胞内部移行を促進する。さらに他の態様では、リンカーはアウリスタチン化合物および191P4D12 MAbと結合体化した時に、細胞内部移行を促進する。

【0171】

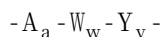
本発明の組成物および方法と共に使用することができる様々な例示的なリンカーは、WO 2004-010957、米国特許出願公開第2006/0074008号、米国特許出願公開第20050238649号、および米国特許出願公開第2006/0024317号に記載されている(これらはそれぞれ、その全

50

体が、および全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられる)。

【0172】

「リンカーユニット」(LU)は、薬物ユニットおよび抗体ユニットを連結して、抗体薬物結合体化合物を形成するのに使用することができる二官能性化合物である。一部の態様において、リンカーユニットは、以下の式:



を有し、式中、

-A-はストレッチャーユニットであり、

aは0または1であり、

それぞれの-W-は独立して、アミノ酸ユニットであり、

wは0~12の整数であり、

-Y-は自己犠牲スペーサーユニットであり、

yは0、1、または2である。

【0173】

一部の態様において、aは0または1であり、wは0または1であり、yは0、1、または2である。一部の態様において、aは0または1であり、wは0または1であり、yは0または1である。一部の態様において、wが1~12である場合、yは1または2である。一部の態様において、wは2~12であり、yは1または2である。一部の態様において、aは1であり、wおよびyは0である。

【0174】

VI.) ストレッチャーユニット

ストレッチャーユニット(A)が存在すれば、ストレッチャーユニット(A)は、抗体ユニットを、アミノ酸ユニット(-W-)が存在すればアミノ酸ユニット(-W-)に、スペーサーユニット(-Y-)が存在すればスペーサーユニット(-Y-)に、または薬物ユニット(-D)に連結することができる。191P4D12 MAb(例えば、Ha22-2(2,4)6.1)に存在し得る有用な官能基には、天然のものでも化学操作を介したものでも、スルフヒドリル基、アミノ基、ヒドロキシル基、炭水化物のアノマーヒドロキシル基、およびカルボキシルが含まれるが、これに限定されない。適切な官能基はスルフヒドリルおよびアミノである。一例では、スルフヒドリル基は、191P4D12 MAbの分子内ジスルフィド結合を還元することによって作製することができる。別の態様において、スルフヒドリル基は、191P4D12 MAbのリジン部分のアミノ基を、2-イミノチオラン(Traut試薬)または他のスルフヒドリル生成試薬と反応させることによって作製することができる。ある特定の態様では、191P4D12 MAbは組換え抗体であり、1つまたは複数のリジンを有するように操作される。ある特定の他の態様では、組換え191P4D12 MAbは、さらなるスルフヒドリル基、例えば、さらなるシステインを有するように操作される。

【0175】

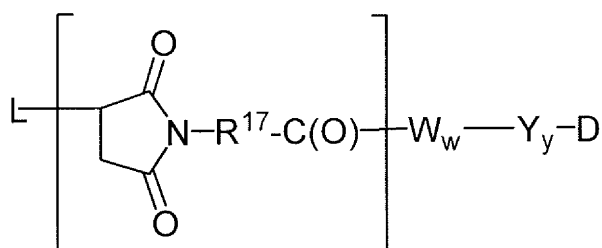
一態様において、ストレッチャーユニットは、抗体ユニットの硫黄原子との結合を形成する。硫黄原子は抗体のスルフヒドリル基に由来するものでもよい。この態様の代表的なストレッチャーユニットは式IIIaおよびIIIbの角括弧の中に描かれている。式中、L-、-W-、-Y-、-D、w、およびyは前記で定義され、R¹⁷は-C₁~C₁₀アルキレン-、-C₁~C₁₀アルケニレン-、-C₁~C₁₀アルキニレン-、カルボシクロ-、-O-(C₁~C₈アルキレン)-、O-(C₁~C₈アルケニレン)-、-O-(C₁~C₈アルキニレン)-、-アリーレン-、-C₁~C₁₀アルキレン-アリーレン-、-C₂~C₁₀アルケニレン-アリーレン-、-C₂~C₁₀アルキニレン-アリーレン-、-アリーレン-C₁~C₁₀アルキレン-、-アリーレン-C₂~C₁₀アルケニレン-、-アリーレン-C₂~C₁₀アルキニレン-、-C₁~C₁₀アルキレン-(カルボシクロ)-、-C₂~C₁₀アルケニレン-(カルボシクロ)-、-C₂~C₁₀アルキニレン-(カルボシクロ)-、-(カルボシクロ)-C₁~C₁₀アルキレン-、-(カルボシクロ)-C₂~C₁₀アルケニレン-、-(カルボシクロ)-C₂~C₁₀アルキニレン-、-ヘテロシクロ-、-C₁~C₁₀アルキレン-(ヘテロシクロ)-、-C₂~C₁₀アルケニレン-(ヘテロシクロ)-、-C₂~C₁₀アルキニレン-(ヘテロシクロ)-、-(ヘテロシクロ)-C₁~C₁₀アルキレン-、-(ヘテロシクロ)-C₂~C₁₀アルケニレン-、-(ヘテロシクロ)-C₁~C₁₀アルキニレン-

、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-$ 、または $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ より選択され、 r は1~10の整数であり、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、カルボサイクル、カルボシクロ、ヘテロシクロ、およびアリーレンラジカルは単独でも別の基の一部でも置換されてもよい。一部の態様において、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、カルボサイクル、カルボシクロ、ヘテロシクロ、およびアリーレンラジカルは単独でも別の基の一部でも置換されない。一部の態様において、 R^{17} は $-\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキレン-、-カルボシクロ-、 $-\text{O}-(\text{C}_1\sim\text{C}_8\text{アルキレン})-$ 、-アリーレン-、 $-\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキレン-アリーレン-、-アリーレン- $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキレン-、 $-\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキレン-(カルボシクロ)-、-(カルボシクロ)- $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキレン-、 $-\text{C}_3\sim\text{C}_8$ ヘテロシクロ-、 $-\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキレン-(ヘテロシクロ)-、-(ヘテロシクロ)- $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキレン-、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-$ 、および $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ より選択され、 r は1~10の整数であり、前記のアルキレン基は置換されず、残りの基は置換されてもよい。

10

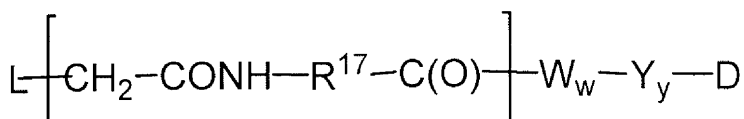
【0176】

はっきりと示されていない場合でも、1~20個の薬物部分($p=1\sim 20$)を抗体に連結できることが全ての例示的な態様から理解されるはずである。



IIIa

20

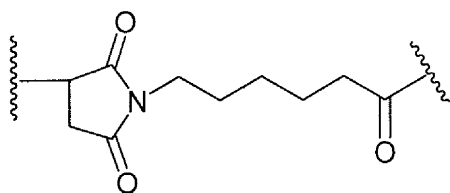


IIIb

【0177】

例示的なストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(\text{CH}_2)_5-$ である式IIIaのストレッチャーユニットである。

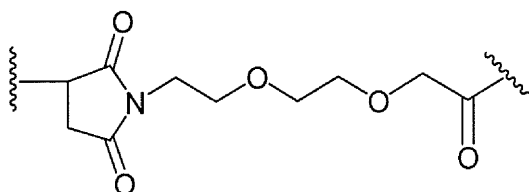
30



【0178】

別の例示的なストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ であり、 r が2である式IIIaのストレッチャーユニットである。

40



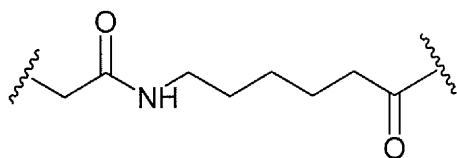
【0179】

例示的なストレッチャーユニットは、 R^{17} がアリーレン-またはアリーレン- $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキレン-である式IIIaのストレッチャーユニットである。一部の態様において、アリール基は非置換フェニル基である。

【0180】

50

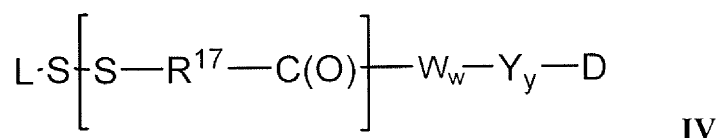
さらに別の例示的なストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(CH_2)_5-$ である式IIIbのストレッチャーユニットである。



【0181】

ある特定の態様では、ストレッチャーユニットは、抗体ユニットの硫黄原子とストレッチャーユニットの硫黄原子とのジスルフィド結合を介して抗体ユニットに連結される。この態様の代表的なストレッチャーユニットは、式IVの角括弧の中に描かれている。式中、 R^{17} 、 $L-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w 、および y は前記で定義されている。

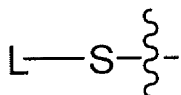
10



【0182】

本願全体を通じて、以下の式の中のS部分は、文脈によって特に定めのない限り、抗体ユニットの硫黄原子を指すことに留意すべきである。

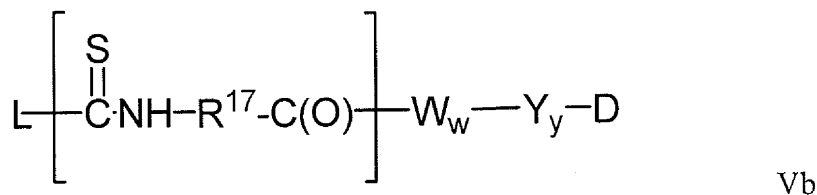
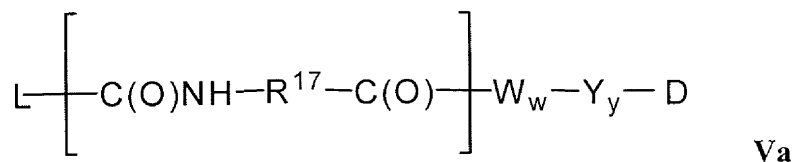
20



【0183】

さらに他の態様では、ストレッチャーは、抗体の第1級アミノ基または第2級アミノ基との結合を形成することができる反応部位を含有する。これらの反応部位の例には、活性化エステル、例えば、スクシンイミドエステル、4ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホン、イソシアネート、およびイソチオシアネートが含まれるが、これに限定されない。この態様の代表的なストレッチャーユニットは、式VaおよびVbの角括弧の中に描かれている。式中、 $-R^{17}-$ 、 $L-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w 、および y は前記で定義されている。

30



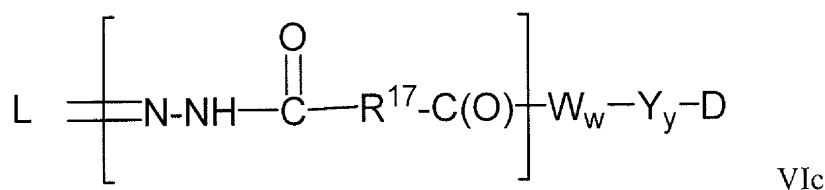
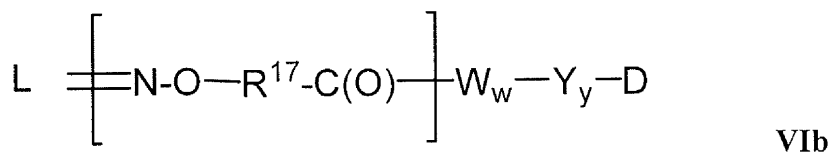
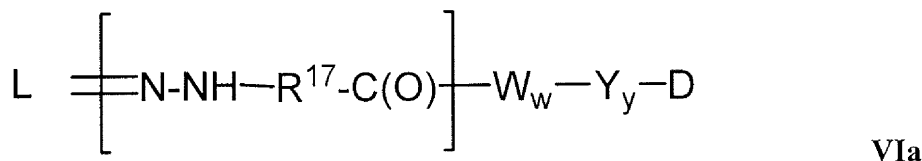
40

【0184】

一部の態様において、ストレッチャーは、抗体に存在し得る改変された炭水化物 $(-CHO)$ 基と反応する反応部位を含有する。例えば、炭水化物を、過ヨウ素酸ナトリウムなどの試薬を用いて穏やかに酸化することができ、酸化された炭水化物の得られた $(-CHO)$ ユニットを、ヒドラジド、オキシム、第1級または第2級アミン、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリアルヒドラジド、例えば、Kaneko et al., 1

50

991, Bioconjugate Chem. 2:133-41に記載のアリールヒドラジドなどの官能基を含有するストレッチャーと縮合することができる。この態様の代表的なストレッチャーユニットは、式VIa、VIb、およびVIcの角括弧の中に描かれている。式中、 $-R^{17}$ 、 L 、 $-W$ 、 $-Y$ 、 $-D$ 、 w 、および y は前記で定義されている。



10

20

【0185】

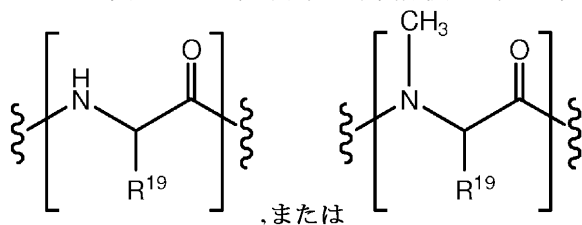
VII.) アミノ酸ユニット

アミノ酸ユニット($-W$)が存在する場合、スペーサーユニットが存在すれば、ストレッチャーユニットをスペーサーユニットに連結し、スペーサーユニットが存在しなければ、ストレッチャーユニットを薬物部分に連結し、ストレッチャーユニットおよびスペーサーユニットが存在しなければ、抗体ユニットを薬物ユニットに連結する。

【0186】

W_w は、例えば、モノペプチド、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチド、またはドデカペプチドユニットでもよい。それぞれの $-W$ ユニットは独立して、以下の角括弧の中に示した式を有し、 w は0~12の整数である。

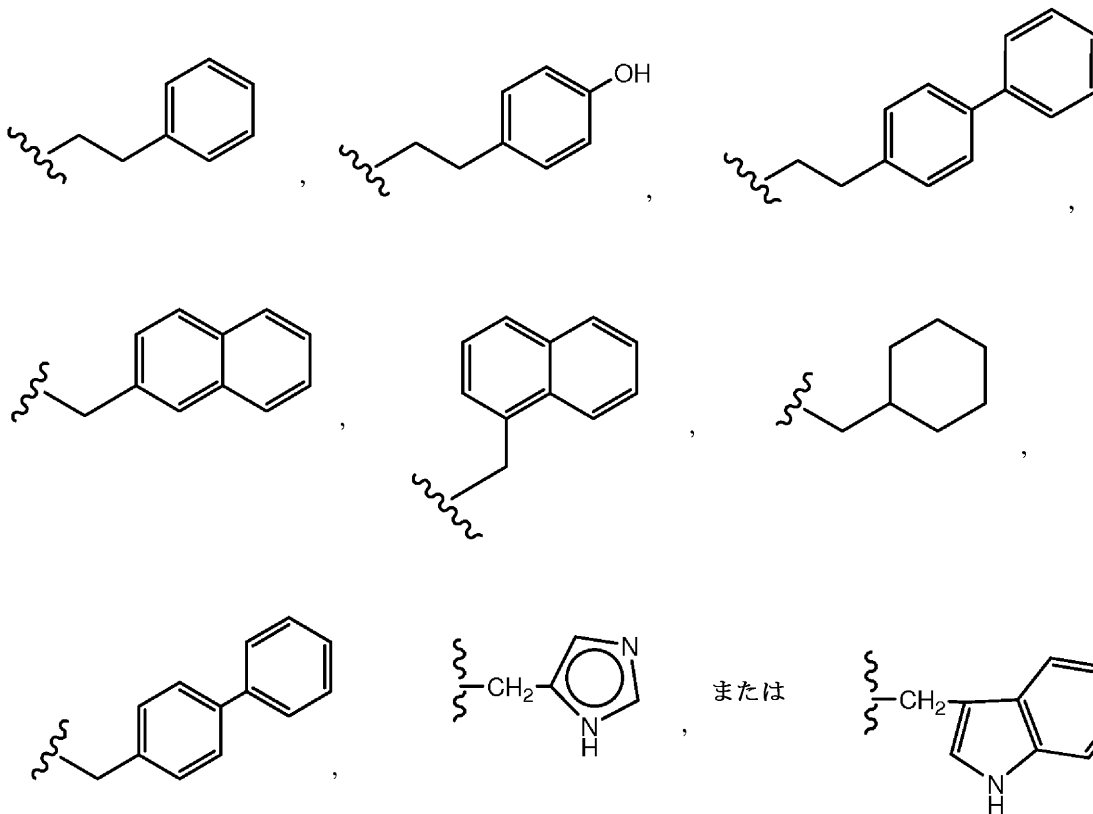
30



【0187】

式中、 R^{19} は水素、メチル、イソプロピル、イソブチル、*sec*-ブチル、ベンジル、*p*-ヒドロキシベンジル、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC(=NH)NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC(=O)CH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC(=NH)NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC(=O)CH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、2-ピリジルメチル-、3-ピリジルメチル-、4-ピリジルメチル-、フェニル、シクロヘキシル、

40



10

20

である。

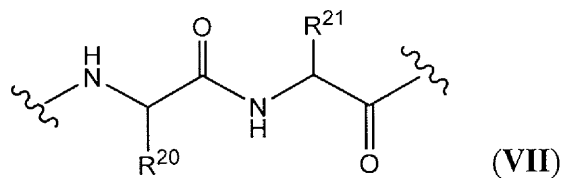
【0188】

一部の態様において、アミノ酸ユニットは、薬物ユニット(-D)を遊離するために、癌または腫瘍に関連するプロテアーゼを含む1種類または複数の種類の酵素によって酵素的に切断することができる。1つの態様では、薬物ユニット(-D)は放出されるとインビボでプロトン化されて、薬物(D)となる。

【0189】

ある特定の態様では、アミノ酸ユニットは天然アミノ酸を含んでもよい。他の態様において、アミノ酸ユニットは非天然アミノ酸を含んでもよい。例示的な W_w ユニットは式(VII)～(IX)によって表される。

30



式中、 R^{20} および R^{21} は以下の通りである：

R²⁰

ベンジル

メチル

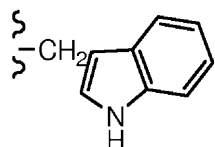
イソプロピル

イソプロピル

ベンジル

イソブチル

sec-ブチル



ベンジル

ベンジル

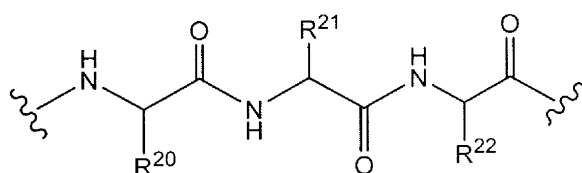
R²¹(CH₂)₄NH₂;(CH₂)₄NH₂;(CH₂)₄NH₂;(CH₂)₃NHCONH₂;(CH₂)₃NHCONH₂;(CH₂)₃NHCONH₂;(CH₂)₃NHCONH₂;(CH₂)₃NHCONH₂;

メチル;

(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂;

10

20



(VIII)

式中、R²⁰、R²¹、およびR²²は以下の通りである：R²⁰

ベンジル

イソプロピル

H

R²¹

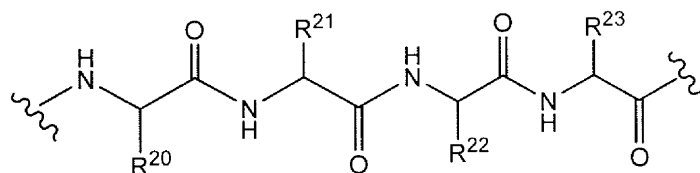
ベンジル

ベンジル

ベンジル

R²²(CH₂)₄NH₂;(CH₂)₄NH₂; および(CH₂)₄NH₂;

30



(IX)

式中、R²⁰、R²¹、R²²、およびR²³は以下の通りである：R²⁰

H

メチル

R²¹

ベンジル

イソブチル

R²²

イソブチル

メチル

R²³

H; および

イソブチル

40

【0190】

例示的なアミノ酸ユニットには、式VIIのユニットが含まれるが、これに限定されない。式中、R²⁰はベンジルであり、R²¹は-(CH₂)₄NH₂であるか、R²⁰はイソプロピルであり、R²¹は-(CH₂)₄NH₂であるか、またはR²⁰はイソプロピルであり、R²¹は-(CH₂)₃NHCONH₂である。別の例示的なアミノ酸ユニットは式VIIIのユニットである。式中、R²⁰はベンジルであり、R²¹はベンジルであり、R²²は-(CH₂)₄NH₂である。

【0191】

50

特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼによる酵素的切断のために、有用な $-W_w$ -ユニットを設計し、 $-W_w$ -ユニットの選択性を最適化することができる。一態様において、 $-W_w$ -ユニットは、カテプシンB、C、およびD、またはプラスミンプロテアーゼによって切断が触媒されるユニットである。

【0192】

一態様において、 $-W_w$ -はジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、またはペンタペプチドである。 R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、または R^{23} は水素以外のものである場合、 R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、または R^{23} が取り付けられる炭素原子はキラルである。

【0193】

R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 、または R^{23} が取り付けられる炭素原子はそれぞれ独立して(S)配置または(R)配置にある。

【0194】

アミノ酸ユニットの1つの局面において、アミノ酸ユニットはバリン-シトルリン(vcまたはVal-Cit)である。別の局面において、アミノ酸ユニットはフェニルアラニン-リジン(すなわち、fk)である。アミノ酸ユニットのさらに別の局面において、アミノ酸ユニットはN-メチルバリン-シトルリンである。さらに別の局面において、アミノ酸ユニットは5-アミノ吉草酸、ホモフェニルアラニンリジン、テトライソキノリンカルボキシレートリジン、シクロヘキシルアラニンリジン、イソネペコチン酸(isonapecotinic acid)リジン、 β -アラニンリジン、グリシンセリンバリングルタミン、およびイソネペコチン酸である。

【0195】

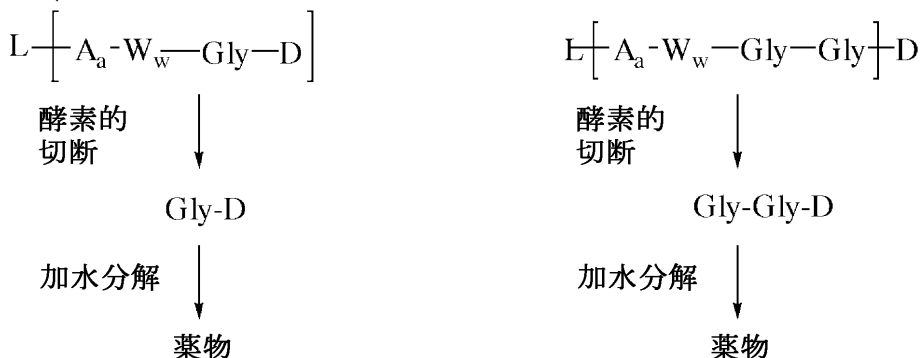
VIII.) スペーサーユニット

スペーサーユニット(-Y-)が存在し、アミノ酸ユニットが存在する時には、スペーサーユニットはアミノ酸ユニットを薬物ユニットに連結する。または、アミノ酸ユニットが存在しない時には、スペーサーユニットはストレッチャーユニットを薬物ユニットに連結する。アミノ酸ユニットおよびストレッチャーユニットがいずれも存在しない時には、スペーサーユニットも薬物ユニットを抗体ユニットに連結する。

【0196】

スペーサーユニットは、2つの大まかなタイプ:非自己犠牲スペーサーユニットまたは自己犠牲スペーサーユニットである。非自己犠牲スペーサーユニットは、抗体薬物結合体からアミノ酸ユニットが切断された後に、特に、酵素によって切断された後に、スペーサーユニットの一部または全てが薬物部分に結合したままになっているスペーサーユニットである。非自己犠牲スペーサーユニットの例には、(グリシン-グリシン)スペーサーユニットおよびグリシンスペーサーユニットが含まれるが、これに限定されない(両方ともスキーム1に図示した)(下記)。グリシン-グリシンスペーサーユニットまたはグリシンスペーサーユニットを含有する結合体が、酵素(例えば、腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼ、またはリンパ球関連プロテアーゼ)によって酵素的切断を受けると、グリシン-グリシン-薬物部分またはグリシン-薬物部分が $L-A_a-W_w$ -から切断される。一態様において、標的細胞内で独立した加水分解反応が起こって、グリシン-薬物部分結合が切断され、薬物が遊離される。

スキーム1



10

20

30

40

50

【0197】

一部の態様において、非自己犠牲スペーサーユニット(-Y-)は-Gly-である。一部の態様において、非自己犠牲スペーサーユニット(-Y-)は-Gly-Gly-である。

【0198】

一態様において、スペーサーユニットが存在しない(-Y_y- 式中y=0)、薬物-リンカー結合体、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和化合物が提供される。

【0199】

または、自己犠牲スペーサーユニットを含有する結合体が-Dを放出することができる。本明細書において使用される場合、「自己犠牲スペーサー」という用語は、間隔のあいた2つの化学部分を一緒にして、安定したトリパーティット(tripartite)分子に共有結合することができると二官能性化学部分を指す。これは、第1の部分と第2の化学部分との結合が切断されれば、第2の化学部分から自発的に分離する。

