

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5727786号  
(P5727786)

(45) 発行日 平成27年6月3日 (2015.6.3)

(24) 登録日 平成27年4月10日 (2015.4.10)

(51) Int. Cl.

F I

**C O 7 K 16/18 (2006.01)**  
**A 6 1 K 39/395 (2006.01)**  
**A 6 1 K 45/00 (2006.01)**  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

C O 7 K 16/18 Z N A  
A 6 1 K 39/395 N  
A 6 1 K 45/00  
C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 9 (全 137 頁)

(21) 出願番号 特願2010-530159 (P2010-530159)  
(86) (22) 出願日 平成20年10月17日 (2008.10.17)  
(65) 公表番号 特表2011-500725 (P2011-500725A)  
(43) 公表日 平成23年1月6日 (2011.1.6)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2008/080373  
(87) 国際公開番号 W02009/052431  
(87) 国際公開日 平成21年4月23日 (2009.4.23)  
審査請求日 平成23年10月17日 (2011.10.17)  
(31) 優先権主張番号 60/981, 206  
(32) 優先日 平成19年10月19日 (2007.10.19)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(31) 優先権主張番号 61/019, 214  
(32) 優先日 平成20年1月4日 (2008.1.4)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503188759  
シアトル ジェネティクス, インコーポレ  
ーテッド  
アメリカ合衆国 98021 ワシントン  
州, ボセル, エス. イー., 30ティーエ  
イチ ドライブ 21823  
(74) 代理人 100091096  
弁理士 平木 祐輔  
(74) 代理人 100118773  
弁理士 藤田 節  
(74) 代理人 100122389  
弁理士 新井 栄一  
(74) 代理人 100111741  
弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C D 1 9 結合性物質およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 9 の重鎖可変領域アミノ酸配列と、配列番号 2 4 の軽鎖可変領域アミノ酸配列  
とを含む、ヒトCD19 に特異的に結合する抗体または抗原結合断片。

【請求項 2】

ヒトIgG定常領域を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

IgG定常領域のアイソタイプが、IgG1、IgG2、またはIgG1V1である、請求項 2 に記載の  
抗体。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片の重鎖および / または軽  
鎖をコードする核酸。

【請求項 5】

抗体が細胞毒性薬剤にコンジュゲート化されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記  
載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 6】

以下の式：

L - (LU-D)p (I)

のリガンド-薬物コンジュゲート化合物または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物  
であって、

式中、

Lは請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片であるリガンド単位であり、

(LU-D)はリンカー単位-薬物単位部分であり、

LU-はリンカー単位であり、

-Dは標的細胞に対する細胞増殖抑制性または細胞毒性活性を有する薬物単位であり、

pは1~20の整数である、

上記化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

#### 【請求項 7】

Dが抗チューブリン剤又はDNA副溝結合剤である、請求項 6 に記載のリガンド-コンジュゲート。 10

#### 【請求項 8】

DがモノメチルアウリスタチンEである、請求項 7 に記載のリガンド-コンジュゲート。

#### 【請求項 9】

DがモノメチルアウリスタチンFである、請求項 7 に記載のリガンド-コンジュゲート。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明はそれ自体、CD19結合性物質および疾患を治療するためのそのようなCD19結合性物質の使用方法に関する。 20

#### 【背景技術】

#### 【0002】

ヒトにおいて、B細胞は、莫大な数の抗体分子を産生することができる。そのような抗体産生は、典型的には、外来抗原が中和された場合に停止する(または実質的に減少する)。しかしながら、時折、特定のB細胞の増殖は衰えず継続し、B細胞リンパ腫として知られている癌をもたらす。B細胞サブタイプの非ホジキンリンパ腫などのB細胞リンパ腫は、癌による死亡率に対する深刻な一因となる。様々な形態の治療に対するB細胞悪性腫瘍の応答は、複雑である。医学的重要性にもかかわらず、非ホジキンリンパ腫などのB細胞媒介性の疾患における研究は、少数の臨床的に利用可能なデータのみをもたらす、そのような疾患を治療するための従来のアプローチは、労力がかかり、好ましくないままでありおよび/または再発の高い危険性を有する。例えば、高度非ホジキンリンパ腫のための初期治療としての高用量化学療法は、全生存率を改善することができるが、患者の約50%はなお、この疾患で死亡する。Devesa et al., J. Nat'l Cancer Inst. 79: 701 (1987)。さらに、低度非ホジキンリンパ腫様慢性リンパ球性白血病および外套細胞リンパ腫はなお、不治である。これは、免疫療法のような代替戦略の調査を促した。CD抗原によって特徴付けられる細胞表面分子に対する抗体は、治療試薬の開発のための特有の可能性を示す。 30

#### 【0003】

大多数の慢性リンパ球性白血病は、B細胞系統のものである。Freedman, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 4: 405, 1990。このタイプのB細胞悪性腫瘍は、欧米における最も一般的な白血病である。Goodman et al., Leukemia and Lymphoma 22: 1, 1996。慢性リンパ球性白血病の自然経過は、いくつかの段階に分かれる。早期段階において、慢性リンパ球性白血病は、寿命が延長した、小さな、成熟した、機能不全の悪性B細胞の蓄積によって特徴付けられる、無痛性の疾患である。最終的に、悪性B細胞の倍加時間は減少し、患者は、ますます症候性になる。治療は、症候性の軽減を提供することができるが、患者の全生存率は、最小限、影響を受けるのみである。慢性リンパ球性白血病の後期ステージは、深刻な貧血および/または血小板減少症によって特徴付けられる。この時点で、平均生存率は、2年未満である。Foon et al., Annals Int. Medicine 113: 525 (1990)。 40

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

## 【 0 0 0 4 】

【非特許文献 1】Devesa et al., J. Nat'l Cancer Inst. 79: 701 (1987)

【非特許文献 2】Freedman, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 4: 405, 1990

【非特許文献 3】Goodman et al., Leukemia and Lymphoma 22: 1, 1996

【非特許文献 4】Foon et al., Annals Int. Medicine 113: 525 (1990)

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 0 5 】

B細胞は、分化および同定のためのマーカーとして利用することができる細胞表面タンパク質を発現する。CD19は、末期の分化を通して前B細胞発生の早期ステージから発現される全B細胞膜糖タンパク質であり、Bリンパ球の発生および機能を調節する。CD19の発現は、リンパ系の起源のほとんどの癌、大部分の非ホジキンリンパ腫(NHL)、ならびに慢性リンパ球性白血病(CLL)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症(WM)を含む白血病で同定された。NHLおよびCLLの患者の治療における主な改善にもかかわらず、大多数は、再発し続け、非交差耐性化合物を用いるサルベージレジメンが、患者生存率を改善するために必要とされる。当技術分野において、治療方法を改善する必要性が存在する。本発明は、この必要性および他の必要性に対処するものである。

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 0 6 】

20

本発明はそれ自体、CD19結合性物質およびそれらの使用方法を提供する。いくつかの態様において、結合性物質は、ヒト化重鎖可変領域および/またはヒト化軽鎖可変領域の(1つまたは複数の)アミノ酸配列を含み、ヒトCD19に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、CD19結合性物質は、ヒトCD19に特異的に結合する抗原結合抗体断片である。抗体断片は、例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv断片、ダイアボディー、直鎖状抗体、scFv、またはscFv-Fcとすることができる。

## 【 0 0 0 7 】

いくつかの態様において、CD19結合性物質は、CD19発現細胞に対して、細胞毒性、細胞増殖抑制性、および/または免疫調節性効果を有する。そのような効果は、例えば、CD19発現細胞の増殖または分化の除去または阻害によって媒介することができる。いくつかの実施形態において、CD19結合性物質は、エフェクター機能を媒介することができる。いくつかの実施形態において、CD19結合性物質は、治療薬剤にコンジュゲート化されている(例えばリガンド-薬物コンジュゲート化合物)。他の実施形態において、CD19結合性物質は、コンジュゲート化されていない、つまり、治療薬剤にコンジュゲート化されていない(例えば抗CD19裸抗体)。

30

## 【 0 0 0 8 】

本発明はそれ自体、リガンド単位が本発明のCD19結合性物質であるリガンド-薬物コンジュゲート化合物を提供する。リガンド-薬物コンジュゲートは、例えば、免疫障害または癌を治療するために使用することができる。

## 【 0 0 0 9 】

40

本発明の方法によって治療されることとなる癌は、例えば、例えばB細胞リンパ腫またはB細胞白血病などのB細胞系統悪性腫瘍を含み、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、および急性リンパ芽球性白血病を含むが、これらに限定されないCD19発現癌を含む。

## 【 0 0 1 0 】

CD19を発現する腫瘍細胞を死滅させる方法およびCD19を発現する腫瘍細胞の増殖または分化を阻害する方法もまた提供される。そのような方法は、細胞に特異的に結合し、例えば、ヒトCD19を発現する細胞を死滅させるまたはその増殖もしくは分化を阻害することができるCD19結合性物質を細胞に投与するステップを含むことができる。いくつかの実施形態において、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲ

50

ート化されていない抗CD19完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体が投与される。いくつかの他の実施形態において、リガンド-薬物コンジュゲート(例えば、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されているCD19結合性物質(例えば完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体))が投与される。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、B細胞、例えば末梢、脾臓、腸間膜リンパ節、および下顎リンパ節のB細胞の除去に有効となるであろう。

#### 【0011】

本発明は、免疫障害と関連するB細胞、例えば末梢B細胞の除去を誘発する方法を包含する。そのような方法は、CD19結合性物質を細胞に投与するステップを含むことができる。いくつかの実施形態において、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されていない抗CD19完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体が投与される。いくつかの他の実施形態において、リガンド-薬物コンジュゲート(例えば、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されているCD19結合性物質(例えば完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体))が投与される。いくつかの実施形態において、免疫障害は、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、または炎症性腸疾患である。

#### 【0012】

疾患の治療のための医薬の製造におけるCD19結合性物質の使用もまた本発明によって提供される。いくつかの実施形態において、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されていない抗CD19完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体を使用される。いくつかの他の実施形態において、リガンド-薬物コンジュゲート(例えば、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されているCD19結合性物質(例えば完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体))が使用される。

#### 【0013】

B細胞の除去のための医薬の製造におけるCD19結合性物質の使用もまた本発明によって提供される。いくつかの実施形態において、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されていない抗CD19完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体を使用される。いくつかの他の実施形態において、リガンド-薬物コンジュゲート(例えば、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されているCD19結合性物質(例えば完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体))が使用される。

#### 【0014】

CD19発現細胞を死滅させるまたはその増殖もしくは分化を阻害するための医薬の製造におけるCD19結合性物質の使用もまた本発明によって提供される。いくつかの実施形態において、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されていない抗CD19完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体を使用される。いくつかの他の実施形態において、リガンド-薬物コンジュゲート(例えば、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されているCD19結合性物質(例えば完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体))が使用される。

#### 【0015】

他の態様において、組成物が、CD19結合性物質および製薬上許容される賦形剤を含む医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されていない抗CD19完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体を含むであろう。いくつかの他の実施形態において、医薬組成物は、リガンド-薬物コンジュゲート(例えば、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されているCD19結合性物質(例えば完全長抗体またはその抗原結合断片もしくはその誘導体))を含むであろう。

#### 【0016】

他の態様において、リガンド-薬物コンジュゲート化合物の製造方法が提供される。一態様において、CD19結合性物質は、下記に、より十分に記載されるように、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤に直接またはリンカーを通してコンジュゲート化されている。

【0017】

本発明は、以下の詳細な説明、特定の実施形態の非限定的な実施例、ならびに添付された図および配列表を参照することによって、より十分に理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】非ヒト霊長類脾臓細胞に対する、CD19抗体の結合のFACS結果を示す図である。

10

【図2】CD19に対する、重鎖および軽鎖可変領域の結合分析を示す図である。

【図3】Ramos異種移植SCIDモデルでの裸のmBU12抗体およびmBU12-mcMMAFの抗腫瘍活性を示す図である。腫瘍サイズが平均で約100mm<sup>3</sup>のときに、マウスの群(5匹/群)に、何も処置しないか、またはmBU12裸抗体(1mg/kg)、mBU12裸抗体(5mg/kg)、mBU12-mcMMAF4(1mg/kg)およびmBU12-mcMMAF4(5mg/kg)を投与した。投与スケジュールは、q4dx3であった。

【図4】SCIDマウスのRamos腫瘍モデルでの抗CD19抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を示す図である。腫瘍サイズが平均で約100mm<sup>3</sup>のとき、マウスの群(5匹/群)を、何も処置しないか、またはcBU12-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答5匹中1匹のマウス)、cHD37-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答5匹中5匹のマウス)、c4g7-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答5匹中0匹のマウス)またはcFMC63-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答5匹中5匹のマウス)で処置した。投与スケジュールは、q4dx3 ivであった。CR応答では、腫瘍体積は、試験中の3回の連続測定で13.5mm<sup>3</sup>未満である。

20

【図5】SCIDマウスのRamos腫瘍モデルでの抗CD19抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を示す図である。腫瘍サイズが平均で約100mm<sup>3</sup>のとき、マウスの群(10匹/群)を、何も処置しないか、またはcBU12-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答10匹中6匹のマウス)、hBU12-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答10匹中10匹のマウス; IgG<sub>1</sub>定常領域)、hBU12-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答10匹中6匹のマウス; IgG<sub>4</sub>定常領域)、cHD37-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答10匹中10匹のマウス)、cFMC63-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答10匹中10匹のマウス)、c4G7-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答10匹中10匹のマウス)またはcAC10-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答10匹中0匹のマウス)で処置した。投与スケジュールは、q4dx4 ivであった。

30

【図6】cBU12-mcMMAF8とcHD37-mcMMAF8のトラフレベルを示す図である。

【図7】SCIDマウスのRamos腫瘍モデルでの抗CD19抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を示す図である。腫瘍サイズが平均で約100mm<sup>3</sup>のとき、マウスの群(10匹/群)を、何も処置しないか、またはhBU12-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答10匹中10匹のマウス)、cHD37-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答10匹中10匹のマウス)またはcAC10-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答10匹中0匹のマウス)で処置した。投与スケジュールは、q4dx4 ivであった。

【図8】SCIDマウスのDoHH2腫瘍モデルでの抗CD19抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を示す図である。腫瘍サイズが平均で約100mm<sup>3</sup>のとき、マウスの群(5匹/群)を、何も処置しないか、またはcAC10-mcMMAF8(3mg/kg)、cBU12-mcMMAF8(3mg/kg)、hBU12-mcMMAF8(3mg/kg); cHD37-mcMMAF8(3mg/kg)またはcFMC63-mcMMAF8(3mg/kg)で処置した。投与スケジュールは、q4dx4、ipであった。

40

【図9】NaIm-6腫瘍モデルでの抗CD19抗体-薬物コンジュゲートで処置したSCIDマウスの生存アッセイを示す図である。マウスの群(5匹/群)を、何も処置しないか、またはcAC10-mcMMAF8(3mg/kg)、cBU12-mcMMAF8(3mg/kg)、hBU12-mcMMAF8(3mg/kg); cHD37-mcMMAF8(3mg/kg)またはcFMC63-mcMMAF8(3mg/kg)で処置した。投与スケジュールは、q4dx4、ivであった。

【図10】hBU12-mcMMAF8(3mg/kg)とcHD37-mcMMAF8(3mg/kg)のトラフレベルを示す図である。各群中5匹のマウスを処置した。

【図11】SCIDマウスのRamos腫瘍モデルでのhBU12抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を示す図である。マウスの群(10匹/群)を、何も処置しないか、またはhBU12-vcMMAE4(1

50

mg/kg; 完全応答10匹中0匹のマウス)、hBU12-vcMMAE4(3mg/kg; 完全応答10匹中7匹のマウス)、hBU12-vcMMAF4(0.3mg/kg; 完全応答10匹中0匹のマウス)、hBU12-vcMMAF4(1mg/kg; 完全応答10匹中0匹のマウス)、hBU12-vcMMAF4(3mg/kg; 完全応答10匹中1匹のマウス)、hBU12-mcMMAF8(1mg/kg; 完全応答10匹中0匹のマウス)またはhBU12-mcMMAF8(3mg/kg; 完全応答10匹中10匹のマウス)で処置した。投与スケジュールは、q4dx4、ivであった。

【図12】SCIDマウスのDoHH2腫瘍モデルでの抗CD19抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を示す図である。マウスの群(1匹/群)を、1mg/kg、3mg/kgまたは10mg/kgのhBU12-vcMMAE4、hBU12-mcMMAF4およびhBU12-mcMMAF8で処置した。投与スケジュールは、単一用量、ipであった。

【図13】Ramos細胞を、2倍過剰のヤギ抗マウスリガンド薬物コンジュゲートで架橋させた抗CD19抗体(vcMMAF8)と培養した。培養物を96時間インキュベートし、50  $\mu$ Mリザズリンで標識した。値は、単一の実験内の4反復の平均  $\pm$  SDである。

【図14】CD19およびCD21の発現レベル、ならびに培養で増殖させたALL、CLLおよびNHL腫瘍細胞株に対する、hBU12-vcMMAE4およびhBU12-mcMMAF4の細胞毒性を示す図である。

【図15】NHLおよびALL腫瘍細胞株におけるhBU12-vcMMAE4の内在化動態および細胞内輸送を示す図である。

【図16A】NHLモデルでhBU12-vcMMAE4を試験する異種移植実験を示す図である。SCIDマウスの右脇腹に、 $5 \times 10^6$ 個の腫瘍細胞を皮下に移植し、平均腫瘍体積が100mm<sup>3</sup>に到達したときに処置を開始した。処置は、1または3mg/kg、q4dx4のhBU12-vcMMAE4による腹腔内投与であった。各処置群には、7~10匹のマウスが含まれた。16A) NHL細胞株(バーキットリンパ腫)の増殖曲線; 16B) 濾胞性リンパ腫細胞株DOHH2の増殖曲線。

【図16B】NHLモデルでhBU12-vcMMAE4を試験する異種移植実験を示す図である。SCIDマウスの右脇腹に、 $5 \times 10^6$ 個の腫瘍細胞を皮下に移植し、平均腫瘍体積が100mm<sup>3</sup>に到達したときに処置を開始した。処置は、1または3mg/kg、q4dx4のhBU12-vcMMAE4による腹腔内投与であった。各処置群には、7~10匹のマウスが含まれた。16A) NHL細胞株(バーキットリンパ腫)の増殖曲線; 16B) 濾胞性リンパ腫細胞株DOHH2の増殖曲線。

【図16C】NHLモデルでhBU12-vcMMAE4を試験する異種移植実験を示す図である。SCIDマウスの右脇腹に、 $5 \times 10^6$ 個の腫瘍細胞を皮下に移植し、平均腫瘍体積が100mm<sup>3</sup>に到達したときに処置を開始した。処置は、1または3mg/kg、q4dx4のhBU12-vcMMAE4による腹腔内投与であった。各処置群には、7~10匹のマウスが含まれた。16C) びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)細胞株DLCL2の増殖曲線。

【図16D】NHLモデルでhBU12-vcMMAE4を試験する異種移植実験を示す図である。SCIDマウスの右脇腹に、 $5 \times 10^6$ 個の腫瘍細胞を皮下に移植し、平均腫瘍体積が100mm<sup>3</sup>に到達したときに処置を開始した。処置は、1または3mg/kg、q4dx4のhBU12-vcMMAE4による腹腔内投与であった。各処置群には、7~10匹のマウスが含まれた。16D) 尾静脈からALL細胞株RS4; 11を移植されたマウスの生存曲線。マウスの処置は、腹腔内へのq4dx4のスケジュールで、腫瘍移植から7日目を開始した。

【図16E】NHLモデルでhBU12-vcMMAE4を試験する異種移植実験を示す図である。SCIDマウスの右脇腹に、 $5 \times 10^6$ 個の腫瘍細胞を皮下に移植し、平均腫瘍体積が100mm<sup>3</sup>に到達したときに処置を開始した。処置は、1または3mg/kg、q4dx4のhBU12-vcMMAE4による腹腔内投与であった。各処置群には、7~10匹のマウスが含まれた。16E) 尾静脈からALL細胞株Nalm-6を移植されたマウスの生存曲線。処置は、腹腔内注射による、示された用量のhBU12-vcMMAE4の単回投与で腫瘍移植から7日目を開始した。

【図17A】リツキシマブ耐性リンパ腫でのhBU12-vcEの効力を示す図である。17A) SCIDマウスに、リツキシマブ耐性腫瘍を生成するために用いた、 $5 \times 10^6$ 個の親Ramos-P細胞株を移植した。リツキシマブ(12mg/kg、q4dx4)およびhBU12-vcE(3mg/kg、q4dx4)によって、同等レベルの腫瘍増殖阻害が達成された。

【図17B】リツキシマブ耐性リンパ腫でのhBU12-vcEの効力を示す図である。17B) hBU12-vcE(1および3mg/kg、IP、q4dx4)またはリツキシマブ(12mg/kg、q4dx4、IP)で処置したリツキシマブ耐性Ramos腫瘍(R-Ramos)の腫瘍増殖曲線。これらの化合物によって誘導され

10

20

30

40

50

た腫瘍増殖遅滞に、統計的に有意な差があった。

【図17C】リツキシマブ耐性リンパ腫でのhBU12-vcEの効力を示す図である。17C) Ramos-P(感受性)およびR-Ramos(耐性)腫瘍から単離した細胞上の、CD19およびCD20の発現のFACS分析。両抗原の同等の発現レベルが、両方の腫瘍で見られた。

【図17D】リツキシマブ耐性リンパ腫でのhBU12-vcEの効力を示す図である。17D) 1および3mg/kg、q4dx4のhBU12-vcEまたは対照のコンジュゲートで処置した、皮下移植リツキシマブ耐性Raji2R腫瘍(NHL、バーキットリンパ腫)に対する、hBU12-vcEの抗リンパ腫効果。10匹中9匹の永続的退縮がhBU12-vcEで処置したマウスで観察されたが、リツキシマブ(12mg/kg、q4dx4)は、腫瘍増殖に有意な影響を及ぼさなかった。群につき5~10匹のマウスが含まれた。永続的応答(DR)は、実験全体中の明瞭な腫瘍の完全な非存在と定義される。

【図18】ALLの播種性モデルでのhBU12の活性を示す図である。マウスは、腫瘍移植から1日目に、10mg/kgのhBU12、hBU12-vcE(4)またはhBU12-mcF(4)、IPの単一用量を投与された。群につき10匹のマウスが含まれた。

【図19】NHLの皮下モデル(SUDHL4)でのhBU12の限定された抗腫瘍効果を示す図である。処置群につき、8~10匹のマウスが含まれた。投与スケジュールは、Q4dx4、IPであった。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明はそれ自体、ヒトCD19に特異的に結合するCD19結合性物質を提供する。特に、本発明者らは、ヒト化BU12抗体およびヒト化BU12抗体を含むリガンド-薬物コンジュゲート化合物を設計した。

【0020】

一部の態様において、本発明のCD19結合性物質は、抗体mBU12の少なくとも1つのCDR領域を含む。一部の態様において、CD19結合性物質は、mBU12抗体のCDR領域の6つすべてを含む。いくつかの実施形態において、CDR領域は、抗体mBU12のCDRの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つの保存的アミノ酸置換を有する。

【0021】

一部の態様において、本発明のCD19結合性物質は、その誘導体を含む、抗体重鎖可変領域および/または抗体軽鎖可変領域を含む。

【0022】

いくつかの態様において、組成物および方法は、CD19に結合する、抗体誘導体を含む、抗体に関する。一部の態様において、抗CD19抗体および誘導体は、その誘導体を含む、抗体BU12のヒト化重鎖可変領域および/またはヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。一部の態様において、抗CD19抗体および誘導体は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または6つすべての、抗体mBU12のCDR領域を含む。いくつかの実施形態において、抗CD19抗体は、少なくとも1つの免疫グロブリン定常領域ドメインまたはヒト定常領域などの、抗体の全定常領域または任意によりその機能的活性部分を含む。いくつかの実施形態において、抗体定常領域または(1つもしくは複数の)ドメインは、IgGクラスである。いくつかの実施形態において、抗体定常ドメインは、IgG1、IgG2、またはIgG1V1である。

【0023】

一部の態様において、組成物および方法は、CD19に結合し、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されている、抗体誘導体を含む抗体に関する。一部の態様において、抗体は、変化したグリコシル化パターンを有する。

【0024】

開示の明瞭性のために、また限定の目的ではなく、発明の詳細な説明は、続くサブセクションに分けられる。

【0025】

定義および略語

商標名が本明細書において使用される場合、商標名に対する言及はまた、製品製剤、ジ

10

20

30

40

50

エネリック医薬品、および商標名の製品の(1つまたは複数の)活性医薬品成分を特に文脈によって指示されない限り指す。

【0026】

本明細書において使用される場合、用語「CD19結合性物質」および「抗CD19結合性物質」は、CD19に特異的に結合する分子、例えばタンパク質を指す。例として、完全長抗CD19抗体、完全長抗CD19抗体の断片、または抗体重鎖可変領域および/もしくは軽鎖可変領域ならびにその誘導体を含む他の物質を含み得る。

【0027】

用語「特異的な結合」および「特異的に結合する」は、CD19結合性物質が、その対応する標的、CD19と高度に選択的な方法において反応するが、多くの他の抗原とは反応しないということの意味する。典型的には、C19結合性物質は、少なくとも約 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、好ましくは $10^{-8} \text{M} \sim 10^{-9} \text{M}$ 、 $10^{-10} \text{M}$ 、 $10^{-11} \text{M}$ 、または $10^{-12} \text{M}$ の親和性で結合し、所定の抗原または密接に関係する抗原以外の非特異的抗原(例えばBSA、カゼイン)への結合についてのその親和性よりも少なくとも2倍大きな親和性で所定の抗原に結合する。

【0028】

本明細書において使用される場合、CD19結合性物質との関連における用語「機能的な」は、結合性物質がCD19に特異的に結合することができることを示す。

【0029】

本明細書において使用される場合、用語「阻害する」または「の阻害」は、測定可能な量を低下させるまたは完全に予防することを意味する。

【0030】

CD19発現細胞に対するCD19結合性物質の効果との関連における用語「除去する」は、CD19発現細胞の数の低下またはその排除を指す。

【0031】

「天然抗体」および「天然免疫グロブリン」は、典型的には、2つの軽(L)鎖および2つの重(H)鎖から成る、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質として本明細書において定義される。各軽鎖は、ジスルフィド結合によって重鎖に共有結合されて、ヘテロ二量体を形成する。ヘテロ四量体は、そのようなヘテロ二量体の2つの重鎖の間の共有結合ジスルフィド連結によって形成される。軽鎖および重鎖は、ジスルフィド結合によって相互に連結されるが、2つの重鎖の間のジスルフィド連結の数は、免疫グロブリン(Ig)アイソタイプによって変わる。各重鎖および軽鎖もまた、規則的に間隔を置いて配置された鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、アミノ末端に可変ドメイン( $V_H$ )、その後3つまたは4つの定常ドメイン(抗体タイプに適切な $C_H1$ 、 $C_H2$ 、 $C_H3$ 、および/または $C_H4$ )、ならびに $C_H1$ および $C_H2$ の間にヒンジ(J)領域を有する。各軽鎖は、2つのドメイン、アミノ末端可変ドメイン( $V_L$ )およびカルボキシ末端定常ドメイン( $C_L$ )を有する。 $V_L$ ドメインは、 $V_H$ ドメインと非共有結合するのに対して、 $C_L$ ドメインは、ジスルフィド結合を介して $C_H1$ ドメインに一般に共有結合する。特定のアミノ酸残基は、軽鎖および重鎖の可変ドメインの間の接合点を形成すると考えられる(例えば、Chothiaら、1985、J. Mol. Biol. 186:651~663ページを参照)。

【0032】

用語「超可変」は、抗体の中で配列が広範囲に異なり、その特異的な抗原決定基に対する各特定の抗体の結合および特異性に直接関与する残基を含有する、免疫グロブリンの可変ドメイン内の一部の配列を指す。超可変性は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインの両方において、相補性決定領域(CDR)または超可変ループ(HVL)として知られている3つのセグメントに集中している。CDRの位置は、Kabat et al., 1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.において配列比較によって定義されるのに対して、HVLは、Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917において記載されるように、可変ドメインの三次元構造に従い、構造上定義される。Kabatによって定義されるように、軽鎖可変ドメインにおいて、CDR-L1は、約残基24~34に、CDR-L2は、約残基50~56に、

10

20

30

40

50



CDR-L3は、約残基89～97に位置する。重鎖可変ドメインにおいて、CDR-H1は、約残基31～35に、CDR-H2は、約残基50～65に、CDR-H3は、約95～102に位置する。

【 0 0 3 3 】

各重鎖および軽鎖内の3つのCDRは、フレームワーク領域(FR)によって離れている。重鎖および軽鎖可変ドメインのアミノ末端からカルボキシ末端まで、FRおよびCDRは順に配置されている:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4。FRの大部分のβ-シート構造は、各鎖内のCDRを互いにおよび他方の鎖からのCDRに対して極めて近接させる。すべてのCDR残基が、必ずしも、直接、抗原結合に関与するわけではないが、結果として生じるコンホメーションは、抗原結合部位に寄与する(例えばKabat et al., 1991, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. 1, pages 647-669を参照)。

10

【 0 0 3 4 】

FR残基およびIg定常ドメインは、典型的には、直接、抗原結合に関与しないが、抗原結合に寄与するまたは抗体エフェクター機能を媒介する可能性がある。いくつかのFR残基は、少なくとも3つの方法において:エピトープに直接非共有結合すること、1つまたは複数のCDR残基と相互作用すること、ならびに重鎖および軽鎖の間の接合点に影響を与えることによって、抗原結合に著しい効果を有し得る。いくつかの実施形態において、定常ドメインは、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)、補体依存性細胞傷害作用(CDC)、および/または抗体依存性細胞食作用(ADCP)における抗体の参加などの様々なIgエフェクター機能を媒介する。

20

【 0 0 3 5 】

脊椎動物免疫グロブリンの軽鎖は、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、2つの明らかに別個のクラス、カッパ( )およびラムダ( )のうちの1つに割り当てられる。比較すると、哺乳動物免疫グロブリンの重鎖は、定常ドメインの配列に従い、5つの主要クラスのうちの1つに割り当てられる:IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM。IgGおよびIgAは、それぞれ、サブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、およびIgG<sub>4</sub>ならびにIgA<sub>1</sub>およびIgA<sub>2</sub>にさらに分けられる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、および $\mu$ と呼ばれる。天然免疫グロブリンのクラスのサブユニット構造および三次元構造は、周知である。

【 0 0 3 6 】

用語「抗体」、「抗CD19抗体」、「ヒト化抗CD19抗体」、および「変異ヒト化抗CD19抗体」は、最も広い意味において本明細書において使用され、完全長抗体および天然抗体、モノクローナル抗体(完全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、ならびに可変ドメインおよび所望の生物学的活性(例えばCD19結合)を示す抗体の他の部分などのその抗体断片を特に包含する。用語「抗CD19抗体断片」、「ヒト化抗CD19抗体断片」、および「変異ヒト化抗CD19抗体断片」は、可変領域または機能的な能力、例えば特異的CD19エピトープ結合が保持されている、完全長抗CD19抗体の部分指す。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、scFv、およびscFv-Fc断片、抗原結合抗体断片から形成されるダイアボディー、直鎖状抗体、ミニボディー、ならびに多重特異性抗体を含むが、これらに限定されない。抗体断片は、「抗体」の定義内に特に含まれる。

30

40

【 0 0 3 7 】

用語「モノクローナル抗体」または「mAb」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、集団を含む個々の抗体は、少量で存在する可能性がある天然に存在する突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、エピトープとも呼ばれる単一の抗原決定基に対して誘導される。修飾語「モノクローナル」は、同一のエピトープに対する抗体の実質的に同種の集団を示し、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ない。モノクローナル抗体は、当技術分野において知られている任意の技術または方法論、例えば、Kohler et al., 1975, Nature 256:495によって最初に記載されたハイブリドーマ方法または当技術分野において知られている組換えDNA方法(例えば米国特許第4,816,567号を参照)によって作製することができ

50

る。他の例において、モノクローナル抗体はまた、Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628およびMarks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-97において記載される技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから単離することができる。

#### 【0038】

本明細書において使用されるような用語「キメラ」抗体は、重鎖および/または軽鎖の部分またはそれにおける1つもしくは複数の領域もしくはドメインの完全アミノ酸配列が、他の生物種由来のまたは他の免疫グロブリンクラスもしくはアイソタイプに属するまたはコンセンサス配列からのモノクローナル抗体における対応する配列と同一である、それに相同である、またはその変異体であるモノクローナル抗体の一種を指す。キメラ抗体の例は、非ヒトモノクローナル抗体に由来する可変領域およびヒトIgG免疫グロブリン定常領域を有するものである。キメラ抗体は、そのような抗体の断片を含む、ただし、抗体断片は、その親抗体の所望の生物学的活性、例えば同じエピトープへの結合を示すことを条件とする(例えば米国特許第4,816,567号およびMorrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855を参照)。キメラ抗体を産生する方法は、当技術分野において知られている。(例えばMorrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; 米国特許第5,807,715号、同第4,816,567号、および同第4,816,397号を参照)。

#### 【0039】

「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、ドメインが、単一のポリペプチド鎖中に存在し、抗原を認識し、それに結合することができる、抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む単鎖Fv変異体である。scFvポリペプチドは、scFvが、抗原結合のための所望の三次元構造を形成することを可能にする、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインの間に位置するポリペプチドリンカーを任意により含有する(例えばPluckthun, 1994, In The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315を参照)。

#### 【0040】

用語「ダイアボディー」は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指す。各断片は、軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に鎖状につながれた重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を含有し、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>またはV<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>ポリペプチドを形成する。短かすぎて、同じ鎖上の2つのドメインの間で対形成を可能にすることができないリンカーを使用することによって、連結されたV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>ドメインは、他の鎖の相補的なドメインと対形成するように強いられて、2つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディーは、例えばEP 0 404 097、WO 93/11161、Hollinger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448において、より十分に記載されている。

#### 【0041】

用語「直鎖状抗体」は、一对の抗原結合領域を形成する一对の直列Fdセグメント(V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1)を有する抗体を指す。直鎖状抗体は、Zapata et al., 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062において記載されるように、二重特異性または単一特異性とすることができる。

#### 【0042】

本明細書における目的のための「ヒト化」抗体は、所定の抗原に結合することができるまたはヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域および非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するCDRを含む免疫グロブリンアミノ酸配列変異体またはその断片である。

#### 【0043】

一般に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源からの、それに導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「移入」残基として本明細書において呼ばれ、これらは、典型的には、「移入」抗体ドメイン、特に可変ドメインから取られる。移入残基、配列、または抗体は、所望の親和性および/もしくは特異性または本明細書において論じられるような他の望ましい抗体生物学的活性を有する。

## 【 0 0 4 4 】

一般に、ヒト化抗体は、すべてまたは実質的にすべてのCDR領域が、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、すべてまたは実質的にすべてのFR領域が、例えばコンセンサス配列または生殖系列配列からのヒト免疫グロブリン配列のFR領域である、実質的にすべての少なくとも1つの、時に2つの可変ドメインを含むであろう。ヒト化抗体はまた、任意により、免疫グロブリンFc領域、典型的にはヒト免疫グロブリンのFc領域の少なくとも1つの部分をも含むであろう。ある種の態様において、抗体は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域の両方を含有するであろう。抗体はまた、適切のように、重鎖のC<sub>H</sub>1、ヒンジ(J)、C<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3、および/またはC<sub>H</sub>4領域ならびに軽鎖のC<sub>L</sub>領域を含んでいてよい。

## 【 0 0 4 5 】

ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、およびIgEを含む任意のクラスの免疫グロブリンならびにIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、およびIgG<sub>4</sub>ならびにIgA<sub>1</sub>およびIgA<sub>2</sub>を含む任意のアイソタイプから選択されるであろう。免疫グロブリンのクラスまたはアイソタイプの選択は、部分的に、所望のエフェクター機能に依存するであろう。例えば、ヒト免疫グロブリンがCDCおよびADCC/ADCPを媒介する能力は、一般に、それぞれ、IgM、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>3</sub>>IgG<sub>2</sub>>IgG<sub>4</sub>およびIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>3</sub>>IgG<sub>2</sub>/IgM/IgG<sub>4</sub>の順である。ヒト化抗体は、1つを超えるクラスまたはアイソタイプからの配列を含んでいてよく、所望のエフェクター機能を最適化するための特定の定常ドメインの選択は、当技術分野における通常の技術の範囲内にある。ヒト化抗体は、エフェクター機能を有していてもよく、または有していなくてもよい。

## 【 0 0 4 6 】

ヒト化抗体のFRおよびCDRは、親の配列に正確に対応する必要はなく、例えば、移入CDRまたはコンセンサスFRは、その部位のCDRまたはFR残基がコンセンサスまたは移入抗体のいずれかに対応しないように、少なくとも1つの残基の置換、挿入、または削除によって変化していてもよい。典型的には、そのような変化は、広範囲にならないであろう。普通、ヒト化抗体残基の少なくとも75%は、親のFRおよびCDR配列の残基に対応するであろうし、より多くは、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも99%が対応するであろう。

## 【 0 0 4 7 】

「治療薬剤」は、癌細胞または活性化免疫細胞に対して細胞毒性、細胞増殖抑制性、および/または免疫調節性効果を及ぼす薬剤である。治療薬剤の例は、細胞毒性薬剤、化学療法薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および免疫調節性薬剤を含む。

## 【 0 0 4 8 】

「化学療法薬剤」は、癌の治療において有用な化学物質である。

## 【 0 0 4 9 】

「細胞毒性効果」は、(1つまたは複数の)標的細胞の除去、排除、および/または死滅を指す。「細胞毒性薬剤」は、細胞に対して、細胞毒性および/または細胞増殖抑制性効果を有する薬剤を指す。用語は、放射性同位体(例えばI<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、およびRe<sup>186</sup>)、化学療法薬剤、ならびに細菌、菌類、植物、または動物起源の酵素活性毒素などの毒素およびその断片を含むように意図される。

## 【 0 0 5 0 】

「細胞増殖抑制性効果」は、細胞増殖の阻害を指す。「細胞増殖抑制性薬剤」は、細胞に対して細胞増殖抑制性効果を有し、それによって、細胞の特定のサブセットの成長および/または増殖を阻害する薬剤を指す。

## 【 0 0 5 1 】

用語「標識」は、結合性物質(例えば抗体)に直接または間接的にコンジュゲート化されている、検出可能な化合物または組成物を指す。標識はそれ自体、検出可能であってもよい(例えば放射性同位元素標識もしくは蛍光標識)または酵素標識の場合において、検出可能な基質化合物または組成物の化学変換を触媒してもよい。標識CD19結合性物質は、調製することができ、インビトロおよびインビボ診断法を含む様々な適用において使用することができる。有用な標識は、造影剤などの診断用薬剤を含む(磁気共鳴画像法、コンピュ

10

20

30

40

50

ーター断層撮影法、または超音波については、例えばマンガン、鉄、またはガドリニウムなど)。

【0052】

「単離」核酸分子は、核酸分子が、同定され、核酸の自然の供給源において通常伴われる少なくとも1つの混入核酸分子から分離されている核酸分子である。単離核酸分子は、それが自然界において見られる形態または環境における以外のものである。したがって、単離核酸分子は、核酸分子が自然の細胞中に存在するので、核酸分子と区別される。しかしながら、単離核酸分子は、例えば、核酸分子が、自然の細胞のものと異なる染色体の位置にある、核酸を通常発現する細胞中に含有される核酸分子を含む。

【0053】

用語「制御配列」は、特定の宿主生物において作動可能に連結されたコード配列の発現に必要なポリヌクレオチド配列を指す。原核細胞における使用に適した制御配列は、例えばプロモーター配列、オペレーター配列、およびリボソーム結合部位配列を含む。真核生物の制御配列は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを含むが、これらに限定されない。これらの制御配列は、原核生物および真核生物宿主細胞においてCD19結合性物質の発現および産生のために利用することができる。

【0054】

核酸配列は、他の核酸配列との機能的な関係に置かれる場合、「機能的に連結されている」。例えば、核酸プレ配列もしくは分泌リーダーは、ポリペプチドの分泌に参加するタンパク質前駆体として発現される場合、ポリペプチドをコードする核酸に機能的に連結されており、プロモーターもしくはエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列に機能的に連結されており、またはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように位置する場合、コード配列に機能的に連結されている。一般に、「機能的に連結された」は、連結されている核酸配列が、隣接していることを意味し、分泌リーダーの場合において、隣接しており、リーディングフレーム中にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、場合によっては隣接している。連結は、例えば、好都合な制限部位でのライゲーションによって達成することができる。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター、リンカー、または当技術分野において知られている他の方法を使用することができる。

【0055】

用語「ポリペプチド」は、アミノ酸のポリマーおよびその等価物を指し、特定の長さの産物を指さず、したがって、「ペプチド」および「タンパク質」は、ポリペプチドの定義の範囲内に含まれる。本明細書において定義される「抗体」もまたポリペプチドの定義の範囲内に含まれる。「ポリペプチド領域」は、ポリペプチドのセグメントを指し、このセグメントは、例えば、1つまたは複数のドメインまたはモチーフを含有していてもよい(例えば、抗体のポリペプチド領域は、例えば、1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)を含有することができる)。用語「断片」は、好ましくは少なくとも20の隣接するまたは少なくとも50の隣接する、ポリペプチドのアミノ酸を有するポリペプチドの部分指す。

【0056】

特に文脈によって示されない限り、「誘導体」は、第2のポリペプチドに比べて1つもしくは複数の非保存的もしくは保存的アミノ酸置換を有するポリペプチドもしくはその断片であり(「変異体」とも呼ばれる)、または例えば異種ポリペプチドの付加もしくはグリコシル化、アセチル化、リン酸化などによるものなど、第2の分子の共有結合によって修飾されるポリペプチドもしくはその断片である。例えば、アミノ酸の1つまたは複数の類似体(例えば非天然アミノ酸など)を含有するポリペプチド、非置換連結を有するポリペプチド、ならびに天然に存在するおよび天然に存在しない当技術分野において知られている他の修飾体は、「誘導体」の定義の範囲内にさらに含まれる。

【0057】

「単離」ポリペプチドは、その自然環境の成分から同定、分離、および/または回収されたものである。その自然環境の混入成分は、ポリペプチドについて診断上または治療上

10

20

30

40

50

の使用に干渉し、また酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を含んでいてよい物質である。単離ポリペプチドは、単離抗体またはその断片もしくは誘導体を含む。

#### 【0058】

一部の実施形態において、ポリペプチドは、(1)ローリー法によって決定した場合、95重量%超のポリペプチドまでおよび他の態様において、99重量%超まで(2)スピニングカップシークエネーターの使用によってN末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15の残基を得るのに十分な程度まで、または(3)クーマシーブルー染色または好ましくは銀染色を使用して還元または非還元条件下でSDS-PAGEによって均一性に精製されるであろう。「単離抗体」は、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないので、組換え細胞内の生体内の抗体を含む。

10

#### 【0059】

ポリペプチドとの関連における用語「異種」は、他のポリペプチドと比較して、異なる供給源(例えば細胞、組織、生物、または生物種)由来のものであることを意味し、その結果、2つのポリペプチドは、異なる。典型的には、異種ポリペプチドは、異なる生物種由来のものである。

#### 【0060】

免疫グロブリンポリペプチドまたはその断片との関連において、上記に定義されるように、「保存的置換」は、抗原への免疫グロブリンポリペプチドまたはその断片の特異的な結合を実質的に低下させない(例えば $K_D$ によって測定されるように)、1つまたは複数のアミノ酸置換を意味する(例えば、結合を増加させる、結合を著しく変化させない、または例えばELISAなどの標準的な結合アッセイによって決定した場合に、約40%以下、典型的には約30%以下、より典型的には約20%以下、さらに典型的には約10%以下、もしくは最も典型的には約5%以下、結合を低下させる置換)。

20

#### 【0061】

2つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列との関連における用語「同一の」または「同一性パーセント」は、最大に一致するように、比較され、アライメントされた場合に、同じもしくは指定された割合のヌクレオチドを有する2つ以上の配列もしくは部分配列または同じであるアミノ酸残基を指す。同一性パーセントを決定するために、配列は、最適な比較の目的のためにアライメントされる(例えば、ギャップは、第2のアミノ酸または核酸配列との最適なアライメントのために、第1のアミノ酸の配列または核酸配列中に導入することができる)。その後、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列の位置が、第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合、分子は、その位置で同一となる。2つの配列の間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一の位置の数の関数である(つまり%同一性=同一の位置の数/位置の総数(例えば重複する位置) $\times 100$ )。いくつかの実施形態において、2つの配列は、同じ長さである。

30

#### 【0062】

2つの核酸またはポリペプチドとの関連における用語「実質的に同一の」は、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有する2つ以上の配列または部分配列を指す(例えば以下に述べられる方法のうちの1つを使用して決定されるように)。

40

#### 【0063】

本発明のCD19結合性物質との関連において、抗CD19抗体の1つまたは複数の抗原結合領域(例えば重鎖もしくは軽鎖可変領域または重鎖CDRもしくは軽鎖CDR)と実質的に同一の1つまたは複数のポリペプチド領域を有するタンパク質は、当技術分野において知られているまたは本明細書において言及される様々な標準的なイムノアッセイのうちのいずれかを使用して決定されるように、抗CD19抗体によって認識されるCD19のエピトープへの特異的な結合を保持する。

50

## 【 0 0 6 4 】

2つの配列の間の同一性パーセントの決定は、数学的なアルゴリズムを使用して達成することができる。2つの配列の比較のために利用される数学的なアルゴリズムの非限定的な例は、Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877におけるように改良されたKarlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLASTおよびXBLASTのプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド調査は、対象となるタンパク質をコードする核酸に相同のヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて実行することができる。BLASTタンパク質調査は、対象となるタンパク質に相同のアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実行することができる。比較の目的のためのギャップアライメントを得るために、ギャップBLASTは、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402において記載されるように利用することができる。その代わりに、PSI-Blastは、分子の遠縁の関係を検出する反復調査を実行するために使用することができる(同著者)。BLAST、ギャップBLASTおよびPSI-BLASTプログラムを利用する場合、各プログラム(例えばXBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを使用することができる。配列の比較のために利用される数学的なアルゴリズムの他の非限定的な例は、Myers and Miller, CABIOS (1989)のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。アミノ酸配列の比較のためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120加重残基表、12のギャップ長ペナルティー、および4のギャップペナルティーを使用することができる。配列分析のためのさらなるアルゴリズムは、当技術分野において知られており、Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5において記載されるADVANCEおよびADAMならびにPearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8において記載されるFASTAを含む。FASTA内で、ktupは、調査の感度および速度を設定する制御オプションである。ktup=2の場合、比較されている2つの配列の類似した領域は、アライメントされた残基の対を探ることにより見出すことができ、ktup=1の場合、単一のアライメントされたアミノ酸が検査される。ktupは、タンパク質配列については2もしくは1にまたはDNA配列については1~6に設定することができる。ktupが指定されない場合、デフォルトは、タンパク質については2、DNAについては6となる。その代わりに、タンパク質配列アライメントは、Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402によって記載されるように、CLUSTAL Wアルゴリズムを使用して行われてもよい。

## 【 0 0 6 5 】

場合により、2つの任意の抗体配列は、例えば、一方の抗体配列の各アミノ酸が、同じKabat番号を有する他方の配列のアミノ酸とアライメントされるように、Kabat番号システムを使用することによって、同一性パーセントを決定するためにアライメントすることができる。アライメントの後に、対象抗体領域(例えば重鎖または軽鎖の成熟可変領域全体)が、参照抗体の同じ領域と比較されている場合、対象および参照抗体領域の間のパーセンテージ配列同一性は、ギャップを数えない、2つの領域のアライメントされた位置の総数で割り、パーセンテージに変換するために100を掛けた、対象および参照抗体領域の両方における同じアミノ酸によって占められる位置の数である。

## 【 0 0 6 6 】

本明細書において使用される場合、「エフェクター細胞」は、免疫グロブリンのFc領域に対する表面受容体(FcR)を発現する細胞を指す。例えば、FcRIII(CD16)、FcRII(CD32)、およびFcRI(CD64)をはじめとする、IgGに対する表面FcRを発現する細胞は、エフェクター細胞として作用することができる。そのようなエフェクター細胞は、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、および好酸球を含む。

## 【 0 0 6 7 】

本明細書において使用される場合、用語「(1つまたは複数の)抗体エフェクター機能」

10

20

30

40

50

は、Igの(1つまたは複数の)Fc領域によって寄与される機能を指す。そのような機能は、例えば、食作用活性もしくは溶解活性を有する免疫細胞上のFc受容体への(1つもしくは複数の)Fcエフェクター領域の結合によってまたは補体系の成分への(1つもしくは複数の)Fcエフェクター領域の結合によって果たすことができる。本発明のCD19結合性物質は、エフェクター機能を有していてもよく、または有していなくてもよい。

【0068】

本明細書において使用される場合、「障害」ならびに用語「CD19関連疾患」および「CD19関連疾病」は、本明細書において記載されるCD19結合性物質を用いる治療から利益を得るあらゆる状態を指す。これは、対象となる障害に哺乳動物を罹患しやすくする病理学的状態を含む、慢性および急性の障害または疾患を含む。本明細書において治療される対象の非限定的な例または障害は、血液悪性腫瘍、良性および悪性腫瘍、白血病、ならびにリンパ系悪性腫瘍を含むCD19発現癌ならびに炎症障害、血管新生障害、および免疫障害を含む。障害の特定の例は、以下に開示される。

【0069】

B細胞系統悪性腫瘍と呼ばれるB細胞悪性腫瘍は、本発明の方法によって治療可能である。B細胞悪性腫瘍という用語は、B細胞系統の細胞に由来する任意の悪性腫瘍を含む。

【0070】

本明細書において使用される場合、用語「治療」および「療法」などは、1つまたは複数の症状の緩和または軽減、疾患または障害の進行の後退、遅延、または停止を含むが、これらに限定されない、任意の臨床的に望ましいまたは有益な効果に至る、疾患または障害に対する治療上または抑制性の手段を含むよう意味される。例えば、治療は、被験体への抗CD19抗体または他のCD19結合性物質の投与による、臨床的なまたは診断上の症状の発症の後の、CD19発現障害の臨床的なまたは診断上の症状の減少または排除を含むことができる。治療は、症状の重症度、症状の数、または再発の頻度の減少として証明することができる。

【0071】

指示される場合を除いて、用語「被験体」および「患者」は、区別なく使用され、ヒト患者および非ヒト霊長動物などの哺乳動物ならびにウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、および他の動物などの実験動物を指す。したがって、本明細書において使用される場合、用語「被験体」または「患者」は、本発明のCD19結合性物質を投与することができる任意の哺乳動物患者または被験体を意味する。本発明の被験体は、例えばB細胞リンパ腫またはB細胞白血病を含み、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、および急性リンパ芽球性白血病を含むが、これらに限定されないCD19発現癌と診断された被験体を含む。一部の実施形態において、被験体は、抵抗性のまたは再発したCD19発現癌を有するであろう。本発明の被験体は、自己免疫疾患と診察された被験体を含む。

