

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7170642号

(P7170642)

(45)発行日 令和4年11月14日(2022.11.14)

(24)登録日 令和4年11月4日(2022.11.4)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 0 7 K

16/18

Z N A

C 0 7 K 16/40 (2006.01)

C 0 7 K

16/40

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K

39/395

T

A 6 1 K 31/5517 (2006.01)

A 6 1 K

39/395

L

A 6 1 K 31/5383 (2006.01)

A 6 1 K

31/5517

請求項の数 15 (全247頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-533514(P2019-533514)

(86)(22)出願日 平成29年12月21日(2017.12.21)

(65)公表番号 特表2020-504607(P2020-504607  
A)

(43)公表日 令和2年2月13日(2020.2.13)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/067823

(87)国際公開番号 WO2018/119196

(87)国際公開日 平成30年6月28日(2018.6.28)

審査請求日 令和2年12月18日(2020.12.18)

(31)優先権主張番号 62/438,488

(32)優先日 平成28年12月23日(2016.12.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/480,201

(32)優先日 平成29年3月31日(2017.3.31)

最終頁に続く

(73)特許権者 504039155

イミュノジェン・インコーポレーテッド

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02

451, ウォルサム, ウィンター・スト

リート 830

(73)特許権者 504438727

マクロジェニクス, インコーポレーテッ

ド

アメリカ合衆国 20850 メリーラン

ド州, ロックヴィル, メディカル セン

ター ドライブ 9704

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 A D A M 9 を標的とする免疫コンジュゲート及びその使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ヒト A D A M 9 及び c y n o A D A M 9 に特異的に結合するヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントを含む免疫コンジュゲートであって、

(I) 前記ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントは、医薬薬剤に結合されており、

(II) 前記ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントは、軽鎖可変(VL)ドメインと重鎖可変(VH)ドメインとを含み、前記重鎖可変ドメインは、C D R<sub>H</sub>1ドメイン、C D R<sub>H</sub>2ドメイン及びC D R<sub>H</sub>3ドメインを含み、前記軽鎖可変ドメインは、C D R<sub>L</sub>1ドメイン、C D R<sub>L</sub>2ドメイン及びC D R<sub>L</sub>3ドメインを含み、  
前記C D R<sub>H</sub>1ドメイン、前記C D R<sub>H</sub>2ドメイン及び前記C D R<sub>H</sub>3ドメインと、前記C D R<sub>L</sub>1ドメイン、前記C D R<sub>L</sub>2ドメイン及び前記C D R<sub>L</sub>3ドメインが、以下からなる群から選択される配列：

(a) それぞれ、配列番号8、35及び45配列番号62、13、14；

(b) それぞれ、配列番号8、35及び38及び配列番号62、13、14；

(c) それぞれ、配列番号8、35及び39及び配列番号62、13、14；

(d) それぞれ、配列番号8、35及び40及び配列番号62、13、14；

(e) それぞれ、配列番号8、35及び41及び配列番号62、13、14；

(f) それぞれ、配列番号8、35及び42及び配列番号62、13、14；

(g) それぞれ、配列番号8、35及び43及び配列番号62、13、14；

(h) それぞれ、配列番号 8、35 及び 44 及び配列番号 62、13、14；  
 (i) それぞれ、配列番号 8、35 及び 37 及び配列番号 62、13、14；並びに  
 (j) それぞれ、配列番号 8、35 及び 46 及び配列番号 62、13、14  
 を含む、前記免疫コンジュゲート。

【請求項 2】

(A) 前記 V H ドメインが、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28 又は配列番号 29 を含む；かつ

(B) 前記 V L ドメインが、配列番号 54、配列番号 55、配列番号 56 又は配列番号 57 を含む、請求項 1 に記載の免疫コンジュゲート。

10

【請求項 3】

前記 C D R<sub>H</sub>1 ドメインが、アミノ酸配列 S Y W M H (配列番号 8) を含む、前記 C D R<sub>H</sub>2 ドメインが、アミノ酸配列 E I I P I F G H T N Y N E K F K S (配列番号 35) を含む、前記 C D R<sub>H</sub>3 ドメインが、アミノ酸配列 G G Y Y Y Y P R Q G F L D Y (配列番号 45) を含む、前記 C D R<sub>L</sub>1 ドメインが、アミノ酸配列 K A S Q S V D Y S G D S Y M N (配列番号 62) を含む、前記 C D R<sub>L</sub>2 ドメインが、アミノ酸配列 A A S D L E S (配列番号 13) を含む、前記 C D R<sub>L</sub>3 ドメインが、アミノ酸配列 Q Q S H E D P F T (配列番号 14) を含む、請求項 1 に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 4】

前記免疫コンジュゲートが、

20

(A) h M A B - A (2 I . 2) の重鎖可変 (V H) ドメイン (配列番号 28)；および / または

(B) h M A B - A (2 I . 2) の軽鎖可変 (V L) ドメイン (配列番号 55)；および / または

(C) h M A B - A (2 I . 2) の重鎖可変 (V H) ドメイン (配列番号 28) 及び h M A B - A (2 I . 2) の軽鎖可変 (V L) ドメイン (配列番号 55)

を含む、請求項 3 に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 5】

前記免疫コンジュゲートが F c 領域を含み、任意選択で、前記 F c 領域が、

(a) F c R に対する変異体 F c 領域のアフィニティを下げる 1 つ以上のアミノ酸改変；及び / または

30

(b) システイン残基を導入する 1 つ以上のアミノ酸改変；及び / または

(c) 血清半減期を延ばす 1 つ以上のアミノ酸改変

を含む変異体 F c 領域である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 6】

(I) F c R に対する変異体 F c 領域のアフィニティを下げる前記 1 つ以上のアミノ酸改変が、

(A) L 2 3 4 A；

(B) L 2 3 5 A；または

40

(C) L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A

を含み；および / または

(II) システイン残基を導入する前記 1 つ以上のアミノ酸改変が、S 4 4 2 C を含む；および / または

(III) 血清半減期を延ばす前記 1 つ以上のアミノ酸改変が：

(A) M 2 5 2 Y；

(B) M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T；

(C) M 2 5 2 Y 及び T 2 5 6 E；

(D) M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E；又は

(E) K 2 8 8 D 及び H 4 3 5 K

50

を含み、前記番号付けが、K a b a tにあるE Uインデックスの番号付けである、請求項 5 に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 7】

前記ヒト化抗 A D A M 9 抗体が、

- ( a ) それぞれ、配列番号 1 5 2 及び配列番号 6 8 ;
- ( b ) それぞれ、配列番号 1 4 1 及び配列番号 6 8 ;
- ( c ) それぞれ、配列番号 1 4 2 及び配列番号 6 8 ;
- ( d ) それぞれ、配列番号 1 4 3 及び配列番号 6 8 ;
- ( e ) それぞれ、配列番号 1 5 1 及び配列番号 6 8 ;
- ( f ) それぞれ、配列番号 5 2 及び配列番号 6 8 ;
- ( g ) それぞれ、配列番号 1 5 3 及び配列番号 6 8 ; 及び
- ( h ) それぞれ、配列番号 1 5 4 及び配列番号 6 8

からなる群から選択される配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 8】

配列番号 1 4 1、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 3、配列番号 1 5 1、配列番号 1 5 2、配列番号 1 5 3 または配列番号 1 5 4 の X が存在しない、請求項 7 に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 9】

前記ヒト化抗 A D A M 9 抗体が、配列番号 1 5 2 及び配列番号 6 8 の配列をそれぞれ有する重鎖及び軽鎖を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 10】

前記医薬薬剤が、メイタンシノイド化合物、ピロロベンゾジアゼピン化合物、又はインドリノベンゾジアゼピン化合物である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 11】

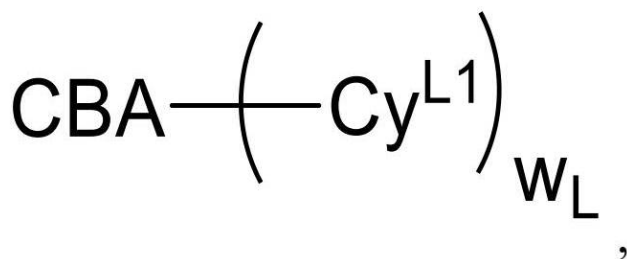
前記医薬薬剤が、メイタンシノイド化合物である、請求項 10 に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 12】

前記免疫コンジュゲートが、以下からなる群から選択される式：

( I )

【化 1】



ここで、

C B A は、リシン残基を介して C y <sup>L 1</sup> に共有結合する、前記ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントであり；

W <sub>L</sub> は、1 ~ 2 0 の整数であり；

C y <sup>L 1</sup> は、以下の式

10

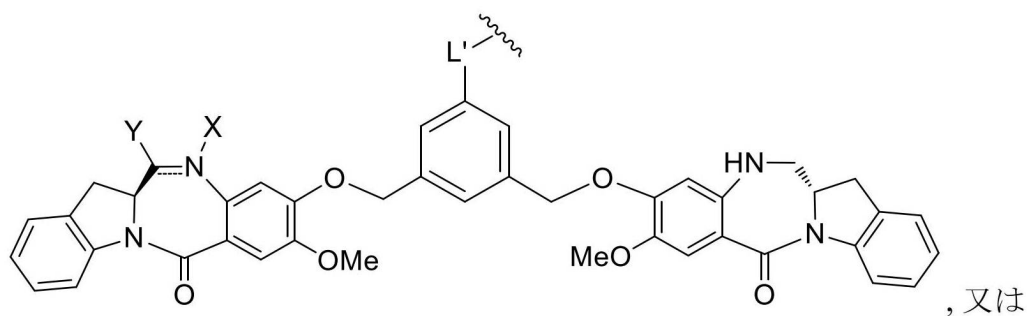
20

30

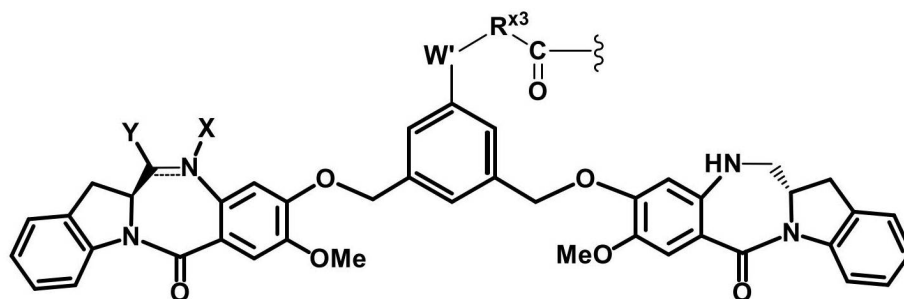
40

50

## 【化 2】



10



によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり：

20

NとCとの間の二重線

## 【化 3】



は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

30

W'は、-NR<sup>e</sup>であり、

R<sup>e</sup>は、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>であり；

nは、2～6の整数であり；

R<sup>k</sup>は、-Hまたは-Meであり；

R<sup>x3</sup>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

L'は、以下の式

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)-(B1')；または

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-S-Z<sup>s1</sup>-(B2')

によって表され、

R<sub>5</sub>は、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキルであり；

40

Pは、アミノ酸残基または2～20個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；

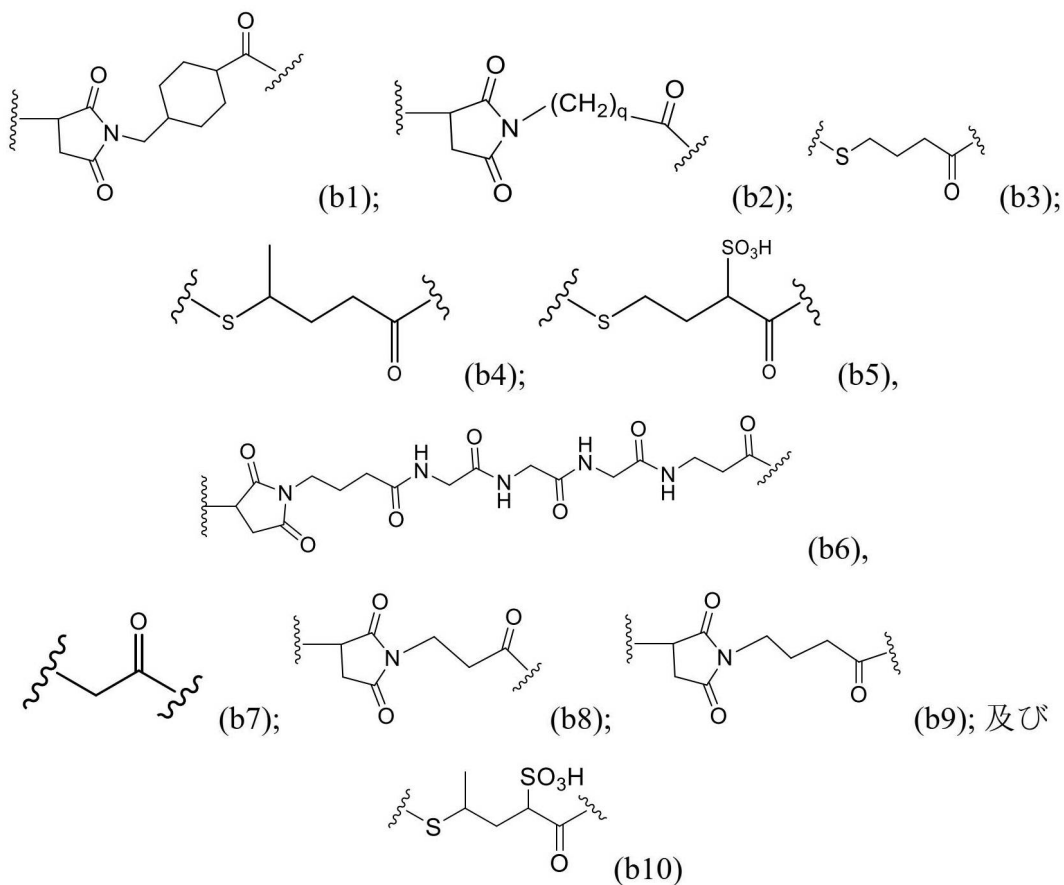
R<sub>a</sub>及びR<sub>b</sub>は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、-H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキル、または帯電した置換基またはイオン化可能な基Qであり；

mは、1～6の整数であり；

Z<sup>s1</sup>は、以下の式

50

## 【化 4】



10

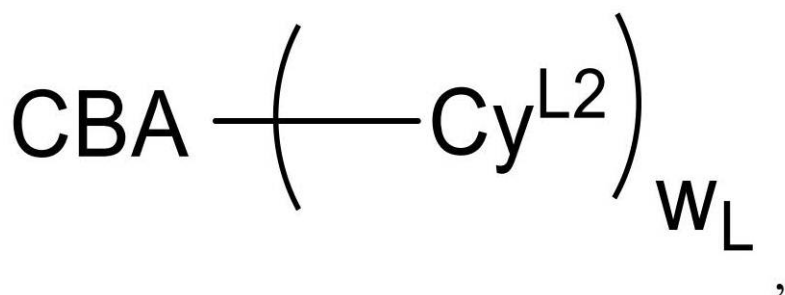
20

のいずれか 1 つから選択され、

q は、1 ~ 5 の整数であり、そして任意選択で、前記医薬的に許容される塩はナトリウム塩またはカリウム塩である；

( I I )

## 【化 5】



30

40

ここで、

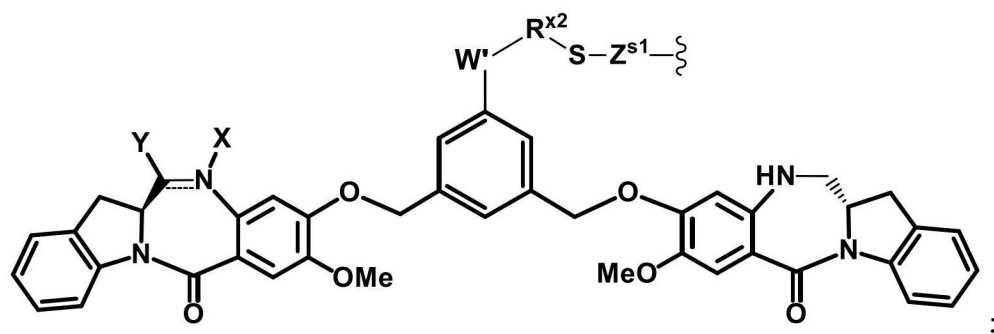
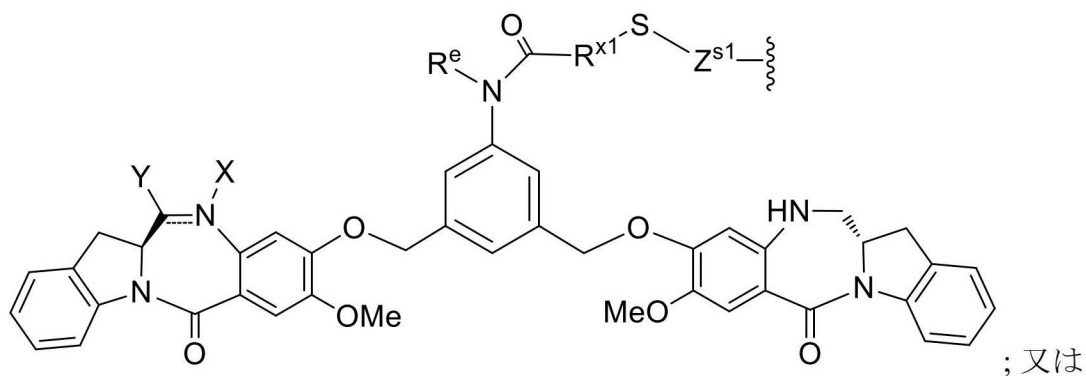
CBA は、リシン残基を介して  $\text{Cy}^{\text{L2}}$  に共有結合する、前記ヒト化抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントであり；

$\text{WL}$  は、1 ~ 20 の整数であり；

$\text{Cy}^{\text{L2}}$  は、以下の式

50

## 【化 6】



によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり：

NとCとの間の二重線

## 【化 7】



は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであり；

R<sup>x1</sup>及びR<sup>x2</sup>は、独立に(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

R<sup>e</sup>は、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

W'は、-N<sup>R<sup>e</sup></sup>であり、

R<sup>e</sup>は、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>であり；

nは、2～6の整数であり；

R<sup>k</sup>は、-Hまたは-Meであり；

Z<sup>s1</sup>は、以下の式

10

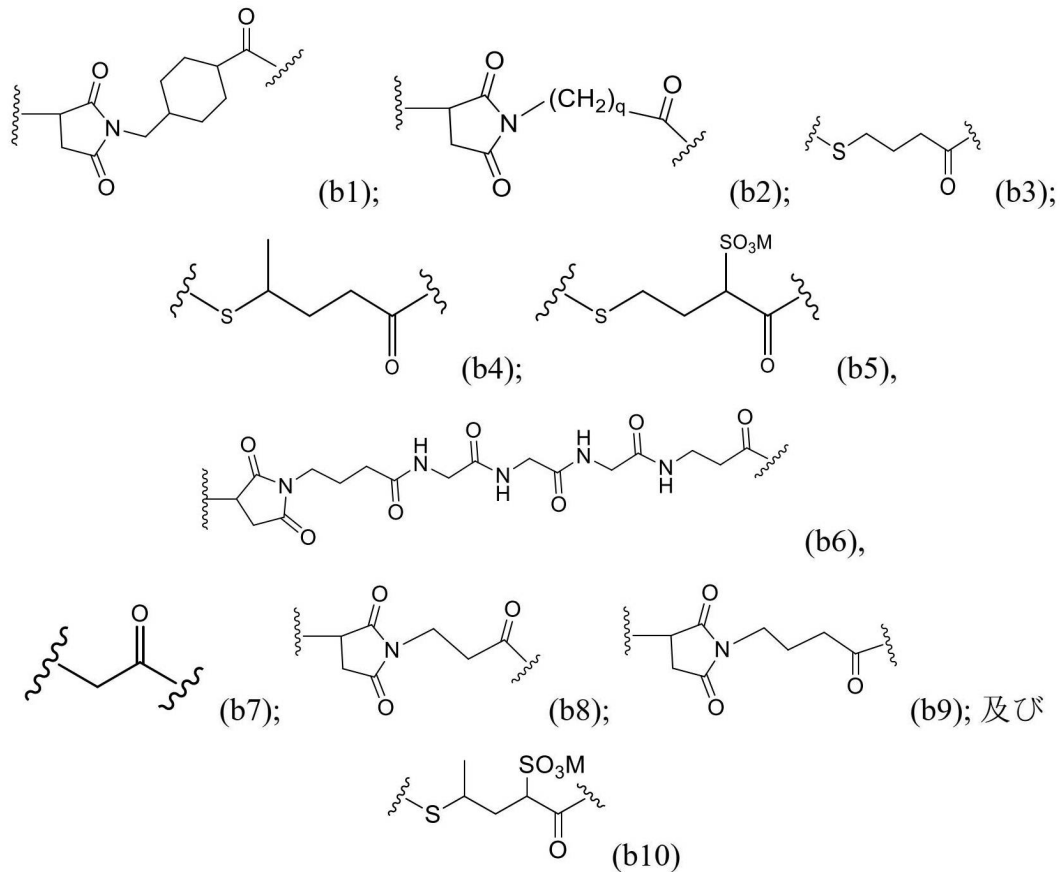
20

30

40

50

## 【化 8】



10

20

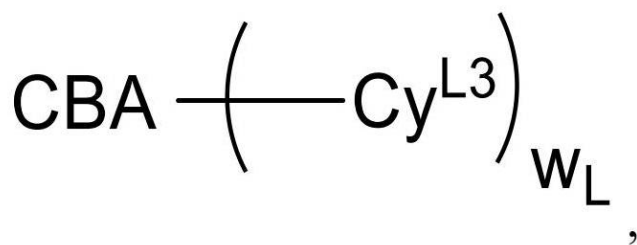
のいずれか 1 つから選択され、

q は、1 ~ 5 の整数であり、そして任意選択で、前記医薬的に許容される塩はナトリウム塩またはカリウム塩である；

( I I I )

## 【化 9】

30



40

ここで、

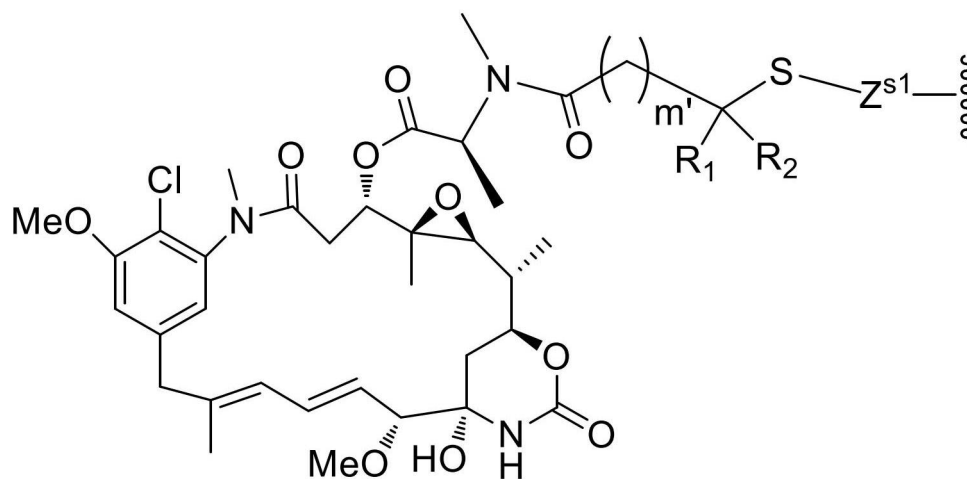
CBA は、リシン残基を介して  $\text{Cy}^{\text{L3}}$  に共有結合する、前記ヒト化抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントであり；

$\text{WL}$  は、1 ~ 20 の整数であり；

$\text{Cy}^{\text{L3}}$  は、以下の式

50

## 【化 1 0】



10

によって表され：

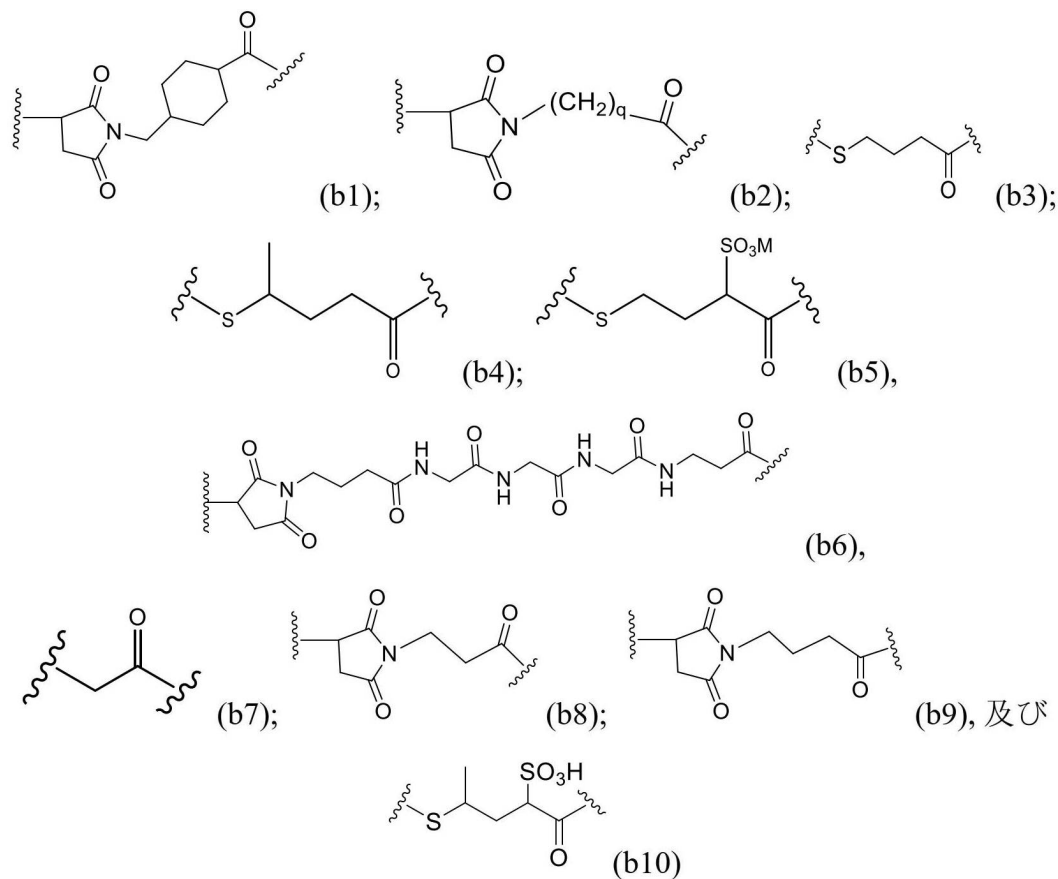
$m'$  は 1 または 2 であり；

$R^1$  および  $R^2$  は、それぞれ独立に、H または ( $C_1 - C_3$ ) アルキルであり；

$Z^{s1}$  は、以下の式

20

## 【化 1 1】



30

40

のいずれか 1 つから選択され、

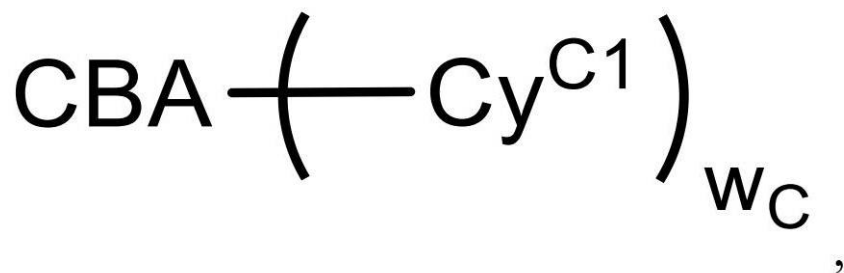
$q$  は、1 ~ 5 の整数であり、そして任意選択で、前記医薬的に許容される塩はナトリウム塩またはカリウム塩である；

( I V )

50



【化 1 2】



10

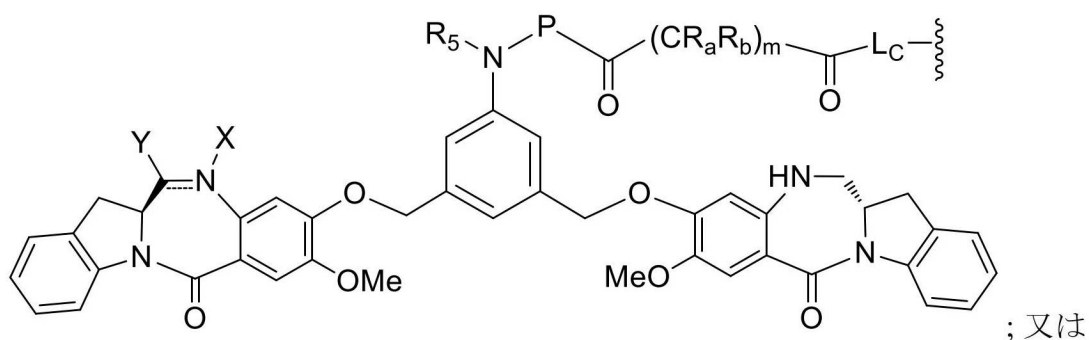
ここで、

CBAは、システイン残基を介して $\text{Cy}^{\text{C}1}$ に共有結合する、前記ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントであり；

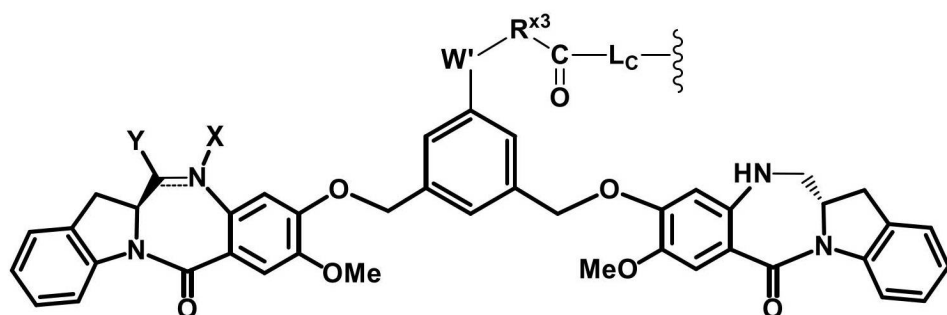
$\text{W}_\text{C}$ は、1または2であり；

$\text{Cy}^{\text{C}1}$ は、以下の式

【化 1 3】



20



30

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり；

NとCとの間の二重線

【化 1 4】



40

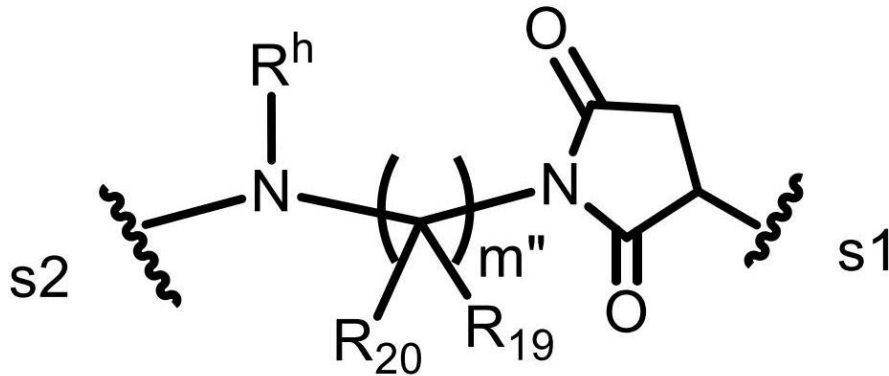
は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

R<sup>5</sup>は、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキルであり；

50

P は、アミノ酸残基または 2 ～ 20 個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；  
 $R_a$  及び  $R_b$  は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、- H、(  $C_1 - C_3$  ) アルキル、  
 または帯電した置換基またはイオン化可能な基 Q であり；  
 $W'$  は、-  $N R^e$  であり、  
 $R^e$  は、- (  $CH_2 - CH_2 - O$  )  $_n$  -  $R^k$  であり；  
 $n$  は、2 ～ 6 の整数であり；  
 $R^k$  は、- H または - Me であり；  
 $R^{x3}$  は (  $C_1 - C_6$  ) アルキルであり；  
 $L_c$  は  
 【化 15】

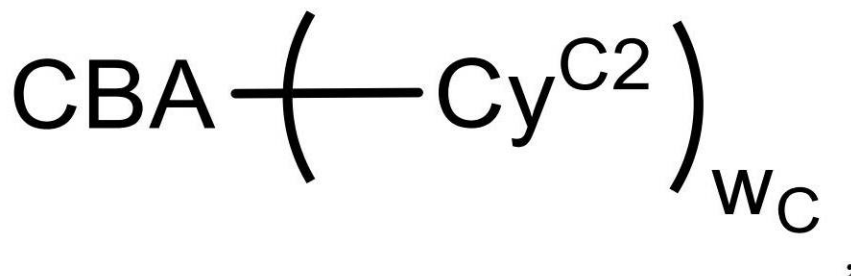
10



20

で表され、 $s_1$  は、CBA に共有結合した部位であり、 $s_2$  は、 $Cy^{C1}$  上の - C ( = O ) - 基に共有結合した部位であり；  
 $R_{19}$  及び  $R_{20}$  は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、- H または (  $C_1 - C_3$  )  
 アルキルであり；  
 $m''$  は、1 ～ 10 の整数であり；  
 $R^h$  は、- H または (  $C_1 - C_3$  ) アルキルであり、そして任意選択で、前記医薬的に許  
 容される塩はナトリウム塩またはカリウム塩である；  
 ( V )  
 【化 16】

30

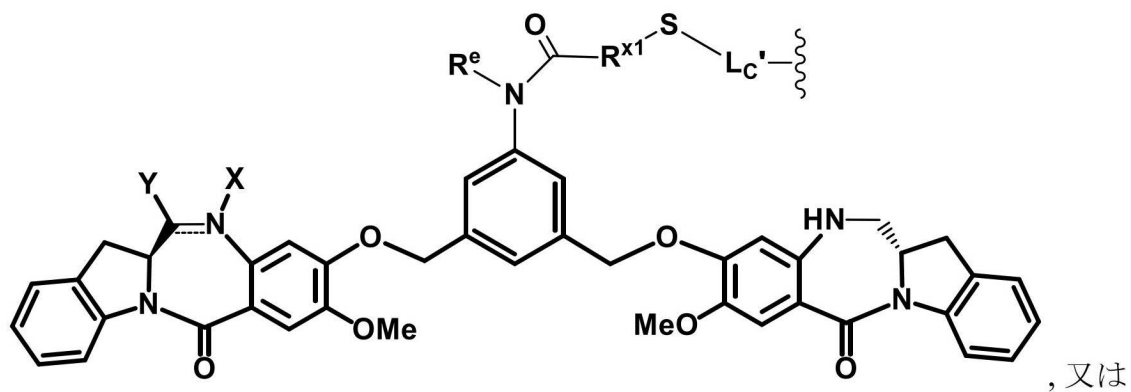


40

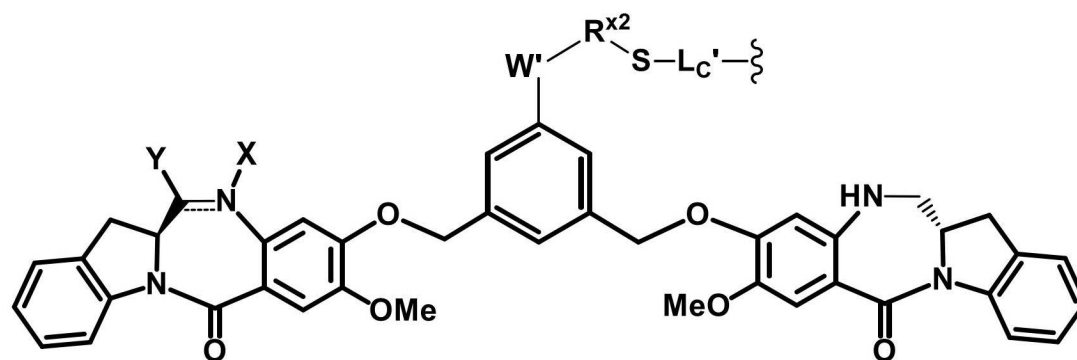
ここで、  
 CBA は、システイン残基を介して  $Cy^{C2}$  に共有結合する、前記ヒト化抗 ADAM9  
 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントであり；  
 $W_c$  は、1 または 2 であり；  
 $Cy^{C2}$  は、以下の式

50

## 【化 1 7】



10



20

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり；

NとCとの間の二重線

## 【化 1 8】



30

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

R<sup>x1</sup>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

R<sup>e</sup>は、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

W'は、-N<sup>R'</sup>であり；

R<sup>e</sup>は、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>であり；

nは、2～6の整数であり；

R<sup>k</sup>は、-Hまたは-Meであり；

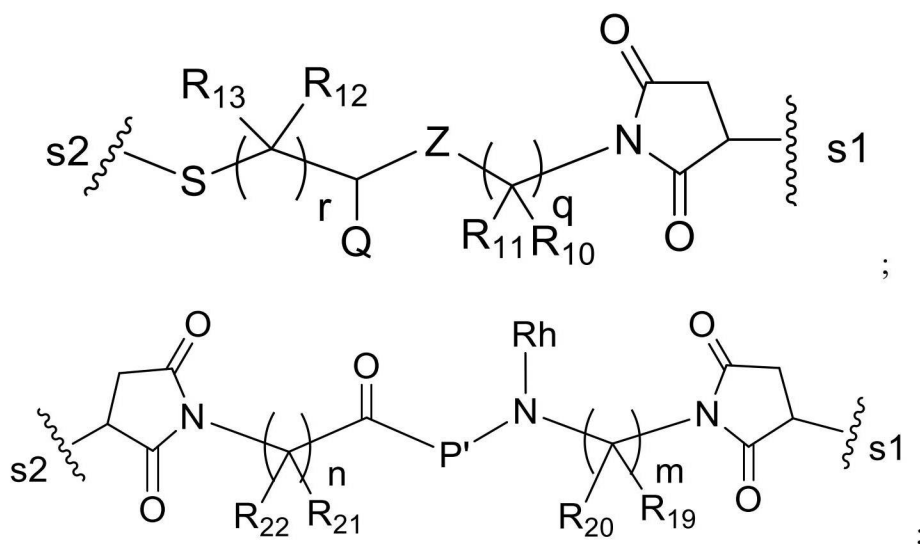
R<sup>x2</sup>は(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

L<sub>C</sub>'は

40

50

## 【化 19】



10

で表され、 $s1$  は、CBAに共有結合した部位であり、 $s2$  は、 $Cy^{C2}$  上の - S - 基に共有結合した部位であり；

Z は、 $C(=O) - NR_9 -$  または  $- NR_9 - C(=O) -$  であり；

20

Q は、- H、帯電した置換基またはイオン化可能な基であり；

$R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{19}$ 、 $R_{20}$ 、 $R_{21}$  及び  $R_{22}$  は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、- Hまたは $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；

$q$  及び  $r$  は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、0 ~ 10 の整数であり；

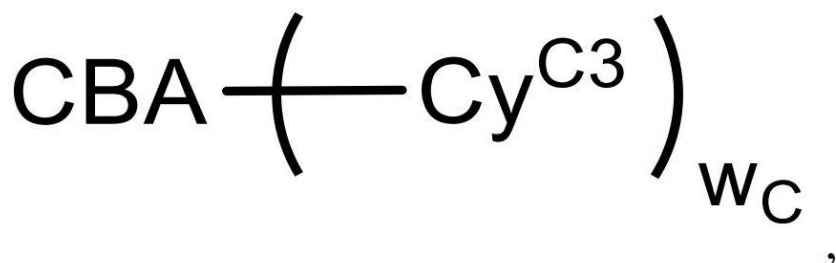
$m$  及び  $n$  は、それぞれ独立して、0 ~ 10 の整数であり；

$R^h$  は、- Hまたは $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；

$P'$  は、アミノ酸残基または2 ~ 20個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり、そして任意選択で、前記医薬的に許容される塩はナトリウム塩またはカリウム塩である；および (VI)

## 【化 20】

30



40

ここで、

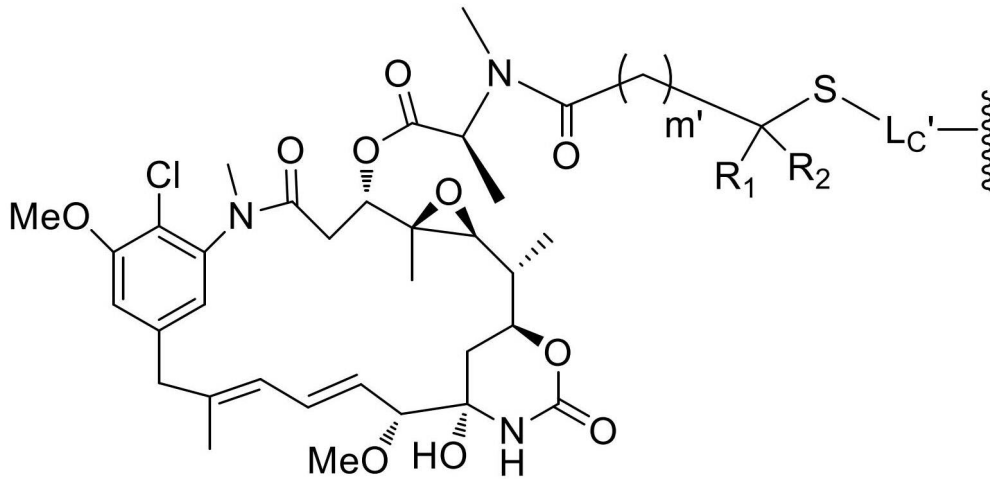
CBA は、システイン残基を介して  $Cy^{C3}$  に共有結合する、前記ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントであり；

$w_C$  は、1または2であり；

$Cy^{C3}$  は、以下の式

50

## 【化 2 1】



10

によって表され：

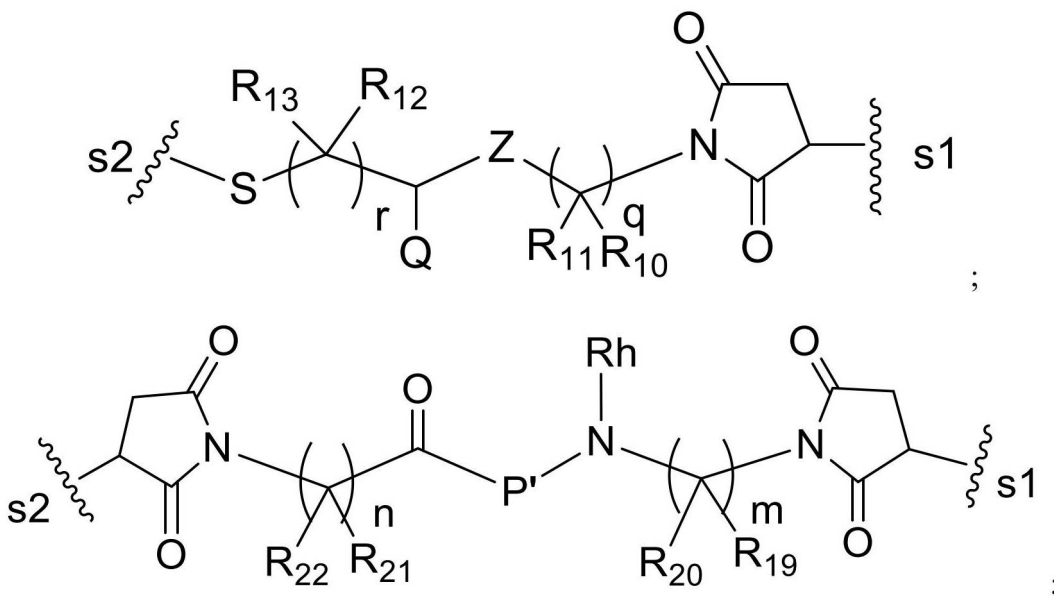
$m'$  は、1 または 2 であり；

$R_1$  および  $R_2$  は、それぞれ独立して、- H または ( $C_1 - C_3$ ) アルキルであり；

$L_c$  は

20

## 【化 2 2】



30

で表され、 $s_1$  は、CBA に共有結合した部位であり、 $s_2$  は、 $Cy^{C^3}$  上の - S - 基に共有結合した部位であり；

Z は、- C(=O) -  $NR_9$  - または -  $NR_9$  - C(=O) - であり；

Q は、- H、帯電した置換基またはイオン化可能な基であり；

$R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{19}$ 、 $R_{20}$ 、 $R_{21}$  及び  $R_{22}$  は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、- H または ( $C_1 - C_3$ ) アルキルであり；

$q$  及び  $r$  は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、0 ~ 10 の整数であり；

$m$  及び  $n$  は、それぞれ独立して、0 ~ 10 の整数であり；

$R^h$  は、- H または ( $C_1 - C_3$ ) アルキルであり；

$P'$  は、アミノ酸残基または 2 ~ 20 個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり、そして任意選択で、前記医薬的に許容される塩はナトリウム塩またはカリウム塩である；

50

によって表される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 13】

有効量の請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートと、医薬的に許容される担体、賦形剤または希釈剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 14】

ADAM9 の発現と関連するか、または ADAM9 の発現によって特徴付けられる疾患または状態の治療における使用のための医薬組成物であって、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートを含む、前記医薬組成物。

【請求項 15】

ADAM9 と関連するか、または ADAM9 によって特徴付けられる前記疾患または状態が、がんであり、任意選択で、前記がんが、非小細胞肺癌、大腸癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、腎細胞癌、前立腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、子宮癌、卵巣癌、肝臓癌、子宮頸癌、甲状腺癌、精巣癌、骨髄がん、黒色腫及びリンパがんからなる群から選択される、請求項 14 に記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016 年 12 月 23 日に出願された米国特許出願番号第 62 / 438 , 488 号、2017 年 3 月 31 日に出願された米国特許出願第 62 / 480 , 201 号に対する優先権を主張し、これらの出願は、その全体が本明細書に参考として組み込まれる。

20

【0002】

本発明は、少なくとも 1 種類の医薬薬剤に結合される「ジスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメインを含有するタンパク質 9」（「ADAM9」）に特異的に結合することが可能な抗体またはそのフラグメントを含む免疫コンジュゲートに関する。本発明は、特に、ヒト ADAM9 及び非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）の ADAM9 と交差反応する、このような免疫コンジュゲートに関する。本発明は、更に、レシピエント対象にこのような免疫コンジュゲートを投与すると免疫原性の低下を示すようなヒト化及び／または脱免疫化された軽鎖可変（VL）ドメイン及び／または重鎖可変（VH）ドメインを含む、全てのこのような免疫コンジュゲートに関する。本発明はまた、このような免疫コンジュゲートのいずれかを含有する医薬組成物、並びにがん及び他の疾患及び状態の治療において、このような免疫コンジュゲートのいずれかの使用を伴う方法に関する。

30

【背景技術】

【0003】

ADAM は、種々の生理学的プロセス及び疾病プロセスに關与するタンパク質の一ファミリーである（Amendola, R. S. et al. (2015) 「ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2」, J. Leukocyte Biol. 97(5): 951 - 962; Edwards, D. R. et al. (2008) 「The ADAM Metalloproteases」 Molec. Aspects Med. 29: 258 - 289）。このファミリーの少なくとも 40 の遺伝子群が同定されており、このような群のうち、少なくとも 21 が、ヒトにおいて機能性であると考えられている（Li, J. et al. (2016) 「Overexpression of ADAM9 Promotes Colon Cancer Cells Invasion」 J. Invest. Surg. 26(3): 127 - 133; Duffy, M. J. et al. (2011) 「The ADAMs Family Of Proteases: New Biomarkers And Therapeutic Targets For Cancer?」 Clin. Proteomics 8: 9: 1 - 13; 米国特許出願公開第 2013 / 0045244 号も参照）。

40

50

## 【0004】

ADAMファミリーメンバーは、8個のドメインを有する十分に保存された構造を有し、特に、メタロプロテアーゼドメイン及びインテグリン結合（ジスインテグリン）ドメインを有する（Duffy, M. J. et al. (2009) 「The Role Of ADAMs In Disease Pathophysiology」 Clin. Chim. Acta 403:31 - 36）。ADAMメタロプロテアーゼドメインは、シェダーゼ（shedase）として作用し、膜貫通タンパク質を開裂させることによって一連の生体プロセスを調整することが報告されており、次いで、可溶性リガンドとして作用し、細胞シグナル伝達を制御することができる（Amendola, R. S. et al. (2015) 「ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2」 J. Leukocyte Biol. 97(5):951 - 962; Ito, N. et al. (2004) 「ADAMs, A Disintegrin And Metalloproteinases, Mediate Shedding Of Oxytocinase」 Biochem. Biophys. Res. Commun. 314(2004)1008 - 1013）。

10

## 【0005】

ADAM9は、分子のADAMファミリーのメンバーである。不活性な形態として合成され、タンパク質分解により開裂し、活性な酵素を生成する。上流部位での処理は、酵素前駆体の活性化にとって特に重要である。ADAM9は、線維芽細胞で発現し（Zigrino, P. et al. (2011) 「The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM - 9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts」 J. Biol. Chem. 286:6801 - 6807）、活性化された血管平滑筋細胞（Sun, C. et al. (2010) 「ADAM15 Regulates Endothelial Permeability And Neutrophil Migration Via Src/ERK1/2 Signaling」 Cardiovasc. Res. 87:348 - 355）、単球（Namba, K. et al. (2001) 「Involvement Of ADAM9 In Multinucleated Giant Cell Formation Of Blood Monocytes」 Cell. Immunol. 213:104 - 113）、活性化されたマクロファージ（Oksala, N. et al. (2009) 「ADAM - 9, ADAM - 15, And ADAM - 17 Are Upregulated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries - Tampere Vascular Study」, Ann. Med. 41:279 - 290）で発現する。

20

30

## 【0006】

ADAM9のメタロプロテアーゼ活性は、マトリックス構成要素の変成に関与し、それにより、腫瘍細胞の移動が可能になる（Amendola, R. S. et al. (2015) 「ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2」 J. Leukocyte Biol. 97(5):951 - 962）。そのジスインテグリンドメインは、多くのヘビ毒ジスインテグリンに対して高度に相同性であり、ADAM9及びインテグリンと相互作用が可能であり、ADAM9が細胞接着事象を正または負に調整することができる（Zigrino, P. et al. (2011) 「The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM - 9 Mediate Interactions Between Melanoma

40

50

Cells And Fibroblasts」 J. Biol. Chem. 286: 6801 - 6807; Karadag, A. et al. (2006) 「ADAM-9 (MD C-9/Meltringamma), A Member Of The A Disintegrin And Metalloprotease Family, Regulates Myeloma-Cell-Induced Interleukin-6 Production In Osteoblasts By Direct Interaction With The Alpha(v)Beta5 Integrin」 Blood 107: 3271 - 3278; Cominetti, M. R. et al. (2009) 「Inhibition Of Platelets And Tumor Cell Adhesion By The Disintegrin Domain Of Human ADAM9 To Collagen I Under Dynamic Flow Conditions」, Biochimie, 91: 1045 - 1052)。ADAM9ジスインテグリンドメインは、61、64、5及び91インテグリンと相互作用することが示されている。

#### 【0007】

ADAM9の発現は、疾患、特に、がんと関係があることがわかっている。ADAM9は、腫瘍化及び血管新生において重要な役割を有する多くの分子、例えば、TEK、KDR、EPHB4、CD40、VCAM1及びCDH5を開裂させ、放出することがわかっている。ADAM9は、乳癌、結腸癌、胃癌、グリオーマ、肝臓癌、非小細胞肺癌、黒色腫、骨髄腫、膵臓癌及び前立腺癌の腫瘍細胞を含め、多くの腫瘍細胞型によって発現する (Yoshimasu, T. et al. (2004) 「Overexpression Of ADAM9 In Non-Small Cell Lung Cancer Correlates With Brain Metastasis」 Cancer Res. 64: 4190 - 4196; Peduto, L. et al. (2005) 「Critical Function For ADAM9 In Mouse Prostate Cancer」 Cancer Res. 65: 9312 - 9319; Zigrino, P. et al. (2005) 「ADAM-9 Expression And Regulation In Human Skin Melanoma And Melanoma Cell Lines」, Int. J. Cancer 116: 853 - 859; Fritzsche, F. R. et al. (2008) 「ADAM9 Is Highly Expressed In Renal Cell Cancer And Is Associated With Tumour Progression」, BMC Cancer 8: 179: 1 - 9; Fry, J. L. et al. (2010) 「Secreted And Membrane-Bound Isoforms Of Protease ADAM9 Have Opposing Effects On Breast Cancer Cell Migration」, Cancer Res. 70, 8187 - 8198; Chang, L. et al. (2016) 「Combined Rnai Targeting Human Stat3 And ADAM9 As Gene Therapy For Non Small Cell Lung Cancer」, Oncology Letters 11: 1242 - 1250; Fan, X. et al. (2016) 「ADAM9 Expression Is Associate with Glioma Tumour Grade and Histological Type, and Acts as a Prognostic Factor in Lower-Grade Gliomas」, Int. J. Mol. Sci. 17: 1276: 1 - 11)。

#### 【0008】

顕著なことに、ADAM9発現の増加は、腫瘍の悪性度及び転移能と正の相関関係にあることがわかっている (Amendola, R. S. et al. (2015) 「ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2」, J. Leukocyte B

10

20

30

40

50



iol. 97(5):951-962; Fan, X. et al. (2016) 「ADAM9 Expression Is Associate with Glioma Tumor Grade and Histological Type, and Acts as a Prognostic Factor in Lower-Grade Gliomas」, Int. J. Mol. Sci. 17:1276:1-11; Li, J. et al. (2016) 「Overexpression of ADAM9 Promotes Colon Cancer Cells Invasion」 J. Invest. Surg. 26(3):127-133)。更に、ADAM9及びその分泌した可溶性アイソフォームは、がん細胞の播種にとって重要なようである (Amendola, R. S. et al. (2015) 「ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2」 J. Leukocyte Biol. 97(5):951-962; Fry, J. L. et al. (2010) 「Secreted And Membrane-Bound Isoforms Of Protease ADAM9 Have Opposing Effects On Breast Cancer Cell Migration; Cancer Res. 70, 8187-8198; Mazzocca, A. (2005) 「A Secreted Form Of ADAM9 Promotes Carcinoma Invasion Through Tumor-Stromal Interactions」 Cancer Res. 65:4728-4738; また、米国特許第9,150,656号、第7,585,634号、第7,829,277号、第8,101,361号及び第8,445,198号、米国特許出願公開第2009/0023149号も参照)。

#### 【0009】

従って、多くの研究が、抗がん治療のための潜在的な標的としてADAM9を特定してきた (Peduto, L. (2009) 「ADAM9 As A Potential Target Molecule In Cancer」 Curr. Pharm. Des. 15:2282-2287; Duffy, M. J. et al. (2009) 「Role Of ADAMs In Cancer Formation And Progression」, Clin. Cancer Res. 15:1140-1144; Duffy, M. J. et al. (2011) 「The ADAMs Family Of Proteases: New Biomarkers And Therapeutic Targets For Cancer!」, Clin. Proteomics 8:9:1-13; Jossion, S. et al. (2011) 「Inhibition of ADAM9 Expression Induces Epithelial Phenotypic Alterations and Sensitizes Human Prostate Cancer Cells to Radiation and Chemotherapy」 Prostate 71(3):232-240; また、米国特許出願公開第2016/0138113号、第2016/0068909号、第2016/0024582号、第2015/0368352号、第2015/0337356号、第2015/0337048号、第2015/0010575号、第2014/0342946号、第2012/0077694号、第2011/0151536号、第2011/0129450号、第2010/0291063号、第2010/0233079号、第2010/0112713号、第2009/0285840号、第2009/0203051号、第2004/0092466号、第2003/0091568号、第2002/0068062号、PCT公開第WO2016/077505号、第WO2014/205293号、第WO2014/186364号、第WO2014/124326号、第WO2014/108480号、第WO2013/119960号、第WO2013/098797号、第WO2013/049704号及び第WO2011/100362号も参照)。更に、ADAM9の発現は、肺疾患及び炎症にも関連があることがわかってきた (例えば、米国特許出願公開第2016/0068909号、第2012/0149595号、

10

20

30

40

50

第2009/0233300号、第2006/0270618号及び第2009/0142301号を参照)。ADAM9に結合する抗体は、Abeam、ThermoFisher、Sigma-Aldrich及びその他の企業から市販されている。

【0010】

しかし、従来の全ての進歩にもかかわらず、正常組織への結合は最小限を示し、同様の高いアフィニティでヒトADAM9及び非ヒトADAM9に結合することが可能な、免疫コンジュゲートを標的とする高アフィニティADAM9が依然として必要である。本発明は、この需要及びがんの改良された治療薬の需要に対処するものである。

【発明の概要】

【0011】

本発明は、少なくとも1種類の医薬薬剤に結合される「ジスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメインを含有するタンパク質9」(「ADAM9」)に特異的に結合することが可能な抗体またはそのフラグメントを含む免疫コンジュゲートに関する。本発明は、特に、ヒトADAM9及び非ヒト霊長類(例えば、カニクイザル)のADAM9と交差反応する、このような免疫コンジュゲートに関する。本発明は、更に、レシピエント対象にこのような免疫コンジュゲートを投与すると免疫原性の低下を示すようなヒト化及び/または脱免疫化された軽鎖可変(VL)ドメイン及び/または重鎖可変(VH)ドメインを含む、全てのこのような免疫コンジュゲートに関する。本発明はまた、このような免疫コンジュゲートのいずれかを含有する医薬組成物、並びにがん及び他の疾患及び状態の治療において、このような免疫コンジュゲートのいずれかの使用を伴う方法に関する。

【0012】

詳細には、本発明は、抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントを含む免疫コンジュゲートであって、

(I)抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、医薬薬剤に結合されており、

(II)抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、軽鎖可変(VL)ドメインと重鎖可変(VH)ドメインとを含み、前記重鎖可変ドメインは、CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインを含み、前記軽鎖可変ドメインは、CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインを含み、

(A)前記CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインは、MAB-Aの最適化された変異体の重鎖可変(VH)ドメインのCDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインのアミノ酸配列を有し、前記CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインは、MAB-Aの軽鎖可変(VL)ドメインのCDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインのアミノ酸配列を有するか、または

(B)前記CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインは、MAB-Aの重鎖可変(VH)ドメインのCDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインのアミノ酸配列を有し、前記CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインは、MAB-Aの最適化された変異体の軽鎖可変(VL)ドメインのCDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインのアミノ酸配列を有するか、または

(C)前記CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインは、MAB-Aの最適化された変異体の重鎖可変(VH)ドメインのCDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインのアミノ酸配列を有し、前記CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインは、MAB-Aの最適化された変異体の軽鎖可変(VL)ドメインのCDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインのアミノ酸配列を有する、免疫コンジュゲートを提供する。

【0013】

特定の実施形態では、抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、

(A)(1)MAB-Aの重鎖可変(VH)ドメインのCDRH1ドメイン、CDRH

10

20

30

40

50

2 ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメイン、及び

(2) MAB-Aのヒト化変異体のVHドメインのFR1、FR2、FR3及びFR4、または

(B)(1) MAB-Aの軽鎖可変(VL)ドメインのCDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及びCDR<sub>L</sub>3ドメイン、及び

(2) MAB-Aのヒト化変異体のVLドメインのFR1、FR2、FR3及びFR4、または

(C)(1) MAB-Aの最適化された変異体の重鎖可変(VH)ドメインのCDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメイン、及び

(2) MAB-Aのヒト化変異体のVHドメインのFR1、FR2、FR3及びFR4、または

(D)(1) MAB-Aの最適化された変異体の軽鎖可変(VL)ドメインのCDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及びCDR<sub>L</sub>3ドメイン、及び

(2) MAB-Aのヒト化変異体のVLドメインのFR1、FR2、FR3及びFR4、または

(E)(1) MAB-Aのヒト化/最適化された変異体の重鎖可変(VH)ドメイン、及び

(2) MAB-Aのヒト化/最適化された変異体のVL軽重鎖可変(VL)ドメインを含む。

#### 【0014】

特定の実施形態では、MAB-Aの最適化された変異体の重鎖可変(VH)ドメインのCDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメインは、それぞれ、以下のアミノ酸配列：

(1) 配列番号47(SYWX<sub>1</sub>H)

(ここで、X<sub>1</sub>は、MまたはIである)、

(2) 配列番号48(EIIPIX<sub>2</sub>GHTNYNEX<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>)

(ここで、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>及びX<sub>5</sub>は、独立して選択され、

X<sub>2</sub>は、NまたはFであり；X<sub>3</sub>は、KまたはRであり；

X<sub>4</sub>は、KまたはQであり、

X<sub>5</sub>は、SまたはGである)、

(3) 配列番号49(GGYYYX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>DY)

(ここで、X<sub>6</sub>は、P、F、Y、W、I、L、V、T、GまたはDであり、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>、X<sub>9</sub>、X<sub>10</sub>及びX<sub>11</sub>は、

(A) X<sub>6</sub>がPである場合、

X<sub>7</sub>は、KまたはRであり；X<sub>8</sub>は、FまたはMであり；X<sub>9</sub>は、Gであり；

X<sub>10</sub>は、WまたはFであり；X<sub>11</sub>は、M、LまたはKであり；

(B) X<sub>6</sub>が、F、YまたはWである場合、

X<sub>7</sub>は、NまたはHであり；X<sub>8</sub>は、SまたはKであり；X<sub>9</sub>は、GまたはAであり；

X<sub>10</sub>は、TまたはVであり；X<sub>11</sub>は、M、LまたはKであり；

(C) X<sub>6</sub>が、I、LまたはVである場合、

X<sub>7</sub>は、Gであり；X<sub>8</sub>は、Kであり；X<sub>9</sub>は、GまたはAであり；

X<sub>10</sub>は、Vであり；X<sub>11</sub>は、M、LまたはKであり；

(D) X<sub>6</sub>がTである場合、

X<sub>7</sub>は、Gであり；X<sub>8</sub>は、K、MまたはNであり；X<sub>9</sub>は、Gであり；

X<sub>10</sub>は、VまたはTであり；X<sub>11</sub>は、LまたはMであり；

(E) X<sub>6</sub>がGである場合、

X<sub>7</sub>は、Gであり；X<sub>8</sub>は、Sであり；X<sub>9</sub>は、Gであり；

X<sub>10</sub>は、Vであり；X<sub>11</sub>は、Lであり、

(F) X<sub>6</sub>がDである場合、

X<sub>7</sub>は、Sであり；X<sub>8</sub>は、Nであり；X<sub>9</sub>は、Aであり；

X<sub>10</sub>は、Vであり；X<sub>11</sub>は、Lであるように選択される）を有する。

【0015】

特定の実施形態では、MAB - Aの最適化された変異体の重鎖可変（VH）ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列を含み、

【化1】

EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYWX<sub>1</sub></u> HWVRQA
PGKGLEWVGE	<u>IIPIX<sub>2</sub></u> GHTNY	<u>NEX<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>X<sub>5</sub></u> RFTI	SLDNSKNTLY
LQMGSRAED	TAVYYCARGG	<u>YYYYX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub></u>	
<u>DYWGQGTTVT</u>	VSS		

10

ここで、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>及びX<sub>6</sub>は、独立して選択され、  
 X<sub>1</sub>は、MまたはIであり；X<sub>2</sub>は、NまたはFであり；  
 X<sub>3</sub>は、KまたはRであり；X<sub>4</sub>は、KまたはQであり；  
 X<sub>5</sub>は、SまたはGであり、X<sub>6</sub>は、P、F、Y、W、I、L、V、T、GまたはDであり；

X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>、X<sub>9</sub>、X<sub>10</sub>及びX<sub>11</sub>は、  
 X<sub>6</sub>がPである場合、X<sub>7</sub>は、KまたはRであり；X<sub>8</sub>は、FまたはMであり；X<sub>9</sub>は、Gであり；X<sub>10</sub>は、WまたはFであり；X<sub>11</sub>は、M、LまたはKであり；

20

X<sub>6</sub>が、F、YまたはWである場合、X<sub>7</sub>は、NまたはHであり；X<sub>8</sub>は、SまたはKであり；X<sub>9</sub>は、GまたはAであり；X<sub>10</sub>は、TまたはVであり；X<sub>11</sub>は、M、LまたはKであり；

X<sub>6</sub>が、I、LまたはVである場合、X<sub>7</sub>は、Gであり；X<sub>8</sub>は、Kであり；X<sub>9</sub>は、GまたはAであり；X<sub>10</sub>は、Vであり；X<sub>11</sub>は、M、LまたはKであり；

X<sub>6</sub>がTである場合、X<sub>7</sub>は、Gであり；X<sub>8</sub>は、K、MまたはNであり；X<sub>9</sub>は、Gであり；X<sub>10</sub>は、VまたはTであり；X<sub>11</sub>は、LまたはMであり；

X<sub>6</sub>がGである場合、X<sub>7</sub>は、Gであり；X<sub>8</sub>は、Sであり；X<sub>9</sub>は、Gであり；X<sub>10</sub>は、Vであり；X<sub>11</sub>は、Lであり；

X<sub>6</sub>がDである場合、X<sub>7</sub>は、Sであり；X<sub>8</sub>は、Nであり；X<sub>9</sub>は、Aであり；X<sub>10</sub>は、Vであり；X<sub>11</sub>は、Lであるように選択される。

30

【0016】

特定の実施形態では、MAB - Aの最適化された変異体の重鎖可変（VH）ドメインは、

- (1) hMAB - A VH(1) (配列番号16)；
- (2) hMAB - A VH(2) (配列番号17)；
- (3) hMAB - A VH(3) (配列番号18)；
- (4) hMAB - A VH(4) (配列番号19)；
- (5) hMAB - A VH(2A) (配列番号20)；
- (6) hMAB - A VH(2B) (配列番号21)；
- (7) hMAB - A VH(2C) (配列番号22)；
- (8) hMAB - A VH(2D) (配列番号23)；
- (9) hMAB - A VH(2E) (配列番号24)；
- (10) hMAB - A VH(2F) (配列番号25)；
- (11) hMAB - A VH(2G) (配列番号26)；
- (12) hMAB - A VH(2H) (配列番号27)；
- (13) hMAB - A VH(2I) (配列番号28)；及び
- (14) hMAB - A VH(2J) (配列番号29) からなる群から選択される。

40

【0017】

特定の実施形態では、MAB - Aの最適化された変異体の軽鎖可変（VL）ドメインのCDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインは、それぞれ、

50

( 1 ) 配列番号 6 6 (  $X_{12}$  A S Q S V D Y  $X_{13}$  G D S Y  $X_{14}$  N )  
 ( ここで、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$ 、 $X_{14}$  は、独立して選択され、  
 $X_{12}$  は、K または R であり； $X_{13}$  は、D または S であり； $X_{14}$  は、M または L である ) ；

( 2 ) 配列番号 1 3 ( A A S D L E S ) ；及び

( 3 ) 配列番号 6 7 ( Q Q S  $X_{15}$   $X_{16}$   $X_{17}$  P F T )

( ここで、 $X_{15}$ 、 $X_{16}$  及び  $X_{17}$  は独立して選択され、  
 $X_{15}$  は、H または Y であり； $X_{16}$  は、E または S であり； $X_{17}$  は、D または T である )

のアミノ酸配列を有する。

10

【 0 0 1 8 】

特定の実施形態では、軽鎖可変 ( V L ) ドメインは、配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含み、

【 化 2 】

DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	ISC <u><math>X_{12}</math>ASQSVD</u>
<u><math>YX_{13}</math>GDSY<math>X_{14}</math>NWY</u>	QQKPGQPPKL	LIY <u>AASDLES</u>
GIPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFATY
YC <u>QQSX<math>_{15}</math><math>X_{16}</math><math>X_{17}</math>PF</u>	<u>TFGQGTKLEI</u>	K

20

ここで、 $X_{12}$ 、 $X_{13}$ 、 $X_{14}$ 、 $X_{15}$ 、 $X_{16}$  及び  $X_{17}$  は、独立して選択され、

$X_{12}$  は、K または R であり； $X_{13}$  は、D または S であり；

$X_{14}$  は、M または L であり； $X_{15}$  は、H または Y であり；

$X_{16}$  は、E または S であり； $X_{17}$  は、D または T である。

【 0 0 1 9 】

特定の実施形態では、M A B - A の最適化された変異体の軽鎖可変 ( V L ) ドメインが、

( 1 ) h M A B - A V L ( 1 ) ( 配列番号 5 4 ) ；

( 2 ) h M A B - A V L ( 2 ) ( 配列番号 5 5 ) ；

( 3 ) h M A B - A V L ( 3 ) ( 配列番号 5 6 ) ；

( 4 ) h M A B - A V L ( 4 ) ( 配列番号 5 7 ) ；

( 5 ) h M A B - A V L ( 2 A ) ( 配列番号 2 0 ) からなる群から選択される。

30

【 0 0 2 0 】

特定の実施形態では、C D R<sub>H</sub> 1 ドメインは、アミノ酸配列 S Y W M H ( 配列番号 8 ) を含み、C D R<sub>H</sub> 2 ドメインは、アミノ酸配列 E I I P I F G H T N Y N E K F K S ( 配列番号 3 5 ) を含み、C D R<sub>H</sub> 3 ドメインは、アミノ酸配列 G G Y Y Y Y P R Q G F L D Y ( 配列番号 4 5 ) を含む。

【 0 0 2 1 】

特定の実施形態では、C D R<sub>H</sub> 1 ドメインは、アミノ酸配列 K A S Q S V D Y S G D S Y M N ( 配列番号 6 2 ) を含み、C D R<sub>H</sub> 2 ドメインは、アミノ酸配列 A A S D L E S ( 配列番号 1 3 ) を含み、C D R<sub>L</sub> 3 ドメインは、アミノ酸配列 Q Q S H E D P F T ( 配列番号 1 4 ) を含む。

40

【 0 0 2 2 】

特定の実施形態では、免疫コンジュゲートは、

( A ) h M A B - A ( 2 I . 2 ) の重鎖可変 ( V H ) ドメイン ( 配列番号 2 8 ) ；または

( B ) h M A B - A ( 2 I . 2 ) の軽鎖可変 ( V L ) ドメイン ( 配列番号 5 5 ) ；または

( C ) h M A B - A ( 2 I . 2 ) の重鎖可変 ( V H ) ドメイン ( 配列番号 2 8 ) 及び h M A B - A ( 2 I . 2 ) の軽鎖可変 ( V L ) ドメイン ( 配列番号 5 5 )

を含む。

【 0 0 2 3 】

50

特定の実施形態では、免疫コンジュゲートは、F c 領域を含む。いくつかの実施形態では、F c 領域は、

( a ) F c R に対する変異体 F c 領域のアフィニティを下げる 1 つ以上のアミノ酸改変、及び/または

( b ) シス테인残基を導入する 1 つ以上のアミノ酸改変

を含む変異体 F c 領域である。いくつかの実施形態では、F c R に対する変異体 F c 領域のアフィニティを下げる 1 つ以上のアミノ酸改変は、

( A ) L 2 3 4 A ;

( B ) L 2 3 5 A ; または

( C ) L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A

を含み、前記番号付けが、K a b a t にある E U インデックスの番号付けである。いくつかの実施形態では、シス테인残基を導入する 1 つ以上のアミノ酸改変は、S 4 4 2 C を含み、前記番号付けが、K a b a t にある E U インデックスの番号付けである。

#### 【 0 0 2 4 】

特定の実施形態では、免疫コンジュゲートは、ヒト A D A M 9 及び c y n o A D A M 9 に特異的に結合するヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントを含み、ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントは、前記医薬薬剤に結合される。

#### 【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントは、

( a ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 1 0 及び配列番号 6 2、1 3、1 4 ;

( b ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 1 0 及び配列番号 6 3、1 3、1 4 ;

( c ) それぞれ、配列番号 8、3 6 及び 1 0 及び配列番号 6 3、1 3、1 4

( d ) それぞれ、配列番号 3 4、3 6 及び 1 0 及び配列番号 6 4、1 3、6 5

からなる群から選択される配列を有する、C D R<sub>H</sub> 1 ドメイン、C D R<sub>H</sub> 2 ドメイン及び C D R<sub>H</sub> 3 と、C D R<sub>L</sub> 1 ドメイン、C D R<sub>L</sub> 2 ドメイン及び C D R<sub>L</sub> 3 ドメインとを含む。

#### 【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントは、

( a ) それぞれ、配列番号 1 7 及び配列番号 5 5 ;

( b ) それぞれ、配列番号 1 7 及び配列番号 5 6 ;

( c ) それぞれ、配列番号 1 8 及び配列番号 5 6 ; 及び

( d ) それぞれ、配列番号 1 9 及び配列番号 5 7

からなる群から選択される配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % または少なくとも 9 9 % の同一性を有する配列を有する重鎖可変ドメイン ( V H ) 及び軽鎖可変ドメイン ( V L ) を含む。

#### 【 0 0 2 7 】

特定の実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントは、

( a ) それぞれ、配列番号 1 7 及び配列番号 5 5 ;

( b ) それぞれ、配列番号 1 7 及び配列番号 5 6 ;

( c ) それぞれ、配列番号 1 8 及び配列番号 5 6 ; 及び

( d ) それぞれ、配列番号 1 9 及び配列番号 5 7

からなる群から選択される配列を有する重鎖可変ドメイン ( V H ) 及び軽鎖可変ドメイン ( V L ) を含む。

#### 【 0 0 2 8 】

特定の実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントは、キメラまたはマウス親抗体と比較して、c y n o A D A M 9 に対する結合アフィニテ

10

20

30

40

50

ィが少なくとも100倍向上し、ヒトADAM9に対する高いアフィニティを保持しているように最適化される。

【0029】

特定の実施形態では、抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、

- (a) それぞれ、配列番号8、35及び37及び配列番号62、13、14；
- (b) それぞれ、配列番号8、35及び38及び配列番号62、13、14；
- (c) それぞれ、配列番号8、35及び39及び配列番号62、13、14；
- (d) それぞれ、配列番号8、35及び40及び配列番号62、13、14；
- (e) それぞれ、配列番号8、35及び41及び配列番号62、13、14；
- (f) それぞれ、配列番号8、35及び42及び配列番号62、13、14；
- (g) それぞれ、配列番号8、35及び43及び配列番号62、13、14；
- (h) それぞれ、配列番号8、35及び44及び配列番号62、13、14；
- (i) それぞれ、配列番号8、35及び45及び配列番号62、13、14；及び
- (j) それぞれ、配列番号8、35及び46及び配列番号62、13、14

10

からなる群から選択される配列を有する、CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインと、CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインを含む。

【0030】

特定の実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、

20

- (a) それぞれ、配列番号20及び配列番号55；
- (b) それぞれ、配列番号21及び配列番号55；
- (c) それぞれ、配列番号22及び配列番号55；
- (d) それぞれ、配列番号23及び配列番号55；
- (e) それぞれ、配列番号24及び配列番号55；
- (f) それぞれ、配列番号25及び配列番号55；
- (g) それぞれ、配列番号26及び配列番号55；
- (h) それぞれ、配列番号27及び配列番号55；
- (i) それぞれ、配列番号28及び配列番号55；及び
- (j) それぞれ、配列番号29及び配列番号55

30

からなる群から選択される配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%の同一性を有する配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)及び軽鎖可変ドメイン(VL)を含む。

【0031】

特定の実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、

- (a) それぞれ、配列番号20及び配列番号55；
- (b) それぞれ、配列番号21及び配列番号55；
- (c) それぞれ、配列番号22及び配列番号55；
- (d) それぞれ、配列番号23及び配列番号55；
- (e) それぞれ、配列番号24及び配列番号55；
- (f) それぞれ、配列番号25及び配列番号55；
- (g) それぞれ、配列番号26及び配列番号55；
- (h) それぞれ、配列番号27及び配列番号55；
- (i) それぞれ、配列番号28及び配列番号55；及び
- (j) それぞれ、配列番号29及び配列番号55

40

からなる群から選択される配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)及び軽鎖可変ドメイン(VL)を含む。

【0032】

特定の実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体は、Fc領域を含む全長抗体である。い

50

くつかの実施形態では、F c 領域は、( a ) L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 並びに L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A からなる群から選択される、F c R に対する変異体 F c 領域のアフィニティを下げる 1 つ以上のアミノ酸改変；及び/または ( b ) S 4 4 2 にシステイン残基を導入するアミノ酸改変を含む変異体 F c 領域であり、前記番号付けは、K a b a t にある E U インデックスの番号付けである。

#### 【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体は、

( a ) それぞれ、配列番号 5 0 及び配列番号 6 8 ；

( b ) それぞれ、配列番号 5 1 及び配列番号 6 8 ；及び

( c ) それぞれ、配列番号 5 2 及び配列番号 6 8 からなる群から選択される配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。

10

#### 【 0 0 3 4 】

特定の実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体は、

( a ) それぞれ、配列番号 1 4 1 及び配列番号 6 8 ；

( b ) それぞれ、配列番号 1 4 2 及び配列番号 6 8 ；

( c ) それぞれ、配列番号 1 4 3 及び配列番号 6 8 ；

( d ) それぞれ、配列番号 1 5 1 及び配列番号 6 8 ；

( e ) それぞれ、配列番号 1 5 2 及び配列番号 6 8 ；

( f ) それぞれ、配列番号 1 5 3 及び配列番号 6 8 ；及び

( g ) それぞれ、配列番号 1 5 4 及び配列番号 6 8

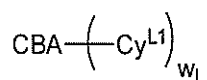
20

からなる群から選択される配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。

#### 【 0 0 3 5 】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

#### 【 化 3 】



ここで、

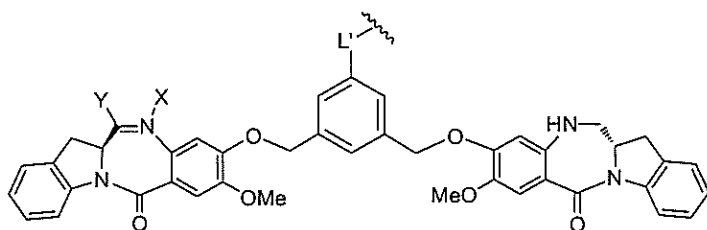
C B A は、リシン残基を介して C y <sup>L 1</sup> に共有結合する、本明細書に記載の本発明の抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントであり；

30

W<sub>L</sub> は、1 ~ 2 0 の整数であり、

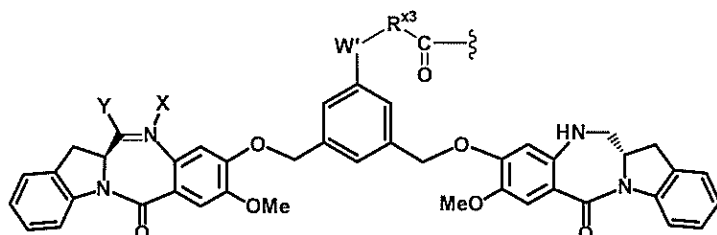
C y <sup>L 1</sup> は、以下の式

#### 【 化 4 】



40

または



50



によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
NとCとの間の二重線

【化5】

==

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

10

W'は、-N<sup>R<sup>e</sup></sup>であり、

R<sup>e</sup>は、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>であり；

nは、2～6の整数であり；

R<sup>k</sup>は、-Hまたは-Meであり；

R<sup>x3</sup>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

L'は、以下の式

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)-(B1')；または

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-S-Z<sup>s1</sup>-(B2')

によって表され、

R<sub>5</sub>は、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキルであり；

20

Pは、アミノ酸残基または2～20個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；

R<sub>a</sub>及びR<sub>b</sub>は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、-H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキル、または帯電した置換基またはイオン化可能な基Qであり；

mは、1～6の整数であり、

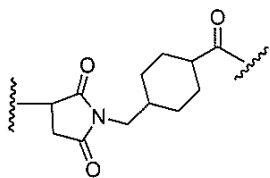
Z<sup>s1</sup>は、以下の式

30

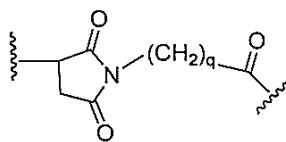
40

50

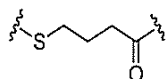
## 【化 6】



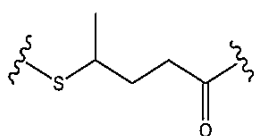
(b 1)



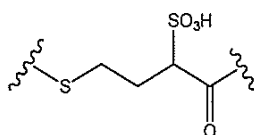
(b 2)



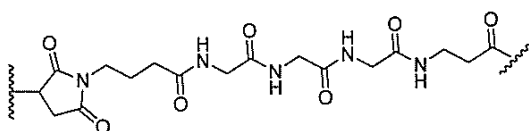
(b 3)



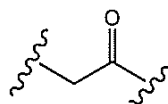
(b 4)



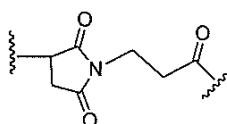
(b 5)



(b 6)



(b 7)



(b 8)

10

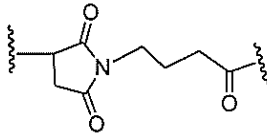
20

30

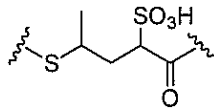
40

50

## 【化 7】



(b 9) ; 及び



(b 1 0)

10

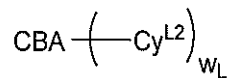
のいずれか 1 つから選択され、

q は、1 ~ 5 の整数である。

## 【 0 0 3 6 】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

## 【化 8】



20

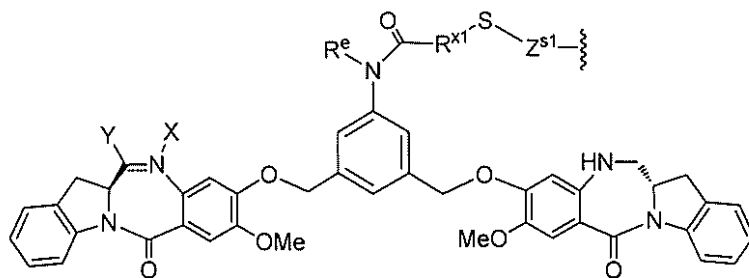
ここで、

C B A は、リシン残基を介して  $\text{C}_y\text{L}^2$  に共有結合する、本明細書に記載の本発明の抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントであり；

$w_L$  は、1 ~ 2 0 の整数であり、

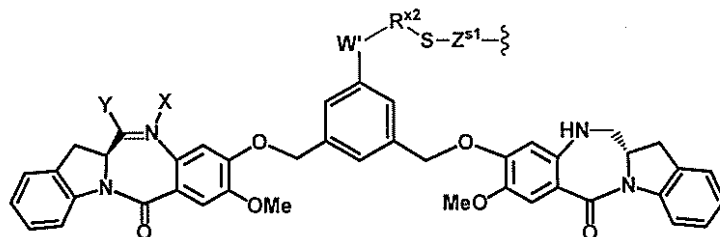
$\text{C}_y\text{L}^2$  は、以下の式

## 【化 9】



30

または



40

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、

N と C との間の二重線

50

【化 10】

==

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであり；

R<sup>x1</sup>及びR<sup>x2</sup>は、独立して、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

R<sup>e</sup>は、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

W'は、-NR<sup>e</sup>であり、

R<sup>e</sup>は、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>であり；

nは、2～6の整数であり；

R<sup>k</sup>は、-Hまたは-Meであり；

Z<sup>s1</sup>は、以下の式

10

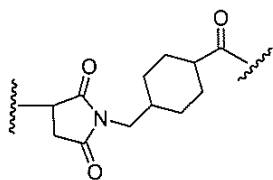
20

30

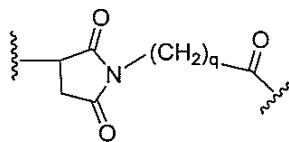
40

50

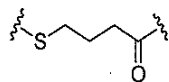
## 【化 1 1】



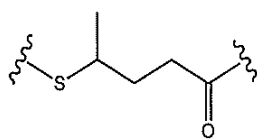
(b 1)



