

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7585230号
(P7585230)

(45)発行日 令和6年11月18日(2024.11.18)

(24)登録日 令和6年11月8日(2024.11.8)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28 Z N A
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
請求項の数 44 (全170頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-564298(P2021-564298)	(73)特許権者	512186793
(86)(22)出願日	令和2年4月28日(2020.4.28)		イミュノジェン, インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2022-530524(P2022-530524 A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(43)公表日	令和4年6月29日(2022.6.29)		4 5 1, ウォルサム, ウィンター ス
(86)国際出願番号	PCT/US2020/030245	(74)代理人	110001173
(87)国際公開番号	WO2020/223221		弁理士法人川口国際特許事務所
(87)国際公開日	令和2年11月5日(2020.11.5)	(72)発明者	アブ, オルガ
審査請求日	令和5年4月27日(2023.4.27)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(31)優先権主張番号	62/840,297		0 5 4, ミリス, ベイベリー サークル
(32)優先日	平成31年4月29日(2019.4.29)		2 6
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	コーリ, ニーラジ
(31)優先権主張番号	62/879,864		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(32)優先日	令和1年7月29日(2019.7.29)		4 7 4, アーリントン, ウィートン
最終頁に続く			ロード 7
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 バイパラトピック F R - 抗体及びイムノコンジュゲート

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト葉酸受容体 1 (F R) に特異的に結合するバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体またはその抗原結合断片は、

(a) F R の第 1 のエピトープに結合する第 1 の可変重鎖 (V H) 及び第 1 の可変軽鎖 (V L) を含む第 1 の F R 結合ドメインと、

(b) F R の第 2 のエピトープに結合する第 2 の V H 及び第 2 の V L を含む第 2 の F R 結合ドメインと、を含み、

ここで、前記第 1 の V H が、それぞれ (a) 配列番号 1 0 ~ 1 2 または (b) 配列番号 1 5、1 6、及び 1 2 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 ~ 3 を含み、

前記第 1 の V L が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 ~ 3 を含み、

前記第 2 の V H が、それぞれ (a) 配列番号 7 ~ 9 または (b) 配列番号 1 3、1 4、及び 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 ~ 3 を含み、かつ

前記第 2 の V L が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 ~ 3 を含み、

前記バイパラトピック抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

(i) 前記第 1 の V H が、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含み、及び / もしくは前記第 1 の V L が、配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含み、ならびに / または (i i) 前記第 2 の

V H が、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含み、及び／もしくは前記第 2 の V L が、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

(i) 前記第 1 の V H が、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含み、及び前記第 1 の V L が、配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含み、ならびに (i i) 前記第 2 の V H が、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含み、及び前記第 2 の V L が、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

(a) 前記第 1 の F R 結合ドメインが単鎖可変断片 (s c F v) である、及び前記第 2 の F R 結合ドメインが別個のポリペプチド上の V H 及び V L を含む、または (b) 前記第 2 の F R 結合ドメインが s c F v である、及び前記第 1 の F R 結合ドメインが別個のポリペプチド上の V H 及び V L を含む請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 5】

前記 s c F v が、V H - リンカー - V L または V L - リンカー - V H のペプチドの配向を有する、請求項 4 に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

前記リンカーがグリシン - セリンリンカーである、請求項 5 に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 7】

前記バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片が、I g G 1 重鎖定常領域及び軽鎖定常領域を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

ノブインホール (K I H) 構造を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

前記第 1 の F R 結合ドメインが、前記 K I H 構造のホール側にある、及び前記第 2 の F R 結合ドメインが、前記 K I H 構造のノブ側にある、請求項 8 に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 10】

配列番号 4 1 ~ 4 3 のアミノ酸配列を含む、バイパルトピック抗体。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子の組み合わせ。

【請求項 12】

請求項 1 1 に記載の核酸分子のうちの 1 つを含む、単離されたベクター。

【請求項 13】

請求項 1 1 に記載の単離された核酸分子の組み合わせ、または請求項 1 2 に記載の単離されたベクターを含む宿主細胞。

40

【請求項 14】

E . c o l i 、 P s e u d o m o n a s 、 B a c i l l u s 、 S t r e p t o m y c e s 、 酵母、C H O 、 Y B / 2 0 、 N S 0 、 P E R - C 6 、 H E K - 2 9 3 T 、 N I H - 3 T 3 、 H e L a 、 B H K 、 H e p G 2 、 S P 2 / 0 、 R 1 . 1 、 B - W 、 L - M 、 C O S 1 、 C O S 7 、 B S C 1 、 B S C 4 0 、 B M T 1 0 細胞、植物細胞、昆虫細胞、及び組織培養におけるヒト細胞からなる群から選択される、請求項 1 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片、請求項 1 1 に記載の核酸分子の組み合わせ、請求項 1 2 に記載のベクター、または請求

50

項 1 3 もしくは 1 4 に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される担体または賦形剤と、を含む、医薬組成物。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載のバイパロトピック抗体またはその抗原結合断片を作製する方法であって、(a) 前記抗体またはその抗原結合断片を発現する細胞を培養することと、(b) 前記培養された細胞から前記抗体またはその抗原結合断片を単離することと、を含む、前記方法。

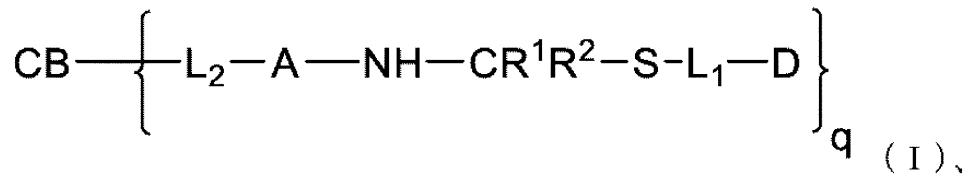
【請求項 1 7】

前記細胞が真核細胞である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

以下の式：

【化 1】



またはその薬学的に許容される塩で表されるイムノコンジュゲートであって、式中：

C B は、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載のバイパロトピック抗体またはその抗原結合断片であり；

L₂ は、以下の式のうちの 1 つによって表され：

10

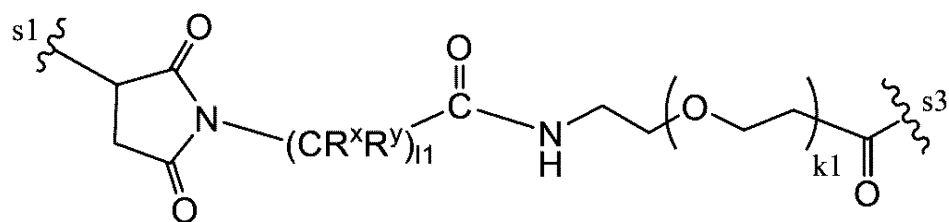
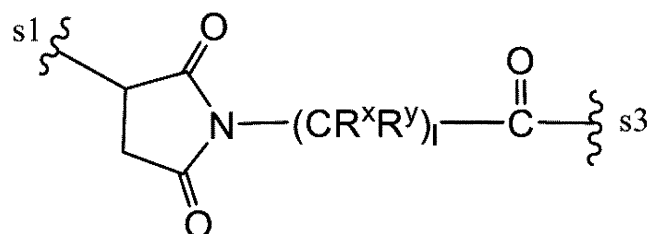
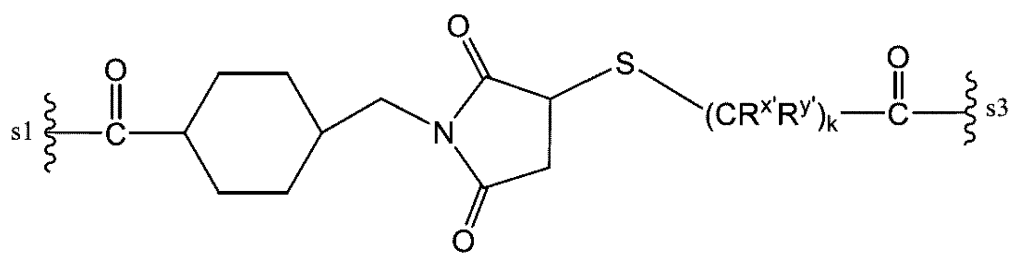
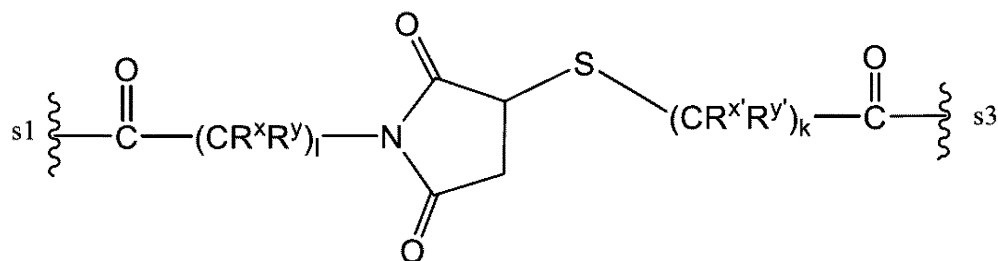
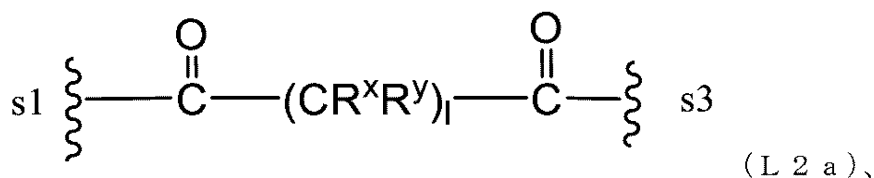
20

30

40

50

【化 2】



式中：

R^x 、 R^y 、 $R^{x'}$ 、及び $R^{y'}$ は、それぞれの存在について、独立してH、-OH、ハロゲン、-O-(C₁-4アルキル)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺、またはC₁-4アルキルであり、ここで、R₄₀、R₄₁、及びR₄₂は、それぞれ独立してHまたはC₁-4アルキルであり；

l及びkは、それぞれ独立して、1～10の整数であり；

l₁は、2～5の整数であり；

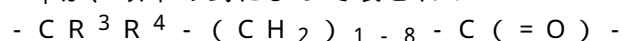
k₁は、1～5の整数であり；

s₁は細胞結合剤C_Bに接続された部位を示し、s₃はA基に接続された部位を示し；

Aが、アミノ酸残基または2～20個のアミノ酸残基を含むペプチドであり；

R¹及びR²が、それぞれ独立して、HまたはC₁-3アルキルであり；

L₁が、以下の式によって表され：



式中、R³及びR⁴が、それぞれ独立してHまたはMeであり、L₁の-C(=O)-部分

10

20

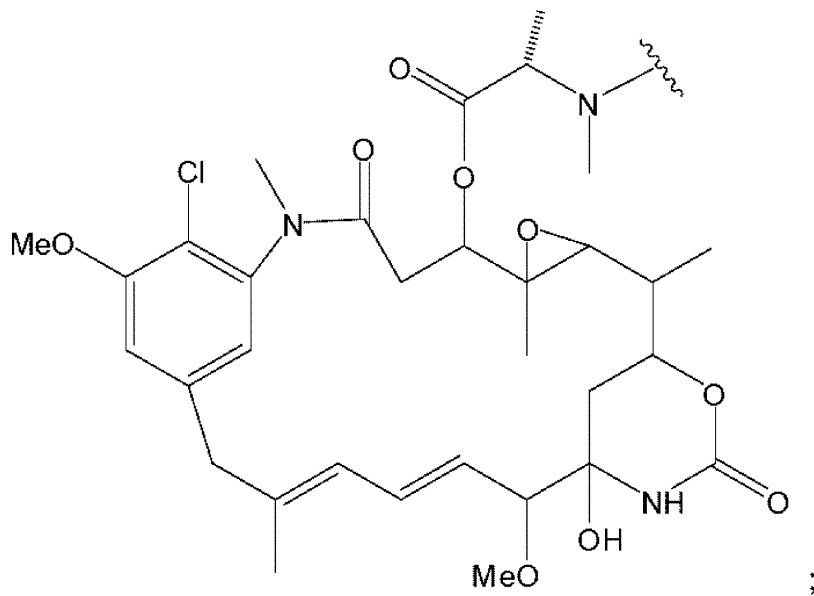
30

40

50

は、D に接続されており；
D が以下の式で表され：

【化 3】



10

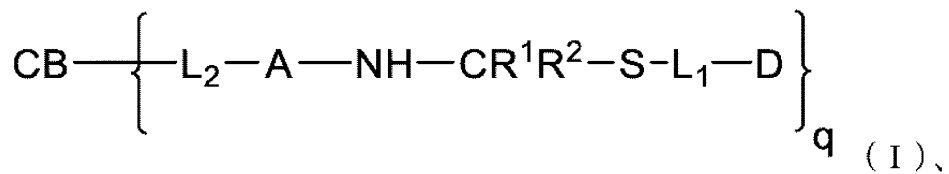
20

q が、1 ～ 20 の整数である、前記イムノコンジュゲート。

【請求項 19】

以下の式：

【化 4】



30

またはその薬学的に許容される塩で表されるイムノコンジュゲートであって、式中：

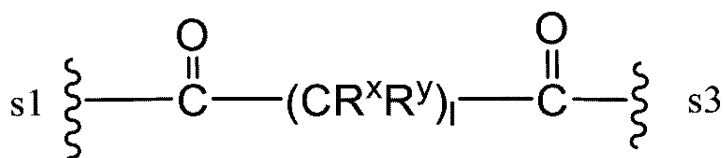
CB は、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のバイパロトピック抗体またはその抗原結合断片であり；

L₂ は、以下の式のうちの 1 つによって表され：

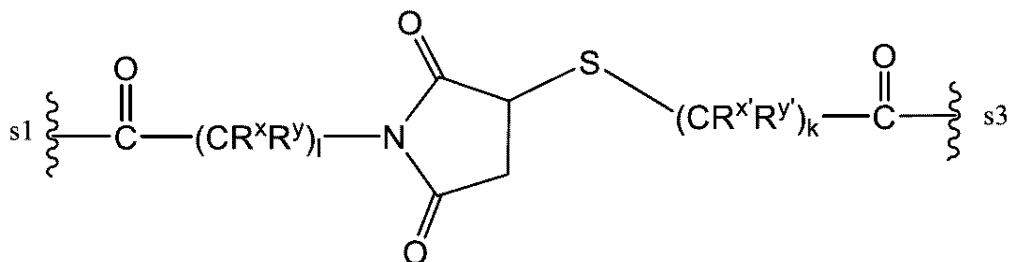
40

50

【化 5】

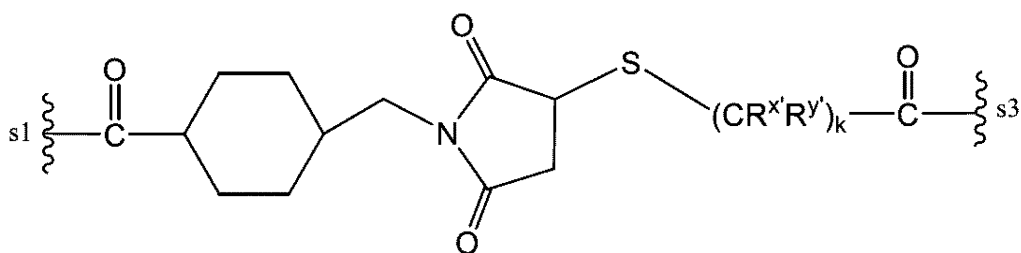


(L 2 a)、



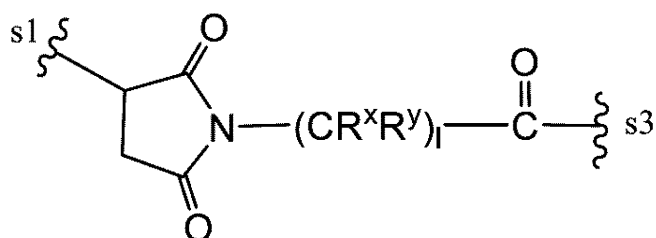
10

(L 2 b)、

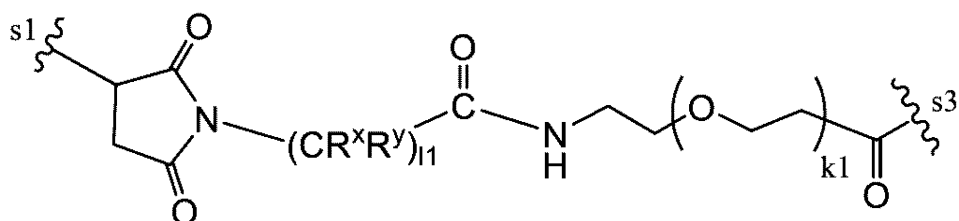


20

(L 2 c)、



(L 2 d)、または



30

(L 2 e) ;

式中：

R^x 、 R^y 、 $R^{x'}$ 、及び $R^{y'}$ は、それぞれの存在について、独立してH、-OH、ハロゲン、-O-(C₁₋₄アルキル)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺、または-OH、ハロゲン、SO₃H、もしくはNR₄₀R₄₁R₄₂⁺によって置換されたC₁₋₄アルキルであり、ここで、R₄₀、R₄₁、及びR₄₂は、それぞれ独立してHまたはC₁₋₄アルキルであり；

40

l及びkは、それぞれ独立して、1～10の整数であり；

l₁は、2～5の整数であり；

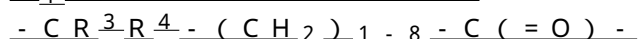
k₁は、1～5の整数であり；

s₁は細胞結合剤CBに接続された部位を示し、s₃はA基に接続された部位を示し；

Aが、アミノ酸残基または2～20個のアミノ酸残基を含むペプチドであり；

R¹及びR²が、それぞれ独立して、HまたはC₁₋₃アルキルであり；

L₁が、以下の式によって表され；

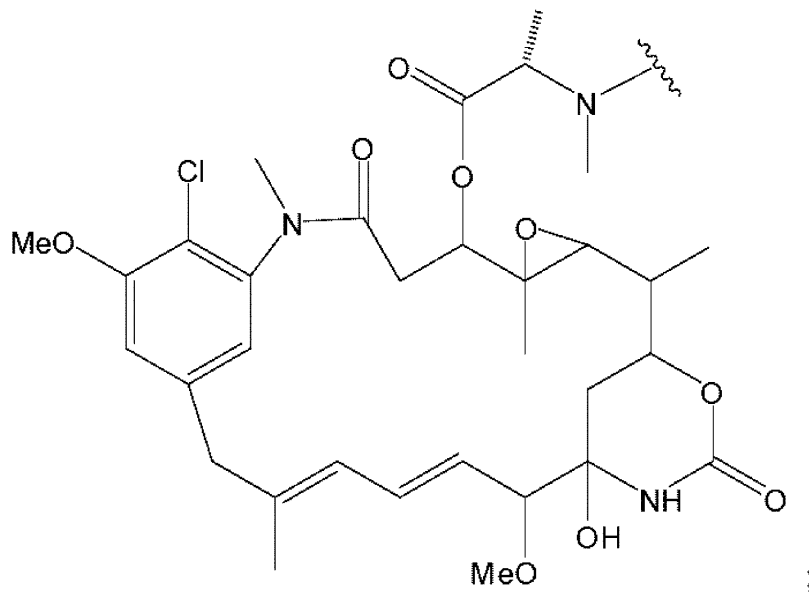


50

式中、 R^3 及び R^4 が、それぞれ独立してHまたはMeであり、 L_1 の $-C(=O)-$ 部分は、Dに接続されており；

Dが以下の式で表され：

【化6】



10

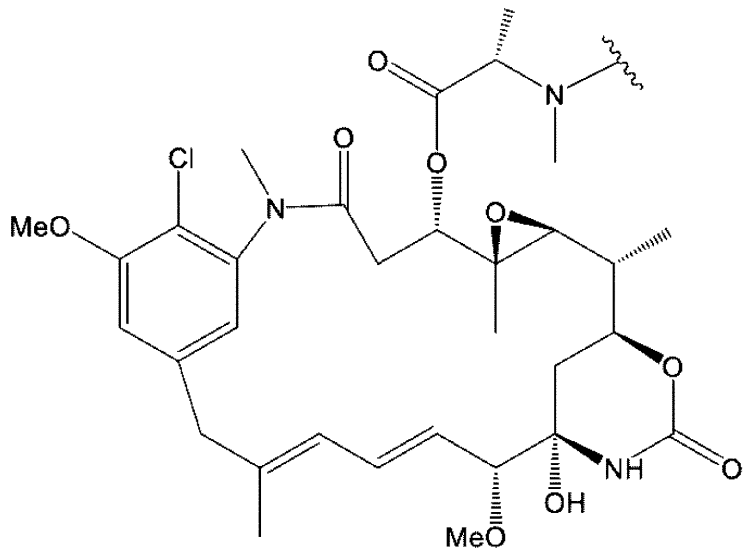
20

qが、1～20の整数である、前記イムノコンジュゲート。

【請求項20】

Dが以下の式で表される、請求項18又は19に記載のイムノコンジュゲート：

【化7】



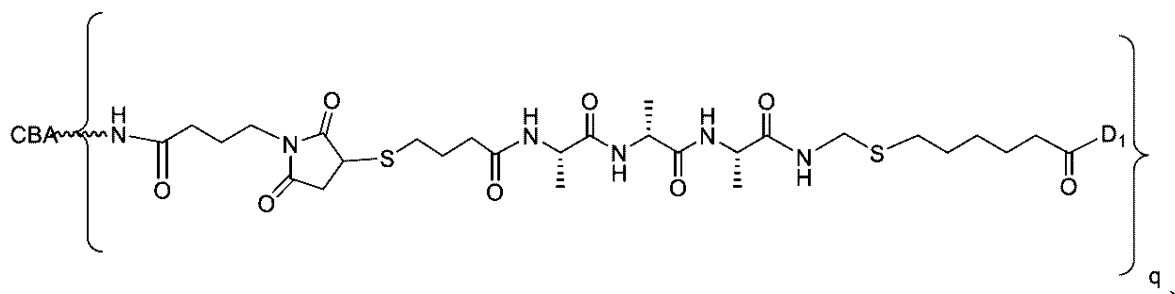
30

40

【請求項21】

前記イムノコンジュゲートが以下の式で表され：

【化 8】

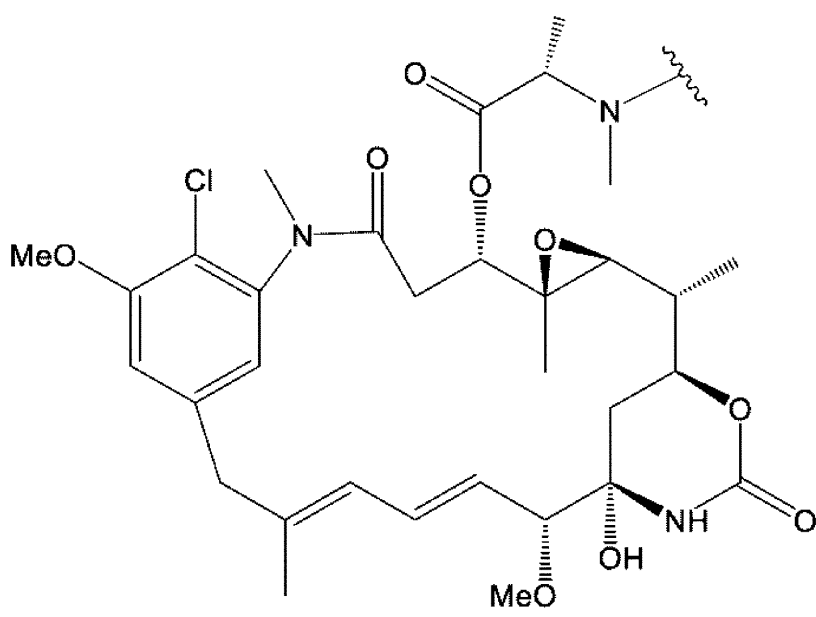


10

式中：

C B A が、バイパロトピック抗体またはその抗原結合断片であり；q が、1 ～ 10 の整数であり；D₁ が以下の式で表される請求項 20 に記載のイムノコンジュゲート：

【化 9】



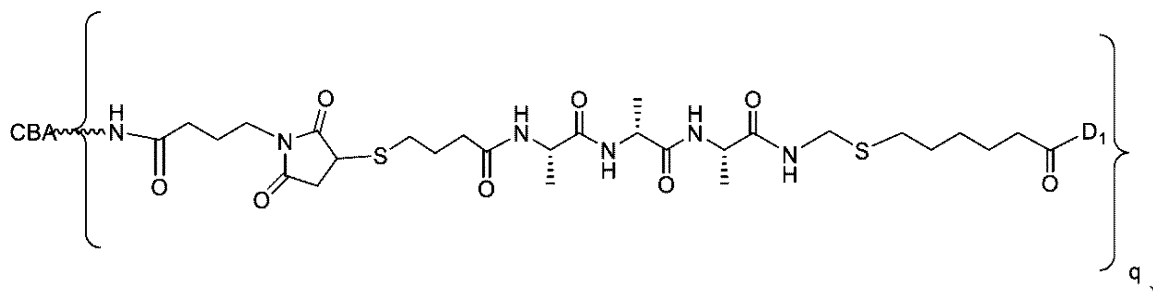
20

30

【請求項 22】

以下の式：

【化 10】



40

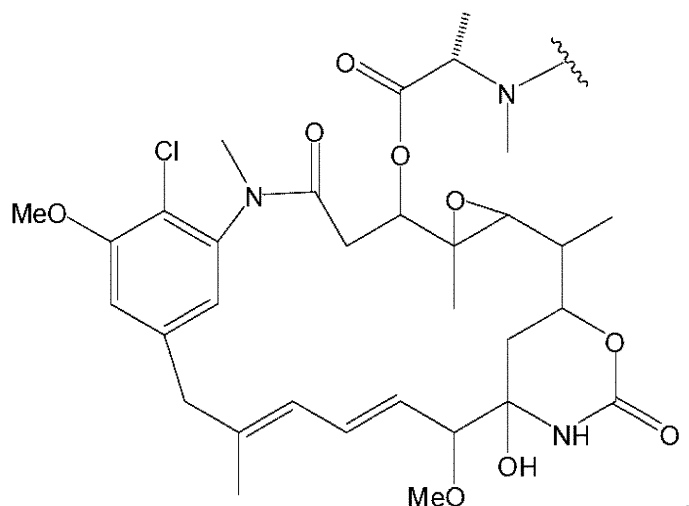
またはその薬学的に許容される塩で表されるイムノコンジュゲートであって、式中：

C B A が、ヒト葉酸受容体 1 (F R) に特異的に結合し、(a) I g G 定常領域に連結される単鎖可変断片 (s c F v) を含み、前記 I g G 定常領域に連結される s c F v が配列番号 41 のアミノ酸配列を含む第 1 の F R 結合アーム、並びに (b) I g G 重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖及び前記軽鎖がそれぞれ配列番号 42 及び 43 のアミノ酸配列を含む第 2 の F R 結合アームを含む、バイパロトピック抗体であり；

50

D₁ が、以下の式で表され：

【化 1 1】



10

及び

q が、2 ~ 5 の整数である、前記イムノコンジュゲート。

【請求項 2 3】

20

式 (A) - (L) - (C) を有するイムノコンジュゲートであって、式中、
(A) が請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載のバイパロトピック抗体またはその抗原結合断片であり；

(L) が、リンカーであり；

(C) が細胞傷害性薬剤であり、前記リンカー (L) が (A) を (C) に連結する、前記イムノコンジュゲート。

【請求項 2 4】

前記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、親水性リンカー、及びジカルボン酸ベースのリンカーからなる群から選択される、請求項 2 3 に記載のイムノコンジュゲート。

30

【請求項 2 5】

前記リンカーが、N - (マレイミドブトリルオキシ) スルホスクシンイミドエステル (スルホ - G M B S または s G M B S)、マレイミド酪酸 N - スクシンイミジルエステル (G M B S)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) - 2 - スルホブタノエート (スルホ - S P D B)；N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペンタノエート (S P P) または N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) - 2 - スルホペンタノエート (スルホ - S P P)；N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (S P D B)、N - スクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (S M C C)；N - スルホスクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (スルホ S M C C)；N - スクシンイミジル - 4 - (ヨードアセチル) - アミノ安息香酸 (S I A B)；及び N - スクシンイミジル - [(N - マレイミドプロピオンアミド) - テトラエチレングリコール] エステル (N H S - P E G 4 - マレイミド) からなる群から選択される、請求項 2 4 に記載のイムノコンジュゲート。

40

【請求項 2 6】

前記細胞傷害性薬剤がマイタンシノイドである、請求項 2 3 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 2 7】

前記マイタンシノイドが D M 2 1 である、請求項 2 6 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 2 8】

50

請求項 2 2 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのイムノコンジュゲートを含む組成物であって、前記イムノコンジュゲートが、A あたり平均 3 ~ 4 個の C を含む前記組成物。

【請求項 2 9】

請求項 1 8 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のイムノコンジュゲートと、薬学的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。

【請求項 3 0】

前記医薬組成物が、抗体またはその抗原結合断片あたり平均 3 ~ 4 の薬物を含む、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

がんの治療のための医薬として使用するための、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片を含む組成物、請求項 1 8 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のイムノコンジュゲートを含む組成物、請求項 2 8 に記載の組成物、または請求項 1 5、2 9、もしくは 3 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

前記がんが、卵巣癌、子宮癌、腹膜癌、卵管癌、子宮内膜癌、肺癌、または脳癌である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記がんが卵巣癌である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記卵巣癌が、プラチナ抵抗性上皮卵巣癌である、請求項 3 3 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記卵巣癌が、再発した上皮卵巣癌である、請求項 3 3 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記卵巣癌が、プラチナ不応性上皮卵巣癌である、請求項 3 3 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記がんが子宮癌である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記がんが腹膜癌である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記がんが卵管癌である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記がんが子宮内膜癌である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 4 1】

前記がんが肺癌である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記がんが脳癌である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記がんが I M G N 8 5 3 抵抗性である、請求項 3 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 4】

ステロイドと共に投与するためのものである、請求項 3 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示の分野は、一般的に、ヒト葉酸受容体 1 (F R) に結合するバイパラトピック抗体及びイムノコンジュゲートに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

10

20

30

40

50

がんは先進国の主要な死因の1つであり、米国だけで100万人超ががんと診断され、年間50万人が死亡している。全体として、3人に1人を超えて生涯に何らかの形のがんを発症すると推定されている。

【0003】

腫瘍関連抗原に結合する抗体にコンジュゲートした細胞毒性の高い薬剤で構成される抗体薬物コンジュゲート(ADC)は、腫瘍標的抗体の効力を高めるための有望な治療戦略である。ADCは、抗体の好ましい薬物動態、生体内分布、及び腫瘍標的化特性を、付着した小分子またはペイロードによって提供される強力な細胞殺傷メカニズムと組み合わせる可能性を提供する。

【0004】

葉酸受容体 - (FR またはFOLR1)は、葉酸に対して高い親和性を持つグリコシルホスファチジルイノシトール結合細胞表面糖タンパク質である。正常組織及びがん性組織におけるその生理学的役割は、まだ完全には解明されていない。ほとんどの正常組織はFRを発現せず、ほとんどの細胞への生理的葉酸の輸送は、他のいくつかのタンパク質、特に還元型葉酸担体によって媒介されると考えられている。高レベルのFRは、漿液性及び類内膜上皮性卵巢癌、子宮内膜腺癌、及び腺癌サブタイプの非小細胞肺癌で発見されている。重要なことに、FRの発現は、卵巢癌患者の転移性病巣及び再発がん、ならびに上皮性卵巢癌及び子宮内膜癌の化学療法後に維持される。これらの特性は、正常組織でのFRの高度に制限された発現と共に、FRをADCなどの標的療法の非常に有望な標的にする。

【0005】

強力なチューブリン作用性マイタンスノイドであるDM4にコンジュゲートしたFR標的抗体を含む葉酸標的化ADCであるミルベツキシマブソラブタンシン(IMGN853)は、最近、中程度及び高程度のFRレベルを示すプラチナ抵抗性卵巢癌患者の診療所において評価された。FORWARD I第3相試験では366人の患者を2:1で無作為化し、ミルベツキシマブソラブタンシンまたは医師が選択した単剤化学療法(ペグ化リボソームドキソルビシン、トポテカン、または毎週のパクリタキセル)のいずれかを投与した。試験は無増悪生存期間(PFS)の改善という主要評価項目を満たさなかったが(全体的な集団ハザード比(HR)=0.98、p=0.897)、事前に指定された高FR亜集団(218/366)が、IMGN853治療で24%の全奏効率を示したのに対し、標準治療化学療法では10%であった。さらに、事前に指定された高FR亜集団では、化学療法と比較して、IMGN853を投与された患者のPFSが長く(HR=0.69、p値=0.049)、化学療法と比較して、IMGN853を投与された患者の全生存期間は長かった(HR=0.62、p値=0.033)。これらの結果は、高レベルのFRを発現している患者にとって有望であるが、結果はまた、より広い患者集団にわたって無増悪生存期間を改善する上でのIMGN853の限界を示した。

【0006】

したがって、さらに効果的な治療とより高いADC送達をもたらし得る、さらなる葉酸を標的化するADCを特定する必要性が残っている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本明細書で提供されるのは、ヒト葉酸受容体1(FR)に特異的に結合するバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片であって、抗体またはその抗原結合断片は、(a)第1の可変重鎖(VH)及び第1の可変軽鎖(VL)を含み、FRの第1のエピトープに結合する第1のFR結合ドメインと、(b)第2のVH及び第2のVLを含み、FRの第2のエピトープに結合する第2のFR結合ドメインと、を含む、抗体またはその抗原結合断片である。

【0008】

いくつかの実施形態では、第1のFR結合ドメインは、配列番号24、25、及び2

10

20

30

40

50

6 からなる群から選択される V H アミノ酸配列と、配列番号 19、20、及び 21 からなる群から選択される V L アミノ酸配列と、を含む抗体と同じ F R のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第 1 の F R 結合ドメインは、配列番号 24、57、及び 26 からなる群から選択される V H アミノ酸配列と、配列番号 19、20、及び 21 からなる群から選択される V L アミノ酸配列と、を含む抗体と同じ F R のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第 1 の F R 結合ドメインは、配列番号 24、25、及び 26 からなる群から選択される V H アミノ酸配列と、配列番号 19、20、及び 21 からなる群から選択される V L アミノ酸配列と、を含む抗体と同じ F R のエピトープへの結合を競合的に阻害する。いくつかの実施形態では、第 1 の F R 結合ドメインは、配列番号 24、57、及び 26 からなる群から選択される V H アミノ酸配列と、配列番号 19、20、及び 21 からなる群から選択される V L アミノ酸配列と、を含む抗体と同じ F R のエピトープへの結合を競合的に阻害する。いくつかの実施形態では、第 2 の F R 結合ドメインは、配列番号 22 または 23 の V H アミノ酸配列と、配列番号 17 または 18 の V L アミノ酸配列と、を含む抗体と同じ F R のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第 2 の F R 結合ドメインは、配列番号 22 または 23 の V H アミノ酸配列と、配列番号 17 または 18 の V L アミノ酸配列と、を含む抗体と同じ F R のエピトープへの結合を競合的に阻害する。

【0009】

いくつかの実施形態では、第 1 の V H は、それぞれ (a) 配列番号 10 ~ 12 または (b) 配列番号 15、16、及び 12 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 ~ 3 を含み、第 1 の V L は、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 ~ 3 を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の V H は、配列番号 24、25、及び 26 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、及び / または第 1 の V L は、配列番号 19、20、及び 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の F R 結合ドメインは、配列番号 24、57、及び 26 からなる群から選択される V H アミノ酸配列と、配列番号 19、20、及び 21 からなる群から選択される V L アミノ酸配列と、を含む抗体と同じ F R のエピトープへの結合を競合的に阻害する。いくつかの実施形態では、第 2 の V H は、それぞれ (a) 配列番号 7 ~ 9 または (b) 配列番号 13、14、及び 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 ~ 3 を含み、第 2 の V L は、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 ~ 3 を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の V H は、配列番号 22 もしくは 23 のアミノ酸配列を含み、及び / または第 2 の V L は、配列番号 17 もしくは 18 のアミノ酸配列を含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、第 1 の V H と V L の対及び / または第 2 の V H と V L の対は、マウス、非ヒト、ヒト化、キメラ、表面再構成 (r e s u r f a c e d)、またはヒトである。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、ヒト F R に結合するが、F O L R 2 または F O L R 3 に結合しない。いくつかの実施形態では、第 1 の F R 抗原結合ドメインは、単鎖可変断片 (s c F v) である。いくつかの実施形態では、第 1 の F R 結合ドメインの s c F v は、V H - リンカー - V L のペプチドの配向を有する。いくつかの実施形態では、第 1 の F R 結合ドメインの s c F v は、V L - リンカー - V H のペプチドの配向を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の F R 結合ドメインは、単鎖可変断片 (s c F v) である。いくつかの実施形態では、第 2 の F R 結合ドメインの s c F v は、V H - リンカー - V L のペプチド配向を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の F R 結合ドメインの s c F v は、V L - リンカー - V H のペプチドの配向を有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、グリシン - セリンリンカーである。

【0011】

いくつかの実施形態では、第 2 の F R 結合ドメインは、配列番号 27 ~ 29 から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の F R 結合ドメインは、配列番号 30 ~ 32 から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、(i) 配列番号 33 及

10

20

30

40

50

び 34、(i i) 配列番号 35 及び 36、(i i i) 配列番号 37 及び 38、または (i v) 配列番号 39 及び 40 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 41 ~ 43 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 44 ~ 46 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、4 価のバイパトリック抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、2 価のバイパトリック抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、タンデム s c F v、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、及びノブインホール構造からなる群から選択される F R 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、ノブインホール (K I H) 構造を有する。

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、F R 結合ドメインを含み、F R 結合ドメインは、配列番号 1 ~ 3 及び 7 ~ 9 を含み、K I H 構造のノブ側にある。いくつかの実施形態では、F R 結合ドメインは、配列番号 1 ~ 3 及び 7 ~ 9 を含み、K I H 構造のホール側にある。いくつかの実施形態では、F R 結合ドメインは、配列番号 4 ~ 6 及び 10 ~ 12 を含み、K I H 構造のノブ側にある。いくつかの実施形態では、F R 結合ドメインは、配列番号 4 ~ 6 及び 10 ~ 12 を含み、K I H 構造のホール側にある。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、全長抗体を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は第 1 の F R 結合ドメインを含み、第 1 の F R 結合ドメインは、全長抗体である。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は第 2 の F R 結合ドメインを含み、第 2 の F R 結合ドメインは、全長抗体である。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、抗原結合断片を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は第 1 の F R 結合ドメインを含み、第 1 の F R 結合ドメインは、抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は第 2 の F R 結合ドメインを含み、第 2 の F R 結合ドメインは、抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 41 ~ 43 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるバイパトリック抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子の組み合わせである。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示される核酸分子のうちの 1 つを含む単離されたベクターである。

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示される単離された核酸分子、または本明細書で開示される単離されたベクターの組み合わせを含む宿主細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、E . c o l i、P s e u d o m o n a s、B a c i l l u s、S t r e p t o m y c e s、酵母、C H O、Y B / 20、N S 0、P E R - C 6、H E K - 293 T、N I H - 3 T3、H e L a、B H K、H e p G 2

10

20

30

40

50

、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS 1、COS 7、BSC1、BSC40、BMT10細胞、植物細胞、昆虫細胞、及び組織培養におけるヒト細胞からなる群から選択される。

【0020】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるバイパラトピック抗体または抗原、本明細書で開示される核酸分子（複数可）、本明細書で開示されるベクター、または本明細書で開示される宿主細胞の組み合わせ、及び薬学的に許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される医薬組成物は、本明細書で開示されるバイパラトピック抗体、及び医薬担体または賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、抗体またはその抗原結合断片あたり平均1～10の薬物を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、抗体またはその抗原結合断片あたり平均2～5の薬物を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、抗体またはその抗原結合断片あたり平均3～4の薬物を含む。

10

【0021】

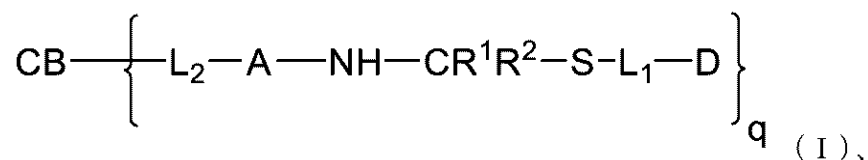
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるバイパラトピック抗体を作製する方法であって、（a）抗体を発現する細胞を培養することと、（b）培養された細胞から抗体を単離することと、を含む方法である。いくつかの実施形態では、培養される細胞は、真核生物である。

【0022】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、以下の式によって表されるイムノコンジュゲート：

20

【化1】



またはその薬学的に許容される塩であって、式中、CBは、本明細書で提供される任意のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片であり、

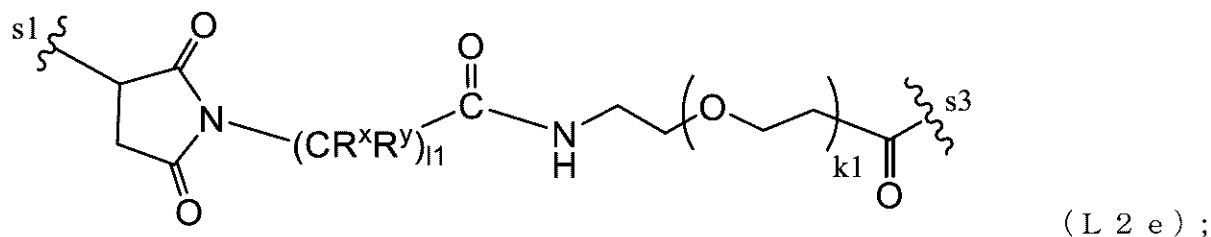
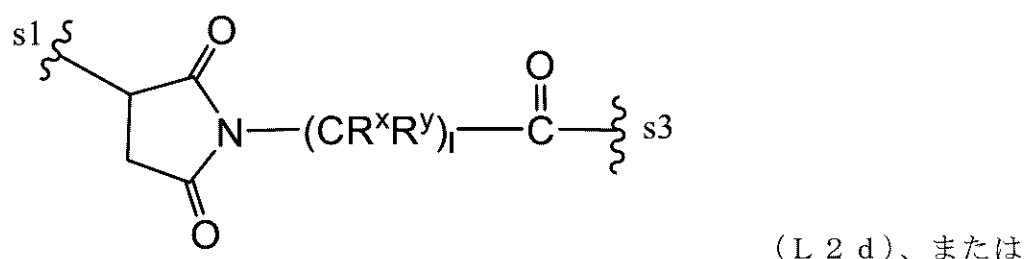
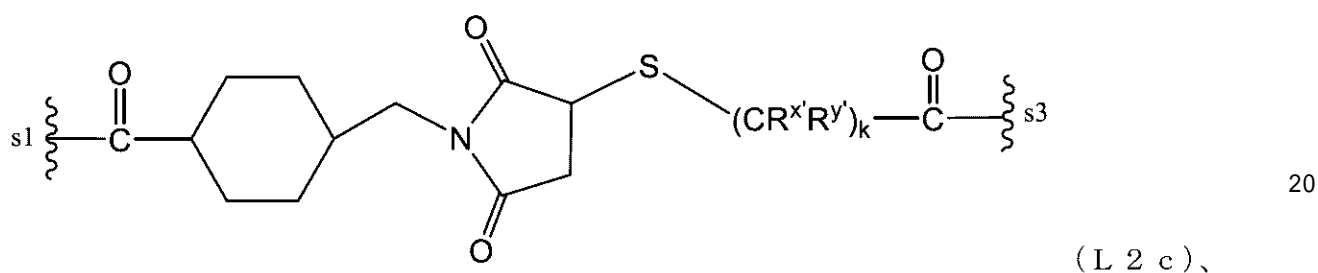
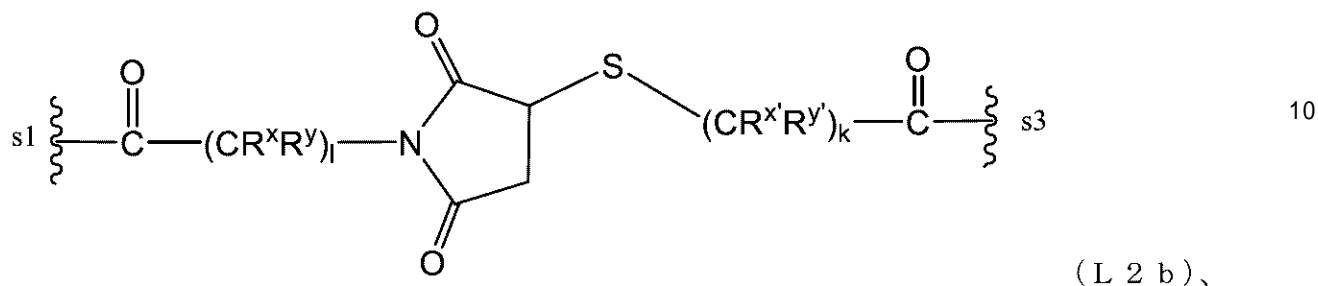
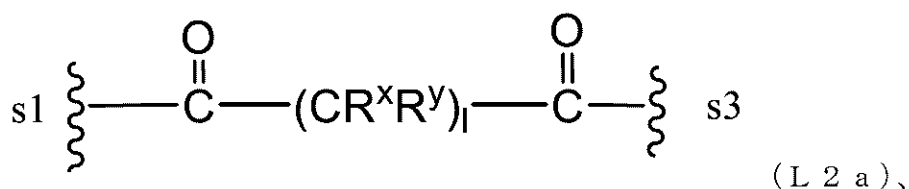
30

L₂は、以下の式のうちの1つによって表され：

40

50

【化 2】



式中、

R^x 、 R^y 、 $R^{x'}$ 、及び $R^{y'}$ は、それぞれの存在について、独立してH、-OH、ハロゲン、-O-(C₁₋₄アルキル)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺、または任意選択で-OH、ハロゲン、SO₃H、もしくはNR₄₀R₄₁R₄₂⁺によって置換されたC₁₋₄アルキルであり、ここで、R₄₀、R₄₁、及びR₄₂は、それぞれ独立してHまたはC₁₋₄アルキルであり；

l及びkは、それぞれ独立して、1～10の整数であり；

l₁は、2～5の整数であり；

k₁は、1～5の整数であり；

s₁は細胞結合剤C_Bに接続された部位を示し、s₃はA基に接続された部位を示し；

Aは、アミノ酸残基または2～20個のアミノ酸残基を含むペプチドであり；

R¹及びR²は、それぞれ独立して、HまたはC₁₋₃アルキルであり；

L₁は、以下の式によって表され；

40

30

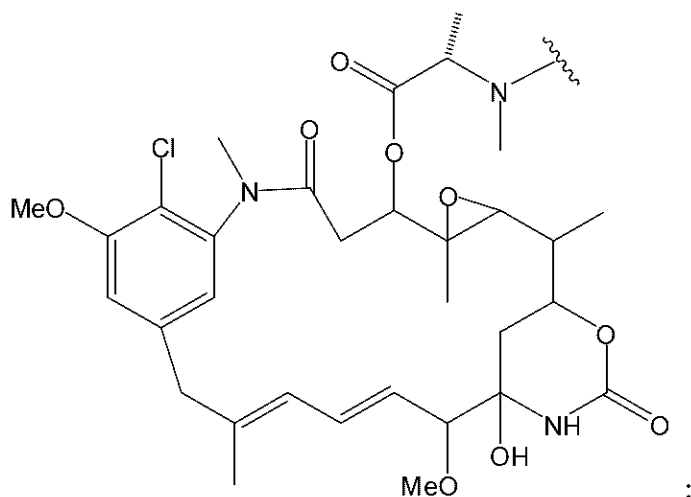
50

- C R³ R⁴ - (C H₂)₁₋₈ - C (= O) -

式中、R³ 及び R⁴ は、それぞれ独立して H または Me であり、L₁ の - C (= O) - 部分は、D に接続されており；

D は以下の式で表され：

【化 3】



10

q は、1 ~ 20 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、1 ~ 10 の整数である。いくつかの実施形態では、q は 2 ~ 5 の整数である。いくつかの実施形態では、q は 3 ~ 4 の整数である。

20

【0023】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートの R^x、R^y、R^{x'}、及び R^{y'} は全て H であり；l 及び k は、それぞれ独立して 2 ~ 6 の整数である。いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートの A は、2 ~ 5 個のアミノ酸残基を含むペプチドである。

【0024】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートの A は、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Val - Ala、D - Val - Ala、Val - Cit、D - Val - Cit、Val - Lys、Phe - Lys、Lys - Lys、Ala - Lys、Phe - Cit、Leu - Cit、Ile - Cit、Phe - Ala、Phe - N⁹ - トシル - Arg、Phe - N⁹ - ニトロ - Arg、Phe - Phe - Lys、D - Phe - Phe - Lys、Gly - Phe - Lys、Leu - Ala - Leu、Ile - Ala - Leu、Val - Ala - Val、Ala - Ala - Ala、D - Ala - Ala - Ala、Ala - D - Ala - Ala、Ala - Ala - D - Ala、Ala - Leu - Ala - Leu (配列番号 54)、- Ala - Leu - Ala - Leu (配列番号 55)、Gly - Phe - Leu - Gly (配列番号 56)、Val - Arg、Arg - Arg、Val - D - Cit、Val - D - Lys、Val - D - Arg、D - Val - Cit、D - Val - Lys、D - Val - Arg、D - Val - D - Cit、D - Val - D - Lys、D - Val - D - Arg、D - Arg - D - Arg、Ala - Ala、Ala - D - Ala、D - Ala - Ala、D - Ala - D - Ala、Ala - Met、Gln - Val、Asn - Ala、Gln - Phe、Gln - Ala、D - Ala - Pro、及び D - Ala - tBu - Gly からなる群から選択され、それぞれのペプチドの最初のアミノ酸は L₂ 基に接続され、それぞれのペプチドの最後のアミノ酸は - NH - C R¹ R² - S - L₁ - D に接続されている。いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートの R¹ と R² は両方とも H である。いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートの L₁ は、- (C H₂)₄₋₆ - C (= O) - である。

30

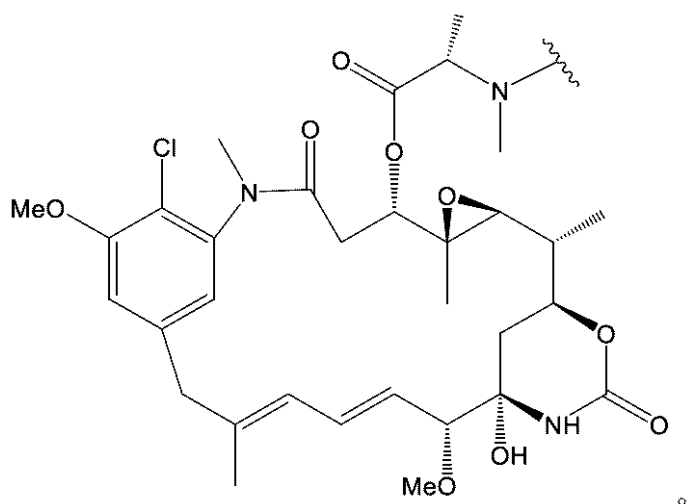
40

【0025】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートの D は、以下の式によって表される：

50

【化 4】



10

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の式：

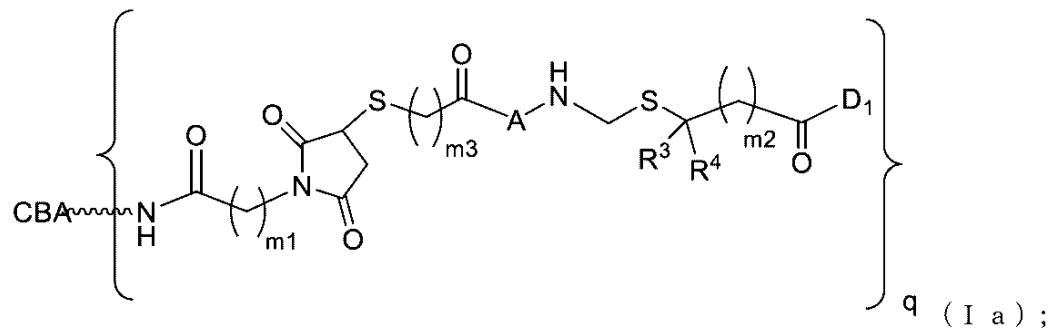
20

30

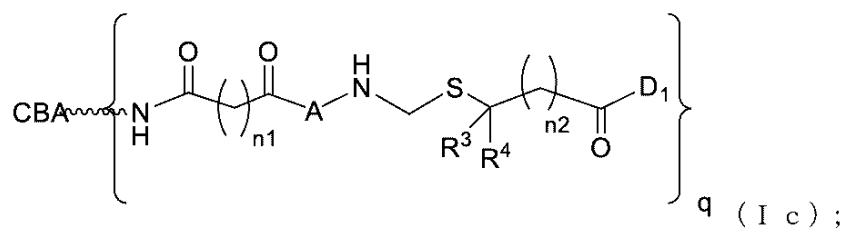
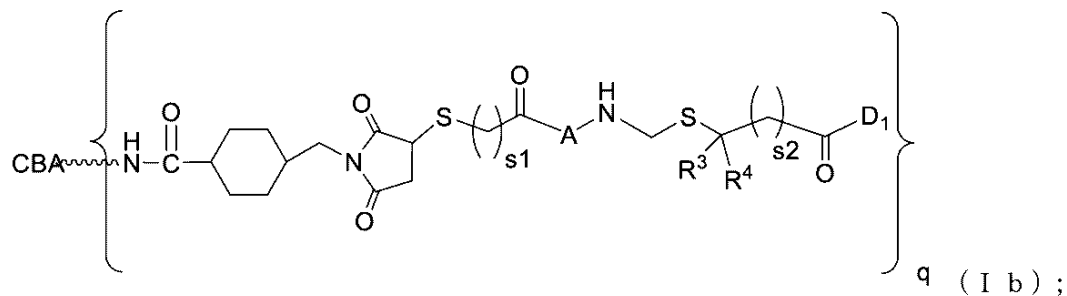
40

50

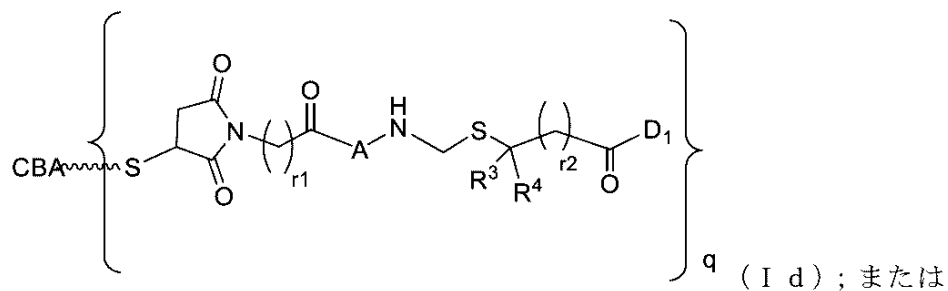
【化 5】



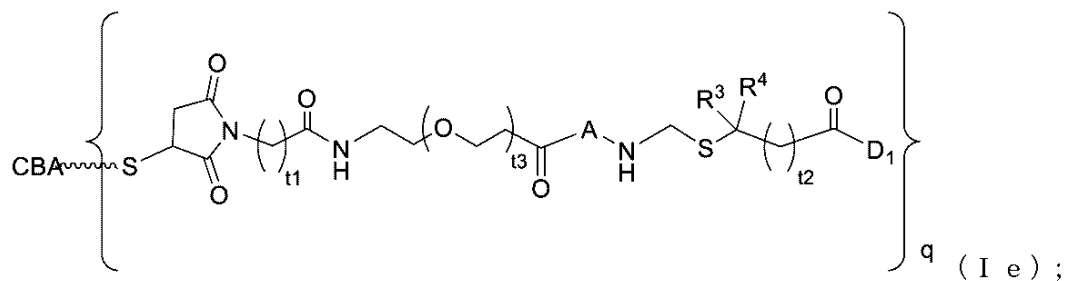
10



20



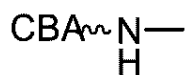
30



40

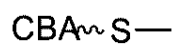
またはその薬学的に許容される塩によって表され、式中、

【化 6】



は、Lysのアミン基を介してL₂基に接続される、本明細書で提供される任意のバイブラトピック抗体またはその抗原結合断片であり；

【化 7】



50

は、Cysのチオール基を介してL₂基に接続される、本明細書で提供される任意のバイ
パラトピック抗体またはその抗原結合断片であり；

R³及びR⁴は、それぞれ独立してHまたはMeであり；

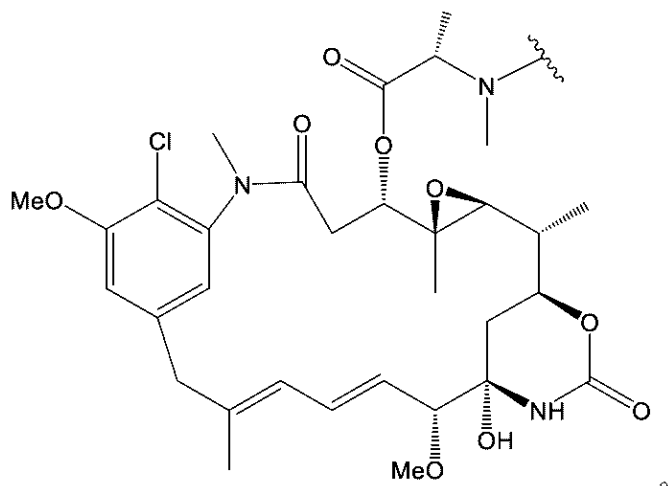
m₁、m₃、n₁、r₁、s₁、及びt₁は、それぞれ独立して1～6の整数であり；

m₂、n₂、r₂、s₂、及びt₂は、それぞれ独立して、1～7の整数であり；

t₃は、1～12の整数であり；

D₁は以下の式で表される：

【化8】



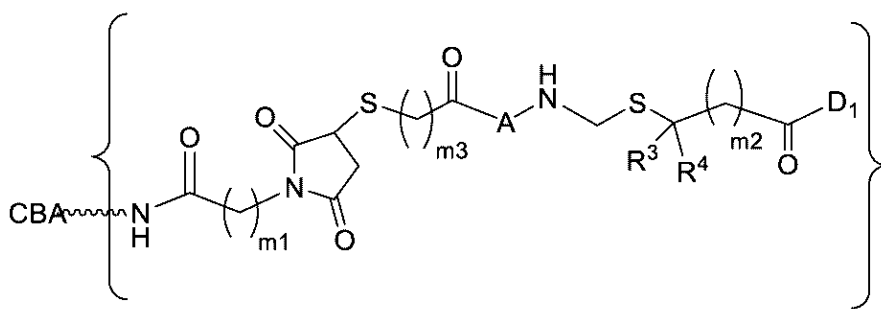
10

20

【0027】

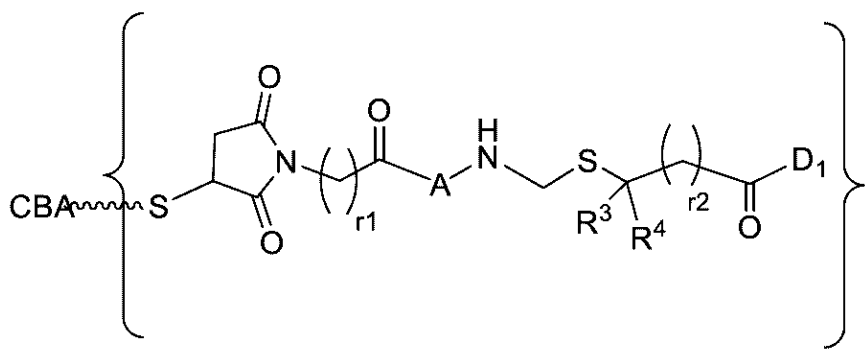
いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の式で表され：

【化9】



30

q (I a)、または



40

q (I d)；

式中：

m₁及びm₃は、それぞれ独立して、2～4の整数であり；

m₂は、2～5の整数であり；

r₁は、2～6の整数であり；

r₂は、2～5の整数である。

50

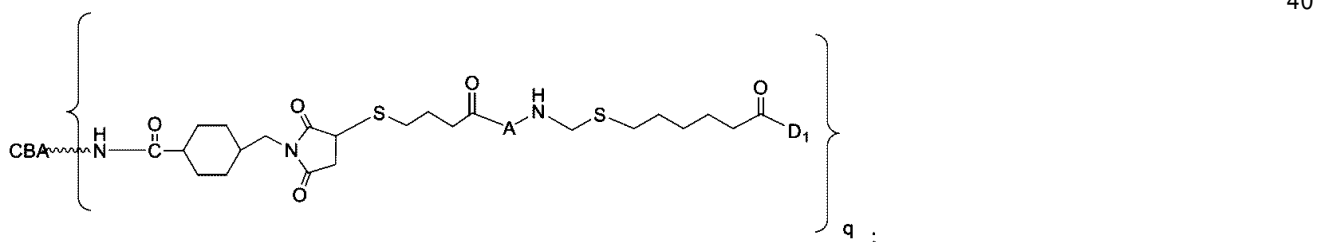
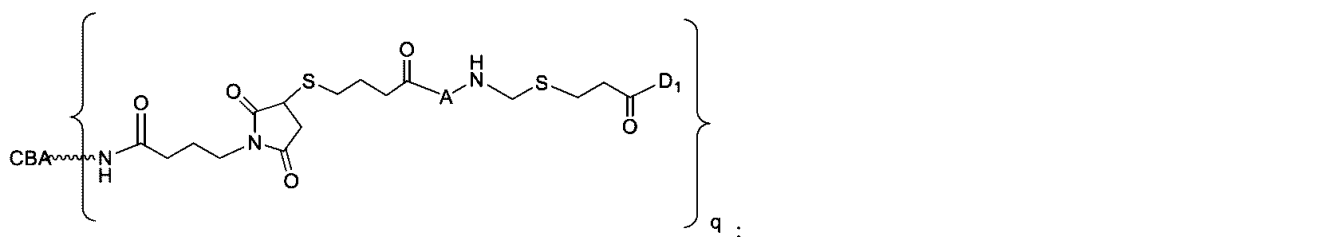
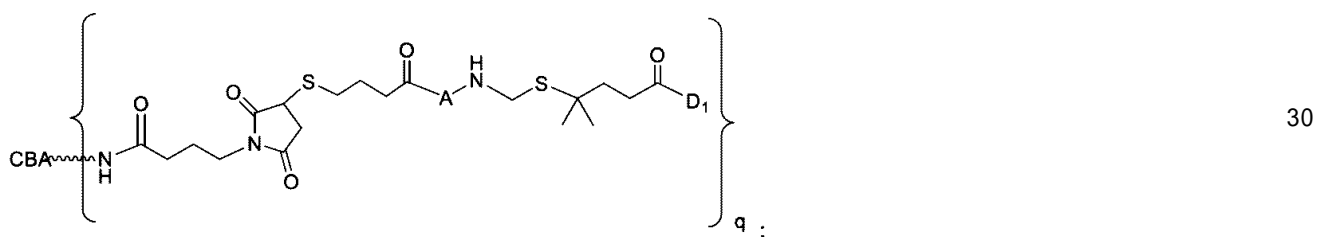
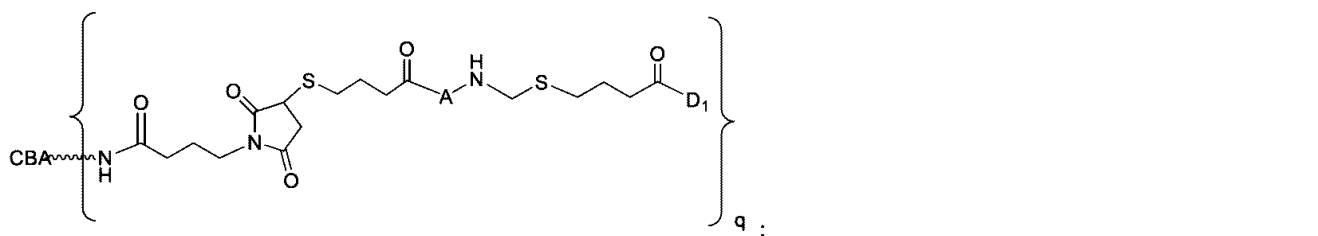
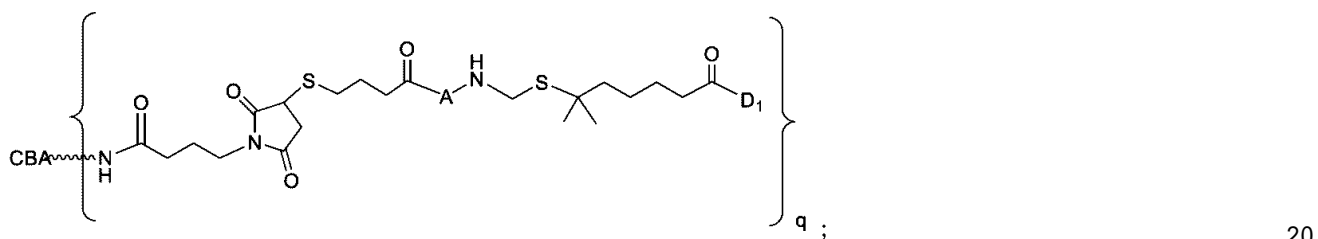
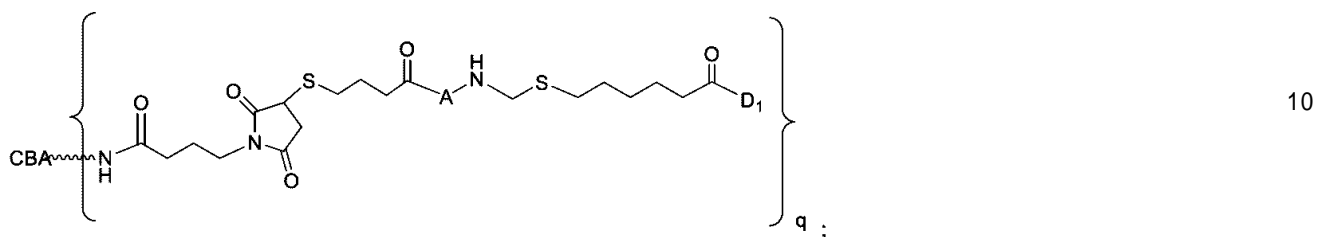
【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートのAは、Ala - Ala - Ala、Ala - D - Ala - Ala、Ala - Ala、D - Ala - Ala、Val - Ala、D - Val - Ala、D - Ala - Pro、またはD - Ala - tBu - Glyである。