【0072】

抵抗性のCD19発現癌を有する被験体は、療法に応答しない被験体である。つまり、被験体は、療法にもかかわらず疾患進行を経験し続ける。

【0073】

再発したCD19発現癌を有する被験体は、ある時点での療法に応答したが、応答に続いて疾患の再発またはさらなる進行を有した被験体である。

【0074】

用語「有効な量」は、被験体におけるCD19関連疾患の発生を阻害するかまたはその1つもしくは複数の臨床的なもしくは診断上の症状を寛解させるのに十分な、CD19結合性物質またはリガンド-薬物コンジュゲートの量を指す。有効な量の薬剤は、「有効なレジメン」において本明細書において記載される方法に従い投与される。用語「有効なレジメン」は、CD19関連疾患の治療または予防を達成するのに適切な薬剤および投薬頻度の量の組合せを指す。

【0075】

用語「白血病」は、造血器官の進行性の悪性疾患を指し、一般に、血液および骨髄中の

10

20

30

40

50

白血球およびそれらの前駆体の異常な増殖および発生によって特徴付けられる。白血病は、一般に、(1)疾患の期間および性質--急性または慢性、(2)関与する細胞のタイプ;骨髄系(骨髄性)、リンパ系(リンパ行性)、または単球系、ならびに(3)血液中の異常細胞の数の増加または非増加--白血病性または非白血病性(亜白血病)に基づいて臨床的に分類される。白血病は、例えば、急性非リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、成人T細胞白血病、非白血性白血病、白血球血症性白血病(leukocytchemic leukemia)、好塩基球性白血病、芽細胞白血病、ウシ白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚白血病、胎生細胞性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、ヘアリーセル白血病、血芽球性白血病(hemoblastic leukemia)、血球芽細胞性白血病(hemocytoblastic leukemia)、組織球性白血病、幹細胞性白血病、急性単球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ行性白血病、リンパ系白血病、リンパ肉腫細胞性白血病、肥満細胞性白血病、巨核球性白血病、小骨髄芽球性白血病、単球性白血病、骨髄芽球性白血病、骨髄性白血病、骨髄系顆粒球性白血病、骨髄単球性白血病、ネーグリ白血病、形質細胞白血病、形質細胞性白血病、前骨髄性白血病、リーダー細胞性白血病、シリング白血病、幹細胞性白血病、亜白血性白血病、および未分化細胞性白血病を含む。

10

## 【0076】

本明細書において使用される場合、用語「製薬上許容される」は、適切な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴わないで、人間および動物の組織との接触に適し、妥当な利益/危険比と釣り合っているそれらの化合物、物質、組成物、および/または剤形を指す。用語「製薬上適合性の成分」は、CD19結合性物質またはリガンド-薬物コンジュゲートが共に投与される、製薬上許容される希釈剤、補助剤、賦形剤、または媒体を指す。

20

## 【0077】

用語「製薬上適合性の成分」は、CD19結合性物質が共に投与される、製薬上許容される希釈剤、補助剤、賦形剤、または媒体を指す。

## 【0078】

用語「化合物」は、化学物質自体ならびに明示的に述べられるにせよ、述べられないにせよ、また下記が除外されることになっていることを文脈が明確にしない限り、多形形態を含む、化合物の非結晶および結晶形態、これらの形態は、混合物の一部であってもよく、または単離されていてもよい;化合物の遊離酸および遊離塩基形態、これらは、典型的には、本明細書において提供される構造において示される形態となる;化合物の異性体、これは、光学異性体および互変異性異性体を指し、光学異性体は、鏡像異性体およびジアステレオマー、キラル異性体、ならびに非キラル異性体を含み、光学異性体は、単離光学異性体ならびにラセミ化合物および非ラセミ混合物を含む光学異性体の混合物を含み、異性体は、単離形態または1つもしくは複数の他の異性体との混合物であってもよい;重水素含有化合物およびトリチウム含有化合物を含み、放射性同位元素を含有する化合物を含み、治療上および診断上有効な放射性同位元素を含む化合物の同位体;二量体、三量体などの形態を含む、化合物の多量体形態;酸付加塩および塩基付加塩を含み、有機対イオンおよび無機対イオンを有する塩を含み、両性イオン形態を含み、化合物が2つ以上の対イオンと結合する場合、2つ以上の対イオンは、同じであってもよく、または異なってもよい化合物の塩、好ましくは製薬上許容される塩;ならびに半溶媒和物、一溶媒和物、二溶媒和物などを含み、有機溶媒和物および無機溶媒和物を含み、上述の無機溶媒和物は、水酸化物を含み、化合物が2つ以上の溶媒分子と結合する場合、2つ以上の溶媒分子は、同じであってもよく、または異なってもよい化合物の溶媒和物を指し、これらを包含する。いくつかの実例において、本発明の化合物に対して本明細書においてなされる言及は、1つまたは複数の上記の形態、例えば塩および/または溶媒和物の明示的な言及を含むであろうが、この言及は、強調のためのみのものであり、上記に記載される上記の形態の他のものを除外するとして解釈されないものとする。

30

40

## 【0079】

50



本明細書において使用される場合、「製薬上許容される塩」は、親化合物が、その酸性または塩基性塩を作製することによって修飾される、開示される化合物の誘導体を指す。製薬上許容される塩の例は、アミンなどの塩基性残基のミネラルまたは有機酸塩、カルボン酸などの酸性残基のアルカリまたは有機塩などを含むが、これらに限定されない。製薬上許容される塩は、例えば無毒性無機酸または有機酸から形成される親化合物の従来の無毒性塩または第四級アンモニウム塩を含む。例えば、そのような従来の無毒性塩は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸などの無機酸に由来するものならびに酢酸、プロピオン酸、琥珀酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パモ酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イセチオン酸などの有機酸から調製される塩を含む。これらの生理学上許容される塩は、例えば、水性アルコール中で過剰な酸と遊離アミン塩基を溶解することまたは水酸化物などのアルカリ金属塩基ともしくはアミンと遊離カルボン酸を中和することによって当技術分野において知られている方法によって調製される。

#### 【0080】

他に指示されない限り、用語「アルキル」は、約1～約20の(およびその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組合せおよび部分組合せ)炭素原子を有する飽和直鎖状または分岐炭化水素を指し、約1～約8の炭素原子が好ましい。アルキル基の例は、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソ-プロピル、*n*-ブチル、イソ-ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチル、*n*-ノニル、*n*-デシル、3-メチル-2-ブチル、3-メチル-1-ブチル、2-メチル-1-ブチル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、2-メチル-2-ペンチル、3-メチル-2-ペンチル、4-メチル-2-ペンチル、3-メチル-3-ペンチル、2-メチル-3-ペンチル、2,3-ジメチル-2-ブチル、および3,3-ジメチル-2-ブチルである。

#### 【0081】

アルキル基は、単独でまたは他の基の一部としてのいずれにせよ、任意により、ハロゲン、任意により置換されている-O-(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニル)、任意により置換されているアリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-NHC(O)R'、-SR'、-SO<sub>3</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R')、-N(R')<sub>2</sub>、および-CNを含むが、これらに限定されない1つまたは複数の基、好ましくは1～3の基(およびハロゲンから選択される任意のさらなる置換基)と置換することができ、各R'は、独立に、H、任意により置換されている-C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル、任意により置換されている-C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニル、任意により置換されている-C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニル、または任意により置換されているアリールから選択され、上述の任意により置換されている-O-(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニル)、任意により置換されているアリール、任意により置換されているC<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル、任意により置換されている-C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニル、および任意により置換されている-C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニル基は、任意により、-C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル、-C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニル、-C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニル、ハロゲン、-O-(C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル)、-O-(C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニル)、-O-(C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニル)、-アリール、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')<sub>2</sub>、-NHC(O)R''、-SR''、-SO<sub>3</sub>R''、-S(O)<sub>2</sub>R''、-S(O)R''、-OH、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R'')、-N(R'')<sub>2</sub>、および-CNを含むが、これらに限定されない1つまたは複数の基とさらに置換することができ、各R''は、H、-C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニル、またはアリールから独立に選択される。

#### 【0082】

他に指示されない限り、用語「アルケニル」および「アルキニル」は、約2～約20の(およびその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組合せおよび部分組合せ)炭素原子を有する直鎖状および分岐炭素鎖を指し、約2～約8の炭素原子が好ましい。アルケニル

10

20

30

40

50

鎖は、鎖中に少なくとも1つの二重結合を有し、アルキニル鎖は、鎖中に少なくとも1つの三重結合を有する。アルケニル基の例は、エチレンまたはビニル、アリル、-1-ブテニル、-2-ブテニル、-イソブチレニル、-1-ペンテニル、-2-ペンテニル、-3-メチル-1-ブテニル、-2-メチル-2-ブテニル、および-2,3-ジメチル-2-ブテニルを含むが、これらに限定されない。アルキニル基の例は、アセチレン、プロパルギル、アセチレニル、プロピニル、-1-ブチニル、-2-ブチニル、-1-ペンチニル、-2-ペンチニル、および-3-メチル-1ブチニルを含むが、これらに限定されない。

#### 【0083】

アルケニルおよびアルキニル基は、単独でまたは他の基の一部としてのいずれにせよ、任意により、ハロゲン、任意により置換されている-O-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル)、任意により置換されているアリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-NHC(O)R'、-SR'、-SO<sub>3</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R')、-N(R')<sub>2</sub>、および-CNを含むが、これらに限定されない1つまたは複数の基、好ましくは1~3の基(およびハロゲンから選択される任意のさらなる置換基)と置換することができ、各R'は、独立に、H、任意により置換されている-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、任意により置換されている-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、任意により置換されている-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、または任意により置換されているアリールから選択され、上述の任意により置換されている-O-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル)、任意により置換されているアリール、任意により置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、任意により置換されている-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、および任意により置換されている-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル基は、任意により、-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、ハロゲン、-O-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル)、-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル)、-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル)、-アリール、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')<sub>2</sub>、-NHC(O)R''、-SR''、-SO<sub>3</sub>R''、-S(O)<sub>2</sub>R''、-S(O)R''、-OH、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R'')、-N(R'')<sub>2</sub>、および-CNを含むが、これらに限定されない1つまたは複数の置換基とさらに置換することができ、各R''は、H、-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、またはアリールから独立に選択される。

#### 【0084】

他に指示されない限り、用語「アルキレン」は、約1~約20の(およびその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組合せおよび部分組合せ)炭素原子を有する飽和分岐または直鎖状鎖炭化水素ラジカルを指し、約1~約8の炭素原子が好ましく、親アルカンの同じまたは2つの異なる炭素原子からの2つの水素原子の除去によって誘導される2つの1価ラジカル中心を有する。典型的なアルキレンは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オシチレン、ノニレン、デカレン、1,4-シクロヘキシルエンなどを含むが、これらに限定されない。アルキレン基は、単独でまたは他の基の一部としてのいずれにせよ、任意により、ハロゲン、任意により置換されている-O-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル)、任意により置換されているアリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-NHC(O)R'、-SR'、-SO<sub>3</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R')、-N(R')<sub>2</sub>、および-CNを含むが、これらに限定されない1つまたは複数の基、好ましくは1~3の基(およびハロゲンから選択される任意のさらなる置換基)と置換することができ、各R'は、独立に、H、任意により置換されている-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、任意により置換されている-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、任意により置換されている-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、または任意により置換されているアリールから選択され、上述の任意により置換されている-O-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル)、任意により置換されている-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル)、任意により置換されているアリール、任意により置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、任意により置換されている-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、および任意により置換されている-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル基は、任意により、C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、ハロゲン、-O-(C<sub>1</sub>

~C<sub>8</sub>アルキル)、-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル)、-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-NHC(O)R'、-SR'、-SO<sub>3</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)R'、-OH、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R')、-N(R')<sub>2</sub>、および-CNを含むが、これらに限定されない1つまたは複数の置換基とさらに置換することができ、各R'は、H、-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、またはアリールから独立に選択される。

#### 【0085】

他に指示されない限り、用語「アルケニレン」は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含有する、任意により置換されているアルキレン基を指す。例示的なアルケニレン基は、例えばエテニレン(-CH=CH-)およびプロペニレン(-CH=CHCH<sub>2</sub>-)を含む。

10

#### 【0086】

他に指示されない限り、用語「アルキニレン」は、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含有する、任意により置換されているアルキレン基を指す。例示的なアルキニレン基は、例えば、アセチレン(-C≡C-)、プロパルギル(-CH<sub>2</sub>C≡C-)、および4-ペンチニル(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡CH-)を含む。

#### 【0087】

他に指示されない限り、用語「アリール」は、親芳香族環系の単一の炭素原子からの1つの水素原子の除去によって誘導される6~20の炭素原子(およびその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組合せおよび部分組合せ)の1価芳香族炭化水素ラジカルを指す。一部のアリール基は、「Ar」として例示的な構造において示される。典型的なアリール基は、ベンゼン、置換ベンゼン、フェニル、ナフタレン、アントラセン、ピフェニルなどに由来するラジカルを含むが、これらに限定されない。

20

#### 【0088】

アリール基は、単独でまたは他の基の一部分としてのいずれにせよ、任意により、ハロゲン、任意により置換される-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、任意により置換される-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、任意により置換される-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、任意により置換される-O-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル)、任意により置換される-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル)、任意により置換される-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル)、任意により置換されるアリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-NHC(O)R'、-SR'、-SO<sub>3</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)R'、-OH、-NO<sub>2</sub>、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R')、-N(R')<sub>2</sub>、および-CNを含むが、これらに限定されない1つまたは複数の、好ましくは1~5の、さらに1~2の基と置換することができ、各R'は、独立に、H、任意により置換される-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、任意により置換される-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、任意により置換される-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、または任意により置換されるアリールから選択され、上述の任意により置換されるC<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、任意により置換される-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、任意により置換される-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、任意により置換される-O-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル)、任意により置換される-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル)、任意により置換される-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル)、および任意により置換されるアリール基は、任意により、C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、ハロゲン、-O-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル)、-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル)、-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-NHC(O)R'、-SR'、-SO<sub>3</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)R'、-OH、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R')、-N(R')<sub>2</sub>、および-CNを含むが、これらに限定されない1つまたは複数の置換基とさらに置換することができ、各R'は、H、-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、-C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、またはアリールから独立に選択される。

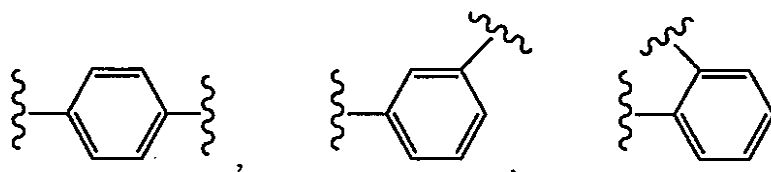
30

40

#### 【0089】

他に指示されない限り、用語「アリーレン」は、二価であり(つまり、親芳香族環系の同じまたは2つの異なる炭素原子からの2つの水素原子の除去によって誘導され)、例示的なアリール基としてフェニルを有する以下の構造において示されるように、オルト、メタ、またはパラ構造とすることができる、任意により置換されているアリール基を指す：

## 【化 1】



## 【0090】

典型的な「-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキレン)アリール」、「-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルケニレン)アリール」、および「-(C<sub>2</sub>~C<sub>8</sub>アルキニレン)アリール」基は、ベンジル、2-フェニルエタン-1-イル、2-フェニルエテン-1-イル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-ナフチルエテン-1-イル、ナフトベンジル、2-ナフトフェニルエタン-1-イルなどを含むが、これらに限定されない。

10

## 【0091】

他に指示されない限り、用語「複素環」は、3~14の環原子(環員とも呼ばれる)を有する単環式、二環式、または多環式環系を指し、少なくとも1つの環における少なくとも1つの環原子は、N、O、P、またはS(およびその中のヘテロ原子の範囲および炭素原子の特定の数のすべての組合せおよび部分組合せ)から選択されるヘテロ原子である。複素環は、N、O、P、またはSから独立に選択される1~4の環ヘテロ原子を有することができる。複素環中の1つまたは複数のN、C、またはS原子は、酸化することができる。単環式複素環は、好ましくは、3~7の環員を有し(例えば、2~6の炭素原子およびN、O、P、またはSから独立に選択される1~3のヘテロ原子)、二環式複素環は、好ましくは、5~10の環員を有する(例えば、4~9の炭素原子およびN、O、P、またはSから独立に選択される1~3のヘテロ原子)。ヘテロ原子を含む環は、芳香族または非芳香族であってもよい。他に指示されない限り、複素環は、安定した構造をもたらす任意のヘテロ原子または炭素原子のそのペンダント基に付加される。

20

## 【0092】

複素環は、Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularly Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9, "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), in particular Volumes 13, 14, 16, 19, and 28, およびJ. Am. Chem. Soc. 82:5566 (1960)において記載される。

30

## 【0093】

他に指示されない限り、用語「ヘテロシクロ」は、二価である(つまり、親複素環式環系の同じまたは2つの異なる炭素原子からの2つの水素原子の除去によって誘導される)、本明細書において定義される任意により置換される複素環基を指す。

## 【0094】

「複素環」基の例は、例としてであり限定するものではないが、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(ピペリジル)、チアゾリル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、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、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、6H-1,2,5-チアジニル、2H,6H-1,5,2-ジチアジニル、チエニル、チアントレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-インダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテリジニル、4aH-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

40

50

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、ベンズイソオキサゾリル、オキシンドリル、ベンズオキサゾリニル、およびイサチノイルを含む。好ましい「複素環」基は、ベンゾフラニル、ベンゾチオフエニル、インドリル、ベンゾピラゾリル、クマリニル、イソキノリニル、ピロリル、チオフエニル、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、ピリミジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、およびテトラゾリルを含むが、これらに限定されない。

10

#### 【0095】

複素環基は、単独または他の基の一部分としてのいずれにせよ、任意により、任意により置換されている $-C_1 \sim C_8$ アルキル、任意により置換されている $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、任意により置換されている $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、ハロゲン、任意により置換されている $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、任意により置換されている $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、任意により置換されている $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、任意により置換されている $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、および $-CN$ を含むが、これらに限定されない1つまたは複数の基、好ましくは1~2の基と置換することができ、各 $R'$ は、独立に、 $H$ 、任意により置換されている $-C_1 \sim C_8$ アルキル、任意により置換されている $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、任意により置換されている $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、または任意により置換されているアリールから選択され、上述の任意により置換されている $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、任意により置換されている $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、任意により置換されている $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、任意により置換されている $-C_1 \sim C_8$ アルキル、任意により置換されている $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、任意により置換されている $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、および任意により置換されているアリール基は、任意により、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、ハロゲン、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、 $-アリール$ 、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 、および $-CN$ を含むが、これらに限定されない1つまたは複数の置換基とさらに置換することができ、各 $R''$ は、 $H$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、またはアリールから独立に選択される。

20

30

#### 【0096】

例としてであり限定するものではないが、炭素結合複素環は、以下の位置で結合することができる：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。さらに典型的には、炭素結合複素環は、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-チアゾリルを含む。

40

#### 【0097】

例としてであり限定するものではないが、窒素結合複素環は、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、2-ピロリン、3-ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2-イミダゾリン、3-イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2-ピラゾリン、3-ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、または1H-インダゾールの1位、イ

50

ソインドールまたはイソインドリンの2位、モルホリンの4位、およびカルバゾールまたは  
-カルボリンの9位で結合することができる。さらに典型的には、窒素結合複素環は、1-  
アジリジル、1-アゼテジル、1-ピロリル、1-イミダゾリル、1-ピラゾリル、および1-ピペ  
リジニルを含む。

#### 【0098】

他に指示されない限り、用語「炭素環」は、3~14(およびその中の炭素原子の範囲およ  
び特定の数のすべての組合せおよび部分組合せ)の環原子を有する、飽和または不飽和非  
芳香族単環式、二環式、または多環式環系を指し、環原子はすべて炭素原子である。単環  
式炭素環は、好ましくは3~6の環原子、さらに好ましくは5または6の環原子を有する。二  
環式炭素環は、好ましくは、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、もしくは[6,6]系とし  
て配置された7~12の環原子またはビシクロ[5,6]もしくは[6,6]系として配置された9もし  
くは10の環原子を有する。用語「炭素環」は、例えば、アリアル環に融合された単環式炭  
素環を含む(例えばベンゼン環に融合された単環式炭素環)。炭素環は、好ましくは、3~8  
の炭素環原子を有する。

#### 【0099】

炭素環基は、単独でまたは他の基の一部としてのいずれにせよ、任意により、例えば  
、ハロゲン、任意により置換されている $C_1 \sim C_8$ アルキル、任意により置換されている $-C_2$   
~ $C_8$ アルケニル、任意により置換されている $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、任意により置換されて  
いる $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、任意により置換されている $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、任意によ  
り置換されている $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、任意により置換されているアリール、 $-C(O)R'$   
、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$   
、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、および $-CN$ を含むが、こ  
れらに限定されない1つまたは複数の基、好ましくは1~2基(およびハロゲンから選択され  
る任意のさらなる置換基)と置換することができ、各 $R'$ は、独立に、 $H$ 、任意により置換さ  
れている $-C_1 \sim C_8$ アルキル、任意により置換されている $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、任意により置  
換されている $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、または任意により置換されているアリールから選択さ  
れ、上述の任意により置換されている $-C_1 \sim C_8$ アルキル、任意により置換されている $-C_2 \sim$   
 $C_8$ アルケニル、任意により置換されている $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、任意により置換されてい  
る $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、任意により置換されている $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、任意によ  
り置換されている $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、および任意により置換されているアリール基は  
、任意により、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、ハロゲン、 $-O$   
~ $-C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、 $-アリール$ 、 $-C(O)$   
 $R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$   
、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 、および $-CN$ を  
含むが、これらに限定されない1つまたは複数の置換基とさらに置換することができ、各 $R''$   
は、 $H$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、またはアリールか  
ら独立に選択される。

#### 【0100】

単環式炭素環置換基の例は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シク  
ロペンタ-1-エニル、1-シクロペンタ-2-エニル、1-シクロペンタ-3-エニル、シクロヘキ  
シル、1-シクロヘキサ-1-エニル、1-シクロヘキサ-2-エニル、1-シクロヘキサ-3-エニル  
、シクロヘプチル、およびシクロオクチル、-1,3-シクロヘキサジエニル、-1,4-シクロヘ  
キサジエニル、-1,3-シクロヘプタジエニル、-1,3,5-シクロヘプタトリエニル、ならびに  
-シクロオクタジエニルを含む。

#### 【0101】

「カルボシクロ」は、単独で使用されるにせよ、他の基の一部として使用されるにせ  
よ、二価である(つまり、親炭素環式環系の同じまたは2つの異なる炭素原子からの2つの  
水素原子の除去によって誘導される)、上記に定義される、任意により置換されている炭  
素環基を指す。

#### 【0102】

10

20

30

40

50

任意の変数が、任意の成分または任意の式において1回以上発生する場合、各発生におけるその定義は、その他すべてのその定義から独立している。そのような組合せが安定した化合物をもたらす場合のみ、置換基および/または変数の組合せは、許容可能となる。

【0103】

特に文脈によって指示されない限り、ハイフン(-)は、ペンダント分子への付加の場所を示す。したがって、用語「-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキレン)アリール」または「-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキレン(アリール)」は、本明細書において定義されるC<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキレンラジカルを指し、アルキレンラジカルは、アルキレンラジカルの炭素原子のうちのいずれかのペンダント分子に付加され、アルキレンラジカルの炭素原子に結合した水素原子のうちの1つは、本明細書において定義されるアリールラジカルと交換される。

10

【0104】

特定の基が「置換されている」場合、その基は、置換基の表から独立に選択される1つまたは複数の置換基、好ましくは1~5の置換基、より好ましくは1~3の置換基、最も好ましくは1~2の置換基を有していてもよい。しかしながら、基は、一般に、ハロゲンから選択される、任意の数の置換基を有することができる。置換されている基はそのように示される。

【0105】

分子中の特定の位置の任意の置換基または変数の定義は、その分子における他のその定義から独立していることが意図される。本発明の化合物上の置換基および置換パターンは、化学的に安定しており、当技術分野において知られている技術および本明細書において述べられる方法によって容易に合成することができる化合物を提供するために、当業者によって選択することができることが理解される。

20

【0106】

本明細書において使用される保護基は、多官能化合物中のある反応部位を一時的にまたは永続的に選択的にブロックする基を指す。本発明における使用に適したヒドロキシ保護基は、本発明との関連における被験体に投与することができ、化合物が活性となるように、被験体への投与の後に親化合物から切断される必要がある可能性もあり、またはない可能性もある。切断は身体内の正常な代謝プロセスを通してのものである。ヒドロキシ保護基は、当技術分野においてよく知られており、これについては、その全体がすべての目的で参照により本明細書に組み込まれるProtective Groups in Organic Synthesis by T. W. Greene and P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3<sup>rd</sup> Edition)を参照されたいが、例えば、エーテル(例えば、例えばジアルキルシリルエーテル、トリアルキルシリルエーテル、ジアルキルアルコキシシリルエーテルを含むアルキルエーテルおよびシリルエーテル)、エステル、炭酸、カルバミン酸、スルホン酸、およびリン酸の保護基を含む。ヒドロキシ保護基の例は、メチルエーテル;メトキシメチルエーテル、メチルチオメチルエーテル、(フェニルジメチルシリル)メトキシメチルエーテル、ベンジルオキシメチルエーテル、p-メトキシベンジルオキシメチルエーテル、p-ニトロベンジルオキシメチルエーテル、o-ニトロベンジルオキシメチルエーテル、(4-メトキシフェノキシ)メチルエーテル、グアイアコルメチルエーテル、t-ブトキシメチルエーテル、4-ペンテニルオキシメチルエーテル、シロキシメチルエーテル、2-メトキシエトキシメチルエーテル、2,2,2-トリクロロエトキシメチルエーテル、ビス(2-クロロエトキシ)メチルエーテル、2-(トリメチルシリル)エトキシメチルエーテル、メトキシメチルエーテル、テトラヒドロピラニルエーテル、1-メトキシシクロヘキシルエーテル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルエーテル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルエーテルS,S-二酸化物、1-[(2-クロロ-4-メチル)フェニル]-4-メトキシピペリジン-4-イルエーテル、1-(2-フルオロフェニル)-4-メトキシピペリジン-4-イルエーテル、1,4-ジオキサソ-2-イルエーテル、テトラヒドロフラニルエーテル、テトラヒドロチオフラニルエーテル;1-エトキシエチルエーテル、1-(2-クロロエトキシ)エチルエーテル、1-[2-(トリメチルシリル)エトキシ]エチルエーテル、1-メチル-1-メトキシエチルエーテル、1-メチル-1-ベンジルオキシエチルエーテル、1-メチル-1-ベンジルオキシ-2-フルオロエチルエーテル、1-メチル-1フェノキシエチルエーテル、2-トリメチ

30

40

50

ルシリルエーテル、*t*-ブチルエーテル、アリルエーテル、プロパルギルエーテル、*p*-クロロフェニルエーテル、*p*-メトキシフェニルエーテル、ベンジルエーテル、*p*-メトキシベンジルエーテル、3,4-ジメトキシベンジルエーテル、トリメチルシリルエーテル、トリエチルシリルエーテル、トリプロピルシリルエーテル、ジメチルイソプロピルシリルエーテル、ジエチルイソプロピルシリルエーテル、ジメチルヘキシルシリルエーテル、*t*-ブチルジメチルシリルエーテル、ジフェニルメチルシリルエーテル、ベンゾイルギ酸エステル、酢酸エステル、クロロ酢酸エステル、ジクロロ酢酸エステル、トリクロロ酢酸エステル、トリフルオロ酢酸エステル、メトキシ酢酸エステル、トリフェニルメトキシ酢酸エステル、酢酸フェニルエステル、安息香酸エステル、アルキル炭酸メチル、アルキル9-炭酸フルオルエニルメチル、アルキル炭酸エチル、アルキル2,2,2,-炭酸トリクロロエチル、1,1,-ジメチル-2,2,2-炭酸トリクロロエチル、スルホン酸アルキル、スルホン酸メタン、スルホン酸ベンジル、トシラート、メチレンアセタール、エチリデンアセタール、および*t*-ブチルメチリデンケタールなどの置換エチルエーテルを含むが、これらに限定されない。好ましい保護基は、式- $R^a$ 、 $-\text{Si}(R^a)(R^a)(R^a)$ 、 $-\text{C}(\text{O})R^a$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}(R^a)$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2R^a$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 、 $\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ 、および $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{OR}^a$ によって示され、 $R^a$ は、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$ アルキル、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{20}$ アルケニル、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_{20}$ アルキニル、 $-\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$ アルキレン(炭素環)、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_{20}$ アルケニレン(炭素環)、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_{20}$ アルキニレン(炭素環)、 $\text{C}_6 \sim \text{C}_{10}$ アリール、 $-\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$ アルキレン(アリール)、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_{20}$ アルケニレン(アリール)、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_{20}$ アルキニレン(アリール)、 $-\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_{20}$ アルケニレン(複素環)、または $-\text{C}_2 \sim \text{C}_{20}$ アルキニレン(複素環)であり、上述のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、およびアルキニレンラジカルは、単独でまたは他の基の一部分として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基と任意により置換され、上述の炭素環ラジカルは、単独でまたは他の基の一部分として、A2から独立に選択される1つまたは複数の基と任意により置換され、上述のアリールラジカルは、単独でまたは他の基の一部分として、A3から独立に選択される1つまたは複数の基と任意により置換され、上述の複素環ラジカルは、単独でまたは他の基の一部分として、A4から独立に選択される1つまたは複数の基と任意により置換される。A1、A2、A3、およびA4は本明細書において定義されるとおりである。

#### 【0107】

略語「AFP」は、ジメチルバリン-バリン-ドライソロイシン-ドラプロイン-フェニルアラニン-*p*-フェニレンジアミンを指す(以下の式XVIを参照)。

#### 【0108】

略語「MMAE」は、モノメチルアウリスタチンEを指す(以下の式XIを参照)。

#### 【0109】

略語「AEB」は、パラアセチル安息香酸とアウリスタチンEを反応させることによって產生されるエステルを指す(以下の式XXを参照)。

#### 【0110】

略語「AEVB」は、ベンゾイル吉草酸とアウリスタチンEを反応させることによって產生されるエステルを指す(以下の式XXIを参照)。

#### 【0111】

略語「MMAF」は、ドバリン-バリン-ドライソロイシン-ドラプロイン-フェニルアラニンを指す(以下の式XVIVを参照)。

#### 【0112】

### CD19結合性物質

本明細書で述べる方法は、CD19結合性物質およびリガンド-薬物コンジュゲート化合物の使用を含み、該リガンド単位はCD19に特異的に結合する抗CD19結合性物質である。CD19結合性物質は、例えば、抗CD19抗体、抗CD19抗原結合性フラグメント、あるいはヒト化抗体重鎖および/または軽鎖可変領域のアミノ酸配列、またはその誘導体を含む他のCD19結合性物質であってよい。

#### 【0113】

特定の態様において、本発明のCD19結合性物質は、重鎖および/または軽鎖可変ドメイ



ンを含み、該重鎖および軽鎖可変ドメインは、それぞれが(a)mAb mBU12の対応するCDRsと同じまたは実質的に同じである3つのCDRsの組、および(b)ヒト化免疫グロブリンのフレームワーク領域と同じまたは実質的に同じである4つの可変領域フレームワーク領域の組を有する。

【0114】

本発明は、本発明のCD19結合性物質の重鎖可変領域について選択されるフレームワーク領域がヒト化FR4配列のヒト生殖系列V<sub>H</sub>エキソンV<sub>H</sub>2-70またはV<sub>H</sub>4-31およびヒト生殖系列J<sub>H</sub>4エキソンである実施形態を包含する。いくつかの実施形態において、ヒト化FR4配列のヒト生殖系列J<sub>H</sub>4エキソンの代わりにヒト生殖系列J<sub>H</sub>1、J<sub>H</sub>2、J<sub>H</sub>3、J<sub>H</sub>5またはJ<sub>H</sub>6エキソンを用いる。

10

【0115】

本発明は、本発明のCD19結合性物質の軽鎖可変領域について選択されるフレームワーク領域がヒト化FR4配列のヒト生殖系列V<sub>L</sub>エキソンV<sub>L</sub>-L6またはV<sub>L</sub> A10およびヒト生殖系列J<sub>k</sub>2エキソンである実施形態を包含する。いくつかの実施形態において、ヒト化FR4配列のヒト生殖系列J<sub>k</sub>2エキソンの代わりにヒト生殖系列J<sub>k</sub>1、J<sub>k</sub>3、J<sub>k</sub>4またはJ<sub>k</sub>5エキソンを用いる。

【0116】

本発明は、マウスドナー残基がCD19結合性物質のフレームワーク領域の配列内に再導入されている実施形態を包含する。そのような残基は、例えば、V<sub>H</sub>2-70/J<sub>H</sub>4生殖系列のKabat番号システムに従った75位、79位、81位、82位、82A位、82B位、82C位および89位の、V<sub>H</sub>4-31/J<sub>H</sub>4生殖系列のKabat番号システムに従った24位、27位、29位、71位、75位、78位、79位および89位の、V<sub>L</sub>-L6/J<sub>k</sub>2生殖系列のKabat番号システムに従った2位、40位、41位、42位、69位、70位、71位、72位および83位の、ならびにV<sub>L</sub>-A10/J<sub>k</sub>2生殖系列のKabat番号システムに従った2位および71位の1または複数の箇所でのマウスドナー残基の再導入を含む。代替位置における追加のマウスドナー残基を配列に再導入することができる。

20

【0117】

本発明は、本明細書で述べるCD19結合性物質が、マウスドナー残基の再導入に加えてアクセプターヒト生殖系列エキソンにおけるアミノ酸配列修飾ならびに超可変領域におけるアミノ酸配列修飾を有する実施形態を包含する。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが望ましい。CD19結合性物質のアミノ酸配列変異体は、適切なヌクレオチドの変化を抗体核酸に導入することにより、あるいはペプチド合成により調製することができる。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および/または残基への挿入および/または残基の置換を含む。欠失、挿入および置換の組合せは、最終構築体が所望の特性を有するならば、最終構築体に到達するために行うことができる。置換は、保存的または非保存的置換であってよい。グリコシル化部位の数または位置の変化などのアミノ酸の変化も抗体の翻訳後過程を変化させる可能性がある。

30

【0118】

突然変異誘発に有利な位置であるCD19結合性物質の特定の残基または領域を同定する有用な方法は、CunnighamおよびWells、Science、244、1081~1085ページ(1989)により記載されているように「アラニンスキャニング突然変異誘発法」と呼ばれている。ここで、残基または標的残基の群(例えば、arg、asp、his、lysおよびgluなどの荷電した残基)を同定し、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を与えるために中性または負に荷電したアミノ酸(最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン)により置換する。次に、置換部位において、または置換部位の代わりに、さらなるまたは他の変異体を導入することにより、置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置をさらに正確にする。したがって、アミノ酸配列変異体を導入する部位はあらかじめ決定するが、突然変異の性質自体は、あらかじめ決定する必要はない。例えば、所定の部位における突然変異の働きを分析するために、alaスキャニングまたはランダム突然変異誘発を標的コドンまたは領域において行い、発現変異体を所望の活性についてスクリーニングする。

40

50

## 【0119】

アミノ酸配列の挿入は、アミノおよび/またはカルボキシ末端融合ならびに1つまたは複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。他の種類の変異体は、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、異なる残基により置換された抗体分子における少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。置換突然変異誘発の最も興味深い部位は、超可変領域を含むが、FRの変更も考えられる。

## 【0120】

CD19結合性物質の生物学的特性の実質的な変化は、(a)例えば、シートもしくはらせんコンホメーションとしての置換の範囲のポリペプチド主鎖の構造、(b)標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖の大部分を維持することに対するそれらの影響が著しく異なる置換を選択することによって達成される。天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいて以下のように分類される：

- (1)疎水性:met、ala、val、leu、ile、
- (2)中性親水性:cys、ser、thr、
- (3)酸性:asp、glu、
- (4)塩基性:asn、gln、his、lys、arg、
- (5)分子鎖の配向に影響を及ぼす残基:gly、proおよび
- (6)芳香族:trp、tyr、phe

## 【0121】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーと他のクラスとの交換を必然的に伴う。保存的置換は、同じクラスのメンバーの交換を必然的に伴う。

## 【0122】

置換変異体の1つのタイプは、1つまたは複数の超可変領域残基の置換を含む。1つの実施形態において、さらなる開発のために選択される得られる変異体は、それらを発生させた親結合性物質と比べて改善された生物学的特性を有するであろう。そのような置換変異体を発生させる都合のよい方法は、ファージディスプレイを用いる親和性成熟を含む。簡単に述べると、いくつかの超可変領域部位(例えば、6~7部位)を突然変異させて、各部位におけるすべての可能なアミノ置換を発生させる。そのように発生させた変異体を各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子III産物との融合体として繊維状ファージ粒子により1価的に提示させる。次いで、本明細書に開示するように、ファージ提示変異体をそれらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングする。修飾のための候補超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング突然変異誘発を実施して抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基を同定することができる。その代わりに、またはそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を解析して、結合性物質と抗原との接触点を同定することが有用でありうる。そのような接触残基および隣接残基は、本明細書で詳述する技術による置換の候補である。そのような変異体を発生させたならば、変異体のパネルを本明細書で述べるスクリーニングに供し、1つまたは複数の適切なアッセイにおける優れた特性を有する結合性物質をさらなる開発のために選択することができる。

## 【0123】

いくつかの実施形態において、本発明のCD19結合性物質(例えば、抗CD19抗体またはその誘導体)は、Fc受容体と相互作用するアミノ酸残基における修飾(例えば、置換、欠失または付加)を有する。いくつかの態様において、本発明のCD19結合性物質は、Fcドメインと1つまたは複数のFc受容体との結合相互作用に関与するアミノ酸残基における修飾を有する結合性物質(例えば、抗CD19抗体またはその誘導体)を含む。いくつかの実施形態において、本発明のCD19結合性物質は、抗FcドメインとFcRn受容体との相互作用に関与するアミノ酸残基における修飾を有する結合性物質(例えば、抗CD19抗体またはその誘導体)を含む(例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれている国際公開WO/97/34631を参照)。

## 【0124】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のFc受容体に対する標的結合性物質の

結合は、当技術分野で知られている1つまたは複数の抗体エンジニアリングアプローチを用いて弱めることができる。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のFc 受容体に対する標的結合性物質の結合は、当技術分野で知られている1つまたは複数の抗体エンジニアリングアプローチを用いて標的結合性物質のエフェクター機能を減弱させることによって、弱めることができる。そのようなアプローチの説明に役立つ非限定的な例を下に示す。

#### 【0125】

Fc 受容体結合は、抗体の領域とFcガンマ(Fc $\gamma$ )受容体(Fc $\gamma$ R)との相互作用により媒介される。Fc領域またはドメインは、Fc領域の1つまたは複数のFc 受容体(例えば、FcRI(CD64)、FcRIIb(CD32b)もしくはFcRIIIa(CD16))に対する結合相互作用に關与する抗体の定常領域(例えば、IgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4)の領域を意味する。IgG Fc領域のグリコシル化状態および主要なアミノ酸配列は、Fc領域-Fc $\gamma$ R相互作用に対して機能的効果を有する。

#### 【0126】

IgGアイソタイプ定常領域のFc領域における特定のアミノ酸位置の置換は、1つまたは複数のFc 受容体に結合する抗体の能力に対して機能的効果を有することが知られている。例えば、Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-6604およびCanfield and Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173:1483-1491を参照のこと。Fc領域は、例えば、また制限するものでないが、ヒンジ領域およびC<sub>H</sub>2ドメインにおけるアミノ酸残基を含む。非保存的アミノ酸によるIgG定常領域のFc領域もしくは一部における1つまたは複数のアミノ酸残基の置換は、Fc領域-Fc $\gamma$ R相互作用の親和性を変化、すなわち、減少または増加させると予想することができる。非保存的アミノ酸置換を導入する方法は、当技術分野でよく知られている。

#### 【0127】

その代わりに、またはそれに加えて、システイン残基をIgG定常領域のFc領域もしくは一部に、またはその近傍に導入することができ、それにより、この領域における鎖内ジスルフィド結合の形成が可能となる。そのような鎖内ジスルフィド結合形成は、立体障害を引き起こし、それにより、Fc領域-Fc $\gamma$ R結合相互作用の親和性を減少させると予想することができる。IgG定常領域のFc領域に、またはその近傍に導入されたシステイン残基は、治療薬剤とのコンジュゲーションの部位としての役割も果たす可能性がある(すなわち、薬物のマレイミド誘導体などのチオール特異的試薬を用いた細胞毒性薬のカップリング)。治療薬剤の存在は、立体障害を引き起こし、それにより、Fc領域-Fc $\gamma$ R結合相互作用の親和性を減少させると予想することができる。抗体またはその誘導体にシステイン残基を導入する方法は、当技術分野でよく知られている。

#### 【0128】

その代わりに、またはそれに加えて、1つまたは複数のN結合グリコシル化部位をIgG定常領域のFc領域に、またはその近傍に導入することができ、それにより、この領域における翻訳後グリコシル化が可能になる。そのようなN結合グリコシル化は、立体障害を引き起こし、それにより、Fc領域-Fc $\gamma$ R結合相互作用の親和性を減少させると予想することができる。抗体またはその誘導体にN結合グリコシル化部位を導入する方法は、当技術分野でよく知られている。

#### 【0129】

ヒトIgG Fc領域の溶媒曝露アミノ酸の系統的置換により、Fc $\gamma$ R結合親和性の変化を有するIgG誘導体を得られた(Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604)。例えば、親IgG1と比較したとき、AlaへのThr256/Ser298、Ser298/Glu333、Ser298/Lys334またはSer298/Glu333/Lys334における置換を含むこれらの誘導体のサブセットは、Fc $\gamma$ Rに対する結合親和性およびADCC活性の両方の増加を示す(Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604, Okazaki et al., 2004, J. Mol. Biol. 336:1239-49)。これと対照的に、親IgG1と比較したとき、AlaへのVal/Leu235、Pro/Leu234、Glu233における置換およびGly236欠失、AlaへのPro238、AlaへのAsp265、AlaへのAsn297、GlnへのAla327またはAl

aへのPro329における置換を含むこれらの誘導体のサブセットは、すべてのFc Rに対する結合親和性の減少を示し、AlaへのAsp265置換はADCC活性の減少ももたらした(Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604)。ヒンジ領域およびC<sub>H</sub>2ドメインにおけるアミノ酸は、Fc Rに対するヒトIgGの高い親和性に寄与することが示された(Canfield and Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173:1483-1491)。Fc領域-Fc R結合相互作用の媒介に関与するこれらのアミノ酸位置またはその近傍のアミノ酸は、非保存的アミノ酸による置換および/または1つもしくは複数のシステインの導入、および/または1つもしくは複数のN結合グリコシル化部位の導入の可能な標的である。

#### 【0130】

抗体のin vivoでの半減期もそのエフェクター機能に影響を及ぼしうる。いくつかの実施形態において、抗体の半減期を延長させてその治療活性を改変することが望ましい。いくつかの実施形態において、抗体の半減期を短縮させてその治療活性を改変することが望ましい。FcRnは、2-マイクログロブリンと非共有結合により結合するMHCクラスI抗原と構造的に類似している受容体である。FcRnは、IgGsの異化および組織にわたるそれらのトランスサイトーシスを調節する(Ghetie and Ward, 2000, Annu. Rev. Immunol. 18:739-766、Ghetie and Ward, 2002, Immunol. Res. 25:98-113)。IgG-FcRn相互作用は、pH6.0(細胞内小胞のpH)で起こるが、pH7.4(血液のpH)では起こらない。この相互作用は、IgGsが再循環されて循環に戻ることを可能にする(Ghetie and Ward, 2000, Ann. Rev. Immunol. 18:739-766、Ghetie and Ward, 2002, Immunol. Res. 25:97-113)。FcRn結合に関与するヒトIgG<sub>1</sub>上の領域がマップされた(Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604)。ヒトIgG<sub>1</sub>のPro238、Thr256、Thr307、Gln311、Asp312、Glu380、Glu382またはAsn434位におけるアラニン置換は、FcRn結合を増大させる(Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604)。これらの置換を含むIgG<sub>1</sub>分子は、より長い血清半減期を有すると予想される。結果として、これらの修飾IgG<sub>1</sub>分子は、それらのエフェクター機能をなし遂げ、また、したがって、非修飾IgG<sub>1</sub>と比較して長い時間にわたりそれらの治療効果をもたらすことができる。

#### 【0131】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のFc Rに対して弱い結合を有する本発明の結合性物質は、少なくともある程度、FcRnに結合する能力を保持している。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のFc Rに対して弱い結合を有する結合性物質は、FcRnに結合する能力を保持している。FcRnに結合する抗体もしくはその誘導体または他の結合性物質の能力は、当技術分野で知られている技術(例えば、Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604)により測定することができる。

#### 【0132】

エフェクター機能に関して改変されたCD19結合性物質は、いくつかの実施形態において、改善されたインターナリゼーション能力および/または高い補体媒介性細胞殺滅および抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を示す可能性がある。Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195(1992)およびShopes, B.J. Immunol. 148:2918-2922(1992)を参照のこと。高い抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体もWolff et al. Cancer Research 53:2560-2565(1993)に記載されているようにヘテロ二官能性クロスリンカーを用いて調製することができる。あるいは、2Fc領域を有し、それにより、高い補体溶解およびADCC能力を有することができる抗体を遺伝子工学で得ることができる。Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230(1989)を参照のこと。

#### 【0133】

特定の実施形態において、Fc領域とFc RIIIIa受容体との結合相互作用に影響を及ぼすために、システイン残基をFc領域に導入することができる。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸239位、265位、269位もしくは327位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸239位もしくは269位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸の

アミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸239位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸265位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸269位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸327位に導入する。

【0134】

他の実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸236位もしくは238位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸236位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸238位に導入する。

【0135】

他の実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸234位、235位、237位、267位、298位、299位、326位、330位もしくは332位に導入する。他の実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸237位、298位、299位、326位、330位もしくは332位に導入する。他の実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸298位、299位、326位もしくは330位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸234位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸235位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸237位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸267位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸298位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸299位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸326位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸330位に導入する。いくつかの実施形態において、システイン残基への天然アミノ酸のアミノ酸置換をKabat番号システムに従うアミノ酸332位に導入する。

【0136】

いくつかの実施形態において、本発明のCD19結合性物質の血清半減期をさらに延長させるために、該結合性物質のサルベージ受容体結合性エピトープを例えば、米国特許第5,739,277号に記載されているように修飾することができる。本明細書で用いる場合、「サルベージ受容体結合性エピトープ」という用語は、IgG分子のin vivo血清半減期の延長に関与するIgG分子(例えば、IgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4)のFc領域のエピトープを意味する。あるいは、CD19結合性物質の血清半減期は、下に述べるように、Fcガンマ(Fc $\gamma$ )受容体に対する結合に関して抗体のFc領域(例えば、IgG定常ドメイン)を修飾することによって延長させることができる。

【0137】

抗体は、それらの定常領域における保存位置においてグリコシル化されていてよい(例えば、Jefferis and Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128、Wright and Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32を参照)。免疫グロブリンのオリゴ糖側鎖は、タンパク質の機能(例えば、Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318、Wittwe and Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180を参照)、およびコンホメーションに影響を及ぼす可能性がある糖タンパク質の部分間の分子内相互作用に影響を及ぼす可能性があり、糖タンパク質の3次元表面を示した(例えば、Jefferis and Lund, supra、Wyss and Wagner, 1996, Current

10

20

30

40

50

Opin. Biotech. 7:409-416を参照)。オリゴ糖は、固有の認識構造に基づき所定の糖タンパク質を特定の分子に対する標的にする役割も果たす可能性がある。例えば、アガラクトシル化IgGにおいて、オリゴ糖部分がC<sub>H</sub>2間空間から「フリップ」し、末端N-アセチルグルコサミン残基はマンノース結合タンパク質に結合するのに利用可能になることが報告された(例えば、Malhotra et al., 1995, Nature Med. 1:237-243を参照)。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞で産生されたCAMPATH-1H(ヒトリンパ球のCDw52抗原を認識する組換えヒト化マウスモノクローナルIgG1抗体)からのオリゴ糖のグリコペプチダーゼによる除去は、補体媒介性溶解(CMCL)の完全な減少をもたらした(Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318)が、ノイラミダーゼを用いたシアル酸残基の選択的除去は、DMCLの喪失をもたらさなかった。抗体のグリコシル化もADCCに影響を及ぼすことも報告された。特に、バイセクティングGlcNAcの生成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII)のテトラサイクリン調節発現を有するCHO細胞は、改善されたADCC活性を有することが報告された(例えば、Umana et al., 1999, Mature Biotech. 17:176-180を参照)。

#### 【0138】

抗体のグリコシル化は、一般的にN結合型またはO結合型である。N結合型は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン(Xはプロリンを除く任意のアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素結合の認識配列である。したがって、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、可能なグリコシル化部位を生じさせる。O結合型グリコシル化は、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンも用いることができるが、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースの1つの結合を指す。

#### 【0139】

抗体のグリコシル化誘導体は、抗体のグリコシル化パターンが変化している誘導体である。本発明の特定の抗体は、グリコシル化パターンの変化を有する。変化とは、抗体に認められる1つまたは複数の炭水化物部分の欠失、抗体への1つまたは複数の炭水化物部分の付加、グリコシル化の構成(すなわち、グリコシル化パターン)、グリコシル化の程度等の変化を意味する。特定の実施形態において、本発明の抗体は、低いコアフコシル化を有する。

#### 【0140】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、好都合には例えば、1つまたは複数の上述のトリペプチド配列(N結合型グリコシル化部位のための)を含むようにアミノ酸配列を変化させることによって達成することができる。変化は、例えば、最初の抗体の配列への1つまたは複数のセリンまたはトレオニン残基の付加または置換(O結合型グリコシル化部位のための)によっても生じさせることもできる。同様に、グリコシル化部位の除去は、抗体の天然グリコシル化部位内のアミノ酸の変化によって達成することができる。

#### 【0141】

アミノ酸配列は、基礎をなす核酸配列を変更することによって通常変化させる。これらの方法は、天然供給源からの分離(天然に存在するアミノ酸配列誘導体の場合)あるいはオリゴヌクレオチド媒介性(もしくは部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、または抗体の以前の調製済み誘導体もしくは非誘導体型のカセット突然変異誘発による調製を含むが、これらに限定されない。

#### 【0142】

抗体のグリコシル化(グリコシル化パターンを含む)は、アミノ酸配列または基礎をなす核酸配列を変化させずに、変化させることもできる。グリコシル化は、抗体を発現させるために用いる宿主細胞に主として依存する。組換え糖タンパク質、例えば、可能な治療法としての抗体の発現に用いる細胞タイプが天然細胞であることはまれなので、抗体のグリコシル化パターンのかなりの変異を予想することができる。例えば、Hse et al., 1997,

J. Biol. Chem. 272:9062-9070を参照のこと。宿主細胞の選択に加えて、抗体の組換え産生時のグリコシル化に影響を及ぼす要因としては、増殖様式、培地の処方、培養密度、酸素化、pH、精製スキームなどがある。オリゴ糖産生に関与する特定の酵素を導入または過剰発現させることを含む、個々の宿主生物で達成されたグリコシル化パターンを変化させる様々な方法が提案された(例えば、米国特許第5,047,335号、同第5,510,261号および同第5,278,299号を参照)。グリコシル化、または特定の種類のグリコシル化は、例えば、エンドグリコシダーゼH(Endo H)を用いて、糖タンパク質から酵素的に除去することができる。さらに、組換え宿主細胞は、遺伝子操作する、例えば、特定の種類の多糖の処理において欠陥を生じさせることができる。これらの技術および同様な技術は、当技術分野でよく知られている。

