

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-508009
(P2025-508009A)

(43)公表日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全164頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-552760(P2024-552760)			(71)出願人	391008951
(86)(22)出願日	令和5年3月1日(2023.3.1)				アストラゼネカ・アクチエボラーグ
(85)翻訳文提出日	令和6年9月4日(2024.9.4)				A S T R A Z E N E C A A K T I E B
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/055129				O L A G
(87)国際公開番号	WO2023/169896				スウェーデン国エスエー ー 1 5 1 8 5
(87)国際公開日	令和5年9月14日(2023.9.14)				セーデルティエ
(31)優先権主張番号	63/269,068			(74)代理人	100106518
(32)優先日	令和4年3月9日(2022.3.9)				弁理士 松谷 道子
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100156144
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(72)発明者	パテル, ネキ
		最終頁に続く			英国シービー 2 1 ・ 6 ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グラント・パーク、ミルスタイン・ビルディング、メディミュン・リミテッド
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 F R α に対する結合分子

(57)【要約】

本開示は、F R a に対する結合分子（例えば、抗体又はその抗原結合断片）及び関連する抗体－薬物複合体、並びにそれを含む医薬組成物及びキットを提供する。癌の治療における前記結合分子及び関連する抗体－薬物複合体の使用方法もまた提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 1 の重鎖 CDR1 (SDSATWN)、配列番号 2 の重鎖 CDR2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS)、配列番号 3 の重鎖 CDR3 (GVGSFDY)、配列番号 4 の軽鎖 CDR1 (RASQSISSWLA)、配列番号 5 の軽鎖 CDR2 (KASGLES)、及び配列番号 6 の軽鎖 CDR3 (QQYNSYSQLT)；

(b) 配列番号 7 の重鎖 CDR1 (SYAMS)、配列番号 8 の重鎖 CDR2 (SISSGRSYIYYADSVKG)、配列番号 9 の重鎖 CDR3 (EMQQLALDY)、配列番号 10 の軽鎖 CDR1 (RASQGISNFLA)、配列番号 11 の軽鎖 CDR2 (AASSLQS)、及び配列番号 12 の軽鎖 CDR3 (QQYNSYPFT)；

(c) 配列番号 13 の重鎖 CDR1 (SNSAAWN)、配列番号 14 の重鎖 CDR2 (RTYYRSNWyNDYTL SVKS)、配列番号 15 の重鎖 CDR3 (GVGRFDS)、配列番号 16 の軽鎖 CDR1 (RASQSISSWLA)、配列番号 17 の軽鎖 CDR2 (KASSLES)、及び配列番号 18 の軽鎖 CDR3 (QEYKTYSI FT)；

(d) 配列番号 19 の重鎖 CDR1 (SYNMN)、配列番号 20 の重鎖 CDR2 (SISSGSSYIYYADSMKG)、配列番号 21 の重鎖 CDR3 (GMTTLTFDY)、配列番号 22 の軽鎖 CDR1 (RASQGISTFLA)、配列番号 23 の軽鎖 CDR2 (AASSLQS)、及び配列番号 24 の軽鎖 CDR3 (QQYISYPLT)；

(e) 配列番号 25 の重鎖 CDR1 (SYSMN)、配列番号 26 の重鎖 CDR2 (SISSRSSYVYYADSVKG)、配列番号 27 の重鎖 CDR3 (GMTTLTFDY)、配列番号 28 の軽鎖 CDR1 (RASQGISSFLA)、配列番号 29 の軽鎖 CDR2 (AASSLQS)、及び配列番号 30 の軽鎖 CDR3 (QQYNSYPLT)；又は

(f) 配列番号 31 の重鎖 CDR1 (SDSATWN)、配列番号 32 の重鎖 CDR2 (RTYYRSKWYSDYAVSVKS)、配列番号 33 の重鎖 CDR3 (GGAPFDY)、配列番号 34 の軽鎖 CDR1 (RASQSISSWLA)、配列番号 35 の軽鎖 CDR2 (KASSLES)、及び配列番号 36 の軽鎖 CDR3 (QQYNSYSMYT)；

を含む、抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

(a) 配列番号 37 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VH、及び配列番号 38 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VL；

(b) 配列番号 39 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VH、及び配列番号 40 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VL；

(c) 配列番号 41 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VH、及び配列番号 42 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VL；

(d) 配列番号 43 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VH、及び配列番号 44 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VL；

(e) 配列番号 45 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VH、及び配列番号 46 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VL；又は

(f) 配列番号 47 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VH、及び配列番号 48 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む VL

を含む、請求項 1 に記載の抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3】

- (a) 前記 V H の N 末端（例えば、1 位）に L ；
- (b) 前記 V H の N 末端（例えば、1 位）に E ；又は
- (c) 前記 V H の N 末端（例えば、1 位）に L

を含む、請求項 2 に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4】

- (a) 配列番号 3 7 の V H 及び配列番号 3 8 の V L ；
- (b) 配列番号 3 9 の V H 及び配列番号 4 0 の V L
- (c) 配列番号 4 1 の V H 及び配列番号 4 2 の V L ；
- (d) 配列番号 4 3 の V H 及び配列番号 4 4 の V L ；
- (e) 配列番号 4 5 の V H 及び配列番号 4 6 の V L ；又は
- (f) 配列番号 4 7 の V H 及び配列番号 4 8 の V L

を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5】

前記抗 F R α 抗体は、配列番号 1 0 9 又は 1 1 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む定常重鎖、及び配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む定常軽鎖を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 6】

前記抗 F R α 抗体は、配列番号 1 0 9 又は 1 1 1 の定常重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 1 1 0 の配列を含む定常軽鎖アミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 7】

(a) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 5 0 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖；

(b) 配列番号 5 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖；

(c) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 5 4 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖；

(d) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 5 6 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖；

(e) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 5 8 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖；又は

(f) 配列番号 5 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 6 0 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体。

【請求項 8】

(a) 配列番号 4 9 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 5 0 の軽鎖アミノ酸配列；

(b) 配列番号 5 1 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 5 2 の軽鎖アミノ酸配列；

(c) 配列番号 5 3 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 5 4 の軽鎖アミノ酸配列；

(d) 配列番号 5 5 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 5 6 の軽鎖アミノ酸配列；

(e) 配列番号 5 7 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 5 8 の軽鎖アミノ酸配列；又は

(f) 配列番号 5 9 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 6 0 の軽鎖アミノ酸配列

を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体。

【請求項 9】

F a b 断片、F a b ' 断片、又は F (a b ') 2 断片である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の抗原結合断片。

【請求項 10】

ヒト化、キメラ又は完全ヒトであり、好ましくは完全ヒトである、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 11】

モノクローナル、ポリクローナル、組換え又は多重特異性である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 12】

I g G 1 型、I g G 2 型、I g G 3 型又は I g G 4 型、好ましくは I g G 1 型のものである、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 13】

1 つ又は複数の異種薬剤と複合化されている、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 14】

前記 1 つ又は複数の異種薬剤は、細胞毒、抗微生物剤、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、脂質、生体応答修飾物質、医薬品、リンホカイン、異種抗体、異種抗体の断片、検出可能な標識、ポリエチレングリコール (P E G)、放射性同位体、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 13 に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 15】

前記異種薬剤は、細胞毒である、請求項 14 に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 16】

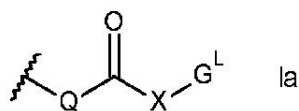
請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片を含み、前記抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、細胞毒に複合化されている、抗体薬物複合体 (A D C) 。

【請求項 17】

前記細胞毒は、

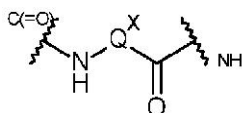
【化 1】

(Ia):



〔式中、Q は、

【化 2】



(式中、Q^X は、Q がアミノ酸残基、ジペプチド残基、トリペプチド残基又はテトラペプチド残基であるようなものである)

であり；

X は：

10

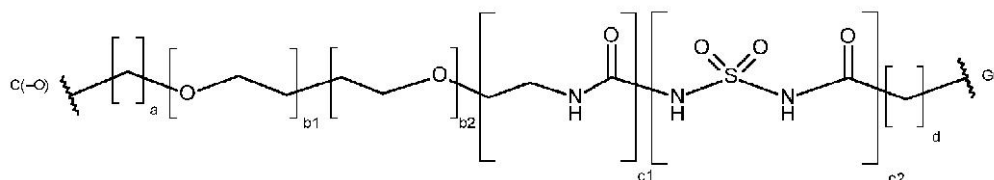
20

30

40

50

【化 3】

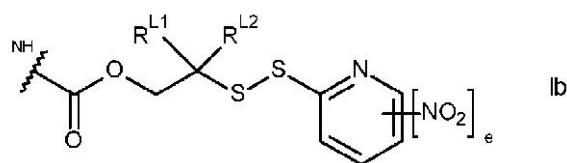


〔式中、 $a = 0 \sim 5$ 、 $b1 = 0 \sim 16$ 、 $b2 = 0 \sim 16$ 、 $c1 = 0$ 又は 1 、 $c2 = 0$ 又は 1 、 $d = 0 \sim 5$ であり、少なくとも $b1$ 又は $b2 = 0$ （すなわち、 $b1$ 及び $b2$ の一方だけが 0 でない場合がある）であり、少なくとも $c1$ 又は $c2 = 0$ （すなわち、 $c1$ 及び $c2$ の一方だけが 0 でない場合がある）である〕であり；

G^L は、抗 $FR\alpha$ 抗体又はその抗原結合断片に結合するためのリンカーである〕；

【化 4】

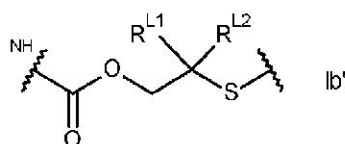
(Ib):



〔式中、 R^{L1} 及び R^{L2} は、独立して H 及びメチルから選択されるか、又はそれらが結合する炭素原子とともにシクロプロピレン基若しくはシクロブチレン基を形成し； e は、 0 又は 1 である〕；或いは

【化 5】

(Ib'):



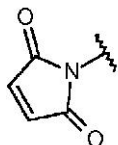
〔式中、 R^{L1} 及び R^{L2} は、独立して H 及びメチルから独立して選択されるか、又はそれらが結合する炭素原子とともにシクロプロピレン基若しくはシクロブチレン基を形成する〕

から選択されるリンカー R^L を介して前記抗 $FR\alpha$ 抗体又はその抗原結合断片に連結されている、請求項 14 又は 15 に記載の抗 $FR\alpha$ 抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項 16 に記載の ADC。

【請求項 18】

G^L は、

【化 6】



である、請求項 17 に記載の抗 $FR\alpha$ 抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項 17 に記載の ADC。

【請求項 19】

R^L は、

10

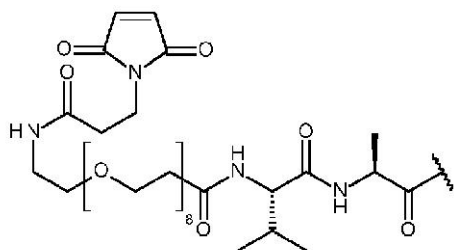
20

30

40

50

【化 7】



である、請求項 17 又は 18 に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項 17 又は 18 に記載の A D C。 10

【請求項 20】

前記細胞毒は、トポイソメラーゼ I 阻害剤、ツブリシン誘導体、ピロロベンゾジアゼピン、又はこれらの組み合わせから選択され、好ましくは、前記細胞毒は、トポイソメラーゼ I 阻害剤である、請求項 14 若しくは 15 又は 17～19 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項 16～19 のいずれか一項に記載の A D C。 20

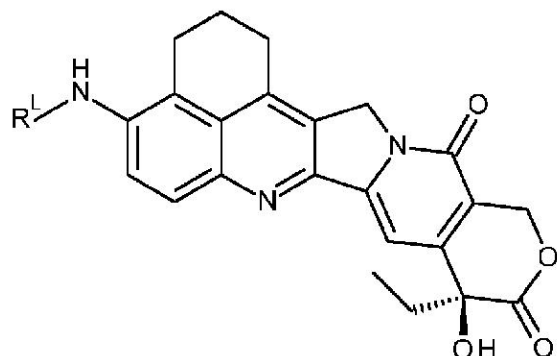
【請求項 21】

細胞毒に連結された抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片を含む A D C であって、前記細胞毒はトポイソメラーゼ I 阻害剤である、A D C。 20

【請求項 22】

前記トポイソメラーゼ I 阻害剤は、式 (I)：

【化 8】



並びにその塩及び溶媒和物で表され、

式中、R^Lは、請求項 17～19 のいずれか一項に定義されている、

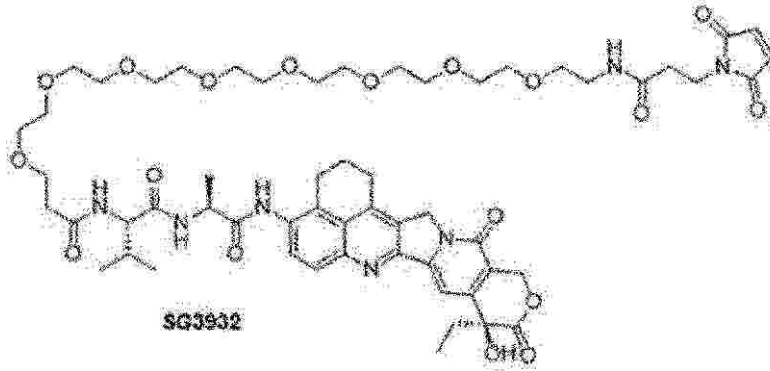
請求項 20 に記載の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項 20 又は 21 に記載の A D C。 30

【請求項 23】

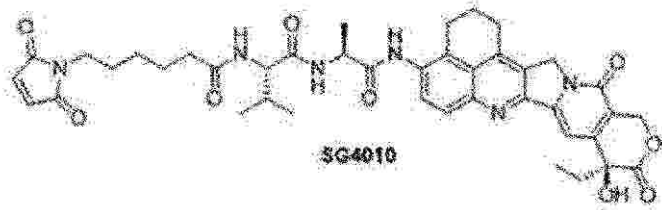
前記トポイソメラーゼ I 阻害剤は、 40

40

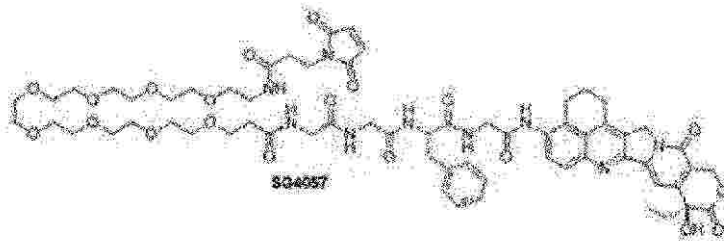
【化 9】



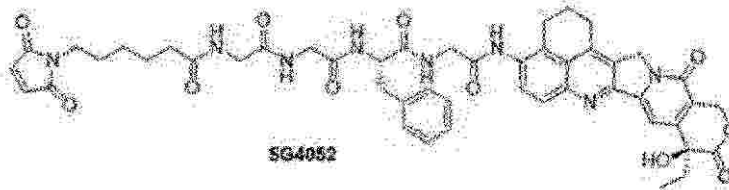
10



20

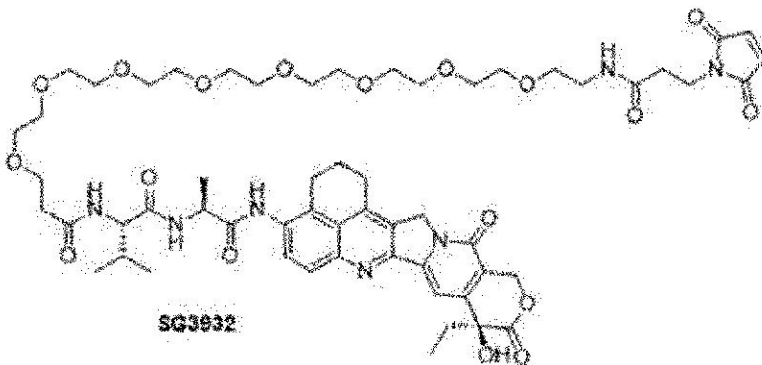


; 及び/又は



30

であり、好ましくは、前記トポイソメラーゼ I 阻害剤は、
【化 10】



40

である、請求項 20 又は 22 に記載の抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項 20～22 のいずれか一項に記載の ADC。

【請求項 24】

薬物抗体比 (DAR) は約 1～20 の範囲であり、任意選択により DAR の範囲は、約

50

1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択される、請求項14若しくは15、17～20又は22若しくは23のいずれか一項に記載の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項16～23のいずれか一項に記載のADC。

【請求項25】

前記DARは約8又は約4であり、好ましくはDARは約8である、請求項24に記載の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項24に記載のADC。

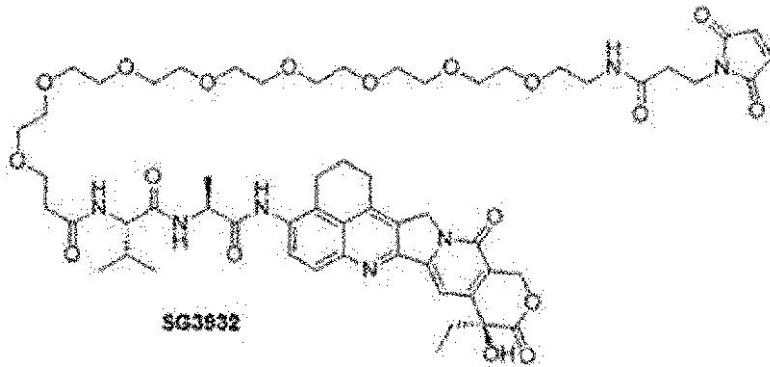
【請求項26】

細胞毒に連結された抗FR α 抗体又はその抗原結合断片を含むADCであって、

(i) 前記抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号1の重鎖CDR1 (SDSATWN)、配列番号2の重鎖CDR2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS)；配列番号3の重鎖CDR3 (GVGSFDY)；配列番号4の軽鎖CDR1 (RASQSISSWLA)；配列番号5の軽鎖CDR2 (KASGLEES)；及び配列番号6の軽鎖CDR3 (QQYNSYSQLT)を含み、任意選択により前記抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号37のVH及び配列番号38のVLを有し；

(ii) 前記細胞毒は、トポイソメラーゼI阻害剤SG3932

【化11】



であり、且つ

(iii) DARは、約8である、ADC。

【請求項27】

請求項1～15、17～20及び22～25のいずれか一項に記載の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項28】

(a) プロモーターと作動可能に結合された請求項27に記載のポリヌクレオチド；又は

(b) 請求項2～4のいずれか一項で定義されるVH領域をコードするポリヌクレオチド、及び請求項2～4のいずれか一項で定義されるVL領域をコードするポリヌクレオチド（ここで、前記ポリヌクレオチドは、1つ以上のプロモーターと作動可能に結合されている）

を含むベクター。

【請求項29】

請求項5又は6で定義される定常重鎖領域をコードするポリヌクレオチド、及び請求項5又は6で定義される定常軽鎖領域をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項28に記載のベクター。

【請求項30】

請求項27に記載のポリヌクレオチド或いは請求項28又は29に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項31】

請求項1～15、17～20又は22～25のいずれか一項に記載の抗FR α 抗体又は

その抗原結合断片を調製するための方法であって、

(a) 請求項 28 又は 29 に記載のベクターをトランスフェクトする工程；

(b) 前記抗体又は抗原結合断片の合成を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養する工程；及び

(c) 前記培養物から前記抗体又は抗原結合断片を回収する工程を含む方法。

【請求項 32】

請求項 1～15、17～20 又は 22～25 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 16～26 のいずれか一項に記載の A D C と、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物。

10

【請求項 33】

対象における F R α 陽性細胞の集団を枯渇させる方法で使用するための、請求項 1～15、17～20 又は 22～25 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体若しくはその抗原結合断片、請求項 16～26 のいずれか一項に記載の A D C、又は請求項 32 に記載の医薬組成物であって、前記方法は、前記抗 F R α 抗体若しくはその抗原結合断片、前記 A D C、又は前記医薬組成物を前記対象に投与することを含み、任意選択により、前記 F R α 陽性細胞は、F R α 陽性癌細胞である、前記抗 F R α 抗体若しくはその抗原結合断片、前記 A D C、又は前記医薬組成物。

【請求項 34】

F R α 発現に関連する癌の治療に使用するための、請求項 1～15、17～20 又は 22～25 のいずれか一項に記載の抗 F R α 抗体若しくはその抗原結合断片、請求項 16～26 のいずれか一項に記載の A D C、又は請求項 32 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 35】

前記癌は、F R α の不均一な発現及び／又は F R α の低発現を有する癌細胞を含み、任意選択により、前記癌細胞は I g r o v - 1 細胞株と同様の F R α 発現を有する、請求項 34 に記載の使用のための抗 F R α 抗体若しくはその抗原結合断片、A D C、又は医薬組成物。

【請求項 36】

前記癌は、卵巣癌、肺癌、子宮内膜癌、膵臓癌、胃癌、腎細胞癌（R C C）、結腸直腸癌、頭頸部扁平上皮癌（H N S C C）、乳癌（例えば、T N B C）、子宮頸癌及び悪性胸膜中皮腫から選択され、好ましくは、前記癌は、卵巣癌及び肺癌から選択される、請求項 34 又は 35 に記載の使用のための抗 F R α 抗体若しくはその抗原結合断片、A D C、又は医薬組成物。

30

【請求項 37】

前記肺癌は非小細胞肺癌（N S C L C）であり、任意選択により、前記 N S C L C は、扁平上皮 N S C L C、腺癌 N S C L C、又はこれらの組み合わせから選択される、請求項 36 に記載の使用のための抗 F R α 抗体若しくはその抗原結合断片、A D C、又は医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、癌の治療のための F R α に対する結合分子（例えば、抗体又はその結合断片）、及び関連する抗体薬物複合体に関する。

【背景技術】

【0002】

癌は、癌発症のメカニズム及び多数の潜在的な抗癌薬の開発に対する長年の研究にもかかわらず、依然として世界中で最も多く見られる疾患の 1 つである。特に、肺癌及び卵巣癌は、それぞれ女性において 3 番目及び 5 番目に多い癌である。化学療法及び放射線療法が最も一般的な癌治療である。それにもかかわらず、これらの治療は、疲労、悪心及び脱毛を含む、様々な負の副作用に繋がっている。これらの問題は、化学療法治療が長期間に

50

わたって頻繁に施されるという事実によって複雑化している。この数十年にわたり、癌に対する多くの抗体療法が開発され、市販されてきており、これが、多くの癌タイプに対する従来の形態の化学療法の必要性の低下に繋がっている。抗体（例えば、モノクローナル抗体）を作製するための方法の利用可能性がこの期間を通して大きく向上したにもかかわらず、臨床的に利用可能な抗癌抗体は比較的少数であり、広範な癌タイプを標的として使用し得るものはさらに少ない。さらに、標的抗原の発現率及び抗体結合後の癌細胞におけるその後の影響により一般的に制限される治療用抗体の効力を上昇させる必要がある。抗体薬物複合体（ADC）を生成するためにモノクローナル抗体を細胞傷害性分子に複合化することは、悪性腫瘍のための標的療法を送達するための新規な手法である。この手法は、特定の標的（HER2、CD30及びCD79b）でうまく実施されており、それぞれ、fam-トラスツズマブデルクステカン-nxki（乳癌及び胃癌）、ブレンツキシマブベドチン（ホジキンリンパ腫）、及びボラツズマブベドチン-piiq（非ホジキンリンパ腫）などの市販ADCに至っている。

10

【0003】

葉酸受容体（FR）は細胞表面に存在する膜結合タンパク質であり、したがって、新しいADCを開発するために利用され得る。FRファミリーには、FR α 、FR β 、FR γ 及びFR δ が含まれる。FRは葉酸分子と結合し、それらを細胞内に輸送し、その結果、葉酸分子は、葉酸サイクルに送達され、ヌクレオチドの代謝を支援する。特に、葉酸は、DNAの合成、メチル化及び修復に重要である（非特許文献1）。

【0004】

FR α は、葉酸の活性型である5-メチルテトラヒドロ葉酸（5-MTF）に対して高い親和性を有するグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー膜タンパク質である。FR α は、FOLR1遺伝子によって発現される。これまでの研究では、FR α が胚形成に重要な役割を果たすことが示された（非特許文献2）。しかしながら、成人における葉酸輸送は、還元された葉酸担体及びプロトン結合葉酸輸送体の遍在的発現によって主に駆動される（非特許文献3）。成人におけるFR α 発現の分布は、通常、脈絡叢、腎臓、肺及び胎盤などの極性上皮の頂端表面に限定される。

20

【0005】

葉酸受容体1（FOLR1）又は葉酸結合タンパク質（FBP）としても知られるFR α の過剰発現は、卵巣癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌（NSCLC））及び乳癌腫などの腫瘍細胞で頻繁に観察される（非特許文献4）。特に、これまでの研究により、卵巣癌患者の血液中の可溶性FR α のレベルが上昇していることが見出され、FR α を早期卵巣癌のバイオマーカーとして応用する可能性を支持している（非特許文献5）。前臨床卵巣癌モデルはまた、FR α の過剰発現が腫瘍の進行と関連し、葉酸のFR α への結合が癌誘発遺伝子STAT3の活性化を媒介し得ることを明らかにした（非特許文献6）。

30

【0006】

当該技術分野におけるFR α に対する抗体は、不十分な内部移行、短い半減期、及び不十分な細胞毒性などの欠点を有する。さらに、当該技術分野におけるFR α 標的化ADCは、角膜炎症（メイタンシノイド弾頭DM4とスルホ-SPBDリンカーを介して複合化された抗FR α 抗体M9346Aからなるミルベツキシマブソラブタンシン）（非特許文献7）、間質性肺疾患（エリブリン弾頭に複合化されたLK26に由来するヒト化抗体ファルレツズマブからなるMORA b-202）（非特許文献8）、並びに神経障害及び好中球減少症（ヘミアステルリン弾頭に複合化された抗FR α 抗体SP8166からなるSTRO-002）（非特許文献9）などの、臨床試験において特定の毒性と関連している微小管阻害剤を使用する。最近の研究ではまた、癌細胞が微小管阻害剤に対する耐性を獲得し得ることが見出された（非特許文献10）。

40

【0007】

さらに、最近のFR α 標的化ADCは、複雑な構造を有する抗体を使用している。例えば、ADC IMG N151は、ADCミルベツキシマブソラブタンシンから開発された。IMG N151の抗体は、ヘテロ二量体化を強制するノブインホール変異を含む非対称

50

でバイパルトピックの二重特異性分子である。抗体の半分はIgG1重鎖及び軽鎖からなり、その可変ドメインはミルベツキシマブと共有されている。残りの半分は、FR α 上の第2の別個のエピトープに結合するscFv-Fc融合タンパク質からなる。IgGの改変は、生理化学的特性（したがって、開発可能性又は製造可能性）及び免疫原性の点で負の結果を有し得る。二重特異性フォーマットは、発現力価を低下させ、凝集を増加させる傾向を有することが知られており、これは、より複雑な製造プロセス及び製品コストの増加をもたらし得る。一方、STRO-002の抗体には、薬物の部位特異的複合化のために、各重鎖上の2つの指定された部位に非天然アミノ酸のp-アジドメチルフェニルアラニン（pAMF）が含まれている。非天然アミノ酸の導入は、特異的であるが、実質的な細胞株又は無細胞操作の取り組みが必要となり得、mAb産生力価をより低下させる可能性がある。

10

【0008】

したがって、高濃度の細胞傷害性ペイロードを標的細胞に送達し、患者に対してより低い毒性で非常に有効な腫瘍細胞殺滅を媒介することができるFR α を標的としたADCの開発が必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Cheung, et al., *Oncotarget*. 2016; 7 (32): 52553-52574

20

【非特許文献2】Kelemen, *Int J Cancer*. 2006; 119 (2): 243-250

【非特許文献3】Zhao, et al., *Annu Rev Nutr*. 2011; 31: 177-201

【非特許文献4】Shi, et al., *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9: 4989-4996

【非特許文献5】Basal, et al., *PLoS One*. 2009; 4 (7): e6292

【非特許文献6】Hansen, et al., *Cell Signal*. 2015; 27 (7): 1356-1368

30

【非特許文献7】Moore et al. (2017) *Cancer* 123: 3080-7

【非特許文献8】Sato, et al. (2020) *ESMO Abstract* <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.01.026>

【非特許文献9】Naumann, et al. (2021) *J Clin Oncol* 39 (Suppl 15/abstr 5550) https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.5550

【非特許文献10】Ganguly, et al., *Biochim Biophys Acta*. 2011 Dec; 1816 (2): 164-171

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、特に、核酸分子、ベクター、宿主細胞、医薬組成物を含む抗FR α 抗体、及び医薬組成物を含むキット、並びに治療の方法を含む医薬組成物の使用を提供する。

【0011】

一態様では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片が提供され、抗体又はその抗原結合断片は、

(a) 配列番号1の重鎖CDR1 (SDSATWN)、配列番号2の重鎖CDR2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS)、配列番号3の重鎖CDR3 (GVGSFDY)

50

、配列番号４の軽鎖ＣＤＲ１（ＲＡＳＱＳＩＳＳＷＬＡ）、配列番号５の軽鎖ＣＤＲ２（ＫＡＳＧＬＥＳ）、及び配列番号６の軽鎖ＣＤＲ３（ＱＱＹＮＳＹＳＱＬＴ）；

（ｂ）配列番号７の重鎖ＣＤＲ１（ＳＹＡＭＳ）、配列番号８の重鎖ＣＤＲ２（ＳＩＳＳＧＲＳＹＩＹＹＡＤＳＶＫＧ）、配列番号９の重鎖ＣＤＲ３（ＥＭＱＱＬＡＬＤＹ）、配列番号１０の軽鎖ＣＤＲ１（ＲＡＳＱＧＩＳＮＦＬＡ）、配列番号１１の軽鎖ＣＤＲ２（ＡＡＳＳＬＱＳ）、及び配列番号１２の軽鎖ＣＤＲ３（ＱＱＹＮＳＹＰＦＴ）；

（ｃ）配列番号１３の重鎖ＣＤＲ１（ＳＮＳＡＡＷＮ）、配列番号１４の重鎖ＣＤＲ２（ＲＴＹＹＲＳＮＷＹＮＤＹＴＬＳＶＫＳ）、配列番号１５の重鎖ＣＤＲ３（ＧＶＧＲＦＤＳ）、配列番号１６の軽鎖ＣＤＲ１（ＲＡＳＱＳＩＳＳＷＬＡ）、配列番号１７の軽鎖ＣＤＲ２（ＫＡＳＳＬＥＳ）、及び配列番号１８の軽鎖ＣＤＲ３（ＱＥＹＫＴＹＳＩＦＴ）；

（ｄ）配列番号１９の重鎖ＣＤＲ１（ＳＹＮＭＮ）、配列番号２０の重鎖ＣＤＲ２（ＳＩＳＳＧＳＳＹＩＹＹＡＤＳＭＫＧ）、配列番号２１の重鎖ＣＤＲ３（ＧＭＴＴＬＴＦＤＹ）、配列番号２２の軽鎖ＣＤＲ１（ＲＡＳＱＧＩＳＴＦＬＡ）、配列番号２３の軽鎖ＣＤＲ２（ＡＡＳＳＬＱＳ）、及び配列番号２４の軽鎖ＣＤＲ３（ＱＱＹＩＳＹＰＬＴ）；

（ｅ）配列番号２５の重鎖ＣＤＲ１（ＳＹＳＭＮ）、配列番号２６の重鎖ＣＤＲ２（ＳＩＳＳＲＳＳＹＶＹＹＡＤＳＶＫＧ）、配列番号２７の重鎖ＣＤＲ３（ＧＭＴＴＬＴＦＤＹ）、配列番号２８の軽鎖ＣＤＲ１（ＲＡＳＱＧＩＳＳＦＬＡ）、配列番号２９の軽鎖ＣＤＲ２（ＡＡＳＳＬＱＳ）、及び配列番号３０の軽鎖ＣＤＲ３（ＱＱＹＮＳＹＰＬＴ）；
又は

（ｆ）配列番号３１の重鎖ＣＤＲ１（ＳＤＳＡＴＷＮ）、配列番号３２の重鎖ＣＤＲ２（ＲＴＹＹＲＳＫＷＹＳＤＹＡＶＳＶＫＳ）、配列番号３３の重鎖ＣＤＲ３（ＧＧＡＰＦＤＹ）、配列番号３４の軽鎖ＣＤＲ１（ＲＡＳＱＳＩＳＳＷＬＡ）、配列番号３５の軽鎖ＣＤＲ２（ＫＡＳＳＬＥＳ）、及び配列番号３６の軽鎖ＣＤＲ３（ＱＱＹＮＳＹＳＭＹＴ）

を含む。

【００１２】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗ＦＲα抗体又はその抗原結合断片は、

（ａ）配列番号３７のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号３８のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＬ；

（ｂ）配列番号３９のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号４０のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＬ；

（ｃ）配列番号４１のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号４２のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＬ；

（ｄ）配列番号４３のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号４４のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＬ；

（ｅ）配列番号４５のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号４６のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＬ；又は

（ｆ）配列番号４７のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号４８のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＶＬ
を含む。

【００１３】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗ＦＲα抗体又はその抗原結合断片は

- 、
- (a) V H の N 末端 (例えば、1 位) に L ;
 - (b) V H の N 末端 (例えば、1 位) に E ; 又は
 - (c) V H の N 末端 (例えば、1 位) に Q
- を含む。

【0014】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は

- 、
- (a) 配列番号 37 の V H 及び配列番号 38 の V L ;
 - (b) 配列番号 39 の V H 及び配列番号 40 の V L
 - (c) 配列番号 41 の V H 及び配列番号 42 の V L ;
 - (d) 配列番号 43 の V H 及び配列番号 44 の V L ;
 - (e) 配列番号 45 の V H 及び配列番号 46 の V L ; 又は
 - (f) 配列番号 47 の V H 及び配列番号 48 の V L
- を含む。

【0015】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体は、配列番号 109 又は 111 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む定常重鎖、及び配列番号 110 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む定常軽鎖を含む。

【0016】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体は、配列番号 109 又は 111 の定常重鎖アミノ酸配列と配列番号 110 の定常軽鎖アミノ酸配列とを含む。

【0017】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体は、

- (a) 配列番号 49 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 50 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖 ;
 - (b) 配列番号 51 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 52 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖 ;
 - (c) 配列番号 53 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 54 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖 ;
 - (d) 配列番号 55 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 56 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖 ;
 - (e) 配列番号 57 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 58 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖 ; 又は
 - (f) 配列番号 59 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 60 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖
- を含む。

【0018】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体は、

- (a) 配列番号 49 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 50 の軽鎖アミノ酸配列 ;
- (b) 配列番号 51 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 52 の軽鎖アミノ酸配列 ;
- (c) 配列番号 53 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 54 の軽鎖アミノ酸配列 ;
- (d) 配列番号 55 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 56 の軽鎖アミノ酸配列 ;

(e) 配列番号 57 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 58 の軽鎖アミノ酸配列；又は

(f) 配列番号 59 の重鎖アミノ酸配列及び配列番号 60 の軽鎖アミノ酸配列

を含む。

【0019】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗原結合断片は、Fab断片、Fab'断片、又はF(ab')₂断片である。

【0020】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、ヒト化、キメラ又は完全ヒトであり、好ましくは抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、完全ヒトである。

【0021】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、モノクローナル、ポリクローナル、組換え又は多重特異性である。

【0022】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、IgG1型、IgG2型、IgG3型又はIgG4型、好ましくはIgG1型のものである。

【0023】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、1つ又は複数の異種薬剤と複合化されている。

【0024】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、1つ又は複数の異種薬剤は、細胞毒、抗微生物剤、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、脂質、生体応答修飾物質、医薬品、リンホカイン、異種抗体、異種抗体の断片、検出可能な標識、ポリエチレングリコール(PEG)、放射性同位体、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0025】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、異種薬剤は、細胞毒である。

【0026】

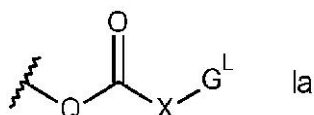
別の態様では本発明の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片を含む抗体薬物複合体(ADC)であって、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、細胞毒に複合化されている抗体薬物複合体が提供される。

【0027】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、細胞毒は、以下から選択されるリンカー^Lを介して抗FR α 抗体又はその抗原結合断片に連結されている：

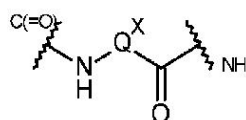
【化1】

(Ia):



【式中、Qは、

【化2】

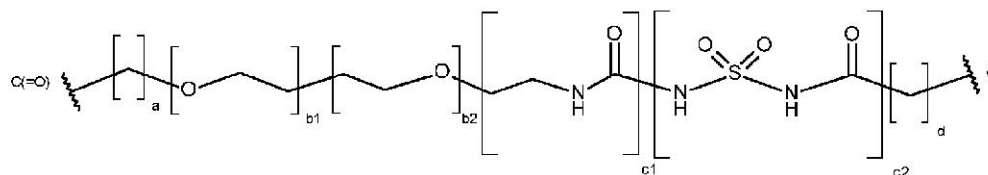


(式中、Q^Xは、Qがアミノ酸残基、ジペプチド残基、トリペプチド残基又はテトラペプチド残基であるようなものである)

であり；

X は、

【化 3】



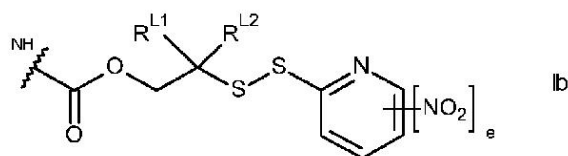
(式中、 $a = 0 \sim 5$ 、 $b_1 = 0 \sim 16$ 、 $b_2 = 0 \sim 16$ 、 $c_1 = 0$ 又は 1 、 $c_2 = 0$ 又は 1 、 $d = 0 \sim 5$ であり、少なくとも b_1 又は $b_2 = 0$ (すなわち、 b_1 及び b_2 の一方だけが 0 でない場合がある)であり、少なくとも c_1 又は $c_2 = 0$ (すなわち、 c_1 及び c_2 の一方だけが 0 でない場合がある)である)

であり；

G^Lは、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片に結合するためのリンカーである]；

【化 4】

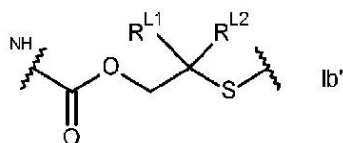
(Ib):



〔式中、 R^{L1} 及び R^{L2} は、独立してH及びメチルから選択されるか、又はそれらが結合する炭素原子とともにシクロプロピレン基若しくはシクロブチレン基を形成し；eは、0又は1である〕；或いは

【化 5】

(Pb²⁺):

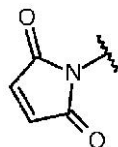


〔式中、 R^{L1} 及び R^{L2} は、独立してH及びメチルから独立して選択されるか、又はそれらが結合する炭素原子とともにシクロプロピレン基若しくはシクロブチレン基を形成する〕。

【 0 0 2 8 】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、 G^L は、

【化 6】

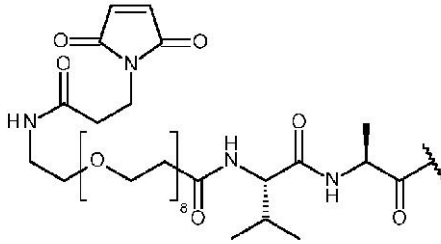


である。

【 0 0 2 9 】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、 R^L は、

【化 7】



である。

10

【0030】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、細胞毒は、トポイソメラーゼⅠ阻害剤、ツブリシン誘導体、ピロロベンゾジアゼピン、又はこれらの組み合わせから選択される。好ましい実施形態では、細胞毒は、トポイソメラーゼⅠ阻害剤である。

【0031】

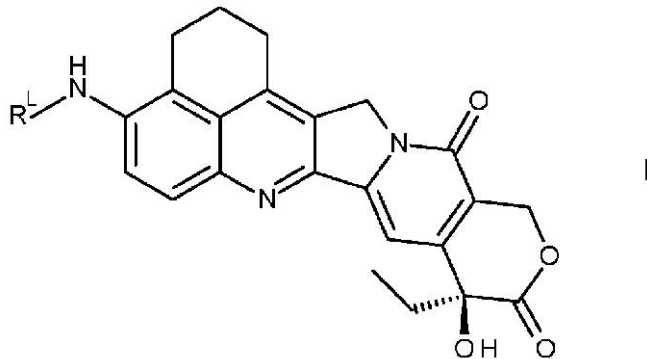
別の態様では、細胞毒に連結された抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片を含む A D C であって、細胞毒は、トポイソメラーゼⅠ阻害剤である A D C が提供される。

【0032】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、トポイソメラーゼⅠ阻害剤は、式（Ⅰ）：

20

【化 8】



30

並びにその塩及び溶媒和物で表される；

（式中、 R^L は上記で定義されている）。

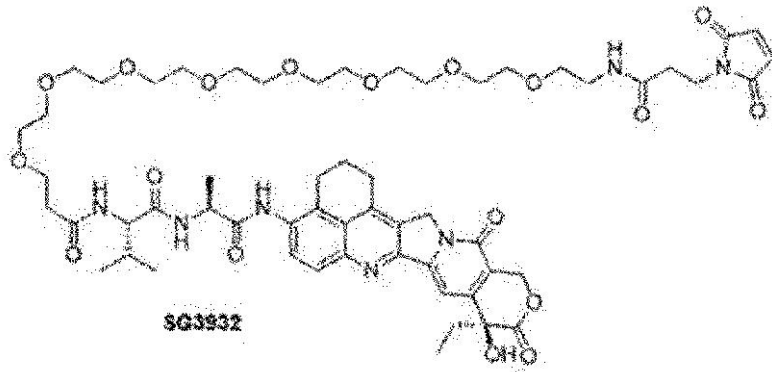
【0033】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、トポイソメラーゼⅠ阻害剤は：

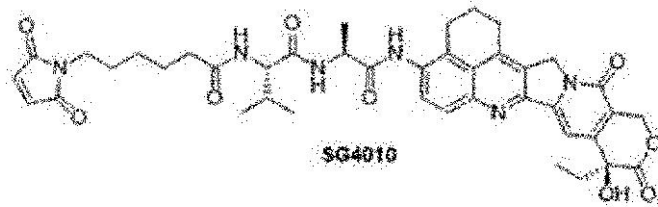
40

50

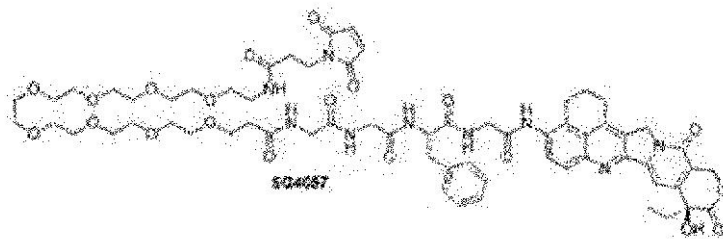
【化 9】



10

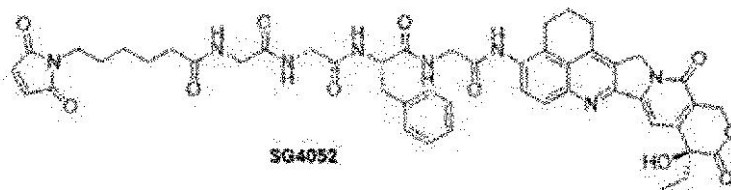


20



; 及び/又は

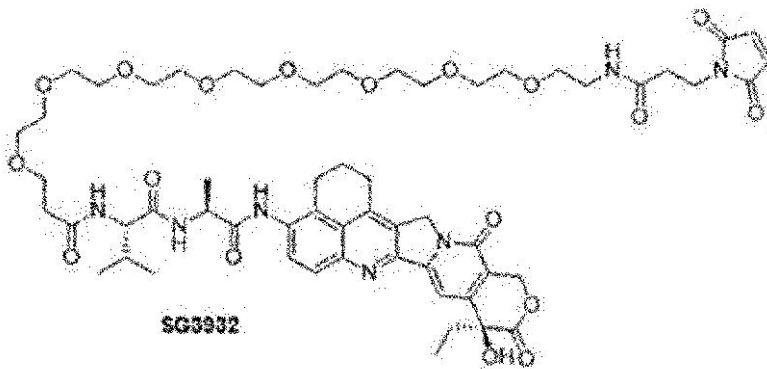
【化 10】



30

であり、好ましくは、トポイソメラーゼⅠ阻害剤は、

【化 11】



40

である。

【0034】

50

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、薬物抗体比（DAR）は約1～20の範囲であり、任意選択によりDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択される。

【0035】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、DARは約8又は約4であり、好ましくはDARは約8である。

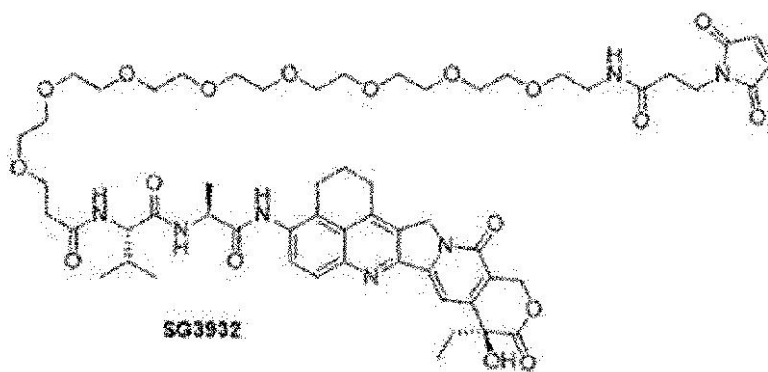
【0036】

別の態様では、細胞毒に連結された抗FR α 抗体又はその抗原結合断片を含むADCであって、

（i）抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号1の重鎖CDR1（SDSATWN）、配列番号2の重鎖CDR2（RTYYRSKWYNDYAVSVKS）；配列番号3の重鎖CDR3（GVGSFDY）；配列番号4の軽鎖CDR1（RASQSISSWLA）；配列番号5の軽鎖CDR2（KASGLES）；及び配列番号6の軽鎖CDR3（QQYNSYSQLT）を含み、任意選択により抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号37のVH及び配列番号38のVLを有し；

（ii）細胞毒は、トポイソメラーゼI阻害剤SG3932

【化12】



であり、

（iii）DARは、約8である、ADCが提供される。

【0037】

別の態様では、本発明の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0038】

別の態様では、

（a）プロモーターと作動可能に結合されたポリヌクレオチド、又は

（b）本発明で定義されるVH領域をコードするポリヌクレオチド、及び本発明で定義されるVL領域をコードするポリヌクレオチド（ここで、前記ポリヌクレオチドは、1つ以上のプロモーターと作動可能に結合されている）を含むベクターが提供される。

【0039】

いくつかの実施形態では、ベクターは、本発明で定義される定常重鎖領域をコードするポリヌクレオチド、及び本発明で定義される定常軽鎖領域をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。

【0040】

別の態様において、本発明のポリヌクレオチド又は本発明のベクターを含む宿主細胞が提供される。

【0041】

別の態様では、本発明の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片を調製するための方法であって、

(a) 本発明のベクターを宿主細胞にトランスフェクトする工程；

(b) 前記抗体又は抗原結合断片の合成を可能にする条件下で宿主細胞を培養する工程；及び

(c) 前記培養物から前記抗体又は抗原結合断片を回収する工程

を含む方法が提供される。

【0042】

別の態様では、本発明の抗 F R α 抗体若しくはその抗原結合断片又は本発明の A D C と、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物が提供される。

10

【0043】

別の態様では、対象における F R α 陽性細胞の集団を枯渇させる方法で使用するのための、本発明の抗 F R α 抗体若しくはその抗原結合断片、本発明の A D C、又は本発明の医薬組成物が提供され、その方法は抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片、A D C、又は医薬組成物を対象に投与することを含む。典型的には、F R α 陽性細胞は、F R α 陽性癌細胞である。

【0044】

関連する態様において、対象における F R α 陽性細胞の集団を枯渇させる方法であって、本発明の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片、本発明の A D C、又は本発明の医薬組成物を対象に投与することを含む方法が提供される。典型的には、F R α 陽性細胞は、F R α 陽性癌細胞である。

20

【0045】

別の態様では、F R α 発現に関連する癌の治療に使用するのための、本発明の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片、本発明の A D C、又は本発明の医薬組成物が提供される。

【0046】

関連する態様において、F R α 発現に関連する癌の治療方法であって、本発明の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片、本発明の A D C、又は本発明の医薬組成物を対象に投与することを含む方法が提供される。

【0047】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、癌は、F R α の不均一な発現及び／又は F R α の低発現を有する癌細胞を含み、任意選択で、癌細胞は I g r o v - 1 細胞株と同様の F R α 発現を有する。

30

【0048】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、前記癌は、卵巣癌、肺癌、子宮内膜癌、膵臓癌、胃癌、腎細胞癌 (R C C)、結腸直腸癌、頭頸部扁平上皮癌 (H N S C C)、乳癌 (例えば、T N B C)、子宮頸癌及び悪性胸膜中皮腫から選択され、好ましくは、前記癌は、卵巣癌及び肺癌から選択される。

【0049】

いくつかの実施形態では、肺癌が非小細胞肺癌 (N S C L C) であり、任意選択で、N S C L C は、扁平上皮 N S C L C、腺癌 N S C L C、又はこれらの組み合わせから選択される。

40

【0050】

本発明の態様及び実施形態は、添付の請求項において述べられる。本発明のこれら及び他の態様及び実施形態はまた、本明細書において説明される。

【0051】

ここで、本発明を添付の図面に関してより詳細に記載する。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1は、H T R F アッセイによる、(A) A B 1 3 7 0 0 2 6、(B) A B 1 3 7 0 0 3 5、(C) A B 1 3 7 0 0 4 9、(D) A B 1 3 7 0 0 8 3、(E) A B 1 3 7

50

0096及び(F)AB1370117のヒトFR α 、カニクイザルFR α 、マウスFR α 、ヒトFR β 又はヒトFR γ への結合を示す。

【図2】図2は、横軸の試料濃度に対して縦軸の強度をプロットした、KB細胞への抗体の内部移行のハイコンテンツプロファイラマルチパラメータ分析を示す。陽性対照試料(丸)によって決定されたカットオフを上回る取り込みを有する抗体をショートリストに載せ、灰色の菱形として示し、カットオフを下回るものを白色の菱形として示した。アッセイにおいて重複して実行した6つの例示的な抗体のデータ点は、黒色の菱形で示され、試料名が標識される。1つの例示的な抗体あたり少なくとも1つの試料がカットオフを上回った。

【図3】図3は、(A)比較体1IgG、(B)比較体2IgG、及び(C)比較体3IgGを用いたHTRFエピトープ競合アッセイにおける6つの例示的IgGを示す。

【図4】図4は、AC-SINS自己相互作用アッセイの結果を示す。HSA(黒色カラム)緩衝液中で自己会合する抗体の傾向を調べた。陰性対照抗体は低いレベルの自己相互作用を示したが、陽性対照抗体は予想通り、HSA中で高いレベルの自己相互作用を示す。リスクのある抗体(>5nm)にフラグを立てるための閾値を、点線の横線で示す。

【図5】図5は、CX7機器での蛍光の増加によって測定された、(A)Jeg-3細胞(FR α を中程度発現)及び(B)KB細胞(FR α を高発現)への抗FR α 抗体の経時的な内部移行を示す。

【図6】図6は、(A)214nmでのUHPLC-RP(還元型)(B)330nmでのUHPLC-RP(還元型)、(C)280nmでのUHPLC-SEC、及び(D)214nmでのUHPLC-HICで得られたAB1370049-SG3932 DAR8のクロマトグラムを示す。

【図7】図7は、(A)214nmでのUHPLC-RP(還元型)(B)330nmでのUHPLC-RP(還元型)、(C)280nmでのUHPLC-SEC、及び(D)214nmでのUHPLC-HICで得られたAB1370049-SG3932 DAR4のクロマトグラムを示す。

【図8】図8は、様々な血清に曝露された場合の一連のDAR8 ADCへの化学変換の進行を示す。観察された化学プロセスは、(A)脱複合及び(B)マレイミド加水分解である。

【図9】図9は、(A)KB細胞(FR α を高発現)、(B)Jeg-3細胞(FR α を中程度～高発現)及び(C)Igro-1細胞(FR α を中程度発現)に対するリードDAR8 ADCを用いた6日間の細胞毒性アッセイを示す。

【図10】図10は、AB1370049-SG3932 DAR8のバイスタンダー殺滅活性を示す。FR α 陽性及びFR α 陰性KB細胞を、単独で、又は1:1の比で、1nMのAB1370049-SG3932 DAR8 ADCで6日間処理した。6日後に、細胞毒性活性をフローサイトメトリーで測定した。

【図11】図11は、リードDAR8 ADCを用いたKB異種移植試験を示す。6日目に、(A)1.25mg/kg又は(B)5mg/kgを単回静脈内投与した。用量投与を黒色のアスタリスクによって示す。

【図12】図12は、リードDAR8 ADCを用いたOVCA-3異種移植試験を示す。33日目に、(A)1.25mg/kg又は(B)5mg/kgを単回静脈内投与した。用量投与を黒色のアスタリスクによって示す。

【図13】図13は、AB1370049-SG3932 DAR8を用いたIGROV-1異種移植研究を示す。33日目に、5mg/kgの単回静脈内投与を行った。

【図14】図14は、リードDAR4 ADCを用いたKB異種移植試験を示す。7日目に、5mg/kgの単回静脈内投与を行った。

【図15】図15は、AB1370049-SG3932 DAR8又はFR α -DM4 ADCを1.25、2.5及び5mg/kgで単回投与した(A)OVCA-3及び(B)CaCo-2の移植試験を示す。用量投与を黒色のアスタリスクによって示す。

【図16】図16は、(A)51のPDXモデルにおける5mg/kgのAB13700

10

20

30

40

50

49-SG3932 DAR8、及び(B)39のPDXモデルにおける2.5mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8の単回投与による腫瘍増殖率の中央値を示す。

【図17】図17は、(A)卵巣PDXモデルCTG-0711、(B)NSCLC PDXモデルCTG-2367、及び(C)子宮内膜PDXモデルCTG-2268に対し、2.5mg/kg又は5mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8の単回用量投与によるPDXモデル試験を示す。

【図18】図18は、(A)巨核球系における前駆細胞、(B)骨髄系における前駆細胞、(C)赤血球系における前駆細胞、(D)巨核球系における増殖し分化した細胞、(E)骨髄系における増殖し分化した細胞、及び(F)赤血球系における増殖し分化した細胞について測定した細胞生存シグナルを示す。X軸は薬物濃度を表し、Y軸は生存率のパーセントを表す(値は3回の平均-/+SDである)。AB1370049-SG3932 DAR8は、赤血球系、骨髄系又は巨核球系に分化するように誘導された一次CD34⁺骨髄由来造血幹前駆細胞において、非標的化ADC対照よりも毒性の悪化を示さない。

【図19】図19は、カニクイザルにおける非複合化mAbとAB1370049-SG3932 DAR8の濃度-時間プロファイルの平均(±SD)を示す。15及び25mg/kgの血漿試料におけるPKプロファイルを集し、免疫捕捉LC-MS/MSアッセイ及びノンコンパートメントPKを用いて処理した。全mAbは、インタクトな抗体の測定値である(ADCの場合、ADC又は脱複合mAbが含まれる)。全ADCは、インタクトなADCのみの測定値である。