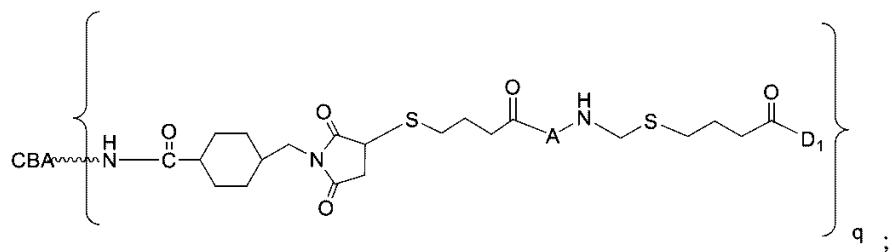
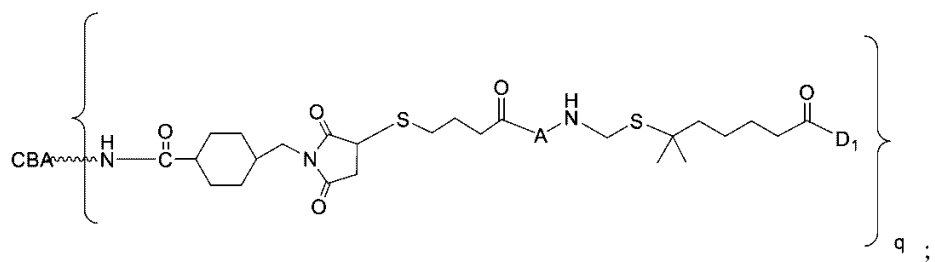
【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の式：

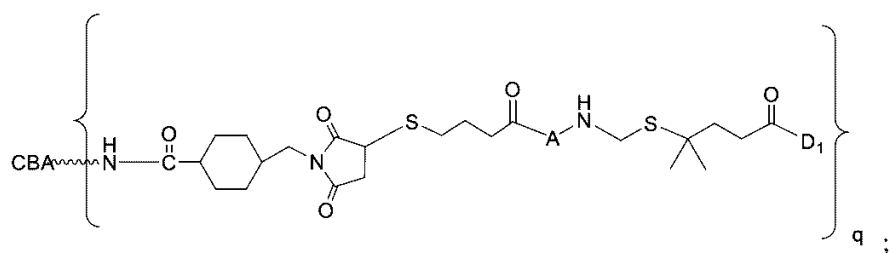
【 化 1 0 - 1 】



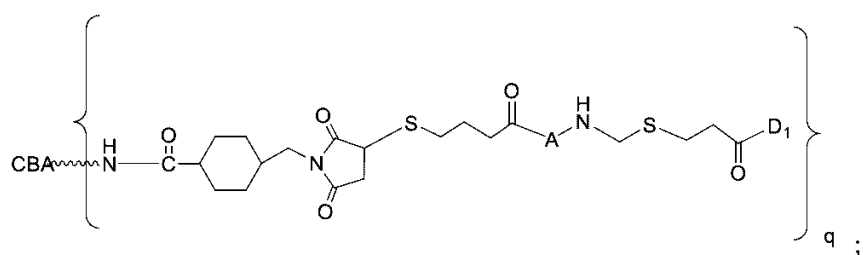
【化 1 0 - 2】



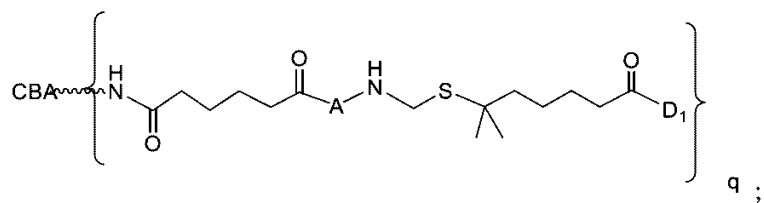
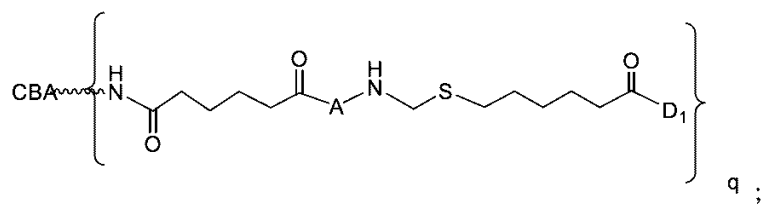
10



20



30



40

50

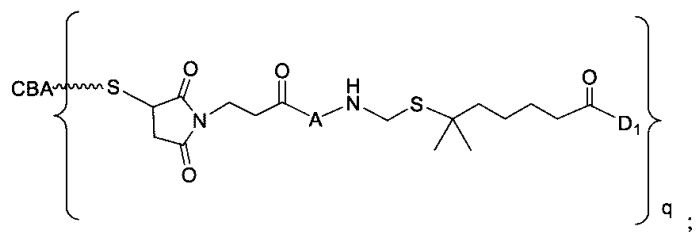
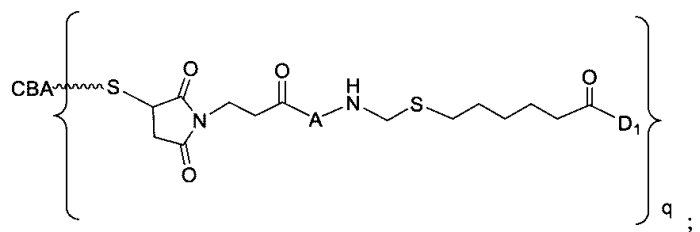
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2\text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q ;$$
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{C}(\text{CH}_3)_3 - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q ;$$
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2\text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q$$
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q ;$$
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{C}(\text{CH}_3)_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q ;$$
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q$$
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{C}(\text{CH}_3)_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q ;$$
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q ;$$

20

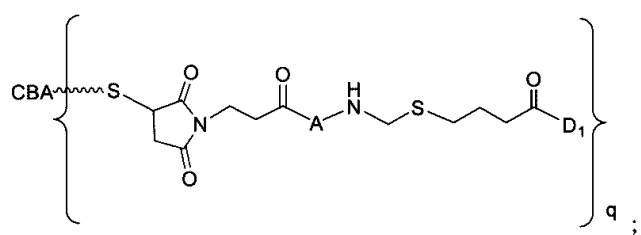
30

40

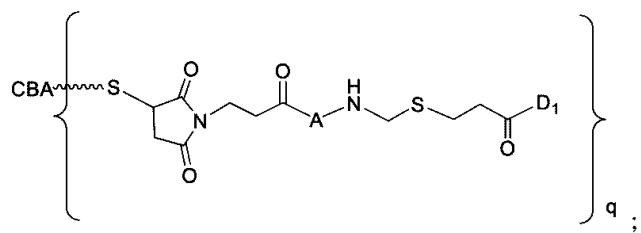
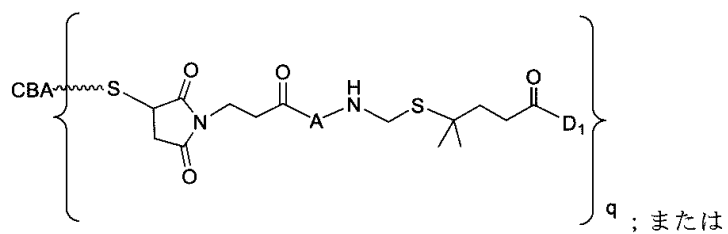
【化 1 0 - 4】



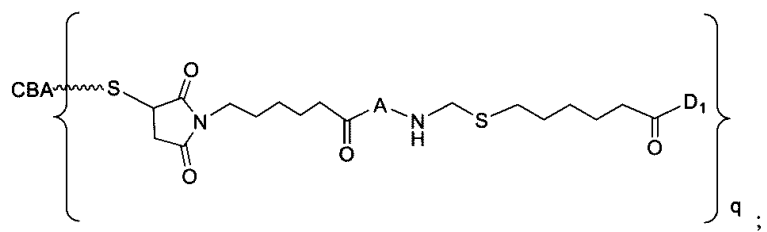
10



20



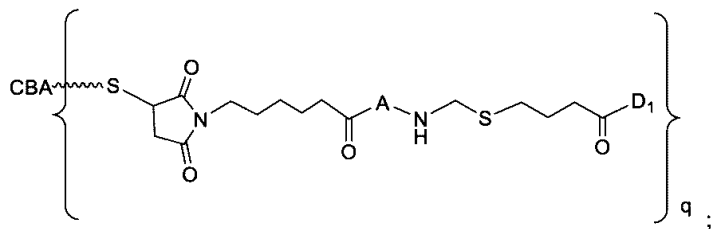
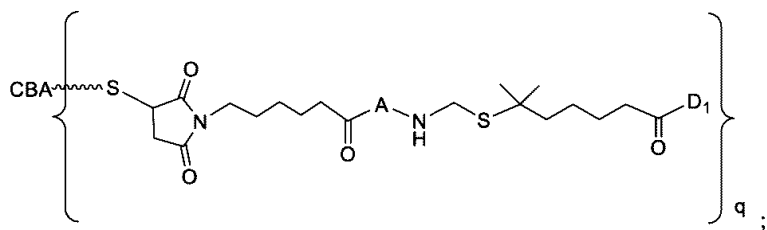
30



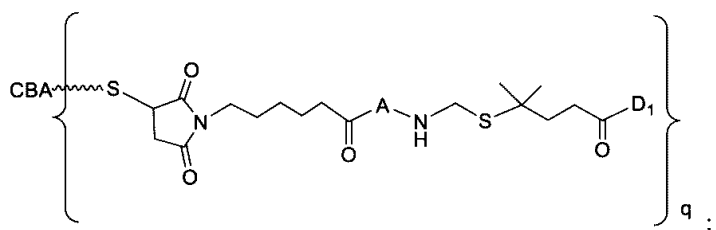
40

50

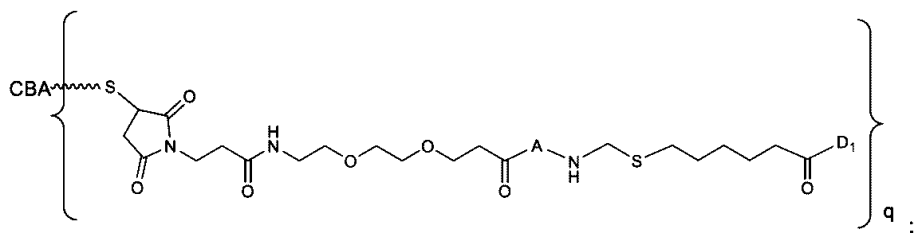
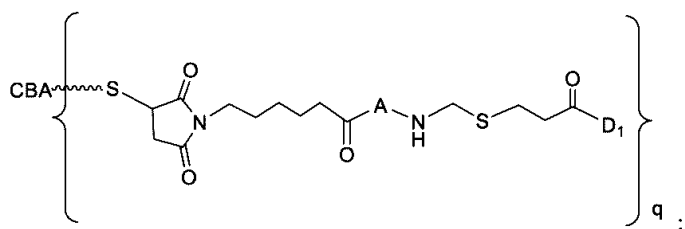
【化 1 0 - 5】



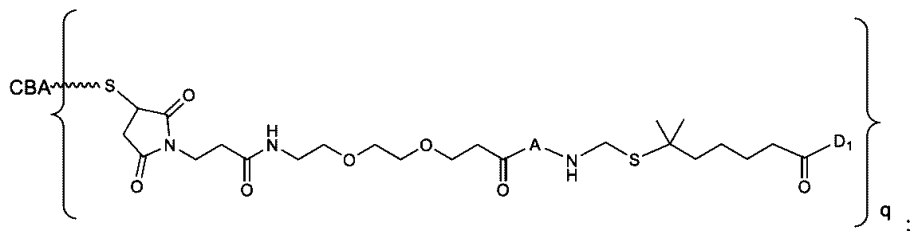
10



20



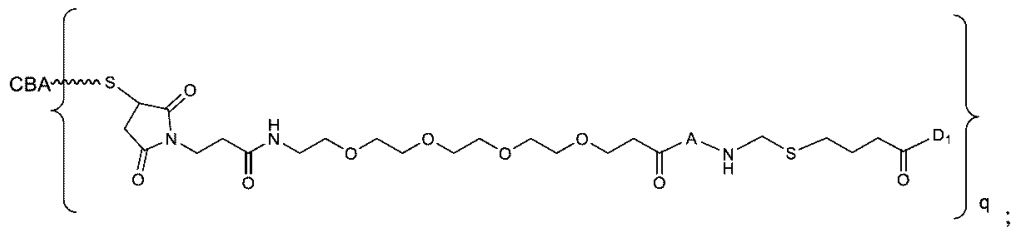
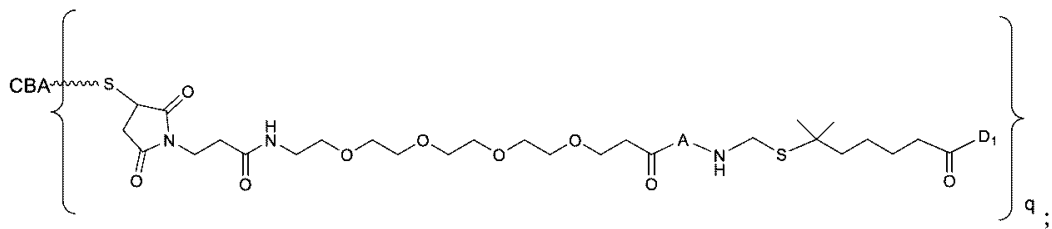
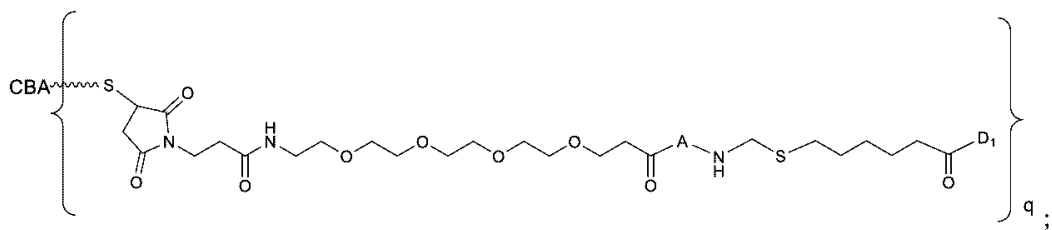
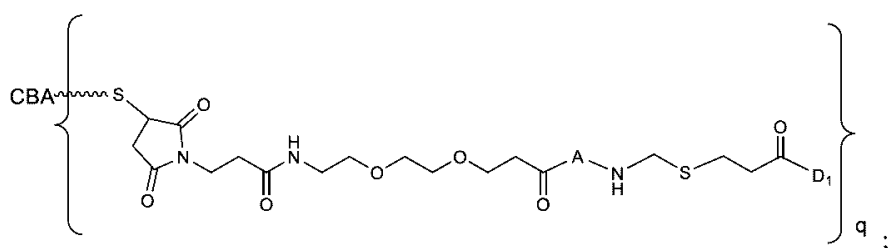
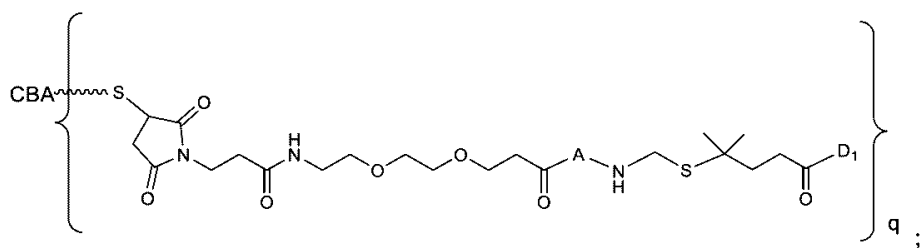
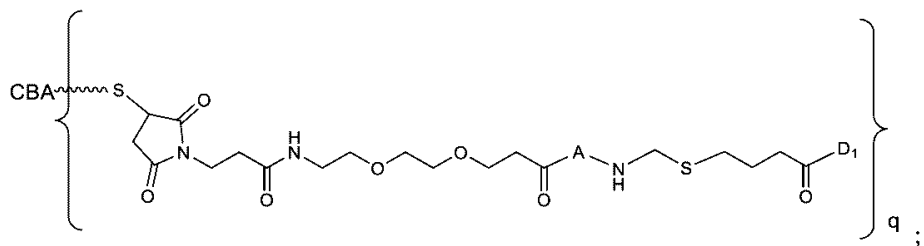
30



40

50

【化 1 0 - 6】



10

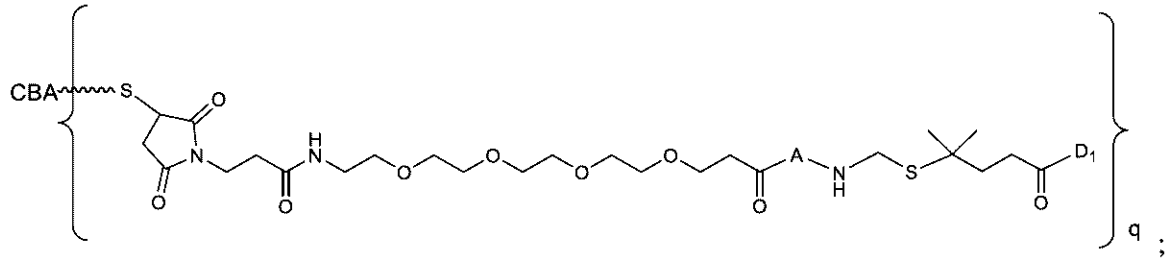
20

30

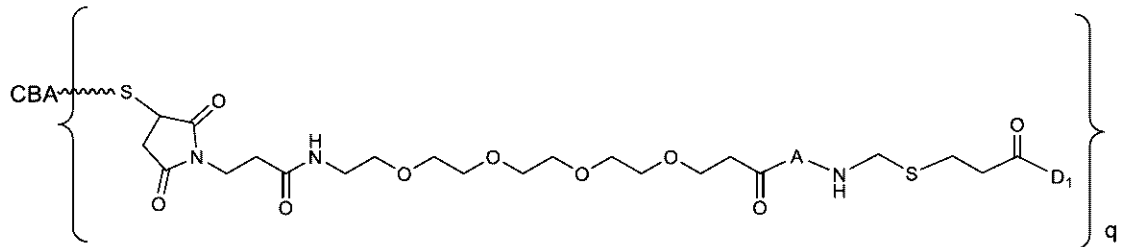
40

50

【化 10 - 7】



または



10

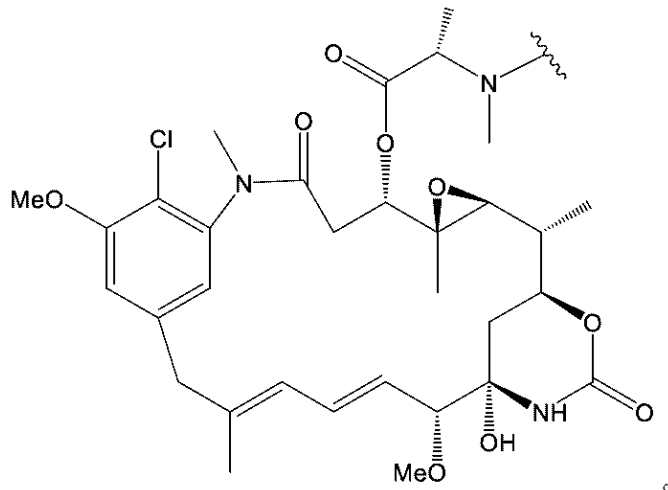
またはその薬学的に許容される塩によって表され、式中、

Aは、Ala - Ala - Ala、Ala - D - Ala - Ala、Ala - Ala、D - Ala - Ala、Val - Ala、D - Val - Ala、D - Ala - Pro、またはD - Ala - tBu - Glyであり；

20

D₁は以下の式で表される：

【化 11】



30

【0030】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の式で表され：

40

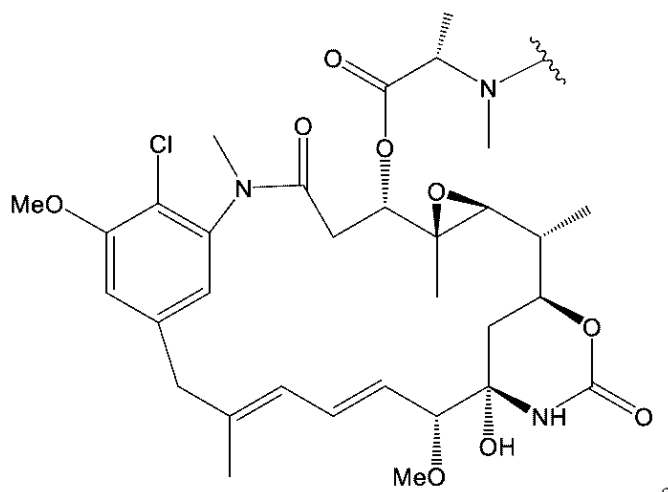
$$\left\{ \text{CBA} \cdots \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}(=\text{O}) \\ \diagdown \text{C}(=\text{O}) \end{array} \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_n$$


;

 q ; または

50

【化 1 3】

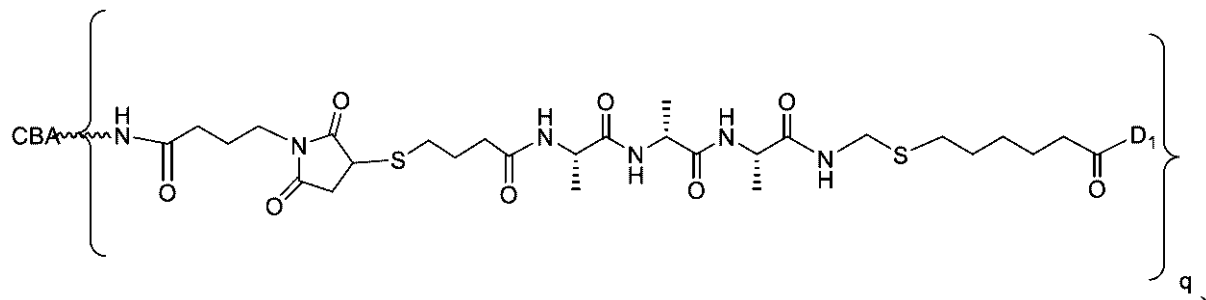


10

【 0 0 3 1】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の式で表され：

【化 1 4】



20

式中、

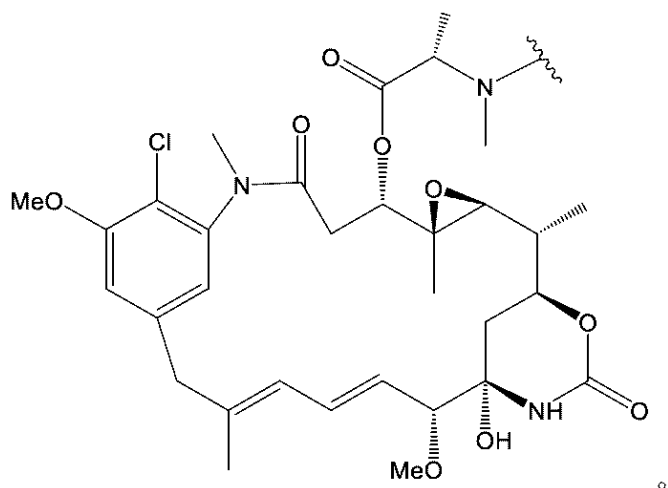
CBAは、本明細書で提供される任意のバイパロトピック抗体またはその抗原結合断片であり、

30

qは、1～10の整数、例えば、1または10であり；

D₁は以下の式で表される：

【化 1 5】



40

【 0 0 3 2】

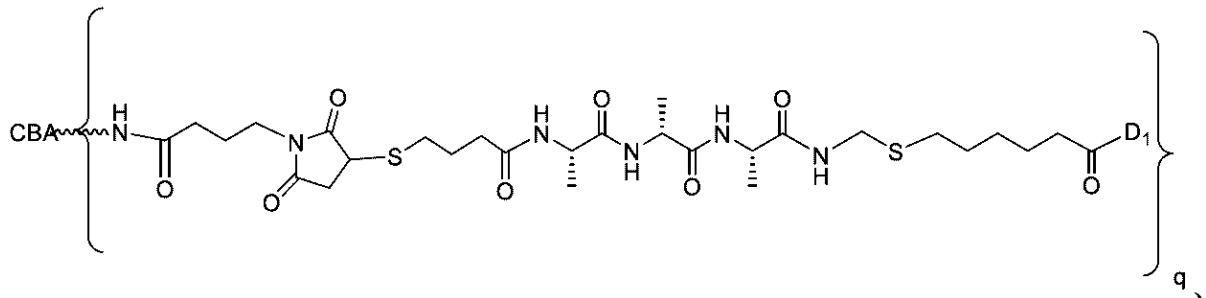
いくつかの実施形態では、qは、2～5の整数である。いくつかの実施形態では、qは、3～4の整数である。

50

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の式：

【 化 1 6 】



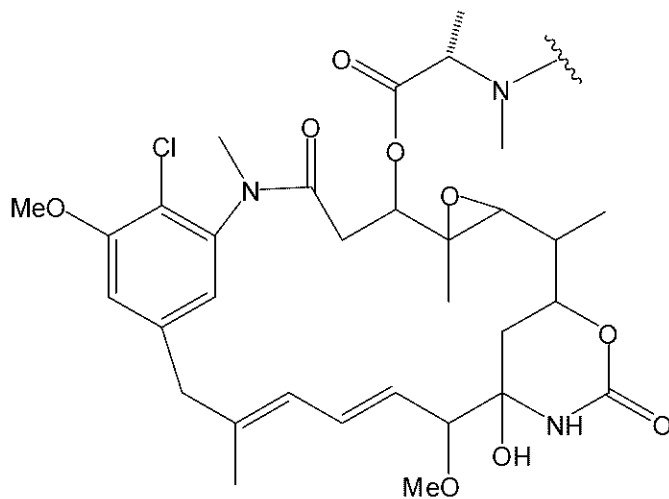
10

またはその薬学的に許容される塩で表され、式中、

C B A は、配列番号 4 1 ~ 4 3 のアミノ酸配列を含むバイパラトピック抗体または抗原結合断片であり；

D₁ は、以下の式で表され：

【 化 1 7 】



20

30

q は、1 ~ 10 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、2 ~ 5 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、3 ~ 4 の整数である。

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるのは、式 (A) - (L) - (C) を有するイムノコンジュゲートであって、式中、

(A) は、本明細書で提供される任意のバイパラトピック抗体または抗原結合断片であり、

(L) は、リンカーであり；

(C) は細胞傷害性薬剤であり、リンカー (L) は (A) を (C) に連結する。

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるイムノコンジュゲートのリンカーは、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、親水性リンカー、及びジカルボン酸ベースのリンカーからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、リンカーは、N - (マレイミドブトリルオキシ) スルホスクシンイミドエステル (スルホ - G M B S または s G M B S)、マレイミド酪酸 N - スクシンイミジルエステル (G M B S)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) - 2 - スルホブタノエート (スルホ - S P D B) ； N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペンタノエート (S P P) または N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) - 2 - スルホペンタノエート (スルホ - S P P) ； N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (S P D B) 、 N - スクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (S

40

50

MCC) ; N - スルホスクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (スルホSMCC) ; N - スクシンイミジル - 4 - (ヨードアセチル) - アミノ安息香酸 (SIAB) ; 及び N - スクシンイミジル - [(N - マレイミドプロピオンアミド) - テトラエチレングリコール] エステル (NHS - PEG 4 - マレイミド) からなる群から選択される。

【0036】

いくつかの実施形態では、リンカーは、スルホ - GMB S である。

【0037】

いくつかの実施形態では、リンカーは GMB S である。

【0038】

いくつかの実施形態では、リンカーはスルホ - SPDB である。

【0039】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるイムノコンジュゲートの細胞傷害性薬剤は、マイタンシノイド、マイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、タキソイド、CC - 1065、CC - 1065 類似体、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリチアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アウリスタチン、トメイマイシン誘導体、及びレプトマイシン誘導体または薬剤のプロドラッグからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬剤は、マイタンシノイドである。

【0040】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、第2の(C)をさらに含む。いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、第3の(C)をさらに含む。いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、第4の(C)をさらに含む。

【0041】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示される少なくとも1つのイムノコンジュゲートを含む組成物であり、イムノコンジュゲートは、Aあたり平均3～4個のCを含む。

【0042】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、抗体またはその抗原結合断片あたり平均1～10の薬物を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、抗体またはその抗原結合断片あたり平均2～5の薬物を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、抗体またはその抗原結合断片あたり平均3～4の薬物を含む。

【0043】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、対象においてがんを治療する方法であって、治療有効量の本明細書で開示される抗体もしくはその抗原結合断片、本明細書で開示されるイムノコンジュゲート、または本明細書で開示される医薬組成物を対象に投与することを含む、方法である。

【0044】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、がんを治療する方法である。いくつかの実施形態では、がんは、卵巣癌、子宮癌、腹膜癌、卵管癌、子宮内膜癌、肺癌、または脳癌である。いくつかの実施形態では、がんは、卵巣癌である。いくつかの実施形態では、卵巣癌は、プラチナ抵抗性上皮性卵巣癌である。いくつかの実施形態において、卵巣癌は、再発した上皮性卵巣癌である。特定の実施形態では、卵巣癌は、プラチナ不応性上皮性卵巣癌である。いくつかの実施形態では、がんは、子宮癌である。いくつかの実施形態では、がんは、腹膜癌である。いくつかの実施形態では、がんは卵管癌である。いくつかの実施形態では、がんは、子宮内膜癌である。いくつかの実施形態では、がんは、肺癌である。いくつかの実施形態では、がんは、脳癌である。いくつかの実施形態では、がんは、IMGN 853 耐性である。

【0045】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、方法は、ステロイドの投与をさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】 huMov19 - ビオチンと葉酸受容体抗体 FR57 ; FR 抗体 A (「FR - A」) ; FR 抗体 B (「FR - B」) ; FR 抗体 C (「FR - C」) ; 及び非ビオチン化 huMov19 (「huMov19」) との結合競合を FACS により示す。(実施例1を参照されたい。)

【図2】従来の単一特異性抗体 (huMov19 及び FR57 など)、2 価のバイパラトピックノブインホール (KIH) 抗体、ならびに 4 価のバイパラトピック (Morrison) 抗体の例示的な分子、特性、及び概略図を示す。(実施例1を参照されたい。)

【図3】非対称Fcベースの分子を生成するために使用されたいくつかの重鎖と軽鎖のプラスミドのトランスフェクション比のゲルを示す。L1 : FR57 scFv - ノブのみによるトランスフェクション ; L2 : 4 : 4 : 1 での Mov19 LC : Mov19 HC - ホール : FR57 scFv - ノブのトランスフェクション ; L3 : 6 : 2 : 1 での Mov19 LC : Mov19 HC - ホール : FR57 scFv - ノブのトランスフェクション ; L4 : 6 : 6 : 1 での Mov19 LC : Mov19 HC - ホール : FR57 scFv - ノブのトランスフェクション ; L5 : 9 : 3 : 1 での Mov19 LC : Mov19 HC - ホール : FR57 scFv - ノブのトランスフェクション ; L6 : 2 : 3 : 1 での Mov19 LC : Mov19 HC - ホール : FR57 scFv - ノブのトランスフェクション ; L7 : 1 : 1 : 1 での Mov19 LC : Mov19 HC - ホール : FR57 scFv - ノブのトランスフェクション ; L8 : 3 : 1 での Mov19 LC : Mov19 - ホールのトランスフェクション ; L9 : アイソタイプヒト IgG1 トランスフェクション。(実施例1を参照されたい。)

【図4A】競合FACSによる Morrison の抗体またはその断片の結合活性を示す。(実施例2を参照されたい。)特に、Mov19 - G1 - FR57 scFv1 (M9346A - FR57 scFv) の結合活性を示す。

【図4B】競合FACSによる Morrison の抗体またはその断片の結合活性を示す。(実施例2を参照されたい。)特に、FR57 - G1 - Mov19 scFv1 (FR57 - M9346A scFv) の結合活性を示す。

【図4C】競合FACSによる Morrison の抗体またはその断片の結合活性を示す。(実施例2を参照されたい。)特に、Mov19 - G1 - FR 抗体 - A - scFv1 (M9346A - FR - A : scFv) の結合活性を示す。

【図4D】競合FACSによる Morrison の抗体またはその断片の結合活性を示す。(実施例2を参照されたい。)特に、FR 抗体 - A - G1 - Mov19 scFv1 (FR - A : M9346A scFv) の結合活性を示す。

【図4E】競合FACSによる Morrison の抗体またはその断片の結合活性を示す。(実施例2を参照されたい。)特に、FR 抗体 - A - scFv2 - G1 - Mov19 (FR - A : scFv - M9346A) の結合活性を示す。

【図4F】競合FACSによる Morrison の抗体またはその断片の結合活性を示す。(実施例2を参照されたい。)特に、FR 抗体 - B - scFv2 - G1 - Mov19 (FR - B : scFv - M9346A) の結合活性を示す。

【図4G】競合FACSによる Morrison の抗体またはその断片の結合活性を示す。(実施例2を参照されたい。)特に、FR 抗体 - C - scFv2 - G1 - Mov19 (FR - C : scFv - M9346A) の結合活性を示す。

【図4H】競合FACSによる Morrison の抗体またはその断片の結合活性を示す。(実施例2を参照されたい。)特に、FR57 scFv2 - G1 - Mov19 (FR57 scFv - M9346A) の結合活性を示す。

【図5】非還元及び還元条件下での FR57 scFv2 - ノブ - Mov19 - ホール抗体の3つの精製された調製物 (P1、P2、及びP3) の SDS PAGE ゲルを示す。FR57 scFv2 - ノブ - Mov19 - ホール抗体は、ノブインホール (KIH) フォー

10

20

30

40

50

マットのバイパルトピック抗体であり、抗体のノブ側にFR57 scFvがあり、抗体のホール側にhuMov19抗体配列がある。(実施例2を参照されたい。)

【図6】FR57 scFv2 - ノブ - Mov19 - ホール抗体の0日目と14日目の試料から得られたサイズ排除クロマトグラフィーの結果のオーバーレイを示す。mAU: ミリ吸光度単位。(実施例2を参照されたい。)

【図7】huMov19(「親」)抗体と比較した、ノブインホール(KIH)バイパルトピック抗体(A、C、及びE)、または4価のバイパルトピック抗体(B、D、及びF)の、結合(A及びB)、内在化及びプロセッシング(C及びD)、ならびに分解(E及びF)を示す。(実施例2を参照されたい。)

【図8】ビヒクル、4価のバイパルトピック抗体を含むイムノコンジュゲート(「4価 - s - SPDB - DM4」)、またはhuMov19抗体を含むイムノコンジュゲート(「M - s - SPDB - DM4」)の投与後の、OV - 90異種移植モデルにおける腫瘍体積の中央値を示す。(実施例4を参照されたい。)

10

【図9】ビヒクル、4価 - s - SPDB - DMまたはM - s - SPDB - DM4の投与後の、Igrov - 1異種移植モデルにおける腫瘍体積の中央値を示す。(実施例4を参照されたい。)

【図10】ビヒクル、ノブインホールのバイパルトピック抗体を含むイムノコンジュゲート(「KIH - s - SPDB - DM4」)、またはM - s - SPDB - DM4の投与後の、OV - 90異種移植モデルにおける腫瘍体積の中央値を示す。(実施例4を参照されたい。)

20

【図11】KB細胞に対するFR57抗体を含むイムノコンジュゲート(FR57 - L - DM21)またはhuMov19抗体を含むイムノコンジュゲート(M - L - DM21)の細胞傷害性活性を示す。(実施例5を参照されたい。)

【図12】KB細胞(A)、Igrov - 1細胞(B)、JEG - 3細胞(C)、T47D細胞(D)、及びJHOS - 4細胞(E)を含む、FR陽性細胞株のパネルに対する、バイパルトピックKIH - DM21イムノコンジュゲート、huMov19イムノコンジュゲートM - DM21、及びhuMov19イムノコンジュゲートM - s - SPDB - DM4の細胞傷害活性を示す。(実施例5を参照されたい。)

【図13】KB細胞(A)、Igrov - 1細胞(B)、JEG - 3細胞(C)、及びT47D細胞(D)と混合された標的陰性細胞Namalwa/luclにおける、バイパルトピックKIH - L - DM21イムノコンジュゲート、huMov19イムノコンジュゲートM - L - DM21、及びhuMov19イムノコンジュゲートM - s - SPDB - DM4のインビトロバースタンダー殺傷活性を示す。(実施例5を参照されたい。)

30

【図14A】OV - 90異種移植モデルに対する、バイパルトピックイムノコンジュゲートKIH - L - DM21及びhuMov19イムノコンジュゲートM - L - DM21の投与後の腫瘍体積の中央値を示す。(実施例6を参照されたい。)

【図14B】OV - 90異種移植モデルに対する、バイパルトピックイムノコンジュゲートKIH - s - SPDB - DM4及びhuMov19イムノコンジュゲートM - s - SPDB - DM4の投与後の腫瘍体積の中央値を示す。(実施例6を参照されたい。)

【図15】Ishikawa異種移植モデルに対する、ビヒクル、huMov19イムノコンジュゲートM - L - DM21、またはhuMov19イムノコンジュゲートM - s - SPDB - DM4(「IMG N853」)と比較された、バイパルトピックイムノコンジュゲートKIH - L - DM21イムノコンジュゲートの投与後の腫瘍体積の中央値を示す。(実施例6を参照されたい。)

40

【図16】Igrov - 1異種移植モデルに対する、ビヒクル、huMov19イムノコンジュゲートM - L - DM21、またはhuMov19イムノコンジュゲートIMG N853と比較された、バイパルトピックKIH - L - DM21イムノコンジュゲートの投与後の腫瘍体積の中央値を示す。(実施例6を参照されたい。)

【図17】KB異種移植モデルに対する、ビヒクル、huMov19イムノコンジュゲートM - L - DM21、またはhuMov19イムノコンジュゲートM - s - SPDB - D

50

M4と比較された、バイパルトピックKIH-L-DM21イムノコンジュゲートの投与後の腫瘍体積の中央値を示す。(実施例7を参照されたい。)

【図18】A及びBは、全抗体(TAb:全抗体、コンジュゲート及び非コンジュゲート)と比較した、バイパルトピックKIH-sSPDB-DM21イムノコンジュゲート(A)及びhuMov19イムノコンジュゲートM-s-SPDB-DM4(「IMGN853」)(B)の毒性を示す。(実施例7を参照されたい。)

【図19】IMGN853耐性KBヒト子宮頸癌異種移植モデルに対する、ビヒクル、huMov19イムノコンジュゲートM9346A-DM21-L、またはhuMov19イムノコンジュゲートIMGN853と比較された、バイパルトピックKIH-L-DM21イムノコンジュゲートの投与後の腫瘍体積の中央値を示す。(実施例6を参照されたい。)

10

【発明を実施するための形態】

【0047】

I. 定義

本開示の理解を促すために、いくつかの用語及び語句を以下に定義する。

【0048】

特に断りのない限り、「ヒト葉酸受容体1」、「FR」、「葉酸受容体アルファ(FR-)」、または「FOLR1」という用語は、本明細書で使用される場合、任意の天然のヒトFRポリペプチドを指す。「FR」という用語は、「全長」の未処理のFRポリペプチド、ならびに細胞内の処理から生じるFRポリペプチドの任意の形態を包含する。この用語はまた、FRの天然に存在するバリエーション、例えば、スプライスバリエーション及び対立遺伝子バリエーションによってコードされるものを包含する。本明細書に記載されるFRポリペプチドは、ヒト組織型から、もしくは別の供給源からなど、多様な供給源から単離され得るか、または組換えまたは合成法によって調製され得る。具体的に示される場合、「FR」は、FRポリペプチドをコードする核酸を指すために使用され得る。ヒトFR配列は公知であり、例えば、(アイソフォームを含む)UniProtKBアクセッション番号P15328で公的に入手可能である配列を含む。本明細書で使用される場合、「ヒトFR」という用語は、配列番号53の配列を含むFRを指す。

20

【化18】

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLH
EQCRPWRKNACCSTNTSQAHKDVSYLRYFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYEC
SPNLGPWIIQQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWT
SGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNNYSRGSGRCIQMWFDPAQG
NPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS (配列番号53)。

30

【0049】

「抗FR抗体」または「FRに結合する抗体」という用語は、抗体がFRを標的化する点において診断剤及び/または治療剤として有用になるように、十分な親和性でFRに結合することができる抗体を指す。本明細書で使用される場合、そのような抗体には、例えば、二重特異性(例えば、バイパルトピック)抗体が含まれる。別段の定めがない限り、抗FR抗体の、無関係の非FRタンパク質への結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)により測定されたときに、抗体の、FRへの結合の約10%未満である。FR抗体の例は当該技術分野で知られており、米国公開出願番号2012/0009181及び同2012/0282175、ならびに米国特許第9,200,073B2号、及びPCT公開WO2011/106528A1に開示されており、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。例示的な抗FR抗体及びその抗原結合断片の配列は、表1~8において提供される。

40

【0050】

50

「IMGN853」(「ミルベツキシマブソラブタンシン」としても知られる)という用語は、huMov19(またはM9346A)抗体、スルホSPDBリンカー、及びDM4マイタンシノイドを含む本明細書に記載のイムノコンジュゲートを指す。「huMov19」(または「M9346A」)抗体は、配列番号47の全長重鎖(以下の配列番号47に関連して下線が付されている、可変重鎖配列配列番号24を含む)及び配列番号48の全長軽鎖(以下の配列番号48に関連して下線が付されている、可変軽鎖配列配列番号19を含む)を含む抗FR抗体である。

【化19】

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWKQSPGQSLEWIGRIHPYDGD
DTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号47)

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQOPRLLIYRASNL
EAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号48)

【0051】

huMov19(M9346A)抗体は、ブダペスト条約の条項に基づいて2010年4月7日に10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110にあるAmerican Type Culture Collection(ATCC)に寄託されたプラスミドによってコードされており、ATCC寄託番号PTA-10772及びPTA-10773または10774を有している。DM4は、N2'-デアセチル-N2'-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソベンチル)マイタンシノイドを指す。「スルホSPDB」は、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホブタノエート)リンカーを指す。

【0052】

特定の腫瘍、組織、細胞試料における「上昇した」FR、FRの「増加した発現」、またはFRの「過剰発現」という用語は、同じ種類または起源の健常または非疾患(天然、野生型)の組織または細胞に存在するレベルよりも高いレベルで存在するFR(FRポリペプチドまたはそのようなポリペプチドをコードする核酸)を指す。そのような増加した発現または過剰発現は、例えば、変異、遺伝子増幅、増加した転写、増加した翻訳、または増加したタンパク質の安定性によって引き起こされ得る。

【0053】

FR発現は、免疫組織化学的に測定することができ、定義されたスコアを示す較正対照と比較して「染色強度スコア」または「染色均一性スコア」を与えることができる(例えば、強度がレベル3の較正対照と同等であれば強度スコア3が試験試料に与えられ、強度がレベル2の較正対照と同等であれば強度スコア2が試験試料に与えられる)。例えば

10

20

30

40

50

、1、2、または3のスコアは、好ましくは、免疫組織化学によって2または3のスコアが、FR の増加した発現を示している。不均一または均一である染色の均一性はまた、FR 発現を示す。染色強度及び染色均一性スコアは、単独で使用することも、組み合わせて使用することもできる（例えば、2 homo、2 hetero、3 homo、3 heteroなど）。染色の均一性は、特定の強度で染色された細胞のパーセンテージ（%）で表すこともできる（例えば、25%の細胞が1、2、または3の強度で染色される；50%の細胞が1、2、または3の強度で染色される；70%の細胞が1、2、または3の強度で染色される）。別の例では、FR 発現の増加は、対照の値（例えば、がんのない、またはFR 値が上昇していないがんのある対象からの組織または細胞における発現レベル）と比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、または、少なくとも5倍の増加の検出によって決定することができる。FR 発現は、免疫組織化学によって測定することができ、視覚的なスコアが与えられ、FR 陽性は、10倍以下の顕微鏡対物レンズでFR の膜の染色が可視化される腫瘍細胞が50%以上あることを指す。

【0054】

「抗体」という用語は、標的、例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、またはこれらの組み合わせを、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を介して認識しこれに特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味する。本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、無傷のポリクローナル抗体、無傷のモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体を含む融合タンパク質、及び抗体が所望の生物活性を示す限り任意の他の改変された免疫グロブリン分子を包含する。本明細書で使用される場合、そのような抗体には、例えば、二重特異性（例えば、バイパラトピック）抗体が含まれる。抗体は、それぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、及びミューと呼ばれる重鎖定常ドメインの識別性に基づいて、5つの主な免疫グロブリンクラス、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM、またはそれらのサブクラス（アイソタイプ）（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）のいずれかであり得る。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なるよく知られたサブユニット構造及び3次元構成を有する。抗体は、ネイキッドであるか、または毒素、放射性同位体等の他の分子にコンジュゲートすることができる。

【0055】

「抗体断片」または「その抗体断片」という用語は、無傷の抗体の一部を指す。「抗原結合断片」とは、抗原に結合する無傷の抗体の一部を指す。抗原結合性断片は、無傷の抗体の抗原決定可変領域を含み得る。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片、直線状抗体、及び一本鎖抗体が挙げられるがこれらに限定されない。抗体断片は、ネイキッドであるか、または毒素、放射性同位体等の他の分子にコンジュゲートすることができる。

【0056】

「モノクローナル」抗体またはその抗原結合断片とは、単一の抗原決定基、すなわち、エピトープの抗原特異性の高い認識及び結合に関与する均一な抗体または抗原結合断片の集団を指す。これは、通常は異なる抗原決定基に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体とは対照的である。「モノクローナル」抗体またはその抗原結合断片という用語は、無傷かつ全長のモノクローナル抗体、ならびに抗体断片（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された免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル」抗体またはその抗原結合断片は、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が挙げられるがこれらに限定されないあらゆる方法で作製される抗体及びその抗原結合断片を指す。

【0057】

「ヒト化」抗体またはその抗原結合断片という用語は、最小限の非ヒト（例えば、マウス）配列を含む特定の免疫グロブリン鎖、キメラ免疫グロブリン、またはそれらの断片で

10

20

30

40

50

ある非ヒト（例えば、マウス）抗体または抗原結合断片の形態を指す。通常、ヒト化抗体またはその抗原結合断片は、ヒト免疫グロブリンであって、その相補性決定領域（CDR）由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び機能を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター）のCDR由来の残基で置き換えられている（「CDRグラフト化」）（Jones et al., Nature 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323 - 327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534 - 1536 (1988)）。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基は、所望の特異性、親和性、及び機能を有する非ヒト種由来の抗体または断片における対応する残基で置き換えられる。ヒト化抗体またはその抗原結合断片を、Fvフレームワーク領域及び/または置き換えられた非ヒト残基内のいずれかでのさらなる残基の置換によってさらに改変し、抗体またはその抗原結合断片の特異性、親和性、及び/または機能を改善及び最適化することができる。一般に、ヒト化抗体またはその抗原結合断片は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDR領域の全てまたは実質的に全てを含む、少なくとも1つ、典型的には2つまたは3つの可変ドメインの実質的に全てを含むが、FR領域の全てまたは実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス領域のものである。ヒト化抗体またはその抗原結合断片は、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域またはドメイン（Fc）の少なくとも一部も含むことができる。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、Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3): 969 - 973 (1994)、及びRoguska et al., Protein Eng. 9(10): 895 - 904 (1996)に記載されている。いくつかの実施形態では、「ヒト化抗体」は、表面再構成抗体である。

【0058】

抗体の「可変領域」とは、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を単独でまたは組み合わせて指す。重鎖及び軽鎖の可変領域はそれぞれ、超可変領域としても知られる3つの相補性決定領域（CDR）によって接続された4つのフレームワーク領域（FR）からなる。それぞれの鎖内のCDRは、FRにより極めて近接して一緒に保持され、もう一方の鎖由来のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するための技法が少なくとも2つ存在する：（1）種間の配列変化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.), 「Kabat」）、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（Al-lazikani et al., J. Molec. Biol. 273: 927 - 948 (1997)）。さらに、当該技術分野ではこれら2つの方法の組み合わせを用いてCDRを決定することもある。

【0059】

「定常」領域は、抗体を抗原に結合することに直接関与はしないが、抗体依存性の細胞傷害性における抗体の関与などのさまざまなエフェクター機能を示す。

【0060】

Kabatナンバリングシステムは、一般に、可変ドメイン内の残基（大まかに、軽鎖の1～107残基及び重鎖の1～113残基）に言及する際に使用される（例えば、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.）（「Kabat」）。

【0061】

Kabatのアミノ酸位置のナンバリングとは、Kabat et al. (Sequences of Immunological Interest, 5th Ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda

10

20

30

40

50

、M d .)、(「K a b a t」)における抗体の編成の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに使用されるナンバリングシステムを指す。このナンバリングシステムを使用すると、実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのF RもしくはC D Rの短縮、またはそれへの挿入に対応するより少ないアミノ酸または追加のアミノ酸を含み得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H 2の残基5 2の後に単一のアミノ酸挿入(K a b a tに従う残基5 2 a)、ならびに重鎖F R残基8 2の後に挿入された残基(例えば、K a b a tに従う残基8 2 a、8 2 b、及び8 2 cなど)を含み得る。残基のK a b a tナンバリングは、「標準の」K a b a tナンバリング配列との抗体の配列の相同性領域でのアラインメントによって所与の抗体について決定され得る。一方、C h o t h i aは構造ループの位置に言及する(C h o t h i a a n d L e s k , J . M o l . B i o l . 1 9 6 : 9 0 1 - 9 1 7 (1 9 8 7))。K a b a tナンバリング規則を用いてナンバリングした場合、C h o t h i a C D R - H 1ループの末端は、ループの長さに応じてH 3 2とH 3 4の間で異なる(これは、K a b a tナンバリングスキームがH 3 5 AとH 3 5 Bに挿入を置くためであり、3 5 Aも3 5 Bも存在しない場合、このループは3 2で終わり、3 5 Aのみが存在する場合、このループは3 3で終わり、3 5 A及び3 5 Bの両方が存在する場合、このループは3 4で終わる)。A b M超可変領域は、K a b a tのC D RとC h o t h i aの構造的ループとの折衷物を表し、O x f o r d M o l e c u l a rのA b M抗体モデリングソフトウェアによって使用されている。

【表 A】

ループ	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24~L34	L24~L34	L24~L34
L2	L50~L56	L50~L56	L50~L56
L3	L89~L97	L89~L97	L89~L97
H1	H31~H35B	H26~H35B (Kabatナンバリング)	H26~H32..34
H1	H31~H35	H26~H35 (Chothiaナンバリング)	H26~H32
H2	H50~H65	H50~H58	H52~H56
H3	H95~H102	H95~H102	H95~H102

【0062】

「ヒト」抗体またはその抗原結合断片という用語は、ヒトによって産生される抗体もしくはその抗原結合断片、当該技術分野で知られている任意の技術を使用して作製された、ヒトによって産生される抗体もしくはその抗原結合断片に対応するアミノ酸配列を有する抗体もしくはその抗原結合断片を意味する。ヒト抗体またはその抗原結合断片のこの定義には、無傷または全長の抗体及びその断片が含まれる。

【0063】

「キメラ」抗体またはその抗原結合断片という用語は、アミノ酸配列が2つ以上の種に由来する抗体またはその抗原結合断片を指す。典型的には、軽鎖と重鎖の両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、及び機能を有する哺乳動物の一種(例えば、マウス、ラット、ウサギ等)由来の抗体またはその抗原結合断片の可変領域に対応し、その定常領域は、別の種(通常はヒト)由来の抗体またはその抗原結合断片の配列に対して相同であり、その種での免疫応答の誘発を回避する。

【0064】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特定の抗体によって認識され特異的に結合されることが可能な抗原の部分の部分を指す。抗原がポリペプチドの場合、エピトープは、連続アミノ酸とタンパク質の三次フォールディングによって並置された非連続アミノ酸の両方から形成し得る。連続アミノ酸から形成された

エピトープは、典型的には、タンパク質変性の際に保持されるが、三次フォールディングによって形成されたエピトープは、典型的には、タンパク質変性の際に失われる。エピトープは、典型的には、固有の空間立体配座内に、少なくとも3個、より一般的には、少なくとも5個、または8～10個のアミノ酸を含む。

【0065】

「結合親和性」とは、概して、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）との間の非共有相互作用の合計の強度を指す。別段示されない限り、本明細書において使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）の間の1：1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、一般的に解離定数（ K_d ）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は、一般に、抗原にゆっくり結合し、容易に解離する傾向があるが、高親和性抗体は、一般に、抗原により早く結合し、より長く結合したままである傾向がある。結合親和性を測定するさまざまな方法が当該技術分野で既知であり、これらのいずれも、本開示の目的のために使用することができる。

10

【0066】

結合親和性に言及するために本明細書で使用される場合の「またはそれよりよい」とは、分子とその結合パートナーとの間のより強い結合を指す。本明細書で使用される場合の「またはそれよりよい」とは、より小さい数値の K_d 値によって表されるより強い結合を指す。例えば、抗原に対する親和性が「0.6 nMまたはそれよりよい」抗体は、抗原に対する抗体の親和性は、 < 0.6 nM、すなわち、0.59 nM、0.58 nM、0.57 nMなど、または0.6 nM未満の任意の値である。

20

【0067】

「特異的に結合する」とは、一般に、抗体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、及び結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間にある程度の相補性を伴うことを意味する。この定義によれば、抗体は、それがランダムな無関係のエピトープに結合するよりも容易にその抗原結合ドメインを介してそのエピトープに結合する場合、エピトープに「特異的に結合する」と言われる。「特異性」という用語は、本明細書では、特定の抗体が特定のエピトープに結合する相対的親和性を限定するために使用される。例えば、抗体「A」は、所与のエピトープに対して抗体「B」よりも高い特異性を有するとみなされ得るか、または抗体「A」は、関連するエピトープ「D」に対するよりも高い特異性でエピトープ「C」に結合すると言われ得る。

30

【0068】

「優先的に結合する」とは、抗体が、関連する、同様の、同種の、または類似のエピトープに対して結合するよりも容易にあるエピトープに特異的に結合することを意味する。したがって、所与のエピトープに「優先的に結合する」抗体は、そのような抗体が関連するエピトープに交差反応する場合があるとしても、関連するエピトープに対するよりもそのエピトープに対して結合する可能性が高い。

【0069】

ある抗体は、参照抗体がエピトープに結合するのをある程度ブロックする程度まで、そのエピトープ、または重複エピトープに優先的に結合する場合、所与のエピトープに対する参照抗体の結合を「競合的に阻害する」と言われる。競合的阻害は、当該技術分野で既知の任意の方法、例えば、競合ELISAアッセイによって測定され得る。ある抗体は、所与のエピトープに対する参照抗体の結合を、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%競合的に阻害すると言われ得る。

40

【0070】

本明細書で使用される場合、「実質的に同様の」または「実質的に同じ」という語句は、2つの数値（概して、一方は本開示の抗体に関連し、他方は参照/比較抗体に関連する）間の十分に高い類似度を表し、これは、当業者が、2つの値の間の差異を、当該値（例

50

えば、 K_d 値)によって測定される生物学的特徴において生物学的及び/または統計的有意性がほとんどないものとみなすようなものである。当該2つの値の差は、参照/比較抗体の値に応じて、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、または約10%未満とすることができる。

【0071】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書では互換的に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは、直鎖状であっても分岐鎖状であってもよく、修飾アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されていてよい。この用語は、天然にまたは介入によって修飾されたアミノ酸ポリマーも包含し、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分とのコンジュゲーションなどの任意の他の操作または修飾を包含する。この定義に同様に含まれるのは、例えば、アミノ酸(例えば、非天然アミノ酸等を含む)の1つ以上の類似体を含むポリペプチド、及び当該技術分野で既知の他の修飾である。本開示のポリペプチドは抗体に基づいているため、ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、一本鎖または結合鎖として存在し得ることが理解される。

【0072】

本明細書において互換的に用いられる、「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNA及びRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、及び/またはそれらの類似体、またはDNAポリメラーゼまたはRNAポリメラーゼによってポリマーに組み込まれ得る任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体などの修飾ヌクレオチドを含んでよい。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーの組立て前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、標識構成要素とのコンジュゲーション等によって、重合後にさらに修飾することができる。他のタイプの修飾としては、例えば、その他の修飾としては、例えば、「キャップ」、天然に存在するヌクレオチドのうちの1つ以上を類似体で置換したもの、ヌクレオチド間の修飾として、例えば、非電荷の結合を有するもの(メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カバメートなど)や電荷の結合を持つもの(ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)、ペンダント部位を含むもの、例えば、タンパク質(例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、プライ- L -リジンなど)、インターカレーターを有するもの(例えば、アクリジン、プソラレンなど)、キレーターを含むもの(例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化性金属など)、アルキル化剤を含むもの、修飾された結合を有するもの(例えば、アノメリック核酸など)、ならびにポリヌクレオチド(複数可)の未修飾の形態などがある。さらに、糖内に通常存在するヒドロキシル基のうちのいずれかは、例えば、ホスホン酸基、リン酸基により置換されるか、標準保護基により保護されるか、または活性化されて追加のヌクレオチドへの追加の結合を調製し得るか、または固体支持体にコンジュゲートされてもよい。5'及び3'末端OHをリン酸化するか、またはアミンもしくは1~20個の炭素原子の有機キャッピング基部分と置換することができる。他のヒドロキシルは、標準保護基に誘導体化されてもよい。ポリヌクレオチドは、例えば、2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロ-もしくは2'-アジド-リボース、炭素環式糖類似体、 α -アノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロース、もしくはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、及び脱塩基ヌクレオシド類似体、例えば、メチルリボシドを含む、一般に当該技術分野において既知のリボースまたはデオキシリボース糖の類似形態を含むこともできる。1つ以上のホスホジエステル結合は、代替連結基に置き換えられてもよい。これらの代替連結基としては、非限定的に、リン酸塩が $\text{P}(\text{O})\text{S}$ (「チオエート」)、 $\text{P}(\text{S})\text{S}$ (「ジチオエート」)、 $(\text{O})\text{NR}_2$ (「アミデート」)、 $\text{P}(\text{O})\text{R}$ 、 $\text{P}(\text{O})\text{OR}'$ 、 CO 、または CH_2 (「ホルムアセタール」)に置き換えられる実施形態を含み、それぞれのRまたはR'は、独立してHであるか、または置換もしくは非置換ア

10

20

30

40

50

ルキル（１～２０Ｃ）（任意選択でエーテル（－－Ｏ－－）結合を含む）、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはアラルジルである。ポリヌクレオチドの全ての結合が同一である必要はない。前述の説明は、RNA及びDNAを含む、本明細書で言及される全てのポリヌクレオチドに適用される。

【００７３】

「ベクター」という用語は、宿主細胞において目的の１つ以上の遺伝子（複数可）または配列（複数可）を送達し、任意選択で発現することができる構築物を意味する。ベクターの例としては、ウイルスベクター、ネイキッドDNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、カチオン性縮合剤に結合するDNAまたはRNA発現ベクター、リポソームにカプセル化されたDNAまたはRNA発現ベクター、及びプロデューサー細胞などの特定の真核細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【００７４】

「単離された」ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、天然には見られない形態のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物である。単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物には、もはやそれらが天然に見られる形態ではない程度まで精製されたものが含まれる。いくつかの実施形態では、単離された抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、実質的に純粋である。

【００７５】

本明細書で使用される場合、「実質的に純粋」とは、少なくとも５０％純粋（すなわち、汚染物質を含まない）、少なくとも９０％純粋、少なくとも９５％純粋、少なくとも９８％純粋、または少なくとも９９％純粋である物質を指す。

20

【００７６】

２つ以上の核酸またはポリペプチドの文脈における「同一」または「同一性パーセント」という用語は、配列同一性の一部としていずれかの保存的アミノ酸置換を考慮せずに、最大の対応のために比較及び整列された場合（必要に応じてギャップを導入）に、同一であるか、または同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の特定のパーセンテージを有する２つ以上の配列またはサブ配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェアまたはアルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定できる。アミノ酸またはヌクレオチド配列のアラインメントを得るために使用することができるさまざまなアルゴリズム及びソフトウェアが当該技術分野で知られている。配列アラインメントアルゴリズムのそのような非限定的な例の１つは、Karlin et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 2264 - 2268 (1990)に記載され、Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 5873 - 5877 (1993)において改変され、NBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれている(Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25: 3389 - 3402 (1997))アルゴリズムである。特定の実施形態では、ギャップ付きBLASTは、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402 (1997)に記載されているように使用され得る。BLAST-2、WU-BLAST-2(Altschul et al., Methods in Enzymology, 266: 460 - 480 (1996))、ALIGN、ALIGN-2(Genentech, South San Francisco, California)、またはMegalign(DNASTAR)は、配列を整列させるために使用できる追加の公的に利用可能なソフトウェアプログラムである。特定の実施形態では、２つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアのGAPプログラムを使用して決定される（例えば、NWSgapdna.CMPマトリックスで、４０、５０、６０、７０、または９０のギャップウェイト、及び１、２、３、４、５、または６の長さのウェイトを使用して）。特定の代替的な実施形態では、Needleman and Wunsch(J. Mol. Biol. (48): 444 - 453 (1970))のアルゴリズムを組み入れた、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムは、

30

40

50

2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを決定するのに使用できる（例えば、B l o s s u m 62マトリックスまたはP A M 250マトリックスのいずれかで、16、14、12、10、8、6、または4のギャップウェイト、及び1、2、3、4、または5の長さのウェイトを使用して）。代替的に、特定の実施形態では、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性パーセントは、M y e r s a n d M i l l e r (C A B I O S , 4 : 11 - 17 (1989)) のアルゴリズムを使用して決定される。例えば、同一性パーセントは、A L I G N プログラム（バージョン2.0）を使用し、残基表、12のギャップ長ペナルティ、4のギャップペナルティと共にP A M 120を使用して決定できる。特定のアラインメントソフトウェアによる最大アラインメントの適切なパラメーターは、当業者によって決定できる。特定の実施形態では、アラインメントソフトウェアのデフォルトパラメーターが使用される。特定の実施形態では、第2の配列アミノ酸に対する第1のアミノ酸配列の同一性パーセント「X」は、 $100 \times (Y / Z)$ として計算され、式中、Yは第1と第2の配列のアラインメントで同一の一致としてスコア付けされたアミノ酸残基の数（目視検査または特定の配列アラインメントプログラムによってアラインメントされた場合の）であり、Zは第2の配列の残基の総数である。第1の配列の長さが第2の配列よりも長い場合、第2の配列に対する第1の配列の同一性パーセントは、第1の配列に対する第2の配列の同一性パーセントよりも長くなる。