10

**【 0 1 4 3 】**

抗体のグリコシル化構造は、レクチンクロマトグラフィー、NMR、質量分析、HPLC、GPC、単糖組成分析、逐次酵素消化および電荷に基づいて多糖を分離するための高pH陰イオン交換クロマトグラフィーを用いるHPAEC-PADを含む、炭水化物分析の従来の技術により容易に分析することができる。分析の目的のためにオリゴ糖を遊離させる方法も知られており、限定するものではないが、酵素処理(一般的にペプチド-N-グリコシダーゼF/エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いて行われる)、主としてO結合型構造を遊離させるための苛酷なアルカリ環境を用いる脱離、ならびにNおよびO結合型多糖を遊離させるための無水ヒドラジンを用いる化学的方法などがある。

**【 0 1 4 4 】**

20

下表に、各配列識別子(配列番号)に対応するキメラおよびヒト化BU12の領域の要約を示す。

【表 1】

分子	ヌクレオチドま たはアミノ酸	配列番号
リーダー配列 (重鎖領域)	アミノ酸	1
重鎖可変領域 (VH2-70/J <sub>H</sub> 4生殖系列)/ 変異体HAとも呼ばれる	アミノ酸	2
重鎖定常ドメイン (IgG <sub>1</sub> )	アミノ酸	3
変異体HB 重鎖可変領域 (VH2-70/J <sub>H</sub> 4生殖系列)	アミノ酸	4
変異体HC 重鎖可変領域 (VH2-70/J <sub>H</sub> 4生殖系列)	アミノ酸	5
変異体HD 重鎖可変領域 (VH2-70/J <sub>H</sub> 4生殖系列)	アミノ酸	6
変異体HE 重鎖可変領域 (VH2-70/J <sub>H</sub> 4生殖系列)	アミノ酸	7
重鎖可変領域 (マウス)	アミノ酸	8
重鎖可変領域 (VH4-31/J <sub>H</sub> 4生殖系列)/ 変異体HFとも呼ばれる	アミノ酸	9
変異体HG 重鎖可変領域 (VH4-31/J <sub>H</sub> 4生殖系列)	アミノ酸	10
変異体HH 重鎖可変領域 (VH4-31/J <sub>H</sub> 4生殖系列)	アミノ酸	11
変異体HI 重鎖可変領域 (VH4-31/J <sub>H</sub> 4生殖系列)	アミノ酸	12
変異体HJ 重鎖可変領域 (VH4-31/J <sub>H</sub> 4生殖系列)	アミノ酸	13
変異体HK 重鎖可変領域 (VH4-31/J <sub>H</sub> 4生殖系列)	アミノ酸	14
変異体HL 重鎖可変領域 (VH4-31/J <sub>H</sub> 4生殖系列)	アミノ酸	15
リーダー配列 (軽鎖領域)	アミノ酸	16

10

20

30

40



分子	ヌクレオチドまたはアミノ酸	配列番号
軽鎖可変領域 (VL-L6/J <sub>k</sub> 2生殖系列)/ 変異体LAとも呼ばれる	アミノ酸	17
軽鎖定常ドメイン (カッパドメイン)	アミノ酸	18
変異体LB 軽鎖可変領域 (VL-L6/J <sub>k</sub> 2生殖系列)	アミノ酸	19
変異体LC 軽鎖可変領域 (VL-L6/J <sub>k</sub> 2生殖系列)	アミノ酸	20
変異体LD 軽鎖可変領域 (VL-L6/J <sub>k</sub> 2生殖系列)	アミノ酸	21
変異体LE 軽鎖可変領域 (VL-L6/J <sub>k</sub> 2生殖系列)	アミノ酸	22
変異体LF 軽鎖可変領域 (VL-L6/J <sub>k</sub> 2生殖系列)	アミノ酸	23
変異体LG 軽鎖可変領域 (VL-L6/J <sub>k</sub> 2生殖系列)	アミノ酸	24
軽鎖可変領域 (マウス)	アミノ酸	25
軽鎖可変領域 (VL-A10/J <sub>k</sub> 2生殖系列)/ 変異体LHドメインとも呼ばれる	アミノ酸	26
変異体LI 軽鎖可変領域 (VL-A10/J <sub>k</sub> 2生殖系列)	アミノ酸	27
重鎖可変領域 (VH2-70/J <sub>H</sub> 4生殖系列) のコンセンサス配列	アミノ酸	28
重鎖可変領域 (VH4-31/J <sub>H</sub> 4生殖系列) のコンセンサス配列	アミノ酸	29
軽鎖可変領域 (VL-L6/J <sub>k</sub> 2生殖系列) のコンセンサス配列	アミノ酸	30
軽鎖可変領域 (VL-A10/J <sub>k</sub> 2生殖系列) のコンセンサス配列	アミノ酸	31
重鎖可変領域 (VH2-70/J <sub>H</sub> 1-6生殖系列) のコンセンサス配列	アミノ酸	32
重鎖可変領域 (VH4-31/J <sub>H</sub> 1-6生殖系列) のコンセンサス配列	アミノ酸	33

10

20

30

40

分子	ヌクレオチドまたはアミノ酸	配列番号
軽鎖可変領域 (VL-L6/J <sub>k</sub> 1-5生殖系列) のコンセンサス配列	アミノ酸	34
軽鎖可変領域 (VL-A10/J <sub>k</sub> 1-5生殖系列) のコンセンサス配列	アミノ酸	35
重鎖定常ドメイン (IgG <sub>2</sub> )	アミノ酸	36
重鎖定常ドメイン (IgG <sub>3</sub> )	アミノ酸	37
重鎖定常ドメイン (IgG <sub>4</sub> )	アミノ酸	38
重鎖定常ドメイン変異体 (IgG <sub>1</sub> V <sub>1</sub> )	アミノ酸	39
リーダー配列 (重鎖領域)	ヌクレオチド	40
重鎖可変領域 (VH4-31/J <sub>H</sub> 4生殖系列)/ 変異体HFとも呼ばれる	ヌクレオチド	41
重鎖定常ドメイン (IgG <sub>1</sub> )	ヌクレオチド	42
リーダー配列 (軽鎖領域)	ヌクレオチド	43
変異体LG 軽鎖可変領域 (VL-L6/J <sub>k</sub> 2生殖系列)	ヌクレオチド	44
軽鎖定常ドメイン (κドメイン)	ヌクレオチド	45
重鎖CDR1	アミノ酸	46
重鎖CDR2	アミノ酸	47
重鎖CDR3	アミノ酸	48
軽鎖CDR1	アミノ酸	49
軽鎖CDR2	アミノ酸	50
軽鎖CDR3	アミノ酸	51
代替重鎖配列 (リーダー、可変領域(変異体HF) および定常ドメインを含む)	ヌクレオチド	53
代替リーダー配列 (重鎖領域)	ヌクレオチド	54
代替重鎖定常ドメイン (IgG1)	ヌクレオチド	55
代替重鎖配列 (リーダー、可変領域(変異体HF) および定常ドメインを含む)	アミノ酸	56
代替リーダー配列 (重鎖領域)	アミノ酸	57
代替軽鎖配列 (リーダー、可変領域(変異体LG) および定常ドメインを含む)	ヌクレオチド	58

10

20

30

40

分子	ヌクレオチドまたはアミノ酸	配列番号
代替リーダー配列 (軽鎖領域)	ヌクレオチド	59
代替軽鎖配列 (リーダー、可変領域(変異体LG) および定常ドメインを含む)	アミノ酸	60
代替リーダー配列 (軽鎖領域)	アミノ酸	61

10

## 【 0 1 4 5 】

本発明は、CD19結合性物質が、配列番号2のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む実施形態を包含する。該アミノ酸配列は、CD19結合性物質が機能活性(すなわち、CD19結合活性)を保持し、配列が配列番号2のアミノ酸配列と実質的または完全な同一性を保持するならば、例えば、任意の数の置換を有する配列番号2のアミノ酸配列であってよい。例示的な重鎖可変領域は、Kabat番号システムに従い配列番号2のアミノ酸配列の75位、79位、81位、82位、82A位、82B位、82C位または89位での少なくとも1箇所のアミノ酸置換、好ましくは0、1または2箇所のアミノ酸置換を任意により有する配列番号2のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む。例示的な配列は、例えば、配列番号2、4、5、6および7のアミノ酸配列を含む。1つの態様において、配列番号2のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むCD19結合性物質は、抗体mBU12のCDR領域、すなわち、配列番号46、47および48を含む。

20

## 【 0 1 4 6 】

本発明は、CD19結合性物質が、配列番号9のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む実施形態を包含する。該アミノ酸配列は、CD19結合性物質が機能活性を保持し、配列が配列番号9のアミノ酸配列と実質的または完全な同一性を保持するならば、例えば、任意の数の置換を有する配列番号9のアミノ酸配列であってよい。例示的な重鎖可変領域は、Kabat番号システムに従い配列番号9のアミノ酸配列の24位、27位、29位、71位、75位、78位、79位または89位での少なくとも1箇所のアミノ酸置換、好ましくは0、1または2箇所のアミノ酸置換を任意により有する配列番号9のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む。例示的な配列は、例えば、配列番号9、10、11、12、13、14および15のアミノ酸配列を含む。1つの態様において、配列番号9のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むCD19結合性物質は、抗体mBU12のCDR領域、すなわち、配列番号46、47および48を含む。

30

40

## 【 0 1 4 7 】

本発明は、CD19結合性物質が、配列番号17のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む実施形態を包含する。該アミノ酸配列は、CD19結合性物質が機能活性を保持し、配列が配列番号17のアミノ酸配列と実質的または完全な同一性を保持するならば、例えば、任意の数の置換を有する配列番号17のアミノ酸配列であってよい。例示的な軽鎖可変領域は、Kabat番号システムに従い配列番号17のアミノ酸配列の2位、40位、41位、42位、69位、70位、71位、72位または83位での少なくとも1箇所のアミノ酸置換、好ましくは0、1または2箇所のアミノ酸

50

置換を任意により有する配列番号17のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む。例示的な配列は、例えば、配列番号17、19、20、21、22、23および24のアミノ酸配列を含む。1つの態様において、配列番号17のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むCD19結合性物質は、抗体mBU12のCDR領域、すなわち、配列番号49、50および51を含む。

#### 【0148】

本発明は、CD19結合性物質が、配列番号26のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む実施形態を包含する。該アミノ酸配列は、CD19結合性物質が機能活性を保持し、配列が配列番号26のアミノ酸配列と実質的または完全な同一性を保持するならば、例えば、任意の数の置換を有する配列番号26のアミノ酸配列であってよい。例示的な軽鎖可変領域は、Kabat番号システムに従い配列番号26のアミノ酸配列の2位および71位での少なくとも1箇所のアミノ酸置換を任意により有する配列番号26のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む。例示的な配列は、例えば、配列番号26および27のアミノ酸配列を含む。1つの態様において、配列番号26のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むCD19結合性物質は、抗体mBU12のCDR領域、すなわち、配列番号49、50および51を含む。

#### 【0149】

本発明は、CD19結合性物質が、上で示したように配列番号2のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、上で示したように配列番号17のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む実施形態を包含する。これらの実施形態のいずれかにおいて、重鎖可変領域を定常領域に連結させることができ、軽鎖可変領域を定常領域に連結させることができる。いくつかの実施形態において、重鎖定常領域は、配列番号3または36~39のアミノ酸配列を含むであろう。いくつかの実施形態において、軽鎖定常領域は、配列番号18のアミノ酸配列を含むであろう。特定の実施形態において、重鎖可変領域は、配列番号1または配列番号57のアミノ酸配列をさらに含み、軽鎖可変領域は、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列をさらに含むであろう。

#### 【0150】

したがって、特定の実施形態において、CD19結合性物質は、配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号5のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖、または配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むであろう。これらの実施形態のいずれかにおいて、重鎖可変領域を定常領域に連結させることができ、軽鎖可変領域を定常領域に連結させることができる。いくつかの実施形態において、重鎖定常領域は、配列番号3または36~39のアミノ酸配列を含むであろう。いくつかの実施形態において、軽鎖定常領域は、配列番号18のアミノ酸配列を含むであろう。特定の実施形態において、重鎖可変領域は、配列番号1または配列番号57のアミノ酸配列をさらに含み、軽鎖可変領域は、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列をさらに含むであろう。

#### 【0151】

本発明は、CD19結合性物質が、上で示したように配列番号2のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、上で示したように配列番号26のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む実施形態を包含する。これらの実施形態のいずれかにおいて、重鎖可変領域を定常領域に連結させることができ、軽鎖可変領域を定常領域に連結させることができる。いくつかの実施形態において、重鎖定常領域は、配列番号3または36~39のアミノ酸配列を含むであろう。いくつかの実施形態において、軽鎖定常領域は、配列番号18のアミノ酸配列を含むであろう。特定の  
10 実施形態において、重鎖可変領域は、配列番号1または配列番号57のアミノ酸配列をさらに含み、軽鎖可変領域は、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列をさらに含むであろう。

#### 【0152】

したがって、特定の実施形態において、CD19結合性物質は、配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号5のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖、  
20 または配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むであろう。これらの実施形態のいずれかにおいて、重鎖可変領域を定常領域に連結させることができ、軽鎖可変領域を定常領域に連結させることができる。いくつかの実施形態において、重鎖定常領域は、配列番号3または36~39のアミノ酸配列を含むであろう。いくつかの実施形態において、軽鎖定常領域は、配列番号18のアミノ酸配列を含むであろう。特定の実施形態において、重鎖可変領域は、配列番号1または配列番号57のアミノ酸配列をさらに含み、軽鎖可変領域は、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列をさらに含むであろう。

#### 【0153】

本発明は、CD19結合性物質が、上で示したように配列番号9のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、上で示したように配列番号17と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む実施形態を包含する。これらの実施形態のいずれかにおいて、重鎖可変領域を定常領域に連結させることができ、軽鎖可変領域を定常領域に連結させることができる。いくつかの実施形態において、重鎖定常領域は、配列番号3または36~39のアミノ酸配列を含むであろう。いくつかの実施形態において、軽鎖定常領域は、配列番号18のアミノ酸配列を含むであろう。特定の  
30 実施形態において、重鎖可変領域は、配列番号1または配列番号57のアミノ酸配列をさらに含み、軽鎖可変領域は、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列をさらに含むであろう。

#### 【0154】

したがって、特定の実施形態において、CD19結合性物質は、配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号12のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号13のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号14のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖または配列番号15のアミノ酸配列  
50

を含む重鎖および配列番号17、19、20、21、22、23もしくは24のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むであろう。これらの実施形態のいずれかにおいて、重鎖可変領域を定常領域に連結させることができ、軽鎖可変領域を定常領域に連結させることができる。いくつかの実施形態において、重鎖定常領域は、配列番号3または36～39のアミノ酸配列を含むであろう。いくつかの実施形態において、軽鎖定常領域は、配列番号18のアミノ酸配列を含むであろう。特定の実施形態において、重鎖可変領域は、配列番号1または配列番号57のアミノ酸配列をさらに含み、軽鎖可変領域は、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列をさらに含むであろう。

【0155】

本発明は、CD19結合性物質が、上で示したように配列番号9のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、上で示したように配列番号26のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む実施形態を包含する。これらの実施形態のいずれかにおいて、重鎖可変領域を定常領域に連結させることができ、軽鎖可変領域を定常領域に連結させることができる。いくつかの実施形態において、重鎖定常領域は、配列番号3または36～39のアミノ酸配列を含むであろう。いくつかの実施形態において、軽鎖定常領域は、配列番号18のアミノ酸配列を含むであろう。特定の実施形態において、重鎖可変領域は、配列番号1または配列番号57のアミノ酸配列をさらに含み、軽鎖可変領域は、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列をさらに含むであろう。

【0156】

したがって、特定の実施形態において、CD19結合性物質は、配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号12のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号13のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号14のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖または配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号26もしくは27のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むであろう。これらの実施形態のいずれかにおいて、重鎖可変領域を定常領域に連結させることができ、軽鎖可変領域を定常領域に連結させることができる。いくつかの実施形態において、重鎖定常領域は、配列番号3または36～39のアミノ酸配列を含むであろう。いくつかの実施形態において、軽鎖定常領域は、配列番号18のアミノ酸配列を含むであろう。特定の実施形態において、重鎖可変領域は、配列番号1または配列番号57のアミノ酸配列をさらに含み、軽鎖可変領域は、配列番号16または配列番号61のアミノ酸配列をさらに含むであろう。

【0157】

本発明は、CD19結合性物質が、配列番号28または配列番号32のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む実施形態を包含する。該アミノ酸配列は、CD19結合性物質が機能活性(すなわち、CD19結合活性)を保持し、配列がそれぞれ配列番号28または配列番号32のアミノ酸コンセンサス配列と実質的または完全な同一性を保持するならば、例えば、任意の数の置換を有する配列番号28または配列番号32のアミノ酸コンセンサス配列であってよい。

【0158】

本発明は、CD19結合性物質が、配列番号29または配列番号33のアミノ酸コンセンサス配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖

可変領域を含む実施形態を包含する。該アミノ酸配列は、CD19結合性物質が機能活性を保持し、配列がそれぞれ配列番号29または配列番号33のアミノ酸コンセンサス配列と実質的または完全な同一性を保持するならば、例えば、任意の数の置換を有する配列番号29または配列番号33のアミノ酸配列であってよい。

【0159】

本発明は、CD19結合性物質が、配列番号30または配列番号34のアミノ酸コンセンサス配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む実施形態を包含する。該アミノ酸配列は、CD19結合性物質が機能活性を保持し、配列がそれぞれ配列番号30または配列番号34のアミノ酸コンセンサス配列と実質的または完全な同一性を保持するならば、例えば、任意の数の置換を有する配列番号30または配列番号34のアミノ酸配列であってよい。

10

【0160】

本発明は、CD19結合性物質が、配列番号31または配列番号35のアミノ酸コンセンサス配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む実施形態を包含する。該アミノ酸配列は、CD19結合性物質が機能活性を保持し、配列がそれぞれ配列番号31または配列番号35のアミノ酸コンセンサス配列と実質的または完全な同一性を保持するならば、例えば、任意の数の置換を有する配列番号31または配列番号35のアミノ酸配列であってよい。

20

【0161】

本発明は、CD19結合性物質が、上で示したように配列番号28または配列番号32と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、上で示したように配列番号30または配列番号34と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む実施形態を包含する。

【0162】

本発明は、CD19結合性物質が、上で示したように配列番号28または配列番号32のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、上で示したように配列番号31または配列番号35のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む実施形態を包含する。

30

【0163】

本発明は、CD19結合性物質が、上で示したように配列番号29または配列番号33のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、上で示したように配列番号30または配列番号34と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む実施形態を包含する。

40

【0164】

本発明は、CD19結合性物質が、上で示したように配列番号29または配列番号33のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、上で示したように配列番号31または配列番号35のアミノ酸配列と同一または実質的に同一である(すなわち、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95

50

%、96%、97%、98%、99%または100%同一性を有する)アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む実施形態を包含する。

【0165】

いくつかの実施形態において、本発明のCD19結合性物質は、ヒト化抗体を含む。配列番号9の重鎖可変領域および配列番号17の軽鎖可変領域を含むヒト化抗体は、マウスBU12抗体のすべての6つの完全なCDRおよび完全にヒト可変領域フレームワークアミノ酸を有する。多くの他のヒト化抗体と対照的に、そのような抗体は、さらなる置換のない場合でさえ、その抗原に対する有用な結合親和性を有する。しかし、そのような抗体は、変異体を調製するための出発点も与える。いくつかのそのような変異体は、配列番号9と(その全長にわたって)少なくとも90%同一な配列を有する重鎖可変領域および配列番号17と少なくとも90%同一な配列を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの変異体は、重鎖可変領域における配列番号9と異なる5、4、3、2もしくは1個以下のアミノ酸および軽鎖可変領域における配列番号17と異なる5、4、3、2もしくは1個以下のアミノ酸を有する。

【0166】

いくつかの変異体は、配列番号9または配列番号17に対する可変領域フレームワークにおける1つもしくは複数のアミノ酸の置換が上の抗体と異なっている。置換は、BU12抗体(時としてドナー抗体と呼ばれる)のそれぞれ重鎖または軽鎖可変領域における対応する位置(特に示さない限り、位置はKabat番号によるものである)を占めるアミノ酸による置換であってよい。ドナーアミノ酸による置換は、ドナーマウス抗体とよりよく類似したフレームワークコンホメーションをヒト化抗体に付与することによって、その抗原に対する得られるヒト化抗体の親和性をしばしば増大させる。L83位でのドナー置換は、図2に示すように親和性の増大に特に有利である(置換のある軽鎖Gおよび置換のないHと比較)。ドナー置換を行うことができる配列番号9とBU12重鎖とで異なる他の位置は、例えば、H24位、H27位、H29位、H71位、H75位、H789位、H79位およびH89位などであり、ドナー置換後に各位置がそれぞれF、F、L、K、S、V、FおよびAにより占められる。配列番号17とBU12軽鎖とで異なる軽鎖可変領域フレームワーク位置は、マウスBU12軽鎖においてそれぞれN、S、S、T、N、S、H、FおよびVにより占められるL2位、L40位、L41位、L42位、L69位、L70位、L71位、L72位およびL83位などである。抗体親和性に対するこれらの置換の多くの効果も図2に示す。これらの置換または置換の組合せの一部は親和性を増大させることがわかる。いくつかの好ましい重鎖置換は、ドナー置換後にそれぞれK、S、VおよびFにより占められるH71位、H75位、H78位およびH79位の1つまたは複数を含む。いくつかの好ましい軽鎖置換は、ドナー置換後にそれぞれN、N、H、FおよびVにより占められるL2位、L69位、L71位、L72位およびL83位の1つまたは複数を含む。試験した置換または置換の組合せのいずれも親和性の許容できない喪失をもたらさなかった。

【0167】

含めるべきドナー置換の数が競合する検討事項のバランスを反映する。一般的に、親和性を顕著に増加させる置換が望ましい。しかし、可変領域フレームワーク置換の総数を最小限にすることも潜在的免疫原性を減少させるのに有利である。重鎖可変領域フレームワークに置換を有さないヒト化抗体および軽鎖可変領域フレームワークのL83ドナー置換は、親和性の最大化と免疫原性の最小化との好ましいバランスを示す。他の多くの置換が可能である。

【0168】

ならびに、またはドナー置換の代わりに、可変領域フレームワークアミノ酸を、他のヒト抗体配列またはヒト抗体配列のコンセンサス配列における対応する位置を占めるアミノ酸で置換することができる(例えば、Queen, US 7,022,500を参照)。そのような置換の根拠は、しばしば、免疫原性を減少させる目的でヒト免疫グロブリン配列における比較的まれなアミノ酸を当位置のより一般的なアミノ酸で置換することである。可変領域フレームワークが生殖系列配列によってもたらされるヒト化抗体において、生殖系列配列は体細胞突然変異によって導入される可能性があるまれなアミノ酸を欠いているので、そのような置換は、可能であるが、一般的に必要でない。



## 【0169】

可変領域フレームワークアミノ酸は、ドナーアミノ酸または共通アミノ酸でないアミノ酸で置換することもできる。そのような置換は、好ましくは保存的アミノ酸置換である。多くの置換が親和性に対してほとんど影響を及ぼさないが、それらは、免疫原性を増加させる可能性があるため、一般的に好ましくない。

## 【0170】

1つまたは複数のCDR残基の置換あるいは1つまたは複数のCDRの削除も可能である。結合のために1つまたは2つのCDRをなしで済ますことができる多くの抗体が科学文献に記載された。Padlan et al., FASEB Journal 9:133-139(1995)は、公表された結晶構造に基づいて抗体とそれらの抗原との接触領域を解析し、CDR残基の約1/5から1/3のみが実際に抗原に接触していると結論した。Padlanらは、これらの残基をSDR(特異性決定残基)と呼んだ。Padlanは、1つまたは2つのCDRが抗原と接触したアミノ酸を有さなかった多くの抗体も見いだした。同様に、Vajdosら(Journal of Molecular Biology, vol. 320, p. 415-428(2002))は、ErbB2に対する抗体の軽鎖のCDR1が結合に関与していなかったことを報告した。そのような教示は、例えば、Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, (1999)により抗体のヒト化に適用され、彼らは、ヒトフレームワーク上にCR49マウス抗体のL1およびL3またはL2およびL3のみを移植し、抗原との高親和性相互作用を保持することができたことを示した。同様に、Tamura et al., Journal of Immunology, 2000, 164:1432-1441 (2000)は、軽鎖CDR1および2は、残りのCDRにおけるいくつかの残基と同様に、ヒト化抗腫瘍抗体においてなしで済ませることができることを報告した。CDR内の特定の領域の置換は、不要なCDRの削除と同じ原理に基づいている。すなわち、CDR残基の小サブセットのみ、すなわちSDRが実際に抗原に接触している。

## 【0171】

抗原に接触していないCDR残基は、以前の試験(例えば、CDRH2における残基H60~H65はしばしば必要でない)に基づいてChothia CDR外にあるKabat CDRの領域から分子モデリングによりかつ/または経験的に同定することができる。CDRまたはその残基を削除する場合、それを通常、可変領域フレームワーク配列(この例では、重鎖についてはVH4-31/JH4および軽鎖についてはVL-L6 JK2)を供給するヒト受容体配列における対応する位置を占めるアミノ酸で置換する。含めるべきそのような置換の数は、競合する検討事項のバランスを反映する。そのような置換は、ヒト化抗体におけるマウスアミノ酸の数を減少させ、結果として可能な免疫原性を減少させるのに有利である可能性がある。しかし、置換は、親和性の変化をもたらす可能性もあり、親和性の著明な低下を避けることが好ましい。CDR内の置換の位置および置換するアミノ酸も経験的に選択することができる。経験的置換は、保存的または非保存的であってよい。しかし、一般的に経験的置換は、免疫原性の減少の点ではマウスからヒトへの置換の利点はない。経験的置換は、得られるヒト化抗体の親和性を増加または減少させうる。

## 【0172】

一般的にCD19に対する十分な結合親和性を有し、実質的な免疫原性を欠くヒト化抗体は、上の原理に従って、かつ/または本発明の実施例に従って調製した変異体の個別スクリーニングによって得ることができる。しかし、ファージディスプレイなどのディスプレイ選択法を用いて非常に多数の変異体を同時にスクリーニングすることができる(Dow et al., WO91/17271, McCafferty et al., WO92/001047およびWinter, WO92/20791を参照)。同様の考慮が本明細書に開示される他のヒト化抗体または抗体鎖の変異体を設計する際に必要な変更を加えて当てはまる。例えば、配列番号2は、重鎖変異体の設計のための代替出発点を配列番号9に与える。配列番号2は、VH2-70およびJH4遺伝子の完全にヒト可変領域フレームワーク配列を有するBU12抗体の3つの重鎖CDRを含む。配列番号26は、軽鎖変異体の設計のための代替出発点を配列番号17に与える。配列番号26は、A10およびJK2遺伝子の完全にヒト可変領域フレームワーク配列におけるBU12抗体の3つの軽鎖CDRsを含む。可能な置換のための特定の重鎖可変領域フレームワーク位置およびそのような位置に置換するアミノ酸を実施例1における表「非相同FR残基 BU12 vs. VH431」に示す。配列番号26にお

ける可能な置換のための特定の軽鎖可変領域フレームワーク位置を実施例2における表「非相同FR残基 BU12 VL vs. L6およびA10」に示す。

【0173】

本発明は、重鎖可変領域がリーダー配列をさらに含む実施形態を包含する。例示的な重鎖リーダー配列は、配列番号1および配列番号57に示す。

【0174】

本発明は、軽鎖可変領域がリーダー配列をさらに含む実施形態を包含する。例示的な軽鎖リーダー配列は、配列番号16および配列番号61に示す。

【0175】

CD19結合性物質は、任意により抗体エフェクター領域を含んでいてよい。エフェクタードメインは、例えば、免疫グロブリンのヒンジ-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3領域などのFC領域、あるいは好ましくはエフェクター機能を有するエフェクター領域の一部またはフラグメントであってよい。単鎖抗体を含む、抗原結合性抗体フラグメントは、例えば、エフェクター領域の全部または一部と組み合わせられた可変領域(例えば、C<sub>H</sub>2および/またはC<sub>H</sub>3ドメイン単独あるいはC<sub>H</sub>1、ヒンジおよび/またはC<sub>L</sub>ドメインとの組合せ)であってよい。また、抗原結合性フラグメントは、エフェクター領域のいずれかの組合せを含んでいてよい。いくつかの実施形態において、抗CD19抗体は、ヒンジ-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3ドメインに連結されたCD19結合性可変領域を含む単鎖抗体であり得る。

【0176】

抗CD19抗体のエフェクター領域は、適切な免疫グロブリンアイソタイプからのものであり得る。CD19結合性物質は、所望のエフェクター機能を生ずるための適切な定常ドメインからなる組換え融合タンパク質として発現させることができる。

【0177】

本発明は、CD19結合性物質の重鎖可変領域が、IgGなどの定常領域、すなわち、IgG1定常領域もしくはIgG2定常領域、または変更定常領域、例えば、IgG1V1に連結されている実施形態を包含する。例示的な定常領域ドメインを配列番号3および36~39として示す。

【0178】

本発明はまた、CD19結合性物質の軽鎖可変領域が 定常領域などの定常領域に連結されている実施形態を包含する。例示的な定常領域ドメインを配列番号18として示す。

【0179】

本発明は、CD19結合性物質の軽鎖可変領域が 定常領域などの定常領域に連結されている実施形態を包含する。例示的な定常領域ドメインを配列番号18として示し、CD19結合性物質の重鎖可変領域は、IgGなどの定常領域、例えば、IgG1定常領域もしくはIgG2定常領域、または変更定常領域、例えば、IgG1V1に連結されている。例示的な定常領域ドメインを配列番号3および36~39として示す。

【0180】

いくつかの実施形態において、CD19結合性物質は、ヒトまたは非ヒトFc領域もしくはその一部分を含むCD19結合性物質であってよい。例えば、抗体は、ヒト化重鎖および/または軽鎖可変領域に連結された非ヒト由来、例えば、げっ歯類(例えば、マウスもしくはラット)、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ科動物、ウマ、ニワトリまたはサル(例えば、マカーク、アカゲザル、カニクイザルなど)由来のFc領域もしくはその一部分を含んでいてよい。

【0181】

抗体などのCD19結合性物質は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、またはより高次の多重特異性であってよい。多重特異性抗体は、CD19の異なるエピトープに対して特異的であってよく、かつ/またはCD19ならびに異種タンパク質に対して特異的であってよい。(例えば、PCT公開WO 93/17715、WO 92/08802、WO 91/00360およびWO 92/05793、Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69、米国特許第4,474,893号、同第4,714,681号、同第4,925,648号、同第5,573,920号および同第5,601,819号、Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553を参照。)本明細書で述べる方法を実施するのに有用な二重特異性およ

10

20

30

40

50

び三重特異性抗体を含む多重特異性抗体は、CD19ならびに第2の細胞表面受容体または受容体複合体、すなわちADCC、ADCPおよび/またはCDCを媒介するものに免疫特異的に結合する抗体である。

【0182】

CD19結合性物質は、CD19に対するそれらの結合親和性によっても記述または指定することができる。一般的な結合親和性は、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $10^{-6} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $10^{-7} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $10^{-8} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $10^{-9} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $10^{-10} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 $10^{-11} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 $10^{-12} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 $10^{-13} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 $10^{-14} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ または $10^{-15} \text{M}$ 未満の解離定数またはKdを有するものを含む。

【0183】

本発明は、CD19結合性物質をコードする核酸を包含する。CD19結合性物質は、例えば、完全ヒト化抗体またはヒト化抗原結合性フラグメントであってよい。いくつかの実施形態において、本発明の核酸は、配列番号2、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、15、17、19、20、21、22、23、24、26もしくは27のアミノ酸配列を有する、または実質的な同一性を有するポリペプチド鎖をコードする。いくつかの実施形態において、本発明の核酸は、配列番号1、3、16、18、56、57、60もしくは61のアミノ酸配列を有する、または実質的な同一性を有するポリペプチド鎖をコードする。特定の実施形態において、本発明の核酸は、配列番号40、41、42、43、44、45、53、54、55、58もしくは59のヌクレオチド配列を含むであろう。特定の実施形態において、該核酸は、抗体の重鎖可変領域をコードし、配列番号41ならびに任意により配列番号40および42の配列の1つまたは複数の配列を含むであろう。特定の実施形態において、該核酸配列は、抗体の重鎖可変領域をコードし、配列番号41ならびに任意により配列番号54および55の配列の1つまたは複数の配列を含むであろう。特定の実施形態において、該核酸は、抗体の重鎖可変領域をコードし、配列番号53を含むであろう。特定の実施形態において、該核酸は、抗体の軽鎖可変領域をコードし、配列番号44ならびに任意により配列番号43および45の配列の1つまたは複数の配列を含むであろう。特定の実施形態において、該核酸は、抗体の軽鎖可変領域をコードし、配列番号44ならびに任意により配列番号59および45の配列の1つまたは複数の配列を含むであろう。特定の実施形態において、該核酸は、抗体の軽鎖可変領域をコードし、配列番号58を含むであろう。

【0184】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示するCD19結合性物質をコードする核酸配列のすべてもしくは一部に、またはその相補体により、本明細書で定義される低、中および高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするCD19結合性物質をコードする核酸配列も含まれる。核酸ハイブリダイゼーションの高ストリンジェンシー、中ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシー条件は、当技術分野で知られている。Ausubel, F.M. et al., "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons 1998), p.2.10.1-2.10.16、6.3.1-6.3.6。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する正確な条件は、イオン強度(例えば、 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1 \times \text{SSC}$ )、温度(例えば、室温、42、68)およびホルムアルデヒドなどの不安定化剤またはSDSなどの変性剤の濃度だけでなく、核酸配列の長さ、塩基組成、ハイブリダイゼーション配列間のミスマッチパーセントおよび他の同じでない配列内の当配列のサブセット発生の頻度などの要因にも依存する。例えば、低ストリンジェンシー洗浄は、 $0.2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$ を含む溶液での室温で10分間の洗浄を含んでいてよく、中ストリンジェンシー洗浄は、 $0.2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$ を含むあらかじめ加温した溶液(42)での42で15分間の洗浄を含んでいてよく、高ストリンジェンシー洗浄は、 $0.1 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$ を含むあらかじめ加温した溶液(68)での68で15分間の洗浄を含んでいてよい。さらに、洗浄を反復して、または連続的に行って、当技術分野で知られている所望の結果を得ることができる。

【0185】

本発明は、CD19結合性物質が、例えば、ヒト化全長抗体、ヒト化抗体フラグメントまたはその誘導体である実施形態を包含する。

## 【 0 1 8 6 】

CD19結合性物質は、当技術分野で知られている方法により生成することができる。例えば、モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマの使用、組換えおよびファージディスプレイ法またはその組合せを含む、様々な技術を用いて調製することができる。ハイブリドーマ法は、例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988、Harlow and Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1999)およびHammerling et al., *In Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, p. 563-681(Elsevier, N. Y., 1981)において一般的に考察されている。抗CD19抗体を調製するのに用いることができるファージディスプレイ法の例としては、例えば、Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381、Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581、Quan and Carter, 2002, *The rise of monoclonal antibodies as therapeutics in Anti-IgE and Allergic Disease*, Jardieu and Fick Jr., eds., Marcel Dekker, New York, NY, Chapter 20, p 427-469、Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50、Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186、Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958、Persic et al., 1997, Gene 187:9-18、Burton et al., 1994, *Advances in Immunology* 57:191-280、PCT出願番号PCT/GB91/01134、PCT公開W090/02809、W091/10737、W092/01047、W092/18619、W093/11236、W095/15982、W095/20401ならびに米国特許第5,698,426号、同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,580,717号、同第5,427,908号、同第5,750,753号、同第5,821,047号、同第5,571,698号、同第5,427,908号、同第5,516,637号、同第5,780,225号、同第5,658,727号、同第5,733,743号および同第5,969,108号(それらの開示が参照により本明細書に組み込まれている)に開示されているものが挙げられる。

10

20

## 【 0 1 8 7 】

本明細書で述べるように、CD19結合性物質は、ヒト化重鎖および/または軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含んでいてよい。抗体は、例えば、CDRグラフティング(例えば、EP0239400、PCT公開W091/09967、米国特許第5,225,539号、同第5,530,101号および同第5,585,089号を参照)、ベニアリング(veneering)もしくはリサーフェシング(resurfacing)(例えば、EP0592106、EP0519596、Padlan, *Molecular Immunology*, 1991, 28(4/5):489-498、Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814、Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973を参照)および鎖シャッフリング(chain shuffling)(例えば、米国特許第5,565,332号を参照)(これらの参考文献のすべてが参照により本明細書に組み込まれる)を含む当技術分野で知られている様々な技術を用いてヒト化することができる。ヒト化抗体およびそのフラグメントは、例えば、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、国際公開番号W087/02671、欧州特許公開第0184187号、欧州特許公開第0171496号、欧州特許公開第0173494号、国際公開番号W086/01533、米国特許第4,816,567号、欧州特許公開第0012023号、Berter et al., 1988, *Science* 240:1041-43、Liu et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-43、Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139:3521-26、Sun et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-18、Nishimura et al., 1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005、Wood et al., 1985, *Nature* 314:446-449、Shaw et al., 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-59、Morrison, 1985, *Science* 229:1202-07、Oi et al., 1986, *Bio Techniques* 4:214、米国特許第5,225,539号、Jones et al., 1986, *Nature* 321:552-25、Verhoeyan et al., 1988, *Science* 239:1534およびBeidler et al., 1988, *J. Immunol.* 141:4053-60を含む、当技術分野で知られている組換えDNA技術によって産生することができる。

30

40

## 【 0 1 8 8 】

単鎖抗体を産生させるのに用いることができる技術の例としては、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号、Huston et al., 1991, *Methods in Enzymology* 203:46-88、Shu et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995-7999ならびにSkerra et al., 1988, *Science* 240:1038-1040に記載されているものが挙げられる。

50

## 【0189】

二重特異性抗体を調製する方法は、当技術分野で知られている。全長二重特異性抗体の慣用的な生成は、2本の鎖が異なる特異性を有する、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現に基づいている(例えば、Milstein et al., 1983, Nature 305:537-39を参照)。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな組合せのため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、1つが正しい二重特異性構造を有する、異なる抗体分子の可能な混合物を産生する。類似の方法が国際公開番号W093/08829およびTraunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-59に開示されている。

## 【0190】

異なるアプローチにより、所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させる。ヒンジ、 $C_H2$ および $C_H3$ 領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合が一般的である。いくつかの実施形態において、融合は、融合体の少なくとも1つに存在する、軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域( $C_H1$ )を含む。免疫グロブリン重鎖融合体および所望の場合免疫グロブリン軽鎖をコードする配列を有する核酸を別々の発現ベクター中に挿入し、それを適切な宿主生物にコトランスフェクトする。これは、構築に用いる3本のポリペプチド鎖の不等な比率が最適な収率をもたらす実施形態において3つのポリペプチドフラグメントの相互の特性を調節するうえで大きな柔軟性を与える。しかし、等比率の少なくとも2本のポリペプチド鎖が高い収率をもたらす場合、または比率が特に重要でない場合、2本または3本すべてのポリペプチド鎖のコーディング配列を1つの発現ベクターに挿入することは可能である。

## 【0191】

このアプローチの例において、二重特異性抗体は、1つのアームにおける第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他のアームにおけるハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第2の結合特異性を与える)を有する。二重特異性分子の1/2のみに免疫グロブリン軽鎖が存在することは、容易な分離の方法を与えるものであるので、この非対称構造は、望まない免疫グロブリン鎖の組合せからの所望の二重特異性化合物の分離を容易にする(例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、例えば、国際公開番号W094/04690を参照)。

## 【0192】

二重特異性抗体のさらなる考察については、例えば、Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:210、Rodrigues et al., 1993, J. Immunology 151:6954-61、Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-67、Carter et al., 1995, J. Hematotherapy 4:463-70、Merchant et al., 1998, Nature Biotechnology 16:677-81を参照のこと。そのような技術を用いて、本明細書で定義される疾患の治療または予防用の二重特異性抗体を調製することができる。

## 【0193】

二価抗体は、欧州特許公開第0105360号にも記載されている。この参考文献に開示されているように、ハイブリッドまたは二価抗体は、生物学的に、すなわち細胞融合技術により、または化学的に、特に架橋剤もしくはジスルフィド架橋形成剤を用いて得ることができ、全抗体もしくはそのフラグメントを含んでよい。そのようなハイブリッド抗体を得る方法は、例えば、両方が参照により本明細書に組み込まれている、国際公開番号W083/03679および欧州特許公開第0217577号に開示されている。

## 【0194】

CD19結合性物質は、抗CD19抗体の誘導体であり得る。特定の実施形態において、抗CD19抗体誘導体は、抗CD19抗体(例えば、完全な抗体、抗原結合性フラグメントまたは保存的に置換されたポリペプチド)および少なくとも1つのポリペプチド領域または抗CD19抗体に対して異種の他の部分を含む。例えば、抗CD19抗体は、例えば、共有結合が、抗体誘導体が抗原結合領域もしくはそれから得られる領域を介してCD19に特異的に結合することを、または所望ならば、エフェクター領域もしくはその一部がFc受容体に特異的に結合するこ

とを妨げないように、任意の種類の分子の共有結合により修飾することができる。一般的な修飾は、例えば、グリコシル化、脱グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護基による誘導体化、タンパク質分解、細胞リガンドもしくは他のタンパク質への結合などである。多くの化学修飾のいずれも、特異的化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含むが、これらに限定されない既知の手法により行うことができる。

#### 【0195】

いくつかの実施形態において、抗体誘導体は、1つまたは複数の単量体を含む、例えば、二量体などの多量体であり、各単量体は、(i)抗CD19抗体の抗原結合領域、またはそれ由来のポリペプチド領域(例えば、1つまたは複数のアミノ酸の保存的置換によるなど)、および(ii)抗体誘導体がCD19に特異的に結合する多量体(例えば、ホモ二量体)を形成するように、多量体化(例えば、二量体化)ポリペプチド領域を含む。一般的実施形態において、抗CD19抗体の抗原結合領域、またはそれ由来のポリペプチド領域は、異種タンパク質と組換えにより、または化学的に融合されており、異種タンパク質は、二量体化もしくは多量体化ドメインを含む。CD19発現癌を治療または予防する目的のための被験体への抗体誘導体の投与前に、誘導体をホモ二量体もしくはヘテロ二量体の形成を可能にする条件に供する。本明細書で用いているように、ヘテロ二量体は、同一の二量体化ドメインであるが、異なるCD19抗原結合領域、同一のCD19抗原結合領域であるが、異なる二量体化ドメイン、または異なるCD19抗原結合領域および二量体化ドメインを含んでいてよい。

#### 【0196】

典型的な二量体化ドメインは、転写因子に由来するものである。1つの実施形態において、二量体化ドメインは、塩基性領域ロイシンジッパー(「bZIP」)の二量体化ドメインである(例えば、Vinson et al., 1989, Science 246:911-916を参照)。有用なロイシンジッパードメインは、例えば、酵母転写因子GCN4、哺乳動物転写因子CCAAT/エンハンサー結合タンパク質C/EBP、ならびに癌遺伝子産物における核トランスフォーム、FosおよびJunのロイシンジッパードメインを含む。(例えば、Landschultz et al., 1988, Science 240:1759-64、Baxeavanis and Vinson, 1993, Curr. Op. Gen. Devel. 3:278-285、O'Shea et al., 1989, Science 243:538-542を参照)他の実施形態において、二量体化ドメインは、塩基性領域ヘリックス-ループ-ヘリックス(「bHLH」)タンパク質の二量体化ドメインである。(Murre et al., 1989, Cell 56:777-783を参照。Davis et al., 1990, Cell 60:733-746、Voronova and Baltimore, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4722-26も参照。)特に有用なbHLHタンパク質は、myc、maxおよびmacである。

#### 【0197】

他の実施形態において、二量体化ドメインは、例えば、重鎖定常領域またはそのドメイン(例えば、 $C_H1$ ドメイン、 $C_H2$ ドメインおよび/または $C_H3$ ドメイン)などの免疫グロブリン定常領域である。(例えば、米国特許第5,155,027号、同第5,336,603号、同第5,359,046号および同第5,349,053号、EP0367166ならびにWO96/04388を参照)。

ヘテロ二量体は、FosとJunの間(Bohmann et al., 1987, Science 238:1386-1292)、ATF/CREBファミリーのメンバー間(Hai et al., 1989, Genes Dev. 3:2083-2090)、C/EBPファミリーのメンバー間(Cao et al., 1991, Genes Dev. 5:1538-52、Williams et al., 1991, Genes Dev. 5:1553-67、Roman et al., 1990, Genes Dev. 4:1404-15)ならびにATF/CREBおよびFos/Junファミリーのメンバー間(Hai and Curran, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3720-24)で形成されることが知られている。したがって、CD19結合性物質を異なる二量体化ドメインを含むヘテロ二量体として被験体に投与する場合、前述のいずれかの組合せを用いることができる。

#### 【0198】

他の実施形態において、抗CD19抗体誘導体は、第2の抗体と複合体化された抗CD19抗体(「抗体ヘテロコンジュゲート」)である(例えば、米国特許第4,676,980を参照)。ヘテロコンジュゲートは、例えば、CD19に結合する抗体と、CD16/Fc RIII、CD64/Fc RI、キラー細胞活性化もしくは抑制受容体、または補体調節タンパク質CD59などのADCC、食作用、

および/またはCDCを媒介する表面受容体もしくは受容体複合体に結合する抗体との間で形成させることができる。1つの実施形態において、第2の細胞表面分子もしくは受容体複合体に対する多重特異性抗体の一部の結合は、抗CD19抗体のエフェクター機能を増大させる。

#### 【0199】

抗体および他の結合性物質は、様々な既知の方法のいずれかにより、CD19(例えば、ヒトCD19)への特異的結合についてアッセイすることができる。用いることができるイムノアッセイは、例えば、競合的および非競合的アッセイシステムなどである。そのようなアッセイは、当技術分野で常用され、よく知られている。(例えば、Ausubel et al., eds., Short Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc., New York, 4th ed., 1999)、Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999)を参照)。

#### 【0200】

さらに、CD19に対するCD19結合性物質(例えば、抗CD19抗体またはその誘導体)の結合親和性および結合性物質-CD19相互作用の解離速度(off-rate)は、競合的結合アッセイにより測定することができる。競合的結合アッセイの1つの例は、漸増量の非標識CD19の存在下での標識CD19(例えば、 $^3\text{H}$ または $^{125}\text{I}$ )と、対象となる抗体とのインキュベーション、および標識CD19に結合した抗体の検出を含む、ラジオイムノアッセイである。CD19に対する抗体の親和性および結合解離速度をデータからScatchardプロット解析により求めることができる。第2抗体との競合もラジオイムノアッセイを用いて測定することができる。この場合、漸増量の非標識第2抗体の存在下で、CD19を、標識化合物(例えば、 $^3\text{H}$ または $^{125}\text{I}$ )と複合体化した対象となる抗体とともにインキュベートする。あるいは、CD19に対する抗体の結合親和性ならびに抗体-CD19相互作用の結合および解離速度を表面プラスモン共鳴により測定することができる。いくつかの実施形態において、抗CD19抗体またはその誘導体は、CD19発現細胞を標的とし、CD19発現細胞の膜上に蓄積させることができる。

#### 【0201】

CD19結合性物質(例えば、抗CD19抗体またはその誘導体)は、タンパク質の合成の技術分野で知られている方法、一般的に例えば、組換え発現技術により生成することができる。抗体またはその誘導体の組換え発現は、一般的に結合性物質をコードする核酸を含む発現ベクターの構築を必要とする。タンパク質分子の産生のためのベクターは、当技術分野で知られている技術を用いて組換えDNA技術により生成することができる。例えば、Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 3rd ed., 2001)、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2nd ed., 1989)、Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., John Wiley and Sons, New York, 4th ed., 1999)およびGlick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press, Washington, D.C., 2nd ed., 1998)に記載されているような標準的技術を組換え核酸法、核酸合成、細胞培養、トランス遺伝子組込みおよび組換えタンパク質発現に用いることができる。

#### 【0202】

例えば、抗CD19抗体の組換え発現のために、発現ベクターは、プロモーターに作動可能に連結された、その重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖可変ドメインをコードしてよい。発現ベクターは、例えば、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでいてよく(例えば、PCT公開W086/05807、PCT公開W089/01036および米国特許第5,122,464号を参照)、全重鎖もしくは軽鎖の発現のために、抗体の可変ドメインをそのようなベクターにクローニングすることができる。発現ベクターを従来の技術により宿主細胞に転移させ、次いで、トランスフェクト細胞を従来の技術により培養して、抗CD19抗体を産生させる。二本鎖抗体の発現のための一般的実施形態において、全免疫グロブリン分子の発現のために、重鎖および軽鎖をコードするベクターを宿主細胞において共発現させるこ

とができる。

【0203】

様々な原核および真核宿主発現ベクターシステムを用いてCD19結合性物質(例えば、抗CD19抗体またはその誘導体)を発現させることができる。一般的に、特に全組換え抗CD19抗体分子を得るための真核細胞を組換えタンパク質の発現に用いる。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO、例えば、DG44)などの哺乳動物細胞は、ヒトサイトメガウイルスからの主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターとともに、抗CD19抗体またはその誘導体の産生のための有効な発現システムである(例えば、Foecking et al., 1986, Gene 45:101、Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2を参照)。CD19結合性物質はまた、CHEFシステムを用いて発現させることができる(例えば、米国特許第5,888,809号を参照)。

10

【0204】

他の宿主発現システムとしては、例えば、細菌細胞におけるプラスミドに基づく発現システム(例えば、Ruther et al., 1983, EMBO 1,2:1971、Inouye and Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109、Van Heeke and Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509を参照)、例えば、ヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*)細胞におけるオートグラフアカリフォルニカ(*Autographa californica*)核多角体病ウイルス(AcNPV)発現ベクターの使用などの昆虫システム、および例えば、アデノウイルスに基づくシステムなどの哺乳動物細胞におけるウイルスに基づく発現システム(例えば、Logan and Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359、Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544を参照)などがある。

20

【0205】

さらに、挿入された配列の発現を調節する、または遺伝子産物を所望の特異的な形で修飾し、処理する宿主細胞株を選択することができる。発現するタンパク質の正しい修飾および処理(例えば、グリコシル化、リン酸化および切断)を保証するために、適切な細胞株または宿主システムを選択することができる。このために、主要な転写産物および遺伝子産物の適切な処理のための細胞装置を有する真核宿主細胞を用いることができる。そのような哺乳動物宿主細胞としては、例えば、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、292、3T3およびW138などがある。

