

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-505371
(P2011-505371A)

(43) 公表日 平成23年2月24日(2011.2.24)

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/4045 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
C07D 209/58 (2006.01)

F 1

A 61 K 39/395
A 61 P 35/00
A 61 K 39/395
A 61 K 31/4045
A 61 K 31/496

T

テーマコード(参考)

4 C 0 6 3
4 C 0 8 5
4 C 0 8 6
4 C 2 0 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-536173 (P2010-536173)
(86) (22) 出願日 平成20年11月26日 (2008.11.26)
(85) 翻訳文提出日 平成22年7月16日 (2010.7.16)
(86) 國際出願番号 PCT/US2008/084899
(87) 國際公開番号 WO2009/073524
(87) 國際公開日 平成21年6月11日 (2009.6.11)
(31) 優先権主張番号 60/991,690
(32) 優先日 平成19年11月30日 (2007.11.30)
(33) 優先権主張国 米国(US)

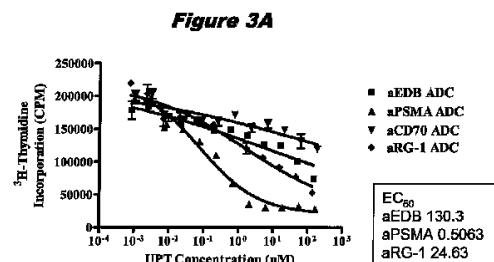
(71) 出願人 391015708
ブリストルマイヤーズ スクイブ カン
パニー
B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B
B C O M P A N Y
アメリカ合衆国ニューヨーク州 1015
4 ニューヨーク パーク アベニュー
345
(74) 代理人 100068526
弁理士 田村 恒生
(74) 代理人 100100158
弁理士 鮫島 瞳
(74) 代理人 100126778
弁理士 品川 永敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗-RG-1抗体の複合体

(57) 【要約】

RG-1結合複合体が標的細胞内に内在化されるかどうかにかかわらずパートナー分子がその効果を発揮する、該パートナー分子、例えば薬物、放射性同位元素、および細胞毒素に結合した抗-RG-1抗体、抗体フラグメントもしくは抗体模倣体は、癌の治療に有用である。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒトモノクローナル抗体もしくはパートナー分子に結合したその抗原結合部分を含有する抗体-パートナー分子複合体であって、抗体もしくはその抗原結合部分はヒトRG-1を結合し、該複合体は以下の特性：

- (a) 1×10^{-8} M以下の K_D でヒトRG-1に結合するか；または、
- (b) *in vivo*においてRG-1-発現細胞の増殖を阻害する
のうち少なくとも1つを示す、複合体。

【請求項 2】

抗体もしくはその抗原結合部分が：

- (a) 配列番号：1を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b) 配列番号：3を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c) 配列番号：5を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d) 配列番号：7を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e) 配列番号：9を含む軽鎖可変領域CDR2；および、
- (f) 配列番号：11を含む軽鎖可変領域CDR3

を含有する、請求項1に記載の複合体。

10

【請求項 3】

該抗体もしくはその抗原結合部分が：

- (a) 配列番号：2を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b) 配列番号：4を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c) 配列番号：6を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d) 配列番号：8を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e) 配列番号：10を含む軽鎖可変領域CDR2；および、
- (f) 配列番号：12を含む軽鎖可変領域CDR3

20

を含有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項 4】

該抗体もしくはその抗原結合部分が：

- (a) 配列番号：13～14およびいずれかの保存的修飾からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；ならびに、
- (b) 配列番号：15～16およびいずれかの保存的修飾からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

30

を含有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項 5】

該抗体もしくはその抗原結合部分が：

- (a) 配列番号：1、配列番号：2、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域 CDR1；
- (b) 配列番号：3、配列番号：4、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域 CDR2；
- (c) 配列番号：5、配列番号：6、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域 CDR3；
- (d) 配列番号：7、配列番号：8、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域 CDR1；
- (e) 配列番号：9、配列番号：10、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域 CDR2；お
よび、
- (f) 配列番号：11、配列番号：12、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域 CDR3

40

を含有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項 6】

請求項1に記載の複合体であって、該抗体もしくはその抗原結合部分が：

- (a) 配列番号：13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域か；または、
- (b) 配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

50

を含有する基準抗体により認識されるヒトRG-1上のエピトープに結合する、該複合体。

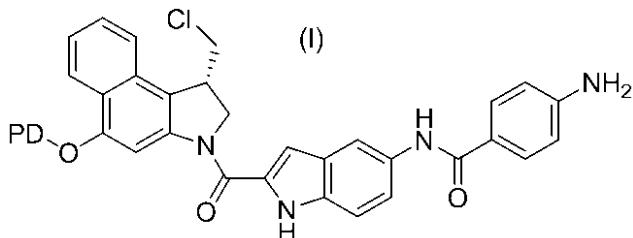
【請求項 7】

該パートナー分子が細胞毒素である、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 8】

該パートナー分子が、式(I):

【化 1】



10

(式中、PDは、プロドラッグ化基を示す)

により表される構造を有する、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 9】

該プロドラッグ化基PDがカルバメート、ホスフェート、または -グルクロン酸である、請求項 8 に記載の複合体。

【請求項 10】

該抗体もしくはその抗原結合部分が:

20

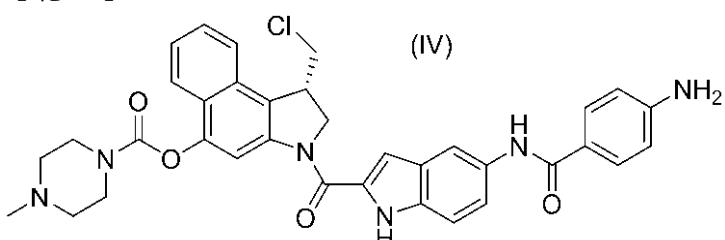
- (a)配列番号:1、配列番号:2、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR1;
- (b)配列番号:3、配列番号:4、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR2;
- (c)配列番号:5、配列番号:6、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR3;
- (d)配列番号:7、配列番号:8、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR1;
- (e)配列番号:9、配列番号:10、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR2; および、
- (f)配列番号:11、配列番号:12、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR3を含有する、請求項 8 に記載の複合体。

【請求項 11】

該パートナー分子が式(IV):

【化 2】

30



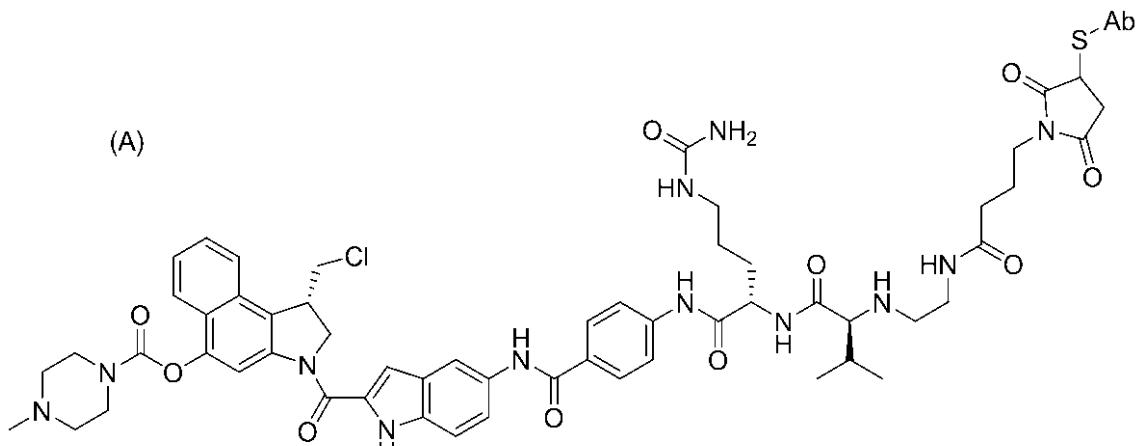
により表される構造を有する、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 12】

式(A):

40

【化3】



10

(式中、Abは抗体もしくはその抗原結合部分を示す)

により表される構造を有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項13】

請求項1に記載の複合体および医薬的に許容される担体を含有する組成物。

【請求項14】

RG-1-発現腫瘍細胞と請求項1に記載の複合体を接触させることによりRG-1-発現腫瘍細胞の増殖を阻害することを含む、RG-1-発現腫瘍細胞の増殖を阻害する方法。

20

【請求項15】

該抗体もしくはその抗原結合部分が:

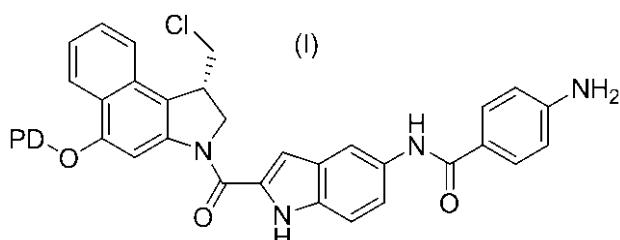
- (a)配列番号:1、配列番号:2、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR1;
- (b)配列番号:3、配列番号:4、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR2;
- (c)配列番号:5、配列番号:6、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR3;
- (d)配列番号:7、配列番号:8、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR1;
- (e)配列番号:9、配列番号:10、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR2; および、
- (f)配列番号:11、配列番号:12、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR3を含有する、請求項14に記載の方法。

30

【請求項16】

該パートナー分子が、式(I):

【化4】



40

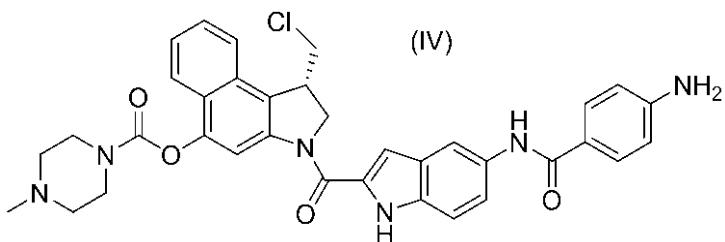
(式中、PDはプロドラッグ化基を示す)

により表される構造を有する、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

該パートナー分子が、式(IV):

【化5】

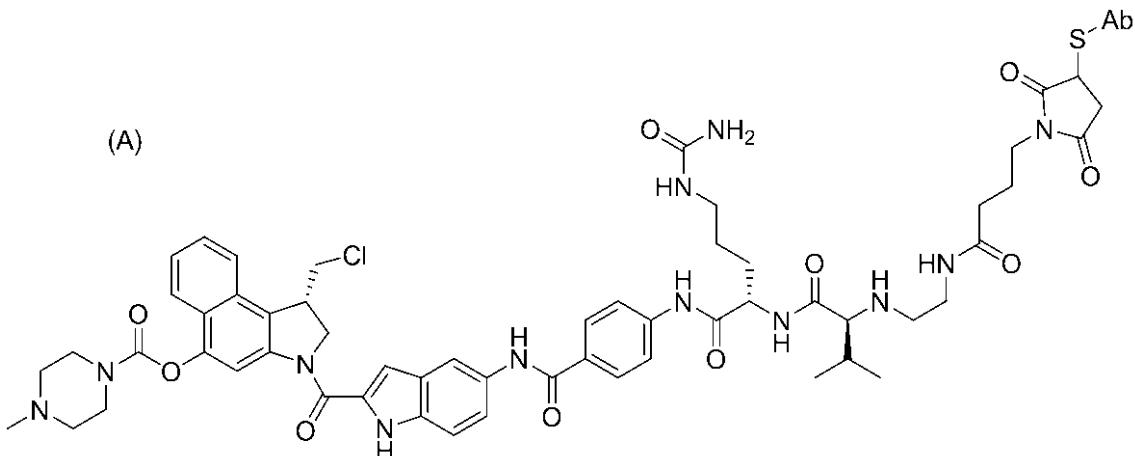


により表される構造を有する、請求項1~4に記載の方法。

【請求項18】

該複合体が、式(A):

【化6】



(式中、Abは抗体もしくはその抗原結合部分を示す)

により表される構造を有する、請求項1~4に記載の方法。

【請求項19】

該RG-1-発現腫瘍細胞が前立腺癌細胞または膀胱癌細胞である、請求項1~4に記載の方法。

【請求項20】

治療を必要としている患者に有効な量の請求項1に記載の複合体を投与することによって該患者の癌を治療することを含む、患者における癌の治療方法。

【請求項21】

該癌が前立腺癌または膀胱癌である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

該癌が、肺癌、胃癌、乳癌、腎癌、膵癌、大腸癌、メラノーマ、または膵島細胞腺腫である、請求項20に記載の方法。

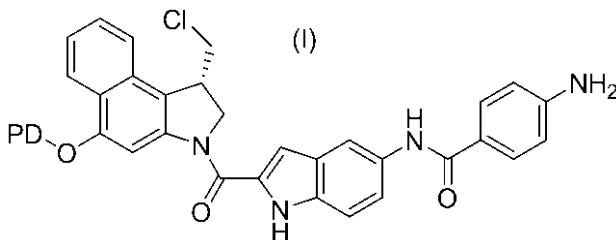
【請求項23】

該パートナー分子が細胞毒素である、請求項21に記載の方法。

【請求項24】

該パートナー分子が、式(I):

【化7】



(式中、PDはプロドラッグ化基を示す)

10

20

30

40

50

により表される構造を有する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

該抗体もしくはその抗原結合部分が：

- (a) 配列番号:1、配列番号:2、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b) 配列番号:3、配列番号:4、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c) 配列番号:5、配列番号:6、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d) 配列番号:7、配列番号:8、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e) 配列番号:9、配列番号:10、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR2；および、
- (f) 配列番号:11、配列番号:12、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR3

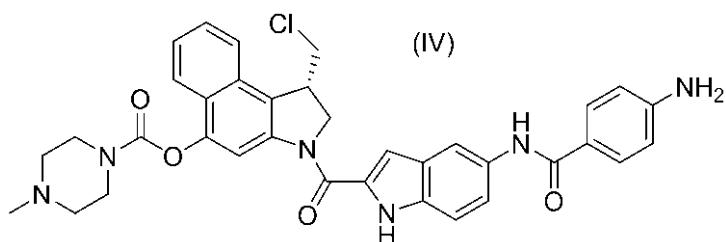
10

を含有する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

該パートナー分子が、式(IV)：

【化 8】



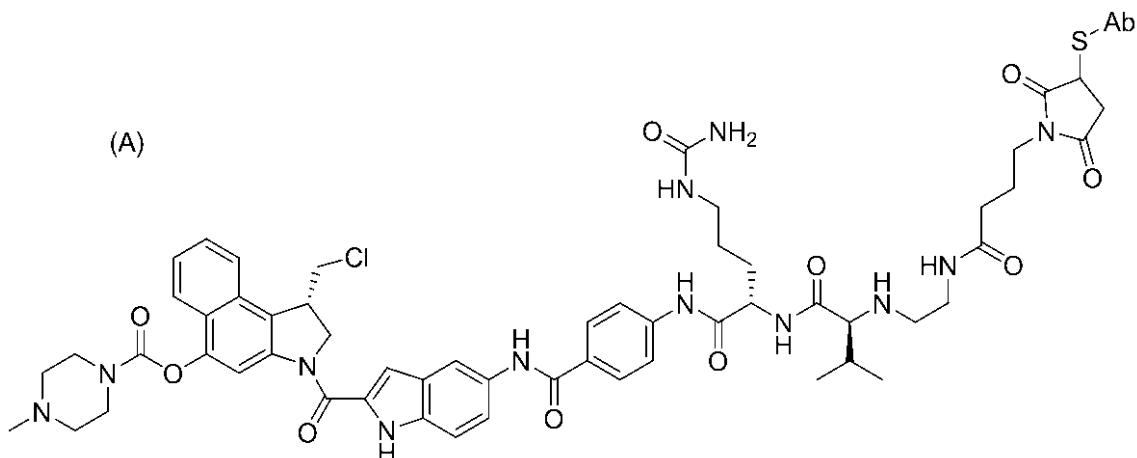
20

により表される構造を有する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

該複合体が、式(A)：

【化 9】



30

(式中、Abは抗体もしくはその抗原結合部分を示す)

により表される構造を有する、請求項 2 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、癌などの疾患の治療において、結合RG-1が標的細胞内で内在化されるかどうかにかかわらずパートナー分子がその効果を発揮する、該パートナー分子に結合した抗-RG-1抗体を提供する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

細胞傷害性化合物に結合した抗体-パートナー分子が、癌を含めた疾患の治療のために開発されている。通常、この技術は、抗体/抗原複合体が標的細胞に内在化され、次いでパートナー分子が放出および/または細胞内で活性化される、抗原標的に限定されている

40

50

。そのような複合体はまた、一般的に、抗体-薬物複合体もしくはADCとして知られている。

【0003】

そのような「内在化-ベース」システムを用いて治療され得る疾患の例は、前立腺癌である。前立腺癌は男性においてよく見られる疾患であり、45歳以上の男性の約3分の1が発症している。遺伝的要因および環境的要因の両方に関する証拠があり、症例の大部分はおそらく両方の因子の組み合わせによりもたらされる。

【0004】

前立腺癌は通常、理学的検査および前立腺特異抗原(PSA)の血清濃度によって診断される。根治的な前立腺切除が、限局性疾患に対して選択される治療である。進行した転移性疾患は、現在、アンドロゲン除去療法もしくはGnRH(ゴナドトロピン放出ホルモン)による治療によって、および抗アンドロゲン療法によって治療される。しかしながら、進行した疾患は、ほぼ常にホルモン耐性となり、進行性疾患に対する治療法はない。その上、根治的な前立腺切除およびアンドロゲン除去療法の両方に関連した重篤な副作用がある。内在化-ベースシステムはそのような治療的アプローチに代わるものとして期待されうる一方、初期および後期前立腺癌の両方に対する新しい治療的アプローチが依然として強く必要とされている。

10

【0005】

ポリペプチドRG-1は、細胞外マトリクスタンパク質のミンディン/F-スponдин(Mindin/F-spondin)ファミリーのホモログである(特許文献1)。それは前立腺組織において高く発現しており(特許文献2)、従って、前立腺癌およびそれが発現される他の癌(例えば膀胱癌)の診断および療法に対して有用な標的となりうる。Harkinsらの特許文献3は、ヒト抗-RG-1抗体、ならびに癌の検出および治療におけるその使用について開示している。本発明者らは、予期せぬことに、RG-1は抗体の結合後に内在化されないという事実にもかかわらず、RG-1抗体とパートナー分子の複合体が異常なRG-1発現に関連した障害の治療に有効であることを発見した。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第5,871,969号

30

【特許文献2】国際公開第98/45442号

【特許文献3】米国特許第7,335,748号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

(発明の開示)

本発明は、RG-1に高親和性で特異的に結合する、単離された抗-RG-1抗体-パートナー分子複合体を提供する。本発明はまた、そのような複合体を用いて癌(例えば前立腺癌および膀胱癌)を治療する方法も提供する。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

一実施態様において、抗体-パートナー分子複合体は抗体もしくはパートナー分子に結合したその抗原結合部分を含有し、ここで、該抗体もしくはその抗原結合部分はヒトRG-1を結合し、該複合体は、以下の特性:

(a) 1×10^{-8} M以下の K_D でヒトRG-1に結合するか;または、

(b) *in vivo*においてRG-1-発現細胞の増殖を阻害する、

のうち少なくとも1つ(および好ましくは両方)を示す。

【0009】

好ましくは、該複合体の抗体部分はヒト抗体であり、より好ましくはヒトモノクローナル抗体である。また好ましくは、該抗体もしくはその抗原結合部分は:

50

(a)配列番号:13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H)および配列番号:15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L)か;または、

(b)配列番号:14のアミノ酸配列を含む V_H および配列番号:16のアミノ酸配列を含む V_L を含有する基準(reference)抗体によって認識されるヒトRG-1上のエピトープへの結合に対して交差競合する。

【0010】

好みの実施態様において、該基準抗体は、配列番号:13のアミノ酸配列を含む V_H および配列番号:15のアミノ酸配列を含む V_L を含有する。別の好みの実施態様において、該基準抗体は、配列番号:14のアミノ酸配列を含む V_H および配列番号:16のアミノ酸配列を含む V_L を含有する。

10

【0011】

本発明の複合体の、特に好みの抗体またはその抗原結合部分は:

- (a)配列番号:1を含む V_H CDR1;
- (b)配列番号:3を含む V_H CDR2;
- (c)配列番号:5を含む V_H CDR3;
- (d)配列番号:7を含む V_L CDR1;
- (e)配列番号:9を含む V_L CDR2; および、
- (f)配列番号:11を含む V_L CDR3

を含有する。

【0012】

本発明の複合体の、別の特に好みの抗体またはその抗原結合部分は:

- (a)配列番号:2を含む V_H CDR1;
- (b)配列番号:4を含む V_H CDR2;
- (c)配列番号:6を含む V_H CDR3;
- (d)配列番号:8を含む V_L CDR1;
- (e)配列番号:10を含む V_L CDR2; および、
- (f)配列番号:12を含む V_L CDR3

を含有する。

【0013】

別の態様において、本発明の複合体の、モノクローナル抗体またはその抗原結合部分は 30

- : (a)配列番号:13および14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V_H ; ならびに、
- (b)配列番号:15および16からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V_L ;
- (ここで、該抗体はヒトRG-1を特異的に結合する)を含有する。

【0014】

好みの前述の組み合わせは:

- (a)配列番号:13のアミノ酸配列を含む V_H ; および、
- (b)配列番号:15のアミノ酸配列を含む V_L

を含有する。

【0015】

別の好みの前述の組み合わせは:

- (a)配列番号:14のアミノ酸配列を含む V_H ; および、
- (b)配列番号:16のアミノ酸配列を含む V_L

を含有する。

【0016】

該抗体は、IgG1もしくはIgG4アイソタイプ、または抗体フラグメント(例えばFab、Fab'もしくはFab'2フラグメント)、あるいは単鎖抗体といった全長抗体であり得る。

【0017】

別の態様において、本発明は、細胞を本発明の抗体-パートナー分子複合体と接触させることによりRG-1-腫瘍細胞の増殖を阻害することを含む、RG-1-発現腫瘍細胞の増殖を阻

40

50

害する方法に関連する。

【0018】

別の態様において、本発明は、有効な量の本発明の抗体-パートナー分子複合体を患者に投与することにより患者の癌を治療することを含む、治療を必要としている患者において癌を治療する方法に関連する。好ましくは、該癌はRG-1発現細胞により特徴づけられるものである。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1Aは、19G9ヒトモノクローナル抗体のV_Hのヌクレオチド配列(配列番号:17)およびアミノ酸配列(配列番号:13)を示す。CDR1(配列番号:1)、CDR2(配列番号:3)およびCDR3(配列番号:5)領域に線を引いてある。図1Bは、19G9ヒトモノクローナル抗体のV_Lのヌクレオチド配列(配列番号:19)およびアミノ酸配列(配列番号:15)を示す。CDR1(配列番号:7)、CDR2(配列番号:9)およびCDR3(配列番号:11)領域に線を引いてある。
10

【図2】図2Aは、34E1ヒトモノクローナル抗体のV_Hのヌクレオチド配列(配列番号:18)およびアミノ酸配列(配列番号:14)を示す。CDR1(配列番号:2)、CDR2(配列番号:4)およびCDR3(配列番号:6)領域に線を引いてある。図2Bは、34E1ヒトモノクローナル抗体のV_Lのヌクレオチド配列(配列番号:20)およびアミノ酸配列(配列番号:16)を示す。CDR1(配列番号:8)、CDR2(配列番号:10)およびCDR3(配列番号:12)領域に線を引いてある。

【図3】図3Aおよび3Bは、各々、LNCaPおよび786-0細胞における特定の抗体-パートナー分子複合体のin vitroでの腫瘍-活性化活性のEC₅₀値を示す。
20

【図4】図4A-4Dは、in vivoでのLNCaP/前立腺ストローマ細胞異種移植マウスモデルの結果を示しており、平均腫瘍容積の変化データを提示している。

【図5】図5A-5Dは、in vivoでのLNCaP/前立腺ストローマ細胞異種移植マウスモデルの結果を示しており、平均体重の変化データを提示している。

【図6】図6A-6Dは、in vivoでのLNCaP異種移植マウスモデルの結果を示しており、平均腫瘍容積の変化データを提示している。

【図7】図7A-7Dは、in vivoでのLNCaP異種移植マウスモデルの結果を示しており、平均体重の変化データを提示している。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明は、RG-1に対して特異的にかつ高親和性で結合し、有効性を発揮するのに複合体(conjugate)の内在化を必要としないパートナー分子に結合している抗体、抗体フラグメント、および抗体模倣体に関する。
30

【0021】

非内在化(non-internalized)抗原(例えばRG-1)は腫瘍部位で保持されており、抗体の結合後早急に内在化されない。結合効率は、内在化の誘発、輸送に続いて活性な細胞毒素性ペイロードを放出する、細胞表面の抗体-抗原相互作用に依存することが報告されている(Sutherland et al., J. Biol. Chem. 281, 10540-10547 (2006))。しかしながら、本発明において出願人らは、たとえ標的とされる抗原が内在化されていなかったり、または腫瘍細胞それ自体の上には存在し得ないが、その代わりに周囲の細胞外マトリクス、ストローマ細胞、腫瘍血管細胞、もしくは侵入炎症細胞(例えば、腫瘍関連マクロファージ)上には存在し得ても、腫瘍部位での抗体薬物複合体の保持が腫瘍に対する細胞毒素性効果をもたらすのに十分であることを証明する。あるいは、抗原が、腫瘍細胞から脱落しているが、腫瘍細胞、細胞外マトリクス、ストローマ細胞、侵入炎症細胞または腫瘍血管細胞とのその結合により腫瘍部位に保有されている場合、保持が起こり得る。
40

【0022】

非内在化抗原(例えばRG-1)は腫瘍部位に保持され、抗体の結合後に内在化されない。腫瘍部位でのかかる抗原の保持は、腫瘍細胞、周囲のストローマ細胞、または腫瘍血管細胞の外部原形質膜への標的抗原の結合により媒介され得る。あるいは、該抗原が、腫瘍細胞から脱落しているが、細胞外マトリクスまたは腫瘍細胞、ストローマ細胞もしくは腫瘍
50

血管細胞との結合により腫瘍部位では保持されている場合、保持が生じ得る。

【0023】

抗体-パートナー分子複合体の場合、それは抗原結合により疾患部位で保持され、パートナー分子の腫瘍バイアス放出を可能にする。パートナー分子の放出後（例えば、後述の通りのリンカー基の切断により）、それは、隣接細胞の中へ自由に通過し、活性化し、その効果を発揮することができる。pH感受性リンカー（例えばヒドラゾン）の場合、リンカー基の切断は、腫瘍の低い細胞外pH(pHe)（一般に6.8付近であるか、または正常の組織よりも約0.5単位低い）を利用することができる。あるいは、該リンカーは、腫瘍の細胞外マトリクス中または腫瘍中の細胞の表面上のプロテアーゼ、例えばCD10、カテーテン、マトリックスマタロプロテアーゼ、およびセリンプロテアーゼにより切断され得る。

10

【0024】

本発明がより容易に理解され得るように、いくつかの用語をまず定義する。さらなる定義は詳細な説明を通して記載する。

【0025】

用語「RG-1」には、ヒトRG-1の変異体、アイソフォーム、および相同種 (species homolog) が含まれる。従って、ある特定の場合、本発明のヒト抗体はヒト以外の種からのRG-1と交差反応し得る。ある特定の実施態様において、該抗体、抗体フラグメント、または抗体模倣体は、1つ以上のヒトRG-1に対して完全に特異的であり得て、非ヒト交差反応性の種または他のタイプを示し得ない。

20

【0026】

用語「免疫応答」とは、侵入病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、癌細胞、または、自己免疫もしくは病的炎症の場合における正常なヒト細胞もしくは組織に対する選択的損傷、それらの破壊、またはそれらの人体からの排除をもたらす、例えば、上記の細胞または肝臓により産生されるリンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球、および可溶性高分子(抗体、サイトカイン、および補体が含まれる)の作用を言う。

【0027】

「シグナル伝達経路」とは、細胞のある部分から細胞の別の部分へのシグナルの伝達を担う、様々なシグナル伝達分子間の生化学的関係を言う。該語句「細胞表面受容体」には、シグナルの受け取りおよび細胞の原形質膜を通過するようなシグナルの伝達が可能な分子および分子の複合体が含まれ、RG-1受容体が1つの例である。

30

【0028】

用語「抗体」とは、全抗体およびいずれの抗原結合フラグメント（「抗原結合部分」）またはその単鎖を言う。「全長抗体」とは、ジスルフィド結合により相互に結合した少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含有するタンパク質を言う。各重鎖は、重鎖可変領域(V_H と略記)および重鎖定常領域を含有する。該重鎖定常領域は、3つのドメイン、 C_{H1} 、 C_{H2} および C_{H3} を含有する。各軽鎖は、軽鎖可変領域(V_L と略記)および軽鎖定常領域を含有する。該軽鎖定常領域は、1つのドメイン、 C_L を含有する。該 V_H および V_L 領域は、超可変領域（相補性決定領域(CDR)と称される）にさらに細分され、より高度に保存される領域（フレームワーク領域(FR)と称される）が組み入れられ得る。各 V_H および V_L は3つのCDRおよび4つのFRから成り、アミノ末端からカルボキシ末端へ以下の順序で配列されている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、宿主組織または因子（免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第一成分(C1q)が含まれる）への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

40

【0029】

「抗体フラグメント」および抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」）という用語は、抗原（例えばRG-1）に特異的に結合する能力を保持している抗体の1つ以上のフラグメントを言い、全長抗体のフラグメントによって抗原結合機能が果たされ得ることが示されている。そのような結合フラグメントの例としては、(i) V_L 、 V_H 、 C_L および C_{H1} ドメインからなる1価のフラグメントであるFabフラグメント；(ii) ヒンジ領域でジスルフィ

50

ド架橋により連結した 2 つの Fab フラグメントを含有する 2 値のフラグメントである F(ab')₂ フラグメント; (iii) 本質的にヒンジ領域を有する Fab である Fab' フラグメント (FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3rd ed. 1993) を参照); (iv) V_H および C_H1 ドメインからなる Fd フラグメント; (v) 抗体の単一の腕の V_L および V_H ドメインからなる Fv フラグメント; (vi) V_H ドメインからなる dAb フラグメント (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546); (vii) 単離された相補性決定領域 (CDR); および (viii) 1 つの可変ドメインと 2 つの定常ドメインを含む V_H であるナノボディ (nanobody) が挙げられる。Fv フラグメントの 2 つのドメイン、V_L および V_H、は別個の遺伝子によりコードされるけれども、組換え方法を用いて、合成リinker によりそれらを結合して単一のタンパク質鎖とすることができます、その中で V_L および V_H 領域は対をなして 1 値の分子を形成する (単鎖 Fv (scFv)) として知られる; 例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; および、Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 を参照)。そのような単鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲内に包含されると意図される。

10

【0030】

「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を言う(例えば、特異的に RG-1 を結合する単離された抗体は、RG-1 以外の抗原を特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかしながら、RG-1 を特異的に結合する単離された抗体は、他の抗原(例えば他の種由来の RG-1 分子)に対する交差反応性を有し得る。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質および/または化学物質を実質的に含まなくてもよい。

20

【0031】

用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」とは、単一の分子組成の抗体分子の調製物 (preparation) を言う。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。

【0032】

用語「ヒト抗体」には、フレームワークおよび CDR 領域の両方ともがヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来である可変領域を有する抗体が含まれる。さらに、該抗体が定常領域を含む場合、該定常領域もまたヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来である。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基(例えば、in vitro でのランダムもしくは部位特異的変異誘発によってか、または in vivo での細胞変異によって導入された変異)を含み得る。しかしながら、本明細書で用いられる該用語「ヒト抗体」は、別の哺乳動物種(例えばマウス)の生殖系列由来の CDR 配列がヒトフレームワーク配列上に移植 (graft) されている抗体を意図しない。

30

【0033】

用語「ヒトモノクローナル抗体」とは、フレームワークおよび CDR 領域の両方ともがヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来である可変領域を有する、単一の結合特異性を提示する抗体を言う。一実施態様において、該ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含有するゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物(例えば、トランスジェニックマウス)から得た B 細胞を含む、ハイブリドーマにより產生される。

40

【0034】

用語「組換えヒト抗体」には、組換え手法により作製、発現、創出もしくは単離された全てのヒト抗体、例えば(a) ヒト免疫グロブリン遺伝子のトランスジェニックもしくは導入染色体 (transchromosomal) である動物(例えばマウス)、またはそれから作製されたハイブリドーマから単離された抗体(以下にさらに記載)、(b) ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞(例えばトランスフェクトーマ(transfectoma))から単離された抗体、(c) 組換え、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体、および(d) いずれか他の手法(他のDNA配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む)により作製、発現、創出もしくは単離された抗体が含まれる。そのような組換えヒト抗体は、フレームワークおよび CDR 領域がヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来で

50

ある可変領域を有する。しかしながら、ある特定の実施態様において、そのような組換えヒト抗体は、*in vitro*変異誘発(または、ヒトIg配列のトランスジェニック動物が用いられる場合、*in vivo*体細胞変異誘発)処理することができ、それ故、組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_HおよびV_L配列由来であってそれに関連する一方、*in vivo*においてヒト抗体の生殖系列レパートリー内に天然に存在していなくてもよい配列である。

【0035】

本明細書で用いる「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる抗体クラス(例えば、IgMまたはIgG1)を言う。

【0036】

「抗原を認識する抗体」および「抗原に対して特異的な抗体」という語句は、本明細書において「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と同義的に用いられる。

【0037】

用語「ヒト化抗体」とは、別の哺乳動物種(例えばマウス)の生殖系列由來のCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を言う。さらなるフレームワーク領域修飾がヒトフレームワーク配列内でなされ得る。

【0038】

用語「キメラ抗体」とは、可変領域配列はある1種に由來し、定常領域配列は別の種に由來している抗体(例えば、可変領域配列はマウス抗体に由來し、定常領域配列はヒト抗体に由來している抗体)を言う。

【0039】

用語「抗体模倣体」とは、抗体(しかし天然の抗体構造に限定されない)の持つ抗原を結合する能力を模倣することが可能な分子を言う。そのような抗体模倣体の例としては、限定はされないが、アフィボディ(Affibody)、DARPin、アンチカリン(Anticalin)、アビマー(Avimer)、およびベルサボディ(Versabody)が挙げられる。

【0040】

用語「パートナー分子」とは、抗体-パートナー分子複合体中の抗体に結合しているものを言う。パートナー分子の例としては、薬物、細胞毒素、マーカー分子(限定はされないが、ペプチドおよび小分子マーカー(例えば蛍光色素マーカー)、ならびに単一原子マーカー(例えば放射性同位元素)が含まれる)、タンパク質および治療薬が挙げられる。

【0041】

本明細書で用いる、「ヒトRG-1に特異的に結合する」抗体とは、 1×10^{-7} M以下、より好ましくは 5×10^{-8} M以下、より好ましくは 3×10^{-8} M以下、より好ましくは 1×10^{-8} M以下、さらにより好ましくは 5×10^{-9} M以下のK_DでヒトRG-1に結合する抗体を言う。

【0042】

タンパク質または細胞に「実質的に結合しない」という用語は、抗体が、高親和性でタンパク質または細胞に結合しない、すなわち、 1×10^{-6} M以上、より好ましくは 1×10^{-5} M以上、より好ましくは 1×10^{-4} M以上、より好ましくは 1×10^{-3} M以上、さらにより好ましくは 1×10^{-2} M以上のK_Dでタンパク質または細胞に結合しないことを意味する。

【0043】

本明細書で用いる用語「K_{assoc}」または「K_a」は、特定の抗体-抗原相互作用の結合速度を示すように意図され、一方、本明細書で用いる用語「K_{diss}」または「K_d」は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を示すように意図されている。本明細書で用いる用語「K_D」は、解離定数を示すように意図され、それはK_aに対するK_dの比(すなわちK_d/K_a)から得られ、モル濃度(M)で表される。抗体についてのK_D値は、当分野で十分に確立された方法を用いて決定することができる。抗体のK_Dを決定するための好ましい方法は、表面プラズモン共鳴、好ましくはバイオセンサーシステム(例えばBiacore(登録商標)システム)を用いることによるものである。

【0044】

10

20

30

40

50

IgG抗体についての「高親和性」という用語は、標的抗原に対して、 1×10^{-7} M以下、より好ましくは 5×10^{-8} M以下、より好ましくは 1×10^{-8} M以下、より好ましくは 5×10^{-9} M以下、およびさらにより好ましくは 1×10^{-9} M以下の K_D を有する抗体を示す。しかしながら、「高親和性」結合は、他の抗体アイソタイプに応じて変化し得る。例えば、IgMアイソタイプに対する「高親和性」結合は、 10^{-6} M以下、より好ましくは 10^{-7} M以下、さらにより好ましくは 10^{-8} M以下の K_D を有する抗体を示す。

【0045】

本明細書で用いる用語「対象」には、いずれのヒトまたは非ヒト動物が含まれる。該用語「非ヒト動物」には、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、は虫類などが含まれる。10