【0077】

非限定的な例として、特定のポリヌクレオチドが、参照配列に対して、特定のパーセンテージの「配列同一性」を有するかどうか（例えば、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、及びいくつかの実施形態では、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%同一）は、特定の実施形態では、B e s t f i t プログラム（W i s c o n s i n S e q u e n c e A n a l y s i s P a c k a g e , V e r s i o n 8 f o r U n i x (登録商標), G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , U n i v e r s i t y R e s e a r c h P a r k , 575 S c i e n c e D r i v e , M a d i s o n , W I 53711)）を使用して決定できる。B e s t f i t は、S m i t h a n d W a t e r m a n (A d v a n c e s i n A p p l i e d M a t h e m a t i c s 2 : 482 - 489 (1981)) のローカル相同性アルゴリズムを使用して、2つの配列間の相同性の最良のセグメントを見つける。B e s t f i t または任意の他の配列アライメントプログラムを使用して、特定の配列が、例えば本開示による参照配列と95%同一であるかどうかを決定するとき、パラメーターは、同一性のパーセンテージが参照ヌクレオチド配列の全長にわたって計算され、参照配列内のヌクレオチドの総数の最大5%の相同性のギャップが許容されるように設定される。

【0078】

「保存的アミノ酸置換」とは、1つのアミノ酸残基が、類似の側鎖を有する別のアミノ酸残基に置き換えられている置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義され、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、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、トリプトファン）、分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸残基を含む。例えば、チロシンをフェニルアラニンに置換することは、保存的置換である。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチド及び抗体の配列における保存的置換は、ポリペプチドまたは抗体が結合する抗原（複数可）、すなわち、F R に対する、アミノ酸配列を含むポリペプチドまたは抗体の結合を阻害しない。抗原結合を排除しないヌクレオチド及びアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、当該技術分野で周知である（例えば、B r u m m e l l e t a l . , B i o c h e m . 32 : 1180 - 1187 (1993) ; K o b a y a s h i e t a l . P r o t e i n E n g . 12 (10) : 879 - 884 (1999) ; 及び B u r k s e t

10

20

30

40

50

al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997)を参照されたい)。

【0079】

「二重特異性抗体」は、2つの異なるエピトープに結合する抗体を指す。エピトープは、同じ標的抗原上にあってもよく、異なる標的抗原上にあってもよい。

【0080】

「バイパラトピック抗体」は、同じ標的抗原（例えば、FR）上の2つの異なる重複しないエピトープに結合する二重特異性抗体である。

【0081】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるFR抗体またはその抗原結合断片は、多価分子である。本出願内で使用される場合、「価」という用語は、抗体分子内に特定の数の結合部位が存在することを意味する。例えば、本発明による天然の抗体または全長抗体は、2つの結合部位を有し、「2価」である。「4価」という用語は、抗原結合タンパク質中の4つの結合部位が存在することを意味する。「3価」という用語は、抗体分子内に3つの結合部位が存在することを意味する。本明細書で使用される場合、「二重特異性、4価」という用語は、少なくとも1つが第1の抗原に結合し、少なくとも1つが第2の抗原または抗原の別のエピトープに結合する4つの抗原結合部位を有する本発明による抗原結合タンパク質を意味する。

10

【0082】

本明細書で使用される場合、「イムノコンジュゲート」または「コンジュゲート」という用語は、細胞結合剤に連結され、一般式：C-L-Aによって定義される化合物またはその誘導体を指し、式中、C=細胞毒素、L=リンカー、及びA=抗体またはその抗原結合断片（例えば、抗FR抗体または抗体断片）である。イムノコンジュゲートは、逆の順序：A-L-Cの一般式によって定義することもできる。

20

【0083】

「リンカー」は、化合物、通常はマイタンシノイドなどの薬物である化合物を、例えば、抗FR抗体またはその抗原結合断片などの細胞結合剤に、安定した共有結合で連結することができる任意の化学的部分である。リンカーは、化合物または抗体が活性を維持する条件下で、切断（例えば、酸誘導性の切断、光誘導性の切断、ペプチダーゼ誘導性の切断、エステラーゼ誘導性の切断、またはジスルフィド結合の切断）に対して感受性であっても実質的に耐性であってもよい。適切なリンカーは当該技術分野で周知であり、例えば、ジスルフィド基及びチオエーテル基が含まれる。

30

【0084】

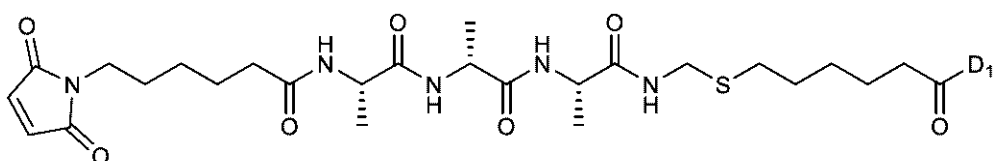
本明細書で使用される場合、「細胞傷害性薬剤」という用語は、1つ以上の細胞機能を阻害するかもしれない阻止する、及び/または細胞死を引き起こす、物質を指す。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬剤は、マイタンシノイド、例えば、DM21である。DM21を含むイムノコンジュゲートはWO2018/160539A1に開示されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0085】

イムノコンジュゲートは、以下の構造式によって表される「DM21C」の部位特異的DM21結合を含むことができる：

40

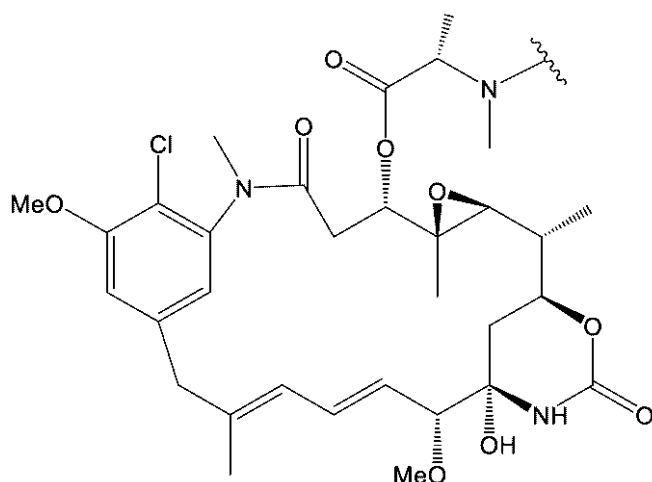
【化20】



式中D₁は：

50

【化 2 1】



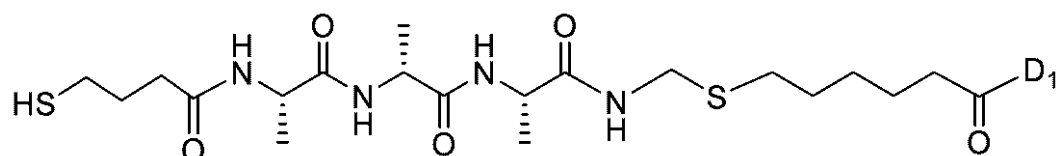
10

である。

【 0 0 8 6】

イムノコンジュゲートはまた、以下の構造式によって表される、リジン結合 DM 2 1 「L - DM 2 1」、「DM 2 1 - L」、または「DM 2 1 L」を含み得：

【化 2 2】

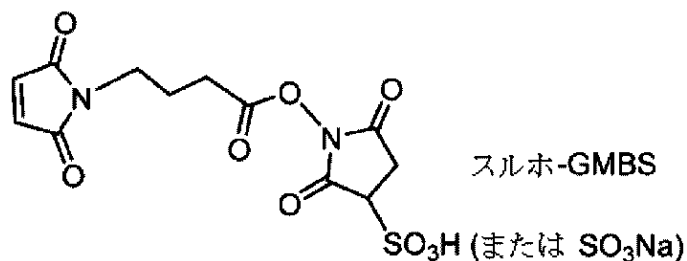
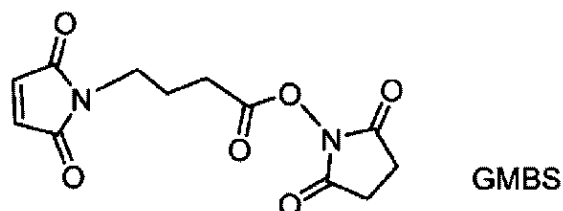


20

式中、D₁は上に示され、リンカー、例えば、 γ -マレイミド酪酸 N - スクシンイミジルエステル (GMBS) または N - (γ -マレイミドブトリルオキシ) スルホスクシンイミドエステル (スルホ - GMBS または sGMBS) リンカーによって抗体に結合されている。GMBS 及びスルホ - GMBS (または sGMBS) リンカーは当該技術分野で知られており、以下の構造式で表すことができる：

30

【化 2 3】



40

【 0 0 8 7】

「任意選択的な」または「任意選択的で」は、引き続いて記載された状況が起こっても起こらなくてもよいこと、そのため本出願が、その状況が起こる場合及びそれが起こらない場合を含むことを意味する。例えば、「任意選択で置換された」という語句は、非水素

50

置換基が所与の原子上に存在しても、存在しなくてもよいことを意味し、したがって、本出願は、非水素置換基が存在する構造及び非水素置換基が存在しない構造を含む。

【0088】

「がん」及び「がん性」という用語は、細胞集団の制御されていない細胞増殖を特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指すか、または説明する。がんの例としては、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれるが、これらに限定されない。そのようながんのさらに特定の例としては、卵管癌、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、膵臓癌、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝臓癌、及び種々の種類の頭頸部癌が挙げられる。がんは、FR を発現するがんであってよい（「FR 発現がん」）。

10

【0089】

「がん細胞」、「腫瘍細胞」という用語、及び文法上の同等物は、腫瘍細胞集団の大部分を構成する非腫瘍形成細胞と腫瘍形成性幹細胞（がん幹細胞）の両方を含む、腫瘍または前がん病変に由来する細胞の総集団を指す。本明細書で使用される場合、「腫瘍細胞」という用語は、それらの腫瘍細胞をがん幹細胞から区別するために再生及び分化する能力を欠く腫瘍細胞のみを指す場合、「非腫瘍形成性」という用語によって修飾される。

【0090】

「進行」がんとは、元の部位または器官の外に、局所浸潤または転移のいずれかによって広がったがんである。「進行」がんという用語は、局所的に進行した疾患と転移性疾患の両方を含む。

20

【0091】

「転移性」がんは、身体の1つの部分から身体の別の部分へ広がっているがんを指す。

【0092】

「不応性」がんとは、化学療法剤などの抗腫瘍剤ががん患者に投与されているにもかかわらず進行するがんである。

【0093】

「再発性」がんとは、初期療法に応答した後に、初期の部位または遠位部位で再増殖したがんである。

30

【0094】

「再発」患者は、寛解後にがんの兆候または症状を有する者である。任意選択で、患者は、アジュバントまたはネオアジュバント療法後に再発した。

【0095】

「維持療法」という用語は、最初の治療後にがんが消失した後にがんが再発するのを防ぐための一助として行われる療法を指す。

【0096】

「対象」という用語は、特定の治療を受けることになる、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯類などを含むがこれらに限定されない任意の動物（例えば、哺乳動物）を指す。「対象」及び「患者」という用語は、本明細書では、ヒト対象に言及して互換的に使用される。

40

【0097】

「医薬製剤」という用語は、活性成分の生物学的活性が有効になるような形態であり、かつ製剤が投与される対象に許容できない程度に毒性のさらなる成分を含まない製剤を指す。製剤は無菌にすることができる。

【0098】

本明細書で開示される抗体、イムノコンジュゲート、または他の薬物の「有効量」は、具体的に述べられた目的を実行するのに十分な量である。

【0099】

「治療有効量」という用語は、対象または哺乳動物の疾患または障害を「治療」するのに有効な抗体、イムノコンジュゲート、または他の薬物の量を指す。がんの場合、治療有

50

効量の薬物はがん細胞の数を減らすことができ、腫瘍サイズまたは腫瘍量を軽減することができ、末梢器官へのがん細胞の浸潤を阻害する（すなわち、ある程度遅くし、特定の実施形態では停止する）ことができ、腫瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度遅くし、特定の実施形態では停止する）ことができ、腫瘍増殖をある程度阻害することができ、がんに関連する1つ以上の症状をある程度緩和することができ、及び/または無増悪生存期間（PFS）、無病生存期間（DFS）、または全生存期間（OS）の増加、完全奏効（CR）、部分奏効（PR）、場合によっては安定疾患（SD）の増加、進行性疾患（PD）の減少、進行までの時間（TTP）の短縮、またはそれらの任意の組み合わせなどの良好な奏効をもたらす。本明細書の「治療すること」の定義を参照されたい。薬物が増殖を妨げ及び/または既存のがん細胞を殺傷し得る限りにおいて、それは細胞増殖抑制性及び/または細胞傷害性であり得る。

10

【0100】

「治療すること」または「治療」または「治療する」または「緩和すること」または「緩和する」などの用語は、診断された病的状態または障害の症状を治癒、減速、軽減、及びまたはその進行を停止する治療手段を指す。したがって、治療が必要なものには、すでに障害があると診断されたもの、またはその疑いがあるものが含まれる。特定の実施形態では、患者が以下のうちの1つ以上を示す場合、対象は、本開示の方法に従ってがんについて首尾よく「治療されている」：がん細胞の数の減少または完全な欠如；腫瘍サイズの縮小；例えば、軟部組織及び骨へのがんの広がりを含む、末梢器官へのがん細胞浸潤の阻害または欠如；腫瘍転移の阻害または欠如；腫瘍増殖の阻害または欠如；特定の癌に関連する1つ以上の症状の緩和；罹患率と死亡率の低下；生活の質の向上；腫瘍の腫瘍形成性、腫瘍形成頻度、または腫瘍形成能の低下；腫瘍内のがん幹細胞の数または頻度の減少；腫瘍形成性細胞の非腫瘍形成性状態への分化；無増悪生存期間（PFS）、無病生存期間（DFS）、または全生存期間（OS）の増加、完全奏効（CR）、部分奏効（PR）、安定疾患（SD）、進行性疾患（PD）の減少、進行までの時間（TTP）の短縮、またはそれらの任意の組み合わせ。

20

【0101】

本明細書で使用される場合、「投与する」、「投与すること」、「投与」などの用語は、所望の生物作用部位へのイムノコンジュゲートの送達を可能にするために使用され得る方法を指す。本明細書に記載の薬剤及び方法と共に使用することができる投与技術は、例えば、Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, current ed.; Pergamon; 及び Remington's, Pharmaceutical Sciences (current edition), Mack Publishing Co., Easton, PA において見出される。一態様では、イムノコンジュゲートは静脈内投与される。

30

【0102】

「指示すること」という用語は、適用可能な治療、投薬、治療、治療レジメンなどの指示を、任意の手段によって、例えば、添付文書または他の書面による販促資料の形で、書面で提供することを意味する。

【0103】

「前処理する」及び「前処理」という用語は、治療用抗体、その抗原結合断片、またはイムノコンジュゲートの投与前に行われる治療手段を指す。例えば、本明細書でより詳細に記載されるように、ステロイド（例えば、コルチコステロイド）は、予防薬として、イムノコンジュゲートの投与の、約1週間、約5日、約3日、約2日、または約1日、または24時間前に投与することができる。ステロイドはまた、イムノコンジュゲートと同じ日において、イムノコンジュゲートの前に投与することができる。

40

【0104】

特に述べられていないか、または文脈から明らかでない限り、本明細書において使用されるとき、用語「約」は、当該技術分野において通常の許容範囲内、例えば、平均の2標準偏差内であると理解される。約は、述べられた値の、10%、9%、8%、7%、6%

50

、5 %、4 %、3 %、2 %、1 %、0 . 5 %、0 . 1 %、0 . 0 5 %、または0 . 0 1 % 内として理解することができる。別段文脈から明らかでない限り、本明細書において提供される全ての数値は、約という用語によって修飾される。

【0105】

本明細書の変数の任意の定義の中の化学基のリストの列挙は、任意の単一の基または列挙した基の組み合わせとしてその変数の定義を含む。本明細書の変数または態様についての実施形態の列挙は、任意の単一の実施形態として、または任意の他の実施形態もしくはその一部と組み合わせるその実施形態を含む。

【0106】

本開示及び特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明らかに他を示していない限り、複数形を含む。

10

【0107】

本明細書で「含むこと (comprising)」という文言で実施形態が記載されている場合は常に、「からなる」及び/または「から本質的になる (consisting essentially of)」という用語で記載されている類似の実施形態も提供されていることを理解されたい。本開示において、「含む (comprises)」、「含むこと (comprising)」、「含むこと (containing)」、及び「有すること」などは、米国特許法に帰属するそれらの意味を有し得、「含む (includes)」、「含むこと (including)」、などを意味し得、「から本質的になる (consisting essentially of)」、または「から本質的になる (consists essentially)」などは、同様に米国特許法に帰属する意味を有し得、用語はオープンエンドであり、列挙されているものを超えるものの存在によって列挙されているものの基本的または新規の特性が変化しない限り、列挙されているものを超えるものの存在を許容するが、従来技術の実施形態を排除する。

20

【0108】

特に述べられていないか、または文脈から明らかでない限り、本明細書において使用される時、「または」という用語は、両立的であると理解されるべきである。本明細書で「A及び/またはB」等の語句で使用される場合、「及び/または」という用語は、「A及びB」、「AまたはB」、「A」、及び「B」を含むことを意図する。同様に、「A、B、及び/またはC」等の語句で使用される時、「及び/または」という用語は、次の実施形態の各々を包含することを意図する：A、B、及びC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；A及びC；A及びB；B及びC；A（単独）；B（単独）；ならびにC（単独）。

30

【0109】

本明細書で提供する任意の組成物または方法は、本明細書で提供する任意の他の組成物及び方法のうちの1つ以上と組み合わせることができる。

【0110】

II. バイパラトピック抗体

本明細書で提供されるのは、バイパラトピック抗FR 抗体及びその抗原結合断片である。これらのバイパラトピック抗体及びその抗原結合断片は、FR の第1のエピトープに結合する第1のFR 結合ドメインと、FR の第2のエピトープに結合する第2のFR 結合ドメインと、を含む。FR の第1のエピトープと第2のエピトープは重複しないエピトープである。これらのバイパラトピックの抗体及び抗原結合断片は、追加のFR 結合ドメインを含むことができる。例えば、四価バイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、第1のエピトープに結合する2つのFR 結合ドメインと、第2のエピトープに結合する2つのFR 結合ドメインと、を有することができる。例示的なバイパラトピック抗体及びその抗原結合断片を図1に示す。

40

【0111】

A. FR 結合ドメイン

バイパラトピック抗体またはその抗原結合断片を組み立てるために使用することができ

50

る F R 結合ドメインが、本明細書で開示される。F R 結合ドメインは、6つの相補性決定領域(CDR)、すなわち、可変重鎖(VH)CDR1、VH CDR2、VH CDR3、可変軽鎖(VL)CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3を含むことができる。F R 抗原結合ドメインは、可変重鎖(VH)と可変軽鎖(VL)とを含むことができる。VHとVLは、別個のポリペプチドであり得るか、または同じポリペプチドの一部であり得る(例えば、s c F vにおいて)。

【0112】

F R 抗体及びその抗原結合断片は、当該技術分野で既知であり、例えば、P C T出願公開番号WO2011/106528A1; WO2012/135675A3; WO2012/138749A1; WO2014/036495A3; 及びWO2015/031815A2に開示されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。追加のF R 抗体は、米国特許第8,557,966B2号、同第8,709,432B2号、同第9,702,881B2号; 及び同第9,637,547B2号; ならびに米国特許出願公開第US-2012-0282282A1号に開示されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。さらに、F R 抗体huMov19(M9346A)抗体は、ブダペスト条約の条項に基づいて2010年4月7日に10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110にあるAmerican Type Culture Collection(ATCC)に寄託されたプラスミドによってコードされており、ATCC寄託番号PTA-10772及びPTA-10774を有している。本明細書で提供される場合、F R 結合ドメインは、これらの抗体またはその抗原結合断片のいずれかのF R 結合ドメイン(例えば、6つのCDRまたはVH及びVL)とすることができる。

【0113】

一例として、F R 結合ドメインは、huMov19抗体及び/またはFR57抗体の、CDR配列、VH配列、及び/またはVL配列を含むことができる。huMov19及びFR57抗体のCDR配列を以下の表1及び2に示す。

【0114】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるF R 結合ドメインは、本明細書に記載のCDR配列の1つ以上を含む1つ以上のポリペプチドを含む。例えば、F R 結合ドメインは、以下の表1及び2に示された、軽鎖CDR配列(すなわち、LC CDR1、LC CDR2、及びLC CDR3)のうちの1つ以上、及び/または重鎖CDR配列(すなわち、HC CDR1、HC CDR2、及びHC CDR3)のうちの1つ以上を含むことができる。

【表1】

表1: 軽鎖CDR配列(Kabat定義による)

抗体	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
FR57	RASQNINNNLH(配列番号1)	YVSQSVS(配列番号2)	QQSNSWPHYT(配列番号3)
huMov19	KASQSVSFAGTSLMH(配列番号4)	RASNLEA(配列番号5)	QQSREYPYT(配列番号6)

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2：重鎖 C D R 配列

抗体	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
FR57	SFGMH(配列番号 7) AbMの定義: GFTFSFGMH(配列番号13)	Kabatの定義: YISSGSSTISYADSVKG(配列番号8) AbMの定義: YISSGSSTIS(配列番号14)	KabatまたはAbMの定義: EAYGSSMEY(配列番号9)
huMov19	Kabatの定義: GYFMN(配列番号10) AbMの定義: GYTFTGYFMN(配列番号15)	Kabatの定義: RIHPYDGDTFYNQKFQG(配列番号11) AbMの定義: RIHPYDGDTF(配列番号16)	KabatまたはAbMの定義: YDGSRAMDY(配列番号12)

10

【0115】

いくつかの実施形態では、F R 結合ドメインは、(a)それぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列を含む、V L C D R 1、V L C D R 2、及びV L C D R 3と、(b)それぞれ配列番号7～9のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、V H C D R 2、及びV H C D R 3と、を含む。いくつかの実施形態では、F R 結合ドメインは、(a)それぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列を含む、V L C D R 1、V L C D R 2、及びV L C D R 3と、(b)それぞれ配列番号13、14、及び9のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、V H C D R 2、及びV H C D R 3と、を含む。いくつかの実施形態では、F R 結合ドメインは、(a)それぞれ配列番号4～6のアミノ酸配列を含む、V L C D R 1、V L C D R 2、及びV L C D R 3と、(b)それぞれ配列番号10～12のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、V H C D R 2、及びV H C D R 3と、を含む。いくつかの実施形態では、F R 結合ドメインは、(a)それぞれ配列番号4～6のアミノ酸配列を含む、V L C D R 1、V L C D R 2、及びV L C D R 3と、(b)それぞれ配列番号15、16、及び12のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、V H C D R 2、及びV H C D R 3と、を含む。

20

30

【0116】

一例として、F R 結合ドメインは、h u M o v 1 9 抗体及び/またはF R 5 7 抗体の、C D R 配列、V H 配列、及び/またはV L 配列を含むことができる。h u M o v 1 9 及びF R 5 7 のC D R 配列を以下の表1及び2に示す。

【0117】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるF R 結合ドメインは、本明細書に記載のC D R 配列の1つ以上を含む1つ以上のポリペプチドを含む。例えば、F R 結合ドメインは、以下の表1及び2に示された、軽鎖C D R 配列(すなわち、L C C D R 1、L C C D R 2、及びL C C D R 3)のうちの1つ以上、及び/または重鎖C D R 配列(すなわち、H C C D R 1、H C C D R 2、及びH C C D R 3)のうちの1つ以上を含むことができる。

40

【0118】

いくつかの実施形態では、F R 結合ドメインは、h u M o v 1 9 抗体及び/またはF R 5 7 抗体の軽鎖可変配列及び/または重鎖可変配列を含む。h u M o v 1 9 及びF R 5 7 の軽鎖可変配列及び重鎖可変配列を以下の表3及び4に示す。

【表 3】

表 3. 輕鎖可變配列

抗体	配列
FR57	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQQKPGQSPRLLIKYV SQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISVEPEDFGMYFCQQSNSWPHYTFGQG TKLEIK (配列番号17)
FR57 F83E;Q1 01C	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQQKPGQSPRLLIKYV SQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISVEPEDEGMYFCQQSNSWPHYTFGCG TKLEIK (配列番号18)
huMov19	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLL IYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTF GGGTKLEIK (配列番号19)
huMov19 G104C	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLL IYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTF GCGTKLEIK (配列番号20)
huMov19 A87E;G1 04C	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLL IYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAED E AATYYCQQSREYPYTF GCGTKLEIK (配列番号21)

【表 4】

表 4. 重鎖可変配列

抗体	配列
FR57	EVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVA YISSGSSTISYADSVKGRFTISRDN SKK TLL LQMTSLRAEDTAMYYCAREA YGSSMEYWGGQGLVTVSS (配列番号22)
FR57 E6Q;G44 C	EVQLVQSGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKCLEWV AYISSGSSTISYADSVKGRFTISRDN SKK TLL LQMTSLRAEDTAMYYCARE AYGSSMEYWGGQGLVTVSS (配列番号23)
huMov19	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIG RIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELL SLTSEDFAVYYCTRY DGSRAMDYWGQGTTTVTVSS (配列番号24)
huMov19 S44C	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQCLEWIG RIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELL SLTSEDFAVYYCTRY DGSRAMDY (配列番号25)
huMov19 S44C	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQCLEWIG RIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELL SLTSEDFAVYYCTRY DGSRAMDYWGQGTTTVTVSS (配列番号57)
huMov19 A16E;S4 4C	QVQLVQSGAEVVKPGESVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQCLEWIG RIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELL SLTSEDFAVYYCTRY DGSRAMDYWGQGTTTVTVSS (配列番号26)

10

20

【0119】

いくつかの実施形態では、FR 結合ドメインは、配列番号17に対して、少なくとも70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%の配列同一性を有するVLを含み、任意選択で、VLは、それぞれ配列番号1~3のVL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3の配列を含む。いくつかの実施形態では、FR 結合ドメインは、配列番号19に対して、少なくとも70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%の配列同一性を有するVLを含み、任意選択で、VLは、それぞれ配列番号4~6のVL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3の配列を含む。

30

40

【0120】

いくつかの実施形態では、FR 結合ドメインは、配列番号22に対して、少なくとも70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%の配列同一性を有するVHを含み、任意選択で、VHは、それぞれ配列番号7~9、またはそれぞれ配列番号13、14、及び9のVH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3の配列を含む。いくつかの実施形態では、FR 結合ドメインは、配列番号24に対して、少なくとも70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約

50

95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%の配列同一性を有するVHを含み、任意選択で、VHは、それぞれ配列番号10~12、またはそれぞれ配列番号15、16、及び12のVH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3の配列を含む。

【0121】

いくつかの実施形態では、FR結合ドメインは、VLとVHとを含み、(i)VLは、配列番号17に対して、少なくとも70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%の配列同一性を有し、任意選択で、VLは、それぞれ配列番号1~3のVL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3の配列を含み、(ii)VHは、配列番号22に対して、少なくとも70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%の配列同一性を有し、任意選択で、VHは、それぞれ配列番号7~9、またはそれぞれ配列番号13、14、及び9のVH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3の配列を含む。

10

【0122】

いくつかの実施形態では、FR結合ドメインは、VLとVHとを含み、(i)VLは、配列番号19に対して、少なくとも70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%の配列同一性を有し、任意選択で、VLは、それぞれ配列番号4~6のVL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3の配列を含み、(ii)VHは、配列番号24に対して、少なくとも70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%の配列同一性を有し、任意選択で、VHは、それぞれ配列番号10~12、またはそれぞれ配列番号15、16、及び12のVH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3の配列を含む。

20

【0123】

いくつかの実施形態では、FR結合ドメインは、VLとVHとを含む。VLとVHは別個のポリペプチドにすることができる。VL及びVHは、同じポリペプチド、例えば、VL、リンカー、及びVHを含むポリペプチドの一部であってもよい。VL、リンカー、及びVHを含むポリペプチドは、VL-リンカー-VHの配向またはVH-リンカー-VLの配向であってもよい。

30

【0124】

したがって、いくつかの実施形態では、FR結合ドメイン(例えば、scFv)は、N末端からC末端に向けて、配列番号17のアミノ酸配列を含むVL、リンカー(例えば、グリシン-セリンリンカー)、及び配列番号22のアミノ酸配列を含むVHを含む。いくつかの実施形態では、FR結合ドメインは、N末端からC末端に向けて、配列番号22のアミノ酸配列を含むVH、リンカー(例えば、グリシン-セリンリンカー)、及び配列番号17のアミノ酸配列を含むVLを含む。

40

【0125】

いくつかの実施形態では、FR結合ドメイン(例えば、scFv)は、N末端からC末端に向けて、配列番号19のアミノ酸配列を含むVL、リンカー(例えば、グリシン-セリンリンカー)、及び配列番号24のアミノ酸配列を含むVHを含む。いくつかの実施形態では、FR結合ドメインは、N末端からC末端に向けて、配列番号24のアミノ酸配列を含むVH、リンカー(例えば、グリシン-セリンリンカー)、及び配列番号19のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0126】

VH及びVLを接続するために使用することができるリンカーは、当該技術分野で知ら

50

れている。例えば、リンカーはグリシン - セリンリンカーにすることができる。いくつかの実施形態では、リンカーは任意の長さのものであってよく、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、もしくは 60、またはそれ以上のアミノ酸を含むことができる。他の実施形態では、本開示に有用なリンカーは、少なくとも 1つのアミノ酸及び 100未満のアミノ酸、90未満のアミノ酸、80未満のアミノ酸、70未満のアミノ酸、60未満のアミノ酸、50未満のアミノ酸、40未満のアミノ酸、30未満のアミノ酸、20未満のアミノ酸、19未満のアミノ酸、18未満のアミノ酸、17未満のアミノ酸、16未満のアミノ酸、15未満のアミノ酸、14未満のアミノ酸、13未満のアミノ酸、または 12未満のアミノ酸を有する。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、グリシンアミノ酸残基を含む。他の例では、リンカー配列は、グリシンとセリンのアミノ酸残基の組み合わせを含む。

【0127】

いくつかの実施形態では、FR 結合ドメインは、VHとVLとの間でインフレームで融合されたリンカーを含む。いくつかの実施形態では、そのようなグリシン/セリンリンカーは、ペプチドGGGS（配列番号49）もしくはGGGS（配列番号50）、またはそれらの所与のペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはそれ以上の反復を含む、それらの反復を含むがこれらに限定されないアミノ酸残基の任意の組み合わせを含む。本明細書で開示されるグリシン/セリンリンカーは、(GS)_n、(GGS)_n、(GGGS)_n、(GGGS)_n、または(GGGGS)_nのアミノ酸配列を含み、式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の整数である。一実施形態では、リンカー配列はGGGS GGGS GGGS（配列番号51）(Gly₄ Ser)₃とも呼ばれる）である。別の実施形態では、リンカー配列はGGGS GGGS GGGS GGGS（配列番号52）(Gly₄ Ser)₄とも呼ばれる）である。

【0128】

いくつかの実施形態では、FR 結合ドメインは、scFvである。例示的なscFvのFR 結合ドメインを以下の表5に示す。

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. s c F v 融合タンパク質

名称	scFv配列
FR57scFv1 VH-(G ₄ S) ₄ -VL 配向でのscFv	EVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEW VAYISSGSSTISYADSVKGRFTISRDNSSKKTLLQLMTSLRAEDTAMYYC AREAYGSSMEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEIVLT QSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQQKPGQSPRLLIKYYVSQ SVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISVEPEDFGMYFCQQSNSWPHYTFGQG TKLEIK (配列番号27)
FR57scFv2 VL(F83E; Q101C)-(G ₄ S) ₄ - VH(E6Q;G44C) 配向でのscFv	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQQKPGQSPRLLIK YVSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISVEPEDEGMYFCQQSNSWPHYT FGCGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVQSGGGLVQPGGS RRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKCLEWVAYISSGSSTISYADSVK GRFTISRDNSSKKTLLQLMTSLRAEDTAMYYCAREAYGSSMEYWGGQT LTVSS (配列番号28)
FR57scFv3wt VL-(G ₄ S) ₄ -VH 配向でのscFv	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQQKPGQSPRLLIK YVSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISVEPEDFGMYFCQQSNSWPHYTF GQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSR RLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSTISYADSVKG RFTISRDNSSKKTLLQLMTSLRAEDTAMYYCAREAYGSSMEYWGGQGL TVTVSS (配列番号29)
Mov19scFv1 VH-(G ₄ S) ₄ -VL 配向でのscFv	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEW IGRIHPYDGDFTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYY CTRYDGSRAMDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIV LTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLI YRASNL EAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYT FGGGTKLEIK (配列番号30)
Mov19scFv2 VL(G104C)-(G ₄ S) ₄ -VH(S44C) 配向でのscFv	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPR LLIYRASNL EAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREY PYTFGCGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLVQSGAEVVKP GASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQCLEWIGRIHPYDGDFTFYN QKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDY WGQGTITVTVSS (配列番号31)
Mov19scFv3 VL(A87E; G104C)-(G ₄ S) ₄ - VH(A16E; S44C)配向での scFv	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPR LLIYRASNL EAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAED EATYYCQQSREY PYTFGCGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLVQSGAEVVKP GESVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQCLEWIGRIHPYDGDFTFYN QKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDY WGQGTITVTVSS (配列番号32)

【0129】

いくつかの実施形態では、FR 結合ドメインは、配列番号27、28、または29に
対して、少なくとも70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約8
5%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約9
7%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%の配列同一性であるア
ミノ酸配列を含むs c F vを含み、任意選択で、s c F vは、それぞれ配列番号1~3の
V L C D R 1、V L C D R 2、及びV L C D R 3の配列と、それぞれ配列番号7~9
、またはそれぞれ配列番号13、14、及び9のV H C D R 1、V H C D R 2、及びV
H C D R 3の配列と、を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 0 】

いくつかの実施形態では、F R 結合ドメインは、配列番号 3 0、3 1、または 3 2 に対して、少なくとも 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 %の配列同一性であるアミノ酸配列を含む s c F v を含み、任意選択で、s c F v は、それぞれ配列番号 4 ~ 6 の V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3 の配列と、それぞれ配列番号 1 0 ~ 1 2、またはそれぞれ配列番号 1 5、1 6、及び 1 2 の V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3 の配列と、を含む。

【 0 1 3 1 】

特定の実施形態では、F R 結合ドメインは、配列番号 1 7 及び配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む抗体と同じ F R のエピトープに結合する。

【 0 1 3 2 】

特定の実施形態では、F R 結合ドメインは、配列番号 1 9 及び配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む抗体と同じ F R のエピトープに結合する。

【 0 1 3 3 】

特定の実施形態では、F R 結合ドメインは、マウス、キメラ、またはヒト化 F R 結合ドメインである。本明細書で使用される場合、ヒト化 F R 結合ドメインは、表面再構成 F R 結合ドメインであってよい。

【 0 1 3 4 】

特定の実施形態では、F R 結合ドメインは、ヒト F R に結合するが、F O L R 2 または F O L R 3 に結合しない。

【 0 1 3 5 】

B . パイパロトピック抗体フォーマット

パイパロトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、上述の F R 結合ドメインの組み合わせを含んでもよく、F R 結合ドメインは、F R の重複していないエピトープに結合する。

【 0 1 3 6 】

二重特異性構築物の多くの異なる種類が当該技術分野で知られており、本明細書に提供されるパイパロトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片で 사용할 ことができる。

【 0 1 3 7 】

二重特異性抗体構築の初期の試みは、化学的架橋またはハイブリッドハイブリドーマまたはクアドローマのいずれかを利用して、2 つの異なる抗体の 2 つの半分を一緒に結合した。これらの技術は二重特異性抗体の作製に役立つが、抗原結合部位のさまざまな組み合わせを含む混合集団の産生、タンパク質発現の困難さ、目的の二重特異性抗体の精製の必要性、低収量、産生の費用などの産生の問題に関連している。

【 0 1 3 8 】

より最近のアプローチは、不要な副産物を除去するための大規模な精製を必要とせずに、単一の二重特異性抗体の均一な産物を産生することができる遺伝子操作された構築物を利用している。このような構築物には、タンデム s c F v、ダイアボディ、タンデムダイアボディ、二重可変ドメイン抗体、及び C h 1 / C k ドメインまたは D N L (登録商標) のようなモチーフを使用したヘテロ二量体化が含まれる (Chames & Baty, 2009, Curr Opin Drug Discov Devel 12: 276 - 83; Chames & Baty, mAbs 1: 539 - 47)。BITE (登録商標) は、短いペプチドリンカーによって連結されているタンデム s c F v を指す (Chames & Baty, mAbs 1: 539 - 47)。二重特異性抗体産生に対する他のアプローチには、4 価の I g G - s c F v 融合体 (Dong et al., 2011, MAb s 3: 273 - 88); 二重作用 F a b (D A F) 抗体 (Bostrom et al., 2009, Science 323: 1610 - 14); I g g 様二重可変ドメイン抗体 (DVD - I g) (Wu et al., 2007, Nat Biotechnol 25:

10

20

30

40

50

1290-97) ; 及び IgG4 分子間の動的交換の使用 (van der Neut Kolf schoten et al. , 2007 , Science 317 : 1554 - 57) が含まれる。

【0139】

DOCK - AND - LOCK (登録商標) (DNL (登録商標)) 複合体 (例えば、米国特許第7,521,056号 ; 同第7,527,787号 ; 同第7,534,866号 ; 同第7,550,143号 ; 同第7,666,400号 ; 同第7,901,680号 ; 同第7,906,118号 ; 同第7,981,398号 ; 同第8,003,111号を参照されたい) は、別の二重特異性抗体フォーマットを表す。標準的なDNL (登録商標) 複合体は、1つのAD連結分子に結合した2つのDDD連結分子を有するトリマーを含むが、複雑な構造のバリエーションは、ダイマー、トリマー、テトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、及び他の多量体の形成を可能にする。

10

【0140】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるのは、「ノブインホール」構造を含む、非対称Fc分子を有するバイパルトピック構築物である。Kontermann, MAb s. , 4(2) : 182-97(2012)を参照されたい。ノブイントゥホール(KIH)テクノロジーでは、CH3ドメインを操作して、各重鎖に「ノブ」または「ホール」のいずれかを作成し、ヘテロ二量体化を促進する。KIHテクノロジーは、例えば、Ridgway et al. , Protein Engineering 9(7) : 617-721(1996) ; US5,731,168 ; US5,807,706 ; US5,821,333に記載され、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。「CrossMab」技術はさらに、二重特異性抗体の半分のFab内で重鎖ドメインと軽鎖ドメインを交換することを含み、2つのアームを非常に異なるものにして、軽鎖-重鎖の誤対形成が発生しないようする(Schaefer et al. , 2011, Proc Natl Acad Sci USA 108 : 11187-92)。ノブイントゥホールアプローチは、一方の重鎖のCH3ドメインに、もう一方の重鎖のCH3ドメインの適切に設計された空洞に適合するかさばる側鎖を持つアミノ酸を導入する。アプローチの組み合わせは、重鎖と重鎖と、重鎖と軽鎖との両方の相互作用のミスマッチを防ぎ、主に単一の製品をもたらす。

20

【0141】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、2価(例えば、図1に示された「ノブインホール」の例を参照されたい)である。2価のバイパルトピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、例えばscFvを含む2つのFR 結合ドメイン、別個のポリペプチド鎖上にVHとVLを含む2つのFR 結合ドメイン、または、scFvを含む1つのFR 結合ドメイン及び別個のポリペプチド鎖上にVHとVLを含む1つのFR 結合ドメインを含むことができる。

30

【0142】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、3価である。

【0143】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、3価(例えば、図1に示された「Morrison」の例を参照されたい)である。4価抗体は、例えば、M.J.Coloma, S.L.Morrison, Nat. Biotechnol. , 15(2) : 159-63(1997)に記載され、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0144】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、scFvであるFR 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、別個のポリペプチド上のVH及びVLを含むFR 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗FR 抗体また

50

はその抗原結合断片は、s c F vであるF R 結合ドメインと、別個のポリペプチド上のV H及びV Lを含むF R 結合ドメインと、を含む。

【0145】

いくつかの実施形態では、2価のバイパトリック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、s c F vである単一のF R 結合ドメインと、別個のポリペプチド上のV H及びV Lを含む単一のF R 結合ドメインを含む。そのような実施形態では、s c F vは重鎖定常領域に融合することができ、V Hは重鎖定常領域に融合することができる。いくつかの実施形態では、定常領域は「ノブアンドホール」配列を有する。「ノブ」配列は、s c F vに融合した重鎖定常領域にあり得、「ホール」配列は、V Hに融合した定常領域に融合し得る。代替的に、「ホール」変異は、s c F vに融合した重鎖定常領域にあり得、「ノブ」配列は、V Hに融合された定常領域に融合され得る。そのようなフォーマットの例示的バイパトリック抗F R 抗体またはその抗原結合断片の配列は、表7に見出される。

10

【0146】

いくつかの実施形態では、4価のバイパトリック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、s c F vである2つのF R 結合ドメインと、別個のポリペプチド上のV H及びV Lを含む2つのF R 結合ドメインと、を含む。そのような実施形態では、s c F vは、V Hを含むポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。s c F vは、V Lを含むポリペプチドのN末端またはC末端に融合させることもできる。

【0147】

4価のバイパトリック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、2つのポリペプチドを含み得、第1のポリペプチドは、重鎖定常領域、V H、及びs c F vを含み、第2のポリペプチドは、軽鎖定常領域及びV Lを含む。4価のバイパトリック抗F R 抗体またはその抗原結合断片はまた、2つのポリペプチドを含み得、第1のポリペプチドは、重鎖定常領域、及びV Hを含み、第2のポリペプチドは、軽鎖定常領域、V L、及びs c F vを含む。そのようなフォーマットの例示的バイパトリック抗F R 抗体またはその抗原結合断片の配列は、表6に見出される。

20

【0148】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、二重特異性ヘテロダイマーダイアボディ、例えば、テトラマー二重特異性ヘテロダイマーダイアボディである。本明細書で使用される場合、「二重特異性ヘテロダイマーダイアボディ」という用語は、2つ以上のポリペプチド鎖またはタンパク質の複合体を指し、それぞれが少なくとも1つの抗体のV L及び1つの抗体のV Hドメインを含むことができ、それぞれのポリペプチド鎖のV L及びV Hドメインは、異なる抗体に由来する。

30

【0149】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるバイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、1つ以上の表面再構成F R 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片のF R 結合ドメインの全ては、表面再構成されている。

【0150】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、ヒト免疫グロブリンであって、その相補性決定領域(CDR)由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び機能を有する非ヒト種(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター)のCDR由来の残基で置き換えられている(「CDRグラフト化」)(Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536 (1988))。

40

【0151】

さらなる実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、少なくとも1つの重鎖可変領域及び少なくとも1つの軽鎖可変領域を含むCDRグラフト化抗体または表面再構成抗体であり、上記重鎖可変領域は、それぞれ配列番号7~9で表されるアミ

50

ノ酸配列を有する 3 つの相補性決定領域を含み、上記軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 1 ~ 3 で表されるアミノ酸配列を有する 3 つの相補性決定領域を含む。

【 0 1 5 2 】

さらなる実施形態では、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片は、少なくとも 1 つの重鎖可変領域及び少なくとも 1 つの軽鎖可変領域を含む C D R グラフト化抗体または表面再構成抗体であり、上記重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 1 3、1 4、及び 9 で表されるアミノ酸配列を有する 3 つの相補性決定領域を含み、上記軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 1 ~ 3 で表されるアミノ酸配列を有する 3 つの相補性決定領域を含む。

【 0 1 5 3 】

さらなる実施形態では、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片は、少なくとも 1 つの重鎖可変領域及び少なくとも 1 つの軽鎖可変領域を含む C D R グラフト化抗体または表面再構成抗体であり、上記重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 1 0 ~ 1 2 で表されるアミノ酸配列を有する 3 つの相補性決定領域を含み、上記軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 4 ~ 6 で表されるアミノ酸配列を有する 3 つの相補性決定領域を含む。

10

【 0 1 5 4 】

さらなる実施形態では、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片は、少なくとも 1 つの重鎖可変領域及び少なくとも 1 つの軽鎖可変領域を含む C D R グラフト化抗体または表面再構成抗体であり、上記重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 1 5、1 6、及び 1 2 で表されるアミノ酸配列を有する 3 つの相補性決定領域を含み、上記軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 4 ~ 6 で表されるアミノ酸配列を有する 3 つの相補性決定領域を含む。

20

【 0 1 5 5 】

さらなる実施形態では、配列番号 2 2 ~ 2 6 に対応するアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性、より好ましくは、配列番号 2 2 ~ 2 6 と 9 5 % の配列同一性、最も好ましくは、配列番号 2 2 ~ 2 6 と 1 0 0 % の配列同一性を共有するヒト化（例えば、表面再構成、C D R グラフト化）重鎖可変領域を有する抗体またはその抗原結合断片が提供される。特定の実施形態では、抗体は、C D R の外側のフレームワーク領域に保存的変異を含む。

【 0 1 5 6 】

同様に、配列番号 1 7 ~ 2 1 に対応するアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性、より好ましくは、配列番号 1 7 ~ 2 1 と 9 5 % の配列同一性、最も好ましくは、配列番号 1 7 ~ 2 1 と 1 0 0 % の配列同一性を共有するヒト化（例えば、表面再構成、C D R グラフト化）軽鎖可変領域を有する抗体が提供される。特定の実施形態では、抗体は、C D R の外側のフレームワーク領域に保存的変異を含む。

30

【 0 1 5 7 】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、重鎖定常領域、例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g E、I g M、または I g D の定常領域を含む。いくつかの実施形態では、重鎖定常領域は、I g G 1 重鎖定常領域または I g G 4 重鎖定常領域である。さらに、いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、カッパ軽鎖定常領域またはラムダ軽鎖定常領域のいずれかである、軽鎖定常領域を含むことができる。いくつかの実施形態では、軽鎖定常領域は、カッパ軽鎖定常領域である。

40

【 0 1 5 8 】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 1 9 と 2 4 ; 2 0 と 2 5 ; 及び 2 1 と 2 6 からなる群から選択される、V L と V H との配列を含む、第 1 の F R 結合ドメインと、F R への結合について h u M o v 1 9 と競合しない第 2 の F R 結合ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 2 0 と 5 7 の、V L と V H との配列を含む、第 1 の F R 結合ドメインと、F R への結合について h u M o v 1 9 と競合しない第 2 の F R 結合ドメインと、を含む。

【 0 1 5 9 】

50

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号17と22；及び18と23からなる群から選択される、V LとV Hとの配列を含む、第1のF R 結合ドメインと、F R への結合についてF R 57と競合しない第2のF R 結合ドメインと、を含む。

【0160】

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号22のV Hアミノ酸配列と、配列番号17のV Lアミノ酸配列とを含む抗体と、同じF R エピトープへの結合について、競合的に阻害する、F R 結合ドメインを含む。

【0161】

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号24のV Hアミノ酸配列と、配列番号19のV Lアミノ酸配列とを含む抗体と、同じF R エピトープへの結合を競合的に阻害する、F R 結合ドメインを含む。

10

【0162】

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、(i)配列番号22のV Hアミノ酸配列と、配列番号17のV Lアミノ酸配列とを含む抗体と、同じF R エピトープへの結合を競合的に阻害する、第1のF R 結合ドメインと、(ii)配列番号24のV Hアミノ酸配列と、配列番号19のV Lアミノ酸配列とを含む抗体と、同じF R エピトープへの結合を競合的に阻害する、第2のF R 結合ドメインと、を含む。

【0163】

20

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号22のV Hアミノ酸配列と、配列番号17のV Lアミノ酸配列とを含む抗体と、同じF R エピトープに結合するF R 結合ドメインを含む。

【0164】

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号24のV Hアミノ酸配列と、配列番号19のV Lアミノ酸配列とを含む抗体と、同じF R エピトープに結合するF R 結合ドメインを含む。

【0165】

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、(i)配列番号22のV Hアミノ酸配列と、配列番号17のV Lアミノ酸配列とを含む抗体と、同じF R エピトープへの結合に結合する第1のF R 結合ドメインと、(ii)配列番号24のV Hアミノ酸配列と、配列番号19のV Lアミノ酸配列とを含む抗体と、同じF R エピトープへの結合に結合する第2のF R 結合ドメインと、を含む。

30

【0166】

いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、F R 57の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号17及び/または22）と、h u M O V 19の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号19及び/または24）と、を含む。

【0167】

いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、F R 57の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号17及び/または22）と、h u M O V 19の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号19及び/または25）と、を含む。いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、F R 57の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号17及び/または22）と、h u M O V 19の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号19及び/または57）と、を含む。

40

【0168】

いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、F R 57の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号17及び/または22）と、h u M O V 19の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号

50

【 0 1 6 9 】

【 0 1 7 0 】

10

【 0 1 7 1 】

20

【 0 1 7 2 】

30

【 0 1 7 3 】

【 0 1 7 4 】

40

【 0 1 7 5 】

【 0 1 7 6 】

50

【 0 1 7 8 】

10

【 0 1 8 0 】

20

【 0 1 8 2 】

30

40

【 0 1 8 5 】

50

【 0 1 8 6 】

【 0 1 8 7 】

【 0 1 8 8 】

【 0 1 8 9 】

【 0 1 9 0 】

【 0 1 9 1 】

【 0 1 9 2 】

【 0 1 9 3 】

50

【 0 1 9 4 】

いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、F R 5 7 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 1 8 及び／または 2 3 ）と、h u M O V 1 9 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 1 9 及び／または 2 5 ）と、を含む。いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、F R 5 7 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 1 8 及び／または 2 2 ）と、h u M O V 1 9 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 2 1 及び／または 5 7 ）と、を含む。

【 0 1 9 5 】

いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、FR57の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号18及び/または23）と、hUMOV19の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号19及び/または26）と、を含む。

【 0 1 9 6 】

いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、FR57の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号18及び/または23）と、hUMOV19の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号20及び/または24）と、を含む。

【 0 1 9 7 】

いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、F R 5 7 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 1 8 及び／または 2 3 ）と、h u M O V 1 9 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 2 0 及び／または 2 5 ）と、を含む。いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、F R 5 7 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 1 8 及び／または 2 3 ）と、h u M O V 1 9 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 2 0 及び／または 5 7 ）と、を含む。

【 0 1 9 8 】

いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、FR57の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号18及び/または23）と、hUMOV19の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号20及び/または26）と、を含む。

【 0 1 9 9 】

いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、FR57の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号18及び/または23）と、h u M O V 19の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号21及び/または24）と、を含む。

【 0 2 0 0 】

いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、F R 5 7 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 1 8 及び／または 2 3 ）と、h u M O V 1 9 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 2 1 及び／または 2 5 ）と、を含む。いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、F R 5 7 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 1 8 及び／または 2 3 ）と、h u M O V 1 9 の可変軽鎖及び／または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号 2 1 及び／または 5 7 ）と、を含む。

【 0 2 0 1 】

いくつかの実施形態では、本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、FR57の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号18及び/または23）と、h u M O V 19の可変軽鎖及び/または可変重鎖（例えば、それぞれ配列番号21及び/または26）と、を含む。

【 0 2 0 2 】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、(i) F R 5 7 と同じエピトープに結合する s c F v と、(i i) h u M o v 1 9 と同じエピトープに結合する s c F v と、を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7 及び配列番号 3 0 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7 及び配列番号 3 1 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7 及び配列番号 3 2 を含む。

【 0 2 0 3 】

いくつかの実施形態では、抗F R バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 8 及び配列番号 3 0 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 8 及び配列番号 3 1 を含む。いくつかの実施形態では、抗F R バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 8 及び配列番号 3 2 を含む。

【 0 2 0 4 】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 9 及び配列番号 3 0 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 9 及び配列番号 3 1 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 9 及び配列番号 3 2 を含む。

【 0 2 0 5 】

配列番号 2 7 ~ 3 2 の V H 及び V L 配列は、異なる順序で配置され得ることが理解されるべきである。例えば、配列番号 2 7 に記載されているような N 末端から C 末端への配向は、V H - (G 4 S)₄ - V L である。しかしながら、本明細書で開示されるのは、V H 及び V L 配列がグリシン - セリンリンカーの周りで交換される配向 (例えば、V L - (G 4 S)₄ - V H) である s c F v ポリペプチド配列である。

【 0 2 0 6 】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7、配列番号 1 9、及び配列番号 2 4 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7、配列番号 1 9、及び配列番号 2 5 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7、配列番号 1 9、及び配列番号 5 7 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7、配列番号 1 9、及び配列番号 2 6 を含む。

【 0 2 0 7 】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7、配列番号 2 0、及び配列番号 2 4 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7、配列番号 2 0、及び配列番号 2 5 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7、配列番号 2 0、及び配列番号 5 7 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7、配列番号 2 0、及び配列番号 2 6 を含む。

【 0 2 0 8 】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、(i) F R 5 7 と同じエピトープに結合する s c F v と、(i i) h u M o v 1 9 と同じエピトープに結合する別個のポリペプチド上の V H 及び V L を含む F R 結合ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7、配列番号 2 1、及び配列番号 2 4 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7、配列番号 2 1、及び配列番号 2 5 を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 7、配列番号 2 1、及び配列番号 5 7 を含む。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 9 】

10

【 0 2 1 0 】

【 0 2 1 1 】

20

【 0 2 1 2 】

30

【 0 2 1 3 】

40

【 0 2 1 4 】

50

【0215】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、(i) huMo v 19と同じエピトープに結合するscFvと、(ii) FR57と同じエピトープに結合する別個のポリペプチド上のVH及びVLを含むFR 結合ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号30、配列番号17、及び配列番号22を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号30、配列番号17、及び配列番号23を含む。

【0216】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号30、配列番号18、及び配列番号22を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号30、配列番号18、及び配列番号23を含む。

10

【0217】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、(i) huMo v 19と同じエピトープに結合するscFvと、(ii) FR57と同じエピトープに結合する別個のポリペプチド上のVH及びVLを含むFR 結合ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号31、配列番号18、及び配列番号22を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号31、配列番号18、及び配列番号23を含む。

20

【0218】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号31、配列番号17、及び配列番号22を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号31、配列番号17、及び配列番号23を含む。

【0219】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号32、配列番号17、及び配列番号22を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号32、配列番号17、及び配列番号23を含む。

30

【0220】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号32、配列番号18、及び配列番号22を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号32、配列番号18、及び配列番号23を含む。

【0221】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、以下の表6に開示されるポリペプチド配列を含む。

40

【表 6 - 1】

表 6. Morrison フォーマット (C 末端 scFv) 融合タンパク質

	名称	scFv配列
分子-1: mov19-IgG1-F R57scFv1	mov19-IgG1-F R57scFv-HC	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNW VKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDFTFYNQKFQGKATLTV DKSSNTAHMELLSTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGL EWVAYISSGSSTISYADSVKGRFTISRDNSSKTLTLLQ MTSRAEDTAMYYCAREAYGSSMEYWGQGLTVTVSS GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSVTPGD RVSLSRASQINNNLHWYQQKPGQSPRLLIKYVSQS VSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISVEPEDFGMYFCQSN SWPHYTFGQGTKLEIKRT (配列番号33)
	huMov19LC	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMH WYHQKPGQQRLLIYRASNLAEAGVPDRFSGSGSKTDF TLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGSKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号34)
分子2: FR57-IgG1-mo v19scFv1	FR57-IgG1-mo v19scFv1-HC	EVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSFGMHW VRQAPGKGLEWVAYISSGSSTISYADSVKGRFTISR NSKKTLTLLQMTSLRAEDTAMYYCAREAYGSSMEYW GGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTOTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNNHY TQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEV VKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEW IGRIHPYDGDFTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELL SLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPLSLAVSLGQ PAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQRLLIYRA SNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYC QQSREYPYTFGGGSKLEIKRT (配列番号35)

10

20

30

40

	FR57LC	<p>EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQ QKPGQSPRLLIK YVSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSIS SVEPEDFGM YFCQQSNSWPHYTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> <p>(配列番号36)</p>
分子3: FR57scFv2-mo v19-IgG1	FR57scFv2-mo v19-IgG1-HC	<p>EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQ QKPGQSPRLLIK YVSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSIS SVEPEDEGM YFCQQSNSWPHYTFGCGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGGGLVQPGGSRRL SCAASGFTFSSFGMHWRQAPGKCLEWVA YISSGSST ISYADSVKGRFTISRDN SKKTLLQLMTSLRAEDTAMY YCAREAYGSSMEYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGY FMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDFTFYNQKFQGA TLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRA MDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYKKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHN HYTQKSLSLSPG</p> <p>(配列番号37)</p>
	huMov19LCv1- 6	<p>DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMH WYHQQKPGQQPRLLIYRASNL EAGVPDRFSGSGSKTDF TLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p> <p>(配列番号38)</p>

40

【表 6 - 3】

分子4: FR57scFv3wt- mov19-IgG1	FR57scFv3wt- mov19-IgG1-H C	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQ QKPGQSPRLLIKYSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLIS SVEPEDFGMYFCQQSNSWPHYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRRL SCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSS TISYADSVKGRFTISRDNSSKKTLLQMTSLRAEDTAM YYCAREAYGSSMEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTG YFMNWWKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGK ATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSR AMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG (配列番号39)	10
	huMov19LCv1- 6	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMH WYHQPQGQPRLLIYRASNLGAVPDRFSGSGSKTDF TLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号NO:40)	20

【0222】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号33及び配列番号34のポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号35及び配列番号36から選択されるポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号37及び配列番号38から選択されるポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号39及び配列番号40から選択されるポリペプチド配列を含む。

【0223】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、以下の表7に開示されるポリペプチド配列を含む。

10

20

30

40

50

表 7. 非対称 F c 分子 (ノブインホール)

	名称	配列
分子5: FR57 ^{sc} Fv2-ノブ-Mov1 9-ホール	FR57 ^{sc} Fv2-Fc- ノブ(C220S, T 366W)	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQ QKPGQSPRLLIKYVSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLIS SVEPEDE <u>E</u> GMYFCQQSNSWPHYTFG <u>C</u> GTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV <u>Q</u> SGGGLVQPGGSRRL SCAASGFTFSSFGMHWRQAPGK <u>C</u> LEWVA YISSGSS TISYADSVKGRFTISRDNSSKKTLLQMTSLRAEDTAM YYCAREAYGSSMEYWGGTILVTVSSGSEPKS <u>S</u> DKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL <u>W</u> CLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG (配列番号41)
	Mov19-Fc-ホー ル(T366S, L36 8A, Y407V)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNW VKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTV DKSSNTAHMELLSTLSEDFAVYYCTRYDGSRAMDY WGQGTTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TP EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSL <u>S</u> <u>C</u> <u>A</u> VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG (配列番号42)
	Mov19-LC	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMH WYHQKPGQQPRLLIYRASNL EAGVPDRFSGSGSKTDF TLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号43)

【表 7 - 2】

分子6: FR57 _{sc} Fv3wt-ノブ-Mo v19-ホール	FR57 _{sc} Fv3wt-Fc-ノブ(C220S, T366W)	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQ QKPGQSPRLLIKYSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSIS SVEPEDFGMYFCQQSNSWPHYTFGQGTKLEIKGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSRRL SCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSS TISYADSVKGRFTISRDNSSKTLTLLQMTSLRAEDTAM YYCAREAYGSSMEYWGQGTLLTVSSGSEPKSSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLL YSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG (配列番号44)
	Mov19-Fc-ホール(T366S, L368A, Y407V)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNW VKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTV DKSSNTAHMELLSTSEDAVYYCTRYDGSRAMDY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG (配列番号45)
	Mov19-LC	DIVLTQSPSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMH WYHQPGQQPRLLIYRASNLGAVPDRFSGSGSKTDF TLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号46)

【0224】

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号41～43のポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号44～46のポリペプチド配列を含む。

【0225】

本開示のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、リンカーをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、リンカーは、第1の抗体またはその抗原結合断片を、N末端からC末端に向けて、第2の抗体またはその抗原結合断片に連結することができる。他の実施形態では、リンカーは、第2のポリペプチドを、N末端からC末端に向けて、第1のポリペプチドに連結することができる。

【 0 2 2 6 】

一実施形態では、バイパラトピック抗体またはその抗原結合断片は、第1のペプチド、抗体、またはその抗原結合断片と、第2のペプチド、抗体、またはその抗原結合断片との間に位置するリンカー配列を含む。リンカーは任意の長さのものであってよく、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、もしくは60、またはそれ以上のアミノ酸を含むことができる。他の実施形態では、本開示に有用なリンカーは、少なくとも1つのアミノ酸及び100未満のアミノ酸、90未満のアミノ酸、80未満のアミノ酸、70未満のアミノ酸、60未満のアミノ酸、50未満のアミノ酸、40未満のアミノ酸、30未満のアミノ酸、20未満のアミノ酸、19未満のアミノ酸、18未満のアミノ酸、17未満のアミノ酸、16未満のアミノ酸、15未満のアミノ酸、14未満のアミノ酸、13未満のアミノ酸、または12未満のアミノ酸を有する。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、グリシンアミノ酸残基を含む。他の例では、リンカー配列は、グリシンとセリンのアミノ酸残基の組み合わせを含む。

10

【 0 2 2 7 】

いくつかの実施形態では、そのようなグリシン/セリンリンカーは、ペプチドGGGS（配列番号49）もしくはGGGS（配列番号50）、またはそれらの所与のペプチドの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはそれ以上の反復を含む、それらの反復を含むがこれらに限定されないアミノ酸残基の任意の組み合わせを含むことができる。本明細書で開示されるグリシン/セリンリンカーは、 $(GS)_n$ 、 $(GGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 、または $(GGGS)_n$ のアミノ酸配列を含み、式中、 n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の整数である。一実施形態では、リンカー配列はGGGS GGGS GGGS（配列番号51） $(Gly_4Ser)_3$ とも呼ばれる）である。別の実施形態では、リンカー配列はGGGS GGGS GGGS GGGS（配列番号52） $(Gly_4Ser)_4$ とも呼ばれる）である。

20

【 0 2 2 8 】

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F_R抗体は、改変（例えば、変異または操作）されたFc領域を含む。例えば、いくつかの態様において、Fc領域は、抗体のエフェクター機能を低減または増強するために、血清半減期または抗体の他の機能的特性を改変するために改変されている。エフェクター機能の低減または排除は、特定の場、例えば、その作用機序が標的抗原を担持する細胞の殺傷ではなく遮断または拮抗作用を含む抗体の場合に望ましい。エフェクター機能の増加は、Fc_Rが低レベルで発現する腫瘍及び外来細胞などの望ましくない細胞、例えば、Fc_RIIIBのレベルが低い腫瘍特異的B細胞（例えば、非ホジキンリンパ腫、CLL、及びバーキットリンパ腫）を対象とする場合に、一般的に望ましい。そのような付与されたかまたは改変されたエフェクター機能活性を有する本発明のイムノコンジュゲートは、エフェクター機能活性の効力の増強が望まれる疾患、障害、または感染症の治療、及び/または予防に有用である。いくつかの態様において、Fc領域は、IgM、IgA、IgG、IgE、または他のアイソタイプから選択されるアイソタイプである。

30

40

【 0 2 2 9 】

バイパラトピック抗F_R抗体またはその抗原結合断片のFc領域が、1つ以上のFc受容体（例えば、Fc_R（複数可））に結合する能力を有し得るが、特定の実施形態では、抗体または抗体断片は、Fc_{RI}A（CD64）、Fc_{RI}IA（CD32A）、Fc_{RI}IB（CD32B）、Fc_{RI}IIA（CD16a）、またはFc_{RI}IB（CD16b）への（野生型Fc領域によって示される結合と比較して）改変された結合を有するバリエーションFc領域を含み、例えば、活性化受容体への結合に対する増強された結合を有し、及び/または抑制性受容体（複数可）に結合する能力が大幅に低下するか、まったくない。このように、バイパラトピック抗F_R抗体またはその抗原結合断片のFc領域は、CH2ドメインの一部または全部、及び/または完全なFc領域のCH

50

3ドメインの一部または全てを含んでいてもよく、あるいはバリエーションCH2及び/またはバリエーションCH3の配列を含んでもよい(例えば、完全なFc領域のCH2またはCH3ドメインに対して1つ以上の挿入及び/または1つ以上の欠失を含んでもよい)。そのようなFc領域は、非Fcポリペプチド部分を含み得るか、または非天然の完全なFc領域の部分を含み得るか、または天然に存在しないCH2及び/またはCH3ドメインの配向(例えば、2つのCH2ドメインまたは2つのCH3ドメイン、あるいはN末端からC末端方向に、CH3ドメインがCH2ドメインに連結されるなど)を含み得る。

【0230】

活性化受容体(例えば、FcRIIA(CD16A))への結合を増加させ、抑制性受容体(例えば、FcRIIB(CD32B))への結合を低減させる改変を含む、エフェクター機能を改変するとして同定されたFc領域改変は、当該技術分野で知られている(例えば、Stavenghagen, et al., Cancer Res. 57(18): 8882-8890(2007))を参照されたい)。表8に、活性化受容体への結合を増加させ、及び/または抑制性受容体への結合を低減する、例示的な改変の、例示的な単一、二重、三重、四重、五重の置換を示す(ナンバリングは、Kabattに示されるEUIンデックスのものであり、置換は、配列番号59のアミノ酸配列と比較している)。