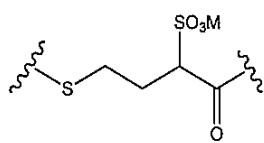
(b 2)



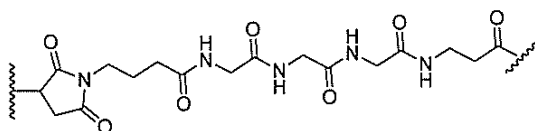
(b 3)



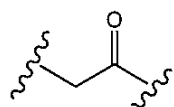
(b 4)



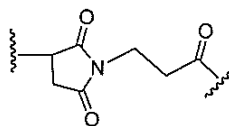
(b 5)



(b 6)



(b 7)



(b 8)

10

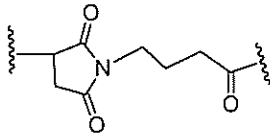
20

30

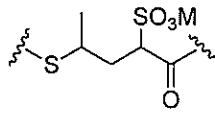
40

50

## 【化 1 2】



(b 9) ; 及び



(b 1 0)

10

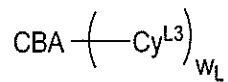
のいずれか 1 つから選択され、

q は、1 ~ 5 の整数である。

## 【0 0 3 7】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

## 【化 1 3】



20

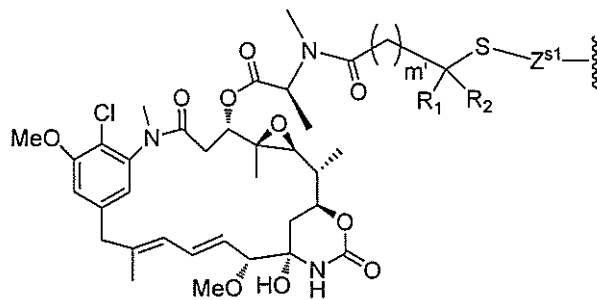
ここで、

CBA は、リシン残基を介して  $\text{Cy}^{\text{L}3}$  に共有結合する、本明細書に記載の本発明の抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントであり；

$\text{w}_\text{L}$  は、1 ~ 20 の整数であり、

$\text{Cy}^{\text{L}3}$  は、以下の式

## 【化 1 4】



30

によって表され、

$m'$  は、1 または 2 であり；

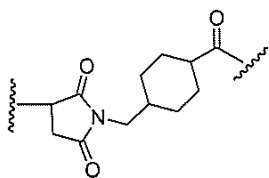
$R_1$  及び  $R_2$  は、それぞれ独立して、H または ( $C_1 - C_3$ ) アルキルであり；

$Z^{\text{s}1}$  は、以下の式

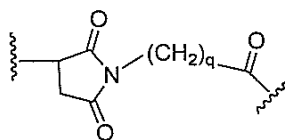
40

50

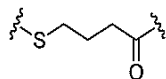
## 【化 1 5】



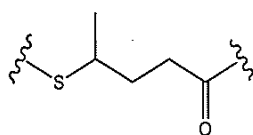
(b 1)



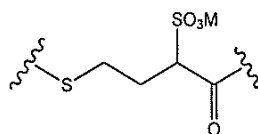
(b 2)



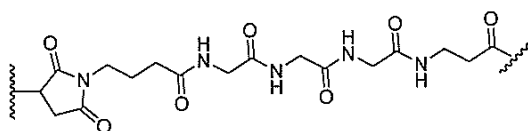
(b 3)



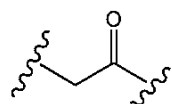
(b 4)



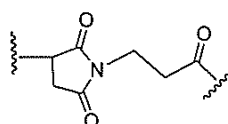
(b 5)



(b 6)



(b 7)



(b 8)

10

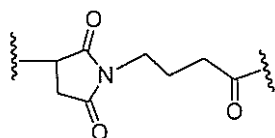
20

30

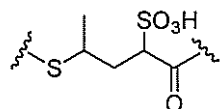
40

50

## 【化 1 6】



(b 9) ; 及び



(b 10)

10

のいずれか 1 つから選択され、  
q は、1 ~ 5 の整数である。

## 【0038】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、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 ( スルホ - S P D B ) を介してメイタンシノイド D M 4 に結合したヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントを含み、ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントは、それぞれ配列番号 8、35 及び 45 及び配列番号 62、13、14 の配列を有する C D R<sub>H</sub>1 ドメイン、C D R<sub>H</sub>2 ドメイン及び C D R<sub>H</sub>3 ドメインと、C D R<sub>L</sub>1 ドメイン、C D R<sub>L</sub>2 ドメイン及び C D R<sub>L</sub>3 ドメインとを含む。特定の実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントは、それぞれ配列番号 28 及び配列番号 55 の配列を有する重鎖可変ドメイン ( V H ) と軽鎖可変ドメイン ( V L ) とを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体は、それぞれ配列番号 52 及び配列番号 68 の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体は、それぞれ配列番号 151 及び配列番号 68 の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、配列番号 52 または配列番号 151 の X は、リシンである。いくつかの実施形態では、配列番号 52 または配列番号 151 の X は、存在しない。

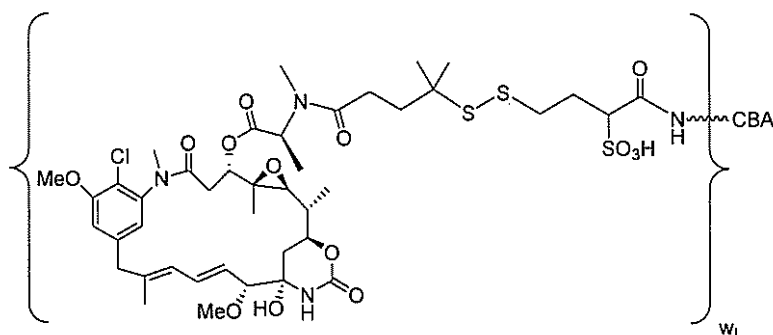
20

30

## 【0039】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、以下の式

## 【化 1 7】



40

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
ここで、

W<sub>L</sub> は、1 ~ 10 の整数である。

## 【0040】

C B A は、それぞれ、配列番号 8、35 及び 45 及び配列番号 62、13、14 の配列を有する C D R<sub>H</sub>1 ドメイン、C D R<sub>H</sub>2 ドメイン及び C D R<sub>H</sub>3 ドメインと、C D R<sub>L</sub>1 ドメイン、C D R<sub>L</sub>2 ドメイン及び C D R<sub>L</sub>3 ドメインとを含むヒト化抗 A D A M 9 抗体

50



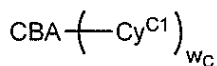
またはその A D A M 9 結合フラグメントである。特定の実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントは、それぞれ配列番号 2 8 及び配列番号 5 5 の配列を有する重鎖可変ドメイン ( V H ) と軽鎖可変ドメイン ( V L ) とを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体は、それぞれ配列番号 5 2 及び配列番号 6 8 の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗 A D A M 9 抗体は、それぞれ配列番号 1 5 1 及び配列番号 6 8 の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、配列番号 5 2 または配列番号 1 5 1 の X は、リシンである。いくつかの実施形態では、配列番号 5 2 または配列番号 1 5 1 の X は、存在しない。いくつかの実施形態では、免疫コンジュゲートを含む組成物 (例えば、医薬組成物) の D A R 値は、1.0 ~ 5.0、1.0 ~ 4.0、1.0 ~ 3.4、1.0 ~ 3.0、1.5 ~ 2.5、2.0 ~ 2.5 または 1.8 ~ 2.2 の範囲である。いくつかの実施形態では、D A R 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。

10

# 【0041】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

# 【化18】



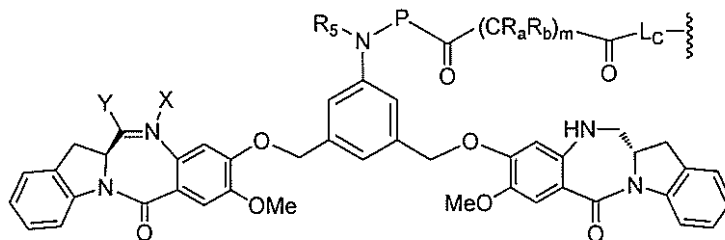
ここで、

C B A は、システイン残基を介して C y <sup>C 1</sup> に共有結合する、本明細書に記載の本発明の抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントであり；

W<sub>C</sub> は、1 または 2 であり、

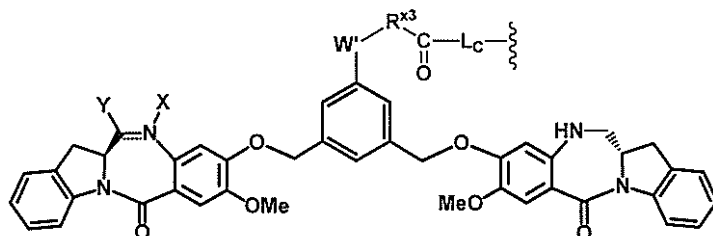
C y <sup>C 1</sup> は、以下の式

# 【化19】



30

または



40

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、

N と C との間の二重線

# 【化20】

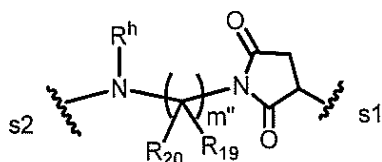


は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、X は存在せず、Y は、- H または ( C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> ) アルキルであり；単結合である場合には、X は、- H またはアミン保護部分であり、Y は、- O H または - S O<sub>3</sub> H であるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

50

$R_5$  は、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；  
 $P$  は、アミノ酸残基または 2 ～ 20 個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；  
 $R_a$  及び  $R_b$  は、それぞれの場合に、独立して、 $-H$ 、 $(C_1 - C_3)$  アルキルまたは帯電した置換基またはイオン化可能な基  $Q$  であり；  
 $W'$  は、 $-NR^e$  であり、  
 $R^e$  は、 $-(CH_2 - CH_2 - O)_n - R^k$  であり；  
 $n$  は、2 ～ 6 の整数であり；  
 $R^k$  は、 $-H$  または  $-Me$  であり；  
 $R^{x3}$  は、 $(C_1 - C_6)$  アルキルであり；  
 $L_c$  は、  
**【化 2 1】**

10



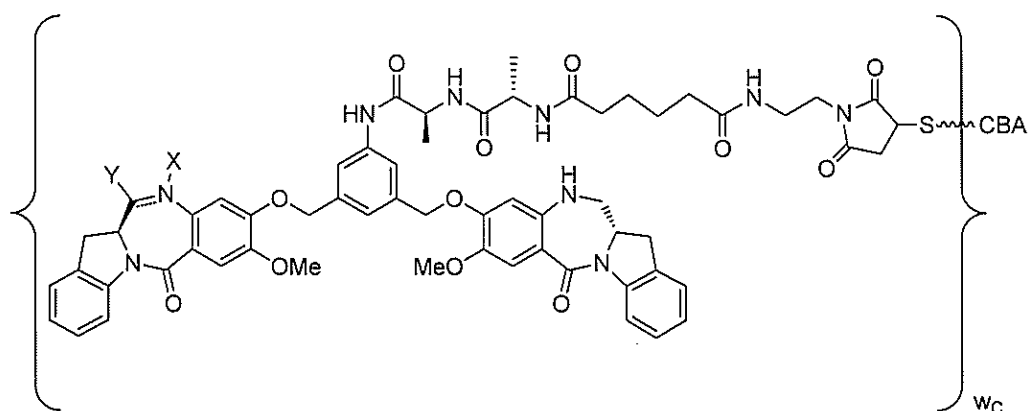
によって表され、 $s_1$  は、 $CBA$  に共有結合した部位であり、 $s_2$  は、 $Cy^{C1}$  上の  $-C(=O)-$  基に共有結合した部位であり；  
 $R_{19}$  及び  $R_{20}$  は、それぞれの場合に、独立して、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；  
 $m''$  は、1 ～ 10 の整数であり；  
 $R^h$  は、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルである。

20

**【0042】**

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、以下の式

**【化 2 2】**



30

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
 $N$  と  $C$  との間の二重線

40

**【化 2 3】**



は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、 $X$  は存在せず、 $Y$  は  $-H$  であり；単結合である場合には、 $X$  は、 $-H$  であり、 $Y$  は、 $-SO_3H$  であるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

**【0043】**

$CBA$  は、それぞれ、配列番号 8、35 及び 45 及び配列番号 62、13、14 の配列を有する  $CDR_H1$  ドメイン、 $CDR_H2$  ドメイン及び  $CDR_H3$  ドメインと、 $CDR_L1$

50

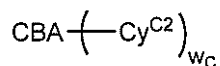
ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインとを含むヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントである。特定の実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、それぞれ配列番号28及び配列番号55の配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)とを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体は、それぞれ配列番号142及び配列番号68の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、配列番号142のXは、リシンである。いくつかの実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体は、それぞれ配列番号152及び配列番号68の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、配列番号142または配列番号152のXは、リシンである。いくつかの実施形態では、配列番号142または配列番号152のXは、存在しない。

10

【0044】

特定の実施形態では、免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

【化24】



ここで、

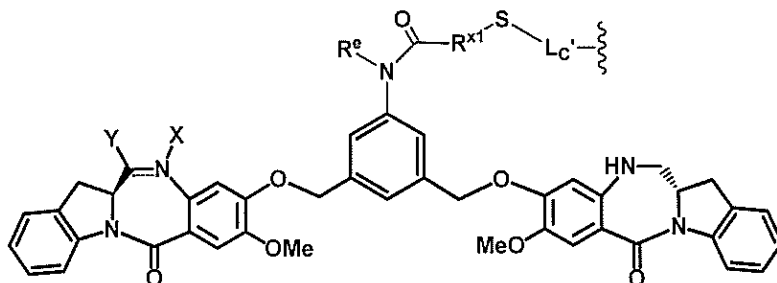
CBAは、システイン残基を介して $\text{Cy}^{\text{C}2}$ に共有結合する、本明細書に記載の本発明の抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントであり；

20

$\text{Wc}$ は、1または2であり、

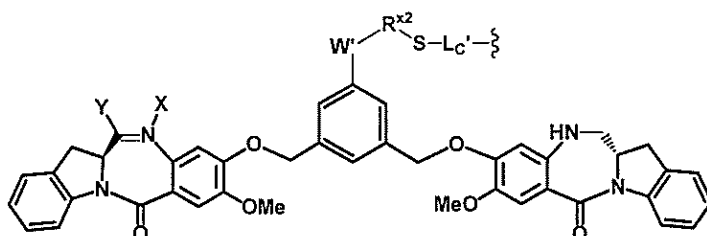
$\text{Cy}^{\text{C}2}$ は、以下の式

【化25】



30

または



40

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、

NとCとの間の二重線

【化26】

==

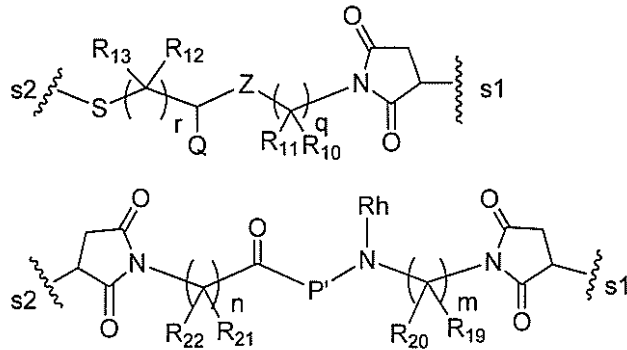
は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

$\text{R}^{\text{x}1}$ は、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

50

$R^e$  は、H または  $(C_1 - C_6)$  アルキルであり；  
 $W'$  は、 $-N R^f$  であり、  
 $R^e$  は、 $-(CH_2 - CH_2 - O)_n - R^k$  であり；  
 $n$  は、2 ~ 6 の整数であり；  
 $R^k$  は、 $-H$  または  $-Me$  であり；  
 $R^{x2}$  は、 $(C_1 - C_6)$  アルキルであり；  
 $Lc'$  は、以下の式

【化 27】



10

によって表され、  
 ここで、

20

$s1$  は、CBA に共有結合した部位であり、 $s2$  は、 $Cy^{C2}$  上の  $-S-$  基に共有結合した部位であり；

$Z$  は、 $C(=O) - N R_9 -$  または  $-N R_9 - C(=O) -$  であり；

$Q$  は、H、帯電した置換基またはイオン化可能な基であり；

$R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{19}$ 、 $R_{20}$ 、 $R_{21}$  及び  $R_{22}$  は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；

$q$  及び  $r$  は、それぞれの場合に、独立して、0 ~ 10 の整数であり；

$m$  及び  $n$  は、それぞれ独立して、0 ~ 10 の整数であり；

$R^h$  は、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；

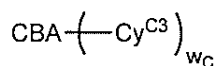
30

$P'$  は、アミノ酸残基または 2 ~ 20 個のアミノ酸残基を含有するペプチドである。

【0045】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

【化 28】



ここで、

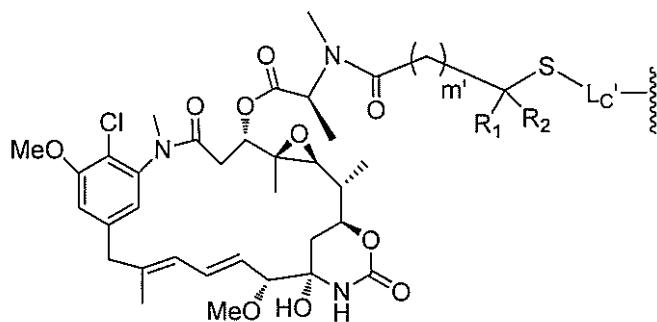
$CBA$  は、システイン残基を介して  $Cy^{C3}$  に共有結合する、本明細書に記載の本発明の抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントであり；

40

$w_C$  は、1 または 2 であり、

$Cy^{C3}$  は、以下の式

## 【化 29】



10

によって表され、

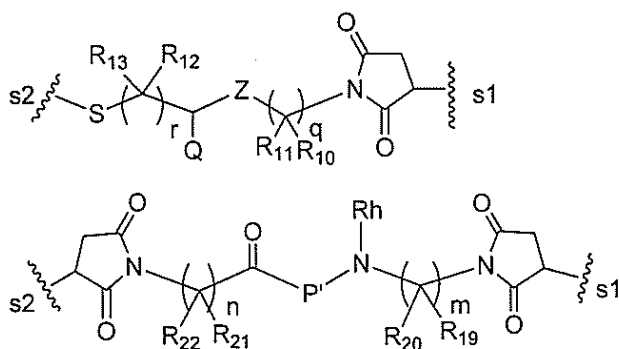
ここで、

$m'$  は、1 または 2 であり；

$R_1$  及び  $R_2$  は、それぞれ独立して、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；

$L_c$  は、以下の式

## 【化 30】



20

によって表され、

ここで、

$s_1$  は、CBA に共有結合した部位であり、 $s_2$  は、 $Cy^{C^3}$  上の  $-S-$  基に共有結合した部位であり；

$Z$  は、 $C(=O) - NR_9 -$  または  $-NR_9 - C(=O) -$  であり；

$Q$  は、 $H$ 、帯電した置換基またはイオン化可能な基であり；

$R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{19}$ 、 $R_{20}$ 、 $R_{21}$  及び  $R_{22}$  は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；

$q$  及び  $r$  は、それぞれの場合に、独立して、0 ~ 10 の整数であり；

$m$  及び  $n$  は、それぞれ独立して、0 ~ 10 の整数であり；

$R^h$  は、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；

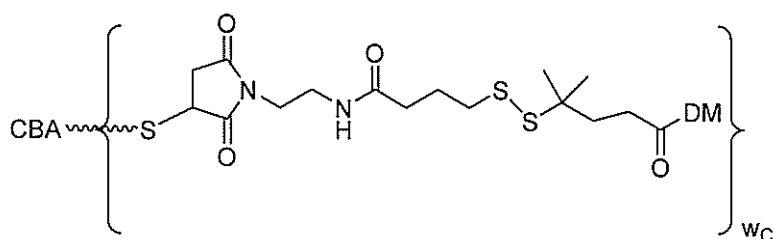
$P'$  は、アミノ酸残基または 2 ~ 20 個のアミノ酸残基を含有するペプチドである。

40

## 【0046】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、以下の式

## 【化 31】

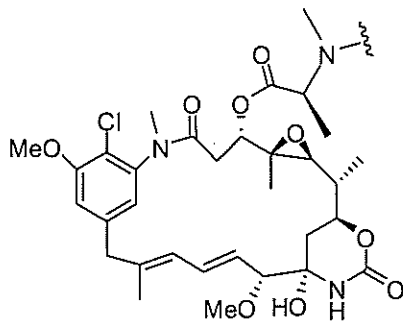


50

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
ここで、

DMは、以下の式

【化32】



10

によって表される薬物部分であり、

$W_C$ は、1または2である。

【0047】

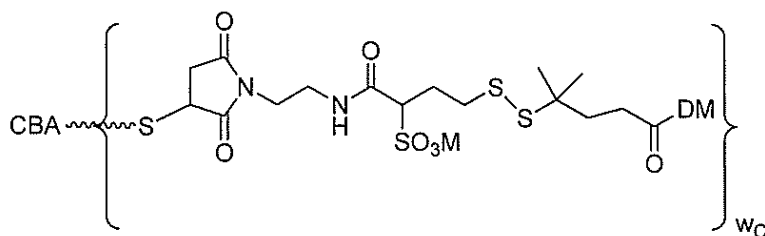
CBAは、それぞれ、配列番号8、35及び45及び配列番号62、13、14の配列を有するCDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインと、CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインとを含むヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントである。特定の実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、それぞれ配列番号28及び配列番号55の配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)とを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体は、それぞれ配列番号142及び配列番号68の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体は、それぞれ配列番号152及び配列番号68の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、配列番号142または配列番号152のXは、リシンである。いくつかの実施形態では、配列番号142または配列番号152のXは、存在しない。いくつかの実施形態では、 $W_C$ は、2である。

20

【0048】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、以下の式

【化33】



30

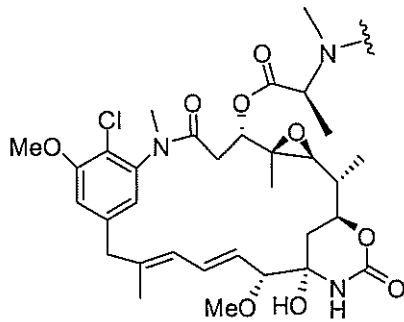
40

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
ここで、

DMは、以下の式

50

## 【化 3 4】



10

によって表される薬物部分であり、

CBAは、それぞれ配列番号8、35及び45及び配列番号62、13、14の配列を有するCDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインと、CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインとを含む、ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントである。特定の実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、それぞれ配列番号28及び配列番号55の配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)とを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体は、それぞれ配列番号142及び配列番号68の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗ADAM9抗体は、それぞれ配列番号152及び配列番号68の配列を有する重鎖と軽鎖とを含み、

20

WCは、1または2である。いくつかの実施形態では、WCは、2である。

## 【0049】

本発明の別の態様は、有効量の本明細書に記載の本発明の免疫コンジュゲートと、医薬的に許容される担体、賦形剤または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。

## 【0050】

別の態様では、本発明は、対象において、ADAM9の発現と関連するか、またはADAM9の発現によって特徴付けられる疾患または状態を治療するための方法であって、前記対象に、有効量の本明細書に記載する本発明の免疫コンジュゲートまたは医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。また、本発明において提供されるのは、対象において、ADAM9の発現と関連するか、またはADAM9の発現によって特徴付けられる疾患または状態の治療における、本明細書に記載する本発明の免疫コンジュゲートまたは医薬組成物の使用である。本発明はまた、対象において、ADAM9の発現と関連するか、またはADAM9の発現によって特徴付けられる疾患または状態を治療するための医薬の製造のための本明細書に記載する本発明の免疫コンジュゲートまたは医薬組成物の使用を提供する。

30

## 【0051】

特定の実施形態では、ADAM9と関連するか、またはADAM9によって特徴付けられる疾患または状態は、がんである。いくつかの実施形態では、癌は、非小細胞肺癌、大腸癌、胃癌、膵臓癌、腎細胞癌、前立腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、卵巣癌、肝臓癌、子宮頸癌、甲状腺癌、精巣癌、骨髄がん、黒色腫及びリンパがんからなる群から選択される。特定の実施形態では、非小細胞肺癌は、扁平上皮癌、腺癌または大細胞未分化癌である。特定の実施形態では、大腸癌は、腺癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、原発性大腸リンパ腫、平滑筋肉腫または扁平上皮癌である。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0052】

【図1A】免疫組織化学(IHC)試験の結果を提示し、MAB-Aが種々の非小細胞肺癌型を特異的に標識する能力を示し、一方、アイソタイプ対照は、これらのいずれの癌細胞型も特異的に標識することができなかった。

50

【図 1 B】免疫組織化学 ( I H C ) 試験の結果を提示し、M A B - A が乳癌細胞、前立腺癌細胞、胃癌細胞を特異的に標識する能力を示し、一方、アイソタイプ対照は、これらのいずれの癌細胞型も特異的に標識することができなかった。

【図 1 C】免疫組織化学 ( I H C ) 試験の結果を提示し、M A B - A が結腸癌細胞を特異的に標識する能力を示し、一方、アイソタイプ対照は、これらのいずれの癌細胞型も特異的に標識することができなかった。

【図 2】細胞染色試験の結果を提示し、M A B - A がヒト A D A M 9 に結合し、これより少ない程度でカニクイザル A D A M 9 に結合し、2 9 3 - F T 細胞及び C H O - K 細胞の表面で一時的に発現することを示す ( それぞれ、上側及び下側のパネル ) 。

【図 3 A】M A B - A のいくつかのヒト化 / 最適化された変異体とアラインメントされたマウス抗 A D A M 9 - V H ドメインのアミノ酸配列 ( 図 3 A、配列番号 7、1 6、1 7、1 8、1 9、2 1、2 2、2 3 及び 2 8 ) を示す。初期の最適化中に C D R 内で置換された位置は、以下のように下線が引かれている。潜在的な脱アミド化及び異性化部位は、1 本の下線で示されており、リシン残基は、二重下線で示されており、更なる不安定な残基は、二重破線下線で示されている。

10

【図 3 B】M A B - A のいくつかのヒト化 / 最適化された変異体とアラインメントされたマウス抗 A D A M 9 - V L ドメインのアミノ酸配列 ( 図 3 B、配列番号 1 1、5 1、5 2、5 3 及び 5 4 ) を示す。初期の最適化中に C D R 内で置換された位置は、以下のように下線が引かれている。潜在的な脱アミド化及び異性化部位は、1 本の下線で示されており、リシン残基は、二重下線で示されており、更なる不安定な残基は、二重破線下線で示されている。

20

【図 4】A ~ B は、C D R<sub>H</sub>3 変異体を含む 1 0 種類の選択した最適化された h M A B - A クローン、親 h M A B - A ( 2 . 2 ) 及びアイソタイプ対照抗体の E L I S A 結合曲線を提示す。A は、c y n o A D A M 9 の結合曲線を提示し、B は、h u A D A M 9 の結合曲線を提示する。

【図 5】A ~ B は、F c 変異体の E L I S A 結合曲線を提示する。A は、c y n o A D A M 9 の結合曲線を提示し、B は、h u A D A M 9 の結合曲線を提示する。

【図 6】A ~ B は、2 0 がん組織マイクロアレイにおける A D A M 9 I H C 膜染色と、8 種類の選択した適応症における A D A M I H C 膜及び細胞組織染色をそれぞれ示す。

【図 7】A ~ B は、種々の抗 A D A M 9 抗体コンジュゲートのパルスインターナリゼーション及び連続インターナリゼーションを示す。

30

【図 8】A ~ D は、c h M A B - A、h M A B - A ( 2 . 2 )、h M A B - A ( 2 C . 2 ) 及び h M A B - A ( 2 I . 2 ) 抗体、及びこれらの対応する免疫コンジュゲートの F A C S 結合曲線を示す。

【図 9】A ~ H は、A D A M 9 陽性腫瘍細胞株の広範囲にわたるパネルについて、種々の抗 A D A M 9 免疫コンジュゲート ( h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - s S P D B - D M 4、h M A B - A ( 2 . 2 ) - D G N 5 4 9 及び h M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 ) の i n v i t r o 細胞毒性を示す。標的ではない I g G 1 由来のコンジュゲートは、陰性対照として含まれる。

【図 1 0】C a l u - 3 ヒト非小細胞肺腺癌異種移植モデルにおいて、h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 ( 1 . 2 5 m g / k g、2 . 5 m g / k g、5 m g / k g、抗体による ) 及び c h M A B - A - D G N 5 4 9 ( 1 0 μ g / k g、ペイロードによる ) の抗腫瘍活性を示す。

40

【図 1 1】C a l u - 3 ヒト非小細胞肺腺癌異種移植モデルにおいて、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 ( 0 . 5 μ g / k g、1 μ g / k g、3 μ g / k g 及び 1 0 μ g / k g、ペイロードによる ) の抗腫瘍活性を示す。

【図 1 2】H 1 7 0 3 非小細胞肺扁平上皮癌異種移植モデルにおいて、h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 ( 1 . 2 5 m g / k g、2 . 5 m g / k g、5 m g / k g、抗体による ) の抗腫瘍活性を示す。

【図 1 3】D e t r o i t 5 6 2 頭頸部扁平上皮細胞癌モデル ( 腫瘍体積が 9 5 . 7 6 ~

50



450.83 mm<sup>3</sup>)におけるchMAB-A-sSPDB-DM4(1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg)の抗腫瘍活性を示す。

【図14】Detroit 562頭頸部扁平上皮細胞癌モデル(腫瘍体積が277.51~503.49 mm<sup>3</sup>)におけるchMAB-A-sSPDB-DM4(1.25 mg/kg及び5 mg/kg)の抗腫瘍活性を示す。

【図15】SNU-5胃癌異種移植モデルにおけるhMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549の抗腫瘍活性を示す。

【図16】SNU-5胃癌異種移植モデルにおけるhMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4の抗腫瘍活性を示す。

【図17】SW48大腸癌異種移植モデルにおけるhMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549の抗腫瘍活性を示す。

10

【図18】SW48大腸癌異種移植モデルにおけるhMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4の抗腫瘍活性を示す。

【図19】Aは、pH6.0でのYTE突然変異がある状態及びない状態において、捕捉された抗ADAM9抗体に対する250 nM及び1000 nM huFcRnの結合を示す。Bは、pH6.0で固定されたFcRnに対する、YTE突然変異がある状態及びない状態において、25 nM及び100 nM抗ADAM9抗体の結合を示す。

【図20】4 mg/kg及び12 mg/kg(抗体投薬量)でのカニクイザルにおけるhMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4及びhMAB-A(2I.2)-YTE-sSPDB-DM4の抗体-薬物コンジュゲートPKデータを示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0053】

本発明は、少なくとも1種類の医薬薬剤に結合される「ジスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメインを含有するタンパク質9」(「ADAM9」)に特異的に結合することが可能な抗体またはそのフラグメントを含む免疫コンジュゲートに関する。本発明は、特に、ヒトADAM9及び非ヒト霊長類(例えば、カニクイザル)のADAM9と交差反応する、このような免疫コンジュゲートに関する。本発明は、更に、レシピエント対象にこのような免疫コンジュゲートを投与すると免疫原性の低下を示すようなヒト化及び/または脱免疫化された軽鎖可変(VL)ドメイン及び/または重鎖可変(VH)ドメインを含む、全てのこのような免疫コンジュゲートに関する。本発明はまた、このような免疫コンジュゲートのいずれかを含有する医薬組成物、並びにがん及び他の疾患及び状態の治療において、このような免疫コンジュゲートのいずれかの使用を伴う方法に関する。

30

I. 抗体及びその結合ドメイン

【0054】

本発明の免疫コンジュゲートは、ADAM9またはそのADAM9結合フラグメントに結合する抗体を含む。「抗体」は、免疫グロブリン分子の可変ドメインに位置する少なくとも1つの抗原認識部位を介し、標的(例えば、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなど)に特異的に結合することが可能な免疫グロブリン分子である。本明細書で使用される場合、「抗体(antibody)」及び「抗体(antibodies)」との用語は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ポリクローナル抗体、ラクダ化抗体、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、イントラボディ、及び上述のいずれかのエピトープ結合フラグメントを指す。特に、「抗体」との用語は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち、エピトープ結合部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子は、任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>及びIgA<sub>2</sub>)またはサブクラスであってもよい。ここ数十年間は、抗体の治療薬への潜在能力についての関心が再び起こっており、抗体は、バイオテクノロジーに基づく薬物のリーディング群の1つになってきている(Chan, C. E. et al. (2009) 「The Use Of Antibodies In The Tre

40

50

ment Of Infectious Diseases」, Singapore Med. J. 50 (7) : 663 - 666)。診断でのこれらの使用に加え、抗体は、治療薬剤として有用であることが示されている。200を超える抗体由来の薬物が、使用承認されているか、または開発中である。

#### 【0055】

抗体は、特定のドメインまたは部分または配座を有するこのような分子（「エピトープ」）の存在に起因して、ポリペプチドまたはタンパク質または非タンパク質分子に「免疫特異的に結合する」ことが可能である。エピトープ含有分子は、免疫原性活性を有していてもよく、その結果、動物において、抗体産生応答を誘発する。このような分子は、「抗原」と呼ばれる。本明細書で使用される場合、抗体は、代替的なエピトープと比較して、そのエピトープと、より頻繁に、より迅速に、より長い継続時間で、及び/またはより大きなアフィニティで反応するか、または会合する場合、別の分子（すなわちエピトープ）の領域に「免疫特異的に」結合すると言われる。例えば、ウイルスエピトープに免疫特異的に結合する抗体は、他のウイルスエピトープまたは非ウイルス性エピトープに対して免疫特異的に結合するよりも、より大きなアフィニティ、アビデティで、より容易に、及び/またはより長い継続時間で、そのウイルスエピトープに結合する抗体である。例えば、第1の標的に免疫特異的に結合する抗体（または部分またはエピトープ）が、第2の標的に特異的または優先的に結合してもよく、または結合しなくてもよいことが、この定義を読むことによって理解される。このように、特定のエピトープに「免疫特異的に結合する」ことは、そのエピトープに対する排他的な結合を必ずしも必要とするわけではない（が、含まれていてもよい）。一般的に、必ずそうというわけではないが、結合に対する言及は、「免疫特異的な」結合を意味する。2つの分子は、このような結合が、それぞれのリガンドに結合する特異性を示す場合、「生理学的に特異的な」様式で互いに結合することが可能であると言われる。

#### 【0056】

「モノクローナル抗体」との用語は、均一な抗体集合を指し、モノクローナル抗体は、ある抗原への選択的に結合に関与するアミノ酸（天然に存在するか、または天然に存在しない）で構成される。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、1つのエピトープ（または抗原部位）に指向する。「モノクローナル抗体」との用語は、インタクトなモノクローナル抗体及び全長モノクローナル抗体だけではなく、そのフラグメント（例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>Fv）、単鎖（scFv）、これらの突然変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、及び所望の特異性と抗原に対する結合能を有する抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の改変した構成を包含する。この用語は、抗体の供給源または製造様式（例えば、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、トランスジェニック動物など）に関して限定することを意図していない。この用語は、「抗体」の定義の下で、免疫グロブリン全体及び上に記載したフラグメントなどを含む。モノクローナル抗体を製造する方法は、当該技術分野で既知である。使用可能な1つの方法は、Kohler, G. et al. (1975) 「Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity」 Nature 256 : 495 - 497の方法、またはその改変法である。典型的には、モノクローナル抗体は、マウス、ラットまたはウサギで開発されている。抗体は、動物に、免疫原になる量の所望のエピトープを含む細胞、細胞抽出物またはタンパク質調製物を用いて免疫付与することによって作られる。免疫原は、限定されないが、初代細胞、培養した細胞株、がん細胞、タンパク質、ペプチド、核酸または組織であってもよい。免疫付与に使用される細胞は、免疫原として使用する前に、所定時間（例えば、少なくとも24時間）培養されてもよい。細胞は、それ自体で、または非変成アジュバント（例えば、Ribi）と組み合わせて免疫原として使用されてもよい（例えば、Jennings, V.M. (1995) 「Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production」 ILAR J. 37 (3)

： 1 1 9 - 1 2 5 )。一般的に、細胞は、インタクトなまま保持されるべきであり、好ましくは、免疫原として使用されるとき、生存可能であるべきである。インタクトな細胞は、免疫付与された動物によって破壊された細胞よりも、抗原をよりよく検出し得る。変成アジュバントまたは過酷なアジュバント（例えば、フロイントのアジュバント）の使用は、細胞を破壊し得るため、推奨されない。免疫原は、周期的な間隔（例えば、隔週または毎週）で複数回投与されてもよく、または動物において（例えば、組織組換えにおいて）生存率を維持する様式で投与されてもよい。または、所望の病原性エピトープに免疫特異的な既存のモノクローナル抗体及び任意の他の等価な抗体は、配列決定され、当該技術分野で知られている任意の手段によって組換えによって作られてもよい。一実施形態では、このような抗体は、配列決定され、次いで、ポリヌクレオチド配列を、発現または繁殖のためにベクター内にクローン化する。目的の抗体をコードする配列は、宿主細胞中のベクター内に維持されてもよく、次いで、宿主細胞は、次いで、宿主細胞は、膨張し、将来的な使用のために凍結されてもよい。このような抗体のポリヌクレオチド配列は、最適化されたアフィニティ、キメラ抗体、ヒト化抗体及び/またはラクダ化抗体を作成するため、アフィニティまたは抗体の他の特徴、及び本発明の免疫コンジュゲートを向上させるために、遺伝子操作に使用されてもよい。抗体をヒト化する一般的な原理は、抗体の抗原結合部位の基本配列を保持しつつ、抗体の残りの非ヒト部分をヒト抗体配列と交換することを含む。

10

#### 【 0 0 5 7 】

天然抗体（例えば、天然 I g G 抗体）は、2つの「重鎖」と複合体化する2つの「軽鎖」で構成される。各軽鎖は、可変ドメイン（「V L」）と定常ドメイン（「C L」）とを含む。各重鎖は、可変ドメイン（「V H」）と、3つの定常ドメイン（「C H 1」、「C H 2」及び「C H 3」）と、C H 1 ドメインと C H 2 ドメインとの間に位置する「ヒンジ」領域（「H」）とを含む。対照的に、s c F v は、短い連結ペプチドを介し、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインを連結することによって作られる単鎖分子である。

20

#### 【 0 0 5 8 】

従って、天然に存在する免疫グロブリン（例えば、I g G）の基本的な構造単位は、2つの軽鎖と2つの重鎖を有するテトラマーであり、通常は、約 1 5 0 , 0 0 0 D a の糖タンパク質として発現する。各鎖のアミノ末端（「N 末端」）部分は、主に抗原認識に関与する約 1 0 0 ~ 1 1 0、またはもっと多いアミノ酸の可変ドメインを含む。各鎖のカルボキシ末端（「C 末端」）部分は、定常領域を規定し、軽鎖は、1つの定常ドメインを有し、重鎖は、通常、3つの定常ドメインとヒンジ領域とを有する。従って、I g G 分子の軽鎖の構造は、n - V L - C L - c であり、I g G 重鎖の構造は、n - V H - C H 1 - H - C H 2 - C H 3 - c である（ここで、n 及び c は、それぞれ、ポリペプチドの N 末端及び C 末端を表す）。

30

#### A . 抗体可変ドメインの特性決定

#### 【 0 0 5 9 】

I g G 分子の可変ドメインは、1、2、最も一般的には3の相補性決定領域（「C D R」、すなわち、それぞれ C D R 1、C D R 2 及び C D R 3）からなり、これらは、エピトープと接触する残基と、フレームワーク領域（「F R」と呼ばれる非 C D R セグメント）とを含み、F R は、一般的に、その構造を維持し、このような接触を可能にするように、C D R 領域の位置を決定する（しかし、特定のフレームワーク残基も、エピトープと接触してもよい）。従って、V L ドメイン及び V H ドメインは、典型的には、n - F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 - c の構造を有する（ここで、「n」は、N 末端を示し、「c」は、C 末端を示す）。抗体の軽鎖の第 1、第 2、第 3 及び第 4 の F R である（か、またはこれらとして作用し得る）ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれ、F R<sub>L</sub> 1 ドメイン、F R<sub>L</sub> 2 ドメイン、F R<sub>L</sub> 3 ドメイン及び F R<sub>L</sub> 4 ドメインと呼ばれる。同様に、抗体の重鎖の第 1、第 2、第 3 及び第 4 の F R である（か、またはこれらとして作用し得る）ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれ、F R<sub>H</sub> 1 ドメイン、F R<sub>H</sub> 2 ドメイン、F R<sub>H</sub> 3 ドメイン及び F R<sub>H</sub> 4 ドメインと呼ばれる。抗体の軽鎖の第 1

40

50

、第2及び第3のCDRである（か、またはこれらとして作用し得る）ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれ、CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインと呼ばれる。同様に、抗体の重鎖の第1、第2及び第3のCDRである（か、またはこれらとして作用し得る）ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれ、CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインと呼ばれる。従って、CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン、CDRL3ドメイン、CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインとの用語は、抗体に組み込まれると、抗体が特定のエピトープに結合することができる、ポリペプチドに関する。

#### 【0060】

本明細書全体で、免疫グロブリンの成熟重鎖及び軽鎖の可変ドメイン中の残基の番号付けは、鎖中のアミノ酸の位置によって命名される。Kabatは、抗体の多くのアミノ酸配列を記載し、各サブグループのアミノ酸コンセンサス配列を同定し、各アミノ酸に残基の数を割り当て、CDRは、Kabatによって定義されるように同定される（CDRH1は、Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) 「Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins」 J. Mol. Biol. 196:901-917) に定義されるように、初期に5つの残基を開始することが理解されるだろう）。Kabatの番号付けスキームは、問題となっている抗体と、保存されたアミノ酸を参照することによるKabatにおけるコンセンサス配列の1つとをアラインメントすることによって、その概要に含まれない抗体にまで拡張可能である。残基の番号を割り当てるための方法は、当該技術分野で標準的なものとなっており、キメラ変異体またはヒト化変異体を含め、異なる抗体での等価な位置にあるアミノ酸を容易に同定する。例えば、ヒト抗体軽鎖の50位にあるアミノ酸は、マウス抗体軽鎖の50位にあるアミノ酸と等価な位置を占める。

#### 【0061】

抗体が抗原のエピトープに結合する能力は、抗体のVLドメイン及びVHドメインの存在及びアミノ酸配列に依存して変わる。抗体の軽鎖及び重鎖の相互作用、特に、そのVLドメイン及びVHドメインの相互作用は、天然抗体（例えばIgG）の2つのエピトープ結合部位の1つを形成する。天然抗体は、たった1つのエピトープ種に結合することができる（すなわち、天然抗体は、一重特異性である）が、そのエピトープ種の複数のコピーに結合することができる（すなわち、二価または多価を示す）。

#### 【0062】

従って、本明細書で使用される場合、「エピトープ結合フラグメント」との用語は、エピトープに免疫特異的に結合することが可能な抗体のフラグメントを意味し、「エピトープ結合部位」との用語は、エピトープ結合フラグメントを含む分子の部分を目指す。エピトープ結合フラグメントは、抗体の任意の1つ、2つ、3つ、4つ、または5つのCDRドメインを含んでいてもよく、または抗体の6つのCDRドメイン全てを含んでいてもよく、このようなエピトープに免疫特異的に結合することが可能であるが、このような抗体とは異なる、このようなエピトープに対する免疫特異性、アフィニティまたは選択性を示してもよい。しかし、好ましくは、エピトープ結合フラグメントは、このような抗体の6個全てのCDRドメインを含むだろう。抗体のエピトープ結合フラグメントは、単鎖ポリペプチドであってもよく（例えば、scFv）、または2つ以上のポリペプチド鎖を含んでいてもよく、それぞれがアミノ末端とカルボキシ末端を有している（例えば、Fabフラグメント、Fab<sub>2</sub>フラグメントなど）。特に明記されない限り、本明細書に記載のタンパク質分子のドメインの順序は、「N末端からC末端に向かう」方向である。

#### 【0063】

本発明はまた、本発明の抗ADAM9-VL及び/またはVHドメインを含む単鎖可変ドメインフラグメント（「scFv」）を含む免疫コンジュゲートを包含する。単鎖可変ドメインフラグメントは、VLドメインとVHドメインとを含み、これらが短い「リンカー」ペプチドを用い、一緒に連結する。このようなリンカーは、更なる機能を与えるよう

10

20

30

40

50

に、例えば、薬物の接続を可能にするように、または固体支持体の接続を可能にするように、改変されてもよい。単鎖変異体は、組換えによって、または合成によって製造することができる。s c F v の合成による製造のために、自動化された合成機を使用してもよい。s c F v の組換え産生のために、s c F v をコードするポリヌクレオチドを含有する適切なプラスミドが、適切な宿主細胞、真核、例えば、酵母、植物、昆虫または哺乳動物細胞、または原核、例えば、E . c o l i のいずれかに導入されてもよい。目的の s c F v をコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのライゲーションなどの通常操作によって作られてもよい。得られた s c F v は、当該技術分野で既知の標準的なタンパク質精製技術を用いて単離することができる。

#### 【0064】

本発明はまた、特に、本発明の抗ADAM9抗体のヒト化/最適化された変異体のCDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2及びCDRL3ドメインと、任意の1つ、2つまたは3つのこのようなCDRLを含むVLDドメインと、任意の1つ、2つまたは3つのこのようなCDRHを含むVHドメインとを含む免疫コンジュゲート、及びこれらを含む多重結合分子を包含する。「ヒト化」抗体は、非ヒト主由来の免疫グロブリンのエピトープ結合部位と、ヒト免疫グロブリンの構造及び/または配列に基づく残りの免疫グロブリン構造とを有するキメラ分子を指す。ヒト化抗体は、一般的に、組換え技術を用いて調製される。本発明の免疫コンジュゲートは、本明細書で「MAB-A」と呼ばれる抗体のヒト化変異体、キメラ変異体またはラクダ化変異体を含んでいてもよい。MAB-Aの可変ドメインをコードするポリヌクレオチド配列は、改良または変更された特徴（例えば、アフィニティ、交差反応性、特異性など）を有するMAB-A誘導体を作成するための遺伝子操作に使用されてもよい。抗体をヒト化する一般的な原理は、抗体のエピトープ結合部位の基本配列を保持しつつ、抗体の残りの非ヒト部分をヒト抗体配列と交換することを含む。モノクローナル抗体をヒト化するために、4つの一般的な工程が存在する。これらは、（1）出発原料である抗体軽鎖及び重鎖可変ドメインのヌクレオチド及び予想アミノ酸配列を決定することと、（2）ヒト化抗体またはラクダ化抗体を設計すること、すなわち、ヒト化またはラクダ化プロセスの間にどの抗体フレームワーク領域を使用するかを決定することと、（3）実際にヒト化またはラクダ化する方法論/技術を使用することと、（4）ヒト化抗体をトランスフェクトし、発現させることである。例えば、米国特許第4,816,567号、第5,807,715号、第5,866,692号及び第6,331,415号を参照。「最適化された」抗体との用語は、軽鎖または重鎖可変領域の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）において親抗体とは異なる少なくとも1つのアミノ酸を有する抗体を指し、親抗体と比較して、ヒトADAM9及び/またはカニクイザルADAM9に対し、高い結合アフィニティ（例えば、2倍以上）を与える。本明細書に提示する教示から、本発明の抗体は、ヒト化または最適化されていてもよく、またはヒト化され、最適化されていてもよいことが理解されるだろう。

#### 【0065】

エピトープ結合部位は、1つ以上の定常ドメインに融合した完全可変ドメイン、または適切なフレームワーク領域に接合したこのような可変ドメインのCDRのみを含んでいてもよい。エピトープ結合部位は、野生型であってもよく、または1つ以上のアミノ酸置換、挿入または欠失によって改変されていてもよい。このような操作は、レシピエント（例えばヒト個体）において定常領域が免疫原として機能する能力を部分的に、または完全になくするが、外来可変ドメインに対する免疫応答の可能性は残る（LoBuglio, A. F. et al. (1989) 「Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response」, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 4220-4224）。別の手法は、ヒト由来の定常領域を与えることだけではなく、ヒト免疫グロブリンでみられる形態に可能な限り近づくように再成形するように可変ドメインも改変することに注目している。抗体の重鎖及び軽鎖の両方の可変ドメインが、問題となる抗原に対する応答が様々であり、結合能力を決定する3つのCDRを含有し、

10

20

30

40

50

このCDRが、4つのフレームワーク領域によって中断され、フレームワーク領域は、所与の種において比較的保存されており、おそらくCDRの足場を与えていることが知られている。非ヒト抗体が、特定の抗原に対して調製される場合、可変ドメインは、改変されるヒト抗体中に存在するFRに、非ヒト抗体から誘導されるCDRを接合することによって、「再成形」されるか、または「ヒト化」されてもよい。種々の抗体へのこの手法の応用は、Sato, K. et al. (1993) Cancer Res 53:851-856; Riechmann, L. et al. (1988) 「Reshaping Human Antibodies for Therapy」, Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) 「Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity」, Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) 「Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation」, Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) 「Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity」, Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) 「Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody」 Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P. R. et al. (1991) 「Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo」, Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) 「Humanized Antibodies For Antiviral Therapy」, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) 「Humanization Of An Anti-*p185<sup>her2</sup>* Antibody For Human Cancer Therapy」, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; 及び Co, M. S. et al. (1992) 「Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen」, J. Immunol. 148:1149-1154によって報告されている。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、全てのCDR配列を保存している（例えば、マウス抗体中に存在する6個全てのCDRを含むヒト化マウス抗体）。他の実施形態では、ヒト化抗体は、元々の抗体のCDRと配列が異なる1つ以上のCDR（1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つ）を有する。

#### 【0066】

齧歯類または改変齧歯類可変ドメインと、ヒト定常ドメインに融合する、その関連する相補性決定領域（CDR）とを含むキメラ抗体を含め、非ヒト免疫グロブリンから誘導されるエпитープ結合部位を含む多くのヒト化抗体分子が記載されている（例えば、Winter et al. (1991) 「Man-made Antibodies」, Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) 「Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response」, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224; Shaw et al. (1987) 「Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated An

10

20

30

40

50

tigen」, J. Immunol. 138: 4534 - 4538; 及び Brown et al. (1987) 「Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody」, Cancer Res. 47: 3577 - 3583 を参照)。他の参考文献は、適切なヒト抗体定常ドメインとの融合前にヒト支持フレームワーク領域 (FR) に接合した齧歯類 CDR を記載する (例えば、Riechmann, L. et al. (1988) 「Reshaping Human Antibodies for Therapy」, Nature 332: 323 - 327; Verhoeyen, M. et al. (1988) 「Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity」, Science 239: 1534 - 1536; 及び Jones et al. (1986) 「Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse」, Nature 321: 522 - 525 を参照)。別の参考文献は、組換え操作された齧歯類フレームワーク領域によって支持される齧歯類 CDR を記載する (例えば、欧州特許公開第 519,596 号を参照)。これらの「ヒト化」分子は、ヒトレシピエントにおけるこれらの部分の滞留時間及び有効性、治療適用を制限してしまうような、齧歯類抗ヒト抗体分子に対する望ましくない免疫応答を最小限にするように設計される。利用可能な抗体をヒト化する他の方法は、Daugherty et al. (1991) 「Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins」, Nucl. Acids Res. 19: 2471 - 2476 及び米国特許第 6,180,377 号、第 6,054,297 号、第 5,997,867 号及び第 5,866,692 号によって開示される。

#### B. 抗体定常ドメインの特性決定

##### 【0067】

本明細書全体で、IgG 重鎖の定常領域中の残基の番号付けは、Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991) (「Kabat」) (本明細書に明示的に参考として組み込まれる) のような EU インデックスの番号付けである。「Kabat に記載するような EU インデックス」との用語は、Kabat で与えられるヒト IgG1 EU 抗体の定常ドメインの番号付けを指す。残基の番号を割り当てるためのこの方法は、当該技術分野で標準的なものとなっており、異なる抗体アイソタイプの定常領域内の等価な位置にあるアミノ酸を容易に同定する。

##### 1. 軽鎖の定常領域

##### 【0068】

上に示したとおり、抗体の各軽鎖は、可変ドメイン (「VL」) と定常ドメイン (「CL」) とを含む。

##### 【0069】

好ましい CL ドメインは、ヒト IgG CL ドメインである。例示的なヒト CL ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 69) である。

##### 【化 35】

```
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC
```

10

20

30

40

## 【 0 0 7 0 】

または、例示的な C L ドメインは、ヒト I g G C L ドメインである。

例示的なヒト C L ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 7 0)である。

## 【 化 3 6 】

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA  
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP  
TECS

## 2 . 重鎖の定常領域

10

## a . 天然に存在する F c 領域

## 【 0 0 7 1 】

本明細書に提示されるとおり、本発明の免疫コンジュゲートは、F c 領域を含んでいてもよい。本発明のこのような免疫コンジュゲートの F c 領域は、任意のアイソタイプ(例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4)を有していてもよい。本発明の免疫コンジュゲートは、C H I ドメイン及び/またはヒンジ領域を更に含んでいてもよい。存在する場合、C H I ドメイン及び/またはヒンジ領域は、任意のアイソタイプ(例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4)を有していてもよく、好ましくは、所望な F c 領域と同じエピトープを有する。

## 【 0 0 7 2 】

20

本発明の F c 領域を含有する免疫コンジュゲートの F c 領域は、完全な F c 領域(例えば、完全な I g G F c 領域)または F c 領域のフラグメントのみのいずれかであってもよい。場合により、本発明の F c 領域を含有する免疫コンジュゲートの F c 領域は、C 末端のリシンアミノ酸残基を欠いている。

## 【 0 0 7 3 】

抗体の 2 つの重鎖の C H 1 ドメインは、抗体の軽鎖「C L」定常領域と複合体を形成し、介在するヒンジドメインを介し、重鎖 C H 2 ドメインに接続する。

## 【 0 0 7 4 】

例示的な C H 1 ドメインは、ヒト I g G 1 C H 1 ドメインである。例示的なヒト I g G 1 C H 1 ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 7 1)である。

30

## 【 化 3 7 】

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

## 【 0 0 7 5 】

例示的な C H 1 ドメインは、ヒト I g G 2 C H 1 ドメインである。例示的なヒト I g G 2 C H 1 ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 7 2)である。

## 【 化 3 8 】

40

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVNHDHPS NTKVDKTV

## 【 0 0 7 6 】

例示的な C H 1 ドメインは、ヒト I g G 4 C H 1 ドメインである。例示的なヒト I g G 4 C H 1 ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 7 3)である。



## 【化 3 9】

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPKPS NTKVDKRV

## 【0077】

他の例示的なヒンジ領域は、ヒト Ig G 1 ヒンジ領域である。例示的なヒト Ig G 1 ヒンジ領域のアミノ酸配列は、(配列番号 74) である。

E P K S C D K T H T C P P C P

## 【0078】

別の例示的なヒンジ領域は、ヒト Ig G 2 ヒンジ領域である。例示的なヒト Ig G 2 ヒンジ領域のアミノ酸配列は、(配列番号 75) である。

E R K C C V E C P P C P

## 【0079】

別の例示的なヒンジ領域は、ヒト Ig G 4 ヒンジ領域である。例示的なヒト Ig G 4 ヒンジ領域のアミノ酸配列は、(配列番号 76) である。

E S K Y G P P C P S C P 上述のとおり、Ig G 4 ヒンジ領域は、安定化する突然変異、例えば、S 2 2 8 P 置換を含んでいてもよい。例示的な安定化されたヒト Ig G 4 ヒンジ領域のアミノ酸配列は、(配列番号 77) である。

E S K Y G P P C P P C P

## 【0080】

抗体の2つの重鎖のCH2ドメインとCH3ドメインが相互作用して「Fc領域」を形成し、Fc領域は、限定されないがFc受容体(「FcR」)を含む細胞「Fc受容体」によって認識されるドメインである。本明細書で使用される場合、「Fc領域」との用語は、重鎖のCH2ドメイン及びCH3ドメインを含むIgG重鎖のC末端領域を定義するために使用される。Fc領域は、アミノ酸配列が、他のIgGアイソタイプと比較して、特定のアイソタイプに対して最も相同性である場合に、その特定のIgGアイソタイプ、クラスまたはサブクラスを有すると言われる。

## 【0081】

例示的なヒト Ig G 1 のCH2 - CH3ドメインのアミノ酸配列は、

## 【化 4 0】

231            240            250            260            270            280  
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

              290            300            310            320            330  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

              340            350            360            370            380  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

              390            400            410            420            430  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME

              440            447  
ALHNHYTQKS LSLSPGX

Kabatに示されるようなEUIンデックスによって番号付けされる場合、(配列番号 1) であり、ここで、Xは、リシン(K)であるか、または存在しない。

## 【0082】

10

20

30

40

50

例示的なヒト I g G 2 の C H 2 - C H 3 ドメインのアミノ酸配列は、  
【化 4 1】

```

231      240      250      260      270      280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD

      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

      340      350      360      370      380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

      390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

      440      447
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

10

K a b a t に示されるような E U インデックスによって番号付けされる場合、(配列番号 1) であり、ここで、X は、リシン ( K ) であるか、または存在しない。

20

【 0 0 8 3】

例示的なヒト I g G 3 の C H 2 - C H 3 ドメインのアミノ酸配列は、  
【化 4 2】

```

231      240      250      260      270      280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

      340      350      360      370      380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

      390      400      410      420      430
WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

      440      447
ALHNRFTQKS LSLSPGX

```

30

K a b a t に示されるような E U インデックスによって番号付けされる場合、(配列番号 1) であり、ここで、X は、リシン ( K ) であるか、または存在しない。

40

【 0 0 8 4】

例示的なヒト I g G 4 の C H 2 - C H 3 ドメインのアミノ酸配列は、

## 【化 4 3】

231            240            250            260            270            280  
 APEFLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD  
  
              290            300            310            320            330  
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
  
              340            350            360            370            380  
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
  
              390            400            410            420            430  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME  
  
              440            447  
 ALHNHYTQKS LSLSLGX

10

K a b a t に示されるような E U インデックスによって番号付けされる場合、( 配列番号 1 ) であり、ここで、X は、リシン ( K ) であるか、または存在しない。

20

## 【 0 0 8 5】

多型は、抗体定常領域内の多くの異なる位置で観察されており ( 例えば、F c 位置、限定されないが、K a b a t に記載されるような E U インデックスによって番号付けされる場合、位置 270、272、312、315、356 及び 358 )、そのため、従来技術で存在する 1 つ以上の配列間に、わずかな差が存在し得る。ヒト免疫グロブリンの多型形態は、十分に特性決定されている。現在、18 G m アロタイプが知られている。G 1 m ( 1、2、3、17 ) または G 1 m ( a、x、f、z )、G 2 m ( 23 ) または G 2 m ( n )、G 3 m ( 5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28 ) または G 3 m ( b 1、c 3、b 3、b 0、b 3、b 4、s、t、g 1、c 5、u、v、g 5 ) ( L e f r a n c , e t a l . , 「The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis of Structure, Function And Regulation」. Pergamon, Oxford, p. 43 - 78 ( 1990 ) ; L e f r a n c , G . e t a l , 1979, Hum. Genet. : 50, 199 - 211 )。本発明の抗体は、任意の免疫グロブリン遺伝子の任意のアロタイプ、イソアロタイプまたはハプロタイプを組み込んでいてもよく、本明細書で提示される配列のアロタイプ、イソアロタイプまたはハプロタイプに限定されないことが具体的に想定されている。更に、ある発現系において、C H 3 ドメインの C 末端アミノ酸残基 ( 上に太字で記載 ) は、翻訳後に除去されてもよい。従って、C H 3 ドメインの C 末端残基は、本発明の免疫コンジュゲートの任意要素のアミノ酸残基である。特定の

30

40

b . F c 受容体 ( F c R )

## 【 0 0 8 6】

従来の免疫機能において、抗体 - 抗原複合体と免疫系の細胞との相互作用によって、エフェクター機能、例えば、抗体依存性の細胞毒性、マスト細胞の脱顆粒及び免疫制御シグナル ( 例えば、制御するリンパ球増殖及び抗体分泌 ) に対する食作用などの広範囲の応答が得られる。これらの相互作用は全て、抗体の F c 領域の結合または造血細胞、特に、複数種類の免疫系細胞 ( 例えば、B リンパ球、濾胞樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球及びマスト細胞 ) の表面にみられる受容体 ( 単純

50

に、「Fc 受容体」、「Fc R」及びまとめて「Fc R」と呼ばれる)上の特殊な細胞表面受容体に対する免疫複合体の結合によって開始される。

#### 【0087】

抗体及び免疫複合体が引き金となる細胞応答の多様性は、Fc RI (CD64)、Fc RII (CD32) 及び Fc RIII (CD16) の3つのFc受容体の構造不均一性から生じる。

Fc RI (CD64)、Fc RIIA (CD32A) 及び Fc RIII (CD16) は、活性化する(すなわち、免疫系を向上させる)受容体であり、Fc RIIB (CD32B) は、阻害(すなわち、免疫系を弱める)受容体である。加えて、新生児Fc受容体 (FcRn) との相互作用が、エンドソームから細胞表面へのIgG分子の再循環及び血中への放出を媒介する。例示的な野生型IgG1 (配列番号1)、IgG2 (配列番号2)、IgG3 (配列番号3) 及びIgG4 (配列番号4) のアミノ酸配列を上に表示している。

#### 【0088】

異なるFc Rが全く反対の機能を媒介する能力は、異なるFc Rの構造差を反映したものであり、特に、結合したFc Rが、免疫受容体チロシン系活性化モチーフ(「ITAM」)または免疫受容体チロシン系阻害モチーフ(「ITIM」)を有するかどうかを反映したものである。異なる細胞質酵素へのこれらの構造の動員が、Fc Rが介在する細胞応答の結果を決定づける。ITAMを含有するFc Rとしては、Fc RI、Fc RIIA、Fc RIIIAが挙げられ、Fc領域(例えば、免疫複合体中に存在する凝集したFc領域)に結合すると免疫系を活性化させる。Fc RIIBは、現時点で唯一知られている天然のITIM含有Fc Rであり、凝集したFc領域に結合すると、免疫系を弱めるか、または阻害するように作用する。ヒト好中球は、Fc RIIA遺伝子を発現する。免疫複合体または特定の抗体架橋によるFc RIIAのクラスター化は、ITAMを、受容体付随キナーゼと共に凝集させ、ITAMリン酸化を容易にするように作用する。ITAMリン酸化は、Sykキナーゼのドッキング部位として作用し、これが活性化すると、下流の物質(例えば、PI3K)が活性化する。細胞活性化により、炎症誘発メディエーターが放出される。Fc RIIB遺伝子は、Bリンパ球で発現する。その細胞外ドメインは、Fc RIIAと96%同一であり、識別不可能な様式でIgG複合体に結合する。Fc RIIBの細胞質ドメイン中のITIMの存在は、このFc Rの阻害性サブクラスを規定する。近年、この阻害の分子機構が確立された。活性化するFc Rと共にライゲーションする場合、Fc RIIB中のITIMは、リン酸化され、イノシトールポリホスフェート 5'-ホスファターゼ(SHIP)のSH2ドメインを引き寄せ、ITAMを含有するFc Rが介在するチロシンキナーゼ活性化の結果として、ホスホイノシトールメッセンジャーを加水分解し、その結果、細胞内のCa<sup>++</sup>の流入を防ぐ。従って、Fc RIIBの架橋は、Fc Rライゲーションに対する活性化応答を弱め、細胞応答を阻害する。従って、B細胞活性化、B細胞増殖及び抗体分泌が失われる。

#### c. 変異体Fc領域

#### 【0089】

Fc領域の改変によって、表現型が変わる場合があり、例えば、血清半減期が変わり、安定性が変わり、細胞酵素に対する感受性が変わるか、またはエフェクター機能が変わる場合がある。従って、本発明のFc領域を含有する分子を、エフェクター機能の観点で、例えば、がんを治療する際のこのような分子の有効性を高めるように改変することが望ましい場合がある。エフェクター機能の減少または消滅は、特定の場、例えば、作用機構がブロックまたは拮抗作用を含むが、標的抗原を生じる細胞を殺さない抗体の場合には、望ましい。エフェクター機能の増加は、望ましくない細胞(例えば、腫瘍細胞及び外来細胞)に指向する場合、Fc Rsが低レベルで発現する場合、例えば、低レベルのFc RIIBを有する腫瘍特異的な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)では、一般的に望ましい。エフェクター機能活性がこのように付与さ

10

20

30

40

50

れ、または変えられた本発明の免疫コンジュゲートは、エフェクター機能活性の効力向上が望ましい疾患、障害または感染の治療及び/または予防に有用である。

【0090】

従って、特定の実施形態では、本発明のFc領域を含有する免疫コンジュゲートのFc領域は、操作された変異体Fc領域であってもよい。本発明の免疫コンジュゲートのFc領域が、1つ以上のFc受容体（例えば、FcR(s)）に結合する能力を有していてもよく、より好ましくは、このような変異体Fc領域は、FcRI A (CD64)、FcRII A (CD32A)、FcRII B (CD32B)、FcRIII A (CD16a) またはFcRIII B (CD16b) に対する改変された結合を有し（例えば、野生型Fc領域によって示される結合に対して）、例えば、活性化受容体に対する結合が向上し、及び/または阻害受容体（複数可）に結合する能力がかなり減少しているか、またはないだろう。従って、本発明の免疫コンジュゲートのFc領域は、完全Fc領域のCH2ドメインの一部または全て、及び/またはCH3ドメインの一部または全てを含んでいてもよく、または変異体CH2及び/または変異体CH3の配列を含んでいてもよい（完全Fc領域のCH2またはCH3ドメインに関し、例えば、1つ以上の挿入及び/または1つ以上の欠失を含んでいてもよい）。このようなFc領域は、非Fcポリペプチド部分を含んでいてもよく、または非天然の完全Fc領域の一部を含んでいてもよく、または天然に存在しないCH2及び/またはCH3ドメインの配向を含んでいてもよい（例えば、2つのCH2ドメインまたは2つのCH3ドメイン、またはN末端からC末端に向かう方向で、CH2ドメインに接続するCH3ドメインなど）。

【0091】

エフェクター機能を変えるものとして同定されたFc活性化受容体（例えば、FcRII A (CD16A) に対する結合を増やし、阻害受容体（例えば、FcRII B (CD32B) に対する結合を減らす改変を含め、Fc領域改変は、当該技術分野で知られている（例えば、Stavenhagen, J. B. et al. (2007) 「Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fc gamma Receptors」, Cancer Res. 57(18): 8882-8890を参照）。表1は、活性化受容体への結合を増加させるか、及び/または阻害受容体への結合を減らす例示的な改変の例示的な一部位、二部位、三部位、四部位及び五部位の置換を列挙する（番号付けは、KabattにあるEUインデックスの番号付けであり、置換は、配列番号1のアミノ酸に対するものである）。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1 好ましい活性化 F c 領域の変異			
一部位変異			
F 2 4 3 L	R 2 9 2 G	D 2 7 0 E	R 2 9 2 P
Y 3 0 0 L	P 3 9 6 L		
二部位変異			
F 2 4 3 L 及 び R 2 9 2 P	F 2 4 3 L 及び Y 3 0 0 L	F 2 4 3 L 及び P 3 9 6 L	R 2 9 2 P 及び Y 3 0 0 L
D 2 7 0 E 及 び P 3 9 6 L	R 2 9 2 P 及び V 3 0 5 I	P 3 9 6 L 及び Q 4 1 9 H	P 2 4 7 L 及び N 4 2 1 K
R 2 9 2 P 及 び P 3 9 6 L	Y 3 0 0 L 及び P 3 9 6 L	R 2 5 5 L 及び P 3 9 6 L	R 2 9 2 P 及び P 3 0 5 I
K 3 9 2 T 及 び P 3 9 6 L			
三部位変異			
F 2 4 3 L、P 2 4 7 L 及び N 4 2 1 K		P 2 4 7 L、D 2 7 0 E 及び N 4 2 1 K	
F 2 4 3 L、R 2 9 2 P 及び Y 3 0 0 L		R 2 5 5 L、D 2 7 0 E 及び P 3 9 6 L	
F 2 4 3 L、R 2 9 2 P 及び V 3 0 5 I		D 2 7 0 E、G 3 1 6 D 及び R 4 1 6 G	
F 2 4 3 L、R 2 9 2 P 及び P 3 9 6 L		D 2 7 0 E、K 3 9 2 T 及び P 3 9 6 L	
F 2 4 3 L、Y 3 0 0 L 及び P 3 9 6 L		D 2 7 0 E、P 3 9 6 L 及び Q 4 1 9 H	
V 2 8 4 M、R 2 9 2 L 及び K 3 7 0 N		R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L 及び P 3 9 6 L	

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

四部位変異	
L 2 3 4 F、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P 及び Y 3 0 0 L	F 2 4 3 L、P 2 4 7 L、D 2 7 0 E 及び N 4 2 1 K
L 2 3 4 F、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P 及び Y 3 0 0 L	F 2 4 3 L、R 2 5 5 L、D 2 7 0 E 及び P 3 9 6 L
L 2 3 5 I、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P 及び Y 3 0 0 L	F 2 4 3 L、D 2 7 0 E、G 3 1 6 D 及び R 4 1 6 G
L 2 3 5 Q、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P 及び Y 3 0 0 L	F 2 4 3 L、D 2 7 0 E、K 3 9 2 T 及び P 3 9 6 L
P 2 4 7 L、D 2 7 0 E、Y 3 0 0 L 及び N 4 2 1 K	F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L 及び P 3 9 6 L
R 2 5 5 L、D 2 7 0 E、R 2 9 2 G 及び P 3 9 6 L	F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、V 3 0 5 I 及び P 3 9 6 L
R 2 5 5 L、D 2 7 0 E、Y 3 0 0 L 及び P 3 9 6 L	F 2 4 3 L、D 2 7 0 E、P 3 9 6 L 及び Q 4 1 9 H
D 2 7 0 E、G 3 1 6 D、P 3 9 6 L 及び R 4 1 6 G	
五部位変異	
L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L 及び P 3 9 6 L	F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、V 3 0 5 I、Y 3 0 0 L 及び P 3 9 6 L
L 2 3 5 P、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L 及び P 3 9 6 L	

## 【0092】

C D 3 2 B に対する結合が減少し、及び/または C D 1 6 A に対する結合が増加したヒト I g G 1 F c 領域の例示的な変異体は、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 置換を含み、ここで、番号付けは、K a b a t にある E U インデックスの番号付けである。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 領域中に存在していてもよい。一実施形態では、変異体ヒト 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、変異体ヒト 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。

## 【0093】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートの F c 領域が、F c R I A (C D 6 4)、F c R I I A (C D 3 2 A)、F c R I I B (C D 3 2 B)、F c R I I I A (C D 1 6 a) または F c R I I I B (C D 1 6 b) に対する結合の減少(または実質的に存在しない)を示すことが好ましい(野生型 I g G 1 F c 領域(配列番号 1)によって示される結合に対して)。具体的な実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、A D C C エフェクター機能の減少を示す I g G F c 領域を含む。好ましい実施形態では、免疫コンジュゲートの C H 2 - C H 3 ドメインは、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、D 2 6 5 A、N 2 9 7 Q 及び N 2 9 7 G の置換のうち、任意の 1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つを含み、番号付けは、K a b a t にある E U インデックスの番号付けである。別の実施形態では、C H 2 - C H 3 ドメインは、N 2 9 7 Q 置換、N 2 9 7 G 置換、L 2 3 4 A 置換及び L 2 3 5 A 置換または D 2 6 5 A 置換を含む。これらの突然変異が、F c R 結合を失わせるからである。または、F c R I I I A (C D 1 6 a) に対する結合の減少(または実質的に存在しない)及び/またはエフェクター機能の減少(野生型 I g G 1 F c 領域

(配列番号 1) によって示される結合及びエフェクター機能に対して) を固有に示す天然に存在する Fc 領域の CH2 - CH3 ドメインが利用される。具体的な実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、IgG2 Fc 領域 (配列番号 2) または IgG4 Fc 領域 (配列番号 4) を含む。IgG4 Fc 領域が利用される場合、本発明はまた、安定化する突然変異の導入、例えば、上に記載するヒンジ領域 S228P 置換 (例えば、配列番号 77 を参照) を包含する。N297G、N297Q、L234A、L235A 及び D265A 置換は、エフェクター機能を失わせるため、エフェクター機能が望ましい状況では、これらの置換は、好ましくは使用されないだろう。

#### 【0094】

エフェクター機能を減少させるか、または失わせる本発明の Fc 領域を含有する免疫コンジュゲートの CH2 及び CH3 ドメインにとって好ましい IgG1 配列は、置換 L234A / L235A (下線で示される) を含むだろう (配列番号 78)。

#### 【化 4 4】

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

ここで、X は、リシン (K) であるか、または存在しない。

#### 【0095】

本発明の Fc 領域を含有する免疫コンジュゲートの CH2 及び CH3 ドメインにとって好ましい第 2 の IgG1 配列は、S442C 置換 (下線で示される) を含み、2 つの CH3 ドメインが互いにジスルフィド結合によって共有結合するのが可能になるか、または医薬薬剤の結合が可能になる。このような分子のアミノ酸配列は、(配列番号 79) であり、

#### 【化 4 5】