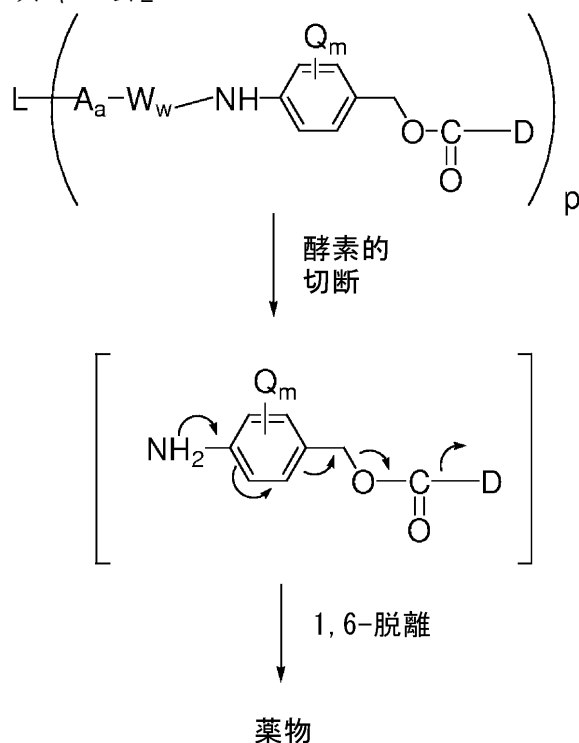
【0200】

一部の態様において、-Y_y-は、フェニレン部分がQ_mで置換されたp-アミノベンジルアルコール(PAB)ユニット(スキーム2および3を参照されたい)である。式中、Qは-C₁~C₈アルキル、-C₁~C₈アルケニル、-C₁~C₈アルキニル、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₁~C₈アルケニル)、-O-(C₁~C₈アルキニル)、-ハロゲン、-ニトロ、または-シアノであり、mは0~4の整数である。アルキル基、アルケニル基、およびアルキニル基は単独でも別の基の一部でも置換されてもよい。

【0201】

一部の態様において、-Y-は、PAB基のアミノ窒素原子を介して-W_w-に連結し、カーボネート基、カルバメート基、またはエーテル基を介して-Dと直接つながっているPAB基である。特定の理論または機構に拘束されるものではないが、スキーム2は、Toki et al., 2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872に記載のように、カルバメート基またはカーボネート基を介して-Dに直接取り付けられたPAB基の可能性のある薬物放出機構を図示している。

スキーム2



【0202】

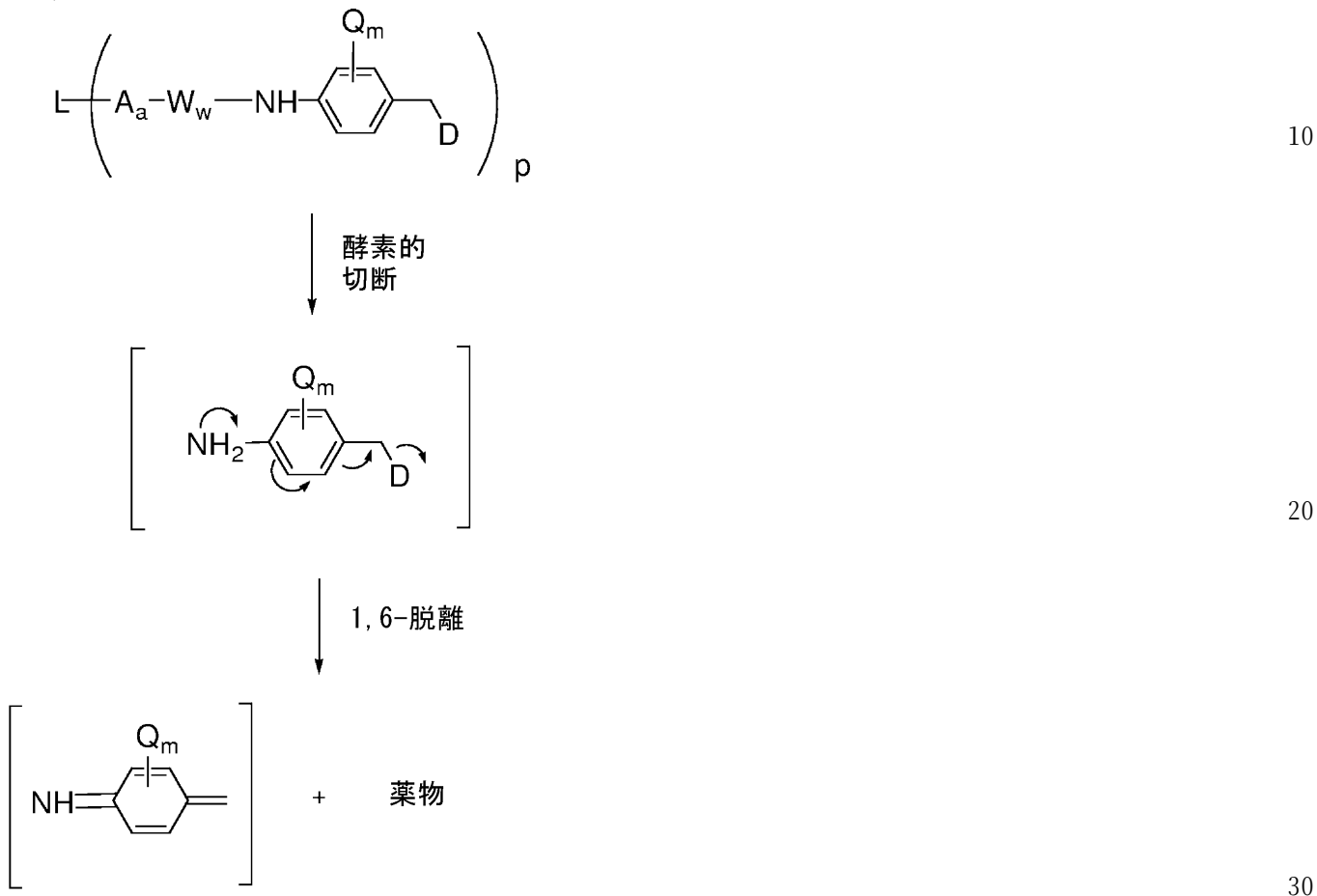
スキーム2において、Qは-C₁~C₈アルキル、-C₁~C₈アルケニル、-C₁~C₈アルキニル、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₁~C₈アルケニル)、-O-(C₁~C₈アルキニル)、-ハロゲン、-ニトロ、または-シアノであり、mは0~4の整数であり、pは1~約20である。アルキル基、ア

ルケニル基、およびアルキニル基は単独でも別の基の一部でも置換されてもよい。

【0203】

特定の理論または機構に拘束されるものではないが、スキーム3は、エーテル結合またはアミン結合を介して-Dと直接取り付けられたPAB基の可能性のある薬物放出機構を図示している。式中、Dは、薬物ユニットの一部である酸素基または窒素基を含む。

スキーム3



【0204】

スキーム3において、Qは-C₁~C₈アルキル、-C₁~C₈アルケニル、-C₁~C₈アルキニル、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₁~C₈アルケニル)、-O-(C₁~C₈アルキニル)、-ハロゲン、-ニトロ、または-シアノであり；mは0~4の整数であり；pは1~約20である。アルキル基、アルケニル基、およびアルキニル基は単独でも別の基の一部でも置換されてもよい。

【0205】

自己犠牲スペーサーの他の例には、PAB基と電子的に類似する芳香族化合物、例えば、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体(Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)およびオルトまたはパラ-アミノベンジルアセタールが含まれるが、これに限定されない。アミド結合が加水分解されると環化するスペーサー、例えば、置換および非置換の4-アミノ酪酸アミド(Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2:223)、適切に置換されたビスクロ[2.2.1]およびビスクロ[2.2.2]環構造(Storm et al., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)、ならびに2-アミノフェニルプロピオン酸アミド(Amsberry et al., 1990, J. Org. Chem. 55:5867)を使用することができる。グリシンのα位置において置換されたアミン含有薬物(Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27:1447)の脱離も自己犠牲スペーサーの例である。

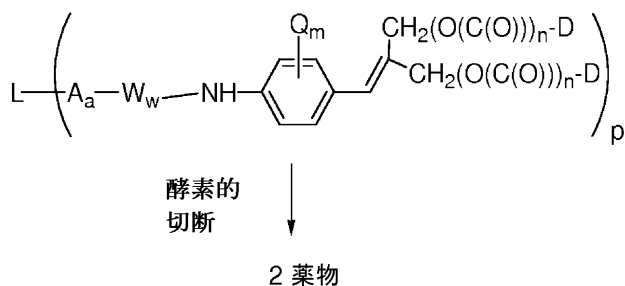
40

【0206】

一態様において、スペーサーユニットは、スキーム4に示したような分枝bis(ヒドロキシメチル)-スチレン(BHMS)ユニットである。これは、複数の薬物を組み込み、放出するのに使用することができる。

50

スキーム4



【0207】

10

スキーム4において、Qは-C₁～C₈アルキル、-C₁～C₈アルケニル、-C₁～C₈アルキニル、-O-(C₁～C₈アルキル)、-O-(C₁～C₈アルケニル)、-O-(C₁～C₈アルキニル)、-ハロゲン、-ニトロ、または-シアノであり；mは0～4の整数であり；nは0または1であり；pは1～約20である。アルキル基、アルケニル基、およびアルキニル基は単独でも別の基の一部でも置換されてもよい。

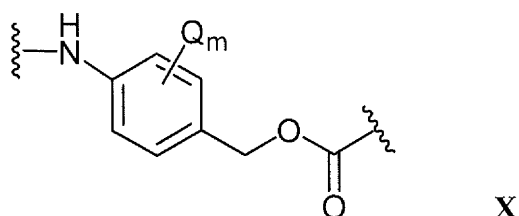
【0208】

一部の態様において、-D部分は同じである。さらに別の態様において、-D部分は異なる。

【0209】

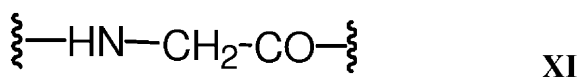
1つの局面において、スペーサーユニット(-Y_v-)は、式(X)～(XII)によって表される：

20

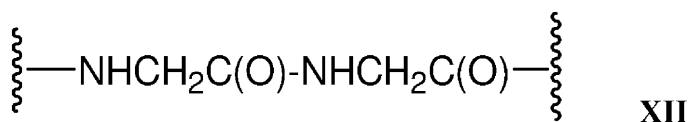


式中、Qは-C₁～C₈アルキル、-C₁～C₈アルケニル、-C₁～C₈アルキニル、-O-(C₁～C₈アルキル)、-O-(C₁～C₈アルケニル)、-O-(C₁～C₈アルキニル)、-ハロゲン、-ニトロ、または-シアノであり；mは0～4の整数である。アルキル基、アルケニル基、およびアルキニル基は単独でも別の基の一部でも置換されてもよい。

30



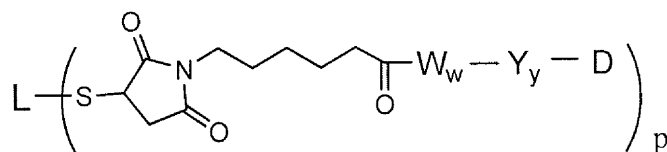
および



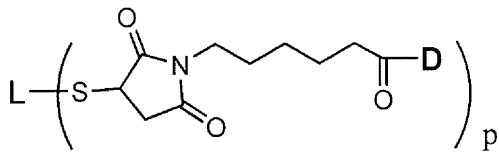
【0210】

抗体薬物結合体化合物を含む式IおよびIIの態様は、以下を含んでもよい：

40

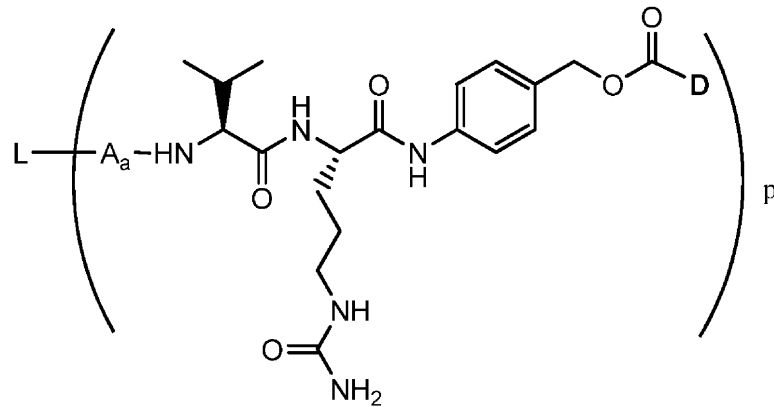


式中、wおよびyはそれぞれ、0、1、または2、および



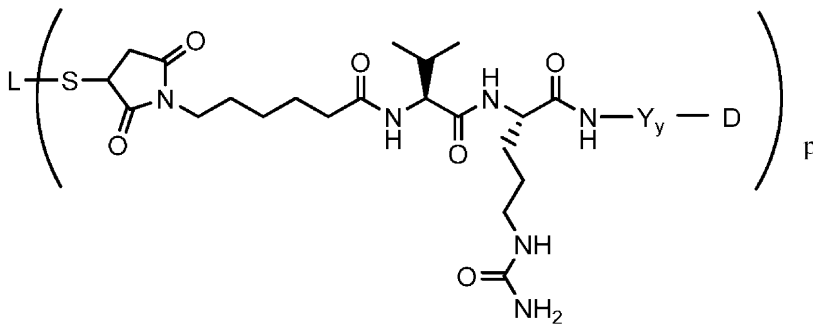
であり、

式中、wおよびyはそれぞれ0、



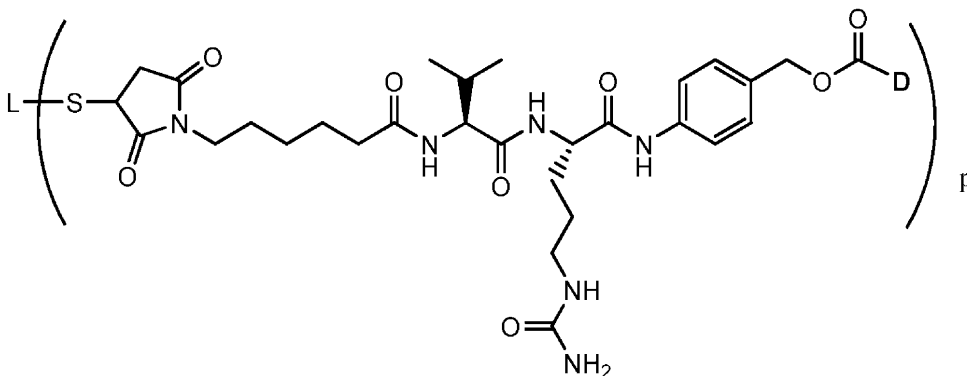
10

20



, および

30



40

である。

【0211】

IX.) 薬物ユニット

薬物部分(D)は、任意の細胞傷害剤、細胞分裂阻害剤、または免疫調節剤(例えば、免疫抑制剤)でよい。Dは、スペーサーユニット、アミノ酸ユニット、ストレッチャーユニット、または抗体ユニットとの結合を形成することができる原子を有する薬物ユニット(部分)である。一部の態様において、薬物ユニットDは、スペーサーユニットとの結合を形成す

50

ることができる窒素原子を有する。本明細書において使用される場合、「薬物ユニット」および「薬物部分」という用語は同義語であり、同義に用いられる。

【0212】

細胞傷害剤、細胞分裂阻害剤、または免疫調節剤の有用なクラスには、例えば、抗チューブリン剤、DNA副溝結合剤、DNA複製阻害剤、およびアルキル化剤が含まれる。

【0213】

一部の態様において、薬物は、アウリスタチン、例えば、アウリスタチンE(当技術分野においてドラスタチン-10の誘導体としても知られる)、またはその誘導体である。アウリスタチンは、例えば、アウリスタチンEとケト酸との間で形成されるエステルでもよい。例えば、アウリスタチンEはパラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応して、それぞれ、AEBおよびAEVBを生成することができる。他の代表的なアウリスタチンには、AFP、MMAF、およびMMAEが含まれる。例示的なアウリスタチンの合成および構造は、米国特許出願公開第2003-0083263号;国際公開公報第04/010957、国際公開公報第02/088172号、および米国特許第7,498,298号;同第6,884,869号;同第6,323,315号;同第6,239,104号;同第6,034,065号;同第5,780,588号;同第5,665,860号;同第5,663,149号;同第5,635,483号;同第5,599,902号;同第5,554,725号;同第5,530,097号;同第5,521,284号;同第5,504,191号;同第5,410,024号;同第5,138,036号;同第5,076,973号;同第4,986,988号;同第4,978,744号;同第4,879,278号;同第4,816,444号;および同第4,486,414号に記載されている。これらはそれぞれ、その全体が、および全ての目的のために参照により本明細書に組み入れられる。

【0214】

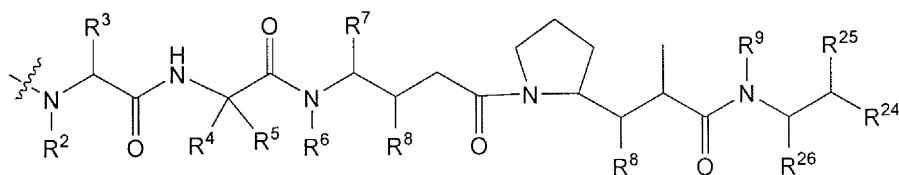
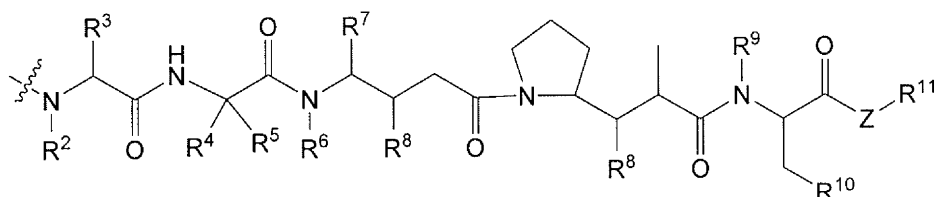
アウリスタチンは、微小管の動態ならびに核分裂および細胞分裂を妨害し、抗癌活性を有することが示されている。アウリスタチンはチューブリンに結合し、191P4D12発現細胞に対して細胞傷害作用または細胞分裂阻害作用を発揮することができる。アウリスタチンまたは得られた抗体薬物結合体が所望の細胞株に対して細胞分裂阻害作用または細胞傷害作用を発揮するかどうか確かめるために使用することができる、当技術分野において公知の多くの異なるアッセイがある。

【0215】

化合物がチューブリンに結合するかどうか確かめるための方法が当技術分野において公知である。例えば、Muller et al., Anal. Chem 2006, 78, 4390-4397; Hamel et al., Molecular Pharmacology, 1995 47: 965-976; およびHamel et al., The Journal of Biological Chemistry, 1990 265:28, 17141-17149を参照されたい。本発明のために、チューブリンに対する化合物の相対親和性を確かめることができる。本発明の好ましいアウリスタチンの中には、チューブリンに対するMMAEの結合親和性の1/10(弱い親和性)から、チューブリンに対するMMAEの結合親和性の10倍、20倍、さらには100倍(強い親和性)まででチューブリンに結合するものもある。

【0216】

一部の態様において、-Dは、式D_EまたはD_F:

**D_E****D_F**

10

のアウリスタチン、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和化合物型であり、
式中、独立して、それぞれの場所で、
波線は結合を示し；

R²は-C₁~C₂₀アルキル、-C₂~C₂₀アルケニル、もしくは-C₂~C₂₀アルキニルであり；
R³は-H、-C₁~C₂₀アルキル、-C₂~C₂₀アルケニル、-C₂~C₂₀アルキニル、-カルボサイク
ル、-C₁~C₂₀アルキレン(カルボサイクル)、-C₂~C₂₀アルケニレン(カルボサイクル)、-C
2~C₂₀アルキニレン(カルボサイクル)、-アリール、-C₁~C₂₀アルキレン(アリール)、-C₂
~C₂₀アルケニレン(アリール)、-C₂~C₂₀アルキニレン(アリール)、複素環、-C₁~C₂₀ア
ルキレン(複素環)、-C₂~C₂₀アルケニレン(複素環)、もしくは-C₂~C₂₀アルキニレン(複
素環)であり；

20

R⁴は-H、-C₁~C₂₀アルキル、-C₂~C₂₀アルケニル、-C₂~C₂₀アルキニル、カルボサイクル
、-C₁~C₂₀アルキレン(カルボサイクル)、-C₂~C₂₀アルケニレン(カルボサイクル)、-C₂
~C₂₀アルキニレン(カルボサイクル)、アリール、-C₁~C₂₀アルキレン(アリール)、-C₂~
C₂₀アルケニレン(アリール)、-C₂~C₂₀アルキニレン(アリール)、-複素環、-C₁~C₂₀アル
キレン(複素環)、-C₂~C₂₀アルケニレン(複素環)、もしくは-C₂~C₂₀アルキニレン(複素
環)であり；

30

R⁵は-Hもしくは-C₁~C₈アルキルであり；または

R⁴およびR⁵は一緒になってカルボサイクル環を形成し、式-(CR^aR^b)_sを有し、

式中、R^aおよびR^bは独立して、-H、-C₁~C₂₀アルキル、-C₂~C₂₀アルケニル、-C₂~C₂₀ア
ルキニル、もしくは-カルボサイクルであり、sは2、3、4、5、もしくは6であり；

R⁶は-H、-C₁~C₂₀アルキル、-C₂~C₂₀アルケニル、もしくは-C₂~C₂₀アルキニルであり；

R⁷は-H、-C₁~C₂₀アルキル、-C₂~C₂₀アルケニル、-C₂~C₂₀アルキニル、カルボサイクル
、-C₁~C₂₀アルキレン(カルボサイクル)、-C₂~C₂₀アルケニレン(カルボサイクル)、-C₂
~C₂₀アルキニレン(カルボサイクル)、-アリール、-C₁~C₂₀アルキレン(アリール)、-C₂
~C₂₀アルケニレン(アリール)、-C₂~C₂₀アルキニレン(アリール)、複素環、-C₁~C₂₀ア
ルキレン(複素環)、-C₂~C₂₀アルケニレン(複素環)、もしくは-C₂~C₂₀アルキニレン(複
素環)であり；

40

それぞれのR⁸は独立して、-H、-OH、-C₁~C₂₀アルキル、-C₂~C₂₀アルケニル、-C₂~C₂₀
アルキニル、-O-(C₁~C₂₀アルキル)、-O-(C₂~C₂₀アルケニル)、-O-(C₁~C₂₀アルキニル)
、もしくは-カルボサイクルであり；

R⁹は-H、-C₁~C₂₀アルキル、-C₂~C₂₀アルケニル、もしくは-C₂~C₂₀アルキニルであり；

R²⁴は-アリール、-複素環、もしくは-カルボサイクルであり；

R²⁵は-H、C₁~C₂₀アルキル、-C₂~C₂₀アルケニル、-C₂~C₂₀アルキニル、-カルボサイク
ル、-O-(C₁~C₂₀アルキル)、-O-(C₂~C₂₀アルケニル)、-O-(C₂~C₂₀アルキニル)、もしく
はOR¹⁸であり、式中、R¹⁸は-H、ヒドロキシル保護基、もしくはOR¹⁸が=Oである場合、直

50

接結合であり；

R^{26} は-H、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、-アリーール、-複素環、もしくは-カルボサイクルであり；

R^{10} は-アリーールもしくは-複素環であり；

Zは-O、-S、-NH、もしくは $-NR^{12}$ であり、式中、 R^{12} は $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり；

R^{11} は-H、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、-アリーール、-複素環、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 、もしくは $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ であり；

mは1～1000の整数であるか、または $m=1 \sim 1000$ であり；

R^{13} は $-C_2 \sim C_{20}$ アルキレン、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン、もしくは $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレンであり；

R^{14} は-H、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり；

R^{15} のそれぞれの出現は独立して、-H、-COOH、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-(CH_2)_n-SO_3-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり；

R^{16} のそれぞれの出現は独立して、-H、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、もしくは $-(CH_2)_n-COOH$ であり；

nは0～6の整数であり、

前記のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーール、カルボサイクル、および複素環ラジカルは単独でも別の基の一部でも置換されてもよい。

【0217】

式 D_E のアウリスタチンは、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーール、カルボサイクル、および複素環ラジカルが置換されていないアウリスタチンを含む。

【0218】

式 D_E のアウリスタチンは、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、および R^9 の基が置換されておらず、 R^{19} 、 R^{20} 、および R^{21} の基が本明細書に記載のように置換されてもよいアウリスタチンを含む。

【0219】

式 D_E のアウリスタチンは、

R^2 が $C_1 \sim C_8$ アルキルであり；

R^3 、 R^4 、および R^7 が独立して、-H、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ カルボサイクル、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ カルボサイクル)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ カルボサイクル)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ カルボサイクル)、 $C_6 \sim C_{10}$ アリーール、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン($C_6 \sim C_{10}$ アリーール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン($C_6 \sim C_{10}$ アリーール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン($C_6 \sim C_{10}$ アリーール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)、もしくは $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)より選択され、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、カルボサイクル、アリーール、および複素環ラジカルは置換されてもよく；

R^5 が-Hであり；

R^6 が $-C_1 \sim C_8$ アルキルであり；

それぞれの R^8 は独立して、-OH、-O- $(C_1 \sim C_{20}$ アルキル)、-O- $(C_2 \sim C_{20}$ アルケニル)、もしくは-O- $(C_2 \sim C_{20}$ アルキニル)より選択され、前記のアルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは置換されてもよく；

R^9 が-Hもしくは $-C_1 \sim C_8$ アルキルであり；

R^{24} が、置換されてもよい-フェニルであり；

R^{25} が-OR¹⁸であり、 R^{18} は、H、ヒドロキシル保護基、もしくはOR¹⁸が=Oである場合、直接結合であり；

10

20

30

40

50

R^{26} が-H、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、もしくは-カルボサイクルより選択され、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル、およびカルボサイクルラジカルは置換されてもよい、アウリスタチン
またはその薬学的に許容される塩型もしくは溶媒和化合物型を含む。