【図20】図20は、1.25、2.5、5及び10mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8、又は2.5及び5mg/kgのFRα-DM4 ADCを単回投与したOVO857 PDXモデルにおける平均腫瘍増殖率を示す。

【図21】図21は、1.25、2.5、5及び10mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8、又は2.5及び5mg/kgのFRα-DM4 ADCを単回投与したCTG3226 PDXモデルにおける平均腫瘍増殖率を示す。

【図22】図22は、0.15、0.3、0.6、1.25、2.5、5及び10mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8を単回投与したCTG-0956 PDXモデルにおける平均腫瘍増殖率を示す。

【図23】図23は、最初に5mg/kgのFRα-DM4 ADCをQ2Wで8ラウンド静脈内投与し、その後、5mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8をQ2Wで静脈内に再投与して、2ラウンドのAB1370049-SG3932 DAR8の投与を受けた、4匹のマウス(それぞれ2_2718、4_7C2A、18_2146、27_2438と指定)のOVCA3異種移植モデルにおける腫瘍の平均増殖率を示す。破線による縦線は、マウスに投与された用量を示す。

【図24】図24は、FRα-DM4耐性腫瘍がマウスから単離され、新たな宿主マウスに再移植されたOVCA3異種移植モデルにおける平均腫瘍増殖率を示す。腫瘍が280~360mm³の平均サイズに達した後、マウスに5mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8又はFRα-DM4を2回(Q2W)投与した。破線による縦線は、マウスに投与された用量を示す。

【発明を実施するための形態】

【0053】

一般的な定義

別段定義されない限り、本明細書で使用する全ての技術的用語及び科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味と同様の意味を有する。

Singletton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994)、及びHale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991)は、本開示で使用され

る用語の多くの一般的な辞書を当業者に提供する。

【0054】

別段示されない限り、それぞれ、任意の核酸配列は、5'から3'方向に左から右に記述され、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシ方向に左から右に記述される。

【0055】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において用いられる場合、文脈が別途明確に指示しない限り、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、複数の指示対象を含むことが留意されなければならない。したがって、例えば、「薬剤(agent)」への言及は、複数のそのような薬剤を含み、「薬剤(the agent)」への言及は、1つ以上の薬剤及び当業者に知られるその均等物などへの言及を含む。

10

【0056】

「約」は、一般的に、測定法の性質又は精度を考慮すれば、測定された数量について許容される程度の誤差を意味し得る。誤差の例示的な程度は、示された値又は値の範囲の20パーセント(%)以内、典型的には10%以内、より典型的には5%以内である。好ましくは、「約」という用語は、本明細書では、使用されている数の数値のプラス又はマイナス(±)5%、好ましくは±4%、±3%、±2%、±1%、±0.5%、±0.1%として理解される。1つ以上の特徴を「含む」として本明細書において記載される実施形態はまた、そのような特徴「からなる」対応する実施形態の開示と見なし得る。

【0057】

本明細書においては、アミノ酸は、アミノ酸の名称、3文字の略称、又は1文字の略称を用いて言及される。「タンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、タンパク質、ポリペプチド及びペプチドを含む。本明細書で使用される場合、「アミノ酸配列」という用語は、「ポリペプチド」及び／又は「タンパク質」という用語と同義である。場合によっては、「アミノ酸配列」という用語は、「ペプチド」という用語と同義である。「タンパク質」及び「ポリペプチド」という用語は、本明細書においては互換的に使用される。本開示及び特許請求の範囲においては、アミノ酸残基に対し、従来の1文字コード及び3文字コードが使用され得る。IUPACIUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature(JCBN)に準拠して定義されるようなアミノ酸に対する3文字コード。遺伝暗号の縮重に起因して、ポリペプチドは2つ以上のヌクレオチド配列によりコードされ得ることも理解されたい。

20

30

【0058】

濃度、量、体積、割合及び他の数値は、本明細書においては、範囲形式で示され得る。そのような範囲形式は、単に便宜上及び簡潔さのために使用され、範囲の限界として明示的に列挙される数値を含むだけでなく、あたかもそれぞれの数値及び部分範囲が明示的に列挙されているかのように、その範囲内に包含される個々の数値又は部分範囲を全て含むと柔軟に解釈されるべきであることも理解されるべきである。

【0059】

抗FR α 抗体

本発明者らは、癌細胞上のFR α に対し高い親和性及び特異的結合を有する(例えば、FR β 及びFR γ などの他のFRファミリーメンバーに特異的に結合しない)抗FR α 抗体の例示的なアレイを開発した。本発明者らは、抗体の開発可能性について徹底的な評価を行い、可逆的自己会合、内部移行、非特異的結合及び疎水性の傾向、並びにmAbの熱ストレス及び光ストレスに対する安定性をチェックした。さらに、本発明者らは、インビボでの短い半減期及びクリアランスの上昇を示したものを除去するために、mAbの焦点を絞ったパネルのためにインビボでのマウスPK試験を用いた。ヒトにおいて抗薬物抗体(ADA)反応が生じる可能性を低減するために、ADA反応のリスク増加が予測される抗体を除去するために、コンピューターによる免疫原性評価を行った。上記のスクリーニング戦略を通して、本発明者らは、類似の有益な特性を有する6つの抗体のパネルを特定した。

40

50

【0060】

抗体配列

本発明は、列挙されたCDR配列又は可変重鎖配列及び可変軽鎖配列（参照抗体）を有する、本明細書で定義される抗体又は抗原結合断片）並びにその機能的バリエーションを包含する。機能的バリエーションは、参照抗体と同じ標的抗原に結合し、好ましくは参照抗体と同じ抗原交差反応性を示す。機能的バリエーションは、参照抗体と比較した場合、標的抗原に対して異なる親和性を有し得るが、実質的に同じ親和性を有することが好ましい。

【0061】

いくつかの実施形態では、参照抗体の機能的バリエーションは、対応する参照CDR配列と比較した場合、1つ以上のCDRで配列の変動を示す。したがって、機能的な抗体バリエーションは、CDRの機能的バリエーションを含み得る。「機能的バリエーション」という用語がCDR配列と関連して使用される場合、CDRが、対応する参照CDR配列との比較で、最大で2つ、好ましくは最大で1つのアミノ酸の相違を有し、残りの5つのCDR（又はそのバリエーション）と組み合わせた場合、バリエーション抗体が、参照抗体と同じ標的抗原に結合し、好ましくは参照抗体と同じ抗原交差反応性を示すことができることを意味する。機能的バリエーションは、「バリエーション抗体」と称し得る。

10

【0062】

表1～5は、構築物AB1370049、AB1370026、AB1370035、AB1370083、AB1370095及びAB1370117のCDR配列、VH及びVL配列、重鎖及び軽鎖配列、FR配列並びに定常ドメイン配列をそれぞれ示す。相異があった場合、表中の配列が優先される。

20

【0063】

一態様では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、表2の構築物AB1370049、AB1370026、AB1370035、AB1370083、AB1370095又はAB1370117のいずれか1つの6つのCDRを含む（ここで、CDRは、Kabatt、Chothia又はIMGTによって決定される）。

【0064】

本発明の別の態様では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片が提供され、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、

配列番号1の重鎖CDR1（SDSATWN）；

配列番号2の重鎖CDR2（RTYYRSKWYNDYAVSVKS）；

配列番号3の重鎖CDR3（GVGSFDY）；

配列番号4の軽鎖CDR1（RASQSISSWLA）；

配列番号5の軽鎖CDR2（KASGLES）；及び

配列番号6の軽鎖CDR3（QQYNSYSQLT）

30

を含み、

前記CDRのいずれか1つ以上は、前記配列と比較して1、2又は3個の保守的アミノ酸置換を含む。

【0065】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、

配列番号1の重鎖CDR1（SDSATWN）；

配列番号2の重鎖CDR2（RTYYRSKWYNDYAVSVKS）；

配列番号3の重鎖CDR3（GVGSFDY）；

配列番号4の軽鎖CDR1（RASQSISSWLA）；

配列番号5の軽鎖CDR2（KASGLES）；及び

配列番号6の軽鎖CDR3（QQYNSYSQLT）

40

を含む。

【0066】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少な

50

くとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 38 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、又は少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V L を有する。いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 37 の V H 及び配列番号 38 の V L を含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体は、配列番号 49 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 50 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 F R α 抗体は、配列番号 49 の重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 50 の軽鎖アミノ酸配列を含む。

10

【0068】

本発明の別の態様では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片が提供され、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、

配列番号 7 の重鎖 C D R 1 (S Y A M S) ;

配列番号 8 の重鎖 C D R 2 (S I S S G R S Y I Y Y A D S V K G) ;

配列番号 9 の重鎖 C D R 3 (E M Q Q L A L D Y) ;

配列番号 10 の軽鎖 C D R 1 (R A S Q G I S N F L A) ;

20

配列番号 11 の軽鎖 C D R 2 (A A S S L Q S) ; 及び

配列番号 12 の軽鎖 C D R 3 (Q Q Y N S Y P F T)

を含み、

前記 C D R のいずれか 1 つ以上は、前記配列と比較して 1、2 又は 3 個の保存的アミノ酸置換を含む。

【0069】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、

配列番号 7 の重鎖 C D R 1 (S Y A M S) ;

配列番号 8 の重鎖 C D R 2 (S I S S G R S Y I Y Y A D S V K G) ;

配列番号 9 の重鎖 C D R 3 (E M Q Q L A L D Y) ;

30

配列番号 10 の軽鎖 C D R 1 (R A S Q G I S N F L A) ;

配列番号 11 の軽鎖 C D R 2 (A A S S L Q S) ; 及び

配列番号 12 の軽鎖 C D R 3 (Q Q Y N S Y P F T)

を含む。

【0070】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 39 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 40 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V L を有する。いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 39 の V H 及び配列番号 40 の V L を含む。

40

【0071】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体は、配列番号 51 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 52 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 F R α 抗体は、配列番号 51 の重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 52 の軽鎖アミノ酸配列を含む。

50

【0072】

本発明の別の態様では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片が提供され、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、

配列番号13の重鎖CDR1 (SNSAAWN) ;
配列番号14の重鎖CDR2 (RTYYRSNWYNDYTL SVKS) ;
配列番号15の重鎖CDR3 (GVGRFDS) ;
配列番号16の軽鎖CDR1 (RASQSIS SWLA) ;
配列番号17の軽鎖CDR2 (KASSLES) ; 及び
配列番号18の軽鎖CDR3 (QEYKTYSI FT)

を含み、

前記CDRのいずれか1つ以上は、前記配列と比較して1、2又は3個の保存的アミノ酸置換を含む。

【0073】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、

配列番号13の重鎖CDR1 (SNSAAWN) ;
配列番号14の重鎖CDR2 (RTYYRSNWYNDYTL SVKS) ;
配列番号15の重鎖CDR3 (GVGRFDS) ;
配列番号16の軽鎖CDR1 (RASQSIS SWLA) ;
配列番号17の軽鎖CDR2 (KASSLES) ; 及び
配列番号18の軽鎖CDR3 (QEYKTYSI FT)

を含む。

【0074】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号41のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号42のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVLを有する。いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号41のVH及び配列番号42のVLを含む。

【0075】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体は、配列番号53のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号54のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗FR α 抗体は、配列番号53の重鎖アミノ酸配列、及び配列番号54の軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0076】

本発明の別の態様では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片が提供され、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、

配列番号19の重鎖CDR1 (SYNMN) ;
配列番号20の重鎖CDR2 (SIS SGSSYIYYAD SMKG) ;
配列番号21の重鎖CDR3 (GMTTLTFDY) ;
配列番号22の軽鎖CDR1 (RASQGISTFLA) ;
配列番号23の軽鎖CDR2 (AASSLQS) ; 及び
配列番号24の軽鎖CDR3 (QQYISYPLT)

を含み、

前記CDRのいずれか1つ以上は、前記配列と比較して1、2又は3個の保存的アミノ酸置換を含む。

【0077】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、
配列番号 19 の重鎖 C D R 1 (S Y N M N) ；
配列番号 20 の重鎖 C D R 2 (S I S S G S S Y I Y Y A D S M K G) ；
配列番号 21 の重鎖 C D R 3 (G M T T L T F D Y) ；
配列番号 22 の軽鎖 C D R 1 (R A S Q G I S T F L A) ；
配列番号 23 の軽鎖 C D R 2 (A A S S L Q S) ；及び
配列番号 24 の軽鎖 C D R 3 (Q Q Y I S Y P L T)

を含む。

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 43 のアミノ酸配列と少なくとも 85 % 同一、少なくとも 90 % 同一、少なくとも 95 % 同一、少なくとも 97 % 同一、少なくとも 99 % 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 44 のアミノ酸配列と少なくとも 85 % 同一、少なくとも 90 % 同一、少なくとも 95 % 同一、少なくとも 97 % 同一、少なくとも 99 % 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V L を有する。いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 43 の V H 及び配列番号 44 の V L を含む。

10

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体は、配列番号 55 のアミノ酸配列と少なくとも 85 % 同一、少なくとも 90 % 同一、少なくとも 95 % 同一、少なくとも 97 % 同一、少なくとも 99 % 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 56 のアミノ酸配列と少なくとも 85 % 同一、少なくとも 90 % 同一、少なくとも 95 % 同一、少なくとも 97 % 同一、少なくとも 99 % 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 F R α 抗体は、配列番号 55 の重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 56 の軽鎖アミノ酸配列を含む。

20

【 0 0 8 0 】

本発明の別の態様では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片が提供され、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、

配列番号 25 の重鎖 C D R 1 (S Y S M N) ；
配列番号 26 の重鎖 C D R 2 (S I S S R S S Y V Y Y A D S V K G) ；
配列番号 27 の重鎖 C D R 3 (G M T T L T F D Y) ；
配列番号 28 の軽鎖 C D R 1 (R A S Q G I S S F L A) ；
配列番号 29 の軽鎖 C D R 2 (A A S S L Q S) ；及び
配列番号 30 の軽鎖 C D R 3 (Q Q Y N S Y P L T)

30

を含み、

前記 C D R のいずれか 1 つ以上は、前記配列と比較して 1、2 又は 3 個の保守的アミノ酸置換を含む。

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、
配列番号 25 の重鎖 C D R 1 (S Y S M N) ；
配列番号 26 の重鎖 C D R 2 (S I S S R S S Y V Y Y A D S V K G) ；
配列番号 27 の重鎖 C D R 3 (G M T T L T F D Y) ；
配列番号 28 の軽鎖 C D R 1 (R A S Q G I S S F L A) ；
配列番号 29 の軽鎖 C D R 2 (A A S S L Q S) ；及び
配列番号 30 の軽鎖 C D R 3 (Q Q Y N S Y P L T)

40

を含む。

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 45 のアミノ酸配列と少なくとも 85 % 同一、少なくとも 90 % 同一、少なくとも 95 % 同一、少なくとも 97 % 同一、少なくとも 99 % 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 46 のアミノ酸配列と少なくとも 85 % 同一、少なくとも 90 % 同一、少なく

50

とも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む VL を有する。いくつかの実施形態では、抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 45 の VH 及び配列番号 46 の VL を含む。

【0083】

いくつかの実施形態では、抗 FR α 抗体は、配列番号 57 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 58 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 FR α 抗体は、配列番号 57 の重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 58 の軽鎖アミノ酸配列を含む。

10

【0084】

本発明の別の態様では、抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片が提供され、抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片は、

配列番号 31 の重鎖 CDR1 (SDSATWN) ;

配列番号 32 の重鎖 CDR2 (RTYYRSKWYSDYAVSVKS) ;

配列番号 33 の重鎖 CDR3 (GGAPFDY) ;

配列番号 34 の軽鎖 CDR1 (RASQSISSWLA) ;

配列番号 35 の軽鎖 CDR2 (KASSLES) ; 及び

配列番号 36 の軽鎖 CDR3 (QQYNSYSMYT)

20

を含み、

前記 CDR のいずれか 1 つ以上は、前記配列と比較して 1、2 又は 3 個の保存的アミノ酸置換を含む。

【0085】

いくつかの実施形態では、抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片は、

配列番号 31 の重鎖 CDR1 (SDSATWN) ;

配列番号 32 の重鎖 CDR2 (RTYYRSKWYSDYAVSVKS) ;

配列番号 33 の重鎖 CDR3 (GGAPFDY) ;

配列番号 34 の軽鎖 CDR1 (RASQSISSWLA) ;

配列番号 35 の軽鎖 CDR2 (KASSLES) ; 及び

配列番号 36 の軽鎖 CDR3 (QQYNSYSMYT)

30

を含む。

【0086】

いくつかの実施形態では、抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 47 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む VH、及び配列番号 48 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む VL を有する。いくつかの実施形態では、抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 47 の VH 及び配列番号 48 の VL を含む。

40

【0087】

いくつかの実施形態では、抗 FR α 抗体は、配列番号 59 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 60 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 FR α 抗体は、配列番号 59 の重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 60 の軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0088】

本明細書に記載の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、抗 FR α 抗体又はその抗

50

原結合断片は、表 4 に記載の構築物 AB1370049、AB1370026、AB1370035、AB1370083、AB1370095 又は AB1370117 のいずれか 1 つの参照重鎖 VH FR1、VH FR2、VH FR3 及び／又は VH FR4 とそれぞれ少なくとも 80%、85%、90% 若しくは 95% 同一であるか又は同一である重鎖 VH FR1、VH FR2、VH FR3 及び／又は VH FR4 を含み、抗体又は断片は単独で（例えば、単鎖抗体断片の形態で）FR α に結合することができる。

【0089】

本明細書に記載の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片は、表 4 に記載の構築物 AB1370049、AB1370026、AB1370035、AB1370083、AB1370095 又は AB1370117 のいずれか 1 つの参照軽鎖 VL FR1、VL FR2、VL FR3 及び／又は VL FR4 とそれぞれ少なくとも 80%、85%、90% 若しくは 95% 同一であるか又は同一である軽鎖 VL FR1、VL FR2、VL FR3 及び／又は VL FR4 を含み、抗体又は断片は単独で（例えば、単鎖抗体断片の形態で）FR α に結合することができる。

10

【0090】

本明細書に記載の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片は、(a) 表 4 に記載の構築物 AB1370049、AB1370026、AB1370035、AB1370083、AB1370095 又は AB1370117 のいずれか 1 つの参照軽鎖 VL FR1、VL FR2、VL FR3 及び VL FR4 とそれぞれ少なくとも 80%、85%、90% 若しくは 95% 同一であるか又は同一である軽鎖 VL FR1、VL FR2、VL FR3 及び VL FR4；並びに (b) 表 4 に記載の構築物 AB1370049、AB1370026、AB1370035、AB1370083、AB1370095 又は AB1370117 のいずれか 1 つの参照重鎖 VH FR1、VH FR2、VH FR3 及び VH FR4 とそれぞれ少なくとも 80%、85%、90% 若しくは 95% 同一であるか又は同一である重鎖 VH FR1、VH FR2、VH FR3 及び VH FR4 を含む。

20

【0091】

本明細書に記載の態様のいずれかのいくつかの実施形態では、抗 FR α 抗体は、配列番号 109 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む定常重鎖、及び配列番号 110 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む定常軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 FR α 抗体は、配列番号 109 の定常重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 110 の定常軽鎖アミノ酸配列を含む。

30

【0092】

本明細書に記載の抗原結合断片態様のいずれかのいくつかの実施形態では、抗 FR α 抗原結合断片は、配列番号 111 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む定常重鎖、及び配列番号 110 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む定常軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 FR α 抗原結合断片は、配列番号 111 の定常重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 110 の定常軽鎖アミノ酸配列を含む。

40

【0093】

50

【表 1】

表 1: FRα抗体CDR配列

構築物	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
AB1370049	SDSATWN (配列番号1)	RTYYRSK WYNDYAV SVKS (配列番号2)	GVGSFDY (配列番号3)	RASQSIG SWLA (配列番号4)	KASGLES (配列番号5)	QQYNSYS QLT (配列番号6)
AB1370026	SYAMS (配列番号7)	SISSGRS YIYYADS VKG (配列番号8)	EMQQLAL DY (配列番号9)	RASQGIS NFLA (配列番号10)	AASSLQS (配列番号11)	QQYNSYP FT (配列番号12)
AB1370035	SNSAAWN (配列番号13)	RTYYRSN WYNDYTL SVKS (配列番号14)	GVGRFDS (配列番号15)	RASQSIG SWLA (配列番号16)	KASSLES (配列番号17)	QEYKTYS IFT (配列番号18)
AB1370083	SYNMN (配列番号19)	SISSGSS YIYYADS MKG (配列番号20)	GMTTLTF DY (配列番号21)	RASQGIS TFLA (配列番号22)	AASSLQS (配列番号23)	QQYISYP LT (配列番号24)
AB1370095	SYSMN (配列番号25)	SISSRSS YVYYADS VKG (配列番号26)	GMTTLTF DY (配列番号27)	RASQGIS SFLA (配列番号28)	AASSLQS (配列番号29)	QQYNSYP LT (配列番号30)
AB1370117	SDSATWN (配列番号31)	RTYYRSK WYSDYAV SVKS (配列番号32)	GGAPFDY (配列番号33)	RASQSIG SWLA (配列番号34)	KASSLES (配列番号35)	QQYNSYS MYT (配列番号36)

【0094】

【表 2】

表 2: FRα抗体VH及びVL配列

構築物	VH	VL
AB1370049	LVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAI SGDSVSSDSATWNWIRQSPSRCLE WLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRIT	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTTCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS GLESQVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSL

【0095】

【表 3】

構築物	VH	VL
	INPDTSKNQFSLQLNSVTPEDIAV YYCARGVGSEFDYWGQGTLLTVSS (配列番号37)	QPDDFATYYCQQYNYSQLTFGGGTK VEIK (配列番号38)
AB1370026	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SSISSGRSYIYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLKMNSLRDEDTAVYYC AREMQQLALDYWGQGTLLTVSS (配列番号39)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGISNFLAWFQQAPGKAPKSLIYAAS SLQSGVPSKFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYNISYPFTFGQGTKL EIK (配列番号40)
AB1370035	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAI SGDSVSSNSAANNWIRQSPSRGLE WLGRITYYRSNWYNDYTLVKSRIT VNPDTSKNQFSLQLNSVTPEDIAV YYCVRGVGRFDSWGQGTLLTVSS (配列番号41)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSL QPDDFASYYCQEKYTSIFTFGPGTK VDIK (配列番号42)
AB1370083	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEWV SSISSGSSYIYYADSMKGRFTISR DNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYC ARGMTTLTFDYWGQGTLLTVSS (配列番号43)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGISTFLAWFQQKPGKAPKSLIYAAS SLQSGVPSKFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYISYPLTFGGGTKV EIK (配列番号44)
AB1370095	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV SSISSRSSYVYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGMTTLTFDYWGQGTLLTVSS (配列番号45)	DIQMTQSPSSLSASVCDRVTITCRAS QGISSFLAWFQQKPGKAPKSLIYAAS SLQSGVPSKFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYNISYPLTFGGGTKV EIK (配列番号46)
AB1370117	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAI SGDSVSSDSATWNWIRQSPSRGLE WLGRITYYRSKWYSDYAVSVKSRIT INPDTSKNQFSLQLNSVTPEDIAV YFCARGGAPFDYWGQGTLLTVSS (配列番号47)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIKCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYNISYMYTFGQGTK LEIK (配列番号48)

【0096】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 3: FRα抗体重鎖及び軽鎖配列

構築物	VH-CH	VL-CL
AB1370049	LVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCA ISGDSVSSDSATWNWIRQSPSRG LEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKS RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPE DTAVYYCARGVGSFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTIS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK (配列番号49)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS GLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYNSYSQLTFTGGG VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (配列番号50)
AB1370026	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSSISSGRSYIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLKMNSLRDEDTA VYYCAREMQQLALDYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK (配列番号51)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGISNFWLAWYQQAPGKAPKSLIYAAS SIQSGVPSKFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYNSYPFTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSITYSLSSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC (配列番号52)
AB1370035	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCA ISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRG	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIITCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS

【 0 0 9 7 】

10

20

30

40

50

【表 5】

構築物	VH-CH	VL-CL
	LEWLGRTYYRSNWYNDYTL SVKS RITVNPDT SKNQFSLQLNSVTPE DTAVYYCVRGVGRFDSWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTIS CCTAALCCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHIALIINII YTQKSLSLSPGK (配列番号53)	SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSL QPDDFASYCQEQYKTYSI FTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SCNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (配列番号54)
AB1370083	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLE WVSSISSGSSYIYYADSMKGRFT ISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTA VYYCARGMTTLTFDYWGQGLVLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKF FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSINKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK (配列番号55)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGISTFLAWFQQKPGKA PKSLIYAAS SLQSGVPSKFSGSGSETDFTLTIS SLQPEDFATYYCQYISYPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFKNRGEC (配列番号56)
AB1370095	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QGISSFLAWFQQKPGKA PKSLIYAAS

【 0 0 9 8 】

10

20

30

40

50

【表 6】

構築物	VH-CH	VL-CL
	WVSSISSRSSYVYYADSVKGRET ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDIA VYYCARGMTTLTFDYWGQGTTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKE NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPFVLDSGSPFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK (配列番号57)	SLQSGVPSKFSGSGSGTDFLTITISL QPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC (配列番号58)
AB1370117	QVQLQQSGPGLVKPSQTLISLTCA ISGDSVSSDSATWNWIRQSPSRG LEWLGRTYYRSKWYSDYAVSVKS RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPE DTAVYFCARGGAPFDYWGQGTTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SCALTSCVHTFPAVLQSSCLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNAKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYITLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPFVLDSGSPFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK (配列番号59)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTINCRAS QSISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYNSYSMYTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (配列番号60)

【 0 0 9 9 】

10

20

30

40

【表 7】

表 4: FR α 抗体FR領域

構築物	VH-FR1	VH-FR2	VH-FR3	VH-FR4	VL-FR1	VL-FR2	VL-FR3	VL-FR4
AB1370-049	LVQLQ QSGPG LVKPS QTLSL TCAIS GDSVS (配列番号61)	WIRQS PSRGL EWLG (配列番号62)	RITIN PDTSK NQFSL QLNSV TPEDT AVYYC AR (配列番号63)	WGQGT LVTVS S (配列番号64)	DIQMT QSPST LSASV GDRV ITC (配列番号65)	WYQQK PGKAP KLLIY (配列番号66)	GVPSR FSCSG SGTEF TITIS SIQPD DEATY YC (配列番号67)	FGGGT KVEIK (配列番号68)
AB1370-026	EVQLV ESGGG LVKPG GSLRL SCAAS GFTFS (配列番号69)	WVRQA PGKGL EWVS (配列番号70)	RFTIS RDNAK NSLYL KMNSL RDEDT AVYYC AR (配列番号71)	WGQGT LVTVS S (配列番号72)	DIQMT QSPSS LSASV GDRV ITC (配列番号73)	WFQQA PGKAP KSLIY (配列番号74)	GVPSK FSCSG SGTDF TITIS SIQPE DEATY YC (配列番号75)	FGQGT KLEIK (配列番号76)
AB1370-035	QVQLQ QSGPG LVKPS QTLSL TCAIS GDSVS (配列番号77)	WIRQS PSRGL EWLG (配列番号78)	RITVN PDTSK NQFSL QLNSV TPEDT AVYYC VR (配列番号79)	WGQGT LVTVS S (配列番号80)	DIQMT QSPST LSASV GDRV ITC (配列番号81)	WYQQK PGKAP KLLIY (配列番号82)	GVPSR FSCSC SGTEF TITIT SIQPD DEASY YC (配列番号83)	FGPGT KVDIK (配列番号84)
AB1370-083	EVQLV ESGGG LVKPG GSLRL SCAAS GFTFS (配列番号85)	WVRQA PGKGL EWVS (配列番号86)	RFTIS RDNAK NSLFL QMNSL RAEDT AVYYC AR (配列番号87)	WGQGT LVTVS S (配列番号88)	DIQMT QSPSS LSASV GDRV ITC (配列番号89)	WFQQK PGKAP KSLIY (配列番号90)	GVPSK FSCSG SETDF TITIS SIQPE DEATY YC (配列番号91)	FGGGT KVEIK (配列番号92)

【 0 1 0 0 】

10

20

30

40

50

【表 8】

構築物	VH-FR1	VH-FR2	VH-FR3	VH-FR4	VL-FR1	VL-FR2	VL-FR3	VL-FR4
AB1370095	FVQIV ESGGG LVKPG GSLRL SCAAS GFTFS (配列番号93)	WVRQA PGKGL EWVS (配列番号94)	RFTIS RDNAK NSLYL QMNSL RAEDT AVYYC AR (配列番号95)	WGQGT LVTVS S (配列番号96)	DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITC (配列番号97)	WFQQK PGKAP KSLIY (配列番号98)	GVPSK FSGSG SGTDF TLTIS SLQPE DEATY YC (配列番号99)	FGGGT KVEIK (配列番号100)
AB1370117	QVQLQ QSGPG LVKPS QTLSL TCAIS GDSVS (配列番号101)	WIRQS PSRGL EWLG (配列番号102)	RITIN PDTSK NQFSL QLNSV TPEDT AVYFC AR (配列番号103)	WGQGT LVTVS S (配列番号104)	DIQMT QSPST LSASV GDRVT INC (配列番号105)	WYQQK PGKAP NLLIY (配列番号106)	GVPSR FSGSG SGTEF TLTIS SLQPD DEATY YC (配列番号107)	FGQGT KLEIK (配列番号108)

【0101】

【表 9】

表 5: FRα抗体定常ドメイン配列

定常領域	配列
CH (CH1-ヘンジ-CH2-CH3)	ASTKGPSVFPLAAPS ¹ SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELIGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHKHYTQKSLSLSPGK (配列番号109)
CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC (配列番号110)
CH1	ASTKGPSVFPLAAPS ¹ SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV (配列番号111)

【0102】

本発明の抗体のアミノ酸配列におけるわずかな変異は、アミノ酸配列における変異が本明細書のいずれかの箇所で定義される本発明の抗体又はその抗原結合断片と少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を維持することを条件として、本発明に包含されると考えられる。

【0103】

本発明の抗体は、保存された位置又は保存されていない位置において、1つの種からのアミノ酸残基が別の種における対応する残基に置換されているバリエーションを含み得る。いくつかの実施形態では、非保存的位置のアミノ酸残基が保存的又は非保存的残基で置換される。特に、保存的アミノ酸置換が考慮される。

【0104】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で定められており、例えば、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン又はヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン又はシステイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン又はトリプトファン）、ベータ分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン又はヒスチジン）が含まれる。したがって、ポリペプチド中のアミノ酸が同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸で置き換えられる場合、アミノ酸置換は、保存的とみなされる。本発明の抗体に保存的に改変されたバリエーションを含めることは、他の形態のバリエーション、例えば多型バリエーション、種間相同体、及び対立遺伝子を排除するものではない。

【0105】

「非保存的アミノ酸置換」は、(i) 正電荷側鎖を有する残基（例えば、Arg、His又はLys）が負電荷残基（例えば、Glu又はAsp）と又はそれにより置換される場合、(ii) 親水性残基（例えば、Ser又はThr）が疎水性残基（例えば、Ala、Leu、Ile、Phe又はVal）と又はそれにより置換される場合、(iii) システイン又はプロリンが任意の他の残基と又はそれにより置換される場合、或いは(iv) 巨大な疎水性側鎖又は芳香族側鎖を有する残基（例えば、Val、His、Ile又はTrp）が、より小さい側鎖を有するもの（例えば、Ala、Ser）又は側鎖を有しないもの（例えば、Gly）と又はそれにより置換される場合を含む。

【0106】

20個の標準アミノ酸に加えて、非標準アミノ酸（例えば、4-ヒドロキシプロリン、6-N-メチルリシン、2-アミノイソ酪酸、イソバリン及びα-メチルセリン）を、本発明のポリペプチドのアミノ酸残基と置換し得る。限られた数の非保存的アミノ酸、遺伝暗号によってコードされないアミノ酸、及び非天然アミノ酸が、アミノ酸残基と置換され得る。本発明の抗体はまた、非天然アミノ酸残基を含み得る。

【0107】

非天然アミノ酸としては、trans-3-メチルプロリン、2,4-メタノプロリン、cis-4-ヒドロキシプロリン、trans-4-ヒドロキシプロリン、N-メチルグリシン、アロトレオニン、メチルトレオニン、ヒドロキシエチルシステイン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、tert-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン及び4-フルオロフェニルアラニンが挙げられるが限定されない。天然に存在しないアミノ酸残基をタンパク質に組み込むためのいくつかの方法が当該技術分野で知られている。例えば、化学的にアミノアシル化されたサプレッサ-tRNAを使用して、ナンセンス変異が抑制されるインビトロの系が使用され得る。アミノ酸を合成し、tRNAをアミノアシル化するための方法は、当該技術分野で知られている。ナンセンス変異を含有するプラスミドの転写及び翻訳は、E. コリ (E. coli) S30抽出物

10

20

30

40

50

及び市販の酵素及び他の試薬を含む無細胞系で行われる。タンパク質は、クロマトグラフィーにより精製される。例えば、Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellman et al., Methods Enzymol. 202:301, 1991; Chung et al., Science 259:806-9, 1993; 及び Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-9, 1993) を参照されたい。第2の方法では、翻訳は、変異させたmRNA及び化学的にアミノアシル化したサブレッサー tRNA のマイクロインジェクションによりアフリカツメガエル卵細胞において行われる (Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271:19991-8, 1996)。第3の方法では、置き換えられることになる天然アミノ酸 (例えば、フェニルアラニン) の非存在下、所望の天然に存在しないアミノ酸 (例えば、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン又は4-フルオロフェニルアラニン) の存在下で、E. コリ (E. coli) 細胞を培養する。天然に存在しないアミノ酸が、その天然の対応物の代わりにポリペプチドに組み込まれる。Koida et al., Biochem. 33:7470-6, 1994 を参照されたい。インビトロでの化学修飾により、天然に存在するアミノ酸残基が、天然に存在しない種に変換され得る。化学修飾は、一連の置換をさらに拡大するために部位特異的変異誘発と組み合わせられ得る (Wynn and Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993)。

10

20

【0108】

限られた数の非保存的アミノ酸、遺伝暗号によってコードされないアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、及び非天然アミノ酸を、本発明のポリペプチドのアミノ酸残基と置換し得る。

【0109】

本発明のポリペプチド中の必須アミノ酸は、当該技術分野で知られた手順、例えば、部位特異的変異誘発又はアラニンスキャニング変異誘発 (Cunningham and Wells, Science 244:1081-5, 1989) などにより、同定され得る。生物学的相互作用の部位はまた、推定接触部位のアミノ酸の変異と併せた、核磁気共鳴、結晶学、電子回折又は光親和性標識などの技術によって決定されるような構造の物理的分析によっても決定され得る。例えば、de Vos et al., Science 255:306-12, 1992; Smith et al., J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., FEBS Lett. 309:59-64, 1992 を参照されたい。必須アミノ酸の同一性はまた、本発明の抗体の関連成分 (例えば、トランスロケーション成分又はプロテアーゼ成分) との相同性の分析から推測され得る。

30

【0110】

複数のアミノ酸置換は、Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241:53-7, 1988) 又は Bowie and Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-6, 1989) に開示されるものなど、変異誘発及びスクリーニングの既知の方法を使用して、作製され、試験され得る。簡潔に述べると、これらの著者らは、ポリペプチド中の2箇所以上の位置を同時にランダム化し、機能的ポリペプチドを選択し、続いて変異誘発されたポリペプチドの配列を決定して、各位置における許容可能な置換の範囲を決定する方法について開示する。使用し得る他の方法としては、ファージディスプレイ (例えば、Lowman et al., Biochem. 30:10832-7, 1991; Ladner et al., 米国特許第5,223,409号明細書; Huse, 国際公開第92/06204号パンフレット) 及び領域特異的変異誘発 (Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986; Ner et al., DNA 7:127, 1988) が挙げられる。

40

【0111】

50

2つ以上の核酸配列又はアミノ酸配列間の「配列同一性パーセント」は、配列によって共有される同一位置の数の関数である。したがって、同一性%は、同一ヌクレオチド／アミノ酸の数をヌクレオチド／アミノ酸の総数で割り、100を掛けたものとして算出され得る。配列同一性パーセントの算出はまた、2つ以上の配列のアライメントを最適化するために導入する必要があるギャップ数、及び各ギャップの長さを考慮に入れ得る。2つ以上の配列間での配列比較及び同一性パーセントの決定は、当業者によく知られているBLASTなどの特定の数学的アルゴリズムを使用して実施され得る。

【0112】

様々な配列アライメント方法のいずれかを使用して、同一性パーセントを決定することができ、これらの方法としては、限定されないが、包括的方法、局所的方法、及び、例えばセグメントアプローチ法などの複合型の方法が挙げられる。同一性パーセントを決定するためのプロトコルは、当業者の範囲内の通例の手順である。包括的方法は、分子の始まりから終わりまで配列をアラインし、個々の残基対のスコアを合計することにより、及びギャップペナルティを付与することにより、最良のアライメントを決定する。非限定的な方法としては、例えば、CLUSTAL W（例えば、Julie D. Thompson et al., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22 (22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994) を参照）、及び反復改良法（例えば、Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264 (4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996) を参照）が挙げられる。局所的方法は、入力配列の全てによって共有される1つ以上の保存されたモチーフを同定することにより配列をアラインする。非限定的な方法としては、例えば、Match-box（例えば、Eric Depiereux and Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8 (5) CABIOS 501-509 (1992) を参照）、ギブスサンプリング（例えば、C. E. Lawrence et al., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 262 (5131) Science 208-214 (1993) を参照）、Align-M（例えば、Ivo Van Waaij et al., Align-M-A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20 (9) Bioinformatics: 1428-1435 (2004) を参照）が挙げられる。

【0113】

パーセント配列同一性は、従来の方法によって決定することができる。例えば、Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603-16, 1986 及び Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-19, 1992 を参照されたい。簡潔に述べると、10のギャップオープニングペナルティ、1のギャップ伸長ペナルティ、及び以下に示されるとおりのHenikoff and Henikoff（同上）の「blossum62」スコアリングマトリクスを使用して、アライメントスコアを最適化するように2つのアミノ酸配列をアラインする（アミノ酸は標準的な1文字コードによって示される）。

10

20

30

40

50

【0114】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片の重鎖及び軽鎖の両方の可変ドメインは、1つ以上のCDRの少なくとも部分的な置換によって、及び／又は部分的なフレームワーク領域の置換及び配列変更によって改変される。CDRは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラス又はサブクラスの抗体に由来し得るが、異なるクラスの抗体に、またある特定の実施形態では異なる種の抗体に、CDRが由来することが想定される。ある可変ドメインの抗原結合能を別の可変ドメインに移すために、全てのCDRをドナー可変領域の完全なCDRに置き換える必要はない。むしろ、抗原結合部位の活性の維持に必要な残基を移しさえすれば十分である。米国特許第5,585,089号明細書、同第5,693,761号明細書、及び同第5,693,762号明細書に記載される説明を考慮すれば、免疫原性が低減した機能的抗体を得るために通例の実験を実施することは、十分に当業者の能力の範囲内である。

10

【0115】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、VH及びVLに加えて、重鎖定常領域又はその断片を含み得る。いくつかの実施形態では、重鎖定常領域は、ヒト重鎖定常領域、例えばヒトIgG定常領域、例えばヒトIgG1定常領域である。

【0116】

(好ましくは、抗体又はその抗原結合断片が細胞傷害性薬剤などの薬剤に複合化される) いくつかの実施形態では、残基が部位特異的複合化のために重鎖定常領域に挿入される。例えば、システイン残基は、IgG1のCH2領域のアミノ酸S239とV240との間に挿入され得、これは「239挿入」又は「239i」と称され得る。

20

【0117】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体は、3つの重鎖定常ドメイン(CH1、CH2又はCH3)のうちの1つ以上及び／又は軽鎖定常ドメイン(CL)に対する改変又は修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のドメインが部分的に又は完全に欠失している改変された定常領域が企図される。いくつかの実施形態では、改変された抗体は、CH2ドメイン全体が取り除かれたドメイン欠失構築物又はバリエーション(ΔCH2構築物)を含むことになる。いくつかの実施形態では、除かれた定常領域ドメインは、通常はその欠けた定常領域によって付与されるある程度の分子可動性をもたらす、短いアミノ酸スペーサー(例えば、10残基)によって置き換えられ得る。定常領域ドメインを(点変異又は他の手段によって)欠失又は不活性化させると、循環中の改変抗体のFc受容体結合が低下し得る。他の場合、定常領域を改変すると、本開示と一致して、補体結合が調整され、したがって複合化された細胞毒の血清半減期及び非特異的な会合が減少し得る。定常領域のさらに他の改変を使用して、抗原特異性又は抗体柔軟性の向上による局在化の増進を可能にするジスルフィド結合又はオリゴ糖部分を除去することができる。いくつかの実施形態において、抗体又はその抗原結合断片は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性及び／又は補体依存性細胞傷害(CDC)活性を有しない。

30

【0118】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、個々の改変された抗体又はその断片のヒンジ領域に直接CH3ドメインを融合させるために操作され得る。他の構築物では、ヒンジ領域と修飾CH2及び／又はCH3ドメインとの間にペプチドスペーサーが挿入され得る。例えば、適合性構築物を発現させることができ、ここではCH2ドメインが欠失しており、且つ残りのCH3ドメイン(改変又は非改変)が5~20個のアミノ酸のスペーサーでヒンジ領域に連結される。このようなスペーサーを加えると、例えば、定常ドメインの調節エレメントが空いて利用可能なままであること、又はヒンジ領域が可動なままであることが確実になり得る。ある場合には、アミノ酸スペーサーが免疫原性で、且つ構築物に対する望ましくない免疫応答を誘導すると分かる。いくつかの実施形態では、改変抗体の所望の生化学的品質を維持するため、構築物に加えられ得るいずれのスペーサーも比較的免疫原性が低いか、又は完全に省かれ得る。

40

【0119】

50

全定常領域ドメインの欠失に加えて、本明細書で提供される抗体又はその抗原結合断片は、定常領域における数個又は単一のアミノ酸の部分欠失又は置換によって改変し得る。例えば、C H 2ドメインの選択された領域にある単一のアミノ酸の変異は、F c結合を実質的に低減させ、それにより腫瘍局在を増加させるのに十分であり得る。同様に、エフェクター機能（例えば、補体C 1 Q結合）を制御する1つ以上の定常領域ドメインを完全に又は部分的に欠失させることができる。定常領域のこのような部分欠失は、対象となる定常領域ドメインに付随する他の望ましい機能はそのままにしておきながら、抗体又はその抗原結合断片の選択された特性（例えば血清半減期）を改善し得る。さらに、抗体及びその抗原結合断片の定常領域は、得られる構築物のプロファイルを増強させる1つ以上のアミノ酸の変異又は置換によって改変され得る。これに関して、改変抗体又はその抗原結合断片の立体配置及び免疫原性プロファイルを実質的に維持しながら、保存された結合部位（例えば、F c結合）によりもたらされる活性を破壊することが可能である。いくつかの実施形態では、エフェクター機能の低下若しくは増加などの望ましい特性を増強するために、又はより多くの細胞毒若しくは炭水化物の結合を提供するために、定常領域への1つ以上のアミノ酸の付加が存在し得る。いくつかの実施形態では、選択された定常領域ドメインに由来する特定の配列を挿入又は複製することが望ましい場合もある。いくつかの実施形態では、重鎖定常領域又はその断片、例えばヒトI g G定常領域又はその断片は、野生型I g G定常ドメインと比較して、1つ以上のアミノ酸置換を含み得、ここで改変されたI g Gは、野生型I g G定常ドメインを有するI g Gの半減期と比較して半減期を延長させる。例えば、I g G定常ドメインは、251～257位、285～290位、308～314位、385～389位及び428～436位のアミノ酸残基の1つ以上のアミノ酸置換を含有し得る（ここで、アミノ酸位置の番号付けは、K a b a tに記載のE Uインデックスによる）。いくつかの実施形態において、I g G定常ドメインは、K a b a t位置252のアミノ酸のチロシン（Y）、フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）又はトレオニン（T）による置換、K a b a t位置254のアミノ酸のトレオニン（T）による置換、K a b a t位置256のアミノ酸のセリン（S）、アルギニン（R）、グルタミン（Q）、グルタミン酸（E）、アスパラギン酸（D）又はトレオニン（T）による置換、K a b a t位置257のアミノ酸のロイシン（L）による置換、K a b a t位置309のアミノ酸のプロリン（P）による置換、K a b a t位置311のアミノ酸のセリン（S）による置換、K a b a t位置428のアミノ酸のトレオニン（T）、ロイシン（L）による置換、K a b a t位置433のアミノ酸のアルギニン（R）、セリン（S）、イソロイシン（I）、プロリン（P）又はグルタミン（Q）による置換、或いはK a b a t位置434のアミノ酸のトリプトファン（W）、メチオニン（M）、セリン（S）、ヒスチジン（H）、フェニルアラニン（F）又はチロシンによる置換の1つ以上を含有し得る。いくつかの実施形態では、抗F R α抗体又はその抗原結合断片は、Y T E変異体を含む。「Y T E」又は「Y T E変異体」という用語は、ヒトF c R nへの結合の増加をもたらす、この変異を有する抗体の血清半減期を改善するI g G 1 F cにおける変異を指す。Y T E変異体は、I g G 1の重鎖に導入される3つの変異、M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E（E U番号付け K a b a t e t a l.（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D. C.）の組み合わせを含む。米国特許第7, 658, 921号明細書を参照されたい（この文献は参照により本明細書に組み込まれる）。Y T E変異体は、同じ抗体の野生型バージョンと比較したときに、抗体の血清中半減期がおよそ4倍に増加することが示されている（D a l l ' A c q u a e t a l., J. Biol. Chem. 281: 23514-24（2006）; R o b b i e e t a l.,（2013）Antimicrob. Agents Chemother. 57, 6147-6153）。米国特許第7, 083, 784号明細書も参照されたい（この文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

10

20

30

40

50

【0120】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、
VHのN末端（例えば、1位）にL；
VHのN末端（例えば、1位）にE；又は
VHのN末端（例えば、1位）にQ

を含む。

【0121】

定義と抗体フォーマット

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、特定の抗原に特異的に結合するか、又は特定の抗原と免疫学的に反応する免疫グロブリン分子を指す。

10

【0122】

本発明の抗体は、一般に、単離された抗体であるか又は組換えられた抗体である。「単離された」は、本明細書で使用される場合、それが発現された細胞又は細胞培養物から識別され、分離及び／又は回収されたポリペプチド、例えば抗体を指す。通常、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程によって調製される。したがって、「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す。例えば、FR α に特異的に結合する単離された抗体は、FR α 以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない。

【0123】

一般に、抗体は、少なくとも2つの「軽鎖」（LC）及び2つの「重鎖」（HC）を含む。このような抗体の軽鎖及び重鎖は、いくつかのドメインからなるポリペプチドである。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書では「VH」と略記される）及び重鎖定常領域（本明細書では「CH」と略記される）を含む。重鎖定常領域は、重鎖定常ドメインCH1、CH2及びCH3（抗体クラスIgA、IgD及びIgG）、並びに任意選択的に重鎖定常ドメインCH4（抗体クラスIgE及びIgM）を含む。各軽鎖は、軽鎖可変ドメイン（本明細書では「VL」と略記される）及び軽鎖定常領域（本明細書では「CL」と略記される）を含む。

20

【0124】

いくつかの実施形態では、抗体は、完全長抗体である。「インタクト」又は「完全長」抗体は、本明細書で使用される場合、ジスルフィド結合によって相互接続された2つの重（H）鎖ポリペプチド及び2つの軽（L）鎖ポリペプチドを有する抗体を指す。

30

【0125】

抗体の「可変領域」は、単独の又は組み合わされた、抗体軽鎖の可変領域又は抗体重鎖の可変領域を指す。可変領域VH及びVL領域は、保存性の高いフレームワーク領域（FR）と呼ばれる領域が散在する、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域にさらに細分することができる。好ましくは、各VH及びVLは、3つのCDR及び4つのFRから構成されており、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端に配置される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。抗体のVH又はVL鎖は、重鎖定常領域又は軽鎖定常領域の全て又は一部をさらに含み得る。

【0126】

抗体とその標的抗原又はエピトープとの間の結合は、CDRによって媒介される。「エピトープ」という用語は、本発明の抗体又は抗原結合断片に結合可能な（例えば、結合されている）標的タンパク質領域（例えば、ポリペプチド）を指す。CDRは、抗原特異性の主要な決定因子である。CDRの決定に、以下の少なくとも2つの技術がある：（1）種間の配列の変動に基づくアプローチ（すなわち、Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)）；及び（2）抗原抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ（All-lazikani et al. (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948）。加えて、当該技術分野では、これらの2

40

50

つのアプローチの組合せを使用してCDRを決定することがある。

【0127】

CDRの配列は、当該技術分野で知られた任意の付番システム、例えばKabatシステム(Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991); Chothiaシステム(Chothia & Lesk, "Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)); 又はIMGTシステム(Lefranc et al., "IMGT Unique Numbering for Immunoglobulin and Cell Receptor Variable Domains and Ig superfamily V-like domains," Dev. Comp. Immunol. 27, 55-77 (2003))を参照して特定することができる(表6を参照)。

10

【0128】

【表10】

表6: CDRの定義

	Kabat	Chothia	IMGT
VH CDR1	31-35	26-32	27-38
VH CDR2	50-65	52-56	56-65
VH CDR3	95-102	95-102	105-117
VL CDR1	24-34	24-34	27-38
VL CDR2	50-56	50-56	56-65
VL CDR3	89-97	89-97	105-117

20

【0129】

重鎖及び軽鎖の「定常ドメイン」(又は「定常領域」)は、標的への抗体の結合に直接関与しないが、様々なエフェクター機能を示す。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞(例えばエフェクター細胞)及び古典的補体系の第1の成分(C1q)を含む宿主の組織又は因子への、免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

30

【0130】

IgA、IgG、IgD、IgE及びIgMとして分類される重鎖定常領域の5つの主要なクラスが存在し、各々がアイソタイプによって指定される特徴的なエフェクター機能を有する。Ig分子は、複数のクラスの細胞受容体と相互作用する。例えば、IgG分子は、抗体のIgGクラスに特異的なFcγ受容体(FcγR)の3つのクラス、すなわち、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIと相互作用する。細胞表面のFc受容体への抗体の結合は、多くの重要且つ多様な生物学的応答、例えば、抗体コートされた粒子の飲み込み及び破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体コートされた標的細胞の溶解(抗体依存性細胞媒介性細胞毒性、又はADCCと呼ばれる)、炎症メディエーターの放出、胎盤通過及び免疫グロブリン産生の制御を誘発する。FcγR受容体へのIgGの結合のために重要な配列は、CH2及びCH3ドメインに位置すると報告されている。

40

【0131】

好ましい実施形態では、抗FRα抗体又はその抗原結合断片は、IgGアイソタイプである。抗FRα抗体又は抗原結合断片は、任意のIgGサブクラス、例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4アイソタイプであり得る。好ましい実施形態では、抗FRα抗体又はその抗原結合断片は、IgG1アイソタイプに基づいている。天然IgGに

50

近い野生型ヒトIgG1分子の使用は、開発可能性及び他のリスクを低減し得る。例えば、本発明者らは、理論に束縛されるものではないが、IMGN151などの開発されている他の抗FR α ADCよりも免疫原性が低いと考えられる、ヒトIgG1 mAb構造を使用するADCを考案した。

【0132】

本発明の抗体において考察される重鎖定常領域アミノ酸位置の番号付けは、Edelman, G. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969): 78-85)で最初に記載されたEUインデックスによる。EdelmanのEU番号付けはまた、Kabatt et al., (1991) (上記)に記載されている。したがって、重鎖の文脈における「Kabattに記載されているEUインデックス」、「EUインデックス」、「KabattのEUインデックス」又は「EU番号付け」という用語は、Kabatt et al., (1991)に記載されているEdelmanらのヒトIgG1 EU抗体に基づく残基番号付けシステムを指す。軽鎖定常領域アミノ酸配列に使用される番号付けシステムは、Kabatt et al., (上記)に同様に記載されている。したがって、本明細書で使用される場合、「Kabattにより番号付けされる」は、Kabatt et al., (上記)に記載されるKabatt番号付けシステムを指す。

【0133】

「Fc領域」、「Fc部分」及び「Fc」という用語は、本明細書において互換的に使用され、2つのFc鎖によって形成される天然免疫グロブリンの部分の部分を指す。各「Fc鎖」は、定常ドメインCH2及び定常ドメインCH3を含む。各Fc鎖はまた、ヒンジ領域を含み得る。天然のFc領域はホモ二量体である。いくつかの実施形態では、Fc領域は、Fcヘテロ二量体化を強制するための改変を含み得るため、ヘテロ二量体であり得る。Fc領域は、補体及びFc受容体(FcRn受容体を含む)の炭水化物部分及び結合部位を含み、抗原結合活性を有しない。Fcとは、独立してこの領域を指し得るか、又は抗体、抗体断片若しくはFc融合タンパク質に関連してこの領域を指し得る。以下に限定されないがEU位置270、272、312、315、356及び358を含むFcドメインにおけるいくつかの位置で多形性が認められているため、本出願に提示した配列と当該技術分野で知られる配列との間に若干の差が存在し得る。結果として、全ての天然に存在するIgG Fc領域は、「野生型IgG Fcドメイン」又は「WT IgG Fcドメイン」(すなわち、任意の対立遺伝子)と称される。ヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4の重鎖の配列は、様々な配列データベース、例えばUniProtデータベース(www.uniprot.org)でそれぞれ受託番号P01857(IGHG1__HUMAN)、P01859(IGHG2__HUMAN)、P01860(IGHG3__HUMAN)及びP01861(IGHG4__HUMAN)で得ることができる。

【0134】

いくつかの実施形態において、本発明の抗FR α 抗体は、モノクローナル抗体である。「モノクローナル抗体」(mAb)は、単一の抗原決定基又はエピトープの高度に特異的な認識及び結合に関与する均一な抗体集団を指す。これは、様々な抗原決定基に対して向けられる様々な抗体を典型的に含むポリクローナル抗体と対照的である。用語「モノクローナル抗体」は、両方の完全長モノクローナル抗体、並びに抗体断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、一本鎖(scFv)変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、及び抗原認識部位を含む任意の他の改変免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」は、様々な方法、例えば、以下に限定されないが、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現及びトランスジェニック動物を含む方法で作製されるような抗体を指す。より好ましくは、本発明の抗FR α 抗体は、単離されたモノクローナル抗体である。より好ましい実施形態では、抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である。別の実施形態では、本発明の方法は、ポリクローナル抗体を使用し得る。

【0135】

本発明の抗FR α 抗体及びその抗原結合断片は、組換えによる手段によって任意の種か

ら誘導し得る。例えば、抗体又は抗原結合断片は、マウス、ラット、ヤギ、ウマ、ブタ、ウシ、ニワトリ、ウサギ、ラクダ、ロバ、ヒト、又はそれらのキメラバージョンであり得る。ヒトへの投与における使用のために、非ヒト由来の抗体又は抗原結合断片は、ヒト患者への投与時に抗原性が低くなるように遺伝的に又は構造的に改変し得る。ヒト又はヒト化抗体、特に組み換えヒト又はヒト化抗体が、特に好ましい。