```
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LCLSPGX
```

ここで、X は、リシン (K) であるか、または存在しない。

#### 【0096】

本発明の Fc 領域を含有する免疫コンジュゲートの CH2 及び CH3 ドメインにとって好ましい第 3 の IgG1 配列は、

エフェクター機能を減少させるか、または失わせる L234A / L235A 置換 (下線で示される) と、2 つの CH3 ドメインが互いにジスルフィド結合によって共有結合するのが可能になるか、または医薬薬剤の結合が可能になる S442C 置換 (下線で示される) とを含む。このような分子のアミノ酸配列は、(配列番号 80) であり、

10

20

30

40

50



## 【化 4 6】

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPSSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH  
 ALHNHYTQKS LCLSPGX

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

10

## 【0097】

Fc領域を含むタンパク質の血清半減期は、FcRnに対するFc領域の結合アフィニティを高めることによって長くなり得る。「半減期」との用語は、本明細書で使用される場合、投与後の分子の平均生存時間の指標である、分子の薬物動態特性を意味する。半減期は、対象（例えば、ヒト患者または他の哺乳動物）の体内またはその特定のコンパートメントから、例えば、血清中で測定される場合には、すなわち血中半減期であり、または他の組織から既知の量の分子の50%を排泄するのに必要な時間として表すことができる。一般に、半減期が延びると、投与された分子の血液循環中での平均滞留時間（MRT）が延びる。

## 【0098】

20

いくつかの実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、野生型Fc領域に対して少なくとも1つのアミノ酸改変を含む変異体Fc領域を含み、その結果、前記分子は、半減期が延びている（野生型Fc領域を含む分子に対して）。いくつかの実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、変異体IgGFc領域を含み、前記変異体Fc領域は、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つ以上の位置に、半減期を延ばすアミノ酸置換を含み、番号付けは、KabattにあるEUIンデックスの番号付けである。Fc領域含有分子の半減期を長くすることが可能な多くの突然変異は、当該技術分野で知られており、例えば、M252Y、S254T、T256E、及びこれらの組み合わせを含む。例えば、全体的に本明細書に参考として組み込まれる、米国特許第6,277,375号、第7,083,784号、第7,217,797号、第8,088,376号、米国公開第2002/0147311号、第2007/0148164号、及びPCT公開第WO98/23289号、第WO2009/058492号及び第WO2010/033279号に記載の変異を参照。延びた半減期を有する免疫コンジュゲートは、Fc領域残基250、252、254、256、257、288、307、308、309、311、378、428、433、434、435及び436の2つ以上に置換を含む変異体Fc領域を有するものも含み、番号付けは、KabattにあるEUIンデックスの番号付けである。

30

特に、T250Q、M252Y、S254T、T256E、K288D、T307Q、V308P、A378V、M428L、N434A、H435K及びY436Iから選択される2つ以上の置換。番号付けは、KabattにあるEUIンデックスの番号付けである。

40

## 【0099】

具体的な実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、

- (A) M252Y、S254T及びT256E；
- (B) M252Y及びS254T；
- (C) M252Y及びT256E；
- (D) T250Q及びM428L；

50

( E ) T 3 0 7 Q 及び N 4 3 4 A ;  
 ( F ) A 3 7 8 V 及び N 4 3 4 A ;  
 ( G ) N 4 3 4 A 及び Y 4 3 6 I ;  
 ( H ) V 3 0 8 P 及び N 4 3 4 A ; または  
 ( I ) K 2 8 8 D 及び H 4 3 5 K

の置換を含む変異体 I g G F c 領域を有する。

【 0 1 0 0 】

好ましい実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E の置換のうち、任意の 1 つ、2 つまたは 3 つを含む変異体 I g G F c 領域を有する。本発明は更に、

( A ) エフェクター機能及び / または F c R を変える 1 つ以上の突然変異と、

( B ) 血清半減期を延ばす 1 つ以上の突然変異とを含む変異体 F c 領域を有する免疫コンジュゲートを包含する。

【 0 1 0 1 】

本発明の F c 領域を含有する免疫コンジュゲートの C H 2 及び C H 3 ドメインにとって好ましい第 4 の I g G 1 配列は、血清半減期を延ばすように、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E 置換 ( 下線で示される ) を含む。このような分子のアミノ酸配列は、( 配列番号 1 4 7 ) であり、

【 化 4 7 】

APELLGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME  
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

ここで、X は、リシン ( K ) であるか、または存在しない。

【 0 1 0 2 】

本発明の F c 領域を含有する免疫コンジュゲートの C H 2 及び C H 3 ドメインにとって好ましい第 5 の I g G 1 配列は、血清半減期を延ばすように、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E 置換 ( 下線で示される ) と、2 つの C H 3 ドメインが互いにジスルフィド結合によって共有結合するのが可能になるか、または薬物部分の結合が可能になるように、S 4 4 2 C 置換 ( 下線で示される ) とを含む。このような分子のアミノ酸配列は、( 配列番号 1 4 8 ) であり、

【 化 4 8 】

APELLGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME  
 ALHNHYTQKS LCLSPGX

ここで、X は、リシン ( K ) であるか、または存在しない。

【 0 1 0 3 】

本発明の F c 領域を含有する免疫コンジュゲートの C H 2 及び C H 3 ドメインにとって好ましい第 6 の I g G 1 配列は、エフェクター機能を減少させるか、または失わせる L 2 3 4 A / L 2 3 5 A 置換 ( 下線で示される ) と、血清半減期を延ばすように、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E 置換 ( 下線で示される ) とを含む。このような分子のアミノ酸配列は、( 配列番号 1 4 9 ) であり、

10

20

30

40

50

## 【化 4 9】

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

10

## 【0104】

本発明のFc領域を含有する免疫コンジュゲートのCH2及びCH3ドメインにとって好ましい第7のIgG1配列は、エフェクター機能を減少させるか、または失わせるL234A/L235A置換（下線で示される）と、血清半減期を延ばすように、M252Y、S254T及びT256E置換（下線で示される）と、2つのCH3ドメインが互いにジスルフィド結合によって共有結合するのが可能になるか、または薬物部分の結合が可能になるように、S442C置換（下線で示される）とを含む。このような分子のアミノ酸配列は、（配列番号150）であり、

## 【化 5 0】

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHNHYTQKS LCLSPGX

20

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

II．例示的な抗ADAM9抗体

## 【0105】

本発明は、本発明の免疫コンジュゲートの生成に有用な、ADAM9に特異的に結合することが可能な特定の抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。

30

## 【0106】

代表的なヒトADAM9ポリペプチド（NCBI配列NP\_003807、28アミノ酸残基シグナル配列を含む、下線が引かれた状態で示される）は、アミノ酸配列（配列番号5）を有する。

40

50

## 【化 5 1】

MGSGARFPSG TLRVRWLLLL GLVGPVLGAA RPFQQTSHL SSYEIITPWR  
 LTRERREAPR PYSKQVSYVI QAEGKEHIIH LERNKDLLPE DFVVYTYNKE  
 GTLITDHPNI QNHCHYRGYV EGVHNSSIAL SDCFGLRGLL HLENASYGIE  
 PLQNSSHFEH IIRMDDEVYK EPLKCGVSNK DIEKETAKDE EEEPPSMTQL  
 LRRRRRAVL PQ TRYVELFIVV DKERYDMMGR NQTAVREEMI LLANYLDSMY  
 IMLNIRIVLV GLEIWTNGNL INIVGGAGDV LGNFVQWREK FLITRRRHDS  
 AQLVLKKGFG GTAGMAFVGT VCSRSHAGGI NVFGQITVET FASIVAHELG  
 HNLGMNHDDG RDCSCGAKSC IMNSGASGSR NFSSCSAEDF EKLTNLKGGN  
 CLLNIPKPDE AYSAPSCGNK LVDAGEECDG GTPKECELDG CCEGSTCKLK  
 SFAECAYGDC CKDCRFLPGG TLCRGKTSEC DVPEYCNGSS QFCQPDVFIQ  
 NGYPCQNNKA YCYNGMCQYY DAQCQVIFGS KAKAAPKDCF IEVNSKGDRF  
 GNCGFSGNEY KKCATGNALC GKLQCENVQE IPVFGIVPAI IQTPSRGTC  
 WGVDFQLGSD VPDPGMVNEG TKCGAGKICR NFQCVDAVL NYDCDVQKKC  
 HGHGVCNSNK NCHCENGWAP PNCETKGYGG SVDSGPTYNE MNTALRDGLL  
 VFFFLLIVPLI VCAIFIFIKR DQLWRSYFRK KRSQTYESDG KNQANPSRQP  
 GSVPRHVSPV TPPREVPIYA NRFAVPTYAA KQPQQFPSRP PPPQPKVSSQ  
 GNLIPARPAP APPLYSSLT

10

20

ADAM9 (配列番号5) の819のアミノ酸残基のうち、残基1～28は、シグナル配列であり、残基29～697は、細胞外ドメインであり、残基698～718は、膜貫通ドメインであり、残基719～819は、細胞内ドメインである。レプロリシン(M12B)ファミリージンクメタロプロテアーゼドメイン(およそ残基約212-406)、ジスインテグリンドメイン(およそ残基423-497)；及びEGF様ドメイン(およそ残基644-697)の3つの構造ドメインは、細胞外ドメイン内に位置している。多くの翻訳後改変及びアイソフォームが同定され、血漿膜に達して成熟タンパク質を生成する前に、trans-Golgi網目構造内でタンパク質をタンパク質分解によって開裂させる。プロドメインの除去は、2つの異なる部位での開裂によって起こる。プロドメインと触媒ドメインとの間の境界(Arg-205/Ala-206)で、フリンなどのプロタンパク質変換酵素によって最も処理されると思われる。更なる上流の開裂プロタンパク質変換酵素部位(Arg-56/Glu-57)は、ADAM9の活性化において重要な役割をもつ。

30

## 【0107】

代表的なカニクイザルADAM9ポリペプチド(NCBI配列XM\_005563126.2、おそらく28アミノ酸残基シグナル配列を含む、下線が引かれた状態で示される)は、アミノ酸配列(配列番号6)を有する。

40

50

## 【化 5 2】

MGSGVGSPSG TLRVRWLLLL CLVGPVLGAA RPGFQQTSHL SSYEIITPWR  
 LTRERREAPR PYSKQVSYLI QAEGKEHIIH LERNKDLLPE DFFVYTYNKE  
 GTVITDHPNI QNHCHFRGYV EGVYNSSVAL SNCFGLRGLL HLENASYGIE  
 PLQNSSHFEH IYRMDDVHK EPLKCGVSNK DIEKETTKDE EEEPPSMTQL  
 LRRRRRAVLPO TRYVELFIVV DKERYDMMGR NQTAVREEMI LLANYLDSMY  
 IMLNIRIVLV GLEIWTNGNL INIAGGAGDV LGNFVQWREK FLITRRRHDS  
 AQLVLKKGFQ GTAGMAFVGT VCSRSAGGI NVFGHITVET FASIVAHELQ  
 HNLGMNHDDG RDCSCGAKSC IMNSGASGSR NFSSCSAEDF EKLTNLKGGN  
 CLLNIPKPDE AYSAPSCGNK LVDAGEECDG GTPKECELDP CCEGSTCKLK  
 SFAECAYGDC CKDCRFLPGG TLRCGKTSEC DVPEYCNGSS QFCQPDVFIQ  
 NGYPCQNNKA YCYNMCMQYY DAQCQVIFGS KAKAAPKDCF IEVNSKGDRE  
 GNCGFSGNEY KKCATGNALC GKLQCENVQE IPVFGIVPAI IQTPSRGTC  
 WGVDFQLGSD VPDPGMVNEG TKCGADKICR NFQCVDASVL NYDCDIQKKC  
 HGHGVCNSNK NCHCENGWAP PNCETKGYGG SVDSGPTYNE MNTALRDGLL  
 VFFFLLIVPLI VCAIFIFIKR DQLWRRYFRK KRSQTYESDG KNQANPSRQP  
 VSVPRHVSPV TPPREVPIYA NRPVPTTYAA KQPQQFSPSRP PPPQPKVSSQ  
 GNLIPARPAP APPLYSSLT

10

20

タンパク質のレプロリシン (M12B) ファミリージンクメタロプロテアーゼドメインは、おおそ残基 212 - 406) であり、タンパク質のジスインテグリンドメインは、おおそ残基 423 - 497 である。

## 【0108】

特定の実施形態では、本発明の抗ADAM9抗体及びそのADAM9結合フラグメントは、以下の基準の任意の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、または9つによって特徴付けられる。

(1) がん細胞表面で内因性発現する場合に、ヒトADAM9に免疫特異的に結合する能力；

30

(2) 同様の結合アフィニティで、ヒト及び非ヒト霊長類ADAM9 (例えば、カニクイザルADAM9) に特異的に結合する；

(3) 4 nM以下の平衡結合定数 ( $K_D$ ) で、ヒトADAM9に特異的に結合する；

(4) 4 nM以下の平衡結合定数 ( $K_D$ ) で、非ヒト霊長類ADAM9に特異的に結合する；

(5)  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 分}^{-1}$ 以上のオンレート ( $k_a$ ) で、ヒトADAM9に特異的に結合する；

(6)  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 分}^{-1}$ 以上のオンレート ( $k_a$ ) で、非ヒト霊長類ADAM9に特異的に結合する；

(7)  $1 \times 10^{-3} \text{ 分}^{-1}$ 以下のオフレート ( $k_d$ ) でヒトADAM9に特異的に結合する；

40

(8)  $9 \times 10^{-4} \text{ 分}^{-1}$ 以下のオフレート ( $k_d$ ) で非ヒト霊長類ADAM9に特異的に結合する。

(9) キメラまたはマウス親抗体と比較して、cyno ADAM9に対する結合アフィニティ (例えば、BIACORE (登録商標) 分析によって決定されるような) において、少なくとも100倍の向上 (例えば、少なくとも100倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも250倍、少なくとも300倍、少なくとも350倍、少なくとも400倍、少なくとも450倍、少なくとも500倍、少なくとも550倍、または少なくとも600倍の向上) を有し、ヒトADAM9に対する高アフィニティ結合 (例えば、BIACORE (登録商標) 分析) を保持するように最適化される。

50

## 【 0 1 0 9 】

本明細書で記載される場合抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントの結合定数は、表面プラズモン共鳴を用いて、例えば、B I A C O R E (登録商標) 分析によって決定されてもよい。表面プラズモン共鳴データは、1 : 1 L a n g m u i r 結合モデル (同時に  $k_a$  と  $k_d$ ) にフィッティングされ、平衡結合定数  $K_D$  は、速度定数の比率  $k_d / k_a$  から計算された。このような結合定数は、一価抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメント (すなわち、1つの A D A M 9 エピトープ結合部位を含む分子)、二価抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメント (すなわち、2つの A D A M 9 エピトープ結合部位を含む分子)、またはそれより高い価数を有する抗 A D A M 9 抗体及びその A D A M 9 結合フラグメント (例えば、3、4、またはもっと多くの A D A M 9 エピトープ結合部位を含む分子) について決定されてもよい。

10

## 【 0 1 1 0 】

本発明は、特に、ヒト A D A M 9 ポリペプチドのエピトープに免疫特異的に結合する抗 A D A M 9 軽鎖可変 (V L) ドメインと抗 A D A M 9 重鎖可変 (V H) ドメインとを含む抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントを含む免疫コンジュゲートを包含する。特に示されていない限り、このような全ての抗 A D A M 9 抗体及びその A D A M 9 結合フラグメントは、ヒト A D A M 9 に免疫特異的に結合することができる。本明細書で使用される場合、このような A D A M 9 可変ドメインは、それぞれ「抗 A D A M 9 - V L」及び「抗 A D A M 9 - V H」と呼ばれる。

A . マウス抗ヒト A D A M 9 抗体

20

## 【 0 1 1 1 】

A D A M 9 の標的タンパク質処理活性をブロックするマウス抗 A D A M 9 抗体が内部移行し、抗腫瘍活性を有することが同定された (例えば、米国特許第 8 , 3 6 1 , 4 7 5 号を参照)。この抗体は、米国特許第 7 , 6 7 4 , 6 1 9 号及び第 8 , 3 6 1 , 4 7 5 号では、ハイブリドーマクローン A T C C P T A - 5 1 7 4 によって産生する「抗 K I D 2 4」抗体と呼ばれ、本明細書では「M A B - A」と呼ばれる。M A B - A は、正常組織と比べ、腫瘍に対して強く優先的な結合を示す (図 7 A ~ 7 C を参照)。M A B - A は、正常な細胞型の大きなパネルでの染色をほとんど、または全く示さなかった (表 2)。

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2	
組織	M A B - A ( 1 . 2 5 $\mu$ g / m L )
副腎	陰性
膀胱	陰性
骨髄	陰性
乳房	陰性
小脳	陰性
大脳	N D
子宮頸管	陰性
結腸	陰性
食道	平滑筋±から 1 + ( g r c ) < 5 %
卵管	陰性
心臓	陰性
腎臓	陰性
肝臓	陰性
肺	陰性
リンパ節	陰性
卵巢	陰性
膵臓	非常に稀 (膵腺房と考えられる) 1 + ( c )
副甲状腺	上皮肝実質細胞 1 + ( g r c )、1 % 細胞 (望ましい主細胞) 2 + ( m , c ) 5 % 1 + ( m , c ) 主に 1 0 % 先端
下垂体	後葉細胞 (おそらく神経細胞及び/または後葉グリア細胞 1 + ( c > m ) < 5 %
胎盤	絨毛膜板内の血管内壁細胞 1 + ( g r c > m ) 絨毛膜板の間葉細胞 1 - 2 + g r c )、5 %
前立腺	腺上皮 2 + ( g r c ) 5 % 及び 1 + ( g r c ) 5 %

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

網膜 + 毛様体	おそらく陰性（染色していない顔料に起因する、着色した上皮層 3 - 4 + (g r c)）
顎下腺	導管上皮 + / - (c) 10 %
骨格筋	陰性
皮膚	陰性
小腸	陰性
脊髄	神経網 1 + (g r c) < 1 %
脾臓	陰性
胃	陰性
精巣	細精管 1 + (g r c) < 5 % 間質細胞（おそらくライディッヒ細胞） 2 - 3 + (g r c) < 5 % 及び 1 + (g r c) 10 %
甲状腺	陰性
扁桃腺	内皮細胞 2 - 3 + (c, m) < 5 % 及び 1 + (m, c) 15 %
尿管	移行上皮 1 + (m, c) < 5 % 及び 1 + (m, c) 5 % ; 内皮細胞 1 + (c) < 5 %
子宮	陰性
A 4 9 8 細胞プレート	2 - 3 + (m, c)、50 %、1 + (m, c) 45 %

## 【0112】

図2に示すように、MAB-Aは、ヒトADAM9に高アフィニティで結合するが、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）ADAM9には、これより小さな程度で結合する。

## 【0113】

MAB-AのVLドメイン及びVHドメインのアミノ酸配列を以下に与える。MAB-AのVHドメイン及びVLドメインはヒト化されており、CDRは、アフィニティを改善し、及び/または潜在的なアミノ酸の易罹病性を取り除くために、最適化される。CDRH3は、ヒトADAM9に対する高いアフィニティを維持しつつ、非ヒト霊長類ADAM9に対する結合を向上させるために、更に最適化された。

## 【0114】

本発明の好ましい免疫コンジュゲートは、MAB-Aの最適化された変異体のVHドメインの1つ、2つまたは3つ全てのCDRH、及び/またはVLドメインの1つ、2つまたは3つ全てのCDRLを含み、好ましくは更に、ヒト化MAB-AのVH及び/またはVLドメインのヒト化フレームワーク領域（「FR」）を含む。本発明の他の好ましい免疫コンジュゲートは、MAB-Aのヒト化/最適化された変異体のVHドメイン及び/またはVLドメイン全体を有する。



## 【 0 1 1 5 】

本発明は、特に、免疫コンジュゲートであって、

( A ) ( 1 ) M A B - A の V H ドメインの 3 個の C D R<sub>H</sub> ; 及び

( 2 ) M A B - A のヒト化変異体の V H ドメインの 4 個の F R ; または

( B ) ( 1 ) M A B - A の V L ドメインの 3 個の C D R<sub>L</sub> ; 及び

( 2 ) M A B - A のヒト化変異体の V L ドメインの 4 個の F R ; または

( C ) M A B - A の最適化された変異体の V H ドメインの 3 個の C D R<sub>H</sub> ; 及び

M A B - A の V L ドメインの 3 個の C D R<sub>L</sub> ; または

( D ) M A B - A の V H ドメインの 3 個の C D R<sub>H</sub> ; 及び最適化された変異体 M A B -

A の V L ドメインの 3 個の C D R<sub>L</sub> ; または

( E ) M A B - A の最適化された変異体の V H ドメインの 3 個の C D R<sub>H</sub> ; 及び最適化された M A B - A の V L ドメインの 3 個の C D R<sub>L</sub> ; または

( F ) ( 1 ) M A B - A の最適化された変異体の V H ドメインの 3 個の C D R<sub>H</sub> ; 及び

( 2 ) M A B - A のヒト化変異体の V H ドメインの 4 個の F R ; または

( G ) ( 1 ) M A B - A の最適化された変異体の V L ドメインの 3 個の C D R<sub>L</sub> ; 及び

( 2 ) M A B - A のヒト化変異体の V L ドメインの 4 個の F R ; または

( H ) ( 1 ) M A B - A のヒト化 / 最適化された変異体の V H ドメイン ; 及び

( 2 ) M A B - A のヒト化 / 最適化された変異体の V L ドメイン

を含む免疫コンジュゲートに関する。マウス抗体「 M A B - A 」

## 【 0 1 1 6 】

マウス抗 A D A M 9 抗体 M A B - A の V H ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 7 である ( C D R<sub>H</sub> 残基は、下線が引かれた状態で示されている ) 。

## 【 化 5 3 】

QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMHWVKQR PGQGLEWIGE  
IIPINGHTNY NEKFKSKATL TLDKSSSTAY MQLSSLASED SAVYYCARGG  
YYYYGSRDYF DYWGQGTTLT VSS

## 【 0 1 1 7 】

M A B - A の C D R<sub>H</sub> 1 ドメインのアミノ酸配列は、( 配列番号 8 ) : S Y W M H である。

## 【 0 1 1 8 】

M A B - A の C D R<sub>H</sub> 2 ドメインのアミノ酸配列は、( 配列番号 9 ) : E I I P I N G H T N Y N E K F K S である。

## 【 0 1 1 9 】

M A B - A の C D R<sub>H</sub> 3 ドメインのアミノ酸配列は、( 配列番号 1 0 ) : G G Y Y Y Y G S R D Y F D Y である。

## 【 0 1 2 0 】

マウス抗 A D A M 9 抗体 M A B - A の V L ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 1 1 である ( C D R<sub>L</sub> 残基は、下線が引かれた状態で示されている ) 。

## 【 化 5 4 】

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGDSYMNWY QQIPGQPPKL  
 LIYAAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSHEDPF  
TFGGGTKLEI K

## 【 0 1 2 1 】

M A B - A の C D R<sub>L</sub> 1 ドメインのアミノ酸配列は、( 配列番号 1 2 ) : K A S Q S V

D Y D G D S Y M Nである。

【 0 1 2 2 】

M A B - A の C D R<sub>L</sub> 2 ドメインのアミノ酸配列は、( 配列番号 1 3 ) : A A S D L E Sである。

【 0 1 2 3 】

M A B - A の C D R<sub>L</sub> 3 ドメインのアミノ酸配列は、( 配列番号 1 4 ) : Q Q S H E D P F Tである。

B . 例示的なヒト化 / 最適化された抗 A D A M 9 - V H ドメイン及び V L ドメイン

1 . M A B - A の変異体 V H ドメイン

【 0 1 2 4 】

M A B - A の特定の好ましいヒト化 / 最適化された抗 A D A M 9 - V H ドメインのアミノ酸配列は、M A B - A の A D A M 9 - V H ドメインの変異体 ( 配列番号 7 ) であり、配列番号 1 5 によって表され ( C D R<sub>H</sub> 残基は、下線が引かれた状態で示されている )、

【 化 5 5 】

EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYWX<sub>1</sub></u> HWVRQA
PGKGLEWVGE	<u>IIPIX<sub>2</sub>GHTNY</u>	<u>NEX<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>X<sub>5</sub></u> RFTI	SLDNSKNTLY
LQMGSRLRAED	TAVYYCARGG	<u>YYYYX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub></u>	<u>DYWGQGTTVT</u>
VSS			

ここで、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub> 及び X<sub>6</sub> は、独立して選択され、  
 X<sub>1</sub> は、M または I であり ; X<sub>2</sub> は、N または F であり ;  
 X<sub>3</sub> は、K または R であり ; X<sub>4</sub> は、K または Q であり ;  
 X<sub>5</sub> は、S または G であり、及び X<sub>6</sub> は、P、F、Y、W、I、L、V、T、G または D であり ;  
 X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>、X<sub>9</sub>、X<sub>10</sub> 及び X<sub>11</sub> は、以下になるように選択される。

10

20

30

40

50

## 【表 3】

<p>(A) <math>X_6</math> が P である場合、  <math>X_7</math> は、K または R であり；  <math>X_8</math> は、F または M であり；  <math>X_9</math> は、G であり；  <math>X_{10}</math> は、W または F であり；  及び  <math>X_{11}</math> は、M、L または K であり；</p>	<p>(B) <math>X_6</math> が、F、Y または W である場合、  <math>X_7</math> は、N または H であり；  <math>X_8</math> は、S または K であり；  <math>X_9</math> は、G または A であり；  <math>X_{10}</math> は、T または V であり；  及び  <math>X_{11}</math> は、M、L または K であり；</p>	10
<p>(C) <math>X_6</math> が、I、L または V である場合、  <math>X_7</math> は、G であり；  <math>X_8</math> は、K であり；  <math>X_9</math> は、G または A であり；  <math>X_{10}</math> は、V であり；及び  <math>X_{11}</math> は、M、L または K であり；</p>	<p>(D) <math>X_6</math> が T である場合、  <math>X_7</math> は、G であり；  <math>X_8</math> は、K、M または N であり；  <math>X_9</math> は、G であり；  <math>X_{10}</math> は、V または T であり；  及び  <math>X_{11}</math> は、L または M であり；</p>	
<p>(E) <math>X_6</math> が G である場合、  <math>X_7</math> は、G であり；  <math>X_8</math> は、S であり；  <math>X_9</math> は、G であり；  <math>X_{10}</math> は、V であり；及び  <math>X_{11}</math> は、L であり；</p>	<p>(F) <math>X_6</math> が D である場合、  <math>X_7</math> は、S であり；  <math>X_8</math> は、N であり；  <math>X_9</math> は、A であり；  <math>X_{10}</math> は、V であり；及び  <math>X_{11}</math> は、L である。</p>	

## 【0125】

MAB の好ましいヒト化抗 ADAM9 VH ドメイン：hMAB-A VH(1) (配列番号 16) 及び MAB-A の特定の好ましいヒト化 / 最適化された抗 ADAM9-VH ドメインのアミノ酸配列：

hMAB-A VH(2) (配列番号 17) hMAB-A VH(2D) (配列番号 23)

hMAB-A VH(3) (配列番号 18) hMAB-A VH(2E) (配列番号 24)

hMAB-A VH(4) (配列番号 19) hMAB-A VH(2F) (配列番号 25)

hMAB-A VH(2A) (配列番号 20) hMAB-A VH(2G) (配列番号 26)

hMAB-A VH(2B) (配列番号 21) hMAB-A VH(2H) (配列番号 27)

hMAB-A VH(2C) (配列番号 22) hMAB-A VH(2I) (配列番号 28)

及び hMAB-A VH(2J) (配列番号 29)

を以下に示す (CDRH 残基は、1 本の下線が引かれた状態で示されている。hMAB-A VH(1) (配列番号 7) に関する差は、二重下線で示されている)。

## 【化 5 6】

h M A B - A V H ( 1 ) ( 配列番号 1 6 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPINGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYGSRDYF DYWGQTTVT VSS

h M A B - A V H ( 2 ) ( 配列番号 1 7 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYGSRDYF DYWGQTTVT VSS

10

h M A B - A V H ( 3 ) ( 配列番号 1 8 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NERFOGRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYGSRDYF DYWGQTTVT VSS

h M A B - A V H ( 4 ) ( 配列番号 1 9 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWIHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NERFOGRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYGSRDYF DYWGQTTVT VSS

20

h M A B - A V H ( 2 A ) ( 配列番号 2 0 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYFNSGTL DYWGQTTVT VSS

h M A B - A V H ( 2 B ) ( 配列番号 2 1 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYIGKGVL DYWGQTTVT VSS

30

h M A B - A V H ( 2 C ) ( 配列番号 2 2 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYPRFGWL DYWGQTTVT VSS

40

## 【化 5 7】

h M A B - A V H ( 2 D ) ( 配列番号 2 3 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYTGKGV DYWGQTTVT VSS

h M A B - A V H ( 2 E ) ( 配列番号 2 4 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYDSNAVL DYWGQTTVT VSS

10

h M A B - A V H ( 2 F ) ( 配列番号 2 5 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYFHSGTL DYWGQTTVT VSS

h M A B - A V H ( 2 G ) ( 配列番号 2 6 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYFNKAVL DYWGQTTVT VSS

20

h M A B - A V H ( 2 H ) ( 配列番号 2 7 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYGGSGVL DYWGQTTVT VSS

h M A B - A V H ( 2 I ) ( 配列番号 2 8 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYPRQGL DYWGQTTVT VSS

30

h M A B - A V H ( 2 J ) ( 配列番号 2 9 ) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
YYYYYNSGTL DYWGQTTVT VSS

40

## 【 0 1 2 6 】

M A B - A のヒト化及び/または最適化された抗 A D A M 9 - V H ドメインの F R に適したアミノ酸配列は、以下である。

F R<sub>H</sub>1 ドメイン ( 配列番号 3 0 ) : E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S C  
A A S G F T F S

F R<sub>H</sub>2 ドメイン ( 配列番号 3 1 ) : W V R Q A P G K G L E W V G

F R<sub>H</sub>3 ドメイン ( 配列番号 3 2 ) : R F T I S L D N S K N T L Y L Q M G S L R A  
E D T A V Y Y C A R

F R<sub>H</sub>4 ドメイン ( 配列番号 3 3 ) : W G Q G T T V T V S S

50

## 【 0 1 2 7 】

抗 A D A M 9 - V H ドメインの C D R<sub>H</sub> 1 ドメインに適した代替的なアミノ酸配列としては、以下のものが挙げられる。

配列番号 8 : S Y W M H

配列番号 3 4 : S Y W I H

## 【 0 1 2 8 】

抗 A D A M 9 - V H ドメインの C D R<sub>H</sub> 2 ドメインに適した代替的なアミノ酸配列としては、以下のものが挙げられる。

配列番号 9 : E I I P I N G H T N Y N E K F K S

配列番号 3 5 : E I I P I F G H T N Y N E K F K S

配列番号 3 6 : E I I P I F G H T N Y N E R F Q G

10

## 【 0 1 2 9 】

抗 A D A M 9 - V H ドメインの C D R<sub>H</sub> 3 ドメインに適した代替的なアミノ酸配列としては、以下のものが挙げられる。

配列番号 1 0 : G G Y Y Y Y G S R D Y F D Y

配列番号 3 7 : G G Y Y Y Y F N S G T L D Y

配列番号 3 8 : G G Y Y Y Y I G K G V L D Y

配列番号 3 9 : G G Y Y Y Y P R F G W L D Y

配列番号 4 0 : G G Y Y Y Y T G K G V L D Y

配列番号 4 1 : G G Y Y Y Y D S N A V L D Y

配列番号 4 2 : G G Y Y Y Y F H S G T L D Y

配列番号 4 3 : G G Y Y Y Y F N K A V L D Y

配列番号 4 4 : G G Y Y Y Y G G S G V L D Y

配列番号 4 5 : G G Y Y Y Y P R Q G F L D Y

配列番号 4 6 : G G Y Y Y Y Y N S G T L D Y

20

## 【 0 1 3 0 】

従って、本発明は、以下を含む V H ドメインを含む A D A M 9 結合分子を包含する。

( 1 ) 以下のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H</sub> 1 ドメイン

配列番号 4 7 : S Y W X<sub>1</sub> H

ここで、X<sub>1</sub> は、M または I であり；

30

( 2 ) 以下のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H</sub> 2 ドメイン

配列番号 4 8 : E I I P I X<sub>2</sub> G H T N Y N E X<sub>3</sub> F X<sub>4</sub> X<sub>5</sub>

X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub> 及び X<sub>5</sub> は、独立して選択され、

X<sub>2</sub> は、N または F であり；X<sub>3</sub> は、K または R であり；

X<sub>4</sub> は、K または Q であり；X<sub>5</sub> は、S または G である。

及び

( 3 ) 以下のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H</sub> 3 ドメイン

配列番号 4 9 : G G Y Y Y Y X<sub>6</sub> X<sub>7</sub> X<sub>8</sub> X<sub>9</sub> X<sub>10</sub> X<sub>11</sub> D Y

ここで、X<sub>6</sub> は、P、F、Y、W、I、L、V、T、G または D であり、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>、X<sub>9</sub>、X<sub>10</sub> は、以下になるように選択される。

40

## 【表 4】

(A) $X_6$ が P である場合、 $X_7$ は、K または R であり； $X_8$ は、F または M であり； $X_9$ は、G であり； $X_{10}$ は、W または F であり； 及び $X_{11}$ は、M、L または K であり；	(B) $X_6$ が、F、Y または W である場合、 $X_7$ は、N または H であり； $X_8$ は、S または K であり； $X_9$ は、G または A であり； $X_{10}$ は、T または V であり；及び $X_{11}$ は、M、L または K であり；	10
(C) $X_6$ が、I、L または V である場合、 $X_7$ は、G であり； $X_8$ は、K であり； $X_9$ は、G または A であり； $X_{10}$ は、V であり；及び $X_{11}$ は、M、L または K であり；	(D) $X_6$ が T である場合、 $X_7$ は、G であり； $X_8$ は、K、M または N であり； $X_9$ は、G であり； $X_{10}$ は、V または T であり；及び $X_{11}$ は、L または M であり；	
(E) $X_6$ が G である場合、 $X_7$ は、G であり； $X_8$ は、S であり； $X_9$ は、G であり； $X_{10}$ は、V であり；及び $X_{11}$ は、L であり；	(F) $X_6$ が D である場合、 $X_7$ は、S であり； $X_8$ は、N であり； $X_9$ は、A であり； $X_{10}$ は、V であり；及び $X_{11}$ は、L である。	30

## 【0131】

MAB - A の誘導体 / 変異体の第 1 の例示的なヒト化 / 最適化された IgG1 重鎖は、hMAB - A VH (2) ドメイン (配列番号 17) を含有し、アミノ酸配列 (配列番号 50) を有し、

## 【化 58】

```

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRTFI SLDNSKNTLY LQMGSRLRAED TAVYYCARGG
YYYYGSRDYF DYWGQGTIVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTIVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
PGX

```

40

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

【0132】

MAB-Aの誘導体/変異体の第2の例示的なヒト化/最適化されたIgG1重鎖は、hMAB-A VH(2C)ドメイン(配列番号22)を含有し、アミノ酸配列(配列番号51)を有し、

【化59】

```
EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRFGWL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
PGX
```

10

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

20

【0133】

MAB-Aの誘導体/変異体の第3の例示的なヒト化/最適化されたIgG1重鎖は、hMAB-A VH(21)ドメイン(配列番号28)を含有し、アミノ酸配列(配列番号52)を有し、

【化60】

```
EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
PGX
```

30

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

【0134】

40

上に提示されるとおり、Fc領域のCH2-CH3ドメインは、例えば、エフェクター機能を減少させ、及び/または結合部位を導入し、及び/または血清半減期を延ばすように操作されてもよい。特定の実施形態では、本発明の例示的なヒト化/最適化されたIgG1重鎖のCH2-CH3ドメインは、L234A、L235A、M252Y、S254T、T256E及びS442Cから選択される1つ以上の置換を含む。

【0135】

従って、MAB-Aの誘導体/変異体の第4の例示的なヒト化/最適化されたIgG1重鎖は、hMAB-A VH(2I)ドメイン(配列番号28)を含有し、更に、Fc領域のCH2-CH3ドメインに置換L234A及びL235Aを有し(配列番号78)、アミノ酸配列(配列番号141)を有し、

50



## 【化 6 1】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
 IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
 YYYYPQGF L DYWGQGT T V VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC  
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG  
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL  
 PGX

10

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

## 【0 1 3 6】

M A B - A の誘導体 / 変異体の第 5 の例示的なヒト化 / 最適化された I g G 1 重鎖は、  
 h M A B - A V H ( 2 I ) ドメイン（配列番号 2 8 ）を含有し、更に、F c 領域の C H  
 2 - C H 3 ドメインに S 4 4 2 C 置換を有し（配列番号 7 9 ）、アミノ酸配列（配列番号  
 1 4 2 ）を有し、

20

## 【化 6 2】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
 IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
 YYYYPQGF L DYWGQGT T V VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC  
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG  
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS  
 PGX

30

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

## 【0 1 3 7】

M A B - A の誘導体 / 変異体の第 6 の例示的なヒト化 / 最適化された I g G 1 重鎖は、  
 h M A B - A V H ( 2 I ) ドメイン（配列番号 2 8 ）を含有し、更に、F c 領域の C H  
 2 - C H 3 ドメインに置換 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 及び S 4 4 2 C を有し（配列番号 8 0  
 ）、アミノ酸配列（配列番号 1 4 3 ）を有し、

40

## 【化 6 3】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
 IIPIFGHTNY NEKFCSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLLRAED TAVYYCARGG  
 YYYYPQQGFL DYWGQGTITV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC  
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG  
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA A AGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS  
 PGX

10

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

## 【0138】

MAB - Aの誘導体／変異体の第7の例示的なヒト化／最適化されたIgG1重鎖は、  
 hMAB - A VH（2I）ドメイン（配列番号28）を含有し、更に、Fc領域のCH  
 2 - CH3ドメインに置換M252Y、S254T及びT256Eを有し（配列番号14  
 7）、アミノ酸配列（配列番号151）を有し、

20

## 【化 6 4】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
 IIPIFGHTNY NEKFCSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLLRAED TAVYYCARGG  
 YYYYPQQGFL DYWGQGTITV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC  
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG  
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP  
 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS  
 PGX

30

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

## 【0139】

MAB - Aの誘導体／変異体の第8の例示的なヒト化／最適化されたIgG1重鎖は、  
 hMAB - A VH（2I）ドメイン（配列番号28）を含有し、更に、Fc領域のCH  
 2 - CH3ドメインに置換M252Y、S254T、T256E及びS442Cを有し（  
 配列番号148）、アミノ酸配列（配列番号152）を有し、

40

## 【化 6 5】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
 IIPIFGHTNY NEKFCSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
 YYYYPQQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC  
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG  
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPVFLFP  
 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS  
 PGX

10

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

## 【0 1 4 0】

M A B - A の誘導体 / 変異体の第 9 の例示的なヒト化 / 最適化された I g G 1 重鎖は、  
 h M A B - A V H ( 2 I ) ドメイン ( 配列番号 2 8 ) を含有し、更に、F c 領域の C H  
 2 - C H 3 ドメインに置換 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T 及び T 2 5  
 6 E を有し ( 配列番号 1 4 9 )、アミノ酸配列 ( 配列番号 1 5 3 ) を有し、

20

## 【化 6 6】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
 IIPIFGHTNY NEKFCSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
 YYYYPQQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC  
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG  
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPVFLFP  
 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL  
 PGX

30

ここで、Xは、リシン（K）であるか、または存在しない。

## 【0 1 4 1】

M A B - A の誘導体 / 変異体の第 1 0 の例示的なヒト化 / 最適化された I g G 1 重鎖は  
 、h M A B - A V H ( 2 I ) ドメイン ( 配列番号 2 8 ) を含有し、更に、F c 領域の C  
 H 2 - C H 3 ドメインに置換 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、T 2 5  
 6 E 及び S 4 4 2 C を有し ( 配列番号 1 5 0 )、アミノ酸配列 ( 配列番号 1 5 4 ) を有し、

40

## 【化 6 7】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE  
 IIPIFGHTNY NEKFKSRTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG  
 YYYYPQGF L DYWGQGTITV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC  
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG  
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP  
 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFPY SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCRASQSV YSGDSYLNWY QQKPGQPPKL  
 LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFATY YCQQSYSTPF  
TFGQGTKLEI K

10

ここで、X は、リシン ( K ) であるか、または存在しない。

2 . MAB - A の変異体 VL ドメイン

## 【 0 1 4 2 】

MAB - A の好ましいヒト化 / 最適化された抗 ADAM9 - VL ドメインのアミノ酸配列は、MAB - A の ADAM9 - VL ドメインの変異体 ( 配列番号 1 1 ) であり、配列番号 5 3 によって表され ( CDR<sub>L</sub> 残基は、下線が引かれた状態で示されている )、

20

## 【化 6 8】

DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	ISC <u>X<sub>12</sub>ASQSV</u>	<u>YX<sub>13</sub>GDSYX<sub>14</sub>NWY</u>
QQKPGQPPKL	LIY <u>AASDLES</u>	GIPARFSGSG	SGTDFLTIS
SLEPEDFATY	YC <u>QQSX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>PF</u>	<u>TFGQGTKLEI</u>	K

ここで、X<sub>12</sub>、X<sub>13</sub>、X<sub>14</sub>、X<sub>15</sub>、X<sub>16</sub> 及び X<sub>17</sub> は、独立して選択され、

30

X<sub>12</sub> は、K または R であり ; X<sub>13</sub> は、D または S であり ;

X<sub>14</sub> は、M または L であり ; X<sub>15</sub> は、H または Y であり ;

X<sub>16</sub> は、E または S であり ; X<sub>17</sub> は、D または T である。

## 【 0 1 4 3 】

MAB - A の好ましいヒト化抗 ADAM9 - VL ドメイン : hMAB - A VL ( 1 ) ( 配列番号 5 4 ) 及び MAB - A の特定の好ましいヒト化 / 最適化された抗 ADAM9 - VL ドメイン : hMAB - A VL ( 2 ) ( 配列番号 5 5 )、hMAB - A VL ( 3 ) ( 配列番号 5 6 ) 及び hMAB - A VL ( 4 ) ( 配列番号 5 7 ) のアミノ酸配列を以下に提示する ( CDR<sub>L</sub> 残基は、1 本の下線が引かれた状態で示されている。hMAB - A VL ( 1 ) ( 配列番号 5 4 ) に関する差は、二重下線で示されている )。

40

## 【化 6 9】

h M A B - A V L ( 1 ) ( 配列番号 5 4 ) :

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGQPPKL  
 LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQQSHEDPF  
TFGQGTKLEI K

h M A B - A V L ( 2 ) ( 配列番号 5 5 ) :

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSVD YSGDSYMNWY QQKPGQPPKL  
 LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQQSHEDPF  
TFGQGTKLEI K

10

h M A B - A V L ( 3 ) ( 配列番号 5 6 ) :

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCRASQSVD YSGDSYMNWY QQKPGQPPKL  
 LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQQSHEDPF  
TFGQGTKLEI K

h M A B - A V L ( 4 ) ( 配列番号 5 7 ) :

20

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCRASQSVD YSGDSYLNWY QQKPGQPPKL  
 LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQQSYSTPF  
TFGQGTKLEI K

## 【 0 1 4 4 】

従って、M A B - A のヒト化及び／または最適化された抗 A D A M 9 - V L ドメインの F R に適したアミノ酸配列は、以下である。

F R L 1 ドメイン ( 配列番号 5 8 ) : D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I S C

F R L 2 ドメイン ( 配列番号 5 9 ) : W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y

30

F R L 3 ドメイン ( 配列番号 6 0 ) : G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L  
 E P E D F A T Y Y C

F R L 4 ドメイン ( 配列番号 6 1 ) : F G Q G T K L E I K

## 【 0 1 4 5 】

抗 A D A M 9 - V L ドメインの C D R L 1 ドメインに適した代替的なアミノ酸配列としては、以下のものが挙げられる。

配列番号 1 2 : K A S Q S V D Y D G D S Y M N

配列番号 6 2 : K A S Q S V D Y S G D S Y M N

配列番号 6 3 : R A S Q S V D Y S G D S Y M N

配列番号 6 4 : R A S Q S V D Y S G D S Y L N

40

## 【 0 1 4 6 】

抗 A D A M 9 - V L ドメインの C D R L 3 ドメインに適した代替的なアミノ酸配列としては、以下のものが挙げられる。

配列番号 1 4 : Q Q S H E D P F T

配列番号 6 5 : Q Q S Y S T P F T

## 【 0 1 4 7 】

従って、本発明は、以下を含む抗 A D A M 9 抗体 V L ドメインを包含する。

( 1 ) 以下のアミノ酸配列を有する C D R L 1 ドメイン

配列番号 6 6 : X <sub>1 2</sub> A S Q S V D Y X <sub>1 3</sub> G D S Y X <sub>1 4</sub> N

ここで、X <sub>1 2</sub>、X <sub>1 3</sub>、X <sub>1 4</sub> は、独立して選択され、

50

$X_{12}$  は、K または R であり； $X_{13}$  は、D または S であり； $X_{14}$  は、M または L であり；

(2) 以下のアミノ酸配列を有する CDR<sub>L2</sub> ドメイン

配列番号 13 : A A S D L E S

及び

(3) 以下のアミノ酸配列を有する CDR<sub>L3</sub> ドメイン

配列番号 67 : Q Q S  $X_{15}$   $X_{16}$   $X_{17}$  P F T

ここで、 $X_{15}$ 、 $X_{16}$ 、及び  $X_{17}$  は、独立して選択され、

$X_{15}$  は、H または Y であり； $X_{16}$  は、E または S であり； $X_{17}$  は、D または T である。

10

【0148】

MAB-A の誘導体 / 変異体の例示的なヒト化 / 最適化された IgG1 軽鎖は、hMAB-A VL (2) ドメイン (配列番号 55) を含有し、アミノ酸配列 (配列番号 68) を有する。

【化70】