【0220】

式D_Eのアウリスタチンは、
 R^2 がメチルであり；
 R^3 が-H、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、もしくは $C_2 \sim C_8$ アルキニルであり、前記のアルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは置換されてもよく；
 R^4 が-H、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ カルボサイクル、 $-C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $-C_1 \sim C_8$ アルキレン($C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニレン($C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニレン($C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_1 \sim C_8$ アルキレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ カルボサイクル)、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ カルボサイクル)、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ カルボサイクル)であり、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、およびカルボサイクルラジカルは単独でも別の基の一部でも、置換されてもよく；
 R^5 が-Hであり；
 R^6 がメチルであり；
 R^7 が $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、もしくは $-C_2 \sim C_8$ アルキニルであり、それぞれの R^8 はメトキシであり；
 R^9 が-Hもしくは $-C_1 \sim C_8$ アルキルであり；
 R^{24} が-フェニルであり；
 R^{25} が $-OR^{18}$ であり、 R^{18} は、H、ヒドロキシル保護基、もしくは OR^{18} が=Oである場合、直接結合であり；
 R^{26} がメチルである、アウリスタチン
 またはその薬学的に許容される塩型を含む。

【0221】

式D_Eのアウリスタチンは、 R^2 がメチルであり； R^3 が-Hもしくは $-C_1 \sim C_3$ アルキルであり； R^4 が $-C_1 \sim C_5$ アルキルであり； R^5 が-Hであり； R^6 がメチルであり； R^7 がイソプロピルもしくはsec-ブチルであり； R^8 がメトキシであり； R^9 が-Hもしくは $-C_1 \sim C_8$ アルキルであり； R^{24} がフェニルであり； R^{25} が $-OR^{18}$ であり、 R^{18} は、-H、ヒドロキシル保護基、もしくは OR^{18} が=Oである場合、直接結合であり； R^{26} がメチルである、アウリスタチン、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和化合物型を含む。

【0222】

式D_Eのアウリスタチンは、
 R^2 がメチルもしくは $C_1 \sim C_3$ アルキルであり；
 R^3 が-Hもしくは $-C_1 \sim C_3$ アルキルであり；
 R^4 が $-C_1 \sim C_5$ アルキルであり；
 R^5 がHであり；
 R^6 が $C_1 \sim C_3$ アルキルであり；
 R^7 が $-C_1 \sim C_5$ アルキルであり；
 R^8 が $-C_1 \sim C_3$ アルコキシであり；
 R^9 が-Hもしくは $-C_1 \sim C_8$ アルキルであり；
 R^{24} がフェニルであり；
 R^{25} が $-OR^{18}$ であり、 R^{18} は、-H、ヒドロキシル保護基、もしくは OR^{18} が=Oである場合、直接結合であり；
 R^{26} が $-C_1 \sim C_3$ アルキルである、アウリスタチン、
 またはその薬学的に許容される塩型を含む。

【0223】

式D_Fのアウリスタチンは、

10

20

30

40

50

R^2 がメチルであり;

R^3 、 R^4 、および R^7 が独立して、 $-H$ 、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2\sim C_{20}$ アルキニル、単環式 $C_3\sim C_6$ カルボサイクル、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキレン(単環式 $C_3\sim C_6$ カルボサイクル)、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニレン(単環式 $C_3\sim C_6$ カルボサイクル)、 $-C_2\sim C_{20}$ アルキニレン(単環式 $C_3\sim C_6$ カルボサイクル)、 $-C_6\sim C_{10}$ アリール、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキレン($C_6\sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニレン($C_6\sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2\sim C_{20}$ アルキニレン($C_6\sim C_{10}$ アリール)、複素環、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)、もしくは $-C_2\sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)より選択され、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、カルボサイクル、アリール、および複素環ラジカルは単独でも別の基の一部でも、置換されてもよく;

10

R^5 が $-H$ であり;

R^6 がメチルであり;

それぞれの R^8 がメトキシであり;

R^9 が $-H$ 、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-C_2\sim C_{20}$ アルキニルであり; 前記のアルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは置換されてもよく;

R^{10} が、置換されてもよいアリールもしくは置換されてもよい複素環であり;

Z が $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、もしくは $-NR^{12}$ であり、 R^{12} は、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-C_2\sim C_{20}$ アルキニルであり、これらはそれぞれ置換されてもよく;

R^{11} が $-H$ 、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2\sim C_{20}$ アルキニル、 $-$ アリール、 $-$ 複素環、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 、もしくは $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ であり、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、および複素環ラジカルは置換されてもよく;

20

m は1~1000の整数であるか、もしくは $m=0$ であり;

R^{13} が $-C_2\sim C_{20}$ アルキレン、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニレン、もしくは $-C_2\sim C_{20}$ アルキニレンであり、これらはそれぞれ置換されてもよく;

R^{14} が $-H$ 、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-C_2\sim C_{20}$ アルキニルであり、前記のアルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは置換されてもよく、

R^{15} のそれぞれの出現は独立して、 $-H$ 、 $-COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1\sim C_{20}$ アルキル、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2\sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-(CH_2)_n-SO_3-C_2\sim C_{20}$ アルキニルであり、前記のアルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは置換されてもよく;

30

R^{16} のそれぞれの出現は独立して、 $-H$ 、 $-C_1\sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2\sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2\sim C_{20}$ アルキニル、もしくは $-(CH_2)_n-COOH$ であり、前記のアルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは置換されてもよく;

n は0~6の整数である、アウリスタチン、またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0224】

これらのいくつかの態様において、 R^{10} は、置換されてもよいフェニルである。

【0225】

式 D_F のアウリスタチンは、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、および R^9 の基が非置換であり、 R^{10} および R^{11} の基が本明細書に記載されてものであるアウリスタチンを含む。

40

【0226】

式 D_F のアウリスタチンは、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、カルボサイクル、および複素環ラジカルが非置換のアウリスタチンを含む。

【0227】

式 D_F のアウリスタチンは、 R^2 が $-C_1\sim C_3$ アルキルであり; R^3 が $-H$ もしくは $-C_1\sim C_3$ アルキルであり; R^4 が $-C_1\sim C_5$ アルキルであり; R^5 が $-H$ であり; R^6 が $-C_1\sim C_3$ アルキルであり; R^7 が $-C_1\sim C_5$ アルキルであり; R^8 が $-C_1\sim C_3$ アルコキシであり; R^9 が $-H$ もしくは $-C_1\sim C_8$ アルキルであり; R^{10} が、置換されてもよいフェニルであり; Z が $-O-$ 、 $-S-$ 、もしくは $-NH-$ であり; R^{11} が本明細書において定義されたものであるアウリスタチン、またはその薬学的に許容される

50

塩を含む。

【0228】

式D_Fのアウリスタチンは、R²がメチルであり；R³が-Hもしくは-C₁～C₃アルキルであり；R⁴が-C₁～C₅アルキルであり；R⁵が-Hであり；R⁶がメチルであり；R⁷がイソプロピルもしくはsec-ブチルであり；R⁸がメトキシであり；R⁹が-Hもしくは-C₁～C₈アルキルであり；R¹⁰が、置換されてもよいフェニルであり；Zが-O-、-S-、もしくは-NH-であり；R¹¹が本明細書において定義されたものであるアウリスタチン、またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0229】

式D_Fのアウリスタチンは、R²がメチルであり；R³が-Hもしくは-C₁～C₃アルキルであり；R⁴が-C₁～C₅アルキルであり；R⁵が-Hであり；R⁶がメチルであり；R⁷がイソプロピルもしくはsec-ブチルであり；R⁸がメトキシであり；R⁹が-HもしくはC₁～C₈アルキルであり；R¹⁰がフェニルであり；Zが-O-もしくは-NH-であり；R¹¹が本明細書において定義されたもの、好ましくは、水素であるアウリスタチン、またはその薬学的に許容される塩型を含む。

10

【0230】

式D_Fのアウリスタチンは、R²が-C₁～C₃アルキルであり；R³が-Hもしくは-C₁～C₃アルキルであり；R⁴が-C₁～C₅アルキルであり；R⁵が-Hであり；R⁶が-C₁～C₃アルキルであり；R⁷が-C₁～C₅アルキルであり；R⁸が-C₁～C₃アルコキシであり；R⁹が-Hもしくは-C₁～C₈アルキルであり；R¹⁰がフェニルであり；Zが-O-もしくは-NH-であり、R¹¹が本明細書において定義されたもの、好ましくは、水素であるアウリスタチン、またはその薬学的に許容される塩型を含む。

20

【0231】

式D_EもしくはD_Fのアウリスタチンは、R³、R⁴、およびR⁷が独立してイソプロピルもしくはsec-ブチルであり、R⁵が-Hであるアウリスタチンを含む。例示的な態様において、R³およびR⁴はそれぞれイソプロピルであり、R⁵はHであり、R⁷はsec-ブチルである。残りの置換基は本明細書において定義されたものである。

【0232】

式D_EもしくはD_Fのアウリスタチンは、R²およびR⁶がそれぞれメチルであり、R⁹がHであるアウリスタチンを含む。残りの置換基は本明細書において定義されたものである。

【0233】

式D_EもしくはD_Fのアウリスタチンは、R⁸のそれぞれの出現が-OCH₃であるアウリスタチンを含む。残りの置換基は本明細書において定義されたものである。

30

【0234】

式D_EもしくはD_Fのアウリスタチンは、R³およびR⁴がそれぞれイソプロピルであり、R²およびR⁶がそれぞれメチルであり、R⁵がHであり、R⁷がsec-ブチルであり、R⁸のそれぞれの出現が-OCH₃であり、R⁹がHであるアウリスタチンを含む。残りの置換基は本明細書において定義されたものである。

【0235】

式D_Fのアウリスタチンは、Zが-O-もしくは-NH-であるアウリスタチンを含む。残りの置換基は本明細書において定義されたものである。

【0236】

式D_Fのアウリスタチンは、R¹⁰がアリールであるアウリスタチンを含む。残りの置換基は本明細書において定義されたものである。

40

【0237】

式D_Fのアウリスタチンは、R¹⁰が-フェニルであるアウリスタチンを含む。残りの置換基は本明細書において定義されたものである。

【0238】

式D_Fのアウリスタチンは、Zが-O-であり、R¹¹がH、メチル、もしくはt-ブチルであるアウリスタチンを含む。残りの置換基は本明細書において定義されたものである。

【0239】

式D_Fのアウリスタチンは、Zが-NH-であり、R¹¹が-(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂であり、R¹⁵が-(CH

50

$_2)_n-N(R^{16})_2$ であり、 R^{16} が $-C_1\sim C_8$ アルキルもしくは $-(CH_2)_n-COOH$ であるアウリスタチンを含む。残りの置換基は本明細書において定義されたものである。

【0240】

式 D_F のアウリスタチンは、 Z が $-NH-$ であり、 R^{11} が $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ であり、 R^{15} が $-(CH_2)_n-SO_3H$ であるアウリスタチンを含む。残りの置換基は本明細書において定義されたものである。

【0241】

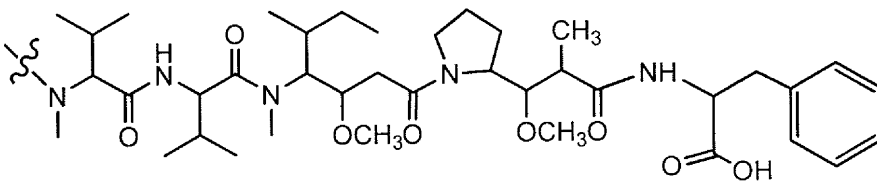
好ましい態様において、 D が式 D_E のアウリスタチンである場合、 w は1~12、好ましくは、2~12の整数であり、 y は1もしくは2であり、 a は好ましくは1である。

【0242】

一部の態様において、 D が式 D_F のアウリスタチンである場合、 a は1であり、 w および y は0である。

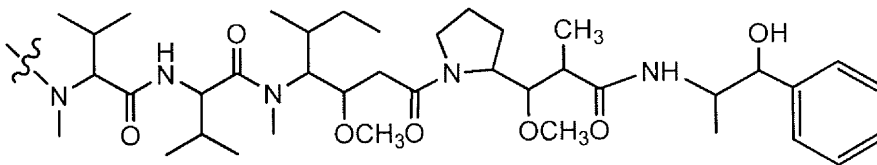
【0243】

例示的な薬物ユニット(-D)は、以下の構造:

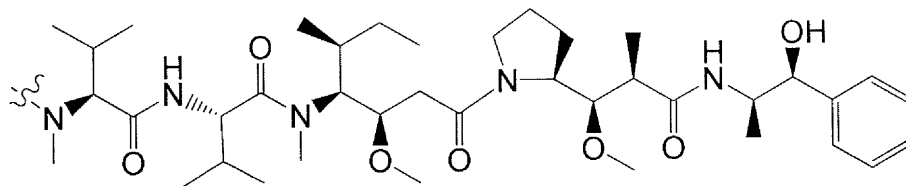


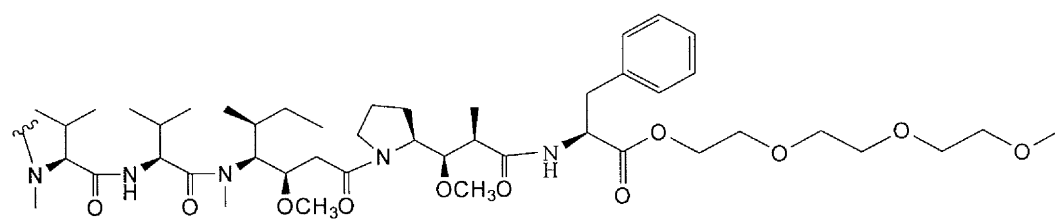
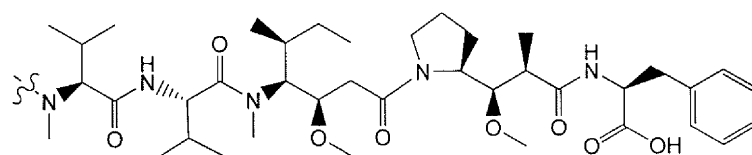
10

20

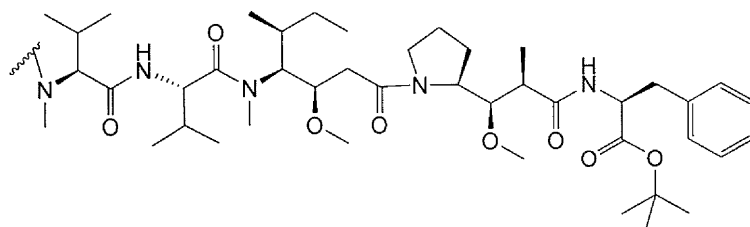


30

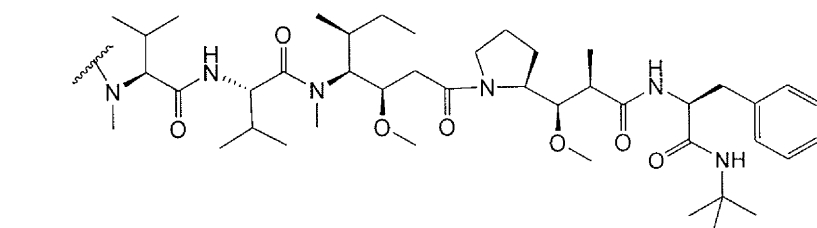




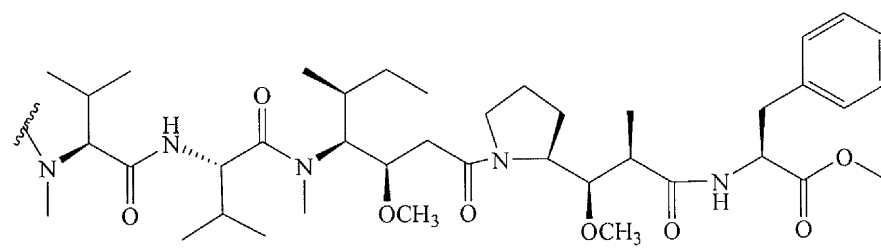
10



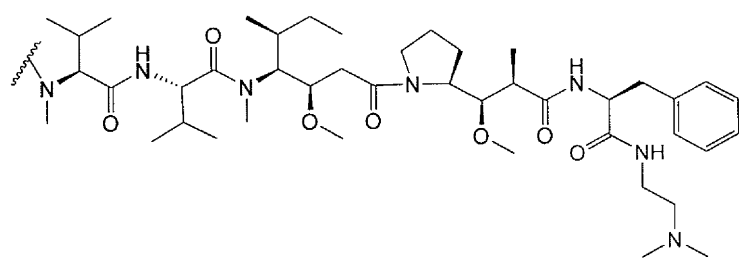
20

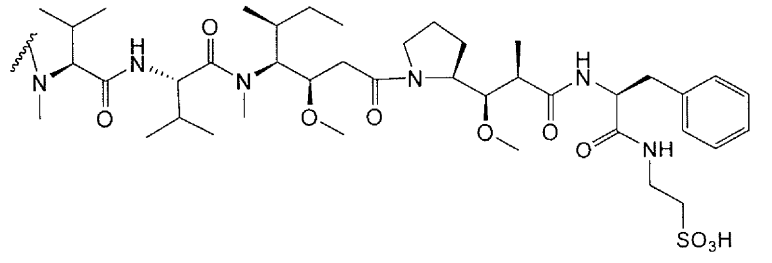
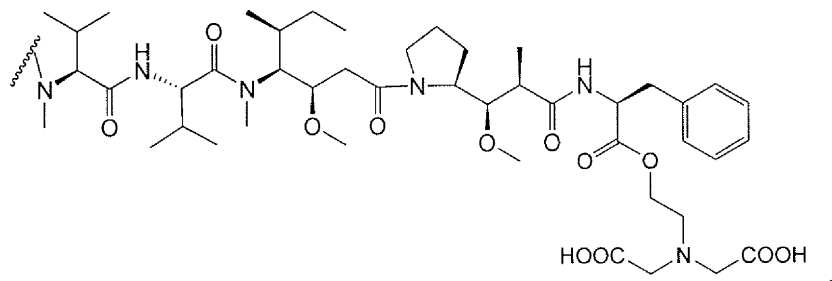


30

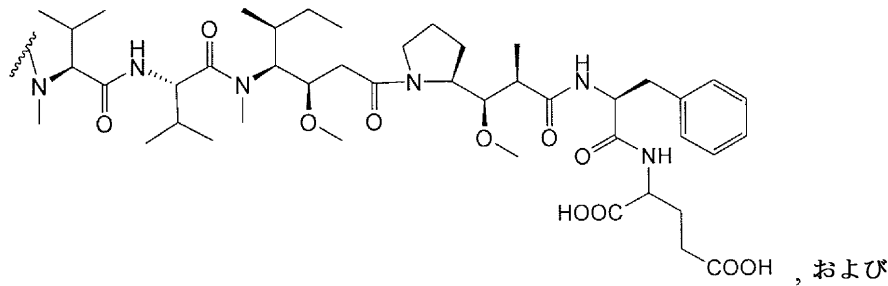


40

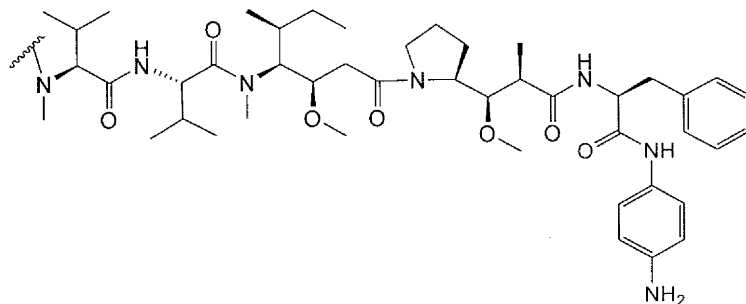




10



20



30

を有する薬物ユニット、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和化合物を含む。

【0244】

1つの局面において、トリエチレングリコールエステル(TEG)などがあるが、これに限定されない親水基を、薬物ユニットのR¹¹に取り付けることができる。理論に拘束されるものではないが、親水基は薬物ユニットの内部移行および非凝集を助ける。

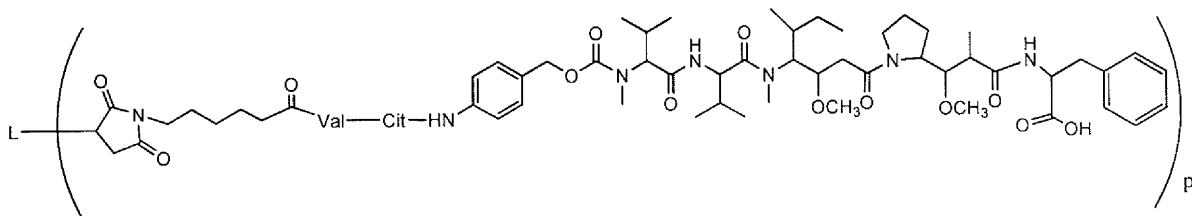
【0245】

一部の態様において、薬物ユニットはTZT-1027ではない。一部の態様において、薬物ユニットは、アウリスタチンE、ドラスタチン10、またはアウリスタチンPEではない。

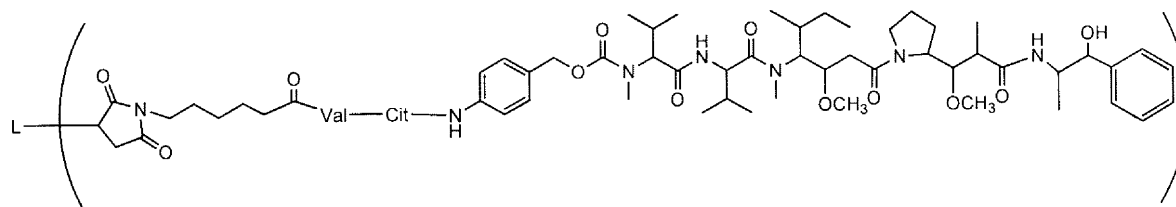
40

【0246】

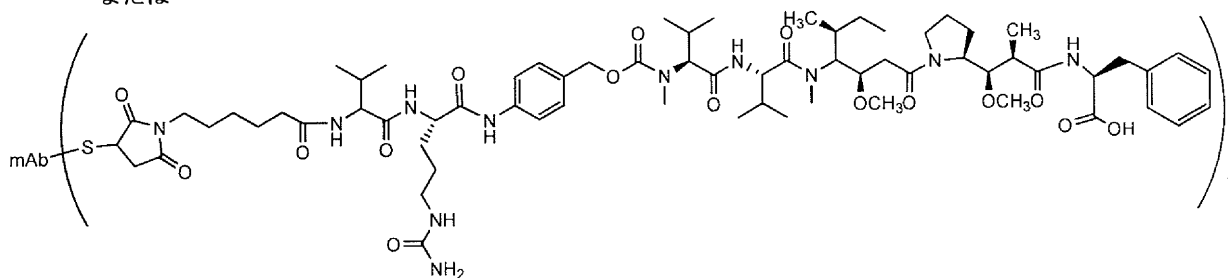
例示的な抗体薬物結合体化合物は、「L」または「mAb-s-」が、本明細書において示されたHa22-2(2,4)6.1と命名された191P4D12 MAbを表す、以下の構造:



10

**L-MC-vc-PAB-MMAF**

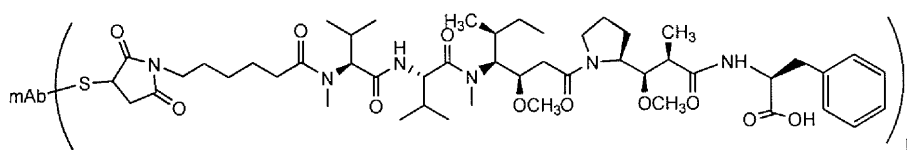
または



20

L-MC-vc-PAB-MMAE.