【0206】

30

安定な発現システムは、一般的に組換えCD19結合性物質の長期の高収率産生に用いる。例えば、抗CD19抗体またはその誘導体を安定に発現する細胞株は、適切な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、シーケンサー、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位)により制御されるDNAおよび選択可能マーカーによる宿主細胞の形質転換、その後の選択培地中の形質転換細胞の増殖によって遺伝子工学的に作製することができる。選択可能マーカーは、選択に対する抵抗性を与え、細胞がDNAをそれらの染色体に安定に組み込み、増殖して細胞増殖フォーカスを形成することを可能にし、次にこれをクローニングし、細胞株に拡大させることができる。例えば、それぞれ $tk^-$ 、 $hgprt^-$ または $aprt^-$ 細胞に用いることができる、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ、ヒポキサンチンアニンホスホリボシルトランスフェラーゼおよびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む多くの選択システムに用いることができる。また、抗代謝産物抵抗性(antimetabolite resistance)は、次の遺伝子の選択の基礎として用いることができる。すなわち、メトトレキセートに対する抵抗性を与える $dhfr$ 、マイコフェノール酸に対する抵抗性を与える $gpt$ 、アミノグリコシドG-418に対する抵抗性を与える $neo$ 、ハイグロマイシンに対する抵抗性を与える $hygo$ 。組換えDNA技術の分野で一般的に知られている方法は、所望の組換えクローンを選択するのにルーチンに適用することができ、そのような方法は、例えば、Ausubel et al., eds., in the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, 1987-1999 Current Protocols ((著作権)1994-1999 John Wiley and Sons, Inc.)、Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual (Stockton Press, N.Y., 1990)、Current Protocols in Human Geneti

40

50



cs (Dracopoli et al., John Wiley and Sons, N.Y., 1994, Chapters 12 and 13)および Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1に記載されている。

#### 【0207】

抗体または誘導体の発現レベルは、ベクターの増幅により増加させることができる(一般的にBebbington and Hentschel, The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning, Vol.3 (Academic Press, New York, 1987)を参照)。抗CD19抗体またはその誘導体を発現するベクターシステムにおけるマーカーを増幅するとき、宿主細胞培地中に存在する阻害剤のレベルの増加により、阻害剤に抵抗性を与えるマーカー遺伝子の高いコピー数を有する宿主細胞を選択することとなる。付随する抗体遺伝子のコピー数も増加し、それにより、抗体またはその誘導体の発現が増加する(例えば、Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257を参照)。

10

#### 【0208】

CD19結合性物質が重鎖および軽鎖を含む場合、宿主細胞は重鎖タンパク質をコードする第1のベクターと軽鎖タンパク質をコードする第2のベクターの2つの発現ベクターを共トランスフェクトすることができる。2つのベクターは、重鎖および軽鎖タンパク質の同等な発現を可能にする同一の選択可能なマーカーを含んでいてよい。あるいは、重鎖および軽鎖タンパク質の両方をコードし、発現することができる単一ベクターを用いることができる。そのような状況においては、有毒な遊離重鎖の過剰を避けるために、軽鎖を一般的に重鎖の前に配置する(例えば、Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197を参照)。重鎖および軽鎖のコーディング配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含んでいてよい。

20

#### 【0209】

CD19結合性物質が生成された(例えば、動物、化学合成または組換え発現により)ならば、タンパク質の適切な精製方法により、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換もしくはアフィニティークロマトグラフィー(例えば、完全なFc領域を有する抗体の精製のためのプロテインAクロマトグラフィーなど))、遠心分離、溶解度の差またはタンパク質の精製のための他の標準的手法により精製することができる。抗CD19抗体またはその誘導体は、例えば、ペプチドなどのマーカー配列に融合させて、アフィニティークロマトグラフィーによる精製を促進することができる。適切なマーカーアミノ酸配列としては、例えば、pQEベクター(QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA, 91311)に備えられているタグなどのヘキサヒスチジンペプチド、およびインフルエンザ血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する「HA」タグ(Wilson et al., 1984, Cell 37:767)、および「フラッグ」タグなどがある。

30

#### 【0210】

一般的に、CD19結合性物質は、実質的に精製されている(例えば、その効果を制限する、または望ましくない副作用を引き起こす物質を実質的に含まない)。いくつかの実施形態において、CD19結合性物質は、少なくとも約40%純粋、少なくとも約50%純粋、または少なくとも約60%純粋である。いくつかの実施形態において、CD19結合性物質は、少なくとも約60~65%、65~70%、70~75%、75~80%、80~85%、85~90%、90~95%または95~98%純粋である。いくつかの実施形態において、CD19結合性物質は、約99%純粋である。

40

#### 【0211】

さらなるCD19結合性物質は、異種タンパク質(一般的に少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90または少なくとも100アミノ酸の)との融合タンパク質(すなわち、組換えにより融合または化学的に複合体化されている(共有結合もしくは非共有結合を含む)タンパク質)を含んでいてよい。いくつかの実施形態において、そのようなCD19結合性物質は、CD19および任意により免疫グロブリンエフェクター領域もしくはその機能的同等物に特異的に結合するヒト化重鎖および/または軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。本明細書で用いているように、免疫グロブリンエフェクター領域の機能的同等物は、食作用もし

50

くは溶解活性を有する免疫細胞上のFc受容体に結合し、あるいは免疫グロブリンエフェクター領域は、補体システムの1つまたは複数の構成要素に結合する。異種タンパク質へのCD19結合性部分の結合は、必ずしも直接的でなく、リンカー配列を介して発生してよい。

#### 【0212】

例えば、CD19結合性物質は、フレームにおけるヒト化可変領域を異種タンパク質をコードする配列と融合させることによる組換えによって生成することができる。異種タンパク質は、任意によりエフェクター領域もしくはその機能的同等物を含んでいてよく、次の特性の1つまたは複数の特性を与えることができる。すなわち、安定な発現を促進し、高収率の組換え発現を促進する手段、かつ/または多量体化ドメインを与える。

#### 【0213】

CD19結合性物質は、タンパク質-タンパク質相互作用をスクリーニングするのに適する方法を用いて同定することができる。一般的に、タンパク質は、最初にCD19に特異的に結合するそれらの能力により同定する。用いることができる慣用的方法の主なものは、gt11ライブラリーの抗体プローブ化の技術と同様な方法で標識CD19の発現ライブラリーのプローブ化を必要とする「相互作用クローニング」技術である。例としてであり限定するものではないが、これは、次のように達成することができる。すなわち、心筋キナーゼ(HMK)のリン酸化部位を挿入することにより、CD19をコードするcDNAクローンをC末端で修飾することができる(例えば、Blonar and Rutter, 1992, Science 256:1014-18)。組換えタンパク質を大腸菌(E. coli)において発現させ、GDPアフィニティークラム上で等質性となるまで精製し(Ederly et al., 1988, Gene 74:517-25)、<sup>32</sup>P-ATPおよびウシ心筋キナーゼ(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)を用いて $1 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ gの比活性となるまで標識し、「ファウエスタンアッセイ」においてヒト胎盤 gt11 cDNAライブラリーをスクリーニングするのに用いる(Blonar and Rutter, 1992, Science 256:1014-18)。CD19プローブと相互作用するブランクを分離する。陽性ブランクのcDNA挿入断片を遊離させ、pBluescript KS(Stratagene, La Jolla, CA)などの配列決定に適するベクターにサブクローニングする。

#### 【0214】

in vivoでのタンパク質相互作用を検出する1つの方法は、ツーハイブリッドシステムである。このシステムの1つのバージョンが記載され(Chien et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-82)、Clontech (Palo Alto, CA)により市販されている。

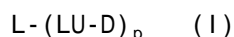
#### 【0215】

#### リガンド-薬物コンジュゲート化合物

本発明は、とりわけ、薬物の対標的送達のための、リガンド-薬物コンジュゲート化合物を提供する。発明者らは、リガンド-薬物コンジュゲート化合物が、CD19を発現するB細胞に対して強力な細胞傷害活性および/または細胞増殖抑制活性を有することを発見した。リガンド-薬物コンジュゲート化合物は、少なくとも1つの薬物単位に共有結合で連結されるリガンド単位を含む。薬物単位は、直接に、またはリンカー単位(-LU-)を通して共有結合で連結することができる。

#### 【0216】

いくつかの実施形態において、リガンド薬物コンジュゲート化合物は、以下の式:



または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物を有し、式中、

Lはリガンド単位、すなわち、本発明のCD19結合性物質であり、

(LU-D)はリンカー単位-薬物単位部分であり、式中、

LU-はリンカー単位であり、

-Dは、標的細胞に対する細胞増殖抑制活性または細胞毒性活性を有する薬物単位であり、

、

pは、1~約20の整数である。

#### 【0217】

いくつかの実施形態において、pの範囲は、1~10、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、1

10

20

30

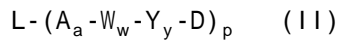
40

50

～4、1～3または1～2である。いくつかの実施形態において、pの範囲は、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4または2～3である。他の実施形態において、pは、1、2、3、4、5または6である。いくつかの実施形態において、pは2または4である。

#### 【0218】

いくつかの実施形態において、リガンド薬物コンジュゲート化合物は、以下の式：



または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物を有し、  
式中、

Lはリガンド単位、すなわち、CD19結合性物質であり、

-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-Y<sub>y</sub>はリンカー単位(LU)であり、式中、

-A-はストレッチャー単位であり、

aは0または1であり、

各-W-は、独立にアミノ酸単位であり、

wは、0～12の範囲の整数であり、

-Y-は、自壊的(self-immolative)なスペーサー単位であり、

yは、0、1または2であり；

-Dは、標的細胞に対する細胞増殖抑制活性または細胞毒性活性を有する薬物単位であり、

pは、1～約20の整数である。

#### 【0219】

いくつかの実施形態において、aは0または1であり、wは0または1であり、yは0、1または2である。いくつかの実施形態において、aは0または1であり、wは0または1であり、yは0または1である。いくつかの実施形態において、pの範囲は、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3または1～2である。いくつかの実施形態において、pの範囲は、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4または2～3である。他の実施形態において、pは、1、2、3、4、5または6である。いくつかの実施形態において、pは2または4である。いくつかの実施形態において、wがゼロでないとき、yは1または2である。いくつかの実施形態において、wが1～12であるとき、yは1または2である。いくつかの実施形態において、wは2～12であり、yは1または2である。いくつかの実施形態において、aは1であり、wおよびyは0である。

#### 【0220】

薬物負荷は、リガンド、例えば分子中の抗体当たりの薬物分子の平均数である、pによって表される。薬物負荷は、リガンド当たり1～20個の薬剤(D)であってよい。コンジュゲーション反応体の調製におけるリガンド当たりの薬物の平均数は、質量分析、ELISAアッセイおよびHPLCなどの従来の手段によって特徴付けることができる。pに関するリガンド-薬物-コンジュゲートの定量的分布を判定することもできる。場合によっては、pが他の薬物負荷とのリガンド-薬物-コンジュゲートからの一定の値である、均一なりガンド-薬物-コンジュゲートの分離、精製および特徴付けは、逆相HPLCまたは電気泳動などの手段によって達成することができる。例示的な実施形態において、pは2～8である。

#### 【0221】

リガンド-薬物コンジュゲート化合物の生成は、熟練技術者に公知である任意の技術によって達成することができる。簡潔には、リガンド-薬物コンジュゲート化合物は、リガンド単位としてのCD19結合性物質、薬物および、任意により、薬物および結合性物質を結合するリンカーを含む。結合性物質への薬剤および/またはリンカーの共有結合のために、いくつかの異なる反応が利用可能である。これは、リジンのアミン基、グルタミン酸およびアスパラギン酸の遊離のカルボン酸基、システインのスルフヒドリル基ならびに芳香族アミノ酸の様々な部分を含む、結合性物質、例えば抗体分子のアミノ酸残基の反応によってしばしば達成される。最も一般的に用いられる共有結合の非特異的方法の1つは、化合物のカルボキシ(またはアミノ)基を抗体のアミノ(またはカルボキシ)基に連結するカルボジイミド反応である。さらに、化合物のアミノ基を抗体分子のアミノ基に連結するため

に、ジアルデヒドまたはイミドエステルなどの二官能性物質が用いられてきた。また、結合性物質への薬物の結合のために、シッフ塩基反応も利用可能である。この方法は、グリコールまたはヒドロキシ基を含む薬物の過ヨウ素酸化を含み、したがってアルデヒドを形成し、それは、次に結合性物質と反応する。結合は、結合物質のアミノ基とのシッフ塩基の形成を通して起こる。薬物を結合性物質に共有結合させるためのカップリング剤として、イソチオシアネートを用いることもできる。他の技術が当業者に公知であり、本発明の範囲内である。

#### 【0222】

一部の実施形態において、リンカーの前駆体である中間体を、適当な条件下で薬物と反応させる。一部の実施形態において、薬物および/または中間体の上で反応基が用いられる。薬物と中間体との間の反応の生成物または誘導体化薬物は、その後適当な条件下で、CD19結合性物質と反応させる。

10

#### 【0223】

リガンド-薬物コンジュゲート化合物の個々の単位の各々は、本明細書でさらに詳細に記載される。例示的なリンカー単位、ストレッチャー単位、アミノ酸単位、自壊的スペーサー単位および薬物単位の合成および構造が、米国特許出願公開第2003-0083263号、同第2005-0238649号および同第2005-0009751号にも記載されており、これらはそれぞれ、参照によりその全体がすべての目的で本明細書に組み込まれている。

#### 【0224】

##### リンカー単位

20

一般的に、リガンド-薬物コンジュゲート化合物は、薬物単位とリガンド単位との間にリンカー領域を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは細胞内条件下で切断が可能であるので、細胞内環境でリンカーの切断は薬物単位をリガンドから解放する。さらに他の実施形態において、リンカー単位は切断不可能であり、薬物は、例えば抗体分解によって解放される。

#### 【0225】

いくつかの実施形態において、リンカーは、細胞内環境(例えば、リソソームまたはエンドソームまたはカベオラの中)に存在する切断物質によって切断が可能である。リンカーは、例えば、それらに限定されないがリソソームまたはエンドソームのプロテアーゼを含む、細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断されるペプチジルリンカーであってよい。いくつかの実施形態において、ペプチジルリンカーは、長さが少なくとも2アミノ酸または少なくとも3アミノ酸である。切断物質には、カテプシンBおよびDならびにプラスミンを含めることができ、それらのすべてはジペプチド薬物誘導体を加水分解して、標的細胞内に活性薬物を放出することが知られている(例えば、Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123を参照)。CD19発現細胞に存在する酵素による切断が可能であるペプチジルリンカーが、最も一般的である。例えば、癌組織で高度に発現されるチオール依存性プロテアーゼカテプシンBによる切断が可能な、ペプチジルリンカーを用いることができる(例えば、Phe-LeuまたはGly-Phe-Leu-Glyリンカー(配列番号52))。そのようなリンカーの他の例は、例えば、参照によりその全体がすべての目的で本明細書に組み込まれる、米国特許第6,214,345号に記載されている。具体的な実施形態において、細胞内プロテアーゼによる切断が可能なペプチジルリンカーは、Val-CitリンカーまたはPhe-Lysリンカーである(例えば、val-citリンカーによるドキソルピシンの合成を記載する米国特許第6,214,345号を参照)。治療薬剤の細胞内タンパク分解性放出を用いることの1つの利点は、コンジュゲートされるとその剤が一般的に弱毒化され、コンジュゲートの血清中安定性が一般的に高いことである。

30

40

#### 【0226】

他の実施形態において、切断が可能なリンカーはpH感受性、すなわち、あるpH値で加水分解に感受性である。一般的に、酸性条件下でpH感受性リンカーは加水分解する。例えば、リソソーム中で加水分解性である酸不安定性のリンカー(例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シス-アコニット酸アミド、オルソエステル、アセター

50

ル、ケタールなど)を用いることができる。(例えば、米国特許第5,122,368号;同第5,824,805号;同第5,622,929号; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661を参照)。そのようなリンカーは、血液中の条件などの中性pH条件の下で比較的安定であるが、リソソームのおおよそのpHであるpH5.5または5.0未満で不安定である。一部の実施形態において、加水分解性リンカーはチオエーテルリンカー、(例えば、アシルヒドラゾン結合を通して治療薬剤に結合しているチオエーテルなどである(米国特許第5,622,929号を参照))。

#### 【0227】

さらに他の実施形態において、リンカーは還元条件下で切断が可能である(例えば、ジスルフィドリンカー)。様々なジスルフィドリンカーが当技術分野で公知であり、その例には、例えば、SATA(N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート)、SPDP(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)、SPDB(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート)およびSMPT(N-スクシンイミジル-オキシカルボニル- -メチル- (2-ピリジル-ジチオ)トルエン)、SPDBおよびSMPTを用いて形成することができるものが含まれる(例えば、Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931、Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987)中のWawrzynczak et al.を参照。米国特許第4,880,935号も参照)。

#### 【0228】

さらなる他の具体的な実施形態において、リンカーは、マロン酸リンカー(Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93)、マレイミドベンゾイルリンカー(Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304)、または3'-N-アミド類似体(Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12)である。

#### 【0229】

さらに他の実施形態において、リンカー単位は切断不可能であり、薬物は、抗体分解によって解放される。(参照によりその全体がすべての目的で本明細書に組み込まれている、米国特許出願公開第20050238649号を参照)。

#### 【0230】

典型的には、リンカーは、細胞外の環境に実質的に感受性でない。本明細書で用いるように、リンカーに関して「細胞外の環境に実質的に感受性でない」とは、リガンド-薬物コンジュゲート化合物が細胞外環境(例えば、血漿)中に存在するとき、リガンド-薬物コンジュゲート化合物の試料中で、リンカーの約20%以下、典型的には約15%以下、より典型的には約10%以下、さらにより典型的には約5%以下、約3%以下、または約1%以下が切断されることを意味する。リンカーが細胞外の環境に実質的に感受性でないかどうかは、例えば、所定期間(例えば、2、4、8、16または24時間)リガンド-薬物コンジュゲート化合物を血漿とインキュベートし、次に、血漿中に存在する遊離の薬物の量を定量することによって判定することができる。

#### 【0231】

他の、非相互排他的実施形態において、リンカーは細胞内在化を促進する。一部の実施形態において、治療薬剤にコンジュゲートされると(すなわち、本明細書に記載されるリガンド-薬物コンジュゲート化合物のリンカー-治療薬剤部分の環境で)、リンカーは細胞内在化を促進する。さらに他の実施形態において、オーリスチン化合物および抗CD19抗体にコンジュゲートされると、リンカーは細胞内在化を促進する。

#### 【0232】

本組成物および方法と用いることができる様々な例示的なリンカーは、WO 2004-010957、米国特許出願公開第20060074008号、米国特許出願公開第20050238649号および米国特許出願公開第20060024317号(それぞれ参照によりその全体がすべての目的で本明細書に組み込まれる)に記載される。

#### 【0233】

「リンカー単位」(LU)は、薬物単位およびリガンド単位を連結してリガンド-薬物コン

10

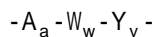
20

30

40

50

ジユゲート化合物を形成するために用いることができる、二官能性化合物である。いくつかの実施形態において、リンカー単位は以下の式:



を有し、

式中、-A-はストレッチャー単位であり、

aは0または1であり、

各-W-は、独立にアミノ酸単位であり、

wは、0~12の範囲の整数であり、

-Y-は、自壊的スペーサー単位であり、

yは、0、1または2である。

10

#### 【0234】

いくつかの実施形態において、aは0または1であり、wは0または1であり、yは0、1または2である。いくつかの実施形態において、aは0または1であり、wは0または1であり、yは0または1である。いくつかの実施形態において、wが1~12のとき、yは1または2である。いくつかの実施形態において、wは2~12であり、yは1または2である。いくつかの実施形態において、aは1であり、wおよびyは0である。

#### 【0235】

##### ストレッチャー単位

存在する場合、ストレッチャー単位(A)は、リガンド単位を、存在するならばアミノ酸単位(-W-)に、存在するならばスペーサー単位(-Y-)に、または薬物単位(-D)に連結することができる。CD19結合性物質に天然にまたは化学操作により存在することができる有用な官能基には、スルフヒドリル、アミノ、ヒドロキシル、炭水化物のアノマーヒドロキシル基、およびカルボキシルが含まれるが、これらに限定されない。適する官能基は、スルフヒドリルおよびアミノである。一例では、スルフヒドリル基は、抗CD19抗体の分子内ジスルフィド結合の還元によって生成することができる。別の実施形態において、スルフヒドリル基は、2-イミノチオラン(Trautの試薬)または他のスルフヒドリル生成試薬との、抗CD19抗体のリジン部分のアミノ基の反応によって生成することができる。一部の実施形態において、抗CD19抗体は組換え抗体であり、1つまたは複数のリジンを含むように組み換えられる。ある他の実施形態において、組換え抗CD19抗体は、追加のスルフヒドリル基、例えば追加のシステインを含むように組み換えられている。

20

30

#### 【0236】

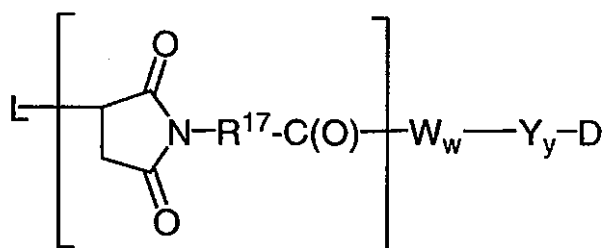
一実施形態において、ストレッチャー単位は、リガンド単位の硫黄原子との結合を形成する。硫黄原子は、リガンドのスルフヒドリル基に由来することができる。この実施形態の代表的なストレッチャー単位を、式IIIaおよびIIIbの角括弧で表し、式中、L-、-W-、-Y-、-D、wおよびyは上で定義されるとおりであり、R<sub>17</sub>は、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキレン-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルケニレン-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキニレン-、カルボシクロ-、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキレン)-、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルケニレン)-、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキニレン)-、-アリーレン-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキレン-アリーレン-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルケニレン-アリーレン-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルキニレン-アリーレン-、-アリーレン-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキレン-、-アリーレン-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルケニレン-、-アリーレン-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルキニレン-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキレン-(カルボシクロ)-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルケニレン-(カルボシクロ)-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルキニレン-(カルボシクロ)-、-(カルボシクロ)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキレン-、-(カルボシクロ)-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルケニレン-、-(カルボシクロ)-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルキニレン-、-ヘテロシクロ-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキレン-(ヘテロシクロ)-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルケニレン-(ヘテロシクロ)-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルキニレン-(ヘテロシクロ)-、-(ヘテロシクロ)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキレン-、-(ヘテロシクロ)-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルケニレン-、-(ヘテロシクロ)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキニレン-、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-、または-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-から選択され、rは、1~10の範囲の整数であり、式中、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、カルボシクロ、ヘテロシクロおよびアリーレン基は、単独で、または別の基の一部分として、任意により置換されている。アルキレン、アルケニレン、アルキニレン基は、単独で、または別の基の一部分として、任意により、例えばA1から独立に選択される1つ

40

50

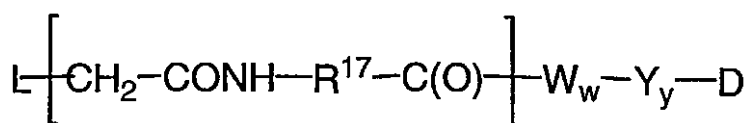
または複数の基で置換することができ;カルボシクロ基は、単独で、または別の基の一部として、任意により、例えばA2から独立に選択される1つまたは複数の基で置換することができ;アリーレン基は、単独で、または別の基の一部として、任意により、例えばA3から独立に選択される1つまたは複数の基で置換することができ;ヘテロシクロ基は、単独で、または別の基の一部として、任意により、例えばA4から独立に選択される1つまたは複数の基で置換することができる。A1、A2、A3およびA4は、本明細書で定義されておりである。明示的に示されていない場合でも、すべての例示的な実施形態から、1~20個の薬物部分をリガンド(p=1~20)に連結することができると理解するべきである。

【化2】



IIIa

10



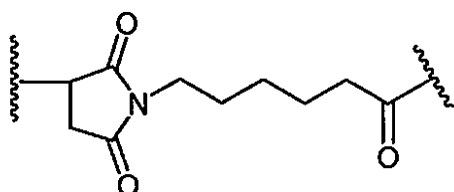
IIIb

20

【0237】

例示的なストレッチャー単位は、式IIIa:

【化3】



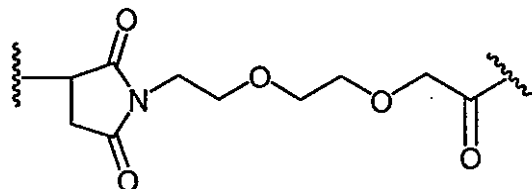
30

のものであり、式中、R<sup>17</sup>は-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-である。

【0238】

別の例示的なストレッチャー単位は、式IIIa:

【化4】



40

のものであり、式中、R<sup>17</sup>は-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-であり、rは2である。

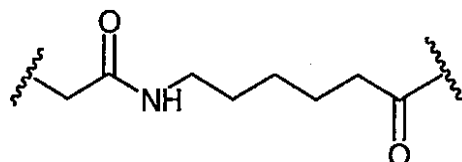
【0239】

例示的なストレッチャー単位は、式IIIaのものであり、式中、R<sup>17</sup>は-アリーレン-またはアリーレン-C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキレン-である。いくつかの実施形態において、アリアル基は非置換のフェニル基である。

【0240】

さらに別の例示的なストレッチャー単位は、式IIIb:

## 【化5】



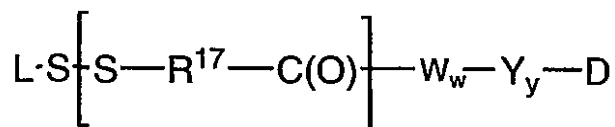
のものであり、式中、 $R^{17}$ は $-(CH_2)_5-$ である。

## 【0241】

一部の実施形態において、ストレッチャー単位は、リガンド単位の硫黄原子とストレッチャー単位の硫黄原子との間のジスルフィド結合を通して、リガンド単位に連結される。この実施形態の代表的なストレッチャー単位を、式IVの角括弧で表し、式中、 $R^{17}$ 、 $L-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 $w$ および $y$ は上で定義されるとおりである。

10

## 【化6】



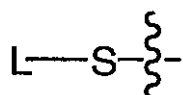
IV

## 【0242】

本出願全体で、文脈上特に明記しない限り、下記式のS部分は、リガンド単位の硫黄原子を指す点に留意すべきである。

20

## 【化7】

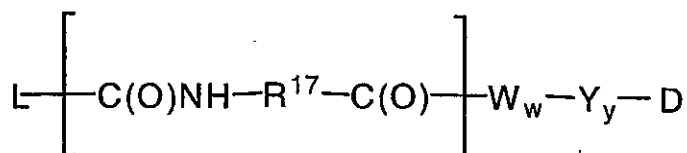


## 【0243】

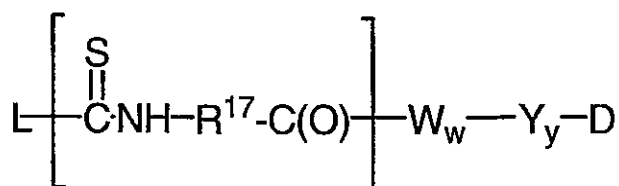
さらに他の実施形態において、ストレッチャーは、リガンドの第1級または第2級アミノ基と結合を形成することができる反応部位を含む。これらの反応部位の例には、活性化エステル、例えばスクシンイミドエステル、4ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアネートおよびイソチオシアネートが含まれるが、これらに限定されない。この実施形態の代表的なストレッチャー単位を、式VaおよびVb:

30

## 【化8】



Va



Vb

40

の角括弧で表し、式中、 $-R^{17}-$ 、 $L-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 $w$ および $y$ は上で定義されるとおりである。

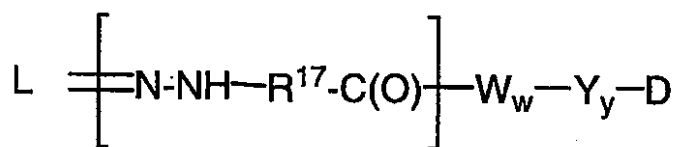
## 【0244】

いくつかの実施形態において、ストレッチャーは、リガンドの上に存在することができる修飾された炭水化物の $(-CHO)$ 基に反応性である、反応性部位を含む。例えば、過ヨウ素酸ナトリウムなどの試薬を用いて炭水化物を軽く酸化することができ、結果として生じる

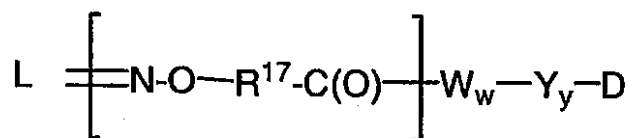
50



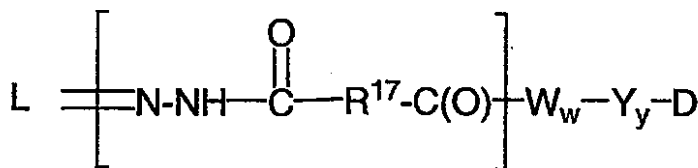
酸化された炭水化物の(-CHO)単位は、ヒドラジド、オキシム、第1級もしくは第2級アミン、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、カルボン酸ヒドラジンおよびアリールヒドラジド、例えばKaneko et al., 1991, Bioconjugate Chem. 2:133-41に記載のものなどの、官能性を含むストレッチャーで縮合させることができる。この実施形態の代表的なストレッチャー単位を、式VIa、VIbおよびVIcの角括弧で表し、式中、-R<sup>17</sup>-、L-、-W-、-Y-、-D、wおよびyは上で定義されるとおりである：



10



VIb



VIc

20

【0245】

## アミノ酸単位

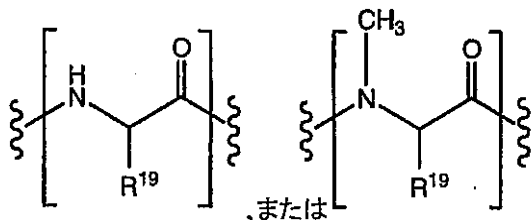
存在する場合、アミノ酸単位(-W-)は、スペーサー単位が存在するならばストレッチャー単位をスペーサー単位に連結し、スペーサー単位が存在しないならばストレッチャー単位を薬物部分に連結し、ストレッチャー単位およびスペーサー単位が存在しないならばリガンド単位を薬物単位に連結する。

【0246】

30

W<sub>w</sub>-は、例えば、モノペプチド、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペントペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチドまたはドデカペプチド単位であってよい。各-W-単位は、下の角括弧で表す式：

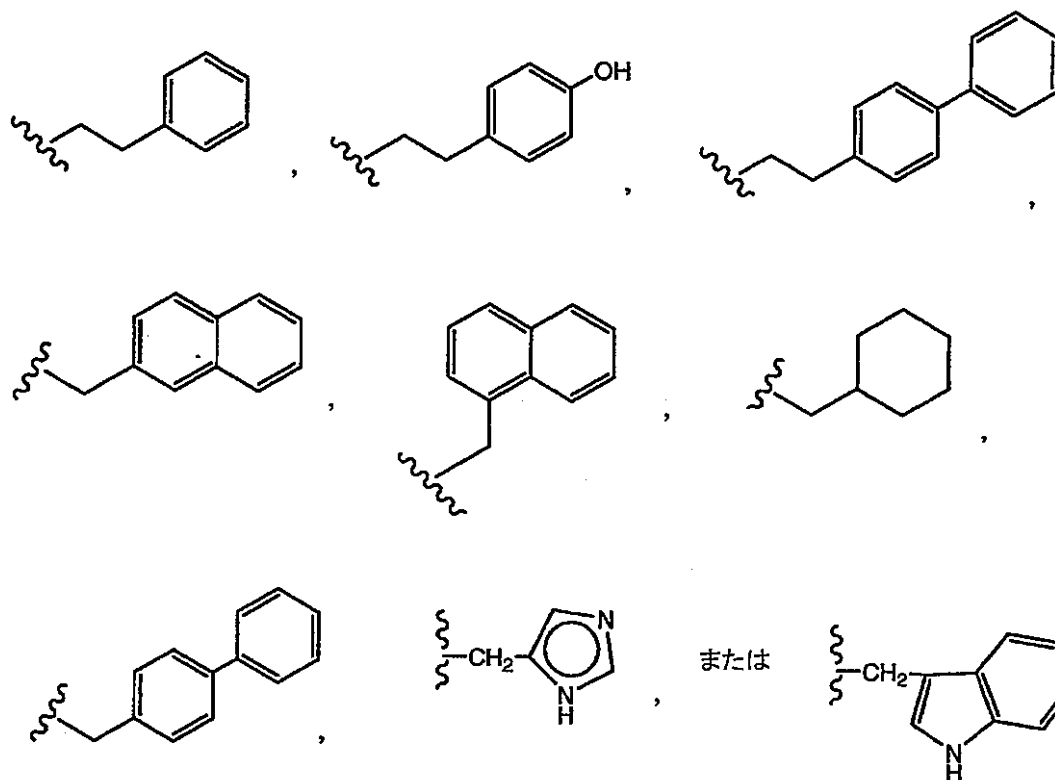
【化10】



40

を独立に有し、wは0~12の範囲の整数であり、上式で、R<sup>19</sup>は、水素、メチル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、ベンジル、p-ヒドロキシベンジル、-CH<sub>2</sub>OH、-CH(OH)CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>COOH、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、2-ピリジルメチル-、3-ピリジルメチル-、4-ピリジルメチル-、フェニル、シクロヘキシル、

## 【化 1 1】



10

20

である。

## 【0247】

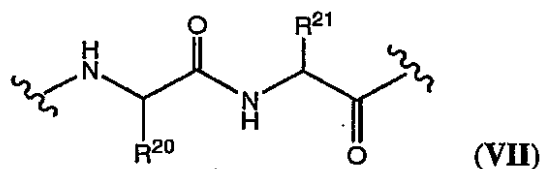
いくつかの実施形態において、アミノ酸単位を、癌または腫瘍関連プロテアーゼを含む1つまたは複数の酵素による酵素処理によって切断して、薬物単位(-D)を遊離させることができ、それは、一実施形態において、放出後にインピボでプロトン化されて薬物(D)を提供する。

## 【0248】

一部の実施形態において、アミノ酸単位は、天然のアミノ酸を含むことができる。他の実施形態において、アミノ酸単位は、非天然のアミノ酸を含むことができる。例示的なWw単位を、式(VII)~(IX)に表し：

30

## 【化 1 2】

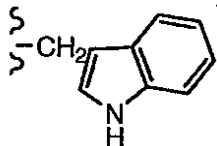


式中、 $R^{20}$ および $R^{21}$ は以下のとおりであり：

$R^{20}$	$R^{21}$
ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$ ;
メチル	$(CH_2)_4NH_2$ ;
イソプロピル	$(CH_2)_4NH_2$ ;
イソプロピル	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;
ベンジル	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;
イソブチル	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;
sec-ブチル	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;

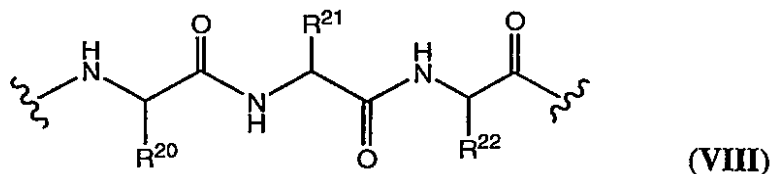
40

## 【化 1 3】



ベンジル  $(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ ;  
 ベンジル メチル;  
 ベンジル  $(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ ;

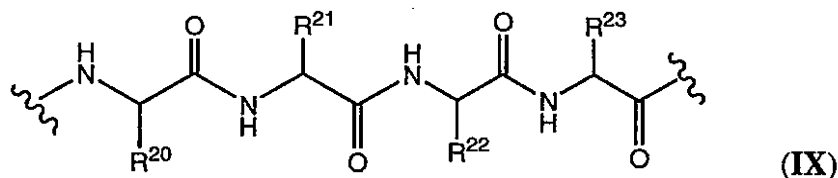
## 【化 1 4】



式中、 $\text{R}^{20}$ 、 $\text{R}^{21}$ および $\text{R}^{22}$ は以下のとおりであり：

$\text{R}^{20}$	$\text{R}^{21}$	$\text{R}^{22}$
ベンジル	ベンジル	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ;
イソプロピル	ベンジル	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ; および
H	ベンジル	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ;

## 【化 1 5】



式中、 $\text{R}^{20}$ 、 $\text{R}^{21}$ 、 $\text{R}^{22}$ および $\text{R}^{23}$ は以下のとおりである：

$\text{R}^{20}$	$\text{R}^{21}$	$\text{R}^{22}$	$\text{R}^{23}$
H	ベンジル	イソブチル	H; および
メチル	イソブチル	メチル	イソブチル。

## 【0 2 4 9】

例示的なアミノ酸単位には、それらに限定されないが、式VIIの単位が含まれ、式中、 $\text{R}^{20}$ はベンジルであり、 $\text{R}^{21}$ は $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ であるか； $\text{R}^{20}$ はイソプロピルであり、 $\text{R}^{21}$ は $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ であるか；または、 $\text{R}^{20}$ はイソプロピルであり、 $\text{R}^{21}$ は $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ である。別の例示的なアミノ酸単位は式VIIIの単位であり、式中、 $\text{R}^{20}$ はベンジルであり、 $\text{R}^{21}$ はベンジルであり、 $\text{R}^{22}$ は $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ である。

## 【0 2 5 0】

有用な $-\text{W}_w$ 単位は、特定の酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼによる酵素切断に対するそれらの選択性について、設計および最適化することができる。一実施形態において、 $-\text{W}_w$ -単位は、その切断がカテプシンB、CおよびD、またはプラスミンプロテアーゼによって触媒される単位である。

## 【0 2 5 1】

一実施形態において、 $-\text{W}_w$ -は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペンタペプチドである。 $\text{R}^{19}$ 、 $\text{R}^{20}$ 、 $\text{R}^{21}$ 、 $\text{R}^{22}$ または $\text{R}^{23}$ が水素以外である場合、 $\text{R}^{19}$ 、 $\text{R}^{20}$ 、 $\text{R}^{21}$ 、 $\text{R}^{22}$ または $\text{R}^{23}$ が結合する炭素原子はキラルである。

## 【0 2 5 2】

$\text{R}^{19}$ 、 $\text{R}^{20}$ 、 $\text{R}^{21}$ 、 $\text{R}^{22}$ または $\text{R}^{23}$ が結合する各炭素原子は、独立に(S)または(R)配置である。

## 【0 2 5 3】

アミノ酸単位の一態様において、アミノ酸単位は、バリン-シトルリン(vcまたはval-ci

10

20

30

40

50

t)である。別の態様において、アミノ酸単位は、フェニルアラニン-リジン(すなわち、fk)である。アミノ酸単位のさらに別の態様において、アミノ酸単位は、N-メチルバリン-シトルリンである。さらに別の態様において、アミノ酸単位は、5-アミノ吉草酸、ホモフェニルアラニンリジン、テトライソキノリンカルボキシレートリジン、シクロヘキシルアラニンリジン、イソネペコチン(isonepecotic)酸リジン、ベータアラニンリジン、グリシンセリンバリングルタミンおよびイソネペコチン酸である。

#### 【0254】

##### スパーサー単位

存在する場合、スパーサー単位(-Y-)は、アミノ酸単位が存在する場合アミノ酸単位を薬物単位に連結する。あるいは、スパーサー単位は、アミノ酸単位が存在しない場合ストレッチャー単位を薬物単位に連結する。また、スパーサー単位は、アミノ酸単位およびストレッチャー単位の両方が存在しない場合、薬物単位をリガンド単位に連結する。

10

#### 【0255】

スパーサー単位は、2つの一般的な種類、すなわち、非自壊的または自壊的である。非自壊的スパーサー単位は、スパーサー単位の一部または全体が、リガンド-薬物コンジュゲートからのアミノ酸単位の切断、特に酵素処理による切断の後、薬物部分に結合されたままであるスパーサー単位である。非自壊的スパーサー単位の例には、(グリシン-グリシン)スパーサー単位およびグリシンスパーサー単位(両方ともスキーム1に表す)(下記)が含まれるが、これらに限定されない。グリシン-グリシンスパーサー単位またはグリシンスパーサー単位を含むコンジュゲートが、酵素(例えば、腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼまたはリンパ球関連プロテアーゼ)による酵素切断を経る場合、グリシン-グリシン-薬物部分またはグリシン-薬物部分はL-Aa-Ww-から切断される。一実施形態において、独立した加水分解反応が標的細胞の中で起こり、グリシン-薬物部分結合を切断して、薬物を遊離させる。

20

#### 【0256】

##### スキーム1

いくつかの実施形態において、非自壊的スパーサー単位(-Y-)は、-Gly-である。いくつかの実施形態において、非自壊的スパーサー単位(-Y-)は、-Gly-Gly-である。

#### 【0257】

一実施形態において、スパーサー単位が存在しない(y=0)薬物-リンカーコンジュゲート、または製薬上許容されるその塩または溶媒和物が提供される。

30

#### 【0258】

あるいは、自壊的スパーサー単位を含むコンジュゲートは、-Dを放出することができる。本明細書で用いるように、用語「自壊的スパーサー」は、間隔のあいた2つの化学部分を安定した三者構成の分子と一緒に共有結合させることができる、二官能性化学部分を指す。第1の部分へのその結合が切断されると、それは第2の化学部分から自発的に分離する。

#### 【0259】

いくつかの実施形態において、-Y<sub>y</sub>-は、そのフェニレン部分がQ<sub>m</sub>で置換されているp-アミノベンジルアルコール(PAB)単位(スキーム2および3を参照)であり、上式で、Qは、-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル、-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル、-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル、-O-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキル)、-O-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルケニル)、-O-(C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキニル)、-ハロゲン、-ニトロまたは-シアノであり；mは、0~4の範囲の整数である。アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、単独で、または別の基の一部分として、本明細書で定義されるA1により任意により置換することができる。

40

#### 【0260】

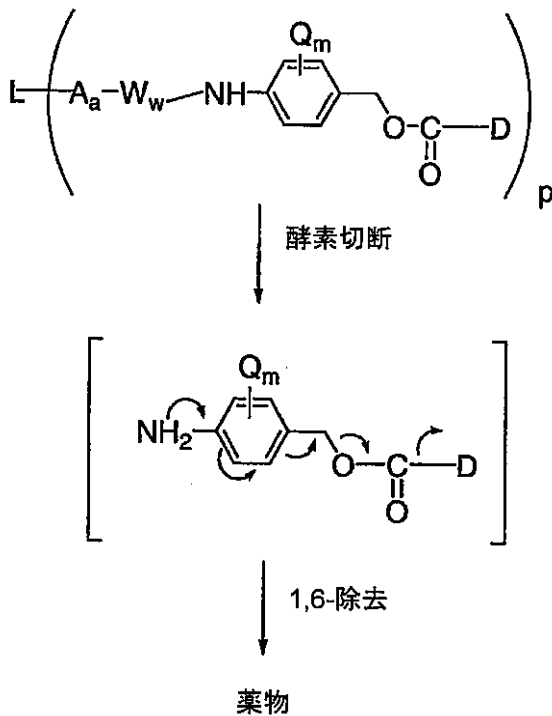
いくつかの実施形態において、-Y-は、PAB基のアミノ窒素原子によって-W<sub>w</sub>-に連結され、カーボネート、カルバメートまたはエーテル基によって-Dに直接に連結されるPAB基である。いかなる特定の理論またはメカニズムによっても束縛されることなく、スキーム2は、Toki et al., 2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872によって記載される、カルバメー

50

トまたはカーボネート基によって-Dに直接に結合されるPAB基の薬物放出の可能な機構を表す。

【化16】

スキーム2



10

20

【0261】

スキーム2では、Qは、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_1 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_1 \sim C_8$ アルキニル、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキニル)、 $-ハロゲン$ 、 $-ニトロ$ または $-シアノ$ であり；mは、0～4の範囲の整数であり；pは、1～約20の範囲である。アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、単独で、または別の基の一部として、本明細書で定義されるA1で、任意により置換することができる。

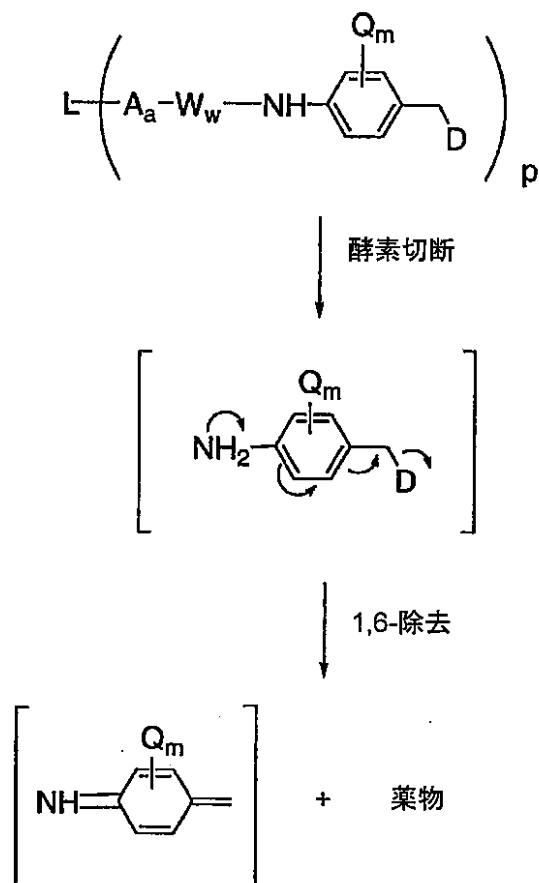
30

【0262】

いかなる特定の理論またはメカニズムによっても束縛されることなく、スキーム3は、エーテルまたはアミン連結によって-Dに直接に結合されるPAB基の薬物放出の可能な機構を表し、式中、Dは、薬物単位の一部である酸素または窒素基を含む。

## 【化 17】

スキーム3



10

20

## 【0263】

スキーム3では、Qは、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_1 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_1 \sim C_8$ アルキニル、 $-O-$ ( $C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-$ ( $C_1 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-$ ( $C_1 \sim C_8$ アルキニル)、 $-ハロゲン$ 、 $-ニトロ$ または $-シアノ$ であり；mは、0～4の範囲の整数であり；pは、1～約20の範囲である。アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、単独で、または別の基の一部として、本明細書で定義されるA1で、任意により置換することができる。

30

## 【0264】

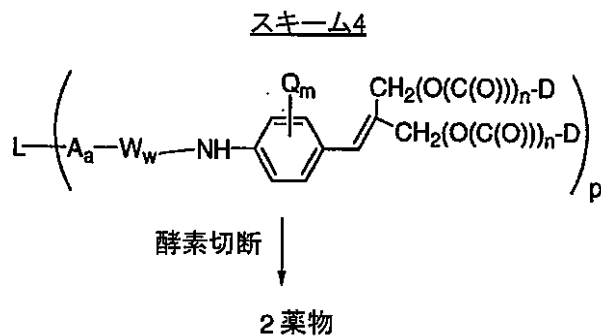
自壊的スペーサーの他の例には、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体(Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)およびオルトまたはパラ-アミノベンジルアセタールなどのPAB基に電子的に類似している芳香族化合物が含まれるが、これらに限定されない。アミド結合加水分解の後に環化を経るスペーサー、例えば、置換および非置換4-アミノ酪酸アミド(Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2:223)、適切に置換されたビシクロ[2.2.1]およびビシクロ[2.2.2]環系(Storm et al., 1972, 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)を用いることができる。グリシンの位置で置換されるアミン含有薬物の除去(Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27:1447)も、自壊的スペーサーの例である。

40

## 【0265】

一実施形態において、スペーサー単位は、スキーム4に表す分枝状ビス(ヒドロキシメチル)-スチレン(BHMS)単位であり、それは、複数の薬物を組み込み、放出するために用いることができる。

## 【化18】



10

## 【0266】

スキーム4では、Qは、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_1 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_1 \sim C_8$ アルキニル、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキニル)、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{ニトロ}$ または $-\text{シアノ}$ であり；mは、0～4の範囲の整数であり；nは、0または1であり；pは、1～約20の範囲である。アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、単独で、または別の基の一部として、本明細書で定義されるA1で、任意により置換することができる。

## 【0267】

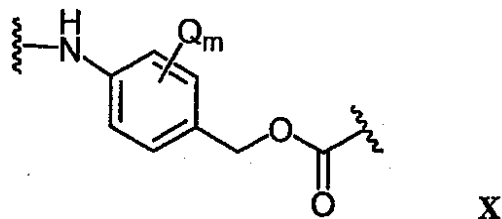
いくつかの実施形態において、-D部分は、同じである。さらに別の実施形態において、-D部分は異なる。

## 【0268】

一態様において、スペーサー単位(-Y<sub>y</sub>-)は、式(X)～(XII)によって表され：

20

## 【化19】

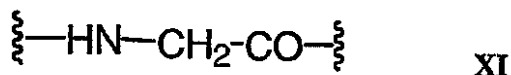


## 【0269】

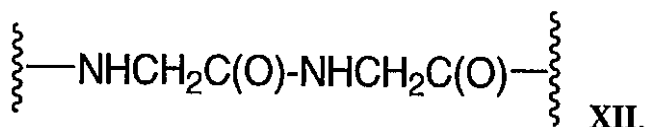
式中、Qは、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_1 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_1 \sim C_8$ アルキニル、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキニル)、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{ニトロ}$ または $-\text{シアノ}$ であり；mは、0～4の範囲の整数である。アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、単独で、または別の基の一部として、本明細書で定義されるA1で、任意により置換することができる。

30

## 【化20】



および

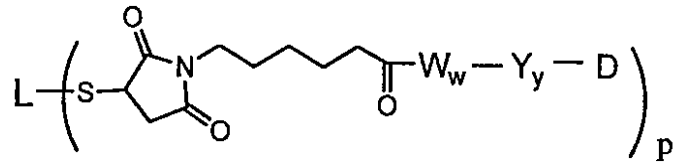


40

## 【0270】

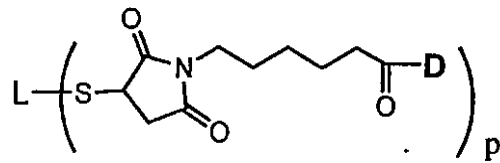
リガンド-薬物コンジュゲート化合物を含む式IおよびIIの実施形態は、以下を含むことができる：

## 【化 2 1】



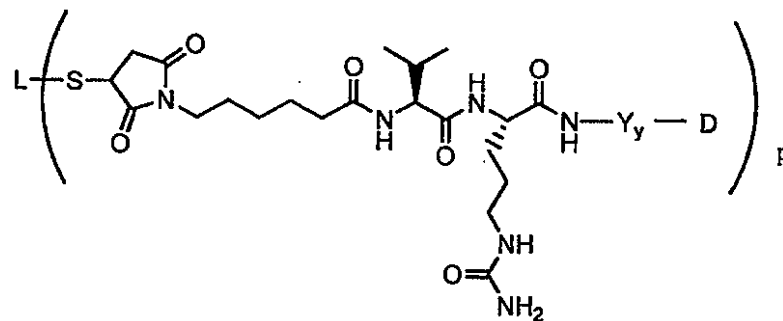
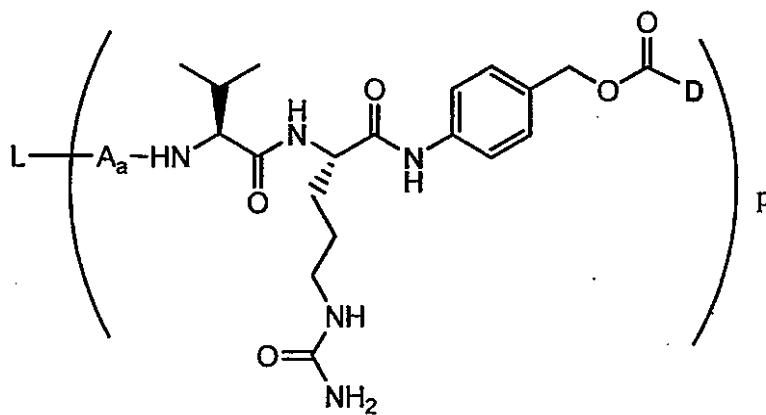
式中、wおよびyはそれぞれ0、1または2である、  
および、

## 【化 2 2】

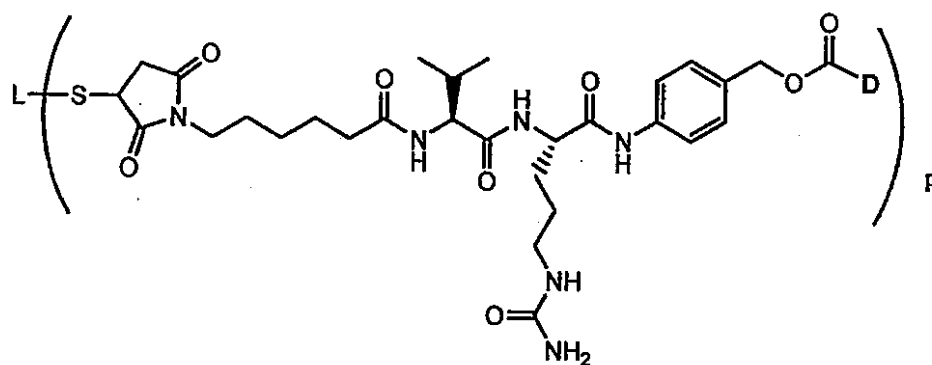


式中、wおよびyはそれぞれ0である、

## 【化 2 3】



, および



## 【 0 2 7 1 】

薬物単位



薬物部分(D)は、任意の細胞毒性性、細胞分裂停止性または免疫調節性(例えば、免疫抑制性)薬物であってよい。Dは、スパーサー単位と、アミノ酸単位と、ストレッチャー単位と、またはリガンド単位と結合を形成することができる原子を有する、薬物単位(部分)である。いくつかの実施形態において、薬物単位Dは、スパーサー単位と結合を形成することができる窒素原子を有する。本明細書で用いる場合、用語「薬物単位」および「薬物部分」は同義であり、互換的に用いられる。

#### 【0272】

細胞毒性薬剤または免疫調節薬剤の有用な部類には、例えば、抗チューブリン剤、オーリスタチン、DNA副溝結合剤、DNA複製阻害剤、アルキル化剤(例えば、シスプラチン、モノ(白金)複合体、ビス(白金)複合体および三核白金複合体、ならびにカルボプラチンなどの白金複合体)、アントラサイクリン、抗生物質、抗葉酸剤、代謝拮抗物質、化学療法感作物質、デュオカルマイシン、カンプトセシン、エトポシド、フッ化ピリミジン、イオノフォア、レクシトロプシン、ニトロソウレア、platinol、前形成性化合物、プリン代謝拮抗物質、ピューロマイシン、放射線感作物質、ステロイド、タキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、ピンカアルカロイドなどが含まれる。

#### 【0273】

個々の細胞毒性薬剤または免疫調節薬剤には、例えば、アンドロゲン、アントラマイシン(AMC)、アスパラギナーゼ、5-アザシチジン、アザチオプリン、プレオマイシン、ブスルファン、ブチオニンスルホキシイミン、カリケアマイシン、カンプトセシン、カルボプラチン、カルムスチン(BSNU)、CC-1065、クロラムブシル、シスプラチン、コルヒチン、シクロホスファミド、シタラビン、シチジンアラビノシド、サイトカラシンB、ダカルバジン、ダクチノマイシン(旧アクチノマイシン)、ダウノルビシン、デカルバジン、ドセタキセル、ドキソルビシン、エトポシド、エストロゲン、5-フルオルデオキシウリジン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、グラミシジンD、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イリノテカン、ロムスチン(CCNU)、マイタンシン、メクロレタミン、メルファラン、6-メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトラマイシン、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ニトロイミダゾール、パクリタキセル、パリトキシン、プリカマイシン、プロカルビジン、リゾキシン、ストレプトゾトシン、テノポシド、6-チオグアニン、チオテバ、トポテカン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ビノレルビン、VP-16およびVM-26が含まれる。

#### 【0274】

いくつかの典型的な実施形態において、適する細胞毒性薬剤には、例えば、DNA副溝結合剤(例えば、エンジンおよびレクシトロプシン、CBI化合物;米国特許第6,130,237号も参照)、デュオカルマイシン、タキサン(例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル)、ピューロマイシン、ピンカアルカロイド、CC-1065、SN-38、トポテカン、モルホリノ-ドキソルビシン、リゾキシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、エキノマイシン、コンブレタスタチン、ネトロプシン、エポチロンAおよびB、エストラムスチン、クリプトフィシン、セマドチン、マイタンシノイド、ジスコデルモリド、エロイテロピンおよびミトキサントロンが含まれる。

#### 【0275】

いくつかの実施形態において、薬物は抗チューブリン剤である。抗チューブリン剤の例には、オーリスタチン、タキサン(例えば、Taxol(登録商標)(パクリタキセル)、Taxotere(登録商標)(ドセタキセル))、T67(Tularik)およびピンカアルカロイド(例えば、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシンおよびビノレルビン)が含まれるが、これらに限定されない。他の抗チューブリン剤には、例えば、バックチン誘導体、タキサン類似体(例えば、エポチロンAおよびB)、ノコダゾール、コルヒチンおよびコルシミド、エストラムスチン、クリプトフィシン、セマドチン、マイタンシノイド、コンブレタスタチン、ジスコデルモリドおよびエロイテロピンが含まれる。

#### 【0276】

一部の実施形態において、細胞毒性薬剤は、抗チューブリン剤の別の群であるマイタン

10

20

30

40

50

シノイドである。例えば、具体的な実施形態において、マイタンシノイドは、マイタンシンまたはDM-1である(ImmunoGen, Inc.; Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131も参照)。

【0277】

いくつかの実施形態において、薬物は、オーリスタチンE(当技術分野でドラスタチン-10の誘導体としても知られる)またはその誘導体などのオーリスタチンである。一般的に、オーリスタチンE誘導体は、例えば、オーリスタチンEとケト酸との間で形成されるエステルである。例えば、オーリスタチンEをパラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応させて、それぞれAEBおよびAEVBを生成することができる。他の一般的なオーリスタチン誘導体には、AFP、MMAFおよびMMAEが含まれる。オーリスタチン誘導体の合成および構造は、米国特許出願公開第2003-0083263号、同第2005-0238649号および同第2005-0009751号; 国際特許出願公開第04/010957号、国際特許出願公開第02/088172号ならびに米国特許第6,323,315号; 同第6,239,104号; 同第6,034,065号; 同第5,780,588; 同第5,665,860号; 同第5,663,149号; 同第5,635,483号; 同第5,599,902号; 同第5,554,725号; 同第5,530,097号; 同第5,521,284号; 同第5,504,191号; 同第5,410,024号; 同第5,138,036号; 同第5,076,973号; 同第4,986,988号; 同第4,978,744号; 同第4,879,278号; 同第4,816,444号; および同第4,486,414号に記載され、これらはそれぞれ、参照によりその全体がすべての目的で本明細書に組み込まれる。

10

【0278】

オーリスタチンは、微小管動態ならびに核および細胞の分裂を妨害し、抗癌活性を有することがわかっている。本発明のオーリスタチンは、チューブリンに結合し、CD19発現細胞株に対する細胞毒性または細胞増殖抑制性の効果を発揮することができる。オーリスタチンまたは結果として生じる抗体-薬物コンジュゲートが、所望の細胞株に対して細胞増殖抑制性または細胞毒性性の効果を発揮するかどうかを判定するために用いることができる、当技術分野で公知のいくつかの異なるアッセイがある。例えば、実施例7を参照されたい。

20

【0279】

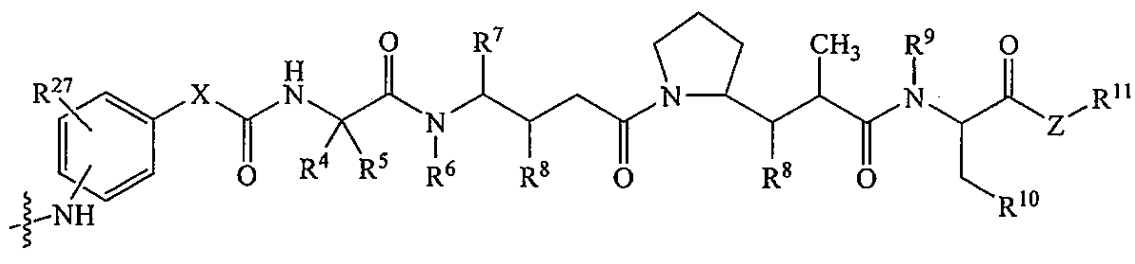
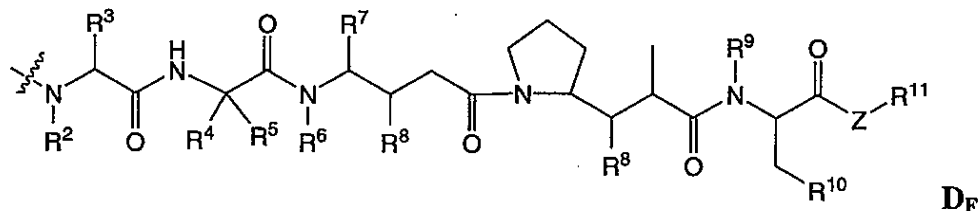
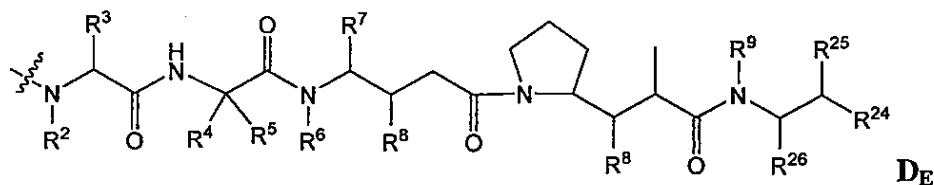
化合物がチューブリンに結合するかどうかを判定する方法が、当技術分野で公知である。例えば、Muller et al., Anal. Chem 2006, 78, 4390-4397; Hamel et al., Molecular Pharmacology, 1995 47: 965-976; および Hamel et al., The Journal of Biological Chemistry, 1990 265:28, 17141-17149を参照。本発明の目的のために、チューブリンへの化合物の相対親和性を判定することができる。本発明のいくつかの好ましいオーリスタチンは、チューブリンへのMMAEの結合親和性よりも10倍低い(弱い親和性)ものから、チューブリンへのMMAEの結合親和性よりも10倍、20倍または100倍も高い(高い親和性)親和性で、チューブリンに結合する。

30

【0280】

いくつかの実施形態において、-Dは、式D<sub>E</sub>、D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>:

## 【化 2 4】



のオーリスタチン、または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物であり、  
式中、各位置で独立に、

$R^2$  は、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニルまたは  $C_2 \sim C_{20}$  アルキニルであり、

$R^3$  は、H、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルキニル、炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン(炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン(炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン(炭素環)、アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン(アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン(アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン(アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン(複素環)、または  $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン(複素環)であり、

$R^4$  は、H、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルキニル、炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン(炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン(炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン(炭素環)、アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン(アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン(アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン(アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン(複素環)、または  $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン(複素環)であり、

$R^5$  は、Hまたは  $C_1 \sim C_8$  アルキルであり、

あるいは、 $R^4$  および  $R^5$  は一緒になって炭素環を形成し、式  $-(CR^aR^b)_s-$  を有し、式中、 $R^a$  および  $R^b$  は独立に H、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルキニルまたは炭素環であり、 $s$  は 2、3、4、5 または 6 であり、

$R^6$  は、H、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニルまたは  $C_2 \sim C_{20}$  アルキニルであり、

$R^7$  は、H、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルキニル、炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン(炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン(炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン(炭素環)、アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン(アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン(アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン(アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン(複素環)、または  $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン(複素環)であり、

各  $R^8$  は独立に、H、OH、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルキニル、 $-O$ 、 $-(C_1 \sim C_{20}$  アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$  アルケニル)、 $-O-(C_1 \sim C_{20}$  アルキニル)または炭素環で

あり、

$R^9$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、

$R^{24}$ は、アリール、複素環または炭素環であり、

$R^{25}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、炭素環、 $-O-(C_1 \sim C_{20}$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルキニル)、または $OR^{18}$ であり、式中、 $R^{18}$ はH、ヒドロキシル保護基、または直接結合であって $OR^{18}$ が=Oを表し、

$R^{26}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルもしくは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、アリール、複素環または炭素環であり、

$R^{10}$ は、アリールまたは複素環であり、

Zは、O、S、NHまたは $NR^{12}$ であり、式中、 $R^{12}$ は $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、

$R^{11}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(炭素環)、アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 、または $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ であり、

mは、1～1000の範囲の整数であり、

$R^{13}$ は、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキレン、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニレンまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニレンであり、

$R^{14}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、

$R^{15}$ は各発生ごとに独立に、H、COOH、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $-(CH_2)_n-SO_3-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、

$R^{16}$ は各発生ごとに独立に、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルまたは $-(CH_2)_n-COOH$ であり、

nは、0～6の範囲の整数であり、

$R^{27}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $O-(C_1 \sim C_{20}$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルキニル)、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-COOH$ または $-C(O)OR^{28}$ であり、式中、 $R^{28}$ はH、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、アリール、複素環、 $-(CH_2CH_2O)_r-H$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_3$ または $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2CH_2C(O)OH$ であり、式中、rは1～10の範囲の整数であり、

Xは $-(CR^{29}_2)_1-$ であり、式中、 $R^{29}$ はH、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、lは0～10の範囲の整数であり、

式中、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環および複素環基は、単独で、または別の基の一部として、任意により置換される。

#### 【0281】

式 $D_E$ 、 $D_F$ または $D_Z$ のオーリスタチンには、式中、

$R^2$ は、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、それぞれは、独立にA1から選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^3$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)であり；前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン基は、単独で、または別の基の一部として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、単独で、または別の基の一部として、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、単独で、または別の基の一

10

20

30

40

50

部分として、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環基は、単独で、または別の基の一部として、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^4$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)であり;前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン基は、単独で、または別の基の一部として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、単独で、または別の基の一部として、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、単独で、または別の基の一部として、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環基は、単独で、または別の基の一部として、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^5$ は、Hまたは $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、

あるいは、 $R^4$ および $R^5$ は一緒になって炭素環を形成し、式 $-(CR^aR^b)_s-$ を有し、式中、 $R^a$ および $R^b$ は独立にH、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $C_2 \sim C_8$ アルキニルまたは炭素環であり、sは2、3、4、5または6であり、

$R^6$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^7$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)であり;前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン基は、単独で、または別の基の一部として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、単独で、または別の基の一部として、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、単独で、または別の基の一部として、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環基は、単独で、または別の基の一部として、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

各 $R^8$ は独立に、H、OH、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $-O-(C_1 \sim C_{20}$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルケニル)、 $-O-(C_1 \sim C_{20}$ アルキニル)または炭素環であり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、単独で、または別の基の一部として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環は、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^9$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{24}$ は、アリール、複素環または炭素環であり、式中、前記炭素環基は、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環基は、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{25}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、炭素環、OH、-

O-(C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキル)、-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニル)、-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニル)またはOR<sup>18</sup>から選択され、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、単独で、または別の基の一部分として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環は、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

R<sup>18</sup>は、H、ヒドロキシル保護基、または直接結合であってOR<sup>18</sup>が=Oを表し、

R<sup>26</sup>は、H、C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニルまたは炭素環から選択され、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

10

R<sup>10</sup>は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換されるアリール、または、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換される複素環であり、

Zは、O、S、NHまたはNR<sup>12</sup>であり、式中、R<sup>12</sup>は、C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニルまたはC<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニルであり、それぞれは、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

R<sup>11</sup>は、H、C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニル、炭素環、-C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキレン(炭素環)、-C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニレン(炭素環)、-C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニレン(炭素環)、アリール、-C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキレン(アリール)、-C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニレン(アリール)、-C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニレン(アリール)、複素環、-C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキレン(複素環)、-C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニレン(複素環)、-C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニレン(複素環)、-(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>、または-(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>であり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環は、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

20

mは、1~1000の範囲の整数であり、

R<sup>13</sup>は、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキレン、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニレンまたはC<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニレンであり、それぞれは、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

R<sup>14</sup>は、H、C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニルまたはC<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

30

R<sup>15</sup>は各発生ごとに独立に、H、COOH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキル、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニルまたは-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

R<sup>16</sup>は各発生ごとに独立に、H、C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニルまたは-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOHであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

nは、0~6の範囲の整数であり、

40

R<sup>27</sup>は、H、C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニル、O-(C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキル)、-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニル)、-O-(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニル)、ハロゲン、-NO<sub>2</sub>、-COOHまたは-C(O)OR<sup>28</sup>であり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、R<sup>28</sup>は、H、C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニル、アリール、複素環、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-H、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>3</sub>または-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OHであり、式中、rは1~10の範囲の整数であり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環基は、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

50

Xは $-(CR^{29})_1-$ であり、式中、 $R^{29}$ はH、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、Iは0～10の範囲の整数であり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

A1は、ハロゲン、任意により置換された $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルケニル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルキニル})$ 、任意により置換された-アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ および-CNであり、式中、各 $R'$ は、H、任意により置換された $-C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ 、または任意により置換されたアリールから独立に選択され、式中、前記任意により置換された $O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルケニル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルキニル})$ 、任意により置換されたアリール、任意により置換された $C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、および任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ 基は、 $-C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、 $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、 $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ 、ハロゲン、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、 $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルケニル})$ 、 $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルキニル})$ 、-アリール、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ および-CNから独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換されてもよく、式中、各 $R''$ は、H、 $-C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、 $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、 $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ またはアリールから独立に選択され、

A2は、ハロゲン、任意により置換された $C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ 、任意により置換された $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルケニル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルキニル})$ 、任意により置換されたアリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ および-CNであり、式中、各 $R'$ は、H、任意により置換された $-C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ 、または任意により置換されたアリールから独立に選択され、式中、前記任意により置換された $-C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ 、任意により置換された $O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルケニル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルキニル})$ 、および任意により置換されたアリール基は、 $-C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、 $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、 $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ 、ハロゲン、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、 $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルケニル})$ 、 $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルキニル})$ 、-アリール、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ および-CNから独立に選択される1つまたは複数の置換基によって任意により置換されてもよく、式中、各 $R''$ は、H、 $-C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、 $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、 $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ またはアリールから独立に選択され、

A3は、ハロゲン、任意により置換された $-C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ 、任意により置換された $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルケニル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルキニル})$ 、任意により置換された-アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ および-CNであり、式中、各 $R'$ は、H、任意により置換された $-C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ 、または任意により置換されたアリールから独立に選択され、式中、前記任意により置換された $-C_1 \sim C_8 \text{アルキル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルケニル}$ 、任意により置換された $-C_2 \sim C_8 \text{アルキニル}$ 、任意により置換された $O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルケニル})$ 、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8 \text{アルキニル})$ 、

アルキニル)、および任意により置換されたアリール基は、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、ハロゲン、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ および $-CN$ から独立に選択される1つまたは複数の置換基によってさらに任意により置換されてもよく、式中、各 $R''$ は、 $H$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニルまたはアリールから独立に選択され、

A4は、任意により置換された $-C_1 \sim C_8$ アルキル、任意により置換された $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、任意により置換された $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、ハロゲン、任意により置換された $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、任意により置換された $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ および $-CN$ であり、式中、各 $R'$ は、 $H$ 、任意により置換された $-C_1 \sim C_8$ アルキル、任意により置換された $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、任意により置換された $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、または任意により置換されたアリールから独立に選択され、式中、前記任意により置換された $O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、任意により置換された $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、任意により置換された $-C_1 \sim C_8$ アルキル、任意により置換された $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、任意により置換された $-C_2 \sim C_8$ アルキニルおよび任意により置換されたアリール基は、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、ハロゲン、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ および $-CN$ から独立に選択される1つまたは複数の置換基によってさらに任意により置換されてもよく、式中、各 $R''$ は、 $H$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニルまたはアリールから独立に選択されるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

#### 【0282】

式D<sub>E</sub>のオーリスタチンには、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環および複素環基が置換されていないものが含まれる。

#### 【0283】

式D<sub>E</sub>のオーリスタチンには、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ および $R^9$ の基が置換されていなく、 $R^{24}$ 、 $R^{25}$ および $R^{26}$ の基が、本明細書に記載されるとおりに任意により置換されるものが含まれる。

#### 【0284】

式D<sub>E</sub>のオーリスタチンには、式中、

$R^2$ は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換される $C_1 \sim C_{20}$ アルキルであり、

$R^3$ および $R^7$ は、 $H$ 、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)から独立に選択され、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン基は、単独で、または別の基の一部として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、単独で、または別の基の一部として、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、単独で、または別の基の一部として、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環基は、単独で、または別の基の一部として、A4から



独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^4$ は、 $H$ 、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)であり、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン基は、単独で、または別の基の一部として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、単独で、または別の基の一部として、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、単独で、または別の基の一部として、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環基は、単独で、または別の基の一部として、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

10

$R^5$ は、 $H$ または $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、

あるいは、 $R^4$ および $R^5$ は一緒になって炭素環を形成し、式 $-(CR^aR^b)_s-$ を有し、式中、 $R^a$ および $R^b$ は $H$ 、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $C_2 \sim C_8$ アルキニルまたは炭素環から独立に選択され、 $s$ は2、3、4、5または6から選択され、

$R^6$ は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換される $C_1 \sim C_{20}$ アルキルであり、

20

各 $R^8$ は、 $OH$ 、 $O-(C_1 \sim C_{20}$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルケニル)または $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルキニル)から独立に選択され、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^9$ は、水素または、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換される $C_1 \sim C_{20}$ アルキルであり、

$R^{24}$ は、アリール、複素環または炭素環であり、式中、前記炭素環基は、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環基は、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{25}$ は、 $OR^{18}$ であり、式中、 $R^{18}$ は、 $H$ 、ヒドロキシル保護基、または直接結合であって $O$   $R^{18}$ が $=O$ を表し、

30

$R^{26}$ は、 $H$ 、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルまたは炭素環から選択され、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

A1、A2、A3およびA4は、本明細書で定義されるとおりであるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

#### 【0285】

式 $D_E$ のオーリスタチンには、式中、

$R^2$ は、 $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、

40

$R^3$ 、 $R^4$ および $R^7$ は、 $H$ 、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)から独立に選択され、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン基は、単独で、または別の基の一部として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、単独で、または別の基の一部として、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は

50

、単独で、または別の基の一部として、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環基は、単独で、または別の基の一部として、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

R<sup>5</sup>は、水素であり、

R<sup>6</sup>は、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキルであり、

各R<sup>8</sup>は、OH、O-(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキル)、-O-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニル)または-O-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニル)から独立に選択され、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

R<sup>9</sup>は、水素またはC<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキルであり、

R<sup>24</sup>は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換されるフェニルであり、 10

R<sup>25</sup>は、OR<sup>18</sup>であり、式中、R<sup>18</sup>は、H、ヒドロキシル保護基、または直接結合であってO R<sup>18</sup>が=Oを表し、

R<sup>26</sup>は、H、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニルまたは炭素環から選択され、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

A1、A2、A3およびA4は、本明細書で定義されるとおりであるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

#### 【0286】

20

式D<sub>E</sub>のオーリスタチンには、式中、

R<sup>2</sup>は、メチルであり、

R<sup>3</sup>は、H、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニルまたはC<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

R<sup>4</sup>は、H、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニル、単環式C<sub>3</sub>～C<sub>6</sub>炭素環、C<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>アリール、-C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキレン(C<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>アリール)、C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニレン(C<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>アリール)、-C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニレン(C<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>アリール)、-C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキレン(単環式C<sub>3</sub>～C<sub>6</sub>炭素環)、-C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニレン(単環式C<sub>3</sub>～C<sub>6</sub>炭素環)、-C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニレン(単環式C<sub>3</sub>～C<sub>6</sub>炭素環)であり、式中、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン基は、単独で、または別の基の一部として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、単独で、または別の基の一部として、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、単独で、または別の基の一部として、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

30

R<sup>5</sup>はH、R<sup>6</sup>はメチルであり、

R<sup>7</sup>は、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルケニルまたはC<sub>2</sub>～C<sub>8</sub>アルキニルであり、

各R<sup>8</sup>は、メトキシであり、

R<sup>9</sup>は、水素またはC<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキルであり、

R<sup>24</sup>は、フェニルであり、

40

R<sup>25</sup>は、OR<sup>18</sup>であり、式中、R<sup>18</sup>は、H、ヒドロキシル保護基、または直接結合であってO R<sup>18</sup>が=Oを表し、

R<sup>26</sup>は、メチルであり、A1、A2およびA3は、本明細書で定義されるとおりであるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

#### 【0287】

式D<sub>E</sub>のオーリスタチンには、式中、

R<sup>2</sup>はメチルであり、R<sup>3</sup>は、HまたはC<sub>1</sub>～C<sub>3</sub>アルキルであり、R<sup>4</sup>はC<sub>1</sub>～C<sub>5</sub>アルキルであり、R<sup>5</sup>はHであり、R<sup>6</sup>はメチルであり、R<sup>7</sup>は、イソプロピルまたはsec-ブチルであり、R<sup>8</sup>はメトキシであり、R<sup>9</sup>は、水素またはC<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキルであり、R<sup>24</sup>はフェニルであり、R<sup>25</sup>はOR<sup>18</sup>であり、式中、R<sup>18</sup>は、H、ヒドロキシル保護基、または直接結合であってOR<sup>18</sup>が=Oを表し 50

、 $R^{26}$ はメチルであるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

【0288】

式D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、式中、

$R^2$ は、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、それぞれは、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^3$ 、 $R^4$ および $R^7$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン( $C_6 \sim C_{10}$ アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)から独立に選択され、式中、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン基は、単独で、または別の基の一部として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、単独で、または別の基の一部として、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、単独で、または別の基の一部として、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環基は、単独で、または別の基の一部として、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^5$ はHであり、

$R^6$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

各 $R^8$ は、H、OH、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $-O-(C_1 \sim C_{20}$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルケニル)、 $-O-(C_1 \sim C_{20}$ アルキニル)または炭素環から独立に選択され、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、単独で、または別の基の一部として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環は、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^9$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{10}$ は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換されるフェニルであり、

Zは、O、S、NHまたは $NR^{12}$ であり、式中、 $R^{12}$ は、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、それぞれは、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{11}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、アリール、複素環、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ または $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ であり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環は、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

mは、1～1000の範囲の整数であり、

$R^{13}$ は、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキレン、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニレンまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニレンであり、それぞれは、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{14}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{15}$ は各発生ごとに独立に、H、COOH、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C$

$_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2 \sim C_{20}$  アルケニルまたは  $-(CH_2)_n-SO_3-C_2 \sim C_{20}$  アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{16}$  は各発生ごとに独立に、H、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルキニルまたは  $-(CH_2)_n-COOH$  であり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$n$  は、0～6の範囲の整数であり、

$R^{27}$  はHであり、

Xは  $-(CR^{29}_2)_1-$  であって、式中、Iは0であり、A1、A2、A3およびA4は、本明細書で定義されるとおりであるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

10

# 【 0 2 8 9 】

式D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、式中、

$R^2$  はメチルであり、

$R^3$ 、 $R^4$ および $R^7$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $C_6 \sim C_{10}$  アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン( $C_6 \sim C_{10}$  アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン( $C_6 \sim C_{10}$  アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン( $C_6 \sim C_{10}$  アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$  アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$  アルケニレン(複素環)または $-C_2 \sim C_{20}$  アルキニレン(複素環)から独立に選択され、式中、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン基は、単独で、または別の基の一部として、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記炭素環基は、単独で、または別の基の一部として、A2から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、単独で、または別の基の一部として、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環基は、単独で、または別の基の一部として、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

20

$R^5$  はHであり、

$R^6$  はメチルであり、

各 $R^8$  はメトキシであり、

30

$R^9$  は、H、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$  アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{10}$  は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換されるアリール、または、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換される複素環であり、

Zは、O、S、NHまたは $NR^{12}$ であり、式中、 $R^{12}$ は、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$  アルキニルであり、それぞれは、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{11}$  は、H、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルキニル、アリール、複素環、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ または $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ であり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記アリール基は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、前記複素環は、A4から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

40

$m$  は、1～1000の範囲の整数であり、

$R^{13}$  は、 $C_2 \sim C_{20}$  アルキレン、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニレンまたは $C_2 \sim C_{20}$  アルキニレンであり、それぞれは、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{14}$  は、H、 $C_1 \sim C_{20}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$  アルケニルまたは $C_2 \sim C_{20}$  アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまた

50

は複数の基によって任意により置換され、

$R^{15}$ は各発生ごとに独立に、 $H$ 、 $COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_{1\sim C_{20}}$ アルキル、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_{2\sim C_{20}}$ アルケニルまたは $-(CH_2)_n-SO_3-C_{2\sim C_{20}}$ アルキニルであり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$R^{16}$ は各発生ごとに独立に、 $H$ 、 $C_1\sim C_{20}$ アルキル、 $C_2\sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2\sim C_{20}$ アルキニルまたは $-(CH_2)_n-COOH$ であり、式中、前記アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、A1から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換され、

$n$ は、0～6の範囲の整数であり、

$R^{27}$ は $H$ であり、

$X$ は $-(CR^{29})_1-$ であって、式中、 $l$ は0であり、A1、A2、A3およびA4は、本明細書で定義されるとおりであるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

#### 【0290】

これらの実施形態のいくつかでは、 $R^{10}$ は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換されているフェニルである。

#### 【0291】

式 $D_F$ のオーリスタチンには、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ および $R^9$ の基が置換されておらず、 $R^{10}$ および $R^{11}$ の基が本明細書に記載されるとおりであるものが含まれる。

#### 【0292】

式 $D_F$ のオーリスタチンには、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環および複素環基が置換されていないものが含まれる。

#### 【0293】

式 $D_F$ のオーリスタチンには、式中、

$R^2$ はメチルであり、 $R^3$ は、 $H$ または $C_1\sim C_3$ アルキルであり、 $R^4$ は $C_1\sim C_5$ アルキルであり、 $R^5$ は $H$ であり、 $R^6$ はメチルであり、 $R^7$ は、イソプロピルまたは $sec$ -ブチルであり、 $R^8$ はメトキシであり、 $R^9$ は、水素または $C_1\sim C_8$ アルキルであり、 $R^{10}$ は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換されるフェニルであり、 $Z$ は、 $O$ 、 $S$ または $NH$ であり、 $R^{11}$ は本明細書で定義されるとおりであるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

#### 【0294】

式 $D_F$ のオーリスタチンには、式中、

$R^1$ は水素であり、 $R^2$ はメチルであり、 $R^3$ は、 $H$ または $C_1\sim C_3$ アルキルであり、 $R^4$ は $C_1\sim C_5$ アルキルであり、 $R^5$ は $H$ であり、 $R^6$ はメチルであり、 $R^7$ は、イソプロピルまたは $sec$ -ブチルであり、 $R^8$ はメトキシであり、 $R^9$ は、水素または $C_1\sim C_8$ アルキルであり、 $R^{10}$ はフェニルであり、 $Z$ は、 $O$ または $NH$ であり、 $R^{11}$ は本明細書で定義されるとおりであるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

#### 【0295】

式 $D_Z$ のオーリスタチンには、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{27}$ 、 $R^{28}$ および $R^{29}$ の基が置換されていなく、 $R^{10}$ および $R^{11}$ の基が本明細書に記載されるとおりであるものが含まれる。

#### 【0296】

式 $D_Z$ のオーリスタチンには、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環および複素環基が置換されていないものが含まれる。

#### 【0297】

式 $D_Z$ のオーリスタチンには、式中、

$R^1$ は水素であり、 $R^2$ はメチルであり、 $R^3$ は、 $H$ または $C_1\sim C_3$ アルキルであり、 $R^4$ は $C_1\sim C_5$ アルキルであり、 $R^5$ は $H$ であり、 $R^6$ はメチルであり、 $R^7$ は、イソプロピルまたは $sec$ -ブチ

10

20

30

40

50

ルであり、 $R^8$ はメトキシであり、 $R^9$ は、水素または $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、

$R^{10}$ は、A3から独立に選択される1つまたは複数の基によって任意により置換されるフェニルであり、Zは、O、SまたはNHであり、 $R^{11}$ は本明細書で定義されるとおりであり、 $R^{27}$ はHであり、Xは $-(CR^{29}_2)_1-$ であって、式中、Iは0であるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

【0298】

式D<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、式中、

$R^1$ は水素であり、 $R^2$ はメチルであり、 $R^3$ は、Hまたは $C_1 \sim C_3$ アルキルであり、 $R^4$ は $C_1 \sim C_5$ アルキルであり、 $R^5$ はHであり、 $R^6$ はメチルであり、 $R^7$ は、イソプロピルまたはsec-ブチルであり、 $R^8$ はメトキシであり、 $R^9$ は、水素または $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、 $R^{10}$ はフェニルであり、 $R^{11}$ は本明細書で定義されるとおりであり、 $R^{27}$ はHであり、Xは $-(CR^{29}_2)_1-$ であって、式中、Iは0であり、Zは、OまたはNHであるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

10

【0299】

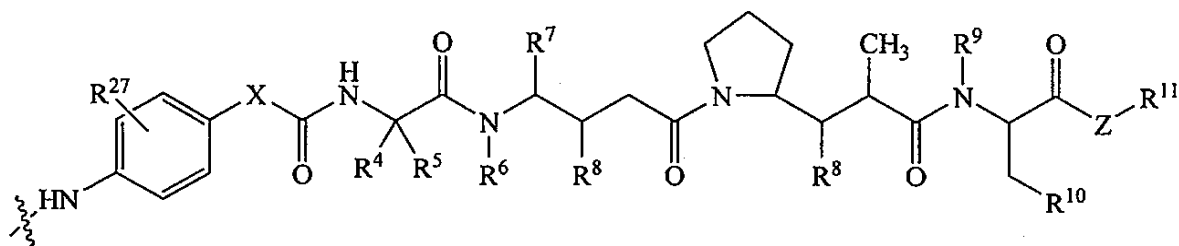
式D<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、 $R^{11}$ が $-(CH_2CH_2O)_r-H$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_3$ または $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2CH_2C(O)OH$ であり、式中、rは1~10の範囲の整数であるオーリスタチン、あるいは、製薬上許容されるその塩または溶媒和物形態が含まれる。

【0300】

式D<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、アミノ末端のフェニル基が、以下:

【化25】

20



に示すようにパラ置換されているものが含まれる。

【0301】

式D<sub>E</sub>、D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、 $R^3$ 、 $R^4$ および $R^7$ が独立にイソプロピルまたはsec-ブチルであり、 $R^5$ が-Hであるものが含まれる。例示的な実施形態において、 $R^3$ および $R^4$ 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。残りの置換基は、本明細書で定義されるとおりである。

30

【0302】

式D<sub>E</sub>、D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、 $R^2$ および $R^6$ がそれぞれメチルであり、 $R^9$ がHであるものが含まれる。残りの置換基は、本明細書で定義されるとおりである。

【0303】

式D<sub>E</sub>、D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、 $R^8$ の各発生が $-OCH_3$ であるものが含まれる。残りの置換基は、本明細書で定義されるとおりである。

【0304】

40

式D<sub>E</sub>、D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、 $R^3$ および $R^4$ がそれぞれイソプロピルであり、 $R^2$ および $R^6$ がそれぞれメチルであり、 $R^5$ がHであり、 $R^7$ がsec-ブチルであり、 $R^8$ の各出現が $-OCH_3$ であり、 $R^9$ がHであるものが含まれる。残りの置換基は、本明細書で定義されるとおりである。

【0305】

式D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、Zが-O-または-NH-であるものが含まれる。残りの置換基は、本明細書で定義されるとおりである。

【0306】

式D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、 $R^{10}$ がアリールであるものが含まれる。残りの置換基は、本明細書で定義されるとおりである。

50

## 【0307】

式D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、R<sup>10</sup>が-フェニルであるものが含まれる。残りの置換基は、本明細書で定義されるとおりである。

## 【0308】

式D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、Zが-O-であり、R<sup>11</sup>がH、メチルまたはt-ブチルであるものが含まれる。残りの置換基は、本明細書で定義されるとおりである。

## 【0309】

式D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、Zが-NHである場合にR<sup>11</sup>は-(R<sup>130</sup>)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>であり、式中、R<sup>15</sup>は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>であり、R<sup>16</sup>は-C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>アルキルまたは-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOHであるものが含まれる。残りの置換基は、本明細書で定義されるとおりである。

10

## 【0310】

式D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>のオーリスタチンには、Zが-NHである場合にR<sup>11</sup>は-(R<sup>130</sup>)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>であり、式中、R<sup>15</sup>は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>Hであるものが含まれる。残りの置換基は、本明細書で定義されるとおりである。

## 【0311】

好ましい実施形態において、Dが式D<sub>E</sub>のオーリスタチンである場合、wは1~12、好ましくは2~12の範囲の整数であり、yは1または2であり、aは好ましくは1である。

## 【0312】

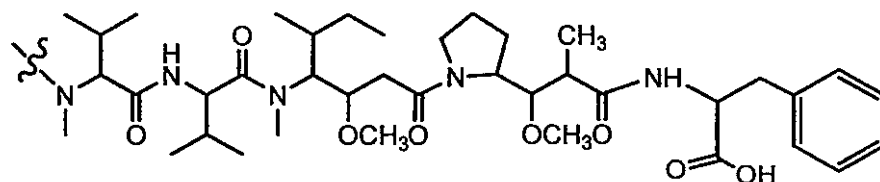
いくつかの実施形態において、Dが式D<sub>F</sub>のオーリスタチンである場合、aは1であり、wおよびyは0である。

20

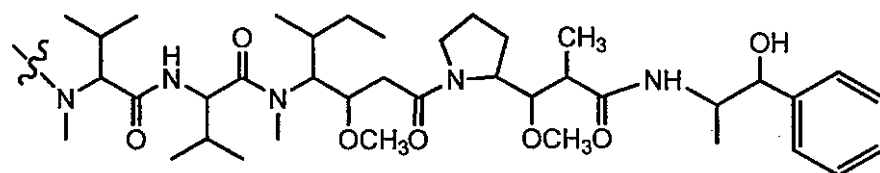
## 【0313】

例示的な薬物単位(-D)には、以下の構造：

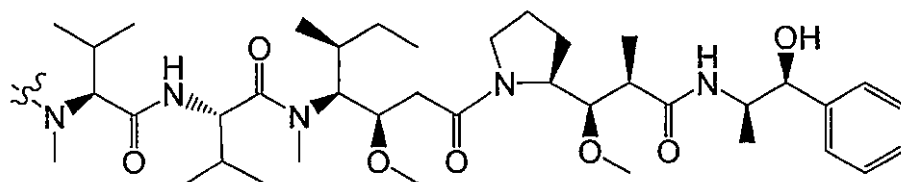
## 【化26】

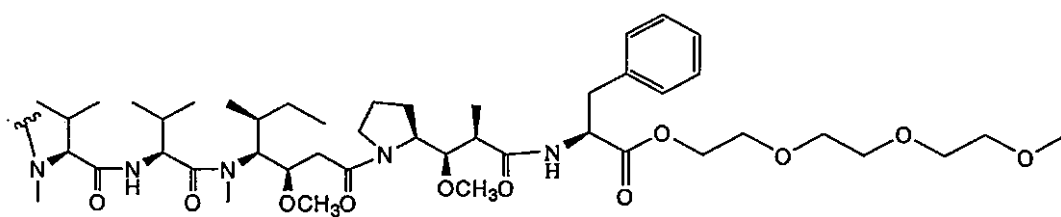
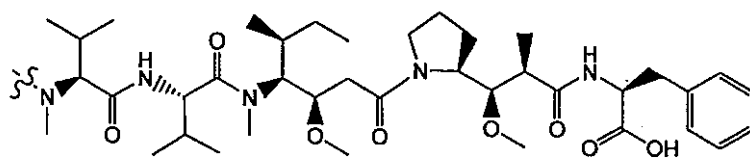


30

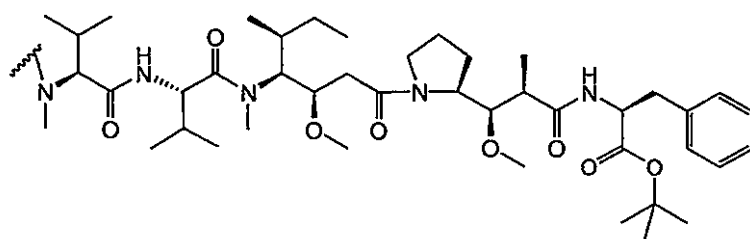


40

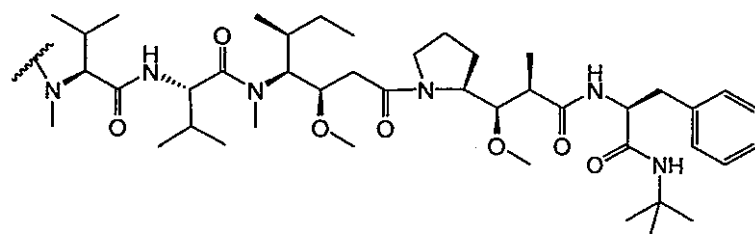




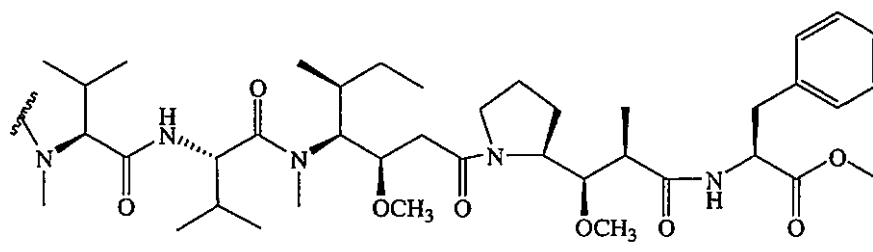
10



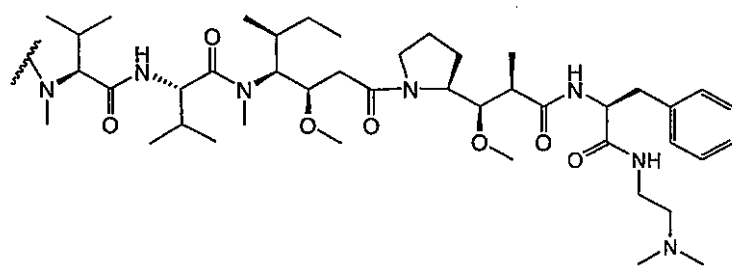
20



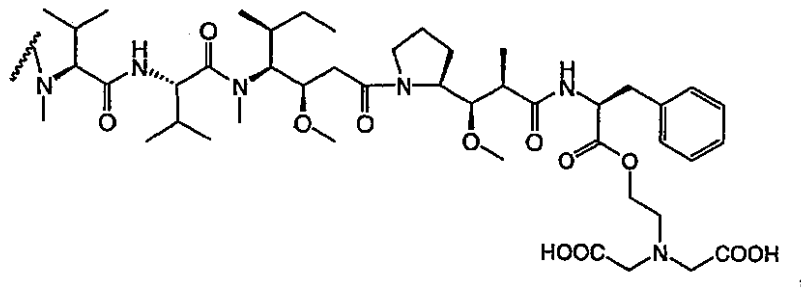
30



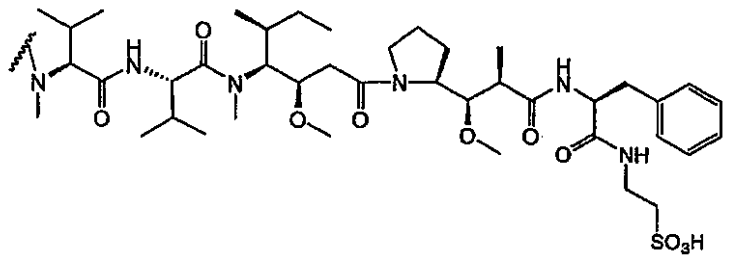
40



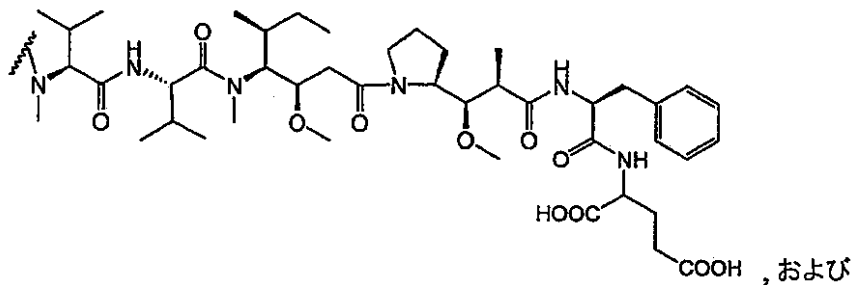




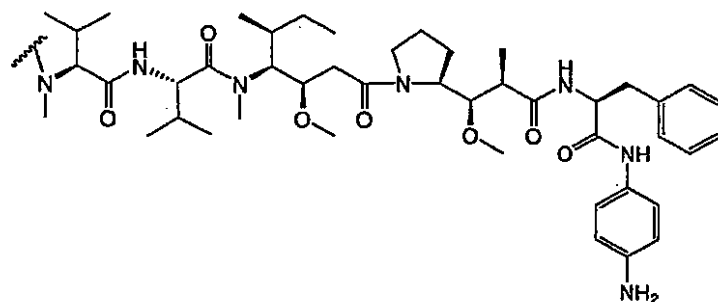
10



20



30



を有する薬物単位、または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物が含まれる。

#### 【0314】

一態様において、それらに限定されないがトリエチレングリコールエステル(TEG)などの親水性の基を、R<sup>11</sup>で薬物単位に結合することができる。理論によって束縛されことなく、親水性の基は、薬物単位の内在化および非凝集に役立つ。

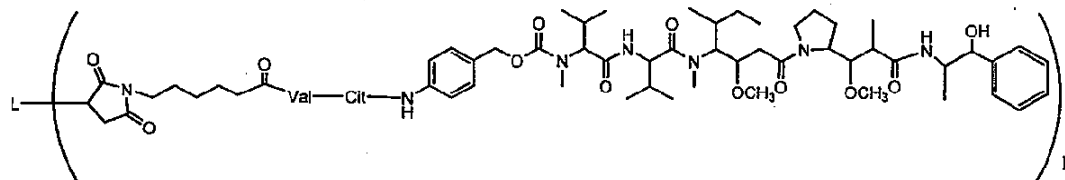
40

#### 【0315】

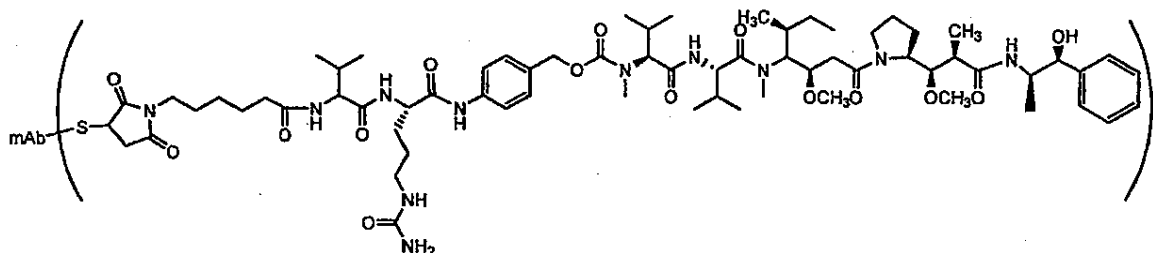
いくつかの実施形態において、薬物単位は、TZT-1027ではない。いくつかの実施形態において、薬物単位は、オーリスタチンE、ドラスタチン10またはオーリスタチンPEではない。

#### 【0316】

例示的なリガンド-薬物コンジュゲート化合物は、以下の構造：

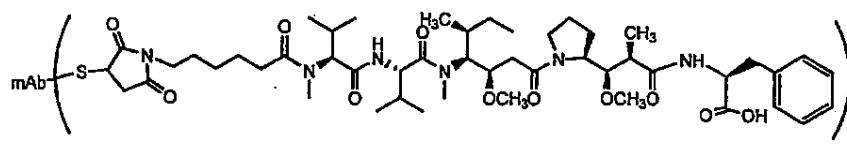
[illegible][illegible]

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



### L-MC-vc-PAB-MMAE

40



**L-MC-MMAF**

【 0 3 1 7 】

50

一部の実施形態において、薬物は代謝拮抗物質である。代謝拮抗物質は、例えば、プリンアンタゴニスト(例えば、アゾチオプリンまたはミコフェノール酸モフェチル)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤(例えば、メトトレキセート)、アシクロビル、ガンシクロビル、ジドブジン、ピダラビン、リババリン、アジドチミジン、シチジンアラビノシド、アマンタジン、ジデオキシウリジン、ヨウ化デオキシウリジン、ポスカルネットまたはトリフルリジンであり得る。

#### 【0318】

他の実施形態において、薬物は、タクロリムス、シクロスポリンまたはラパマイシンである。さらなる実施形態において、薬物は、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アロピュリノール、アルトレタミン、アミホスチン、アナストロゾール、三酸化ヒ素、ベキサロテン、ベキサロテン、カルステロン、カペシタビン、セレコキシブ、クラドリビン、ダーベポエチン、デニロイキンディフチトックス、デクスラゾキサン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピルピシン、エポエチンアルファ、エストラムスチン、エクセメスタン、フィルグラスチム、フロクシウリジン、フルダラビン、フルベストラント、ゲムシタビン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゴセレリン、イダルピシン、イホスファミド、イマチニブメシレート、インターフェロン-2a、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、レバミゾール、メクロレタミンもしくはナイトロジェンマスタード、メゲストロール、メスナ、メトトレキセート、メトキサレン、マイトマイシンC、ミトタン、ナンドロロンフェンプロピオネート、オブレルベキン、オキサリプラチン、パミドロネート、ペガデマゼ、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、ペントスタチン、ピポプロマン、プリカマイシン、ポリフィマーナトリウム、プロカルバジン、キナクリン、ラスブリケース、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロマイド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、ウラシルマスタード、バルルピシン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビノレルビンおよびゾレドロンネートである。

#### 【0319】

いくつかの実施形態において、薬物部分は、免疫調節薬剤である。免疫調節薬剤は、例えば、ガンシクロビル、エタナーセプト、タクロリムス、シクロスポリン、ラパマイシン、シクロホスファミド、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチルまたはメトトレキセートであってよい。あるいは、免疫調節薬剤は、例えば、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)、またはグルココルチコイド類似体(例えば、プレドニゾンもしくはデキサメタゾン)であってよい。

#### 【0320】

いくつかの実施形態において、免疫調節薬剤は、アリアルカルボン酸誘導体、ピラゾール含有誘導体、オキシカム誘導体およびニコチン酸誘導体などの抗炎症剤である。抗炎症剤の類には、例えば、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、5-リポオキシゲナーゼ阻害剤およびロイコトリエン受容体アンタゴニストが含まれる。