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8. 優先される活性化 F c 領域のバリエーション

単一部位のバリエーション			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
二重部位のバリエーション			
F243L及びR292P	F243L及びY300L	F243L及びP396L	R292P及びY300L
D270E及びP396L	R292P及びV305I	P396L及びQ419H	P247L及びN421K
R292P及びP396L	Y300L及びP396L	R255L及びP396L	R292P及びP305I
K392T及びP396L			
三重部位のバリエーション			
F243L、P247L、及びN421K		P247L、D270E、及びN421K	
F243L、R292P、及びY300L		R255L、D270E、及びP396L	
F243L、R292P、及びV305I		D270E、G316D、及びR416G	
F243L、R292P、及びP396L		D270E、K392T、及びP396L	
F243L、Y300L、及びP396L		D270E、P396L、及びQ419H	
V284M、R292L、及びK370N		R292P、Y300L、及びP396L	
4重部位のバリエーション			
L234F、F243L、R292P、及びY300L		F243L、P247L、D270E、及びN421K	
L234F、F243L、R292P、及びY300L		F243L、R255L、D270E、及びP396L	
L235I、F243L、R292P、及びY300L		F243L、D270E、G316D、及びR416G	
L235Q、F243L、R292P、及びY300L		F243L、D270E、K392T、及びP396L	
P247L、D270E、Y300L、及びN421K		F243L、R292P、Y300L、及びP396L	
R255L、D270E、R292G、及びP396L		F243L、R292P、V305I、及びP396L	
R255L、D270E、Y300L、及びP396L		F243L、D270E、P396L、及びQ419H	
D270E、G316D、P396L、及びR416G			
五重部位のバリエーション			
L235V、F243L、R292P、Y300L、及びP396L		F243L、R292P、V305I、Y300L、及びP396L	
L235P、F243L、R292P、Y300L、及びP396L			

【0231】

C D 3 2 B への結合が低減し、及び/または C D 1 6 A への結合が増加したヒト I g G 1 F c 領域の例示的なバリエーションには、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、V 3 0 5 I、または P 3 9 6 L の置換が含まれ、ナンバリングは K a b a t に示される E U インデックスのものである。これらのアミノ酸置換は、任意の組み合わせでヒト I g G 1 F c 領域に存在し得る。一実施形態では、バリエーションヒト I g G 1 F c 領域は、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、及び Y 3 0 0 L 置換を含む。別の実施形態では、バリエーションヒト I g G 1 F c 領域は、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、V 3 0 5 I、及び P 3 9 6 L 置換を含む。

【0232】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、エフェクター機能を低下させる改変を含む免疫グロブリン重鎖定常領域を含む（例えば

、Idusogie et al., J. Immunol. 166:2571-2575 (2001); Sazinsky et al., PNAS USA 105:20167-20172 (2008); Davis et al., J. Rheumatol. 34:2204-2210 (2007); Bolt et al., Eur. J. Immunol. 23:403-411 (1993); Alegre et al., Transplantation 57:1537-1543 (1994); Xu et al., Cell Immunol. 200:16-26 (2000); Cole et al., Transplantation 68:563-571 (1999); Hutchins et al., PNAS USA 92:11980-11984 (1995); Reddy et al., J. Immunol. 164:1925-1933 (2000); WO97/11971、及びWO07/106585; 米国特許出願公開第2007/0148167 A1号; McEarchern et al., Blood 109:1185-1192 (2007); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20:685-691 (2009); ならびにKumagai et al., J. Clin. Pharmacol. 47:1489-1497 (2007)を参照されたい(そのそれぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0233】

いくつかの実施形態では、バイパトリック抗F_R 抗体またはその抗原結合断片のF_c領域にとって好ましいのは、野生型IgG F_c領域(配列番号59)によって示される結合と比較して、F_c RIIA(CD64)、F_c RIIA(CD32A)(アロタイプR131及びH131)、F_c RII B(CD32B)、F_c RIIIA(CD16a)(アロタイプV158及びF158)、ならびにF_c RIIIB(CD16b)(アロタイプF_c IIIb-NA1及びF_c IIIb-NA2)からなる群から選択されるエフェクター受容体への低下した結合(または実質的に結合しないこと)を示すことである。いくつかの実施形態では、バイパトリック抗F_R 抗体またはその抗原結合断片のF_c領域バリエーションのエフェクター受容体結合親和性は、対応する免疫グロブリンの野生型F_c領域を含む対応する抗体または抗体結合断片の結合親和性と比較して、1/10以下、1/50以下、または1/100以下に減少している。

【0234】

特定の実施形態では、バイパトリック抗F_R 抗体または抗原結合断片は、低下したエフェクター機能(例えば、減少したADCC)を示すIgG F_c領域を含み、233、234、235、236、237、238、239、265、266、267、269、270、271、295、296、297、298、300、324、325、327、328、329、331、及び332からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸位置で改変を含み、ここで、アミノ酸位置のナンバリングは、Kabataに記載されるEUインデックスに従う。一実施形態では、バイパトリック抗F_R 抗体または抗原結合断片のCH₂-CH₃ドメインは、置換:L234A、L235A、D265A、N297Q、N297A、及びN297Gのうちの任意の1、2、3、または4つを含み、ナンバリングはKabataに示されるEUインデックスのものである。別の実施形態では、CH₂-CH₃ドメインは、N297Q置換、N297A置換、またはL234A及びL235A置換を含み、これらの変異は、F_cR結合を無効にするためである。代替的に、バイパトリック抗F_R 抗体またはその抗原結合断片は、(野生型IgG1 F_c領域(配列番号59)によって示される結合及びエフェクター機能と比較して)低下した(または実質的にない)F_c RIIIA(CD16a)への結合、及び/または低減したエフェクター機能を本質的に示す、天然に存在するF_c領域のCH₂-CH₃ドメインを含む。特定の実施形態では、バイパトリック抗F_R 抗体のF_c定常領域は、IgG2 F_c領域(配列番号60)またはIgG4 F_c領域(配列番号61)を含む。N297A、N297G、N297Q、L234A、L235A、及びD265A置換はエフェクター機能を無効にするので、エフェクター機能が望まれる状況では、これらの置換は好ましくは使用されないであろう。

【 0 2 3 5 】

低下または消滅エフェクター機能を有する F c 領域を含むバイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片の C H 2 及び C H 3 ドメインのための好ましい I g G 1 配列は、置換 L 2 3 4 A / L 2 3 5 A (下線で示す)を含む(配列番号 6 2) :

【 化 2 4 】

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG

10

【 0 2 3 6 】

低下または消滅エフェクター機能を有する F c 領域を含むバイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片の C H 2 及び C H 3 ドメインのための好ましい I g G 1 配列は、置換 N 2 9 7 A (下線で示す)を含む(配列番号 6 3) :

【 化 2 5 】

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYASTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG

20

【 0 2 3 7 】

低下または消滅エフェクター機能を有する F c 領域を含むバイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片の C H 2 及び C H 3 ドメインのための好ましい I g G 1 配列は、置換 N 2 9 7 Q (下線で示す)を含む(配列番号 6 4) :

【 化 2 6 】

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEOYOSTY RVVSVLTVLH ODWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG

30

【 0 2 3 8 】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 6 2、配列番号 6 3、または配列番号 6 4 から選択される F c (免疫グロブリン)配列を含む。いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、低下または消滅したエフェクター機能を有する F c (免疫グロブリン)配列(例えば、上述の配列番号 6 2、配列番号 6 3、及び/または配列番号 6 4 に示される置換を含む)、及び本明細書に記載の 1 つ以上のノブインホール変異を含む。いくつかの実施形態では、F c 配列は、本明細書で開示されるようなノブ変異を含む。いくつかの実施形態では、F c 配列は、本明細書で開示されるようなホール変異を含む。

40

【 0 2 3 9 】

いくつかの実施形態では、バイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、I g G 1 - C 2 2 0 S、C 2 2 6 S、C 2 2 9 S、P 2 3 8 S ; I g G 1 - C 2 2 6 S、C 2 2 9 S ; I g G 1 - C 2 2 6 S、C 2 2 9 S、E 2 3 3 P、L 2 3 4 V、L 2 3 5 A ; I g G 1 - L 2 3 4 A、L 2 3 5 A ; I g G 1 - L 2 3 4 F、L 2 3 5 E、P 3 3 1 S

50

; IgG1 - L234F、L235E、P331S; IgG1 - H268Q、A330S、P331S; IgG1 - G236R、L328R; IgG1 - L235G、G236R、IgG1 - N297A; IgG1 - N325A、L328R; IgG1 - N325L、L328R; IgG1 - K326W、E333S; IgG2 - V234A、G237A; IgG2 - E333S; IgG2 H268Q、V309L、A330S、A331S; IgG4 - S228P、L236E; IgG4 - F234A、L235A; IgG4 - F234A、G237A、E318A; IgG4 - L235A、G237A、E318A; IgG4 - L236E; IgG2 - EU配列118~260; 及びIgG4 - EU配列261~447に対応する1つのまたは複数の改変を含み、ここで、位置のナンバリングは、Kababに示されるEUインデックスによる。

10

【0240】

いくつかの実施形態では、バイパロピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、CDC活性が低下している重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。特定の態様において、バイパロピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、CDC活性を低下させる変異を含むIgG1重鎖定常領域を含む（例えば、WO1997/11971及びWO2007/106585; 米国特許出願公開第2007/0148167A1号; McEarchern et al., Blood 109:1185-1192(2007); Hayden-Ledbetter et al., Clin. Cancer 15:2739-2746(2009); Lazar et al., PNAS USA 103:4005-4010(2006); Bruckheimer et al., Neoplasia 11:509-517(2009); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20:685-691(2009); ならびにSazinsky et al., PNAS USA 105:20167-20172(2008)を参照されたい(それぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)）。CDCを減少させる重鎖定常ドメイン配列改変の例としては、EUインデックスによる、IgG1 - C226S、C229S、E233P、L234V、L235A; IgG1 - C226S、P230S; IgG1 - L234F、L235E、P331S; IgG1 - S239D、A330L、I332E; IgG2 EU配列118~260; IgG4 - EU配列261~447; 及びIgG2 - H268Q、V309L、A330S、A331Sに対応する1つ以上の改変が挙げられる。

20

30

【0241】

いくつかの実施形態では、提供されるバイパロピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片は、1つ以上の半減期を延長させるアミノ酸改変（例えば、置換）を含む重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。Fc領域を含む分子の半減期を増加させることができる多数の変異は、当該技術分野で知られており、本明細書で提供されるバイパロピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片の構成要素として包含される。例えば、米国特許第6,277,375号、同第7,083,784号、同第7,217,797号、及び同第8,088,376号、米国特許出願公開第2002/0147311号; 及び同第2007/0148164号; ならびにPCT公開番号WO1998/23289; WO2009/058492; 及びWO2010/033279を参照されたい(それぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

40

【0242】

Fc領域を含むタンパク質の血清半減期は、FcRnに対するFc領域の結合親和性を増加させることによって増加させることができる。本明細書で使用される場合、「半減期」という用語は、それらの投与後の分子の平均生存時間の尺度である分子の薬物動態学的特性を意味する。半減期は、例えば、血清中(すなわち、循環半減期)または他の組織で測定されるとき、対象(例えば、ヒトの患者または他の哺乳動物)の身体またはその特定のコンパートメントから、既知の量の分子の50%を排除するのに必要な時間として表すことができる。一般に、半減期の増加は、投与された分子の循環中の平均滞留時間(MRT)の増加をもたらす。

50

【0243】

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、238、250、252、254、256、257、256、265、272、286、288、303、305、307、308、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428、433、434、435、及び436からなる群から選択される1つ以上の位置で半減期を延長させるアミノ酸置換を含み、ここで、アミノ酸位置のナンバリングはE Uインデックスに従う。いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、位置251～257、285～290、308～314、385～389、及び428～436におけるアミノ酸残基の一つ以上のアミノ酸置換を含み、ここで、アミノ酸位置のナンバリングはE Uインデックスに従う。いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、K a b a t位置252のアミノ酸のT y r、P h e、T r p、もしくはT h rによる置換；K a b a t位置254のアミノ酸のT h rによる置換；K a b a t位置256のアミノ酸のS e r、A r g、G l n、G l u、A s p、もしくはT h rによる置換；K a b a t位置257のアミノ酸のL e uによる置換；K a b a t位置309のアミノ酸のP r oによる置換；K a b a t位置311のアミノ酸のS e rによる置換；K a b a tの428位のアミノ酸のT h r、L e u、P h e、もしくはS e rによる置換；K a b a tの433位のアミノ酸のA r g、S e r、I s o、P r o、もしくはG l nによる置換；または、K a b a tの434位のアミノ酸のT r p、M e t、S e r、H i s、P h e、もしくはT y rによる置換の一つ以上を含む。より具体的には、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片ドメインは、野生型ヒトI g Gの定常ドメインに対して、K a b a t位置252のアミノ酸のT y rによる置換、K a b a t位置254のアミノ酸のT y rによる置換、及びK a b a t位置256のアミノ酸のG l uによる置換を含むアミノ酸置換を含むことができる。

【0244】

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、T250Q、M252Y、S254T、T256E、K288D、T307Q、V308P、A378V、M428L、N434A、N434S、N434H、N434Y、H435K、及びY436Iから選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで、ナンバリングは、K a b a tに示されるE Uインデックスのものである。さらなる実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、置換基は、(a) M252Y、S254T、及びT256E；(b) M252Y及びS254T；(c) M252Y及びT256E；(d) T250Q及びM428L；(e) T307Q及びN434A；(f) A378V及びN434A；(g) N434A及びY436I；(h) V308P及びN434A；ならびに(i) K288D及びH435Kから選択される置換を含む。

【0245】

好ましい実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、置換M252Y、S254T、及びT256Eのうちの任意の1、2、または3つを含むバリエーションI g G F c領域を含む。本開示はさらに、(a) エフェクター機能及び/またはF c Rを改変する1つ以上の変異；及び(b) 血清半減期を延長させる1つ以上の変異を含むバリエーションF c領域を有する、バイパラトピック抗F R 抗体または抗原結合断片を提供する。

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9：免疫グロブリン配列

例示的なIgG1 Fc領域	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (配列番号59)	
例示的なIgG2 Fc領域	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG (配列番号60)	10
例示的なIgG4 Fc領域	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLG (配列番号61)	20
例示的なL234A/ L235A IgG1 Fc領域	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (配列番号62)	
例示的なN297A IgG1 Fc領域	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (配列番号63)	30
例示的なN297Q IgG1 Fc領域	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (配列番号64)	40

【0246】

III. バイパロトピック抗体産生

FR に免疫特異的に結合するバイパロトピック抗体またはその抗原結合断片は、例えば、化学合成または組換え発現技術によって、抗体の合成のための当該分野で公知の任意の方法により生成することができる。本明細書に記載の方法は、別途示されない限り、分子生物学、微生物学、遺伝子分析、組換えDNA、有機化学、生化学、PCR、オリゴヌクレオチド合成及び修飾、核酸ハイブリダイゼーション、及び当業者の範囲内の関連分野における従来技術を使用する。これらの技術は、例えば、本明細書で引用された参考文献に記載されており、文献で完全に説明されている。例えば、Sambrook J et

al., (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren B et al., (ed.) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。

【0247】

本明細書で提供されるバイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、2つの異なるモノクローナル抗体を化学的に連結することによって、または2つのハイブリドーマ細胞株を融合してハイブリッドハイブリドーマを生成することによって調製することができる。

【0248】

特定の実施形態では、記載されたバイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、例えばDNA配列の合成、遺伝子操作を介した創出を含む任意の手段により調製、発現、創出、または単離される。特定の実施形態では、そのようなバイパトリック抗体またはその抗原結合断片は、インビボで動物または哺乳動物（例えば、ヒト）の抗体生殖系列レパートリー内に天然に存在しない配列（例えば、DNA配列、またはアミノ酸配列）を含む。

【0249】

二重特異性、二価抗体またはその抗原結合断片を作製する方法は、例えば、米国特許第5,731,168号、同第5,807,706号、同第5,821,333号、ならびに米国特許出願公開第2003/020734号、及び同第2002/0155537号に記載され、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。二重特異性4価抗体、及びそれらを作製する方法は、例えば、国際出願公開番号WO02/096948及び同WO00/44788に記載され、両方の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一般に、国際出願公開番号WO93/17715、WO92/08802、WO91/00360、及びWO92/05793; Tuttle et al., J. Immunol. 147: 60-69 (1991); 米国特許第4,474,893号; 同第4,714,681号; 同第4,925,648号; 同第5,573,920号; 及び5,601,819; 及びKostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992)を参照されたい（これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0250】

二重特異性抗体を生成するための1つの方法は、「ノブイントゥホール」戦略と呼ばれている（例えば、国際公開WO2006/028936を参照されたい）。この技術では、IgGのCH3ドメインの界面を形成する選択されたアミノ酸を変異させることにより、Ig重鎖の誤対形成が減少する。2本の重鎖が直接相互作用するCH3ドメイン内の位置で、小さい側鎖（ホール）を有するアミノ酸が一方の重鎖の配列に導入され、大きい側鎖（ノブ）を有するアミノ酸がもう一方の重鎖上の対応物である相互作用する残基の位置に導入される。いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、2つのポリペプチド間の界面で相互作用する選択されたアミノ酸を変異させることによって二重特異性抗体を優先的に形成するように、CH3ドメインが改変された免疫グロブリン鎖を有する。二重特異性抗体は、同じサブクラス（例えば、IgG1もしくはIgG3）または異なるサブクラス（例えば、IgG1及びIgG3、もしくはIgG3及びIgG4）の免疫グロブリン鎖

10

20

30

40

50

から構成することができる。

【0251】

一実施形態では、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片は、「ノブ鎖」におけるT366W変異及び「ホール鎖」におけるT366S、L368A、Y407V変異、及び任意選択によるCH3ドメイン間の追加の鎖間ジスルフィド架橋を含む。これらは、例えば、「ノブ鎖」にY349C変異、及び「ホール鎖」にE356C変異またはS354C変異；「ノブ鎖」にR409D、K370E変異、及び「ホール鎖」にD399K、E357K変異；「ノブ鎖」にT366W変異、及び「ホール鎖」にT366S、L368A、Y407V変異；「ノブ鎖」にR409D、K370E変異、及び「ホール鎖」にD399K、E357K変異；鎖の一方にY349C、T366W変異、対応する鎖にE356C、T366S、L368A、Y407V変異；鎖の一方にY349C、T366W変異、対応する鎖にS354C、T366S、L368A、Y407V変異を導入することによる（EUのナンバリングシステムに従ったナンバリング）。

10

【0252】

本明細書に記載の二重特異性抗体は、例えば、国際公開番号WO2011/131746、WO2011/147986、WO2008/119353、及びWO2013/060867、ならびにLabrijn A F et al., (2013) PNAS 110(13):5145-5150に記載されているように、DuoBodyテクノロジープラットフォーム（Genmab A/S）に従って生成することもできる。DuoBody技術は、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む第1のFR結合ドメインの一方の半分を、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む第2のFR結合ドメインの一方の半分と組み合わせるために使用することができる。得られたヘテロダイマーは、第2のFR結合ドメイン由来の1つの重鎖及び1つの軽鎖と対形成した、第1のFR結合ドメイン由来の1つの重鎖及び1つの軽鎖を含む。

20

【0253】

バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片は、場合によっては、IgG4とIgG1、IgG4とIgG2、IgG4とIgG2、IgG4とIgG3、またはIgG1とIgG3の鎖のヘテロダイマーを含む。そのようなヘテロ二量体重鎖抗体は、例えば、ヘテロ二量体重鎖形成を促進するように、ヒトIgG4及びIgG1またはIgG3のCH3ドメインの界面を形成する選択されたアミノ酸を改変することによって日常的に操作することができる。

30

【0254】

特定の実施形態では、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片は、キメラFR結合ドメインまたはヒト化FR結合ドメインを含むことができる。特定の実施形態では、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片は、F(ab')₂断片であり得る。F(ab')₂断片には、ヒンジ領域のジスルフィド結合によって連結された四量体抗体分子の2つの抗原結合アームが含まれている。

【0255】

本明細書に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片は、当業者に知られている任意の技術によって生成することができる。例えば、本明細書に記載のF(ab')₂断片は、ペプシンなどの酵素を使用して、免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって生成することができる。

40

【0256】

特定の態様において、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の1つ以上の細胞を培養することを含む、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片を作製する方法である。特定の態様において、本明細書で提供されるのは、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片を作製する方法であって、本明細書に記載の細胞または宿主細胞（例えば、本明細書に記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む細胞または宿主細胞）を使用して、抗体または抗原結合断片を発現させる（例えば、組換え発現）ことを含む、方法である。特定の実施形態では、細胞は単離された細胞である。特定の実施形態では、外因性

50

ポリヌクレオチドが細胞に導入されている。特定の実施形態では、方法は、細胞または宿主細胞から得られた抗体または抗原結合断片を精製するステップをさらに含む。

【0257】

FR 抗原結合ドメインは、ハイブリドーマの使用、組換え、及びファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせを含む、当該技術分野で公知の多種多様な技術を用いて、例えば、モノクローナル抗体から調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当該技術分野で知られており、例えば、Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammeling GJ et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)において教示されているものを含むハイブリドーマ技術を使用して產生することができる。本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術によって產生される抗体に限定されない。例えば、モノクローナル抗体は、本明細書に記載の抗体を外因的に発現する宿主細胞から組換え的に產生することができる。本明細書に記載のモノクローナル抗体は、例えば、Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495に記載されているハイブリドーマ法によって作製することができるか、または、例えば、本明細書に記載の技術を使用して、例えばファージライブラリーから単離することができる。クローン細胞株及びそれによって発現されるモノクローナル抗体の調製のための他の方法は、当該技術分野において周知である（例えば、Short *Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., 前出の11章を参照されたい）。

【0258】

さらに、本明細書に記載のFR 結合ドメインはまた、当該技術分野で既知のさまざまなファージディスプレイ法を用いても生成することができる。ファージディスプレイ法では、タンパク質は、それらをコードするポリヌクレオチド配列を担持するファージ粒子の表面で提示される。特に、VH及びVLドメインをコードするDNA配列は、動物のcDNAライブラリー（例えば、罹患組織のヒトまたはマウスのcDNAライブラリー）から増幅される。VH及びVLドメインをコードするDNAは、PCRによってscFvリンカーと一緒に組み換えられ、ファージミドベクターにクローニングされる。ベクターをE. coliにエレクトロポレーションし、E. coliにヘルパーファージを感染させる。これらの方法で使用するファージは、典型的には、fd及びM13を含む繊維状ファージであり、VH及びVLドメインは通常、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIのいずれかに組換えにより融合される。特定の抗原に結合する抗体または断片を発現するファージは、例えば、標識した抗原、または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を用いて、抗原によって選択または特定され得る。本明細書に記載の抗体を作製するために使用することができるファージディスプレイ法の例としては、Brinkman U et al., (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS et al., (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA et al., (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L et al., (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; PCT出願番号PCT/GB91/001134; 国際公開番号WO90/02809、WO91/10737、WO92/01047、WO92/18619、WO93/11236、WO95/15982、WO95/20401、及びWO97/13844; ならびに米国特許第5,698,426号、同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,580,717号、同第5,427,908号、同第5,750,753号、同第5,821,047号、同第5,571,698号、同第5,427,908号、同第5,516

、637号、同第5、780、225号、同第5、658、727号、同第5、733、743号、及び同第5、969、108号に開示されるものが挙げられる。

【0259】

上述の参考文献に記載されているように、ファージ選択後、ファージからの抗体コード領域を単離し、ヒトFR 結合ドメインを含むFR 結合ドメインを生成し、例えば、以下に記載されているように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌を含む任意の望ましい宿主で発現させることができる。例えば、Fab、Fab'、及びF(ab')₂断片などのFR 結合ドメインを組換え的に生成する技術は、PCT公開WO92/22324、Mullinax RL et al., (1992) BioTechniques 12(6):864-9; Sawai H et al., (1995) Am J Reprod Immunol 34:26-34; 及びBetter M et al., (1988) Science 240:1041-1043に開示されているものなどの当該技術分野で既知の方法を使用して採用することができる。

【0260】

一態様では、FR 結合ドメインまたは抗体を産生するために、VHまたはVLヌクレオチド配列、制限部位、及び制限部位を保護するための隣接配列を含むPCRプライマーを使用して、鋳型、例えば、scFvクローンからVH及びVL配列を増幅することができる。当業者に公知のクローニング技術を利用して、PCR増幅VHドメインをVH定常領域を発現するベクターにクローニングし、PCR増幅VLドメインをVL定常領域、例えば、ヒトカッパまたはラムダ定常領域を発現するベクターにクローニングすることができる。VH及びVLドメインは、必要な定常領域を発現する1つのベクターにクローニングすることもできる。重鎖変換ベクター及び軽鎖変換ベクターは、その後、当業者に公知の技術を使用して抗体、例えば、IgGを発現する安定なまたは一過性細胞株を生成する細胞株に共トランスフェクトされる。

【0261】

IV. バイパルトピック抗体をコードするポリヌクレオチド

特定の実施形態では、本開示はバイパルトピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片、またはそのような抗体または断片のドメイン、例えば、VH、VL、VLとVH（例えば、scFvにおいて）、重鎖、軽鎖、scFvを伴う重鎖、scFvを伴う軽鎖、定常領域、またはscFvを伴う定常領域をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを包含する。

【0262】

したがって、本明細書で提供されるのは、配列番号17~40をコードするポリヌクレオチドである。本明細書でまた提供されるのは、任意のバイパルトピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドの組み合わせを含む組成物（例えば、配列番号17をコードするポリヌクレオチドと配列番号22をコードするポリヌクレオチドを含む組成物、配列番号18をコードするポリヌクレオチドと配列番号23をコードするポリヌクレオチドを含む組成物、配列番号19をコードするポリヌクレオチドと配列番号24をコードするポリヌクレオチドを含む組成物、配列番号20をコードするポリヌクレオチドと配列番号25をコードするポリヌクレオチドを含む組成物、配列番号21をコードするポリヌクレオチドと配列番号26をコードするポリヌクレオチドを含む組成物、配列番号33をコードするポリヌクレオチドと配列番号34をコードするポリヌクレオチドを含む組成物、配列番号35をコードするポリヌクレオチドと配列番号36をコードするポリヌクレオチドを含む組成物、配列番号37をコードするポリヌクレオチドと配列番号38をコードするポリヌクレオチドを含む組成物、配列番号39をコードするポリヌクレオチドと配列番号40をコードするポリヌクレオチドを含む組成物、配列番号41をコードするポリヌクレオチドと配列番号42をコードするポリヌクレオチドと配列番号43をコードするポリヌクレオチドを含む組成物、または、配列番号44をコードするポリヌクレオチドと配列番号45をコードするポリヌクレオチドと配列番号46をコードするポリヌクレオチドを含む組成物）である。本明細書でまた提供されるのは、任意のバイパ

ラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドの組み合わせを含む組成物（例えば、配列番号20をコードするポリヌクレオチドと配列番号57をコードするポリヌクレオチドを含む組成物）である。

【0263】

特定の実施形態では、パイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、ブダペスト条約の条項の下でAmerican Type Culture Collection (ATCC) (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110に所在)に寄託された、ATCC寄託番号PTA-10774 (2010年4月7日に寄託)、PTA-125915 (「Mov19-Fc-ホール」、2019年4月29日にATCCに寄託され、2019年4月30日にATCCに受領された)、及びPTA-125916 (「FR57scFv2-Fc-ノブ」; 2019年4月29日にATCCに寄託され、2019年4月30日にATCCに受領された)を有するプラスミドによってコードされる。

10

【0264】

本発明のポリヌクレオチドは、RNAの形態またはDNAの形態であり得る。DNAには、cDNA、ゲノムDNA、及び合成DNAが含まれ、二本鎖、または一本鎖がコード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であり得る場合一本鎖であり得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の内因性イントロンを欠くcDNAまたはDNAである。

【0265】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、天然に存在しないポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは組換え的に産生される。

20

【0266】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは単離される。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは実質的に純粋である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、天然成分から精製される。

【0267】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるポリヌクレオチドは、特定の宿主での発現のためにコドン最適化されている（ヒトmRNAのコドンを、E. coliなどの細菌宿主によって好ましいコドンに変更する）。

30

【0268】

V. 細胞及びベクター

本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクター及び細胞も提供される。

【0269】

特定の態様において、本明細書で提供されるのは、F R に特異的に結合する、本明細書に記載の抗体、その抗原結合断片を（例えば、組換え的に）発現し、関連するポリヌクレオチド及び発現ベクターを含む細胞（例えば、宿主細胞）である。本明細書で提供されるのは、宿主細胞、好ましくは哺乳動物細胞での組換え発現のためのそのような抗F R 抗体またはその断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含むベクター（例えば発現ベクター）である。また、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の抗F R 抗体またはその抗原結合断片を組換え発現するためのベクターを含む宿主細胞である。特定の態様において、本明細書で提供されるのは、宿主細胞においてそのような抗体またはその抗原結合断片を発現することを含む、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片を産生するための方法である。

40

【0270】

本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片の組換え発現は、抗体またはその断片（例えば、重鎖または軽鎖）、重鎖または軽鎖を含む融合タンパク質（例えば、1つ以上の可変ドメインに融合した重鎖または軽鎖（例えば、scFv）、可変ドメイン、VH及びVLを含むポリペプチド（例えば、scFv）、定常ドメイン、及びまたは定常ドメインを含む融合タンパク質（例えば、1つ以上の可変ドメインに融合された定常ドメイン（

50

例えば、S c F v)) をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築を含む。本明細書に記載の抗体またはその断片をコードするポリヌクレオチドが得られたら、抗体またはその断片の生成のためのベクターは、当該技術分野で周知の技術を用いて組換えDNA技術によって生成することができる。このように、抗体またはその断片をコードするヌクレオチド配列であるポリヌクレオチドを発現することによるタンパク質の調製方法が本明細書に記載される。当業者に周知の方法を使用して、抗体またはその断片のコード配列及び適切な転写及び翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、及びインビボ遺伝子組換えが含まれる。プロモーターに作動可能に連結された、抗体またはその断片をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターも提供される。そのようなベクターは、例えば、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むことができ（例えば、国際公開番号WO 86 / 05807、及びWO 89 / 01036；ならびに米国特許第5,122,464号）、抗体の可変ドメインは、重鎖全体、軽鎖全体、または重鎖と軽鎖の両方の全体の発現のためにそのようなベクターにクローニングすることができる。付加的な可変ドメインまたはFR 結合ドメイン（例えば、s c F v）をコードするヌクレオチド配列はまた、FR 結合ドメインまたはその断片（例えば、V HまたはV L）に融合した重鎖または軽鎖を含む融合タンパク質の発現のためのそのようなベクターにクローニングすることができる。

10

【0271】

発現ベクターは、従来の技術によって細胞（例えば、宿主細胞）に導入することができ、次に、得られた細胞を従来の技術によって培養して、本明細書に記載の抗体または断片（例えば、重鎖または軽鎖）、重鎖または軽鎖を含む融合タンパク質（例えば、1つ以上の可変ドメインに融合した重鎖または軽鎖（例えば、s c F v））、可変ドメイン、V H及びV Lを含むポリペプチド（例えば、s c F v）、定常ドメイン、及びまたは定常ドメインを含む融合タンパク質（例えば、1つ以上の可変ドメインに融合された定常ドメイン（例えば、S c F v））を生成することができる。したがって、本明細書で提供されるのは、宿主細胞におけるそのような配列の発現のためのプロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載の抗体またはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞である。

20

【0272】

特定の実施形態では、多鎖抗体の発現のために、全ての鎖を個別にコードするベクターを、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞で共発現させることができる。

30

【0273】

特定の実施形態では、宿主細胞は、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片の全ての鎖をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む。特定の実施形態では、宿主細胞は、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片の全ての鎖をコードする複数の異なるベクターを含む。

【0274】

ベクターまたはベクターの組み合わせは、相互作用して本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片を形成する2つのポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドを含むことができる：例えば、重鎖及びs c F vを含む融合タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドと、軽鎖をコードする第2のポリヌクレオチド；軽鎖を含む融合タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド及びs c F vと、重鎖をコードする第2のポリヌクレオチド；重鎖及びV Hを含む融合タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチドと、軽鎖及びV Lを含む融合タンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドなど。2つのポリペプチドが2つの別個のベクター中のポリヌクレオチドによってコードされる場合、ベクターは、重鎖を含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを3：軽鎖を含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを1の比率で宿主細胞にトランスフェクトされる。

40

【0275】

50

ベクターまたはベクターの組み合わせは、相互作用して本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片を形成する3つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むことができる：例えば、重鎖をコードする第1のポリヌクレオチド、軽鎖をコードする第2のポリヌクレオチド、ならびに重鎖定常ドメイン、VH、及びVLを含む融合タンパク質をコードする第3のポリヌクレオチド（任意選択で、VH及びVLはscFvである）。3つのポリペプチドが3つの別個のベクター中のポリヌクレオチドによってコードされる場合、ベクターは、重鎖をコードするポリヌクレオチドを6：軽鎖をコードするポリヌクレオチドを3：融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを1の比率で宿主細胞にトランスフェクトすることができる。

【0276】

ベクターまたはベクターの組み合わせは、相互作用して本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片を形成する4つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むことができる：例えば、第1の重鎖をコードする第1のポリヌクレオチド、第2の重鎖をコードする第2のポリヌクレオチド、第1の軽鎖をコードする第3のポリヌクレオチド、及び第2の軽鎖をコードする第4のポリヌクレオチド。

【0277】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、上述のベクターまたはベクターの組み合わせを含む。他の実施形態では、2つの宿主細胞、3つの宿主細胞、または4つの宿主細胞が、上述のベクターまたはベクターの組み合わせを含む。

【0278】

さまざまな宿主発現ベクターシステムを利用して、本明細書に記載の抗体分子またはその断片（例えば、重鎖または軽鎖）、重鎖または軽鎖を含む融合タンパク質（例えば、1つ以上の可変ドメインに融合した重鎖または軽鎖（例えば、scFv）、可変ドメイン、VH及びVLを含むポリペプチド（例えば、scFv）、定常ドメイン、及びまたは定常ドメインを含む融合タンパク質（例えば、1つ以上の可変ドメインに融合された定常ドメイン（例えば、ScFv））を発現させることができる。そのような宿主発現系は、目的のコード配列を産生し、その後精製することができる媒体を表すが、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトすると、本明細書に記載の抗体またはその断片をインサイチュで発現できる細胞も表す。これらには、抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、E. coli及びB. subtilis）などの微生物；抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、Saccharomyces Pichia）；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）に感染したか、または抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞系（例えば、Chlamydomonas reinhardtiiなどの緑藻）；あるいは哺乳類細胞のゲノム（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳類ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を担持する哺乳類細胞システム（例えば、COS（例えば、COS1またはCOS）、CHO、BHK、MDCK、HEK293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa、及びNIH3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、及びBMT10細胞）が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片を発現するための細胞は、CHO細胞、例えば、CHO GS System（商標）（Lonza）からのCHO細胞である。特定の実施形態では、FR（例えば、ヒトFR）に免疫特異的に結合する抗体をコードするヌクレオチド配列の発現は、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または組織特異的プロモーターによって調節される。

10

20

30

40

50

【 0 2 7 9 】

本明細書に記載の抗体分子またはその断片（例えば、重鎖または軽鎖、可変ドメイン、及びノまたはVH及びVLを含むポリペプチド（例えば、scFv））は、組換え発現によって生成されており、免疫グロブリン分子の精製のための当該技術分野で知られている任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー、特にプロテインA後の特定の抗原に対するアフィニティー、及びサイジングカラムクロマトグラフィーによる）、遠心分離、異なる溶解度、またはタンパク質の精製のための他の標準的な技術によって精製することができる。さらに、本明細書に記載の抗体は、精製を促進するために、本明細書に記載の、または当該技術分野で既知の異種ポリペプチド配列に融合することができる。

10

【 0 2 8 0 】

VI．バイパルトピック抗体を含むイムノコンジュゲート

一態様において、本開示は、本明細書に記載のバイパルトピックFR 結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合断片）と、細胞傷害性薬剤とを含むイムノコンジュゲートに関する。細胞傷害性薬剤は、「イムノコンジュゲート」、「コンジュゲート」、または「ADC」を生成するために、当該技術分野で公知の技術を用いて、直接的に、またはリンカーを介して間接的に、FR 結合剤に結合またはコンジュゲートさせることができる。

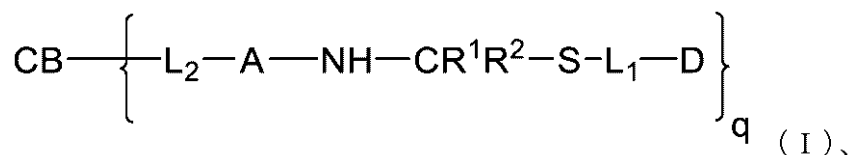
【 0 2 8 1 】

A．例示的なイムノコンジュゲート

第1の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、バイパルトピックFR 抗体またはその抗原結合断片上に位置する1つ以上のリジン残基のアミノ基を介して本明細書に記載のマイタンシノイド化合物に共有結合された本明細書に記載のバイパルトピックFR 抗体またはその抗原結合断片を含む。一実施形態では、イムノコンジュゲートは式（I）：

20

【 化 2 7 】



30

またはその薬学的に許容される塩で表され、式中、

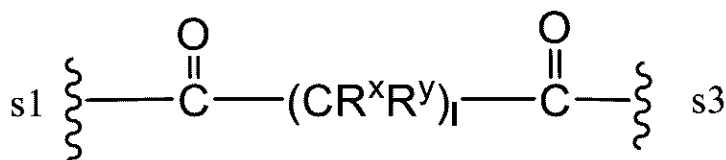
CBは、バイパルトピック抗FR 抗体またはその抗原結合断片であり；

L₂は、以下の式のうちの1つによって表され：

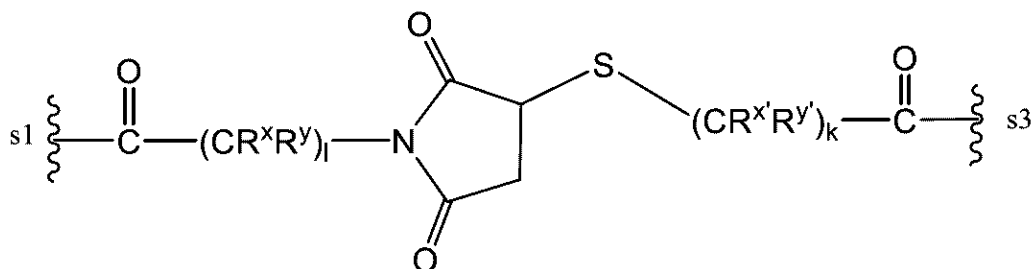
40

50

【化 2 8】

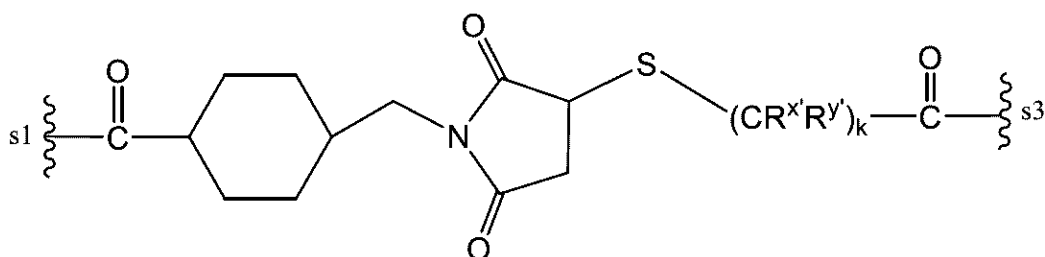


(L 2 a)、



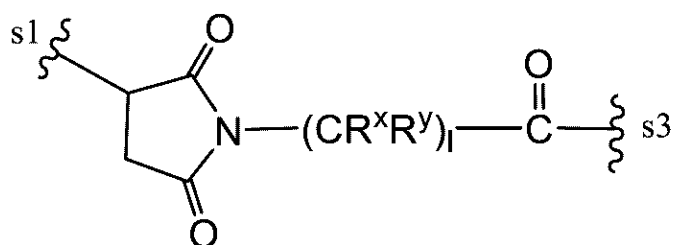
10

(L 2 b)、



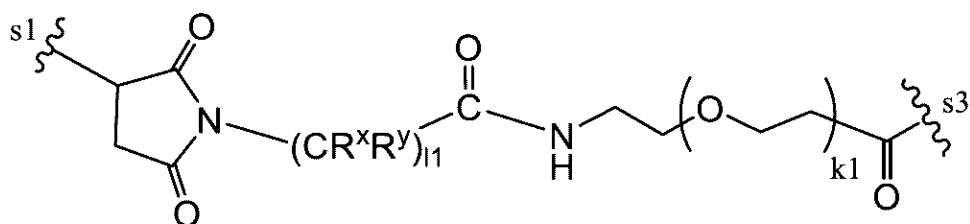
20

(L 2 c)、



(L 2 d)、または

30



(L 2 e) ;

式中、

R^x 、 R^y 、 $R^{x'}$ 、及び $R^{y'}$ は、それぞれの存在について、独立してH、-OH、ハロゲン、-O-(C₁₋₄アルキル)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺、または任意選択で-OH、ハロゲン、SO₃H、もしくはNR₄₀R₄₁R₄₂⁺によって置換されたC₁₋₄アルキルであり、ここで、R₄₀、R₄₁、及びR₄₂は、それぞれ独立してHまたはC₁₋₄アルキルであり；

40

l及びkは、それぞれ独立して、1～10の整数であり；

l₁は、2～5の整数であり；

k₁は、1～5の整数であり；

s₁は細胞結合剤CBに接続された部位を示し、s₃はA基に接続された部位を示し；

Aは、アミノ酸残基または2～20個のアミノ酸残基を含むペプチドであり；

R¹及びR²は、それぞれ独立して、HまたはC₁₋₃アルキルであり；

L₁は、以下の式によって表され；

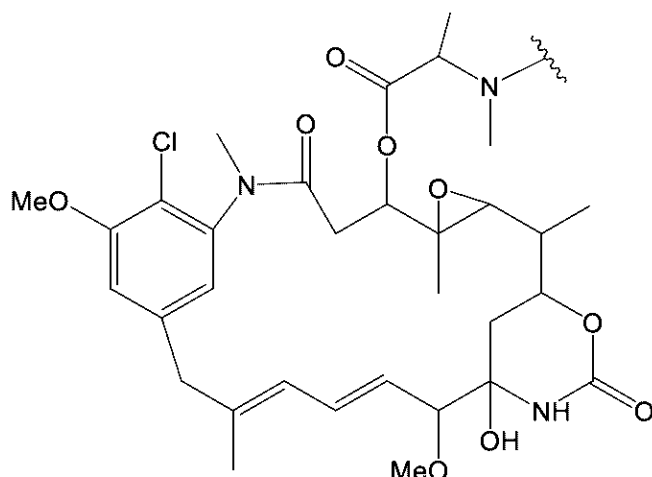
50

- C R³ R⁴ - (C H₂)_{1 - 8} - C (= O) -

式中、R³ 及び R⁴ は、それぞれ独立して H または M e であり、L₁ の - C (= O) - 部分は、D に接続されており；

D は以下の式で表され：

【化 2 9】



；

q は、1 ~ 20 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、1 ~ 10 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、2 ~ 5 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、3 ~ 4 の整数である。

【0282】

第1の実施形態の第1の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、上述の式(I)で表され、式中、R^x、R^y、R^{x'}、及びR^{y'}は全てHであり；l及びkはそれぞれ独立して、2 ~ 6 の整数であり；残りの変数は、式(I)について上述したとおりである。

【0283】

第1実施形態の第2の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、上述の式(I)で表され、式中、Aは、2 ~ 5 個のアミノ酸残基を含むペプチドであり；残りの変数は、第1の実施形態または第1の特定の実施形態で式(I)について上述したとおりである。いくつかの実施形態では、Aは、プロテアーゼによって切断可能なペプチドである。いくつかの実施形態では、腫瘍組織において発現するプロテアーゼによって切断可能なペプチドである。いくつかの実施形態では、Aは、それぞれ独立してLまたはD異性体としてのAla、Arg、Asn、Asp、Cit、Cys、セリノ-Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、及びValからなる群から選択される、- NH - C R¹ R² - S - L₁ - Dに共有結合したアミノ酸を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、- NH - C R¹ R² - S - L₁ - Dに接続されたアミノ酸はLアミノ酸である。

【0284】

第1の実施形態の第3の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、上述の式(I)によって表され、式中、Aは、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Val - Ala、D - Val - Ala、Val - Cit、D - Val - Cit、Val - Lys、Phe - Lys、Lys - Lys、Ala - Lys、Phe - Cit、Leu - Cit、Ile - Cit、Phe - Ala、Phe - N9 - トシル - Arg、Phe - N9 - ニトロ - Arg、Phe - Phe - Lys、D - Phe - Phe - Lys、Gly - Phe - Lys、Leu - Ala - Leu、Ile - Ala - Leu、Val - Ala - Val、Ala - Ala - Ala、D - Ala - Ala - Ala、Ala - D - Ala - Ala、Ala - Ala - D - Ala、Ala - Leu - Ala - Leu (配

列番号54)、 - Ala - Leu - Ala - Leu (配列番号55)、 Gly - Phe - Leu - Gly (配列番号56)、 Val - Arg、 Arg - Arg、 Val - D - Cit、 Val - D - Lys、 Val - D - Arg、 D - Val - Cit、 D - Val - Lys、 D - Val - Arg、 D - Val - D - Cit、 D - Val - D - Lys、 D - Val - D - Arg、 D - Arg - D - Arg、 Ala - Ala、 Ala - D - Ala、 D - Ala - Ala、 D - Ala - D - Ala、 Ala - Met、 Gln - Val、 Asn - Ala、 Gln - Phe、 Gln - Ala、 D - Ala - Pro、 及び D - Ala - t Bu - Gly からなる群から選択され、それぞれのペプチドの最初のアミノ酸は L_2 基に接続され、それぞれのペプチドの最後のアミノ酸は $-NH-CR_1R_2-S-L_1-D$ に接続され、残りの変数は、第1の実施形態または第1の特定の実施形態で式(I)について上述したとおりである。

10

【0285】

第1実施形態の第4の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、上述の式(I)で表され、式中、 R^1 と R^2 は両方ともHであり；残りの変数は、第1の実施形態または第1、第2、もしくは第3の特定の実施形態で式(I)について上述したとおりである。

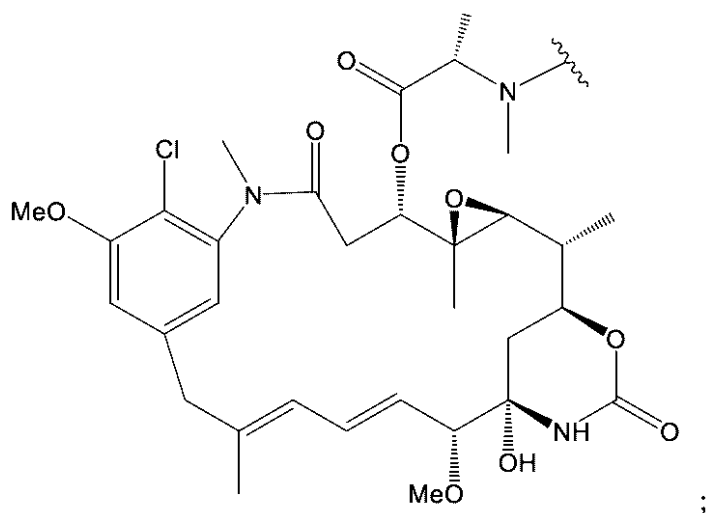
【0286】

第1実施形態の第5の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、上述の式(I)で表され、式中、 L_1 は $-(CH_2)_4-6-C(=O)-$ であり；残りの変数は、第1の実施形態または第1、第2、第3、もしくは第4の特定の実施形態で式(I)について上述したとおりである。

20

[01] 第1の実施形態の第6の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、上述の式(I)で表され、式中、Dは、以下の式で表され：

【化30】



30

残りの変数は第1の実施の形態または第1、第2、第3、第4、もしくは第5の特定の実施形態で式(I)について上述したとおりである。

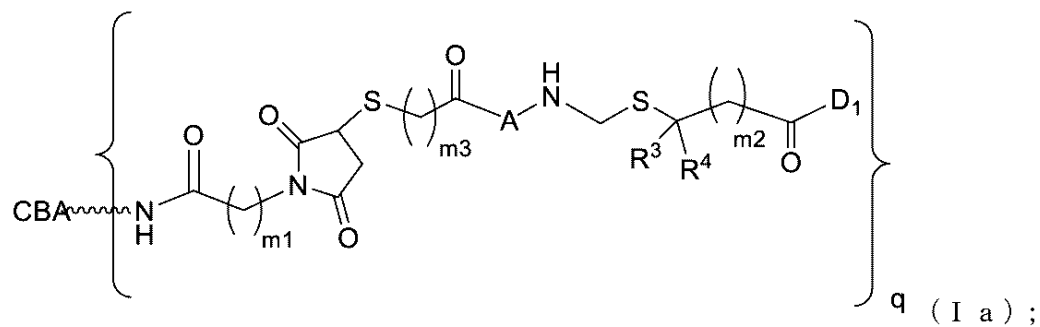
40

【0287】

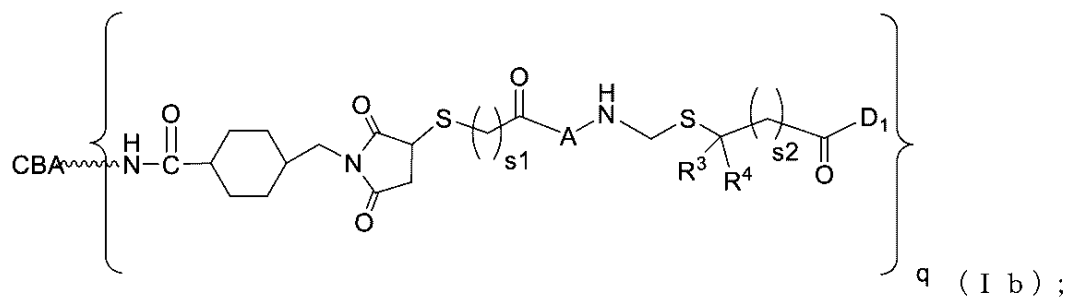
第7の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、以下の式：

50

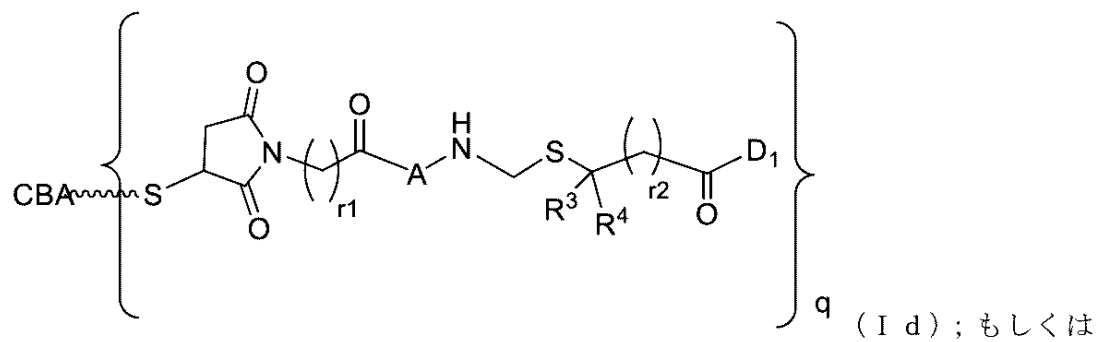
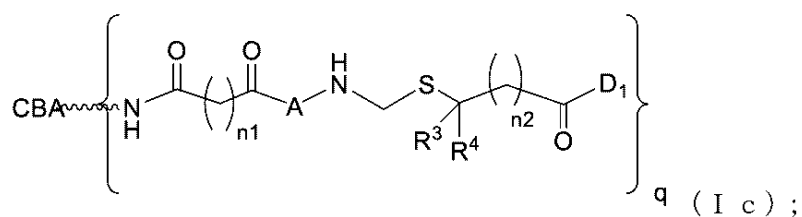
【化 3 1】



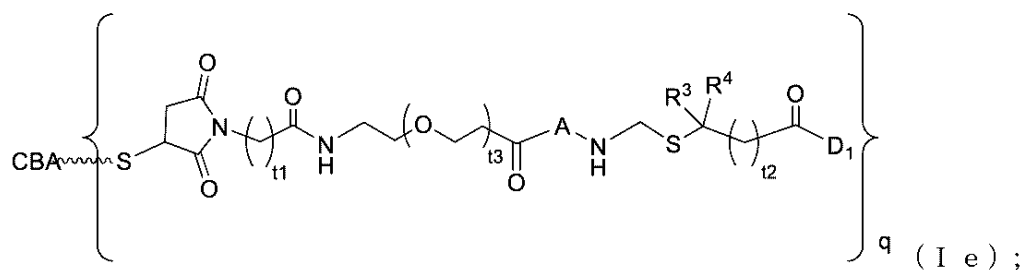
10



20



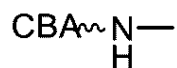
30



40

またはその薬学的に許容される塩で表され、式中、

【化 3 2】



は、Lysのアミン基を介してL₂基に接続される、バイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片であり；

【化 3 3】

CBA^mS—

は、C y s のチオール基を介して L₂ 基に接続される、バイパラトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片であり；

R³ 及び R⁴ は、それぞれ独立して H または M e であり；

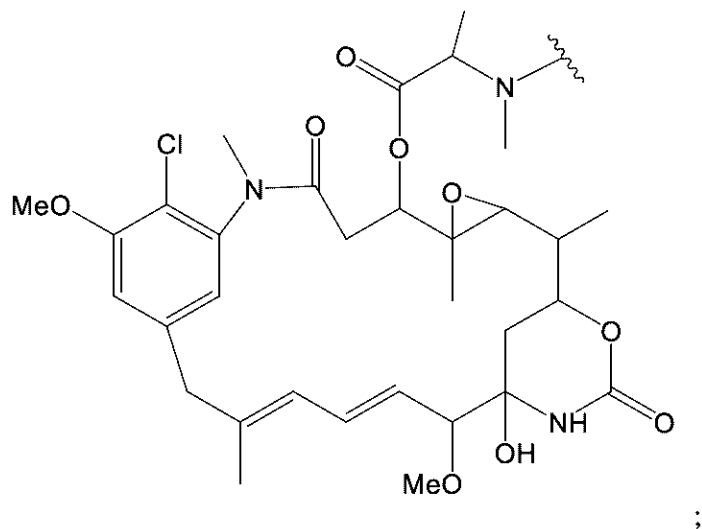
m 1、m 3、n 1、r 1、s 1、及び t 1 は、それぞれ独立して 1 ～ 6 の整数であり；

m 2、n 2、r 2、s 2、及び t 2 は、それぞれ独立して、1 ～ 7 の整数であり；

t 3 は、1 ～ 1 2 の整数であり；

D₁ は以下の式で表され；

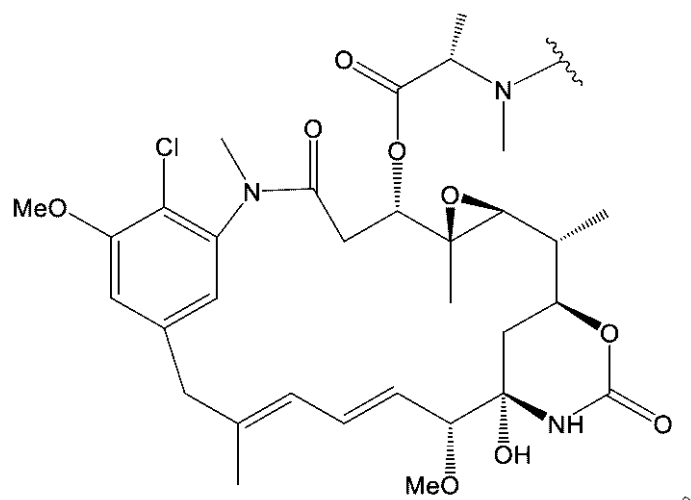
【化 3 4】



；

q は、1 ～ 2 0 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、1 ～ 1 0 の整数である。いくつかの実施形態では、q は 2 ～ 5 の整数である。いくつかの実施形態では、q は 3 ～ 4 の整数である。より具体的な実施形態では、D₁ は以下の式で表される；

【化 3 5】



。

【 0 2 8 8】

第 8 の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、以下の式で表され；

10

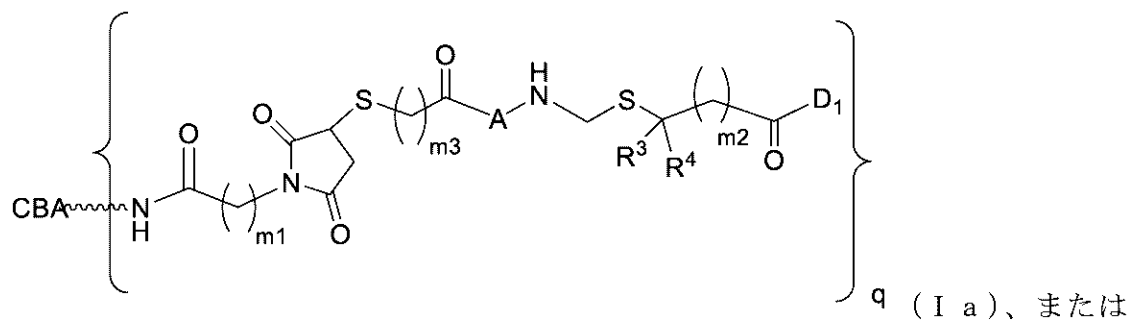
20

30

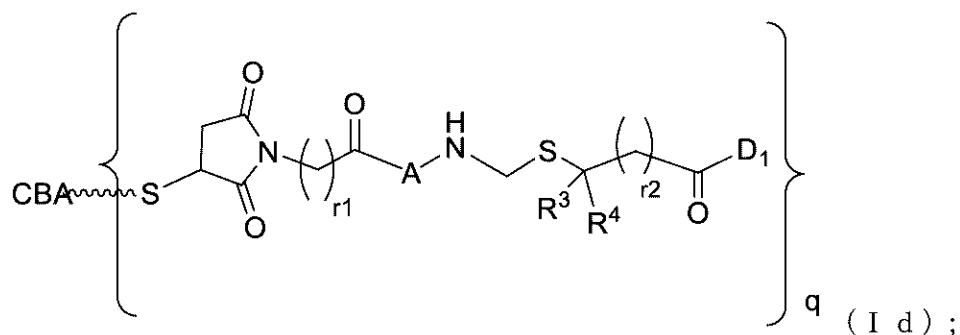
40

50

【化 3 6】



10



20

式中：

m 1 及び m 3 は、それぞれ独立して、2 ～ 4 の整数であり；

m 2 は、2 ～ 5 の整数であり；

r 1 は、2 ～ 6 の整数であり；

r 2 は、2 ～ 5 の整数であり；

残りの変数は、第 7 の特定の実施形態に記載されているとおりである。

【 0 2 8 9】

第 9 の特定の実施形態では、第 7 または第 8 の特定の実施形態で記載したイムノコンジュゲートについて、A は、Ala - Ala - Ala、Ala - D - Ala - Ala、Ala - Ala - Ala、D - Ala - Ala、Val - Ala、D - Val - Ala、D - Ala - Pro、または D - Ala - tBu - Gly である。より具体的な実施形態では、第 7 または第 8 の特定の実施形態で記載したイムノコンジュゲートについて、A は L - Ala - D - Ala - L - Ala である。

30

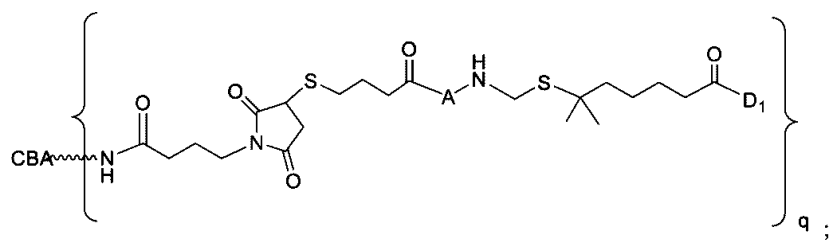
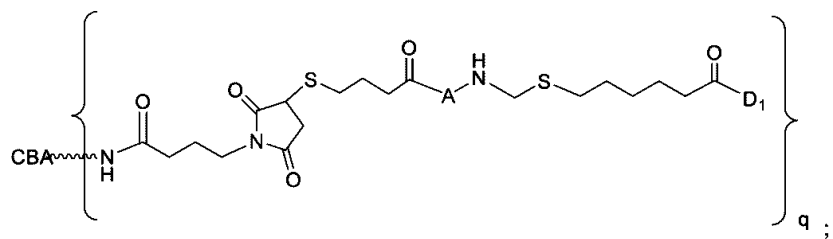
【 0 2 9 0】

第 10 の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、以下の式：

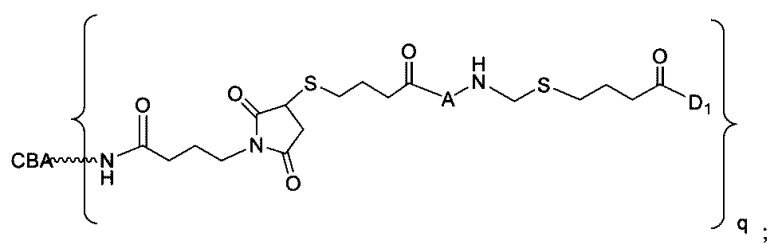
40

50

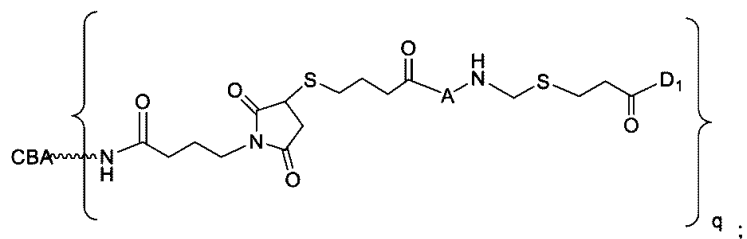
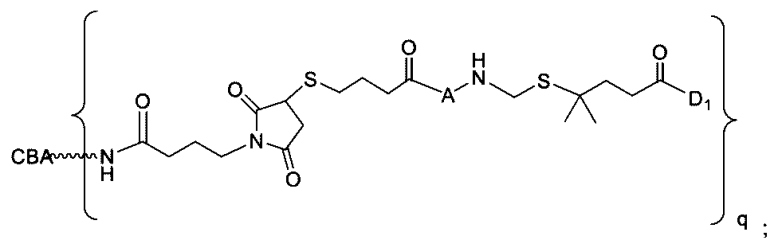
【化 3 7 - 1】



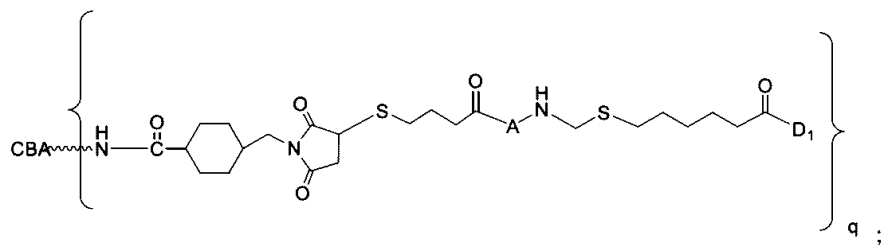
10



20



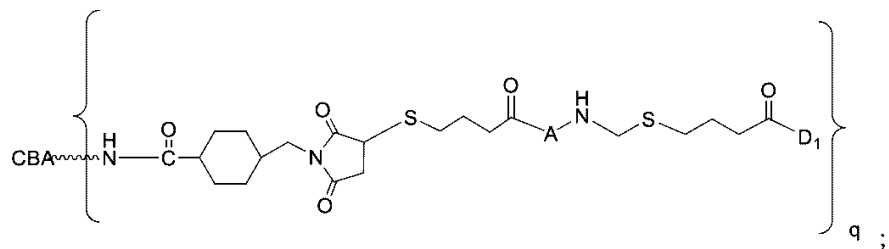
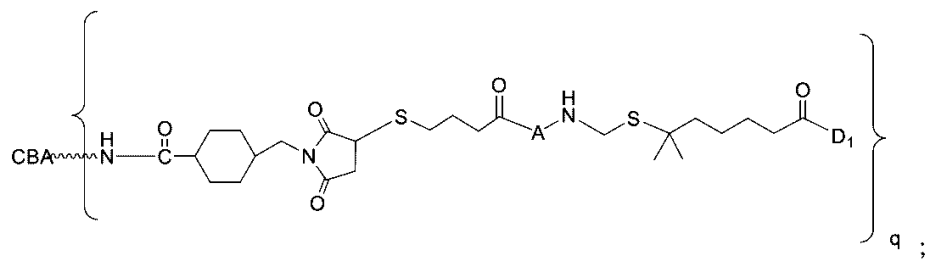
30