または



30

L-MC-MMAF

を有するか、

またはその薬学的に許容される塩である。

【0247】

一部の態様において、薬物ユニットは、カリチアマイシン、カンプトテシン、マイタンシノイド、またはアントラサイクリンである。一部の態様において、薬物は、タキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、ビンカルカロイドなどである。

40

【0248】

一部の代表的な態様において、適切な細胞傷害剤には、例えば、DNA副溝結合剤(例えば、エンジインおよびレキシトロプシン(lexitropsin)、CBI化合物;米国特許第6,130,237号も参照されたい)、デュオカルマイシン、タキサン(例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル)、ピューロマイシン、およびビンカルカロイドが含まれる。他の細胞傷害剤には、例えば、CC-1065、SN-38、トポテカン、モルホリノ-ドキシソルビシン、リゾキシシン(rhizoxin)、シアノモルホリノ-ドキシソルビシン、エキノマイシン、コンプレタスタチン、ネトロプシン、エポシロンAおよびB、エストラムスチン、クリプトフィシン(cryptophysin)、セマドチン(cemadotin)、マイタンシノイド、ディスコデルモリド、エリユテロビン、およびミトキサントロンが含まれる。

50

【0249】

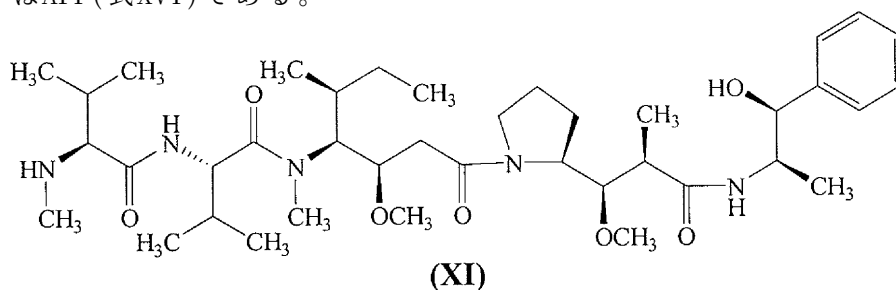
一部の態様において、薬物は抗チューブリン剤である。抗チューブリン剤の例には、アウリスタチン、タキサン(例えば、Taxol(登録商標)(パクリタキセル)、Taxotere(登録商標)(ドセタキセル))、T67(Tularik)、ならびにビンカアルカロイド(例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、およびビノレルビン)が含まれる。他の抗チューブリン剤には、例えば、バッカチン誘導体、タキサン類似体(例えば、エポシロンAおよびB)、ノコダゾール、コルヒチンおよびコルシミド(colcimid)、エストラムスチン、クリプトフィシン、セマドチン(cemadotin)、マイタンシノイド、コンプレタスタチン、ディスコデルモリド、およびエリュテロビンが含まれる。

【0250】

ある特定の態様では、細胞傷害剤は、抗チューブリン剤の別のグループであるマイタンシノイドである。例えば、特定の態様では、マイタンシノイドは、マイタンシンまたはDM-1である(ImmunoGen, Inc.; Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131も参照されたい)。

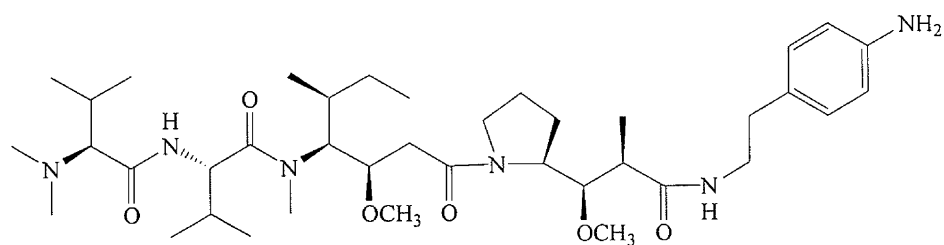
【0251】

ある特定の態様では、細胞傷害剤または細胞分裂阻害剤はドラスタチンである。ある特定の態様では、細胞傷害剤または細胞分裂阻害剤は、アウリスタチンクラスの細胞傷害剤または細胞分裂阻害剤である。従って、特定の態様において、細胞傷害剤または細胞分裂阻害剤はMMAE(式XI)である。別の特定の態様において、細胞傷害剤または細胞分裂阻害剤はAFP(式XVI)である。

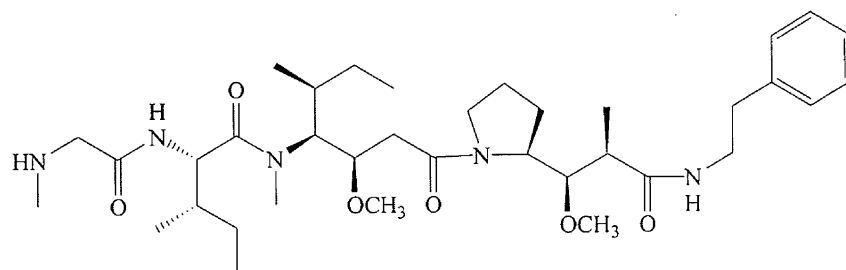


【0252】

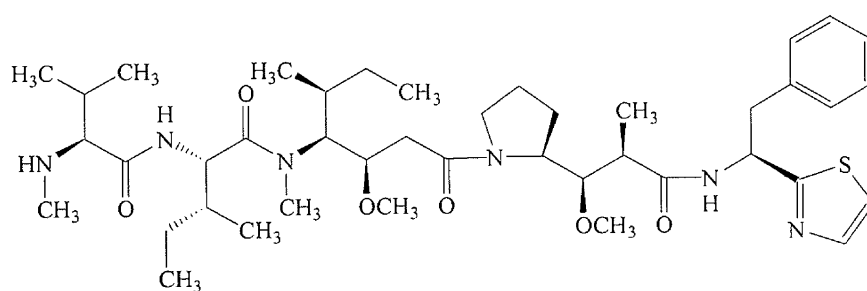
ある特定の態様では、細胞傷害剤または細胞分裂阻害剤は、式XII~XXIの化合物またはその薬学的に許容される塩である。



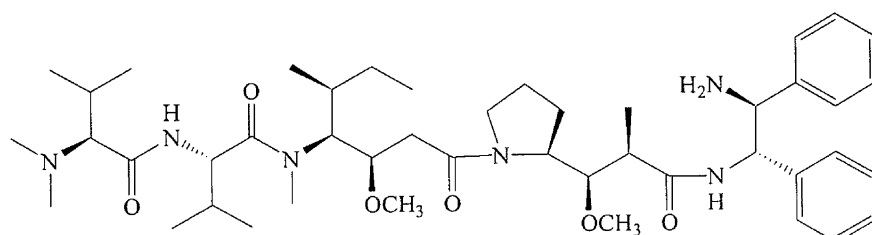
(XII)



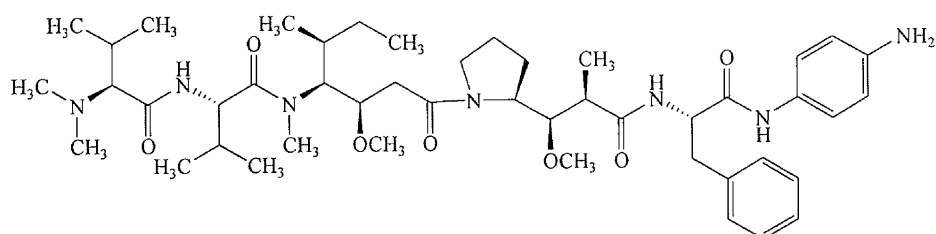
(XIII)



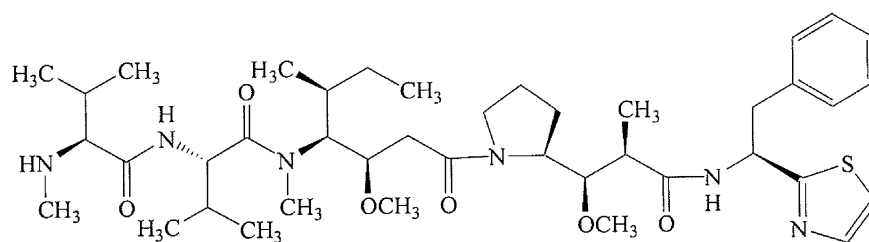
(XIV)



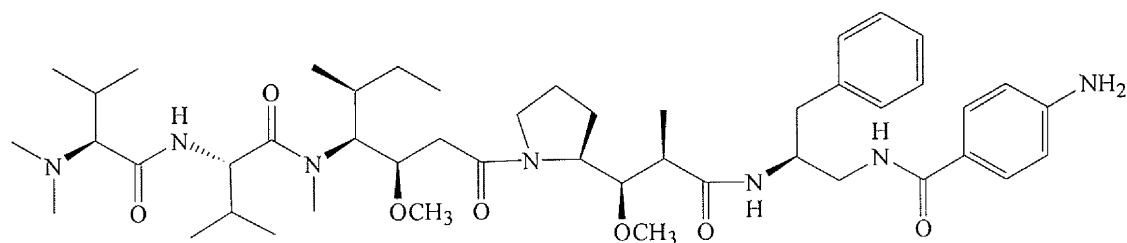
(XV)



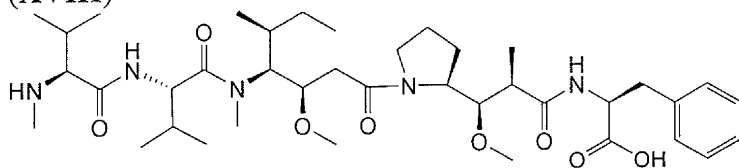
(XVI)



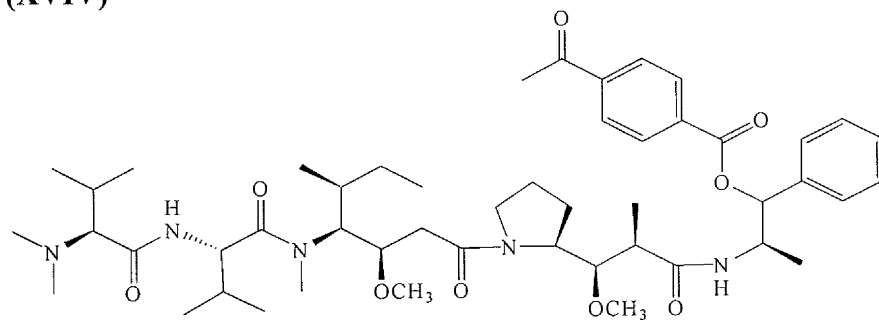
(XVII)



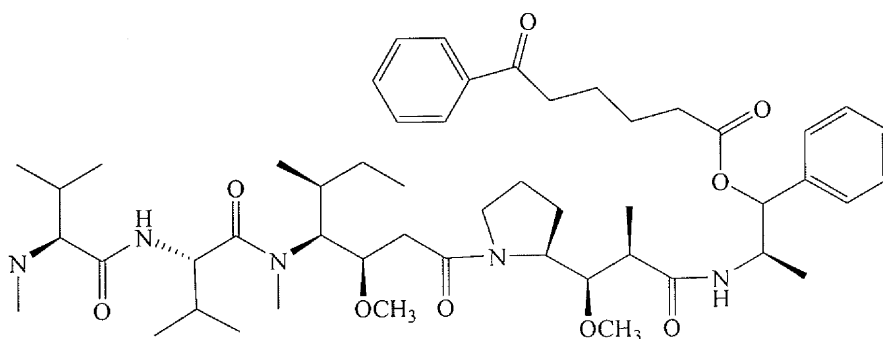
(XVIII)



(XIV)



(XX)



(XXI)

【0253】

X.) 薬物ローディング

薬物ローディングはpによって表され、分子内にある抗体1個あたりの薬物部分の数の平均である。薬物ローディングは、抗体1個あたり1~20個の薬物部分(D)でもよい。本発明のADCは、1~20個の範囲の薬物部分と結合体化した抗体が集まったものを含む。結合体化反応からのADC調製物中にある抗体1個あたりの薬物部分の数の平均は、質量分析およびELISAアッセイなどの従来手段によって特徴付けることができる。pに関するADCの定量分布も求めることができる。場合によっては、他の薬物ローディングを有するADCから、pがある特定の値の均一なADCを、電気泳動などの手段によって分離、精製、および特徴付けることができる。

【0254】

一部の抗体薬物結合体において、pは、抗体の取り付け部位の数によって限定されることがある。例えば、取り付けがシステインチオールの場合、前記の例示的な態様と同様に、抗体は、1個だけのシステインチオール基または数個のシステインチオール基を有してもよく、リンカーを取り付けることができる1個だけの十分に反応性のあるチオール基または数個の十分に反応性のあるチオール基を有してもよい。ある特定の態様では、薬物ローディングが大きくなると、例えば、 $p > 5$ になると、ある特定の抗体薬物結合体の凝集、不溶性、毒性、または細胞透過性の喪失が起こる場合がある。ある特定の態様では、本発

明のADCの薬物ローディングは、1～約8;約2～約6;約3～約5;約3～約4;約3.1～約3.9;約3.2～約3.8;約3.2～約3.7;約3.2～約3.6;約3.3～約3.8;または約3.3～約3.7である。実際には、ある特定のADCについて、抗体1個あたりの薬物部分の最適比は8未満でもよく、約2～約5でもよいことが示されている。(その全体が参照により本明細書に組み入れられる)米国特許第7,498,298号を参照されたい。

【0255】

ある特定の態様では、結合体化反応の間に、薬物部分の最大理論値より少ない薬物部分が抗体と結合体化される。抗体は、例えば、下記で議論するように、薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬と反応しないリジン残基を含有することがある。一般的に、抗体は、薬物部分に連結することができる遊離かつ反応性のシステインチオール基を含有しない。実際には、抗体にあるほとんどのシステインチオール残基はジスルフィド架橋として存在する。ある特定の態様では、反応性システインチオール基を作製するために、抗体は、部分的または完全な還元条件下で、ジチオスレイトール(DTT)またはトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)などの還元剤によって還元することができる。ある特定の態様では、リジンまたはシステインなどの反応性求核基を曝露するために、抗体は変性条件に供される。

【0256】

ADCのローディング(薬物/抗体比)は、様々なやり方で、例えば、(i)抗体に対してモル過剰な薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬を制限することによって、(ii)結合体化の反応時間または温度を制限することによって、(iii)システインチオール修飾のための部分的または限定的な還元条件によって、(iv)リンカー-薬物取り付けの数および/または位置を制御するように、システイン残基の数および位置が改変されるように、抗体のアミノ酸配列を組換え法によって操作することによって(例えば、本明細書およびWO2006/034488(その全体が参照により本明細書に組み入れられる)において開示されたようにチオMabまたはチオFabが調製される)制御することができる。

【0257】

複数の求核基が薬物-リンカー中間体と反応する、またはリンカー試薬と反応した後に薬物部分試薬と反応する場合、結果として生じた生成物が、抗体に取り付けられた1つまたは複数の薬物部分が分布しているADC化合物の混合物であることが理解されるだろう。抗体あたりの薬物の数の平均は、抗体に特異的であり、かつ薬物に特異的なデュアルELISA抗体アッセイによって混合物から計算することができる。個々のADC分子を、混合物中で質量分析によって特定し、HPLC、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって分離することができる(例えば、Hamblett, KJ., et al. 「Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate」, Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. 「Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates」, Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004を参照されたい)。ある特定の態様では、単一のローディング値を有する均一なADCを、電気泳動またはクロマトグラフィーによって結合体化混合物から単離することができる。

【0258】

XI.)ADCの細胞傷害作用を確かめる方法

薬物または抗体薬物結合体が細胞に対して細胞分裂阻害作用および/または細胞傷害作用を発揮するかどうか確かめる方法は公知である。一般的に、抗体薬物結合体の細胞傷害活性または細胞分裂阻害活性は、細胞培地中で、抗体薬物結合体の標的タンパク質を発現する哺乳動物細胞を曝露する工程;約6時間～約5日間、細胞を培養する工程;および細胞生存率を測定する工程によって測定することができる。細胞をベースとするインビトロアッセイを用いて、生存率(増殖)、細胞傷害性、および抗体薬物結合体のアポトーシス(カスパーゼ活性化)誘導を測定することができる。

【0259】

抗体薬物結合体が細胞分裂阻害作用を発揮するかどうか確かめるために、チミジン組み込みアッセイを用いることができる。例えば、96ウェルプレートの1ウェルにつき5,000個細胞の密度で標的抗原を発現する癌細胞を72時間にわたって培養し、72時間の最後の8時間の間に0.5 μ Ciの³H-チミジンに曝露することができる。培養細胞への³H-チミジンの組み込みは、抗体薬物結合体の存在下および非存在下で測定される。

【0260】

細胞傷害性を確かめるために、壊死またはアポトーシス(プログラム細胞死)を測定することができる。壊死は、典型的には、原形質膜の透過性の増大;細胞の膨張、および原形質膜の破裂によって達成される。アポトーシスは、典型的には、膜小胞化(membrane blebbing)、細胞質の凝集、および内因性エンドヌクレアーゼの活性化を特徴とする。癌細胞に対するこれらの任意の作用が確かめられることは、抗体薬物結合体が癌処置において有用であることを示している。 10

【0261】

細胞生存率は、細胞において、ニュートラルレッド、トリパンブルー、またはALAMAR(商標)ブルーの取り込みを確かめることによって測定することができる(例えば、Page et al., 1993, Intl. J. Oncology 3:473-476を参照されたい)。このようなアッセイにおいては、色素を含有する培地中で細胞をインキュベートし、細胞を洗浄し、色素の細胞取り込みを反映する残った色素が分光測定される。細胞傷害性を測定するために、タンパク質結合色素であるスルホローダミンB(SRB)も使用することができる(Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12)。 20

【0262】

または、テトラゾリウム塩、例えば、MTTが、生細胞を検出するが、死細胞を検出しないことによって哺乳動物細胞の生存および増殖を定量比色するアッセイにおいて用いられる(例えば、Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63を参照されたい)。

【0263】

アポトーシスは、例えば、DNA断片化を測定することによって定量することができる。インビトロでDNA断片化を定量測定するための商業的な測光法を利用することができる。このようなアッセイの例は、TUNEL(断片化されたDNAへの標識ヌクレオチドの組み込みを検出する)およびELISAをベースとするアッセイを含めてBiochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals)に記載されている。 30

【0264】

アポトーシスはまた、細胞の形態変化を測定することによって確かめることもできる。例えば、壊死と同様に、原形質膜完全性の喪失は、ある特定の色素(例えば、蛍光染料、例えば、アクリジンオレンジまたは臭化エチジウム)の取込みを測定することによって確かめることができる。アポトーシス細胞数を測定する方法は、Duke and Cohen, Current Protocols in Immunology(Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16)に記載されている。細胞を、DNA色素(例えば、アクリジンオレンジ、臭化エチジウム、またはヨウ化プロピジウム)によって標識し、クロマチンの凝集および核内膜に沿った辺縁趨向について観察することもできる。アポトーシスを確かめるために測定することができる他の形態変化には、例えば、細胞質の凝集、膜小胞化の増大、および細胞収縮が含まれる。 40

【0265】

アポトーシス細胞の存在は、培養物の付着区画および「浮遊」区画の両方において測定することができる。例えば、両区画とも、上清を除去し、付着した細胞をトリプシン処理し、遠心分離による洗浄工程(例えば、2000rpmで10分)の後に調製物を組み合わせ、(例えば、DNA断片化を測定することによって)アポトーシスを検出することによって収集することができる。(例えば、Piazza et al., 1995, Cancer Research 55:3110-16を参照されたい)。

【0266】

191P4D12治療用組成物の作用を適切な動物モデルにおいてインビボで評価することがで 50

きる。例えば、異種癌モデルを使用することができる。異種癌モデルにおいては、癌外植片または継代された異種移植片組織が、免疫不全動物、例えば、ヌードマウスまたはSCIDマウスに導入される(Klein et al., 1997, Nature Medicine 3: 402-408)。例えば、PCT特許出願W098/16628および米国特許第6,107,540号は、原発腫瘍の発症、微小転移巣、および後期疾患に特有の骨芽細胞性転移の形成を再現することができる様々なヒト前立腺癌異種移植片モデルについて述べている。腫瘍形成の阻害、腫瘍退縮、または転移などを測定するアッセイを用いて、効力を予測することができる。

【0267】

アポトーシスの促進を評価するインビボアッセイは、治療用組成物の評価において有用である。一態様において、治療用組成物で処置された腫瘍保有マウス由来の異種移植片をアポトーシス巣の存在について試験し、未処置コントロール異種移植片保有マウスと比較することができる。処置されたマウスの腫瘍においてアポトーシス巣が見られる程度から前記組成物の治療効力が分かる。

10

【0268】

上述の方法の実施において使用される治療用組成物は、所望の送達方法に適した担体を含む薬学的組成物に処方することができる。適切な担体は、治療用組成物と組み合わせられた場合に治療用組成物の抗腫瘍機能を保持し、患者の免疫系と一般的に非反応性である任意の材料を含む。例には、任意の多数の標準的な薬学的担体、例えば、滅菌リン酸緩衝食塩水溶液、静菌水などが含まれるが、これに限定されない(一般的に、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A.Osal編、1980を参照のこと)。

20

【0269】

治療製剤を可溶化し、治療用組成物を腫瘍部位に送達することができる任意の経路を介して投与することができる。潜在的に効率的な投与経路には、静脈内、非経口、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内、器官内、同所などが含まれるが、これに限定されない。静脈注射に好ましい製剤は、防腐処理をした静菌水、防腐処理をしていない滅菌水の溶液に溶解した、および/または0.9%の滅菌注射用塩化ナトリウム、USPを含むポリ塩化ビニルバッグもしくはポリエチレンバッグの中で希釈された治療用組成物を含む。治療タンパク質調製物は凍結乾燥されてもよく、滅菌粉末として、好ましくは、真空中で保管されてもよく、次いで、注射前に、静菌水(例えば、ベンジルアルコール防腐剤を含む)または滅菌水に溶解して再構成されてもよい。

30

【0270】

上述の方法を用いて癌を処置するための投与量および投与プロトコールは方法および標的癌によって異なり、一般的に、当技術分野において認められている他の多くの要因に左右されるだろう。

【0271】

XII.)191P4D12を発現する癌の処置

限られたセットの組織において通常発現するが、表Iに列挙した癌のような癌においても発現するタンパク質として191P4D12を同定されたことは、このような癌の処置に対する多くの治療アプローチを切り開く。

【0272】

注目すべきは、標的とされた抗腫瘍治療は、標的とされたタンパク質が正常組織で、さらに生命維持に必要な(vital)正常器官組織で発現する場合でも有用であったことである。生命維持に必要な器官は、生命を維持するために必要な器官、例えば、心臓または結腸である。生命維持に必要な器官は除去されても、個体がなお生存することができる器官である。生命維持に必要な器官の例は、卵巣、乳房、および前立腺である。

40

【0273】

正常組織における、さらに生命維持に必要な正常組織における標的タンパク質の発現は、標的タンパク質が過剰発現する特定の腫瘍の治療剤としての標的タンパク質に対する標的化薬剤の有用性を無効にしない。例えば、生命維持に必要な器官における発現は、それ自体ではかつそのものは有害ではない。さらに、前立腺および卵巣のような重要でない

50

考えられる器官は、死亡率に影響を及ぼすことなく除去することができる。最後に、いくつかの生命維持に必要な器官は、免疫寛容(immunoprivilege)のために正常器官発現の影響を受けない。免疫寛容器官は、血液-器官関門によって血液から保護されている器官であり、従って、免疫療法の手が届かない。免疫寛容器官の例は脳および精巣である。

【0274】

従って、191P4D12タンパク質の活性を阻害する治療アプローチは、191P4D12を発現する癌に罹患している患者に有用である。これらの治療アプローチは、一般的に、3つのクラスに分けられる。第1のクラスは、腫瘍細胞増殖に関する191P4D12機能を調節して、腫瘍細胞増殖の阻害もしくは遅延をもたらす、または腫瘍細胞の死滅を誘導する。第2のクラスは、191P4D12タンパク質と191P4D12タンパク質の結合パートナーもしくは他のタンパク質との結合または会合を阻害するための種々の方法を含む。第3のクラスは、191P4D12遺伝子の転写または191P4D12 mRNAの翻訳を阻害するための種々の方法を含む。

【0275】

従って、癌患者は、191P4D12発現の存在およびレベルについて、好ましくは、腫瘍組織の免疫組織化学的評価、定量的191P4D12画像化、または191P4D12発現の存在および程度を確実に示す他の技術を用いて評価することができる。腫瘍生検または外科手術標本の免疫組織化学分析は、この目的に好ましい。腫瘍組織の免疫組織化学分析のための方法は、当技術分野で周知である。

【0276】

XIII.) 抗体ベースの療法の標的としての191P4D12

191P4D12は、抗体ベースの治療戦略の魅力的な標的である。細胞外分子および細胞内分子の両方について多くの抗体の戦略が当技術分野で公知である(例えば、補体およびADCC媒介死滅ならびにイントラボディ(intrabody)の使用を参照のこと)。191P4D12は、対応する正常細胞に対して種々の系統の癌細胞において発現するので、非標的器官および非標的組織に免疫反応性組成物が結合することによって引き起こされる毒性の、非特異的なかつ/または非標的な影響を及ぼすことなく優れた感受性を示す、191P4D12免疫反応性組成物の全身投与が準備される。191P4D12のドメインと特異的に反応する抗体は、好ましくは毒素もしくは治療剤との抗体薬物結合体(すなわち、ADC)として、191P4D12発現癌を全身処置するために有用である。

【0277】

当業者であれば、免疫原性分子(例えば、図1に示した191P4D12配列の免疫原性領域)を特異的に標的化し、かつ結合するために抗体を使用できることを理解する。さらに、当業者であれば、抗体を細胞傷害剤に結合体化することは日常的であることを理解する(例えば、Slevers et al., Blood 93:11 3678-3684(June 1, 1999)を参照のこと)。細胞傷害剤および/または治療剤が、この細胞に、例えば、これら薬剤を、その細胞が発現する分子(例えば、191P4D12)に特異的な抗体に結合体化することによって直接送達される場合、細胞傷害剤は、その細胞に対して既知の生物学的効果(すなわち、細胞傷害性)を発揮する。

【0278】

細胞を死滅させるために抗体-細胞傷害剤結合体を使用する広範な種々の組成物および方法が当技術分野で公知である。癌の状況において、代表的な方法は、腫瘍を有する哺乳動物に、発現細胞表面に利用可能な、または局在に利用可能な発現されている抗原(例えば、191P4D12)に結合する標的化薬剤(例えば、191P4D12 MAb、好ましくはHa22-2(2,4)6.1)に連結された、選択された細胞傷害剤および/または治療剤を含む、生物学的に有効な量の結合体を投与する工程を含む。代表的な態様は、細胞傷害剤および/または治療剤を、191P4D12を発現する細胞に送達する方法であり、この方法は、細胞傷害剤を、191P4D12エピトープに免疫特異的に結合する抗体に結合体化する工程、およびこの細胞を、抗体薬物結合体(ADC)に曝露する工程を含む。別の例示的態様は、転移癌を罹患していると疑われる個体を処置する方法であり、この方法は、この個体に、細胞傷害剤および/または治療剤に結合体化した、治療的有効量の抗体を含む薬学的組成物を非経口投与する工程を含む。

。

【0279】

191P4D12抗体を使用する癌免疫療法は、他の型の癌の処置において首尾よく使用されてきた種々のアプローチに従って行うことができる(結腸癌(Arlen et al., 1998, Crit.Rev.Immunol.18:133-138)、多発性骨髄腫(Ozaki et al., 1997, Blood 90:3179-3186、Tsunenari et al., 1997, Blood 90:2437-2444)、胃癌(Kasprzyk et al., 1992, Cancer Res.52:2771-2776)、B細胞リンパ腫(Funakoshi et al., 1996, J.Immunother.Emphasis Tumor Immunol.19:93-101)、白血病(Zhong et al., 1996, Leuk.Res.20:581-589)、結腸直腸癌(Moun et al., 1994, Cancer Res.54:6160-6166; Velders et al., 1995, Cancer Res.55:4398-4403)、および乳癌(Shepard et al., 1991, J.Clin.Immunol.11:117-127)が含まれるが、これに限定されない)。治療アプローチの中には、毒素または放射性同位体への裸の抗体の結合体化、例えば、抗CD20抗体へのそれぞれ Y^{91} もしくは I^{131} の結合体化(例えば、Zevalin(商標)、IDEC Pharmaceuticals Corp.またはBexxar(商標)、Coulter Pharmaceuticals)を伴うものもあれば、抗体および他の治療剤、例えば、Herceptin(商標)(trastuzumab)とパクリタキセル(Genentech, Inc.)の同時投与を伴うものもある。好ましい態様において、抗体は、細胞傷害剤(前記)、好ましくはMMAE(Seattle Genetics, Inc.)という名称のアウリスチン誘導体に結合体化することができる。