#### 【0321】

適するシクロオキシゲナーゼ阻害剤には、メクロフェナム酸、メフェナム酸、カルプロフェン、ジクロフェナク、ジフルニサル、フェンブフェン、フェノプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、ナブメトン、ナプロキセン、スリンダク、テノキシカム、トルメチンおよびアセチルサリチル酸が含まれる。

#### 【0322】

適するリポオキシゲナーゼ阻害剤には、酸化還元阻害剤(例えば、カテコールブタン誘導体、ノルジヒドログアイアレチン酸(NDGA)、マソプロコル、フェニドン、イアノパレン、インダゾリノン、ナファザトロム、ベンゾフラノール、アルキルヒドロキシルアミン)、ならびに非酸化還元阻害剤(例えば、ヒドロキシチアゾール、メトキシアルキルチアゾール、ベンゾピランおよびその誘導体、メトキシテトラヒドロピラン、ボズウェル酸およびボズウェル酸のアセチル化誘導体、および、シクロアルキル基で置換されたキノリンメトキシフェニル酢酸)、ならびに酸化還元阻害剤の前駆体が含まれる。

## 【 0 3 2 3 】

他の適するリポオキシゲナーゼ阻害剤には、抗酸化剤(例えば、フェノール、没食子酸プロピル、フラボノイドおよび/もしくは天然基質含有フラボノイド、フラボンのヒドロキシル化誘導体、フラボノール、ジヒドロケルセチン、ルテオリン、ガラングイン、オロポール、カルコン誘導体、4,2',4'-トリヒドロキシカルコン、オルトアミノフェノール、N-ヒドロキシ尿素、ベンゾフラノール、エブセレン、ならびに還元セレン含有酵素の活性を増加させる種)、鉄キレート化剤(例えば、ヒドロキサム酸およびその誘導体、N-ヒドロキシ尿素、2-ベンジル-1-ナフトール、カテコール、ヒドロキシルアミン、カルノソルトロロックSC、カテコール、ナフトール、スルファサラジン、チロイトン、5-ヒドロキシアントラニル酸および4-( -アリールアルキル)フェニルアルカン酸)、イミダゾール含有化合物(例えば、ケトコナゾールおよびイトラコナゾール)、フェノチアジンならびにベンゾピラン誘導体が含まれる。

10

## 【 0 3 2 4 】

他のさらなる適するリポオキシゲナーゼ阻害剤には、エイコサノイド阻害剤(例えば、オクタデカテトラエン、エイコサテトラエン、ドコサペンタエン、エイコサヘキサエンおよびドコサヘキサエン酸およびそのエステル、PGE1(プロスタグランジンE1)、PGA2(プロスタグランジンA2)、ビプロストール、15-モノヒドロキシエイコサテトラエン、15-モノヒドロキシエイコサトリエンおよび15-モノヒドロキシエイコサペンタエン酸、ならびにロイコトリエンB5、C5およびD5)、カルシウム流動阻害化合物、フェノチアジン、ジフェニルブチルアミン、ベラパミル、フスコシド、クルクミン、クロロゲン酸、カフェー酸、5,8,11,14-エイコサテトラエン酸(ETYA)、ヒドロキシフェニルレチナミド、イオナパレン、エスクリン、ジエチルカルバマジン、フェナントロリン、バイカレイン、プロキシクロミル、チオエーテル、硫化ジアリルならびにジ-(1-プロペニル)スルフィドが含まれる。

20

## 【 0 3 2 5 】

ロイコトリエン受容体アンタゴニストには、カルシトリオール、オンタゾラスト、Bayer Bay-x-1005、Ciba-Geigy CGS-25019C、エブセレン、Leo Denmark ETH-615、Lilly LY-293111、Ono ONO-4057、Terumo TMK-688、Boehringer Ingelheim BI-RM-270、Lilly LY 213024、Lilly LY 264086、Lilly LY 292728、Ono ONO LB457、Pfizer 105696、Purdue Frederick PF 10042、Rhone-Poulenc Rorer RP 66153、SmithKline Beecham SB-201146、SmithKline Beecham SB-201993、SmithKline Beecham SB-209247、Searle SC-53228、Sumitomo SM 15178、American Home Products WAY 121006、Bayer Bay-o-8276、Warner-Lambert CI-987、Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982、Lilly LY 233569、Lilly LY-255283、MacroNex MNX-160、Merck and Co. MK-591、Merck and Co. MK-886、Ono ONO-LB-448、Purdue Frederick PF-5901、Rhone-Poulenc Rorer RG 14893、Rhone-Poulenc Rorer RP 66364、Rhone-Poulenc Rorer RP 69698、Shionogi S-2474、Searle SC-41930、Searle SC-50505、Searle SC-51146、Searle SC-52798、SmithKline Beecham SK&F-104493、Leo Denmark SR-2566、Tanabe T-757およびTeijin TEI-1338が含まれる。

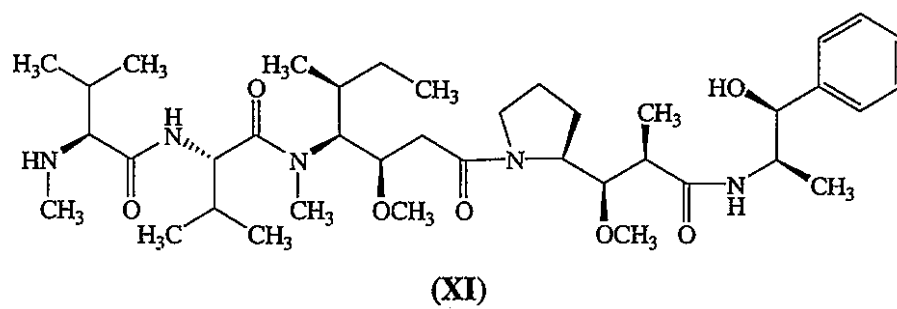
30

## 【 0 3 2 6 】

一部の実施形態において、細胞毒性薬剤または細胞増殖抑制薬剤は、ドラスタチンである。一部の実施形態において、細胞毒性薬剤または細胞増殖抑制薬剤は、オーリスタチンの類である。したがって、具体的な実施形態において、細胞毒性薬剤または細胞増殖抑制薬剤は、MMAE(式XI)である。別の具体的な実施形態において、細胞毒性薬剤または細胞増殖抑制薬剤は、AFP(式XVI)である。

40

【化 2 8】

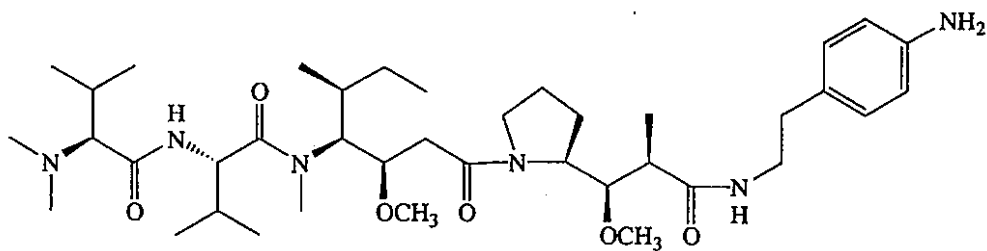


【 0 3 2 7】

10

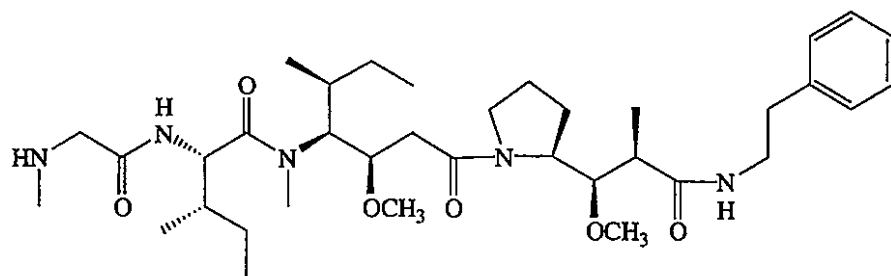
一部の実施形態において、細胞毒性薬剤または細胞増殖抑制薬剤は、式XII～XXI:

【化 2 9】



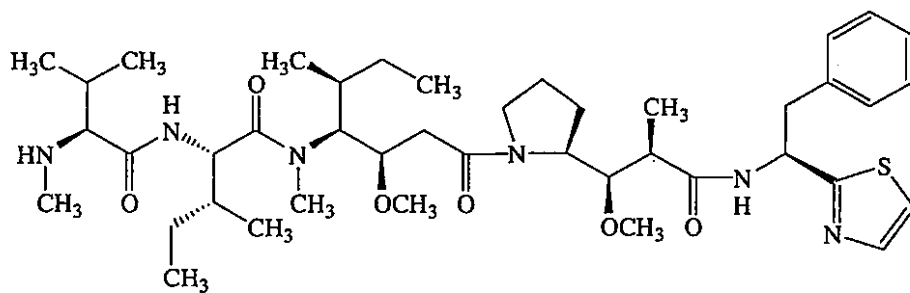
(XII)

10



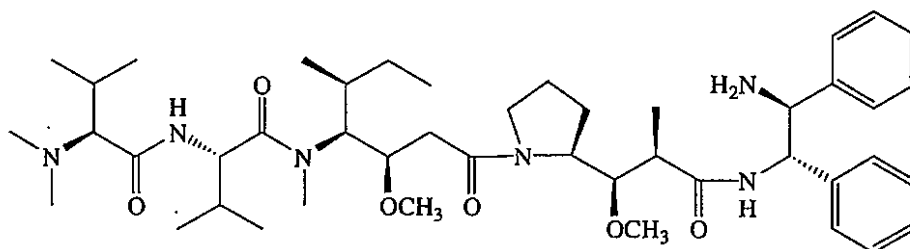
(XIII)

20



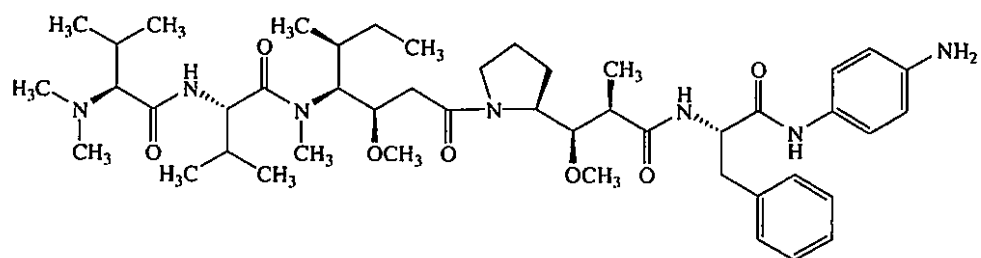
(XIV)

30



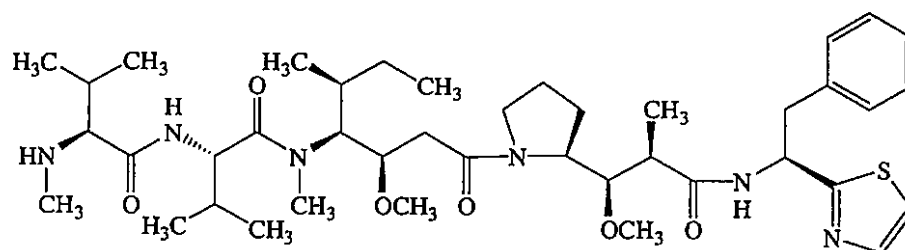
(XV)

40



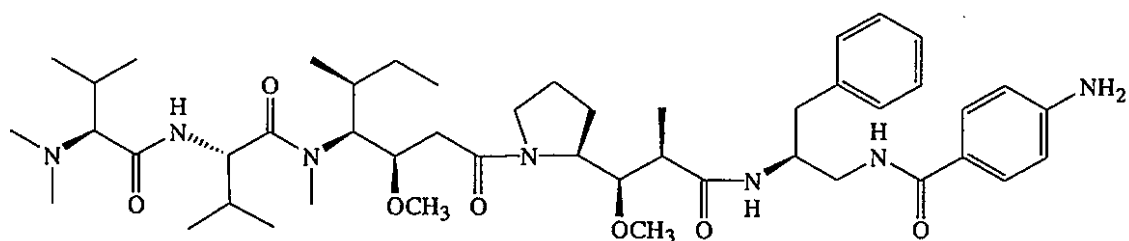
(XVI)

10



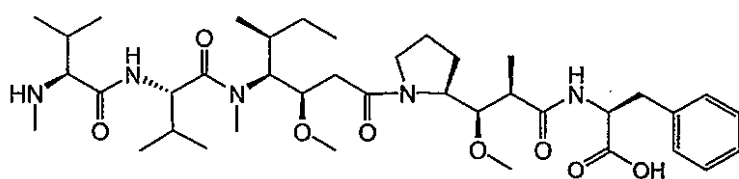
(XVII)

20



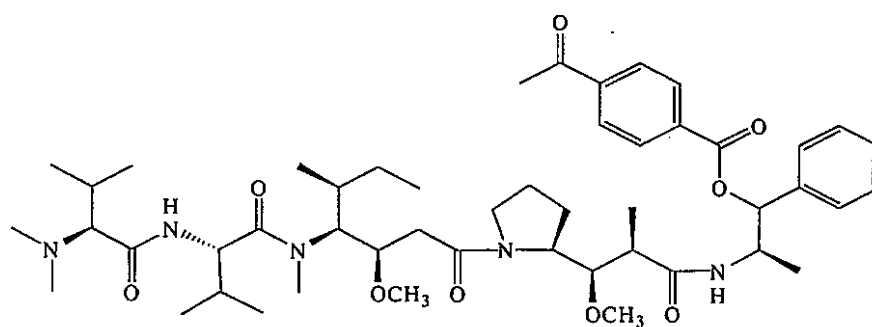
(XVIII)

30

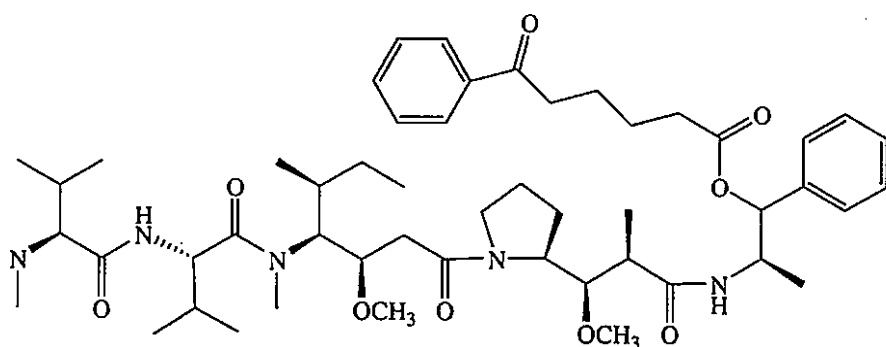


(XIV)

40



## (XX)



10

## (XXI)

の化合物または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物の形態である。

## 【0328】

薬物またはリガンド-薬物コンジュゲートが、細胞に対して細胞増殖抑制効果および/または細胞毒性効果を発揮するかどうか判定する方法は公知である。一般に、リガンド薬物コンジュゲートの細胞毒性活性または細胞増殖抑制活性は、細胞培地でリガンド薬物コンジュゲートの標的タンパク質を発現する哺乳動物の細胞を曝露させること、約6時間～約5

20

## 【0329】

リガンド薬物コンジュゲートが細胞増殖抑制効果を発揮するかどうか判定するために、チミジン組込みアッセイを用いることができる。例えば、96ウェルプレートの1ウェルにつき細胞数5,000個の密度の標的抗原を発現する癌細胞を72時間の間培養し、72時間の最後の8時間の間、0.5  $\mu$ Ciの $^3$ H-チミジンに曝露させることができる。培養細胞への $^3$ H-チミジンの組込みは、リガンド薬物コンジュゲートの存在下および非存在下で測定される。

30

## 【0330】

細胞毒性を判定するために、壊死またはアポトーシス(プログラム細胞死)を測定することができる。壊死は、典型的には、原形質膜の透過性の増加、細胞の膨潤、および原形質膜の破裂を伴う。アポトーシスは、典型的には、膜小疱形成、細胞質の凝縮、および内因性エンドヌクレアーゼの活性化を特徴とする。癌細胞に対するこれらの影響のいずれかの判定は、リガンド薬物コンジュゲートが癌の処置で有用なことを示す。

## 【0331】

細胞生存度は、ニュートラルレッド、トリパンブルーまたはALAMAR(商標)ブルーなどの色素の取り込みを細胞で判定することによって測定することができる(例えば、Page et al., 1993, Intl. J. Oncology 3:473-476を参照)。そのようなアッセイでは、色素を含む

40

## 【0332】

あるいは、死んでいる細胞でなく生きている細胞を検出することによる、哺乳動物細胞の生存および増殖の定量的比色アッセイで、MTTなどのテトラゾリウム塩が用いられる(例えば、Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63を参照)。

## 【0333】

アポトーシスは、例えば、DNA断片化を測定することによって定量化することができる

50



。DNA断片化の定量的なインビトロ判定のための市販の光度測定法が利用可能である。TUNEL(断片化DNA中の標識ヌクレオチドの組込みを検出する)およびELISAベースのアッセイを含むそのようなアッセイの例が、Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals)に記載されている。

#### 【0334】

アポトーシスは、細胞の形態変化を測定することによって判定することもできる。例えば、壊死と同様に、原形質膜統合性の喪失は、ある色素(例えば、蛍光染料、例えばアクリジンオレンジまたは臭化エチジウム)の取り込みを測定することによって判定することができる。アポトーシス細胞数の測定方法が、Duke and Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16)によって記載されている。細胞をDNA色素(例えば、アクリジンオレンジ、臭化エチジウムまたはヨウ化プロピジウム)で標識し、細胞を、内部の核膜沿いのクロマチンの凝集および辺縁趨向について観察することができる。アポトーシスの判定のために測定することができる他の形態変化には、例えば、細胞質の凝縮、膜小胞形成の増加および細胞の縮小が含まれる。

#### 【0335】

アポトーシス細胞の存在は、培養物に付着しているおよび「浮動」している区画で測定することができる。例えば、両区画は、上清を除去し、付着細胞をトリプシン処理し、遠心分離洗浄段階(例えば、2000rpmで10分)の後に調製物を合わせ、アポトーシスを(例えば、DNA断片化を測定することによって)検出することによって収集することができる。(例えば、Piazza et al., 1995, Cancer Research 55:3110-16を参照)。

#### 【0336】

リガンド薬物コンジュゲートの効果は、動物モデルで試験または検証することができる。癌のいくつかの確立されている動物モデルが熟練技術者に公知であり、リガンド薬物コンジュゲートの効力を検査するために、そのいずれかをを用いることができる。そのようなモデルのそれには限定されない例を、以下に記載する。さらに、リガンド薬物コンジュゲートのインビボ効力を検討する小動物モデルは、ヒト腫瘍細胞株を適当な免疫不全齧歯動物の系統、例えば胸腺欠損ヌードマウスまたはSCIDマウスに移植することによって作製することができる。

#### 【0337】

##### リガンド単位

リガンド単位(L)は、リンカー単位の官能基と結合を形成することができる少なくとも1つの官能基を有する。リガンド単位に天然に、化学操作によりまたは工学技術により存在することができる有用な官能基には、スルフヒドリル(-SH)、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシ、炭水化物のアノマーヒドロキシル基、およびカルボキシルが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、リガンド単位の官能基は、スルフヒドリル基である。スルフヒドリル基は一般的に、システイン残基上の溶媒易接近性のスルフヒドリル基などの、溶媒易接近性のスルフヒドリル基である。スルフヒドリル基は、リガンドの分子内または分子間のジスルフィド結合の還元によって生成することができる。スルフヒドリル基は、2-イミノチオラン(Traut試薬)または別のスルフヒドリル生成試薬を用いる、リガンドのリジン部分のアミノ基の反応によって生成することもできる。

#### 【0338】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数のスルフヒドリル基が、例えばアミノ酸置換によってリガンド単位に組み入れられる。例えば、スルフヒドリル基をリガンド単位に導入することができる。いくつかの実施形態において、スルフヒドリル基は、セリンまたはスレオニンのアミノ酸置換によって、および/またはリガンド単位へのシステイン残基の付加(組み入れられたシステイン残基)によって、システイン残基に導入される。いくつかの実施形態において、システイン残基は内部システイン残基であり、すなわち、リガンド部分のN末端またはC末端に位置しない。

#### 【0339】

例示的な実施形態において、アミノ酸置換によってシステイン残基を(例えば、ダイア

10

20

30

40

50

ボディーなどの抗体フラグメントの)抗体重鎖または軽鎖可変領域に組み入れることができる。アミノ酸置換は典型的にはフレームワーク領域に導入され、可変領域のエピトープ結合面から遠位に位置する。例えば、アミノ酸置換は、エピトープ結合面またはCDRから、少なくとも10オングストローム、少なくとも20オングストロームまたは少なくとも25オングストロームであってよい。システイン残基の置換に適する位置は、抗体可変領域の既知であるか予測される三次元構造に基づいて決定することができる。(一般には、Holliger and Hudson, 2005, Nature BioTechnology 23(9):1126-1136を参照)。例示的な実施形態において、セリンからシステインへのアミノ酸置換は、V<sub>H</sub>領域のアミノ酸位置84および/またはV<sub>L</sub>領域の位置14(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, (Bethesda, MD, NIH) 1991の番号システムに従う)に導入される。

10

#### 【0340】

リガンド単位に結合する薬物またはリンカー単位-薬物単位の数値を制御するために、1つまたは複数のシステイン残基をアミノ酸置換によって除去してもよい。例えば、免疫グロブリンヒンジ領域での溶媒易接近性のシステイン残基の数は、システインからセリン残基へのアミノ酸置換によって減少させることができる。

#### 【0341】

いくつかの実施形態において、リガンド単位は、1、2、3、4、5、6、7または8個の溶媒易接近性システイン残基を含む。いくつかの実施形態において、リガンド単位は、2個または4個の溶媒易接近性システイン残基を含む。

#### 【0342】

#### 組成物および投与方法

CD19結合性物質およびリガンド-薬物コンジュゲート化合物は、その化合物をCD19関連障害の処置のために患者に投与することを可能にする、任意の形態であってよい。様々な送達系が公知であり、CD19結合性物質およびリガンド-薬物コンジュゲート化合物を投与するために用いることができる。導入の方法には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下経路が含まれるが、これらに限定されない。投与は、例えば、注入またはボラス注射によることができる。ある好ましい実施形態において、化学療法剤および抗体-薬物コンジュゲート化合物の両方の投与は、注入による。非経口投与が、好ましい投与経路である。

20

#### 【0343】

CD19結合性物質およびリガンド-薬物コンジュゲート化合物は、1つまたは複数の製薬上適合する成分を含む医薬組成物として投与することができる。例えば、医薬組成物は、1つまたは複数の製薬用担体(例えば、石油、動物、植物または合成起源のもの、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などを含む、水および油などの無菌液体)を典型的に含む。医薬組成物が静脈内投与される場合、水はより典型的な担体である。特に注射用溶液のために、食塩水および水性デキストロースおよびグリセロール溶液を、液体担体として使用することもできる。適する製薬用賦形剤は、当技術分野で公知である。組成物は、所望により、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含むこともできる。適する製薬用担体の例が、E.W. Martinによる"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載されている。製剤は、投与の様式に対応する。

30

#### 【0344】

典型的な実施形態において、医薬組成物はヒトへの静脈内投与用の医薬組成物として、通常の手順に従って製剤化される。一般的に、静脈内投与のための組成物は、無菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要な場合、医薬は、可溶化剤および、注射部位の疼痛を緩和するためのリグノカインなどの局所麻酔薬を含むこともできる。一般に、成分は別々に供給されるか、または単位投与量剤形中に、例えば、活性剤の量を表示するアンプルまたはサシットなどの密封容器中の、乾燥している凍結乾燥粉末または無水濃縮物として一緒に混合される。医薬が注入によって投与される場合、それは、例えば、無菌の医薬用の水または生理食塩水を含有する注入ピンで注入することができる。医薬が注射によって投与される場合、投与前に成分を混合できるように、例えば、無菌注射用蒸留水または生理食

40

50

塩水のアンブルを提供することができる。

【0345】

特定の障害または状態の処置で有効な化合物の量は、障害または状態の性質によって決まり、標準の臨床技術によって判定することができる。さらに、最適投与量範囲の特定を助けるために、インビトロまたはインビボのアッセイを任意により使用することができる。組成物で使用する正確な用量は、投与経路、および疾患または障害の程度によっても決まり、臨床医の判断および各患者の状態によって決定されるべきである。

【0346】

組成物は、適する投与量が得られるように有効な量の化合物を含む。一般的に、この量は、組成物の少なくとも約0.01重量%の化合物である。

10

【0347】

静脈内の投与のために、組成物は、動物の体重1kgにつき約0.01～約100mgの化合物を含むことができる。一態様において、組成物は、動物の体重1kgにつき約1～約100mgの化合物を含むことができる。別の態様において、投与量は、体重1kgにつき約0.1～約25mgの化合物である。

【0348】

一般に、患者に投与する化合物の投与量は、一般的に、被験体の体重1kgにつき約0.01mg～約100mgである。いくつかの実施形態において、患者に投与する投与量は、被験体の体重1kgにつき約0.01mg～約15mgである。いくつかの実施形態において、患者に投与する投与量は、被験体の体重1kgにつき約0.1mg～約15mgである。いくつかの実施形態において、患者に投与する投与量は、被験体の体重1kgにつき約0.1mg～約20mgである。いくつかの実施形態において、投与量は、被験体の体重1kgにつき約0.1mg～約5mgまたは約0.1mg～約10mgである。いくつかの実施形態において、投与量は、被験体の体重1kgにつき約1mg～約15mgである。いくつかの実施形態において、投与量は、被験体の体重1kgにつき約1mg～約10mgである。いくつかの実施形態において、投与量は、治療周期にわたって、被験体の体重1kgにつき約0.1～4mg、0.1～3.2mgまたは0.1～2.7mgである。いくつかの実施形態において、投与量は、治療周期にわたって、被験体の体重1kgにつき約0.5～4mg、より好ましくは0.5～3.2mg、またはより好ましくは0.5～2.7mgである。

20

【0349】

一般に、医薬組成物は、無菌で実質的に等張に、U.S. Food and Drug Administrationの医薬品適正製造基準(GMP)の全規則を完全に遵守して製剤化される。

30

【0350】

自己免疫疾患

本明細書で記載されるCD19結合性物質、ならびにリガンド-薬物コンジュゲート化合物は、免疫障害の治療または予防に役立つことができる。本明細書に記載の方法による免疫障害の治療または予防は、そのような治療または予防が必要な被験体に対して、CD19結合性物質またはリガンド-薬物コンジュゲート化合物の有効量を投与することによって達成することができる。いくつかの好ましい実施形態において、リガンド-薬物コンジュゲートは、(i)CD19を発現し、疾患状態に関連する活性化免疫細胞に結合し、(ii)活性化免疫細胞に対して、細胞毒性、細胞増殖抑制または免疫調節効果を発揮する。

40

【0351】

免疫細胞の不適當な活性化を特徴とし、本明細書に記載の方法によって治療または予防することができる免疫疾患は、例えば、障害の基礎をなす過敏性反応の型によって分類することができる。これらの反応は、一般的に以下の4つの型に分類することができる：アナフィラキシー反応、細胞傷害性(細胞溶解性)反応、免疫複合体反応、または細胞性免疫(CMI)反応(遅延型過敏症(DTH)反応とも呼ばれる)。(例えば、Fundamental Immunology, William E. Paul ed., Raven Press, N.Y., 3rd ed. 1993を参照)。

【0352】

そのような免疫疾患の具体的な例には、それらに限定されないが、関節リウマチ、多発性硬化症、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、

50

甲状腺機能亢進症、糸球体腎炎、自己免疫肝障害、自己免疫炎症性腸疾患、アナフィラキシー、アレルギー反応、シェーグレン症候群、若年型(Ⅰ型)糖尿病、原発性胆汁性肝硬変、ヴェーゲナー肉芽腫症、線維筋痛、炎症性腸疾患、多発筋炎、皮膚筋炎、多発性内分泌不全症、シュミット症候群、自己免疫ブドウ膜炎、アジソン病、副腎炎、甲状腺炎、橋本甲状腺炎、自己免疫甲状腺疾患、悪性貧血、胃萎縮、慢性肝炎、ルポイド肝炎、アテローム硬化、初老期痴呆、脱髄疾患、亜急性皮膚エリテマトーデス、副甲状腺機能低下症、ドレスラー症候群、自己免疫血小板減少、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、尋常天疱瘡、天疱瘡、疱疹状皮膚炎、円形脱毛症、類天疱瘡、強皮症、進行性全身性硬化、クレスト症候群(石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症および毛細血管拡張)、成人発症糖尿病(Ⅱ型糖尿病)、雄雌の自己免疫不妊症、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、混合結合組織疾患、結節性多発性動脈炎、全身性壊死性脈管炎、若年発症関節リウマチ、アトピー性皮膚炎、アトピー性鼻炎、グッドパスチャー症候群、シャガス病、サルコイドーシス、リウマチ熱、喘息、反復流産、抗リン脂質症候群、農夫肺、多形紅斑、開心術後症候群、クッシング症候群、自己免疫慢性活動性肝炎、愛鳥家肺、アレルギー性脳脊髄炎、中毒性表皮壊死症、アルポート症候群、肺炎、アレルギー性肺炎、線維化性肺炎、間質性肺疾患、結節性紅斑、壊疽性膿皮症、輸血反応、ハンセン病、マラリア、リーシュマニア症、トリパノソーマ症、高安動脈炎、リウマチ性多筋痛、側頭動脈炎、住血吸虫病、巨細胞性動脈炎、蛔虫症、アスペルギルス症、サムター症候群、湿疹、リンパ腫様肉芽腫症、ベーチェット病、キャプラン症候群、川崎病、デング熱、脳脊髄炎、心内膜炎、心内膜心筋線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、乾癬、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎、シュルマン症候群、フェルティー症候群、糸状虫感染症、毛様体炎、慢性毛様体炎、異虹彩色性毛様体炎、フックス毛様体炎、IgA腎症、ヘノッホ-シェーンライン紫斑病、移植片対宿主疾患、移植拒絶、ヒト免疫不全ウイルス感染症、エコーウイルス感染症、心筋症、アルツハイマー病、パルボウイルス感染症、風疹ウイルス感染症、ワクチン接種後症候群、先天性風疹感染症、イトトン-ランバート症候群、再発性多発性軟骨炎、寒冷グロブリン血症、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、EBウイルス感染症、耳下腺炎、エバン症候群および自己免疫生殖腺不全症が含まれる。

### 【0353】

したがって、本明細書で記載される方法は、Bリンパ球(例えば、全身性エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群、関節リウマチおよびⅠ型糖尿病)、Th<sub>1</sub>-リンパ球(例えば、関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、甲状腺機能亢進症、原発性胆汁性肝硬変、ヴェーゲナー肉芽腫症、結核もしくは移植片対宿主疾患)、またはTh<sub>2</sub>-リンパ球(例えば、アトピー性皮膚炎、全身性エリテマトーデス、アトピー性喘息、鼻結膜炎、アレルギー性鼻炎もしくは慢性移植片対宿主疾患)の障害の処置を包含する。一般に、樹状細胞が関係する障害は、Th<sub>1</sub>-リンパ球またはTh<sub>2</sub>-リンパ球の障害を含む。

### 【0354】

本発明は、自己免疫疾患、例えば、少なくとも部分的に、B細胞によって媒介される自己免疫疾患の処置を含む。自己免疫疾患の例には、急性壊死性出血性白質脳炎;アジソン病;無ガンマグロブリン血症;アレルギー性喘息;アレルギー性鼻炎;円形脱毛;アミロイド症;強直性脊椎炎;抗GBM/抗TBM腎炎;抗リン脂質症候群;自己免疫無形成性貧血;自己免疫自律神経障害;自己免疫肝炎;自己免疫高脂血症;自己免疫免疫不全;自己免疫内耳疾患;自己免疫心筋炎;自己免疫性血小板減少性紫斑病;軸索およびニューロンの神経障害;パロー病;ベーチェット病;水疱性類天疱瘡;心筋症;キャスルマン病;セリアックスブルー(非熱帯性);シャガス病;慢性疲労症候群;慢性炎症性脱髄髄鞘除去性多発性神経障害;チャグ-ストラウス症候群;癰痕性類天疱瘡/良性粘膜類天疱瘡;クローン病;コーガン症候群;寒冷凝集素症;先天性の心臓ブロック;コクサッキー心筋炎;クレスト病;本態性混合寒冷グロブリン血症;脱髄性神経障害;皮膚筋炎;ドヴィック病;円板状狼瘡;ドレスラー症候群;子宮内膜症;好酸球性筋膜炎;結節性紅斑;実験的アレルギー性脳脊髄炎;エバンス症候群;線維筋痛;線維化性肺炎;巨細胞性動脈炎(側頭動脈炎);グッドパスチャー症候群;グレーブス病;ギ

10

20

30

40

50

ランバレー症候群;橋本病;溶血性貧血;ヘノッホ-シェーンライン紫斑病;妊娠性疱疹;低ガンマグロブリン血症;特発性血小板減少性紫斑病;IgA腎症;免疫調節性リポタンパク質;封入体筋炎;インスリン依存型糖尿病(1型);間質性膀胱炎;若年性関節炎;若年型糖尿病;川崎病;ランバート-イトン症候群;白血球破砕性血管炎;扁平苔癬;硬化性萎縮性苔癬;木質性結膜炎;線状IgA疾患(LAD);狼瘡(SLE);ライム病;メニエール病;顕微鏡的多発血管炎;混合結合組織疾患;モーレン潰瘍;ムッハ-ハーベルマン病;多発性硬化症;重症筋無力症;筋炎;ナルコレプシー;好中球減少;眼の瘢痕性類天疱瘡;骨関節炎;回帰性リウマチ;腫瘍随伴小脳変性;発作性夜間ヘモグロビン尿症;パーソニッジ-ターナー症候群;扁平部炎(末梢ブドウ膜炎);天疱瘡;末梢神経障害;静脈周囲の脳脊髄炎;悪性貧血;POEMS症候群;結節性多発動脈炎;I型、II型およびIII型自己免疫多腺症候群;リウマチ性多筋痛;多発筋炎;心筋梗塞後症候群;心膜切開後症候群;プロゲステロン皮膚炎;原発性胆汁性肝硬変;乾癬;乾癬性関節炎;特発性の肺線維症;壊疽性膿皮症;赤芽球癆;レイノー現象;灼熱痛;ライター症候群;再発性多発性軟骨炎;レストレスレッグス症候群;リウマチ熱;関節リウマチ;サルコイドーシス;シュミット症候群;強膜炎;強皮症;シェーグレン症候群;精子と精巣の自己免疫病;全身硬直症候群;亜急性細菌性心内膜炎;交感性眼炎;高安動脈炎;側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎;血小板減少性紫斑病;自己免疫甲状腺疾患;トロサ-ハント症候群;横断性脊髄炎および壊死性ミエロパシー;潰瘍性大腸炎;未分化結合組織疾患;ブドウ膜炎;血管炎;水疱性皮膚症;白斑;およびヴェーゲナー肉芽腫症が含まれる。特別な関心のあるより一般的な自己免疫疾患には、(a)全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、全身性硬化症(強皮症)、シェーグレン症候群などの結合組織疾患、(b)多発性硬化症、重症筋無力症、ギランバレー症候群などの神経筋疾患、(c)橋本甲状腺炎、甲状腺機能亢進症、インスリン依存型(1型)糖尿病などの内分泌疾患、および(d)炎症性腸疾患(クローン病および潰瘍性大腸炎を含む)などの胃腸疾患、ならびに(e)血管炎症候群、血液学的自己免疫疾患および自己免疫皮膚疾患などの他の疾患が含まれる。

#### 【0355】

自己免疫疾患は、例えば自己抗体の存在を含む。自己抗体は、宿主標的または抗原、例えばリウマチ因子(例えば、関節リウマチ);トポイソメラーゼ(例えば、強皮症);ミエリン塩基性タンパク質(例えば、多発性硬化症);基底膜コラーゲンiv型タンパク質(例えば、グッドパスチャー症候群);ガングリオシド(例えば、ギランバレー症候群);血小板(例えば、慢性特発性の血小板減少);平滑筋アクチン(例えば、自己免疫肝炎);水疱性類天疱瘡抗原1および2;別名、ヘミデスモソーム抗原(例えば、水疱性類天疱瘡);トランスグルタミナーゼ(例えば、セリアック疾患);デスモゲイン3(例えば、尋常天疱瘡);p62またはsp100またはミトコンドリア(m2)抗原(例えば、原発性胆汁性肝硬変);好中球細胞質のc-ANCA(例えば、ヴェーゲナー肉芽腫症);好中球核周囲のp-ANCA(例えば、結節性多発動脈炎、顕微鏡的多発血管炎、チャージ-ストラウス症候群、全身性の脈管炎(非特異的));二本鎖DNA(例えば、全身性エリテマトーデス);エキソゾーム(exosome)複合体(例えば、硬化性筋炎);RoもしくはLa抗原(例えば、全身性エリテマトーデスおよび新生児心臓ブロック、もしくは原発性シェーグレン症候群);スミス抗原(例えば、全身性エリテマトーデス);リン脂質抗原(例えば、抗リン脂質症候群);SSAまたはSSB抗原(例えば、シェーグレン症候群);セントロメア(例えば、クレスト症候群);ミトコンドリア(例えば、原発性胆汁性肝硬変);ニコチンアセチルコリン受容体(例えば、重症筋無力症);電位作動型カルシウムチャネル(例えば、ランバート-イトン症候群);甲状腺ペルオキシダーゼ(例えば、橋本甲状腺炎);TSH受容体(例えば、グレーブス病);Hu抗原(例えば、腫瘍随伴小脳症候群);電位作動型カリウムチャネル(例えば、辺縁系脳炎およびN-メチル-D-アスパラギン酸受容体(例えば、脳炎)に特異的に結合することができる。1種類を超える自己抗体が免疫障害に関連することがあり、またはその逆のこともあり、このリストは網羅的ではない。例えば、関節リウマチで特定された自己抗原には、関節関連タンパク質、例えばコラーゲンII型ヒト軟骨細胞糖タンパク質39、およびプロテオグリカン、ならびに、熱ショックタンパク質、シトルリン化フィラグリ、免疫グロブリン、グルコース6リン酸イソメラーゼ、p205およびBiPが含まれる。

10

20

30

40

50

## 【 0 3 5 6 】

CD19結合性物質は、自己免疫疾患の少なくとも1つの症状を軽減するために有効な量で投与することができる。いくつかの実施形態において、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されていない、抗CD19完全長抗体またはその抗原結合性フラグメントまたはその誘導体が投与される。他のいくつかの実施形態において、リガンド-薬物コンジュゲート(すなわち、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されているCD19結合性物質(例えば、完全長抗体またはその抗原結合性フラグメントまたはその誘導体))が投与される。本発明は、本発明のリガンド-薬物コンジュゲート化合物の少なくとも1つのCD19結合性物質による、従来の療法に治療抵抗性である自己免疫疾患を含む自己免疫疾患の処置を提供する。CD19結合性物質またはリガンド-薬物コンジュゲート化合物は、任意により別の療法、例えば、手術、抗炎症薬療法、ホルモン/酵素補充療法、プラズマフェレシスおよび免疫抑制療法と併用投与される。抗炎症薬療法には、ステロイド、例えば、プレドニゾンなどのコルチコステロイド、ならびにサリチル酸および他のCOX阻害剤などのNSAIDが含まれる。ホルモン補充療法には、甲状腺ホルモン補充(例えば、橋本甲状腺炎において)が含まれる。免疫抑制薬には、グルココルチコイド、アルキル化剤(例えば、SLEでしばしば有効なシクロホスファミド)、ならびに代謝拮抗物質(例えば、メトトレキサート、アザチオプリンおよびメルカプトプリン)が含まれる。他の療法には、抗甲状腺薬療法、または外科的なもしくは放射性ヨウ素による甲状腺の除去(例えば、グレーブス病の場合)が含まれる。

10

## 【 0 3 5 7 】

いくつかの実施形態において、本発明のCD19結合性物質は、B細胞を減少させる。

20

## 【 0 3 5 8 】

癌

例示されるCD19結合性物質は、CD19発現性の癌の治療または予防に有用である。本明細書に記載の方法によるCD19発現性の癌の治療または予防は、そのような治療または予防が必要な被験体に対して、CD19結合性物質の有効量を投与することによって達成することができる。いくつかの実施形態において、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されていない、抗CD19完全長抗体またはその抗原結合性フラグメントまたはその誘導体が投与される。他のいくつかの実施形態において、リガンド-薬物コンジュゲート(すなわち、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されているCD19結合性物質(例えば、完全長抗体またはその抗原結合性フラグメントまたはその誘導体))が投与される。いくつかの例示的な実施形態において、本発明のリガンド-薬物コンジュゲートは、(i) CD19発現癌細胞に結合し、(ii)細胞毒性または細胞増殖抑制効果を発揮して、例えば、CD19発現癌細胞の増殖を阻害するか、CD19発現癌細胞を死滅させる。

30

## 【 0 3 5 9 】

本明細書で記載される方法によって治療または予防することができる癌には、例えば、白血病およびリンパ腫を含むB細胞悪性腫瘍、例えば、それらに限定されないが、軽度/濾胞性NHL、小リンパ球(SL)NHL、中等度/濾胞性NHL、中等度び慢性NHL、び慢性大B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、高度免疫芽細胞NHL、高度リンパ芽球性NHL、高度非核切れ込み小細胞NHL、マントル細胞リンパ腫、および大型の疾患NHLを含むB細胞サブタイプ非ホジキンリンパ腫(NHL);パーキットリンパ腫;多発性骨髄腫;前B急性リンパ芽球性白血病および早期のB細胞前駆体に由来する他の悪性腫瘍;一般的な急性リンパ芽球性白血病;慢性リンパ球性白血病;毛様細胞性白血病;ヌル急性リンパ芽球性白血病;ヴァルデンシュトレームマクログロブリン血症;および前リンパ性白血病;び慢性B大細胞リンパ腫、前リンパ性白血病、軽鎖疾患;プラズマ細胞腫;骨硬化性の骨髄腫;形質細胞白血病;重要性不明のモノクローナル高ガンマグロブリン血症(MGUS);くすぶり型多発性骨髄腫(SMM);無痛性多発性骨髄腫(IMM);または、ホジキンリンパ腫が含まれるが、癌がCD19抗原を発現する場合に限る。

40

## 【 0 3 6 0 】

50

治療的な適用では、少なくとも1つのCD19結合性物質(例えば、抗体またはリガンド-薬物コンジュゲート)を、CD19関連障害、例えば癌が疑われるか、それを発症していることが既知である患者に投与することができる。本物質は、例えば、障害の少なくとも1つの症状を消滅させるか、少なくとも軽減させるのに十分な量で投与される。

#### 【0361】

治療の予防的適用では、少なくとも1つの物質を、CD19関連障害を発症するか、その再発を起こす危険のある患者に投与することができる。患者は、例えば、再発の可能性がある、CD19関連障害が見かけ上寛解している患者、または、一般集団と比較して、CD19関連障害の少なくとも1つの症状の増加の危険が高い患者である。CD19関連障害またはその再発の危険性が高いことが知られている患者には、例えば、その障害の攻撃的な形態、またはその障害もしくはその病期(例えば、悪性腫瘍)に関連する遺伝的もしくは組織学的異常、または関連危険因子(例えば、家族性病歴もしくは別のCD19関連障害もしくはEBV感染)と診断された患者、あるいは、幹細胞移植を受けた患者が含まれる。いくつかの実施形態において、本発明のCD19結合性物質またはリガンド-薬物コンジュゲート化合物は、CD19発現癌の処置のために幹細胞移植を受けた患者に、維持療法として投与される。

10

#### 【0362】

本物質は、障害の推測される開始または増加または増悪または再発の前に、障害を消滅させるか、その危険を減らすか、その開始もしくは再発を遅らせるのに十分な量で投与することができる。

#### 【0363】

20

CD19結合性物質およびリガンド-薬物コンジュゲート化合物は、正常なもの(例えば、非癌性組織)と比較してCD19が発現されるか過剰発現される、癌および他の疾患の治療に有用である。CD19結合性物質は、正常なものと比較してCD19が過剰発現されない、CD19関連障害を治療するために用いることもできる。例えば、障害は、CD19陽性のB細胞数の増加を含むことができる。いくつかの実施形態において、CD19結合性物質およびリガンド-薬物コンジュゲート化合物は、単独療法として投与される。他の実施形態において、CD19結合性物質およびリガンド-薬物コンジュゲート化合物は、別の治療薬剤と同時に投与されるか、別の治療薬剤と逐次的に投与される。いくつかの実施形態において、CD19結合性物質およびリガンド-薬物コンジュゲート化合物は、治療標準化学療法薬を含む化学療法薬と同時に投与されるか、逐次投与される。

30

#### 【0364】

患者の応答は、CD19関連障害に及ぼす物質の影響を判定することによって監視することができる。

#### 【0365】

##### 癌の多剤療法

その必要性のある患者にCD19結合性物質および別の治療薬剤の有効量を投与するステップを含む、癌の治療方法。いくつかの実施形態において、追加の治療薬剤は抗癌剤である。いくつかの実施形態において、CD19結合性物質は、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されていない、抗CD19完全長抗体またはその抗原結合性フラグメントまたはその誘導体である。他のいくつかの実施形態において、CD19結合性物質は、リガンド-薬物コンジュゲート(すなわち、細胞毒性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤、および/または治療薬剤にコンジュゲート化されているCD19結合性物質(例えば、完全長抗体またはその抗原結合性フラグメントまたはその誘導体))である。

40

#### 【0366】

いくつかの実施形態において、他の治療薬剤は、治療する特定の疾患のための治療標準であるか、治療する特定の疾患のためのサルベージ処方計画の一部である物質である。抗癌剤および化学療法処方計画には、例えば、抗CD52抗体(例えば、アレムツズマブ)、抗CD20抗体(例えば、リツキシマブ)および抗CD40抗体(例えば、SGN40)などを含む抗癌抗体;例えば、CHOP(シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン); CVP(シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン); RCVP(リツキシマブ+C

50

VP); RCHOP(リツキシマブ+CHOP); RICE(リツキシマブ+イホスアミド、カルボプラチン、エトポシド); RDHAP(リツキシマブ+デキサメタゾン、シタラビン、シスプラチン); RESHAP(リツキシマブ+エトポシド、メチルプレドニゾロン、シタラビン、シスプラチン); ゲムシタピン; ピンクリスチン、プレドニゾンおよびアントラサイクリンによる併用処置で、アスパラギナーゼを含むか含まず; ダウノルビシン、ピンクリスチン、プレドニゾンおよびアスパラギナーゼによる併用処置; テニポシドおよびAra-C(シタラビン)による併用処置; メトトレキセートおよびロイコボリンによる併用処置; プレオマイシン、ドキソルビシン、エトポシド、メクロレタミン、プレドニゾン、ビンブラスチンおよびピンクリスチンによる併用処置; 小分子阻害剤; ならびに、例えばボルテゾミブを含むプロテオソーム阻害剤を含む化学療法処方計画が含まれる。

10

**【0367】**

本発明は、記載のCD19結合性物質(コンジュゲート型(例えば、リガンド-薬物コンジュゲート)または非コンジュゲート型)を単独療法として、または、例えば抗リンパ腫抗体、例えば、抗CD20抗体、すなわち、リツキシマブ、および/または抗CD40抗体、すなわち、SGN-40との併用療法で用いる、リンパ腫の治療方法を包含する。

**【0368】**

本発明は、記載のCD19結合性物質(コンジュゲート型(例えば、リガンド-薬物コンジュゲート)または非コンジュゲート型)を単独療法として、または、例えばリンパ腫の治療のための化学療法処方計画、例えば、CHOP(シクロホスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチンおよびプレドニゾン)、CVP(シクロホスファミド、ピンクリスチンおよびプレドニゾン)および/または他のアントラサイクリンB化学療法処方計画との併用療法で用いる、リンパ腫の治療方法を包含する。

20

**【0369】**

本発明は、記載のCD19結合性物質(コンジュゲート型(例えば、リガンド-薬物コンジュゲート)または非コンジュゲート型)を単独療法として、または、例えばRCVP(リツキシマブ+CVP)および/またはRCHOP(リツキシマブ+CHOP)との併用療法で用いる、無痛性リンパ腫の治療方法を包含する。

**【0370】**

本発明は、記載のCD19結合性物質(コンジュゲート型(例えば、リガンド-薬物コンジュゲート)または非コンジュゲート型)を単独療法として、または、例えばRICE(リツキシマブ+イホスアミド、カルボプラチン、エトポシド)、RDHAP(リツキシマブ+デキサメタゾン、シタラビン、シスプラチン)、RESHAP(リツキシマブ+エトポシド、メチルプレドニゾロン、シタラビン、シスプラチン)、ゲムシタピンおよび/または免疫性調節薬、すなわち、レナリドマイドとの併用療法で用いる、再発性または治療抵抗性のリンパ腫を発症している被験体の治療方法を包含する。

30

**【0371】**

本発明は、再発疾患を有するか、または、リツキシマブまたは癌治療の他の療法、例えば、CHOP、CVP、CHOP、RICE、RDHAP、RCHOP、RCVP、RESHAPによる治療に抵抗性である被験体を治療する方法を包含する。一態様において、本方法は、例えば、被験体に本発明のリガンド-薬物コンジュゲートを投与するステップを含む。一部の実施形態において、リガンド-薬物コンジュゲートは、オーリスタチン化合物に結合されているCD19結合性物質を含む。一態様において、CD19結合性物質は、ヒト化BU12抗体である。

40

**【0372】**

本発明は、CD21発現レベルによって特徴付けられる癌を有する被験体を治療する方法を包含する。癌は、CD21を発現しないか、低レベルで発現するか、または高レベルで発現することができる。一態様において、本方法は、例えば、被験体に本発明のリガンド-薬物コンジュゲートを投与するステップを含む。一部の実施形態において、リガンド-薬物コンジュゲートは、オーリスタチン化合物に結合されているCD19結合性物質を含む。一態様において、CD19結合性物質は、ヒト化BU12抗体である。

**【0373】**

50



本発明は、記載のCD19結合性物質(コンジュゲート型(例えば、リガンド-薬物コンジュゲート)または非コンジュゲート型)を単独療法として、または、例えばビンクリスチン、プレドニゾンおよびアントラサイクリンの組合せをアスパラギナーゼと一緒にまたはそれなしで含む化学療法処方計画との併用療法で用いる、ALLの治療方法を包含する。代替の化学療法処方計画には、例えば、ダウノルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびアスパラギナーゼの組合せ;テニポシドおよびara-C(シタラビン)の組合せ;メトトレキセートおよびロイコボリンの組合せ;ブレオマイシン、ドキソルビシン、エトポシド、メクロレタミン、プレドニゾン、ビンブラスチンおよびビンクリスチンの組合せ(「Stanford 5処方計画」)が含まれる。

【0374】

10

いくつかの実施形態において、それを必要とする患者にCD19結合性物質またはリガンド-薬物コンジュゲート化合物の有効量を、放射線治療、および任意により別の治療薬剤と組み合わせて投与するステップを含む、癌の治療方法が提供される。

