

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6886398号
(P6886398)

(45) 発行日 令和3年6月16日 (2021.6.16)

(24) 登録日 令和3年5月18日 (2021.5.18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 Z N A Z

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 54 (全 136 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-513781 (P2017-513781)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月11日 (2015.9.11)
 (65) 公表番号 特表2017-534256 (P2017-534256A)
 (43) 公表日 平成29年11月24日 (2017.11.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/049794
 (87) 国際公開番号 W02016/040868
 (87) 国際公開日 平成28年3月17日 (2016.3.17)
 審査請求日 平成30年9月11日 (2018.9.11)
 (31) 優先権主張番号 62/049,876
 (32) 優先日 平成26年9月12日 (2014.9.12)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
 ス サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 ジェン, ビン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, デ
 ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー
 ジェネンテック, インコーポレイテ
 ド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ANT I - C L L - 1 抗体及び免疫複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C L L - 1 に結合する単離抗 C L L - 1 抗体であって、(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 と、(b) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 と、(c) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 と、(d) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 と、(e) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 と、(f) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 と、を含む、抗体。

【請求項 2】

C L L - 1 に結合する単離抗 C L L - 1 抗体であって、(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 と、(b) 配列番号 9、43、44、45、または 47 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 と、(c) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 と、(d) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 と、(e) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 と、(f) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 と、を含む、抗体。

【請求項 3】

a) 配列番号 33 の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 32 の配列を含む軽鎖可変領域、

b) 配列番号 34 の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 32 の配列を含む軽鎖可変領域、

c) 配列番号 46 の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 32 の配列を含む軽鎖可変

10

20

領域、または

d) 配列番号 48 の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 32 の配列を含む軽鎖可変領域を含む、C L L - 1 に結合する単離抗体。

【請求項 4】

C L L - 1 に結合する単離抗体であって、(a) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 と、(b) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 と、(c) 配列番号 23 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 と、(d) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 と、(e) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 と、(f) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 と、を含む、抗体。

【請求項 5】

(a) 配列番号 38 の配列を含む重鎖可変領域と、(b) 配列番号 37 の配列を含む軽鎖可変領域と、を含む、C L L - 1 に結合する単離抗体。

【請求項 6】

以下の特徴：

- a) 組み換えヒト C L L - 1 に結合する、
- b) 組み換えカニクイザル C L L - 1 に結合する、
- c) ヒト末梢血単核球 (P B M C) の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する、
- d) カニクイザル P B M C の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する、
- e) 癌細胞の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する、
- f) A M L 癌細胞の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する、
- g) H L - 60 細胞の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する、
- h) E O L - 1 細胞の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する、
- i) K 2 4 4 Q 突然変異を含む C L L - 1 に結合する、
- j) 配列番号 49 のアミノ酸を含むエピトープに結合する、
- k) 配列番号 50 及び / もしくは配列番号 51 を含むエピトープには結合しない、
- l) ヒト C L L - 1 結合に関して R & D クローン 6 8 7 3 1 7 抗体と競合する、
- m) 15 nM 未満の K d で内因性ヒト C L L - 1 に結合する、
- n) 10 nM 未満の K d で組み換えヒト C L L - 1 に結合する、および
- o) 10 nM 未満の K d で組み換えカニクイザル C L L - 1 に結合する、のうちの 1 つ

以上を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

抗体の 1 つ以上の残基が遊離システイン残基で置換されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

遊離システインアミノ酸残基で置換されている抗体の 1 つ以上の残基が、軽鎖内に位置する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

遊離システインアミノ酸残基で置換されている抗体の 1 つ以上の残基が、K a b a t 番号付けによる K 1 4 9 C を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

遊離システインアミノ酸残基で置換されている抗体の 1 つ以上の残基が、重鎖内に位置する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 11】

モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 12】

ヒト化抗体である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

C L L - 1 に結合するキメラ抗体または抗体断片である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

I g G 1、I g G 2 a、またはI g G 2 b抗体である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 5】

I g G 1 抗体である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体をコードする、単離核酸。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 1 8】

抗体が産生されるように、請求項 1 7 に記載の宿主細胞を培養すること、および抗体を単離することを含む、抗体の産生方法。

10

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体と、細胞傷害性薬剤と、を含む、免疫複合体。

【請求項 2 0】

式 A b - (L - D) p を有し、式中、

(a) A b が、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体であり、

(b) L が、A b を D にリンクするリンカーであり、

(c) D が、細胞傷害性薬剤であり、

(d) p が、1 ~ 8 の範囲である、免疫複合体。

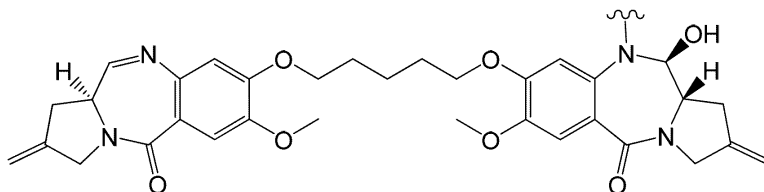
20

【請求項 2 1】

細胞傷害性薬剤が、マイタンシノイド、カリケアミシン、ピロロベンゾジアゼピン、及びネモルピシン誘導体から選択される、請求項 1 9 または 2 0 に記載の免疫複合体。

【請求項 2 2】

D が、構造：



30

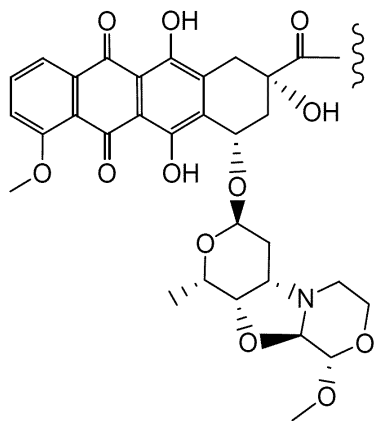
を有する、請求項 2 0 に記載の免疫複合体。

【請求項 2 3】

D が、ネモルピシン誘導体である、請求項 2 0 に記載の免疫複合体。

【請求項 2 4】

D が、構造：



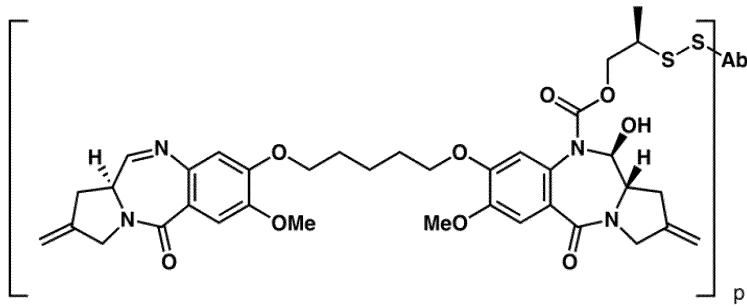
40

を有する、請求項 2 3 に記載の免疫複合体。

【請求項 2 5】

50

構造：



10

を有する、請求項 22 に記載の免疫複合体。

【請求項 26】

p が、2～5 の範囲である、請求項 20～25 のいずれか一項に記載の免疫複合体。

【請求項 27】

p が、1 である、請求項 20～25 のいずれか一項に記載の免疫複合体。

【請求項 28】

p が、2 である、請求項 20～25 のいずれか一項に記載の免疫複合体。

【請求項 29】

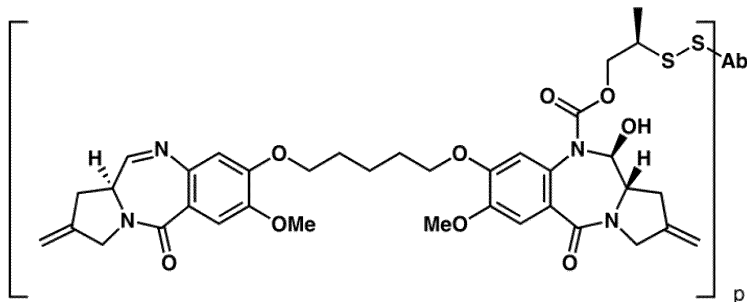
軽鎖中の K a b a t 番号付けによる K 1 4 9 C に位置する A b の残基が、遊離システイン残基で置換され、かつ A b が、I g G 1 抗体である、請求項 20～28 のいずれか一項

20

に記載の免疫複合体。

【請求項 30】

構造：



30

を有する、免疫複合体であって、

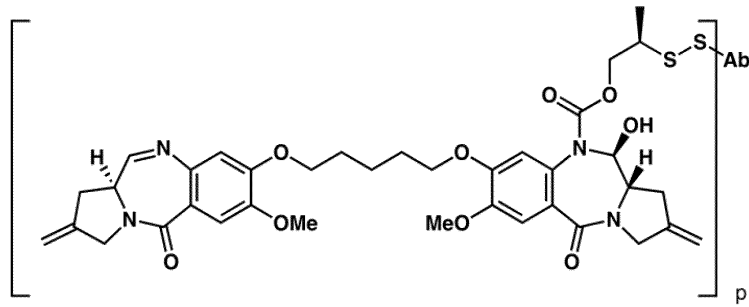
A b が、単離モノクローナル抗 C L L - 1 抗体であり、抗体が、(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 と、(b) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 と、(c) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 と、(d) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 と、(e) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 と、(f) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 と、を含み、抗体が、軽鎖中の K a b a t 番号付けによる K 1 4 9 C に位置する、遊離システイン残基で置換された残基を含み、かつ p が、2 である、

40

免疫複合体。

【請求項 31】

構造：



を有する、免疫複合体であって、

10

A b が、単離モノクローナル抗 C L L - 1 抗体であり、抗体が、(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 と、(b) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 と、(c) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 と、(d) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 と、(e) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 と、(f) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 と、を含み、抗体が、軽鎖中の K a b a t 番号付けによる K 1 4 9 C に位置する、遊離システイン残基で置換された残基を含み、かつ p が、1 である、

免疫複合体。

【請求項 3 2】

ヒト化抗体である、請求項 2 6 または 3 1 に記載の免疫複合体。

20

【請求項 3 3】

I g G 1、I g G 2 a、または I g G 2 b 抗体である、請求項 2 6 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の免疫複合体。

【請求項 3 4】

I g G 1 抗体である、請求項 3 3 に記載の免疫複合体。

【請求項 3 5】

請求項 1 9 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の免疫複合体と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的製剤。

【請求項 3 6】

追加の治療剤をさらに含む、請求項 3 5 に記載の薬学的製剤。

30

【請求項 3 7】

追加の治療剤が、5 - アザシチジンおよびデシタピンから選択される、請求項 3 6 に記載の薬学的製剤。

【請求項 3 8】

追加の治療剤が、5 - アザシチジンである、請求項 3 6 に記載の薬学的製剤。

【請求項 3 9】

追加の治療剤が、デシタピンである、請求項 3 6 に記載の薬学的製剤。

【請求項 4 0】

追加の治療剤が、B C L 2 阻害剤である、請求項 3 6 に記載の薬学的製剤。

【請求項 4 1】

5 - アザシチジンおよび B C L 2 阻害剤をさらに含む、請求項 3 5 に記載の薬学的製剤。

40

【請求項 4 2】

C L L - 1 陽性癌を有する個体の治療に使用するための医薬であって、有効量の、請求項 1 9 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の免疫複合体、または請求項 3 5 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の薬学的製剤を含む、医薬。

【請求項 4 3】

C L L - 1 陽性癌が、A M L である、請求項 4 2 に記載の医薬。

【請求項 4 4】

追加の治療剤が、さらに投与される、請求項 4 2 または請求項 4 3 に記載の医薬。

50

【請求項 45】

インビトロにおける C L L - 1 陽性細胞の増殖の阻害方法であって、細胞を、請求項 19 ~ 34 のいずれか一項に記載の免疫複合体に、細胞の表面上の C L L - 1 への免疫複合体の結合を許容する条件下で曝露し、それによって細胞の増殖を阻害することを含む、方法。

【請求項 46】

細胞が、A M L 癌細胞である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

標識にコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 48】

標識が、陽電子放出体である、請求項 47 に記載の抗体。

【請求項 49】

陽電子放出体が、 ^{89}Zr である、請求項 48 に記載の抗体。

【請求項 50】

インビトロにおける生体試料中のヒト C L L - 1 の検出方法であって、生体試料を、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗 C L L - 1 抗体と、自然発生ヒト C L L - 1 への抗 C L L - 1 抗体の結合を許容する条件下で接触させることと、生体試料中で、抗 C L L - 1 抗体と自然発生ヒト C L L - 1 との間の複合体が形成されるかどうかを検出することと、を含む、方法。

【請求項 51】

生体試料が、A M L 癌試料である、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体を含む、対象において C L L - 1 陽性癌を検出するためのキット。

【請求項 53】

抗体が、陽電子放出体にコンジュゲートされた抗 C L L - 1 抗体を含む、請求項 52 に記載のキット。

【請求項 54】

陽電子放出体が、 ^{89}Zr である、請求項 53 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、2014年9月12日出願の米国特許仮出願第62/049876号の優先権を主張し、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、E F S - W e b を介して提出され、かつその全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。本 A S C I I のコピーは、2015年8月31日に作成され、P 3 2 3 1 4 - W O _ S L _ t x t . t x t という名称であり、42,697バイトの大きさである。

【0003】

本発明は、抗 C L L - 1 抗体及び免疫複合体、ならびにそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0004】

C L L - 1 (C L E C 1 2 A 、 M I C L 、 及び D C A L 2 とともに称される) は、C 型レクチン / C 型レクチン様ドメイン (C T L / C T L D) スーパーファミリーのメンバーをコードする。このファミリーのメンバーは、共通のタンパク質折り畳みを共有し、細胞接着、細胞間シグナル伝達、糖タンパク質ターンオーバー、ならびに炎症及び免疫応答における役割等の多様な機能を有する。C L L - 1 は、単一の C 型レクチン様ドメイン (カルシ

10

20

30

40

50

ウムまたは糖のどちらにも結合しないことが予測される)、茎領域、膜貫通ドメイン、及びITIMモチーフを含有する短細胞質尾部を含む、II型膜貫通受容体に対して示されている。さらに、CLL-1は、正常な末梢血及び骨髓(BM)中の単球及び顆粒球上に存在し、非血液学的組織中には存在しない。CLL-1はまた、急性骨髄性白血病(AML)、骨髄異形成症候群(MDS)、及び慢性骨髄性白血病(CML)細胞上にも発現される。具体的には、CLL-1は、CD34陽性(CD34+)AMLにおいてCD34+CD38-AML細胞の画分上に発現される白血病幹細胞(LSC)関連表面抗原である。

【0005】

モノクローナル抗体(mAb)に基づく療法は、癌の重要な治療モダリティとなっている。白血病は、血液、骨髓、脾臓、及びリンパ節中の悪性細胞の接近可能性、ならびに抗原標的の特定を可能にする造血分化の種々の系列及びステージの十分に定義された免疫表現型のため、このアプローチに非常に適している。急性骨髄性白血病(AML)に関する研究の大部分は、CD33に焦点を置いてきた。しかしながら、コンジュゲートされていない抗CD33mAbリンツズマブによる応答は、少量の単剤及びAMLに対する活性を有し、従来の化学療法と組み合わせた際に場合の2つの無作為治験において患者の予後を改善できなかった。

【0006】

当該技術分野において、癌等のCLL-1関連病態の診断及び治療用の、CLL-1を含むAMLを標的とする安全で有効な薬剤が必要とされている。本発明はその必要性を満たし、また他の便益を提供する。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、抗CLL-1抗体及び免疫複合体、ならびにそれらの使用方法を提供する。

【0008】

本明細書において、単離モノクローナル抗CLL-1抗体であって、配列番号49のアミノ酸を含むエピトープ及び/または重複エピトープに結合し、かつ配列番号50及び/または配列番号51を含むエピトープには結合しない、抗体が提供される。いくつかの実施形態において、本抗CLL-1抗体は、配列番号49のアミノ酸を含むエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、本抗CLL-1抗体は、配列番号49のアミノ酸からなるか、またはそれから本質的になるエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、該エピトープは、ヒドロキシラジカルフットプリント法によって決定される。

【0009】

本明細書において、CLL-1に結合する単離抗体であって、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、(b)配列番号45のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、(d)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、(e)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2と、(f)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3と、を含む、抗体がさらに提供される。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号47のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。

【0010】

いくつかの実施形態において、本抗体は、(a)配列番号33の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号32の配列を含む軽鎖可変領域、(b)配列番号34の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号32の配列を含む軽鎖可変領域、(c)配列番号46の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号32の配列を含む軽鎖可変領域、または(d)配列番号48の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号32の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態において、本抗体は、配列番号 48 の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 32 の配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号 34 の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 32 の配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0011】

本明細書において、C L L - 1 に結合する単離抗体であって、(a) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 と、(b) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 と、(c) 配列番号 23 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 と、(d) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 と、(e) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 と、(f) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 と、を含む、抗体も提供される。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 38 の配列を含む重鎖可変領域と、(b) 配列番号 37 の配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

10

【0012】

本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、組み換えヒト C L L - 1 に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、組み換えカニクイザル C L L - 1 に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、ヒト末梢血単核球 (P B M C) の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、カニクイザル P B M C の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、癌細胞の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、A M L 癌細胞の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、H L - 60 細胞の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、E O L - 1 細胞の表面上の内因性 C L L - 1 に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、K 244Q 突然変異 (K 244Q を有する配列番号 1) を含む C L L - 1 に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号 49 のアミノ酸を含むエピトープ及び/または重複エピトープに結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号 50 及び/または配列番号 51 を含むエピトープには結合しない。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、ヒト C L L - 1 結合に関して R & D システムクローン 687317 抗体と競合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、15 n M 未満、10 n M 未満、7 n M 未満、5 n M 未満、または 3 n M 未満の K d で内因性ヒト C L L - 1 に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、10 n M 未満、7 n M 未満、5 n M 未満、または 3 n M 未満の K d で組み換えヒト C L L - 1 に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、10 n M 未満、7 n M 未満、5 n M 未満、または 3 n M 未満、2 n M 未満、または 1 n M 未満の K d で組み換えカニクイザル C L L - 1 に結合する。

20

30

【0013】

本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、1 つ以上の操作された遊離システインアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、1 つ以上の操作された遊離システインアミノ酸残基は、軽鎖内に位置する。いくつかの実施形態において、軽鎖内の 1 つ以上の操作された遊離システインアミノ酸残基は、K a b a t 付番に従う V 205 C を含む。いくつかの実施形態において、軽鎖内の 1 つ以上の操作された遊離システインアミノ酸残基は、K a b a t 付番に従う K 149 C を含む。いくつかの実施形態において、1 つ以上の操作された遊離システインアミノ酸残基は、重鎖内に位置する。いくつかの実施形態において、重鎖内の 1 つ以上の操作された遊離システインアミノ酸残基は、E U 付番に従う A 118 C を含む。いくつかの実施形態において、重鎖内の 1 つ以上の操作された遊離システインアミノ酸残基は、E U 付番に従う S 400 C を含む。

40

【0014】

本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、モノクローナル抗体である。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、ヒトまたはキメラ抗体である。

50

本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、C L L - 1 に結合する抗体断片である。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、I g G 1、I g G 2 a、またはI g G 2 b 抗体である。

【 0 0 1 5 】

さらに、本明細書において、本明細書に記載される抗体をコードする単離核酸が提供される。また、本明細書において、本明細書に記載される抗体をコードする核酸を含む宿主細胞が提供される。本明細書において、抗体の産生方法であって、本明細書に記載される抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、該抗体が産生されるように培養することを含む、方法も提供される。

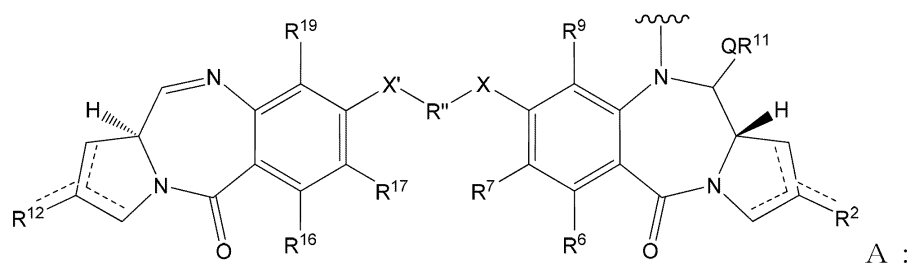
【 0 0 1 6 】

本明細書において、本明細書に記載される抗体と細胞傷害性薬剤とを含む免疫複合体が提供される。具体的には、本明細書において、式 A b - (L - D) p を有する免疫複合体が提供され、式中、

- (a) A b が、本明細書に記載される抗体であり、
- (b) L が、リンカーであり、
- (c) D が、細胞傷害性薬剤であり、前記細胞傷害性薬剤が、薬物であり、
- (d) p が、1 ~ 8 の範囲である。

【 0 0 1 7 】

本免疫複合体のいずれかのいくつかの実施形態では、細胞傷害性薬剤は、マイタンシノイド、カリケアミシン、ピロロベンゾジアゼピン、及びネモルピシン誘導体から選択される。本免疫複合体のいずれかのいくつかの実施形態では、D は、式 A :



のピロロベンゾジアゼピンであり、式中、点線が、C 1 と C 2 または C 2 と C 3 との間の二重結合の任意の存在を示し、

R² が独立して、H、OH、= O、= CH₂、CN、R、OR、= CH - R^D、= C (R^D)₂、O - SO₂ - R、CO₂ R、及び COR から選択され、任意に八口またはジハ口からさらに選択され、R^D が独立して、R、CO₂ R、COR、CHO、CO₂ H、及びハ口から選択され、

R⁶ 及び R⁹ が独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR、NO₂、Me₃Sn、及びハ口から選択され、

R⁷ が独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR、NO₂、Me₃Sn、及びハ口から選択され、

Q が独立して、O、S、及び NH から選択され、

R¹¹ が、H もしくは R のいずれかであるか、または Q が O である場合には SO₃ M であり、式中、M が金属陽イオンであり、

R 及び R がそれぞれ独立して、任意に置換される C₁ ~ 8 アルキル、C₃ ~ 8 ヘテロシクリル、及び C₅ ~ 20 アリール基から選択され、任意に基 NRR との関連で、R 及び R が、それらが結合する窒素原子と一緒に、任意に置換される 4 員、5 員、6 員、または 7 員の複素環式環を形成し、

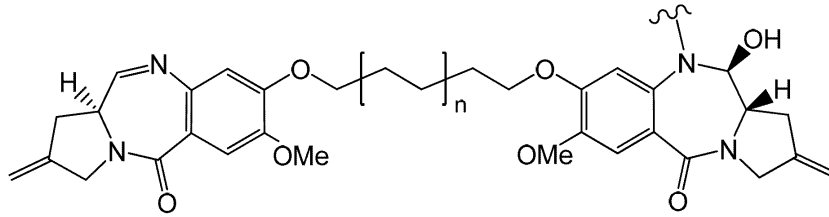
R¹²、R¹⁶、R¹⁹、及び R¹⁷ が、それぞれ R²、R⁶、R⁹、及び R⁷ について定義される通りであり、

R が、C₃ ~ 12 アルキレン基であり、その鎖が、任意に置換される 1 つ以上のヘテロ原子及び / または芳香族環によって分断され得、

X 及び X が独立して、O、S、及びN(H)から選択される。

【0018】

本免疫複合体のいずれかのいくつかの実施形態では、Dは、構造：

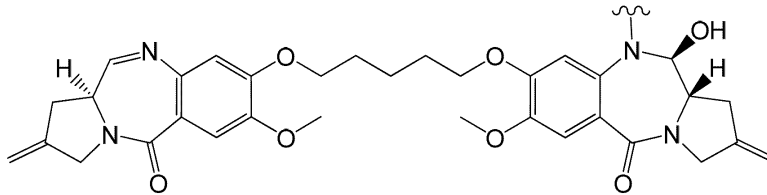


10

を有し、式中、nが、0または1である。

【0019】

本免疫複合体のいずれかのいくつかの実施形態では、Dは、構造：

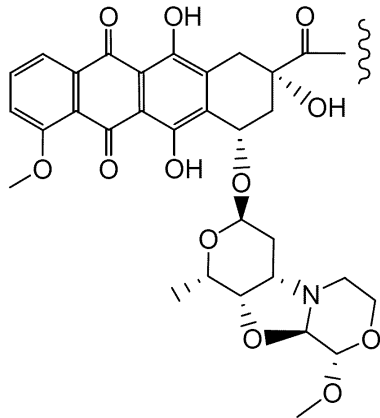


を有する。

20

【0020】

本免疫複合体のいずれかのいくつかの実施形態では、Dは、ネモルピシン誘導体である。
本免疫複合体のいずれかのいくつかの実施形態では、Dは、構造：



30

を有する。

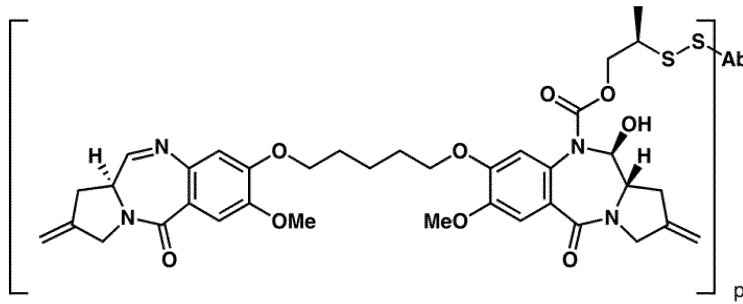
【0021】

本免疫複合体のいずれかのいくつかの実施形態では、Lは、プロテアーゼによって切断可能である。本免疫複合体のいずれかのいくつかの実施形態では、Lは、酸不安定性である。本免疫複合体のいずれかのいくつかの実施形態では、Lは、ヒドラゾンを含む。

40

【0022】

本免疫複合体のいずれかのいくつかの実施形態では、本免疫複合体は、構造：



を有する。

【 0 0 2 3 】

本免疫複合体のいずれかのいくつかの実施形態では、 p は、2 ~ 5 の範囲である。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態において、薬学的製剤が提供される。いくつかの実施形態において、薬学的製剤は、本明細書に記載される免疫複合体と薬学的に許容される担体とを含む。いくつかの実施形態において、本薬学的製剤は、追加の治療剤を含む。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、アントラサイクリンである。いくつかの実施形態において、アントラサイクリンは、ダウノルピシンまたはイダルビシンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、シタラピンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、クラドリピンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、フルダラピンまたはトポテカンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、5 - アザシチジンまたはデシタピンである。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態において、治療方法が提供される。いくつかの実施形態において、CLL - 1 陽性癌の治療方法が提供される。いくつかの実施形態において、治療方法は、有効量の、本明細書に記載される免疫複合体または本明細書に記載される薬学的製剤を個体に投与することを含む。いくつかの実施形態において、癌は、癌である。いくつかの実施形態において、癌は、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、及び/または骨髄異形成症候群 (MDS) である。いくつかの実施形態において、癌は、CLL - 1 陽性である。いくつかの実施形態において、CLL - 1 陽性癌は、AMLである。いくつかの実施形態において、本方法は、追加の治療剤を個体に投与することを含む。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、アントラサイクリンである。いくつかの実施形態において、アントラサイクリンは、ダウノルピシンまたはイダルビシンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、シタラピンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、クラドリピンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、フルダラピンまたはトポテカンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、5 - アザシチジンまたはデシタピンである。

【 0 0 2 6 】

本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、本方法は、対象に、PD - 1 軸結合アンタゴニストまたは追加の治療剤を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態において、PD - 1 軸結合アンタゴニストは、PD - 1 結合アンタゴニストである。いくつかの実施形態において、PD - 1 軸結合アンタゴニストは、PD - L1 結合アンタゴニストである。いくつかの実施形態において、PD - 1 軸結合アンタゴニストは、PD - L2 結合アンタゴニストである。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態において、CLL - 1 陽性細胞の増殖の阻害方法が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、細胞を、本明細書に記載される免疫複合体に、細胞の表面上の CLL - 1 への該免疫複合体の結合を許容する条件下で曝露し、それによって細胞の増殖を阻害することを含む。いくつかの実施形態において、細胞は、AML 癌細胞である。

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態において、生体試料中のヒト C L L - 1 の検出方法が提供される。いくつかの実施形態において、方法は、生体試料を、抗 C L L - 1 抗体と、自然発生ヒト C L L - 1 への抗 C L L - 1 抗体の結合を許容する条件下で接触させることと、生体試料中で、抗 C L L - 1 抗体と自然発生ヒト C L L - 1 との間の複合体が形成されるかどうかを検出することを含む。いくつかの実施形態において、抗 C L L - 1 抗体は、本明細書に記載される抗体である。いくつかの実施形態において、生体試料は、A M L 癌試料である。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態において、C L L - 1 陽性癌の検出のための方法が提供される。いくつかのかかる実施形態において、方法は、(i) 標識された抗 C L L - 1 抗体を、C L L - 1 陽性癌を有するか、またはそれを有することが疑われる対象に投与することと (i i) 該対象において該標識された抗 C L L - 1 抗体を検出することであって、該標識された抗 C L L - 1 抗体の検出が、該対象における C L L - 1 陽性癌を示す、検出することと、を含む。いくつかの実施形態において、抗 C L L - 1 抗体は、本明細書に記載される抗体である。いくつかのかかる実施形態において、標識された抗 C L L - 1 抗体は、陽電子放出体にコンジュゲートされた抗 C L L - 1 抗体を含む。いくつかの実施形態において、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 0 】

【図 1 A】マウス (m) 6 E 7、m 2 1 C 9、m 2 0 B 1、及び m 2 8 H 1 2 の軽鎖可変領域配列 (A) 及び重鎖可変領域配列 (B) のアラインメントを示す。

【図 1 B】マウス (m) 6 E 7、m 2 1 C 9、m 2 0 B 1、及び m 2 8 H 1 2 の軽鎖可変領域配列 (A) 及び重鎖可変領域配列 (B) のアラインメントを示す。

【図 2 A】K 1 H 1、m 6 E 7、ヒト化 (h) 6 E 7、L 4 H 1 e、及び h 6 E 7、L 4 H 1 e、A 5 4 の軽鎖可変領域配列 (A) 及び重鎖可変領域配列 (B) のアラインメントを示す。

【図 2 B】K 1 H 1、m 6 E 7、ヒト化 (h) 6 E 7、L 4 H 1 e、及び h 6 E 7、L 4 H 1 e、A 5 4 の軽鎖可変領域配列 (A) 及び重鎖可変領域配列 (B) のアラインメントを示す。

【図 3 A】K 1 H 1、m 2 1 C 9、及び h 2 1 C 9、L 2 H 3 の軽鎖可変領域配列 (A) 及び重鎖可変領域配列 (B) のアラインメントを示す。

【図 3 B】K 1 H 1、m 2 1 C 9、及び h 2 1 C 9、L 2 H 3 の軽鎖可変領域配列 (A) 及び重鎖可変領域配列 (B) のアラインメントを示す。

【図 4】E O L - 1 異種移植片モデルにおける、 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ での E U 付番 (A 1 1 8 C) に従うアミノ酸残基 1 1 8 においてシステイン操作された重鎖を介して P N U にコンジュゲートされた c h 2 1 C 9、c h 3 H 1 0、c h 2 8 H 1 2、c h 2 0 B 1、及び c h 6 E 7 による治療時の、経時的な腫瘍体積 (mm^3) の変化を示す。

【図 5】H L - 6 0 異種移植片モデルにおける、 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ での E U 付番 (A 1 1 8 C) に従うアミノ酸残基 1 1 8 においてシステイン操作された重鎖を介して P N U にコンジュゲートされた c h 2 1 C 9、c h 3 H 1 0、c h 2 8 H 1 2、c h 2 0 B 1、及び c h 6 E 7 による治療時の、経時的な腫瘍体積 (mm^3) の変化を示す。

【図 6】H L - 6 0 異種移植片モデルにおける、 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ または $20\mu\text{g}/\text{m}^2$ での、P B D (S G 3 4) にコンジュゲートされた E U 付番 (A 1 1 8 C) に従うアミノ酸残基 1 1 8 においてシステイン操作された重鎖または K a b a t 付番 (K 1 4 9 C) に従うアミノ酸残基番号 1 4 9 においてシステイン操作された軽鎖を伴う、ヒト化抗体 6 E 7、L 4 H 1 e または 2 1 C 9、L 2 H 3 による治療時の経時的な腫瘍体積 (mm^3) の変化を示す。

【図 7】H L - 6 0 異種移植片モデルにおける、 $5\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、または $20\mu\text{g}/\text{m}^2$ での、P B D (S G 3 4) にコンジュゲートされた K a b a t 付番 (K 1

10

20

30

40

50

49C)に従うアミノ酸残基番号149においてシステイン操作された軽鎖を伴う、ヒト化抗体6E7・L4H1eまたは6E7・L4H1eN54Aによる治療時の、経時的な腫瘍体積(mm^3)の変化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0031】

I. 定義

本明細書では、「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義される、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変ドメイン(VL)フレームワークまたは重鎖可変ドメイン(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでもよく、またはそれは、アミノ酸配列変化を含有し得る。いくつかの実施形態において、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、または2以下である。いくつかの実施形態において、VLアクセプターヒトフレームワークの配列は、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と同一である。

【0032】

「親和性」は、分子(例えば、抗体)の単一の結合部位とその結合パートナー(例えば、抗原)との間の、非共有性相互作用の合計の強度を指す。別途指定されない限り、本明細書で使用されるとき、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば、抗体及び抗原)間の1:1の相互作用を反映する、本来の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数(K_d)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例証的説明及び例示的な実施形態が、以下に記載される。

【0033】

「親和性成熟」抗体は、変化を有しない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域(HVR)において1つ以上の変化を有し、かかる変化によって抗原に対する抗体の親和性を改善する、抗体を指す。

【0034】

「抗CLL-1抗体」及び「CLL-1に結合する抗体」という用語は、抗体が、CLL-1を標的とする際に診断剤及び/または治療剤として有用であるように、CLL-1に十分な親和性で結合可能である抗体を指す。一実施形態において、無関係の非CLL-1タンパク質に抗CLL-1抗体が結合する程度は、例えば、放射免疫測定法(RIA)によって測定されるときに、CLL-1への抗体の結合の約10%未満である。ある特定の実施形態において、CLL-1に結合する抗体は、1 μM 以下、10nM以下、1nM以下、5nM以下、4nM以下、3nM以下、2nM以下、1nM以下、0.1nM以下、0.01nM以下、または0.001nM以下(例えば、 10^{-8}M 以下、例えば、 $10^{-8}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$)の解離定数(K_d)を有する。ある特定の実施形態において、抗CLL-1抗体は、異なる種由来のCLL-1の間で保存されるCLL-1のエピトープに結合する。

【0035】

「抗体」という用語は、本明細書で最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、及び抗体断片を含むが、これらに限定されない、種々の抗体構造を包含する。

【0036】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部を含み、インタクトな抗体が結合する抗原に結合する、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、二重特異性抗体、線状抗体、単鎖抗体分

10

20

30

40

50

子（例えば、s c F v）、及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【0037】

「癌」及び「癌性」という用語は、細胞成長／増殖の未制御によって典型的に特徴付けられる、哺乳動物における生理的状态を指すか、または説明する。癌の例には、癌腫、リンパ腫（例えば、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれるが、これらに限定されない。かかる癌のより具体的な例には、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群（MDS）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病、急性前骨髄球性白血病（APL）、慢性骨髄増殖性障害、血小板性白血病、前駆体B細胞急性リンパ芽球性白血病（pre-B-ALL）、前駆体T細胞急性リンパ芽球性白血病（pre-T-ALL）、多発性骨髄腫（MM）、肥満細胞疾患、肥満細胞性白血病、肥満細胞肉腫、骨髄性肉腫、リンパ性白血病、及び未分化白血病が含まれる。いくつかの実施形態において、癌は、骨髄性白血病である。いくつかの実施形態において、癌は、急性骨髄性白血病（AML）である。

10

【0038】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／または軽鎖の一部が特定の源または種に由来し、重鎖及び／または軽鎖の残りの部分が異なる源または種に由来する抗体を指す。

【0039】

抗体の「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域の型を指す。5つの主要な抗体クラスIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのうちの数個は、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂にさらに分類され得る。免役グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 κ 、 λ 、 μ 、及び δ と呼ばれる。

20

【0040】

本明細書で使用される「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞機能を阻害するもしくは阻止する、かつ／または細胞死もしくは破壊を引き起こす、物質を指す。細胞傷害性薬剤には、放射性同位体（例えば、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²、及びLuの放射性同位体）、化学療法剤もしくは化学療法薬（例えば、メトトレキサート、アドリマイシン、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン、または他のインターカレート剤）、成長阻害剤、核酸分解酵素等の酵素及びそれらの断片、抗生物質、細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素活性毒素（それらの断片及び／または変異形を含む）等の毒素、ならびに以下に記載される種々の抗腫瘍または抗癌薬剤が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0041】

「エフェクター機能」は、抗体アイソタイプにより異なる抗体のFc領域に起因し得る生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害作用（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用（ADCC）、食作用、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御、ならびにB細胞活性化が挙げられる。

40

【0042】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」は、所望の治療的または予防的結果を達成するために必要である、一定期間にわたって投与する投薬量の有効な量を指す。

【0043】

「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位を指す。いくつかの実施形態において、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位は、ヒドロキシラジカルフットプリント法によって決定される。

【0044】

50

本明細書における「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含有する、免役グロブリン重鎖のC末端領域を定義するように使用される。この用語は、天然配列Fc領域及び変異形Fc領域を含む。一実施形態において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端までに及ぶ。しかしながら、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は、存在する場合もあれば、しない場合もある。本明細書で別途明記されない限り、Fc領域または定常領域におけるアミノ酸残基の付番は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載される、EUインデックスとも呼ばれる、EU付番方式に従う。

10

【0045】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に、4つのFRドメインFR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般に、VH(またはVL)において次の配列、FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4で出現する。

【0046】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書で、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、または本明細書に定義されるFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指すように互換的に使用される。

20

【0047】

「CLL-1のグリコシル化型」という用語は、炭水化物残基の付加によって翻訳後修飾されている、CLL-1の自然発生型を指す。

【0048】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞には、初代形質転換細胞及び継代の数に関わらずそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれる。子孫の核酸含量は親細胞と完全に同一でない場合があるが、突然変異を含有し得る。元々形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する突然変異体子孫が、本明細書に含まれる。

30

【0049】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生された、またはヒト抗体レパートリーを利用する非ヒト源に由来する、抗体のアミノ酸配列、または他のヒト抗体コード配列に対応する、アミノ酸配列を保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に除外する。

【0050】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免役グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免役グロブリンVLまたはVH配列の選択は、可変ドメイン配列の下位集団から行われる。一般に、配列の下位集団は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3にあるような下位集団である。一実施形態において、VLについて、下位集団は、上記のKabatらにあるような下位集団カップIである。一実施形態において、VHについて、下位集団は、上記のKabatらにあるような下位集団IIIである。

40

【0051】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基及びヒトFR由来のアミノ酸残基を含む、キメラ抗体を指す。ある特定の実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも1

50

つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、そのHVR（例えば、CDR）の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、そのFRの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は任意に、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでもよい。抗体、例えば非ヒト抗体の、「ヒト化型」は、ヒト化を経た抗体を指す。

【0052】

本明細書で使用される「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列が高度に変化する、かつ／または構造的に規定されたループ（「超可変ループ」）を形成する、抗体可変ドメインの領域のそれぞれを指す。一般に、天然4本鎖抗体は、6つのHVRを含み、このうち3つがVH（H1、H2、H3）にあり、3つがVL（L1、L2、L3）にある。HVRは一般に、超可変ループに由来するかつ／または「相補性決定領域」（CDR）に由来するアミノ酸残基を含み、後者は、配列可変性が最も高く、及び／または抗原認識に関与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26～32（L1）、50～52（L2）、91～96（L3）、26～32（H1）、53～55（H2）、及び96～101（H3）において生じる（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917（1987））。例示的なCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3）は、アミノ酸残基L1の24～34、L2の50～56、L3の89～97、H1の31～35B、H2の50～65、及びH3の95～102において生じる。（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD（1991））。VHにおけるCDR1を除いて、CDRは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRはまた、抗原に接触する残基である、「特異性決定残基」または「SDR」も含む。SDRは、短縮型（abbreviated）CDR、またはa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含有される。例示的なa-CDR（a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、及びa-CDR-H3）は、アミノ酸残基L1の31～34、L2の50～55、L3の89～96、H1の31～35B、H2の50～58、及びH3の95～102において生じる。（Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619-1633（2008）を参照されたい）。別途指定されない限り、可変ドメインにおけるHVR残基及び他の残基（例えば、FR残基）は、本明細書において上記のKabatらに従って付番される。

【0053】

「免疫複合体」は、細胞傷害性薬剤を含むが、これらに限定されない1個以上の異種性分子（複数可）にコンジュゲートされる抗体である。

【0054】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物には、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト、及びサル等の非ヒト霊長類）、ウサギ、及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、個体または対象は、ヒトである。

【0055】

「単離抗体」は、その天然環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、例えば、電気泳動法（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフ法（例えば、イオン交換または逆相HPLC）によって決定される、95%超または99%超の純度まで精製される。抗体の純度評価のための方法の概説については、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848: 79-87（2007）を参照されたい。

【0056】

「単離核酸」は、その天然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離核酸に

10

20

30

40

50

は、核酸分子を通常含有する細胞内に含有される核酸分子が含まれるが、その核酸分子は、染色体外に、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0057】

「抗CLL-1抗体をコードする単離核酸」は、抗体の重鎖及び軽鎖（またはそれらの断片）をコードする1個以上の核酸分子を指し、それには単一のベクターまたは別個のベクターにおけるかかる核酸分子（複数可）が含まれ、かかる核酸分子（複数可）は、宿主細胞内の1つ以上の場所に存在する。

【0058】

本明細書で使用される「CLL-1」という用語は、細胞内のCLL-1前駆体タンパク質の処理からもたらされる任意の天然の成熟CLL-1を指す。この用語には、別途指定されない限り、霊長類（例えば、ヒト及びカニクイザル）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源由来のCLL-1が含まれる。この用語はまた、CLL-1の自然発生変異形、例えば、スプライス変異形または対立遺伝子変異形を包含する。例示的なヒトCLL-1タンパク質配列のアミノ酸配列は、配列番号1に示される。いくつかの実施形態において、ヒトCLL-1タンパク質配列は、K244Q SNP（配列番号1、式中、K244はQである）を含む。例示的な細胞外ドメインのアミノ酸配列は、配列番号2のアミノ酸である。例示的なC型レクチン様ドメイン（CTLD）のアミノ酸配列は、配列番号3のアミノ酸である。例示的なカニクイザルCLL-1タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号4に示される。

【0059】

「CLL-1陽性癌」という用語は、その表面上でCLL-1を発現する細胞を含む癌を指す。いくつかの実施形態において、細胞表面上のCLL-1の発現は、例えば、免疫組織化学、FACS等の方法においてCLL-1に対する抗体を使用して決定される。代替的に、CLL-1 mRNA発現は、細胞表面上のCLL-1発現と相関すると考えられ、in situハイブリダイゼーション及びRT-PCR（定量的RT-PCRを含む）から選択される方法によって決定され得る。

【0060】

「CLL-1陽性細胞」という用語は、その表面上でCLL-1を発現する細胞を指す。

【0061】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、かつ/または同じエピトープに結合するが、例えば、自然発生突然変異を含有する、またはモノクローナル抗体調製物の産生中に発生する、想定される変異形抗体は例外であり、かかる変異形は一般に少量で存在する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象とする。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組み換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むが、これらに限定されない、多様な技法によって作製されてもよく、モノクローナル抗体を作製するためのかかる方法及び他の例示的な方法が、本明細書に記載される。

【0062】

「裸の抗体」は、異種性部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。裸の抗体は、薬学的製剤中に存在してもよい。

【0063】

「天然抗体」は、様々な構造を有する、自然発生免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2つの同一の軽鎖及び2つの同一の重鎖

10

20

30

40

50

から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端まで、各重鎖は、可変重ドメイン(variable heavy domain)または重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VH)、続いて3つの定常ドメイン(CH1、CH2、及びCH3)を有する。同様に、N末端からC末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメイン(variable light domain)または軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VL)、続いて定常軽(CL)ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()及びラムダ()と呼ばれる2つの型うちの1つに割り付けられ得る。

【0064】

「添付文書」という用語は、かかる治療薬の適応症、使用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌症についての情報、及び/またはその使用に関する警告を含有する、治療剤製品のパッケージに通例含まれる指示書を指すように使用される。

【0065】

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、配列をアライメントし、配列同一性最大パーセントを得るのに必要な場合はギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の部分として考慮せずに、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、当該技術分野における技術の範囲内の種々の方式で、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェア等の、公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、達成することができる。当業者は、比較されている配列の完全長にわたる最大のアライメントを得るために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列をアライメントするために適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書では、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.によって記述され、ソースコードは、ユーザ文書と共に米国著作権庁(U.S. Copyright Office)、Washington D.C., 20559に提出されており、米国著作権番号TXU510087の下に登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に利用可能であるか、またはソースコードから編集されてもよい。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムで使用するために編集すべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変更されない。

【0066】

アミノ酸配列比較のためにALIGN-2が用いられる場合、所与のアミノ酸配列Bに対する、それとの、またはそれと対比した、所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性%(代替的に、所与のアミノ酸配列Bに対する、それとの、またはそれと対比したある特定のアミノ酸配列同一性%を有する、またはそれを含む、所与のアミノ酸配列Aと表現され得る)は、次のように算出される。

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

式中、Xは、配列アライメントプログラムALIGN-2によって、そのプログラムのA及びBのアライメントにおいて完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと等しくない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一性%は、Aに対するBのアミノ酸配列同一性%と等しくはならないことが理解されよう。特に別途定めのない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性%値は、直前の段落に記載されるように、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して得られる。

【0067】

「薬学的製剤」という用語は、調製物の中に含有される活性成分の生物活性が有効になるような形態であり、かつ製剤が投与される対象にとって許容できないほど有毒である追加の構成成分を何ら含有しない調製物を指す。

【 0 0 6 8 】

「薬学的に許容される担体」は、対象にとって無毒である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤、または防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用されるとき、「治療」（及び「治療する」または「治療すること」等のその文法上の変形形態）は、治療されている個体の自然経過を変えることを目的とした臨床介入を指し、予防のために、または臨床病理過程に行うことができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患進行速度の低減、病状の寛解または緩和、及緩和または予後の改善が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本発明の抗体を使用して、疾患の発達を遅らせるか、または疾患の進行を減速させる。

【 0 0 7 0 】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学化合物を指す。化学療法剤の例としては、チオテパ及びシクロスホスファミド（CYTOXAN（登録商標））等のアルキル化剤；ブスルファン、イムブスルファン、及びピボスルファン等のアルキルスルホン酸塩；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、及びウレドーパ等のアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオオホスホルアミド、及びトリメチロメラミンを含む、エチレンイミン及びメチルアメラミン；アセトゲニン（特にプラタシン及びプラタシノン）；デルタ - 9 - テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））； - ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成類似体トポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT - 11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン、及び9 - アミノカンプトテシンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC - 1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、及びビゼレシン合成類似体を含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン類（特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、KW - 2189及びCB1 - TM1を含む）；エレウテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロランブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムピシン、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムスチン等のニトロソウレア；エネジイン抗生物質等の抗生物質（例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシン 1I及びカリケアミシン I1（例えば、Nicolaou et al., Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183 - 186（1994）参照）；CDP323、経口 - 4インテグリン阻害剤；ダイネマイシンAを含むダイネマイシン；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団及び関連色素タンパクエンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン（carabycin）、カルミノマイシン（carminomycin）、カルジノフィリン、クロモマイシン（chromomycin）、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン（ADRIAMYCIN（登録商標））、モルホリノ - ドキシソルピシン、シアノモルホリノ - ドキシソルピシン、2 - ピロリノ - ドキシソルピシン、ドキシソルピシンHClリボソーム注射（DOXIL（登録商標））、リボソームドキシソルピシンTLC D -