【0046】

単独または別の置換基の一部としての用語「アルキル」は、他に明記しない限り、直鎖もしくは分枝鎖、または環状炭化水素ラジカル、あるいはそれらの組み合わせを意味し、それは完全飽和、モノ不飽和もしくは多不飽和であってよく、示された数の炭素原子(例えば、C₁-C₁₀は1から10個の炭素を意味する)を有する二価および多価ラジカルを含むことができる。飽和炭化水素ラジカルの例としては、限定はされないが、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、シクロヘキシリル、(シクロヘキシリル)メチル、シクロプロピルメチル、n-ペンチル、n-ヘキシリル、n-ヘプチル、n-オクチルなど、ならびにそれらの同族体および異性体が挙げられる。不飽和アルキル基は、1つ以上の二重結合または三重結合を有するものである。不飽和アルキル基の例としては、限定はされないが、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル)、2,4-ペンタジエニル、3-(1,4-ペンタジエニル)、エチニル、1-および3-プロピニル、3-ブチニル、ならびにより高級な同族体および異性体が挙げられる。該用語「アルキル」にはまた、他に断りのない限り、以下(例えば「ヘテロアルキル」)により詳細に記載のアルキルの誘導体も含む。炭化水素基に限定されているアルキル基は、「ホモアルキル」と称する。20

【0047】

単独または別の置換基の一部としての用語「アルキレン」は、アルカン由来の二価ラジカルを意味し、限定はされないが、-CH₂CH₂CH₂CH₂-により例示され、以下の「ヘテロアルキレン」に記載の基をさらに含む。典型的には、アルキル(またはアルキレン)基は1から2個の炭素原子を有し得て、本発明においては10個以下の炭素原子を有する基が好ましい。30

【0048】

単独または別の用語と組み合わされた用語「ヘテロアルキル」は、他に明記しない限り、安定な直鎖もしくは分枝鎖、または環状炭化水素ラジカル、あるいはそれらの組み合わせを意味し、規定数の炭素原子ならびにO、N、Si、およびSからなる群から選択される少なくとも1個のヘテロ原子から成り、ここで、該窒素、炭素および硫黄原子は適宜酸化されていてもよく、該窒素ヘテロ原子は適宜四級化されていてもよい。該ヘテロ原子O、N、S、およびSiは、ヘテロアルキル基のいずれの内部位置、またはアルキル基が分子の残りの部分に結合している位置に配置され得る。例としては、限定はされないが、-CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)₂-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(=O)-CH₃、-CH₂-CH₂-S(=O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=N-OCH₃、および-CH=CH-N(C₂H₅)₂-CH₃が挙げられる。例えば、-CH₂-NH-OCH₃および-CH₂-O-Si(CH₃)₃のように、最大2個のヘテロ原子が連続し得る。同様に、単独または別の置換基の一部としての用語「ヘテロアルキレン」は、ヘテロアルキル由来の二価ラジカルを意味し、限定はされないが、-CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂-および-CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-として例示される。ヘテロアルキレン基において、ヘテロ原子は鎖末端の一方または両方を占有し得る(例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど)。該用語「ヘテロアルキル」および「ヘテロアルキレン」は、ポリ(エチレングリコール)およびその誘導4050

体を包含する(例えば、Shearwater Polymers Catalog, 2001を参照)。さらに、アルキレンおよびヘテロアルキレン連結基において、記載された連結基の式の方向は連結基の配向を意味していない。例えば、式-CO₂R'-は-CO₂R'-および-R'CO₂-の両方を表す。

【0049】

用語「アルキル」、「アルキレン」、「ヘテロアルキル」等と組み合わせた用語「低級」とは、1から6個の炭素原子を有する部分を言う。

【0050】

用語「アルコキシ」、「アルキルアミノ」、「アルキルスルホニル」、および「アルキルチオ」(またはチオアルコキシ)は、それらの通常の意味で用いられ、各々、酸素原子、アミノ基、SO₂基または硫黄原子を介して分子の残りに結合したアルキル基を言う。用語「アリールスルホニル」とはSO₂基を介して分子の残りに結合したアリール基を言い、用語「スルフヒドリル」とはSH基を言う。

10

【0051】

用語「アシル置換基」とは、本発明の化合物の多環式の核に直接的または間接的に結合したカルボニル炭素に結合し、その原子価を満たしている基を言う。「アシル置換基」の置換基部分は上記の基から選択することができる。

【0052】

用語「シクロアルキル」および「ヘテロシクロアルキル」は、単独でまたは他の用語と組み合わせて、他に明記しない限り、各々、置換もしくは無置換「アルキル」および置換もしくは無置換「ヘテロアルキル」の環状体を表す。加えて、ヘテロシクロアルキルにおいて、ヘテロ原子は、ヘテロ環が分子の残りに結合している位置を占有することができる。シクロアルキルの例としては、限定はされないが、シクロペンチル、シクロヘキシリル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどが挙げられる。ヘテロシクロアルキルの例としては、限定はされないが、1-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルホリニル、3-モルホリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニルなどが挙げられる。環状構造のヘテロ原子および炭素原子は適宜酸化されている。

20

【0053】

単独または別の置換基の一部としての用語「ハロ」または「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素原子を意味する。加えて、「ハロアルキル」といった用語は、モノハロアルキルおよびポリハロアルキルを含む。従って、「ハロ(C₁-C₄)アルキル」として、限定はされないが、トリフルオロメチル、2,2,2-トリフルオロエチル、4-クロロブチル、3-ブロモプロピルなどが挙げられる。

30

【0054】

用語「アリール」は、他に明記しない限り、置換または無置換の多不飽和の芳香族の炭化水素置換基を意味し、それは单環または多環(好ましくは1から3環)であることができ、共に縮合しているかまたは共有結合している。用語「ヘテロアリール」とは、N、O、またはSから選択される1から4個のヘテロ原子を有するアリール基(または環)を言い、ここで該窒素、炭素および硫黄原子は適宜酸化されており、該窒素原子は適宜四級化されている。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子を介して分子の残りに結合することができる。アリールおよびヘテロアリール基の非限定的な例として、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ビフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソオキサゾリル、4-イソオキサゾリル、5-イソオキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、ブリニル、2-ベンズイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル、および6-キノリルが挙げられる。上記のアリールおよびヘテロアリール環系の各々に対する置換基は、下記の

40

50

許容される置換基の群から選択される。「アリール」および「ヘテロアリール」はまた、1つ以上の非芳香族環系がアリールもしくはヘテロアリール系に縮合しているかまたは結合している環系を包含する。

【0055】

簡潔にするため、他の用語と組み合わせて用いる場合(例えば、アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル)、用語「アリール」は、上記のアリールおよびヘテロアリール環の両方を含む。従って、用語「アリールアルキル」は、アリール基が、炭素原子(例えばメチレン基)が、例えは酸素原子(例えは、フェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチル、3-(1-ナフチルオキシ)プロピルなど)により置換されているアルキル基を含むアルキル基(例えは、ベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなど)に結合しているラジカルを含むことを意図している。10

【0056】

上記の用語(例えは、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリール」および「ヘテロアリール」)の各々には、示したラジカルの置換および無置換形態の両方が含まれる。各タイプのラジカルに対して好ましい置換基を以下に提示する。

【0057】

アルキル、およびヘテロアルキルラジカル(アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニルおよびヘテロシクロアルケニルとしばしば称される基が含まれる)に対する置換基は、概して、各々、「アルキル置換基」および「ヘテロアルキル置換基」と称され、それらは、限定はされないが、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R'R''、-OC(=O)R'、-C(=O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(=O)NR'R''、-NR'R'C(=O)R'、-NR'-C(=O)NR'R'''、-NR''CO₂R'、-NR-C(NR'R'R''')=NR''''、-NR-C(NR'R'')=NR'''、-S(=O)R'、-S(=O)₂R'、-S(=O)₂NR'R''、-NRSO₂R'、-CNまたは-NO₂から、0から(2m'+1)(ここで、m'はかかるラジカル中の炭素原子の総数である)の範囲の数で選択される、1つ以上の様々な基であり得る。R'、R''、R'''およびR''''は、各々好ましくは独立して、水素、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、置換もしくは無置換アリール、例えは、1-3個のハロゲンで置換されたアリール、置換もしくは無置換アルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を示す。本発明の化合物が2つ以上のR基を含む場合、例えは、R基の各々は、各R'、R''、R'''およびR''''基として、これらの基のうちの2つ以上が存在する場合に独立して選択される。R'およびR''が同一の窒素原子に結合している場合、それらは該窒素原子と合わせて、5、6、または7員環を形成することができる。例えは、-NR'R''は、限定はされないが、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを含むことを意図している。置換基についての上記考察から、当業者であれば、用語「アルキル」が、水素基以外の基に結合した炭素原子を含む基(例えは、ハロアルキル(例えは、-CF₃および-CH₂CF₃)およびアシリル(例えは、-C(=O)CH₃、-C(=O)CF₃、-C(=O)CH₂OCH₃など))を含むことを意図していることを理解するであろう。2030

【0058】

アルキルラジカルについて記載された置換基と同様に、アリール置換基およびヘテロアリール置換基は、一般的に、各々、「アリール置換基」および「ヘテロアリール置換基」と称され、多様であり、例えは、ハロゲン、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R'R''、-OC(=O)R'、-C(=O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(=O)NR'R''、-NR'R'C(=O)R'、-NR'-C(=O)NR'R'''、-NR''CO₂R'、-NR-C(NR'R'')=NR''''、-S(=O)R'、-S(=O)₂NR'R''、-NRSO₂R'、-CNもしくは-NO₂、-R'、-N₃、-CH(Ph)₂、フルオロ(C₁-C₄)アルコキシ、またはフルオロ(C₁-C₄)アルキルから、0から芳香族環系の開放原子価(open valence)の総数の範囲の数で選択され;ここで、R'、R''、R'''およびR''''は、好ましくは独立して、水素、(C₁-C₈)アルキルおよびヘテロアルキル、無置換アリールおよびヘテロアリール、(無置換アリール)-(C₁-C₄)アルキル、あるいは(無置換アリール)オキシ-(C₁-C₄)アルキルから選択される。本発明の化合物が2つ以上のR、R'、R''、R'''、またはR''''基を含む場合、かかる各基は、他と独立して、変え得る。4050

【0059】

アリールまたはヘテロアリール環の隣接する原子上の2つの置換基は、適宜、式-T-C(=O)-(CRR')_q-U-の置換基で置換されていてもよく、ここで、TおよびUは独立して、-NR-、-O-、-CRR'-または単結合であり、qは0から3の整数である。あるいは、かかる置換基のうちの2つは、適宜、式-A-(CH₂)_r-B-の置換基で置換されていてもよく、ここで、AおよびBは独立して、-CRR'-、-O-、-NR-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、-S(=O)₂NR'-または単結合であり、rは1から4の整数である。このように形成された新しい環の単結合の1つは、適宜、二重結合で置換されていてもよい。あるいは、かかる置換基のうちの2つは、適宜、式-(CRR')_s-X-(CR''R''')_d-の置換基で置換されていてもよく、ここで、sおよびdは独立して、0から3の整数であり、Xは-O-、-NR'-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、または-S(=O)₂NR'-である。該置換基R、R'、R'''およびR''は、好ましくは独立して、水素、または置換もしくは無置換(C₁-C₆)アルキルから選択される。

10

【0060】

本明細書で用いる用語「ジホスフェート」には、限定はされないが、2つのリン酸基を有するリン酸のエステルが含まれる。用語「トリホスフェート」には、限定はされないが、3つのリン酸基を有するリン酸のエステルが含まれる。

【0061】

本明細書で用いる用語「ヘテロ原子」は、酸素(O)、窒素(N)、硫黄(S)およびケイ素(Si)を含む。

20

【0062】

記号「R」は、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、置換もしくは無置換アリール、置換もしくは無置換ヘテロアリール、または置換もしくは無置換ヘテロシクリル基から選択される置換基を表す一般的な略語である。

【0063】

本発明の様々な態様を、以下のサブセクションにおいてさらに詳細に記載する。

【0064】

抗-RG-1抗体

本発明の複合体中の抗体は、ヒトRG-1に特異的に結合することにより特徴づけられる。好ましくは、該抗体は、高親和性、例えば 1×10^{-7} M以下のK_Dで、RG-1に結合する。該抗-RG-1抗体は、好ましくは、以下の特徴のうちの1つ以上を示す：

30

- (a) 1×10^{-7} M以下のK_DでヒトRG-1に結合する；
- (b) RG-1でトランスフェクトされたCHO細胞に結合する；および、
- (c) *in vivo*においてRG-1-発現細胞の増殖を阻害する。

【0065】

好ましい実施態様において、該抗体は、特性(a)、(b)、および(c)のうち少なくとも2つを示す。より好ましい実施態様において、該抗体は3つの全ての特性(a)、(b)、および(c)を示す。好ましくは、該抗体は、 5×10^{-8} M以下のK_D、 2×10^{-8} M以下のK_D、 5×10^{-9} M以下のK_D、 4×10^{-9} M以下のK_D、 3×10^{-9} M以下のK_D、または 2×10^{-9} M以下のK_DでヒトRG-1に結合する。

30

【0066】

該抗体は、好ましくは、他のタンパク質中には存在しない、RG-1中の抗原エピトープに結合する。該抗体は、好ましくは、RG-1には結合するが他のタンパク質に結合しないか、あるいは、低い親和性で、例えば 1×10^{-6} M以上、より好ましくは 1×10^{-5} M以上、より好ましくは 1×10^{-4} M以上、より好ましくは 1×10^{-3} M以上、およびさらにより好ましくは 1×10^{-2} M以上のK_Dで、他のタンパク質に結合する。

40

【0067】

RG-1に対する抗体の結合親和性を評価するための標準的なアッセイが当分野において公知であり、例えば、ELISA、ウエスタンプロット、RIA、およびフローサイトメトリー分析が含まれる。結合はまた、標準的なアッセイ、例えばBiacore（登録商標）システム分析によっても評価することができる。RajiまたはDaudi B細胞腫瘍細胞への結合を評価する

50

ために、Raji(ATCC寄託No.CCL-86)またはDaudi(ATCC寄託No. CCL-213)細胞をアメリカ合衆国培養細胞系保存機関から入手することができる。

【0068】

モノクローナル抗体19G9および34E1

本発明の複合体での使用に好ましい抗体は、ヒトモノクローナル抗体19G9および34E1であり、それらはUS2004/0152139およびUS7,335,748 B2に記載されており、それらは引用により本明細書に援用される。19G9および34E1のV_Hアミノ酸配列は、各々、配列番号：13(図1A)および14(図2A)に示される。19G9および34E1のV_Lアミノ酸配列は、各々、配列番号：15(図1B)および16(図2B)に示される。対応するコードヌクレオチド配列もまた、前述の図：抗体19G9のV_Hに関しては配列番号：17(図1A)、抗体19G9のV_Lに関しては配列番号：19(図1B)、抗体34E1のV_Hに関しては配列番号：18(図2A)、および抗体34E1のV_Lに関しては配列番号：20(図2B)に示される。
10

【0069】

別の態様において、該抗体は、19G9もしくは34E1の重鎖および軽鎖CDR1、CDR2ならびにCDR3、あるいはそれらの組み合わせを含有し得る。19G9および34E1のV_H CDR1のアミノ酸配列は、各々、配列番号：1-2に示される。19G9および34E1のV_H CDR2のアミノ酸配列は、各々、配列番号：3-4に示される。19G9および34E1のV_H CDR3のアミノ酸配列は、各々、配列番号：5-6に示される。19G9および34E1のV_L CDR1のアミノ酸配列は、各々、配列番号：7-8に示される。19G9および34E1のV_L CDR2のアミノ酸配列は、配列番号：9-10に示される。19G9および34E1のV_L CDR3のアミノ酸配列は、各々、配列番号：11-12に示される。該CDR領域は、Kabatシステム(Kabat, E. A., et al. (1991). Sequences of Proteins of Immunochemical Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; hereinafter “Kabat ‘3242’”)を用いて図示される。
20

【0070】

抗原-結合特異性は主にCDR1、CDR2、およびCDR3領域により供されることから、他の抗-RG-1結合分子を作出するために、V_H CDR1、CDR2、およびCDR3配列ならびにV_L CDR1、CDR2、およびCDR3配列を「混合および適合(mix and match)」することができる(すなわち、各抗体はV_H CDR1、CDR2、およびCDR3ならびにV_L CDR1、CDR2、およびCDR3を含まなくてはならないけれども、異なる抗体由来のCDRを混合および適合することができる)。好ましくは、混合および適合することにおいて、特定のV_H/V_Lペア由来のV_H配列は構造的に類似したV_H配列で置換される。同様に、特定のV_H/V_Lペア由来のV_L配列は好ましくは、構造的に類似したV_L配列で置換される。そのような「混合および適合」した抗体のRG-1結合は、上記の結合アッセイを用いて試験することができる。好ましくは、V_H CDR配列が混合および適合される場合、特定のV_H配列由来のCDR1、CDR2および/またはCDR3配列は構造的に類似したCDR配列で置換される。同様に、V_L CDR配列が混合および適合される場合、特定のV_L配列由来のCDR1、CDR2および/またはCDR3配列は、好ましくは構造的に類似したCDR配列で置換される。1つ以上のV_Hおよび/またはV_L CDR領域配列をモノクローナル抗体19G9および34E1について本明細書に開示のCDR配列由来の構造的に類似した配列で置換することにより、新規V_HおよびV_L配列を作出することは当業者には容易に明らかであろう。
30

【0071】

従って、別の態様において、本発明の複合体の抗体またはそれらの抗原結合部分は：

- (a) 配列番号：1または配列番号：2を含有する、重鎖可変領域CDR1；
- (b) 配列番号：3または配列番号：4を含有する、重鎖可変領域CDR2；
- (c) 配列番号：5または配列番号：6を含有する、重鎖可変領域CDR3；
- (d) 配列番号：7または配列番号：8を含有する、軽鎖可変領域CDR1；
- (e) 配列番号：9または配列番号：10を含有する、軽鎖可変領域CDR2；および、
- (f) 配列番号：11または配列番号：12を含有する、軽鎖可変領域CDR3、を含む。

【0072】

10

20

30

40

50

CDR3ドメインはCDR1および/またはCDR2ドメインから独立して単独で同族抗原に対する抗体の結合特異性を決定できること、ならびに、共通のCDR3配列に基づく同一の結合特異性を有する複数の抗体を予想通りに作製できることがよく知られている。例えば、Klimka et al., British J. of Cancer 83(2):252-260 (2000); Beiboer et al., J. Mol. Biol. 296:833-849 (2000); Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:8910-8915 (1998); Barbas et al., J. Am. Chem. Soc. 116, 2161-2162 (1994); Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:2529-2533 (1995); Ditzel et al., J. Immunol. 157:739-749 (1996); Berezov et al., BIAjournal 8:Scientific Review 8 (2001); Igarashi et al., J. Biochem (Tokyo) 117:452-7 (1995); Bourgeois et al., J. Virol 72:807-10 (1998); Levi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:4374-8 (1993); Polymen is and Stoller, J. Immunol. 152:5218-5329 (1994)、およびXu and Davis, Immunity 1:37-45 (2000)を参照。また、US6,951,646; 6,914,128; 6,090,382; 6,818,216; 6,156,313; 6,827,925; 5,833,943; 5,762,905および5,760,185も参照。これらの文献の各々は、その全般が引用により本明細書に援用される。

10

【0073】

従って本発明は、ヒトまたは非ヒト動物由来の抗体からの1つ以上の重鎖および/または軽鎖CDR3を含有するモノクローナル抗体を提供し、ここで、該モノクローナル抗体はヒトRG-1に特異的に結合することができる。特定の態様において、本発明の複合体は、非ヒト抗体（例えばマウスまたはラット抗体）からの1つ以上の重鎖および/または軽鎖CDR3ドメインを含有するモノクローナル抗体を用いることができ、ここで、該モノクローナル抗体はRG-1に特異的に結合することができる。あるいは、(a)対応する親非ヒト抗体に結合することができ；(b)対応する親非ヒト抗体の機能特性を保持し；(c)対応する親非ヒト抗体と同一のエピトープに結合し；および/または(d)対応する親非ヒト抗体と同様の結合親和性を有する、非ヒト抗体からの1つ以上の重鎖および/または軽鎖CDR3ドメインを含有することができる。

20

【0074】

特定の生殖系列配列を有する抗体

ある特定の実施態様において、本発明の複合体の抗体部分は、特定の生殖系列重鎖免疫グロブリン遺伝子由来のV_Hおよび/または特定の生殖系列軽鎖免疫グロブリン遺伝子由來のV_Lを含有する。

30

【0075】

本明細書において、該抗体の可変領域がヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子を用いる系から得られる場合、ヒト抗体は、特定の生殖系列配列「の産生物」または「由来」である、重鎖または軽鎖可変領域を含有する。そのような系には、目的の抗原を用いてヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを免疫化すること、あるいはファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリを目的の抗原を用いてスクリーニングすることが含まれる。そのようなヒト抗体は、そのアミノ酸配列をヒト生殖系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、ヒト抗体の配列に最も近い(すなわち、最大の%同一性)ヒト生殖系列免疫グロブリン配列を選択することにより同定できる。特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列「の産生物」または「由来」であるヒト抗体は、例えば、天然の体細胞変異または部位特異的突然変異の意図的導入に起因する、生殖系列配列とのアミノ酸配列の差違を有し得る。しかしながら、選択されたヒト抗体は典型的にはヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性であり、他の種の生殖系列免疫グロブリンアミノ酸配列(例えば、マウス生殖系列配列)と比べた場合にヒトであるとしてヒト抗体を同定するアミノ酸残基を有する。特定の場合において、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも95%、またはさらには少なくとも96%、97%、98%、もしくは99%同一であり得る。典型的には、特定のヒト生殖系列配列由來のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列とは10アミノ酸以下の差違を示すであろう。特定の場合において、該ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子により

40

50

コードされるアミノ酸配列とは、5以下、またはさらには4、3、2、もしくは1アミノ酸以下の差違を示し得る。

【0076】

相同抗体

さらに別の実施態様において、本発明の複合体の抗体部分の抗体は、本明細書に記載の好ましい抗体のアミノ酸配列に相同であるアミノ酸配列を含有する重鎖および軽鎖可変領域を有し、ここで、該抗体は本発明の抗-RG-1抗体の目的の機能特性を保持する。

【0077】

例えば、本発明は、 V_H および V_L を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供し、ここで：

(a)該 V_H は、配列番号:13-14からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%相同であるアミノ酸配列を含有し；

(b)該 V_L は、配列番号:15-16からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%相同であるアミノ酸配列を含有し；および、

(c)該抗体は、ヒトRG-1に特異的に結合する。

【0078】

他の実施態様において、該 V_H および/または V_L アミノ酸配列は、上記の配列に対して、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%相同であり得る。上記の配列の V_H および V_L 領域に対して高い(すなわち、80%以上)相同性を有する V_H および V_L 領域を有する抗体は、配列番号:17-18もしくは19-20をコードする核酸分子の変異誘発(例えば、部位特異的またはPCR媒介変異誘発)の後、保持機能(すなわち、上記の機能)について、コードされた変異抗体を本明細書に記載の機能アッセイを用いて試験することによって、得ることができる。

【0079】

2つのアミノ酸配列間のパーセント相同性は2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性に相当し、それは、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、配列により共有される同一ポジションの数の関数(すなわち、%相同性 = 同一ポジションの数/ポジションの総数 × 100)であり、2つの配列の最適アラインメントにおいて導入される必要がある。2つの配列間の配列の比較およびパーセント同一性の決定は、以下の非限定的実施例に記載のとおり、数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。

【0080】

2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に導入されているE. MeyersおよびW. Millerのアルゴリズム(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))により、PAM120重み残基表(weight residue table)、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップペナルティを用いて、決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラム(<http://www.gcg.com>で入手可能)に導入されているNeedlemanおよびWunsch(J. Mol. Biol. 48:4 44-453 (1970))アルゴリズムにより、Blosum62マトリックスもしくはPAM250マトリックスのいずれか、ならびに、16、14、12、10、8、6もしくは4のギャップ荷重(gap weight)および1、2、3、4、5もしくは6の長さ荷重(length weight)を用いて、決定することができる。

【0081】

さらにまたは別法として、例えば関連配列を同定するために、本発明のタンパク質配列を「クエリー配列」としてさらに用いて、公開データベースに対して検索を実施することができる。そのような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のXBLASTプログラム(バージョン2.0)を用いて実施することができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3を用いて実施し、本発明の抗体分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップアラインメント(gapped alignment)を得るために、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載のとおりGapped BLASTを用いることができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラ

ムを用いる場合、各プログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを用いることができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照。

【0082】

保存的修飾を有する抗体

本発明の複合体中に用いられる抗体はCDR1、CDR2およびCDR3配列を含有するV_H、ならびに、CDR1、CDR2およびCDR3配列を含有するV_Lを有することができ、これらのCDR配列のうちの1つ以上は公知の抗-RG-1抗体に基づく特定のアミノ酸配列またはその保存的修飾を含み、該抗体は本発明の抗-RG-1抗体の目的の機能特性を保持する。特定の保存的配列修飾を行うことができ、それは抗原結合を除去しないことが当分野において分かっている。例えば、Brummell et al. (1993) Biochem 32:1180-8; de Wildt et al. (1997) Prot. Eng. 10:835-41; Komissarov et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:26864-26870; Hall et al. (1992) J. Immunol. 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) Biochem. 32:6862-35; Adib-Conquy et al. (1998) Int. Immunol. 10:341-6およびBeers et al. (2000) Clin. Can. Res. 6:2835-43を参照。従って、本発明の複合体は、ヒトRG-1に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合部分を有することができ、ここで:

(a) 該V_H CDR3配列は配列番号:5-6のアミノ酸配列有し; および、

(b) 該V_L CDR3配列は配列番号:11-12のアミノ酸配列を有し;

V_H CDR3およびV_L CDR3のうちの少なくとも1つは1つ以上のその保存的修飾を有する。

【0083】

さらにまたは別法として、該抗体は、上記した以下の機能特性、例えばヒトRG-1に対する高親和性結合、RG-1でトランスフェクトしたCHO細胞への結合能力、および/または細胞毒素に結合された場合のin vivoにおけるRG-1-発現腫瘍細胞の腫瘍増殖阻害能力、のうちの1つ以上を保有し得る。

【0084】

好みの実施態様において、該V_H CDR2配列は配列番号: 3-4から選択されるアミノ酸配列を有し; 該V_L CDR2配列は配列番号: 9-10から選択されるアミノ酸配列を有し; 該V_H CD R1配列は配列番号: 1-2から選択されるアミノ酸配列を有し; および/または該V_L CDR1配列は配列番号: 7-8から選択されるアミノ酸配列を有し、ここで前記のV_H CDR2、V_L CDR2、V_H CDR1、およびV_L CDR1のうちの1つ以上は保存的修飾を有することができる。

【0085】

従って、別の態様において、本発明の複合体の抗体またはその抗原結合部分は:

(a) 配列番号: 1もしくは配列番号: 2、またはいずれかの保存的修飾を含有する重鎖可変領域CDR1;

(b) 配列番号: 3もしくは配列番号: 4、またはいずれかの保存的修飾を含有する重鎖可変領域CDR2;

(c) 配列番号: 5もしくは配列番号: 6、またはいずれかの保存的修飾を含有する重鎖可変領域CDR3;

(d) 配列番号: 7もしくは配列番号: 8、またはいずれかの保存的修飾を含有する軽鎖可変領域CDR1;

(e) 配列番号: 9もしくは配列番号: 10、またはいずれかの保存的修飾を含有する軽鎖可变領域CDR2; および、

(f) 配列番号: 11もしくは配列番号: 12、またはいずれかの保存的修飾を含有する軽鎖可变領域CDR3、

を含む。

【0086】

該用語「保存的配列修飾」とは、アミノ酸配列を有する抗体の結合特性に顕著に影響しないかまたは変化させないアミノ酸修飾を言い、これには、アミノ酸置換、付加、および欠失が含まれる。修飾を、標準的な技法(例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発)によって、本発明の抗体に導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。類似の側鎖を

10

20

30

40

50

有するアミノ酸残基のファミリーが当分野で明らかになっている。これらのファミリーには、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、無電荷極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、-分枝側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸が含まれる。従って、本発明の抗体のCDR領域内の1つ以上のアミノ酸残基は、同一の側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置換することができ、保持機能(すなわち、上記(a)から(c)に記載の機能)について、本明細書に記載の機能アッセイを用いて、該変異抗体を試験することができる。好ましくは、該保存的修飾は1または2以下の数である。

10

【0087】

抗-RG-1抗体と同一のエピトープに結合する抗体

別の実施態様において、本発明の複合体中の抗体は、本発明の抗-RG-1モノクローナル抗体(すなわち、ヒトRG-1への結合において本発明のモノクローナル抗体のいずれかと交差競合する能力を有する抗体)のいずれかにより認識されるRG-1上のエピトープに結合する。好ましい実施態様において、交差競合試験の基準抗体は抗体19G9または抗体34E1である。

20

【0088】

交差競合抗体は、標準的なRG-1結合アッセイにおいて、19G9または34E1と交差競合するその能力に基づいて同定され得る。例えば、ELISAアッセイを用いることができ、その場合、組換えヒトRG-1タンパク質をプレートに固定化し、抗体の1つを蛍光標識して、標識抗体に対して競合する未標識抗体の能力を評価する。さらにまたは別法として、BIAcore分析を用いて抗体が交差競合する能力を評価することができる。好ましい実施態様において、19G9または34E1により認識されるヒトRG-1上の同一のエピトープに結合する抗体はヒトモノクローナル抗体である。そのようなヒトモノクローナル抗体は、本明細書に記載の方法および当分野で公知の方法を用いて調製および単離することができる。

20

【0089】

改変(Engineered)および修飾抗体

また、出発物質として1つ以上の公知のV_Hおよび/またはV_L配列を有する抗体から、本発明の複合体中の抗体を調製して、出発抗体に比べて特性を変えた修飾抗体を改変することもできる。抗体は、一方または両方の可変領域内、例えば1つ以上のCDR領域内および/または1つ以上のフレームワーク領域内の1つ以上のアミノ酸を修飾することにより、改変することができる。さらにまたは別法として、抗体を定常領域内の残基を修飾することにより改変して、例えばエフェクター機能を変化させることができる。

30

【0090】

ある特定の実施態様において、CDR移植により抗体の可変領域を改変することができる。抗体は、6つの重鎖および軽鎖相補性決定領域(CDR)中に位置するアミノ酸残基全体を通して、優勢に標的抗原と相互作用する。このことから、CDR内のアミノ酸配列は、CDR外の配列間よりも個々の抗体間の方が多様である。CDR配列はほとんどの抗体-抗原相互作用に関与しているので、異なる特性を有する異なる抗体からのフレームワーク配列に移植された特定の天然の抗体由来のCDR配列を有する発現ベクターを構築することによって、特定の天然の抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現させることができる(例えば、Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; WinterのUS5,225,539、ならびにQueen et alのUS5,530,101; 5,585,089; 5,693,762および6,180,370を参照)。

40

【0091】

そのようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公的DNAデータベースまたは公開文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖およびV_L遺伝子の生殖系列DN

50

A配列は、「VBase」ヒト生殖系列配列データベース(インターネット上のwww.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseで利用可能)、ならびにKabat '3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; および、Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836; (その各々の内容は引用により本明細書に明確に援用される)に見いだすことができる。また、ヒト重鎖およびV_L遺伝子の生殖系列DNA配列はGenbankデータベースに見いだすことができる。例えば、HC o7 HuMAbマウスで見いだされる以下の重鎖生殖系列配列は、付随のGenbank受入番号: 1-6 9 (NG_0010109、NT_024637およびBC070333)、3-33 (NG_0010109およびNT_024637)ならびに3-7 (NG_0010109およびNT_024637)で入手可能である。別の例として、HCo12 HuMAbマウスで見いだされる以下の重鎖生殖系列配列は、付随のGenbank受入番号: 1-69 (NG_0010109、NT_024637およびBC070333)、5-51 (NG_0010109およびNT_024637)、4-34 (NG_0010109およびNT_024637)、3-30.3 (CAJ556644)ならびに(AJ406678)で入手可能である。

10

20

30

【0092】

抗体タンパク質配列を、Gapped BLASTと呼ばれる配列類似性検索方法(Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Research 25:3389-3402)を用いて、タンパク質配列データベースと比較する。抗体配列とデータベース配列との間での統計的に有意なアラインメントはアラインメントされたワードの高スコアセグメント対 (high-scoring segment pair) (HSP) を有する傾向が強い点で、BLASTはヒューリスティックアルゴリズムである。伸長またはトリミングによりスコアを改善することができないセグメント対をヒット (hit) と呼ぶ。簡単に言うと、VBASE由来のヌクレオチド配列(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>)が翻訳され、FR1からFR3フレームワーク領域間の領域および同領域を含む領域が保持される。該データベース配列は、平均98残基長を有する。タンパク質の全長にわたって厳密に一致する重複配列が除去される。デフォルトでのblastpプログラム、低複雑性フィルタ(オフにしている)以外の標準パラメータ、およびBLOSUM62の置換マトリックスを用いたタンパク質についてのBLAST検索によって、配列の一一致をもたらす上位5つのヒットにフィルタがかけられる。該ヌクレオチド配列は全6つのフレーム内で翻訳され、データベース配列の一一致するセグメント中に停止コドンを有しないフレームはヒットの可能性があると考えられる。同様に、BLASTプログラムtblastxを用いてこのことを確認する(全6つのフレーム内で抗体配列を翻訳し、それら翻訳を全6つのフレーム内で動的に翻訳されたVBASEヌクレオチド配列と比較する)。

30

40

【0093】

同一性は、抗体配列と配列の全長にわたるタンパク質データベースとの間の正確なアミノ酸の一一致である。ポジティブ(positive)(同一性+置換の一一致)は、同一ではなく、BLOSUM62置換行列によって導かれるアミノ酸置換である。抗体配列がデータベース配列のうちの2つと同じ同一性で一致する場合、大部分のポジティブを伴うヒットが、一致する配列ヒットであると決定され得る。

50

【0094】

本発明の抗体における使用に好ましいフレームワーク配列は、公知のRG-1抗体により用いられるフレームワーク配列に構造的に類似したものである。該V_H CDR1、CDR2、およびCDR3配列、ならびに該V_L CDR1、CDR2、およびCDR3配列は、フレームワーク配列が由来する生殖系列免疫グロブリン遺伝子中に見いだされるのと同一の配列を有するフレームワーク領域上に移植され得るか、あるいは、該CDR配列は、生殖系列配列と比べて1つ以上の変異を含むフレームワーク領域上に移植され得る。例えば、特定の場合において、フレームワーク領域内の残基を変異させて抗体の抗原結合親和性を維持もしくは増強させることが有益であることが見いだされている(例えば、Queen et al.のUS5,530,101; 5,585,089; 5,693,762および6,180,370を参照)。

50

【0095】

別のタイプの可変領域修飾は、V_Hおよび/またはV_Lの、CDR1、CDR2および/またはCDR3領

域内のアミノ酸残基を変異させて、1つ以上の結合特性を改善するものである。部位特異的変異誘発またはPCR媒介変異誘発を実施して変異を導入することができ、抗体結合における効果または他の目的の機能特性を、*in vitro*もしくは*in vivo*アッセイで評価することができる。保存的修飾が導入されるのが好ましい。該変異は、アミノ酸の置換、付加、または欠失であってよいが、好ましくは置換である。さらに、典型的には、CDR領域内の1、2、3、4または5以下の残基を変異させる。

【0096】

従って、別の実施態様において、本発明の複合体中の抗体もしくはその抗原結合部分は：(a) 配列番号：1-2から選択されるアミノ酸配列を含有するV_H CDR1領域；(b) 配列番号：3-4から選択されるアミノ酸配列を含有するV_H CDR2領域；(c) 配列番号：5-6から選択されるアミノ酸配列を含有するV_H CDR3領域；(d) 配列番号：7-8から選択されるアミノ酸配列を含有するV_L CDR1領域；(e) 配列番号：9-10から選択されるアミノ酸配列を含有するV_L CDR2領域；および(f) 配列番号：11-12から選択されるアミノ酸配列を含有するV_L CDR3領域；を含み、ここで、前述のV_H CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにV_L CDR1、CDR2、およびCDR3のうちの少なくとも1つは、上記の配列番号と比べて1、2、3、4もしくは5(好ましくは1もしくは2)のアミノ酸の置換、欠失または付加を有する。
10

【0097】

改変(Engineered)抗体には、V_Hおよび/またはV_L内のフレームワーク残基が、典型的には免疫原性を低下させるように、修飾されているものが含まれる。例えば、1つのアプローチは、1つ以上のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列に「復帰変異(backmutation)」させることである。より具体的には、体細胞変異を経た抗体は、抗体が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含み得る。そのような残基は、抗体フレームワーク配列と該抗体が由来する生殖系列配列とを比較することにより同定することができる。
20

【0098】

別のタイプのフレームワーク修飾は、フレームワーク領域内またはさらには1つ以上のCDR領域内での、1つ以上の残基の変異に関与して、T細胞エピトープを除去し、また免疫原性を低下させる。このアプローチはまた、「脱免疫化(deimmunization)」とも称され、Carr et alによるUS2003/0153043に記載されている。
30