【0375】

いくつかの実施形態において、CD19結合性物質またはCD19リガンド-薬物コンジュゲート化合物は、抗癌剤(例えば、化学療法剤)および/または放射線療法と並行して、または逐次的に投与される。いくつかの実施形態において、化学療法剤または放射線療法は、本発明の化合物の投与の少なくとも1時間、5時間、12時間、1日、1週間、1ヵ月、数ヵ月(例えば、最高3ヵ月)前または後に投与される。

【0376】

20

本発明の化合物および化学療法薬が別々に投与される場合、1日に投与される各化合物の投与回数は必ずしも同じである必要はなく、例えば、1つの化合物がより長い持続時間の活性を有する場合があります、したがってより低い頻度で投与される。本発明の化合物および追加の抗癌剤は、同じか異なる投与経路で投与することができる。それらは、同時であるか交互の処方計画により、療法期間中の同じ時間もしくは異なる時間に、分割形態もしくは単一の形態で並行して投与することができる。一方または両方の剤の投与は、例えば注入または移植された貯蔵器を通して、連続的であってよい。

【0377】

いくつかの実施形態において、本発明の化合物と併用投与される化学療法剤は、それによる癌の治療が不応性でないことがわかっているものである。別の実施形態において、化学療法剤は、それによる癌の治療が不応性であることがわかっているものである。

30

【0378】

いくつかの実施形態において、本発明の化合物による癌の治療方法は、化学療法または放射線療法に代わるものとして提供され、そこでは、化学療法または放射線療法は、治療被験体にとって毒性が強すぎることで、例えば、許容されないか耐えられない副作用をもたらすことが証明されているか証明することができる。

【0379】

本発明の化合物は、例えばある癌の治療のために、インビトロまたはエキソビボの方法で用いることもできる。

【0380】

40

ヒトCD19に特異的に結合する単離されたCD19結合性物質、またはCD19結合性物質を含むリガンド-薬物コンジュゲート、および取扱説明書を含むキットも本発明の範囲内である。キットは、少なくとも1つの追加の試薬をさらに含むことができる。キットは、典型的には、キット内容の用途を示すラベルを含む。ラベルとの語には、キットに、またはそれと一緒に供給されるか、さもなければキットに付属する文書または記録材が含まれる。

【0381】

本発明は、ヒト化CD19抗体の診断的使用も含む。例えば、ヒト化CD19抗体は、単独で、および/または他の診断用造影剤と組み合わせて診断用造影剤として、および/または治療適用と同時に用いることができる。診断剤は、CD19関連障害を有するか有していたことが知られているヒト患者で、インビボで用いることができる。任意により、障害は、例えば

50

、固形腫瘍に別々に位置するCD19陽性の細胞を含む。

【0382】

そのような方法では、CD19結合性物質は、蛍光団などの検出可能な標識で直接または間接に標識することができ、任意により、標的細胞または患者試料とインビトロまたはインビボで接触させることができる。試料または個体中のCD19の存在および/または密度を判定することができる。判定のインビボ方法には、PET(陽電子放出断層撮影法)またはSPECT(単光子放射型コンピューター断層撮影法)などの画像化技術を含めることができる。

【0383】

患者または試料(任意により対照も)を、CD19結合性物質と、存在するならばCD19抗原との間で複合体の形成を可能にする条件下で、例えばCD19結合性物質と接触させる。次に、複合体の形成を被験患者で検出し、対照における結合と(例えば、FACS分析またはウェスタンブロット法を用いて)比較する。対照と試験試料/患者との間における、複合体の形成のいかなる統計的有意差も、CD19関連障害の存在を示す。対照は、例えば、同じ患者から異なる位置もしくは時点でとられる類似した読取值、または、無病の被験体からとられる読取值、あるいは、無作為に選択されるか障害を発症していないことがわかっている個体からとられる複数の読取值に基づく既定の統計値であってよい。診断検査は、CD19関連障害を有する患者を特定するために、または、特定の患者でそのような障害の程度を判定するために、または、障害の経時的過程もしくは障害に及ぼす選定治療の影響をモニタリングするために用いることができる。

【0384】

上記で引用されるすべての刊行物および特許文書は、各々がそのように個々に示されるのと同じ程度に、すべての目的でそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0385】

本発明は、以下の実施例に関してさらに記載される。しかし、本発明はそのような実施例に限定されないことを理解すべきである。

【0386】

本発明の実施の具体的な態様の以下の実施例は、例示目的のためだけに提供され、いかなる形であれ本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0387】

実施例 1

ヒト化BU12重鎖可変領域の設計：

BU12  $V_H$ を、機能的ヒト生殖系列 $V_H$ エキソンとアライメントさせた。 $V_H$ エキソンの選択は、フレームワーク相同性および標準的構造に基づいて行なわれた。ヒト化のためのフレームワークを提供するために、ヒト生殖系列 $V_H$ エキソン $V_H2-70$ および $V_H4-31$ を選択した。BU12  $V_H$ のFR4とのその同一性(85%)に基づいて、ヒト化FR4配列を提供するために、ヒト生殖系列 $J_H4$ エキソンを選択した。

【0388】

BU12  $V_H$ をマウス $V_H$ エキソン生殖系列配列に対してアライメントさせ、構造上の重要性を有するであろう体細胞性突然変異の領域を特定した。BU12  $V_H$ は、H75、H82AおよびH89に体細胞性突然変異の潜在的フレームワーク領域を有する機能的CB17H-10  $V_H$ エキソンと、高い相同性を有することがわかった。

【0389】

BU12  $V_H$ を、選択されたヒト生殖系列 $V_H$ エキソン( $V_H2-70$ または $V_H4-31$ )とアライメントさせ、CDR構造または $V_H/V_L$ 相互作用に影響すると文献に記載されている残基におけるBU12  $V_H$ とヒトフレームワークとの間の差を特定した。 $V_H4-31$ については、そのような残基の変化が、H24位、H27位、H29位およびH71位で見出された。さらに、非相同的フレームワーク領域が特定され、相同的 $V_H$ ドメイン(1ETZ)の結晶構造を用いて、非相同的残基の位置を判定し、CDR構造へのそれらの可能な影響を評価した。

【表 2】

## 重鎖変異体でのヒト化突然変異:

V <sub>H</sub> 変異体	V <sub>H</sub> エキソン受容体配列	ドナーフレームワーク残基
V <sub>H</sub> A	VH2-70	なし
V <sub>H</sub> B	VH2-70	H75
V <sub>H</sub> C	VH2-70	H79
V <sub>H</sub> D	VH2-70	H81, H82, H82A, H82B, H82C
V <sub>H</sub> E	VH2-70	H89
V <sub>H</sub> F	VH4-31	なし
V <sub>H</sub> G	VH4-31	H71
V <sub>H</sub> H	VH4-31	H24, H27, H29
V <sub>H</sub> I	VH4-31	H24, H27, H29, H71
V <sub>H</sub> J	VH4-31	H75
V <sub>H</sub> K	VH4-31	H78, H79
V <sub>H</sub> L	VH4-31	H89

10

【表 3】

非相同時FR残基BU12 V<sub>H</sub> vs. V<sub>H</sub>2-70

位置	変化	コメント
H41	S → P	ループ領域-除外
H75	S → K	考えられる体細胞性突然変異/電荷変化
H79	F → P	コアでの芳香性
H81	K → T	コア(連続的領域)
H82	I → M	コア(連続的領域)
H82A	A → T	コア(連続的領域)
H82B	S → N	コア(連続的領域)
H82C	V → M	コア(連続的領域)
H84	T → P	ループ領域-除外
H89	A → T	考えられる体細胞性突然変異

20

30

【表 4】

## BU12重鎖変異体での特異的突然変異:

変異体	H75	H79	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H89
cBU12 VH	S*	F*	K*	I*	A*	S*	V*	A*
VH2-70	K	V	T	M	T	N	M	T
HA	K	V	T	M	T	N	M	T
HB	S*	V	T	M	T	N	M	T
HC	K	F*	T	M	T	N	M	T
HD	K	V	K*	I*	A*	S*	V*	T
HE	K	V	T	M	T	N	M	A*

\*マウス残基

40

【表 5】

非相同的FR残基BU12 VH vs. VH4-31

位置	変化	コメント
H3	T → Q	CDRから離れた接近可能な表面-除外
H24	F → V	CDR1構造に影響
H27	F → G	CDR1構造に影響
H29	L → I	CDR1構造に影響
H41	S → P	ループ領域-除外
H71	K → V	CDR2構造に影響
H75	S → K	考えられる体細胞性突然変異/電荷変化
H78	V → F	コア芳香性
H79	F → P	コア芳香性
H83	D → T	ループ領域-除外
H89	A → V	考えられる体細胞性突然変異

10

【表 6】

BU12重鎖変異体での特異的突然変異:

20

変異体	H24	H27	H29	H71	H75	H78	H79	H89
cBU12 VH*	F*	F*	L*	K*	S*	V*	F*	A*
VH4-31	V	G	I	V	K	F	S	V
HF	V	G	I	V	K	F	S	V
HG	V	G	I	K*	K	F	S	V
HH	F*	F*	L*	V	K	F	S	V
HI	F*	F*	L*	K*	K	F	S	V
HJ	V	G	I	V	S*	F	S	V
HK	V	G	I	V	K	V*	F*	V
HL	V	G	I	V	K	F	S	A*

30

\*マウス残基

【0390】

## 実施例 2

ヒト化BU12軽鎖可変領域の設計:

BU12  $V_L$  を、機能的ヒト生殖系列 $V_H$ エキソンとアライメントさせた。L6の使用率は高い(約11%)ので、これをBU12  $V_L$  ヒト化のための最良のフレームワークとして選択した。BU12  $V_L$  と最良の相同性を有するA10も選択した。BU12  $V_L$  のFR4とのその同一性(77%)に基づいて、ヒト化FR4配列を提供するために、ヒト生殖系列 $J_K2$ エキソンを選択した。

【0391】

40

BU12  $V_L$  をマウス $V_L$ エキソン生殖系列配列に対してアライメントさせ、構造上の重要性を有するであろう体細胞性突然変異の領域を特定した。最も近いマッチは、ac4、kn4およびkk4であった。体細胞性突然変異の潜在部位は、L40位、L41位、L42位、L69位、L71位、L72位およびL83位で特定された。

【0392】

BU12  $V_L$  を選択されたヒト生殖系列および $V_L$ エキソン(L6またはA10)とアライメントさせ、CDR構造または $V_H/V_L$ 相互作用に影響すると文献に記載されている残基におけるBU12  $V_L$  とヒトフレームワークとの間の差を特定した。そのような残基の差は、L2位およびL71位で出現する。さらに、非相同的フレームワーク領域が特定され、相同的 $V_L$ ドメイン(1Q0K)の結晶構造を用いて、非相同的残基の位置を判定し、CDR構造へのそれらの可能な影響を

50

評価した。

【表 7】

軽鎖変異体でのヒト化突然変異:

V <sub>L</sub> 変異体	V <sub>H</sub> エキソン受容体配列	ドナーフレームワーク残基
V <sub>L</sub> A	VL-L6	なし
V <sub>L</sub> B	VL-L6	L2
V <sub>L</sub> C	VL-L6	L71
V <sub>L</sub> D	VL-L6	L2, L71
V <sub>L</sub> E	VL-L6	L40, L41, L42
V <sub>L</sub> F	VL-L6	L69, L70, L71, L72
V <sub>L</sub> G	VL-L6	L83
V <sub>L</sub> H	VL A10	なし
V <sub>L</sub> I	VL A10	L2, L71

【表 8】

非相同的FR残基BU12 VL vs. L6およびA10

位置	変化	コメント
L2	N → I	L2はCDR1構造に影響を及ぼすことが知られている
L40	S → P	考えられる体細胞性突然変異
L41	S → G	考えられる体細胞性突然変異
L42	T → Q	考えられる体細胞性突然変異
L69	N → T	考えられる体細胞性突然変異
L70	S → D	CDR1に対する鎖パッキングでの電荷
L71	H → F	体細胞性突然変異/L71はCDR1構造に影響を及ぼすことが知られている
L72	F → T	考えられる体細胞性突然変異
L83	V → F	考えられる体細胞性突然変異

【表 9】

BU12軽鎖変異体での特異的突然変異:

変異体	L2	L40	L41	L42	L69	L70	L71	L72	L83
cBU12 VL*	N*	S*	S*	T*	N*	S*	H*	F*	V*
L6	I	P	G	Q	T	D	F	T	F
LA	I	P	G	Q	T	D	F	T	F
LB	N*	P	G	Q	T	D	F	T	F
LC	I	P	G	Q	T	D	H*	T	F
LD	N*	P	G	Q	T	D	H*	T	F
LE	I	S*	S*	T*	T	D	F	T	F
LF	I	P	G	Q	N*	S*	H*	F*	F
LG	I	P	G	Q	T	D	F	T	V*

\*マウス残基

【表 10】

BU12軽鎖変異体での特異的突然変異:

変異体	L2	L71
cBU12*	N*	H*
A10	I	F
LH	I	F
LI	N*	H*

\*マウス残基

【0393】

10

実施例 3

抗CD19抗体のパネルを、CD19<sup>+</sup> NHL細胞株のパネルに関してスクリーニングした(図13)。評価した抗体のすべては薬物を送達することができたが、細胞株の間に差があった。

【表 11】

細胞株	疾患タイプ	CD19 分子数/細胞	2° -ADC と連結された様々な抗 CD19 抗体の IC <sub>50</sub> (ng/mL)				
			LT19	HIB19	cBU12	SJ25-C1	B-C3
CA46	バーキットリンパ腫、EBV-	60527	4	1	7	4	17
HS Sultan	バーキットリンパ腫、EBV+	59669	112	97	100	150	234
HT	びまん性混合リンパ腫	35813	111	~1000	238	ND	ND
MC 116	未分化リンパ腫	29210	192	188	186	~200	195
Ramos	バーキットリンパ腫、EBV-	34377	1	1	5	3	13
Toledo	びまん性大細胞型リンパ腫	28657	584	~1000	~1000	512	359

20

30

抗 CD19 抗体は、CD19<sup>+</sup>細胞株に 2° -ヤギ抗マウス vcMMAF を送達する。細胞株を、2 倍過剰のヤギ抗マウス ADC で架橋させた異なる抗 CD19 抗体(187.1-vcMMAF8)と培養した。培養物を 96 時間インキュベートし、50 μM リザズリンで標識した。試験した細胞株のいずれの増殖に対して、187.1-vcMMAF のいかなる影響もなかった。値は、単一の実験内の 4 反復の平均±SD である。

40

【0394】

実施例 4

SCIDマウスのRamos腫瘍モデルに対する抗CD19抗体-薬物コンジュゲート化合物の抗腫瘍活性を判定した。結果は、概して、マウスおよびキメラのBU12抗体薬物コンジュゲートは、他のキメラ抗CD19抗体薬物コンジュゲートと比較して、およびヒト化BU12抗体薬物コンジュゲートと比較して、活性が劣っていたことを示す。図3、4、5、7および8を参照されたい。

【0395】

実施例 5

Fc Rへの結合に重要であることが知られているIgG1のFcドメイン中のアミノ酸残基を

50

突然変異させて、1つまたは複数のFc Rへの結合を損なわせることができるヒト化BU12抗体の変異体は、標準的な分子生物学技術を用いて生成することができる。

【0396】

例えば、IgG1v1は、以下の突然変異、すなわちKabat番号方式によりE233P:L234V:L235Aを含む。IgG1V1のアミノ酸配列を、配列番号35に示す。

【0397】

ヒト化抗CD19抗体のさらなるFcドメイン変異体を同様に生成することができ、その例には、例えば、1つまたは複数のFc 受容体への結合相互作用に参与するFcドメインに、またはそれに近接して、1つまたは複数の非保存的アミノ酸置換、1つまたは複数のシステイン残基の導入、またはN結合グリコシル化のための1つまたは複数の部位の導入を有するFcドメイン変異体が含まれる。

【0398】

#### 実施例 6

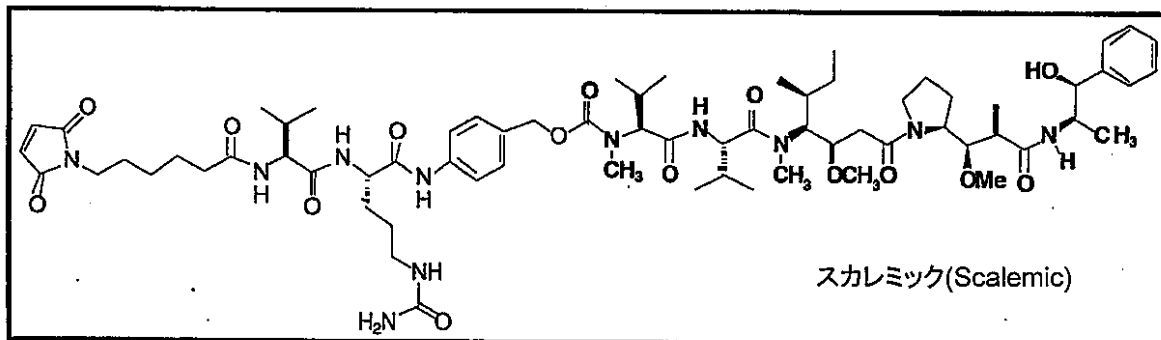
##### hBU12抗体薬物コンジュゲートの調製

hBU12 mAb(Lot番号PR208(69mg)および1033154(100mg))の130ミリグラムを合わせて濃縮し、150kDの分子量および $1.47\text{AU} \cdot \text{mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ の吸光係数に基づき、 $10.8\text{mg/mL}$ の濃度で $141\text{mg}$ を得た。

【0399】

オーリスタチンMMAEおよびMMAFを、精製された抗体に以下のとおりにコンジュゲートさせた。抗体( $130\text{mg}$ 、 $867\text{nmol}$ )を、カチオンスカベンジャーとして $1\text{mM}$  DTPAを含む $2.17\text{nmol}$ のTCEP(1抗体につき4つの遊離チオール of 所望の還元レベルのための25%過剰の還元剤を表す)と、37℃で45分間インキュベートした。還元レベルは、以下の試験化合物でマイクロスケールの試験コンジュゲーションを実施することによって判定した：

【化30】



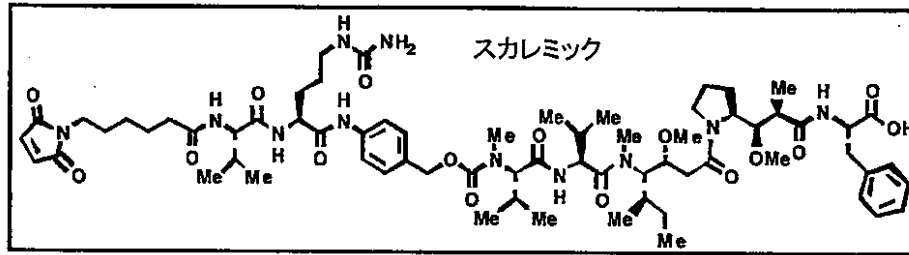
【0400】

薬物負荷分布は、HICクロマトグラフィーによって特徴付けした。このmAbは、マウスの抗体で時折見られる還元パターンを示し、そこにおいて、分布は1抗体につき0および10個の薬物で重み付けし、4個および6個を負荷された抗体がより低いレベルで表される。平均薬物負荷は所望のものより高く、1Abにつき4.9個の薬剤であった。抗体ジスルフィドを再酸化させ、それによって1Abにつき4.1個の薬剤の分析レベルまで薬物負荷レベルを低下させるために、増加する分量のDTNB( $217\text{nmol}$ 、その後 $303.8\text{nmol}$ )を加えた。

【0401】

約 $9.0\text{mL}$ のmAb溶液に $795\mu\text{L}$ のDMSOを加え、次に、以下の化合物、マレイミドカプロイル-Val-Cit-MMAF( $3.88\mu\text{mol}$ )の $19.1\text{mM}$ のDMSO溶液の $203.1\mu\text{L}$ を加えることによって、部分的に還元されたmAb( $97\text{mg}$ 、 $647\text{nmol}$ )をMMAFとコンジュゲートさせた。

## 【化 3 1】



## 【 0 4 0 2 】

コンジュゲート化反応は、0 で100分間進行させた。100mMのN-アセチルシステイン194  $\mu$ Lを加えることによって、残留したマレイミドカプロイル-Val-Cit-MMAFをクエンチした。次に、DMSO、未反応のもしくはクエンチされた薬物、およびコンジュゲーション工程から生じた他の小分子汚染物を除去するために、4 で、25000 MWCO膜を用いて、反応混合液を4LのPBSに対して3回透析し、濃縮した。生成物は、1Abについて4.1個の薬剤を含んでいた。

## 【 0 4 0 3 】

## 実施例 7

リツキシマブ感受性および耐性のリンパ腫に対する、ならびにCD21高発現および低発現リンパ腫における、抗CD19オーリスチン抗体薬物コンジュゲートhBU12-vcMMAE(hBU12-MC-vc-PAB-MMAEとも呼ばれる)の活性:

## 材料および方法

腫瘍細胞株上のCD19およびCD21の発現レベルを判定するフローサイトメトリー分析: 腫瘍細胞株上のCD19およびCD21のコピー数を評価するために、細胞を、PE結合マウス抗CD19および抗CD21抗体(BD Pharmingen、San Diego、CA)と氷上で30分間インキュベートし、冷却染色媒体で洗浄し、Becton Dickison FACSscanフローサイトメータで評価した。細胞表面のCD19およびCD21の定量測定は、DAKO QiFiKitフローサイトメトリー間接免疫蛍光アッセイおよびマウス抗体を製造業者(DAKO A/S、Glostrup、Denmark)によって記載されているとおりに用いて判定した。

## 【 0 4 0 4 】

結合親和性を判定するための飽和結合試験: 細胞を、10  $\mu$ g/ml hBU12またはhBU12-vcMMAEと4 で0.5時間インキュベートし、洗浄した。1セットの細胞を37 へ移し、選択された時点で回収した。検出のために、PE結合二次抗体を用い、残った表面結合抗体の量をフローサイトメトリーによって判定した。あるいは、細胞をAlexaFluor488標識hBU12抗体または薬物コンジュゲートと氷上で1時間インキュベートし、冷却PBSで洗浄し、結合をBecton Dickison FACSscanフローサイトメータで評価した。見かけのKd値は、PrismからのOne Site Bindingアルゴリズム(GraphPad Software、San Diego、CA)を用いて判定した。

## 【 0 4 0 5 】

CD19内在化動態試験: 放射標識抗体-薬物コンジュゲートを作製するために、受注合成された[3H]-vcMMAE(24.7Ci/mmol、Moravek Biochemicals、Brea、CA)を用いて、放射標識hBU12-vcMMAEコンジュゲートを調製した。放射活性を計算した。1mLの培養物からの細胞中に見出される遊離薬物の量を、1mLの培地中に検出される遊離薬物の量に加え、この値を用いて、細胞培養中に放出される全薬物の濃度を判定した。3反復の結果を平均し、Microsoft ExcelのSTDEVPA機能を用いてそれらの値の標準偏差を計算した。

## 【 0 4 0 6 】

hBU12およびhBU12-ADCのリソソーム共存試験: Ramos細胞を、1 $\mu$ g/mlのhBU12またはhBU12-ADCと一緒に氷上で、または37 で20分間もしくは4時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を冷却PBSで洗浄して未結合の抗体またはADCを除去し、次に、BD Cyt ofix/Cytoperm(BD Biosciences、San Jose、CA)で固定、透過性化した。抗体およびADCは、AlexaFluor-488標識ヤギ抗ヒトIgG(Molecular Probes、Eugene、OR)で検出した。リソ

10

20

30

40

50



ソーム区画を、AlexaFluor647標識LAMP-1抗体(マウスCD107、BD Biosciences)による染色によって可視化した。核区画は、DAPI(4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール、Roche、Basel、Switzerland)で染色した。蛍光画像は、Carl Zeiss Axiovert 200M顕微鏡で取得した。

#### 【0407】

細胞毒性および増殖停止アッセイ:腫瘍細胞を、hBU12および薬物コンジュゲートと96時間インキュベートした。以前に報告されているように(Doronina、2003 #1834)、細胞生存率を、Alamar Blue(Biosource International、Camarillo、CA)色素の減少によって測定した。細胞を色素と4時間インキュベートし、色素の減少をFusion HT蛍光プレートリーダー(Perkin Elmer、Waltham、MA)で測定した。結果は、ビヒクル処理細胞(対照=100%)と比較して生存率の50%低減をもたらすために必要な化合物の濃度である、IC50で報告する。増殖停止およびアポトーシス試験のために、製造業者の指示に従い、細胞をまず抗体およびADCで処理し、次に、アネキシンV-FITCアポトーシス検出キット(BD Pharmingen)を用いて処理した。ADCへの曝露の後の細胞周期位置を分析するために、細胞をプロモデオキシウリジン(BrdUrd、Sigma、St. Louis、MO)で20分間標識した。初期のDNA合成は、抗BrdUrd抗体(BD Biosciences)を用いて検出し、総DNA含量は、ヨウ化プロピジウム(PI)で検出した。次に、細胞をフローサイトメトリーによって分析した。

10

#### 【0408】

皮下リンパ腫および播種性ヒト白血病のインビボモデル:B細胞リンパ腫の限局性、皮下および播種性モデルを、SCIDマウスで確立した。皮下モデルのために、 $5 \times 10^6$ 個のリンパ腫細胞を、雌マウスの右脇腹に移植した。hBU12および-ADCまたは対照化合物を、腫瘍体積が100mm<sup>3</sup>に到達したときに投与した。腫瘍サイズを、少なくとも週2回観察した。播種性疾患を確立するために、0.2ml PBS中の $1 \times 10^5$ 個のNaIm6細胞またはRS4;11細胞を、C.B.-17 SCIDマウス(Harlan、Indianapolis、IN)の外側尾静脈に注入した。細胞注入の7日後にマウスを試験化合物で処置し、1週当たり少なくとも2回観察した。15~20%の体重減少、背中を丸めた姿勢および毛づくろいをしなくなることで、頭部膨潤および後肢麻痺を含む疾患の徴候を示したとき、マウスを屠殺した。処置スケジュールは、図の説明に示すとおりである。

20

#### 【0409】

統計分析:腫瘍の4倍増または3倍増の時間(示すような)を、エンドポイントまでの時間(TTE)として選択し、それらは、各実験動物からの各個体の腫瘍増殖データセットの指数的増殖の非線形回帰分析を用いることにより判定した。腫瘍4倍増時間は、処置開始時の腫瘍体積に基づいて計算した。エンドポイントに到達しなかった動物には、試験の最終日と同じTTE値を割り当てた。TGD(腫瘍増殖遅延)率は、対照処置腫瘍と比較してのTTE到達の遅れを反映し、それは式 $\%TGD = [(T-C)/C] \times 100$ を用いることにより判定し、式中、TおよびCは、処置の始まりを1日目とする、処置群および対照群がTTEに到達するための、日数で表した時間中央値である。統計分析および図形表示は、Graphpad Prismソフトウェアバージョン4.01(Graphpad、San Diego、CA)を用いて行った。腫瘍増殖曲線中央値は、群の腫瘍体積中央値を時間の関数として示す。処置群および対照腫瘍群のTTEの間の差の有意性を分析するために、ログランク検定を用い、差は、 $0.01 < P < 0.05$ で有意(\*)、 $P < 0.01$ で非常に有意(\*\*)であるとみなされた。CR応答では、腫瘍体積は、試験中の3回の連続測定で13.5mm<sup>3</sup>未満である。永続的応答(DR)は、実験全体の間の明瞭な腫瘍の完全な非存在と定義される。CD19およびCD21発現レベルの間の有意な相関とインビトロ細胞毒性とを判定するために、95%信頼区間を用いて、標準的なピアソン相関分析(両側)を使用した。

30

40

#### 【0410】

リツキサン(Rituxan)耐性Ramos腫瘍およびRaji腫瘍の発達:親細胞を、マウス1匹につき $5 \times 10^6$ 個の細胞の濃度で、40匹のSCIDマウスに移植した。細胞移植の2日後、隔日に合計9用量にわたって、マウスを8mg/kgのリツキシマブで処置した。40匹のマウス中約6匹が腫瘍を形成し、腫瘍が約300~400mm<sup>3</sup>のとき、マウスを安楽死させ、腫瘍を無菌的に回収した。腫瘍は、ナイロンフィルターを通す分離を通して、単一細胞懸濁液にした。培養の間

50

、細胞を100ug/mlまでのリツキシマブの様々なレベルに連続的に曝露させた。1週間に数回、細胞生存率を検証した。1週間の培養後に、細胞を30匹のSCIDマウスに移植した。移植の2日後に、マウスを前と同じスケジュールで12mg/kgのリツキシマブで処置した。10匹のSCIDマウスで、インピトロおよびインピボ選択をもう一度繰り返した。生じた腫瘍を単一細胞懸濁液に調製し、液体窒素で冷凍した。Raji R2およびRaji H4細胞株を、Czuczamn et al., Clin Cancer Res. 2008; 14:1561-1570に記載されているとおりに生成した。

#### 【 0 4 1 1 】

hBU12-vcMMAE(4)コンジュゲートの薬物動態特性:hBU12-vcMMAEの単一用量を、ナイーブSCIDマウスの腹腔内に投与した。複合薬物動態プロフィールを得るために、11週間にわたって予定された間隔で血清試料を回収した。試料を、抗MMAE抗体を用いる認証された多重

10

#### 【 0 4 1 2 】

#### 結果

CD19およびCD21の発現と培養で増殖させたALL、CLLおよびNHL腫瘍細胞株に対するhBU12-vcMMAEの効力との間の相関の欠如:hBU12-vcMMAEの効力を判定するために、パーキットリンパ腫、び慢性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リンパ腫(FL)および急性リンパ球性白血病(ALL)を表すCD19陽性リンパ腫および白血病細胞を、hBU12-vcMMAEの漸増濃度に曝露した。さらに、これらの遺伝子の発現と抗腫瘍活性との間の潜在的相関を研究するために、CD19およびCD21の細胞表面コピー数を判定した。hBU12-vcMMAEコンジュゲートの強力な細胞毒性活性が、試験した17種のCD19陽性腫瘍細胞株中15種で認められた。T細胞リンパ腫細胞株Jurkatを、CD19陰性対照細胞株として用いた。これらの対照細胞に対するhBU12-vcMMAEの活性の非存在は、抗腫瘍活性が標的依存性であることを示唆した。ADC効力とCD19( $p=0.45$ ,  $R^2=0.038$ )およびCD21( $p=0.55$ ,  $R^2=0.028$ )の発現レベルとの間の有意な相関の欠如が認められた(データ示さず)。さらに、ALL細胞株に対するhBU12-vcMMAEの類似した強力な細胞毒性効果が見られた。要約すると、データは、CD19およびCD21の発現レベルならびに腫瘍サブタイプが、オーリスタチンベースのADCに対するリンパ腫および白血病細胞株の感受性を予測するには不十分なことを証明する。

20

#### 【 0 4 1 3 】

NHL細胞株におけるhBU12-vcMMAEの内在化動態および細胞内輸送:一部のオーリスタチンベースのADCの抗腫瘍効果を決定することが以前に示された重要なパラメータは、抗体による連結の後に内在化して、リソソーム区画に移行する標的抗原の能力である。これらの過程を研究するために、CD21低発現腫瘍細胞(RamosおよびSUDHL-4)およびCD21高発現腫瘍細胞株(Raji, Daudi)をhBU12-vcMMAEとインキュベートし、蛍光活性化細胞分取(FACS)による内在化動態を判定した。図15に示すように、hBU12およびhBU12-vcMMAEコンジュゲートはCD21低発現Ramos細胞で速やかに内在化し、化合物の>50%がインキュベーションから60分以内に内在化した。hBU12-vcMMAEのいくぶんか遅い内在化動態が、CD21高発現RajiおよびDaudi細胞で見られた。しかし、内在化動態の小さな差は効力にあまり影響を及ぼさず、CD21低発現Ramos細胞とCD21高発現リンパ腫間で同等のIC50値が見られた。合わせると、これらの知見は、異なる腫瘍細胞株上のhBU12-vcMMAEの内在化動態がインピトロでの細胞毒性和相関しないことを証明する。NHL細胞株でのhBU12およびhBU12-vcMMAEコンジュゲートの細胞内輸送を調べた。この目的のために、CD21低発現RamosおよびSUDHL4細胞を、裸抗体またはhBU12-vcMMAEとインキュベートした。同時免疫蛍光試験は、大部分の内在化hBU12がリソソームに局在化し、それが、インキュベーションから15分後という早い時期に開始されることを明らかにした。リソソーム区画へのhBU12およびコンジュゲートの同等の細胞内移行が、CD21低発現RamosまたはHTおよびCD21高発現DaudiおよびRaji細胞の間で観察された(データ示さず)。合わせると、これらの知見は、内在化動態単独では、異なるNHL細胞株に対するhBU12-vcMMAE効力の差を説明するには不十分であることを証明する。

30

40

#### 【 0 4 1 4 】

50

リツキシマブ感受性および耐性の、CD21高発現およびCD21低発現リンパ腫細胞株における、hBU12-vcEによる遊離薬物の放出:MMAEは細胞質区画で微小管安定性に干渉し、したがって、腫瘍細胞内で放出される活性遊離MMAE薬物の量は、抗リンパ腫効果に重要である。これらの側面を調べるために、CD21高発現DaudiおよびCD21高発現リツキシマブ耐性Raji R2およびRaji 4H細胞をhBU12-vcMMAEとインキュベートし、CD21低発現Ramos細胞で放出された遊離薬物のレベルを比較した。遊離活性薬物の細胞放出は、細胞内で保持された放射活性および経時的に上清中に脱出した放射活性を組み合わせることによって定量化した。CD21低発現細胞(Ramos)とCD21高発現細胞(Daudi)との間に、遊離薬物放出の差はなかった。したがって、遊離薬物放出の変動が、これらの異なるリンパ腫細胞株の間の、50倍を超えるIC50値の差を説明する可能性は低い。結論として、高いCD21レベルは、内在化hBU12-vcMMAEからの遊離薬物の細胞内放出に、最小限しか干渉しない可能性がある。

#### 【0415】

NHLおよびALLモデルでのhBU12コンジュゲートの効力:hBU12-vcMMAEは、SCIDマウスに異種移植した種々のNHL細胞株を用いて、単一用量および複数回用量実験で試験した(図16A~Eおよびデータ示さず)。パーキットリンパ腫に対して試験したとき、q4dx4で投与された3mg/kgのhBU12-vcMMAE用量で、7/8の永続的応答が観察された(図16A)。DOHH2腫瘍(濾胞性リンパ腫)に対して試験したとき、3mg/kg用量レベルで2/10のDR(図16B)によって示される、腫瘍増殖速度の有意な障害が観察された。SUDHL4リンパ腫(DLBCL)に対して試験したときにも、腫瘍増殖速度の有意な障害があった(図16C)。ALLを表す播種性RS4;11モデルでは、hBU12-vcMMAEで処置したマウスの生存期間の有意な増加が観察され、対照または無処置動物での約45日から3mg/kgのvcEコンジュゲートで処置したマウスでの90日超への、疾患発症の遅延をもたらした(図16D)。播種性ALLの第2のモデル(Nalm6)でhBU12-vcMMAEを試験したときに類似した観察を行い、そこでは、単一用量の投与は30~60%の永続的な応答をもたらした(図16E)。合わせると、これらのデータは、それらのCD21発現状態にかかわらず、NHLおよびALLの異なるモデルでのhBU12-vcMMAEの強力な抗腫瘍効果を証明する。

#### 【0416】

リツキシマブ耐性リンパ腫に対するhBU12-vcE抗腫瘍活性。リツキシマブ処置に対するNHL腫瘍の治療抵抗性を模倣する前臨床モデルを作製するために、材料および方法で記載したリツキシマブ処置と同時に、マウスでの腫瘍細胞のインビトロおよびインビボ反復継代によって治療抵抗性にした、Ramos腫瘍細胞を生成した。CD20およびCD19の発現レベルを判定するために、R-Ramos腫瘍からの細胞を単離し、リツキシマブ耐性Ramos腫瘍で同等レベルのCD20およびCD19の発現が見られた(図17C)。高用量リツキシマブ(12mg/kg、q4dx4)と比較して、hBU12-vcMMAE処置は、親腫瘍およびリツキシマブ耐性腫瘍の間で、腫瘍増殖遅延(TGD)率の有意な差をもたらした。重要なことに、リツキシマブに感受性および耐性の細胞株でhBU12-vcMMAEによる類似した抗腫瘍活性が見られ、NHL細胞をリツキシマブ耐性にするメカニズムがhBU12-vcMMAE効力に干渉することが示唆された。これらの知見をさらに検証するために、hBU12-vcMMAEを、以前に記載された2つのさらなるリツキシマブ耐性NHL細胞株(Raji 2Rおよび4RH 27;図17Dおよびデータ示さず)と一緒に試験し、両細胞株は、親のクローンと比較して類似レベルのCD19およびCD20を発現することが示された。リツキシマブ耐性Ramos腫瘍を試験した過去の知見を裏づけるように、hBU12-vcMMAE処置は、リツキシマブ感受性の親Rajiクローンと比較して、類似した永続性応答を誘導した。結論として、リツキシマブ耐性細胞株に対するCD19-ADCの強力な抗腫瘍活性が観察された。

#### 【0417】

### 実施例 8

#### NHLおよびALLの前臨床モデルにおけるヒト化抗CD19抗体hBU12の治療効果の媒介におけるエフェクター細胞の役割

ヒトリンパ腫および白血病細胞株に対してCDC、ADCCおよびADCPを誘導するヒト化抗CD19抗体hBU12の能力を調べた。強力なADCCおよびADCPが見出され、ADCCは、hBU12がvcMMAE薬物リンカーにコンジュゲートされたとき、わずかに低減した。活性ヒト初代B細胞単離物で試験したとき、hBU12およびコンジュゲートの直接的な増殖抑制効果が観察された。C

10

20

30

40

50

DC抗腫瘍効果の欠如が、すべてのhBU12化合物で認められた。hBU12の治療活性に対するエフェクター細胞媒介性活性の関与を判定するために、ヒトリンパ腫および白血病細胞を、SCIDマウスの皮下に、または尾静脈注入(播種性モデル)を通して移植した。最も強力な抗腫瘍効果が播種性モデルで観察され、このことは、腫瘍細胞へのエフェクター細胞の接近の制限が播種性モデルでより少ないとの認識と一貫している(図18および19)。抗腫瘍効果を媒介する細胞の性質を特定するために、エフェクター細胞枯渇実験をNHLの播種性モデル(Ramos)で行った。NK細胞、好中球またはマクロファージを選択的に除去し、癌を有するマウスでhBU12の腫瘍増殖阻害に及ぼす影響を測定した。マクロファージおよび好中球の除去はほとんど完全にhBU12の抗腫瘍効果を消滅させたが、NK細胞の除去は活性の中度の低下を伴っていた。結論として、これらの知見は、エフェクター細胞媒介性のADCPおよびADCC活性を通して、hBU12が抗腫瘍効果を誘導したことを証明する。

10

## 【 0 4 1 8 】

材料および方法

インビボ枯渇試験のために、ウサギ抗アジアロ-GM-1抗体をWako Pure Chemical Industries, Ltd. (Richmond, VA)から得、ラット抗マウス-Gr-1抗体をBD Biosciences (San Diego, CA)から得た。リポソームカプセル化クロドロナート(CEL)を、以前に記載されたとおりに調製した(Van Rooijen and Sanders 1994)。クロドロナートは、Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)から供与された。以前に記載のとおり(Van Rooijen and Sanders 1994; van Rooijen and Sanders 1997; McEarchern, Oflazoglu et al. 2007)に、特異的抗体またはCELを用いて癌を有するマウスからエフェクター細胞を除去した。ナチュラルキラー(NK)細胞は、抗アジアロ-GM1(1.25mg/kg)の腹腔内注射によって除去した。マウスには、腫瘍細胞移植の日から開始して5日ごとに1回の、合計3用量を投与した。マクロファージは、腫瘍注入の日およびその後3日ごとに、合計5用量のCEL(100  $\mu$ l/10gr)の腹腔内注射によって除去した。細胞除去は、脾臓細胞、リンパ節および血液のフローサイトメトリー分析によって確認した(データ示さず)。

20

## 【 0 4 1 9 】

配列配列番号1

## 【 化 3 2 】

Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr Val Leu Ser

30

## 【 0 4 2 0 】

配列番号2

(CDR領域に下線を引く。Kabat 75位、79位、81位、82位、82A位、82B位、82C位および89位は太字フォントである。CDR構造を決定する残基は、それらの右側にアステリスク\*を有する。)

## 【 化 3 3 】

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe\* Ser Gly\* Phe\* Ser Leu\* Ser Thr Ser Gly Met Gly Val\* Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp\* Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys\* Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg\* Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

40

## 【 0 4 2 1 】

配列番号3

## 【化 3 4】

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

10

## 【0 4 2 2】

## 配列番号4

(CDR領域に下線を引く。Kabat 75位、79位、81位、82位、82A位、82B位、82C位および89位は太字フォントである。)

20

## 【化 3 5】

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys  
 Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Val Leu **Thr Met Thr Asn Met** Asp Pro  
 Val Asp Thr Ala **Thr** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

## 【0 4 2 3】

## 配列番号5

(CDR領域に下線を引く。Kabat 75位、79位、81位、82位、82A位、82B位、82C位および89位は太字フォントである。)

30

## 【化 3 6】

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys  
 Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser **Lys** Asn Gln Val **Phe Leu Thr Met Thr Asn Met** Asp Pro  
 Val Asp Thr Ala **Thr** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

## 【0 4 2 4】

## 配列番号6

(CDR領域に下線を引く。Kabat 75位、79位、81位、82位、82A位、82B位、82C位および89位は太字フォントである。)

40

## 【化 3 7】

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys  
 Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser **Lys** Asn Gln Val **Val Leu Lys Ile Ala Ser Val** Asp Pro  
 Val Asp Thr Ala **Thr** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

## 【0 4 2 5】

50

## 配列番号7

(CDR領域に下線を引く。Kabat 75位、79位、81位、82位、82A位、82B位、82C位および89位は太字フォントである。)

【化38】

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys  
Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro  
Val Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

10

【0426】

## 配列番号8

【化39】

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser  
Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly  
Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg  
Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp  
Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

20

【0427】

## 配列番号9

(CDR領域に下線を引く。Kabat 24位、27位、29位、71位、75位、78位、79位および89位は太字フォントである。CDR構造を決定する残基は、それらの右側にアステリスク\*を有する。)

【化40】

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
Thr **Val\*** Ser Gly\* **Gly\*** Ser **Ile\*** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly  
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys

30

Ser Arg Val Thr Ile Ser **Val\*** Asp Thr Ser Lys Asn Gln **Phe Ser** Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr  
Ala Ala Asp Thr Ala **Val** Tyr Tyr Cys Ala Arg\* Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

【0428】

## 配列番号10

(CDR領域に下線を引く。Kabat 24位、27位、29位、71位、75位、78位、79位および89位は太字フォントである。)

【化41】

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
Thr **Val** Ser Gly **Gly** Ser **Ile** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln **Phe Ser** Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
Ala Asp Thr Ala **Val** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

40

【0429】

## 配列番号11

(CDR領域に下線を引く。Kabat 24位、27位、29位、71位、75位、78位、79位および89位は太字フォントである。)

## 【化42】

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr **Phe** Ser Gly **Phe** Ser **Leu** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Val Thr Ile Ser **Val** Asp Thr Ser **Lys** Asn Gln **Phe** Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala  
 Asp Thr Ala **Val** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

## 【0430】

## 配列番号12

(CDR領域に下線を引く。Kabat 24位、27位、29位、71位、75位、78位、79位および89位は  
 太字フォントである。)

10

## 【化43】

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr **Phe** Ser Gly **Phe** Ser **Leu** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Val Thr Ile Ser **Lys** Asp Thr Ser **Lys** Asn Gln **Phe** Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
 Ala Asp Thr Ala **Val** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

## 【0431】

## 配列番号13

(CDR領域に下線を引く。Kabat 24位、27位、29位、71位、75位、78位、79位および89位は  
 太字フォントである。)

20

## 【化44】

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr **Val** Ser Gly **Gly** Ser **Ile** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Val Thr Ile Ser **Val** Asp Thr Ser **Ser** Asn Gln **Phe** Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala  
 Asp Thr Ala **Val** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

## 【0432】

## 配列番号14

(CDR領域に下線を引く。Kabat 24位、27位、29位、71位、75位、78位、79位および89位は  
 太字フォントである。)

30

## 【化45】

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr **Val** Ser Gly **Gly** Ser **Ile** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Val Thr Ile Ser **Val** Asp Thr Ser **Lys** Asn Gln **Val** **Phe** Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
 Ala Asp Thr Ala **Val** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

## 【0433】

## 配列番号15

(CDR領域に下線を引く。Kabat 24位、27位、29位、71位、75位、78位、79位および89位は  
 太字フォントである。)

40

【化46】

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 Thr **Val** Ser Gly **Gly** Ser **Ile** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly **His Ile** Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 Arg Val Thr Ile Ser **Val** Asp Thr Ser Lys Asn Gln **Phe Ser** Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala  
 Asp Thr Ala **Ala** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

【0434】

配列番号16

【化47】

10

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly

【0435】

配列番号17

(CDR領域に下線を引く。Kabat 2位、40位、41位、42位、69位、70位、71位、72位および83位は太字フォントである。CDR構造を決定する残基は、それらの右側にアステリスク\*を有する。)

【化48】

Glu **Ile\*** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
 Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys **Pro Gly Gln** Ala Pro Arg  
 Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
**Thr Asp Phe\*** Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp **Phe** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln  
Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

20

【0436】

配列番号18

【化49】

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser  
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr  
 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

30

【0437】

配列番号19

(CDR領域に下線を引く。Kabat 2位、40位、41位、42位、69位、70位、71位、72位および83位は太字フォントである。)

【化50】

Glu **Asn** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
 Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys **Pro Gly Gln** Ala Pro Arg  
 Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

40

**Thr Asp Phe Thr** Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp **Phe** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln  
Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

【0438】

配列番号20

(CDR領域に下線を引く。Kabat 2位、40位、41位、42位、69位、70位、71位、72位および83位は太字フォントである。)



## 【化5 1】

Glu **Ile** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys **Pro Gly Gln** Ala Pro Arg Leu  
 Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly **Thr**  
**Asp His Thr** Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp **Phe** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

## 【0 4 3 9】

## 配列番号21

(CDR領域に下線を引く。Kabat 2位、40位、41位、42位、69位、70位、71位、72位および8  
 3位は太字フォントである。)

10

## 【化5 2】

Glu **Asn** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
 Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys **Pro Gly Gln** Ala Pro Arg  
 Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
**Thr Asp His Thr** Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp **Phe** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln  
Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

## 【0 4 4 0】

## 配列番号22

(CDR領域に下線を引く。Kabat 2位、40位、41位、42位、69位、70位、71位、72位および8  
 3位は太字フォントである。)

20

## 【化5 3】

Glu **Ile** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys **Ser Ser Thr** Ala Pro Arg Leu Leu  
 Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly **Thr Asp**  
**Phe Thr** Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp **Phe** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

## 【0 4 4 1】

## 配列番号23

(CDR領域に下線を引く。Kabat 2位、40位、41位、42位、69位、70位、71位、72位および8  
 3位は太字フォントである。)

30

## 【化5 4】

Glu **Ile** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys **Pro Gly Gln** Ala Pro Arg Leu  
 Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly **Asn**  
**Ser His Phe** Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp **Phe** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

## 【0 4 4 2】

## 配列番号24

(CDR領域に下線を引く。Kabat 2位、40位、41位、42位、69位、70位、71位、72位および8  
 3位は太字フォントである。)

40

## 【化5 5】

Glu **Ile** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys **Pro Gly Gln** Ala Pro Arg Leu  
 Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly **Thr**  
**Asp Phe Thr** Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp **Val** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

## 【0 4 4 3】

50

## 配列番号25

【化56】

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp  
Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser  
His Phe Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val  
Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

【0444】

## 配列番号26

(CDR領域に下線を引く。Kabat 2位および71位は太字フォントである。CDR構造を決定する  
残基は、それらの右側にアスタリスク\*を有する。)

10

【化57】

Glu **Ile\*** Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu  
Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
**Phe\*** Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

【0445】

## 配列番号27

(CDR領域に下線を引く。Kabat 2位および71位は太字フォントである。)

20

【化58】

Glu **Asn** Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu  
Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
**His** Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

【0446】

## 配列番号28

【化59】

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys  
Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser **Xa** Asn Gln Val **Xb** Leu **Xc** **Xd** **Xe** **Xf** **Xg** Asp Pro Val  
Asp Thr Ala **Xh** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

30

【0447】

XaはSerまたはLysであり、XbはPheまたはValであり、XcはLysまたはThrであり、XdはIle  
またはMetであり、XeはAlaまたはThrであり、XfはSerまたはAsnであり、XgはValまたはMet  
であり、XhはAlaまたはThrである。

【0448】

40

## 配列番号29

【化60】

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
Thr **Xa** Ser Gly **Xb** Ser **Xc** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys  
Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
Arg Val Thr Ile Ser **Xd** Asp Thr Ser **Xe** Asn Gln **Xf** **Xg** Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala  
Asp Thr Ala **Xh** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

【0449】

XaはPheまたはValであり、XbはPheまたはGlyであり、XcはLeuまたはIleであり、XdはLy

50

sまたはValであり、XeはSerまたはLysであり、XfはValまたはPheであり、XgはPheまたはSerであり、XhはAlaまたはValである。

【 0 4 5 0 】

配列番号30

【 化 6 1 】

Glu **Xa** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys **Xb Xc Xd** Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly **Xe Xf Xg Xh** Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp **Xi** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

10

【 0 4 5 1 】

XaはAsnまたはIleであり、XbはSerまたはProであり、XcはSerまたはGlyであり、XdはThrまたはGlnであり、XeはAsnまたはThrであり、XfはSerまたはAspであり、XgはHisまたはPheであり、XhはPheまたはThrであり、XiはValまたはPheである。

【 0 4 5 2 】

配列番号31

【 化 6 2 】

Glu **Xa** Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp **Xb** Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

20

【 0 4 5 3 】

XaはAsnまたはIleであり、XbはHisまたはPheである。

【 0 4 5 4 】

配列番号32

【 化 6 3 】

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser **Xa** Asn Gln Val **Xb** Leu **Xc Xd Xe Xf Xg** Asp Pro Val Asp Thr Ala **Xh** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly **Xi** Gly Thr **Xj** Val Thr Val Ser Ser

30

【 0 4 5 5 】

XaはSerまたはLysであり、XbはPheまたはValであり、XcはLysまたはThrであり、XdはIleまたはMetであり、XeはAlaまたはThrであり、XfはSerまたはAsnであり、XgはValまたはMetであり、XhはAlaまたはThrであり、XiはGlnまたはArgであり、XjはLeu、ThrまたはMetである。

【 0 4 5 6 】

配列番号33

【 化 6 4 】

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr **Xa** Ser Gly **Xb** Ser **Xc** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser **Xd** Asp Thr Ser **Xe** Asn Gln **Xf Xg** Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala

40

Asp Thr Ala **Xh** Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly **Xi** Gly Thr **Xj** Val Thr Val Ser Ser

【 0 4 5 7 】

50

XaはPheまたはValであり、XbはPheまたはGlyであり、XcはLeuまたはIleであり、XdはLysまたはValであり、XeはSerまたはLysであり、XfはValまたはPheであり、XgはPheまたはSerであり、XhはAlaまたはValであり、XiはGlnまたはArgであり、XjはLeu、ThrまたはMetである。

【 0 4 5 8 】

配列番号34

【 化 6 5 】

Glu **Xa** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys **Xb Xc Xd** Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly **Xe Xf Xg Xh** Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp **Xi** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly **Xj** Gly Thr **Xk Xi Xm** Ile Lys Arg

10

【 0 4 5 9 】

XaはAsnまたはIleであり、XbはSerまたはProであり、XcはSerまたはGlyであり、XdはThrまたはGlnであり、XeはAsnまたはThrであり、XfはSerまたはAspであり、XgはHisまたはPheであり、XhはPheまたはThrであり、XiはValまたはPheであり、XjはGln、ProまたはGlyであり、XkはLysまたはArgであり、XiはLeuまたはValであり、XmはGluまたはAspである。

【 0 4 6 0 】

配列番号35

【 化 6 6 】

Glu **Xa** Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp **Xb** Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly **Xc** Gly Thr **Xd Xe Xf** Ile Lys Arg

20

【 0 4 6 1 】

XaはAsnまたはIleであり、XbはHisまたはPheであり、XcはGln、ProまたはGlyであり、XdはLysまたはArgであり、XeはLeuまたはValであり、XfはGluまたはAspである。

【 0 4 6 2 】

配列番号36

【 化 6 7 】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT  
VPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLGKEYKCKVSNKGLPAP  
IEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 4 6 3 】

配列番号37

【 化 6 8 】

QMCGVNCTVSSELKTPGLDTHHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCP  
RCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVQVHNAKTKPREQQFN  
STFRVSVLTVLHQNWLDGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL  
LVKGFYPSDIAVEWESSGQPNNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNHRT  
QKSLSLSPGK

40

【 0 4 6 4 】

配列番号38

【化 6 9】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT  
VPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS  
SIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

【0 4 6 5】

配列番号39

【化 7 0】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG  
TQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPFVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP  
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

【0 4 6 6】

配列番号40

【化 7 1】

atggggcaggcttacttcttcattcttctgttctgctgattgtccctgcatatgtcctgtcc

【0 4 6 7】

配列番号41

【化 7 2】

cagggttcagctgcaagagtctggccctgggttggttaagccctcccagaccctcagtcctgacttgactgtgtctgg  
gggttcaatcagcacttctggatgggtgtaggctggattaggcagcaccaggaagggtctggagtggttgac  
acatttgggtgggatgatgacaagagatataaccagccctgaagagcagagtgacaatctctgtggatacctccaag  
aaccagtttagcctcaagctgtccagtgtagacgtgcagatactgctgtctactactgtgctagaatggaacttg  
gtcctactatctttagactactggggccaaggcacccttgctcacagtctcctca

20

【0 4 6 8】

配列番号42

【化 7 3】

gctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacacagcggccctggg  
ctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcaca  
ccttccccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagctgggc  
accagacctaatactgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagagccaaatcttg  
tgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcctcctcttcccccaa  
aaccgaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccct  
gaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccggggaggagcagtaaa  
cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagg  
tctccaaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtg  
tacacctgcccccatcccggtgatgagtgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtaaaaggcttctatcc  
cagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccggtgctggact  
ccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc  
tccgtgatgcagaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga

30

【0 4 6 9】

配列番号43

【化 7 4】

atggattttcaagtgcagattttcagcttctgctaatacagtcctcagtcataatgtccagagga

40

【0 4 7 0】

配列番号44

【化 7 5】

gaaattgttctcaccagttctccagcaaccctgtctctctctccaggggaaagggtaccctgagctgcagtgccag  
ctcaagtgttaagttacatgcactgggtaccagcagaagccagggcaggtcccagactcctgatttatgacacatcca  
aactggcttctggtattccagcaaggttcagtggcagtggtctggaacagattttacactcacaatcagcagcctg  
gagccagaggatgttgctgtctattactgttttcaggggagtgatataccattcacttttggccaagggaacaaagt  
ggaaatcaaaaga

【 0 4 7 1 】

配列番号45

【化 7 6】

actgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtg  
cctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccc  
aggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagac  
tacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgctcacaagagcttcaacag  
gggagagtgttag

10

【 0 4 7 2 】

配列番号46

【化 7 7】

Thr Ser Gly Met Gly Val Gly

【 0 4 7 3 】

配列番号47

【化 7 8】

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser

20

【 0 4 7 4 】

配列番号48

【化 7 9】

Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr

【 0 4 7 5 】

配列番号49

【化 8 0】

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

30

【 0 4 7 6 】

配列番号50

【化 8 1】

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

【 0 4 7 7 】

配列番号51

【化 8 2】

Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr

40

本発明の様々な態様をまとめて以下に示す。

1 .