10

20

30

40

50

99 (MYOCET (登録商標))、ペグ化リボソームドキソルピシン (CAELYX (登録商標))、及びデオキソドキソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン (marcellomycin)、マイトマイシンC等のマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン (tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；メトトレキサート、ゲムシタビン (GEMZAR (登録商標))、テガフル (UFTORAL (登録商標))、カベシタビン (XELODA (登録商標))、エポチロン (epothilone)、及び5-フルオロウラシル (5-FU)等の代謝拮抗物質；デノプテリン (denopterin)、メトトレキサート、プテロブリン、トリメトトレキサート等の葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカトプリン、チアミプリン、チオグアニン等のプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン等のピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン等のアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン等の抗副腎剤 (anti-adrenal)；フロリン酸 (frolinic acid)等の葉酸補給剤；アセグラトン；アルドホスファミド (aldophosphamide)グリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル (eniluracil)；アムサクリン；ベストラブシル (bestrabucil)；ピサントレン；エダトレキサート (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルチン；ジアジコン (diaziquone)；エルフォルニチン；酢酸エリブチニウム；エポチロン (epothilone)；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン (lonidainine)；マイタイシン及びアンサミトシン等のマイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール (mopidanmol)；ニトラエリン (nitraerine)；ペントスタチン；フェナメト (phenamet)；ピラルピシン；ロソキサントロン (losoxantrone)；2-エチルヒドラジン；プロカルバジン；PSK (登録商標)多糖類複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン；リゾキシシン (rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2'-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン (trichothecene) (特にT-2トキシシン、ベラクリンA (verracurin A)、ロリジンA (roridin A)、及びアングイジン (anguidine))；ウレタン；ピンデシン (ELDISINE (登録商標))、FILDESIN (登録商標)；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド (「Ara-C」)；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル (TAXOL (登録商標))、パクリタキセルのアルブミン操作されたナノ粒子製剤 (ABRAXANETM)、及びドセタキセル (TAXOTERE (登録商標))；クロランブシル (chloranbucil)；6-チオグアニン；メルカトプリン；メトトレキサート；シスプラチン、オキサリプラチン (例えば、ELOXATIN (登録商標))、及びカルボプラチン等の白金剤；ピンブラスチン (VELBAN (登録商標))、ピンクリスチン (ONCOVIN (登録商標))、ピンデシン (ELDISINE (登録商標))、FILDESIN (登録商標)、及びピノレルビン (NAVELBINE (登録商標))を含む、チューブリン重合化の微小管形成を防止するピンカ；エトポシド (VP-16)；イフォスファミド；ミトキサントロン；ロイコボリン；ノバントロン；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン (DMFO)；ベキサロテン (TARGRETIN (登録商標))を含む、レチノイン酸等のレチノイド；クロドロネート (例えば、BONEFOS (登録商標)またはOSTAC (登録商標))、エチドロネート (DIDROCAL (登録商標))、NE-58095、ゾレドロネ酸/ゾレドロネート (ZOMET

10

20

30

40

50

A（登録商標））、アレンドロネート（FOSAMAX（登録商標））、パミドロネート（AREDIA（登録商標））、チルドロネート（SKELED（登録商標））、またはリセドロネート（ACTONEL（登録商標））等のビスホスホネート；トロキサシタビン（1, 3 - ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞の増殖に關与するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、PKC - 、Raf、H - Ras、及び上皮成長因子受容体（EGF - R）等；THERATOPE（登録商標）ワクチン及び遺伝子療法ワクチン等のワクチン、例えば、ALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、及びVAXID（登録商標）ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害剤（例えば、LURTOTECAN（登録商標））；rmRH（例えば、ABARELIX（登録商標））；BAY439006（ソラフェニブ；Bayer）；SU - 11248（スニチニブ、SUTENT（登録商標）、Pfizer）；ペリフォシン、COX - 2阻害剤（例えば、セレコキシブまたはエトリコキシブ）、生体沈殿阻害剤（例えば、PS341）；ボルテゾミブ（VELCADE（登録商標））；CCI - 779；ティピファニブ（R11577）；オラフェニブ（orafenib）、ABT510；オブリメルセンナトリウム（GENA SENSE（登録商標））等のBcl - 2阻害剤；ピキサントロン；EGFR阻害剤（下記の定義を参照）；チロシンキナーゼ阻害剤；ラパマイシン（シロリムス、RAPAMUNE（登録商標））等のセリン - トレオニンキナーゼ阻害剤；ロナファーマニブ（SCH 6636、SARASARTM）等のファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤；及び上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびにシクロホスファミド、ドキソルピシン、ピンクリスチン、及びブレドニゾロンの組み合わせ療法（略語であるCHOP等の、上記の2つ以上の組み合わせ）；ならびに5 - FU及びロイコボリンと組み合わせたオキサリプラチン（ELOXATINTM）による治療レジメンの略語である、FOLFOXが挙げられる。

【0071】

本明細書に定義される化学療法剤は、「抗ホルモン剤」または「内分泌治療薬」が含まれ、これは、癌の成長を促進し得るホルモンの効果を調節、低減、遮断、または阻害するように作用する。それらは、それら自体がホルモンであってもよく、限定されないが、タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標））、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン（toremifene）（FARESTON（登録商標））、イドキシフェン、ドロロキシフェン（droloxifene）、ラロキシフェン（EVISTA（登録商標））、トリオキシフェン、ケオキシフェン、及びSERM3等の選択的エストロゲン受容体調節剤（SERM）を含む、混合アゴニスト/アンタゴニストプロフィールを有する抗エストロゲン剤；フルベストラント（FASLODEX（登録商標））、及びEM800（かかる薬剤は、エストロゲン受容体（ER）の二量体化を遮断する、DNA結合を阻害する、ERターンオーバーを増加させる、かつ/またはERレベルを抑制する場合がある）等のアゴニスト特性を有しない純粋な抗エストロゲン剤；アロマターゼ阻害剤（フォルメスタン及びエキセメスタン（AROMASIN（登録商標））等のステロイドアロマターゼ阻害剤を含む）、ならびにアナストラゾール（anastrozole）（ARIMIDEX（登録商標））、レトロゾール（FEMARA（登録商標））、及びアミノグルテチミド等の非ステロイドアロマターゼ阻害剤が含まれ、また他のアロマターゼ阻害剤には、ボロゾール（RIVISOR（登録商標））、酢酸メゲストロール（MEGASE（登録商標））、ファドロゾール、及び4（5） - イミダゾール；リュープロリド（LUPRON（登録商標））及びELIGARD（登録商標））、ゴセレリン、ブセレリン、ならびにトリプテレリン（tripterelin）を含む、黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト；酢酸メゲストロール及び酢酸メドロキシプロゲステロン等のプロゲステロン、ジエチルスチルベストロール及びプレマリン等のエストロゲン、ならびにフルオキシメステロン、全トランス型レチノイン酸、及びフェンレチニド等のアンドロゲン/レチノイドを含む、性ステロイド；オナプリストン；抗黄体ホルモン；エストロゲン受容体下方調節剤（ERD）；フルタミド、ニルタミド、及びピカルタミド等の抗アンドロゲン；及

び上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびに上記の2つ以上の組み合わせが含まれる。

【0072】

本明細書で使用される、補助療法に関する「免疫抑制剤」という用語は、本明細書で治療されている哺乳動物の免疫系を抑制またはマスクするように作用する物質を指す。これには、サイトカイン産生を抑制する、自己抗原発現を下方調節もしくは抑制する、またはMHC抗原をマスクする物質が含まれるであろう。かかる薬剤の例には、2-アミノ-6-アリール-5-置換ピリミジン（米国特許第4,665,077号参照）；非ステロイド抗炎症薬（NSAID）；ガンシクロビル、タクロリムス、グルココルチコイド、例えば、コルチゾールもしくはアルドステロン等、抗炎症剤、例えば、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、5-リボキシゲナーゼ阻害剤、またはロイコトリエン受容体アンタゴニスト等；アザチオプリンまたはミコフェノール酸モフェチル（MMF）等のプリンアンタゴニスト；シクロホスファミド等のアルキル化剤；プロモクリプチン；ダナゾール；ダブソン；グルタルアルデヒド（これは、米国特許第4,120,649号に記載される通り、MHC抗原をマスクする）；MHC抗原及びMHC断片に関する抗イディオタイプ抗体；シクロスポリンA；コルチコステロイドまたはグルココルチコステロイドまたはグルココルチコイド類似体等のステロイド、例えば、プレドニゾン、SOLU-MEDROL（登録商標）メチルプレドニゾロンナトリウムコハク酸塩を含むメチルプレドニゾン、及びデキサメタゾン；メトトレキサート（経口または皮下）等のジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤；クロロキン及びヒドロキシクロロキン等の抗マラリア剤；スルファサラジン；レフルノミド；抗インターフェロン- α 、 β 、 γ 、または δ 抗体、抗腫瘍壊死因子（TNF）- α 抗体（インフリキシマブ（REMICADE（登録商標））またはアダリムマブ）、抗TNF- β 免疫接着体（エタネルセプト）、抗TNF- γ 抗体、抗インターロイキン-2（IL-2）抗体及び抗IL-2受容体抗体、ならびに抗インターロイキン-6（IL-6）受容体抗体及びアンタゴニスト（ACTEMRA（商標）（トシリズマブ）等）を含む、サイトカインまたはサイトカイン受容体抗体；抗CD11a及び抗CD18抗体を含む抗LFA-1抗体；抗L3T4抗体；異種抗リンパ球グロブリン；pan-T抗体、好ましくは抗CD3または抗CD4/CD4a抗体；LFA-3結合ドメインを含有する可溶性ペプチド（WO90/08187、1990年7月26日公開）；ストレプトキナーゼ；形質転換成長因子- β （TGF- β ）；ストレプトドルナーゼ；宿主由来のRNAまたはDNA；FK506；RS-61443；クロランブシル；デオキシスベルグアリン；ラパマイシン；T細胞受容体（Cohen et al., 米国特許第5,114,721号）；T細胞受容体断片（Offner et al., Science, 251:430-432（1991）；WO90/11294；Ilaneway, Nature, 341:482（1989）；及びWO91/01133）；BAFF抗体及びBR3抗体及び γ TNF4アンタゴニスト等のBAFFアンタゴニスト（概説については、Mackay and Mackay, Trends Immunol., 23:113-5（2002）を参照、また下記の定義も参照されたい）；CD40-CD40リガンドに対するブロッキング抗体を含む、抗CD40受容体または抗CD40リガンド（CD154）等のT細胞ヘルパーシグナルと干渉する生物学的薬剤（例えば、Durie et al., Science, 261:1328-30（1993）；Mohan et al., J. Immunol., 154:1470-80（1995））及びCTLA4-Ig（Finck et al., Science, 265:1225-7（1994））；ならびにT10B9等のT細胞受容体抗体（EP 340,109）が挙げられる。本明細書のいくつかの好ましい免疫抑制剤には、シクロホスファミド、クロランブシル、アザチオプリン、レフルノミド、MMF、またはメトトレキサートが挙げられる。

【0073】

「PD-1軸結合アンタゴニスト」という用語は、PD-1軸結合パートナーの、その結合パートナーのうちの1つ以上との相互作用を阻害して、PD-1シグナル伝達軸上のシグナル伝達から生じるT細胞機能不全を取り除き、T細胞機能（例えば、増殖、サイト

10

20

30

40

50

カイン産生、標的細胞殺傷)を復元または強化するような結果をもたらす分子を指す。本明細書で使用されるとき、PD-1軸結合アンタゴニストには、PD-1結合アンタゴニスト、PD-L1結合アンタゴニスト、及びPD-L2結合アンタゴニストが含まれる。

【0074】

「PD-1結合アンタゴニスト」という用語は、PD-1の、PD-L1、PD-L2等のその結合パートナーのうちの1つ以上との相互作用から生じるシグナル伝達を減少させる、ブロックする、阻害する、無効化する、またはそれに干渉する分子を指す。いくつかの実施形態において、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1の、その結合パートナーのうちの1つ以上への結合を阻害する分子である。具体的な態様において、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1の、PD-L1及び/またはPD-L2への結合を阻害する。例えば、PD-1結合アンタゴニストには、抗PD-1抗体、その抗原結合断片、免疫接着体、融合タンパク質、オリゴペプチド、ならびにPD-1のPD-L1及び/またはPD-L2との相互作用から得られるシグナル伝達を減少させる、ブロックする、阻害する、無効化する、またはそれに干渉する他の分子が挙げられる。一実施形態において、PD-1結合アンタゴニストは、Tリンパ球上に発現される細胞表面タンパク質によって媒介されるか、またはそれを介した負の共刺激シグナルを低減し、PD-1を介するシグナル伝達を媒介して、機能不全T細胞をより機能不全性が低いものにする(例えば、抗原認識に対するエフェクター応答を強化する)。いくつかの実施形態において、PD-1結合アンタゴニストは、抗PD-1抗体である。具体的な態様において、PD-1結合アンタゴニストは、本明細書に記載されるMDX-1106(ニボルマブ)である。別の具体的な態様において、PD-1結合アンタゴニストは、本明細書に記載されるMK-3475(ランプロリズマブ)である。別の具体的な態様において、PD-1結合アンタゴニストは、本明細書に記載されるCT-011(ピディリズマブ)である。別の具体的な態様において、PD-1結合アンタゴニストは、本明細書に記載されるAMP-224である。

【0075】

「PD-L1結合アンタゴニスト」という用語は、PD-L1の、PD-1、B7-1等のその結合パートナーのうちの1つ以上との相互作用から生じるシグナル伝達を減少させる、ブロックする、阻害する、無効化する、またはそれに干渉する分子を指す。いくつかの実施形態において、PD-L1結合アンタゴニストは、PD-L1の、その結合パートナーへの結合を阻害する分子である。具体的な態様において、PD-L1結合アンタゴニストは、PD-L1の、PD-1及び/またはB7-1への結合を阻害する。いくつかの実施形態において、PD-L1結合アンタゴニストには、抗PD-L1抗体、その抗原結合断片、免疫接着体、融合タンパク質、オリゴペプチド、ならびにPD-L1の、PD-1、B7-1等のその結合パートナーのうちの1つ以上との相互作用から生じるシグナル伝達を減少させる、ブロックする、阻害する、無効化する、またはそれに干渉する他の分子が挙げられる。一実施形態において、PD-L1結合アンタゴニストは、Tリンパ球上に発現される細胞表面タンパク質によって媒介されるか、またはそれを介した負の共刺激シグナルを低減し、PD-L1を介するシグナル伝達を媒介して、機能不全T細胞をより機能不全性が低いものにする(例えば、抗原認識に対するエフェクター応答を強化する)。いくつかの実施形態において、PD-L1結合アンタゴニストは、抗PD-L1抗体である。具体的な態様において、抗PD-L1抗体は、本明細書に記載されるYW243.55.S70である。別の具体的な態様において、抗PD-L1抗体は、本明細書に記載されるMDX-1105である。さらに別の具体的な態様において、抗PD-L1抗体は、本明細書に記載されるMPDL3280Aである。さらに別の具体的な態様において、抗PD-L1抗体は、本明細書に記載されるMEDI4736である。

【0076】

「PD-L2結合アンタゴニスト」という用語は、PD-L2の、PD-1等のその結合パートナーのうちの1つ以上との相互作用から生じるシグナル伝達を減少させる、ブロックする、阻害する、無効化する、またはそれに干渉する分子を指す。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態において、PD-L2 結合アンタゴニストは、PD-L2 の、その結合パートナーのうちの1つ以上への結合阻害する分子である。具体的な態様において、PD-L2 結合アンタゴニストは、PD-L2 のPD-1 への結合を阻害する。いくつかの実施形態において、PD-L2 アンタゴニストには、抗PD-L2 抗体、その抗原結合断片、免疫接着体、融合タンパク質、オリゴペプチド、ならびにPD-L2 の、PD-1 等のその結合パートナーのうちの1つ以上との相互作用から生じるシグナル伝達を減少させる、ブロックする、阻害する、無効化する、またはそれに干渉する他の分子が挙げられる。一実施形態において、PD-L2 結合アンタゴニストは、Tリンパ球上に発現される細胞表面タンパク質によって媒介されるか、またはそれを介した負の共刺激シグナルを低減して、機能不全T細胞をより機能不全性が低いものにする（例えば、抗原認識に対するエフェクター応答を強化する）。いくつかの実施形態において、PD-L2 結合アンタゴニストは、免疫接着体である。

10

【0077】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体を抗原に結合することに関与する、抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、VH 及びVL）は一般に、同様の構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）及び3つの超可変領域（HVR）を含む。（例えば、Kindt et al., *Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照されたい。）抗原結合特異性を付与するためには、単一のVH またはVL ドメインで十分であり得る。さらに、抗原に結合する抗体のVH またはVL ドメインを使用して、それぞれ、相補的VL またはVH ドメインのライブラリをスクリーニングして、特定の抗原に結合する抗体を単離してもよい。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150: 880-887 (1993)、Clarkson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991) を参照されたい。

20

【0078】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、連結している別の核酸を増殖することが可能な核酸分子を指す。この用語には、自己複製核酸構造としてのベクター及び導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターが含まれる。ある特定のベクターは、作動的に連結された核酸の発現を導くことが可能である。かかるベクターは、本明細書で「発現ベクター」と称される。

30

【0079】

「アルキル」は、ノルマル、第二級、第三級、または環式炭素原子を含有するC1～C18 炭化水素である。例として、メチル（Me、-CH₃）、エチル（Et、-CH₂CH₃）、1-プロピル（n-Pr、n-プロピル、-CH₂CH₂CH₃）、2-プロピル（i-Pr、i-プロピル、-CH（CH₃）₂）、1-ブチル（n-Bu、n-ブチル、-CH₂CH₂CH₂CH₃）、2-メチル-1-プロピル（i-Bu、i-ブチル、-CH₂CH（CH₃）₂）、2-ブチル（s-Bu、s-ブチル、-CH（CH₃）CH₂CH₃）、2-メチル-2-プロピル（t-Bu、t-ブチル、-C（CH₃）₃）、1-ペンチル（n-ペンチル、-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃）、2-ペンチル（-CH（CH₃）CH₂CH₂CH₃）、3-ペンチル（-CH（CH₂CH₃）₂）、2-メチル-2-ブチル（-C（CH₃）₂CH₂CH₃）、3-メチル-2-ブチル（-CH（CH₃）CH（CH₃）₂）、3-メチル-1-ブチル（-CH₂CH₂CH（CH₃）₂）、2-メチル-1-ブチル（-CH₂CH（CH₃）CH₂CH₃）、1-ヘキシル（-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃）、2-ヘキシル（-CH（CH₃）CH₂CH₂CH₂CH₃）、3-ヘキシル（-CH（CH₂CH₃）（CH₂CH₂CH₃））、2-メチル-2-ペンチル（-C（CH₃）₂CH₂CH₂CH₃）、3-メチル-2-ペンチル（-CH（CH₃）CH（CH₃）CH₂CH₃）、4-メチル-2-ペンチル（-CH（CH₃）CH₂CH（CH₃）₂）、3-メチル-3-ペンチル（-C（CH₃）（CH₂CH₃）₂）、2-メチル-3-ペンチル（-CH（CH₂

40

50

$\text{CH}_3) \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、2, 3 - ジメチル - 2 - ブチル ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2 \text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、3, 3 - ジメチル - 2 - ブチル ($-\text{CH}(\text{CH}_3) \text{C}(\text{CH}_3)_3$) がある。

【0080】

本明細書で使用される「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル」という用語は、1 ~ 8 個の炭素原子を有する直鎖または分岐、飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル」基としては、-メチル、-エチル、-n-プロピル、-n-ブチル、-n-ペンチル、-n-ヘキシル、-n-ヘプチル、-n-オクチル、-n-ノニル、及び-n-デシルが含まれるが、これらに限定されず、分岐 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキルとしては、-イソプロピル、-sec-ブチル、-イソブチル、-tert-ブチル、-イソペンチル、2-メチルブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキルとしては、-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、-2, 3-ジメチル-2-ブテニル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、-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、-3-メチル-1-ブチニルが含まれるが、これらに限定されない。 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル基は、非置換であり得るか、または- $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、-O-($\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル)、-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'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂、及び-CNを含むが、これらに限定されない1つ以上の基で置換され得、式中、各R'は独立して、H、- $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

【0081】

本明細書で使用される「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ アルキル」という用語は、1 ~ 12 個の炭素原子を有する直鎖または分岐、飽和または不飽和炭化水素を指す。 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ アルキル基は、非置換であり得るか、または- $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、-O-($\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル)、-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'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂、及び-CNを含むが、これらに限定されない1つ以上の基で置換され得、式中、各R'は独立して、H、- $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

【0082】

本明細書で使用される「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル」という用語は、1 ~ 6 個の炭素原子を有する直鎖または分岐、飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル」基としては、-メチル、-エチル、-n-プロピル、-n-ブチル、-n-ペンチル、及び-n-ヘキシルが含まれるが、これらに限定されず、分岐 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルとしては、-イソプロピル、-sec-ブチル、-イソブチル、-tert-ブチル、-イソペンチル、及び2-メチルブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルとしては、-ビニル、-アリル、-1-ブテニル、-2-ブテニル、及び-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、-2, 3-ジメチル-2-ブテニル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、及び3-ヘキシルが含まれるが、これらに限定されない。 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル基は、非置換であり得るか、または $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル基について上述されるように、1つ以上の基で置換され得る。

【0083】

本明細書で使用される「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル」という用語は、1 ~ 4 個の炭素原子を有する直鎖または分岐、飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル」基としては、-メチル、-エチル、-n-プロピル、-n-ブチルが含まれるが、これ

らに限定されず、分岐 $C_1 \sim C_4$ アルキルとしては、- イソプロピル、- *sec*-ブチル、- イソブチル、- *tert*-ブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和 $C_1 \sim C_4$ アルキルとしては、- ビニル、- アリル、- 1-ブテニル、- 2-ブテニル、及び- イソブチレニルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_1 \sim C_4$ アルキル基は、非置換であり得るか、または $C_1 \sim C_8$ アルキル基について上述されるように、1つ以上の基で置換され得る。

【0084】

「アルコキシ」は、酸素に単一結合されたアルキル基である。例示的なアルコキシ基としては、メトキシ ($-OCH_3$) 及びエトキシ ($-OCH_2CH_3$) が含まれるが、これらに限定されない。「 $C_1 \sim C_5$ アルコキシ」は、1～5個の炭素原子を有するアルコキシ基である。アルコキシ基は、非置換であり得るか、またはアルキル基について上述されるように、1つ以上の基で置換され得る。

10

【0085】

「アルケニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素-炭素、 sp^2 二重結合を有するノルマル、第二級、第三級、または環式炭素原子を含有する $C_2 \sim C_{18}$ 炭化水素である。例としては、エチレンまたはビニル ($-CH=CH_2$)、アリル ($-CH_2CH=CH_2$)、シクロペンテニル ($-C_5H_7$)、及び5-ヘキセニル ($-CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$) が含まれるが、これらに限定されない。「 $C_2 \sim C_8$ アルケニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素-炭素、 sp^2 二重結合を有する2～8個のノルマル、第二級、第三級、または環式炭素原子を含有する炭化水素である。

20

【0086】

「アルキニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素-炭素、 sp 三重結合を有するノルマル、第二級、第三級、または環式炭素原子を含有する $C_2 \sim C_{18}$ 炭化水素である。例としては、アセチレン ($-C \equiv CH$) 及びプロパルギル ($-CH_2C \equiv CH$) が含まれるが、これらに限定されない。「 $C_2 \sim C_8$ アルキニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち、炭素-炭素、 sp 三重結合を有する2～8個のノルマル、第二級、第三級、または環式炭素原子を含有する炭化水素である。

【0087】

「アルキレン」は、1～18個の炭素原子の飽和、分岐もしくは直鎖、または環式炭化水素ラジカルを指し、親アルカンの同じ、または2個の異なる炭素原子から2個の水素原子を除去することによって得られる2つの一価ラジカル中心を有する。典型的なアルキレンラジカルとしては、メチレン ($-CH_2-$)、1,2-エチル ($-CH_2CH_2-$)、1,3-プロピル ($-CH_2CH_2CH_2-$)、1,4-ブチル ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$) 等が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0088】

「 $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン」は、式 $-(CH_2)_{1 \sim 10}-$ の直鎖飽和炭化水素基である。 $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンの例には、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 (*heptylene*)、オクチレン、ノニレン、及びデカレン (*decylene*) が挙げられる。

40

【0089】

「アルケニレン」は、2～18個の炭素原子の不飽和、分岐もしくは直鎖、または環式炭化水素ラジカルを指し、親アルケンの同じ、または2個の異なる炭素原子から2個の水素原子を除去することによって得られる2つの一価ラジカル中心を有する。典型的なアルケニレンラジカルとしては、1,2-エチレン ($-CH=CH-$) が含まれるが、これに限定されない。

【0090】

「アルキニレン」は、2～18個の炭素原子の不飽和、分岐もしくは直鎖、または環式炭化水素ラジカルを指し、親アルキンの同じ、または2個の異なる炭素原子から2個の水素原子を除去することによって得られる2つの一価ラジカル中心を有する。典型的なアル

50

キニレンラジカルとしては、アセチレン ($-C \equiv C-$)、プロパルギル ($-CH_2C \equiv C-$)、及び 4 - ペンチニル ($-CH_2CH_2CH_2C \equiv C-$) が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 1 】

「アリール」は、炭素環式芳香族基を指す。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、及びアントラセニルが含まれるが、これらに限定されない。炭素環式芳香族基または複素環式芳香族基は、非置換であり得るか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{ アルキル})$ 、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含むが、これらに限定されない 1 つ以上の基で置換され得、式中、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

10

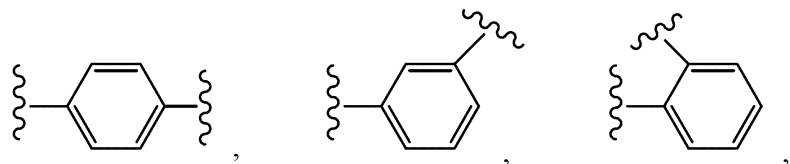
【 0 0 9 2 】

「 $C_5 \sim C_{20}$ アリール」は、炭素環式芳香族環内に 5 ~ 20 個の炭素原子を有するアリール基である。 $C_5 \sim C_{20}$ アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、及びアントラセニルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_5 \sim C_{20}$ アリール基は、アリール基について上述されるように置換され得るか、または非置換であり得る。「 $C_5 \sim C_{14}$ アリール」は、炭素環式芳香族環内に 5 ~ 14 個の炭素原子を有するアリール基である。 $C_5 \sim C_{14}$ アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、及びアントラセニルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_5 \sim C_{14}$ アリール基は、アリール基について上述されるように置換され得るか、または非置換であり得る。

20

【 0 0 9 3 】

「アリーレン」は、2 つの共有結合を有し、以下の構造に示されるように、オルト、メタ、またはパラ構成であり得るアリール基であり、



30

式中、フェニル基は、非置換であり得るか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{ アルキル})$ 、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含むが、これらに限定されない最大 4 個の基で置換され得、式中、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

【 0 0 9 4 】

「アリールアルキル」は、炭素原子に結合された水素原子のうちの 1 個、典型的には末端または sp^3 炭素原子がアリールラジカルで置換される、非環式アルキルラジカルを指す。典型的なアリールアルキル基としては、ベンジル、2 - フェニルエタン - 1 - イル、2 - フェニルエタン - 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 - イル等が含まれるが、これらに限定されない。アリールアルキル基は、6 ~ 20 個の炭素原子を含み、例えば、アリールアルキル基のアルカニル、アルケニル、またはアルキニル基を含むアルキル部分は、1 ~ 6 個の炭素原子であり、アリール部分は、5 ~ 14 個の炭素原子である。

40

【 0 0 9 5 】

「ヘテロアリールアルキル」は、炭素原子に結合された水素原子のうちの 1 個、典型的には末端または sp^3 炭素原子がヘテロアリールラジカルで置換される、非環式アルキル

50

ラジカルを指す。典型的なヘテロアリールアルキル基としては、2 - ベンズイミダゾリルメチル、2 - フリリエチル等が含まれるが、これらに限定されない。ヘテロアリールアルキル基は、6 ~ 20 個の炭素原子を含み、例えば、ヘテロアリールアルキル基のアルカニル、アルケニル、またはアルキニル基を含むアルキル部分は、1 ~ 6 個の炭素原子である、ヘテロアリール部分が、5 ~ 14 個の炭素原子、ならびにN、O、P、及びSから選択される1 ~ 3 個のヘテロ原子である。ヘテロアリールアルキル基のヘテロアリール部分は、3 ~ 7 環員 (2 ~ 6 個の炭素原子) を有する単環、または7 ~ 10 環員 (4 ~ 9 個の炭素原子、ならびにN、O、P、及びSから選択される1 ~ 3 個のヘテロ原子) を有する二環、例えば、ビシクロ [4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、または[6, 6]系であり得る。

10

【0096】

「置換アルキル」、「置換アリール」、及び「置換アリールアルキル」は、それぞれアルキル、アリール、及びアリールアルキルを意味し、1つ以上の水素原子は、それぞれ独立して置換基で置換される。典型的な置換基としては、-X、-R、-O⁻、-OR、-SR、-S⁻、-NR₂、-NR₃、=NR、-CX₃、-CN、-OCN、-SCN、-N=C=O、-NCS、-NO、-NO₂、=N₂、-N₃、NC(=O)R、-C(=O)R、-C(=O)NR₂、-SO₃⁻、-SO₃H、-S(=O)₂R、-OS(=O)₂OR、-S(=O)₂NR、-S(=O)R、-OP(=O)(OR)₂、-P(=O)(OR)₂、-PO₃⁻、-PO₃H₂、-C(=O)R、-C(=O)X、-C(=S)R、-CO₂R、-CO₂⁻、-C(=S)OR、-C(=O)SR、-C(=S)SR、-C(=O)NR₂、-C(=S)NR₂、-C(=NR)NR₂が含まれるが、これらに限定されず、式中、各Xは独立して、ハロゲン、F、Cl、Br、またはIであり、各Rは独立して、-H、C₂-C₁₈アルキル、C₆-C₂₀アリール、C₃-C₁₄複素環、保護基、またはプロドラッグ部分である。上述されるアルキレン、アルケニレン、及びアルキニレン基もまた、同様に置換され得る。

20

【0097】

「ヘテロアリール」及び「複素環」は、1個以上の環原子がヘテロ原子、例えば、窒素、酸素、及び硫黄である環系を指す。複素環ラジカルは、3 ~ 20 個の炭素原子、ならびにN、O、P、及びSから選択される1 ~ 3 個のヘテロ原子を含む。複素環は、3 ~ 7 環員 (2 ~ 6 個の炭素原子、ならびにN、O、P、及びSから選択される1 ~ 3 個のヘテロ原子) を有する単環、または7 ~ 10 環員 (4 ~ 9 個の炭素原子、ならびにN、O、P、及びSから選択される1 ~ 3 個のヘテロ原子) を有する二環、例えば、ビシクロ [4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、または[6, 6]系であり得る。

30

【0098】

例示的な複素環は、例えば、Paquette, Leo A., Principle of Modern Heterocyclic Chemistry (W.A. Benjamin, New York, 1968) の特に第1章、第3章、第4章、第6章、第7章、及び第9章、The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs (John Wiley & Sons, New York, 1950 ~ 現在) の特に第13巻、第14巻、第16巻、第19巻、及び第28巻、ならびにJ. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566に記載される。

40

【0099】

例示的な複素環には、例として、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、テトラヒドロチオフェニル、酸化硫黄テトラヒドロチオフェニル、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、ビス - テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス - テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、

50

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、トリアジニル、6 H - 1, 2, 5 - チアジアジニル、2 H, 6 H - 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、キサンテニル、フェノキサンチニル、2 H - ピロリル、イソチアゾリル、イソキゾリル、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、3 H - インドリル、1 H - インダゾリル、プリニル、4 H - 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、4 a H - カルバゾリル、カルバゾリル、- 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、オキシンドリル、ベンゾキサゾリニル、及びイサチノイルが含まれるが、これらに限定されない。

【0100】

例えば、限定されないが、炭素結合した複素環は、ピリジンの2、3、4、5、もしくは6位、ピリダジンの3、4、5、もしくは6位、ピリミジンの2、4、5、もしくは6位、ピラジンの2、3、5、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、3、4、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、4、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、4、もしくは5位、アジリジンの2もしくは3位、アゼチジンの2、3、もしくは4位、キノリンの2、3、4、5、6、7、もしくは8位、またはイソキノリンの1、3、4、5、6、7、もしくは8位で結合される。さらにより典型的には、炭素結合した複素環としては、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 - チアゾリルが挙げられる。

【0101】

例えば、限定されないが、窒素結合した複素環は、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、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、1 H - 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、及びカルバゾールまたは- カルボリンの9位で結合される。さらにより典型的には、窒素結合した複素環としては、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、及び1 - ピペリジニルが挙げられる。

【0102】

「 $C_3 \sim C_8$ 複素環」は、芳香族または非芳香族 $C_3 \sim C_8$ 炭素環を指し、環炭素原子のうちの1～4個が独立して、O、S、及びNからなる群からのヘテロ原子で置換される。 $C_3 \sim C_8$ 複素環の代表例としては、ベンゾフラニル、ベンゾチオフエン、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、及びテトラゾリルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_3 \sim C_8$ 複素環は、非置換であり得るか、- $C_1 \sim C_8$ アルキル、- O - ($C_1 \sim C_8$ アルキル)、- アリール、- $C(O)R'$ 、- $OC(O)R'$ 、- $C(O)OR'$ 、- $C(O)NH_2$ 、- $C(O)NHR'$ 、- $C(O)N(R')_2$ 、- $NHC(O)R'$ 、- $S(O)_2R'$ 、- $S(O)R'$ 、- OH、- ハロゲン、- N_3 、- NH_2 、- $NH(R')$ 、- $N(R')_2$ 、及び- CNを含むが、これらに限定されない最大7個の基で置換され得、式中、各 R' は独立して、H、- $C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

10

20

30

40

50

【0103】

「 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ」は、上で定義される $C_3 \sim C_8$ 複素環基を指し、この複素環基の水素原子のうちの1個が結合で置換される。 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロは、非置換であり得るか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{ アルキル})$ 、 $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含むが、これらに限定されない最大6個の基で置換され得、式中、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

【0104】

10

「 $C_3 \sim C_{20}$ 複素環」は、芳香族または非芳香族 $C_3 \sim C_8$ 炭素環を指し、環炭素原子のうちの1～4個が独立して、 O 、 S 、及び N からなる群からのヘテロ原子で置換される。 $C_3 \sim C_{20}$ 複素環は、非置換であり得るか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{ アルキル})$ 、 $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含むが、これらに限定されない最大7個の基で置換され得、式中、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

【0105】

20

「 $C_3 \sim C_{20}$ ヘテロシクロ」は、上で定義される $C_3 \sim C_{20}$ 複素環基を指し、この複素環基の水素原子のうちの1個が結合で置換される。

【0106】

「炭素環」は、単環として3～7個の炭素原子、または二環として7～12個の炭素原子を有する飽和または不飽和環を意味する。単環式炭素環は、3～6個の環原子、さらにより典型的には5または6個の環原子を有する。二環式炭素環は、例えば、ビシクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、もしくは[6, 6]系として配列された7～12個の環原子、またはビシクロ[5, 6]または[6, 6]系として配列された9または10個の環原子を有する。単環式炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペンチ-1-エニル、1-シクロペンチ-2-エニル、1-シクロペンチ-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキシ-1-エニル、1-シクロヘキシ-2-エニル、1-シクロヘキシ-3-エニル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが挙げられる。

30

【0107】

「 $C_3 \sim C_8$ 炭素環」は、3員、4員、5員、6員、7員、または8員の飽和または不飽和非芳香族炭素環式環である。代表的な $C_3 \sim C_8$ 炭素環としては、 $-シクロプロピル$ 、 $-シクロブチル$ 、 $-シクロペンチル$ 、 $-シクロペンタジエニル$ 、 $-シクロヘキシル$ 、 $-シクロヘキセニル$ 、 $-1, 3-シクロヘキサジエニル$ 、 $-1, 4-シクロヘキサジエニル$ 、 $-シクロヘプチル$ 、 $-1, 3-シクロヘプタジエニル$ 、 $-1, 3, 5-シクロヘプタトリエニル$ 、 $-シクロオクチル$ 、及び $-シクロオクタジエニル$ が含まれるが、これらに限定されない。 $C_3 \sim C_8$ 炭素環基は、非置換であり得るか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{ アルキル})$ 、 $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含むが、これらに限定されない1つ以上の基で置換され得、式中、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、及びアリールから選択される。

40

【0108】

「 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ」は、上で定義される $C_3 \sim C_8$ 炭素環基を指し、この炭素環基の水素原子のうちの1個が結合で置換される。

50

【0109】

「リンカー」は、共有結合、または抗体を薬物部分に共有結合させる原子の鎖を含む、化学部分を指す。様々な実施形態において、リンカーは、二価ラジカル、例えば、アルキルジイル、アリアルジイル、ヘテロアリアルジイル、 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ 、アルキルオキシ（例えば、ポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ）、及びアルキルアミン（例えば、ポリエチレンアミノ、Jeffamine（商標））の反復単位、ならびにコハク酸塩、スクシンアミド、ジグリコール酸塩、マロン酸塩、及びカプロアミドを含む二酸エステル及びアミド等の部分を含む。様々な実施形態において、リンカーは、1つ以上のアミノ酸残基、例えば、バリン、フェニルアラニン、リシン、及びホモリシンを含み得る。

10

【0110】

「キラル」という用語は、鏡像パートナーの重ね合わせできない（non-superimposability）特性を有する分子を指し、一方で「アキラル」という用語は、それらの鏡像パートナーと重ね合わせできる（superimposability）分子を指す。

【0111】

「立体異性体」という用語は、同一の化学構成を有するが、空間内の原子または基の配置に関して異なる、化合物を指す。

【0112】

「ジアステレオマー」は、2つ以上のキラル性の中心を有し、それらの分子が互いの鏡像でない、立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理特性、例えば、融点、沸点、スペクトル特性、及び反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動法及びクロマトグラフィー等の高分解能分析手順の下で分離されてもよい。

20

【0113】

「鏡像異性体」は、互いに重ね合わせできない鏡像である、化合物の2つの立体異性体を指す。

【0114】

本明細書で使用される立体化学的な定義及び慣例は、一般に、S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York、及び Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York に従う。多くの有機化合物は、光学活性形態で存在し、すなわち、それらは、平面偏光の平面を回転させる能力を有する。光学活性化合物を説明する際、接頭辞 D 及び L、または R 及び S は、そのキラル中心（複数可）の周りの分子の絶対配置を表すように使用される。接頭辞 d 及び l または (+) 及び (-) は、化合物による平面偏光の回転の徴候を表記するために用いられ、このうち (-) または l は、化合物が左旋性であることを意味する。(+) または d の接頭辞を有する化合物は、右旋性である。所与の化学構造について、これらの立体異性体は、それらが互いの鏡像であることを除いて同一である。特定の立体異性体はまた、鏡像異性体とも称され得、かかる異性体の混合物は、しばしば鏡像異性体混合物と呼ばれる。鏡像異性体の 50 : 50 混合物は、ラセミ混合物またはラセミ体と称され、それらは、化学反応またはプロセスにおいて立体選択または立体特異性が存在していない場合に生じ得る。「ラセミ混合物」及び「ラセミ体」という用語は、光学活性を欠く2つの鏡像異性体種の等モル混合物を指す。

30

40

【0115】

「脱離基」は、別の官能基によって置換され得る官能基を指す。ある特定の脱離基は、当該技術分野で周知であり、例としては、ハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物）、メタンスルホニル（メシル）、p-トルエンスルホニル（トシル）、トリフルオロメチルスルホニル（トリフル酸塩）、及びトリフルオロメチルスルホン酸塩が含まれる

50

が、これらに限定されない。

【0116】

「保護基」という用語は、特定の官能性を、化合物上の他の官能基を反応させながら、ブロックするまたは保護するために一般的に用いられる置換基を指す。例えば、「アミノ保護基」は、化合物中のアミノ官能性をブロックするまたは保護する、アミノ基に結合した置換基である。好適なアミノ保護基には、アセチル、トリフルオロアセチル、*t*-ブトキシカルボニル (BOC)、ベンジルオキシカルボニル (CBZ)、及び9-フルオレニルメチレンオキシカルボニル (fluorenylmethylenoxycarbonyl) (Fmoc) が含まれるが、これらに限定されない。保護基の一般的な説明及びそれらの使用については、T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991、またはより新しい版を参照されたい。

10

【0117】

II. 組成物及び方法

一態様において、本発明は、部分的に、CLL-1に結合する抗体及びかかる抗体を含む免疫複合体に基づく。本発明の抗体及び免疫複合体は、例えば、CLL-1陽性癌の診断または治療に有用である。

【0118】

本発明は、抗CLL-1抗体及び免疫複合体、ならびにそれらの使用方法を提供する。

【0119】

本明細書において、単離モノクローナル抗CLL-1抗体であって、配列番号49のアミノ酸を含むエピトープ及び/または重複エピトープに結合し、かつ配列番号50及び/または配列番号51を含むエピトープには結合しない、抗体が提供される。いくつかの実施形態において、本抗CLL-1抗体は、配列番号49のアミノ酸を含むエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、本抗CLL-1抗体は、配列番号49のアミノ酸からなるか、またはそれから本質的になるエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、該エピトープは、ヒドロキシルラジカルフットプリント法によって決定される。いくつかの実施形態において、ヒドロキシルラジカルフットプリント法によって決定されるエピチオプは、約1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または3.0超のうちのいずれかの、[抗原の速度定数] / [抗原と抗体複合体の速度定数] の比を有する。いくつかの実施形態において、ヒドロキシルラジカルフットプリント法によって決定されるエピチオプは、約2.0超の[抗原の速度定数] / [抗原と抗体複合体の速度定数] の比を有する。

20

30

【0120】

ヒドロキシルラジカルフットプリント法は、実施例に記載されるように実施され得る。例えば、試料は、Brookhaven National Laboratoryにおいて、X28c Beam lineを使用して0、10、15、及び20ミリ秒 (ms) の間隔でヒドロキシルラジカルに曝露される。標識された試料は、PNGase Fを使用して脱グリコシル化され得る。試料は、アセトン中でトリクロロ酢酸を使用して沈殿され、LC-MS分析が行われ得る。次に試料を、還元化してアルキル化し、トリプシンを使用して消化した後、液体クロマトグラフィーを高解像度質量分析 (LC-MS) と併用して行うことができる。MSデータは、ProMap MSを使用して分析されて、各ペプチドの用量応答プロットをもたらす得る。遊離抗原の結果が、複合体型の各々と比較され得る。Swiss-Modelソフトウェアを使用して抗原の相同性ベースモデルが生成され得、3つの複合体型の各々に関して溶媒保護領域がマッピングされ得る。選択イオンクロマトグラム (SIC) が抽出され、(特定の m/z の) ペプチドイオンの未酸化形及び全ての酸化形に関して統合され得る。これらのピーク面積値は、用量応答 (DR) プロットの形式で反応速度を特徴付けるために使用され得、それは、ヒドロキシルラジカル曝露の関数としてインタクトなペプチドの損失を測定する。複合体内の溶媒保護領域は、遊離抗原とは対照的に段階的な酸化反応を経て、酸化の速度の比 (速度定数、RCと呼ば

40

50

れる)の差は、エピトープの場所をハイライトするように機能し得る。

【0121】

本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、組み換えヒトC L L - 1に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、組み換えカニクイザルC L L - 1に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、ヒト末梢血単核球(P B M C)の表面上の内因性C L L - 1に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、カニクイザルP B M Cの表面上の内因性C L L - 1に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、癌細胞の表面上の内因性C L L - 1に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、A M L癌細胞の表面上の内因性C L L - 1に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、H L - 60細胞の表面上の内因性C L L - 1に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、E O L - 1細胞の表面上の内因性C L L - 1に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、K 2 4 4 Q突然変異(K 2 4 4 Qを有する配列番号1)を含むC L L - 1に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号49のアミノ酸を含むエピトープ及び/または重複エピトープに結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号50及び/または配列番号51を含むエピトープには結合しない。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、ヒトC L L - 1結合に関してR & Dシステムクローン6 8 7 3 1 7抗体と競合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、15 n M未満、10 n M未満、7 n M未満、5 n M未満、または3 n M未満のK dで内因性ヒトC L L - 1に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、10 n M未満、7 n M未満、5 n M未満、または3 n M未満のK dで組み換えヒトC L L - 1に結合する。本抗体のいずれかのいくつかの実施形態では、本抗体は、10 n M未満、7 n M未満、5 n M未満、または3 n M未満、2 n M未満、または1 n M未満のK dで組み換えカニクイザルC L L - 1に結合する。

【0122】

いくつかの実施形態において、抗体の特徴は、下記の実施例において本明細書に記載されるように決定される。

【0123】

抗体6 E 7及び他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b)配列番号45のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3、(d)配列番号5のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(e)配列番号6のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(f)配列番号7のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される、少なくとも1、2、3、4、5、または6つのH V Rを含む抗C L L - 1抗体を提供する。いくつかの実施形態において、H V R - H 2は、配列番号9のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、H V R - H 2は、配列番号47のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、H V R - H 2は、配列番号11のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、H V R - H 2は、配列番号43のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、H V R - H 2は、配列番号44のアミノ酸配列を含む。

【0124】

一態様において、本発明は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b)配列番号45のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのV H H V R配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む。別の実施形態において、本抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3及び配列番号7のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3、配列番号7のアミノ酸配列を含むH V R - L 3、及び配列番号45

のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号45のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。いくつかの実施形態において、HVR-H2は、配列番号9のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HVR-H2は、配列番号47のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HVR-H2は、配列番号11のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HVR-H2は、配列番号43のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HVR-H2は、配列番号44のアミノ酸配列を含む。

【0125】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVLHVR配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、(a)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0126】

別の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号45のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号10から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVHHVR配列を含むVHドメインと、(b)(i)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVLHVR配列を含むVLドメインと、を含む。

【0127】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号45のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号47のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-

L 1、(e) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (f) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

【 0 1 2 8 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、抗 C L L - 1 抗体は、ヒト化されている。一実施形態において、抗 C L L - 1 抗体は、上記の実施形態のいずれかにあるような H V R を含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒト V L カッパ I コンセンサス (V L _{K I}) フレームワーク及び / または V H フレームワーク V H₁ である。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、以下の突然変異のいずれかを含む、ヒト V L カッパ I コンセンサス (V L _{K I}) フレームワーク及び / または V H フレームワーク V H₁ である。

【 0 1 2 9 】

別の態様において、抗 C L L - 1 抗体は、配列番号 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 4 6、及び / または配列番号 4 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (V H) 配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 4 6、及び / または配列番号 4 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する V H 配列は、参照配列と比較して、置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗 C L L - 1 抗体は、C L L - 1 に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、合計 1 ~ 1 0 個のアミノ酸が、配列番号 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 4 6、及び / または配列番号 4 8 内で置換、挿入、及び / または欠失された。ある特定の実施形態において、合計 1 ~ 5 個のアミノ酸が、配列番号 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 4 6、及び / または配列番号 4 8 内で置換、挿入、及び / または欠失された。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、H V R の外側の領域で (すなわち、F R において) 生じる。任意に、本抗 C L L - 1 抗体は、配列番号 3 1、配列番号 3 3、及び / または配列番号 3 4 の V H 配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、V H は、(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (c) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される、1、2、または 3 つの H V R を含む。いくつかの実施形態において、H V R - H 2 は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、H V R - H 2 は、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、H V R - H 2 は、配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、H V R - H 2 は、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、H V R - H 2 は、配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 3 0 】

別の態様において、抗 C L L - 1 抗体が提供され、該抗体は、配列番号 3 0 及び / または配列番号 3 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。ある特定の実施形態において、配列番号 3 0 及び / または配列番号 3 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する V L 配列は、参照配列と比較して、置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を有するが、その配列を含む抗 C L L - 1 抗体は、C L L - 1 に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、合計 1 ~ 1 0 個のアミノ酸が、配列番号 3 0 及び / または配列番号 3 2 内で置換、挿入、及び / または欠失された。ある特定の実施形態において、合計 1 ~ 5 個のアミノ酸が、配列番号 3 0 及び / または配列番号 3 2 内で置換、挿入、及び / または欠失された。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、H V R の外側の領域で (すなわち、F R において) 生じる。任意に、本抗 C L L - 1 抗体は、配列番号 3 0

及び／または配列番号 32 の V L 配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、V L は、(a) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(c) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、1、2、または3つの H V R を含む。

【 0 1 3 1 】

別の態様において、抗 C L L - 1 抗体が提供され、該抗体は、上述の実施形態のいずれかにあるような V H、及び上述の実施形態のいずれかにあるような V L を含む。

【 0 1 3 2 】

一実施形態において、本抗体は、配列番号 31 及び配列番号 30 それぞれの V H 及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、本抗体は、配列番号 33 及び配列番号 32 それぞれの V H 及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、本抗体は、配列番号 34 及び配列番号 33 それぞれの V H 及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、本抗体は、配列番号 46 及び配列番号 33 それぞれの V H 及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、本抗体は、配列番号 48 及び配列番号 33 それぞれの V H 及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【 0 1 3 3 】