【0099】

抗体はまた、Fc領域内に修飾を含むように改変され、典型的には、例えば、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/または抗原依存性の細胞毒素性といった特性が変化され得る。さらに、本発明の抗体を化学的に修飾してもよい(例えば、1つ以上の化学的部分が抗体に結合され得る)か、あるいはそのグリコシル化を変化させて、抗体の1つ以上の機能特性を再び変化させててもよい。これらの実施態様の各々を、以下にさらに詳細に記載する。Fc領域における残基のナンバリングは、KabatのEUインデックスのものである。
。

【0100】

一実施態様においては、C_H1のヒンジ領域が修飾されて、該ヒンジ領域中のシステイン残基の数が変化される(例えば、増加または減少される)。このアプローチはさらに、Bodmer et alによるUS5,677,425に記載されている。C_H1のヒンジ領域中のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖の構築を促進させるように、あるいは抗体の安定性を増大または低下させるように、変えられる。
40

【0101】

別の実施態様において、抗体のFcヒンジ領域を変異させて、その生物学的半減期を低下させる。より具体的には、該抗体が天然のFc-ヒンジドメインSpA結合と比べて低下したブドウ球菌プロテイン(SpA)結合を有するように、1つ以上のアミノ酸変異がFc-ヒンジフラグメントのCH2-CH3ドメイン界面領域に導入される。このアプローチは、Ward et alによるUS6,165,745により詳細に記載されている。
50

【0102】

別の実施態様において、該抗体は、その生物学的半減期を増大させるように修飾される。様々なアプローチが可能である。例えば、WardのUS6,277,375に記載のとおり、以下の変異のうちの1つ以上を導入することができる：T252L、T254S、T256F。別法として、生物学的半減期を増大させるために、Presta et al.によるUS5,869,046および6,121,022に記載のとおり、該抗体を、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループからのサルベージ(salvage)受容体結合エピトープを含むように、CH1またはC_L領域内で変化させることができる。

【0103】

さらに他の実施態様において、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することによってFc領域を変異させて、抗体のエフェクター機能を変化させる。例えば、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320、または322から選択される1つ以上のアミノ酸を、抗体がエフェクターリガンドに対して親和性が変化されているが親抗体の抗原-結合親和性を保持しているように、異なるアミノ酸残基で置換することができる。親和性が変化されるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分であり得る。このアプローチは、Winter et al.によるUS5,624,821および5,648,260にさらに詳細に記載されている。

10

【0104】

別の実施例において、アミノ酸残基329、331または322から選択される1つ以上のアミノ酸を、抗体が、変化したC1q結合および/または低下もしくは消滅した補体依存性細胞毒素性(CDC)を有するように、異なるアミノ酸残基で置換することができる。このアプローチは、Idusogie et al.によるUS6,194,551にさらに詳細に記載されている。

20

【0105】

別の実施例において、アミノ酸位置231および239内の1つ以上のアミノ酸残基が変化されることによって、抗体の補体を結合する能力を変化させる。このアプローチは、Bodmer et al.によるWO 94/29351にさらに詳細に記載されている。

20

【0106】

さらに別の実施例において、Fc領域は、以下の位置で1つ以上のアミノ酸を修飾することによって、Fc受容体に対する抗体の親和性を増大させるように修飾される：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438または439。このアプローチは、PrestaによるWO 00/42072にさらに詳細に記載されている。さらに、Fc R1、Fc RII、Fc RIIIおよびFcRnに対するヒトIgG1上の結合部位がマッピングされており、結合が改善された変異体が記載されている(Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照)。位置256、290、298、333、334および339での特異的変異がFc RIIIに対する結合を改善することが示された。さらに、以下の組み合せ変異体がFc RIII結合を改善することが示された：T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224AおよびS298A/E333A/K334A。

30

【0107】

さらに別の実施態様において、本発明の抗体のC末端は、King et al., 国際出願PCT/US 2008/073569に記載(引用によりその全般が本明細書に援用される)されているように、システイン残基の導入によって修飾される。そのような修飾としては、限定はされないが、全長重鎖配列のC末端もしくはその付近に存在するアミノ酸残基の置換、ならびに全長重鎖配列のC末端へのシステイン-含有伸長の導入、が挙げられる。好ましい実施態様において、システイン-含有伸長は、配列アラニン-アラニン-システイン(N末端からC末端)を含む。

40

そのようなC末端システイン修飾により、パートナー分子の結合のための官能基(例えばジスルフィドリンカーまたはマレイミド基を介して)を得ることができる。このように抗体のパートナー分子へ結合することで、特異的な結合部位についての制御が高められ得

50

る。さらに、C末端またはその付近に結合部位を導入することによって結合を最適化することができ、それにより、抗体-抗原結合の妨害を低減または除去し、分析および品質管理の簡易化を可能にする。

【0108】

さらに別の実施態様において、該抗体をアグリコシル化 (aglycoslated) (すなわち、グリコシル化の欠如)されるように改変して、抗原への結合を増大させることができる。そのような修飾は、抗体配列内の1つ以上のグリコシル化部位を変化させることにより達成することができる。例えば、1つ以上のアミノ酸置換をして1つ以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位を除去し、該部位でのグリコシル化を防ぐことができる。そのようなアプローチは、Co et al. のUS5,714,350および6,350,861にさらに詳細に記載されている。グリコシル化を変化させるさらなるアプローチがHanai et al. のUS7,214,775、PrestaのUS6,737,056、PrestaのUS2007/0020260、Dickey et al. のWO 2007/084926、Zhu et al. のWO 2006/089294、およびRavetch et al. のWO 2007/055916 (その各々は引用によりその全般が本明細書に援用される) に記載されている。10

【0109】

改変 (altered) タイプのグリコシル化を有する抗体、例えば、フコシル残基の量が低下した低フコシル化 (hypofucosylated) 抗体または分岐 (bisecting) GlcNAc構造が増加した抗体を作製することができる。そのような改変グリコシル化パターンはADCCを増大させることができ。そのような修飾は、改変グリコシル化機構を有する宿主細胞中で抗体を発現させることにより達成することができる。改変グリコシル化機構を有する細胞は当分野で記載されており、組換え抗体を発現することにより改変グリコシル化を有する抗体を産生する宿主細胞として用いることができる。例えば、細胞株Ms704、Ms705、およびMs709は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8 ((1,6) フコシルトランスフェラーゼ) が欠如しており、それにより、これらの細胞株で発現する抗体はその糖 (carbohydrate) 上にフコースを欠如している。そのような細胞株は、2つの置換ベクターを用いてCHO/DG44細胞中のFUT8遺伝子を標的破壊することにより創り出すことができた (Yamane et al. によるUS20040110704およびYamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22を参照)。別の実施例として、Hanai et al. によるEP 1,176,195は機能的に破壊されたFUT8遺伝子を有する細胞株を記載しており、それはフコシルトランスフェラーゼをコードし、それにより、そのような細胞株で発現する抗体は、(1,6) 結合-関連酵素の低減もしくは除去による低フコシル化を示す。Hanai et al. はまた、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素活性が低いか、あるいは酵素活性をもたない細胞株、例えばラットミエローマ細胞株YB2/0(ATCC CRL 1662)も記載している。PrestaによるWO 03/035835は、Asn(297)-連結糖 (carbohydrate) にフコースを結合させる能力が低下したCHO細胞変異株、Lec13細胞 (これもまた該宿主細胞において発現される抗体の低フコシル化をもたらす) を記載している (また、Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740を参照)。Umana et al. によるWO 99/54342は、細胞株中で発現する抗体が分岐GlcNAc構造の増大を示すように糖タンパク質-修飾グリコシルを発現するように改変され、結果として抗体のADCC活性の増大をもたらす細胞株を記載している (Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180もまた参照)。別法としては、抗体のフコース残基がフコシダーゼ酵素を用いて切断され得る (例えば-L-フコシダーゼはフコシル残基を抗体から除去する) (Tarentino et al. (1975) Biochem. 14:5516-23)。203040

【0110】

さらにまたは別法として、シアリル化のレベルが変化された抗体を作製することができる (例えば、Dickey et al. のWO 2007/084926、およびRavetch et al. のWO 2007/055916に記載されており、両者とも引用によりその全般が援用される)。例えば、アルスロバクター・ウレアファシエンス (Arthrobacter ureafacens) シアリダーゼなどのシアリダーゼとの酵素反応を用いてよい。そのような反応の条件は、概して、US5,831,077に記載されており、引用によりその全般が本明細書に援用される。適切な酵素の他の非限定的な例は、ノイラミニダーゼおよびN-グリコシダーゼFであり、各々、Schloemer et al. , J. 50

. Virology, 15(4), 882-893 (1975) および Leibiger et al., Biochem J., 338, 529-538 (1999) に記載されている。脱シリアル化抗体を、アフィニティークロマトグラフィーを用いることによりさらに精製してもよい。別法として、例えばシリルトランスフェラーゼ (sialyltransferase) 酵素を用いることにより、シリル化 (sialylation) のレベルを増大させる方法を用いてもよい。そのような反応の条件は、概して、Basset et al., Scandinavian Journal of Immunology, 51(3), 307 - 311 (2000) に記載されている。

【 0 1 1 1 】

本明細書で用いられる抗体の別の意図的な修飾は、ペグ化である。抗体をペグ化して、抗体の生物学的(例えば、血清)半減期を増大させることができる。抗体をペグ化するためには、典型的には、1つ以上のPEG基が抗体または抗体フラグメントに結合した状態になる条件下において、該抗体またはそのフラグメントをポリエチレングリコール(PEG)(例えば、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体)と反応させる。好ましくは、該ペグ化は、反応性PEG分子(または類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施される。本明細書で用いる用語「ポリエチレングリコール」は、他のタンパク質を誘導体化するのに用いられるPEGの形態のいずれか、例えば、モノ(C1-C10)アルコキシ-もしくはアリールオキシポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール-マレイミドを包含する。ある特定の実施態様において、ペグ化される抗体はアグリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化する方法が当分野において公知である。例えば、Nishimura et al. によるEP 0154316、およびIshikawa et al. によるEP 0401384を参考。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 2 】

抗体の物理的特性

本発明で用いられる抗体は、様々な物理的特性によりキャラクタライズされ得る。

【 0 1 1 3 】

該抗体は、 V_L または V_H のいずれかにおいて1つ以上のグリコシル化部位を有し得て、それによって免疫原性の増大またはpKの変化がもたらされ得る(Marshall et al (1972) Ann u Rev Biochem 41:673-702; Gala and Morrison (2004) J Immunol 172:5489-94; Wallik et al (1988) J Exp Med 168:1099-109; Spiro (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parikh et al (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706)。グリコシル化はN-X-S/T配列を有するモチーフで生じることが知られている。可変領域のグリコシル化は、抗体を切断してFabを作製した後に過ヨウ素酸酸化およびシップ塩基形成を測定するアッセイを用いてグリコシル化を試験する、グライコプロット (Glycoblott) アッセイを用いて試験され得る。別法として、可変領域のグリコシル化は、Fabから糖を切断して单糖にして個々の单糖含量を分析する、ダイオネクス液体クロマトグラフィー (Dionex light chromatography) (Dionex-LC) を用いて試験され得る。場合によっては、可変領域のグリコシル化を含まない抗-RG-1抗体を有することが好ましい。このことは、可変領域にグリコシル化モチーフを含まない抗体を選択することによってか、あるいは標準的な技法を用いてグリコシル化モチーフ内の塩基を変異させることによって、達成することができる。

【 0 1 1 4 】

好ましい実施態様において、本発明の抗体はアスパラギン異性部位を含まない。アスパラギンの脱アミドはN-GまたはD-G配列上で生じ得て、イソアスパラギン酸残基の産生をもたらし、ポリペプチド鎖に捻れを導入してその安定性を低下させる(イソアスパラギン酸効力)。イソアスパラギン酸の存在は、逆相HPLC試験(iso-quantアッセイ)を用いて測定することができる。

【 0 1 1 5 】

各抗体は、特有の等電点(pI)を有するであろう(一般的には6~9.5のpH範囲に収まる)。IgG1抗体のpIは典型的には7~9.5のpH範囲内に收まり、IgG4抗体のpIは典型的には6~8のpH範囲内に收まる。正常範囲外のpIを有する抗体は、in vivo条件下においていくらかのアンフォールディングおよび不安定性を有し得ることが推測される。従って、正常範囲

に収まるpI値を有する抗-メソテリン抗体を有することが好ましい。このことは、正常範囲のpIを有する抗体を選択することによってか、あるいは荷電した表面残基を変異させることによって達成することができる。

【0116】

各抗体は特有の融解温度を有するであろう（より高い融解温度はin vivoにおいてより高い全体的安定性を示す）(Krishnamurthy R and Manning MC (2002) Curr Pharm Biotech 3:361-71)。一般的には、 T_{M1} （初期アンフォールディングの温度）は、60以上、好ましくは65以上、さらにより好ましくは70以上であることが好ましい。抗体の融点は示差走査熱量測定(Chen et al (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) Immunol Lett 68:47-52)、または円偏光二色性(Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sc i 40:343-9)を用いて測定することができる。10

【0117】

好ましい実施態様において、急速に分解しない抗体が選択される。抗-RG-1抗体の断片化は、当分野で十分に理解されているような、キャビラリー電気泳動(CE)およびMALDI-MSを用いて測定され得る(Alexander AJ and Hughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32)。

【0118】

別の好ましい実施態様において、最小の凝集効果を有する抗体が選択され、それは望ましくない免疫応答および/または変化されたかもしくは好ましくない薬物動態学的特性の引き金を導き得る。一般的に、抗体は、25%以下、好ましくは20%以下、さらにより好ましくは15%以下、さらにより好ましくは10%以下、およびさらにより好ましくは5%以下の凝集で許容される。凝集は、サイズ排除カラム(SEC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、および光散乱を含む、いくつかの技法により測定できる。20

【0119】

抗体の改変方法

上記のとおり、公知の V_H および V_L 配列を有する抗-RG-1抗体を用いて、 V_H および/または V_L 配列、あるいはそれに結合する定常領域を修飾することにより、新しい抗-RG-1抗体を作り出すことができる。従って、本発明の別の態様において、公知の抗-RG-1抗体の構造的特徴を用いて、本発明の抗体の少なくとも1つの機能特性（例えば、ヒトRG-1への結合）を保持する、構造的に関連した抗-RG-1抗体が作り出される。例えば、上述のとおり、公知のRG-1抗体の1つ以上のCDR領域もしくはその変異体を、公知のフレームワーク領域および/または他のCDRと組み替えで合わせて、さらなる、組み替えで改変した本発明の抗-RG-1抗体を作り出すことができる。他のタイプの修飾としては、前項に記載のものが挙げられる。改変方法のための出発物質は、本明細書に記載の V_H および/または V_K 配列の1つ以上、またはそれらのCDR領域の1つ以上である。改変抗体を作出するために、公知のRG-1抗体の V_H および/または V_K 配列の1つ以上、またはそれらのCDR領域の1つ以上を有する抗体を実際に調製する（すなわち、タンパク質として発現させる）必要はない。むしろ、配列に含まれる情報を出発物質として用いて、元の配列由来の「第二世代」配列を作り出し、次いで該「第二世代」配列をタンパク質として調製および発現させる。30

【0120】

変異は、ランダムもしくは選択的に、全てもしくは一部の抗-RG-1抗体コード配列を導入することができ、得られた修飾抗-RG-1抗体は、結合活性および/または本明細書に記載の他の機能特性についてスクリーニングされ得る。変異方法は当分野で記載されている。例えば、ShortによるWO 02/092780は、飽和変異誘発、合成ライゲーションアセンブリー(synthetic ligation assembly)、またはその組み合わせを用いた、抗体変異の作出およびスクリーニング方法を記載する。別法として、Lazar et al.によるWO 03/074679は、コンピューターによるスクリーニング方法を用いて抗体の生理化学的特性を最適化する方法を記載している。40

【0121】

抗体フラグメントおよび抗体模倣体

本発明の複合体は、RG-1結合成分としての従来の抗体に限定されず、抗体フラグメント

10

20

30

40

50

および抗体模倣体の使用を通して実用可能である。様々な抗体フラグメントおよび抗体模倣技術が開発され、当分野で広く知られている。

【0122】

ドメイン抗体(dAb)は、抗体の最小の機能的結合ユニット(functional binding unit)-分子量約13 kDa-であり、抗体の重鎖(VH)または軽鎖(VL)のいずれかの可変領域に対応する。ドメイン抗体およびその製造方法についてのさらなる詳細は、US 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; および6,696,245; US 2004/0110941; EP 1433846、0368684および0616640; WO 2005/035572、2004/101790、2004/081026、2004/058821、2004/003019および2003/002609に記載されており、その各々は引用によりその全般が本明細書に援用される。

10

【0123】

ナノボディは、天然の重鎖抗体の特有の構造特性および機能特性を有する抗体由来のタンパク質である。これらの重鎖抗体は、単一の可変ドメイン(VHH)および2つの定常ドメイン(CH₂およびCH₃)を有する。重要なことには、クローニングされて単離されたVHHドメインは、元の重鎖抗体の完全な抗原結合能力を有する安定なポリペプチドである。ナノボディはヒト抗体のVHドメインと高い相同意を有し、活性のいずれの損失も伴うことなくさらにヒト化され得る。重要なことには、ナノボディは低い免疫原性を有する。

【0124】

ナノボディは、従来の抗体の利点と小分子薬物の重要な特徴とを組み合わせる。従来の抗体と同様に、ナノボディは、高い標的特異性および高い親和性ならびに低い固有の毒性を示す。さらに、ナノボディは極めて安定であり、注入以外の方法により投与することができ(例えば、WO 2004/041867を参照)、製造が容易である。ナノボディの他の利点としては、その小さいサイズに起因する稀であるかまたは隠れたエピトープの認識、それら特有の3-次元の薬物形態の柔軟性に起因するタンパク質標的の空洞または活性部位への高親和性および選択的な結合、半減期の調整、ならびに薬物発見の容易さおよび速度が挙げられる。

20

【0125】

ナノボディは単一の遺伝子によってコードされており、ほとんど全ての原核生物宿主および真核生物宿主、例えば、大腸菌(例えば、引用によりその全般が本明細書に援用されるUS 6,765,087を参照)、カビ(例えば、アスペルギルスまたはトリコデルマ)および酵母(例えば、サッカロマイセス、クリベロマイセス、ハンゼヌラまたはビキア)(例えば、引用によりその全般が本明細書に援用されるUS 6,838,254を参照)において効率的に産生される。

30

【0126】

ナノクローン(Nanoclone)法(例えば、引用によりその全般が本明細書に援用されるWO 06/079372を参照)により、B-細胞の自動化ハイスクループット選別に基づいて、目的の標的に対するナノボディが得られ、本発明に関連して用いられ得る。

【0127】

ユニボディ(UniBody)は、IgG4抗体のヒンジ領域の除去に基づく、別の抗体フラグメント技術である。ヒンジ領域の除去により、従来のIgG4抗体の本質的に半分のサイズであって、2価の結合領域よりむしろ1価の結合領域を有する分子が得られる。さらに、ユニボディはおよそより小さいので、より大きな固形腫瘍全体によりよく分布し、有利な効果の可能性を示し得る。ユニボディに関するさらなる詳細はWO 2007/059782を参照することにより得られ、それは引用によりその全般が援用される。

40

【0128】

アフィボディ分子は、ブドウ球菌プロテインAの3つのヘリックスバンドルIgG-結合ドメイン由来の58-アミノ酸残基タンパク質ドメインに基づく親和性タンパク質である。このドメインはコンビナトリアルファージミドライブラーの構築のための骨格として用いられており、そこからファージディスプレイ技術を用いて目的の分子を標的にするアフィボディ変異体が選択され得る(Nord et al., Nat Biotechnol 1997;15:772-7; Ronmark et

50

al., Eur J Biochem 2002;269:2647-55)。アフィボディ分子は、その単純で強固な構造および低い分子量(6 kDa)によって、様々な用途(例えば検出試薬および受容体相互作用の阻害剤)に適している。アフィボディに関するさらなる詳細はUS 5,831,012に記載されており、それは引用によりその全般が援用される。標識アフィボディはまた、アイソフォームの存在量の決定のためのイメージング用途においても有用である。

【0129】

DARPin(設計アンキリン反復タンパク質(Designed Ankyrin Repeat Protein))は、非抗体ポリペプチドの結合能を開発利用するDRP(設計反復タンパク質(Designed Repeat Protein))抗体模倣技術の具体例である。反復タンパク質、例えばアンキリンおよびロイシン-リッチな反復タンパク質は、抗体とは異なり、細胞内および細胞外で生じる偏在性の結合分子である。それらの特有のモジュール構造は、共に積み重なって可変性を示す伸長された反復ドメインおよびモジュール標的結合表面を形成する、構造単位を繰り返すこと(反復)を特徴とする。このモジュール性に基づいて、高度に多様化された結合特異性を有するポリペプチドのコンビナトリアルライブラリが形成され得る。この方策には、可変表面残基および反復ドメインへのそのランダムなアセンブリーを提示する自家和合性反復の共通設計が含まれる。DARPinおよび他のDRP技術に関するさらなる情報は、US 2004/0132028およびWO 02/20565中に見いだすことができ、その両方とも引用により援用される。

10

【0130】

アンチカリンは別の抗体模倣技術である。この場合、結合特異性はヒト組織および体液において天然に豊富に発現される低分子量タンパク質のファミリーであるリポカリン由来である。リポカリンは、*in vivo*において、生理学的輸送および化学的感受性もしくは不溶性の化合物の保存に関連する様々な機能を果たすように進化してきた。リポカリンは、タンパク質の一末端で4つのループを支持する高度に保存された-バレルを含有する、強固な固有の構造を有する。これらのループが結合ポケットへの入り口を形成し、分子のこの部分における立体構造上の差違が個々のリポカリン間の結合特異性におけるバリエーションを決定づけている。

20

【0131】

保存された-シートフレームワークにより支持された高頻度可変ループの全体構造はイムノグロブリンを連想させるが、リポカリンはサイズに関して抗体とは大きく異なっていて、160-180のアミノ酸の単一のポリペプチド鎖からなっており、それは単一の免疫グロブリンドメインよりもわずかに大きい。

30

【0132】

リポカリンをクローニングし、それらのループを改変してアンチカリンを作り出すことができる。構造的に多様なアンチカリンのライブラリが作製されており、アンチカリンの提示は、結合機能の選択およびスクリーニング、それに続く原核生物系もしくは真核生物系におけるさらなる分析のための可溶性タンパク質の発現および産生を可能にする。研究により、実質的にいずれのヒト標的タンパク質に特異的なアンチカリンを開発することができ、ナノモル以上の範囲の結合親和性が得られることが証明されている。アンチカリンに関するさらなる情報はUS 7,250,297およびWO 99/16873に見いだすことができ、その両方とも引用によりその全般が本明細書に援用される。

40

【0133】

アビマーは、本発明と関連して有用な別のタイプの抗体模倣技術である。アビマーは、エクソンシャッフリングおよびファージディスプレイにより、大きなヒト細胞外受容体ドメインファミリーから得られ、結合特性および阻害特性を有する多ドメインタンパク質を生成する。複数の独立した結合ドメインの連結により、結合活性が生み出され、それにより従来の单エピトープ結合タンパク質に比べて改善された親和性および特異性がもたらされることが示されている。他の潜在的な利点としては、大腸菌における多標的特異的分子の単純で効率的な产生、改善された熱安定性およびプロテアーゼに対する耐性が挙げられる。ナノモル以下の親和性を有するアビマーが、様々な標的に対して得られている。アビマーに関するさらなる情報はUS 2006/0286603、2006/0234299、2006/0223114、2006/01

50

77831、2006/0008844、2005/0221384、2005/0164301、2005/0089932、2005/0053973、2005/0048512、2004/0175756に見いだすことができ、それら全ては引用によりその全般が本明細書に援用される。

【0134】

ベルサボディは、本発明に関連して有いることができる別の抗体模倣技術である。ベルサボディは、>15%のシスティンを有する3-5 kDaの小さなタンパク質であり、典型的なタンパク質が有する疎水性コアに置き換わる高いジスルフィド密度の骨格を形成する。より小さく、より親水性であり(すなわち、凝集および非特異的結合をする傾向が低い)、プロテアーゼおよび熱に対してより耐性があり、MHC提示に最も貢献する残基が疎水性であることからT-細胞エピトープの密度がより低いタンパク質が、この置換によりもたらされる。これらの特性は免疫原性に影響することがよく知られており、それらはともに免疫原性の大幅な低下をもたらすと予期される。

10

【0135】

ベルサボディの構造を考慮すると、これらの抗体模倣体は、多価、多重特異性、多様な半減期メカニズム、組織ターゲティングモジュールおよび抗体Fc領域の欠損を含む、多用途形式を提示する。さらに、ベルサボディは大腸菌において高収率で製造され、ベルサボディは親水性でサイズが小さいことからそれらは高溶解性であり、高濃度で製剤化され得る。ベルサボディは非常に熱安定であり、有効期間を伸ばす。ベルサボディに関するさらなる情報はUS 2007/0191272に見いだすことができ、それは引用によりその全般が本明細書に援用される。

20

【0136】

抗体フラグメントおよび模倣技術の上述の記載は包括的であることを意図しない。代替ポリペプチドに基づく技術(例えば、Qui et al., *Nature Biotechnology*, 25(8) 921-929 (2007)に概説される相補性決定領域の融合)、ならびに核酸に基づく技術(例えば、US 5,789,157; 5,864,026; 5,712,375; 5,763,566; 6,013,443; 6,376,474; 6,613,526; 6,114,120; 6,261,774; および6,387,620; (その全ては引用により本明細書に援用される)に記載のRNAアプタマー技術を含む、様々にさらなる技術が本発明に関連して用いられる。

20

【0137】

本発明の抗体をコードする核酸分子

30

本発明の別の態様は、本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。該核酸は、ホールセルで、細胞溶解物で、または部分精製形態もしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、他の細胞成分もしくは他の夾雑物(例えば、他の細胞核酸もしくはタンパク質)から、標準的な技法(アルカリ/SDS処理、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動およびその他当分野において周知のものが含まれる)によって精製されて、「単離される」か、または「実質的に純粋にされる」。F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New Yorkを参照。本発明の核酸は、例えば、DNAまたはRNAであることができ、イントロン配列を有しても有さなくてもよい。好ましい実施態様において、該核酸はcDNA分子である。

40

【0138】

該核酸は、標準的な分子生物学的技法を用いて得ることができる。ハイブリドーマ(例えば、以下に記載の、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスから調製したハイブリドーマ)により発現される抗体について、ハイブリドーマにより作製される抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAは、標準的なPCR増幅もしくはcDNAクローニング技法により得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライプラリから得られる抗体(例えば、ファージディスプレイ技法を用いて)について、抗体をコードする核酸は該ライプラリから回収することができる。

【0139】

好ましい核酸は、19G9もしくは34E1モノクローナル抗体のV_HおよびV_L配列をコードする

50

ものである。19G9および34E1のV_H配列をコードするDNA配列は、各々、配列番号：17-18で示される。19G9および34E1のV_L配列をコードするDNA配列は、各々、配列番号：19-20で示される。

【0140】

V_HおよびV_LセグメントをコードするDNAフラグメントが得られたところで、それらを標準的な組換えDNA技法により操作して、例えば、可変領域遺伝子を、全長抗体鎖遺伝子、Fabフラグメント遺伝子、またはscFv遺伝子に変換することができる。これらの操作において、V_L-もしくはV_H-コードDNAフラグメントは、別のタンパク質（例えば抗体定常領域または可動性リンカー）をコードする別のDNAフラグメントに作動可能に連結される。この文脈で用いられる用語「作動可能に連結した」とは、それによりコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように2つのDNAフラグメントが結合していることを意味する。

10

【0141】

V_H-コードDNAを、重鎖定常領域C_H1、C_H2およびC_H3をコードする別のDNA分子に作動可能に連結することにより、V_H領域をコードする単離されたDNAを全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は当分野で公知であり（例えば、Kabat '3242参照）、それらを包含するDNAフラグメントはPCR增幅により得ることができる。該重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgMまたはIgD定常領域であることができるが、最も好ましくはIgG1またはIgG4定常領域である。Fabフラグメント重鎖遺伝子について、該V_H-コードDNAは、重鎖C_H1定常領域のみをコードするDNAに作動可能に連結することができる。

20

【0142】

V_L-コードDNAを、軽鎖定常領域C_Lをコードする別のDNA分子に作動可能に連結することにより、V_L領域をコードする単離されたDNAを全長軽鎖遺伝子（ならびにFab軽鎖遺伝子）に変換することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当分野で公知であり（例えば、Kabat '3242参照）、それらを包含するDNAフラグメントはPCR增幅により得ることができる。好ましい実施態様において、該軽鎖定常領域は または 定常領域であり得る。

20

【0143】

scFv遺伝子の作製のため、V_H-およびV_L-コードDNAフラグメントを、可動性リンカーをコードする別のフラグメント、例えばアミノ酸配列(Gly₄-Ser)₃をコードする別のフラグメントに作動可能に連結させることにより、V_HおよびV_L配列は、可動性リンカーにより結合されたV_LおよびV_H領域を有する、近接する1本鎖タンパク質として発現され得る（例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554を参照）。

30

【0144】

モノクローナル抗体の產生

本発明において用いるモノクローナル抗体(mAb)は、様々な技法（従来のモノクローナル抗体方法、例えば、Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495の体細胞ハイブリダイゼーション法が含まれる）により製造することができる。体細胞ハイブリダイゼーション法が好ましいけれども、原理上は他の技法、例えば、Bリンパ球のウイルス性形質転換もしくは癌化を用いることができる。

40

【0145】

ハイブリドーマの調製に好ましい動物系はマウス系である。マウスにおけるハイブリドーマの產生は極めて十分に確立された方法である。融合用の免疫化脾細胞を単離するための免疫化方法および技法が当分野において公知である。融合パートナー（例えば、マウスマエローマ細胞）および融合方法もまた公知である。

【0146】

キメラまたはヒト化抗体は、上記のとおり調製された非-ヒトモノクローナル抗体の配列に基づいて調製され得る。重鎖および軽鎖イムノグロブリンをコードするDNAは、目的の非-ヒトハイブリドーマから得ることができ、標準的な分子生物学的技法を用いて、非-

50

マウス(例えば、ヒト)免疫グロブリン配列を含むように改変され得る。例えば、キメラ抗体を作製するために、当分野で公知の方法を用いて、マウス可変領域をヒト定常領域に連結することができる(例えば、Cabilly et al. のUS 4,816,567を参照)。ヒト化抗体を作製するために、当分野で公知の方法を用いて、マウスCDR領域をヒトフレームワークに挿入することができる(例えば、WinterのUS 5,225,539、ならびにQueen et al. のUS 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762および6,180,370を参照)。

【 0 1 4 7 】

好ましくは、本発明の抗体はヒトモノクローナル抗体である。RG-1に対するヒトモノクローナル抗体は、マウス免疫系よりむしろヒト免疫系の各部を保有するトランスジェニックもしくはトランス染色体(transchromosomal)マウスを用いて、得ることができる。これらのトランスジェニックおよびトランス染色体マウスには、本明細書において、各々、HuMAbマウス(登録商標)およびKMマウス(登録商標)型または系統のマウスと称されるマウスが含まれ、本明細書においてはまとめて「ヒトIgマウス」と称する。

【 0 1 4 8 】

HuMAbマウス(登録商標)系統(Medarex(登録商標), Inc.)は、再配列していないヒト重鎖(μおよび)および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を、内在性μおよび鎖遺伝子座を不活性化する標的変異とともに有する(例えば、Lonberg et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859を参照)。従って、該マウスは、マウスIgMまたはの発現低下を示し、免疫化に反応して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチおよび体細胞変異を経て高親和性ヒトIgGモノクローナル抗体を産生する(Lonberg et al. (1994), 上記; Lonberg (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg and Huszar (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93、およびHarding and Lonberg (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546に概説)。HuMAbマウス(登録商標)系統のマウスの作製および使用、ならびにそのようなマウスが保有するゲノム修飾は、Taylor et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailion et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen et al. (1993) *EMBO J.* 12: 82**30; Tuailion et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; および、Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851にさらに記載されており、その全ての内容はその全般が引用により本明細書に具体的に援用される。さらに、Lonberg and KayのUS 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; および5,770,429; Surani et al. のUS 5,545,807; Lonberg and KayのWO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884およびWO 99/45962; ならびにKorman et al. のWO 01/14424を参照。

【 0 1 4 9 】

別の実施態様において、ヒト抗体は、導入遺伝子およびトランス染色体(例えば、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖トランス染色体)上にヒト免疫グロブリン配列を保有するマウスを用いて得ることができる。そのようなマウスは本明細書において「KMマウス(登録商標)」型であると称され、Ishida et al. のWO 02/43478に詳述されている。

【 0 1 5 0 】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する別のトランスジェニック動物系が当分野で利用可能であり、それを用いて本発明の抗-RG-1抗体を産生させることができる。例えば、Xenomouse(Abgenix, Inc.)と称される別のトランスジェニック系を用いることができる; そのようなマウスは、例えば、Kucherlapati et al. のUS 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584および6,162,963に記載されている。

【 0 1 5 1 】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する別のトランス染色体動物系が当分野において利用可能であり、それを用いて本発明の抗-RG-1抗体を産生させることができる。例えば、「TCマウス」と称される、ヒト重鎖トランス染色体およびヒト軽鎖トランス染色体

10

20

30

40

50

の両方を保有するマウスを用いることができ；そのようなマウスはTomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727に記載されている。さらに、ヒト重鎖および軽鎖トランス染色体を保有するウシが、当分野(Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894)およびWO 2002/092812に記載されており、それを用いて本発明の抗-RG-1抗体を作製することができる。

【0152】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を用いて製造することができる。例えば：Ladner et al. のUS 5,223,409; 5,403,484; および5,571,698; Dower et al. のUS 5,427,908および5,580,717; McCafferty et al. のUS 5,969,108および6,172,197;ならびにGriffiths et al. のUS 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915および6,593,081を参照。

10

【0153】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、免疫するとヒト抗体反応を生じることができるようにヒト免疫細胞を再構成したSCIDマウスを用いて製造することができる。そのようなマウスは、例えば、Wilson et al. のUS 5,476,996および5,698,767に記載されている。

【0154】

ヒトIgマウスの免疫化

ヒトIgマウスを用いてヒト抗体を産生させる場合、Lonberg et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; ならびにWO 98/24884およびWO 01/14424に記載のとおり、精製または濃縮したRG-1抗原および/または組換えRG-1調製物か、またはRG-1を発現する細胞、あるいはRG-1融合タンパク質を用いて、それらを免疫化することができる。好ましくは、初回注入時に6-16週齢である。例えば、精製もしくは組換えRG-1抗原調製物(5-50 μg)を用いて、ヒトIgマウスに、腹腔内に免疫することができる。

20

【0155】

様々な抗原を用いた累積実験により、トランスジェニックマウスは、最初に完全フロイントアジュバント中の抗原を用いて腹腔内に(IP)免疫し、その後不完全フロイントアジュバント中の抗原を用いて隔週でIP免疫(計6まで)した場合に、応答することが示されている。しかしながら、フロイント以外のアジュバントもまた有効であることが分かっている。加えて、アジュバント非存在下のホールセルは高い免疫原性であることが分かっている。該免疫応答は、後眼窩採血によって得た血漿サンプルを用いる一連の免疫化プロトコールを通してモニターすることができる。血漿はELISAによりスクリーニングすることができる、十分な力値の抗-RG-1ヒト免疫グロブリンを有するマウスを融合に用いることができる。マウスは、屠殺および脾臓摘出の3日前に抗原を静脈内に追加免疫され得る。各免疫化に対して2-3融合が必要とされ得ると予想される。典型的には、各抗原について6から24匹のマウスを免疫化する。通常はHCo7とHCo12系統の両方を用いる。さらに、HCo7とHCo12導入遺伝子の両方と一緒に、2つの異なるヒト重鎖導入遺伝子(HCo7/HCo12)を有する単一のマウスに育種することができる。別法としてまたはさらに、KMマウス(登録商標)系統を用いることができる。

30

【0156】

ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するために、免疫化マウスからの脾細胞および/またはリンパ節細胞を単離し、適当な不死化細胞株(例えばマウスマイエローマ細胞株)に融合することができる。得られたハイブリドーマを抗原-特異的抗体の産生についてスクリーニングすることができる。例えば、免疫化マウスからの脾臓リンパ球の単一細胞懸濁液を、P3X63-Ag8.653非分泌性マウスマイエローマ細胞(ATCC, CRL 1580)の数の6分の1に、50% PEGを用いて融合させることができる。別法として、免疫化マウスからの脾臓のリンパ球の単一細胞懸濁液を、CytoPulse大型チャンバー細胞融合エレクトロポレーター(CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie Maryland)を用いて、電界に