ヒトCD19に特異的に結合するCD19結合性物質であって、配列番号 2 と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、 $10^{-7}$ M未満の解離定数でヒトCD19に結合する、上記結合性物質。

2 .

配列番号 1 7 と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む、

50

上記 1 に記載の結合性物質。

3 .

配列番号 2 6 と少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む、  
上記 1 に記載の結合性物質。

4 .

ヒト CD19 に特異的に結合する CD19 結合性物質であって、配列番号 9 と少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、 $10^{-7}$  M 未満の解離定数でヒト CD19 に結合する、上記結合性物質。

5 .

配列番号 1 7 と少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む、  
上記 4 に記載の結合性物質。

10

6 .

配列番号 2 6 と少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む、  
上記 4 に記載の結合性物質。

7 .

重鎖可変領域に連結されたヒト IgG 定常領域をさらに含む、上記 1 ~ 6 のいずれかに記載の CD19 結合性物質。

8 .

IgG 定常領域のアイソタイプが、IgG1、IgG2、または IgG1V1 である、上記 7 に記載の CD19 結合性物質。

20

9 .

軽鎖可変領域に連結された軽鎖定常ドメインをさらに含む、上記 2、3、5 または 6 に記載の CD19 結合性物質。

10 .

軽鎖定常ドメインが 定常ドメインである、上記 9 に記載の CD19 結合性物質。

11 .

重鎖可変領域が、Kabat 番号システムに従い配列番号 2 の 75 位、79 位、81 位、82 位、82A 位、82B 位、82C 位、または 89 位での少なくとも 1 箇所のアミノ酸置換を任意により有する配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、上記 1 ~ 3 のいずれかに記載の CD19 結合性物質。

12 .

重鎖可変領域が、Kabat 番号システムに従い配列番号 2 の 75 位、79 位、81 位、82 位、82A 位、82B 位、82C 位、もしくは 89 位での 0、1 または 2 箇所のアミノ酸置換を有する配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、上記 1 ~ 3 のいずれかに記載の CD19 結合性物質。

30

13 .

重鎖可変領域が、Kabat 番号システムに従い配列番号 9 の 24 位、27 位、29 位、71 位、75 位、78 位、79 位または 89 位での少なくとも 1 箇所のアミノ酸置換を任意により有する配列番号 9 のアミノ酸配列を含む、上記 4 ~ 6 のいずれかに記載の CD19 結合性物質。

14 .

重鎖可変領域が、Kabat 番号システムに従い配列番号 9 の 24 位、27 位、29 位、71 位、75 位、78 位、79 位もしくは 89 位での 0、1 または 2 箇所のアミノ酸置換を有する配列番号 9 のアミノ酸配列を含む、上記 4 ~ 6 のいずれかに記載の CD19 結合性物質。

40

15 .

軽鎖可変領域が、Kabat 番号システムに従い 2 位、40 位、41 位、42 位、69 位、70 位、71 位、72 位または 83 位での少なくとも 1 箇所のアミノ酸置換を任意により有する配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む、上記 2 または 5 に記載の CD19 結合性物質。

16 .

重鎖可変領域が、Kabat 番号システムに従い配列番号 2 の 75 位、79 位、81 位、82 位、82A 位、82B 位、82C 位、もしくは 89 位での 0、1 または 2 箇所のアミノ酸置換を有する配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、上記 1 5 に記載の CD19 結合性物質。

17 .

50

重鎖可変領域が、Kabat番号システムに従い配列番号9の24位、27位、29位、71位、75位、78位、79位もしくは89位での0、1または2箇所のアミノ酸置換を任意により有する配列番号9のアミノ酸配列を含む、上記15に記載のCD19結合性物質。

18.

軽鎖可変領域が、Kabat番号システムに従い2位および71位での少なくとも1箇所のアミノ酸置換を任意により有する配列番号26のアミノ酸配列を含む、上記3または6に記載のCD19結合性物質。

19.

重鎖可変領域が、Kabat番号システムに従い配列番号2の75位、79位、81位、82位、82A~C位、もしくは89位での0、1または2箇所のアミノ酸置換を有する配列番号2のアミノ酸配列を含む、上記18に記載のCD19結合性物質。

10

20.

重鎖可変領域が、Kabat番号システムに従い配列番号9の24位、27位、29位、71位、75位、78位、79位もしくは89位での0、1または2箇所のアミノ酸置換を有する配列番号9のアミノ酸配列を含む、上記18に記載のCD19結合性物質。

21.

ヒトCD19に特異的に結合するCD19結合性物質であって、配列番号17と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、 $10^{-7}$ M未満の解離定数でヒトCD19に結合する、上記結合性物質。

22.

ヒトCD19に特異的に結合するCD19結合性物質であって、配列番号26と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、 $10^{-7}$ M未満の解離定数でヒトCD19に結合する、上記結合性物質。

20

23.

ヒト化抗体を含む、上記1~22のいずれかに記載のCD19結合性物質。

24.

配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、CD19結合性物質。

25.

配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む、上記24に記載のCD19結合性物質。

30

26.

ヒト化抗体を含む、上記25に記載のCD19結合性物質。

27.

コアフコシル化が低下したヒト化抗体を含む、上記26に記載のCD19結合性物質。

28.

細胞毒性薬剤にコンジュゲート化されている、上記1~27のいずれかに記載のCD19結合性物質。

29.

以下の式：

$L - (LU-D)_p \quad (I)$

40

のリガンド-薬物コンジュゲート化合物または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物であって、

式中、

Lは上記1~27のいずれかに記載のCD19結合性物質であるリガンド単位であり、

(LU-D)はリンカー単位-薬物単位部分であり、

LU-はリンカー単位であり、

-Dは標的細胞に対する細胞増殖抑制性または細胞毒性活性を有する薬物単位であり、

pは1~約20の整数である、

上記化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

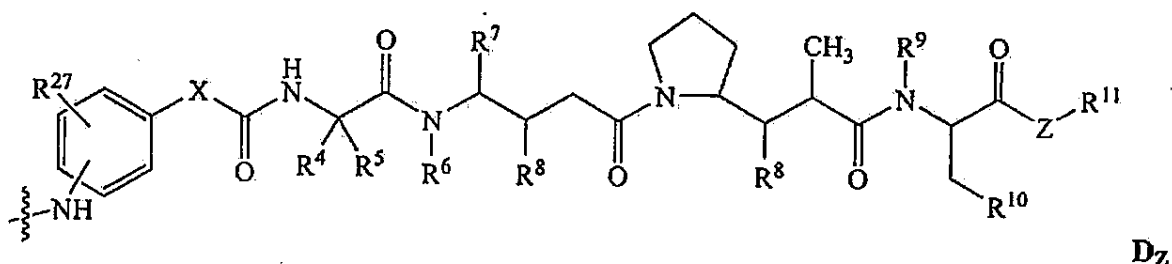
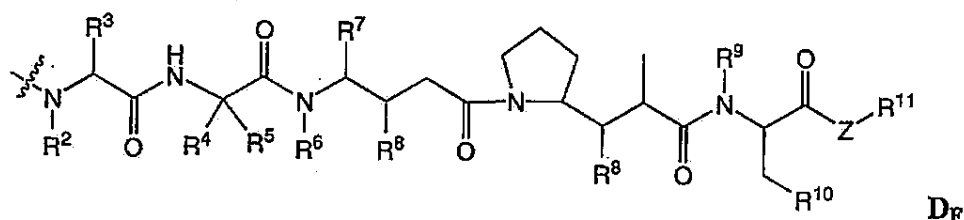
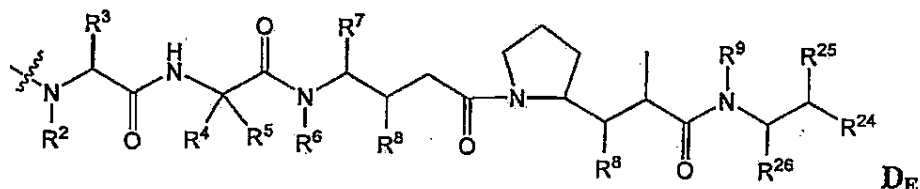
30.

50



薬物単位が、以下の式D<sub>E</sub>、D<sub>F</sub>またはD<sub>Z</sub>：

【化 8 3】



または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有する上記 2 9 に記載のリガンド-薬物コンジュゲート化合物であって、

式中、各位置で独立に、

R<sup>2</sup>は、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニル、またはC<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニルであり、

R<sup>3</sup>は、H、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニル、炭素環、-C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキレン(炭素環)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニレン(炭素環)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニレン(炭素環)、アリール、-C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキレン(アリール)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニレン(アリール)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニレン(アリール)、複素環、-C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキレン(複素環)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニレン(複素環)、または-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニレン(複素環)であり、

R<sup>4</sup>は、H、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニル、炭素環、-C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキレン(炭素環)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニレン(炭素環)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニレン(炭素環)、アリール、-C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキレン(アリール)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニレン(アリール)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニレン(アリール)、複素環、-C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキレン(複素環)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニレン(複素環)、または-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニレン(複素環)であり、

R<sup>5</sup>は、HまたはC<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキルであり、

あるいは、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は一緒になって炭素環を形成し、式-(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>s</sub>-を有し、ここでR<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>は独立に、H、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニル、または炭素環であり、sは2、3、4、5または6であり、

R<sup>6</sup>は、H、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニル、またはC<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニルであり、

R<sup>7</sup>は、H、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニル、炭素環、-C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキレン(炭素環)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニレン(炭素環)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニレン(炭素環)、アリール、-C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキレン(アリール)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニレン(アリール)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニレン(アリール)、複素環、-C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキレン(複素環)、-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニレン(複素環)、または-C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニレン(複素環)であり、

各R<sup>8</sup>は独立に、H、OH、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニル、-O-(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキル)、-O-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニル)、-O-(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキニル)、または炭素

10

20

40

50

環であり、

$R^9$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、または $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、

$R^{24}$ は、アリール、複素環、または炭素環であり、

$R^{25}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、炭素環、 $-O-(C_1 \sim C_{20}$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルキニル)、または $OR^{18}$ であり、 $R^{18}$ は、H、ヒドロキシル保護基、または直接結合であって $OR^{18}$ が=Oを表し、

$R^{26}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、アリール、複素環、または炭素環であり、

$R^{10}$ は、アリールまたは複素環であり、

Zは、O、S、NH、または $NR^{12}$ であり、 $R^{12}$ は、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、または $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、

$R^{11}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(炭素環)、アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(アリール)、複素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(複素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(複素環)、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 、または $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ であり、

mは1～1000の整数であり、

$R^{13}$ は、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキレン、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン、または $C_2 \sim C_{20}$ アルキニレンであり、

$R^{14}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、または $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、

$R^{15}$ は各発生ごとに独立に、H、COOH、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、または $-(CH_2)_n-SO_3-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、

$R^{16}$ は各発生ごとに独立に、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルまたは $-(CH_2)_n-COOH$ であり、

nは0～6の整数であり、

$R^{27}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $O-(C_1 \sim C_{20}$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルキニル)、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-COOH$ 、または $-C(O)OR^{28}$ であり、 $R^{28}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、アリール、複素環、 $-(CH_2CH_2O)_r-H$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_3$ 、または $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2CH_2C(O)OH$ であり、rは1～10の整数であり、

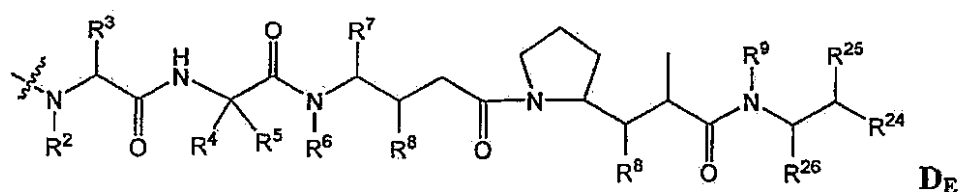
Xは $-(CR^{29})_l-$ であり、 $R^{29}$ は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、lは0～10の整数であり、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、および複素環基は、単独で、または別の基の一部として、任意により置換されている、

上記化合物。

31.

薬物単位が、以下の式 $D_E$ ：

【化84】



または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有する、上記30に記載のリガンド-薬物コンジュゲート化合物。

32.

10

20

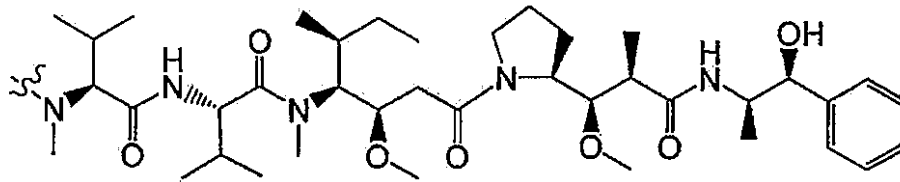
30

40

50

薬物単位が、以下の式：

【化 8 5】

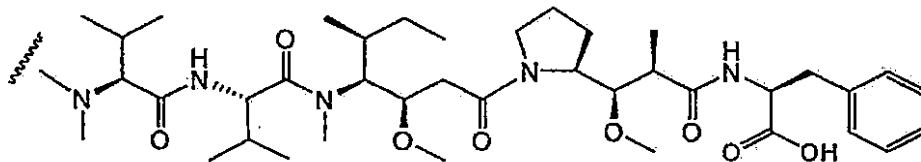


または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有する、上記 3 0 に記載のリガンド-薬物コンジュゲート化合物。

3 3 .

薬物単位が、以下の式：

【化 8 6】



または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有する、上記 3 0 に記載のリガンド-薬物コンジュゲート化合物。

3 4 .

リンカー単位が、以下の式：



または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有し、  
式中、

-A-はストレッチャー単位であり、

aは0または1であり、

各-W-は独立にアミノ酸単位であり、

wは独立に0～12の整数であり、

-Y-はスペーサー単位であり、

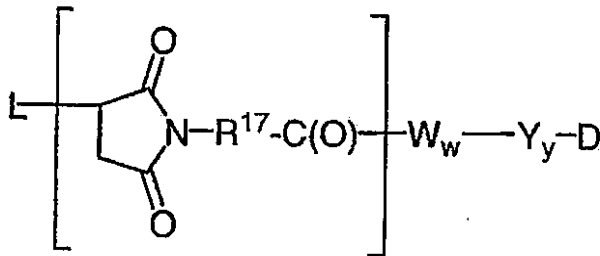
yは0、1または2である、

上記 2 9 ～ 3 3 のいずれかに記載のリガンド-薬物コンジュゲート。

3 5 .

リガンド-薬物コンジュゲート化合物が、以下の式：

【化 8 7】



または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有し、  
式中、

$R^{17}$ は、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルケニレン-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキニレン-、カーボシクロ-、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキレン})-$ 、 $O-(C_1 \sim C_8 \text{アルケニレン})-$ 、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキニレン})-$ 、 $-アリーレン-$ 、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-アリーレン-、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン-アリーレン-、 $-C_2 \sim C_{10}$ アルキニレン-アリーレン-、 $-アリーレン-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-、 $-アリーレン-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン-、 $-アリーレン-C_2 \sim C_{10}$ アルキニレン-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-(カ

10

20

30

40

50

-ボシクロ)-、 $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン-(カーボシクロ)-、 $-C_2 \sim C_{10}$ アルキニレン-(カーボシクロ)-、-(カーボシクロ)- $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-、-(カーボシクロ)- $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン-、-(カーボシクロ)- $C_2 \sim C_{10}$ アルキニレン、ヘテロシクロ-、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-(ヘテロシクロ)-、 $-C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン-(ヘテロシクロ)-、 $-C_2 \sim C_{10}$ アルキニレン-(ヘテロシクロ)-、-(ヘテロシクロ)- $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-、-(ヘテロシクロ)- $C_2 \sim C_{10}$ アルケニレン-、-(ヘテロシクロ)- $C_1 \sim C_{10}$ アルキニレン-、 $-(CH_2CH_2O)_r$ -、または $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ であり、 $r$ は1～10の整数であり、

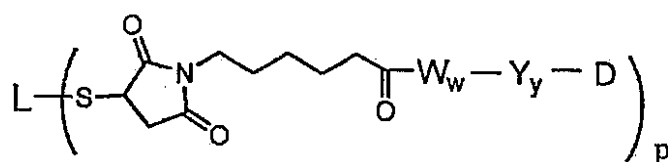
前記アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、カーボシクロ、ヘテロシクロ、およびアリーレン基は、単独で、または別の基の一部分として、任意により置換されている、  
上記34に記載のリガンド-薬物コンジュゲート。

10

36.

リガンド-薬物コンジュゲート化合物が、以下の式：

【化88】



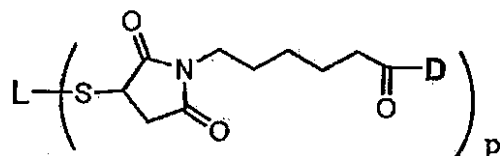
20

または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有する、上記34に記載のリガンド-薬物コンジュゲート。

37.

リガンド-薬物コンジュゲート化合物が、以下の式：

【化89】



30

または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有する、上記34に記載のリガンド-薬物コンジュゲート。

38.

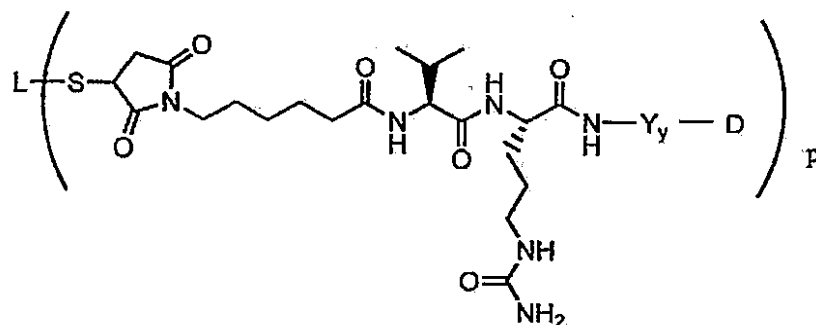
リガンド-薬物コンジュゲート化合物が、以下の式：

または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有する、上記34に記載のリガンド-薬物コンジュゲート。

39.

リガンド-薬物コンジュゲート化合物が、以下の式：

【化90】



40

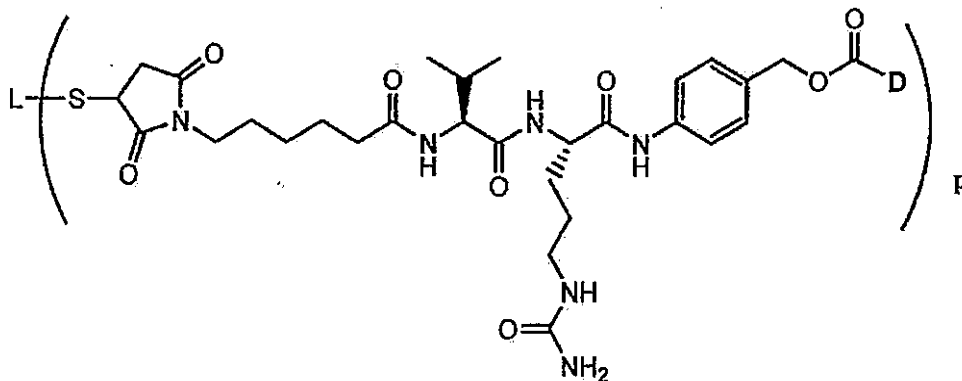
50

または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有する、上記 3 4 に記載のリガンド-薬物コンジュゲート。

4 0 .

リガンド-薬物コンジュゲート化合物が、以下の式：

【化 9 1】



10

または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有する、上記 3 4 に記載のリガンド-薬物コンジュゲート。

4 1 .

w が 2 ~ 12 の整数であり、y が 1 または 2 である、上記 3 4 ~ 3 6 のいずれかに記載のリガンド-薬物コンジュゲート。

20

4 2 .

w が 2 であり、y が 1 または 2 である、上記 3 4 ~ 3 6 のいずれかに記載のリガンド-薬物コンジュゲート。

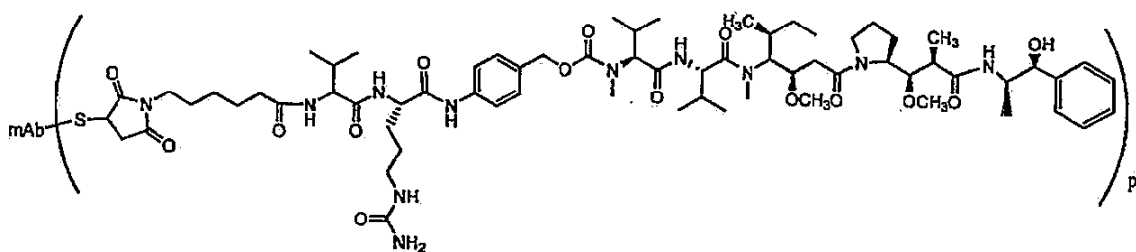
4 3 .

W<sub>w</sub> が -バリン-シトルリン-であり、y が 1 または 2 である、上記 3 4 ~ 3 6 のいずれかに記載のリガンド-薬物コンジュゲート。

4 4 .

リガンド-薬物コンジュゲート化合物が、以下の式：

【化 9 2】



30

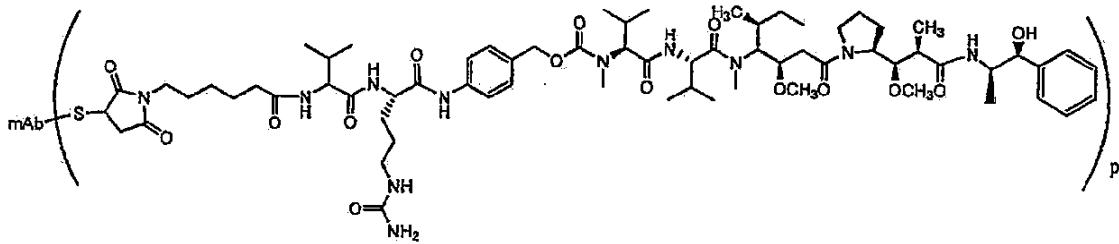
または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有し、式中、mAb-S-は上記 1 ~ 2 7 のいずれかに記載の CD19 結合性物質であり、p は 1 ~ 8 である、上記 2 9 に記載のリガンド-薬物コンジュゲート化合物。

40

4 5 .

以下の式：

## 【化 9 3】

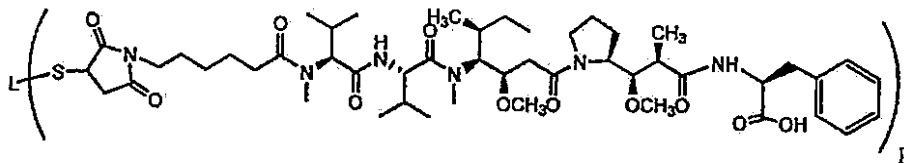


または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有し、式中、mAb-S-は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、かつ配列番号 24 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むCD19結合性物質であり、pは1～8である、リガンド-薬物コンジュゲート化合物。

46 .

リガンド-薬物コンジュゲート化合物が、以下の式：

## 【化 9 4】



または製薬上許容されるその塩もしくは溶媒和物形態を有する、上記 29 に記載のリガンド-薬物コンジュゲート。

47 .

配列番号 2、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、15、17、19、20、21、22、23、24、26もしくは27のアミノ酸配列を含む抗体重鎖または軽鎖可変領域をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

48 .

上記 29～46 のいずれかに記載のリガンド-薬物コンジュゲート化合物および製薬上許容される担体または賦形剤を含む、医薬組成物。

49 .

哺乳動物被験体でのCD19関連疾患の治療方法であって、該哺乳動物被験体で該疾患を治療するのに有効な量の上記 48 に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、上記方法。

50 .

CD19関連疾患がCD19発現癌である、上記 49 に記載の方法。

51 .

CD19関連疾患が、慢性白血病、リンパ腫、または多発性骨髄腫である、上記 50 に記載の方法。

52 .

CD19発現癌が、B型急性リンパ芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫およびホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、またはびまん性大細胞型B細胞リンパ腫である、上記 50 に記載の方法。

53 .

リツキシマブでの治療に対して不応性の癌を有する被験体の治療方法であって、該癌を治療するのに有効な量の上記 48 に記載の医薬組成物を該被験体に投与するステップを含む、上記方法。

54 .

凍結乾燥された上記 29～46 のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート化合物を

10

20

30

40

50

含む容器、および製薬上許容される希釈剤を含む第2の容器を含む、医薬キット。

5 5 .

上記 1 ~ 2 7 のいずれかに記載のCD19結合性物質を細胞毒性薬剤にコンジュゲート化するステップを含む、リガンド-薬物コンジュゲート化合物の製造方法。

5 6 .

上記 1 ~ 2 7 のいずれかに記載のCD19結合性物質を、薬物単位にコンジュゲート化されたリンカー単位にコンジュゲート化するステップを含む、リガンド-薬物コンジュゲート化合物の製造方法。

5 7 .

ヒト化抗体を含む、上記 2 に記載の結合性物質。

10

5 8 .

配列番号 2 と異なる重鎖可変領域フレームワーク位置が配列番号 8 または配列番号 3 2 の対応する位置を占めるアミノ酸により占められ、配列番号 1 7 と異なる軽鎖可変領域フレームワーク位置がも配列番号 2 5 または配列番号 3 4 の対応する位置を占めるアミノ酸により占められている、上記 5 7 に記載のヒト化抗体。

5 9 .

配列番号 2 と異なる重鎖可変領域フレームワーク位置およびそれらの位置を占めるアミノ酸が、それぞれS、F、K、I、A、S、V、およびAにより占められるH75位、H79位、H81位、H82位、H82A位、H82B位、H82C位、およびH89位からなる群より選択され、配列番号 1 7 と異なる軽鎖可変領域フレームワーク位置およびそれらの位置を占めるアミノ酸が、それぞれN、S、S、T、N、S、H、F、およびVにより占められるL2位、L40位、L41位、L42位、L69位、L70位、L71位、L72位およびL83位からなる群より選択される、上記 5 7 に記載のヒト化抗体。

20

6 0 .

軽鎖可変領域フレームワークL83位がVにより占められている、上記 5 9 に記載のヒト化抗体。

6 1 .

重鎖可変領域H75位、H79位、H81位、H82位、H82A位、H82B位、H82C位およびH89位のうち少なくとも1箇所が、それぞれS、F、K、I、A、S、V、およびAにより占められている、上記 5 7 に記載のヒト化抗体。

30

6 2 .

軽鎖可変領域L2位、L69位、L71位、L72位およびL83位のうち少なくとも1箇所が、それぞれN、N、H、FおよびVにより占められている、上記 5 7 に記載のヒト化抗体。

6 3 .

重鎖可変領域フレームワーク中の3個以下のアミノ酸が配列番号 2 と異なり、軽鎖可変領域フレームワーク中の3個以下のアミノ酸が配列番号 1 7 と異なる、上記 5 7 に記載のヒト化抗体。

6 4 .

前記抗体がヒトCD19に結合するときに、配列番号 2 と異なる重鎖CDR中のいずれの位置もヒトCD19と直接接触せず、該抗体がヒトCD19に結合するときに、配列番号 1 7 と異なる軽鎖CDR中のいずれの位置もヒトCD19と直接接触しない、上記 5 7 に記載のヒト化抗体。

40

6 5 .

配列番号 2 と異なる重鎖CDR中の位置が配列番号 3 2 の対応する位置を占めるアミノ酸により占められ、配列番号 1 7 と異なる軽鎖CDR中の位置が配列番号 3 4 の対応する位置を占めるアミノ酸により占められている、上記 5 7 に記載のヒト化抗体。

6 6 .

配列番号 9 と異なる重鎖可変領域のCDR位置がCHR H2の残基60~65のうちにあり、配列番号 3 2 の対応する位置を占めるアミノ酸により占められ、軽鎖可変領域が、それぞれ配列番号 4 9、4 0 および 5 1 と示されるCDR1、CDR2およびCDR3を含む、上記 5 7 に記載のヒト化抗体。

50

6 7 .

重鎖が、それぞれ配列番号 4 6、4 7 および 4 8 と示される CDR1、CDR2 および CDR3 を含み、軽鎖が、それぞれ配列番号 4 9、4 0 および 5 1 と示される CDR1、CDR2 および CDR3 を含む、上記 5 7 に記載のヒト化抗体。

6 8 .

ヒト化抗体を含む、上記 5 に記載の結合性物質。

6 9 .

配列番号 9 と異なる重鎖可変領域フレームワーク位置が配列番号 8 または配列番号 3 3 の対応する位置を占めるアミノ酸により占められ、配列番号 1 7 と異なる軽鎖可変領域フレームワーク位置が配列番号 2 5 または配列番号 3 4 の対応する位置を占めるアミノ酸により占められている、上記 6 8 に記載のヒト化抗体。

10

7 0 .

配列番号 9 と異なる重鎖可変領域フレームワーク位置およびそれらの位置を占めるアミノ酸が、それぞれ F、F、L、K、S、V、F、および A により占められる H24 位、H27 位、H29 位、H71 位、H75 位、H78 位、H79 位、および H89 位からなる群より選択され、配列番号 1 7 と異なる軽鎖可変領域フレームワーク位置およびそれらの位置を占めるアミノ酸が、それぞれ N、S、S、T、N、S、H、F、および V により占められる L2 位、L40 位、L41 位、L42 位、L69 位、L70 位、L71 位、L72 位および L83 位からなる群より選択される、上記 6 8 に記載のヒト化抗体。

7 1 .

軽鎖可変領域フレームワーク L83 位が V により占められている、上記 7 0 に記載のヒト化抗体。

20

7 2 .

重鎖可変領域 H71 位、H75 位、H78 位および H79 位のうち少なくとも 1 箇所が、それぞれ K、S、V および F により占められている、上記 7 0 に記載のヒト化抗体。

7 3 .

軽鎖可変領域 L2 位、L69 位、L71 位、L72 位および L83 位のうち少なくとも 1 箇所が、それぞれ N、N、H、F、および V により占められている、上記 7 0 に記載のヒト化抗体。

7 4 .

重鎖可変領域フレームワーク中の 3 個以下のアミノ酸が配列番号 9 と異なり、軽鎖可変領域フレームワーク中の 3 個以下のアミノ酸が配列番号 1 7 と異なっている、上記 6 8 に記載のヒト化抗体。

30

7 5 .

前記抗体がヒト CD19 に結合するときに、配列番号 9 と異なる重鎖 CDR 中のいずれの位置もヒト CD19 と直接接触せず、該抗体がヒト CD19 に結合するときに、配列番号 1 7 と異なる軽鎖 CDR 中のいずれの位置もヒト CD19 と直接接触しない、上記 6 8 に記載のヒト化抗体。

7 6 .

配列番号 9 と異なる重鎖 CDR 中の位置が配列番号 3 3 の対応する位置を占めるアミノ酸により占められ、配列番号 1 7 と異なる軽鎖 CDR 中の位置が配列番号 3 4 の対応する位置を占めるアミノ酸により占められている、上記 6 8 に記載のヒト化抗体。

40

7 7 .

配列番号 9 と異なる重鎖可変領域の CDR 位置が CHR H2 の残基 60 ~ 65 のうちにあり、配列番号 3 3 の対応する位置を占めるアミノ酸により占められ、軽鎖可変領域が、それぞれ配列番号 4 9、4 0 および 5 1 と示される CDR1、CDR2 および CDR3 を含む、上記 6 8 に記載のヒト化抗体。

7 8 .

重鎖が、それぞれ配列番号 4 6、4 7 および 4 8 と示される CDR1、CDR2 および CDR3 を含み、軽鎖が、それぞれ配列番号 4 9、4 0 および 5 1 と示される CDR1、CDR2 および CDR3 を含む、上記 6 8 に記載のヒト化抗体。

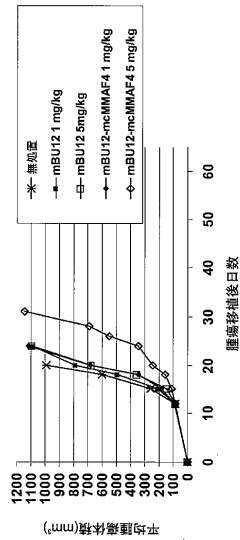
7 9 .

50

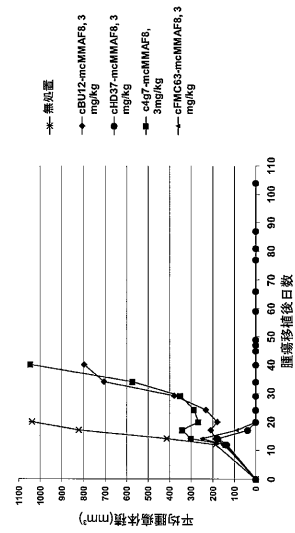




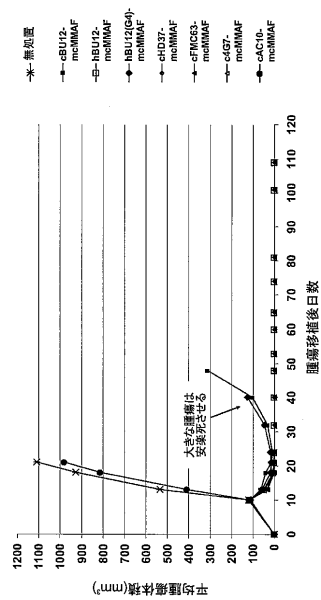
【図 3】



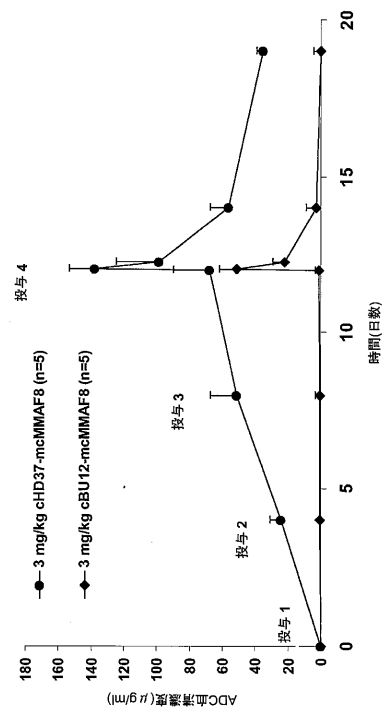
【図 4】



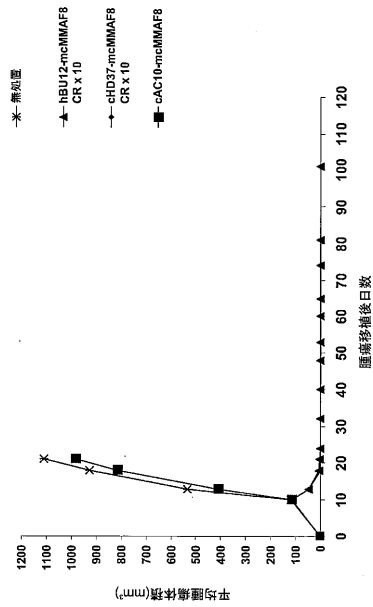
【図 5】



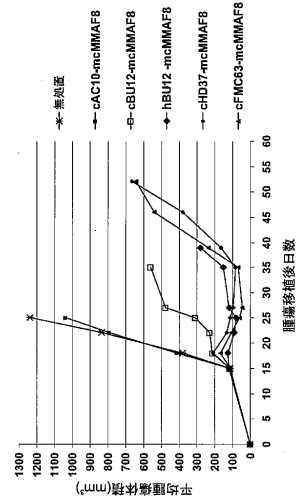
【図 6】



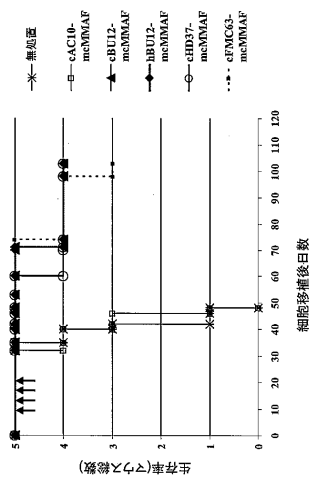
【図 7】



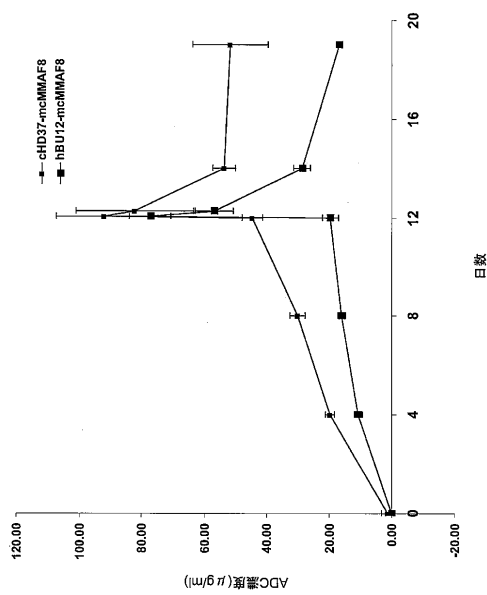
【図 8】



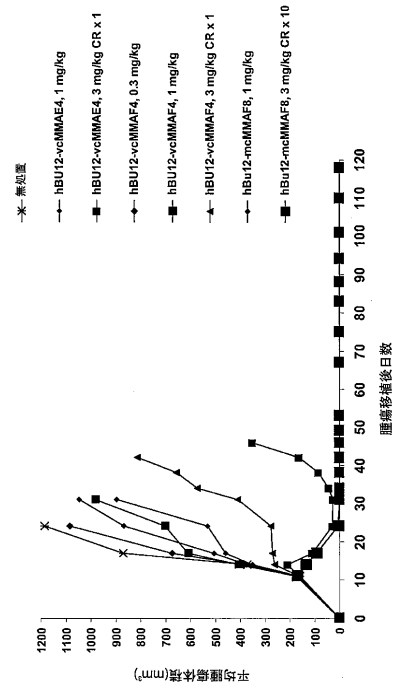
【図 9】



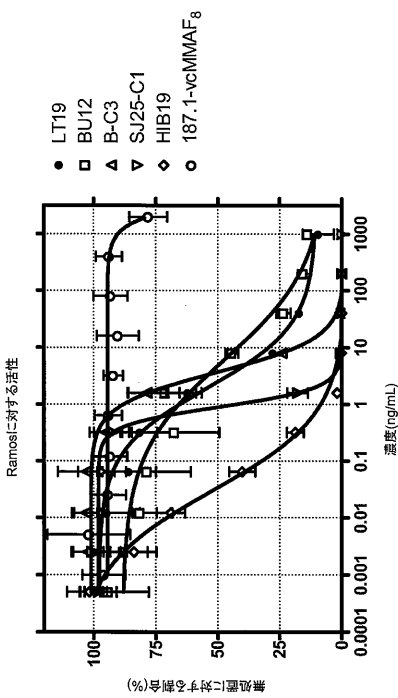
【図 10】



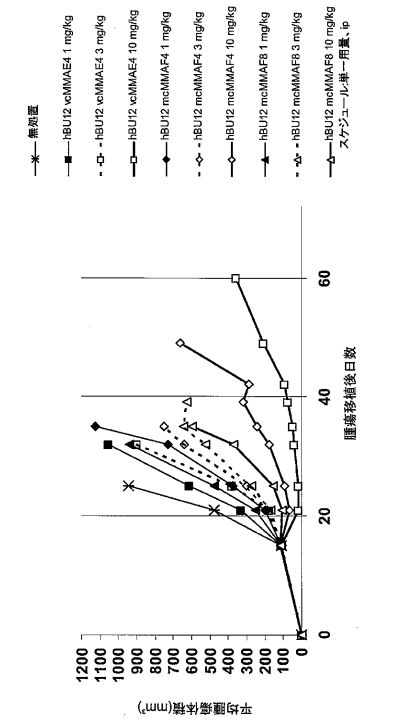
【図 1 1】



【図 1 3】



【図 1 2】

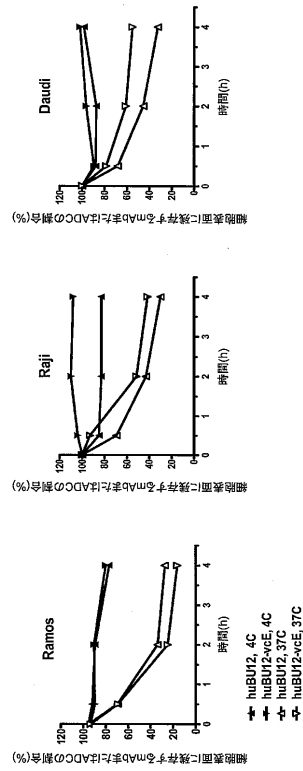


【図 1 4】

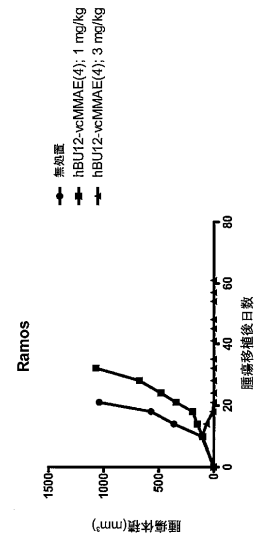
適応症	細胞株	CD21/ 細胞	CD19/ 細胞	IC <sub>50</sub> [nM] 細胞毒性	
				hBU12- mcF(4)	hBU12- vcF(4)
ALL	Nalm-S	0	53773	38	4
	RS4-11	0	38227	0.08	0.05
濾過性リンパ腫	DOHH2	0	40056	5	5
	WSU-NHL	0	38242	0.06	0.4
DLBCL	HT *	952	38534	0.26	0.20
	RL	0	32542	208	>300
	WSU-DLCL2	0	19924	208	51
	CA46 *	2167	57240	0.5	2
バークキットリンパ腫	Nalm-S *	374	28629	6	54
	Ramos	2369	41016	0.06	0.6
	Daudi *	25531	54074	>300	30
	Raji	56660	73798	>300	33.3
CLL	MEC-2	3246	67562	>300	>300
	JVM3	17850	26321	67	42
	Jurkat: CD19+		0	>300	>300

\* WHCI-mcMMAF(4) IC50 = 0.5 nM;

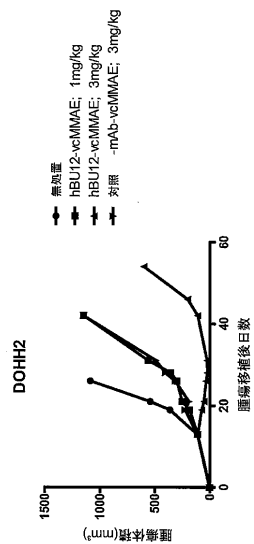
【図 15】



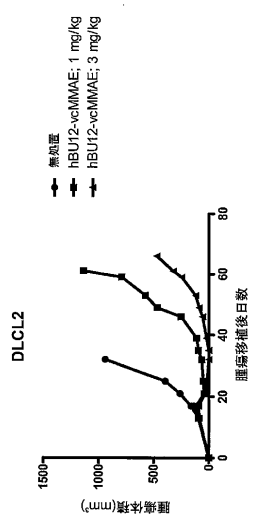
【図 16 A】



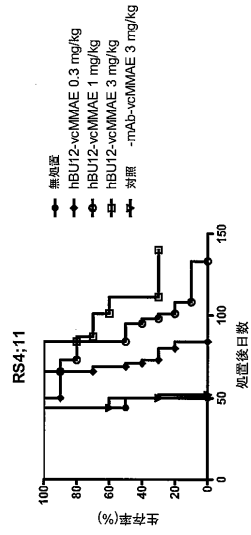
【図 16 B】



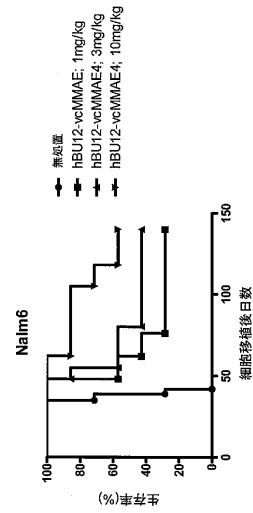
【図 16 C】



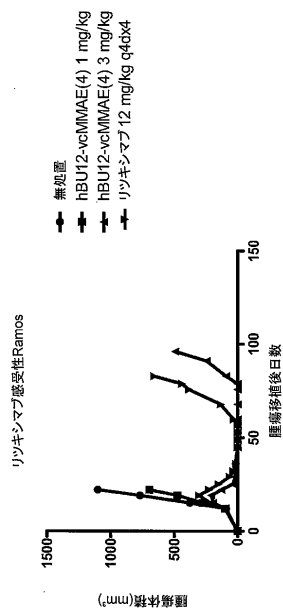
【図 16 D】



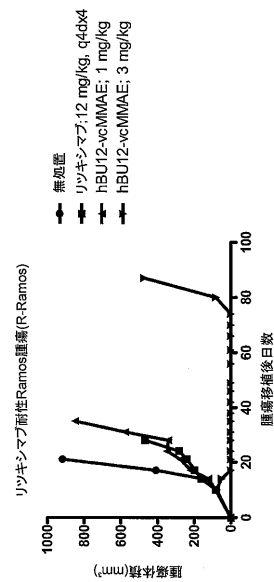
【図 16 E】



【図 17 A】



【図 17 B】





【配列表】

0005727786000001.app



---

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/080,169  
(32)優先日 平成20年7月11日(2008.7.11)  
(33)優先権主張国 米国(US)

## 前置審査

- (72)発明者 マクドナー, シャーロット  
アメリカ合衆国 98021 ワシントン州, ボセル, 30ティーエイチ ドライブ エス.イー  
. 21823
- (72)発明者 チェルベニ, チャールズ, ジー.  
アメリカ合衆国 98021 ワシントン州, ボセル, 30ティーエイチ ドライブ エス.イー  
. 21823
- (72)発明者 ベンジャミン, デニス  
アメリカ合衆国 98021 ワシントン州, ボセル, 30ティーエイチ ドライブ エス.イー  
. 21823
- (72)発明者 カーター, ポール  
アメリカ合衆国 98021 ワシントン州, ボセル, 30ティーエイチ ドライブ エス.イー  
. 21823
- (72)発明者 ガーバー, ハンス, ピーター  
アメリカ合衆国 98021 ワシントン州, ボセル, 30ティーエイチ ドライブ エス.イー  
. 21823
- (72)発明者 フランシスコ, レイ  
アメリカ合衆国 98021 ワシントン州, ボセル, 30ティーエイチ ドライブ エス.イー  
. 21823

審査官 山本 晋也

- (56)参考文献 特表2007-528029(JP, A)  
国際公開第2007/011968(WO, A1)  
国際公開第2007/084693(WO, A1)  
国際公開第2007/103288(WO, A1)  
Flavell DJ et al, British Journal of Cancer, 1995年, Vol. 72, p. 1373-1379

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K  
C07K  
C12N  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)