さらなる態様において、本明細書において、本明細書に提供される抗 C L L - 1 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 46、及び／または配列番号 48 の V H 配列、ならびに配列番号 30 及び／または配列番号 32 の V L 配列をそれぞれ含む抗 C L L - 1 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

【 0 1 3 4 】

本明細書において、図 2 A に示される K a b a t 付番に従う H V R 1 - L C、H V R 2 - L C、及び H V R 3 - L C 配列を含む軽鎖可変ドメインと、図 2 B に示される K a b a t 付番に従う H V R 1 - H C、H V R 2 - H C、及び H V R 3 - H C 配列を含む重鎖可変ドメインと、を含む抗体が提供される。いくつかの実施形態において、本抗体は、図 2 A に示される H V R 1 - L C、H V R 2 - L C、及び／または H V R 3 - L C 配列、ならびに F R 1 - L C、F R 2 - L C、F R 3 - L C、及び／または F R 4 - L C 配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、図 2 B に示される H V R 1 - H C、H V R 2 - H C、及び／または H V R 3 - H C 配列、ならびに F R 1 - H C、F R 2 - H C、F R 3 - H C、及び／または F R 4 - H C 配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【 0 1 3 5 】

本発明のさらなる態様において、上記の実施形態のいずれかによる抗 C L L - 1 抗体は、ヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施形態において、抗 C L L - 1 抗体は、抗体断片、例えば、F v、F a b、F a b'、s c F v、ダイアボディ、または F (a b')₂ 断片である。別の実施形態において、本抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、本明細書に定義される I g G 1 抗体、I g G 2 a 抗体、または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

【 0 1 3 6 】

抗体 20 B 1 及び他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1、2、3、4、5、または6つの H V R を含む抗 C L L - 1 抗体を提供する。

【 0 1 3 7 】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての VH HVR 配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含む。別の実施形態において、本抗体は、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 及び配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - L3、及び配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H3

10

【0138】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(b) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (c) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての VL HVR 配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(b) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (c) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む。

【0139】

20

別の態様において、本発明の抗体は、(a) (i) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(ii) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (iii) 配列番号 17 から選択されるアミノ酸配列を含む HVR - H3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての VH HVR 配列を含む VH ドメインと、(b) (i) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(ii) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (c) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての VL HVR 配列を含む VL ドメインと、を含む。

【0140】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、(c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、(d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む抗体を提供する。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、(c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、(d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む。

30

【0141】

40

上記の実施形態のいずれかにおいて、抗 CLL - 1 抗体は、ヒト化されている。一実施形態において、抗 CLL - 1 抗体は、上記の実施形態のいずれかにあるような HVR を含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒト VL カッパ I コンセンサス (VL_{K_I}) フレームワーク及び/または VH フレームワーク VH₁ である。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、以下の突然変異のいずれかを含む、ヒト VL カッパ I コンセンサス (VL_{K_I}) フレームワーク及び/または VH フレームワーク VH₁ である。

【0142】

別の態様において、抗 CLL - 1 抗体が提供され、該抗体は、上述の実施形態のいずれ

50

かにあるようなV H、及び上述の実施形態のいずれかにあるようなV Lを含む。

【0143】

一実施形態において、本抗体は、配列番号36及び配列番号35それぞれのV H及びV L配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0144】

さらなる態様において、本明細書において、本明細書に提供される抗C L L - 1抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号36のV H配列及び配列番号35のV L配列をそれぞれ含む抗C L L - 1抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

【0145】

本明細書において、図1Aに示されるK a b a t付番に従うH V R 1 - L C、H V R 2 - L C、及びH V R 3 - L C配列を含む軽鎖可変ドメインと、図1Bに示されるK a b a t付番に従うH V R 1 - H C、H V R 2 - H C、及びH V R 3 - H C配列を含む重鎖可変ドメインと、を含む抗体が提供される。

【0146】

本発明のさらなる態様において、上記の実施形態のいずれかによる抗C L L - 1抗体は、ヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施形態において、抗C L L - 1抗体は、抗体断片、例えば、F v、F a b、F a b'、s c F v、ダイアボディ、またはF (a b')₂断片である。別の実施形態において、本抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、本明細書に定義されるI g G 1抗体、I g G 2 a抗体、または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

【0147】

抗体21C9及び他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a) 配列番号21のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b) 配列番号22のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、(c) 配列番号23のアミノ酸配列を含むH V R - H 3、(d) 配列番号18のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(e) 配列番号19のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(f) 配列番号20のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される、少なくとも1、2、3、4、5、または6つのH V Rを含む抗C L L - 1抗体を提供する。

【0148】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号21のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b) 配列番号22のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c) 配列番号23のアミノ酸配列を含むH V R - H 3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのV H H V R配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、配列番号23のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む。別の実施形態において、本抗体は、配列番号23のアミノ酸配列を含むH V R - H 3及び配列番号20のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、配列番号23のアミノ酸配列を含むH V R - H 3、配列番号20のアミノ酸配列を含むH V R - L 3、及び配列番号22のアミノ酸配列を含むH V R - H 2を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号21のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b) 配列番号22のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c) 配列番号23のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む。

【0149】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号18のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b) 配列番号19のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c) 配列番号20のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのV L H V R配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号18のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b) 配列番号19のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c) 配列番号20のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 0 】

別の態様において、本発明の抗体は、(a) (i) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(i i i) 配列番号 2 3 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての V H H V R 配列を含む V H ドメインと、(b) (i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(c) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての V L H V R 配列を含む V L ドメインと、を含む。

【 0 1 5 1 】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(f) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む抗体を提供する。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(f) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

【 0 1 5 2 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、抗 C L L - 1 抗体は、ヒト化されている。一実施形態において、抗 C L L - 1 抗体は、上記の実施形態のいずれかにあるような H V R を含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒト V L カッパ I コンセンサス (V L _{K I}) フレームワーク及び/または V H フレームワーク V H₁ である。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、以下の突然変異のいずれかを含む、ヒト V L カッパ I コンセンサス (V L _{K I}) フレームワーク及び/または V H フレームワーク V H₁ である。

【 0 1 5 3 】

別の態様において、抗 C L L - 1 抗体は、配列番号 3 8 及び/または配列番号 4 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (V H) 配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号 3 8 及び/または配列番号 4 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する V H 配列は、参照配列と比較して、置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を有するが、その配列を含む抗 C L L - 1 抗体は、C L L - 1 に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、合計 1 ~ 1 0 個のアミノ酸が、配列番号 3 8 及び/または配列番号 4 0 内で置換、挿入、及び/または欠失された。ある特定の実施形態において、合計 1 ~ 5 個のアミノ酸が、配列番号 3 8 及び/または配列番号 4 0 内で置換、挿入、及び/または欠失された。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、H V R の外側の領域で (すなわち、F R において) 生じる。任意に、本抗 C L L - 1 抗体は、配列番号 3 8 及び/または配列番号 4 0 の V H 配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、V H は、(a) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(c) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される、1、2、または 3 つの H V R を含む。

【 0 1 5 4 】

別の態様において、抗 C L L - 1 抗体が提供され、該抗体は、配列番号 3 7 及び/または配列番号 3 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9

10

20

30

40

50

4 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または100 %の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。ある特定の実施形態において、配列番号37及び/または配列番号39のアミノ酸配列に対して少なくとも90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または99 %の同一性を有するV L配列は、参照配列と比較して、置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を有するが、その配列を含む抗C L L - 1抗体は、C L L - 1に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、合計1 ~ 10個のアミノ酸が、配列番号37及び/または配列番号39内で置換、挿入、及び/または欠失された。ある特定の実施形態において、合計1 ~ 5個のアミノ酸が、配列番号37及び/または配列番号39内で置換、挿入、及び/または欠失された。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、H V Rの外側の領域で (すなわち、F Rにおいて) 生じる。任意に、本抗C L L - 1抗体は、配列番号37及び/または配列番号39のV L配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、V Lは、(a) 配列番号18のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b) 配列番号19のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c) 配列番号20のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される、1、2、または3つのH V Rを含む。

10

【0155】

別の態様において、抗C L L - 1抗体が提供され、該抗体は、上述の実施形態のいずれかにあるようなV H、及び上述の実施形態のいずれかにあるようなV Lを含む。

【0156】

一実施形態において、本抗体は、配列番号38及び配列番号37それぞれのV H及びV L配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、本抗体は、配列番号40及び配列番号39それぞれのV H及びV L配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

20

【0157】

さらなる態様において、本明細書において、本明細書に提供される抗C L L - 1抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号38及び/または配列番号40のV H配列、ならびに配列番号37及び/または配列番号39のV L配列をそれぞれ含む抗C L L - 1抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

【0158】

本明細書において、図3Aに示されるK a b a t付番に従うH V R 1 - L C、H V R 2 - L C、及びH V R 3 - L C配列を含む軽鎖可変ドメインと、図3Bに示されるK a b a t付番に従うH V R 1 - H C、H V R 2 - H C、及びH V R 3 - H C配列を含む重鎖可変ドメインと、を含む抗体が提供される。いくつかの実施形態において、本抗体は、図3Aに示されるH V R 1 - L C、H V R 2 - L C、及び/またはH V R 3 - L C配列、ならびにF R 1 - L C、F R 2 - L C、F R 3 - L C、及び/またはF R 4 - L C配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、図3Bに示されるH V R 1 - H C、H V R 2 - H C、及び/またはH V R 3 - H C配列、ならびにF R 1 - H C、F R 2 - H C、F R 3 - H C、及び/またはF R 4 - H C配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

30

40

【0159】

本発明のさらなる態様において、上記の実施形態のいずれかによる抗C L L - 1抗体は、ヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施形態において、抗C L L - 1抗体は、抗体断片、例えば、F v、F a b、F a b'、s c F v、ダイアボディ、またはF (a b')₂断片である。別の実施形態において、本抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、本明細書に定義されるI g G 1抗体、I g G 2 a抗体、または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

【0160】

抗体28H12及び他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a) 配列番号27のアミノ酸配列を含むH

50

V R - H 1、(b) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(f) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1、2、3、4、5、または 6 つの H V R を含む抗 C L L - 1 抗体を提供する。

【 0 1 6 1 】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(c) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての V H H V R 配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。別の実施形態において、本抗体は、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 及び配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(c) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。

10

【 0 1 6 2 】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(c) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての V L H V R 配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(c) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

20

【 0 1 6 3 】

別の態様において、本発明の抗体は、(a) (i) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(i i i) 配列番号 2 9 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての V H H V R 配列を含む V H ドメインと、(b) (i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(c) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての V L H V R 配列を含む V L ドメインと、を含む。

30

【 0 1 6 4 】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(f) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む抗体を提供する。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(f) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

40

【 0 1 6 5 】

上記の実施形態のいずれかにおいて、抗 C L L - 1 抗体は、ヒト化されている。一実施形態において、抗 C L L - 1 抗体は、上記の実施形態のいずれかにあるような H V R を含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまた

50

はヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒトV_LカッパIコンセンサス(V_L_{K_I})フレームワーク及び/またはV_HフレームワークV_H₁である。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、以下の突然変異のいずれかを含む、ヒトV_LカッパIコンセンサス(V_L_{K_I})フレームワーク及び/またはV_HフレームワークV_H₁である。

【0166】

別の態様において、抗C_LL-1抗体が提供され、該抗体は、上述の実施形態のいずれかにあるようなV_H、及び上述の実施形態のいずれかにあるようなV_Lを含む。

【0167】

一実施形態において、本抗体は、配列番号42及び配列番号41それぞれのV_H及びV_L配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

10

【0168】

さらなる態様において、本明細書において、本明細書に提供される抗C_LL-1抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号42のV_H配列及び配列番号41のV_L配列をそれぞれ含む抗C_LL-1抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

【0169】

本明細書において、図1Aに示されるKabat付番に従うHVR1-LC、HVR2-LC、及びHVR3-LC配列を含む軽鎖可変ドメインと、図1Bに示されるKabat付番に従うHVR1-HC、HVR2-HC、及びHVR3-HC配列を含む重鎖可変ドメインと、を含む抗体が提供される。

20

【0170】

本発明のさらなる態様において、上記の実施形態のいずれかによる抗C_LL-1抗体は、ヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施形態において、抗C_LL-1抗体は、抗体断片、例えば、F_v、F_{ab}、F_{ab}'、s_cF_v、ダイアボディ、またはF(a_b')₂断片である。別の実施形態において、本抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、本明細書に定義されるIgG1抗体、IgG2a抗体、または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

【0171】

さらなる態様において、上記の実施形態のいずれかによる抗C_LL-1抗体は、以下に記載される特長のうちのいずれかを、単独でまたは組み合わせて組み込むことができる。

30

【0172】

1. 抗体親和性

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、1μM以下、100nM以下、50nM以下、10nM以下、5nM以下、1nM以下、0.1nM以下、0.01nM以下、または0.001nM以下の解離定数(K_d)を有し、任意に、10⁻¹³M以上である(例えば、10⁻⁸M以下、例えば、10⁻⁸M~10⁻¹³M、例えば、10⁻⁹M~10⁻¹³M)。

【0173】

一実施形態において、K_dは、目的の抗体のF_{ab}バージョン及びその抗原と共に行われる、放射標識抗原結合アッセイ(RIA)によって、次のアッセイで説明されるように測定される。抗原に対するF_{ab}の溶液結合親和性は、F_{ab}を、未標識抗原の一連の滴定の存在下で、最小濃度の(¹²⁵I)標識抗原と平衡化し、次いで抗F_{ab}抗体コーティングプレートと結合した抗原を捕捉することによって、測定される(例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999)を参照されたい)。BioLアッセイのための条件を確立するために、MICROTITER(登録商標)マルチウェルプレート(Thermo Scientific)を、5μg/mLの捕捉抗F_{ab}抗体(Cappel Labs)含有50mMの炭酸ナトリウム(pH 9.6)で一晩コーティングし、その後、2%(w/v)ウシ血清アルブミン含有PBSにより、室温(およそ23℃)で2~5時間ブロッキングする。非吸着性のプレート(

40

50

Nunc 番号 269620) 中で、100 pM または 26 pM [^{125}I] - 抗原を、目的の Fab の段階希釈液と混合する (例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593 - 4599 (1997) における抗 VEGF 抗体 Fab - 12 の評価と一貫する)。目的の Fab を次いで一晚インキュベートするが、確実に平衡に到達するように、インキュベーションはより長い期間 (例えば、約 65 時間) 継続してもよい。その後、混合物を、室温での (例えば、1 時間にわたる) インキュベーションのために、捕捉プレートに移す。次いで溶液を除去し、プレートを、0.1% ポリソルベート 20 (TWEEN - 20 (登録商標)) 含有 PBS で 8 回洗浄する。プレートが乾燥したとき、150 μL / ウェルのシンチラント (scintillant) (MICROSCINT - 20 (商標)、Packard) を添加し、プレートを TOPCOUNT (商標) 計数器 (Packard) により 10 分間計数する。最大結合の 20% 以下をもたらす各 Fab の濃度を、競合結合アッセイにおいて使用するために選定する。

【0174】

別の実施形態によれば、 K_d は、BIA CORE (登録商標) - 2000、BIA CORE (登録商標) - T200、または BIA CORE (登録商標) - 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を使用した表面プラスモン共鳴アッセイを使用して、25 $^{\circ}\text{C}$ で、約 10 応答単位 (RU) で固定化された抗原 CM5 チップを用いて測定される。簡潔に述べると、供給業者の指示に従って、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ (CM5、BIA CORE, Inc.) を、N - エチル - N' - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及び N - ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) により活性化する。抗原を、10 mM の酢酸ナトリウム (pH 4.8) で 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ まで (約 0.2 μM) 希釈し、かつ / または HBS - P (0.01 M Hepes pH 7.4、0.15 M NaCl、0.005% Surfactant P20) で希釈した後、5 $\mu\text{L} / \text{分}$ 及び / または 30 $\mu\text{L} / \text{分}$ の流速で注入して、カップリングされたタンパク質のおよそ 10 応答単位 (RU) を達成する。抗原の注入後、1 M のエタノールアミンを注入して、未反応の基をブロックする。動態測定のために、Fab の 2 倍段階希釈液 (0.78 nM ~ 500 nM) を、0.05% ポリソルベート 20 (TWEEN - 20 (商標)) 界面活性剤を含む PBS (PBST) 中に、25 $^{\circ}\text{C}$ で、およそ 25 $\mu\text{L} / \text{分}$ の流速で注入する。会合速度 (k_{on}) 及び解離速度 (k_{off}) を、単純な 1 対 1 Langmuir 結合モデル (BIA CORE (登録商標) Evaluation Software 第 3.2 版) を使用して、会合センサグラム及び解離センサグラムを同時に適合することによって、算出する。平衡解離定数 (K_d) は、比率 k_{off} / k_{on} として算出する。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999) を参照されたい。オン速度が、上記表面プラスモン共鳴アッセイによって、106 M $^{-1}$ s $^{-1}$ を超える場合、オン速度は、攪拌キュベットを備えるストップフロー装着分光光度計 (Aviv Instrument s) または 8000 - シリーズ SLM - AMINCO (商標) 分光光度計 (Thermo Spectronic) 等の分光計において測定される、漸増濃度の抗原の存在下で、25 $^{\circ}\text{C}$ で、PBS (pH 7.2) 中 20 nM 抗 - 抗原抗体 (Fab 型) の蛍光発光強度 (励起 = 295 nm、発光 = 340 nm、16 nm 帯域通過) の増加または減少を測定する、蛍光消光技法を使用することによって、決定することができる。

【0175】

2. 抗体断片

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片には、Fab、Fab'、Fab' - SH、F(ab') $_2$ 、Fv、及び scFv 断片、ならびに以下に記載される他の断片が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の抗体断片の概説については、Hudson et al. Nat. Med. 9: 129 - 134 (2003) を参照されたい。scFv 断片の概説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore e

ds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994) を参照されたく、また、WO93/16185、ならびに米国特許第5,571,894号及び同第5,587,458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、in vivo 半減期が増加した、Fab及びF(ab')₂断片の考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

【0176】

ダイアボディは、二価性または二重特異性であり得る、2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、EP404,097、WO1993/01161、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)、及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) を参照されたい。トリアボディ (Triabodies) 及びテトラボディ (tetrabodies) もまた、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003) に記載される。

10

【0177】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部分、または軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部分を含む、抗体断片である。ある特定の実施形態において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, MA、例えば、米国特許第6,248,516 B1号を参照されたい)。

【0178】

抗体断片は、本明細書に記載される、インタクトな抗体のタンパク質分解消化、及び組み換え宿主細胞 (例えば、大腸菌またはファージ) による産生を含むが、これらに限定されない、種々の技法によって作製することができる。

20

【0179】

3. キメラ及びヒト化抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、及びMorrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) に記載される。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサル等の非ヒト霊長類に由来する可変領域)、及びヒト定常領域を含む。さらなる実施例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変更された、「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体には、それらの抗原結合断片が含まれる。

30

【0180】

ある特定の実施形態において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的に、非ヒト抗体は、親の非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減するためにヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR (またはそれらの部分) が非ヒト抗体に由来し、かつFR (またはそれらの部分) がヒト抗体配列に由来する、1つ以上の可変ドメインを含む。また、ヒト化抗体は任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部分も含む。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元するまたは改善するために、非ヒト抗体 (例えば、HVR残基が由来する抗体) 由来の対応する残基で置換される。

40

【0181】

ヒト化抗体及びそれらを作製する方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) に概説され、また例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)、Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号、及び同第7,087,409号、Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (SDR (a-CDR) 移植について説明する)、Padlan, Mol. Imm

50

unol. 28: 489 - 498 (1991) (「リサーフェシング (resurfacing)」について説明する)、Dall'Acqua et al., Methods 36: 43 - 60 (2005) (「FRシャフリング」について説明する)、ならびに Osbourn et al., Methods 36: 61 - 68 (2005)、及び Klimka et al., Br. J. Cancer, 83: 252 - 260 (2000) (FRシャフリングへの「誘導選択 (guided selection)」アプローチについて説明する) にさらに記載されている。

【0182】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、「最良適合 (best-fit)」法を使用して選択されるフレームワーク領域 (例えば、Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993) を参照されたい)、軽鎖または重鎖可変領域の特定の低位集団のヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域 (例えば、Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992)、及び Presta et al., J. Immunol., 151: 2623 (1993) を参照されたい)、ヒト成熟 (体細胞突然変異した) フレームワーク領域またはヒト生殖細胞株フレームワーク領域 (例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619 - 1633 (2008) を参照されたい)、ならびに FRライブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域 (例えば、Baca et al., J. Biol. Chem. 272: 10678 - 10684 (1997) 及び Rosok et al., J. Biol. Chem. 271: 22611 - 22618 (1996) を参照されたい) が含まれるが、これらに限定されない。

【0183】

4. ヒト抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野において既知の種々の技法を使用して生成され得る。ヒト抗体は、一般に、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368 - 74 (2001) 及び Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20: 450 - 459 (2008) に記載される。

【0184】

ヒト抗体は、免疫原を、抗原投与に応答してインタクトなヒト抗体またはヒト可変領域を含むインタクトな抗体を産生するように修飾されたトランスジェニック動物に投与することによって、調製されてもよい。かかる動物は典型的に、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、または染色体外に存在するか、または動物の染色体中に無作為に組み込まれる、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部分を含有する。かかるトランスジェニックマウスにおいて、内因性免疫グロブリン遺伝子座は一般に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23: 1117 - 1125 (2005) を参照されたい。また、米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584号 (XENOMOUSE (商標) 技術について説明する)、米国特許第5,770,429号 (HuMab (登録商標) 技術について説明する)、米国特許第7,041,870号 (K-M MOUSE (登録商標) 技術について説明する)、ならびに米国特許出願公開第2007/0061900号 (VelociMouse (登録商標) 技術について説明する) も参照されたい。かかる動物によって生成されるインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって、さらに修飾されてもよい。

【0185】

ヒト抗体はまた、ハイブリドーマベースの方法によって作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫細胞株及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株が記載される。(例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody

10

20

30

40

50

Production Techniques and Applications, p. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、及び Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991) を参照されたい)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術によって生成されるヒト抗体もまた、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557 - 3562 (2006) に記載される。追加の方法には、例えば、米国特許第7, 189, 826号(ハイブリドーマ細胞株由来のモノクローナルヒトIgM抗体の産生について説明する)、及び Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4): 265 - 268 (2006) (ヒト-ヒトハイブリドーマについて説明する) に記載されるものが含まれる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ(Trioma)技術)はまた、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3): 937 - 2005(27) 及び Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, (27)(3): 185 - 912005にも記載される。

【0186】

ヒト抗体はまた、ヒト由来ファージディスプレイライブラリから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成されてもよい。かかる可変ドメイン配列は、所望のヒト定常ドメインと組み合わせられてもよい。抗体ライブラリからヒト抗体を選択するための技法が、以下に記載される。

【0187】

5. ライブラリ由来抗体

本発明の抗体は、コンビナトリアルライブラリを、所望の活性(単数または複数)を有する抗体についてスクリーニングすることによって、単離されてもよい。例えば、ファージディスプレイライブラリを生成し、かかるライブラリを、所望の結合特性を保有する抗体についてスクリーニングするための、多様な方法が当該技術分野で知られている。かかる方法は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178: 1 - 37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) に概説され、またさらに、例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552 - 554、Clackson et al., Nature 352: 624 - 628 (1991)、Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 - 597 (1992)、Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248: 161 - 175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299 - 310 (2004)、Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073 - 1093 (2004)、Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467 - 12472 (2004)、及び Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119 - 132 (2004) に記載される。Acad.

【0188】

ある特定のファージディスプレイ法において、VH及びVL遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別個にクローニングされ、ファージライブラリ中で無作為に組み換えられ、それを次いで、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433 - 455 (1994) に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは典型的に、単鎖Fv(scFv)断片としてまたはFab断片としてのいずれかで、抗体断片を提示する。免疫された源のライブラリは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。代替的に、Griffiths et al., EMBO J, 12: 725 - 734 (1993) によって記載されるように、ナイーブレパートリーをクロ

ーニングして（例えば、ヒトから）、いかなる免疫化も伴わずに、広範な非自己抗原または自己抗原に対する抗体の単一の源を提供することができる。最後に、ナイーブラライブラリはまた、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)に記載されるように、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、無作為配列を含有するPCRプライマーを使用して高度可変CDR3領域をコードし、かつin vitroで再配列を達成することによって、合成的に作製することができる。ヒト抗体ファージライブラリについて説明する特許公開には、例えば、米国特許第5750373号、及び米国特許第2005/0079574号、同第2005/0119455号、同第2005/0266000号、同第2007/0117126号、同第2007/0160598号、同第2007/0237764号、同第2007/0292936号、及び同第2009/0002360号が含まれる。

【0189】

ヒト抗体ライブラリから単離された抗体または抗体断片は、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされる。

【0190】

6. 多重特異性抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有する、モノクローナル抗体である。ある特定の実施形態において、結合特異性のうちの一方は、CLL-1に対するものであり、他方は、任意の他の抗原に対するものである。ある特定の実施形態において、結合特異性のうちの一方は、CLL-1に対するものであり、他方は、CD3に対するものである。例えば、米国特許第5,821,337号を参照されたい。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、CLL-1の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体をまた使用して、細胞傷害性薬剤を、CLL-1を発現する細胞に局限させてもよい。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製することができる。いくつかの実施形態において、多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。

【0191】

いくつかの実施形態において、多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原結合部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である（二重特異性抗体等）。いくつかの実施形態において、多重特異性抗体の第1の抗原結合ドメイン及び第2の抗原結合ドメインは、1つの同一分子内の2つのエピトープに結合してもよい（分子内結合）。例えば、多重特異性抗体の第1の抗原結合ドメイン及び第2の抗原結合ドメインは、同一CLL-1分子上の2つの異なるエピトープに結合してもよい。ある特定の実施形態において、多重特異性抗体が結合する2つの異なるエピトープは、通常、1つの単一特性抗体、例えば、従来の抗体等、または1つの免疫グロブリン単一可変ドメインによって同時に結合されないエピトープである。いくつかの実施形態において、多重特異性抗体の第1の抗原結合ドメイン及び第2の抗原結合ドメインは、2つの別個の分子内に位置するエピトープに結合してもよい（分子間結合）。例えば、多重特異性抗体の第1の抗原結合ドメインは、あるCLL-1分子上のあるエピトープに結合してもよく、多重特異性抗体の第2の抗原結合ドメインは、異なるCLL-1分子上の別のエピトープに結合してもよく、それによって、2つの分子を架橋してもよい。

【0192】

いくつかの実施形態において、多重特異性抗体（二重特異性抗体等）の抗原結合ドメインは、2つのVH/VLユニットを含み、第1のVH/VLユニットは、第1のエピトープに結合し、第2のVH/VLユニットは、第2のエピトープに結合し、各VH/VLユニットは、重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。かかる多重特異性抗体には、限定されないが、完全長抗体、2つ以上のVL及びVHドメインを有する抗体、及び抗体断片（Fab、Fv、dsFv、scFv、ダイアボディ、二重特異性

ダイアボディ及びトリアボディ、共有結合または非共有結合された抗体断片等)が含まれる。重鎖可変領域の少なくとも一部分及び/または軽鎖可変領域の少なくとも一部分をさらに含むVH/VL単位は、「アーム」または「ヘミマー」または「半抗体」とも称され得る。いくつかの実施形態において、ヘミマーは、第2のヘミマーと分子内ジスルフィド結合が形成されることを可能にするのに十分な重鎖可変領域の部分を含む。いくつかの実施形態において、ヘミマーは、例えば、相補的ホール突然変異またはノブ突然変異を含む第2のヘミマーまたは半抗体とのヘテロ二量体化を可能にする、ノブ突然変異またはホール突然変異を含む。ノブ突然変異及びホール突然変異が、以下でさらに考察される。

【0193】

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される多重特異性抗体は、二重特異性抗体であり得る。本明細書で使用される「二重特異性抗体」という用語は、1つの分子上の2つの異なるエピトープに結合可能であるか、または2つの異なる分子上のエピトープに結合可能である抗原結合ドメインを含む、多重特異性抗体を指す。本明細書において、二重特異性抗体はまた、「デュアル特異性(dual specificity)」を有するもの、または「デュアル特異性である(dual specific)」とも称される場合がある。例示的な二重特異性抗体は、CLL-1及び任意の他の抗原の両方に結合し得る。ある特定の実施形態において、結合特異性のうちの一方は、CLL-1に対するものであり、他方は、CD3に対するものである。例えば、米国特許第5,821,337号を参照されたい。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、同一CLL-1分子の2つの異なるエピトープに結合し得る。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、2つの異なるCLL-1分子の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体をまた使用して、細胞傷害性薬剤を、CLL-1を発現する細胞に局限させてもよい。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製することができる。

【0194】

多重特異性抗体の作製のための技法には、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組み換え共発現(Milstein and Cuello, Nature 305:537(1983)、WO93/08829、及びTraunecker et al., EMBO J. 10:3655(1991)を参照されたい)、及び「ノブ・イン・ホール」操作(例えば、米国特許第5,731,168号、WO2009/089004、US2009/0182127、US2011/0287009、Marvin and Zhu, Acta Pharmacol. Sin. (2005) 26(6):649-658、及びKontermann(2005) Acta Pharmacol. Sin., 26:1-9を参照されたい)が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で使用される「ノブ・イン・ホール」または「KnH」技術という用語は、突起(ノブ)を1つのポリペプチドに、かつ空洞(ホール)を他のポリペプチドに、それらが相互作用する界面で導入することによって、2つのポリペプチドをin vitroまたはin vivoで一緒に対合することを導く技術を指す。例えば、KnHは、抗体のFc:Fc結合界面、CL:CH1界面、またはVH/VL界面に導入されている(例えば、例えば、US2011/0287009、US2007/0178552、WO96/027011、WO98/050431、及びZhu et al., 1997, Protein Science 6:781-788を参照されたい)。いくつかの実施形態において、KnHは、多重特異性抗体の製造中に2つの異なる重鎖を一緒に対合させる。例えば、Fc領域内にKnHを有する多重特異性抗体は、各Fc領域に結合された単一可変ドメインをさらに含み得るか、または同様のもしくは異なる軽鎖可変ドメインと対合する異なる重鎖可変ドメインをさらに含み得る。KnH技術を使用して、2つの異なる受容体細胞外ドメインを一緒に、または異なる標的認識配列を含む(例えば、アフィボディ(affibody)、ペプチボディ(peptibody)、及び他のFc融合を含む)、任意の他のポリペプチド配列を対合することもできる。

【0195】

本明細書で使用される「ノブ突然変異」という用語は、ポリペプチドが別のポリペプチ

10

20

30

40

50

ドと相互作用する界面において、突起（ノブ）をポリペプチドに導入する突然変異を指す。いくつかの実施形態において、他のポリペプチドには、ホール突然変異を有する。

【0196】

本明細書で使用される「ホール突然変異」という用語は、ポリペプチドが別のポリペプチドと相互作用する界面において、空洞（ホール）をポリペプチドに導入する突然変異を指す。いくつかの実施形態において、他のポリペプチドは、ノブ突然変異を有する。

【0197】

簡単な非限定的論考が以下に提供される。

【0198】

「突起」は、第1のポリペプチドの界面から突出し、したがってヘテロ多量体を安定化させるように、隣接した界面（すなわち、第2のポリペプチドの界面）における代償性空洞内に位置付け可能であり、それにより例えば、ホモ多量体形成よりもヘテロ多量体形成が有利になる、少なくとも1つのアミノ酸側鎖を指す。突起は、元の界面に存在し得るか、または合成的に（例えば、界面をコードする核酸を変更することによって）導入され得る。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチドの界面をコードする核酸は、突起をコードするように変更される。これを達成するために、第1のポリペプチドの界面内の少なくとも1つの「元の」アミノ酸残基をコードする核酸は、元のアミノ酸残基よりも大きい側鎖体積を有する少なくとも1つの「インポート」アミノ酸残基をコードする核酸で置換される。複数の元の残基及び対応するインポート残基が存在し得ることが理解されるであろう。様々なアミノ酸残基の側鎖体積は、例えば、US 2011/0287009の表1に示される。「突起」を導入する突然変異は、「ノブ突然変異」と称され得る。

【0199】

いくつかの実施形態において、突起の形成のためのインポート残基は、アルギニン（R）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、及びトリプトファン（W）から選択される、自然発生するアミノ酸残基である。いくつかの実施形態において、インポート残基は、トリプトファンまたはチロシンである。いくつかの実施形態において、突起の形成のための元の残基は、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、トレオニン、またはバリン等の小さい側鎖体積を有する。

【0200】

「空洞」は、第2のポリペプチドの界面から陥没する少なくとも1つのアミノ酸側鎖を指し、したがって、第1のポリペプチドの隣接界面上の対応する突起を収容する。空洞は、元の界面に存在し得るか、または合成的に（例えば、界面をコードする核酸を変更することによって）導入され得る。いくつかの実施形態において、第2のポリペプチドの界面をコードする核酸は、空洞をコードするように変更される。これを達成するために、第2のポリペプチドの界面内の少なくとも1つの「元の」アミノ酸残基をコードする核酸は、元のアミノ酸残基よりも小さい側鎖体積を有する少なくとも1つの「インポート」アミノ酸残基をコードするDNAで置換される。複数の元の残基及び対応するインポート残基が存在し得ることが理解されるであろう。いくつかの実施形態において、空洞の形成のためのインポート残基は、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、及びバリン（V）から選択される、自然発生するアミノ酸残基である。いくつかの実施形態において、インポート残基は、セリン、アラニン、またはトレオニンである。いくつかの実施形態において、空洞の形成のための元の残基は、チロシン、アルギニン、フェニルアラニン、またはトリプトファン等の大きい側鎖体積を有する。「空洞」を導入する突然変異は、「ホール突然変異」と称され得る。

【0201】

突起が空洞内で「位置付け可能」であることは、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドそれぞれの界面上の突起及び空洞の空間位置、ならびに突起及び空洞のサイズが、界面における第1及び第2のポリペプチドの正常な会合を著しく妨害することなく突起が空洞内に位置し得るようなものであることを意味する。Tyr、Phe、及びTrp等の突起は、典型的に界面の軸から垂直に延出せず、好ましい構造を有せず、対応する空洞を

10

20

30

40

50

有する突起のアラインメントは、場合によっては、X線結晶学または核磁気共鳴（NMR）によって得られるもの等の3次元構造に基づいて、突起／空洞の対をモデル化することに依存する。これは、当該技術分野において広く許容される技法を使用して達成され得る。

【0202】

いくつかの実施形態において、IgG1定常領域内のノブ突然変異は、T366W（EU付番）である。いくつかの実施形態において、IgG1定常領域内のホール突然変異は、T366S、L368A、及びY407V（EU付番）から選択される1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、IgG1定常領域内のホール突然変異は、T366S、L368A、及びY407V（EU付番）を含む。

10

【0203】

いくつかの実施形態において、IgG4定常領域内のノブ突然変異は、T366W（EU付番）である。いくつかの実施形態において、IgG4定常領域内のホール突然変異は、T366S、L368A、及びY407V（EU付番）から選択される1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、IgG4定常領域内のホール突然変異は、T366S、L368A、及びY407V（EU付番）を含む。

【0204】

多重特異性抗体はまた、静電的ステアリング（electrostatic steering）効果を操作して抗体Fc-ヘテロ二量体分子を作製すること（WO2009/089004A1）、2つ以上の抗体または断片を架橋すること（例えば、米国特許第4,676,980号、及びBrennan et al., Science, 229:81（1985）を参照されたい）、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生すること（例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148（5）:1547-1553（1992）を参照されたい）、「ダイアボディ」技術を使用して二重特異性抗体断片を作製すること（例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448（1993）を参照されたい）、及び単鎖Fv（sFv）二量体を使用すること（例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368（1994）を参照されたい）、ならびに例えば、Tutt et al., J. Immunol., 147:60（1991）に記載される三重特異性抗体を調製することによって、作製されてもよい。

20

30

【0205】

「オクトパス（Octopus）抗体」または「二重可変（dual-variable）ドメイン免疫グロブリン」（DVD）を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作された抗体もまた、本明細書に含まれる（例えば、US2006/0025576A1US2006/0025576A1、及びWu et al., Nature Biotechnology（2007）を参照されたい）。本明細書における抗体または断片にはまた、CLL-1及び別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む、「二重作用（Dual Acting）Fab」または「DAF」が含まれる（例えば、US2008/0069820を参照されたい）。

【0206】

40

7. 抗体変異形

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列変異形が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異形は、適切な修飾を、抗体をコードするヌクレオチド配列中に導入することによって、またはペプチド合成によって、調製されてもよい。かかる修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列からの残基の欠失、及び／またはそこへの残基の挿入、及び／または抗体のアミノ酸配列内での残基の置換が含まれる。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを作製して、最終構築物に到達することができるが、但し、その最終構築物が、所望の特性、例えば、抗原結合性を保有することを条件とする。

【0207】

50

a) 置換、挿入、及び欠失変異

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異形が提供される。置換型突然変異生成に対する目的の部位には、HVR及びFRが含まれる。保存的置換は、表1において、「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化は、表1において、「例となる置換」の見出しの下に提供され、またアミノ酸側鎖クラスを参照して下にさらに記載される。アミノ酸置換が目的の抗体中に導入され、生成物が、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の低下、またはADCCもしくはCDCの改善についてスクリーニングされてもよい。

表1

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
A l a (A)	V a l、L e u、I l e	V a l
A r g (R)	L y s、G l n、A s n	L y s
A s n (N)	G l n、H i s、A s p、L y s、A r g	G l n
A s p (D)	G l u、A s n	G l u
C y s (C)	S e r、A l a	S e r
G l n (Q)	A s n、G l u	A s n
G l u (E)	A s p、G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n、G l n、L y s、A r g	A r g
I l e (I)	L e u、V a l、M e t、A l a、P h e、ノルロイシン	L e u
L e u (L)	ノルロイシン、I l e、V a l、M e t、A l a、P h e	I l e
L y s (K)	A r g、G l n、A s n	A r g
M e t (M)	L e u、P h e、I l e	L e u
P h e (F)	T r p、L e u、V a l、I l e、A l a、T y r	T y r
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l、S e r	S e r
T r p (W)	T y r、P h e	T y r
T y r (Y)	T r p、P h e、T h r、S e r	P h e
V a l (V)	I l e、L e u、M e t、P h e、A l a、ノルロイシン	L e u

アミノ酸は、次の一般的な側鎖特性に従って分類されてもよい。

- (1) 疎水性：ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、
- (2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n、
- (3) 酸性：A s p、G l u、
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g、
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：G l y、P r o、
- (6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0208】

非保存的置換には、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴うことになる。

【0209】

置換型変異形の1つの種類は、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の1個以上の超可変領域残基を置換することを伴う。一般に、さらなる研究のために選択される、結果

として生じる変異形（複数可）は、親抗体と比較して、ある特定の生物学的特性の修飾（例えば、改善）（例えば、改善された親和性の改善、低下した免疫原性）を有することになり、かつ／または親抗体のある特定の生物学的特性を実質的に保持することになる。例示的な置換型変異形は、例えば、本明細書に記載されるもの等のファージディスプレイベースの親和性成熟技法を使用して、好都合に生成され得る、親和性成熟抗体である。簡潔に述べると、1個以上のHVR残基が突然変異させられ、変異形抗体がファージ上で提示されて、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【0210】

変化（例えば、置換）をHVRにおいて行って、例えば、抗体親和性を改善してもよい。かかる変化は、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で突然変異を経るコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207: 179-196 (2008)を参照されたい）、及び／またはSDR(a-CDR)において行われてもよく、結果として生じる変異形VHまたはVLが、結合親和性について試験される。二次ライブラリを構築し、かつそこから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))に記載される。親和性成熟のいくつかの実施形態において、多様性が、多様な方法（例えば、エラーブローンPCR、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指定突然変異生成）のうちのいずれかによって、成熟のために選定された可変遺伝子中に導入される。次いで、二次ライブラリが作成される。次いで、ライブラリは、所望の親和性を有する任意の抗体変異形を特定するために、スクリーニングされる。多様性を導入するための別の方法は、数個のHVR残基（例えば、1回に4～6個の残基）が無作為化される、HVR指向性アプローチを伴う。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング突然変異生成またはモデリングを使用して、具体的に特定されてもよい。特にCDR-H3及びCDR-L3が、標的とされることが多い。

【0211】

ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、かかる変化が、抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、1つ以上のHVR内で生じてもよい。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的变化（例えば、本明細書に提供される保存的置換）が、HVRにおいて行われてもよい。かかる変化は、HVR「ホットスポット」またはSDRの外側のものであってもよい。以上に提供される変異形VH及びVL配列のある特定の実施形態において、各HVRは、不変であるか、または1つ以下、2つ以下、もしくは3つ以下のアミノ酸置換を含有するかのいずれかである。

【0212】

突然変異生成のための標的とされ得る、抗体の残基または領域の特定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085によって記載される、「アラニンスキャニング変異生成」と呼ばれるものである。この方法において、標的残基（例えば、arg、asp、his、lys、及びglu等の荷電残基）のうちのある残基または基が特定され、中性または負荷電アミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）によって置き換えられて、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定する。さらなる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の場所に導入されてもよい。代替的に、または追加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造を使用して、抗体と抗原との間の接触点が特定される。かかる接触残基及び隣接する残基は、置換の候補として標的とされるか、または排除されてもよい。変異形をスクリーニングして、それらが所望の特性を含有するかどうかを決定してもよい。

【0213】

アミノ酸配列挿入には、1個の残基～100個以上の残基を含有するポリペプチドの範囲の長さである、アミノ末端及び／またはカルボキシル末端融合、ならびに単一のまたは

10

20

30

40

50

多数のアミノ酸残基の配列内 (i n t r a s e q u e n c e) 挿入が含まれる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入型変異形には、抗体の血清半減期を増加させる酵素 (例えば、A D E P Tのための) またはポリペプチドに対する抗体のN末端もしくはC末端への融合が含まれる。

【0214】

b) グリコシル化変異形

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体を、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるように変化させる。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作成されるか、または除去されるように、アミノ酸配列を変化させることによって、好都合に行われてもよい。

10

【0215】

抗体がF c領域を含む場合、そこに結合した炭水化物が変化し得る。哺乳類細胞によって産生される天然抗体は、典型的に、一般にN-結合によって、F c領域のC H 2ドメインのA s n 2 9 7に結合される、分岐した二分岐オリゴ糖を含む。例えば、W r i g h t e t a l . T I B T E C H 1 5 : 2 6 - 3 2 (1 9 9 7) を参照されたい。オリゴ糖類には、種々の炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (G l c N A c)、ガラクトース、及びシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖類構造の「ステム」においてG l c N A cに結合したフコースが含まれ得る。いくつかの実施形態において、本発明の抗体におけるオリゴ糖の修飾は、ある特定の特性が改善された抗体変異形を作成するために行われてもよい。

20

【0216】

一実施形態において、F c領域に (直接的にまたは間接的に) 結合されるフコースを欠いた炭水化物構造を有する、抗体変異形が提供される。例えば、かかる抗体におけるフコースの量は、1% ~ 80%、1% ~ 65%、5% ~ 65%、または20% ~ 40%であってもよい。フコースの量は、例えば、W O 2 0 0 8 / 0 7 7 5 4 6 に記載されるように、M A L D I - T O F 質量分析法によって測定される、A s n 2 9 7に結合した全ての糖鎖構造 (例えば、複合体、ハイブリッド、及び高マンノース構造) の合計と比較した、A s n 2 9 7における糖鎖内のフコースの平均量を算出することによって決定される。A s n 2 9 7は、F c領域における約297位 (F c領域残基のE u付番) に位置するアスパラギン残基を指すが、A s n 2 9 7はまた、抗体での配列変異が小規模であることに起因して、297位から約±3アミノ酸上流または下流、すなわち、294位~300位の間にも位置する場合がある。かかるフコシル化変異形では、A D C C機能が改善され得る。例えば、米国特許公開第U S 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8号 (P r e s t a , L .)、同第U S 2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1号 (K y o w a H a k k o K o g y o C o . , L t d) を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異形に関連する刊行物の例としては、U S 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8、W O 2 0 0 0 / 6 1 7 3 9、W O 2 0 0 1 / 2 9 2 4 6、U S 2 0 0 3 / 0 1 1 5 6 1 4、U S 2 0 0 2 / 0 1 6 4 3 2 8、U S 2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1、U S 2 0 0 4 / 0 1 3 2 1 4 0、U S 2 0 0 4 / 0 1 1 0 7 0 4、U S 2 0 0 4 / 0 1 1 0 2 8 2、U S 2 0 0 4 / 0 1 0 9 8 6 5、W O 2 0 0 3 / 0 8 5 1 1 9、W O 2 0 0 3 / 0 8 4 5 7 0、W O 2 0 0 5 / 0 3 5 5 8 6、W O 2 0 0 5 / 0 3 5 7 7 8、W O 2 0 0 5 / 0 5 3 7 4 2、W O 2 0 0 2 / 0 3 1 1 4 0、O k a z a k i e t a l . J . M o l . B i o l . 3 3 6 : 1 2 3 9 - 1 2 4 9 (2 0 0 4)、Y a m a n e - O h n u k i e t a l . B i o t e c h . B i o e n g . 8 7 : 6 1 4 (2 0 0 4) が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生することが可能な細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損したL e c 1 3 C H O細胞 (R i p k a e t a l . A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s . 2 4 9 : 5 3 3 - 5 4 5 (1 9 8 6)、米国特許出願第U S 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8 A 1号 (P r e s t a , L)、及びW O 2 0 0 4 / 0 5 6 3 1 2 A 1 (A d a m s ら) (特に実施例11))、及び - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、F U T 8、ノックアウトC H O細胞等のノックアウト細胞株 (例えば、Y a m a n e - O h n u k i e t a l . B i o t e c h .