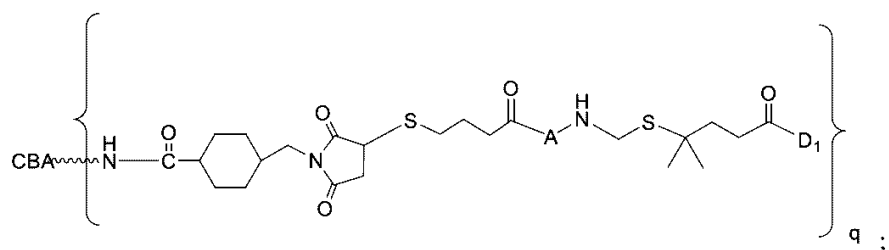
40

50

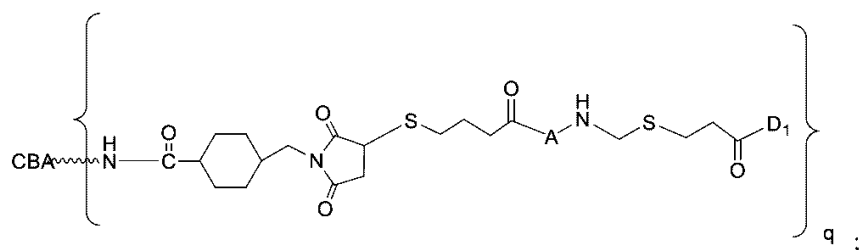
【化 3 7 - 2】



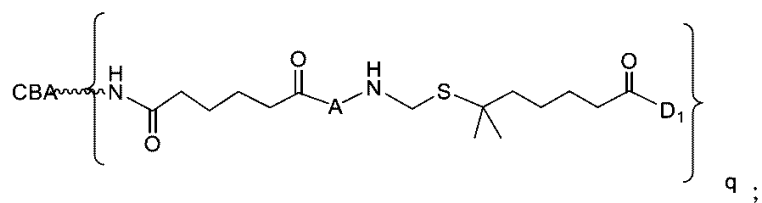
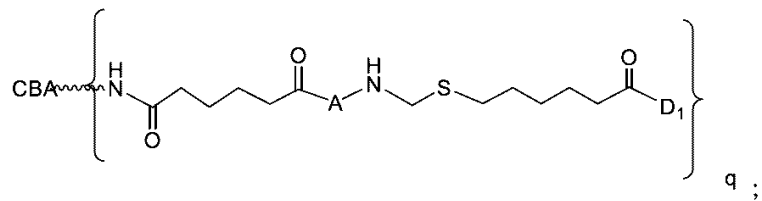
10



20



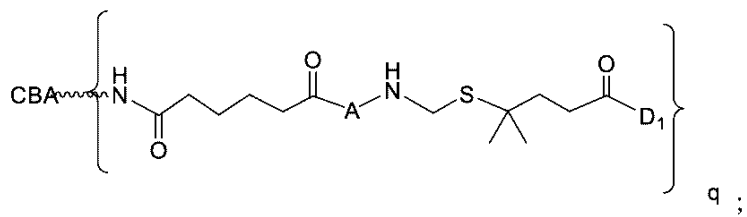
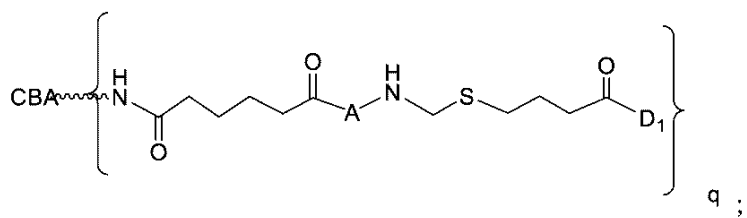
30



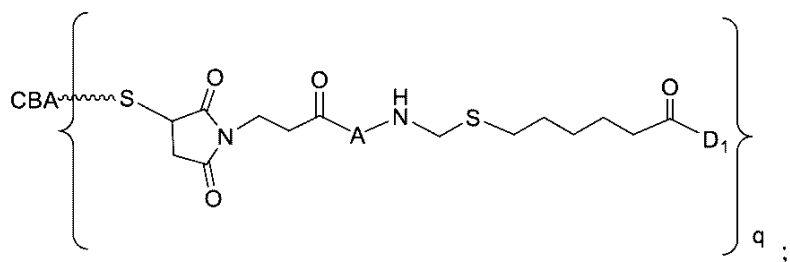
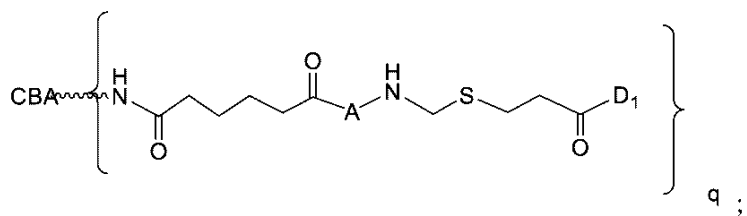
40

50

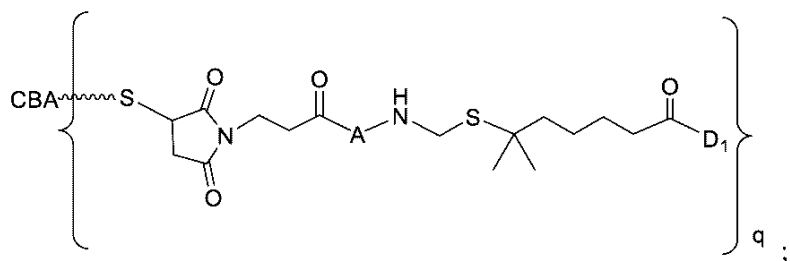
【化 3 7 - 3】



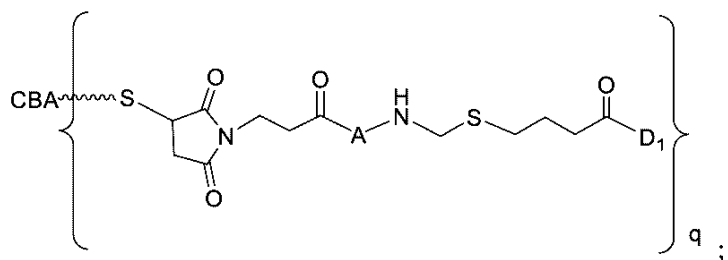
10



20



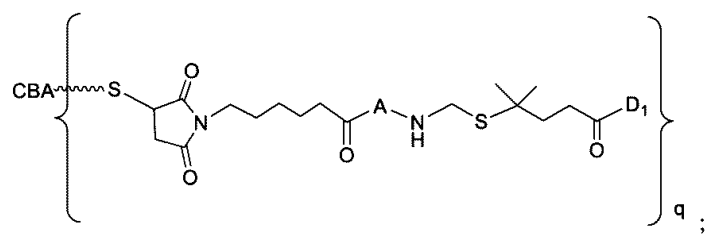
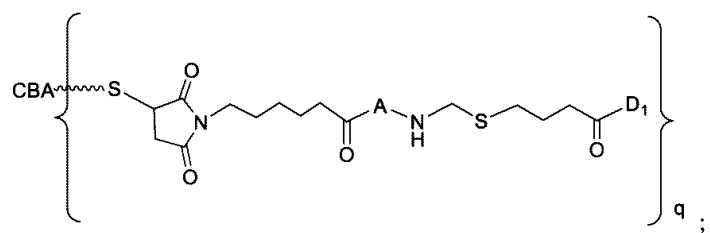
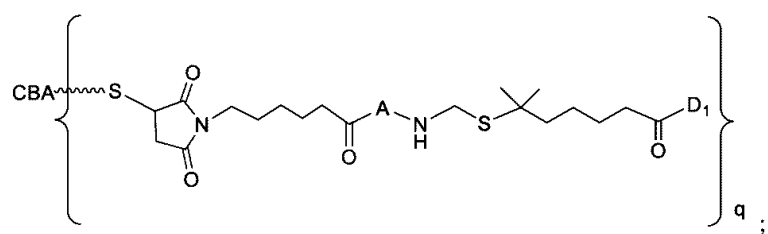
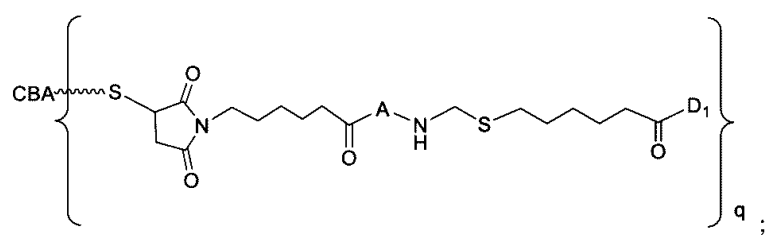
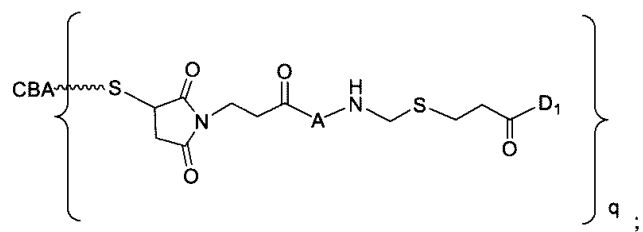
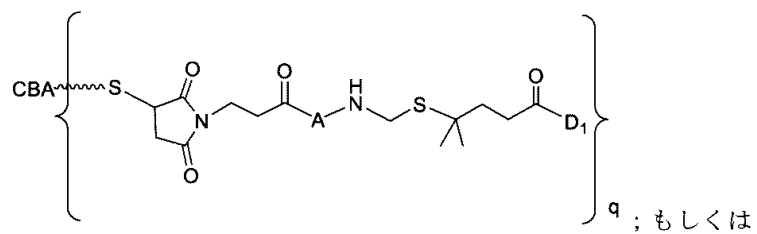
30



40

50

【化 3 7 - 4】



10

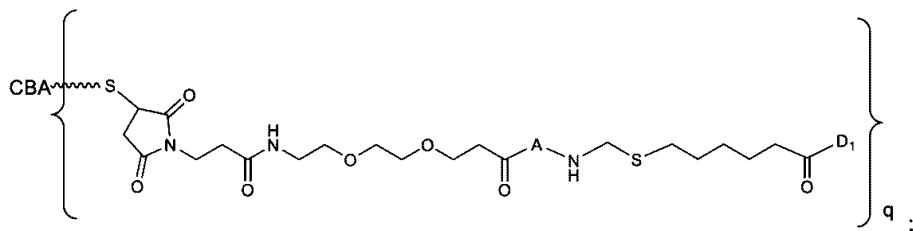
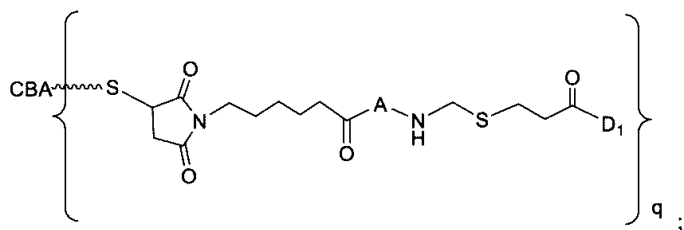
20

30

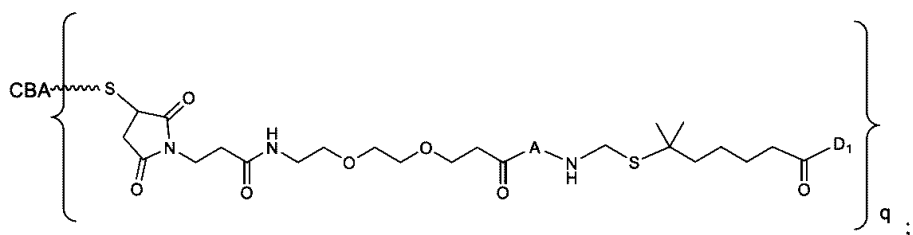
40

50

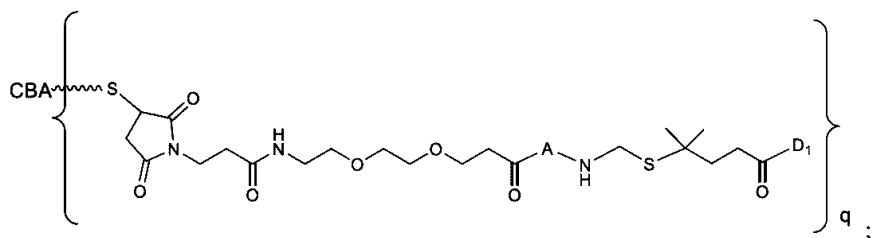
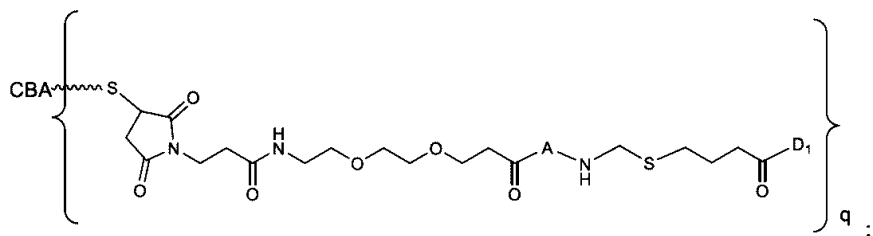
【化 3 7 - 5】



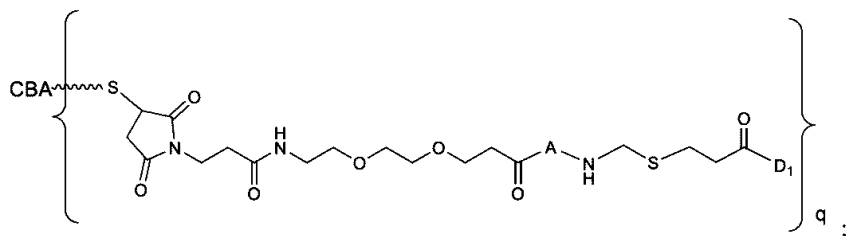
10



20



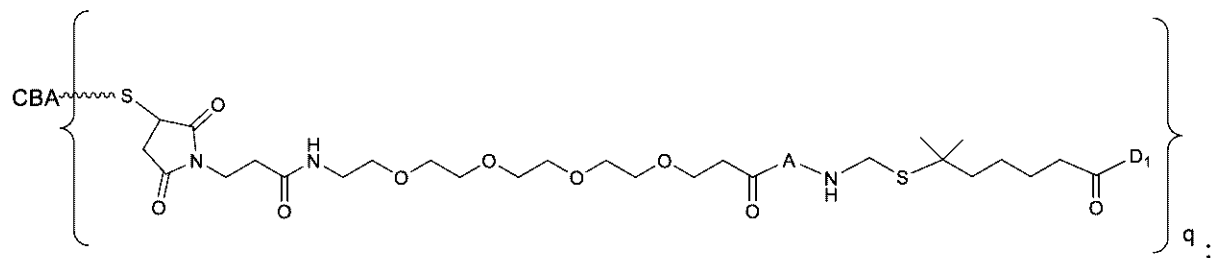
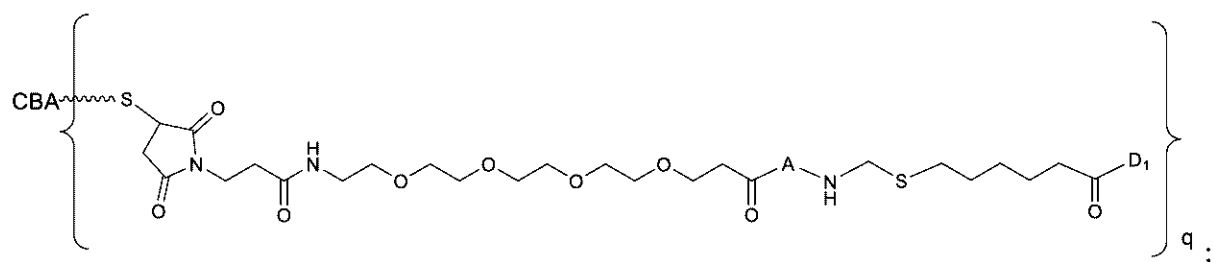
30



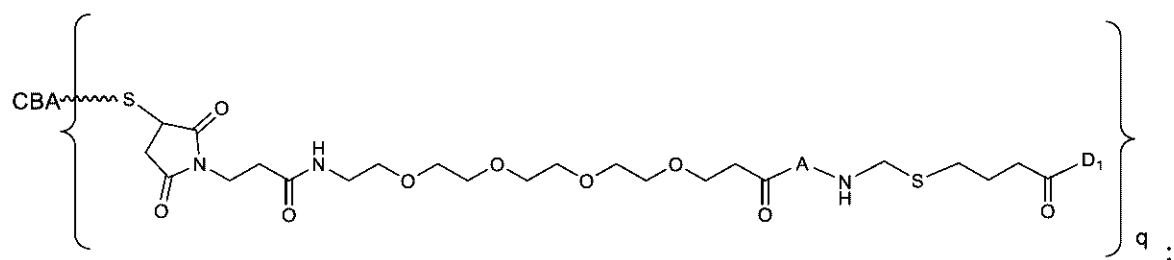
40

50

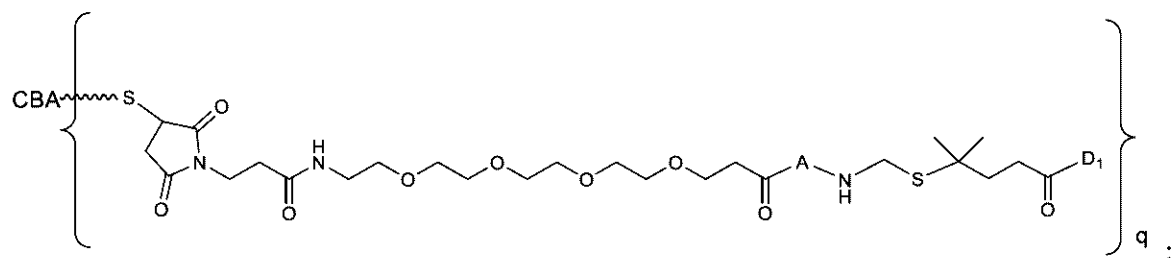
【化 3 7 - 6】



10

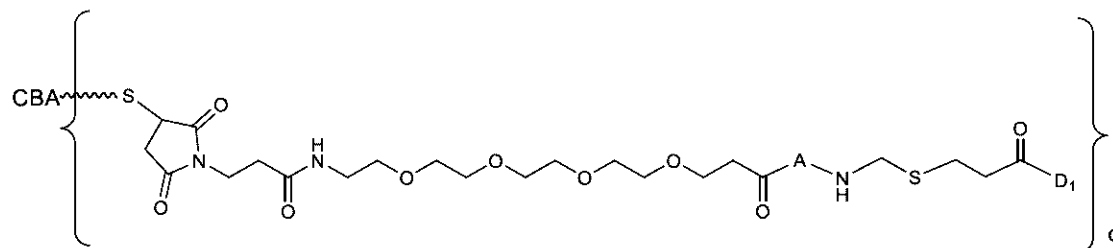


20



または

30



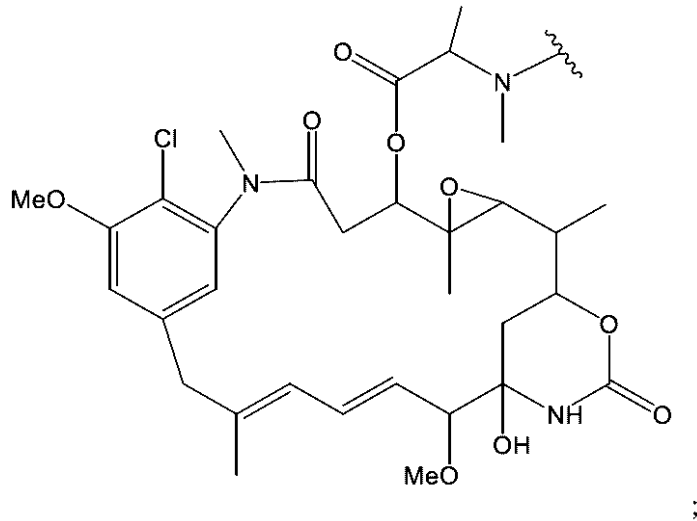
またはその薬学的に許容される塩で表され、式中、

Aは、Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro、またはD-Ala-tBu-Glyであり；

40

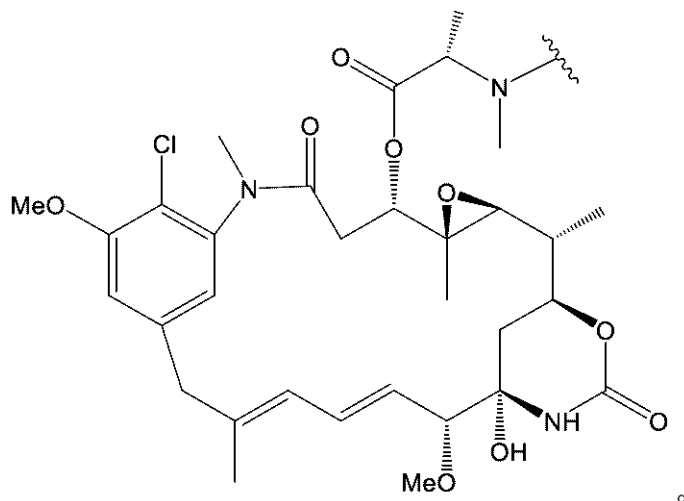
D₁は以下の式で表され：

【化 3 8】



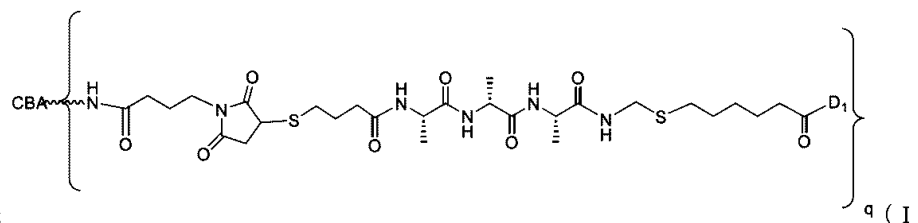
残りの変数は、第 7、第 8、または第 9 の特定の実施形態に記載されているとおりである。より具体的な実施形態では、A は L - A l a - D - A l a - L - A l a である。より具体的な実施形態では、D₁ は、以下の式で表される：

【化 3 9】

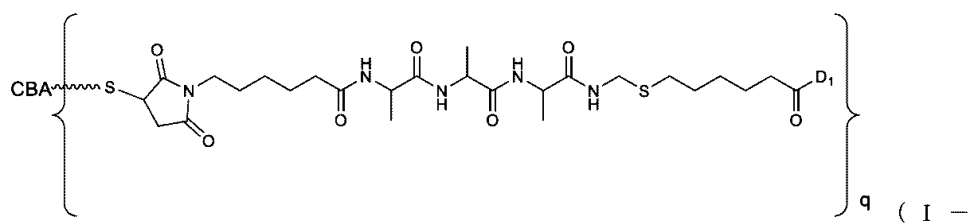
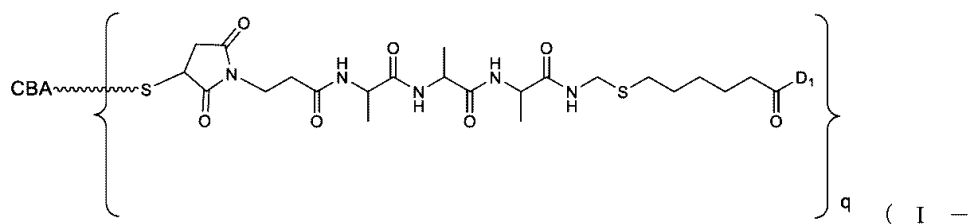


【 0 2 9 1】

第 1 1 の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、以下の式で表され：

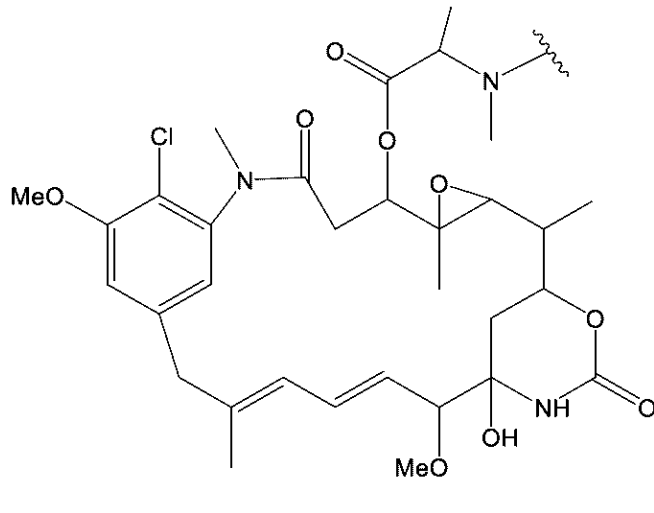
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q \quad (\text{I} - 1)$$


— 2) ;


$$\left\{ \text{CBA} - \text{S} - \text{pyrrolidine-2,5-dione} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH} - \text{CH}(\text{D}_1) - \text{C}(=\text{O})\text{NH} - \text{CH}(\text{D}_1) - \text{C}(=\text{O})\text{NH} - \text{CH}(\text{D}_1) - \text{C}(=\text{O})\text{NH} - \text{CH}_2\text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{D}_1 \right\}_q \quad (\text{I-4});$$

$$\left\{ \text{CBA} \cdots \text{S} - \text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2 - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH} - \text{CH}(\text{D}_1) - \text{C}(=\text{O})\text{NH} - \text{CH}(\text{D}_2) - \text{C}(=\text{O})\text{NH} - \text{CH}(\text{D}_3) - \text{C}(=\text{O})\text{NH} - \text{CH}_2\text{S} - \text{C}_6\text{H}_{13}\text{C}(=\text{O})\text{D}_4 \right\}_q \quad (\text{I}-6)$$

50

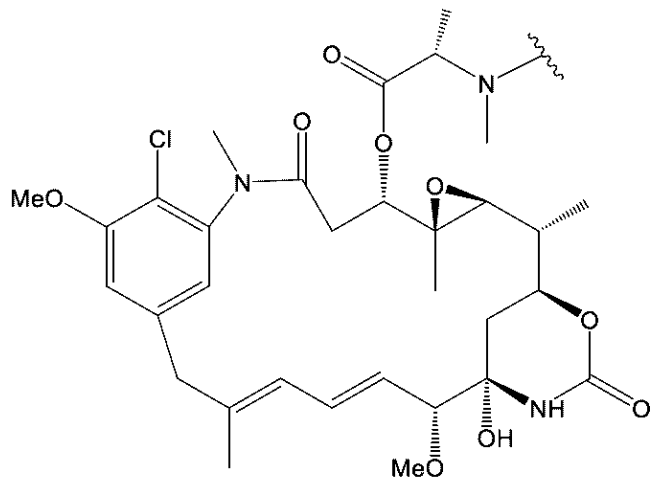
【化 4 1】



10

より具体的な実施形態では、D₁は、以下の式で表される：

【化 4 2】



20

30

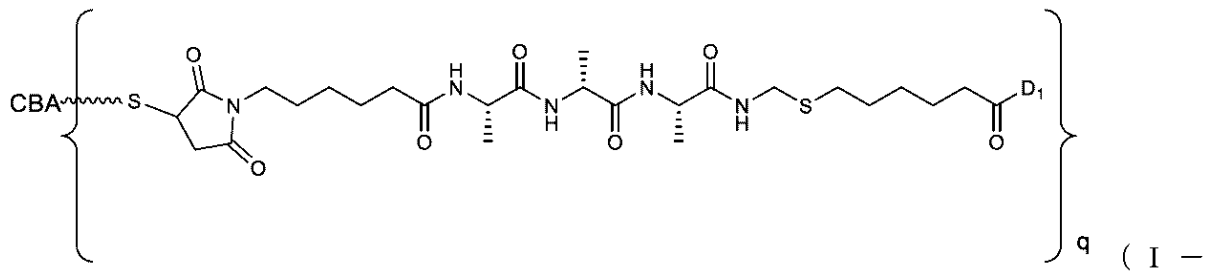
【 0 2 9 2 】

第 1 2 の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、以下の式で表され：

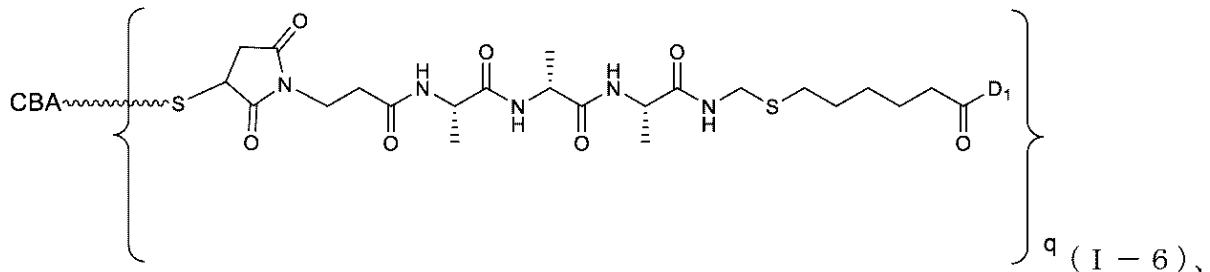
40

50

【化 4 3】



4)、または



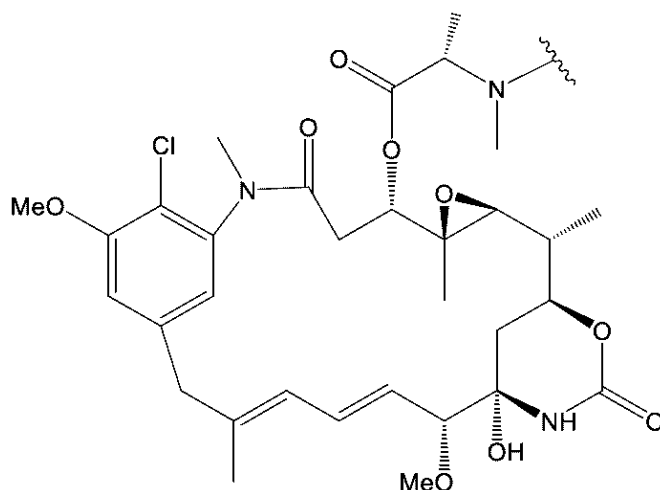
式中：

C B A は、パイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片であり、当該抗体またはその抗原結合断片は、(i) 配列番号 1 ~ 3 の配列を有する、軽鎖相補性決定領域 L - C D R 1、L - C D R 2、及び L - C D R 3、ならびに配列番号 7 ~ 9 の配列を有する重鎖相補性決定領域 H - C D R 1、H - C D R 2、及び H - C D R 3 と、(i i) 配列番号 4 ~ 6 の配列を有する軽鎖相補性決定領域 L - C D R 1、L - C D R 2、及び L - C D R 3、ならびにそれぞれ配列番号 10 ~ 12 の配列を有する重鎖相補性決定領域 H - C D R 1、H - C D R 2、及び H - C D R 3 と、を含み；

q は、1 または 2 であり；

D₁ は以下の式で表される：

【化 4 4】



【 0 2 9 3 】

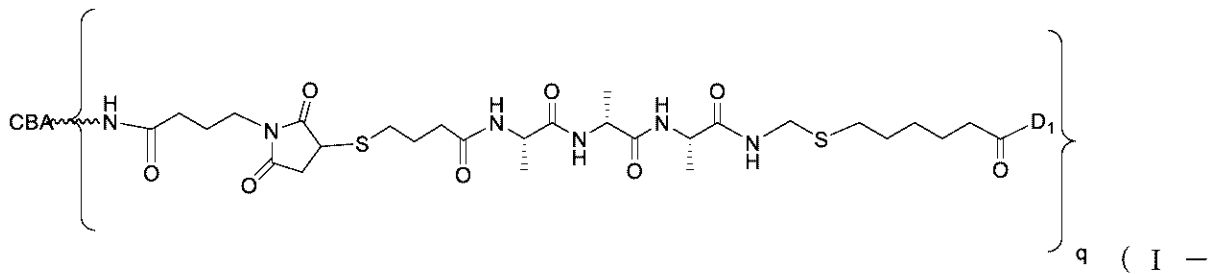
特定の実施形態では、式 (I - 4) または (I - 6) のイムノコンジュゲートについて、パイパルトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む V L と、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V H と、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V L と、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む V H と、を含む。

【 0 2 9 4 】

第 13 の特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、以下の

式で表され：

【化 4 5】



2)、

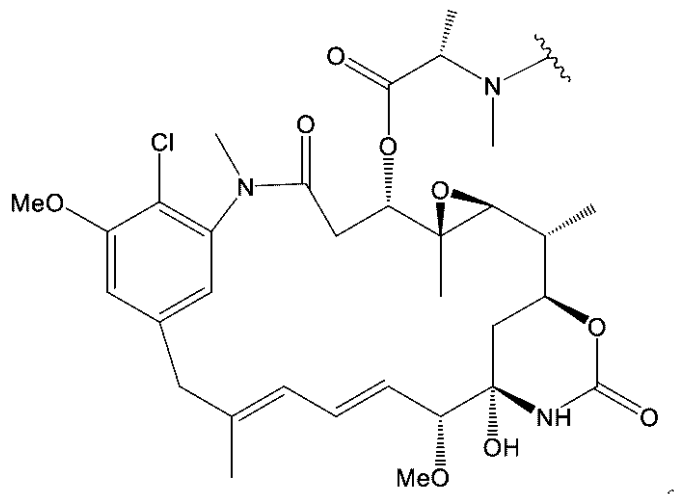
式中：

CBAは、パイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片であり、当該抗体またはその抗原結合断片は、(i)配列番号1～3の配列を有する、軽鎖相補性決定領域L - CDR1、L - CDR2、及びL - CDR3、ならびに配列番号7～9の配列を有する重鎖相補性決定領域H - CDR1、H - CDR2、及びH - CDR3と、(ii)配列番号4～6の配列を有する軽鎖相補性決定領域L - CDR1、L - CDR2、及びL - CDR3、ならびにそれぞれ配列番号10～12の配列を有する重鎖相補性決定領域H - CDR1、H - CDR2、及びH - CDR3と、を含み；

qは、1～10の整数、例えば、1または10であり；

D₁は以下の式で表される：

【化 4 6】



【0295】

特定の実施形態では、式(I-2)のイムノコンジュゲートについて、パイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号18のアミノ酸配列を含むV Lと、配列番号23のアミノ酸配列を含むV Hと、配列番号19のアミノ酸配列を含むV Lと、配列番号24のアミノ酸配列を含むV Hと、を含む。特定の実施形態では、式(I-2)のイムノコンジュゲートについて、パイパラトピック抗F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号41、42、及び43のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0296】

第14の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、以下の構造式で表されるマイタンシノイド化合物であるDM21C(また、Ma1-LDL-DMまたはMa1C5-LDL-DMまたは化合物17Aとも呼ばれる)と結合したパイパラトピック抗F R 抗体を含む；

10

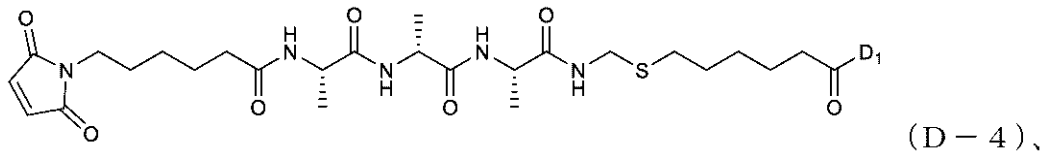
20

30

40

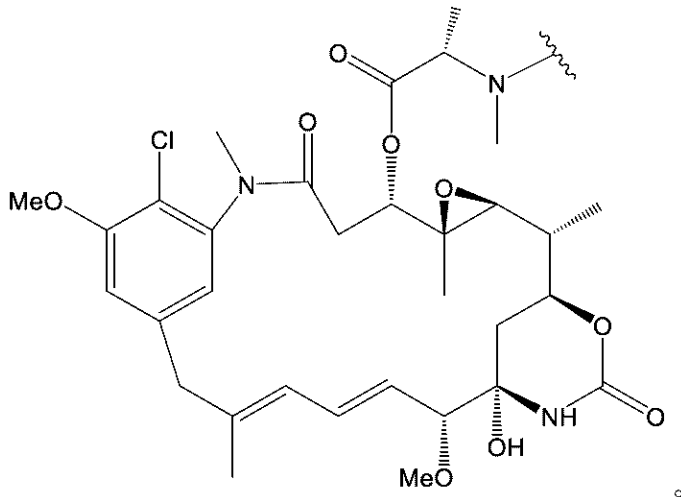
50

【化 4 7】



式中、パイパロトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、(i) それぞれ配列番号 1 8 及び配列番号 2 3 の配列を有する軽鎖可変領域及び重鎖可変領域と、(i i) それぞれ配列番号 1 9 及び配列番号 2 4 の配列を有する軽鎖可変領域及び重鎖可変領域と、を含み、D₁ は、以下の式で表される：

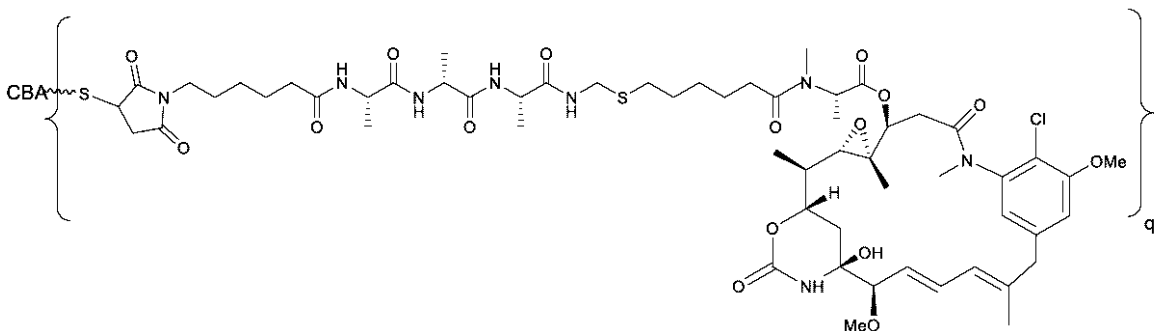
【化 4 8】



【 0 2 9 7】

一実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の構造式で表され：

【化 4 9】



式中：

C B A は、パイパロトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片であり、(i) それぞれ配列番号 1 8 及び配列番号 2 3 の配列を有する軽鎖可変領域及び重鎖可変領域と、(i i) それぞれ配列番号 1 9 及び配列番号 2 4 の配列を有する軽鎖可変領域及び重鎖可変領域と、を含み；

q は、1 または 2 である。

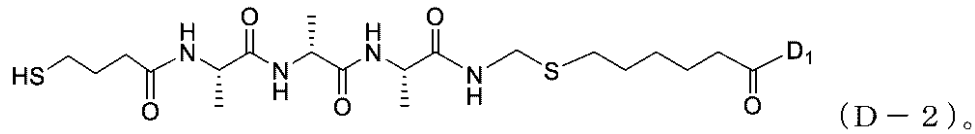
【 0 2 9 8】

特定の実施形態では、第 1 4 の特定の実施形態のイムノコンジュゲートを含む組成物（例えば、医薬組成物）について、D A R は、1 . 5 ~ 2 . 2、1 . 7 ~ 2 . 2、または 1 . 9 ~ 2 . 1 の範囲にある。いくつかの実施形態では、D A R は、1 . 7、1 . 8、1 . 9、2 . 0、または 2 . 1 である。

【 0 2 9 9】

第 15 特定の実施形態では、本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、以下の構造式で表されるマイタンシノイド化合物である DM 21 (また、DM 21 L、LDL-D M、または化合物 14 c と呼ばれる) と - マレイミド酪酸 N - スクシンイミジルエステル (GMBS) または N - (- マレイミドブトリルオキシ) スルホスクシンイミドエステル (スルホ - GMBS または s GMBS) リンカーを介して結合したバイパロトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片を含む：

【化 5 0】



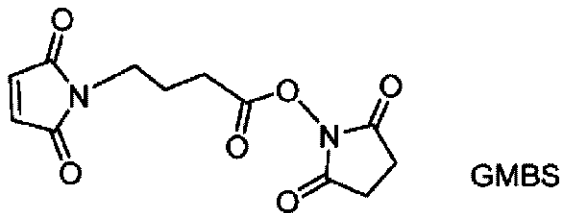
10

バイパロトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、(i) それぞれ配列番号 18 及び配列番号 23 の配列を有する軽鎖可変領域及び重鎖可変領域と、(i i) それぞれ配列番号 19 及び配列番号 24 の配列を有する軽鎖可変領域及び重鎖可変領域と、を含む。

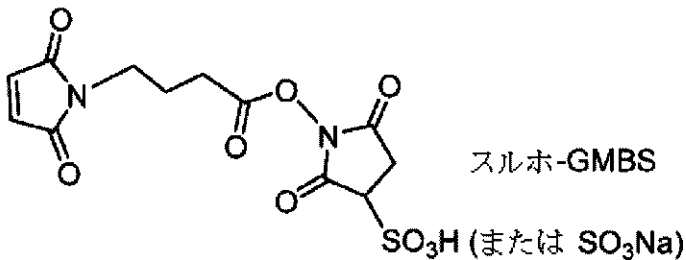
【0300】

GMBS 及びスルホ - GMBS (または s GMBS) リンカーは当該技術分野で知られており、以下の構造式で表すことができる：

【化 5 1】



20

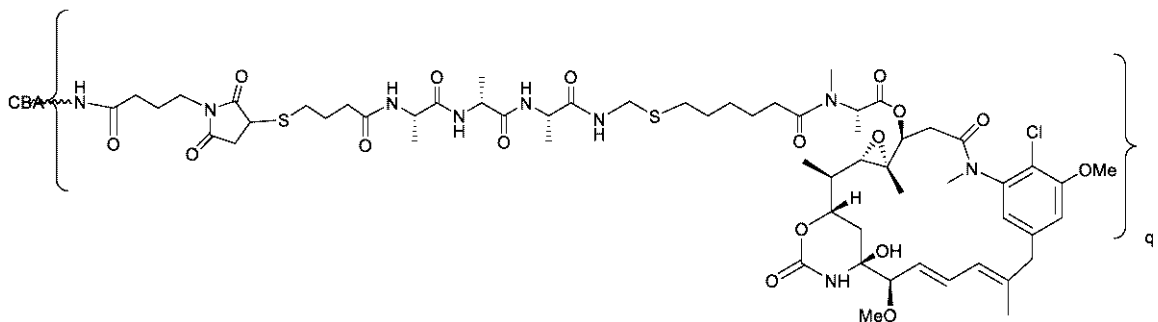


30

【0301】

一実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の構造式で表され：

【化 5 2】



40

式中：

CBA は、バイパロトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片であり、(i) それぞれ配列番号 18 及び配列番号 23 の配列を有する軽鎖可変領域及び重鎖可変領域と、(i

50

i) それぞれ配列番号 19 及び配列番号 24 の配列を有する軽鎖可変領域及び重鎖可変領域と、を含み；

q は、1 ~ 10 の整数、例えば、1 または 10 である。いくつかの実施形態では、q は、2 ~ 5 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、3 ~ 4 の整数である。

【0302】

特定の実施形態では、第 15 の特定の実施形態のイムノコンジュゲートについて、バイパラトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 41、42、及び 43 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0303】

特定の実施形態では、第 15 の特定の実施形態のイムノコンジュゲートを含む組成物（例えば、医薬組成物）について、DAR は、3.0 ~ 4.0、3.2 ~ 3.8、3.1 ~ 3.7、または 3.4 ~ 3.7 の範囲にある。いくつかの実施形態では、DAR は、3.2、3.3、3.4、3.5、3.5、3.7、または 3.8 である。いくつかの実施形態では、DAR は 3.5 である。

【0304】

特定の実施形態では、リジンコンジュゲートを含む組成物について、DAR は 1.5 ~ 3.1 の範囲にある。いくつかの実施形態では、DAR は約 2.0 である。

【0305】

特定の実施形態では、第 1 の実施形態、または第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、第 9、第 10、第 11、第 12、第 13、第 14、または第 15 の特定の実施形態のイムノコンジュゲートを含む組成物（例えば、医薬組成物）について、組成物中の、薬物抗体比（DAR）としても知られている、抗体分子あたりの細胞傷害性薬剤の平均数（すなわち、q の平均値）は、1.0 ~ 8.0 の範囲である。いくつかの実施形態では、DAR は、1.0 ~ 5.0、1.0 ~ 4.0、1.5 ~ 4.0、2.0 ~ 4.0、2.5 ~ 4.0、1.0 ~ 3.4、1.0 ~ 3.0、3.0 ~ 4.0、3.1 ~ 3.5、3.1 ~ 3.7、3.4 ~ 3.6、1.5 ~ 2.5、2.0 ~ 2.5、1.7 ~ 2.3、または 1.8 ~ 2.2 の範囲である。いくつかの実施形態では、DAR は、4.0 未満、3.8 未満、3.6 未満、3.5 未満、3.0 未満、または 2.5 未満である。いくつかの実施形態では、DAR は 3.1 ~ 3.7 の範囲である。いくつかの実施形態では、DAR は 3.1 ~ 3.4 の範囲である。いくつかの実施形態では、DAR は 3.3 ~ 3.7 の範囲である。いくつかの実施形態では、DAR は 3.5 ~ 3.9 の範囲である。いくつかの実施形態では、DAR は、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、または 3.8 である。いくつかの実施形態では、DAR は 3.5 である。いくつかの実施形態では、DAR は 1.8 ~ 2.0 の範囲である。いくつかの実施形態では、DAR は 1.7 ~ 1.9 の範囲である。いくつかの実施形態では、DAR は 1.9 ~ 2.1 の範囲である。いくつかの実施形態では、DAR は、1.9、2.0、または 2.1 である。いくつかの実施形態では、一つ以上のシステインチオール基を介してマイタンシノイド化合物に結合したバイパラトピック抗 F R 抗体またはその抗原結合断片を含む本発明のイムノコンジュゲートについて、DAR は、1.5 ~ 2.5、1.8 ~ 2.2、1.1 ~ 1.9、または 1.9 ~ 2.1 の範囲である。いくつかの実施形態では、DAR は、1.8、1.9、2.0、または 2.1 である。

【0306】

B. リンカー

当該技術分野で知られている任意の適切なリンカーを、本開示のイムノコンジュゲートを調製する際に使用することができる。特定の実施形態では、リンカーは二官能性リンカーである。本明細書で使用される場合、「二官能性リンカー」という用語は、一方は細胞結合剤と反応することができ、もう一方はマイタンシノイド化合物と反応して 2 つの部分を一緒に結合する 2 つの反応性基を有する修飾剤を指す。そのような二官能性架橋剤は当該技術分野でよく知られている（例えば、Isalm and Dent in Bioc onjugation chapter 5, p218-363, Groves Dict

10

20

30

40

50

ionaries Inc. New York, 1999を参照されたい)。例えば、チオエーテル結合を介して結合を可能にする二官能性架橋剤としては、マレイミド基を導入するN - スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (SMCC)、またはヨードアセチル基を導入するN - スクシンイミジル - 4 - (ヨードアセチル) - アミノベンゾエート (SIAB) が挙げられる。マレイミド基またはハロアセチル基を細胞結合剤に導入する他の二官能性架橋剤は、当該技術分野で周知であり (米国特許公開第2008/0050310号、同第20050169933号を参照されたい。Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USAから入手可能)、ビス - マレイミドポリエチレングリコール (BMPEO)、BM (PEO)₂、BM (PEO)₃、N - (- マレイミドプロピルオキシ) スクシンイミドエステル (BMPS)、 - マレイミド酪酸N - スクシンイミジルエステル (GMB S)、 - マレイミドカプロン酸N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (EMCS)、5 - マレイミド吉草酸NHS、HBVS、N - スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシ - (6 - アミドカプロエート)、これはSMCCの「長鎖」類似体である (LC - SMCC)、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)、4 - (4 - N - マレイミドフェニル) - 酪酸ヒドラジドまたはHCl塩 (MPBH)、N - スクシンイミジル3 - (プロモアセトアミド) プロピオネート (SBAP)、N - スクシンイミジルヨードアセテート (SIA)、 - マレイミドウンデカン酸N - スクシンイミジルエステル (KMUA)、N - スクシンイミジル4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート (SMPB)、スクシンイミジル - 6 - (- マレイミドプロピオンアミド) ヘキサノエート (SMPH)、スクシンイミジル - (4 - ビニルスルホニル) ベンゾエート (SVSB)、ジチオビス - マレイミドエタン (DTME)、1, 4 - ビス - マレイミドブタン (BMB)、1, 4 - ビスマレイミジル - 2, 3 - ジヒドロキシブタン (BMD B)、ビス - マレイミドヘキサン (BMH)、ビス - マレイミドエタン (BMOE)、スルホスクシンイミジル4 - (N - マレイミド - メチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - SMCC)、スルホスクシンイミジル (4 - ヨード - アセチル) アミノベンゾエート (スルホ - SIAB)、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル (スルホ - MBS)、N - (- マレイミドブトリルオキシ) スルホスクシンイミドエステル (スルホ - GMB SまたはsGMB S)、N - (- マレイミドカプロイルオキシ) スルホスクシミドエステル (スルホ - EMCS)、N - (- マレイミドウンデカノイルオキシ) スルホスクシンイミドエステル (スルホ - KMUS)、及びスルホスクシンイミジル4 - (p - マレイミドフェニル) ブチレート (スルホ - SMPB) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0307】

ヘテロ二官能性架橋剤は、2つの異なる反応性基を有する二官能性架橋剤である。アミン反応性N - ヒドロキシスクシンイミド基 (NHS基) とカルボニル反応性ヒドラジン基の両方を含むヘテロ二官能性架橋剤を使用して、本明細書に記載の細胞傷害性化合物を細胞結合剤 (例えば、抗体) と結合させることもできる。そのような市販のヘテロ二官能性架橋剤の例には、スクシンイミジル6 - ヒドラジノニコチンアミドアセトンヒドラゾン (SANH)、スクシンイミジル4 - ヒドラジドテレフタレートヒドロクロリド (SHTH)、及びスクシンイミジルヒドラジニウムニコチン酸ヒドロクロリド (SHNH) が含まれる。酸に不安定な連結を有するコンジュゲートはまた、本開示のヒドラジン含有ベンゾジアゼピン誘導体を使用して調製することができる。使用できる二官能性架橋剤の例には、スクシンイミジル - p - ホルミルベンゾエート (SFB) 及びスクシンイミジル - p - ホルミルフェノキシアセテート (SFPA) が含まれる。

【0308】

ジスルフィド結合を介して細胞結合剤と細胞傷害性化合物との結合を可能にする二官能性架橋剤は当該技術分野で知られており、ジチオピリジル基を導入する、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 (SPDP)、N - スクシンイミジ

10

20

30

40

50

ル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペンタノエート (S P P)、N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (S P D B)、N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) 2 - スルホブタノエート (スルホ - S P D B または s S P D B) が含まれる。ジスルフィド基を導入するために使用することができる他の二官能性架橋剤は当該技術分野で知られており、米国特許第 6 , 9 1 3 , 7 4 8 号、同第 6 , 7 1 6 , 8 2 1 号及び米国特許公開 2 0 0 9 / 0 2 7 4 7 1 3 及び同 2 0 1 0 / 0 1 2 9 3 1 4 に開示され、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。代替的に、チオール基を導入する 2 - イミノチオラン、ホモシステインチオラクトン、または S - アセチルコハク酸無水物などの架橋剤も使用することができる。

【 0 3 0 9 】

10

C . 細胞傷害性薬剤

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、本開示のイムノコンジュゲートを作製するために使用され得る細胞傷害性薬剤である。本明細書で提供されるイムノコンジュゲートで使用される細胞傷害性薬剤は、細胞の死をもたらす、または細胞死を誘発する、または何らかの方法で細胞生存率を低下させる任意の化合物であり得、例えば、マイタンシノイド及びマイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、タキソイド、C C - 1 0 6 5 及び C C - 1 0 6 5 類似体、デュオカルマイシン及びデュオカルマイシン類似体、カリチアマイシンなどのエンジン、オーリスタチンを含むドラスタチン及びドラスタチン誘導体、トメイマイシン誘導体、レプトマイシン誘導体、メトトレキサート、シスプラチン、カルボプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メルファラン、マイトマイシン C、クロラムブシル、及びモルフォリノドキソルビシンが含まれる。特定の実施形態では、細胞傷害性薬剤は、マイタンシノイド及びマイタンシノイド類似体である。

20

【 0 3 1 0 】

適切なマイタンシノイドの例には、マイタンシノール及びマイタンシノール類似体のエステルが含まれる。マイタンシノール及びマイタンシノール類似体のように、微小管形成を阻害し、哺乳動物細胞に対して非常に毒性のある任意の薬物が含まれる。

【 0 3 1 1 】

例示的な細胞傷害性薬剤は、以前に W O 2 0 1 8 / 1 6 0 5 3 9 A 1 及び W O 2 0 1 1 / 1 0 6 5 2 8 に記載され、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【 0 3 1 2 】

本明細書で提供されるイムノコンジュゲートは、以下の式：

【 化 5 3 】

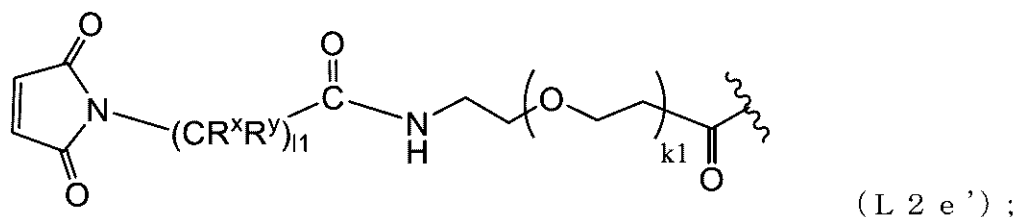
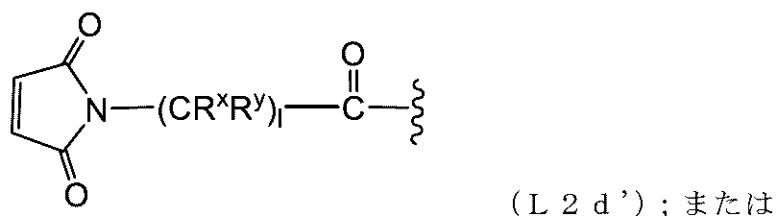
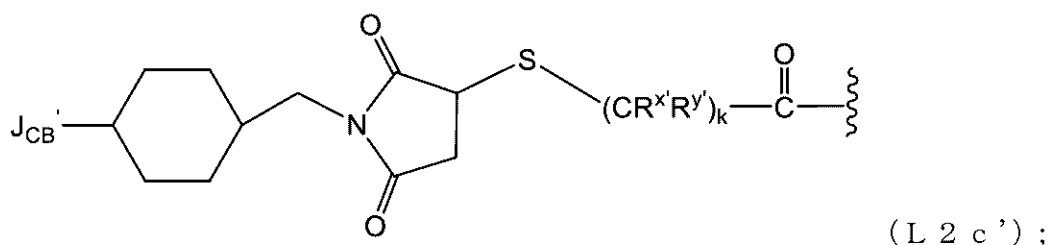
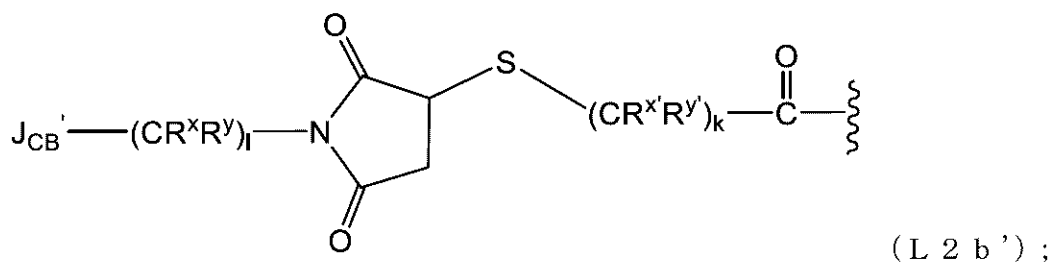
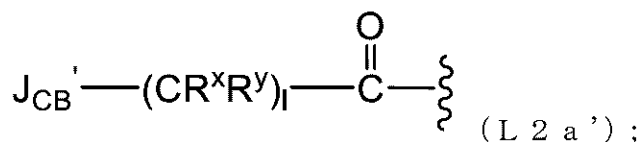


またはその薬学的に許容される塩で表されるマイタンシノイド化合物を含むことができ、式中：

L₂' は、以下の構造式によって表され：

40

【化 5 4】



式中、

R^x 、 R^y 、 $R^{x'}$ 、及び $R^{y'}$ は、それぞれの存在について、独立してH、-OH、ハロゲン、-O-(C₁₋₄アルキル)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺、または任意選択で-OH、ハロゲン、-SO₃H、もしくはNR₄₀R₄₁R₄₂⁺によって置換されたC₁₋₄アルキルであり、ここで、R₄₀、R₄₁、及びR₄₂は、それぞれ独立してHまたはC₁₋₄アルキルであり；

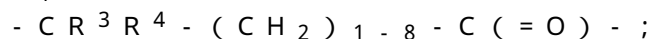
l及びkは、それぞれ独立して、1～10の整数であり；

J_{CB}'は、-C(=O)OHまたは-COEであり、-COEは反応性エステルであり；

Aが、アミノ酸または2～20個のアミノ酸を含むペプチドであり；

R¹及びR²は、それぞれ独立して、HまたはC₁₋₃アルキルであり；

L₁は、以下の式によって表され；



式中、R³及びR⁴は、それぞれ独立してHまたはMeであり、L₁の-C(=O)-部分は、Dに接続されており；

Dが以下の式で表され；

10

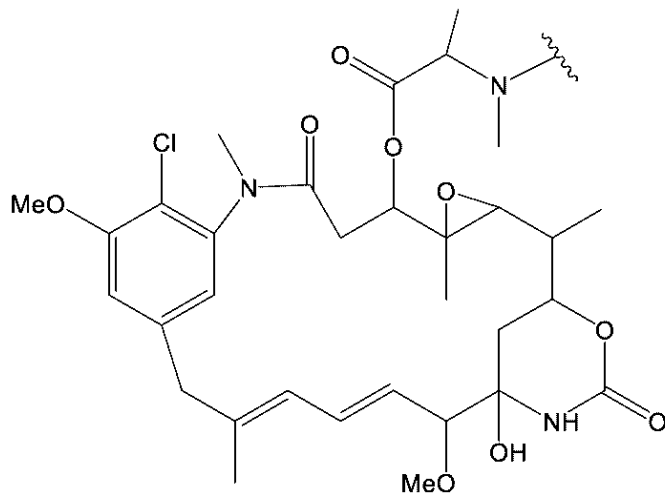
20

30

40

50

【化 5 5】



10

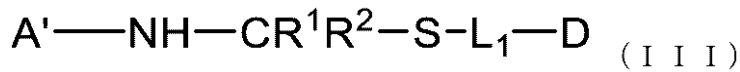
q は、1 ~ 20 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、1 ~ 10 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、2 ~ 5 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、3 ~ 4 の整数である。

【0 3 1 3】

いくつかの実施形態では、本発明のマイタンシノイドは、以下の式：

20

【化 5 6】



またはその薬学的に許容される塩で表され、式中：

A' は、アミノ酸または 2 ~ 20 個のアミノ酸を含むペプチド（すなわち、A - NH₂）であり；

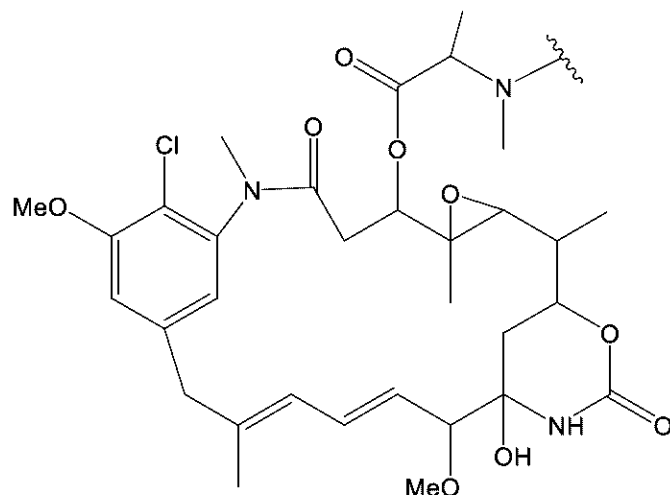
R¹ 及び R² は、それぞれ独立して、H または C₁ - 3 アルキルであり；

L₁ は、- CR³R⁴ - (CH₂)₁ - 8 - C(=O) - であり；R³ 及び R⁴ は、それぞれ独立して H または Me であり；

30

D が以下の式で表され：

【化 5 7】



40

；

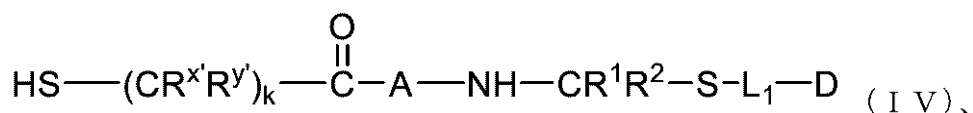
q は、1 ~ 20 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、1 ~ 10 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、2 ~ 5 の整数である。いくつかの実施形態では、q は、3 ~ 4 の整数である。

50

【 0 3 1 4 】

いくつかの実施形態では、本発明のマイタンシノイドは、以下の式：

【 化 5 8 】



またはその薬学的に許容される塩で表され、式中：

$\text{R}^{\text{x}'}$ 及び $\text{R}^{\text{y}'}$ は、それぞれの存在について、独立して H 、 $-\text{OH}$ 、ハロゲン、 $-\text{O}-$ (C_{1-4} アルキル)、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{NR}_{40}\text{R}_{41}\text{R}_{42}^+$ 、または任意選択で $-\text{OH}$ 、ハロゲン、 SO_3H 、もしくは $\text{NR}_{40}\text{R}_{41}\text{R}_{42}^+$ によって置換された C_{1-4} アルキルであり、ここで、 R_{40} 、 R_{41} 、及び R_{42} は、それぞれ独立して H または C_{1-4} アルキルであり；

k は、 $1 \sim 10$ の整数である。

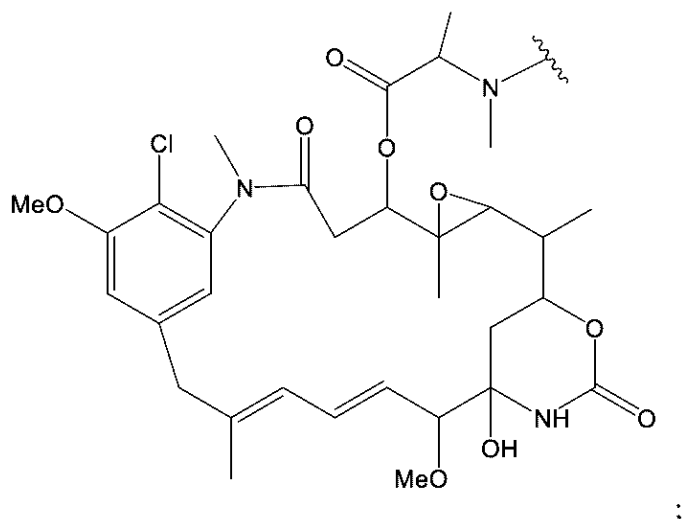
A は、アミノ酸残基または $2 \sim 20$ 個のアミノ酸残基を含むペプチドであり；

R^1 及び R^2 は、それぞれ独立して、 H または C_{1-3} アルキルであり；

L_1 は、 $-\text{CR}^3\text{R}^4-(\text{CH}_2)_{1-8}-\text{C}(=\text{O})-$ であり； R^3 及び R^4 は、それぞれ独立して H または Me であり；

D は以下の式で表され：

【 化 5 9 】



q は、 $1 \sim 20$ の整数である。いくつかの実施形態では、 q は、 $1 \sim 10$ の整数である。いくつかの実施形態では、 q は、 $2 \sim 5$ の整数である。いくつかの実施形態では、 q は、 $3 \sim 4$ の整数である。

【 0 3 1 5 】

いくつかの実施形態では、式 (I I)、(I I I)、または (I V) のマイタンシノイド化合物について、変数は、第 1 の実施形態、または第 1 の実施形態の第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、第 9、第 10、もしくは第 11 の特定の実施形態に記載されるとおりである。