【0136】

用語「ヒト抗体」は、ヒトにおいて産生される抗体又は当該技術分野において知られる技術を使用して作製される、ヒトにおいて産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。ヒト抗体には、インタクトな若しくは完全長の抗体、その断片、及び／又は少なくとも1つのヒト重鎖及び／又は軽鎖ポリペプチドを含む抗体、例えばマウス軽鎖及びヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体が含まれ得る。ヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダム若しくは部位特異的変異誘発によって、又は遺伝子組換えにおいて、又はインビボでの体細胞変異によって導入された変異）を含み得る。ヒト抗体は、機能的に再構成されたヒト免疫グロブリン（重鎖及び軽鎖など）遺伝子を発現することができるヒト細胞（組換え発現を介して）、非ヒト動物、又は原核細胞若しくは真核細胞において作製することができる。天然ヒト抗体に存在しないリンカーペプチドは、一本鎖ヒト抗体に含まれ得る。例えば、Fvは、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域とを連結する、2～約8個のグリシン又は他のアミノ酸残基などのリンカーペプチドを有し得る。これらのリンカーペプチドは、ヒト由来であると考えられる。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリを使用するファージディスプレイ技術を含む、様々な技術を使用して作製することができる。機能的な固有の免疫グロブリンを発現することができないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスもまた、ヒト抗体を作製するために使用することができる（例えば、国際公開第1998/24893号パンフレット、国際公開第1992/01047号パンフレット、国際公開第1996/34096号パンフレット、国際公開第1996/33735号パンフレット、米国特許第5,413,923号明細書、同第5,625,126号明細書、同第5,633,425号明細書、同第5,569,825号明細書、同第5,661,016号明細書、同第5,545,806号明細書、同第5,814,318号明細書、同第5,885,793号明細書、同第5,916,771号明細書及び同第5,939,598号明細書（これらの各文献は参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。ヒト抗体はまた、当該技術分野で知られる様々な技術を使用して直接、調製することができる。インビトロで免疫されたか、又は標的抗原に対する抗体を産生する免疫された個体から単離された、不死化ヒトBリンパ球が生成され得る。例えば、Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., *J. Immunol.* 147 (1): 86-95 (1991); 米国特許第5,750,373号明細書を参照されたい。

【0137】

「ヒト化抗体」という用語は、フレームワーク又はCDRが親免疫グロブリンのものと比較して異なる特異性の免疫グロブリンのCDRを含むように改変されている抗体を指す。例えば、マウスCDRをヒト抗体のフレームワーク領域に移植して、「ヒト化抗体」を調製することができる。例えば、Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; 及びNeuberger, M. S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270を参照されたい。いくつかの実施形態では、「ヒト化抗体」は、定常領域が所望の特性を生成するために、元の抗体のものから追加的に改変又は変更されているものである。

【0138】

ヒト化抗体は、任意選択により、親配列、操作された配列及びヒト化配列の三次元モデルを使用した親配列及び様々な概念的ヒト化産物及び操作された産物の分析プロセスによ

って調製することができる。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に利用可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の予想される三次元立体配座構造を図示し表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を調べることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の見込まれる役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがFR α などのその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、FR残基をコンセンサス配列及び移入配列から選択して組み合わせることができ、これにより所望の抗体特性、例えば標的抗原に対する親和性の増加が実現される。

【0139】

ヒト化抗体は、抗体特異性、親和性及び／又は能力を洗練させ、最適化するために、Fvフレームワーク領域中及び／又は置き換えられた非ヒト残基中のさらなる残基を置換することによってさらに改変し得る。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDR領域の全て又は実質的に全てを含有する可変ドメインの少なくとも1つ、典型的には2つ又は3つを実質的に全て含むことになるが、一方でFR領域の全て又は実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域又はドメイン(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものを含み得る。ヒト化抗体を生成するために使用される方法の例は、米国特許第5,225,539号明細書又は同第5,639,641号明細書に記載されており、これらの各文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【0140】

「キメラ抗体」という用語は、通常、組換えDNA技術によって調製される、1つの供給源又は種由来の可変領域、すなわち結合領域、及び異なる供給源又は種由来の定常領域の少なくとも一部を含む抗体を指す。マウス可変領域及びヒト定常領域を含むキメラ抗体が好ましい。本発明に包含される「キメラ抗体」の他の好ましい形態は、定常領域が所望の特性を生成するために元の抗体のものから改変又は変更されたものである。このようなキメラ抗体は、「クラススイッチ抗体」とも呼ばれる。キメラ抗体は、免疫グロブリン可変領域をコードするDNAセグメント、及び免疫グロブリン定常領域をコードするDNAセグメントを含む、発現された免疫グロブリン遺伝子の産物である。従来の組換えDNA及び遺伝子トランスフェクション技術を含むキメラ抗体を産生するための方法は、当該技術分野においてよく知られている。例えば、Morrison, S. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; 米国特許第5,202,238号明細書及び同第5,204,244を参照されたい。これらの各文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【0141】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、上記の完全長抗体である。或いは、抗体は、抗原結合断片であり得る。本明細書で使用される「抗原結合断片」という用語には、1つ、2つ若しくは3つの軽鎖CDR、及び／又は1つ、2つ若しくは3つの重鎖CDRを含む、天然に存在するか又は人工的に構築された構造からなる抗原結合ポリペプチドが含まれ、ここで、ポリペプチドは抗原に結合することができる。

【0142】

いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合断片はFab断片である。本発明による抗体はまた、Fab'、Fv、scFv、Fd、VNARドメイン、IgNAR、イントラボディ、IgGCH2、ミニボディ、単ドメイン抗体、Fcab、scFv-Fc、F(ab')₂、ジ-scFv、二重特異性T細胞エンゲージャー(BiTE(登録商標))、F(ab')₃、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、DVD-Ig、(scFv)₂、mAb₂又はDARPinであり得る。

【0143】

「Fab断片」及び「Fab」という用語は、本明細書において互換的に使用され、単一の軽鎖(例えば、定常ドメインCL及びVL)及び単一の重鎖(例えば、定常ドメインCH1及びVH)を含む。Fab断片の重鎖は、別の重鎖とジスルフィド結合を形成する

ことができない。

【0144】

「Fab'断片」は、単一の軽鎖及び単一の重鎖を含むが、CH1及びVHに加えて、「Fab'断片」は、鎖間ジスルフィド結合の形成に必要なとされるCH1ドメインとCH2ドメインとの間の重鎖の領域を含む。したがって、2つの「Fab'断片」は、ジスルフィド結合の形成を介して会合して、F(ab')₂分子を形成することができる。

【0145】

「F(ab')₂断片」は、2つの軽鎖及び2つの重鎖を含む。各鎖は、2つの重鎖間の鎖間ジスルフィド結合の形成に必要な定常領域の一部を含む。

【0146】

「Fv断片」は、重鎖及び軽鎖の可変領域のみを含む。それは定常領域を含まない。

【0147】

「単一ドメイン抗体」は、単一抗体ドメイン単位（例えば、VH又はVL）を含有する抗体断片である。

【0148】

「一本鎖Fv」（「scFv」）は、抗体のVH及びVLドメインを含み、これらが一緒に連結されて一本鎖を形成している抗体断片である。ポリペプチドリンカーは、scFvのVH及びVLドメインを接続するために一般に使用される。

【0149】

TandAb（登録商標）としても知られる「タンデムscFv」は、柔軟なペプチドリンカーを用いてタンデム配向で2つのscFvを共有結合させることによって形成される単鎖Fv分子である。

【0150】

「二重特異性T細胞エンゲージャー」（BiTE（登録商標））は、単一ペプチド鎖上の2つの単鎖可変断片（scFv）からなる融合タンパク質である。scFvの一方がCD3受容体を介してT細胞に結合し、他方が腫瘍細胞抗原に結合する。

【0151】

「ダイアボディ」は、同じポリペプチド鎖（VH-VL）上の軽鎖可変ドメイン（VL）に連結された重鎖可変ドメイン（VH）が、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるペプチドリンカーによって連結された小さな二価の二重特異性抗体断片である（Kipriyanov, Int. J. Cancer 77（1998）, 763-772）。これは、別の鎖の相補的ドメインとの対合を強制し、2つの機能的抗原結合部位との二量体分子の集合を促進する。

【0152】

「DARPin」は、二重特異性アンキリンリピート分子である。DARPinは、ヒトゲノム中に見出すことができ、最も豊富なタイプの結合タンパク質の1つである天然アンキリンタンパク質に由来する。DARPinライブラリモジュールは、最初の設計のために229個のアンキリンリピートを使用し、その後の精製のために別の2200個のアンキリンリピートを使用して、天然アンキリンリピートタンパク質配列によって定義される。モジュールは、DARPinライブラリの構成要素として機能する。ライブラリモジュールはヒトゲノム配列に似ている。DARPinは、4～6個のモジュールから構成される。各モジュールは約3.5 kDaであるため、平均DARPinのサイズは16～21 kDaである。結合剤の選択は、完全に無細胞であり、He M. and Taussig M J., Biochem Soc Trans. 2007, Nov; 35 (Pt 5): 962-5に記載されているリボソームディスプレイによって行われる。

【0153】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体及びその抗原結合断片は、裸抗体である。本明細書で使用される「裸抗体」という用語は、治療薬、例えば細胞傷害性薬剤又は放射性標識と複合化していない抗体を指す。実施形態において、抗体又はその抗原結合断片は、裸の単一特異性抗体である。代替の好ましい実施形態では、抗体又はその抗原結合

10

20

30

40

50

断片は、1つ又は複数の異種薬剤（例えば、細胞傷害性薬剤）に複合化される。

【0154】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、通常はそのタンパク質の一部ではないさらなる化学的部分を含有するようにさらに改変され得る。それらの誘導体化部分は、タンパク質の溶解度、生物学的半減期又は吸収を向上させることができる。これらの部分はまた、タンパク質の任意の望ましい副作用などを低減又は消失させることができる。それらの部分についての概要は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012)に見出すことができる。

【0155】

FR α 結合

好ましい態様において、本発明の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、FR α に特異的に結合する。「FR α に特異的に結合する」という用語は、抗体がFR α を標的とする治療薬として有用であるように、十分な親和性をもって定義された標的に結合することができる抗体を指す。いくつかの実施形態では、FR α に特異的に結合する抗体は、他の抗原に結合しないか、又は生理学的効果を生じるのに十分な親和性では他の抗原に結合しない。いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、ヒトFR α (UniProt ID: P15328) 及び／又はカニクイザルFR α (UniProt ID: A0A2K5U044) に特異的に結合する。特に好ましい実施形態では、本発明の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、ヒトFR α に特異的に結合する。好ましい実施形態では、本発明の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、ヒトFR α 及びカニクイザルFR α に特異的に結合する。

【0156】

本発明の任意の態様のいくつかの実施形態では、FR α は、配列番号112又は配列番号113の配列を有する。好ましい実施形態では、FR α は、配列番号112の配列を有する。

配列番号112：ヒトFR α タンパク質（予測される成熟分泌ポリペプチド）

【化13】

```
RIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKNACCSTNTSQEAHKDVSYL
YRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVNLNVPLCKED
CEQWVEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTYH
SYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPAGNPNEEVARFYAAAMS
```

配列番号113：カニクイザルFR α タンパク質（予測される成熟分泌ポリペプチド）

【化14】

```
RTARARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKNACCSTNTSQEAHKDVSYL
YRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVNLNVPLCKEDCE
QWVEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCPVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTYSYK
VSNSYRSGSGRCIQMWFDPAGNPNEEVARFYAAAMS
```

【0157】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、マウスFR α (UniProt ID: P35846)、ラットFR α (UniProt ID: G3V8M6)、ヒトFR β (UniProt ID: P14207)、ヒトFR γ (UniProt ID: P41439) 又はこれらの組み合わせから選択される1つ以上に結合しない。

【0158】

「結合しない」という用語は、本発明の抗体又はその抗原結合断片が、前記分子（例えば、マウスFR α 、ラットFR α 、ヒトFR β 、ヒトFR γ 、又はこれらの組み合わせ）

の1つ以上に実質的に結合しないことを意味する。「実質的にない」という用語は、本明細書中、結合の文脈で使用される場合、本発明の抗体又はその抗原結合断片により（それとの接触時に）結合されるようになる、細胞培養物中の前記分子の1つ以上を発現する細胞が、5%、2%、1%、0.5%又は0.1%未満であることを意味し得る。好適には、「実質的にない」という用語は、本明細書中、結合の文脈で使用される場合、結合されるようになるこのような細胞がないことを意味し得る。

【0159】

結合親和性

「結合親和性」は一般に、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位と、その結合パートナー（例えば、抗原）との間の、非共有結合性の相互作用の全体の強度を指す。別段の指示がない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対構成メンバー（例えば、抗体及び抗原）間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数（KD）によって表され得る。親和性は、本明細書に記載されるものを含む、当該技術分野で知られる一般的な方法によって測定され得る。低親和性抗体は一般に、抗原に緩徐に結合し、容易に解離する傾向があり、一方、高親和性抗体は一般に、抗原により迅速に結合し、結合状態をより長く維持する傾向がある。

10

【0160】

好適には、本発明の抗体又は抗原結合断片は、抗体がFR α を標的とする治療薬又は診断薬として有用となるような十分な親和性でFR α 分子に結合する。

20

【0161】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、約50 nM以下、約40 nM以下、約30 nM以下、約20 nM以下、約10 nM以下、約5 nM以下、約2 nM以下、約1 nM以下のKDでヒトFR α に結合する。

【0162】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、約0.5~約50 nM、約0.5~約40 nM、約0.5~約30 nM、約0.5~約20 nM、約1~約50 nM、約1~約40 nM、約1~約30 nM、約1~約20 nM、約2~約50 nM、約2~約40 nM、約2~約30 nM、約2~約20 nM、約5~約50 nM、約5~約40 nM、約5~約30 nM、約5~約20 nM、約10~約50 nM、約10~約40 nM、約10~約30 nM又は約10~約20 nMのKDでヒトFR α に結合する。

30

【0163】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、約100 nM以下、約80 nM以下、約60 nM以下、約40 nM以下、約30 nM以下、約20 nM以下、約10 nM以下、約5 nM以下、約2 nM以下のKDでヒトFR α に結合する。

【0164】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、約1~約100 nM、約1~約80 nM、約1~約60 nM、約1~約40 nM、約2~約100 nM、約2~約80 nM、約2~約60 nM、約2~約40 nM、約5~約100 nM、約5~約80 nM、約5~約60 nM、約5~約40 nM、約10~約100 nM、約10~約80 nM、約10~約60 nM、約10~約40 nM、約20~約100 nM、約20~約80 nM、約20~約60 nM、約20~約40 nM、約30~約100 nM、約30~約80 nM、約30~約60 nM又は約30~約40 nMのKDでヒトFR α に結合する。

40

【0165】

抗原に対する抗体又はその抗原結合断片の親和性又は結合力は、当該技術分野でよく知られているあらゆる好適な方法、例えばフローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）若しくはラジオイムノアッセイ（RIA）又は動態学（例えば、KINEXA（登録商標）又はBIACORE（商標）分析）を用いて実験的に決定し得る。直接結合アッセイ、及び競合的結合アッセイフォーマットは、容易に用いることができる

50

(例えば、Berzofsky et al., Antibody-Antigen Interactions, In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N. Y. (1984); Kuby, Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N. Y. (1992); 及び本明細書に記載の方法を参照されたい)。

【0166】

本発明によれば、本発明の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片の結合親和性は、本明細書に記載のFR α 結合親和性アッセイを用いて決定することができる。いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片の結合親和性は、25℃でBiacore、例えばBiacore T200によって決定される。例えば、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片に対する組換えヒトFR α ECDの親和性は、例えば以下のプロトコルを用い、Biacore T200を用いて25℃で測定することができる。標準的なアミンカップリング技術を用いて、10mM酢酸ナトリウム pH 4.0中において50 μ g/mlの濃度で、プロテインAをCM5チップ表面に共有結合的に固定化する。抗体又はその抗原結合断片を、10 μ l/分でHBS-E P+緩衝液pH 7.4中のプロテインA表面に捕獲して、FR α ECD結合を可能にする。FR α ECDをHBS-E P+緩衝液pH 7.4で段階希釈し(0.4 nM~100 nMヒトFR α ECD; 0.8 nM~200 nMカニクイザルFR α ECD; 30 nM~4000 nMマウスFR α ECD及びラットFR α ECD)、50 μ l/分でチップ上に流し、2分間結合し、8分間解離する。チップ表面を3MのMgCl₂のパルスで完全に再生して、捕獲された抗体又はその抗原結合断片を結合したFR α ECDと共に除去する。同じ条件で緩衝液のみの注入を複数回行って、最終的なセンサーグラムセットのダブルリファレンスの差し引きを可能にし、Biacore T200解析ソフトウェアを用いて分析する。

【0167】

或いは、本発明の抗FR α 抗体又はその抗原結合断片の結合親和性は、Octet、例えばOctet redによって決定され得る。例えば、抗FR α 抗体の結合親和性は、例えば以下のプロトコルを使用して、25℃でOctet redによってアッセイされ得る。傾斜底ブラック384ウェルプレート(ForteBio、18-5076)を用いて、PBS、0.1 v/v%のBSA(Sigma、A9576)、0.01 v/v%のTween-20(Sigma、P9416)(pH 7.4)を含有するアッセイ緩衝液中、25℃にて、Octet RED384(ForteBio)で結合アッセイを行う。アッセイは、プロテインA又は抗ヒトキャプチャーバイオセンサー(AHC)(ForteBio、18-5089)を用い、製造業者の説明書に従って設定する。10 μ g/mlの抗ラットFR α IgG(Sino Biological、81073-RP01)をプロテインAバイオセンサー(ForteBio、NC9490476)上にコーティングし、10 μ g/mlの試験ヒトIgGを抗ヒトキャプチャーバイオセンサー(AHC)(ForteBio、18-5089)上に180秒間ロードする。結合は、500 nMのヒトFR α (社内)又は500 nMのラットFR α (Sino Biological、81073-R08H)をロードしたバイオセンサーをインキュベートすることによって測定される。解離は、アッセイ緩衝液への移入後に測定される。データは、Octetデータ分析ソフトウェアバージョン7.0を用いて分析する。

【0168】

抗体調製物

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗FR α 抗体及びその抗原結合断片を産生する方法であって、重鎖及び軽鎖を発現する組換え宿主細胞を培養する工程と、その細胞によって産生される抗体又は抗原結合断片を単離する工程とを含む方法を提供する。

【0169】

好ましい実施形態では、抗体又はその抗原結合断片を作製するための方法は、(a) 宿主細胞を培養する工程と、(b) その細胞から発現される抗体又はその抗原結合断片を単

離する工程とを含む。

【0170】

本発明の抗体は、それぞれの抗体又は断片をコードするポリヌクレオチドを含む1つ以上のベクターで宿主細胞をトランスフェクトし、前記抗体分子の合成を可能にする条件下で宿主細胞を培養し、前記培養物から前記抗体分子を回収することによって作製することができる。

【0171】

いくつかの実施形態では、方法は、

a) 本発明の抗体の重鎖及び軽鎖のセットをコードするポリヌクレオチドを含む1つ以上のベクターで宿主細胞をトランスフェクトする工程；

b) 前記抗体分子の合成を可能にする条件下で宿主細胞を培養する工程；並びに

c) 前記培養物から前記抗体分子を回収する工程

を含む。

【0172】

好ましい実施形態では、方法は、

a) 本発明の抗体の軽鎖及び重鎖をコードするポリヌクレオチドを含むベクターで宿主細胞をトランスフェクトする工程；

b) 前記抗体分子の合成を可能にする条件下で宿主細胞を培養する工程；並びに

c) 前記培養物から前記抗体分子を回収する工程

を含む。

【0173】

本発明は、FR α ポリペプチド（例えば、FR α ポリペプチドエピトープ）に結合する抗体又はその抗原結合断片を作製するための前記方法により得ることができる抗体又はその抗原結合断片をさらに包含する。

【0174】

抗体又はその抗原結合断片（例えば、モノクローナル抗体として）はまた、米国特許第4,816,567号明細書（この文献は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される組換えDNA法を使用して作製することができる。モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、この抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子の特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを使用するRT-PCRなどにより、成熟B細胞又はハイブリドーマ細胞から単離し、従来の手順を使用してそれらの配列を決定する。次に、重鎖及び軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドを好適な発現ベクターにクローニングし、これを、通常であれば免疫グロブリンタンパク質を産生しないE. コリ（E. coli）細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞又は骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトした場合、モノクローナル抗体が宿主細胞により産生される。また、所望の種の組換えモノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); 及びMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)に記載されるような所望の種のCDRを発現するファージディスプレイライブラリから単離され得る。

【0175】

親和性成熟戦略及び鎖シャッフリング戦略が、当該技術分野において知られており、高親和性ヒト抗体又はその抗原結合断片を作製するために利用され得る。Marks et al., Biotechnology 10:779-783 (1992)（参照によりその全体が組み込まれる）を参照されたい。

【0176】

抗体断片の生成に、様々な手法が知られている。従来、これらの断片は、例えばMorimoto et al., J. Biochem. Biophys. Meth. 24:107-117 (1993) 及びBrennan et al., Science 229

10

20

30

40

50

： 81 (1985) に記載されるように、インタクトな抗体のタンパク質分解消化を介して得られる。いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体断片は、組換えにより生成される。F a b、F v 及び s c F v 抗体断片は全て、E. コリ (E. coli) 又はその他の宿主細胞に発現させ、それから分泌させることができ、これにより、これらの断片の大量の生産が可能になる。そのような抗 F R α 抗体断片はまた、上述した抗体ファージライブラリから単離することもできる。抗 F R α 抗体断片はまた、米国特許第 5,641,870 号明細書 (この文献は参照により本明細書に組み込まれる) に記載されるような線状抗体であってもよい。抗体断片を作製するための他の技術は、当業者には明らかであろう。

【0177】

本発明によれば、技術は、F R α に特異的な一本鎖抗体の生成に適合させることができる (例えば、米国特許第 4,946,778 号明細書を参照)。加えて、方法は、F R α に対して所望の特異性を有するモノクローナル F a b 断片、又はその誘導体、断片、類似体若しくは相同体の迅速且つ有効な同定を可能にする F a b 発現ライブラリの構築に適合させることができる。例えば、Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989) を参照されたい。抗体断片は、以下に限定されないが、抗体分子のペプシン消化によって生成される F (a b')₂ 断片；F (a b')₂ 断片のジスルフィド架橋の還元によって生成される F a b 断片；抗体分子をパイン及び還元剤で処理することによって生成される F a b 断片；又は F v 断片を含む、当該技術分野で知られる手法によって生成し得る。

【0178】

抗体薬物複合体 (ADC)

また本明細書においては、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片を含む ADC が提供される。

【0179】

異種薬剤

いくつかの実施形態では、本発明の抗体又は抗原結合断片は、異種薬剤に連結される。好ましい実施形態では、抗体又は抗原結合断片は、異種薬剤に複合化される。好適には、「複合化される」は、共有結合又はイオン結合を介して連結されることを意味する。

【0180】

いくつかの実施形態では、抗体又は抗原結合断片は、トポイソメラーゼ I 阻害剤 (T O P O i)、ツブリシン誘導体、ピロロベンゾジアゼピン、抗微生物剤、治療薬、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、脂質、生体応答修飾物質、医薬品、リンホカイン、異種抗体、異種抗体の断片、検出可能な標識、ポリエチレングリコール (P E G)、放射性同位体、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ以上の異種薬剤に複合化される。

【0181】

いくつかの実施形態では、この異種ポリペプチドは、薬物であり得る。好ましくは、異種薬剤は、細胞毒である。例えば、抗体又は抗原結合断片は、「抗体薬物複合体」(ADC) を提供するために、このような異種薬剤に複合化され得る。

【0182】

本発明の別の態様では、本発明の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片を含む ADC であって、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、細胞毒に複合化されている ADC が提供される。

【0183】

異種薬剤は、典型的には、抗体又は抗原結合断片に連結されるか又は「ロードされる」。薬剤ロード量 (p) は、抗体又は抗原結合断片 1 つあたりの平均薬剤数である。2 つ以上の前記薬剤 (例えば、T O P O i) を抗体又はその抗原結合断片に複合化し得ることは、当業者であれば理解されよう。

【0184】

いくつかの実施形態では、抗体 (又はその抗原結合断片) 1 つあたりの平均薬剤数は、

10

20

30

40

50

1～20の範囲である。いくつかの実施形態では、この範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択される。いくつかの実施形態では、抗体（又はその抗原結合断片）1つあたり、1つの薬剤がある。いくつかの実施形態では、抗体（又はその抗原結合断片）1つあたりの薬剤数は、抗体に対する薬剤（すなわち薬物）の比として表され得る。この比は、薬物抗体比（DAR）と呼ばれる。DARは、各抗体に連結される薬物（すなわち薬剤）の平均数である。本発明のいくつかの実施形態では、DARは1～20の範囲である。いくつかの実施形態では、DARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択される。好ましい実施形態では、DARは、約4（例えば、3.8～4.2）又は約8（例えば、7.6～8.4）、より好ましくは約8（例えば、7.6～8.4）である。

10

【0185】

リンカー

抗体又は抗原結合断片は、リンカーによって異種薬剤（例えば、細胞障害性薬剤）に複合化され得る。

【0186】

「リンカー」又は「スペーサー」という用語は、本明細書で使用される場合、抗体又はその抗原結合断片を異種薬剤（例えば、細胞毒）に共有結合して複合体（例えば、ADC）を形成する共有結合又は原子鎖を含む二価の化学的部分を意味する。いくつかの実施形態では、リンカー又はスペーサーは、ペプチドスペーサーである。いくつかの実施形態では、スペーサーは、非ペプチド（例えば、化学的）スペーサーである。好適なリンカーは、2つの反応性末端を有し、一方は抗体の複合化のためのものであり、他方は異種薬剤の複合化のためのものである。リンカー及び／又は異種薬剤（例えば、細胞毒）の間、並びにリンカー及び／又は抗体若しくはその抗原結合断片の間の結合を形成するため、反応性末端の一方又は両方は、存在しないか又は不完全である（例えば、カルボン酸のカルボニルのみである）。これらの複合化反応は、以下でより詳細に論じる。

20

【0187】

好ましい実施形態では、リンカーは、アミノ残基、例えば本明細書中に記載の抗体又は抗原結合断片のアミノ酸に開裂可能に連結される（例えば、複合化される）。

【0188】

いくつかの実施形態では、リンカーは、細胞内環境下で開裂可能であり、薬物単位を細胞内環境において抗体から放出させる。

30

【0189】

或いは、リンカー単位は開裂可能でなくてもよい。そのような実施形態では、薬物は、例えば、抗体分解によって放出される。しかしながら、開裂が不可能なペイロードはリソソームにおける完全なmAb消化を必要とし、得られる薬物含有生成物は、例えばバースタンダー効果を達成するために極性が高すぎる場合がある。

【0190】

異種薬剤に連結された抗体（例えば、ADC）は、細胞内に輸送又は送達される前は、安定且つインタクトであることが好ましい。すなわち、抗体は薬物部分に結合している必要がある。標的細胞の外では、リンカーは安定であるが、細胞内では、リンカーは迅速に切断され得る。効果的なリンカーは、（i）抗体の特異的結合特性を維持し；（ii）複合体又は薬物部分の細胞内への送達が可能であり；（iii）複合体がその標的部位に送達又は輸送されるまで、安定でインタクトなままであり（すなわち、切断されない）；且つ（iv）細胞毒性部分の細胞殺滅効果又は細胞増殖抑制効果を維持する。質量分析、HPLC、及び分離／分析技術LC/MSなどの標準的な分析方法を用いて、異種薬剤に連結された抗体（例えば、ADC）の安定性を評価することができる。

40

【0191】

リンカーは、例えば、酵素加水分解、光分解、酸性条件下での加水分解、塩基性条件下での加水分解、酸化、ジスルフィド還元、求核開裂又は有機金属開裂によって切断される（例えば、Leriche et al., Bioorg. Med. Chem., 2

50

0:571-582, 2012を参照)。

【0192】

酸性条件下で加水分解可能なリンカーとしては、例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、cis-アコニットアミド、オルトエステル、アセタール、ケタールなどが挙げられる(例えば、米国特許第 5,122,368号明細書;同第5,824,805号明細書;同第5,622,929号明細書;Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123;Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661を参照)。還元条件下で開裂可能なリンカーとしては、例えば、ジスルフィドが挙げられる。種々のジスルフィドリンカーが当該技術分野において知られており、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)、及びSMPT(N-スクシンイミジル-オキシカルボニル-アルファ-メチル-アルファ-(2-ピリジル-ジチオ)トルエン)を用いて形成することができるものが挙げられる(例えば、Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931;Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C.W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987)を参照)。

10

20

【0193】

好ましい実施形態では、リンカーは酵素加水分解を受けやすい。このようなリンカーは、標的細胞に到達する前において十分に安定ではなく、早期に開裂され得、したがって、潜在的なオフターゲット毒性が観察され得るpH感受性の開裂可能なリンカーよりも好ましい。酵素により開裂可能なリンカーは、例えば、細胞内ペプチダーゼ又はプロテアーゼ酵素、例えば限定はされないがリソソームプロテアーゼ又はエンドソームプロテアーゼによって切断されるペプチド含有リンカーであり得る。治療薬の細胞内タンパク質分解放出を利用する1つの利点は、薬剤が複合化された場合に通常減弱化され、且つ複合体の血清安定性が通常高いことである。いくつかの実施形態では、ペプチジルリンカーは、少なくとも2アミノ酸長又は少なくとも3アミノ酸長である。例示的なアミノ酸リンカーとしては、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドが挙げられる。アミノ酸のバリン、アラニン、シトルリン(Cit)、フェニルアラニン、リシン、ロイシン及びグリシンを含むペプチドは、適切なペプチドの例である。天然アミノ酸、微量アミノ酸、及びシトルリンなどの天然に存在しないアミノ酸類似体はすべて、アミノ酸リンカー成分を構成するアミノ酸残基の例である。ジペプチドの例としては、バリン-シトルリン(VC又はVal-Cit)及びアラニン-フェニルアラニン(AF又はAla-Phe)が挙げられる。トリペプチドの例としては、グリシン-バリン-シトルリン(Gly-Val-Cit)及びグリシン-グリシン-グリシン(Gly-Gly-Gly)が挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、Val-Cit、Ala-Val、又はPhe-Lys、Val-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Arg、又はTrp-Citなどのジペプチドを含む。

30

40

【0194】

いくつかの実施形態では、リンカーは、PEGを含む。PEGを含有する安定なプロテアーゼ開裂可能リンカーは、ペイロードの疎水性を制限することができ、標的癌細胞内で遊離薬物を選択的に切断し、放出することができる。本明細書に記載されるリンカーの疎水性が低い性質は、凝集を伴わずに薬物を抗体又は抗原結合断片(例えば、DAR8)へ高ロードすることを可能にし、それは、ミルベツキシマブソラブタンシン(DAR3~4)又はその誘導体、例えばIMGN151(DAR3.5)よりも有意に高いであろう。これにより、ADCは、標的の癌細胞に、癌細胞上のFR α への結合を介して、非常に高い濃度の細胞毒を送達することが可能になる。

50

【0195】

いくつかの実施形態では、リンカーは、マレイミドを含む。リンカーにマレイミドを使用することにより、抗体中の天然の鎖間ジスルフィドを使用して、DAR 8 及び DAR 4 の ADC の生成が可能になり得る。これは、DAR 種の混合物及びバッチ間の変動性をもたらし得るリシン残基からの表面アミンの複合化よりも有利である。複合化部位が抗原結合を妨害する場合、ADC の有効性に影響を及ぼす再現性の問題も存在し得る。さらに、他の複合化方法、例えば、操作された抗体を含むアジド-アルキンクリック化学は、4 を超える DAR を容易に達成することができない。

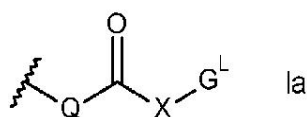
【0196】

特定の実施形態において、本発明の抗 FR α 抗体又はその抗原結合断片は、以下から選択されるリンカー R^L を介して、異種薬剤、好ましくは細胞毒に連結される：

10

【化15】

(1a):

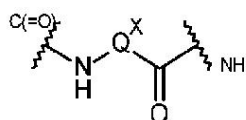


【式中、

Q は、

20

【化16】



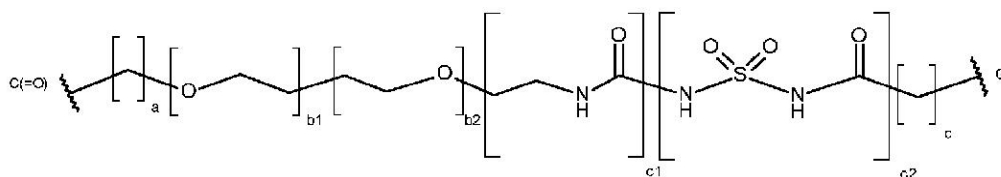
(式中、Q^X は、Q がアミノ酸残基、ジペプチド残基、トリペプチド残基又はテトラペプチド残基であるようなものである)

であり；

X は、

【化17】

30



(式中、a = 0 ~ 5、b₁ = 0 ~ 16、b₂ = 0 ~ 16、c₁ = 0 又は 1、c₂ = 0 又は 1、d = 0 ~ 5 であり、少なくとも b₁ 又は b₂ = 0 (すなわち、b₁ 及び b₂ の一方だけが 0 でない場合がある) であり、少なくとも c₁ 又は c₂ = 0 (すなわち、c₁ 及び c₂ の一方だけが 0 でない場合がある) である)

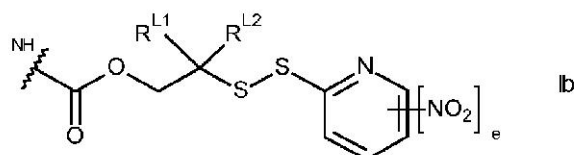
40

であり；

G^L は、本明細書の抗体又はその抗原結合断片に結合するためのリンカーである】；

【化18】

(1b):

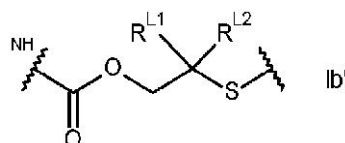


50

〔式中、 R^{L1} 及び R^{L2} は、独立して H 及びメチルから選択されるか、又はそれらが結合する炭素原子とともにシクロプロピレン基若しくはシクロブチレン基を形成し； e は、0 又は 1 である〕；或いは

【化 19】

(1b')



10

〔式中、 R^{L1} 及び R^{L2} は、上で定義されるとおりである〕。

【0197】

例として、 G^L 、 X 、 Q^X （例えば、上記の I a のリンカー内）及び I b のリンカーの好ましい実施形態を概説する。

【0198】

以下の優先事項は、本明細書に記載の本発明の全ての態様に適用され得るか、又は、単一の態様に関し得る。優先事項は、任意の組み合わせで一緒に組み合わせ得る。

【0199】

このセクション中の特定の用語に関する様々な定義は、以下で提供される表題「化学的定義」のもとで提供される。

20

【0200】

G^L

G^L は、次のものから選択され得る。

【0201】

【表 11】

(G^{L1-1})		(G^{L6})	
(G^{L1-2})		(G^{L7})	
(G^{L2})		(G^{L8})	
(G^{L3-1})	 式中、NO ₂ 基は任意である	(G^{L9})	

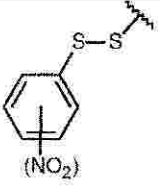
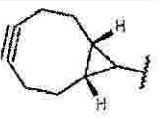
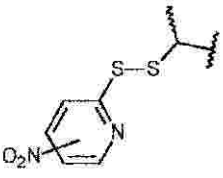
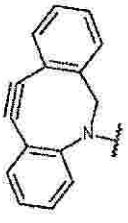
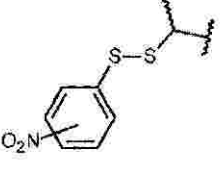
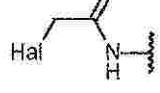
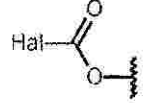
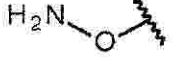
30

40

【0202】

50

【表 1 2】

(G ^{L3-2})  式中、NO ₂ 基は任意である	(G ^{L10}) 
(G ^{L3-3})  式中、NO ₂ 基は任意である	(G ^{L11}) 
(G ^{L3-4})  式中、NO ₂ 基は任意である	(G ^{L12}) 
(G ^{L4})  式中、Hal = I, Br, Clである	(G ^{L13}) 
(G ^{L5}) 	(G ^{L14}) 

10

20

30

【0203】

式中、Arは、C5～6アリーレン基、例えばフェニレンを表し、Xは、C1～4アルキルを表す。

【0204】

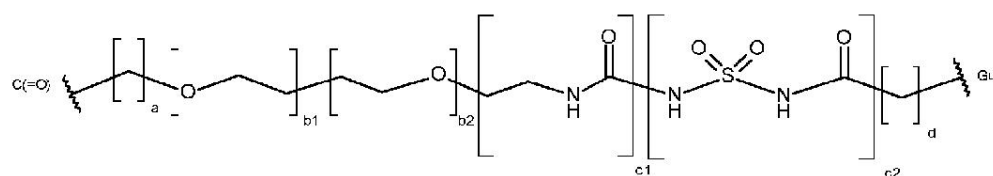
いくつかの実施形態では、G^Lは、G^{L1-1}及びG^{L1-2}から選択される。これらの実施形態のいくつかでは、G^Lは、G^{L1-1}である。

【0205】

X

Xは、好ましくは、

【化20】



(式中、a = 0～5、b1 = 0～16、b2 = 0～16、c = 0又は1、d = 0～5で

50

あり、ここで少なくとも b_1 又は $b_2 = 0$ であり、少なくとも c_1 又は $c_2 = 0$ である) である。

a は、0、1、2、3、4 又は 5 であり得る。いくつかの実施形態では、 a は、0～3 である。これらの実施形態のいくつかでは、 a は、0 又は 1 である。さらなる実施形態では、 a は 0 である。

b_1 は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 又は 16 であり得る。いくつかの実施形態では、 b_1 は、0～12 である。これらの実施形態のいくつかでは、 b_1 は、0～8 であり、0、2、3、4、5 又は 8 であり得る。

b_2 は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 又は 16 であり得る。いくつかの実施形態では、 b_2 は、0～12 である。これらの実施形態のいくつかでは、 b_2 は、0～8 であり、0、2、3、4、5 又は 8 であり得る。好ましくは、 b_1 及び b_2 の一方のみが 0 でない場合がある。

c_1 は、0 又は 1 であり得る。 c_2 は、0 又は 1 であり得る。好ましくは、 c_1 及び c_2 の一方のみが 0 でない場合がある。

d は、0、1、2、3、4 又は 5 であり得る。いくつかの実施形態では、 d は、0～3 である。これらの実施形態のいくつかでは、 d は、1 又は 2 である。さらなる実施形態では、 d は 2 である。さらなる実施形態では、 d は 5 である。

【0206】

X のいくつかの実施形態では、 a は 0 であり、 b_1 は 0 であり、 c_1 は 1 であり、 c_2 は 0 であり、 d は 2 であり、 b_2 は 0～8 であり得る。これらの実施形態のいくつかでは、 b_2 は、0、2、3、4、5 又は 8 である。 X のいくつかの実施形態では、 a は 1 であり、 b_2 は 0 であり、 c_1 は 0 であり、 c_2 は 0 であり、 d は 0 であり、 b_1 は 0～8 であり得る。これらの実施形態のいくつかでは、 b_1 は、0、2、3、4、5 又は 8 である。 X のいくつかの実施形態では、 a は 0 であり、 b_1 は 0 であり、 c_1 は 0 であり、 c_2 は 0 であり、 d は 1 であり、 b_2 は 0～8 であり得る。これらの実施形態のいくつかでは、 b_2 は、0、2、3、4、5 又は 8 である。 X のいくつかの実施形態では、 b_1 は 0 であり、 b_2 は 0 であり、 c_1 は 0 であり、 c_2 は 0 であり、 a 及び d の一方は 0 である。 a 及び d の他方は 1～5 である。これらの実施形態のいくつかでは、 a 及び d の他方は 1 である。これらの実施形態のその他では、 a 及び d の他方は 5 である。 X のいくつかの実施形態では、 a は 1 であり、 b_2 は 0 であり、 c_1 は 0 であり、 c_2 は 1 であり、 d は 2 であり、 b_1 は 0～8 であり得る。これらの実施形態のいくつかでは、 b_2 は、0、2、3、4、5 又は 8 である。

【0207】

Q^X

いくつかの実施形態では、 Q は、アミノ酸残基である。アミノ酸は、天然アミノ酸であっても非天然アミノ酸であってもよい。例えば、 Q は、Phe、Lys、Val、Ala、Cit、Leu、Ile、Arg 及び Trp から選択され得、ここで、Cit はシトルリンである。

【0208】

いくつかの実施形態では、 Q はジペプチド残基を含む。ジペプチド中のアミノ酸は、天然アミノ酸と非天然アミノ酸の任意の組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、ジペプチドは天然アミノ酸を含む。リンカーが、カテプシンに不安定なリンカーである場合、ジペプチドは、カテプシン媒介開裂の作用部位である。その場合、ジペプチドはカテプシンの認識部位である。

【0209】

いくつかの実施形態では、 Q は、
 $NH-Phe-Lys-C=O$ 、
 $NH-Val-Ala-C=O$ 、
 $NH-Val-Lys-C=O$ 、

10

20

30

40

50

$\text{NH}-\text{Ala}-\text{Lys}-\text{C}=\text{O}$ 、
 $\text{NH}-\text{Val}-\text{Cit}-\text{C}=\text{O}$ 、
 $\text{NH}-\text{Phe}-\text{Cit}-\text{C}=\text{O}$ 、
 $\text{NH}-\text{Leu}-\text{Cit}-\text{C}=\text{O}$ 、
 $\text{NH}-\text{Ile}-\text{Cit}-\text{C}=\text{O}$ 、
 $\text{NH}-\text{Phe}-\text{Arg}-\text{C}=\text{O}$ 、
 $\text{NH}-\text{Trp}-\text{Cit}-\text{C}=\text{O}$ 及び
 $\text{NH}-\text{Gly}-\text{Val}-\text{C}=\text{O}$ から選択され；
 ここで、Cit は、シトルリンである。

10

【0210】

好ましくは、Q は、
 $\text{NH}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{C}=\text{O}$ 、
 $\text{NH}-\text{Val}-\text{Ala}-\text{C}=\text{O}$ 、
 $\text{NH}-\text{Val}-\text{Lys}-\text{C}=\text{O}$ 、
 $\text{NH}-\text{Ala}-\text{Lys}-\text{C}=\text{O}$ 及び
 $\text{NH}-\text{Val}-\text{Cit}-\text{C}=\text{O}$
 から選択される。

【0211】

より好ましくは、Q は、 $\text{NH}-\text{Phe}-\text{Lys}-\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{NH}-\text{Val}-\text{Cit}-\text{C}=\text{O}$
 又は $\text{NH}-\text{Val}-\text{Ala}-\text{C}=\text{O}$ から選択される。

20

【0212】

他の好適なジペプチドの組み合わせとしては、
 $\text{NH}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{C}=\text{O}$ 、
 $\text{NH}-\text{Gly}-\text{Val}-\text{C}=\text{O}$ 、
 $\text{NH}-\text{Pro}-\text{Pro}-\text{C}=\text{O}$ 及び
 $\text{NH}-\text{Val}-\text{Glu}-\text{C}=\text{O}$
 が挙げられる。

【0213】

他のジペプチドの組み合わせ、例えば Bioconjugate Chemistry
 , 2002, 13, 855-869 (この文献は参照により本明細書に組み込まれる) に
 記載されるものも使用し得る。

30

【0214】

いくつかの実施形態では、Q はトリペプチド残基である。トリペプチド中のアミノ酸は、
 天然アミノ酸と非天然アミノ酸の任意の組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、
 トリペプチドは天然アミノ酸を含む。リンカーが、カテプシンに不安定なリンカーである
 場合、トリペプチドは、カテプシン媒介開裂の作用部位である。その場合、トリペ
 プチドはカテプシンの認識部位である。特に興味深いトリペプチドリンカーは、

$\text{NH}-\text{Glu}-\text{Val}-\text{Ala}-\text{C}=\text{O}$
 $\text{NH}-\text{Glu}-\text{Val}-\text{Cit}-\text{C}=\text{O}$
 $\text{NH}-\alpha\text{Glu}-\text{Val}-\text{Ala}-\text{C}=\text{O}$
 $\text{NH}-\alpha\text{Glu}-\text{Val}-\text{Cit}-\text{C}=\text{O}$

40

である。

【0215】

いくつかの実施形態では、Q はテトラペプチド残基である。テトラペプチド中のアミノ
 酸は、天然アミノ酸と非天然アミノ酸の任意の組み合わせであり得る。いくつかの実施形
 態では、テトラペプチドは天然アミノ酸を含む。リンカーが、カテプシンに不安定なリン
 カーである場合、テトラペプチドは、カテプシン媒介開裂の作用部位である。その場合、
 テトラペプチドはカテプシンの認識部位である。特に興味深いテトラペプチドリンカーは、
 $\text{NH}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Gly}-\text{C}=\text{O}$; 及び

50

$\text{NH}-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Gly}-\text{Gly}^{\text{C}}=\text{O}$ である。

いくつかの実施形態では、テトラペプチドは、

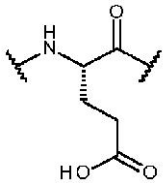
$\text{NH}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Gly}^{\text{C}}=\text{O}$ である。

【0216】

ペプチド残基の上記表現において、 $\text{NH}-$ は、残基のN末端を表し、 $-\text{C}=\text{O}$ は、残基のC末端を表す。C末端は「薬物単位」のNHに結合する（例えば、以下に論じるA*）。

Gluは、グルタミン酸残基、すなわち

【化21】

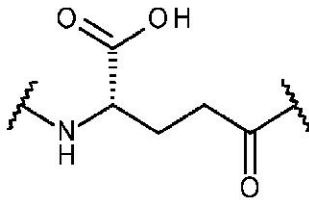


10

を表す。

αGlu は、 α 鎖を介して結合した場合のグルタミン酸残基、すなわち

【化22】



20

を表す。

【0217】

いくつかの実施形態では、適切な場合、アミノ酸側鎖は化学的に保護されている。側鎖保護基は、上述の通りの基であり得る。保護されたアミノ酸配列は、酵素によって開裂可能である。例えば、Boc側鎖保護Lys残基を含むジペプチド配列は、カテプシンによって開裂可能である。

30

【0218】

アミノ酸の側鎖のための保護基は、当該技術分野でよく知られており、Novabiochemカタログに記載されており、上記の通りである。

【0219】

リンカーIb

$\text{R}^{\text{L}1}$ 及び $\text{R}^{\text{L}2}$ は、独立してH及びメチルから独立して選択されるか、又はそれらが結合する炭素原子とともにシクロプロピレン基若しくはシクロブチレン基を形成し得る。

【0220】

いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{L}1}$ 及び $\text{R}^{\text{L}2}$ の両方がHである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{L}1}$ はHであり、 $\text{R}^{\text{L}2}$ はメチルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{L}1}$ 及び $\text{R}^{\text{L}2}$ の両方がメチルである。

40

【0221】

いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{L}1}$ 及び $\text{R}^{\text{L}2}$ は、これらが結合している炭素原子と一緒に、シクロプロピレン基を形成する。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{L}1}$ 及び $\text{R}^{\text{L}2}$ は、これらが結合している炭素原子と一緒に、シクロブチレン基を形成する。

【0222】

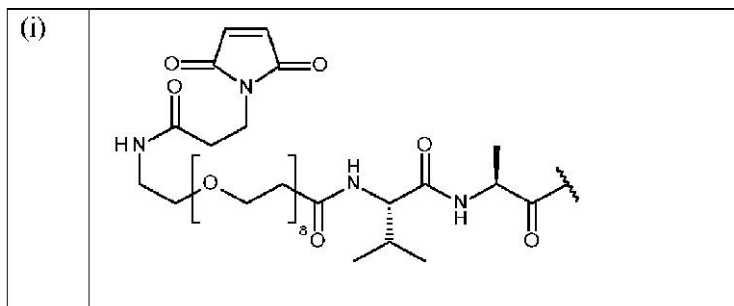
基Ibにおいて、いくつかの実施形態では、eは0である。他の実施形態では、eは1であり、ニトロ基は、環の任意の利用可能な位置にあり得る。これらの実施形態のいくつかにおいて、それはオルト位にある。これらの実施形態の他のものでは、それはパラ位にある。

50

【 0 2 2 3 】

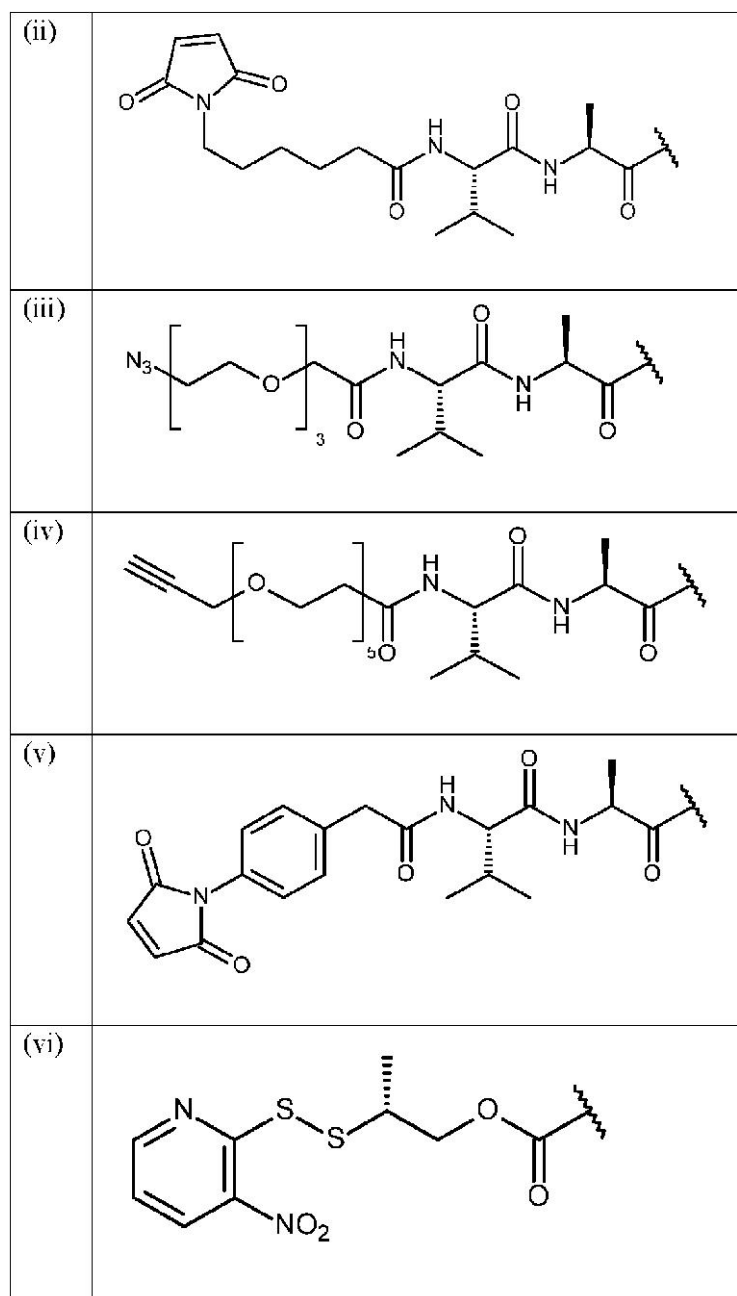
R^Lいくつかの実施形態では、R^Lは、以下から選択される。

【化 2 3】



10

【化 2 4】



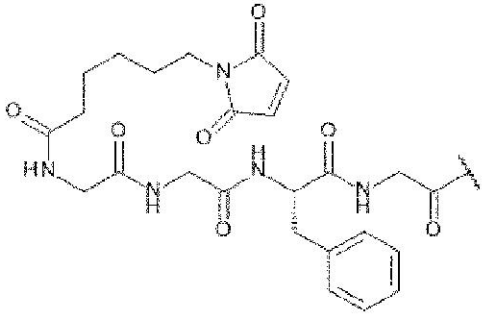
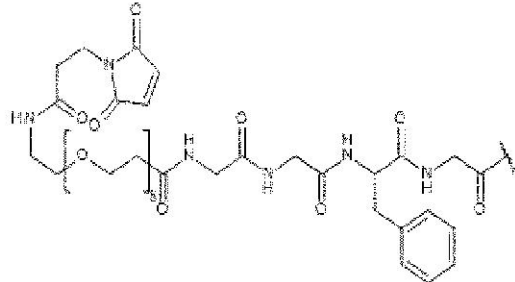
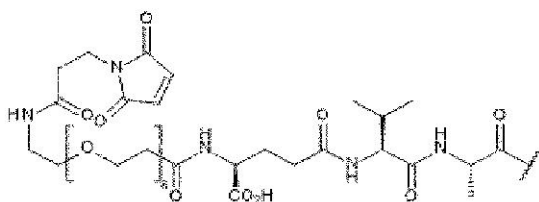
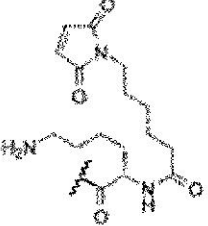
20

30

40

50

【化 2 5】

(vii)	
(viii)	
(ix)	
(x)	

10

20

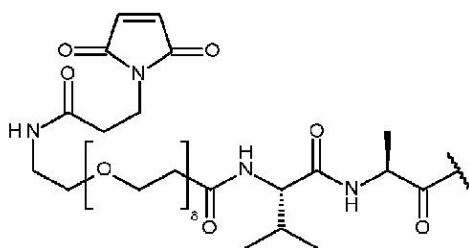
30

【0 2 2 4】

好ましくは、 R^L は、

40

【化 2 6】

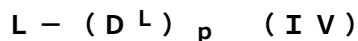


である。

【0 2 2 5】

50

例えば、本発明の複合体（例えば、抗体薬物複合体）は、一般式ⅠⅤ：

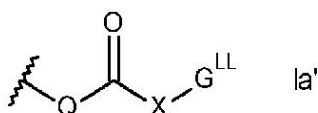


のもの、

又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物〔式中、Lは、本発明の抗体又はその抗原結合断片であり、 D^L は、本発明の抗体又はその抗原結合断片に連結されたリンカー R^{LL} を有する「薬物単位」（例えば、TOPOIなどの細胞毒）であり、このリンカーは、好ましくは、

【化27】

(Ia'):

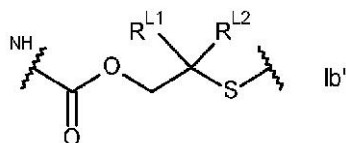


10

（式中、Q及びXは、上記で定義されたとおりであり、 G^{LL} は、本発明の抗体又はその抗原結合断片に連結されたリンカーである）、及び

【化28】

(Ib'):