40

50

基づく電気融合法により、融合することができる。細胞を、約 2×10^5 で、平底マイクロタイタープレートに蒔いた後、20%のfetal Clone血清、18%の“653”条件培地、5%のοrigen(IGEN)、4 mMのL-グルタミン、1 mMのピルビン酸ナトリウム、5mMのHEPES、0.055 mMの2-メルカプトエタノール、50 単位/mlのペニシリン、50 mg/mlのストレプトマイシン、50 mg/mlのゲンタマイシンおよび1X HAT(Sigma; 該HATは融合の24時間後に添加する)を含有する選択培地中において、2週間培養した。約2週間後、細胞はHATがHTで置換されている培地中で培養され得る。その後、個々のウェルを、ヒトモノクローナルIgMおよびIgG抗体について、ELISAによりスクリーニングすることができる。大規模なハイブリドーマ増殖が生じた後、通常10-14日後に、培地が観察され得る。抗体分泌性ハイブリドーマを再播種し、再度スクリーニングし、ヒトIgGについて依然として陽性である場合、該モノクローナル抗体を少なくとも2回、限界希釀によりサブクローニングすることができる。次いで、キャラクタライズのため、安定なサブクローンをin vitroで培養して組織培地中に少量の抗体を產生させることができる。

10

【0157】

ヒトモノクローナル抗体の精製のため、選択したハイブリドーマはモノクローナル抗体精製用の2Lのスピナーフラスコ中で増殖され得る。上清を濾過して濃縮した後、プロテインA-セファロース(Pharmacia, Piscataway, N.J.)を用いたアフィニティークロマトグラフィーで処理することができる。溶離されたIgGは、ゲル電気泳動法および高速液体クロマトグラフィーによって検査することにより純度を確かめることができる。該緩衝液をPBSに交換し、吸光係数1.43を用いてOD280により、濃度を決定することができる。該モノクローナル抗体は、アリコートにして-80°で保存することができる。

20

【0158】

モノクローナル抗体を產生するトランスフェクトーマの作製

本発明で用いる抗体はまた、例えば、組換えDNA技法と遺伝子導入方法の組み合わせを用いて、宿主細胞トランスフェクトーマにおいても產生され得る(例えば、Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。

30

【0159】

部分または全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAを標準的な技法(例えば、目的の抗体を発現するハイブリドーマを用いたPCR增幅またはcDNAクローニング)により得ることができ、該DNAを転写および翻訳制御配列に作動可能に連結するように発現ベクターに挿入し、抗体またはその抗体フラグメントを発現させる。用語「作動可能に連結した」とは、ベクター内の転写および翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を制御するそれらの所望の機能を保持するように、ベクターに連結されていることを意味する。該発現ベクターおよび発現制御配列は、用いる発現宿主細胞に適合するように選択される。該抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は別個のベクターに挿入され得るか、または、より典型的には、両方の遺伝子は同一の発現ベクターに挿入される。該抗体遺伝子は、標準的な方法(例えば、抗体遺伝子フラグメントおよびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または、制限部位が存在しない場合には平滑末端ライゲーション)によって、発現ベクターに挿入される。本明細書に記載の抗体のV_LおよびV_Hを用いて、V_Hセグメントがベクター内のC_Hセグメントに作動可能に連結され、V_Lセグメントがベクター内のC_Lセグメントに作動可能に連結されるように、それらを目的のアイソタイプの重鎖定常領域および軽鎖定常領域をすでにコードする発現ベクターに挿入することによって、いずれの抗体アイソタイプの全長抗体遺伝子を作製することができる。さらにまたは別法として、該組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードし得る。該抗体鎖遺伝子を、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、ベクターにクローニングすることができる。該シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド(すなわち、非-免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド)であり得る。

40

【0160】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞において抗体鎖遺伝

50

子の発現を制御する制御配列を保有する。用語「制御配列」は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御する、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御因子(例えば、ポリアルデニル化シグナル)を含むことを意図する。そのような制御配列は、例えば、Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))に記載されている。発現ベクターの設計(制御配列の選択を含む)は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質発現レベルなどの要素に依存しうることが、当業者には理解されるであろう。哺乳動物の宿主細胞発現の好ましい制御配列には、哺乳動物細胞において高レベルのタンパク質発現を誘導するウイルス性要素、例えばサイトメガロウイルス(CMV)、サルウイルス40(SV40)、アデノウイルス由来のプロモーターおよび/またはエンハンサー(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))ならびにポリオーマが含まれる。別法として、非ウイルス性制御配列、例えばユビキチンプロモーターまたは-グロビンプロモーター、を用いてもよい。さらに、制御要素は異なる源(例えばSRプロモーター系)由来の配列から成り、それはSV40初期プロモーターおよびヒトT細胞白血病ウイルス1型の末端反復配列からの配列を含む(Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

10

【0161】

本発明の組換え発現ベクターは、抗体鎖遺伝子および制御配列に加えて、さらなる配列、例えば宿主細胞においてベクターの複製を制御する配列(例えば、複製開始点)、および選択マーカー遺伝子を保有し得る。該選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を促進する(例えば、US 4,399,216、4,634,665および5,179,017(全てAxe I et al.による)を参照)。例えば典型的には、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞に、薬物(例えばG418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサート)に対する耐性を与える。好ましい選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子(メトトレキサート選択/增幅によるdhfr⁻宿主細胞における使用のため)およびネオ遺伝子(G418選択のため)が含まれる。

20

【0162】

軽鎖および重鎖の発現のため、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターを宿主細胞にトランスフェクトする。様々な形態の用語「トランスフェクション」は、原核もしくは真核宿主細胞への外因性DNAの導入に共通して用いられる様々な技法(例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントransフェクションなど)を包含することを意図する。原核もしくは真核宿主細胞のいずれかにおいて本発明の抗体を発現させることは論理的には可能であるけれども、真核細胞(とりわけ哺乳動物細胞)は、正確に折りたたまれており免疫学的に活性な抗体の構築および分泌する可能性が高いので、真核細胞(最も好ましくは哺乳動物宿主細胞)における抗体の発現が最も好ましい。抗体遺伝子の原核生物での発現は活性抗体の高収率の产生に効果がないことが報告されている(Boss and Wood (1985) Immunology Today 6:12-13)。

30

【0163】

本発明の組換え抗体の発現のための好ましい哺乳動物宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(DHFR選択マーカー、例えばKaufman and Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621に記載のものと共に用いる、Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載のdhfr⁻CHO細胞が含まれる)、NSOミエローマ細胞、COS細胞およびSP2細胞が挙げられる。NSOミエローマ細胞とともに用いる場合、好ましい発現系はWO 87/04462(Wilson所有)、WO 89/01036(Bebbington所有)およびEP 338,841(Bebbington所有)に記載のGS遺伝子発現系である。抗体遺伝子を発現する組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入される場合、該抗体は、宿主細胞中で抗体が発現されるのに十分な時間、より好ましくは宿主細胞が増殖している培地へ抗体が分泌されるのに十分な時間、培養することによって產生される。標準的なタンパク質精製方法を用いて、培地から抗体を回収することができる。

40

【0164】

抗原に結合する抗体のキャラクタライズ

50

標準的なELISAにより、RG-1への結合について抗体を試験することができる。手短に説明すると、マイクロタイタープレートを、PBS中に0.25 μg/mlの精製RG-1を用いてコーティングし、次いで、5%ウシ血清アルブミン/PBSでブロッキングする。抗体の希釈物(例えば、RG-1-免疫化マウス由来の血漿の希釈物)を各ウェルに添加し、1-2時間、37℃でインキュベートする。該プレートをPBS/Tweenで洗浄した後、アルカリホスファターゼに結合した二次試薬(例えば、ヒト抗体に対しては、ヤギ-抗-ヒトIgG Fc-特異的ポリクローナル試薬)とともに、37℃で1時間インキュベートする。洗浄後、該プレートをpNPP基質(1 mg/ml)で発色させ、OD 405-650で分析する。好ましくは、最も高い力値を產生するマウスが融合に用いられ得る。

【0165】

10

上記のELISAアッセイを用いて、RG-1免疫原と陽性の反応性を示すハイブリドーマについてスクリーニングすることもできる。高い結合活性でRG-1に結合するハイブリドーマをサブクローニングしてさらにキャラクタライズする。親細胞の反応性を保持する(ELISAによる)各ハイブリドーマから1クローンを、-140℃で保存される5-10の細胞バンクの作製、および抗体精製のために選択することができる。

【0166】

抗-RG-1抗体の精製のため、選択されたハイブリドーマはモノクローナル抗体精製用の2Lのスピナーフラスコ中で増殖され得る。上清を濾過して濃縮した後、プロテインA-セファロースを用いたアフィニティクロマトグラフィーで処理することができる(Pharmacia, Piscataway, NJ)。溶離されたIgGは、ゲル電気泳動法および高速液体クロマトグラフィーによって検査することにより、純度を確かめることができる。該緩衝液をPBSに交換し、吸光係数1.43を用いてOD280により、濃度を決定することができる。モノクローナル抗体は、アリコートにして、-80℃で保存することができる。

20

【0167】

選択された抗-RG-1モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかどうかを決定するため、市販の試薬を用いて抗体をビオチン化することができる(Pierce, Rockford, IL)。RG-1コート-ELISAプレートを用いて、未標識のモノクローナル抗体とビオチン化モノクローナル抗体を用いた競合試験を実施することができる。ビオチン化mAbの結合は、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼプローブを用いて検出することができる。

30

【0168】

特定のアイソタイプの抗体に特異的な試薬を用いてアイソタイプELISAを実施し、精製抗体のアイソタイプを決定することができる。例えば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを決定するために、1 μg/mlの抗-ヒト免疫グロブリンを用いて4℃で終夜、マイクロタイタープレートのウェルをコーティングすることができる。1% BSAでブロッキングした後、周囲温度で1から2時間、該プレートを1 μg/ml以下の試験モノクローナル抗体または精製アイソタイプコントロールと反応させる。その後、該ウェルをヒトIgG1またはヒトIgM-特異的アルカリホスファターゼ-結合プローブのいずれかと反応させることができる。プレートを上記の通り発色させて分析する。

【0169】

40

抗-RG-1ヒトIgGを、ウエスタンプロットにより、RG-1抗原との反応性についてさらに試験することができる。手短に説明すると、RG-1を調製してドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法で処理する。次いで、分離した抗原をニトロセルロース膜に移し、10%ウシ胎仔血清でブロッキングし、試験するモノクローナル抗体でプローブする。ヒトIgGの結合は、抗-ヒトIgGアルカリホスファターゼを用いて検出し、BCIP/NBT基質錠剤を用いて発色させることができる(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.)。

【0170】

50

本発明の抗体の結合特異性はまた、RG-1を発現する細胞への抗体の結合をモニターすることにより(例えばフローサイトメトリーにより)決定され得る。典型的には、RG-1の膜貫通型をコードする発現ベクターを用いて、細胞株(例えばCHO細胞株)をトランスフェクトしてもよい。トランスフェクトされたタンパク質は、タグに対する抗体を用いた検出

のため、好ましくはN-末端にタグ（例えばmyc-タグ）を有していてよい。RG-1に対する本発明の抗体の結合を、抗体でトランスフェクトされた細胞をインキュベートし、結合抗体を検出することにより、決定してもよい。トランスフェクトされたタンパク質上のタグへの抗体の結合を、陽性コントロールとして用いてもよい。

【0171】

抗体が他のタンパク質（例えば、PROTEIN YまたはRG-1）に結合するか否かを、RG-1への結合の決定と同様の方法を用いて決定することによって、RG-1に対する本発明の抗体の特異性をさらに試験してもよい。

【0172】

二重特異性分子

複合体の抗体部分は二重特異性分子であり得る。抗-RG-1抗体またはそのフラグメントを、別の機能分子、例えば、別のペプチドもしくはタンパク質（例えば、別の抗体もしくは受容体に対するリガンド）を用いて誘導体化するか、あるいはそれに連結して、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子を作製することができる。実際のところ該抗体を2つ以上の他の機能分子に誘導体化するかまたは連結させて、3つ以上の異なる結合部位および/または標的分子に結合する多重特異的分子を作製してもよく；そのような多重特異的分子はまた、本明細書で用いられる用語「二重特異性分子」によって包含されると意図される。二重特異性分子を作出するために、抗体を、1つ以上の他の結合分子、例えば別の抗体、抗体フラグメント、ペプチドもしくは結合模倣体に、二重特異性分子が得られるように機能的に連結させる（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合性会合もしくはその他により）ことができる。

10

20

30

40

【0173】

該二重特異性分子は、少なくとも1つのRG-1に対する第1の結合特異性および、Fc受容体（例えば、ヒトFc RI(CD64)またはヒトFc 受容体(CD89)）などの第2の標的エピトープに対する第2の結合特異性を含有する。Fc R発現エフェクター細胞もしくはFc R発現エフェクター細胞（例えば、単球、マクロファージまたは多形核細胞(PMN)）、およびRG-1を発現する細胞の両方に結合する能力のある、かかる二重特異性分子。これらの二重特異性分子は、エフェクター細胞に対するRG-1発現細胞を標的とし、Fc受容体-媒介エフェクター細胞活性（例えば、RG-1発現細胞の食作用、抗体依存性細胞-媒介細胞毒素性(ADCC)、サイトカイン放出、またはスーパーオキシドアニオンの生成）を誘発する。

【0174】

二重特異性分子は、実際には多重特異的であることができ、すなわち、抗-Fc結合特異性および抗-RG-1結合特異性に加えて第3の結合特異性をさらに含むことができる。一実施態様において、該第3の結合特異性は、抗-増強因子（enhancement factor）(EF)部分、例えば、細胞傷害活性に関する表面タンパク質に結合することによって標的細胞に対する免疫応答を増大させる分子である。該「抗-増強因子部分」は、所定の分子（例えば、抗原または受容体）に結合してそれによりFc受容体または標的細胞抗原に対する結合決定因子の効力を高める、抗体、機能的抗体フラグメントまたはリガンドであり得る。該「抗-増強因子部分」は、Fc受容体または標的細胞抗原か、あるいは第1および第2の結合特異性が結合するものとは異なるものに結合することができる。例えば、該抗-増強因子部分は、細胞傷害性T-細胞（例えば、標的細胞に対する免疫応答を増大させるCD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1または他の免疫細胞を介して）を結合することができる。

【0175】

一実施態様において、本発明の二重特異性分子は、結合特異性として、少なくとも1つの抗体またはその抗体フラグメント（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、dAbまたは单鎖Fvが含まれる）を含有する。該抗体はまた、軽鎖もしくは重鎖二量体、またはそのいずれの最小フラグメント（例えば、Ladner et al.のUS 4,946,778（その内容は引用により明示的に援用される）に記載のFvもしくは单鎖コンストラクト）であってもよい。

【0176】

一実施態様において、Fc 受容体についての結合特異性はモノクローナル抗体により得

50

られ、その結合はヒト免疫グロブリンG(IgG)によって遮断されない。本明細書で用いる用語「IgG受容体」とは、染色体1上に位置する8つの-鎖遺伝子のうちのいずれかを言う。これらの遺伝子は、3つのFc受容体クラス: Fc RI(CD64)、Fc RII(CD32)、およびFc RIII(CD16)にグループ化される、計12の膜貫通または可溶性受容体アイソフォームをコードする。1つの好ましい実施態様において、該Fc受容体はヒト高親和性Fc RIである。該ヒトFc RIは72 kDaの分子であり、単量体IgGに対する高親和性を示す(10^8 - 10^9 M $^{-1}$)。

【0177】

抗-Fcモノクローナル抗体の產生およびキャラクタライズはFanger et al.のWO 88/00052およびUS 4,954,617に記載されており、それらは引用により全てが本明細書に援用される。これらの抗体は、受容体のFc結合部位とは異なる部位で、Fc RI、Fc RIIまたはFc RIIIのエピトープに結合し、それ故に、それらの結合は生理学的濃度のIgGにより実質的には遮断されない。本発明において有用な具体的な抗-Fc RI抗体は、mAb22、mAb32、mAb44、mAb62およびmAb197である。mAb32を產生するハイブリドーマは、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関から入手可能で、ATCC寄託番号 HB9469である。他の実施態様において、該抗-Fc受容体抗体はモノクローナル抗体22(H22)のヒト化形態である。H22抗体の產生およびキャラクタライズは、Graziano et al. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002およびTempest et al.のWO 94/10332に記載されている。H22抗体產生細胞株はHA022CL1の称号の下でアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関に寄託されており、寄託番号 CR L 11177を有する。

10

20

30

【0178】

さらに他の好ましい実施態様において、Fc受容体に対する結合特異性は、ヒトIgA受容体、例えば、Fc-受容体(Fc RI (CD89))に結合する抗体により得られ、その結合は好ましくはヒト免疫グロブリンA(IgA)によって遮断されない。用語「IgA受容体」は、染色体19上に位置する1つの-遺伝子(Fc RI)の遺伝子産物を含むことを意図する。この遺伝子は、55から110 kDaのいくつかの、選択的スプライスによる(alternatively spliced)膜貫通アイソフォームをコードすると知られている。Fc RI(CD89)は、非-エフェクター細胞集団上では発現されないが、単球/マクロファージ、好酸性および好中性の顆粒球上では恒常的に発現される。Fc RIは、IgA1とIgA2の両方に対して中程度の親和性(5×10^7 M $^{-1}$)を有し、それはサイトカイン(例えばG-CSFまたはGM-CSF)に曝露すると増大される(Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440)。IgAリガンド結合ドメインの外部のFc RIを結合する、A3、A59、A62およびA77として同定された4つのFc RI-特異的モノクローナル抗体が記載されている(Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764)。

40

50

【0179】

Fc RIおよびFc RIは、(1)主に、免疫エフェクター細胞、例えば、単球、PMN、マクロファージおよび樹状細胞上で発現され；(2)高レベル(例えば、5,000-100,000/細胞)で発現され；(3)細胞毒素性活性(例えば、ADCC、食作用)のメディエーターであり；そして、(4)それらを標的とする抗原(自己抗原を含む)の抗原提示の増強を媒介することから、本発明の二重特異性分子において用いるために好ましい誘発受容体(trigger receptor)である。

【0180】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、一方で、他の抗体を本発明の二重特異性分子において用いることができ、それは、マウスの、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体である。

【0181】

当分野で公知の方法を用いて、構成成分の結合特異性(例えば、抗-FcRおよび抗-RG-1結合特異性)を結合させることにより、二重特異性分子を調製することができる。例えば、二重特異性分子の各結合特異性を別々に得た後で、それらを互いに結合させることができる。該結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合、様々なカップリング剤また

50

は架橋結合剤を共有結合に用いることができる。架橋結合剤の例としては、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、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)、および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(sulfo-SMCC)が挙げられる(例えば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照)。他の方法としては、Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:8**3、およびGlennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375に記載のものが挙げられる。好ましい結合剤(conjugating agent)はSATAおよびsulfo-SMCCであり、両方ともPierce Chemical Co. (Rockford, IL)から入手できる。

10

【0182】

該結合特異性が抗体である場合、2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介して、それらを結合させることができる。とりわけ好ましい実施態様において、該ヒンジ領域は、奇数の数のスルフヒドリル残基(好ましくは1つ)を含むように修飾され、その後、結合される。

【0183】

別法として、両方の結合特異性を、同一のベクター中でコードし、同一の宿主細胞中で発現および構築することができる。この方法は、二重特異性分子がmAb × mAb、mAb × Fab、Fab × F(ab')₂、またはリガンド × Fab 融合タンパク質である場合においてとりわけ有用である。本発明の二重特異性分子は、1つの単鎖抗体および結合決定因子を含有する単鎖分子、または2つの結合決定因子を含有する単鎖二重特異性分子であり得る。二重特異性分子は少なくとも2つの単鎖分子を含有してよい。二重特異性分子の調製方法は、例えば、US 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; および5,482,858(その全てが引用により本明細書に援用される)に記載されている。

20

【0184】

二重特異性分子の特異的な標的に対するその結合は、例えば、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、FACS分析、バイオアッセイ(例えば、増殖阻害)、またはウエスタンプロットアッセイにより確認することができる。これらのアッセイの各々は通常、目的の複合体に対して特異的な標識試薬(例えば、抗体)を用いることによって、特定の目的のタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。例えばFcR-抗体複合体は、例えば、抗体-FcR複合体を認識して特異的に結合する酵素-結合抗体もしくは抗体フラグメントを用いて、検出され得る。別法として、様々な他のイムノアッセイのいずれかを用いて該複合体を検出することができる。例えば、該抗体を放射活性物質で標識し、ラジオイムノアッセイ(RIA)に用いることができる(例えば、参照により本明細書に援用されるWeintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照)。該放射性同位元素は、カウンターもしくはシンチレーションカウンターの使用といった方法、またはオートラジオグラフィーにより検出され得る。

30

【0185】

複合体

本発明の複合体において、パートナー分子は、化学リンカー(本明細書ではしばしば単に「リンカー」と言う)によって抗体に結合している。該パートナー分子は、治療薬またはマーカーであり得る。該治療薬は、例えば、細胞毒素、非細胞毒素性薬(例えば、免疫抑制剤)、放射性薬物、別の抗体、または酵素であり得る。好ましくは、該パートナー分子は細胞毒素である。該マーカーは、検出可能なシグナルを生じるいずれの標識(例えば、放射性標識、蛍光標識、または基質への検出可能な修飾を触媒する酵素)であり得る。該抗体はターゲティング機能を果たす: その抗原が認められる標的組織または細胞に結合することにより、該抗体は該複合体を標的組織または細胞に誘導する。そこで、該リンカ

40

50

ーが切断され、パートナー分子が放出され、その目的の生物学的機能を果たす。

【0186】

抗体に結合されたパートナー分子の比は、結合反応の間に用いるパートナー分子の量などの因子および実験条件に応じて、変化させることができる。好ましくは、抗体に対するパートナー分子の比は、1~3、より好ましくは1~1.5である。抗体Zの個々の分子は整数の数のパートナー分子に結合されるけれども、複合体の調製物はパートナー分子対抗体の整数でない比（統計的平均を示す）について分析され得ることを、当業者であれば理解するであろう。

【0187】

リンカー

いくつかの実施態様において、リンカーは、 $(L^4)_p-F-(L^1)_m$ として本明細書に描写されるペプチジルリンカーである。他のリンカーとしては、各々、 $(L^4)_p-H-(L^1)_m$ および $(L^4)_p-J-(L^1)_m$ として本明細書に描写される、ヒドラジンおよびジスルフィドリンカーが挙げられる。F、H、およびJは各々、抗体からパートナー分子を放出するために開裂可能である、ペプチジル、ヒドラジン、およびジスルフィド部分であり、一方、 L^1 および L^4 はリンカー基である。 F 、 H 、 J 、 L^1 および L^4 は、下付き文字pおよびmとともに、下記においてさらに十分に定義される。これらおよび他のリンカーの製造および使用はWO 2005/112919に記載されており、その開示は引用により本明細書に援用される。

【0188】

抗体-パートナー複合体におけるペプチジルおよび他のリンカーの使用が、US 2006/0004081; 2006/0024317; 2006/0247295; 6,989,452; 7,087,600; および7,129,261; WO 2007/051081; 2007/038658; 2007/059404; および2007/089100に記載されており；その全ては引用により本明細書に援用される。

【0189】

さらなるリンカーが、US 6,214,345; 2003/0096743; および2003/0130189; de Groot et al., J. Med. Chem. 42, 5277 (1999); de Groot et al. J. Org. Chem. 43, 3093 (2000); de Groot et al., J. Med. Chem. 66, 8815, (2001); WO 02/083180; Carl et al., J. Med. Chem. Lett. 24, 479, (1981); Dubowchik et al., Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998)に記載されており、その開示は引用により本明細書に援用される。

【0190】

抗体およびパートナー分子の連結に加えて、リンカーは、該パートナー分子に安定性を与えるか、そのin vivo毒性を減少させるか、あるいは、その薬物動態、バイオアベイラビリティおよび/または薬力学に好ましく影響を及ぼし得る。該複合体がその作用部位に送達されると、該リンカーが開裂され、パートナー分子を放出するのが一般に好ましい。開裂された後、リンカーの存在の跡が残らないように、リンカーは痕跡がないのもまた好ましい。

【0191】

別の実施態様において、該リンカーは、標的細胞の中または付近の部位（例えば治療作用部位もしくはパートナー分子のマーカー活性部位）で開裂される能力により特徴づけられる。そのような開裂は、本質的には酵素的であり得る。この特徴は、パートナー分子の全身的活性を減少させること、ならびに毒性および全身的副作用を減少させることに役立つ。酵素的開裂に好ましい開裂可能な基としては、ペプチド結合、エステル結合、およびジスルフィド結合、例えば上述のF、H、およびJ部分が挙げられる。他の実施態様において、該リンカーはpHに感受性があり、pHの変化によって開裂される。

【0192】

重要な態様は、該リンカーが開裂するスピードを制御する能力である。多くの場合、すばやく開裂するリンカーが望ましい。しかしながら、いくつかの実施態様においては、よりゆっくりと開裂するリンカーが好ましい。例えば、徐放性製剤においてあるいは速放成分および徐放成分の両方を有する製剤においては、よりゆっくりと開裂するリンカーを提供することが有用であり得る。上記で引用したWO 2005/112919は、非常に速いスピードか

10

20

30

40

50

ら非常に遅いスピードの範囲で開裂するように設計することができるヒドラジンリンカーを開示している。

【0193】

該リンカーはまた、標的組織または細胞に到達する前の複合体が循環している間の分解に対して、パートナー分子を安定化させるのにも役立ち得る。パートナー分子の循環半減期を長くすることから、このことはかなりの利益である。該リンカーはまた、循環している間は該複合体が比較的穏和であるが、目的の作用部位で活性化された後に目的の効果 - 例えば細胞毒性である - を有するように、パートナー分子の活性を減衰させるのにも役立つ。治療薬複合体において、該リンカーのこの特徴は該薬物の治療指数を向上させるのに役立つ。

10

【0194】

各々、開裂可能なペプチド、ヒドラジン、またはジスルフィド基である、F、H、またはJに加えて、場合によっては、1つ以上のリンカー基L¹が、パートナー分子およびF、H、またはJの間で適宜導入される。これらのリンカー基L¹はまた、スペーサー基として記載され、少なくとも2つの官能基を含有し得る。下付き文字mの値(すなわち、存在するL¹基の数)および特定の基L¹の位置に応じて、基L¹の化学官能基は、パートナー分子の化学官能基、F、HまたはJ(場合により)か、あるいは別のリンカー基L¹の化学官能基(2つ以上のL¹が存在している場合)に結合することができる。スペーサー基L¹の適切な化学官能基の例としては、ヒドロキシ、メルカプト、カルボニル、カルボキシ、アミノ、ケトン、アルデヒド、およびメルカプト基が挙げられる。

20

【0195】

該リンカーL¹は、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換アリール、置換もしくは無置換ヘテロアリール、または置換もしくは無置換ヘテロアルキル基であり得る。一実施態様において、該アルキルまたはアリール基は1から20個の炭素原子を含有し得る。それらはまた、ポリエチレングリコール部分も含有し得る。

【0196】

基L¹の例としては、例えば、6-アミノヘキサノール、6-メルカプトヘキサノール、10-ヒドロキシデカン酸、グリシンおよび他のアミノ酸、1,6-ヘキサンジオール、-アラニン、2-アミノエタノール、システアミン(2-アミノエタンチオール)、5-アミノペンタン酸、6-アミノヘキサン酸、3-マレイミド安息香酸、フタリド、-置換フタリド、カルボニル基、アミナルエステル、核酸、ペプチドなどが挙げられる。

30

【0197】

該基L¹の1つの機能は、パートナー分子がF、HもしくはJでの開裂の化学を妨害(例えば、立体的または電子的影響を介して)しないように、F、HもしくはJ(場合により)とパートナー分子との間の空間的分離を提供することである。該基L¹はまた、複合体にさらなる分子量および化学官能基を導入する役割を果たし得る。一般的に、さらなる質量および官能基は複合体の血清半減期および他の特性に影響を及ぼす。従って、スペーサー基を慎重に選択することによって、様々な血清半減期を有する複合体を製造することができる。適宜、1つ以上のリンカーL¹は、以下に記載のように、自壊的(self-immolative)基であり得る。

40

【0198】

下付き文字は、0、1、2、3、4、5、または6から選択される整数である。複数のL¹基が存在する場合、それらは同一であるかまたは異なっていてよい。

【0199】

L⁴は、F、HもしくはJが抗体による抗原結合を妨害しないようにか、または抗体がF、HもしくはJでの開裂の化学を妨害しないように、F、HもしくはJ(場合により)と該抗体との間の空間的分離を提供する、リンカー部分である。好ましくは、L⁴は、該部分を含むかまたは該複合体の加水分解速度を改変するリンカーを利用して、複合体に増大した溶解性特性または低下した凝集特性を与える。L¹の場合と同様、L⁴は適宜、自壊的基である。一実施態様において、L⁴は、置換アルキル、無置換アルキル、置換アリール、無置換アリ-

50

ル、置換ヘテロアルキル、または無置換ヘテロアルキルであり、そのいずれも直鎖、分枝鎖、または環状であってよい。該置換は、例えば、低級(C_1-C_6)アルキル、アルコキシ、アルキルチオ、アルキルアミノ、またはジアルキルアミノであり得る。ある特定の実施態様において、 L^4 は非環状部分を含有する。別の実施態様において、 L^4 は、正もしくは負に荷電したアミノ酸ポリマー(例えばポリリジンまたはポリアルギニン)を含有する。 L^4 は、ポリマー(例えばポリエチレングリコール部分)を含有することができる。また、 L^4 は、例えば、ポリマー成分および小分子部分の両方を含有することができる。

【0200】

好ましい実施態様において、 L^4 はポリエチレングリコール(PEG)部分を含有する。 L^4 の該PEG部分は、1から50単位の長さであり得る。好ましくは、該PEGは、1-12個の反復単位か、より好ましくは3-12個の反復単位か、より好ましくは2-6個の反復単位か、またはさらにより好ましくは3-5個の反復単位を有し、最も好ましくは4個の反復単位を有するであろう。 L^4 は、PEG部分のみから成り得るか、あるいはまた、さらなる置換もしくは無置換のアルキルもしくはヘテロアルキルを含んでいてもよい。該複合体の水溶解性を高めるために L^4 部分の一部としてPEGを結合させるのが有用である。また、該PEG部分は、薬物が抗体へ結合する間に生じ得る凝集の程度を減少させる。

10

【0201】

下付き文字pは0または1であり；すなわち、 L^4 の存在は任意である。存在する場合、 L^4 は少なくとも2つの官能基を有し、1つの官能基はF、HもしくはJ(場合により)における化学官能基に結合し、他の官能基は抗体に結合する。基 L^4 の適切な化学官能基の例としては、ヒドロキシ、メルカブト、カルボニル、カルボキシ、アミノ、ケトン、アルデヒド、およびメルカブト基が挙げられる。抗体は、典型的には、スルフヒドリル基(例えば、酸化されていないシステイン残基、イミノチオランを用いたリジン残基へのスルフヒドリル-含有伸長の付加、またはジスルフィド架橋の還元由来)、アミノ基(例えば、リシン残基由来)、アルデヒド基(例えば、グリコシド側鎖の酸化由来)、またはヒドロキシ基(例えば、セリン残基由来)を介して結合し、抗体への結合に好ましい化学官能基は、前述の基と反応するもの、例えば、マレイミド、スルフヒドリル、アルデヒド、ヒドラジン、セミカルバジド、およびカルボキシル基である。抗体上のスルフヒドリル基と L^4 上のマレイミド基の組み合わせが好ましい。

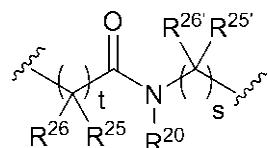
20

【0202】

30

いくつかの実施態様において、 L^4 は、 $(AA^1)_n$ のN-末端に直結した

【化1】



を含有する。 R^{20} は、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、またはアシルから選択されるメンバーである。各 R^{25} 、 $R^{25'}$ 、 R^{26} 、および $R^{26'}$ は独立して、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、置換もしくは無置換アリール、置換もしくは無置換ヘテロアリール、または置換もしくは無置換ヘテロシクロアルキルから選択され；そして、sおよびtは、独立して、1から6の整数である。好ましくは、 R^{20} 、R25、 $R^{25'}$ 、 R^{26} および $R^{26'}$ は疎水性である。いくつかの実施態様において、 R^{20} はHまたはアルキルである(好ましくは、無置換低級アルキル)。いくつかの実施態様において、 R^{25} 、 $R^{25'}$ 、 R^{26} および $R^{26'}$ は独立して、Hまたはアルキルである(好ましくは、無置換 C^1-C^4 アルキル)。いくつかの実施態様において、 R^{25} 、 $R^{25'}$ 、 R^{26} および $R^{26'}$ は全てHである。いくつかの実施態様において、tは1であり、sは1または2である。

40

【0203】

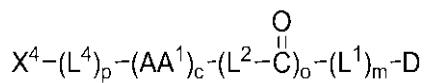
ペプチドリンカー(F)

上述の通り、本発明のペプチドリンカーは、一般式： $(L^4)p - F - (L^1)m$ (式中、Fはペプチド部分を含有する部分を表す)により表すことができる。一実施態様において、該

50

F部分は任意のさらなる自壊的リンカー L^2 およびカルボニル基を含有し、式(a):

【化2】



の複合体に対応する。

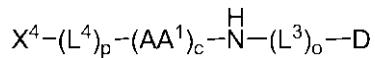
この実施態様において、 L^1 、 L^4 、 p 、および m は上記の通りである。 X^4 は抗体であり、Dはパートナー分子である。該下付き文字oは0または1であり、 L^2 は、存在する場合、自壊的リンカーを表す。AA¹は、1つ以上の天然アミノ酸、および/または非天然 α -アミノ酸を表し；cは1から20の整数である。いくつかの実施態様において、cは2から5の範囲であるか、またはcは2もしくは3である。

式(a)において、AA¹は、そのアミノ末端で、 L^4 に直結しているか、あるいは L^4 が非存在の場合は X^4 に直結している。いくつかの実施態様において、 L^4 が存在する場合、 L^4 は、(AA¹)_cのN-末端に直結したカルボン酸アシル基を含有しない。

【0204】

別の実施態様において、該F部分はアミノ基および任意のスペーサー基 L^3 を含有し、 L^1 は非存在であり(すなわち、mは0である)、式(b):

【化3】



の複合体に対応する。

この実施態様において、 X^4 、D、 L^4 、AA¹、c、およびpは上記の通りである。該下付き文字oは0または1である。 L^3 は、存在する場合、第一級もしくは第二級アミンまたはカルボキシル官能基を含有するスペーサー基であり、 L^3 のアミンはDのペンドントカルボキシル官能基とアミド結合を形成するか、または L^3 のカルボキシルはDのペンドントアミン官能基とアミド結合を形成する。

【0205】

自壊的リンカー

自壊的リンカーは二官能性化学基であり、それは、間隔を空けた2つの化学基と一緒にになって通常は安定なトリパーテート(tripartate)分子に共有結合し、トリパーテート分子から前記の間隔を空けるための化学的部分の1つを酵素的開裂によって放出し；前記の酵素的開裂の後、分子の残りから自発的に開裂して、前記の間隔を空けるための化学的部分の他方を放出することができる。本発明によると、該自壊的スペーサーはその末端の一方でペプチド部分に共有結合し、その他方の末端で薬物部分(その誘導体化が薬理学的活性を阻害する)の化学反応部位に共有結合し、該ペプチド部分および薬物部分と一緒に、トリパーテート分子(これは、標的酵素の非存在下においては安定で薬理学的に不活性であるが、スペーサー部分とペプチド部分を共有結合する結合上で、かかる標的酵素により酵素的に開裂され得て、それによってトリパーテート分子からのペプチド部分の放出をもたらす)へと間隔を空けて共有結合する。そのような酵素的開裂は、同様に、スペーサー部分の自壊的性質を活性化し、スペーサー部分を薬物部分へ共有結合する結合の自発的開裂を惹起し、それにより、薬理学的活性形態の薬物の放出をもたらすであろう。例えば、Carl et al., J. Med. Chem., 24 (3), 479-480 (1981); Carl et al., WO 81/01145 (1981); Toki et al., J. Org. Chem. 67, 1866-1872 (2002); Boyd et al., WO 2005/112919; およびBoyd et al., WO 2007/038658(その開示は引用により本明細書に援用される)を参照。

【0206】

1つの特に好ましい自壊的スペーサーは、式(c):