【 0 3 1 6 】

特定の実施形態では、マイタンシノイド化合物は、以下の式で表される：

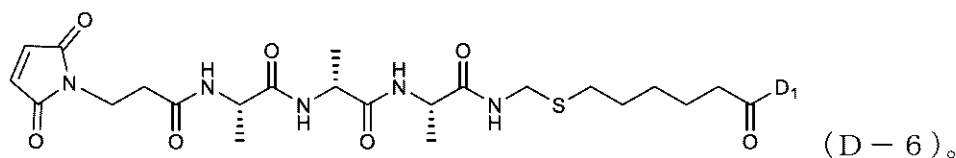
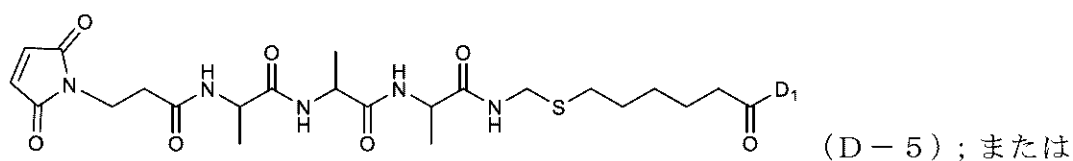
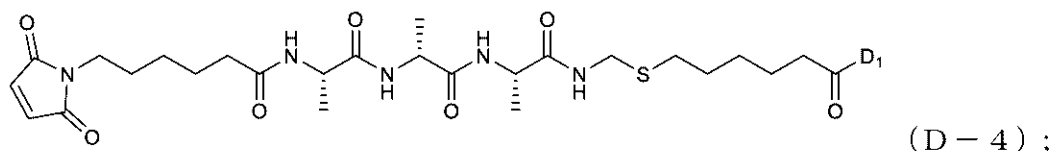
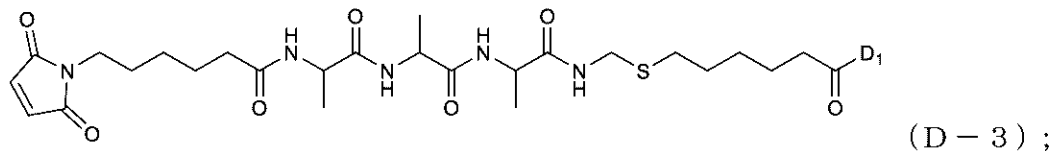
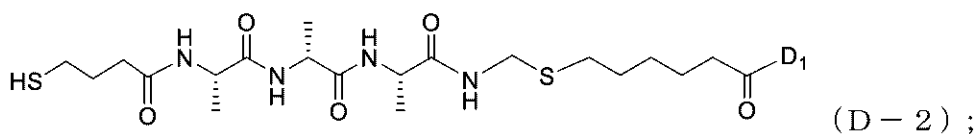
10

20

30

40

50

$$\text{HS-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)NH-CH(CH}_3\text{)-C(=O)NH-CH(CH}_3\text{)-C(=O)NH-CH(CH}_3\text{)-C(=O)NH-CH}_2\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(=O)D}_1 \quad (\text{D}-1);$$


適切なマイタンシノールエステルの追加の例には、修飾された芳香環を有するもの及び他の位置に修飾を有するものが含まれる。そのような適切なマイタンシノイドは、米国特許第4,424,219号；同第4,256,746号；同第4,294,757号；同第4,307,016号；同第4,313,946号；同第4,315,929号；同第4,331,598号；同第4,361,650号；同第4,362,663号；同第4,364,866号；同第4,450,254号；同第4,322,348号；同第4,371,533号；同第5,208,020号；同第5,416,064号；同第5,475,092号；同第5,585,499号；同第5,846,545号；同第6,333,410号；同第7,276,497号；及び同第7,473,796号に開示されている。さらに、そのような抗体-マイタンシノイドコンジュゲートを生成するためのいくつかの説明は、米国特許第6,333,410号、第6,441,163号、第6,716,821号、及び第7,368,565号に提供されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは N^2 '-デアセチル- N^2 '-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン(DM1)、 N^2 '-デアセチル- N^2 '-(4-メルカプト-1-オキソペンチル)-メイタンシン(DM3と呼ばれる)、 N^2 '-デアセチル- N^2 '-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)メイタンシン(DM4)を含み、その両方とも、以前にPCT出願公開番号WO2011/106528A1及び米国特許第8,557,966B2号に記載され、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 3 1 9 】

D．薬物複合体

本明細書に記載の細胞傷害性薬剤（例えば、マイタンシノイド）に共有結合されたバイパルトピックFR 結合抗体またはその抗原結合断片を含むイムノコンジュゲートは、当該技術分野で公知の任意の適切な方法に従って調製することができる。

【0320】

特定の実施形態では、第1の実施形態のイムノコンジュゲートは、バイパルトピックFR 結合抗体またはその抗原結合断片を、第2の実施形態に記載の式（II）のマイタンシノイド化合物と反応させるステップを含む第1の方法によって調製することができる。

【0321】

特定の実施形態では、第1の実施形態のイムノコンジュゲートは、以下のステップを含む第2の方法によって調製することができる：

（a）式（III）または（IV）のマイタンシノイド化合物を本明細書に記載のリンカー化合物と反応させて、アミン反応性基またはチオール反応性基が結合した細胞傷害性薬剤-マイタンシノイド化合物（例えば、式（II）の化合物）であって、バイパルトピックFR 結合抗体またはその抗原結合断片に共有結合することのできるものを形成すること、及び

（b）バイパルトピックFR 結合抗体またはその抗原結合断片をマイタンシノイド-リンカー化合物と反応させてイムノコンジュゲートを形成すること。

【0322】

特定の実施形態では、第1の実施形態のイムノコンジュゲートは、以下のステップを含む第3の方法によって調製することができる：

（a）バイパルトピックFR 結合抗体またはその抗原結合断片を、本明細書に記載のリンカー化合物と反応させて、アミン反応性基またはチオール反応性が結合した改変されたバイパルトピックFR 結合抗体またはその抗原結合断片であって、式（III）または（IV）のマイタンシノイド化合物に共有結合することのできるものを形成すること、及び
（b）改変されたバイパルトピックFR 結合抗体またはその抗原結合断片を式（III）または（IV）のマイタンシノイド化合物と反応させてイムノコンジュゲートを形成すること。

【0323】

特定の実施形態では、上述の第2、第3、または第4の方法について、リンカー化合物は、式（a1L）～（a10L）のいずれか1つ、またはそれらの薬学的に許容される塩で表される：

10

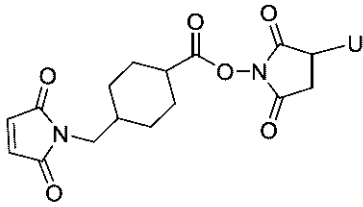
20

30

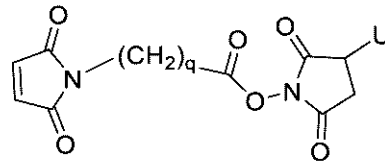
40

50

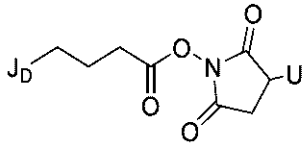
【化 6 1】



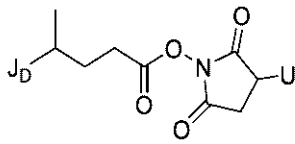
(a 1 L) ;



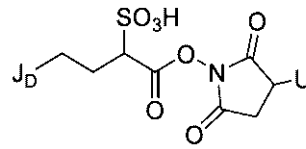
(a 2 L) ;



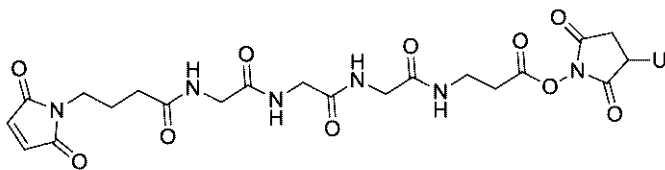
(a 3 L) ;



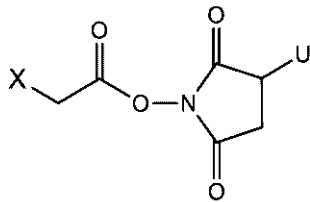
(a 4 L) ;



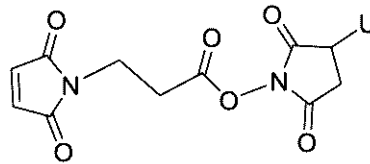
(a 5 L) 、



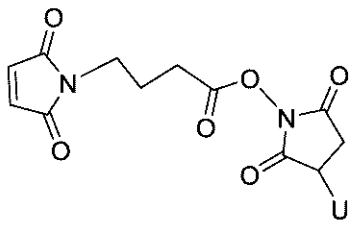
(a 6 L) 、



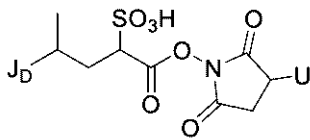
(a 7 L) ;



(a 8 L) ;



(a 9 L) ; 及び



(a 1 0 L) 、

式中、Xはハロゲン；J_D-SH、または-S-S-R^dであり；R^dは、フェニル、ニトロフェニル、ジニトロフェニル、カルボキシニトロフェニル、ピリジル、またはニトロピリジルであり；R^gはアルキルであり；Uは-HまたはSO₃Hである。

【0324】

一実施形態では、リンカー化合物は、式(a9L)またはその薬学的に許容される塩で表されるGMB Sまたはスルホ-GMB S（もしくはsGMB S）であり、式中、Uは、-HまたはSO₃Hである。

【0325】

特定の実施形態では、本発明のイムノコンジュゲートは、以下の式によって表される：

10

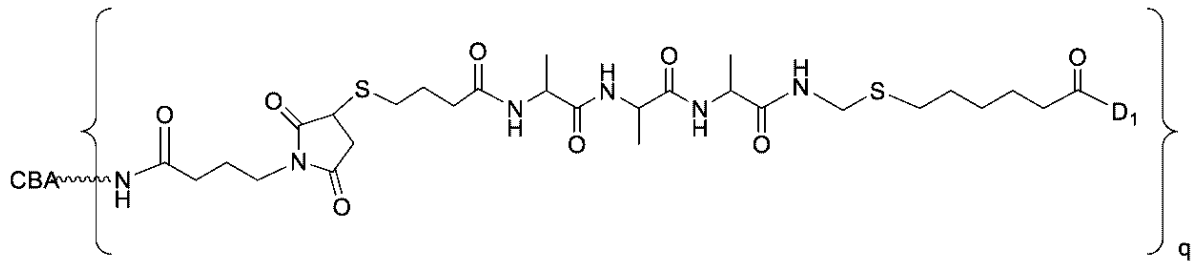
20

30

40

50

【化 6 2】



(I - 1) ;

10

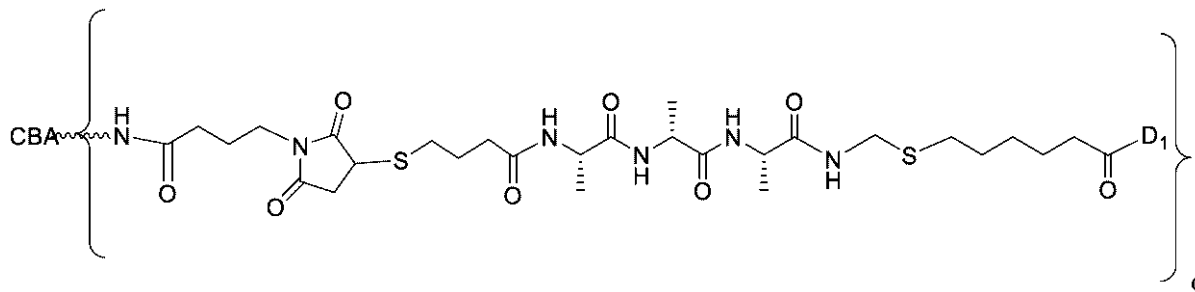
イムノコンジュゲートは、上述の第 2、第 3、または第 4 の方法によって調製することができ、リンカー化合物は、式 (a 9 L) またはその薬学的に許容される塩で表される G M B S またはスルホ - G M B S であり、式中、U は、 - H または S O ₃ H である。マイタンシノイド化合物は、上述の式 (D - 1) で表される。より具体的な実施形態では、式 (I - 1) のイムノコンジュゲートは、式 (D - 1) のマイタンシノイド化合物をリンカー化合物 G M B S またはスルホ - G M B S と反応させてマイタンシノイド - リンカー化合物を形成し、続いてバイパロトピック F R 結合抗体またはその抗原結合断片をマイタンシノイド - リンカー化合物と反応させることによって調製される。さらにより具体的な実施形態では、マイタンシノイドリンカー化合物はバイパロトピック F R 結合抗体またはその抗原結合断片と反応する前に精製されていない。

20

【 0 3 2 6】

別の特の実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の式によって表される：

【化 6 3】



(I - 2) ;

30

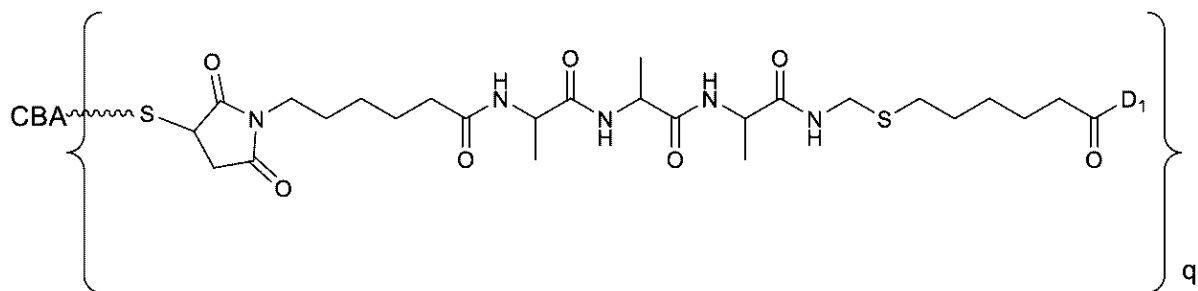
イムノコンジュゲートは、上述の第 2、第 3、または第 4 の方法によって調製することができ、リンカー化合物は、式 (a 9 L) または薬学的に許容される塩で表される G M B S またはスルホ - G M B S であり、式中、U は、 - H または S O ₃ H である。マイタンシノイド化合物は、上述の式 (D - 2) で表される。より具体的な実施形態では、式 (I - 2) のイムノコンジュゲートは、式 (D - 2) のマイタンシノイド化合物をリンカー化合物 G M B S またはスルホ - G M B S と反応させてマイタンシノイド - リンカー化合物を形成し、続いてバイパロトピック F R 結合抗体またはその抗原結合断片をマイタンシノイド - リンカー化合物と反応させることによって調製される。さらにより具体的な実施形態では、マイタンシノイドリンカー化合物はバイパロトピック F R 結合抗体またはその抗原結合断片と反応する前に精製されていない。

40

[0 2] 別の特の実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の式によって表される：

50

【化 6 4】



(I - 3) ;

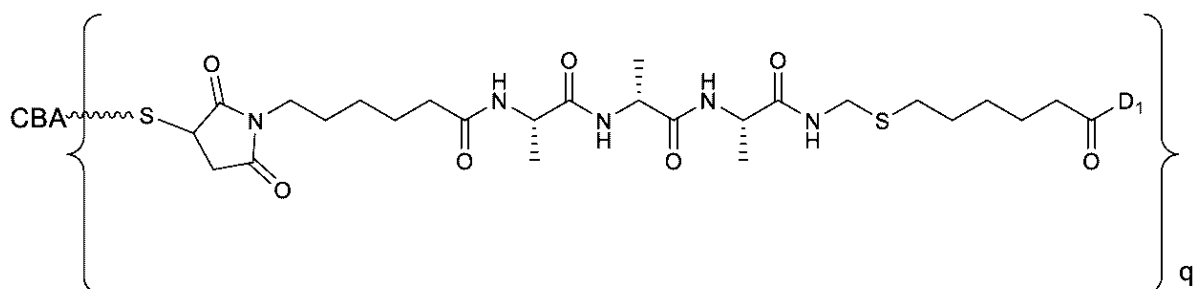
10

イムノコンジュゲートは、上述の第 1 の方法に従って、バイパルトピック F R 結合抗体またはその抗原結合断片を、上述の式 (D - 3) のマイタンシノイド化合物と反応させることによって調製される。

【 0 3 2 7】

別の特定の実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の式によって表される：

【化 6 5】



(I - 4) ;

20

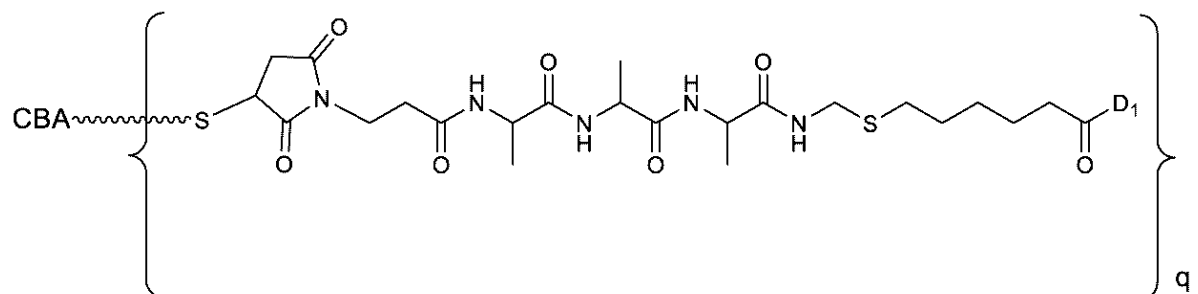
イムノコンジュゲートは、上述の第 1 の方法に従って、バイパルトピック F R 結合抗体またはその抗原結合断片を、上述の式 (D - 4) のマイタンシノイド化合物と反応させることによって調製される。

30

【 0 3 2 8】

別の特定の実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の式によって表される：

【化 6 6】



(I - 5) ;

40

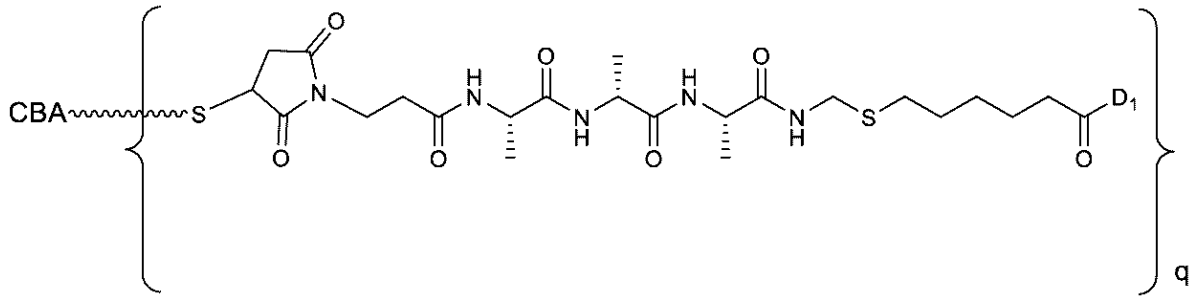
イムノコンジュゲートは、上述の第 1 の方法に従って、抗 F R 抗体またはその抗原結合断片を、上述の式 (D - 5) のマイタンシノイド化合物と反応させることによって調製される。

【 0 3 2 9】

別の特定の実施形態では、イムノコンジュゲートは、以下の式によって表される：

50

【化 6 7】



(I - 6) ;

10

イムノコンジュゲートは、上述の第 1 の方法に従って、バイパラトピック F R 結合抗体またはその抗原結合断片を、上述の式 (D - 6) のマイタンシノイド化合物と反応させることによって調製される。

【 0 3 3 0】

いくつかの実施形態では、上に開示された式 I - 3 から I - 6 によって表されるイムノコンジュゲートは、2019 年 3 月 21 日に出願された米国仮出願 62 / 821,707、及び関連する米国出願第 16 / 825,127 号に記載された方法に従って調製される。

【 0 3 3 1】

いくつかの実施形態では、上述の任意の方法によって調製されたイムノコンジュゲートは、精製ステップの対象となる。これに関して、イムノコンジュゲートは、タンジェント流濾過 (T F F)、非吸着クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、吸着濾過、選択的沈殿、または任意の他の適切な精製プロセス、ならびにそれらの組み合わせを使用して、混合物の他の成分から精製することができる。

20

【 0 3 3 2】

いくつかの実施形態では、イムノコンジュゲートは、単一の精製ステップ (例えば、T F F) を使用して精製される。好ましくは、コンジュゲートは、単一の精製ステップ (例えば、T F F) を使用して精製され、適切な製剤に交換される。本発明の他の実施形態では、イムノコンジュゲートは、2 つの逐次的な精製ステップを使用して精製される。例えば、イムノコンジュゲートは、最初に選択的沈殿、吸着性濾過、吸収性クロマトグラフィー、または非吸収性クロマトグラフィーによって精製され、続いて T F F によって精製され得る。当業者は、免疫コンジュゲートの精製が、細胞傷害性薬剤に化学的に結合された細胞結合剤を含む安定なコンジュゲートの単離を可能にすることを理解するであろう。

30

【 0 3 3 3】

P e l l i c o n タイプのシステム (M i l l i p o r e , B i l l e r i c a , M a s s .)、S a r t o c o n カセットシステム (S a r t o r i u s A G , E d g e w o o d , N . Y .)、及び C e n t r a s e t t e タイプのシステム (P a l l C o r p . , E a s t H i l l s , N . Y .) を含む任意の適切な T F F システムを精製に利用することができる。

【 0 3 3 4】

任意の適切な吸着性クロマトグラフィー樹脂を精製に利用することができる。好ましい吸着性クロマトグラフィー樹脂には、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性電荷誘導クロマトグラフィー (H C I C)、疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C)、イオン交換クロマトグラフィー、混合モードイオン交換クロマトグラフィー、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C)、染料リガンドクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、及びそれらの組み合わせが含まれる。適切なヒドロキシアパタイト樹脂の例には、セラミックヒドロキシアパタイト (C H T タイプ I 及びタイプ I I、B i o - R a d L a b o r a t o r i e s , H e r c u l e s , C a l i f .)、H A ウルトロゲルヒドロキシアパタイト (P a l l C o r p . , E a s t H i l l s , N . Y .)、及びセラミックフルオロアパタイト (

40

50

CFTタイプI及びタイプII、Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)が含まれる。適切なHCIC樹脂の例は、MEP Hypercel樹脂(Pall Corp., East Hills, N.Y.)である。適切なHCIC樹脂の例には、ブチルセファロース、ヘキシルセファロース、フェニルセファロース、及びオクチルセファロース樹脂(全てGE Healthcare, Piscataway, N.J.から)、ならびにマクロプレップメチル及びマクロプレップt-ブチル樹脂(Biorad Laboratories, Hercules, Calif.)が含まれる。適切なイオン交換樹脂の例には、SP-セファロース、CM-セファロース、及びQ-セファロース樹脂(全てGE Healthcare, Piscataway, N.J.から)、及びウノスフィアS樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)が含まれる。適切な混合モードイオン交換体の例には、Bakerbond ABx樹脂(JT Baker, Phillipsburg N.J.)が含まれる。適切なIMAC樹脂の例には、キレートセファロース樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)及びProfinity IMAC樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)が含まれる。適切な色素リガンド樹脂の例としては、ブルーセファロース樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)及びアフィゲルブルー樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)が挙げられる。適切なアフィニティー樹脂の例には、細胞結合剤が抗体である場合、プロテインAセファロース樹脂(例えば、MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, N.J.)、細胞結合剤が適切なレクチン結合部位を有する場合、レクチンアフィニティー樹脂、例えば、Lentilレクチンセファロース樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)が挙げられる。代替的に、細胞結合剤に特異的な抗体を使用することができる。このような抗体は、例えば、セファロース4ファストフロー樹脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)に固定化することができる。適切な逆相樹脂の例としては、C4、C8、及びC18樹脂(Grace Vydac, Hesperia, Calif.)が挙げられる。

【0335】

任意の適切な非吸着性クロマトグラフィー樹脂を精製に利用することができる。適切な非吸着性クロマトグラフィー樹脂の例には、非限定的に、SEPHADEX(商標)G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL(商標)樹脂(例えば、S-200及びS-300)、SUPERDEX(商標)樹脂(例えば、SUPERDEX(商標)75及びSUPERDEX(商標)200)、BIO-GEL(登録商標)樹脂(例えば、P-6、P-10、P-30、P-60、及びP-100)、ならびに当業者に知られている他のものが挙げられる。

【0336】

VII. 組成物及びキット

本明細書で提供されるのは、生理学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤(Remington's Pharmaceutical Sciences(1990) Mack Publishing Co., Easton, PA)において所望の純度を有する、本明細書に記載のイムノコンジュゲート、抗体、またはその抗原結合断片を含む組成物である。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、使用される投与量及び濃度でレシピエントに無毒である。

【0337】

医薬組成物は、対象への特定の投与経路のために製剤化され得る。例えば、医薬組成物は、非経口、例えば、静脈内投与用に製剤化することができる。インビボ投与に使用される組成物は、滅菌され得る。これは、例えば、滅菌濾過膜を通じた濾過によって容易に達成される。

【0338】

本明細書に記載の医薬組成物は、一実施形態では、医薬として使用するためのものであ

10

20

30

40

50

る。本明細書に記載の医薬組成物は、がんなどの状態を治療するのに有用であり得る。本明細書に記載のように治療できるがんの例としては、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれるが、これらに限定されない。そのようながんのさらに特定の例としては、卵管癌、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、膵臓癌、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、小腸癌、子宮内膜または子宮癌腫、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝臓癌、及び種々の種類の頭頸部癌が挙げられる。がんは、F R を発現するがんであってよい。

【0339】

本明細書で提供される医薬組成物は、イムノコンジュゲートを含むことができ、医薬組成物（医薬組成物中のイムノコンジュゲート）は、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片あたり平均1～20の薬物を有することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片あたり平均1～10の薬物を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片あたり平均2～5の薬物を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片あたり平均3～4の薬物を含む。

10

【0340】

V I I I . 方法及び使用

本開示のバイパルトピック抗F R 抗体、その抗原結合断片、及びイムノコンジュゲートは、がんの治療などの治療処置方法を含むがこれらに限定されない種々の用途に有用である。特定の実施形態では、薬剤は、腫瘍増殖を阻害するため及び/または腫瘍体積を低減するために有用である。使用法は、インビトロまたはインビボの方法であってもよい。

20

【0341】

本開示は、対象（例えば、治療を必要とする対象）への治療有効量のバイパルトピック抗F R 抗体、その抗原結合断片、またはイムノコンジュゲートを投与することを含む、がんを治療する方法を提供する。特定の実施形態では、がんは、卵管癌、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病を含むがこれらに限定されないがんである。そのようながんのさらに特定の例としては、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、膵臓癌、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌（TNBC））、結腸癌、結腸直腸癌、小腸癌、子宮内膜または子宮癌腫、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝臓癌、及び種々の種類の頭頸部癌が挙げられる。

30

【0342】

そのようながんのより具体的な例には、卵巣癌、上皮卵巣癌、卵巣原発性腹膜癌、または卵管癌が含まれる。特定の実施形態では、がんは卵巣癌である。いくつかの実施形態では、卵巣癌は上皮卵巣癌（EOC）である。特定の実施形態では、卵巣癌（例えば、EOC）は、プラチナ抵抗性、再発性、または不応性である。特定の実施形態では、がんは腹膜癌である。特定の実施形態では、腹膜癌は原発性腹膜癌である。特定の実施形態では、がんは子宮内膜癌である。特定の実施形態では、子宮内膜癌は、漿液性子宮内膜癌である。いくつかの実施形態では、がんは肺癌である。いくつかの実施形態では、肺癌は、非小細胞肺癌（NSCLC）である。特定の実施形態では、肺癌は、肺癌は、腺癌または細気管支肺胞癌である。特定の実施形態では、がんは、子宮癌である。

40

【0343】

特定の実施形態では、がんはプラチナ不応性である。特定の実施形態では、がんは原発性プラチナ難治性である。特定の実施形態では、がんはプラチナ感受性である。

【0344】

特定の実施形態では、がんは、IMGN853抵抗性である。

【0345】

特定の実施形態では、がんは転移性または進行性のがんである。

【0346】

50

特定の実施形態では、がんは、F R 結合剤または抗体が結合する葉酸受容体を発現する。特定の実施形態では、がんは、ヒトF R を過剰発現する。

【0347】

いくつかの実施形態では、バイパラトピック抗F R 抗体、その抗原結合断片、イムノコンジュゲート、またはそれを含む医薬組成物は、米国公開出願2012/0282175または国際公開出願番号WO2012/135675（これらは両方とも、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるようなF R の増大した発現レベルを有する患者に投与される。F R の検出のための例示的な抗体、アッセイ、及びキットは、WO2014/036495及びWO2015/031815に提供され、これらは両方とも、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。したがって、いくつかの実施形態では、F R タンパク質の発現は、免疫組織化学（IHC）的に測定することができ、定義されたスコアを示す対照（例えば、較正対照）と比較して染色強度スコア及び/または染色均一性スコアを与えることができる（例えば、強度がレベル3の較正対照と同等であれば強度スコア3が試験試料に与えられ、強度がレベル2の較正対照と同等であれば強度スコア2（中程度）が試験試料に与えられる）。「焦点」（すなわち、0%より大きく25%未満の細胞が染色される）の代わりに「不均一」（すなわち、少なくとも25%及び75%未満の細胞が染色される）、または「均一」（すなわち、少なくとも75%の細胞が染色される）である染色均一性も増加したF R 発現を示す。染色強度及び染色均一性スコアは、単独で使用すること、組み合わせで使用すること、（例えば、2 homo、2 hetero、3 homo、3 heteroなど）。別の例では、F R 発現の増加は、対照値（例えば、がんを有さない対象、またはF R 値が上昇していないがんを有する対象からの組織または細胞における発現レベル）と比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、または少なくとも5倍の増加の検出によって決定することができる。いくつかの実施形態では、染色均一性スコアは、染色された細胞のパーセントに基づく。

【0348】

いくつかの実施形態では、がんは、IHCによって1 hetero以上のレベルでF R を発現するがんである。いくつかの実施形態では、がんは、IHCによって2 hetero以上のレベルでF R を発現するがんである。いくつかの実施形態では、がんは、IHCによって3 hetero以上のレベルでF R を発現するがんである。いくつかの実施形態では、がんは、IHCによって2 hetero以上のレベルでF R を発現する肺癌である。いくつかの実施形態では、がんは、IHCによって3 hetero以上のレベルでF R を発現する肺癌である。いくつかの実施形態では、がんは、IHCによって2 hetero以上のレベルでF R を発現する卵巣癌である。いくつかの実施形態では、がんは、IHCによって3 hetero以上のレベルでF R を発現する卵巣癌である。いくつかの実施形態では、がんは、IHCによって2 hetero以上のレベルでF R を発現する子宮内膜癌である。いくつかの実施形態では、がんは、IHCによって1 hetero以上のレベルでF R を発現する子宮内膜癌である。

【0349】

いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の少なくとも1つの細胞は、少なくとも1のF R スコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の少なくとも1つの細胞は、少なくとも2（中程度）のF R スコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の少なくとも1つの細胞は、少なくとも3のF R スコアを有する。

【0350】

いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の細胞の少なくとも25%は、少なくとも1のF R のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の細胞の少なくとも33%は、少なくとも1のF R のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の細胞の少なくとも50%は、少なくとも1のF R のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料

10

20

30

40

50

中の細胞の少なくとも66%は、少なくとも1のFR のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の細胞の少なくとも75%は、少なくとも1のFR のIHCスコアを有する。

【0351】

いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の細胞の少なくとも25%は、少なくとも2(中等度)のFR のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の少なくとも33%の細胞は、少なくとも2(中等度)のFR のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の25~75%の細胞は、少なくとも2(中等度)のFR のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の細胞の少なくとも50%が少なくとも2(中等度)のFR のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の少なくとも66%の細胞は、少なくとも2(中等度)のFR のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の少なくとも75%の細胞は、少なくとも2(中等度)のFR のIHCスコアを有する。

10

【0352】

いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の細胞の少なくとも25%は、少なくとも3のFR のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の少なくとも33%の細胞は、少なくとも3のFR のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の細胞の少なくとも50%が少なくとも3のFR のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の細胞の少なくとも66%は、少なくとも3のFR のIHCスコアを有する。いくつかの実施形態では、患者から得られた試料中の少なくとも75%の細胞は、少なくとも3のFR のIHCスコアを有する。

20

【0353】

いくつかの実施形態では、FR 発現は、免疫組織化学によって測定することができ、視覚的なスコアが与えられ、FR 陽性は、10倍以下の顕微鏡対物レンズでFR の膜の染色が可視化される腫瘍細胞が50%以上あることを指す。いくつかの実施形態では、FR 発現は、免疫組織化学によって測定することができ、視覚的なスコアが与えられ、FR 陽性は、10倍以下の顕微鏡対物レンズでFR の膜の染色が可視化される腫瘍細胞が66%以上あることを指す。いくつかの実施形態では、FR 発現は、免疫組織化学によって測定することができ、視覚的なスコアが与えられ、FR 陽性は、10倍以下の顕微鏡対物レンズでFR の膜の染色が可視化される腫瘍細胞が75%以上あることを指す。

30

【0354】

特定の実施形態において、対象はヒトである。

【0355】

本開示はさらに、本明細書に記載のバイパラトピック抗FR 抗体、その抗原結合断片、及びイムノコンジュゲートを使用する、腫瘍増殖を阻害するための方法を提供する。特定の実施形態では、腫瘍増殖を阻害する方法は、インビトロで、腫瘍を、本明細書で提供されるバイパラトピック抗FR 抗体、その抗原結合断片、及びイムノコンジュゲートと接触させることを含む。例えば、FR を発現する、不死化細胞株またはがん細胞株は、培地中で培養され、そこに、バイパラトピック抗FR 抗体、その抗原結合断片、及びイムノコンジュゲートが添加されて腫瘍増殖を阻害する。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、例えば、組織生検、胸水、または血液試料などの患者試料から単離され、培地中で培養され、そこに、バイパラトピック抗FR 抗体、その抗原結合断片、及びイムノコンジュゲートが添加されて腫瘍増殖を阻害する。

40

【0356】

いくつかの実施形態では、腫瘍増殖を阻害する方法は、インビボで、腫瘍または腫瘍細胞を、バイパラトピック抗FR 抗体、その抗原結合断片、及びイムノコンジュゲートと接触させることを含む。特定の実施形態では、腫瘍または腫瘍細胞を、バイパラトピック

50

抗 F R 抗体、その抗原結合断片、及びイムノコンジュゲートと接触させることは、動物モデル内で実施される。例えば、バイパラトピック抗 F R 抗体、その抗原結合断片、及びイムノコンジュゲートは、免疫無防備状態のマウス（例えば、N O D / S C I D マウス）で増殖した 1 つ以上複数の腫瘍を示す異種移植片に投与されて腫瘍増殖を阻害する。いくつかの実施形態では、がん幹細胞は、例えば、組織生検、胸水、または血液試料などの患者試料から単離され、免疫無防備状態のマウスに注射され、次いで、バイパラトピック抗 F R 抗体、その抗原結合断片、及びイムノコンジュゲートが投与されて腫瘍細胞増殖を阻害する。

【 0 3 5 7 】

特定の実施形態では、腫瘍増殖を阻害する方法は、治療有効量のバイパラトピック抗 F R 抗体、その抗原結合断片、及びイムノコンジュゲートを、対象に投与することを含む。特定の実施形態において、対象はヒトである。特定の実施形態では、対象は、腫瘍を有するか、または腫瘍が除去されている。

10

【 0 3 5 8 】

投与は、静脈内投与を含む非経口投与であってよい。

【 0 3 5 9 】

状態の治療に有効であるバイパラトピックイムノコンジュゲート、抗体もしくはその抗原結合断片、または組成物の量は、疾患の性質に依存するであろう。組成物に使用される正確な用量はまた、投与経路、及び疾患の重症度にも依存するであろう。

【 0 3 6 0 】

20

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、医薬として使用するための、バイパラトピック抗 F R 抗体、その抗原結合断片、イムノコンジュゲート、またはそれを含む医薬組成物である。いくつかの態様において、本明細書で提供されるのは、がんの治療のための方法における使用のための、バイパラトピック抗 F R 抗体、その抗原結合断片、イムノコンジュゲート、または医薬組成物である。いくつかの態様において、本明細書で提供されるのは、有効量の本明細書で提供されるバイパラトピック抗 F R 抗体、その抗原結合断片、イムノコンジュゲート、または医薬組成物を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療するための方法における使用のための、バイパラトピック抗 F R 抗体、その抗原結合断片、イムノコンジュゲート、または医薬組成物である。

【 0 3 6 1 】

30

一態様では、本開示のバイパラトピック抗 F R 抗体、その抗原結合断片、及びイムノコンジュゲートは、例えば生体試料中の、F R の存在を検出するために有用である。本明細書で使用される場合、「検出すること」という用語は、定量的または定性的な検出を包含する。特定の実施形態では、生体試料は、細胞または組織を含む。特定の実施形態では、そのような組織は、他の組織と比較して高いレベルで F R を発現する正常な組織及び/またはがん性組織を含む。特定の実施形態では、F R 過剰発現は、卵巣癌、肺癌、脳癌、乳癌、子宮癌、腎臓癌、または膵臓癌の存在を検出する。

【 0 3 6 2 】

特定の実施形態では、生体試料中で F R の存在を検出する方法は、生体試料を、バイパラトピック抗 F R 抗体、その抗原結合断片、またはイムノコンジュゲートの結合を可能にする条件下で、バイパラトピック抗 F R 抗体、その抗原結合断片、またはイムノコンジュゲートと接触させることと、抗 F R 抗体、その抗原結合断片、またはイムノコンジュゲートと、F R との間で複合体が形成されているか否かを検出することと、を含む。

40

【 0 3 6 3 】

特定の実施形態では、バイパラトピック抗 F R 抗体、その抗原結合断片、またはイムノコンジュゲートを標識する。標識には、直接検出される標識または部分（蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、及び放射性標識など）、ならびに例えば、酵素反応または分子相互作用を通じて、間接的に検出される酵素またはリガンドなどの部分が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 3 6 4 】

50

本開示の実施形態は、本開示の特定の抗体の調製及び本開示の抗体を使用するための方法を詳細に記載する以下の非限定的な例を参照することによってさらに定義することができる。材料と方法の両方に対する多くの修正が、本開示の範囲から逸脱することなく実施され得ることは、当業者には明白であろう。

【実施例】

【0365】

本明細書に記載される実施例及び実施形態は例示のみを目的とするものであり、それを考慮したさまざまな修正または変更が当業者に示唆され、それらは本出願の趣旨及び範囲内に含まれることは理解されよう。

【0366】

実施例1．パイパラトピック抗体の生成

二重特異性抗体の発現

上述のように、マウス抗FR 抗体のパネルは、標準的なハイブリドーマ技術によって生成され、表面再構成法を使用してヒト化された（例えば、WO2011/106528 A1を参照されたい）。抗体は、FACS競合アッセイを使用して、結合についてMov19と競合するか（Bin1）、そうでないか（Bin2；FR 抗体A、FR 抗体B、FR 抗体C、及びFR57）に応じて、2つのBinに分類された。簡潔に述べると、 1.5×10^{-9} MのM9346Aビオチン化抗体を、一般的に 5×10^{-8} M ~ 5×10^{-11} Mの範囲の濃度のFR 抗体A、FR 抗体B、FR 抗体C、及びFR57と混合した。完全な結合競合の対照として、ビオチン化されていないM9346A抗体を使用した。混合物を、ウェルあたり20,000個のFR 陽性KB細胞を含む96ウェルプレートに加え、プレートを氷上で1時間インキュベートした。次いで、細胞を冷リン酸緩衝生理食塩水/1%ウシ血清アルブミンで洗浄し、結合したhUM9346A-ビオチンをストレプトアビジン-PE試薬で検出した。FACSCaliburフローサイトメーターを使用して試料を分析した。図1に示すように、対照抗体M9346AのみがhUM9346A-ビオチンと結合について競合し、分析された4つのFR-抗体のいずれも、hUM9346A-ビオチンの結合を妨害しなかった。

【0367】

Bin1及びBin2抗体の可変領域（VH及びVL）を使用して、Morrisonのフォーマットと非対称Fcの2つの異なるフォーマットを使用していくつかのパイパラトピック分子を構築した。簡潔に述べると、Morrisonのフォーマットベースの分子について、Bin1またはBin2抗体のいずれかのVH及びVL領域に対応する配列を（G4S）4リンカーで接続して単鎖断片（scFv）を作成し、次いで、（G4S）3リンカーを使用して、Bin2またはBin1のIgG1の重鎖のC末端またはN末端に融合させた。非対称Fcベースのパイパラトピック分子は、ノブインホールテクノロジーを使用してFR57scFvとMov19 Fabで作成された（Protein Eng. 1996 Jul; 9(7): 617-21. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Ridgway JB, Presta LC, Carter, P）。簡潔に述べると、FR1-57scFvは、C220S（対になっていないシステインをセリンに変異させる）及びノブ変異（T366W）を含む操作されたFc領域に融合され、Mov19 Fab領域は、ホール変異（T366S、L368A、及びY407V）を含む操作されたFcに融合された。別段の記載がない限り、全てのナンバリングはEUシステムに基づいている。図2は、以降の実験で評価されたさまざまな抗体フォーマットを示す。

【0368】

特定の構築された分子の配列を表6~7に示す。これらの二重特異性抗体に対応する遺伝子は、標準的な分子生物学技術を使用して、コドン最適化され、合成され、プラスミドにクローニングされた。トランスフェクション用の軽鎖プラスミドと重鎖プラスミドの比率は、Morrisonベースの分子の場合1:3に、非対称Fcベースの分子の場合9

10

20

30

40

50

： 3 ： 1 (M o v 1 9 L C : M o v 1 9 H C - ホール : F R 5 7 s c F v - ノブ) に維持された。図 3 に示されるように、非対称 F c ベースの分子を生成するために、いくつかの重鎖及び軽鎖プラスミドトランスフェクション比が調査され、9 ： 3 ： 1 の比率が最小限のホモ二量体を示した。

【 0 3 6 9 】

全ての二重特異性抗体分子は、2 9 3 T で一過性に生成された。簡潔に述べると、2 9 3 T トランスフェクションの場合、振とうフラスコ内で、トランスフェクション試薬として P E I を使用して、懸濁に適合した H E K - 2 9 3 T 細胞で発現構築物を一時的に生成した。P E I 一過性トランスフェクションは、以前に記載されたように実施された (D u r o c h e r e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s . 3 0 (2) : E 9 (2 0 0 2)) が、ただし、H E K - 2 9 3 T 細胞は F r e e s t y l e 2 9 3 で増殖させ、P E I - D N A 複合体の添加後は培養液を希釈せずに残した。トランスフェクション物を 1 週間インキュベートし、回収した。

【 0 3 7 0 】

抗体精製

濾過された上清は、プロテイン A アフィニティーとセラミックヒドロキシアパタイト (C H T) の 2 つのクロマトグラフィーステップから本質的になるスキームを使用して精製された。簡潔に述べると、濾過した上清を、1 × P B S (p H 7 . 3 ± 0 . 1) で事前に平衡化したプロテイン A カラムにロードした。非特異的宿主細胞タンパク質を減少させるために、カラムを 1 × P B S (p H 7 . 3 ± 0 . 1) で洗浄した。結合した抗体は、5 0 m M 塩化ナトリウム (p H 3 . 2) を含む 2 5 m M 酢酸を使用して溶出し、1 M T r i s - b a s e で直ちに p H 7 . 0 ± 0 . 2 に中和した。中和されたブールは C H T 結合緩衝液 (1 5 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 0 ± 0 . 1) 中で 1 : 1 0 に希釈され、C H T 結合緩衝液で事前に平衡化したタイプ I I C H T カラム (4 0 μ m 粒経) にロードした。結合したタンパク質を直線勾配 (1 0 カラム容量で 1 5 m M から 1 6 0 m M のリン酸ナトリウム) を使用して溶出し、目的の画分 (サイズ排除クロマトグラフィー、S E C による高いモノマーパーセント) をブールし、1 × P B S (p H 7 . 3 ± 0 . 1) に対して透析し、濾過滅菌した。最終抗体濃度は、2 8 0 n m での吸光度と 1 . 4 4 m L m g ⁻¹ c m ⁻¹ の吸光係数を測定することによって決定された。

【 0 3 7 1 】

全ての精製実験は、インライン UV、導電率、及び pH プローブを備えた A K T A 精製システムで実施された。S E C 分析は、A g i l e n t H P L C 1 1 0 0 システムを使用して、カラムの寿命を延ばすためのインラインガードカラム (6 . 0 × 4 0 m m) も備えた T S K g e l G 3 0 0 0 S W X L カラム (7 . 8 × 3 0 0 m m) に 4 0 μ g の試料を注入することによって実行した。移動相には 5 0 m m のリン酸ナトリウム緩衝液と 4 0 0 m m の過塩素酸ナトリウムが含まれ、流速は 1 . 0 m L / 分であり、溶出は定組成であった。

【 0 3 7 2 】

実施例 2 . 抗体産生、安定性、及び機能的活性に対するバイパロットピック抗体フォーマットの影響

親 (B i n 1 及び B i n 2) 抗体の結合特性

表 1 0 は、B i n 1 及び B i n 2 抗体と組換え F R 抗原との結合の速度論的パラメーターを要約する。K D 値は、O c t e t 9 6 システム (F o r t e b i o) で実施されたバイオレイヤー干渉法を介して、基本的にメーカーの推奨手順に従って取得された。簡潔に述べると、抗ヒトまたは抗マウス - F c センサーを 1 × K i n e t i c B u f f e r (F o r t e b i o) に 1 0 分間事前に浸し、B i n 1 または B i n 2 I g G のいずれかの 5 μ g / m L と 5 分間インキュベートした。次いで、センサーを 1 × K i n e t i c B u f f e r に 5 分間移してベースラインを決定し、抗原の連続希釈液で結合 (1 0 分間) 、1 × K i n e t i c B u f f e r で解離 (1 0 分間) を順次行った。生データが収集され、処理され、F o r t e b i o 分析ソフトウェアを使用して単純な 1 : 1 結

合モデルに適合され、動的パラメーター K_{on} 及び K_{off} を決定した。

【表 10】

表 10.

名称	KD(M)	$K_{on}(1/Ms)$	$K_{off}(1/s)$
Mov19(Bin 1)	6×10^{-10}	5×10^5	3×10^{-4}
FR57(Bin 2)	1×10^{-9}	3×10^5	4×10^{-4}
FR α 抗体A(Bin 2)	4×10^{-9}	1×10^5	4×10^{-4}
FR α 抗体B(Bin 2)	1×10^{-8}	3×10^5	4×10^{-3}
FR α 抗体C(Bin 2)	3×10^{-9}	3×10^5	7×10^{-4}

10

【0373】

バイパトリック抗体の安定性

バイパトリック抗体は、Mov19抗体を別の重複しないエピトープを認識する抗体と組み合わせることによって作成された。特に、Morrisonのフォーマットに基づくIgGは、Bin IgGの1つからのscFvを別のBinからのIgGのC末端またはN末端に融合することによって生成された。表11に、調査した全ての組み合わせを示す。C末端に融合したscFvはVH-VL配向であり、N末端に融合したものはVL-VH配向であった。Mov19は、BrinkmannのVH44-VL100ジスルフィド安定化変異を含んで、または含まずに、VH-VL及びVL-VHの方向の両方でC末端のscFvとしてのみ探索された(PNAS 1993 August; 90(16): 7538-754. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. U Brinkmann, Y Reiter, S H Jung, B Lee, and I Pastan)。

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 1 .

名称	力価 (mg/L):293T	プロテインA後 のモノマー%	1週間にわた るモノマ ー%におけ る変化	scFvの位置
Morrisonのフォーマット				
Mov19-G1-FR α 抗体 -A-scFv1*	2.35	93	>5%	C末端
Mov19-G1-FR α 抗体 -B-scFv1*	2.24	<70		C末端
Mov19-G1-FR α 抗体 -C-scFv1*	0.4	<70		C末端
Mov19-G1-FR57scFv1*	4.43	91	<0.1%	C末端
FR α -抗体 -A-G1-Mov19scFv1*	6.37	75		C末端
FR α -抗体 -B-G1-Mov19scFv1*	9.35	<70		C末端
FR α -抗体 -C-G1-Mov19scFv1*	10.1	<70		C末端
FR α -抗体 -C-G1-Mov19scFv2	1.38	<70		C末端
FR α -抗体 -C-G1-Mov19scFv3	2.78	<70		C末端
FR57-G1-Mov19scFv1*	5	73	>5%	C末端
FR α -抗体 -A-scFv2-G1-Mov19*	11.2	72	>5%	N末端
FR α -抗体 -B-scFv2-G1-Mov19*	12.0	89	>5%	N末端
FR α -抗体 -C-scFv2-G1-Mov19*	6.2	83	>5%	N末端
FR57scFv2-G1-Mov19*	13.3	90	<0.1%	N末端
非対称-Fc				
FR57scFv2-ノブ /Mov19-ホール	26	87		該当せず
FR57scFv3wt-ノブ /Mov19-ホール	15	70		該当せず

【 0 3 7 4 】

表 9 に示すように、Morrison のフォーマットに基づくかなりの数のバイパトリック分子は、プロテイン A アフィニティー精製後で低いモノマーパーセントを有した。スケーラビリティまたは製造可能性は、モノマーパーセントまたは力価が低い構築物にとって課題となる可能性があるため、より高い力価及び 70 を超えるモノマー%を示した 8 つの構築物（表 9 にアスタリスクで示される）がさらなる評価のために選択された。これらの 8 つの構築物は、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを使用して 95 % を超える純度までさらに洗練され、さらに特性評価された。バイパトリックアームの結合に対する s c F v アームの全体的な分子立体配座または潜在的な構造変化の影響を

説明するために、8つのMorrison構築物の各アームの結合効率を競合FACSアッセイでアッセイした。簡潔に述べると、FR陽性T47D細胞を、対応するマウス親抗体と通常50nM~0.2nMの濃度範囲で混合した0.8nMのMorrison抗体とインキュベートした。氷上で2時間インキュベートした後、細胞を非結合抗体から洗い流し、結合したMorrison抗体を二次抗ヒトFITC標識抗体で検出した。親抗体の濃度を増加させた場合のMorrison抗体の結合の減少は、第2のアームのセットの結合に対する効果を示した。図4A~4H及び表12に示されるように、Morrisonの抗体の8つのうち5つは、完全に不活性であるか、または部分的に影響を受けたアームを有していた。機能アームの両方のセットを有する3つのMorrison抗体のうち、2つの抗体(FRα-抗体-A-scFv2-Mov19-IgG1及びFRα-抗体-C-scFv2-Mov19-IgG1)は安定性の問題を示した。これらのデータに基づいて、FR57scFv2-Mov19-IgG1(「4価」)がさらなる評価のために選択された。

【表12】

表12.

四価抗体	アーム結合(競争FACSによる)	
	Fab	scFv
Mov19:FRα-抗体-A-scFv	活性	不活性
FRα-抗体-A:Mov19scFv	活性	部分的に影響を受ける
Mov19:FR57scFv	活性	部分的に影響を受ける
FR57:Mov19scFv	活性	不活性
FRα-抗体-A-scFv:Mov19	活性	活性
FRα-抗体-B-scFv: Mov19	部分的に影響を受ける	活性
FRα-抗体-C-scFv: Mov19	活性	活性
FR57scFv:Mov19	活性	活性

【0375】

別の実験では、非対称Fc形式に基づく2つのバイパラトピック分子(FR57scFv2-ノブ-Mov19-ホール及びFR57scFv3wt-ノブ-Mov19-ホール)も発現した。FR57scFv2-ノブ-Mov19-ホール(「KIH」)はより高いモノマー%と力価を示し、さらなる評価のために選択された。図5に示すように、この分子は、非還元条件下でのゲル電気泳動で単一のバンド(約125kDaに対応する)として泳動し、還元条件下で3つのバンド(1つは軽鎖(約25kD)に対応し、2つは、同様のサイズ(それぞれ約50kDa)の重鎖(FR57scFv-Fc-ノブ及びMov19-HC-ホール)に対応する)に分解する。これらの結果は、FR57scFv2-ノブ-Mov19-ホールが細胞培養で正しく組み立てられ、精製中に分解しないことを示唆している。

【0376】

次に、FR57scFv2-ノブ-Mov19-ホール分子の安定性を、分子を40(1×PBS中の濃度:10mg/mL)で2週間加熱し、本質的に実施例1に記載の手順を用いてSEC分析を行うことによって評価した。図6は、0日目と14日目の試料のSECオーバーレイを示している。特に、凝集や切断は見られず、分子の安定性が良好であることを示唆している。

【0377】

抗体の結合とプロセッシング

抗体の結合とプロセッシングに対する抗体フォーマットの影響は、3[H]抗体を使用し

てインビトロで評価された。簡潔に述べると、FR 陽性KB細胞を飽和濃度の親、KIHバイパロピック、またはMorrison抗体に対して37℃で30分間曝露し、PBSで洗浄して未結合の抗体を除去し、新鮮な培地に再懸濁し、6%に加湿したCO₂雰囲気中で37℃で22時間インキュベートした。アセトン抽出及び液体シンチレーションカウンティングに続いて、タンパク質を含まない放射能（プロセシングされた抗体）及びタンパク質関連放射能（プロセシングしていない抗体）の量を評価し、データを使用して細胞あたりの抗体結合部位（ABC）、プロセシングされた抗体%、プロセシングされた抗体の量を計算した。予備実験は、親抗体M9346AとhuFR57のプロセシングが類似していることを示した。したがって、1つの親抗体（M9346A）のみがさらなる実験で使用された。

10

【0378】

両方のバイパロピックフォーマット（KIH及び4価）は、親抗体と比較して増加したプロセシングされた抗体の量を示した（図7C及び7D）。興味深いことに、2つのバイパロピックフォーマットの改善された送達/プロセシングのメカニズムが異なっていた。KIHバイパロピック抗体は、単一特異性親抗体よりも高いABC及び同様の内在化効率を有し（図7A～7D）、Morrisonの4価抗体は、改善された内在化効率及び親抗体に匹敵するABC値を示した（図7C及び7D）。2つのバイパロピックフォーマットについて分解された抗体の量は類似していた（図7E及び7F）。

【0379】

実施例3．バイパロピックFR 標的化イムノコンジュゲートの調製

20

FR57scfv-huMov19-スルホ-SPDB-DM4コンジュゲートの調製

FR57scfv-huMov19、スルホ-SPDB、及びDM4のモル濃度は、それぞれ280、343、412nmでのUV/Vis吸光度値と吸光係数を用いてベールの法則に従って計算された。リンカー濃度は、リンカーを50mMのリン酸カリウム緩衝液、50mMの塩化ナトリウムと2mMのEDTA、pH7.5中の25mMのDTTと反応させ、343nmでのチオピリジン放出を測定することによって決定した。薬物濃度は、DM4を50mMのリン酸カリウム緩衝液、50mMの塩化ナトリウム、2mMのEDTA、pH7.5中の10mMのDTNB[5,5-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)]と反応させ、412nmでの吸光度を測定することによって決定された。

【0380】

30

抗体コンジュゲーションの前に、1.5mMのスルホ-SPDBを30%水溶液[15mMのリン酸カリウムpH7.6]中の1.95mMのDM4及び70%有機[(N-N-ジメチルアセトアミド、DMA、SAFC)]と25℃で90分間反応させることにより、スルホ-SPDB-DM4インサイチュ混合物を調製した。コンジュゲーション反応中、2.5mg/mLの抗体溶液を、10%DMA(v/v)を含む15mMのリン酸カリウムpH7.6で、抗体の8～8.5倍モル過剰のスルホ-SPDB-DM4と25℃で15～20時間反応させた。反応物を、AKTA上のSephadex 25脱塩カラムを使用して10mMの酢酸塩、9%スクロース、0.01%Tween 20、pH5.0の製剤緩衝液中に精製し、0.22µmPVDFメンブレンを備えたシリンジフィルターで濾過した。

40

【0381】

抗体に対するコンジュゲートしたDM4のモル比(DAR)及びコンジュゲートしていないマイタンシノイド種のパーセンテージを以下のように決定した。精製されたコンジュゲートは、UV-Visによって3.4モルDM4/モル抗体、SECによって99.8%モノマー、HPLC Hisepカラム分析によって2%未満の遊離薬物であることがわかった。

【0382】

DARは、252及び280nmでのUV/Vis吸光度を測定することと、各成分の寄与を説明する二項方程式を使用してAb濃度及びDM4濃度を計算することとによって決定された。最終的なFR57scfv-huMov19-スルホ-SPDB-DM4コ

50

ンジュゲート試料に存在する非結合マイタンシノイドの量は、H I S E P カラム (2 5 c m × 4 . 6 m m 、 5 μ m) で分析した試料で観察されたピーク面積から計算した。コンジュゲート試料に存在する遊離マイタンシノイドパーセント (F M %) は、以下の式を使用して計算された：遊離マイタンシノイド % = (D M 4 による逆相 P A 2 5 2) / (D M 4 による逆相 P A 2 5 2 + D M 4 によるフロースルー P A 2 5 2) × 1 0 0 % 。

【 0 3 8 3 】

ノブインホール (K I H) - F R 5 7 s c f v - h u M o v 1 9 - スルホ - S P D B - D M 4 コンジュゲートの調製

抗体コンジュゲーションの前に、1 . 5 m M のスルホ - S P D B を 3 0 % 水溶液 [1 5 m M のリン酸カリウム p H 7 . 6) 中の 1 . 9 5 m M の D M 4 及び 7 0 % 有機 [(N - N - ジメチルアセトアミド、DMA、S A F C)] と 2 5 で 9 0 分間反応させることにより、スルホ - S P D B - D M 4 インサイチュ混合物を調製した。コンジュゲーション反応中、3 . 0 m g / m L の抗体溶液を、1 1 % D M A (v / v) を含む 1 5 m M のリン酸カリウム p H 7 . 6 で、抗体の 1 0 倍モル過剰のスルホ - S P D B - D M 4 と 2 5 で 1 5 ~ 2 0 時間反応させた。反応物を、N A P 脱塩カラムを使用して 1 0 m M のコハク酸塩、2 5 0 m M のグリシン、0 . 5 % スクロース、0 . 0 1 % T w e e n 2 0 、p H 5 . 5 の製剤緩衝液中に 2 回精製し、0 . 2 2 μ m P V D F メンブレンを備えたシリンジフィルターで濾過した。精製されたコンジュゲートは、U V - V i s によって 2 . 9 モル D M 4 / モル抗体、S E C によって 9 0 . 6 % モノマー、H P L C H i s e p カラム分析によって 1 % 未満の遊離薬物であることがわかった。

【 0 3 8 4 】

F R 5 7 s c f v - h u M o v 1 9 - D M 2 1 コンジュゲートの調製

F R 5 7 s c f v - h u M o v 1 9 、スルホ - G M B S 、及び D M 2 1 のモル濃度は、それぞれ 2 8 0 、3 4 3 、4 1 2 n m での U V / V i s 吸光度値と吸光係数を用いてベールの法則に従って計算された。リンカー濃度は、リンカーを 5 0 m M のリン酸カリウム緩衝液、5 0 m M の塩化ナトリウムと 2 m M の E D T A 、p H 7 . 5 中の 2 5 m M の D T T の 5 0 m M の D T T と反応させ、3 4 3 n m でのチオピリジン放出を測定することによって決定した。薬物濃度は、D M 2 1 を 5 0 m M のリン酸カリウム緩衝液、5 0 m M の塩化ナトリウム、2 m M の E D T A 、p H 7 . 5 中の 1 0 m M の D T N B [5 , 5 - ジチオビス - (2 - ニトロ安息香酸)] と反応させ、4 1 2 n m での吸光度を測定することによって決定された。

【 0 3 8 5 】

コンジュゲーションの前に、1 . 5 m M のスルホ - G M B S を、それぞれ 6 0 / 4 0 (v / v) D M A 及びコハク酸緩衝液 p H 5 . 0 中の 1 . 9 5 m M の D M 2 1 と反応させることにより、スルホ - G M B S - D M 2 1 のインサイチュ混合物を調製した。コンジュゲーションは、1 0 % D M A (v / v) を含む、6 0 m M の 4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンプロパンスルホン酸 (E P P S) p H 8 . 0 中の 2 . 5 m g / m L の抗体に対して 6 . 5 リンカー過剰のスルホ - G M B S - D M 2 1 で実施された。2 5 で 2 0 ~ 2 2 時間インキュベートした後、反応物を、N A P 脱塩カラムを使用して 1 0 m M のコハク酸塩、2 5 0 m M のグリシン、0 . 5 % スクロース、0 . 0 1 % T w e e n 2 0 、p H 5 . 5 中に精製し、0 . 2 2 μ m P V D F メンブレンフィルターで濾過した。

【 0 3 8 6 】

抗体に対するコンジュゲートした D M 2 1 のモル比 (D A R) 及びコンジュゲートしていないマイタンシノイド種のパーセンテージを以下のように決定した。精製されたコンジュゲートは、U V - V i s によって 3 . 7 モル D M 2 1 / モル抗体、S E C によって 9 8 % モノマー、H P L C H i s e p カラム分析によって 2 % 未満の遊離薬物であることがわかった。

【 0 3 8 7 】

抗体に対するコンジュゲートした D M 2 1 のモル比 (D A R) は、2 5 2 及び 2 8 0 n m での U V / V i s 吸光度を測定することと、各成分の寄与を説明する二項方程式を使用

してA b濃度及びDM 2 1濃度を計算することによって決定された。最終的なFR 5 7 s c f v - h u M o v 1 9 - G M B S - D M 2 1 Lコンジュゲート試料に存在する非結合マイタンシノイドの量は、H I S E Pカラム (2 5 c m × 4 . 6 m m 、 5 μ m) で分析した試料で観察されたピーク面積から計算した。コンジュゲート試料に存在する遊離マイタンシノイドパーセント (F M %) は、以下の式を使用して計算された：遊離マイタンシノイド % = (D M 2 1 による逆相 P A 2 5 2) / (D M 2 1 による逆相 P A 2 5 2 + D M 2 1 によるフロースルー P A 2 5 2) × 1 0 0 %。

【 0 3 8 8 】

ノブインホール (K I H) - F R 5 7 s c f v - h u M o v 1 9 - G M B S - D M 2 1 L
コンジュゲートの調製

K I H - F R 5 7 s c f v - h u M o v 1 9 - G M B S - D M 2 1 Lの最初のバッチは、インサイチュ混合物中のより低濃度の薬物とリンカー、及びコンジュゲーションプロセス中のより低濃度の抗体を使用して調製した。簡潔に述べると、コンジュゲーションの前に、1 . 5 m Mのスルホ - G M B Sを、それぞれ6 0 / 4 0 (v / v) D M A及びコハク酸緩衝液p H 5 . 0中の1 . 9 5 m MのD M 2 1と反応させることにより、スルホ - G M B S - D M 2 1のインサイチュ混合物を調製した。コンジュゲーションは、1 0 % D M A (v / v)を含む、6 0 m Mの4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンプロパンスルホン酸 (E P P S) p H 8 . 0中の2 . 5 m g / m Lの抗体に対して7 . 5 リンカー過剰のスルホ - G M B S - D M 2 1で実施された。2 5 で2 0 ~ 2 2時間インキュベートした後、反応物を、N A P脱塩カラムを使用して1 0 m Mのコハク酸塩、2 5 0 m Mのグリシン、0 . 5 %スクロース、0 . 0 1 % T w e e n 2 0、p H 5 . 5中に2回精製し、0 . 2 2 μ m P V D Fメンブレンフィルターで濾過した。精製されたコンジュゲートは、U V - V i sによって3 . 1モルD M 2 1 / モル抗体、S E Cによって9 9 . 1 %モノマー、H P L C H i s e pカラム分析によって2 %未満の遊離薬物であることがわかった。

【 0 3 8 9 】

薬物動態及び有効性研究で使用するためのK I H - F R 5 7 s c f v - h u M o v 1 9 - G M B S - D M 2 1 Lのその後のバッチは、インサイチュ混合物中のより高濃度の薬物とリンカー、及びコンジュゲーションプロセス中のより高濃度の抗体を使用して調製した。簡潔に述べると、コンジュゲーションの前に、3 m Mのスルホ - G M B Sを、それぞれ6 0 / 4 0 (v / v) D M A及びコハク酸緩衝液p H 5 . 0中の3 . 9 m MのD M 2 1と反応させることにより、スルホ - G M B S - D M 2 1のインサイチュ混合物を調製した。コンジュゲーションは、1 0 % D M A (v / v)を含む、6 0 m Mの4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンプロパンスルホン酸 (E P P S) p H 8 . 0中の5 . 7 ~ 6 m g / m Lの抗体に対して6 . 5 ~ 7 リンカー過剰のスルホ - G M B S - D M 2 1で実施された。2 5 で2 0 ~ 2 2時間インキュベートした後、反応物を、A K T A上のS e p h a d e x - 2 5脱塩カラムを使用して1 0 m Mのコハク酸塩、2 5 0 m Mのグリシン、0 . 5 %スクロース、0 . 0 1 % T w e e n 2 0、p H 5 . 5中に精製し、0 . 2 2 μ m P V D Fメンブレンフィルターで濾過した。精製されたコンジュゲートは、U V - V i sによって3 . 1モルD M 2 1 / モル抗体、S E Cによって9 8 . 7 %モノマー、H P L C H i s e pカラム分析によって2 %未満の遊離薬物であることがわかった。

【 0 3 9 0 】

D A Rが3 . 5のK I H - F R 5 7 s c f v - h u M o v 1 9 - G M B S - D M 2 1 L構築物を含む組成物を「 I M G N 1 5 1 」と呼ぶ。

【 0 3 9 1 】

実施例 4 . イムノコンジュゲートの有効性に対するバイパルトピック抗体フォーマットの効果

バイパルトピックイムノコンジュゲートのインビトロ細胞傷害性

イムノコンジュゲートの細胞傷害性に対するバイパルトピック抗体フォーマットの効果は、K B、I g r o v - 1、及びT 4 7 D細胞を使用してインビトロで評価された。親抗

10

20

30

40

50

体、K I H抗体、及びM o r r i s s o n抗体のスルホ - S P D B - D M 4 コンジュゲートを、実施例 3 に記載の方法に従って調製した。コンジュゲートを適切な培地で希釈し、 1×10^3 細胞 / ウェルを含む 96 ウェル平底プレートのウェルに添加した。プレートを 37、6% C O₂ で 5 日間インキュベートした。細胞生存率は、製造元のプロトコールに従って W S T - 8 アッセイによって決定され、I C₅₀ は、シグモイド用量反応 (可変勾配) 非線形回帰カーブフィット (G r a p h P a d S o f t w a r e I n c) を使用して生成された。

【表 13】

表 13.

細胞株	FR α 密度 (1000倍)、抗FR α 従来型抗体 -PE FACS	抗体-スルホ-SPDB-DM4、IC ₅₀ 、nM		
		親(M9346A)	2価、KIH	4価、Morrison
KB	約4,000	0.1	0.09	0.07
Igrov-1	500	2.0	0.2	0.2
T47D	100	20.0	0.2	1.0

10

【0392】

バイパルトピックスルホ - S P D B - D M 4 コンジュゲートは両方とも、試験した 3 つの中程度から低い F R 発現細胞株のうち 2 つ (I g r o v - 1 及び T 4 7 D) に対して、親抗体コンジュゲートよりも高い活性であった。3 つのコンジュゲートに同等に感受性のある唯一の細胞株は K B であり、これは非常に高レベルの標的発現を有する。K I H コンジュゲートは、T 4 7 D 細胞株 (すなわち、標的発現のレベルが最も低い細胞) に対して M o r r i s s o n フォーマットコンジュゲートよりも高い細胞傷害活性を示した。しかしながら、K I H コンジュゲートと M o r r i s s o n のフォーマットコンジュゲートはどちらも、分析された他の 2 つの細胞株に対して同等に活性であった。

20

【0393】

O V - 90 ヒト卵巣癌異種移植片を有する S C I D マウスにおける 4 価バイパルトピック A D C のインビボ抗腫瘍活性

30

イムノコンジュゲートの治療効果に対する 4 価のバイパルトピック抗体フォーマットの効果は、O V - 90 異種移植モデルを使用してインビボで評価された。マウスは腫瘍体積によって群に無作為化され (群あたり n = 6)、その後接種後 7 日目に投与された。これらの群には、製剤緩衝液を投与した対照群、2.5 及び 5 m g / k g の 4 価 - s - S P D B - D M 4、ならびに 2.5 及び 5 m g / k g の M - s - S P D B - D M 4 が含まれていた。全てのマウスに、上述の化合物を単回静脈内投与した。接種後 80 日目に研究を終了した。

【0394】

腫瘍体積は、キャリパーを使用して 3 次元で週に 2 回測定された。体積は、式、体積 = $1/2$ (長さ \times 幅 \times 高さ) を使用して m m³ で表された。(C a n c e r C h e m o t h e r . P h a r m a c o l . 1989 (24): 148 - 154 . D e t e r m i n a t i o n o f s u b c u t a n e o u s t u m o r s i z e i n a t h y m i c (n u d e) m i c e . M M T o m a y k o a n d C P R e y n o l d s) . 試験剤の毒性の大まかな指標として、体重を週に 2 回測定した。活性を、C a n c e r R e s . 1991 S e p t . (51): 4845 - 4852 . E x p e r i m e n t a l A n t i t u m o r A c t i v i t y o f T a x o t e r e (R P 56976 , N S C 628503) , a T a x o l A n a l o g u e . M B i s s e r y , D G u e n a r d , F G u e r i t t e - V o e g e l e i n , e t a l に記載されるように評価した。

40

【0395】

50

研究の結果を図 8 及び表 1 4 に示す。4 価 - s - S P D B - D M 4 コンジュゲートは 2 . 5 と 5 m g / k g 用量の両方で活性であり、それぞれ T / C が 1 3 % 及び 1 1 % であった。2 . 5 m g / k g 用量では、T - C が 3 2 日、L C K が 1 . 2 5 (活性)、P R が 2 / 6、C R が 0 / 6 であった。5 m g / k g 用量では、T - C が 4 7 日、L C K が 1 . 8 4 (活性)、P R が 2 / 6、C R が 2 / 6、T F S が 1 / 6 であった。M - s - S P D B - D M 4 コンジュゲートは 2 . 5 m g / k g 用量で活性であり、T / C が 2 6 % であり、5 m g / k g 用量で高い活性であり、T / C が 3 % であった。2 . 5 m g / k g 用量では、T - C が 2 5 日、L C K が 0 . 9 8 (不活性) で、退縮はなかった。腫瘍体積が小さい場合の壊死のため、5 m g / k g 群の T - C 及び L C K を決定できなかった。しかしながら、この群では、P R が 4 / 6、C R が 3 / 6、T F S が 3 / 6 であった。接種後 1 3 日目に最下点で研究の全ての群において 2 ~ 5 % の最小限の体重減少があった。この研究の結果は、4 価の A D C フォーマットが親コンジュゲートよりも活性の改善をもたらさないことを示している。

10

【表 1 4】

表 1 4 .

群 (s-SPDB-DM4)	抗体用量 (mg/kg)	T/C% (27日目)	PR	CR	結果
4 価	2.5	13%	2/6	0/6	活性
4 価	5	11%	2/6	2/6	活性
M	2.5	26%	0/6	0/6	活性
M	5	3%	4/6	3/6	高い活性

20

【0 3 9 6】

I G R O V - 1 ヒト卵巣癌異種移植片を有する S C I D マウスにおける 4 価バイパラトピック A D C のインビボ抗腫瘍活性

イムノコンジュゲートの治療効果に対する 4 価のバイパラトピック抗体フォーマットの効果は、I G R O V - 1 異種移植モデルを使用してインビボで評価された。マウスは腫瘍体積によって群に無作為化され (群あたり $n = 8$)、その後接種後 1 1 日目に投与された。これらの群には、製剤緩衝液を投与した対照群、1 0 0 μ g / k g の 4 価 - s - S P D B - D M 4、及び 1 0 0 μ g / k g の M - s - S P D B - D M 4 が含まれていた。4 価抗体と親抗体の分子量の違い (すなわち、5 0 k D a の違い) による 4 価コンジュゲートの過少投与の可能性を説明するために、この研究及び今後の全ての研究では、用量をペイロードによって正規化した。全てのマウスに、上述の化合物を単回静脈内投与した。接種後 8 1 日目に研究を終了した。腫瘍の測定及び計算は、上述のサブセクション「O V - 9 0 ヒト卵巣癌異種移植片を有する S C I D マウスにおける 4 価バイパラトピック A D C のインビボ抗腫瘍活性」に記載されているように決定された。

30

【0 3 9 7】

研究の結果を図 9 及び表 1 5 に示す。4 価 - s - S P D B - D M 4 と親の M - s - S P D B - D M 4 コンジュゲートは両方とも 1 0 0 μ g / k g で活性であり、それぞれ、T / C が 2 1 % 及び 1 5 % であった。腫瘍体積が小さい場合の壊死のため、いずれの群も T - C 及び L C K を決定できなかった。四価コンジュゲートは、P R が 2 / 8、C R が 1 / 8、T F S が 0 / 8 であったが、M - s - S P D B - D M 4 は、P R が 3 / 8、C R が 1 / 8、T F S が 0 / 8 であった。接種後 1 4 日目に最下点で 8 % の体重減少があった 1 0 0 μ g / k g の 4 価 A D C を除いて、研究のほとんどの群で最小限の体重減少があった。同様に、この研究の結果は、4 価の A D C フォーマットが親コンジュゲートよりも活性の改善をもたらさないことを示している。

40

【表 1 5】

表 1 5.

群 (s-SPDB-DM4)	DM用量 (μ g/kg)	T/C% (31日目)	PR	CR	結果
4価	100	21%	2/8	1/8	活性
M	100	15%	3/8	1/8	活性

【0398】

OV-90 ヒト卵巣癌異種移植片を有するSCIDマウスにおけるKIHバイパロピックADCのインビボ抗腫瘍活性

10

イムノコンジュゲートの治療効果に対するKIHバイパロピック抗体フォーマットの効果は、OV-90 異種移植モデルを使用してインビボで評価された。マウスは腫瘍体積によって群に無作為化され（群あたり $n = 6$ ）、その後接種後7日目に投与された。これらの群には、製剤緩衝液を投与した対照群、40、20、及び $10 \mu\text{g/kg}$ の KIH-s-SPDB-DM4、ならびに $20 \mu\text{g/kg}$ の M-s-SPDB-DM4 が含まれていた。全てのマウスに、上述の化合物を単回静脈内投与した。接種後80日目に研究を終了した。腫瘍の測定及び計算は、サブセクション「OV-90 ヒト卵巣癌異種移植片を有するSCIDマウスにおける4価バイパロピックADCのインビボ抗腫瘍活性」に記載されているように決定された。

20

【0399】

研究の結果を図10及び表16に示す。KIH-s-SPDB-DM4コンジュゲートは $40 \mu\text{g/kg}$ で高い活性であり、 $20 \mu\text{g/kg}$ で活性であり、 $10 \mu\text{g/kg}$ で不活性であり、それぞれのT/Cが6%、12%、及び83%であった。 $40 \mu\text{g/kg}$ 用量群では、T-Cが29日、LCKが1.84（活性）、PRが3/6、CRが2/6、TFSが0/6であった。 $20 \mu\text{g/kg}$ 用量群では、T-Cが38日、LCKが1.32（活性）で、退縮はなかった。 $10 \mu\text{g/kg}$ 群では、T-Cが2日、LCKが0.09（不活性）で、退縮はなかった。親のM-s-SPDB-DM4コンジュゲートは $20 \mu\text{g/kg}$ で不活性であり、T/Cは81%で、退縮はなかった。腫瘍体積が小さい場合の壊死のため、この群のT-C及びLCKを決定できなかった。この研究では体重減少は観察されなかった。4価コンジュゲートで実施された研究とは対照的に、KIH-s-SPDB-DM4はM-s-SPDB-DM4よりも顕著に高い活性を示した。これらの研究の結果に基づいて、さらなる評価のために、4価フォーマットよりもKIHフォーマットが選択された。

30

【表 1 6】

表 1 6.

群(s-SPDB-DM4)、 エフェクター用量	T/C%	退縮		結果
		部分	完全	
KIH 40 $\mu\text{g/kg}$	6%	3/6	2/6	高い活性
KIH 20 $\mu\text{g/kg}$	12%	0/6	0/6	活性
KIH 10 $\mu\text{g/kg}$	83%	0/6	0/6	不活性
M 20 $\mu\text{g/kg}$	81%	0/6	0/6	不活性

40

【0400】

実施例5. DM21にコンジュゲートしたノブインホールバイパロピック抗体のインビトロ活性

DM21にコンジュゲートしたノブインホールバイパロピック抗体のインビトロ細胞傷

50

害性

DM 2 1 にコンジュゲートした K I H バイパルトピック抗体のインビトロ細胞傷害性を、実施例 4 に記載のプロトコール（「バイパルトピックイムノコンジュゲートのインビトロ細胞傷害性」）に従って複数の細胞株で評価した。以前の研究では、2 つの親 DM 2 1 コンジュゲート（M - DM 2 1 及び h u F R 5 7 - DM 2 1）の活性が非常に類似していることが示された（図 1 1）。さらなる全ての研究において、K I H - DM 2 1 の活性を親 M 抗体のコンジュゲート（M - s - S P D B - DM 4 及び M - DM 2 1）と比較して、K I H - DM 2 1 の全体的な細胞傷害性に対するバイパルトピックフォーマット及び DM 2 1 ペイロードの寄与を評価した。

【 0 4 0 1 】

K I H - DM 2 1 は、試験した 5 つの細胞株のうち 3 つ（I g r o v - 1、T 4 7 D、及び J H O S - 4）に対して、2 つの親コンジュゲートよりも顕著に高い活性であった（図 1 2 A ~ 1 2 E）。さらに、DM 2 1 リンカー / ペイロードを含む 2 つのコンジュゲート（K I H - DM 2 1 及び M - DM 2 1）は J e g - 3 細胞に対して同様に活性であったが、M - s - S P D B - DM 4 コンジュゲートはこの細胞株に対してより低い活性を示した。最高 F R 発現レベルを示す唯一の細胞株（K B）は、全ての 3 つのコンジュゲートに同様に感受性であった。したがって、これらの結果は、K I H - DM 2 1 が、親抗体のコンジュゲート（M - s - S P D B - DM 4 及び M - DM 2 1）と比較して、ほとんどの試験された細胞株に対して増加した活性を示すことを示している。

【 0 4 0 2 】

さらに、K I H - DM 2 1 と親の単一特異性抗体の結合、内在化、及びプロセッシングを、³H 抗体を使用して比較した。中程度（J H O S - 4）及び高い（K B）F R 発現を有する腫瘍細胞では、K I H - DM 2 1 は抗体結合イベント及びプロセッシングを、それぞれ 1 0 0 % 及び 1 7 0 % プーストした。

【 0 4 0 3 】

DM 2 1 にコンジュゲートしたノブインホールバイパルトピック抗体のバイスタンダー殺傷活性

混合細胞培養において F R 細胞を殺傷する K I H - DM 2 1 の能力は、複数の細胞株を使用してインビトロで評価された。他のインビトロ細胞傷害性実験と一致して、親抗体コンジュゲート M - DM 2 1 及び M - s - S P D B - DM 4 を対照として使用した。標的陽性細胞（K B、I g r o v - 1、J e g - 3 または T 4 7 D）と標的陰性細胞 N a m a l w a / l u c（すなわち、ルシフェラーゼを発現する N a m a l w a 細胞）の混合培養を 0 . 5 n M のコンジュゲートに曝露した。この濃度のコンジュゲートは、細胞を単独でインキュベートした場合、標的陰性細胞に対して毒性がない。混合培養における標的陽性細胞のさまざまなパーセンテージ（9 % ~ 5 0 %）がその後、試験された。5 日間の曝露後、混合物中の標的陰性細胞の細胞増殖の阻害は、製造元のプロトコールに従って O n e G l o（P r o m e g a）によって決定された。

【表 1 7】

表 1 7

FR α + 細胞株	FR α 発現(従来の抗体-PEを用いた FACSによる)	90%のFR α + 細胞を殺傷するのに十分な代謝物を生成するために必要なFR α + 細胞の%		
		IMGN853	M-DM21	KIH-DM21
KB	約2,000,000	30	30	10未満
Igov-1	500,000	50を超える	35	10
Jeg-3	150,000	50を超える	40	40
T47D	100,000	70を超える	70を超える	65

【 0 4 0 4 】

試験した全ての混合培養で、K I H - DM 2 1 が最も高いバイスタンダー活性を示し、

M - DM 2 1 がそれに続いた。M - s - SPDB - DM 4 は、図 1 3 A ~ 1 3 D 及び表 1 7 に示すように、最も活性の低いコンジュゲートであった。

【 0 4 0 5 】

まとめると、これらのデータは、DM 2 1 リンカー / ペイロードと組み合わされた K I H バイパラトピックフォーマットが、DM 2 1 または s - SPDB - DM 4 にコンジュゲートした親抗体と比較してインビトロの有効性の向上をもたらしたことを示している。

【 0 4 0 6 】

実施例 6 . K I H バイパラトピックイムノコンジュゲートのインビボ有効性

OV - 9 0 ヒト卵巣癌異種移植片を有する SCID マウスにおける K I H バイパラトピック ADC のインビボ抗腫瘍活性

低い FR 発現 (Hスコア 3 0) を有する OV - 9 0 異種移植モデルで、K I H - DM 2 1 のインビボ有効性を評価し、K I H - s - SPDB - DM 4 と比較した。マウスは腫瘍体積によって群に無作為化され (群あたり n = 6)、その後接種後 7 日目に投与された。これらの群には、製剤緩衝液を投与した対照群、4 0、2 0、及び 1 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ の K I H - s - SPDB - DM 4、4 0、2 0、及び 1 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ の K I H - DM 2 1、2 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ の M - DM 2 1、ならびに 2 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ の M - s - SPDB - DM 4 が含まれていた。全てのマウスに、上述の化合物を単回静脈内投与した。接種後 8 0 日目に研究を終了した。腫瘍の測定及び計算は、実施例 4 のサブセクション「OV - 9 0 ヒト卵巣癌異種移植片を有する SCID マウスにおける 4 価バイパラトピック ADC のインビボ抗腫瘍活性」に記載されているように決定された。

【 0 4 0 7 】

研究の結果を図 1 4 A ~ 1 4 B 及び表 1 8 に示す。K I H - s - SPDB - DM 4 の 4 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 用量群では、T - C が 2 9 日、LCK が 1 . 8 4 (活性)、PR が 3 / 6、CR が 2 / 6、TFS が 0 / 6 であった。2 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 用量群では、T - C が 3 8 日、LCK が 1 . 3 2 (活性) で、退縮はなかった。1 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 群では、T - C が 2 日、LCK が 0 . 0 9 (不活性) で、退縮はなかった。親の M - s - SPDB - DM 4 コンジュゲートは 2 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ で不活性であり、T / C は 8 1 % で、退縮はなかった。腫瘍体積が小さい場合の壊死のため、この群の T - C 及び LCK を決定できなかった。K I H - DM 2 1 コンジュゲートは、全ての用量で非常に高い活性であり、4 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 用量に対して T / C は 1 % で、2 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 用量に対して 7 % で、1 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 用量に対して 9 % であった。4 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 用量では、T - C が 5 3 日、LCK が 2 . 4 9 (活性)、PR が 5 / 6、CR が 5 / 6、TFS が 3 / 6 であった。2 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 用量では、T - C が 4 2 日、LCK が 1 . 9 8 (活性)、PR が 3 / 6、CR が 2 / 6、TFS が 1 / 6 であった。1 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 用量では PR が 2 / 6、CR が 0 / 6 であった。腫瘍体積が小さい場合の壊死のため、この群の T - C 及び LCK を決定できなかった。M - DM 2 1 コンジュゲートは 2 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ で活性であり、T / C が 2 2 %、T - C が 3 0 日、LCK が 1 . 4 1 (活性) で、退縮はなかった。この研究では体重減少は観察されなかった。要約すると、DM 2 1 コンジュゲートは、この研究の親フォーマットと K I H バイパラトピックフォーマットの両方で s - SPDB - DM 4 コンジュゲートよりも活性であった。さらに、バイパラトピック K I H コンジュゲートは、同じリンカー / ペイロードフォーマット内での釣り合った 2 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 用量で、それらの親の対応物よりもより活性であった。これらの結果に基づいて、K I H - DM 2 1 が追加の異種移植モデルでの評価のために選択された。

10

20

30

40

50

【表 18】

表 18.

群、エフェクター用量	T/C%	退縮		結果
		部分	完全	
KIH-DM21 40 μ g/kg	1%	5/6	5/6	高い活性
KIH-DM21 20 μ g/kg	7%	3/6	2/6	高い活性
KIH-DM21 10 μ g/kg	9%	2/6	0/6	高い活性
KIH-s-SPDB-DM4 40 μ g/kg	6%	3/6	2/6	高い活性
KIH-s-SPDB-DM4 20 μ g/kg	12%	0/6	0/6	活性
KIH-s-SPDB-DM4 10 μ g/kg	83%	0/6	0/6	不活性
M-DM21 20 μ g/kg	22%	0/6	0/6	活性
M-s-SPDB-DM4 20 μ g/kg	81%	0/6	0/6	不活性

10

【0408】

Ishikawa ヒト子宮内膜腺癌異種移植片を有する SCID マウスにおける KIH バイパラトピック ADC のインビボ抗腫瘍活性

中程度の FR 発現 (Hスコア 100) を有する Ishikawa 異種移植モデルで、DM21 にコンジュゲートした KIH バイパラトピック抗体のインビボ有効性を評価した。

20

【0409】

マウスは腫瘍体積によって群に無作為化され (群あたり $n = 6$)、その後接種後 11 日目に投与された。これらの群には、製剤緩衝液を投与した対照群、100、50、及び 25 μ g/kg の KIH-DM21、100 及び 50 μ g/kg の M-DM21、ならびに 100 μ g/kg の M-s-SPDB-DM4 が含まれていた。全てのマウスに、上述の化合物を単回静脈内投与した。接種後 90 日目に研究を終了した。腫瘍の測定及び計算は、実施例 4 のサブセクション「OV-90 ヒト卵巣癌異種移植片を有する SCID マウスにおける 4 価バイパラトピック ADC のインビボ抗腫瘍活性」に記載されているように決定された。

【0410】

30

研究の結果を図 15 及び表 19 に示す。KIH-DM21 コンジュゲートは 100 及び 50 μ g/kg で高い活性であったが、25 μ g/kg で不活性であり、それぞれ、T/C が 0%、9%、及び 78% であった。100 μ g/kg 用量では、T-C が 63 日を超え、LCK が 3.33 を超え (高い活性)、PR が 6/6、CR が 5/6、TFS が 4/6 であった。50 μ g/kg 用量では PR が 3/6、CR が 0/6 であった。腫瘍体積が小さい場合の壊死のため、この群の T-C 及び LCK を決定できなかった。25 μ g/kg 用量では、T-C が 2 日、LCK が 0.11 (不活性) で、退縮はなかった。M-DM21 コンジュゲートは 130 μ g/kg で高い活性であり、70 μ g/kg で活性であり、それぞれ、T/C が 0% 及び 11% であった。130 μ g/kg 用量では、T-C が 63 日を超え、LCK が 3.33 を超え (高い活性)、PR が 6/6、CR が 6/6、TFS が 0/6 であった。50 μ g/kg 用量では、T-C が 27 日、LCK が 1.43 (活性)、PR が 4/6、CR が 2/6、TFS が 0/6 であった。100 μ g/kg での M-s-SPDB-DM4 コンジュゲートは高い活性であり、T/C が 1%、PR が 6/6、CR が 3/6 であった。腫瘍体積が小さい場合の壊死のため、この群の T-C 及び LCK を決定できなかった。この研究の全ての群で、1~5% の最小限の体重減少があった。要約すると、KIH-DM21 は、100 μ g/kg で投与した場合、親コンジュゲート M-DM21 及び M-s-SPDB-DM4 よりも顕著に高い活性であった。3 つのコンジュゲートは全て 100 μ g/kg で高い活性であったが、応答の持続時間は、親抗体コンジュゲートよりも KIH バイパラトピック ADC の方がはるかに長かった。

40

50

【表 19】

表 19.

群、エフェクター用量	T/C%	退縮		TFS	結果
		部分	完全		
KIH-DM21 100 μ g/kg	0%	6/6	5/6	4/6	高い活性
KIH-DM21 50 μ g/kg	9%	3/6	0/6	0/6	高い活性
KIH-DM21 25 μ g/kg	78%	0/6	0/6	0/6	不活性
M-DM21 約130 μ g/kg	0%	6/6	6/6	0/6	高い活性
M-DM21 約70 μ g/kg	11%	4/6	2/6	0/6	活性
M-s-SPDB-DM4 100 μ g/kg	1%	6/6	0/6	0/6	高い活性

10

【0411】

I G R O V - 1 ヒト卵巣癌異種移植片を有する S C I D マウスにおける K I H バイパラトピック A D C のインビボ抗腫瘍活性

中程度の F R 発現 (H スコア 140) を有する I G R O V - 1 異種移植モデルで、D M 21 にコンジュゲートした K I H バイパラトピック抗体のインビボ有効性を評価した。マウスは腫瘍体積によって群に無作為化され (群あたり n = 8)、その後接種後 10 日目に投与された。これらの群には、製剤緩衝液を投与した対照群、100 及び 50 μ g / k g の K I H - D M 21、130 及び 70 μ g / k g の M - D M 21、ならびに 100 及び 50 μ g / k g の M - s - S P D B - D M 4 が含まれていた。全てのマウスに、上述の化合物を単回静脈内投与した。接種後 120 日目に研究を終了した。腫瘍の測定及び計算は、実施例 4 のサブセクション「O V - 90 ヒト卵巣癌異種移植片を有する S C I D マウスにおける 4 価バイパラトピック A D C のインビボ抗腫瘍活性」に記載されているように決定された。

20

【0412】

研究の結果を図 16 及び表 20 に示す。K I H - D M 21 コンジュゲートは 100 と 50 μ g / k g の両方で活性であり、それぞれ T / C が 19 % 及び 12 % であった。100 μ g / k g 用量では、T - C が 99 日を超え、L C K が 2.87 を超え (高い活性)、P R が 7 / 8、C R が 6 / 8、T F S が 0 / 8 であった。50 μ g / k g 用量では、T - C が 53 日、L C K が 1.53 (活性)、P R が 5 / 8、C R が 3 / 8、T F S が 0 / 8 であった。M - D M 21 コンジュゲートは 130 μ g / k g と 70 μ g / k g の両方で活性であり、それぞれ T / C が 13 % 及び 16 % であった。130 μ g / k g 用量では、T - C が 99 日を超え、L C K が 2.87 を超え (高い活性)、P R が 8 / 8、C R が 7 / 8、T F S が 2 / 8 であった。70 μ g / k g 用量では、T - C が 36 日、L C K が 1.04 (活性)、P R が 3 / 8、C R が 2 / 8、T F S が 0 / 8 であった。M - s - S P D B - D M 4 コンジュゲートは 100 と 50 μ g / k g 用量の両方で活性であり、それぞれ T / C が 17 % 及び 34 % であった。100 μ g / k g 用量では、T - C が 23 日、L C K が 0.67 (不活性)、P R が 3 / 8、C R が 2 / 8、T F S が 0 / 8 であった。50 μ g / k g 用量では、T - C が 17 日、L C K が 0.49 (不活性) で、退縮はなかった。接種後 16 日目最下点での 50 μ g / k g (6 %) の M - D M 21 及び 50 μ g / k g の M - s - S P D B - D M 4 (7 %) を除いて、ほとんどの群で 1 ~ 5 % の最小限の体重減少があった。要約すると、親の M - s - S P D B - D M 4 コンジュゲートは、D M 21 コンジュゲートよりもインビボでの有効性が低かった。さらに、K I H - D M 21 と親 M - D M 21 は、試験した 2 つの用量で同様に活性であった。

30

40

【表 2 0】

表 2 0.

群	T/C%	退縮		結果
		部分	完全	
KIH-DM21 100 μ g/kg	19%	7/8	6/8	活性
KIH-DM21 50 μ g/kg	12%	5/8	3/8	活性
M-DM21 100 μ g/kg	13%	8/8	7/8	活性
M-DM21 50 μ g/kg	16%	3/8	2/8	活性
M-s-SPDB-DM4 100 μ g/kg	17%	3/8	2/8	活性
M-s_SPDB-DM4 50 μ g/kg	34%	0/8	0/8	活性

10

【 0 4 1 3】

K B ヒト子宮頸癌異種移植片を有する S C I D マウスにおける K I H バイパロトピック A D C のインビボ抗腫瘍活性

20

高い F R 発現 (H スコア 3 0 0) を有する K B 異種移植モデルで、 D M 2 1 にコンジュゲートした K I H バイパロトピック抗体のインビボ有効性を評価した。腫瘍が約 1 0 0 m m 3 に到達したとき、マウスは腫瘍体積によって群に無作為化され (群あたり n = 6) 、その後接種後 6 日目に投与された。これらの群には、製剤緩衝液を投与した対照群、5 0 及び 2 5 μ g / k g の K I H - D M 2 1 、5 0 及び 2 5 μ g / k g の M - D M 2 1 、ならびに 5 0 及び 2 5 μ g / k g の M - s - S P D B - D M 4 が含まれていた。全てのマウスに、上述の化合物を単回静脈内投与した。接種後 1 2 0 日目に研究を終了した。腫瘍の測定及び計算は、実施例 4 のサブセクション「 O V - 9 0 ヒト卵巣癌異種移植片を有する S C I D マウスにおける 4 価バイパロトピック A D C のインビボ抗腫瘍活性」に記載されているように決定された。

30

【 0 4 1 4】

研究の結果を図 1 7 及び表 2 1 に示す。K I H - D M 2 1 コンジュゲートは 5 0 と 2 5 μ g / k g の両方で高い活性であり、両方の用量で、T / C が 0 %、T - C が 1 0 0 日を超え、L C K が 6 . 4 1 を超えた (高い活性) 。1 0 0 μ g / k g 用量では、P R が 6 / 6、C R が 6 / 6、T F S が 6 / 6 であったが、2 5 μ g / k g 用量では、P R が 6 / 6、C R が 5 / 6、T F S が 5 / 6 であった。M - D M 2 1 コンジュゲートは 5 0 と 2 5 μ g / k g の両方で高い活性であり、それぞれ T / C が 0 % 及び 2 % であった。両方の用量では、T - C が 1 0 0 日を超え、L C K が 6 . 4 1 を超えた (高い活性) 。5 0 μ g / k g 用量では、P R が 6 / 6、C R が 6 / 6、T F S が 6 / 6 であったが、2 5 μ g / k g 用量では、P R が 5 / 6、C R が 4 / 6、T F S が 4 / 6 であった。M - s - S P D B - D M 4 コンジュゲートは 5 0 と 2 5 μ g / k g の両方で高い活性であり、それぞれ T / C が 0 % 及び 8 % であった。5 0 μ g / k g 用量では、T - C が 1 0 0 日を超え、L C K が 6 . 4 1 を超え (高い活性) 、P R が 6 / 6、C R が 6 / 6、T F S が 5 / 6 であった。2 5 μ g / k g 用量では、T - C が 2 4 日、L C K が 1 . 5 4 (活性) 、P R が 3 / 6、C R が 1 / 6、T F S が 1 / 6 であった。M - D M 2 1 及び M - s - S P D B - D M 4 群では、接種後 8 日目の最下点で 2 ~ 4 % の最小限の体重減少が見られた。要約すると、2 5 μ g / k g での M - s - S P D B - D M 4 の応答は一過性であり、一方、5 0 μ g / k g で M - s - S P D B - D M 4 を投与すると、ほとんどのマウスで長期にわたる完全な退縮をもたらした。2 5 μ g / k g と 5 0 μ g / k g 用量の両方の M - D M 2 1 と K I H - D M 2 1 の投与は、ほとんどのマウスで長期にわたる完全な退縮をもたらした。

40

50

【 0 4 1 5 】

まとめると、ここで説明するインビボ有効性研究は、K I H - D M 2 1 が試験されたほとんどの異種移植モデルで最も活性の高いコンジュゲートであり、M - D M 2 1 と M - s - S P D B - D M 4 がそれに続くことを示している。

【表 2 1】

表 2 1 .

群	T/C%	退縮		TFS	結果
		部分	完全		
KIH-DM21 50μg/kg	0%	6/6	6/6	6/6	高い活性
KIH-DM21 25μg/kg	0%	6/6	5/6	5/6	高い活性
M-DM21 50μg/kg	0%	6/6	6/6	6/6	高い活性
M-DM21 25μg/kg	2%	5/6	4/6	4/6	高い活性
M-s-SPDB-DM4 50μg/kg	0%	6/6	6/6	5/6	高い活性
M-s-SPDB-DM4 25μg/kg	8%	3/6	1/6	1/6	高い活性

10

20

【 0 4 1 6 】

I M G N 8 5 3 抵抗性 K B ヒト子宮頸癌異種移植片を有する S C I D マウスにおける K I H バイパラトピック A D C のインビボ抗腫瘍活性

D M 2 1 にコンジュゲートした K I H バイパラトピック抗体のインビボ有効性は I M G N 8 5 3 抵抗性 K B 異種移植モデルで評価した。親 K B 細胞は 1 n M の D M 1 - M e の存在下で増殖させた。安定して増殖した培養物が確立された後、細胞をサブクローン化し、クローンを増殖させ、特徴評価して、凍結させた。この研究のためにサブクローン 6 A を選択し、マウスに皮下接種した。腫瘍が約 1 0 0 m m ³ に到達したとき、マウスは腫瘍体積によって群に無作為化され（群あたり n = 6 ）、その後接種後 5 日目に投与された。これらの群には、製剤緩衝液を投与した対照群、4 0 及び 2 0 μ g / k g の K I H - L - D M 2 1 、4 0 及び 2 0 μ g / k g の M - L - D M 2 1 、ならびに 4 0 及び 2 0 μ g / k g の M - s - S P D B - D M 4 が含まれていた。全てのマウスに、上述の化合物を単回静脈内投与した。接種後 7 8 日目に研究を終了した。腫瘍の測定及び計算は、上述の O V - 9 0 ヒト卵巣癌異種移植片実験に記載されているように決定された。

30

【 0 4 1 7 】

研究の結果を図 1 9 及び表 2 2 に示す。K I H - L - D M 2 1 コンジュゲートは 4 0 と 2 0 μ g / k g の両方で高い活性であり、T / C が 0 % であった。4 0 μ g / k g 用量群では、T - C が 6 0 日を超え、L C K が 3 . 4 1 を超え（高い活性）、P R が 6 / 6 、C R が 6 / 6 、T F S が 6 / 6 であった。2 0 μ g / k g 投与群では、T - C が 4 6 日、L C K が 2 . 6 1 （活性）、P R が 6 / 6 、C R が 4 / 6 、T F S が 1 / 6 であった。M - L - D M 2 1 コンジュゲートは 4 0 μ g / k g と 2 0 μ g / k g の両方で高い活性であり、それぞれ T / C が 0 % 及び 2 % であった。4 0 μ g / k g 用量群では、T - C が 6 0 日を超え、L C K が 3 . 4 1 を超え（高い活性）、P R が 6 / 6 、C R が 6 / 6 、T F S が 6 / 6 であった。2 0 μ g / k g 用量群では、T - C が 2 8 日、L C K が 1 . 5 9 （活性）、P R が 5 / 6 、C R が 2 / 6 、T F S が 2 / 6 であった。M - s - S P D B - D M 4 コンジュゲートは 4 0 μ g / k g で高い活性であるが 2 0 μ g / k g で不活性であり、それぞれ T / C が 0 % 及び 6 3 % であった。4 0 μ g / k g 用量では、T - C が 4 1 日、L

40

50

C K が 2 . 3 3 (活 性) 、 P R が 6 / 6 、 C R が 6 / 6 、 T F S が 0 / 6 で あ っ た 。 2 0 μ g / k g 用 量 で は 、 T - C が 6 日 、 L C K が 0 . 3 4 (不 活 性) 、 P R が 0 / 6 、 C R が 0 / 6 、 T F S が 0 / 6 で あ っ た 。 K I H - L - D M 2 1 の 2 0 μ g / k g 群 で は 、 接 種 後 8 日 目 の 最 下 点 で 3 % の 最 小 限 の 体 重 減 少 が 見 ら れ た 。 要 約 す る と 、 こ の モ デ ル で は K I H - L - D M 2 1 は M - L - D M 2 1 と 同 等 の 効 果 が あ り 、 K I H - L - D M 2 1 と M - L - D M 2 1 の 両 方 が M - s - S P D B - D M 4 よ り も 効 果 的 で あ っ た 。

【表 2 2】

表 2 2 .

群	T/C%	退縮		TFS	結果
		部分	完全		
KIH-L-DM21 40	0%	6/6	6/6	6/6	高い活性
KIH-L-DM21 20	0%	6/6	4/6	1/6	高い活性
M-L-DM21 40	0%	6/6	6/6	6/6	高い活性
M-L-DM21 20	2%	5/6	2/6	2/6	高い活性
M-s-SPDB-DM4 40	0%	6/6	6/6	0/6	高い活性
M-s-SPDB-DM4 20	63%	0/6	0/6	0/6	不活性

10

【 0 4 1 8 】

20

実施例 7 . バイパルトピックイムノコンジュゲートの薬物動態と忍容性

バイパルトピックな F R 標的化イムノコンジュゲートの毒性及び毒物動態プロファイルを、単回投与後のカニクイザルで評価した。簡潔に述べると、K I H - D M 2 1 は、用量レベルあたり 2 頭のオスのサルに対し、1 0 または 1 3 m g / k g の用量レベルで 1 0 分間のゆっくりとしたボラス注入として投与された。動物は投与後 2 8 日まで観察され、影響の回復、持続、または進行を評価した。体重、臨床観察、及び食物消費を評価し、臨床病理学パラメーター（血液学、血清化学、及び凝固）及び毒物動態パラメーターのために血液試料を収集した。

【 0 4 1 9 】

30

全ての動物は研究の終わりまで生き残った。体重、血液学、または血清化学パラメーターに対する K I H - D M 2 1 関連の影響はなかった。単回の 1 0 A b m g / k g 群動物で見られた K I H - D M 2 1 関連の臨床観察は、8 日目と 1 2 日目の後肢の発赤であったが、非投与期間の残りの期間は臨床所見は認められなかった。K I H L D M 2 1 に関連するより高いフィブリノーゲン値は、両方の用量群で 4 日目と 8 日目で見られ。値は、非投与期間の終わり（2 9 日目）までの前処理値と同様であった。

【 0 4 2 0 】

40

K I H - D M 2 1 A D C は、サルへの単回静脈内投与後の二相性薬物動態を示す。A D C の平均終末相 $t_{1/2}$ は 1 0 m g / k g 用量で 1 5 6 時間であった。総抗体（T A b）の平均 $t_{1/2}$ は、A D C で観察されたものよりも長かった（1 0 m g / k g 用量で 1 8 4 時間）。A D C と T A b の濃度時間プロファイルの比較は、K I H - D M 2 1 イムノコンジュゲートが 1 0 m g / k g 用量で I M G N 8 5 3 よりも安定していることを示した。K I H - D M 2 1 は、1 0 m g / k g 用量での I M G N 8 5 3 よりも長い終末相半減期と大きな曝露測定基準（A U C 値）を有する。

【表 2 3】

表 2 3.

PKパラメーター	FR α バイパラトピックADC		IMGN853	
投与群	10mg/kg(N=2、NS)		10mg/kg(N=10)	
	ADC	Tab	ADC	TAAb
半減期(時間)	156	184	98.2	168.9
AUC _{0-inf} (時間 * μ g/mL)	35,400	42,200	25,583	30,587

10

【0 4 2 1】

図 1 8 A 及び 1 8 B に示されるように、FR バイパラトピックイムノコンジュゲートと IMGN 8 5 3 は、両方とも 1 0 m g / k g で十分に許容され、バイパラトピックイムノコンジュゲートは、1 3 m g / k g で同様によく許容された。さらに、表 2 3 に示すように、FR バイパラトピックイムノコンジュゲートは 1 0 m g / k g 用量で IMGN 8 5 3 よりも安定していた。特に、バイパラトピックイムノコンジュゲートは、IMGN 8 5 3 よりも約 6 0 時間長い終末半減期と、IMGN 8 5 3 よりも約 4 0 % 高い総曝露量を示した。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

ヒト葉酸受容体 1 (FR) に特異的に結合するバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体またはその抗原結合断片は、

(a) FR の第 1 のエピトープに結合する第 1 の可変重鎖 (VH) 及び第 1 の可変軽鎖 (VL) を含む第 1 の FR 結合ドメインと、

(b) FR の第 2 のエピトープに結合する第 2 の VH 及び第 2 の VL を含む第 2 の FR 結合ドメインと、を含む、前記バイパラトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 2)

前記第 1 の FR 結合ドメインが、配列番号 2 4、2 5、2 6、及び 5 7 からなる群から選択される VH アミノ酸配列と、配列番号 1 9、2 0、及び 2 1 からなる群から選択される VL アミノ酸配列と、を含む抗体と同じ FR エピトープに特異的に結合する、項目 1 に記載のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片。

30

(項目 3)

前記第 1 の FR 結合ドメインが、配列番号 2 4、2 5、2 6、及び 5 7 からなる群から選択される VH アミノ酸配列と、配列番号 1 9、2 0、及び 2 1 からなる群から選択される VL アミノ酸配列と、を含む抗体と同じ FR のエピトープへの結合を競合的に阻害する、項目 1 に記載のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 4)

前記第 2 の FR 結合ドメインが、配列番号 2 2 または 2 3 の VH アミノ酸配列と、配列番号 1 7 または 1 8 の VL アミノ酸配列と、を含む抗体と同じ FR のエピトープに特異的に結合する、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片。

40

(項目 5)

前記第 2 の FR 結合ドメインが、配列番号 2 2 または 2 3 の VH アミノ酸配列と、配列番号 1 7 または 1 8 の VL アミノ酸配列と、を含む抗体と同じ FR のエピトープへの結合を競合的に阻害する、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のバイパラトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 6)

前記第 1 の VH が、それぞれ (a) 配列番号 1 0 ~ 1 2 または (b) 配列番号 1 5、1 6、及び 1 2 のアミノ酸配列を含む VH CDR 1 ~ 3 を含み、前記第 1 の VL が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列を含む VL CDR 1 ~ 3 を含み、項目 1 ~ 5 のいづ

50

れか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 7)

前記第 1 の V H が、配列番号 2 4、2 5、2 6、及び 5 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、及び / または前記第 1 の V L が、配列番号 1 9、2 0、及び 2 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 8)

前記第 2 の V H が、それぞれ (a) 配列番号 7 ~ 9 または (b) 配列番号 1 3、1 4、及び 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 ~ 3 を含み、前記第 2 の V L が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 ~ 3 を含み、項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

10

(項目 9)

前記第 2 の V H が、配列番号 2 2 もしくは 2 3 のアミノ酸配列を含み、及び / または前記第 2 の V L が、配列番号 1 7 もしくは 1 8 のアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 1 0)

前記第 1 の V H と V L の対、及び / または前記第 2 の V H と V L の対が、マウス、非ヒト、ヒト化、キメラ、表面再構成 (r e s u r f a c e d)、またはヒトである、項目 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 1 1)

20

前記抗体またはその抗原結合断片が、ヒト F R に結合するが、F O L R 2 または F O L R 3 に結合しない、項目 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 1 2)

前記第 1 の F R 結合ドメインが単鎖可変断片 (s c F v) である、項目 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 1 3)

前記第 1 の F R 結合ドメインの前記 s c F v が、V H - リンカー - V L のペプチドの配向を有する、項目 1 2 に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 1 4)

30

前記第 1 の F R 結合ドメインの前記 s c F v が、V L - リンカー - V H のペプチドの配向を有する、項目 1 2 に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 1 5)

前記第 2 の F R 結合ドメインが単鎖可変断片 (s c F v) である、項目 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 1 6)

前記第 2 の F R 結合ドメインの前記 s c F v が、V H - リンカー - V L のペプチドの配向を有する、項目 1 5 に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 1 7)

前記第 2 の F R 結合ドメインの前記 s c F v が、V L - リンカー - V H のペプチドの配向を有する、項目 1 5 に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

40

(項目 1 8)

前記リンカーがグリシン - セリンリンカーである、項目 1 3 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 1 9)

前記第 2 の F R 結合ドメインが、配列番号 2 7 ~ 2 9 から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 2 0)

前記第 1 の F R 結合ドメインが、配列番号 3 0 ~ 3 2 から選択されるアミノ酸配列を

50

含む、項目 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 21)

(i) 配列番号 33 及び 34、(ii) 配列番号 35 及び 36、(iii) 配列番号 37 及び 38、または (iv) 配列番号 39 及び 40 のアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 22)

配列番号 41 ~ 43 のアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 23)

配列番号 44 ~ 46 のアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 24)

前記バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片が、4 価のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片である、項目 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 25)

前記バイパルトピック抗体またはその抗原結合断片が、2 価のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片である、項目 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 26)

前記二重特異性抗体またはその抗原結合断片が、タンデム s c F v、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、及びノブインホール構造からなる群から選択される F R 結合ドメインを含む、項目 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 27)

ノブインホール (K I H) 構造を有する、項目 1 ~ 20 及び 22 ~ 26 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 28)

配列番号 1 ~ 3 及び 7 ~ 9 を含む前記 F R 結合ドメインが、前記 K I H 構造のノブ側にある、項目 27 に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 29)

配列番号 1 ~ 3 及び 7 ~ 9 を含む前記 F R 結合ドメインが、前記 K I H 構造のホール側にある、項目 27 に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 30)

配列番号 4 ~ 6 及び 10 ~ 12 を含む前記 F R 結合ドメインが、前記 K I H 構造のノブ側にある、項目 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 31)

配列番号 4 ~ 6 及び 10 ~ 12 を含む前記 F R 結合ドメインが、前記 K I H 構造のホール側にある、項目 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 32)

全長抗体を含む、項目 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 33)

前記第 1 の F R 結合ドメインが全長抗体である、項目 1 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のバイパルトピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 34)

前記第 2 の F R 結合ドメインが全長抗体である、項目 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載

10

20

30

40

50

のバイパロットピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 5)

抗原結合断片を含む、項目 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載のバイパロットピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 6)

前記第 1 の F R 結合ドメインが抗原結合断片である、項目 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載のバイパロットピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 7)

前記第 2 の F R 結合ドメインが抗原結合断片である、項目 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載のバイパロットピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 8)

配列番号 4 1 ~ 4 3 のアミノ酸配列を含む、バイパロットピック抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 9)

項目 1 ~ 3 8 に記載のバイパロットピック抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子の組み合わせ。

(項目 4 0)

項目 3 9 に記載の核酸分子のうちの 1 つを含む、単離されたベクター。

(項目 4 1)

項目 3 9 に記載の単離された核酸分子、または項目 4 0 に記載の単離されたベクターの組み合わせを含む宿主細胞。

(項目 4 2)

E. coli、Pseudomonas、Bacillus、Streptomyces、酵母、CHO、YB/20、NS0、PER-C6、HEK-293T、NIH-3T3、HeLa、BHK、Hep G2、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10 細胞、植物細胞、昆虫細胞、及び組織培養におけるヒト細胞からなる群から選択される、項目 4 1 に記載の宿主細胞。

(項目 4 3)

項目 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載のバイパロットピック抗体または抗原、項目 3 9 に記載の核酸分子、項目 4 0 に記載のベクター、または項目 4 1 もしくは 4 2 に記載の宿主細胞の組み合わせと、薬学的に許容される担体または賦形剤と、を含む、医薬組成物。

(項目 4 4)

項目 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載のバイパロットピック抗体と、薬学的担体または賦形剤を含む、医薬組成物。

(項目 4 5)

項目 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のバイパロットピック抗体を作製する方法であって、(a) 前記抗体を発現する細胞を培養することと、(b) 前記培養された細胞から前記抗体を単離することと、を含む、前記方法。

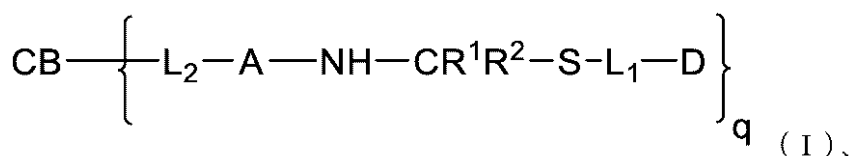
(項目 4 6)

前記細胞が真核細胞である、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

以下の式：

【化 6 8】



またはその薬学的に許容される塩で表されるイムノコンジュゲートであって、式中：

C B は、項目 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載のバイパロットピック抗体またはその抗原結合

10

20

30

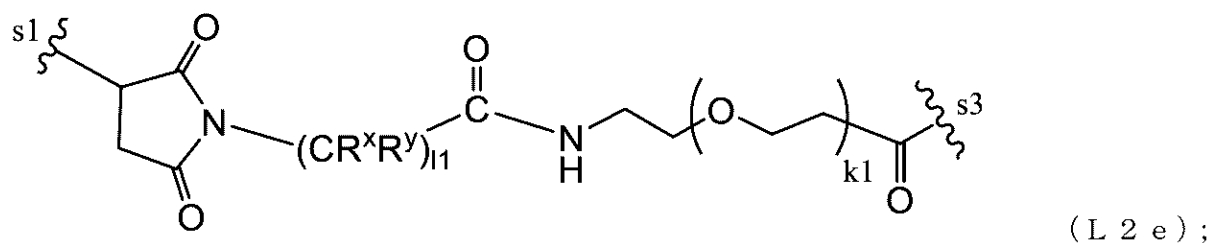
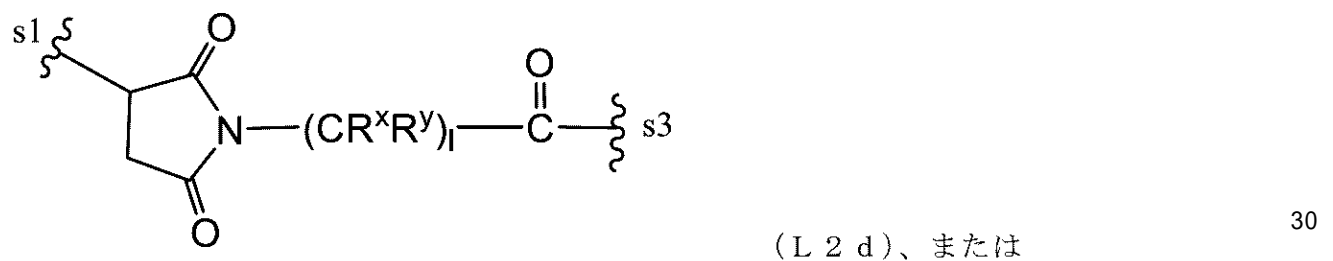
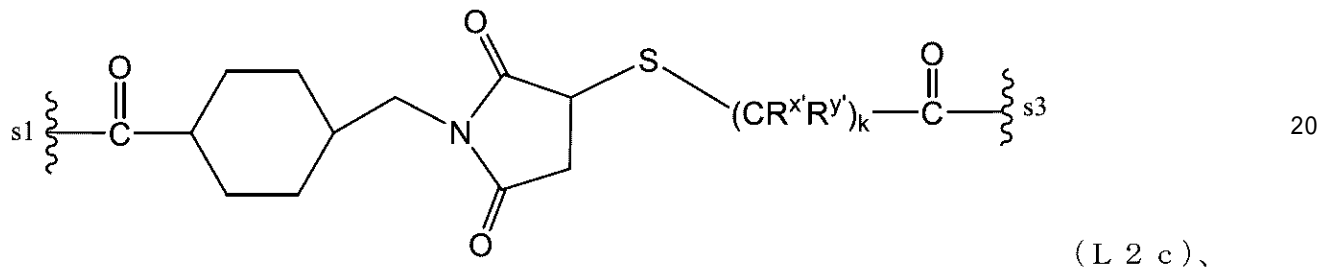
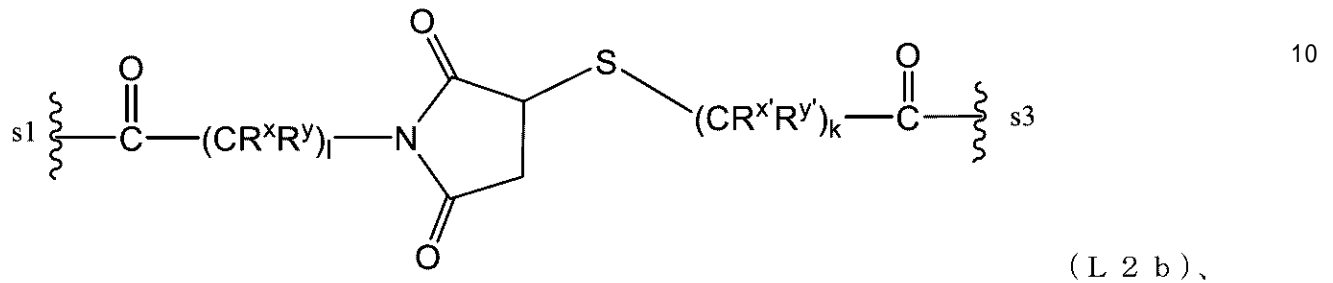
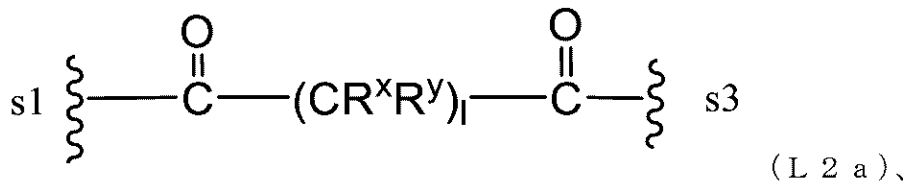
40

50

断片であり；

L_2 は、以下の式のうちの 1 つによって表され；

【化 6 9】



式中；

R^x 、 R^y 、 $R^{x'}$ 、及び $R^{y'}$ は、それぞれの存在について、独立して H、-OH、ハロゲン、-O-(C_{1-4} アルキル)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺、または任意選択で -OH、ハロゲン、SO₃H、もしくは NR₄₀R₄₁R₄₂⁺ によって置換された C_{1-4} アルキルであり、ここで、 R_{40} 、 R_{41} 、及び R_{42} は、それぞれ独立して H または C_{1-4} アルキルであり；

l 及び k は、それぞれ独立して、1 ~ 10 の整数であり；

$l1$ は、2 ~ 5 の整数であり；

$k1$ は、1 ~ 5 の整数であり；

$s1$ は細胞結合剤 C B に接続された部位を示し、 $s3$ は A 基に接続された部位を示し；

A が、アミノ酸残基または 2 ~ 20 個のアミノ酸残基を含むペプチドであり；

R^1 及び R^2 が、それぞれ独立して、H または C_{1-3} アルキルであり；

10

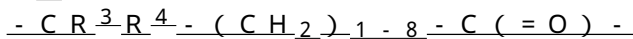
20

30

40

50

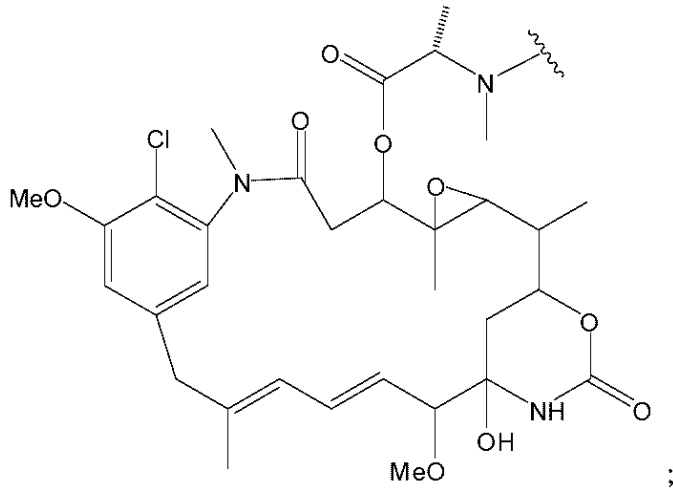
L_1 が、以下の式によって表され：



式中、 R^3 及び R^4 が、それぞれ独立して H または Me であり、 L_1 の $-C(=O)-$ 部分は、D に接続されており；

D が以下の式で表され：

【化 70】



10

20

q が、1 ~ 20 の整数である、前記イミノコンジュゲート。

(項目 48)

R^x 、 R^y 、 $R^{x'}$ 、及び $R^{y'}$ の全てが H であり、 l 及び k が、それぞれ独立して、2 ~ 6 の整数である、項目 47 に記載のイミノコンジュゲート。

(項目 49)

A が 2 ~ 5 個のアミノ酸残基を含むペプチドである、項目 47 または 48 に記載のイミノコンジュゲート。

(項目 50)

A が、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Val - Ala、D - Val - Ala、Val - Cit、D - Val - Cit、Val - Lys、Phe - Lys、Lys - Lys、Ala - Lys、Phe - Cit、Leu - Cit、Ile - Cit、Phe - Ala、Phe - N⁹-トシル - Arg、Phe - N⁹-ニトロ - Arg、Phe - Phe - Lys、D - Phe - Phe - Lys、Gly - Phe - Lys、Leu - Ala - Leu、Ile - Ala - Leu、Val - Ala - Val、Ala - Ala - Ala、D - Ala - Ala - Ala、Ala - D - Ala - Ala、Ala - Ala - D - Ala、Ala - Leu - Ala - Leu (配列番号 54)、- Ala - Leu - Ala - Leu (配列番号 55)、Gly - Phe - Leu - Gly (配列番号 56)、Val - Arg、Arg - Arg、Val - D - Cit、Val - D - Lys、Val - D - Arg、D - Val - Cit、D - Val - Lys、D - Val - Arg、D - Val - D - Cit、D - Val - D - Lys、D - Val - D - Arg、D - Arg - D - Arg、Ala - Ala、Ala - D - Ala、D - Ala - Ala、D - Ala - D - Ala、Ala - Met、Gln - Val、Asn - Ala、Gln - Phe、Gln - Ala、D - Ala - Pro、及び D - Ala - tBu - Gly からなる群から選択され、それぞれのペプチドの最初のアミノ酸が L_2 基に接続され、それぞれのペプチドの最後のアミノ酸が $-NH-C(R^1)(R^2)-S-L_1-D$ に接続されている、項目 49 に記載のイミノコンジュゲート。

30

40

(項目 51)

R^1 と R^2 が両方とも H である、項目 47 ~ 50 のいずれか 1 項に記載のイミノコンジュゲート。

(項目 52)

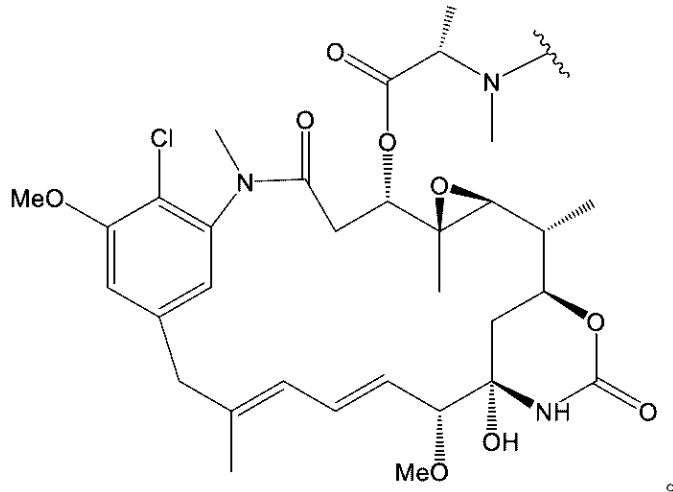
50

L_1 が $-(CH_2)_4-6-C(=O)-$ である、項目 47 ~ 51 のいずれか 1 項に記載のイミノコンジュゲート。

(項目 53)

D が以下の式で表される、項目 47 ~ 52 のいずれか 1 項に記載のイミノコンジュゲート：

【化 71】



10

20

(項目 54)

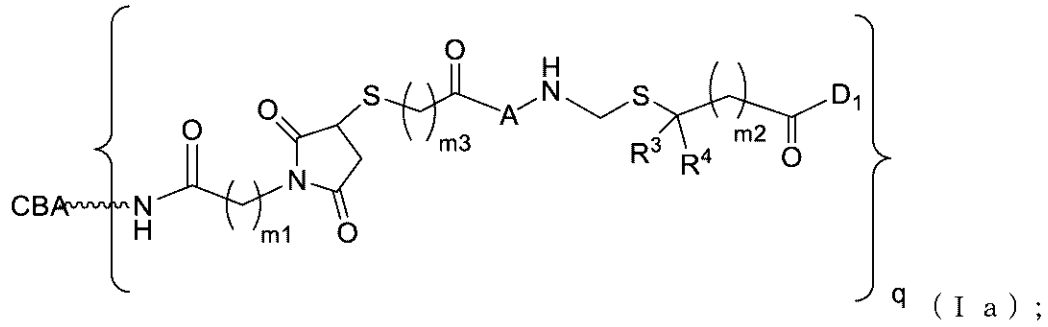
前記イミノコンジュゲートが以下の式：

30

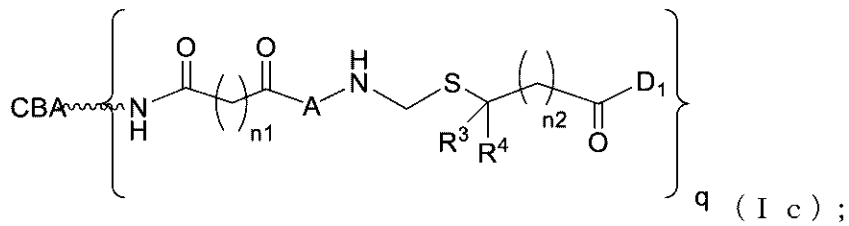
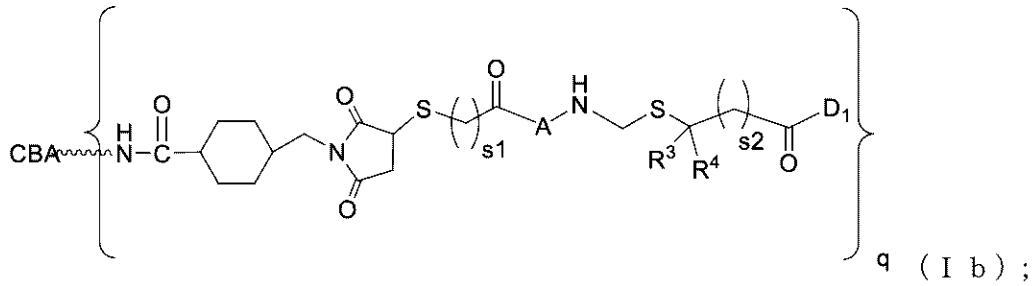
40

50

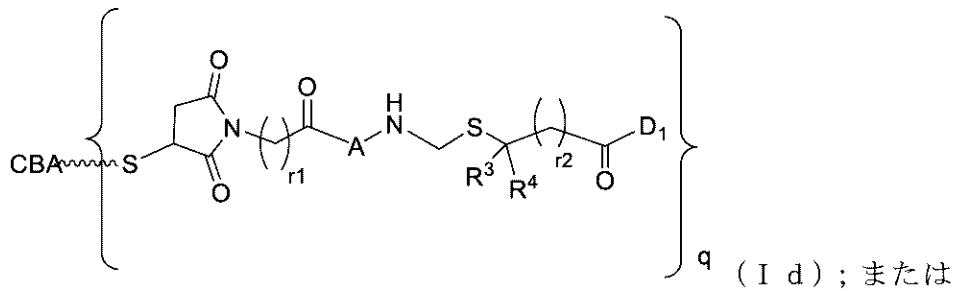
【化 7 2】



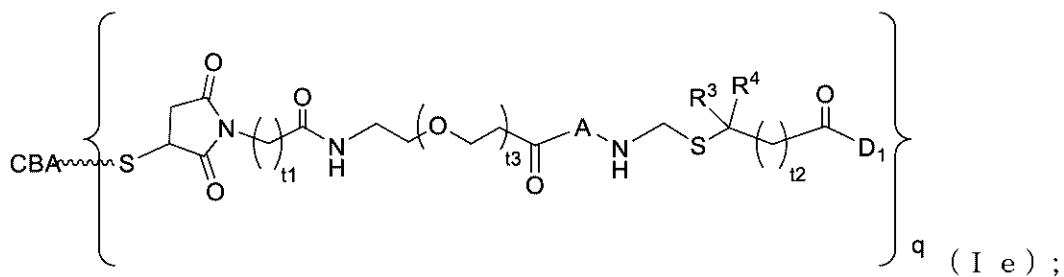
10



20



30



40

またはその薬学的に許容される塩で表され、式中：

【化 7 3】



が、Lysのアミン基を介してL₂基に接続される、項目1～38のいずれか1項に記載のバイパロピック抗体またはその抗原結合断片であり；

【化 7 4】

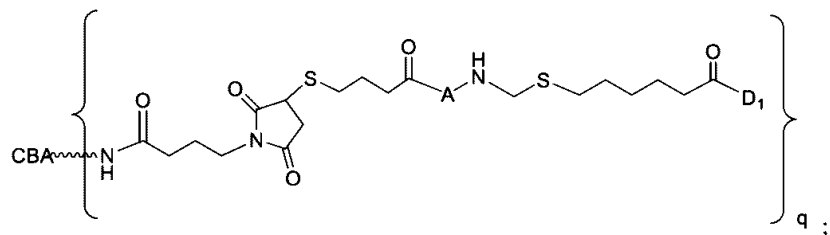


50

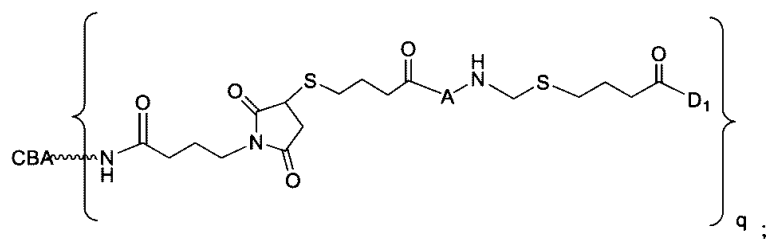
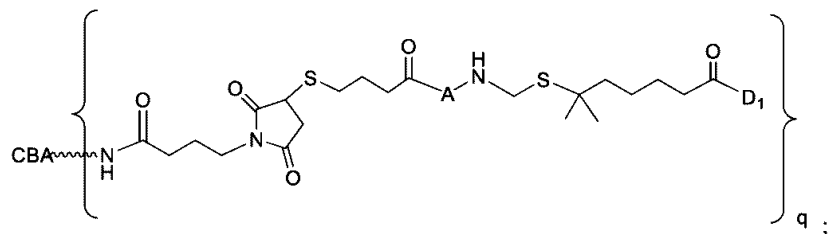
- A l a - t B u - G l y である、項目 5 4 または 5 5 に記載のイムノコンジュゲート。
(項目 5 7)

前記イムノコンジュゲートが以下の式：

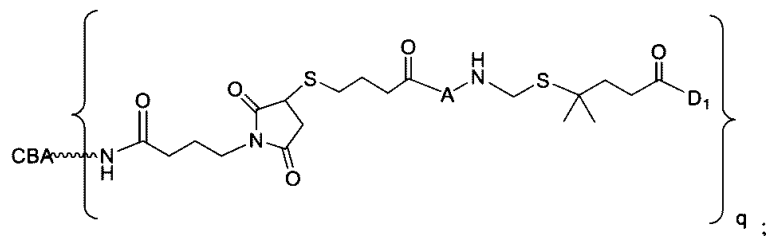
【化 7 7 - 1】



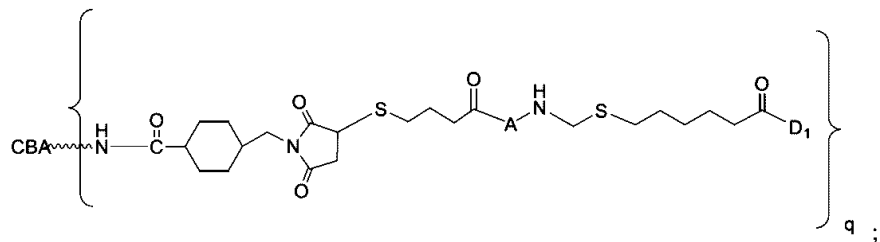
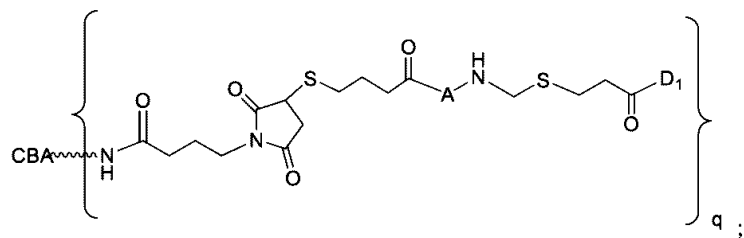
10



20

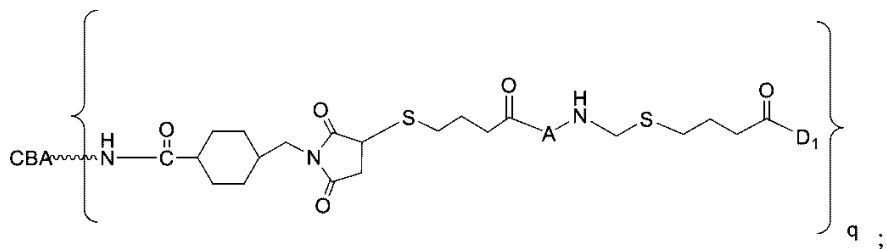
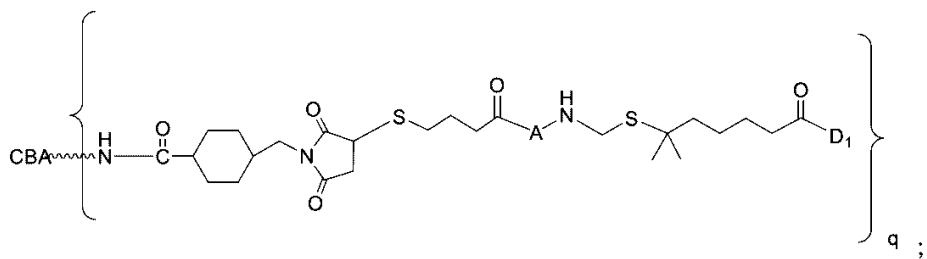


30

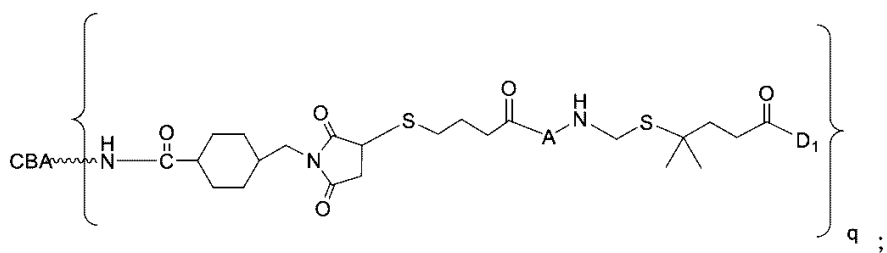


40

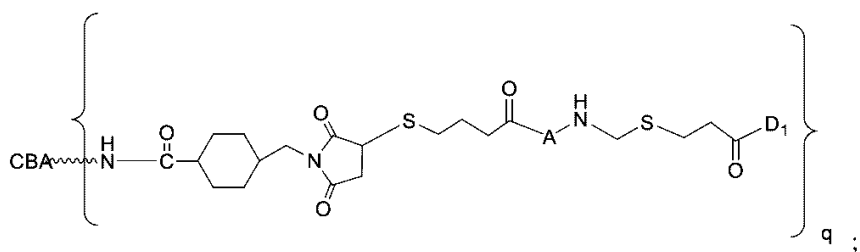
【化 77 - 2】



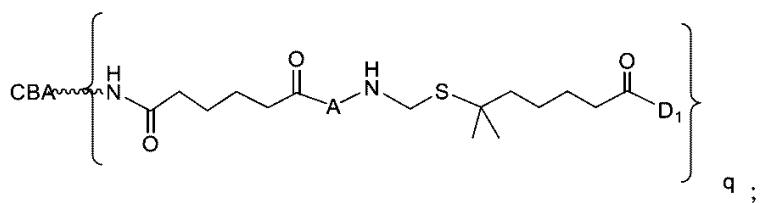
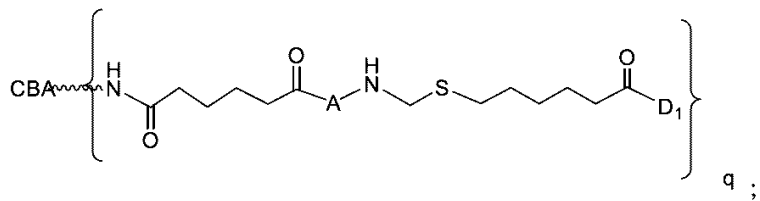
10



20



30



40

50

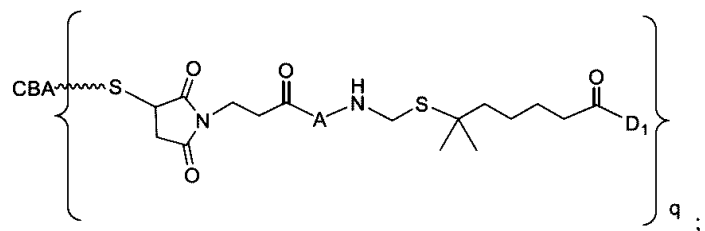
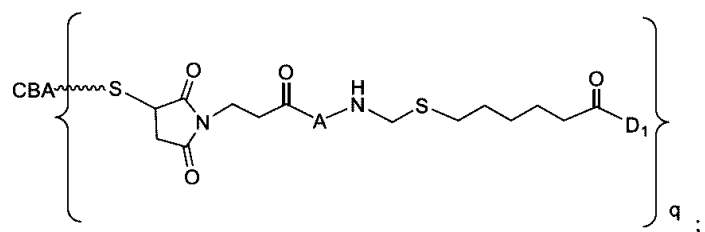
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2\text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q ;$$
$$\left\{ \text{CBA} \sim \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{C}(\text{CH}_3)_3 - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q ;$$
$$\left\{ \text{CBA} \sim \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2\text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q ;$$
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q$$
$$\text{CBA} \left\{ \begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ -\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{A}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{D}_1 \\ || \quad \quad \quad || \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \end{array} \right\}_q ;$$
$$\left\{ \text{CBA} - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q$$
$$\left\{ \text{CBA} - \left[\text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{C}(\text{CH}_3)_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right] \right\}_q$$
$$\left\{ \text{CBA} \sim \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{A} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{D}_1 \right\}_q$$

20

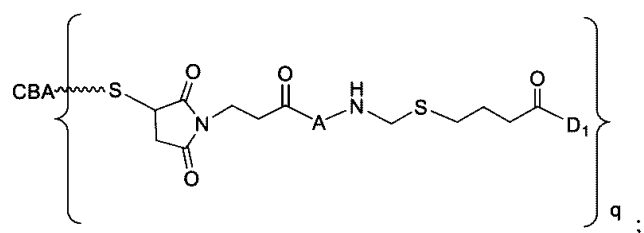
30

40

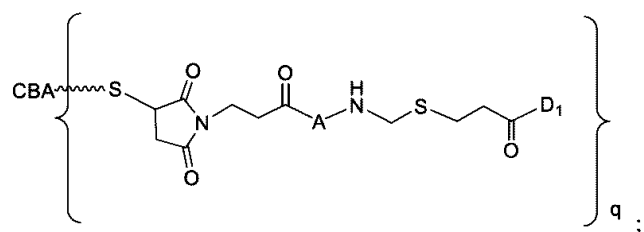
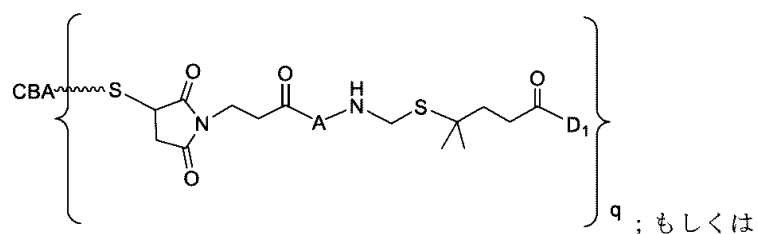
【化 7 7 - 4】



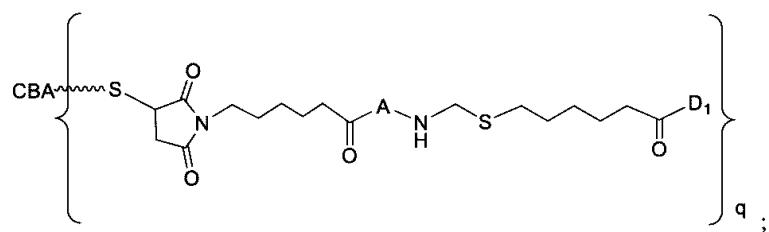
10



20

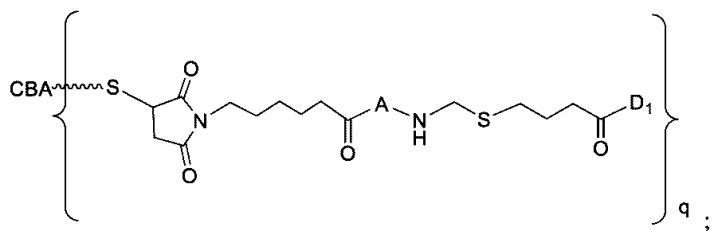
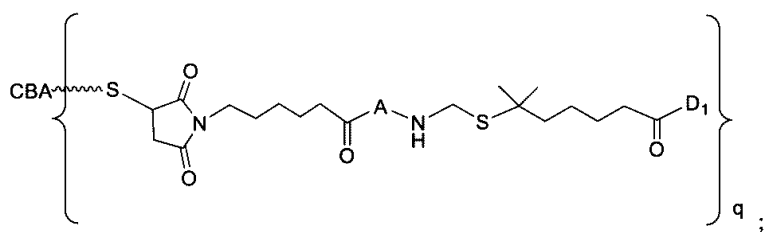


30

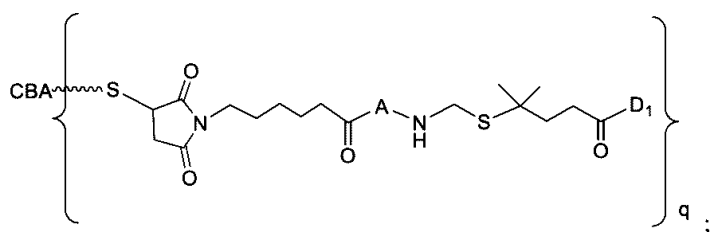


40

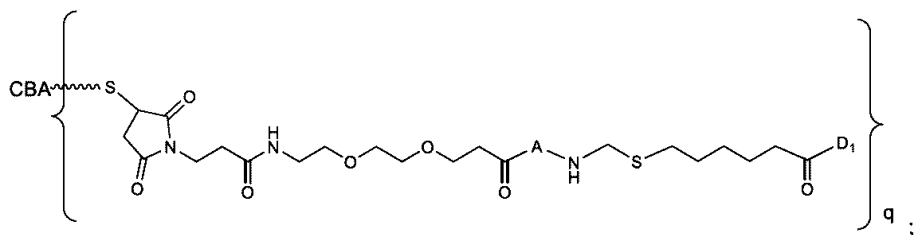
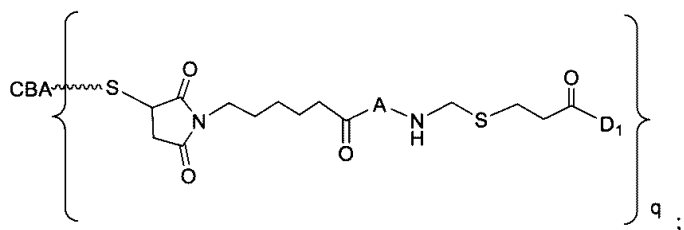
【化 7 7 - 5】



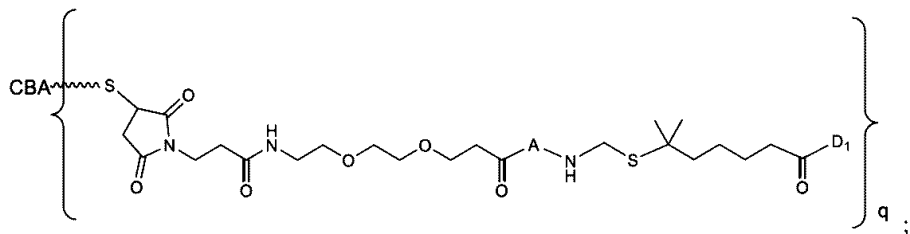
10



20



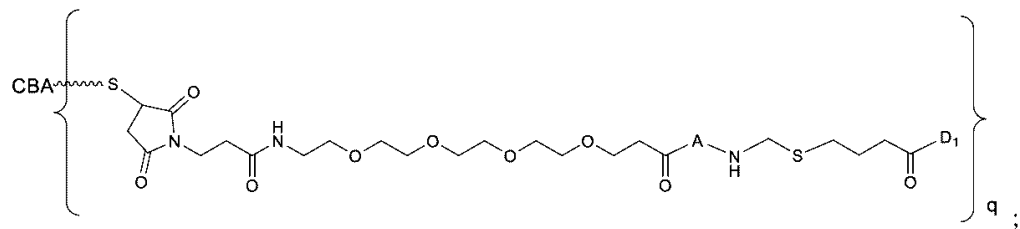
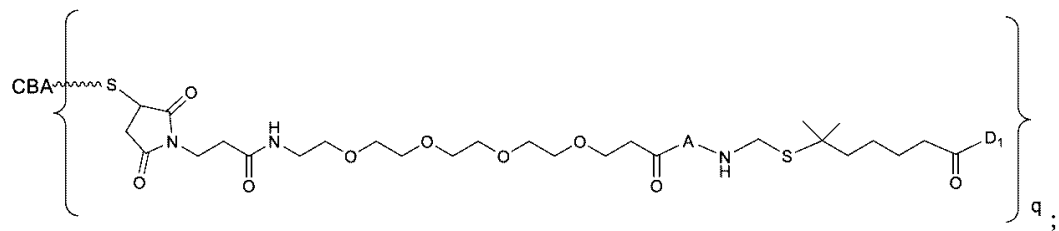
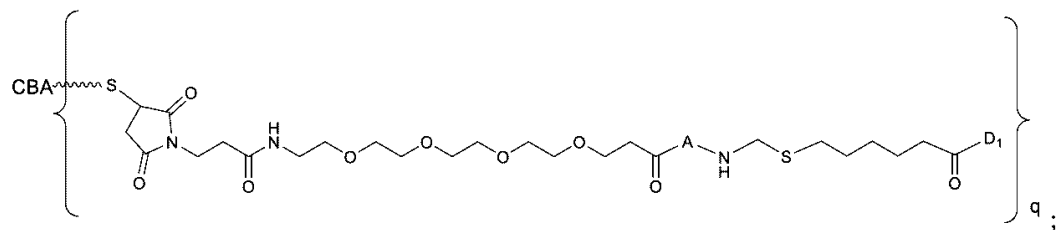
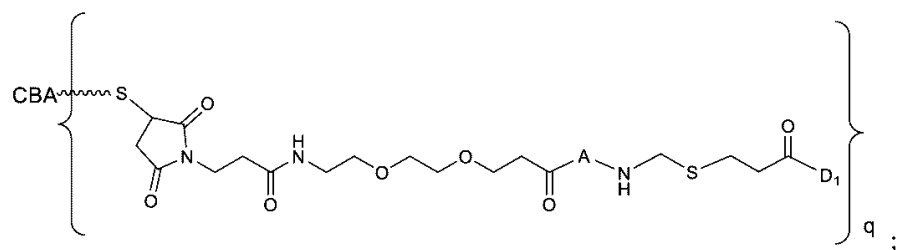
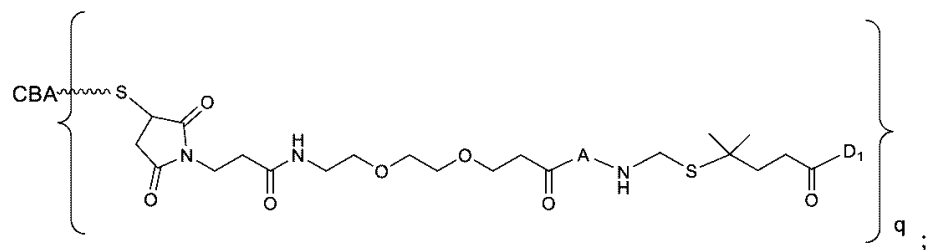
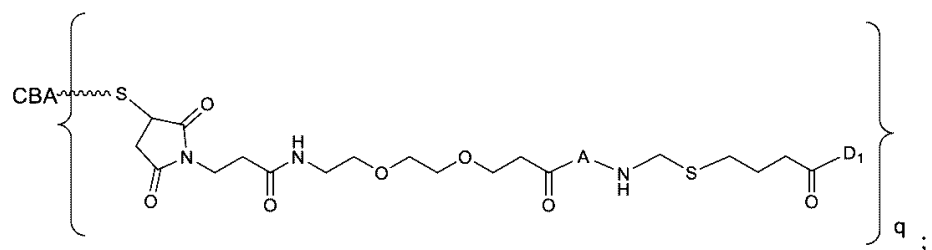
30



40

50

【化 77 - 6】



10

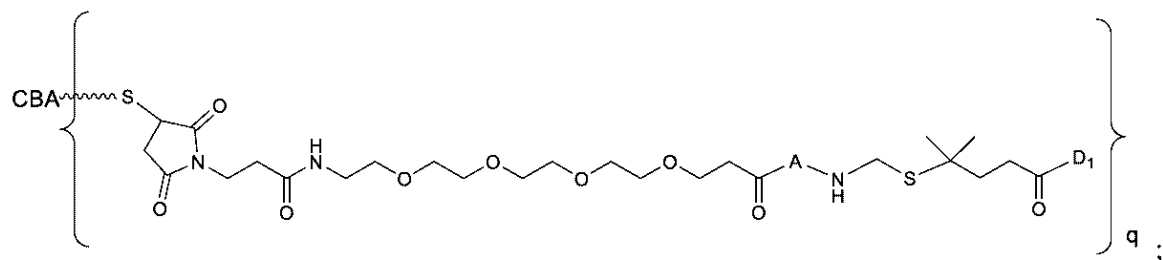
20

30

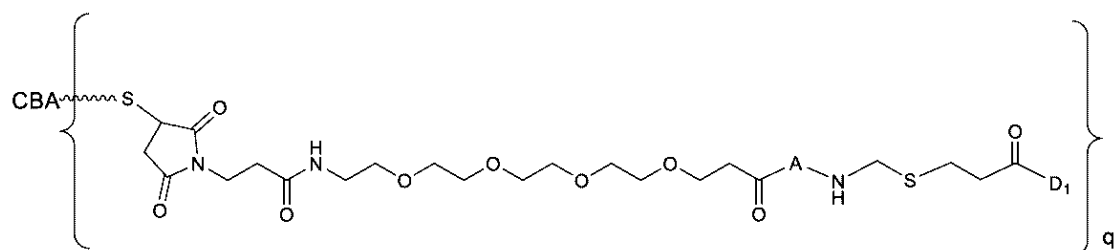
40

50

【化 77 - 7】



または



10

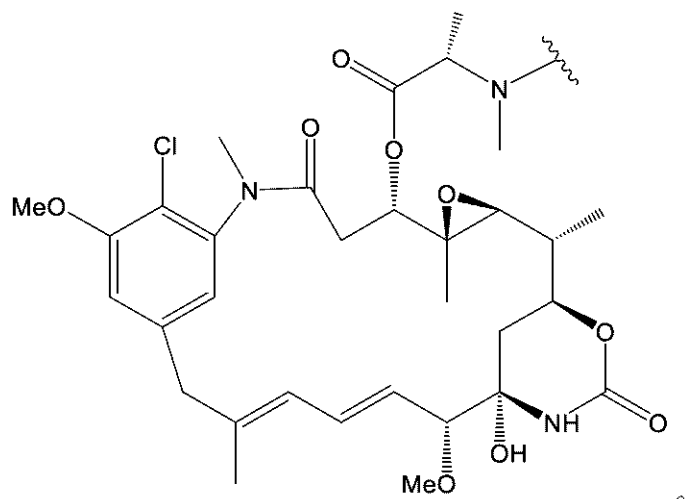
またはその薬学的に許容される塩で表され、式中：

A が、Ala - Ala - Ala、Ala - D - Ala - Ala、Ala - Ala、D - Ala - Ala、Val - Ala、D - Val - Ala、D - Ala - Pro、または D - Ala - tBu - Glyであり；

20

D₁ が以下の式で表される項目 54 に記載のイムノコンジュゲート：

【化 78】



30

(項目 58)

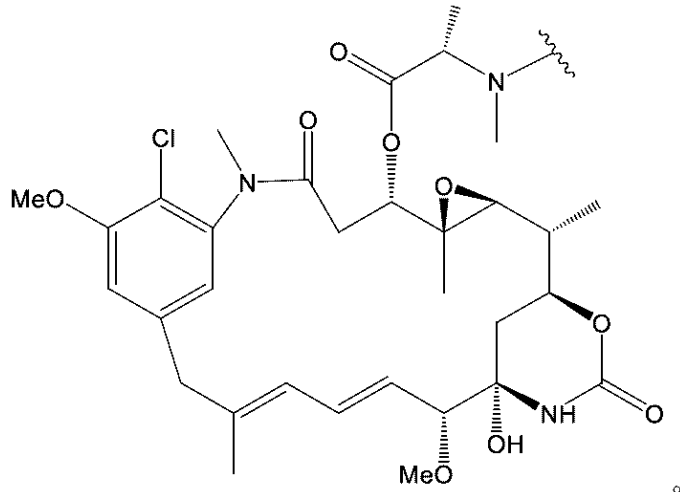
前記イムノコンジュゲートが以下の式で表され：

40

[illegible]

式中、 D_1 が以下の式で表される項目 57 に記載のイムノコンジュゲート：

【化 8 0】

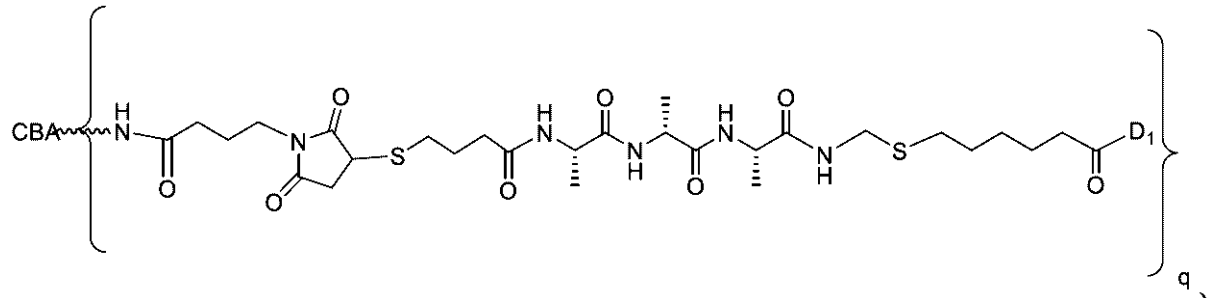


10

(項 目 5 9)

前記イムノコンジュゲートが以下の式で表され：

【化 8 1】



20

式中：

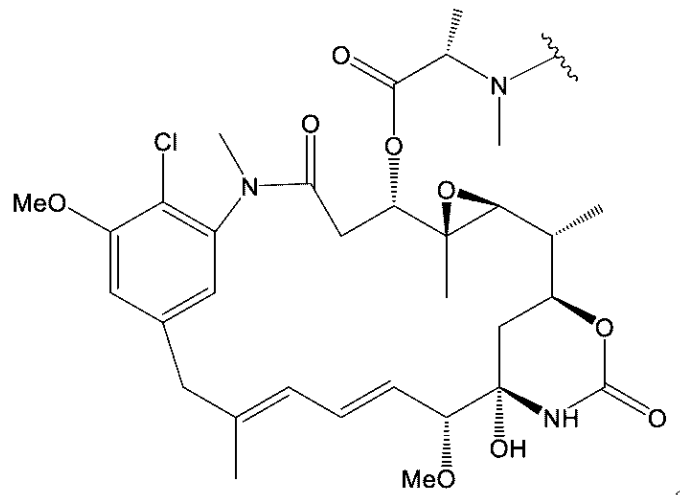
C B A が、項目 1 ～ 3 8 のいずれか 1 項に記載のバイパロトピック抗体またはその抗原結合断片であり；

30

q が、1 ～ 1 0 の整数であり；

D₁ が以下の式で表される項目 4 7 に記載のイムノコンジュゲート：

【化 8 2】



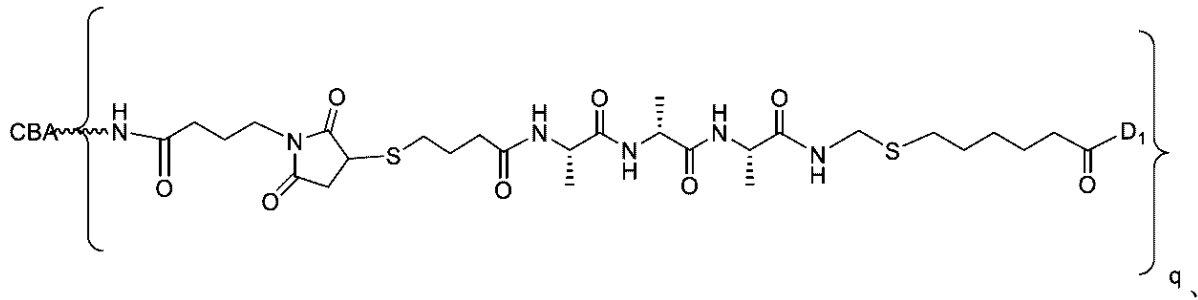
40

(項 目 6 0)

以下の式：

50

【化 8 3】

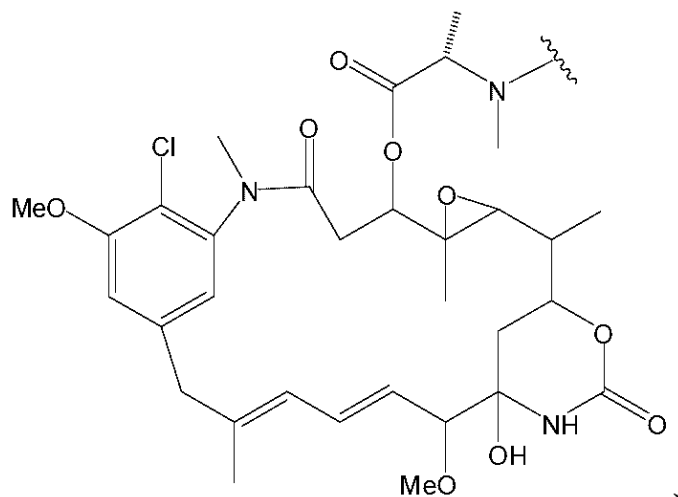


10

またはその薬学的に許容される塩で表されるイムノコンジュゲートであって、式中：
C B A が、配列番号 4 1 ~ 4 3 のアミノ酸配列を含むバイパラトピック抗体または抗原結
合断片であり；

D₁ が、以下の式で表され；

【化 8 4】



20

及び

30

q が、1 ~ 10 の整数である、前記イムノコンジュゲート。

(項目 6 1)

式 (A) - (L) - (C) を有するイムノコンジュゲートであって、式中、

(A) が項目 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載のバイパラトピック抗体またはその抗原結合
断片であり；

(L) が、リンカーであり；

(C) が細胞傷害性薬剤であり、前記リンカー (L) が (A) を (C) に連結する、前記
イムノコンジュゲート。

(項目 6 2)

前記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、親水性リンカー、及び
ジカルボン酸ベースのリンカーからなる群から選択される、項目 6 1 に記載のイムノコン
ジュゲート。

40

(項目 6 3)

前記リンカーが、N - (マレイミドブトリルオキシ) スルホスクシンイミドエステル
(スルホ - G M B S または s G M B S)、マレイミド酪酸 N - スクシンイミジルエステ
ル (G M B S)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) - 2 - スルホブタノ
エート (スルホ - S P D B)；N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペンタ
ノエート (S P P) または N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) - 2 - スル
ホペンタノエート (スルホ - S P P)；N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ)
ブタノエート (S P D B)、N - スクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘ

50

キサンカルボキシレート (SMCC) ; N - スルホスクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (スルホ SMCC) ; N - スクシンイミジル - 4 - (ヨードアセチル) - アミノ安息香酸 (SIAB) ; 及び N - スクシンイミジル - [(N - マレイミドプロピオンアミド) - テトラエチレングリコール] エステル (NH S - PEG 4 - マレイミド) からなる群から選択される、項目 6 2 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 6 4)

前記リンカーが、スルホ - G M B S である、項目 6 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 6 5)

前記リンカーが、G M B S である、項目 6 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 6 6)

前記リンカーが、スルホ - S P D B である、項目 6 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 6 7)

前記細胞傷害性薬剤が、マイタンシノイド、マイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、タキソイド、CC - 1 0 6 5、CC - 1 0 6 5 類似体、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリチアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アウリスチン、トメイマイシン誘導体、及びレプトマイシン誘導体または薬剤のプロドラッグからなる群から選択される、項目 6 1 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 6 8)

前記細胞傷害性薬剤がマイタンシノイドである、項目 6 1 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 6 9)

前記マイタンシノイドが D M 4 である、項目 6 8 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 7 0)

前記マイタンシノイドが D M 2 1 である、項目 6 8 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 7 1)

第 2 の (C) をさらに含む、項目 6 1 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 7 2)

第 3 の (C) をさらに含む、項目 7 1 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 7 3)

第 4 の (C) をさらに含む、項目 7 2 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 7 4)

項目 6 1 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのイムノコンジュゲートを含む組成物であって、前記イムノコンジュゲートが、A あたり平均 3 ~ 4 個の C を含む前記組成物。

(項目 7 5)

項目 4 7 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載のイムノコンジュゲートと、薬学的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。

(項目 7 6)

前記医薬組成物が、抗体またはその抗原結合断片あたり平均 2 ~ 5 の薬物を含む、項目 7 5 に記載の医薬組成物。

(項目 7 7)

前記医薬組成物が、抗体またはその抗原結合断片あたり平均 3 ~ 4 の薬物を含む、項目 7 5 に記載の医薬組成物。

(項目 7 8)

対象におけるがんを治療する方法であって、治療有効量の項目 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項

10

20

30

40

50

に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、項目 4 7 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載のイムノ
コンジュゲート、または項目 4 3、4 4、もしくは 7 4 ~ 7 7 に記載の組成物を、前記対
象に投与することを含む、前記方法。

(項目 7 9)

前記がんが、卵巣癌、子宮癌、腹膜癌、卵管癌、子宮内膜癌、肺癌、または脳癌である
、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 0)

前記がんが卵巣癌である、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 1)

前記卵巣癌が、プラチナ抵抗性上皮卵巣癌である、項目 8 0 に記載の方法。

10

(項目 8 2)

前記卵巣癌が、再発した上皮卵巣癌である、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 3)

前記卵巣癌が、プラチナ不応性上皮卵巣癌である、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 4)

前記がんが子宮癌である、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記がんが腹膜癌である、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 6)

前記がんが卵管癌である、項目 7 8 に記載の方法。

20

(項目 8 7)

前記がんが子宮内膜癌である、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記がんが肺癌である、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記がんが脳癌である、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記がんが I M G N 8 5 3 抵抗性である、項目 7 8 ~ 8 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9 1)

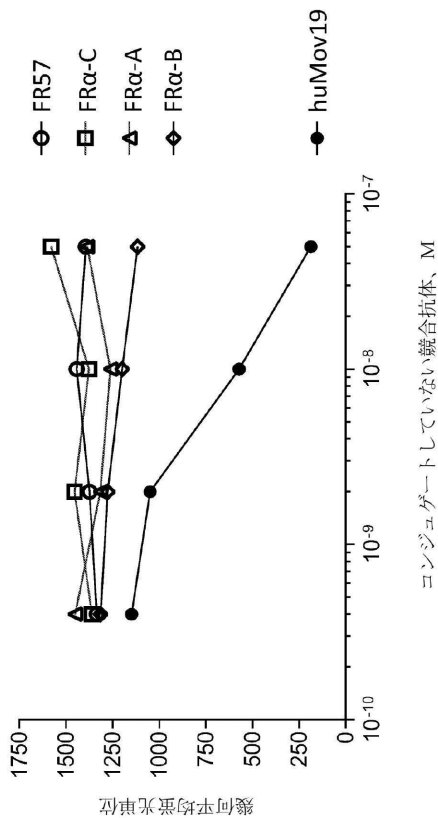
ステロイドの投与をさらに含む、項目 7 8 ~ 9 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

40

50

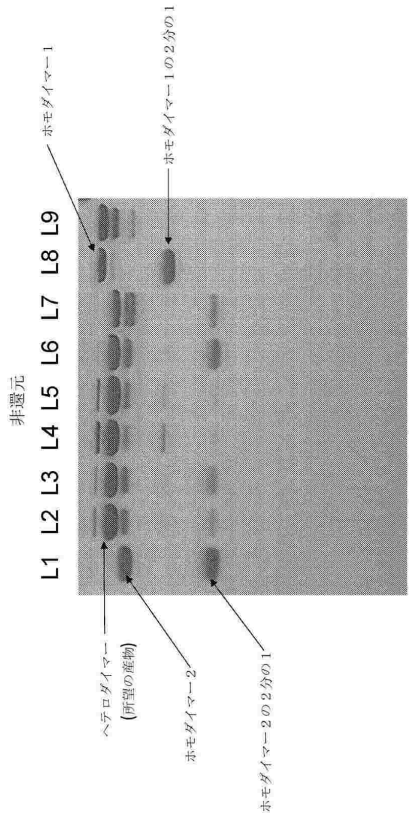
【図面】
【図 1】
【図 1】



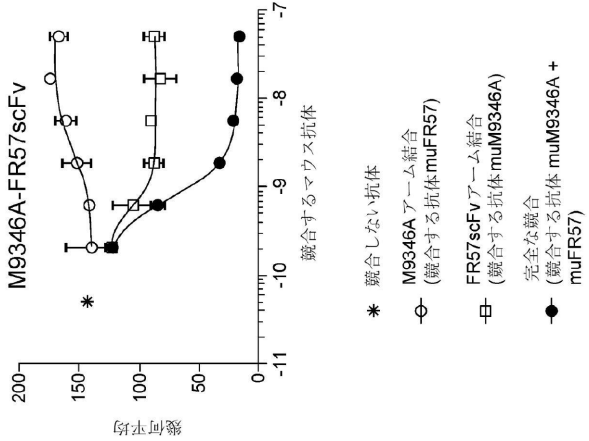
【図 2】
【図 2】

フォーマット	例示的な分子	特性	模式図
従来の抗体	<ul style="list-style-type: none">• M9346A (「huMov19」, 「MJ」)• FR57• FRα-A• FRα-B• FRα-C	2価単一特異性	
ノブリンホール (KIH)	<ul style="list-style-type: none">• FR57scFv2-ノブ- Mov19-ホール (「KIH」)• FR57scFv3Wc-ノブ- Mov19-ホール	2価二重特異性	
Morrison	<ul style="list-style-type: none">• Mov19-IgG1-FR13scFv1• Mov19-IgG1-FR57scFv1• FRα-A-IgG1-Mov19scFv1• FR7-IgG1-Mov19scFv1• FRα-AscFv2-Mov19-IgG1• FRα-BscFv2-Mov19-IgG1• FRα-CscFv2-Mov19-IgG1 (「4価」)	4価二重特異性	

【図 3】
【図 3】



【図 4 A】
【図 4 A】



10

20

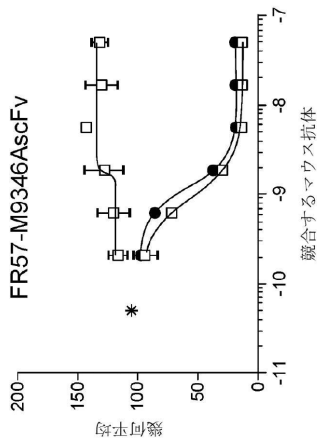
30

40

50

【図 4 B】

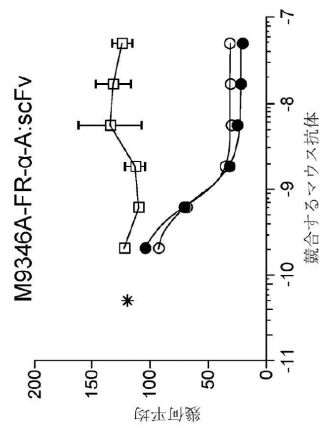
【図 4 B】



* 競合しない抗体
 □ FR57 アーム結合
 (競合する抗体 muM9346A)
 □ M9346A アーム結合
 (競合する抗体 muFR57)
 ● 完全な競合
 (競合する抗体 mu9346A +
 muFR57)

【図 4 C】

【図 4 C】

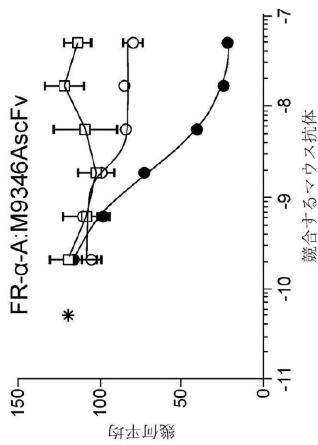


* 競合しない抗体
 □ FR-α-scFv アーム結合
 (競合する抗体 mu9346A)
 □ M9346A アーム結合
 (競合する抗体 muFR-α-A)
 ● 完全な競合
 (競合する抗体 muM9346A +
 muFR57)

10

【図 4 D】

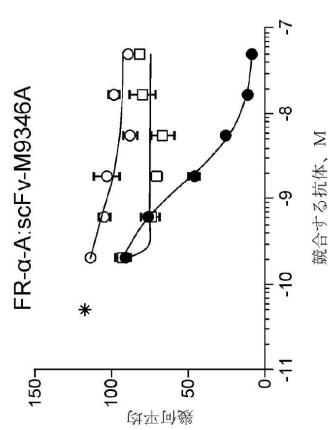
【図 4 D】



* 競合しない抗体
 □ FR57 アーム結合
 (競合する抗体 muM9346A)
 □ M9346A アーム結合
 (競合する抗体 muFR57)
 ● 完全な競合
 (競合する抗体 mu9346A +
 muFR57)

【図 4 E】

【図 4 E】



* 競合しない抗体
 □ FR-α-scFv-huM9346AFab
 (競合する抗体 muFR-α-A)
 □ M9346AFab アーム結合
 (競合する抗体 muFR-α-A)
 □ huFR-α-A:scFv アーム結合
 (競合する抗体 muM9346A)
 ● 完全な競合
 (競合する抗体 muM9346A +
 muFR-α-A)

20

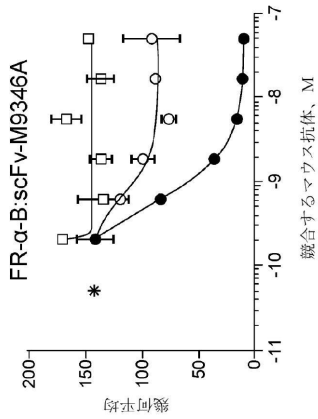
30

40

50

【図 4 F】

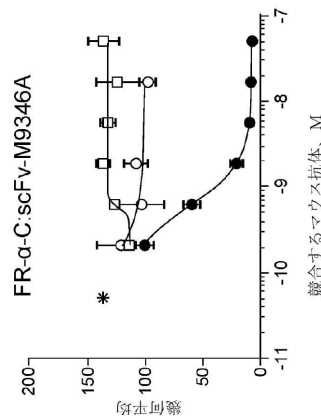
【図 4 F】



* 競合しない抗体
□ M9346AFab アーム結合
(競合する抗体muFR-α-B)
○ FR-α-B: scFv アーム結合
(競合する抗体muM9346A)
● 完全な競合
(競合する抗体mu9346A +
muFR-α-B)

【図 4 G】

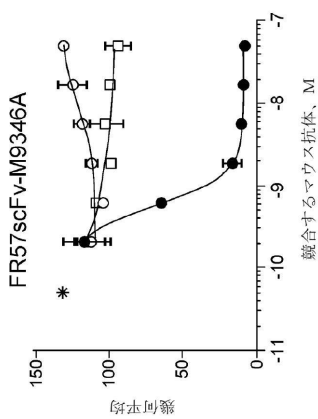
【図 4 G】



* 競合しない抗体
□ M9346AFab アーム結合
(競合する抗体muFR-α-C)
○ FR-α-C:scFv アーム結合
(競合する抗体mu9346A)
● 完全な競合
(競合する抗体muM9346A +
muFR-α-C)

【図 4 H】

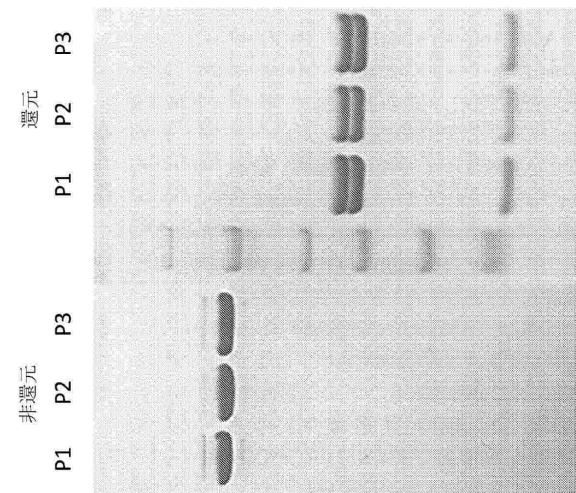
【図 4 H】



* 競合しない抗体
□ M9346A アーム結合
(競合する抗体muFR57)
○ FR57scFv アーム結合
(競合する抗体mu9346A)
● 完全な競合
(競合する抗体mu9346A +
muFR57)

【図 5】

【図 5】



10

20

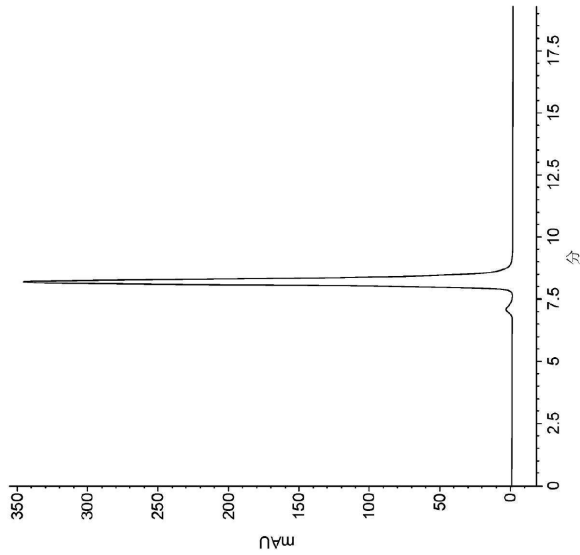
30

40

50

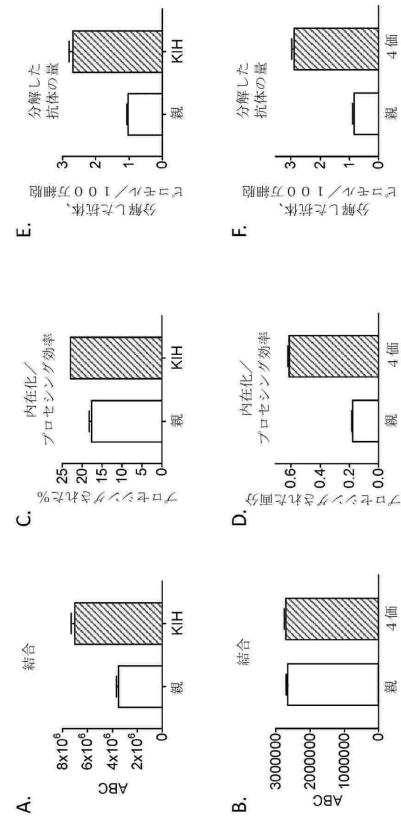
【図 6】

【図 6】



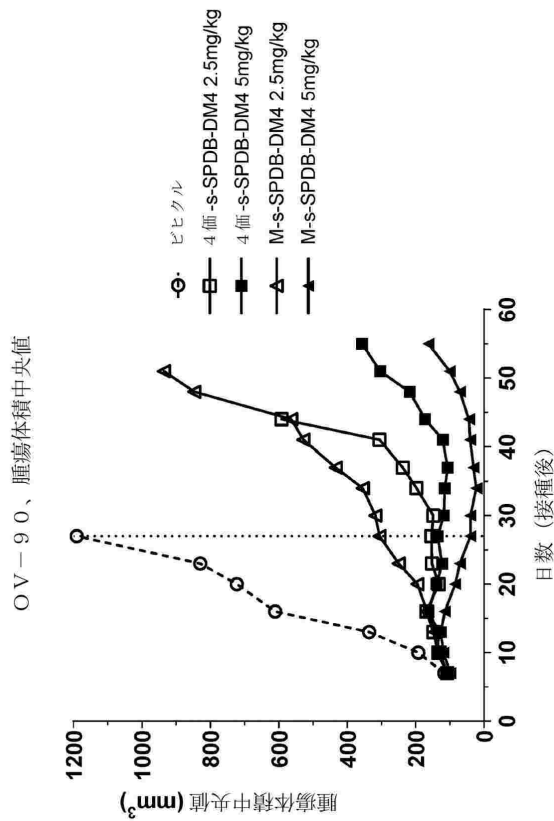
【図 7】

【図 7】



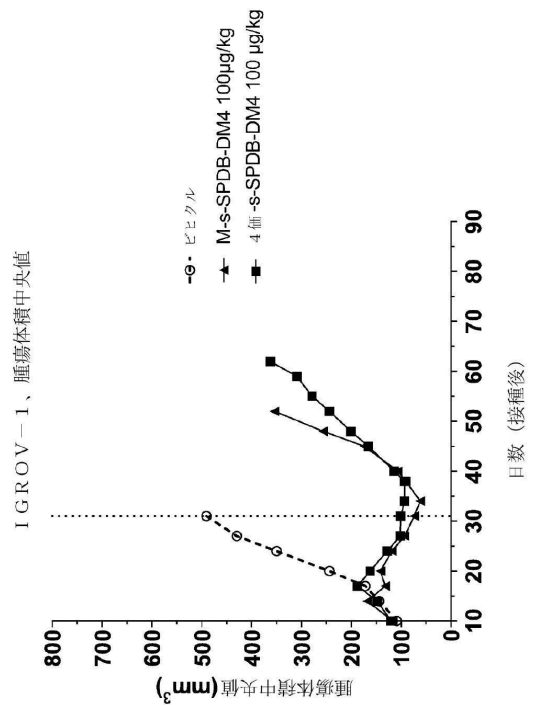
【図 8】

【図 8】



【図 9】

【図 9】



10

20

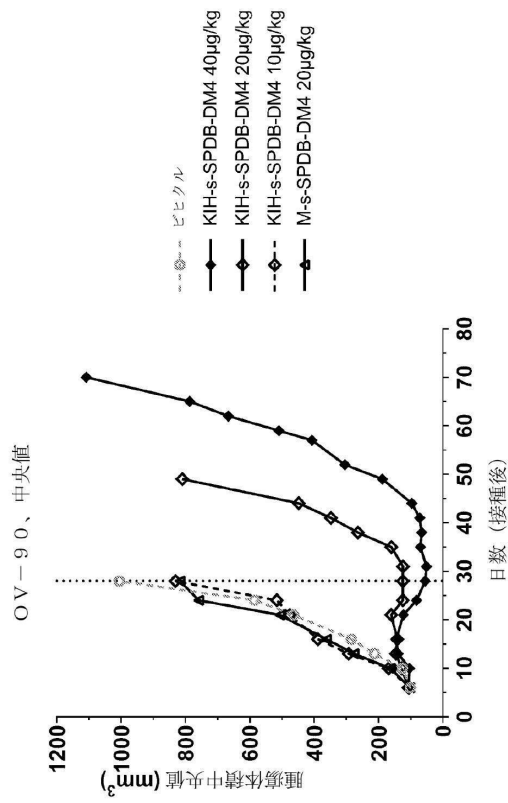
30

40

50

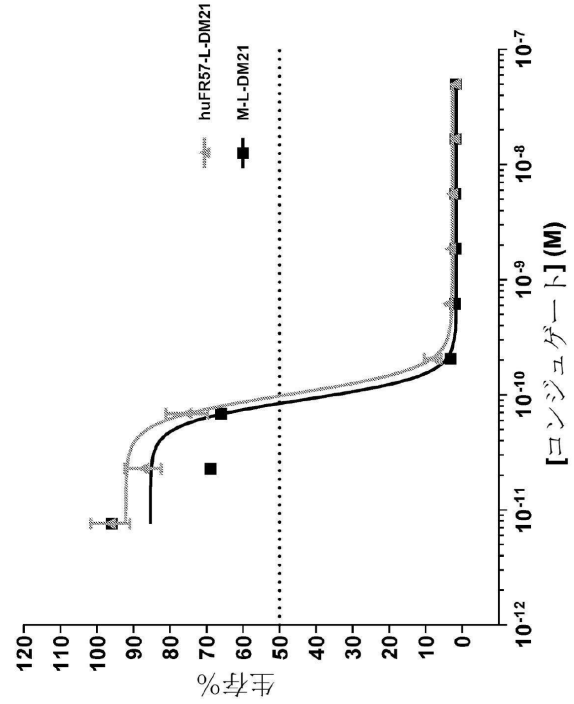
【図10】

【図10】



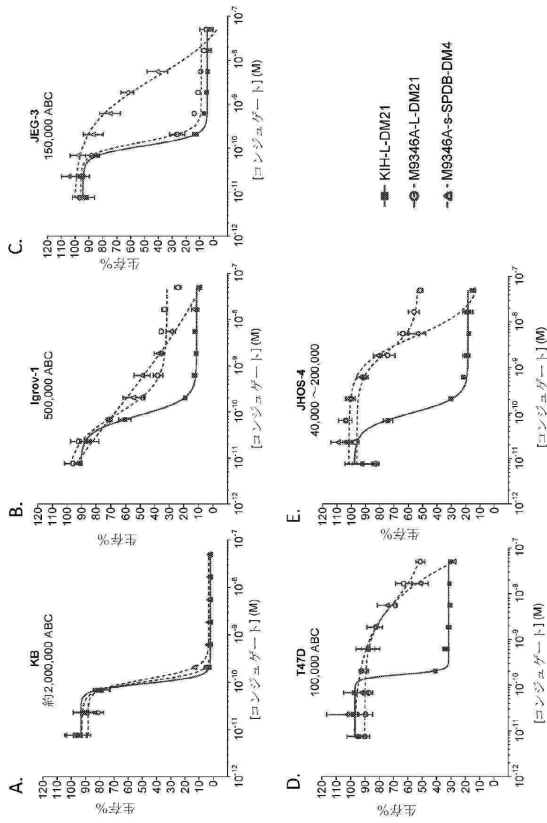
【図11】

【図11】



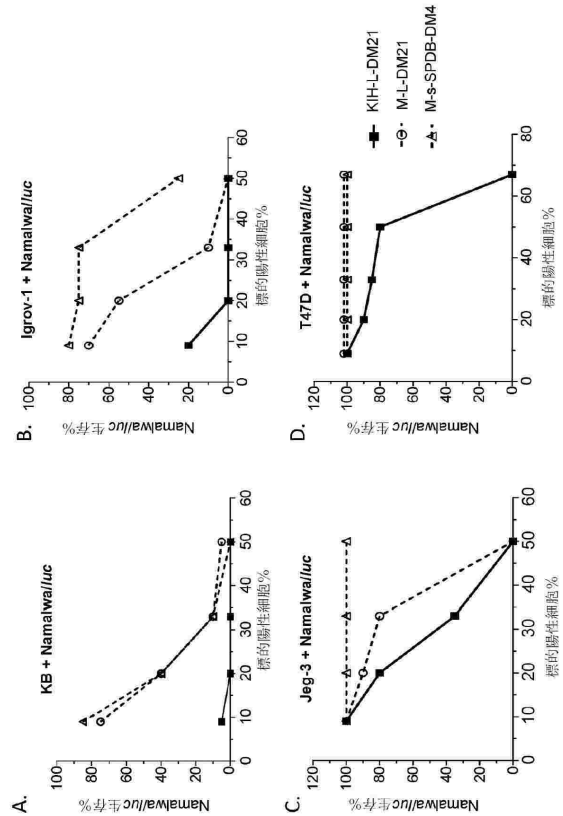
【図12】

【図12】



【図13】

【図13】



10

20

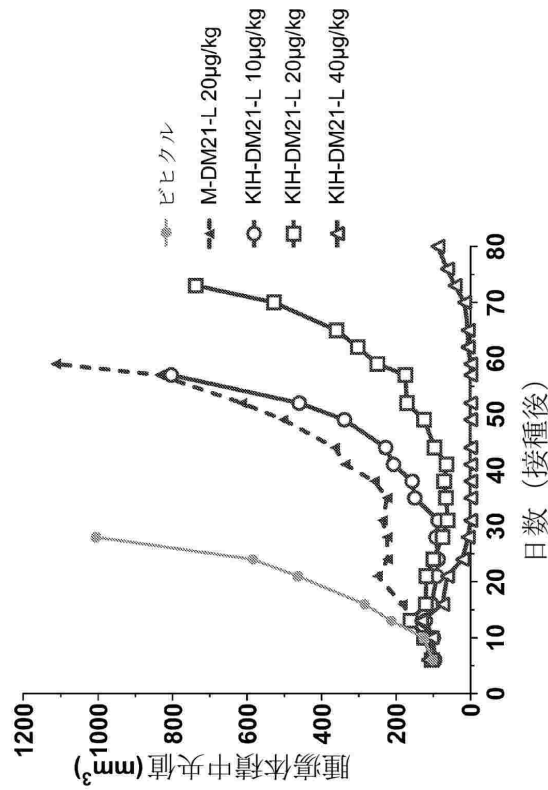
30

40

50

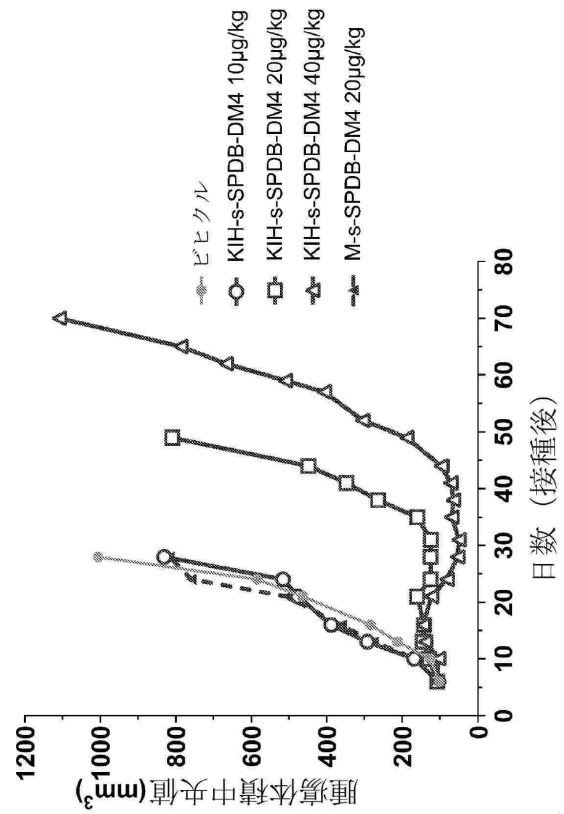
【図 14 A】

【図 14 A】



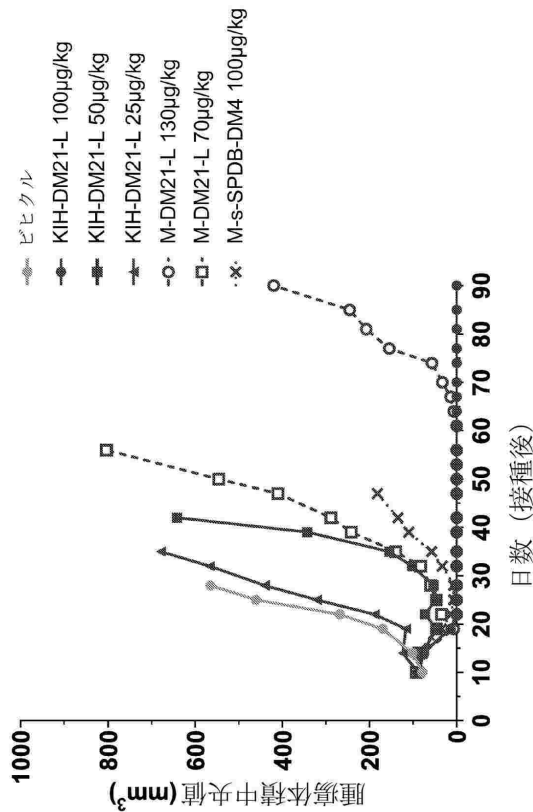
【図 14 B】

【図 14 B】



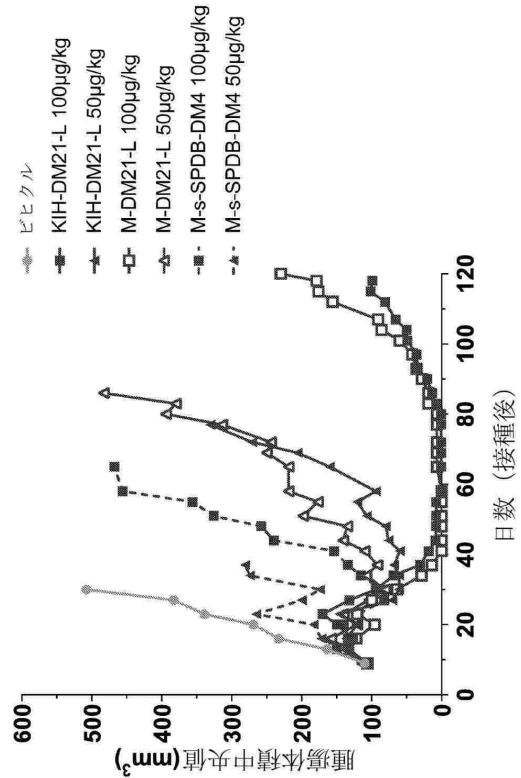
【図 15】

【図 15】



【図 16】

【図 16】



10

20

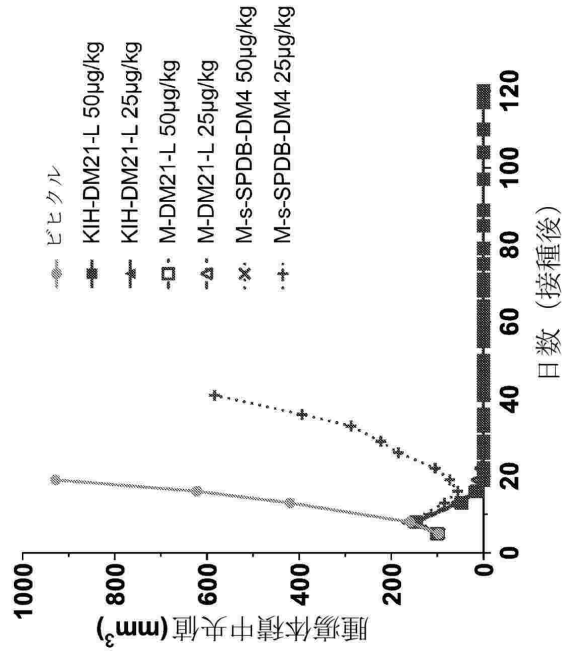
30

40

50

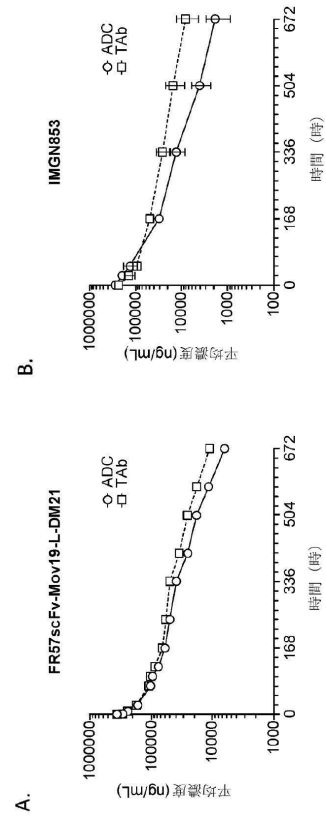
【図 17】

【図 17】



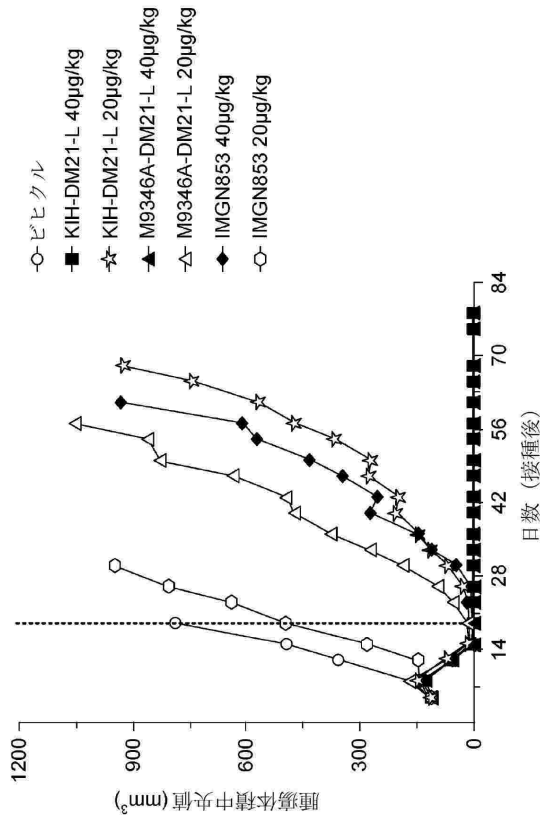
【図 18】

【図 18】



【図 19】

【図 19】



10

20

30

40

50

【配列表】

0007585230000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	31/537 (2006.01)	A 6 1 K	31/537	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 K	39/44 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	39/44	
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/54	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/65	
		A 6 1 P	35/00	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 チッテンデン, トーマス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 6, サドベリー, ウォーカー ファーム ロード 2 4

(72)発明者 セティアードー, ジュリアント

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 0, レキシントン, バーリントン ストリート 1 1 1

審査官 團野 克也

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 2 4 7 7 3 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 8 / 1 6 0 5 3 9 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

I P C C 1 2 N、C 0 7 K

D B 名 R E G I S T R Y / C A P L U S / M E D L I N E /

E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0

(J D r e a m I I I)

G e n B a n k / E M B L / G e n e s e q

U n i p r o t / G e n e s e q