```
DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSVD YSGDSYMNWY QQKPGQPPKL
LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQQSHEDPF
TFGQGKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC
```

20

【0149】

本発明は更に、明確に、ヒト ADAM9 ポリペプチドのエピトープに免疫特異的に結合し、上に提示した MAB-A CDR<sub>H1</sub>、CDR<sub>H2</sub>、CDR<sub>H3</sub>、CDR<sub>L1</sub>、CDR<sub>L2</sub> または CDR<sub>L3</sub> のいずれかを含む免疫コンジュゲートを想定しており、特に、上に提示した MAB-A CDR<sub>H1</sub> の 1 つ、上に提示した MAB-A CDR<sub>H2</sub> の 1 つ、上に提示した MAB-A CDR<sub>H3</sub> の 1 つ、上に提示した MAB-A CDR<sub>L1</sub> の 1 つ、上に提示した MAB-A CDR<sub>L2</sub> の 1 つ、及び上に提示した MAB-A CDR<sub>L3</sub> の 1 つを含む、このような免疫コンジュゲートを想定している。本発明は更に、上に提示したヒト化 MAB-A FR<sub>H1</sub>、FR<sub>H2</sub>、FR<sub>H3</sub> または FR<sub>H4</sub>、FR<sub>L1</sub>、FR<sub>L2</sub>、FR<sub>L3</sub> または FR<sub>L4</sub> のいずれかを含む、このような免疫コンジュゲートを想定しており、特に、FR<sub>H1</sub>、FR<sub>H2</sub>、FR<sub>H3</sub> 及び FR<sub>H4</sub> を含み、及び / または FR<sub>L1</sub>、FR<sub>L2</sub>、FR<sub>L3</sub>、FR<sub>L4</sub> 及び FR<sub>H1</sub> を含む、このような免疫コンジュゲートを想定している。

30

【0150】

いくつかの実施形態では、ヒト化 / 最適化された抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントは、

- (a) それぞれ、配列番号 8、35 及び 10 及び配列番号 62、13、14；
- (b) それぞれ、配列番号 8、35 及び 10 及び配列番号 63、13、14；
- (c) それぞれ、配列番号 8、36 及び 10 及び配列番号 63、13、14；
- (d) それぞれ、配列番号 34、36 及び 10 及び配列番号 64、13、65；
- (e) それぞれ、配列番号 8、35 及び 37 及び配列番号 62、13、14；
- (f) それぞれ、配列番号 8、35 及び 38 及び配列番号 62、13、14；
- (g) それぞれ、配列番号 8、35 及び 39 及び配列番号 62、13、14；
- (h) それぞれ、配列番号 8、35 及び 40 及び配列番号 62、13、14；
- (i) それぞれ、配列番号 8、35 及び 41 及び配列番号 62、13、14；
- (j) それぞれ、配列番号 8、35 及び 42 及び配列番号 62、13、14；
- (k) それぞれ、配列番号 8、35 及び 43 及び配列番号 62、13、14；

40

50

- ( l ) それぞれ、配列番号 8、35 及び 44 及び配列番号 62、13、14；
- ( m ) それぞれ、配列番号 8、35 及び 45 及び配列番号 62、13、14；及び
- ( n ) それぞれ、配列番号 8、35 及び 46 及び配列番号 62、13、14

からなる群から選択される配列を有する、CDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及び CDR<sub>H</sub>3ドメインと、CDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及び CDR<sub>L</sub>3ドメインを含む。

#### 【0151】

具体的な実施形態では、ヒト化／最適化された抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントは、それぞれ、配列番号 8、35 及び 45 及び配列番号 62、13、14 の配列を有する CDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及び CDR<sub>H</sub>3ドメインと、CDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及び CDR<sub>L</sub>3ドメインとを含む。

10

#### 【0152】

いくつかの実施形態では、ヒト化／最適化された抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントは、

- ( a ) それぞれ、配列番号 17 及び配列番号 55；
- ( b ) それぞれ、配列番号 17 及び配列番号 56；
- ( c ) それぞれ、配列番号 18 及び配列番号 56；
- ( d ) それぞれ、配列番号 19 及び配列番号 57；
- ( e ) それぞれ、配列番号 20 及び配列番号 55；
- ( f ) それぞれ、配列番号 21 及び配列番号 55；
- ( g ) それぞれ、配列番号 22 及び配列番号 55；
- ( h ) それぞれ、配列番号 23 及び配列番号 55；
- ( i ) それぞれ、配列番号 24 及び配列番号 55；
- ( j ) それぞれ、配列番号 25 及び配列番号 55；
- ( k ) それぞれ、配列番号 26 及び配列番号 55；
- ( l ) それぞれ、配列番号 27 及び配列番号 55；
- ( m ) それぞれ、配列番号 28 及び配列番号 55；及び
- ( n ) それぞれ、配列番号 29 及び配列番号 55

20

の配列に対して少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 99% または 100% の同一性を有する配列を有する重鎖可変ドメイン (VH) 及び軽鎖可変ドメイン (VL) を含む。

30

#### 【0153】

「実質的に同一」または「同一」とは、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書に記載するアミノ酸のいずれか 1 つ）に対して少なくとも 50% の同一性を示すポリペプチドを意味する。好ましくは、このような配列は、比較のために使用される配列に対して、アミノ酸レベルで、または核酸で、少なくとも 60%、より好ましくは少なくとも 80% または少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 99%、または更には 100% 同一である。

#### 【0154】

配列同一性は、典型的には、配列分析ソフトウェア（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group、University of Wisconsin Biotechnology Center、1710 University Avenue、Madison、Wis. 53705、BLAST、BESTFIT、GAP、または PILEUP/PRETTYBOX プログラム）を用いて測定される。このようなソフトウェアは、種々の置換、欠失及び／または他の改変に対するホモロジーの程度をアサインすることによって、同一または類似の配列をマッチングする。保存的置換は、典型的には、以下の群に含まれる置換を含む。グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；及びフェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を決定するための例示

40

50

的な手法において、BLASTプログラムが使用されてもよく、 $e^{-3} \sim e^{-100}$ までの確率スコア(probability score)は、密接に関連する配列を示している。

#### 【0155】

特定の実施形態では、ヒト化/最適化された抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、それぞれ配列番号28及び配列番号55の配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%または100%の同一性を有する配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)及び軽鎖可変ドメイン(VL)を含む。

#### 【0156】

特定の実施形態では、ヒト化/最適化された抗ADAM9抗体は、以下のような重鎖配列と軽鎖配列とを有する。

- (a) それぞれ、配列番号50及び配列番号68；
- (b) それぞれ、配列番号51及び配列番号68；
- (c) それぞれ、配列番号52及び配列番号68；
- (d) それぞれ、配列番号141及び配列番号68；
- (e) それぞれ、配列番号142及び配列番号68；
- (f) それぞれ、配列番号143及び配列番号68；
- (g) それぞれ、配列番号151及び配列番号68；
- (h) それぞれ、配列番号152及び配列番号68；
- (i) それぞれ、配列番号153及び配列番号68；及び
- (j) それぞれ、配列番号154及び配列番号68。

#### 【0157】

具体的な実施形態では、ヒト化/最適化された抗ADAM9抗体は、配列番号52の配列を有する重鎖と、配列番号68の配列を有する軽鎖とを含む。他の具体的な実施形態では、ヒト化/最適化された抗ADAM9抗体は、配列番号142の配列を有する重鎖と、配列番号68の配列を有する軽鎖とを含む。他の実施形態では、ヒト化/最適化された抗ADAM9抗体は、血清半減期が延びるように操作され、配列番号151の配列を有する重鎖と、配列番号68の配列を有する軽鎖とを含む。他の具体的な実施形態では、ヒト化/最適化された抗ADAM9抗体は、血清半減期が延びるように操作され、部位特異的な結合をするように操作され、配列番号152の配列を有する重鎖と、配列番号68の配列を有する軽鎖とを含む。

#### 【0158】

本発明はまた、明確に、ヒトADAM9ポリペプチドのエピトープに免疫特異的に結合し、上に提示したヒト化/最適化された抗ADAM9 MAB-A VLドメインまたはVHドメインのいずれかを含む免疫コンジュゲートを想定している。本発明は、特に、ヒト化/最適化された抗ADAM9 VLドメインまたはVHドメインの以下の組み合わせを含む、このような抗ADAM9抗体及びそのADAM9結合フラグメントを想定している。

10

20

30

40

50



【表 5 - 1】

h M A B - A    V H / h M A B - A    V L の組み合わせ	
h M A B - A    V H ( 1 ) / h M A B - A    V L ( 1 )	h M A B - A    V H ( 2 D ) / h M A B - A    V L ( 1 )
h M A B - A    V H ( 1 ) / h M A B - A    V L ( 2 )	h M A B - A    V H ( 2 D ) / h M A B - A    V L ( 2 )
h M A B - A    V H ( 1 ) / h M A B - A    V L ( 3 )	h M A B - A    V H ( 2 D ) / h M A B - A    V L ( 3 )
h M A B - A    V H ( 1 ) / h M A B - A    V L ( 4 )	h M A B - A    V H ( 2 D ) / h M A B - A    V L ( 4 )
h M A B - A    V H ( 2 ) / h M A B - A    V L ( 1 )	h M A B - A    V H ( 2 E ) / h M A B - A    V L ( 1 )
h M A B - A    V H ( 2 ) / h M A B - A    V L ( 2 )	h M A B - A    V H ( 2 E ) / h M A B - A    V L ( 2 )
h M A B - A    V H ( 2 ) / h M A B - A    V L ( 3 )	h M A B - A    V H ( 2 E ) / h M A B - A    V L ( 3 )
h M A B - A    V H ( 2 ) / h M A B - A    V L ( 4 )	h M A B - A    V H ( 2 E ) / h M A B - A    V L ( 4 )
h M A B - A    V H ( 3 ) / h M A B - A    V L ( 1 )	h M A B - A    V H ( 2 F ) / h M A B - A    V L ( 1 )
h M A B - A    V H ( 3 ) / h M A B - A    V L ( 2 )	h M A B - A    V H ( 2 F ) / h M A B - A    V L ( 2 )
h M A B - A    V H ( 3 ) / h M A B - A    V L ( 3 )	h M A B - A    V H ( 2 F ) / h M A B - A    V L ( 3 )
h M A B - A    V H ( 3 ) / h M A B - A    V L ( 4 )	h M A B - A    V H ( 2 F ) / h M A B - A    V L ( 4 )
h M A B - A    V H ( 4 ) / h M A B - A    V L ( 1 )	h M A B - A    V H ( 2 G ) / h M A B - A    V L ( 1 )
h M A B - A    V H ( 4 ) / h M A B - A    V L ( 2 )	h M A B - A    V H ( 2 G ) / h M A B - A    V L ( 2 )
h M A B - A    V H ( 4 ) / h M A B - A    V L ( 3 )	h M A B - A    V H ( 2 G ) / h M A B - A    V L ( 3 )
h M A B - A    V H ( 4 ) / h M A B - A    V L ( 4 )	h M A B - A    V H ( 2 G ) / h M A B - A    V L ( 4 )

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

h M A B - A V H ( 2 A ) / h M A B - A V L ( 1 )	h M A B - A V H ( 2 H ) / h M A B - A V L ( 1 )
h M A B - A V H ( 2 A ) / h M A B - A V L ( 2 )	h M A B - A V H ( 2 H ) / h M A B - A V L ( 2 )
h M A B - A V H ( 2 A ) / h M A B - A V L ( 3 )	h M A B - A V H ( 2 H ) / h M A B - A V L ( 3 )
h M A B - A V H ( 2 A ) / h M A B - A V L ( 4 )	h M A B - A V H ( 2 H ) / h M A B - A V L ( 4 )
h M A B - A V H ( 2 B ) / h M A B - A V L ( 1 )	h M A B - A V H ( 2 I ) / h M A B - A V L ( 1 )
h M A B - A V H ( 2 B ) / h M A B - A V L ( 2 )	h M A B - A V H ( 2 I ) / h M A B - A V L ( 2 )
h M A B - A V H ( 2 B ) / h M A B - A V L ( 3 )	h M A B - A V H ( 2 I ) / h M A B - A V L ( 3 )
h M A B - A V H ( 2 B ) / h M A B - A V L ( 4 )	h M A B - A V H ( 2 I ) / h M A B - A V L ( 4 )
h M A B - A V H ( 2 C ) / h M A B - A V L ( 1 )	h M A B - A V H ( 2 J ) / h M A B - A V L ( 1 )
h M A B - A V H ( 2 C ) / h M A B - A V L ( 2 )	h M A B - A V H ( 2 J ) / h M A B - A V L ( 2 )
h M A B - A V H ( 2 C ) / h M A B - A V L ( 3 )	h M A B - A V H ( 2 J ) / h M A B - A V L ( 3 )
h M A B - A V H ( 2 C ) / h M A B - A V L ( 4 )	h M A B - A V H ( 2 J ) / h M A B - A V L ( 4 )

10

20

## 【 0 1 5 9 】

30

本発明は、具体的には、上に提示されるようなヒト化 / 最適化された抗 A D A M 9 - V L 及び / または V H ドメインを含む免疫コンジュゲートを包含する。具体的な実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、( i ) 上に提示されるようなヒト化 / 最適化された抗 A D A M 9 - V L 及び / または V H ドメインと、( i i ) F c 領域とを含む。

## 【 0 1 6 0 】

抗 A D A M 9 V H ドメイン及び V L ドメインに対する具体的な改変が、上にまとめられ、図 3 A ~ 3 B で比較されているが、本発明のヒト化及び / または最適化された抗 A D A M 9 - V H ドメインまたは V L ドメインを操作する際に、これらの残基の全てまたは大部分を改変する必要はない。本発明はまた、例えば、サブクローニングを容易にするために導入され得る C 末端及び / または N 末端のアミノ酸残基のアミノ酸置換を含め、これらの V H 配列及び V L 配列の微細な変化も包含する。

40

## I I I . 抗体薬物コンジュゲート

## 定義

## 【 0 1 6 1 】

「免疫コンジュゲート」、「コンジュゲート」または「A D C」との用語は、本明細書で 사용되는場合、細胞結合剤（例えば、本明細書に記載の抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメント）に結合するか、またはこれに結合される化合物またはその誘導体（例えば、医薬薬剤）を指す。

## 【 0 1 6 2 】

「リンカー」は、ある化合物、通常は薬物、例えば、本明細書に記載の細胞毒性薬また

50

は医薬薬剤（例えば、メイタンシノイドまたは（インドリノベンゾジアゼピン）化合物）を、細胞結合剤、例えば、抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントに安定な共有結合様式で結合することが可能な任意の化学部分である。リンカーは、化合物または抗体が活性なままの状態、酸によって誘発される開裂、光によって誘発される開裂、ペプチダーゼによって誘発される開裂、エステラーゼによって誘発される開裂及びジスルフィド結合開裂を受けやすいか、または実質的に耐性であってもよい。適切なリンカーは、当該技術分野でよく知られており、例えば、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸に不安定な基、光に不安定な基、ペプチダーゼに不安定な基及びエステラーゼに不安定な基を含む。リンカーはまた、帯電したリンカー、本明細書に記載され、当該技術分野で既知のその親水性形態も含む。

10

#### 【0163】

「アルキル」は、本明細書で使用される場合、1～20個の炭素原子を含む飽和の直鎖または分枝鎖の一価炭化水素基を指す。アルキルの例としては、限定されないが、メチル、エチル、1-プロピル、2-プロピル、1-ブチル、2-メチル-1-プロピル、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、2-ブチル、2-メチル-2-プロピル、1-ペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、3-メチル-2-ブチル、3-メチル-1-ブチル、2-メチル-1-ブチル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、2-メチル-2-ペンチル、3-メチル-2-ペンチル、4-メチル-2-ペンチル、3-メチル-3-ペンチル、2-メチル-3-ペンチル、2,3-ジメチル-2-ブチル、3,3-ジメチル-2-ブチル、1-ヘプチル、1-オクチルなどが挙げられる。好ましくは、アルキルは、1～10個の炭素原子を含む。より好ましくは、アルキルは、1～4個の炭素原子を含む。

20

#### 【0164】

ある基の炭素原子数は、本明細書では「 $C_{x-x}$ 」との接頭語によって明記することができ、ここで、 $x$ 及び $x-x$ は整数である。例えば、「 $C_{1-4}$ アルキル」は、1～4個の炭素原子を含むアルキル基である。

#### 【0165】

「化合物」または「細胞毒性化合物」または「細胞毒性薬」は、相互に置き換え可能に使用される。これらは、その構造または式または任意の誘導体が本発明において開示されているか、またはこの構造または式または任意の誘導体が参考として組み込まれている化合物を含むことを意図している。この用語は、本発明に開示される全ての式の化合物の立体異性体、幾何異性体、互変異性体、溶媒和物、代謝物及び塩（例えば、医薬的に許容される塩）も含む。この用語は、任意の溶媒和物、水和物、及び上述のいずれかの多型も含む。本出願で記載される「立体異性体」、「幾何異性体」、「互変異性体」、「溶媒和物」、「代謝物」、「塩」、「コンジュゲート」、「コンジュゲート塩」、「溶媒和物」、「水和物」または「多型」という具体的な引用は、本発明の特定の態様では、「化合物」との用語がこれらの他の形態を引用することなく使用される本発明の他の態様でのこれらの形態を除外することを意図していると解釈すべきではない。

30

#### 【0166】

「キラル」との用語は、鏡像体の相手と重ね合わせることができないという性質を有する分子を指し、一方、「アキラル」との用語は、鏡像体の相手と重ね合わせることができる分子を指す。

40

#### 【0167】

「立体異性体」との用語は、同一の化学構成及び接続を有するが、空間中の原子向きが異なり、単結合を中心に回転させることによって相互に変換することができない化合物を指す。

#### 【0168】

「ジアステレオマー」は、2つ以上のキラリティ中心を有する立体異性体であって、これらの分子が互いに鏡像体ではないものを指す。ジアステレオマーは、例えば、融点、沸点、分光特性及び反応性などの異なる物理特性を有する。ジアステレオマー混合物は、結

50

晶化、電気泳動及びクロマトグラフィーなどの高解像度分析手段の下で分離することができる。

【0169】

「エナンチオマー」は、互いに重ね合わせることができない鏡像体である、化合物の2つの立体異性体を指す。

【0170】

本明細書で使用する立体化学の定義及び規則は、一般的に、S. P. Parker 編集、McGraw-Hill, Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York、及び Eliel, E. 及び Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994 に従う。本発明の化合物は、非対称中心またはキラル中心を含んでいてもよく、そのため、異なる立体異性体形態で存在してもよい。本発明の化合物の全ての立体異性体形態は、限定されないが、ジアステレオマー、エナンチオマー及びアトロプ異性体、及びラセミ体混合物などのこれらの混合物を含め、本発明の一部を形成することを意図している。多くの有機化合物は、光学的に活性な形態で存在し、すなわち、平面偏光の面を回転させる能力を有する。光学活性化合物を記述する際に、D 及び L、または R 及び S の添え字は、キラル中心（複数可）の周りの分子の絶対配置を示すために用いられる。d 及び l または (+) 及び (-) といった添え字は、化合物による面偏光の回転の徴候を示すために使用され、(-) または l は、その化合物が左旋性であることを意味している。(+) または d という添え字が付けられた化合物は、右旋性である。所与の化学構造について、これらの立体異性体は、互いに鏡像体であることを除けば、同じである。特定の立体異性体は、エナンチオマーと呼ばれることもあり、このような異性体の混合物は、多くは、エナンチオマー混合物と呼ばれる。エナンチオマーの 50 : 50 混合物は、ラセミ体混合物またはラセミ体と呼ばれ、化学反応またはプロセスで立体選択性または立体特異性がない場合に起こり得る。「ラセミ体混合物」及び「ラセミ体」との用語は、2つのエナンチオマー種の等モル混合物を指し、光学活性がない。

【0171】

「互変異性体」または「互変異性体形態」との用語は、低いエネルギー障壁によって互いに変換可能な異なるエネルギーの構造異性体を指す。例えば、プロトン互変異性体（プロトトロピー互変異性体としても知られる）は、プロトンの移動による相互変換を含み、例えば、ケト-エノール及びイミン-エナミンの異性化を含む。原子価互変異性体は、結合電子の一部の再組織化による相互変換を含む。

【0172】

「イミン反応性試薬」は、イミン基と反応可能な試薬を指す。イミン反応性試薬の例としては、限定されないが、亜硫酸塩 ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ 、 $\text{H}_2\text{SO}_2$ 、またはカチオンを用いて生成する  $\text{HSO}_3^-$ 、 $\text{SO}_3^{2-}$  または  $\text{HSO}_2^-$  の塩)、ピロ亜硫酸塩 ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  またはカチオンを用いて生成する  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$  の塩)、モノ、ジ、トリ及びテトラ-チオホスフェート ( $\text{PO}_3\text{SH}_3$ 、 $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$ 、 $\text{POS}_3\text{H}_3$ 、 $\text{PS}_4\text{H}_3$  またはカチオンを用いて生成する  $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ 、 $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ 、 $\text{POS}_3^{3-}$  または  $\text{PS}_4^{3-}$  の塩)、チオリン酸エステル ( $(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ 、 $\text{R}^i\text{SH}$ 、 $\text{R}^i\text{SOH}$ 、 $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$ 、 $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$ )、種々のアミン（ヒドロキシルアミン（例えば、 $\text{NH}_2\text{OH}$ ）、ヒドラジン（例えば、 $\text{NH}_2\text{NH}_2$ ）、 $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i\text{R}^i$ 、 $\text{NH}-\text{R}^i$ 、 $\text{NH}_2-\text{R}^i$ ）、 $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ 、 $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ ）、チオサルフェート ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$  またはカチオンを用いて生成する  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  の塩)、亜ジチオン酸塩 ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$  またはカチオンを用いて生成する  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$  の塩)、ホスホロジチオエート ( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$  またはカチオンを用いて生成するその塩)、ヒドロキサム酸 ( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$  またはカチオンを用いて生成する塩)、ヒドラジン ( $\text{R}^k\text{CONHNH}_2$ )、ホルムアルデヒドスルホキシレート ( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$  またはカチオンを用いて生成する  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$  の塩、例えば、 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$ )、糖化ヌクレオチド（例えば

、GDP-マンノース)、フルダラビンまたはその混合物が挙げられ、ここで、 $R^i$ 及び $R^j$ は、それぞれ独立して、1～10個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖のアルキルであり、 $-N(R^j)_2$ 、 $-CO_2H$ 、 $-SO_3H$ 及び $-PO_3H$ から選択される少なくとも1つの置換基で置換されており； $R^i$ 及び $R^j$ は、更に場合により、本明細書に記載するアルキルについての置換基で置換されていてもよく； $R^j$ は、1～6個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖のアルキルであり； $R^k$ は、1～10個の炭素原子を含む直鎖、分枝鎖または環状のアルキル、アルケニルまたはアルキニル、アリール、ヘテロシクリルまたはヘテロアリールである（好ましくは、 $R^k$ は、1～4個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖のアルキルであり、より好ましくは、 $R^k$ は、メチル、エチルまたはプロピルである）。好ましくは、カチオンは、一価カチオン、例えば、 $Na^+$ または $K^+$ である。好ましくは、イミン反応性試薬は、亜硫酸塩、ヒドロキシルアミン、尿素及びヒドラジンから選択される。より好ましくは、イミン反応性試薬は、 $NaHSO_3$ または $KHSO_3$ である。

#### 【0173】

「カチオン」との用語は、正電荷を有するイオンを指す。カチオンは、一価（例えば、 $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $NH_4^+$ など）、二価（例えば、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ など）または多価（例えば、 $Al^{3+}$ など）であってもよい。好ましくは、カチオンは一価である。

#### 【0174】

「医薬的に許容される塩」との句は、本明細書で使用される場合、本発明の化合物の医薬的に許容される有機または無機の塩を指す。例示的な塩としては、限定されないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチジン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカリン酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩「メシレート」、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、パモ酸塩（すなわち、1,1'-メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトエート)）塩、アルカリ金属（例えば、ナトリウム及びカリウム）塩、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）塩及びアンモニウム塩が挙げられる。医薬的に許容される塩は、酢酸イオン、コハク酸イオンまたは他の対イオンなどの別の分子を含んでいてもよい。対イオンは、親化合物上の電荷を安定化する任意の有機部分または無機部分であってもよい。更に、医薬的に許容される塩は、その構造に1個より多い帯電した原子を含んでいてもよい。複数の帯電した原子が、医薬的に許容される塩の一部である場合は、複数の対イオンを含んでいてもよい。従って、医薬的に許容される塩は、1つ以上の帯電した原子及び/または1つ以上の対イオンを含んでいてもよい。

#### 【0175】

本発明の化合物が塩基である場合、所望な医薬的に許容される塩は、当該技術分野で利用可能な任意の適切な方法、例えば、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、メタンスルホン酸、リン酸など）を用いた遊離塩基の処理、または有機酸（例えば、酢酸、マレイン酸、コハク酸、マンデル酸、フマル酸、マロン酸、ビルビン酸、シュウ酸、グリコール酸、サリチル酸、ピラノシド酸、例えば、グルクロン酸またはガラクトロン酸、ヒドロキシ酸、例えば、クエン酸または酒石酸、アミノ酸、例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸、芳香族酸、例えば、安息香酸またはケイ皮酸、スルホン酸、例えば、p-トルエンスルホン酸またはエタンスルホン酸など）を用いた処理によって調製することができる。

#### 【0176】

本発明の化合物が酸である場合、所望な医薬的に許容される塩は、任意の適切な方法、例えば、無機または有機の塩基（例えば、アミン（一級、二級または三級）、アルカリ金属水酸化物またはアルカリ土類金属水酸化物など）を用いた遊離酸の処理によって調製することができる。適切な塩の具体例としては、限定されないが、アミノ酸、例えば、グリシン及びアルギニン、アンモニア、一級、二級及び三級アミン及び環状アミン、例えば、

ピペリジン、モルホリン及びピペラジンから誘導される有機塩、ナトリウム、カルシウム、カリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛、アルミニウム及びリチウムから誘導される無機塩が挙げられる。

#### 【0177】

本明細書で使用される場合、「溶媒和物」との用語は、非共有結合分子間力によって結合した、化学量論量または非化学量論量の溶媒（例えば、水、イソプロパノール、アセトン、エタノール、メタノール、DMSO、酢酸エチル、酢酸及びエタノールアミンジクロロメタン、2-プロパノールなど）を更に含む化合物を意味する。化合物の溶媒和物または水和物は、少なくとも1モル当量のヒドロキシル溶媒、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールまたは水を化合物に添加し、イミン部分の溶媒和または水和を行うことによって容易に調製される。

10

#### 【0178】

「代謝物」または「異化産物」は、体内で代謝または異化によって作られる、特定の化合物、その誘導体、またはそのコンジュゲート、またはその塩の生成物である。化合物、その誘導体、またはそのコンジュゲートの代謝物は、当該技術分野で既知の通常の技術を用いて同定することができ、その活性は、本明細書に記載するような試験を用いて決定することができる。このような生成物は、例えば、投与された化合物の酸化、ヒドロキシル化、還元、加水分解、アミド化、脱アミド化、エステル化、脱エステル化、酵素開裂などから得られ得る。従って、本発明は、本発明の化合物の代謝物、その誘導体、またはそのコンジュゲートを含み、本発明の化合物、その誘導体、またはそのコンジュゲートと、哺乳動物とを、その代謝産物が得られるのに十分な期間接触させることを含むプロセスによって作られる化合物、その誘導体、またはそのコンジュゲートを含む。

20

#### 【0179】

「医薬的に許容される」との句は、物質または組成物が、他の成分を含む製剤及び/またはこれを用いて治療される哺乳動物と、化学的及び/または毒性的に適合性でなければならないことを示す。

#### 【0180】

「保護基」または「保護部分」との用語は、化合物、その誘導体、またはそのコンジュゲートの他の官能基を反応させつつ、特定の機能をブロックするか、または保護するために一般的に使用される置換基を指す。例えば、「アミン保護基」または「アミノ保護部分」は、アミノ基に接続し、化合物のアミノ官能性をブロックするか、または保護する置換基である。このような基は、当該技術分野でよく知られており（例えば、P. Wuts 及び T. Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Chapter 7, J. Wiley & Sons, NJ を参照）、カルバミン酸メチル及びカルバミン酸エチル、Fmoc、置換カルバミン酸エチル、1,6-脱離によって開裂するカルバメートなどのカルバメート（「自己犠牲型」とも呼ばれる）、尿素、アミド、ペプチド、アルキル誘導体及びアリール誘導体によって例示される。適切なアミノ保護基としては、アセチル、トリフルオロアセチル、t-ブトキシカルボニル（BOC）、ベンジルオキシカルボニル（CBZ）及び9-フルオレニルメチレンオキシカルボニル（Fmoc）が挙げられる。保護器及びその使用の一般的な記載については、P. G. M. Wuts & T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2007 を参照。

30

40

#### 【0181】

「アミノ酸」との用語は、天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸を指す。一実施形態では、アミノ酸は、 $\text{NH}_2 - \text{C}(\text{R}^{\text{aa}})(\text{R}^{\text{aa}}) - \text{C}(=\text{O})\text{OH}$ によって表され、ここで、 $\text{R}^{\text{aa}}$ 及び $\text{R}^{\text{aa}}$ は、それぞれ独立して、H、場合により置換されていてよい、1~10個の炭素原子を含む直鎖、分枝鎖または環状のアルキル、アルケニルまたはアルキニル、アリール、ヘテロアリールまたはヘテロシクリルであるか、 $\text{R}^{\text{aa}}$ 及びN末端窒素原子が合わさってヘテロ環式環を形成してもよい（例えば、プロリンのよ

50

うな)。「アミノ酸残基」との用語は、1個の水素原子がアミノ酸のアミン末端及び/またはカルボキシ末端から除去されたときに、対応する残基、例えば、 $-NH-C((R^a)_{a'})(R^a)_{a''})-C(=O)O-$ を指す。

#### 【0182】

「ペプチド」との用語は、ペプチド(アミド)結合によって結合したアミノ酸モノマーの短鎖を指す。いくつかの実施形態では、ペプチドは、2~20個のアミノ酸残基を含有する。他の実施形態では、ペプチドは、2~10個のアミノ酸残基を含有する。さらに他の実施形態では、ペプチドは、2~5個のアミノ酸残基を含有する。本明細書で使用される場合、あるペプチドが、アミノ酸の特定の配列によって表される本明細書に記載の細胞毒性薬またはリンカーの一部である場合、そのペプチドは、両方向で、細胞毒性薬またはリンカーの残りの部分に結合していてもよい。例えば、ジペプチド $X_1-X_2$ は、 $X_1-X_2$ 及び $X_2-X_1$ を含む。同様に、トリペプチド $X_1-X_2-X_3$ は、 $X_1-X_2-X_3$ 及び $X_3-X_2-X_1$ を含み、テトラペプチド $X_1-X_2-X_3-X_4$ は、 $X_1-X_2-X_3-X_4$ 及び $X_4-X_2-X_3-X_1$ を含む。 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 及び $X_4$ は、アミノ酸残基を表す。

10

#### 【0183】

「反応性エステル基」との用語は、アミン基と容易に反応してアミド結合を形成し得るエステル基を指す。例示的な反応性エステル基としては、限定されないが、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、N-ヒドロキシフタルイミドエステル、N-ヒドロキシスルホ-スクシンイミドエステル、パラ-ニトロフェニルエステル、ジニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル及びこれらの誘導体が挙げられ、前記誘導体は、アミド結合の生成を容易にする。特定の実施形態では、反応性エステル基は、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたはN-ヒドロキシスルホ-スクシンイミドエステルである。

20

#### 【0184】

「アミン反応性基」との用語は、アミン基と反応して共有結合を形成し得る基を指す。例示的なアミン反応性基としては、限定されないが、反応性エステル基、ハロゲン化アシル、ハロゲン化スルホニル、イミドエステル、または反応性チオエステル基が挙げられる。特定の実施形態では、アミン反応性基は、反応性エステル基である。一実施形態では、アミン反応性基は、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたはN-ヒドロキシスルホ-スクシンイミドエステルである。

30

#### 【0185】

「チオール反応性基」との用語は、チオール( $-SH$ )基と反応して共有結合を形成し得る基を指す。例示的なチオール反応性基としては、限定されないが、マレイミド、ハロアセチル、アロアセタミド、ビニルスルホン、ビニルスルホンアミドまたはビニールピリジンが挙げられる。一実施形態では、チオール反応性基は、マレイミドである。

#### 【0186】

本開示及び特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、その内容が明確に他の意味を示している場合を除き、複数形態も含む。

#### 【0187】

「~を含む(comprising)」という言葉を用いて実施形態が本明細書に記載される場合、「~からなる」及び/または「~から本質的になる」という観点で記載される他の類似の実施形態も与えられていると理解される。

40

A. 例示的な免疫コンジュゲート

#### 【0188】

第2の態様では、本発明は、少なくとも1種類の医薬薬剤に結合される抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントを含む免疫コンジュゲートに関する。医薬薬剤としては、限定されないが、細胞毒(例えば、細胞増殖抑制剤または細胞破壊剤)、治療薬剤及び放射性金属イオン、例えば、 $^{225}Ac$ -エミッターが挙げられる。細胞毒または細胞毒性薬は、細胞に有害な任意の薬剤、例えば、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、ボ

50

ツリヌス毒素 A ~ F、リシナブリン、サポリン、及びこのような薬剤の細胞毒性フラグメントを含む。治療薬剤は、ある障害を予防または治療のために治療するための治療効果を有する任意の薬剤を含む。このような治療薬剤は、化学治療薬剤、タンパク質またはポリペプチド治療薬剤であってもよく、所望の生体活性を有し、及び/または所与の生体応答を改変する治療薬剤を含む。治療薬剤の例としては、アルキル化剤、血管新生阻害剤、抗有糸分裂剤、ホルモン療法剤及び細胞増殖性障害の治療に有用な抗体が挙げられる。特定の実施形態では、治療薬剤は、メイタンシノイド化合物であり、例えば、その全体が本明細書に参考として組み込まれる米国特許第 5,208,020 号及び第 7,276,497 号に記載されるものである。特定の実施形態では、治療薬剤は、ベンゾジアゼピン化合物、例えば、ピロロベンゾジアゼピン (PBD) (例えば、WO 2010/043880 号、WO 2011/130616 号、WO 2009/016516 号、WO 2013/177481 号及び WO 2012/112708 号に記載されるもの) 及びインドリノベンゾジアゼピン (IGN) 化合物 (例えば、WO 2010/091150 号及び WO 2012/128868 号及び 2016 年 6 月 28 日に出願された米国出願第 15/195,269 号、表題「CONJUGATES OF CYSTEINE ENGINEERED ANTIBODIES」に記載されるものである。これらの特許、特許刊行物及び出願の全ての教示全体が、全体的に本明細書に参考として組み込まれる。

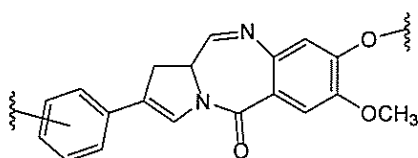
【0189】

本明細書で使用される場合、「ピロロベンゾジアゼピン」(PBD) 化合物は、ピロロベンゾジアゼピンコア構造を有する化合物である。ピロロベンゾジアゼピンは、置換されていてもよく、または置換されていないともよい。これには、リンカーによって結合する 2 個のピロロベンゾジアゼピンコアを有する化合物も含まれる。インドリノベンゾジアゼピンコアの一部としてのイミン官能性 ( $-C=N-$ ) は、還元されてもよい。

【0190】

特定の実施形態では、ピロロベンゾジアゼピン化合物は、

【化 71】

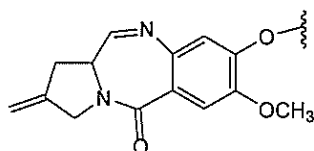


によって表されるコア構造を含み、この構造は、場合により置換されていてもよい。

【0191】

特定の実施形態では、ピロロベンゾジアゼピン化合物は、

【化 72】



によって表されるコア構造を含み、この構造は、場合により置換されていてもよい。

【0192】

本明細書で使用される場合、「インドリノベンゾジアゼピン」(IGN) 化合物は、インドリノベンゾジアゼピンコア構造を有する化合物である。インドリノベンゾジアゼピンは、置換されていてもよく、または置換されていないともよい。これには、リンカーによって結合する 2 個のインドリノベンゾジアゼピンコアを有する化合物も含まれる。インド

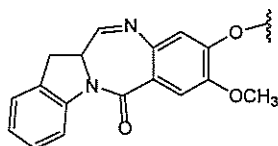


リノベンゾジアゼピンコアの一部としてのイミン官能性 ( - C = N - ) は、還元されてもよい。

【 0 1 9 3 】

特定の実施形態では、インドリノベンゾジアゼピン化合物は、

【 化 7 3 】



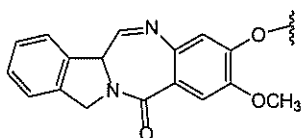
10

によって表されるコア構造を含み、この構造は、場合により置換されていてもよい。

【 0 1 9 4 】

いくつかの実施形態では、インドリノベンゾジアゼピン化合物は、

【 化 7 4 】



20

によって表されるコア構造を含み、この構造は、更に置換されていてもよい。

【 0 1 9 5 】

医薬薬剤は、抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントに直接的に連結または結合されてもよく、または間接的に、当該技術分野で既知の技術を用い、リンカーを介して連結または結合され、「免疫コンジュゲート」、「コンジュゲート」または「A D C」を生成してもよい。

【 0 1 9 6 】

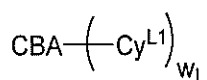
第 1 の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメント上に位置する 1 つ以上のリシン残基の - アミノ基を介して本明細書に記載の医薬薬剤に共有結合する本明細書に記載される抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントを含む。

30

【 0 1 9 7 】

第 1 の実施形態の第 1 の具体的な実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

【 化 7 5 】



( L 1 )

40

ここで、

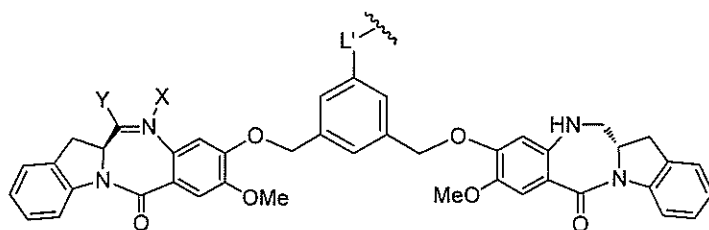
C B A は、リシン残基を介して C y <sup>L 1</sup> に共有結合する、本明細書で上に記載の抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントであり；

W L は、1 ~ 2 0 の整数であり、

C y <sup>L 1</sup> は、以下の式

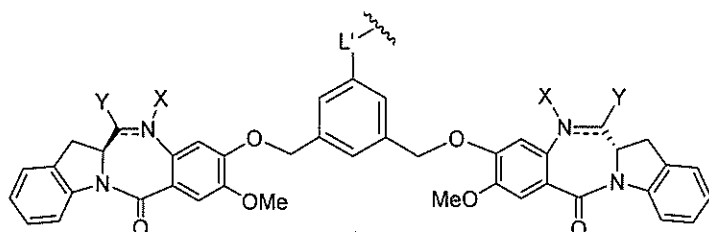
50

## 【化 7 6】

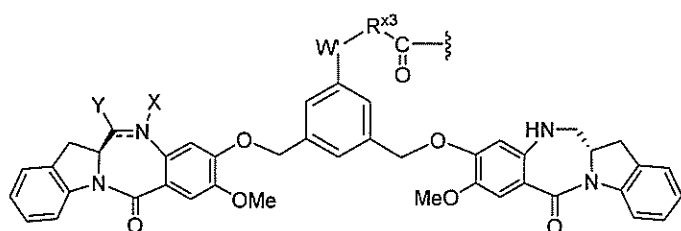


(L 1 a)

10

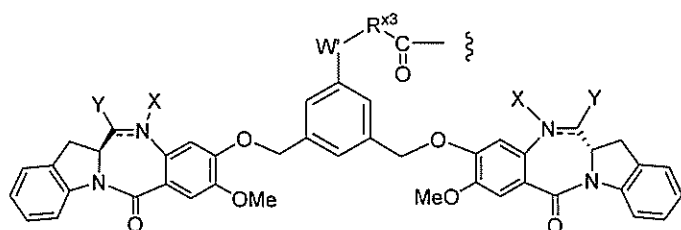


(L 1 a 1)



(L 1 b)、または

20



(L 1 b 1)

30

によって表される細胞毒性化合物であるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
NとCとの間の二重線

## 【化 7 7】

==

40

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

W'は、-N<sup>R<sup>e</sup></sup>であり、

R<sup>e</sup>は、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>であり；

nは、2～6の整数であり；

R<sup>k</sup>は、-Hまたは-Meであり；

R<sup>x3</sup>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

L'は、以下の式

50

- NR<sub>5</sub> - P - C(=O) - (CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub> - C(=O) - (B1') ; または  
 - NR<sub>5</sub> - P - C(=O) - (CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub> - S - Z<sup>s1</sup> - (B2')

によって表され、

R<sub>5</sub> は、- H または (C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>) アルキルであり ;

P は、アミノ酸残基または 2 ~ 20 個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり ;

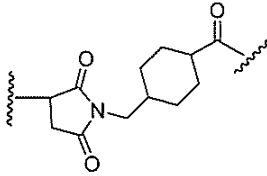
R<sub>a</sub> 及び R<sub>b</sub> は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、- H、(C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>) アルキル、または帯電した置換基またはイオン化可能な基 Q であり ;

m は、1 ~ 6 の整数であり、

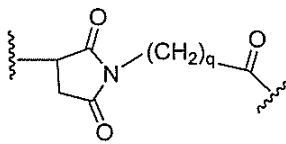
Z<sup>s1</sup> は、以下の式

【化 78】

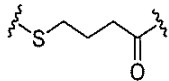
10



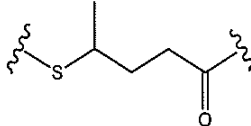
(b1)



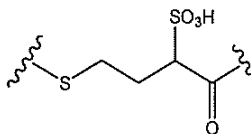
(b2)



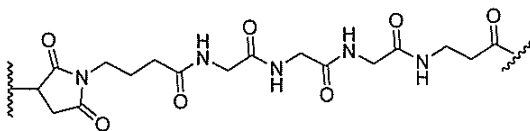
(b3)



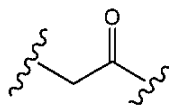
(b4)



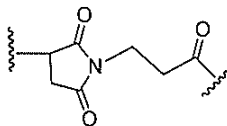
(b5)



(b6)



(b7)



(b8)

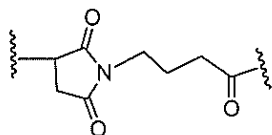
20

30

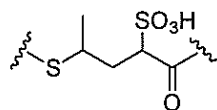
40

50

## 【化 7 9】



(b 9) ; 及び



(b 10)

10

のいずれか 1 つから選択され、

q は、1 ~ 5 の整数である。

## 【0198】

第 2 の具体的な実施形態では、式 (L 1) のコンジュゲートの場合、 $Cy^{L1}$  は、式 (L 1 a) または (L 1 a 1) によって表され；残りの可変部分は、第 1 の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

## 【0199】

第 3 の具体的な実施形態では、式 (L 1) のコンジュゲートの場合、 $Cy^{L1}$  は、式 (L 1 b) または (L 1 b 1) によって表され；残りの可変部分は、第 1 の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。より具体的には、 $R^{x3}$  は、(C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub>) アルキルである。

20

## 【0200】

第 4 の具体的な実施形態では、式 (L 1) のコンジュゲートの場合、 $Cy^{L1}$  は、式 (L 1 a) によって表され； $R_a$  及び  $R_b$  は、両方とも H であり； $R_5$  は、H または Me であり、残りの可変部分は、第 1 の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

## 【0201】

第 5 の具体的な実施形態では、P は、2 ~ 5 個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり、残りの可変部分は、第 1、第 2 または第 4 の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。より具体的な実施形態では、P は、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Val - Ala、Val - Cit、Val - Lys、Phe - Lys、Lys - Lys、Ala - Lys、Phe - Cit、Leu - Cit、Ile - Cit、Trp、Cit、Phe - Ala、Phe - N<sup>9</sup> - トシル - Arg、Phe - N<sup>9</sup> - ニトロ - Arg、Phe - Phe - Lys、D - Phe - Phe - Lys、Gly - Phe - Lys、Leu - Ala - Leu、Ile - Ala - Leu、Val - Ala - Val、Ala - Leu - Ala - Leu (配列番号 144)、- Ala - Leu - Ala - Leu (配列番号 145)、Gly - Phe - Leu - Gly (配列番号 146)、Val - Arg、Arg - Val、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、Met - Ala、Gln - Val、Asn - Ala、Gln - Phe 及び Gln - Ala からなる群から選択される。より具体的には、P は、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Ala - Ala、Ala - D - Ala、D - Ala - Ala または D - Ala - D - Ala である。

30

## 【0202】

第 6 の具体的な実施形態では、Q は、- SO<sub>3</sub>H またはその医薬的に許容される塩であり、残りの可変部分は、第 1、第 2、第 4 または第 5 の具体的な実施形態またはそこに記

40

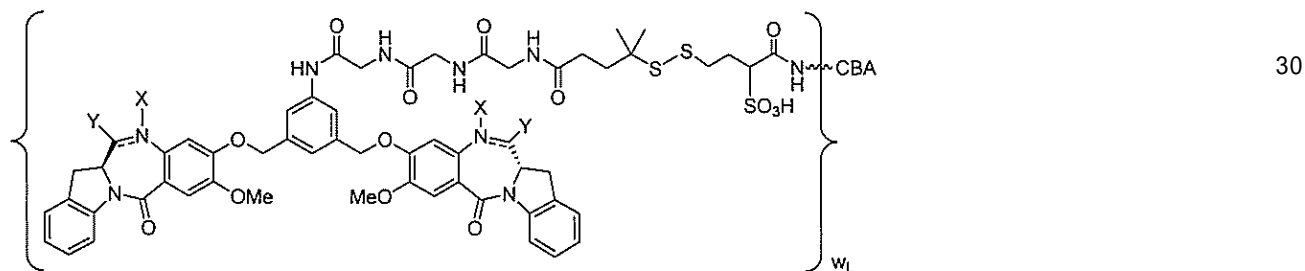
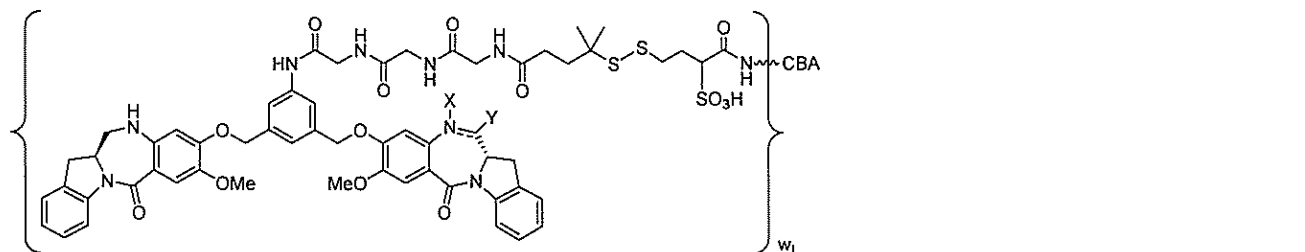
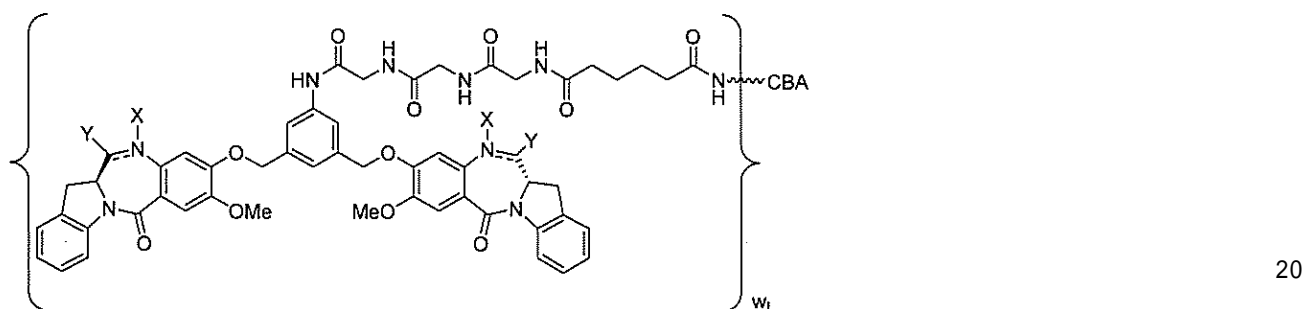
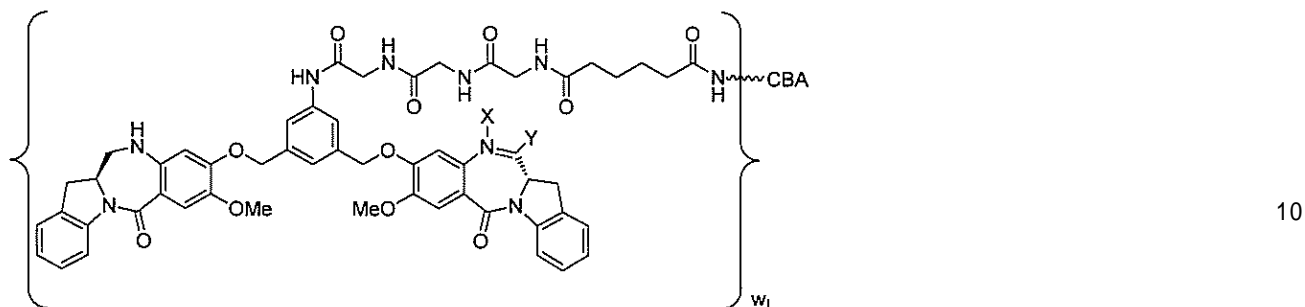
50

載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

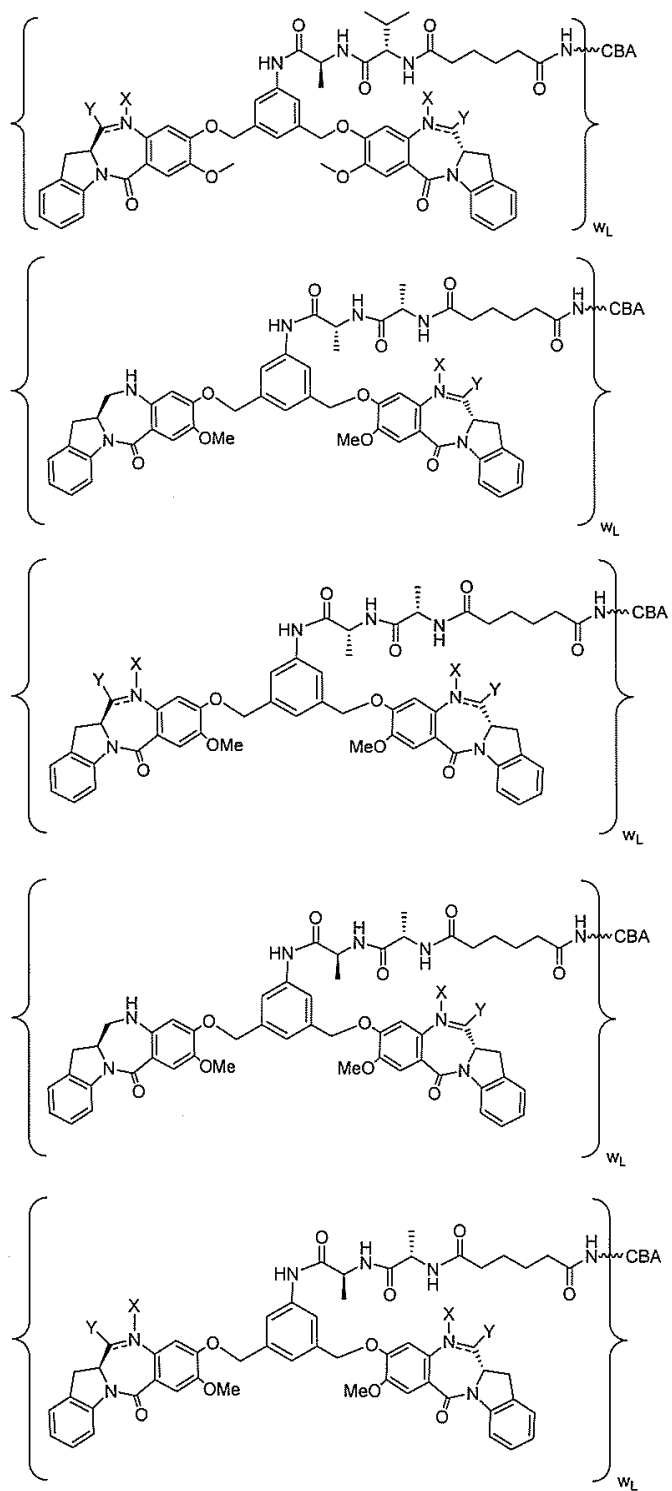
【 0 2 0 3 】

第 7 の具体的な実施形態では、第 1 の実施形態の免疫コンジュゲートは、以下の式

【 化 8 0 】



## 【化 8 1】



10

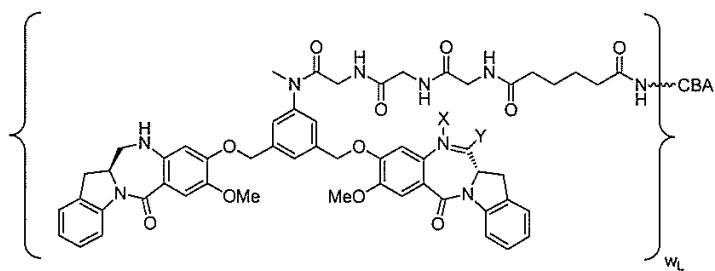
20

30

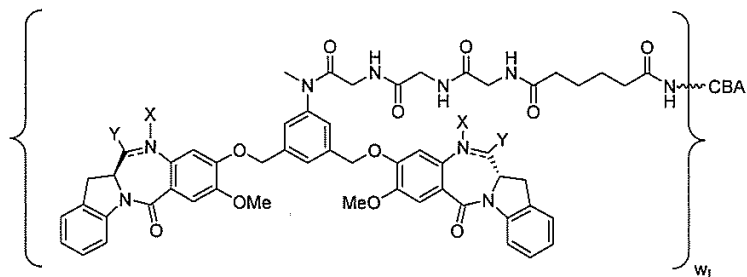
40

50

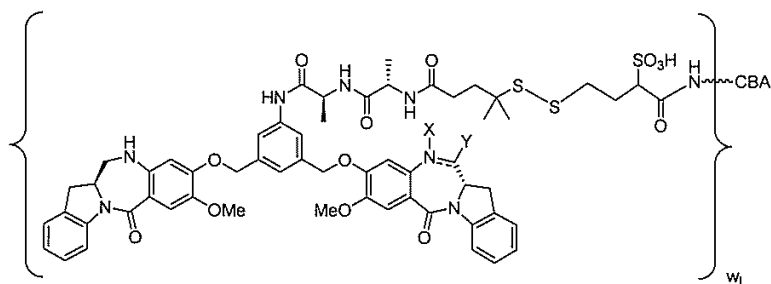
## 【化 8 2】

 $w_L$ 

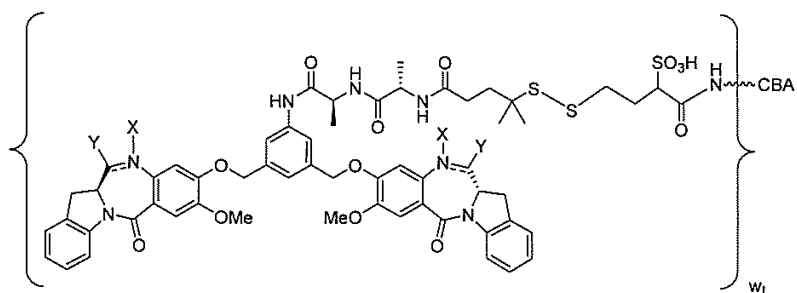
10

 $w_L$ 

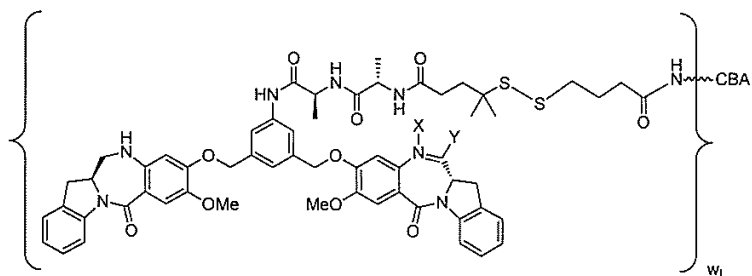
20

 $w_L$ 

30

 $w_L$ 

40

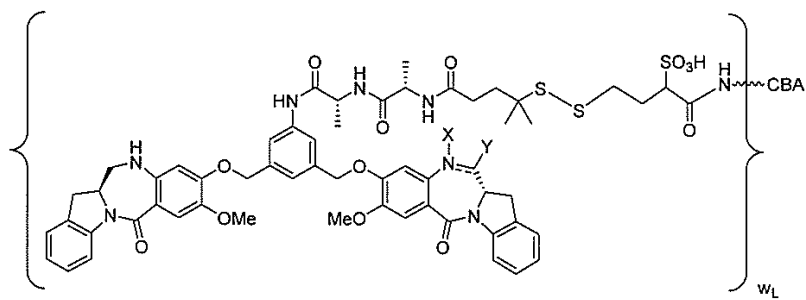
 $w_L$ 

50

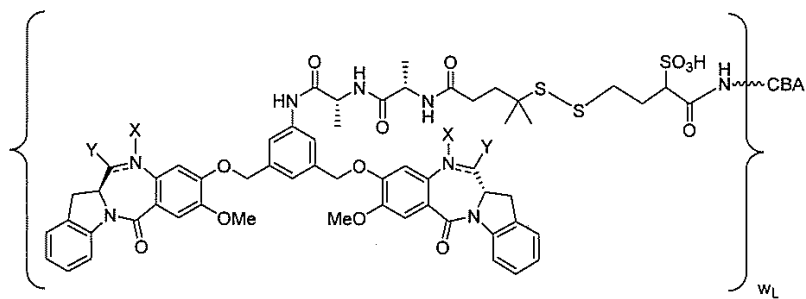
40



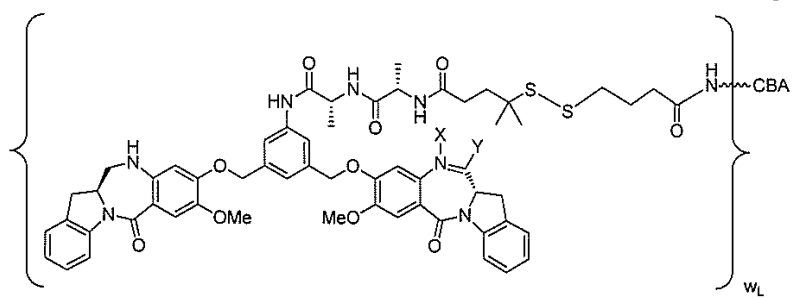
## 【化 8 4】



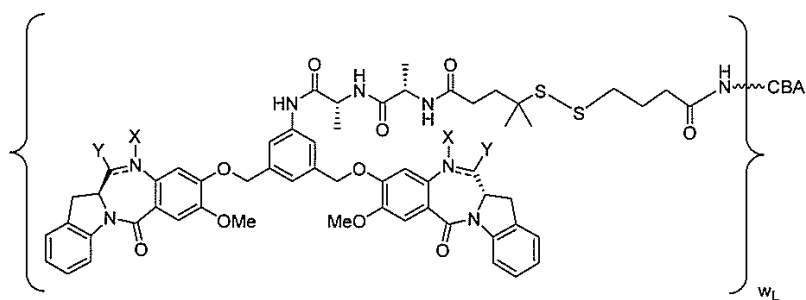
10



20



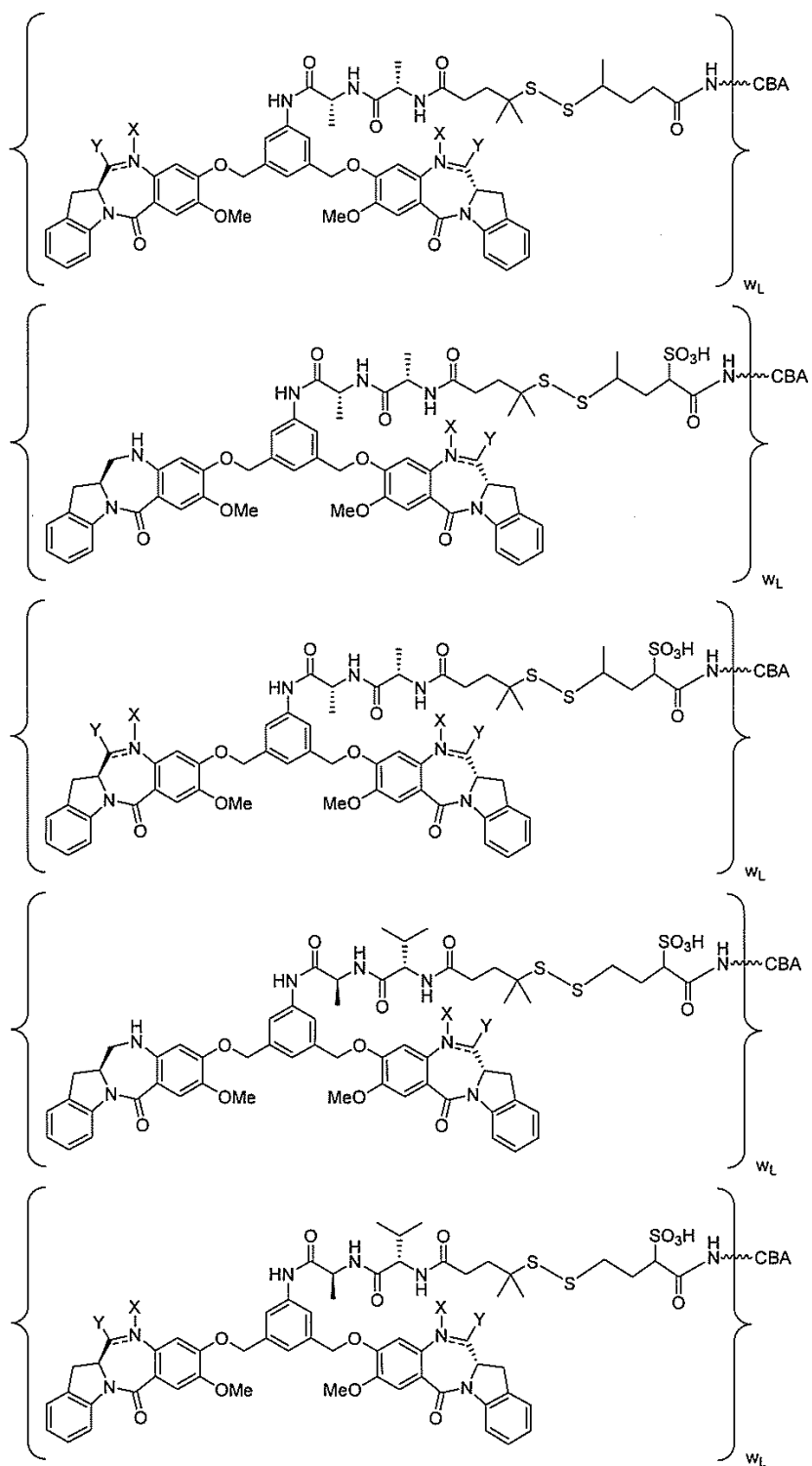
30



40

50

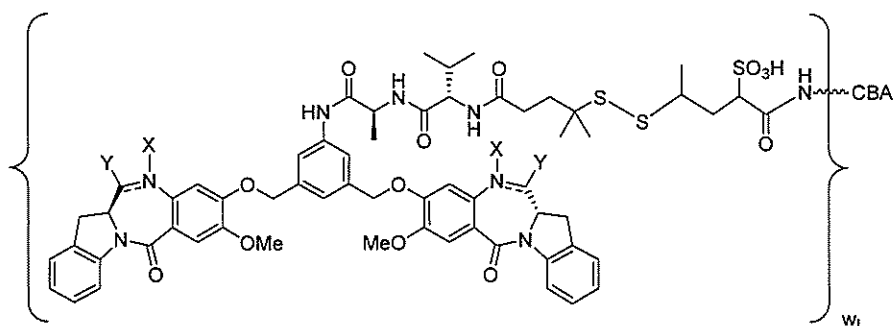
## 【化 8 5】



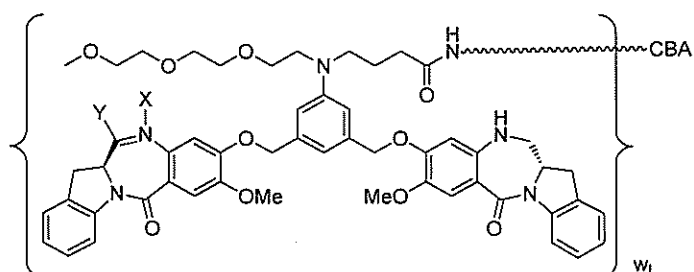
[illegible]

40

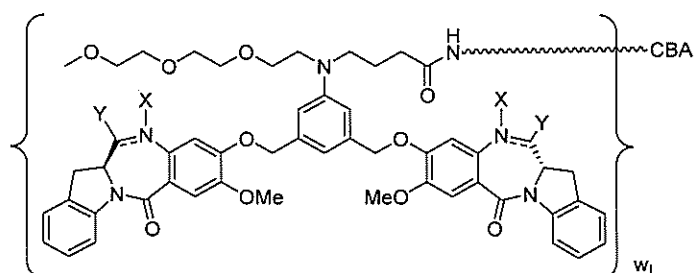
## 【化 8 7】



10



または



20

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、 $W_L$ は、1 ~ 10の整数であり；NとCとの間の二重線

## 【化 8 8】

30

==

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは - Hであり；単結合である場合には、Xは、 - Hであり、Yは、 - OHまたは - SO<sub>3</sub>Hである。より具体的な実施形態では、NとCとの間の二重線

## 【化 8 9】

==

40

は、二重結合を表し、

Xは存在せず、Yは - Hである。別のより具体的な実施形態では、NとCとの間の二重線

## 【化 9 0】

==

が単結合を表し、Xは - Hであり、Yは - SO<sub>3</sub>Hであるか、またはその医薬的に許容される塩である。

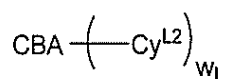
## 【0 2 0 4】

第8の実施形態では、第1の実施形態の免疫コンジュゲートは、以下の式によって表さ

50

れ、

【化 9 1】



( L 2 )

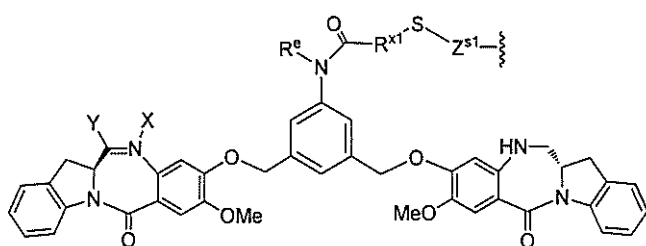
ここで、

C B A は、リシン残基を介して  $\text{Cy}^{\text{L2}}$  に共有結合する、本明細書で上に記載の抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントであり；

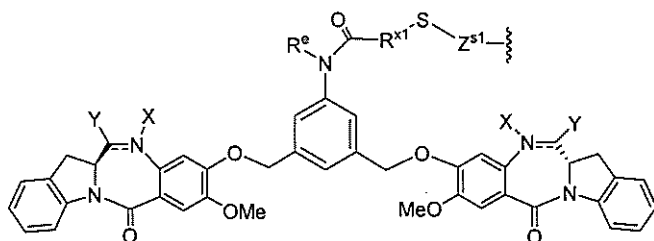
$\text{WL}$  は、1 ~ 20 の整数であり、

$\text{Cy}^{\text{L2}}$  は、以下の式

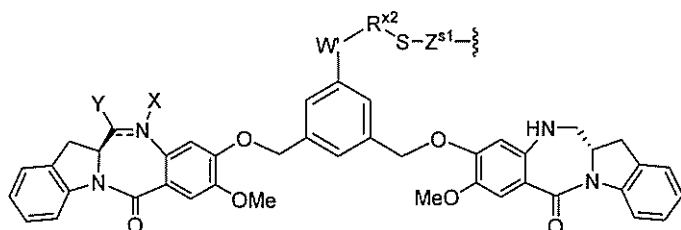
【化 9 2】



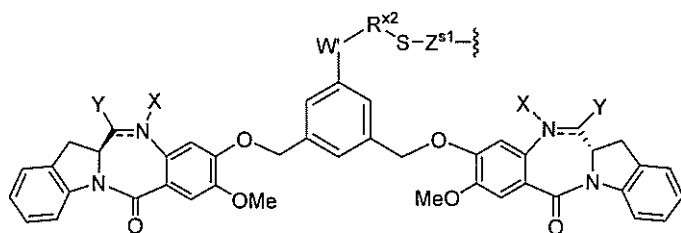
( L 2 a )



( L 2 a 1 )



( L 2 b )、または



( L 2 b 1 )

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
N と C との間の二重線

【化 9 3】

==

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはその医薬的に許容される塩であり；

R<sup>x1</sup>及びR<sup>x2</sup>は、独立して、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

R<sup>e</sup>は、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

W'は、-N<sup>R'</sup>であり、

R<sup>e'</sup>は、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>であり；

nは、2～6の整数であり；

R<sup>k</sup>は、-Hまたは-Meであり；

Z<sup>s1</sup>は、以下の式

10

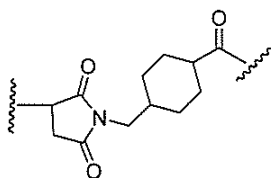
20

30

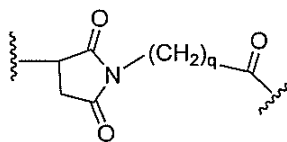
40

50

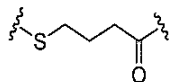
## 【化 9 4】



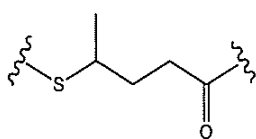
(b 1)



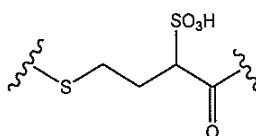
(b 2)



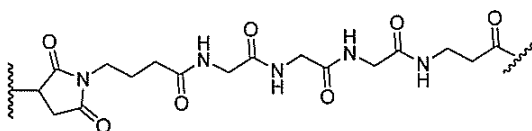
(b 3)



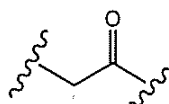
(b 4)



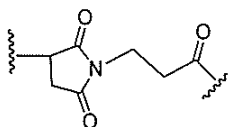
(b 5)



(b 6)



(b 7)



(b 8)

10

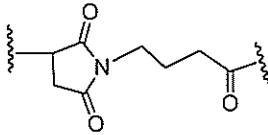
20

30

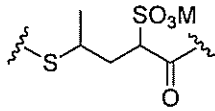
40

50

## 【化 9 5】



(b 9); 及び



(b 10)

10

のいずれか 1 つから選択され、

q は、1 ~ 5 の整数である。

## 【0 2 0 5】

第 9 の具体的な実施形態では、式 (L 2) のコンジュゲートの場合、 $Cy^{L2}$  は、式 (L 2 a) または (L 2 a 1) によって表され；残りの可変部分は、第 8 の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

## 【0 2 0 6】

第 10 の具体的な実施形態では、式 (L 2) のコンジュゲートの場合、 $Cy^{L2}$  は、式 (L 2 b) または (L 2 b 1) によって表され；残りの可変部分は、第 8 の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

20

## 【0 2 0 7】

第 11 の具体的な実施形態では、式 (L 2) のコンジュゲートの場合、 $R^e$  は、H または Me であり； $R^{x1}$  及び  $R^{x2}$  は、独立して、 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$  であり、 $R^f$  及び  $R^g$  は、それぞれ独立して、 $-H$  または  $(C_1-C_4)$  アルキルであり；p は、0、1、2 または 3 であり；残りの可変部分は、第 8、第 9 または第 10 の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。より具体的には、 $R^f$  及び  $R^g$  が同じであるか、または異なっており、 $-H$  及び  $-Me$  から選択される。

## 【0 2 0 8】

第 12 の具体的な実施形態では、第 1 の実施形態の免疫コンジュゲートは、以下の式

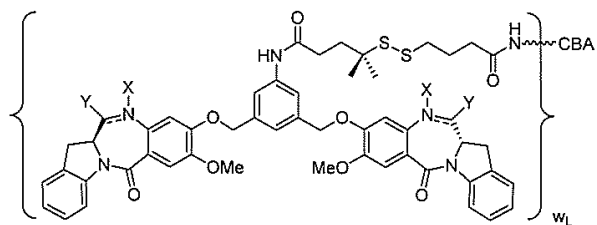
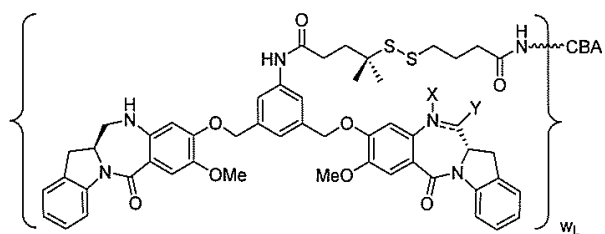
30

40

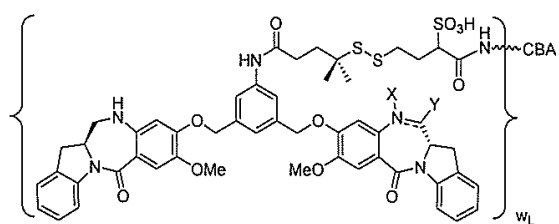
50



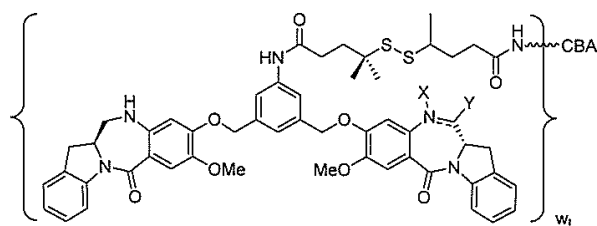
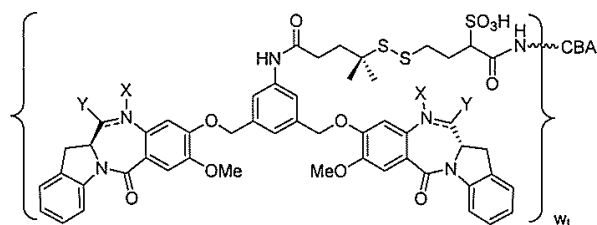
## 【化 9 6】



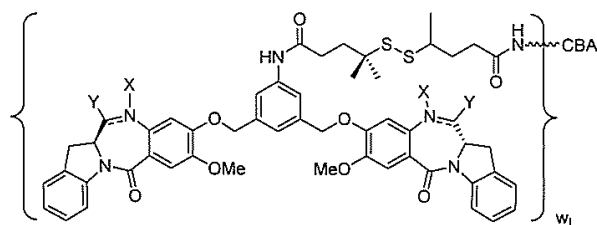
10



20



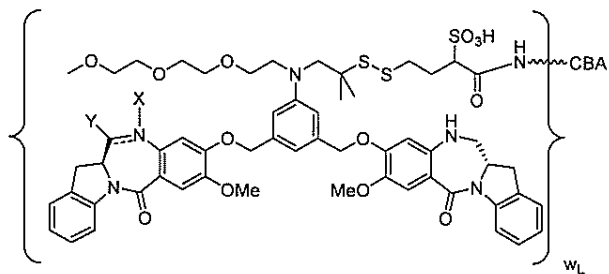
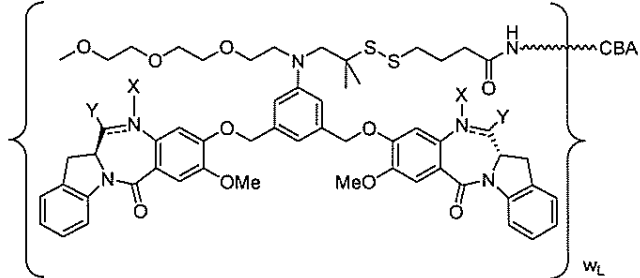
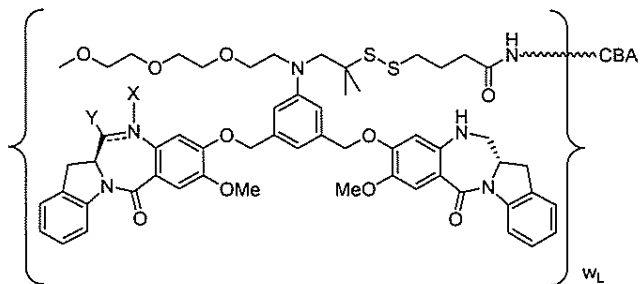
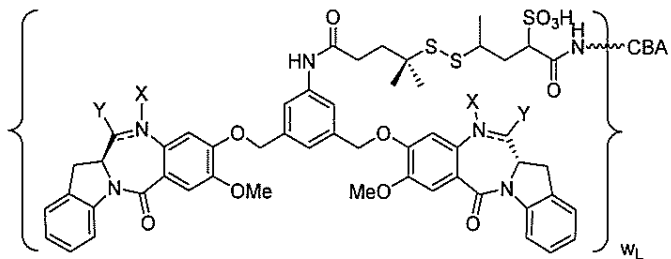
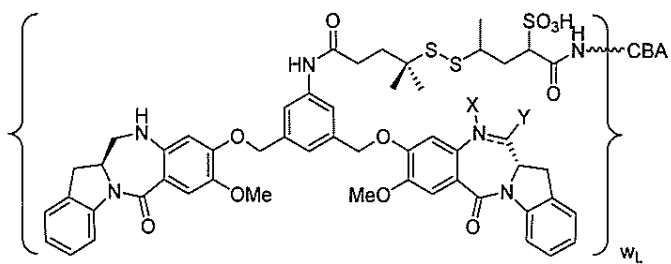
30



40

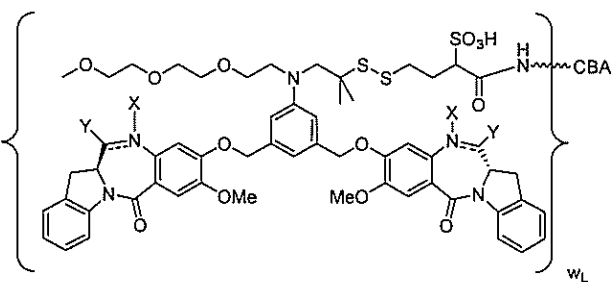
50

## 【化 9 7】



または

## 【化 9 8】



10

20

30

40

50

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、 $W_L$ は、1 ~ 10の整数であり；NとCとの間の二重線

【化99】



は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは - Hであり；単結合である場合には、Xは、 - Hであり、Yは、 - OHまたは - SO<sub>3</sub>Hであるか、またはその医薬的に許容される塩である。より具体的な実施形態では、NとCとの間の二重線

【化100】



は、二重結合を表す。別のより具体的な実施形態では、NとCとの間の二重線

【化101】

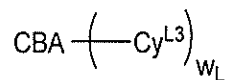


が単結合を表し、Xは - Hであり、Yは - SO<sub>3</sub>Hであるか、またはその医薬的に許容される塩である。

【0209】

第13の具体的な実施形態では、第1の実施形態の免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

【化102】



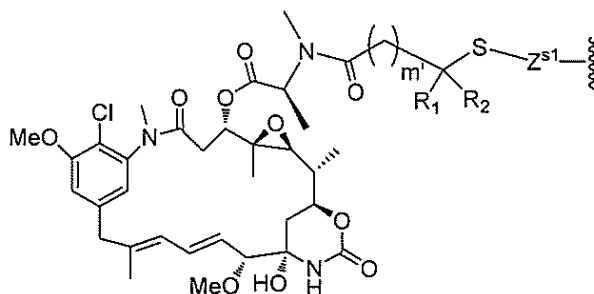
ここで、

CBAは、リシン残基を介して $Cy^{L3}$ に共有結合する、本明細書で上に記載の抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントであり；

$W_L$ は、1 ~ 20の整数であり、

$Cy^{L3}$ は、以下の式

【化103】



によって表され、

$m'$ は、1または2であり；

$R_1$ 及び $R_2$ は、それぞれ独立して、Hまたは(C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>)アルキルであり；

$Z^{s1}$ は、以下の式

10

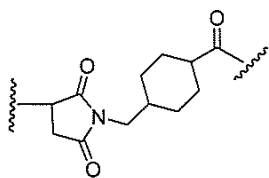
20

30

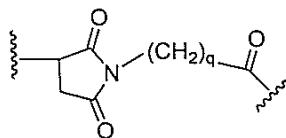
40

50

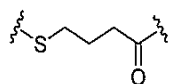
## 【化 1 0 4】



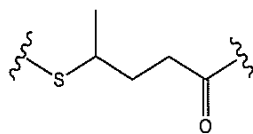
(b 1)



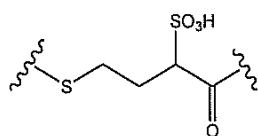
(b 2)



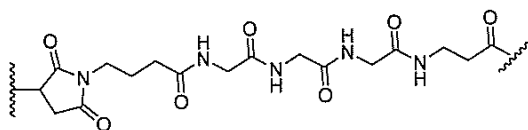
(b 3)



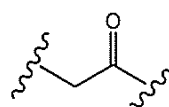
(b 4)



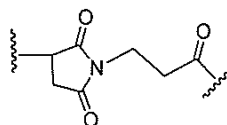
(b 5)



(b 6)



(b 7)



(b 8)

10

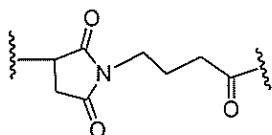
20

30

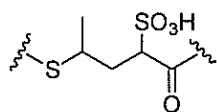
40

50

## 【化 1 0 5】



(b 9); 及び



(b 10)

10

のいずれか 1 つから選択され、

q は、1 ~ 5 の整数である。

## 【0 2 1 0】

第 1 4 の具体的な実施形態では、式 ( L 3 ) のコンジュゲートの場合、m ' は 1 であり、 $R_1$  及び  $R_2$  は両方とも H であり、残りの可変部分は、第 1 3 の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

## 【0 2 1 1】

第 1 5 の具体的な実施形態では、式 ( L 3 ) のコンジュゲートの場合、m ' は 2 であり、 $R_1$  及び  $R_2$  は両方とも Me であり、残りの可変部分は、第 1 3 の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

20

## 【0 2 1 2】

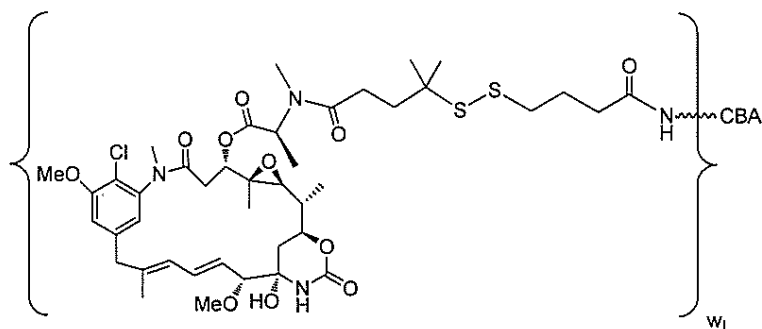
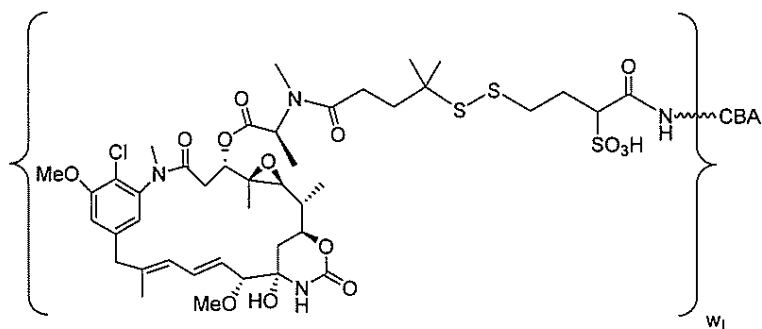
第 1 6 の具体的な実施形態では、第 1 の実施形態の免疫コンジュゲートは、以下の式

30

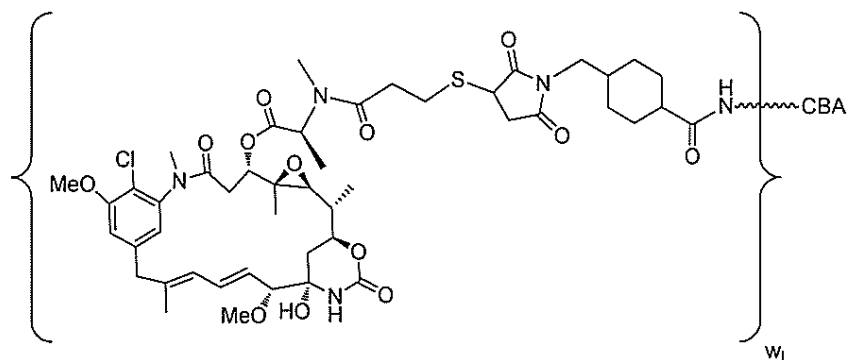
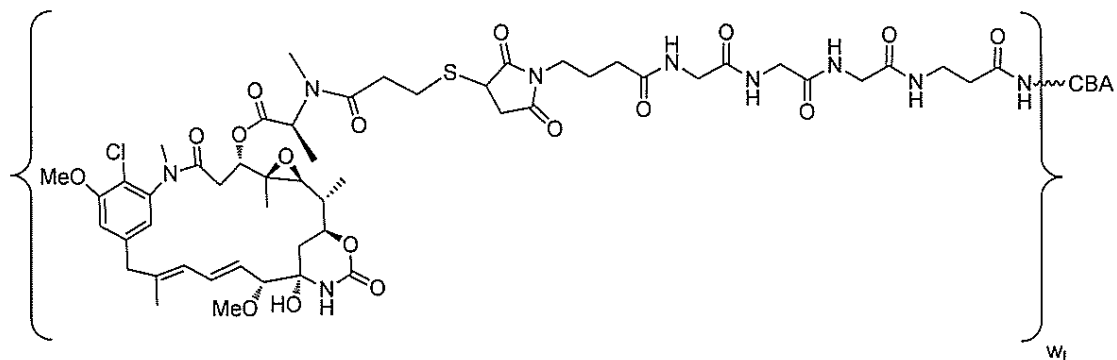
40

50

## 【化 1 0 6】



または



によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
ここで、

$w_L$  は、1 ~ 10 の整数である。

## 【 0 2 1 3】

第 17 の具体的な実施形態では、第 1 の実施形態のコンジュゲートの場合、Y は、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3Na$  または  $-SO_3K$  であり、残りの可変部分は、第 1 ~ 第 16 の具体的な実施形態のいずれか 1 つ、またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。一実施形態では、Y は、 $-SO_3Na$  である。

## 【 0 2 1 4】

特定の実施形態では、第 1 の実施形態の免疫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、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、第 15、第 16 または第 17 の具体的な実施形態について、抗体分子あたりの細胞毒性薬の平均数（すなわち、平均値  $w_L$ ）、組成物中の薬物 - 抗体比率（DAR）は、1.0 ~ 8.0 である。いくつかの実施形態では、DAR は、1.0 ~ 5.0、1.0 ~ 4.0、1.0 ~ 3.4、1.0 ~ 3.0、1.5 ~ 2.5、2.0 ~ 2.5 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。

【0215】

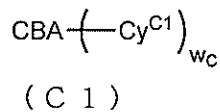
10

第 2 の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメント上に位置する 1 つ以上のシステイン残基のチオール基（-SH）を介して本明細書に記載の細胞毒性剤に共有結合する本明細書で上に記載される抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントを含む。

【0216】

第 1 の具体的な実施形態では、第 2 の実施形態の免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

【化 107】



20

ここで、

CBA は、システイン残基を介して  $\text{Cy}^{\text{C1}}$  に共有結合する、本明細書に記載の本発明の抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントであり；

$w_C$  は、1 または 2 であり、

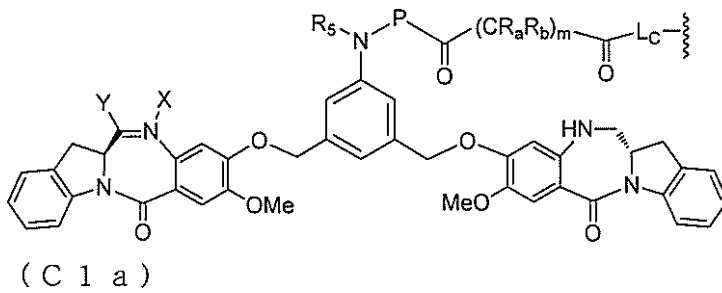
$\text{Cy}^{\text{C1}}$  は、以下の式

30

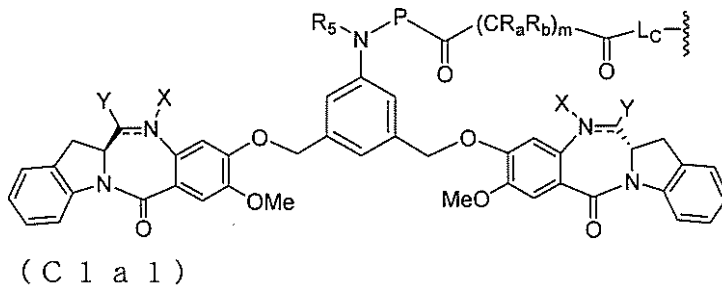
40

50

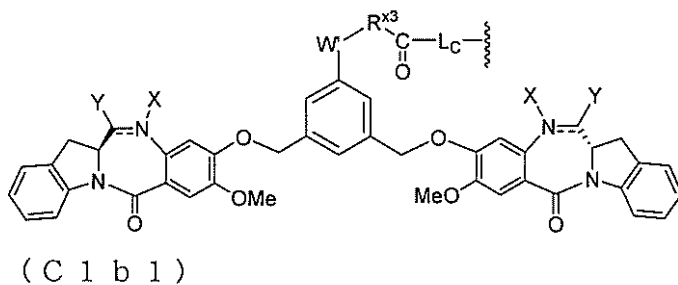
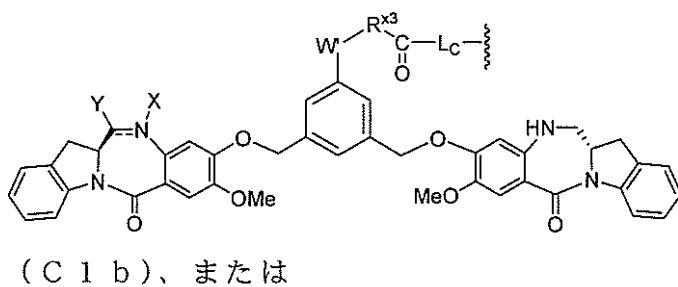
## 【化 1 0 8】



10



20



30

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
NとCとの間の二重線

## 【化 1 0 9】

==

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

40

R<sub>5</sub>は、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキルであり；

Pは、アミノ酸残基または2～20個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；

R<sub>a</sub>及びR<sub>b</sub>は、それぞれの場合に、独立して、-H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキルまたは帯電した置換基またはイオン化可能な基Qであり；

W'は、-N<sup>Re</sup>であり、

R<sup>e</sup>は、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>であり；

nは、2～6の整数であり；

50

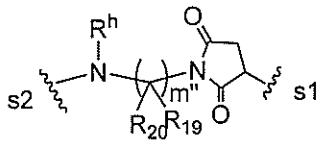


$R^k$  は、 $-H$  または  $-Me$  であり；

$R^{x3}$  は、 $(C_1 - C_6)$  アルキルであり；

$L_C$  は、

【化 110】



10

によって表され、 $s_1$  は、 $CBA$  に共有結合した部位であり、 $s_2$  は、 $Cy^{C1}$  上の  $-C(=O)-$  基に共有結合した部位であり；

$R_{19}$  及び  $R_{20}$  は、それぞれの場合に、独立して、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；

$m''$  は、 $1 \sim 10$  の整数であり；

$R^h$  は、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルである。

【0217】

第2の具体的な実施形態では、式(C1)のコンジュゲートの場合、 $Cy^{C1}$  は、式(C1a)または(C1a1)によって表され；残りの可変部分は、第2の実施形態の第1の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

20

【0218】

第3の具体的な実施形態では、式(C1)のコンジュゲートの場合、 $Cy^{C1}$  は、式(C1b)または(C1b1)によって表され；残りの可変部分は、第2の実施形態の第1の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

【0219】

第4の具体的な実施形態では、式(C1)のコンジュゲートの場合、 $Cy^{C1}$  は、式(C1a)または(C1a1)によって表され； $R_a$  及び  $R_b$  は両方とも  $H$  であり； $R_5$  は、 $H$  または  $Me$  であり；残りの可変部分は、第2の実施形態の第1または第2の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

30

【0220】

第5の具体的な実施形態では、式(C1)のコンジュゲートの場合、 $P$  は、 $2 \sim 5$  個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり、残りの可変部分は、第2の実施形態の第1、第2または第4の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。より具体的な実施形態では、 $P$  は、 $Gly - Gly - Gly$ 、 $Ala - Val$ 、 $Val - Ala$ 、 $Val - Cit$ 、 $Val - Lys$ 、 $Phe - Lys$ 、 $Lys - Lys$ 、 $Ala - Lys$ 、 $Phe - Cit$ 、 $Leu - Cit$ 、 $Ile - Cit$ 、 $Trp$ 、 $Cit$ 、 $Phe - Ala$ 、 $Phe - N^9 - トシル - Arg$ 、 $Phe - N^9 - ニトロ - Arg$ 、 $Phe - Phe - Lys$ 、 $D - Phe - Phe - Lys$ 、 $Gly - Phe - Lys$ 、 $Leu - Ala - Leu$ 、 $Ile - Ala - Leu$ 、 $Val - Ala - Val$ 、 $Ala - Leu - Ala - Leu$  (配列番号144)、 $-Ala - Leu - Ala - Leu$  (配列番号145)、 $Gly - Phe - Leu - Gly$  (配列番号146)、 $Val - Arg$ 、 $Arg - Val$ 、 $Arg - Arg$ 、 $Val - D - Cit$ 、 $Val - D - Lys$ 、 $Val - D - Arg$ 、 $D - Val - Cit$ 、 $D - Val - Lys$ 、 $D - Val - Arg$ 、 $D - Val - D - Cit$ 、 $D - Val - D - Lys$ 、 $D - Val - D - Arg$ 、 $D - Arg - D - Arg$ 、 $Ala - Ala$ 、 $Ala - D - Ala$ 、 $D - Ala - Ala$ 、 $D - Ala - D - Ala$ 、 $Ala - Met$ 、 $Met - Ala$ 、 $Gln - Val$ 、 $Asn - Ala$ 、 $Gln - Phe$  及び  $Gln - Ala$  から選択される。別のより具体的な実施形態では、 $P$  は、 $Gly - Gly - Gly$ 、 $Ala - Val$ 、 $Ala - Ala$ 、 $Ala - D - Ala$ 、 $D - Ala - Ala$  または  $D - Ala - D - Ala$  である。

40

50

## 【 0 2 2 1 】

第 6 の具体的な実施形態では、式 ( C 1 ) のコンジュゲートの場合、Q は、 $-SO_3H$  またはその医薬的に許容される塩であり、残りの可変部分は、第 2 の実施形態の第 1、第 2、第 4 または第 5 の具体的な実施形態またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

## 【 0 2 2 2 】

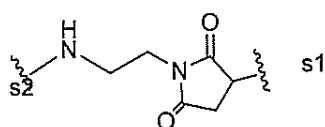
第 7 の具体的な実施形態では、式 ( C 1 ) のコンジュゲートの場合、 $R_{19}$  及び  $R_{20}$  は、両方とも H であり、 $m''$  は、1 ~ 6 の整数であり、残りの可変部分は、第 2 の実施形態の第 1、第 2、第 3、第 4、第 5 または第 6 の具体的な実施形態またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

10

## 【 0 2 2 3 】

第 8 の具体的な実施形態では、式 ( C 1 ) のコンジュゲートの場合、 $-L-L_c-$  は、以下の式

## 【 化 1 1 1 】



によって表され、残りの可変部分は、第 2 の実施形態の第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6 または第 7 の具体的な実施形態またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

20

## 【 0 2 2 4 】

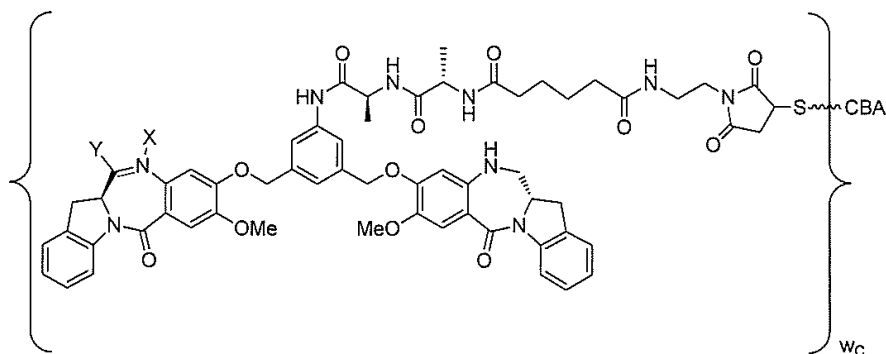
第 9 の具体的な実施形態では、第 2 の実施形態の免疫コンジュゲートは、以下の式

30

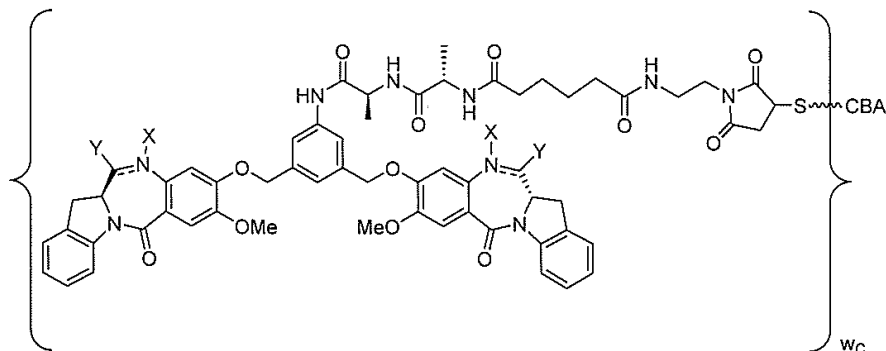
40

50

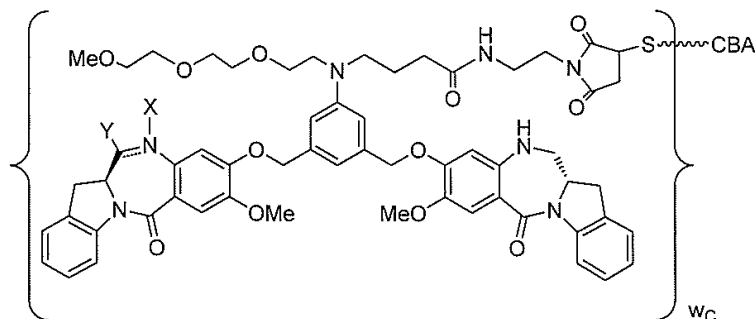
## 【化 1 1 2】



10

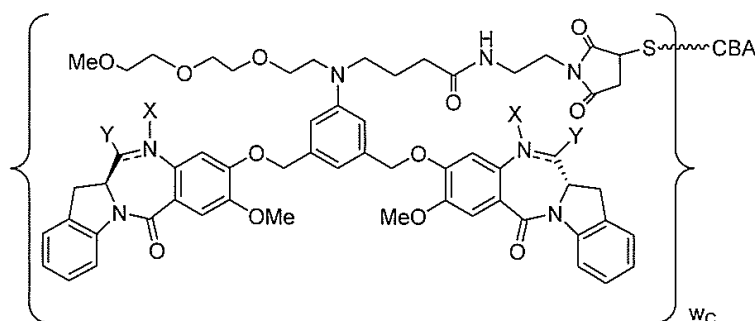


20



30

または



40

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、NとCとの間の二重線  
【化 1 1 3】

==

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは - Hであり；単結合である場合には、Xは、 - Hであり、Yは、 - OHまたは - SO<sub>3</sub>Hであるか、またはその医薬的に許容される塩である。より具体的な実施形態では、NとCとの間の二重線

50

【化 1 1 4】



は、二重結合を表し、

X は存在せず、Y は - H である。別のより具体的な実施形態では、N と C との間の二重線

【化 1 1 5】

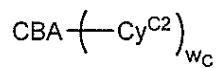


が単結合を表し、X は - H であり、Y は - S O<sub>3</sub> H であるか、またはその医薬的に許容される塩である。

【0 2 2 5】

第 1 0 の具体的な実施形態では、第 2 の実施形態の免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

【化 1 1 6】



(C 2)

ここで、