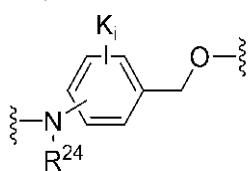
10

20

30

40

【化4】



により表されうる。

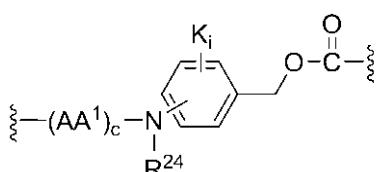
【0207】

アミノベンジル基の芳香環は1つ以上の「K」基で置換され得る。「K」基は、環構造の一部である4つの無置換炭素のうちの一つに結合した水素をそれ以外のものに置換する、芳香環上の置換基である。該「K」基は、単一原子、例えばハロゲンであってもよいが、あるいは、多原子基、例えばアルキル、ヘテロアルキル、アミノ、ニトロ、ヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルキル、およびシアノであってよい。各Kは独立して、置換アルキル、無置換アルキル、置換ヘテロアルキル、無置換ヘテロアルキル、置換アリール、無置換アリール、置換ヘテロアリール、無置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、無置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、NO₂、NR²¹R²²、NR²¹COR²²、OCO NR²¹R²²、OCOR²¹、およびOR²¹からなる群から選択され、ここでR²¹およびR²²は独立して、H、置換アルキル、無置換アルキル、置換ヘテロアルキル、無置換ヘテロアルキル、置換アリール、無置換アリール、置換ヘテロアリール、無置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキルおよび無置換ヘテロシクロアルキルからなる群から選択される。K置換基の例としては、限定はされないが、F、Cl、Br、I、NO₂、OH、OCH₃、NHCOCH₃、N(CH₃)₂、NHCOCF₃およびメチルが挙げられる。「K_i」において、iは0、1、2、3、または4の整数である。1つの好ましい実施態様において、iは0である。上記構造のエーテル酸素原子は、カルボニル基に結合している(示されていない)。NR²⁴官能基から芳香環への線は、アミン官能基が、該環を形成しあつ-CH₂-O-基によって置換されていない5個の炭素のいずれかと結合しうることを示す。好ましくは、XのNR²⁴官能基は、-CH₂-O-基に対してパラ位で芳香環に共有結合する。R²⁴は、H、置換アルキル、無置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および無置換ヘテロアルキルからなる群から選択されるメンバーである。特定の態様において、R²⁴は水素である。

【0208】

一実施態様において、本発明は上記の式(a)のペプチドリンカーを提供し、その中で、Fは構造:

【化5】



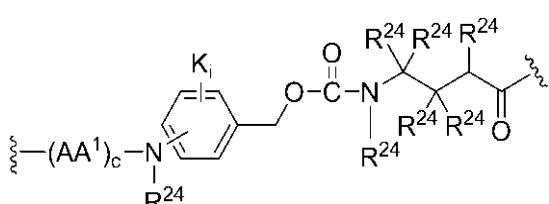
(式中、R²⁴、AA¹、K、i、およびcは上記の通りである)

を含有する。

【0209】

別の実施態様において、上記の式(a)のペプチドリンカーは、構造:

【化6】



(式中、R²⁴、AA¹、K、i、およびcは上記の通りである)

10

20

30

40

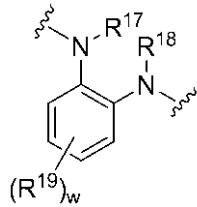
50

を含む- $F-(L^1)_m-$ を含有する。

【0210】

いくつかの実施態様において、自壊的スペーサー L^1 または L^2 は、

【化7】



10

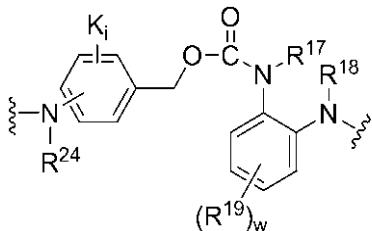
(式中、各 R^{17} 、 R^{18} 、および R^{19} は独立して、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキルまたは置換もしくは無置換アリールから選択され、wは0から4の整数である)

を含む。いくつかの実施態様において、 R^{17} および R^{18} は独立して、Hまたはアルキル(好ましくは、無置換C₁-C₄アルキル)である。好ましくは、 R^{17} および R^{18} は、C₁₋₄アルキル、例えば、メチルまたはエチルである。いくつかの実施態様において、wは0である。この特定の自壊的スペーサーは比較的迅速に環化することが経験的に見いだされている。

【0211】

いくつかの実施態様において、 L^1 または L^2 は、

【化8】



20

(式中、 R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、 R^{24} 、およびKjは上記の通りである)

を含む。

【0212】

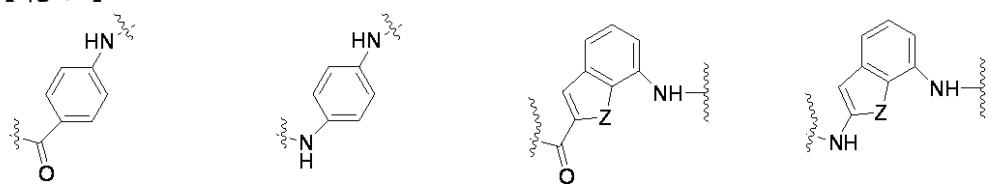
30

スペーサー基

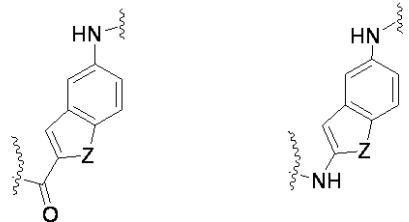
スペーサー基 L^3 は、第一級もしくは第二級アミンまたはカルボキシル官能基を含有することにより特徴づけられ、 L^3 のアミンはDのペンドントカルボキシル官能基とアミド結合を形成するか、あるいは L^3 のカルボキシルはDのペンドントアミン官能基とアミド結合を形成する。 L^3 は、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、置換もしくは無置換アリール、置換もしくは無置換ヘテロアリール、および置換もしくは無置換ヘテロシクロアルキルからなる群から選択することができる。好ましい態様において、 L^3 は芳香族基を含有する。より好ましくは、 L^3 は、安息香酸基、アニリン基またはインドール基を含有する。 $-L^3-NH-$ スペーサーとしての役割を果たし得る構造の非限定的な例としては、以下の構造:

40

【化9】



10



20

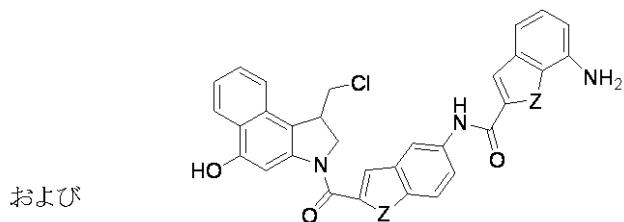
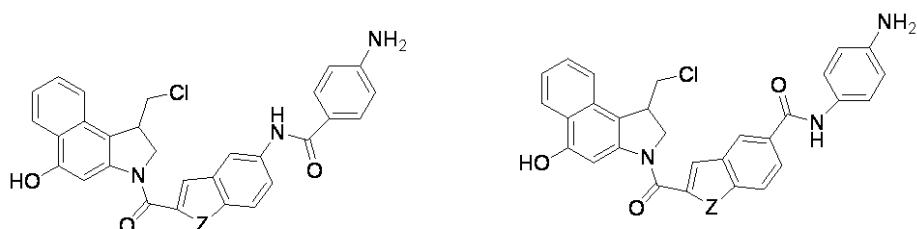
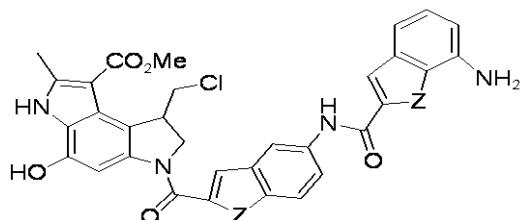
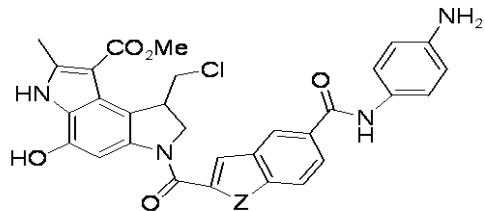
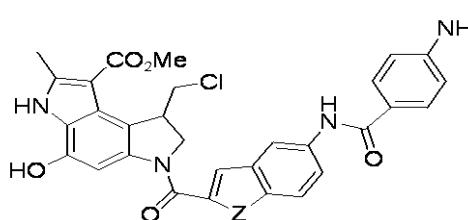
(式中、Zは、O、SまたはNR²³から選択されるメンバーであり、ここで該R²³は、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、またはアシルから選択されるメンバーである)

が挙げられる。

【0213】

L³を含む本発明のリンカーの開裂後、該L³部分は薬物Dに結合したままである。従って、該L³部分は、Dへのその結合がDの活性を著しく変化させないように選択される。別の実施態様において、薬物Dそれ自体の一部がL³スペーサーとして機能する。例えば、一実施態様において、該薬物Dは、薬物の一部がL³スペーサーとして機能するデュオカルマイシン誘導体である。そのような実施態様の非限定的な例としては、NH₂-(L³)-Dが：

【化10】



10

20

30

(式中、Zは0、SまたはNR²³であり、ここでR²³はH、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、またはアシルであり；ならびに、各構造上のNH₂基は(AA¹)_cと反応して-(AA¹)_c-NH-を形成する)

からなる群から選択される構造を有するものが挙げられる。

【0214】

ペプチド配列(AA¹)_c

該基AA¹は、単一のアミノ酸、またはアミド結合によって共に結合した複数のアミノ酸を表す。該アミノ酸は、天然アミノ酸および/または非天然の-L-アミノ酸であり得る。それらはLまたはD配置であり得る。一実施態様において、少なくとも3つの異なるアミノ酸が用いられる。別の実施態様においては、2つのアミノ酸のみが用いられる。

40

【0215】

用語「アミノ酸」は、天然および合成アミノ酸、ならびに、天然アミノ酸と同様の様式で機能するアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣体を言う。天然アミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるもの、ならびに、後に修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタミン酸、シトルリン、およびD-ホスホセリンである。アミノ酸アナログとは、天然アミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）に結合した炭素を有する化合物を言う。そのようなアナログは、修飾したR基（例えば、ノルロイシン）または修飾したペプチド骨格を有するが、天然のアミノ酸と同じ基本化学構造を保持している。特に用いられ得る1つのアミノ酸

50

はシトルリンであり、それはアルギニンの前駆体であって、肝臓における尿素の形成に関する。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と同様の様式で機能する化合物を言う。用語「非天然アミノ酸」は、上記の20個の天然アミノ酸の「D」立体化学形態を表すことを意図する。該用語「非天然のアミノ酸」には、天然アミノ酸のホモログ、および天然アミノ酸の合成的に修飾された形態が含まれることがさらに理解される。合成的に修飾された形態としては、限定はされないが、最大で2個の炭素原子だけ短くされたか長くされたアルキレン鎖を有するアミノ酸、適宜置換されたアリール基を含有するアミノ酸、ならびに、ハロゲン化基（好ましくはハロゲン化アルキルおよびアリール基）を含んだアミノ酸が挙げられる。本発明のリンカーまたは複合体に結合する場合、該アミノ酸は「アミノ酸側鎖」の形態であり、ここで、アミノ酸のカルボン酸基はケト(C(0))基で置換されている。従って、例えば、アラニン側鎖は-C(0)-CH(NH₂)-CH₃などである。

10

【0216】

ペプチド配列(AA¹)_nは、機能的には、単一のアミノ酸(c=1である場合)またはアミド結合によって共に結合した複数のアミノ酸の、アミド化残基である。該ペプチド配列(AA¹)_nは好ましくは、生物システムの目的の位置における酵素による酵素触媒開裂のために選択される。例えば、標的とされるが細胞によって内在化されない複合体については、ペプチドが細胞外で開裂されるように、細胞外マトリクス中のプロテアーゼ（例えば、近くの死細胞により放出されたプロテアーゼもしくは腫瘍関連プロテアーゼ）によって開裂されるペプチドが選択される。細胞によって内在化されるように設計された複合体については、該配列(AA¹)_nは好ましくは、エンドソームもしくはリソソームプロテアーゼによって開裂されるように選択される。ペプチド内のアミノ酸の数は、1から20個の範囲であり得るが；しかし、より好ましくは、(AA¹)_nを含有する1-8個のアミノ酸、1-6個のアミノ酸、または1、2、3もしくは4個のアミノ酸が存在しうる。特定の酵素または酵素クラスによって開裂されやすいペプチド配列が、当分野では周知である。

20

【0217】

好ましくは、(AA¹)_nは、プロテアーゼによる開裂部位であるアミノ酸配列（「開裂認識配列」）を有する。多くのプロテアーゼ開裂配列が、当分野で公知である。例えば、Matayoshi et al. Science 247: 954 (1990); Dunn et al. Meth. Enzymol. 241: 254 (1994); Seidah et al. Meth. Enzymol. 244: 175 (1994); Thornberry, Meth. Enzymol. 244: 6 15 (1994); Weber et al. Meth. Enzymol. 244: 595 (1994); Smith et al. Meth. Enzymol. 244: 412 (1994); Bouvier et al. Meth. Enzymol. 248: 614 (1995), Hardy et al., in Amyloid Protein Precursor in Development, Aging, and Alzheimer's Disease, ed. Masters et al. pp. 190-198 (1994)を参照。

30

【0218】

該ペプチドは典型的には、3-12個（またはそれ以上）のアミノ酸を含む。特定のアミノ酸の選択は、少なくとも部分的には、ペプチドの開裂に用いられる酵素、ならびに、in vivoでのペプチドの安定性に依存しうる。適切な開裂可能なペプチドの1つの例は、-Ala-Leu-Ala-Leu(配列番号：27)である。これは、安定化基と結合して、スクシニル--Ala-Leu-Ala-Leu(配列番号：30)を形成することができる。適切な開裂可能なペプチドの他の例は、下記の引用文献中に記載されている。別法として、WO 2008/103693（その開示は引用により本明細書に援用される）に記載の通り、単一のアミノ酸残基を含有するリンカーを用いることができる。

40

【0219】

好ましい態様において、該ペプチド配列(AA¹)_nは、リソソームプロテアーゼ（その例としては、カテプシンB、C、D、H、L、およびSが挙げられる）によって開裂されるその能力に基づいて選択される。好ましくは、ペプチド配列(AA¹)_nは、in vitroでカテプシンBによって開裂され得る。カテプシンBはリソソームプロテアーゼであるにもかかわらず、その特定の濃度は、腫瘍組織の周囲の細胞外マトリクスに見られると考えられている。

【0220】

50

別の実施態様において、該ペプチド配列(AA¹)_nは、腫瘍関連プロテアーゼ、例えば、腫瘍細胞付近の細胞外で見られるプロテアーゼ(その例としては、チメット(thimet)オリゴペプチダーゼ(TOP)およびCD10が挙げられる)によって開裂されるその能力に基づいて選択される。あるいは、該配列(AA¹)_nは、ウロキナーゼまたはトリプターゼによる選択的開裂用に設計される。

【0221】

1つの実例として、CD10(ネプリライシンとしても知られている)、中性エンドペプチダーゼ(NEP)、および共通の急性リンパ性白血病共通抗原(CALLA)が、II型細胞表面亜鉛依存性メタロプロテアーゼである。CD10とともに用いるのに適切な開裂可能な基質には、Leu-Ala-LeuおよびIle-Ala-Leuが含まれる。

10

【0222】

別の実例は、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)に基づいている。おそらく最もよく特徴がわかっている腫瘍に関連したタンパク質分解酵素であり、腫瘍微小環境内においてMMPの活性化の明かな相関がある。とりわけ、可溶性マトリックス酵素MMP2(ゼラチナーゼA)およびMMP9(ゼラチナーゼB)が集中的に研究されており、組織再構築(腫瘍増殖を含む)の間に選択的に活性化されることが示されている。MMP2およびMMP9によって開裂されるように設計されたペプチド配列は、デキストランおよびメトトレキサート(Chau et al., Bioconjugate Chem. 15:931-941 (2004)); PEG(ポリエチレングリコール)およびドキソルビシン(Bae et al., Drugs Exp. Clin. Res. 29:15-23 (2004));ならびに、アルブミンおよびドキソルビシン(Kratz et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:2001-2006 (2001))の複合体について、設計および試験されている。MMPとの使用に適切な配列の例としては、限定はされないが、Pro-Val-Gly-Leu-Ile-Gly (SEQ. ID NO: 21)、Gly-Pro-Leu-Gly-Val (SEQ. ID NO: 22)、Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln (SEQ. ID NO: 23)、Pro-Leu-Gly-Leu (SEQ. ID NO: 24)、Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Leu-Ser-Gln (SEQ. ID NO: 25)、およびGly-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Gln (SEQ. ID NO: 26)が挙げられる。(例えば、前述の引用文献、ならびにKline et al., Mol. Pharmaceut. 1:9-22 (2004)およびLiu et al., Cancer Res. 60:6061-6067 (2000)を参照)。

20

【0223】

さらに別の例は、II型膜貫通セリンプロテアーゼである。この酵素群には、例えば、ヘプシン、テスチシン(testisin)、およびTMPRSS4が含まれる。Gln-Ala-Argは、マトリプターゼ/MT-SP1(乳癌および卵巣癌で過剰発現される)を用いて有用である1つの基質配列であり、Leu-Ser-Argはヘプシン(前立腺癌およびいくつかの他の腫瘍タイプにおいて過剰発現される)を用いて有用である。(例えば、Lee et.al., J. Biol. Chem. 275:36720-36725およびKurachi and Yamamoto, Handbook of Proeolytic Enzymes Vol. 2, 2nd edition (Barrett AJ, Rawlings ND & Woessner JF, eds) pp. 1699-1702 (2004)を参照)。

30

【0224】

限定はしないが、本発明の複合体における使用に適したペプチド配列の適切な例として、Val-Cit、Cit-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N9-tosyl-Arg、Phe-N9-ニトロ-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Ph e-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu、 -Ala-Leu-Ala-Leu(配列番号: 27)、Gly-Phe-Leu-Gly(配列番号: 28)、Val-Ala、Leu-Leu-Gly-Leu(配列番号: 29)、Leu-Asn-Ala、およびLys-Leu-Valが挙げられる。好ましいペプチド配列は、Val-CitおよびVal-Lysである。

40

【0225】

別の実施態様において、薬物部分の最も近くに位置するアミノ酸は: Ala、Asn、Asp、Cit、Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValからなる群から選択される。さらに別の実施態様において、薬物部分の最も近くに位置するアミノ酸は: Ala、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValからなる群から選択される。

【0226】

50

当業者は、必要以上の実験を行うことなく、ペプチド配列のアレイを容易に評価して、本発明におけるそれらの有用性を決定することができる。例えば、Zimmerman, M., et al., (1977) Analytical Biochemistry 78:47-51; Lee, D., et al., (1999) Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9:1667-72; およびRano, T.A., et al., (1997) Chemistry and Biology 4:149-55を参照。

【0227】

本発明の複合体は適宜、2つ以上のリンカーを含み得る。これらのリンカーは、同一または異なっていてよい。例えば、ペプチジルリンカーを用いて薬物をリガンドに結合させてもよく、第2のペプチジルリンカーは診断薬を複合体に結合させ得る。さらなるリンカーについての他の使用には、結合分析剤 (linking analytical agent)、生体分子、標的薬剤、および抗体-パートナー複合体への検出可能な標識が含まれる。

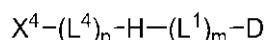
10

【0228】

ヒドラジンリンカー(H)

別の実施態様において、本発明の複合体はヒドラジン自壊的リンカーを含有し、ここで、該複合体は、構造：

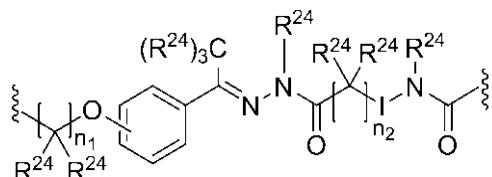
【化11】



[式中、D、L¹、L⁴、p、m、およびX⁴は上記の通りであり、さらに本明細書に記載されており、そして、Hは構造：

20

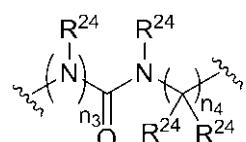
【化12】



を含有するリンカーであり、その中で、n₁は1~10の整数であり；n₂は0、1、または2であり；各R²⁴は、H、置換アルキル、無置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および無置換ヘテロアルキルからなる群から独立して選択されるメンバーであり；そして、Iは、結合(すなわち、骨格の炭素と隣接する窒素の間の結合)か、または：

30

【化13】



[式中、n₃は0または1であるが、ただし、n₃が0の場合、n₂は0でなく；および、n₄は1、2、または3である]である]

を有する。

【0229】

一実施態様において、フェニル環上の置換はパラ置換である。好ましい実施態様において、n₁は2、3、または4であるか、あるいはn₁は3である。好ましい実施態様において、n₂は1である。好ましい実施態様において、Iは結合(すなわち、骨格の炭素と隣接する窒素の間の結合)である。一態様において、例えばn₃が0であってn₄が2である場合、ヒドラジンリンカーHは、開裂して6-員の自壊的リンカーを形成することができる。別の態様において、該ヒドラジンリンカーHは、開裂して2つの5-員自壊的リンカーを形成することができる。さらに他の態様において、開裂して、Hは5-員自壊的リンカーおよび6-員自壊的リンカーを形成する。該開裂速度は、開裂後に形成される環の大きさの影響を受ける。従って、望ましい開裂速度に応じて、開裂後に形成される適当な大きさの環が選択され得る。

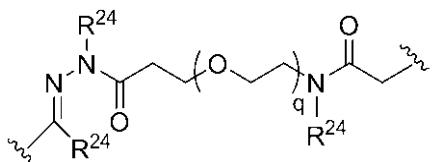
40

【0230】

50

別のヒドラジン構造Hは、式：

【化14】



(式中、qは0、1、2、3、4、5または6であり；そして、各R²⁴は、H、置換アルキル、無置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および無置換ヘテロアルキルからなる群から独立して選択されるメンバーである)

10

を有する。このヒドラジン構造は5-、6-もしくは7-員環を形成することもでき、さらなる構成要素を附加して多環を形成することもできる。

【0231】

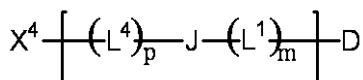
様々なヒドラジンリンカーの製造、開裂の化学および環化の動態はWO 2005/112919に記載されており、該開示は引用により本明細書に援用される。

【0232】

ジスルフィドリンカー(J)

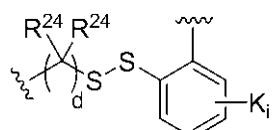
さらに別の実施態様において、該リンカーは酵素的に開裂可能なジスルフィド基を含有する。一実施態様において、本発明は、式(d)：

【化15】



[式中、D、L¹、L⁴、p、m、およびX⁴は上記の通りであり、本明細書にさらに記載されており、そして、Jは、構造：

【化16】



30

を有する基を含有するジスルフィドリンカーであり、その中で、各R²⁴はH、置換アルキル、無置換アルキル、置換ヘテロアルキル、および無置換ヘテロアルキルからなる群から独立して選択されるメンバーであり；各K_iは、置換アルキル、無置換アルキル、置換ヘテロアルキル、無置換ヘテロアルキル、置換アリール、無置換アリール、置換ヘテロアリール、無置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキル、無置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、NO₂、NR²¹R²²、NR²¹COR²²、OCO NR²¹R²²、OCOR²¹、およびOR²¹からなる群から独立して選択されるメンバーであり（ここでR²¹およびR²²は、H、置換アルキル、無置換アルキル、置換ヘテロアルキル、無置換ヘテロアルキル、置換アリール、無置換アリール、置換ヘテロアリール、無置換ヘテロアリール、置換ヘテロシクロアルキルおよび無置換ヘテロシクロアルキルからなる群から独立して選択される）；iは0、1、2、3、または4の整数であり；そして、dは0、1、2、3、4、5、または6の整数である]

40

の構造を有する細胞傷害性抗体-パートナー化合物を提供する。

【0233】

ジスルフィドリンカーの芳香環を、1つ以上の「K」基で置換することができる。「K」基は、環構造の一部である4つの無置換炭素のうちの1つに結合した水素を他のものに置き換える置換基である。「K」基は、単一原子、例えばハロゲンであってよいか、あるいは、多原子基、例えばアルキル、ヘテロアルキル、アミノ、ニトロ、ヒドロキシ、アルコキシ、ハロアルキル、およびシアノであってよい。K置換基の例としては、限定はされないが、F、Cl、Br、I、NO₂、OH、OCH₃、NHCOCH₃、N(CH₃)₂、NHCOCF₃およびメチルが挙げられる。「K_i」について、iは、0、1、2、3、または4の整数である。特定の実施態様にお

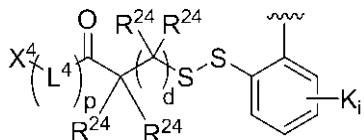
50

いて、 i は0である。

【0234】

好ましい実施態様において、該リンカーは、以下の式：

【化17】



(式中、 L^4 、 X^4 、 p 、および R^{24} は上記の通りであり、 d は0、1、2、3、4、5、または6である)

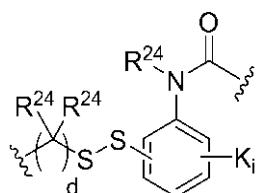
10

の酵素的に開裂可能なジスルフィド基を含有する。特定の実施態様において、 d は1または2である。

【0235】

より具体的なジスルフィドリンカーは、以下の式：

【化18】



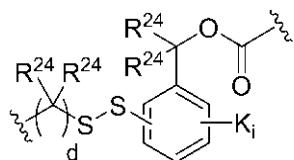
20

に示される。好ましくは、 d は1または2であり、各 K はHである。

【0236】

別のジスルフィドリンカーは、以下の式：

【化19】



30

に示される。好ましくは、 d は1または2であり、各 K はHである。

【0237】

様々な実施態様において、該ジスルフィドはアミンに対してオルトである。別の具体的な実施態様において、 a は0である。好ましい実施態様において、 R^{24} は独立して、HまたはCH₃から選択される。

【0238】

上記のようなジスルフィドリンカーの製造および使用は、WO 2005/112919に開示されており、該開示は引用により本明細書に援用される。細胞毒素のタイプ、リンカーのタイプ、および抗体への治療薬の複合のタイプのさらなる考察に関しては、US 7,087,600; US 6,989,452; US 7,129,261; US 2006/0004081; US 2006/0247295; WO 02/096910; WO 2007/051081; WO 2005/112919; WO 2007/059404; WO 2008/083312; WO 2008/103693; Saito et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan and Kreitman (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter and Springer (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264 (その各々は引用により本明細書に援用される)をまた参照。

40

【0239】

パートナー分子としての細胞毒素

一態様において、本発明は、パートナー分子、例えば細胞毒素、薬物(例えば、免疫抑制剤)または放射性毒素に結合した抗体を特徴とする。そのような複合体はまた、「免疫

50

毒素」とも言う。細胞毒素もしくは細胞傷害性薬物には、細胞に有害な（例えば、死滅させる）いずれの薬剤も含まれる。本明細書において、「細胞毒素」には、プロドラッグ形態であって、*in vivo*で実際の有毒種に変換される化合物が含まれる。

【0240】

本発明のパートナー分子の例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化工チジウム、エメチン、マイトイマイシン、エトポシド、テノボシド(*tenoposide*)、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセンジオン(*dihydroxy anthracin dione*)、ミトキサンtron、ミトライマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシンならびにそれらのアナログもしくはホモログが挙げられる。パートナー分子の例としては、また、例えば、代謝拮抗剤(例えば、メトトレキサート、6-メルカブトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルダカルバジン(*5-fluorouracil decarbazine*))、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパクロランブシル(*thioepa* クロラムブシル)、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ツブリシン(*tubulysin*)、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトイマイシンC、シスプラチニン、アントラサイクリン(例えば、ダウノルビシン(以前はダウノマイシン)およびドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトライマイシン、およびアントラマイシン(AMC))、ならびに有糸分裂阻害剤(例えば、ビンクリスチンおよびビンプラスチン)が挙げられる。本発明の抗体に結合させることができるパートナー分子の他の好ましい例としては、カリチアマイシン、マイタンシンおよびアウリスタチン、ならびにそれらの誘導体が挙げられる。
10
20

【0241】

パートナー分子の好ましい例は、CC-1065および構造的に関連したデュオカルマイシンの、アナログおよび誘導体である。CC-1065は実験動物において遅延性死亡を引き起こすため、その強力で幅広い抗腫瘍活性にもかかわらずヒトで用いることができず、より良い治療指数を有するアナログもしくは誘導体の探索が促されている。

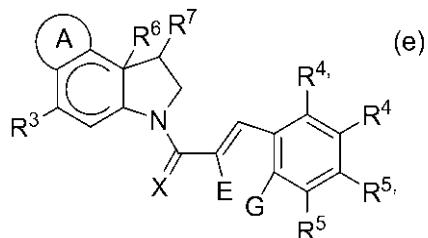
【0242】

CC-1065およびデュオカルマイシンの多くのアナログおよび誘導体が当分野において公知である。多くの化合物の構造、合成および特性への研究が概説されている。例えば、Bo ger et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35: 1438 (1996); および、Boger et al., *Chem. Rev.* 97: 787 (1997)を参照。CC-1065アナログもしくは誘導体に関する他の開示としては: US 5,101,038; US 5,641,780; US 5,187,186; US 5,070,092; US 5,703,080; US 5,070,092; US 5,641,780; US 5,101,038; US 5,084,468; US 5,739,350; US 4,978,757, US 5,332,837およびUS 4,912,227; WO 96/10405; ならびにEP 0,537,575 A1が挙げられる。
30

【0243】

特に好ましい態様において、該パートナー分子は、以下の式(e):

【化20】



(式中、環系Aは、置換もしくは無置換アリール、置換もしくは無置換ヘテロアリール、または置換もしくは無置換ヘテロシクロアルキル基から選択されるメンバーである)
の構造を有するCC-1065/デュオカルマイシンアナログである。環系Aの例としては、フェ
50

ニルおよびピロールが挙げられる。

【0244】

記号EおよびGは、独立して、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、ヘテロ原子、または単結合から選択されるか、あるいは、EおよびGは適宜一緒にになって、置換もしくは無置換アリール、置換もしくは無置換ヘテロアリール、または置換もしくは無置換ヘテロシクロアルキルから選択される環系を形成する。

【0245】

記号Xは、O、SまたはNR²³から選択されるメンバーを表す。R²³は、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、またはアシルから選択されるメンバーである。

10

【0246】

記号R³は、(=O)、SR¹¹、NHR¹¹またはOR¹¹から選択されるメンバーを表し、その中でR¹¹は、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、スルホネート、アシル、C(O)R¹²R¹³、C(O)OR¹²、C(O)NR¹²R¹³、P(O)(OR¹²)₂、C(O)CHR¹²R¹³、SR¹²またはSiR¹²R¹³R¹⁴である。該記号R¹²、R¹³、およびR¹⁴は独立して、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキルまたは置換もしくは無置換アリールを表し、ここでR¹²およびR¹³は、それらに結合している窒素もしくは炭素原子とともに、適宜一緒にになって、適宜2個以上のヘテロ原子を含有する4~6員の置換もしくは無置換ヘテロシクロアルキル環系を形成する。

20

【0247】

R⁴、R^{4'}、R⁵およびR^{5'}は、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換アリール、置換もしくは無置換ヘテロアリール、置換もしくは無置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、NO₂、NR¹⁵R¹⁶、NC(O)R¹⁵、OC(O)NR¹⁵R¹⁶、OC(O)OR¹⁵、C(O)R¹⁵、SR¹⁵、OR¹⁵、CR¹⁵=NR¹⁶、またはO(CH₂)_nN(CH₃)₂から独立して選択されるメンバーであり、ここで、nは1から20の整数であるか、あるいは、R⁴、R^{4'}、R⁵およびR^{5'}のいずれの隣接ペアも、それらにけつごうしている炭素原子とともに、一緒にになって、4~6員の置換もしくは無置換のシクロアルキルもしくはヘテロシクロアルキル環系を形成する。R¹⁵およびR¹⁶は独立して、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、置換もしくは無置換アリール、置換もしくは無置換ヘテロアリール、置換もしくは無置換ヘテロシクロアルキルまたは置換もしくは無置換ペプチジルを表し、ここで、R¹⁵およびR¹⁶は、それらに結合している窒素原子とともに、適宜一緒にになって、適宜2個以上のヘテロ原子を含有する4~6員の置換もしくは無置換ヘテロシクロアルキル環系を形成する。1つの例示的な構造はアニリンである。

30

【0248】

R³、R⁴、R^{4'}、R⁵、およびR^{5'}のうちの1つは、細胞毒素を、本明細書に記載の通り、本発明のリンカーまたは酵素開裂可能な基質、例えば、存在する場合はL¹もしくはL³か、またはF、H、もしくはJに結合させる。

【0249】

R⁶は、存在しても存在しなくてもよい単結合である。R⁶が存在している場合、R⁶およびR⁷は一緒にになってシクロプロピル環を形成する。R⁷はCH₂-X¹または-CH₂-である。R⁷が-CH₂-である場合、それはシクロプロパン環の構成要素である。該記号X¹は、脱離基、例えばハロゲン(例えばCl、BrまたはF)を表す。R⁶およびR⁷の組み合わせは、化学原子価の原則に反しないように解釈される。

40

【0250】

X¹はいずれの脱離基であってもよい。有用な脱離基としては、限定はされないが、ハロゲン、アジド、スルホン酸エステル(例えば、アルキルスルホニル、アリールスルホニル)、オキソニウムイオン、アルキル過塩素酸エステル、アンモニオアルカンスルホン酸エステル(ammonioalkanesulfonate ester)、アルキルフルオロスルホン酸エステルおよびフッ化化合物(例えば、トリフレート、ノナフレート(nonaflate)、トレシレート(tres-

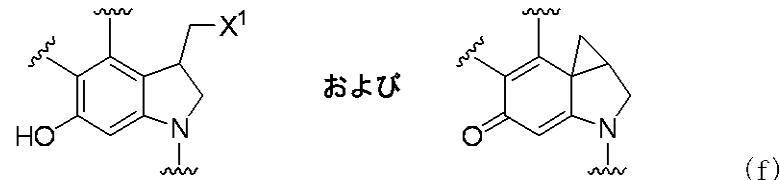
50

ylate))などが挙げられる。脱離基として有用な特定のハロゲンは、F、ClおよびBrである。

【0251】

6員環の中の曲線を描く線は、該環が1以上の不飽和度を有していてもよく、それが芳香族であり得ることを示す。従って、以下に示されるような環構造、および関連構造は、式(f):

【化21】



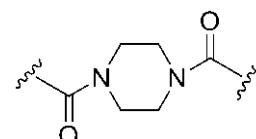
10

の範囲内である。

【0252】

一実施態様において、R¹¹は、自己環化 (self-cyclize) せず、存在する場合L¹もしくはL³に薬物を連結するか、またはF、HもしくはJに薬物を連結する、部分X⁵を含む。該部分、X⁵は、好ましくは酵素を用いて開裂可能であり、開裂されると活性薬物を与える。例として、R¹¹は、以下の構造(右側が薬物の残りの部分にカップリングしている):

【化22】



20

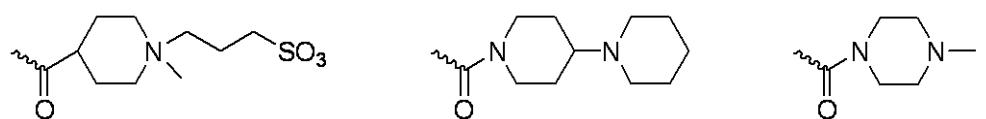
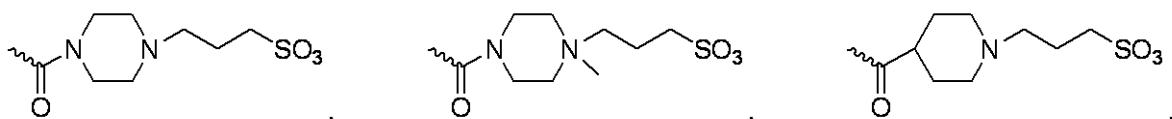
を有し得る。

【0253】

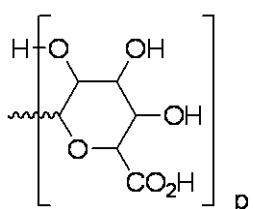
いくつかの実施態様において、R⁴、R^{4'}、R⁵、およびR^{5'}のうちの少なくとも1つは、前記薬物を、存在する場合L¹に連結するか、またはF、H、JもしくはX²に連結し、そして、R³は、SR¹¹、NHR¹¹またはOR¹¹から選択される。R¹¹は、SO(OH)₂、-PO(OH)₂、-AA_n、-Si(CH₃)₂C(CH₃)₃、-C(O)OPhNH(AA)_m、