30

40

50

Bioeng. 87:614(2004)、Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688(2006)、及びWO2003/085107を参照されたい)が挙げられる。

【0217】

例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖類がGlcNAcによって二分される、二分されたオリゴ糖類を有する抗体変異形がさらに提供される。かかる抗体変異形では、フコシル化が低減され、かつ/またはADCC機能が改善され得る。かかる抗体変異形の例は、例えば、WO2003/011878(Jean-Mairetら)、米国特許第6,602,684号(Umanaら)、及びUS2005/0123546(Umanaら)に記載される。Fc領域に結合したオリゴ糖類において少なくとも1個のガラクトース残基を有する、抗体変異形もまた提供される。かかる抗体変異形では、CDC機能が改善され得る。かかる抗体変異形は、例えば、WO1997/30087(Patelら)、WO1998/58964(Raju, S.)、及びWO1999/22764(Raju, S.)に記載される。

【0218】

c) Fc領域変異形

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体のFc領域に導入され、それによってFc領域変異形を生成してもよい。Fc領域変異形は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾(例えば、置換)を含む、ヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域)を含んでもよい。

【0219】

ある特定の実施形態において、本発明は、いくつかのエフェクター機能を保有するが、全てのエフェクター機能は保有するわけではなく、それにより、*in vivo*の抗体の半減期が重要であるが、なおもある特定のエフェクター機能(補体及びADCC等)が不必要であるかまたは有害である場合の適用に対する望ましい候補となる、抗体変異形を企図する。*in vitro*及び/または*in vivo*の細胞傷害性アッセイを実行して、CDC及び/またはADCC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、抗体が確実に、FcR結合を欠く(よって、ADCC活性を欠いている可能性が高い)がFcRn結合能力を保持するように、Fc受容体(FcR)結合アッセイを実行することができる。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、Fc(RIIIのみを発現するが、一方で単球は、Fc(RI、Fc(RII及びFc(RIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991)の464ページ、表3に要約される。目的の分子のADCC活性を評価するための*in vitro*アッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号(例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063(1986)を参照されたい)及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502(1985)、同第5,821,337号(Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361(1987)を参照されたい)に記載される。代替的に、非放射性アッセイ法が用いられてもよい(例えば、フローサイトメトリーのためのACTI(商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mounta in View, CA、及びCytotox 96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照されたい。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。代替的に、または追加的に、目的の分子のADCC活性は、*in vivo*で、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656(1998)に開示されるもの等の動物モデルにおいて、評価されてもよい。また、C1q結合アッセイをまた行って、抗体がC1qに結合不可能

10

20

30

40

50

であり、したがってCDC活性を欠いていることを確認してもよい。例えば、WO2006/02987及びWO2005/100402におけるC1q及びC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい(例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163(1996)、Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052(2003)、及びCragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743(2004)を参照されたい)。FcRn結合及びin vivoクリアランス/半減期決定もまた、当該技術分野で既知の方法を使用して行うことができる(例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006)を参照されたい)。

10

【0220】

いくつかの実施形態において、新生児Fc受容体へのIgG結合を増加させるために、1つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体のFc部分に導入されてもよい。ある特定の実施形態において、本抗体は、EU付番に従う以下の3つの突然変異、すなわちM252Y、S254T、及びT256E(「YTE突然変異」を含む(米国特許第8,697,650号、Dall'Acqua et al., Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524(2006)も参照されたい)。ある特定の実施形態において、YTE突然変異は、抗体がその同族抗原に結合する能力に影響を及ぼさない。ある特定の実施形態において、YTE突然変異は、抗体の血清半減期を、天然(すなわち、非YTE突然変異体)抗体と比較して増加させる。いくつかの実施形態において、YTE突然変異は、抗体の血清半減期を、天然(すなわち、非YTE突然変異体)抗体と比較して3倍増加させる。いくつかの実施形態において、YTE突然変異は、抗体の血清半減期を、天然(すなわち、非YTE突然変異体)抗体と比較して2倍増加させる。いくつかの実施形態において、YTE突然変異は、抗体の血清半減期を、天然(すなわち、非YTE突然変異体)抗体と比較して4倍増加させる。いくつかの実施形態において、YTE突然変異は、抗体の血清半減期を、天然(すなわち、非YTE突然変異体)抗体と比較して少なくとも5倍増加させる。いくつかの実施形態において、YTE突然変異は、抗体の血清半減期を、天然(すなわち、非YTE突然変異体)抗体と比較して少なくとも10倍増加させる。例えば、米国特許第8,697,650号を参照されたい。またDall'Acqua et al., Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524(2006)も参照されたい。

20

30

【0221】

ある特定の実施形態において、YTE突然変異体は、抗体の抗体依存的細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)活性を調節する手段を提供する。ある特定の実施形態において、YTE突然変異体は、ヒト抗原を対象とするヒト化IgG抗体のADCC活性を調節する手段を提供する。例えば、米国特許第8,697,650号を参照されたい。またDall'Acqua et al., Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524(2006)も参照されたい。

40

【0222】

ある特定の実施形態において、YTE突然変異体は、血清半減期、組織分布、及び抗体活性(例えば、IgG抗体のADCC活性)の同時調節を可能にする。例えば、米国特許第8,697,650号を参照されたい。またDall'Acqua et al., Journal of Biological Chemistry 281(33):23514-23524(2006)も参照されたい。

【0223】

エフェクター機能が低下した抗体には、EU付番に従うFc領域残基238、265、269、270、297、327、及び329のうちの1つ以上の置換を有するものが含まれる(米国特許第6,737,056号)。かかるFc突然変異体には、EU付番に従

50

うアラニンへの残基 265 及び 297 の置換（すなわち、EU 付番に従う D265A 及び N297A）を有する、いわゆる「DANA」Fc 突然変異体を含む、EU 付番に従うアミノ酸位置 265、269、270、297、及び 327 のうちの 2 つ以上において置換を有する Fc 突然変異体が含まれる（米国特許第 7,332,581 号）。ある特定の実施形態において、Fc 突然変異体は、以下の 2 つのアミノ酸置換、すなわち D265A 及び N297A を含む。ある特定の実施形態において、Fc 突然変異体は、以下の 2 つのアミノ酸置換、すなわち D265A 及び N297A からなる。

【0224】

ある特定の実施形態において、野生型ヒト Fc 領域の 329 位（EU 付番）（P329）におけるプロリンは、グリシンもしくはアルギニン、または Fc の P329 と FcγRIII のトリプトファン残基 W87 及び W110 との間に形成される Fc/Fc 受容体界面内でプロリンサンドイッチを破壊するのに十分に大きいアミノ酸残基で置換される（Sondermann et al.: Nature 406, 267-273 (20 July 2000)）。さらなる実施形態において、Fc 変異形内の少なくとも 1 つのさらなるアミノ酸置換は、S228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D、または P331S であり、さらに別の実施形態において、該少なくとも 1 つのさらなるアミノ酸置換は、ヒト IgG1 Fc 領域の L234A 及び L235A、またはヒト IgG4 Fc 領域の S228P 及び L235E である。これらは全て、EU 付番に従うものである（米国特許第 8,969,526 号、参照によりその全体が組み込まれる）。

【0225】

ある特定の実施形態において、ポリペプチドは、野生型ヒト IgG Fc 領域の Fc 変異形を含み、このポリペプチドは、グリシンで置換されたヒト IgG Fc 領域の P329 を有し、Fc 変異形は、ヒト IgG1 Fc 領域の L234A 及び L235A、またはヒト IgG4 Fc 領域の S228P 及び L235E において少なくとも 2 つのさらなるアミノ酸置換を含み、残基は、EU 付番に従って付番される（米国特許第 8,969,526 号、参照によりその全体が組み込まれる）。ある特定の実施形態において、P329G、L234A、及び L235A（EU 付番）置換を含むポリペプチドでは、野生型ヒト IgG Fc 領域を含むポリペプチドにより ADCC が少なくともその 20% に下方調節される場合、及び/または ADCP が下方調節される場合は、ヒト FcγRIIIA 及び FcγRIIA に対する親和性の低下が示される（米国特許第 8,969,526 号、参照によりその全体が組み込まれる）。

【0226】

特定の実施形態において、野生型ヒト Fc ポリペプチドの Fc 変異形を含むポリペプチドは、三重突然変異、EU 付番（P329/LALA）に従い Pro329、L234A、及び L235A 位にアミノ酸置換を含む（米国特許第 8,969,526 号、参照によりその全体が組み込まれる）。特定の実施形態において、ポリペプチドは、以下のアミノ酸置換、すなわち、EU 付番に従い P329G、L234A、及び L235A を含む。

【0227】

FcR へ結合が改善されたまたは減少したある特定の抗体変異形が記載される。（例えば、米国特許第 6,737,056 号、WO2004/056312 号、及び Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) を参照されたい。）

【0228】

ある特定の実施形態において、抗体変異形は、ADCC を改善する 1 つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc 領域の 298、333、及び/または 334 位（EU 付番）における置換を有する Fc 領域を含む。

【0229】

いくつかの実施形態において、例えば、米国特許第 6,194,551 号、WO99/51642、及び Idusogie et al. J. Immunol. 164: 417

10

20

30

40

50

8 - 4 1 8 4 (2 0 0 0) に記載されるように、C 1 q 結合及び/または補体依存性細胞傷害性 (C D C) の改変 (改善または減少のいずれか) をもたらず改変が、F c 領域においてなされる。

【 0 2 3 0 】

母体 I g G の胎児への移入に関与する、半減期が増加しかつ新生児型 F c 受容体 (F c R n) への結合が改善された抗体 (G u y e r e t a l . , J . I m m u n o l . 1 1 7 : 5 8 7 (1 9 7 6) 及び K i m e t a l . , J . I m m u n o l . 2 4 : 2 4 9 (1 9 9 4)) が、U S 2 0 0 5 / 0 0 1 4 9 3 4 A 1 (H i n t o n ら) に記載される。それらの抗体は、F c R n への F c 領域の結合を改善する、1 つ以上の置換を内部に有する F c 領域を含む。かかる F c 変異形には、F c 領域残基 : 2 3 8 、 2 5 6 、 2 6 5 、 2 7 2 、 2 8 6 、 3 0 3 、 3 0 5 、 3 0 7 、 3 1 1 、 3 1 2 、 3 1 7 、 3 4 0 、 3 5 6 、 3 6 0 、 3 6 2 、 3 7 6 、 3 7 8 、 3 8 0 、 3 8 2 、 4 1 3 、 4 2 4 、または 4 3 4 のうちの 1 つ以上における置換、例えば、E U 付番に従う F c 領域残基 4 3 4 の置換 (米国特許第 7 、 3 7 1 、 8 2 6 号) を有するものが含まれる。また、F c 領域変異形の他の例に関して、D u n c a n & W i n t e r , N a t u r e 3 2 2 : 7 3 8 - 4 0 (1 9 8 8) 、米国特許第 5 , 6 4 8 , 2 6 0 号、米国特許第 5 , 6 2 4 , 8 2 1 号、及び W O 9 4 / 2 9 3 5 1 も参照されたい。

10

【 0 2 3 1 】

d) シス테인操作された抗体変異形

ある特定の実施形態において、抗体の 1 つ以上の残基がシス테인残基で置換されている、シス테인操作された抗体、例えば、「T H I O M A B (商標) 抗体」を作成することが望ましい場合がある。特定の実施形態において、置換された残基は、抗体の採取可能な部位で発生する。それらの残基をシス테인で置換することによって、反応性のチオール基は、抗体の利用可能な部位に位置付けられ、それを使用して、抗体を、薬物部分またはリンカー - 薬物中間体等の他の部分にコンジュゲートして、本明細書にさらに記載される、免疫複合体を作成してもよい。ある特定の実施形態において、次の残基、すなわち軽鎖の V 2 0 5 (K a b a t 付番) 、重鎖の A 1 4 0 (E U 付番) 、重鎖の L 1 7 4 (E U 付番) 、重鎖の Y 3 7 3 (E U 付番) 、軽鎖の K 1 4 9 (K a b a t 付番) 、重鎖の A 1 1 8 (E U 付番) 、及び重鎖 F c 領域の S 4 0 0 (E U 付番) のうちの任意の 1 個以上が、シス테인で置換されてもよい。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、H C - A 1 4 0 C (E U 付番) シス테인置換を含む。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、L C - K 1 4 9 C (K a b a t 付番) シス테인置換を含む。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、H C - A 1 1 8 C (E U 付番) シス테인置換を含む。シス테인操作された抗体は、例えば、米国特許第 7 , 5 2 1 , 5 4 1 号に記載されるように生成されてもよい。

20

30

【 0 2 3 2 】

ある特定の実施形態において、本抗体は、以下の重鎖シス테인置換のうちの 1 つを含む。

鎖 (H C / L C)	残基	E U突然変異部 位番号	K a b a t突然変 異部位番号
HC	T	1 1 4	1 1 0
HC	A	1 4 0	1 3 6
HC	L	1 7 4	1 7 0
HC	L	1 7 9	1 7 5
HC	T	1 8 7	1 8 3
HC	T	2 0 9	2 0 5
HC	V	2 6 2	2 5 8
HC	G	3 7 1	3 6 7
HC	Y	3 7 3	3 6 9
HC	E	3 8 2	3 7 8
HC	S	4 2 4	4 2 0
HC	N	4 3 4	4 3 0
HC	Q	4 3 8	4 3 4

10

【 0 2 3 3 】

20

ある特定の実施形態において、抗体は、以下の軽鎖システイン置換のうちの1つを含む。

鎖 (HC/ LC)	残基	E U突然変異部 位番号	K a b a t突然 変異部位番号
LC	I	1 0 6	1 0 6
LC	R	1 0 8	1 0 8
LC	R	1 4 2	1 4 2
LC	K	1 4 9	1 4 9

30

【 0 2 3 4 】

e) 抗体誘導体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、当該技術分野で既知であり、かつ容易に入手可能な、追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに修飾されてもよい。抗体の誘導体化に好適な部分には、水溶性ポリマーが含まれるが、これらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール (PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸 (ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストランまたはポリ (n-ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロプロピレン (propylene) グリコールホモポリマー、プロリプロピレン (polypropylene) オキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性に起因して、製造における利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量のものであってもよく、分岐していても非分岐であってもよい。抗体に結合したポリマーの数は、様々であってもよく、1つを超えるポリマーが結合される場合、それらは、同じ分子または異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/または種類は、改善対象の抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が規定の条件下で療法において

40

50

使用されるかどうか等を含むが、これらに限定されない考慮に基づいて決定することができる。

【0235】

別の実施形態において、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る、抗体及び非タンパク質性部分の複合体が提供される。一実施形態において、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブ (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600 - 11605 (2005)) である。Natl. Acad. Sci. 放射線は、任意の波長のものであってもよく、通常の細胞を害さないが、非タンパク質性部分を、抗体 - 非タンパク質性部分に近位の細胞が死滅させる温度まで加熱する波長が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0236】

B. 組み換え法及び組成物

抗体は、例えば、米国特許第 4,816,567 号に記載される組み換え法及び組成物を使用して産生されてもよい。一実施形態において、本明細書に記載される抗 C L L - 1 抗体をコードする単離核酸が提供される。かかる核酸は、抗体の V L を含むアミノ酸配列及び/または V H を含むアミノ酸配列 (例えば、抗体の軽鎖及び/または重鎖) をコードし得る。さらなる実施形態において、かかる核酸を含む 1 つ以上のベクター (例えば、発現ベクター) が提供される。さらなる実施形態において、かかる核酸を含む宿主細胞が提供される。1 つのかかる実施形態において、宿主細胞は、(1) 抗体の V L を含むアミノ酸配列及び抗体の V H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または (2) 抗体の V L を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第 1 のベクター、及び抗体の V H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第 2 のベクターを含む (例えば、それらで形質転換されている)。一実施形態において、宿主細胞は、真核性、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞またはリンパ系細胞 (例えば、Y 0、N S 0、S p 2 0 細胞) である。一実施形態において、抗 C L L - 1 抗体の作製方法が提供され、本方法は、上記抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に好適な条件下で培養することと、任意に、抗体を宿主細胞 (または宿主細胞培養地) から回収することを含む。

20

【0237】

抗 C L L - 1 抗体の組み換え産生のために、例えば、上述のもの等の、抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニング及び/または発現のために、1 つ以上のベクター中に挿入される。かかる核酸は、従来の手順を使用して (例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能である、オリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離されて配列決定され得る。

30

【0238】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞には、本明細書に記載される原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、特にグリコシル化及び F c エフェクター機能が必要とされない場合に、細菌において産生されてもよい。細菌における抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第 5,648,237 号、同第 5,789,199 号、及び同第 5,840,523 号を参照されたい。(また、大腸菌における抗体断片の発現について説明する Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245 - 254 も参照されたい)。発現後、抗体は、可溶性画分において細菌細胞ペーストから単離されてもよく、またさらに精製されてもよい。

40

【0239】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核微生物は、抗体をコードするベクターに好適なクローニングまたは発現宿主であり、それには、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、それによって部分的または完全ヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす、真菌及び酵母株が含まれる。Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409 - 1414 (2004)、及び Li et al., Nat. Biot

50

ech. 24: 210 - 215 (2006) を参照されたい。

【0240】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と併せて、特にヨトウガ細胞のトランスフェクションのために使用され得る、多数のバキュロウイルス株が特定されている。

【0241】

植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号（トランスジェニック植物において抗体を産生するためのPLANTIBODIES（商標）技術について説明している）を参照されたい。

【0242】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で成長するように適合される哺乳類細胞株が、有用であり得る。有用な哺乳類宿主細胞株の他の例としては、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7）、ヒト胚性腎臓株（例えば、Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977) に記載される293または293細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）、マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, Biol. Reprod. 23: 243 - 251 (1980) に記載されるTM4細胞）、サル腎臓細胞（CV1）、アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）、ヒト子宮頸癌細胞（HELA）、イヌ腎臓細胞（MDCK）、バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A）、ヒト肺細胞（W138）、ヒト肝癌細胞（Hep G2）、マウス乳腺腫瘍（MMT 060562）、例えば、Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44 - 68 (1982) に記載されるTRI細胞、MRC 5細胞、及びFS4細胞がある。他の有用な哺乳類宿主細胞株には、DHFR-CHO細胞（Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980) を含む、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ならびにY0、NS0、及びSp2/0等の骨髓腫細胞株が含まれる。Natl. Acad. Sci. 抗体産生に好適なある特定の哺乳類宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255 - 268 (2003) を参照されたい。

【0243】

C. アッセイ

本明細書に提供される抗CLL-1抗体は、それらの物理/化学特性及び/または生物活性について、当該技術分野で既知の種々のアッセイによって、特定され、スクリーニングされ、または特徴付けられてもよい。

【0244】

一態様において、本発明の抗体は、その抗原結合活性について、例えば、ELISA、BIACore（登録商標）、FACS、またはウェスタンブロット等の既知の方法によって試験される。

【0245】

別の態様において、競合アッセイを使用して、CLL-1への結合について本明細書に記載される抗体のいずれかと競合する抗体を特定してもよい。ある特定の実施形態において、かかる競合抗体は、本明細書に記載される抗体によって結合される、同じエピトープ（例えば、直線状または立体配座エピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的方法は、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, N

J) に提供される。

【0246】

例示的な競合アッセイにおいて、固定化されたCLL-1は、CLL-1に結合する第1の標識抗体（例えば、本明細書に記載される抗体のいずれか）、及びCLL-1への結合について第1の抗体と競合するその能力について試験されている第2の未標識抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定化されたCLL-1が、第1の標識抗体を含むが、第2の未標識抗体を含まない溶液中でインキュベートされる。CLL-1への第1の抗体の結合を許容する条件下でのインキュベーション後、過剰な非結合抗体が除去され、固定化されたCLL-1に関連する標識の量が測定される。固定化されたCLL-1に関連する標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に低減される場合、それは、第2の抗体がCLL-1への結合について第1の抗体と競合していることを示す。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照されたい。

10

【0247】

D. 免疫複合体

本発明はまた、化学療法剤もしくは化学療法薬、成長阻害性薬剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはそれらの断片）、または放射性同位体（すなわち、放射性物質複合体（radioconjugate））等の、1つ以上の細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる、本明細書における抗CLL-1抗体を含む免疫複合体も提供する。

20

【0248】

免疫複合体によって、腫瘍への薬物部分の送達を標的とすることが可能となり、いくつかの実施形態においては、コンジュゲートされていない薬物を全身投与することにより、正常な細胞にとって許容できないレベルの毒性がもたされ得る場合に、その中の細胞内蓄積が可能となる（Polakis P. (2005) Current Opinion in Pharmacology 5: 382-387）。

【0249】

抗体-薬物複合体（ADC）は、強力な細胞傷害性薬物の標的を抗原発現腫瘍細胞にして（Teicher, B. A. (2009) Current Cancer Drug Targets 9: 982-1004）、それによって、有効性を最大化してオフターゲット毒性を最小化することにより治療指数を増強することで、抗体及び細胞傷害性薬物の両方の特性を併せ持つ標的的化学療法分子である（Carter, P. J. and Senter P. D. (2008) The Cancer Jour. 14 (3): 154-169、Chari, R. V. (2008) Acc. Chem. Res. 41: 98-107）。

30

【0250】

本発明のADC化合物には、抗癌活性を有するものが含まれる。いくつかの実施形態において、ADC化合物には、薬物部分にコンジュゲートされた、すなわち、共有結合された抗体が含まれる。いくつかの実施形態において、本抗体は、リンカーによって薬物部分に共有結合される。本発明の抗体-薬物複合体（ADC）は、有効量の薬物を腫瘍組織に選択的に送達し、それによって、治療指数（「治療濃度域」）を増加させながら、より高い選択性、すなわちより低い効果的用量が、達成され得る。

40

【0251】

抗体-薬物複合体（ADC）の薬物部分（D）は、細胞傷害性効果または細胞静止効果を有する任意の化合物、部分、または基を含んでもよい。薬物部分は、チューブリン結合、DNA結合またはインターカレーション、ならびにRNAポリメラーゼ、タンパク質合成、及び/またはトポイソメラーゼの阻害を含むが、これらに限定されない機序によって、それらの細胞傷害性効果及び細胞静止効果を付与し得る。例示的な薬物部分には、マイ

50

タンシノイド、ドラスタチン、オーリスタチン、カリケアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン (PBD)、ネモルピシン及びその誘導体、PNU-159682、アントラサイクリン、デュオカルマイシン、ピンカアルカロイド、タキサン、トリコテセン、CC1065、カンプトテシン、エリナフィド、ならびに細胞傷害活性を有するそれらの立体異性体、イソスター (isosteres)、類似体、及び誘導体が含まれるが、これらに限定されない。かかる免疫複合体の非限定的な例が、以下でさらに詳細に考察される。

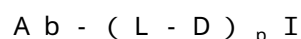
【0252】

1. 例示的な抗体 - 薬物複合体

抗体 - 薬物複合体 (ADC) 化合物の例示的な実施形態は、腫瘍細胞を標的とする抗体 (Ab)、薬物部分 (D)、及び Ab を D に結合させるリンカー部分 (L) を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、リジン及び / またはシステイン等の 1 個以上のアミノ酸残基によって、リンカー部分 (L) に結合される。

【0253】

例示的な ADC は、式 I :



を有し、式中、p は、1 ~ 約 20 である。いくつかの実施形態において、抗体にコンジュゲートされ得る薬物部分の数は、遊離システイン残基の数によって限定される。いくつかの実施形態において、遊離システイン残基は、本明細書に記載される方法によって抗体アミノ酸配列中に導入される。式 I の例示的な ADC には、1、2、3、または 4 個の操作されたシステインアミノ酸を有する抗体が含まれるが、これらに限定されない (Lyons, R. et al (2012) *Methods in Enzymol.* 502: 123-138)。いくつかの実施形態において、1 個以上の遊離システイン残基が、操作を使用することなく、抗体においてすでに存在しており、その場合、既存の遊離システイン残基を使用して、抗体を薬物にコンジュゲートしてもよい。いくつかの実施形態において、抗体は、1 個以上の遊離システイン残基を生成するために、抗体のコンジュゲート前に還元条件に曝露される。

【0254】

a) 例示的なリンカー

「リンカー」(L) は、1 個以上の薬物部分 (D) を抗体 (Ab) に連結させて、式 I の抗体 - 薬物複合体 (ADC) を形成させるために使用することができる、二機能性または多機能性部分である。いくつかの実施形態において、抗体 - 薬物複合体 (ADC) は、薬物に及び抗体に共有結合するための反応性官能基を有するリンカーを使用して調製することができる。例えば、いくつかの実施形態において、抗体の (Ab) システインチオールは、リンカーの反応性官能基または薬物 - リンカー中間体との結合を形成して、ADC を作製することができる。

【0255】

一態様において、リンカーは、抗体上に存在する遊離システインと反応して共有結合を形成することが可能である官能性を有する。かかる反応性官能基の非限定的な例には、マレイミド、ハロアセトアミド、 α -ハロアセチル、コハク酸イミドエステル、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等の活性化エステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアン酸塩、及びイソチオシアン酸塩が含まれる。例えば、Klussman, et al (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4): 765-773 の 766 ページにおけるコンジュゲート方法、及びその中の実施例を参照されたい。

【0256】

いくつかの実施形態において、リンカーは、抗体上に存在する求電子基と反応することが可能である官能性を有する。かかる求電子基の例には、アルデヒド基及びケトンカルボニル基が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、リンカーの反応性官能基のヘテロ原子が、抗体上の求電子基と反応して抗体単位との共有結合を形成することができる。かかる反応性官能基の非限定的な例には、ヒドラジド、オキシム、ア

ミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸塩、及びアリールヒドラジドが含まれるが、これらに限定されない。

【0257】

リンカーは、1つ以上のリンカー構成要素を含んでもよい。例示的なリンカー構成要素には、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」または「vc」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-コハク酸イミジル4-(4-ピリジルチオ)ペンタン酸塩(「SPP」)、及び2-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボン酸塩(「MCC」)が含まれる。種々のリンカー構成要素が当該技術分野で知られており、このうちのいくつかは以下に記載される。

10

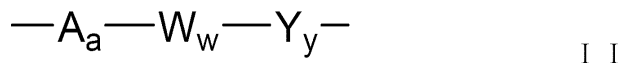
【0258】

リンカーは、薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であってもよい。切断可能なリンカーの非限定的な例には、酸不安定性リンカー(例えば、ヒドラゾンを含む)、プロテアーゼ感受性(例えば、ペプチダーゼ感受性)リンカー、感光性リンカー、またはジスルフィド含有リンカー(Chari et al., Cancer Research 52:127-131(1992)、米国公開特許第5208020号)が含まれる。

【0259】

ある特定の実施形態において、リンカーは、次の式II:

20

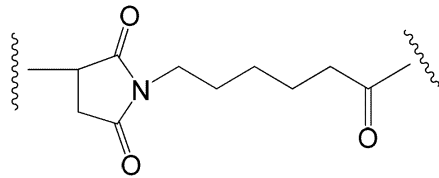


を有し、式中、Aは、「ストレッチャー(stretcher)単位」であり、aは、0～1の整数であり、Wは、「アミノ酸単位」であり、wは、0～12の整数であり、Yは「スペーサ単位」であり、yは、0、0、または2であり、Ab、D、及びpは上記式Iで定義されるものである。かかるリンカーの例示的な実施形態は、米国特許第7,498,298号に記載され、それは参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

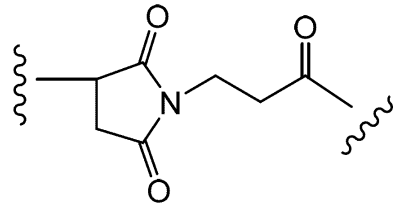
【0260】

いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、抗体を別のリンカー構成要素にまたは薬物部分に連結させる「ストレッチャー単位」を含む。ストレッチャー単位の比限定的な例が以下に示される(ここで波線は、抗体、薬物、または追加のリンカー構成要素への共有結合の部位を示す)。

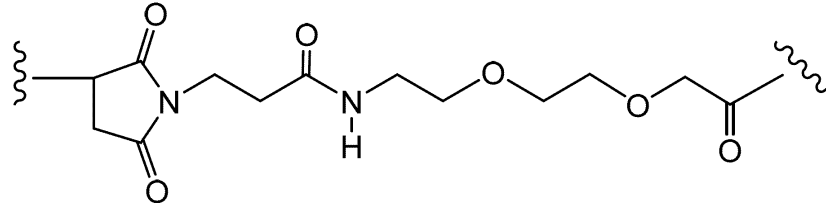
30



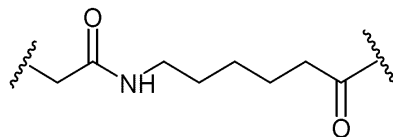
MC



MP



m P E G



【 0 2 6 1 】

いくつかの実施形態において、リンカーは、WO 2 0 1 5 / 0 9 5 2 2 7、WO 2 0 1 5 / 0 9 5 1 2 4、またはWO 2 0 1 5 / 0 9 5 2 2 3に記載されるもの等のペプチド模倣体リンカーであってもよく、これらの文書は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 2 6 2 】

いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、「アミノ酸単位」を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸単位は、プロテアーゼによるリンカーの切断を可能にし、それによって、リソソーム酵素等の細胞内プロテアーゼへの曝露時に免疫複合体から薬物が容易に放出される (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21: 778 - 784)。例示的なアミノ酸単位には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、及びペンタペプチドが含まれるが、これらに限定されない。例示的なジペプチドには、バリン - シトルリン (v c または v a l - c i t)、アラニン - フェニルアラニン (a f または a l a - p h e)、フェニルアラニン - リジン (f k または p h e - l y s)、フェニルアラニン - ホモリジン (p h e - h o m o l y s)、及び N - メチル - バリン - シトルリン (M e - v a l - c i t) が含まれるが、これらに限定されない。例示的なトリペプチドには、グリシン - バリン - シトルリン (g l y - v a l - c i t) 及びグリシン - グリシン - グリシン (g l y - g l y - g l y) が含まれるが、これらに限定されない。アミノ酸単位は、自然発生アミノ酸残基、及び/または微量アミノ酸、及び/またはシトルリン等の非自然発生アミノ酸類似体を含んでもよい。アミノ酸単位は、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシン B、C、及び D、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断のために設計して最適化することができる。

【 0 2 6 3 】

いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、直接、またはストレッチャー単位及び/もしくはアミノ酸単位によって、抗体を薬物部分に連結する、「スペーサ」単位を含む。スペーサ単位は、「自己犠牲型 (s e l f - i m m o l a t i v e)」または「非自己犠牲型」であり得る。「非自己犠牲型」スペーサ単位は、ADCの切断時にスペーサ単位の一部または全てが薬物部分に結合した状態に保持されているものである。非自己犠

10

20

30

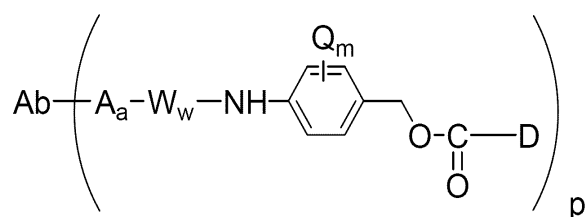
40

50

性型スペーサ単位の例としては、グリシンスペーサ単位及びグリシン - グリシンスペーサ単位が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、腫瘍細胞関連プロテアーゼによる、グリシン - グリシンスペーサ単位を含有するADCの酵素的切断によって、ADCの残りの部分からグリシン - グリシン - 薬物部分が放出する。いくつかのかかる実施形態において、グリシン - グリシン - 薬物部分に対して、腫瘍細胞内で加水分解ステップを行い、その結果グリシン - グリシンスペーサ単位を薬物部分から切断する。

【0264】

「自己犠牲型」スペーサ単位は、薬物部分の放出を可能にする。ある特定の実施形態において、リンカーのスペーサ単位は、p - アミノベンジル単位を含む。いくつかのかかる実施形態において、p - アミノベンジルアルコールは、アミド結合によってアミノ酸単位に結合し、カルバミン酸塩、メチルカルバミン酸塩、または炭酸塩が、ベンジルアルコールと薬物との間に作製される (Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103)。いくつかの実施形態において、スペーサ単位は、p - アミノベンジルオキシカルボニル (PAB) である。いくつかの実施形態において、自己犠牲型リンカーを含むADCは、構造：



を有し、式中、Qは、-C₁~C₈アルキル、-O-(C₁~C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、または-シアノであり、mは、0~4範囲の整数であり、pは、1~約20の範囲である。いくつかの実施形態において、pは、1~10、1~7、1~5、または1~4の範囲である。

【0265】

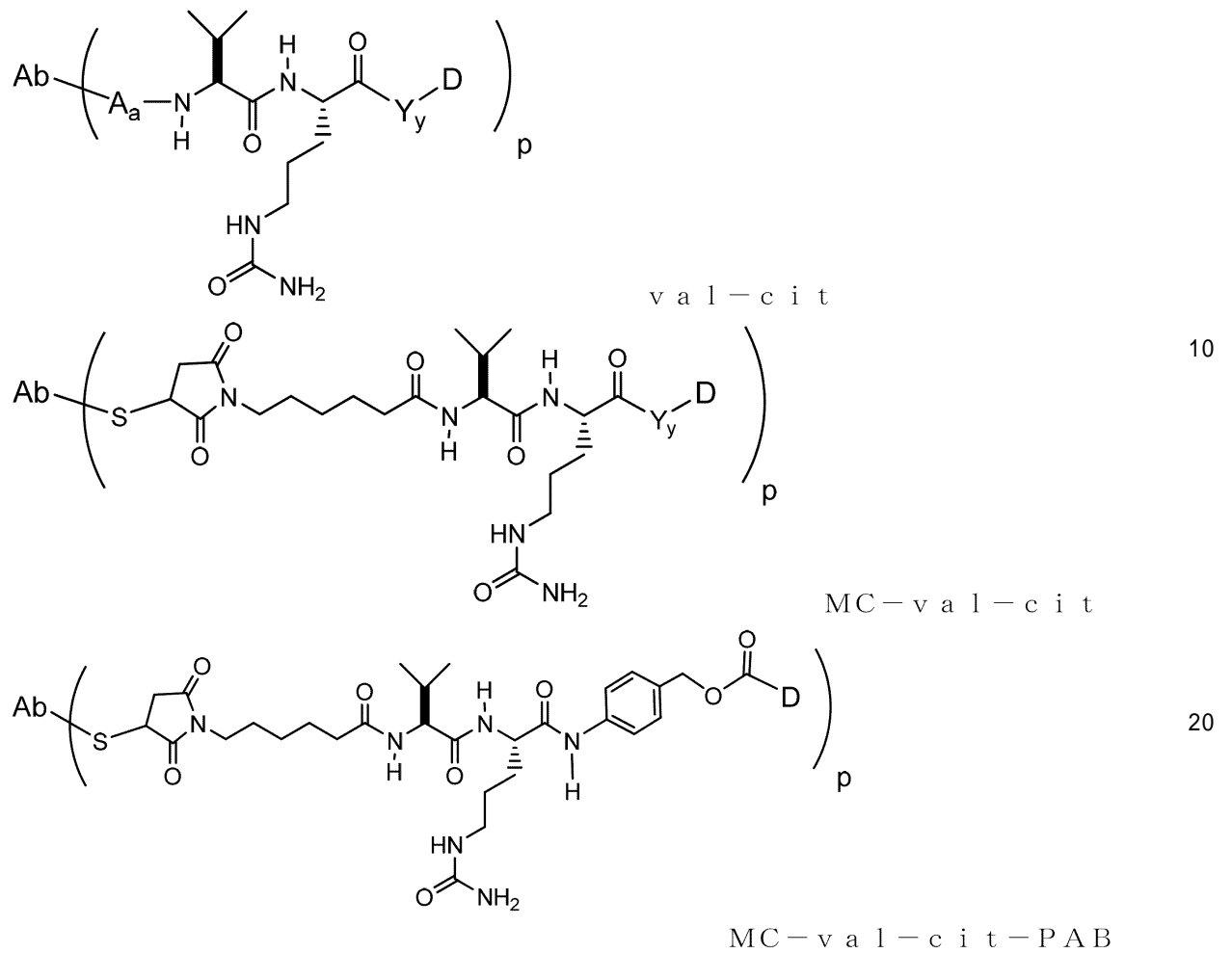
自己犠牲型スペーサの他の例としては、2 - アミノイミダゾール - 5 - メタノール誘導体等の、PAB基と電子的に同様である芳香族化合物 (米国特許第7,375,078号、Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) 及びオルト - またはパラ - アミノベンジルアセタールが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、置換及び非置換4 - アミノ酪酸アミド (Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2:223)、適切に置換されたピシクロ[2.2.1]及びピシクロ[2.2.2]環系 (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) 等の、アミド結合加水分解時に環化を経るスペーサを使用することができる。グリシン残基の - 炭素への薬物の結合は、ADCにおいて有用であり得る自己犠牲型スペーサの別の例である (Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27:1447)。

【0266】

いくつかの実施形態において、リンカーLは、分岐する多機能性リンカー部分を介して1超の薬物部分が抗体に共有結合するための樹状型リンカーであり得る (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215、Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹状リンカーは、ADCの効力に関連する、薬物対抗体のモル比、すなわち、負荷を増加させることができる。したがって、抗体が1個のみの反応性システインチオール基を有する場合、多数の薬物部分が、樹状リンカーを介して結合され得る。

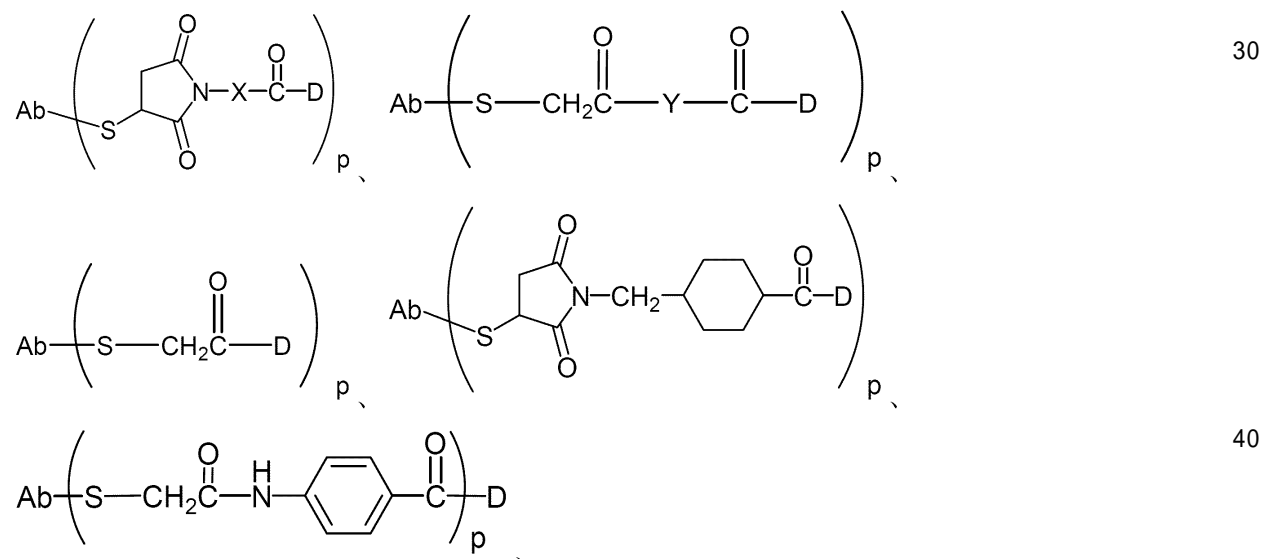
【0267】

リンカーの非限定的な例は、式IのADCの関連において以下に示される：

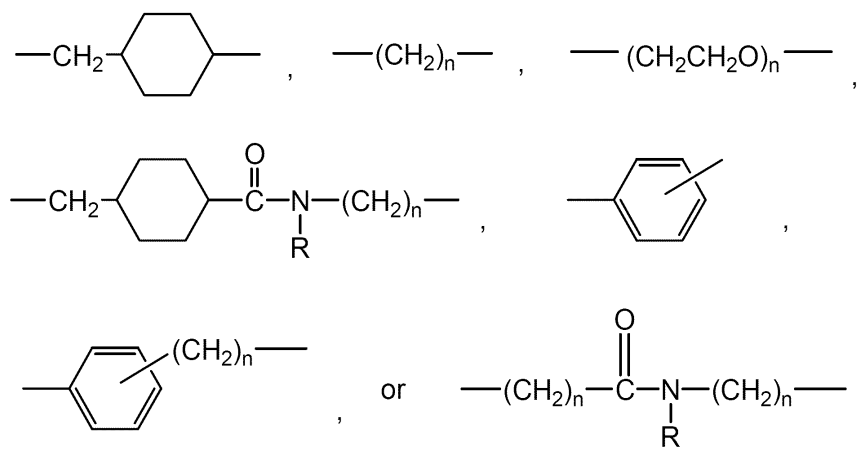


【0268】

A D C のさらなる非限定的例には、次の構造：

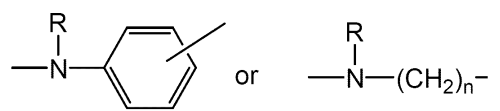


(式中、Xは、



10

であり、Yは、



各Rは独立して、HまたはC₁ - ~ C₆ アルキルであり、nは、6 ~ 12である)が含まれる。

20

【0269】

典型的に、ペプチド型リンカーは、2つ以上のアミノ酸及び/またはペプチド断片の間に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。かかるペプチド結合は、例えば、液相合成法に従って調製することができる(例えば、E. Schröder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76 - 136, Academic Press)。

【0270】

いくつかの実施形態において、リンカーは、溶解性及び/または反応性を調節する基で置換される。非限定的な例として、スルホン酸塩(-SO₃⁻)またはアンモニウム等の荷電置換基は、リンカー試薬の水溶性を増加させ、抗体及び/もしくは薬物部分とのリンカー試薬のカップリング反応を促進し得るか、またはADCを調製するために用いられる合成経路に応じて、DとのAb-L(抗体-リンカー中間体)とのカップリング反応、もしくはAbとのD-L(薬物-リンカー中間体)とのカップリング反応を促進し得る。いくつかの実施形態において、リンカーの一部が抗体にカップリングされ、リンカーの一部が薬物にカップリングされ、次いでAb-(リンカー部分)^aが薬物-(リンカー部分)^bにカップリングされて、式IのADCが形成される。いくつかのかかる実施形態において、本抗体は、1つを超える薬物が式IのADCにおいて抗体にカップリングされるように、1つを超える(リンカー部分)^a置換基を含む。

30

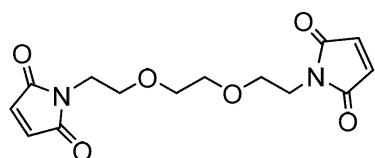
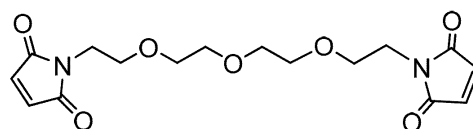
【0271】

本発明の化合物は、次のリンカー試薬、すなわちビス-マレイミド-トリオキシエチレングリコール(BMPEO)、N-(--- マレイミドプロピルオキシ)-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(BMPSE)、N-(--- マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミドエステル(EMCS)、N-[--- マレイミドブチリルオキシ]コハク酸イミドエステル(GMBS)、1,6-ヘキサン-ビス-ビニルスルホン(HBVS)、コハク酸イミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロン酸塩)(LC-SMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(MBS)、4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド(MPBH)、コハク酸イミジル3-(プロモアセトアミド)プロピオン酸塩(SBAP)、コハク酸イミジルヨード酢酸塩(SIA)、コハク酸イミジル(4-ヨードアセチル)アミノ安息香酸塩(SIAB)、N-コハク酸イミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プ

40

50

ロピオン酸塩 (SPDP)、N-コハク酸イミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタン酸塩 (SPP)、コハク酸イミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩 (SMCC)、コハク酸イミジル4-(p-マレイミドフェニル)酪酸塩 (SMPB)、コハク酸イミジル6-[(-マレイミドプロピオンアミド)ヘキサン酸塩] (SMPH)、イミノチオラン (IT)、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、ならびにコハク酸イミジル-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩 (SVSB)で、また次のビス-マレイミド試薬、すなわちジチオビスマレイミドエタン (DTME)、1,4-ビスマレイミドブタン (BMB)、1,4-ビスマレイミジル-2,3-ジヒドロキシブタン (BMDB)、ビスマレイミドヘキサン (BMH)、ビスマレイミドエタン (BMOE)、BM(PEG)₂ (以下に示される)、及びBM(PEG)₃ (以下に示される)、イミドエステル of 二機能性誘導体 (アジブイミド酸ジメチルHC1等)、活性エステル (スベリン酸ジスクシンイミジル等)、アルデヒド (グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物 (ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (ビス-(p-ジアゾニウムンゾイル等)-エチレンジアミン)、ジイソシアン酸塩 (トルエン2,6-ジイソシアン酸塩等)、及びビス活性フッ素化合物 (1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)で調製されるADCを明示的に企図するが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ビス-マレイミド試薬は、抗体内のシステインのチオール基の、チオール含有薬物部分、リンカー、またはリンカー-薬物中間体への結合を可能にする。チオール基と反応性である他の官能基には、ヨードアセトアミド、ブromoアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアン酸塩、及びイソチオシアン酸塩が含まれるが、これらに限定されない。

BM(PEG)₂BM(PEG)₃

【0272】

ある特定の有用なリンカー試薬は、Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL), Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO)等の、種々の商業的供給源から得るか、または当該技術分野において、例えば、Toki et al (2002) J. Org. Chem. USA 97:829-834、Dubowchik et al 67:1866-1872、Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60、Walker, M. A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355、Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186、US6214345、WO02/088172、US2003130189、US2003096743、WO03/026577、WO03/043583、及びWO04/032828に記載される手順に従って合成することができる。

【0273】

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を抗体にコンジュゲートさせるための、例示的なキレート剤である。例えば、WO94/11026を参照されたい。

【0274】

b) 例示的な薬物部分

(1) マイタイシン及びマイタンシノイド

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、1つ以上のマイタンシノイド分子にコン

ジュゲートされた抗体を含む。マイタンシノイドは、マイタンシンの誘導体であり、チューブリン重合化を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。マイタンシンは、東アフリカ低木メイテナス・セラタ (east African shrub *Maytenus serrata*) から最初に単離された (米国特許第 3 8 9 6 1 1 1 号)。その後、ある特定のマイクロブもまた、マイタンシノール及び C - 3 マイタンシノールエステル等のマイタンシノイドを産生することが発見された (米国特許第 4 , 1 5 1 , 0 4 2 号)。合成マイタンシノイドは、例えば、米国特許第 4 , 1 3 7 , 2 3 0 号、同第 4 , 2 4 8 , 8 7 0 号、同第 4 , 2 5 6 , 7 4 6 号、同第 4 , 2 6 0 , 6 0 8 号、同第 4 , 2 6 5 , 8 1 4 号、同第 4 , 2 9 4 , 7 5 7 号、同第 4 , 3 0 7 , 0 1 6 号、同第 4 , 3 0 8 , 2 6 8 号、同第 4 , 3 0 8 , 2 6 9 号、同第 4 , 3 0 9 , 4 2 8 号、同第 4 , 3 1 3 , 9 4 6 号、同第 4 , 3 1 5 , 9 2 9 号、同第 4 , 3 1 7 , 8 2 1 号、同第 4 , 3 2 2 , 3 4 8 号、同第 4 , 3 3 1 , 5 9 8 号、同第 4 , 3 6 1 , 6 5 0 号、同第 4 , 3 6 4 , 8 6 6 号、同第 4 , 4 2 4 , 2 1 9 号、同第 4 , 4 5 0 , 2 5 4 号、同第 4 , 3 6 2 , 6 6 3 号、及び同第 4 , 3 7 1 , 5 3 3 号に開示されている。

【 0 2 7 5 】

マイタンシノイド薬物部分は、(i) 発酵または化学修飾または発酵生成物の誘導体化による調製に比較的利用しやすく、(i i) 非ジスルフィドリンカーによる抗体へのコンジュゲートに好適な官能基との誘導体化に適しており、(i i i) 血漿中で安定しており、かつ (i v) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体 - 薬物複合体中の魅力的な薬物部分である。

【 0 2 7 6 】

マイタンシノイド薬物部分としての使用に好適なある特定のマイタンシノイドは、当該技術分野において既知であり、既知の方法に従って天然源から単離され得るか、または遺伝子操作技法を使用して産生され得る (例えば、Y u e t a l (2 0 0 2) P N A S 9 9 : 7 9 6 8 - 7 9 7 3 を参照されたい)。マイタンシノイドは、既知の方法に従って合成的に調製されてもよい。

【 0 2 7 7 】

例示的なマイタンシノイド薬物部分としては、C - 1 9 - デクロロ (米国特許第 4 2 5 6 7 4 6 号) (例えば、アンサマイトシン P 2 の水素化リチウムアルミニウム還元によって調製されるもの)、C - 2 0 - ヒドロキシ (または C - 2 0 - デメチル) + / - C - 1 9 - デクロロ (米国特許第 4 3 6 1 6 5 0 号及び同第 4 3 0 7 0 1 6 号) (例えば、ストレプトミセスもしくはアクチノミセスを使用する脱メチル化、または L A H を使用する脱塩素化によって調製されるもの)、及び C - 2 0 - デメトキシ、C - 2 0 - アシルオキシ (- O C O R) 、 + / - デクロロ (米国特許第 4 , 2 9 4 , 7 5 7 号) (例えば、塩化アシルを使用するアシル化によって調製されるもの) 等の修飾された芳香族環を有するもの、ならびに芳香族環の他の位置に修飾を有するものが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 2 7 8 】

例示的なマイタンシノイド薬物部分としてはまた、C - 9 - S H (米国特許第 4 4 2 4 2 1 9) (例えば、マイタンシノールと、 H_2S もしくは P_2S_5 との反応によって調製されるもの)、C - 1 4 - アルコキシメチル (デメトキシ / CH_2OR) (米国特許第 4 3 3 1 5 9 8 号)、C - 1 4 - ヒドロキシメチルもしくはアシルオキシメチル (CH_2OH もしくは CH_2OAc) (米国特許第 4 4 5 0 2 5 4 号) (例えば、ノカルディア (*Nocardia*) から調製されるもの)、C - 1 5 - ヒドロキシ / アシルオキシ (米国特許第 4 3 6 4 8 6 6 号) (例えば、ストレプトミセスによるマイタンシノールの変換によって調製されるもの)、C - 1 5 - メトキシ (米国特許第 4 3 1 3 9 4 6 号及び同第 4 3 1 5 9 2 9 号) (例えば、トレウィア・ヌドロフローラ (*Trewia nudiflora*) から単離されるもの)、C - 1 8 - N - ジメチル (米国特許第 4 3 6 2 6 6 3 号及び同第 4 3 2 2 3 4 8 号) (例えば、ストレプトミセスによるマイタンシノールの脱メチル化によって調製されるもの)、ならびに 4 , 5 - デオキシ (米国特許第 4 3 7 1 5 3 3

10

20

30

40

50

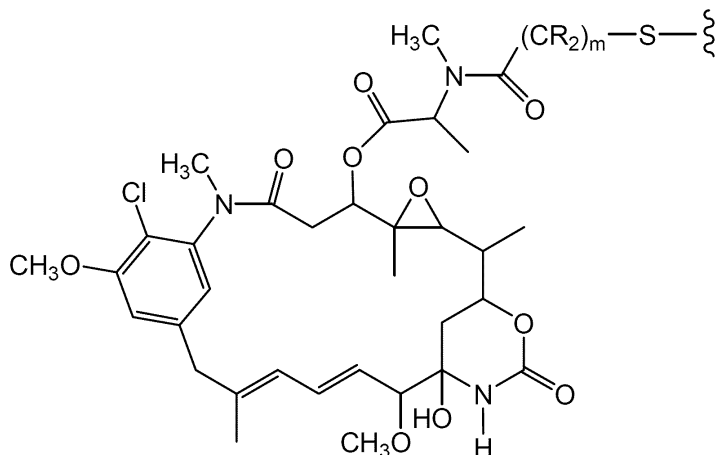
号) (例えば、マイタンシノールの三塩化チタン/ L A H 還元によって調製されるもの) 等の修飾を有するものが挙げられる。

【 0 2 7 9 】

マイタンシノイド化合物上の多くの位置は、結合位置として有用である。例えば、エステル結合は、従来のカップリング技法を使用するヒドロキシル基との反応によって形成され得る。いくつかの実施形態において、この反応は、ヒドロキシル基を有する C - 3 位、ヒドロキシメチルで修飾された C - 1 4 位、ヒドロキシル基で修飾された C - 1 5 位、及びヒドロキシル基を有する C - 2 0 位で起こり得る。いくつかの実施形態において、結合は、マイタンシノールまたはマイタンシノール類似体の C - 3 位で形成される。

【 0 2 8 0 】

マイタンシノイド薬物部分としては、構造：



を有するものが挙げられ、式中、波線は、マイタンシノイド薬物部分の硫黄原子が A D C のリンカーに対する共有結合を示す。各 R は独立して、H または C₁ ~ C₆ アルキルであり得る。アミド基を硫黄原子に結合させるアルキレン鎖は、メタニル、エタニル、またはプロピルであり得、すなわち、m は、1、2、または 3 である (U S 6 3 3 4 1 0 、 U S 5 2 0 8 0 2 0 、 C h a r i e t a l (1 9 9 2) C a n c e r R e s . 5 2 : 1 2 7 - 1 3 1 、 L i u e t a l (1 9 9 6) P r o c . N a t l . A c a d . S c i U S A 9 3 : 8 6 1 8 - 8 6 2 3) 。

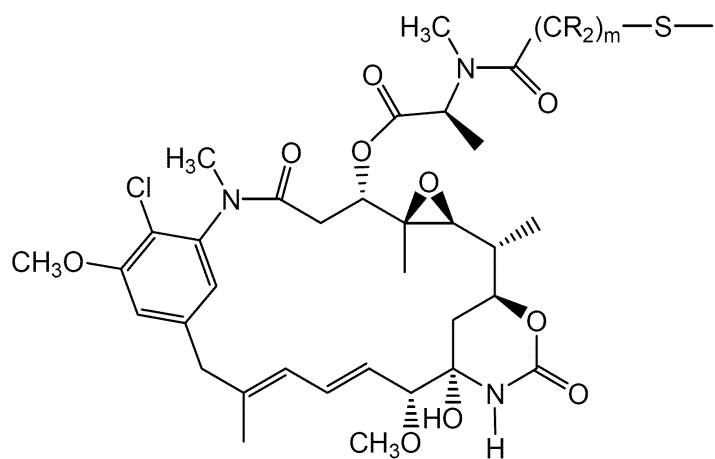
【 0 2 8 1 】

マイタンシノイド薬物部分の全ての立体異性体は、本発明の A D C 、すなわち、キラル炭素における R 及び S 構成の任意の組み合わせに対して企図される (U S 7 2 7 6 4 9 7 、 U S 6 9 1 3 7 4 8 、 U S 6 4 4 1 1 6 3 、 U S 6 3 3 4 1 0 (R E 3 9 1 5 1) 、 U S 5 2 0 8 0 2 0 、 W i d d i s o n e t a l (2 0 0 6) J . M e d . C h e m . 4 9 : 4 3 9 2 - 4 4 0 8 、これは参照により全体が組み込まれる)。いくつかの実施形態において、マイタンシノイド薬物部分は、以下の立体化学を有する。

10

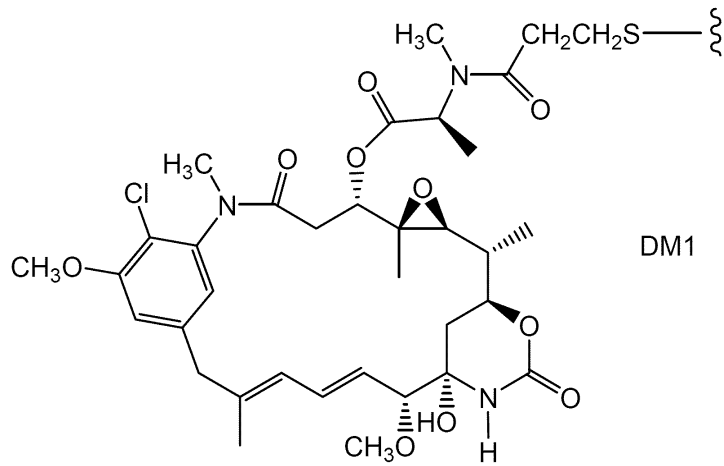
20

30

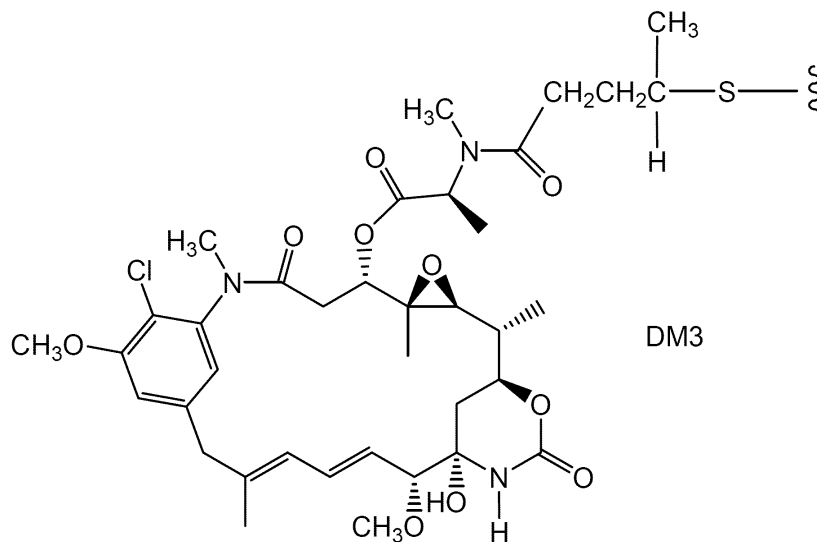


【 0 2 8 2 】

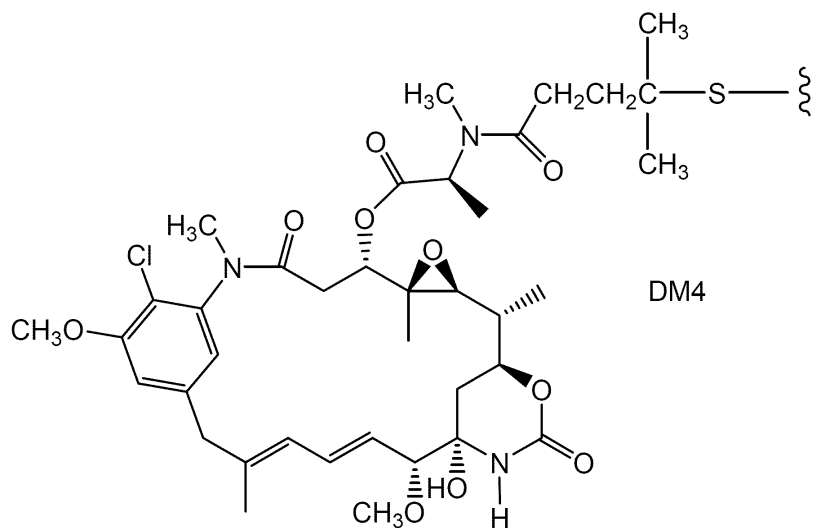
マイタンシノイド薬物部分の例示的な実施形態としては、構造：



10



20



30

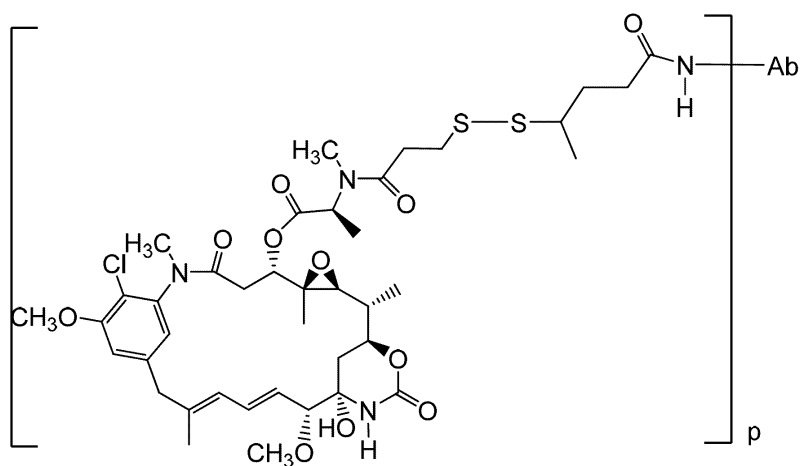
40

を有するDM1、DM3、及びDM4が含まれるが、これらに限定されず、式中、波線は、薬物の硫黄原子の、抗体-薬物複合体のリンカー(L)への共有結合を示す。

【0283】

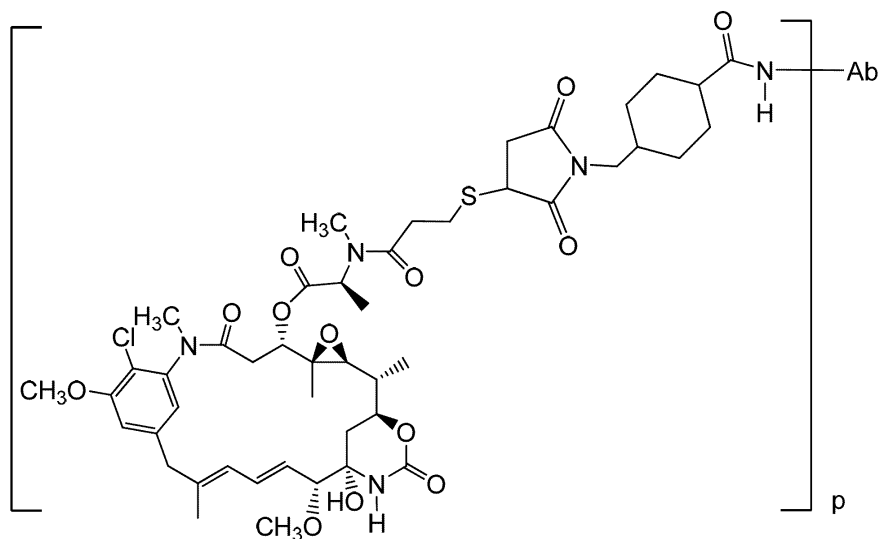
他の例示的なマイタシンノイド抗体-薬物複合体は、以下の構造及び省略形を有する(式中、Abは抗体であり、pは1~約20である。いくつかの実施形態において、pは1~10であるか、pは1~7であるか、pは1~5であるか、またはpは1~4である)。

。



Ab-SPP-DM1

10



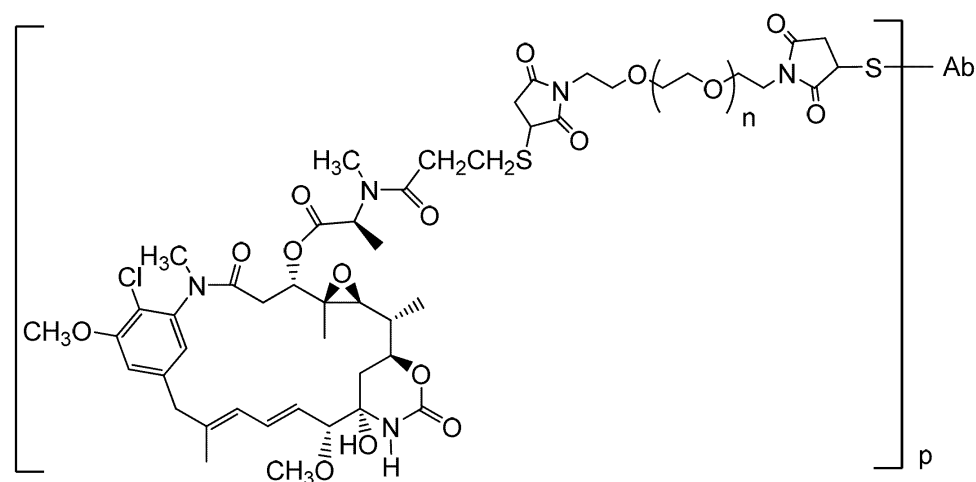
Ab-SMCC-DM1

20

【0284】

DM1がBMPEOリンカーを介して抗体のチオール基に結合される例示的な抗体-薬物複合体は、構造及び省略形：

30



40

を有し、式中、Abは抗体であり、nは0、1、または2であり、pは1～約20である。いくつかの実施形態において、pは1～10であるか、pは1～7であるか、pは1～5であるか、またはpは1～4である。

【0285】

マイタシンノイドを含有する免疫複合体、その作製方法、及びそれらの治療的使用は、例えば、米国特許第5,208,020号及び同第5,416,064号、US2005

50

/ 0 2 7 6 8 1 2 A 1、ならびに欧州特許第 E P 0 4 2 5 2 3 5 B 1 号に開示され、それらの開示は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。L i u e t a l . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 : 8 6 1 8 - 8 6 2 3 (1 9 9 6)、及び C h a r i e t a l . C a n c e r R e s e a r c h 5 2 : 1 2 7 - 1 3 1 (1 9 9 2) も参照されたい。

【 0 2 8 6 】

いくつかの実施形態において、抗体 - マイタンシノイド複合体は、抗体またはマイタンシノイド分子のいずれかの生物活性を著しく減少させることなく、抗体をマイタンシノイド分子に化学的に結合させることによって調製されてもよい。例えば、米国特許第 5 , 2 0 8 , 0 2 0 号を参照されたい（その開示は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる）。いくつかの実施形態において、抗体分子 1 個当たり平均 3 ~ 4 個のマイタンシノイド分子がコンジュゲートされた ADC は、抗体の機能または可溶性に悪影響を及ぼすことなく、標的細胞の細胞傷害性を増強することにおいて有効性を示した。場合によっては、毒素 / 抗体の 1 つの分子でさえも、裸の抗体を使用するより細胞傷害性を増強することが予想される。

10

【 0 2 8 7 】

抗体 - マイタンシノイド複合体を作製するための例示的な結合基としては、例えば、本明細書に記載されるもの、及び米国特許第 5 2 0 8 0 2 0 号、欧州特許第 0 4 2 5 2 3 5 B 1 号、C h a r i e t a l . C a n c e r R e s e a r c h 5 2 : 1 2 7 - 1 3 1 (1 9 9 2)、U S 2 0 0 5 / 0 2 7 6 8 1 2 A 1、及び U S 2 0 0 5 / 0 1 6 9 9 3 A 1 に開示されるものが挙げられ、それらの開示は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

20

【 0 2 8 8 】

(2) オーリスタチン及びドラスタチン

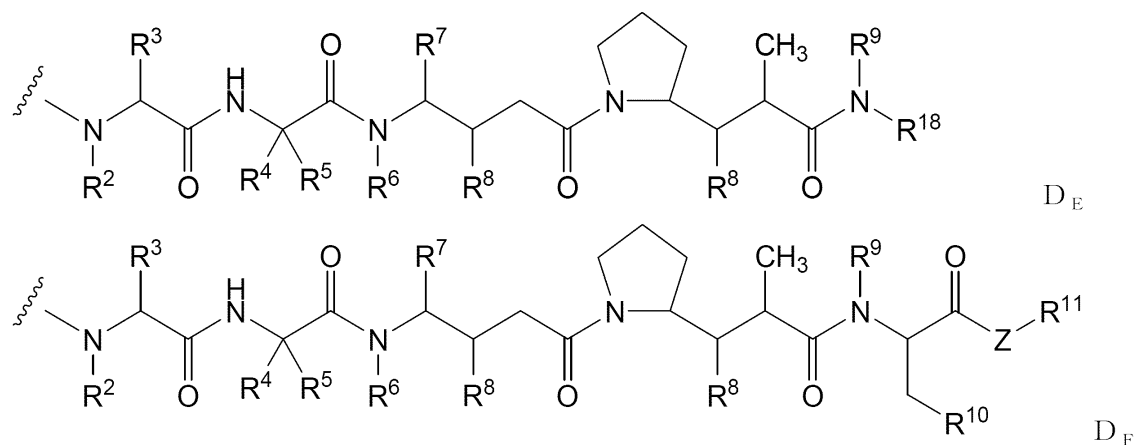
薬物部分は、ドラスタチン、オーリスタチン、ならびにそれらの類似体及び誘導体を含む（U S 5 6 3 5 4 8 3、U S 5 7 8 0 5 8 8、U S 5 7 6 7 2 3 7、U S 6 1 2 4 4 3 1）。オーリスタチンは、海生軟体動物化合物ドラスタチン - 1 0 の誘導体である。いかなる特定の理論によっても拘束されることを意図しないが、ドラスタチン及びオーリスタチンは、微小管動態、G T P 加水分解、ならびに核分裂及び細胞分裂を干渉し（W o y k e e t a l (2 0 0 1) A n t i m i c r o b . A g e n t s a n d C h e m o t h e r . 4 5 (1 2) : 3 5 8 0 - 3 5 8 4）、抗癌活性（米国特許第 5 6 6 3 1 4 9）及び抗菌活性（P e t t i t e t a l (1 9 9 8) A n t i m i c r o b . A g e n t s C h e m o t h e r . 4 2 : 2 9 6 1 - 2 9 6 5）を有する。ドラスタチン / オー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結合され得る（W O 0 2 / 0 8 8 1 7 2、D o r o n i n a e t a l (2 0 0 3) N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 1 (7) : 7 7 8 - 7 8 4、F r a n c i s c o e t a l (2 0 0 3) B l o o d 1 0 2 (4) : 1 4 5 8 - 1 4 6 5）。

30

【 0 2 8 9 】

例示的なオーリスタチン実施形態としては、U S 7 4 9 8 2 9 8 及び U S 7 6 5 9 2 4 1 に開示される N 末端結合されたモノメチルオーリスタチン薬物部分 D_E 及び D_F が挙げられ、それらの開示は、参照にその全体が明示的に組み込まれ、

40



10

式中、D_E 及び D_F の破線は、抗体または抗体 - リンカー成分への共有結合部位を示し、独立して各位置において、

R² が、H 及び C₁ ~ C₈ アルキルから選択され、

R³ が、H、C₁ ~ C₈ アルキル、C₃ ~ C₈ 炭素環、アリール、C₁ ~ C₈ アルキル - アリール、C₁ ~ C₈ アルキル - (C₃ ~ C₈ 炭素環)、C₃ ~ C₈ 複素環、及び C₁ ~ C₈ アルキル - (C₃ ~ C₈ 複素環) から選択され、

R⁴ が、H、C₁ ~ C₈ アルキル、C₃ ~ C₈ 炭素環、アリール、C₁ ~ C₈ アルキル - アリール、C₁ ~ C₈ アルキル - (C₃ ~ C₈ 炭素環)、C₃ ~ C₈ 複素環、及び C₁ ~ C₈ アルキル - (C₃ ~ C₈ 複素環) から選択され、

20

R⁵ が、H 及びメチルから選択されるか、

または R⁴ 及び R⁵ が結合して炭素環を形成し、式 - (C R^a R^b)_n を有し、式中、R^a 及び R^b が独立して、H、C₁ ~ C₈ アルキル、及び C₃ ~ C₈ 炭素環から選択され、n が、2、3、4、5、及び 6 から選択され、

R⁶ が、H 及び C₁ ~ C₈ アルキルから選択され、

R⁷ が、H、C₁ ~ C₈ アルキル、C₃ ~ C₈ 炭素環、アリール、C₁ ~ C₈ アルキル - アリール、C₁ ~ C₈ アルキル - (C₃ ~ C₈ 炭素環)、C₃ ~ C₈ 複素環、及び C₁ ~ C₈ アルキル - (C₃ ~ C₈ 複素環) から選択され、

各 R⁸ が独立して、H、OH、C₁ ~ C₈ アルキル、C₃ ~ C₈ 炭素環、及び O - (C₁ ~ C₈ アルキル) から選択され、

30

R⁹ が、H 及び C₁ ~ C₈ アルキルから選択され、

R¹⁰ が、アリールまたは C₃ ~ C₈ 複素環から選択され、

Z が、O、S、NH、または N R¹² であり、式中、R¹² が、C₁ ~ C₈ アルキルであり、

R¹¹ が、H、C₁ ~ C₂₀ アルキル、アリール、C₃ ~ C₈ 複素環、- (R¹³ O)_m - R¹⁴、または - (R¹³ O)_m - CH (R¹⁵)₂ から選択され、

m が、1 ~ 1000 の範囲の整数であり、

R¹³ が、C₂ ~ C₈ アルキルであり、

R¹⁴ が、H または C₁ ~ C₈ アルキルであり、

40

それぞれ存在する R¹⁵ が独立して、H、COOH、- (CH₂)_n - N (R¹⁶)₂、- (CH₂)_n - SO₃H、または - (CH₂)_n - SO₃ - C₁ ~ C₈ アルキルであり、

それぞれ存在する R¹⁶ が独立して、H、C₁ ~ C₈ アルキル、または - (CH₂)_n - COOH であり、

R¹⁸ が、- C (R⁸)₂ - C (R⁸)₂ - アリール、- C (R⁸)₂ - C (R⁸)₂ - (C₃ ~ C₈ 複素環)、及び - C (R⁸)₂ - C (R⁸)₂ - (C₃ ~ C₈ 炭素環) から選択され、

n が、0 ~ 6 の範囲の整数である。

【0290】

50

一実施形態において、 R^3 、 R^4 、及び R^7 は独立して、イソプロピルまたは *sec*-ブチルであり、 R^5 は、-Hまたはメチルである。例示的な実施形態において、 R^3 及び R^4 は、それぞれイソプロピルであり、 R^5 は、-Hであり、 R^7 は、*sec*-ブチルである。

【0291】

さらに別の実施形態において、 R^2 及び R^6 は、それぞれメチルであり、 R^9 は、-Hである。

【0292】

さらに別の実施形態において、それぞれ存在する R^8 は、-OCH₃である。

【0293】

例示的な実施形態において、 R^3 及び R^4 は、それぞれイソプロピルであり、 R^2 及び R^6 は、それぞれメチルであり、 R^5 は、-Hであり、 R^7 は、*sec*-ブチルであり、それぞれ存在する R^8 は、-OCH₃であり、 R^9 は、-Hである。

【0294】

一実施形態において、Zは、-O-または-NH-である。

【0295】

一実施形態において、 R^{10} は、アリールである。

【0296】

例示的な実施形態において、 R^{10} は、-フェニルである。

【0297】

例示的な実施形態において、Zが-O-である場合、 R^{11} は、-H、メチル、または *t*-ブチルである。

【0298】

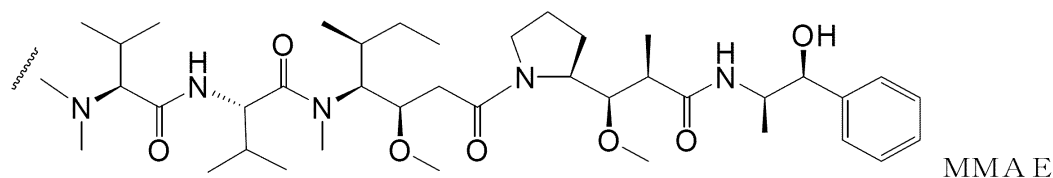
一実施形態において、Zが-NHである場合、 R^{11} は、-CH(R^{15})₂であり、式中、 R^{15} が、-(CH₂)_n-N(R^{16})₂であり、 R^{16} が、-C₁~C₈アルキルまたは-(CH₂)_n-COOHである。

【0299】

別の実施形態において、Zが-NHである場合、 R^{11} は、-CH(R^{15})₂であり、式中、 R^{15} は、-(CH₂)_n-SO₃Hである。

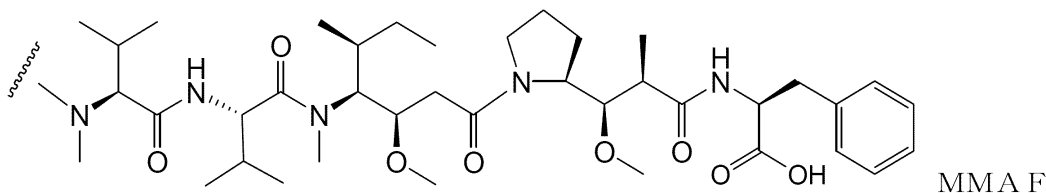
【0300】

式D_Eの例示的なオーリスタチン実施形態は、MMAEであり、式中、波線は、抗体-薬物複合体のリンカー(L)への共有結合を示す。



【0301】

式D_Fの例示的なオーリスタチン実施形態は、MMAFであり、式中、波線は、抗体-薬物複合体のリンカー(L)への共有結合を示す。



【0302】

他の例示的な実施形態としては、ペントペプチドオーリスタチン薬物部分のC末端にフェニルアラニンカルボキシ修飾を有するモノメチルバリン化合物(WO2007/008848)及びペントペプチド薬物部分のC末端にフェニルアラニン側鎖修飾を有するモノ

10

20

30

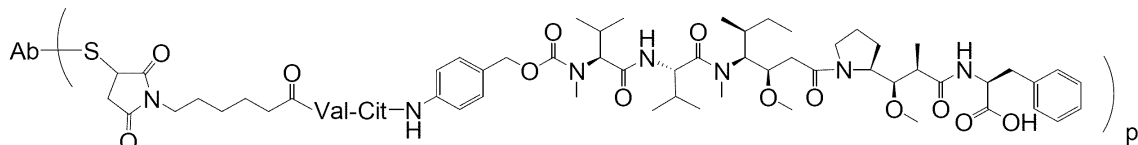
40

50

メチルバリン化合物 (WO 2007 / 008603号) が挙げられる。

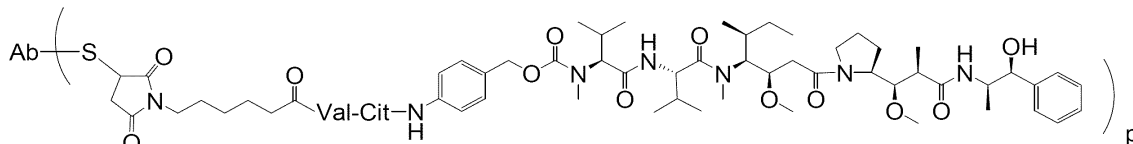
【0303】

MMAE または MMAF 及び様々なリンカー成分を含む式 I の ADC の実施形態の非限定的な例には、以下の構造及び省略形を有する (式中、「Ab」は、抗体であり、p は、1 ~ 約 8 であり、「Val-Cit」は、バリン-シトルリンジペプチドであり、「S」は、硫黄原子である。

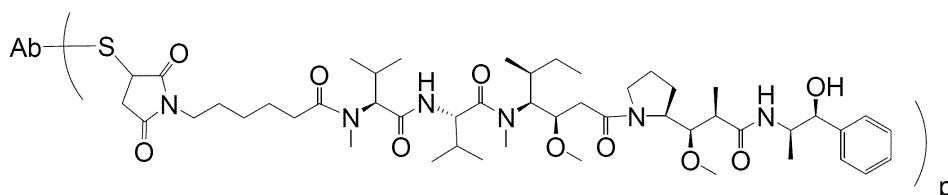


10

Ab-MC-v c-PAB-MMAF

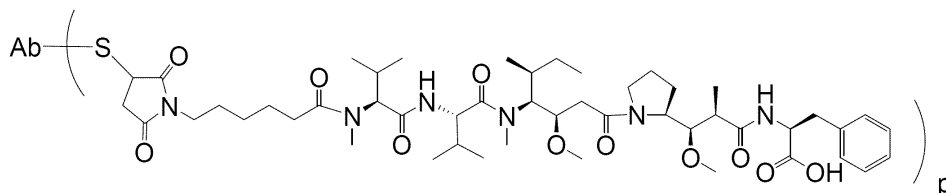


Ab-MC-v c-PAB-MMAE



20

Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

30

【0304】

MMAF 及び様々なリンカー成分を含む式 I の ADC の実施形態の非限定的な例としては、さらに Ab-MC-PAB-MMAF 及び Ab-PAB-MMAF が挙げられる。タンパク質分解的に切断可能でないリンカーによって抗体に結合された MMAF を含む免疫複合体は、タンパク質的に切断可能なリンカーによって抗体に結合された MMAF を含む免疫複合体に相当する活性を有することが示された (Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124)。いくつかのかかる実施形態において、薬物放出は、細胞内の抗体分解によって引き起こされと考えられる。

【0305】

40

典型的に、ペプチド型薬物部分は、2 つ以上のアミノ酸及び / またはペプチド断片の間に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。かかるペプチド結合は、例えば、液相合成法に従って調製することができる (例えば、E. Schroder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press)。オーリスタチン / ドラスタチン薬物部分は、いくつかの実施形態において、US 7498298、US 5635483、US 5780588、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

50

al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859 - 863、及び Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21 (7) : 778 - 784 の方法に従って調製されてもよい。

【0306】

いくつかの実施形態において、MMAE等の式D_E、及びMMAF等の式D_Fのオーリスチン/ドラスチン薬物部分、薬物-リンカー中間体、ならびにそれらの誘導体、例えば、MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF、及びMC-vc-PAB-MMAE等は、US7498298、Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114 - 124、及びDoronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21: 778 - 784に記載される方法を使用して調製され得、次に対象の抗体にコンジュゲートされ得る。

10

【0307】

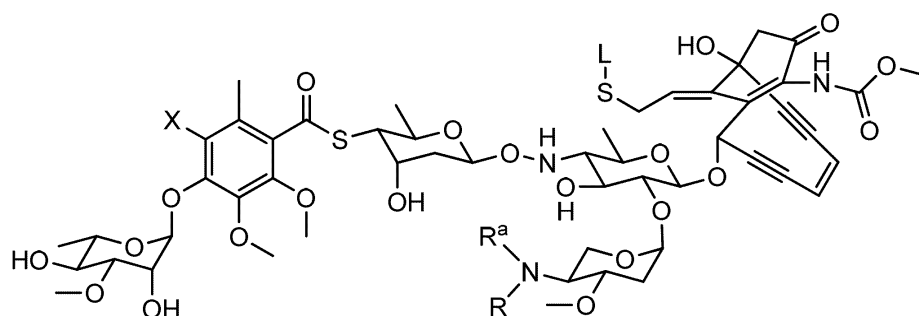
(3) カリケアミシン

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、1つ以上のカリケアミシン分子にコンジュゲートされた抗体を含む。カリケアミシンファミリーの抗生物質、及びそれらの類似体は、ピコモル以下の濃度で二重鎖DNA切断を生成することができる(Hinman et al., (1993) Cancer Research 53: 3336 - 3342、Lode et al., (1998) Cancer Research 58: 2925 - 2928)。カリケアミシンは、細胞内作用部位を有するが、ある特定の例では、血漿膜を容易に横断しない。したがって、いくつかの実施形態において、抗体媒介性内在化によるこれらの薬剤の細胞取り込みによって、それらの細胞傷害性効果を大幅に増強され得る。カリケアミシン薬物部分を有する抗体-薬物複合体を調製する方法の非限定的な例は、例えば、US5712374、US5714586、US5739116、及びUS5767285に記載される。

20

【0308】

いくつかの実施形態において、抗体にコンジュゲートされるカリケアミシン薬物部分は、式：



30

を有し、式中、Xが、BrまたはIであり、Lが、リンカーであり、Rが、水素、C₁-₆アルキル、または-C(=O)C₁-₆アルキルであり、R^aが水素またはC₁-₆アルキルである。

【0309】

いくつかの実施形態において、Xは、Brであり、R^aは、水素であり、Rは、イソプロピルである。

40

【0310】

他の実施形態において、Xは、Brであり、R^aは、水素であり、Rは、エチルである。

【0311】

他の実施形態において、Xは、Iであり、R^aは、水素であり、Rは、イソプロピルである。

【0312】

他の実施形態において、Xは、Iであり、R^aは、水素であり、Rは、エチルである。

50

【0313】

いくつかの実施形態において、Xは、Brであり、R^aは、水素であり、Rは、-C(=O)CH₃である。

【0314】

他の実施形態において、Xは、Iであり、R^aは、水素であり、Rは、-C(=O)CH₃である。

【0315】

他の実施形態において、Xは、Iであり、R^aは、エチルであり、Rは、-C(=O)CH₃である。

【0316】

他の実施形態において、Xは、Brであり、R^aは、エチルであり、Rは、-C(=O)CH₃である。

【0317】

(4) ピロロベンゾジアゼピン

いくつかの実施形態において、ADCは、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)を含む。いくつかの実施形態において、PBD二量体は、特定のDNA配列を認識し、それに結合する。天然生成物アントラマイシンであるPBDは、1965年に最初に報告された(Leimgruber, et al., (1965) J. Am. Chem. Soc., 87: 5793-5795、Leimgruber, et al., (1965) J. Am. Chem. Soc., 87: 5791-5793)。それ以来、三環式PBD足場の二量体を含む、自然発生及び類似体の両方のいくつかのPBDが、報告されてきている(Thurstion, et al., (1994) Chem. Rev. 1994, 433-465 (US 6884799、US 7049311、US 7067511、US 7265105、US 7511032、US 7528126、US 7557099)。いかなる特定の理論にも拘束されることを意図せずに、二量体構造が、B型DNAの副溝との等螺旋性(isohelicity)に適切な三次元形状を付与し、それによって結合部位において滑り嵌めがもたらされると考えられている(Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975)、Hurley and Needham-VanDevanter, (1986) Acc. Chem. Res., 19: 230-237)。C2アリール置換基を有する二量体PBD化合物は、細胞傷害性薬剤として有用であることが示されてきた(Hartley et al. (2010) Cancer Res. 70(17): 6849-6858、Antonow (2010) J. Med. Chem. 53(7): 2927-2941、Howard et al. (2009) Bioorganic and Med. Chem. Letters 19(22): 6463-6466)。

【0318】

いくつかの実施形態において、PBD化合物は、それらをN10位において、in vivoで除去可能である窒素保護基で保護することによって、プロドラッグとして用いることができる(WO 00/12507、WO 2005/023814号)。

【0319】

PBD二量体は、抗体にコンジュゲートされており、結果として生じるADCは、抗癌特性を有することが示されてきた(US 2010/0203007)。PBD二量体上の結合部位の非限定的な例には、5員のピロロ環、PBD単位のためのテザー、及びN10-C11イミン基が含まれる(WO 2009/016516、US 2009/304710、US 2010/047257、US 2009/036431、US 2011/0256157、WO 2011/130598)。

【0320】

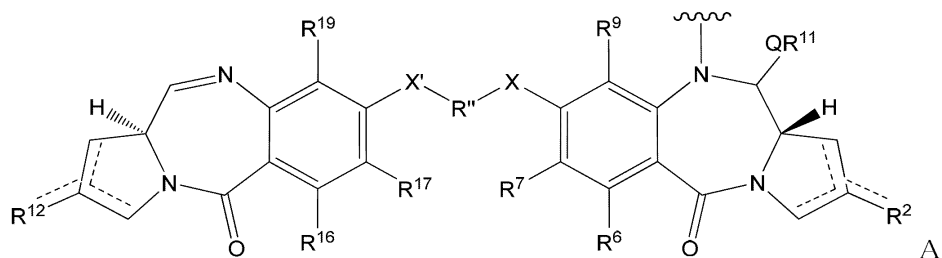
ADCのPBD二量体構成要素の非限定的な例は、式A：

10

20

30

40



のもの、ならびにその塩及び溶媒和物であり、式中、

波線は、リンカーへの共有結合部位を示し、

点線は、C 1 と C 2 との間または C 2 と C 3 の間の二重結合の任意の存在を示し、

R² が独立して、H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R、及びCORから選択され、任意にハロまたはジハロからさらに選択され、R^D が独立して、R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H、及びハロから選択され、

R⁶ 及び R⁹ が独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR、NO₂、Me₃Sn、及びハロから選択され、

R⁷ が独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR、NO₂、Me₃Sn、及びハロから選択され、

Q が独立して、O、S、及びNHから選択され、

R¹¹ が、HもしくはRのいずれかであるか、またはQがOである場合にはSO₃Mであり、式中、Mが金属陽イオンであり、

R⁶ 及び R⁹ がそれぞれ独立して、任意に置換される C₁ - 8 アルキル、C₁ - 12 アルキル、C₃ - 8 ヘテロシクリル、C₃ - 20 ヘテロシクリル、及び C₅ - 20 アリール基から選択され、任意に基NRRとの関連で、R⁶ 及び R⁹ が、それらが結合する窒素原子と一緒に、任意に置換される4員、5員、6員、または7員の複素環式環を形成し、

R¹²、R¹⁶、R¹⁹、及びR¹⁷ が、それぞれR²、R⁶、R⁹、及びR⁷ について定義される通りであり、

R¹¹ は、C₃ - 12 アルキレン基であり、その鎖は、1個以上のヘテロ原子、例えば、O、S、N(H)、NMe、及び/または芳香族環、例えば、ベンゼンまたはピリジンによって分断され得、それらの環は、任意に置換されており、

X¹ 及び X² が独立して、O、S、及びN(H)から選択される。

【0321】

いくつかの実施形態において、R⁶ 及び R⁹ はそれぞれ独立して、任意に置換される C₁ - 12 アルキル、C₃ - 20 複素環、及び C₅ - 20 アリール基から選択され、任意に基NRRとの関連で、R⁶ 及び R⁹ は、それらが結合する窒素原子と一緒に、任意に置換される4員、5員、6員、または7員の複素環式環を形成する。

【0322】

いくつかの実施形態において、R⁹ 及び R¹⁹ は、Hである。

【0323】

いくつかの実施形態において、R⁶ 及び R¹⁶ は、Hである。

【0324】

いくつかの実施形態において、R⁷ 及び R¹⁷ は両方とも、OR^{7A}であり、式中、R^{7A} は、任意に置換される C₁ - 4 アルキルである。いくつかの実施形態において、R^{7A} は、Meである。いくつかの実施形態において、R^{7A} は、Ch₂Phであり、式中、Phは、フェニル基である。

【0325】

いくつかの実施形態において、Xは、Oである。

【0326】

いくつかの実施形態において、R¹¹ は、Hである。

【0327】

いくつかの実施形態において、各単量体単位においてC2とC3との間に二重結合が存在する。

【0328】

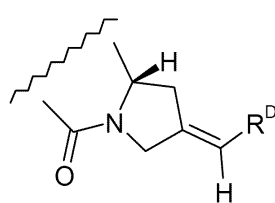
いくつかの実施形態において、 R^2 及び $R^{1,2}$ は独立して、H 及び R から選択される。いくつかの実施形態において、 R^2 及び $R^{1,2}$ は独立して、R である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び $R^{1,2}$ は独立して、任意に置換される C_{5-20} アリールまたは C_{5-7} アリールまたは C_{8-10} アリールである。いくつかの実施形態において、 R^2 及び $R^{1,2}$ は独立して、任意に置換されるフェニル、チエニル、ナプチル (naphthyl)、ピリジル、キノリニル、またはイソキノリニルである。いくつかの実施形態において、 R^2 及び $R^{1,2}$ は独立して、 $=O$ 、 $=CH_2$ 、 $=CH-R^D$ 、及び $=C(R^D)_2$ から選択される。いくつかの実施形態において、 R^2 及び $R^{1,2}$ はそれぞれ、 $=CH_2$ である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び $R^{1,2}$ はそれぞれ H である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び $R^{1,2}$ はそれぞれ $=O$ である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び $R^{1,2}$ はそれぞれ $=CF_2$ である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び / または $R^{1,2}$ は独立して、 $=C(R^D)_2$ である。いくつかの実施形態において、 R^2 及び / または $R^{1,2}$ は独立して、 $=CH-R^D$ である。

10

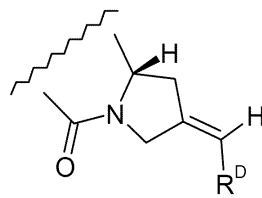
【0329】

いくつかの実施形態において、 R^2 及び / または $R^{1,2}$ が $=CH-R^D$ であるとき、各基は独立して、以下に示される立体配置のいずれかを有し得る。

20



(I)



(II)

【0330】

いくつかの実施形態において、 $=CH-R^D$ は、立体配置 (I) にある。

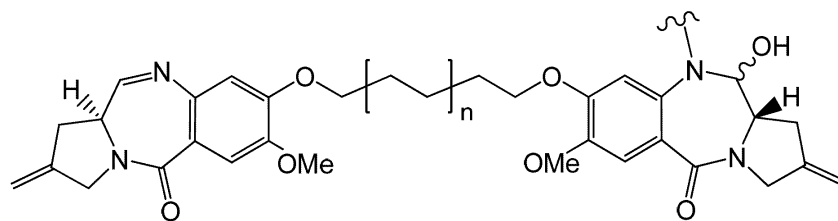
30

【0331】

いくつかの実施形態において、R は、 C_3 アルキレン基または C_5 アルキレン基である。

【0332】

いくつかの実施形態において、ADCの例示的なPBD二量体構成要素は、式A(I) :



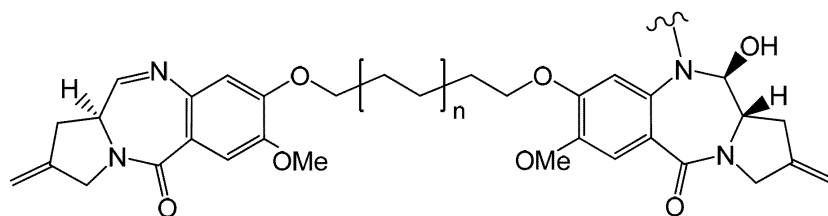
A (I) 、

40

を有し、式中、n が、0 または 1 である。

【0333】

いくつかの実施形態において、ADCの例示的なPBD二量体構成要素は、式A(II) :

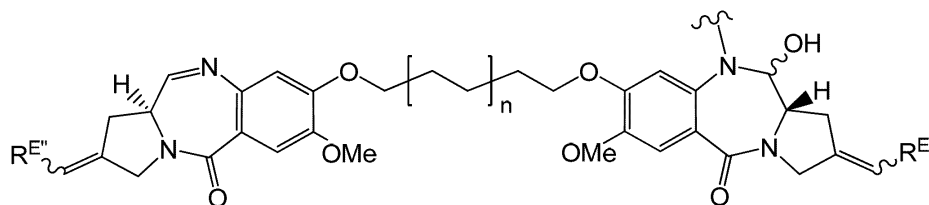


A (I I) 、

を有し、式中、 n が、0 または 1 である。

【 0 3 3 4 】

いくつかの実施形態において、A D C の例示的な P B D 二量体構成要素は、式 A (I I I) : 10



A (I I I) 、

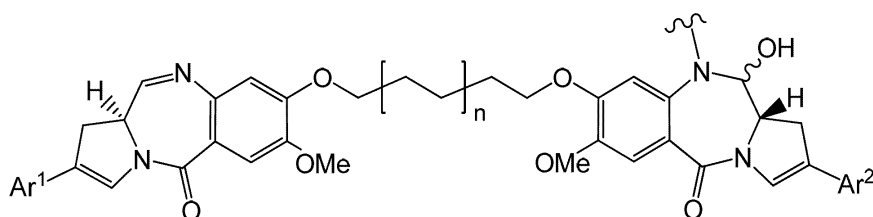
の構造を有し、式中、 R^E 及び $R^{E''}$ は、それぞれ独立して、H または R^D から選択され、式中、 R^D は、上記のように定義され、
を有し、式中、 n が、0 または 1 である。 20

【 0 3 3 5 】

いくつかの実施形態において、 n は、0 である。いくつかの実施形態において、 n は、1 である。いくつかの実施形態において、 R^E 及び / または $R^{E''}$ は、H である。いくつかの実施形態において、 R^E 及び $R^{E''}$ は、H である。いくつかの実施形態において、 R^E 及び / または $R^{E''}$ は、 R^D であり、式中、 R^D は、任意に置換される C_{1-12} アルキルである。いくつかの実施形態において、 R^E 及び / または $R^{E''}$ は、 R^D であり、式中、 R^D は、メチルである。

【 0 3 3 6 】

いくつかの実施形態において、A D C の例示的な P B D 二量体構成要素は、式 A (I V) : 30

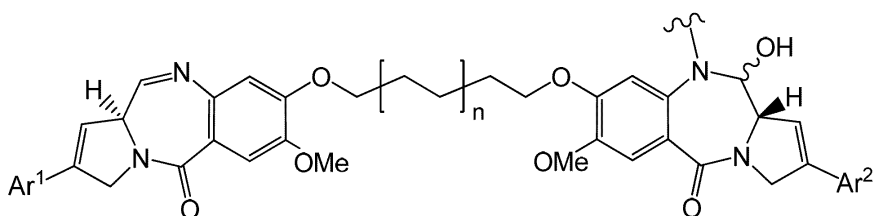


A (I V) 、

の構造を有し、式中、 Ar^1 及び Ar^2 はそれぞれ独立して、任意に置換される C_{5-20} アリールであり、 Ar^1 及び Ar^2 は、同じであっても異なってもよく、
を有し、式中、 n が、0 または 1 である。 40

【 0 3 3 7 】

いくつかの実施形態において、A D C の例示的な P B D 二量体構成要素は、式 A (V) : 50



A (V) 、

【 0 3 3 8 】

10

【 0 3 3 9 】

20

Chemical structure of a dimeric compound (B) consisting of two 6-methoxy-2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[2,3-b]pyridin-9(1H)-one units linked by a polyether chain. The left unit has a substituent R^{V1} at the 2-position, and the right unit has a substituent R^{V2} at the 2-position. The polyether chain is represented as $-O-(CH_2)_2-[-CH_2-CH_2-]_n-CH_2-CH_2-O-$.