C B A は、システイン残基を介して C y<sup>C 2</sup> に共有結合する、本明細書で上に記載の抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントであり；

W<sub>C</sub> は、1 または 2 であり、

C y<sup>C 2</sup> は、以下の式

10

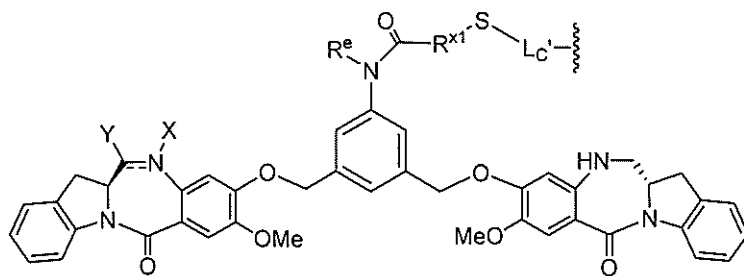
20

30

40

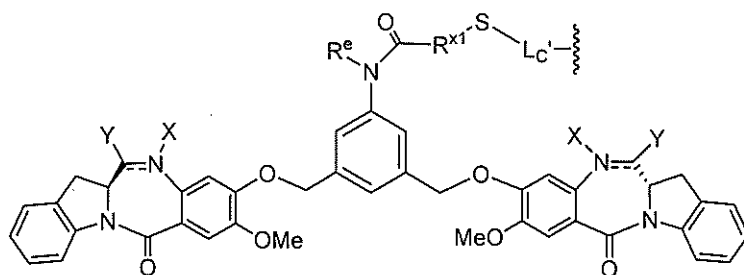
50

## 【化 1 1 7】



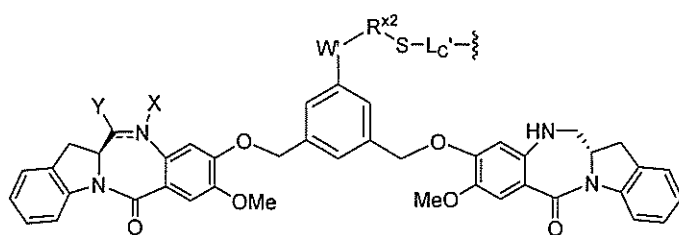
(C 2 a)

10

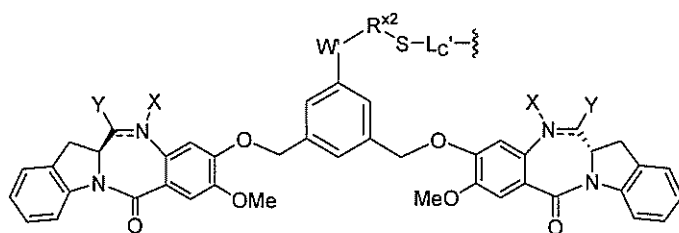


(C 2 a 1)

20



(C 2 b)、または



(C 2 b 1)

30

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
NとCとの間の二重線

## 【化 1 1 8】

==

40

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

R<sup>x1</sup>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

R<sup>e</sup>は、Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

W'は、-N<sup>R<sup>e</sup></sup>であり、

R<sup>e</sup>は、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>であり；

nは、2～6の整数であり；

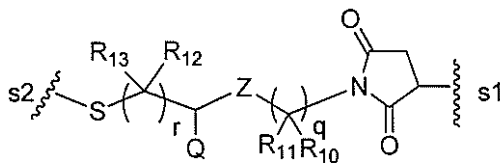
50

$R^k$  は、 $-H$  または  $-Me$  であり；

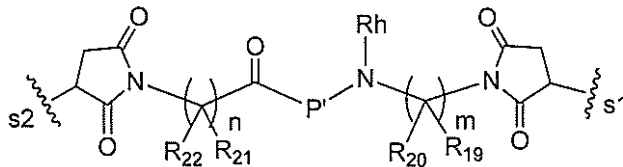
$R^{x2}$  は、 $(C_1 - C_6)$  アルキルであり；

$L_{C'}$  は、以下の式

【化 119】



または



によって表され、

ここで、

$s1$  は、 $CBA$  に共有結合した部位であり、 $s2$  は、 $Cy^{C2}$  上の  $-S-$  基に共有結合した部位であり；

$Z$  は、 $C(=O) - NR_9 -$  または  $- NR_9 - C(=O) -$  であり；

$Q$  は、 $-H$ 、帯電した置換基またはイオン化可能な基であり；

$R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$ 、 $R_{13}$ 、 $R_{19}$ 、 $R_{20}$ 、 $R_{21}$  及び  $R_{22}$  は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；

$q$  及び  $r$  は、それぞれの場合に、独立して、 $0 \sim 10$  の整数であり；

$m$  及び  $n$  は、それぞれ独立して、 $0 \sim 10$  の整数であり；

$R^h$  は、 $-H$  または  $(C_1 - C_3)$  アルキルであり；

$P'$  は、アミノ酸残基または  $2 \sim 20$  個のアミノ酸残基を含有するペプチドである。

【0226】

より具体的な実施形態では、 $q$  及び  $r$  は、それぞれ独立して、 $1 \sim 6$  の整数であり、より具体的には、 $1 \sim 3$  の整数である。更により具体的には、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$  及び  $R_{13}$  は、全て  $H$  である。

【0227】

別のより具体的な実施形態では、 $m$  及び  $n$  は、それぞれ独立して、 $1 \sim 6$  の整数であり、より具体的には、 $1 \sim 3$  の整数である。更により具体的には、 $R_{19}$ 、 $R_{20}$ 、 $R_{21}$  及び  $R_{22}$  は、全て  $H$  である。

【0228】

第 11 の具体的な実施形態では、式 (C2) のコンジュゲートの場合、 $Cy^{C2}$  が、式 (C2a) または (C2a1) によって表され、残りの可変部分は、第 2 の実施形態の第 10 の具体的な実施形態またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

【0229】

第 12 の具体的な実施形態では、式 (C2) のコンジュゲートの場合、 $Cy^{C2}$  が、式 (C2b) または (C2b1) によって表され、残りの可変部分は、第 2 の実施形態の第 10 の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

【0230】

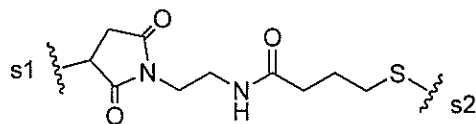
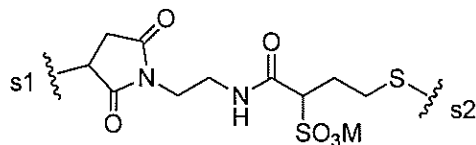
第 13 の具体的な実施形態では、式 (C2) のコンジュゲートの場合、 $P'$  は、 $2 \sim 5$  個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり、残りの可変部分は、第 2 の実施形態の第 10、第 11 または第 12 の具体的な実施形態またはそこに記載される任意のより具体的な実

施形態において上に記載したとおりである。より具体的な実施形態では、 $P'$ は、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Val - Ala、Val - Cit、Val - Lys、Phe - Lys、Lys - Lys、Ala - Lys、Phe - Cit、Leu - Cit、Ile - Cit、Trp、Cit、Phe - Ala、Phe -  $N^9$  - トシル - Arg、Phe -  $N^9$  - ニトロ - Arg、Phe - Phe - Lys、D - Phe - Phe - Lys、Gly - Phe - Lys、Leu - Ala - Leu、Ile - Ala - Leu、Val - Ala - Val、Ala - Leu - Ala - Leu (配列番号144)、 - Ala - Leu - Ala - Leu (配列番号145)、Gly - Phe - Leu - Gly (配列番号146)、Val - Arg、Arg - Val、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、Met - Ala、Gln - Val、Asn - Ala、Gln - Phe及びGln - Alaから選択される。別のより具体的な実施形態では、 $P'$ は、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Ala - Ala、Ala - D - Ala、D - Ala - AlaまたはD - Ala - D - Alaである。

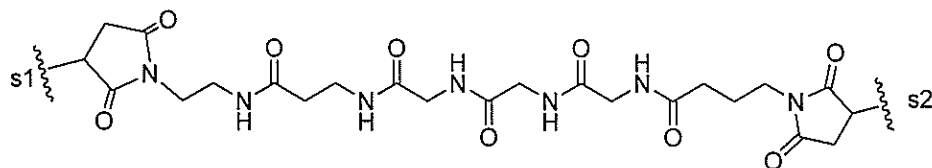
# 【0231】

第14の具体的な実施形態では、式(C2)のコンジュゲートの場合、 $-L_C'$ は、以下の式

# 【化120】



または



によって表される。

# 【0232】

第15の具体的な実施形態では、(C2)のコンジュゲートの場合、 $R^e$ は、HまたはMeであり； $R^{x1}$ は、 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$ であり、 $R^{x2}$ は、 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$ であり、 $R^f$ 及び $R^g$ は、それぞれ独立して、 $-H$ または $(C_1-C_4)$ アルキルであり； $p$ は、0、1、2または3であり；残りの可変部分は、第2の実施形態の第10、第11、第12、第13または第14の具体的な実施形態において上に記載したとおりである。より具体的には、 $R^f$ 及び $R^g$ が同じであるか、または異なっており、 $-H$ 及び $-Me$ から選択される。

# 【0233】

第16の具体的な実施形態では、第2の実施形態の免疫コンジュゲートは、以下の式

10

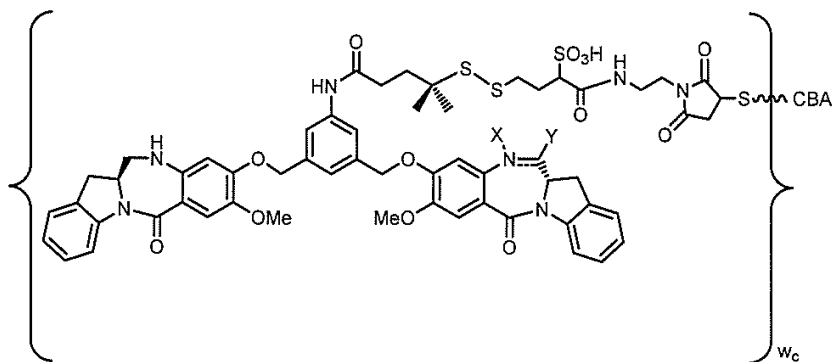
20

30

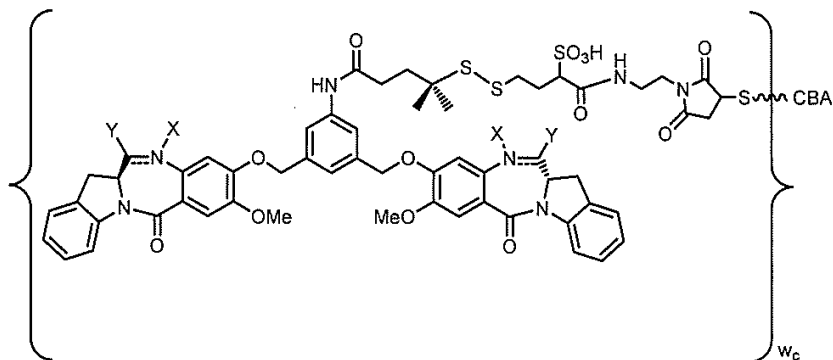
40

50

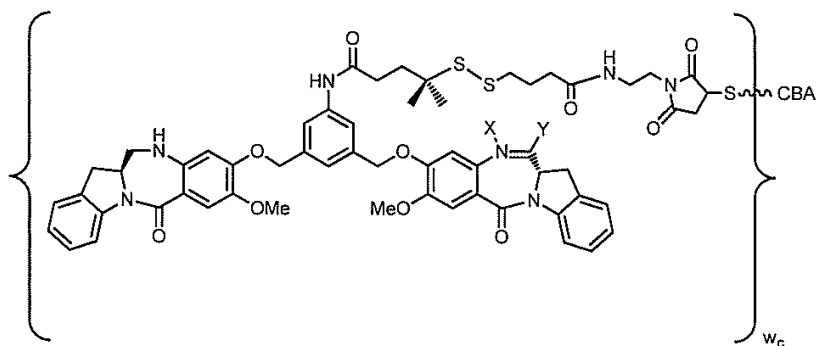
## 【化 1 2 1】



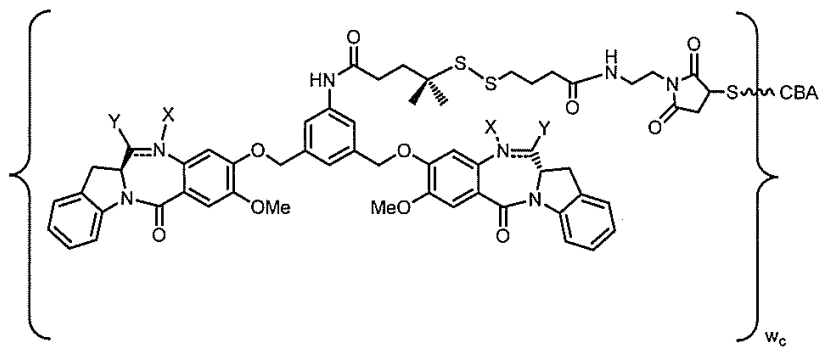
10



20



30

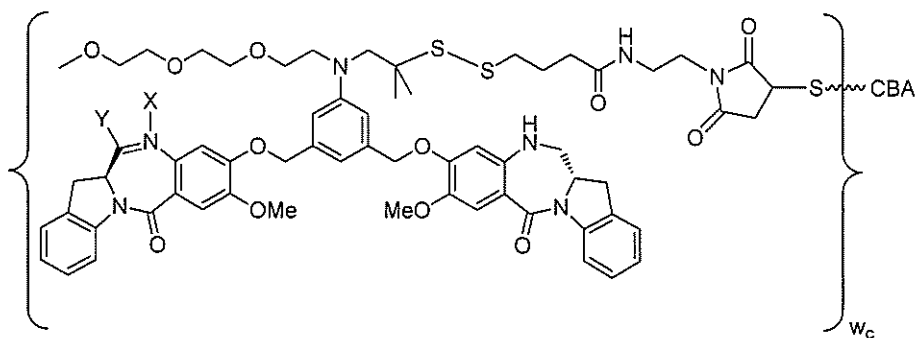


40

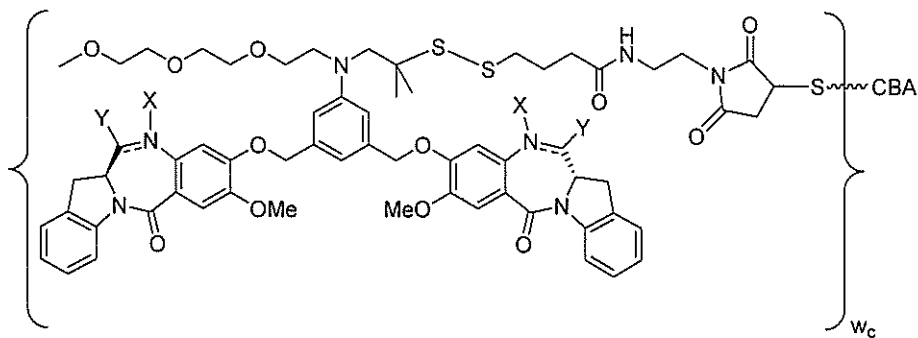
50



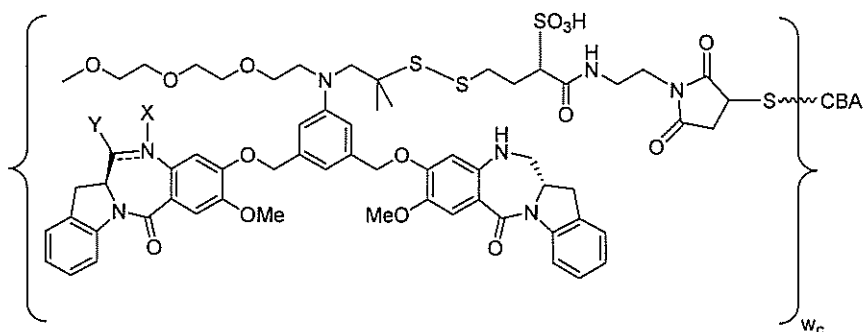
## 【化 1 2 2】



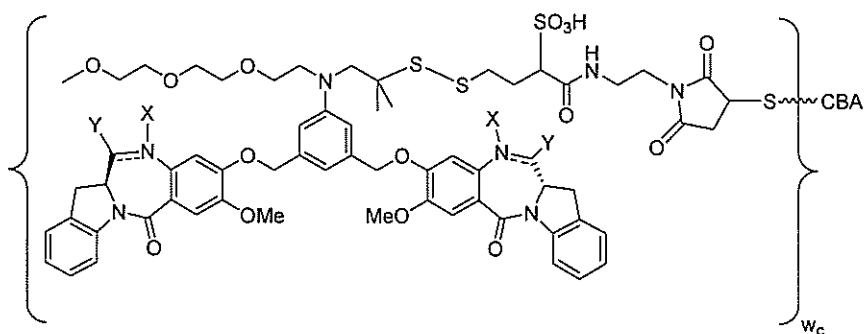
10



20



30



40

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、NとCとの間の二重線  
【化 1 2 3】

==

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは - Hであり；単結合である場合には、Xは、 - Hであり、Yは、 - O Hまたは - S O<sub>3</sub> Hであるか、またはその医薬的に許容される塩である。より具体的な実施形態では、NとCとの間の二重線

50

【化 1 2 4】

==

は、二重結合を表し、

X は存在せず、Y は - H である。別の具体的な実施形態では、N と C との間の二重線

【化 1 2 5】

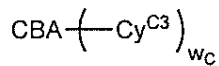
==

が単結合を表し、X は - H であり、Y は - S O<sub>3</sub> H であるか、またはその医薬的に許容される塩である。

【0 2 3 4】

第 1 7 の具体的な実施形態では、第 2 の実施形態の免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

【化 1 2 6】



(C 3)

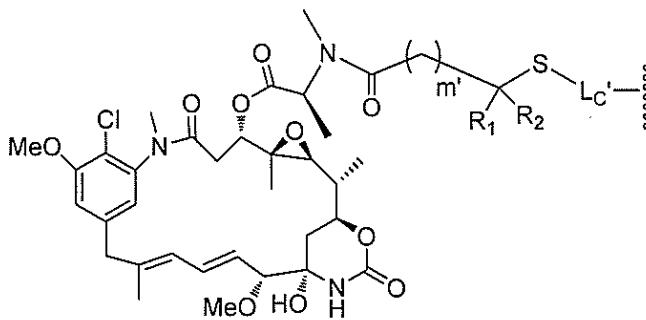
ここで、

CBA は、システイン残基を介して Cy<sup>C3</sup> に共有結合する、本明細書で上に記載の本発明の抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントであり；

w<sub>c</sub> は、1 または 2 であり、

Cy<sup>C3</sup> は、以下の式

【化 1 2 7】



(C 3 a)

によって表され、

ここで、

m' は、1 または 2 であり；

R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> は、それぞれ独立して、- H または (C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>) アルキルであり；

L<sub>C'</sub> は、以下の式

10

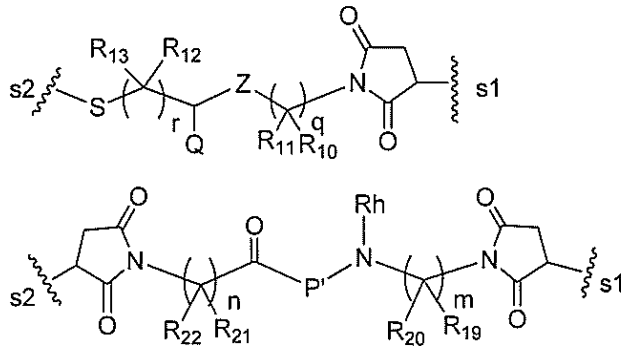
20

30

40

50

## 【化 1 2 8】



10

によって表され、

ここで、

s 1 は、C B A に共有結合した部位であり、s 2 は、C y C <sup>3</sup> 上の - S - 基に共有結合した部位であり；

Z は、C ( = O ) - N R <sub>9</sub> - または - N R <sub>9</sub> - C ( = O ) - であり；

Q は、H、帯電した置換基またはイオン化可能な基であり；

R <sub>9</sub>、R <sub>10</sub>、R <sub>11</sub>、R <sub>12</sub>、R <sub>13</sub>、R <sub>19</sub>、R <sub>20</sub>、R <sub>21</sub> 及び R <sub>22</sub> は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、Hまたは ( C <sub>1</sub> - C <sub>3</sub> ) アルキルであり；

20

q 及び r は、それぞれの場合に、独立して、0 ~ 10 の整数であり；

m 及び n は、それぞれ独立して、0 ~ 10 の整数であり；

R <sup>h</sup> は、- H または ( C <sub>1</sub> - C <sub>3</sub> ) アルキルであり；

P ' は、アミノ酸残基または 2 ~ 20 個のアミノ酸残基を含有するペプチドである。

## 【0 2 3 5】

より具体的な実施形態では、q 及び r は、それぞれ独立して、1 ~ 6 の整数であり、より具体的には、1 ~ 3 の整数である。更により具体的には、R <sub>10</sub>、R <sub>11</sub>、R <sub>12</sub> 及び R <sub>13</sub> は、全て H である。

## 【0 2 3 6】

別のより具体的な実施形態では、m 及び n は、それぞれ独立して、1 ~ 6 の整数であり、より具体的には、1 ~ 3 の整数である。更により具体的には、R <sub>19</sub>、R <sub>20</sub>、R <sub>21</sub> 及び R <sub>22</sub> は、全て H である。

30

## 【0 2 3 7】

第 1 8 の具体的な実施形態では、式 ( C 3 ) のコンジュゲートの場合、P ' は、2 ~ 5 個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり、残りの可変部分は、第 2 の実施形態の第 1 7 の具体的な実施形態またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。より具体的な実施形態では、P ' は、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Val - Ala、Val - Cit、Val - Lys、Phe - Lys、Lys - Lys、Ala - Lys、Phe - Cit、Leu - Cit、Ile - Cit、Trp、Cit、Phe - Ala、Phe - N<sup>9</sup> - トシル - Arg、Phe - N<sup>9</sup> - ニトロ - Arg、Phe - Phe - Lys、D - Phe - Phe - Lys、Gly - Phe - Lys、Leu - Ala - Leu、Ile - Ala - Leu、Val - Ala - Val、Ala - Leu - Ala - Leu ( 配列番号 1 4 4 )、- Ala - Leu - Ala - Leu ( 配列番号 1 4 5 )、Gly - Phe - Leu - Gly ( 配列番号 1 4 6 )、Val - Arg、Arg - Val、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、Met - Ala、Gln - Val、Asn - Ala、Gln - Phe 及び Gln - Ala から選択される。別のより具体的な実施形態では、P ' は

40

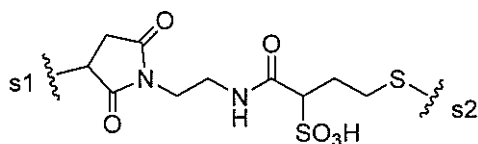
50

、G l y - G l y - G l y、A l a - V a l、A l a - A l a、A l a - D - A l a、D - A l a - A l aまたはD - A l a - D - A l aである。

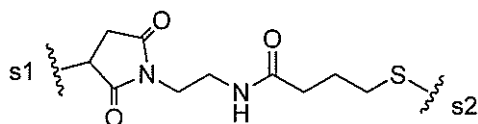
【 0 2 3 8 】

第 1 9 の具体的な実施形態では、式 ( C 3 ) のコンジュゲートの場合、- L c ' - は、以下の式

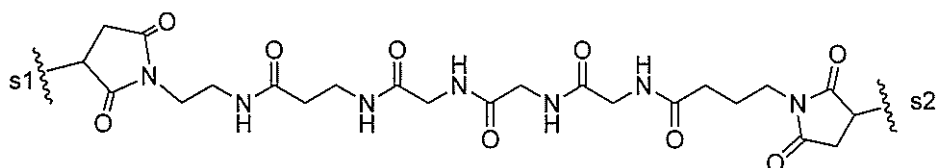
【 化 1 2 9 】



10



または



20

によって表され、Mは、H<sup>+</sup>またはカチオンであり、残りの可変部分は、第 2 の実施形態の第 1 7 または第 1 8 の具体的な実施形態またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

【 0 2 3 9 】

第 2 0 の具体的な実施形態では、式 ( C 3 ) のコンジュゲートの場合、m ' は 1 であり、R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> は両方とも H であり、残りの可変部分は、第 2 の実施形態の第 1 7、第 1 8 または第 1 9 の具体的な実施形態またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

30

【 0 2 4 0 】

第 2 1 の具体的な実施形態では、式 ( C 3 ) のコンジュゲートの場合、m ' は 2 であり、R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> は両方とも M e であり、残りの可変部分は、第 2 の実施形態の第 1 7、第 1 8 または第 1 9 の具体的な実施形態またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

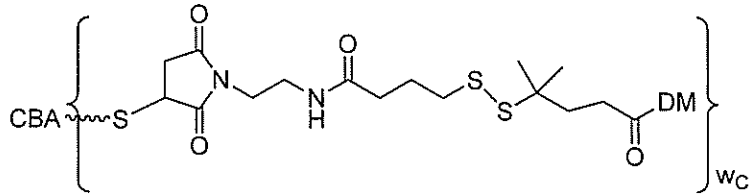
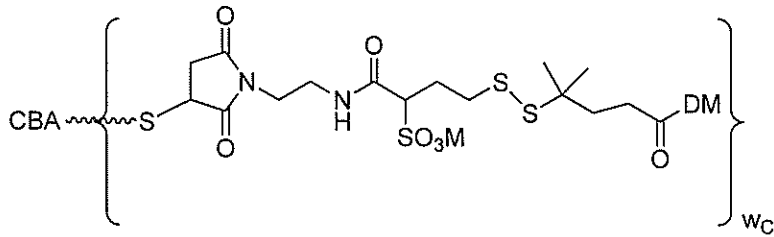
【 0 2 4 1 】

第 2 2 の具体的な実施形態では、第 2 の実施形態の免疫コンジュゲートは、以下の式

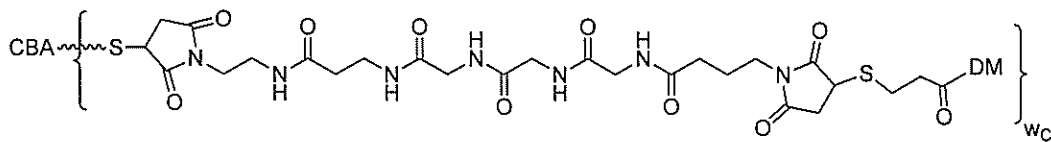
40

50

## 【化 1 3 0】

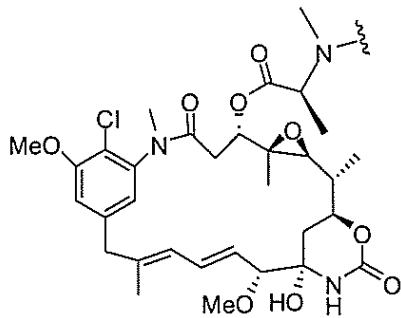


または



によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、ここで、DMは、以下の式

## 【化 1 3 1】



によって表される薬物部分である。

## 【0 2 4 2】

第23の具体的な実施形態では、第2の実施形態のコンジュゲートの場合、Yは、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3Na$ または $-SO_3K$ であり、残りの可変部分は、第2の実施形態の第1～第22の具体的な実施形態のいずれか1つ、またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。一実施形態では、Yは、 $-SO_3Na$ である。

C．例示的なリンカー分子

## 【0 2 4 3】

本発明の免疫コンジュゲートを調製する際に、当該技術分野で既知の任意の適切なリンカーを使用してもよい。特定の実施形態では、リンカーは、二官能リンカーである。本明細書で使用される場合、「二官能リンカー」との用語は、2つの反応性基を有する改変薬剤を指し、反応性基の片方は、細胞結合剤と反応することが可能であり、他方は、細胞毒性化合物と反応し、2つの部分を一緒に連結する。このような二官能クロスリンカーは、当該技術分野でよく知られている（例えば、Isalm and Dent in Bioconjugation chapter 5, p218 - 363, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999を参照）。例えば、チオエーテ

ル結合を介して結合することが可能な二官能架橋剤としては、マレイミド基を導入するための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ための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。細胞結合剤にマレイミド基またはハロセチル基を導入する他の二官能架橋剤は、当該技術分野で十分に知られており (米国特許出願公開第 2008/0050310 号、第 20050169933 号、Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA から入手可能)、限定されないが、ビス - マレイミドポリエチレングリコール (BMPEO)、BM (PEO)<sub>2</sub>、BM (PEO)<sub>3</sub>、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) (SMCC (LC - SMCC) の「長鎖」アナログである)、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 (BMDB)、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)、 - ( - マレイミドカプロイルオキシ) スルホスクシイミドエステル (スルホ - EMCS)、 - ( - 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。

#### 【0244】

ヘテロ二官能架橋剤は、2つの異なる反応性基を有する二官能架橋剤である。アミン反応性 N - ヒドロキシスクシンイミド基 (NHS 基) 及びカルボニル反応性ヒドラジン基を両方とも含有するヘテロ二官能架橋剤を使用し、本明細書に記載の細胞毒性化合物と細胞結合剤 (例えば抗体) とを連結することもできる。このような市販のヘテロ二官能架橋剤の例としては、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塩酸塩 (SHTH) 及びスクシンイミジルヒドラジニウムニコチネート塩酸塩 (SHNH) が挙げられる。酸に不安定な結合を有するコンジュゲートも、本発明のヒドラジンを有するベンゾジアゼピン誘導体を用いて調製することができる。使用可能な二官能架橋剤の例としては、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) が挙げられる。

#### 【0245】

ジスルフィド結合を介して細胞結合剤と細胞毒性化合物との連結を可能にする二官能架橋剤は、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ために 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 - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペンタノエート (SPP)、N - スクシンイミジル - 4

10

20

30

40

50

- (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (SPDB)、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 - SPDB) が挙げられる。ジスルフィド基を導入するために使用可能な他の二官能架橋剤は、当該技術分野で知られており、米国特許第 6, 913, 748 号、第 6, 716, 821 号及び米国特許出願公開第 20090274713 号及び第 20100129314 号 (全て本明細書に参考として組み込まれる) に開示されている。または、架橋剤、例えば、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を使用することもできる。

特定の実施形態では、二官能リンカーは、以下に記載する式 (a1L) ~ (a10L) のいずれか 1 つによって表される。

10

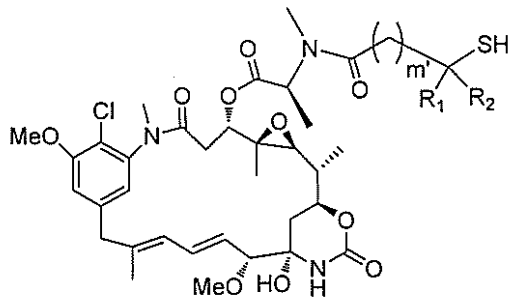
D. 例示的な医薬薬剤

1. メイタンシノイド

【0246】

特定の実施形態では、医薬薬剤は、メイタンシノイド化合物であり、例えば、その全体が本明細書に参考として組み込まれる米国特許第 5, 208, 020 号及び第 7, 276, 497 号に記載されるものである。特定の実施形態では、メイタンシノイド化合物は、以下の式によって表され、

【化132】



20

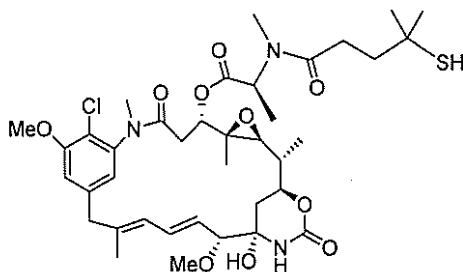
ここで、可変部分は、上の第 1 の実施形態の第 13 ~ 17 の具体的な実施形態のいずれか 1 つまたはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

30

【0247】

より具体的な実施形態では、メイタンシノイド化合物は、DM4 である。

【化133】



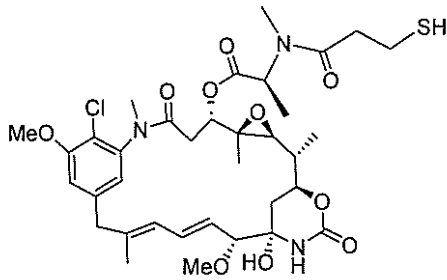
40

【0248】

別の実施形態では、メイタンシノイド化合物は、DM1 である。

50

## 【化 1 3 4】



10

## 2. ベンゾジアゼピン

## 【0 2 4 9】

特定の実施形態では、医薬薬剤は、ベンゾジアゼピン化合物、例えば、ピロロベンゾジアゼピン (PBD) (例えば、WO 2010/043880号、WO 2011/130616号、WO 2009/016516号、WO 2013/177481号及びWO 2012/112708号に記載されるもの) 及びインドリノベンゾジアゼピン (IGN) 化合物 (例えば、WO 2010/091150号及びWO 2012/128868号及び2016年6月28日に出願された米国出願第15/195,269号、表題「CONJUGATES OF CYSTEINE ENGINEERED ANTIBODIES」に記載されるものである。これらの特許、特許公開及び出願の全ての全教示は、その全体が本明細書に参考として組み込まれる。

20

## 【0 2 5 0】

本明細書で使用される場合、「ベンゾジアゼピン」化合物は、ベンゾジアゼピンコア構造を有する化合物である。ベンゾジアゼピンコアは、置換されていてもよく、または置換されていなくてもよく、及び/または1つ以上の環置換基と縮合していてもよい。これには、リンカーによって結合する2個のベンゾジアゼピンコアを有する化合物も含まれる。ベンゾジアゼピンコアの一部としてのイミン官能性 ( $-C=N-$ ) は、還元されてもよい。

## 【0 2 5 1】

本明細書で使用される場合、「ピロロベンゾジアゼピン」(PBD) 化合物は、ピロロベンゾジアゼピンコア構造を有する化合物である。ピロロベンゾジアゼピンは、置換されていてもよく、または置換されていなくてもよい。これには、リンカーによって結合する2個のピロロベンゾジアゼピンコアを有する化合物も含まれる。インドリノベンゾジアゼピンコアの一部としてのイミン官能性 ( $-C=N-$ ) は、還元されてもよい。

30

## 【0 2 5 2】

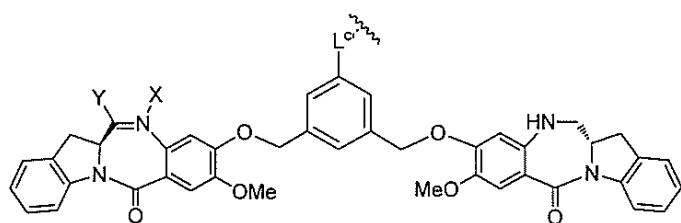
特定の実施形態では、医薬薬剤は、以下の式

40

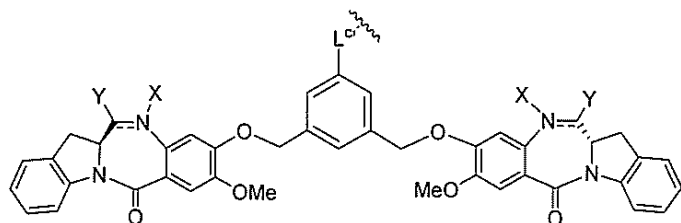
50



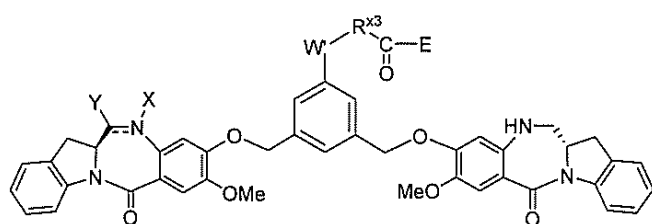
【化 1 3 5】



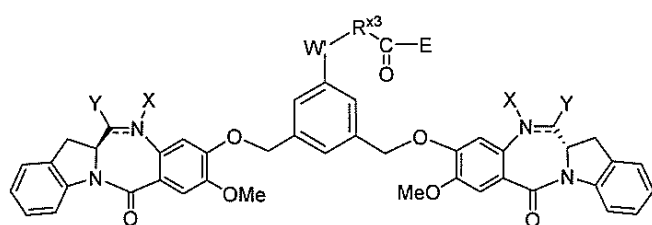
(L 1 a'),



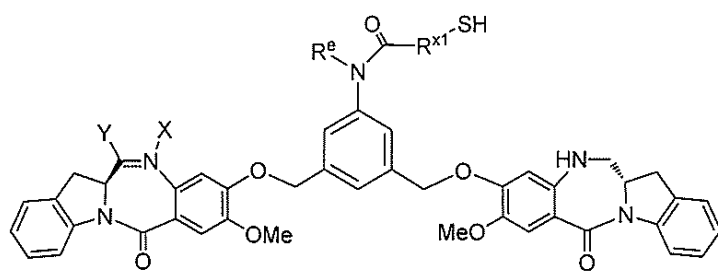
(L 1 a' 1),



(L 1 b'),



(L 1 b' 1),



(L 2 a')

10

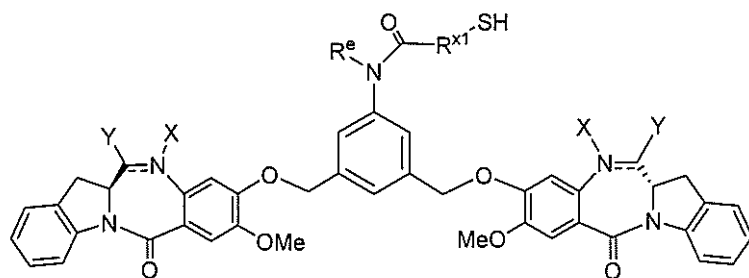
20

30

40

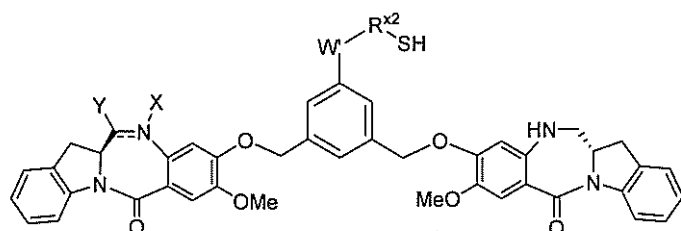
50

## 【化 1 3 6】



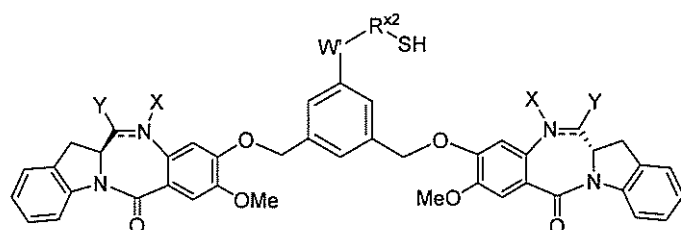
(L 2 a' 1)、

10



(L 2 b') ; または

20



(L 2 b' 1)

によって表されるインドリノベンゾジアゼピン化合物であるか、またはその医薬的に許容される塩であり、ここで、

$L^c$  は、以下の式

30

-  $NR_5$  - P - C(=O) - (CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub> - C(=O)E (B 1) ; または

-  $NR_5$  - P - C(=O) - (CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub> - S - Z<sup>s</sup> (B 2)

によって表され、

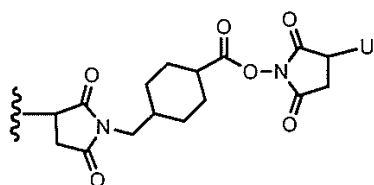
C(=O)E は、反応性エステル基、例えば、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、N - ヒドロキシルホスクシンイミドエステル、ニトロフェニル (例えば、2 または 4 - ニトロフェニル) エステル、ジニトロフェニル (例えば、2, 4 - ジニトロフェニル) エステル、スルホ - テトラフルオロフェニル (例えば、4 - スルホ - 2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル) エステル、またはペンタフルオロフェニルエステル、好ましくは N - ヒドロキシスクシンイミドエステルであり ;

Z<sup>s</sup> は、以下の式

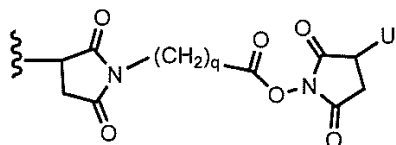
40

50

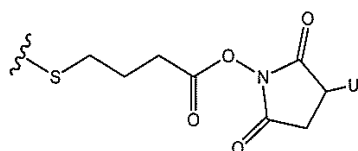
## 【化 1 3 7】



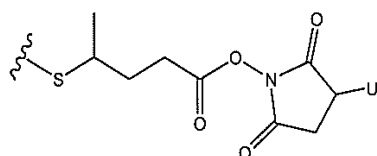
( a 1 )



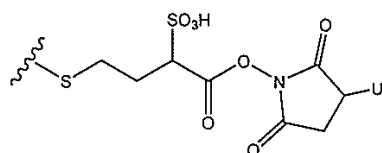
( a 2 )



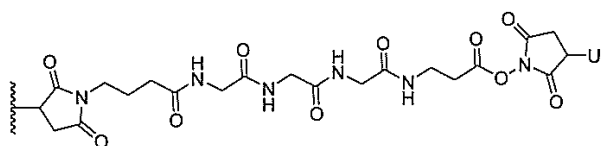
( a 3 )



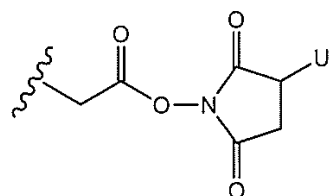
( a 4 )



( a 5 )



( a 6 )



( a 7 )

10

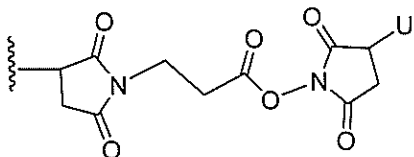
20

30

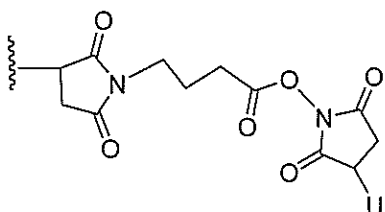
40

50

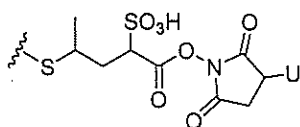
【化 1 3 8】



( a 8 )



( a 9 )、及び



( a 1 0 )

によって表され、

ここで、

q は、1 ~ 5 の整数であり；

U は、- H または  $\text{SO}_3\text{H}$ 、またはその医薬的に許容される塩であり、残りの可変部分は、第 1 の実施形態の第 1 ~ 1 2 及び第 1 7 の具体的な実施形態のいずれか 1 つまたはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

【 0 2 5 3】

特定の実施形態では、医薬インドリノベンゾジアゼピン化合物は、以下の式：

10

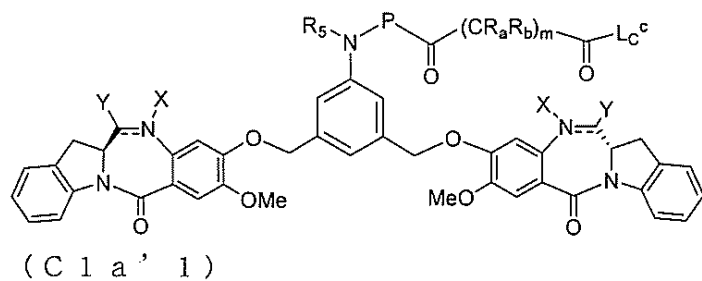
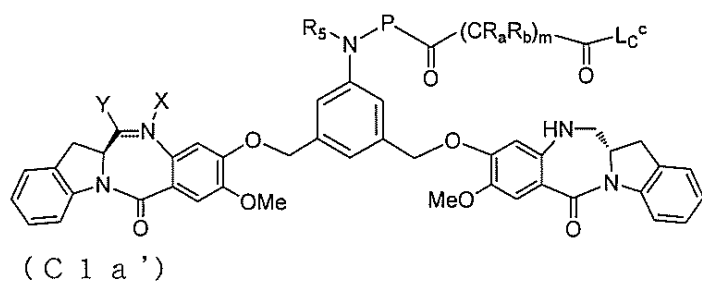
20

30

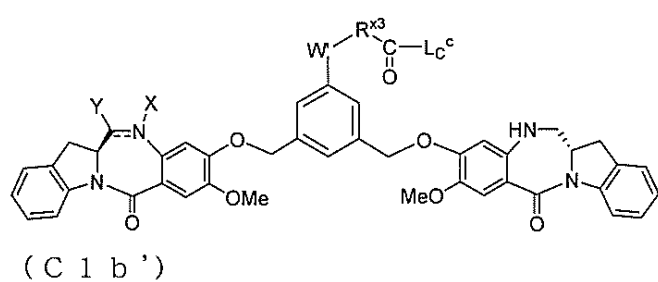
40

50

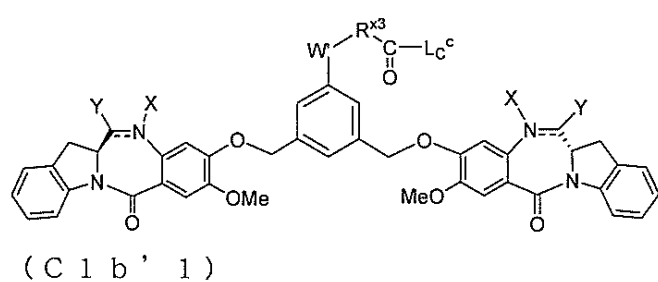
【化 1 3 9】



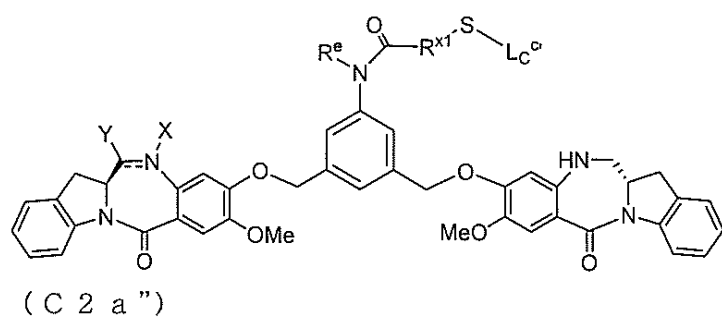
10



20



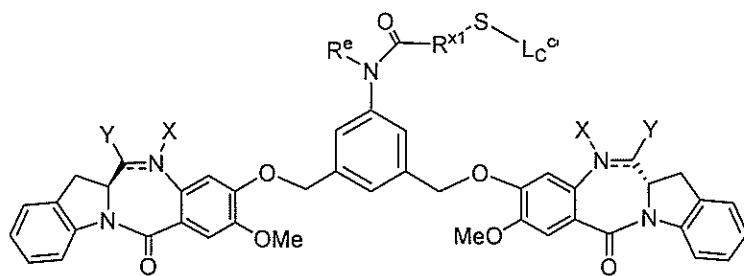
30



40

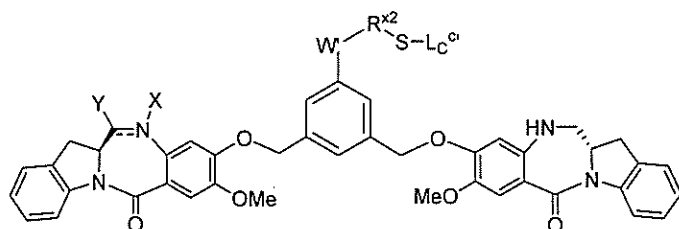
50

【化 1 4 0】

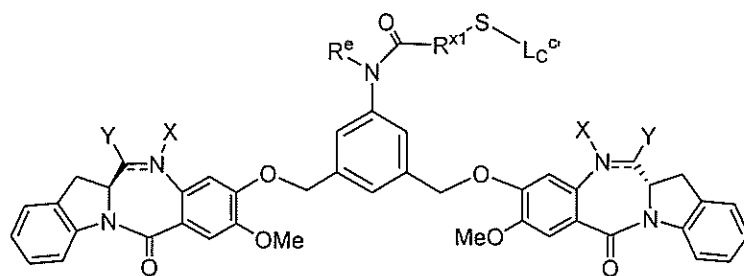


(C 2 a'')

10



(C 2 b''), または



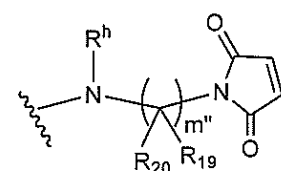
(C 2 b'')

20

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、

式 (C 1 a'), (C 1 a' 1), (C 1 b') 及び (C 1 b' 1) の  $\text{C}$  は、以下の式

30



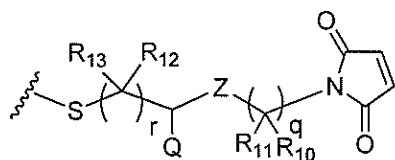
によって表され、可変部分は、第 2 の実施形態の第 1 ~ 9 及び第 2 3 の具体的な実施形態またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりであり、

40

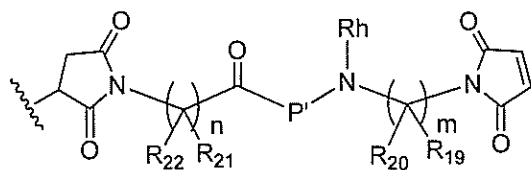
式 (C 2 a''), (C 2 a' 1), (C 2 b'') 及び (C 2 b' 1) の  $\text{C}$  は、以下の式

50

## 【化 1 4 2】



または



10

によって表され、可変部分は、第 2 の実施形態の第 1 0 ~ 1 6 及び第 2 3 の具体的な実施形態またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

## 【 0 2 5 4】

特定の実施形態では、医薬薬剤は、以下の任意のいずれかのインドリノベンゾジアゼピン化合物またはその医薬的に許容される塩である。

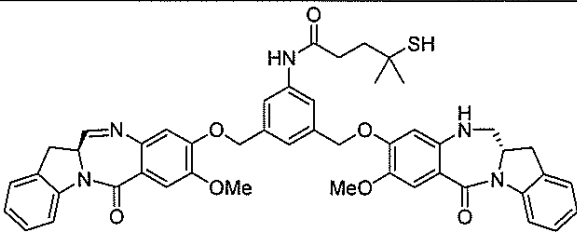
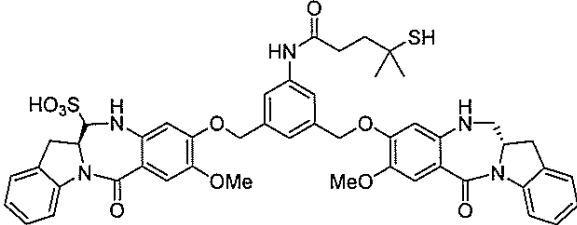
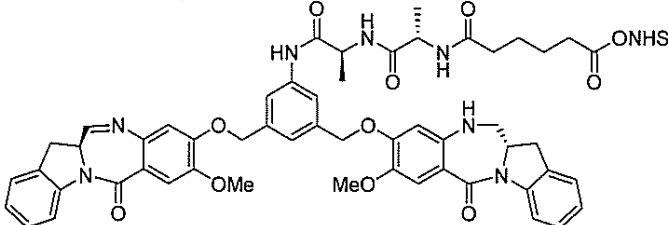
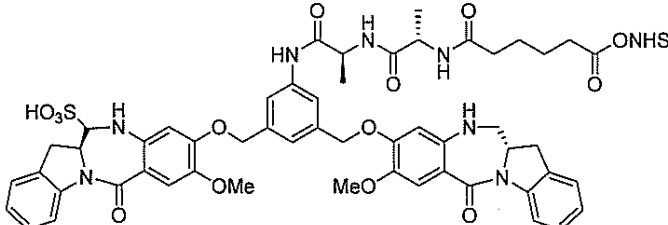
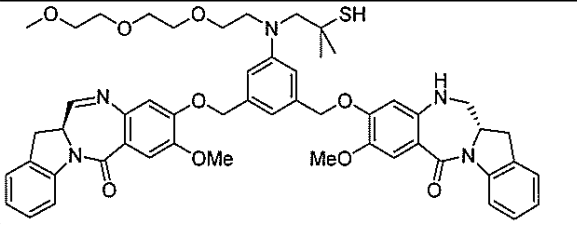
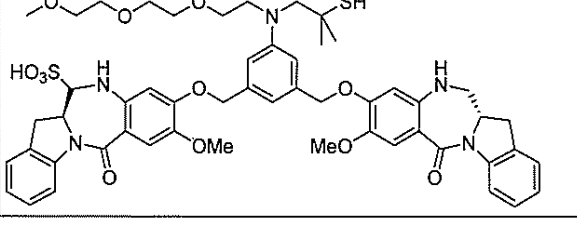
20

30

40

50

【表 6 - 1】

化合物番号	構造
D 1	
s D 1	
D 2	
s D 2	
D G N 4 6 2	
s D G N 4 6 2	

10

20

30

40

50



【表 6 - 2】

D 3	
s D 3	
D 4	
s D 4	
D 5	
s D 5	

10

20

30

40

【表 6 - 3】

D 5 ' ,	
s D 5 ' ,	
D 6	
s D 6	
D 7	
s D 7	

10

20

30

40

【 0 2 5 5 】

上に示す化合物 D 1、s D 1、D 2、s D 2、D G N 4 6 2、s D G N 4 6 2、D 3 及び s D 3 は、米国特許第 9, 3 8 1, 2 5 6 号、第 8, 7 6 5, 7 4 0 号、第 8, 4 2 6, 4 0 2 号及び第 9, 3 5 3, 1 2 7 号、及び米国出願公開第 U S 2 0 1 6 / 0 0 8 2 1 1 4 号（全てが、その全体が本明細書に参考として組み込まれる）に記載される手順に従って調製することができる。

【 0 2 5 6 】

特定の実施形態では、上に示す化合物（例えば、s D 1、s D 2、s D 4、s D G N 4 6 2、s D 3、s D 4、s D 5、s D 5'、s D 6またはs D 7）の医薬的に許容される塩

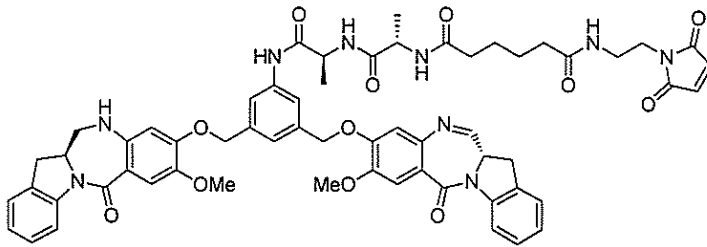
50

は、ナトリウム塩またはカリウム塩である。より具体的には、医薬的に許容される塩は、ナトリウム塩である。

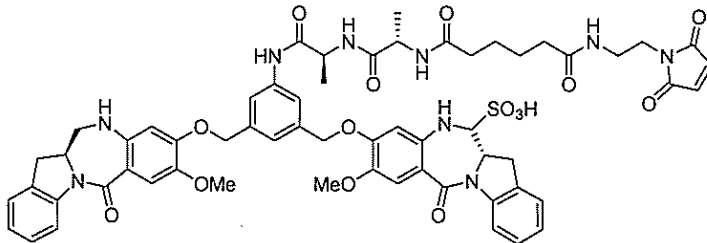
【0257】

具体的な実施形態では、医薬薬剤は、以下の式

【化143】



または

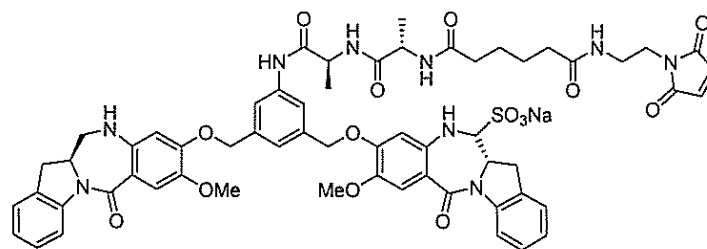


によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩である。具体的な実施形態では、医薬的に許容される塩は、ナトリウム塩またはカリウム塩である。

【0258】

別の具体的な実施形態では、医薬薬剤は、以下の式

【化144】



によって表される。

IV. 製造方法

【0259】

本発明の抗ADAM9抗体及びそのADAM9結合フラグメントは、最も好ましくは、当該技術分野でよく知られているように、このようなポリペプチドをコードする核酸分子の組換え発現によって作られる。

【0260】

本発明のポリペプチドは、固相ペプチド合成を用いて簡便に調製されてもよい(Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis" Science 232(4748): 341-347; Houghten, R. A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Aci

10

20

30

40

50

ds」 Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 82 (15) : 5131 - 5135 ; Ganesan, A. (2006) 「Solid - Phase Synthesis In The Twenty - First Century」 Mini Rev. Med. Chem. 6 (1) : 3 - 10)。

【0261】

代替例では、抗体は、組換えによって作られ、当該技術分野で既知の任意の方法を用いて発現されてもよい。抗体は、まず、宿主動物から作られた抗体を単離し、遺伝子配列を得て、この遺伝子配列を使用し、宿主細胞（例えば、CHO細胞）において抗体を組換えによって発現させることによって、組換えによって作られてもよい。使用可能な別の方法は、植物（例えばタバコ）またはトランスジェニック乳において抗体配列を発現させることである。植物または乳において組換えによって抗体を発現させるのに適した方法が開示されている（例えば、Peeters et al. (2001) 「Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants」, Vaccine 19:2756 ; Lonberg, N. et al. (1995) 「Human Antibodies From Transgenic Mice」, Int. Rev. Immunol 13:65 - 93 ; 及び Pollock et al. (1999) 「Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies」, J. Immunol Methods 231:147 - 157）。抗体の誘導体（例えば、ヒト化、単鎖など）を製造するのに適した方法は、当該技術分野で知られており、上に記載している。別の代替例では、抗体は、ファージディスプレイ技術によって、組換えにより作られてもよい（例えば、米国特許第5,565,332号、第5,580,717号、第5,733,743号、第6,265,150号及びWinter, G. et al. (1994) 「Making Antibodies By Phage Display Technology」, Annu. Rev. Immunol. 12. 433 - 455を参照）。

【0262】

目的のポリヌクレオチド（例えば、本発明の抗ADAM9抗体及びそのADAM9結合フラグメントのポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド）を含むベクターは、電気穿孔、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE - デキストランまたは他の物質を使用するトランスフェクション、微粒子銃、リポフェクション及び感染（例えば、ベクターが、ワクシニアウイルスなどの感染薬剤である場合）を含む任意の多くの適切な手段によって宿主細胞に導入されてもよい。導入ベクターまたはポリヌクレオチドの選択は、多くは、宿主細胞の特徴に依存して変わるだろう。

【0263】

目的のポリペプチドまたはタンパク質を発現させるために、異種DNAを過剰発現することが可能な任意の宿主細胞を使用してもよい。適切な哺乳動物宿主細胞の非限定的な例としては、限定されないが、COS、HeLa及びCHO細胞が挙げられる。

【0264】

本発明は、本発明の抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントのアミノ酸配列を含む免疫コンジュゲートを含む。本発明のポリペプチドは、当該技術分野で既知の手順によって製造することができる。ポリペプチドは、抗体のタンパク質分解または他の分解によって、上述の組換え方法（すなわち、1本のポリペプチドまたは融合ポリペプチド）によって、または化学合成によって作られてもよい。抗体のポリペプチド、特に、約50アミノ酸までの短いポリペプチドは、化学合成によって簡便に作られる。化学合成の方法は、当該技術分野で既知であり、市販されている。

【0265】

本発明は、分子の特性に顕著な影響を与えない、機能的に等価なポリペプチド、及び活性が向上しているか、または減少している変異体を含め、抗ADAM9抗体の変異体及びそのフラグメントを含む、免疫コンジュゲートを含む。ポリペプチドの改変は、当該技術

10

20

30

40

50

分野で通常の実施であり、本明細書で詳細に記載する必要はない。改変ポリペプチドの例としては、アミノ酸残基の保存的置換、機能活性または化学アナログの使用に顕著な悪影響を与えないアミノ酸の1つ以上の欠失または付加を有するポリペプチドが挙げられる。互いに保存的に置換され得る、互いに保存的に置換が可能なアミノ酸残基としては、限定されないが、グリシン/アラニン；セリン/トレオニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グルタミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；リシン/アルギニン；及びフェニルアラニン/チロシンが挙げられる。これらのポリペプチドは、グリコシル化ポリペプチド及び非グリコシル化ポリペプチド、及び例えば、異なる糖を用いたグリコシル化、アセチル化及びリン酸化などの他の翻訳後改変を有するポリペプチドも含む。

好ましくは、アミノ酸置換は、保存的であろう（すなわち、置換アミノ酸が、元々のアミノ酸と同様の化学特性を有している）。このような保存的置換は、当該技術分野で知られており、例を上記に提示している。アミノ酸改変は、領域（例えば可変ドメイン）の完全な再設計のために、1つ以上のアミノ酸を交換するか、または改変するものまでの範囲であってもよい。可変ドメインを交換すると、結合アフィニティ及び/または特異性が変化する可能性がある。他の改変方法は、当該技術分野で既知のカップリング技術、限定されないが、酵素手段、酸化置換及びキレート化を含む技術を用いることを含む。例えば、イムノアッセイのための標識の接続、例えば、ラジオイムノアッセイのための放射性部分の接続に、改変を使用してもよい。改変ポリペプチドは、当該技術分野で確立された手順を用いて作られ、当該技術分野で既知の標準的なアッセイを用いてスクリーニングすることができる。

#### 【0266】

本発明は、本発明の抗ADAM9-VL及び/またはVHのうち1つ以上を含む融合タンパク質を含む免疫コンジュゲートを包含する。一実施形態では、軽鎖、または重鎖または軽鎖と重鎖を含む融合ポリペプチドが提供される。別の実施形態では、融合ポリペプチドは、異種免疫グロブリン定常領域を含む。別の実施形態では、融合ポリペプチドは、公的に寄託されたハイブリドーマから製造した抗体の軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインを含む。本発明の目的のために、抗体融合タンパク質は、ADAM9に特異的に結合する1つ以上のポリペプチドドメインと、天然の分子では接続されていない別のアミノ酸配列、例えば、異種配列または別の領域由来の同種配列とを含む。

#### V. 薬物の結合

#### 【0267】

上の第1の実施形態またはそこに記載される具体的な実施形態に記載されるように、抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメント上に位置する1つ以上のリシン残基の - アミノ基を介して医薬薬剤に共有結合した抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントを含む免疫コンジュゲートは、当該技術分野で既知の任意の方法に従って、例えば、本明細書に参考として組み込まれる第WO2012/128868号及び第WO2012/112687号に従って調製することができる。

#### 【0268】

特定の実施形態では、第1の実施形態の免疫コンジュゲートは、CBAと、アミン反応性基を有する細胞毒性薬とを反応させる工程を含む第1の方法によって調製することができる。

#### 【0269】

一実施形態では、上に記載の第1の方法について、この反応は、イミン反応性試薬、例えばNaHSO<sub>3</sub>存在下で行われる。

#### 【0270】

一実施形態では、上に記載の第1の方法について、イミン反応性基を有する細胞毒性薬は、以下の式

10

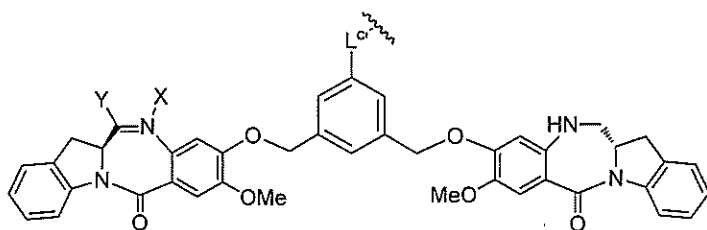
20

30

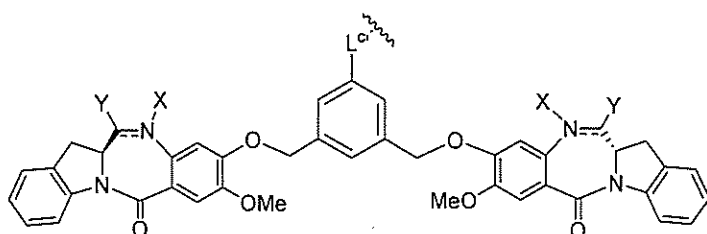
40

50

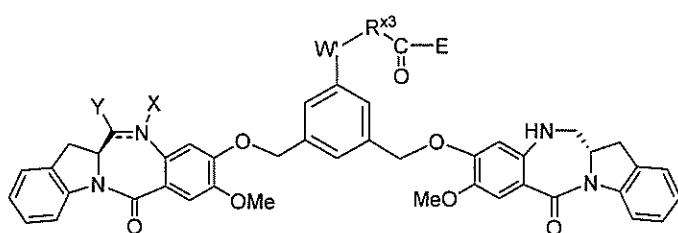
## 【化 1 4 5】



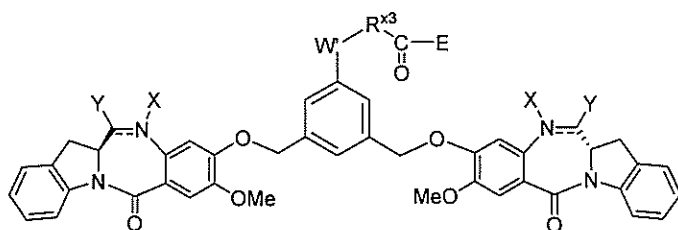
(L 1 a'),



(L 1 a' 1),



(L 1 b'), または



(L 1 b' 1)

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、可変部分の定義は、式 (L 1 a'), (L 1 a' 1)、(L 1 b') 及び (L 1 b' 1) について上に記載している。

## 【0 2 7 1】

特定の実施形態では、第 1 の実施形態の免疫コンジュゲートは、

(a) 細胞毒性薬と、アミン反応性基及びチオール反応性基を有するリンカー化合物とを反応させ、アミン反応性基が結合した細胞毒性薬 - リンカー化合物を形成する工程と、

(b) C B A と、細胞毒性薬 - リンカー化合物とを反応させる工程とを含む、第 2 の方法によって調製することができる。

## 【0 2 7 2】

一実施形態では、上に記載の第 2 の方法について、工程 (a) の反応は、イミン反応性試薬 (例えば  $\text{NaHSO}_3$ ) 存在下で行われる。

## 【0 2 7 3】

一実施形態では、上に記載の第 2 の方法について、細胞毒性薬 - リンカー化合物は、精製することなく C B A と反応する。または、細胞毒性薬 - リンカー化合物は、C B A と反応する前に、まず精製される。

## 【 0 2 7 4 】

特定の実施形態では、第 1 の実施形態の免疫コンジュゲートは、

( a ) C B A と、アミン反応性基及びチオール反応性基を有するリンカー化合物とを反応させ、チオール反応性基が結合した改変 C B A を形成する工程と、

( b ) 改変 C B A と、細胞毒性薬とを反応させる工程とを含む、第 3 の方法によって調製することができる。

## 【 0 2 7 5 】

一実施形態では、上に記載の第 3 の方法について、工程 ( b ) の反応は、イミン反応性試薬 ( 例えば N a H S O <sub>3</sub> ) 存在下で行われる。

## 【 0 2 7 6 】

特定の実施形態では、第 1 の実施形態の免疫コンジュゲートは、C B A と、細胞毒性化合物と、アミン反応性基及びチオール反応性基を有するリンカー化合物とを反応させる工程を含む第 4 の方法によって調製することができる。

## 【 0 2 7 7 】

一実施形態では、第 4 の方法について、この反応は、イミン反応性試薬、例えば N a H S O <sub>3</sub> 存在下で行われる。

## 【 0 2 7 8 】

特定の実施形態では、上に記載した第 2 、第 3 または第 4 の方法について、アミン反応性基及びチオール反応性基を有するリンカー化合物は、以下の式

10

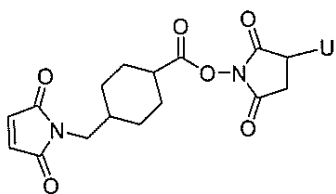
20

30

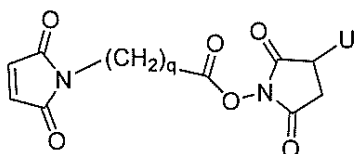
40

50

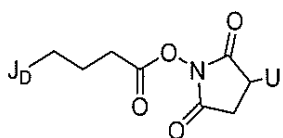
## 【化 1 4 6】



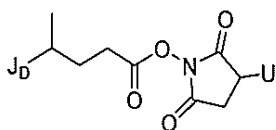
( a 1 L )



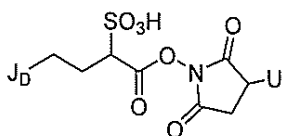
( a 2 L )



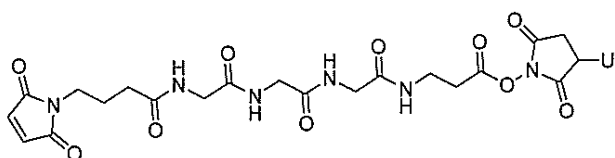
( a 3 L )



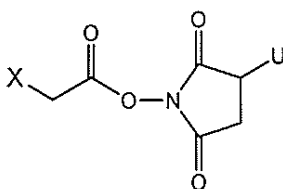
( a 4 L )



( a 5 L )



( a 6 L )



( a 7 L )

10

20

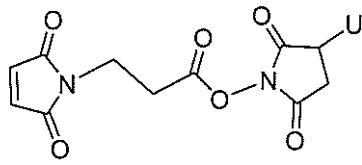
30

40

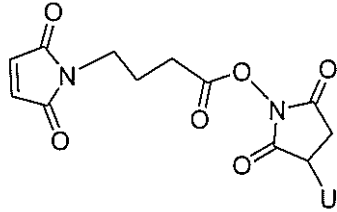
50



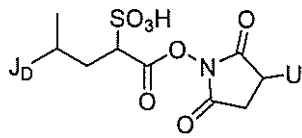
## 【化 1 4 7】



( a 8 L )



( a 9 L )、及び



( a 1 0 L )

によって表され、

ここで、Xはハロゲン；J<sub>D</sub>-SH、-SSR<sup>d</sup>、または-SC(=O)R<sup>g</sup>であり；R<sup>d</sup>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<sup>g</sup>は、アルキルであり；残りの可変部分は、式(a 1)～(a 10)について上に記載したとおりであり、細胞毒性薬は、以下の式

10

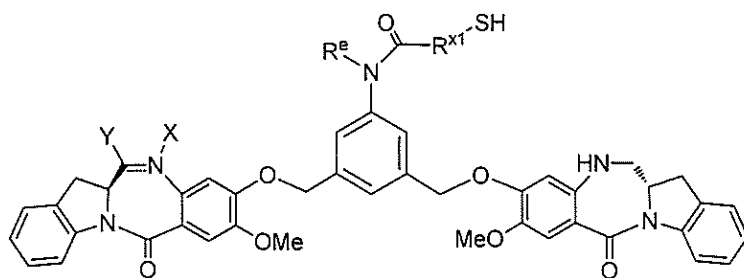
20

30

40

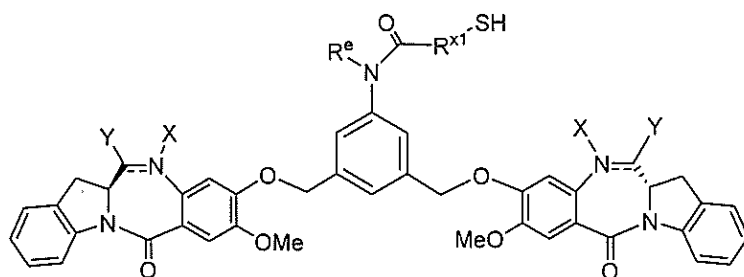
50

## 【化 1 4 8】



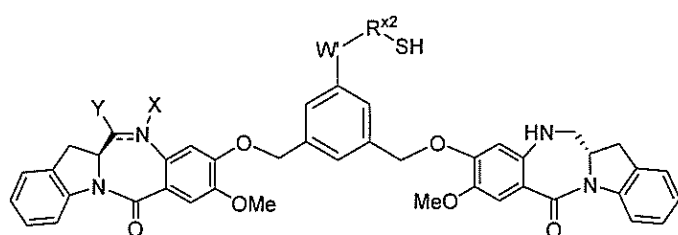
(L 2 a')

10

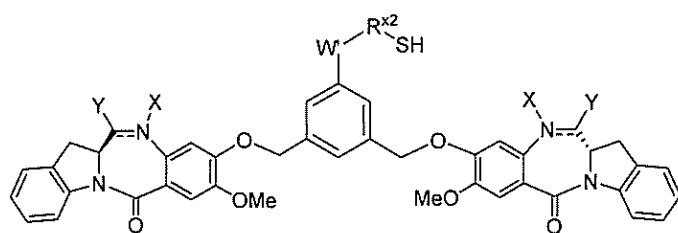


(L 2 a' 1)

20



(L 2 b'), または



(L 2 b' 1)

30

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、可変部分は、式 (L 1 a'), (L 1 a' 1), (L 1 b'), (L 1 b' 1), (L 2 a'), (L 2 a' 1), (L 2 b') 及び (L 2 b' 1) について上に記載したとおりである。

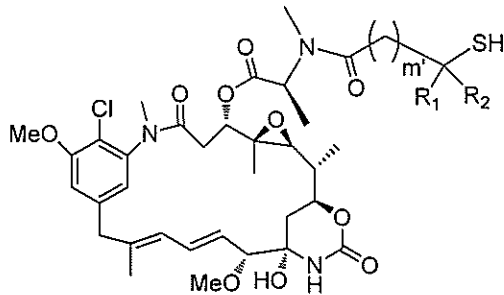
## 【0 2 7 9】

40

特定の実施形態では、上に記載した第 2、第 3 または第 4 の方法について、アミン反応性基及びチオール反応性基を有するリンカー化合物は、式 (a 1 L) ~ (a 1 O L) によって表され、細胞毒性薬は、以下の式

50

## 【化 1 4 9】



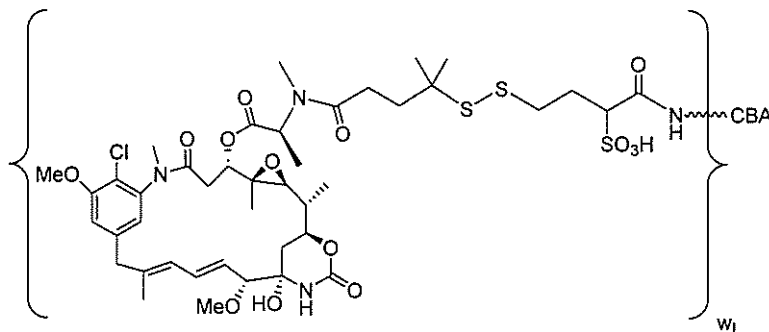
10

によって表され、ここで、可変部分は、上述の第 1 の実施形態の第 1 3 ~ 第 1 7 の具体的な実施形態のいずれか 1 つ、またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

## 【 0 2 8 0】

具体的な実施形態では、上に記載した第 2、第 3 または第 4 の方法について、リンカーは、スルホ - S P D B であり、細胞毒性薬は、DM 4 であり、免疫コンジュゲートは、以下の式

## 【化 1 5 0】



20

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、 $w_L$  は、1 ~ 10 の整数である。

## 【 0 2 8 1】

上の第 2 の実施形態に記載されるように、抗 ADAM 9 抗体またはその ADAM 9 結合フラグメント上に位置する 1 つ以上のシステイン残基のチオール (-SH) 基を介して細胞毒性薬に共有結合した抗 ADAM 9 抗体またはその ADAM 9 結合フラグメントを含む免疫コンジュゲート (例えば、第 1 ~ 第 2 3 の具体的な実施形態のいずれか 1 つ、またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態の免疫コンジュゲート) は、1 つ以上の遊離システインを有する CBA と、本明細書に記載のチオール反応性基を有する細胞毒性薬とを反応させることによって調製することができる。

30

40

## 【 0 2 8 2】

好ましい実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、このような化合物 (例えば、配列番号 7 9 及び 8 0) に対する医薬薬剤の結合を可能にするように、さらなるシステイン残基を含む変異体 IgG Fc 領域を含む。

## 【 0 2 8 3】

一実施形態では、チオール反応性基を有する細胞毒性薬は、以下の式：

50

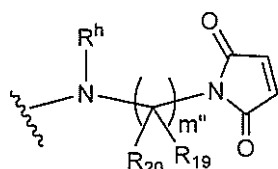
(C1a')

(C1a', 1)

(C1b'), または

(C1b', 1)

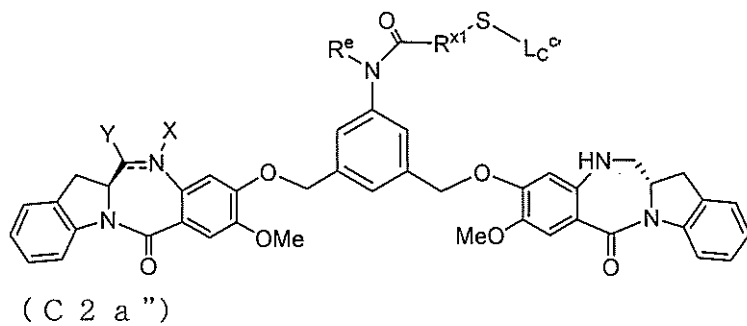
【化 1 5 2】



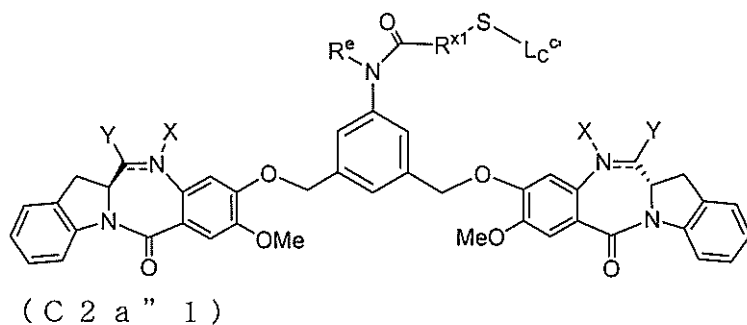
【 0 2 8 4 】

別の実施形態では、チオール反応性基を有する細胞毒性薬は、以下の式：

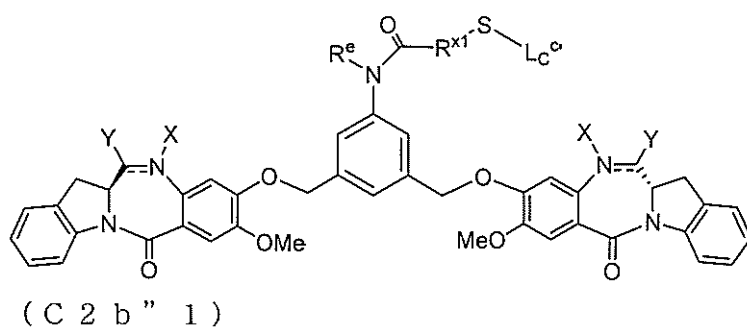
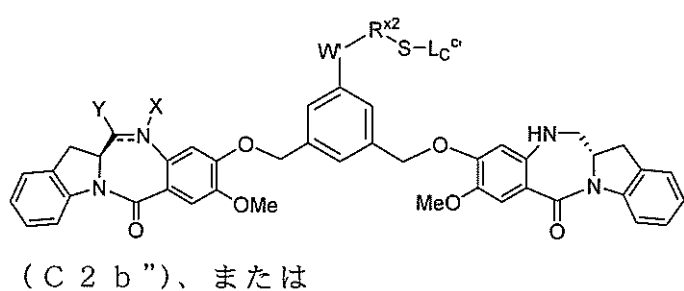
【化 1 5 3】



10



20



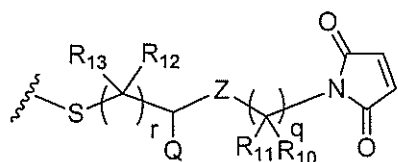
30

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、ここで、 $Lc^c$  は、以下の式

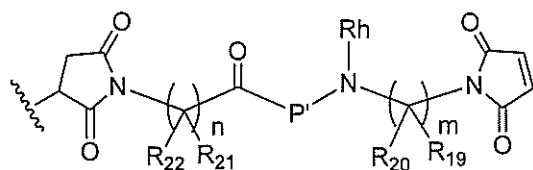
40

50

【化 1 5 4】



または



10

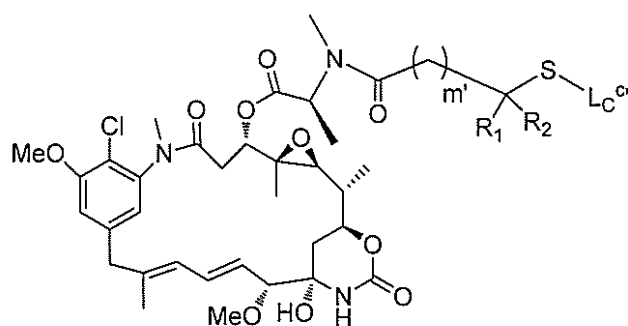
によって表され、可変部分は、第 2 の実施形態の第 1 0 ~ 1 6 及び第 2 3 の具体的な実施形態のいずれか 1 つ、またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

【 0 2 8 5】

さらに別の実施形態では、チオール反応性基を有する細胞毒性薬は、以下の式：

【化 1 5 5】

20



( C 3 a ' )

30

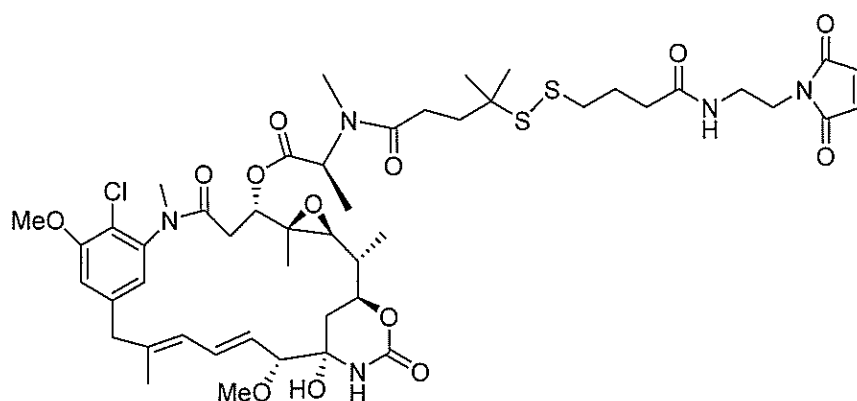
によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、ここで、 $L_c$  は、上に記載されており、可変部分は、第 2 の実施形態の第 1 7 ~ 第 2 3 の具体的な実施形態のいずれか 1 つ、またはそこに記載される任意のより具体的な実施形態において上に記載したとおりである。

【 0 2 8 6】

具体的な実施形態では、チオール反応性基を有する細胞毒性薬は、以下の式：

【化 1 5 6】

40



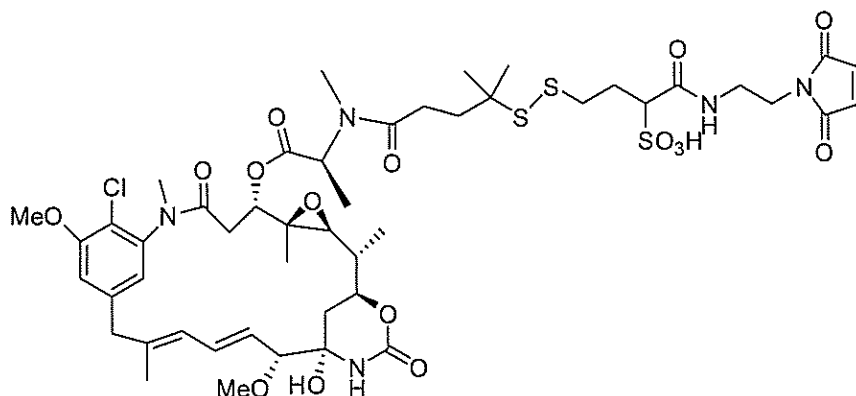
50

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩である。

【 0 2 8 7 】

別の具体的な実施形態では、チオール反応性基を有する細胞毒性薬は、以下の式：

【 化 1 5 7 】



10

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩である。

【 0 2 8 8 】

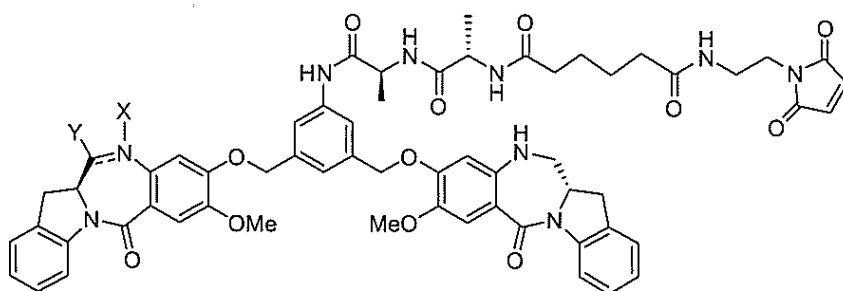
特定の実施形態では、CBAと細胞毒性薬との反応に有機溶媒が使用され、細胞毒性薬を溶解する。例示的な有機溶媒としては、限定されないが、ジメチルアセトアミド (DMA) 、プロピレングリコールなどが挙げられる。一実施形態では、CBAと細胞毒性薬との反応は、DMA及びプロピレングリコール存在下で行われる。

20

【 0 2 8 9 】

具体的な実施形態では、以下の式

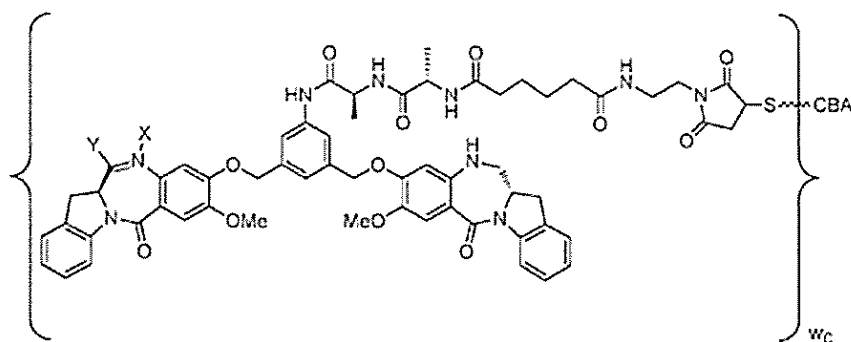
【 化 1 5 8 】



30

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩である細胞毒性薬は、CBA (例えば、抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメント) と反応し、以下の式

【 化 1 5 9 】



40

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩である免疫コンジュゲートを形

50

成し、

ここで、NとCとの間の

二重線

【化 1 6 0】

==

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは - Hであり；単結合である場合には、Xは、 - Hであり、Yは、 - S O<sub>3</sub> Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり、W<sub>C</sub>は、1または2である。より具体的な実施形態では、NとCとの間の二重線

10

【化 1 6 1】

==

は、二重結合を表し、

Xは存在せず、Yは - Hである。別のより具体的な実施形態では、NとCとの間の二重線

【化 1 6 2】

==

20

が単結合を表し、Xは - Hであり、Yは - S O<sub>3</sub> Hであるか、またはその医薬的に許容される塩である。更により具体的には、医薬的に許容される塩は、ナトリウム塩またはカリウム塩である。

【0 2 9 0】

特定の実施形態では、Yが - S O<sub>3</sub> Hまたはその医薬的に許容される塩である場合、免疫コンジュゲートは、

( a ) 上述のチオール反応性基を有するイミン含有細胞毒性薬のイミン部分（すなわち、式 ( C 1 a ' )、( C 1 a ' 1 )、( C 1 b ' )、( C 1 b ' 1 )、( C 2 a '' )、( C 2 a '' 1 )、( C 2 b '' )または( C 2 b '' 1 )、ここで、NとCとの間の二重線

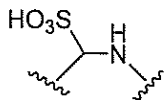
30

【化 1 6 3】

==

は、二重結合を表し、Xは存在せず、Yは - Hである ) と、p Hが1 . 9 ~ 5 . 0 の水溶液中、二酸化硫黄、亜硫酸水素塩またはピロ亜硫酸塩と反応させ、以下の式

【化 1 6 4】



40

によって表される改変イミン部分、またはその医薬的に許容される塩を含む改変細胞毒性薬を形成し、

( b ) 改変細胞毒性薬と、本明細書に記載の抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントとを反応させ、免疫コンジュゲートを形成することによって調製することができる。

【0 2 9 1】

第 1 の態様では、上述の方法について、工程 ( a ) の反応は、p Hが1 . 9 ~ 5 . 0 で行われる。より具体的には、p Hは、2 . 5 ~ 4 . 9、1 . 9 ~ 4 . 8、2 . 0 ~ 4 . 8

50



、2.5～4.5、2.9～4.5、2.9～4.0、2.9～3.7、3.1～3.5、または3.2～3.4である。別の具体的な実施形態では、工程(a)の反応は、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9または5.0のpHで行われる。更に別の具体的な実施形態では、工程(a)の反応は、pH3.3で行われる。

#### 【0292】

本明細書で使用される場合、具体的なpH値は、その具体的な値 $\pm 0.05$ を意味する。

#### 【0293】

いくつかの実施形態では、工程(a)の反応は、バッファー溶液存在下で行われる。当該技術分野で既知の任意の適切なバッファー溶液を、本発明の方法で使用することができる。適切なバッファー溶液としては、例えば、限定されないが、クエン酸バッファー、酢酸バッファー、コハク酸バッファー、リン酸バッファー、グリシン含有バッファー（例えば、グリシン-HClバッファー）、フタル酸バッファー（例えば、フタル酸水素ナトリウムまたはフタル酸水素カリウムを含むバッファー溶液、及びこれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態では、バッファー溶液は、コハク酸バッファーである。いくつかの実施形態では、バッファー溶液は、リン酸バッファーである。いくつかの実施形態では、バッファーは、クエン酸-リン酸バッファーである。いくつかの実施形態では、バッファーは、クエン酸と $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ とを含むクエン酸-リン酸バッファーである。他の実施形態では、バッファーは、クエン酸と $\text{K}_2\text{HPO}_4$ とを含むクエン酸-リン酸バッファーである。いくつかの実施形態では、上述のバッファー溶液の濃度は、10～250 mM、10～200 mM、10～150 mM、10～100 mM、25～100 mM、25～75 mM、10～50 mM、または20～50 mMの範囲であってもよい。

#### 【0294】

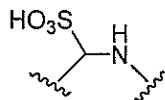
第2の態様では、反応工程(a)は、バッファー溶液（例えば、第1の態様で記載したバッファー）非存在下で行われる。いくつかの実施形態では、本方法は、(a)上述のチオール反応性基を有するイミン含有細胞毒性薬のイミン部分（すなわち、式(C1a')、(C1a'1)、(C1b')、(C1b'1)、(C2a'')、(C2a''1)、(C2b'')または(C2b''1)、ここで、NとCとの間の二重線

#### 【化165】



は、二重結合を表し、Xは存在せず、Yは-Hである）と、水溶液中、二酸化硫黄、亜硫酸水素塩またはピロ亜硫酸塩と反応させ、以下の式

#### 【化166】



によって表される改変イミン部分、またはその医薬的に許容される塩を含む改変細胞毒性薬を形成し、前記水溶液がバッファーを含まない工程と、(b)改変細胞毒性薬と、本明細書に記載の抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントとを反応させ、免疫コンジュゲートを形成することによって調製する工程とを含む。いくつかの実施形態では、工程(a)の反応は、有機溶媒と水の混合物中で行われる。より具体的には、工程(a)の反応は、ジメチルアセトアミド(DMA)と水の混合物中で行われる。いくつかの実施形態では、DMAと水の混合物は、60体積%未満のDMAを含む。更により具体的には、DMAと水の体積比は、1:1である。

## 【 0 2 9 5 】

第3の態様では、上述の方法または第1または第2の態様について、工程(a)の反応において、1当量のイミン含有細胞毒性薬ごとに、0.5～5.0当量の亜硫酸水素塩または0.25または2.5当量のピロ亜硫酸塩を使用する。いくつかの実施形態では、0.5～4.5、0.5～4.0、0.5～3.5、0.5～4.0、0.5～3.5、0.5～3.0、0.5～2.5、0.8～2.0、0.9～1.8、1.0～1.7、1.1～1.6、または1.2～1.5当量の亜硫酸水素塩または0.25～2.25、0.25～2.0、0.25～1.75、0.25～2.0、0.25～1.75、0.25～1.5、0.25～1.25、0.4～1.0、0.45～0.9、0.5～0.85、0.55～0.8、または0.6～0.75当量のピロ亜硫酸塩を、1当量のイミン含有細胞毒性薬ごとに使用する。他の実施形態では、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、4.0、4.5または5.0当量の亜硫酸水素塩または0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1.0、1.05、1.1、1.15、1.2、1.25、1.3、1.35、1.4、1.45、1.5、1.55、1.6、1.65、1.7、1.75、2.0、2.25または2.5当量のピロ亜硫酸塩を、1当量のイミン含有細胞毒性薬ごとに使用する。更に他の実施形態では、1.4当量の亜硫酸水素塩または0.7当量のピロ亜硫酸塩を、1当量のイミン含有細胞毒性薬ごとに使用する。他の実施形態では、1.2当量の亜硫酸水素塩または0.6当量のピロ亜硫酸塩を、1当量のイミン含有細胞毒性薬ごとに使用する。

10

20

## 【 0 2 9 6 】

本明細書で使用される場合、具体的な当量は、その具体的な値±0.05を意味する。

## 【 0 2 9 7 】

第4の態様では、上述の方法について、工程(a)の反応は、2.9～3.7のpHで行われ、1.0～1.8当量の亜硫酸水素塩または0.5～0.9当量のピロ亜硫酸塩を、1当量のイミン含有細胞毒性薬と反応させる。いくつかの実施形態では、工程(a)の反応は、3.1～3.5のpHで行われ、1.1～1.6当量の亜硫酸水素塩または0.55～0.8当量のピロ亜硫酸塩を、1当量のイミン含有細胞毒性薬と反応させる。他の実施形態では、工程(a)の反応は、3.2～3.4のpHで行われ、1.3～1.5当量の亜硫酸水素塩または0.65～0.75当量のピロ亜硫酸塩を、1当量のイミン含有細胞毒性薬と反応させる。他の実施形態では、工程(a)の反応は、3.3のpHで行われ、1.4当量の亜硫酸水素塩または0.7当量のピロ亜硫酸塩を、1当量のイミン含有細胞毒性薬と反応させる。更に他の実施形態では、工程(a)の反応は、3.3のpHで行われ、1.4当量の亜硫酸水素ナトリウムを、1当量のイミン含有細胞毒性薬と反応させる。

30

## 【 0 2 9 8 】

第5の態様では、上述の方法について、または第1、第2、第3または第4の態様において、工程(a)の反応は、有機溶媒と水の混合物中で行われる。任意の適切な有機溶媒が使用可能である。例示的な有機溶媒としては、限定されないが、アルコール（例えば、メタノール、エタノール、プロパノールなど）、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、アセトニトリル、アセトン、塩化メチレンなどが挙げられる。いくつかの実施形態では、有機溶媒は、水と混和性である。他の実施形態では、有機溶媒は、水と混和性ではなく、すなわち、工程(a)の反応は、二相溶液中で行われる。いくつかの実施形態では、有機溶媒は、ジメチルアセトアミド（DMA）である。有機溶媒（例えば、DMA）は、水と有機溶媒の合計体積の1体積%～99体積%、1～95体積%、10～80体積%、20～70体積%、30～70体積%、1～60体積%、5～60体積%、10～60体積%、20～60体積%、30～60体積%、40～60体積%

40

50

積%、45～55体積%、10～50体積%または20～40体積%の量で存在していてもよい。いくつかの実施形態では、工程(a)の反応は、DMAと水の混合物中で行われ、DMAと水の体積比は、1:1である。

#### 【0299】

第6の態様では、上述の方法について、または第1、第2、第3、第4または第5の態様において、工程(a)の反応は、任意の適切な温度で行うことができる。いくつかの実施形態では、反応は、0～50、10～50、10～40、または10～30の温度で行われる。他の実施形態では、反応は、15～30、20～30、15～25、16～24、17～23、18～22または19～21の温度で行われる。更に他の実施形態では、反応は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25で行われてもよい。いくつかの実施形態では、反応は、0～15、0～10、1～10、5～15、または5～10で行われてもよい。

10

#### 【0300】

第7の態様では、上述の方法について、または、第1、第2、第3、第4、第5または第6の態様において、工程(a)の反応は、1分間～48時間、5分間～36時間、10分間～24時間、30分間～24時間、30分間～20時間、1時間～20時間、1時間～15時間、1時間～10時間、2時間～10時間、3時間～9時間、3時間～8時間、4時間～6時間、または1時間～4時間行われる。いくつかの実施形態では、反応は、4～6時間進められる。他の実施形態では、反応は、10分間、15分間、20分間、30分間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間などの時間進められる。他の実施形態では、反応は、4時間進められる。さらに他の実施形態では、反応は、2時間進められる。

20

#### 【0301】

第8の態様では、本明細書に記載の本発明の方法について、または第1、第2、第3、第4、第5、第6または第7の態様において、工程(b)の反応は、pHが4～9で行われる。いくつかの実施形態では、工程(b)の反応は、4.5～8.5、5～8.5、5～8、5～7.5、5～7、5～6.5、または5.5～6.5のpHで行われる。他の実施形態では、工程(b)の反応は、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9または8.0のpHで行われる。

30

#### 【0302】

いくつかの実施形態では、上述の方法について、または第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7または第8の態様において、工程(b)の反応は、水と有機溶媒の混合物を含む水溶液中で行われる。上述の任意の適切な有機溶媒が使用可能である。より具体的には、有機溶媒は、DMAである。いくつかの実施形態では、水溶液は、水と有機溶媒の合計体積の50体積%未満、40体積%未満、30体積%未満、25体積%未満、20体積%未満、15体積%未満、10体積%未満、5体積%未満、3体積%未満、2体積%未満、または1体積%未満の有機溶媒(例えば、DMA)を含む。

40

#### 【0303】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法について、または第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7または第8の態様において、亜硫酸水素塩は、亜硫酸水素ナトリウムまたは亜硫酸水素カリウムであり、ピロ亜硫酸塩は、ピロ亜硫酸ナトリウムまたはピロ亜硫酸カリウムである。具体的な実施形態では、亜硫酸水素塩は、亜硫酸水素ナトリウムであり、ピロ亜硫酸塩は、ピロ亜硫酸ナトリウムである。

#### 【0304】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法について、または第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7または第8の態様において、改変細胞毒性薬は、工程(b)で細

50

胞結合剤と反応させる前に、精製されない。または、改変細胞毒性薬は、工程（b）で細胞結合剤と反応させる前に、精製される。本明細書に記載の任意の適切な方法を使用し、改変細胞毒性薬を精製してもよい。

#### 【0305】

いくつかの実施形態では、上述の方法について、工程（a）の反応によって、マレイミド基の実質的なスルホン化は起こらない。いくつかの実施形態では、マレイミド基の50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、6%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満または1%未満がスルホン化される。マレイミドのスルホン化率は、マレイミドスルホン化細胞毒性薬（マレイミド上のみでスルホン化している細胞毒性薬）及びジスルホン化細胞毒性薬（マレイミドとイミン部分の両方でスルホン化している細胞毒性薬）の合計量を、亜硫酸水素塩またはピロ亜硫酸塩との反応前のイミン含有細胞毒性薬の開始時の量で割り算したものと等しい。

10

#### 【0306】

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る免疫コンジュゲートは、精製工程を受ける。この観点で、免疫コンジュゲートは、タンジェンシャルフローフィルトレーション（TFF）、非吸着性クロマトグラフィー、吸着性クロマトグラフィー、吸着濾過、選択的な沈殿、または任意の他の適切な精製プロセス、及びこれらの組み合わせを用い、混合物の他の構成要素から精製することができる。

#### 【0307】

いくつかの実施形態では、免疫コンジュゲートは、1回の精製工程（例えば、TFF）を用いて精製される。好ましくは、コンジュゲートは、精製され、1回の精製工程（例えば、TFF）を用い、適切な製剤へと交換される。本発明の他の実施形態では、免疫コンジュゲートは、2つの連続的な精製工程を用いて精製される。例えば、免疫コンジュゲートは、まず、選択的な沈殿、吸着濾過、吸着性クロマトグラフィーまたは非吸着性クロマトグラフィーを用いて精製され、その後、TFFを用いて精製することができる。当業者は、免疫コンジュゲートの精製によって、細胞毒性薬に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む安定なコンジュゲートの単離が可能になることを理解するだろう。

20

#### 【0308】

精製のために、Pellicon型システム（Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ）、Sartocan Cassetteシステム（Sartorius AG、エッジウッド、N.Y.）及びCentrasette型システム（Pall Corp.、イーストヒルズ、N.Y.）を含め、任意の適切なTFFシステムを利用してもよい。

30

#### 【0309】

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してもよい。好ましい吸着性クロマトグラフィー樹脂としては、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（HCIC）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、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、固定された金属アフィニティクロマトグラフィー（IMAC）、染料リガンドクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、及びこれらの組み合わせが挙げられる。適切なヒドロキシアパタイト樹脂の例としては、セラミックヒドロキシアパタイト（CHT Type I及びType II、Bio-Rad Laboratories、ハーキュリーズ、カリフォルニア）、HA Ultrogelヒドロキシアパタイト（Pall Corp.、イーストヒルズ、N.Y.）及びセラミックフルオロアパタイト（CFT Type I及びType II、Bio-Rad Laboratories、ハーキュリーズ、カリフォルニア）が挙げられる。適切なHCIC樹脂の一例が、MEP Hypercel樹脂である（Pall Corp.、イーストヒルズ、N.Y.）。適切なHIC樹脂の例としては、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が挙げられる（全てGE Healthcare、ピスカタウェイ、N.J.製）及びMacro-prep Met

40

50

hyl及びMacro-Prep t-Butyl樹脂(Biorad Laboratories, Hercules, カリフォルニア)が挙げられる。適切なイオン交換樹脂の例としては、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、ピスカタウェイ、N.J.製)及びUnosphere S樹脂(Bio-Rad Laboratories、Hercules、カリフォルニア)が挙げられる。適切なコンゴ得モードイオン交換機(例としては、Bakerbond ABx樹脂(JT Baker、フィリップスバーグ、N.J.))が挙げられる。適切なIMAC樹脂の例としては、Chelating Sepharose樹脂(GE Healthcare、ピスカタウェイ、N.J.)及びProfinity IMAC樹脂(Bio-Rad Laboratories、ハーキュリーズ、カリフォルニア)が挙げられる。適切な染料リガンド樹脂の例としては、Blue Sepharose樹脂(GE Healthcare、ピスカタウェイ、N.J.)及びAffi-gel Blue樹脂(Bio-Rad Laboratories、ハーキュリーズ、カリフォルニア)が挙げられる。適切なアフィニティ樹脂の例としては、タンパク質Aセファロース樹脂(例えば、MabSelect、GE Healthcare、ピスカタウェイ、N.J.) (ここで、細胞結合剤は抗体である)、レクチンアフィニティ樹脂、例えば、Lentil Lectin Sepharose樹脂(GE Healthcare、ピスカタウェイ、N.J.) (ここで、細胞結合剤は、適切なレクチン結合部位を有する)が挙げられる。または、細胞結合剤に特異的な抗体を使用してもよい。このような抗体は、例えば、Sepharose 4 Fast Flow樹脂(GE Healthcare、ピスカタウェイ、N.J.)に固定されてもよい。適切な逆相樹脂の例としては、C4、C8及びC18樹脂(Grace Vydac、ヘスペリア、カリフォルニア)が挙げられる。

#### 【0310】

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してもよい。適切な非吸着性クロマトグラフィーの例としては、限定されないが、SEPHADEX™ G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL™樹脂(例えば、S-200及びS-300)、SUPERDEX™樹脂(例えば、SUPERDEX™ 75及びSUPERDEX™ 200)、BIO-GEL(登録商標)樹脂(例えば、P-6、P-10、P-30、P-60及びP-100)、及び当業者に知られているその他のものが挙げられる。

#### VI. 本発明の免疫コンジュゲートの使用

##### 【0311】

本発明は、本発明の免疫コンジュゲートを含む組成物(医薬組成物を含む)を包含する。

##### 【0312】

本明細書に提示されるとおり、本明細書に提示されるヒト化/最適化された抗ADAM9-VL及び/またはVHドメインを含む本発明の免疫コンジュゲートは、細胞表面に存在するADAM9に結合し、細胞死に介在する能力を有する。特に、医薬薬剤を含む本発明の免疫コンジュゲートは、インターナリゼーションされ、医薬薬剤の活性によって細胞死に介在する。このような細胞死活性は、抗体依存性の細胞が介在する細胞毒性(ADCC)及び/または相補性依存性の細胞毒性(CDC)を誘発する免疫コンジュゲートによって強化されてもよい。

##### 【0313】

従って、本明細書に提示されるヒト化/最適化された抗ADAM9-VL及び/またはVHドメインを含む本発明の免疫コンジュゲートは、ADAM9の発現と関連するか、またはADAM9の発現によって特徴付けられる任意の疾患または状態を治療する能力を有する。上述のように、ADAM9は、多くの血液及び個体悪性腫瘍で発現するがん性胚細胞抗原であり、ほとんど分化しない形態を示す重度腫瘍と関係があり、臨床転帰不良と相関関係がある。従って、限定されないが、本発明の免疫コンジュゲートを、がんの治療、特に、ADAM9の発現によって特徴付けられるがんの治療に使用してもよい。

##### 【0314】

10

20

30

40

50

他の具体的な実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、大腸癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、腎細胞癌、前立腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、子宮癌、卵巣癌、肝臓癌、子宮頸癌、甲状腺癌、精巣癌、骨髄がん、黒色腫及びリンパがんの治療に有用であってもよい。

#### 【0315】

更なる実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、非小細胞肺癌（扁平上皮癌、腺癌または大細胞未分化腺癌）及び大腸癌（腺癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、原発性大腸リンパ腫、平滑筋肉腫または扁平上皮癌）の治療に有用であってもよい。

#### 【0316】

治療における有用性に加え、本発明の免疫コンジュゲートは、検出可能に標識され、がんの診断または腫瘍及び腫瘍細胞の画像化に使用されてもよい。

10

#### VII. 医薬組成物

#### 【0317】

本発明の組成物は、医薬組成物の製造に有用なバルク薬物組成物（例えば、純粋ではないか、または滅菌していない組成物）、または単位投薬形態の調製に使用可能な医薬組成物（すなわち、対象または患者に投与するのに適した組成物）を含む。このような組成物は、予防または治療に有効な量の本発明の免疫コンジュゲート、またはこれらの薬剤の組み合わせと、医薬的に許容される担体とを含む。好ましくは、本発明の組成物は、予防または治療に有効な量の本発明の免疫コンジュゲートと、医薬的に許容される担体とを含む。本発明はまた、特定のがん抗原に特異的な第2の治療抗体（例えば、腫瘍特異性のモノクローナル抗体）と、医薬的に許容される担体とを更に含む、このような医薬組成物を包含する。

20

#### 【0318】

具体的な実施形態では、「医薬的に許容される」との用語は、政府または州政府の規制機関によって承認されているか、または動物への使用、より特定的にはヒトへの使用について、米国薬局方または他の一般的に認識されている薬局方に列挙されていることを意味する。「担体」との用語は、治療薬と一緒に投与される希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントのアジュバント（完全または不完全）、賦形剤、またはビヒクルを指す。一般的に、本発明の組成物の成分は、別個に供給されるか、または例えば、活性薬剤の量を示すアンプルまたは小袋などの気密密封した容器中の乾燥凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として、単位投薬形態と一緒に混合されている。組成物が、注入によって投与される場合、滅菌医薬グレード水または生理食塩水を含む注入瓶に分注してもよい。組成物が注射によって投与される場合、投与前に成分を混合することができるよう、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルを与えてもよい。

30

#### 【0319】

本発明はまた、本発明の免疫コンジュゲート単独を、またはこのような医薬的に許容される担体と共に充填した1つ以上の容器を含む医薬パックまたはキットも提供する。更に、疾患の治療に有用な1つ以上の他の予防薬剤または治療薬剤も、医薬パックまたはキットに含まれていてもよい。本発明はまた、本発明の医薬組成物の1つ以上の成分を充填した1つ以上の容器を含む医薬パックまたはキットも提供する。場合により、このような容器（複数可）に、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって処方された形態での注意書きが付随していてもよく、この注意書きは、ヒトへの投与のための製造、使用または販売の機関による承認を反映している。