30

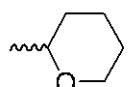
【化23】



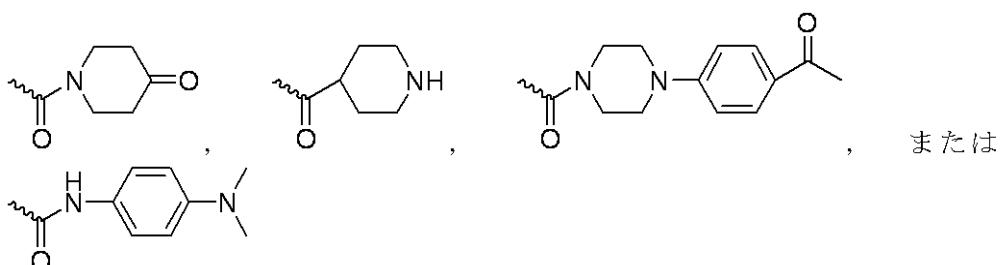
10



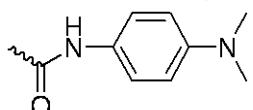
またはいずれの他の糖もしくは糖の組み合わせ



20



または



あるいは医薬的に許容されるその塩から選択され、ここで、nは1～10の範囲のいずれかの整数であり、mは1～4の範囲のいずれかの整数であり、pは1～6の範囲のいずれかの整数であり、そして、AAはいずれかの天然もしくは非天然アミノ酸である。式(e)の化合物がR⁴、R^{4'}、R⁵、もしくはR⁶を介して結合している場合、R³は好ましくは開裂可能な遮断基(blocking group)を含み、その存在は、化合物の細胞傷害活性を遮断するが、細胞毒素を抗体に結合させるリンカーの開裂におけるメカニズムとは異なるメカニズムによって、意図される作用部位で見いだされる条件下において、開裂可能である。このような様式では、血漿中において該複合体の偶発的開裂がある場合、該遮断基は、放出された細胞毒素の細胞otoxic性を減衰させる。例えば、該複合体がヒドラゾンまたはジスルフィドリンカーを有する場合、該遮断基は酵素的に開裂可能なアミドであり得る。あるいは、該リンカーがプロテアーゼにより開裂可能なペプチジルリンカーである場合、該保護基はカルボキシエステラーゼにより開裂可能なエステルまたはカルバメートであり得る。

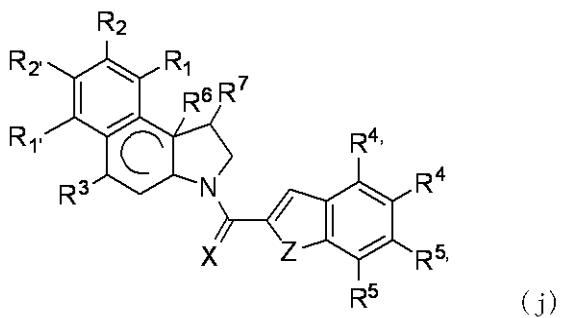
30

【0254】

例えば、好ましい実施態様において、Dは、構造(j):

40

【化24】



50

を有する細胞毒素である。

この構造において、 R^3 、 R^6 、 R^7 、 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、 $R^{5'}$ および X は、式(e)について上記した通りである。 Z は、O、Sまたは NR^{23} から選択されるメンバーであり、ここで、 R^{23} は、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、またはアシルから選択されるメンバーである。

R^1 は、H、置換もしくは無置換低級アルキル、 $C(O)R^8$ 、または CO_2R^8 であり、その中で、 R^8 は、 NR^9R^{10} または OR^9 から選択されるメンバーであり、その中の R^9 および R^{10} は、H、置換もしくは無置換アルキル、または置換もしくは無置換ヘテロアルキルから独立して選択されるメンバーである。

$R^{1'}$ は、H、置換もしくは無置換低級アルキル、または $C(O)R^8$ であり、その中で、 R^8 は、 NR^9R^{10} または OR^9 から選択されるメンバーであり、その中の R^9 および R^{10} は、H、置換もしくは無置換アルキル、または置換もしくは無置換ヘテロアルキルから独立して選択されるメンバーである。

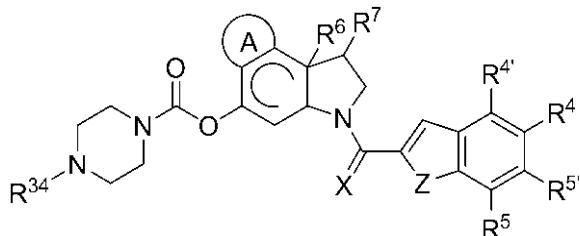
R^2 は、H、置換もしくは無置換低級アルキル、無置換ヘテロアルキル、シアノ、またはアルコキシであり； $R^{2'}$ は、H、置換もしくは無置換低級アルキル、または無置換ヘテロアルキルである。

R^3 、 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、または $R^{5'}$ のうちの1つは、細胞毒素を、存在する場合 L^1 もしくは L^3 に連結させるか、またはF、HもしくはJに連結させる。

【0255】

さらなる実施態様は、式：

【化25】



を有する。

この構造において、A、 R^6 、 R^7 、X、 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 、および $R^{5'}$ は、式(e)について上記した通りである。 Z は、O、Sまたは NR^{23} から選択されるメンバーであり、ここで、 R^{23} は、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、またはアシルから選択されるメンバーであり；

R^{34} は、 $C(=O)R^{33}$ または C_1-C_6 アルキルであり、ここで、 R^{33} は、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換アリール、置換もしくは無置換ヘテロアリール、置換もしくは無置換ヘテロシクロアルキル、ハロゲン、 NO_2 、 $NR^{15}R^{16}$ 、 $NC(O)R^{15}$ 、 $OC(O)NR^{15}R^{16}$ 、 $OC(O)OR^{15}$ 、 $C(O)R^{15}$ 、 SR^{15} 、 OR^{15} 、 $CR^{15}=NR^{16}$ 、または $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$ から選択され、その中で、nは1~20の整数である。 R^{15} および R^{16} は、独立して、H、置換もしくは無置換アルキル、置換もしくは無置換ヘテロアルキル、置換もしくは無置換アリール、置換もしくは無置換ヘテロアリール、置換もしくは無置換ヘテロシクロアルキルまたは置換もしくは無置換ペプチジルを表し、ここで R^{15} および R^{16} は、それらに結合している窒素原子とともに、適宜一緒に、適宜2個以上のヘテロ原子を含む4~6員の置換もしくは無置換ヘテロシクロアルキル環系を形成する。

好ましくは、Aは、置換もしくは無置換フェニルまたは置換もしくは無置換ピロールである。さらに、 R^{11} について本明細書に記載した置換基のいずれの選択もまた、 R^{33} に適用可能である。

【0256】

好ましいパートナー分子は、式(I)

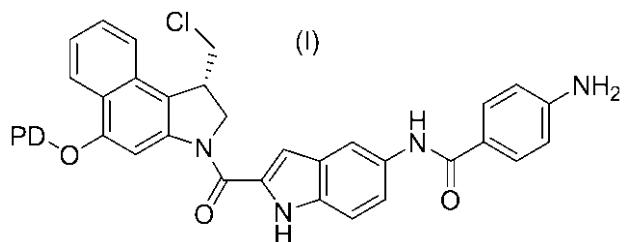
10

20

30

40

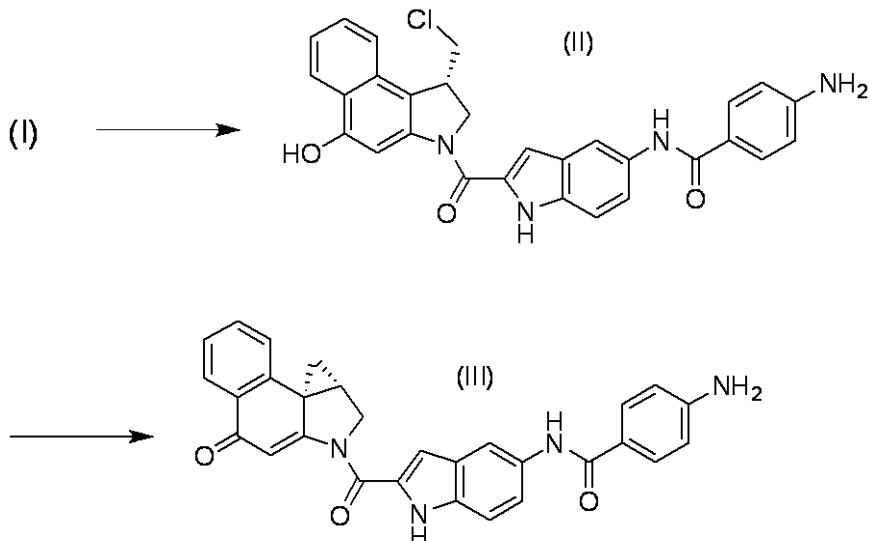
【化26】



により表される構造を有する。

式(I)において、PDは、プロドラッグ化(prodrugging)基(時折、保護基とも呼ばれる)を表す。化合物(I)は、*in situ*で(好ましくは酵素的に)加水分解されて、式(II)の化合物を放出する。当業者が認識しうるよう、化合物(II)は、CBI化合物として知られる化合物の類に属する(Boger et al., J. Org. Chem. 2001, 66, 6654-6661およびBoger et al., US 2005/0014700 A1 (2005))。CBI化合物は、*in situ*で(または、患者に投与される場合、*in vivo*で)、そのシクロプロピル誘導体、例えば化合物(III)に変換され、DNAの副溝に結合し、次いで、実際のアルキル化種であると考えられるシクロプロピル誘導体を用いて、アデニン基上で、DNAをアルキル化する。

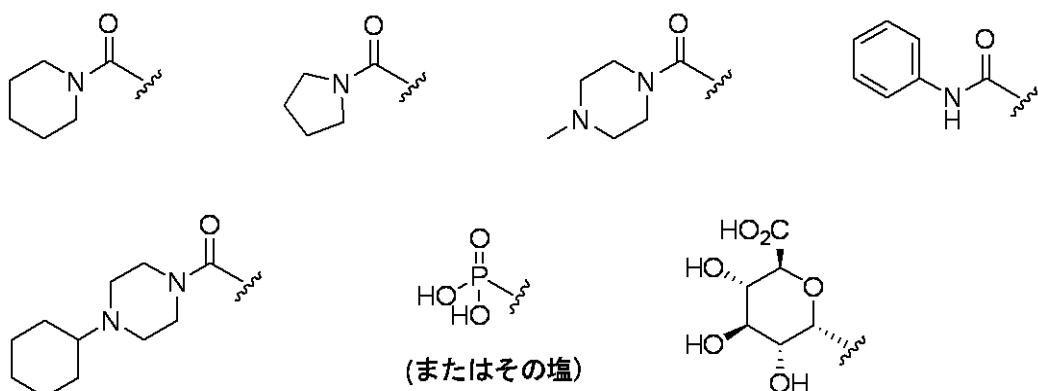
【化27】



【0257】

適切なプロドラッグ化基PDの非限定的な例としては、以下:

【化28】



に例示される、エステル、カルバメート、ホスフェート、およびグリコシドが挙げられる。

好ましいプロドラッグ化基PDは、カルボキシエステラーゼによって加水分解されるカル

10

20

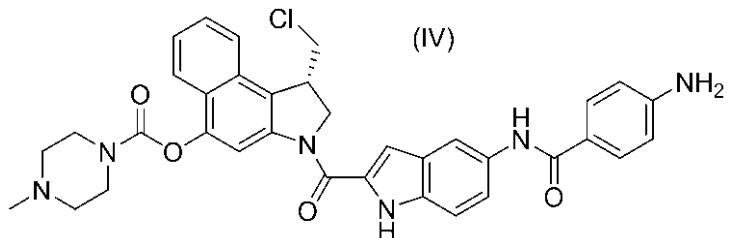
30

40

50

バメート(上記の最初の5つの構造により例示される); アルカリホスファターゼによって加水分解されるホスフェート(上記の6番目の構造)、ならびに -グルクロニダーゼによって加水分解される -グルクロン酸誘導体である。特定の好ましいパートナー分子は、式(IV):

【化29】



10

20

30

40

により表されるカルバメートプロドラッグ化物である。

【0258】

パートナー分子としてのマーカー

パートナー分子がマーカーである場合、それは、検出可能な物理的または化学的特性を有するかまたは生じるいずれの部分であり得て、それにより、特定の組織もしくは細胞においてその存在が示される。マーカー(時折、レポーター基とも呼ばれる)は、イムノアッセイ、生物医学研究、および医学診断の領域で十分に開発されている。マーカーは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段によって検出されうる。例としては、磁気ビーズ(例えば、DYNABEADS(商標))、蛍光色素(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン、など)、放射標識(例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P)、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびELISAで通常用いられる他のもの)、ならびに、比色分析標識、例えば、コロイド金、色ガラス、またはプラスチックビーズ(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス、など)があげられる。

【0259】

該マーカーは好ましくは、放射性同位元素、蛍光剤、蛍光剤前駆体、発色団、酵素、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるメンバーである。適切な酵素の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 -ガラクトシダーゼ、およびグルコースオキシダーゼである。蛍光剤としては、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、などが挙げられる。化学発光化合物としては、ルシフェリン、および2,3-ジヒドロフタラジンジオン、例えば、ルミノールが挙げられる。用いられ得る様々な標識またはシグナル生成システムの概説については、US 4,391,904を参照。

【0260】

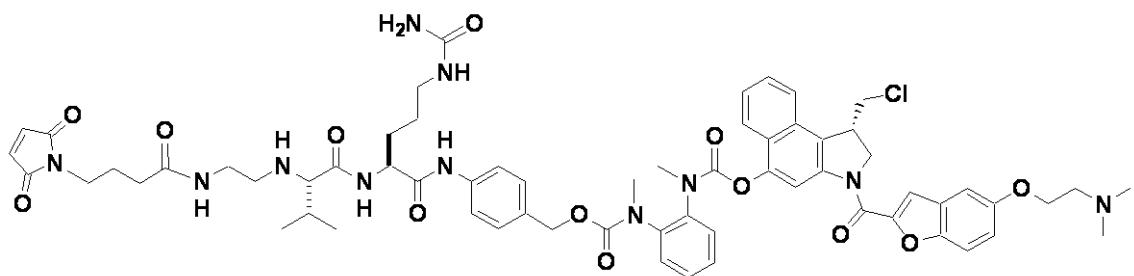
マーカーは間接的手段によって結合され得る: リガンド分子(例えば、ビオチン)は抗体に共有結合する。次いで、該リガンドを、本質的に検出可能であるか、またはシグナルシステム(例えば、検出可能な酵素、蛍光化合物、もしくは化学発光化合物)に共有結合している別の分子(例えば、ストレプトアビシン)に結合する。

【0261】

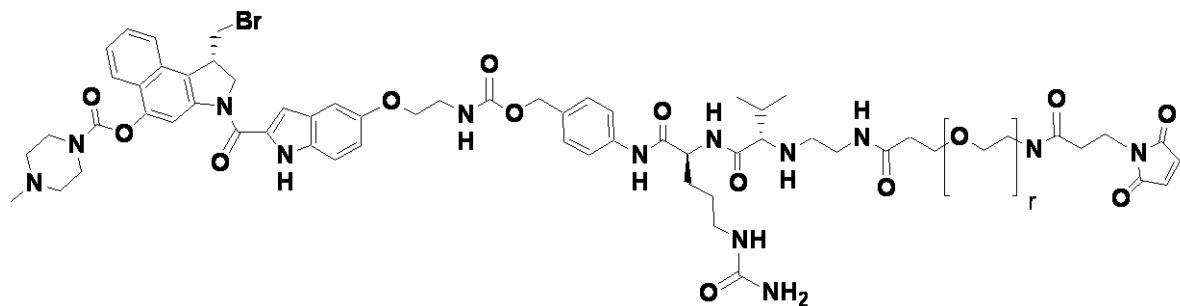
複合体の例

本発明の抗体の複合体に適したパートナー分子-リンカーの組み合わせの具体的な例は、以下:

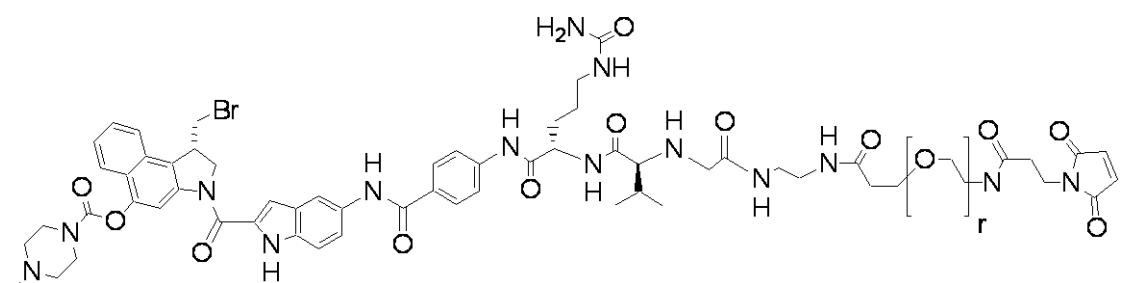
【化 3 0】



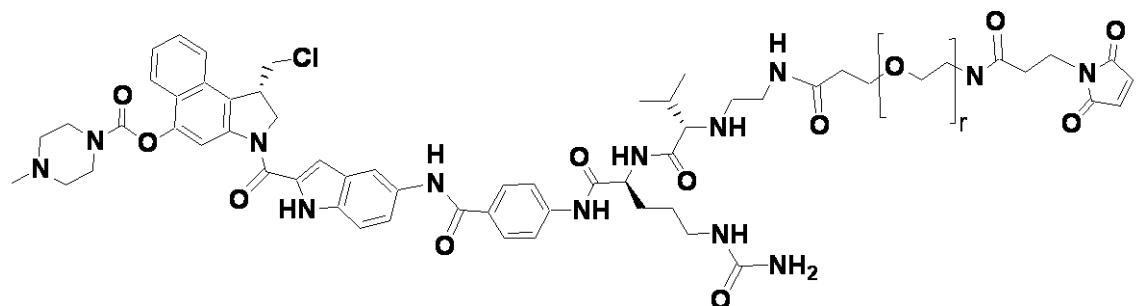
10



20

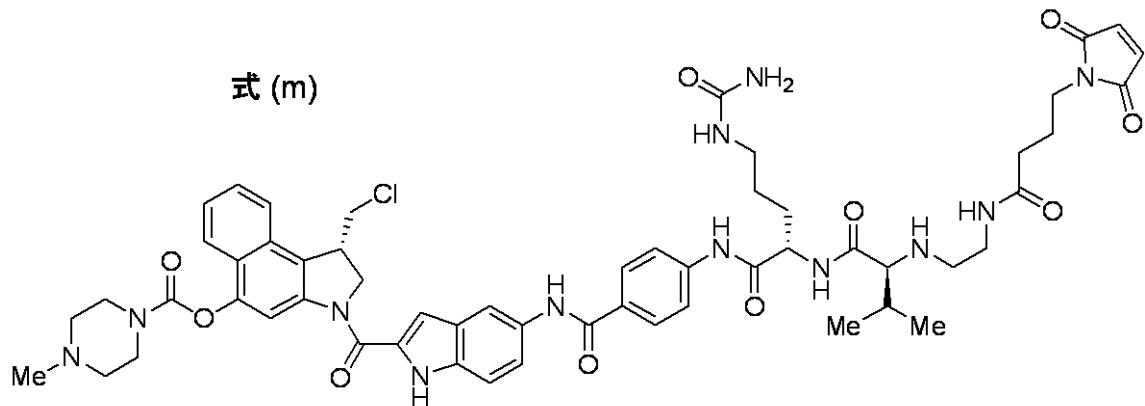


30

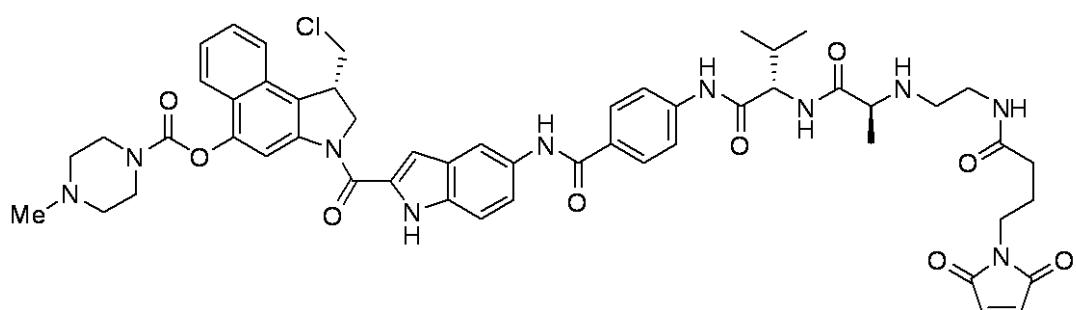
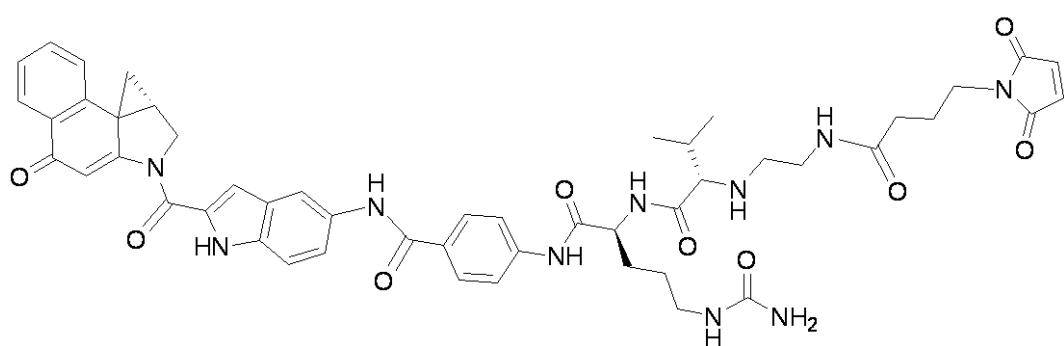
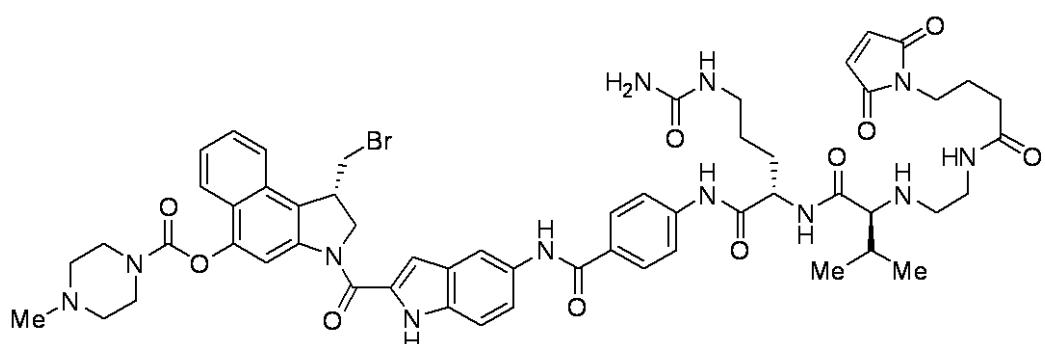
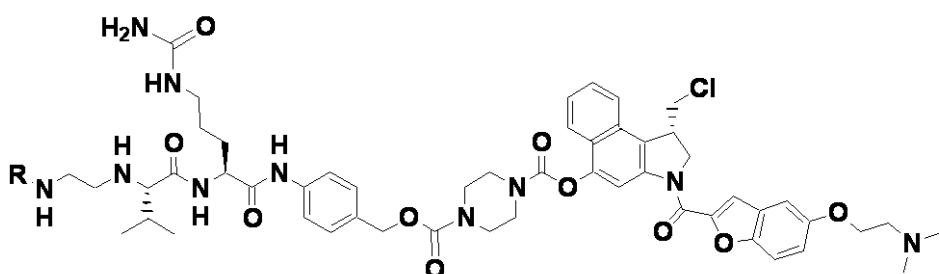
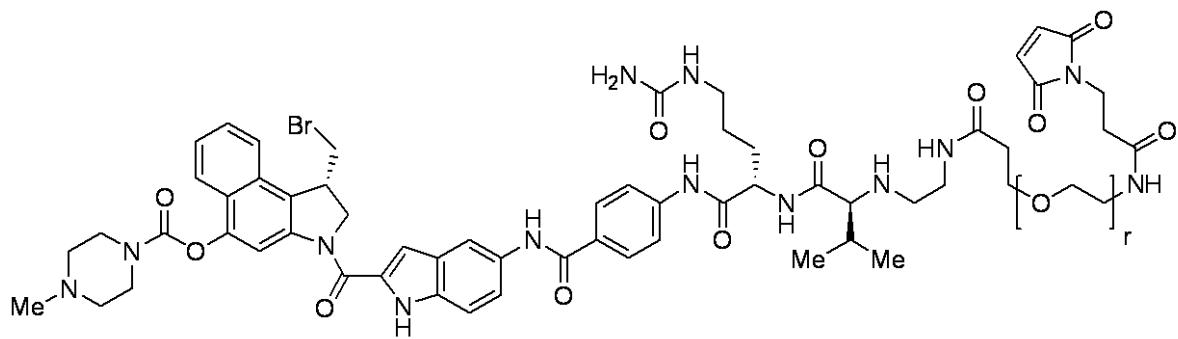


40

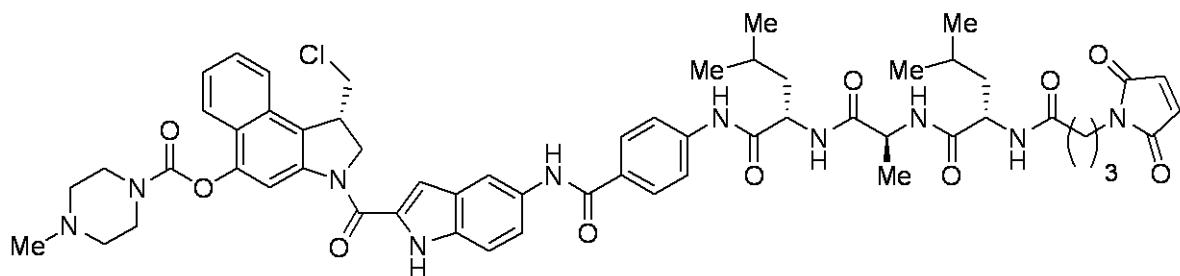
式 (m)



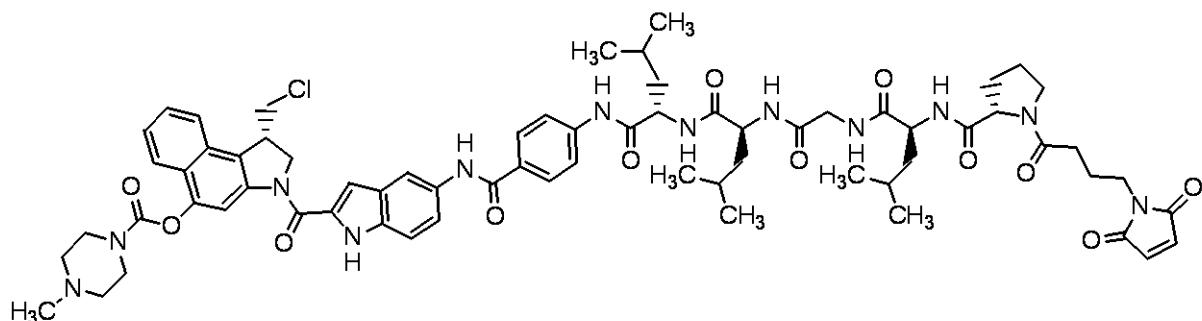
【化 3 1】



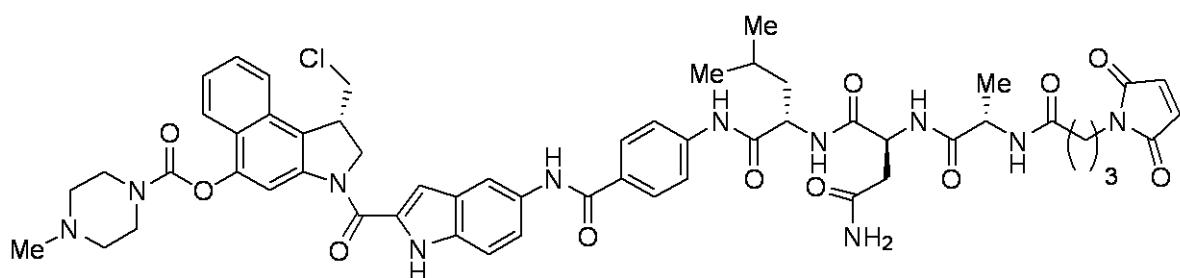
【化 3 2】



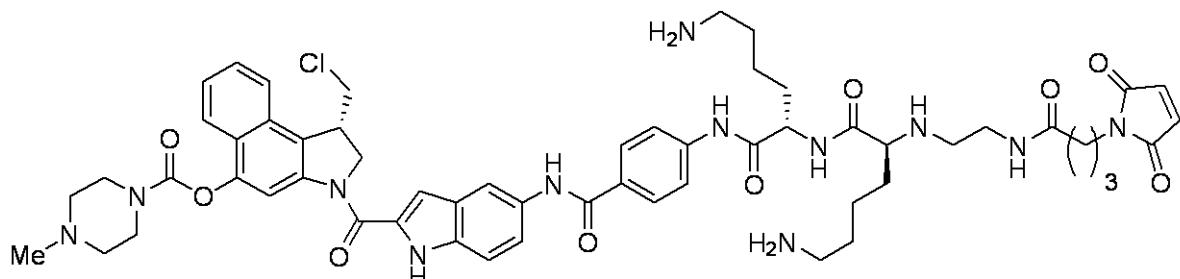
10



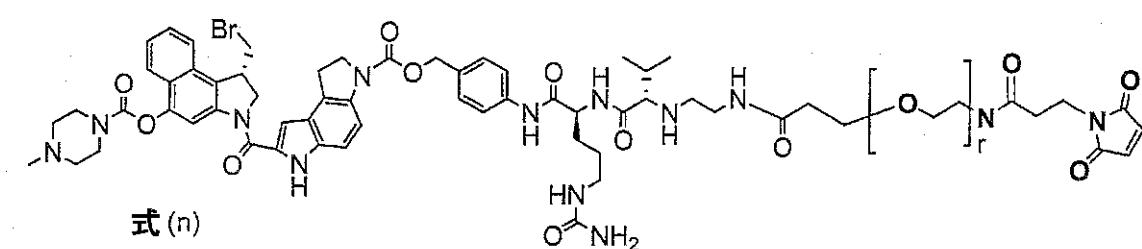
20



30

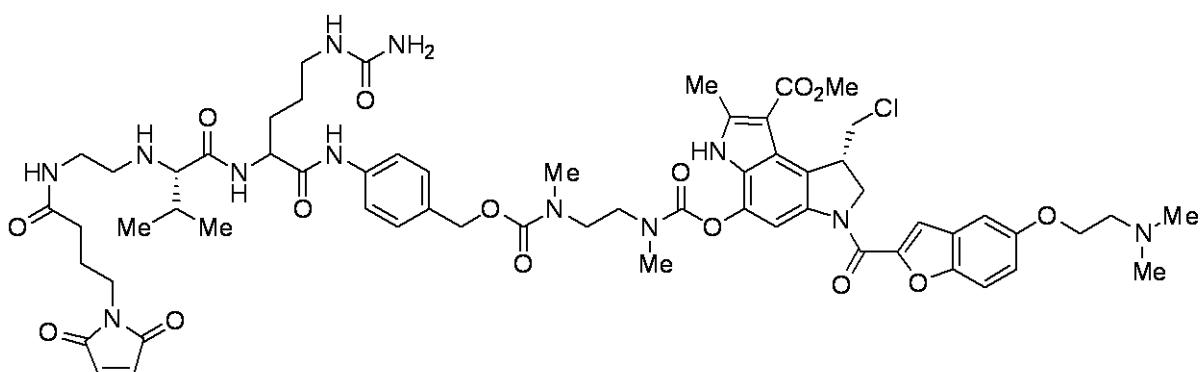
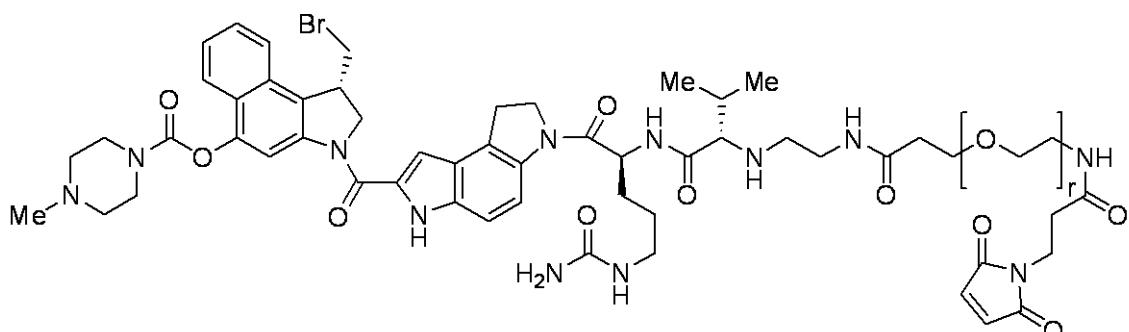
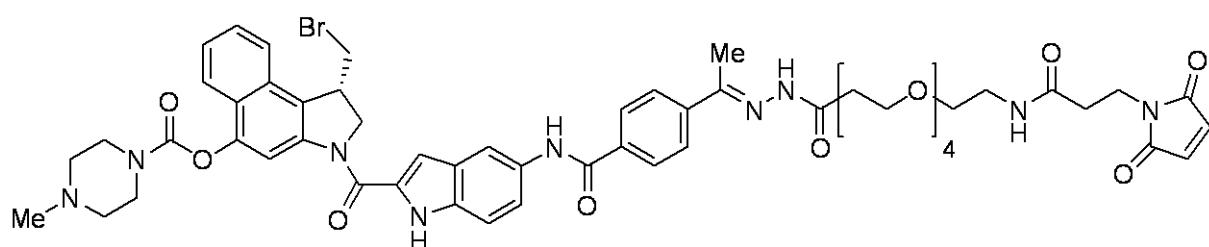
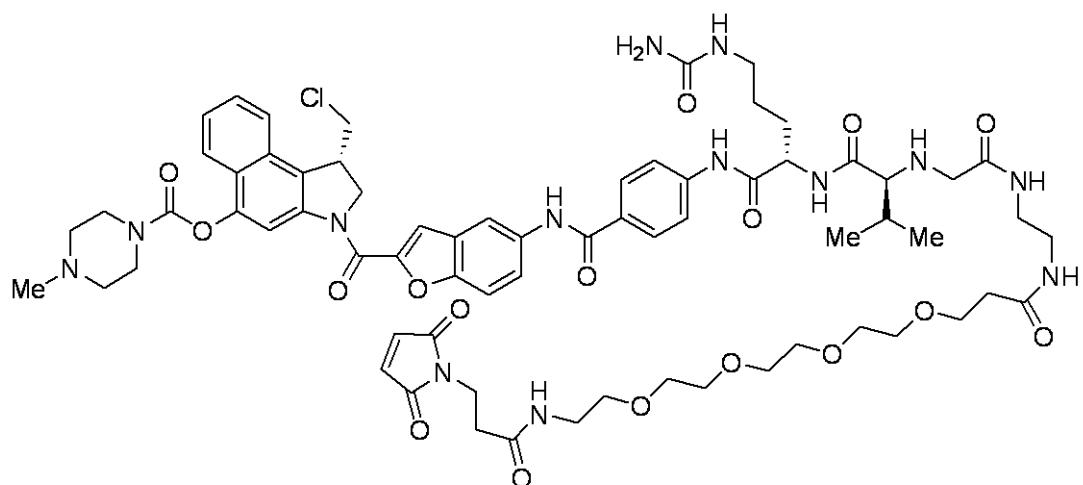


40

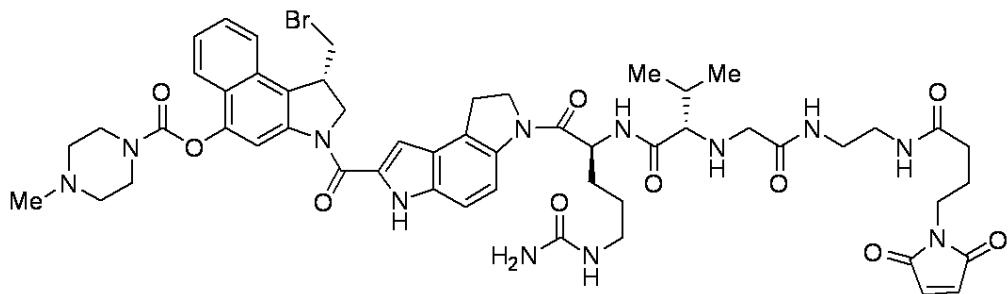


式 (n)