10

【0280】

191P4D12抗体療法は癌の全ての段階に有用であるが、抗体療法は、進行癌または転移癌において特に適切であり得る。本発明の抗体療法による処置は、1回またはそれ以上の化学療法を受けたことがある患者に適応がある。または、本発明の抗体療法は、化学療法による処置を受けたことがない患者のために化学療法レジメンまたは放射線レジメンと組み合わせられる。さらに、抗体療法は、特に、化学療法剤の毒性にあまり耐えられない患者にとって、低用量の併用化学療法の使用を可能にし得る。Fan et al.(Cancer Res.53:4637-4642,1993)、Prewett et al.(International J. of Onco.9:217-224,1996)、およびHancock et al.(Cancer Res.51:4575-4580,1991)は、化学療法剤と一緒に種々の抗体を使用することを記載している。

20

【0281】

表Iに記載の癌を処置する191P4D12モノクローナル抗体は、腫瘍に対して強力な免疫応答を起こす抗体または直接細胞傷害性である抗体を含む。この点に関して、191P4D12モノクローナル抗体(MAb)は、補体媒介性細胞傷害機構または抗体依存性細胞傷害(ADCC)機構のいずれかによって腫瘍細胞溶解を誘発することができる。これらの機構はともに、補体タンパク質上のエフェクター細胞Fc受容体部位との相互作用のために、免疫グロブリン分子のインタクトなFc部分を要する。さらに、腫瘍増殖に対して直接的な生物学的効果を発揮する191P4D12 MAbは、191P4D12を発現する癌を処置するために有用である。細胞傷害性MAbが直接的に作用する機構には、以下が含まれる:細胞増殖の阻害、細胞分化の調節、腫瘍新脈管形成因子プロファイルの調節、およびアポトーシスの誘導。特定の191P4D12 MAbが抗腫瘍効果を発揮する機構は、ADCC、補体媒介性細胞溶解などのような、細胞死を評価する当技術分野で一般に公知の任意の数のインビトロアッセイを用いて評価される。

30

【0282】

従って、本発明の治療法において使用される好ましいモノクローナル抗体は、標的191P4D12抗原を高親和性で特異的に結合する、完全ヒト抗体である。

40

【0283】

XIV.)191P4D12 ADCカクテル

本発明の治療法は、単一の191P4D12 ADC、および異なるMAb(すなわち、191P4D12 MAbまたは他のタンパク質に結合するMAb)の組み合わせ、すなわち、カクテルの投与を意図する。このようなMAbカクテルは、これらカクテルが、異なるエピトープを標的とするMAbを含むか、異なるエフェクター機構を利用するか、または免疫エフェクター機能に依存するMAbと細胞傷害性MAbを直接組み合わせる限りは、特定の利点を有し得る。このような組み合わせられたMAbは相乗的治療効果を示し得る。さらに、191P4D12 MAbは、種々の化学療法剤および生物学的薬剤、アンドロゲンブロッカー、免疫モジュレーター(例えば、IL-2、GM-

50

CSF)、外科手術または放射線を含むが、これに限定されない、他の治療様式と同時に投与することができる。好ましい態様において、191P4D12 MAbは、結合体化された形態で投与される。

【0284】

191P4D12 ADC製剤は、腫瘍細胞に抗体を送達することができる任意の経路を介して投与される。投与経路には、静脈内、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内などが含まれるが、これに限定されない。一般的に、処置は、典型的には約0.1mg/kg体重、0.2mg/kg体重、0.3mg/kg体重、0.4mg/kg体重、0.5mg/kg体重、0.6mg/kg体重、0.7mg/kg体重、0.8mg/kg体重、0.9mg/kg体重、1mg/kg体重、2mg/kg体重、3mg/kg体重、4mg/kg体重、5mg/kg体重、6mg/kg体重、7mg/kg体重、8mg/kg体重、9mg/kg体重、10mg/kg体重、15mg/kg体重、20mg/kg体重、または25mg/kg体重の範囲の用量での、許容可能な投与経路、例えば、静脈内注射(IV)を介した191P4D12 ADC調製物の反復投与を含む。一般的に、1週間あたり、10~1000mg MAbの範囲の用量が有効かつ十分に許容される。

10

【0285】

転移性乳癌の処置におけるHerceptin(登録商標)(トラスツズマブ(Trastuzumab))での臨床経験に基づくと、約4mg/kg患者体重のIVの初回負荷投与量、続いて、約2mg/kg IVの毎週投与量のMAb調製物が、許容可能な投与レジメンを示す。好ましくは、この初回負荷投与量は、90分間以上の注入として投与される。定期的な維持用量が、初期投与量が十分許容されたことを条件として、30分間以上の注入として投与される。当業者により認識されるように、種々の要因が、特定の症例における理想的な投与レジメンに影響を及ぼし得る。このような要因には、例えば、使用されるMAbの結合親和性および半減期、患者における191P4D12発現の程度、循環中の分離した191P4D12抗原の程度、望ましい定常状態の抗原濃度レベル、処置頻度、ならびに本発明の方法と組み合わせて使用される化学療法剤もしくは他の薬剤の影響、ならびに特定の患者の健康状態が含まれる。

20

【0286】

任意で、最も有効な投与レジメンなどの決定を助けるために、所定のサンプル中の191P4D12レベル(例えば、循環する191P4D12抗原および/または191P4D12発現細胞のレベル)について患者を評価すべきである。このような評価はまた、治療の間にわたってモニタリング目的で使用され、他のパラメーター(例えば、膀胱癌治療における尿細胞診および/またはImmunoCytレベル、あるいは類似性、前立腺癌治療における血清PSAレベル)の評価と組み合わせて、治療的成功を測定するために有用である。

30

【0287】

本発明の目的は、191P4D12を発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する、または遅らせる191P4D12 ADCを提供することである。本発明のさらなる目的は、新脈管形成および他の生物学的機能を阻害する方法を提供し、それによって、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、このような191P4D12 ADCを用いて、特に、他の薬物または免疫学的に活性な処置とこのような191P4D12 ADCとを併用して、腫瘍増殖を低減させることである。

【0288】

XV.) 併用療法

一態様において、ヒト腫瘍を含む腫瘍が、化学療法剤または放射線またはこれらの組み合わせとともに191P4D12 ADCで処置される場合、相乗効果がある。言い換えると、191P4D12 ADCによる腫瘍増殖の阻害は、化学療法剤または放射線またはこれらの組み合わせと組み合わせられる場合、予想よりも強くなる。相乗効果は、例えば、191P4D12 ADCのみの処置または191P4D12 ADCおよび化学療法剤または放射線による処置の相加効果から予想されるよりも大きな、組み合わせ処置による腫瘍増殖阻害により示され得る。好ましくは、相乗効果は、寛解が、191P4D12 ADCによる処置または191P4D12 ADCおよび化学療法剤もしくは放射線の付加的組み合わせによる処置から予想されない場合に、癌の寛解によって実証される。

40

【0289】

191P4D12 ADCおよび化学療法もしくは放射線の組み合わせ、またはその両方を使用して

50

腫瘍細胞の増殖を阻害する方法は、化学療法もしくは放射線療法、およびこれらの組み合わせを始める前、その間またはその後に(すなわち、化学療法および/もしくは放射線療法を始める前とその間か、始める前と後か、その間と後か、もしくは始める前と間と後)、191P4D12 ADCを投与する工程を含む。例えば、191P4D12 ADCは、典型的には、放射線療法および/または化学療法を開始する1日間～60日間前、好ましくは、3日間～40日間前、より好ましくは、5日間～12日間前に投与される。しかしながら、処置プロトコールおよび特定の患者の要求に応じて、この方法は最も有効な処置を提供し、最終的には、患者の寿命を延ばす様式において行われる。

【0290】

化学療法剤の投与は、非経口経路および腸経路による全身投与を含め、種々の方法で達成することができる。一態様において、191P4D12 ADCおよび化学療法剤は別々の分子として投与される。化学療法剤または化学療法の特定の例には、シスプラチン、ダカルバジン(DTIC)、ダクチノマイシン、メクロレタミン(ナイトロジェンマスタード)、ストレプトゾトシン、シクロホスファミド、カルムスチン(BCNU)、ロムスチン(CCNU)、ドキシソルビシン(アドリアマイシン)、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、パクリタキセル(タキソール)、トセタキセル(タキソテール)、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、クラドリビン、ダカルバジン、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イホスファミド、インターフェロン α 、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、プリカマイシン、ミトーテン、ペグアスバルガーゼ、ペントスタチン、ビボプロマン、プリカマイシン、ストレプトゾトシン、タモキシフェン、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルビン、ゲムシタビン、クロラムブシル、タキソールおよびこれらの組み合わせが含まれる。

【0291】

191P4D12 ADCと組み合わせて使用される放射線源は、処置される患者に対して外部にある、または内部にあるかのいずれかであり得る。この放射線源が患者に対して外部にある場合、この療法は、外部ビーム放射線療法(EBRT)として公知である。放射線源が患者に対して内部にある場合、この処置は、近接放射線療法(BT)といわれる。

【0292】

前記の治療レジメンはさらに、さらなる癌治療剤および/またはレジメン、例えば、さらなる化学療法、癌ワクチン、シグナル伝達インヒビター、異常な細胞増殖もしくは癌を処置するのに有用な薬剤、IGF-1Rに結合することによって腫瘍増殖を阻害する抗体(例えば、WO/2005/092380(Pfizer)に記載されるような抗CTLA-4抗体)または他のリガンド、ならびにサイトカインと組み合わせることができる。

【0293】

哺乳動物がさらなる化学療法に供される場合、前記の化学療法剤を使用することができる。さらに、増殖因子インヒビター、生物学的応答調節物質、抗ホルモン治療、選択的エストロゲン受容体調節因子(SERM)、新脈管形成インヒビター、および抗アンドロゲンを使用することができる。例えば、抗ホルモン、例えば、抗エストロゲン、例えば、Nolvadex(タモキシフェン)または抗アンドロゲン、例えば、Casodex(4'-シアノ-3-(4-フルオロフェニルスルホニル)-2-ヒドロキシ-2-メチル-3'-(トリフルオロメチル)プロピオンアニリド)を使用することができる。

【0294】

前記の治療アプローチは、広範に種々の外科的、化学療法的または放射線治療的レジメンのうちのいずれか1つと併用することができる。本発明の治療アプローチは、低用量の化学療法(または他の治療)および/または低頻度の投与の使用を可能にし得る。これは、全ての患者に対して、特に化学療法剤の毒性に十分に耐性ではない患者に対しても好都合である。

【0295】

XVI.) キット/製造物品

本明細書中で記載される研究用途、予後判定用途、予防用途、診断用途および治療用途における使用のために、キットが本発明の範囲内に含まれる。このようなキットは、1つまたはそれ以上の容器、例えば、バイアル、チューブなどを収容するために区画化されたキャリア、包装、または容器を備えてもよい。各容器は、使用、例えば、本明細書中に記載される使用のための説明書を含むラベルまたは挿入物と一緒に、前記方法において使用される別個の要素の1つを含む。例えば、容器は、検出可能に標識される抗体または検出可能に標識することができる抗体を含んでもよい。キットは、薬物ユニットを含む容器を備えてもよい。キットは、図2もしくは図3におけるアミノ酸配列またはそれらのアナログ、あるいはこのようなアミノ酸配列をコードする核酸分子の全てまたは一部を含んでもよい。

10

【0296】

本発明のキットは、典型的には、前記の容器およびそれに付随した1つまたはそれ以上の他の容器を備える。この他の容器は、商業的なまたは使用者の観点から望ましい物質を含む。この物質には、例えば、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、キャリア、包装、容器、バイアル、ならびに/または内容物を列挙したチューブラベルおよび/もしくは使用説明書、ならびに使用説明書を有する包装挿入物が含まれる。

【0297】

ラベルは、組成物が特定の治療用途または非治療的用途、例えば、予後判定用途、予防用途、診断用途、または研究用途のために使用されることを示すために、容器上または容器と一緒に存在してもよく、本明細書中に記載のように、インビボまたはインビトロでの使用のいずれかについての指示を示してもよい。指示および/または他の情報はまた、キットと一緒に、またはキット上に含まれる挿入物またはラベル上に載っていてもよい。ラベルはまた、容器上にまたは容器に付けられてもよい。ラベルを形成する文字、数字または他の字が容器それ自体に成型またはエッチングされた場合、ラベルはその容器上に存在してもよい。ラベルが、例えば、包装挿入物として、容器を保持する入れ物またはキャリア内に存在する場合は、容器に付けられてもよい。ラベルは、組成物が、状態、例えば、表Iに示した組織の癌の、診断、処置、予防または予後判定のために使用されることを示してもよい。

20

【0298】

「キット」および「製造物品」という用語は、同義語として使用することができる。

30

【0299】

本発明の別の態様において、組成物、例えば、抗体または抗体薬物結合体(ADC)を含む製造物品、例えば、表Iに示したもののような組織の癌の診断、予後判定、予防および/または処置のために有用な物質を含む製造物品が提供される。製造物品は、典型的には、少なくとも1つの容器および少なくとも1つのラベルを備える。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジおよび試験管が含まれる。容器は、ガラス、金属またはプラスチックのような種々の材料から形成することができる。この容器は、アミノ酸配列、低分子、核酸配列、細胞集団および/または抗体を保持してもよい。別の態様において、容器は、細胞および組織における191P4D12のタンパク質発現の評価において使用するために、または関連する研究目的、予後判定目的、診断目的、予防目的および治療目的のために、抗体、その結合フラグメントまたは特異的結合タンパク質を含む。このような使用のための説明書および/または指示書が、このような容器上に、またはその容器と共に備えられてもよく、これらの目的のために使用される試薬および他の組成物またはツールも同様であり得る。

40

【0300】

または、容器はまた、状態を処置、診断、予後判定または予防するために有効な組成物を保持してもよく、滅菌アクセスポートを有してもよい(例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静注液バッグまたはバイアルであり得る)。前記組成物における活性薬剤は、191P4D12に特異的に結合できる抗体または191P4D12に特異的に

50

結合する抗体薬物結合体であり得る。

【0301】

製造物品はさらに、薬学的に許容可能な緩衝液、例えば、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液および/またはデキストロス溶液を含む第二の容器を含んでもよい。製造物品はさらに、商業的なおよび使用者の観点から望ましい他の物質を含んでもよく、これには他の緩衝液、希釈剤、フィルター、攪拌棒、針、シリンジならびに/または使用のための指示書および/もしくは説明書の付いた包装挿入物が含まれる。

【実施例】

【0302】

本発明の種々の局面が、以下の数個の実施例によって、さらに説明および例示される。これらはいずれも、本発明の範囲を制限することを意図しない。

10

【0303】

実施例1

191P4D12抗原

当技術分野において公知のサプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション(SH)法を用いて191P4D12遺伝子配列を発見した。標準的な方法を用いて、9つの正常組織のプールに由来する膀胱腫瘍マイナスcDNAから、223bpの191P4D12 SSH配列を同定した。膀胱癌cDNAライブラリーから完全長191P4D12 cDNAクローンを単離した。このcDNAは長さが3464bpであり、510アミノ酸ORFをコードする(図1を参照されたい)。191P4D12遺伝子はネクチン-4遺伝子と相同性を示す。さらなる参照については、US2004/0083497(Agensys, Inc., Santa Monica, CA)およびPCT公報W02004/016799(Agensys, Inc., Santa Monica, CA)を参照されたい。191P4D12抗原の例示的な態様については、図1を参照されたい。

20

【0304】

実施例2

191P4D12モノクローナル抗体(MAb)の作製

1つの態様において、191P4D12および191P4D12変種に対する治療用モノクローナル抗体(「MAb」)は、191P4D12または191P4D12変種に結合、内部移行し、191P4D12または191P4D12変種の生物学的機能を破壊または調節する、それぞれのタンパク質に特異的な、または変種間で共通する配列に特異的なエピトープと反応する抗体、例えば、リガンド、基質、および結合パートナーとの相互作用を破壊する抗体を含む。このようなMAbを作製するための免疫原には、細胞外ドメインまたは191P4D12タンパク質配列全体をコードまたは含有するように設計された免疫原、アミノ酸配列のコンピュータ分析から機能モチーフを含有すると予測された領域および抗原性があると予測された191P4D12タンパク質変種領域が含まれる。免疫原には、ペプチドおよび組換えタンパク質、例えば、tag5-191P4D12、精製された哺乳動物細胞由来Hisタグ化タンパク質が含まれる。さらに、マウスを免疫するために、高レベルの191P4D12、例えば、ラット1-191P4D12または300.19-191P4D12を発現するように操作された細胞が用いられる。

30

【0305】

191P4D12に対するMAbは、マウス重鎖およびκ軽鎖遺伝子座が不活化され、ヒト重鎖およびκ軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の大半が挿入されているXenoMouse technology(登録商標)(Amgen Fremont)を用いて作製した。Ha22-2(2,4)6.1と命名されたMAbは、pTag5/mychis-191P4D12(アミノ酸23-351)によるヒトγ1産生XenoMiceの免疫化から作製した。

40

【0306】

191P4D12 MAb Ha22-2(2,4)6.1は、ELISAによってpTag5/mychis-191P4D12タンパク質に特異的に結合し、組換え191P4D12発現細胞および複数種の191P4D12発現癌細胞株にも特異的に結合する。

【0307】

Ha22-2(2,4)6.1と命名された抗体を産生するハイブリドーマは、2010年8月18日に(Federal Expressを介して)American Type Culture Collection(ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108に送られ、アクセッション番号PTA-11267が割り当てられた。

50

【0308】

それぞれのハイブリドーマ細胞からトリゾール試薬(Life Technologies, Gibco BRL)を用いてmRNAを単離した後に、191P4D12 MAb Ha22-2(2,4)6.1のDNAコード配列を決定した。

【0309】

以下のプロトコルを用いて、ハイブリドーマ細胞から抗191P4D12 Ha22-2(2,4)6.1重鎖可変核酸配列および軽鎖可変核酸配列を配列決定した。Ha22-2(2,4)6.1分泌ハイブリドーマ細胞をトリゾール試薬(Life Technologies, Gibco BRL)で溶解した。総RNAを精製および定量した。オリゴ(dT)12-18プライミングとGibco-BRL Superscript Preamplificationシステムを用いて、総RNAから第1鎖cDNAを作製した。ヒト免疫グロブリン重鎖可変プライマーおよびヒト免疫グロブリン軽鎖可変プライマーを用いて第1鎖cDNAを増幅した。PCR産物を配列決定し、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を決定した。 10

【0310】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域の核酸配列およびアミノ酸配列を図2および図3に列挙した。Ha22-2(2,4)6.1 MAbとヒトIg生殖系列とのアラインメントを図4A~4Bに示した。

【0311】

実施例3組換えDNA方法を用いたHa22-2(2,4)6.1発現

Ha22-2(2,4)6.1 MAbをトランスフェクト細胞において組換え発現させるために、Ha22-2(2,4)6.1 MAb重鎖可変配列および軽鎖可変配列をそれぞれ、ヒト重鎖IgG1定常領域およびヒト軽鎖Igκ定常領域の上流にクローニングした。完全なHa22-2(2,4)6.1 MAbヒト重鎖カセットおよび軽鎖カセットを、クローニングベクターの中のCMVプロモーター/エンハンサーの下流にクローニングした。ポリアデニル化部位をMAbコード配列の下流に含めた。組換えHa22-2(2,4)6.1 MAb発現構築物をCHO細胞にトランスフェクトした。組換え細胞から分泌されたHa22-2(2,4)6.1 MAbと細胞表面191P4D12との結合をフローサイトメトリーによって評価した(図5A)。ラット-コントロール細胞およびラット-191P4D12細胞を、ハイブリドーマまたはHa22-2(2,4)6.1重鎖ベクター構築物および軽鎖ベクター構築物によってトランスフェクトされたCHO細胞いずれかからのHa22-2(2,4)6.1 MAbによって染色した。フローサイトメトリーによって結合を検出した。 20

【0312】

結果から、CHO細胞において発現された組換え発現Ha22-2(2,4)6.1は、ハイブリドーマから精製されたHa22-2(2,4)6.1と同じように191P4D12に結合することが分かる。191P4D12組換えタンパク質との結合について、組換え細胞から分泌されたHa22-2(2,4)6.1 MAbもELISAによって評価した。図5Bに示したように、Ha22-2(2,4)6.1と191P4D12タンパク質との結合はCHO由来MAb材料とハイブリドーマ細胞由来MAb材料との間で同一であった。 30

【0313】

実施例4Ha22-2(2,4)6.1 MAbの抗体薬物結合体化

以下のプロトコルを用いて、Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEと命名された本発明の抗体薬物結合体(ADC)を作り出すために、本明細書に記載のvc(Val-Cit)リンカーを用いて、Ha22-2(2,4)6.1 MAb(図2)と、MMAE(式XI)と命名されたアウリスタチン誘導体を結合体化した。細胞傷害性vcMMAEを作り出すために、表IVに示した一般的方法を用いて、vc(Val-Cit)リンカーとMMAE(Seattle Genetics, Inc., Seattle, WA)との結合体化を完了した(米国特許第7,659,241号を参照されたい)。 40

【0314】

次に、以下のプロトコルを用いて、Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEと命名された本発明の抗体薬物結合体(ADC)を作製した。

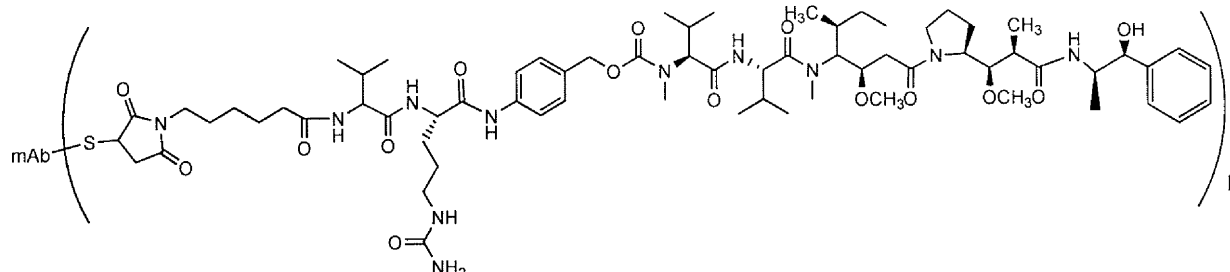
【0315】

簡単に述べると、Ha22-2(2,4)6.1 MAbを10mM酢酸塩pH5.0、1%ソルビトール、3%L-アグリニン(agrinine)に溶解した15mg/mL溶液を、この溶液のpHを7.5に調整する20%体積の0.1M TrisCl, pH8.4、25mM EDTA、および750mM NaCl、5mM EDTA、ならびに150mM塩化ナト 50

リウムと共に添加する。次いで、2.3モル当量のTCEP(MAbのモルを基準とする)を添加することによってMABを部分的に還元し、次いで、37℃で2時間攪拌する。次いで、部分的に還元したMAB溶液を5℃に冷却し、4.4モル当量のvcMMAE(抗体のモルを基準とする)を6%(v/v)DMSO溶液として添加する。混合物を5℃で60分間攪拌し、次いで、vcMMAEを基準にして1モル当量のN-アセチルシステインを添加した後にさらに15分間攪拌する。10体積の20mMヒスチジン、pH6.0を用いた抗体薬物結合体(ADC)の限外濾過/ダイアフィльтраーションによって、クエンチされた過剰なvcMMAEおよび他の反応成分を除去する。

【0316】

結果とした生じた抗体薬物結合体(ADC)はHa22-2(2,4)6.1vcMMAEと名付けられ、以下の式:



を有する。

式中、MABはHa22-2(2,4)6.1(図2および図3)であり、pは1~8である。本実施例において示した抗体薬物結合体のp値は約3.8であった。

【0317】

実施例5

Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEの特徴付け

「Ha22-2(2,4)6.1 MABの抗体薬物結合体化」というタイトルの実施例に示した手順を用いて、191P4D12に結合する抗体薬物結合体を作製し、当技術分野において公知のアッセイの組み合わせを用いてスクリーニング、同定、および特徴付けを行った。

【0318】

A.FACSによる親和性の決定

PC3-ヒト-191P4D12細胞の表面上に発現している191P4D12に対するHa22-2(2,4)6.1vcMMAEの結合親和性、PC3-カニクイザル-191P4D12細胞の表面上に発現している191P4D12に対するHa22-2(2,4)6.1vcMMAEの結合親和性、およびPC3-ラット-191P4D12細胞の表面上に発現している191P4D12に対するHa22-2(2,4)6.1vcMMAEの結合親和性を試験した。簡単に述べると、最終濃度が160nM~0.011nMの11(11)種類のHa22-2(2,4)6.1vcMMAE希釈液を、それぞれの細胞タイプ(50,000個の細胞/ウェル)と4℃で一晩インキュベートした。インキュベーションの終わりに、細胞を洗浄し、抗hIgG-PE検出抗体と4℃で45分間インキュベートした。結合しなかった検出抗体を洗浄した後に、細胞をFACSによって分析する。図6~8に列挙したように平均蛍光強度(MFI)値を得た。MFI値をGraphpad Prismソフトウェアに入力し、 $Y = B_{max} \cdot X / (K_d + X)$ の1部位結合(one site binding)(双曲線)式を用いて分析して、図6~8に示したHa22-2(2,4)6.1vcMMAE飽和曲線を作成した。Bmaxは、Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEと191P4D12との最大結合時のMFI値であり、Kdは、最大半量結合に達するのに必要なHa22-2(2,4)6.1vcMMAE濃度であるHa22-2(2,4)6.1vcMMAE結合親和性である。

【0319】

PC3-ヒト-191P4D12細胞の表面上に発現している191P4D12に対するHa22-2(2,4)6.1vcMMAEの親和性(Kd)、PC3-カニクイザル-191P4D12細胞の表面上に発現している191P4D12に対するHa22-2(2,4)6.1vcMMAEの親和性(Kd)、およびPC3-ラット-191P4D12細胞の表面上に発現している191P4D12に対するHa22-2(2,4)6.1vcMMAEの親和性(Kd)の計算値は、それぞれ、0.69nM(図6)、0.34nM(図7)、および1.6nM(図8)である。

【0320】

B.SPRによる親和性の決定

10

20

30

40

50

精製された組換え191P4D12(ECDアミノ酸1~348)に対するHa22-2(2,4)6.1 MAbおよびHa22-2(2,4)6.1vcMMAEの親和性を表面プラズモン共鳴(SPR)(BIAcore)によって行った。簡単に述べると、ヤギ抗ヒトFc γ ポリクローナルAb(Jackson Immuno Research Labs, Inc.)をCM5センサーチップ(Biacore)の表面に共有結合により固定した。次いで、精製されたHa22-2(2,4)6.1 MAbまたはHa22-2(2,4)6.1vcMMAEを前記チップの表面上に捕捉した。平均して、約300RUの試験Ha22-2(2,4)6.1 MAbまたはHa22-2(2,4)6.1vcMMAEを各サイクルにおいて捕捉した。その後に、このような表面上に、1nM~100nMにわたる一連の5~6種類の組換え191P4D12(ECDアミノ酸1~348)希釈液を注入して、BIAevaluation 3.2およびCLAMPソフトウェア(Myszka and Morton, 1998)を用いて処理され、1:1相互作用モデルに大域的(globally)にフィットされた結合曲線(センソグラム(sensogram))を作成した(図22)。表Vは、組換え191P4D12(ECDアミノ酸1~348)に対するHa22-2(2,4)6.1 MAbおよびHa22-2(2,4)6.1vcMMAEの会合速度定数および解離速度定数ならびに親和性をまとめたものである。

10

【0321】

C.Ha22-2(2,4)6.1 MAbのドメインマッピング

191P4D12タンパク質の特定のドメインに対するHa22-2(2,4)6.1 MAbの結合部位をマッピングするために、このようなドメイン(またはその組み合わせ)を発現する数種類のラット1(E)組換え細胞株を作製した(表VI)。標準的なプロトコールを用いて、Ha22-2(2,4)6.1と細胞表面との結合をFACSによって評価した。図10に示したように、Ha22-2(2,4)6.1 MAbはVC1ドメイン発現細胞ならびに野生型191P4D12に結合するが、C1C2ドメイン発現細胞に結合しない。さらに、Ha22-8e6.1と名付けられた別の191P4D12 MAbは、細胞表面上にある191P4D12 C1C2ドメインを認識するが、VC1ドメインを認識しない。このことは、Ha22-2(2,4)6.1 MAbの結合部位が191P4D12の1~147aaドメインに位置するが、191P4D12に結合する全てのMAbがこのドメインを認識するとは限らないことを示唆する。

20

【0322】

図10に示した結果をさらに裏付けるために、ウエスタンブロット分析を行った。簡単に述べると、191P4D12の細胞外部分全体(完全長)ならびに表VIに示した特定のドメインをマウスFc融合タンパク質として293T細胞において発現させ、精製した。ヤギ抗マウス-HRPをコントロールとして使用した。図11に示したように、SDS-PAGE(非還元)によって分離し、Ha22-2(2,4)6.1-ビオチンの後にストレプトアビジン-HRPでプローブした時に、完全長191P4D12(レーン1)、V(レーン2)、およびVC1(レーン3)融合構築物に対応するバンドは認められたが、C1C2融合構築物(レーン4)に対応するバンドは認められなかった。このことは、Ha22-2(2,4)6.1 MAbの結合エピトープが191P4D12の1-147aaドメイン内に位置することをさらに示唆する。

30

【0323】

実施例6

Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEにより媒介される細胞傷害性

ヒト191P4D12、カニクイザル191P4D12、およびラット191P4D12を発現するように操作されたPC3細胞において、Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEが191P4D12依存性細胞傷害性を媒介する能力を評価した。簡単に述べると、1日目に、PC3-Neo、PC3-ヒト-191P4D12細胞、PC3-カニクイザル-191P4D12細胞、またはPC3-ラット-191P4D12細胞(1500個の細胞/ウェル)を96ウェルプレートに播種した。翌日、示された濃度のHa22-2(2,4)6.1vcMMAEまたはvcMMAEと結合体化したコントロールMAb(すなわち、コントロール-vcMMAE)を含有する等量の培地を各ウェルに添加した。細胞を37℃で4日間インキュベートした。インキュベーション期間の終わりに、Alamar Blueを各ウェルに添加し、インキュベーションをさらに4時間続けた。励起波長620nmおよび発光波長540nmでBiotekプレートリーダーを用いて、結果として生じた蛍光を検出した。

40

【0324】

図9A~9Dの結果から、Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEは、PC3-ヒト-191P4D12(図9A)、PC3-カニクイザル-191P4D12(図9B)、およびPC3-ラット-191P4D12細胞(図9C)において細胞傷害性を媒介したのに対して、vcMMAEと結合体化したコントロールヒトIgGは全く効果がなかった

50

ことが分かる。Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEの特異性は、191P4D12を発現しないPC3-Neo細胞に対する毒性の欠如によってさらに証明された(図9D)。従って、これらの結果から、Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEは細胞傷害薬物を191P4D12発現細胞に選択的に送達して、191P4D12発現細胞を死滅できることが分かる。

【0325】

実施例7

Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEはインビボで腫瘍成長を阻害する

腫瘍組織細胞表面上でのかなりの191P4D12発現と正常組織における限定的な191P4D12発現のために191P4D12は抗体療法の優れた標的であり、同じようにADCを介した療法の優れた標的でもある。従って、ヒト膀胱癌、肺癌、乳癌、および膵臓癌異種移植片マウスモデルにおけるHa22-2(2,4)6.1vcMMAEの治療効力を評価する。

10

【0326】

腫瘍成長および転移形成に対する抗体薬物結合体の効力をマウス癌異種移植片モデル(例えば、皮下および同所)において研究する。

【0327】

Matrigel(Collaborative Research)で1:1希釈して混合した $5 \times 10^4 \sim 10^6$ 個の癌細胞を雄SCIDマウスの右側腹部に注射することによって、皮下(s.c.)腫瘍を作製する。腫瘍形成に対するADC効力を試験するために、腫瘍細胞注射と同日にADC注射を開始する。コントロールとして、マウスに精製ヒトIgGもしくはPBSまたはヒト細胞において発現していない無関係の抗原を認識する精製MAbを注射する。予備研究では、腫瘍成長に対するコントロールIgGまたはPBS間で差違は認められなかった。カリパス測定を用いて腫瘍サイズを測定する。腫瘍体積を幅²×長さ/2として計算する。幅は最も短い寸法であり、長さは最も長い寸法である。直径が1.5cmより大きな皮下腫瘍を有するマウスを屠殺する。

20

【0328】

卵巢腫瘍は腹腔内に転移し、成長することが多い。従って、雌マウスの腹膜内に200万個の細胞を直接注射することによって、マウスの腹腔内において卵巢腫瘍を成長させる。マウスが瀕死になるまで、マウスの身体全体の健康、身体活動、および外見をモニタリングする。屠殺時に、腫瘍量を確かめるために腹腔を検査し、離れた場所への転移を評価するために肺を収集してもよい。または、エンドポイントとして死亡を使用してもよい。次いで、適切な治療のためにマウスを群に分け、191P4D12またはコントロールMAbをi.p.注射する。

30

【0329】

異種移植片癌モデルの利点は血管新生および血管形成を研究できることである。腫瘍成長は新血管の発達にある程度依存する。毛細血管系および発達している血液ネットワークは宿主に由来するが、新脈管構造の開始および構築は異種移植片腫瘍によって調節される(Davidoff et al., Clin Cancer Res.(2001)7:2870; Solesvik et al., Eur J Cancer Clin Oncol.(1984)20:1295)。腫瘍組織およびその周囲微小環境のIHC分析などの当技術分野において公知の手順に従って、血管新生に対する抗体および低分子の効果を研究する。

【0330】

Ha22-2(2,4)6.1 ADCは、肺癌異種移植片、膀胱癌異種移植片、乳癌異種移植片、および膵臓癌異種移植片の形成を阻害する。これらの結果は、癌、好ましくは、表Iに示した癌の局所期および進行期の治療におけるHa22-2(2,4)6.1 ADCの有用性を示す。

40

【0331】

191P4D12 ADC:

「191P4D12モノクローナル抗体(MAb)の作製」というタイトルの実施例に記載のように、191P4D12に対してモノクローナル抗体を産生した。さらに、「Ha22-2(2,4)6.1 MAbの抗体薬物結合体化」というタイトルの実施例に記載のように、このMAbを毒素と結合体化して、Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEを形成した。Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEが191P4D12に結合する能力を確かめるために、Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEをFACSおよび当技術分野において公知の他の方法によって特徴付けた。

50

【0332】

細胞株および異種移植片:

BT-483およびHPAC細胞は、当技術分野において公知のようにL-グルタミンおよび10%FBSを添加したDMEM中で維持した。AG-B8、AG-Panc4、AG-Panc2、AG-B1、AG-L4、およびAG-Panc3異種移植片はSCIDマウスにおける連続増殖によって維持した。

【0333】

SCIDマウス中のヒト肺癌異種移植片AG-L4の皮下腫瘍形成モデルにおけるHa22-2(2,4)6.1vcMMAE MAbの評価

本実験では、患者由来肺癌異種移植片AG-L4をSCIDマウス中で連続継代することによって維持した。ストック腫瘍を無菌的に収集し、酵素消化して単一細胞懸濁液にした。200万個の細胞をSCIDマウス一匹一匹の側腹部に移植した。次いで、動物を7つの群:6つの191P4D12抗体治療群およびコントロール抗体H3-1.10.1.2群(n=10)に無作為に割り当てた。研究が終了するまで、全ての抗体を週2回、750 μ g/動物で腹腔内投与した。3~4日ごとにカリパス測定を用いて腫瘍成長をモニタリングした。腫瘍体積を幅²x長さ/2として計算した。幅は最も短い寸法であり、長さは最も長い寸法である。

【0334】

結果から、191P4D12 MAbはSCIDマウス中のヒト肺癌異種移植片AG-L4における腫瘍成長を有意に阻害しなかったことが分かる。さらに、他の191P4D12 MAbを本研究において使用した。結果は示していない(図12)。

【0335】

SCIDマウス中のヒト膵臓癌異種移植片HPACの皮下腫瘍形成モデルにおけるHa22-2(2,4)6.1MAbの評価

別の実験では、ヒト膵臓癌HPAC細胞(200万個/マウス)をSCIDマウス一匹一匹の側腹部に注射した。次いで、動物を8つの群:7つの191P4D12抗体治療群およびコントロール抗体H3-1.4.1.2群(n=10)に無作為に割り当てた。研究が終了するまで、全ての抗体を週2回、500 μ g/動物で腹腔内投与した。3~4日ごとにカリパス測定を用いて腫瘍成長をモニタリングした。腫瘍体積を幅²x長さ/2として計算した。幅は最も短い寸法であり、長さは最も長い寸法である。

【0336】

結果から、コントロール抗体と比較して、191P4D12 MAbはSCIDマウス中のヒト膵臓異種移植片における腫瘍成長を阻害しなかったことが分かる。さらに、他の191P4D12 MAbを本研究において使用した。結果は示していない(図13)。

【0337】

SCIDマウス中のヒト膵臓癌異種移植片AG-Panc3の皮下腫瘍形成モデルにおけるHa22-2(2,4)6.1MAbの評価

別の実験では、患者由来膵臓癌異種移植片AG-Panc3をSCIDマウス中で連続継代することによって維持した。ストック腫瘍を無菌的に収集し、1mm³の細片に切り刻んだ。6つの細片をSCIDマウス一匹一匹の側腹部に移植した。次いで、動物を以下のコホート(n=10):2つの191P4D12 MAb治療群およびコントロール抗体H3-1.4.1.2群に無作為に割り当てた。研究が終了するまで、全ての抗体を週2回、500 μ g/動物で腹腔内投与した。3~4日ごとにカリパス測定を用いて腫瘍成長をモニタリングした。腫瘍体積を幅²x長さ/2として計算した。幅は最も短い寸法であり、長さは最も長い寸法である。

【0338】

結果から、コントロール抗体と比較して、191P4D12 MAbはSCIDマウス中のヒト膵臓異種移植片における腫瘍成長を阻害しなかったことが分かる。さらに、他の191P4D12 MAbを本研究において使用した。結果は示していない(図14)。

【0339】

SCIDマウス中の皮下に確立されたヒト肺癌異種移植片AG-L4におけるHa22-2(2,4)6.1-vcMMAEの効力

別の実験では、患者由来肺癌異種移植片AG-L13をSCIDマウス中で連続継代することによ

10

20

30

40

50

って維持した。ストック腫瘍を無菌的に収集し、 1mm^3 の細片に切り刻んだ。6つの細片をSCIDマウス一匹一匹の側腹部に移植した。腫瘍が 200mm^3 のおおよその体積に達するまで、未治療の状態で腫瘍を成長させた。10mg/kgのHa22-2(2,4)6.1vcMMAEおよびコントロールADCを、7日ごとに2回投与するために静脈内大量瞬時投与によって投与した。投与されたADCの量は、投与直前に得られたそれぞれの動物の個々の体重に基づいた。3~4日ごとにカリパス測定を用いて腫瘍成長をモニタリングした。腫瘍体積を幅²x長さ/2として計算した。幅は最も短い寸法であり、長さは最も長い寸法である。

【0340】

結果から、コントロールADCと比較して、Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAEを用いた治療はヌードマウスに皮下移植されたAG-L4肺癌異種移植片の成長を有意に阻害したことが分かる。さらに、他の191P4D12 MAbを本研究において使用した。結果は示していない(図15)。

10

【0341】

SCIDマウス中の皮下に確立されたヒト乳癌異種移植片BT-483におけるHa22-2(2,4)6.1-vcMMAEの効力

本実験では、ヒト乳癌BT-483細胞を用いてストック異種移植片を作製した。ストック異種移植片をSCIDマウス中で連続継代することによって維持した。ストック腫瘍を無菌的に収集し、 1mm^3 の細片に切り刻んだ。6つの細片をSCIDマウス一匹一匹の側腹部に移植した。腫瘍が 100mm^3 のおおよその体積に達するまで、未治療の状態で腫瘍を成長させた。5mg/kgのHa22-2(2,4)6.1vcMMAEおよびコントロールADCを、4日ごとに4回投与するために静脈内大量瞬時投与によって投与した。投与されたADCの量は、投与直前に得られたそれぞれの動物の個々の体重に基づいた。3~4日ごとにカリパス測定を用いて腫瘍成長をモニタリングした。腫瘍体積を幅²x長さ/2として計算した。幅は最も短い寸法であり、長さは最も長い寸法である。

20

【0342】

結果から、コントロールADCと比較して、Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAEを用いた治療は、SCIDマウスに皮下移植されたBT-483乳腺腫瘍異種移植片の成長を有意に阻害したことが分かる。さらに、他の191P4D12 MAbを本研究において使用した。結果は示していない(図16)。

【0343】

SCIDマウス中の皮下に確立されたヒト膀胱癌異種移植片AG-B1におけるHa22-2(2,4)6.1-vcMMAEの効力

30

別の実験では、患者由来膀胱癌異種移植片AG-B1をSCIDマウス中で連続継代することによって維持した。ストック腫瘍を無菌的に収集し、 1mm^3 の細片に切り刻んだ。6つの細片をSCIDマウス一匹一匹の側腹部に移植した。腫瘍が 230mm^3 のおおよその体積に達するまで、未治療の状態で腫瘍を成長させた。4mg/kgのHa22-2(2,4)6.1vcMMAEおよびコントロールADCを静脈内大量瞬時投与によって1回投与した。投与されたADCの量は、投与直前に得られたそれぞれの動物の個々の体重に基づいた。3~4日ごとにカリパス測定を用いて腫瘍成長をモニタリングした。腫瘍体積を幅²x長さ/2として計算した。幅は最も短い寸法であり、長さは最も長い寸法である。

【0344】

結果から、コントロールADCと比較して、Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAEを用いた治療はAG-B1膀胱癌異種移植片の成長を有意に阻害したことが分かる。さらに、他の191P4D12MAbを本研究において使用した。結果は示していない(図17)。

40

【0345】

SCIDマウス中の皮下に確立されたヒト膵臓癌異種移植片AG-Panc2にけるHa22-2(2,4)6.1-vcMMAEの効力

別の実験では、患者由来膵臓癌異種移植片AG-Panc2をSCIDマウス中で連続継代することによって維持した。ストック腫瘍を無菌的に収集し、 1mm^3 の細片に切り刻んだ。5つの細片をSCIDマウス一匹一匹の側腹部に移植した。腫瘍が 100mm^3 のおおよその体積に達するまで、未治療の状態で腫瘍を成長させた。5mg/kgのHa22-2(2,4)6.1vcMMAEおよびコントロールADCを、4日ごとに4回投与するために静脈内大量瞬時投与によって投与した。投与され

50

たADCの量は、投与直前に得られたそれぞれの動物の個々の体重に基づいた。3～4日ごとにカリパス測定を用いて腫瘍成長をモニタリングした。腫瘍体積を幅²x長さ/2として計算した。幅は最も短い寸法であり、長さは最も長い寸法である。

【0346】

結果から、コントロールADCと比較して、Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAEを用いた治療はAG-Panc2膵臓癌異種移植片の成長を有意に阻害したことが分かる。さらに、他の191P4D12 MAbを本研究において使用した。結果は示していない(図18)。

【0347】

SCIDマウス中の皮下に確立されたヒト膵臓癌異種移植片AG-Panc4におけるHa22-2(2,4)6.1-vcMMAEの効力

10

別の実験では、患者由来膵臓癌異種移植片AG-Panc4をSCIDマウス中で連続継代することによって維持した。ストック腫瘍を無菌的に収集し、1mm³の細片に切り刻んだ。6つの細片をSCIDマウス一匹一匹の側腹部に移植した。5mg/kgのHa22-2(2,4)6.1vcMMAEおよびコントロールADCを、7日ごとに3回投与するために静脈内大量瞬時投与によって投与した。投与されたADCの量は、投与直前に得られたそれぞれの動物の個々の体重に基づいた。3～4日ごとにカリパス測定を用いて腫瘍成長をモニタリングした。腫瘍体積を幅²x長さ/2として計算した。幅は最も短い寸法であり、長さは最も長い寸法である。

【0348】

結果から、コントロールADCと比較して、Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAEを用いた治療はAG-Panc4膵臓癌異種移植片の成長を有意に阻害したことが分かる。さらに、他の191P4D12 MAbを本研究において使用した。結果は示していない(図19)。

20

【0349】

SCIDマウス中の皮下に確立されたヒト膀胱癌異種移植片AG-B8における比較投与量のHa22-2(2,4)6.1-vcMMAEの効力

本実験では、患者由来膀胱癌異種移植片AG-B8をSCIDマウス中で連続継代することによって維持した。ストック腫瘍を無菌的に収集し、1mm³の細片に切り刻んだ。6つの細片をSCIDマウス一匹一匹の側腹部に移植した。腫瘍が200mm³のおおよその体積に達するまで、未治療の状態に腫瘍を成長させた。次いで、動物を以下の3つのコホート(n=6):2つのHa22-2(2,4)6.1-vcMMAE治療群およびコントロールADC VCD37-5ce5p-vcMMAE群に無作為に割り当てた。Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAEを5mg/kgまたは10mg/kgで投与し、コントロールADCを5mg/kgで与えた。全てのADCを静脈内大量瞬時投与によって1回投与した。投与されたADCの量は、投与直前に得られたそれぞれの動物の個々の体重に基づいた。3～4日ごとにカリパス測定を用いて腫瘍成長をモニタリングした。腫瘍体積を幅²x長さ/2として計算した。幅は最も短い寸法であり、長さは最も長い寸法である。

30

【0350】

結果から、10mg/kg Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEを用いた治療は、5mg/kg Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEと比較してAG-B8膀胱癌異種移植片の成長を阻害したことが分かる(図20)。

【0351】

結論

要約すると、図12～20は、Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEと名付けられた191P4D12 ADCが、191P4D12を発現する腫瘍細胞の増殖をコントロールADCと比較して有意に阻害したことを示している。従って、Ha22-2(2,4)6.1vcMMAEは、表Iに示した癌を治療および管理するために治療目的で使用する事ができる。

40

【0352】

実施例8

191P4D12 ADCを用いてヒトの癌腫を処置および診断するためのヒト臨床試験

191P4D12に特異的に結合する191P4D12 ADCを本発明に従って使用し、特定の腫瘍、好ましくは、表Iに列挙した腫瘍の処置において使用した。これらの指標の各々と関連して、2つの臨床的アプローチを、首尾よく実行する。

【0353】

50

I.) 補助的療法: 補助的療法において、患者を、化学療法剤もしくは抗腫瘍性薬剤および/または放射線療法あるいはそれらの組み合わせと組み合わせた191P4D12 ADCによって処置する。原発癌の標的、例えば、表Iに列举した癌を、191P4D12 ADCを標準的な一次治療および二次治療に加えることによって標準的なプロトコールの下で処置する。プロトコールの設計は、以下の例によって評価されるような有効性を取り扱う。原発性または転移性の病変の腫瘍塊の縮小、無増悪生存期間の延長、全生存、患者の健康の改善、疾患の安定化、ならびに標準的な化学療法および他の生物学的薬剤の常用量を減少させる能力が含まれるが、これに限定されない。これらの投薬量の減少は、化学療法剤または生物学的薬剤の用量関連毒性を減少させることによって、さらなる療法および/または長期の療法を可能にする。191P4D12 ADCは、化学療法剤または抗腫瘍性薬剤と組み合わせて、数種の補助的な臨床試験において利用される。

10

【0354】

II.) 単独療法: 腫瘍の単独療法における191P4D12 ADCの使用に関連して、191P4D12 ADCは、化学療法剤または抗腫瘍性薬剤を伴わずに患者に投与される。一態様において、単独療法を、広範囲の転移疾患を有する末期癌患者において臨床的に行う。プロトコールの設計は、以下の例によって評価されるような有効性を取り扱う。原発性または転移性の病変の腫瘍塊の縮小、無増悪生存期間の延長、全生存、患者の健康の改善、疾患の安定化、ならびに標準的な化学療法および他の生物学的薬剤の常用量を減少させる能力が含まれるが、これに限定されない。

20

【0355】

投薬

投薬レジメンを、最適な所望の応答をもたらすように調整することができる。例えば、単一のボラスを投与してもよく、いくつかの分割用量を、ある期間にわたって投与してもよく、またはその用量は、治療状況の難局により示されるように、比例して減少または増加してもよい。投与の容易さおよび投薬の均一性のために単位剤形で非経口組成物を処方することが特に有利である。本明細書中で使用される場合、単位剤形態とは、処置される哺乳動物対象に対する単一の投薬として適した物理的に分離した単位をいう。所定の量の活性化化合物を含む各単位は、必要とされる薬学的担体と関係して所望の治療効果をもたらすように算出される。本発明の単位剤形の仕様は、(a) その抗体および/またはADCの特有の特徴および達成される特定の治療効果または予防効果、ならびに(b) 個体における処置の感受性に関する、このような活性化化合物を配合する分野に固有の制限によって決められ、それらに直接依存する。

30

【0356】

本発明に従って組み合わせて投与される191P4D12 ADCの治療的有効量についての例示的、非限定的な範囲は、約0.5~約10mg/kg、約1~約5mg/kg、少なくとも1mg/kg、少なくとも2mg/kg、少なくとも3mg/kg、または少なくとも4mg/kgである。他の例示的、非限定的な範囲は、例えば、約0.5~約5mg/kg、または例えば、約0.8~約5mg/kg、または例えば、約1~約7.5mg/kgである。本発明の高用量の態様は、10mg/kgよりも多い投薬量に関する。投薬量の値が緩和されるべき状態の型および重篤度によって変動し得、単一用量または複数用量を含んでもよいことに留意すべきである。任意の特定の対象に関して、特定の投薬レジメンは、個々のニーズ、および組成物を投与するか、組成物の投与を監督する者の専門的な判断に従って、ある期間にわたって調整すべきであること、ならびに本明細書中に示した投薬量の範囲は単なる例示であり、特許請求の範囲の組成物の範囲または実施を限定することを意図しないことがさらに理解されるべきである。

40

【0357】

臨床開発計画(CDP)

CDPは、補助的療法または単独療法に関連した191P4D12 ADCによる処置を追求し、開発する。試験は最初に安全性を証明し、その後、反復投与での効力を確認する。試験は、標準的な化学療法と191P4D12 ADCを加えた標準的な療法とを比較する非盲検である。認識される通り、患者の登録に関して利用することができる1つの非限定的な基準は、生検によ

50

って決定されるような、患者の腫瘍における191P4D12の発現レベルである。

【0358】

任意のタンパク質または抗体の注入に基づく治療と同様に、安全上の問題は、主に以下：(i)サイトカイン放出症候群、すなわち、低血圧、発熱、震え、悪寒；(ii)その物質に対する免疫原性応答の発生(すなわち、その抗体治療に対する患者によるヒト抗体の発生、すなわちHAMA反応)；および(iii)191P4D12を発現する正常細胞に対する毒性に関する。標準的な検査および追跡調査を、これらの安全上の問題の各々をモニタリングするために利用する。191P4D12 ADCは、ヒトへの投与において安全であることが見出された。