40

#### 【0320】

本発明は、上述の方法で使用可能なキットを提供する。キットは、本発明のいずれかの免疫コンジュゲートを含んでいてもよい。キットは、1つ以上の容器中に、がんの治療に有用な1つ以上の他の予防薬剤及び/または治療薬剤を更に含んでいてもよい。

#### VIII. 投与方法

#### 【0321】

本発明の組成物は、対象に有効量の本発明の免疫コンジュゲートを投与することによる

50

、疾患、障害に関連する１つ以上の症状の治療、予防及び軽減のために与えられてもよい。好ましい態様では、このような組成物は、実質的に精製されている（すなわち、効果を制限するか、または望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない）。具体的な実施形態では、対象は、動物、好ましくは、哺乳動物、例えば、非霊長類（例えば、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、齧歯類など）または霊長類（例えば、サル、例えば、カニクイザル、ヒトなど）である。好ましい実施形態では、対象は、ヒトである。

【０３２２】

例えば、リボソーム、微粒子、マイクロカプセル、抗体または融合タンパク質を発現することが可能な組換え細胞への封入、受容体が介在するエンドサイトーシス（例えば、Wu et al. (1987) 「Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System」, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築など、種々の送達系が知られており、本発明の組成物を投与するために使用可能である。

10

【０３２３】

本発明の免疫コンジュゲートを投与する方法としては、限定されないが、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下）、硬膜外及び粘膜（例えば、経鼻及び口腔経路）が挙げられる。具体的な実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、筋肉内投与、静脈内投与、または皮下投与される。組成物は、任意の簡便な経路によって、例えば、注入またはボーラス注射によって投与されてもよく、他の生物学的に活性な薬剤と共に投与されてもよい。投与は全身投与であってもよく、または局所投与であってもよい。

20

【０３２４】

本発明はまた、本発明の免疫コンジュゲートの製剤が、分子の量を示す気密密封した容器（例えば、アンプルまたは小袋）に封入されることも提供する。一実施形態では、このような分子は、気密密封した容器中の乾燥滅菌した凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給され、対象に投与するために、例えば、水または生理食塩水で適切な濃度になるまで再構築してもよい。好ましくは、本発明の免疫コンジュゲートは、気密密封した容器中の乾燥滅菌凍結乾燥粉末として供給される。

【０３２５】

本発明の免疫コンジュゲートの凍結乾燥した製剤は、その元々の容器中、２～８で保存すべきであり、分子は、再構築してから１２時間以内、好ましくは６時間以内、５時間以内、３時間以内、または１時間以内に投与すべきである。代替的な実施形態では、このような分子は、分子、融合タンパク質、または結合された分子の量及び濃度を示す気密密封した容器中の液体形態として供給される。好ましくは、このような免疫コンジュゲートは、液体形態で提供される場合、気密密封された容器で供給される。

30

【０３２６】

本明細書で使用される場合、医薬組成物の「有効量」は、限定されないが、臨床結果、例えば、疾患から生じる症状の減少、感染の症状（例えば、ウイルスの負荷、熱、痛み、敗血症など）またはがんの症状（例えば、がん細胞の増殖、腫瘍の存在、腫瘍の転移など）の緩和によって、疾患を患う者の生活の質を上げること、疾患を治療するのに必要な他の医薬の投薬量を減らすこと、標的化及び／またはインターナリゼーションなどによって別の医薬の効果を高めること、疾患の進行を遅らせること、及び／または個人の生存時間を長くすることを含め、有益な結果または望ましい結果を与えるのに十分な量である。

40

【０３２７】

１回以上の投与で、有効量が投与されてもよい。本発明の目的のために、薬物、化合物または医薬組成物の有効量は、がん細胞を殺し、及び／または増殖を減らし、及び／またはがんの原発性部位からの転移をなくすか、減らすか、及び／または転移の進行を遅らせるのに十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量の薬物、化合物または医薬組成物を、別の薬物、化合物または医薬組成物と組み合わせる達成してもよく、または組み合わせなくてもよい。従って、「有効量」は、１つ以上の化学治療薬剤を投与するという観

50

点で考慮されてもよく、単剤が、有効量で与えられることを考慮してもよく、1つ以上の他の薬剤と組み合わせる場合には、望ましい結果が達成され得るか、または達成されるように考慮してもよい。

#### 【0328】

本発明に包含される免疫コンジュゲートの場合、患者に投与される投薬量は、好ましくは、レシピエント対象の体重(kg)に基づいて決定される。

#### 【0329】

本発明の免疫コンジュゲートの投薬量及び投与頻度は、例えば、脂質化などの改変によって取り込み量及び分子の組織への浸透を高めることによって減らすか、または変えてもよい。

#### 【0330】

患者に投与される本発明の免疫コンジュゲートの投薬量は、単剤療法としての使用について計算されてもよい。または、分子を他の治療組成物と組み合わせて使用してもよく、及び患者に投与される投薬量は、単剤治療として前記分子を使用するときよりも少なくなる。

#### 【0331】

本発明の医薬組成物は、治療が必要な領域に局所的に投与されてもよい。このことは、例えば、限定されないが、局所的な注入、注射によって、または移植手段によって達成されてもよく、前記移植は、シリコン膜などの膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性またはゼラチン状の材料で作られている。好ましくは、本発明の免疫コンジュゲートを投与する場合、分子が吸収されない材料を使用することに注意をはらわなければならない。

#### 【0332】

本発明の組成物は、小胞、特にリポソーム内に送達されてもよい(Langer (1990)「New Methods Of Drug Delivery」, Science 249:1527-1533); Treat et al, LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein and Fidler (編集), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, 前出, pp. 317-327を参照)。

#### 【0333】

治療または予防に有効な量の本発明の免疫コンジュゲートを用いた対象の治療は、単回治療を含んでいてもよく、または好ましくは、一連の治療を含んでいてもよい。治療に使用する分子の有効投薬量は、一連の具体的な治療期間にわたって、増加してもよく、または減少してもよいことも理解されるだろう。

#### 【実施例】

#### 【0334】

ここで本発明を一般的に記載してきたが、以下の実施例を参照することによって、本発明がさらに容易に理解されるだろう。以下の実施例は、本発明の診断方法または治療方法における組成物のための種々の方法を示す。実施例は、本発明を説明することを意図しているが、本発明の範囲をいかなる様式にも限定するものではない。

#### 【0335】

##### 実施例1

##### 抗ADAM9抗体MAB-Aの腫瘍細胞特異性

マウス抗ADAM9抗体(本明細書でMAB-Aと呼ばれる)は、(1)ADAM9の標的タンパク質処理活性をブロックし、(2)内部移行し、(3)抗腫瘍活性を有することが同定された(例えば、米国特許第8,361,475号を参照)。MAB-Aの腫瘍細胞特異性を、IHCによって観察した。腫瘍組織をMAB-A(0.4µg/mL)と接触させるか、またはアイソタイプ対照(0.4µg/mL)と接触させ、染色の程度を視覚化した。MAB-Aは、種々の大細胞癌、扁平上皮癌及び腺癌非小細胞肺癌細胞型(図1A)、乳癌細胞、前立腺癌細胞、胃癌細胞(図1B)及び結腸癌サンプル(図1C)



を強く標識することがわかった。正常組織をMAB-A (1.25 µg/mL) と接触させ、染色の程度を視覚化した。上の表2にまとめたように、MAB-Aは、多種多様な正常組織の染色をほとんど示さないか、または全く示さなかった。これらの試験に使用したMAB-Aの濃度は、腫瘍細胞の染色に使用したもののほぼ3倍であったことを注記しておく。これらのIHC試験の結果は、MAB-Aが、正常細胞よりも腫瘍細胞に対して、強い優先的な結合を示すことを示している。

#### 【0336】

##### 実施例2

##### 種の交差反応性

ヒトADAM9 (huADAM9) 及びカニクイザルADAM9 (cynoADAM9) に対するMAB-Aの結合を試験した。簡単に言うと、huADAM9、cynoADAM9、無関係の抗原を一次的に発現する293-FT細胞及びCHO-K細胞、またはトランスフェクトしていない親細胞をMAB-Aと共にインキュベートし、その後、ヤギ抗マウスPE二次抗体と共にインキュベートし、FACSによって分析した。図2に示されるように、MAB-Aは、両方の細胞型を一時的に発現するhuADAM9に対して強い結合を示す。MAB-Aは、cynoADAM9に対する良好な結合を示さない。MAB-Aは、親細胞または無関係な抗原を発現する細胞に結合しなかった。ELISAアッセイにおいて、cynoADAM9に対する同様の低レベルの結合がみとめられた。

#### 【0337】

##### 実施例3

##### ヒト化及び初期最適化

MAB-Aのヒト化によって、ヒト化VHドメイン (本明細書で「hMAB-A VH (1)」と呼ばれる) 及びヒト化VLドメイン (本明細書で「hMAB-A VL (1)」と呼ばれる) が得られた。次いで、結合活性を高め、及び/または以下に更に詳細に記載する、潜在的に不安定なアミノ酸残基を除去するために、ヒト化可変ドメインを最適化した。この1回目の最適化によって、本明細書で「hMAB-A VH (2)」、「hMAB-A VH (3)」及び「hMAB-A VH (4)」と呼ぶ3つの更なるヒト化VHドメインと、本明細書で「hMAB-A VL (2)」、「hMAB-A VL (3)」及び「hMAB-A VL (4)」と呼ぶ3つの更なるヒト化VLドメインが得られた。これに加え、マウスVHドメイン及びVLドメインとヒト定常領域とを有するMAB-Aのキメラ態様 (「chMAB-A」) を作成した。マウス及びヒト化/最適化されたVH及びVLドメインのアミノ酸配列を上に表示しており、アラインメントを図3A及び3Bに表示している。これらのヒト化/最適化されたVH及びVLドメインのコンセンサス配列を上に表示している。複数のヒト化可変ドメインが作成される場合、特定の抗ADAM9抗体 (例えば、MAB-A) のヒト化重鎖及び軽鎖可変ドメインを、任意の組み合わせで使用してもよく、ヒト化鎖の特定の組み合わせは、特定のVH/VLドメインを参照することによって言及され、例えば、hMAB-A VH (1) 及びhMAB-A VL (2) を含む抗体は、具体的に「hMAB-A (1.2)」と呼ばれる。

#### 【0338】

ヒト生殖細胞系列VH3-21及びVH3-64から誘導されるフレームワーク領域を含むhMAB-A VH (1) を作成し、ヒト生殖細胞系列B3及びL6から誘導されるフレームワーク領域を含むhMAB-A VL (1) を作成した。これらのヒト化可変ドメインに、マウスCDRは保持されていた。

#### 【0339】

潜在的な脱アミド化部位が、CDRH2で同定され (図3Aで1本の下線で示されている)、潜在的なアスパラギン酸異性化部位が、CDRL1で同定された (図3Bで1本の下線で示されている)。これらの位置でのアミノ酸置換を調べ、結合アフィニティを維持しつつ、これらの部位を除去するための置換を特定した。CDRH2 (hMAB-A VH (2) 中に存在) の位置54 (N54F) でのフェニルアラニンの置換と、CDRL1 (hMAB-A VL (2) 中に存在) の位置28 (D28S) でのセリンでの置換を選

10

20

30

40

50

択し、ここで、番号付けは、K a b a tに従う。同定された置換を別個に使用してもよく、または組み合わせて使用してもよい。驚くべきことに、N 5 4 F置換を含む抗体は、ヒトA D A M 9に対するアフィニティの約2倍の増加を示し（例えば、以下の表3を参照）、カニクイザルA D A M 9に対してわずかに向上した結合を示すことがわかった。

#### 【0340】

更に、C D R中に存在するリシン残基の数を最小限にするために、最適化された変異体を作成した。2つのリシン残基がC D R<sub>H</sub>2に存在し（図3Aで二重下線で示されている）、1つのリシンがC D R<sub>L</sub>1に存在する（図3Bに二重下線で示されている）。これらの位置でのアミノ酸置換を調べ、結合アフィニティを維持した置換を特定した。位置62でのアルギニンの置換（K 6 2 R）、位置64でのグルタミンの置換（K 6 4 Q）、及び位置65でのセリンの置換（S 6 5 G）をC D R<sub>H</sub>2（h M A B - A V H（3）中に存在）のために選択し、ここで、番号付けは、K a b a tに従う。位置24でのアルギニンの置換（K 2 4 R）を、C D R<sub>L</sub>1（h M A B - A V L（3）中に存在する）のために選択した。同定された置換を別個に使用してもよく、または組み合わせて使用してもよい。

#### 【0341】

C D R中に存在する他の潜在的に不安定な残基を同定し（図3A～3Bに点線下線で示されている）、1つは、C D R<sub>H</sub>1内の位置34にあるメチオニン残基（M 3 4）であり、1つは、C D R<sub>L</sub>1内の位置33にあるメチオニン残基（M 3 3）であり、C D R<sub>L</sub>3内の位置92、93及び94にあるヒスチジン（H 9 3）、グルタミン酸（E 9 3）及びアスパラギン酸残基（D 9 4）であり、番号付けは、K a b a tに従う。これらの位置でのアミノ酸置換を調べ、結合アフィニティを維持した置換を特定した。位置34でのイソロイシンの置換（M 3 4 I）をC D R<sub>H</sub>1のために選択し、C D R<sub>L</sub>3の位置33（M 3 3 L）、92（H 9 3 Y）、93（E 9 3 S）及び94（D 9 4 T）でのロイシン、チロシン、セリン及びトレオニンの置換を選択し、番号付けは、K a b a tに従う。これらのそれぞれの位置は、上に詳細に記載した置換の全てと組み合わせて容易に置換され、h M A B - A V H（4）及びh M A B - A V L（4）が得られ、これらが一緒に対になり、親マウス抗体と比較して少し向上したアフィニティを保持した抗体を生成する場合には、脱アミド化または酸化の可能性が大きく下がり、C D R中にリシン残基が存在しない。

#### 【0342】

h u A D A Mに対するヒト化/最適化された抗体h M A B - A（1.1）、h M A B - A（2.2）、h M A B - A（2.3）、h M A B - A（3.3）、h M A B - A（4.4）及びキメラc h M A B - A（マウスV H/V Lドメインを含む）の相対的な結合アフィニティを、B I A C O R E（登録商標）分析を用いて観察し、このとき、Hisタグ化可溶性ヒトA D A M 9（ヒスチジンを含有するタンパク質に融合するヒトA D A M 9の細胞外部分を含む「s h A D A M 9 - H i s」）が、固定された抗体でコーティングされた表面を通過した。簡単に言うと、各抗体が、F a b 2ヤギ抗ヒトF c表面に捕捉され、次いで、異なる濃度（6.25～100nM）のs h A D A M 9 - H i sタンパク質存在下でインキュベートされた。結合の速度論は、B I A C O R E（登録商標）分析結合（正規化された1:1 L a n g m u i r結合モデル）によって決定された。これらの試験から計算したk<sub>a</sub>、k<sub>d</sub>及びK<sub>D</sub>を表3に提示している。c y n o A D A M 9に対する結合を、上述のようにF A C Sによって、また、E L I S Aによって試験した。

10

20

30

40

## 【表 7】

表 3

抗体	p I	h u A D A M 9		
		$k_a (\times 10^6)$	$k_d (\times 10^{-3})$	K D (n M)
c h M A B - A	6.61	1.3	4.7	3.6
h M A B - A (1. 1)	6.44	1.5	5.2	3.5
h M A B - A (2. 2)	6.58	1.1	1.5	1.4
h M A B - A (2. 3)	6.58	1.3	1.7	1.3
h M A B - A (3. 3)	6.44	1.1	1.5	1.4

10

## 【0343】

これらの試験の結果は、ヒト化 / 最適化された抗体が、親マウス抗体と比較して、ヒト A D A M 9 に対して同じか、または高い結合アフィニティを有することを示している。特に、ヒト化抗体に N 5 4 F 突然変異を導入すると、h u A D A M 9 (すなわち、h M A B - A (2. 2)、h M A B - A (2. 3) 及び h M A B - A (3. 3)) に対する結合が向上することが観察された。この突然変異は、F A C S 及び E L I S A によって決定されるように、c y n o A D A M 9 への結合もわずかに向上させたが、これらの抗体は、依然

20

として c y n o A D A M 9 への良好な結合を示さなかった。これらの試験は、アフィニティを下げることなく、C D R からリシン残基を除去するために導入し得る更なる置換も特定した。アフィニティに対する影響を最小限にしつつ、他の潜在的に不安定な残基を除去するために、更なる置換を同定した。

## 【0344】

## 実施例 4

## 非ヒト霊長類 A D A M 9 に対する結合の最適化

ランダム突然変異を使用し、h M A B - A (2. 2) の重鎖 C D R<sub>H</sub>2 (K a b a t 位置 53 - 58) 及び C D R<sub>H</sub>3 (K a b a t 位置 95 - 100 及び 100 a - 100 f) ドメイン内に置換を導入した。この変異体をスクリーニングし、非ヒト霊長類 A D A M 9 (例えば、c y n o A D A M 9) への結合が向上し、h u A D A M 9 に対する高アフィニティ結合を保持するクローンを同定した。C D R<sub>H</sub>3 (K a b a t 位置 100 a - 100 f) 内の突然変異の 2 種類の独立したスクリーニングから、48 種類のクローンを選択した。表 4 は、2 つの独立したスクリーニングから c y n o A D A M 9 に対する結合の向上について選択した h M A B - A (2. 2) クローンからの C D R<sub>H</sub>3 K a b a t 残基 100 a - f のアミノ酸配列のアラインメントを提示する。更なるクローンアラインメントを表 5 に提示している。このような表で示されるように、各実験で、別個の置換パターンに含まれる同様のクローンが発生した。

30

40

50

【表 8 - 1】

表 4 M A B - A の重鎖 C D R H 3 のサブドメイン内の置換 (K a b a t 位置 1 0 0 a ~ 1 0 0 f)					
スクリーン 1			スクリーン 2		
クローン I D	配 列 番号	C D R H 3 サブドメイ ン配列	クローン I D	配列番号	C D R H 3 サブドメイ ン配列
M A B - A	81	GSRDYF	M A B - A	81	GSRDYF
1	82	DGEGVM	1	112	DGKAVL
2	82	DGEGVM	2	113	FNKAVL
3	83	FHSGLL	3	84	FNSATL
4	84	FNSATL	4	114	FNSGTW
5	85	FNSGTL	5	115	FNTGVF
6	86	FNSSTL	6	116	GKSRFH
7	87	GKSKWL	7	91	IGKGVF
8	88	GMGGTL	8	92	IGKGVL
9	89	HAKGGM	9	117	IGKNVY
10	90	IGEAVL	10	118	MGKGVM
11	91	IGKGVF	11	119	NGESVF
12	91	IGKGVF	12	120	PDFGWM
13	92	IGKGVL	13	121	PGSGVM
14	93	KHDSVL	14	122	PKDAWL
15	94	LNTAVM	15	99	PKFGWK
16	95	NGEGTL	16	99	PKFGWK
17	96	NGKNTL	17	123	PKFGWL
18	97	NSAGIL	18	124	PKIGWH
19	98	PKEGWM	19	124	PKIGWH
20	99	PKFGWK	20	124	PKIGWH
21	100	PKMGWV	21	125	PKMGWA
22	101	PRLGHL	22	126	PKMGWM
23	102	PSFGWA	23	126	PKMGWM
24	103	QAKGTM	24	126	PKMGWM
25	104	RGMGVM	25	126	PKMGWM
26	105	RKEGWM	26	127	PQMGWL
27	106	TGKGVL	27	128	PRFGWL
28	107	TGMGTL	28	128	PRFGWL
29	108	TGNGVM	29	128	PRFGWL
30	108	TGNGVM	30	129	PRMGFL
31	109	WNAGTF	31	130	PRMGFM

【表 8 - 2】

32	110	YHHTPL	32	131	PSFGWM
33	110	YHHTPL	33	132	RREGWM
34	111	YQSATL	34	133	SGEGVL
			35	134	SGNGVM
			36	135	VGKAVL

10

20

30

40

50

【表 9】

表 5 M A B - A の重鎖 C D R <sub>H</sub> 3 のサブドメイン内の置換 (K a b a t 位置 1 0 0 a ~ 1 0 0 f)		
クローン I D	配列番号	C D R <sub>H</sub> 3 サブドメイン 配列
M A B - A V H ( 2 A )	85	FNSGTL
M A B - A V H ( 2 B )	92	IGKGV L
M A B - A V H ( 2 C )	128	PRFGWL
M A B - A V H ( 2 D )	106	TGKGV L
M A B - A V H ( 2 E )	136	DSNAVL
M A B - A V H ( 2 F )	137	FHSGTL
M A B - A V H ( 2 G )	113	FNKAVL
M A B - A V H ( 2 H )	138	GGSGVL
M A B - A V H ( 2 I )	139	PRQGFL
M A B - A V H ( 2 J )	140	YNSGTL

## 【 0 3 4 5 】

試験した全てのクローンについて、位置 4 ( P 4 ) で G l y 及び A l a が好ましいアミノ酸残基であり、位置 6 ( P 6 ) で L e u、M e t 及び P h e が好ましいアミノ酸残基である。他の位置 (例えば、位置 2 ( P 2 )、位置 3 ( P 3 ) 及び位置 5 ( P 5 )) の好ましいアミノ酸残基は、P 1 でみられるアミノ酸残基によって変わる。位置 1 ( P 1 ) に P r o 残基を有するクローンについて、P 2 には L y s 及び A r g が好ましく、P 3 には P h e 及び M e t が好ましく、P 4 には G l y、P 5 には T r p または P h e が好ましい。P 1 に P h e、T y r または T r p を有するクローンの場合、P 2 に A s n 及び H i s があり、P 3 に S e r 及び H i s、P 6 に L e u があることが好ましい。P 1 に H e、L e u または V a l を有するクローンの場合、P 2 には G l y が好ましく、P 3 には L y s、P 5 には V a l、P 6 には疎水性のものが好ましい。加えて、図 4 からわかるように、P 1 に T h r 残基を有する場合、P 2 には G l y が好ましく、P 3 には L y s、M e t 及び A s n が好ましく、P 4 には G l y が好ましく、P 5 には T h r が好ましく、P 6 には L e u 及び M e t が好ましい。P 1 に A s p、G l y、A r g、H i s または S e r 残基を有する更なるクローンも、更に低い頻度で同定した (表 4 及び表 5 を参照)。

## 【 0 3 4 6 】

表 5 に示される 1 0 種類のクローンの V H ドメインを使用し、h M A B - A ( 2 . 2 ) の更なる最適化された変異体を作成し、これを h M A B - A ( 2 A . 2 ) - ( 2 J . 2 ) と称した。選択したクローンの結合を E L I S A アッセイによって試験した。簡単に言うと、ヒスチジン含有ペプチドに結合し、マイクロタイタープレート上にコーティングされた抗体を使用し、H i s ペプチドタグ化可溶性 c y n o A D A M 9 (「c y n o A D A M 9 - H i s」) ( 1 μ g / m L ) または H i s ペプチドタグ化可溶性 h u A D A M 9 ( 1 μ g / m L ) を捕捉し、親 h M A B - A ( 2 . 2 ) 及び 1 0 種類の C D R<sub>H</sub>3 h M A B - A ( 2 A . 2 ) 変異体の段階的希釈物の結合を試験した。c y n o A D A M 9 及び h u A D A M 9 の結合曲線は、それぞれ図 4 A 及び 4 B に提示される。c y n o A D A M 9 と M A B - A V H ( 2 B )、M A B - A V H ( 2 C )、M A B - A V H ( 2 D ) 及び M A B - A V H ( 2 I ) に対する改良された結合を示す選択された V H ドメインのそれぞれを含む h M A B - A ( 2 A . 2 ) 変異体は、親 h M A B - A ( 2 . 2 ) 抗体と同様の h u A D A M 9 に対する結合を維持しつつ、c y n o A D A M 9 結合において最も高い向上

を示した。

【 0 3 4 7 】

h u A D A M 9 - H i s 及び c y n o A D A M 9 - H i s に対するヒト化 / 更に最適化された抗体 M A B - A V H ( 2 B . 2 ) 、 M A B - A V H ( 2 C 2 ) 、 M A B - A V H ( 2 D . 2 ) 及び M A B - A V H ( 2 I . 2 ) 及び親の h M A B - A ( 2 . 2 ) の相対的な結合アフィニティを、上に本質的に記載したように、B I A C O R E ( 登録商標 ) 分析を用いて観察した。これらの試験から計算した  $k_a$ 、 $k_d$  及び  $K_D$  を表 6 に提示している。

【 表 1 0 】

表 6						
抗体	h u A D A M 9			c y n o A D A M 9		
	$k_a$ ( $\times 10^5$ ) ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_d$ ( $\times 10^{-4}$ ) ( $s^{-1}$ )	$K_D$ ( n M )	$k_a$ ( $\times 10^5$ ) ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_d$ ( $\times 10^{-4}$ ) ( $s^{-1}$ )	$K_D$ ( n M )
h M A B - A ( 2 . 2 )	9.0	5.5	0.6	2.0	220	110
h M A B - A ( 2 B . 2 )	6.1	3.9	0.6	3.4	0.66	0.2
h M A B - A ( 2 C . 2 )	5.9	8.1	1.4	3.5	< 0.1	< 0.3
h M A B - A ( 2 D . 2 )	6.9	5.8	0.8	4.2	3.0	0.7
h M A B - A ( 2 I . 2 )	6.6	2.3	0.4	4.0	0.85	0.2

【 0 3 4 8 】

結合試験は、4 種類の上位のクローンが、親抗体として h u A D A M 9 に対して結合する同じ高いアフィニティを維持しつつ、c y n o A D A M 9 に対する結合アフィニティにおいて、150 ~ 550 倍の向上を示したことを示す。h M A B - A ( 2 C . 2 ) 及び h M A B - A ( 2 I . 2 ) を、さらなる試験のために選択した。

【 0 3 4 9 】

実施例 5

抗体 h M A B - A ( 2 I . 2 ) の免疫組織化学試験

h M A B - A ( 2 I . 2 ) の細胞特異性を I H C によって観察した。陽性対照及び陰性対照細胞及び正常なヒト及びカニクイザル組織を、h M A B - A ( 2 I . 2 ) ( 2 . 5  $\mu g / mL$  ) またはアイソタイプ参照 ( 2 . 5  $\mu g / mL$  ) と接触させ、染色の程度を視覚化した。この試験の結果を表 7 にまとめている。

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 7		
細胞／組織	h M A B - A ( 2 I . 2 ) ( 2 . 5 μ g / m l )	I g G 1 陰性コントロール ( 2 . 5 μ g / m l )
C h o - K 親細胞	-	-
Cho-K/huADAM9 medium expression P:1	2 - 4 + ( g r c > m ) 稀から時々発生まで、及び 1 + ( g r c > m ) 時々 発生	-
Cho-K/huADAM9 high expression	2 - 4 + ( g r c > m ) 頻繁	-
C h o - K / c y n o A D A M 9 ク ローン 2	2 - 4 + ( g r c > m ) 頻繁	-
C h o - K / c y n o A D A M 9 ク ローン 1 6 番	2 - 4 + ( g r c > m ) 頻繁	-
A 4 9 8 細胞	2 - 4 + ( g r c > m ) 稀から時々発生まで、及び 1 + ( g r c > m ) 時々 発生から頻繁に発生まで	-
直腸 M G 0 6 - C H T N - 9 6 B	-	マクロファージと一致する 多くの 2 - 4 + ( g r c ) 細胞
肺 M G 0 6 - C H t N - 1 6 2 B 1 A	-	マクロファージと一致する 時折発生する 2 - 4 + ( g r c ) 細胞
肝臓 I L S 1 1 1 0 3 B	-	肝細胞 1 + ( g r c ) 稀 から時々発生まで
脾臓 I L S 1 0 2 6 6	-	-
H e a r t L i f e L e g a c y 0 9 1 0 0 3 5 D	-	多くの 1 - 3 + リボフスチ ン顔料と一致する ( g r c ) の小さな病巣を有する 心筋細胞
腎臓 I L S 1 0 2 4 1 B	-	尿細管上皮 1 + ( g r c ) 稀
膀胱 I L S D 8 0 1 1 J	-	マクロファージと一致する 時折発生する 2 - 4 + ( g r c ) 細胞

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

C y n o 結腸 1 番	-	粘膜上皮（管腔膜）2 - 4 + 稀から時々発生まで、及び 1 + 稀から時々発生まで；LP 内の優先的なマクロファージと一致する多くの 2 - 3 + ( g r c ) 細胞
C y n o 肺 1 番	-	マクロファージと一致する非常に稀な 2 - 4 + ( g r c ) 細胞
C y n o 肝臓 1 番	-	-
C y n o 脾臓 1 番	-	-
C y n o 心臓 1 番	-	-
C y n o 腎臓 0 7 0 3 6 8 M 番	-	尿細管上皮 2 + ( g r c ) 稀、及び 1 + ( g r c ) 稀から時々発生まで
C y n o 膀胱 1 番	移行細胞上皮 + ( g r c ) 稀	マクロファージと一致する稀な 1 - 4 + ( g r c ) 細胞
肺 C A I L S 1 0 1 0 8	Hスコア 1 5 0	t u -
Lung CA ILS7223	Hスコア 1 8 0	t u -
肺 C A I L S 2 1 5 6 A	Hスコア 8 0	t u -
肺 C A I L S 7 2 9 5 A	Hスコア 6 0	t u -

## 【 0 3 5 0 】

IHC 研究も行い、ヒト化 / 最適化された h M A B - A ( 2 I . 2 ) の結合を、1 2 . 5 μ g / m L の濃度 ( 5 × 最適染色濃度 ) で評価した。陽性対照細胞及び陰性対照細胞、及び通常のヒト及びカニクイザルの組織をこの試験で使用した。この試験の結果を表 8 にまとめている。

10

20

30

40

50



【表 12 - 1】

表 8		
細胞／組織	h M A B - A ( 2 I . 2 ) ( 1 2 . 5 $\mu$ g / m l )	I g G 1 陰性コントロール ( 1 2 . 5 $\mu$ g / m l )
C h o - K 親細胞	-	-
Cho-K/huADAM9 medium expression P:1	2 - 4 + ( g r c > m ) 時々発生から頻繁に発生ま で	-
Cho-K/huADAM9 high expression	3 - 4 + ( g r c > m ) 時々発生から頻繁に発生ま で	-
C h o - K / c y n o A D A M 9 ク ローン 2	3 - 4 + ( g r c > m ) 頻繁	-
C h o - K / c y n o A D A M 9 ク ローン 16 番	3 - 4 + ( g r c > m ) 頻繁	-
A 4 9 8 細胞	2 - 4 + ( g r c > m ) 時々発生から頻繁に発生ま で	-
直腸 M G 0 6 - C H T N - 9 6 B	e p i ± - 1 + 稀から時々 発生まで	試験物品及び陰性対象にお いて、L P 内の優先的なマ クロファージと一致する多 くの 2 - 4 + ( g r c ) 細胞
肺 M G 0 6 - C H t N - 1 6 2 B 1 A	肺細胞（望ましい肺細胞） 2 - 3 + ( g r c > m ) 稀、1 + ( g r c > m ) 稀から時々発生まで； E C 2 - 4 + ( c , m ) 稀、 1 + ( c , m ) 稀	試験物品及び陰性対象にお いて、マクロファージと一 致する時々発生し播種され た 2 - 4 + ( g r c ) 細胞
肝臓 I L S 1 1 1 0 3 B	-	試験物品及び陰性対象にお いて、マクロファージと一 致する時々発生し播種され た 2 - 4 + ( g r c ) 細胞

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

膵臓 I L S 1 0 2 6 6	導管上皮 1 + ( g r c > m ) 非常に稀	細胞 ( 望ましい腺房細胞 ) 1 + ( g r c ) 非常に稀 ; 試験物品及び陰性対象において、マクロファージと一致する時々発生し播種された 2 - 4 + ( g r c ) 細胞
H e a r t L i f e L e g a c y 0 9 1 0 0 3 5 D	-	リボフスシン顔料と一致する心筋細胞を含む多くの小さな病巣 1 - 3 + 顆粒染色は、試験物品及び陰性対照において、アーチファクトと一致した。
腎臓 I L S 1 0 2 4 1 B	尿細管上皮 1 + ( g r c ) 稀から時々発生まで	尿細管上皮 ± ( g r c ) 稀
膀胱 I L S D 8 0 1 1 J	移行細胞上皮 1 + ( g r c ) 稀	試験物品及び陰性対象において、マクロファージと一致する稀な 2 - 4 + ( g r c ) 細胞
C y n o 結腸 1 番	-	粘膜上皮 ( 管腔膜 ) 2 - 4 + 時々発生、及び 1 + 稀から時々発生まで
C y n o 肺 1 番	気管支上皮 1 + ( g r c > m ) 稀から時々発生まで、及び ± ( g r c > m ) 時々発生から頻繁に発生まで	-
C y n o 肝臓 1 番	-	-
C y n o 膵臓 1 番	-	-
C y n o 心臓 1 番	-	-
C y n o 腎臓 0 7 0 3 6 8 M 番	-	尿細管上皮 1 + ( g r c ) 稀、及び ± ( g r c ) 稀
C y n o 膀胱 1 番	移行細胞上皮 2 + ( g r c > m ) 稀及び 1 + ( g r c > m ) 稀から時々発生まで	-
肺 C A I L S 1 0 1 0 8	Hスコア 1 8 0	t u -

【表 1 2 - 3】

Lung CA ILS7223	Hスコア 1 8 0	t u -
肺 C A I L S 2 1 5 6 A	Hスコア 1 1 5	t u -
肺 C A I L S 7 2 9 5 A	Hスコア 1 1 5	t u -

10

20

30

40

50

## 【 0 3 5 1 】

2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ または5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、hMAB-A(2.2)、hMAB-A(2.3)、hMAB-A(2C.2)及びhMAB-A(2I.2)による結合の差を評価するために、比較IHCアッセイを行った。陽性対照細胞及び陰性対照細胞、及び通常のヒト及びカニクイザルの組織をこの試験で使用した。この試験の結果を表9にまとめている。

【表13-1】

表 9	組織	hMAB-A (2.3) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	hMAB-A (2.2) 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	hMAB-A(2C. 2) 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	hMAB-A(2 I.2) 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	アイソタイプ 制御 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Ch o - K 親 P : 3		-	-	-	-	-
Ch o - K / h u A D A M 9 . 2 中 程 度 の 発 現 P : 1	1 + ( c ) 時々 発生	2 - 4 + ( g r c > m ) 稀及び + ( g r c > m ) 稀から時々発生 で	2 - 4 + ( g r c > m ) 稀から時々 発生及び + ( g r c > m ) 稀から時々発生 で	2 - 4 + ( g r c > m ) 稀から時々 発生及び + ( g r c > m ) 稀から時々発生 で	2 - 4 + ( g r c > m ) 稀から時々 発生及び + ( g r c > m ) 稀から時々発生 で	-
Ch o - K / h u A D A M 9 . 1 8 高 発 現 P : 1	3 + ( m , c ) 頻繁	2 - 4 + ( g r c > m ) 時々発生 から頻繁に発生 で、及び + ( g r c > m ) 時々発生	2 - 4 + ( g r c > m ) 時々発生 から頻繁に発生 で、及び + ( g r c > m ) 時々発生	2 - 4 + ( g r c > m ) 時々発生 から頻繁に発生 で、及び + ( g r c > m ) 時々発生	2 - 4 + ( g r c > m ) 時々発生 から頻繁に発生 で、及び + ( g r c > m ) 時々発生	-
Ch o - K C y n o 2 番	1 + ( c ) 時々 発生	-	3 - 4 + ( g r c > m ) 頻繁	2 - 4 + ( g r c > m ) 頻繁	2 - 4 + ( g r c > m ) 頻繁	-
Ch o - K C y n o 1 6 番	2 + ( c , m ) 時々発生から頻 繁に発生まで	2 - 4 + ( g r c > m ) 稀及び + ( g r c > m ) 稀から時々発生 で	3 - 4 + ( g r c > m ) 頻繁	3 - 4 + ( g r c > m ) 頻繁	2 - 4 + ( g r c > m ) 頻繁	-

10

20

30

40

50

【表 13 - 2】

A 498 210	072	3-4+(c, m) 頻繁	2-4+(gr c>m) 稀、及び 1+(gr c>m) m) 時々発生から 頻繁に発生まで	2-4+(gr c>m) 稀、及び 1+(gr c>m) r c>m) 時々発生	2-4+(gr c>m) 稀から時々 発生まで、及び (gr c>m) 時々発生から頻繁に 発生まで	
肺CA 0108	ILS1	IHCスコア3	Hスコア55	Hスコア17	Hスコア150	-
Lung CA ILS723		IHCスコア3	Hスコア205	Hスコア160	Hスコア180	-
肺CA 156A	ILS2	IHCスコア1	Hスコア5	Hスコア0	Hスコア80	-
肺CA 295A	ILS7	IHCスコア1	Hスコア1	Hスコア0	Hスコア60	-

## 【0352】

2.5 µg/mL、5 µg/mLまたは12.5 µg/mLで、hMAB-A(2.2)、hMAB-A(2.3)、hMAB-A(2C.2)及びhMAB-A(2I.2)及びマウスMAB-Aによる結合の差を評価するために、更なる比較IHCアッセイを行った。陽性対照細胞及び陰性対照細胞、及び通常のヒト及びカニクイザルの組織をこの試験で使用した。この試験の結果を表10にまとめている。

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1】

表 1 0					
組織	h M A B - A ( 2 . 3 ) 5 u g / m L	h M A B - A ( 2 . 2 ) 2 . 5 μ g / m L	h M A B - A ( 2 C . 2 ) 2 . 5 μ g / m L	h M A B - A ( 2 I . 2 ) 1 2 . 5 μ g / m L	M A B - A 5 μ g / m L
結腸 M G 0 6 - C H T N - 9 6 B	上 皮 1 + ( c , m ) 稀 ; s m 陰 性	-	-	e p i ± - 1 + 稀 から 時々発生ま で	上 皮 1 - 3 + [ m , c ] ( 時々発生 から頻繁に 発生まで ); その他 ( N e g )
肺 M G 0 6 - C H t N - 1 6 2 B 1 A	肺細胞 / マ クロファー ジ 2 + ( c , m ) 時々発生	-	-	肺 胞 細 胞 ( 望 ま し い 肺 細 胞 ) 2 - 3 + ( g r c > m ) 稀 , 1 + ( g r c > m ) 稀 から時々発 生まで ; E C 2 - 4 + ( c , m ) 稀 , 1 + ( c , m ) 稀	単 球 1 + [ c ] ( 稀 か ら時々発生 まで ); そ の 他 ( N e g )
肝臓 I L S 1 1 1 0 3 B	肝細胞 1 + ( c ) 稀 か ら時々発生 まで	肝細胞 1 + ( g r c ) 頻 繁 に 発生	肝細胞 2 + ( g r c ) 稀 , 及 び 1 + ( g r c ) 頻 繁 に発生	-	ク ッ パ ー 細 胞 3 + [ c ] ( 時 々 発 生 ); そ の 他 ( N e g )

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

膵臓 ILS1 0266	上皮 1 + (c) 稀 ; 島細胞 1 + (c) 非常に稀	-	-	導管上皮 1 + (gr c > m) 非常に稀	導管上皮 1 - 2 + [c, m] (稀から時々発生まで); 原線維 2 + (稀); その他 (Neg)
Heart Life Legacy 0910035D	±	-	-	-	Neg
腎臓 ILS1 0241B	上皮 2 - 3 + (c, m) 頻繁に発生	尿管上皮 2 + (gr c) 稀から時々発生まで、及び 1 + (gr c) 時々発生から頻繁に発生まで	尿管上皮 2 + (gr c) 稀から時々発生まで、及び 1 + (gr c) 時々発生から頻繁に発生まで	尿管上皮 1 + (gr c) 稀から時々発生まで	上皮 1 + [c] (rare); その他 (Neg)
膀胱 ILSD 8011J	移行上皮 1 + (c) 稀から時々発生まで	-	-	移行細胞上皮 1 + (gr c) 稀	移行上皮 2 + [c, m] (稀から頻繁まで); 間質細胞 3 + [c] (稀); その他 (Neg)
Cyno 結腸 1 番	上皮 1 + (c, m) 稀	-	-	-	

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

C y n o 肺 1 番	マクロファ ージ及び肺 細胞 1 + ( c ) 非 常 に 稀	-	気 管 支 上 皮 3 - 4 + ( g r c ) 稀、 2 + ( g r c ) 時 々 発 生、 及 び 1 + ( g r c ) 時 々 発 生	気 管 支 上 皮 1 + ( g r c > m ) 稀 か ら 時 々 発 生 ま で、 及 び 土 ( g r c > m ) 時 々 発 生 か ら 頻 繁 に 発 生 ま で	
C y n o 肝 臓 1 番	肝細胞 1 + ( c ) 頻 繁	肝 細 胞 2 + ( g r c ) 稀 か ら 時 々 発 生 ま で、 及 び 1 + ( g r c ) 稀 か ら 時 々 発 生 ま で	肝 細 胞 2 + ( g r c ) 稀 か ら 時 々 発 生 ま で、 及 び 1 + ( g r c ) 時 々 発 生； 導 管 上 皮 1 + ( g r c ) 時 々 発 生	-	
C y n o 脾 臓 1 番	上 皮 及 び 島 細 胞 1 + ( c ) 非 常 に 稀	-	島 細 胞 土 ( g r c ) 頻 繁 に 発 生； 導 管 上 皮 1 + ( g r c ) 稀 か ら 時 々 発 生 ま で	-	陽 性
C y n o 心 臓 1 番	心 筋 1 + ( c ) 頻 繁	-	-	-	

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 4】

Cyno 腎臓 #070368M	上皮 2 + (c) 頻繁 に発生	尿細管上皮 2 + (g r c) 稀から 時々発生ま で、及び 1 + (g r c) 稀から 時々発生ま で	尿細管上皮 2 + (g r c) 稀から 時々発生ま で、及び 1 + (g r c) 時々発 生から頻繁 に発生まで	-	陽性
Cyno 膀胱 1 番	移行上皮 ± (c); マク ロファージ 非常に稀	-	移行細胞上 皮 2 - 3 + (g r > m) 稀、 及び 1 + (g r > m) 時々 発生	移行細胞上 皮 2 + (g r c > m) 稀、及 び 1 + (g r c > m) 稀か ら時々発生 まで	

10

20

## 【0 3 5 3】

従って、この結果は、hMAB - A (2 . 2) が、最適濃度でヒト肝細胞及び尿細管の全体的に低レベルの染色を示し、陰性対照で観察された肝細胞及び尿細管では、低い染色強度 / 反応頻度を有していることを示す。hMAB - A (2 . 2) は、最適濃度でカニクイザルの肝細胞及び尿細管の同様の低レベルの染色を示し、陰性対照で観察された尿細管では、低い染色強度 / 反応頻度を有していた。

30

## 【0 3 5 4】

この結果は、hMAB - A (2 C . 2) も、最適濃度でヒト肝細胞及び尿細管の全体的に低レベルの染色を示し、陰性対照で観察された肝細胞及び尿細管では、低い染色強度 / 反応頻度を有していることを示す。hMAB - A (2 C . 2) は、最適濃度でカニクイザルの肝細胞及び尿細管の同様の低レベルの染色を示した。hMAB - A (2 C . 2) について、カニクイザルの肺上皮、膵臓島 / 上皮及び膀胱上皮における更なる小さな知見は、対応するヒト組織では観察されなかった。肺上皮、尿細管、膀胱上皮、陰性対照では、低い染色強度 / 反応頻度が観察された。この結果は、hMAB - A (2 I . 2) が、最適濃度でヒトまたはカニクイザルの組織を染色しないことを示し、稀な + / - 膀胱移行細胞上皮染色を伴っていたことも示す。hMAB - A (2 I . 2) はまた、ヒト肺肺胞細胞、膵管上皮、尿細管、膀胱以降細胞上皮に、5 倍の最適濃度で全体的に低レベルで低頻度の染色を示し、カニクイザルの気管支上皮及び膀胱移行細胞上皮に 5 倍の最適濃度で、全体的に低レベルの染色を示した。hMAB - A (2 I . 2) は、試験したヒト正常組織で全体的に望ましい IHC プロフィールを示し、対応するカニクイザル組織で同様のプロファイルを示す。

40

## 【0 3 5 5】

## 実施例 6

変異体 Fc 領域を含む hMAB - A (2 I . 2)

hMAB - A (2 I . 2) は、軽鎖定常領域を有する軽鎖 (配列番号 68) と、野生型 IgG 重鎖定常領域を有する重鎖 (配列番号 52) とを含む。以下の置換を Fc 領域に

50



導入することによってFc変異体を作成した。L234A/L235A（例えば、配列番号78を参照）、hMAB-A(2I.2)(AA)と呼ばれる；S442C（例えば、配列番号79を参照）、hMAB-A(2I.2)(C)と呼ばれる；及びL234A/L235A/S442C（例えば、配列番号80を参照）、hMAB-A(2I.2)(AA/C)と呼ばれる。huADAM9-His及びcynoADAM9-Hisに対する各Fc変異体の結合をELISAアッセイによって試験した。簡単に言うと、ヒスチジン含有ペプチドに結合し、マイクロタイタープレート上にコーティングされた抗体を使用し、Hisペプチドタグ化可溶性cynoADAM9またはHisペプチドタグ化可溶性huADAM9(0.5 µg/mL)を捕捉し、親hMAB-A(2.2)及びFc変異体の段階的希釈物の結合を試験した。結合曲線huADAM9及びcynoADAM9は、図5A及び図5Bに提示されており、それぞれ、Fc変異体が、野生型Fc領域を有するhMAB-A(2I.2)の結合アフィニティを保持していたことを示している。

10

#### 【0356】

##### 実施例7

##### 標的発現分析

異なる適応症間でADAM9発現を評価するために、20種類の異なる腫瘍型を用いた組織マイクロアレイ(TMA)を、まず、予備研究使用のためにImmunoGenで開発されたADAM9 IHCアッセイを用いて評価した。

#### 【0357】

分析した全てのサンプルは、FFPE（ホルマリン固定及びパラフィン埋込）サンプルであった。500コア20がんTMAをFolio Biosciences（カタログ番号ARY-HH0212）から購入した。腺癌について80コア、扁平上皮細胞癌について80コアを有するNSCLC TMAをUS Biomax（カタログ番号LC1921A）から購入した。腺癌について80コアを有する大腸癌TMAをPantomics Inc.（カタログ番号COC1261）から購入した。胃癌サンプルは、Avaden Biosciencesから購入した。

20

#### 【0358】

ADAM9の免疫組織化学染色を、Ventana Discovery Ultra自動染色機を用いて行った。ADAM9の一次抗体は、市販のウサギモノクローナル抗体であった。全てのサンプルを評価し、スコアリングアルゴリズムで訓練を受けた広く資格のある病理学者によってスコアが付けられた。スコア付けのために、少なくとも100の生存可能な腫瘍細胞の存在が必要であった。染色強度は、0～3までの半定量的な整数スケールでスコアが付けられ、0は、染色がないことを表し、1は弱い染色を表し、2は中程度、3は強い染色を表す。各強度レベルでの陽性に染色した細胞の割合を記録した。スコア付けは、細胞膜のみへのAdam9の局在化、細胞質及び膜両方への局在化の評価に基づいている。染色の結果をHスコアによって分析し、これを染色強度の構成成分と、陽性細胞の割合と合わせた。0～300の値を有し、以下のように定義される。

30

$$\begin{aligned} & 1^* (1 + \text{強度で染色する細胞の割合}) \\ & + 2^* (2 + \text{強度で染色する細胞の割合}) \\ & + 3^* (3 + \text{強度で染色する細胞の割合}) \\ & = \text{Hスコア。} \end{aligned}$$

40

#### 【0359】

各腫瘍型について、5の通常組織対照を含む500コア20がんTMAを染色し、2つの異なる様式でスコア付けした。（1）膜染色のみに基づく、または（2）膜及び細胞質染色に基づく。以下の表11及び図6Aは、20全ての適応症についての膜染色に基づくADAM9の罹患率をまとめたものである。表12及び図6Bは、8種類の選択した適応症についての膜及び細胞質染色の結果をまとめたものである。

#### 【0360】

複数のがんTMAからの結果に基づき、拡張した罹患率分析のために、非小細胞肺癌(NSCLC)、大腸癌(CRC)及び胃癌の3種類の適応症を選択した。NSCLCの場

50

合、腺癌について80コア、扁平上皮細胞癌について80コアを有する1種類のTMAを染色し、評価した。CRCの場合、腺癌について80コアを有する1種類のTMAを分析し、そのうち78が評価可能であった。胃癌の場合、腺癌の15の組織全体切片を分析した。これら全てのサンプルを、膜及び細胞質染色についてスコア付けし、結果を表13にまとめている。これらの予備試験の結果は、ADAM9が、多種多様な固形がんで発現し、多くの異なるADAM9を発現する固形腫瘍における抗ADAM9薬物コンジュゲートの使用を裏付けている。

【表15】

表11：膜染色に基づく20種類の異なる適応症におけるADAM9の罹患率

腫瘍型	陽性率% (Hスコア ≥ 1)	Hスコア： 1～100	Hスコア： 101～200
膵臓 (n = 17)	95%	24%	71%
子宮 (n = 18)	89%	67%	22%
甲状腺 (n = 17)	88%	88%	0%
腎臓 (n = 17)	88%	59%	29%
精巣 (n = 17)	83%	65%	18%
前立腺 (n = 20)	80%	45%	35%
結腸 (n = 16)	76%	38%	38%
膀胱 (n = 16)	76%	63%	13%
乳房 (n = 20)	75%	65%	10%
脳 (n = 19)	68%	63%	5%
胃 (n = 17)	59%	24%	35%
肺 (n = 19)	58%	58%	0%
食道 (n = 19)	43%	32%	11%
子宮頸管 (n = 20)	40%	40%	0%
卵巣 (n = 18)	39%	33%	6%
頭頸部 (n = 20)	35%	30%	2%
肝臓 (n = 19)	32%	32%	0%
皮膚 (n = 20)	10%	10%	0%
軟組織 (n = 20)	0%	0%	0%
リンパ腫 (n = 20)	0%	0%	0%

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表 1 2 : 膜及び細胞質染色に基づく 8 種類の選択した適応症における A D A M 9 の罹患率

腫瘍型	陽性率 % ( H ス コ ア ≥ 1 )	H ス コ ア : 1 ~ 1 0 0	H ス コ ア : 1 0 1 ~ 2 0 0	H ス コ ア : 2 0 1 ~ 3 0 0
結腸	100%	31%	63%	6%
肺	100%	58%	42%	0%
膵臓	100%	18%	76%	6%
前立腺	95%	25%	55%	15%
食道	95%	58%	37%	0%
胃	94%	18%	71%	6%
乳房	70%	50%	20%	0%
卵巣	61%	44%	17%	0%

10

【表 1 7】

表 1 3 : 膜及び細胞質染色に基づく N S C L C、C R C 及び胃癌の更なるサンプルについての A D A M 9 の罹患率

20

腫瘍型	サ ン プ ル 数	陽性率 % ( H ス コ ア ≥ 1 )	H ス コ ア 分 布		
			1 ~ 1 0 0	1 0 1 ~ 2 0 0	2 0 1 ~ 3 0 0
N S C L C 腺癌	80	90%	46%	39%	5%
N S C L C 扁平上皮	80	81%	65%	13%	3%
C R C 腺癌	78	91%	51%	41%	0%
胃腺癌	15	100%	27%	53%	20%

30

## 【 0 3 6 1】

## 実施例 8

## 抗 A D A M 9 抗体インターナリゼーション試験

本発明の抗 A D A M 9 抗体のインターナリゼーションを評価するためにフローサイトメトリーに基づくインターナリゼーション実験を、A l e x a F l u o r 4 8 8 に結合された h M A B - A ( 2 . 2 )、h M A B - A ( 2 I . 2 ) 及び h M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C 抗体で行った。

40

## 【 0 3 6 2】

製造業者の指示 ( T h e r m o f i s h e r ) に従って、A l e x a F l u o r 4 8 8 テトラフルオロフェニルエステルを用い、h M A B - A ( 2 . 2 )、h M A B - A ( 2 I . 2 )、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C のための抗 A D A M 9 A l e x a 4 8 8 抗体コンジュゲートを作成した。インターナリゼーションアッセイを実行するために、コンジュゲートをナトリウムアジドを含まない P B S ( p H 7 . 2 ) に溶出させた。標識の濃度及び程度は、2 8 0 n m 及び 4 9 4 n m での吸光度測定から計算された。A l e x a 4 8 8 標識が標的結合に悪影響を及ぼさないことを確実にするために、F A C S 結合アッセイを行った。

50

## 【0363】

抗ADAM9 - Alexa488コンジュゲートのインターナリゼーションは、蛍光にコンジュゲートを連続的に、またはパルス状態でさらした後に決定された。連続的な実験の場合、NCI - H1703細胞を、飽和濃度の所定のAlexa488標識された抗体で、氷上、または37℃で、指定の全時間をかけて処理した。一方、パルス実験の場合、抗ADAM9 - Alexa488コンジュゲートを、氷上の細胞にあらかじめ結合させておき、過剰なコンジュゲートを洗い流した後、37℃に変え、インターナリゼーションを監視した。連続的な曝露またはパルス状態の曝露後の所定の時間点で、細胞をヴェルセン（ThermoFisher）と共に持ち上げ、氷冷したPBSで2回洗浄し、複製物のウェルを、300nMの抗A488抗体を用いずに（クエンチしていないサンプル）または用い（クエンチしたサンプル）、氷冷したPBSに再懸濁させた。全てのサンプルを、氷上で30分間インキュベートした。次いで、細胞をペレット化し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、フローサイトメトリーによって分析した。氷上で30分間インキュベートし、次いで、抗Alexa488抗体と共にインキュベートした細胞の蛍光は、消光しない蛍光フラクションがあらわれ、インターナリゼーションを計算する前に、全ての他のサンプルから引き算した。インターナリゼーションの割合は、消光したサンプルの蛍光を、不完全な表面消光（細胞内蛍光）について補正し、これを消光していない細胞（全蛍光）で割り算して計算した。抗ADAM9抗体コンジュゲートのインターナリゼーションをグラフにし、単相指数減衰式を用いてデータをフィッティングした（GraphPad Prism, ver. 5.01）。

10

20

## 【0364】

表面に結合したAlexa488で標識された抗ADAM9抗体のインターナリゼーションは、NCI - H1703細胞におけるパルス治療及び連続治療の後に評価した。試験した3種類全ての抗ADAM9 - Alexa488コンジュゲートは、迅速なインターナリゼーションを示し、コンジュゲートの約39%が、最初の15分でインターナリゼーションし、全部で約77%が6時間後にインターナリゼーションした（図7A）。興味深いことに、24時間連続曝露した後、インターナリゼーションした蛍光シグナルは、30分間細胞表面に結合した初期の全蛍光シグナルよりも約7倍強かった（図7B）。従って、ADAM9は、37℃でインキュベートしている間に、細胞表面で細胞内プールから補充されるようであり、複数回の抗ADAM9抗体コンジュゲートインターナリゼーションを可能なものとしている。抗ADAM9免疫コンジュゲートの効能は、インターナリゼーション、細胞内トラフィッキング及び免疫コンジュゲートの分解に依存して変わる。抗ADAM9免疫コンジュゲートの効能は、一部には、抗ADAM9免疫コンジュゲートの高いインターナリゼーションによって説明することができ、おそらく、多量の細胞毒性異化生成物が生成する。

30

## 【0365】

## 実施例9

## 抗ADAM9抗体細胞処理試験

細胞上での標的結合、chMAB - Aの取り込み、リボソーム分解を評価するために、既に記載した<sup>3</sup>H - プロピオンアミド標識された抗体を処理する方法を使用した（Lai et al., Pharm Res., 2015年11月; 32(11): 3593 - 603）。この方法を用い、ADAM9を標的とするchMAB - A抗体を、リシン残基を介したトリチウム化プロピオネートを用いてわずかに標識した。細胞結合、取り込み、リボソームへのトラフィッキングの時に、[<sup>3</sup>H]プロピオネート標識されたAb（<sup>3</sup>H - Ab）が分解し、リシン - [<sup>3</sup>H]プロピオンアミドが、細胞成長培地に放出されることが以前示されている。有機溶媒を加えると、インタクトな標識された抗体が沈殿し、リシン - [<sup>3</sup>H]プロピノアミド溶液が残り、これは、抗体処理の程度の簡便かつ正確な指標となる。

40

## 【0366】

chMAB - Aを、既に記載したように、[<sup>3</sup>H] - プロピオネートで標識した。NS

50

C L C株、N C I - H 1 7 0 3及びC R C株、D L D - 1を、結合曲線を介して抗原飽和量を決定した後、 $10\text{ nM}$   $^3\text{H}$  - c h M A B - A抗体で処理した。いくつかの細胞サンプルを、標的ではないトリチウム化アイソタイプ対照抗体 $^3\text{H}$  - c h K T Iで処理し、一方、その他は未処理のままであった。細胞を6ウェルプレートに接種し、一晩かけて成長させ、次いで、既に記載したように、試薬（複数可）でパルス処理した。簡単に言うと、細胞を $^3\text{H}$  - c h M A B - A抗体または $^3\text{H}$  - c h K T Iと共に20分インキュベートした後、新鮮な培地で3回洗浄した。細胞を $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$ と共に一晩インキュベートした。20～24時間のインキュベートの後、細胞を集め、タンパク質を、4：3体積のアセトン：培地／細胞混合物を用いて沈殿させた。サンプルを $-80^\circ\text{C}$ で最小限1時間かけて凍結させた後、解凍し、遠心分離処理によって分離した。ペレットを処理してタンパク質を溶解し、T r i - C a r b液体シンチレーションカウンター（L S C）で5分間計測した。

10

製造プロトコルあたり、 $1\text{ mL}$ のS O L V A B L E（P e r k i n E l m e r）を各ウェルサンプルに加え、 $50^\circ\text{C}$ の水浴で一晩インキュベートした。サンプルを水浴から取り出し、 $20\text{ mL}$ のガラスシンチレーションバイアルに移し、E D T A及び $\text{H}_2\text{O}_2$ をサンプルに加え、次いで、さらに $50^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートした。サンプルをH C lでクエンチし、 $15\text{ mL}$ のO p t i m a G o l d液体シンチレーション液（P e r k i n E l m e r）を加え、サンプルを十分にボルテックス撹拌した。L S Cで計測する前に、サンプルを暗室に最短で4時間保持した。タンパク質を含まないアセトン抽出物サンプルを、高減圧下、体積が $1\text{ mL}$ 未満になるまで乾燥させ、L S C前に、上述のようなS o l v a b l eを用いて処理した。得られたサンプルのC P M値から、結合し、分解し、インタクトな標識された抗体の量を計算した。

20

#### 【0367】

$^3\text{H}$  - c h M A B - A抗体の処理レベルを決定した後、パルス処置を行い、 $37^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートした。N C I - H 1 7 0 3細胞は、 $93\%$ の $^3\text{H}$  - c h M A B - Aが24時間以内に処理され、D L D - 1細胞は、 $92\%$ の $^3\text{H}$  - c h M A B - Aが同じ期間で処理された。 $^3\text{H}$  - c h K T Iの結合及び処理は、無視できるものであった（標的とされた抗体よりも全C P Mが100倍以上小さい）。これらの細胞株の処理値は高く、特に、本発明の抗A D A M 9抗体を有効な薬物コンジュゲートとして支持する他のA D C標的／抗体について既に報告されている24時間パルス処理値と比較すると高い。

30

#### 【0368】

##### 実施例10

ヒト化／最適化された抗A D A M 9抗体及び薬物コンジュゲートの結合アフィニティ試験  
抗原結合に対する結合の結果を評価するために、A D A M 9に対する各抗A D A M 9免疫コンジュゲート及びそのそれぞれの結合していない抗体の相対結合アフィニティを、F A C S分析によって、ヒトA D A M 9またはカニクイザルA D A M 9のいずれかを異所的に発現する300 - 19細胞で決定した。簡単に言うと、A D A M 9を発現する300 - 19細胞を、段階希釈した抗A D A M 9抗体または免疫コンジュゲートと共に、F A C Sバッファ（P B S、 $0.1\%$  B S A、 $0.01\%$   $\text{NaN}_3$ ）中、 $4^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートした。次いで、サンプルを洗浄し、蛍光標識した二次抗体と共に $4^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートした。各濃度での蛍光強度の正規化された平均値をプロットし、結合のE C 50を、非線形回帰分析を用いて計算した（G r a p h P a d P r i m s 4.0）。この試験から得た結果を表14にまとめている。

40

#### 【0369】

試験した全ての抗A D A M 9抗体及び免疫コンジュゲートは、同様のアフィニティでヒトA D A M 9に結合し、フローサイトメトリーで測定すると、E C 50が約 $1.4\text{ nM}$ であり、このことは、結合が、抗体の結合アフィニティを適切には変えなかったことを示している（図8A～8Dを参照）。ヒト化は、キメラ抗体（c h M A B - A）と比較して、カニクイザルA D A M 9に対する結合を向上させたが、更に最適化された変異体（h M A B - A（2 C 2）、h M A B - A（2 I . 2）及びh M A B - A（2 I . 2）S 4 4 2 C

50

）及びこれらの免疫コンジュゲートは、カニクイザルADAM9に対し、顕著に向上した結合を示した。このカニクイザルADAM9に対する顕著な結合の向上により、薬物治療薬としてのADAM9免疫コンジュゲートの仕様を確認するための毒性及び安全性の試験が容易になる。

【表18】

表14

抗ADAM9抗体／免疫コンジュゲート	EC50 (nM) FACSによる		
	300- 19:huADA M9	300- 19:cyn oADAM9	c y n o ／ ヒ ト
chMAB-A	0.41	112.2	273
chMAB-A-sSPDB-DM4	0.95	275.3	290
chMAB-A-DGN-549	1.24	153.2	123
hMAB-A(2, 2)	0.69	32.7	47
hMAB-A(2, 2)-sSPDB-DM4	1.11	13.3	12
hMAB-A(2, 2)-DGN549	1.55	22.3	14
hMAB-A(2C, 2)	1.22	3.8	3
hMAB-A(2C, 2)-sSPDB-DM4	1.50	4.4	3
hMAB-A(2C, 2)-DGN549	1.99	5.6	3
hMAB-A(2I, 2)	1.49	4.1	3
hMAB-A(2I, 2)-sSPDB-DM4	1.55	4.9	3
hMAB-A(2I, 2)-DGN549	2.25	6.6	3
hMAB-A(2I, 2)S442C	1.33	3.8	3
hMAB-A(2I, 2)S442C-DGN549	2.49	6.2	2

## 【0370】

## 実施例11

N-(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル)-11-(3-(((S)-8-メトキシ-6-オキソ-11,12,12a,13-テトラヒドロ-6H-ベンゾ[5,6][1,4]ジアゼピノ[1,2-a]インドール-9-イル)オキシ)メチル)-5-(((S)-8-メトキシ-6-オキソ-12a,13-ジヒドロ-6H-ベンゾ[5,6][1,4]ジアゼピノ[1,2-a]インドール-9-イル)オキシ)メチル)フェニル)-13,13-ジメチル-2,5,8-トリオキサ-14,15-ジチア-11-アザノナデカン-19-アミド(化合物D6)の合成

10

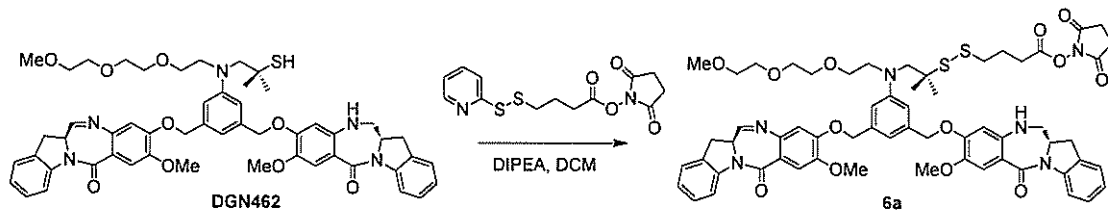
20

30

40

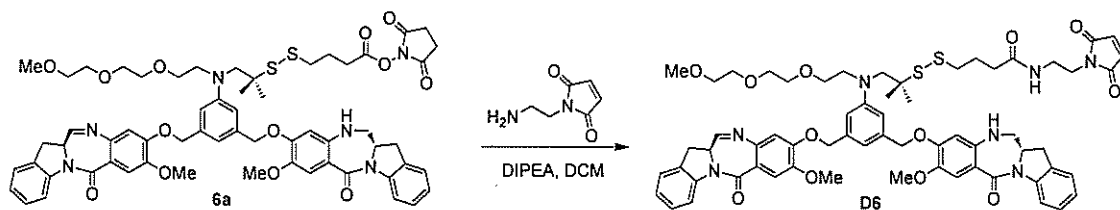
50

## 【化 1 6 7】



工程 1：遊離チオール DGN462 (40 mg、0.042 mmol) 及び NHS 4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート (35 mg、純度 80%、0.085 mmol) の無水ジクロロメタン (0.5 mL) 溶液に、無水ジイソプロピルエチルアミン (0.015 mL、0.085 mmol) を加え、室温で 16 時間撹拌した。反応混合物を飽和塩化ナトリウムでクエンチし、ジクロロメタンで希釈した。得られた混合物を分液漏斗で分離した。有機層を食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、減圧下で蒸留した。残渣を半分取逆相 HPLC (C18 カラム、CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) によって精製した。純粋な生成物を含むフラクションを合わせ、凍結させ、凍結乾燥し、所望の NHS エステルである化合物 6a を得た (29.7 mg、60% 収率)。LCMS = 9.1 分 (15 分法)。MS (m/z) : 1157.3 (M + 1)<sup>+</sup>。

## 【化 1 6 8】



## 【0 3 7 1】

工程 2：NHS エステルである化合物 6a (12.3 mg、0.011 mmol) 及び N-(2-アミノエチル)マレイミド塩酸塩 (2.0 mg、0.011 mmol) の無水ジクロロメタン (0.3 mL) 溶液に、DIPEA (0.0022 mL、0.013 mmol) を加えた。混合物を室温で 3 時間撹拌し、次いで、減圧下で蒸留した。残渣を半分取逆相 HPLC (C18 カラム、CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) によって精製した。純粋な生成物を含むフラクションを合わせ、凍結させ、凍結乾燥し、所望のマレイミドである化合物 D6 を得た (10 mg、80% 収率)。LCMS = 8.3 分 (15 分法)。MS (m/z) : 1181.8 (M + 1)<sup>+</sup>。

## 【0 3 7 2】

## 実施例 12

N1-(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル)-N6-((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-メトキシ-6-オキソ-11,12,12a,13-テトラヒドロ-6H-ベンゾ[5,6][1,4]ジアゼピノ[1,2-a]インドール-9-イル)オキシ)メチル)-5-(((S)-8-メトキシ-6-オキソ-12a,13-ジヒドロ-6H-ベンゾ[5,6][1,4]ジアゼピノ[1,2-a]インドール-9-イル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アミノ)-1-オキソプロパン-2-イル)アジパミド (化合物 D5) の合成

10

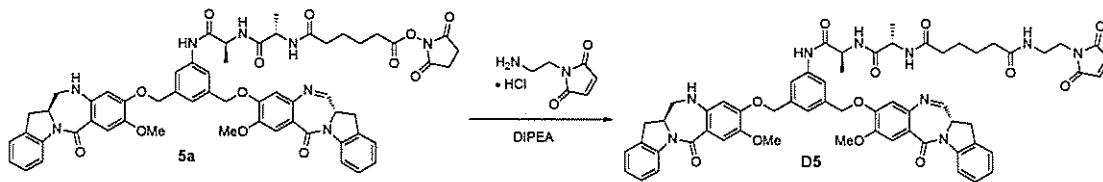
20

30

40

50

## 【化 1 6 9】



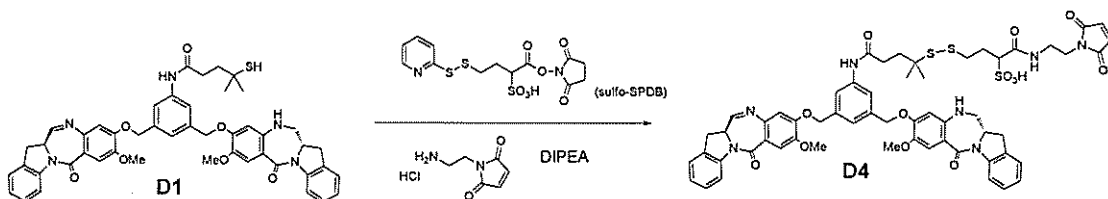
NHSエステルである化合物5a(8.2mg、7.6 $\mu$ mol)及び1-(2-アミノエチル)-1H-ピロール-2,5-ジオン塩酸塩(2.2mg、0.011mmol)を無水ジクロロメタン(305 $\mu$ L)に室温で溶解した。DIPEA(2.66 $\mu$ L、0.015mmol)を加え、反応物を3.5時間撹拌した。反応混合物を濃縮し、RP HPLC(C18カラム、CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O、勾配、35%から55%)によって精製した。所望な生成物フラクションを凍結させ、凍結乾燥し、マレイミドである化合物D5を固体白色粉末として得た(5.3mg、収率58%)。LCMS=5.11分(8分法)。MS(m/z):1100.6(M+1)<sup>+</sup>。

## 【0373】

## 実施例13

1-((2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル)アミノ)-4-((5-((3-((S)-8-メトキシ-6-オキソ-11,12,12a,13-テトラヒドロ-6H-ベンゾ[5,6][1,4]ジアゼピノ[1,2-a]インドール-9-イル)オキシ)メチル)-5-((S)-8-メトキシ-6-オキソ-12a,13-ジヒドロ-6H-ベンゾ[5,6][1,4]ジアゼピノ[1,2-a]インドール-9-イル)オキシ)メチル)フェニル)アミノ)-2-メチル-5-オキソペンタン-2-イル)1スルファニル)-1-オキソブタン-2-スルホン酸(化合物D4)の合成

## 【化 1 7 0】



## スルホ-SPDB

遊離チオールD1(88mg、0.105mmol)及び1-((2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ)-1-オキソ-4-(ピリジン-2-イルジスルファニル)ブタン-2-スルホン酸(スルホ-SPDB)(64.0mg、0.158mmol)の無水ジクロロメタン(2.10mL)懸濁物に、DIPEA(55.0 $\mu$ L、0.315mmol)を窒素下、室温に加えた。混合物を16時間撹拌し、次いで、1-(2-アミノエチル)-1H-ピロール-2,5-ジオン塩酸塩(55.6mg、0.315mmol)、無水ジクロロメタン(1.0mL)及びDIPEA(0.055mL、0.315mmol)を加えた。混合物を室温で更に5時間撹拌し、その時点で、反応物を高減圧下で濃縮した。得られた残渣をRP-HPLC(C18、CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)によって精製した。所望の生成物を含有するフラクションを凍結させ、凍結乾燥し、マレイミドD4(20mg、収率16%)を白色固体として得た。LCMS=4.92分(8分法)。MS(m/z):1158.6(M+1)<sup>+</sup>。

## 【0374】

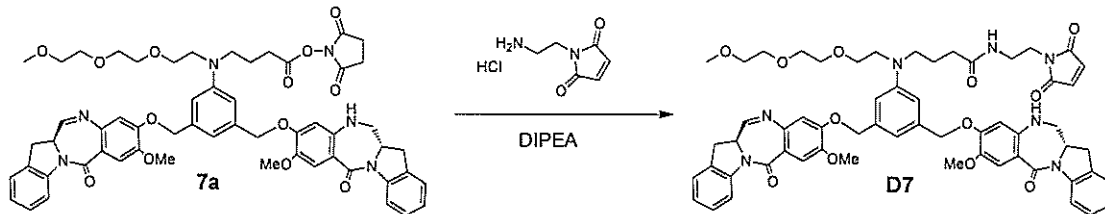
## 実施例14

N-(2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチ



ル) - 11 - (3 - (( (S) - 8 - メトキシ - 6 - オキソ - 11, 12, 12a, 13 - テトラヒドロ - 6H - ベンゾ[5, 6][1, 4]ジアゼピノ[1, 2-a]インドール - 9 - イル) オキシ) メチル) - 5 - (( (S) - 8 - メトキシ - 6 - オキソ - 12a, 13 - ジヒドロ - 6H - ベンゾ[5, 6][1, 4]ジアゼピノ[1, 2-a]インドール - 9 - イル) オキシ) メチル) フェニル) - 2, 5, 8 - トリオキサ - 11 - アザペンタデカン - 15 - アミド (化合物 D7) の合成

#### 【化171】



10

NHSエステル7a (5 mg、4.82  $\mu\text{mol}$ ) 及び1-(2-アミノエチル)-1H-ピロール-2,5-ジオン塩酸塩 (1.7 mg、9.64  $\mu\text{mol}$ ) の無水ジクロロメタン (200  $\mu\text{L}$ ) 溶液に、窒素下、DIPEA (1.512  $\mu\text{L}$ 、8.68  $\mu\text{mol}$ ) を加えた。混合物を室温で4時間攪拌し、次いで、高減圧下で濃縮した。得られた残渣をRP-HPLC (C18、 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) によって精製した。所望な生成物を含むフラクションを凍結させ、凍結乾燥し、マレイミドである化合物D7を得た (3.5 mg、収率68%)。LCMS = 4.61分 (15分法)。MS ( $m/z$ ): 1062.8 ( $M+1$ )<sup>+</sup>。

20

#### 【0375】

##### 実施例15

抗ADAM9抗体hMAB-A (2I.2) - S442C - DGN549のシステイン部位特異的コンジュゲートの調製

hMAB-A (2I.2) - S442Cは、配列番号68の軽鎖配列 (配列番号55のVL配列を含む) と、配列番号142の重鎖配列 (配列番号28のVH配列を含む) とを含む、ヒト化/最適化された抗体であり、Xがリシンである場合、配列番号142の6番目から最後の残基に対応する操作されたCysを含み、またはXが存在しない場合、配列番号142の5番目から最後の残基に対応する操作されたCysを含む。

30

#### 【0376】

hMAB-A (2I.2) - S442C抗体の2つの対になっていないシステイン残基を、標準的な手順を用いて還元した。この中間体のリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 溶液に、5 mMのN, N, N', N' - エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (pH 6.0) を加え、N, N - ジメチルアセトアミド (DMA)、プロピレングリコール及び10モル当量のDGN549-C (化合物D5) をDMAのストック溶液として加え、PBS 5 mM EDTA (pH 6.0) 中の最終溶媒組成が2% (v/v) DMA及び38% (v/v) プロピレングリコールである反応混合物を得て、反応を25℃で一晩進めた。

#### 【0377】

コンジュゲートを、20 mMコハク酸塩、8.5%ショ糖、0.01% Tween-20、50  $\mu\text{M}$  の重硫酸ナトリウム (pH 4.2) で、Sephadex G-25 Fine脱塩カラムを取り付けた迅速タンパク質液体クロマトグラフィー (FPLC) 系を用い、流速を5 mL/分に設定して精製した。次いで、コンジュゲートを0.22  $\mu\text{m}$  シリンジフィルターによって濾過した。コンジュゲートは、平均で1.9 mol DGN549/mol抗体を含むことがUV-visによって判明し、97.6%のモノマーを含むことがSECによって判明し、0.8%の結合していないDGN549を含むことがタンデムSEC/RP-UPLCによって判明した。脱グリコシル化したコンジュゲートのLC-MSは示していない。

40

#### 【0378】

50

## 実施例 16

抗ADAM9抗体のリシンが結合したIGNコンジュゲートの調製

a. hMAB-A(2I.2)-DGN549の調製

hMAB-A(2I.2)は、配列番号68の軽鎖配列と、配列番号52の重鎖配列とを含むヒト化/最適化された抗体である。15mMの2-[4-(ヒドロキシエチル)ピペリジン-1-イル]エタンスルホン酸(HEPES)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)を用いてpH8.5で緩衝化したhMAB-A(2I.2)抗体を含有する溶液に、4.8当量のDGN549-L(化合物D2)をDMAのストック溶液として加え、最終溶媒組成を10%(v/v)DMA及び90%(v/v)バッファー水溶液とした。反応を25℃で4時間進めた。

10

## 【0379】

コンジュゲートを、20mMのコハク酸塩、8.5%のショ糖、0.01% Tween-20、50μMの重硫酸ナトリウム(pH5.2)中、Sephadex G-25脱塩カラムで精製し、このバッファーに対し、10kDaの分子量カットオフ値を有する膜を用いて透析し、0.22μmシリンジフィルターで濾過した。

## 【0380】

コンジュゲートは、平均で2.8mol DGN549/mol抗体を含むことがUV-visによって判明し、98.6%のモノマーを含むことがSECによって判明し、0.5%未満の結合していないDGN549を含むことがタンデムSEC/RP-UPLCによって判明した。脱グリコシル化したコンジュゲートのLC-MSは示していない。

20

b. hMAB-A(2.2)-DGN549の調製

## 【0381】

hMAB-A(2.2)は、配列番号68の軽鎖配列と、配列番号50の重鎖配列とを含むヒト化抗体である。hMAB-A(2.2)抗体は、hMAB-A(2I.2)-DGN549について記載したのと同じ条件で、DGN549に結合されたが、但し、4.4当量のDGN549-L(化合物D2)を反応物に加えた。hMAB-A(2.2)-DGN549は、hMAB-A(2I.2)-DGN549について記載したのと同じ様式で精製された。

## 【0382】

精製されたhMAB-A(2.2)-DGN549は、平均で2.7mol DGN549/mol抗体を含むことがUV-visによって判明し、95.6%のモノマーを含むことがSECによって判明し、0.6%の結合していないDGN549を含むことがタンデムSEC/RP-UPLCによって判明した。脱グリコシル化したコンジュゲートのLC-MSは示していない。

30

c. hMAB-A(2C.2)-DGN549の調製

## 【0383】

hMAB-A(2C.2)は、配列番号68の軽鎖配列と、配列番号51の重鎖配列とを含むヒト化/最適化された抗体である。