30

OHに接続された波線は、SまたはR配置を示し、

n は、0 または 1 である。

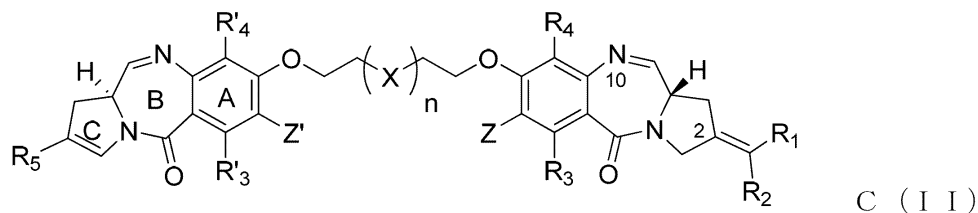
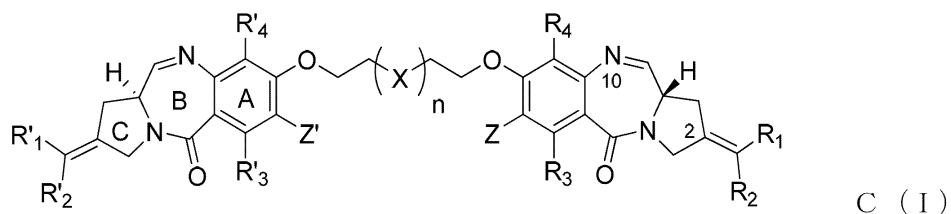
【 0 3 4 0 】

【 0 3 4 1 】

40

【 0 3 4 2 】

A D C の P B D 二量体構成要素の非限定的な例には、次の式 C (I) 及び C (I I) が含まれる。



10

【0343】

式C(I)及びC(II)は、それらのN10-C11イミン型で示される。例示的なPBD薬物部分にはまた、以下の表に示される、カルビノールアミン及び保護されたカルビノールアミン型も含まれる。

<p>イミン</p>	<p>カルビノールアミン</p>	<p>保護されたカルビノールアミン</p>
------------	------------------	-----------------------

20

(式中、

Xは、CH₂ (n = 1 ~ 5)、N、またはOであり、

Z及びZ'は独立して、OR及びNR₂から選択され、式中、Rは、1 ~ 5個の炭素原子を含有する第一級、第二級、または第三級アルキル鎖であり、

R₁、R'₁、R₂及びR'₂はそれぞれ独立して、H、C₁ ~ C₈アルキル、C₂ ~ C₈アルケニル、C₂ ~ C₈アルキニル、C₅ - 20アリール(置換アリールを含む)、C₅ - 20ヘテロアリール基、-NH₂、-NHMe、-OH、及び-SHから選択され、いくつかの実施形態において、アルキル、アルケニル、及びアルキニル鎖は、最大5個の炭素原子を含み、

30

R₃及びR'₃は独立して、H、OR、NHR、及びNR₂から選択され、式中、Rは、1 ~ 5個の炭素原子を含有する第一級、第二級、または第三級アルキル鎖であり、

R₄及びR'₄は独立して、H、Me、及びOMeから選択され、

R₅は、C₁ ~ C₈アルキル、C₂ ~ C₈アルケニル、C₂ ~ C₈アルキニル、C₅ - 20アリール(ハロ、ニトロ、シアノ、アルコキシ、アルキル、ヘテロシクリルによって置換されたアリールを含む)、及びC₅ - 20ヘテロアリール基から選択され、いくつかの実施形態において、アルキル、アルケニル、及びアルキニル鎖は、最大5個の炭素原子を含み、

R₁₁は、H、C₁ ~ C₈アルキル、または保護基(アセチル、トリフルオロアセチル、t-ブトキシカルボニル(BOC)、ベンジルオキシカルボニル(CBZ)、9-フルオレニルメチレンオキシカルボニル(Fmoc)、またはバリン-シトルリン-PAB等の自己犠牲単位を含む部分等)であり、

40

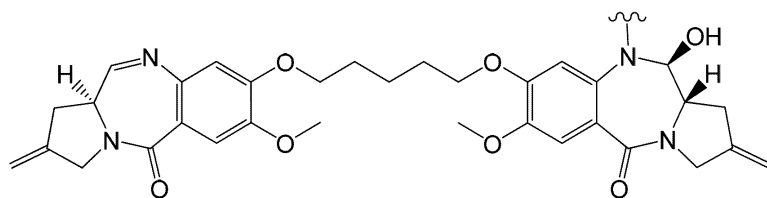
R₁₂は、H、C₁ ~ C₈アルキル、または保護基であり、

R₁、R'₁、R₂、R'₂、R₅、またはR₁₂のうちの1つの水素、またはA環の間の-OCH₂CH₂(X)_nCH₂CH₂O-スペーサの水素は、ADCのリンカーに接続された結合と置き換えられている)。

【0344】

ADCの例示的なPDB二量体部分には、以下のものが含まれるが、これらに限定されない(波線は、リンカーへの共有結合の部位を示す)。

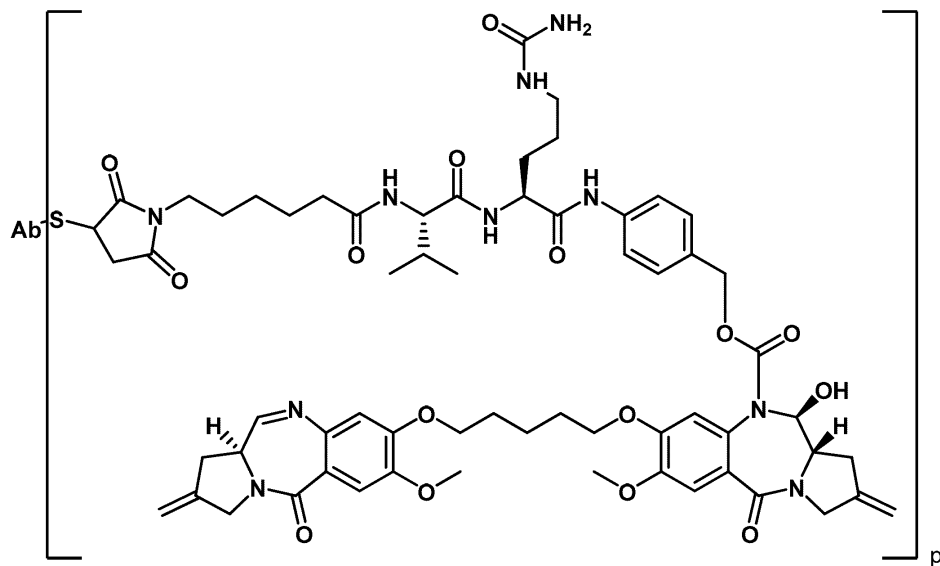
50



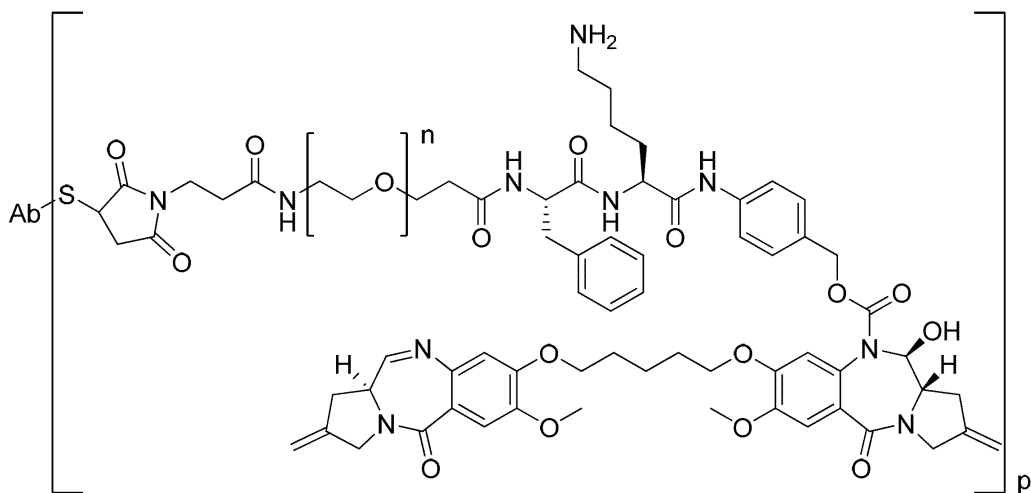
PBD二量体、

【0345】

PBD二量体を含むADCの実施形態の非限定的な例は、次の構造を有する。



PBD二量体-Val-Cit-PAB-Ab、



PBD二量体-Phe-Lys-PAB-Ab、

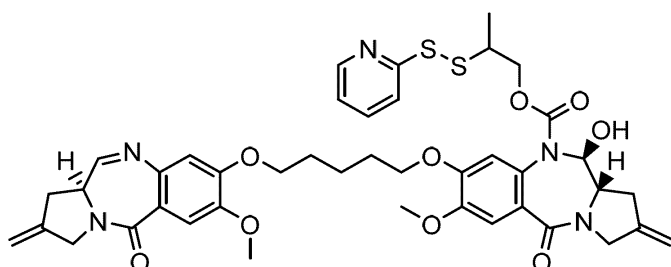
式中、

nは、0～12である。いくつかの実施形態において、nは、2～10である。いくつかの実施形態において、nは、4～8である。いくつかの実施形態において、nは、4、5、6、7、及び8から選択される。

【0346】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるPBD二量体を含むADCは、ピリジン脱離基を含むリンカー-薬物中間体を、硫黄原子を介して抗体のシステインチオールにコンジュゲートして、ジスルフィド結合を形成することによって作製され得る。さらに、いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるPBD二量体を含むADCは、ピリジン環が1つ以上のニトロ基で置換されているチオピリジル脱離基を含むリンカー-薬物中間体をコンジュゲートすることによって作製され得る。いくつかの実施形態において

、ピリジル環は、 $-NO_2$ で一置換される。いくつかの実施形態において、 $-NO_2$ 一置換は、ジスルフィドに対してパラである。いくつかの実施形態において、PBD二量体は、N10位を介して接続される。例えば、PBD二量体を含む非限定的な例示的なADCは、モノメチルエチルピリジルジスルフィド、N10結合されたPBDリンカー中間体（以下に示される）を、抗体にコンジュゲートすることによって作製され得る。



10

【0347】

PBD二量体 - val - cit - PAB - Ab及びPBD二量体 - Phe - ホモLys - PAB - Abのリンカーは、プロテアーゼ切断可能であるのに対して、PBD二量体 - マレイミド - アセタールのリンカーは、酸不安定性である。

【0348】

PBD二量体、及びPBD二量体を含むADCは、当該技術分野で既知の方法に従って調製されてもよい。例えば、WO2009/016516、US2009/304710、US2010/047257、US2009/036431、US2011/0256157、WO2011/130598、WO2013/055987を参照されたい。

20

【0349】

(5) アントラサイクリン

いくつかの実施形態において、ADCは、アントラサイクリンを含む。アントラサイクリンは、細胞傷害性活性を示す抗生物質化合物である。いかなる特定の理論によっても拘束されることを意図しないが、試験では、アントラサイクリンが、1) 薬物分子の、細胞のDNAへのインターカレーションによってDNA依存的核酸合成を阻害すること、2) 次に細胞巨大分子と反応して細胞への損傷を引き起こすフリーラジカルの薬物による産生、及び/または3) 薬物分子と細胞膜との相互作用を含む、多くの異なる機序によって、細胞を死滅させるように動作し得ることを示した（例えば、C. Peterson et al., Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia in Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy, N.R. Bachur, Free Radical Damage id. at pp. 97 - 102を参照されたい）。それらは細胞傷害性であるため、潜在的アントラサイクリンは、白血病、乳癌、肺癌、卵巣腺癌、及び肉腫等の多くの癌の治療に使用されてきた（例えば、P.H. Wiernik, in Anthracycline: Current Status And New Developments p11を参照されたい）。

30

40

【0350】

アントラサイクリンの非限定的な例としては、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ダウノマイシン、ネモルビシン、及びそれらの誘導体が挙げられる。ダウノルビシン及びドキソルビシンの免疫複合体及びプロドラッグが調製され、試験されてきた（Kratz et al (2006) Current Med. Chem. 13: 477 - 523、Jeffrey et al (2006) Bioorganic & Med. Chem. Letters 16: 358 - 362、Torgov et al (2005) Bioconj. Chem. 16: 717 - 721、Nagy et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 829 - 834、Dubowchik et al (2002) Bioorg. & Med. Chem. Letters

50

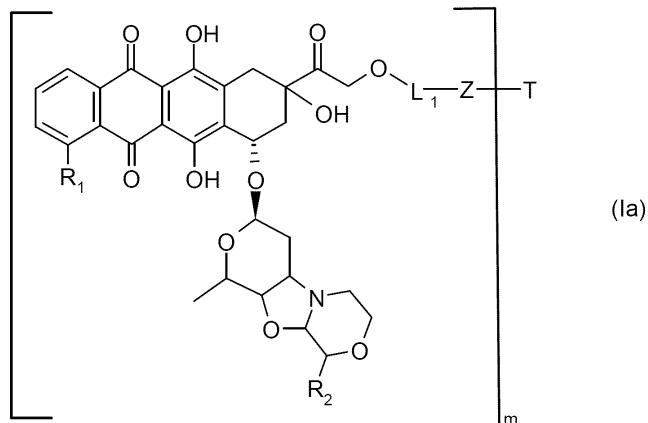
12:1529-1532、King et al (2002) J. Med. Chem. 45:4336-4343、EP0328147、US6630579)。抗体-薬物複合体BR96-ドキソルビシンは、腫瘍関連抗原ルイス-Yと特異的に反応し、I相及びII相試験において評価された(Saleh et al (2000) J. Clin. Oncology 18:2282-2292、Ajani et al (2000) Cancer Jour. 6:78-81、Tolcher et al (1999) J. Clin. Oncology 17:478-484)。

【0351】

PNU-159682は、ネモルピシンの有力な代謝物(または誘導体)である(Quintieri, et al. (2005) Clinical Cancer Research 11(4):1608-1617)。ネモルピシンは、ドキソルビシンのグリコシドアミノ上に2-メトキシモルホリノ基を有するドキソルビシンの半合成類似体であり、臨床評価中であり(Grandi et al (1990) Cancer Treat. Rev. 17:133、Ripamonti et al (1992) Brit. J. Cancer 65:703)(肝細胞癌についてのII相/III相試験を含む(Sun et al (2003)、Proceedings of the American Society for Clinical Oncology 22, Abs 1448、Quintieri (2003) Proceedings of the American Association of Cancer Research, 44:1st Ed, Abs 4649、Pacciarini et al (2006) Jour. Clin. Oncology 24:14116)。

【0352】

ネモルピシンまたはネモルピシン誘導体を含むADCの非限定的な例は、式Ia:



に示され、式中、 R_1 は、水素原子、ヒドロキシ、またはメトキシ基であり、 R_2 は、 $C_1 \sim C_5$ アルコキシ基、またはその薬学的に許容される塩であり、

L_1 及びZは一緒に、本明細書に記載されるリンカー(L)であり、

Tは、本明細書に記載される抗体(Ab)であり、

mは、1~約20である。いくつかの実施形態において、mは、1~10、1~7、1~5、または1~4である。

【0353】

いくつかの実施形態において、 R_1 及び R_2 の両方がメトキシ(-OMe)である。

【0354】

ネモルピシンまたはネモルピシン誘導体を含むADCのさらに非限定的な例は、式Ib:



20

30

40

50

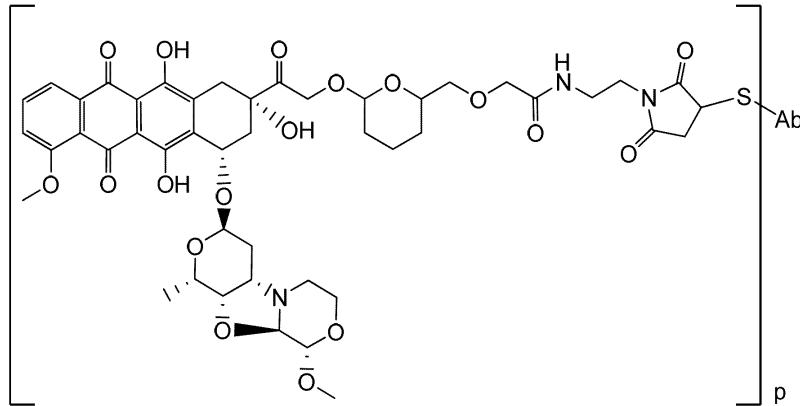
のうちの1つを有し得、式中、波線は、リンカー（L）への結合を示す。

【0357】

PNU-159682を含むアントラサイクリンは、いくつかの結合部位、及び本明細書に記載されるリンカーを含む種々のリンカー（US2011/0076287、WO2009/099741、US2010/0034837、WO2010/009124）を介して抗体にコンジュゲートされ得る。

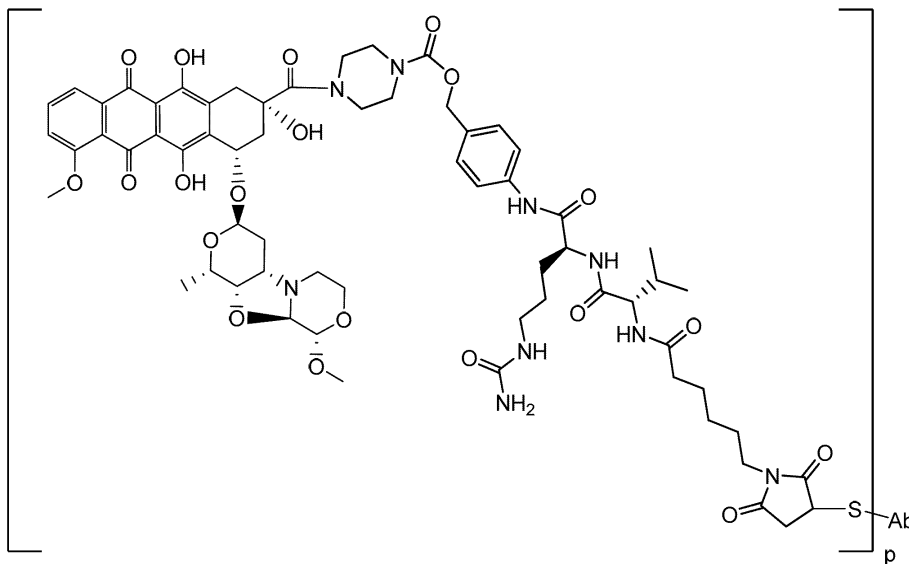
【0358】

ネモルピシン及びリンカーを含む例示的なADCとしては、



10

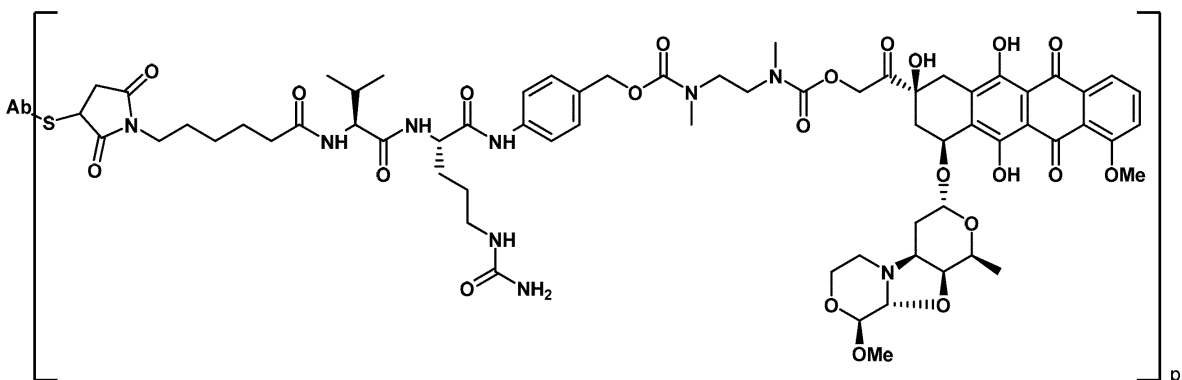
PNU-159682-maleimide ester-Ab、



20

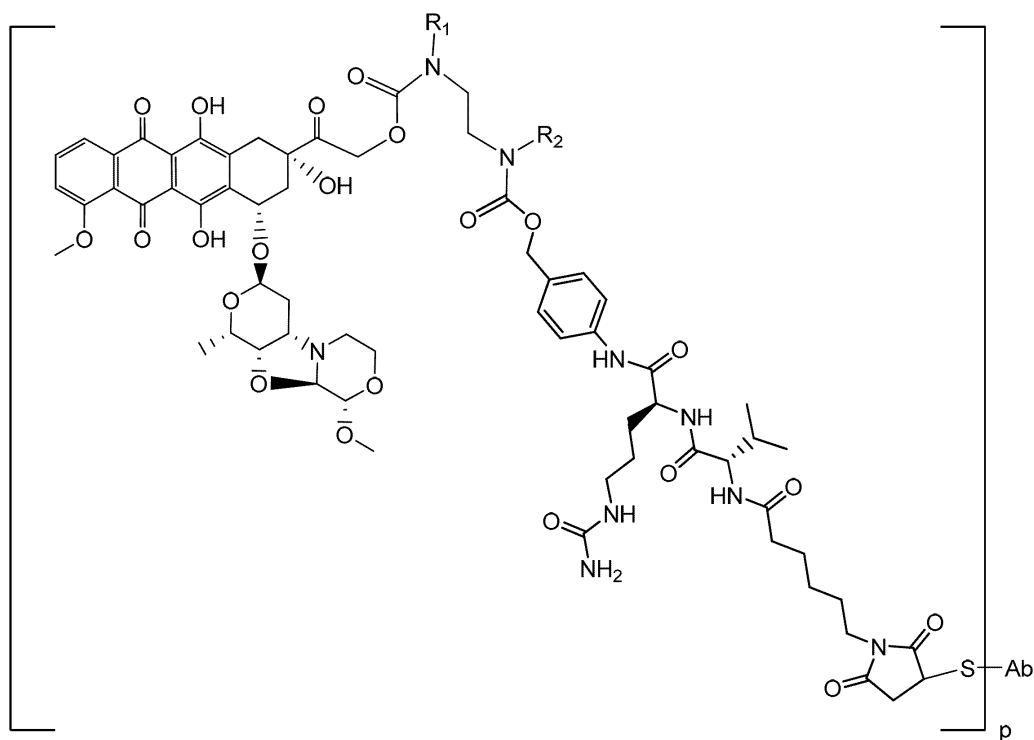
30

PNU-159682-val-cit-PAB-Ab、



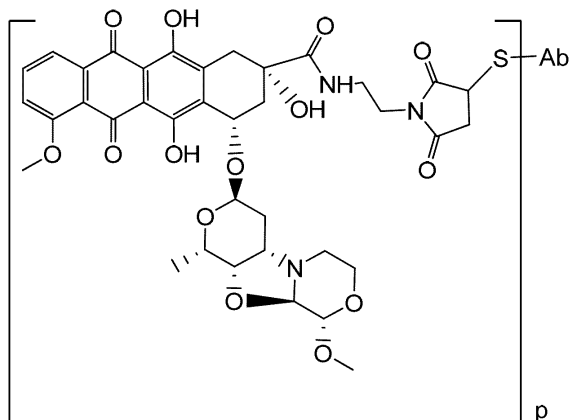
40

PNU-159682-val-cit-PAB-spacer-Ab、



PNU-159682-val-cit-PAB-スぺーサ (R¹R²) -Ab

が含まれるが、これらに限定されず、式中、
R₁ 及び R₂ は独立して、H 及び C₁ ~ C₆ アルキル、及び



PNU-159682-マレイミド-Ab

から選択される。

【0359】

PNU-159682マレイミドアセタール-Abのリンカーは、酸不安定性である一方で、PNU-159682-val-cit-PAB-Ab、PNU-159682-val-cit-PAB-スぺーサ-Ab、及びPNU-159682-val-cit-PAB-スぺーサ(R¹R²)-Abのリンカーは、プロテアーゼ切断可能である。

【0360】

(6) 1-(クロロメチル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール(CBI)二量体薬物部分

いくつかの実施形態において、ADCは、1-(クロロメチル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール(CBI)を含む。5-アミノ-1-(クロロメチル)-1,2-ジヒドロ-3H-ベンゾ[e]インドール(アミノCBI)クラスのDNA小溝アルキル化剤は、有力な細胞傷害性薬剤であり(Atwell, et al (1999) J. Med. Chem., 42:3400)、癌療法のために設計された多くのクラスの

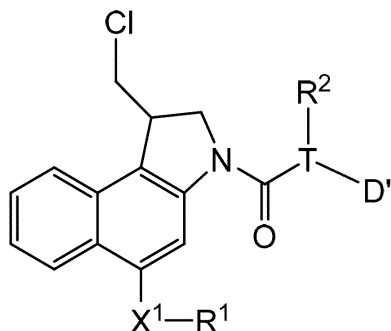
プロドラッグ中のエフェクター単位として利用されてきた。これらは、抗体複合体 (Jeffrey, et al. (2005) J. Med. Chem., 48:1344)、ニトロベンジルカルバメートに基づく遺伝子療法のためのプロドラッグ (Hay, et al (2003) J. Med. Chem. 46:2456)、及び低酸素活性化プロドラッグとしての対応するニトロ-CBI誘導体 (Tercele, et al (2011) Angew. Chem., Int. Ed., 50:2606-2609) を含んでいた。CBI及びピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン (PBD) ファルマコフォアは、アルキル鎖によって一緒に結合された (Tercele et al (2003) J. Med. Chem. 46:2132-2151)。

【0361】

いくつかの実施形態において、ADCは、1-(クロロメチル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール(CBI)二量体(WO2015/023355)を含む。いくつかのかかる実施形態において、二量体は、ヘテロ二量体であり、その二量体の半分がCBI部分であり、二量体のもう半分がPBD部分である。

【0362】

いくつかの実施形態において、CBI二量体は、式：



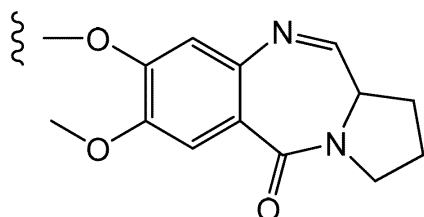
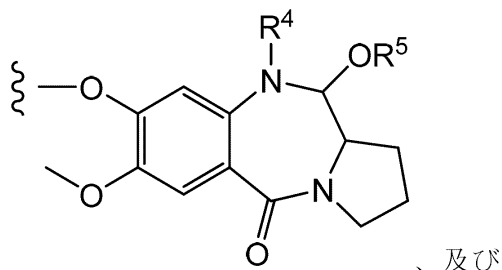
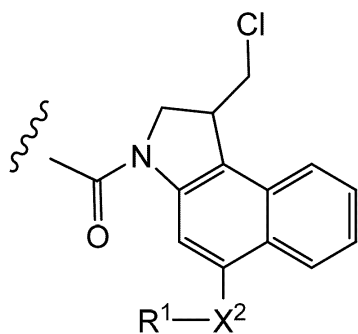
を有し、式中、

R^1 が、H、 $P(O)_3H_2$ 、 $C(O)NR^aR^b$ 、またはLへの結合から選択され、
 R^2 が、H、 $P(O)_3H_2$ 、 $C(O)NR^aR^b$ 、またはLへの結合から選択され、
 R^a 及び R^b が独立して、H及び1つ以上のFで任意に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択されるか、または R^a 及び R^b は、5員または6員複素環基を形成し、
 Tが、 $C_3 \sim C_{12}$ アルキレン、Y、($C_1 \sim C_6$ アルキレン) - Y - ($C_1 \sim C_6$ アルキレン)、($C_1 \sim C_6$ アルキレン) - Y - ($C_1 \sim C_6$ アルキレン) - Y - ($C_1 \sim C_6$ アルキレン)、($C_2 \sim C_6$ アルケニレン) - Y - ($C_2 \sim C_6$ アルケニレン)、及び ($C_2 \sim C_6$ アルキニレン) - Y - ($C_2 \sim C_6$ アルキニレン) から選択されるテザー基であり、

式中、Yが独立して、O、S、 NR^1 、アリール、及びヘテロアリールから選択され、アルキレン、アルケニレン、アリール、及びヘテロアリールが独立してかつ任意に、F、OH、 $O(C_1 \sim C_6$ アルキル)、 NH_2 、 $NHCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$ 、 $OP(O)_3H_2$ 、及び $C_1 \sim C_6$ アルキルで置換され、式中、アルキルが、1つ以上のFで任意に置換されるか、

またはアルキレン、アルケニレン、アリール、及びヘテロアリールが独立してかつ任意に、Lへの結合で置換され、

D が、



から選択される薬物部分であり、式中、波線が、Tへの結合部位を示し、
 X^1 及び X^2 が独立して、O 及び NR^3 から選択され、式中、 R^3 が、H、及び 1 つ以上の F で任意に置換される $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、
 R^4 が、H、 CO_2R 、またはリンカー (L) への結合であり、式中、R が、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、またはベンジルであり、
 R^5 が、H、または $C_1 \sim C_6$ アルキルである、請求項 27 に記載の免疫複合体。

【0363】

(6) アマトキシシン

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、1 つ以上のアマトキシシン分子にコンジュゲートされた抗体を含む。アマトキシシンは、8 個のアミノ酸からなる環状ペプチドである。それらは、タマゴテングダケ (*Amanita phalloide*) マッシュルームから単離され得るか、または合成的に調製され得る。アマトキシシンは、哺乳動物細胞の DNA 依存的 RNA ポリメラーゼ II を特異的に阻害し、それにより影響を受ける細胞の転写及びタンパク質生合成も阻害する。細胞内の転写の阻害により、成長及び増殖が停止する。例えば、Moldenhauer et al. JNCI 104: 1 - 13 (2012)、WO2010115629、WO2012041504、WO2012119787、WO2014043403、WO2014135282、及び WO2012119787 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を参照されたい。いくつかの実施形態において、1 つ以上のアマトキシシン分子は、1 つ以上の - アマニチン分子である。

【0364】

(7) 他の薬物部分

薬物部分は、ゲルダナマイシン (Mandler et al (2000) J. 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)、ならびに、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の

非結合活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）由来）、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（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンシンタンパク質、アメリカヤマゴボウ（*Phytolacca americana*）タンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、ニガウリ（*Momordica charantia*）阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ（*Saponaaria officinalis*）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、エノマイシン、及びトリコテセンが含まれるが、これらに限定されない酵素的活性毒素及びその断片も含む。例えば、WO 93 / 21232を参照されたい。

【0365】

薬物部分は、核酸分解活性を有する化合物も含む（例えば、リボヌクレアーゼまたはDNAエンドヌクレアーゼ）。

【0366】

ある特定の実施形態において、免疫複合体は、放射活性が高い原子を含み得る。種々の放射活性アイソトープは、放射性複合抗体の産生に使用可能である。例としては、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、及びLuの放射活性アイソトープが挙げられる。いくつかの実施形態において、免疫複合体が検出に使用される場合、シンチグラフィ試験のための放射活性原子、例えば、 Tc^{99} もしくは I^{123} 、または核磁気共鳴（NMR）撮像（磁気共鳴撮像（MRI）としても知られる）のためのスピン標識、例えば、ジルコニウム - 89、ヨード - 123、ヨード - 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、マンガナーゼ、または鉄を含み得る。ジルコニウム - 89は、様々な金属キレート剤に複合体化され得、例えば、PET撮像のために抗体にコンジュゲートされ得る（WO 2011 / 056983号）。

【0367】

放射標識または他の標識が、既知の方法で免疫複合体に組み込まれてもよい。例えば、ペプチドは、例えば、1つ以上のフッ素 - 19原子を1つ以上の水素の代わりに含む好適なアミノ酸前駆体を使用して、生合成され得るか、または化学的に合成され得る。いくつかの実施形態において、 Tc^{99} 、 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、及びIn¹¹¹等の標識は、抗体内のシステイン残基を介して結合され得る。いくつかの実施形態において、イットリウム - 90は、抗体のリシン残基を介して結合され得る。いくつかの実施形態において、IODOGEN法（Fraker et al（1978）Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49 - 57）を使用して、ヨード - 123を組み込むことができる。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」（Chatall, CRC Press 1989）では、ある特定の他の方法を説明する。

【0368】

ある特定の実施形態において、免疫複合体は、プロドラッグ活性酵素にコンジュゲートされた抗体を含み得る。いくつかのかかる実施形態において、プロドラッグ活性酵素は、プロドラッグ（例えば、ペプチジル化学療法剤、WO 81 / 01145を参照されたい）を、抗癌薬等の活性薬物に変換する。かかる免疫複合体は、いくつかの実施形態において、抗体依存的酵素媒介性プロドラッグ療法（「ADEPT」）において有用である。抗体にコンジュゲートされ得る酵素としては、リン酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なアルカリホスファターゼ、硫酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なアリアルスルファターゼ、非傷害性5 - フルオロシトシンを抗癌薬、5 - フルオロウラシルに変換するために有用なシトシンデアミナーゼ、ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、及びカテプシン（例えば、カテプシンB及びL）等のプロテアーゼ、D - アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを変換するために有用なD - アラニルカルボキシペプチダーゼ、グリコシル化プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用な

10

20

30

40

50

- ガラクトシダーゼ及びノイラミニダーゼ等の炭水化物切断酵素、 - ラクタムで誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するために有用な - ラクタマーゼ、ならびにそれらのアミン窒素において、フェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基でそれぞれ誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するために有用なペニシリンVアミダーゼ及びペニシリンGアミダーゼ等のペニシリンアミダーゼが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、酵素は、当該技術分野において周知の組み換えDNA技法によって抗体に共有結合され得る。例えば、Neuberger et al., Nature 312: 604 - 608 (1984) を参照されたい。

【0369】

c) 薬物負荷

薬物負荷は、式Iの分子における1抗体当たりの薬物部分の平均数である、pによって表される。薬物負荷は、1抗体当たり1~20個の薬物部分(D)の範囲であり得る。式IのADCは、1~20個の範囲の薬物部分とコンジュゲートされた抗体の集団を含む。複合反応からADCを調製する際の1抗体当たりの薬物部分の平均数は、質量分析法、ELISAアッセイ、及びHPLC等の従来手段によって特徴付けられてもよい。また、pの単位でのADCの定量分布が決定されてもよい。いくつかの事例において、pがある特定の値である同種のADCを、他の薬物負荷を有するADCから分離し、精製し、かつ特徴付けることは、逆相HPLCまたは電気泳動等の手段によって達成されてもよい。

【0370】

いくつかの抗体-薬物複合体では、pは、抗体上の結合部位の数によって限定され得る。例えば、上記のある特定の例示的な実施形態のように、結合がシステインチオールである場合、抗体は、1個のみもしくは数個のシステインチオール基を有し得るか、または、1個のみもしくは数個の反応性が十分なチオール基を有し得、それによって、リンカーが結合され得る。ある特定の実施形態において、薬物負荷がより高くなると、例えば、pが5超になると、ある特定の抗体-薬物複合体は凝集し、不溶性となり、毒性となるか、または細胞透過性が喪失し得る。ある特定の実施形態において、ADCの平均薬物負荷は、1~約8、すなわち約2~約6、または約3~約5の範囲である。実際、ある特定のADCでは、1抗体当たりの薬物部分の最適な比率は、8未満であり得、また約2~約5であり得ることが示されてきた(US7498298)。

【0371】

ある特定の実施形態において、理論上の最大数よりも少ない薬物部分が、複合反応中に抗体にコンジュゲートされる。抗体は、以下に考察されるように、例えば、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し得る。一般に、抗体は、薬物部分に連結し得る多くの遊離及び反応性システインチオール基を含有せず、実際、抗体におけ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。ある特定の実施形態において、抗体は、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)等の還元剤により、部分または完全還元条件下で還元されて、反応性システインチオール基が生成され得る。ある特定の実施形態において、本抗体は、リジンまたはシステイン等の反応性求核基を明らかにするために、変性条件に置かれる。

【0372】

ADCの負荷(薬物/抗体比)は、異なる方式で、ならびに例えば、(i)抗体と比較して比するモル過剰の薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬を限定すること、(ii)複合反応時間または温度を限定すること、及び(iii)システインチオール修飾のための部分または限定的還元条件によって制御されてもよい。

【0373】

1個を超える求核基が薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬と反応する場合、結果として生じる生成物は、抗体に結合する1個以上の薬物部分が分布するADC化合物の混合物であることを理解されたい。1抗体当たりの平均数薬物は、抗体及び薬物に特異的である二重ELISA抗体アッセイによって混合物から算出されてもよい。個々のADC分

10

20

30

40

50

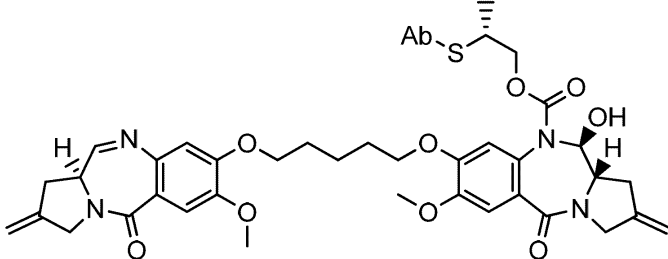
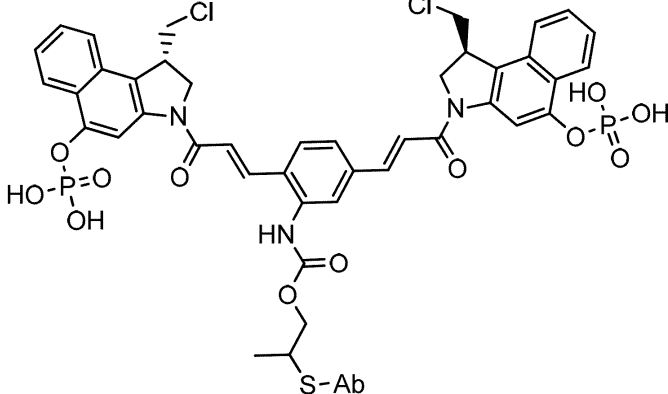
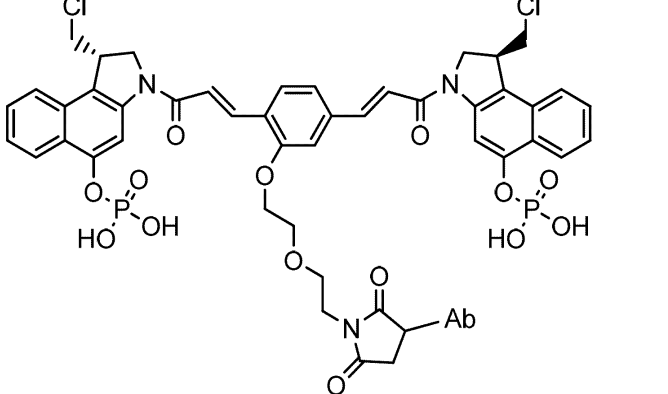
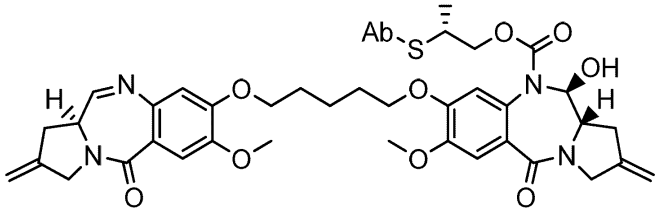
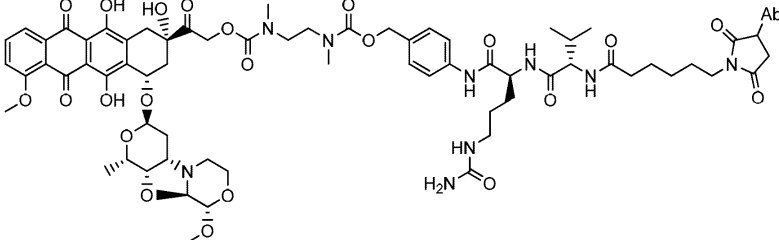
子は、質量分析法によって混合物中で特定され、HPLC、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって、分離されてもよい（例えば、McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7): 299-307、Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10: 7063-7070、Hamblett, K. J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 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）。ある特定の実施形態において、単一の負荷値を有する同種のADCが、電気泳動またはクロマトグラフィーによって複合混合物から単離されてもよい。

10

表Aの抗体薬物複合体51～58は、WO2013/055987、WO2015/023355、WO2010/009124、WO2015/095227の手順に従って、薬物部分をリンカー試薬とカップリングすることによって調製され、また本明細書に記載される、システイン操作された抗体を含む抗CLL1抗体のいずれかとコンジュゲートされ得る。特定の抗体-薬物複合体は、表Bに示される。

20

表A 抗体薬物複合体5 1～5 8

ADC番号	構造
5 1	
5 2	
5 3	
5 4	
5 5	

10

20

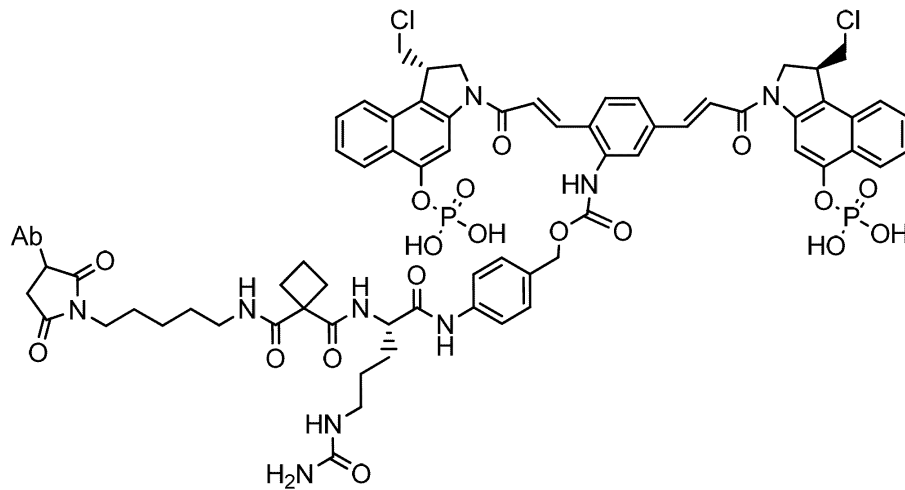
30

40

30

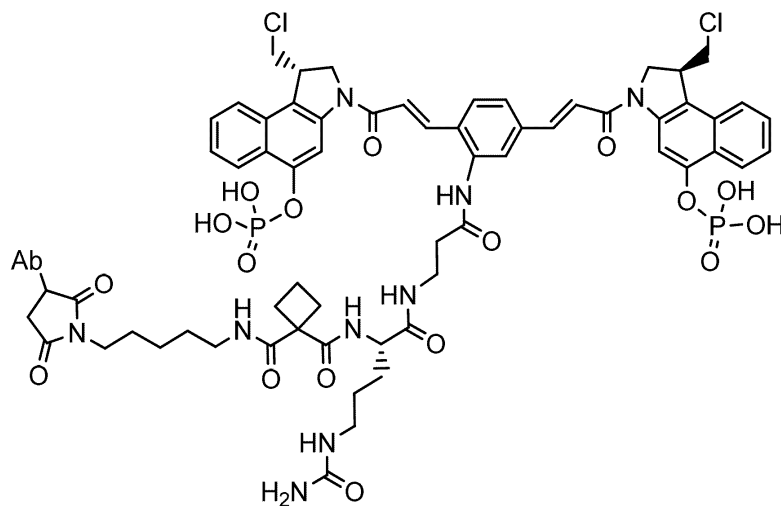
追加の例示的な抗体薬物複合体には、





10

、及び／または



20

が含まれる。

【 0 3 7 5 】

単純化のために、上記の構造及びA D C 5 1 ~ 5 8 の構造は、抗体に結合した1つのリンカー - 薬物基のみを示していることに留意されたい。上述の通り、1つを超えるリンカー - 薬物基が抗体に結合され得る。

30

表B 特定の抗体-薬物複合体 (ADC)

ADC番号	ADC式	リンカー-薬物 LD番号 (表1)	DAR*
ADC-1 01	チオCh抗CLL-1 21C9 HC A 118C-(LD-55)	55	2.0
ADC-1 02	チオCh抗CLL-1 3H10 HC A1 18C-(LD-55)	55	2.0
ADC-1 03	チオCh抗CLL-1 28H12 HC A118C-(LD-55)	55	1.9
ADC-1 04	チオCh抗CLL-1 20B1 HC A 118C-(LD-55)	55	1.8
ADC-1 05	チオCh抗CLL-1 6E7 HC A1 18C-(LD-55)	55	1.9
ADC-1 06	チオHu抗CLL-1 6E7. H1eL4 HC A118C-(LD-54)	54	1.95
ADC-1 07	チオHu抗CLL-1 21C9. H3L2 HC A118C-(LD-54)	54	1.96
ADC-1 08	チオHu抗CLL-1 21C9. H3L2 LC K149C-(LD-54)	51	1.9
ADC-1 09	チオHu抗CLL-1 6E7. H1eL4 LC K149C-(LD-51)	51	1.91
ADC-1 10	チオHu抗CLL-1 6E7. N54A LC K149C-(LD-51)	51	2.0
ADC-1 11	チオHu抗CLL-1 6E7. H1eL4 . N54A LC K149C-(LD-5 3)	53	2.0
ADC-1 12	チオHu抗CLL-1 6E7. H1eL4 . N54A LC K149C-(LD-5 2)	52	1.9
ADC-1 13	チオHu抗CLL-1 6E7. N54A LC K149C-(LD-51)	51	1.9
ADC-1 14	チオHu抗CLL-1 6E7. N54A LC K149C-(LD-56)	56	2.0
ADC-1 15	チオHu抗CLL-1 6E7. N54A LC K149C-(LD-57)	57	1.7
ADC-1 16	チオHu抗CLL-1 6E7. N54A LC K149C-(LD-58)	58	1.9

DAR = 薬物 / 抗体比平均

A118C (EU付番) = A121C (連続的付番) = A114C (Kabata付番)

野生型 (「WT」)、システイン操作された突然変異抗体 (「チオ」)、軽鎖 (「LC」)、重鎖 (「HC」)、6-マレイミドカプロイル (「MC」)、マレイミドプロパノイル (「MP」)、バリン-シトルリン (「val-cit」または「vc」)、アラニン-フェニルアラニン (「ala-phe」)、p-アミノベンジル (「PAB」)、及び p-アミノベンジロキシカルボニル (「PABC」)

【0376】

d) 免疫複合体を調製するある特定の方法

式IのADCは、(1) 抗体の求核基と二価リンカー試薬とを反応させて共有結合によってAb-Lを形成し、続いて薬物部分Dと反応させることと、(2) 薬物部分の求核基と二価リンカー試薬とを反応させて、共有結合を介してD-Lを形成し、続いて抗体の求核基と反応させることとを含む、当業者に既知の有機化学反応、条件、及び試薬を用いる

いくつかの経路によって調製されてもよい。後者の経路を介して式 I の A D C を調製するための例示的な方法は、U S 7 4 9 8 2 9 8 に記載され、それは参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【 0 3 7 7 】

抗体上の求核基には、(i) N 末端アミン基、(i i) 側鎖アミン基、例えば、リジン、(i i i) 側鎖チオール基、例えば、システイン、及び(i v) 抗体がグリコシル化される糖ヒドロキシルまたはアミノ基が含まれるが、これらに限定されない。アミン、チオール、及びヒドロキシル基は、求核性であり、(i) N H S エステル、H O B t エステル、ハロホルメート(h a l o f o r m a t e)、及び酸ハロゲン化物等の活性エステル、(i i) ハロアセトアミド等のアルキル及びベンジルハロゲン化物、ならびに(i i i) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、及びマレイミド基を含む、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と反応して、共有結合を形成することが可能である。ある特定の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、完全にまたは部分的に還元されるように、D T T (ジチオスレイトール) またはトリカルボニルエチルホスフィン(T C E P) 等の還元剤での処理によって、リンカー試薬とのコンジュゲートに対して反応し得る。したがって、各システイン架橋は、理論上、2 つの反応性のチオール求核剤を形成することになる。追加の求核基は、リジン残基の修飾によって、例えば、リジン残基と 2 - イミノチオラン(トラウト試薬(T r a u t ' s r e a g e n t)) とを反応させて、アミンをチオールへと変換させることによって抗体中に導入することができる。反応性のチオール基もまた、1 個、2 個、3 個、4 個、またはそれ以上のシステイン残基を導入することによって(例えば、1 個以上の非天然システインアミノ酸残基を含む変異形抗体を調製することによって) 抗体中に導入され得る。

【 0 3 7 8 】

本発明の抗体 - 薬物複合体はまた、アルデヒドまたはケトンカルボニル基等の抗体上の求電子基と、リンカー試薬または薬物上の求核基との間の反応によって産生されてもよい。リンカー試薬上の有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸塩、及びアリールヒドラジドが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、抗体は、リンカー試薬または薬物上の求核置換基と反応することができる求電子部分を導入するように修飾される。別の実施形態において、グリコシル化抗体の糖を、例えば、過ヨウ素酸塩酸化試薬で酸化させて、リンカー試薬または薬物部分のアミン基と反応し得るアルデヒド基またはケトン基を形成してもよい。結果として生じるイミンシッフ塩基群は、安定した結合を形成し得るか、または例えば、水素化ホウ素試薬によって還元されて、安定したアミン結合を形成し得る。一実施形態において、グリコシル化された抗体の炭水化物部分と、ガラクトースオキシダーゼまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとを反応させると、抗体において、薬物上の適切な基と反応することができるカルボニル(アルデヒド及びケトン)基がもたらされ得る(H e r m a n s o n , B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s) 。別の実施形態において、N 末端セリンまたはスレオニン残基を含有する抗体は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応し、それによって第 1 のアミノ酸の代わりにアルデヒドが産生され得る(G e o g h e g a n & S t r o h , (1 9 9 2) B i o c o n j u g a t e C h e m . 3 : 1 3 8 - 1 4 6 、米国公開特許第 5 3 6 2 8 5 2 号) 。かかるアルデヒドと、薬物部分またはリンカー求核剤とを反応させることができる。

【 0 3 7 9 】

薬物部分上の例示的な求核基には、(i) N H S エステル、H O B t エステル、ハロホルメート、及び酸ハロゲン化物等の活性エステル、(i i) ハロアセトアミド等のアルキル及びベンジルハロゲン化物、ならびに(i i i) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、及びマレイミド基を含む、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と反応して、共有結合を形成することが可能なアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸塩、及びアリールヒドラジド基が含まれるが、これらに限定されない。

【0380】

A D Cを調製するために使用され得るクロスリンカー試薬の非限定的な例は、本明細書において、「例示的なリンカー」と題される節に記載される。かかるクロスリンカー試薬を使用して、タンパク質性部分及び化学部分を含む2つの部分を連結する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、抗体及び細胞傷害性薬剤を含む融合タンパク質は、例えば、組み換え技法またはペプチド合成によって作製されてもよい。組み換えDNA分子は、互いに隣接しているか、または複合体の所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって隔離されている、複合体の抗体及び細胞傷害性部分をコードする領域を含んでもよい。

【0381】

なおも別の実施形態において、抗体は、腫瘍の事前標的化 (pre-targeting) において利用するために「受容体」(ストレプトアビジン等) に複合されてもよく、その腫瘍の事前標的化において抗体-受容体複合体が、患者に投与され、続いて除去剤を使用した血液循環からの非結合複合体の除去、次いで細胞傷害性薬剤 (例えば、薬物または放射性ヌクレオチド) に複合されている「リガンド」(例えば、アビジン) の投与が行われる。

【0382】

E. 診断及び検出のための方法及び組成物

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗CLL-1抗体のいずれかは、生体試料中のCLL-1の存在の検出に有用である。本明細書で使用される「検出すること」という用語は、定量または定性検出を包含する。「生体試料」は、例えば、細胞または組織 (例えば、癌性であるかまたは癌性である可能性がある、リンパ球、リンパ芽球、単球、骨髄単球、及びこれらの混合物等のリンパ組織を含む、生検材料) を含む。

【0383】

一実施形態において、診断または検出の方法において使用するための抗CLL-1抗体が提供される。さらなる態様において、生体試料中のCLL-1の存在の検出方法が提供される。ある特定の実施形態において、本方法は、生体試料を、本明細書に記載される抗CLL-1抗体と、CLL-1への抗CLL-1抗体の結合を許容する条件下で接触させることと、複合体が、生体試料中で、抗CLL-1抗体とCLL-1との間の複合体が形成されるかどうかを検出することを含む。かかる方法は、in vitro方法であっても、in vivo方法であってもよい。一実施形態において、例えば、CLL-1が患者の選択のためのバイオマーカーである場合、抗CLL-1抗体を使用して、抗CLL-1抗体での治療に適格な対象を選択する。さらなる実施形態において、生体試料は、細胞または組織である。

【0384】

さらなる実施形態において、抗CLL-1抗体は、例えば、癌を診断する、癌の予後を判定するもしくは癌を病期分類する、癌の適切な治療過程を決定する、または治療法に対する癌の反応を監視する目的でin vivoで使用されて、例えば、in vivo画像法によって、対象におけるCLL-1陽性癌を検出する。in vivo検出のための当該技術分野で既知の1つの方法は、例えば、van Dongen et al., The Oncologist 12:1379-1389 (2007) 及びVerel et al., J. Nucl. Med. 44:1271-1281 (2003) に記載される、イムノ-陽電子放射断層撮影 (イムノ-PET) である。かかる実施形態において、対象におけるCLL-1陽性癌の検出のための方法が提供され、本方法は、標識された抗CLL-1抗体を、CLL-1陽性癌を有するかまたはそれを有することが疑われる対象に投与することと、対象において標識された抗CLL-1抗体を検出することと、を含み、その標識された抗CLL-1抗体の検出は、対象におけるCLL-1陽性癌を示す。かかる実施形態のある特定のものにおいて、標識された抗CLL-1抗体は、 ^{68}Ga 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 、及び ^{124}I 等の陽電子放出体にコンジュゲートされる抗CLL-1抗体を含む。特定の実施形態において、陽電子放出体は、

10

20

30

40

50

^{89}Zr である。

【0385】

さらなる実施形態において、診断または検出方法は、基質に固定化された第1の抗CLL-1抗体を、CLL-1の存在について試験されるべき生体試料と接触させることと、その基質を第2の抗CLL-1抗体に曝露することと、その第2の抗CLL-1が、生体試料中で、第1の抗CLL-1抗体とCLL-1との間の複合体に結合されるかどうかを検出することを含む。基質は、任意の支持培地、例えば、ガラス、金属、セラミック、ポリマービーズ、スライド、チップ、及び他の基質であってもよい。ある特定の実施形態において、生体試料は、細胞または組織を含む。ある特定の実施形態において、第1または第2の抗CLL-1抗体は、本明細書に記載される抗体のいずれかである。

10

【0386】

上記の実施形態のいずれかに従って診断または検出され得る例示的な障害には、CLL-1陽性癌、例えば、CLL-1陽性AML、CLL-1陽性CML、CLL-1陽性MDS、CLL-1陽性慢性骨髄単球性白血病、CLL-1陽性APL、CLL-1陽性慢性骨髄増殖性障害、CLL-1陽性血小板性白血病、CLL-1陽性pre-B-ALL、CLL-1陽性pre-T-ALL、CLL-1陽性多発性骨髄腫、CLL-1陽性肥満細胞疾患、CLL-1陽性肥満細胞性白血病、CLL-1陽性肥満細胞肉腫、CLL-1陽性骨髄性肉腫、CLL-1陽性リンパ性白血病、及びCLL-1陽性未分化白血病等が含まれる。いくつかの実施形態において、CLL-1陽性癌は、「0」超の抗CLL-1免疫組織化学(IHC)またはin situハイブリダイゼーション(ISH)スコアを受ける癌であり、それは、実施例Bにおいて本明細書に記載される条件下での、90%超の腫瘍細胞の非常に弱い染色または無染色に対応する。別の実施形態において、CLL-1陽性癌は、実施例Bにおいて本明細書に記載される条件下で定義されるように、1+、2+、または3+レベルでCLL-1を発現する。いくつかの実施形態において、CLL-1陽性癌は、CLL-1 mRNAを検出する逆転写酵素PCR(RT-PCR)アッセイに従ってCLL-1を発現する癌である。いくつかの実施形態において、RT-PCRは、定量RT-PCRである。

20

【0387】

ある特定の実施形態において、標識された抗CLL-1抗体が提供される。標識には、直接検出される標識(蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、及び放射性標識等)または部分、及び例えば、酵素反応または分子相互作用によって間接的に検出される酵素またはリガンド等の部分が含まれるが、これらに限定されない。例示的な標識には、放射性同位体 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、及び ^{131}I 、希土類キレートまたはフルオレセイン及びその誘導体等のフルオロフォア、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルセリフェラーゼ(luciferases)、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ(米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖質オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸塩デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化させる酵素、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、またはマイクロペルオキシダーゼとカップリングされた、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ等の複素環式オキシダーゼ、ピオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定した遊離ラジカル等が含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態において、標識は、陽電子放出体である。陽電子放出体には、 ^{68}Ga 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 、及び ^{124}I が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。

30

40

【0388】

F. 薬学的製剤

本明細書に記載される抗CLL-1抗体または免疫複合体の薬学的製剤は、所望の程度

50

の純度を有するかかる抗体または免疫複合体と、1つ以上の任意の薬学的に許容される担体 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) とを混合することによって、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製される。薬学的に許容される担体は、一般に、用いられる投薬量及び濃度で、レシピエントに対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸等の緩衝液、アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤、防腐剤 (塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム等、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール、メチルもしくはプロピルパラベン等のアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール等)、低分子量 (約10残基未満) のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン等のタンパク質、ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン等のアミノ酸、単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物、EDTA等のキレート薬剤、ショ糖、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール等の糖類、ナトリウム等の塩形成対イオン、金属複合体 (例えば、Zn-タンパク質複合体)、ならびに/またはポリエチレングリコール (PEG) 等の非イオン性界面活性剤が含まれるが、これらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体には、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (SHASEGP)、例えば、rHuPH20 (HYLENE X (登録商標)、Baxter International, Inc.) 等のヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質等の、介在性 (instertial) 薬物分散剤がさらに含まれる。rHuPH20を含むある特定の例示的なSHASEGP及び使用法は、米国特許公開第2005/0260186号、同第2006/0104968号に記載される。一態様において、SHASEGPは、コンドロイチナーゼ等の1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【0389】

例示的な凍結乾燥抗体または免疫複合体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載される。水性抗体または免疫複合体製剤には、米国特許第6,171,586号及びWO2006/044908に記載されるものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液が含まれる。

【0390】

本明細書における製剤はまた、必要に応じて、治療されている特定の適応症に対する1つを超える活性成分、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない相補的活性を有する成分を含むしてもよい。

【0391】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合によって調製される、マイクロカプセル、例えば、それぞれ、コロイド状薬物送達系 (例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル) 中またはマクロエマルジョン中のヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ- (メチルメタクリレート (methyl methacrylate)) マイクロカプセル中に封入されてもよい。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示される。

【0392】

徐放性調製物が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例としては、抗体または免疫複合体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、そのマトリクスは、造形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。

【0393】

in vivo 投与のために使用されるべき製剤は、一般に滅菌されている。無菌状態は、例えば、無菌濾過膜を介する濾過によって、容易に達成され得る。

【0394】

G. 治療方法及組成物

本明細書に提供される抗CLL-1抗体または免疫複合体のいずれも、例えば、治療方法等の方法において使用され得る。

【0395】

一態様において、本明細書に提供される抗CLL-1抗体または免疫複合体は、CLL-1陽性細胞の増殖の阻害方法において使用され、本方法は、細胞を、細胞の表面上のCLL-1への抗CLL-1抗体または免疫複合体の結合を許容する条件下で、抗CLL-1抗体または免疫複合体に曝露し、それによって細胞の増殖を阻害することを含む。ある特定の実施形態において、本方法は、*in vitro*方法または*in vivo*方法である。さらなる実施形態において、細胞は、リンパ球、リンパ芽球、単球、または骨髓単球細胞である。さらなる実施形態において、細胞は、単球、顆粒球、及び/または単球/顆粒球系列の前駆細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は、FLT3遺伝子内縦列反復の存在について陽性である。いくつかの実施形態において、細胞は、MLL-AF9融合遺伝子（例えば、MLL-AF9転座）の存在について陽性である。いくつかの実施形態において、細胞は、染色体11q23転座の存在について陽性である。いくつかの実施形態において、細胞は、転座t(9;11)(p22;q23)の存在について陽性について陽性である。

【0396】

*in vitro*での細胞増殖の阻害は、Promega (Madison, WI) から市販されている、CellTiter-Glo (商標) Luminescent Cell Viability アッセイを使用してアッセイされてもよい。そのアッセイは、代謝的に活性な細胞を示す、存在するATPの定量に基づいて、培養物中の生存細胞の数を決定する。Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88、米国特許第6602677号を参照されたい。アッセイは、自動化高処理スクリーニング(HTS)に適した96ウェルまたは384ウェル形式で行われてもよい。Cree et al. (1995) Anti Cancer Drugs 6: 398-404を参照されたい。アッセイ手順には、単一の試薬(CellTiter-Glo (登録商標) 試薬)を培養細胞に直接添加することを伴う。これにより、細胞溶解及びルシフェラーゼ反応によって生み出される発光シグナルの生成がもたらされる。発光シグナルは、培養物中に存在する生存細胞の数に直接比例する、存在するATPの量に比例する。データは、ルミノメーターまたはCCDカメラ画像化デバイスによって記録することができる。発光出力は、相対発光量(RLU)として表される。

【0397】

別の態様において、薬として使用するための抗CLL-1抗体または免疫複合体が提供される。さらなる態様において、治療方法において使用するための抗CLL-1抗体または免疫複合体が提供される。ある特定の実施形態において、CLL-1陽性癌の治療において使用するための抗CLL-1抗体または免疫複合体が提供される。ある特定の実施形態において、本発明は、CLL-1陽性癌を有する個体を治療方法において使用するための抗CLL-1抗体または免疫複合体を提供し、本方法は、個体に有効量の抗CLL-1抗体または免疫複合体を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、例えば、以下に記載される有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。

【0398】

さらなる態様において、本発明は、薬の製造または調製における、抗CLL-1抗体または免疫複合体の使用を提供する。一実施形態において、薬は、CLL-1陽性癌の治療のためのものである。さらなる実施形態において、薬は、CLL-1陽性癌の治療方法において使用するためのものであり、本方法は、CLL-1陽性癌を有する個体に有効量の薬を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、例えば、以下に記載される有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。

【0399】

さらなる態様において、本発明は、CLL-1陽性癌の治療のための方法を提供する。一実施形態において、本方法は、かかるCLL-1陽性癌有する個体に、有効量の抗CLL-1抗体または免疫複合体を投与することを含む。いくつかの実施形態において、癌は、AMLである。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、以下に記載されるような、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。

【0400】

上記の実施形態のいずれかによるCLL-1陽性癌は、例えば、CLL-1陽性AML、CLL-1陽性CML、CLL-1陽性骨髓異形成症候群(MDS)、CLL-1陽性慢性骨髓単球性白血病(CML)、CLL-1陽性APL、CLL-1陽性慢性骨髓増殖性障害、CLL-1陽性血小板性白血病、CLL-1陽性pre-B-ALL、CLL-1陽性pre-T-ALL、CLL-1陽性多発性骨髓腫、CLL-1陽性肥満細胞疾患、CLL-1陽性肥満細胞性白血病、CLL-1陽性肥満細胞肉腫、CLL-1陽性骨髓性肉腫、CLL-1陽性リンパ性白血病、及びCLL-1陽性未分化白血病であり得る。いくつかの実施形態において、CLL-1陽性癌は、「0」超の抗CLL-1免疫組織化学(IHC)またはin situハイブリダイゼーション(ISH)スコアを受ける癌であり、それは、実施例Bにおいて本明細書に記載される条件下での、90%超の腫瘍細胞の非常に弱い染色または無染色に対応する。別の実施形態において、CLL-1陽性癌は、実施例Bにおいて本明細書に記載される条件下で定義されるように、1+、2+、または3+レベルでCLL-1を発現する。いくつかの実施形態において、CLL-1陽性癌は、CLL-1 mRNAを検出する逆転写酵素PCR(RT-PCR)アッセイに従ってCLL-1を発現する癌である。いくつかの実施形態において、RT-PCRは、定量RT-PCRである。

【0401】

いくつかの実施形態において、上記の実施形態のいずれかによる細胞増殖性障害は、例えば、AML、CML、及び/またはMDSであり得る。いくつかの実施形態において、CLL-1陽性細胞増殖性障害は、CLL-1陽性AML、CLL-1陽性CML、CLL-1陽性MDSである。いくつかの実施形態において、AMLは、AMLサブタイプ1、AMLサブタイプ2、AMLサブタイプ3、AMLサブタイプ4、AMLサブタイプ5、AMLサブタイプ6、及びAMLサブタイプ7のうちの1つ以上である。いくつかの実施形態において、AMLは、AMLサブタイプ3(急性前骨髓球性白血病、APML)である。いくつかの実施形態において、AMLは、AMLサブタイプ1、AMLサブタイプ2、AMLサブタイプ4、AMLサブタイプ5、AMLサブタイプ6、及びAMLサブタイプ7のうちの1つ以上であり、かつAMLサブタイプ3ではない。

【0402】

いくつかの実施形態において、細胞増殖性障害(例えば、CLL-1陽性癌及び/またはAML)は、FLT3、ヌクレオフォスミン(NPM1)、CCAAT/エンハンサー結合タンパク質(C/EBP)(CEBPA)、及び/またはc-KITにおける突然変異の存在について陽性である。いくつかの実施形態において、細胞増殖性障害(例えば、CLL-1陽性癌及び/またはAML)は、FLT3遺伝子内縦列反復の存在について陽性である。いくつかの実施形態において、細胞増殖性障害(例えば、CLL-1陽性癌及び/またはAML)は、FLT3チロシンキナーゼドメイン点突然変異の存在について陽性である。いくつかの実施形態において、細胞増殖性障害(例えば、CLL-1陽性癌及び/またはAML)は、イソクエン酸脱水素酵素1及び/または2(IDH1及び/またはIDH2)における突然変異の存在について陽性である。いくつかの実施形態において、細胞増殖性障害(例えば、CLL-1陽性癌及び/またはAML)は、DNAメチルトランスフェラーゼ3A(DNMT3A)における突然変異の存在について陽性である。いくつかの実施形態において、細胞増殖性障害(例えば、CLL-1陽性癌及び/またはAML)は、(a)NPM1及びFLT3における突然変異、(b)野生型NPM1及び突然変異FLT3、ならびに/または(c)野生型NPM1及びFLT3の存在につい

てNK - AML陽性である。

【0403】

いくつかの実施形態において、細胞増殖性障害（例えば、CLL - 1陽性癌及び／またはAML）は、t(15;17)、t(8;21)、inv(16)、t(16;16)、t(9;11)(p22;q23)、t(6;9)(p23;q34)、inv(3)(q21;q26.2)、inv(3;3)(q21;q26.2)、t(1;22)(p13;q13)、t(8;21)(q22;q22)、inv(16)(p13;q22)、t(16;16)(p13.1;q22)、及び／またはt(15;17)(q22;q12)のうちの1つ以上等の陽性細胞遺伝学的異常である。いくつかの実施形態において、細胞増殖性障害（例えば、CLL - 1陽性癌及び／またはAML）は、MLL - AF9融合遺伝子（例えば、MLL - AF9転座）の存在について陽性である。いくつかの実施形態において、細胞増殖性障害（例えば、CLL - 1陽性癌及び／またはAML）は、染色体11q23転座の存在について陽性である。いくつかの実施形態において、細胞増殖性障害（例えば、CLL - 1陽性癌）は、転座t(9;11)(p22;q23)の存在について陽性である細胞増殖性障害（例えば、CLL - 1陽性癌及び／またはAML）である。

10

【0404】

上の実施形態のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

【0405】

さらなる態様において、本発明は、例えば、上記の治療方法のいずれかにおいて使用するための、本明細書に提供される抗CLL - 1抗体または免疫複合体のいずれかを含む薬学的製剤を提供する。一実施形態において、薬学的製剤は、本明細書に提供される抗CLL - 1抗体または免疫複合体のいずれかと薬学的に許容される担体とを含む。別の実施形態において、薬学的製剤は、本明細書に提供される抗CLL - 1抗体または免疫複合体のいずれかと、例えば、以下に記載されるような少なくとも1つの追加の治療剤とを含む。

20

【0406】

本発明の抗体または免疫複合体は、治療法において、単独で、または他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体または免疫複合体は、少なくとも1つの追加の治療剤と同時に投与されてもよい。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、アントラサイクリンである。いくつかの実施形態において、アントラサイクリンは、ダウノルビシンまたはイダルビシンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、シタラピンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、クラドリピンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、フルダラビンまたはトポテカンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、5 - アザシチジンまたはデシタビンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、ATRA（全トランス型レチノイン酸）である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、三酸化ヒ素である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、ヒドロキシ尿素である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、エトポシドである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、ミトキサントロンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、クロファラビンである。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、ヒドロキシ尿素である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、キザルチニブ等のFLT3阻害剤である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、IDH2阻害剤である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、CHK1阻害剤である。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、ボラセルチブ等のPLK阻害剤である。

30

40

【0407】

本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、追加の治療薬は、BCL2阻害剤である。いくつかの実施形態において、BCL2阻害剤は、ベナトクラックス(venatoclax)である。

【0408】

本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、追加の治療剤は、後成的修飾剤(epi

50

genetic modifier)である。いくつかの実施形態において、後成的修飾剤は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態において、後成的修飾剤は、DNAメチルトランスフェラーゼI阻害剤である。いくつかの実施形態において、後成的修飾剤は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態において、後成的修飾剤は、BET阻害剤である。いくつかの実施形態において、BET阻害剤は、第1のプロモドメイン(BD1)を選択的に標的とする。いくつかの実施形態において、BET阻害剤は、第2のプロモドメイン(BD2)を選択的に標的とする。いくつかの実施形態において、BET阻害剤は、GSK1210151A、GSK525762、OTX-01、TEN-010、CPI-203、及びCPI-0610のうちの1つ以上である。

10

【0409】

いくつかの実施形態において、本方法は、追加の療法をさらに含んでもよい。追加の療法は、放射線療法、手術、化学療法、遺伝子療法、DNA療法、ウイルス療法、RNA療法、免疫療法、骨髄移植、ナノ療法、モノクローナル抗体療法、または前述のものの組み合わせであってもよい。追加の療法は、アジュバントまたはネオアジュバント療法の形式であってもよい。いくつかの実施形態において、追加の療法は、小分子酵素阻害剤または抗転移剤の投与である。いくつかの実施形態において、追加の療法は、副作用制限剤(例えば、制嘔吐剤等の治療の副作用の発生及び/または重症度を低減することを意図された薬剤)の投与である。いくつかの実施形態において、追加の療法は、放射線療法である。いくつかの実施形態において、追加の療法は、手術である。いくつかの実施形態において、追加の療法は、放射線療法と手術の組み合わせである。いくつかの実施形態において、追加の療法は、線照射である。いくつかの実施形態において、追加の療法は、幹細胞移植である。いくつかの実施形態において、追加の療法は、上述の治療剤のうちの1つ以上の別個の投与であってもよい。

20

【0410】

本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、追加の療法は、癌免疫療法を含む。本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、癌免疫療法は、PD-1軸結合アンタゴニストを含む。本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、癌免疫療法は、PD-1結合アンタゴニストを含む。本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、癌免疫療法は、PD-L1結合アンタゴニストを含む。本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、癌免疫療法は、PD-L2結合アンタゴニストを含む。本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、癌免疫療法は、CTLA-4阻害を含む。本方法のいずれかのいくつかの実施形態では、癌免疫療法は、免疫アゴニストを含む。

30

【0411】

上述のかかる併用療法は、併用投与(2つ以上の治療剤が同じまたは別個の製剤中に含まれる)、及び個別投与を包含するが、この場合、本発明の抗体または免疫複合体の投与は、追加の治療剤及び/またはアジュバントの投与の前に、それと同時に、かつ/またはその後に行われ得る。本発明の抗体または免疫複合体はまた、放射線療法と組み合わせて使用することもできる。

【0412】

本発明の抗体または免疫複合体(及び任意の追加の治療剤)は、非経口投与、肺内投与、及び鼻腔内投与、ならびに局所治療で所望される場合、病変内投与を含む、任意の好適な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。投薬は、任意の好適な経路によるもの、例えば、注射によるものであってよく、例えば、投与が短時間であるか慢性的であるかに部分的に応じて、静脈内または皮下注射等によるものであってよい。単回または種々の時点にわたる複数回投与、ボラス投与、及びパルス注入を含むが、これらに限定されない、種々の投薬スケジュールが本明細書で企図される。

40

【0413】

本発明の抗体または免疫複合体は、良好な医療行為と一致した様式で、製剤化され、投

50

薬され、かつ投与されることになる。これに関連して考慮する要因には、治療されている特定の障害、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的病態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール管理、及び医療従事者に既知の他の要因が含まれる。必然的にではなく任意に、抗体または免疫複合体は、問題の障害を予防または治療するために現在使用される１つ以上の薬剤と共に製剤化される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体または免疫複合体の量、障害または治療の種類、及び以上で考察された他の要因によって決定される。これらは、一般に、本明細書に記載されるものと同じ投薬量及び投与経路で、または本明細書に記載される投薬量の約１～９９％で、または適切であると経験的／臨床的に決定される任意の投薬量及び任意の経路で使用される。

10

【０４１４】

疾患の予防または治療のために、本発明の抗体または免疫複合体の適切な投薬量は（単独でまたは１つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用されるとき）、治療対象の疾患の種類、抗体または免疫複合体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体または免疫複合体が予防目的または治療目的で投与されるかどうか、以前の治療法、患者の病歴、抗体または免疫複合体への反応、ならびに主治医の裁量によって決定されることになる。抗体または免疫複合体は、患者に、１回で、または一連の治療にわたって、好適に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば、１回以上の別個の投与によるものであれ、連続注入によるものであれ、約１μg/kg～１５mg/kg（例えば、０．１mg/kg～１０mg/kg）の抗体または免疫複合体が、患者への投与のための初期候補投薬量であり得る。１つの典型的な１日投薬量は、上述の要因に応じて、約１μg/kg～１００mg/kg以上の範囲であり得る。数日間またはそれより長い日数にわたる反復投与では、病態に応じて、治療は一般に、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続される。抗体または免疫複合体の１つの例示的な投薬量は、約０．０５mg/kg～約１０mg/kgの範囲内となる。したがって、約０．５mg/kg、２．０mg/kg、４．０mg/kg、または１０mg/kg（またはそれらの任意の組み合わせ）の１つ以上の用量が患者に投与されてもよい。かかる用量は、断続的に、例えば、毎週または３週間毎に（例えば、約２～約２０回、または例えば、約６回用量の抗体を患者に投与するように）投与されてもよい。初回よりも高い負荷用量、続いて１回以上のより低い用量が投与されてもよい。しかしながら、他の投薬レジメンが有用な場合がある。この治療法の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

20

30

【０４１５】

上記製剤または治療方法のいずれも、本発明の免疫複合体と抗ＣＬＬ－１抗体との両方を使用して行われ得ることが理解される。

【０４１６】

H．製品

本発明の別の態様において、上述の障害の治療、予防、及び／または診断に有用な物質を含有する製品が提供される。本製品は、容器と、その容器上の、またはそれに関連したラベルもしくは添付文書とを含む。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、ＩＶ溶液バッグ等が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチック等の多様な材料から形成され得る。容器は、それ自体で、または別の組成物と組み合わせて障害の治療、予防、及び／または診断に有効である組成物を保有し、無菌アクセスポート（例えば、容器は、静脈注射用溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアルであってもよい）を有してもよい。組成物中の少なくとも１つの活性な薬剤は、本発明の抗体または免疫複合体である。ラベルまたは添付文書は、組成物が選定した病態を治療するために使用されることを表示する。さらに、製品は、（a）組成物がその中に含有された第１の容器（この組成物は本発明の抗体または免疫複合体を含む）、及び（b）組成物がその中に含有された第２の容器（この組成物はさらなる細胞傷害性薬剤または治療剤を含む）を含んでもよい。本発明のこの実施形態の製品は、組成物が特定の病態を治療するために使用され得ることを表示する、添付文書をさらに含んでもよい。代替的に、または追加

40

50

的に、製品は、注入用静菌水（B W F I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、またはデキストロース溶液等の薬学的に許容される緩衝液を含む第2の（または第3の）容器をさらに含んでもよい。それは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的な観点及びユーザの観点から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

【0417】

III. 実施例

以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。以上に提供される一般的説明を考慮すると、種々の他の実施形態が実施され得ることが理解される。

【0418】

実施例 1

10

A. モノクローナル抗体生成

ヒト（hu）及びカニクイザル（cyno）CLL-1に対するモノクローナル抗体を、以下の手順を使用して、動物を、哺乳動物発現系内で発現されたN末端Flag（DYKDDDDK）に融合した組み換えhu及びcynoCLL-1細胞外ドメイン（ECD、65-265huCLL-1及び65-265cynoCLL-1のアミノ酸）で免疫付与することによって生成した。huCLL1 ECDタンパク質（アミノ酸65-265）は、29%のマイナー対立遺伝子頻度（MAF）を有するSNP、AAA（Lys, K）244->CAA（GLN, Q）を含んだ。

【0419】

陽性クローンを拡大し、ELISA及びFACSによってhuCLL-1及びcynoCLL-1への結合について再スクリーニングした。組み換えhu及びcynoCLL-1を発現する安定した細胞株及び急性骨髄性白血病腫瘍細胞株上に発現された腫瘍由来CLL-1による蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）によって、強く反応した5つのクローン、すなわちm3H10、m6E7、m20B1、m21C9、及びm28H12を特定した。マウス重及び軽可変ドメインのアミノ酸配列のアラインメントが、図1A及びBに示される。m3H10及びm21C9は、同じ重鎖及び軽鎖CDRを共有し、m21C9重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列のみが、図1に示される。

20

【0420】

B. 種交差反応性及び結合親和性

モノクローナル抗体を試験して、それらがcynoCLL-1細胞外ドメイン（ECD）（huCLL-1タンパク質ECDに対して85.07%同一であり、87.35%類似である）と交差反応するかどうかを決定した。キメラ抗CLL-1ヒトIgGを、CM5センサーチップ上にコーティングしたマウス抗ヒトIgGによって捕捉した。動態測定のために、ヒトまたはcynoCLL-1の3倍段階希釈液（4.1nM~1000nM）を、HBS-E緩衝液中に注入した。会合速度（kon）及び解離速度（koff）を、単純な1対1Langmuir結合モデルを使用して算出した。平衡解離定数（KD）を、比率koff/konとして算出した。下の表2は、5つの抗体（m3H10、m6E7、m20B1、m21C9、及びm28H12）のキメラバージョンが、組み換えhu及びcynoCLL-1の両方を認識したことを示し、hu及びcynoCLL-1による相互作用の動態に関する詳細を提供する。cynoCLL-1に対する交差反応性のさらなる確認を、カニクイザル（モーリシャス起源）由来の血液のFACS分析によって行った（データは示されていない）。

30

40

表2. 抗CLL-1のBiacore

リガンド	検体	K_a ($M^{-1} s^{-1}$) 1)	K_d (s^{-1})	KD (M)
ch3H10	huCLL-1-Flag	2.7×10^5	2.4×10^{-3}	8.7 nM
	CynoCLL-1 Flag	1.7×10^5	7.7×10^{-4}	4.3 nM
ch6E7	huCLL-1-Flag	4.6×10^5	4.4×10^{-4}	0.9 nM
	CynoCLL-1 Flag	4.0×10^5	4.6×10^{-4}	1.1 nM
ch20B1	huCLL-1-Flag	2.2×10^5	1.0×10^{-3}	4.5 nM
	CynoCLL-1 Flag	1.9×10^5	1.2×10^{-3}	6.1 nM
ch21C9	huCLL-1-Flag	2.5×10^5	2.4×10^{-3}	9.7 nM
	CynoCLL-1 Flag	1.6×10^5	1.2×10^{-3}	7.1 nM
ch28H12	huCLL-1-Flag	5.0×10^5	9.5×10^{-3}	18 nM
	CynoCLL-1 Flag	6.7×10^5	2.3×10^{-4}	0.3 nM

【0421】

標準的手順 (Holmes et al., Science 256:1205-1210 (1992)) に従って Scatchard 分析を実施して、ch6E7 及び ch21C9 を含む抗体の相対結合親和性を決定した。

【0422】

抗CLL-1抗体を、間接Iodogen法を使用して $[I^{125}]$ 標識した $[I^{125}]$ 標識された抗CLL-1抗体を、NAP-5カラム (GE Healthcare) を使用したゲル濾過によって遊離 $^{125}I-Na$ から精製し、精製したヨウ素化抗CLL-1抗体は、8~10 mmCi/mgの特異性活性の範囲を有した。固定された濃度の $[I^{125}]$ 標識された抗体と減少する濃度の段階希釈した未標識抗体とを含有する50 mL体積の競合アッセイ混合物を、96ウェルプレート内に定置した。組み換えhuもしくはcynoCLL-1を安定して発現するHEK293AD細胞、または内因性CLL-1を発現するHL-60腫瘍細胞を、5%CO₂中において37℃で成長培地内にて培養した。Sigma Cell Dissociation Solutionを使用して細胞をフラスコから分離し、1%ウシ血清アルブミン (BSA)、300 mMヒトIgG、及び0.1%アジ化ナトリウムを有するDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) からなる結合緩衝液で洗浄した。洗浄した細胞を、0.2 mLの結合緩衝液中に100,000個の細胞の密度で96ウェルプレートに添加した。各ウェル内の $[I^{125}]$ 標識された抗体の最終濃度は、約250 pMであった。競合アッセイにおける未標識抗体の最終濃度は、10回の2倍希釈ステップを介した1000 nM~緩衝液のみのアッセイの0 nMの範囲であった。競合アッセイを、3通り行った。競合アッセイを、室温で2時間インキュベーションした。2時間のインキュベーションの後、競合アッセイをMillipore Multiscreenフィルタープレ

10

20

30

40

50

ート (Billerica, MA) に移し、結合緩衝液で4回洗浄して、結合していない (free from bound) [I^{125}] 標識された抗体を分離した。フィルターをWallac Wizard 1470 カウンター (PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc., Wellesley, MA) 上で計数した。Munson and Robardの適合アルゴリズムを使用して抗体の結合親和性を決定する (Munson and Robard 1980)、NewLigandソフトウェア (Genentech) を使用して、結合データを評価した。

【0423】

表は3、HEK293AD CLL-1安定細胞によって発現された組み換えhu及び c y n o C L L - 1 に対する、ならびにHL-60細胞に対する親和性 (0.45 ~ 1.2 nMのkD範囲) を示す。

表3. CLL-1に対する抗体親和性 [kD=nM] (Scatchard分析)

細胞		ch6E7	ch21C9
HL-60	K _D (nM)	0.65	0.45
EOL-1	K _D (nM)		
293AD/huCLL-1	K _D (nM)	0.80	0.59
293AD/c y n o C L L - 1	K _D (nM)	1.0	1.2

【0424】

C. モノクローナル抗体エピトープ分類

細胞ベース競合結合FACSアッセイを使用して、エピトープ分類も決定した。HL-60細胞を、50 ~ 100倍過剰の未標識競合抗体と共に、または伴わずにプレインキュベーションし、次に直接標識された検出抗体で染色した。検出抗体からのシグナルの低減は、未標識競合抗体が、検出抗体と同じまたは類似のCLL-1上の領域に結合することを示す。これは、検出物質 (detector) と競合物質 (competitor) との両方に同じ抗体が使用される場合に発生する。異なる未標識抗体による検出物質シグナルのプロッキングが存在しないとき、未標識抗体は、CLL-1内の異なる領域に結合している。

表4. 抗CLL-1 競合実験

	競合抗体				
検出抗体	c h 6 E 7	c h 2 0 B 1	c h 2 1 C 9	c h 2 8 H 1 2	R&D
R & D システム - P E (クローン 6 8 7 3 1 7)	✓	✗	✓	✗	✓
c h 6 E 7 - D y L i g h t 6 5 0	✓	✗	該当なし	✗	該当なし
c h 2 8 H 1 2 - D y L i g h t 6 5 0	該当なし	✗	該当なし	✓	該当なし
c h 2 1 C 9 - D y L i g h t 6 5 0	✓	✗	✓	✗	✓
e B i o s c i e n c e H B 3 - P E	✗	✗	✗	✗	✓
B D B i o s c i e n c e s 5 0 C 1 - P E	✗	✗	✗	✗	✗

10

20

【0425】

表4は、CLL-1に対する抗体のエピトープ分類を示す。ch6E7及びch21C9はR&Dシステム-PE(クローン687317)と結合するが、ch20B1及びch28H12は結合しない。R&Dシステムはまた、eBioscienceクローンHB3をブロッキングしたが、ch6E7及びch21C9は、eBioscienceクローンHB3結合をブロッキングすることができなかった。ch20B1及びch28H12は、任意の他の抗体と競合することができず、各抗体が別個のエピトープに結合することを示唆している。全ての抗体は、BD Biosciencesクローン50C1と競合することができず、同様にそれが別個のエピトープに結合することを示唆している。

30

【0426】

D. 抗CLL-1抗体のヒト化

モノクローナル抗体6E7及び21C9を、下に記載されるようにヒト化した。残基番号は、Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)に従う。

【0427】

6E7及び21C9のヒト化中に構築された変異形を、IgGの形態で評価した。マウス6E7及び21C9のVL及びVHドメインを、ヒトVLカッパI(VLK I)及びヒトVH下位集団I(VH I)コンセンサス配列と整列させた。マウス抗体の超可変領域を、VLK I及びVH Iアクセプターフレームワークに操作した。具体的には、mu6E7及びmu21C9 VLドメインから、24~34位(L1)、50~56位(L2)、及び89~97位(L3)を、VLK Iに移植し、mu6E7及びmu21C9 VHドメインから、26~35位(H1)、50~65位(H2)、及び93~102位(H3)を、VH Iに移植した。

40

【0428】

このセッションにおける抗体の結合親和性を、BIAcore(商標)T200 Formatによって決定した。簡潔に述べると、供給業者の指示に従って、BIAcore

50

(商標)リサーチグレードCM5チップを、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)試薬により活性化した。ヤギ抗ヒトFcIgGをチップにカップリングして、各フローセルにおいておよそ10,000応答単位(RU)を達成した。未反応のカップリング基を、1Mのエタノールアミンでブロックした。動態測定のために、抗体を捕捉して、およそ300RUを達成した。ヒトCLL-1の3倍段階希釈液を、HBS-P緩衝液(0.01MのHEPES、pH7.4、0.15MのNaCl、0.005%の界面活性剤P20)中に、30µl/分の流速で25 にて注入した。会合速度(kon)及び解離速度(koff)を、1対1Langmuir結合モデル(BIAcore(商標)T200 Evaluation Software第2.0版)を使用して算出した。平衡解離定数(Kd)を、比率koff/konとして算出した。

10

【0429】

CDR移植ヒト化6E7抗体の結合親和性を、キメラ6E7と比較した。CDR移植ヒト化6E7抗体の追加の変異形を作製して、CLL-1への結合に対する他のバーニア位置の寄与を評価した。6E7に関して、初めに4つの追加の軽鎖(L1:CDR移植+(L4、L48、及びK49)、L2:CDR移植+L4、L3:CDR移植+K49、及びL4:CDR移植+K49)、及び5つの追加の重鎖(H1:CDR移植+(A67、L69、V71、K73)、H2:CDR移植+A67、H3:CDR移植+L69、H4:CDR移植+V71、及びH5:CDR移植+K73)。軽鎖上のK49は、重要なマウスバーニア残基であり、突然変異分析に基づき、重鎖上のL69及びV71は、重要なマウスバーニア残基であると決定された(データは示されて位いない)。キメラ6E7は 9.59×10^{-10} MのKDで結合し、一方CDR移植+K49(LC)+(A67、L69、V71、K73(HC))、CDR移植+K49(LC)+(L69、V71(HC))は、それぞれ 1.40×10^{-9} M、及び 1.37×10^{-9} MのKDで結合した。

20

【0430】

CDR移植ヒト化21C9抗体の結合親和性を、キメラ21C9抗体と比較した。CDR移植ヒト化21C9抗体の追加の変異形を作製して、CLL-1への結合に対する他のバーニア位置の寄与を評価した。21C9に関して、初めに3つの追加の軽鎖(L1:CDR移植+(F36及びS43)、L2:CDR移植+F36、L3:CDR移植+S43)、及び5つの追加の重鎖(H1:CDR移植+(A67、L69、V71、K73)、H2:CDR移植+A67、H3:CDR移植+L69、H4:CDR移植+V71、及びH5:CDR移植+K73)。軽鎖上のF36は、重要なマウスバーニア残基であった。キメラ21C9は、 8.615×10^{-9} MのKDで結合し、一方CDR移植+(F36及びS43(LC))+L69(HC)及びCDR移植+F36(LC)+L69(HC)は、それぞれ 1.053×10^{-8} M及び 9.785×10^{-9} MのKDで結合した。重鎖上のL69は、重要なマウスバーニア残基であると決定された。

30

【0431】

ヒト化6E7、L4H1e及び21C9、L2H3を、cyno結合アッセイでcynoCLL-1をhuCLL-1と置き換えたことを除き、ヒト及びcynoCLL-1に結合するそれらの能力について上述の通りに試験した。ヒト化抗体の結合特性は、下の表5に示される。ヒト化6E7、L4H1eの結合親和性は、HL-60、EOL-1、293AD/cynoCLL1、及び293AD/huCLL-1細胞を使用してScatchardによって決定したときに、それぞれ0.34、0.29、0.22、及び0.35Kd(nM)であった。ヒト化21C9、L2H3の結合親和性は、HL-60、EOL-1、293AD/cynoCLL1、及び293AD/huCLL-1細胞を使用してScatchardによって決定したときに、それぞれ1.3、0.74、2.4、及び3.6Kd(nM)であった。

40

表 5

抗体	h u K D (M)	h u k a (1 / M s)	h u k d (1 / s)	c y n o K D (M)	c y n o k a (1 / M s)	c y n o k d (1 / s)
6 E 7 . L 4 H 1 e	6 . 2 1 8 E - 1 0	8 . 2 3 6 E + 5	5 . 1 2 1 E - 4	3 . 1 7 0 E - 1 0	7 . 3 9 1 E + 5	2 . 3 4 3 E - 4
2 1 C 9 . L 2 H 3	1 . 1 7 1 E - 8	2 . 2 4 4 E + 5	2 . 6 2 8 E - 3	9 . 4 7 2 E - 9	1 . 6 8 3 E + 5	1 . 5 9 4 E - 3

10

【 0 4 3 2 】

ヒト化抗体 6 E 7 . L 4 H 1 e 及び 2 1 C 9 . L 2 H 3 を、熱応力下 (4 0 °C、pH 5 . 5、2 週間) 及び 2 , 2 ' - アゾピス (2 - アミノプロパン) 塩酸塩 (A A P H) 分析で試験した試料に熱応力付与して、生成物の保存期間にわたる安定性を模倣した。試料を、2 0 m M の H i s A c e t a t e、2 4 0 m M のスクロース、pH 5 . 5 へと緩衝液交換し、1 m g / m L の濃度に希釈した。1 m L の試料に 4 0 °C で 2 週間応力付与し、2 番目を対照として - 7 0 °C で保管した。次に、トリプシンを使用して両試料を消化して、液体クロマトグラフィー (L C) - 質量分析 (M S) 分析を使用して分析され得るペプチドを作成した。試料中の各ペプチドについて、L C からの保持時間、ならびに高解像度精密質量及びペプチドイオン断片化情報 (アミノ酸配列情報) を、M S において取得した。抽出イオンクロマトグラム (X I C) を、+ - 1 0 p p m のウィンドウにおけるデータセットから関心のペプチド (天然及び修飾ペプチドイオン) について行い、ピークを統合して、面積を決定した。各試料について、(修飾ペプチドの面積) を (修飾ペプチドの面積 + 天然ペプチドの面積) で除し、1 0 0 を乗ずることにより、修飾の相対パーセンテージを算出した。

20

【 0 4 3 3 】

6 E 7 . L 4 H 1 e 及び 2 1 C 9 . L 2 H 3 のどちらも、D R - H 2 内に N ⁵ 4 G ⁵ を有し、これは、脱アミノ化の影響を受けやすい (6 E 7 . L 4 H 1 e に関して、t 0 = 1 3 . 2 % 及び t 2 w k = 1 4 . 5 %、r 0 = 1 1 % 及び t 2 w k = 1 1 . 9 %)。両抗体の N 5 4 変異形を試験して、潜在的な脱アミノ化が h u 及び c y n o C L L - 1 への結合に影響を及ぼすことなく低減され得るかどうかを決定した。表 6 を参照されたい。

30

表6

抗体	h u K D (M)	h u k a (1 / M s)	h u k d (1 / s)	c y n o K D (M)	c y n o k a (1 / M s)	c y n o k d (1 / s)
6 E 7 . L 4 H 1 e N 5 4	1 . 0 8 2 E - 9	9 . 0 9 6 E + 5	9 . 8 3 7 E - 4	2 . 2 5 6 E - 9	8 . 0 4 4 E + 5	1 . 8 1 5 E - 3
6 E 7 . L 4 H 1 e A 5 4	3 . 0 8 2 E - 9	7 . 1 0 3 E + 5	2 . 1 8 9 E - 3	3 . 1 4 3 E - 9	6 . 0 8 7 E + 5	1 . 9 1 3 E - 3
6 E 7 . L 4 H 1 e E 5 4	5 . 0 9 0 E - 9	4 . 8 8 2 E + 5	2 . 4 8 5 E - 3	4 . 2 5 6 E - 9	6 . 6 4 1 E + 5	2 . 8 2 7 E - 3
6 E 7 . L 4 H 1 e S 5 4	1 . 4 1 3 E - 8	5 . 0 9 8 E + 5	7 . 2 0 5 E - 3	6 . 3 7 1 E - 9	5 . 1 3 3 E + 5	3 . 2 7 0 E - 3
6 E 7 . L 4 H 1 e D 5 4	1 . 1 3 2 E - 7	3 . 0 4 4 E + 5	3 . 4 4 4 E - 2	4 . 8 7 0 E - 8	1 . 7 8 5 E + 5	8 . 6 9 4 E - 3
2 1 C 9 . L 2 H 3 N 5 4	1 . 5 1 0 E - 8	1 . 8 8 9 E + 5	2 . 8 5 3 E - 3	9 . 3 0 2 E - 9	2 . 3 5 8 E + 5	2 . 1 9 4 E - 3
2 1 C 9 . L 2 H 3 S 5 4	2 . 8 5 9 E - 7	1 . 4 1 6 E + 5	4 . 0 4 7 E - 2	5 . 6 6 9 E - 6	3 6 5 6	2 . 0 7 2 E - 2
2 1 C 9 . L 2 H 3 A 5 4	6 . 2 1 5 E - 7	1 . 1 1 3 E + 5	6 . 9 1 5 E - 2	4 . 8 1 8 E - 5	4 4 5 . 3	2 . 1 4 6 E - 2
2 1 C 9 . L 2 H 3 E 5 4	8 . 6 2 5 E - 7	1 . 0 2 2 E + 5	8 . 8 1 6 E - 2	4 . 9 6 1 E - 5	7 4 7 . 5	3 . 7 0 9 E - 2
2 1 C 9 . L 2 H 3 D 5 4	8 . 0 1 7 E - 7	2 . 8 5 8 E + 5	2 . 2 9 1 E - 2	2 . 1 7 2 E - 7	4 . 0 7 2 E + 4	8 . 8 4 6 E - 3

10

20

【 0 4 3 4 】

ヒト化 6 E 7 . L 4 H 1 e C D R - H 2 N 5 4 抗体変異形について、A 5 4 は、N 5 4 に最も類似した許容される結合特徴を有した。ヒト化 2 1 C 9 . L 2 H 3 C D R - H 2 N 5 4 抗体変異形について、全ての変異形は、o f f 速度 (1 0 ~ 3 0 倍) において h u C L L - 1 に対して、及び o n 速度 (6 0 ~ 5 0 0 倍) において c y n o C L L - 1 に対して、親和性の低下を示した。ヒト化 6 E 7 . L 4 H 1 e の結合親和性は、2 9 3 A D / c y n o C L L 1、2 9 3 A D / h u C L L - 1、H L - 6 0、及び E O L - 1 細胞を使用して S c a t c h a r d によって決定したときに、それぞれ 0 . 6 7、0 . 6 8、0 . 6、及び 0 . 2 5 K d (n M) であった。ヒト化 6 E 7 . L 4 H 1 e N 5 4 A の結合親和性は、2 9 3 A D / c y n o C L L 1、2 9 3 A D / h u C L L - 1、H L - 6 0、及び E O L - 1 細胞を使用して S c a t c h a r d によって決定したときに、それぞれ 0 . 9、0 . 8 9、0 . 6 4、及び 0 . 3 2 K d (n M) であった。ヒト化 6 E 7 及び 2 1 C 9 抗体の重及び軽可変ドメインアミノ酸配列のアラインメントは、それぞれ、図 2 A ~ B 及び図 3 A ~ B に示される。

30

40

【 0 4 3 5 】

E . エピトープマッピング

C L L - 1 の結合エピトープを決定するために、(a) 遊離抗原 C L L - 1 及び (b) 3 つの異なる抗原 - m A b 複合体の試験を、ヒドロキシルラジカルフットプリント (H R F) 技法を使用して実施した。試料を、B r o o k h a v e n N a t i o n a l L a b o r a t o r y において、X 2 8 c B e a m ラインを使用して 0、1 0、1 5、及び 2 0 ミリ秒 (m s) の間隔でヒドロキシルラジカルに曝露した。標識された試料を、P N G a s e F を使用して脱グリコシル化させた。実験プロトコルを最適化するために、脱

50

グリコシル化試料に対してパイロット実験を初めに行った。MSを使用したパイロット調査は、試料が著しい量のポリマー汚染を含有することを示し、追加の洗浄が必要であることを明らかにした。ポリマー汚染を取り除くために、アセトン中トリクロロ酢酸を使用して試料を沈殿させ、LC-MS分析を行った。沈殿ステップは成功し、MSにおけるポリマー汚染シグナルは著しく弱まった。洗浄した試料を、還元化してアルキル化し、トリプシンを使用して消化した後、液体クロマトグラフィーを高解像度質量分析(LC-MS)と併用して行った。MSデータを、ProtMapMSを使用して分析し、各ペプチドの用量応答プロットを得た。遊離抗原の結果を、複合体型の各々と比較した。Swiss-Modelソフトウェアを使用して抗原の相同性ベースモデルを生成し、3つの複合体の各々に関して溶媒保護領域をマッピングした。

10

【0436】

トリプシンマッピングを使用して得た全体の配列包括度は、90.05%であった。欠けている領域は主に、4残基よりも短い長さのトリプシンペプチドからなり、これは、LCカラム上でのその弱い保持特性のため、検出が本来困難であり得る。HRF処理は、タンデム質量分析データから特定された特定の質量シフトをもたらす安定した側鎖酸化修飾を導入する。選択イオンクロマトグラム(SIC)を抽出し、(特定のm/zの)ペプチドイオンの未酸化形及び全ての酸化形に関して統合した。これらのピーク面積値を使用して、用量応答(DR)プロットの形式で反応速度を特徴付けた。これは、ヒドロキシルラジカル曝露の関数としてインタクトなペプチドの損失を測定する。複合体内の溶媒保護領域は、遊離抗原とは対照的に段階的な酸化反応を経る。酸化の速度の差(速度定数、RCと呼ばれる)は、エピトープの場所をハイライトするように機能し得る。

20

【0437】

ProtMapMSを使用してMSデータを処理し、各ペプチドのRC値を得た。最終的な結果は、表1に示される。ペプチドの場所及び対応する配列は、1列目及び2列目に示される。3列目は、複合体1(6E7.L4H1eA54抗体及びCLL-1抗原)の保護比、PR(=RC抗原/RC複合体)を示す。同様に、4及び5列目は、複合体2(Kabat付番に従うK149(K149C)におけるシステイン残基を含む軽鎖で操作された21C9.L2H3抗体及びCLL-1抗原)及び複合体3(R&Dシステムモノクローナル抗CLL1抗体(クローン687317)及びCLL-1抗原)の対応する保護比を示す。特定の所与のペプチドのPR値が1未満である場合、対応する領域は、複合体形成中に導入される構造的変化のために溶媒露出度の増加を経た。1に近いPR値は、その領域の溶媒露出度が変化していないままであることを示し、1超のPRは、対応する領域が複合体形成の関数として溶媒からの保護を示すことを示唆する。各複合体に関してペプチドの大部分のPR値が1に近く、対応する領域の溶媒露出度の最小の変化を示している。ペプチド142~158は、3つ全ての抗体について最も高いPR値を常に示し、著しい領域の保護を示唆している。ペプチド142~158の保護に加えて、R&Dシステムモノクローナル抗CLL1抗体(クローン687317)は、6E7.L4H1eAG及び21C9.L2H3とは異なり、重複ペプチド103~116及び105~116によって示される通り、領域103~116の著しい保護も示した。

30

配列番号1のペ プチド位置	配列	配列番 号	R C A ／ R C 1	R C A ／ R C 2	R C A ／ R C 3
65～69	DYKDDDDKLEHV TLK	52	1.4	1.0	1.0
68～69	DDDDKLEHVTLK	53	1.1	0.9	0.8
75～87	MNKLQNI SEELQ R	54	1.4	1.1	0.9
78～87	LQNI SEELQR	55	1.3	1.0	0.8
88～102	NISLQLMSNMNI SNK	56	1.1	0.5	0.5
103～116	IRNLSTTLQTIA TK	50	1.1	0.8	2.1
105～116	NLSTTLQTIA TK	51	1.2	1.0	2.2
105～119 *	NLSTTLQTIA TK LCR	57	該当な し	該当な し	該当なし
120～124 *	ELYSK	58	該当な し	該当な し	該当なし
137～141	WIWHK	59	1.0	0.6	1.3
142～158	DSCYFLSDDVQT WQESK	49	3.1	2.0	3.1
159～160	MACAAQNASLLK	60	1.0	1.2	0.8
171～181	INNKNALFEIK	61	1.7	1.3	1.1
175～181	NALEFIK	62	1.3	1.0	1.3
175～185 *	NALEFIKSQSR	63	該当な し	該当な し	該当なし
186～201	SYDYWLGLSPEE DSTR	64	1.0	1.0	1.0
186～204 *	SYDYWLGLSPEE DSTRGMR	65	該当な し	該当な し	該当なし
205～117	VDNIINS SAWVI R	66	1.2	1.0	1.0
218～232	NAPDLNNMYCGY INR	67	1.2	1.0	0.9
233～243	LYVQYYHCTYK	68	1.0	1.1	1.0
246～250 *	MICEK	69	該当な し	該当な し	該当なし
251～263	MANPVQLGSTYF R	70	0.9 9	1.1	1.0

【0438】

F. 抗CLL-1抗体の内在化

ADC標的の1つの望ましい属性は、抗体を、細胞内で分解区画に内在化する能力である。抗CLL-1抗体が結合時に内在化されるかどうかを決定するために、HL-60またはHL-60細胞を、RPMI培地内で0.3mg/mlのhIgGと共に37℃で2

10

20

30

40

50

時間ブレインキュベーションして、FcRへの非特異的結合を低減した後、細胞培養物で処理した4ウェルチャンバースライド(Nalge Nunc International)内に播種した。1 µg/mLの最終濃度でDylight 488に直接コンジュゲートされた抗体を、hIgGでブロッキングした細胞と共に、暗所で30分間、氷上にてインキュベーションした。細胞を即座に撮像して膜染色(T0)を示し、その後Leica SP5共焦点顕微鏡を用いて37 °Cで10時間にわたってタイムラプス撮影した。代表的な例のch21C9は、HL-60細胞によって30分以内に迅速に内在化される(データは示されていない)。リソソームに対するch21C9の限局化を、標的細胞を殺傷する抗体薬物複合体の能力を測定するin vitro細胞ベースアッセイを使用して確認した。

10

【0439】

G. 抗CLL-1抗体薬物複合体の産生

抗体を大量に産生する場合、抗体は、CHO細胞内で産生された。VL及びVHをコードするベクターを、CHO細胞中にトランスフェクトし、IgGを、タンパク質A親和性クロマトグラフィーによって細胞培養培地から精製した。

【0440】

抗CLL-1抗体-薬物複合体(ADC)を、抗体ch21C9、ch3H10、ch28H12、ch20B1、ch6E7、6E7.L4H1e、6E7.L4H1eA54、21C9.L2H3を、リンカーを介してPBD及びPNU誘導体にコンジュゲートすることによって産生した。

20

【0441】

最初に単離されるため、抗体中の操作されたシステイン残基は、細胞チオール(例えば、グルタチオン)との混合ジスルフィドとして存在し、そのためコンジュゲートには使用不可能である。これらの抗体の部分還元(例えば、DTTによる)、精製、及びデヒドロアスコルビン酸(DHAA)での再酸化により、例えば、Junutula et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26: 925-932及びUS 2011/0301334で以前に説明されたように、コンジュゲートに使用可能な遊離システインスルフィドリル基を有する抗体がもたらされる。簡潔に述べると、抗体を薬物-リンカー部分と組み合わせて、抗体の遊離システイン残基に薬物-リンカー部分をコンジュゲートすることを可能にした。数時間、ADCを精製した。

30

【0442】

H. HL-60及びEOL-1ヒト急性骨髄性白血病細胞株異種移植片モデルにおける抗CLL-1抗体薬物複合体の有効性

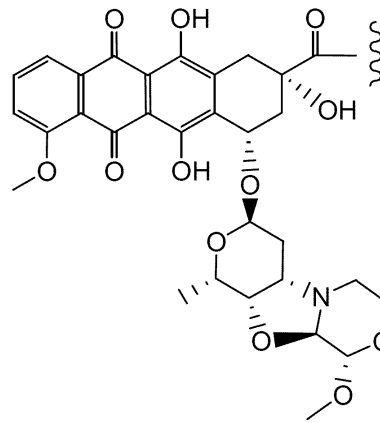
抗CLL-1 ADCの有効性を、ヒト急性骨髄性白血病異種移植片モデル、HL-60(AMLサブタイプM2)及びEOL-1(AMLサブタイプM4a)を使用して調査した。これらのどちらも、それらの遺伝学及び分子異常の結果として中程度~不良な予後に関連する。雌C.B-17 SCIDマウス(Charles River Laboratories; Hollister, CA)を各々、HL-60またはEOL-1の500万個の細胞で隣接領域に皮下接種した。異種移植片腫瘍が100~300 mm³の平均腫瘍体積に到達したとき(0日目と称される)に、動物を各々7~10匹のマウスの群に無作為に分け、ADCの単回静脈内注射を施した。ADCの投与のおよそ4時間に、動物に過剰量(30 mg/kg)の抗gD対照抗体を腹腔内投薬して、腫瘍細胞上の想定される非特異的抗体結合部位をブロッキングした。マウスの腫瘍及び体重を、試験を通して週1~2回測定した。体重損失がそれらの出発体重の20%を超えたとき、マウスを即座に安楽死させた。腫瘍が3000 mm³に到達するか、または切迫した潰瘍化の兆候を示す前に、全ての動物を安楽死させた。抗体の存在を、注射後1、7、及び14日目にPK採血により確認した。

40

【0443】

図4に示されるように、EU付番に従う重鎖アミノ酸118(A118C)における遊離システインを介してPNU薬物部分:

50



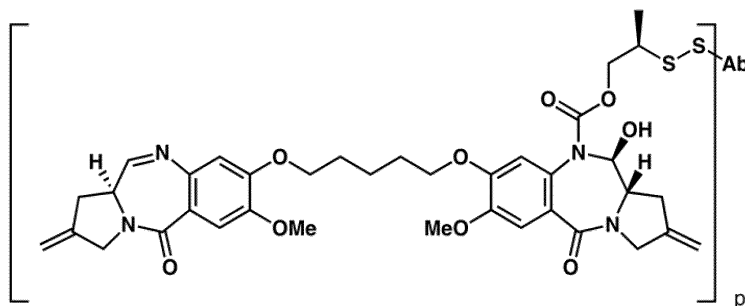
10

にコンジュゲートされた *ch21C9*、*ch28H12*、*ch20B1*、*ch6E7*、及び *ch3H10* は、*EOL-1* 腫瘍体積を著しく低減させ、一方 *ch20B1* は、腫瘍体積を適度に低減させ、*ch28H12* は、効果がほとんどなかった。図5に示されるように、*HL-60* を使用して同様の結果が見られた。

【0444】

ヒト化抗体、*6E7*、*L4H1e* 及び *21C9*、*L2H3* を、システイン操作された異なるコンジュゲート部位を介して、種々の用量 (10 及び $20 \mu\text{g}/\text{m}^2$) で *PBD* 誘導体 (*SG34*) にコンジュゲートした。抗体は、*EU* 付番に従う重鎖アミノ酸 *118* (*A118C*) または *Kabat* 付番に従う軽鎖アミノ酸 *149* (*K149C*) において、操作された遊離システインを含んだ。抗体-薬物複合体の構造は、下記に示される：

20



30

図6に示されるように、*HL-60* 異種移植片モデルにおいて、*6E7L4H1e* かまたは *21C9*、*L2H3* かのいずれかを含む軽鎖 *K149C* システイン操作された免疫複合体は、*6E7*、*L4H1e* かまたは *21C9*、*L2H3* かのいずれかを含む重鎖 *A118C* システイン操作された免疫複合体よりも腫瘍体積の大きな低減を示した。

【0445】

潜在的な脱アミノ化部位 *6E7*、*L4H1e* *A54* を除去するために、腫瘍体積を低減する能力を *6E7*、*L4H1e* と操作された変異形との間でも比較して、抗体の活性及び結合が保持されたかどうかを決定した。図7に示されるように、*6E7L4H1e* 及び *6E7* のどちらも、*HL-60* 異種移植片モデルにおいて腫瘍体積を著しく低減させた。

40

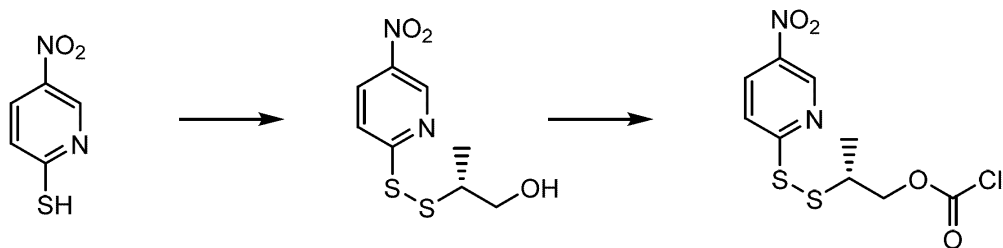
【0446】

実施例2 (表A) に例示される抗体薬物複合体を作製するために使用されるリンカー-薬物 (*LD*) 中間体の合成

ADC-51 : (R)-2-((5-ニトロピリジン-2-イル)ジスルファニル)プロピル(11*S*, 11*aS*)-11-ヒドロキシ-7-メトキシ-8-((5-((S)-7-メトキシ-2-メチレン-5-オキソ-2,3,5,11*a*-テトラヒドロ-1*H*-ベンゾ[*e*]ピロロ[1,2-*a*][1,4]ジアゼピン-8-イル)オキシ)ペンチル)オキシ)-2-メチレン-5-オキソ-2,3,11,11*a*-テトラヒドロ-1*H*-ベンゾ[*e*]ピロロ[1,2-*a*][1,4]ジアゼピン-10(5*H*)-カルボキシレート (*MS(ESI)*: 875 [*M+H*]⁺) のリンカー-薬物中間体を、*WO20*

50

13 / 055987 の手順によって調製した。

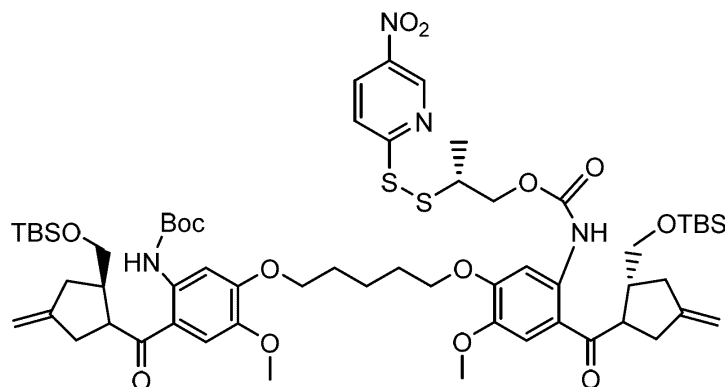
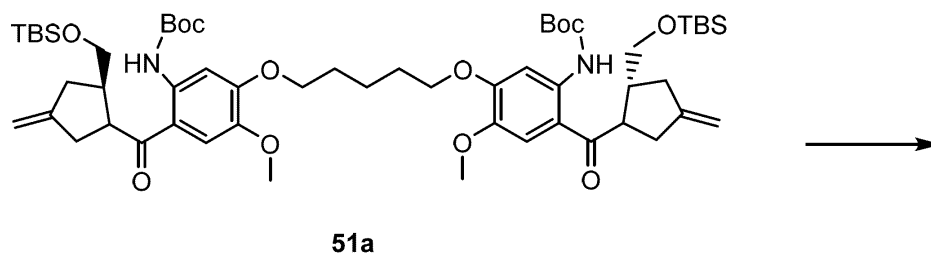


【0447】

塩化スルフィリル (2.35 mL の 1.0 M の DCM 溶液、2.35 mmol) を、アルゴン雰囲気下で、0 (氷/アセトン) にて 5-ニトロピリジン-2-チオール (334 mg、2.14 mmol) の乾燥 DCM の攪拌懸濁液 (7.5 mL) に滴下した。反応混合物は黄色の懸濁液から黄色の溶液となり、それを、室温に加温し、次に 2 時間攪拌した後、溶媒を真空内蒸発により除去して、黄色の固体を得た。固体を DCM (15 mL) 中で再溶解し、アルゴン雰囲気下で 0 にて、(R)-2-メルカプトプロパン-1-オール (213 mg、2.31 mmol) の乾燥 DCM 溶液 (7.5 mL) で滴下処理した。反応混合物を室温に加温し、20 時間攪拌し、この時点で LC/MS による分析は、保持時間 1.41 分間 (ES+) m/z 247 ([M+H]⁺、約 100% 相対強度) における実質的な生成物形成を示した。沈殿物を濾過により除去し、濾液を真空内で蒸発させてオレンジ色の固体を得て、それを、H₂O (20 mL) で処理し、水酸化アンモニウム溶液で塩基性化した。混合物を DCM (3 × 25 mL) で抽出し、組み合わせた抽出物を H₂O (20 mL)、塩水 (20 mL) で洗浄し、乾燥させ (MgSO₄)、濾過し、真空内で蒸発させて、粗生成物を得た。フラッシュクロマトグラフィー (1% 増分の勾配溶離: 100% DCM から 98:2 の v/v の DCM/MeOH) による精製により、(R)-2-((5-ニトロピリジン-2-イル)ジスルファニル)プロパン-1-オールを油として得た (111 mg、21% 収率)。

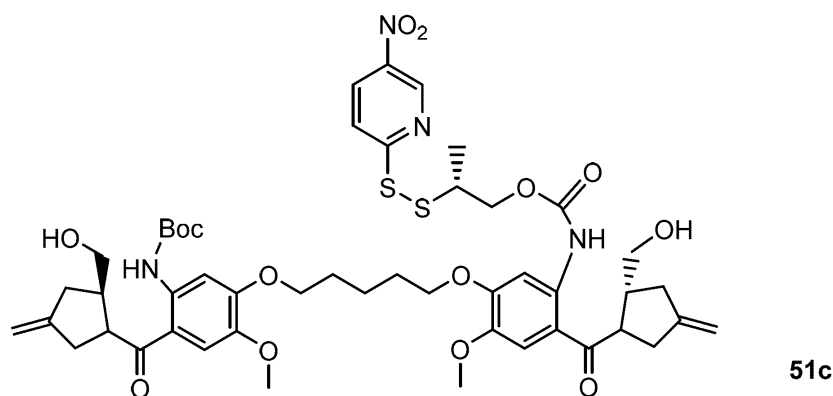
【0448】

トリホスゲン (48 mg、0.16 mmol) を、(R)-2-((5-ニトロピリジン-2-イル)ジスルファニル)プロパン-1-オール (111 mg、0.45 mmol) 及びピリジン (34 µL、33.5 mg、0.42 mmol) を含む乾燥 DCM の攪拌溶液 (5 mL) に添加した。反応混合物をアルゴン雰囲気下で 45 分間攪拌し、その後、溶媒を真空内蒸発により除去して、(R)-2-((5-ニトロピリジン-2-イル)ジスルファニル)プロピルカルボノクロリデートを黄色のフィルムとして得た。生成物は、精製または分析することなく、次のステップで用いた。



【 0 4 4 9 】

(R) - 2 - ((5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ジスルファニル) プロピルカルボノクロリデート (約 1 3 9 m g 、 0 . 4 5 m m o l) の乾燥 D C M 溶液 (5 m L) を、W O 2 0 1 3 / 0 5 5 9 8 7 の実施例 1 の手順により作製したジ - t e r t - ブチル ((ペンタン - 1 , 5 - ジイルビス (オキシ)) ビス (6 - ((2 R) - 2 - (((t e r t - ブチルジメチルシリル) オキシ) メチル) - 4 - メチレンシクロペンタン - 1 - カルボニル) - 4 - メトキシ - 3 , 1 - フェニレン)) ジカルバメート 5 1 a (4 3 0 m g 、 約 0 . 4 5 m m o l) とピリジン (4 0 μ L 、 3 9 m g 、 0 . 4 9 m m o l) の乾燥 D C M 攪拌溶液 (1 2 m L) に室温で滴下した。反応混合物をアルゴン雰囲気下で 2 . 5 時間攪拌し、この時点で、L C / M S による分析は、保持時間 2 . 4 2 分間 (E S +) m / z 1 2 2 6 ([M + H] ⁺ 、 約 2 0 % 相対強度)、1 2 4 8 ([M + N a] ⁺ 、 約 6 0 % 相対強度) における実質的な生成物形成を示した。混合物を D C M (2 0 m L) で希釈し、S i O ₂ で処理し、溶媒を真空内蒸発により除去した。結果として生じた残基を、フラッシュクロマトグラフィー (1 0 % 増分の勾配溶離 : 8 0 : 2 0 の v / v のヘキサン / E t O A c から 7 0 : 3 0 の v / v のヘキサン / E t O A c) により精製して、t e r t - ブチル (2 - ((S) - 2 - (((t e r t - ブチルジメチルシリル) オキシ) メチル) - 4 - メチレンピロリジン - 1 - カルボニル) - 5 - ((5 - (4 - ((S) - 2 - (((t e r t - ブチルジメチルシリル) オキシ) メチル) - 4 - メチレンピロリジン - 1 - カルボニル) - 2 - メトキシ - 5 - (((R) - 2 - ((5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ジスルファニル) プロポキシ) カルボニル) アミノ) フェノキシ) ペンチル) オキシ) - 4 - メトキシフェニル) カルバメート 5 1 b を黄色の発泡体として (4 1 9 m g 、 7 6 % 収率) 得た。 (M S (E S I) : 1 2 2 4 [M + H] ⁺)

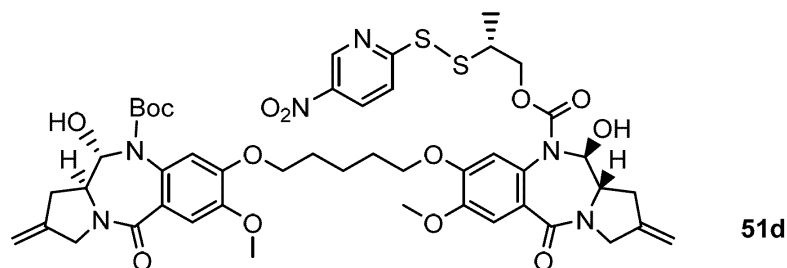


10

【0450】

氷酢酸（24 mL）を、TBS-保護51b（419 mg、0.34 mmol）のTHF（8 mL）及びH₂O（8 mL）の攪拌溶液に添加した。反応混合物を16時間攪拌し、この時点で、LC/MSによる分析は、保持時間1.82分間（ES+）m/z 997（[M+H]⁺、約100%相対強度）、1019（[M+Na]⁺、約45%相対強度）において観察された所望の生成物による反応の完了を示した。反応混合物を、NaHCO₃（400 mL）の冷却した（0～5℃）飽和溶液に滴下した。中性溶液を室温に加温し、EtOAc（4×100 mL）で抽出し、組み合わせた有機層をH₂O（80 mL）、塩水（100 mL）で洗浄し、乾燥させ（MgSO₄）、濾過し、真空内で蒸発させて、粗生成物を得た。フラッシュクロマトグラフィー（1%増分の勾配溶離：100% DCMから98：2のv/vのDCM/MeOH）による精製により、tert-ブチル（2-（（S）-2-（ヒドロキシメチル）-4-メチレンピロリジン-1-カルボニル）-5-（（5-（4-（（S）-2-（ヒドロキシメチル）-4-メチレンピロリジン-1-カルボニル）-2-メトキシ-5-（（（R）-2-（（5-ニトロピリジン-2-イル）ジスルファニル）プロポキシ）カルボニル）アミノ）フェノキシ）ペンチル）オキシ）-4-メトキシフェニル）カルバメート51cを帯黄色の発泡体として得た（341 mg、100%収率）。（MS（ESI）：995 [M+H]⁺）。

20



30

【0451】

無水DMSO（107 μL、188 mg、1.50 mmol）の乾燥DCM溶液（7.5 mL）を、アルゴン雰囲気下で、-45℃（ドライアイス/CH₃CN）にて塩化オキサリル（410 μLの2.0 MのDCM溶液、0.82 mmol）の乾燥DCM（7.5 mL）攪拌溶液に滴下した。-45℃で15分間攪拌した後、反応混合物を51c（341 mg、0.34 mmol）の乾燥DCM（15 mL）溶液で滴下処理した。-45℃でさらに1時間攪拌した後、反応混合物を、TEA（476 μL、342 mg、3.42 mmol）の乾燥DCM（7.5 mL）溶液で滴下処理した。反応混合物を1.5時間にわたり室温に加温し、DCM（50 mL）で希釈し、次に飽和NH₄Cl（15 mL）、飽和NaHCO₃（15 mL）、塩水（15 mL）で洗浄し、乾燥させ（MgSO₄）、濾過し、真空内で蒸発させて、粗生成物を得た。フラッシュクロマトグラフィー（0.4%増分の勾配溶：100% DCMから98.4：1.6のv/vのDCM/MeOH）による精製により、tert-ブチル（11S, 11aS）-11-ヒドロキシ-8-（（5-（（（11S, 11aS）-11-ヒドロキシ-7-メトキシ-2-メチレン-10-

40

50

(((R) - 2 - ((5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ジスルファニル) プロポキシ) カルボニル) - 5 - オキソ - 2 , 3 , 5 , 10 , 11 , 11 a - h e x a h y d r o - 1 H - ベンゾ [e] ピロロ [1 , 2 - a] [1 , 4] ジアゼピン - 8 - イル) オキシ) ペンチル) オキシ) - 7 - メトキシ - 2 - メチレン - 5 - オキソ - 2 , 3 , 11 , 11 a - テトラヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] ピロロ [1 , 2 - a] [1 , 4] ジアゼピン - 10 (5 H) - カルボキシレート 51 d を帯黄色の発泡体として得た (227 mg 、 67 % 収率) : LC / MS 保持時間 1.69 分間 (ES +) m / z 993 ([M + H] ⁺ 、 約 80 % 相対強度) 、 1015 ([M + Na] ⁺ 、 約 20 % 相対強度) 。

【 0452 】

95 : 5 の v / v の TFA / H₂O の溶液 (4 mL) を、 51 d (216 mg 、 0.22 mmol) の粗試料に 0 (氷 / アセトン) で添加した。 0 で 30 分間攪拌した後、 LC / MS 、 所望の生成物ピーク保持時間 1.60 分間 (ES +) m / z 875 ([M + H] ⁺ 、 約 100 % 相対強度) により判断して、 反応が完了したと見なした。 反応混合物を低温に維持し、 NaHCO₃ (100 mL) の冷却した飽和水溶液に滴下した。 混合物を DCM (3 x 30 mL) で抽出し、 組み合わせた有機層を、 塩水 (50 mL) で洗浄し、 乾燥させ (MgSO₄) 、 濾過し、 真空内で蒸発させて、 粗生成物を得た。 フラッシュクロマトグラフィー (0.4 % 増分の勾配溶離 : 100 % CHCl₃ から 98.4 : 1.6 の v / v の CHCl₃ / MeOH) による精製により、 LD - 51 を黄色の発泡体として得た (127 mg 、 66 % 収率) : LC / MS (15 分間実行) 、 保持時間 6.18 分間 (ES +) m / z 875 ([M + H] ⁺ 、 約 100 % 相対強度) ; ¹H NMR (400 MHz , CDCl₃) 9.21 (s , 1 H) 、 8.30 (d , 1 H , J = 8.8 Hz) 、 7.69 (d , 1 H , J = 4.5 Hz) 、 7.62 (d , 1 H , J = 8.9 Hz) 、 7.49 (s , 1 H) 、 7.25 (s , 1 H) 、 6.79 (s , 1 H) 、 6.74 (s , 1 H) 、 5.58 (dd , 1 H , J = 4.4 , 9.8 Hz) 、 5.22 - 5.10 (m , 4 H) 、 4.43 (d , 1 H , J = 3.7 Hz) 、 4.33 - 4.25 (m , 4 H) 、 4.15 - 3.98 (m , 5 H) 、 3.95 - 3.80 (m , 7 H) 、 3.68 - 3.59 (m , 1 H) 、 3.20 - 3.07 (m , 2 H) 、 2.99 - 2.87 (m , 2 H) 、 2.76 - 2.68 (m , 2 H) 、 1.99 - 1.83 (m , 4 H) 、 1.72 - 1.57 (m , 2 H) 、 1.19 (d , 3 H , J = 6.6 Hz) 。

【 0453 】

ADC - 52 : 2 - ((5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ジスルファニル) プロピル (2 , 5 - ビス ((E) - 3 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - (ホスホノオキシ) - 1 , 2 - ジヒドロ - 3 H - ベンゾ [e] インドール - 3 - イル) - 3 - オキソプロブ - 1 - エン - 1 - イル) フェニル) カルバメート (MS (ESI) : 1098 [M + H] ⁺) のリンカー - 薬物中間体を、 WO2015 / 023355 の手順によって調製した。 LD - 53 : (S) - 1 - (クロロメチル) - 3 - ((E) - 3 - (4 - ((E) - 3 - ((S) - 1 - (クロロメチル) - 5 - (ホスホノオキシ) - 1 , 2 - ジヒドロ - 3 H - ベンゾ [e] インドール - 3 - イル) - 3 - オキソプロブ - 1 - エン - 1 - イル) - 2 - (2 - (2 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) エトキシ) エトキシ) フェニル) アクリロイル) - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] インドール - 5 - イルリン酸二水素 (MS (ESI) : 994 [M + H] ⁺) を、 WO2015 / 023355 の手順によって調製した。

【 0454 】

ADC - 54 : (R) - 2 - ((3 - ニトロピリジン - 2 - イル) ジスルファニル) プロピル (11 S , 11 a S) - 11 - ヒドロキシ - 7 - メトキシ - 8 - ((5 - (((S) - 7 - メトキシ - 2 - メチレン - 5 - オキソ - 2 , 3 , 5 , 11 a - テトラヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] ピロロ [1 , 2 - a] [1 , 4] ジアゼピン - 8 - イル) オキシ) ペンチル) オキシ) - 2 - メチレン - 5 - オキソ - 2 , 3 , 11 , 11 a - テトラヒドロ - 1 H - ベンゾ [e] ピロロ [1 , 2 - a] [1 , 4] ジアゼピン - 10 (5 H) - カルボキシレート (MS (ESI) : 876 [M + H] ⁺) のリンカー - 薬物中間体を、 WO20

10

20

30

40

50

13 / 055987 の手順によって調製した。

【0455】

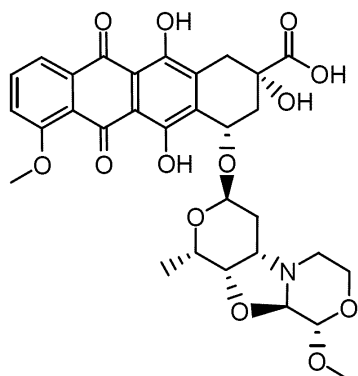
ADC - 55 : 4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (6 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサナムド) - 3 - メチルブタンアミド) - 5 - ウレイドペンタンアミド) ベンジル (2 - オキソ - 2 - ((2 S , 4 S) - 2 , 5 , 12 - トリヒドロキシ - 7 - メトキシ - 4 - (((1 S , 3 R , 4 a S , 9 S , 9 a R , 10 a S) - 9 - メトキシ - 1 - メチルオクタヒドロ - 1 H - ピラノ [4 ' , 3 ' : 4 , 5] オキサゾロ [2 , 3 - c] [1 , 4] オキサジン - 3 - イル) オキシ) - 6 , 11 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 , 6 , 11 - ヘキサヒドロテトラセン - 2 - イル) エチル) エタン - 1 , 2 - ジイルビス (メチルカルバメート) のリンカー - 薬物中間体。

10

【0456】

US 8389697 号の実施例 3 に従い、WO 1998 / 02446、及び US 8470984 の実施例 1 に報告されるように調製された PNU - 159682 (15 . 3 mg、0 . 02038 mmol) を含む 3 mL のメタノール及び 2 mL の H₂O の溶液に、NaIO₄ (5 . 1 mg、0 . 0238 mmol) を含む 1 mL の H₂O の溶液を添加した。出発物質が検出不可能になるまで、反応混合物を室温で 3 時間撹拌した (TLC 及び HPLC 分析)。溶媒を減圧下で除去し、赤色の粗固体 (2 S , 4 S) - 2 , 5 , 12 - トリヒドロキシ - 7 - メトキシ - 4 - { [(1 S , 3 R , 4 a S , 9 S , 9 a R , 10 a S) - 9 - メトキシ - 1 - メチルオクタヒドロ - 1 H - ピラノ [4 ' , 3 ' : 4 , 5] [1 , 3] オキサゾロ [2 , 3 - c] [1 , 4] オキサジン - 3 - イル] オキシ } - 6 , 11 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 , 6 , 11 - ヘキサヒドロテトラセン - 2 - カルボン酸 55 a (MS (ESI) : 628 [M + H]⁺) を、WO 2010 / 009124 の手順により LD - 55 (MS (ESI) : 1355 [M + H]⁺) に変換した。

20



55 a

30

【0457】

ADC - 56 のリンカー - 薬物中間体 : (2 S , 4 S) - 2 , 5 , 12 - トリヒドロキシ - 7 - メトキシ - 4 - (((1 S , 3 R , 4 a S , 9 S , 9 a R , 10 a S) - 9 - メトキシ - 1 - メチルオクタヒドロ - 1 H - ピラノ [4 ' , 3 ' : 4 , 5] オキサゾロ [2 , 3 - c] [1 , 4] オキサジン - 3 - イル) オキシ) - N - (2 - ((5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ジスルファニル) エチル) - 6 , 11 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 , 6 , 11 - ヘキサヒドロテトラセン - 2 - カルボキサミド (MS (ESI) : 842 [M + H]⁺) を、WO 2013 / 055987 の手順によって調製した。

40

【0458】

ADC - 57 のリンカー - 薬物中間体 : (2 S , 4 S) - 2 , 5 , 12 - トリヒドロキシ - 7 - メトキシ - 4 - (((1 S , 3 R , 4 a S , 9 S , 9 a R , 10 a S) - 9 - メトキシ - 1 - メチルオクタヒドロ - 1 H - ピラノ [4 ' , 3 ' : 4 , 5] オキサゾロ [2 , 3 - c] [1 , 4] オキサジン - 3 - イル) オキシ) - N - (2 - ((5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ジスルファニル) プロピル) - 6 , 11 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 , 6 , 11 - ヘキサヒドロテトラセン - 2 - カルボキサミド (MS (ESI) : 856 [M + H]⁺) を、US 8389697 の手順によって調製した。

50

【 0 4 5 9 】

A D C - 5 8 のリンカー - 薬物中間体：(2 S , 4 S) - 2 , 5 , 1 2 - トリヒドロキシ - 7 - メトキシ - 4 - (((1 S , 3 R , 4 a S , 9 S , 9 a R , 1 0 a S) - 9 - メトキシ - 1 - メチルオクタヒドロ - 1 H - ピラノ [4 ' , 3 ' : 4 , 5] オキサゾロ [2 , 3 - c] [1 , 4] オキサジン - 3 - イル) オキシ) - N - (2 - メチル - 2 - ((5 - ニトロピリジン - 2 - イル) ジスルファニル) プロピル) - 6 , 1 1 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 , 6 , 1 1 - ヘキサヒドロテトラセン - 2 - カルボキサミド (M S ((E S I) : 8 7 0 [M + H] +) を、U S 8 3 8 9 6 9 7 号の手順によって調製した。

【 0 4 6 0 】

上述の発明は、明確な理解を目的として、例示説明及び例により、ある程度詳細に記載されたが、これらの説明及び例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書で引用される全ての特許及び科学文献の開示は、参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる。

配列表

名称	配列	配 列 番号
ヒトCLL-1 (UniProt 番号 Q5QGZ9; NCBI 参照 NP_612210.4)	MSEEVTYADL QFQNSSEMEK IPEI GKFGEK APPAPSHVWR PAALFLTL LC LLLLI GLGVL ASMFHVTLKI E MKKMNKLQN ISEELQRNIS LQLMS NMNIS NKIRNLSTTL QTIATKLCR E LYSKEQEHKC KPCPRRWIWH KD SCYFLSDD VQTWQESKMA CAAQNA SLLK INNKNLEFI KSQSRSYDYW LGLSPEEDST RGM RVDNI IN SSAW VIRNAP DLNNMYCGYI NRLYVQYY HC TYKKRMICEK MANPVQLGST Y FREA	1
ヒトCLL-1 E CD (配列番号1の aa 65-265)	HVTLK IEMKKMNKLQNI SEELQRNIS LQLMSNMNIS NKIRNLSTTLQTIATK LCRELYSKEQEHCKPCPRRWIWHKD SCYFLSDDVQTWQESKMACAAQNASL LKINNKNLEFI KSQSRSYDYWLGLS PEEDSTRGM RVDNI IN SSAWVIRNAP DLNNMYCGYI NRLYVQYYHCTYKKRM ICEKMANPVQLGSTYFREA	2
ヒトCLL-1 C 型レクチン様ドメイン (CTLD) (配列番号1の aa 133-250)	CPRRWIWHKDSCYFLSDDVQTWQESK MACAAQNASLLKINNKNLEFI KSQS RSYDYWLGLSPEEDSTRGM RVDNI IN SSAWVIRNAPDLNNMYCGYI NRLYVQ YYHCTYKKRMICEK	3
Cyno CLL- 1	MSEEVTYADLKFQNSSETEKIQEIAK FGGKAPPAPSCVWRPAALFLTVLCLL MLIGLGVLGSMFHITLKTAMKKMNKL QNI NEELQRNVSLQLMSNMNSS NKIRNLSTTLQTIATR LCRELYSKEQ EHKCKPCPRRWIWHKDSCYFLSDDVR TWQESRMACAAQNASLLKINNKNLE FIKSQSTSPYWLGLSPEKDYS YGTSVDDI IN SSAWVTRNASDLNNMF CGYINRIYVHYDYCIYRKKMICEKMA NPVQLGFIHFREA	4
m6E7-HVR L1 6E7L4H1e-	RASQSVSTSSYNMH	5

10

20

30

40

HVR L 1 6 E 7 L 4 H 1 e A 5 4-HVR L 1			
m 6 E 7 - HVR L 2 6 E 7 L 4 H 1 e - HVR L 2 6 E 7 L 4 H 1 e A 5 4-HVR L 2	YASNLES	6	10
m 6 E 7 - HVR L 3 6 E 7 L 4 H 1 e - HVR L 3 6 E 7 L 4 H 1 e A 5 4-HVR L 3	QHSWEIPLT	7	
m 6 E 7 - HVR H 1 6 E 7 L 4 H 1 e - HVR H 1 6 E 7 L 4 H 1 e A 5 4-HVR H 1	DYYMH	8	20
m 6 E 7 - HVR H 2 6 E 7 L 4 H 1 e - HVR H 2	RINPYNGAAFYSQNFKD	9	
m 6 E 7 - HVR H 3 6 E 7 L 4 H 1 e - HVR H 3 6 E 7 L 4 H 1 e A 5 4-HVR H 3	ERGADLEGYAMDY	10	30
6 E 7 L 4 H 1 e A 5 4-HVR H 2	RINPYAGAAFYSQNFKD	11	
m 20B1-HVR L 1 v	SASSSISYMY	12	
m 20B1-HVR L 2	DTSKLAS	13	40
m 20B1-HVR L 3	HQRSSWT	14	
m 20B1-HVR H 1	SYDIN	15	
m 20B1-HVR	WIYPGDGTTEYNERFKG	16	

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

10

20

30

40

	GTKLEIK		
m 6 E 7 V _H	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YSFTDYMHVVKQSHIKSLEWIGRIN PYNGAAFYSQNFKDKASLTVDK	3 1	
6 E 7 L 4 H 1 e V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRAS QSVSTSSYNMHVYQQKPGKPPKLLI KYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQHSWEIPLTFGQ GTKVEIK	3 2	10
6 E 7 L 4 H 1 e V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASG YSFTDYMHVVRQAPGQGLEWIGRIN PYNGAAFYSQNFKDRVTLTVDTSTST AYLELSSLRSEDTAVYYCAIERGADL EGYAMDYWGQGTLVTVSS	3 3	
6 E 7 L 4 H 1 e A G V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASG YSFTDYMHVVRQAPGQGLEWIGRIN PYAGAAFYSQNFKDRVTLTVDTSTST AYLELSSLRSEDTAVYYCAIERGADL EGYAMDYWGQGTLVTVSS	3 4	20
m 2 0 B 1 V _L	DIVLTQSPAISASPGKEVTMTCSAS SSISYMYWYQQKPGTSPKRWIYDTSK LASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSE AEDAATYYCHQRSSWTFGGGTKLEIK	3 5	
m 2 0 B 1 V _H	EVQLQQSGPELVKPGALVKISCKASG YTFTSYDINWLKQRPQGGLWIGWIY PGDGTTEYNERFKGKATLTADKSSST AYLQLSSLTSENSAVYFCARSYDYDY AMDYWGQGTSTVTVSS	3 6	30
m 2 1 C 9 V _L	DIQMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS QDVSTAVAWFQQKPGQSPKLLIYSPS YRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFITSSV QAEDLAVYYCQQLYSTPYTFGGGTKL EIK	3 7	
m 2 1 C 9 V _H	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASG YTFTDYLDWVKQSHGESFEWIGRVN PYNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSST AYMDLNSLTSEDSAVYYCARDHYRYD PLLDYWGQGTTTLTVSS	3 8	40
2 1 C 9. L 2 H 3 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRAS QDVSTAVAWFQQKPGKAPKLLIYSPS YRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISL	3 9	

	QPEDFATYYCQQLYSTPYTFGGQGTKV EIK		
21C9. L2H3 V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASG YTFSTDYYLDWVRQAPGQGLEWIGRVN PYNGGTIYNQKFKGRVTLTRDTSTST AYLELSSLRSEDTAVYYCARDHYRYD PLLDYWGQGTLVTVSS	40	
m28H12 V _L	DIQMTQSPASLAVSLGQRATISCRAS QSVSSSSSYSMHWYQQKPGQPPLKLLI KYASNLESGVPARFSGRGSGETDFTLN IHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGG GTRLEIK	41	10
m28H12 V _H	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASG FNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRID PANGDTDYDPKFQGKATVTADTSSNT AYLQLSSLTSEDTAVYYCTISGPPYY VMDYWGQGTSTVTVSS	42	
6E7L4H1eE 54-HVR H2	RINPYEGAAFYSQNFKD	43	20
6E7L4H1eS 54-HVR H2	RINPYSGAAFYSQNFKD	44	
6E7L4H1eコ ンセンサス-HVR H2	RINPYX ₁ GAAFYSQNFKD、配列中、X ₁ は A、E、S、またはNである	45	
6E7L4H1e- HVR VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASG YSFTDYYMHVVRQAPGQGLEWIGRIN PY X ₁ GAAFYSQNFKDRVTLTVDTST STAYLELSSLRSEDTAVYYCAIERGA DLEGYAMDYWGQGTLVTVSS、配列中、X ₁ はA、E、S、またはNである	46	30
6E7L4H1eコ ンセンサス2-HV R H2	RINPYX ₂ GAAFYSQNFKD、配列中、X ₂ は A、E、またはSである	47	
6E7L4H1eコ ンセンサス2-HV R VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASG YSFTDYYMHVVRQAPGQGLEWIGRIN PY X ₂ GAAFYSQNFKDRVTLTVDTST STAYLELSSLRSEDTAVYYCAIERGA DLEGYAMDYWGQGTLVTVSS、配列中、X ₂ はA、E、またはSである	48	40

【 図 1 B 】

駐機可兼機殼

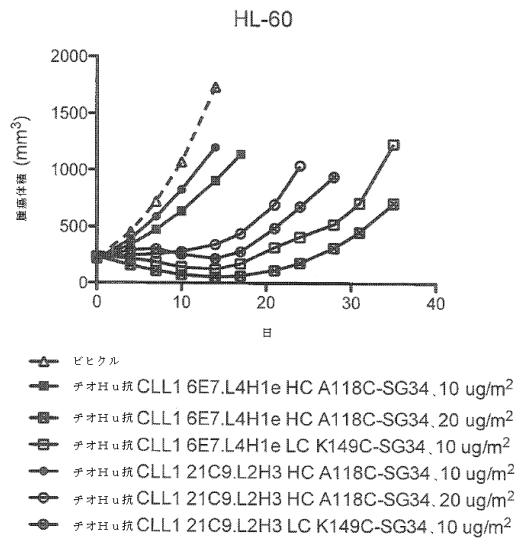
Kabai 番号 m6E7 m2C9 m20B1 m20H2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38					
	D	I	O	M	T	O	S	P	A	S	L	A	V	I	A	S	G	M	F	I	C	E	A	Q	S	V	S	T	Z	E	T	O	C	B	A	K	B	A					
	D	I	O	M	T	O	S	P	A	S	L	A	V	I	A	S	G	M	F	I	C	E	A	Q	S	V	S	T	Z	E	T	O	C	B	A	K	B	A					
	D	I	O	M	T	O	S	P	A	S	L	A	V	I	A	S	G	M	F	I	C	E	A	Q	S	V	S	T	Z	E	T	O	C	B	A	K	B	A					
	D	I	O	M	T	O	S	P	A	S	L	A	V	I	A	S	G	M	F	I	C	E	A	Q	S	V	S	T	Z	E	T	O	C	B	A	K	B	A					
	D	I	O	M	T	O	S	P	A	S	L	A	V	I	A	S	G	M	F	I	C	E	A	Q	S	V	S	T	Z	E	T	O	C	B	A	K	B	A					
	D	I	O	M	T	O	S	P	A	S	L	A	V	I	A	S	G	M	F	I	C	E	A	Q	S	V	S	T	Z	E	T	O	C	B	A	K	B	A					
	D	I	O	M	T	O	S	P	A	S	L	A	V	I	A	S	G	M	F	I	C	E	A	Q	S	V	S	T	Z	E	T	O	C	B	A	K	B	A					
	D	I	O	M	T	O	S	P	A	S	L	A	V	I	A	S	G	M	F	I	C	E	A	Q	S	V	S	T	Z	E	T	O	C	B	A	K	B	A					
	D	I	O	M	T	O	S	P	A	S	L	A	V	I	A	S	G	M	F	I	C	E	A	Q	S	V	S	T	Z	E	T	O	C	B	A	K	B	A					
CDRL1 - 挿針																																											
Kabai 番号 m6E7 m2C9 m20B1 m20H2	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
	K	P	G	O	P	K	E	L	L	I	K	V	A	S	S	L	E	S	G	V	P	A	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	K	P	G	O	P	K	E	L	L	I	K	V	A	S	S	L	E	S	G	V	P	A	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	K	P	G	O	P	K	E	L	L	I	K	V	A	S	S	L	E	S	G	V	P	A	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	K	P	G	O	P	K	E	L	L	I	K	V	A	S	S	L	E	S	G	V	P	A	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	K	P	G	O	P	K	E	L	L	I	K	V	A	S	S	L	E	S	G	V	P	A	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	K	P	G	O	P	K	E	L	L	I	K	V	A	S	S	L	E	S	G	V	P	A	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	K	P	G	O	P	K	E	L	L	I	K	V	A	S	S	L	E	S	G	V	P	A	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	K	P	G	O	P	K	E	L	L	I	K	V	A	S	S	L	E	S	G	V	P	A	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	K	P	G	O	P	K	E	L	L	I	K	V	A	S	S	L	E	S	G	V	P	A	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
CDRL2 - 挿針																																											
Kabai 番号 m6E7 m2C9 m20B1 m20H2	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107																
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
CDRL3 - 挿針																																											
Kabai 番号 m6E7 m2C9 m20B1 m20H2	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107																
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
	Z	O	T	A	E	V	Y	V	C	O	O	H	S	M	E	T	P	L	T	P	G	O	G	G	E	T	E	I	E														
CDRL3 - 挿針																																											

【 図 2 B 】

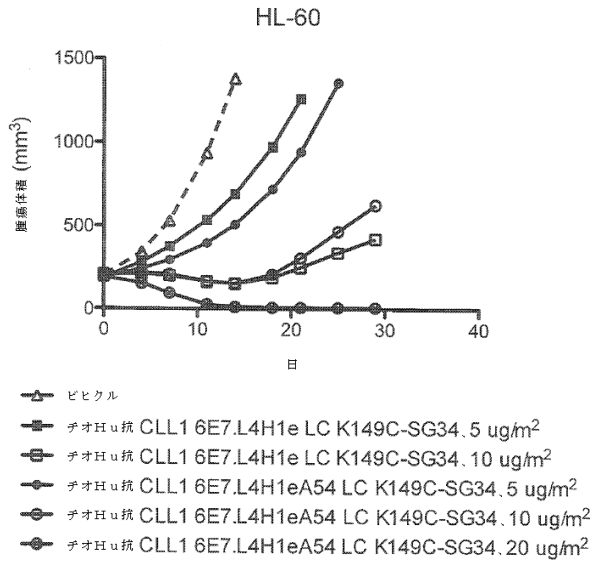
輕鎖可變域

Kabat 番号	K1H1	mE7	hE7/L4H1e	hE7/L4H1eA54	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227
----------	------	-----	-----------	--------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

【図 6】



【図 7】



【配列表】

0006886398000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	51/10	(2006.01)	A 6 1 K	51/10	2 0 0
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
G 0 1 N	33/534	(2006.01)	G 0 1 N	33/534	
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
A 6 1 K	31/706	(2006.01)	A 6 1 K	31/706	
A 6 1 K	31/5517	(2006.01)	A 6 1 K	31/5517	

- (72)発明者 ボルソン, アンドリュー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
 ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 チウ, セシリア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
 ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 リャン, ウェイ-チーン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
 ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 ウー, イェン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
 ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

審査官 長谷川 強

- (56)参考文献 国際公開第2013/169625(WO, A1)
 国際公開第2013/165940(WO, A1)
 米国特許出願公開第2010/0285037(US, A1)
 米国特許出願公開第2006/0177451(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/09
 A 6 1 K 31/5517
 A 6 1 K 31/706
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 51/10
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 C 07 K 16/28
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21

C12N 5/10

C12P 21/08

G01N 33/534

G01N 33/574

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)