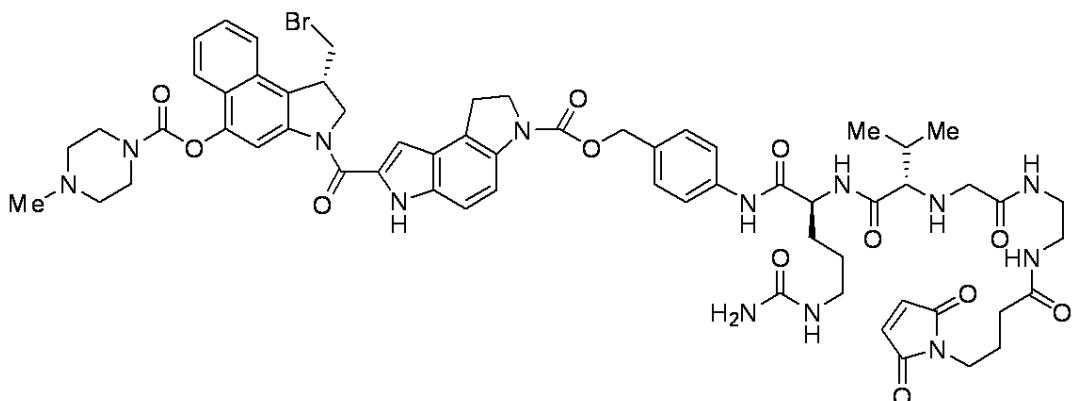
【化 3 3】



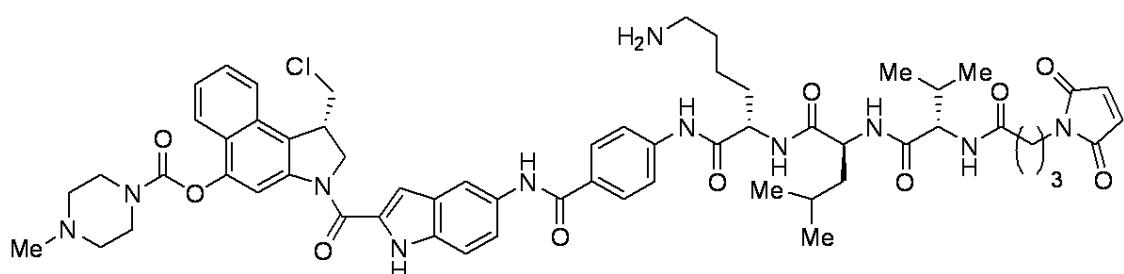
【化 3 4】



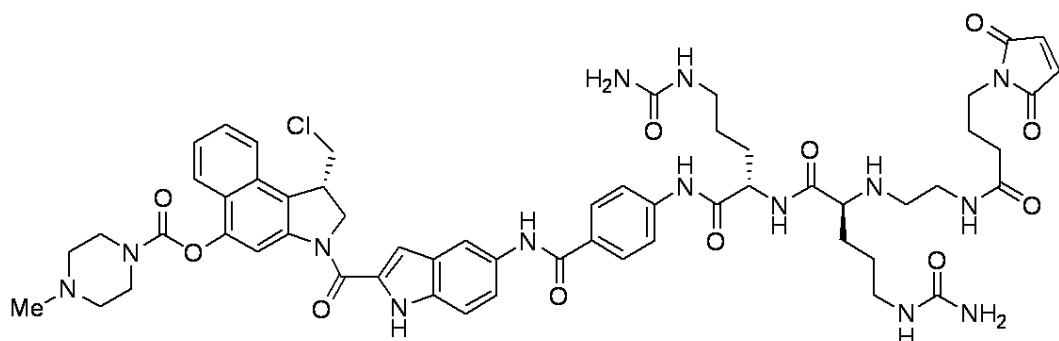
10



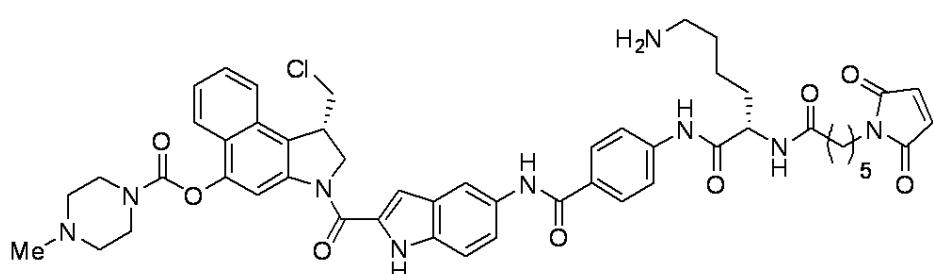
20



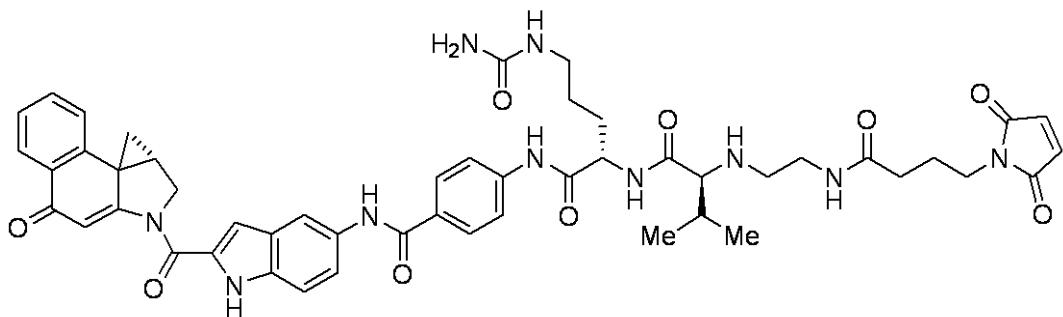
30



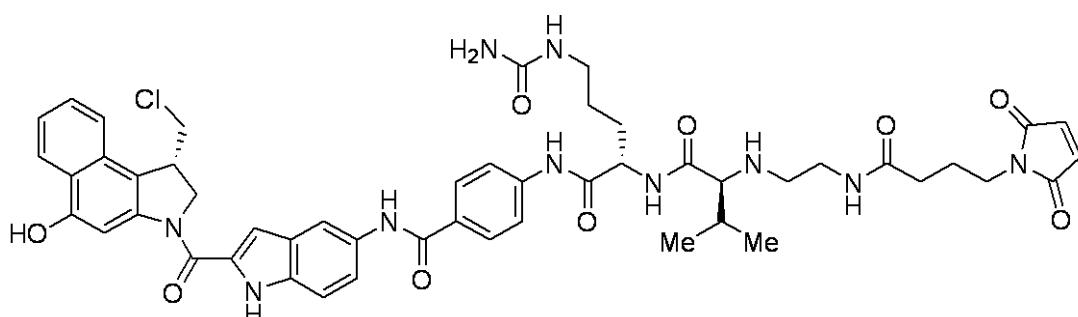
40



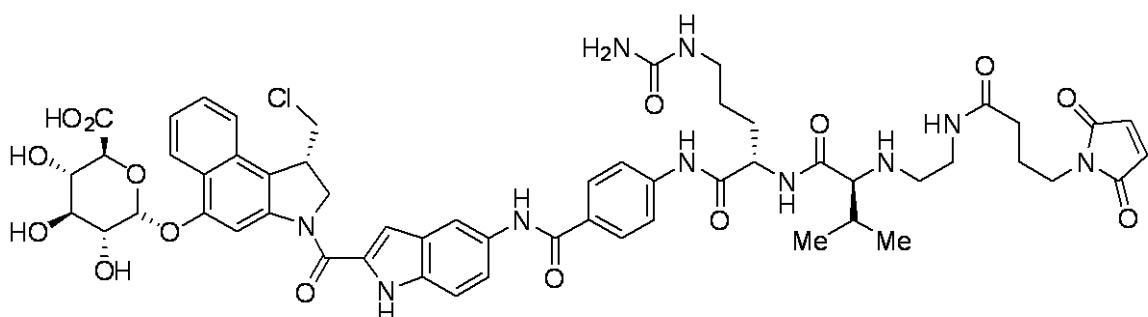
【化 3 5】



10



20



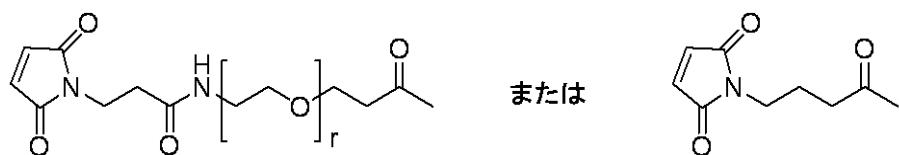
30

に示される。

【 0 2 6 2 】

前述の化合物において、下付き文字rが式中に存在する場合、それは0~24の範囲の整数である。Rは、どこに現れる場合でも、

【化 3 6】



40

である。前述の化合物の各々はマレイミド基を有しており、スルフヒドリル基を介して抗体に結合できる状態にある。

【 0 2 6 3 】

医薬組成物

別の態様において、本発明は、医薬的に許容される担体、および適宜、他の活性もしくは不活性成分とともに製剤化した本発明の複合体を含む医薬組成物を提供する。

[0 2 6 4]

本発明の医薬組成物はまた、他の薬剤との併用療法で投与することもできる。例えば、併用療法は、少なくとも1つの他の抗炎症剤もしくは免疫抑制剤と合わせた本発明の抗-R

G-1複合体を含むことができる。併用療法において用いることができる治療薬の例を、以下においてより詳細に記載する。

【0265】

本明細書で用いる「医薬的に許容される担体」には、生理学的に適合性である、ありとあらゆる溶媒、分散媒、被覆剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤 (absorption delaying agent) などが含まれる。好ましくは、該担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与(例えば、注射または注入によって)に適している。投与経路に応じて、該活性化合物を物質でコーティングして、該化合物を不活性化しうる酸の作用および他の天然の条件から化合物を保護してもよい。

【0266】

本発明の医薬化合物は、1つ以上の医薬的に許容される塩を含み得る。「医薬的に許容される塩」とは、親化合物の目的の生物活性を保持しており、いずれの望ましくない毒性的影響を与えない塩を言う(例えば、Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照)。そのような塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩には、無毒性無機酸、例えば、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸など由来のもの、ならびに無毒性有機酸、例えば脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル-置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸など由来のものが挙げられる。塩基付加塩としては、アルカリ土類金属、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなど由来のもの、ならびに無毒性有機アミン、例えばN,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなど由来のものが挙げられる。

10

【0267】

本発明の医薬組成物はまた、医薬的に許容される抗酸化剤も含み得る。医薬的に許容される抗酸化剤の例としては：(1) 水溶性抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸、システイン塩酸塩、硫酸水素ナトリウム、二亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；(2) 油溶性抗酸化剤、例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、-トコフェロールなど；ならびに(3) 金属キレート化剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸など、が挙げられる。

20

【0268】

適切な担体の例としては、水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの混合物、植物油(例えばオリーブ油)、ならびに注射用有機エステル(例えばオレイン酸エチル)が挙げられる。適当な流動性は、コーティング剤(例えばレシチン)の使用によって、分散の場合に必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持されうる。

30

【0269】

該組成物はまた、アジュバント、例えば保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤も含み得る。無菌化によって、かつ、抗菌剤および抗真菌剤(例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸など)の含有によって、微生物の存在の阻止が保証されうる。組成物中に等張剤(例えば糖、塩化ナトリウムなど)が含まれることもまた望ましい。加えて、注射用医薬形態の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤(例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン)の含有によってもたらされ得る。

40

【0270】

医薬的に許容される担体には、無菌注射用液剤もしくは分散剤の即時調製用の、無菌水溶液もしくは分散液および無菌粉末が含まれる。医薬的に活性な基質についてのそのような媒質および薬剤の使用は、当分野で公知である。いずれの通常の媒質または薬剤も活性化合物と適合しない場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるその使用が意図される。補足的な活性化合物を加えることもできる。

【0271】

50

治療組成物は典型的には、製造および保存の条件下において、無菌および安定でなければならない。該組成物は、溶液、マイクロエマルション、リポソーム、または高い薬物濃度に適した他の秩序構造として製剤化され得る。該担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレンギリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、ならびにそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒であり得る。適当な流動性は、コーティング剤(例えばレシチン)の使用によって、分散の場合に必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持されうる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムが、組成物中に含まれるのが好ましいであろう。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤(例えばモノステアリン酸塩およびゼラチン)の含有によってもたらされ得る。

10

【0272】

無菌注射液は、必要に応じて活性化合物を、上記で列挙した成分の1つもしくは組み合わせとともに、適当な溶媒中、必要量で添加した後、無菌化精密濾過(sterilization microfiltration)によって、製造することができる。一般的に分散剤は、活性化合物を、基本分散媒および上記で列挙したものからの必要な他の成分を有する無菌ビヒクルに加えることによって製造される。無菌注射液の製造用の無菌粉末の場合、製造の好ましい方法は減圧乾燥および凍結乾燥であり、それによって、活性成分に、その予め無菌-濾過した溶液からのいずれのさらなる目的の成分を加えた粉末が得られる。

20

【0273】

担体と組み合わせて単一剤形を製造し得る活性成分の量は、治療している患者および特定の投与様式に応じて変化し、それは一般に治療効果を生じる組成物の中の活性成分の量であろう。一般的に、100%中、この量は、医薬的に許容される担体と組み合わせて、約0.01%～約99%の活性成分、好ましくは約0.1%～約70%、最も好ましくは約1%～約30%の活性成分の範囲であろう。

【0274】

投与レジメンは、最適な望ましい応答(例えば、治療応答)が得られるように調整される。例えば、単回ボーラス投与を行ってもよいし、時間をかけて数回に分けて投与してもよいし、あるいは治療状況の要件に示されるように比例的に減少または増加させてもよい。投与を簡単にし、用量を均一にするためには、用量単位剤形で非経口組成物を製剤化するのが特に有利である。本明細書で用いる用量単位剤形とは、治療される患者に対して単位用量(unitary dosage)として適切な物理的に別個の単位を言い；各単位は、必要な医薬担体と共同して目的の治療効果を生じるように算出された所定量の活性化合物を含む。本発明の用量単位剤形についての詳細は、(a) 該活性化合物の特有の特徴および達成される特定の治療効果、ならびに(b) 個体における治療感受性(treatment of sensitivity)のためにそのような活性化合物を配分する技術分野に内在する限界、により決定され、それらに直接依存する。

30

【0275】

複合体の投与において、用量は、宿主の体重当り、約0.0001～100 mg/kg、より一般には0.01～5 mg/kgの範囲である。例えば用量は、0.3 mg/kg体重、1 mg/kg体重、3 mg/kg体重、5 mg/kg体重もしくは10 mg/kg体重、または1-10 mg/kgの範囲内であり得る。例示的な治療計画は、週に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1か月に1回、3か月に1回または3～6か月に1回の投与を必要とする。本発明の複合体に好ましい投与レジメンとしては、静脈内投与による1 mg/kg体重もしくは3 mg/kg体重が挙げられ、該複合体は以下の投与計画：(i) 6回の投与については4週間毎、その後は3か月毎；(ii)

40

3週間毎；(iii) 3 mg/kg体重を1回、その後、3週間毎に1 mg/kg体重のうちの1つを用いて投与される。いくつかの方法において、用量は、約1～1000 μg/mlの血漿複合体濃度、いくつかの方法においては約25～300 μg/mlを達成するように調整される。

【0276】

50

別法として、抗体を徐放性製剤として投与してもよく、その場合投与頻度を減らす必要

がある。用量および頻度は、患者における抗体の半減期に依存して変化する。一般に、ヒト抗体が最も長い半減期を示し、ヒト化抗体、キメラ抗体、および非ヒト抗体と続く。投与の用量および頻度は、処置が予防的であるかまたは治療的であるかに応じて変化し得る。予防的適用においては、比較的低い用量が比較的離れた間隔で長期にわたって投与される。患者の中には生涯処置を受け続ける者もいる。治療的適用においては、疾患の進行が低下または終結するまで、好ましくは患者が疾患の症状の部分的または完全な寛解を示すまで、比較的高用量が比較的短い間隔で時折必要とされる。その後、該患者は予防的レジメを投与され得る。

【0277】

異常な細胞増殖に関連した疾患の予防および/または治療における使用について、約0.01 μM ~ 20 μM の投与化合物の血中濃度が好ましく、約0.01 μM ~ 5 μM が好ましい。10

【0278】

本明細書に記載の化合物の経口投与についての患者の用量は、典型的には約1 mg/日 ~ 約10,000 mg/日、より典型的には約10 mg/日 ~ 約1,000 mg/日、および最も典型的には約50 mg/日 ~ 約500 mg/日の範囲である。患者の体重の観点で述べると、典型的な用量は、約0.01 ~ 約150 mg/kg/日、より典型的には約0.1 ~ 約15 mg/kg/日、および最も典型的には約1 ~ 約10 mg/kg/日（例えば5 mg/kg/日もしくは3 mg/kg/日）の範囲である。

【0279】

いくつかの実施態様において、腫瘍増殖を遅延もしくは阻害する患者の用量は、1 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{日}$ 以下であり得る。例えば、該患者の用量は、0.9、0.6、0.5、0.45、0.3、0.2、0.15、または0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{日}$ 以下（薬物のモルに関して）であり得る。好ましくは、抗体-薬物複合体は、少なくとも5日間にわたって一日投与量で投与した場合、腫瘍の増殖を遅延させる。少なくともいくつかの実施態様において、該腫瘍はSCIDマウスにおけるヒト型腫瘍である。例として、該SCIDマウスはCB17.SCIDマウス（Taconic, Germantown, NYから入手可能）であり得る。20

【0280】

患者への毒性を伴わず、特定の患者、組成物、および投与様式に対する望ましい治療応答を達成するのに有効な活性成分の量が得られるように、実際の用量レベルを変化させてもよい。選択された用量レベルは、様々な薬物動態学的因子、例えば用いられる特定の組成成分、またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、排出速度、治療期間、用いられる特定の組成成分と組み合わせて用いられる他の薬物、化合物および/または物質、年齢、性別、体重、症状、全般的な健康、ならびに患者の前病歴などの因子に依存するであろう。30

【0281】

本発明の複合体の「治療上有効な用量」は、好ましくは、疾患症状の重症度の低下、疾患症状のない期間の頻度と期間の増大、および/または疾患に起因する機能障害もしくは身体障害の予防をもたらす。例えば、for the RG-1⁺腫瘍の治療において、「治療上有効な用量」は好ましくは、無治療の患者に比べて少なくとも約20%まで、より好ましくは少なくとも約40%まで、さらによくは少なくとも約60%まで、さらにより好ましくは少なくとも約80%まで、細胞増殖もしくは腫瘍増殖を阻害する。該複合体の腫瘍増殖を阻害する能力は、ヒト腫瘍における有効性の予測となる動物モデル系において評価することができる。別法として、組成物のこの特性は、細胞増殖を阻害するその能力を試験することによって評価することができ、そのような能力は当業者に公知のアッセイによってin vitroで測定可能である。治療上有効な量の治療用化合物は、腫瘍の大きさを減少させるか、あるいはその他、患者の症状を寛解させることができる。当業者は、患者の大きさ、症状の重症度、および選択された特定の組成物もしくは投与経路のような要因に基づいて、かかる量を決定することができる。40

【0282】

本発明の複合体は、当分野で公知の様々な方法のうちの1つ以上を用いて、1つ以上の投与経路を介して投与することができる。当業者によって認識されうるように、該投与経50

路および/または投与様式は、目的の結果に応じて変化しうる。本発明の抗体に対して好ましい投与経路としては、例えば注射もしくは注入による、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または他の非経口投与経路が挙げられる。本明細書で用いる語句「非経口投与」は、通常は注射による、腸内投与および局所投与以外の投与方法を意味し、限定はしないが、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、囊内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、囊下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内の注射および注入が挙げられる。別法として、本発明の組成物を、非経口でない経路（例えば局所、表皮もしくは粘膜投与経路）を介して、例えば、鼻腔内、経口的、経腔的、直腸内、舌下もしくは局所的に投与することができる。

【0283】

10

該活性化合物は、早期放出 (premature release) に対してそれらを保護する担体を用いて製造することができる（例えば、放出制御製剤、植込錠（implant）、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達システム）。生分解性の生体適合性ポリマー、例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を用いることができる。例えば、*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 を参照。

【0284】

20

治療組成物は、当分野で公知の医療機器を用いて投与することができる。例えば、好ましい実施態様において、本発明の治療組成物は、無針皮下投与機器（needleless hypodermic injection device）、例えばUS 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; もしくは4,596,556に開示のものを用いて投与することができる。他の適切な機器の例としては： US 4,487,603; US 4,486,194; US 4,447,233; US 4,447,224; US 4,439,196; およびUS 4,475,196に開示のものが挙げられる。これらの特許は引用により本明細書に援用される。

【0285】

30

ある特定の実施態様において、本発明の複合体は、*in vivo*での適当な分布が確保されるように製剤化することができる。例えば、血液脳関門(BBB)は多くの高親水性の化合物を排除する。本発明の治療用化合物がBBBを通過することを確実とするために(必要であれば)、それらを、例えば、リポソーム中に製剤化することができる。リポソームを製造する方法については、例えば、US 4,522,811; 5,374,548; および5,399,331を参照。該リポソームは、特定の細胞もしくは器官に選択的に輸送される1つ以上の部分を含有し得て、それにより、標的薬物送達が亢進される（例えば、V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685を参照）。標的部分の例としては、葉酸またはビオチン（例えば、Low et al. のUS 5,416,016を参照）；マンノシド(Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038)；抗体(P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); サーファクタントプロテインA受容体(Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120(Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090)が挙げられる；K. Keinanen; M.L. Laukkonen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273もまた参照。

40

【0286】

使用および方法

本発明の抗体-パートナー分子複合体組成物および方法は、RG-1介在障害の診断および治療を含む、多くの*in vitro*および*in vivo*での診断的および治療的有用性を有する。例えば、これらの分子は、*in vitro*もしくは*ex vivo*において培養細胞に投与することができるか、あるいはヒト患者に、例えば*in vivo*で投与して、様々な障害を治療、予防および診断することができる。好ましい患者には、RG-1活性により介在される障害を有するヒト患者が含まれる。該方法はとりわけ、異常なRG-1発現に関連した障害を有するヒト患者の治療に適している。これらの中で特筆すべきは前立腺癌および膀胱癌である。本発明者らはまた、RG-1が、多くの他の腫瘍タイプ、とりわけ、肺癌、胃癌、乳癌、腎癌、脾癌、

50

大腸癌、メラノーマ、および膵島細胞腺腫に関連していることを見いだした。膵癌および膵島細胞腺腫の場合、RG-1は腫瘍細胞で発現していたけれども、ほとんどの場合において腫瘍ストローマで認められている。従って、本発明の複合体はそのような癌の治療に適している。

【0287】

本発明の抗体の、RG-1に対する特異的な結合を考慮すると、本発明の抗体を用いてRG-1発現を特異的に検出することができ、さらには、免疫アフィニティー精製によりRG-1を精製することができる。

【0288】

さらに、様々な腫瘍細胞によるRG-1の発現を考慮すると、本発明の抗体-パートナー分子複合体組成物および方法を用いて、腫瘍原性障害 (tumorigenic disorder)、例えば、RG-1を発現する腫瘍細胞の存在により特徴づけられる障害 (例えば、前立腺癌または膀胱癌が含まれる) を有する患者を治療することができる。10

【0289】

一実施態様において、本発明の組成物を用いてRG-1のレベルを検出することができ、次いで、そのレベルを特定の疾患症状へと結びつけることができる。あるいは、該組成物を用いてRG-1機能を阻害もしくは遮断することができ、それは同様に、特定の疾患症状の予防もしくは対処に結びつけられ得ることから、RG-1を疾患のメディエーターとして意味づけることができる。このことは、抗体とRG-1間の複合体形成を可能にする条件下において、サンプルおよびコントロールサンプルを抗-RG-1抗体と接触させることにより、達成され得る。抗体とRG-1間に形成されたいずれの複合体も、例えばマーカーまたはレポート基 (reporting group) としてパートナー分子を用いて、サンプルおよびコントロールにおいて検出および比較される。20

【0290】

別の実施態様において、本発明の組成物は最初に、治療的もしくは診断的使用に関連する結合活性について、in vitroにおいて試験され得る。例えば、本発明の組成物は、当分野で公知のフローサイトメトリー・アッセイを用いて試験され得る。

【0291】

特定の実施態様において、該組成物をin vivoで用いて、様々なRG-1-関連疾患を治療、予防もしくは診断する。RG-1-関連疾患の例としては、とりわけ、前立腺癌および膀胱癌が挙げられる。30

【0292】

前述の通り、本発明の組成物は、薬剤 (とりわけ、抗新生物薬 (例えばドキソルビシン (アドリアマイシン)、シスプラチン、硫酸ブレオマイシン、カルムスチン、クロラムブシリル、シクロホスファミド、およびヒドロキシウレア) が含まれ、それらは単独では、患者に対して毒性もしくは毒性水準下のレベルで有効であるのみである) を含有することができる。シスプラチンは、4週毎に1回、100 mg/kg用量で静脈内投与され、アドリアマイシンは、21日毎に1回、60-75 mg/ml用量で静脈内投与される。本発明のヒト抗-RG-1抗体もしくはその抗原結合フラグメントと化学療法薬との同時投与は、ヒト腫瘍細胞に対して細胞毒素性効果をもたらす異なるメカニズムを介して機能する2つの抗癌剤を提供する。かかる同時投与により、薬剤に対する耐性もしくは腫瘍細胞の抗原性における変化 (それらは抗体との非反応性をもたらす) の進行に起因する問題を解決することができる。40

【0293】

抗体が補体結合部位 (例えば、補体を結合する、IgG1、-2もしくは-3、またはIgM由來の部分) を有する場合、補体の存在下において用いられ得る。一実施態様において、本発明の結合剤および適当なエフェクター細胞を用いた、標的細胞を含有する細胞集団のex vivo処置は、補体または補体を有する血清の追加により補完され得る。本発明の結合剤で覆われた標的細胞の食作用は、補体タンパク質の結合により改善され得る。別の実施態様において、本発明の組成物 (例えば、ヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子) で覆われた標的細胞もまた、補体により溶解され得る。さらに別の実施態様において、本発明の

10

20

30

40

50

組成物は補体を活性化しない。

【0294】

本発明の組成物はまた、補体と共に投与することができる。ある特定の実施態様において、本発明は、ヒト抗体、多重特異性もしくは二重特異性分子、および血清もしくは補体を含有する組成物を提供する。これらの組成物は、補体が、ヒト抗体、多重特異性もしくは二重特異性分子の近接に位置している場合に有利であり得る。別法として、本発明のヒト抗体、多重特異性もしくは二重特異性分子、および補体もしくは血清を別々に投与することができる。

【0295】

また、本発明の抗体組成物および使用説明書を含むキットも本発明の範囲内である。該キットは、1つ以上のさらなる試薬（例えば、免疫抑制試薬、細胞傷害性薬物、もしくは放射性毒性薬物（radiotoxic agent））、または1つ以上のさらなる本発明のヒト抗体（例えば、第1ヒト抗体とは異なるRG-1抗原中のエピトープに結合する、相補的活性を有するヒト抗体）をさらに含むことができる。

10

【0296】

従って、本発明の抗体組成物を用いて治療される患者に、該組成物の治療効果を増強もしくは増大させる別の治療薬（例えば、細胞傷害製薬物もしくは放射性毒性薬物）をさらに（本発明の組成物の投与の前、同時、または後に）投与することができる。

【0297】

他の実施態様において、FcもしくはFc受容体の発現もしくは活性を調節（例えば、増強もしくは増大させる）する薬剤を用いて、該患者をさらに治療することができる（例えばサイトカインを用いて患者を治療することができる）。多重特異的分子を用いた治療中における投与に好ましいサイトカインとしては、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターフェロン- α (IFN- α)、および腫瘍壞死因子(TNF)が挙げられる。

20

【0298】

本発明の組成物を用いて、例えばFcRまたはRG-1を発現する細胞を標識するために、かかる細胞を標的とすることもできる。そのような使用のために、該結合剤を検出可能な分子に連結することができる。従って、本発明は、Fc受容体（例えば、FcR）またはRG-1を発現する細胞の、ex vivoまたはin vitroにおける検出方法を提供する。検出可能な標識は、例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。

30

【0299】

さらに別の実施態様において、本発明の免疫複合体を用いて、化合物を抗体に結合することによって、RG-1を発現する細胞に対する化合物（例えば、治療薬、標識、細胞毒素、放射性毒素（radiotoxin）、免疫抑制剤、など）を標的とすることができます。例えば、抗-RG-1抗体を、US 6,281,354および6,548,530、US 2003/0050331、2003/0064984、2003/0073852および2004/0087497、またはWO 03/022806に記載の細胞毒素化合物のいずれかに結合させることができます。従って、本発明はまた、RG-1を発現する細胞のex vivoもしくはin vivoにおける検出方法も提供する（例えば、検出可能な標識、例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子を用いて）。別法として、免疫複合体を用いて、RG-1を標的とする細胞毒素もしくは放射性毒素により、RG-1細胞表面受容体を有する細胞を死滅させることができます。

40

【0300】

さらに別の実施態様において、本発明の免疫複合体は、細胞内で見られるエンドソームのpHで容易に開裂されるヒドラゾンリンカーを含有する。腫瘍の細胞外環境は低酸素かつ酸性であるので、そのようなリンカーが非内在化複合体に対して有用であり得る。腫瘍の細胞外pH(pHe)の測定は多くのグループにより実施してきた。pHeは、ラクテートおよびCO₂の生成につながる腫瘍微小環境における酸素およびグルコースの限られた利用可能性によって制御されると考えられる(Heimlinger et al., (2002). Clin. Cancer Res. 8, 1284-1291)。pHeの推定値は、一貫しておよそ6.8か；または、対応する組織より0.5 pH単

50

位低い(Yamagata & Tannock (1996) Br. J. Cancer 73, 1328-1334; Yamagata et al., (1998). Br. J. Cancer 77, 1726-1731; Helmlinger et al., (1997) Nature Med. 3, 177-182)。操作によって、短期間、pHを6.5の低さに近づけることが可能である(Helmlinger et al., (1997) Nature Med. 3, 177-182; Kozin et al., (2001) Cancer Res. 61, 4740-4743)。これはpHにおける小さな差異であるけれども、該抗体は薬物を腫瘍環境内で長期間保持し得て、そのことがヒドラゾンリンカーからの薬物の放出を可能とし得る。pO₂とpHeは強く相関しており、最も低いpHe値は、腫瘍の中心における壊死性の不十分な血管新生領域(necrotic poorly vascularized area) - 抗体の侵入が最も少ないが長期にわたって保持することができる領域において認められる(Yamagata et al., (1998) Br. J. Cancer 77, 1726-1731)。

10

【0301】

本発明は、以下の実施例によりさらに説明され、該実施例はさらに限定するものとして解釈されるべきではない。本願を通して言及される全ての図面ならびに全ての参考文献、特許および公開特許出願の内容は、引用により本明細書に明確に援用される。

【実施例】

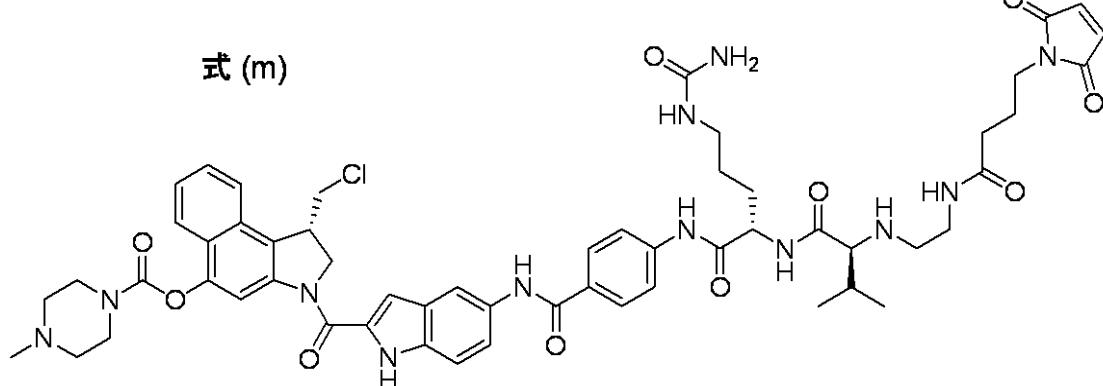
【0302】

実施例1: 複合体の製造および製剤化

抗-RG-1抗体19G9およびいくつかの比較用抗体を、式(m):

【化37】

20



30

の分子に結合させた。抗体19G9および分子(m)に用いた以下の方法は代表的なものである。

【0303】

100 mM リン酸ナトリウム、50 mM NaCl、2 mM DTPA、pH 8.0中において~5 mg/mLの濃度で抗体19G9を、10-倍のモルの過剰量の2-イミノチオランを用いてチオール化する。連続混合により室温で1時間、チオール化反応を行った。(2-イミノチオランをリジン-アミノ基と反応させて、それらを結合反応に利用可能なチオールに変換する。)

【0304】

チオール化に続いて、該抗体を、PES膜による10 kDa NMWO フラットシート タンジェンシャルフロー・フィルトレーション(TFF)カセットを用いて、膜分離(diafiltration)により、複合バッファー(50 mM HEPES、5 mM グリシン、2 mM DTPA、pH 5.5)にバッファー交換する。チオール化抗体の濃度を2.5 mg/mLに調節し、チオール濃度を決定する。

【0305】

抗体のチオールあたり3-倍モルの過剰量で5 mMのDMSO中の分子(m)の保存液を添加し、室温で90分間混合する。結合した抗体を、0.2 μmフィルターを通して濾過する。結合の後、100 mMのN-エチルマレイミド/DMSOを、抗体チオール含量の10-倍モルの過剰量で添加し、すべての未反応のチオール基をクエンチする。このクエンチ反応を室温で1時間、連続混合により行う。

【0306】

0.2 μmフィルターを通して該複合体を濾過した後、カチオン交換クロマトグラフィー

40

50

精製で処理する。SPセファロース高速カチオン交換カラム(CEX)を、5 CV(カラム容積)の50 mM HEPES、5 mM グリシン、1M NaCl、pH 5.5を用いて再生する。再生の後、該カラムを、3 CVの平衡化バッファー(50 mM HEPES、5 mM グリシン、pH 5.5)を用いて平衡化する。該複合体をロードし、該カラムを平衡化バッファーで1回洗浄する。該複合体を、50 mM HEPES、5 mM グリシン、230 mM NaCl、pH 5.5で溶離する。溶離液をフラクション毎に集める。その後、該カラムを、50 mM HEPES、5 mM グリシン、1M NaCl、pH 5.5を用いて再生して、タンパク質凝集物およびいずれの未反応の分子(m)をも除去する。

【0307】

溶離フラクションのプールは、凝集レベルおよび置換率(SR)すなわちパートナー分子のモル/抗体のモルに基づく。プールする判断基準は、1~1.5のSR範囲を用いてSEC-HPLCにより決定された 95%モノマーである。

10

【0308】

精製したCEX溶離物プールを、PES膜を有する10 NMWCO フラットシート TFF カセットにおいて、バルクの膜分離バッファー (bulk diafiltration buffer) (30 mg/mL スクロース、10 mg/mL グリシン、pH 6.0)に、バッファー交換する。バルク製剤は、タンパク質濃度を5 mg/mlまで希釈することによって、およびデキストラン40を膜分離した複合体溶液に、最終濃度10 mg/mlまで添加することによって完了される。製剤されたバルクを、0.2 μm PESフィルターを通して無菌のPETGボトルに濾過し、2~8℃で保存する。

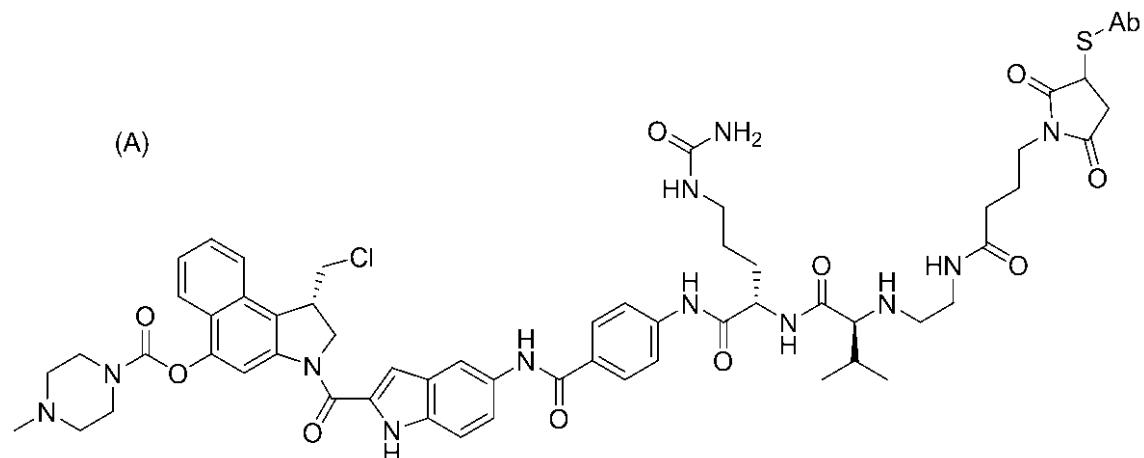
20

【0309】

式(m)の分子を有する抗体の複合体は、式(A)により表すことができ、ここでAbは抗体(上記の実施例において、抗体は19G9である)を意味する。統計的平均である1~1.5のSR範囲により分かるように、該抗体のいくつかはそれに結合する2以上の式(m)の分子を有する。

30

【化38】

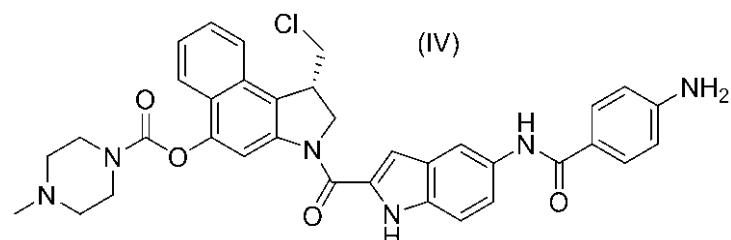


【0310】

当業者は、構造(m)は実際のところ、厳密な意味での(proper)パートナー分子(IV)および抗体にそれを結合するためのリンカー部分の両方を包含し、複合体の開裂後に厳密な意味でのパートナー分子(IV)が放出されることを認識するであろう。上記の通り、カルバメートプロドラッグ化基の加水分解の後、厳密な意味での活性分子を放出する。

40

【化39】



【0311】

50

実施例 2: LNCaPおよび786-O細胞での腫瘍活性化活性

抗-RG-1およびED-B-細胞毒素複合体の腫瘍活性化活性を決定するために、ATCCから入手した接着細胞、LNCaP(PSMA+/CD70- 前立腺癌)および786-O(CD70+/PSMA+ 腎細胞癌)を、ATCCのインストラクションに従って10%熱不活性化ウシ胎仔血清(FCS)を含むRPMI培地中で培養した。該細胞を、トリプシン溶液を用いてプレートから剥離した。細胞を集めて洗浄し、LNCaPおよび786-O細胞について各々、10% FCS含有RPMI中に0.25もしくは 0.1×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁した。100 μlの細胞懸濁液を96ウェルプレートに添加し、該プレートを3時間インキュベートして、細胞を接着させた。このインキュベートの後、特定の抗体-細胞毒素複合体の、300 nM 細胞毒素を開始とする1:3段階希釈物を個々のウェルに添加した。その後、該プレートを48時間インキュベートし、10 μlの100 μCi/ml ^{3}H -チミジンでパルスし(pulsed)、さらに24時間インキュベートした。該プレートを、96ウェルハーベスター(Packard Instruments)を用いて採取し、Packard Top Count Counterでカウントした。Prismソフトウェアを用いて、4つのパラメーターのロジスティック曲線を薬物モル濃度の関数として ^{3}H -チミジン取り込みにフィッティングさせてEC₅₀値を決定した。様々な抗体-細胞毒素複合体について該ロジスティック曲線をフィッティングさせ、LNCaPおよび786-O細胞において得られたそのEC₅₀値を、各々、図3Aおよび3Bに図示する。LNCaP細胞のPSMA⁺、RG-1⁺、ED-B⁺およびCD70⁻の特性(nature)と、786-O細胞のPSMA⁻、RG-1⁻、ED-B⁻およびCD70⁺の特性との差異を考慮すると、これらのグラフは、抗体-細胞毒素複合体が ^{3}H -チミジン取り込みの制限において抗原特異的に有効であることを示唆している(それにより増殖の減衰を示す)。

10

20

30

【0312】

実施例 3: SCIDマウスにおけるLNCaP/前立腺ストローマ共培養腫瘍に対する有効性

本発明の抗-RG-1複合体およびED-B-細胞毒素複合体の有効性を決定するために、LNCaP異種移植を以下のとおり実施した: 0.2 mlのPBS/マトリゲル(1:1)(BD Bioscience)に再懸濁した、200万個のLNCaP細胞および100万個の前立腺ストローマ細胞(cat# CC-2508, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc, Walkersville, MD)を、120個体のCB17.SCIDマウスの側腹部領域に皮下注射した。このLNCaP/ストローマモデルは、細胞表面で高レベルのPSMAを発現し、ストローマ中で高レベルのRG-1を発現する。異種移植体はCD70に対して陰性であるので、CD70をアイソタイプコントロールとして用いる。移植後、マウスは週に1回、体重測定され、電子キャリバーを用いて腫瘍について三次元的に測定された。腫瘍容積は、高さ × 幅 × 長さ/2として算出した。平均して 50 mm^3 の腫瘍を有するマウスを、-1日目に、7個体のマウスの16の処置群に任意抽出し、0日目に、表1に記載の投与レジメンに従って、ビヒクル、抗体、または抗体-細胞毒素複合体を腹腔内に処置した。研究は、62日目に終了した。

40

【表1】

表 1: SCIDマウスへの投薬	
抗体または複合体	用量(細胞毒素 $\mu\text{ mole/kg}$, 抗体 mg/kg)
ビヒクルIP SD (コントロール)	
抗-PSMA IP SD	30
抗-RG-1 IP SD	30
抗-EDB IP SD	30
抗-CD70-毒素 IP SD	0.03, 0.1, 0.3
抗-PSMA-毒素 IP SD	0.03, 0.1, 0.3
抗-RG-1-毒素 IP SD	0.03, 0.1, 0.3
抗-EDB-毒素 IP SD	0.03, 0.1, 0.3

50

【0313】

図4Aから4Dは、16の異なる群の各々の7個体のマウスについての腫瘍容積における平均増大を表す。左上のグラフに示すとおり、抗-RG-1および抗-ED-Bのネイキッド(naked)抗体は、腫瘍増殖において阻害効果を有しなかった。抗-PSMAネイキッド抗体はいくらかの抗-腫瘍増殖効果を有した。この抗-腫瘍効果は、抗-PSMA抗体への細胞毒素の結合により増大された。しかしながら、および予期せぬことに、内在化抗原に対する複合抗体のものに類似した抗-腫瘍活性が、予め非-内在化抗原に対する無力抗体が細胞毒素に結合している場合に認められた。これらの結果は、細胞毒素の抗-腫瘍活性が非-内在化抗原に対する抗体によって介在され得ることを立証する。

【0314】

10

図5Aから5Dは、研究した16の異なる群の各々の7個体のマウスについての平均体重の変化を表す。LNCaP腫瘍はマウスにおいて悪液質を引き起こし、この悪液質はビヒクルもしくはネイキッド抗体を用いて処置したマウスにおいて、おそらく腫瘍増殖に起因する体重減少をもたらした。対照的に、抗体-薬物複合体を用いて処置したマウスは投与の直後が最も低い体重であり、全ての試験された用量0.03-0.3は耐用性良好であることを示唆している。複合体群においてマウスの体重が増加したという事実は、腫瘍増殖の制御および悪液質の軽減を強く示唆する。

【0315】

20

実施例4: SCIDマウスにおけるLNCaP腫瘍に対する有効性

本発明の抗-RG-1複合体およびED-B-細胞毒素複合体の有効性を決定するために、LNCaP異種移植を以下のとおり実施した：0.2 mlのPBS/マトリゲル(1:1)(BD Bioscience)に再懸濁した250万個のLNCaP細胞を、120個体のCB17.SCIDマウスの側腹部領域に皮下注射した。移植後、マウスは週に1回、体重測定され、電子キャリバーを用いて腫瘍について三次元的に測定された。腫瘍容積は、高さ×幅×長さ/2として算出した。このLNCaP/ストローマモデルは、細胞表面で高レベルのPMSAを発現し、ストローマ中で低レベルのRG-1を発現する。異種移植体はCD70に対して陰性であるので、CD70をアイソタイプコントロールとして用いる。平均して 80 mm^3 の腫瘍を有するマウスを、-1日目に、8個体のマウスの13の処置群に任意抽出し、0日目に、表2に記載の投与レジメンに従って、ビヒクル、抗体、または抗体-毒素複合体を腹腔内に処置した。研究は、55日目に終了した。

【表2】

30

表2: SCIDマウスへの投薬

抗体または複合体	用量(細胞毒素 $\mu\text{ mole/kg}$, 抗体 mg/kg)
ビヒクルIP SD(コントロール)	
抗-CD70 IP SD	30
抗-PSMA IP SD	30
抗-RG-1 IP SD	30
抗-CD70-毒素 IP SD	0.03, 0.1, 0.3
抗-PSMA-毒素 IP SD	0.03, 0.1, 0.3
抗-RG-1-毒素 IP SD	0.03, 0.1, 0.3

40

【0316】

図6Aから6Dは、研究した13の異なる群の各々の8個体のマウスについての腫瘍容積における平均増大を表す。LNCaP/ストローマモデルと同様に、抗-RG-1ネイキッド抗体は腫瘍増殖における阻害効果を有していないかった。抗-PSMAネイキッド抗体はいくらかの抗-腫瘍増殖効果を有していた。該抗-PSMA抗体の抗-腫瘍効果は、細胞毒素の結合により顕著に増大した。しかし予期せぬことに、同様の抗-腫瘍活性が、非-内在化抗-RG-1抗体が細胞毒

50

素に結合した場合において認められた。これらの結果は、細胞毒素の抗-腫瘍活性が非-内在化抗原に対する抗体によって介在され得ることをさらに確かなものとする。

【0317】

図7Aから7Dは、研究した16の異なる群の各々の8個体のマウスについての平均体重の変化を表す。上述のとおり、LNCaP腫瘍はマウスにおいて悪液質を引き起こす。さらに、この悪液質はビヒクルもしくはネイキッド抗体を用いて処置したマウスにおいて、おそらく腫瘍増殖の増大に起因する体重減少をもたらした。対照的に、抗体-薬物複合体を用いて処置したマウスは投与の直後が最も低い体重であり、全ての試験された用量0.03-0.3は耐用性良好であることを示唆している。複合体群においてマウスの体重が増加したという事実は、腫瘍増殖の制御および悪液質の軽減を強く示唆する。

10

【0318】

前述の本発明の詳細な説明は、本発明の特定の部分もしくは態様に、主としてもしくは排他的に関係する一節を含む。これは明確性および利便性を目的としており、特定の特徴はそれが開示されている一節のみではなくそれ以外にも関連していてよく、そして、本明細書の記載は異なる節に見られる情報の適当な組み合わせを包含することが理解される。同様に、本明細書の様々な図面および記載は本発明の特定の実施態様に関連しているけれども、特定の図面もしくは実施態様の範囲に特定の特徴が記載されている場合、かかる特徴はまた、別の図面もしくは実施態様の範囲において、別の特徴との組み合わせにおいて、または発明一般において、適当な範囲にまで用いることができる理解される。

20

【0319】

さらに、本発明はとりわけ、特定の好ましい実施態様の観点において記載されているけれども、本発明はそのような好ましい実施態様に限定されない。むしろ、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲により明示される。

【0320】

【表3】

配列表の概要			
配列番号:	配列	配列番号:	配列
1	V _H CDR1 a.a. 19G9	17	V _H n.t. 19G9
2	V _H CDR1 a.a. 34E1	18	V _H n.t. 34E1
3	V _H CDR2 a.a. 19G9	19	V _L n.t. 19G9
4	V _H CDR2 a.a. 34E1	20	V _L n.t. 34E1
5	V _H CDR3 a.a. 19G9	21	ペプチドリンカー
6	V _H CDR3 a.a. 34E1	22	ペプチドリンカー
7	V _L CDR1 a.a. 19G9	23	ペプチドリンカー
8	V _L CDR1 a.a. 34E1	24	ペプチドリンカー
9	V _L CDR2 a.a. 19G9	25	ペプチドリンカー
10	V _L CDR2 a.a. 34E1	26	ペプチドリンカー
11	V _L CDR3 a.a. 19G9	27	ペプチドリンカー
12	V _L CDR3 a.a. 34E1	28	ペプチドリンカー
13	V _H a.a. 19G9	29	ペプチドリンカー
14	V _H a.a. 34E1	30	ペプチドリンカー
15	V _L a.a. 19G9		
16	V _L a.a. 34E1		

30

40

【図1A】

図1A

抗-RG-1 19G9 V_H

E V Q L V Q S G G G L V H P G G S L
1 GAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAT CCT GGG GGG TCC CTG

CDR1

R L S C A G S G F T F S S Y V M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GTT ATG CAC TGG

CDR2

L R Q A P G K G L E W V S V I G T G
109 CTT CGC CAG GCT CCA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTA TCA GTT ATT GGT ACT GGT

CDR3

G V T H Y A D S V K G R F T I S R D
163 GGT GTC ACA AAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC

N A K N S L Y L Q M N S L R A E D M
217 AAT GCC ARG AAC TCC TTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ATG

CDR3

A M Y Y C A R W G Y Y G S G S Y E N
271 GCT ATG TAT TAC TGT GCA AGA TGG GGT TAC TAT GTT CGT GGG AGT TAT GAG AAT

D A F D I W G Q G T M V T V S S
325 GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA

【図1B】

図1B

抗-RG-1 19G9 V_L

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

A T L S C R A S Q S V S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG ACT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

CDR2

Y Q Q K P G Q A F R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG CCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

CDR3

R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

CDR3

Q Y S S S L T F G G G T K V E I K
271 CAG TAT AGT AGC TCG CTC ACT TTC GGC GGG GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

【図2A】

図2A

抗-RG-1 34E1 V_H

E V Q L V Q S G G G L V H P G G S L
1 GAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAT CCT GGG GGG TCC CTG

CDR1

R L S C A G S G F T F S S Y V M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GTT ATG CAC TGG

CDR2

V R Q A F G K G L E W V S V I G T G
109 GGT CGC CAG GCT CCA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTA TCA GTT ATT GGT ACT GGT

CDR3

G V T N Y A D S V K G R F T I S R D
163 GGT GTC ACA AAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC

N A K N S L Y L Q M N S L R A E D M
217 AAT GCC ARG AAC TCC TTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ATG

CDR3

A V Y Y C A R W G D W D D A F D I W
271 GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA TGG GGG GRC TGG GAT GAT GCT TTT GAT ATC TGG

G Q G T M V T V S S
325 GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA

【図2B】

図2B

抗-RG-1 34E1 V_L

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

A T L S C R A S Q S V S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG ACT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

CDR2

Y Q Q K P G Q A F R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG CCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

CDR3

R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

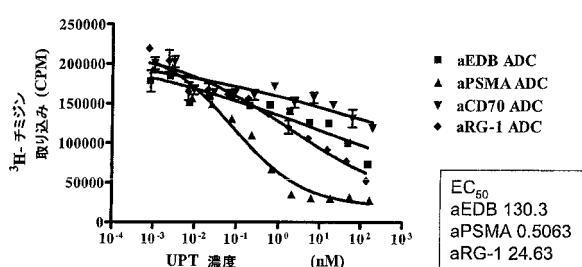
T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

CDR3

Q Y G S S L T F G G G T K V E I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

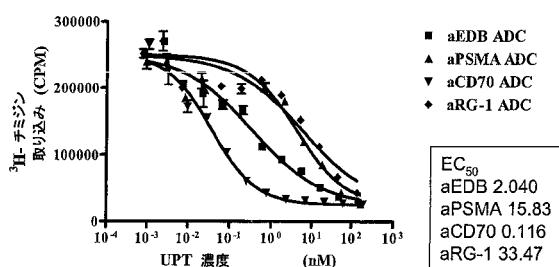
【図3A】

図3A



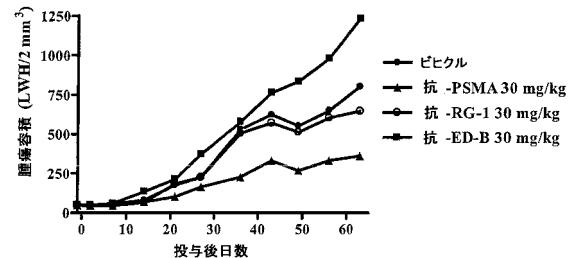
【図3B】

図3B



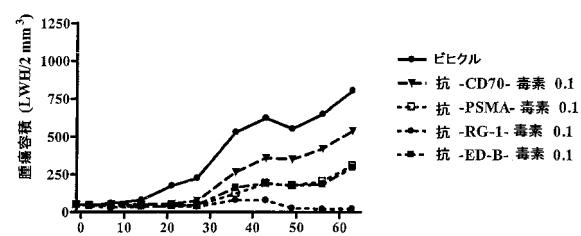
【図4A】

図4A



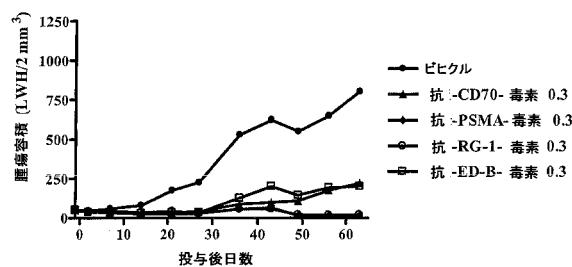
【図4B】

図4B



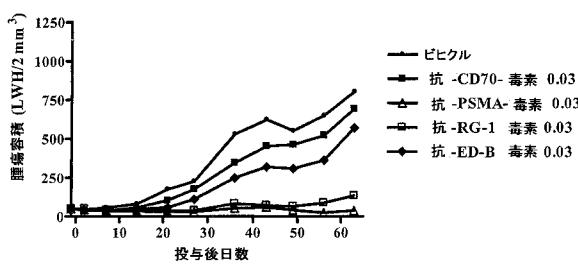
【図4C】

図4C



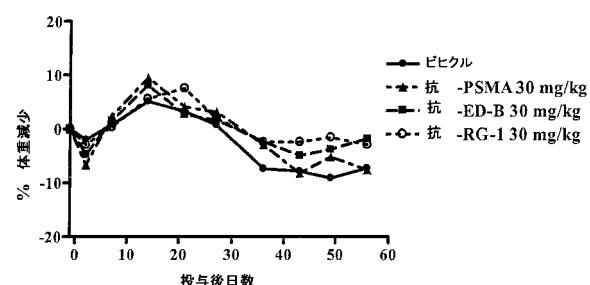
【図4D】

図4D



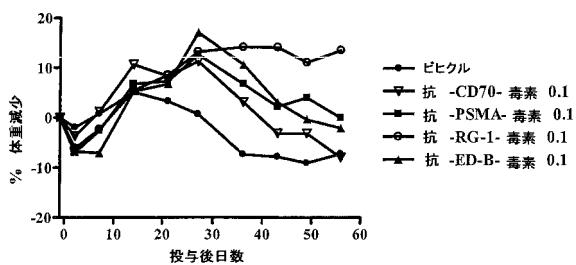
【図5A】

図5A



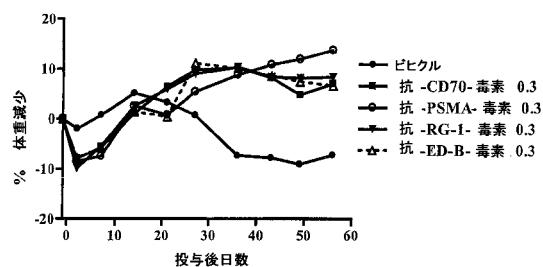
【図5B】

図5B



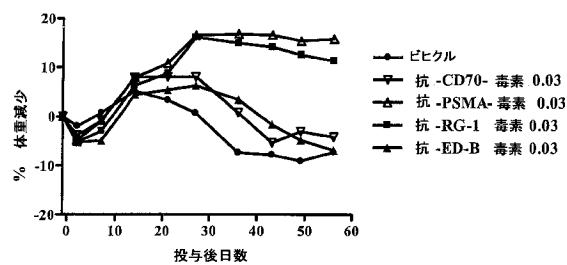
【図 5 C】

図 5C



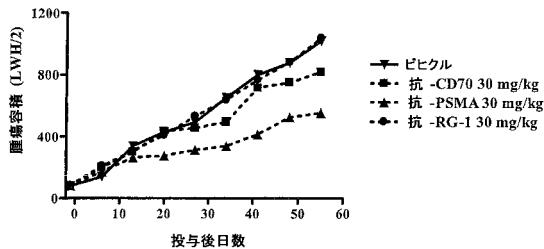
【図 5 D】

図 5D



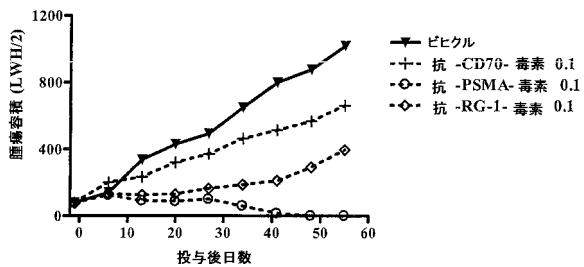
【図 6 A】

図 6A



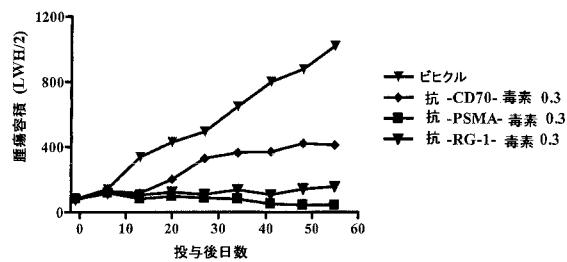
【図 6 B】

図 6B



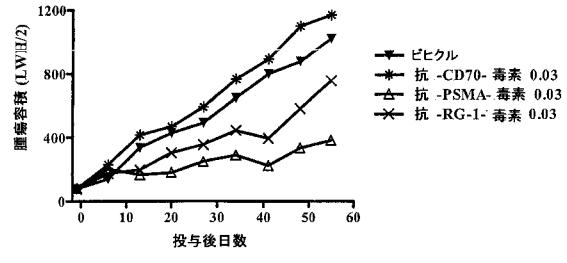
【図 6 C】

図 6C



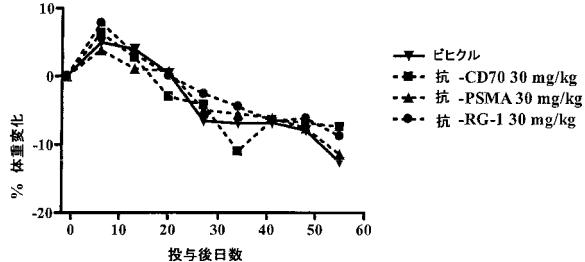
【図 6 D】

図 6D



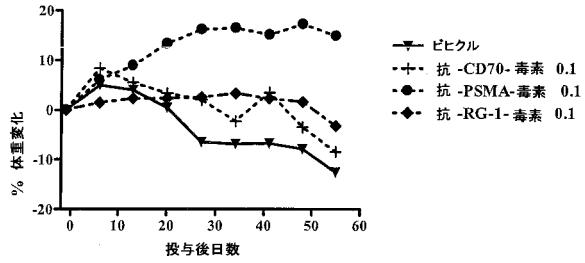
【図 7 A】

図 7A



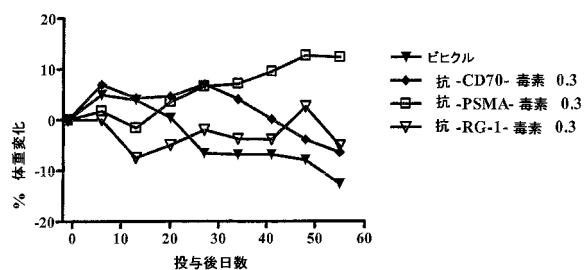
【図 7 B】

図 7B



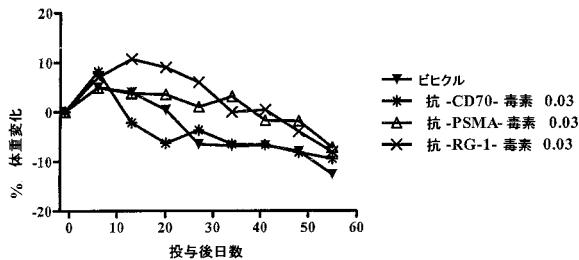
【図7C】

図7C



【図7D】

図7D



【配列表】

2011505371000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成22年7月16日(2010.7.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2011505371000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年8月5日(2010.8.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトモノクローナル抗体もしくはパートナー分子に結合したその抗原結合部分を含有する抗体-パートナー分子複合体であって、抗体もしくはその抗原結合部分はヒトRG-1を結合し、該複合体は以下の特性：

(a) 1×10^{-8} M以下の K_D でヒトRG-1に結合するか；または、

(b) *in vivo*においてRG-1-発現細胞の増殖を阻害する

のうち少なくとも1つを示す、複合体。

【請求項2】

抗体もしくはその抗原結合部分が：

- (a)配列番号：1を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b)配列番号：3を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c)配列番号：5を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d)配列番号：7を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e)配列番号：9を含む軽鎖可変領域CDR2；および、
- (f)配列番号：11を含む軽鎖可変領域CDR3

を含有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項3】

該抗体もしくはその抗原結合部分が：

- (a)配列番号：2を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b)配列番号：4を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c)配列番号：6を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d)配列番号：8を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e)配列番号：10を含む軽鎖可変領域CDR2；および、
- (f)配列番号：12を含む軽鎖可変領域CDR3

を含有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項4】

該抗体もしくはその抗原結合部分が：

- (a)配列番号：13～14およびいずれかの保存的修飾からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；ならびに、

- (b)配列番号：15～16およびいずれかの保存的修飾からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項5】

該抗体もしくはその抗原結合部分が：

- (a)配列番号：1、配列番号：2、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b)配列番号：3、配列番号：4、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c)配列番号：5、配列番号：6、またはいずれかの保存的修飾を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d)配列番号：7、配列番号：8、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e)配列番号：9、配列番号：10、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR2；および、
- (f)配列番号：11、配列番号：12、またはいずれかの保存的修飾を含む軽鎖可変領域CDR3

を含有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項6】

請求項1に記載の複合体であって、該抗体もしくはその抗原結合部分が：

- (a)配列番号：13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域か；または、

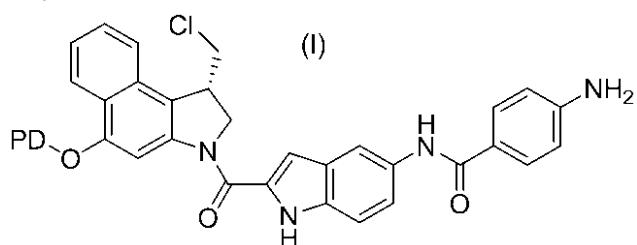
- (b)配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含有する基準抗体により認識されるヒトRG-1上のエピトープに結合する、該複合体。

【請求項7】

該パートナー分子が、式(1)：

【化1】

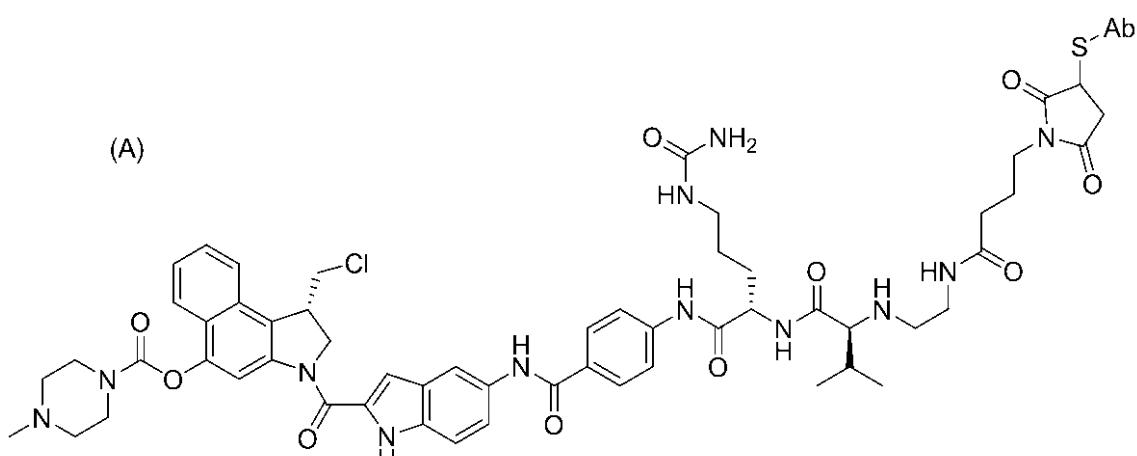


により表される構造を有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項8】

式(A):

【化2】



により表される構造を有する、請求項1に記載の複合体。

【請求項9】

請求項1に記載の複合体および医薬的に許容される担体を含有する組成物。

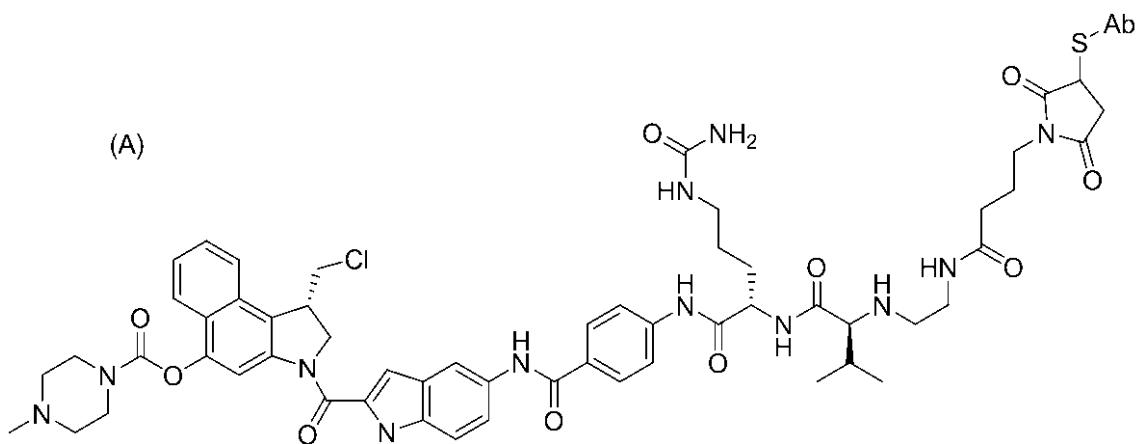
【請求項10】

RG-1-発現腫瘍細胞と請求項1に記載の複合体を接触させることによりRG-1-発現腫瘍細胞の増殖を阻害することを含む、RG-1-発現腫瘍細胞の増殖を阻害する方法。

【請求項11】

該複合体が、式(A):

【化3】



により表される構造を有する、請求項10に記載の方法。

【請求項 1 2】

該RG-1-発現腫瘍細胞が前立腺癌細胞または膀胱癌細胞である、請求項10に記載の方法。

【請求項 1 3】

治療を必要としている患者に有効な量の請求項1に記載の複合体を投与することによって該患者の癌を治療することを含む、患者における癌の治療方法。

【請求項 1 4】

該癌が前立腺癌または膀胱癌である、請求項13に記載の方法。

【請求項 1 5】

該癌が、肺癌、胃癌、乳癌、腎癌、膵癌、大腸癌、メラノーマ、または膵島細胞腺腫である、請求項13に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/084899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/019845 A1 (HARKINS RICHARD [US] ET AL) 27 January 2005 (2005-01-27) the whole document page 2, paragraph 15-18 page 9, paragraphs 92,93,96 page 10, paragraph 107 claims; figure 3; sequence 28	1-6,14, 15,19-21
X	WO 2005/010048 A (SCHERING AG [DE]; HARKINS RICHARD [US]; PARKES DEBORAH [US]; PARRY GOR) 3 February 2005 (2005-02-03) the whole document sequences 26,28,29,31 page 3, lines 11-30 page 16, lines 29-34 page 18, lines 4-14 page 20, lines 9-13; claims; example 10	1-6,14, 15,19-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the Invention

X document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

28 September 2009

20/10/2009

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Orlando, Michele

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2008/084899

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/44291 A (SCHERING AG [DE]; HARKINS RICHARD [US]; PARKES DEBORAH [US]; PARRY GOR) 21 June 2001 (2001-06-21) the whole document page 5, lines 20-25; claims 31-36 page 32, lines 1-13 page 32, line 34 - page 33, line 2	1-6, 14, 15, 19-21 1-27
X	PARRY RENATE ET AL: "Identification of a novel prostate tumor target, mindin/RG-1, for antibody-based radiotherapy of prostate cancer" CANCER RESEARCH, vol. 65, no. 18, September 2005 (2005-09), pages 8397-8405, XP002547620 ISSN: 0008-5472 the whole document page 8400; figure 6	1, 2, 4-6, 13-15, 19-21
Y	WO 2007/038658 A (MEDAREX INC [US]; BOYD SHARON ELAINE [US]; CHEN LIANG [US]; GANGWAR SAN) 5 April 2007 (2007-04-05) the whole document claims 1-15	1-27
Y	WO 2007/059404 A (MEDAREX INC [US]; GANGWAR SANJEEV [US]; SUFI BILAL [US]) 24 May 2007 (2007-05-24) the whole document page 45, lines 15-21	1-27
Y	WO 2006/110476 A (MEDAREX INC [US]; GANGWAR SANJEEV [US]; SUFI BILAL [US]) 19 October 2006 (2006-10-19) the whole document page 45, lines 15-21	1-27
P, X	WO 2007/137760 A (BAYER SCHERING PHARMA AG [DE]; HEITNER TARA [DK]; LIGHT DAVID [US]; MC) 6 December 2007 (2007-12-06) the whole document page 2, lines 8-11 page 6, lines 6-14 page 8, lines 1-24; claims 38,39; example 4	1-6, 14, 15, 19-21 -/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2008/084899

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	PAN C ET AL: "Human antibody conjugates of potential utility for prostate cancer therapy: A comparison of MGBA conjugates with antibodies targeting a cell surface target (prostate-specific membrane antigen) and an extracellular matrix target (Mindin/RG-1)" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 49, 16 April 2008 (2008-04-16), pages 965-966, XP008112667 ISSN: 0197-016X -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/084899

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005019845	A1	27-01-2005	US 2008138899 A1 US 2008226656 A1	12-06-2008 18-09-2008
WO 2005010048	A	03-02-2005	AU 2004259731 A1 BR PI0412245 A CA 2532394 A1 CN 1826138 A EC SP066379 A EP 1648510 A2 JP 2007527403 T KR 20060054329 A MX PA06000798 A NZ 544911 A UY 28424 A1 ZA 200601521 A	03-02-2005 19-09-2006 03-02-2005 30-08-2006 30-08-2006 26-04-2006 27-09-2007 22-05-2006 07-04-2006 24-12-2008 28-02-2005 25-04-2007
WO 0144291	A	21-06-2001	AT 440862 T AU 784674 B2 BG 106823 A BR 0017022 A CA 2394574 A1 CN 1434832 A CZ 299232 B6 EE 200200323 A EP 1237915 A2 EP 2048157 A1 HR 20020549 A2 HU 0204224 A2 JP 2003521244 T LT 2002070 A MX PA02005914 A NO 20022836 A NZ 519598 A PL 356220 A1 RO 122543 B1 RU 2283130 C2 SI 21140 A SK 8482002 A3 US 2004023307 A1 US 2004152139 A1 US 2002004047 A1 US 2009214422 A1 ZA 200205638 A	15-09-2009 25-05-2006 30-04-2003 05-11-2002 21-06-2001 06-08-2003 21-05-2008 15-10-2003 11-09-2002 15-04-2009 30-04-2004 28-03-2003 15-07-2003 25-04-2003 27-02-2003 15-08-2002 26-03-2004 28-06-2004 28-08-2009 10-09-2006 31-08-2003 04-02-2003 05-02-2004 05-08-2004 10-01-2002 27-08-2009 15-10-2003
WO 2007038658	A	05-04-2007	AU 2006294554 A1 CA 2623652 A1 CN 101312748 A EA 200800952 A1 EP 1940470 A2 JP 2009509977 T KR 20080057310 A US 2008279868 A1 ZA 200803153 A	05-04-2007 05-04-2007 26-11-2008 27-02-2009 09-07-2008 12-03-2009 24-06-2008 13-11-2008 25-02-2009
WO 2007059404	A	24-05-2007	CA 2627190 A1 EP 1948242 A2 US 2008293800 A1	24-05-2007 30-07-2008 27-11-2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/084899

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2006110476 A	19-10-2006	CA EP JP US	2603860 A1 1865991 A2 2008535845 T 2006247295 A1		19-10-2006 19-12-2007 04-09-2008 02-11-2006
WO 2007137760 A	06-12-2007	EP	2027153 A2		25-02-2009

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 D 403/14	C 0 7 D 209/58	
	C 0 7 D 403/14	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74) 代理人 100150500
弁理士 森本 靖
 (74) 代理人 100156111
弁理士 山中 伸一郎
 (72) 発明者 デイビッド・ジェイ・キング
アメリカ合衆国 9 2 0 7 5 カリフォルニア州ソラナ・ビーチ、セロ・ラルゴ・ドライブ 1 1 2 1 番
 (72) 発明者 ジョナサン・エイ・テレット
アメリカ合衆国 9 4 0 8 7 カリフォルニア州サニーベイル、ノース・キャッスルロック・テラス 5 1 0 番
 (72) 発明者 サンジープ・ギャングウォー
アメリカ合衆国 9 5 0 3 5 カリフォルニア州ミルピタス、コットンウッド・ドライブ 5 2 1 番
 (72) 発明者 ジョセフィーン・エム・カーダレリ
アメリカ合衆国 9 5 0 3 5 カリフォルニア州ミルピタス、コットンウッド・ドライブ 5 2 1 番
 (72) 発明者 チェタナ・ラオ・ナイク
アメリカ合衆国 9 5 0 3 5 カリフォルニア州ミルピタス、コットンウッド・ドライブ 5 2 1 番
 (72) 発明者 チン・パン
アメリカ合衆国 9 5 0 3 5 カリフォルニア州ミルピタス、コットンウッド・ドライブ 5 2 1 番、メダレックス・インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 4C063 AA03 BB07 CC06 DD04 EE01
 4C085 AA14 AA23 BB31 CC23 DD62 EE01
 4C086 AA01 AA02 BC13 BC50 GA07 MA01 MA02 MA04 NA13 ZB26
 4C204 BB01 BB09 CB12 DB11 EB02 FB19 GB25