20

（式中、 R^{L1} 及び R^{L2} は、上記で定義されたとおりである）から選択され、

pは、1～20の整数である〕

であり得る。

【0226】

薬物ロード量は、p、すなわち抗体又はその抗原結合断片1つあたりの「薬物単位」（例えば、TOPOIなどの細胞毒）の数で表される。薬物ロード量は、抗体又はその抗原結合断片1つあたり、薬物単位(D) 1～20の範囲であり得る。組成物の場合、pは、組成物中の複合体の平均薬物ロード量を表し、pは、1～20の範囲である。いくつかの実施形態では、pの範囲は、1～10、2～10、2～8、2～6及び4～10から選択され、好ましくは、pは8である。

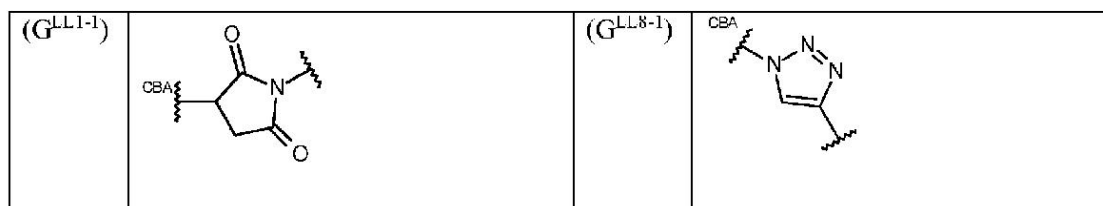
30

【0227】

G^{LL}

G^{LL} は、以下から選択され得る。

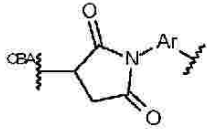
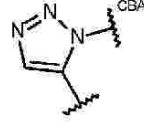
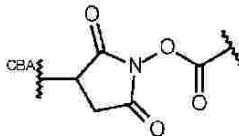
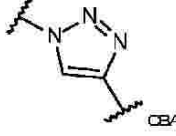
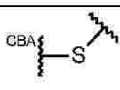
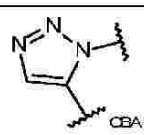
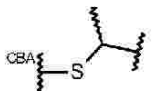
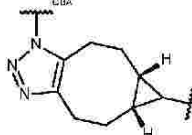
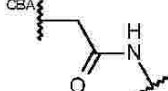
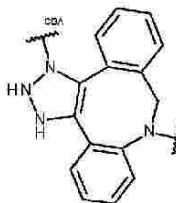
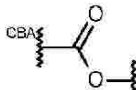
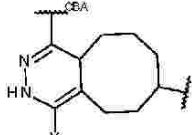
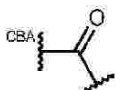
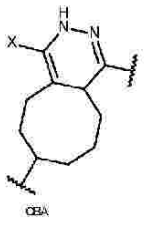
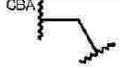
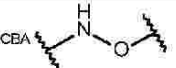
【化29】



40

50

【化 3 0】

(G ^{LL1-2})		(G ^{LL8-2})	
(G ^{LL3})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL3-1})		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL3-2})		(G ^{LL10})	
(G ^{LL4})		(G ^{LL11})	
(G ^{LL5})		(G ^{LL12})	
(G ^{LL6})		(G ^{LL13})	
(G ^{LL7})		(G ^{LL14})	

式中、Arは、C₅～6アリーレン基、例えばフェニレンを表し、Xは、C₁～4アルキルを表す。

【0228】

いくつかの実施形態では、G^{LL}は、G^{LL1-1}及びG^{LL1-2}から選択される。これらの実施形態のいくつかでは、G^{LL}は、G^{LL1-1}である。

【0229】

いくつかの実施形態では、R^{LL}は、上記のR^L基から誘導される基である。

【0230】

本明細書に開示される化学基、部分及び特徴のうちの任意の1つ以上を複数の方法で組

10

20

30

40

50

み合わせて、本明細書に開示される抗体及び細胞毒の複合化に有用なリンカーを形成し得ることは、当業者には認識されるであろう。

【0231】

本明細書中に記載の化合物が単一のエナンチオマーで又はエナンチオマー的に濃縮された形態で提供されるいくつかの実施形態では、エナンチオマー的に濃縮された形態は、60:40、70:30、80:20又は90:10を超えるエナンチオマー比を有する。さらなる実施形態では、エナンチオマー比は、95:5超、97:3超又は99:1超である。

【0232】

細胞毒

好ましい実施形態では、異種薬剤は細胞毒（細胞傷害性薬剤とも呼ばれる）である。細胞傷害性薬剤又は細胞毒は、細胞の機能を阻害し又は妨げる、及び／又は細胞の破壊（細胞死）を引き起こす、及び／又は抗新生物／抗増殖効果を及ぼす、当該技術分野で知られた任意の分子であり得る。いくつかのクラスの細胞傷害性薬剤が、ADC分子において潜在的な有用性を有することが知られている。本発明の好適な細胞傷害性薬剤としては、トポイソメラーゼI阻害剤（TOPOI）、アマニチン、アウリスタチン、ダウノマイシン、ドキソルビシン、デュオカルマイシン、ドラスタチン、エンジン、レキシトロプシン、タキサン、ピューロマイシン、メイタンシノイド、ピンカアルカロイド、ツブリシン、及びピロロベンゾジアゼピン（PBD）が挙げられるがこれらに限定されない。このような細胞傷害性薬剤の例は、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB、アウリスタチンE、パクリタキセル、ドセタキセル、CC-1065、SN-38、トポテカン、モルホリノードキソルビシン、リゾキシン、シアノモルホリノードキソルビシン、ドラスタチン-10、エキノマイシン、コンブレタトスタチン（combrexostatatin）、カリケアミシン、メイタンシン、DM-1、ピンブラスチン、メトトレキサート及びネトロプシン、並びにこれらの誘導体及び類似体である。ADCにおける使用に好適な細胞毒に関するさらなる開示は、例えば、国際公開第2015/155345号パンフレット及び国際公開第2015/157592号パンフレット（これらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に見出し得る。

【0233】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、トポイソメラーゼI阻害剤、ツブリシン誘導体、ピロロベンゾジアゼピン又はこれらの組み合わせから選択される1つ以上の細胞毒に複合化される。例えば、抗体又はその抗原結合断片は、トポイソメラーゼI阻害剤SG3932（AZ14170133としても知られる）、SG4010、SG4057若しくはSG4052（この構造を下記に示す）、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される1つ以上の細胞毒に複合化される。抗体又はその抗原結合断片は、トポイソメラーゼI阻害剤に複合化され得ることが好ましく、トポイソメラーゼI阻害剤SG3932がより好ましい。

【0234】

特定の実施形態では、本発明の抗体又はその抗原結合断片は、チューブリン阻害剤（例えば、メイタンシノイド、アウリスタチン）などの微小管阻害剤と複合化されていない、又は本発明の抗FR α ADCは、微小管阻害剤を含まない。微小管阻害剤クラスの分子は、投与量を制限する、潜在的に治療が困難な毒性を伴う。

【0235】

トポイソメラーゼI阻害剤

本発明は、トポイソメラーゼI阻害剤（TOPOI）ペイロードを使用する最初の抗FR α ADCを実証する。さらに、インビボ及びインビトロモデルを使用して、本発明者らは、TOPOIペイロードに複合化し、ADCとして展開した場合の抗FR α mAbの安定性及び有効性を実証した。

【0236】

したがって、一態様では、TOPOIペイロードにコンジュゲートされた抗FR α 抗体

又はその抗原結合断片（例えば、本発明の抗体又はその抗原結合断片）を含むADCが提供される。好ましい実施形態では、本発明の抗体又はその抗原結合断片はトポイソメラーゼⅠ阻害剤にコンジュゲートされる、又は本発明の抗FR α ADCはトポイソメラーゼⅠ阻害剤を含む。

【0237】

トポイソメラーゼ阻害剤は、正常な細胞周期中のDNA鎖のリン酸ジエステル骨格の切断及び再結合を触媒することによって、DNA構造の変化を制御する酵素の一種であるトポイソメラーゼ（トポイソメラーゼⅠ及びⅡ）の作用を遮断する化学的化合物である。トポイソメラーゼⅠ阻害剤は、腫瘍細胞死滅を非常に効果的に媒介するとともに、患者に対する毒性が非常に少ないので有利である。特に、抗FR α ADCを開発するために現在まで一般的に使用されている微小管阻害剤などの代替ペイロードは、毒性問題を有することが知られている（Hinrichs, et al., AAPS J. 2015 Sep; 17(5): 1055-1064）。さらに、より効力の低い弾頭（例えば、TOPOⅠ）を有するより疎水性の低いリンカーの使用は、異種腫瘍におけるバイスタンダー殺滅を促進するであろう。バイスタンダー活性は、効力の増大、及び／又は疎水性を高めることによる弾頭の透過性の改善によって達成され得るが、これは非特異的取り込みによる毒性の増加をもたらし得る。

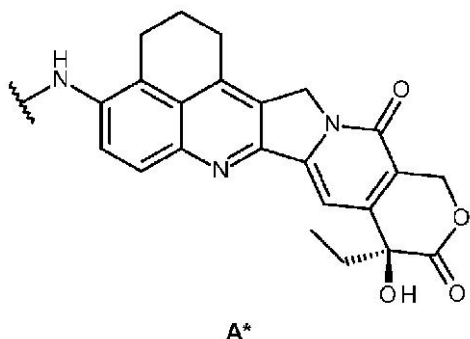
10

【0238】

好適なトポイソメラーゼⅠ阻害剤の一般的な例は、次の化合物により表される。

【化31】

20



30

前記化合物は、A*として示され、本明細書においては、「薬物単位」と呼ばれ得る。

【0239】

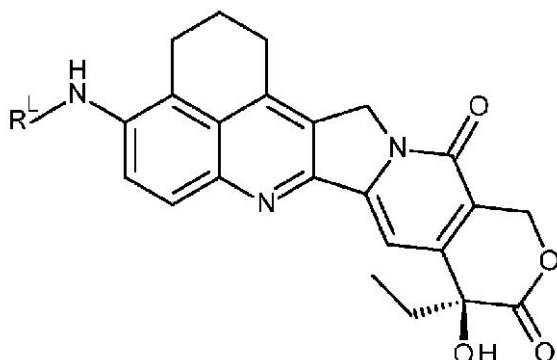
本化合物（例えば、A*）は、好ましくは、本発明の抗体又は抗原結合断片に連結する（好ましくは、複合化する）ためのリンカーとともに提供される。好ましい実施形態では、リンカーは、アミノ残基、例えば本発明の抗体又は抗原結合断片のアミノ酸に、開裂可能に連結される（例えば、複合化される）。

【0240】

より特には、好適なトポイソメラーゼⅠ阻害剤の例は、次の式「Ⅰ」を有する化合物

【化32】

40



50

並びにその塩及び溶媒和物によって表される（式中、 R^L は上記に定義されている）。

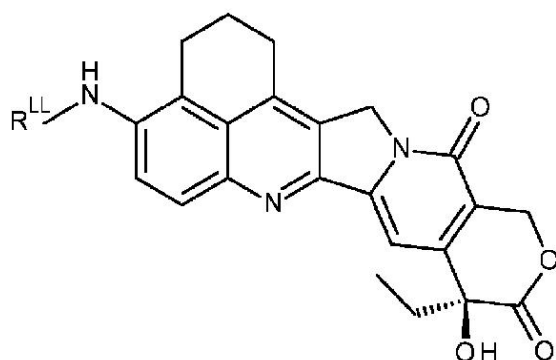
【0241】

したがって、一般式ⅠⅤ：

$L - (D^L)_p$ (ⅠⅤ)

を有する本発明の複合体（例えば、抗体－薬物複合体）又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物（式中、 L 及び p は上記に定義されている）では、 D^L は、式ⅠⅠⅠ：

【化33】



Ⅲ

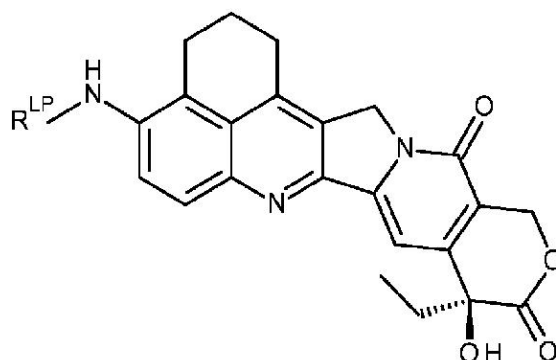
10

で表されるリンカーを有するトポイソメラーゼⅠ阻害剤並びにその塩及び溶媒和物である（式中、 R^{LL} は上記で定義されている）。

【0242】

いくつかの実施形態では、式Ⅰの化合物は、式Ⅰ^P：

【化34】



Ⅰ^P

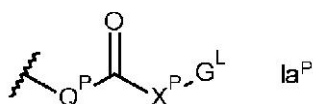
20

30

の化合物並びにその塩及び溶媒和物であり、式中、 R^{LP} は、本発明の抗体又はその抗原結合断片に連結するためのリンカーであり、前記リンカーは、以下から選択される：

【化35】

(Ia^P):



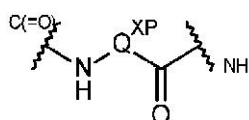
Ia^P

40

【式中、

Q^P は、

【化36】

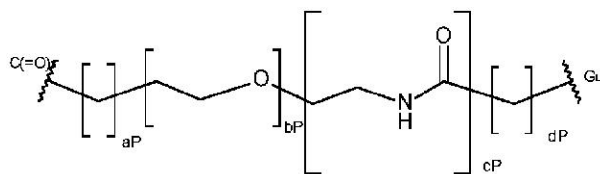


（式中、 Q^{XP} は、 Q^P がアミノ酸残基、ジペプチド残基又はトリペプチド残基であるようなものである）

であり；

50

X^P は、
【化 3 7】

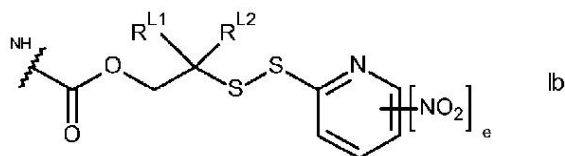


(式中、aP = 0 ~ 5、bP = 0 ~ 16、cP = 0 又は 1、dP = 0 ~ 5 である)
であり；
G^L は上記で定義されている]；

10

【化 3 8】

(Ib):



[式中、R^{L1} 及び R^{L2} は、独立して H 及びメチルから選択されるか、又はそれらが結合する炭素原子とともにシクロプロピレン基若しくはシクロブチレン基を形成し；
e は、0 又は 1 である]。

20

【0 2 4 3】

aP は、0、1、2、3、4 又は 5 であり得る。いくつかの実施形態では、aP は、0 ~ 3 である。これらの実施形態のいくつかでは、aP は、0 又は 1 である。さらなる実施形態では、aP は 0 である。

【0 2 4 4】

bP は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 又は 16 であり得る。いくつかの実施形態では、b は、0 ~ 12 である。これらの実施形態のいくつかでは、bP は、0 ~ 8 であり、0、2、4 又は 8 であり得る。

30

【0 2 4 5】

cP は、0 又は 1 であり得る。

【0 2 4 6】

dP は、0、1、2、3、4 又は 5 であり得る。いくつかの実施形態では、dP は、0 ~ 3 である。これらの実施形態のいくつかでは、dP は、1 又は 2 である。さらなる実施形態では、dP は 2 である。

【0 2 4 7】

X^P のいくつかの実施形態では、aP は 0 であり、cP は 1 であり、dP は 2 であり、bP は 0 ~ 8 であり得る。これらの実施形態のいくつかでは、bP は、0、4 又は 8 である。

40

【0 2 4 8】

式 I の化合物について上記 Q^X に対して好ましいものは、(例えば、適切な場合) Q^X P に適用され得る。

【0 2 4 9】

式 I の化合物について上記 G^L、R^{L1}、R^{L2} 及び e に対して好ましいものは、式 I^P の化合物に適用され得る。

【0 2 5 0】

いくつかの実施形態では、式 IV の複合体は、式 IV^P：

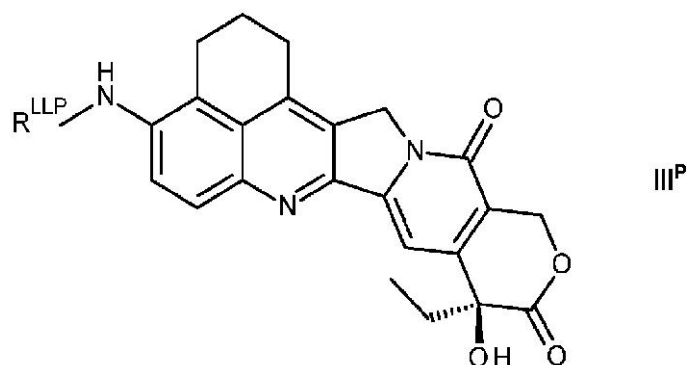
L - (D^LP)_p (IV^P)

の複合体又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物であり、式中、L は、本発明の

50

抗体又はその抗原結合断片であり、 D^{LP} は、式 III^P :

【化 3 9】

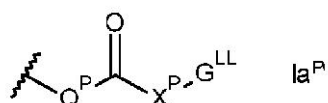


10

のトポイソメラーゼ I 阻害剤（例えば、薬物リンカー単位）であり、 R^{LLP} は、抗体又はその抗原結合断片に連結されるリンカーであり、前記リンカーは、

【化 4 0】

($Ia^{P'}$):

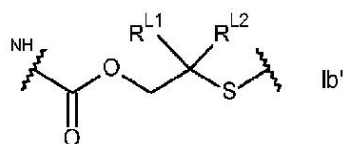


20

（式中、 Q^P 、 X^P 及び G^{LL} は上記で定義されたとおりである）及び

【化 4 1】

(Ib'):



（式中、 R^{L1} 及び R^{L2} は、上記で定義されたとおりである）

30

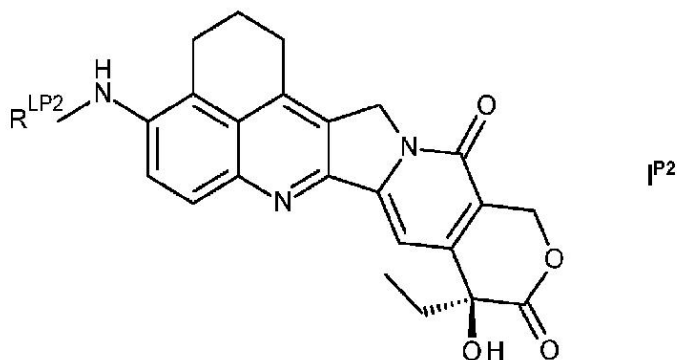
から選択され、

p は、1～20の整数である。

【0 2 5 1】

いくつかの実施形態では、式 I の化合物は、式 I^{P2} :

【化 4 2】

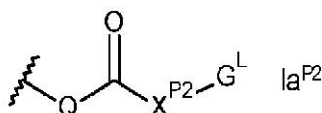


40

の化合物並びにその塩及び溶媒和物であり、式中、 R^{LP2} は、本発明の抗体又はその抗原結合断片に連結するためのリンカーであり、前記リンカーは、

50

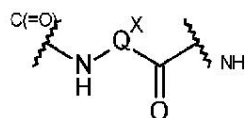
【化 4 3】

(Ia^{P2}):

〔式中、

Q は、

【化 4 4】



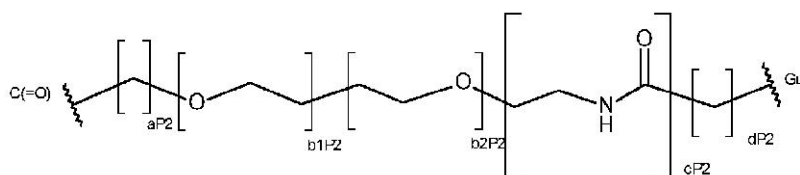
10

〔式中、Q^Xは、Qがアミノ酸残基、ジペプチド残基、トリペプチド残基又はテトラペプチド残基であるようなものである〕

であり、

X^{P2}は、

【化 4 5】



20

〔式中、a^{P2}=0~5、b^{1P2}=0~16、b^{2P2}=0~16、c^{P2}=0又は1、d^{P2}=0~5であり、少なくともb^{1P2}又はb^{2P2}=0である（すなわち、b¹及びb²の一方のみが0でない場合がある）〕

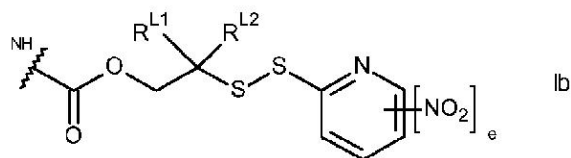
であり、

G^Lは、本発明の抗体又はその抗原結合断片に連結するためのリンカーである〕；

30

【化 4 6】

(Ib):



〔式中、R^{L1}及びR^{L2}は、独立してH及びメチルから選択されるか、又はそれらが結合する炭素原子とともにシクロプロピレン基若しくはシクロブチレン基を形成し；eは0又は1である〕

40

から選択される。

【0252】

a^{P2}は、0、1、2、3、4又は5であり得る。いくつかの実施形態では、a^{P2}は、0~3である。これらの実施形態のいくつかでは、a^{P2}は、0又は1である。さらなる実施形態では、a^{P2}は0である。

【0253】

b^{1P2}は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16であり得る。いくつかの実施形態では、b^{1P2}は、0~12である。これらの実施形態のいくつかでは、b^{1P2}は、0~8であり、0、2、3、4、5又は

50

8であり得る。

【0254】

b 2 P 2 は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16であり得る。いくつかの実施形態では、b 2 P 2 は、0～12である。これらの実施形態のいくつかでは、b 2 P 2 は、0～8であり、0、2、3、4、5又は8であり得る。

【0255】

好ましくは、b 1 P 2 及び b 2 P 2 の一方だけが0でない場合がある。

【0256】

c P 2 は、0又は1であり得る。

10

【0257】

d P 2 は、0、1、2、3、4又は5であり得る。いくつかの実施形態では、d P 2 は、0～3である。これらの実施形態のいくつかでは、d P 2 は、1又は2である。さらなる実施形態では、d P 2 は2である。さらなる実施形態では、d P 2 は5である。

【0258】

X^{P2}のいくつかの実施形態では、a P 2 は0であり、b 1 P 2 は0であり、c P 2 は1であり、d P 2 は2であり、b 2 P 2 は0～8であり得る。これらの実施形態のいくつかでは、b 2 P 2 は、0、2、3、4、5又は8である。X^{P2}のいくつかの実施形態では、a P 2 は1であり、b 2 P 2 は0であり、c P 2 は0であり、d P 2 は0であり、b 1 P 2 は0～8であり得る。これらの実施形態のいくつかでは、b 1 P 2 は、0、2、3、4、5又は8である。X^{P2}のいくつかの実施形態では、a P 2 は0であり、b 1 P 2 は0であり、c P 2 は0であり、d P 2 は1であり、b 2 P 2 は0～8であり得る。これらの実施形態のいくつかでは、b 2 P 2 は、0、2、3、4、5又は8である。X^{P2}のいくつかの実施形態では、b 1 P 2 は0であり、b 2 P 2 は0であり、c P 2 は0であり、a P 2 及び d P 2 の一方は0である。a P 2 及び d の他方は1～5である。これらの実施形態のいくつかでは、a P 2 及び d の他方は1である。これらの実施形態の他のものでは、a P 2 及び d P 2 の他方は5である。

20

【0259】

式Iの化合物について上記Q^Xに対して好ましいものは、(例えば、適切な場合)、式I a^{P2}のQ^Xに適用され得る。

30

【0260】

式Iの化合物について上記G^L、R^{L1}、R^{L2}及びeに対して好ましいものは、式I^{P2}の化合物に適用され得る。

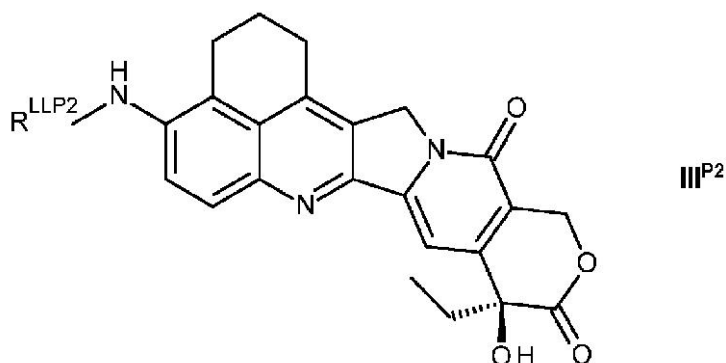
【0261】

いくつかの実施形態では、式IVの複合体は、式IV^{P2}：

L - (D^{L P2})_p (IV^{P2})

の複合体又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物であり、式中、Lは、本発明の抗体又はその抗原結合断片であり、D^{L P2}は、式II I^{P2}：

【化47】



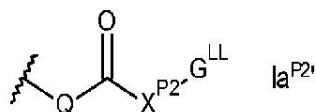
40

50

のトポイソメラーゼⅠ阻害剤（例えば、薬物リンカー単位）であり、
 R^{L1} 、 R^{L2} は、抗体又はその抗原結合断片に連結されるリンカーであり、前記リンカーは、

【化 4 8】

(Ia^{P2}):

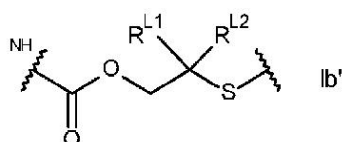


10

（式中、Q 及び X^{P2} は、上記で定義されたとおりであり、 G^{LL} は、本発明の抗体又はその抗原結合断片に連結されたリンカーである）、及び

【化 4 9】

(Ib[']):



20

（式中、 R^{L1} 及び R^{L2} は、上記で定義されたとおりである）
 から選択され、
 p は、1～20の整数である。

【0262】

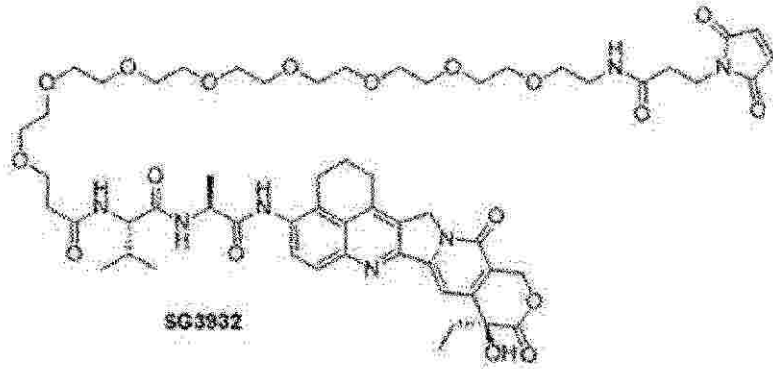
特に好適なトポイソメラーゼⅠ阻害剤としては、次の式を有するものが挙げられる。

30

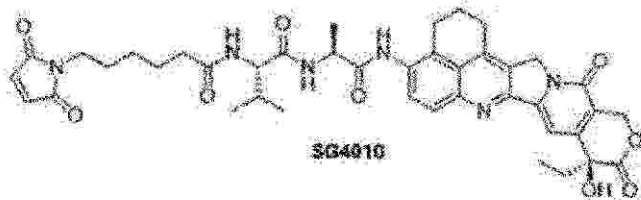
40

50

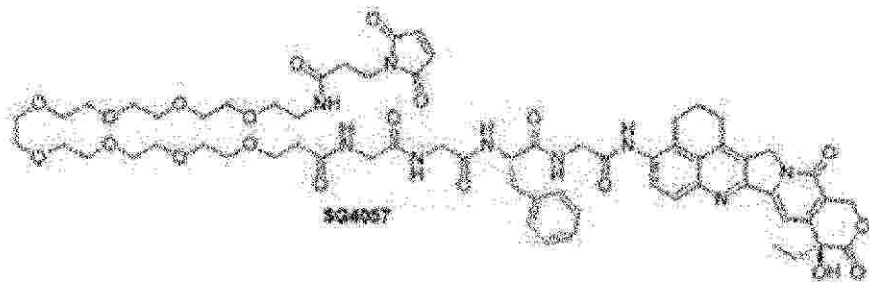
【化 5 0】



10

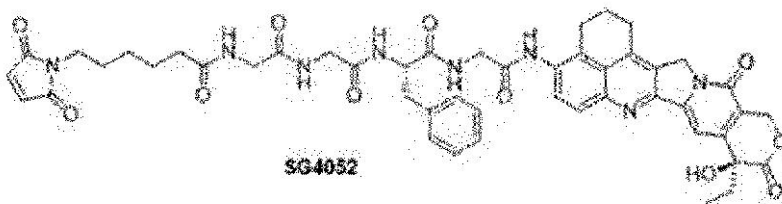


20

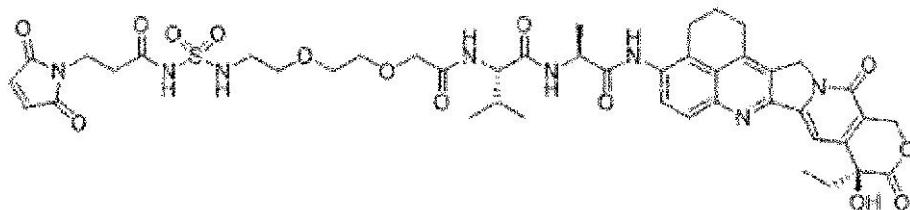


【化 5 1】

30



; 及び/又は



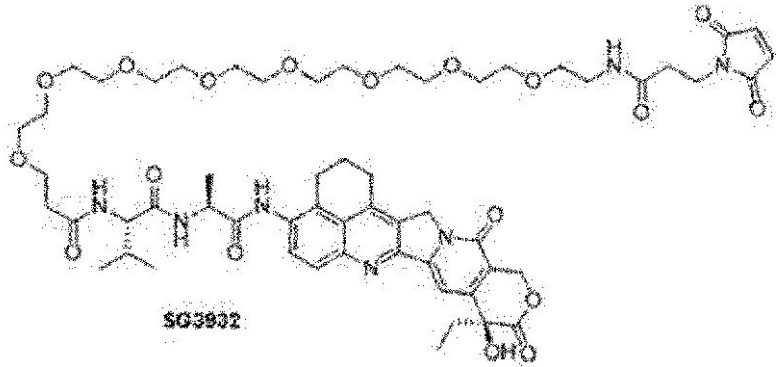
40

【 0 2 6 3】

SG3932 が特に好ましい。したがって、好ましい実施形態では、本発明の抗体又はその抗原結合断片は、次の式を有するトポイソメラーゼⅠ阻害剤（例えば、SG3932）と複合化される。

50

【化 5 2】



10

【0 2 6 4】

トポイソメラーゼⅠ阻害剤を作製する合成方法は、例えば、国際公開第2020/200880号パンフレット（この文献は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0 2 6 5】

上記で概説されているように、トポイソメラーゼⅠ阻害剤が好ましいものの、任意の好適な薬剤（例えば、薬物／細胞毒）が本発明の抗体又はその抗原結合断片に連結され得ることに留意すべきである。他の好適な薬剤の例は以下に概説する。

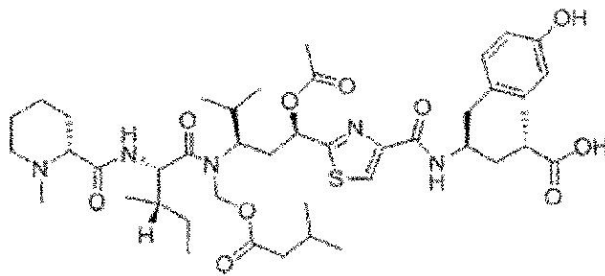
20

【0 2 6 6】

ツブリシン及びピロロベンゾジアゼピン

いくつかの実施形態では、細胞毒はツブリシン又はツブリシン誘導体である。いくつかの実施形態では、細胞毒は、次の化学構造を有するツブリシンAである。

【化 5 3】



30

【0 2 6 7】

ツブリシンは、粘液細菌種から単離される天然生成物のクラスのメンバーである。細胞骨格相互作用剤として、ツブリシンは、チューブリン重合を阻害し、細胞周期停止及びアポトーシスに導く有糸分裂毒である。本明細書で使用される場合、用語「ツブリシン」は、集会的にも個別的にも、天然に存在するツブリシン並びにツブリシンの類似体及び誘導体を指す。ツブリシンの具体的な例は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2004/005326A2号パンフレット、国際公開第2012/019123A1号パンフレット、国際公開第2009/134279A1号パンフレット、国際公開第2009/055562A1号パンフレット、国際公開第2004/005327A1号パンフレット、米国特許第7776841号明細書、米国特許第7754885号明細書、米国特許出願公開第2010/0240701号明細書、米国特許第7816377号明細書、米国特許出願公開第2011/0021568号明細書及び米国特許出願公開第2011/0263650号明細書に開示されている。かかる誘導体には、例えば、ツブリシンプロドラッグ又は1つ以上の保護基（protection group）若しくは保護基（protecting group）、1つ以上の連結部分を含むツブリシンが含まれることは理解されるべきである。

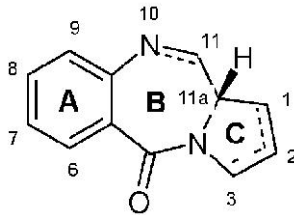
40

【0 2 6 8】

50

別の実施形態では、細胞毒はピロロベンゾジアゼピン（PBD）又はPBD誘導体であり得る。PBDは、それがDNAを架橋する核に移動し、有糸分裂中の複製を阻止し、一本鎖切断を誘導することによりDNAを損傷させ、その後、アポトーシスへとつながる。いくつかのPBDは、DNAの特異的な配列を認識し、それに結合する能力を有しており、好ましい配列はPuG Puである。PBDは以下の一般構造である。

【化54】



10

【0269】

PBDは、その芳香族A環及びピロロC環の両方で、置換基の数、種類及び位置が異なり、またC環の飽和度が異なる。B環には、N10～C11位にイミン（N=C）、カルビノールアミン（NH-CH(OH)）又はカルビノールアミンメチルエーテル（NH-CH(OMe)）があり、これがDNAのアルキル化に関与する求電子中心である。知られた天然産物の全てが、キラルなC11a位に（S）配置を有しており、これによりC環からA環に向かって見た場合に右回りのねじれが天然産物に付与される。これにより、B型DNAの副溝に対してイソらせん性（*isohelicity*）となるための適切な三次元形状がもたらされ、結合部位でぴったりと適合するようになる。副溝において付加物を形成するその能力により、DNAプロセシングの妨害、したがって抗腫瘍薬剤としてのそれらの使用が可能となる。

20

【0270】

最初のPBD抗腫瘍抗生物質であるアントラマイシンは、1965年に発見された。それ以降、多数の天然に存在するPBDが報告されており、種々の類似体に至る10を超える合成経路が開発されている。ファミリーメンバーには、アベイマイシン、チカマイシン、DC-81、マゼトラマイシン、ネオトラマイシンA及びB、ポロトラマイシン、プロトラカルシン、シバノマイシン（DC-102）、シビロマイシン並びにトママイシンが含まれる。PBD及びそれを含むADCはまた、国際公開第2015/155345号パンフレット及び国際公開第2015/157592号パンフレット（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）にも記載されている。

30

【0271】

具体的なADCの実施形態

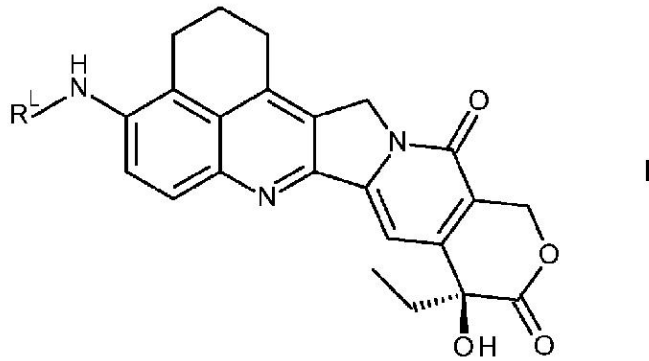
一態様では、本発明は、細胞毒に複合化された抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、又は細胞毒に複合化された抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片を含むADCを提供する。

【0272】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片が、トポイソメラーゼI阻害剤に複合化されるか、又は本発明の抗FR α ADCが、式「I」を有する以下の化合物によって表されるトポイソメラーゼI阻害剤に複合化された本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片を含み：

40

【化 5 5】



10

(式中、 R^L は上記で定義されている)；

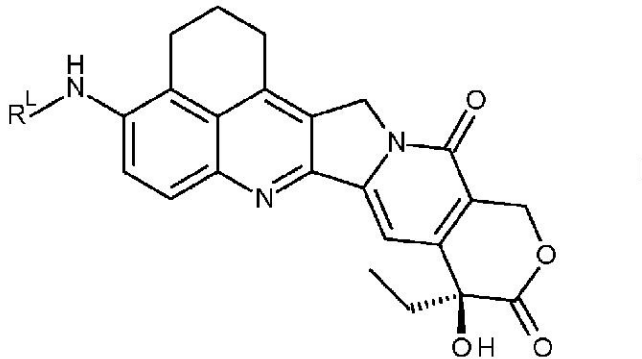
そのDARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約8である。

【0273】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片が、トポイソメラーゼI阻害剤に複合化されるか、又は本発明の抗FR α ADCが、式「I」を有する以下の化合物によって表されるトポイソメラーゼI阻害剤に複合化された本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片を含み：

20

【化 5 6】



30

(式中、 R^L は上記で定義されている)；

そのDARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約4である。

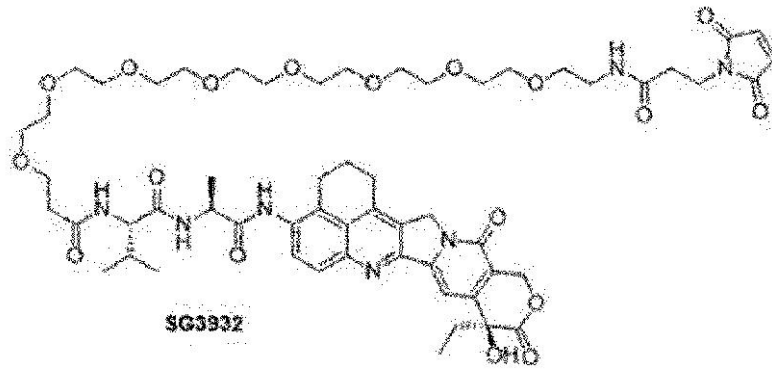
【0274】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片が、トポイソメラーゼI阻害剤SG3932に複合化されるか、又は本発明の抗FR α ADCが、トポイソメラーゼI阻害剤SG3932に複合化された本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片を含み

40

50

【化 5 7】



10

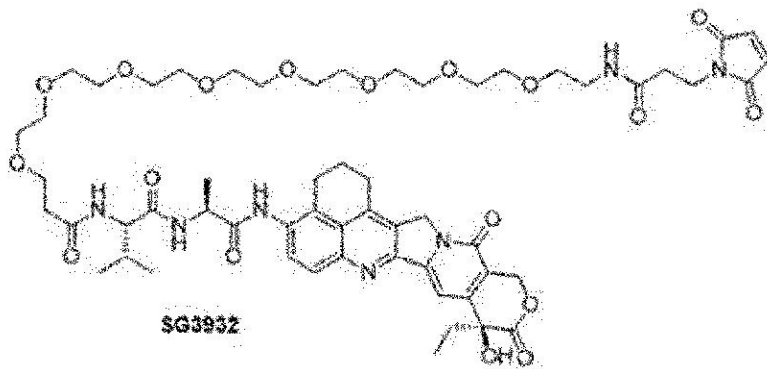
、DARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約8である。

【0275】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片が、トポイソメラーゼI阻害剤SG3932に複合化されるか、又は本発明の抗FR α ADCが、トポイソメラーゼI阻害剤SG3932に複合化された本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片を含み

【化 5 8】

20



30

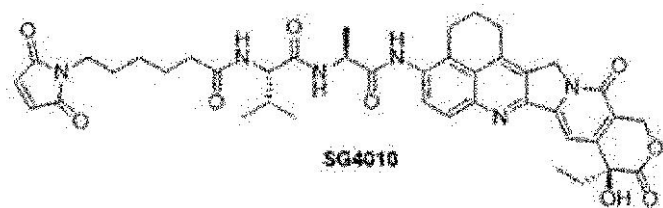
、DARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約4である。

【0276】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片が、トポイソメラーゼI阻害剤SG4010に複合化されるか、又は本発明の抗FR α ADCが、トポイソメラーゼI阻害剤SG4010に複合化された本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片を含み

【化 5 9】

40



、DARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約8である。

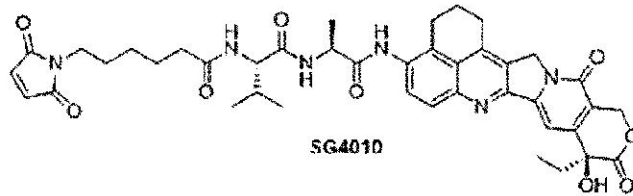
【0277】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片が、トポイ

50

ソメラゼⅠ阻害剤SG4010に複合化されるか、又は本発明の抗FR α ADCが、トポイソメラーゼⅠ阻害剤SG4010に複合化された本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片を含み

【化60】



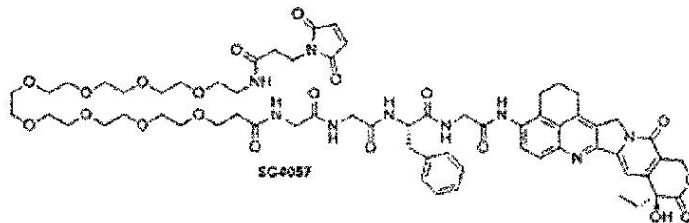
10

、DARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約4である。

【0278】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片が、トポイソメラーゼⅠ阻害剤SG4057に複合化されるか、又は本発明の抗FR α ADCが、トポイソメラーゼⅠ阻害剤SG4057に複合化された本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片を含み

【化61】



20

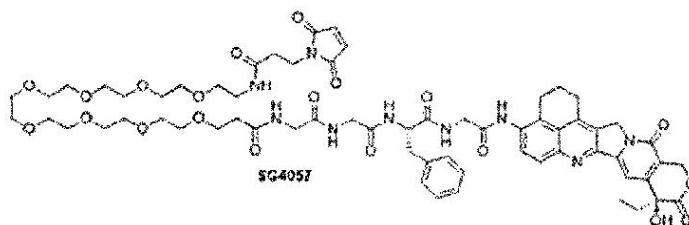
、DARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約8である。

【0279】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片が、トポイソメラーゼⅠ阻害剤SG4057に複合化されるか、又は本発明の抗FR α ADCが、トポイソメラーゼⅠ阻害剤SG4057に複合化された本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片を含み

30

【化62】



40

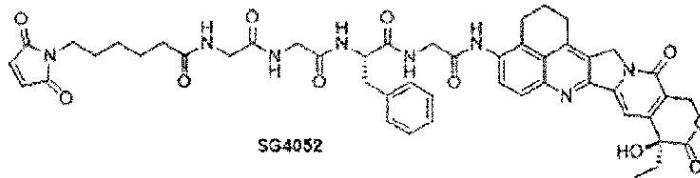
、DARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約4である。

【0280】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片が、トポイソメラーゼⅠ阻害剤SG4052に複合化されるか、又は本発明の抗FR α ADCが、トポイソメラーゼⅠ阻害剤SG4052に複合化された本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片を含み

50

【化 6 3】

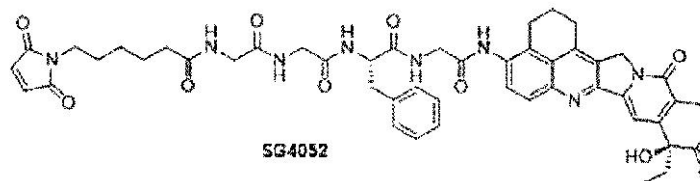


、DARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約8である。

【0281】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片が、トポイソメラーゼI阻害剤SG4052に複合化されるか、又は本発明の抗FR α ADCが、トポイソメラーゼI阻害剤SG4052に複合化された本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片を含み

【化 6 4】



、DARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約4である。

【0282】

いくつかの実施形態では、

(i) 抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号1の重鎖CDR1 (SDSATWN)；配列番号2の重鎖CDR2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS)；配列番号3の重鎖CDR3 (GVGSFDY)；配列番号4の軽鎖CDR1 (RASQSISSWLA)；配列番号5の軽鎖CDR2 (KASGLESL)；及び配列番号6の軽鎖CDR3 (QQYNSYSQLT)を含み、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号38のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVLを有し、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号49のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号50のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である軽鎖アミノ酸配列を含み；

(ii) 細胞毒は、式「I」を有する以下の化合物によって表されるトポイソメラーゼI阻害剤であり

10

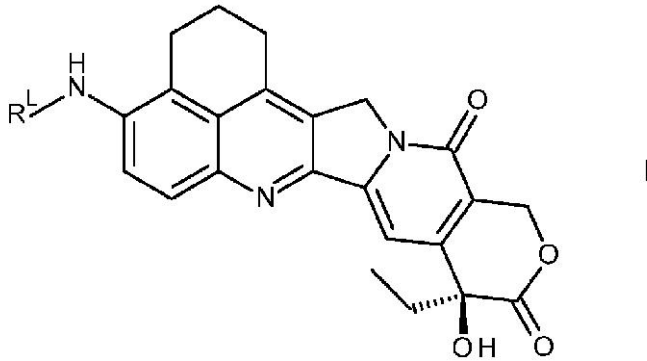
20

30

40

50

【化 6 5】



10

、（式中、 R^L は上記で定義されている）；且つ

（iii）DARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約8である。

【0283】

いくつかの実施形態では、

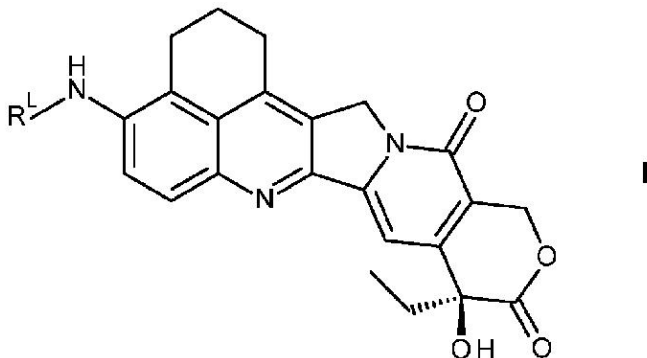
（i）抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号1の重鎖CDR1（SDSATWN）；配列番号2の重鎖CDR2（RTYYRSKWYNDYAVSVKS）；配列番号3の重鎖CDR3（GVGSFDY）；配列番号4の軽鎖CDR1（RASQSISSWLA）；配列番号5の軽鎖CDR2（KASGLESL）；及び配列番号6の軽鎖CDR3（QQYNSYSQLT）を含み、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号38のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVLを有し、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号49のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号50のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である軽鎖アミノ酸配列を含み；

20

30

（ii）細胞毒は、式「I」を有する以下の化合物によって表されるトポイソメラーゼI阻害剤であり

【化 6 6】



40

、（式中、 R^L は上記で定義されている）；且つ

（iii）DARは約1～20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1～10、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約4である。

【0284】

50

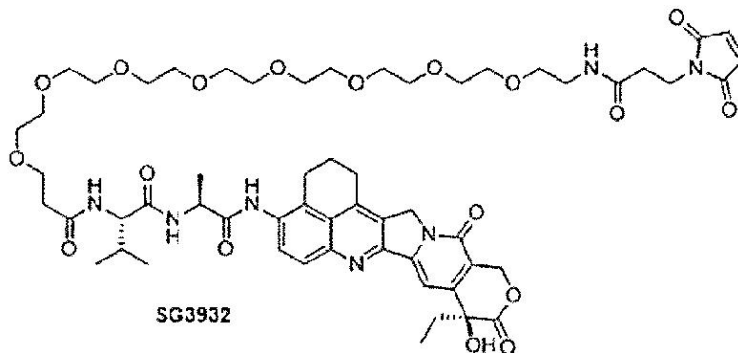
いくつかの実施形態では、

(i) 抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号1の重鎖CDR1 (SDSATWN) ; 配列番号2の重鎖CDR2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS) ; 配列番号3の重鎖CDR3 (GVGSFDY) ; 配列番号4の軽鎖CDR1 (RASQSISSWLA) ; 配列番号5の軽鎖CDR2 (KASGLEES) ; 及び配列番号6の軽鎖CDR3 (QQYNSYSQLT) を含み、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号38のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVLを有し、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号49のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号50のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である軽鎖アミノ酸配列を含み；

10

(ii) 細胞毒は、トポイソメラーゼI阻害剤SG3932

【化67】



20

であり、且つ

30

(iii) DARは約1~20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1~10、約2~10、約2~8、約2~6及び約4~10から選択され、好ましくは約8である。

【0285】

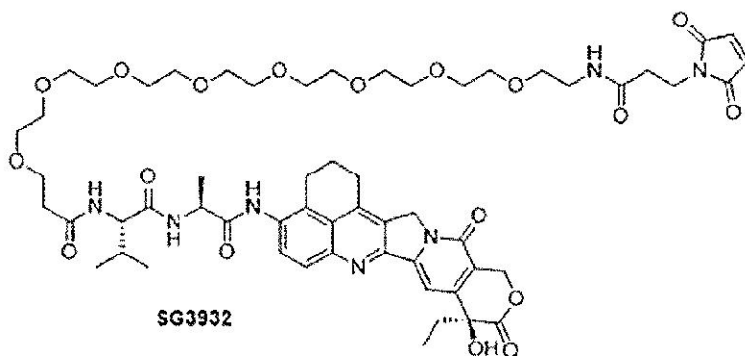
いくつかの実施形態では、

(i) 抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号1の重鎖CDR1 (SDSATWN) ; 配列番号2の重鎖CDR2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS) ; 配列番号3の重鎖CDR3 (GVGSFDY) ; 配列番号4の軽鎖CDR1 (RASQSISSWLA) ; 配列番号5の軽鎖CDR2 (KASGLEES) ; 及び配列番号6の軽鎖CDR3 (QQYNSYSQLT) を含み、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号38のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVLを有し、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号49のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号50のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である軽鎖アミノ酸配列を含み；

40

50

(i i) 細胞毒は、トポイソメラーゼ I 阻害剤 S G 3 9 3 2
【化 6 8】



10

であり、且つ

(i i i) D A R は約 1 ～ 2 0 の範囲であり、任意選択的に D A R の範囲は、約 1 ～ 1 0、約 2 ～ 1 0、約 2 ～ 8、約 2 ～ 6 及び約 4 ～ 1 0 から選択され、好ましくは約 4 である。

【 0 2 8 6 】

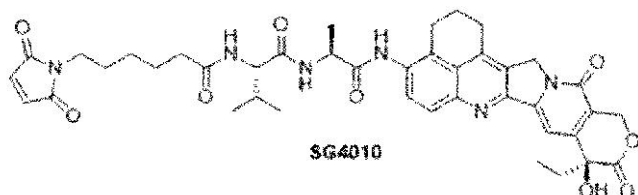
いくつかの実施形態では；

(i) 抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 1 の重鎖 C D R 1 (S D S A T W N) ；配列番号 2 の重鎖 C D R 2 (R T Y Y R S K W Y N D Y A V S V K S) ；配列番号 3 の重鎖 C D R 3 (G V G S F D Y) ；配列番号 4 の軽鎖 C D R 1 (R A S Q S I S S W L A) ；配列番号 5 の軽鎖 C D R 2 (K A S G L E S) ；及び配列番号 6 の軽鎖 C D R 3 (Q Q Y N S Y S Q L T) を含み、任意選択により、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 7 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 7 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 3 8 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 7 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V L を有し、任意選択により、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 4 9 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 7 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一、又は同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 5 0 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 7 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一、又は同一である軽鎖アミノ酸配列を含み；

20

30

(i i) 細胞毒は、トポイソメラーゼ I 阻害剤 S G 4 0 1 0
【化 6 9】



40

であり、且つ

(i i i) D A R は約 1 ～ 2 0 の範囲であり、任意選択的に D A R の範囲は、約 1 ～ 1 0、約 2 ～ 1 0、約 2 ～ 8、約 2 ～ 6 及び約 4 ～ 1 0 から選択され、好ましくは約 8 である。

【 0 2 8 7 】

いくつかの実施形態では、

(i) 抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 1 の重鎖 C D R 1 (S D S A T W N) ；配列番号 2 の重鎖 C D R 2 (R T Y Y R S K W Y N D Y A V S V K S) ；配列番号

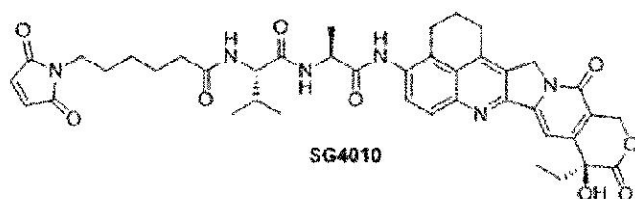
50

号3の重鎖CDR3 (GVGSFDY) ; 配列番号4の軽鎖CDR1 (RASQSISSWLA) ; 配列番号5の軽鎖CDR2 (KASGLES) ; 及び配列番号6の軽鎖CDR3 (QQYNSYSQLT) を含み、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号38のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVLを有し、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号49のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号50のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である軽鎖アミノ酸配列を含み；

10

(ii) 細胞毒は、トポイソメラーゼI阻害剤SG4010

【化70】



20

であり、且つ

(iii) DARは約1~20の範囲であり、任意選択的にDARの範囲は、約1~10、約2~10、約2~8、約2~6及び約4~10から選択され、好ましくは約4である。

【0288】

いくつかの実施形態では；

(i) 抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号1の重鎖CDR1 (SDSATWN) ; 配列番号2の重鎖CDR2 (RTYYRSKWYNDYAVSVKS) ; 配列番号3の重鎖CDR3 (GVGSFDY) ; 配列番号4の軽鎖CDR1 (RASQSISSWLA) ; 配列番号5の軽鎖CDR2 (KASGLES) ; 及び配列番号6の軽鎖CDR3 (QQYNSYSQLT) を含み、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号37のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号38のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一であるアミノ酸配列を含むVLを有し、任意選択により、抗FR α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号49のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号50のアミノ酸配列と少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも99%同一、又は同一である軽鎖アミノ酸配列を含み；

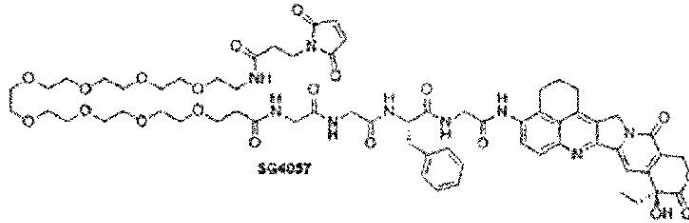
30

40

(ii) 細胞毒は、トポイソメラーゼI阻害剤SG4057

50

【化 7 1】



であり、且つ

(i i i) D A R は約 1 ～ 2 0 の範囲であり、任意選択的に D A R の範囲は、約 1 ～ 1 0 、約 2 ～ 1 0 、約 2 ～ 8 、約 2 ～ 6 及び約 4 ～ 1 0 から選択され、好ましくは約 8 である。