【0359】

実施例9

IHCによる癌患者標本における191P4D12タンパク質の検出

免疫組織化学によって、191P4D12タンパク質発現を(i)膀胱癌患者、(ii)乳癌患者、(iii)膵臓癌患者、(iv)肺癌患者、(v)卵巣癌患者、(vi)食道患者、および(vii)頭頸部患者に由来する患者腫瘍標本において試験した。簡単に述べると、ホルマリン固定、パラフィンろう包埋した組織を4ミクロン切片に切断し、ガラススライドの上にのせた。切片を脱ろうし、再水和し、EZ-Retrieverマイクロウェーブ(Biogenex, San Ramon, CA)の中に入れてEDTA抗原賦活化溶液(Biogenex, San Ramon, CA)によって95℃で30分間処理した。次いで、内因性ペルオキシダーゼ活性を不活性化するために、切片を3%過酸化水素溶液によって処理した。無血清タンパク質ブロック(Dako, Carpinteria, CA)を用いて非特異的結合を阻害した後に、モノクローナルマウス抗191P4D12抗体またはアイソタイプコントロールとインキュベートした。その後、Super Enhancer(商標)試薬中でのインキュベーションとその後のポリマー-HRP二次抗体結合体(BioGenex, San Ramon, CA)とのインキュベーションからなるSuper Sensitive(商標)Polymer-horseradish peroxidase(HRP) Detection Systemによって切片を処理した。次いで、切片を、DABキット(BioGenex, San Ramon, CA)を用いて発色させた。核をヘマトキシリンを用いて染色し、明視野顕微鏡観察によって分析した。茶色染色によって示されたように、191P4D12免疫反応性抗体を用いて患者標本において特異的染色が検出された(図21(A)、21(C)、21(E)、21(G)、21(I)、21(K)、および21(M)を参照されたい)。対照的に、コントロール抗体はどちらの患者標本も染色しなかった(図21(B)、21(D)、21(F)、21(H)、21(J)、21(L)、および21(N)を参照されたい)。

【0360】

結果から、191P4D12は患者の膀胱癌組織、乳癌組織、膵臓癌組織、肺癌組織、卵巣癌組織、食道癌組織、および頭頸部癌組織の腫瘍細胞において発現していることが分かる。これらの結果から、191P4D12はヒト癌において発現し、この抗原に対する抗体およびHa22-2(2,4)6.1vcMMAE)と命名された抗体薬物結合体は診断目的および治療目的に有用なことが分かる(図21)。

【0361】

実施例10

Ha22-2(2,4)6.1 MAbの結合エピトープの決定

Ha22-2(2,4)6.1とヒト、カニクイザル、ラット、およびマウスに由来する191P4D12タンパク質との交差反応性を確かめるために、これらのオルソログをPC3細胞株において組換えにより過剰発現させた。Ha22-2(2,4)6.1は191P4D12のカニクイザルオルソログおよびラットオルソログと強く交差反応することが示された(図23)。EC50結合値を表VIIに示した。Ha22-2(2,4)6.1とマウスオルソログとの結合は結合EC50値の有意な低下を示す。このことから、(ヒト配列およびラット配列と比較した)VDメインにおける重要なアミノ酸置換は191P4D12に対するHa22-2(2,4)6.1の親和性に影響を及ぼしたことが分かる。

【0362】

表VIIIは、VDメインを含有する191P4D12オルソログのaa1~180タンパク質配列アラインメントを示す。ラットオルソログ配列にある2つのアミノ酸Thr-75およびSer-90だけが、それぞれ、マウスオルソログ配列においてIleおよびAsnの代わりに置換されている(太字で示した)。ヒト配列にある対応するアミノ酸はAla-76およびSer-91であることに留意

しなければならない。これらのアミノ酸がHa22-2(2,4)6.1の結合エピトープを含むかどうか確かめるために、191P4D12およびそのマウスオルソログのいくつかの変異構築物を作製し、PC3細胞において発現させた(表IX)。標準的なアラニン置換変異誘発の代わりに「マウス」アミノ酸をヒト配列に導入し、逆に「ヒト」アミノ酸をマウス配列に導入した。

【0363】

191P4D12のSer-91がAsnに変異すると、Ha22-2(2,4)6.1結合が著しく損なわれることが示された。このことは、このアミノ酸Ser-91が結合に絶対必要であり、Ha22-2(2,4)6.1 MAbによって認識されるエピトープを含んでいるのに違いないことを裏付けている。位置76にあるAlaのさらなる変異(A76I、S91N二重変異体)も191P4D12に導入した。Ha22-2(2,4)6.1と二重変異体A76I、S91Nとの結合はマウスオルソログ結合に極めて似ていることが示された(図24)。逆に、マウス配列にあるAsn-90がSerに変異すると、Ha22-2(2,4)6.1とマウス変異オルソログとの結合が劇的に改善する。このことは、この位置にあるアミノ酸がHa22-2(2,4)6.1結合に重要なことをさらに裏付けている。Ha22-2(2,4)6.1とマウスオルソログ二重変異体A90S、I75Aとの結合は191P4D12ヒトオルソログと極めて似ているように思われる。

【0364】

まとめると、これらのデータから、Ser-91およびAla-76は、Ha22-2(2,4)6.1と、細胞表面上にある191P4D12タンパク質との結合において重要な役割を果たし、191P4D12表面にある、Ha22-2(2,4)6.1によって認識されるエピトープの一部を構成することが分かる。

【0365】

この考えを視覚化するために、本発明者らは、191P4D12およびIgドメイン含有タンパク質からなるファミリーメンバーの公表された結晶構造データに基づいて191P4D12 Vドメインのコンピュータモデルを、PyMOLを用いて作製した(図25)。Ala-76の位置(点描)およびSer-91の位置(網掛け)を示した。

【0366】

さらに、191P4D12分子上にあるHa22-2(2,4)6.1結合部位をさらに精巧にするために、本発明者らはラット(1)E細胞表面上にあるVドメインに対応する191P4D12フラグメントを設計および発現した。以下の構築物をレトロウイルスベクター内で作製した。

191P4D12(aa1~150, 347~510)

【0367】

Ha22-2(2,4)6.1 MAbの結合をFACSによって評価した。図26に示したように、Ha22-2(2,4)6.1はVドメイン発現細胞(A)ならびに野生型191P4D12(B)に結合するが、以前に作製されたC1C2ドメイン発現細胞(C)に結合しない。このことから、この抗体の結合部位が、最初の150アミノ酸の中にある191P4D12 Vドメインに位置することが分かる。

【0368】

結果から、Ha22-2(2,4)6.1 MAbは、位置aa1~150の191P4D12タンパク質vドメインに結合することが分かり、さらに、Ha22-2(2,4)6.1 MAbの結合にはaaSer-91およびaaAla-76を含む特異的エピトープが重要であることが分かる。

【0369】

本願全体を通して、種々のウェブサイトのデータコンテンツ、刊行物、特許出願および特許が参照される(ウェブサイトは、ワールドワイドウェブ上のアドレスである、ユニフォームリソースロケータ(Uniform Resource Locator)、すなわち、URLによって参照される)。これらの参照の各々の開示は、本明細書によってその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0370】

本発明は、本明細書中に開示される態様によって範囲が限定されるべきではなく、この態様は、本発明の個々の局面の単一の例示として意図され、機能的に等価である任意の態様が本発明の範囲内である。本明細書中に記載されるものに加えて、本発明のモデルおよび方法に対する種々の改変は、前述の説明および開示から当業者に明らかとなり、同様に本発明の範囲内に含まれることが意図される。このような改変または他の態様は、本発明

10

20

30

40

50

の真の範囲および精神から逸脱することなく実施することができる。

【0371】

(表 I) 悪性である場合に191P4D12を発現する組織

結腸
 膀胱
 卵巣
 乳房
 肺
 膀胱

【0372】

(表 I I) アミノ酸の略語

一文字	三文字	フルネーム
F	Phe	フェニルアラニン
L	Leu	ロイシン
S	Ser	セリン
Y	Tyr	チロシン
C	Cys	システイン
W	Trp	トリプトファン
P	Pro	プロリン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
R	Arg	アルギニン
I	Ile	イソロイシン
M	Met	メチオニン
T	Thr	スレオニン
N	Asn	アスパラギン
K	Lys	リジン
V	Val	バリン
A	Ala	アラニン
D	Asp	アスパラギン酸
E	Glu	グルタミン酸
G	Gly	グリシン

【0373】

(表 I I I) アミノ酸置換行列

GCG Software 9.0 BLOSUM62アミノ酸置換行列(ブロック置換行列)から編集。値が大きければ大きいほど、関連する天然タンパク質において置換が見つかる可能性は高くなる。

10

20

30

A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	.
4	0	-2	-1	-2	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-2	A
	9	-3	-4	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-2	C
		6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-3	D
			5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-2	E
				6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-1	1	3	F
					6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-3	-2	-3	G
						8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	2	H
							4	-3	2	1	-3	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	I
								5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-2	K
									4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	L
										5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	M
											6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-2	N
												7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-3	P
													5	1	0	-1	-2	-2	-1	Q
														5	-1	-1	-3	-3	-2	R
															4	1	-2	-3	-2	S
																5	0	-2	-2	T
																	4	-3	-1	V
																		11	2	W
																			7	Y

10

【0374】

20

(表 I V) vcMMAEを合成するための一般的方法

式中、AA1=アミノ酸1

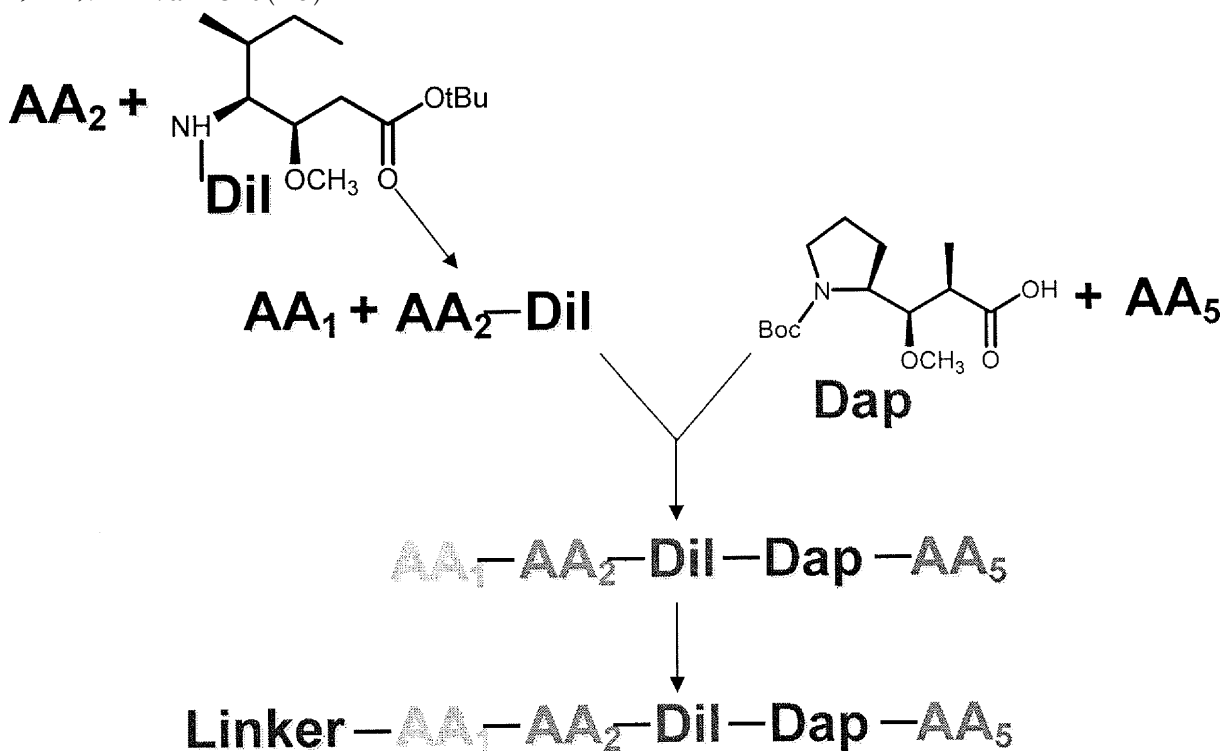
AA2=アミノ酸2

AA5=アミノ酸5

DIL=ドライソロイン

DAP=ドラプロイン

リンカー=Val-Cit(vc)



30

40

【0375】

(表 V) Biacore会合速度および解離速度ならびに結果として生じた親和性の計算

	kon, M-1s-1	koff, s-1	KD, M
Ha22-2(2,4)6.1	3.8E+05	5.8E-03	1.6E-08
Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE	4.5E+05	5.2E-03	1.1E-08

【 0 3 7 6 】

(表 V I) ドメインマッピングアッセイにおいて用いられた191P4D12構築物

構築物	名称
191P4D12 (aa 1-242, 347-510)	VC1, ラット1(E) 発現株
191P4D12 (aa 1-31, 147-510)	C1C2, ラット1(E)
191P4D12 (aa 1-242)	mFc-VC1, 融合タンパク質
191P4D12 (aa 1-31, 147-346)	mFc-C1C2, 融合タンパク質
191P4D12 (aa 1-141)	mFc-V, 融合タンパク質

10

【 0 3 7 7 】

(表 V I I)

	PC3-191P4D12	カニクイザルオルソログ	ラットオルソログ	マウスオルソログ
Bmax (MFI)	816	1146	679	325
EC₅₀ (nM)	0.28	0.30	0.44	70.3

20

【 0 3 7 8 】

(表 V I I I) SEQ ID NO:11~13、出現順

マウス	MPLSLGAEMWGPEAWLR-LLFLASFTGQYSAGELETSADVVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDE	59
ラット	MPLSLGAEMWGPEAWLL-LLFLASFTGRYSAGELETSDLVTVVLGQDAKLPCFYRGDPDE	59
ヒト	MPLSLGAEMWGPEAWLLLLLLLLLASFTGRCPAGELETSADVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGE	60
	***** **;*****: .*****;*****. . *	
マウス	QVGQVAWARVDPNEGIRELALLHSKYGLHVNPAVEDRVEQPPPPRDPLDGSVLLRNAVQA	119
ラット	QVGQVAWARVDPNEGIRELALLHSKYGLHVSPAYEDRVEQPPPPRDPLDGSILLRNAVQA	119
ヒト	QVGQVAWARVDAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQA	120
	***** . ** :*****. ****. *****;*****;*****	
マウス	DEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLPPLPSLNPGPPLEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS	179
ラット	DEGEYECRVSTFPAGSFQARMRLRVLPPLPSLNPGPPLEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS	179
ヒト	DEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLPPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPS	180
	*****;*****. *****	

30

【 0 3 7 9 】

(表 I X)

野生型構築物	変異構築物	二重変異構築物
191P4D12, 野生型	S91N	S91N, A76I
191P4D12, 野生型のマウスオルソログ	N90S	N90S, I75A

40

【图 1-2】

191P4D12のcDNA配列(SEQ ID NO:1)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:2)。開始メチオニンに下線を引いた。オープンリーディングフレームは、停止コドンを含む核酸264~1796まで及んでいる。

[illegible]

【図 2】

A: Ha22-2 (2, 4) 6.1 重鎖のcDNA配列 (SEQ ID NO: 3) および
アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 4)。リーダー配列に二重下線を引き、
重鎖可変領域に下線を引き、ヒトIgG1定常領域に破線で下線を引いた。

[illegible]

B: Ha22-2(2, 4) 6.1 軽鎖のcDNA配列 (SEQ ID NO:5) および
アミノ酸配列 (SEQ ID NO:6)。リーダー配列に二重下線を引き、
軽鎖可変領域に下線を引き、ヒトκ 定常領域に破線で下線を引いた。

[illegible][illegible]

【図 3】

A: Ha22-2 (2,4) 6.1 重鎖のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:7)。
リーダ配列に二重下線を引き、重鎖可変領域に下線を引き、
ヒトIgG1定常領域に破線で下線を引いた。

```

1  MELGLWVWVLALEVGVGTFVIVSSGSLVDPKSGSLRLSCAAAGSTTTS6
51  YNNKNGKAGAFGRKDEWVYVTSGGSGCTYYATVSEGRKTLTSGNMAHSL6
151  QKQLGQRVETVETVAPRVYVINDWQGVVIVVIVVIVVIVVIVVIVVIVV6
251  PKTSGSTAAKGLVQVYVILPNTVWNSGALTSQPHITVAVISGGLV6
301  LQSVYVTSGGSGCTCYVIVNAPKNTVPLSRVSRPKSGRTHITFQCPA6
401  PELLKGLVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVET6
451  VIVVIVVIVVIVVIVVIVVIVVIVVIVVIVVIVVIVVIVVIVVIVVIV6
501  LKTKSPAKGQSTVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETV6
551  ERTVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVET6
601  LKSTVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVETVET6

```

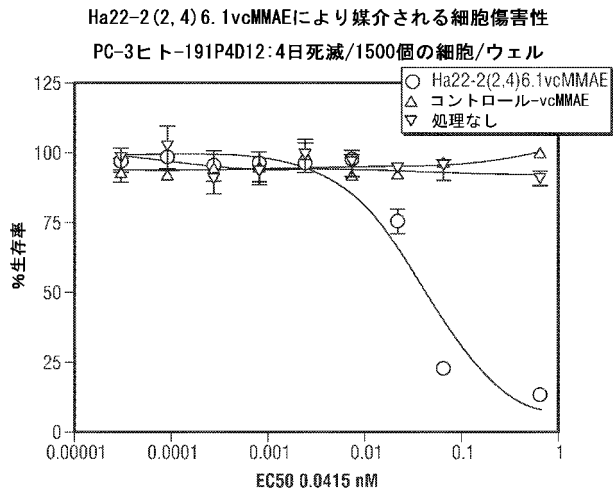
B: Ha22-2(2,4)6.1軽鎖のアミノ酸配列(SEQ ID NO:8)。
リーダ配列に二重下線を引き、軽鎖可変領域に下線を引き、
ヒトK定常領域に破線で下線を引いた。

```

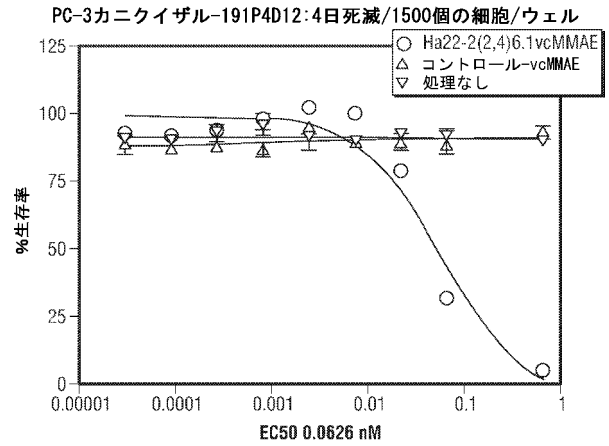
1  MFMVPAQGLILLILMTGGSGCDQMTQSGPSVSASGVRVTTCRASQG
5  LSGSLAWYQPIKAPKPLLYAAFTLSSVSPSPSGSGHTTFTFTLPSL
6  QGQVATYQYQAGNLTPTTGGSTLVKIKLYAAPGVFTPTPTDQWQF
9  TSTVCLLVNTPKAKVSTVNLKQMSQVFTPTDQKQDSVLSQF
10 LSLKADYERKIKYAGCVTHQGLASPTKSTPINGSGL

```

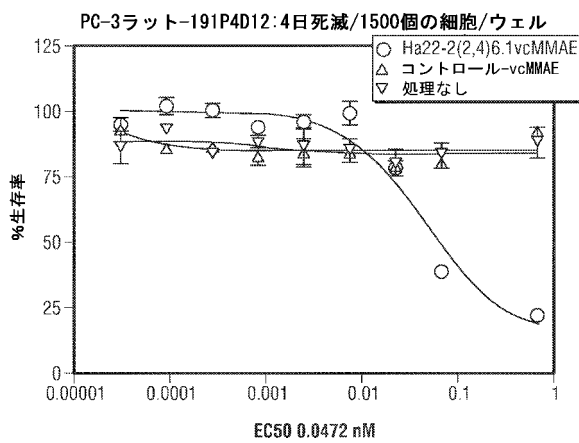

【図 9 A】



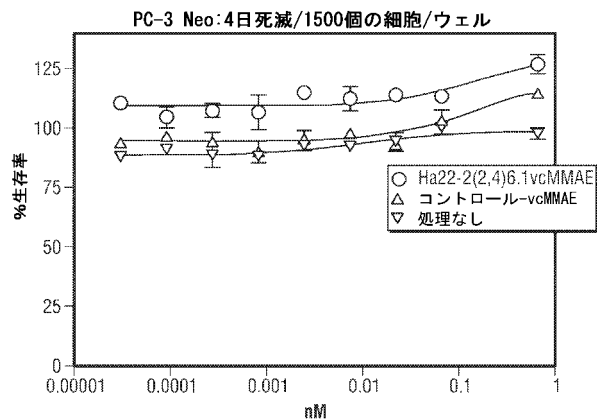
【図 9 B】



【図 9 C】

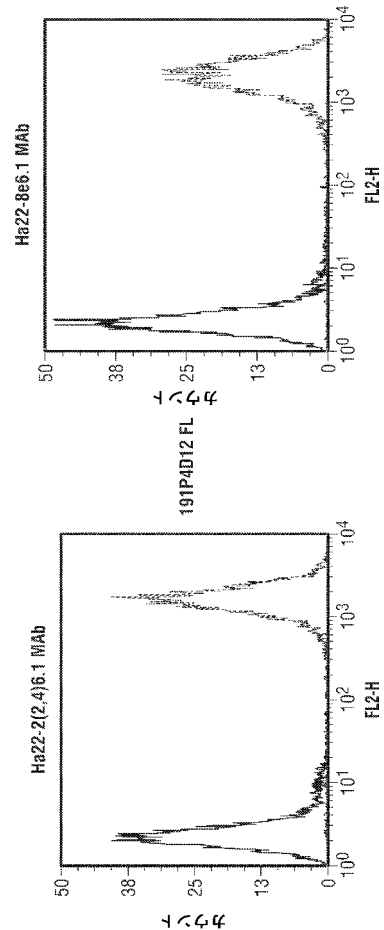


【図 9 D】

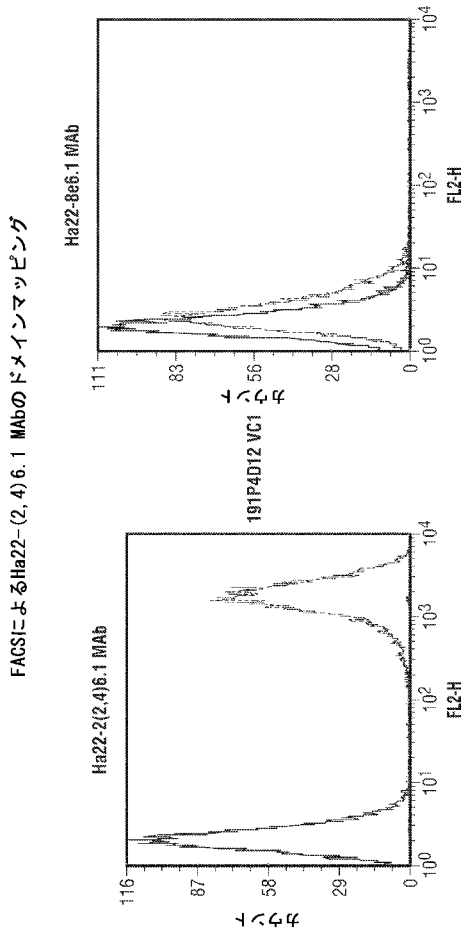


【図 10 - 1】

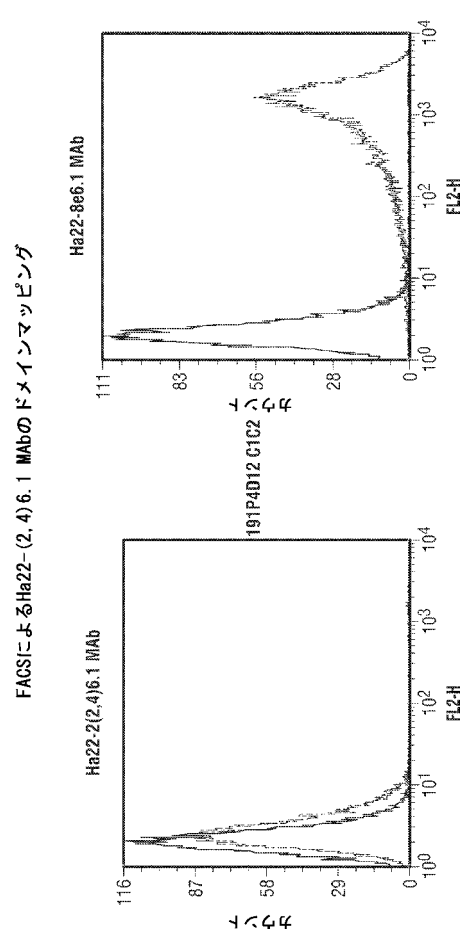
FACSによるHa22-(2,4)6.1 Mabのドメインマッピング



【図 10-2】

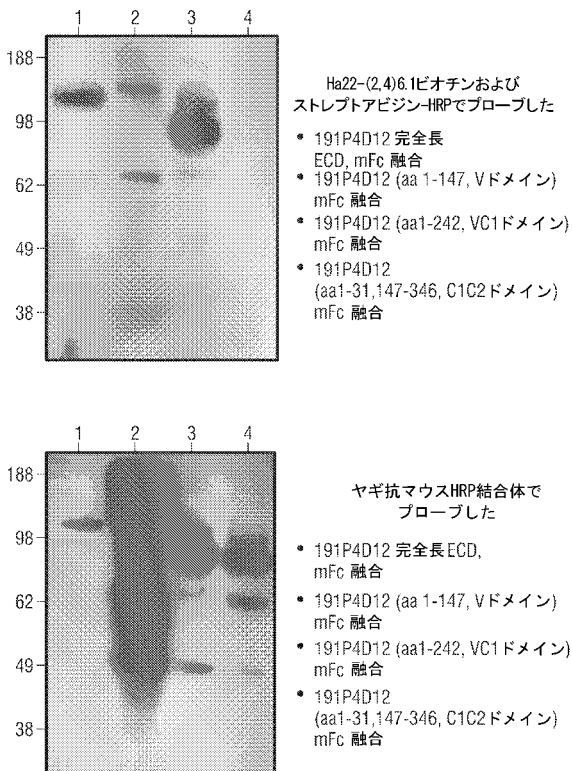


【図 10-3】

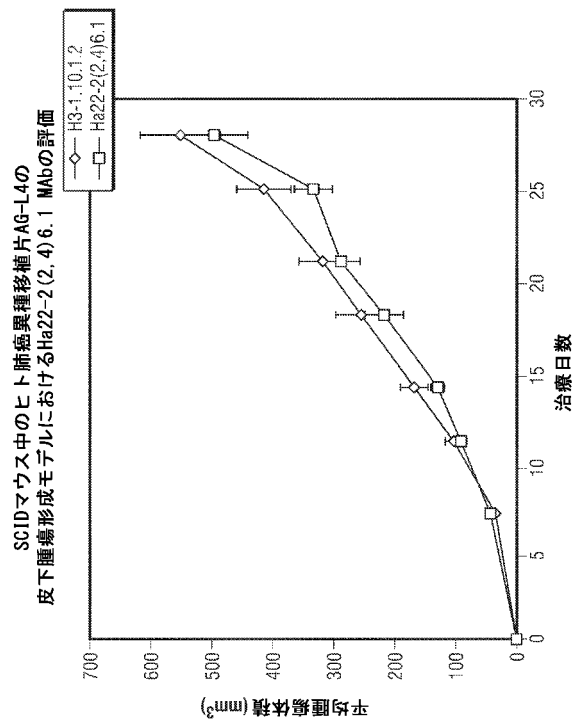


【図 11】

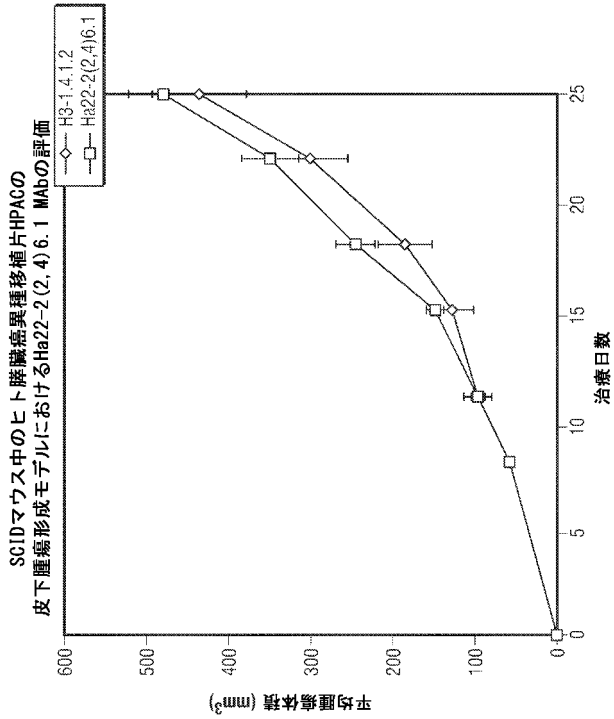
ウェスタンブロット分析による
Ha22-2(2,4)6.1 MAbドメインマッピング



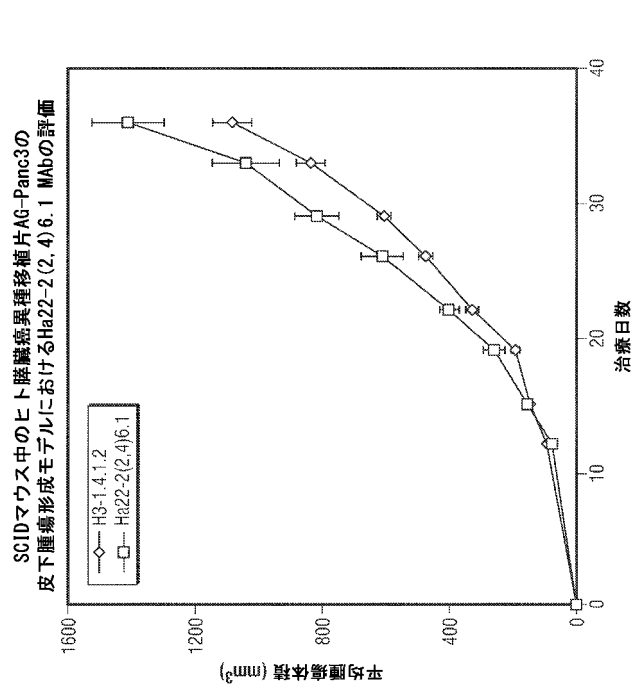
【図 12】



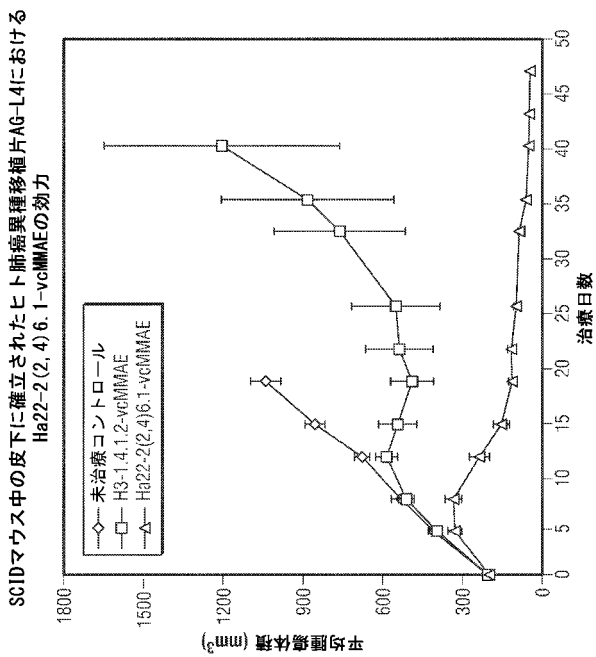
【図 13】



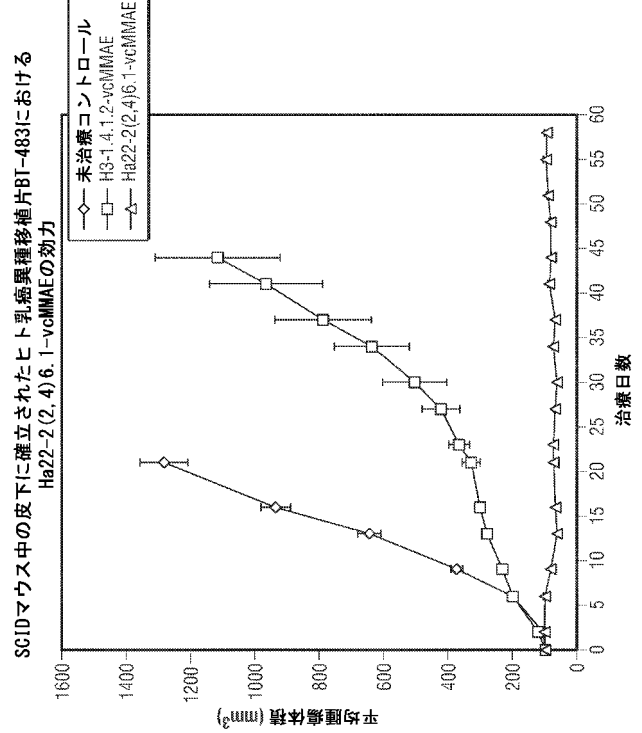
【図 14】



【図 15】

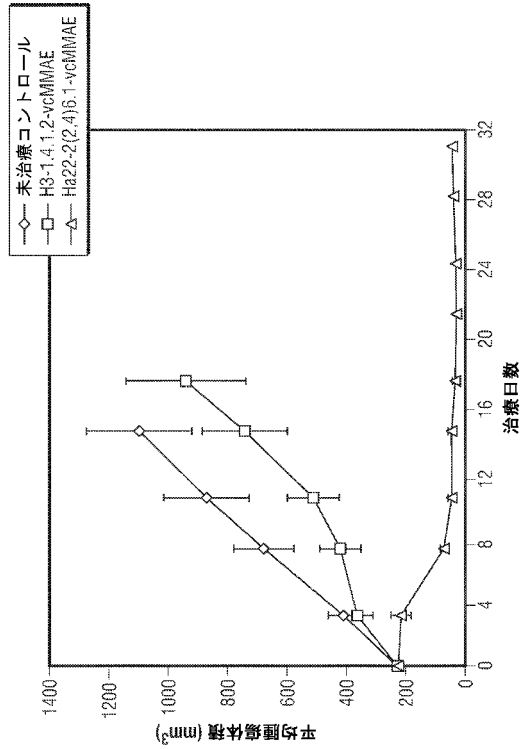


【図 16】



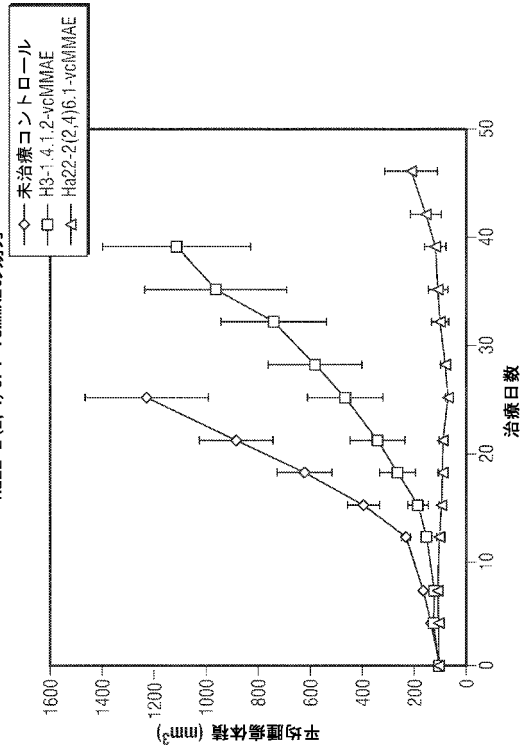
【図 17】

SCIDマウス中の皮下に確立されたヒト膀胱癌異種移植片AG-B1における
Ha22-2(2,4)6,1-vcMMAEの効力



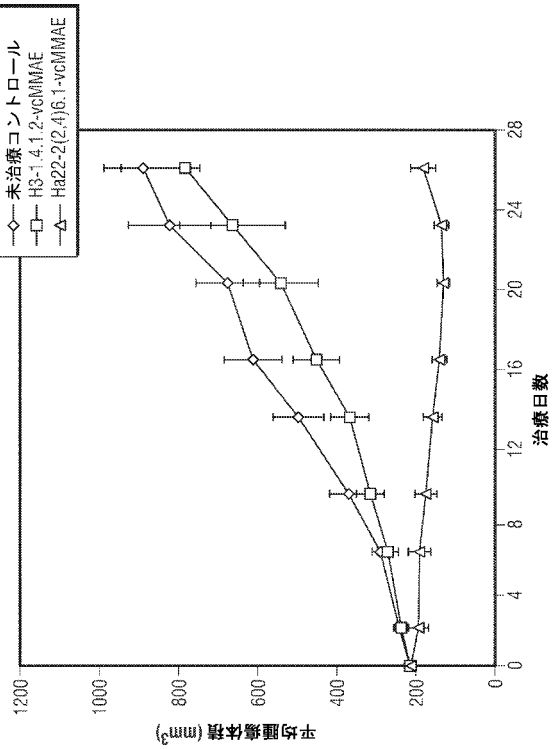
【図 18】

SCIDマウス中の皮下に確立されたヒト膀胱癌異種移植片AG-Panc21における
Ha22-2(2,4)6,1-vcMMAEの効力



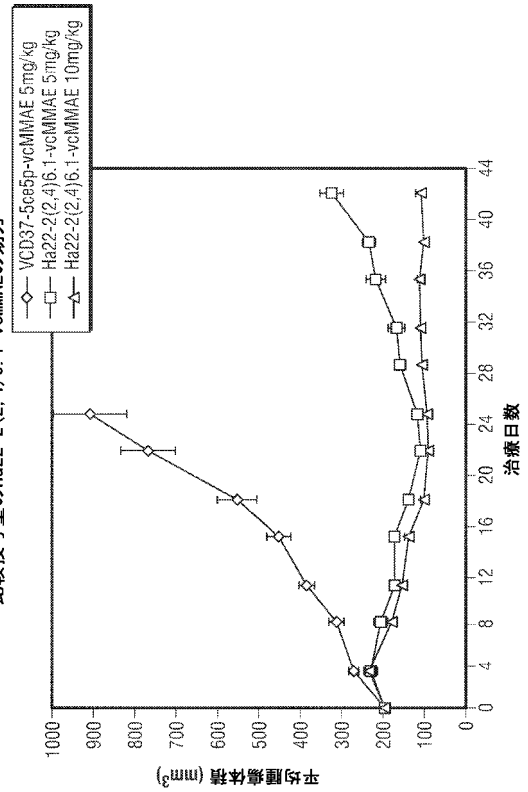
【図 19】

SCIDマウス中の皮下に確立されたヒト膀胱癌異種移植片AG-Panc4における
Ha22-2(2,4)6,1-vcMMAEの効力



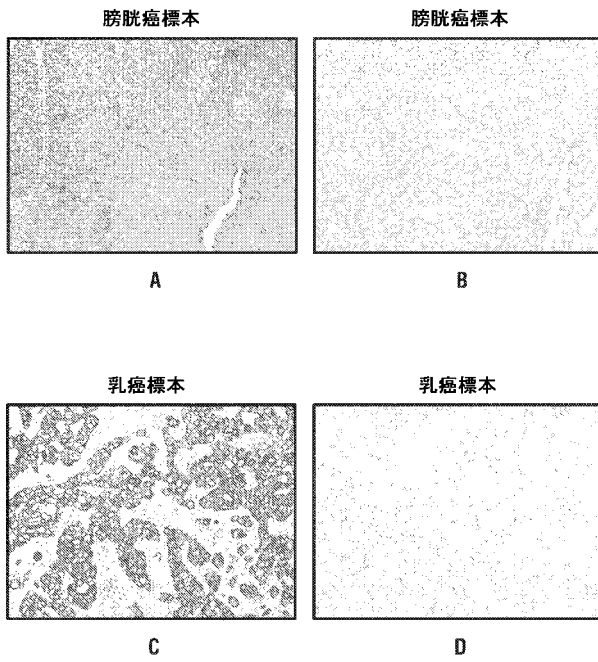
【図 20】

SCIDマウス中の皮下に確立されたヒト膀胱癌異種移植片AG-B81における
比較投与量のHa22-2(2,4)6,1-vcMMAEの効力

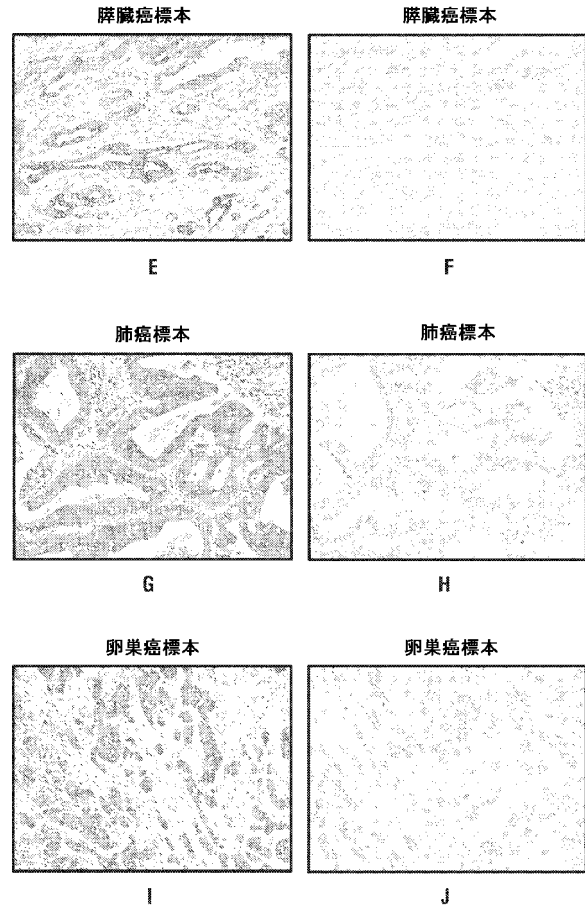


【図 2 1 - 1】

免疫組織化学による癌患者標本中の
191P4D12タンパク質の検出

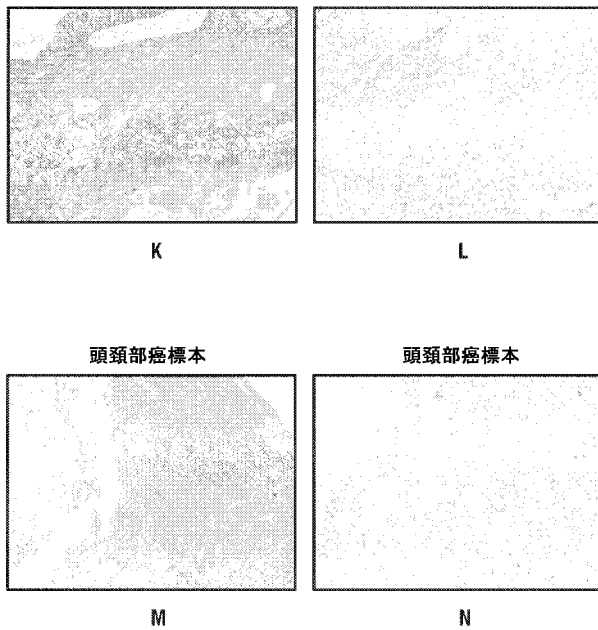


【図 2 1 - 2】

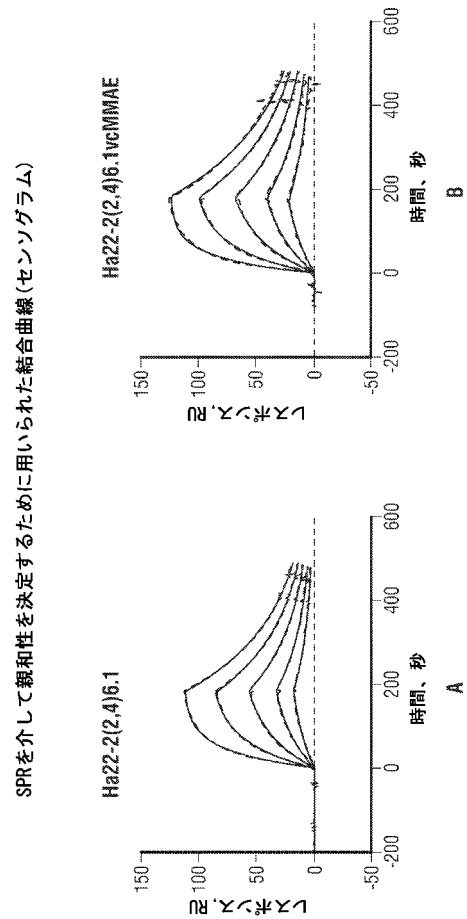


【図 2 1 - 3】

食道癌標本 食道癌標本



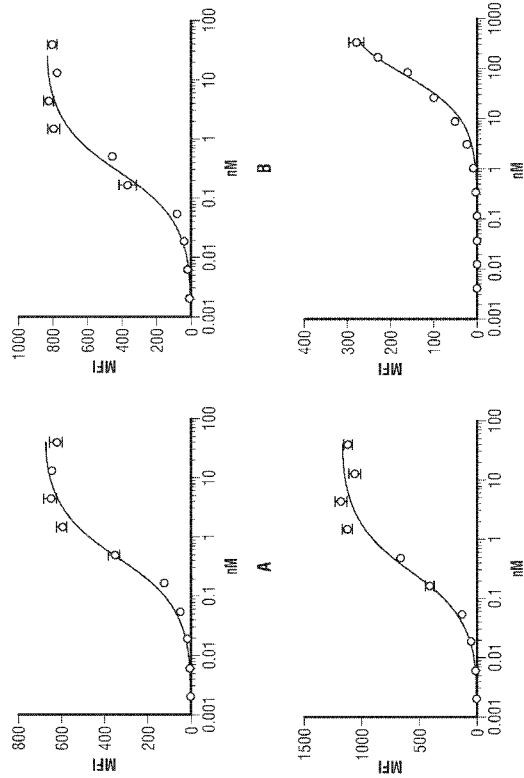
【図 2 2】



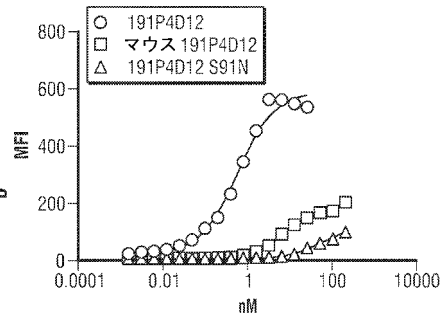
SPRを介して親和性を決定するために用いられた結合曲線(センソグラム)

【図 2 3】

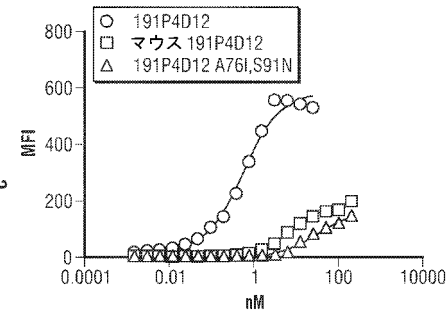
Ha22-2(2,4)6.1は、191P4D12 (A)ならびにカニクイザル(B)、ラット(C)、およびマウス(D)に由来するPC3細胞に結合する。



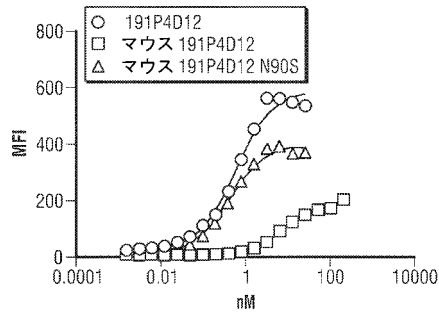
【図 2 4 A】



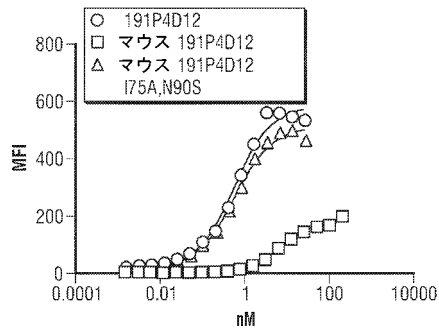
【図 2 4 B】



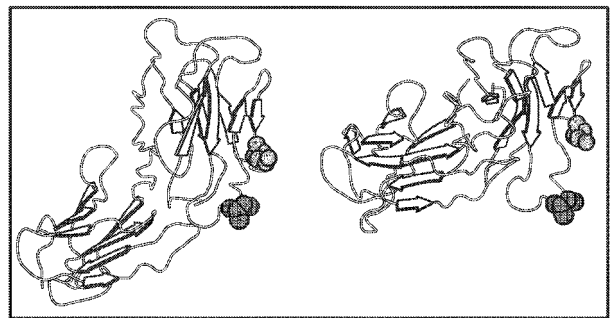
【図 2 4 C】



【図 2 4 D】

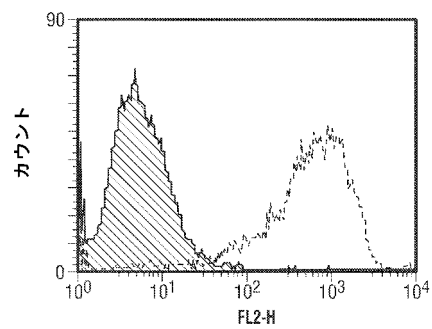


【図 2 5】

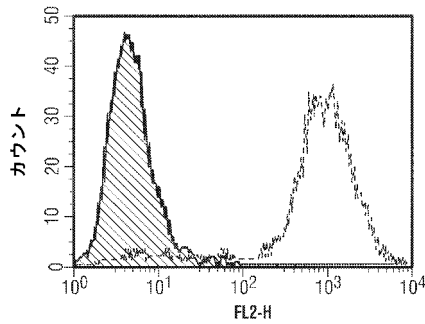


【図 2 6 A】

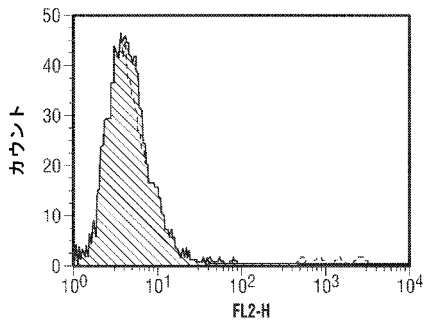
FACSによって評価されたHa22-2(2,4)6.1結合



【図 2 6 B】



【図 2 6 C】



【配列表】

2017110002000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年1月13日(2017.1.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO:7に示された重鎖可変領域相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列を有するCDRを含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:8に示された軽鎖可変領域CDRのアミノ酸配列を有するCDRを含む軽鎖可変領域を含む、191P4D12抗体またはその抗原結合フラグメント。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
			C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(72)発明者 サトパーエフ ダウレット

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタモニカ スチュアート ストリート 1 8 0 0

(72)発明者 モリスン ロバート ケンダル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタモニカ スチュアート ストリート 1 8 0 0

(72)発明者 モリスン カレン ジェーン メイリック

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタモニカ スチュアート ストリート 1 8 0 0

(72)発明者 ガダス ジーン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタモニカ スチュアート ストリート 1 8 0 0

(72)発明者 ヤコボヴィッツ アヤ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタモニカ スチュアート ストリート 1 8 0 0

(72)発明者 トーゴフ マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタモニカ スチュアート ストリート 1 8 0 0

(72)発明者 アン ジリ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタモニカ スチュアート ストリート 1 8 0 0

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA05

4C084 AA19 NA13 ZB26 ZC75

4C085 AA26 BB11 EE01 EE03

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA13 BA40 BA72 CA40 CA50 DA76

DA83 EA28 FA34 FA50 FA72 FA74