## 【0384】

hMAB-A(2C.2)抗体は、hMAB-A(2I.2)-DGN549について記載したのと同じ条件で、DGN549に結合されたが、但し、4.9当量のDGN549-L(化合物D2)を反応物に加えた。hMAB-A(2C.2)-DGN549は、hMAB-A(2I.2)-DGN549について記載したのと同じ様式で精製された。

40

## 【0385】

精製されたhMAB-A(2C.2)-DGN549は、平均で2.8mol DGN549/mol抗体を含むことがUV-visによって判明し、98.6%のモノマーを含むことがSECによって判明し、0.6%未満の結合していないDGN549を含むことがタンデムSEC/RP-UPLCによって判明した。脱グリコシル化したコンジュゲートのLC-MSは示していない。

d. chMAB-A-DGN549、chMAB-A-sSPDB-IGN137、c

50

### hMAB - A - I G N 2 3 及び c h M A B - A - s S P D B - D G N 4 6 2 の調製 【 0 3 8 6 】

c h M A B - A 抗体は、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - D G N 5 4 9 について記載したのと同じ条件で、D G N 5 4 9 に結合されたが、但し、3 . 4 当量の D G N 5 4 9 - L ( 化合物 D 2 ) を反応物に加えた。c h M A B - A ( 2 C . 2 ) - D G N 5 4 9 は、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - D G N 5 4 9 について記載したのと同じ様式で精製されたが、但し、コンジュゲートを、20 mM ヒスチジン、50 mM 塩化ナトリウム、8 . 5 % ショ糖、0 . 0 1 % T w e e n - 2 0、50  $\mu$  M 重硫酸ナトリウム ( p H 6 . 2 ) 中で精製した。精製された c h M A B - A - D G N 5 4 9 は、平均で 2 . 7 m o l D G N 5 4 9 / m o l 抗体を含むことが U V - v i s によって判明し、94 . 4 % のモノマーを含むことが S E C によって判明し、0 . 4 % 未満の結合していない D G N 5 4 9 を含むことがタンデム S E C / R P - U P L C によって判明した。脱グリコシル化したコンジュゲートの L C - M S は示していない。

10

### 【 0 3 8 7 】

c h M A B - A 抗体は、米国特許第 9 , 3 8 1 , 2 5 6 号に既に記載されているように、スルホ - S P D B リンカーを介し、I G N 1 3 7 ( 化合物 D 1 ) に結合された。コンジュゲートは、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - D G N 5 4 9 について記載したのと同じ様式で精製されたが、但し、コンジュゲートを、20 mM ヒスチジン、50 mM 塩化ナトリウム、8 . 5 % ショ糖、0 . 0 1 % T w e e n - 2 0、50  $\mu$  M 重硫酸ナトリウム ( p H 6 . 2 ) 中で精製した。コンジュゲートは、平均で 2 . 9 m o l I G N 1 3 7 / m o l 抗体を含むことが U V - v i s によって判明し、88 . 4 % のモノマーを含むことが S E C によって判明し、0 . 4 % 未満の結合していない I G N 1 3 7 を含むことがタンデム S E C / R P - U P L C によって判明した。脱グリコシル化したコンジュゲートの L C - M S は示していない。

20

### 【 0 3 8 8 】

c h M A B - A 抗体は、米国特許第 8 , 4 2 6 , 4 0 2 号に既に記載されているように、I G N 2 3 ( 化合物 D 3 ) に結合された。コンジュゲートは、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - D G N 5 4 9 について記載したのと同じ様式で精製されたが、但し、コンジュゲートを、20 mM ヒスチジン、50 mM 塩化ナトリウム、8 . 5 % ショ糖、0 . 0 1 % T w e e n - 2 0、50  $\mu$  M 重硫酸ナトリウム ( p H 6 . 2 ) 中で精製し、透析は行わなかった。コンジュゲートは、平均で 3 . 2 m o l I G N 2 3 / m o l 抗体を含むことが U V - v i s によって判明し、97 . 9 % のモノマーを含むことが S E C によって判明し、1 . 2 % の結合していない I G N 2 3 を含むことが逆相 H P L C 分析によって判明した。脱グリコシル化したコンジュゲートの L C - M S は示していない。

30

### 【 0 3 8 9 】

c h M A B - A 抗体は、米国特許第 8 7 6 5 7 4 0 号に既に記載されているように、スルホ - S P D B を介し、D G N 4 6 2 に結合された。コンジュゲートは、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - D G N 5 4 9 について記載したのと同じ様式で精製されたが、但し、コンジュゲートを、20 mM ヒスチジン、50 mM 塩化ナトリウム、8 . 5 % ショ糖、0 . 0 1 % T w e e n - 2 0、50  $\mu$  M 重硫酸ナトリウム ( p H 6 . 2 ) 中で精製し、透析は行わなかった。コンジュゲートは、平均で 2 . 8 m o l D G N 4 6 2 / m o l 抗体を含むことが U V - v i s によって判明し、95 . 6 % のモノマーを含むことが S E C によって判明し、0 . 5 % の結合していない D G N 4 6 2 を含むことが逆相 H P L C 分析によって判明した。脱グリコシル化したコンジュゲートの L C - M S は示していない。

40

### 【 0 3 9 0 】

#### 実施例 1 7

抗 A D A M 9 抗体のリシンが結合した D M コンジュゲートの調製

a . h M A B - A ( 2 I . 2 ) - s S P D B - D M 4 の調製

h M A B - A ( 2 I . 2 ) は、配列番号 6 8 の軽鎖配列と、配列番号 5 2 の重鎖配列とを含むヒト化 / 最適化された抗体である。

50

## 【0391】

hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4コンジュゲートを調製するために、スルホ-SPDB(sSPDB)及びDM4付加を工程ごとに進める様式で行った。第1に、hMAB-A(2I.2)抗体を含み、50mM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(EPPS)を用いてpH8.1に緩衝化した溶液に、50mMの塩化ナトリウムをDMA及び11.5当量のDMAストック溶液からのsSPDBと混合し、最終溶媒組成を10%(v/v)DMA及び90%(v/v)バッファ-水溶液とした。第1の反応工程を25で4時間進めた後、17.3当量のDMAストック溶液からのDM4、500mMのEPPS/500mMの塩化ナトリウム(pH8.1)バッファ-を反応混合物に加え、第1の反応工程からの最終溶媒組成を10%(v/v)DMA及び90%(v/v)バッファ-水溶液とし、これを維持した。第2の反応工程を25で一晩進めた。

10

## 【0392】

コンジュゲートを、10mMのコハク酸塩、250mMのグリシン、0.5%のショ糖、0.01% Tween-20(pH5.5)中、Sephadex G-25脱塩カラムで精製し、このバッファ-に対し、10kDaの分子量カットオフ値を有する膜を用いて透析し、0.22µmシリンジフィルターで濾過した。

## 【0393】

コンジュゲートは、UV-visにより平均で3.5mol DM4/mol抗体であり、SECにより99.2%がモノマーであり、混合モードのHPLCにより、1.7%未満が結合していないDM4であった。脱グリコシル化したコンジュゲートのLC-MSは示していない。

20

b. hMAB-A(2C.2)-sSPDB-DM4の調製

## 【0394】

hMAB-A(2C.2)は、配列番号68の軽鎖配列と、配列番号51の重鎖配列とを含むヒト化/最適化された抗体である。

## 【0395】

hMAB-A(2C.2)抗体は、sSPDBリンカーを介し、hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4について記載したのと同じ方法を用い、DM4に結合された。このコンジュゲートは、hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4について記載したのと同じ様式で精製された。

30

## 【0396】

コンジュゲートは、UV-visにより平均で3.2mol DM4/mol抗体であり、SECにより98.9%がモノマーであり、混合モードのHPLCにより、2.6%が結合していないDM4であった。脱グリコシル化したコンジュゲートのLC-MSは示していない。

c. hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4の調製

## 【0397】

hMAB-A(2.2)は、配列番号68の軽鎖配列と、配列番号50の重鎖配列とを含むヒト化抗体である。

40

## 【0398】

hMAB-A(2.2)抗体は、sSPDBリンカーを介し、hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4について記載したのと同じ方法を用い、DM4に結合された。コンジュゲートを、10mMコハク酸塩、250mMグリシン、0.5%ショ糖、0.01% Tween-20(pH5.5)で、Sephadex G-25 Fine脱塩カラムを取り付けた迅速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)系を用いて精製し、次いで、0.22µmシリンジフィルターによって濾過した。

## 【0399】

コンジュゲートは、UV-visにより平均で3.2mol DM4/mol抗体であり、SECにより97.4%がモノマーであり、混合モードのHPLCにより、1.1%

50

未満が結合していないDM4であった。脱グリコシル化したコンジュゲートのLC-MSは示していない。

d . c h M A B - A - s S P D B - D M 4 及び c h M A B - A - S M C C - D M 1 の調製【0400】

c h M A B - A 抗体は、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - s S P D B - D M 4 について記載したのと同じ方法を用いたが、但し、6 . 4 当量の s S P D B 及び 9 . 6 当量の D M 4 をそれぞれの反応工程で使用し、スルホ - S P D B リンカーを介し、D M 4 に結合された。このコンジュゲートは、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - s S P D B - D M 4 について記載したのと同じ様式で精製されたが、但し、透析は行わなかった。コンジュゲートは、U V - v i s により平均で 3 . 4 m o l D M 4 / m o l 抗体であり、S E C により 9 7 . 0 % がモノマーであり、混合モードの H P L C により、4 . 7 % が結合していない D M 4 であった。脱グリコシル化したコンジュゲートの LC - M S は示していない。

10

【0401】

c h M A B - A 抗体は、米国特許第 8 6 2 4 0 0 3 号に既に記載されている方法を用い、S M C C リンカーを介し、D M 1 に結合された。このコンジュゲートは、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - s S P D B - D M 4 について記載したのと同じ様式で精製されたが、但し、透析は行わなかった。コンジュゲートは、U V - v i s により平均で 3 . 9 m o l D M 1 / m o l 抗体であり、S E C により 9 9 . 7 % がモノマーであり、混合モードの H P L C により、4 . 9 % が結合していない D M 1 であった。脱グリコシル化したコンジュゲートの LC - M S は示していない。

20

【0402】

#### 実施例 18

##### 抗 ADAM9 抗体薬物コンジュゲートのインビトロ細胞毒性

A D A M 9 を発現する細胞株のパネルに対する種々の抗 A D A M 9 抗体免疫コンジュゲートのインビトロ細胞毒性を、標的ではない I g G 1 コンジュゲートと比較した。具体的には、治療の 24 時間前に、500 ~ 2000 細胞/ウェルを 96 ウェルプレートに接種した。コンジュゲートを、段階的な 3 倍希釈を用い、培地で希釈し、ウェルあたり 100  $\mu$ L を加えた。細胞を含むが、コンジュゲートを含まない対照ウェルと、培地のみを含むウェルが、各アッセイプレートに含まれていた。各データ点について、アッセイを 3 個ずつ実施した。プレートを加湿した 5 % C O <sub>2</sub> インキュベータ中、37 °C で 4 ~ 5 日間インキュベートした。次いで、W S T - 8 に基づく C e l l C o u n t i n g K i t - 8 ( D o j i n d o M o l e c u l a r T e c h n o l o g i e s ) を用い、各ウェル中の生存可能な細胞の相対数を決定した。まず、培地バックグラウンド吸光度で補正し、次いで、それぞれの値を、対照ウェル ( 未処理細胞 ) の値の平均で割り算することによって、各ウェル中の細胞の生存している分率を計算した。生存している細胞の割合を、コンジュゲート濃度に対してプロットし、活性の E C 50 を、非線形回帰分析 ( G r a p h P a d P r i m s 4 . 0 ) を用いて計算した。

30

【0403】

これらの結果は、抗 A D A M 9 免疫コンジュゲートが、肺、脾臓、腎臓、前立腺及び結腸の腫瘍細胞株を含め、広範囲の A D A M 9 陽性腫瘍細胞株を殺すことができることを示す ( 図 9 A ~ 9 H ) 。試験したそれぞれの場合に、良好な特異性ウィンドウが観察され、このことは、細胞毒性が、標的細胞に対する抗 A D A M 9 抗体の特異的な結合の結果であることを示唆している。特に、抗 A D A M 9 - D G N 5 4 9 コンジュゲート ( h M A B - A ( 2 . 2 ) - D G N 5 4 9 及び h M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 ) は、特に強力であり、I C 50 値が 1 ~ 115 p M であり、標的ではない I g G 1 コンジュゲートよりも約 3 l o g 活性が高かった ( 表 15 を参照 ) 。

40

【表 19 - 1】

表 15

細胞株	疾患型	抗ADAM9 ADC	インビトロ細胞毒性 (IC <sub>50</sub> nM)	特異性の倍率 変化 (IC <sub>50</sub> 対照 ADC/ IC <sub>50</sub> 抗AD AM9 AD C)
NCI-H1703	NSCLS - 扁平上皮細胞	hMAB-A (2, 2) - sSPDB-DM4	0.024	152
		hMAB-A (2I, 2) - sSPDB-DM4	0.028	132
		hMAB-A (2, 2) - DGN549	0.002	> 1000
		hMAB-A (2I, 2) S442C-DGN549	0.004	> 1000
		hMAB-A (2, 2) - sSPDB-DM4	2.729	9
DLD-1	結腸直腸腺癌	hMAB-A (2I, 2) - sSPDB-DM4	0.386	63
		hMAB-A (2, 2) - DGN549	0.010	> 1000
		hMAB-A (2I, 2) S442C-DGN549	0.045	> 1000
		hMAB-A (2, 2) - sSPDB-DM4	0.119	27
		hMAB-A (2I, 2) - sSPDB-DM4	0.108	30
A498	腎臓癌	hMAB-A (2, 2) - DGN549	0.001	> 1000
		hMAB-A (2I, 2) S442C-DGN549	0.004	> 1000

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

DU145	前立腺癌	hMAB-A (2. 2) - sSPDB-DM4	0.570	25
		hMAB-A (2 I. 2) - sSPDB-DM4	0.439	32
		hMAB-A (2. 2) -DGN549	0.002	>1000
		hMAB-A (2 I. 2) S442C-DGN549	0.004	>1000
HPAF2	膵臓腺癌	hMAB-A (2. 2) - sSPDB-DM4	0.622	9
		hMAB-A (2 I. 2) - sSPDB-DM4	0.422	13
		hMAB-A (2. 2) -DGN549	0.043	>1000
		hMAB-A (2 I. 2) S442C-DGN549	0.115	>1000
IGROV1	卵巣腺癌	hMAB-A (2. 2) - sSPDB-DM4	4.078	3
		hMAB-A (2 I. 2) - sSPDB-DM4	1.411	8
		hMAB-A (2. 2) -DGN549	0.001	>1000
		hMAB-A (2 I. 2) S442C-DGN549	0.003	>1000
KATOIII	胃癌	hMAB-A (2. 2) - sSPDB-DM4	1.154	5
		hMAB-A (2 I. 2) - sSPDB-DM4	0.480	11
		hMAB-A (2. 2) -DGN549	0.031	>1000
		hMAB-A (2 I. 2) S442C-DGN549	0.065	>1000

10

20

30

40

50

【表 1 9 - 3】

H S 5 7 8 T	乳 癌	h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4	0. 119	16
		h M A B - A ( 2 I . 2 ) - s S P D B - D M 4	0. 094	20
		h M A B - A ( 2 . 2 ) - D G N 5 4 9	0. 009	> 1 0 0 0
		h M A B - A ( 2 I . 2 ) S 4 4 2 C - D G N 5 4 9	0. 017	646

10

20

30

40

## 【 0 4 0 4 】

## 実施例 1 9

C a l u 3 ヒト非小細胞肺腺癌異種移植片を有する S C I D マウスにおける抗 A D A M 9 抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性

種々の投薬量の h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 及び 1 種類の投薬量の c h M A B - A - D G N 5 4 9 コンジュゲートの抗腫瘍活性を、ヒト肺腺癌皮下異種移植モデルである C a l u 3 細胞を含む雌 S C I D マウスで評価した。

## 【 0 4 0 5 】

接種のために C a l u 3 細胞を集め、トリパンブルー排除によって 9 9 % 生存率を決定

50



した。マウスに、0.2 mlの50% Matrigel / 50% 無血清培地中の  $5 \times 10^6$  個の Calu3 細胞を、右後側の脇腹領域に、皮下注射によって接種した。84匹の雌 SCIDマウス(6週齢)を Charles River Laboratories から得た。受領したら、試験開始前に9日間、動物を観察した。動物は、到着時、または治療前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。

#### 【0406】

84匹のマウスを、腫瘍体積によって、8グループ(1グループあたり8匹のマウス)に無作為に分けた。腫瘍体積は、74.09 ~ 150.21 (106.41 ± 18.69、平均 ± SD) mm<sup>3</sup> の範囲であった。マウスを測定し、移植から6日後の腫瘍体積に基づき、無作為に分けた。移植から7日目に、マウスに投薬した。マウスの体重は、16.05 ~ 21.72 (18.64 ± 1.03、平均 ± SD) グラムであった。各グループ中のマウスは、パンチ法によって特定した。試験薬剤及びピヒクルの投与は、27ゲージ、1/2インチ針を取り付けた1.0 mLのシリンジを用いることによって、静脈内で行われた。グループを以下のように分けた。ピヒクル(PBS)を投薬した対照グループ、chKITI-sSPDB-DM4を5 mg/kg、qdx1、hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4を1.25 mg/kg(抗体による)、qdx1、hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4を2.5 mg/kg(抗体による)、qdx1、hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4を5 mg/kg(抗体による)、qdx1及びchMAB-A-DGN549を10 µg/kg(ペイロードによる; 抗体によると0.6 mg/kg)、qdx1。

#### 【0407】

カリパスを用い、1週間に2回、腫瘍サイズを三次元で測定した。式  $V = \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ} \times 1/2$  を用い、腫瘍体積をmm単位で表した。マウスは、腫瘍体積が50%以上減っているときに、部分的な退縮(PR)であるとされ、明白な腫瘍が消えたときに、完全な腫瘍退縮(CR)であるとされ、腫瘍のない生存者(TFS)は、試験終了時に腫瘍のないマウスの数である。腫瘍体積及び体重は、StudyLogソフトウェアによって決定した。Log<sub>10</sub>細胞死(LCK)は、式  $LCK = (T - C) / T_d \times 3.32$  を用いて計算され、ここで、(T - C)、すなわち、腫瘍成長遅れ(TGD)は、治療グループ及び対照グループについて、腫瘍が所定のサイズである815 mm<sup>3</sup>に達するまで(腫瘍のない生存者は除く)のメジアン時間(単位は日数)であり<sup>1</sup>、T<sub>d</sub>は、マウスにおける腫瘍倍加時間であり(対照の腫瘍成長の毎日のメジアンの非線形対数曲線フィッティングから概算)、xは、細胞成長のlogあたりの細胞倍加数である。%T/C(腫瘍成長阻害)は、対照の終点での対照のメジアンTVに対する、所定時間(すなわち、対照腫瘍のメジアンTVが、最大腫瘍体積に達するまでの時間、すなわち、TVが1000 mm<sup>3</sup>に達するまでの時間であるか、または腫瘍が壊死状態になったため、全ての対照グループのマウスが試験から離脱する時点である)での治療グループのメジアン腫瘍体積(TV)の比率である。

#### 【0408】

全てのマウスの体重を、薬物毒性の粗い指標として週に2回測定した。マウスの体重(BW)は、以下のように、治療前の体重からの体重の変化率として表された。BW変化率% = [(BW後 / BW前) - 1] × 100。ここで、BW後は、治療後の体重であり、BW前は、治療前の開始時の体重である。体重減少(BWL)の割合は、治療後の体重の平均変化として表された。腫瘍体積が1000 mm<sup>3</sup>より大きくなるか、または壊死したら、または体重が試験中の任意の時間点で20%を超えて減少したら、動物を安楽死させた。

#### 【0409】

この試験の結果は、図10に示されている。hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 コンジュゲートは、試験した全ての投薬量で活性であった。hMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4 コンジュゲートは、腫瘍成長阻害(T/C)値が39%であり、T-C値が17であり、投薬量1.25 mg/kgでLCK値が0.5であり(8匹のマウスのうち、3匹が部分的な退縮であり、さらに完全な退縮)、投薬量2.5 mg/kgで

T / C 値は 25 %、T - C 値は 22、L C K 値は 0.7 (8 匹のマウスのうち、3 匹が部分的な退縮、完全な退縮はなし)、投薬量 5 mg / kg で T / C 値は 14 %、T - C 値は 36、L C K 値は 1.1 (8 匹のマウスのうち、4 匹が部分的な退縮、8 匹のマウスのうち、1 匹が完全な退縮)であった。c h M A B - A - D G N 5 4 9 は、10  $\mu$  g / kg (ペイロードによる、抗体によれば 0.6 mg / kg) で非常に活性であり、8 匹のマウスのうち、8 匹が完全に退縮した。h M A B - A (2.2) - s S P D B - D M 4、または c h M A B - D G N 5 4 9、または c h K T I - s S P D B - D M 4 コンジュゲートのいずれも、指定の投薬量で顕著な体重減少はみられず、そのため、3 種類全てのコンジュゲートは、この試験では、指定の投薬量でマウスにおいて十分に忍容性であった。この結果は、h M A B - A (2.2) - s S P D B - D M 4 コンジュゲートが、このモデルにおいて、種々の投薬量で活性であることを示す。この結果は、c h M A B - A - D G N 5 4 9 が、10  $\mu$  g / kg (ペイロードによる、抗体によれば 0.6 mg / kg) で非常に活性であることを示している。

10

#### 【0410】

1 回 i . v . 投薬したときの種々の投薬量の h M A B - A (2 I . 2) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 の抗腫瘍活性も、N S C L C モデルである C a l u - 3 腫瘍異種移植片を有する雌 S C I D マウスで評価した。接種から 6 日後、腫瘍体積によってマウスを無作為に 8 グループに分けた (グループあたり n = 8)。治療群は、ビヒクル (P B S) を投薬した対照グループ、h M A B - A (2 I . 2) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 コンジュゲートを 0.5 (ペイロードによる、抗体によれば 0.04 mg / kg)、1 (ペイロードによる、抗体によれば 0.08 mg / kg)、3 (ペイロードによる、抗体によれば 0.25 mg / kg) 及び 10  $\mu$  g / kg (ペイロードによる、抗体によれば 0.8 mg / kg) を 1 回、静脈内に投薬、及び h u K T I - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 コンジュゲートの標的ではない対照を 1 (ペイロードによる、抗体によれば 0.08 mg / kg)、3 (ペイロードによる、抗体によれば 0.25 mg / kg) 及び 10  $\mu$  g / kg (ペイロードによる、抗体によれば 0.8 mg / kg) を 1 回、静脈内に投薬を含んでいた。

20

#### 【0411】

腫瘍体積及び体重を上述のように測定し、結果を図 11 に示している。簡単に言うと、h M A B - A (2 I . 2) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 は、最も低い投薬量である 0.5  $\mu$  g / kg (ペイロードによる、抗体によれば 0.04 mg / kg) でさえ、非常に活性であり、強力な活性が、1 (ペイロードによる、抗体によれば 0.08 mg / kg)、3 (ペイロードによる、抗体によれば 0.25 mg / kg)、10  $\mu$  g / kg (ペイロードによる、抗体によれば 0.8 mg / kg) の投薬量で観察された。標的ではない対照である h u K T I - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 は、このモデルでは、試験した全ての 3 種類の投薬量で不活性であった。すなわち、1 (ペイロードによる、抗体によれば 0.08 mg / kg)、3 (ペイロードによる、抗体によれば 0.25 mg / kg) 及び 10  $\mu$  g / kg (ペイロードによる、抗体によれば 0.8 mg / kg)。h M A B - A (2 I . 2) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 は、0.5  $\mu$  g / kg (ペイロードによる、抗体によれば 0.04 mg / kg) で、T / C が 7 % であり、試験終了時で 7 / 8 が P R、0 / 8 が C R であった。h M A B - A (2 I . 2) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 は、1  $\mu$  g / kg (ペイロードによる、抗体によれば 0.08 mg / kg) で、T / C が 2 % であり、試験終了時に 8 / 8 が P R、2 / 8 が C R であった。h M A B - A (2 I . 2) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 は、3  $\mu$  g / kg (ペイロードによる、抗体によれば 0.25 mg / kg) で、T / C が 0 % であり、試験終了時に 8 / 8 が P R、8 / 8 が C R であり、h M A B - A (2 I . 2) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 は、10  $\mu$  g / kg (ペイロードによる、抗体によれば 0.8 mg / kg) で、T / C が 0 % であり、試験終了時に 8 / 8 が P R、8 / 8 が C R であった。

30

40

#### 【0412】

h M A B - A (2 I . 2) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 (0.5、1、3、10  $\mu$  g / kg、ペイロードによる) 及び h u K T I - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 (1、3、10  $\mu$

50

g / k g、ペイロードによる)は、両方とも、この試験で指定の全ての投薬量で、マウスにおいて十分に忍容性であった。ここに示した用量では、2つのコンジュゲートのいずれかを用い、顕著な体重減少はみられなかった。この試験からの結果は、h M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 コンジュゲートが、競合する抗腫瘍活性を示し、C a l u - 3 非小細胞肺癌腫瘍異種移植片モデルにおいて非常に有効であることを示唆している。

#### 【 0 4 1 3 】

##### 実施例 2 0

H 1 7 0 3 ヒト非小細胞肺扁平上皮癌異種移植片を有する S C I D マウスにおける抗 A D A M 9 抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性

種々の投薬量の h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 コンジュゲートの抗腫瘍活性を、N S C L C 扁平上皮細胞癌異種移植片モデルである、H 1 7 0 3 細胞を有する雌 S C I D マウスで評価した。

#### 【 0 4 1 4 】

接種のために H I 7 0 3 細胞を集め、トリパンブルー排除によって 1 0 0 % 生存率を決定した。マウスに、0 . 2 m l の 5 0 % M a t r i g e l / 5 0 % 無血清培地中の  $5 \times 10^6$  個の H 1 7 0 3 細胞を、右後側の脇腹領域に、皮下注射によって接種した。7 2 匹の雌 N u d e マウス ( 6 週齢 ) を 3 / 2 4 / 1 6 に C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s から得た。受領したら、試験開始前に 8 日間、動物を観察した。動物は、到着時、または治療前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。

4 8 匹のマウスを、腫瘍体積によって、8 グループ ( 1 グループあたり 6 匹のマウス ) に無作為に分けた。腫瘍体積は、7 6 . 1 8 ~ 1 5 9 . 0 0 ( 1 1 5 . 1 9  $\pm$  2 2 . 0 8 、平均  $\pm$  S D ) m m <sup>3</sup> の範囲であった。マウスを測定し、移植から 1 9 日後の腫瘍体積に基づき、無作為に分けた。移植 ( 4 / 2 1 / 1 6 ) から 2 0 日目に、マウスに投薬した。マウスの体重は、2 0 . 2 0 ~ 2 9 . 1 5 ( 2 3 . 8 8  $\pm$  1 . 9 5 、平均  $\pm$  S D ) グラムであった。各グループ中のマウスは、パンチ法によって特定した。試験薬剤及びビヒクルの投与は、2 7 ゲージ、1 / 2 インチ針を取り付けた 1 . 0 m L のシリンジを用いることによって、静脈内で行われた。グループは、以下が含まれていた。ビヒクル ( P B S ) を 1 5 0  $\mu$  L / マウスで投薬した対照グループ、q d x 1、c h K T I - s S P D B - D M 4 を 5 m g / k g で、q d x 1、h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 を 1 . 2 5 m g / k g で、q d x 1、h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 を 2 . 5 m g / k g で、q d x 1、h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 を 5 m g / k g で、q d x 1。

#### 【 0 4 1 5 】

腫瘍サイズ及び体重の測定値は、実施例 1 9 に記載したように決定した。この試験の結果を図 1 2 に示している。h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 は、低い投薬量の 2 . 5 m g / k g で非常に活性であり、T / C は 6 %、T - C は 2 8、L C K は 1 . 4 であり ( 6 匹のマウスのうち、3 匹が部分的な退縮、完全な退縮はなし )、5 m g / k g の投薬量で非常に活性であり、T / C が 1 %、T - C が 6 3、L C K が 3 . 2 であった ( 6 匹のマウスのうち、6 匹が部分的な退縮、3 匹が完全な退縮、1 匹が腫瘍のない生存者 )。h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 コンジュゲートは、投薬量 1 . 2 5 m g / k g で不活性であり、腫瘍成長阻害 ( T / C ) が 7 9 %、T - C が 4、L C K が 0 . 2 であった ( 6 匹のマウスのうち、1 匹が部分的な退縮、完全な退縮はなし )。h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4、または c h K T I - s S P D B - D M 4 コンジュゲートのいずれも、指定の投薬量で顕著な体重減少はみられず、そのため、両コンジュゲートは、この試験では、指定の投薬量でマウスにおいて十分に忍容性であった。この結果は、h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 コンジュゲートが、このモデルにおいて、2 . 5 m g / k g の低い投薬量で非常に活性であることを示す。

#### 【 0 4 1 6 】

##### 実施例 2 1

頭頸部異種移植片のDetroit 562扁平上皮癌を有するSCIDマウスにおける抗ADAM9抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性

種々の投薬量のchMAB-A-sSPDB-DM4コンジュゲートの抗腫瘍活性を、咽頭癌異種移植片モデルである、Detroit 562を含む雌CD-I免疫欠損マウスで評価した。

【0417】

マウス(6週齢)を7/1/14にCharles River Laboratoriesから得た。受領したら、試験開始前に15日間、動物を観察した。動物は、到着時、または試験開始前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。接種のためにDetroit 562細胞を集め、トリパンブルー排除によって90%より大きい生存率を決定した。マウスに、0.2mlの50%Matrigel/50%無血清培地中の $5 \times 10^6$ 個のDetroit 562細胞を、右後側の脇腹領域に、皮下注射によって接種した。

10

【0418】

42匹のマウスを、腫瘍体積によって、6グループ(1グループあたり7匹のマウス)に無作為に分けた。腫瘍体積は、 $95.76 \sim 450.83 \text{ mm}^3$ の範囲であった。マウスを測定し、移植から26日後の腫瘍体積に基づき、無作為に分けた。試験薬剤及びビヒクルの投与は、無作為に分けた日の次の日(試験第0日)に、27ゲージの1/2インチ針を取り付けた1.0mlシリンジを用いた腹腔内注射によって行った。このグループは、以下を含んでいた。ビヒクル(PBS)を投薬された対照グループ、chKTI-sSPDB-DM4を5mg/kgで、qdx1、chKTI-sSPDB-DM4を2.5mg/kgで、qdx1、chMAB-A-sSPDB-DM4を5mg/kgで、qdx1、chMAB-A-sSPDB-DM4を2.5mg/kgで、qdx1、chMAB-A-sSPDB-DM4を1.25mg/kgで、qdx1。

20

【0419】

腫瘍サイズ及び体重の測定値は、実施例19に記載したように決定した。この試験の結果を図13に示している。簡単に言うと、chMAB-A-sSPDB-DM4は、試験した3種類全ての投薬レベルで、試験全体にわたって活性であった(5、2.5及び1.25mg/kg)。chMAB-A-sSPDB-DM4は、5mg/kgで、T/Cが32%であり、試験終了時に6/7がPR、1/7がCRであった。chMAB-A-sSPDB-DM4は、2.5mg/kgで、T/Cが27%であり、試験終了時に6/7がPR、2/7がCRであった。chMAB-A-sSPDB-DM4は、1.25mg/kgで、T/Cが37%であり、試験終了時に5/7がPR、0/7がCRであった。chKTI-sSPDB-DM4は、5mg/kgで、T/Cが89%であり、試験終了時に3/7がPR、0/7がCRであった。chKTI-sSPDB-DM4は、5mg/kgで、T/Cが80%であり、試験終了時に、3/7がPR、1/7がCRであった。

30

【0420】

chMAB-A-sSPDB-DM4は、この試験で調べた全ての投薬量で、マウスにおいて十分に忍容性であった。ここに示した用量では、顕著な体重減少はみられなかった。この試験からの結果は、chMAB-A-sSPDB-DM4コンジュゲートが、抗腫瘍活性を示し、Detroit 562咽頭癌腫瘍異種移植片モデルにおいて有効であることを示唆している。

40

【0421】

第2の試験で、種々の投薬量のchMAB-A-sSPDB-DM4コンジュゲートの抗腫瘍活性を、もっと大きな体積のDetroit 562腫瘍異種移植片を有する雌CD-I免疫欠損マウスで評価した。

【0422】

マウス(5週齢)を9/17/14にCharles River Laboratoriesから得た。受領したら、試験開始前に7日間、動物を観察した。動物は、到着時、または試験開始前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。接種のためにDetroit 562細胞を集め、トリパンブルー排除によって90%より大きい生存率を決定した。

50

マウスに、0.2 mlの50% Matrigel / 50%無血清培地中の $5 \times 10^6$ 個のDetroit 562細胞を、右後側の脇腹領域に、皮下注射によって接種した。

#### 【0423】

18匹のマウスを、腫瘍体積によって、3グループ（1グループあたり6匹のマウス）に無作為に分けた。腫瘍体積は、277.51～503.49 mm<sup>3</sup>の範囲であった。マウスを測定し、移植から35日後の腫瘍体積に基づき、無作為に分けた。試験薬剤及びビヒクルの投与は、無作為に分けた日の2日後（試験第1日）に、27ゲージの1/2インチ針を取り付けた1.0 mlシリンジを用いた腹腔内注射によって行った。

グループには、以下が含まれていた。ビヒクル（PBS）を投薬された対照グループ、chMAB-A-sSPDB-DM4を5 mg/kg、qdx1及びchMAB-A-sSPDB-DM4を1.25 mg/kg、qdx1。

10

#### 【0424】

腫瘍サイズ及び体重の測定値は、実施例19に記載したように決定した。この試験の結果を図14に示している。簡単に言うと、chMAB-A-sSPDB-DM4は、試験した2種類の投薬レベルで、試験全体にわたって活性であった（5及び1.25 mg/kg）。chMAB-A-sSPDB-DM4は、5 mg/kgで、T/Cが3%であり、試験終了時に6/6がPR、1/7がCRであった。chMAB-A-sSPDB-DM4は、1.25 mg/kgで、T/Cが14%であり、試験終了時に6/6がPR、0/7がCRであった。

#### 【0425】

20

chMAB-A-sSPDB-DM4は、この試験で調べた両方の投薬量で、マウスにおいて十分に忍容性であった。ここに示した用量では、顕著な体重減少はみられなかった。この試験からの結果は、chMAB-A-sSPDB-DM4コンジュゲートが、抗腫瘍活性を示し、より大きな体積のDetroit 562咽頭癌腫瘍異種移植片モデルで有効であることを示唆している。

#### 【0426】

##### 実施例22

SNU-5胃癌異種移植片を有するNudeマウスにおける抗ADAM9抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性

種々の投薬量のhuMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4及び1種類の投薬量のhuMAB-A(2I.2)-S442C-DGN549コンジュゲートの抗腫瘍活性を、ヒト胃癌異種移植モデルであるSnu-5細胞を含む雌Nudeマウスで評価した。

30

#### 【0427】

接種のためにSnu-5細胞を集め、トリパンブルー排除によって100%生存率を決定した。マウスに、0.1 mlの50% Matrigel / 50%無血清培地中の $5 \times 10^6$ 個のSnu-5細胞を、右後側の脇腹領域に、皮下注射によって接種した。56匹の雌Nudeマウス（6週齢）を1/25/17にCharles River Laboratoriesから得た。受領したら、試験開始前に8日間、動物を観察した。動物は、到着時、または治療前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。

#### 【0428】

40

56匹のマウスを、腫瘍体積によって、7グループ（1グループあたり8匹のマウス）に無作為に分けた。腫瘍体積は、76.29～129.12（130.58±13.28、平均±SD）mm<sup>3</sup>の範囲であった。マウスを測定し、移植から13日後の腫瘍体積に基づき、無作為に分けた。移植（2/17/17）から14日目に、マウスに投薬した。マウスの体重は、19.50～26.35（22.69±1.40、平均±SD）グラムであった。各グループ中のマウスは、パンチ法によって特定した。試験薬剤及びビヒクルの投与は、27ゲージ、1/2インチ針を取り付けた1.0 mLのシリンジを用いることによって、静脈内で行われた。グループは以下を含んでいた。ビヒクル（PBS）を投薬された対照グループ、chKTI-sSPDB-DM4を5 mg/kg、huMAB-A(2.2)-sSPDB-DM4を2.5 mg/kg、huMAB-A(2.2)-sS

50

P D B - D M 4 を 5 m g / k g 、 h u K T I - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 を 1 0 μ g / k g 、 h u M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 を 3 μ g / k g 及び h u M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 を 1 0 μ g / k g 。

#### 【 0 4 2 9 】

カリパスを用い、1週間に2回、腫瘍サイズを三次元で測定した。式  $V = \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ} \times 1/2$  を用い、腫瘍体積を mm 単位で表した。マウスは、腫瘍体積が 50 % 以上減っているときに、部分的な退縮 ( P R ) であるとされ、明白な腫瘍が消えたときに、完全な腫瘍退縮 ( C R ) であるとされ、腫瘍のない生存者 ( T F S ) は、試験終了時に腫瘍のないマウスの数である。腫瘍体積及び体重は、Study Log ソフトウェアによって決定した。Log<sub>10</sub> 細胞死 ( L C K ) は、式  $L C K = ( T - C ) / T_d \times 3.32$  を用いて計算され、ここで、( T - C )、すなわち、腫瘍成長遅れ ( T G D ) は、治療グループ及び対照グループについて、腫瘍が所定のサイズである 798 mm<sup>3</sup> に達するまで (腫瘍のない生存者は除く) のメジアン時間 (単位は日数) であり<sup>1</sup>、T<sub>d</sub> は、マウスにおける腫瘍倍加時間であり (対照の腫瘍成長の毎日のメジアンの非線形対数曲線フィッティングから概算)、x は、細胞成長の log あたりの細胞倍加数である。% T / C (腫瘍成長阻害) は、対照の終点での対照のメジアン T V に対する、所定時間 (すなわち、対照腫瘍のメジアン T V が、最大腫瘍体積に達するまでの時間、すなわち、T V が 1000 mm<sup>3</sup> に達するまでの時間であるか、または腫瘍が壊死状態になったため、全ての対照グループのマウスが試験から離脱する時間点である) での治療グループのメジアン腫瘍体積 ( T V ) の比率である。

#### 【 0 4 3 0 】

全てのマウスの体重を、薬物毒性の粗い指標として週に2回測定した。マウスの体重 ( B W ) は、以下のように、治療前の体重からの体重の変化率として表された。B W 変化率 % = [ ( B W 後 / B W 前 ) - 1 ] × 100。ここで、B W 後は、治療後の体重であり、B W 前は、治療前の開始時の体重である。体重減少 ( B W L ) の割合は、治療後の体重の平均変化として表された。腫瘍体積が 1000 mm<sup>3</sup> より大きくなるか、または壊死したら、または体重が試験中の任意の時間点で 20 % を超えて減少したら、動物を安楽死させた。

#### 【 0 4 3 1 】

この試験の結果は、図 15 及び図 16 に示されている。h u M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 コンジュゲートは、試験した量投薬量で非常に活性であった。h u M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 コンジュゲートは、投薬量 2.5 m g / k g で腫瘍成長阻害 ( T / C ) 値が 5 % であり ( 8 匹のマウスのうち、8 匹が部分的な退縮、2 匹が完全な退縮 )、5 m g / k g で T / C 値が 1 % ( 8 匹のマウスのうち、8 匹が部分的な退縮、6 匹が完全な退縮 ) であった。h u M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 は、試験した両投薬量で非常に活性であった。h u M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 コンジュゲートは、投薬量 3 μ g / k g で ( T / C ) 値が 7 % ( 8 匹のマウスのうち、8 匹が部分的な退縮、4 匹が完全な退縮 ) であり、5 m g / k g で T / C 値が 4 % ( 8 匹のマウスのうち、8 匹が部分的な退縮、5 匹が完全な退縮 ) であった。h u M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4、または h u M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9、または c h K T I - s S P D B - D M 4、または h u K T I - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 コンジュゲートのいずれも、指定の投薬量で顕著な体重減少はみられず、そのため、全てのコンジュゲートは、この試験では、指定の投薬量でマウスにおいて十分に忍容性であった。

#### 【 0 4 3 2 】

##### 実施例 23

S W 48 大腸癌細胞株異種移植片を有するマウスにおける抗 A D A M 9 抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性

種々の投薬量の h M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 及び h u M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 6 4 9 コンジュゲートの抗腫瘍活性を、大腸癌細胞株異種移植モデルである S W 48 細胞を含む雌 N u d e マウスで評価した。

## 【 0 4 3 3 】

接種のために S W 4 8 細胞を集めた。マウスに S W 4 8 細胞を、右後側の脇腹領域に、皮下注射によって接種した。動物は、実験室から到着時、または治療前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。

## 【 0 4 3 4 】

4 2 匹のマウスを、腫瘍体積によって、7 グループ ( 1 グループあたり 6 匹のマウス ) に無作為に分けた。腫瘍体積は、8 9 ~ 1 6 9 m m <sup>3</sup> の範囲であった。マウスを測定し、移植から 1 7 日後の腫瘍体積に基づき、無作為に分け、投薬した。各グループ中のマウスは、耳タグによって特定した。試験薬剤及びビヒクルの投与を静脈内で行った。グループは以下を含んでいた。ビヒクル ( P B S ) を投薬された対照グループ、c h K T I - s S P D B - D M 4 を 1 0 m g / k g 、h u M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 を 5 m g / k g 、h u M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 を 1 0 m g / k g 、h u K T I - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 を 5 μ g / k g 、h u M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 を 2 . 5 μ g / k g 及び h u M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 を 5 μ g / k g 。

10

## 【 0 4 3 5 】

腫瘍サイズ及び体重の測定値は、実施例 2 2 に記載したように決定した。この試験の結果を図 1 7 及び図 1 8 に示している。h u M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 コンジュゲートは、試験した両投薬量で活性であった。h u M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 コンジュゲートは、腫瘍成長阻害 ( T / C ) 値が、5 m g / k g 投薬量で 1 3 % ( 部分的または完全な退縮はなし ) 、1 0 m g / k g での T / C 値は 5 % ( 6 匹のマウスのうち、6 匹が部分的な退縮あり ) であった。h u M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 は、5 μ g / k g の投薬量で活性であり、試験した 2 . 5 μ g / k g の投薬量では不活性であった。h u M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 コンジュゲートは、( T / C ) 値が 2 . 5 μ g / k g の投薬量で 9 2 % であり、5 μ g / k g での T / C 値が 4 1 % であった ( 6 匹のマウスのうち、2 匹が部分的な退縮あり ) 。h u M A B - A ( 2 . 2 ) - s S P D B - D M 4 、または h u M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 、または c h K T I - s S P D B - D M 4 、または h u K T I - S 4 4 2 C - D G N 5 4 9 コンジュゲートのいずれも、指定の投薬量で顕著な体重減少はみられず、そのため、全てのコンジュゲートは、この試験では、指定の投薬量でマウスにおいて十分に忍容性であった ( M G N X によって確認する必要がある ) 。

20

30

## 【 0 4 3 6 】

## 実施例 2 4

F c R n 結合を向上させることによって、抗 A D A M 9 抗体メイタンシノイドコンジュゲートの曝露を延ばす

抗 A D A M 9 抗体メイタンシノイドコンジュゲートが、効力を発揮する潜在能力を最大にするために、F c R n 結合を向上させることによって抗体薬物コンジュゲートの曝露時間を延ばすために、置換 M 2 5 2 Y 、S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E ( 「 Y T E 突然変異」 ) を抗 A D A M 9 抗体である h M A B - A ( 2 I . 2 ) 及び h M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C の F c 領域に導入した。F c R n は、血清 I g G レベルの維持において、主要な役割を果たす。非特異的に取り込まれる I g G は、p H 依存性の相互作用に起因して、エンドソーム中の F c R n に結合する。次いで、F c R n が結合した I g G は、再循環するエンドソーム内に選別され、細胞表面に再び運ばれ、その場所で、中性 p H に起因して、I g G が放出される。F c R n 結合の向上は、選別を向上させ、薬物動態を向上させることができる。

40

## 【 0 4 3 7 】

h M A B - A ( 2 I . 2 ) - Y T E - s S P D B - D M 4 コンジュゲートは、実施例 1 7 a に詳細に記載したように調製された。h M A B - A ( 2 I . 2 ) - S 4 4 2 C - Y T E - s S P D B - D M 4 コンジュゲートは、P C T 公開第 W O 2 0 1 7 / 0 0 4 0 2 5 号で既に記載されているように調製された。図 1 9 A 及び図 1 9 B からわかるように、Y T

50

E突然変異は、ヒト及びカニクイザルのFcRnに対するhMAB-A(2I.2)抗体の結合アフィニティ及びアビデティを増加させた。更に、hMAB-A(2I.2)-YTE-sSPDB-DM4コンジュゲートは、親hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4コンジュゲートとしてのNCI-H1703、SNU5及びCalu3と同様のインビトロ活性及びインビボ活性を示した。

#### 【0438】

カニクイザルPK及び忍容性試験を行い、親hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4コンジュゲートと比較して、hMAB-A(2I.2)-YTE-sSPDB-DM4コンジュゲートの忍容性及び薬物動態プロファイルを特性決定した。両コンジュゲートを、10分間IV注入することにより、雄カニクイザルに投薬量4及び12mg/kg(抗体投薬量)で投与し、PKプロファイル及び急性忍容性を評価した。加えて、裸の抗体hMAB-A(2I.2)及びhMAB-A(2I.2)-YTEを、雄カニクイザルに投薬量4mg/kgで投与し、PKパラメータに対する結合の潜在的な効果を調べた。血液を28日間にわたって集め、ADC、全抗体及び遊離ペイロード濃度を測定した。生存率、臨床観察、体重及び臨床病理学に基づき、忍容性を決定した。

#### 【0439】

図20からわかるように、hMAB-A(2I.2)-YTE-sSPDB-DM4コンジュゲートのカニクイザルPKデータを、親コンジュゲートと比較すると、YTE突然変異が、親コンジュゲートと比較して、曝露時間を延ばすことがわかった。これに加え、裸のhMAB-A(2I.2)抗体及びhMAB-A(2I.2)-YTE抗体のカニクイザルPKデータは、結合が、PKパラメータに対して最小限の効果しかないこと、YTE突然変異が、裸の抗体及びコンジュゲート両方のPKパラメータを向上させることを示した。更に、hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4及びhMAB-A(2I.2)-YTE-sSPDB-DM4コンジュゲートは、12mg/kgの投薬量まで、最小限の皮膚臨床観察と、血液パラメータに対する用量依存性の影響がありつつ、十分に忍容性であった。

#### 【0440】

本明細書で述べられるあらゆる刊行物及び特許は、個々の刊行物または特許明細書が、具体的かつ個々に、全体的に本明細書に参考として組み込まれるのと同じ程度まで、本明細書に参考として組み込まれる。本発明を、その具体的な実施形態と組み合わせ記載してきたが、さらなる改変が可能であることが理解されるだろう。本出願は、一般的に、本発明の原理に従って、本発明の任意の変形、使用または適応を包含することを意図している。本発明が属する技術分野でよく知られているか、または通常の実施内にある本開示からのこのような発展を含み、本明細書で既に示した本質的な特徴に適用してもよいからである。

#### [1]

抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントを含む免疫コンジュゲートであって、

(I)前記抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、医薬薬剤に結合されており、

(II)前記抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントは、軽鎖可変(VL)ドメインと重鎖可変(VH)ドメインを含み、前記重鎖可変ドメインは、CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインを含み、前記軽鎖可変ドメインは、CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインを含み、

(A)前記CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインは、MAB-Aの最適化された変異体の重鎖可変(VH)ドメインのCDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインのアミノ酸配列を有し、前記CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインは、MAB-Aの軽鎖可変(VL)ドメインのCDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインのアミノ酸配列を有するか、または

10

20

30

40

50



(B) 前記CDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメインは、MAB-Aの重鎖可変(VH)ドメインのCDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメインのアミノ酸配列を有し、前記CDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及びCDR<sub>L</sub>3ドメインは、MAB-Aの最適化された変異体の軽鎖可変(VL)ドメインのCDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及びCDR<sub>L</sub>3ドメインのアミノ酸配列を有するか、または

(C) 前記CDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメインは、MAB-Aの最適化された変異体の重鎖可変(VH)ドメインのCDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメインのアミノ酸配列を有し、前記CDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及びCDR<sub>L</sub>3ドメインは、MAB-Aの最適化された変異体の軽鎖可変(VL)ドメインのCDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及びCDR<sub>L</sub>3ドメインのアミノ酸配列を有する、前記免疫コンジュゲート。

10

[ 2 ]

前記抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントが、

(A) (1) MAB-Aの重鎖可変(VH)ドメインのCDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメイン、及び

(2) MAB-Aのヒト化変異体のVHドメインのFR1、FR2、FR3及びFR4、または

(B) (1) MAB-Aの軽鎖可変(VL)ドメインのCDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及びCDR<sub>L</sub>3ドメイン、及び

20

(2) MAB-Aのヒト化変異体のVLドメインのFR1、FR2、FR3及びFR4、または

(C) (1) MAB-Aの最適化された変異体の重鎖可変(VH)ドメインのCDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメイン、及び

(2) MAB-Aのヒト化変異体のVHドメインのFR1、FR2、FR3及びFR4、または

(D) (1) MAB-Aの最適化された変異体の軽鎖可変(VL)ドメインのCDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及びCDR<sub>L</sub>3ドメイン、及び

(2) MAB-Aのヒト化変異体のVLドメインのFR1、FR2、FR3及びFR4、または

30

(E) (1) MAB-Aのヒト化/最適化された変異体の重鎖可変(VH)ドメイン、  
(2) MAB-Aのヒト化/最適化された変異体のVL軽鎖可変(VL)ドメインを含む、[ 1 ]に記載の免疫コンジュゲート。

[ 3 ]

MAB-Aの前記最適化された変異体の前記重鎖可変(VH)ドメインのCDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメインは、それぞれ、以下のアミノ酸配列：

(1) 配列番号47(SYW<sub>1</sub>H)

(ここで、X<sub>1</sub>は、MまたはIである)、

(2) 配列番号48(EIIPIX<sub>2</sub>GHTNYNEX<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>)

(ここで、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>及びX<sub>5</sub>は、独立して選択され、

X<sub>2</sub>は、NまたはFであり；X<sub>3</sub>は、KまたはRであり；

X<sub>4</sub>は、KまたはQであり、

X<sub>5</sub>は、SまたはGである)、

(3) 配列番号49(GGY<sub>6</sub>Y<sub>7</sub>Y<sub>8</sub>Y<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>DY)

(ここで、X<sub>6</sub>は、P、F、Y、W、I、L、V、T、GまたはDであり、X<sub>7</sub>、X<sub>8</sub>、X<sub>9</sub>、X<sub>10</sub>及びX<sub>11</sub>は、

40

(A) X<sub>6</sub>がPである場合、

X<sub>7</sub>は、KまたはRであり；X<sub>8</sub>は、FまたはMであり；X<sub>9</sub>は、Gであり；

X<sub>10</sub>は、WまたはFであり；X<sub>11</sub>は、M、LまたはKであり；

(B) X<sub>6</sub>が、F、YまたはWである場合、

50

$X_7$  は、N または H であり； $X_8$  は、S または K であり； $X_9$  は、G または A であり；  
 $X_{10}$  は、T または V であり； $X_{11}$  は、M、L または K であり；  
 (C)  $X_6$  が、I、L または V である場合、  
 $X_7$  は、G であり； $X_8$  は、K であり； $X_9$  は、G または A であり；  
 $X_{10}$  は、V であり； $X_{11}$  は、M、L または K であり；  
 (D)  $X_6$  が T である場合、  
 $X_7$  は、G であり； $X_8$  は、K、M または N であり； $X_9$  は、G であり；  
 $X_{10}$  は、V または T であり； $X_{11}$  は、L または M であり；  
 (E)  $X_6$  が G である場合、  
 $X_7$  は、G であり； $X_8$  は、S であり； $X_9$  は、G であり；  
 $X_{10}$  は、V であり； $X_{11}$  は、L であり、  
 (F)  $X_6$  が D である場合、  
 $X_7$  は、S であり； $X_8$  は、N であり； $X_9$  は、A であり；  
 $X_{10}$  は、V であり； $X_{11}$  は、L であるように選択される) を有する、[ 1 ] または [ 2 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

10

[ 4 ]

[ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートであって、MAB - A の前記最適化された変異体の前記重鎖可変 (VH) ドメインは、配列番号 15 のアミノ酸配列を含み、

【化 172 - 1】

20

EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYWX<sub>1</sub></u> HWVRQA
PGKGLEWVGE	<u>IIPIX<sub>2</sub>GHTNY</u>	<u>NEX<sub>3</sub>FX<sub>4</sub>X<sub>5</sub></u> RFTI	SLDNSKNTLY
LQMGSRLRAED	TAVYYCARGG	<u>YYYYX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub></u>	
<u>DYWGQG</u> TTVT	VSS		

ここで、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$  及び  $X_6$  は、独立して選択され、  
 $X_1$  は、M または I であり； $X_2$  は、N または F であり；  
 $X_3$  は、K または R であり； $X_4$  は、K または Q であり；  
 $X_5$  は、S または G であり、 $X_6$  は、P、F、Y、W、I、L、V、T、G または D であり；

30

$X_7$ 、 $X_8$ 、 $X_9$ 、 $X_{10}$  及び  $X_{11}$  は、  
 $X_6$  が P である場合、 $X_7$  は、K または R であり； $X_8$  は、F または M であり； $X_9$  は、G であり； $X_{10}$  は、W または F であり； $X_{11}$  は、M、L または K であり；  
 $X_6$  が、F、Y または W である場合、 $X_7$  は、N または H であり； $X_8$  は、S または K であり； $X_9$  は、G または A であり； $X_{10}$  は、T または V であり； $X_{11}$  は、M、L または K であり；

$X_6$  が、I、L または V である場合、 $X_7$  は、G であり； $X_8$  は、K であり； $X_9$  は、G または A であり； $X_{10}$  は、V であり； $X_{11}$  は、M、L または K であり；

$X_6$  が T である場合、 $X_7$  は、G であり； $X_8$  は、K、M または N であり； $X_9$  は、G であり； $X_{10}$  は、V または T であり； $X_{11}$  は、L または M であり；

40

$X_6$  が G である場合、 $X_7$  は、G であり； $X_8$  は、S であり； $X_9$  は、G であり； $X_{10}$  は、V であり； $X_{11}$  は、L であり；

$X_6$  が D である場合、 $X_7$  は、S であり； $X_8$  は、N であり； $X_9$  は、A であり； $X_{10}$  は、V であり； $X_{11}$  は、L であるように選択される、前記免疫コンジュゲート。

[ 5 ]

MAB - A の前記最適化された変異体の前記重鎖可変 (VH) ドメインは、

- (1) hMAB - A VH (1) (配列番号 16)；
- (2) hMAB - A VH (2) (配列番号 17)；
- (3) hMAB - A VH (3) (配列番号 18)；

50

( 4 ) h M A B - A V H ( 4 ) ( 配列番号 1 9 ) ;  
 ( 5 ) h M A B - A V H ( 2 A ) ( 配列番号 2 0 ) ;  
 ( 6 ) h M A B - A V H ( 2 B ) ( 配列番号 2 1 ) ;  
 ( 7 ) h M A B - A V H ( 2 C ) ( 配列番号 2 2 ) ;  
 ( 8 ) h M A B - A V H ( 2 D ) ( 配列番号 2 3 ) ;  
 ( 9 ) h M A B - A V H ( 2 E ) ( 配列番号 2 4 ) ;  
 ( 1 0 ) h M A B - A V H ( 2 F ) ( 配列番号 2 5 ) ;  
 ( 1 1 ) h M A B - A V H ( 2 G ) ( 配列番号 2 6 ) ;  
 ( 1 2 ) h M A B - A V H ( 2 H ) ( 配列番号 2 7 ) ;  
 ( 1 3 ) h M A B - A V H ( 2 I ) ( 配列番号 2 8 ) ; 及び  
 ( 1 4 ) h M A B - A V H ( 2 J ) ( 配列番号 2 9 ) からなる群から選択される、 [ 4 ] に記載の免疫コンジュゲート。

10

[ 6 ]

M A B - A の前記最適化された変異体の前記軽鎖可変 ( V L ) ドメインの前記 C D R <sub>L</sub> 1 ドメイン、C D R <sub>L</sub> 2 ドメイン及び C D R <sub>L</sub> 3 ドメインは、それぞれ、

( 1 ) 配列番号 6 6 ( X <sub>1 2</sub> A S Q S V D Y X <sub>1 3</sub> G D S Y X <sub>1 4</sub> N )  
 ( ここで、X <sub>1 2</sub>、X <sub>1 3</sub>、X <sub>1 4</sub> は、独立して選択され、  
 X <sub>1 2</sub> は、K または R であり；X <sub>1 3</sub> は、D または S であり；X <sub>1 4</sub> は、M または L である ) ;

20

( 2 ) 配列番号 1 3 ( A A S D L E S ) ; 及び

( 3 ) 配列番号 6 7 ( Q Q S X <sub>1 5</sub> X <sub>1 6</sub> X <sub>1 7</sub> P F T )

( ここで、X <sub>1 5</sub>、X <sub>1 6</sub> 及び X <sub>1 7</sub> は独立して選択され、  
 X <sub>1 5</sub> は、H または Y であり；X <sub>1 6</sub> は、E または S であり；X <sub>1 7</sub> は、D または T である )

の amino 酸配列を有する、[ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 7 ]

[ 1 ] ~ [ 6 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートであって、前記軽鎖可変 ( V L ) ドメインは、配列番号 5 3 の amino 酸配列を含む、

【化 1 7 2 - 2】

DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	ISC <u>X<sub>12</sub>ASQSV</u>
<u>YX<sub>13</sub>GDSYX<sub>14</sub>NWY</u>	QQKPGQPPKL	LIY <u>AASDLES</u>
GIPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFATY
YC <u>QQSX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>PF</u>	<u>TFGQG</u> TKLEI	K

30

( ここで、X <sub>1 2</sub>、X <sub>1 3</sub>、X <sub>1 4</sub>、X <sub>1 5</sub>、X <sub>1 6</sub> 及び X <sub>1 7</sub> は、独立して選択され、  
 X <sub>1 2</sub> は、K または R であり；X <sub>1 3</sub> は、D または S であり；  
 X <sub>1 4</sub> は、M または L であり；X <sub>1 5</sub> は、H または Y であり；  
 X <sub>1 6</sub> は、E または S であり；X <sub>1 7</sub> は、D または T である )

前記免疫コンジュゲート。

40

[ 8 ]

M A B - A の前記最適化された変異体の前記軽鎖可変 ( V L ) ドメインが、

( 1 ) h M A B - A V L ( 1 ) ( 配列番号 5 4 ) ;

( 2 ) h M A B - A V L ( 2 ) ( 配列番号 5 5 ) ;

( 3 ) h M A B - A V L ( 3 ) ( 配列番号 5 6 ) ;

( 4 ) h M A B - A V L ( 4 ) ( 配列番号 5 7 ) ;

( 5 ) h M A B - A V L ( 2 A ) ( 配列番号 2 0 ) からなる群から選択される、[ 7 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 9 ]

前記 C D R <sub>H</sub> 1 ドメインが、amino 酸配列 S Y W M H ( 配列番号 8 ) を含み、前記 C D

50

R<sub>H</sub>2ドメインが、アミノ酸配列E I I P I F G H T N Y N E K F K S（配列番号35）を含み、前記C D R<sub>H</sub>3ドメインが、アミノ酸配列G G Y Y Y Y P R Q G F L D Y（配列番号45）を含む、[1]に記載の免疫コンジュゲート。

[10]

前記C D R<sub>L</sub>1ドメインが、アミノ酸配列K A S Q S V D Y S G D S Y M N（配列番号62）を含み、前記C D R<sub>L</sub>2ドメインが、アミノ酸配列A A S D L E S（配列番号13）を含み、前記C D R<sub>L</sub>3ドメインが、アミノ酸配列Q Q S H E D P F T（配列番号14）を含む、[1]または[9]のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[11]

前記免疫コンジュゲートが、

(A) h M A B - A ( 2 I . 2 ) の重鎖可変 ( V H ) ドメイン ( 配列番号 2 8 ) ; または  
(B) h M A B - A ( 2 I . 2 ) の軽鎖可変 ( V L ) ドメイン ( 配列番号 5 5 ) ; または  
(C) h M A B - A ( 2 I . 2 ) の重鎖可変 ( V H ) ドメイン ( 配列番号 2 8 ) 及び h M A B - A ( 2 I . 2 ) の軽鎖可変 ( V L ) ドメイン ( 配列番号 5 5 )  
を含む、[9]または[10]のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[12]

前記免疫コンジュゲートが、F c 領域を含む、[1]～[11]のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[13]

前記F c 領域が、

(a) F c R に対する変異体 F c 領域のアフィニティを下げる1つ以上のアミノ酸改変、及び/または  
(b) シスチン残基を導入する1つ以上のアミノ酸改変  
を含む変異体 F c 領域である、[12]に記載の免疫コンジュゲート。

[14]

F c R に対する変異体 F c 領域のアフィニティを下げる前記1つ以上のアミノ酸改変が、

(A) L 2 3 4 A ;  
(B) L 2 3 5 A ; または  
(C) L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A

を含み、前記番号付けが、K a b a t にあるE U インデックスの番号付けである、[13]に記載の免疫コンジュゲート。

[15]

シスチン残基を導入する前記1つ以上のアミノ酸改変が、S 4 4 2 C を含み、前記番号付けが、K a b a t にあるE U インデックスの番号付けである、[13]または[14]のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[16]

前記免疫コンジュゲートが、ヒトA D A M 9 及び c y n o A D A M 9 に特異的に結合するヒト化抗A D A M 9 抗体またはそのA D A M 9 結合フラグメントを含み、前記ヒト化抗A D A M 9 抗体またはそのA D A M 9 結合フラグメントが、前記医薬薬剤に結合される、[1]に記載の免疫コンジュゲート。

[17]

前記ヒト化抗A D A M 9 抗体またはそのA D A M 9 結合フラグメントが、

(a) それぞれ、配列番号8、35及び10及び配列番号62、13、14 ;  
(b) それぞれ、配列番号8、35及び10及び配列番号63、13、14 ;  
(c) それぞれ、配列番号8、36及び10及び配列番号63、13、14  
(d) それぞれ、配列番号34、36及び10及び配列番号64、13、65

からなる群から選択される配列を有する、C D R<sub>H</sub>1ドメイン、C D R<sub>H</sub>2ドメイン及びC D R<sub>H</sub>3と、C D R<sub>L</sub>1ドメイン、C D R<sub>L</sub>2ドメイン及びC D R<sub>L</sub>3ドメインとを含む、[16]に記載の免疫コンジュゲート。

10

20

30

40

50

[ 1 8 ]

前記ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントが、

- ( a ) それぞれ、配列番号 1 7 及び配列番号 5 5 ;
- ( b ) それぞれ、配列番号 1 7 及び配列番号 5 6 ;
- ( c ) それぞれ、配列番号 1 8 及び配列番号 5 6 ; 及び
- ( d ) それぞれ、配列番号 1 9 及び配列番号 5 7

からなる群から選択される配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % または少なくとも 9 9 % の同一性を有する配列を有する重鎖可変ドメイン ( V H ) 及び軽鎖可変ドメイン ( V L ) を含む、 [ 1 6 ] または [ 1 7 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 1 9 ]

前記ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントが、

- ( a ) それぞれ、配列番号 1 7 及び配列番号 5 5 ;
- ( b ) それぞれ、配列番号 1 7 及び配列番号 5 6 ;
- ( c ) それぞれ、配列番号 1 8 及び配列番号 5 6 ; 及び
- ( d ) それぞれ、配列番号 1 9 及び配列番号 5 7

からなる群から選択される配列を有する重鎖可変ドメイン ( V H ) 及び軽鎖可変ドメイン ( V L ) を含む、 [ 1 8 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 2 0 ]

前記ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントは、キメラまたはマウス親抗体と比較して、c y n o A D A M 9 に対する結合アフィニティが少なくとも 1 0 0 倍向上し、ヒト A D A M 9 に対する高いアフィニティを保持しているように最適化される、 [ 1 6 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 2 1 ]

前記抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントが、

- ( a ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 3 7 及び配列番号 6 2、1 3、1 4 ;