10

【 0 2 8 9 】

いくつかの実施形態では；

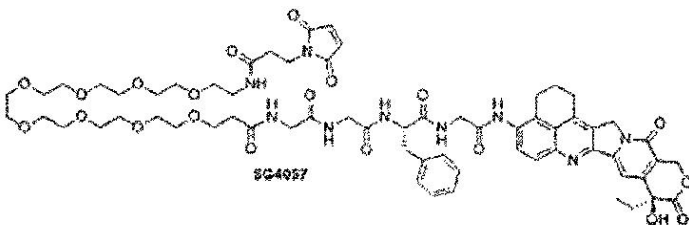
(i) 抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 1 の重鎖 C D R 1 (S D S A T W N) ；配列番号 2 の重鎖 C D R 2 (R T Y Y R S K W Y N D Y A V S V K S) ；配列番号 3 の重鎖 C D R 3 (G V G S F D Y) ；配列番号 4 の軽鎖 C D R 1 (R A S Q S I S S W L A) ；配列番号 5 の軽鎖 C D R 2 (K A S G L E S) ；及び配列番号 6 の軽鎖 C D R 3 (Q Q Y N S Y S Q L T) を含み、任意選択により、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 7 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 7 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V H 、及び配列番号 3 8 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 7 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V L を有し、任意選択により、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 4 9 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 7 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一、又は同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 5 0 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一、少なくとも 9 7 % 同一、少なくとも 9 9 % 同一、又は同一である軽鎖アミノ酸配列を含み；

20

(i i) 細胞毒は、トポイソメラーゼ I 阻害剤 S G 4 0 5 7

30

【化 7 2】



であり、且つ

(i i i) D A R は約 1 ～ 2 0 の範囲であり、任意選択的に D A R の範囲は、約 1 ～ 1 0 、約 2 ～ 1 0 、約 2 ～ 8 、約 2 ～ 6 及び約 4 ～ 1 0 から選択され、好ましくは約 4 である。

40

【 0 2 9 0 】

いくつかの実施形態では、

(i) 抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 1 の重鎖 C D R 1 (S D S A T W N) ；配列番号 2 の重鎖 C D R 2 (R T Y Y R S K W Y N D Y A V S V K S) ；配列番号 3 の重鎖 C D R 3 (G V G S F D Y) ；配列番号 4 の軽鎖 C D R 1 (R A S Q S I S S W L A) ；配列番号 5 の軽鎖 C D R 2 (K A S G L E S) ；及び配列番号 6 の軽鎖 C D R 3 (Q Q Y N S Y S Q L T) を含み、任意選択により、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 7 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少

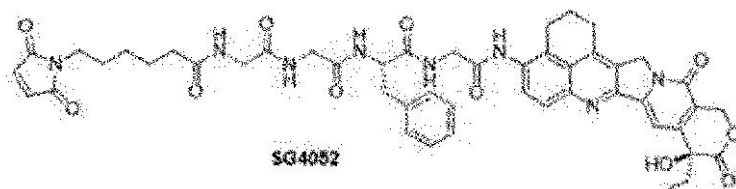
50

なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 38 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V_L を有し、任意選択により、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 49 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 50 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一である軽鎖アミノ酸配列を含み；

(i i) 細胞毒は、トポイソメラーゼ I 阻害剤 S G 4 0 5 2

10

【化 7 3】



であり、且つ

(i i i) D A R は約 1 ～ 2 0 の範囲であり、任意選択的に D A R の範囲は、約 1 ～ 1 0、約 2 ～ 1 0、約 2 ～ 8、約 2 ～ 6 及び約 4 ～ 1 0 から選択され、好ましくは約 8 である。

20

【0 2 9 1】

いくつかの実施形態では、

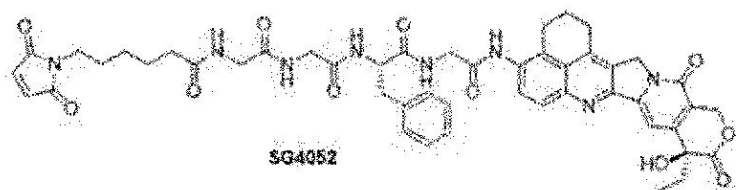
(i) 抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 1 の重鎖 C D R 1 (S D S A T W N)；配列番号 2 の重鎖 C D R 2 (R T Y Y R S K W Y N D Y A V S V K S)；配列番号 3 の重鎖 C D R 3 (G V G S F D Y)；配列番号 4 の軽鎖 C D R 1 (R A S Q S I S S W L A)；配列番号 5 の軽鎖 C D R 2 (K A S G L E S)；及び配列番号 6 の軽鎖 C D R 3 (Q Q Y N S Y S Q L T) を含み、任意選択により、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 37 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 38 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一であるアミノ酸配列を含む V_L を有し、任意選択により、抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 49 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一である重鎖アミノ酸配列、及び配列番号 50 のアミノ酸配列と少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 97% 同一、少なくとも 99% 同一、又は同一である軽鎖アミノ酸配列を含み；

30

(i i) 細胞毒は、トポイソメラーゼ I 阻害剤 S G 4 0 5 2

40

【化 7 4】



であり、且つ

(i i i) D A R は約 1 ～ 2 0 の範囲であり、任意選択的に D A R の範囲は、約 1 ～ 1

50

0、約2～10、約2～8、約2～6及び約4～10から選択され、好ましくは約4である。

【0292】

内部移行

内部移行は、ADCの有用な特性であり得る。例えば、内部移行は、ペイロードの細胞への送達を可能にする。本発明者らは、本発明の抗体及びADCが迅速な内部移行及びリソソーム輸送を示したことを示した。

【0293】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体若しくはその抗原断片又は抗FR α ADCは、細胞表面のFR α に結合し、細胞に内部移行する。いくつかの実施形態では、本発明の抗原若しくは抗体断片又は抗FR α ADCのFR α 発現細胞内への内部移行は、約4時間以内、約5時間以内、約6時間以内、約7時間以内、約8時間以内、約9時間以内、約10時間以内、約11時間以内又は約12時間以内に飽和状態になる。

【0294】

細胞毒性

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α ADCは、本抗体又はその抗原結合断片（例えば、抗FR α ADC）の非存在下での阻害又は抑制レベルと比較して、（例えば、腫瘍の）増殖を、少なくとも10%、又は少なくとも20%、又は少なくとも30%、又は少なくとも40%、又は少なくとも50%、又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%、又は約100%（好ましくは、少なくとも40%）、阻害又は抑制する。細胞増殖は、細胞分裂速度、及び／又は細胞集団内で細胞分裂を起こす細胞の割合、及び／又は終末分化若しくは細胞死に起因する細胞集団からの細胞損失率（例えば、チミジン取り込み）を計測する当該技術分野で認められている技法を使用してアッセイすることができる。

【0295】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α ADCは、約1000 ng/ml以下、約500 ng/ml以下、約400 ng/ml以下、約300 ng/ml以下、約290 ng/ml以下、約280 ng/ml以下、約270 ng/ml以下、約260 ng/ml以下又は約250 ng/ml以下のEC50値で、FR α を発現する細胞に対して細胞毒性を発揮する。

【0296】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α ADCは、約100 μ g/ml以下、約50 μ g/ml以下、約25 μ g/ml以下、約10 μ g/ml以下、約5 μ g/ml以下、約2.5 μ g/ml以下、約1 μ g/ml以下、約0.75 μ g/ml以下、約0.5 μ g/ml以下、約0.25 μ g/ml以下、約0.1 μ g/ml以下、約0.075 μ g/ml以下、約0.05 μ g/ml以下、約0.025 μ g/ml以下、約0.01 μ g/ml以下のIC50値でFR α を発現する細胞に対して細胞毒性を発揮する。

【0297】

いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α ADCは、FR α の不均一な発現及び／又はFR α の低発現を示す細胞集団の増殖を阻害又は抑制する。いくつかの実施形態では、本発明の抗FR α ADCは、FR α を中程度発現する細胞集団（例えば、Jeg-3、OVCA-R-3細胞株、又はFR α の発現レベルが類似若しくは同等である細胞）、FR α を中～高発現する細胞集団（例えば、Igrov-1細胞株、又はFR α の発現レベルが類似若しくは同等である細胞）、FR α を高発現する細胞集団（例えば、KB細胞株、又はFR α の発現レベルが類似若しくは同等である細胞）の増殖を阻害又は抑制する。

【0298】

ADC又は異種薬剤に連結された抗体の調製

本開示の異種薬剤に連結された抗体（例えば、ADC）は、（1）抗体又は抗原結合断片の反応性置換基を二価のリンカー試薬と反応させ、次いで異種薬剤（例えば、細胞毒、好ましくは、トポイソメラーゼI阻害剤）と反応させる；又は（2）異種薬剤（例えば、

10

20

30

40

50

細胞毒、好ましくは、トポイソメラーゼⅠ阻害剤)の反応性置換基を二価のリンカー試薬と反応させ、次いで本発明の抗体又はその抗原結合断片の反応性置換基と反応させるなどの、既知の有機化学反応、条件、及び試薬を使用して様々な方法で作製することができる。

【0299】

本明細書に開示される抗体又はその抗原結合断片内に存在し得る反応性置換基としては、(i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリシン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv) 抗体がグリコシル化されている場合の糖のヒドロキシル基又はアミノ基などの求核基が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に開示される抗体又はその抗原結合断片内に存在し得る反応性置換基としては、セリン、トレオニン及びチロシン残基のヒドロキシル部分；リシン残基のアミノ部分；アスパラギン酸及びグルタミン酸残基のカルボキシル部分；並びにシステイン残基のチオール部分、並びに非天然アミノ酸のプロパルギル、アジド、ハロアリール（例えば、フルオロアリール）、ハロヘテロアリール（例えば、フルオロヘテロアリール）、ハロアルキル及びハロヘテロアルキル部分が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体又はその抗原結合断片内に存在する反応性置換基には、アミン部分又はチオール部分が含まれる。特定の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィドであるシステイン架橋を有する。抗体を還元剤（D L-ジチオトレイトール（DTT）及びトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）など）で処理することによって、それらをリンカー試薬と複合化のために反応させることができる。各システイン架橋は、理論的には2つの反応性チオール求核試薬の形成をもたらす。アミンのチオールへの変換をもたらすリシンと2-イミノチオラン（Traut試薬）との反応を用いて、さらなる求核基を抗体に導入することができる。1つ、2つ、3つ、4つ又はそれ以上のシステイン残基を使用して、反応性チオール基を抗体（又はその断片）に挿入する（例えば、1つ以上の非天然システインアミノ酸残基を含む変異抗体を調製する）ことができる。反応性システインアミノ酸を有する抗体を操作することは、米国特許 第7,521,541号明細書（この文献は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

10

20

【0300】

別の態様では、抗体又はその抗原結合断片は、1つ以上のスルフヒドリル基を含有するように化学的に変化させることができる1つ以上の炭水化物基を有することができる。次いで、スルフヒドリル基の硫黄原子を介して複合化することによって、異種薬剤に連結された抗体（例えば、ADC）が形成される。

30

【0301】

さらに別の態様では、抗体は、酸化してアルデヒド（-CHO）基を生成することができる1つ以上の炭水化物基を含有し得る（例えば、Laguzza et al., J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55を参照）。対応するアルデヒドを介した複合化により、異種薬剤に連結された抗体（例えば、ADC）が形成される。細胞毒を付着又は結合するためにタンパク質を改変するさらなるプロトコルは、Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002)に記載されている。抗体、免疫グロブリン又はその断片などの細胞標的タンパク質へのリンカー-薬物部分の複合化のための方法は、例えば、米国特許 第5,208,020号明細書、米国特許 第6,441,163号明細書、国際公開第2005/037992号パンフレット、国際公開第2005/081711号パンフレット及び国際公開第2006/034488号パンフレットに見出され、これらの文献は参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0302】

抗体又はその抗原結合断片の従来の複合化戦略は、リシン又はシステインを介してペイロードを抗体又は断片にランダムに又は確率的に複合化することに依存している。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、例えば、抗体又は断片を部分的に還元

50

し、その後、連結するリンカー部分の有無にかかわらず、所望の薬剤と反応させることによって、異種薬剤（例えば、細胞毒、好ましくはトポイソメラーゼⅠ阻害剤）に確率的に複合化される。抗体又は断片は、D T T又は他の還元剤、例えばT C E Pを用いて還元して、同様の還元を行うことができる。次いで、連結するリンカー部分の有無にかかわらず、薬剤を、D M S Oの存在下、還元された抗体又は断片にモル過剰で加えることができる。複合化後、N－アセチル－L－システインなどのクエンチング剤を加えて、未反応の薬剤をクエンチさせることができる。次いで、（例えば、T F F、S E C－F P L C、C H T、スピニフィルター遠心分離によって）反応混合物を精製し、P B S又は他の関連する製剤緩衝液に緩衝液交換することができる。

【0303】

10

いくつかの実施形態では、薬剤（例えば、細胞毒）は、部位特異的な複合化によって抗体又はその抗原結合断片に複合化される。いくつかの実施形態では、特異的な位置にある反応性アミノ酸残基を使用して治療用部分を抗体へ部位特異的に複合化することにより、均一な化学量論比で、異種薬剤に連結された抗体（例えば、A D C）の均一な調製物が得られる。

【0304】

部位特異的な複合化は、システイン残基又は非天然アミノ酸を介することができる。好ましい実施形態では、異種薬剤（好ましくは、細胞毒）が、少なくとも1つのシステイン残基を介して、抗体又はその抗原結合断片に複合化される。抗体（又はその抗原結合断片）の反応性部位にあり、好ましくは鎖内又は分子間ジスルフィド結合を形成しないシステインアミノ酸を操作し得る（J u n u t u l a , e t a l . , 2 0 0 8 b N a t u r e B i o t e c h . , 2 6 (8) : 9 2 5 - 9 3 2 , D o r n a n e t a l . (2 0 0 9) B l o o d 1 1 4 (1 3) : 2 7 2 1 - 2 7 2 9 , 米国特許第7 5 2 1 5 4 1号明細書、米国特許第7 7 2 3 4 8 5号明細書、国際公開第2 0 0 9 / 0 5 2 2 4 9号パンフレット）。いくつかの実施形態において、薬剤（例えば、細胞毒）は、位置2 3 9、2 4 8、2 5 4、2 7 3、2 7 9、2 8 2、2 8 4、2 8 6、2 8 7、2 8 9、2 9 7、2 9 8、3 1 2、3 2 4、3 2 6、3 3 0、3 3 5、3 3 7、3 3 9、3 5 0、3 5 5、3 5 6、3 5 9、3 6 0、3 6 1、3 7 5、3 8 3、3 8 4、3 8 9、3 9 8、4 0 0、4 1 3、4 1 5、4 1 8、4 2 2、4 4 0、4 4 1、4 4 2、4 4 3及び4 4 6（付番は、K a b a tのE Uインデックスに対応する）の少なくとも1つのシステイン置換によって抗体又はその抗原結合断片に複合化される。いくつかの態様において、特異的なK a b a t位置は、2 3 9、4 4 2、又は両方である。いくつかの態様において、特異的な位置は、K a b a t位置4 4 2、K a b a t位置2 3 9及び2 4 0間のアミノ酸挿入、又は両方である。いくつかの実施形態では、異種薬剤（好ましくは、細胞毒）は、チオール－マレイミド結合を通じて本抗体又はその抗原結合断片に複合化される。いくつかの態様において、アミノ酸側鎖はスルフヒドリル側鎖である。

20

30

【0305】

抗体又はその抗原結合断片の複数の求核又は求電子基が薬剤と反応すると、得られる生成物は、例えば1、2、3などの抗体に結合した薬物単位の分布がある、異種薬剤に連結した抗体（例えば、A D C）の混合物になり得る。疎水的相互作用（H I C）などの液体クロマトグラフィー法は、薬物ロード量の値により混合物中の化合物を分離し得る。単一薬剤ロード値（p）を有する異種薬剤に連結された抗体（例えば、A D C）の調製物を分離することができる。

40

【0306】

複合化反応からA D Cを調製する場合の抗体（又は抗原結合断片）1つあたりの平均薬剤数は、UV、逆相H P L C、H I C、質量分析法、E L I S Aアッセイ及び電気泳動などの従来の手段により特性評価し得る。pに関するA D Cの定量的分布も決定し得る。E L I S Aによって、異種薬剤に連結された抗体（例えば、A D C）の特定の調製物中のpの平均値を決定することができる（H a m b l e t t e t a l . (2 0 0 4) C l i n . C a n c e r R e s . 1 0 : 7 0 6 3 - 7 0 7 0 ; S a n d e r s o n e t

50

al. (2005) Clin. Cancer Res. 11: 843-852)。いくつかの例では、異種薬剤に連結された均質な抗体（例えば、ADC）の分離、精製及び特性評価（ここで、pは他の薬剤を含む抗体からの特定の値である）は、逆相HPLC、電気泳動、TFF、SEC-FPLC、CHT、スピンフィルター遠心分離などの手段によって達成され得る。そのような手法は、他の型の複合体にも応用可能である。

【0307】

化学定義

以下の定義は、特に、上記のトポイソメラーゼI阻害剤の説明に関係する。

【0308】

C₅~₆アリーレン：用語「C₅~₆アリーレン」は、本明細書で使用する場合、芳香族化合物の芳香族環原子から2個の水素原子を除去することによって得られる二価部分に関する。

10

【0309】

本文脈において、接頭語（例えば、C₅~₆）は、炭素原子かヘテロ原子かにかかわらず、環原子数又は環原子数の範囲を示す。

【0310】

「カルボアリーレン基」のように、環原子は全て炭素原子であってもよく、その場合、基はフェニレン（C₆）である。

【0311】

或いは、環原子は、「ヘテロアリーレン基」のように、1個以上のヘテロ原子を含んでもよい。ヘテロアリーレン基の例としては、以下に由来するものが挙げられるが、それらに限定されない：

20

N₁：ピロール（アゾール）（C₅）、ピリジン（アジン）（C₆）；

O₁：フラン（オキソール）（C₅）；

S₁：チオフェン（チオール）（C₅）；

N₁O₁：オキサゾール（C₅）、イソオキサゾール（C₅）、イソキサジン（C₆）；

N₂O₁：オキサジアゾール（フラザン）（C₅）；

N₃O₁：オキサトリアゾール（C₅）；

N₁S₁：チアゾール（C₅）、イソチアゾール（C₅）；

N₂：イミダゾール（1,3-ジアゾール）（C₅）、ピラゾール（1,2-ジアゾール）（C₅）、ピリダジン（1,2-ジアジン）（C₆）、ピリミジン（1,3-ジアジン）（C₆）（例えば、シトシン、チミン、ウラシル）、ピラジン（1,4-ジアジン）（C₆）；及び

30

N₃：トリアゾール（C₅）、トリアジン（C₆）。

C₁~₄アルキル：用語「C₁~₄アルキル」は、本明細書で使用する場合、脂肪族でも脂環式でもよく、また、飽和でも不飽和（例えば、部分不飽和、完全不飽和）でもよい、1~4個の炭素原子を有する炭化水素化合物の1つの炭素原子から1つの水素原子を除去して得られる一価部分に関する。用語「C₁~_nアルキル」は、本明細書で使用する場合、脂肪族でも脂環式でもよく、また、飽和でも不飽和（例えば、部分不飽和、完全不飽和）でもよい、1~_n個の炭素原子を有する炭化水素化合物の1つの炭素原子から1つの水素原子を除去して得られる一価部分に関する。したがって、用語「アルキル」は、以下に論じる、サブクラスのアルケニル、アルキニル、シクロアルキルなどを含む。

40

【0312】

飽和アルキル基の例としては、メチル（C₁）、エチル（C₂）、プロピル（C₃）、及びブチル（C₄）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0313】

飽和直鎖アルキル基の例としては、メチル（C₁）、エチル（C₂）、*n*-プロピル（C₃）及び*n*-ブチル（C₄）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0314】

飽和分枝アルキル基の例としては、イソプロピル（C₃）、イソブチル（C₄）、

50

s e c -ブチル (C₄) 及び t e r t -ブチル (C₄) が挙げられる。

【0315】

C₂～₄アルケニル：用語「C₂～₄アルケニル」は、本明細書で使用する場合、1つ以上の炭素-炭素二重結合を有するアルキル基に関する。

【0316】

不飽和アルケニル基の例としては、エテニル (ビニル、-CH=CH₂)、1-プロペニル (-CH=CH-CH₃)、2-プロペニル (アリル、-CH=CH-CH₂)、イソプロペニル (1-メチルビニル、-C(CH₃)=CH₂) 及びブテニル (C₄) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0317】

C₂～₄アルキニル：用語「C₂～₄アルキニル」は、本明細書で使用する場合、1つ以上の炭素-炭素三重結合を有するアルキル基に関する。

【0318】

不飽和アルキニル基の例としては、エチニル (-C≡CH) 及び2-プロピニル (プロパルギル、-CH₂-C≡CH) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0319】

C₃～₄シクロアルキル：用語「C₃～₄シクロアルキル」は、本明細書で使用する場合、シクリル基でもあるアルキル基、すなわち、環式炭化水素 (炭素環式) 化合物の1個の脂環式環原子から1個の水素原子を除去することによって得られる一価部分 (この部分は、3～7個の環原子を含む、3～7個の炭素原子を有する) に関する。

【0320】

シクロアルキル基の例としては、以下に由来するものが挙げられるが、それらに限定されない：

飽和単環式炭化水素化合物：

シクロプロパン (C₃) 及びシクロブタン (C₄) ；及び

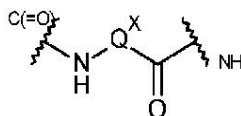
不飽和単環式炭化水素化合物：

シクロプロペン (C₃) 及びシクロブテン (C₄) 。

【0321】

接続標識：式

【化75】



において、上付きの標識 C (=O) 及び NH は、原子が結合している基を示す。例えば、NH 基は、カルボニル (図示された部分の一部ではない) に結合しているように示され、カルボニルは、NH 基 (図示された部分の一部ではない) に結合しているように示される。

【0322】

塩

活性化合物／薬剤の対応する塩、例えば、薬学的に許容される塩を調製、精製及び／又は取り扱うことが、好都合であるか又は望ましい場合がある。薬学的に許容される塩の例は、B e r g e , e t a l . , J . P h a r m . S c i . , 6 6 , 1 - 1 9 (1 9 7 7) で論じられている。

【0323】

例えば、化合物がアニオン性であるか、又はアニオン性であり得る官能基を有する (例えば、-COOH は、-COO⁻であり得る) 場合、塩は、好適なカチオンで形成され得る。好適な無機カチオンの例としては、Na⁺ 及び K⁺ などのアルカリ金属イオン、Ca²⁺ 及び Mg²⁺ などのアルカリ土類カチオン、並びに Al³⁺ などの他のカチオンが挙げられるが、これらに限定されない。好適な有機カチオンの例としては、アンモニウムイ

10

20

30

40

50

オン（すなわち、 NH_4^+ ）及び置換アンモニウムイオン（例えば、 NH_3R^+ 、 NH_2R_2^+ 、 NHR_3^+ 、 NR_4^+ ）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの好適な置換アンモニウムイオンの例は、エチルアミン、ジエチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、トリエチルアミン、ブチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジン、ベンジルアミン、フェニルベンジルアミン、コリン、メグルミン及びトロメタミン、並びにリシン及びアルギニンなどのアミノ酸に由来するものである。一般的な第四級アンモニウムイオンの例は、 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ である。

【0324】

化合物がカチオン性であるか、又はカチオン性であり得る官能基を有する（例えば、 $-\text{NH}_2$ は、 $-\text{NH}_3^+$ であり得る）場合、塩は、好適なアニオンで形成され得る。好適な無機アニオンの例としては、以下の無機酸：塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、亜硫酸、硝酸、亜硝酸、リン酸及び亜リン酸由来のものが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0325】

好適な有機アニオンの例としては、以下の有機酸：2-アセチオキシ安息香酸（2-acetyoxybenzoic）、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、ケイ皮酸、クエン酸、エデト酸、エタンジスルホン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、ヒドロキシマレイン酸、ヒドロキシナフタレンカルボン酸、イセチオン酸、乳酸、ラクトビオン酸、ラウリン酸、マレイン酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、粘液酸、オレイン酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモ酸、パントテン酸、フェニル酢酸、フェニルスルホン酸、プロピオン酸、ビルビン酸、サリチル酸、ステアリン酸、コハク酸、スルファニル酸、酒石酸、トルエンスルホン酸、トリフルオロ酢酸及び吉草酸由来のものが挙げられるが、これらに限定されない。好適なポリマー有機アニオンの例としては、以下のポリマー酸：タンニン酸、カルボキシメチルセルロース由来のものが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0326】

溶媒和物

活性化化合物の対応する溶媒和物を調製、精製及び／又は取り扱うことが、好都合であるか又は望ましい場合がある。「溶媒和物」という用語は、本明細書中、溶質（例えば、活性化化合物、活性化化合物の塩）と溶媒の複合体を指すために従来の意味で使用される。溶媒が水である場合、溶媒和物は、便宜上、水和物、例えば一水和物、二水和物、三水和物などと呼ばれ得る。

30

【0327】

異性体

本発明の特定の化合物／薬剤は、1つ以上の特定の幾何異性体、光学異性体、エナンチオマー、ジアステレオマー、エピマー、アトロプ、立体異性体、互変異性体、配座異性体又はアノマー形態で存在し得、これには、シス及びトランス形態；E及びZ形態；c、t及びr形態；エンド及びエキソ形態；R、S及びメソ形態；D及びL形態；d及びl形態；（+）及び（-）形態；ケト、エノール及びエノラート形態；シン及びアンチ形態；シンクリナル及びアンチクリナル形態； α 及び β 形態；アキシャル及びエクatorial形態；舟、いす、ねじれ、封筒及び半いす形；並びにそれらの組み合わせが挙げられるが、これには限定されず、以下、まとめて「異性体」（又は「異性体形態」）と呼ぶ。

40

【0328】

別段の指定がない限り、特定の化合物への言及は、このような異性体形態を全て、それらの（完全又は部分）ラセミ混合物及び他の混合物も含めて、包含する。このような異性体形態の調製（例えば、不斉合成）及び分離（例えば、分別結晶化及びクロマトグラフィー手段）のための方法は、当技術分野で知られているか、又は本明細書中に教示される方法又は知られた方法を、知られた様式で適用することにより容易に得られる。

【0329】

50

ポリヌクレオチド、ベクター及び宿主細胞

いくつかの態様では、本発明の抗 F R α 抗体又はその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドが提供される。ポリヌクレオチドは、表 7～8 のヌクレオチド配列のいずれであり得る。相異があった場合、表中の配列が優先される。

【0330】

別の態様では、ポリヌクレオチドは、(a) 表 7 に記載の構築物 A B 1 3 7 0 0 4 9、A B 1 3 7 0 0 2 6、A B 1 3 7 0 0 3 5、A B 1 3 7 0 0 8 3、A B 1 3 7 0 0 9 5 又は A B 1 3 7 0 1 1 7 のいずれか 1 つの参照 V L ヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % 若しくは 9 5 % 同一であるか又は同一である V L、及び (b) 表 7 に記載の構築物 A B 1 3 7 0 0 4 9、A B 1 3 7 0 0 2 6、A B 1 3 7 0 0 3 5、A B 1 3 7 0 0 8 3、A B 1 3 7 0 0 9 5 又は A B 1 3 7 0 1 1 7 のいずれか 1 つの参照 V H ヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % 若しくは 9 5 % 同一であるか又は同一である V H をコードする配列を含む。

10

【0331】

別の態様では、そのポリヌクレオチドは、(a) 表 8 に記載の構築物 A B 1 3 7 0 0 4 9、A B 1 3 7 0 0 2 6、A B 1 3 7 0 0 3 5、A B 1 3 7 0 0 8 3、A B 1 3 7 0 0 9 5 又は A B 1 3 7 0 1 1 7 のいずれか 1 つの参照軽鎖ヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % 若しくは 9 5 % 同一であるか又は同一である軽鎖、及び (b) 表 8 に記載の構築物 A B 1 3 7 0 0 4 9、A B 1 3 7 0 0 2 6、A B 1 3 7 0 0 3 5、A B 1 3 7 0 0 8 3、A B 1 3 7 0 0 9 5 又は A B 1 3 7 0 1 1 7 のいずれか 1 つの参照重鎖ヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % 若しくは 9 5 % 同一であるか又は同一である重鎖をコードする配列を含む。

20

【0332】

30

40

50

【表 13】

表 7: FR α 抗体 VH 及び VL スクレオチド配列

構築物	VH	VL
AB1370049	CTGCTACAGCTGCAGCAGTCTEG ACCTGGACTGGTCAAGCCTTCTC AGACCTGTCTCTGACCTGCGCC ATCTCTGGCGACTCTGTGTCCTC TGATTCTGCCACCTGGAAGTGA TCCGCGCAGTCTCCATCTAGAGGC CTGGAATGGCTGGGCAGAACCTA CTACCGGTCCAAGTGGTACAACG ACTACGCCGTGTCCGGAAGTCC CGGATCACCATCAATCCCAGACAC CTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGC AGCTGAACAGCGTGACCCCTGAG GATACCGCGTGTACTATTGTCC TAGAGGCGTGGGCTCCTTCGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCA (配列番号114)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CACACTGTCTGCCTCTGTGGGCGACA GAGTGACCATCACCTGTGGGCTCT CAGTCCATCTCTAGCTGGCTGGCTTG GTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCC CTAAGCTGCTGATCTACAAGCCTCT GGACTGGAATCCGGCGTGCCTCTAG ATTTTCTGGCTCTGGATCTGGCACCG AGTTCACCCCTGACCATTCTAGCCTG CAGCCTGACGACTTCGCCACCTACTA CTGCCAGCAGTACAACCTCTACAGCC AGCTGACCTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAAA (配列番号115)
AB1370026	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATTACCTTTAGCAG CTATGCCATGAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAG TGGGTCTCATCCATTAGTAGTGG TCGTAGTTACATATACTACGCAG ACTCAGTGAAGGGCCGATTACCC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCCTGTATCTGAAAATGAACA GCCTGAGAGACGAGGACACAGCT GTTTATTACTGTGCGAGAGAAAT GCAGCAGCTGGCCCTTGACTACT GGGGCCAGGGAACCCGGTCAACC GTCTCCTCA (配列番号116)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCACCATCACTTGTGGGCGAGT CAGGGCATTAGCAATTTTTCAGCCTG GTTTCAGCAGGCACCAGGGAAAGCCC CTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAA GTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTA CTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGT TCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTG GAGATCAAA (配列番号117)
AB1370035	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAAG TCCAGGACTGGTGAAGCCCTCC AGACCTCTCACTCACCTGTGCC ATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAG CAACAGTGCTGCTTGGAACTGCA TCAAGCAGTCCCATCGAGAGGC CTTGAGTGGCTGGGAAGGACATA CTACAGGTCCAATTGGTATAAIG ATTATACATTATCTGTGAAAAGT CGAATAACCGTCAACCCAGACAC	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC CACCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCATCATCACTTGCCGGGCCAGT CAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTG GTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAGCGCTCT AGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAG GTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG AATTTACTCTCACCATTACAGCCTT CAGCCTGATGATTTTGCAAGTTATTA

10

20

30

40

【0333】

【表 1 4】

構築物	VH	VL
	ATCCAAGAACCAGTTCTCCCTCC AGTTGAACTCTGTGACTCCCGAG GACACGGCTGTGTATTTATTGTCT AAGAGGGGTGGGACGCTTTGACT CCTGGGGCCAGGGAACCTGGTC ACCGTCTCCTCA (配列番号118)	CTGCCAAGAGTATAAACTTATTCTA TATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAA GTGGATATCAAA (配列番号119)
AB1370083	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTCG CCCAGCCCTCGTCAAACCTCGCC GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATTACCTTCAGTAG CTATAACATGAACCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGGGTCTCATCCATTAGTAGTCTG TAGTAGTTACATATACTACGCAG ACTCAATGAAGGGCCGATTACCC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACCTGTTTCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCGAGAGGGAT GACTACATTAACTTTTGACTACT CCGGCCAGGGAACCTCGGTACCC GTCTCCTCA (配列番号120)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CTCACCTCTCTGCATCTCTAGCAGACA GAGTCACCATCACTTGTGGGCGAGT CAGGGCATTAGCACTTTTTTAGCCTG GTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAA GTTCAGCGGCAGTGGATCTGAGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTA CTGCCAACAGTATATTAGTTACCCGC TCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG GAGATCAAA (配列番号121)
AB1370095	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTCG GGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGCG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATTACCTTCAGTAG CTATAGCATGAATTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGGGTCTCATCCATTAGTAGTCTG GAGTAGTTACGTATACTACGCAG ACTCAGTGAAGGGCCGATTACCC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACCTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACAGCT CTCTATTACTCTGCCACACGGAT GACTACATTAACTTTTGACTACT GGGGCCAGGGAACCTCGGTACCC GTCTCCTCA (配列番号122)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CTCACCTCTCTGCATCTGTGGGAGACA GAGTCACCATCACTTGTGGGCGAGT CAGGGCATTAGCAGTTTTTTAGCCTG GTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAA GTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTA CTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGC TCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG GAGATCAAA (配列番号123)
AB1370117	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG TCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGC AGACCCCTCTCACTCACCTGTGCC	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC CACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCACCATCAATTGCCGGGCCAGT

【0334】

10

20

30

40

50

【表 1 5】

構築物	VH	VL
	ATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAG CGACAGTGCTACTTGGAAGTGA TCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGC CTTGAGTGGCTGGGAAGGACAIA CTACAGGTCCAAGTGGTATAGTG ATTATGCAGTATCTGTGAAAACT CGAATAACCAITCAACCCAGACAC ATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGC AGCTGAAGTCTGTGACTCCCGAG GACACGGCTGTGTATTTCTGTGC AAGACGGGGAGCTCCCTTTCACT ACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGIC ACCGTCTCCTCA (配列番号124)	CAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTG GTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAACCTCCTGATCTATAAGGCGTCG AGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAG GTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG AATTCAGTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTA CTGCCAACAGTATAATAGTTATTCCA TGTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGAGATCAAA (配列番号125)

10

【0 3 3 5】

【表 1 6】

表 8: FR α 抗体重鎖及び軽鎖ヌクレオチド配列

20

構築物	VH-CH	VL-CL
AB1370049	CTGGTACAGCTGCAGCAGTCTGG ACCTGGACTGGTCAAGCCTTCTIC AGACCCCTGTCTCTGACCTGCGCC ATCTCTGGCGACTCTGTGTCCIC TGATTCTGCCACCTGGAAGTGA TCCGCGCAGTCTCCATCTAGAGGC CTGGAATGGCTGGGCAGAACCTA CTACCGGTCCAAGTGGTACAACG ACTACGCCGTGTCCGTGAAGTCC CGGATCACCATCAATCCCGACAC CTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGC AGCTGAACAGCGTGACCCCTGAG GATACCGCCGTGTACTATTGTGC TAGAGGCGTGGGCTCCTTCGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGIC ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGC CACCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCTGTGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCCT GCACACCTTCCCGGCTGTCTTAC AGTCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTC CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CACACTGTCTGCCTCTGTGGGCGACA GAGTGACCATCACCTGTGCGGCCTCT CAGTCCATCTCTAGCTGGCTGGCTTG GTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCC CTAAGCTGCTGATCTACAAGCCTCT GGACTGGAATCCGGCGTGCCCTCTAG ATTTTCTGGCTCTGGATCTGGCACCG AGTTCACCCTGACCATTTCTAGCCTG CAGCCTGACGACTTCGCCACCTACTA CTGCCAGCAGTACAACTCCTACAGCC AGCTGACCTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCCCCCCA GCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACC GCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAA CTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGC AGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAG TCCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCAC CGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACC AGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG AGCTTCAACAGGGGCGAGTGC

30

40

【0 3 3 6】

50

20

40

50

【表 18】

構築物	VH-CH	VL-CL
	GTTTATTACTGTGCGAGAGAAAT GCAGCAGCTGGCCCTTGACTACT GGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACC GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACCAGCGEC GGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGACC CCGTGACCGTGTCTTGGAAACAGC GGAGCCCTGACCTCCGGCGGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGA GCA3CGGCCCTGTACAGCCTGAGC AGC3TGGTGACAGTGCCAAGCAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAACCCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTTGAGCCCAAATCTTGAGACA AAACCTCACACATGCCACCGTCC CCAGCACCTGAACCTCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTTCTGTTCCCCC CCAAGCCCAAGGACACCTGATG ATCAGCAGGACCCCGAGGTGAC ATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGCA GGTGCACAACGCCAAGACCAAEC CCAGAGAGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGTGGTGTCCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGEC TGAACGGCAAGGAATACAAGTCC AAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCC AGCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCAAGGTGTACACCTGCC CCCCAGCCGCGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTG3TGAAGGGCTTCTACCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGACA GCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCAGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAA CGT3TTAGCTGCAGCGTGATCC ACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT TCCGGGTAAA	GAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACC ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG ATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCC TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAATT CTATCCCAGAGAGGCCAAAATACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCCTGCGAAGTCAACCATCAGG GCCTGAGCTCGCCCGTCAACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号129)

10

20

30

40

【0338】

【表 19】

構築物	VH-CH	VL-CL
	(配列番号128)	
AB1370035	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG TCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGC AGACCCCTCTCACTCACCTGTGCC ATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAG CAACAGTGCTGCTTGGAAGTGG TCAGGCAGTCCCATCGAGAGGC CTTGAGTGGCTGGGAAGGACATA CTACAGGTCCAATTGGTATAAIG ATTATACATTATCTGTGAAAAGT CGAATAACCGTCAACCCAGACAC ATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGC AGTTGAAGTCTGTGACTCCCGAG GACACGGCTGTGTATATTGTGT AAGAGGGGTGGGACGCTTTGACT CCTGGGGCCAGGGAACCCTTGGTC ACCGTCTCCTCAGCCCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG CCCCAGCAGCAAGAGCACCAGC GGCAGCAGCCGCCCCCTGGGCTG CCTGGTGAAGGACTACTTCCCCG AGCCCTCAGCGTGTCTTGAAC AGCAGAGCCCTGACCTCCGGCCT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTEC AGAGCAGCGGCCTGTACAGCCIG AGCAGCGTGGTGACAGTGCCAAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAACTCACACATGCCCACCG TGCCAGCACCTGAACTCCTGGG GGGACCGTCAGTCTTTCTGTTC CCCCAGGCCAAGGACACCCCTG ATGATCAGCAGGACCCCCGAGGT GACATGCGTGGTGGTGGATGTCT CCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCCT GGAGGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGTGTCCCT GCTGACCGTGCTGCACAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAATACAAG TGCAAAGTCTCAACAAGGCCCT GCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC CACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCATCATCACTTGCCGGGCCAGT CAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTG GTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCT AGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAG GTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG AATTTACTCTCACCATTACCAGCCTT CAGCCTGATGATTTTGCAAGTTATTA CTGCCAAGAGTATAAACTTATTCTA TATTCACCTTCGGCCCTGGGACCAA GTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGC ACCATCTGTCTCATCTTCCCGCCAT CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC GCCTCTGTTGTGTCCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACTCCCAGGAGAAGTGCAC AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATC AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
	(配列番号131)	

10

20

30

40

【0339】

【表 20】

構築物	VH-CH	VL-CL
	TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCCT GCCGCCAGCCGCGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC TGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGEG AGAGCAACGGCCAGCCCGAGAAC AACTACAAGACCACCCCCCAGT GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCT TCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACCTCTTCACCTCCAGCCTCA TGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA (配列番号130)	
AB1370083	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCCCTGGTCAAACCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATTTCACCTTCAGTAG CTATAACATGAAGTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGGGTCTCATCCATTAGTAGTGG TAGTAGTTACATATACTACGCAG ACTCAATGAAGGGCCGATTACACC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACTGTTTCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT GTGTATTACTGTGCGAGAGGGAT GACTACATTAACTTTTGACTACT GGGGCCAGGGAACCTGGTCAACC GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCCC CCAACAGCAAGAGCACCAGCGGC GGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGC CCGTGACCGTGTCTGGAACAGC GGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGA GCAGCGGCCCTGTACAGCCTGAGC AGCGTGGTGACAGTGCCAAGCAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAAGAG AGTTGAGCCCAAATCTGTGACA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCACCATCACTTGTGSGCGAGT CAGGGCATTAGCACCTTTTTAGCCTG GTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAA GTTTCAGCGGCAGTGGATCTGAGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTA CTGCCAACAGTATATTAGTTACCCGC TCACTTTGCGCGAGGGACCAAGGTG GAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACC ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCCC TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCGTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号133)

【0340】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

構築物	VH-CH	VL-CL
	AAACTCACACATGCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCCTTCTGTCCCCC CCAAGCCCAAGGACACCTGATG ATCAGCAGGACCCCCGAGGTGAC ATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC ACGACGACCCAGAGCTCAACTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCACAACGCCAAGACCAAGC CCAGAGAGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGTGGTGTCGCTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGEC TGAACGGCAAGGAATACAAGTGC AAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCC AGCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCAAGGTGTACACCCTGCC CCCCAGCCGCGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTGAAGGGCTTCTACCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCAGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAA CGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAA (配列番号132)	
AB1370095	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCCTCTGGATTACCTTCAGTAG CTATAGCATGAATTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAG TGGTCTCATCCATTAGTAGTAG GAGTAGTTACGTATACTACGCAG ACTCACTCAAGCCCCATTACCC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACAGCT GTGTATTACTGTGCGAGAGGGAT GACTACATTAACTTTGACTACT	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CTCACTGTCTGCATCTGTCCGAGACA GAGTCACCATCACCTGTTCGGCGAGT CAGGGCATTAGCAGTTTTTTAGCCTG GTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAA GTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCACCACCCCTG CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTA CTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGC TCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG GAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACC ATCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTG

【0341】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

構築物	VH-CH	VL-CL
	GGGSCCAGGGAACCCCTGGTCACC GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCCC CCA3CAGCAAGAGCACCAGCGCC GGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGT3AAGGACTACTTCCCCGACC CCCTCACCCTGTCTTCCAACACC GGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGA GCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGC AGCSTGGTGACAGTGCCAAGCAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACA TCT3CAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AAACTCACACATGCCACCGTCC CCA3CACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTTCTGTTCCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCCTGATG ATCAGCAGGACCCCCGAGGTGAC ATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGCA GGT3CACAAAGCCAAGACCAAGC CCA3AGAGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGTGGTGCCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGCC TGAACGGCAAGGAATACAAGTCC AAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCC AGCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCCA GAACCAAGGTGTACACCCCTGCC CCCCAGCCGCGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGACA GCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCAGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAA CGTGTTCAGCTGCAGCGTGATCC ACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCCGCTAAA (配列番号134)	ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCC TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCCTCACGCTGACC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCTTCCGAAGTCACCCATCAGG GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号135)

10

20

30

40

【0 3 4 2】

【表 2 3】

構築物	VH-CH	VL-CL
AB1370117	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG TCCAGGACTGGTGAAGCCCTCC AGACCTCTCACTCACCTGTGCC ATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAG CGACAGTGCTACTTGGAAGTGCA TCAGCAGTCCCCATCGAGAGCC CTT3AGTGGCTGGGAAGGACATA CTACAGGTCCAAGTGGTATAGTG ATTATGCAGTATCTGTGAAAAGT CGAATAAACCATCAACCCAGACAC ATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGC AGCTGAACTCTGTGACTCCCGAG GACACGGCTGTGTATTTCTGTGC AAGAGGGGGAGCTCCCTTTGACT ACT3GGGCCAGGGAACCTGGTC ACCGTCTCTCAGCCCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG CCCCCAGCAGCAAGAGCACCACC GGC3GCACAGCCGCCCTGGGCTG CCT3GTGAAGGACTACTTCCCCG AGC3CGTGACCGTGTCTTGGAAC AGC3GAGCCCTGACCTCCGGCCT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGC AGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG AGCAGCGTGGTGACAGTGCCAAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTTGAGCCCAAATCTTGIG ACAAAACCTCACACATGCCACCG TGCCCAGCACCTGAACTCCTGCG GGGACCGTCAGTCTTTCTGTTC CCCCCAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCAGCAGGACCCCCGAGCT GACATGCGTGGTGGTGGATGTCT CCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCCT GGAGGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCAOCTACAGGGTGGTGTCCCT GCTGACCGTGCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAATACAAG TGCAAAGTCTCCAACAAGSCCCT GCCAGCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCC CGASAACCACAGGTGTACACCCT	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTC CACCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCACCATCAATTGCCGGGCCAGT CAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTG GTATCAGCAGAAAACCAGGGAAAGCCC CTAACCTCCTGATCTATAAGGCGTCG AGTTTAGAAAAGTGGGGTCCCATCAAG GTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG AATTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTA CTGCCAACAGTATAATAGTTATTCCA TGTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC GCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTAC AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

(配列番号137)

【0 3 4 3】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

構築物	VH-CH	VL-CL
	GGGGGGAGCCGCGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC TGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAACGGCCAGCCCGAGAAC AACTACAAGACCACCCCCCAGT GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCT TCCTGTACAGCAAGCTGACCGIG GACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGG CAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGA TGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA (配列番号136)	

10

【0344】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、単離されたポリヌクレオチドである。

【0345】

20

本発明の配列（例えば、ポリヌクレオチド配列）は、それらの天然の環境から取り出された配列、組み換え又はクローン化（例えば、DNA）単離物、及び化学的に合成された類似物又は異種の系により生物学的に合成された類似物を含む。

【0346】

本発明の配列（例えば、ポリヌクレオチド配列）は、当該技術分野で知られたいずれかの手段により調製され得る。例えば、好適な宿主細胞での複製及び／又は発現によって大量の配列が作製され得る。所望の断片をコードする天然又は合成DNA断片は一般的に、原核又は真核細胞への導入及びそれらにおける複製が可能である、組換え核酸コンストラクト、一般的にはDNAコンストラクトに組み込まれる。通常、DNAコンストラクトは、酵母又は細菌などの単細胞宿主での自己複製に好適であるが、培養された細菌、昆虫、哺乳動物、植物又は他の真核細胞株のゲノムへの導入及びそれら内への組み込みも意図され得る。

30

【0347】

本発明の配列（例えば、ポリヌクレオチド配列）は、化学合成によっても作製され得、例えば、ホスホラミダイト法又はトリエステル法によるポリヌクレオチドであり、市販の自動オリゴヌクレオチド合成装置で行われ得る。2本鎖（例えば、DNA）断片は、相補鎖を合成し、適切な条件下で一緒に鎖をアニールするか、又は適切なプライマー配列とともにDNAポリメラーゼを使用して相補鎖を添加することにより、化学合成の1本鎖生成物から得られ得る。

【0348】

40

本発明の配列（例えば、ポリヌクレオチド配列）に適用する場合、「単離される」という用語は、好ましくは、その天然の遺伝的環境から配列が取り出され、したがって他の外来性又は不要なコード配列を含まないようになり（しかし、プロモーター及び終結因子などの天然の5'及び3'非翻訳領域を含み得る）、遺伝子改変されたタンパク質産生系内での使用に好適な形態であることを示す。このような単離分子は、それらの天然の環境から分離されたものである。

【0349】

本明細書に記載のポリヌクレオチドのバリエーションは、本発明により包含される。ポリヌクレオチドバリエーションは、コード領域、非コード領域、又はその両方に改変を含有し得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドバリエーションは、サイレント置換、付加又は

50

欠失を生じさせるが、コードされるポリペプチドの特性も活性も変化させない改変を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドバリエーションは、遺伝子コードの縮重によるサイレント置換によって作製される。様々な理由で、例えば、特定の宿主に対するコドン発現を最適化する（ヒトmRNA中のコドンを、E. コリ（*E. coli*）などの細菌宿主に好ましいものに変化させる）ために、ポリヌクレオチドバリエーションが作製され得る。

【0350】

いくつかの態様では、ポリヌクレオチドを含むベクターも提供される。ベクターは、発現ベクターであり得る。発現ベクターは、以下に限定されないが、調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー）、選択マーカー及びポリアダニル化シグナルなどの、1つ又は複数のさらなる配列を含み得る。多種多様な宿主細胞をトランスフェクトするためのベクターはよく知られており、例えば、以下に限定されないが、プラスミド、ファージミド、コスミド、バキュロウイルス、バクミド、細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）、並びに他の細菌、酵母及びウイルスベクターが挙げられる。

【0351】

ベクターは、ポリヌクレオチドの発現を制御する核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ベクターは、プロモーターと作動可能に結合された本発明のポリヌクレオチドを含む。例えば、ベクターは、本発明の抗体のVH領域をコードするポリヌクレオチド、及び本発明の抗体のVL領域をコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドは、1つ以上のプロモーターと作動可能に結合されている。本明細書で使用する場合、用語「プロモーター」は、ポリヌクレオチドの転写を駆動することによってポリヌクレオチドの発現を調節する任意の核酸配列を意味する。本明細書で使用する場合、用語「作動可能に結合される」及び「作動可能に連結される」は、プロモーターが、それが当該配列の転写開始及び／又は発現を制御するために調節するポリヌクレオチドに対して正しい機能的な位置及び／又は方向にあることを意味する。いくつかの実施形態では、VH領域及びVL領域をコードするポリヌクレオチドは、同じプロモーターと作動可能に結合されている。いくつかの実施形態では、VH領域及びVL領域をコードするポリヌクレオチドはそれぞれ、別々のプロモーターと作動可能に結合されている。いくつかの実施形態では、別々のプロモーターは、同じ型のプロモーターである。いくつかの実施形態では、別々のプロモーターは、異なる型のプロモーターである。

【0352】

いくつかの実施形態では、例えば、ベクターは、エンハンサー及びリプレッサー配列の1つ以上を含む。本明細書で使用する場合、用語「エンハンサー」は、ポリヌクレオチドの転写活性化を増大させる1つ以上のタンパク質に結合する核酸配列を意味する。本明細書で使用する場合、用語「リプレッサー」は、ポリヌクレオチドの転写活性化を低減する1つ以上のタンパク質に結合する核酸配列を意味する。

【0353】

いくつかの態様では、本発明は、以下の作動可能に連結されたエレメント、転写プロモーター、本発明の抗体又は抗原結合断片の重鎖をコードするポリヌクレオチド、本発明の抗体又は抗原結合断片の軽鎖をコードするポリヌクレオチド、及び転写ターミネーターのうちの1つ又は複数を含む発現ベクターを提供する。

【0354】

本明細書で提供される別の態様は、ポリヌクレオチドを含む宿主細胞であり、前記ポリヌクレオチドは、本発明の抗体又はその抗原結合断片をコードする核酸配列を含む。

【0355】

さらなる態様では、本発明のベクターを発現し、発現することができる宿主細胞が提供される。これらの細胞は、哺乳動物細胞（293F細胞、CHO細胞など）、昆虫細胞（スポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞など）、酵母細胞（サッカロミセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）及びピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）など）、

植物細胞、又は細菌細胞（*E. coli*（*E. coli*）など）であり得る。好ましい実施形態では、細胞は哺乳動物細胞、好ましくはCHO細胞である。

【0356】

医薬組成物

用語「医薬組成物」は、活性成分の生物活性が発揮されるような形態であり、且つその組成物を投与される対象にとって許容されない毒性をもつ追加の成分を含有しない調製物を指す。そのような組成物は、無菌であり得、生理食塩水などの薬学的に許容される担体を含み得る。好適な医薬組成物は、緩衝液（例えば、酢酸塩、リン酸塩又はクエン酸塩緩衝液）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート）、安定化剤（例えば、ヒトアルブミン）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール）、及びバイオアベイラビリティを増強する吸収促進剤の1つ以上、並びに／又は他の従来の可溶化剤若しくは分散剤を含み得る。

10

【0357】

用語「薬学的に許容される」は、本明細書で使用する場合、動物、より特にはヒトにおける使用のために、連邦若しくは州政府の規制機関によって認可されているか、又は米国薬局方（*U. S. Pharmacopeia*）、欧州薬局方（*European Pharmacopeia*）若しくは他の一般に認められている薬局方に列記されていることを意味する。

【0358】

本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、又は本発明のADCは、医薬組成物として対象に投与することができる。したがって、本発明はまた、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、又は本発明のADC、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

20

【0359】

別の態様では、本発明による、及び本発明による使用のための医薬組成物は、活性成分（例えば、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、又は本発明のADC）に加えて、薬学的に許容可能な賦形剤、担体、緩衝液、安定剤又は当業者によく知られた他の材料を含み得る。このような材料は、無毒であるべきであり、且つ活性成分の有効性を妨害してはならない。担体又は他の材料の正確な性質は、投与経路（経口、又は注射、例えば皮膚注射、皮下注射若しくは静脈内注射であり得る）に依存する。

【0360】

30

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、生理食塩水などの薬学的に許容される無毒性で無菌の担体、無毒性の緩衝液、保存剤などを含み得る。本明細書に開示される治療方法に使用するための好適な製剤は、*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 22nd ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012)に記載されている。

【0361】

好適な賦形剤の例としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、並びにそれらの任意の組み合わせの1つ以上が挙げられる。多くの場合、等張剤、例えば糖類、多価アルコール又は塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましいであろう。

40

【0362】

当業者であれば、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、又は本発明のADCと共に使用するための賦形剤の適切な選択が、医薬組成物の所望の特性に依存することは理解していよう。

【0363】

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、カプセル剤、錠剤、水性懸濁液、溶液、鼻腔エアロゾル、使用前に懸濁液又は溶液を作るために再構成することができる凍結乾燥粉末、又はそれらの組み合わせから選択される1種以上の製剤内に含まれ得る。

【0364】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、2つ以上のタイプの本発明の抗体又は抗原結

50

合断片を含む。例えば、医薬組成物は、抗体、抗原結合断片、細胞毒に複合化された抗体若しくはその抗原結合断片、又はそれらの組み合わせから選択される2つ以上のものを含み得る。

【0365】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、緩衝液（例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液又はクエン酸緩衝液）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート）、任意選択により安定剤（例えば、ヒトアルブミン）などを含み得る。

【0366】

本明細書に開示される医薬組成物は、障害の診断、検出若しくは監視、障害若しくはその1つ以上の症状の予防、治療、管理若しくは改善、及び／又は研究に使用されるが、これらに限定されない。本明細書に開示される医薬組成物は、ヒトにおける獣医学的使用又は薬学的使用に好適であり得る。

【0367】

本発明の医薬組成物は、任意の適切な全身又は局所の投与経路によって患者に投与することができる。例えば、投与は、経口、口腔、舌下、眼、鼻腔内、気管内、肺、局所、経皮、泌尿生殖器、直腸、皮下、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、頭蓋内、髄腔内、硬膜外、脳室内又は腫瘍内であり得る。

【0368】

本発明の医薬組成物は、任意の適切な手段によって、例えば、表皮若しくは経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、又はゲルによって；噴霧器、気化器、又は吸入器によって；注射又は注入によって；或いはカプセル剤、錠剤、水若しくは非水性媒体の溶液若しくは懸濁液、点滴剤、坐剤、浣腸、スプレー、又は粉末の形態で、投与するために製剤化することができる。任意の所与の場合における最も好適な投与経路は、対象の身体的及び精神的状態、疾患の性質及び重症度、並びに製剤の所望の特性に依存する。

【0369】

経口投与用のための医薬組成物は、錠剤、カプセル剤、粉剤又は液体形態であり得る。錠剤は、固形担体又はアジュバントを含み得る。液体医薬組成物は一般に、水、石油、動物若しくは植物油、鉱物油又は合成油などの液体担体を含む。生理食塩水、デキストロース若しくは他の糖類溶液、又はエチレングリコール、プロピレングリコール若しくはポリエチレングリコールなどのグリコールが含まれ得る。カプセル剤は、ゼラチンなどの固形担体を含み得る。

【0370】

静脈内注射、皮膚注射若しくは皮下注射、又は罹患部位での注射のためには、活性成分は、発熱物質を含まず、好適なpH、等張性及び安定性を有する、非経口的に許容される水溶液の形態である。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射、リンゲル注射、乳酸加リンゲル注射などの等張ビヒクルを使用して、好適な溶液を十分に調製可能である。保存剤、安定剤、緩衝液、抗酸化剤及び／又は他の添加剤が必要に応じて含まれ得る。

【0371】

治療

本発明は、疾患、障害又は感染に関連する症状を予防、治療又は改善するために、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、ADC又は医薬組成物を対象に投与することを含む治療法を包含する。

【0372】

「治療する」とは、診断された病的状態又は障害を治癒させる、減速させる、その症状を緩和する、及び／又はその進行を止める治療的手段を指す。したがって、治療が必要なものは、既に障害を有するものを含む。いくつかの実施形態では、対象が疾患又は障害（好ましくは、癌）に関連する症状の例えば全面的な、部分的な又は一過性の緩和又は消失を示すなら、その対象は疾患又は障害（好ましくは、癌）について本明細書で提供される方法によって成功裏に「治療されている」。

【0373】

「予防する」とは、標的とする病的状態又は障害の発生を予防し且つ／又は遅らせる予防的又は防御的手段を指す。したがって、予防が必要なものは、障害を起こす傾向があるか又は障害を起こし易いものを含む。いくつかの実施形態では、患者が本発明の方法に供されたことがない患者よりも一過性に又は永久に、例えば疾患若しくは障害に関連する症状の発症が少ないか若しくはその重症度が低い、又は疾患若しくは障害に関連する症状の発症が遅いなら、疾患又は障害（好ましくは、癌）は、本明細書で提供される方法によって成功裏に予防されている。

【0374】

「対象」、「個体」及び「患者」という用語は、本明細書では哺乳動物対象を指すために互換的に使用される。いくつかの実施形態では、「対象」は、ヒト、飼育動物、家畜、スポーツ用の動物及び動物園の動物、例えばヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシなどである。いくつかの実施形態では、対象は、カニクイザル（マカカ・ファスシキュラリス（*Macaca fascicularis*））である。好ましい実施形態では、対象はヒトである。本発明の方法において、対象は、癌を有すると以前に診断されていなくてもよい。或いは、対象は、癌を有すると以前に診断されていてもよい。対象はまた、疾患リスク因子を示すものであっても、又は癌の症状がないものであってもよい。対象はまた、癌に罹患しているものであっても、癌を発症するリスクのあるものであってもよい。いくつかの実施形態では、対象は、癌治療を以前受けたことがある。

【0375】

したがって、いくつかの態様では、例えば、疾患又は障害（例えば、癌）を治療する療法に使用するための、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、本発明のADC、又は医薬組成物が提供される。また、疾患又は障害（例えば、癌）を治療する方法であって、対象に治療有効量の本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、又は医薬組成物を投与することを含む方法が提供される。一態様では、疾患又は障害（例えば、癌）の発症を予防する方法であって、対象に治療有効量の本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、又は医薬組成物を投与することを含む方法が提供される。

【0376】

「治療有効量」という用語は、患者に利益をもたらすのに十分な量である。このような利益は、少なくとも1つの症状の少なくとも改善であり得る。実際の投与量、並びに投与の速度及びタイムコースは、治療されるものの性質及び重症度に依存する。治療の処方箋、例えば投与量に関する決定は、一般開業医及び他の医師の責任の範囲内にある。

【0377】

一態様では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、又は医薬組成物は、FR α 発現に関連する癌の治療に使用される。別の態様では、FR α 発現に関連する癌を治療するための方法であって、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、又は医薬組成物を対象に投与することを含む方法が提供される。言い換えると、本明細書中で言及される癌は、FR α を発現する癌性細胞を含み得る。前記癌性細胞は、腫瘍内に含まれ得る。いくつかの実施形態では、癌は、FR α の不均一な発現及び／又はFR α の低発現を示す癌細胞を含む。

【0378】

好ましくは、癌は、卵巣癌、肺癌（例えば、肺腺癌）、子宮内膜癌、乳癌（例えば、TNBC）、子宮頸癌、膵臓癌、胃癌、腎細胞癌（RCC）、結腸直腸癌、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）及び悪性胸膜中皮腫から選択される。より好ましくは、癌は、卵巣癌又は肺癌である。いくつかの実施形態では、癌は、1つ以上の非小細胞肺癌（NSCLC）であり、好ましくは扁平上皮NSCLC、腺癌NSCLC又はそれらの組み合わせから選択される。

【0379】

癌のさらなる例としては、以下に限定されないが、良性、前悪性及び悪性の細胞増殖が

挙げられ、これには、以下に限定されないが、新生物及び腫瘍（例えば、組織球腫、神経膠腫、星状細胞腫、骨腫）、癌（例えば、卵巣癌、肺癌、非小細胞肺癌（扁平上皮癌又は腺癌）、子宮内膜癌、膵臓癌、胃癌、結腸直腸癌、頭頸部扁平上皮癌、悪性胸膜中皮腫、乳癌（例えば、TNBC）、及び腎臓癌が挙げられる。任意のタイプの細胞、例えば、以下に限定されないが、肺、胃腸、乳腺（乳房）、卵巣、腎臓（kidney）（腎臓（renal））及び膵臓の細胞を治療することができる。

【0380】

一態様では、本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、又は医薬組成物は、対象におけるFR α 陽性細胞の集団を枯渇させる方法で使用され、この方法は、抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、又は医薬組成物を対象に投与することを含む。別の態様では、対象におけるFR α 陽性細胞の集団を枯渇させるための方法であって、治療有効量の本発明の抗FR α 抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、又は医薬組成物を対象に投与することを含む方法が提供される。いくつかの実施形態では、FR α 陽性細胞は、FR α の不均一な発現及び／又はFR α の低発現を示す。

10

【0381】

抗体の他の用途

抗体又は抗原結合断片は、インビトロ、インビボの両方でFR α に対して高い親和性を示し、したがって、FR α エピトープを検出するための方法及び関連する診断方法に有利に使用され得る。

【0382】

本発明の抗体又はその抗原結合断片は、当該技術分野で知られる任意の方法によって、免疫特異的結合に対するアッセイにおいて使用し得る。使用され得るイムノアッセイとしては、以下に限定されないが、ウエスタンブロット、RIA、ELISA、ELISPOT、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル内拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集反応アッセイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、及びプロテインAイムノアッセイなどの技術を使用する競合及び非競合アッセイシステムが挙げられる。

20

【0383】

免疫蛍光、免疫電子顕微鏡又は非免疫学的アッセイでのように、例えばFR α 又はその保存的バリエーション若しくはペプチド断片のインサイチュ検出のために、本発明の抗体又はその抗原結合断片を組織学的に使用し得る。インサイチュ検出は、患者から組織学的検体を取り出し、標識した本発明の抗体又はその抗原結合断片をそれに適用することによって、例えば標識した抗体又はその抗原結合断片を生体試料上に重ねることによって、達成することができる。そのような手順の使用により、FR α 、又は保存されたバリエーション若しくはペプチド断片の存在だけでなく、被験組織におけるその分布も決定することが可能である。本発明を使用して、当業者は、そのようなインサイチュ検出を実現するために多種多様な組織学的方法（染色手順など）のいずれかを改変し得ることを容易に理解するであろう。

30

【0384】

例えば、細胞結合（インビトロ又はインビボ）の検出を補助するために、抗体若しくはその抗原結合断片、又は抗体薬物複合体を標識し得る。標識は、ビオチン標識であり得る。別の実施形態では、標識は放射性同位体であり得る。別の実施形態では、標識はフルオロフォアであり得る。

40

【0385】

一態様では、試料中でFR α ポリペプチド（例えば、FR α ポリペプチドエピトープ）の有無を検出するための方法が提供され、この方法は、

（a）試料を、本発明の抗体若しくはその抗原結合断片、又は医薬組成物と接触させて、抗体-抗原複合体を提供すること；及び

（b）前記抗体-抗原複合体の有無を検出することを含み、

50

抗体－抗原複合体の存在が F R α ポリペプチド（例えば、F R α ポリペプチドエピトープ）の存在を確認するか、又は抗体－抗原複合体の非存在が F R α ポリペプチド（例えば、F R α ポリペプチドエピトープ）の非存在を確認する。

【0386】

製品及びキット

さらなる態様では、本発明の1つ又は複数の抗 F R α 抗体若しくはその抗原結合断片、又は本発明の A D C、又は本発明の医薬組成物を含む製品が本明細書において提供される。

【0387】

またさらなる態様では、本発明の1つ以上の抗体若しくはその抗原結合断片、又は A D C などの、本発明の医薬組成物の成分の1つ以上を充填した1つ以上の容器を含む医薬パック又はキットが提供される。任意選択的に、こうした容器は、医薬品又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって規定された形態の通知を伴ってもよく、この通知は、ヒトに投与するための製造、使用又は販売の機関による承認を示す。例えば、卵巣癌、肺癌（例えば、N S C L C）、子宮内膜癌、乳癌（例えば、T N B C）、子宮頸癌、膵臓癌、胃癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、頭頸部扁平上皮癌（H N S C C）及び悪性胸膜中皮腫などの癌の治療において提供される医薬組成物を使用する方法に関する説明書もまた、含まれるか、患者又は医療サービス提供者に利用可能にされ得る。

【0388】

一態様では、本発明の抗体若しくは抗原結合断片、又は A D C、又は医薬組成物を含むキットが提供される。本発明の方法において、前記キットの使用がさらに包含される。

【0389】

いくつかの実施形態では、キットは、抗原又は抗体結合断片及び異種薬剤を個々に（例えば、抗体又は抗原結合断片に複合化されないが、それへの複合化に好適な形態である細胞毒）提供し得；任意選択的に、キットには、抗体又は抗原結合断片への異種薬剤の複合化のための説明書及び／又は試薬をさらに備える。いくつかの実施形態では、キットには、全ての対照、アッセイの実施に関する説明書、並びに結果の分析及び発表に必要な任意のソフトウェアを含む、検出アッセイの実施に必要且つ／又は十分な構成要素の全てが含まれる。

【0390】

本開示は、本明細書中に開示される例示的な方法及び材料によって限定されず、本明細書中に記載のものと類似又は同等の任意の方法及び材料を、本開示の実施形態の実施又は試験において使用することができる。

【0391】

上記の実施形態は、例示的な例として理解されるべきである。さらなる実施形態が想定される。任意のいくつかの実施形態に関して記載されるいかなる特徴も、単独で又は記載される他の特徴と組み合わせて使用され得、また、任意の他の実施形態若しくは態様、又は任意の他の実施形態若しくは態様の任意の組み合わせの1つ以上の特徴と組み合わせて使用され得ることは理解されるべきである。さらに、上記に記載されていない等価物及び改変もまた、添付の請求項において定義される本発明の範囲から逸脱することなく用いられ得る。

【0392】

本発明に関して、本明細書に記載の抗体及び方法の他の例及び変形は、当業者には明らかであろう。他の例及び変形は、添付の特許請求の範囲に記載されているように本開示の範囲内である。

【0393】

本明細書において引用される全ての文献は、その引用される文献に示される全てのデータ、表、図及び本文を含めて、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0394】

10

20

30

40

50

実施例 1．抗 F R α 抗体の生成

目的

ヒト化トランスジェニックマウスを用いてハイブリドーマキャンペーンを行い、葉酸受容体アルファ（F R α ）に結合する高親和性の完全ヒト抗体を得た。

【0395】

材料及び方法

免疫化のためのヒト F R α の作製

ヒト F R α 遺伝子を p D E S T 1 2 . 2 O r i P ベクターに挿入した。葉酸受容体の可溶性領域に対応する配列を、N 末端 C D 3 3 リーダー及び C 末端 A v i 及び H i s 6 タグを用いてさらにクローニングした。G P I アンカリングに関与する配列を除去し、可溶性コンストラクトを得た。

【0396】

ヒト F R α タンパク質を発現させ、標準的な方法を用いて精製した。簡潔に記載すると、プラスミド DNA を調製し、トランスフェクションの時点で、 4×10^6 細胞 / m l の密度の細胞による P E I 媒介送達を用いて、社内懸濁適合 C H O 細胞株にトランスフェクトした。細胞を 34°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 140rpm 、 70% の湿度で 7 日間培養した。アフィニティーキャプチャー用の 5ml の H i s T r a p エクセルカラム（C y t i v a）を使用して、馴化培地を回収し、精製し、続いて、D P B S 中で平衡化した H i L o a d S u p e r d e x 7 5 1 6 / 6 0 0 p g カラム（C y t i v a）で精製した。画分を純度について S D S - P A G E によって分析し、プールし、その濃度を UV 吸光度によって決定し、液体窒素中で急速凍結した後、 -80°C で保存した。その A v i タグ上のタンパク質を部位特異的にビオチン化するために、タンパク質を組換え B i r A 酵素、A T P 及びビオチンと共にインキュベートし、続いて上記のようにサイズ排除クロマトグラフィーで精製した。抗体を、標的抗原について記載したように発現させ、プロテイン A クロマトグラフィーを用いて精製した。

【0397】

免疫

複数部位反復免疫（R I M M S）戦略を用い、D e l - 1 ヒト化マウス及び C D 1 野生型マウスを以下のように免疫した：

- － マイナス 4 日：前採血
- － 0 日：プライム免疫
- － 7 日：2 回目のブースト
- － 1 3 日：1 回目の採血
- － 1 5 日：3 回目のブースト
- － 2 0 日：2 回目の採血
- － 2 2 日：4 回目のブースト
- － 2 4 日：5 回目のブースト
- － 2 8 日：最終採血と、脾臓（S P）及びリンパ節（L N）の融合

【0398】

免疫化のために、6 匹のヒト化 D e l - 1 マウス及び 4 匹の C D 1 野生型マウスを 2 つの群に分けた（群 1：D e l - 1 マウス 1 ~ 6、群 2：C D 1 マウス 7 ~ 1 0）。上記のように、組換えヒト F R α 細胞外ドメインで動物を免疫した。組換え F R α を P B S で希釈し、等量の完全フロイントアジュバントで乳化し、2 つの部位でマウスに注射した。その後の 3 回の注射においては、免疫原をフロイント不完全アジュバントで乳化し、上記のように注射した。2 4 日目に、P B S 中の組換えタンパク質を腹腔内に注射することによって、最終のブーストを行った。

【0399】

尾静脈出血を、免疫前、初回免疫後の 1 3 日目、及び 2 回目の免疫後の 2 0 日目にマウスから得た。ヒトに対する F R α に対する I g G 力価を、血清 E L I S A によって決定した。

10

20

30

40

50

【0400】

FR α に対するマウス免疫応答の評価（血清ELISA）

ヒトFR α 及び陰性タンパク質対照に対する血清IgG力価を、標準的な技術を用い、96ウェルマイクロタイタープレート中でELISAによって決定した。HRP標識ポリクローナルヤギ抗マウスIgG特異的二次抗体（Jackson Immuno Labs）を用いて抗体を検出し、TMB基質（Sigma）を用いてアッセイを進め、続いて0.5M硫酸を添加して反応を停止させた。次に、プレートを、PerkinElmer EnVision 2103多標識プレートリーダーを使用して読み取った。

【0401】

ヒトFR α 及び陰性タンパク質対照の血清滴定曲線をプロットし、それぞれの曲線下面積（AUC）を計算した。 10

【0402】

モノクローナルマウスIgG単離（ハイブリドーマ生成）

最終ブーストの4日後に、リンパ節を無菌採取し、細胞を機械的破壊によって単離し、次いで、計数した。これらの細胞をSP2/0骨髓腫細胞と混合し、電気融合装置を用いて融合した。得られた融合物をメチルセルロースに基づく半固形培地と混合し、Omni Trayプレートにプレーティングした。半固形培地中の細胞は、5%CO₂インキュベーター内、37℃で13日間培養した。このインキュベーション中に、クローンコロニーが単一の前駆ハイブリドーマ細胞から形成される。これらのコロニーは、半固形培地中に存在するFITC結合型抗IgGによりコロニー近傍で捕捉されるIgGを分泌する。結果的に生じる免疫複合体の形成は、ClonePix FLコロニーピッカー（Molecular Devices）により可視化した場合に、蛍光「ハロー」として細胞周囲に認めることができる。次に、これらのハローを伴うコロニーを96ウェルマイクロタイタープレートに採取する。培養3～5日後、採取したコロニーの上清を回収し、ヒトFR α 結合についてスクリーニングした。 20

【0403】

マウスIgGのDNA配列決定

メッセンジャーRNA（mRNA）をハイブリドーマ細胞から磁気オリゴ（dT）粒子を用いて抽出し、cDNAに逆転写した。全てのマウスIgGサブクラスに特異的なポリC及び定常領域VH又はVLプライマーを用いて、PCR増幅を実施した。PCRアンプリコンの配列を、サンガーシーケンスにより決定した。 30

【0404】

マウスIgGのPhynexus精製

細胞を24ウェルプレートで増殖させ、10日後、上清を96ウェルマスターブロックに移し、全てのサブクラスのマウスIgG（IgG1、IgG2a、IgG2b及びIgG3）を、Perkin Elmer Minitrackを用いてProPlus樹脂（Phynexus）上の過成長細胞培養上清から精製した。捕捉したマウスIgGを、100mM HEPES、140mM NaCl pH3.0で溶出させ、次いで、等体積の200mM HEPES pH8.0で中和させた。精製したIgGを、UV-Star 384ウェルプレート内で280nmでの吸光度読み取りを用いて定量化した。 40

【0405】

マウスIgGの再フォーマット

マウスハイブリドーマIgGクローンを分子的に再フォーマットして、基本的にPersic et al., Gene 187:9-18, 1997に記載されているように、各ハイブリドーマについて、マウスVH及びVLDメイン並びに関連するマウスIgG定常ドメインを発現するコンストラクトを生成した。マウス重鎖定常ドメイン及び調節エレメントを含有する関連するベクターにVHドメインをクローニングして、哺乳動物細胞で全IgG1重鎖を発現させた。同様に、適切なマウス軽鎖（ラムダ又はカッパ）定常ドメイン及び調節エレメントの発現用ベクターにVLDドメインをクローニングして、哺乳動物細胞に全IgG軽鎖を発現させた。IgGを得るために、哺乳動物懸濁CHO細胞を、 50

重鎖 Ig G ベクター及び軽鎖 Ig G ベクターで一過性でトランスフェクトした。Ig G を発現させて、培地に分泌させた。Mab Select SuRe クロマトグラフィーカラム (GE Healthcare Lifesciences カタログ番号 11003493 (1ml カラム用); 11003495 (5ml カラム用))、及び GE Healthcare Lifesciences 製の Akta Xpress (商標) 精製システムを用いて、清澄化した上清から Ig G を精製した。溶出した物質を、PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare Lifesciences; カタログ番号; 17085101) を用いて、PBS 中に緩衝液交換した。Ig G の濃度を、Ig G のアミノ酸配列に基づく吸光係数を使用して、分光光度法で測定し (Pace et al., Protein Sci. 4: 2411-2423, 1995)、精製した Ig G を、SDS-PAGE 及び HPLC 分析を用いて純度について分析した。

10

【0406】

結果

免疫後の血清抗 FR α Ig G 力価

mAb の発見には、ファージディスプレイ、免疫化、及び結合プロファイルの使用など、様々なアプローチが利用可能である (FR α への葉酸結合と競合する mAb を同定することを含む)。ここでは、二重アプローチを用いて、免疫化を通して抗 FR α 抗体を作製した。第 1 の経路は、Ig 遺伝子座に完全なヒト VH 及び Vk ドメインを含むヒトトランスジェニックマウス (すなわち、De1-1) の免疫化を含んだ。これにより、確実に、多様な mAb が生成され、さらに完全にヒト型となり、ヒト化を必要とせずに開発の準備が整った。第 2 の経路は、mAb のヒト化を必要とする非トランスジェニックマウス (すなわち、CD-1) の免疫化を含んだ。

20

【0407】

免疫化プロトコルの -4 日目 (前採血)、13 日目 (採血 1) 及び 20 日目 (採血 2) に、血清試料を全てのマウスから採取し、抗 FR α 特異的抗体の存在について試験した。全てのマウスが免疫化に応答し、抗 FR α 特異的抗体を生成した。

【0408】

ハイブリドーマの作製

合計 10510 個のハイブリドーマクローンが作製され、2586 個が Ig G 分泌コロニーとして同定された。Ig G 分泌コロニーを 96 ウェルマイクロタイタープレートに採取した。培養 3~5 日後、採取したコロニーの上清を回収し、ヒト FR α 結合についてスクリーニングした。生成されたリード抗体 (実施例 2 を参照) は全て、De1-1 トランスジェニックマウスから得られた。

30

【0409】

実施例 2 - 抗 FR α 抗体の種交差反応性

目的

生成された抗体の特性評価を、標的への結合強度、オルソログ特異性及びパラログ特異性について行った。

【0410】

材料及び方法

40

アッセイ用抗原の作製

タンパク質が由来する種、コンストラクトがクローニングされたベクター、タンパク質に融合されたシグナルペプチド及びエピトプタグを示す。表 10 は、各インサートの配列をさらに示す。いずれの場合も、葉酸受容体の可溶性領域に対応する配列を、N 末端 CD33 リーダー及び C 末端 Avi 及び His 6 タグを用いてさらにクローニングした。GP I アンカリングに関与する配列を除去し、可溶性コンストラクトを得た。

【0411】

50

【表 2 5】

表 9: クローン化インサートの概要

クローン化インサート	ベクター	シグナルペプチド	エピトープタグ
ヒト FR α	pDEST12.2 OriP	CD33	C末端Avi-His6
カニクイザル FR α	pDEST12.2 OriP	CD33	C末端Avi-His6
マウス FR α	pDEST12.2 OriP	CD33	C末端Avi-His6
ヒト FR β	pDEST12.2 OriP	CD33	C末端Avi-His6
ヒト FR γ	pDEST12.2 OriP	CD33	C末端Avi-His6

10

【0 4 1 2】

【表 2 6】

表 10: インサートの配列

配列番号	配列内容の説明	配列
配列番号138	ヒ ト FR α ECD-Avi- His	RIAWARTELNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKRNACC STNTSQEAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYE CSPNLGPWIIQQVDQSWRKERVNLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSY TCKSNWHKGWNTSGFNKCAVGAAACQPFHFYFPTPTVLCNEI WTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMS GGGGSGLNDFEFAQKIEWHEAAHHHEHHHHHH
配列番号139	ヒ ト FR β ECD-Avi- His	QDRTDLLNVCMDAKHEKTKPGPEDKLHDQCS PWKKNACCTAS TSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPACKRHFIQDTCLYECS NLGPWIIQQVNVQSWRKERFLDVPLCKEDCQRWWEDCHTSHTCK SNWHRGWDWTSGVNKCPAGALCRTFESYFPTPAALCEGLWSH SYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMHGGG GSGLNDFEFAQKIEWHEAAHHHEHHHHHH

20

30

【0 4 1 3】

40

50

【表 27】

配列番号140	ヒ ト FR γ ECD-Avi- His	SARARTDLLNVCMAKHHKTQPSPEDELYGQCSPWKKNACCT ASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPTCKRHFIQDSCLYEC SPNLGPWIRQVNQSWRKERILNVPLCKEDCERWWEDCRTSYT CKSNWHKCNWWTSCINECPACALCSTFESYFPTPAALCEGLW SHSFKVSNYSRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVAKFYAAAMNA GAPSRGIIDSGGGGGLNDIFEAQKIEWHEAAMHHHHHHHHHH
配列番号141	カニケイザルFR α ECD-Avi- His	RTARARTELLNVCMAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKNACC STNTSQEAHKDVSILYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYE CSPNLGPWIIQQVDQSWRKERVNLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSY TCKSNWHKGNWWTSGFNKCPVGAACQPFHYFPTPTVLCNEI WTYSYKVSNIYRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMS GLNDIFEAQKIEWHEAAHHHHHHHHHH
配列番号142	マウス FR α ECD-Avi- His	TRARTELLNVCMDAKHHKEKPGPEDNLHDQCSPWKTNSCCST NTSQEAHKDISILYRFNWNHCGTMTSECKRHFIQDTCLYECS PNLGPWIIQQVDQSWRKERILDVPLCKEDCQWWEDCQSSFTC KSNWHKGNWSSGHNECPVGASCHPFTFYFPTSAALCEEIWS HSYKLSNIYRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAEAMSGG GGSGGLNDIFEAQKIEWHEAAHHHHHHHHHH

10

20

【0414】

表10中の全てのタンパク質を、ヒトFR α について実施例1で論じた方法を用いて発現させ、精製した。

【0415】

HTRFアッセイ

HTRFアッセイは、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）（Life Technologies、14190）、0.1v/v%ウシ血清アルブミン（BSA）（Sigma、A9576）、及び0.4Mフッ化カリウム（VWR International、26820）を含有するアッセイ緩衝液中、384ウェル白色シャローウェル非結合プレート（Corning、4513）で行った。590nm及び665nmでの時間分解蛍光を、示されたインキュベーション期間の後、Envision（PerkinElmer）プレートリーダーで320nmでの励起後に測定した。（665nm発光/590nm発光） $\times 10,000$ の比の値を使用して、以下の式に従ってデルタF%を計算した。

【数1】

$$\text{デルタF\%} = \left(\frac{\text{試料比} - \text{陰性対照比}}{\text{陰性対照比}} \right) \times 100$$

30

40

【0416】

陰性対照比は、非特異的結合（NSB）対照ウェルから得た。曲線は、GraphPad Prismソフトウェアを使用して、4パラメータロジスティック曲線フィッティング式により分析した。

【0417】

HTRF抗原結合アッセイ

ハイブリドーマ細胞由来のマウスIgGを含有する上清を、0.5nMストレプトアビ

50

ジーンクリプテート (C i s B i o、610SAKLB)、抗マウスIgG AF647 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h、115-605-164)、及び1 nMビオチン化ヒトFR α 、カニクイザルFR α 、マウスFR α 、ヒトFR β 又はヒトFR γ とともに、25%の最終アッセイ希釈で、室温で4時間インキュベートして、10 μ lの最終アッセイ容量を得、その後、蛍光を測定した。

【0418】

ラットFR α の抗原結合アッセイ

傾斜底黒色384ウェルプレート (F o r t e B i o、18-5076) を用いて、PBS、0.1 v/v%のBSA (S i g m a、A9576)、0.01 v/v%のTwee-20 (S i g m a、P9416) (pH7.4) を含有するアッセイ緩衝液中、25℃にて、Octet RED384 (F o r t e B i o) で種結合アッセイを行った。アッセイは、プロテインA又は抗ヒトキャプチャーバイオセンサー (AHC) (F o r t e B i o、18-5089) を用い、製造業者の説明書に従って設定した。10 μ g/mlの抗ラットFR α IgG (S i n o B i o l o g i c a l、81073-RP01) をプロテインAバイオセンサー (F o r t e B i o、NC9490476) 上にコーティングし、10 μ g/mlの試験ヒトIgGを抗ヒトキャプチャーバイオセンサー (AHC) (F o r t e B i o、18-5089) 上に180秒間ロードした。結合を、500 nMのヒトFR α (社内) 又は500 nMのラットFR α (S i n o B i o l o g i c a l、81073-R08H) をロードしたバイオセンサーをインキュベートすることによって測定した。解離は、アッセイ緩衝液への移入後に測定した。データを、Octet データ分析ソフトウェアバージョン7.0を用いて分析した。

【0419】

結果

2586個のハイブリドーマの上清を、HTRFアッセイフォーマットで、ヒトFR α 、カニクイザルFR α 、マウスFR α 、ヒトFR β 又はヒトFR γ への結合について試験した。この実験は、カニクイザルFR α と交差反応する抗体を分離するために行われた一方、パラログのFR β 及びFR γ への結合が観察されないことを確認した。パラログ及びオルソログに対するヒト葉酸受容体の配列類似性を決定するために、Clustal Omega v1.2.2アルゴリズムを用いて複数の配列アライメントを決定した。パラログ (表11) 及びオルソログ (表12) に対するヒトFR α の配列同一性を以下に示す。

【0420】

【表28】

表 11: FR α ポリペプチドに対する成熟ヒトFR β 及びFR γ の配列同一性の割合

	FR γ _ヒト	FR β _ヒト
FR α _ヒト	77.8%	78.9%
FR γ _ヒト	N/A	87.7%

N/A - 該当なし

【0421】

10

20

30

40

50

【表 2 9】

表 12:成熟ヒト、カニクイザル、マウス及びラットFR α の配列同一性の割合

	FR α _ヒト	FR α _マウス	FR α _ラット
FR α _カニクイザル	97.6%	84.3%	85.7%
FR α _ヒト	N/A	83.3%	84.8%
FR α _マウス	N/A	N/A	94.8%

N/A – 該当なし

10

【0 4 2 2】

結合体は、> 3 0 デルタ F % のアッセイシグナルを有する I g G として定義した。合計 1 2 9 の I g G がヒト及びカニクイザルの F R α にのみ結合を示し、9 つの I g G がヒト、カニクイザル及びマウス F R α にのみ結合を示し、さらに 3 0 の I g G がヒト、カニクイザル又はマウスの F R α にのみ結合を示した。6 つのリード I g G のデータを表 1 3 に示す。

【0 4 2 3】

【表 3 0】

表 13: 6 個のリード I g G の HTRF I g G 結合アッセイ

I g G 参照	HTRF I g G 結合アッセイ (デルタ F %)				
	ヒト FR α	カニクイザル FR α	マウス FR α	ヒト FR β	ヒト FR γ
AB1370026	270.58	213.68	1.63	-0.38	1.31
AB1370035	225.19	141.47	-5.22	-3.26	9.2
AB1370049	187.81	94.06	-9.23	-8.11	-0.75
AB1370083	139.98	85.16	-3.65	3.81	-2.92
AB1370095	126.25	85.33	-5.66	-5.87	-1.17
AB1370117	79.81	67.23	-3.41	-1.07	-1.77

20

30

【0 4 2 4】

ハイブリドーマ上清スクリーニングにおいて同定された 1 6 8 のハイブリドーマ I g G を、P h y n e x u s 精製 I g G とした。これらを、抗原結合アッセイにおいて、I g G の 4 希釈で試験した。1 1 5 の I g G が、ヒト及びカニクイザル F R α 交差反応性があり、ヒト F R β 及びヒト F R γ に結合しない I g G として同定された。6 つのリード I g G のデータを図 1 A ~ 1 F に示す。

【0 4 2 5】

さらに、ラット F R α 抗原結合アッセイでは、6 つのリード I g G は、ヒト F R α への結合をまた示したが、ラット F R α への結合は示さなかった。

40

【0 4 2 6】

全体として、広範囲つハイスループットな抗体生成及びスクリーニングキャンペーンによって、様々な異なる抗 F R α I g G 抗体が生成されたことが実証された。

【0 4 2 7】

実施例 3 – ハイスループット内部移行アッセイ

目的

生成された抗体を、それらの内部移行の速度について特性評価した。

【0 4 2 8】

材料及び方法

50

ハイブリドーマアウトプットからのPhyNexus精製IgG試料を、内部移行アッセイにおいて評価した。KB細胞の凍結ストックを、IgG試料を添加する前に一晩プレATINGした。アッセイは、固定取得方法を用いて実行され、固定する前に、2.5時間のインキュベーションを行った。アッセイは、pHrodo Green標識検出試薬及びCell Mask Red (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。

【0429】

1日目

KB細胞の凍結バイアルを解凍し、培地で希釈し、遠心分離し、計数前に新鮮な培地に再懸濁した。細胞をMEM+NEAA+10%FCS (Thermo Fisher Scientific)中、10,000細胞／ウェルでプレATINGし、調製したプレートを加湿インキュベーターにおいて37℃、5%CO₂で一晩インキュベートした。

【0430】

2日目

抗体及び二次検出試薬を調製し、室温で30分間プレインキュベートした。培地を細胞から除去し、予め混合した抗体及び検出試薬を添加した。プレートを、37℃で2.5時間インキュベートした。インキュベーション後、30μl／ウェルの7.2%ホルムアルデヒド (Thermo Fisher Scientific) +Hoechst (Thermo Fisher Scientific) 1:5000希釈溶液を添加して、3.7%ホルムアルデヒド固定液及び1:10000希釈核染色液を得た。プレートを室温で20分間インキュベートし、次いで、1×HBSS (Thermo Fisher Scientific)で洗浄した後、30μl／ウェルのcell mask red (0.1% Triton X-100 (Merck)に1:5000に希釈)を添加した。プレートを暗所において室温で20分間インキュベートし、HBSSで2回洗浄し、Opera High Content Imagingシステムで画像化した (Opera Acquisitionのパラメータについては表14を参照)。

【0431】

【表31】

表 14: Opera Acquisitionのパラメータ

	レーザー	出力	カメラ	フィルタ	ピン	時間 (ms)	レンズ
曝露1 (Hoechst)	405	3100	1	450/50	2	80	20xA
曝露1 (Cell Mask Red)	640	3440	3	600/40	2	80	20xA
曝露2 (pHrodo Green)	488	10400	2	540/75	2	2000	20xA

【0432】

結果

ハイスループット内部移行アッセイを実行して、KB細胞への抗体内部移行速度をアッセイした。PhyNexus精製抗体を標識し、KB細胞に加え、2.5時間の経過後に細胞を固定した。Columbusを用いて画像解析を行い、SpotfireのHigh Content Profiler内でアウトプットを解析し、得られた画像データのマルチパラメータ分析と、取り込み速度の向上を示すmAbを含む「ヒットリスト」の作成を可能にした (図2)。6つのリード抗体は全て、陽性対照試料によって決定されたカットオフを上回る内部移行を示した。

【0433】

実施例4：生成された抗FRα抗体のエピトープマッピング

目的

この実験の目的は、生成された抗FR α 抗体、特に6つの例示的な抗体のエピトープビン
 ングをすることであった。

【0434】

材料及び方法

3つのベンチマーク抗FR α IgGを、マイクロスケールDyLight 650抗
 体標識キット (Thermo Scientific、84536) を使用して、製造業
 者の説明書に従って、均一系時間分解蛍光 (HTRF) アッセイで使用するために標識し
 た (HTRFアッセイの一般的設定については実施例2を参照)。

【0435】

試験IgG、1 nMのストレプトアビジンクリプテート、ビオチン化ヒトFR α 及びD
 yLight 650標識IgGを滴定して、HTRFエピトープ競合アッセイを、アッ
 セイ容量10 μ lに設定した。比較抗体1及び比較抗体2アッセイのために、0.5 nM
 のビオチン化ヒトFR α 及び0.5 nMのDyLight 650標識比較抗体1又は比較
 抗体2を使用した。比較抗体3アッセイのために、1.25 nMのビオチン化ヒトFR α
 及び1.25 nMのDyLight 650標識比較抗体3を使用した。蛍光測定の前に、
 アッセイプレートを室温で3～4時間インキュベートした。

【0436】

結果

115のヒト／カニクイザル葉酸受容体特異的ハイブリドーマIgGを、3つのHTR
 Fエピトープ競合アッセイにおいてプロファイリングして、エピトープ多様性を決定した
 。8つのIgGは全てのアッセイにおいて阻害され、比較体1及び比較体2アッセイにお
 いて41、比較抗体2及び比較抗体3アッセイにおいて39、比較抗体1及び比較抗体3
 アッセイにおいて12、比較抗体1アッセイにおいて4つのみ、比較体3アッセイにおい
 て6つのみ、及び5つのIgGはいずれのアッセイにおいても阻害されなかった。

【0437】

6つの例示的な抗体をヒトIgG1として再フォーマットし、発現させ、精製し、HTR
 Fエピトープ競合アッセイにおいてプロファイリングして、効力を確認した。特に、全
 てのリード例示的な抗体が、比較抗体2競合アッセイにおいて阻害することができた。AB
 1370117及びAB1370035は、3つ全てのエピトープ競合アッセイにおいて
 阻害した。AB1370026、AB1370083及びAB1370095は、比較抗
 体1及び比較抗体2のエピトープ競合アッセイにおいてのみ阻害した。AB137004
 9は、比較抗体2及び比較抗体3の競合アッセイにおいてのみ阻害した (表15及び図3
 を参照)。

【0438】

【表32】

表 15: HTRFエピトープ競合アッセイにおけるIC₅₀プロファイリングの概要

抗体	HTRFエピトープ競合アッセイ、幾何平均 IC ₅₀ (M)、n>2		
	比較体1 IgG	比較体2 IgG	比較体3 IgG
AB1370026 hIgG1	3.20E-11	1.77E-10	阻害せず
AB1370035 hIgG1	阻害するが、 非シグモイド性	1.46E-09	2.85E-10
AB1370049 hIgG1	阻害せず	3.37E-08	6.35E-09
AB1370083 hIgG1	2.96E-11	8.06E-11	阻害せず
AB1370095 hIgG1	3.63E-10	4.15E-09	阻害せず
AB1370117 hIgG1	阻害するが、 非シグモイド性	9.33E-09	1.83E-09

【0439】

結論

6つの抗体をエピトープ競合アッセイによってプロファイリングした。様々な挙動及びエピトープの多様性が観察され、いくつかの分子は3つの比較抗体全てと競合し、他の分子は、サブセットのみと競合した。AB1370049は比較抗体1との競合を示さず、比較抗体2と最も弱い競合を示したが、比較抗体3とは競合した。

【0440】

実施例5－生成した抗FR α 抗体の抗原結合親和性

目的

表面プラズモン共鳴分析を用いて、ヒトFR α 及びカニクイザルFR α に対する、生成された抗体のパネル、特に6つの例示的な抗体の結合反応速度及び平衡解離定数を決定すること。

10

【0441】

材料及び方法

ヒト及びカニクイザルFR α タンパク質に対する抗体親和性を、Biacore T200表面プラズモン共鳴システム(Cytiva)を用いて25℃で測定した。プロテインAを、10mM酢酸ナトリウム(pH4.0)中50 μ g/mlの濃度で標準的なアミンカップリング技術を用いてCM5チップ表面に共有結合的に固定化した。FR α ECD結合を可能にするために、HBS-EP+緩衝液(pH7.4)中、10 μ l/分でプロテインA表面に抗体を捕捉した。FR α ECDをHBS-EP+緩衝液pH7.4で段階希釈し(0.4nM~100nMヒトFR α ECD; 0.8nM~200nMカニクイザルFR α ECD; 30nM~4000nMマウスFR α ECD及びラットFR α ECD)、50 μ l/分でチップ上に流し、2分間結合し、8分間解離した。チップ表面を3M MgCl₂のパルスで完全に再生して、任意の結合FR α ECDと共に捕捉抗体を除去した。同じ条件で緩衝液のみの注入を複数回行って、最終的なセンサーグラムセットのダブルリファレンスの差し引きを可能にし、Biacore T200解析ソフトウェアを用いて分析して、平衡解離定数を導出した。

20

【0442】

結果

ヒト及びカニクイザルFR α タンパク質に対する抗体パネルの抗体親和性をSPRによって測定した。全ての抗体がヒトタンパク質及びカニクイザルタンパク質の両方に結合した。ヒトFR α に対する親和性は1~16nMの範囲であり、カニクイザルFR α に対する親和性は1~37nMであった。6つの例示的な抗体の動態学的結合パラメータを下の表16にまとめる。

30

【0443】

40

50

【表 3 3】

表 16: 抗体親和性データの概要

抗体	タンパク質	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
AB1370026	ヒト FR α	2.79E+05	3.54E-04	1.3
	カニクイザル FR α	1.95E+05	3.42E-04	1.8
AB1370035	ヒト FR α	5.68E+05	5.27E-04	0.93
	カニクイザル FR α	4.75E+05	5.08E-04	1.1
AB1370049	ヒト FR α	2.05E+05	3.22E-03	15.7
	カニクイザル FR α	2.15E+05	7.94E-03	36.9
AB1370083	ヒト FR α	1.45E+05	1.35E-04	0.93
	カニクイザル FR α	1.01E+05	1.60E-04	1.56
AB1370095	ヒト FR α	9.57E+04	1.29E-03	13.5
	カニクイザル FR α	9.58E+04	1.83E-03	19.1
AB1370117	ヒト FR α	2.93E+05	7.62E-04	2.6
	カニクイザル FR α	3.64E+05	1.87E-03	5.1

10

20

【0 4 4 4】

結論

6つの抗体は全て、低 nM 範囲の解離定数を有し、全ての場合で、カニクイザル FR α への結合に対する親和性は、ヒト FR α への結合に対する親和性の 2.5 倍以内であった。したがって、6つの例示的な抗体は全て、親和性の観点から、治療薬としてさらなる開発を行うのに好適であると思われる。

【0 4 4 5】

実施例 6－生成された抗 FR α 抗体の物理化学的特性

目的

開発可能であり、製造要件に合わせて整列された治療用抗体を生成するには、抗体の物理化学的特性を徹底的に評価する必要がある。この実験では、生成された抗体のパネルを、それらの発現力価、安定性、及び可逆的自己会合への傾向について評価した。

30

【0 4 4 6】

材料及び方法

疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) HPLC

UHPLC-HIC 分析は、Sepax Proteomix HIC Butyl- NP5 5 μ M 非多孔性 4.6 $\times$ 35 mm カラムを使用し、25 mM リン酸ナトリウム (pH 7.40) 緩衝液中の 1.5 M 硫酸アンモニウムで 1:1 希釈として、各リード mAb の約 1 mg/ml 試料上で、25 mM リン酸ナトリウム (pH 7.40) 中の 1.5 M ~ 0 M 硫酸アンモニウム及び 0 ~ 20 % アセトニトリルの勾配で溶出する Shimadzu Prominence システムで実施した。種の疎水性が高いほど、遅く溶出され、したがって保持時間が長くなる。

40

【0 4 4 7】

親和性捕捉自己相互作用ナノ粒子分光法 (AC-SINS)

捕捉抗体 (ヤギ抗ヒト IgG Fc γ 断片特異的、Jackson ImmunoResearch) を結合緩衝液 (20 mM 酢酸カリウム、pH 4.3) に緩衝液交換し、捕捉ナノ粒子 (クエン酸安定化 20 nm 金ナノ粒子 (OD = 1)、Innova Biosciences) を、0.4 mg/ml の抗体と室温で 1 時間インキュベートすることによって調製した。100 nM PEG 2000 (Merck) と共に室温で 1 時間インキ

50

ュベートし、続いて10倍濃縮することにより、ナノ粒子をブロックした。96ウェルプレート中で全容量120 μ lになるように、12 μ lの捕捉ナノ粒子と、20mMのヒスチジン、120mMのスクロース、80mMのアルギニン、pH6 (HSA) 緩衝液とを含有する溶液中、最終濃度45 μ g/mlで分析用の抗体を調製した。試料を室温で20分間インキュベートし、次いで、50 μ lのアリコートをして384ウェルポリスチレンプレート (Nunc 384ウェル透明ポリスチレンプレート、Thermo Scientific) に移した。試料吸光度をプレートリーダーで測定し、各試料の波長の赤方偏移を、緩衝液のみの対照ウェルのものと比較して決定した。>5nmのシフトに、自己会合のリスクがあるとしてフラグを立てる。

【0448】

バキュロウイルスELISA

抗体のバキュロウイルス粒子への非特異的結合を、Hotzel et al (Hotzel et al 2012 mAbs 4:6、753-760) によって記載されているように、ELISAによってアッセイした。各抗体の調製物を、PBS (Gibco 14190-086) + 0.5% BSA (Sigma A9576) 中100nM又は10nMで作製し、50mM炭酸ナトリウム中の1%バキュロウイルス抽出物 (BVプレート) 又は50mM炭酸ナトリウム (ブランクプレート) を50 μ L/ウェルで、4 $^{\circ}$ Cにて一晩コーティングした96ウェルNunc Maxisorp FプレートでのELISAアッセイで2回繰り返して使用した。PBSで洗浄した後、プレートを300 μ L/ウェルのPBS + 0.5% BSAで、室温にて1時間遮断し、PBSで3回洗浄した。PBS + 0.5% BSA (バックグラウンド) 又は試験抗体希釈物を50 μ L/ウェル添加し、室温で1時間インキュベートした。PBSで3回洗浄した後、PBS + 0.5% BSAで1:5000に希釈した検出抗体 (抗ヒトFc特異的-HRP Sigma A0170) を50 μ L/ウェルで添加した。試料を室温で1時間インキュベートし、プレートをPBSで3回洗浄した。次いで、HRP基質であるTMB (SureBlue Reserve KPL 53-00-03) を50 μ L/ウェルで添加し、色の変化の後、50 μ L/ウェルの0.5M硫酸を添加して反応を停止させた。吸光度を450nmで測定した。各抗体試料の10nM及び100nM濃度での450nm吸光度を平均し、次いで、第2の対照試料のみで割ることによって、BVスコアを計算する。>5のBVスコアは、非特異的結合によるクリアランス増加のリスクを示し得る。

【0449】

加速熱安定性アッセイ

IgGをPBS中、1mg/mlに希釈し、次いで、4 $^{\circ}$ C又は45 $^{\circ}$ Cで2週間インキュベートし、次いで、フィルタースピナラム (Millipore、UFC30HVNB) を用いて濾過した。高性能サイズ排除クロマトグラフィー (HPLSEC) を、TSK gel G3000SWXL; 5 μ M、7.8mm $\times$ 300mmカラムに、70 μ lのIgGを、1ml/分の流量、並びにアイソクラティックランニング緩衝液として0.1M無水リン酸二ナトリウム及び0.1M硫酸ナトリウム (pH6.8) を用いてロードすることによって実施した。より大きな分子は、より小さな分子よりも多量にサイズ排除カラムの細孔から排除されるため、より早く溶出する。モノマーピークよりも早く溶出するピークは、凝集体として記録される。モノマーピークの後に溶出するピーク (緩衝剤関連ピークを除く) は、断片として記録される。並行して、抗体を、効力変化についてのHTRFエпитープ競合アッセイにおいてプロファイリングした。

【0450】

結果

疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) HPLC

より高いHIC保持時間は疎水性の増加に対応し、これは、凝集のリスク及び非特異的取り込みによるクリアランスの増加を示し得る。さらに、より疎水性のmAbはより疎水性のADCをもたらし得、これは、複合化中の凝集、ADCとしての不安定性、及び潜在的により非特異的な正常組織への取り込み、したがって毒性をもたらし得る。

【0451】

生成された抗体のパネルは、HPLC-HICによって約2.0～2.8分の範囲の保持時間を示した。特に、6つの例示的な抗体は、試験した抗体のパネルと比較して、許容可能な低い保持時間を示した（表17を参照）。

【0452】

【表34】

表 17: HIC-HPLCデータの概要

試料	HIC-HPLCによる保持時間(分)
AB1370026 hIgG1	1.96
AB1370035 hIgG1	2.25
AB1370049 hIgG1	2.27
AB1370083 hIgG1	2.27
AB1370095 hIgG1	2.12
AB1370117 hIgG1	2.27

10

【0453】

親和性捕捉自己相互作用ナノ粒子分光法（AC-SINS）

抗体をまた、親和性捕捉自己相互作用ナノ粒子分光法（AC-SINS）によって自己相互作用するそれらの傾向について試験した。この挙動は、可逆的自己会合、凝集、粘度、乳白色及び相分離などの望ましくない特性の基礎となるか、又はそれに関連する。AC-SINSは、抗体をコーティングした金粒子のピーク吸光度（プラズモン波長）の波長をモニターすることによって、タンパク質濃度が高い環境で自己相互作用するタンパク質の傾向を間接的に測定する。例示的な抗体の赤方偏移は、全ての試験抗体で無視できるレベルのHSA緩衝液中の自己相互作用を示したが、一方、陰性及び陽性対照抗体は予想通りに挙動した（図4）。これらの結果は、試験した6つの例示的な抗体の全てで自己会合リスクが低いことを示している。

20

【0454】

バキュロウイルスELISA

インビボでのクリアランス速度の増加を示し得る非特異的結合について試験するために、抗体のバキュロウイルス粒子への結合のレベルをELISAフォーマットでアッセイした。全ての場合において、抗体は無視できるレベルの非特異的結合を示し、その全てがカットオフアッセイ閾値の5未満であった。有利なことに、これはインビボでのクリアランスが不十分となるリスクが低いことを示唆している。

30

【0455】

加速熱安定性アッセイ

6つの例示的な抗体のパネルに対し、HP-SECと、これと並行して効力の変化についてのHTRFエピトープ競合アッセイの両方を行うことによって、それらの熱安定性を評価した（表18）。全ての場合において、効力の変化は2倍未満であり、単量体の減少は3%未満であり、全ての抗体が試験条件下で熱的に安定であったことを示している。

40

【0456】

50

【表 3 5】

表 18:加速安定性試験データの概要

試料	HP SEC % 単量体		MOv19 HTRFエピトープ競合アッセイ、幾何平均IC50 (M)		
	45°C	4°C	45°C	4°C	差の倍数
AB1370026 hIgG1	97.3	100	7.08E-10	7.11E-10	1.00
AB1370035 hIgG1	97.3	100	1.16E-09	9.45E-10	1.23
AB1370049 hIgG1	97.0	100	9.62E-09	1.63E-08	0.59
AB1370083 hIgG1	98.3	99.6	6.65E-11	5.11E-11	1.30
AB1370095 hIgG1	96.6	99.2	4.31E-09	5.07E-09	0.85
AB1370117 hIgG1	97.0	99.4	5.48E-09	3.75E-09	1.46

10

【0 4 5 7】

結論

6つのリードmAbの全てが良好な熱安定性、低い自己会合リスク、無視できる非特異的結合、及び低い疎水性を示し、したがって、全てのリードmAbは許容可能な開発可能性パラメータを示す。

20

【0 4 5 8】

実施例7－生成された抗FR α 抗体のSCIDマウスにおける薬物動態

目的

生成された抗FR α 抗体の単回静脈内投与後の野生型SCIDマウスにおける薬物動態を調べること。

【0 4 5 9】

材料及び方法

野生型SCIDマウス（1群あたりn=3）に、例示的な抗FR α 抗体（5mg/kg）を静脈内（ボーラス）投与した。投与の15分後、4時間後、1、2、3、6、10、14及び21日後に血液試料を採取し、遠心分離して血漿を得、総抗体を分析した。薬物動態パラメータを、Phoenix 64ソフトウェア（Certara）を用いて決定した。

30

【0 4 6 0】

血漿抗体濃度を、ユニバーサルELISA IgGアッセイによって決定した。

【0 4 6 1】

結果

上述した実施例に基づくスクリーニングプロセスによって例示的に示されたにもかかわらず、マウスのこの広いパネル内で幅広いPKプロファイルが観察された。PKスクリーニングにより、望ましくない高クリアランスと短い半減期とを有するリードが除かれた。

40

【0 4 6 2】

試験した抗体のパネルは、約5～25ml/kg/日の範囲のクリアランス、及び約4～20日の範囲の半減期を与えた。試験した抗体の中で、6つの例示的な抗FR α 抗体が、比較的低いクリアランス及び長い半減期を示した。マウスにおける6つの例示的な抗FR α 抗体の薬物動態パラメータを表19に示す。

【0 4 6 3】

50

【表 3 6】

表 19:野生型SCIDマウスにおける例示的抗FR α 抗体(全抗体)の薬物動態パラメータ

リード抗体	C _{max} [μ g/ml]	AUC _{last} [h $\cdot$ μ g/ml]	CL [ml/kg/h]	V _{ss} [ml/kg]	t _{1/2} [h]
AB1370026	91.7	553	5.3	124	16.6
AB1370035	73.2	455	5.6	160	19.5
AB1370049	80.3	528	5.2	135	18.0
AB1370086	86.0	430	8.6	132	11.0
AB1370095	123.2	646	6.6	71	7.8
AB1370117	110.9	762	5.2	71	10.0

C_{max} = 最高血漿中濃度AUC_{last} =最終定量時点までの血漿中濃度-時間曲線下面積

CL =血漿クリアランス

V_{ss} =定常状態における分布容積t_{1/2} =消失相半減期

10

20

【0 4 6 4】

結論

例示的な抗FR α 抗体は、野生型SCIDマウスにおいて様々な薬物動態学的特性を示し、AB1370035はこのモデルにおいて最も長い半減期を示し、AB1370049がそれにすぐ続き、これはまた、AB1370117と並んで最も低いクリアランスを与えた。

【0 4 6 5】

実施例8－hFcRn Tg32マウスにおけるAB1370049の薬物動態

30

目的

AB1370049の単回静脈内投与後のhFcRn Tg32マウスにおける薬物動態を調べること。

【0 4 6 6】

材料及び方法

ヒトFcRn Tg32マウス(1群あたりn=3)に、AB1370049(5mg/kg)を静脈内(ボラス)投与した。投与の15分後、4時間後、1、2、3、6、10、14及び21日後に血液試料を採取し、遠心分離して血漿を得、総抗体を分析した。薬物動態パラメータを、Phoenix 64ソフトウェア(Certara)を用いて決定した。

40

【0 4 6 7】

抗体濃度を、免疫捕捉LC-MS/MSアッセイを用いて測定した。簡単に説明すると、ポリクロール抗ヒト抗体を磁気ビーズに複合化させた。次いで、25 μ lの血漿試料をTBS中に希釈し、磁気ビーズと共にインキュベートした。捕捉後、磁気ビーズを複数回洗浄した後、内部標準の存在下、トリプシンで消化した。酸を添加して、消化をクエンチした。次いで、トリプシン消化した液体内容物のアリコート、LC-MS/MSによる抗体分析のために注入プレートに移した。

【0 4 6 8】

ヒト抗体Fc領域上のシグネチャトリプシンペプチド(VVSVLTVLHQDWLNGK)を使用して、選択されたマトリックス中の総抗体の濃度を計算した。免疫親和性

50

を富化した試料からのトリプシン消化物を、逆相クロマトグラフィー（RPLC）を用いて分離し、続いて、シグネチャーペプチドを多重反応モニタリング（MRM）を用いて検出した。この実験で使用する内部標準は、同位体標識ペプチドである。内部標準に対する分析物のピーク面積比を使用して、ADC参照物質を所望のマトリックス中にスパイクすることによって作成された標準曲線に対して計算した。

【0469】

標準曲線及びQCは、異なるレベルで標的化合物（ADC参照材料）を試料マトリックスと同じマトリックスにスパイクすることによって調製する。定量範囲は100 ng/ml～12,000 ng/mlをカバーし、希釈QCは50倍までの希釈をカバーする。標準曲線を、1/×2の重み付けで、線形回帰を当てはめた。

10

【0470】

結果

hFcRn Tg32マウスにおけるAB1370049の薬物動態パラメータを表20に示す。

【0471】

【表37】

表 20: hFcRn Tg32マウスにおけるAB1370049の薬物動態パラメータ

抗体	C _{max} [μg/ml]	AUC _{last} [H*μg/ml]	CL [ml/kg/H]	V _{ss} [ml/kg]	t _{1/2} [H]
AB1370049	68	584	5.5	107	13.3

20

C_{max} = 最高血漿中濃度

AUC_{last} = 最終定常時点までの血漿中濃度-時間曲線下面積

CL = 血漿クリアランス

V_{ss} = 定常状態における分布容積

t_{1/2} = 消失相半減期

【0472】

結論

AB1370049は、hFcRn Tg32及び野生型SCIDマウスにおいて同様の薬物動態特性を示した。hFcRn Tg32マウスはトランスジェニックマウスモデルであり、マウスFcRnがノックアウトされ、ヒトFcRnがノックインされている。したがって、それは、AB1370049のヒト薬物動態の予測に特に適したモデルを表す。hFcRn Tg32マウス薬物動態に基づく、AB1370049のヒトクリアランスはおそらく低く、半減期は他の臨床的に使用されている抗体と同様であり、したがって、好都合な投薬を可能にすると予想される。

30

【0473】

実施例9－SCIDマウスにおける例示的な抗FRα抗体の内部移行／リソソーム輸送目的

40

FRα陽性KB及びJEG-3細胞へのリードFRα mAbの内部移行を評価すること。

【0474】

材料及び方法

KB及びJeg-3細胞を、cell trace violet（Thermo scientific）で染色し、96ウェルプレートにプレーティングし、一晚インキュベートした。モノクローナル抗体を50 nMのFab-pHast human（ATSBio、Carlsbad）と共にRTでインキュベートした後、プレーティングした細胞に添加した。細胞画像（20×）を撮影し、CellInsight CX7ハイコンテンツスクリーニングプラットフォーム（Thermo Scientific）において

50

、30分毎に最大48時間、蛍光領域を自動的に分析した。

【0475】

結果

試験した全てのリード抗体は、JEG-3細胞において約6～7時間（図5A）で、またKB細胞において5時間（図5B）で、FR α 発現細胞株に急速に内部移行し、飽和状態となった。

【0476】

結論

KB細胞（3700万個のFR α 受容体／細胞）と比較してJEG-3（絨毛癌）細胞表面におけるFR α 発現がより低い（990,000個のFR α 受容体／細胞）にもかかわらず、試験した抗体は両方の細胞型に迅速に内部移行し、ADCフォーマットにおけるそれらの潜在的有用性を実証した。

【0477】

実施例10-DAR8フォーマットのADC生成

目的

リード選択のためのインビトロ及びインビボでの活性評価のためのSG3932ペイロードを有するリードmAbのためのDAR8 ADCを生成すること。

【0478】

材料及び方法

トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP、Pierce）をリン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）（PBS、Gibco）に溶解させた50mM溶液（50モル当量／抗体、16.7マイクロモル、333 μ L）を、抗体（AB1370049リード、AB1370026、AB1370035、AB1370083、AB1370095又はAB1370117；各50mg、333ナノモル）を、PBS及び1mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA、Molecular）を含有する還元緩衝液に溶解させた、最終抗体濃度が2.5mg/mLの20mL溶液に添加した。この還元混合物を、穏やかに（60rpm）振盪しながら、インキュベートしたオービタルシェーカーで、+37℃で2時間（又は、UHPLCで完全な還元が観察されるまで）加熱した。室温まで冷却した後、過剰の還元剤を、15mLのAmicon Ultracell 50kDa MWCOSピンフィルターを使用して、PBS+1mMEDTA中へのピンフィルター遠心分離により除去した。SG3932を、DMSO溶液（12～24モル当量／抗体、2.0～2.3mLDMSO中4.8～9.0マイクロモル）として、18～19mLのこの還元された抗体溶液（37.0～46.9mg、247～313ナノモル）に2.0～2.5mg/mLで添加して、10%（v/v）の最終DMSO濃度とした。この溶液を室温で1～18時間混合し、次いで、N-アセチルシステイン（22.2～45.2マイクロモル、100mMで222～452 μ L）を室温で>30分間添加することによって複合化をクエンチし、滅菌濾過し、次いで、スピン濾過（PBS、続いて20mMヒスチジン+240mMスクロース（pH6.0））によって精製し、15mLのAmicon Ultracell 30kDa MWCOSピンフィルターを使用して濃縮し、滅菌濾過し、分析した。

【0479】

結果

Shimadzu ProminenceシステムにThermo Scientific MAbPac 50mm $\times$ 2.1mmカラムを用い、水及びアセトニトリルの勾配で溶出させ、214nm及び330nm（SG3932に特異的）で、ADCの還元試料をUHPLC-RP分析すると、非複合化軽鎖（L0）、SG3932の単一分子に結合している軽鎖（L1）、非複合化重鎖（H0）、及びSG3932の最大3つの分子に結合している重鎖（H1、H2、H3）の混合物（ここで、主な種はL1及びH3であり、214nmのクロマトグラムピーク積分を用いて以下の式から算出した1抗体あたりSG3932が7.58～7.94分子という薬物抗体比（DAR）に相当する）を示した。

10

20

30

40

50

遊離NACでクエンチされたペイロードは、 $< LOD / LOQ$ であった。AB1370049-SG3932 DAR8の代表的なUHPLC-RPクロマトグラムを図6A～6Bに示すが、これは7.82のDARを実証した。

【数2】

$$DAR = 2 * \left(\frac{L1}{L0 + L1} + \frac{H1 + 2 * (H2) + 3 * (H3)}{H0 + H1 + H2 + H3} \right)$$

【0480】

Shimadzu ProminenceシステムにTosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μ m 4.6 $\times$ 150mmカラム(4 μ m 3.0 $\times$ 20mmガードカラムを有する)を用い、200mMリン酸カリウム(pH6.95)、250mM塩化カリウム及び10%イソプロパノール(v/v)を含有する0.3mL/分の滅菌濾過SEC緩衝液で溶出させ、280nmで、ADCの試料をUHPLC-SEC分析すると、98.5～99.5%の単量体純度を示した。AB1370049-SG3932 DAR8の代表的なUHPLC-SECクロマトグラムを図6Cに示す。

【0481】

Shimadzu ProminenceシステムにSepax Proteomix HIC Butyl-NP5 5 μ M非多孔性4.6 $\times$ 35mmカラムを用い、25mMリン酸ナトリウム(pH7.40)中の1.5M～0Mの硫酸アンモニウム及び0～20%のアセトニトリルの勾配で溶出させ、214nmで、ADC試料をUHPLC-HIC分析すると、2.98～3.11分の保持時間でDAR8種に対応する複雑な単一ピークを示した。AB1370049-SG3932 DAR8の代表的なUHPLC-SECクロマトグラムを図6Dに示す。

【0482】

UV(Nanodrop、Thermo)分析により、5.0～6.0mL中0.92～3.10mg/mLの最終ADC濃度が得られ、得られたADCの質量は11.0～37.0mg(収率23～74%)であった。

【0483】

結論

リード抗体は全て、DAR8複合化に適しており、DARが > 7.5 の高い複合化効率を示し、精製中のDARの損失がなく、製造中の凝集/断片化がなく、 $> 98\%$ の単量体純度を示した。したがって、本発明のADCは、癌細胞上のFR α に結合することによって、非常に高い濃度の細胞毒ペイロードを標的癌細胞に特異的に送達することができる。DAR8 ADCはまた、均質であり、再現性の利点を提供し、製造中のバッチ間変動が制限される。これにより、忍容性を維持しながら、より効力の弱い薬物(TOPOiなど)をより多く標的癌細胞に送達することが可能になる。

【0484】

さらに、生成されるADCの疎水性が比較的低ければ、正常組織による非特異的取り込みがより少なくなり、したがって、ミルベツキシマブソラブタンシン又はIMGN151などの疎水性のより大きい薬物を送達する比較ADCと比較して、忍容性が改善される可能性がある。

【0485】

次いで、例示的なリードADCを、それらの熱安定性及び血清安定性、インビボのマウスPK、並びにインビトロ及びインビボでの有効性についてさらに評価した(以下の実施例を参照)。

【0486】

実施例11-DAR4フォーマットのADC生成

目的

インビトロ及びインビボでの活性評価のため、またリード選択のためのDAR8 ADCと比較するため、SG3932ペイロードを有するリードmAbのためのDAR4 ADCを生成すること。

【0487】

材料及び方法

トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP、Pierce)をリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)(PBS、Gibco)に溶解させた5mM溶液(2.7~2.9モル当量/抗体、416~588ナノモル、83.2~117.7 μ L)を、抗体(AB1370049リード、AB1370026、AB1370035、AB1370083、AB1370095又はAB1370117;各23~30mg、153~200ナノモル)を、PBS及び1mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA、Molecular)を含有する還元緩衝液に溶解させた、最終抗体濃度が2.5mg/mLの9.2~12mL溶液に添加した。この還元混合物を、穏やかに(60rpm)振盪しながら、インキュベートしたオービタルシェーカーで、+37°Cで3時間加熱した。室温まで冷却した後、SG3932をDMSO溶液(7モル当量/抗体、1.02~1.33mL DMSO中2.91~4.12マイクロモル)として、この還元された抗体溶液(23~30mg、153~200ナノモル)に添加して、10%(v/v)の最終DMSO濃度とした。この溶液を室温で17時間混合し、次いで、複合化をN-アセチルシステイン(5.4~7.1マイクロモル、100mMで54~71 μ L)の添加により30分間超、室温にてクエンチし、滅菌濾過し、次いで、Superdex 200PGを充填したGE Healthcare HiLoad(商標)26/600カラムを使用して、2.6mL/分PBSで溶出して、AKTA(商標)Start FPLCで精製した。ADC単量体ピークに対応する画分をプールし、15mLのAmicon Ultracell 30KDa MWCOスピニフィルターを用いて濃縮し、滅菌濾過し、分析した。

【0488】

結果

Shimadzu ProminenceシステムにThermo Scientific MAbPac 50mm $\times$ 2.1mmカラムを用い、水及びアセトニトリルの勾配で溶出させ、214nm及び330nm(SG3932に特異的)で、ADCの還元試料をUHPLC-RP分析すると、非複合化軽鎖(L0)、SG3932の単一分子に結合している軽鎖(L1)、非複合化重鎖(H0)、及びSG3932の最大3つの分子に結合している重鎖(H1、H2、H3)の混合物を示し、これは、実施例10におけるように算出した1抗体あたりSG3932が4.13~4.27分子という薬物抗体比(DAR)に相当した。遊離NACでクエンチされたペイロードは、<LODであった。AB1370049-SG3932 DAR4の代表的なUHPLC-RPクロマトグラムを図7A~7Bに示すが、これは4.24のDARを実証した。

【0489】

Shimadzu ProminenceシステムにTosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μ m 4.6 $\times$ 150mmカラム(4 μ m 3.0 $\times$ 20mmガードカラムを有する)を用い、200mMリン酸カリウム(pH6.95)、250mM塩化カリウム及び10%イソプロパノール(v/v)を含有する0.3mL/分の滅菌濾過SEC緩衝液で溶出させ、280nmで、ADCの試料をUHPLC-SEC分析すると、99.5%超の単量体純度を示した。AB1370049-SG3932 DAR4の代表的なUHPLC-SECクロマトグラムを図7Cに示す。

【0490】

Shimadzu ProminenceシステムにSepax Proteomix HIC Butyl-NP5 5 μ M非多孔性4.6 $\times$ 35mmカラムを使用し、25mMリン酸ナトリウム(pH7.40)中の1.5M~0Mの硫酸アンモニウム及び0~20%のアセトニトリルの勾配で溶出させ、214nmで、ADC試料をUHPLC-HI

C分析すると、約4の平均DARに相当するDAR種の混合物が示された。AB1370049-SG3932 DAR4の代表的なUHPLC-SECクロマトグラムを図7Dに示す。

【0491】

UV (Stunner, Unchained Labs) 分析により、5.0~6.0 ml中3.59~4.06 mg/mlの最終ADC濃度が得られ、得られたADCの質量は18.0~24.0 mg (収率68~79%)であった。

【0492】

結論

リード抗体は全て、確率的DAR4複合化のためのTCEP当量を調整するのに適しており、精製中のDAR損失がなく、製造中の凝集/断片化がなく、>99%の単量体純度及び高収率を示した。

【0493】

次いで、例示的なリードADCを、それらのインビボのマウスPK、並びにインビボでの有効性についてさらに評価した (以下の実施例を参照)。

【0494】

実施例12-例示的なADCのインビトロ血清安定性/脱複合化

目的

様々な血清に対するAB1370049-SG3932 DAR8及び他のリードDAR8 ADCの安定性を決定すること。

【0495】

材料及び方法

ヒト血清のIgG枯渇

PBS中で平衡化したMabSelect SuRe (商標) LXプロテインA樹脂 (42 ml、1 CV) を充填したカラムに、ヒト血清 (100 ml) を2回通過させ、その都度、ヒト血清を回収した。クエン酸緩衝液 (100 mMクエン酸ナトリウム、pH 3.0、210 ml、5 CV) で洗浄することにより、カラムを毎回再生した。

【0496】

血清中のADCのインキュベーション

ADC (1.00 mg/ml、必要に応じてPBSで希釈) を血清 (マウス (ab7486、abcam)、ラット (C13SDZ、BioRad)、IgG枯渇ヒト (DHP-2001、Access Biologicals)、及びカニクイザル (カスタムオーダー、BioIVT)、血清中、ADCを20倍希釈) に添加した。得られた混合物 (1.8 ml) を96ウェルプレート (Sterile Nunc (商標)) に分注 (200 µl) した。プレートをAeraSeal (商標) フィルムで密封し、マイクロプレート蓋 (Nunc (商標)) で覆い、5% CO₂ インキュベーターにおいて37℃でインキュベートした。試料アリコートを経々な時点 (0、1、3、及び7日目) で取り出し、試料を分析前に-80℃で保存した。

【0497】

捕捉樹脂の調製

PureProteome (商標) ストレプトアビジン磁性ビーズ (4.90 ml) をPBS中で洗浄し (5回)、CaptureSelect (商標) ヒトIgG-Fc PKビオチン複合体 (750 µlの1.0 mg/ml溶液) を加えた。混合物をPBS (60 µl、pH 7.4) でさらに希釈した後、エンドオーバーエンドミキサーで混合した (3時間、40 rpm)。残留するCaptureSelectを除去し、ビーズをPBS中で洗浄 (5回) し、PBSで元の体積にし、その後の使用の前に2~8℃で保存した。

【0498】

血清からのADCの捕捉

解凍した血清試料 (各200 µl) をPBS (1試料あたり7.2 µl) で希釈し、PNGaseF (P0704L、NEB) (1試料あたり0.8 µl) で6時間処理した。

一方、KingFisher Flex磁気ビーズハンドリングシステムで、捕捉樹脂（1試料あたり50 μ l）を、SN1緩衝液（1 $\times$ TBS（pH7.4）、0.05%Tween20、0.1%BSA、1試料あたり2 $\times$ 300 μ l）、Pierce（商標）IgG溶出緩衝液（1試料あたり100 μ l）、及び再びSN1緩衝液（1試料あたり3 $\times$ 300 μ l）で連続的に洗浄した。調製した樹脂アリコートと共に試料をインキュベートする（15分）ことによってADC捕捉を行った。次いで、樹脂をPBSで洗浄し（1試料あたり3 $\times$ 300 μ l）、IgG溶出緩衝液中で樹脂をインキュベートすることによってADCを溶出し（25分、1試料あたり50 μ l）、溶出したADC溶液をMultiScreenHTS HVフィルタプレート（0.45 μ m、透明、非滅菌）を用いて濾過した。

10

【0499】

還元混合物のマスターミックス（1.0Mリン酸ナトリウム（pH6.0）、150mMホウ酸ナトリウム（pH8.4）、1.0M DTT、及びLC-MSグレードの水を15:20:6:10の比で混合）を使用して、試料を37 $^{\circ}$ Cで15分間還元した（1試料あたり17 μ l）。50v/v%アセトニトリル（水中）中2%のギ酸（1試料あたり40 μ l）を添加することによりクエンチして、LC-MS分析前に、最終状態に調製した試料を得た。

【0500】

LC-MS分析

試料を、Exactive Plus EMR Orbitrap質量分析計（Thermo Scientific）に結合された可変波長検出器（VWD）を備えたUltiMate 3000 HPLCスタックからなるLC-MSシステムでの分析に供した。試料（78 μ l）をMAbPac RPカラム（2.1 $\times$ 50mm、4 μ m、Thermo Scientific、088648）に注入し、セグメント化勾配（0.03%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル（水中）、30秒間で5~25%、次いで2分間で25~60%）で分離した。分析物は、VWDでは280nmで、質量分析計（MS）ではEMR Full MSモードで検出した。MSチューンファイルパラメータ：シースガス流量：35、補助ガス流量：10、スweepガス流量：0、噴霧電圧：3.5kV、キャピラリー温度：300 $^{\circ}$ C、SレンズRFレベル：200、補助ガスヒーター温度：300。MS法のパラメータ：極性：正、ソース内CID：20.0eV、マイクロスクリーン：10、分解能17500、AGC標的：3e6、最大IT：自動、スキャン範囲：1000~4000m/z。

20

30

【0501】

MSデータ解析

質量スペクトルは、Thermo BioPharma Finderを用いてデコンボリューションした。化学的に有意であると考えられたデコンボリューションされたスペクトルのピークからは、それらの高さのパーセンテージ値が抽出され、その結果、各試料のDAR及び有意な化学修飾のパーセンテージを決定することができた。所与の血清中の所与のADCのDAR値を経時的に比較することにより、各試料の脱複合化率の決定が可能になった。

40

【0502】

結果

全てのADCが、全ての血清において低度のペイロード脱複合化を示した（図8A）。これは、少なくともマウス、ラット及びカニクイザルの血清において、有意なレベルのマレイミド加水分解を示す全てのADCによって部分的に支援される（図8B）。マレイミド加水分解は複合化されたペイロードを化学的に安定化させ、それらがADCの抗体から脱複合化されるのを防ぐ。しかし、IgG枯渇ヒト血清では、マレイミド加水分解の発生率は低かった。したがって、マレイミド加水分解によって付与される保護効果の減少は、脱複合化に対するこれらのADCの固有の安定性を示す。

【0503】

50

結論

全てのADCが、全ての血清に対して良好な全体的安定性を示した。

【0504】

実施例13-AB1370049-SG3932 DAR8のインビボにおける安定性／脱複合化

目的

AB1370049-SG3932 DAR8抗体の完全性及び弾頭の脱複合化をインビボ条件下で全カニクイザルDRF試験時間枠にわたって評価すること。

【0505】

材料及び方法

雄のカニクイザル(N=3)に、AB1370049-SG3932 DAR8を2回(3週間隔、すなわち1日目及び22日目)単回用量で静脈内投与した。

【0506】

静脈穿刺により血液試料を採取し、遠心分離して血漿を得た。総抗体及びADCアッセイをLBA-LCMS法によって行った。AB1370049-SG3932 DAR8を、磁気ビーズに複合化したビオチン化抗ヒト抗体によって免疫捕捉した。これはさらに複数の洗浄工程を受ける。次いで、トリプシン消化を行い、総抗体アッセイのために、1アリコートの上清をLCMSに注入した。別のアリコートをパパインでのさらなる酵素的開裂に供し、溶液をADCアッセイに使用した。注入された試料を、逆相クロマトグラフィー(RPLC)を用いて分離し、その後、多重反応モニタリング(MRM)により検出した。内部標準に対する分析物のピーク面積比を使用して、ADC参照物質を所望のマトリックス中にスパイクすることによって作成された標準曲線に対して計算した。

【0507】

総抗体アッセイのために、AB1370049-SG3932 DAR8抗体上の2つのシグネチャトリプシンペプチドを使用して、選択されたマトリックス(重鎖(VVSVLTVLHQDWLNGK)及び軽鎖(DSTYSLSSSTLTLSK))中の総抗体の濃度を計算した。ADCアッセイでは、パパイン放出弾頭を使用して濃度を計算した。同位体標識ペプチド又は弾頭を内部標準として使用した。

【0508】

結果

ADCと総抗体との比率は約1であり、インビボで有意な弾頭の脱複合化がなかったことを示した。

【0509】

結論

インビボ条件下で、AB1370049-SG3932 DAR8 ADCは安定であり、有意な分解は観察されなかった。

【0510】

実施例14-SCIDマウスにおける例示的なDAR8 ADCの薬物動態

目的

6つの例示的な抗FR α DAR8 ADCの単回静脈内投与後の野生型SCIDマウスにおける薬物動態を調べること。

【0511】

材料及び方法

野生型SCIDマウス(1群あたりn=3)に、例示的な抗FR α ADC(5mg/kg)を静脈内(ボーラス)投与した。投与の15分後、4時間後、1、2、3、6、10、14及び21日後に血液試料を採取し、遠心分離して血漿を得、総ADCを分析した。薬物動態パラメータを、Phoenix 64ソフトウェア(Certara)を用いて決定した。

【0512】

総ADC濃度を、免疫捕捉LC-MS/MSアッセイを用いて測定した。簡単に説明す

10

20

30

40

50

ると、ポリクローナル抗ヒト抗体を磁気ビーズに複合化させた。次いで、 $25\mu\text{l}$ の血漿試料をTBS中に希釈し、磁気ビーズと共にインキュベートした。捕捉後、磁気ビーズを複数回洗浄した後、トリプシンで消化した。トリプシン消化した上清のアリコートを、内部標準の存在下、パパインで一晩、酵素消化に供した。消化された試料を、酸の添加でクエンチした後、LC-MS/MSにより分析した。

【0513】

パパイン放出弾頭を使用して、ADCの濃度を計算した。この実験で使用する内部標準は、同位体標識弾頭である。免疫親和性を富化した試料からのパパイン消化物を、逆相クロマトグラフィー（RPLC）を用いて分離し、続いて、放出された弾頭を多重反応モニタリング（MRM）を用いて検出した。内部標準に対する分析物のピーク面積比を使用して、ADC参照物質を所望のマトリックス中にスパイクすることによって作成された標準曲線に対して計算した。

10

【0514】

標準曲線及びQCは、異なるレベルで標的化合物（ADC参照材料）を試料マトリックスと同じマトリックスにスパイクすることによって調製した。齧歯類試験（FcRn及びTg32）では、定量範囲は $100\text{ng/ml}\sim 12,000\text{ng/ml}$ をカバーし、希釈QCは50倍までの希釈をカバーする。標準曲線を、 $1/\times 2$ の重み付けで、線形回帰を当てはめた。

【0515】

結果

20

SCIDマウスにおける例示的な抗FR α DAR8 ADCの薬物動態パラメータを表21に示す。

【0516】

【表38】

表 21: SCIDマウスにおけるDAR8 ADCの薬物動態パラメータ

	C_{max} [$\mu\text{g/ml}$]	AUC_{last} [$\Pi^*\mu\text{g/ml}$]	CL [$\text{ml/kg}/\Pi$]	V_{ss} [ml/kg]	$t_{1/2}$ [H]
ADC 26	96.13	576.51	5.15	125.69	18.46
ADC 35	114.24	578.45	4.17	135.57	23.21
ADC 49	127.48	696.25	4.56	97.63	15.94
ADC 95	100.77	609.16	2.95	139.85	34.13
ADC 117	117.14	654.19	5.98	87.21	11.35
ADC 83	106.97	798.87	3.63	93.63	20.05

30

C_{max} = 最高血漿中濃度

AUC_{last} = 最終定量時点までの血漿中濃度-時間曲線下面積

CL = 血漿クリアランス

V_{ss} = 定常状態における分布容積

40

$t_{1/2}$ = 消失相半減期

【0517】

結論

例示的な抗FR α ADCは、野生型SCIDマウスにおいて様々な薬物動態特性を示した。全ての例示的な抗体のSCIDマウス薬物動態は、SCIDマウスにおいて低い血漿クリアランス及び長い血漿半減期を示した。

【0518】

実施例15 - hFcRn Tg32マウスにおいてAB1370049及びSG3932

50

から形成されたDAR4及びDAR8 ADCの薬物動態
目的

単回静脈内投与後のhFcRn Tg32マウスにおいてAB1370049及びSG3932から形成されたDAR4及びDAR8 ADCの薬物動態を調べること。

【0519】

材料及び方法

ヒトFcRn Tg32マウス（1群あたりn=3）に、AB1370049及びSG3932から形成されたDAR4又はDAR8 ADC（5mg/kg）を静脈内（ボラス）投与した。投与の15分後、4時間後、1、2、3、6、10、14及び21日後に血液試料を採取し、遠心分離して血漿を得、総ADCを分析した。薬物動態パラメータを、Phoenix64ソフトウェア（Certara）を用いて決定した。

10

【0520】

AB1370049-SG3932 DAR4又はAB1370049-SG3932 DAR8の濃度を、免疫捕捉LC-MS/MSアッセイにより測定した。簡単に説明すると、ポリクロナル抗ヒト抗体を磁気ビーズに複合化させた。次いで、25µlの血漿試料をTBS中に希釈し、磁気ビーズと共にインキュベートした。捕捉後、磁気ビーズを複数回洗浄した後、トリプシンで消化した。トリプシン消化した上清のアリコートを、内部標準の存在下、パパインで一晩、酵素消化に供した。消化された試料を、酸の添加でクエンチした後、LC-MS/MSにより分析した。

【0521】

パパイン放出弾頭を用いて、DAR4又はDAR8 ADCの濃度を計算した。この実験で使用する内部標準は、同位体標識弾頭である。免疫親和性を富化した試料からのパパイン消化物を、逆相クロマトグラフィー（RPLC）を用いて分離し、続いて、放出された弾頭を多重反応モニタリング（MRM）を用いて検出した。内部標準に対する分析物のピーク面積比を使用して、DAR4又はDAR8 ADC参照物質を所望のマトリックス中にスパイクすることによって作成された標準曲線に対して計算した。

20

【0522】

標準曲線及びQCは、異なるレベルでDAR4又はDAR8 ADC（ADC参照材料）を試料マトリックスと同じマトリックスにスパイクすることによって調製する。定量範囲は100ng/ml～12,000ng/mlをカバーし、希釈QCは50倍までの希釈をカバーする。標準曲線を、1/x2の重み付けで、線形回帰を当てはめた。

30

【0523】

結果

hFcRn Tg32マウスにおけるDAR4及びDAR8 ADCの薬物動態パラメータを表22に示す。

【0524】

40

50

【表 3 9】

表 22: hFcRn Tg32マウスにおけるDAR4又はDAR8フォーマットのAB1370049-SG3932の薬物動態パラメータ (平均ADC)

ADC	C _{max} [μg/ml]	AUC _{last} [H*μg/ml]	CL [ml/kg/日]	V _{ss} [ml/kg]	t _{1/2} [H]
DAR-4 ADC	121	504	7.2	126	12.2
DAR-8 ADC	110	405	10.4	120	8.0

C_{max} = 最高血漿中濃度

AUC_{last} = 最終定量時点までの血漿中濃度-時間曲線下面積

CL = 血漿クリアランス

V_{ss} = 定常状態における分布容積

t_{1/2} = 消失相半減期

10

【0525】

結論

AB1370049-SG3932 DAR8は、野生型SCIDマウスよりも、hFcRn Tg32においてわずかに高いクリアランス及びより短い半減期を示した。hFcRn Tg32マウスはトランスジェニックマウスモデルであり、マウスFcRnがノックアウトされ、ヒトFcRnがノックインされている。したがって、それは、AB1370049-SG3932 DAR8のヒト薬物動態の予測に適したモデルを表す。hFcRn Tg32マウス薬物動態に基づいて、AB1370049-SG3932 DAR8のヒトクリアランスはおそらく低く、半減期は他の臨床的に使用されているADCと共通しており、好都合な投薬を可能にするであろう。このデータは、本発明の例示的なmAbを用いて得られた薬物動態データと一致する。DAR4 ADCは、hFcRn Tg32マウスにおいてわずかに長い半減期を示し、わずかに低い血漿クリアランスによって駆動される。

20

【0526】

実施例 16 - 例示的なDAR8 ADCのインビトロにおける細胞殺滅活性

目的

様々なレベルのFRαを発現する癌細胞株を用いて、例示的な抗FRα DAR8 ADCの細胞毒性活性を評価すること。

30

【0527】

材料及び方法

様々なレベルのFRα発現を有する癌細胞株をATCC (American Tissue Culture collection) から得た。KB細胞は、HeLa汚染株を有する子宮頸癌細胞株であり、一方、IGROV-1は卵巣癌細胞株であり、JEG-3は、絨毛癌細胞株である。細胞を96ウェルプレートに重複してプレーティングした。24時間インキュベーションした後、細胞を、0~66.66 nM (0~10 μg/ml) の範囲のリードADC又は非標的ADC対照NIP228で6日間処理した。次いで、6日目に、細胞をCellTiter-Glo試薬と共に10分間インキュベートし、96ウェルプレートリーダーを用いて発光を測定した。バックグラウンド発光を、細胞を含まない培地で測定し、実験値から差し引いた。IC50値を、Graph Pad Prismで計算した。

40

【0528】

結果

例示的なADCを、FRαの発現レベルが異なる様々な癌細胞株 (KB (高)、IGROV-1 (高~中) 及びJEG-3 (中)) において試験した。図9A~9Cに示すよ

50

うに、全ての例示的なADCは、試験した3つのFR α 陽性細胞株において細胞毒性活性を示した。ADCリード候補は、高FR α 発現細胞株KB（IC₅₀=0.13~0.23 μ g/ml）及び中程度JEG-3（IC₅₀=0.01~0.14 μ g/ml）においてより強い効力を有した。

【0529】

結論

全てのADCが、これらのインビトロ細胞殺滅アッセイにおいて高い効力を示し、FR α を過剰発現する癌の治療におけるそれらの潜在的有効性を示した。特に、AB1370049-SG3932 DAR8は、3つのFR α 発現細胞株全体に最良の細胞毒性活性を有した。

【0530】

実施例17-AB1370049-SG3932 DAR8のバイスタンダー殺滅目的

FR α 陽性及び陰性KB細胞との共培養実験におけるAB1370049-SG3932 DAR8のバイスタンダー活性を評価すること。

【0531】

材料及び方法

AB1370049-SG3932 DAR8のバイスタンダー活性を評価するために、抗原陽性KB細胞（KB WT）と、GFPタグを有する抗原陰性KB FR α ノックアウト細胞（KB FR α k/o GFP）細胞との混合物を、AB1370049-SG3932 DAR8の存在下でインキュベートした。培養6日後、残留する細胞集団をトリプシンを用いて収集し、フローサイトメトリーによって分析した。抗原陽性及び抗原陰性の生細胞を同定し、計数し、未処理の試料と比較する。

【0532】

結果

AB1370049-SG3932 DAR8は、FR α 発現KB細胞及びFR α 陰性KB細胞の1:1共培養実験において混合された場合、効率的なバイスタンダー殺滅活性を示した（図10）。

【0533】

結論

AB1370049-SG3932 DAR8は、細胞の50%がFR α を発現し、50%が発現しない共培養実験において示されるように、均一にFR α を発現する腫瘍だけでなく、不均一に発現する腫瘍においても、アポトーシスを誘導し、最終的に細胞死を引き起こすことができる。ADCは、FR α 陽性細胞内に取り込まれ、遊離した弾頭が放出され、標的癌細胞を死滅させる。遊離弾頭はまた、FR α を発現しない隣接癌細胞にも拡散し、それらを同様に死滅させることができる。

【0534】

実施例18-細胞由来異種移植モデルにおける例示的ADCのインビボ抗癌活性目的

例示的なADC、特にAB1370049-SG3932 DAR8の抗腫瘍活性を、様々な標的発現レベルを示すヒト癌の様々なCDXモデルで評価すること。

【0535】

材料及び方法

KB異種移植モデルでは、雌のCB17-SCIDマウス（Charles River Laboratories）に、 6×10^6 細胞/マウスを皮下接種した。腫瘍が約150~200 mm³に達したなら、マウスを無作為に複数の群に割り当てた。6つのリードDAR8 ADCのそれぞれを、0.3125 mg/kg、0.625 mg/kg、1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg及び10 mg/kgの単回用量（7日目）で、また0.625 mg/kg、1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg及び20 mg/kgでDAR4 ADCを、対応する用量レベ

10

20

30

40

50

ルのアイソタイプ対照NIP228と共に、静脈内投与した。

【0536】

Caco-2異種移植モデルでは、50%マトリゲル中の 5×10^6 細胞/マウスを、雌の無胸腺ヌードマウス(Harlon Laboratories)に皮下接種した。腫瘍が約 150 mm^3 に達したなら、マウスを無作為に複数の群に割り当てた。AB1370049-SG3932 DAR8を、単回投与(17日目)として、 1.25 mg/kg 、 2.5 mg/kg 、 5 mg/kg で、対応するアイソタイプ対照NIP228を、 1.25 mg/kg 、 5 mg/kg で、並びにFR α -DM4 ADC(「ミルベツキシマブソラプタンシンのバイオシミラー」、DARは約3)を、 1.25 mg/kg 、 2.5 mg/kg 及び 5 mg/kg で静脈内投与し、対応するアイソタイプ対照NIP228を 1.25 mg/kg 及び 5 mg/kg で静脈内投与した。

10

【0537】

IGROV-1異種移植モデルでは、50%マトリゲル中の 1×10^7 細胞/マウスを、雌の重度複合免疫不全マウス(SCID)マウス(Envigo)に皮下接種した。腫瘍が約 285 mm^3 (32日目)に達したとき、マウスを腫瘍体積に基づいて複数の群に無作為に割り当てた。対照の動物には、 $100 \mu\text{l}$ のベヒクルを静注し、一方、処置する動物には、AB1370049-SG3932 DAR8を 1.25 mg/kg 、 2.5 mg/kg 、 5 mg/kg 、 4 ml/kg で、対応するアイソタイプ対照NIP228を 1.25 mg/kg 、 2.5 mg/kg 、 5 mg/kg で、FR α -DM4 ADC(「ミルベツキシマブソラプタンシンのバイオシミラー」、DARは約3)を 5 mg/kg で静脈内投与し、対応するアイソタイプ対照NIP228を 5 mg/kg で静脈内投与した。

20

【0538】

OVCAR3異種移植モデルでは、AB1370049-SG3932 DAR8を、単回投与として、 1.25 mg/kg 、 2.5 mg/kg 、 5 mg/kg 、並びにFR α -DM4 ADC(「ミルベツキシマブソラプタンシンのバイオシミラー」、DARは約3)を 1.25 mg/kg 、 2.5 mg/kg 及び 5 mg/kg で投与した。

【0539】

腫瘍体積はキャリパーで週2回測定した。

【0540】

30

結果

試験した全てのDAR8 ADCでは、 5 mg/kg (KB及びOVCAR-3)及び 1.25 mg/kg (OVCAR-3のみ)で完全な腫瘍退縮が観察された(図11~12)。高~中FR α 発現を示すIGROV-1異種移植では、AB1370049-SG3932 DAR8は 5 mg/kg で活性であり、腫瘍が再増殖を始める前の70日間にわたって部分的な腫瘍退縮を示した(図13)。リードADC AB1370049-SG3932 DAR8は、特にKB及びOVCAR-3異種移植モデルにおいて、他のリード候補と比較してより持続性のある応答を示したので、選択された。

【0541】

KBモデルでは、リードDAR4 ADCも試験した(図14)。試験した全てのADCでは、 5 mg/kg で完全な腫瘍退縮が達成され、DAR4 ADCも良好な有効性を有することが示された。

40

【0542】

AB1370049-SG3932 DAR8はまた、中~中低FR α 発現を有する異種移植モデルOVCAR-3及びCaco-2において、FR α -DM4 ADC(ミルベツキシマブソラプタンシンのバイオシミラー、DARは約3)に対しても試験した(図15A~15B)。AB1370049-SG3932 DAR8は、これらのモデルにおいて、FR α -DM4よりも低い用量濃度(1.25 及び 2.5 mg/kg)でより有効であり、より持続性のある抗腫瘍活性を有した。

【0543】

50

結論

例示的なリードADCは全て、様々な異なる異種移植モデルにおいて、異なる用量で、強い抗腫瘍活性を示した。抗腫瘍活性は、比較分子、FR α -DM4と同等であるか、又はより良好であった。

【0544】

実施例19-Champions及び社内の患者由来異種移植モデルにおけるAB1370049-SG3932 DAR8のインビボ抗癌活性

目的

Low Passage Champions PDXモデル、及び様々な標的発現レベルを表すヒト非小細胞肺癌、卵巣癌、結腸直腸癌及び子宮内膜癌の社内PDXモデルにおけるAB1370049-SG3932 DAR8の抗腫瘍活性を評価すること。

【0545】

材料及び方法

Championsモデル

30のPDXモデル（19のNSCLCモデル、9つの卵巣癌モデル及び2つの子宮内膜癌モデル）を調査のために選択した。6～8週齢の雌の無胸腺ヌード-Foxn1nuストックマウスに腫瘍組織断片を皮下移植した。十分な数のストック動物が1000～1500mm³に達したなら、腫瘍を採取し、断片を試験前の動物に移植した。腫瘍が平均体積150～300mm³に達したなら、動物を腫瘍体積によって5つの群に無作為化した。群1は処置を受けず、群2及び群4はそれぞれ5mg/kg又は2.5mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8を受けた。群3及び群5は、アイソタイプ対照抗体NIP228-SG3932をそれぞれ5mg/kg又は2.5mg/kgで受けた。投与された全ての動物は、0日目に静脈内に1用量を投与された。

【0546】

動物を毎日観察し、週2回、腫瘍寸法及び体重を測定し、記録した。腫瘍体積はデジタルキャリパーで測定し、以下の式を用いて腫瘍体積を計算した：腫瘍体積＝長さ（mm）×幅（mm）²×0.52（式中、長さ及び幅はそれぞれ腫瘍の最長径及び最短径である）。

【0547】

全てのモデルにおける試験エンドポイントは、対照群の平均腫瘍体積が1200mm³に達したとき、又は最大腫瘍体積に達しなかった場合は最大60日に実施した。1200mm³の体積が28日目の前に生じた場合、処置群は28日目まで測定した。試験に動物を無作為に割り付けた後、1モデルあたり3匹の動物から腫瘍試料を収集した。腫瘍を約400～600mm³で収集し、腫瘍の半分を免疫組織化学分析のために処理し、残りの半分をゲノム分析のために処理した。

【0548】

社内モデル

卵巣癌、結腸癌、子宮内膜癌、非小細胞肺癌などの様々な腫瘍モデルを用いて、社内インビボ患者由来異種移植（PDX）有効性試験を実施した。これらのPDXモデルの腫瘍断片を、雌のNOD-SCIDマウス（Envigo）にトロカールを用いて皮下移植した。腫瘍が約150～200mm³に達したなら、マウスを無作為に複数の群に割り当てた。AB1370049-SG3932 DAR8を、単回投与として、2.5mg/kg、5mg/kgで、対応する用量レベルのアイソタイプ対照NIP228と共に、静脈内投与した。腫瘍体積はキャリパーで週2回測定した。腫瘍増殖を、式1/2×L×W²（L＝長さ；W＝幅）を用いて計算した。体重を週2回測定して、処置の忍容性を評価した。

【0549】

抗腫瘍応答の測定

初期腫瘍体積（ITV）からの最終腫瘍体積（FTV）の応答を、初期腫瘍体積から最大の減少をもたらした時点で計算した。抗腫瘍応答を、次式を用いて、各腫瘍担持マウス

について計算した：

$$\text{腫瘍増殖率 (\%)} = [(F T V - I T V) / I T V] \times 100$$

腫瘍増殖率 (%) を、試験群における各動物について計算し、群の応答を、全ての処置マウスの応答中央値として計算した。

【0550】

各処置群について、試験薬剤に対する応答があったか、又は応答がなかったかを決定した。応答基準は R E C I S T 1.1 に基づき、応答は、ベースラインの腫瘍測定値からの腫瘍体積の30%の減少に基づく。

【0551】

結果

51のPDXモデルにおける5.0mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8又はNIP228-SG3932の単回投与によりもたらされた腫瘍増殖率の中央値を表23及び図16Aに要約する。5.0mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8の単回投与後、腫瘍増殖阻害が観察され、モデルの54% (54のうち29) が30%以上のベースラインからの腫瘍体積の縮小を示した。5.0mg/kgのNIP228-SG3932の単回投与では、試験されたモデルの22% (49のうち11) で、腫瘍体積がベースラインから30%以上縮小した。試験した卵巢癌PDXモデルにおいては、5.0mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8により、試験したモデルの78.3% (23のうち18:95%CI 58%~91%) で、腫瘍体積がベースラインから30%以上減少した。5.0mg/kgのNIP228-SG3932では、試験したモデルの43.5% (23のうち10:95%CI 26%~63%) で、腫瘍体積がベースラインから30%以上減少した。

【0552】

10

20

30

40

50

【表 4 0】

表 23: 54 のモデル (30 のChampionsモデル及び 24の社内モデル) のAB1370049-SG3932 DAR8 (5.0 mg/kg) に対するインビボ抗腫瘍応答の評価結果

腫瘍名	癌の適応	AB1370049-SG3932 DAR8 5.0 mg/kg		NIP228-SG3932 5.0 mg/kg	
		腫瘍増殖率の 中央値%	応答	腫瘍増殖率の 中央値%	応答
MEDI-COL-06	結腸直腸	59.0%	NR	-6.4%	NR
MEDI-COL-41	結腸直腸	52.3%	NR	試験せず	試験せず
MEDI-COL-37	結腸直腸	46.3%	NR	54.6%	NR
MEDI-COL-08	結腸直腸	43.4%	NR	試験せず	試験せず
MEDI-COL-29	結腸直腸	5.6%	NR	試験せず	試験せず
MEDI-COL-28	結腸直腸	-0.3%	NR	60.9%	NR
MEDI-COL-43	結腸直腸	-1.6%	NR	試験せず	試験せず
MEDI-COL-14	結腸直腸	-5.9%	NR	試験せず	試験せず
MEDI-COL-05	結腸直腸	-67.3%	R	-59.0%	R
MEDI-COL-01	結腸直腸	-81.7%	R	-1.9%	NR
CTG-1577	子宮内膜	120.8%	NR	27.3%	NR
CTG-2268	子宮内膜	-49.0%	R	76.0%	NR
CTG-0502	NSCLC	438.3%	NR	273.7%	NR
CTG-1014	NSCLC	33.8%	NR	29.6%	NR
CTG-0192	NSCLC	29.6%	NR	31.3%	NR
CTG-2532	NSCLC	19.0%	NR	-1.6%	NR
CTG-2393	NSCLC	6.6%	NR	13.1%	NR
CTG-2579	NSCLC	3.5%	NR	77.1%	NR
CTG-2542	NSCLC	2.8%	NR	43.4%	NR
CTG-2610	NSCLC	-2.4%	NR	15.2%	NR
CTG-1194	NSCLC	-5.3%	NR	26.3%	NR
CTG-2535	NSCLC	-20.1%	NR	25.3%	NR
CTG-2548	NSCLC	-30.5%	R	-1.3%	NR
CTG-0848	NSCLC	-49.4%	R	5.5%	NR

【 0 5 5 3】

10

20

30

40

50

【表 4 1】

CTG-0184	NSCLC	-50.5%	R	-9.6%	NR
CTG-2530	NSCLC	-57.0%	R	-8.6%	NR
CTG-2534	NSCLC	-79.7%	R	-18.8%	NR
CTG-2367	NSCLC	-85.4%	R	-13.8%	NR
CTG-1878	NSCLC	16%	NR	-24%	NR
CTG-2143	NSCLC	-87%	R	6%	NR
CTG-2180	NSCLC	-36%	R	-13%	NR
CTG-0252	卵巣	182.5%	NR	211.9%	NR
OV419	卵巣	100.4%	NR	14.5%	NR
CTG-1423	卵巣	48.4%	NR	71.0%	NR
CTG-0992	卵巣	3.1%	NR	14.1%	NR
CTG-3331	卵巣	-7.5%	NR	-18.1%	NR
OV1110F	卵巣	-59.5%	R	-41.8%	R
OV0452F	卵巣	-61.8%	R	-30.5%	R
CTG-0486	卵巣	-63.7%	R	-32.2%	R
CTG-1678	卵巣	-66.8%	R	40.4%	NR
HOXF-031	卵巣	-70.6%	R	6.6%	NR
MEDI-OVA-05	卵巣	-72.4%	R	52.3%	NR
OV1828F	卵巣	-76.4%	R	-68.6%	R
CTG-3383	卵巣	-77.8%	R	-100.0%	R
CTG-3226	卵巣	-87.3%	R	-68.0%	R
OV2022F	卵巣	-90.4%	R	-57.4%	R
CTG-0956	卵巣	-92.2%	R	-12.9%	NR
CTG-1166	卵巣	-93.6%	R	-39.7%	R
CTG-0711	卵巣	-96.9%	R	-0.5%	NR
MEDI-OVA-13	卵巣	-100.0%	R	-74.0%	R
MEDI-OVA-14	卵巣	-100.0%	R	15.3%	NR
HOXF-050	卵巣	-100.0%	R	24.0%	NR
HOXF-053	卵巣	-100.0%	R	-17.8%	NR
OV0857 CIS	卵巣	-100.0%	R	-76.0%	R

10

20

30

40

【0554】

39のPDXモデルにおける2.5mg/kgのAB1370049-SG3932DAR8又はNIP228-SG3932の単回投与によりもたらされた腫瘍増殖率の中央値を表24及び図16Bに要約する。試験したPDXモデルの49%（39のうち19）において、2.5mg/kgのAB1370049-SG3932DAR8の単回静脈内投与後に、特異的な腫瘍増殖阻害が観察されたが、モデルの51%（39のうち20）は応答しなかった。試験した37のうち2つのモデルのみが、同じ用量の非標的化ADCNIP228-SG3932DAR8に応答した。非標的化ADCの活性は、より低い用量濃度でNIP228-SG3932DAR8（5%）に応答したモデルが少ないの

50

で、用量依存的である。

【 0 5 5 5 】

【 表 4 2 】

表 24: 39のモデル (社内10)のAB1370049-SG3932 DAR8 (2.5 mg/kg)に対するインビガ抗腫瘍応答の評価結果

腫瘍名	癌の適応	AB1370049-SG3932 DAR8 2.5 mg/kg		NIP228-SG3932 2.5 mg/kg	
		腫瘍増殖率の 中央値%	応答	腫瘍増殖率の 中央値%	応答
MEDI-COL-28	結腸	31.0%	NR	82.1%	NR
MEDI-COL-43	結腸	15.3%	NR	20.2%	NR
MEDI-COL-05	結腸	-61.6%	R	28.2%	NR
MEDI-COL-01	結腸	-64.0%	R	42.0%	NR
CTG-1577	子宮内膜	40.4%	NR	79.5%	NR
CTG-2268	子宮内膜	-0.4%	NR	86.0%	NR
CTG-0502	NSCLC	310.9%	NR	279.0%	NR
CTG-2579	NSCLC	72.7%	NR	94.4%	NR
CTG-0192	NSCLC	54.5%	NR	55.3%	NR
CTG-1194	NSCLC	49.3%	NR	73.1%	NR
CTG-1014	NSCLC	33.1%	NR	53.4%	NR
CTG-2532	NSCLC	21.2%	NR	41.4%	NR
CTG-2393	NSCLC	16.7%	NR	-1.8%	NR
CTG-2548	NSCLC	10.6%	NR	-14.8%	NR
CTG-0184	NSCLC	2.1%	NR	26.8%	NR
CTG-2535	NSCLC	-1.3%	NR	19.0%	NR
CTG-2610	NSCLC	-23.0%	NR	8.2%	NR
CTG-2542	NSCLC	-24.4%	NR	41.8%	NR
CTG-2530	NSCLC	-28.2%	NR	19.7%	NR

【 0 5 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 4 3】

CTG-0848	NSCLC	-58.4%	R	8.9%	NR
CTG-2367	NSCLC	-80.9%	R	-23.1%	NR
CTG-2534	NSCLC	-83.0%	R	11.9%	NR
CTG-0252	卵巣	151.3%	NR	288.6%	NR
CTG-1423	卵巣	64.7%	NR	64.6%	NR
CTG-0992	卵巣	3.6%	NR	37.9%	NR
OV1110F	卵巣	-29.5%	R	-8.5%	NR
CTG-3331	卵巣	-34.2%	R	-5.8%	NR
CTG-0956	卵巣	-40.1%	R	-5.6%	NR
OV2022F	卵巣	-54.0%	R	試験せず	試験せず
CTG-3383	卵巣	-57.3%	R	-68.7%	R
CTG-0486	卵巣	-60.4%	R	45.4%	NR
CTG-1678	卵巣	-62.6%	R	45.4%	NR
OV1828F	卵巣	-63.0%	R	-42.2%	R
CTG-3226	卵巣	-70.0%	R	-11.1%	NR
MEDI-OVA-14	卵巣	-76.4%	R	試験せず	試験せず
CTG-1166	卵巣	-77.5%	R	-25.8%	NR
CTG-0711	卵巣	-77.8%	R	-21.1%	NR
OV0857 CIS	卵巣	-83.6%	R	試験せず	試験せず
MEDI-OVA-13	卵巣	-100.0%	R	83.1%	NR

10

20

【0557】

30

AB1370049-SG3932DAR8は、卵巣癌、NSCLC、CRC及び子宮内膜癌の4つの適応症にわたって、多くのモデルにおいて抗腫瘍応答を示した。図17A～17Cは、モデルCTG-0711（卵巣癌）、CTG-2367（NSCLC）及びCTG-2268（子宮内膜）からの代表的な試験を示す。

【0558】

卵巣癌における客観的奏効率は80%、NSCLCは30%、CRCは20%、子宮内膜は50%であった。FR α 発現とAB1370049-SG3932DAR8の活性との間に正の相関があった。

【0559】

結論

40

AB1370049-SG3932DAR8は、高、中及び中～低発現レベルを有するFR α 発現腫瘍において非常に有効である。一般に、AB1370049-SG3932DAR8の抗腫瘍活性とFR α 発現レベルとの間に正の相関がある。

【0560】

実施例20－例示的なADCを用いたインビトロ安全性試験

目的

AB1370049-SG3932DAR8のインビトロ安全性を、赤血球、骨髄及び巨核球の細胞に分化する一次造血幹細胞及び前駆細胞（HSPC）を用いて評価した。

【0561】

材料及び方法

50

凍結保存ヒト骨髄CD34⁺始原細胞 (Lonza) を解凍し、5%のCO₂を含む37℃の加湿インキュベーター内の維持培地 (25 ng/mlのSCF、50 ng/mlのTPO及び50 ng/mlのFlt3-Lヒト組み換えタンパク質 (全てPeproTech) を含有するStemSpan SFEM II (Stem Cell Technologies)) 中で、終夜回復させた。翌日、薬物の存在下で、赤血球細胞の分化 (Preferred Cell Systems、SEC-BFU1-40H)、骨髓性細胞の分化 (Preferred Cell Systems、SEC-GM1-40H) 又は巨核球細胞の分化 (Stem Cell Technologies、09707) に対応可能な細胞増殖培地中に、赤血球細胞及び骨髓性細胞の場合には5000細胞/mlの濃度又は巨核球細胞の場合には15000細胞/mlの濃度で細胞を再懸濁した。

10

細胞 (100 µl) を、例示的なADC (例えば、AB1370049-SG3932 DAR8) 又はNIP228アイソタイプ対照ADC (200、66.66、22.22、7.4、2.47、0.82、0.27、0.091、0.03及び0 µg/ml) を添加した三連の白壁透明底の96ウェル組織培養プレート (Corning) にプレATINGし、5%CO₂を含む37℃の加湿インキュベーター中で5日間培養した。

【0563】

さらに、増殖及び分化した細胞に対する例示的なADCの効果を評価した。そうするために、細胞を5000細胞/mlの濃度で5日間赤血球分化にプレATINGした後、例示的なADC (例えば、AB1370049-SG3932 DAR8)、非FR α 標的化NIP228対照ADC又は非複合化mAb (それぞれNIP228及びAB1370049) を以下の濃度200、66.66、22.22、7.4、2.47、0.82、0.27、0.091、0.03及び0 µg/ml) を添加した三連の白壁透明底の96ウェル組織培養プレートに5日間プレATINGし、5%CO₂を含む37℃の加湿インキュベーター中で5日間培養した。骨髓性細胞分化又は巨核球性細胞分化のために、細胞をそれぞれ10000細胞/ml及び15000細胞/mlで5日間播種した後、沈降させ、それぞれ10000細胞/ml及び30000細胞/mlで新鮮な培地にさらに5日間播種し、その後、骨髓性分化培地又は巨核球に20000細胞/ml及び30000細胞/mlで4日間、AB1370049-SG3932 DAR8 (200、66.66、22.22、7.4、2.47、0.82、0.27、0.091、0.03及び0 µg/ml) の存在下でプレATINGした。

20

30

【0564】

PromegaからのCellTiter-Glo 2.0 (10 µl/ウェルの最適化体積を使用) を用いて生存度を決定し、Envisionプレートリーダー (Perkin Elmer) を用いて発光を検出した。相対的発光シグナルを、GraphPadソフトウェア (Prism) 中で、対照のパーセンテージに対して正規化した (対照は100に等しく、最大細胞死は0に等しい) 。

【0565】

結果

2Dインビトロ培養系を使用して、初代ヒトCD34⁺造血幹細胞及び前駆細胞 (HSPC) における毒性を測定した。HSPCは、化合物の存在下で、赤血球系、巨核球系及び骨髓系 (顆粒球/単球) 系列に沿って増殖及び分化している。阻害効果を、細胞生存率の代用としてATP定量を用いて決定した。この方法を使用して、AB1370049-SG3932 DAR8及びその関連する非FR α 標的化ADC対照によって誘導される毒性を評価して、AB1370049-SG3932 DAR8の任意の悪化した毒性を評価した。

40

【0566】

AB1370049-SG3932 DAR8は、同じペイロードを有する非FR α 標的化ADC分子と同様の毒性レベルを示す (図18A~18F)。この観察は、分化のレベルにかかわらず、任意の系統に分化した初代CD34⁺骨髓細胞において見られる。同

50

じ T O P O i ペイロードに複合化された場合、m A b A B 1 3 7 0 0 9 5、A B 1 3 7 0 0 2 6 及び A B 1 3 7 0 1 1 7 を含む、本発明の他の例示的な A D C でも同様の結果が観察された。A B 1 3 7 0 0 4 9 - S G 3 9 3 2 D A R 8 について記載したのと同様の培養条件で投与した場合、複合化されていない m A b (A B 1 3 7 0 0 4 9) は、H S P C 中の A T P レベルの有意な減少を誘導しなかった。さらに、D A R 4 で同じ T O P O i ペイロードと複合化された A B 1 3 7 0 0 4 9 によって処理された H S P C は、非 F R α 標的化 A D C D A R 4 で処理された H S P C と同等のレベルの毒性を示した。

【 0 5 6 7 】

結論

結果は、非 F R α 標的化 A D C 分子と比較して、標的媒介性毒性も、リード抗体によって駆動される毒性の悪化もないことを示唆している。

10

【 0 5 6 8 】

実施例 2 1 - A B 1 3 7 0 0 4 9 及び A B 1 3 7 0 0 4 9 - S G 3 9 3 2 D A R 8 を用いたインビボ薬物動態試験

目的

カニクイザルにおける A B 1 3 7 0 0 4 9 - S G 3 9 3 2 D A R 8 の血漿薬物動態 (P K) 分析を、ピーク及び全曝露、クリアランス、並びに半減期を含め、行った。P K 試料を、リード A D C 候補及び非複合化抗体の様々な用量レベルにわたってカニクイザルから収集した。非コンパートメント分析を実施して、P K パラメータを推定した。

20

【 0 5 6 9 】

材料及び方法

カニクイザルへの A B 1 3 7 0 0 4 9 及び A B 1 3 7 0 0 4 9 - S G 3 9 3 2 D A R 8 の投与

雄のカニクイザル (N = 3) に、A B 1 3 7 0 0 4 9 を 1 5 m g / k g、又は A B 1 3 7 0 0 4 9 - S G 3 9 3 2 D A R 8 を 1 5 m g / k g 及び 2 5 m g / k g の単回用量で 2 回 (3 週間隔、すなわち 1 日目及び 2 2 日目) 静脈内投与した。

【 0 5 7 0 】

血液試料を、投与前、1 日目の投与後 0 . 0 4、0 . 2 5、1、3、7、1 4 及び 2 1 日目、及び 2 2 日目に、静脈穿刺により採取し、遠心分離して血漿を得、総抗体、総 A D C 及び非複合化弾頭について分析した。薬物動態パラメータを、P h o e n i x 6 4 ソフトウェア (C e r t a r a) を用いて決定した。

30

【 0 5 7 1 】

総抗体及び A D C アッセイ

総 A D C 濃度及び総抗体濃度を、免疫捕捉 L C - M S / M S アッセイを用いて測定した。簡単に説明すると、ポリクロナル抗ヒト抗体を磁気ビーズに複合化させた。次いで、4 0 μ l の血漿試料を T B S 中に希釈し、磁気ビーズと共にインキュベートした。捕捉後、磁気ビーズを複数回洗浄した後、内部標準の存在下でトリプシンで消化した。酸を添加して、消化をクエンチした。次いで、トリプシン消化した液体内容物のアリコート、を、総 A b 分析のために注入プレートに移した。

40

【 0 5 7 2 】

総 A D C アッセイでは、トリプシン消化した上清のアリコートを、内部標準の存在下、パパイんで一晚、酵素消化に供した。消化された試料を、酸の添加でクエンチした後、L C - M S / M S により分析した。パパイン放出弾頭を使用して濃度を計算した。この実験で使用する内部標準は、同位体標識弾頭である。免疫親和性を富化した試料からのパパイン消化物を、逆相クロマトグラフィー (R P L C) を用いて分離し、続いて、放出された弾頭を多重反応モニタリング (M R M) を用いて検出した。内部標準に対する分析物のピーク面積比を使用して、A D C 参照物質を所望のマトリックス中にスパイクすることによって作成された標準曲線に対して計算した。

【 0 5 7 3 】

総 A b アッセイでは、ヒト抗体 F c 領域上のシグネチャトリプシンペプチド (V V S

50

V L T V L H Q D W L N G K) を使用して、選択されたマトリックス中の総抗体の濃度を計算した。免疫親和性を富化した試料からのトリプシン消化物を、逆相クロマトグラフィー (R P L C) を用いて分離し、続いて、シグネチャーペプチドを多重反応モニタリング (M R M) を用いて検出した。この実験で使用する内部標準は、同位体標識ペプチドである。内部標準に対する分析物のピーク面積比を使用して、A D C 参照物質を所望のマトリックス中にスパイクすることによって作成された標準曲線に対して計算した。

【0574】

標準曲線及び Q C は、異なるレベルで標的化合物 (A D C 参照材料) を試料マトリックスと同じマトリックスにスパイクすることによって調製した。N H P 試験では、定量範囲は 1 0 0 ~ 1 5 0 0 0 n g / m l であり、希釈係数は 1 0 0 倍までである。標準曲線を、1 / × 2 の重み付けで、線形回帰に当てはめ、アッセイの正確度及び精度は、L L O Q (2 5 %) を除いて、全てのレベルで 2 0 % 以内である。

10

【0575】

非複合化弾頭アッセイ

非複合化弾頭アッセイを、沈殿手順によって行った。この実験で使用する内部標準は、同位体標識弾頭である。試料を、内部標準にスパイクした高パーセンテージの有機溶媒を含有する緩衝液で沈殿させた。次いで、L C M S に注入するために適切な緩衝液で再構成する前に、上清を窒素下で乾燥させた。次いで、逆相クロマトグラフィー (R P L C) を用いて試料を分離し、続いて、非複合化弾頭を多重反応モニタリング (M R M) を用いて検出した。内部標準に対する分析物のピーク面積比を使用して、A D C 参照物質を所望のマトリックス中にスパイクすることによって作成された標準曲線に対して計算した。

20

【0576】

標準曲線及び Q C は、複合化されていない弾頭を異なるレベルで試料マトリックスと同じマトリックスにスパイクすることによって調製した。N H P 試験では、アッセイの定量範囲は 0 . 0 5 9 ~ 2 9 . 5 n g / m l である。標準曲線を線形回帰に当てはめた。アッセイの正確度及び精度は、L L O Q (2 0 %) を除いて、全てのレベルで 1 5 % 以内である。

【0577】

結果

非コンパートメント解析 (N C A) に基づく平均 P K パラメータを表 2 5 に要約する。非複合化 m A b (A B 1 3 7 0 0 4 9) は、カニクイザルにおいて、1 5 m g / k g で線形 P K を示し、サルにおけるヒト I g G についての文献と一致する半減期及びクリアランスを示した。A D C (A B 1 3 7 0 0 4 9 - S G 3 9 3 2 D A R 8) は、カニクイザルにおいて 1 5 m g / k g 及び 2 5 m g / k g で線形 P K を示し、用量比例曝露 (C m a x 及び A U C) 、同等の C L 及び t _{1/2} が観察された。非複合化抗体の曝露は、8 つの細胞毒性弾頭の添加について予想され得るように、用量適合 A D C と比較してより高く、A D C より遅いクリアランス及び A D C よりも長い半減期を有する。しかし、A D C の P K は、カニクイザルにおいて、十分に A D C の許容基準内にある。

30

【0578】

40

50

【表 4 4】

表 25:サルにおける単回投与後の非複合化mAb及び複合化mAbの平均NCA PK パラメータ

用量 (mg/kg)	非複合化mAb (AB1370049) 15 mg/kg	AB1370049-SG3932 DAR8 15 mg/kg		AB1370049-SG3932 DAR8 25 mg/kg	
分析物	総mAb	総ADC	総mAb	総ADC	総 mAb
C _{max} (ug/ml)	377	396	340	773	609
AUC (ug*日/ml)	2470	1620	1390	3990	2910
t _{1/2} (H)	11.5	6.6	6.4	6.2	6.9
CL _r (ml/kg/H)	4.49* n=1	8.4	9.8	5.8	7.8

10

【0579】

ADCの有意な蓄積は、1回目の投与と2回目の投与との間で見られず、2回目の投与後の曝露の低下もなく、有意な中和抗薬物抗体が形成されなかったことを示した（図19）。AB1370049-SG3932 DAR8（25 mg/kg）試料で測定された総抗体及び総ADCのレベルは、0日目から42日目まで、非複合化mAb（15 mg/kg）試料のレベルと同等であった。AB1370049-SG3932 DAR8（15 mg/kg）試料で測定された総抗体及び総ADCのレベルは比較的低かった。要約すると、総抗体及び総ADCは群内で類似しており、さらに、最小限の遊離弾頭が経過時間にわたって見られた一全てが、限られた脱複合化及び高いインビボ安定性を示した。

20

【0580】

結論

DAR8 ADC（AB1370049-SG3932 DAR8）が、サルにおける用量範囲設定試験に進められ、用量依存的な曝露が見られ、マウスPK試験で以前に示されたように、一貫して長い半減期及び遅いクリアランスを有した。

30

【0581】

特に、AB1370049-SG3932 DAR8は、当該技術分野において最も先進的なFRα ADC（Olga, et al. Cancer Res August 15 2020 (80) (16 Supplement) 2890; DOI: 10.1158/1538-7445.AM2020-2890; 国際公開第2020/223221 A1号パンフレット）よりも長い半減期及びより遅いクリアランスを示した。本発明に記載されるADCの毒性プロファイルは、より忍容性のある治療及び潜在的な臨床的優位性をもたらし得る。

40

【0582】

実施例22－患者由来異種移植モデル、OVO857_CIS及びCTG3226におけるAB1370049-SG3932 DAR8のインビボ抗癌活性

目的

中及び中～低FRα発現を有する卵巣PDXモデルにおける抗FRα-DM4 ADCと比較したAB1370049-SG3932 DAR8の抗腫瘍活性の評価を行うこと。

【0583】

材料及び方法

2つの異なる卵巣PDXモデル、OVO857_CIS（「OVO0875」）及びCTG3226を用いて、社内インビボ患者由来異種移植（PDX）有効性試験を実施した

50

。種マウスとしての6～8週齢の雌のNSG (NOD-SCID IL2R gammaⁿ u^ll) に腫瘍組織断片を皮下移植した。十分な数の種動物が1000～1500mm³に達したとき、腫瘍を採取し、断片を試験動物に移植した。腫瘍体積が約150～250mm³に達したなら、マウスを無作為に異なる群に割り当てた(1群あたりn=3マウス)。1つの群は治療を受けなかった。4つの群に、それぞれ10、5、2.5及び1.25mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8を静脈内投与した。2つの群に、それぞれ5及び2.5mg/kgのFRα-DM4 ADC (「ミルベツキシマブソラブタンシンのバイオシミラー」、DARは約3)を静脈内投与した。投与された全ての動物は、OVO857-CISについては39日目に、CTG3226 PDXモデルについては46日目に、10ml/kgを単回投与として薬物が静脈内投与された。

10

【0584】

腫瘍体積をデジタルキャリパーで計測し、以下の式を用いて腫瘍体積を計算した：腫瘍体積=長さ(mm)×幅(mm)²×0.52(式中、長さ及び幅はそれぞれ腫瘍の最長径及び最短径である)。体重を週2回測定して、処置の忍容性を評価した。

【0585】

各実験群における腫瘍の増殖を、使用した動物の数の平均腫瘍体積(mm³)±SEMとして表した。

【0586】

腫瘍増殖阻害率(TGI)を、各処置群を未処置の対照群と比較することによって計算した。阻害率は、以下の式を用いて群平均から計算した：

20

$TGI(\%) = (C - T) / C \times 100$ 。

ここで、Cは、未処置対照群の平均腫瘍体積であり、Tは、処置群の平均腫瘍体積である。

【0587】

FRα発現に対する腫瘍試料の免疫組織化学的染色

免疫組織化学(IHC)に使用した抗ウサギFRαモノクローナル抗体(クローン[EPR20277])をAbcam(カタログ番号ab221543)から入手し、バックグラウンド減少剤を含む抗体希釈剤(Agilent、カタログ番号S3022)で希釈した。IHCは、Ventana Discovery Ultra装置(Roche Diagnostics、Indianapolis、IN、USA)で行った。ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織の切片を4μmで切断し、StarFrost(登録商標)顕微鏡スライド上に置き、自動染色機にロードした。スライドをUltra Cell Conditioning 1(Roche Diagnostic、カタログ番号05424569001)で抗原賦活化し、阻害剤CM(Roche Diagnostics、カタログ番号05266645001)でブロックした。次いで、切片を一次抗体とともにインキュベートし、HRPをDISCOVERY阻害剤(Roche、カタログ番号07017944001)でブロックし、試料を抗ウサギIgG HRP二次抗体(Roche Diagnostics、カタログ番号05269717001)とともにインキュベートした。染色を、DISCOVERY ChromoMap DABキット(Roche Diagnostics、カタログ番号05266645001)を用いて、褐色の3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)によって可視化した。切片をヘマトキシリンII(Roche Diagnostics、カタログ番号05277965001)及び青色化試薬(Roche Diagnostics、カタログ番号05266769001)で対比染色した。最後に、切片を段階的エタノール中で脱水し、キシレン中で清澄化し、カバースリップした。

30

40

【0588】

FRα染色は、病理学者によって評価され、定量化され、染色なし(0+)、低(1+)、中(2+)、又は高(3+)の範囲に分類された。

【0589】

腫瘍試料のFRα発現のデジタル定量化

50

組織試料中に存在する浸潤性腫瘍の少なくとも80%を含む分析可能な腫瘍領域（ATA）の適切な同定を確認するために、FR α IHCアッセイからのデジタル画像が、病理学者によって分析され、コンピューターで定量化され、検証された。細胞の膜光学濃度（OD）値、例えば、全体平均及び中央値（すなわち、第50分位数）OD値を算出した。膜OD値は、0～255の範囲である。各モデルについて、標的発現は、独立した未処置の試験マウスから収集された3つの腫瘍の膜ODの中央値として表される。

【0590】

結果

OVO875腫瘍は、IHCスコア 2+及びOD中央値41に基づいて、中FR α 発現因子として分類された。

【0591】

CTG3226腫瘍は、IHCスコア 1+～2+及びOD中央値28に基づいて、低～中FR α 発現因子として分類された。

【0592】

2つの卵巢癌PDXモデルOVO875（中FR α 発現）及びCTG3226（低～中FR α 発現）に、AB1370049-SG3932 DAR8（10、5、2.5又は1.25mg/kg）又はFR α -DM4（5又は2.5mg/kg）を単回iv用量で投与した。腫瘍体積及び体重を68日間にわたってモニターした。

【0593】

OVO857のほぼ完全な腫瘍阻害は、10、5及び2.5mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8による処置後に観察されたが（それぞれ98.5、96.4、94.5のTGI%）、1.25mg/kg（67のTGI%）では部分応答が見られた。明らかに対照的に、FR α -DM4は、TGIが5mg/kgで24%、2.5mg/kgで2%であり、実質的に効果が低かった（表26及び図20）。

【0594】

【表45】

表 26: OVO875 卵巢癌PDXモデルにおける腫瘍増殖阻害率(TGI%)

処置	平均腫瘍体積 (mm ³) $\pm$ SEM	TGI (%)	p 値 (ANOVA) ^a	
			処置 対 ピヒクル	AB1370049- SG3932 DAR8 vs FR α -DM4 (H2H)
未処置	1928.20 $\pm$ 330.05	N/A	N/A	N/A
10 mg/kg AB1370049- SG3932 DAR8	29.71 $\pm$ 3.24	98.46	0.0008	N/A
5 mg/kg AB1370049- SG3932 DAR8	70.37 $\pm$ 32.84	96.35	0.0010	<0.0001
2.5 mg/kg AB1370049- SG3932 DAR8	105.71 $\pm$ 43.54	94.52	0.0013	<0.0001
1.25 mg/kg AB1370049- SG3932 DAR8	635.56 $\pm$ 248.43	67.04	0.0448	N/A
5 mg/kg FR α -DM4	1457.15 $\pm$ 250.01	24.43	0.9832(NS)	N/A
2.5 mg/kg FR α -DM4	1882.00 $\pm$ 199.43	2.40	0.9999(NS)	N/A

^ap-値<0.05 は平均腫瘍体積の有意差を示す。

【0595】

モデルCTG3226について、AB1370049-SG3932 DAR8は、用量レベル10、5及び2.5mg/kgでほぼ完全な応答を達成したが（それぞれ97.7、96.8、93.6のTGI%）、1.25mg/kgで部分応答（74%のTGI%）が見られた。FR α -DM4は5mg/kgで活性があり、TGI%が76.5の部分応答を示したが、2.5mg/kgのより低い用量では活性を有さなかった（表27及び図21）。

【0596】

【表46】

表 27: CTG3226 卵巣癌 PDXモデルにおける腫瘍増殖阻害率(TGI%)

処置	平均腫瘍体積 (mm ³)± SEM	TGI (%)	p 値 (ANOVA) ^a	
			処置 対 ピヒクル	AB1370049- SG3932 DAR8 vs FRα-DM4 (H2H)
未処置	966.51±152.61	NA	N/A	N/A
10 mg/kg AB1370049- SG3932 DAR8	22.29±6.69	97.69	0.0039	N/A
5 mg/kg AB1370049- SG3932 DAR8	31.23±3.20	96.77	0.0044	<0.0001
2.5 mg/kg AB1370049- SG3932 DAR8	61.43±10.44	93.64	0.0061	<0.0001
1.25 mg/kg AB1370049- SG3932 DAR8	251.65±92.86	73.96	0.0446	N/A
5 mg/kg FRα-DM4	226.86±46.03	76.53	0.0349	N/A
2.5 mg/kg FRα-DM4	1127.58±481.10	-16.66	0.9960(NS)	N/A

^ap-値 <0.05 は平均腫瘍体積の有意差を示す。

【0597】

同じOVO875及びCTG3226 PDXモデルを使用し、この実施例で上記と同じ方法に従って、追加のマウス群をそれぞれ0.15mg/kg、0.3mg/kg及び0.6mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8で処置する第2のセットの実験では、非常に低用量でも部分応答が観察された。例えば、OVO875モデルでは、10、5及び2.5mg/kgのAB1370049-SG3932 DAR8がほぼ完全な応答をもたらし、TGI%はそれぞれ98.5、96.4及び94.52であった。0.3mg/kgという低用量では部分的ではあるが実質的な応答が認められ(TGI値41%)、0.6mg/kgでは0.3mg/kgと同等の応答レベル、1.25mg/kgでは67%のTGIが得られた。CTG3226 PDXモデルでは、それらの用量範囲にわたって同様のTGIの大きさの同様の観察が観察された。

【0598】

結論

これらのさらなる卵巣癌PDXモデルからのデータは、AB1370049-SG3932 DAR8がFRα発現腫瘍を治療するのに非常に有効であり、中発現レベル及び中～低発現レベルでFRαを発現する癌でさえ、ほぼ完全な腫瘍増殖阻害を達成することをさらに実証した。AB1370049-SG3932 DAR8用量の範囲にわたって、実質的なTGIが示された。さらに、これらのモデルにおけるAB1370049-SG3932 DAR8の有効性は、FRα-DM4比較ADCよりも実質的に優れていた。

【0599】

実施例23－患者由来異種移植モデルCTG-0956におけるAB1370049-SG3932 DAR8のインビボ抗癌活性

目的

中～高FRα発現レベルを示す卵巣PDXモデルCTG-0956におけるAB1370049-SG3932 DAR8の抗腫瘍活性を評価すること。

【0600】

材料及び方法

6～8週齢の雌の無胸腺ヌードFoxn1nuストックマウスに腫瘍組織断片を皮下移植した。十分な数のストック動物が1000～1500mm³に達したとき、腫瘍を採取し、断片を試験前の動物に移植した。腫瘍が213～325mm³の体積に達したなら

、動物を腫瘍体積によって8群に無作為化した。群1 (n = 8匹) には処置をせず、群2 ~ 群8 (n = 3匹) には、それぞれ10 mg/kg、5 mg/kg、2.5 mg/kg、1.25 mg/kg、0.6 mg/kg、0.3 mg/kg 及び0.15 mg/kg のAB1370049-SG3932 DAR8を与えた。投与された全ての動物は、0日目に4 ml/kg で1回静脈内投与された。動物を毎日観察し、週2回、腫瘍寸法及び体重を測定し、記録した。実施例22に記載のように、腫瘍体積及びTGIを測定し、計算した。対照群の平均腫瘍体積が1200 mm³に達した49日目に、試験エンドポイントを実施した。

【0601】

CTG-0956 腫瘍細胞上のFR α 発現のデジタル定量を、実施例22に記載のよう

10

【0602】

結果

CTG-0956 腫瘍は、OD中央値143に基づいて、中～高FR α 発現因子として分類された。

【0603】

腫瘍を有する無胸腺ヌードマウスを、単回iv用量 (用量範囲0.15 mg/kg、0.3 mg/kg、0.6 mg/kg、1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg) のADCで処置した。45日目に、異なる用量レベル群の腫瘍増殖阻害率を計算した：用量レベル10 mg/kg (TGI% 96.6) 及び5 mg/kg (95.6%) でほぼ完全な応答が認められ、他の全ての用量レベルで、TGIが69.5% ~ 23.7%の範囲の部分応答が認められた (図22及び表28)。

20

【0604】

【表47】

表 28: CTG-0956 卵巣癌PDXモデルにおける腫瘍増殖阻害率(TGI%)

処置	平均腫瘍体積(mm ³) +/-SEM	TGI (%)
未処置	1110 +/- 121	N/A
10 mg/kg AB1370049-SG3932 DAR8	42 +/- 22	96.6
5 mg/kg AB1370049-SG3932 DAR8	53 +/- 28	95.6
2.5 mg/kg AB1370049-SG3932 DAR8	369 +/- 130	69.5
1.25 mg/kg AB1370049-SG3932 DAR8	573 +/- 306	52.6
0.6 mg/kg AB1370049-SG3932 DAR8	612 +/- 91	49.3
0.3 mg/kg AB1370049-SG3932 DAR8	932 +/- 400	22.9
0.15 mg/kg AB1370049-SG3932 DAR8	922 +/- 108	23.7

30

40

【0605】

結論

この追加の卵巣癌PDXモデルからのデータは、AB1370049-SG3932 DAR8がFR α 発現腫瘍の治療に非常に有効であり、より高い用量でほぼ完全な腫瘍増殖阻害を達成し、AB1370049-SG3932 DAR8用量の全範囲にわたって十分なTGIを示すことをさらに実証した。

【0606】

実施例24-FR α -DM4 ADCへのチャレンジ及び耐性観察後のCDXモデルにおけるAB1370049-SG3932 DAR8の有効性

50

目的

FR α -DM4 耐性 OVCAR-3 細胞株モデルにおける AB1370049-SG3932 DAR8 抗腫瘍活性を評価すること。

【0607】

材料及び方法

OVCAR3 異種移植モデルを開発するために、50%マトリゲル中の 10×10^6 細胞/マウスを、雌の6~8週齢の雌NSG (NOD-SCID IL2R gamma null) に皮下接種した。腫瘍体積が $200 \sim 600 \text{ mm}^3$ の範囲に達したとき、マウスに FR α -DM4 ADC (「ミルベツキシマブソラブタンシンのバイオシミラー」、DARは約3) を 5 mg/kg で2週間に1回 (Q2W)、腫瘍が再発し、大きさが再び増大し始めるまで連続的に静脈内投与した。8ラウンドのQ2W投与の後に再発したマウスのうち、4匹のマウスを選択し、AB1370049-SG3932 DAR8を 5 mg/kg Q2Wで静脈内投与して再チャレンジし、2ラウンドのAB1370049-SG3932 DAR8処置を行った。

【0608】

別に、追加のマウスからの再発した腫瘍を切除し、雌の6~8週齢の雌NSG (NOD-SCID IL2R gamma null) マウスに再度、皮下移植した。腫瘍が $280 \sim 360 \text{ mm}^3$ の平均体積に達したとき、マウスにAB1370049-SG3932 DAR8又はFR α -DM4 ADC (「ミルベツキシマブソラブタンシンのバイオシミラー」、DARは約3) を 5 mg/kg でQ2W静脈内処置し、それぞれの処置を2ラウンド行った。

【0609】

腫瘍体積をデジタルキャリパーで計測し、以下の式を用いて腫瘍体積を計算した：腫瘍体積 = 長さ (mm) $\times$ 幅 (mm)² $\times 0.52$ (式中、長さ及び幅はそれぞれ腫瘍の最長径及び最短径である)。体重を週2回測定して、処置の忍容性を評価した。

【0610】

各実験群における腫瘍の増殖を、使用した動物の数の平均腫瘍体積 (mm^3) $\pm$ SEMとして表した。

【0611】

結果

OVCAR-3 腫瘍担持マウスを最初に FR α -DM4 Q2Wで処置した。ADCに対する最初の応答の後、一部のマウスは、処置を免れ、腫瘍を再増殖させた。その後、これらの腫瘍にAB1370049-SG3932 DAR8で再チャレンジし、処置した全てのマウスで腫瘍増殖阻害を観察したところ、4匹のマウスのうち3匹においてほぼ完全な応答を示した (図23)。これは、FR α -DM4 耐性がFR α ダウンレギュレーションによって引き起こされないことを示している。

【0612】

追跡実験において、FR α -DM4 耐性腫瘍をマウスから単離し、新しい宿主マウスに再移植した。腫瘍が $280 \sim 360 \text{ mm}^3$ の平均サイズに達した後、マウスに 5 mg/kg のAB1370049-SG3932 DAR8又はFR α -DM4を2回 (Q2W) 投与した。AB1370049-SG3932 DAR8で処置されたマウスのみが、処置に対しほぼ完全な応答 (TGI%92.3) を示したが、FR α -DM4処置された動物は処置に対して依然として耐性を有した (図24)。

【0613】

結論

これらの結果は、AB1370049-SG3932 DAR8の、腫瘍 (FR α -DM4 比較ADCに対する耐性を発達させたことが示されたものを含む) におけるほぼ完全な腫瘍増殖阻害を達成する能力を実証している。

10

20

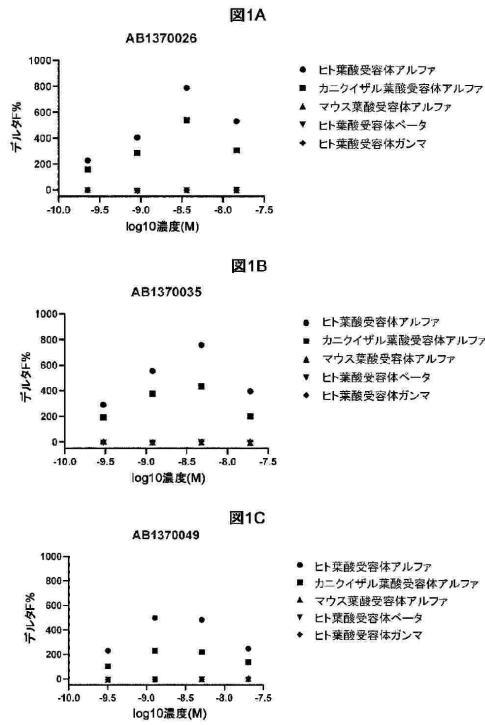
30

40

50

【図面】

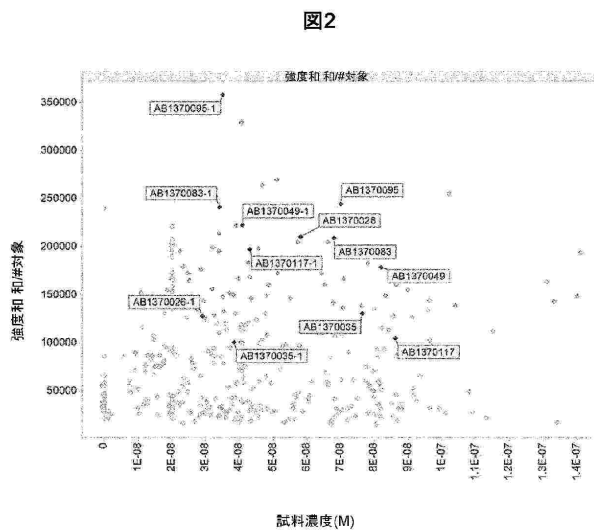
【図 1 - 1】



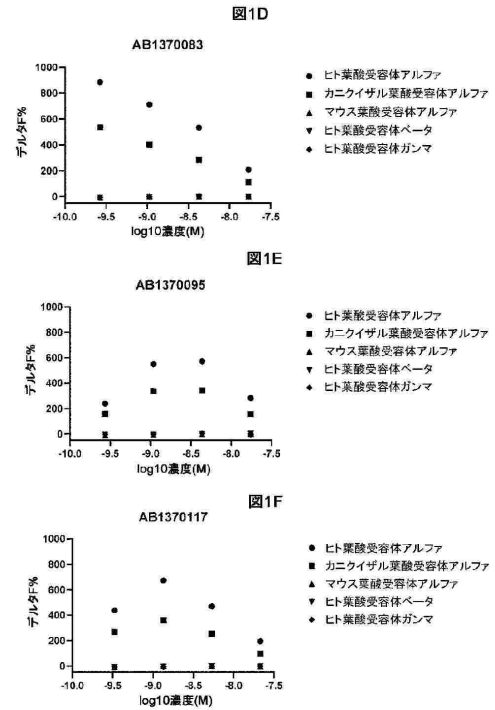
10

20

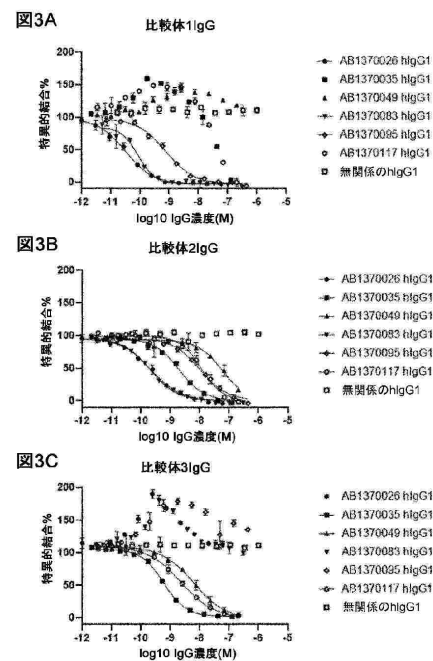
【図 2】



【図 1 - 2】



【図 3】

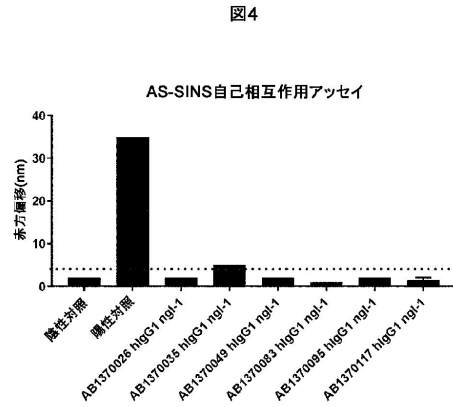


30

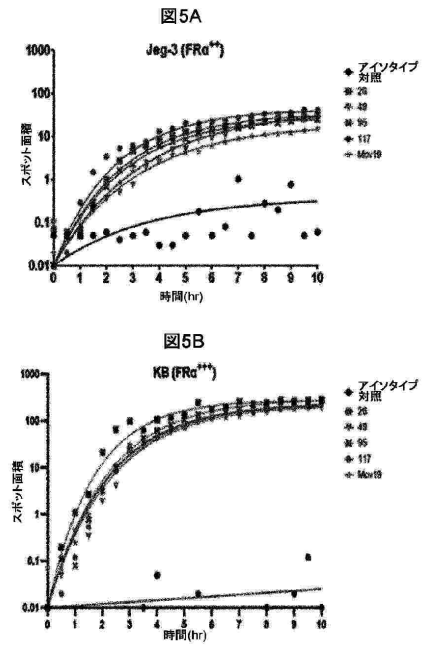
40

50

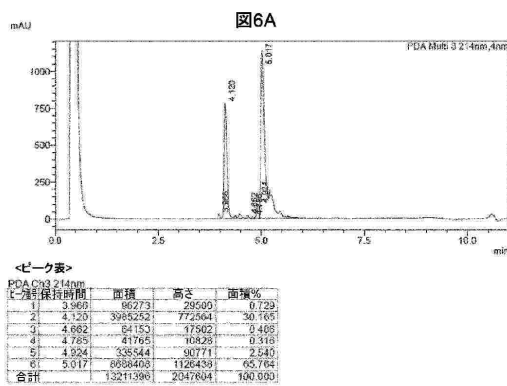
【図 4】



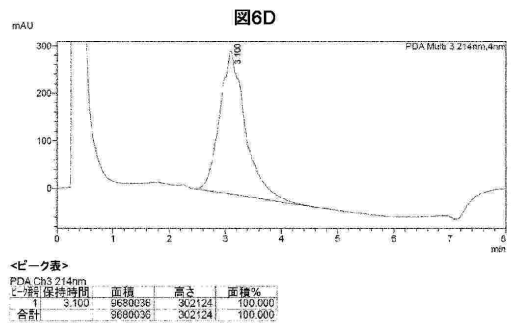
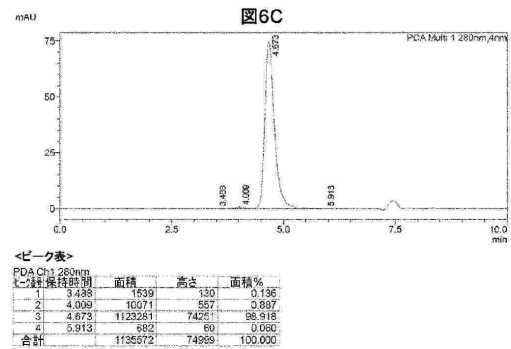
【図 5】



【図 6 - 1】



【図 6 - 2】



10

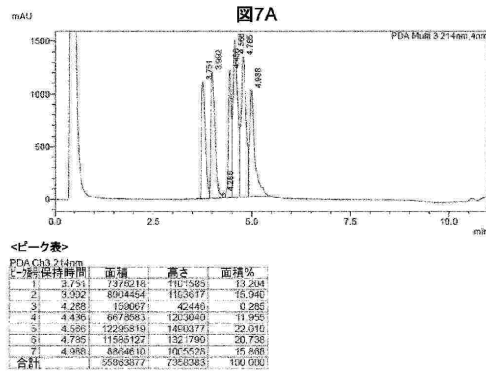
20

30

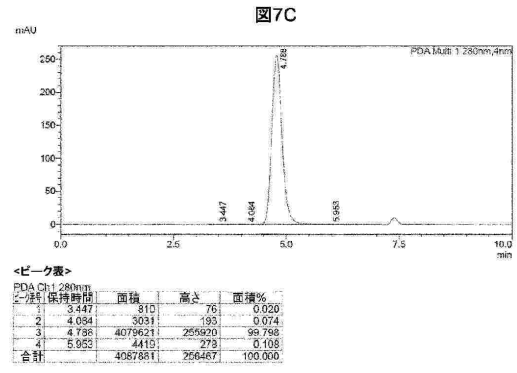
40

50

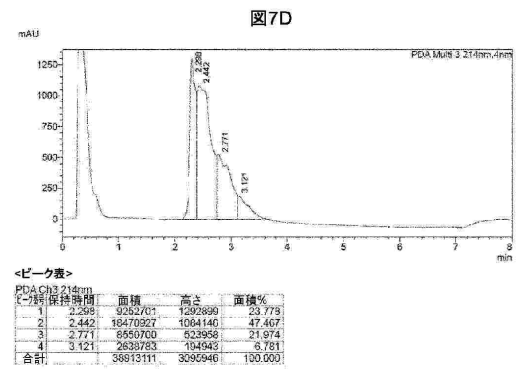
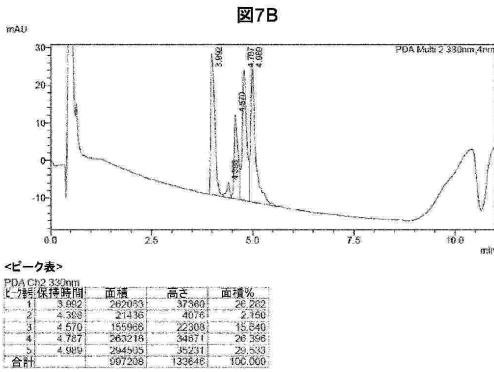
【図 7 - 1】



【図 7 - 2】

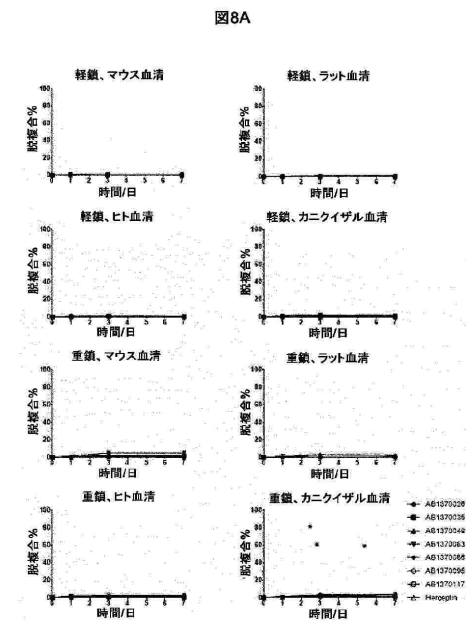


10

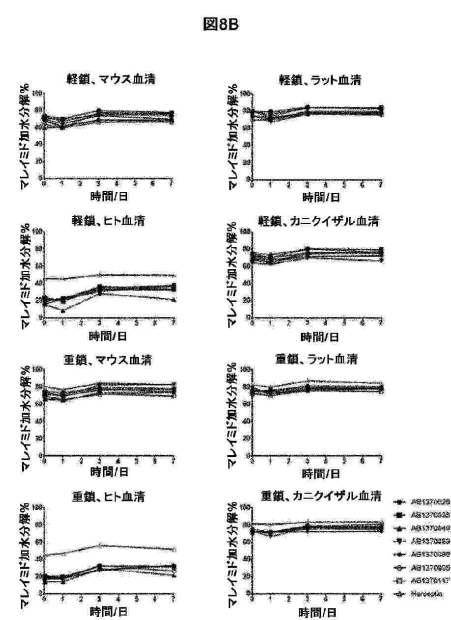


20

【図 8 - 1】



【図 8 - 2】

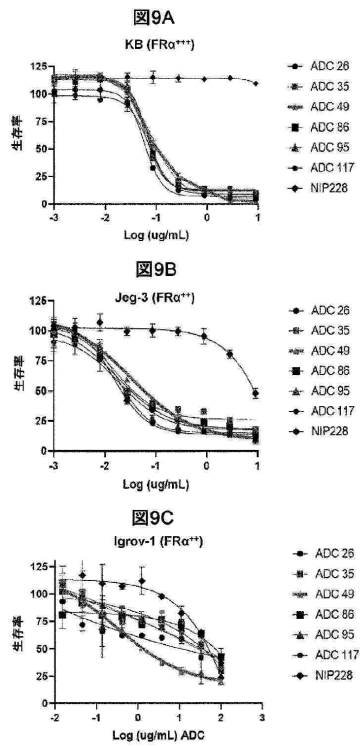


30

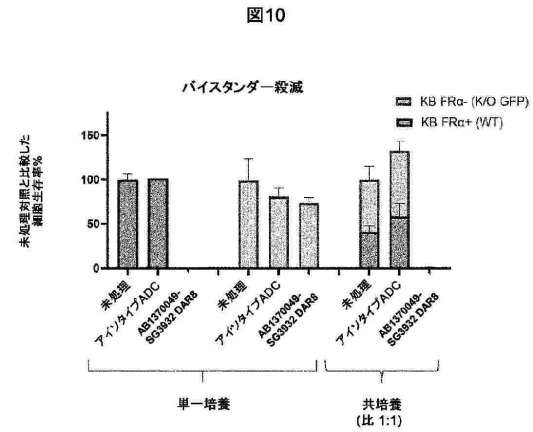
40

50

【図 9】



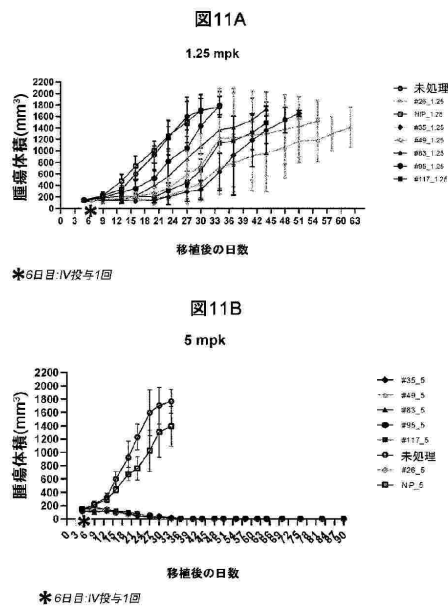
【図 10】



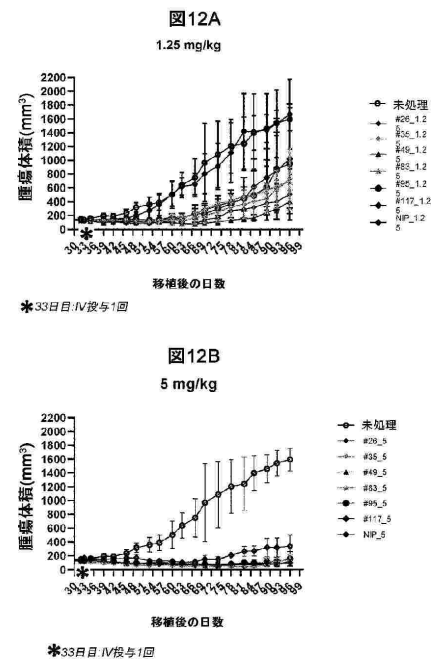
10

20

【図 11】



【図 12】

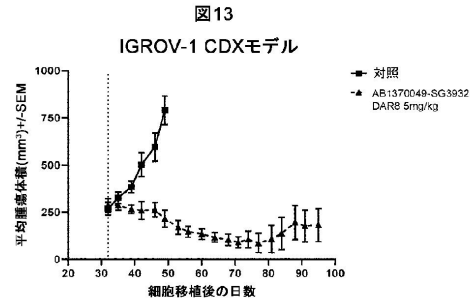


30

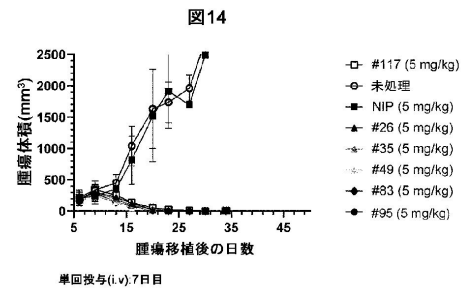
40

50

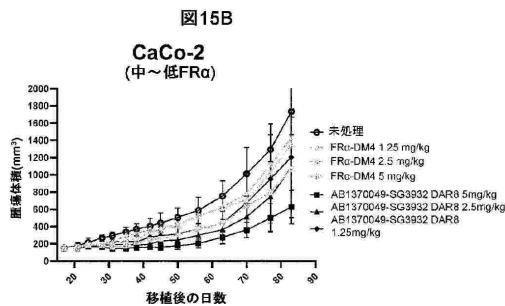
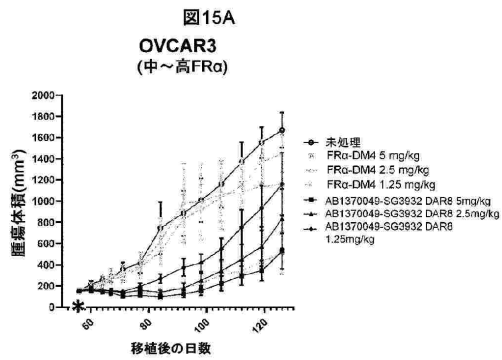
【図 13】



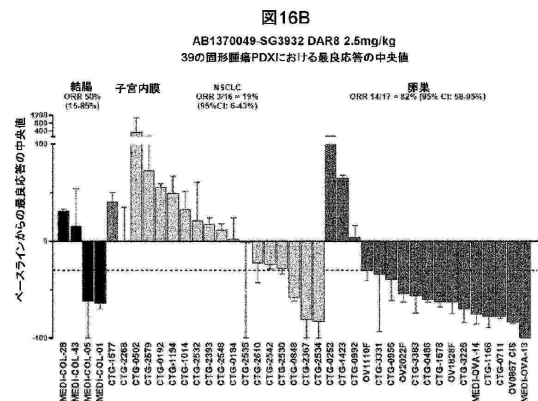
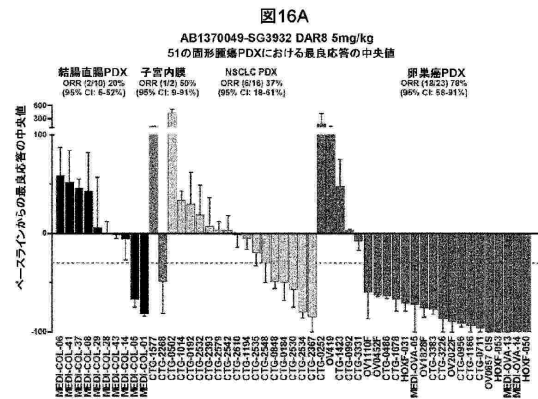
【図 14】



【図 15】



【図 16】



10

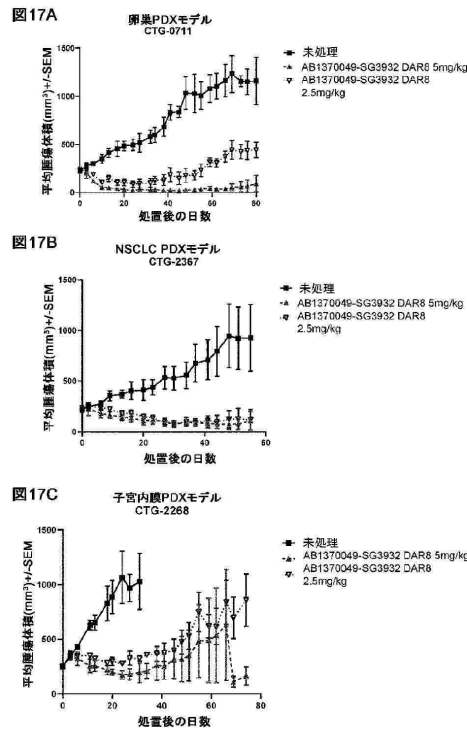
20

30

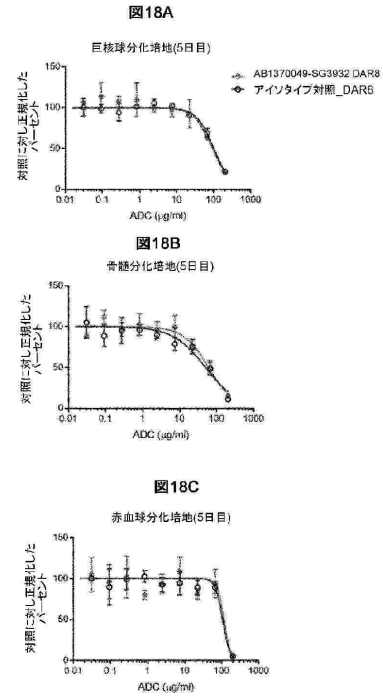
40

50

【図 17】



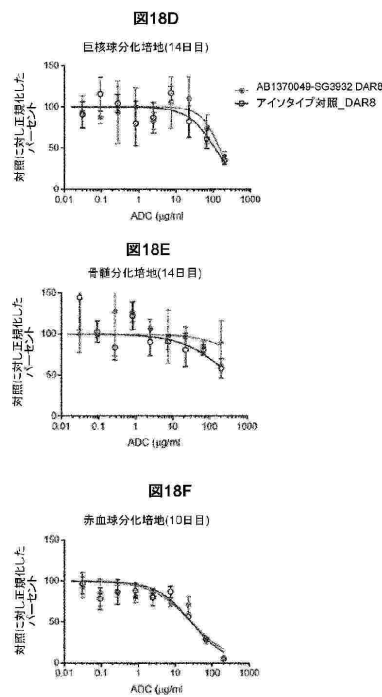
【図 18 - 1】



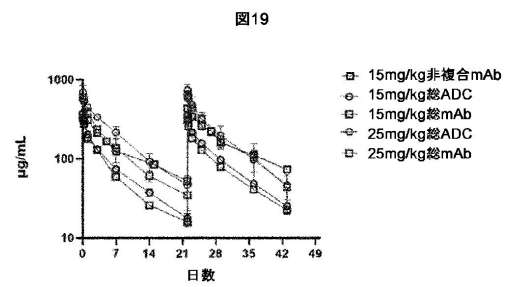
10

20

【図 18 - 2】



【図 19】

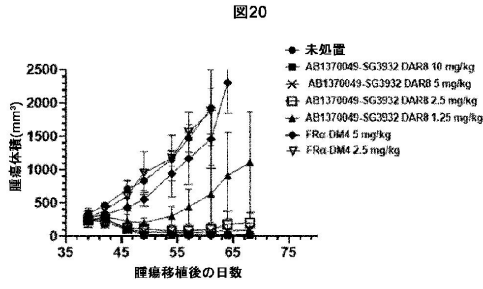


30

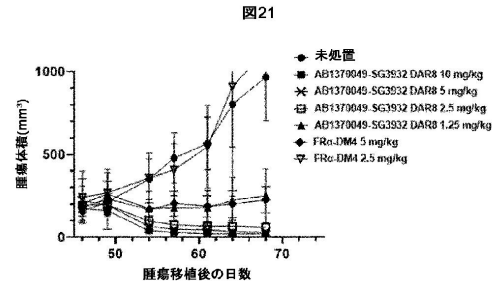
40

50

【図 2 0】

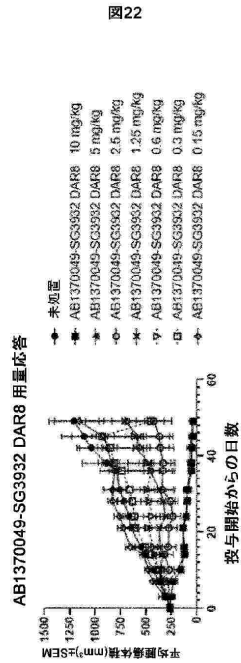


【図 2 1】

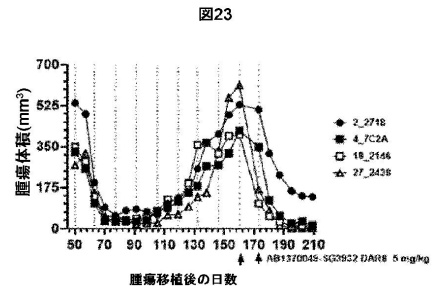


10

【図 2 2】



【図 2 3】



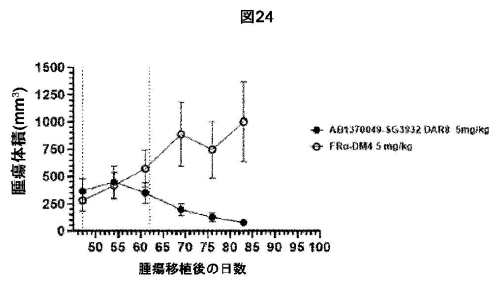
20

30

40

50

【図 2 4】



10

【配列表】

2025508009000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/055129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. **A61P35/00 C07K16/28 A61K39/395**
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	O. AB ET AL: "IMGN853, a Folate Receptor-(FR)-Targeting Antibody-Drug Conjugate, Exhibits Potent Targeted Antitumor Activity against FR -Expressing Tumors", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 14, no. 7, 22 April 2015 (2015-04-22), pages 1605-1613, XP055430560, US ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-1095 the whole document ----- -/--	1-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 May 2023

Date of mailing of the international search report

30/05/2023

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Siaterli, Maria

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/055129

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHENG XIN ET AL: "MORAb-202, an Antibody?Drug Conjugate Utilizing Humanized Anti-human FR? Farletuzumab and the Microtubule-targeting Agent Eribulin, has Potent Antitumor Activity", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 17, no. 12, 1 December 2018 (2018-12-01), pages 2665-2675, XP055831595, US ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-1215 Retrieved from the Internet: URL:https://mct.aacrjournals.org/content/molcanther/17/12/2665.full.pdf> the whole document	1-37
X	KATHLEEN N. MOORE ET AL: "Safety and Activity of Mirvetuximab Soravtansine (IMGN853), a Folate Receptor Alpha?Targeting Antibody?Drug Conjugate, in Platinum-Resistant Ovarian, Fallopian Tube, or Primary Peritoneal Cancer: A Phase I Expansion Study", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 35, no. 10, 1 April 2017 (2017-04-01), pages 1112-1118, XP055638100, US ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2016.69.9538 the whole document	1-37
X	WO 2019/055931 A1 (SUTRO BIOPHARMA INC [US]) 21 March 2019 (2019-03-21) examples 1,6,5,7,10-24	1-37
X	AB: "Abstract 2890: IMGN151 - A next generation folate receptor alpha targeting antibody drug conjugate active against tumors with low, medium and high receptor expression Cancer Research American Association for Cancer Research", AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, AACR 2020, vol. 80, 1 August 2020 (2020-08-01), XP093035400, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2020-2890 Retrieved from the Internet: URL:https://aacrjournals.org/cancerres/article/80/16_Supplement/2890/642251/Abstract-2890-IMGN151-A-next-generation-folate> abstract	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/055129

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/130776 A1 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION [US]) 6 September 2013 (2013-09-06) the whole document claims 1-21 -----	1-37
X	SETIADY Y ET AL: "Preclinical evaluation of M-DGN549, a folate receptor alpha-targeting antibody-drug conjugate (ADC) with a DNA-alkylating payload", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, vol. 69, 2016, XP029843895, ISSN: 0959-8049, DOI: 10.1016/S0959-8049(16)33030-1 the whole document -----	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/055129

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019055931 A1	21-03-2019	AU 2018333945 A1	26-03-2020
		BR 112020005212 A2	15-09-2020
		CA 3075087 A1	21-03-2019
		CN 111655726 A	11-09-2020
		EP 3684814 A1	29-07-2020
		IL 273285 A	30-04-2020
		JP 2020534278 A	26-11-2020
		KR 20200051802 A	13-05-2020
		MA 50265 A	29-07-2020
		SG 11202002310U A	29-04-2020
		US 2019083641 A1	21-03-2019
		US 2020147229 A1	14-05-2020
		US 2020353076 A1	12-11-2020
		WO 2019055909 A1	21-03-2019
		WO 2019055931 A1	21-03-2019
WO 2013130776 A1	06-09-2013	EP 2822386 A1	14-01-2015
		US 2015023874 A1	22-01-2015
		WO 2013130776 A1	06-09-2013

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 0 7 K 5/06 (2006.01)
 C 0 7 K 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 5/08 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/34 (2017.01)
 A 6 1 K 31/4738 (2006.01)

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 C 0 7 K 5/06
 C 0 7 K 5/10
 C 0 7 K 5/08
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 47/34
 A 6 1 K 31/4738

4 C 0 8 6
 4 H 0 4 5

D

N

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

(72)発明者 ニール, フランシス

英国シービー 2 1・6 ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、ミル
 スタイン・ビルディング、メディムーン・リミテッド

(72)発明者 ドッド, ロジャー

英国シービー 2・0 エイエイ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、フランシス・クリック・アベ
 ニュー 1、ケンブリッジ・バイオメディカル・キャンパス、アストラゼネカ・ユーケイ・リミテッ
 ド

(72)発明者 フレンケル, ポーラ

アメリカ合衆国 1 9 8 5 0-5 4 3 7 デラウェア州ウィルミントン、コンコード・パイク 1 8 0 0
 、ピー・オー・ボックス 1 5 4 3 7、アストラゼネカ・ファーマシューティカルズ・リミテッド・
 パートナーシップ

(72)発明者 セロン・メディナ クアイラン, ホルヘ

アメリカ合衆国 1 9 8 5 0-5 4 3 7 デラウェア州ウィルミントン、コンコード・パイク 1 8 0 0
 、ピー・オー・ボックス 1 5 4 3 7、アストラゼネカ・ファーマシューティカルズ・リミテッド・
 パートナーシップ

(72)発明者 ウォード, クリストファー

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州ゲイザーズバーグ、ワン・メディムーン・ウェイ、メ
 ディムーン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー

F ターム (参考)

4B064 AG27 CA19 CC24 DA03
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA25 CA44
 4C076 BB01 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 BB21 BB24 BB25 BB29
 BB31 CC15 CC27 EE23 EE59 FF68
 4C084 AA19 AA27 MA05 MA13 MA16 MA17 MA23 MA28 MA31 MA32
 MA35 MA37 MA43 MA52 MA56 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 NA05
 NA10 NA15 ZC202
 4C085 AA13 AA14 BB11 BB36 BB41 BB42 BB43 CC02 CC23 EE01
 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08
 4C086 AA01 AA02 CB22 MA02 MA06 MA13 MA16 MA17 MA23 MA28
 MA31 MA32 MA35 MA37 MA43 MA52 MA56 MA57 MA58 MA60 MA63
 MA66 NA05 NA10 NA14 ZA59 ZB26 ZC20

F ターム (参考)

ZC20

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA12 BA13 BA72 DA76 FA72
FA74