- ( b ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 3 8 及び配列番号 6 2、1 3、1 4 ;
- ( c ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 3 9 及び配列番号 6 2、1 3、1 4 ;
- ( d ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 4 0 及び配列番号 6 2、1 3、1 4 ;
- ( e ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 4 1 及び配列番号 6 2、1 3、1 4 ;
- ( f ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 4 2 及び配列番号 6 2、1 3、1 4 ;
- ( g ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 4 3 及び配列番号 6 2、1 3、1 4 ;
- ( h ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 4 4 及び配列番号 6 2、1 3、1 4 ;
- ( i ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 4 5 及び配列番号 6 2、1 3、1 4 ; 及び
- ( j ) それぞれ、配列番号 8、3 5 及び 4 6 及び配列番号 6 2、1 3、1 4

からなる群から選択される配列を有する、C D R<sub>H</sub> 1 ドメイン、C D R<sub>H</sub> 2 ドメイン及び C D R<sub>H</sub> 3 ドメインと、C D R<sub>L</sub> 1 ドメイン、C D R<sub>L</sub> 2 ドメイン及び C D R<sub>L</sub> 3 ドメインを含む、 [ 2 0 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 2 2 ]

前記ヒト化抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントが、

- ( a ) それぞれ、配列番号 2 0 及び配列番号 5 5 ;
- ( b ) それぞれ、配列番号 2 1 及び配列番号 5 5 ;
- ( c ) それぞれ、配列番号 2 2 及び配列番号 5 5 ;
- ( d ) それぞれ、配列番号 2 3 及び配列番号 5 5 ;
- ( e ) それぞれ、配列番号 2 4 及び配列番号 5 5 ;
- ( f ) それぞれ、配列番号 2 5 及び配列番号 5 5 ;
- ( g ) それぞれ、配列番号 2 6 及び配列番号 5 5 ;
- ( h ) それぞれ、配列番号 2 7 及び配列番号 5 5 ;
- ( i ) それぞれ、配列番号 2 8 及び配列番号 5 5 ; 及び
- ( j ) それぞれ、配列番号 2 9 及び配列番号 5 5

からなる群から選択される配列に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % または少

10

20

30

40

50

なくとも 99% の同一性を有する配列を有する重鎖可変ドメイン (VH) 及び軽鎖可変ドメイン (VL) を含む、[ 21 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 23 ]

前記ヒト化抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントが、

- (a) それぞれ、配列番号 20 及び配列番号 55 ;
- (b) それぞれ、配列番号 21 及び配列番号 55 ;
- (c) それぞれ、配列番号 22 及び配列番号 55 ;
- (d) それぞれ、配列番号 23 及び配列番号 55 ;
- (e) それぞれ、配列番号 24 及び配列番号 55 ;
- (f) それぞれ、配列番号 25 及び配列番号 55 ;
- (g) それぞれ、配列番号 26 及び配列番号 55 ;
- (h) それぞれ、配列番号 27 及び配列番号 55 ;
- (i) それぞれ、配列番号 28 及び配列番号 55 ; 及び
- (j) それぞれ、配列番号 29 及び配列番号 55

からなる群から選択される配列を有する重鎖可変ドメイン (VH) 及び軽鎖可変ドメイン (VL) を含む、[ 22 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 24 ]

前記ヒト化抗 ADAM9 抗体が、Fc 領域を含む全長抗体である、[ 16 ] ~ [ 23 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 25 ]

前記ヒト化抗 ADAM9 抗体が、

- (a) それぞれ、配列番号 50 及び配列番号 68 ;
- (b) それぞれ、配列番号 51 及び配列番号 68 ; 及び

(c) それぞれ、配列番号 52 及び配列番号 68 からなる群から選択される配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、[ 24 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 26 ]

前記 Fc 領域が、以下を含む変異体 Fc 領域である、[ 16 ] ~ [ 25 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート :

(a) L234A、L235A 並びに L234A 及び L235A からなる群から選択される、Fc R に対する前記変異体 Fc 領域のアフィニティを下げる 1 つ以上のアミノ酸改変 ; 及び / または

(b) S442 にシステイン残基を導入するアミノ酸改変を含む変異体 Fc 領域 (前記番号付けは、Kababt にある EU インデックスの番号付けである) 及び / または

(c) M252Y、S254T 及び T256E からなる群から選択される Fc Rn に対する前記変異体 Fc 領域の半減期を延ばす 1 つ以上のアミノ酸置換。

[ 27 ]

前記ヒト化抗 ADAM9 抗体が、

- (a) それぞれ、配列番号 141 及び配列番号 68 ;
- (b) それぞれ、配列番号 142 及び配列番号 68 ;
- (c) それぞれ、配列番号 143 及び配列番号 68 ;
- (d) それぞれ、配列番号 151 及び配列番号 68 ;
- (e) それぞれ、配列番号 152 及び配列番号 68 ;
- (f) それぞれ、配列番号 153 及び配列番号 68 ; 及び
- (g) それぞれ、配列番号 154 及び配列番号 68

からなる群から選択される配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、[ 21 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 28 ]

配列番号 141、配列番号 142、配列番号 143、配列番号 151、配列番号 152、配列番号 153 または配列番号 154 の X がリシンである、[ 27 ] に記載の免疫コンジュゲート。

10

20

30

40

50

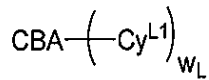
[ 2 9 ]

配列番号 1 4 1、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 3、配列番号 1 5 1、配列番号 1 5 2、配列番号 1 5 3 または配列番号 1 5 4 の X が存在しない、[ 2 7 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 3 0 ]

前記免疫コンジュゲートは、以下の式によって表され、

【化 1 7 2 - 3】



10

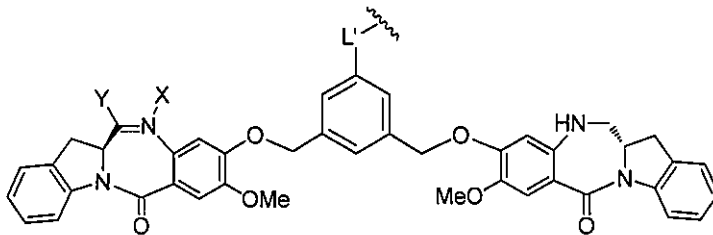
ここで、

C B A は、リシン残基を介して  $\text{Cy}^{\text{L}1}$  に共有結合する、[ 1 ] ~ [ 1 4 ] 及び [ 1 6 ] ~ [ 2 9 ] のいずれか一項に記載の抗 A D A M 9 抗体またはその A D A M 9 結合フラグメントであり；

$\text{W}_\text{L}$  は、1 ~ 2 0 の整数であり、

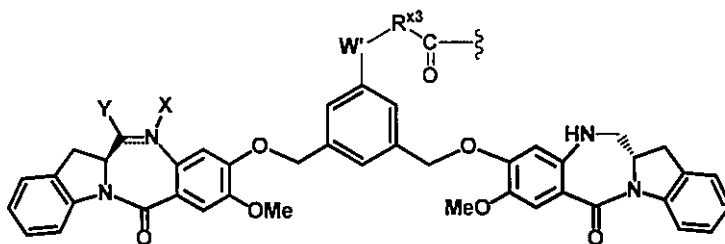
$\text{Cy}^{\text{L}1}$  は、以下の式

【化 1 7 2 - 4】



20

または



30

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、

N と C との間の二重線

【化 1 7 2 - 5】



は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、X は存在せず、Y は、- H または ( C <sub>1</sub> - C <sub>4</sub> ) アルキルであり；単結合である場合には、X は、- H またはアミン保護部分であり、Y は、- O H または - S O <sub>3</sub> H であるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

40

$\text{W}'$  は、- N R <sup>e</sup> であり、

R <sup>e</sup> は、- ( C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> - O ) <sub>n</sub> - R <sup>k</sup> であり；

n は、2 ~ 6 の整数であり；

R <sup>k</sup> は、- H または - M e であり；

R <sup>x3</sup> は、( C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> ) アルキルであり；

L' は、以下の式

- N R <sub>5</sub> - P - C ( = O ) - ( C R <sub>a</sub> R <sub>b</sub> ) <sub>m</sub> - C ( = O ) - ( B 1' ) ; または

50

- NR<sub>5</sub> - P - C(=O) - (CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub> - S - Z<sup>s1</sup> - (B2')

によって表され、

R<sub>5</sub> は、- H または (C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>) アルキルであり；

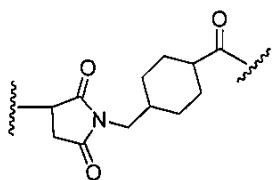
P は、アミノ酸残基または 2 ~ 20 個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；

R<sub>a</sub> 及び R<sub>b</sub> は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、- H、(C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub>) アルキル、または帯電した置換基またはイオン化可能な基 Q であり；

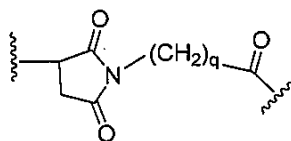
m は、1 ~ 6 の整数であり、

Z<sup>s1</sup> は、以下の式

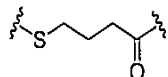
【化 172 - 6】



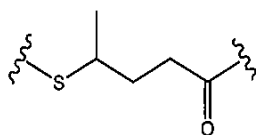
(b1)



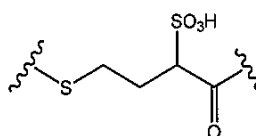
(b2)



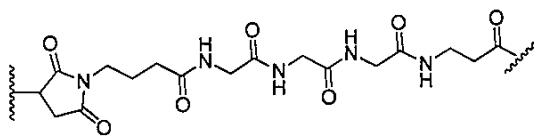
(b3)



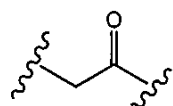
(b4)



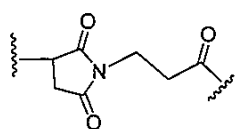
(b5)



(b6)



(b7)



(b8)

10

20

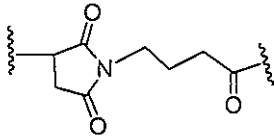
30

40

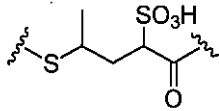
50



## 【化 1 7 2 - 7】



(b 9) ; 及び



(b 1 0)

10

のいずれか 1 つから選択され、

q は、1 ~ 5 の整数である、[ 1 ] ~ [ 1 4 ] 及び [ 1 6 ] ~ [ 2 9 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 3 1 ]

R<sub>a</sub> 及び R<sub>b</sub> が両方とも H であり ; R<sub>5</sub> が、H または Me である、[ 3 0 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 3 2 ]

P が、2 ~ 5 個のアミノ酸残基を含むペプチドである、[ 3 0 ] または [ 3 1 ] に記載の免疫コンジュゲート。

20

[ 3 3 ]

P が、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Val - Ala、Val - Cit、Val - Lys、Phe - Lys、Lys - Lys、Ala - Lys、Phe - Cit、Leu - Cit、Ile - Cit、Trp、Cit、Phe - Ala、Phe - N<sup>9</sup> - トシル - Arg、Phe - N<sup>9</sup> - ニトロ - Arg、Phe - Phe - Lys、D - Phe - Phe - Lys、Gly - Phe - Lys、Leu - Ala - Leu、Ile - Ala - Leu、Val - Ala - Val、Ala - Leu - Ala - Leu ( 配列番号 1 4 4 )、  
- Ala - Leu - Ala - Leu ( 配列番号 1 4 5 )、Gly - Phe - Leu - Gly ( 配列番号 1 4 6 )、Val - Arg、Arg - Val、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、Met - Ala、Gln - Val、Asn - Ala、Gln - Phe 及び Gln - Ala から選択される、[ 3 0 ] ~ [ 3 2 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

30

[ 3 4 ]

P が、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Ala - Ala、Ala - D - Ala、D - Ala - Ala または D - Ala - D - Ala である、[ 3 3 ] に記載の免疫コンジュゲート。

40

[ 3 5 ]

Q が、- SO<sub>3</sub>H またはその医薬的に許容される塩である、[ 3 0 ] ~ [ 3 4 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 3 6 ]

前記免疫コンジュゲートが、以下の式

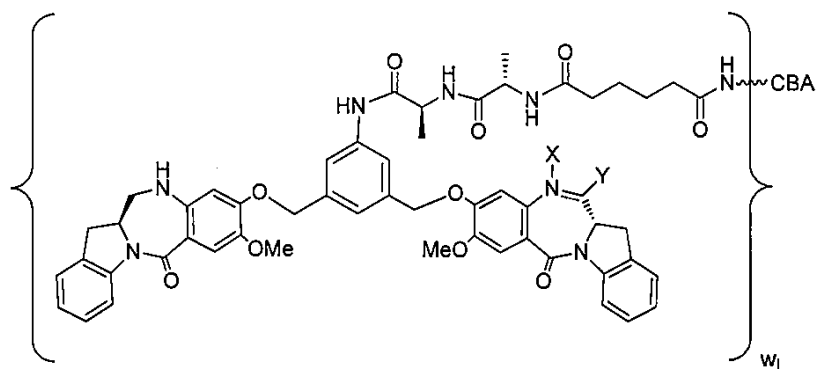
50

The chemical structure shows a dendritic molecule consisting of two dendritic units, each enclosed in a large curly bracket and labeled  $W_L$  at the bottom right. The units are connected by a central linker. Each dendritic unit features a benzimidazole core. The left unit has a methoxy group (OMe) at the 6-position of the benzene ring and a methylene group at the 2-position of the imidazole ring. The right unit has a methoxy group (OMe) at the 6-position of the benzene ring and a methylene group at the 2-position of the imidazole ring. The central linker consists of a benzene ring with two methoxy groups (OMe) at the 3 and 4 positions, connected to two other benzene rings. Each of these outer benzene rings is substituted with a methoxy group (OMe) at the 3-position and a methylene group at the 4-position. The methylene groups are connected to the 2-positions of the imidazole rings of the dendritic units. The right dendritic unit is further substituted with a linker that connects to a CBA group (Cinnamoyl Benzoic Acid) via an amide bond.

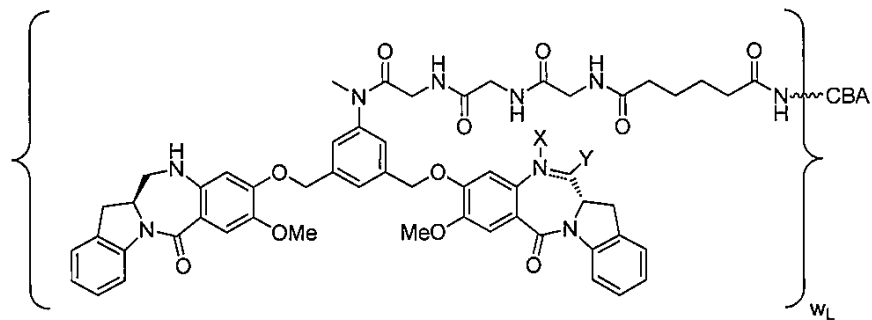
[illegible]COC1=CC=C2C(=C1)C(=O)N(C2)Cc1ccc(OC)c(OC)c1COc3ccc(NC(=O)[C@H](C)NC(=O)[C@@H](C)NC(=O)CCCCC(=O)N\*)cc3Oc4ccc(OC)c(OC)c4N5C(=O)c6ccccc6N5C7=CC=CC=C7

50

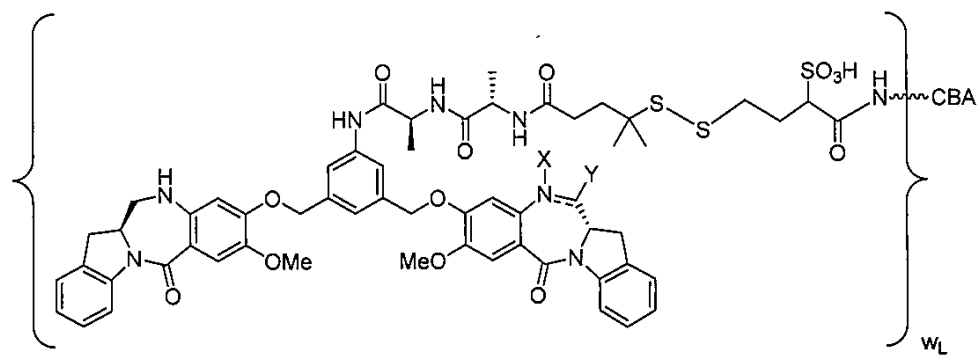
【化 1 7 2 - 9】



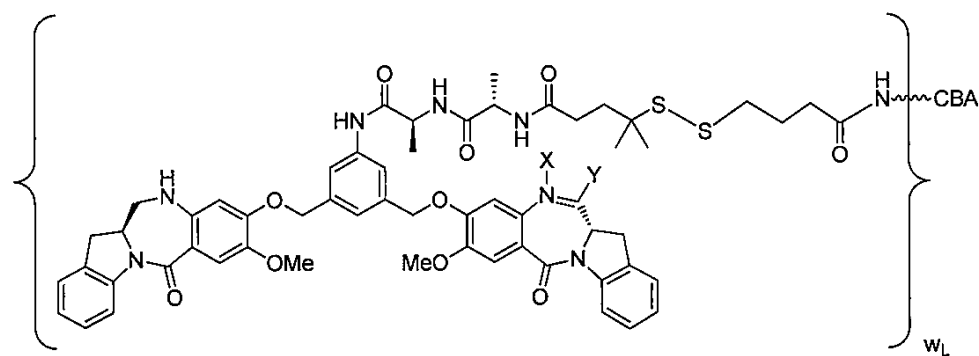
10



20



30



40

50

Chemical structure of a complex molecule, likely a peptide derivative, featuring two indole-3-carboxamide units linked by a biphenyl moiety. The structure includes a central biphenyl core with various substituents, including a methoxy group (OMe), a methylene group (CH<sub>2</sub>), and a carbonyl group (C=O). The molecule is flanked by two large curly braces, with the label "WL" at the bottom right.

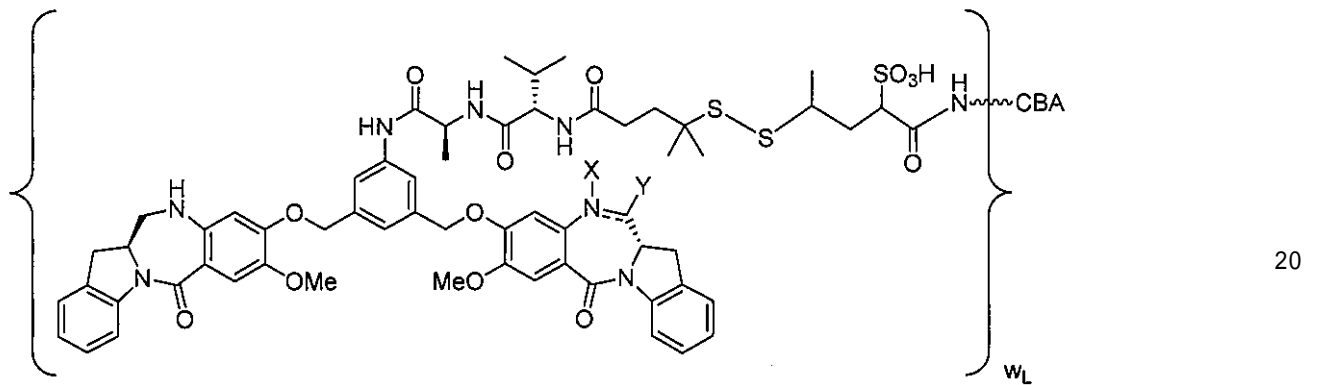
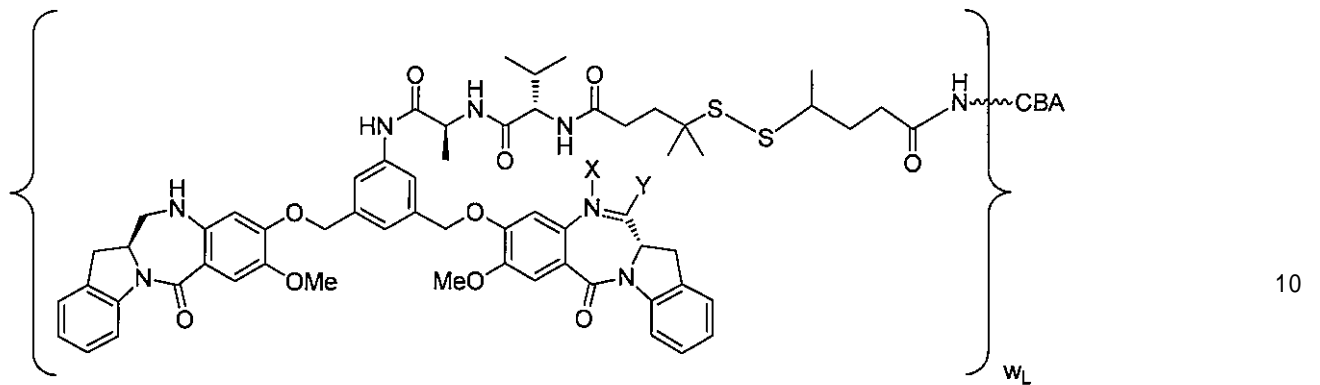
COC1=CC=C2C(=C1)C(=O)N(C2Cc3ccccc3)c4cc(OC)c(OCc5ccc(NC(=O)[C@H](C)NC(=O)[C@@H](C)NC(=O)CC(C)(C)SSC(C)C(C)C(=O)NC(=O)N(C)C(=O)O)cc5)cc4[illegible]

40

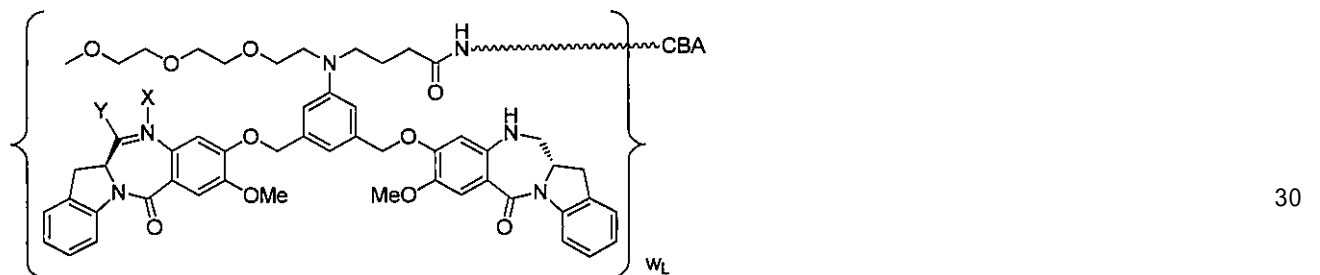
[illegible]

40

【化 1 7 2 - 1 2】



または



によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、 $w_L$  は、1 ~ 10 の整数であり；NとCとの間の二重線

【化 1 7 2 - 1 3】

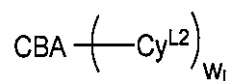
==

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは - H であり；単結合である場合には、Xは、 - H であり、Yは、 - OH または - SO<sub>3</sub>H であるか、またはこれらの医薬的に許容される塩である、[ 3 0 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 3 7 ]

前記免疫コンジュゲートが、以下の式によって表され

【化 1 7 2 - 1 4】



40

50

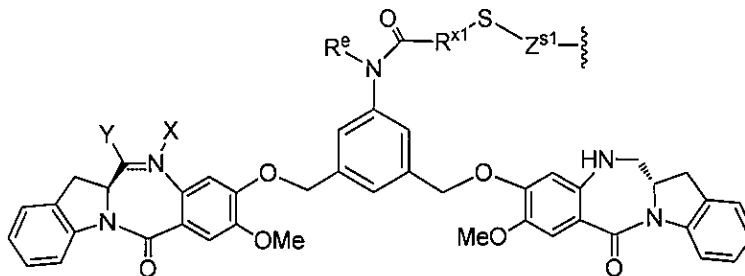
ここで、

CBAは、リシン残基を介してC<sub>y</sub><sup>L2</sup>に共有結合する、請求項1～14及び16～29のいずれか一項に記載の抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントであり；

W<sub>L</sub>は、1～20の整数であり、

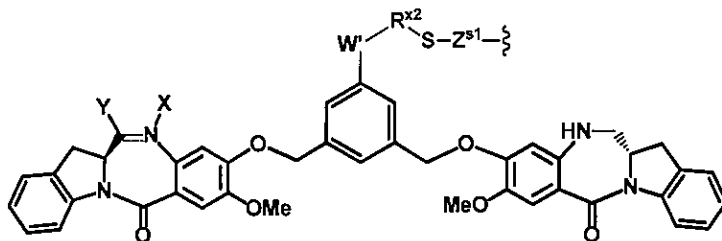
C<sub>y</sub><sup>L2</sup>は、以下の式

【化172-15】



10

または



20

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、

NとCとの間の二重線

【化172-16】

==

30

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであり；

R<sup>x1</sup>及びR<sup>x2</sup>は、独立して、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

R<sup>e</sup>は、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

W'は、-NR<sup>e</sup>であり、

R<sup>e</sup>は、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>であり；

nは、2～6の整数であり；

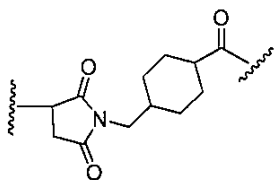
R<sup>k</sup>は、-Hまたは-Meであり；

Z<sup>s1</sup>は、以下の式

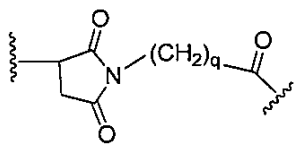
40

50

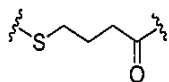
【化 1 7 2 - 1 7】



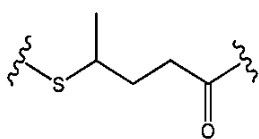
( b 1 )



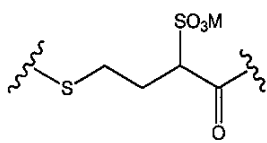
( b 2 )



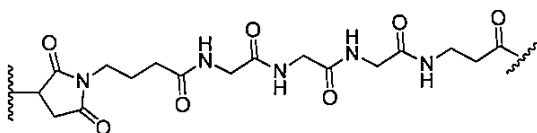
( b 3 )



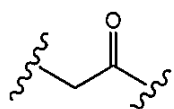
( b 4 )



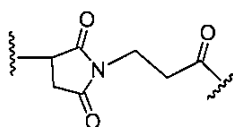
( b 5 )



( b 6 )



( b 7 )



( b 8 )

10

20

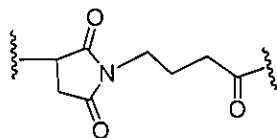
30

40

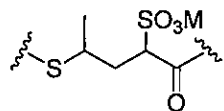
50



【化 1 7 2 - 1 8】



(b 9) ; 及び



(b 10)

10

のいずれか 1 つから選択され、

q は、1 ~ 5 の整数である、[ 1 ] ~ [ 1 4 ] 及び [ 1 6 ] ~ [ 2 9 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 3 8 ]

$R^e$  が、H または Me であり ;  $R^{x1}$  及び  $R^{x2}$  が、独立して、 $-(CH_2)_p-(C R^f R^g)-$  であり、 $R^f$  及び  $R^g$  は、それぞれ独立して、- H または ( $C_1 - C_4$ ) アルキルであり ; p が、0、1、2 または 3 である、[ 3 7 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 3 9 ]

$R^f$  及び  $R^g$  が同じであるか、または異なっており、- H 及び - Me から選択される、[ 3 8 ] に記載の免疫コンジュゲート。

20

[ 4 0 ]

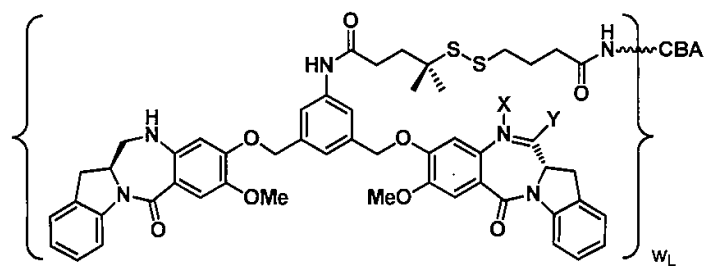
前記免疫コンジュゲートが、以下の式

30

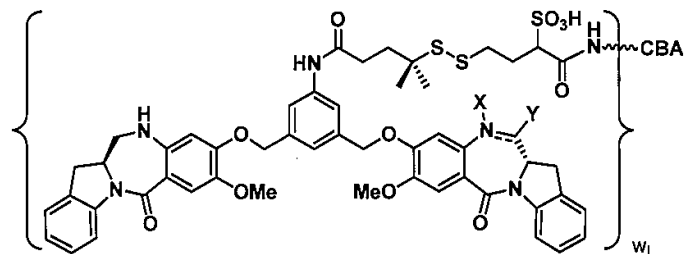
40

50

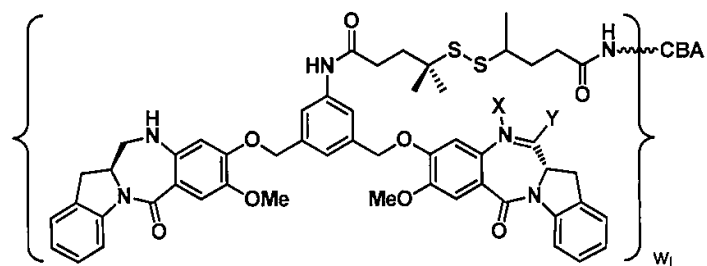
【化 1 7 2 - 1 9】



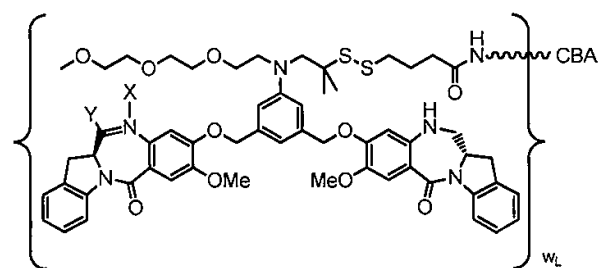
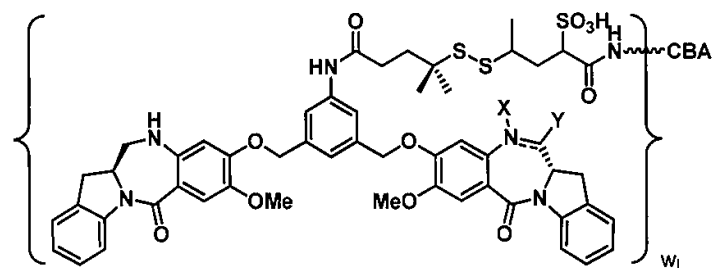
10



20



30

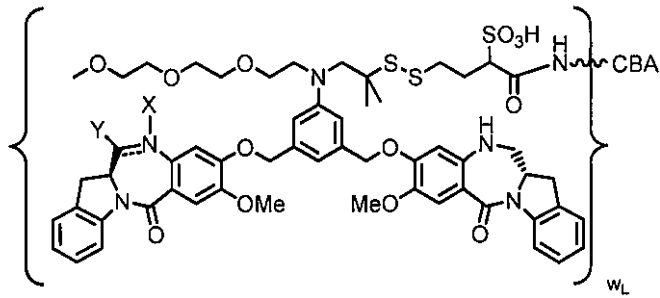


または

40

50

【化 1 7 2 - 2 0】



10

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、 $w_L$ は、1 ~ 10の整数であり；NとCとの間の二重線

【化 1 7 2 - 2 1】



は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは - Hであり；単結合である場合には、Xは、 - Hであり、Yは、 - O Hまたは - S O<sub>3</sub> Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩である、[ 3 7 ]に記載の免疫コンジュゲート。

20

[ 4 1 ]

NとCとの間の二重線

【化 1 7 2 - 2 2】



が二重結合を表し、Xが存在せず、Yが - Hである、[ 3 0 ] ~ [ 4 0 ]のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 4 2 ]

NとCとの間の二重線

【化 1 7 2 - 2 3】



が単結合を表し、Xが - Hであり、Yが - S O<sub>3</sub> Hであるか、またはその医薬的に許容される塩である、[ 3 0 ] ~ [ 4 0 ]のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 4 3 ]

Yが、 - S O<sub>3</sub> H、 - S O<sub>3</sub> Naまたは - S O<sub>3</sub> Kである、[ 4 2 ]に記載の免疫コンジュゲート。

40

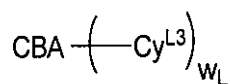
[ 4 4 ]

Yが、 - S O<sub>3</sub> Naである、[ 4 2 ]に記載の免疫コンジュゲート。

[ 4 5 ]

前記免疫コンジュゲートが、以下の式によって表され、

【化 1 7 2 - 2 4】



ここで、

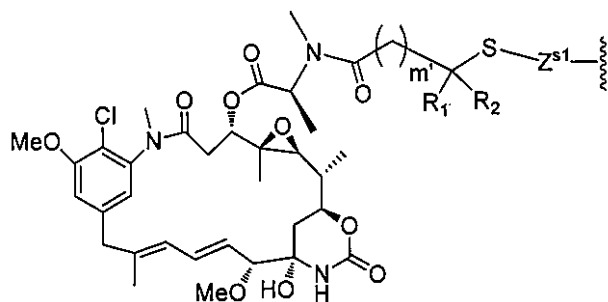
50

CBAは、リシン残基を介してC<sub>y</sub><sup>L3</sup>に共有結合する、請求項1～14及び16～29のいずれか一項に記載の抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントであり；

W<sub>L</sub>は、1～20の整数であり、

C<sub>y</sub><sup>L3</sup>は、以下の式

【化172-25】



10

によって表され、

m'は、1または2であり；

R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は、それぞれ独立して、Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキルであり；

Z<sup>s1</sup>は、以下の式

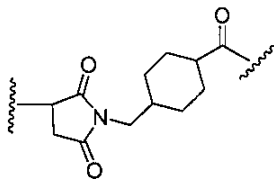
20

30

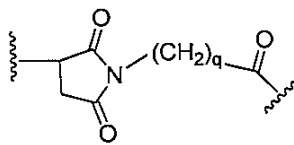
40

50

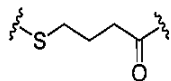
【化 1 7 2 - 2 6】



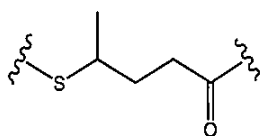
( b 1 )



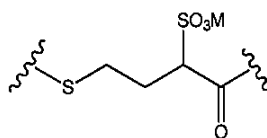
( b 2 )



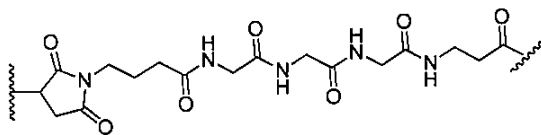
( b 3 )



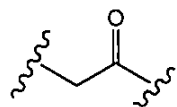
( b 4 )



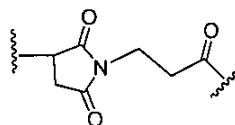
( b 5 )



( b 6 )



( b 7 )



( b 8 )

10

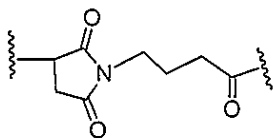
20

30

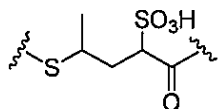
40

50

【化 1 7 2 - 2 7】



(b 9) ; 及び



(b 1 0)

10

のいずれか 1 つから選択され、

q は、1 ~ 5 の整数である、[ 1 ] ~ [ 1 4 ] 及び [ 1 6 ] ~ [ 2 9 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 4 6 ]

m' が 1 であり、R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> が両方とも H である、[ 4 5 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 4 7 ]

m' が 2 であり、R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> が両方とも Me である、[ 4 5 ] に記載の免疫コンジュゲート。

20

[ 4 8 ]

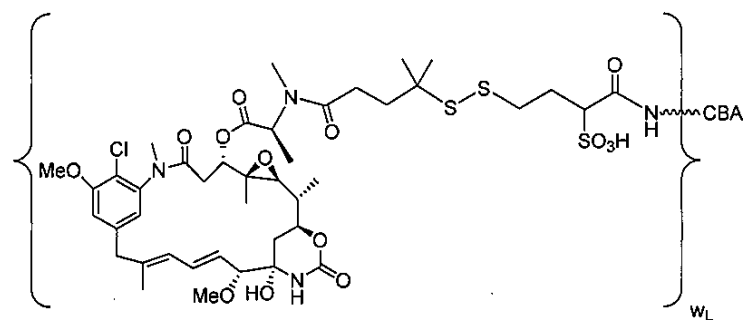
前記免疫コンジュゲートが、以下の式

30

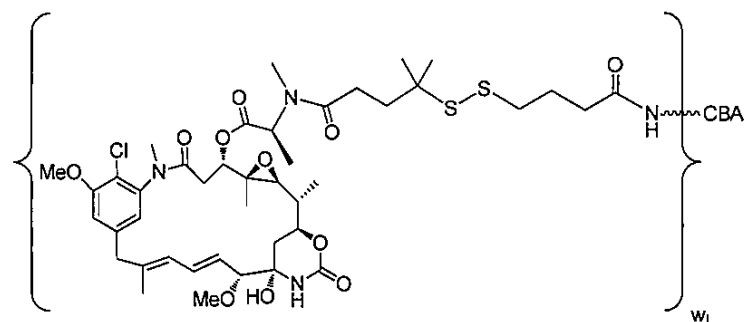
40

50

【化 1 7 2 - 2 8】

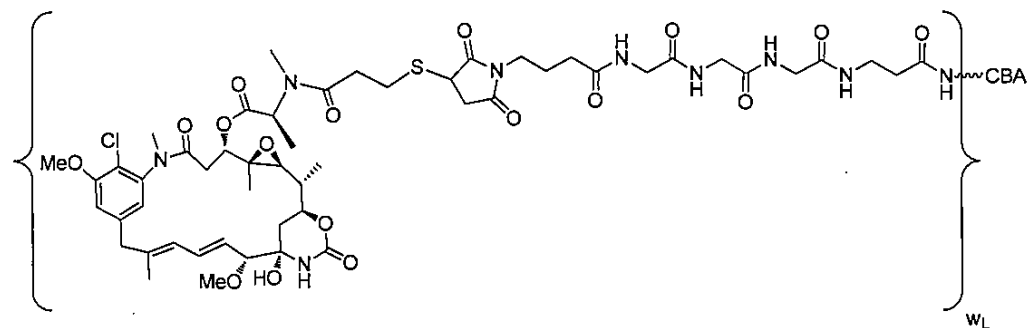


10



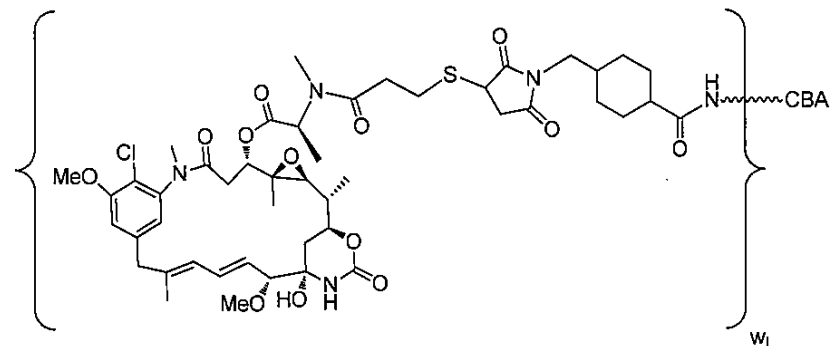
20

または



30

または



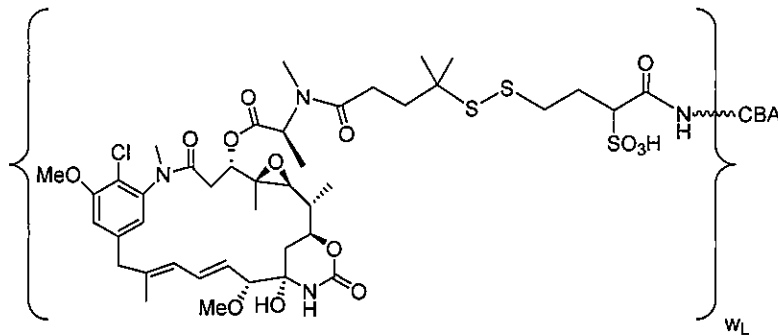
40

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、ここで、 $w_L$ は、1 ~ 10の整数である、[45]に記載の免疫コンジュゲート。

[49]

前記免疫コンジュゲートが、以下の式

## 【化 1 7 2 - 2 9】



10

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
ここで、

$w_L$  は、1 ~ 10 の整数であり、

CBA は、それぞれ配列番号 8、35 及び 45 及び配列番号 62、13、14 の配列を有する CDR<sub>H</sub>1 ドメイン、CDR<sub>H</sub>2 ドメイン及び CDR<sub>H</sub>3 ドメインと、CDR<sub>L</sub>1 ドメイン、CDR<sub>L</sub>2 ドメイン及び CDR<sub>L</sub>3 ドメインとを含む、ヒト化抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントである、[45] に記載の免疫コンジュゲート。

[50]

20

前記ヒト化抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントが、それぞれ配列番号 28 及び配列番号 55 の配列を有する重鎖可変ドメイン (VH) と軽鎖可変ドメイン (VL) とを含む、[49] に記載の免疫コンジュゲート。

[51]

前記ヒト化抗 ADAM9 抗体が、それぞれ配列番号 52 及び配列番号 68 の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、[50] に記載の免疫コンジュゲート。

[52]

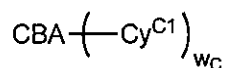
前記ヒト化抗 ADAM9 抗体が、それぞれ配列番号 151 及び配列番号 68 の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、[49] に記載の免疫コンジュゲート。

[53]

30

前記免疫コンジュゲートが、以下の式によって表され、

【化 1 7 2 - 3 0】



ここで、

CBA は、システイン残基を介して  $\text{Cy}^{C1}$  に共有結合する、請求項 1 ~ 24 及び 26 ~ 29 のいずれか一項に記載の抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントであり；

$w_C$  は、1 または 2 であり、

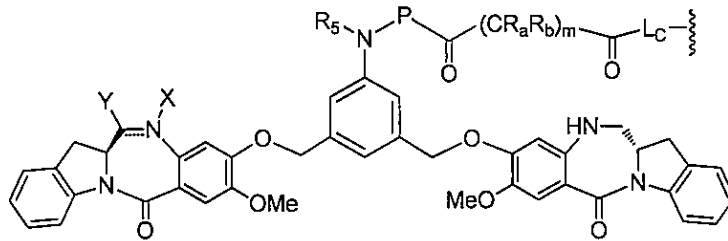
40

$\text{Cy}^{C1}$  は、以下の式

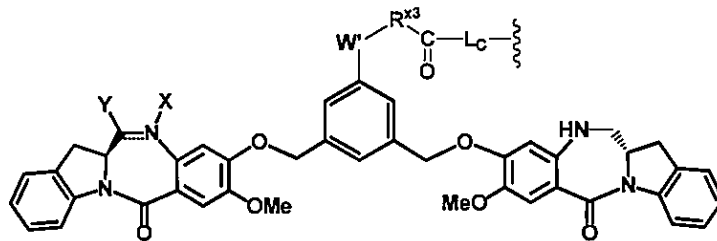
50



## 【化 1 7 2 - 3 1】



または



によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
NとCとの間の二重線

## 【化 1 7 2 - 3 2】



は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであり；単結合である場合には、Xは、-Hまたはアミン保護部分であり、Yは、-OHまたは-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり；

R<sub>5</sub>は、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキルであり；

Pは、アミノ酸残基または2～20個のアミノ酸残基を含有するペプチドであり；

R<sub>a</sub>及びR<sub>b</sub>は、それぞれの場合に、独立して、-H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキルまたは帯電した置換基またはイオン化可能な基Qであり；

W'は、-N<sup>Re</sup>であり、

R<sup>e</sup>は、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>であり；

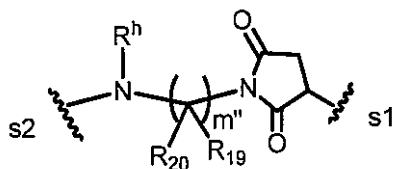
nは、2～6の整数であり；

R<sup>k</sup>は、-Hまたは-Meであり；

R<sup>x3</sup>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであり；

L<sub>c</sub>は、

## 【化 1 7 2 - 3 3】



によって表され、s<sub>1</sub>は、CBAに共有結合した部位であり、s<sub>2</sub>は、Cy<sup>C1</sup>上の-C(=O)-基に共有結合した部位であり；

R<sub>19</sub>及びR<sub>20</sub>は、それぞれの場合に、独立して、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキルであり；

m''は、1～10の整数であり；

R<sup>h</sup>は、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキルである、[1]～[24]及び[26]～[29]のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 5 4 ]

R<sub>a</sub> 及び R<sub>b</sub> が両方とも H であり ; R<sub>5</sub> が、H または Me である、[ 5 3 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 5 5 ]

P が、2 ~ 5 個のアミノ酸残基を含むペプチドである、[ 5 3 ] または [ 5 4 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 5 6 ]

P が、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Val - Ala、Val - Cit、Val - Lys、Phe - Lys、Lys - Lys、Ala - Lys、Phe - Cit、Leu - Cit、Ile - Cit、Trp、Cit、Phe - Ala、Phe - N<sup>9</sup> - トシル - Arg、Phe - N<sup>9</sup> - ニトロ - Arg、Phe - Phe - Lys、D - Phe - Phe - Lys、Gly - Phe - Lys、Leu - Ala - Leu、Ile - Ala - Leu、Val - Ala - Val、Ala - Leu - Ala - Leu ( 配列番号 144 )、  
- Ala - Leu - Ala - Leu ( 配列番号 145 )、Gly - Phe - Leu - Gly ( 配列番号 146 )、Val - Arg、Arg - Val、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、Met - Ala、Gln - Val、Asn - Ala、Gln - Phe 及び Gln - Ala から選択される、  
[ 5 3 ] ~ [ 5 5 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 5 7 ]

P が、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Ala - Ala、Ala - D - Ala、D - Ala - Ala または D - Ala - D - Ala である、[ 5 6 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 5 8 ]

Q が、- SO<sub>3</sub>H またはその医薬的に許容される塩である、[ 5 3 ] ~ [ 5 7 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

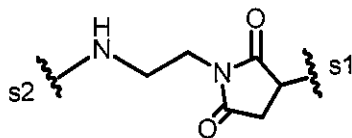
[ 5 9 ]

R<sub>19</sub> 及び R<sub>20</sub> が、両方とも H であり、m'' が、1 ~ 6 の整数である、[ 5 3 ] ~ [ 5 8 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 6 0 ]

- L<sub>C</sub> - は、以下の式

【化 172 - 34】



によって表される、[ 5 9 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 6 1 ]

以下の式

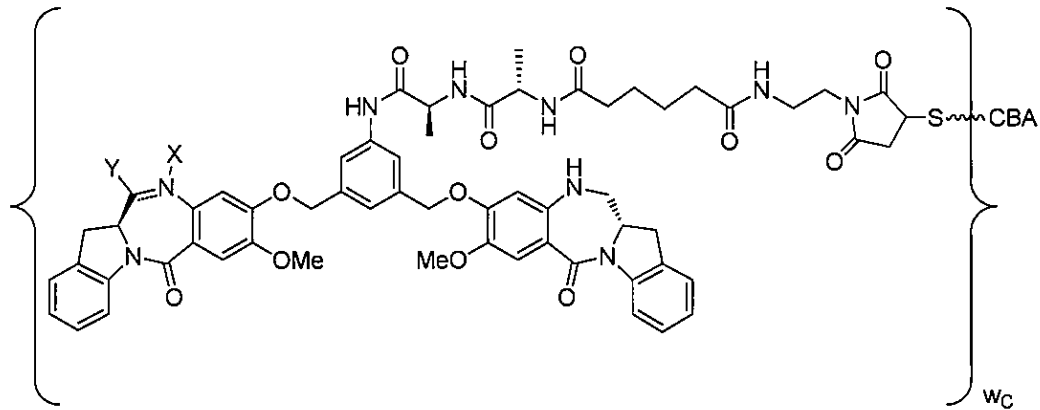
10

20

30

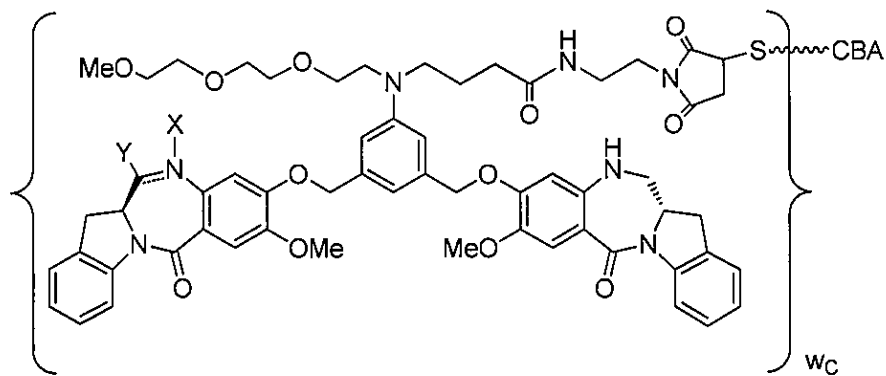
40

【化 1 7 2 - 3 5】



10

または



20

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、NとCとの間の二重線  
【化 1 7 2 - 3 6】

=

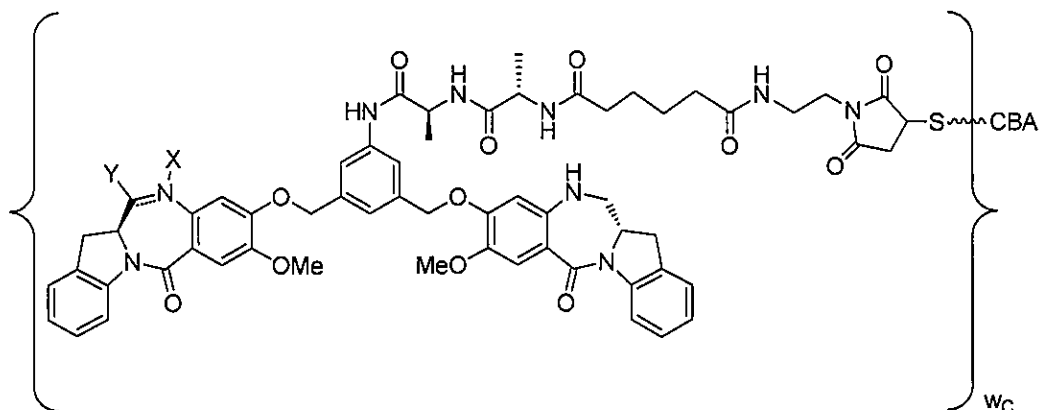
は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは - H であり；単結合である場合には、Xは、 - H であり、Yは、 - O H または - S O<sub>3</sub> H であるか、またはこれらの医薬的に許容される塩である、[ 5 3 ] に記載の免疫コンジュゲート。

30

[ 6 2 ]

以下の式

【化 1 7 2 - 3 7】



40

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、

50

ここで、  
NとCとの間の二重線  
【化172-38】

==

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは-Hであり；単結合である場合には、Xは、-Hであり、Yは、-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり、

CBAは、それぞれ配列番号8、35及び45及び配列番号62、13、14の配列を有するCDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメインと、CDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及びCDR<sub>L</sub>3ドメインとを含む、ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントである、[53]に記載の免疫コンジュゲート。

10

[63]

前記ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントが、それぞれ配列番号28及び配列番号55の配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)とを含む、[62]に記載の免疫コンジュゲート。

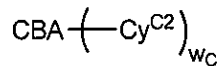
[64]

前記ヒト化抗ADAM9抗体が、それぞれ配列番号142及び配列番号68の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、[63]に記載の免疫コンジュゲート。

20

[65]

前記免疫コンジュゲートが、以下の式によって表され、  
【化172-39】



ここで、

CBAは、システイン残基を介してCy<sup>C2</sup>に共有結合する、請求項1～24及び26～29のいずれか一項に記載の抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントであり；

30

w<sub>c</sub>は、1または2であり、

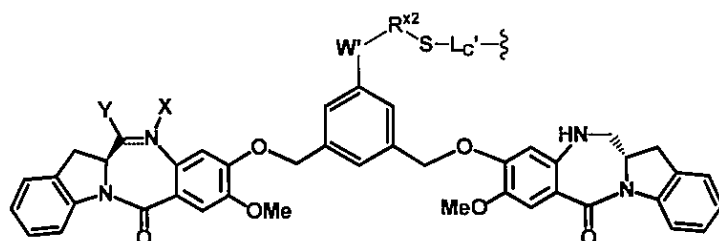
Cy<sup>C2</sup>は、以下の式

40

50

The chemical structure shows a bis-tryptophan derivative. It consists of two tryptophan residues linked by a central linker. The left tryptophan is a tryptophan derivative with a substituent Y at the 2-position of the indole ring and a substituent X at the 3-position. The right tryptophan is a tryptophan derivative with a substituent MeO at the 5-position of the indole ring and a substituent NH at the 2-position. The two tryptophan residues are connected via their carboxylate groups to a central linker. The linker is a benzene ring with a substituent R<sup>e</sup> at the 1-position and a substituent R<sup>x1</sup> at the 4-position. The substituent R<sup>x1</sup> is further connected to a sulfur atom, which is then connected to a linker L<sub>C</sub><sup>1</sup> and a wavy line representing a further substituent.

10

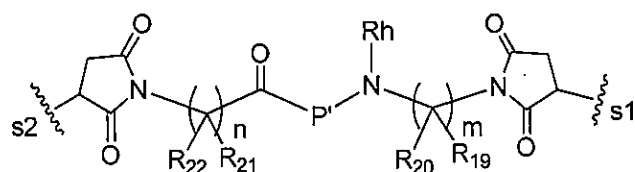


20

11

30

$L_C'$  は、以下の式

$$\text{S}^2 \text{---} \text{S} \text{---} \left( \text{CH}_2 \right)_r \text{---} \text{CH} \left( \text{R}_{12} \right) \text{---} \text{CH} \left( \text{R}_{13} \right) \text{---} \text{Z} \text{---} \left( \text{CH}_2 \right)_q \text{---} \text{N} \text{---} \text{C} \left( \text{O} \right) \text{---} \text{C} \left( \text{O} \right) \text{---} \text{C} \left( \text{O} \right) \text{---} \text{S}^1$$


50

s 1 は、C B A に共有結合した部位であり、s 2 は、C y <sup>C 2</sup> 上の - S - 基に共有結合した部位であり；

Z は、C ( = O ) - N R <sub>9</sub> - または - N R <sub>9</sub> - C ( = O ) - であり；

Q は、- H、帯電した置換基またはイオン化可能な基であり；

R <sub>9</sub>、R <sub>10</sub>、R <sub>11</sub>、R <sub>12</sub>、R <sub>13</sub>、R <sub>19</sub>、R <sub>20</sub>、R <sub>21</sub> 及び R <sub>22</sub> は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、- H または ( C <sub>1</sub> - C <sub>3</sub> ) アルキルであり；

q 及び r は、それぞれの場合に、独立して、0 ~ 10 の整数であり；

m 及び n は、それぞれ独立して、0 ~ 10 の整数であり；

R <sup>h</sup> は、- H または ( C <sub>1</sub> - C <sub>3</sub> ) アルキルであり；

P ' は、アミノ酸残基または 2 ~ 20 個のアミノ酸残基を含有するペプチドである、[ 1 ] ~ [ 24 ] 及び [ 26 ] ~ [ 29 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。 10

[ 66 ]

P ' が、2 ~ 5 個のアミノ酸残基を含むペプチドである、[ 65 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 67 ]

P ' が、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Val - Ala、Val - Cit、Val - Lys、Phe - Lys、Lys - Lys、Ala - Lys、Phe - Cit、Leu - Cit、Ile - Cit、Trp、Cit、Phe - Ala、Phe - N<sup>9</sup> - トシル - Arg、Phe - N<sup>9</sup> - ニトロ - Arg、Phe - Phe - Lys、D - Phe - Phe - Lys、Gly - Phe - Lys、Leu - Ala - Leu、Ile - Ala - Leu、Val - Ala - Val、Ala - Leu - Ala - Leu ( 配列番号 144 )、- Ala - Leu - Ala - Leu ( 配列番号 145 )、Gly - Phe - Leu - Gly ( 配列番号 146 )、Val - Arg、Arg - Val、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、Met - Ala、Gln - Val、Asn - Ala、Gln - Phe 及び Gln - Ala から選択される、[ 65 ] または [ 66 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。 20

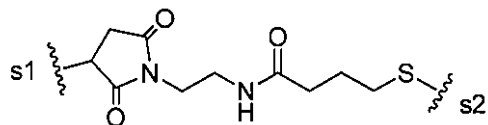
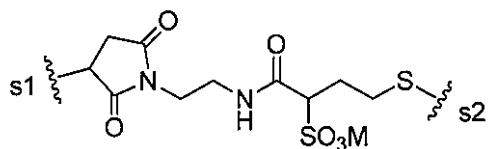
[ 68 ]

P ' が、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Ala - Ala、Ala - D - Ala、D - Ala - Ala または D - Ala - D - Ala である、[ 67 ] に記載の免疫コンジュゲート。 30

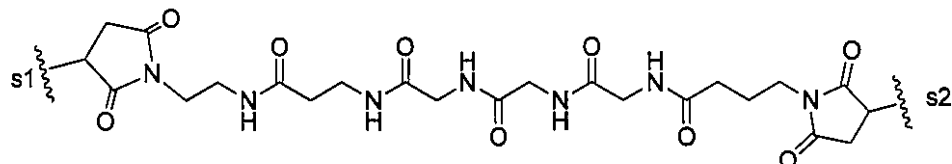
[ 69 ]

- L c ' - は、以下の式

【化 1 7 2 - 4 3】



または



によって表される、[ 6 5 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 7 0 ]

$R^e$  が、H または Me であり； $R^{x1}$  が、 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$  であり、 $R^{x2}$  が、 $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$  であり、 $R^f$  及び  $R^g$  は、それぞれ独立して、 $-H$  または  $(C_1 - C_4)$  アルキルであり； $p$  が、0、1、2 または 3 である、[ 6 5 ] ~ [ 6 9 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 7 1 ]

$R^f$  及び  $R^g$  が同じであるか、または異なっており、 $-H$  及び  $-Me$  から選択される、[ 7 0 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 7 2 ]

以下の式

10

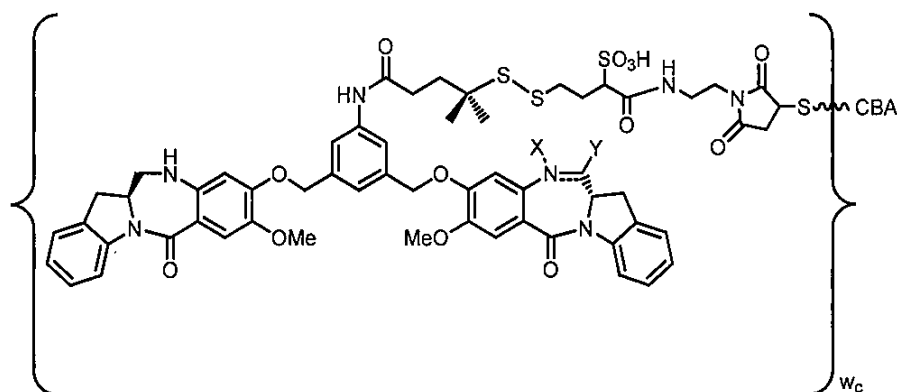
20

30

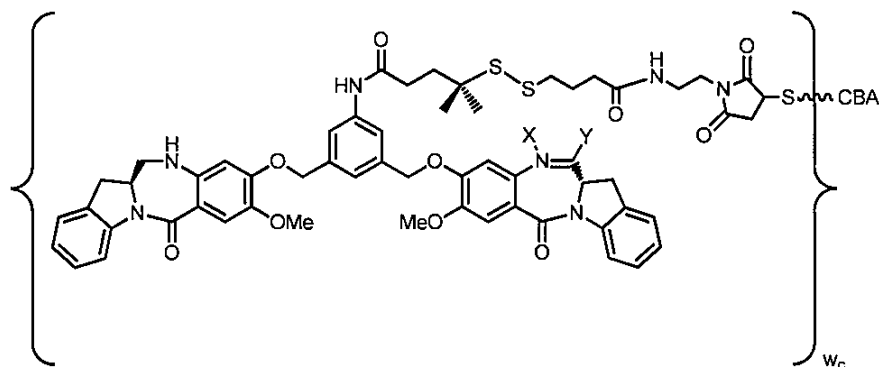
40

50

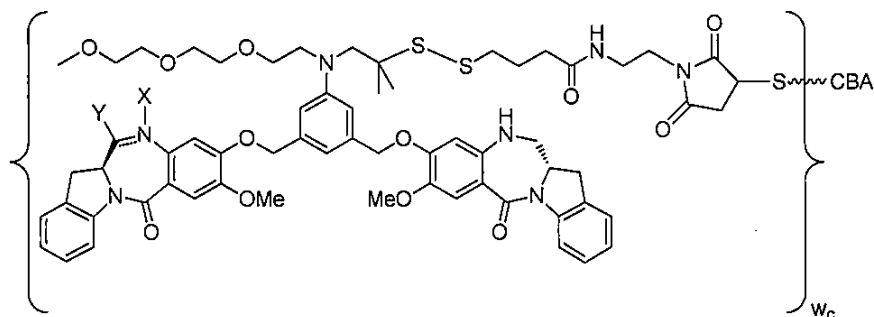
【化 1 7 2 - 4 4】



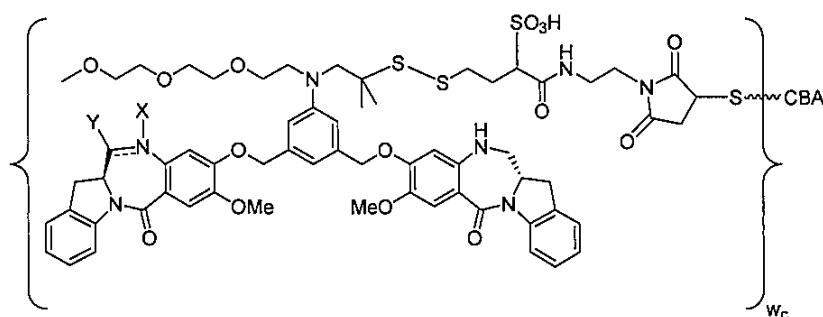
10



20



30



40

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、NとCとの間の二重線  
【化 1 7 2 - 4 5】

==

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは - Hであり；単結合である場合には、Xは、 - Hであり、Yは、 - OHまたは - SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩である、[ 6 5 ]に記載の免疫コンジュゲート。

50



[ 7 3 ]

NとCとの間の二重線

【化 1 7 2 - 4 6 】



が二重結合を表し、Xが存在せず、Yが-Hである、[ 5 3 ] ~ [ 7 2 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 7 4 ]

NとCとの間の二重線

【化 1 7 2 - 4 7 】



10

が単結合を表し、Xが-Hであり、Yが-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはその医薬的に許容される塩である、[ 5 3 ] ~ [ 7 2 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 7 5 ]

Yが、-SO<sub>3</sub>H、-SO<sub>3</sub>Naまたは-SO<sub>3</sub>Kである、[ 7 4 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 7 6 ]

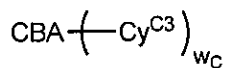
Yが、-SO<sub>3</sub>Naである、[ 7 4 ] に記載の免疫コンジュゲート。

20

[ 7 7 ]

前記免疫コンジュゲートが、以下の式によって表され、

【化 1 7 2 - 4 8 】



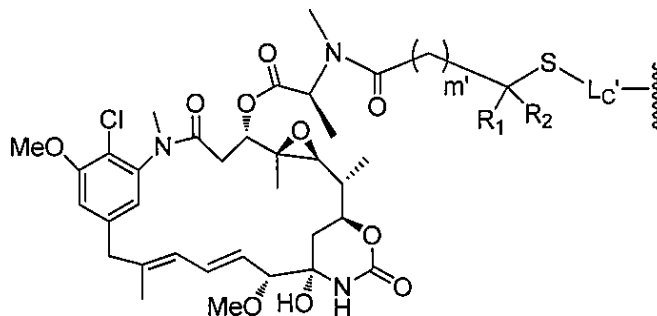
ここで、

CBAは、システイン残基を介してCy<sup>C3</sup>に共有結合する、請求項1~24及び26~29のいずれか一項に記載の抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントであり；

30

w<sub>C</sub>は、1または2であり、Cy<sup>C3</sup>は、以下の式

【化 1 7 2 - 4 9 】



40

によって表され、

ここで、

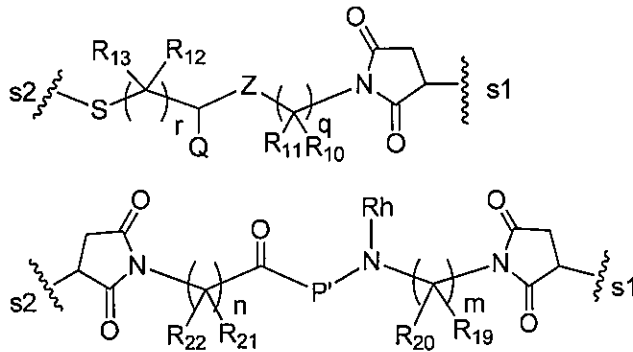
m'は、1または2であり；

R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は、それぞれ独立して、-Hまたは(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)アルキルであり；

Lc'は、以下の式

50

【化 1 7 2 - 5 0】



10

によって表され、

ここで、

s 1 は、C B A に共有結合した部位であり、s 2 は、C y <sup>C 3</sup> 上の - S - 基に共有結合した部位であり；

Z は、- C ( = O ) - N R <sub>9</sub> - または - N R <sub>9</sub> - C ( = O ) - であり；

Q は、H、帯電した置換基またはイオン化可能な基であり；

R <sub>9</sub>、R <sub>10</sub>、R <sub>11</sub>、R <sub>12</sub>、R <sub>13</sub>、R <sub>19</sub>、R <sub>20</sub>、R <sub>21</sub> 及び R <sub>22</sub> は、それぞれの場合に、それぞれ独立して、- H または ( C <sub>1</sub> - C <sub>3</sub> ) アルキルであり；

20

q 及び r は、それぞれの場合に、独立して、0 ~ 10 の整数であり；

m 及び n は、それぞれ独立して、0 ~ 10 の整数であり；

R <sup>h</sup> は、- H または ( C <sub>1</sub> - C <sub>3</sub> ) アルキルであり；

P ' は、アミノ酸残基または 2 ~ 20 個のアミノ酸残基を含有するペプチドである、[ 1 ] ~ [ 24 ] 及び [ 26 ] ~ [ 29 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 78 ]

P ' が、2 ~ 5 個のアミノ酸残基を含むペプチドである、[ 77 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 79 ]

P ' が、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Val - Ala、Val - Cit、Val - Lys、Phe - Lys、Lys - Lys、Ala - Lys、Phe - Cit、Leu - Cit、Ile - Cit、Trp、Cit、Phe - Ala、Phe - N<sup>9</sup> - トシル - Arg、Phe - N<sup>9</sup> - ニトロ - Arg、Phe - Phe - Lys、D - Phe - Phe - Lys、Gly - Phe - Lys、Leu - Ala - Leu、Ile - Ala - Leu、Val - Ala - Val、Ala - Leu - Ala - Leu ( 配列番号 144 )、- Ala - Leu - Ala - Leu ( 配列番号 145 )、Gly - Phe - Leu - Gly ( 配列番号 146 )、Val - Arg、Arg - Val、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、Met - Ala、Gln - Val、Asn - Ala、Gln - Phe 及び Gln - Ala から選択される、[ 77 ] または [ 78 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

30

40

[ 80 ]

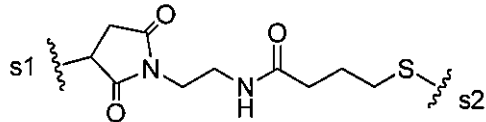
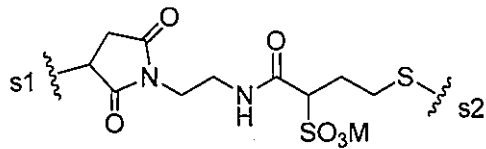
P ' が、Gly - Gly - Gly、Ala - Val、Ala - Ala、Ala - D - Ala、D - Ala - Ala または D - Ala - D - Ala である、[ 79 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 81 ]

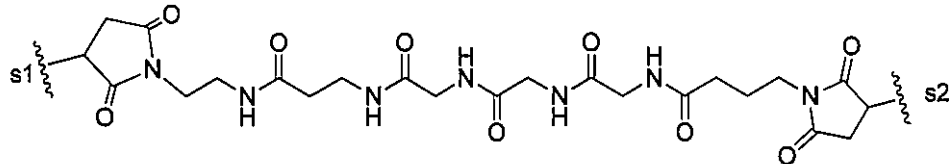
- L c ' - は、以下の式

50

【化 1 7 2 - 5 1】



または



10

によって表され、Mは、 $H^+$ またはカチオンである、[ 7 7 ]に記載の免疫コンジュゲート。

[ 8 2 ]

20

$m'$  が1であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が両方ともHである、[ 7 7 ] ~ [ 8 1 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

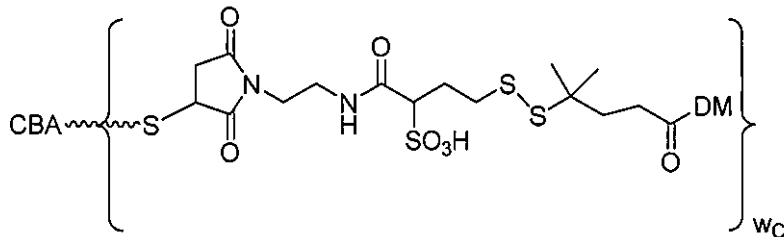
[ 8 3 ]

$m'$  が2であり、 $R_1$  及び  $R_2$  が両方ともMeである、[ 7 7 ] ~ [ 8 1 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

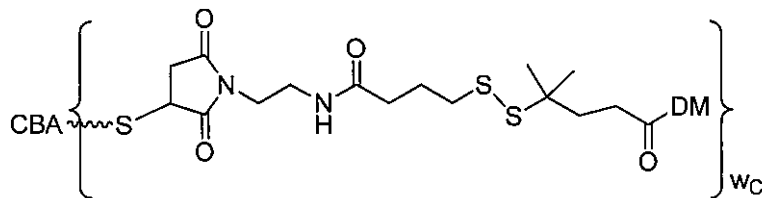
[ 8 4 ]

前記免疫コンジュゲートが、以下の式

【化 1 7 2 - 5 2】

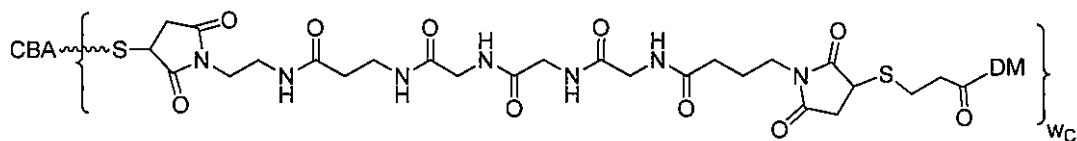


30



40

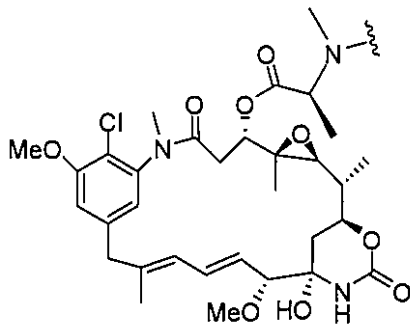
または



によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、ここで、DMは、以下の式

50

【化 1 7 2 - 5 3】



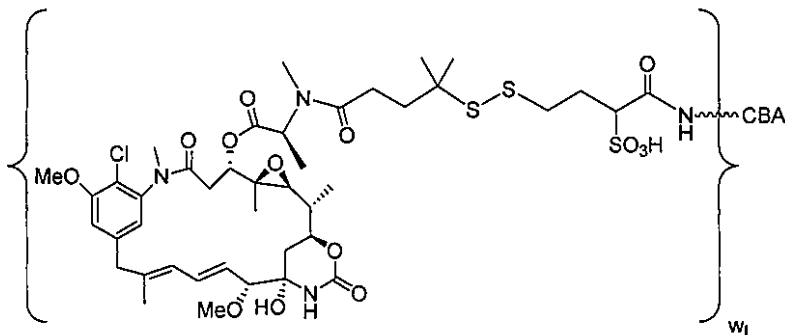
10

によって表される薬物部分である、[ 7 7 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 8 5 ]

以下の式

【化 1 7 2 - 5 4】



20

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
ここで、

$w_L$  は、1 ~ 10 の整数であり、

CBA は、それぞれ配列番号 8、35 及び 45 及び配列番号 62、13、14 の配列を有する CDR<sub>H</sub>1 ドメイン、CDR<sub>H</sub>2 ドメイン及び CDR<sub>H</sub>3 ドメインと、CDR<sub>L</sub>1 ドメイン、CDR<sub>L</sub>2 ドメイン及び CDR<sub>L</sub>3 ドメインとを含む、ヒト化抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントである、免疫コンジュゲート。

30

[ 8 6 ]

前記ヒト化抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントが、それぞれ配列番号 28 及び配列番号 55 の配列を有する重鎖可変ドメイン (VH) と軽鎖可変ドメイン (VL) とを含む、[ 8 5 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 8 7 ]

前記ヒト化抗 ADAM9 抗体が、それぞれ配列番号 52 及び配列番号 68 の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、[ 8 6 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 8 8 ]

前記ヒト化抗 ADAM9 抗体が、それぞれ配列番号 151 及び配列番号 68 の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、[ 8 6 ] に記載の免疫コンジュゲート。

40

[ 8 9 ]

配列番号 52 または配列番号 151 の X がリシンである、[ 8 7 ] または [ 8 8 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 9 0 ]

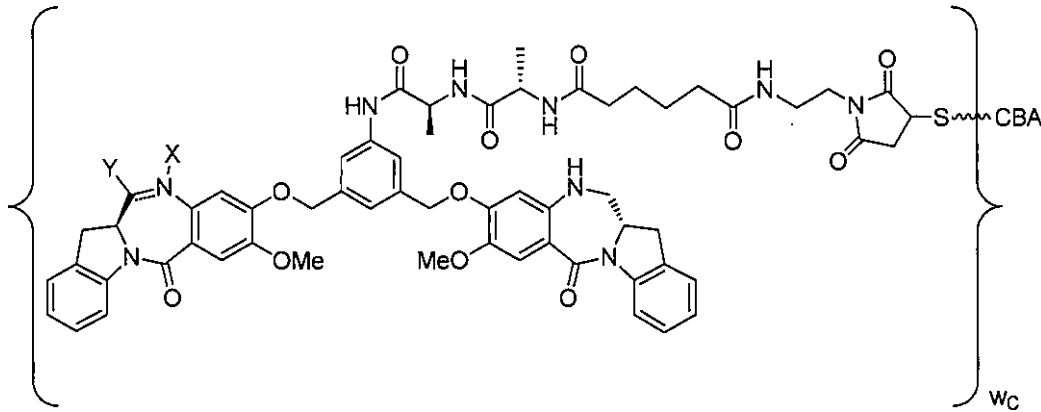
配列番号 52 または配列番号 151 の X が存在しない、[ 8 7 ] または [ 8 8 ] に記載の免疫コンジュゲート。

[ 9 1 ]

以下の式

50

【化 1 7 2 - 5 5】



10

によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
ここで、

NとCとの間の二重線

【化 1 7 2 - 5 6】

=

20

は、単結合または二重結合を表し、但し、二重結合である場合には、Xは存在せず、Yは-Hであり；単結合である場合には、Xは、-Hであり、Yは、-SO<sub>3</sub>Hであるか、またはこれらの医薬的に許容される塩であり、

CBAは、それぞれ配列番号8、35及び45及び配列番号62、13、14の配列を有するCDR<sub>H</sub>1ドメイン、CDR<sub>H</sub>2ドメイン及びCDR<sub>H</sub>3ドメインと、CDR<sub>L</sub>1ドメイン、CDR<sub>L</sub>2ドメイン及びCDR<sub>L</sub>3ドメインとを含む、ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントである、免疫コンジュゲート。

[ 9 2 ]

前記ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントが、それぞれ配列番号28及び配列番号55の配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)とを含む、[ 9 1 ]に記載の免疫コンジュゲート。

30

[ 9 3 ]

前記ヒト化抗ADAM9抗体が、それぞれ配列番号142及び配列番号68の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、[ 9 2 ]に記載の免疫コンジュゲート。

[ 9 4 ]

前記ヒト化抗ADAM9抗体が、それぞれ配列番号152及び配列番号68の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、[ 9 2 ]に記載の免疫コンジュゲート。

[ 9 5 ]

配列番号142または配列番号152のXがリシンである、[ 9 3 ]または[ 9 4 ]に記載の免疫コンジュゲート。

40

[ 9 6 ]

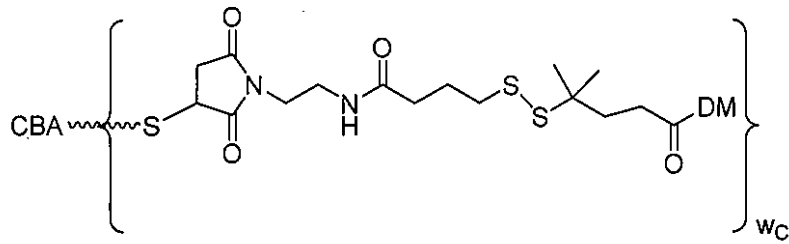
配列番号142または配列番号152のXが存在しない、[ 9 3 ]または[ 9 4 ]に記載の免疫コンジュゲート。

[ 9 7 ]

以下の式

50

【化 1 7 2 - 5 7】

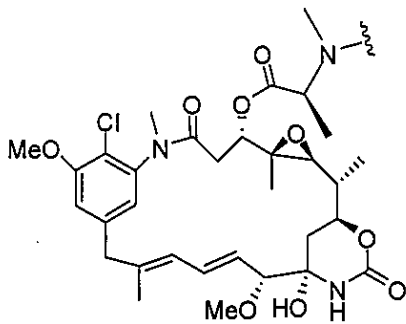


によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
ここで、

$w_C$  が、1 または 2 であり；

DM は、以下の式

【化 1 7 2 - 5 8】



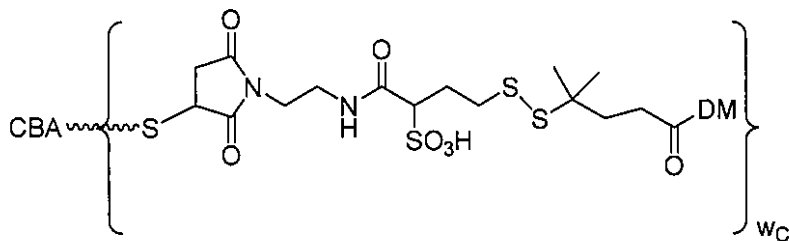
によって表される薬物部分であり、

CBA は、それぞれ配列番号 8、35 及び 45 及び配列番号 62、13、14 の配列を有する CDR<sub>H</sub>1 ドメイン、CDR<sub>H</sub>2 ドメイン及び CDR<sub>H</sub>3 ドメインと、CDR<sub>L</sub>1 ドメイン、CDR<sub>L</sub>2 ドメイン及び CDR<sub>L</sub>3 ドメインとを含む、ヒト化抗 ADAM9 抗体またはその ADAM9 結合フラグメントである、免疫コンジュゲート。

[ 9 8 ]

以下の式

【化 1 7 2 - 5 9】



によって表されるか、またはその医薬的に許容される塩であり、  
ここで、

$w_C$  が、1 または 2 であり；

DM は、以下の式

10

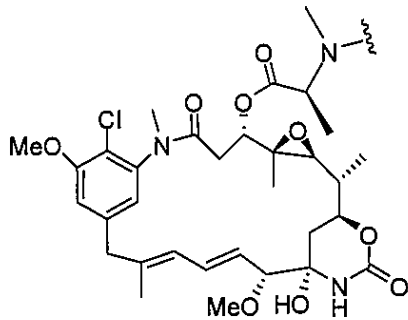
20

30

40

50

【化 1 7 2 - 6 0】



10

によって表される薬物部分であり、

CBAは、それぞれ配列番号8、35及び45及び配列番号62、13、14の配列を有するCDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインと、CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインとを含む、ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントである、免疫コンジュゲート。

[ 9 9 ]

前記ヒト化抗ADAM9抗体またはそのADAM9結合フラグメントが、それぞれ配列番号28及び配列番号55の配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖可変ドメイン(VL)とを含む、[ 9 7 ]または[ 9 8 ]に記載の免疫コンジュゲート。

20

[ 1 0 0 ]

前記ヒト化抗ADAM9抗体が、それぞれ配列番号142及び配列番号68の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、[ 9 7 ]または[ 9 8 ]に記載の免疫コンジュゲート。

[ 1 0 1 ]

前記ヒト化抗ADAM9抗体が、それぞれ配列番号152及び配列番号68の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、[ 9 7 ]または[ 9 8 ]に記載の免疫コンジュゲート。

[ 1 0 2 ]

配列番号142または配列番号152のXがリシンである、[ 1 0 0 ]または[ 1 0 1 ]に記載の免疫コンジュゲート。

[ 1 0 3 ]

配列番号142または配列番号152のXが存在しない、[ 1 0 0 ]または[ 1 0 1 ]に記載の免疫コンジュゲート。

[ 1 0 4 ]

前記医薬的に許容される塩が、ナトリウム塩またはカリウム塩である、[ 3 0 ] ~ [ 1 0 3 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

[ 1 0 5 ]

有効量の[ 1 ] ~ [ 1 0 4 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートと、医薬的に許容される担体、賦形剤または希釈剤とを含む、医薬組成物。

[ 1 0 6 ]

ADAM9の発現と関連するか、またはADAM9の発現によって特徴付けられる疾患または状態の治療における、[ 1 ] ~ [ 1 0 4 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートまたは請求項105に記載の医薬組成物の使用。

40

[ 1 0 7 ]

ADAM9と関連するか、またはADAM9によって特徴付けられる前記疾患または状態が、がんである、[ 1 0 6 ] に記載の使用。

[ 1 0 8 ]

前記がんが、非小細胞肺癌、大腸癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、腎細胞癌、前立腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、子宮癌、卵巣癌、肝臓癌、子宮頸癌、甲状腺癌、精巣癌、骨髄がん、黒色腫及びリンパがんからなる群から選択される、[ 1 0 7 ] に記載の使用。

[ 1 0 9 ]

50

前記非小細胞肺癌が、扁平上皮癌、腺癌または大細胞未分化癌である、[ 1 0 8 ] に記載の使用。

[ 1 1 0 ]

前記大腸癌が、腺癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、原発性大腸リンパ腫、平滑筋肉腫または扁平上皮癌である、[ 1 0 8 ] に記載の使用。

[ 1 1 1 ]

対象において、A D A M 9 の発現と関連するか、または A D A M 9 の発現によって特徴付けられる疾患または状態を治療するための方法であって、前記対象に、有効量の [ 1 ] ~ [ 1 0 4 ] のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートまたは [ 1 0 5 ] に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

[ 1 1 2 ]

A D A M 9 と関連するか、または A D A M 9 によって特徴付けられる前記疾患または状態が、がんである、[ 1 1 1 ] に記載の方法。

[ 1 1 3 ]

前記がんが、非小細胞肺癌、大腸癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、腎細胞癌、前立腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、子宮癌、卵巣癌、肝臓癌、子宮頸癌、甲状腺癌、精巣癌、骨髄がん、黒色腫及びリンパがんからなる群から選択される、[ 1 1 2 ] に記載の方法。

[ 1 1 4 ]

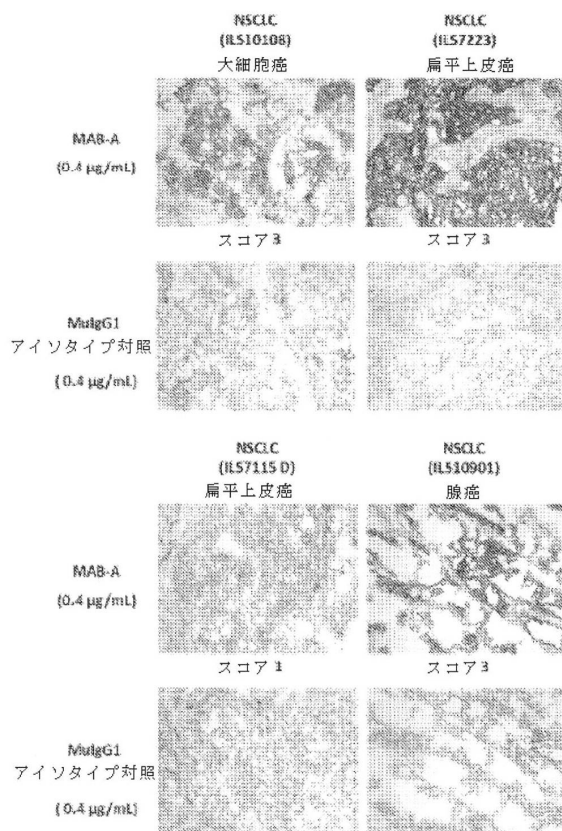
前記非小細胞肺癌が、扁平上皮癌、腺癌または大細胞未分化癌である、[ 1 1 3 ] に記載の方法。

[ 1 1 5 ]

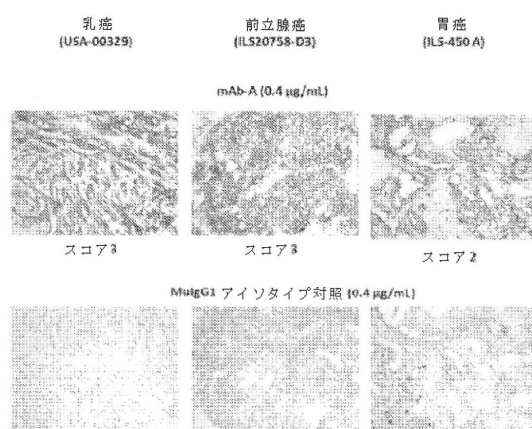
前記大腸癌が、腺癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、原発性大腸リンパ腫、平滑筋肉腫または扁平上皮癌である、[ 1 1 3 ] に記載の方法。

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

20

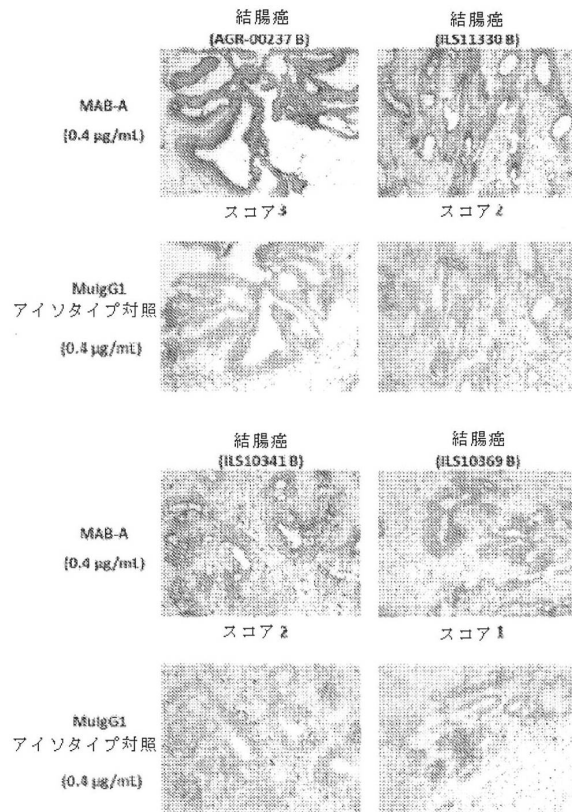
30

40

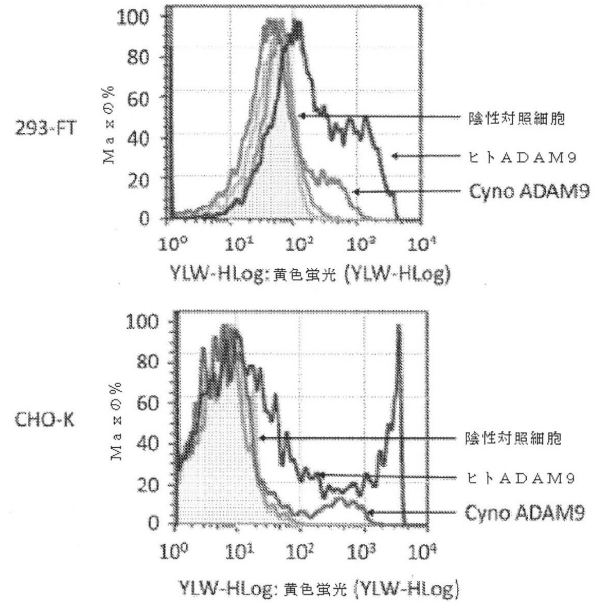
50



【図 1 C】



【図 2】



【図 3 A】

		FR1	CDR1
マウス MAE-A VL	配列番号 7	QVQLQQFGAEIYKPGASVYLSCHASGYTFT	SYWQH
hMAB-A VH (1)	配列番号 16	E...VES.GG...G.LR...A...F...S	
hMAB-A VH (2)	配列番号 17	E...VES.GG...G.LR...A...F...S	
hMAB-A VH (3)	配列番号 18	E...VES.GG...G.LR...A...F...S	
hMAB-A VH (4)	配列番号 19	E...VES.GG...G.LR...A...F...S	
hMAB-A VH (7B)	配列番号 21	E...VES.GG...G.LR...A...F...S	
hMAB-A VH (2C)	配列番号 22	E...VES.GG...G.LR...A...F...S	
hMAB-A VH (2D)	配列番号 23	E...VES.GG...G.LR...A...F...S	
hMAB-A VH (2E)	配列番号 28	E...VES.GG...G.LR...A...F...S	
FR2	CDR2	FR3	
マウス MAB-A VL	配列番号 7	KATLTQKSSSTAYMQLSSLASGDSAVYYCAR	
hMAB-A VH (1)	配列番号 16	RF.IS..N.KN.L.L.MG..R.A..T...	
hMAB-A VH (2)	配列番号 17	RF.IS..N.KN.L.L.MG..R.A..T...	
hMAB-A VH (3)	配列番号 18	RF.IS..N.KN.L.L.MG..R.A..T...	
hMAB-A VH (4)	配列番号 19	RF.IS..N.KN.L.L.MG..R.A..T...	
hMAB-A VH (7B)	配列番号 21	RF.IS..N.KN.L.L.MG..R.A..T...	
hMAB-A VH (2C)	配列番号 22	RF.IS..N.KN.L.L.MG..R.A..T...	
hMAB-A VH (2D)	配列番号 23	RF.IS..N.KN.L.L.MG..R.A..T...	
hMAB-A VH (2E)	配列番号 28	RF.IS..N.KN.L.L.MG..R.A..T...	
CDR3	FR4		
マウス MAB-A VL	配列番号 7	WGCGTTLVSS	
hMAB-A VH (1)	配列番号 16	.....V.....	
hMAB-A VH (2)	配列番号 17	.....V.....	
hMAB-A VH (3)	配列番号 18	.....V.....	
hMAB-A VH (4)	配列番号 19	.....V.....	
hMAB-A VH (7B)	配列番号 21	.....V.....	
hMAB-A VH (2C)	配列番号 22	.....V.....	
hMAB-A VH (2D)	配列番号 23	.....V.....	
hMAB-A VH (2E)	配列番号 28	.....V.....	

【図 3 B】

		FR1	CDR1			
マウス MAB-A VL	配列番号 11	EVLTQSPASIAVLGRATIEC	KASQSVHYDSQSYNN			
hMAB-A VL (1)	配列番号 54	..K...D...E...E...S...S...				
hMAB-A VL (2)	配列番号 55	..K...D...E...E...S...S...				
hMAB-A VL (3)	配列番号 56	..K...D...E...E...S...S...				
hMAB-A VL (4)	配列番号 57	..K...D...E...E...S...S...				
		FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
マウス MAB-A VL	配列番号 11	QYQRIQSPFELDL	AASLGG	GIPTFFGSSGDTFLINHPVSEEDATYYC	QSSHPDPFT	FGGTRLEIN
hMAB-A VL (1)	配列番号 54	..K...D...E...E...S...S...		..T...S...L...P...F...F...F...		
hMAB-A VL (2)	配列番号 55	..K...D...E...E...S...S...		..T...S...L...P...F...F...F...		
hMAB-A VL (3)	配列番号 56	..K...D...E...E...S...S...		..T...S...L...P...F...F...F...		
hMAB-A VL (4)	配列番号 57	..K...D...E...E...S...S...		..T...S...L...P...F...F...F...	..P...S...E...	

10

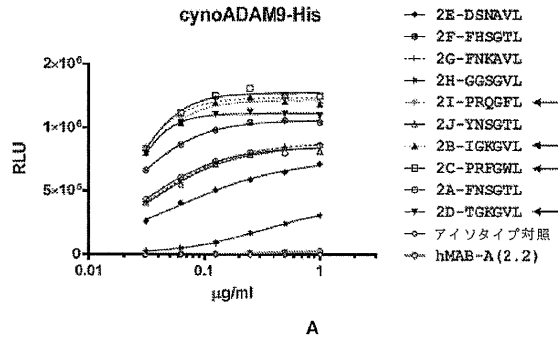
20

30

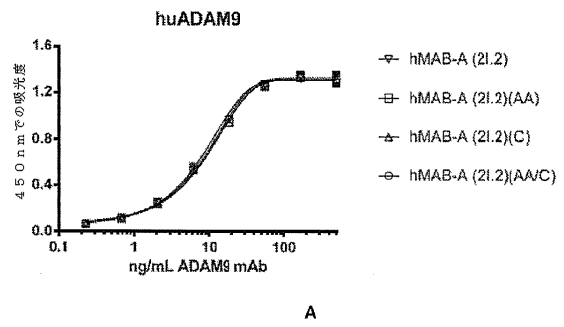
40

50

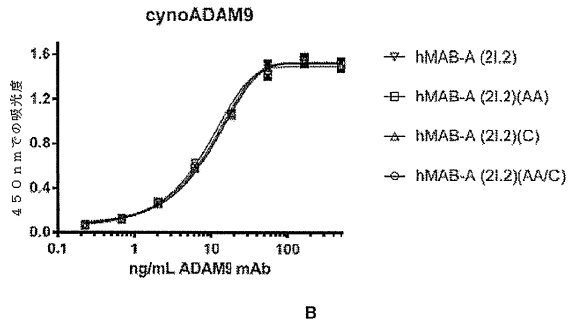
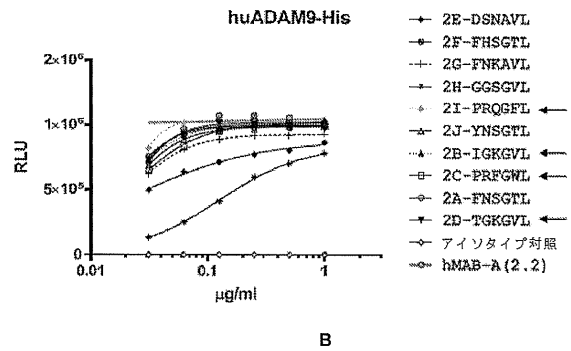
【図 4】



【図 5】

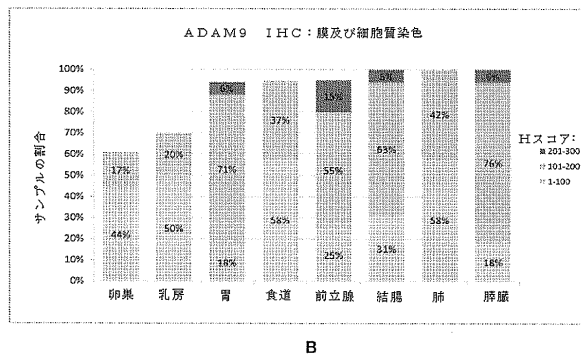
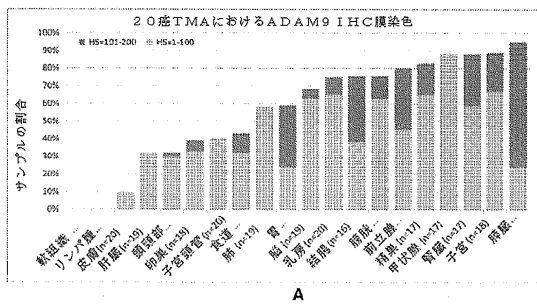


10

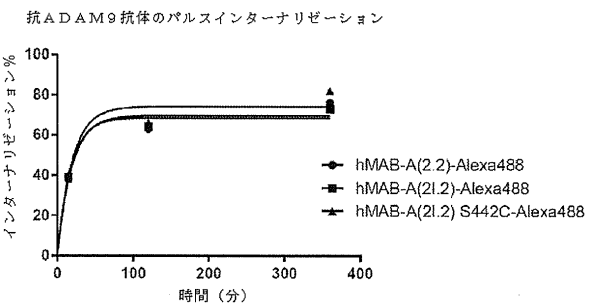


20

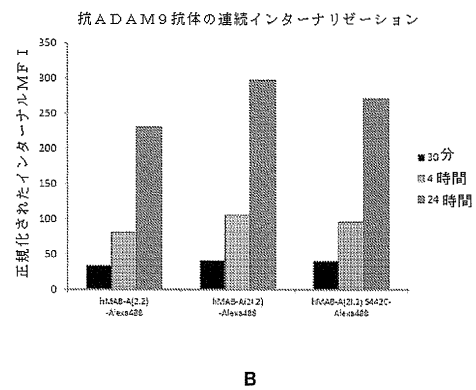
【図 6】



【図 7】



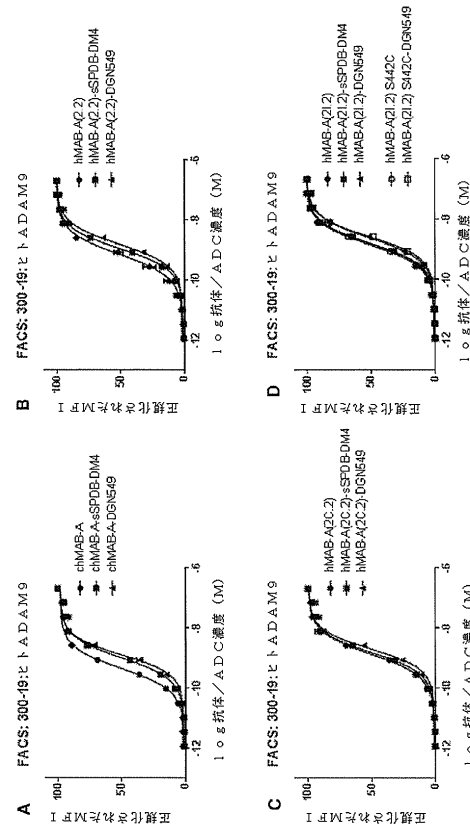
30



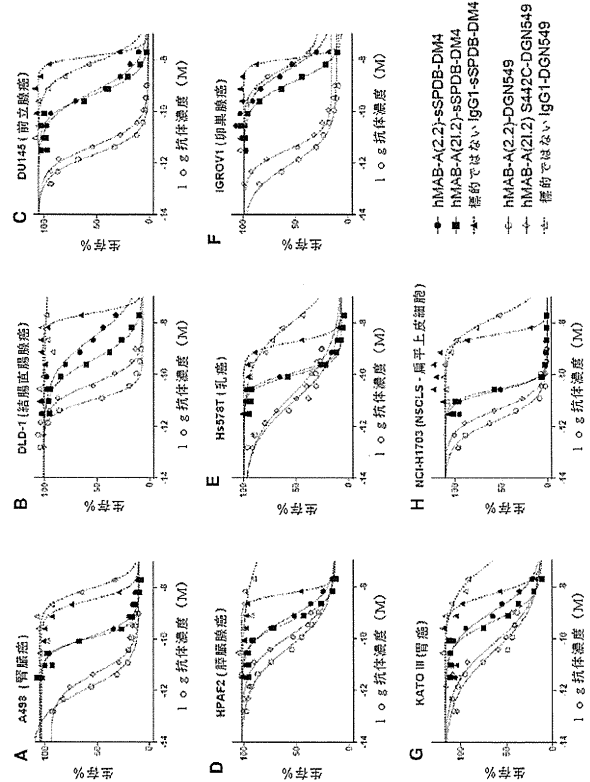
40

50

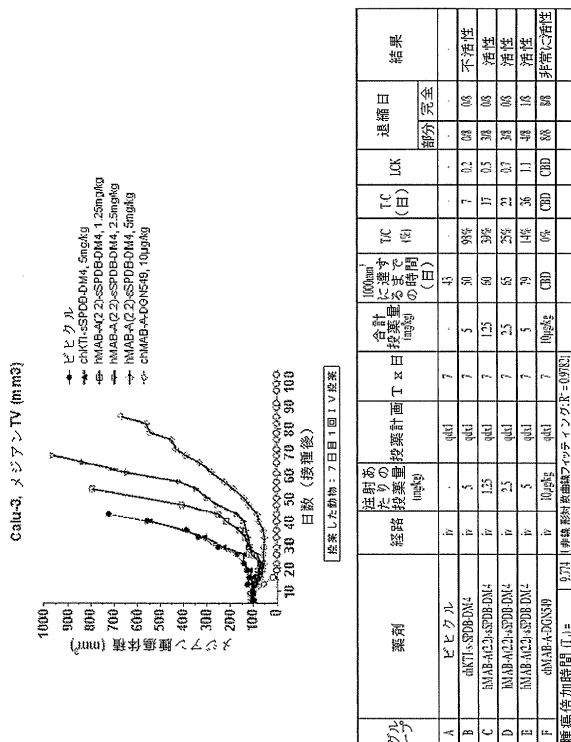
【図 8】



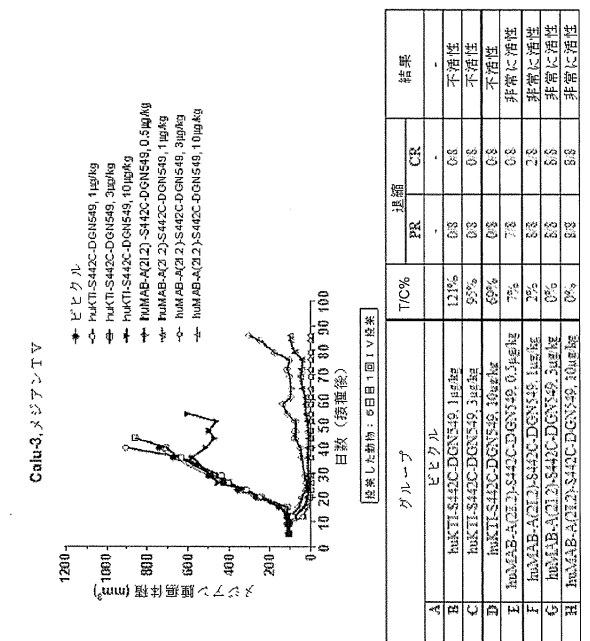
【図 9】



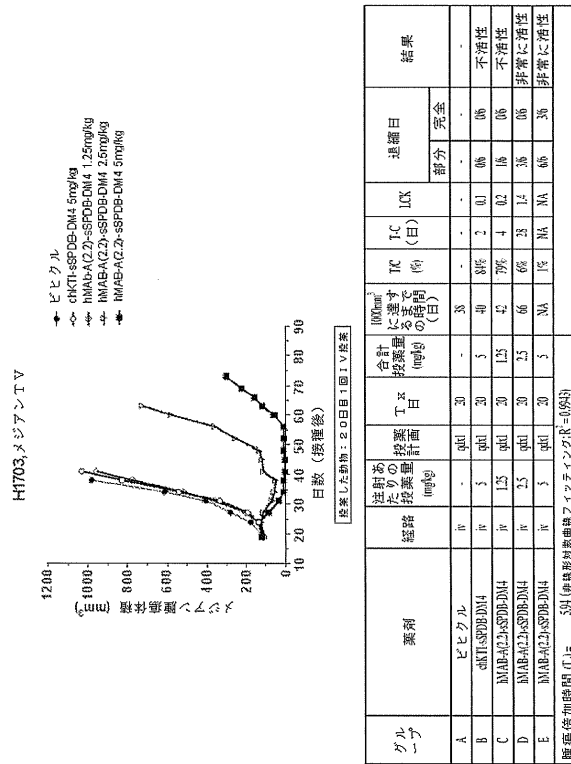
【図 10】



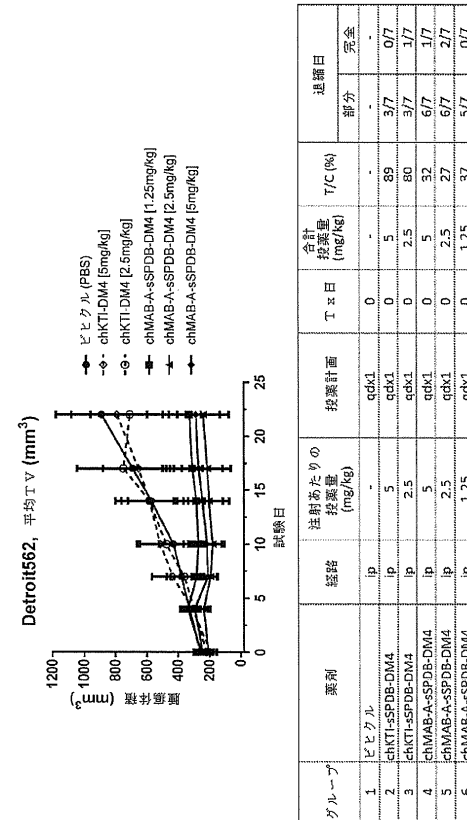
【図 11】



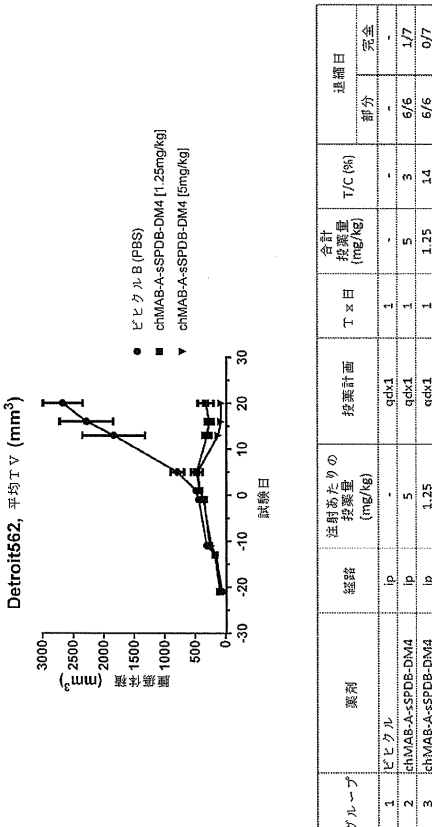
【図 1 2】



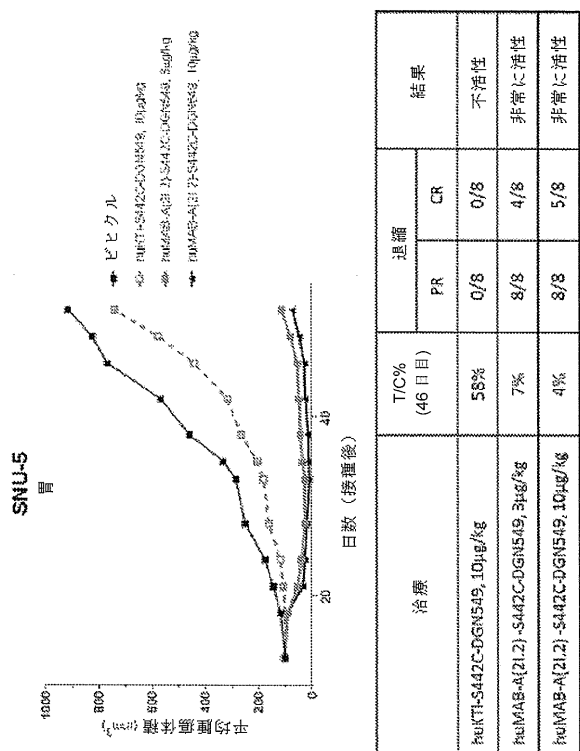
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



10

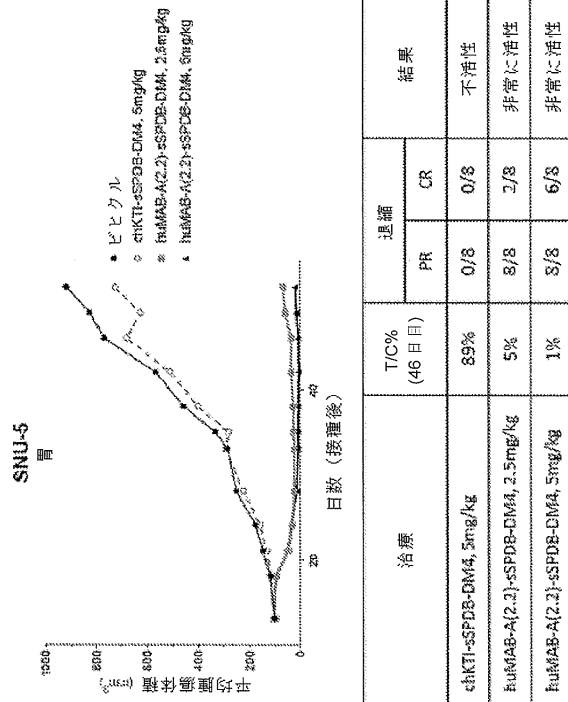
20

30

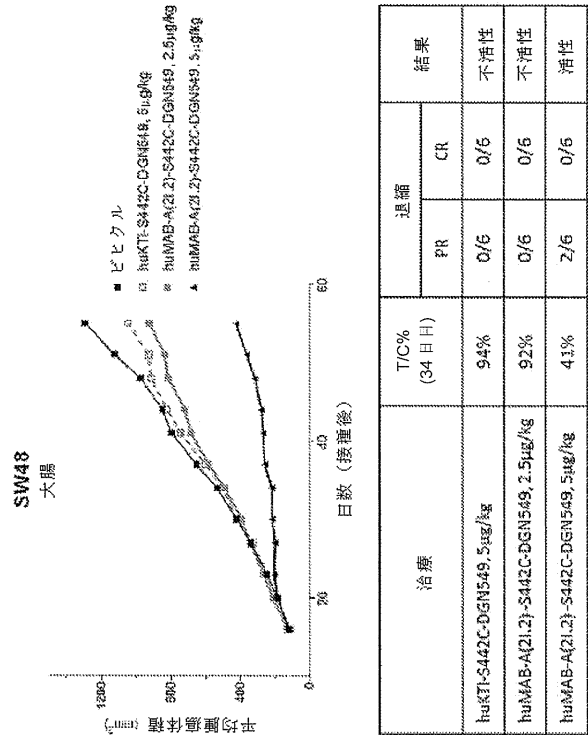
40

50

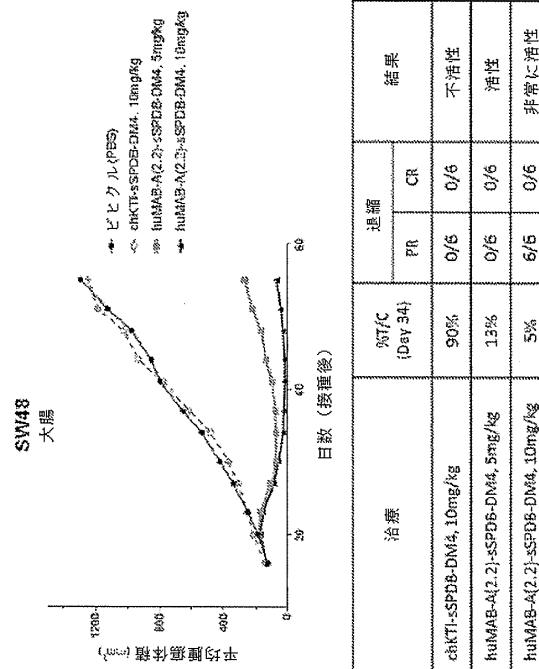
【図 16】



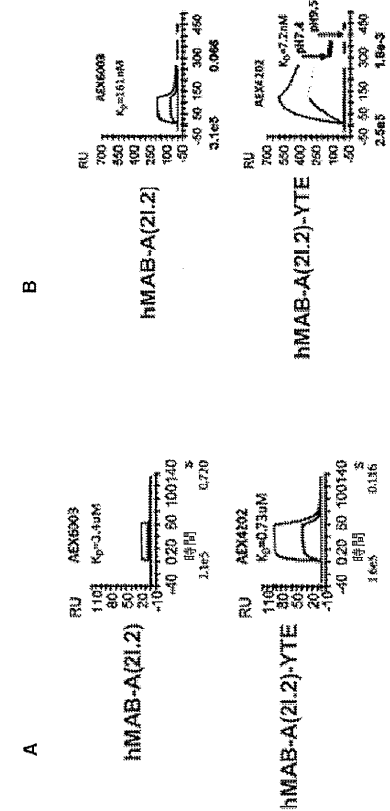
【図 17】



【図 18】



【図 19】



10

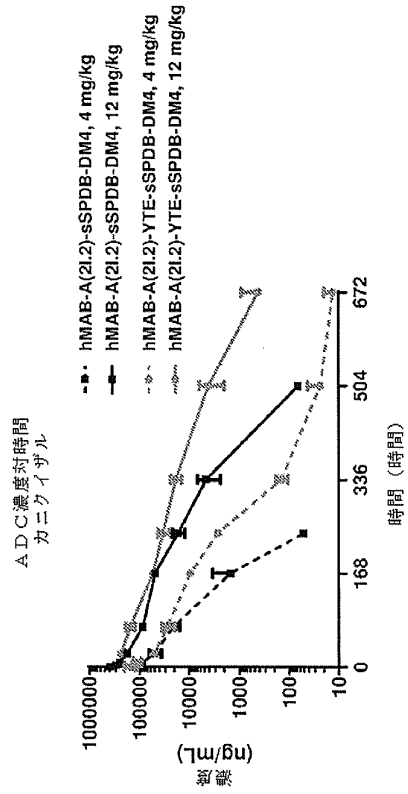
20

30

40

50

【図 20】



【配列表】

0007170642000001.app

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 P 35/00 (2006.01)  
C 1 2 N 15/13 (2006.01)

## F I

A 6 1 K 31/5383  
A 6 1 P 35/00  
C 1 2 N 15/13

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100120112

中西 基晴

(74)代理人 100128750

弁理士 廣瀬 しのぶ

(72)発明者 ヒックス, スチュアート・ウィリアム

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 8 4 5 , ノース・アンドーバー, マサチューセッツ・アベニュー 4 1 5

(72)発明者 ユッター, ニコラス・シー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 4 4 6 , ブルックライン, エグモント・ストリート 2 0 , ナンバー 6

(72)発明者 バラー, バスワティ

アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 5 5 , ダーウッド, ピリスカ・テラス 1 5 5 0 4

(72)発明者 ボンビニ, エツィオ

アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 5 4 , ポトマック, パウダー・ホーン・ドライブ 1 1 1 3 6

(72)発明者 ディードリッヒ, グンド

アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 7 8 , ノース・ポトマック, ボニー・デール・ドライブ 1 3 4 0 9

(72)発明者 ジョンソン, レスリー・エス

アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 7 4 , ダーンズタウン, ポプラー・ヒル・ロード 1 4 4 1 1

(72)発明者 ルー, デリキ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 0 2 , ベルモント, パイン・ノール・ドライブ 1 5 0 9

(72)発明者 スクリブナー, ジュニパー・エイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 1 0 , バーリンゲーム, オーク・グローブ・アベニュー 1 2 1 7 , アpartment ナンバー 4

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 独国特許出願公開第 1 0 3 3 7 3 6 8 ( D E , A 1 )

米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 2 8 5 8 4 0 ( U S , A 1 )

Bioconjugate Chem. , 2010年, Vol. 21 , p. 84-92

Blood , 2016年12月02日, Volume 128, Issue 22: 2832

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

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 )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )