(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2021-528471
(P2021-528471A)
(43)公表日　令和3年10月21日(2021.10.21)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA	4C076
A61K 47/68	(2017.01)	A61K	47/68		4C085
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4H045
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	C	
A61P 35/02	(2006.01)	A61K	39/395	L	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 204 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-573007 (P2020-573007)
(86)(22)出願日　令和1年6月25日 (2019.6.25)
(85)翻訳文提出日　令和3年2月24日 (2021.2.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/038992
(87)国際公開番号　WO2020/005945
(87)国際公開日　令和2年1月2日 (2020.1.2)
(31)優先権主張番号　62/690,052
(32)優先日　平成30年6月26日 (2018.6.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/691,342
(32)優先日　平成30年6月28日 (2018.6.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

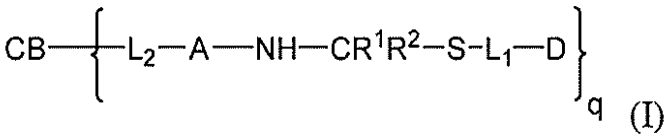
(71)出願人　504039155
イミュノジェン・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５１，ウォルサム，ウィンター・ストリート　８３０
(71)出願人　504438727
マクロジェニクス，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国　２０８５０　メリーランド州、ロックヴィル、メディカル　センター　ドライブ　９７０４
(74)代理人　100118902
弁理士　山本　修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前　徹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＡＤＡＭ９を標的とする免疫コンジュゲート、及び、その使用の方法

(57)【要約】
本発明は、少なくとも１つのメイタンシノイド化合物に対して結合する「ジスインテグリン、及び、メタロプロテイナーゼドメインを含有するタンパク質９」（「ＡＤＡＭ９」）に対して特異的に結合することが可能な抗体、または、そのフラグメントを含む免疫コンジュゲートに関する。本発明は、特に、ヒトＡＤＡＭ９、及び、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）のＡＤＡＭ９と交差反応する、このような免疫コンジュゲートに関する。本発明は、さらに、レシピエント対象に対して、このような免疫コンジュゲートを投与すると免疫原性の低下を示す、ヒト化、及び／または、脱免疫化した軽鎖可変（ＶＬ）ドメイン、及び／または、重鎖可変（ＶＨ）ドメインを含む、すべてのこのような免疫コンジュゲートに関する。本発明はまた、このような免疫コンジュゲートのいずれかを含有する医薬組成物、ならびに、がん、及び、その他の疾患及び病態の治療において、このような免疫コンジュゲートのいずれかの使用を伴う方法に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
次の式：
【化１】

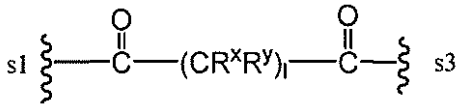


(I)

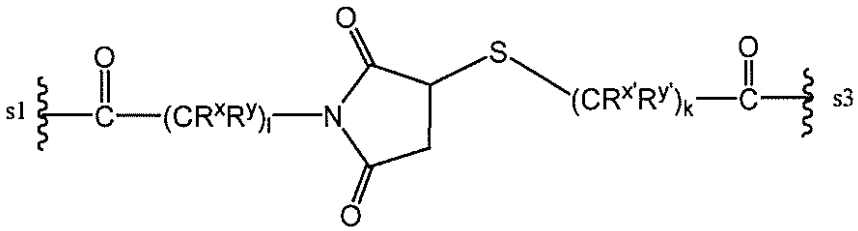
で表される免疫コンジュケート、または、医薬として許容可能なその塩であって、式中：

ＣＢは、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；

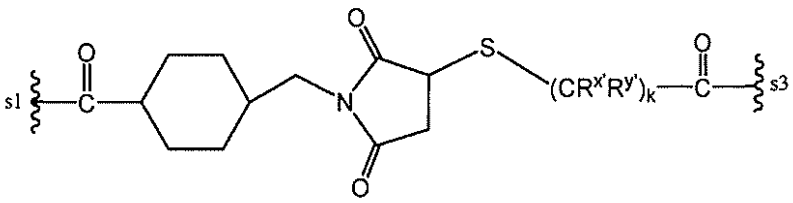
L_2は、次の式：
【化２】



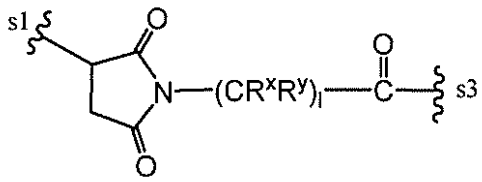
(L2a),



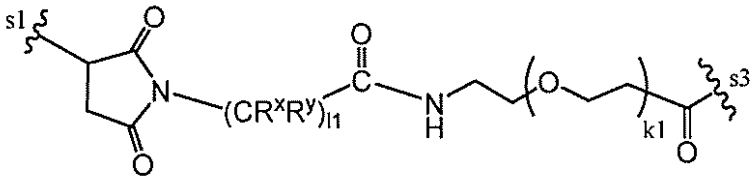
(L2b),



(L2c),



(L2d), または



(L2e);

の１つで表されるものであり、

式中：

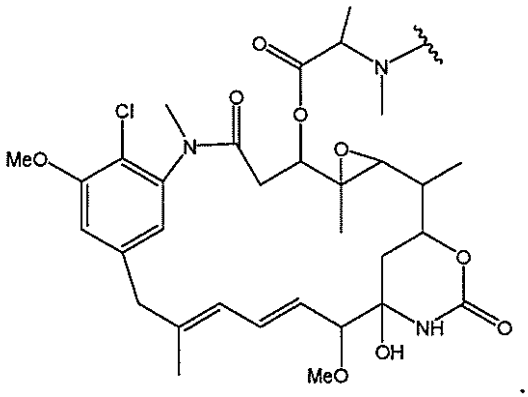
R^x、R^y、$R^{x'}$、及び、$R^{y'}$は、それぞれの場合に、独立して、Ｈ、－ＯＨ、ハロゲン、－Ｏ－（C_{1-4}アルキル）、－SO_3H、－$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$、または、－ＯＨ、ハロゲン、SO_3H、または、$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$で任意に置換したC_{1-4}アルキルであり、式中、R_{40}、R_{41}、及び、R_{42}は、それぞれ、独立して、Ｈ、または、C_{1-4}アルキルであり；

ｌ及びｋは、それぞれ、独立して、１～１０の整数である；

ｌ１は、２～５の整数である；
ｋ１は、１～５の整数である；及び、
ｓ１は、細胞結合剤ＣＢに対して接続した部位を示し、そして、ｓ３は、Ａ基に対して接続した部位を示す；
Ａは、アミノ酸残基、または、２～２０個のアミノ酸残基を含むペプチドである；
R^1及びR^2は、それぞれ、独立して、Ｈ、または、C_{1-3}アルキルである；
L_1は、次の式：
【化３】

$$-CR^3R^4-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$$

で表されるものであり、
式中、R^3及びR^4は、それぞれ、独立して、ＨまたはＭｅであり、かつ、L_1の－Ｃ（＝Ｏ）－部分は、Ｄに対して接続している；
Ｄは、次の式：
【化４】



；

で表されるものであり；及び
ｑは、１～２０の整数である、前記免疫コンジュケート、または、医薬として許容可能なその塩。
【請求項２】
R^x、R^y、$R^{x'}$、及び、$R^{y'}$は、すべてＨである；及び、ｌ及びｋは、それぞれ、独立して、２～６の整数である、請求項１に記載の免疫コンジュケート。
【請求項３】
Ａは、２～５個のアミノ酸残基を含むペプチドである、請求項１または２に記載の免疫コンジュケート。
【請求項４】
Ａを、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｌａ、Ｐｈｅ－N^9－トシル－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－N^9－ニトロ－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号１４４）、β－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号１４５）、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ（配列番号１４６）、Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ａｒｇ－Ａｒｇ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａ

ｌａ、Ａｌａ－Ｍｅｔ、Ｇｌｎ－Ｖａｌ、Ａｓｎ－Ａｌａ、Ｇｌｎ－Ｐｈｅ、Ｇｌｎ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、及び、Ｄ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙからなる群から選択し、それぞれのペプチドの最初のアミノ酸を、$Ｌ_{2}$基に対して接続し、かつ、それぞれのペプチドの最後のアミノ酸を、－ＮＨ－ＣＲ^{1}Ｒ^{2}－Ｓ－$Ｌ_{1}$－Ｄに対して接続する、請求項３に記載の免疫コンジュケート。

【請求項５】

Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、両方ともＨである、請求項１～４のいずれか１項に記載の免疫コンジュケート。

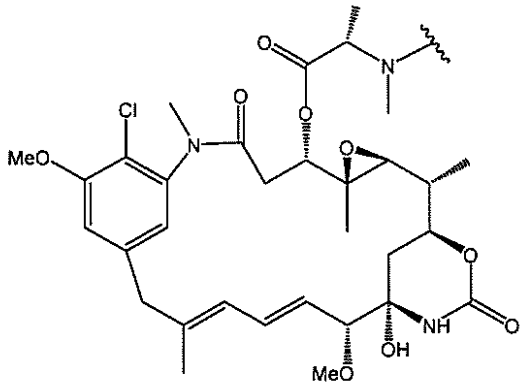
【請求項６】

$Ｌ_{1}$は、－（$ＣＨ_{2}$）$_{4-6}$－Ｃ（＝Ｏ）－である、請求項１～５のいずれか１項に記載の免疫コンジュケート。。

【請求項７】

Ｄは、次の式：

【化５】

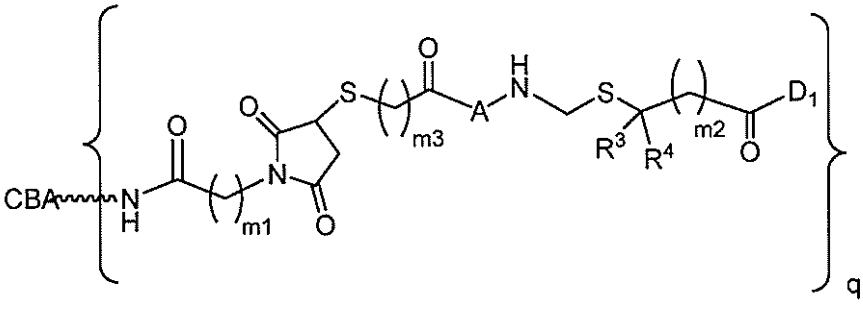


で表される、請求項１～６のいずれか１項に記載の免疫コンジュケート。

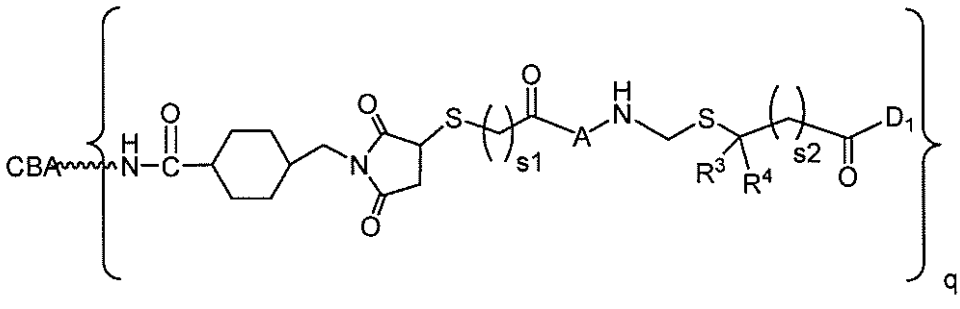
【請求項８】

前記免疫コンジュケートは、次の式：

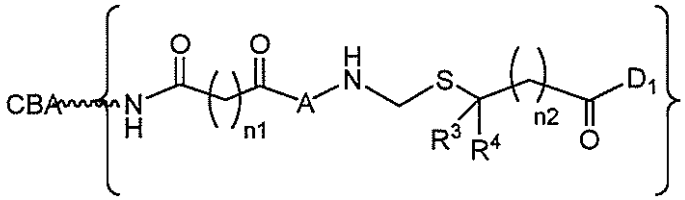
【化６】



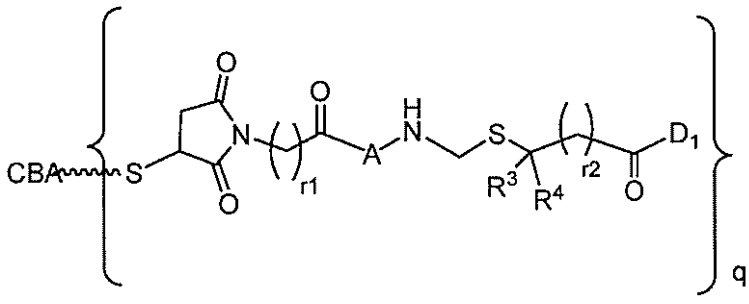
(Ia);



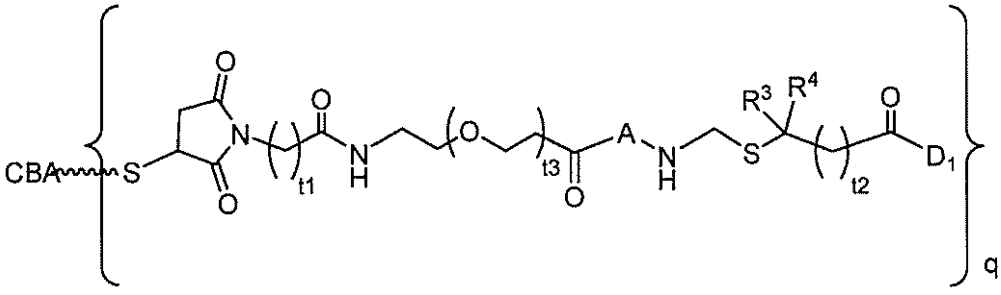
(Ib);



(Ic);



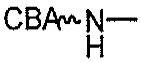
(Id); または



(Ie);

で表されるもの、または、医薬として許容可能なその塩であって、式中：

【化７】



は、Ｌｙｓアミン基を介して、前記Ｌ$_2$基に対して接続した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；

【化８】

は、Ｃｙｓチオール基を介して、前記Ｌ$_2$基に対して接続した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；

Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、それぞれ、独立して、ＨまたはＭｅである；

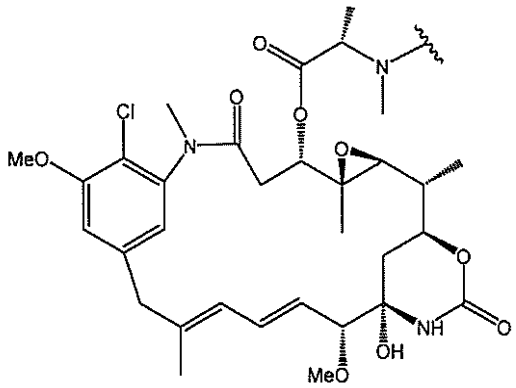
ｍ１、ｍ３、ｎ１、ｒ１、ｓ１、及び、ｔ１は、それぞれ、独立して、１～６の整数である；

ｍ２、ｎ２、ｒ２、ｓ２、及び、ｔ２は、それぞれ、独立して、１～７の整数である；

ｔ３は、１～１２の整数である；

Ｄ$_1$は、次の式：

【化９】

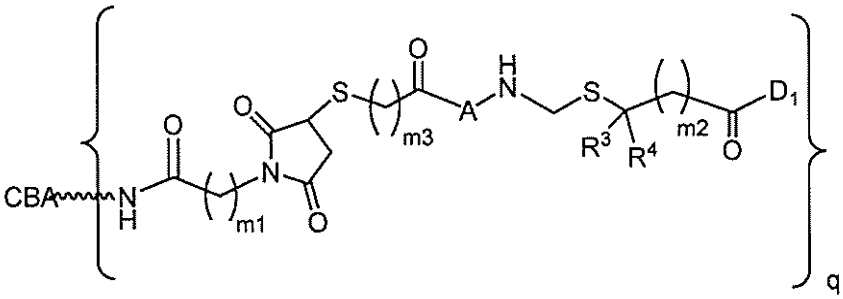


で表される、請求項１～７のいずれか１項に記載の免疫コンジュケート。

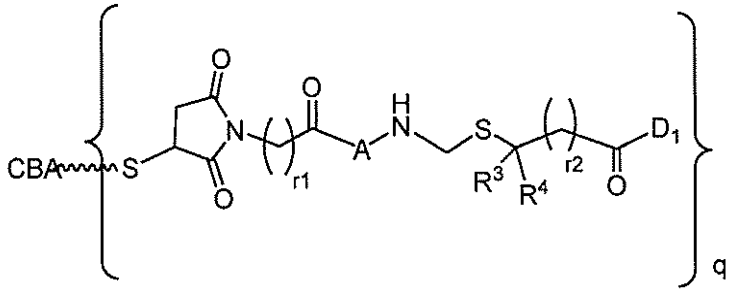
【請求項９】

前記免疫コンジュケートが、次の式：

【化１０】



(Ia), または



(Id);

で表されるものであり、

式中：

ｍ１及びｍ３は、それぞれ、独立して、２～４の整数である；

ｍ２は、２～５の整数である；

ｒ１は、２～６の整数である；及び

ｒ２は、２～５の整数である、請求項８に記載の免疫コンジュケート。

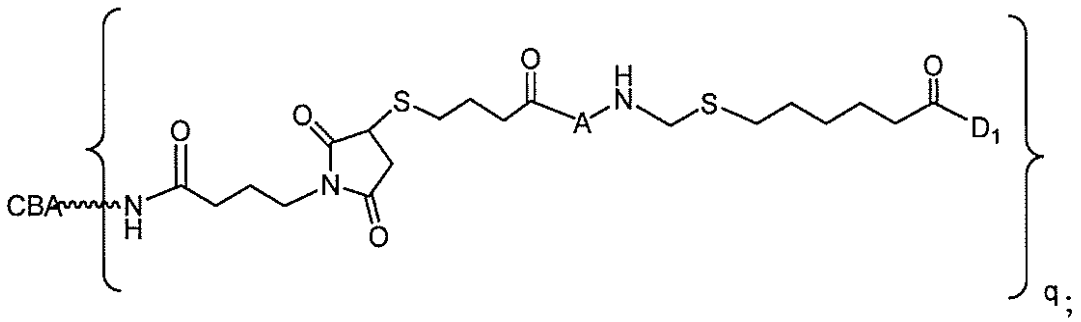
【請求項１０】

Ａが、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、または、Ｄ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙである、請求項８または９に記載の免疫コンジュケート。

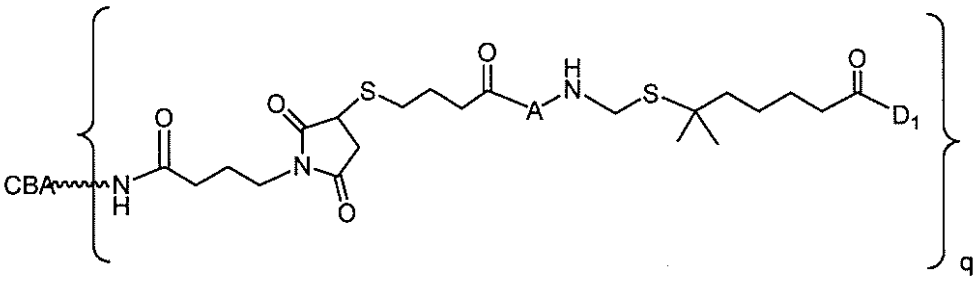
【請求項１１】

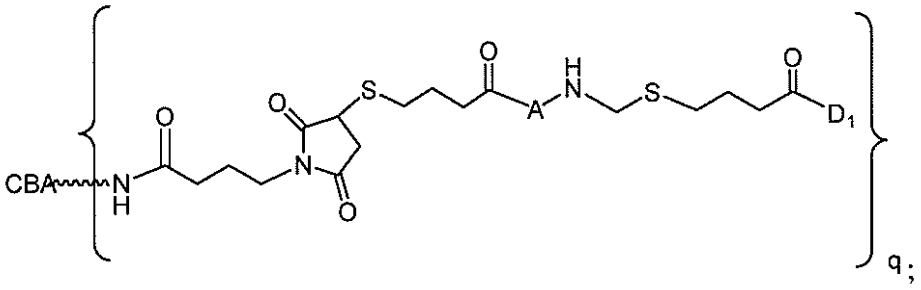
前記免疫コンジュケートは、次の式：

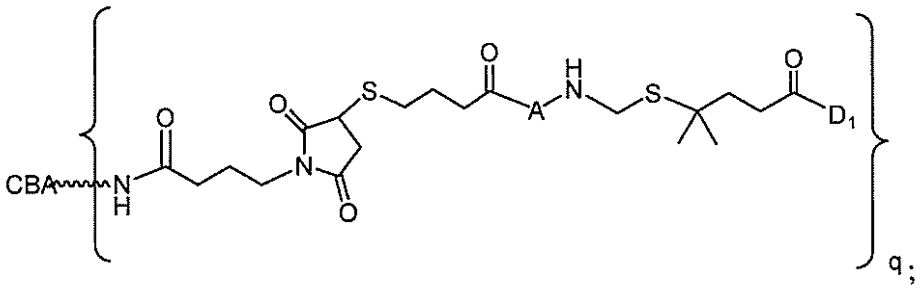
【化１１】

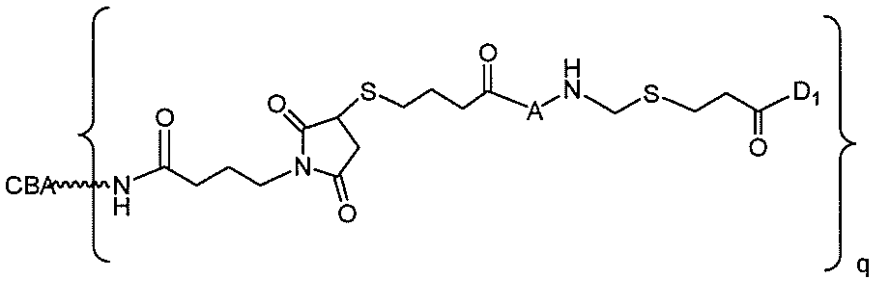


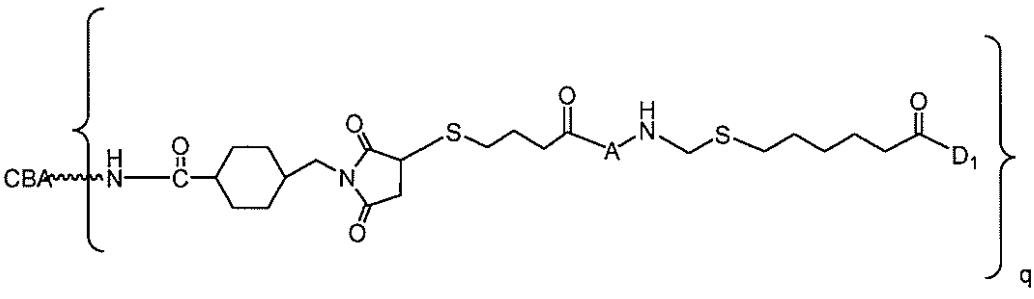
【化１２】



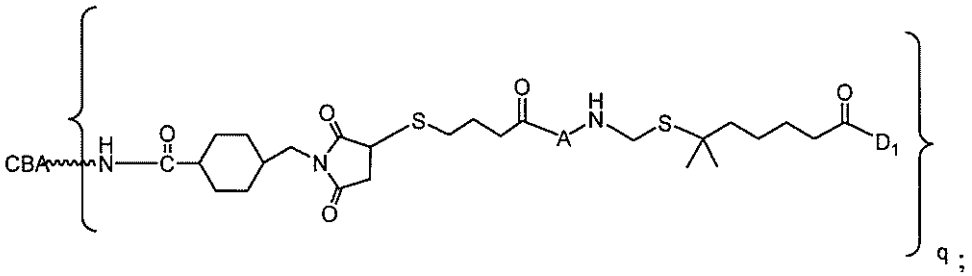




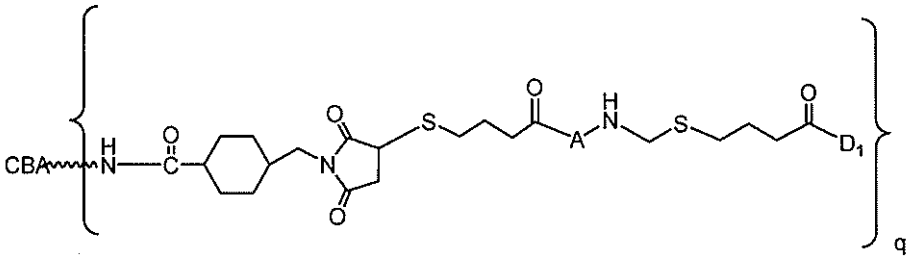




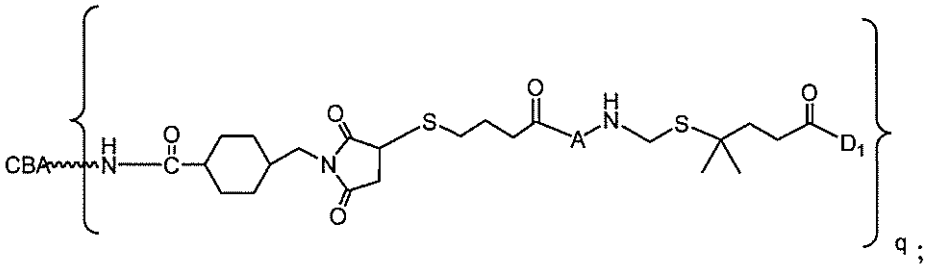
【化１３】



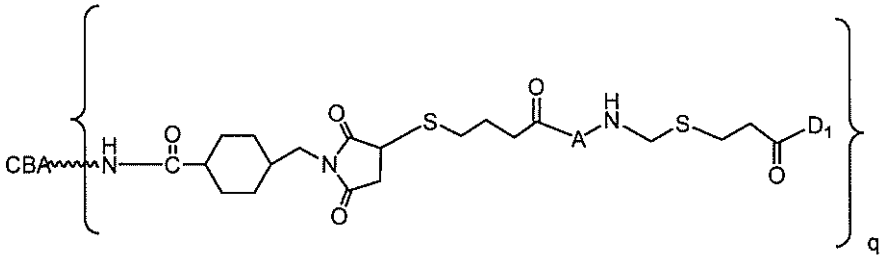
q；



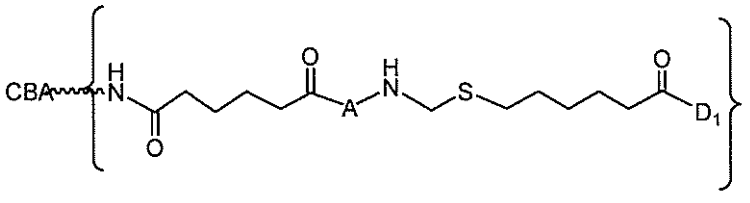
q；



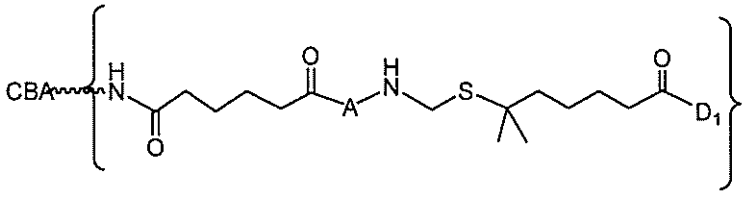
q；



q；

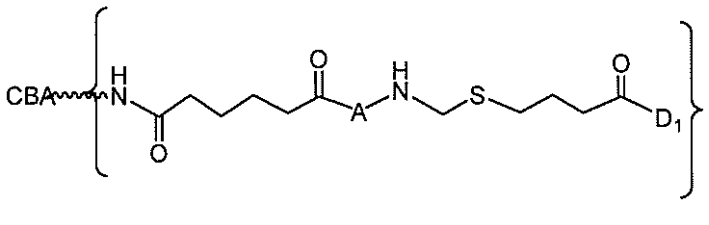


q；

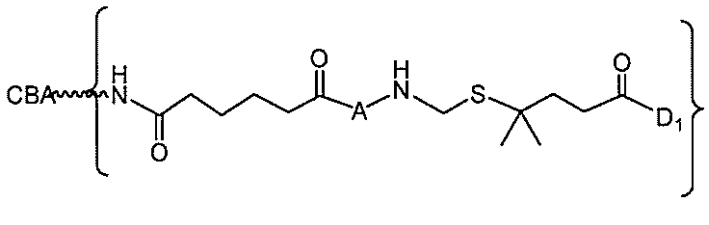


q；

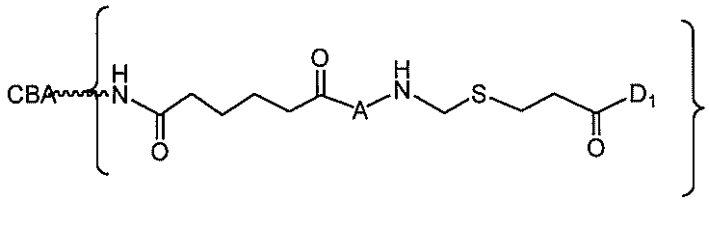
【化１４】



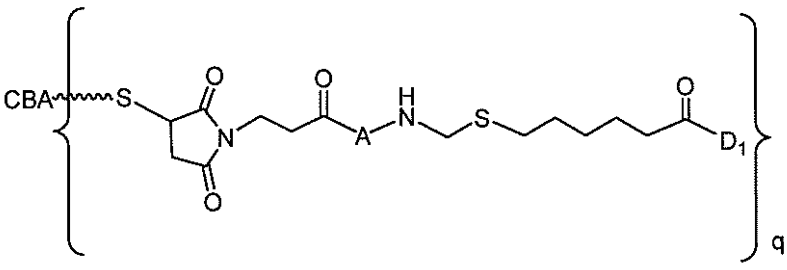
q；



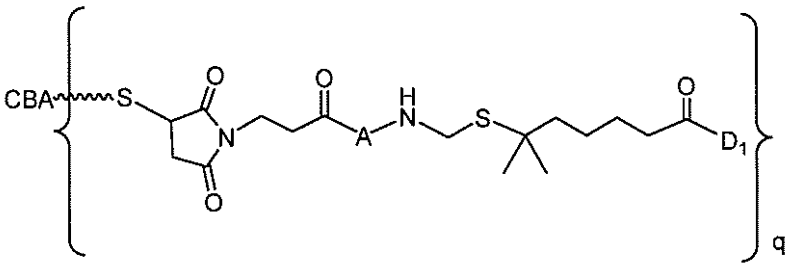
q；



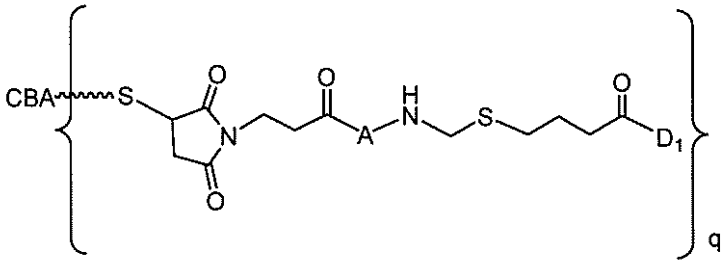
q；



q；

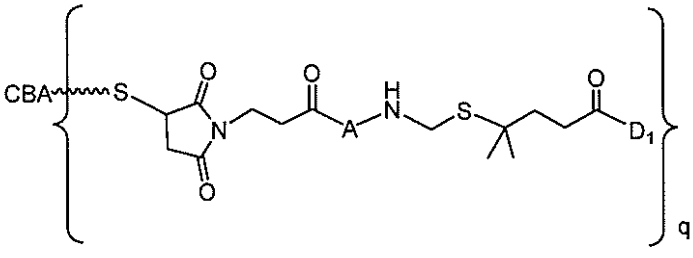


q；

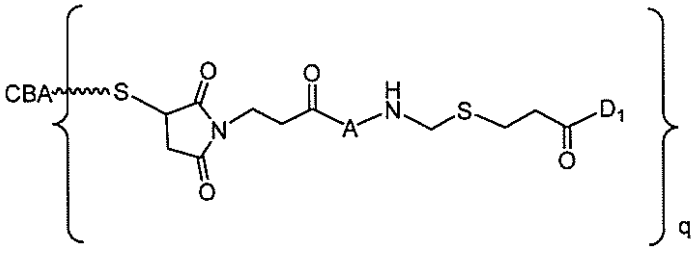


q；

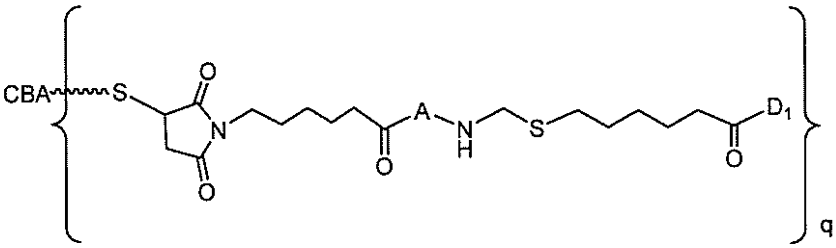
【化１５】


CBA
S
O
N
O
A
H
N
S
O
D1
q

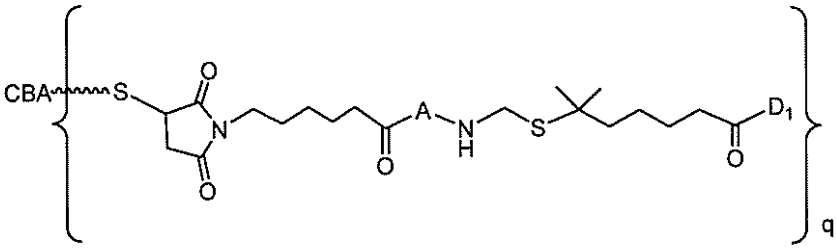
;または


CBA
S
O
N
O
A
H
N
S
D1
O
q

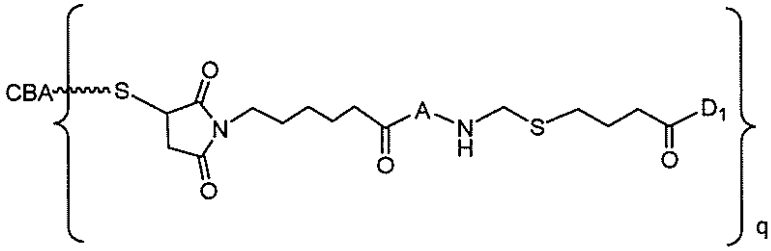
;


CBA
S
O
N
O
A
N
H
S
D1
O
q

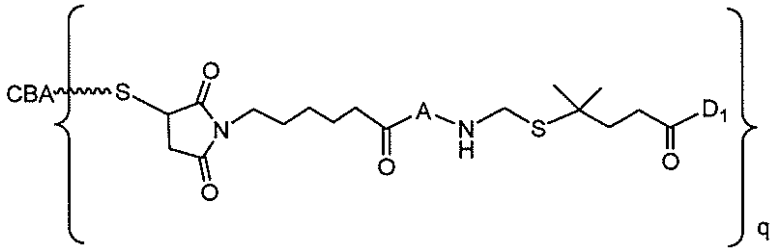
;


CBA
S
O
N
O
A
N
H
S
D1
O
q

;

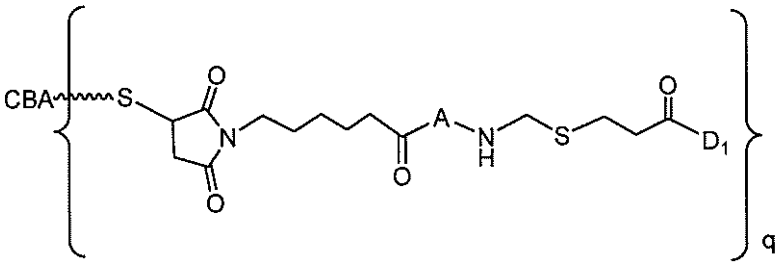

CBA
S
O
N
O
A
N
H
S
D1
O
q

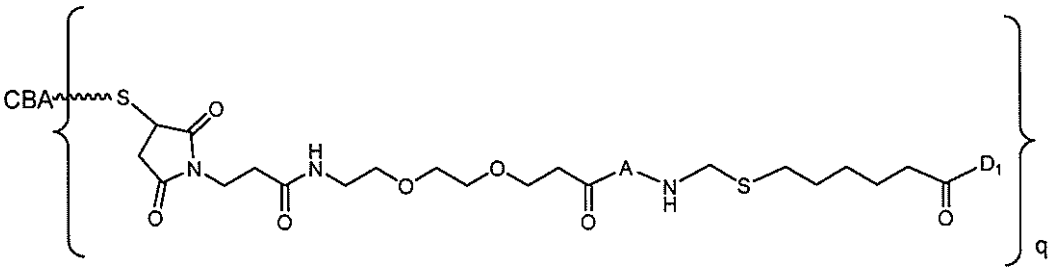
;


CBA
S
O
N
O
A
N
H
S
D1
O
q

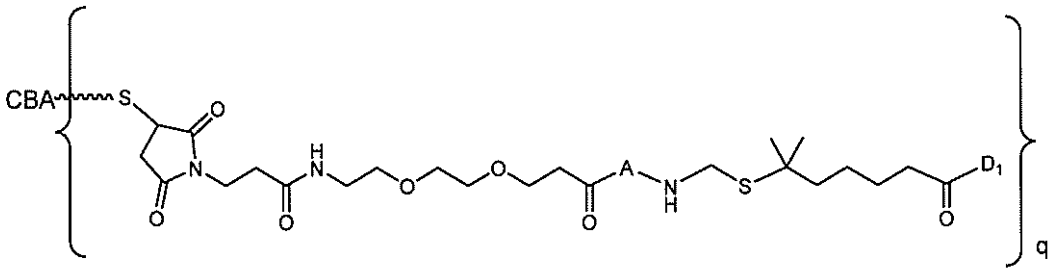
;

【化１６】

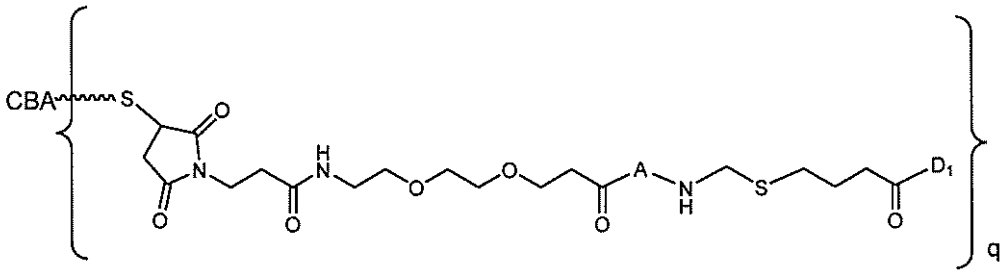


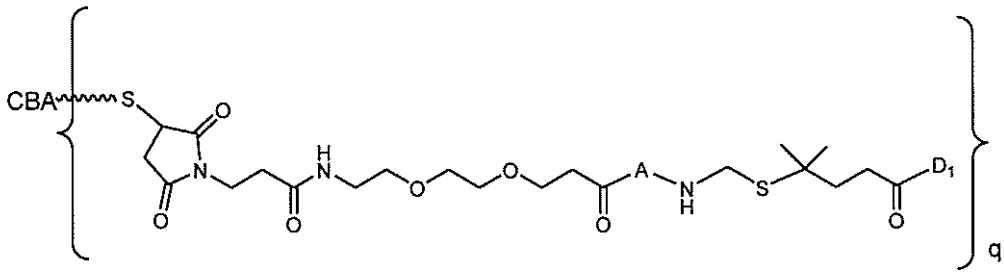


;

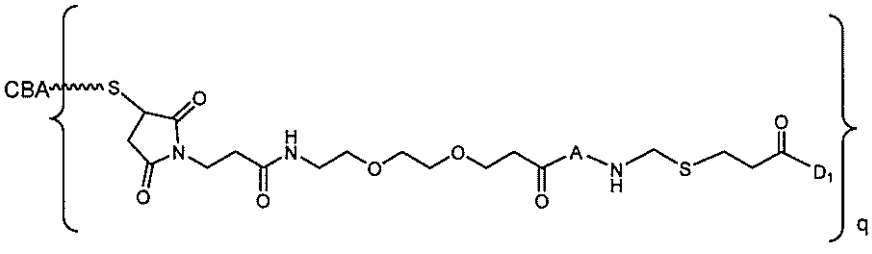


;

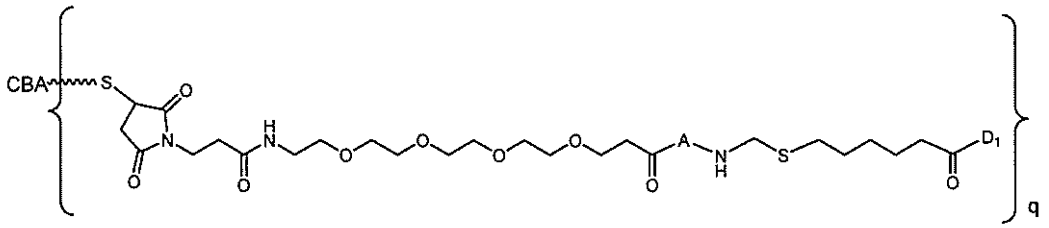




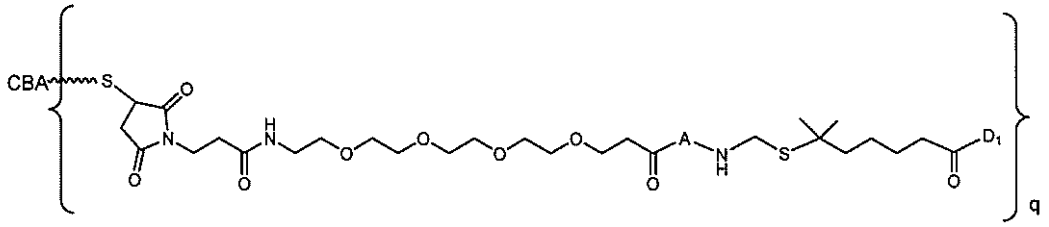
【化１７】



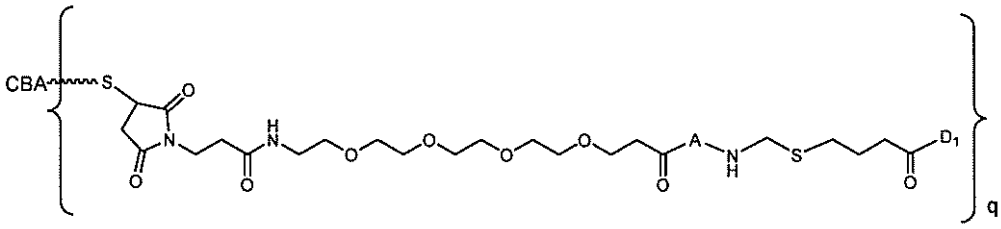
;



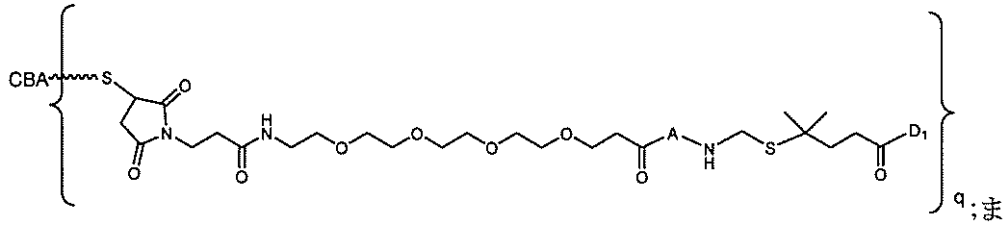
;



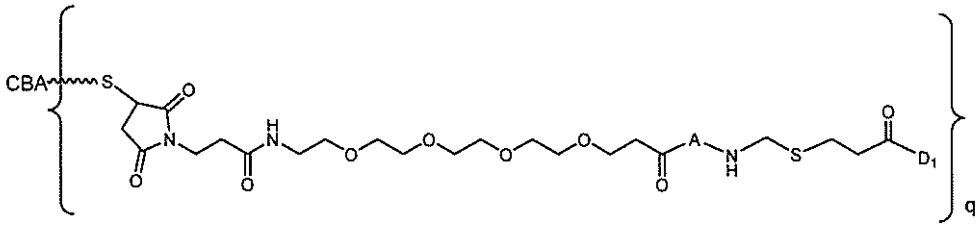
;



;



;または



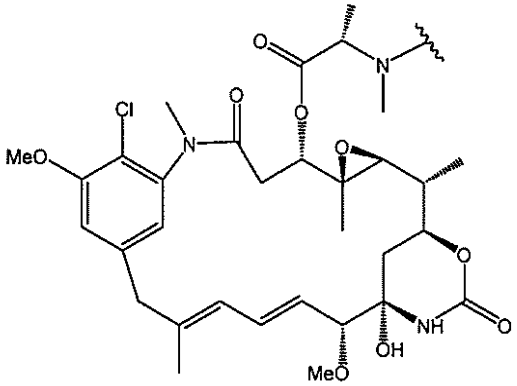
.

で表されるもの、または、医薬として許容可能なその塩であって、式中：

Ａは、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、または、Ｄ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙである、及び

D_1は、次の式：

【化１８】

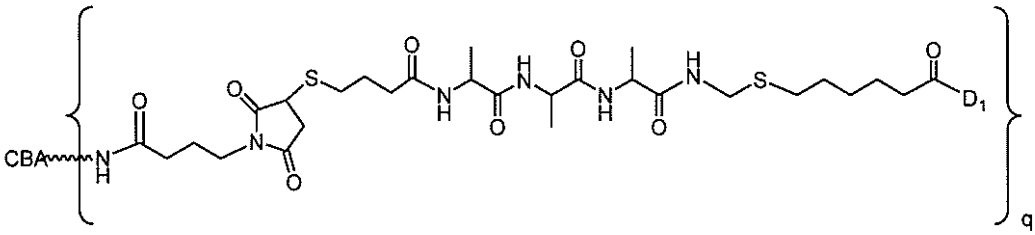


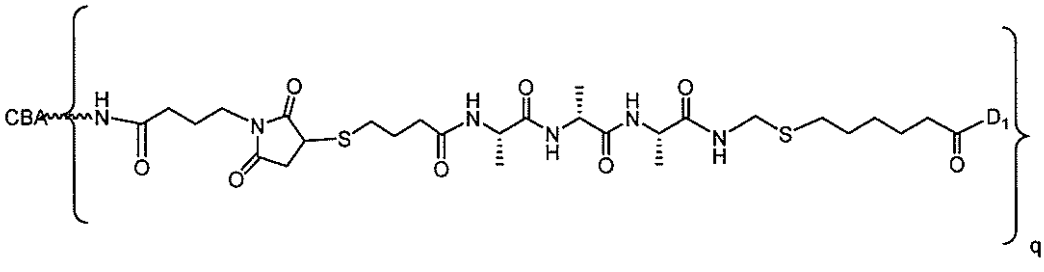
で表される、請求項８に記載の免疫コンジュケート。

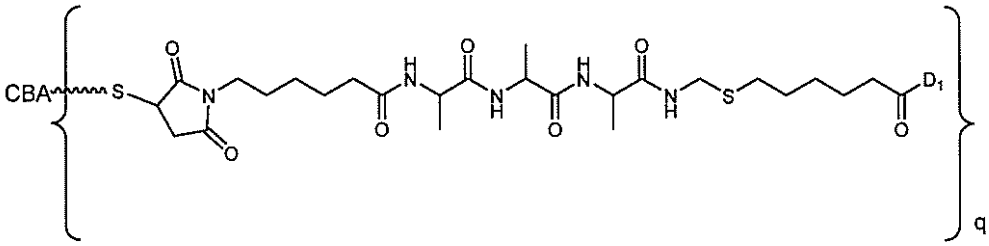
【請求項１２】

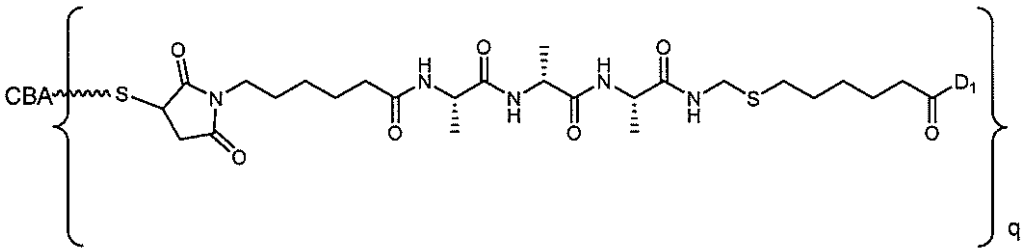
前記免疫コンジュケートは、次の式：

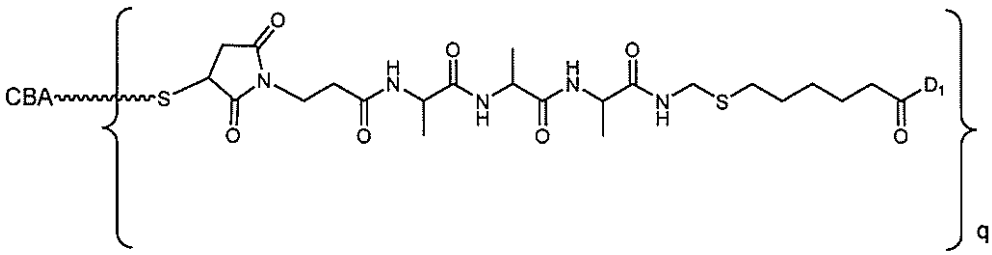
【化１９】

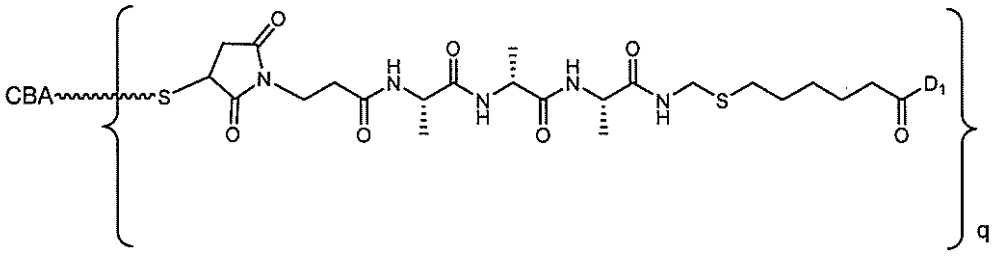






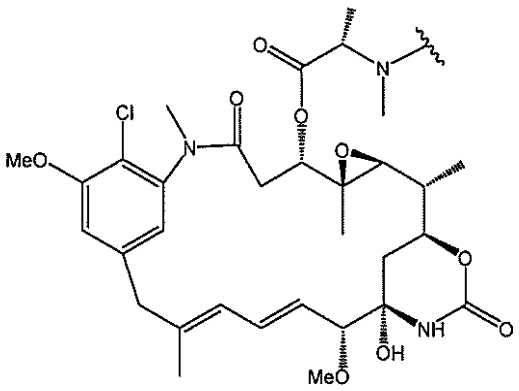






で表されるものであり、
式中、D_1は、次の式：

【化２０】



で表される、請求項１１に記載の免疫コンジュケート。

【請求項１３】

前記免疫コンジュゲートは、ヒトＡＤＡＭ９、及び、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９に対して特異的に結合するヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントを含み、前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントが、前記薬理学的作用物質に対して結合する、請求項１～１２のいずれか１項に記載の免疫コンジュケート。

【請求項１４】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、

（ａ）それぞれ、配列番号８、３５及び１０、及び、配列番号６２、１３、１４；

（ｂ）それぞれ、配列番号８、３５及び１０、及び、配列番号６３、１３、１４；

（ｃ）それぞれ、配列番号８、３６及び１０、及び、配列番号６３、１３、１４；及び

（ｄ）それぞれ、配列番号３４、３６及び１０、及び、配列番号６４、１３、６５、

からなる群から選択される配列を有する、CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインと、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインとを含む、請求項１３に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項１５】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、

（ａ）それぞれ、配列番号１７、及び、配列番号５５；

（ｂ）それぞれ、配列番号１７、及び、配列番号５６；

（ｃ）それぞれ、配列番号１８、及び、配列番号５６；及び

（ｄ）それぞれ、配列番号１９、及び、配列番号５７

からなる群から選択される配列に対して少なくとも９０％、少なくとも９５％、または、少なくとも９９％の同一性を有する配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、及び、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む、請求項１３または１４に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項１６】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、

（ａ）それぞれ、配列番号１７、及び、配列番号５５；

（ｂ）それぞれ、配列番号１７、及び、配列番号５６；

（ｃ）それぞれ、配列番号１８、及び、配列番号５６；及び

（ｄ）それぞれ、配列番号１９、及び、配列番号５７

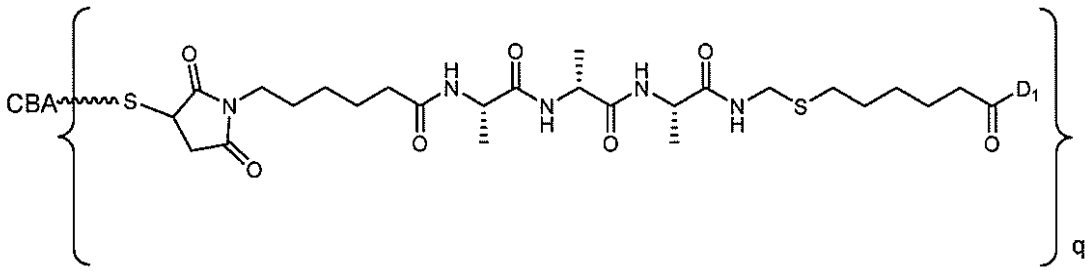
からなる群から選択される配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、及び、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む、請求項１５に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項１７】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、キメラまたはマウス親抗体と比較して、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９に対する結合アフィニティが少なくとも１００倍向上し、かつ、ヒトＡＤＡＭ９に対する高いアフィニティでの結合を保持するように最適化する、請求項１３に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項１８】
前記抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、
（ａ）それぞれ、配列番号８、３５及び３７、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｂ）それぞれ、配列番号８、３５及び３８、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｃ）それぞれ、配列番号８、３５及び３９、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｄ）それぞれ、配列番号８、３５及び４０、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｅ）それぞれ、配列番号８、３５及び４１、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｆ）それぞれ、配列番号８、３５及び４２、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｇ）それぞれ、配列番号８、３５及び４３、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｈ）それぞれ、配列番号８、３５及び４４、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｉ）それぞれ、配列番号８、３５及び４５、及び、配列番号６２、１３、１４；及び
（ｊ）それぞれ、配列番号８、３５及び４６、及び、配列番号６２、１３、１４
からなる群から選択される配列を有する、CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインと、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインを含む、請求項１７に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項１９】
前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、
（ａ）それぞれ、配列番号２０、及び、配列番号５５；
（ｂ）それぞれ、配列番号２１、及び、配列番号５５；
（ｃ）それぞれ、配列番号２２、及び、配列番号５５；
（ｄ）それぞれ、配列番号２３、及び、配列番号５５；
（ｅ）それぞれ、配列番号２４、及び、配列番号５５；
（ｆ）それぞれ、配列番号２５、及び、配列番号５５；
（ｇ）それぞれ、配列番号２６、及び、配列番号５５；
（ｈ）それぞれ、配列番号２７、及び、配列番号５５；
（ｉ）それぞれ、配列番号２８、及び、配列番号５５；及び
（ｊ）それぞれ、配列番号２９、及び、配列番号５５
からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または、少なくとも９９％の同一性を有する配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、及び、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む、請求項１８に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２０】
前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、
（ａ）それぞれ、配列番号２０、及び、配列番号５５；
（ｂ）それぞれ、配列番号２１、及び、配列番号５５；
（ｃ）それぞれ、配列番号２２、及び、配列番号５５；
（ｄ）それぞれ、配列番号２３、及び、配列番号５５；
（ｅ）それぞれ、配列番号２４、及び、配列番号５５；
（ｆ）それぞれ、配列番号２５、及び、配列番号５５；
（ｇ）それぞれ、配列番号２６、及び、配列番号５５；
（ｈ）それぞれ、配列番号２７、及び、配列番号５５；
（ｉ）それぞれ、配列番号２８、及び、配列番号５５；及び
（ｊ）それぞれ、配列番号２９、及び、配列番号５５
からなる群から選択される配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、及び、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む、請求項１９に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２１】
前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体が、Ｆｃ領域を含む全長抗体である、請求項１３～２０のいずれか１項に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２２】
前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体が、
（ａ）それぞれ、配列番号５０、及び、配列番号６８；

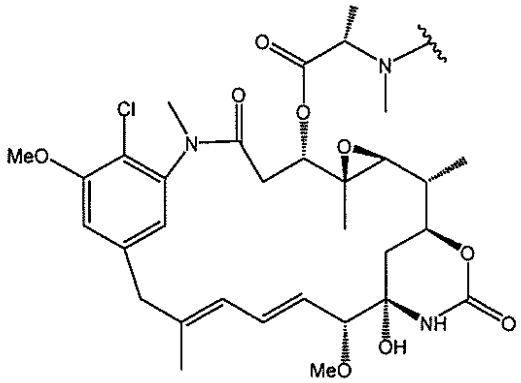
（ｂ）それぞれ、配列番号５１、及び、配列番号６８；及び
（ｃ）それぞれ、配列番号５２、及び、配列番号６８からなる群から選択される配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、請求項２１に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２３】
前記Ｆｃ領域は、変異体Ｆｃ領域であり、前記変異体Ｆｃ領域は：
（ａ）Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、ならびに、Ｌ２３４Ａ及びＬ２３５Ａからなる群から選択される、ＦｃγＲに対する前記変異体Ｆｃ領域のアフィニティを抑制する１つ以上のアミノ酸改変；及び／または
（ｂ）Ｓ４４２にシステイン残基を導入するアミノ酸改変であって、前記付番は、ＫａｂａｔのＥＵインデックス付番法に従う、前記アミノ酸改変；及び／または
（ｃ）Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、及び、Ｔ２５６Ｅからなる群から選択されるＦｃＲｎに対する前記変異体Ｆｃ領域の半減期を延ばす１つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項１３～２２のいずれか１項に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２４】
前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、
（ａ）それぞれ、配列番号１４１、及び、配列番号６８；
（ｂ）それぞれ、配列番号１４２、及び、配列番号６８；
（ｃ）それぞれ、配列番号１４３、及び、配列番号６８；
（ｄ）それぞれ、配列番号１５１、及び、配列番号６８；
（ｅ）それぞれ、配列番号１５２、及び、配列番号６８；
（ｆ）それぞれ、配列番号１５３、及び、配列番号６８；及び
（ｇ）それぞれ、配列番号１５４、及び、配列番号６８
からなる群から選択される配列を有する重鎖と軽鎖とを含む、請求項１８に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２５】
配列番号１４１、配列番号１４２、配列番号１４３、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５３、または、配列番号１５４のＸは、リシンである、請求項２４に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２６】
配列番号１４１、配列番号１４２、配列番号１４３、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５３、または、配列番号１５４のＸは、存在しない、請求項２４に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２７】
前記免疫コンジュケートは、次の式：
【化２１】



で表されるものであり、
式中：
ＣＢＡは、それぞれ、配列番号８、３５及び４５、及び、配列番号６２、１３、１４の配列を有する、CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインと、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；
ｑは、１または２である；

D_1は、次の式：

【化２２】



で表されるものである、請求項１に記載の免疫コンジュケート。

【請求項２８】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、それぞれ、配列番号２８、及び、配列番号５５の配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、及び、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む、請求項２７に記載の免疫コンジュケート。

【請求項２９】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１４２、及び、配列番号６８の配列を有する重鎖、及び、軽鎖を含む、請求項２７に記載の免疫コンジュケート。

【請求項３０】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５２、及び、配列番号６８の配列を有する重鎖、及び、軽鎖を含む、請求項２７に記載の免疫コンジュケート。

【請求項３１】

配列番号１４２、または、配列番号１５２のＸは、リシンである、請求項２９または３０に記載の免疫コンジュケート。

【請求項３２】

配列番号１４２のＸは、存在しない、請求項２９に記載の免疫コンジュケート。

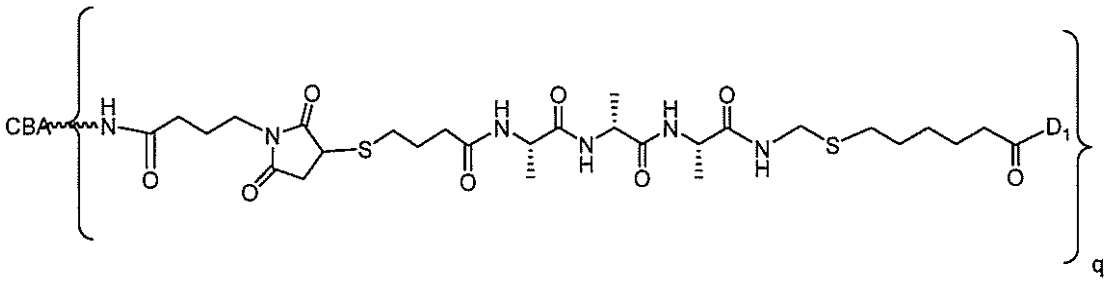
【請求項３３】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５６、及び、配列番号６８の配列を有する重鎖、及び、軽鎖を含む、請求項２７に記載の免疫コンジュケート。

【請求項３４】

前記免疫コンジュケートは、次の式：

【化２３】



で表されるものであり、

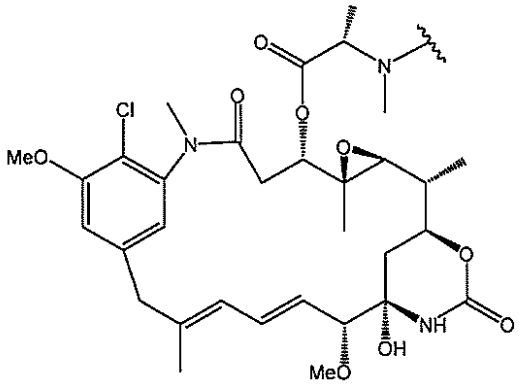
式中：

ＣＢＡは、それぞれ、配列番号８、３５及び４５、及び、配列番号６２、１３、１４の配列を有する、CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインと、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；

ｑは、１～１０の整数である；

D_1は、次の式：

【化２４】



で表されるものである、請求項１に記載の免疫コンジュケート。

【請求項３５】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、それぞれ、配列番号２８、及び、配列番号５５の配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、及び、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む、請求項３３に記載の免疫コンジュケート。

【請求項３６】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号５２、及び、配列番号６８の配列を有する重鎖、及び、軽鎖を含む、請求項３５に記載の免疫コンジュケート。

【請求項３７】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５１、及び、配列番号６８の配列を有する重鎖、及び、軽鎖を含む、請求項３４に記載の免疫コンジュケート。

【請求項３８】

配列番号５２または配列番号１５１のＸは、リシンである、請求項３６または３７に記載の免疫コンジュケート。

【請求項３９】

配列番号５２のＸは、存在しない、請求項３６に記載の免疫コンジュケート。

【請求項４０】

前記ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５５、及び、配列番号６８の配列を有する重鎖、及び、軽鎖を含む、請求項３４に記載の免疫コンジュケート。

【請求項４１】

有効量の請求項１～４０のいずれかに記載の免疫コンジュゲートと、医薬として許容可能な担体、賦形剤または希釈剤とを含む、医薬組成物。

【請求項４２】

対象において、ＡＤＡＭ９の発現と関連する、または、ＡＤＡＭ９の発現によって特徴決定される疾患または病態を治療するための方法であって、前記対象に、有効量の請求項１～４０のいずれか１項に記載の免疫コンジュゲート、または、請求項４１に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項４３】

ＡＤＡＭ９の発現と関連する、または、ＡＤＡＭ９の発現によって特徴決定される前記疾患または病態は、がんである、請求項４２に記載の方法。

【請求項４４】

前記がんは、非小細胞肺癌、大腸癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、腎細胞癌、前立腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、子宮癌、卵巣癌、肝臓癌、子宮頸癌、甲状腺癌、精巣癌、骨髄癌、黒色腫、及び、リンパ癌からなる群から選択される、請求項４３に記載の方法。

【請求項４５】

前記非小細胞肺癌は、扁平上皮細胞癌、非扁平上皮細胞癌、腺癌、または、大細胞未分

化癌である、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記大腸癌は、腺癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、原発性大腸リンパ腫、平滑筋肉腫、または、扁平上皮細胞癌である、請求項４４に記載の方法。
【請求項４７】
前記方法は、非小細胞肺癌、胃癌、膵臓癌、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）、または、大腸癌を治療するためのものである、請求項４２に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１８年6月２６日に出願した米国仮出願第６２／６９０，０５２号、２０１８年6月２８日に出願した米国仮出願第６２／６９１，３４２号、及び、２０１９年２月２６日に出願した米国仮出願第６２／８１０，７０３号の優先権を主張する。これらの出願の全内容を、参照により本明細書の一部を構成するものとして援用する。
【０００２】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出し、かつ、本明細書の一部を構成するものとして、参照によりその全内容を援用する配列表を含む。２０１９年5月１６日に作成した当該ＡＳＣＩＩコピーは、名称が１２１１６２－０４８２０＿ＳＬ．ｔｘｔであり、サイズが１６３，０７０バイトである。
【０００３】
本発明は、少なくとも１種類の薬理学的作用物質に対して結合する「ジスインテグリン、及び、メタロプロテイナーゼドメインを含有するタンパク質９」（「ＡＤＡＭ９」）に対して特異的に結合することが可能な抗体、または、そのフラグメントを含む免疫コンジュゲートに関する。本発明は、特に、ヒトＡＤＡＭ９、及び、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）のＡＤＡＭ９と交差反応する免疫コンジュゲートに関する。本発明は、さらに、レシピエント対象に対して、このような免疫コンジュゲートを投与すると免疫原性の低下を示す、ヒト化、及び／または、脱免疫化した軽鎖可変（ＶＬ）ドメイン、及び／または、重鎖可変（ＶＨ）ドメインを含むすべての免疫コンジュゲートに関する。本発明はまた、このような免疫コンジュゲートのいずれかを含有する医薬組成物、ならびに、がん及びその他の疾患及び病態の治療において、このような免疫コンジュゲートのいずれかの使用を伴う方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
ＡＤＡＭは、様々な生理学的プロセス、及び、疾病プロセスに関与するタンパク質のファミリーである（Ａｍｅｎｄｏｌａ，Ｒ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．（２０１５）“ＡＤＡＭ９ Ｄｉｓｉｎｔｅｇｒｉｎ Ｄｏｍａｉｎ Ａｃｔｉｖａｔｅｓ Ｈｕｍａｎ Ｎｅｕｔｒｏｐｈｉｌｓ Ｔｈｒｏｕｇｈ Ａｎ Ａｕｔｏｃｒｉｎｅ Ｃｉｒｃｕｉｔ Ｉｎｖｏｌｖｉｎｇ Ｉｎｔｅｇｒｉｎｓ Ａｎｄ ＣＸＣＲ２”，Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ Ｂｉｏｌ．９７（５）：９５１－９６２；Ｅｄｗａｒｓ，Ｄ．Ｒ．ｅｔ ａｌ．（２００８）“Ｔｈｅ ＡＤＡＭ Ｍｅｔａｌｌｏｐｒｏｔｅａｓｅｓ” Ｍｏｌｅｃ．Ａｓｐｅｃｔｓ Ｍｅｄ．２９：２５８－２８９）。このファミリーの少なくとも４０の遺伝子群が同定されており、このような群の内、少なくとも２１が、ヒトにおいて機能性であると考えられている（Ｌｉ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．（２０１６）“Ｏｖｅｒｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ＡＤＡＭ９ Ｐｒｏｍｏｔｅｓ Ｃｏｌｏｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌｓ Ｉｎｖａｓｉｏｎ” Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｓｕｒｇ．２６（３）：１２７－１３３；Ｄｕｆｆｙ，Ｍ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．（２０１１）“Ｔｈｅ ＡＤＡＭｓ Ｆａｍｉｌｙ Ｏｆ Ｐｒｏｔｅａｓｅｓ：Ｎｅｗ Ｂｉｏｍａｒｋｅｒｓ Ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉ

c Targets For Cancer？”Clin. Proteomics 8：9：1－13；米国特許出願公開第2013／0045244号も参照されたい）。

【0005】

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

【0006】

ADAM9は、分子のADAMファミリーの一メンバーである。不活性な形態として合成され、タンパク質分解により開裂し、活性な酵素を生成する。上流部位での処理は、酵素前駆体の活性化にとって特に重要である。ADAM9は、線維芽細胞で発現し（Zigrino, P. et al.（2011）“The Disintegrin－Like And Cysteine－Rich Domains Of ADAM －9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts” J. Biol. Chem. 286：6801－6807）、活性化した血管平滑筋細胞（Sun, C. et al.（2010）“ADAM15 Regulates Endothelial Permeability And Neutrophil Migration Via Src／ERKl／2 Signalling” Cardiovasc. Res. 87：348－355）、単球（Namba, K. et al.（2001）“Involvement Of ADAM9 In Multinucleated Giant Cell Formation Of Blood Monocytes” Cell. Immunol. 213：104－113）、活性化したマクロファージ（Oksala, N. et al.（2009）“ADAM－9, ADAM－15, And ADAM－17 Are Upregulated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries － Tampere Vascular Study”, Ann. Med. 41：279－290）で発現する。

【0007】

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

integrin－Like And Cysteine－Rich Domains Of ADAM－9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts” J.Biol.Chem.286：6801－6807；Karadag, A. et al.（2006）“ADAM－9（MDC－9／Meltringamma）, A Member Of The A Disintegrin And Metalloproteinase Family, Regulates Myeloma－Cell－Induced Interleukin－6 Production In Osteoblasts By Direct Interaction With The Alpha（v）Beta5 Integrin” Blood 107：3271－3278；Comineti, M. R. et al.（2009）“Inhibition Of Platelets And Tumor Cell Adhesion By The Disintegrin Domain Of Human ADAM9 To Collagen I Under Dynamic Flow Conditions”, Biochimie, 91：1045－1052）。ADAM9ジスインテグリンドメインは、α6β1、α6β4、αvβ5、及び、α9β1インテグリンと相互作用することが示されている。

【0008】

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

【0009】

顕著なことに、ADAM9発現の増加は、腫瘍の悪性度及び転移能と正の相関関係にあ

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

【0010】

したがって、多くの研究が、抗がん治療のための潜在的な標的としてADAM9を特定してきた（Peduto, L.（2009）“ADAM9 As A Potential Target Molecule In Cancer” Curr. Pharm. Des. 15：2282－2287；Duffy, M. J. et al.（2009）“Role Of ADAMs In Cancer Formation And Progression”, Clin. Cancer Res. 15：1140－1144；Duffy, M. J. et al.（2011）“The ADAMs Family Of Proteases：New Biomarkers And Therapeutic Targets For Cancer?”, Clin. Proteomics 8：9：1－13；Josson, S. et al.（2011）“Inhibition of ADAM9 Expression Induces Epithelial Phenotypic Alterations and Sensitizes Human Prostate Cancer Cells to Radiation and Chemotherapy” Prostate 71（3）：232－240；また、米国特許出願公開第2016／0138113号、第2016／0068909号、第2016／0024582号、第2015／0368352号、第2015／0337356号、第2015／0337048号、第2015／0010575号、第2014／0342946号、第2012／0077694号、第2011／0151536号、第2011／0129450号、第2010／0291063号、第2010／0233079号、第2010／0112713号、第2009／0285840号、第2009／0203051号、第2004／0092466号、第2003／0091568号、第2002／0068062号、PCT公開第WO2016／07

７５０５号、第ＷＯ２０１４／２０５２９３号、第ＷＯ２０１４／１８６３６４号、第ＷＯ２０１４／１２４３２６号、第ＷＯ２０１４／１０８４８０号、第ＷＯ２０１３／１１９９６０号、第ＷＯ２０１３／０９８７９７号、第ＷＯ２０１３／０４９７０４号、及び、第ＷＯ２０１１／１００３６２号も参照されたい）。さらに、ＡＤＡＭ９の発現は、肺疾患及び炎症にも関連があることがわかってきた（例えば、米国特許出願公開第２０１６／００６８９０９号、第２０１２／０１４９５９５号、第２００９／０２３３３００号、第２００６／０２７０６１８号及び第２００９／０１４２３０１号を参照されたい）。ＡＤＡＭ９に結合する抗体は、Ａｂｅａｍ、Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、及び、その他の企業から市販されている。

【００１１】

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

【発明の概要】

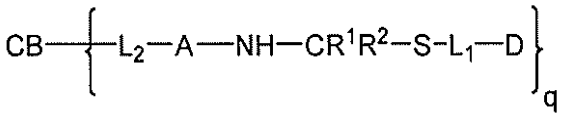
【００１２】

本発明は、本明細書に記載した少なくとも１種類のメイタンシノイドに対して結合する「ジスインテグリン、及び、メタロプロテイナーゼドメインを含有するタンパク質９」（「ＡＤＡＭ９」）に対して特異的に結合することが可能な抗体、または、そのフラグメントを含む免疫コンジュゲートに関する。本発明は、特に、ヒトＡＤＡＭ９、及び、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）のＡＤＡＭ９と交差反応する、このような免疫コンジュゲートに関する。本発明は、さらに、レシピエント対象にこのような免疫コンジュゲートを投与すると免疫原性の低下を示すようなヒト化、及び／または、脱免疫化した軽鎖可変（ＶＬ）ドメイン、及び／または、重鎖可変（ＶＨ）ドメインを含むすべての免疫コンジュゲートに関する。本発明はまた、このような免疫コンジュゲートのいずれかを含有する医薬組成物、ならびにがん及びその他の疾患及び病態の治療において、このような免疫コンジュゲートのいずれかの使用を伴う方法に関する。

【００１３】

詳細には、本発明は、次の式：

【化１】

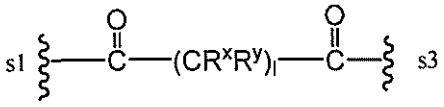


で表される免疫コンジュケート、または、医薬として許容可能なその塩であって、式中：

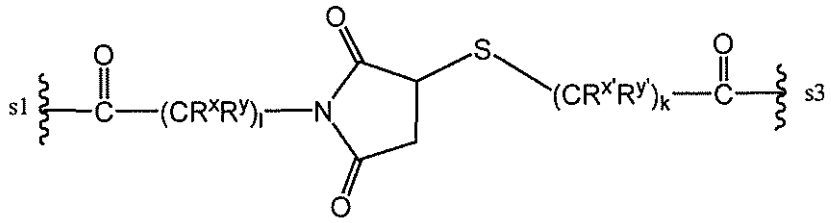
ＣＢは、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；

L_2は、次の式：

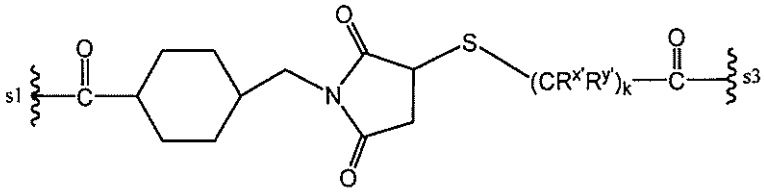
【化２】



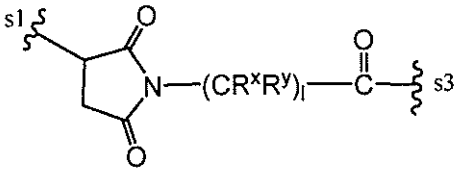
(L2a),



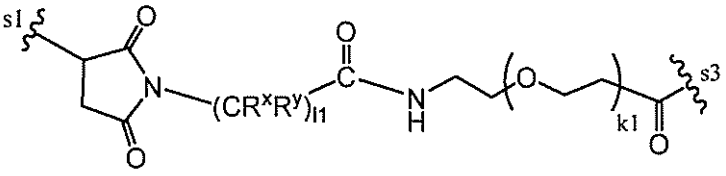
(L2b),



(L2c),



(L2d), または



(L2e);

の１つで表されるものであり、

式中：

R^x、R^y、$R^{x'}$、及び、$R^{y'}$は、それぞれの場合に、独立して、Ｈ、－ＯＨ、ハロゲン、－Ｏ－（C_{1-4}アルキル）、－SO_3H、－$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$、または、－ＯＨ、ハロゲン、SO_3H、または、$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$で任意に置換したC_{1-4}アルキルであり、式中、R_{40}、R_{41}、及び、R_{42}は、それぞれ、独立して、Ｈ、または、C_{1-4}アルキルであり；

ｌ及びｋは、それぞれ、独立して、１～１０の整数である；

ｌ１は、２～５の整数である；

ｋ１は、１～５の整数である；及び、

ｓ１は、細胞結合剤ＣＢに対して接続した部位を示し、そして、ｓ３は、Ａ基に対して接続した部位を示す；

Ａは、アミノ酸残基、または、２～２０個のアミノ酸残基を含むペプチドである；

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

L_1は、次の式：

【化３】

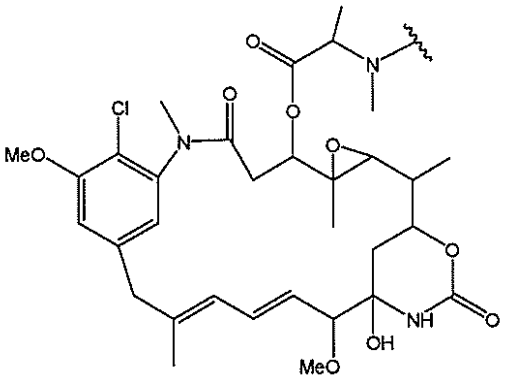
$$-CR^3R^4-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$$

で表されるものであり、

式中、R^3及びR^4は、それぞれ、独立して、ＨまたはＭｅであり、かつ、L_1の－Ｃ（＝Ｏ）－部分は、Ｄに対して接続している；

Ｄは、次の式：

【化４】



；

で表されるものであり；及び

ｑは、１～２０の整数である、当該免疫コンジュケート、または、医薬として許容可能なその塩を提供する。

【００１４】

特定の実施形態では、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、軽鎖可変（ＶＬ）ドメインと、重鎖可変（ＶＨ）ドメインとを含み、重鎖可変ドメインは、CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインを含み、かつ、軽鎖可変ドメインは、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインを含み、ここで：

（Ａ）当該CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインは、ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体の重鎖可変（ＶＨ）ドメインのCDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインのアミノ酸配列を有している；及び、当該CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインは、ＭＡＢ－Ａの軽鎖可変（ＶＬ）ドメインのCDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインのアミノ酸配列を有している；または

（Ｂ）当該CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインは、ＭＡＢ－Ａの重鎖可変（ＶＨ）ドメインのCDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインのアミノ酸配列を有している；及び、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、当該CDR_L3ドメインは、ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体の軽鎖可変（ＶＬ）ドメインのCDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインのアミノ酸配列を有している；または

（Ｃ）当該CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインは、ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体の重鎖可変（ＶＨ）ドメインのCDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインのアミノ酸配列を有している；及び、当該CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインは、ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体の軽鎖可変（ＶＬ）ドメインのCDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインのアミノ酸配列を有している。

【００１５】

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

（Ａ）（１）ＭＡＢ－Ａの重鎖可変（ＶＨ）ドメインのCDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメイン；及び

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

（Ｂ）（１）ＭＡＢ－Ａの軽鎖可変（ＶＬ）ドメインのCDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメイン；及び

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

Ｒ４；または
（Ｃ）（１）ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体の重鎖可変（ＶＨ）ドメインのＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_{H}$３ドメイン；及び
（２）ＭＡＢ－Ａのヒト化変異体のＶＨドメインのＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及び、ＦＲ４；または
（Ｄ）（１）ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体の軽鎖可変（ＶＬ）ドメインのＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_{L}$３ドメイン；及び
（２）ＭＡＢ－Ａのヒト化変異体のＶＬドメインのＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及び、ＦＲ４；または
（Ｅ）（１）ＭＡＢ－Ａのヒト化／最適化した変異体の重鎖可変（ＶＨ）ドメイン；及び
（２）ＭＡＢ－Ａのヒト化／最適化した変異体のＶＬ軽重鎖可変（ＶＬ）ドメイン、を含む。

【００１６】

特定の実施形態では、ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体の重鎖可変（ＶＨ）ドメインのＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_{H}$３ドメインは、それぞれ、次の：
（１）配列番号４７（ＳＹＷＸ$_{1}$Ｈ）
配列中、Ｘ$_{1}$は、ＭまたはＩである、
（２）配列番号４８（ＥＩＩＰＩＸ$_{2}$ＧＨＴＮＹＮＥＸ$_{3}$ＦＸ$_{4}$Ｘ$_{5}$）
配列中、Ｘ$_{2}$、Ｘ$_{3}$、Ｘ$_{4}$及びＸ$_{5}$は、独立して選択され、及び
Ｘ$_{2}$は、ＮまたはＦであり；Ｘ$_{3}$は、ＫまたはＲであり；
Ｘ$_{4}$は、ＫまたはＱであり；及び
Ｘ$_{5}$は、ＳまたはＧである；及び
（３）配列番号４９（ＧＧＹＹＹＹＸ$_{6}$Ｘ$_{7}$Ｘ$_{8}$Ｘ$_{9}$Ｘ$_{10}$Ｘ$_{11}$ＤＹ）
配列中、Ｘ$_{6}$は、Ｐ、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、Ｔ、ＧまたはＤであり、及び、Ｘ$_{7}$、Ｘ$_{8}$、Ｘ$_{9}$、Ｘ$_{10}$及びＸ$_{11}$は、
（Ａ）Ｘ$_{6}$がＰである場合；
Ｘ$_{7}$は、ＫまたはＲであり；Ｘ$_{8}$は、ＦまたはＭであり；Ｘ$_{9}$は、Ｇであり；
Ｘ$_{10}$は、ＷまたはＦであり；及び、Ｘ$_{11}$は、Ｍ、ＬまたはＫであり；
（Ｂ）Ｘ$_{6}$が、Ｆ、ＹまたはＷである場合；
Ｘ$_{7}$は、ＮまたはＨであり；Ｘ$_{8}$は、ＳまたはＫであり；Ｘ$_{9}$は、ＧまたはＡであり；
Ｘ$_{10}$は、ＴまたはＶであり；及び、Ｘ$_{11}$は、Ｍ、ＬまたはＫであり；
（Ｃ）Ｘ$_{6}$が、Ｉ、ＬまたはＶである場合；
Ｘ$_{7}$は、Ｇであり；Ｘ$_{8}$は、Ｋであり；Ｘ$_{9}$は、ＧまたはＡであり；
Ｘ$_{10}$は、Ｖであり；及び、Ｘ$_{11}$は、Ｍ、ＬまたはＫであり；
（Ｄ）Ｘ$_{6}$がＴである場合；
Ｘ$_{7}$は、Ｇであり；Ｘ$_{8}$は、Ｋ、ＭまたはＮであり；Ｘ$_{9}$は、Ｇであり；
Ｘ$_{10}$は、ＶまたはＴであり；及び、Ｘ$_{11}$は、ＬまたはＭであり；
（Ｅ）Ｘ$_{6}$がＧである場合；
Ｘ$_{7}$は、Ｇであり；Ｘ$_{8}$は、Ｓであり；Ｘ$_{9}$は、Ｇであり；
Ｘ$_{10}$は、Ｖであり；及び、Ｘ$_{11}$は、Ｌであり、
（Ｆ）Ｘ$_{6}$がＤである場合、
Ｘ$_{7}$は、Ｓであり；Ｘ$_{8}$は、Ｎであり；Ｘ$_{9}$は、Ａであり；
Ｘ$_{10}$は、Ｖであり；及び、Ｘ$_{11}$は、Ｌであるように選択する、アミノ酸配列を有する。

【００１７】

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

【化５】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWX$_1$H**WVRQA
PGKGLEWVG**E** **IIPIX$_2$GHTNY** **NEX$_3$FX$_4$X$_5$**RFTI SLDNSKNTLY
LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG** **YYYYX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$**
DYWGQGTTVT VSS

配列中、X_1、X_2、X_3、X_4、X_5及びX_6は、独立して選択され、
配列中、X_1は、ＭまたはＩであり；X_2は、ＮまたはＦであり；
X_3は、ＫまたはＲであり；X_4は、ＫまたはＱであり；
X_5は、ＳまたはＧであり、及び、X_6は、Ｐ、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、Ｔ、ＧまたはＤであり；
配列中、X_7、X_8、X_9、X_{10}及びX_{11}は、
X_6がＰである場合；X_7は、ＫまたはＲであり；X_8は、ＦまたはＭであり；X_9は、Ｇであり；X_{10}は、ＷまたはＦであり；及び、X_{11}は、Ｍ、ＬまたはＫであり；
X_6が、Ｆ、ＹまたはＷである場合；X_7は、ＮまたはＨであり；X_8は、ＳまたはＫであり；X_9は、ＧまたはＡであり；X_{10}は、ＴまたはＶであり；及び、X_{11}は、Ｍ、ＬまたはＫであり；
X_6が、Ｉ、ＬまたはＶである場合；X_7は、Ｇであり；X_8は、Ｋであり；X_9は、ＧまたはＡであり；X_{10}は、Ｖであり；及び、X_{11}は、Ｍ、ＬまたはＫであり；
X_6がＴである場合；X_7は、Ｇであり；X_8は、Ｋ、ＭまたはＮであり；X_9は、Ｇであり；X_{10}は、ＶまたはＴであり；及び、X_{11}は、ＬまたはＭであり；
X_6がＧである場合；X_7は、Ｇであり；X_8は、Ｓであり；X_9は、Ｇであり；X_{10}は、Ｖであり；及び、X_{11}は、Ｌであり；
X_6がＤである場合；X_7は、Ｓであり；X_8は、Ｎであり；X_9は、Ａであり；X_{10}は、Ｖであり；及び、X_{11}は、Ｌであるように選択する。

【００１８】

特定の実施形態では、ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体の重鎖可変（ＶＨ）ドメインは、
（１）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（１）（配列番号１６）；
（２）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２）（配列番号１７）；
（３）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（３）（配列番号１８）；
（４）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（４）（配列番号１９）；
（５）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ａ）（配列番号２０）；
（６）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｂ）（配列番号２１）；
（７）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｃ）（配列番号２２）；
（８）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｄ）（配列番号２３）；
（９）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｅ）（配列番号２４）；
（１０）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｆ）（配列番号２５）；
（１１）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｇ）（配列番号２６）；
（１２）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｈ）（配列番号２７）；
（１３）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）（配列番号２８）；及び
（１４）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｊ）（配列番号２９）からなる群から選択する。

【００１９】

特定の実施形態では、ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体の軽鎖可変（ＶＬ）ドメインのＣＤＲ$_L$１ドメイン、ＣＤＲ$_L$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_L$３ドメインは、それぞれ、
（１）配列番号６６（X_{12}ＡＳＱＳＶＤＹX_{13}ＧＤＳＹX_{14}Ｎ）
配列中、X_{12}、X_{13}、X_{14}は、独立して選択され、及び
配列中、X_{12}は、ＫまたはＲであり；X_{13}は、ＤまたはＳであり；及び、X_{14}は、ＭまたはＬである；
（２）配列番号１３（ＡＡＳＤＬＥＳ）；及び

（３）配列番号６７（ＱＱＳＸ$_{15}$Ｘ$_{16}$Ｘ$_{17}$ＰＦＴ）
配列中、Ｘ$_{15}$、Ｘ$_{16}$及びＸ$_{17}$は独立して選択され、及び
配列中、Ｘ$_{15}$は、ＨまたはＹであり；Ｘ$_{16}$は、ＥまたはＳであり；Ｘ$_{17}$は、ＤまたはＴである、アミノ酸配列を有する。

【００２０】

特定の実施形態では、軽鎖可変（ＶＬ）ドメインは、配列番号５３のアミノ酸配列を含み、

【化６】

DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	ISC**X$_{12}$ASQSVD**
YX$_{13}$GDSYX$_{14}$NWY	QQKPGQPPKL	LIY**AASDLES**
GIPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFATY
YC**QQSX$_{15}$X$_{16}$X$_{17}$PF**	**T**FGQGTKLEI	K

配列中、Ｘ$_{12}$、Ｘ$_{13}$、Ｘ$_{14}$、Ｘ$_{15}$、Ｘ$_{16}$及びＸ$_{17}$は、独立して選択され、及び
配列中、Ｘ$_{12}$は、ＫまたはＲであり；Ｘ$_{13}$は、ＤまたはＳであり；
Ｘ$_{14}$は、ＭまたはＬであり；Ｘ$_{15}$は、ＨまたはＹであり；
Ｘ$_{16}$は、ＥまたはＳであり；Ｘ$_{17}$は、ＤまたはＴである。

【００２１】

特定の実施形態では、ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体の軽鎖可変（ＶＬ）ドメインが、
（１）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（１）（配列番号５４）；
（２）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（２）（配列番号５５）；
（３）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（３）（配列番号５６）；
（４）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（４）（配列番号５７）；
（５）ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（２Ａ）（配列番号２０）からなる群から選択する。

【００２２】

特定の実施形態では、ＣＤＲ$_{H}$１ドメインは、アミノ酸配列ＳＹＷＭＨ（配列番号８）を含み、ＣＤＲ$_{H}$２ドメインは、アミノ酸配列ＥＩＩＰＩＦＧＨＴＮＹＮＥＫＦＫＳ（配列番号３５）を含み、及び、ＣＤＲ$_{H}$３ドメインは、アミノ酸配列ＧＧＹＹＹＹＰＲＱＧＦＬＤＹ（配列番号４５）を含む。

【００２３】

特定の実施形態では、ＣＤＲ$_{L}$１ドメインは、アミノ酸配列ＫＡＳＱＳＶＤＹＳＧＤＳＹＭＮ（配列番号６２）を含み、ＣＤＲ$_{L}$２ドメインは、アミノ酸配列ＡＡＳＤＬＥＳ（配列番号１３）を含み、及び、ＣＤＲ$_{L}$３ドメインは、アミノ酸配列ＱＱＳＨＥＤＰＦＴ（配列番号１４）を含む。

【００２４】

特定の実施形態では、免疫コンジュゲートは、
（Ａ）ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）の重鎖可変（ＶＨ）ドメイン（配列番号２８）；または
（Ｂ）ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）の軽鎖可変（ＶＬ）ドメイン（配列番号５５）；または
（Ｃ）ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）の重鎖可変（ＶＨ）ドメイン（配列番号２８）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）の軽鎖可変（ＶＬ）ドメイン（配列番号５５）、を含む。

【００２５】

特定の実施形態では、免疫コンジュゲートは、Ｆｃ領域を含む。一部の実施形態では、Ｆｃ領域は；（ａ）ＦｃγＲに対する変異体Ｆｃ領域のアフィニティを抑制する１つ以上のアミノ酸改変；及び／または、（ｂ）システイン残基を導入する１つ以上のアミノ酸改変、を含む変異体Ｆｃ領域である。一部の実施形態では、ＦｃγＲに対する変異体Ｆｃ領域のアフィニティを抑制する１つ以上のアミノ酸改変は：（Ａ）Ｌ２３４Ａ；（Ｂ）Ｌ２３５Ａ；または、（Ｃ）Ｌ２３４Ａ及びＬ２３５Ａを含む；当該付番法は、Ｋａｂａｔの

ＥＵインデックス付番法による。一部の実施形態では、システイン残基を導入する１つ以上のアミノ酸改変は、Ｓ４４２Ｃを含む；当該付番法は、ＫａｂａｔのＥＵインデックス付番法による。

【００２６】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、ヒトＡＤＡＭ９、及び、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９に対して特異的に結合するヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントを含み、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、薬理学的作用物質に対して結合する。

【００２７】

一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは：

（ａ）それぞれ、配列番号８、３５及び１０、及び、配列番号６２、１３、１４；

（ｂ）それぞれ、配列番号８、３５及び１０、及び、配列番号６３、１３、１４；

（ｃ）それぞれ、配列番号８、３６及び１０、及び、配列番号６３、１３、１４；及び

（ｄ）それぞれ、配列番号３４、３６及び１０、及び、配列番号６４、１３、６５からなる群から選択される配列を有する、CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインと、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインとを含む。

【００２８】

一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは：

（ａ）それぞれ、配列番号１７及び配列番号５５；

（ｂ）それぞれ、配列番号１７及び配列番号５６；

（ｃ）それぞれ、配列番号１８及び配列番号５６；及び

（ｄ）それぞれ、配列番号１９及び配列番号５７

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

【００２９】

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

（ａ）それぞれ、配列番号１７及び配列番号５５；

（ｂ）それぞれ、配列番号１７及び配列番号５６；

（ｃ）それぞれ、配列番号１８及び配列番号５６；及び

（ｄ）それぞれ、配列番号１９及び配列番号５７

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

【００３０】

特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、キメラまたはマウス親抗体と比較して、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９に対する結合アフィニティが、少なくとも１００倍向上し、かつ、ヒトＡＤＡＭ９に対する高いアフィニティでの結合を保持するように最適化する。

【００３１】

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

（ａ）それぞれ、配列番号８、３５及び３７及び配列番号６２、１３、１４；

（ｂ）それぞれ、配列番号８、３５及び３８及び配列番号６２、１３、１４；

（ｃ）それぞれ、配列番号８、３５及び３９及び配列番号６２、１３、１４；

（ｄ）それぞれ、配列番号８、３５及び４０及び配列番号６２、１３、１４；

（ｅ）それぞれ、配列番号８、３５及び４１及び配列番号６２、１３、１４；

（ｆ）それぞれ、配列番号８、３５及び４２及び配列番号６２、１３、１４；
（ｇ）それぞれ、配列番号８、３５及び４３及び配列番号６２、１３、１４；
（ｈ）それぞれ、配列番号８、３５及び４４及び配列番号６２、１３、１４；
（ｉ）それぞれ、配列番号８、３５及び４５及び配列番号６２、１３、１４；及び
（ｊ）それぞれ、配列番号８、３５及び４６及び配列番号６２、１３、１４、からなる群から選択される配列を有する、ＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_{H}$３ドメインと、ＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_{L}$３ドメインを含む。

【００３２】

特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは：
（ａ）それぞれ、配列番号２０及び配列番号５５；
（ｂ）それぞれ、配列番号２１及び配列番号５５；
（ｃ）それぞれ、配列番号２２及び配列番号５５；
（ｄ）それぞれ、配列番号２３及び配列番号５５；
（ｅ）それぞれ、配列番号２４及び配列番号５５；
（ｆ）それぞれ、配列番号２５及び配列番号５５；
（ｇ）それぞれ、配列番号２６及び配列番号５５；
（ｈ）それぞれ、配列番号２７及び配列番号５５；
（ｉ）それぞれ、配列番号２８及び配列番号５５；及び
（ｊ）それぞれ、配列番号２９及び配列番号５５、
からなる群から選択される配列に対して、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または、少なくとも９９％の同一性を有する配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、及び、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。

【００３３】

特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは：
（ａ）それぞれ、配列番号２０及び配列番号５５；
（ｂ）それぞれ、配列番号２１及び配列番号５５；
（ｃ）それぞれ、配列番号２２及び配列番号５５；
（ｄ）それぞれ、配列番号２３及び配列番号５５；
（ｅ）それぞれ、配列番号２４及び配列番号５５；
（ｆ）それぞれ、配列番号２５及び配列番号５５；
（ｇ）それぞれ、配列番号２６及び配列番号５５；
（ｈ）それぞれ、配列番号２７及び配列番号５５；
（ｉ）それぞれ、配列番号２８及び配列番号５５；及び
（ｊ）それぞれ、配列番号２９及び配列番号５５
からなる群から選択される配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、及び、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。

【００３４】

特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、Ｆｃ領域を含む全長抗体である。一部の実施形態では、Ｆｃ領域は、変異体Ｆｃ領域であり、同変異体Ｆｃ領域は：
（ａ）Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、ならびに、Ｌ２３４Ａ及びＬ２３５Ａからなる群から選択される、ＦｃγＲに対する変異体Ｆｃ領域のアフィニティを抑制する１つ以上のアミノ酸改変；及び／または
（ｂ）Ｓ４４２にシステイン残基を導入するアミノ酸改変であって、付番法は、ＫａｂａｔのＥＵインデックスの番号法によるものである当該アミノ酸改変；及び／または
（ｃ）Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、及び、Ｔ２５６Ｅからなる群から選択される、ＦｃＲｎに対する変異体Ｆｃ領域の半減期を延ばす１つ以上のアミノ酸改変、を含む。

【００３５】

一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、
（ａ）それぞれ、配列番号５０及び配列番号６８；
（ｂ）それぞれ、配列番号５１及び配列番号６８；及び
（ｃ）それぞれ、配列番号５２及び配列番号６８からなる群から選択される配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。

【００３６】
特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、
（ａ）それぞれ、配列番号１４１及び配列番号６８；
（ｂ）それぞれ、配列番号１４２及び配列番号６８；
（ｃ）それぞれ、配列番号１４３及び配列番号６８；
（ｄ）それぞれ、配列番号１５１及び配列番号６８；
（ｅ）それぞれ、配列番号１５２及び配列番号６８；
（ｆ）それぞれ、配列番号１５３及び配列番号６８；及び
（ｇ）それぞれ、配列番号１５４及び配列番号６８
からなる群から選択される配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。

【００３７】
特定の実施形態では、配列番号１４１、配列番号１４２、配列番号１４３、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５３、または、配列番号１５４のＸは、リシンである。

【００３８】
特定の実施形態では、配列番号１４１、配列番号１４２、配列番号１４３、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５３、または、配列番号１５４のＸは、存在しない。

【００３９】
特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５６、及び、配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５５、及び、配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。

【００４０】
特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、配列番号１５７がコードする軽鎖、及び、（ｉ）配列番号１５９、（ｉｉ）配列番号１６０、（ｉｉｉ）配列番号１６１、または、（ｉｖ）配列番号１６２がコードする重鎖とを含む。

【００４１】
特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、配列番号１５８がコードする軽鎖、及び、（ｉ）配列番号１５９、（ｉｉ）配列番号１６０、（ｉｉｉ）配列番号１６１、または、（ｉｖ）配列番号１６２がコードする重鎖とを含む。

【００４２】
特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、配列番号１５７がコードする軽鎖、及び、配列番号１６１がコードする重鎖とを含む。

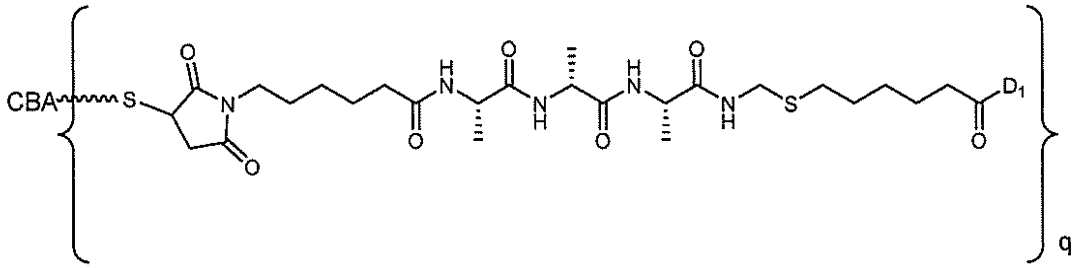
【００４３】
特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、配列番号１５７がコードする軽鎖、及び、配列番号１６２がコードする重鎖とを含む。

【００４４】
特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、配列番号１５８がコードする軽鎖、及び、配列番号１６１がコードする重鎖とを含む。

【００４５】
特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、配列番号１５８がコードする軽鎖、及び、配列番号１６２がコードする重鎖とを含む。

【００４６】
特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュケートは、次の式：

【化７】



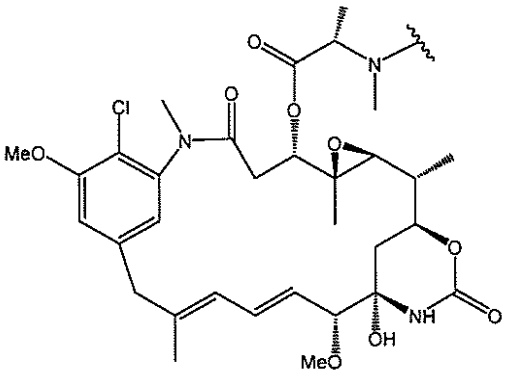
式中：

ＣＢＡは、それぞれ、配列番号８、３５及び４５、及び、配列番号６２、１３、１４の配列を有する、ＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_{H}$３ドメインと、ＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_{L}$３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；

ｑは、１または２である；

Ｄ$_{1}$は、次の式：

【化８】



である、式で表す。

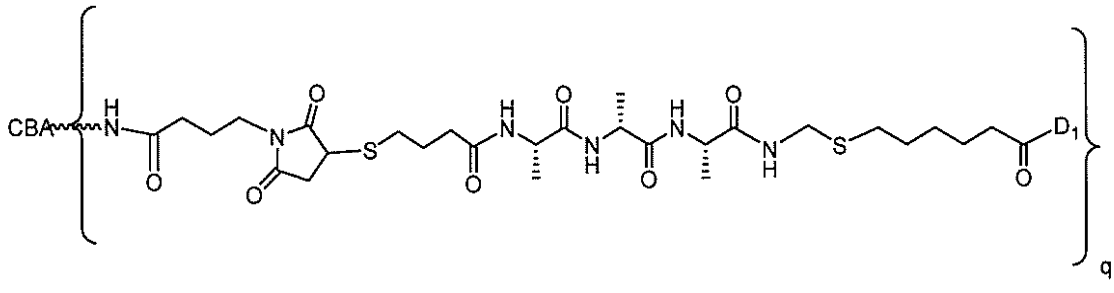
【００４７】

特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、それぞれ、配列番号２８及び配列番号５５の配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１４２及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５２及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態では、一部の実施形態では、配列番号１４２または配列番号１５２のＸは、リシンである。一部の実施形態では、一部の実施形態では、配列番号１４２または配列番号１５２のＸは、存在しない。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５６及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態では、免疫コンジュゲートを含む組成物（例えば、医薬組成物）のＤＡＲ値は、１．０～２．５、１．５～２．５、１．８～２．２、または、１．９～２．１の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、１．８、１．９、２．０、または、２．１である。

【００４８】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュケートは、次の式：

【化９】



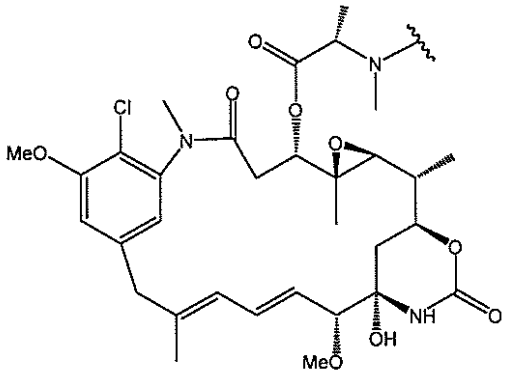
式中：

ＣＢＡは、それぞれ、配列番号８、３５及び４５、及び、配列番号６２、１３、１４の配列を有する、ＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_{H}$３ドメインと、ＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_{L}$３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；

ｑは、１～１０の整数である；

Ｄ$_{1}$は、次の式：

【化１０】



である、式で表す。

【００４９】

特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、それぞれ、配列番号２８及び配列番号５５の配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号５２及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５１及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態では、配列番号５２及び配列番号１５１のＸは、リシンである。一部の実施形態では、配列番号５２及び配列番号１５１のＸは、存在しない。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５５及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態では、免疫コンジュゲートを含む組成物（例えば、医薬組成物）のＤＡＲ値は、１．０～５．０、１．０～４．０、１．５～４．０、２．０～４．０、２．５～４．０、２．９～３．３、３．３～３．８、１．５～２．５、または、１．８～２．２の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、４．０未満、３．８未満、３．６未満、３．５未満、３．０未満、または、２．５未満である。一部の実施形態では、ＤＡＲは、３．０～３．２の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、３．５～３．７の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、または、３．７である。一部の実施形態では、ＤＡＲは、１．９～２．１の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、１．９、２．０、または、２．１である。

【００５０】

本発明の別の態様は、本明細書に記載した有効量の本発明の免疫コンジュゲートと、医

薬として許容可能な担体、賦形剤、または、希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。

【００５１】

別の態様では、本発明は、対象において、ＡＤＡＭ９の発現と関連する、または、ＡＤＡＭ９の発現によって特徴決定される疾患または病態を治療するための方法であって、当該対象に、有効量の本明細書に記載した本発明の免疫コンジュゲート、または、医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。また、本発明では、対象において、ＡＤＡＭ９の発現と関連する、または、ＡＤＡＭ９の発現によって特徴決定される疾患または病態の治療における、本明細書に記載した本発明の免疫コンジュゲートまたは医薬組成物の使用も提供する。本発明は、対象において、ＡＤＡＭ９の発現と関連する、または、ＡＤＡＭ９の発現によって特徴決定される疾患または病態を治療するための医薬の製造のための本明細書に記載した本発明の免疫コンジュゲートまたは医薬組成物の使用も提供する。

【００５２】

特定の実施形態では、ＡＤＡＭ９と関連する、または、ＡＤＡＭ９によって特徴決定される疾患または病態は、がんである。一部の実施形態では、がんは、非小細胞肺癌、大腸癌、胃癌、膵臓癌、腎細胞癌、前立腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、卵巣癌、肝臓癌、子宮頸癌、甲状腺癌、精巣癌、骨髄癌、黒色腫、及び、リンパ癌からなる群から選択する。特定の実施形態では、がんは、非小細胞肺癌、胃癌、膵臓癌、または、大腸癌である。特定の実施形態では、非小細胞肺癌は、扁平上皮細胞癌、腺癌、または、大細胞未分化癌である。特定の実施形態では、大腸癌は、腺癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、原発性大腸リンパ腫、平滑筋肉腫、または、扁平上皮細胞癌である。

【図面の簡単な説明】

【００５３】

【図１Ａ】Ａ～Ｃは、免疫組織化学（ＩＨＣ）試験の結果を提示しており、そして、ＭＡＢ－Ａが、様々な非小細胞肺癌型（Ａ）、乳癌細胞、前立腺癌細胞、胃癌細胞（Ｂ）、及び、結腸癌細胞（Ｃ）を特異的に標識する能力を示しており、一方で、アイソタイプ対照は、これらのいずれの癌細胞型（Ａ～Ｃ）も特異的に標識することができなかった。

【図１Ｂ】Ａ～Ｃは、免疫組織化学（ＩＨＣ）試験の結果を提示しており、そして、ＭＡＢ－Ａが、様々な非小細胞肺癌型（Ａ）、乳癌細胞、前立腺癌細胞、胃癌細胞（Ｂ）、及び、結腸癌細胞（Ｃ）を特異的に標識する能力を示しており、一方で、アイソタイプ対照は、これらのいずれの癌細胞型（Ａ～Ｃ）も特異的に標識することができなかった。

【図１Ｃ】Ａ～Ｃは、免疫組織化学（ＩＨＣ）試験の結果を提示しており、そして、ＭＡＢ－Ａが、様々な非小細胞肺癌型（Ａ）、乳癌細胞、前立腺癌細胞、胃癌細胞（Ｂ）、及び、結腸癌細胞（Ｃ）を特異的に標識する能力を示しており、一方で、アイソタイプ対照は、これらのいずれの癌細胞型（Ａ～Ｃ）も特異的に標識することができなかった。

【図２】細胞染色試験の結果を示しており、また、ＭＡＢ－Ａが、ヒトＡＤＡＭ９に結合し、そして、これより少ない程度で、カニクイザルＡＤＡＭ９に結合し、２９３－ＦＴ細胞、及び、ＣＨＯ－Ｋ細胞の表面で一時的に発現することを示す（それぞれ、上側及び下側のパネル）。

【図３Ａ】Ａ～Ｂは、ＭＡＢ－Ａの幾つかのヒト化／最適化した変異体とアラインメントしたマウス抗ＡＤＡＭ９－ＶＨドメインのアミノ酸配列（Ａ、配列番号７、１６、１７、１８、１９、２１、２２、２３、及び、２８）、及び、ＭＡＢ－Ａの幾つかのヒト化／最適化した変異体とアラインメントしたマウス抗ＡＤＡＭ９－ＶＬドメインのアミノ酸配列（Ｂ、配列番号１１、５４、５５、５６、及び、５７）を示す。初期の最適化の間にＣＤＲ内で置換した位置は、以下のように下線を付している：潜在的な脱アミド化及び異性化部位を、１本の下線で示しており、リシン残基を、二重下線で示しており、さらなる不安定な残基は、破線の下線で示している。

【図３Ｂ】Ａ～Ｂは、ＭＡＢ－Ａの幾つかのヒト化／最適化した変異体とアラインメントしたマウス抗ＡＤＡＭ９－ＶＨドメインのアミノ酸配列（Ａ、配列番号７、１６、１７、１８、１９、２１、２２、２３、及び、２８）、及び、ＭＡＢ－Ａの幾つかのヒト化／最適化した変異体とアラインメントしたマウス抗ＡＤＡＭ９－ＶＬドメインのアミノ酸配列

（Ｂ、配列番号１１、５４、５５、５６、及び、５７）を示す。初期の最適化の間にＣＤＲ内で置換した位置は、以下のように下線を付している：潜在的な脱アミド化及び異性化部位を、１本の下線で示しており、リシン残基を、二重下線で示しており、さらなる不安定な残基は、破線の下線で示している。

【図４】Ａ～Ｂは、CDR_H3変異体を含む１０種類の選択した最適化したｈＭＡＢ－Ａクローン、親ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）、及び、アイソタイプ対照抗体のＥＬＩＳＡ結合曲線を示す。Ａは、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９の結合曲線を示し、Ｂは、ｈｕＡＤＡＭ９の結合曲線を示す。

【図５】Ａ～Ｂは、Ｆｃ変異体のＥＬＩＳＡ結合曲線を示す。Ａは、ｈｕＡＤＡＭ９の結合曲線を示し、そして、Ｂは、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９の結合曲線を示す。

【図６】Ａ～Ｂは、２０種のがん組織マイクロアレイにおけるＡＤＡＭ９　ＩＨＣ膜染色と、８種類の選択した適応症におけるＡＤＡＭ　ＩＨＣ膜と、細胞組織染色とをそれぞれ示す。

【図７】Ａ～Ｂは、様々な抗ＡＤＡＭ９抗体コンジュゲートのパルスインターナリゼーション、及び、連続インターナリゼーションを示す。

【図８】Ａは、ＹＴＥ突然変異の有無に関係なく、捕捉した抗ＡＤＡＭ９抗体に対する、２５０ｎＭ及び１０００ｎＭ　ｈｕＦｃＲｎのｐＨ６．０での結合を示す。Ｂは、ＹＴＥ突然変異の有無に関係なく、固定化したＦｃＲｎに対する、２５ｎＭ及び１００ｎＭ　抗ＡＤＡＭ９抗体のｐＨ６．０での結合を示す。

【図９Ａ】本発明の例示的なメイタンシノイド化合物、及び、免疫コンジュケートを調製するための合成スキームを示す。

【図９Ｂ】本発明の例示的なメイタンシノイド化合物、及び、免疫コンジュケートを調製するための合成スキームを示す。

【図９Ｃ】本発明の例示的なメイタンシノイド化合物、及び、免疫コンジュケートを調製するための合成スキームを示す。

【図１０】ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／－Ｋ）－ＬＤＬ－ＤＭ、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－ＬＤＬ－ＤＭのＦＡＣＳ結合曲線を示す。

【図１１Ａ】様々な非小細胞肺癌細胞株に対する様々な抗ＡＤＡＭ９免疫コンジュケートのインビトロ細胞傷害性を示す。非標的化ＩｇＧ１をベースとしたコンジュゲートを、ネガティブ対照として含む。

【図１１Ｂ】様々な非小細胞肺癌細胞株に対する様々な抗ＡＤＡＭ９免疫コンジュケートのインビトロ細胞傷害性を示す。非標的化ＩｇＧ１をベースとしたコンジュゲートを、ネガティブ対照として含む。

【図１２】Ｃａｌｕ－３ヒト非小細胞肺腺癌異種移植モデルでのｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８ＤＡＲ）の抗腫瘍活性を示す。

【図１３】Ｈ１７０３ヒト非小細胞肺扁平上皮細胞癌異種移植片でのｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８ＤＡＲ）の抗腫瘍活性を示す。

【図１４】ＳＮＵ－５ヒト胃癌異種移植片でのｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．

３ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８ＤＡＲ）の抗腫瘍活性を示す。

【図１５】ＳＣＩＤマウスが担持しているＥＢＣ－１ヒト非小細胞肺扁平上皮細胞癌異種移植片でのｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を示す。

【図１６】ＣＤ１　ｎｕｄｅマウスが担持しているＳＷ４８ヒト大腸腺癌異種移植片でのｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭコンジュゲートのＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇ、及び、非結合対照ｈｕＫＴＩ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．０ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの１００μｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を示す。

【図１７】ＣＤ１　ｎｕｄｅマウスが担持しているＨＰＡＦ－ＩＩヒト膵臓腺癌異種移植片でのｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭコンジュゲートのＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇ、及び、非結合対照ｈｕＫＴＩ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．０ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの１００μｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を示す。

【図１８】ＣＤ１　ｎｕｄｅマウスが担持しているＨ１９７５ヒト非小細胞肺腺癌異種移植片でのｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇ、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を示す。

【図１９】ＣＤ１　ｎｕｄｅマウスが担持しているＨｓ　７４６Ｔヒト胃癌異種移植片でのｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇ、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を示す。

【発明を実施するための形態】

【００５４】

本発明は、本明細書に記載した少なくとも１種類のメイタンシノイド化合物に対して結合する「ジスインテグリン、及び、メタロプロテイナーゼドメインを含有するタンパク質９」（「ＡＤＡＭ９」）に対して特異的に結合することが可能な抗体、または、そのフラグメントを含む免疫コンジュゲートに関する。本発明は、特に、ヒトＡＤＡＭ９、及び、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）のＡＤＡＭ９と交差反応する免疫コンジュゲートに関する。本発明は、さらに、レシピエント対象にこのような免疫コンジュゲートを投与すると免疫原性の低下を示すようなヒト化、及び／または、脱免疫化した軽鎖可変（ＶＬ）ドメイン、及び／または、重鎖可変（ＶＨ）ドメインを含むすべての免疫コンジュゲートに関する。本発明はまた、このような免疫コンジュゲートのいずれかを含有する医薬組成物、ならびに、がん及びその他の疾患及び病態の治療において、このような免疫コンジュゲートのいずれかの使用を伴う方法に関する。

【００５５】

Ｉ．抗体、及び、その結合ドメイン

本発明の免疫コンジュゲートは、ＡＤＡＭ９、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントに結合する抗体を含む。「抗体」とは、免疫グロブリン分子の可変ドメインに位置する少なくとも１つの抗原認識部位を介して、標的、例えば、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどに対して特異的に結合することが可能な免疫グロブリン分子である。本明細書で使用する用語「抗体（ａｎｔｉｂｏｄｙ）」及び「抗体（ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）」とは、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗

体、キメラ抗体、ポリクローナル抗体、ラクダ化抗体、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、一本鎖抗体、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、イントラボディ、及び、上記したもののいずれかのエピトープ結合フラグメントを指す。特に、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、及び、免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち、エピトープ結合部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子は、あらゆる型（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及び、ＩｇＹ）、クラス（例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1、及び、IgA_2）、または、サブクラスとすることができる。ここ数十年間は、抗体の治療薬への潜在能力に関する関心が改めて高まっており、抗体は、バイオテクノロジーに基づいた薬物のリーディング群の１つになってきている（Ｃｈａｎ，Ｃ．Ｅ．ｅｔ ａｌ．（２００９）“Ｔｈｅ Ｕｓｅ Ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｉｎ Ｔｈｅ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ Ｏｆ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅｓ”，Ｓｉｎｇａｐｏｒｅ Ｍｅｄ．Ｊ．５０（７）：６６３－６６６）。診断でのこれらの使用に加え、抗体は、治療薬剤として有用であることを示している。２００を超える抗体由来の薬物が、使用承認されているか、または、開発中である。

【００５６】

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

【００５７】

用語「モノクローナル抗体」とは、均一な抗体集合のことを指し、モノクローナル抗体は、ある抗原への選択的に結合に関与する（天然に存在する、または、天然に存在しない）アミノ酸で構成する。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、１つのエピトープ（または、抗原部位）に指向する。用語「モノクローナル抗体」は、インタクトなモノクローナル抗体、及び、全長モノクローナル抗体だけではなく、そのフラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$Ｆｖ）、一本鎖（ｓｃＦｖ）、これらの突然変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、及び、所望の特異性と抗原に対する結合能を有する抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子のあらゆるその他の改変した構成を含む。この用語は、抗体の供給源または製造様式（例えば、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、トランスジェニック動物など）に関して限定することを意図していない。この用語は、「抗体」の定義の下で、免疫グロブリン全体、及び、上記したフラグメントなどを含む。モノクローナル抗体を製造する方法は、当該技術分野で公知である。使用可能な１つの方法は、Ｋｏｈｌｅｒ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．（１９７５）“Ｃｏｎｔｉｎｕｏｕｓ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ Ｏｆ Ｆｕｓｅｄ

Ｃｅｌｌｓ Ｓｅｃｒｅｔｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｏｆ Ｐｒｅｄｅｆｉｎｅｄ Ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ” Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９７の方法、または、その改変法である。典型的には、モノクローナル抗体は、マウス、ラット、または、ウサギで開発されている。抗体は、動物に、免疫原になる量の所望のエピトープを含む細胞、細胞抽出物、または、タンパク質調製物を用いて免疫付与することによって作られる。免疫原として、初代細胞、培養した細胞株、がん細胞、タンパク質、ペプチド、核酸、または、組織があるが、これらに限定されない。免疫付与に使用する細胞は、免疫原として使用する前に、所定時間（例えば、少なくとも２４時間）培養し得る。細胞は、それ自体で、または、非変性アジュバント、例えば、Ｒｉｂｉと組み合わせて免疫原として使用してもよい（例えば、Ｊｅｎｎｉｎｇｓ，Ｖ．Ｍ．（１９９５）“Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ａｄｊｕｖａｎｔｓ Ｕｓｅｄ ｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ” ＩＬＡＲ Ｊ．３７（３）：１１９－１２５）。一般的に、細胞は、インタクトなまま保持されるべきであり、好ましくは、免疫原として使用するとき、生存可能であるべきである。インタクトな細胞は、免疫付与した動物によって破壊された細胞よりも、抗原を明瞭に検出し得る。変性アジュバントまたは過酷なアジュバント、例えば、フロイントのアジュバントの使用は、細胞を破壊し得るため、推奨されない。免疫原は、周期的な間隔、例えば、隔週または毎週で複数回投与してもよく、または、動物において（例えば、組織組換えにおいて）生存率を維持する様式で投与し得る。または、所望の病原性エピトープに免疫特異的な既存のモノクローナル抗体、及び、あらゆるその他の等価な抗体を、配列決定し、当該技術分野で公知のあらゆる手段で組換えて作り出してもよい。ある実施形態では、このような抗体は、配列決定を行い、次いで、ポリヌクレオチド配列を、発現または繁殖のためにベクター内にクローン化する。目的の抗体をコードする配列は、宿主細胞内のベクターにおいて維持してもよく、そして、宿主細胞を、次いで、膨張させ、将来的な使用のために凍結し得る。このような抗体のポリヌクレオチド配列は、最適化したアフィニティ、キメラ抗体、ヒト化抗体、及び／または、ラクダ化抗体を作成するために、アフィニティ、または、抗体のその他の特徴、そして、本発明の免疫コンジュゲートを向上させるために、遺伝子操作に使用し得る。抗体をヒト化する一般的な原理は、抗体の抗原結合部位の基本配列を保持しつつ、抗体の残余の非ヒト部分を、ヒト抗体配列と交換することを含む。

【００５８】

天然抗体（例えば、天然ＩｇＧ抗体）は、２つの「重鎖」と複合体化する２つの「軽鎖」で構成する。各軽鎖は、可変ドメイン（「ＶＬ」）と定常ドメイン（「ＣＬ」）とを含む。各重鎖は、可変ドメイン（「ＶＨ」）と、３つの定常ドメイン（「ＣＨ１」、「ＣＨ２」及び「ＣＨ３」）と、ＣＨ１ドメインとＣＨ２ドメインとの間に位置する「ヒンジ」領域（「Ｈ」）とを含む。対照的に、ｓｃＦｖは、短い連結ペプチドを介して、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを連結することによって作られる一本鎖分子である。

【００５９】

したがって、天然に存在する免疫グロブリン（例えば、ＩｇＧ）の基本的な構造単位は、２つの軽鎖と２つの重鎖とを有するテトラマーであり、通常は、約１５０，０００Ｄａの糖タンパク質として発現する。各鎖のアミノ末端（「Ｎ末端」）部分は、主に抗原認識に関与する約１００～１１０、またはそれを超える数のアミノ酸の可変ドメインを含む。各鎖のカルボキシ末端（「Ｃ末端」）部分は、定常領域を規定しており、軽鎖は、１つの定常ドメインを有し、重鎖は、通常、３つの定常ドメインとヒンジ領域とを有する。したがって、ＩｇＧ分子の軽鎖の構造は、ｎ－ＶＬ－ＣＬ－ｃであり、ＩｇＧ重鎖の構造は、ｎ－ＶＨ－ＣＨ１－Ｈ－ＣＨ２－ＣＨ３－ｃである（式中、ｎ及びｃは、それぞれ、ポリペプチドのＮ末端及びＣ末端を表す）。

【００６０】

Ａ．抗体可変ドメインの特徴決定

ＩｇＧ分子の可変ドメインは、１つ、２つ、最も一般的には、３つの相補性決定領域（「ＣＤＲ」、すなわち、それぞれ、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及び、ＣＤＲ３）からなり、こ

れらは、エピトープと接触する残基と、フレームワーク領域（「ＦＲ」）と称する非ＣＤＲセグメントとを含み、ＦＲは、一般的に、その構造を維持しながら、このような接触を可能にするように、ＣＤＲ領域の位置を決定する（しかし、特定のフレームワーク残基も、エピトープと接触し得る）。したがって、ＶＬドメイン、及び、ＶＨドメインは、典型的には、ｎ－ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４－ｃの構造を有する（式中、「ｎ」は、Ｎ末端を示し、「ｃ」は、Ｃ末端を示す）。抗体の軽鎖の第１、第２、第３及び第４のＦＲである（または、これらとして作用し得る）ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれ、FR_L1ドメイン、FR_L2ドメイン、FR_L3ドメイン、及び、FR_L4ドメインと称する。同様に、抗体の重鎖の第１、第２、第３及び第４のＦＲである（または、これらとして作用し得る）ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれ、FR_H1ドメイン、FR_H2ドメイン、FR_H3ドメイン、及び、FR_H4ドメインと称する。抗体の軽鎖の第１、第２及び第３のＣＤＲである（または、これらとして作用し得る）ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれ、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインと称する。同様に、抗体の重鎖の第１、第２、及び、第３のＣＤＲである（または、これらとして作用し得る）ポリペプチドは、本明細書では、それぞれ、CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインと称する。したがって、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、CDR_L3ドメイン、CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインという用語は、抗体に組み込まれると、抗体が特定のエピトープに結合することができるポリペプチドに関する。

【００６１】

本明細書全体で、免疫グロブリンの成熟重鎖及び軽鎖の可変ドメインでの残基の付番は、鎖内のアミノ酸の位置によって命名する。Ｋａｂａｔは、抗体の多くのアミノ酸配列を記載し、各サブグループのアミノ酸コンセンサス配列を同定し、そして、各アミノ酸に残基の数を割り当てており、ＣＤＲを、Ｋａｂａｔが定義したように同定した（CDR_H1は、Ｃｈｏｔｈｉａ，　Ｃ．＆　Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．（（１９８７）　“Ｃａｎｏｎｉｃａｌ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎｓ　ｏｆ　ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎｓ”　Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７）で定義されているように、初期に５つの残基を開始する、ことが理解されよう）。Ｋａｂａｔの付番スキームは、問題となっている抗体と、保存したアミノ酸を参照して、Ｋａｂａｔでのコンセンサス配列の１つとをアラインメントすることによって、その概要に含まれない抗体にまで拡張することができる。残基の番号を割り当てるこの方法は、当該技術分野で標準的なものとなっており、キメラ変異体またはヒト化変異体を含め、異なる抗体での等価な位置にあるアミノ酸を容易に同定する。例えば、ヒト抗体軽鎖の５０位にあるアミノ酸は、マウス抗体軽鎖の５０位にあるアミノ酸と等価な位置を占める。

【００６２】

抗体が抗原のエピトープに結合する能力は、抗体のＶＬドメイン、及び、ＶＨドメインの存在、及び、アミノ酸配列に依存して変わる。抗体の軽鎖、及び、重鎖の相互作用、特に、そのＶＬドメイン及びＶＨドメインの相互作用は、天然抗体、例えば、ＩｇＧの２つのエピトープ結合部位の一方を形成する。天然抗体は、唯一のエピトープ種に結合することができる（すなわち、天然抗体は、単一特異性である）が、そのエピトープ種の複数のコピーに結合することができる（すなわち、二価または多価を示す）。

【００６３】

したがって、本明細書で使用する用語「エピトープ結合フラグメント」は、エピトープに免疫特異的に結合することが可能な抗体のフラグメントを意味しており、用語「エピトープ結合部位」とは、エピトープ結合フラグメントを含む分子の部分を指す。エピトープ結合フラグメントは、抗体の１つ、２つ、３つ、４つ、または、５つのいずれの個数のＣＤＲドメインを含み得るものであり、または、抗体の６つのＣＤＲドメインすべてを含み得るものであり、このようなエピトープに免疫特異的に結合することが可能であるが、このような抗体とは異なるエピトープに対する免疫特異性、アフィニティまたは選択性を示

し得る。しかし、好ましくは、エピトープ結合フラグメントは、このような抗体の６個すべてのＣＤＲドメインを含み得る。抗体のエピトープ結合フラグメントは、一本鎖ポリペプチド（例えば、ｓｃＦｖ）とし得るものであり、または、２つ以上のポリペプチド鎖を含み得るものであり、それぞれが、アミノ末端とカルボキシ末端とを有している（例えば、Ｆａｂフラグメント、$Ｆａｂ_{2}$フラグメントなど）。特に断りの無い限り、本明細書に記載したタンパク質分子のドメインの順序は、「Ｎ末端からＣ末端に向かう」方向である。

【００６４】

本発明はまた、本発明の抗ＡＤＡＭ９－ＶＬ、及び／または、ＶＨドメインを含む一本鎖可変ドメインフラグメント（「ｓｃＦｖ」）を含む免疫コンジュゲートを含む。一本鎖可変ドメインフラグメントは、ＶＬドメインとＶＨドメインとを含み、これらが短い「リンカー」ペプチドを用いて、互いに結合する。このようなリンカーは、さらなる機能を与えるように、例えば、薬物の接続を可能にするように、または、固体支持体の接続を可能にするように、改変し得る。一本鎖変異体は、組換え、または、合成によって製造することができる。ｓｃＦｖの合成による製造のために、自動化した合成機器を使用することができる。ｓｃＦｖの組換え生産のために、ｓｃＦｖをコードするポリヌクレオチドを含有する適切なプラスミドを、適切な宿主細胞、真核、例えば、酵母、植物、昆虫、または、哺乳動物細胞、または、原核、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉのいずれかに導入し得る。目的のｓｃＦｖをコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのライゲーションなどの通常の操作によって作り出すことができる。得られたｓｃＦｖは、当該技術分野で公知の標準的なタンパク質精製技術を用いて単離することができる。

【００６５】

本発明はまた、特に、本発明の抗ＡＤＡＭ９抗体のヒト化／最適化した変異体の$ＣＤＲ_{Ｈ}１$、$ＣＤＲ_{Ｈ}２$、$ＣＤＲ_{Ｈ}３$、$ＣＤＲ_{Ｌ}１$、$ＣＤＲ_{Ｌ}２$、及び、$ＣＤＲ_{Ｌ}３$ドメインと、任意の１つ、２つ、または、３つのこのような$ＣＤＲ_{Ｌ}$を含むＶＬドメインと、任意の１つ、２つ、または、３つのこのような$ＣＤＲ_{Ｈ}$を含むＶＨドメインとを含む免疫コンジュゲート、及び、これらを含む多重結合分子を含む。「ヒト化」抗体とは、非ヒト種由来の免疫グロブリンのエピトープ結合部位と、ヒト免疫グロブリンの構造及び／または配列に基づいた残余の免疫グロブリン構造とを有するキメラ分子のことを指す。ヒト化抗体は、一般的に、組換え技術を用いて調製する。本発明の免疫コンジュゲートは、本明細書で「ＭＡＢ－Ａ」と称する抗体のヒト化変異体、キメラ変異体、または、ラクダ化変異体を含み得る。ＭＡＢ－Ａの可変ドメインをコードするポリヌクレオチド配列は、改良または変更された特徴（例えば、アフィニティ、交差反応性、特異性など）を有するＭＡＢ－Ａ誘導体を生成するための遺伝子操作に使用し得る。抗体をヒト化する一般的な原理は、抗体のエピトープ結合部位の基本配列を保持しつつ、抗体の残余の非ヒト部分を、ヒト抗体配列と交換することを含む。モノクローナル抗体をヒト化するために、４つの一般的な工程が存在する。これらは：（１）出発原料である抗体軽鎖及び重鎖可変ドメインのヌクレオチド、及び、予想アミノ酸配列を決定すること；（２）ヒト化抗体またはラクダ化抗体をデザインすること、すなわち、ヒト化またはラクダ化プロセスの間に、どの抗体フレームワーク領域を使用するかを決定すること；（３）実際に、ヒト化またはラクダ化する方法論／技術を使用すること；及び、（４）ヒト化抗体をトランスフェクトして、発現させることである。例えば、米国特許第４，８１６，５６７号、第５，８０７，７１５号、第５，８６６，６９２号、及び、第６，３３１，４１５号を参照されたい。用語「最適化した」抗体とは、軽鎖または重鎖可変領域の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）において、親抗体とは異なる少なくとも１つのアミノ酸を有する抗体のことを指し、親抗体と比較して、ヒトＡＤＡＭ９、及び／または、カニクイザルＡＤＡＭ９に対して、高い結合アフィニティ（例えば、２倍以上）を与える。本明細書での教示から、本発明の抗体は、ヒト化または最適化し得るものであり、または、ヒト化され、最適化され得るものである、ことが理解されよう。

【００６６】

エピトープ結合部位は、１つ以上の定常ドメインに融合した完全可変ドメイン、または、適切なフレームワーク領域に接合したこのような可変ドメインのＣＤＲだけを含み得る。エピトープ結合部位は、野生型とし得るものであり、または、１つ以上のアミノ酸置換、挿入、または、欠失によって改変し得る。このような操作は、レシピエント（例えば、ヒト個体）において、定常領域が免疫原として機能する能力を部分的に、または、完全に解消するが、外来可変ドメインに対する免疫応答の可能性は残存する（ＬｏＢｕｇｌｉｏ，Ａ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．（１９８９）“Ｍｏｕｓｅ／Ｈｕｍａｎ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｎ Ｍａｎ：Ｋｉｎｅｔｉｃｓ Ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｅ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ”，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．Ａ．）８６：４２２０－４２２４）。別の手法は、ヒト由来の定常領域を与えることに止まらず、ヒト免疫グロブリンで認められる形態に可能な限り近づくように再成形するように可変ドメインも改変することに注目している。抗体の重鎖、及び、軽鎖の両方の可変ドメインが、問題となる抗原に対する応答が様々であり、結合能力を決定する３つのＣＤＲを含有しており、このＣＤＲが、４つのフレームワーク領域によって中断され、フレームワーク領域が、所与の種において比較的保存されており、おそらくは、ＣＤＲの足場を付与していることが知られている。非ヒト抗体を、特定の抗原に対して調製する場合、可変ドメインは、改変されるヒト抗体に存在するＦＲに、非ヒト抗体から誘導するＣＤＲを接合することで、「再成形」または「ヒト化」し得る。様々な抗体に対するこの手法の応用は、Ｓａｔｏ，Ｋ．ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ５３：８５１－８５６．Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．（１９８８）“Ｒｅｓｈａｐｉｎｇ Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ Ｔｈｅｒａｐｙ”，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２７；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．（１９８８）“Ｒｅｓｈａｐｉｎｇ Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｇｒａｆｔｉｎｇ Ａｎ Ａｎｔｉｌｙｓｏｚｙｍｅ Ａｃｔｉｖｉｔｙ”，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４－１５３６；Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ，Ｃ．Ａ．ｅｔ ａｌ．（１９９１）“Ｈｕｍａｎｉｚａｔｉｏｎ Ｏｆ Ａ Ｍｏｕｓｅ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｂｙ ＣＤＲ－Ｇｒａｆｔｉｎｇ：Ｔｈｅ Ｉｍｐｏｒｔａｎｃｅ Ｏｆ Ｆｒａｍｅｗｏｒｋ Ｒｅｓｉｄｕｅｓ Ｏｎ Ｌｏｏｐ Ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ”，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ４：７７３－３７８３；Ｍａｅｄａ，Ｈ．ｅｔ ａｌ．（１９９１）“Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ Ｏｆ Ｒｅｓｈａｐｅｄ Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｗｉｔｈ ＨＩＶ －Ｎｅｕｔｒａｌｉｚｉｎｇ Ａｃｔｉｖｉｔｙ”，Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ ２：１２４－１３４；Ｇｏｒｍａｎ，Ｓ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．（１９９１）“Ｒｅｓｈａｐｉｎｇ Ａ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ＣＤ４ Ａｎｔｉｂｏｄｙ” Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．Ａ．）８８：４１８１－４１８５；Ｔｅｍｐｅｓｔ，Ｐ．Ｒ．ｅｔ ａｌ．（１９９１）“Ｒｅｓｈａｐｉｎｇ Ａ Ｈｕｍａｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｏ Ｉｎｈｉｂｉｔ Ｈｕｍａｎ Ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ Ｓｙｎｃｙｔｉａｌ Ｖｉｒｕｓ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｉｎ ｖｉｖｏ”，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：２６６－２７１；Ｃｏ，Ｍ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．（１９９１）“Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｔｈｅｒａｐｙ”，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．Ａ．）８８：２８６９－２８７３；Ｃａｒｔｅｒ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．（１９９２）“Ｈｕｍａｎｉｚａｔｉｏｎ Ｏｆ Ａｎ Ａｎｔｉ－ｐ１８５ｈｅｒ２ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｆｏｒ Ｈｕｍａｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ”，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．Ａ．）８９：４２８５－４２８９；及び、Ｃｏ，Ｍ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．（１９９２）“Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ａｎｄ Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｗｉｔｈ Ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ Ｆｏｒ Ｔｈｅ ＣＤ３３ Ａｎｔｉｇｅｎ”，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１１４９－１１５４で報告されている。一部の実施形態では、ヒト化抗体は、すべてのＣＤＲ配列を保存している（例えば、マウス抗体に存在する６個すべてのＣＤＲを含むヒト化マウス抗体）。その他の実施形態では、ヒト化抗体は、元々の抗体のＣＤ

Ｒと配列が異なる１つ以上（１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または、６つ）のＣＤＲを有する。

【００６７】

齧歯類または改変齧歯類可変ドメインと、ヒト定常ドメインに融合する、その関連する相補性決定領域（ＣＤＲ）とを含むキメラ抗体を含め、非ヒト免疫グロブリンから誘導されるエピトープ結合部位を含む多くのヒト化抗体分子が記載されている（例えば、Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９１）“Ｍａｎ－ｍａｄｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ”，Ｎａｔｕｒｅ ３４９：２９３－２９９；Ｌｏｂｕｇｌｉｏ ｅｔ ａｌ．（１９８９）“Ｍｏｕｓｅ／Ｈｕｍａｎ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｎ Ｍａｎ：Ｋｉｎｅｔｉｃｓ Ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｅ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ”，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．Ａ．）８６：４２２０－４２２４；Ｓｈａｗ ｅｔ ａｌ．（１９８７）“Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ Ｏｆ Ａ Ｍｏｕｓｅ／Ｈｕｍａｎ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ（１７－１ Ａ）Ｔｏ Ａ Ｃｏｌｏｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｕｍｏｒ－Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ａｎｔｉｇｅｎ”，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３８：４５３４－４５３８；及び、Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．（１９８７）“Ｔｕｍｏｒ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｍｕｒｉｎｅ／Ｈｕｍａｎ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ”，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４７：３５７７－３５８３を参照されたい）。その他の参考文献は、適切なヒト抗体定常ドメインとの融合前に、ヒト支持フレームワーク領域（ＦＲ）に接合した齧歯類ＣＤＲを記載する（例えば、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．（１９８８）“Ｒｅｓｈａｐｉｎｇ Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ Ｔｈｅｒａｐｙ”，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２７；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．（１９８８）“Ｒｅｓｈａｐｉｎｇ Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｇｒａｆｔｉｎｇ Ａｎ Ａｎｔｉｌｙｓｏｚｙｍｅ Ａｃｔｉｖｉｔｙ”，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４－１５３６；及び、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９８６）“Ｒｅｐｌａｃｉｎｇ Ｔｈｅ Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ－Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ Ｒｅｇｉｏｎｓ Ｉｎ Ａ Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｗｉｔｈ Ｔｈｏｓｅ Ｆｒｏｍ Ａ Ｍｏｕｓｅ”，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５を参照されたい）。別の参考文献は、組換え操作した齧歯類フレームワーク領域によって支持される齧歯類ＣＤＲを記載する（例えば、欧州特許公開第５１９，５９６号を参照されたい）。これらの「ヒト化」分子は、ヒトレシピエントにおける、これらの部分の滞留時間及び有効性、治療適用を制限してしまうような、齧歯類抗ヒト抗体分子に対する望ましくない免疫応答を最小限にするようにデザインする。利用可能な抗体を、ヒト化するその他の方法は、Ｄａｕｇｈｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．（１９９１）“Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ Ｆａｃｉｌｉｔａｔｅｓ Ｔｈｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ，ＣＤＲ－Ｇｒａｆｔｉｎｇ，Ａｎｄ Ｒａｐｉｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｏｆ Ａ Ｍｕｒｉｎｅ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ａｇａｉｎｓｔ Ｔｈｅ ＣＤ１８ Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ Ｏｆ Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ Ｉｎｔｅｇｒｉｎｓ”，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９：２４７１－２４７６、及び、米国特許第６，１８０，３７７号、第６，０５４，２９７号、第５，９９７，８６７号、及び、第５，８６６，６９２号に開示されている。

【００６８】

Ｂ．抗体定常ドメインの特徴決定

本明細書全体で、ＩｇＧ重鎖の定常領域の残基の付番は、本明細書に明示的に参考として組み込んだ、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，ＳＥＱＵＥＮＣＥＳ ＯＦ ＰＲＯＴＥＩＮＳ ＯＦ ＩＭＭＵＮＯＬＯＧＩＣＡＬ ＩＮＴＥＲＥＳＴ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，ＮＨ１，ＭＤ（１９９１）（「Ｋａｂａｔ」）などのＥＵインデックスの付番に従う。用語「Ｋａｂａｔに記載するようなＥＵインデックス」とは、Ｋａｂａｔが与えたヒトＩｇＧ１ ＥＵ抗体の定常ドメインの付番のこ

とを指す。残基の番号を割り当てるためのこの方法は、当該技術分野で標準的なものとなっており、異なる抗体アイソタイプの定常領域での等価な位置にあるアミノ酸を容易に同定する。

【００６９】

１．軽鎖の定常領域

上記した通り、抗体の各軽鎖は、可変ドメイン（「ＶＬ」）と定常ドメイン（「ＣＬ」）とを含む。

【００７０】

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

【化１１】

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC

【００７１】

または、例示的なＣＬドメインは、ヒトＩｇＧ　ＣＬラムダドメインである。例示的なヒトＣＬラムダドメインのアミノ酸配列は、（配列番号７０）である。

【化１２】

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
TECS

【００７２】

２．重鎖の定常領域

ａ．天然に存在するＦｃ領域

本明細書に記載した通り、本発明の免疫コンジュゲートは、Ｆｃ領域を含み得る。本発明のこのような免疫コンジュゲートのＦｃ領域は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、または、ＩｇＧ４）を有し得る。本発明の免疫コンジュゲートは、ＣＨ１ドメイン、及び／または、ヒンジ領域をさらに含み得る。存在する場合、ＣＨ１ドメイン、及び／または、ヒンジ領域は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、または、ＩｇＧ４）を有し得るものであり、好ましくは、所望のＦｃ領域と同じエピトープを有する。

【００７３】

本発明のＦｃ領域を含有する免疫コンジュゲートのＦｃ領域は、完全なＦｃ領域（例えば、完全なＩｇＧ　Ｆｃ領域）、または、Ｆｃ領域のフラグメントだけのいずれかとし得る。任意に、本発明のＦｃ領域を含有する免疫コンジュゲートのＦｃ領域は、Ｃ末端のリシンアミノ酸残基を欠く。

【００７４】

抗体の２つの重鎖のＣＨ１ドメインは、抗体の軽鎖「ＣＬ」定常領域と複合体を形成し、介在するヒンジドメインを介して、重鎖ＣＨ２ドメインに接続する。

【００７５】

例示的なＣＨ１ドメインは、ヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインである。例示的なヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号７１）である。

【化１３】

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

【００７６】

例示的なＣＨ１ドメインは、ヒトＩｇＧ２　ＣＨ１ドメインである。例示的なヒトＩｇ

Ｇ２　ＣＨ１ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号７２）である。
【化１４】
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

【００７７】
例示的なＣＨ１ドメインは、ヒトＩｇＧ４　ＣＨ１ドメインである。例示的なヒトＩｇＧ４　ＣＨ１ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号７３）である。
【化１５】
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

【００７８】
その他の例示的なヒンジ領域は、ヒトＩｇＧ１ヒンジ領域である。例示的なヒトＩｇＧ１ヒンジ領域のアミノ酸配列は、（配列番号７４）である。
ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ
【００７９】
別の例示的なヒンジ領域は、ヒトＩｇＧ２ヒンジ領域である。例示的なヒトＩｇＧ２ヒンジ領域のアミノ酸配列は、（配列番号７５）である。
ＥＲＫＣＣＶＥＣＰＰＣＰ
【００８０】
別の例示的なヒンジ領域は、ヒトＩｇＧ４ヒンジ領域である。例示的なヒトＩｇＧ４ヒンジ領域のアミノ酸配列は、（配列番号７６）である。ＥＳＫＹＧＰＰＣＰＳＣＰ。上記した通り、ＩｇＧ４ヒンジ領域は、安定化する突然変異、例えば、Ｓ２２８Ｐ置換を含み得る。例示的な安定化されたヒトＩｇＧ４ヒンジ領域のアミノ酸配列は、（配列番号７７）である。ＥＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰ。
【００８１】
抗体の２つの重鎖のＣＨ２ドメインとＣＨ３ドメインとが相互作用して「Ｆｃ領域」を形成し、Ｆｃ領域とは、Ｆｃγ受容体（「ＦｃγＲ」）を含む細胞「Ｆｃ受容体」によって認識されるドメインであるが、これに限定されない。本明細書で使用する用語「Ｆｃ領域」は、重鎖のＣＨ２ドメイン、及び、ＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ重鎖のＣ末端領域を定義するために使用する。Ｆｃ領域は、アミノ酸配列が、その他のＩｇＧアイソタイプと比較して、特定のアイソタイプに対して最も相同性である場合に、その特定のＩｇＧアイソタイプ、クラス、または、サブクラスを有すると言われている。
【００８２】
例示的なヒトＩｇＧ１のＣＨ２－ＣＨ３ドメインのアミノ酸配列は、

【化１６】

```
231      240         250         260         270         280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

         290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

         340         350         360         370         380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

         390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

         440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

Ｋａｂａｔに示されるようなＥＵインデックスによって付番する（配列番号１）であり、配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【００８３】

例示的なヒトＩｇＧ２のＣＨ２－ＣＨ３ドメインのアミノ酸配列は、

【化１７】

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

         290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

         340         350         360         370         380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

         390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

         440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

Ｋａｂａｔに示されるようなＥＵインデックスによって付番する（配列番号２）であり、配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【００８４】

例示的なヒトＩｇＧ３のＣＨ２－ＣＨ３ドメインのアミノ酸配列は、

【化１８】

231 240 250 260 270 280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

290 300 310 320 330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

340 350 360 370 380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

390 400 410 420 430
WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

440 447
ALHNRFTQKS LSLSPG**X**

Ｋａｂａｔに示されるようなＥＵインデックスによって付番する（配列番号３）であり、配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【００８５】

例示的なヒトＩｇＧ４のＣＨ２－ＣＨ３ドメインのアミノ酸配列は、

【化１９】

231 240 250 260 270 280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

290 300 310 320 330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

340 350 360 370 380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

390 400 410 420 430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

440 447
ALHNHYTQKS LSLSLG**X**

Ｋａｂａｔに示されるようなＥＵインデックスによって付番する（配列番号４）であり、配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【００８６】

多型は、抗体定常領域内の数多くの異なる位置で認められており（例えば、Ｆｃ位置であって、Ｋａｂａｔに記載されるようなＥＵインデックスによって付番する位置２７０、２７２、３１２、３１５、３５６、及び、３５８があるが、これらに限定されない）、そのため、従来技術で存在する１つ以上の配列間に、わずかな差が存在し得る。ヒト免疫グロブリンの多型形態は、十分に特徴決定されている。現在、１８Ｇｍアロタイプが知られている：Ｇ１ｍ（１、２、３、１７）、または、Ｇ１ｍ（ａ、ｘ、ｆ、ｚ）、Ｇ２ｍ（２３）、または、Ｇ２ｍ（ｎ）、Ｇ３ｍ（５、６、１０、１１、１３、１４、１５、１６、２１、２４、２６、２７、２８）、または、Ｇ３ｍ（ｂ１、ｃ３、ｂ３、ｂ０、ｂ３、ｂ４、ｓ、ｔ、ｇｌ、ｃ５、ｕ、ｖ、ｇ５）（Ｌｅｆｒａｎｃ，ｅｔ ａｌ．，“Ｔｈｅ Ｈｕｍａｎ ＩｇＧ Ｓｕｂｃｌａｓｓｅｓ：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｆｕｎｃｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ．”

Ｐｅｒｇａｍｏｎ，Ｏｘｆｏｒｄ，ｐｐ．４３－７８（１９９０）；Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｇ．ｅｔ　ａｌ，１９７９，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．：５０，１９９－２１１）。本発明の抗体は、あらゆる免疫グロブリン遺伝子のあらゆるアロタイプ、イソアロタイプ、または、ハプロタイプを組み込み得るものであり、本明細書で示した配列のアロタイプ、イソアロタイプ、または、ハプロタイプに限らないことを具体的に意図している。さらに、一部の発現系では、ＣＨ３ドメインのＣ末端アミノ酸残基（太字で上記した）は、翻訳後に除去し得る。したがって、ＣＨ３ドメインのＣ末端残基は、本発明の免疫コンジュゲートの任意のアミノ酸残基である。特に本発明に含まれるものは、ＣＨ３ドメインのＣ末端残基を欠いた免疫コンジュゲートである。また、特に本発明に含まれるものは、ＣＨ３ドメインのＣ末端リシン残基を含むこのような構築物である。

【００８７】

ｂ．Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ）

従来の免疫機能では、抗体－抗原複合体と免疫系の細胞との相互作用によって、エフェクター機能、例えば、抗体依存性の細胞傷害性、マスト細胞の脱顆粒、及び、免疫制御シグナル、例えば、制御するリンパ球増殖、及び、抗体分泌に対する食作用などの広範囲の応答が得られる。これらの相互作用はすべて、抗体のＦｃ領域の結合または造血細胞、特に、複数種類の免疫系細胞（例えば、Ｂリンパ球、濾胞樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球及びマスト細胞）の表面に認められる受容体（「Ｆｃγ受容体」、「ＦｃγＲ」と略称する、及び、「ＦｃγＲ」と総称する）での特殊な細胞表面受容体に対する免疫複合体の結合から始まる。

【００８８】

抗体及び免疫複合体が引き金となる細胞応答の多様性は、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）、及び、ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の３つのＦｃ受容体の構造不均一性から生じる。ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩＡ（ＣＤ３２Ａ）、及び、ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）は、活性化する（すなわち、免疫系を改善させる）受容体である；ＦｃγＲＩＩＢ（ＣＤ３２Ｂ）は、阻害（すなわち、免疫系を弱める）受容体である。加えて、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）との相互作用が、エンドソームから細胞表面へのＩｇＧ分子の再循環、及び、血中への放出を媒介する。例示的な野生型ＩｇＧ１（配列番号１）、ＩｇＧ２（配列番号２）、ＩｇＧ３（配列番号３）、及び、ＩｇＧ４（配列番号４）のアミノ酸配列を上記している。

【００８９】

異なるＦｃγＲが全く反対の機能を媒介する能力は、異なるＦｃγＲの構造上の差異を反映したものであり、特に、結合したＦｃγＲが、免疫受容体チロシン系活性化モチーフ（「ＩＴＡＭ」）、または、免疫受容体チロシン系阻害モチーフ（「ＩＴＩＭ」）を有するか否かを反映したものである。異なる細胞質酵素へのこれらの構造の動員が、ＦｃγＲが介在する細胞応答の結果を決定づける。ＩＴＡＭを含有するＦｃγＲとして、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＡ、ＦｃγＲＩＩＩＡがあり、Ｆｃ領域（例えば、免疫複合体に存在する凝集したＦｃ領域）に結合すると、免疫系を活性化させる。ＦｃγＲＩＩＢは、現時点で唯一知られている天然のＩＴＩＭ含有ＦｃγＲである；凝集したＦｃ領域に結合すると、免疫系を弱める、または、阻害するように作用する。ヒト好中球は、ＦｃγＲＩＩＡ遺伝子を発現する。免疫複合体、または、特定の抗体架橋によるＦｃγＲＩＩＡのクラスター化は、ＩＴＡＭを、受容体付随キナーゼと共に凝集させ、ＩＴＡＭリン酸化を容易にするように作用する。ＩＴＡＭリン酸化は、Ｓｙｋキナーゼのドッキング部位として作用しており、これが活性化すると、下流の物質（例えば、$ＰＩ_{3}Ｋ$）が活性化する。細胞活性化により、炎症誘発メディエーターを放出する。ＦｃγＲＩＩＢ遺伝子は、Ｂリンパ球で発現する；その細胞外ドメインは、ＦｃγＲＩＩＡと９６％同一であり、識別不可能な様式でＩｇＧ複合体に結合する。ＦｃγＲＩＩＢの細胞質ドメインでのＩＴＩＭの存在は、このＦｃγＲの阻害性サブクラスを規定する。近年、この阻害の分子的機序が確立された。活性化するＦｃγＲと共にライゲーションすると、ＦｃγＲＩＩＢでのＩＴＩＭは、リン酸化され、イノシトールポリホスフェート　５’－ホスファターゼ（ＳＨＩＰ）のＳＨ

２ドメインを引き寄せ、ＩＴＡＭを含有するＦｃγＲが介在するチロシンキナーゼ活性化の結果として、ホスホイノシトールメッセンジャーを加水分解して、その結果、細胞内のＣａ＋＋の流入を防ぐ。したがって、ＦｃγＲＩＩＢの架橋は、ＦｃγＲライゲーションに対する活性化応答を弱め、細胞応答を阻害する。したがって、Ｂ細胞活性化、Ｂ細胞増殖、及び、抗体分泌が失われる。

【００９０】

ｃ．変異体Ｆｃ領域

Ｆｃ領域の改変によって、表現型が変わる場合があり、例えば、血清半減期が変わり、安定性が変わり、細胞酵素に対する感受性が変わるか、または、エフェクター機能が変わることがある。したがって、本発明のＦｃ領域を含有する分子を、エフェクター機能の観点で、例えば、がんを治療する際に、このような分子の有効性を高めるように改変することが望ましい場合がある。エフェクター機能の減少または消滅は、特定の事例では、例えば、作用機序がブロックまたは拮抗作用を含むが、標的抗原を生じる細胞を死滅させない抗体の場合には、望ましい。エフェクター機能の改善は、ＦｃγＲｓが低レベルで発現する、望ましくない細胞（例えば、腫瘍細胞、及び、外来細胞）に指向する場合、例えば、ＦｃγＲＩＩＢが低レベルの腫瘍特異的なＢ細胞（例えば、非ホジキンリンパ腫、ＣＬＬ、及び、バーキットリンパ腫）に指向する場合には、一般的に望ましい。エフェクター機能活性が、このように付与され、または、変化した本発明の免疫コンジュゲートは、エフェクター機能活性の効力の改善が望ましい疾患、障害、または、感染の治療、及び／または、予防に有用である。

【００９１】

したがって、特定の実施形態では、本発明のＦｃ領域を含有する免疫コンジュゲートのＦｃ領域は、操作した変異体Ｆｃ領域とし得る。本発明の免疫コンジュゲートのＦｃ領域は、１つ以上のＦｃ受容体（例えば、ＦｃγＲ（複数可））に結合する能力を有し得るものであり、より好ましくは、このような変異体Ｆｃ領域は、ＦｃγＲＩＡ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩＡ（ＣＤ３２Ａ）、ＦｃγＲＩＩＢ（ＣＤ３２Ｂ）、ＦｃγＲＩＩＩＡ（ＣＤ１６ａ）、または、ＦｃγＲＩＩＩＢ（ＣＤ１６ｂ）に対する改変した結合を有しており（野生型Ｆｃ領域で認められる結合に対して）、例えば、活性化受容体に対する結合が改善しており、及び／または、阻害受容体（複数可）に結合する能力が顕著に抑制されている、または、皆無である。したがって、本発明の免疫コンジュゲートのＦｃ領域は、完全Ｆｃ領域のＣＨ２ドメインの一部または全部、及び／または、ＣＨ３ドメインの一部または全部を含み得るものであり、または、変異体ＣＨ２、及び／または、変異体ＣＨ３の配列を含み得る（完全Ｆｃ領域のＣＨ２またはＣＨ３ドメインに関して、例えば、１つ以上の挿入、及び／または、１つ以上の欠失を含み得る）。このようなＦｃ領域は、非Ｆｃポリペプチド部分を含み得るものであり、または、非天然の完全Ｆｃ領域の一部を含み得るものであり、または、天然に存在しないＣＨ２、及び／または、ＣＨ３ドメインの配向を含み得る（例えば、２つのＣＨ２ドメイン、または、２つのＣＨ３ドメイン、または、Ｎ末端からＣ末端に向かう方向で、ＣＨ２ドメインに接続するＣＨ３ドメインなど）。

【００９２】

エフェクター機能を変化させるものとして同定したＦｃ活性化受容体（例えば、ＦｃγＲＩＩＡ（ＣＤ１６Ａ）に対する結合を増やし、阻害受容体（例えば、ＦｃγＲＩＩＢ（ＣＤ３２Ｂ）に対する結合を減らす改変を含め、Ｆｃ領域改変は、当該技術分野で公知である（例えば、Ｓｔａｖｅｎｈａｇｅｎ，Ｊ．Ｂ．ｅｔ ａｌ．（２００７）“Ｆｃ Ｏｐｔｉｍｉｚａｔｉｏｎ Ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｅｎｈａｎｃｅｓ Ｔｈｅｉｒ Ａｂｉｌｉｔｙ Ｔｏ Ｋｉｌｌ Ｔｕｍｏｒ Ｃｅｌｌｓ Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｓ Ｔｕｍｏｒ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ｖｉａ Ｌｏｗ－Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ａｃｔｉｖａｔｉｎｇ Ｆｃｇａｍｍａ Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ”，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５７（１８）：８８８２－８８９０を参照されたい）。表１は、活性化受容体に対する結合を増やし、及び／または、阻害受容体に対する結合を減らす例示的な改変の例示的な一部位、二部位、三部位、四部位

、及び、五部位の置換を列挙している（付番は、ＫａｂａｔにあるＥＵインデックスの付番法に従っており、置換は、配列番号１のアミノ酸に対するものである）。

【表１－１】

表１ 好ましい活性化Ｆｃ領域の変異			
一部位変異			
Ｆ２４３Ｌ	Ｒ２９２Ｇ	Ｄ２７０Ｅ	Ｒ２９２Ｐ
Ｙ３００Ｌ	Ｐ３９６Ｌ		
二部位変異			
Ｆ２４３Ｌ及びＲ２９２Ｐ	Ｆ２４３Ｌ及びＹ３００Ｌ	Ｆ２４３Ｌ及びＰ３９６Ｌ	Ｒ２９２Ｐ及びＹ３００Ｌ
Ｄ２７０Ｅ及びＰ３９６Ｌ	Ｒ２９２Ｐ及びＶ３０５Ｉ	Ｐ３９６Ｌ及びＱ４１９Ｈ	Ｐ２４７Ｌ及びＮ４２１Ｋ
Ｒ２９２Ｐ及びＰ３９６Ｌ	Ｙ３００Ｌ及びＰ３９６Ｌ	Ｒ２５５Ｌ及びＰ３９６Ｌ	Ｒ２９２Ｐ及びＰ３０５Ｉ
Ｋ３９２Ｔ及びＰ３９６Ｌ			
三部位変異			
Ｆ２４３Ｌ、Ｐ２４７Ｌ及びＮ４２１Ｋ		Ｐ２４７Ｌ、Ｄ２７０Ｅ及びＮ４２１Ｋ	
Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ及びＹ３００Ｌ		Ｒ２５５Ｌ、Ｄ２７０Ｅ及びＰ３９６Ｌ	
Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ及びＶ３０５Ｉ		Ｄ２７０Ｅ、Ｇ３１６Ｄ及びＲ４１６Ｇ	
Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ及びＰ３９６Ｌ		Ｄ２７０Ｅ、Ｋ３９２Ｔ及びＰ３９６Ｌ	
Ｆ２４３Ｌ、Ｙ３００Ｌ及びＰ３９６Ｌ		Ｄ２７０Ｅ、Ｐ３９６Ｌ及びＱ４１９Ｈ	
Ｖ２８４Ｍ、Ｒ２９２Ｌ及びＫ３７０Ｎ		Ｒ２９２Ｐ、Ｙ３００Ｌ及びＰ３９６Ｌ	
四部位変異			
Ｌ２３４Ｆ、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ及びＹ３００Ｌ		Ｆ２４３Ｌ、Ｐ２４７Ｌ、Ｄ２７０Ｅ及びＮ４２１Ｋ	
Ｌ２３４Ｆ、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ及びＹ３００Ｌ		Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２５５Ｌ、Ｄ２７０Ｅ及びＰ３９６Ｌ	
Ｌ２３５Ｉ、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ及びＹ３００Ｌ		Ｆ２４３Ｌ、Ｄ２７０Ｅ、Ｇ３１６Ｄ及びＲ４１６Ｇ	
Ｌ２３５Ｑ、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ及びＹ３００Ｌ		Ｆ２４３Ｌ、Ｄ２７０Ｅ、Ｋ３９２Ｔ及びＰ３９６Ｌ	
Ｐ２４７Ｌ、Ｄ２７０Ｅ、Ｙ３００Ｌ及びＮ４２１Ｋ		Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｙ３００Ｌ及びＰ３９６Ｌ	
Ｒ２５５Ｌ、Ｄ２７０Ｅ、Ｒ２９２Ｇ及びＰ３９６Ｌ		Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｖ３０５Ｉ及びＰ３９６Ｌ	

【表１－２】

Ｒ２５５Ｌ、Ｄ２７０Ｅ、Ｙ３００Ｌ及びＰ３９６Ｌ	Ｆ２４３Ｌ、Ｄ２７０Ｅ、Ｐ３９６Ｌ及びＱ４１９Ｈ
Ｄ２７０Ｅ、Ｇ３１６Ｄ、Ｐ３９６Ｌ及びＲ４１６Ｇ	
五部位変異	
Ｌ２３５Ｖ、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｙ３００Ｌ及びＰ３９６Ｌ	Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｖ３０５Ｉ、Ｙ３００Ｌ及びＰ３９６Ｌ
Ｌ２３５Ｐ、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｙ３００Ｌ及びＰ３９６Ｌ	

【００９３】

ＣＤ３２Ｂに対する結合が減少した、及び／または、ＣＤ１６Ａに対する結合が増加したヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域の例示的な変異体は、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｙ３００Ｌ、Ｖ３０５Ｉ、または、Ｐ３９６Ｌ置換を含み、配列中、付番は、ＫａｂａｔにあるＥＵインデックスの付番法に従う。これらのアミノ酸置換は、あらゆる組み合わせでヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域に存在し得る。ある実施形態では、変異体ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域は、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、及び、Ｙ３００Ｌ置換を含む。別の実施形態では、変異体ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域は、Ｆ２４３Ｌ、Ｒ２９２Ｐ、Ｙ３００Ｌ、Ｖ３０５Ｉ、及び、Ｐ３９６Ｌ置換を含む。

【００９４】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートのＦｃ領域が、（野生型ＩｇＧ１　Ｆｃ領域（配列番号１）によって示される結合に対して）ＦｃγＲＩＡ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩＡ（ＣＤ３２Ａ）、ＦｃγＲＩＩＢ（ＣＤ３２Ｂ）、ＦｃγＲＩＩＩＡ（ＣＤ１６ａ）、または、ＦｃγＲＩＩＩＢ（ＣＤ１６ｂ）に対する結合の減少（または、実質的に存在しないこと）を示すことが好ましい。特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、ＡＤＣＣエフェクター機能の減少を示すＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む。好ましい実施形態では、免疫コンジュゲートのＣＨ２－ＣＨ３ドメインは：Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｄ２６５Ａ、Ｎ２９７Ｑ、及び、Ｎ２９７Ｇの置換の内、いずれか１つ、２つ、３つ、または、４つの個数の置換を含み、付番は、ＫａｂａｔにあるＥＵインデックスの付番法に従う。別の実施形態では、ＣＨ２－ＣＨ３ドメインは、Ｎ２９７Ｑ置換、Ｎ２９７Ｇ置換、Ｌ２３４Ａ置換、及び、Ｌ２３５Ａ置換、または、Ｄ２６５Ａ置換を含み、これらの突然変異は、ＦｃＲ結合を失わせる。あるいは、ＦｃγＲＩＩＩＡ（ＣＤ１６ａ）に対する結合の減少（または、実質的に存在しない）、及び／または、（野生型ＩｇＧ１　Ｆｃ領域（配列番号１）が示す結合、及び、エフェクター機能に対する）エフェクター機能の減少を特徴とする、天然に存在するＦｃ領域のＣＨ２－ＣＨ３ドメインを利用する。特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、ＩｇＧ２　Ｆｃ領域（配列番号２）、または、ＩｇＧ４　Ｆｃ領域（配列番号４）を含む。ＩｇＧ４　Ｆｃ領域を利用する場合、本発明はまた、安定化する突然変異の導入、例えば、上記したヒンジ領域Ｓ２２８Ｐ置換（例えば、配列番号７７を参照されたい）を含む。Ｎ２９７Ｇ、Ｎ２９７Ｑ、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及び、Ｄ２６５Ａ置換は、エフェクター機能を失わせるため、エフェクター機能が望ましい状況では、これらの置換は、好ましくは使用されない。

【００９５】

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

【化２０】

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【００９６】

本発明のＦｃ領域を含有する免疫コンジュゲートのＣＨ２及びＣＨ３ドメインにとって好ましい第２のＩｇＧ１配列は、Ｓ４４２Ｃ置換（下線で示す）を含み、２つのＣＨ３ドメインが互いにジスルフィド結合で共有結合することが可能になる、または、薬理学的作用物質の結合が可能になる。このような分子のアミノ酸配列は、（配列番号７９）であり、

【化２１】

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS L**C**LSPG**X**

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【００９７】

本発明のＦｃ領域を含有する免疫コンジュゲートのＣＨ２及びＣＨ３ドメインにとって好ましい第３のＩｇＧ１配列は、エフェクター機能を減少させる、または、失わせるＬ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ置換（下線で示す）と、２つのＣＨ３ドメインが互いにジスルフィド結合で共有結合することが可能になる、または、薬理学的作用物質の結合が可能になるＳ４４２Ｃ置換（下線で示す）とを含む。このような分子のアミノ酸配列は、（配列番号８０）であり、

【化２２】

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS L**C**LSPG**X**

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【００９８】

Ｆｃ領域を含むタンパク質の血清半減期は、ＦｃＲｎに対するＦｃ領域の結合アフィニティを高めると、長くなり得る。本明細書で使用する用語「半減期」は、投与後の分子の平均生存時間の指標である、分子の薬物動態特性を意味する。半減期は、対象（例えば、ヒト患者、または、その他の哺乳動物）の体内、または、その特定のコンパートメントから、例えば、血清で測定して（すなわち、循環半減期）、または、その他の組織で測定して、公知の量の分子の５０％を排泄するのに必要な時間として表すことができる。一般的に、半減期が延びると、投与した分子の血液循環中での平均滞留時間（ＭＲＴ）が延びる。

【００９９】

一部の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、野生型Ｆｃ領域に対して少なくとも１つのアミノ酸改変を含む変異体Ｆｃ領域を含み、その結果、当該分子は、（野生型Ｆｃ領域を含む分子と比較して）半減期が延びている。一部の実施形態では、本発明の免

疫コンジュゲートは、変異体ＩｇＧ　Ｆｃ領域を含み、当該変異体Ｆｃ領域は、２３８、２５０、２５２、２５４、２５６、２５７、２５６、２６５、２７２、２８６、２８８、３０３、３０５、３０７、３０８、３０９、３１１、３１２、３１７、３４０、３５６、３６０、３６２、３７６、３７８、３８０、３８２、４１３、４２４、４２８、４３３、４３４、４３５、及び、４３６からなる群から選択される１つ以上の位置に、半減期を延ばすアミノ酸置換を含み、付番は、ＫａｂａｔにあるＥＵインデックスの付番法に従う。Ｆｃ領域含有分子の半減期を長くすることが可能な数多くの突然変異は、当該技術分野で公知であり、例えば、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、Ｔ２５６Ｅ、及び、これらの組み合わせを含む。例えば、本明細書の一部を構成するものとして、その全内容を援用する、米国特許第６，２７７，３７５号、第７，０８３，７８４号、第７，２１７，７９７号、第８，０８８，３７６号、米国公開第２００２／０１４７３１１号、第２００７／０１４８１６４号、及び、ＰＣＴ公開第ＷＯ９８／２３２８９号、第ＷＯ２００９／０５８４９２号及び第ＷＯ２０１０／０３３２７９号に記載の変異を参照されたい。延びた半減期を有する免疫コンジュゲートは、Ｆｃ領域残基２５０、２５２、２５４、２５６、２５７、２８８、３０７、３０８、３０９、３１１、３７８、４２８、４３３、４３４、４３５、及び、４３６の２つ以上に置換を含む変異体Ｆｃ領域を有するものも含み、付番は、ＫａｂａｔにあるＥＵインデックスの付番法に従う。とりわけ：Ｔ２５０Ｑ、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、Ｔ２５６Ｅ、Ｋ２８８Ｄ、Ｔ３０７Ｑ、Ｖ３０８Ｐ、Ａ３７８Ｖ、Ｍ４２８Ｌ、Ｎ４３４Ａ、Ｈ４３５Ｋ、及び、Ｙ４３６Ｉから選択される２つ以上の置換であり、付番は、ＫａｂａｔにあるＥＵインデックスの付番法に従う。

【０１００】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは：

（Ａ）Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ及びＴ２５６Ｅ；

（Ｂ）Ｍ２５２Ｙ及びＳ２５４Ｔ；

（Ｃ）Ｍ２５２Ｙ及びＴ２５６Ｅ；

（Ｄ）Ｔ２５０Ｑ及びＭ４２８Ｌ；

（Ｅ）Ｔ３０７Ｑ及びＮ４３４Ａ；

（Ｆ）Ａ３７８Ｖ及びＮ４３４Ａ；

（Ｇ）Ｎ４３４Ａ及びＹ４３６Ｉ；

（Ｈ）Ｖ３０８Ｐ及びＮ４３４Ａ；または

（Ｉ）Ｋ２８８Ｄ及びＨ４３５Ｋ

の置換を含む変異体ＩｇＧ　Ｆｃ領域を有する。

【０１０１】

好ましい実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、及び、Ｔ２５６Ｅの置換の内、いずれか１つ、２つ、または、３つの個数の置換を含む変異体ＩｇＧ　Ｆｃ領域を有する。本発明はさらに：

（Ａ）エフェクター機能、及び／または、ＦｃγＲを変化させる１つ以上の突然変異；及び、

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

【０１０２】

本発明のＦｃ領域を含有する免疫コンジュゲートのＣＨ２及びＣＨ３ドメインにとって好ましい第４のＩｇＧ１配列は、血清半減期を延ばすように、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、及び、Ｔ２５６Ｅ置換（下線で示す）を含む。このような分子のアミノ酸配列は、（配列番号１４７）であり、

【化２３】

APELLGGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１０３】

本発明のＦｃ領域を含有する免疫コンジュゲートのＣＨ２及びＣＨ３ドメインにとって好ましい第５のＩｇＧ１配列は、血清半減期を延ばすように、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、及び、Ｔ２５６Ｅ置換（下線で示す）と、２つのＣＨ３ドメインが、互いにジスルフィド結合で共有結合することが可能になる、または、薬物部分の結合が可能になるように、Ｓ４４２Ｃ置換（下線で示す）とを含む。このような分子のアミノ酸配列は、（配列番号１４８）であり、

【化２４】

APELLGGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS L**C**LSPG**X**

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１０４】

本発明のＦｃ領域を含有する免疫コンジュゲートのＣＨ２及びＣＨ３ドメインにとって好ましい第６のＩｇＧ１配列は、エフェクター機能を減少させる、または、失わせるＬ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ置換（下線で示す）と、血清半減期を延ばすように、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、及び、Ｔ２５６Ｅ置換（下線で示す）とを含む。このような分子のアミノ酸配列は、（配列番号１４９）であり、

【化２５】

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１０５】

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

【化２６】

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS L**C**LSPG**X**

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１０６】

ＩＩ．例示的な抗ＡＤＡＭ９抗体

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

【０１０７】

代表的なヒトＡＤＡＭ９ポリペプチド（ＮＣＢＩ配列ＮＰ＿００３８０７、２８アミノ酸残基シグナル配列を含む、下線を付した状態で示す）は、アミノ酸配列（配列番号５）を有する。

【化２７】

MGSGARFPSG **TLRVRWLLLL** **GLVGPVLG**AA RPGFQQTSHL SSYEIITPWR
LTRERREAPR PYSKQVSYVI QAEGKEHIIH LERNKDLLPE DFVVYTYNKE
GTLITDHPNI QNHCHYRGYV EGVHNSSIAL SDCFGLRGLL HLENASYGIE
PLQNSSHFEH IIYRMDDVYK EPLKCGVSNK DIEKETAKDE EEEPPSMTQL
LRRRRAVLPQ TRYVELFIVV DKERYDMMGR NQTAVREEMI LLANYLDSMY
IMLNIRIVLV GLEIWTNGNL INIVGGAGDV LGNFVQWREK FLITRRRHDS
AQLVLKKGFG GTAGMAFVGT VCSRSHAGGI NVFGQITVET FASIVAHELG
HNLGMNHDDG RDCSCGAKSC IMNSGASGSR NFSSCSAEDF EKLTLNKGGN
CLLNIPKPDE AYSAPSCGNK LVDAGEECDC GTPKECELDP CCEGSTCKLK
SFAECAYGDC CKDCRFLPGG TLCRGKTSEC DVPEYCNGSS QFCQPDVFIQ
NGYPCQNNKA YCYNGMCQYY DAQCQVIFGS KAKAAPKDCF IEVNSKGDRF
GNCGFSGNEY KKCATGNALC GKLQCENVQE IPVFGIVPAI IQTPSRGTKC
WGVDFQLGSD VPDPGMVNEG TKCGAGKICR NFQCVDASVL NYDCDVQKKC
HGHGVCNSNK NCHCENGWAP PNCETKGYGG SVDSGPTYNE MNTALRDGLL
VFFFLIVPLI VCAIFIFIKR DQLWRSYFRK KRSQTYESDG KNQANPSRQP
GSVPRHVSPV TPPREVPIYA NRFAVPTYAA KQPQQFPSRP PPPQPKVSSQ
GNLIPARPAP APPLYSSLT

ＡＤＡＭ９（配列番号５）の８１９のアミノ酸残基の内、残基１～２８は、シグナル配列であり、残基２９～６９７は、細胞外ドメインであり、残基６９８～７１８は、膜貫通ドメインであり、そして、残基７１９～８１９は、細胞内ドメインである。３つの構造ドメイン：レプロリシン（Ｍ１２Ｂ）ファミリージンクメタロプロテアーゼドメイン（概ね残基２１２～４０６）；ジスインテグリンドメイン（概ね残基４２３～４９７）；及び、ＥＧＦ様ドメイン（概ね残基６４４～６９７）は、細胞外ドメイン内に位置している。数多くの翻訳後改変、及び、アイソフォームを同定し、そして、血漿膜に達して成熟タンパク質を生成する前に、ｔｒａｎｓ－Ｇｏｌｇｉネットワーク構造内で、タンパク質をタンパク質分解で開裂させる。プロドメインの除去は、２つの異なる部位での開裂によって起こる。プロドメインと触媒ドメインとの間の境界（Ａｒｇ－２０５／Ａｌａ－２０６）で、フリンなどのプロタンパク質変換酵素によって最も処理を受けると考えられる。さらなる上流の開裂プロタンパク質変換酵素部位（Ａｒｇ－５６／Ｇｌｕ－５７）は、ＡＤＡＭ

９の活性化において重要な役割を担う。

【０１０８】

代表的なカニクイザルＡＤＡＭ９ポリペプチド（ＮＣＢＩ配列ＸＭ＿００５５６３１２６．２、おそらくは、２８アミノ酸残基シグナル配列を含み、下線を付した状態で示す）は、アミノ酸配列（配列番号６）を有する。

【化２８】

MGSGVGSPSG TLRVRWLLLL CLVGPVLGAA RPGFQQTSHL SSYEIITPWR
LTRERREAPR PYSKQVSYLI QAEGKEHIIH LERNKDLLPE DFVVYTYNKE
GTVITDHPNI QNHCHFRGYV EGVYNSSVAL SNCFGLRGLL HLENASYGIE
PLQNSSHFEH IIYRMDDVHK EPLKCGVSNK DIEKETTKDE EEEPPSMTQL
LRRRRAVLPQ TRYVELFIVV DKERYDMMGR NQTAVREEMI LLANYLDSMY
IMLNIRIVLV GLEIWTNGNL INIAGGAGDV LGNFVQWREK FLITRRRHDS
AQLVLKKGFG GTAGMAFVGT VCSRSHAGGI NVFGHITVET FASIVAHELG
HNLGMNHDDG RDCSCGAKSC IMNSGASGSR NFSSCSAEDF EKLTLNKGGN
CLLNIPKPDE AYSAPSCGNK LVDAGEECDC GTPKECELDP CCEGSTCKLK
SFAECAYGDC CKDCRFLPGG TLCRGKTSEC DVPEYCNGSS QFCQPDVFIQ
NGYPCQNNKA YCYNGMCQYY DAQCQVIFGS KAKAAPKDCF IEVNSKGDRF
GNCGFSGNEY KKCATGNALC GKLQCENVQE IPVFGIVPAI IQTPSRGTKC
WGVDFQLGSD VPDPGMVNEG TKCGADKICR NFQCVDASVL NYDCDIQKKC
HGHGVCNSNK NCHCENGWAP PNCETKGYGG SVDSGPTYNE MNTALRDGLL
VFFFLIVPLI VCAIFIFIKR DQLWRRYFRK KRSQTYESDG KNQANPSRQP
VSVPRHVSPV TPPREVPIYA NRFPVPTYAA KQPQQFPSRP PPPQPKVSSQ
GNLIPARPAP APPLYSSLT

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

【０１０９】

特定の実施形態では、本発明の抗ＡＤＡＭ９抗体、及び、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、次の基準：

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

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

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

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

（５）5×10^{5} M^{-1} $分^{-1}$以上のオンレート（ｋａ）で、ヒトＡＤＡＭ９に対して特異的に結合する；

（６）1×10^{6} M^{-1} $分^{-1}$以上のオンレート（ｋａ）で、非ヒト霊長類ＡＤＡＭ９に対して特異的に結合する；

（７）1×10^{-3} $分^{-1}$以下のオフレート（ｋｄ）で、ヒトＡＤＡＭ９に対して特異的に結合する；

（８）9×10^{-4} $分^{-1}$以下のオフレート（ｋｄ）で、非ヒト霊長類ＡＤＡＭ９に対して特異的に結合する。

（９）キメラまたはマウス親抗体と比較して、ｃｙｎｏ　ＡＤＡＭ９に対する結合アフィニティ（例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）分析によって決定する）において、少な

くとも１００倍の向上（例えば、少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも２５０倍、少なくとも３００倍、少なくとも３５０倍、少なくとも４００倍、少なくとも４５０倍、少なくとも５００倍、少なくとも５５０倍、または少なくとも６００倍の向上）を有し、かつ、ヒトＡＤＡＭ９に対する高アフィニティ結合（例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）分析）を保持するように最適化すること、のいずれか１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、または、９つの個数の基準によって特徴決定する。

【０１１０】

本明細書に記載した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントの結合定数は、表面プラズモン共鳴を用いて、例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）分析で決定し得る。表面プラズモン共鳴データは、１：１　Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル（同時に、ｋａ　ｋｄ）にフィッティングされ、そして、平衡結合定数K_Dは、速度定数の比率ｋｄ／ｋａから計算する。このような結合定数は、一価抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメント（すなわち、１つのＡＤＡＭ９エピトープ結合部位を含む分子）、二価抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメント（すなわち、２つのＡＤＡＭ９エピトープ結合部位を含む分子）、または、それより高い価数を有する抗ＡＤＡＭ９抗体、及び、そのＡＤＡＭ９結合フラグメント（例えば、３つ、４つ、または、それを超える個数のＡＤＡＭ９エピトープ結合部位を含む分子）について決定し得る。

【０１１１】

本発明は、特に、ヒトＡＤＡＭ９ポリペプチドのエピトープに免疫特異的に結合する抗ＡＤＡＭ９軽鎖可変（ＶＬ）ドメインと、抗ＡＤＡＭ９重鎖可変（ＶＨ）ドメインとを含む抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントを含む免疫コンジュゲートを含む。特に断りの無い限り、このようなすべての抗ＡＤＡＭ９抗体、及び、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、ヒトＡＤＡＭ９に免疫特異的に結合することができる。本明細書で使用するこのようなＡＤＡＭ９可変ドメインは、それぞれ「抗ＡＤＡＭ９－ＶＬ」及び「抗ＡＤＡＭ９－ＶＨ」と称する。

【０１１２】

Ａ．マウス抗ヒトＡＤＡＭ９抗体

ＡＤＡＭ９の標的タンパク質処理活性をブロックするマウス抗ＡＤＡＭ９抗体が内部移行し、そして、抗腫瘍活性を有することを同定した（例えば、米国特許第８，３６１，４７５号を参照されたい）。この抗体は、米国特許第７，６７４，６１９号、及び、第８，３６１，４７５号では、ハイブリドーマクローンＡＴＣＣ　ＰＴＡ－５１７４が生産する「抗ＫＩＤ２４」抗体と称されており、本明細書では「ＭＡＢ－Ａ」と称する。ＭＡＢ－Ａは、正常組織と比べて、腫瘍に対して強力で優先的な結合を示す（図７Ａ～７Ｃを参照されたい）。ＭＡＢ－Ａは、正常な細胞型の大きなパネルにおいて、染色をほとんど、または、全く示さなかった（表２）。

【表２－１】

表２	
組織	ＭＡＢ－Ａ（１．２５μｇ／ｍＬ）
副腎	陰性
膀胱	陰性
骨髄	陰性
乳房	陰性
小脳	陰性
大脳	ＮＤ
子宮頸管	陰性
結腸	陰性
食道	平滑筋±から１＋（ｇｒ　ｃ）＜５％
卵管	陰性
心臓	陰性
腎臓	陰性
肝臓	陰性
肺	陰性
リンパ節	陰性
卵巣	陰性
膵臓	非常に稀（膵腺房と考えられる）１＋（ｃ）
副甲状腺	上皮肝実質細胞　１＋（ｇｒ　ｃ）、１％ 細胞（望ましい主細胞）２＋（ｍ，ｃ）５％　１＋（ｍ，ｃ） 主に１０％先端
下垂体	後葉細胞（おそらく神経細胞及び／または後葉グリア細胞　１＋（ｃ＞ｍ）＜５％
胎盤	絨毛膜板内の血管内壁細胞　１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ） 絨毛膜板の間葉細胞　１－２＋ｇｒ　ｃ）、５％
前立腺	腺上皮　２＋（ｇｒ　ｃ）５％及び１＋（ｇｒ　ｃ）５％
網膜＋毛様体	おそらく陰性（染色していない顔料に起因する、着色した上皮層３－４＋（ｇｒ　ｃ））

【表２－２】

顎下腺	導管上皮　＋／－（ｃ）１０％
骨格筋	陰性
皮膚	陰性
小腸	陰性
脊髄	神経網　１＋（ｇｒ　ｃ）＜１％
脾臓	陰性
胃	陰性
精巣	細精管　１＋（ｇｒ　ｃ）＜５％ 間質細胞（おそらくライディッヒ細胞）　２－３＋（ｇｒ　ｃ）＜５％及び１＋（ｇｒ　ｃ）１０％
甲状腺	陰性
扁桃腺	内皮細胞　２－３＋（ｃ，ｍ）＜５％及び１＋（ｍ，ｃ）１５％
尿管	移行上皮　１＋（ｍ，ｃ）＜５％及び１＋（ｍ，ｃ）５％； 内皮細胞　１＋（ｃ）＜５％
子宮	陰性
Ａ４９８細胞ペレット	２－３＋（ｍ，ｃ）、５０％、１＋（ｍ，ｃ）４５％

【０１１３】

図２に示すように、ＭＡＢ－Ａは、ヒトＡＤＡＭ９に対して、高いアフィニティで結合するが、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）ＡＤＡＭ９には、これに満たない程度で結合する。

【０１１４】

ＭＡＢ－ＡのＶＬドメイン、及び、ＶＨドメインのアミノ酸配列を、以下に示す。ＭＡＢ－ＡのＶＨドメイン、及び、ＶＬドメインは、ヒト化しており、そして、ＣＤＲは、アフィニティを改善する、及び／または、潜在的なアミノ酸の易罹病性を取り除くために、最適化する。CDR_H3は、ヒトＡＤＡＭ９に対する高いアフィニティを維持しつつ、非ヒト霊長類ＡＤＡＭ９に対する結合を向上させるために、さらに最適化した。

【０１１５】

本発明の好ましい免疫コンジュゲートは、ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体のＶＨドメインの１つ、２つ、または、３つすべてのCDR_H、及び／または、ＶＬドメインの１つ、２つ、または、３つすべてのCDR_Lを含み、好ましくはさらに、ヒト化ＭＡＢ－ＡのＶＨ、及び／または、ＶＬドメインのヒト化フレームワーク領域（「ＦＲ」）を含む。本発明のその他の好ましい免疫コンジュゲートは、ＭＡＢ－Ａのヒト化／最適化した変異体のＶＨドメイン、及び／または、ＶＬドメイン全体を有する。

【０１１６】

本発明は、特に、免疫コンジュゲートであって：

（Ａ）（１）ＭＡＢ－ＡのＶＨドメインの３個のCDR_H；及び

（２）ＭＡＢ－Ａのヒト化変異体のＶＨドメインの４個のＦＲ；または

（Ｂ）（１）ＭＡＢ－ＡのＶＬドメインの３個のCDR_L；及び

（２）ＭＡＢ－Ａのヒト化変異体のＶＬドメインの４個のＦＲ；または

（Ｃ）ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体のＶＨドメインの３個のＣＤＲ$_{H}$；及び、ＭＡＢ－ＡのＶＬドメインの３個のＣＤＲ$_{L}$；または
（Ｄ）ＭＡＢ－ＡのＶＨドメインの３個のＣＤＲ$_{H}$；及び、最適化した変異体ＭＡＢ－ＡのＶＬドメインの３個のＣＤＲ$_{L}$；または
（Ｅ）ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体のＶＨドメインの３個のＣＤＲ$_{H}$；及び、最適化したＭＡＢ－ＡのＶＬドメインの３個のＣＤＲ$_{L}$；または
（Ｆ）（１）ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体のＶＨドメインの３個のＣＤＲ$_{H}$；及び
（２）ＭＡＢ－Ａのヒト化変異体のＶＨドメインの４個のＦＲ；または
（Ｇ）（１）ＭＡＢ－Ａの最適化した変異体のＶＬドメインの３個のＣＤＲ$_{L}$；及び
（２）ＭＡＢ－Ａのヒト化変異体のＶＬドメインの４個のＦＲ；または
（Ｈ）（１）ＭＡＢ－Ａのヒト化／最適化した変異体のＶＨドメイン；及び
（２）ＭＡＢ－Ａのヒト化／最適化した変異体のＶＬドメイン
を含む、免疫コンジュゲートに関する。マウス抗体「ＭＡＢ－Ａ」

【０１１７】

マウス抗ＡＤＡＭ９抗体ＭＡＢ－ＡのＶＨドメインのアミノ酸配列は、配列番号７である（ＣＤＲ$_{H}$残基は、下線を付した状態で示す）。

【化２９】

QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT **SYWMH**WVKQR PGQGLEWIG**E**
IIPINGHTNY **NEKFKS**KATL TLDKSSSTAY MQLSSLASED SAVYYCAR**GG**
YYYYGSRDYF **DY**WGQGTTLT VSS

【０１１８】

ＭＡＢ－ＡのＣＤＲ$_{H}$１ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号８）：ＳＹＷＭＨである。

【０１１９】

ＭＡＢ－ＡのＣＤＲ$_{H}$２ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号９）：ＥＩＩＰＩＮＧＨＴＮＹＮＥＫＦＫＳである。

【０１２０】

ＭＡＢ－ＡのＣＤＲ$_{H}$３ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号１０）：ＧＧＹＹＹＹＧＳＲＤＹＦＤＹである。

【０１２１】

マウス抗ＡＤＡＭ９抗体ＭＡＢ－ＡのＶＬドメインのアミノ酸配列は、配列番号１１である（ＣＤＲ$_{L}$残基は、下線を付した状態で示す）。

【化３０】

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**KASQSVD** **YDGDSYMN**WY QQIPGQPPKL
LIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YC**QQSHEDPF**
TFGGGTKLEI K

【０１２２】

ＭＡＢ－ＡのＣＤＲ$_{L}$１ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号１２）：ＫＡＳＱＳＶＤＹＤＧＤＳＹＭＮである。

【０１２３】

ＭＡＢ－ＡのＣＤＲ$_{L}$２ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号１３）：ＡＡＳＤＬＥＳである。

【０１２４】

ＭＡＢ－ＡのＣＤＲ$_{L}$３ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号１４）：ＱＱＳＨＥＤＰＦＴである。

【０１２５】

Ｂ．例示的なヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９－ＶＨドメイン、及び、ＶＬドメイン

１．ＭＡＢ－Ａの変異体ＶＨドメイン

ＭＡＢ－Ａの特定の好ましいヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９－ＶＨドメインのアミノ酸配列は、ＭＡＢ－ＡのＡＤＡＭ９－ＶＨドメインの変異体（配列番号７）であり、そして、配列番号１５によって表されている（CDR_H残基は、下線を付した状態で示す）、

【化３１】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWX$_1$H**WVRQA
PGKGLEWVG**E** **IIPIX$_2$GHTNY** **NEX$_3$FX$_4$X$_5$**RFTI SLDNSKNTLY
LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG** **YYYYX$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$** **DY**WGQGTTVT
VSS

配列中、X_1、X_2、X_3、X_4、X_5、及び、X_6は、独立して選択され、

配列中、X_1は、ＭまたはＩであり；X_2は、ＮまたはＦであり；

X_3は、ＫまたはＲであり；X_4は、ＫまたはＱであり；

X_5は、ＳまたはＧであり、及び、X_6は、Ｐ、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、Ｔ、ＧまたはＤであり；

配列中、X_7、X_8、X_9、X_{10}、及び、X_{11}は、以下になるように選択する。

【化３２】

（Ａ）X_6がＰである場合、
X_7は、ＫまたはＲであり；
X_8は、ＦまたはＭであり；
X_9は、Ｇであり；
X_{10}は、ＷまたはＦであり；及び
X_{11}は、Ｍ、ＬまたはＫであり；

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

（Ｃ）X_6が、Ｉ、ＬまたはＶである場合、
X_7は、Ｇ；であり；
X_8は、Ｋであり；
X_9は、ＧまたはＡであり；
X_{10}は、Ｖであり；及び
X_{11}は、Ｍ、ＬまたはＫであり；

（Ｄ）X_6がＴである場合、
X_7は、Ｇであり；
X_8は、Ｋ、ＭまたはＮであり；
X_9は、Ｇであり；
X_{10}は、ＶまたはＴであり；及び
X_{11}は、ＬまたはＭであり；

（Ｅ）X_6がＧである場合、
X_7は、Ｇであり；
X_8は、Ｓであり；
X_9は、Ｇであり；
X_{10}は、Ｖであり；及び
X_{11}は、Ｌであり；

（Ｆ）X_6がＤである場合、
X_7は、Ｓであり；
X_8は、Ｎであり；
X_9は、Ａであり；
X_{10}は、Ｖであり；及び
X_{11}は、Ｌである。

【０１２６】

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

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

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

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

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

号２６）
ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｂ）（配列番号２１）　ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｈ）（配列番号２７）
ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｃ）（配列番号２２）　ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）（配列番号２８）
及びｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｊ）（配列番号２９）
を、以下に示す（ＣＤＲ$_H$残基は、１本線を付した状態で示す；ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（１）（配列番号７）に関する差は、二重下線で示す）。
ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（１）（配列番号１６）：
【化３３】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPINGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYGSRDYF **DY**WGQGTTVT VSS

ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２）（配列番号１７）：
【化３４】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYGSRDYF **DY**WGQGTTVT VSS

ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（３）（配列番号１８）：
【化３５】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NERFQG**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYGSRDYF **DY**WGQGTTVT VSS

ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（４）（配列番号１９）：
【化３６】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWIH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NERFQG**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYGSRDYF **DY**WGQGTTVT VSS

ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ａ）（配列番号２０）：
【化３７】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYFNSGTL **DY**WGQGTTVT VSS

ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｂ）（配列番号２１）：
【化３８】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYIGKGVL **DY**WGQGTTVT VSS

ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｃ）（配列番号２２）：

【化３９】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYPRFGWL **DY**WGQGTTVT VSS

hＭＡＢ－Ａ ＶＨ（２Ｄ）（配列番号２３）：

【化４０】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYTGKGVL **DY**WGQGTTVT VSS

hＭＡＢ－Ａ ＶＨ（２Ｅ）（配列番号２４）：

【化４１】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYDSNAVL **DY**WGQGTTVT VSS

hＭＡＢ－Ａ ＶＨ（２Ｆ）（配列番号２５）：

【化４２】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYFHSGTL **DY**WGQGTTVT VSS

hＭＡＢ－Ａ ＶＨ（２Ｇ）（配列番号２６）：

【化４３】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYFNKAVL **DY**WGQGTTVT VSS

hＭＡＢ－Ａ ＶＨ（２Ｈ）（配列番号２７）：

【化４４】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYGGSGVL **DY**WGQGTTVT VSS

hＭＡＢ－Ａ ＶＨ（２Ｉ）（配列番号２８）：

【化４５】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY **NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYPRQGFL **DY**WGQGTTVT VSS

hＭＡＢ－Ａ ＶＨ（２Ｊ）（配列番号２９）：

【化４６】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E**
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG**
YYYYYNSGTL DYWGQGTTVT VSS

【０１２７】

ＭＡＢ－Ａのヒト化、及び／または、最適化した抗ＡＤＡＭ９－ＶＨドメインのＦＲに適したアミノ酸配列は：

FR_H１ドメイン（配列番号３０）：ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＫＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳ

FR_H２ドメイン（配列番号３１）：ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧ

FR_H３ドメイン（配列番号３２）：ＲＦＴＩＳＬＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＧＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲ

FR_H４ドメイン（配列番号３３）：ＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ、である。

【０１２８】

抗ＡＤＡＭ９－ＶＨドメインのCDR_H１ドメインに適した代替的なアミノ酸配列として：

配列番号８：ＳＹＷＭＨ

配列番号３４：ＳＹＷＩＨ、がある。

【０１２９】

抗ＡＤＡＭ９－ＶＨドメインのCDR_H２ドメインに適した代替的なアミノ酸配列として：

配列番号９：ＥＩＩＰＩＮＧＨＴＮＹＮＥＫＦＫＳ

配列番号３５：ＥＩＩＰＩＦＧＨＴＮＹＮＥＫＦＫＳ

配列番号３６：ＥＩＩＰＩＦＧＨＴＮＹＮＥＲＦＱＧ、がある。

【０１３０】

抗ＡＤＡＭ９－ＶＨドメインのCDR_H３ドメインに適した代替的なアミノ酸配列として：

配列番号１０：ＧＧＹＹＹＹＧＳＲＤＹＦＤＹ

配列番号３７：ＧＧＹＹＹＹＦＮＳＧＴＬＤＹ

配列番号３８：ＧＧＹＹＹＹＩＧＫＧＶＬＤＹ

配列番号３９：ＧＧＹＹＹＹＰＲＦＧＷＬＤＹ

配列番号４０：ＧＧＹＹＹＹＴＧＫＧＶＬＤＹ

配列番号４１：ＧＧＹＹＹＹＤＳＮＡＶＬＤＹ

配列番号４２：ＧＧＹＹＹＹＦＨＳＧＴＬＤＹ

配列番号４３：ＧＧＹＹＹＹＦＮＫＡＶＬＤＹ

配列番号４４：ＧＧＹＹＹＹＧＧＳＧＶＬＤＹ

配列番号４５：ＧＧＹＹＹＹＰＲＱＧＦＬＤＹ

配列番号４６：ＧＧＹＹＹＹＹＮＳＧＴＬＤＹ、がある。

【０１３１】

したがって、本発明は：

（１）以下のアミノ酸配列：

配列番号４７：ＳＹＷX_1Ｈ

配列中、X_1は、ＭまたはＩである、アミノ酸配列を有するCDR_H１ドメイン

（２）以下のアミノ酸配列：

配列番号４８：ＥＩＩＰＩX_2ＧＨＴＮＹＮＥX_3Ｆ$X_4$$X_5$

X_2、X_3、X_4、及び、X_5は、独立して選択され、

X_2は、ＮまたはＦであり；X_3は、ＫまたはＲであり；

X_4は、ＫまたはＱであり；X_5は、ＳまたはＧである、アミノ酸配列を有するＣＤＲ

$_H$２ドメイン、及び
（３）以下のアミノ酸配列：
配列番号４９：ＧＧＹＹＹＹＸ$_6$Ｘ$_7$Ｘ$_8$Ｘ$_9$Ｘ$_{10}$Ｘ$_{11}$ＤＹ
配列中、Ｘ$_6$は、Ｐ、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｉ、Ｌ、Ｖ、Ｔ、Ｇ、または、Ｄであり、Ｘ$_7$、Ｘ$_8$、Ｘ$_9$、Ｘ$_{10}$は、以下になるように選択される：
【化４７】

（Ａ）Ｘ$_6$がＰである場合、
Ｘ$_7$は、ＫまたはＲであり；
Ｘ$_8$は、ＦまたはＭであり；
Ｘ$_9$は、Ｇであり；
Ｘ$_{10}$は、ＷまたはＦであり；及び
Ｘ$_{11}$は、Ｍ、ＬまたはＫであり；

（Ｂ）Ｘ$_6$が、Ｆ、ＹまたはＷである場合、
Ｘ$_7$は、ＮまたはＨであり；
Ｘ$_8$は、ＳまたはＫであり；
Ｘ$_9$は、ＧまたはＡであり；
Ｘ$_{10}$は、ＴまたはＶであり；及び
Ｘ$_{11}$は、Ｍ、ＬまたはＫであり；

（Ｃ）Ｘ$_6$が、Ｉ、ＬまたはＶである場合、
Ｘ$_7$は、Ｇ；であり；
Ｘ$_8$は、Ｋであり；
Ｘ$_9$は、ＧまたはＡであり；
Ｘ$_{10}$は、Ｖであり；及び
Ｘ$_{11}$は、Ｍ、ＬまたはＫであり；

（Ｄ）Ｘ$_6$がＴである場合、
Ｘ$_7$は、Ｇであり；
Ｘ$_8$は、Ｋ、ＭまたはＮであり；
Ｘ$_9$は、Ｇであり；
Ｘ$_{10}$は、ＶまたはＴであり；及び
Ｘ$_{11}$は、ＬまたはＭであり；

（Ｅ）Ｘ$_6$がＧである場合、
Ｘ$_7$は、Ｇであり；
Ｘ$_8$は、Ｓであり；
Ｘ$_9$は、Ｇであり；
Ｘ$_{10}$は、Ｖであり；及び
Ｘ$_{11}$は、Ｌであり；

（Ｆ）Ｘ$_6$がＤである場合、
Ｘ$_7$は、Ｓであり；
Ｘ$_8$は、Ｎであり；
Ｘ$_9$は、Ａであり；
Ｘ$_{10}$は、Ｖであり；及び
Ｘ$_{11}$は、Ｌである、

アミノ酸配列を有するＣＤＲ$_H$３ドメイン、
を含むＶＨドメインを含むＡＤＡＭ９結合分子を含む。
【０１３２】
ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体の第１の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２）ドメイン（配列番号１７）を含んでおり、そして、アミノ酸配列（配列番号５０）を含んでおり、
【化４８】

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

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。
【０１３３】
ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体の第２の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｃ）ドメイン（配列番号２２）を含んでおり、そして、アミノ酸配

列（配列番号５１）を含んでおり、

【化４９】

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

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１３４】

ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体の第３の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）ドメイン（配列番号２８）を含んでおり、そして、アミノ酸配列（配列番号５２）を含んでおり、

【化５０】

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

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１３５】

上記した通り、Ｆｃ領域のＣＨ２－ＣＨ３ドメインは、例えば、エフェクター機能を減少させ、及び／または、結合部位を導入し、及び／または、血清半減期を延ばすように操作し得る。特定の実施形態では、本発明の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖のＣＨ２－ＣＨ３ドメインは、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、Ｔ２５６Ｅ、及び、Ｓ４４２Ｃから選択される１つ以上の置換を含む。

【０１３６】

したがって、ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体の第４の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）ドメイン（配列番号２８）を含んでおり、さらに、Ｆｃ領域のＣＨ２－ＣＨ３ドメインに置換Ｌ２３４Ａ及びＬ２３５Ａを含んでおり（配列番号７８）、そして、アミノ酸配列（配列番号１４１）を含んでおり、

【化５１】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPE**A** **A**GGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGX

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１３７】

ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体の第５の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）ドメイン（配列番号２８）を含んでおり、さらに、Ｆｃ領域のＣＨ２－ＣＨ３ドメインにＳ４４２Ｃ置換を含んでおり（配列番号７９）、そして、アミノ酸配列（配列番号１４２）を含んでおり、

【化５２】

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

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１３８】

ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体の第６の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）ドメイン（配列番号２８）を含んでおり、さらに、Ｆｃ領域のＣＨ２－ＣＨ３ドメインに置換Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及び、Ｓ４４２Ｃを含んでおり（配列番号８０）、そして、アミノ酸配列（配列番号１４３）を含んでおり、

【化５３】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPE**A** **A**GGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSL**C**LS
PGX

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１３９】

ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体の第７の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）ドメイン（配列番号２８）を含んでおり、さらに、Ｆｃ領域のＣＨ２－ＣＨ３ドメインに、置換Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ及びＴ２５６Ｅを含んでおり（配列番号１４７）、そして、アミノ酸配列（配列番号１５１）を含んでおり、

【化５４】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGX

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１４０】

ある実施形態では、ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体のヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）ドメイン（配列番号２８）を含んでおり、さらに、Ｆｃ領域のＣＨ２－ＣＨ３ドメインに、置換Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、及び、Ｔ２５６Ｅを含んでおり（配列番号１４７）、そして、アミノ酸配列（配列番号１５５）：

【化５５】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PG

を含んでいる。

【０１４１】

ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体の第８の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）ドメイン（配列番号２８）を含んでおり、さらに、Ｆｃ領域のＣＨ２－ＣＨ３ドメインに、置換Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、Ｔ２５６Ｅ、及び、Ｓ４４２Ｃを含んでおり（配列番号１４８）、そして、アミノ酸配列（配列番号１５２）を含んでおり、

【化５６】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSL**C**LS
PGX

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１４２】

ある実施形態では、ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体のヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）ドメイン（配列番号２８）を含んでおり、さらに、Ｆｃ領域のＣＨ２－ＣＨ３ドメインに、置換Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、及び、Ｔ２５６Ｅを含んでおり（配列番号１４８）、そして、アミノ酸配列（配列番号１５６）：

【化５７】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSL**C**LS
PG

を含んでいる。

【０１４３】

ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体の第９の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）ドメイン（配列番号２８）を含んでおり、さらに、Ｆｃ領域のＣＨ２－ＣＨ３ドメインに、置換Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、及び、Ｔ２５６Ｅを含んでおり（配列番号１４９）、そして、アミノ酸配列（配列番号１５３）を含んでおり、

【化５８】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPE**A** **A**GGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGX

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１４４】

ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体の第１０の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１重鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）ドメイン（配列番号２８）を含んでおり、さらに、Ｆｃ領域のＣＨ２－ＣＨ３ドメインに、置換Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、Ｔ２５６Ｅ、及び、Ｓ４４２Ｃを含んでおり（配列番号１５０）、そして、アミノ酸配列（配列番号１５４）を含んでおり、

【化５９】

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPE**A** **A**GGPSVFLFP
PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSL**C**LS
PGX

配列中、Ｘは、リシン（Ｋ）である、または、存在しない。

【０１４５】

２．ＭＡＢ－Ａの変異体ＶＬドメイン

ＭＡＢ－Ａの好ましいヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９－ＶＬドメインのアミノ酸配列は、ＭＡＢ－ＡのＡＤＡＭ９－ＶＬドメインの変異体（配列番号１１）であり、配列番号５３によって表され（CDR_L残基は、下線を付した状態で示す）、

【化６０】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISC**X_{12}ASQSVD** **$YX_{13}GDSYX_{14}N$**WY
QQKPGQPPKL LIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLTIS
SLEPEDFATY YC**QQSX$_{15}$X$_{16}$X$_{17}$PF** **T**FGQGTKLEI K

配列中、X_{12}、X_{13}、X_{14}、X_{15}、X_{16}及びX_{17}は、独立して選択され、
X_{12}は、ＫまたはＲであり；X_{13}は、ＤまたはＳであり；
X_{14}は、ＭまたはＬであり；X_{15}は、ＨまたはＹであり；
X_{16}は、ＥまたはＳであり；X_{17}は、ＤまたはＴである。

【０１４６】

ＭＡＢ－Ａの好ましいヒト化抗ＡＤＡＭ９－ＶＬドメイン：ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（１）

（配列番号５４）、及び、ＭＡＢ－Ａの特定の好ましいヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９－ＶＬドメイン：ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（２）（配列番号５５）、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（３）（配列番号５６）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（４）（配列番号５７）のアミノ酸配列を以下に示す（ＣＤＲ$_L$残基は、１本線を付した状態で示す。ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（１）（配列番号５４）に関する差異を、二重下線で示す）。

ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（１）（配列番号５４）：

【化６１】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISC**KASQSVD YDGDSYMN**WY QQKPGQPPKL
LIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YC**QQSHEDPF**
TFGQGTKLEI K

ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（２）（配列番号５５）：

【化６２】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISC**KASQSVD YSGDSYMN**WY QQKPGQPPKL
LIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YC**QQSHEDPF**
TFGQGTKLEI K

ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（３）（配列番号５６）：

【化６３】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISC**RASQSVD YSGDSYMN**WY QQKPGQPPKL
LIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YC**QQSHEDPF**
TFGQGTKLEI K

ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（４）（配列番号５７）：

【化６４】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISC**RASQSVD YSGDSYLN**WY QQKPGQPPKL
LIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YC**QQSYSTPF**
TFGQGTKLEI K

【０１４７】

したがって、ＭＡＢ－Ａのヒト化、及び／または、最適化した抗ＡＤＡＭ９－ＶＬドメインのＦＲに適したアミノ酸配列は、以下である。

ＦＲ$_L$１ドメイン（配列番号５８）：ＤＩＶＭＴＱＳＰＤＳＬＡＶＳＬＧＥＲＡＴＩＳＣ

ＦＲ$_L$２ドメイン（配列番号５９）：ＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹ

ＦＲ$_L$３ドメイン（配列番号６０）：ＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＥＰＥＤＦＡＴＹＹＣ

ＦＲ$_L$４ドメイン（配列番号６１）：ＦＧＱＧＴＫＬＥＩＫ

【０１４８】

抗ＡＤＡＭ９－ＶＬドメインのＣＤＲ$_L$１ドメインに適した代替的なアミノ酸配列として、以下のものがある。

配列番号１２：ＫＡＳＱＳＶＤＹＤＧＤＳＹＭＮ

配列番号６２：ＫＡＳＱＳＶＤＹＳＧＤＳＹＭＮ

配列番号６３：ＲＡＳＱＳＶＤＹＳＧＤＳＹＭＮ

配列番号６４：ＲＡＳＱＳＶＤＹＳＧＤＳＹＬＮ

【０１４９】

抗ＡＤＡＭ９－ＶＬドメインのＣＤＲ$_L$３ドメインに適した代替的なアミノ酸配列として、以下のものがある。

配列番号１４：ＱＱＳＨＥＤＰＦＴ
配列番号６５：ＱＱＳＹＳＴＰＦＴ

【０１５０】

したがって、本発明は：
（１）以下のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_{L}$１ドメイン：
配列番号６６：Ｘ$_{12}$ＡＳＱＳＶＤＹＸ$_{13}$ＧＤＳＹＸ$_{14}$Ｎ
配列中：Ｘ$_{12}$、Ｘ$_{13}$、Ｘ$_{14}$は、独立して選択され、
配列中：Ｘ$_{12}$は、ＫまたはＲであり；Ｘ$_{13}$は、ＤまたはＳであり；及び、Ｘ$_{14}$は、ＭまたはＬであり；
（２）以下のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_{L}$２ドメイン：
配列番号１３：ＡＡＳＤＬＥＳ
及び
（３）以下のアミノ酸配列を有するＣＤＲ$_{L}$３ドメイン：
配列番号６７：ＱＱＳＸ$_{15}$Ｘ$_{16}$Ｘ$_{17}$ＰＦＴ
配列中：Ｘ$_{15}$、Ｘ$_{16}$，及びＸ$_{17}$は、独立して選択され、
配列中：Ｘ$_{15}$は、ＨまたはＹであり；Ｘ$_{16}$は、ＥまたはＳであり；及び、Ｘ$_{17}$は、ＤまたはＴである、
当該ドメインを含む抗ＡＤＡＭ９抗体ＶＬドメインを含む。

【０１５１】

ＭＡＢ－Ａの誘導体／変異体の例示的なヒト化／最適化したＩｇＧ１軽鎖は、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（２）ドメイン（配列番号５５）を含んでおり、そして、アミノ酸配列（配列番号６８）を含む。

【化６５】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSVD YSGDSYMNWY QQKPGQPPKL
LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQQSHEDPF
TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

【０１５２】

本発明はさらに、明確に、ヒトＡＤＡＭ９ポリペプチドのエピトープに免疫特異的に結合し、上記したＭＡＢ－Ａ　ＣＤＲ$_{H}$１、ＣＤＲ$_{H}$２、ＣＤＲ$_{H}$３、ＣＤＲ$_{L}$１、ＣＤＲ$_{L}$２、または、ＣＤＲ$_{L}$３のいずれかを含む免疫コンジュゲートを意図しており、特に、上記したＭＡＢ－Ａ　ＣＤＲ$_{H}$１の１つ、上記したＭＡＢ－Ａ　ＣＤＲ$_{H}$２の１つ、上記したＭＡＢ－Ａ　ＣＤＲ$_{H}$３の１つ、上記したＭＡＢ－Ａ　ＣＤＲ$_{L}$１の１つ、上記したＭＡＢ－Ａ　ＣＤＲ$_{L}$２の１つ、及び上記したＭＡＢ－Ａ　ＣＤＲ$_{L}$３の１つを含む免疫コンジュゲートを意図している。本発明はさらに、上記したヒト化ＭＡＢ－Ａ　ＦＲ$_{H}$１、ＦＲ$_{H}$２、ＦＲ$_{H}$３、または、ＦＲ$_{H}$４、ＦＲ$_{L}$１、ＦＲ$_{L}$２、ＦＲ$_{L}$３、または、ＦＲ$_{L}$４のいずれかを含む免疫コンジュゲートを意図しており、特に、ＦＲ$_{H}$１、ＦＲ$_{H}$２、ＦＲ$_{H}$３、及び、ＦＲ$_{H}$４を含み、及び／または、ＦＲ$_{L}$１、ＦＲ$_{L}$２、ＦＲ$_{L}$３、ＦＲ$_{L}$４、及び、ＦＲ$_{H}$１を含む免疫コンジュゲートを意図している。

【０１５３】

一部の実施形態では、ヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、
（ａ）それぞれ、配列番号８、３５及び１０、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｂ）それぞれ、配列番号８、３５及び１０、及び、配列番号６３、１３、１４；
（ｃ）それぞれ、配列番号８、３６及び１０、及び、配列番号６３、１３、１４；
（ｄ）それぞれ、配列番号３４、３６及び１０、及び、配列番号６４、１３、６５；
（ｅ）それぞれ、配列番号８、３５及び３７、及び、配列番号６２、１３、１４；

（ｆ）それぞれ、配列番号８、３５及び３８、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｇ）それぞれ、配列番号８、３５及び３９、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｈ）それぞれ、配列番号８、３５及び４０、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｉ）それぞれ、配列番号８、３５及び４１、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｊ）それぞれ、配列番号８、３５及び４２、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｋ）それぞれ、配列番号８、３５及び４３、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｌ）それぞれ、配列番号８、３５及び４４、及び、配列番号６２、１３、１４；
（ｍ）それぞれ、配列番号８、３５及び４５、及び、配列番号６２、１３、１４；及び
（ｎ）それぞれ、配列番号８、３５及び４６、及び、配列番号６２、１３、１４、からなる群から選択される配列を有する、CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインと、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインとを含む。

【０１５４】

特定の実施形態では、ヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、それぞれ、配列番号８、３５及び４５、及び、配列番号６２、１３、１４の配列を有するCDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインと、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインとを含む。

【０１５５】

一部の実施形態では、ヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、

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

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

【０１５６】

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

【０１５７】

配列同一性は、典型的には、配列分析ソフトウェア（例えば、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｅｎｔｅｒ、１７１０ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ａｖｅｎ

ｕｅ、Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．５３７０５、ＢＬＡＳＴ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＧＡＰ、またはＰＩＬＥＵＰ／ＰＲＥＴＴＹＢＯＸプログラム）を用いて測定する。このようなソフトウェアは、様々な置換、欠失、及び／または、その他の改変に対するホモロジーの程度をアサインすることで、同一または類似の配列をマッチングする。保存的置換は、典型的には、次の群：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；及び、フェニルアラニン、チロシンでの置換を含む。同一性の程度を決定するための例示的な手法では、ＢＬＡＳＴプログラムを使用してもよく、ｅ$^{-3}$～ｅ$^{-100}$までの確率スコアは、密接に関連する配列を示す。

【０１５８】

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

【０１５９】

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

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

【０１６０】

特定の実施形態では、ヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９抗体は、配列番号５２の配列を有する重鎖と、配列番号６８の配列を有する軽鎖とを含む。その他の特定の実施形態では、ヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９抗体は、配列番号１４２の配列を有する重鎖と、配列番号６８の配列を有する軽鎖とを含む。その他の実施形態では、ヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９抗体は、血清半減期が延びるように操作しており、かつ、配列番号１５１の配列を有する重鎖と、配列番号６８の配列を有する軽鎖とを含む。その他の特定の実施形態では、ヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９抗体は、血清半減期が延びるように操作しており、かつ、配列番号１５５の配列を有する重鎖と、配列番号６８の配列を有する軽鎖とを含む。その他の特定の実施形態では、ヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９抗体は、血清半減期が延びるように操作しており、また、部位特異的な結合をするように操作しており、かつ、配列番号１５２の配列を有する重鎖と、配列番号６８の配列を有する軽鎖とを含む。その他の特定の実施形態では、ヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９抗体は、血清半減期が延びるように操作しており、また、部位特異的な結合をするように操作しており、かつ、配列番号１５６の配列を有する重鎖と、配列番号６８の配列を有する軽鎖とを含む。

【０１６１】

本発明は、ヒトＡＤＡＭ９ポリペプチドのエピトープに対して明確に免疫特異的に結合する、上記したヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９　ＭＡＢ－Ａ　ＶＬドメイン、または、ＶＨドメインのいずれかを含む免疫コンジュゲートも意図している。本発明は、特に、ヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９　ＶＬドメイン、または、ＶＨドメインの以下の組み合わせを含む、このような抗ＡＤＡＭ９抗体、及び、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントを意図している。

【表３－１】

hMAB－A VH／hMAB－A VLの組み合わせ	
hMAB－A VH（1）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（1）／hMAB－A VL（2）	hMAB－A VH（2D）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（2D）／hMAB－A VL（2）
hMAB－A VH（1）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（1）／hMAB－A VL（4）	hMAB－A VH（2D）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（2D）／hMAB－A VL（4）
hMAB－A VH（2）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（2）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（2）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（2）／hMAB－A VL（4）	hMAB－A VH（2E）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（2E）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（2E）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（2E）／hMAB－A VL（4）
hMAB－A VH（3）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（3）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（3）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（3）／hMAB－A VL（4）	hMAB－A VH（2F）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（2F）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（2F）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（2F）／hMAB－A VL（4）
hMAB－A VH（4）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（4）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（4）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（4）／hMAB－A VL（4）	hMAB－A VH（2G）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（2G）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（2G）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（2G）／hMAB－A VL（4）
hMAB－A VH（2A）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（2A）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（2A）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（2A）／hMAB－A VL（4）	hMAB－A VH（2H）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（2H）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（2H）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（2H）／hMAB－A VL（4）

【表３－２】

hMAB－A VH（2B）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（2B）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（2B）／hMAB－A VL（3）	hMAB－A VH（2I）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（2I）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（2I）／hMAB－A VL（3）
hMAB－A VH（2B）／hMAB－A VL（4）	hMAB－A VH（2I）／hMAB－A VL（4）
hMAB－A VH（2C）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（2C）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（2C）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（2C）／hMAB－A VL（4）	hMAB－A VH（2J）／hMAB－A VL（1） hMAB－A VH（2J）／hMAB－A VL（2） hMAB－A VH（2J）／hMAB－A VL（3） hMAB－A VH（2J）／hMAB－A VL（4）

【０１６２】

本発明は、具体的には、上記したヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９－ＶＬ、及び／または、ＶＨドメインを含む免疫コンジュゲートを含む。特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、（ｉ）上記したヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９－ＶＬ、及び／または、ＶＨドメインと、（ｉｉ）Ｆｃ領域とを含む。

【０１６３】

抗ＡＤＡＭ９　ＶＨドメイン、及び、ＶＬドメインに対する具体的な改変は、前述した通りであり、図３Ａ～３Ｂで比較されているが、本発明のヒト化、及び／または、最適化した抗ＡＤＡＭ９－ＶＨドメイン、または、ＶＬドメインを操作する際に、これらの残基のすべて、または、大部分を改変する必要はない。本発明はまた、例えば、サブクローニングを容易にするために導入し得るＣ末端、及び／または、Ｎ末端のアミノ酸残基のアミノ酸置換を含め、これらのＶＨ配列及びＶＬ配列の微細な変化も含む。

【０１６４】

ＩＩＩ．抗体薬物コンジュゲート

定義

本明細書で使用する用語「免疫コンジュゲート」、「コンジュゲート」、または、「ＡＤＣ」とは、細胞結合剤（例えば、本明細書に記載した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメント）に対して結合する、または、同細胞結合剤に対してコンジュケートする本明細書に記載したメイタンシノイド化合物のことを指す。

【０１６５】

「リンカー」は、本明細書に記載したメイタンシノイド化合物を、細胞結合剤、例えば、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントに対して、安定な共有結合様式で結合することが可能なあらゆる化学部分である。リンカーは、化合物または抗体が活性なままの状態で、酸によって誘発される開裂、光によって誘発される開裂、ペプチダーゼによって誘発される開裂、エステラーゼによって誘発される開裂、及び、ジスルフィド結合開裂を受けやすく、または、実質的に耐性なものとし得る。適切なリンカーは、当該技術分野で周知であり、例えば、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸に不安定な基、光に不安定な基、ペプチダーゼに不安定な基、及び、エステラーゼに不安定な基がある。リンカーはまた、本明細書に記載され、かつ、当該技術分野で公知である帯電したリンカーと、その親水性形態をも含む。

【０１６６】
本明細書で使用する「アルキル」とは、１～２０個の炭素原子を含む飽和の直鎖、または、分枝鎖の一価炭化水素基のことを指す。アルキルの例として、メチル、エチル、１－プロピル、２－プロピル、１－ブチル、２－メチル－１－プロピル、－ＣＨ$_2$ＣＨ（ＣＨ$_3$）$_2$）、２－ブチル、２－メチル－２－プロピル、１－ペンチル、２－ペンチル、３－ペンチル、２－メチル－２－ブチル、３－メチル－２－ブチル、３－メチル－１－ブチル、２－メチル－１－ブチル、１－ヘキシル）、２－ヘキシル、３－ヘキシル、２－メチル－２－ペンチル、３－メチル－２－ペンチル、４－メチル－２－ペンチル、３－メチル－３－ペンチル、２－メチル－３－ペンチル、２，３－ジメチル－２－ブチル、３，３－ジメチル－２－ブチル、１－ヘプチル、１－オクチルなどがあるが、これらに限定されない。好ましくは、アルキルは、１～１０個の炭素原子を含む。より好ましくは、アルキルは、１～４個の炭素原子を含む。
【０１６７】
ある基の炭素原子数は、本明細書では接頭語「Ｃ$_{x-xx}$」で記載することがあり、式中、ｘ及びｘｘは、整数である。例えば、「Ｃ$_{1-4}$アルキル」は、１～４個の炭素原子を含むアルキル基である。
【０１６８】
用語「化合物」または「細胞傷害性化合物」または「細胞傷害性薬」は、互換可能に使用する。これらは、その構造または式、または、そのいずれかの誘導体を、本発明において開示しており、または、この構造または式、または、そのいずれかの誘導体を、本明細書の一部を構成するものとして援用している化合物を含むことを意図している。この用語は、本発明に開示しているすべての式の化合物の立体異性体、幾何異性体、互変異性体、溶媒和物、代謝物、及び、塩（例えば、医薬として許容可能な塩）も含む。この用語は、あらゆる溶媒和物、水和物、及び、上記したいずれかの多型も含む。本出願で記載した本発明の特定の態様では、「立体異性体」、「幾何異性体」、「互変異性体」、「溶媒和物」、「代謝物」、「塩」、「コンジュゲート」、「コンジュゲート塩」、「溶媒和物」、「水和物」、または、「多型」を具体的に引用することは、「化合物」の用語を、これらのその他の形態を引用せずに使用している本発明のその他の態様において、これらの形態を除外することを意図している、ものと解釈すべきではない。
【０１６９】
用語「キラル」とは、鏡像体の相手と重ね合わせることができない、という性質を有する分子のことを指し、一方で、用語「アキラル」とは、鏡像体の相手と重ね合わせることができる分子のことを指す。
【０１７０】
用語「立体異性体」とは、同一の化学構成、及び、接続を有するが、空間中の原子向きが異なり、単結合を中心に回転させることで相互に変換することができない化合物のことを指す。
【０１７１】
「ジアステレオマー」とは、２つ以上のキラリティ中心を有する立体異性体であって、これらの分子が互いに鏡像体ではないものを指す。ジアステレオマーは、例えば、融点、沸点、分光特性、及び、反応性などの異なる物理特性を有する。ジアステレオマー混合物は、結晶化、電気泳動、及び、クロマトグラフィーなどの高解像度分析手段の下で分離することができる。
【０１７２】
「エナンチオマー」は、互いに重ね合わせることができない鏡像体である、化合物の２つの立体異性体のことを指す。
【０１７３】
本明細書で使用する立体化学の定義及び規則は、一般的に、Ｓ．Ｐ．Ｐａｒｋｅｒ，Ｅｄ．，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｒｍｓ （１９８４） ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ Ｂｏｏｋ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ

York、及び、Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994に従う。本発明の化合物は、非対称中心またはキラル中心を含むことができ、そのため、異なる立体異性体形態で存在する。本発明の化合物のすべての立体異性体形態は、ジアステレオマー、エナンチオマー、及び、アトロプ異性体、及び、ラセミ体混合物など、これらに限定されるものでなく、これらの混合物を含め、本発明の一部を形成することを意図している。数多くの有機化合物は、光学的に活性な形態で存在しており、すなわち、平面偏光の面を回転させる能力を有する。光学活性化合物を説明する際に、D及びL、または、R及びSの添え字は、キラル中心（複数可）の周りの分子の絶対配置を示すために用いている。d及びI、または、（＋）及び（－）などの添え字は、化合物による面偏光の回転の徴候を示すために使用しており、（－）またはlは、その化合物が左旋性であることを意味している。（＋）またはdという添え字が付けられた化合物は、右旋性である。所与の化学構造について、これらの立体異性体は、互いに鏡像体であることを除けば、同じである。特定の立体異性体は、エナンチオマーと称することもあり、このような異性体の混合物は、多くは、エナンチオマー混合物と称する。エナンチオマーの５０：５０混合物は、ラセミ体混合物、または、ラセミ体と呼ばれており、化学反応またはプロセスで、立体選択性または立体特異性がない場合に起こり得る。用語「ラセミ体混合物」及び「ラセミ体」とは、２つのエナンチオマー種の等モル混合物のことを指し、光学活性がない。

【０１７４】

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

【０１７５】

用語「カチオン」とは、正電荷を有するイオンのことを指す。カチオンは、一価（例えば、Na^{+}、K^{+}、NH_4^{+}など）、二価（例えば、Ca^{2+}、Mg^{2+}など）、または、多価（例えば、Al^{3+}など）とすることができる。好ましくは、カチオンは、一価である。

【０１７６】

本明細書で使用する句「医薬として許容可能な塩」とは、本発明の化合物の医薬として許容可能な有機または無機の塩のことを指す。例示的な塩として、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチジン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカリン酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩「メシレート」、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩、パモ酸塩（すなわち、１，１’－メチレン－ビス－（２－ヒドロキシ－３－ナフトエート））塩、アルカリ金属（例えば、ナトリウム、及び、カリウム）塩、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）塩、及び、アンモニウム塩があるが、これらに限定されない。医薬として許容可能な塩は、酢酸イオン、コハク酸イオン、または、その他の対イオンなどの別の分子を含むことができる。対イオンは、親化合物上の電荷を安定化するあらゆる有機部分または無機部分とすることができる。さらに、医薬として許容可能な塩は、その構造に２個以上の帯電した原子を含むことができる。複数の帯電した原子が、医薬として許容可能な塩の一部である場合は、複数の対イオンを含むことができる。したがって、医薬として許容可能な塩は、１つ以上の帯電した原子、及び／または、１つ以上の対イオンを含むことができる。

【０１７７】

本発明の化合物が塩基である場合、医薬として許容可能な所望の塩は、当該技術分野で利用可能なあらゆる適切な方法、例えば、無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、メタンスルホン酸、リン酸などを用いた遊離塩基の処理、または、有機酸、例えば、酢酸、マレイン酸、コハク酸、マンデル酸、フマル酸、マロン酸、ピルビン酸、シュウ酸、グリコール酸、サリチル酸、ピラノシド酸、例えば、グルクロン酸、または、ガラクツロン酸、アルファヒドロキシ酸、例えば、クエン酸、または、酒石酸、アミノ酸、例えば、アスパラギン酸、または、グルタミン酸、芳香族酸、例えば、安息香酸、または、ケイ皮酸、スルホン酸、例えば、ｐ－トルエンスルホン酸、または、エタンスルホン酸などを用いた処理によって調製することができる。

【０１７８】

本発明の化合物が酸である場合、医薬として許容可能な所望の塩は、あらゆる適切な方法、例えば、無機または有機の塩基、例えば、アミン（一級、二級または三級）、アルカリ金属水酸化物、または、アルカリ土類金属水酸化物などを用いた遊離酸の処理によって調製することができる。適切な塩の具体例としては、アミノ酸、例えば、グリシン、及び、アルギニン、アンモニア、一級、二級、及び、三級アミン、及び、環状アミン、例えば、ピペリジン、モルホリン、及び、ピペラジンから誘導される有機塩、ナトリウム、カルシウム、カリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛、アルミニウム、及び、リチウムから誘導される無機塩があるが、これらに限定されない。

【０１７９】

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

【０１８０】

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

【０１８１】

句「医薬として許容可能な」は、物質または組成物が、その他の成分を含む製剤、及び／または、これを用いて治療する哺乳動物と、化学的、及び／または、毒性的に適合性でなければならないことを示す。

【０１８２】

用語「保護基」または「保護部分」は、化合物、その誘導体、または、そのコンジュゲートのその他の官能基を反応させつつ、特定の機能をブロックするか、または、保護するために一般的に使用される置換基のことを指す。例えば、「アミン保護基」または「アミノ保護部分」は、アミノ基に接続して、化合物のアミノ官能性をブロックする、または、保護する置換基である。このような基は、当該技術分野で周知であり（例えば、Ｐ．Ｗｕｔｓ ａｎｄ Ｔ．Ｇｒｅｅｎｅ，２００７，Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｃｈａｐｔｅｒ ７，Ｊ．Ｗｉｌｅ

ｙ　＆　Ｓｏｎｓ，　ＮＪを参照されたい）、カルバミン酸メチル、及び、カルバミン酸エチル、ＦＭＯＣ、置換カルバミン酸エチル、１，６－β脱離によって開裂するカルバメートなどのカルバメート（「自己犠牲型」とも呼ばれる）、尿素、アミド、ペプチド、アルキル誘導体、及び、アリール誘導体が例示できる。適切なアミノ保護基として、アセチル、トリフルオロアセチル、ｔ－ブトキシカルボニル（ＢＯＣ）、ベンジルオキシカルボニル（ＣＢＺ）、及び、９－フルオレニルメチレンオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）がある。保護基、及び、その使用の一般的な記載については、Ｐ．Ｇ．Ｍ．Ｗｕｔｓ　＆　Ｔ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅ、Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ　Ｇｒｏｕｐｓ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、２００７を参照されたい。

【０１８３】

用語「アミノ酸」とは、天然に存在するアミノ酸、または、天然に存在しないアミノ酸のことを指す。ある実施形態では、アミノ酸は、NH_2－Ｃ（$R^{aa'}$ R^{aa}）－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨによって表され、式中、R^{aa}及び$R^{aa'}$は、それぞれ、独立して、Ｈ、任意に置換した、１～１０個の炭素原子を含む直鎖、分枝鎖、または、環状のアルキル、アルケニル、または、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、または、ヘテロシクリルであり、または、R^{aa}及びＮ末端窒素原子が互いに結合してヘテロ環式環（例えば、プロリンのような）を形成することができる。用語「アミノ酸残基」とは、１個の水素原子を、アミノ酸のアミン末端から除去したとき、及び／または、水酸基を、アミノ酸のカルボキシ末端から除去したときに出現する残基、例えば、－ＮＨ－Ｃ（$R^{aa'}$ R^{aa}）－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－のことを指す。アルファ炭素の特定の立体化学を示さずに、アミノ酸、または、アミノ酸残基に言及する場合は、Ｌ－及びＲ－異性体の両方を含むことを意味する。例えば、「Ａｌａ」は、Ｌ－アラニンとＲ－アラニンの両方を含む。

【０１８４】

用語「ペプチド」は、ペプチド（アミド）結合によって結合したアミノ酸モノマーの短鎖のことを指す。一部の実施形態では、ペプチドは、２～２０個のアミノ酸残基を含有する。その他の実施形態では、ペプチドは、２～１０個のアミノ酸残基を含有する。さらにその他の実施形態では、ペプチドは、２～５個のアミノ酸残基を含有する。本明細書で使用する場合、あるペプチドが、アミノ酸の特定の配列によって表される本明細書に記載した細胞傷害性薬またはリンカーの一部である場合、そのペプチドは、両方向で、細胞傷害性薬またはリンカーの残余の部分に結合することができる。例えば、ジペプチドＸ１－Ｘ２は、Ｘ１－Ｘ２、及び、Ｘ２－Ｘ１を含む。同様に、トリペプチドＸ１－Ｘ２－Ｘ３は、Ｘ１－Ｘ２－Ｘ３、及び、Ｘ３－Ｘ２－Ｘ１を含み、テトラペプチドＸ１－Ｘ２－Ｘ３－Ｘ４は、Ｘ１－Ｘ２－Ｘ３－Ｘ４、及び、Ｘ４－Ｘ２－Ｘ３－Ｘ１を含む。Ｘ１、Ｘ２、Ｘ３、及び、Ｘ４は、アミノ酸残基を表す。ペプチド、または、ペプチド残基を、それぞれのアミノ酸、または、アミノ酸残基の立体化学を示さずに言及している場合、Ｌ－及びＲ－異性体の両方を含むことを意味する。しかしながら、ペプチドまたはペプチド残基中の１つ以上のアミノ酸またはアミノ酸残基の立体化学が、Ｄ－異性体として指定している場合は、特定の立体化学を持たないペプチドまたはペプチド残基でのその他のアミノ酸またはアミノ酸残基は、天然のＬ－異性体だけを含む、ことを意味する。例えば、「Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ」は、ペプチドまたはペプチド残基を含むことを意味しており、Ａｌａの各々は、Ｌ－またはＲ－異性体のいずれかとすることができ；その一方で、「Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ」は、Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａを含むことを意味する。

【０１８５】

用語「反応性エステル基」は、アミン基と容易に反応してアミド結合を形成し得るエステル基のことを指す。例示的な反応性エステル基として、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、Ｎ－ヒドロキシフタルイミドエステル、Ｎ－ヒドロキシスルホ－スクシンイミドエステル、パラ－ニトロフェニルエステル、ジニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、及び、これらの誘導体があるが、これらに限定されることはなく、

当該誘導体は、アミド結合の生成を容易にする。特定の実施形態では、反応性エステル基は、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、または、Ｎ－ヒドロキシスルホ－スクシンイミドエステルである。

【０１８６】

用語「アミン反応性基」とは、アミン基と反応して共有結合を形成し得る基のことを指す。例示的なアミン反応性基として、反応性エステル基、ハロゲン化アシル、ハロゲン化スルホニル、イミドエステル、または、反応性チオエステル基があるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、アミン反応性基は、反応性エステル基である。ある実施形態では、アミン反応性基は、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、または、Ｎ－ヒドロキシスルホ－スクシンイミドエステルである。

【０１８７】

用語「チオール反応性基」とは、チオール（－ＳＨ）基と反応して共有結合を形成し得る基のことを指す。例示的なチオール反応性基として、マレイミド、ハロアセチル、アロアセタミド、ビニルスルホン、ビニルスルホンアミド、または、ビニラールピリジンがあるが、これらに限定されない。ある実施形態では、チオール反応性基は、マレイミドである。

【０１８８】

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

【０１８９】

言語「～を含む」を用いて実施形態を本明細書で記載している場合、「～からなる」及び／または「～から本質的になる」という観点で記載しているその他の類似の実施形態も付与しているものと理解する。

【０１９０】

Ａ．例示的な免疫コンジュゲート

本発明のメイタンシノイド化合物は、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントに直接的に連結または結合し得るものであり、または、間接的に、当該技術分野で公知の技術を用いて、リンカーを介して連結または結合して、「免疫コンジュゲート」、「コンジュゲート」、または、「ＡＤＣ」を生成し得る。

【０１９１】

第１の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメント上に位置する１つ以上のリシン残基のε－アミノ基を介して、または、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメント上に位置する１つ以上のシステイン残基のチオール基を介して、本明細書に記載したメイタンシノイド化合物に共有結合する、本明細書に記載した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントを含む。

【０１９２】

第１の実施形態の第１の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、上記した式（Ｉ）によって表されており、式中、R^{x}、R^{y}、$R^{x'}$、及び、$R^{y'}$は、すべてＨである；及び、ｌ及びｋは、それぞれ、独立して、２～６の整数である；及び、残余の変数は、式（Ｉ）に関して上記した通りである。

【０１９３】

第１の実施形態の第２の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、上記した式（Ｉ）によって表されており、式中、Ａは、２～５個のアミノ酸残基を含むペプチドである；及び、残余の変数は、式（Ｉ）、または、第１の実施形態に関して上記した通りである。一部の実施形態では、Ａは、プロテアーゼによって切断可能なペプチドである。一部の実施形態では、プロテアーゼによって切断可能なペプチドは、腫瘍組織において発現する。一部の実施形態では、Ａは、それぞれが、独立して、ＬまたはＤ異性体である、Ａｌａ、Ａｒｇ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｃｉｔ、Ｃｙｓ、セリノ－Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｇｌｕ、

Ｇｌｙ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、及び、Ｖａｌからなる群から選択する－ＮＨ－ＣＲ^{1}Ｒ^{2}－Ｓ－Ｌ$_{1}$－Ｄと共有結合しているアミノ酸を有するペプチドである。一部の実施形態では、－ＮＨ－ＣＲ^{1}Ｒ^{2}－Ｓ－Ｌ$_{1}$－Ｄに接続したアミノ酸は、Ｌアミノ酸である。

【０１９４】

第１の実施形態の第３の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、上記した式（Ｉ）によって表されており、式中、Ａは、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ａｌａ－Ｖａｌ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｙｓ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｌａ、Ｐｈｅ－Ｎ９－トシル－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｎ９－ニトロ－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｉｌｅ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、Ｖａｌ－Ａｌａ－Ｖａｌ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号１４４）、β－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号１４５）、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ（配列番号１４６）、Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ａｒｇ－Ａｒｇ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｃｉｔ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ｌｙｓ、Ｄ－Ｖａｌ－Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ａｒｇ－Ｄ－Ａｒｇ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｍｅｔ、Ｇｌｎ－Ｖａｌ、Ａｓｎ－Ａｌａ、Ｇｌｎ－Ｐｈｅ、Ｇｌｎ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、及び、Ｄ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙからなる群から選択し、それぞれのペプチドの最初のアミノ酸を、Ｌ２基に基対して接続し、かつ、それぞれの各ペプチドの最後のアミノ酸を、－ＮＨ－ＣＲ１Ｒ２－Ｓ－Ｌ１－Ｄに対して接続する；及び、残余の変数は、式（Ｉ）、または、第１の特定の実施形態に関して上記した通りである。

【０１９５】

第１の実施形態の第４の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、上記した式（Ｉ）によって表されており、式中、Ｒ^{1}、及び、Ｒ^{2}は、すべてＨである；及び、残余の変数は、式（Ｉ）、または、第１、第２、または、第３の特定の実施形態に関して上記した通りである。

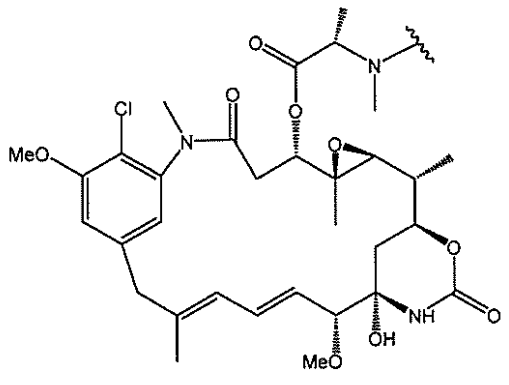
【０１９６】

第１の実施形態の第５の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、上記した式（Ｉ）によって表されており、式中、Ｌ$_{1}$は、－（ＣＨ$_{2}$）$_{4-6}$－Ｃ（＝Ｏ）－である；及び、残余の変数は、式（Ｉ）、または、第１、第２、第３、または、第４の特定の実施形態に関して上記した通りである。

【０１９７】

第１の実施形態の第６の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、上記した式（Ｉ）によって表されており、式中、Ｄは、次の式：

【化６６】



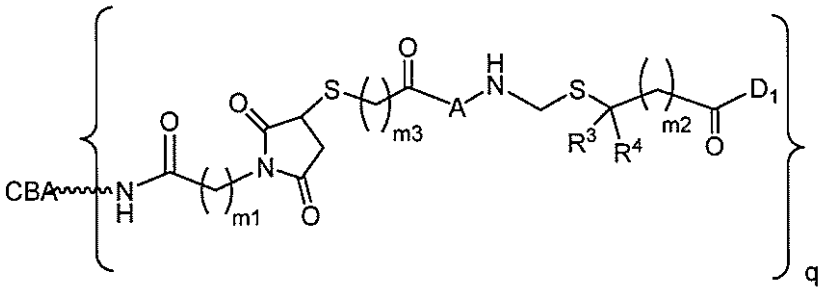
；

で表される；及び、残余の変数は、式（Ｉ）、または、第１、第２、第３、第４、または、第５の特定の実施形態に関して上記した通りである。

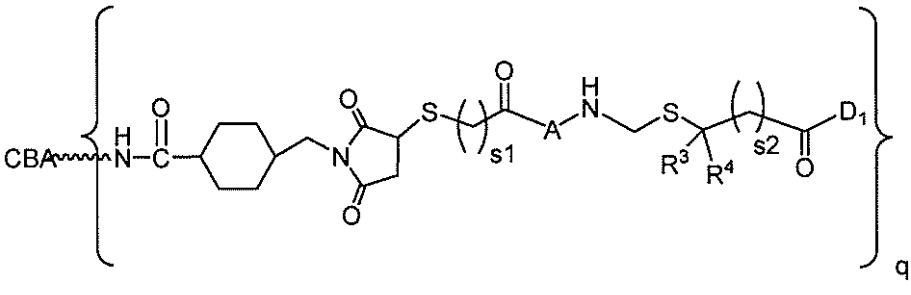
【０１９８】

第７の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、次の式：

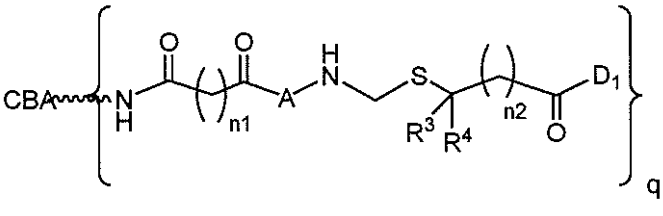
【化６７】



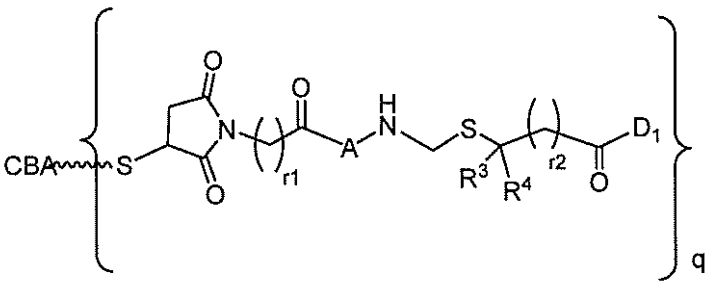
(Ia);



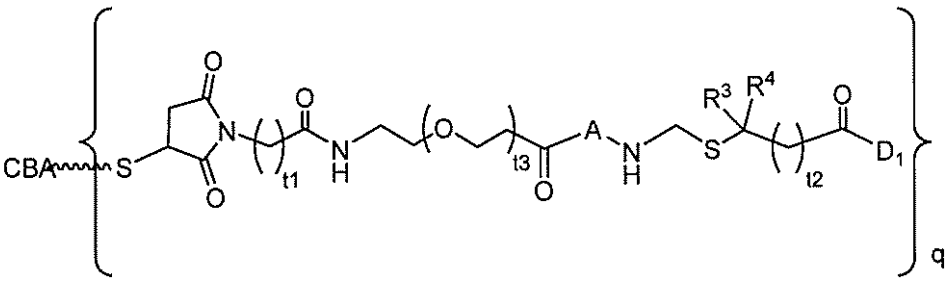
(Ib);



(Ic);



(Id); または



(Ie);

で表されるもの、または、医薬として許容可能なその塩であって、式中：

【化６８】

は、Ｌｙｓアミン基を介して、Ｌ$_2$基に対して接続した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；

【化６９】

CBA～S—

は、Ｃｙｓチオール基を介して、Ｌ$_2$基に対して接続した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；

Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、それぞれ、独立して、ＨまたはＭｅである；

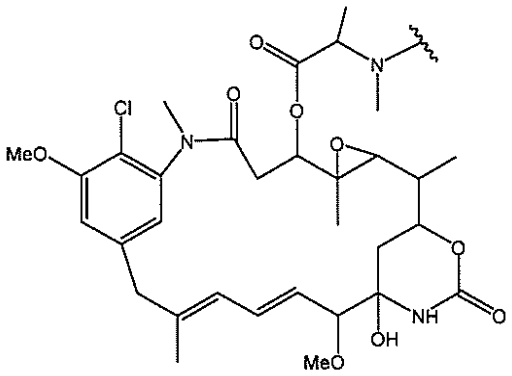
ｍ１、ｍ３、ｎ１、ｒ１、ｓ１、及び、ｔ１は、それぞれ、独立して、１～６の整数である；

ｍ２、ｎ２、ｒ２、ｓ２、及び、ｔ２は、それぞれ、独立して、１～７の整数である；

ｔ３は、１～１２の整数である；

Ｄ$_1$は、次の式：

【化７０】

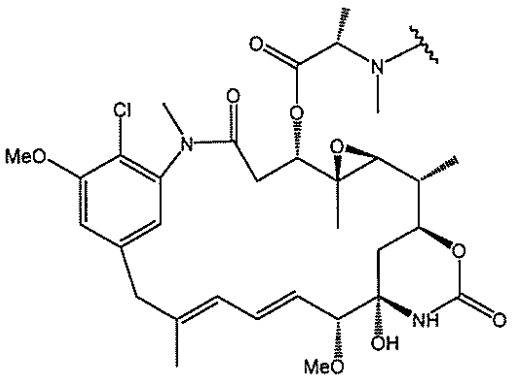


；

で表される、及び

ｑは、１～２０の整数である。さらに特定の実施形態では、Ｄ$_1$は、次の式：

【化７１】

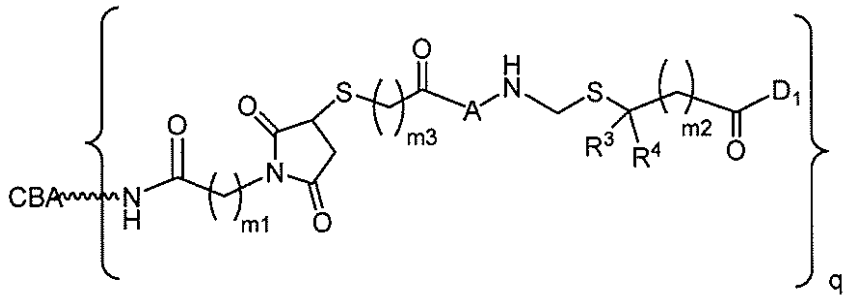


で表される。

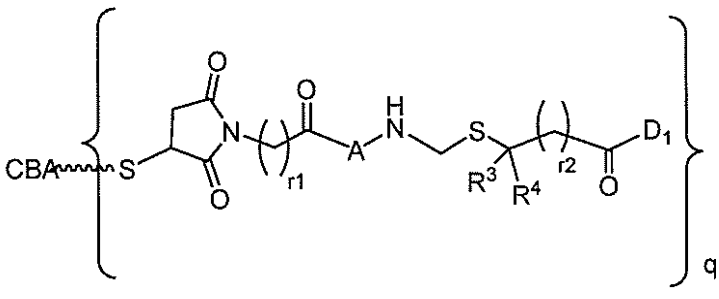
【０１９９】

第８の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、次の式：

【化７２】



(Ia)，または



(Id);

で表されるものであり、

式中：

ｍ１及びｍ３は、それぞれ、独立して、２～４の整数である；

ｍ２は、２～５の整数である；

ｒ１は、２～６の整数である；

ｒ２は、２～５の整数である；及び

残余の変数は、第７の特定の実施形態に関して説明した通りである。

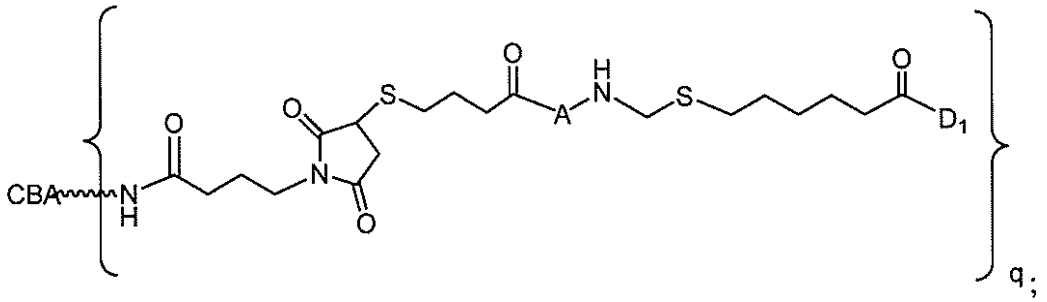
【０２００】

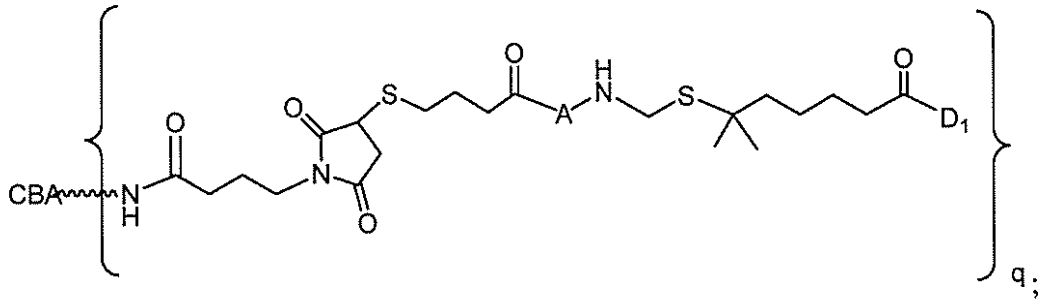
第７または第８の特定の実施形態で説明した免疫コンジュゲートに関する第９の特定の実施形態では、Ａは、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、または、Ｄ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙである。第７または第８の特定の実施形態で説明した免疫コンジュゲートに関するさらなる特定の実施形態では、Ａは、Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａである。

【０２０１】

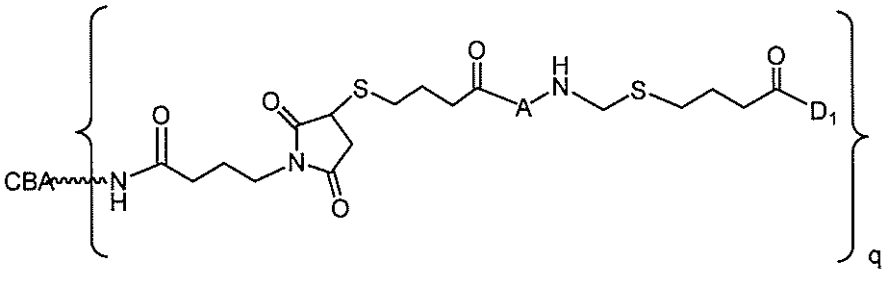
第１０の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、次の式：

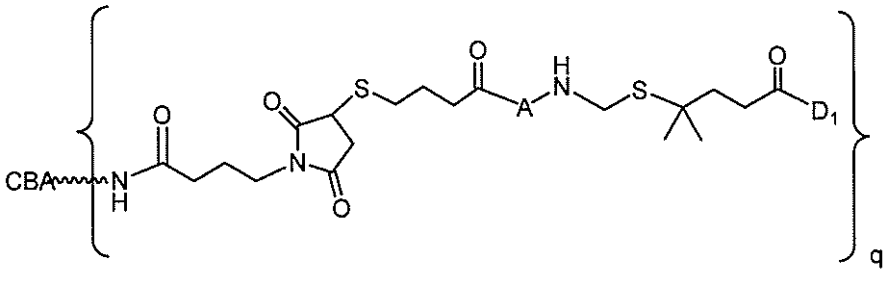
【化７３】

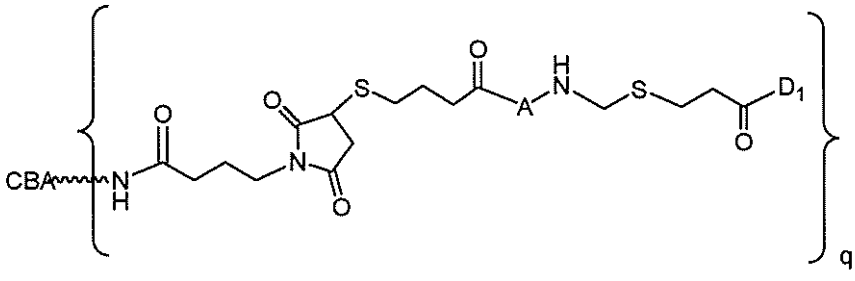


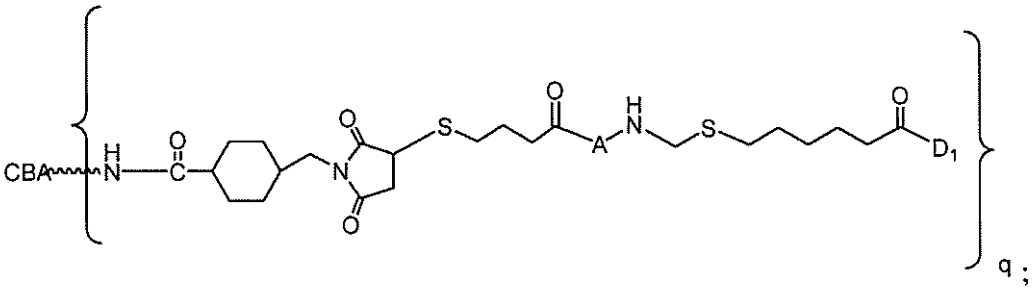


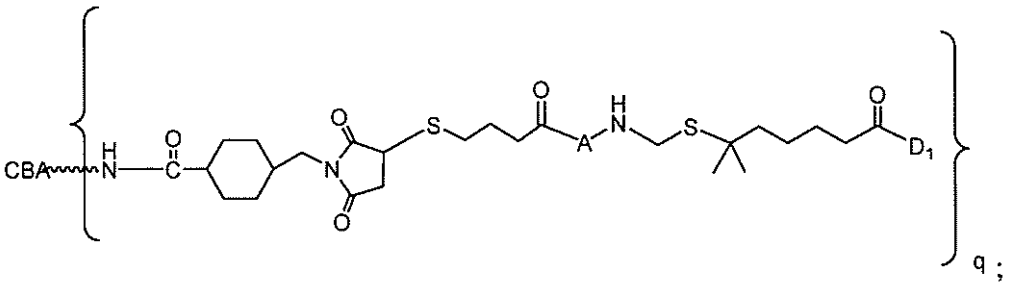
【化７４】



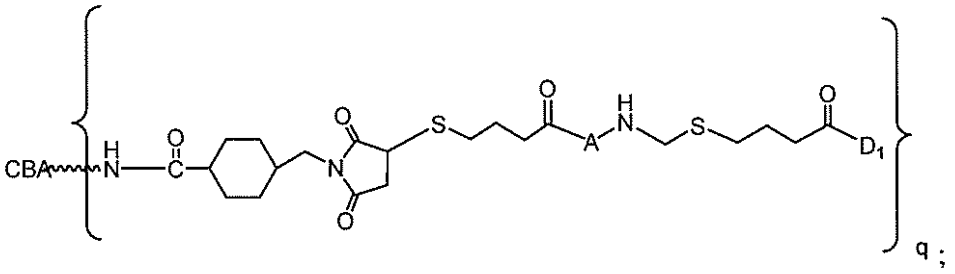




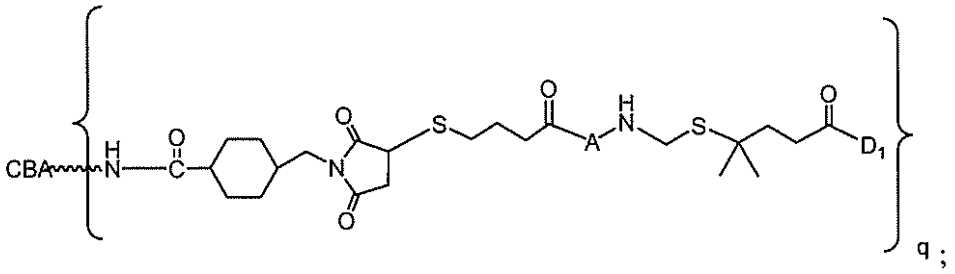




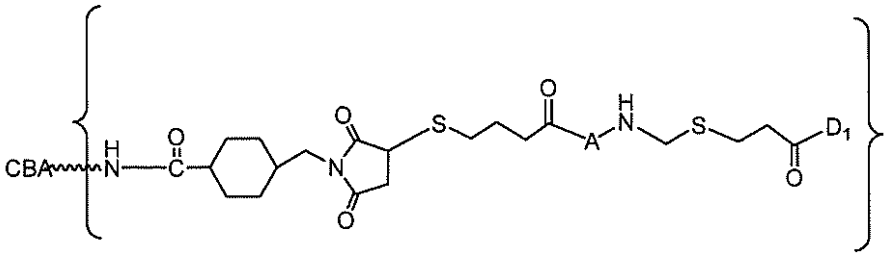
【化７５】



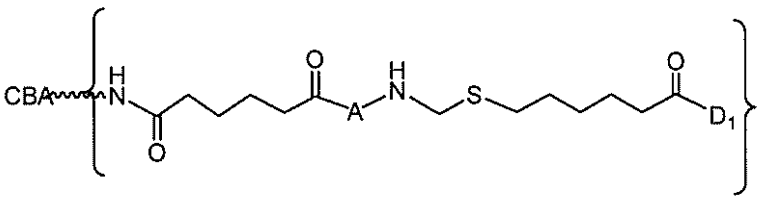
q ;



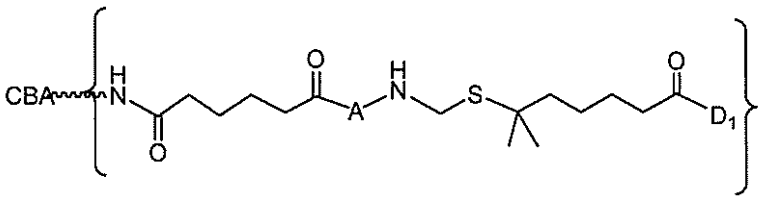
q ;



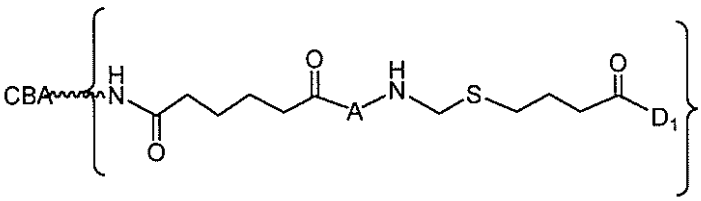
q ;



q ;

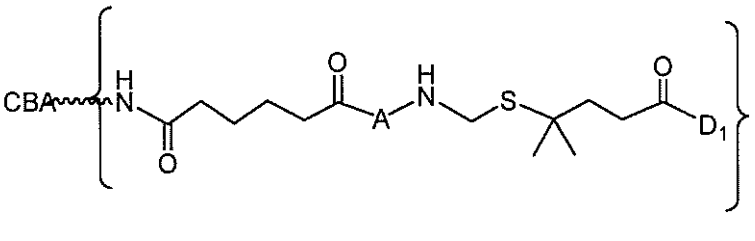


q ;

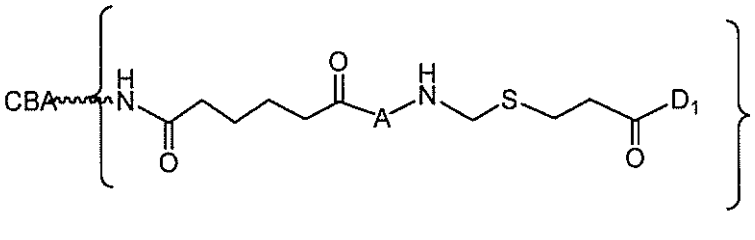


q ;

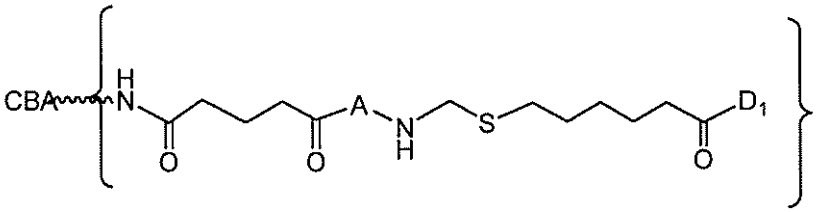
【化７６】


CBA
H
N
O
O
A
H
N
S
O
D1

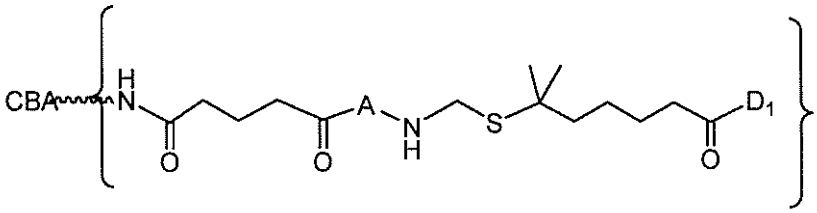
q;


CBA
H
N
O
O
A
H
N
S
O
D1

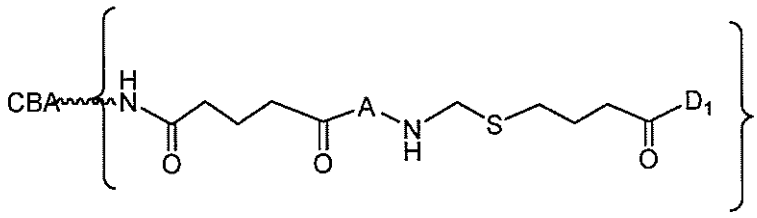
q;


CBA
H
N
O
O
A
N
H
S
O
D1

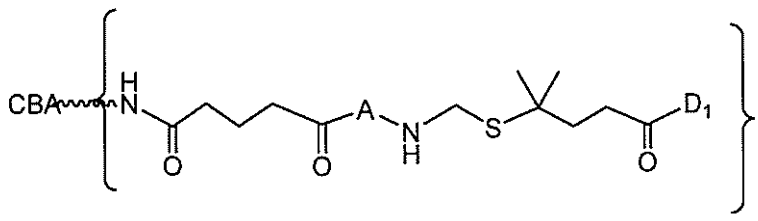
q;


CBA
H
N
O
O
A
N
H
S
O
D1

q;

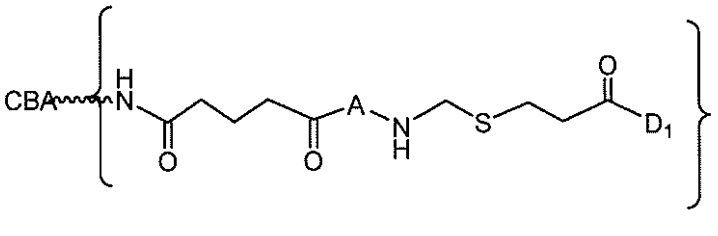

CBA
H
N
O
O
A
N
H
S
O
D1

q;

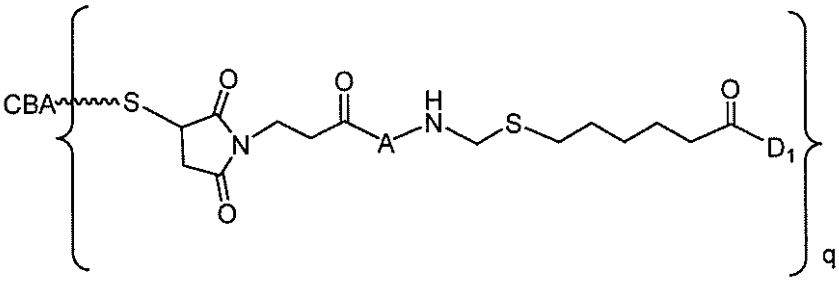

CBA
H
N
O
O
A
N
H
S
O
D1

q;

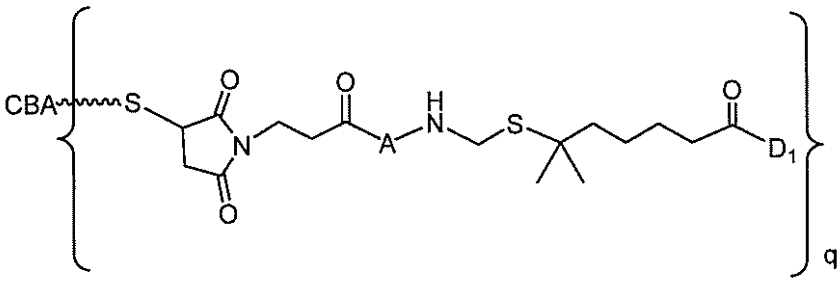
【化７７】


CBA
H
N
O
O
A
N
H
S
O
D1
q

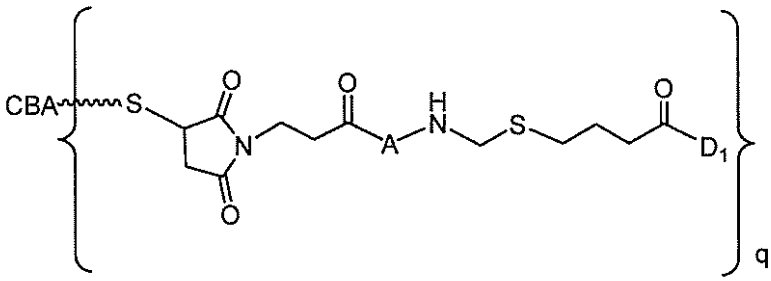
;


CBA
S
O
O
N
O
A
H
N
S
O
D1
q

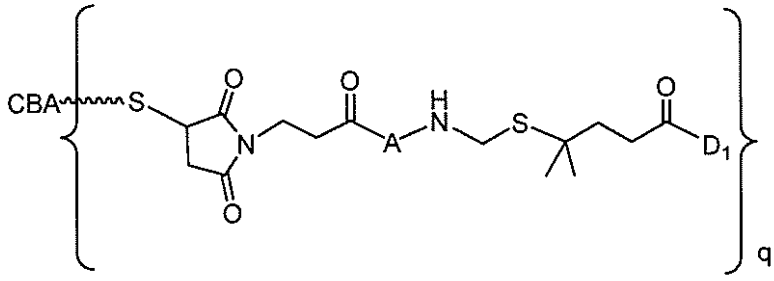
;


CBA
S
O
O
N
O
A
H
N
S
O
D1
q

;

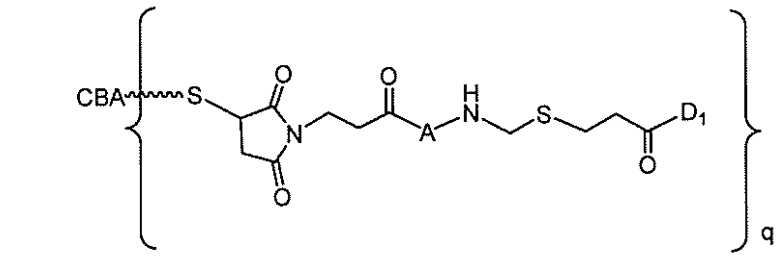

CBA
S
O
O
N
O
A
H
N
S
O
D1
q

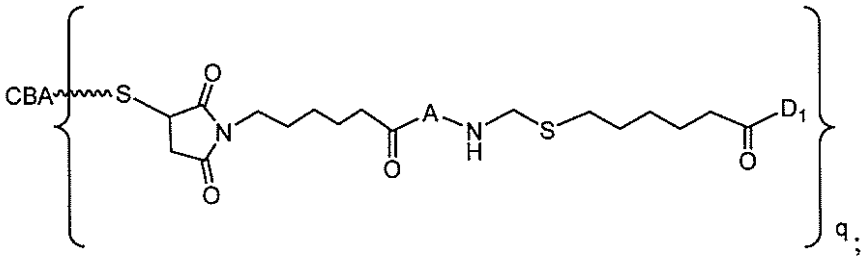
;

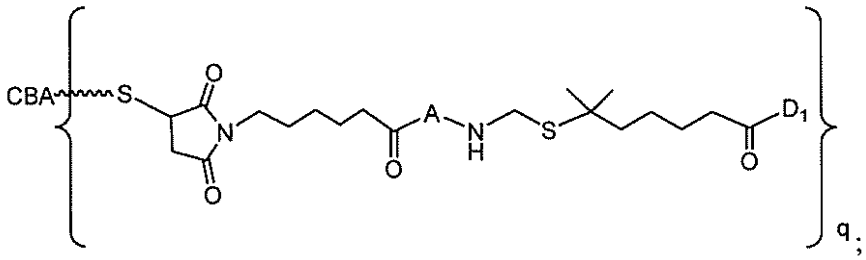

CBA
S
O
O
N
O
A
H
N
S
O
D1
q

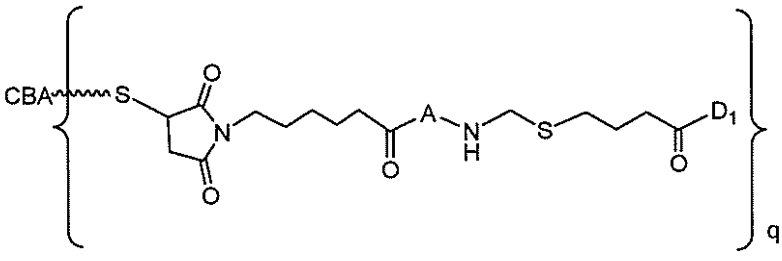
;または

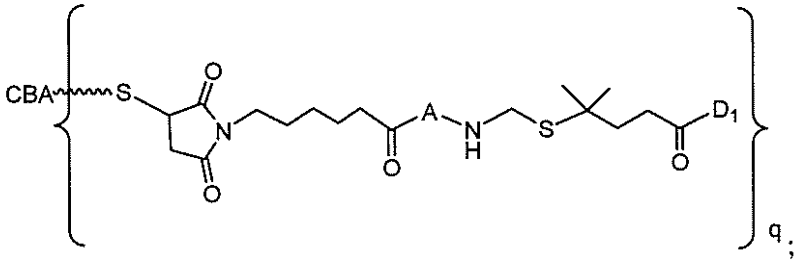
【化７８】

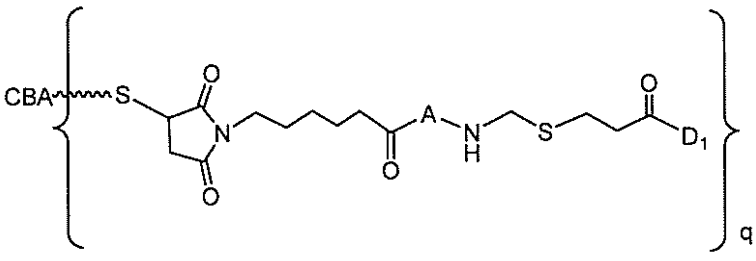




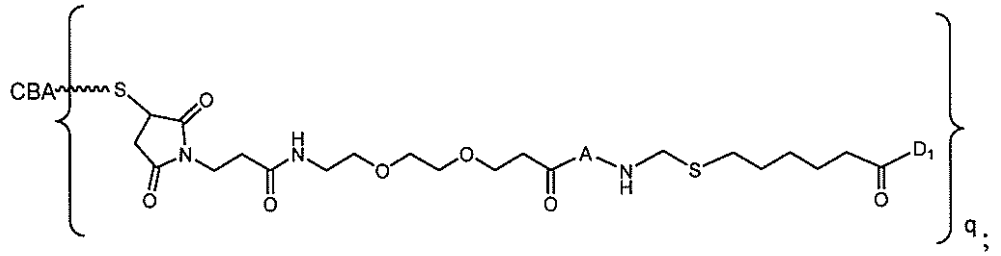


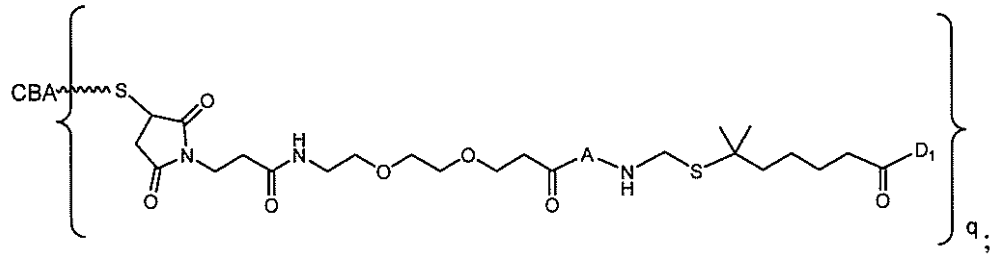


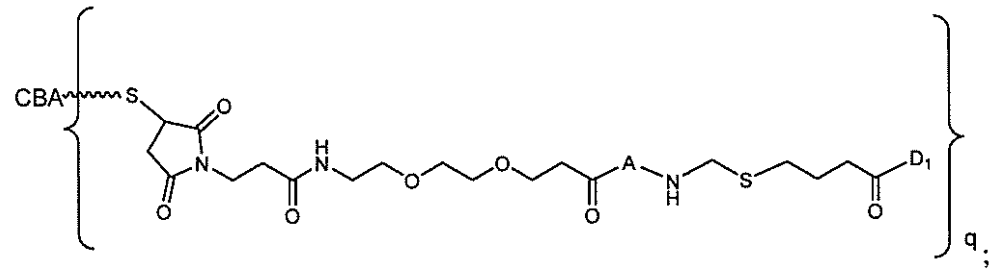


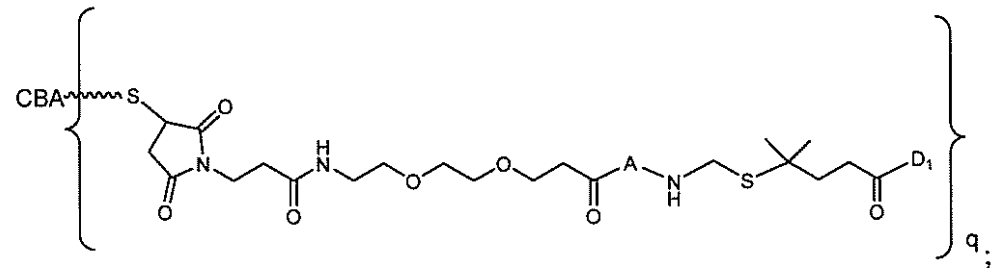


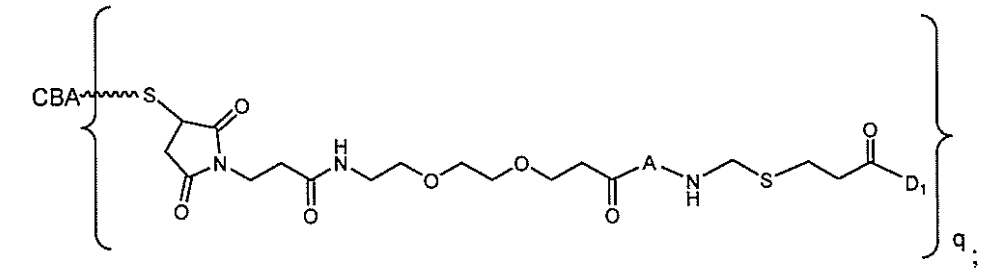
【化７９】

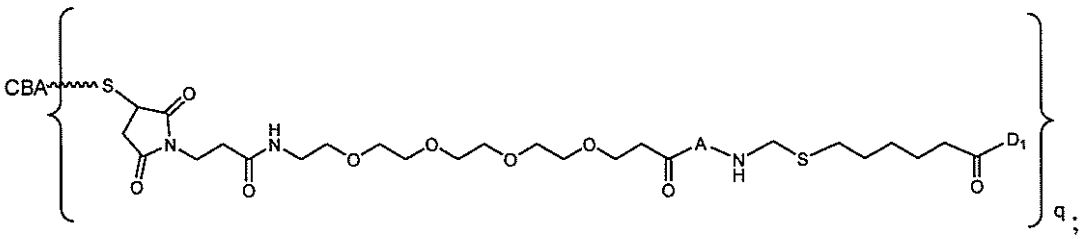




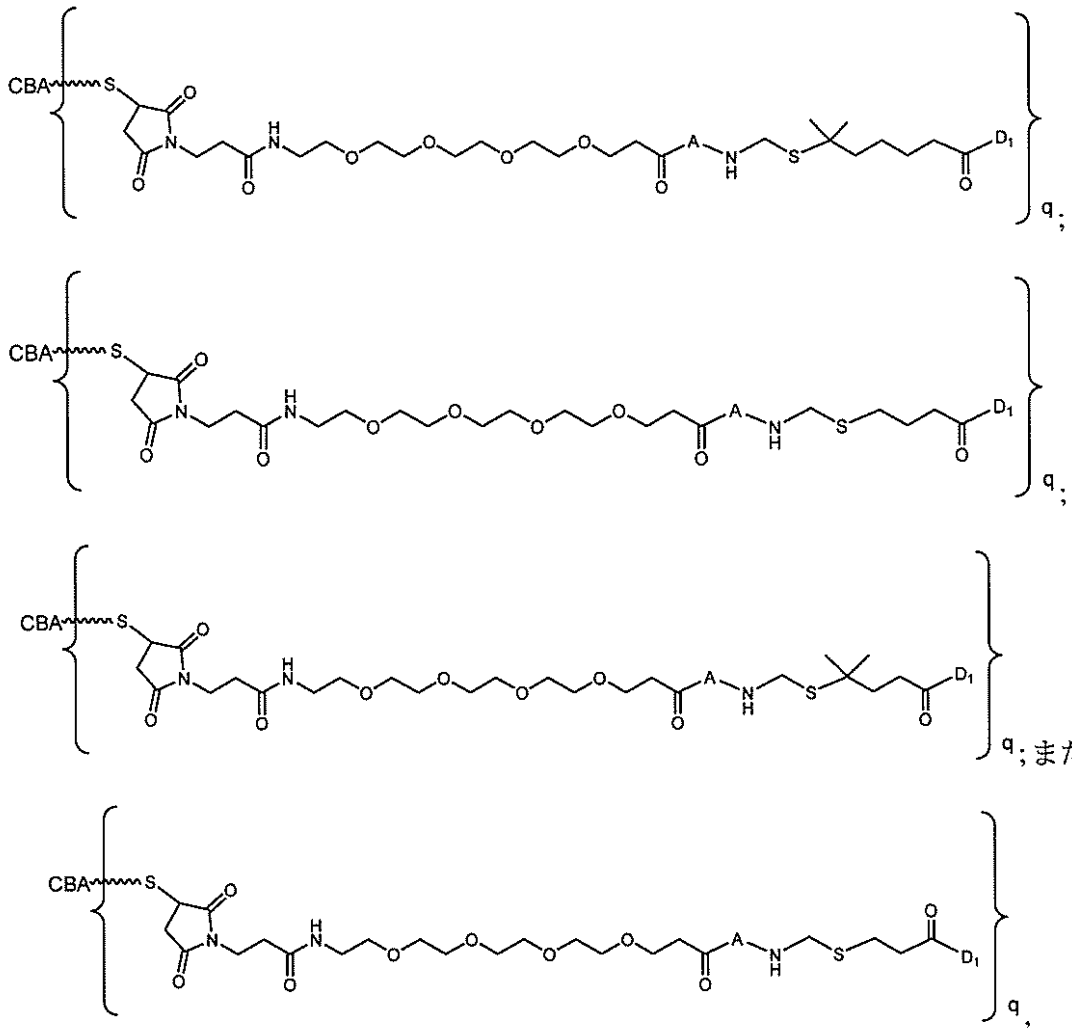








【化８０】

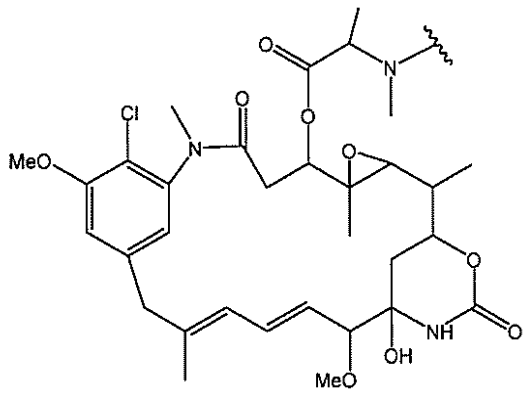


で表されるもの、または、医薬として許容可能なその塩であって、式中：

Ａは、Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ａｌａ、Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ｖａｌ－Ａｌａ、Ｄ－Ａｌａ－Ｐｒｏ、または、Ｄ－Ａｌａ－ｔＢｕ－Ｇｌｙである、及び

D_1は、次の式：

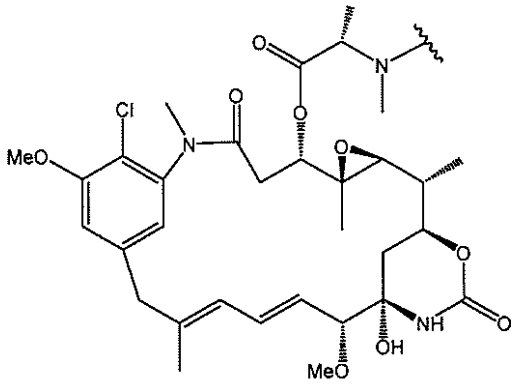
【化８１】



；

で表される；及び、残余の変数は、第７、第８、または、第９の特定の実施形態に関して説明した通りである。さらなる特定の実施形態では、Ａは、Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａである。さらなる特定の実施形態では、D_1は、次の式：

【化８２】

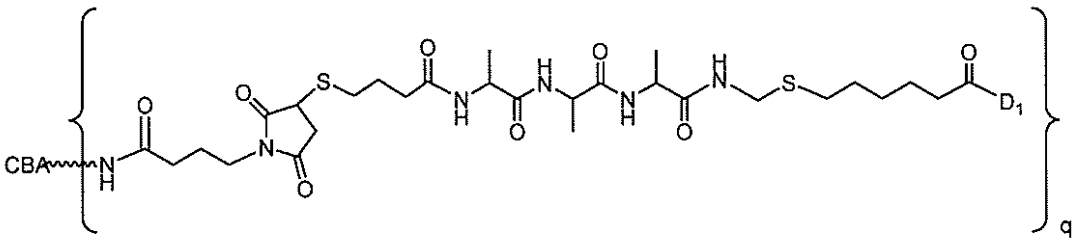


で表される。

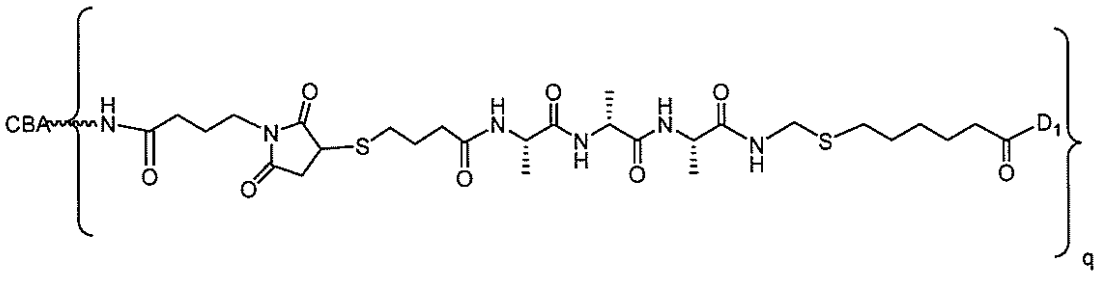
【０２０２】

第１１の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、次の式：

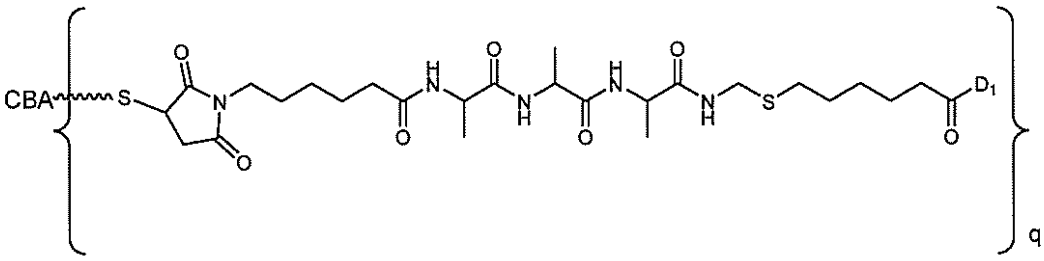
【化８３】



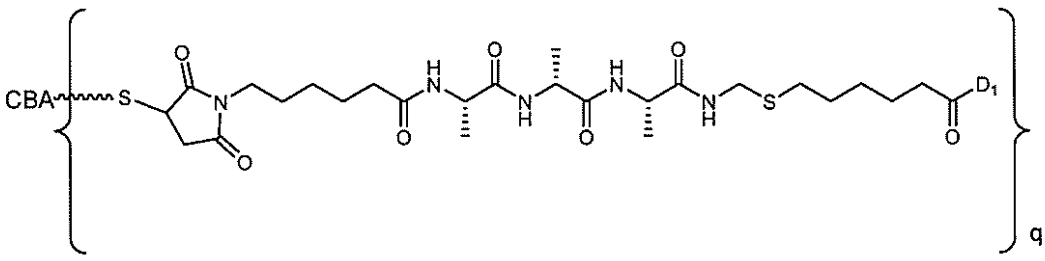
q；



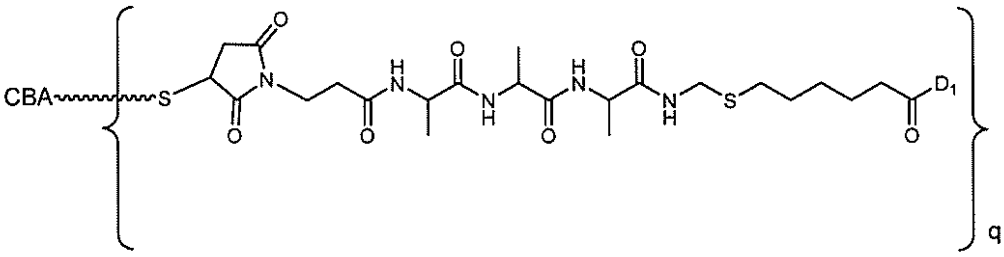
q；



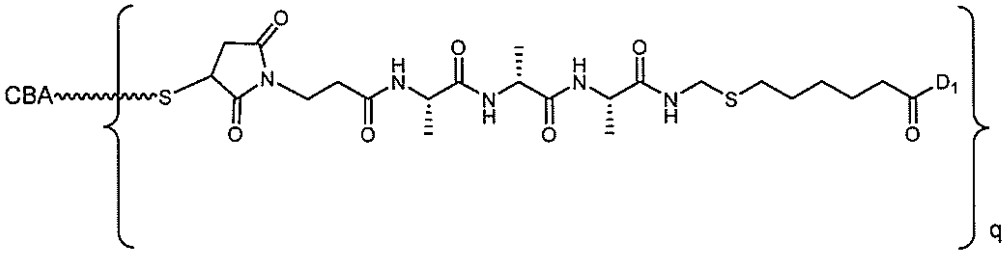
q；



q；



q；または

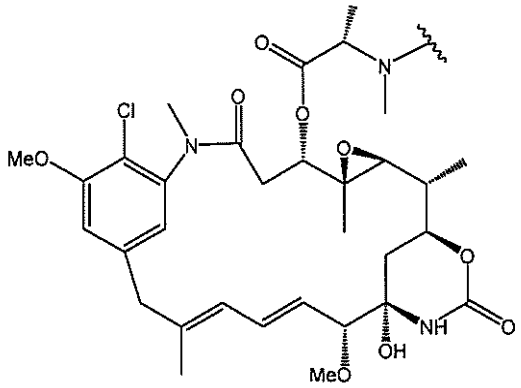


q，

で表される；

式中、D_1は、次の式：

【化８４】

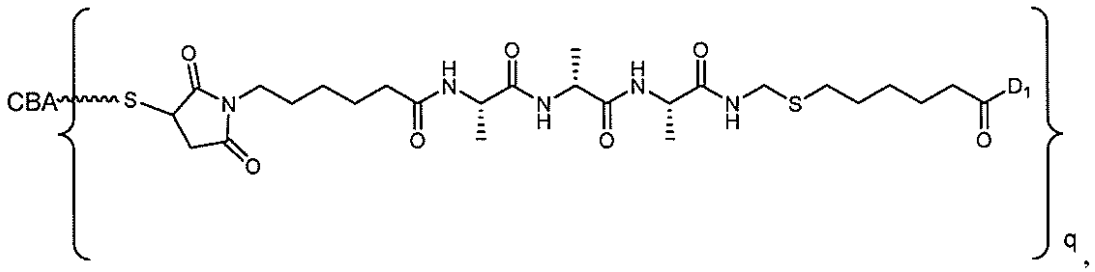


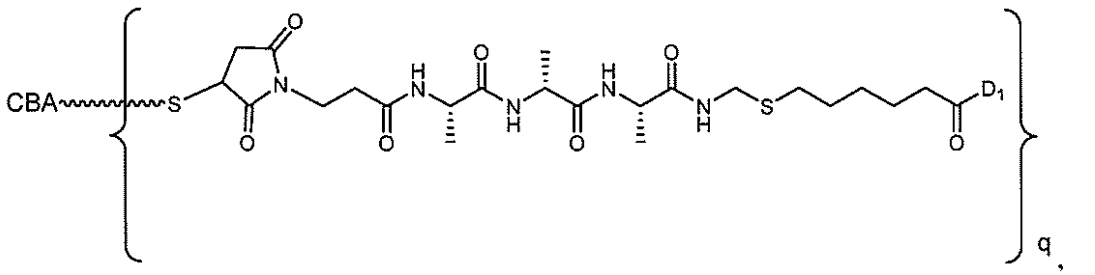
で表される。

【０２０３】

第１２の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、次の式：

【化８５】





で表される：

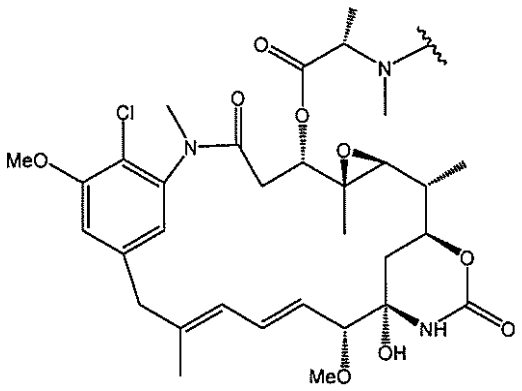
式中：

ＣＢＡは、それぞれ、配列番号８、３５及び４５、及び、配列番号６２、１３、１４の配列を有する、ＣＤＲ$_{H}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{H}$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_{H}$３ドメインと、ＣＤＲ$_{L}$１ドメイン、ＣＤＲ$_{L}$２ドメイン、及び、ＣＤＲ$_{L}$３ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；

ｑは、１または２である；

Ｄ$_{1}$は、次の式：

【化８６】



で表される。

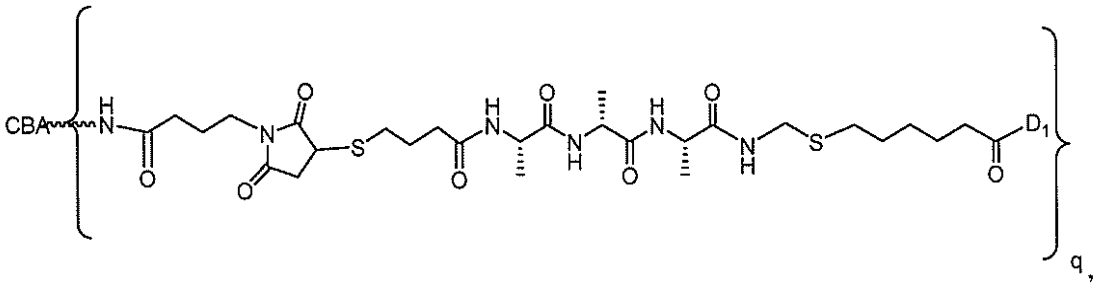
【０２０４】

一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、それぞれ、配列番号２８及び配列番号５５の配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１４２及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５２及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態では、配列番号１４２または配列番号１５２のＸは、リシンである。一部の実施形態では、配列番号１４２または配列番号１５２のＸは、存在しない。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５６及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。

【０２０５】

第１３の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、次の式：

【化８７】



で表される：

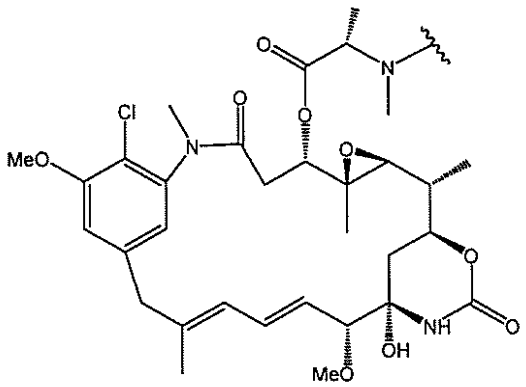
式中：

ＣＢＡは、それぞれ、配列番号８、３５及び４５、及び、配列番号６２、１３、１４の配列を有する、CDR_H1ドメイン、CDR_H2ドメイン、及び、CDR_H3ドメインと、CDR_L1ドメイン、CDR_L2ドメイン、及び、CDR_L3ドメインとを含む、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントである；

ｑは、１～１０の整数である；

D_1は、次の式：

【化８８】



で表される。

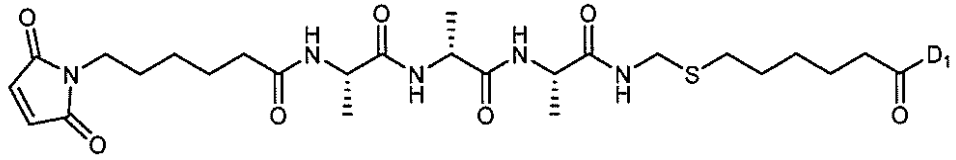
【０２０６】

特定の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、それぞれ、配列番号２８及び配列番号５５の配列を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号５２及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５１及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態では、配列番号５２または配列番号１５１のＸは、リシンである。一部の実施形態では、配列番号５２または配列番号１５１のＸは、存在しない。一部の実施形態では、ヒト化抗ＡＤＡＭ９抗体は、それぞれ、配列番号１５５及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。

【０２０７】

第１４の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、メイタンシノイド化合物ＤＭ２１Ｃ（別名、Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ、または、ＭａｌＣ５－ＬＤＬ－ＤＭ、または、化合物１７ａ）に結合した、次の構造式：

【化８９】

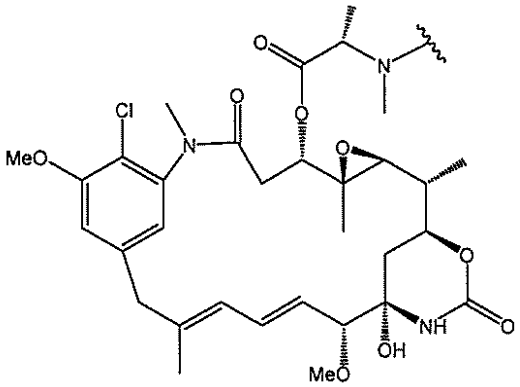


(D-4),

で表される抗ＡＤＡＭ９抗体、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）を含み、

式中、D_1は、次の式：

【化９０】



で表される。

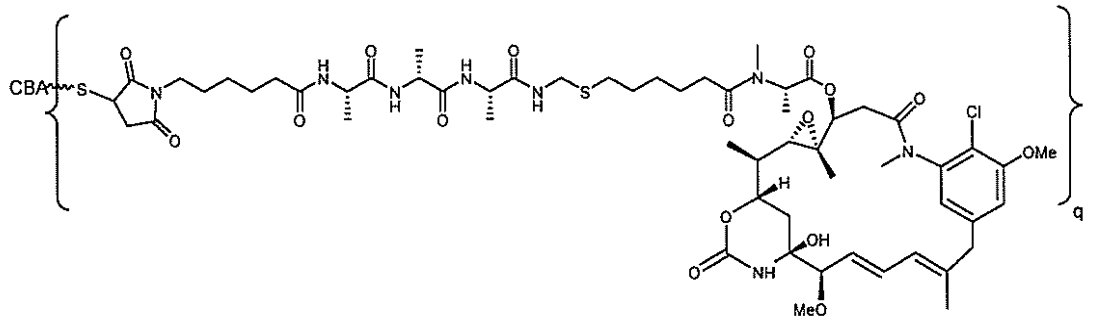
【０２０８】

抗ＡＤＡＭ９抗体ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）は、それぞれ、配列番号１５６及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを含む。一部の実施形態では、当該免疫コンジュゲートを、本明細書では、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭと称する。

【０２０９】

ある実施形態では、免疫コンジュゲートｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭは、次の構造式：

【化９１】



，

で表される：

式中：

ＣＢＡは、Ｃｙｓチオール基を介して、メイタンシノイド化合物に対して接続した抗ＡＤＡＭ９抗体ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）である；及び

ｑは、１または２である。

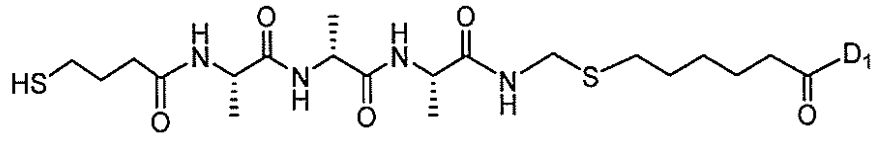
【０２１０】

特定の実施形態では、第１４の特定の実施形態の免疫コンジュケートを含む組成物（例えば、医薬組成物）に関して、ＤＡＲは、１．５～２．２、１．７～２．２、または、１．９～２．１の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、１．７、１．８、１．９、２．０、または、２．１である。

【０２１１】

第１５の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、γ－マレイミド酪酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＧＭＢＳ）、または、Ｎ－（γ－マレイミドブトリルオキシ）スルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＧＭＢＳ、または、ｓＧＭＢＳ）リンカーを介して、メイタンシノイド化合物ＤＭ２１Ｌ（別名、ＬＤＬ－ＤＭ、または、化合物１４ｃ）に結合する、次の構造式：

【化９２】



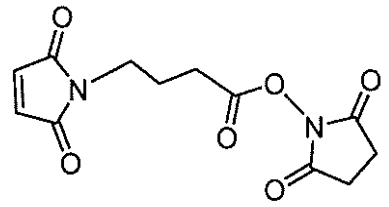
(D-2);

で表される抗ＡＤＡＭ９抗体、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／－Ｋ）を含む。抗ＡＤＡＭ９抗体ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／－Ｋ））は、それぞれ、配列番号１５５及び配列番号６８の配列を有する重鎖と軽鎖とを有する。一部の実施形態では、コンジュゲートを、本明細書では、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／－Ｋ）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭと称する。コンジュゲートを、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／－Ｋ）－ＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭと称することもでき、このものは、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／－Ｋ）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭと互換的に使用可能である。

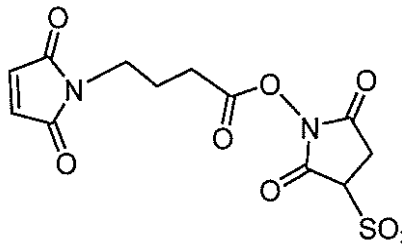
【０２１２】

ＧＭＢＳ、及び、スルホ－ＧＭＢＳ（または、ｓＧＭＢＳ）リンカーは、当該技術分野で公知であり、そして、次の構造式：

【化９３】



GMBS



スルホ-GMBS

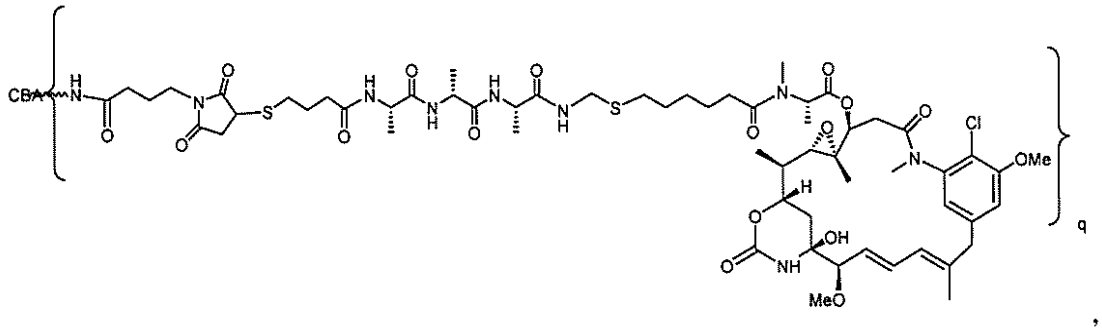
SO_3H (またはSO_3Na)

で表すことができる。

【０２１３】

ある実施形態では、免疫コンジュゲートは、次の構造式：

【化９４】



,

で表される：

式中：

ＣＢＡは、Ｌｙｓアミン基を介して、メイタンシノイド化合物に対して接続した抗ＡＤＡＭ９抗体ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／－Ｋ））である；及び

ｑは、１～１０の整数である。

【０２１４】

特定の実施形態では、第１５の特定の実施形態の免疫コンジュケートを含む組成物（例えば、医薬組成物）に関して、ＤＡＲは、３．０～４．０、３．２～３．８、または、３．４～３．７の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、３．２、３．３、３．４、３．５、３．５、３．７、または、３．８である。

【０２１５】

特定の実施形態では、第１の実施形態の免疫コンジュゲートを含む組成物（例えば、医薬組成物）に関して、または、第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、第１０、第１１、第１２、第１３、第１４、または、第１５の特定の実施形態の免疫コンジュゲートを含む組成物（例えば、医薬組成物）に関して、組成物での薬物－抗体比率（ＤＡＲ）としても知られている、抗体分子あたりの細胞傷害性薬の平均数（すなわち、平均値ｑ）は、１．０～８．０の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、１．０～５．０、１．０～４．０、１．５～４．０、２．０～４．０、２．５～４．０、１．０～３．４、１．０～３．０、２．９～３．３、３．３～３．８、１．５～２．５、２．０～２．５、１．７～２．３、または、１．８～２．２の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、４．０未満、３．８未満、３．６未満、３．５未満、３．０未満、または、２

．５未満である。一部の実施形態では、ＤＡＲ値は、３．２～３．４の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲ値は、３．０～３．２の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、３．５～３．７の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、または、３．７である。一部の実施形態では、ＤＡＲは、１．８～２．０の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、１．７～１．９の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、１．９～２．１の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、１．９、２．０、または、２．１である。一部の実施形態では、１つ以上のシステインチオール基を介してメイタンシノイド化合物に結合した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、その抗ＡＤＡＭ９結合フラグメントを含む本発明の免疫コンジュケートに関して、ＤＡＲは、１．５～２．５、１．８～２．２、１．１～１．９、または、１．９～２．１の範囲にある。一部の実施形態では、ＤＡＲは、１．８、１．９、２．０、または、２．１である。

【０２１６】

Ｃ．例示的なリンカー分子

本発明の免疫コンジュゲートを調製する際に、当該技術分野で公知のあらゆる適切なリンカーを使用することができる。特定の実施形態では、リンカーは、二官能リンカーである。本明細書で使用する用語「二官能リンカー」とは、２つの反応性基を有する改変した作用物質のことを指す；反応性基の一方は、細胞結合剤と反応することができ、他方は、メイタンシノイド化合物と反応して、２つの部分を互いに結合する。このような二官能クロスリンカーは、当該技術分野で周知である（例えば、Ｉｓａｌｍ ａｎｄ Ｄｅｎｔｉｎ Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ ｃｈａｐｔｅｒ ５，ｐ２１８－３６３，Ｇｒｏｖｅｓ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｉｅｓ Ｉｎｃ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９９を参照されたい）。例えば、チオエーテル結合を介して結合することが可能な二官能架橋剤として、マレイミド基を導入するためのＮ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、または、ヨードアセチル基を導入するためのＮ－スクシンイミジル－４－（ヨードアセチル）－アミノベンゾエート（ＳＩＡＢ）がある。細胞結合剤に、マレイミド基、または、ハロセチル基を導入するその他の二官能架橋剤は、当該技術分野で周知であり（米国特許出願公開第２００８／００５０３１０号、第２００５０１６９９３３号、Ｐｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｃ．Ｐ．Ｏ．Ｂｏｘ １１７、Ｒｏｃｋｌａｎｄ、ＩＬ ６１１０５、ＵＳＡから入手可能）、そして、同二官能架橋剤として、ビス－マレイミドポリエチレングリコール（ＢＭＰＥＯ）、ＢＭ（ＰＥＯ）$_2$、ＢＭ（ＰＥＯ）$_3$、Ｎ－（β－マレイミドプロピルオキシ）スクシンイミドエステル（ＢＭＰＳ）、γ－マレイミド酪酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＧＭＢＳ）、ε－マレイミドカプロン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＥＭＣＳ）、５－マレイミド吉草酸ＮＨＳ、ＨＢＶＳ、ＳＭＣＣの「長鎖」アナログ（ＬＣ－ＳＭＣＣ）であるＮ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシ－（６－アミドカプロエート）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、４－（４－Ｎ－マレイミドフェニル）－酪酸ヒドラジドまたはＨＣｌ塩（ＭＰＢＨ）、Ｎ－スクシンイミジル３－（ブロモアセトアミド）プロピオネート（ＳＢＡＰ）、Ｎ－スクシンイミジルヨードアセテート（ＳＩＡ）、κ－マレイミドウンデカン酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＫＭＵＡ）、Ｎ－スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）－ブチレート（ＳＭＰＢ）、スクシンイミジル－６－（β－マレイミドプロピオンアミド）ヘキサノエート（ＳＭＰＨ）、スクシンイミジル－（４－ビニルスルホニル）ベンゾエート（ＳＶＳＢ）、ジチオビス－マレイミドエタン（ＤＴＭＥ）、１，４－ビス－マレイミドブタン（ＢＭＢ）、１，４－ビスマレイミジル－２，３－ジヒドロキシブタン（ＢＭＤＢ）、ビス－マレイミドヘキサン（ＢＭＨ）、ビス－マレイミドエタン（ＢＭＯＥ）、スルホスクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミド－メチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ＳＭＣＣ）、スルホスクシンイミジル（４－ヨード－アセチル）アミノベンゾエート（スルホ－ＳＩＡＢ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ－Ｍ

ＢＳ）、Ｎ－（γ－マレイミドブトリルオキシ）スルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＧＭＢＳ）、Ｎ－（ε－マレイミドカプロイルオキシ）スルホスクシイミドエステル（スルホ－ＥＭＣＳ）、Ｎ－（κ－マレイミドウンデカノイルオキシ）スルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＫＭＵＳ）、及び、スルホスクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（スルホ－ＳＭＰＢ）があるが、これらに限定されない。

【０２１７】

ヘテロ二官能架橋剤は、２つの異なる反応性基を有する二官能架橋剤である。アミン反応性Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド基（ＮＨＳ基）、及び、カルボニル反応性ヒドラジン基を両方とも含有するヘテロ二官能架橋剤を使用し、本明細書に記載した細胞傷害性化合物と細胞結合剤（例えば、抗体）とを連結することもできる。このような市販のヘテロ二官能架橋剤の例として、スクシンイミジル６－ヒドラジノニコチンアミドアセトンヒドラゾン（ＳＡＮＨ）、スクシンイミジル４－ヒドラジドテレフタレート塩酸塩（ＳＨＴＨ）、及び、スクシンイミジルヒドラジニウムニコチネート塩酸塩（ＳＨＮＨ）がある。酸に不安定な結合を有するコンジュゲートも、本発明のヒドラジンを有するベンゾジアゼピン誘導体を用いて調製することができる。使用可能な二官能架橋剤の例として、スクシンイミジル－ｐ－ホルミルベンゾエート（ＳＦＢ）、及び、スクシンイミジル－ｐ－ホルミルフェノキシアセテート（ＳＦＰＡ）がある。

【０２１８】

ジスルフィド結合を介して細胞結合剤と細胞傷害性化合物との連結を可能にする二官能架橋剤は、当該技術分野で公知であり、ジチオピリジル基を導入するために、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオプロピオネート（ＳＰＤＰ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（２－ピリジルジチオ）ペンタノエート（ＳＰＰ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（２－ピリジルジチオ）ブタノエート（ＳＰＤＢ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（２－ピリジルジチオ）２－スルホブタノエート（スルホ－ＳＰＤＢ、または、ｓＳＰＤＢ）がある。ジスルフィド基を導入するために使用可能なその他の二官能架橋剤は、当該技術分野で公知であり、米国特許第６，９１３，７４８号、第６，７１６，８２１号、及び、米国特許出願公開第２００９０２７４７１３号、及び、第２０１００１２９３１４号に開示されており、参照により本明細書の一部を構成するものとして、それらを援用する。あるいは、架橋剤、例えば、チオール基を導入する２－イミノチオラン、ホモシステインチオラクトン、または、Ｓ－アセチルコハク酸無水物を使用することもできる。

【０２１９】

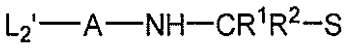
Ｄ．例示的なメイタンシノイド

第２の実施形態では、本発明は、本発明の免疫コンジュケートを作り出すために使用することができるメイタンシノイド化合物を提供する。

【０２２０】

一部の実施形態では、メイタンシノイド化合物は、次の式：

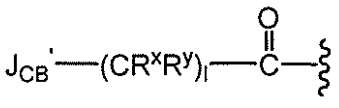
【化９５】



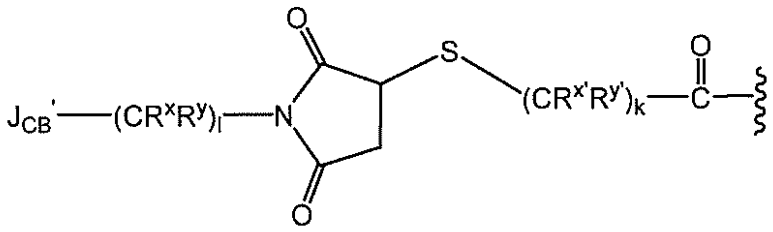
で表され、または、医薬として許容可能なその塩であって、式中：

L_2'は、次の構造式：

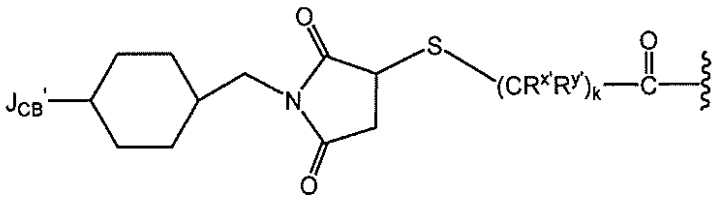
【化９６】



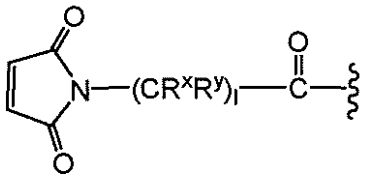
(L2a');



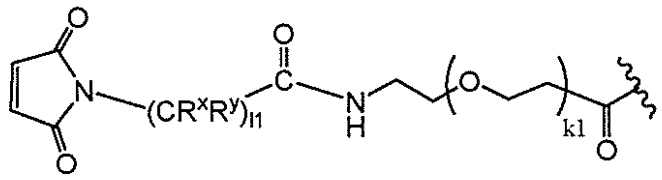
(L2b');



(L2c');



(L2d'); または



(L2e');

で表されるものであり、

式中：

R^x、R^y、$R^{x'}$、及び、$R^{y'}$は、それぞれの場合に、独立して、Ｈ、－ＯＨ、ハロゲン、－Ｏ－（C_{1-4}アルキル）、－SO_3H、－$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$、または、－ＯＨ、ハロゲン、－SO_3H、または、$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$で任意に置換したC_{1-4}アルキルであり、式中、R_{40}、R_{41}、及び、R_{42}は、それぞれ、独立して、Ｈ、または、C_{1-4}アルキルであり；

ｌ及びｋは、それぞれ、独立して、１～１０の整数である；

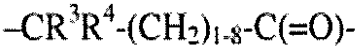
J_{cb}'は、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、または、－ＣＯＥであり、式中、－ＣＯＥは、反応性エステルである；

Ａは、アミノ酸、または、２～２０個のアミノ酸を含むペプチドである；

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

L_1は、次の式：

【化９７】

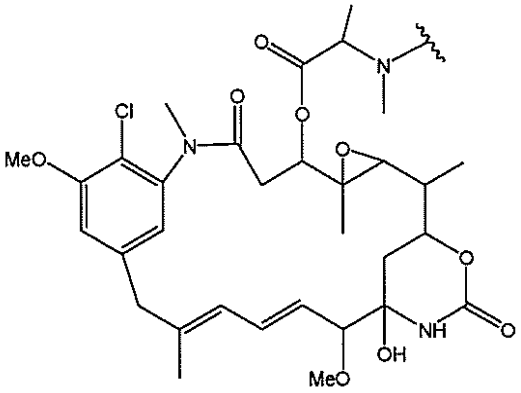


で表されるものであり、

式中、R^3及びR^4は、それぞれ、独立して、ＨまたはＭｅであり、かつ、L_1の－Ｃ（＝Ｏ）－部分は、Ｄに対して接続している；

Ｄは、次の式：

【化９８】

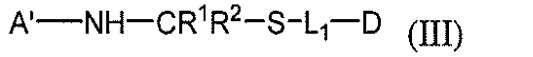


で表されるものであり；及び
ｑは、１～２０の整数である。

【０２２１】

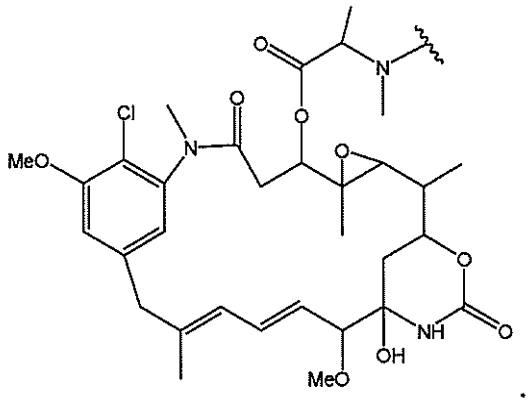
一部の実施形態では、本発明のメイタンシノイドは、次の式：

【化９９】



で表され、または、医薬として許容可能なその塩であって、式中：
Ａ’は、アミノ酸、または、２～２０個のアミノ酸を含むペプチド（すなわち、Ａ－NH_2）である；
R^1及びR^2は、それぞれ、独立して、Ｈ、または、C_{1-3}アルキルである；
L_1は、$-CR^3R^4-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$であり；$R^3$及び$R^4$は、それぞれ、独立して、Ｈ、または、Ｍｅである；
Ｄは、次の式：

【化１００】



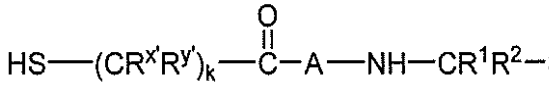
；

で表されるものであり；及び
ｑは、１～２０の整数である。

【０２２２】

一部の実施形態では、本発明のメイタンシノイド化合物は、次の式：

【化１０１】



で表され、または、医薬として許容可能なその塩であって、式中：
$R^{x'}$、及び、$R^{y'}$は、それぞれの場合に、独立して、Ｈ、－ＯＨ、ハロゲン、－Ｏ－（C_{1-4}アルキル）、$-SO_3H$、$-NR_{40}R_{41}R_{42}^{+}$、または、－ＯＨ、ハ

ロゲン、SO_3H、または、$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$で任意に置換したC_{1-4}アルキルであり、式中、R_{40}、R_{41}、及び、R_{42}は、それぞれ、独立して、H、または、C_{1-4}アルキルであり；

kは、１～１０の整数である；

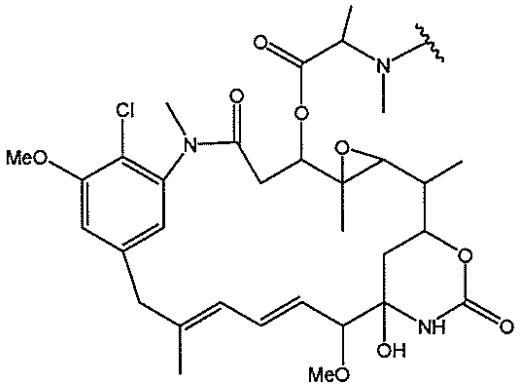
Aは、アミノ酸残基、または、２～２０個のアミノ酸残基を含むペプチドである；

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

L_1は、－CR^3R^4－（CH_2）$_{1-8}$－C（＝O）－であり；R^3及びR^4は、それぞれ、独立して、H、または、Meである；

Dは、次の式：

【化１０２】



；

で表されるものであり；及び

qは、１～２０の整数である。

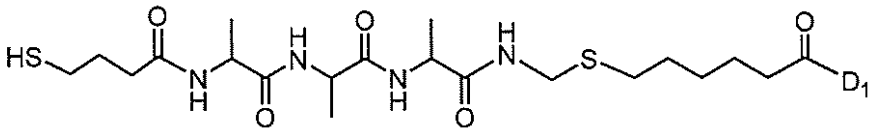
【０２２３】

一部の実施形態では、式（ＩＩ）、（ＩＩＩ）、または、（ＩＶ）のメイタンシノイド化合物に関して、変数は、第１の実施形態、または、第１の実施形態での第１、第２、第３、第４、第５、第６、第７、第８、第９、第１０、または、第１１の特定の実施形態で説明した通りである。

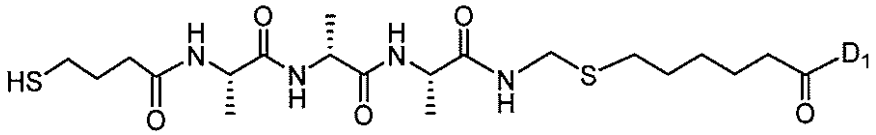
【０２２４】

一部の実施形態では、メイタンシノイド化合物は、次の式：

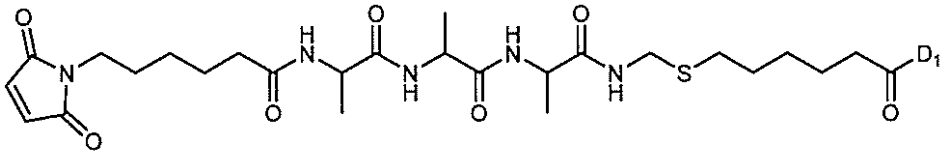
【化１０３】



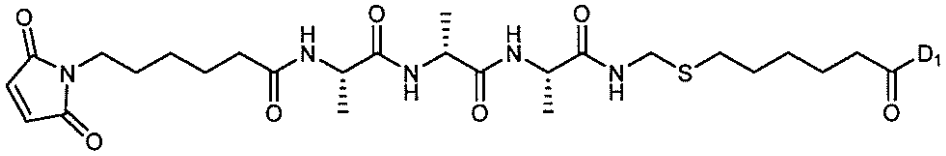
(D-1);



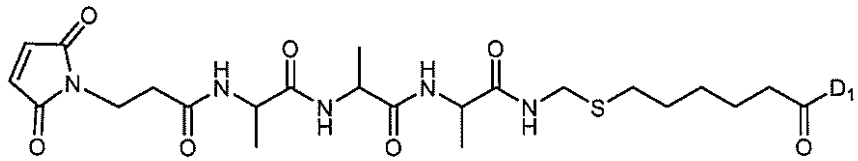
(D-2);



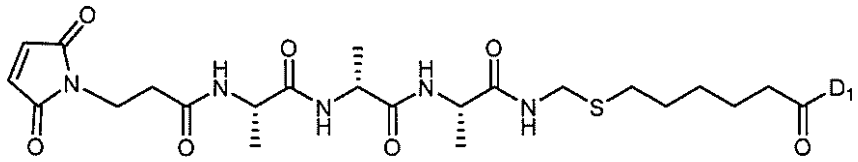
(D-3);



(D-4);



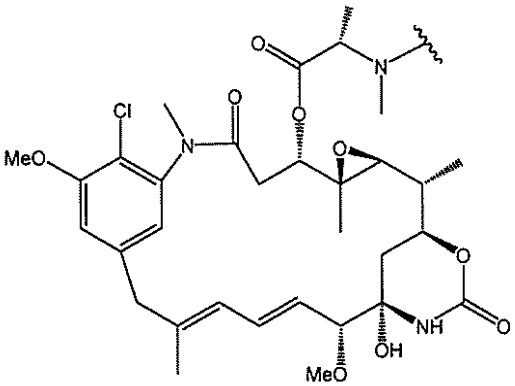
(D-5);または



(D-6),

で表され、式中、D_1は、次の式：

【化１０４】



で表される。

【０２２５】

ＩＶ．製造の方法

本発明の抗ＡＤＡＭ９抗体、及び、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントは、最も好ましくは、そのようなポリペプチドをコードする当該技術分野で公知の核酸分子の組換え発現で

作り出す。

【０２２６】

本発明のポリペプチドは、固相ペプチド合成を用いて簡便に調製し得る（Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｂ．（１９８６）“Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ”Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３２（４７４８）：３４１－３４７；Ｈｏｕｇｈｔｅｎ，Ｒ．Ａ．（１９８５）“Ｇｅｎｅｒａｌ Ｍｅｔｈｏｄ Ｆｏｒ Ｔｈｅ Ｒａｐｉｄ Ｓｏｌｉｄ－Ｐｈａｓｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｏｆ Ｌａｒｇｅ Ｎｕｍｂｅｒｓ Ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ Ｏｆ Ａｎｔｉｇｅｎ－Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ Ａｔ Ｔｈｅ Ｌｅｖｅｌ Ｏｆ Ｉｎｄｉｖｉｄｕａｌ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ” Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．Ａ．）８２（１５）：５１３１－５１３５；Ｇａｎｅｓａｎ，Ａ．（２００６）“Ｓｏｌｉｄ－Ｐｈａｓｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｉｎ Ｔｈｅ Ｔｗｅｎｔｙ－Ｆｉｒｓｔ Ｃｅｎｔｕｒｙ” Ｍｉｎｉ Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．６（１）：３－１０）。

【０２２７】

代替例では、抗体を、組換えで作り出し、そして、当該技術分野で公知のあらゆる方法を用いて発現し得る。抗体は、まず、宿主動物から作られた抗体を単離し、遺伝子配列を得て、この遺伝子配列を使用して、宿主細胞（例えば、ＣＨＯ細胞）において抗体を組換えによって発現させることで、組換えによって作り出し得る。使用可能な別の方法は、植物（例えば、タバコ）、または、トランスジェニック乳において抗体配列を発現させることである。植物または乳において組換えによって抗体を発現させるのに適した方法が開示されている（例えば、Ｐｅｅｔｅｒｓ ｅｔ ａｌ．（２００１）“Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ Ｉｎ Ｐｌａｎｔｓ”，Ｖａｃｃｉｎｅ １９：２７５６；Ｌｏｎｂｅｒｇ，Ｎ．ｅｔ ａｌ．（１９９５）“Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｒｏｍ Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｍｉｃｅ”，Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ １３：６５－９３；及びＰｏｌｌｏｃｋ ｅｔ ａｌ．（１９９９）“Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｍｉｌｋ Ａｓ Ａ Ｍｅｔｈｏｄ Ｆｏｒ Ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｏｆ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ”，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２３１：１４７－１５７）。抗体の誘導体、例えば、ヒト化、一本鎖などを製造するのに適した方法は、当該技術分野で公知であり、上掲している。別の代替例では、抗体は、ファージディスプレイ技術によって、組換えにより作り出し得る（例えば、米国特許第５，５６５，３３２号、第５，５８０，７１７号、第５，７３３，７４３号、第６，２６５，１５０号、及び、Ｗｉｎｔｅｒ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．（１９９４）“Ｍａｋｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｂｙ Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ”，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２．４３３－４５５を参照されたい）。

【０２２８】

目的のポリヌクレオチド（例えば、本発明の抗ＡＤＡＭ９抗体、及び、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントのポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド）を含むベクターは、電気穿孔、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、ＤＥＡＥ－デキストラン、または、その他の物質を使用するトランスフェクション、微粒子銃、リポフェクション；及び、感染（例えば、ベクターが、ワクシニアウイルスなどの感染薬剤である場合）を含む、数多くの適切な手段のいずれによっても宿主細胞に導入し得る。導入ベクター、または、ポリヌクレオチドの選択は、大抵の場合、宿主細胞の特徴に依存して変わる。

【０２２９】

目的のポリペプチド、または、タンパク質を発現させるために、異種ＤＮＡを過剰発現することが可能なあらゆる宿主細胞を使用することができる。適切な哺乳動物宿主細胞の例として、ＣＯＳ、ＨｅＬａ、及び、ＣＨＯ細胞があるが、これらに限定されない。

【０２３０】

本発明は、本発明の抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントのアミノ酸配列を含む免疫コンジュゲートを含む。本発明のポリペプチドは、当該技術分野で

公知の手順によって製造することができる。ポリペプチドは、抗体のタンパク質分解、または、その他の分解によって、上記した組換え方法（すなわち、１本のポリペプチド、または、融合ポリペプチド）によって、または、化学合成によって作り出すことができる。抗体のポリペプチド、特に、約５０個のアミノ酸までの短いポリペプチドは、化学合成によって簡便に作り出せる。化学合成の方法は、当該技術分野で公知であり、市販されている。

【０２３１】

本発明は、分子の特性に顕著な影響を与えない、機能的に等価なポリペプチド、及び、活性が向上、または、減少している変異体を含め、抗ＡＤＡＭ９抗体の変異体、及び、そのフラグメントを含む、免疫コンジュゲートを含む。ポリペプチドの改変は、当該技術分野で日常的に実施されているものであって、本明細書で詳細に記載する必要はない。改変ポリペプチドの例として、アミノ酸残基の保存的置換、機能活性、または、化学アナログの使用に顕著な悪影響を与えないアミノ酸の１つ以上の欠失または付加を有するポリペプチドがある。互いに保存的に置換し得る、互いに保存的に置換が可能なアミノ酸残基として：グリシン／アラニン；セリン／トレオニン；バリン／イソロイシン／ロイシン；アスパラギン／グルタミン；アスパラギン酸／グルタミン酸；リシン／アルギニン；及び、フェニルアラニン／チロシンがあるが、これらに限定されない。これらのポリペプチドは、グリコシル化ポリペプチド、及び、非グリコシル化ポリペプチド、及び、例えば、異なる糖を用いたグリコシル化、アセチル化、及び、リン酸化などのその他の翻訳後改変を有するポリペプチドも含む。好ましくは、アミノ酸置換は、保存的であり、すなわち、置換アミノ酸が、元々のアミノ酸と同様の化学特性を有している。このような保存的置換は、当該技術分野で公知であり、その例は上記した通りである。アミノ酸改変は、領域、例えば、可変ドメインの完全な新たなデザインのために、１つ以上のアミノ酸を交換、または、改変するものまでの範囲とすることができる。可変ドメインを交換すると、結合アフィニティ、及び／または、特異性が変化することがある。その他の改変方法は、当該技術分野で公知のカップリング技術など、酵素手段、酸化置換、及び、キレート化を含む技術の使用などがあるが、これらに限定されない。例えば、イムノアッセイのための標識の接続、例えば、ラジオイムノアッセイのための放射性部分の接続に、改変を使用することができる。改変ポリペプチドを、当該技術分野で確立された手順を用いて作り出し、そして、当該技術分野で公知の標準的なアッセイを用いてスクリーニングすることができる。

【０２３２】

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

【０２３３】

本発明は、本発明の抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドも提供する。

【０２３４】

特定の実施形態では、本発明は、配列番号６８のアミノ酸配列を有するｈＭＡＢ－ＡＶＬ（２）軽鎖をコードするポリヌクレオチドを提供しており、当該ポリヌクレオチドは、配列番号１５７：

【化１０５】

gacattgtgatgacccaatctccagattctttggctgtgtctctaggggagagggccacc

atctcctgcaaggccagccaaagtgttgattactctggtgatagttatatgaactggtac

caacagaaaccaggacagccacccaaactcctcatctatgctgcatccgacctagaatct

ggaatcccagccaggtttagtggcagtgggtctgggacagacttcaccctcactatctct

agcctggagcctgaggatttcgcaacctattactgtcagcaaagtcatgaagacccgttc

acgttcggacaagggaccaagctcgaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttc

atcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctg

aataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcg

ggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagc

agcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtc

acccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

のヌクレオチド配列を有する。

【０２３５】

特定の実施形態では、本発明は、配列番号６８のアミノ酸配列を有するｈＭＡＢ－ＡＶＬ（２）軽鎖をコードするポリヌクレオチドを提供しており、当該ポリヌクレオチドは、コドン最適化したものであり、かつ、配列番号１５８：

【化１０６】

gacattgtgatgacgcagtcccccgactccctggccgtgtccttgggcgaaagggccac

aatcagctgcaaggcatcacagagcgtggactactctggggacagctacatgaattggt

accagcagaagcccgggcagcctccaaagctgctgatctacgccgcatccgacctggag

tccggcatcccggcgcggttctcgggttcgggatccggcactgacttcaccctgaccat

ctcaagcctggagcccgaggactttgcgacctactactgccaacagtcccacgaagatc

cgtttaccttcggacaaggcaccaagctcgagatcaagagaactgtggccgccccgagc

gtgttcattttcccgccatcggatgagcaactgaagtccggaactgcgagcgtggtctg

cctcctcaacaacttctatcctcgggaagccaaagtgcagtggaaggtcgacaacgctc

tgcagtccggaaactcccaagagagcgtgaccgaacaggattccaaggactcgacctac

tcgctgtcatccactctgaccctgagcaaggccgattacgaaaagcacaaagtgtacgc

ttgcgaagtgacccaccagggactgtcatcccctgtgaccaagtcgttcaaccgcggcg

aatgc

のヌクレオチド配列を有する。

【０２３６】

特定の実施形態では、本発明は、配列番号１５１のアミノ酸配列を有するｈＭＡＢ－ＡＶＨ（２Ｉ）重鎖をコードするポリヌクレオチドを提供しており、当該ポリヌクレオチドは、配列番号１５９：

【化１０７】

gaggtccaactggtggaatctgggggaggcctggtgaagcctgggggctcactgagact
gtcttgcgctgcttctggttttaccttctctagctactggatgcactgggtgagacagg
cacctggaaagggccttgagtgggttggagagattattcctatctttggtcatactaac
tacaatgagaagttcaagagcaggttcacaatttctttagacaactccaagaatacact
gtacctccaaatgggaagcctgagggcagaggacacagcggtctattactgtgcaagag
ggggttattattattacccccggcagggcttcctggactactggggccaaggcaccact
gtgacagtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctc
caagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccg
aaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccg
gctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccag
cagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagg
tggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccca
gcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacac
cctctatatcacccgggagcctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaag
accctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
aagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct
gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc
cagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtg
tacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcct
ggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg
agaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctac
agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgt
gatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt**x**
xx

のヌクレオチド配列であって、配列中、ｘｘｘは、ａａａである、または、存在しない、ヌクレオチド配列を有する。

【０２３７】

特定の実施形態では、本発明は、配列番号１５５のアミノ酸配列を有するｈＭＡＢ－ＡＶＨ（２Ｉ）重鎖をコードするポリヌクレオチドを提供しており、当該ポリヌクレオチドは、配列番号１６０：

【化１０８】

gaggtccaactggtggaatctgggggaggcctggtgaagcctgggggctcactgagact
gtcttgcgctgcttctggttttaccttctctagctactggatgcactgggtgagacagg
cacctggaaagggccttgagtgggttggagagattattcctatctttggtcatactaac
tacaatgagaagttcaagagcaggttcacaatttctttagacaactccaagaatacact
gtacctccaaatgggaagcctgagggcagaggacacagcggtctattactgtgcaagag
ggggttattattattacccccggcagggcttcctggactactggggccaaggcaccact
gtgacagtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctc
caagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccg
aaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccg
gctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccag
cagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagg
tggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccca
gcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacac
cctctatatcacccgggagcctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaag
accctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
aagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct
gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcc
cagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtg
tacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcct
ggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg
agaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctac
agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgt
gatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt

のヌクレオチド配列を有する。

【０２３８】

特定の実施形態では、本発明は、配列番号１５６のアミノ酸配列を有するｈＭＡＢ－ＡＶＨ（２Ｉ）重鎖をコードするポリヌクレオチドを提供しており、当該ポリヌクレオチドは、配列番号１６１：

【化１０９】

gaggtccaactggtggaatctgggggaggcctggtgaagcctgggggctcactgagactg
tcttgcgctgcttctggttttaccttctctagctactggatgcactgggtgagacaggca
cctggaaagggccttgagtgggttggagagattattcctatctttggtcatactaactac
aatgagaagttcaagagcaggttcacaatttctttagacaactccaagaatacactgtac
ctccaaatgggaagcctgagggcagaggacacagcggtctattactgtgcaagaggggt
tattattattacccccggcagggcttcctggactactggggccaaggcaccactgtgaca
gtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagc
acctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtg
acggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta
cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggc
acccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaga
gttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactc
ctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctctatatcacc
cgggagcctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaag
ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggag
cagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
aatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaa
accatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcc
cgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatccc
agcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg
cctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaag
agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaac
cactacacgcagaagagcctctgcctgtctccgggt

のヌクレオチド配列を有する。

【０２３９】

特定の実施形態では、本発明は、配列番号１５６のアミノ酸配列を有するｈＭＡＢ－ＡＶＨ（２Ｉ）重鎖をコードするポリヌクレオチドを提供しており、当該ポリヌクレオチドは、コドン最適化したものであり、かつ、配列番号１６２：

【化１１０】

gaagtccaactggtggaatcgggggcggcctcgtgaagcccggaggatccctgaggctc
tcctgcgccgcctccgggttcacttttcgtcatactggatgcattgggtccgccaggcc
ccggggaagggactggaatgggtcggagagatcatccccattttcggccacacaaactac
aacgaaaagttcaagagccgctttactatttccttggacaattcaaagaacaccctgtat
ctgcaaatgggaagcctgcgggccgaggacaccgctgtgtactactgcgcccggggtggc
tactattactacccgagacagggtttcctcgattactggggccagggaaccaccgtgacc
gtgtcctctgcctcgaccaaaggcccctcggtgttcccgcttgcgccatcctccaaatcc
acctccggcggcaccgccgctctgggatgcctggtcaaagattacttcccggagcctgtg
acggtgtcgtggaactctggagccctcacgagcggagtgcataccttccctgcggtgctc
caatcgtccggactgtacagcctgagcagcgtcgtcactgtgcctagctcgtccctgggc
acccagacctacatttgcaacgtgaaccataagccttcaaacactaaggtcgacaaacgg
gtggaacccaagtcgtgcgataagactcatacttgcccgccttgccccgcgcctgaactt
ttgggagggccgtccgtgttcctgttcccgccaaagccaaaggacactctgtacatcact
cgcgaacccgaagtgacctgtgtggtcgtggacgtgtcccacgaggatccggaagtcaag
ttcaattggtacgtggacggtgtcgaggtgcacaacgcaaagaccaagccgcgcgaggaa
cagtacaactccacataccgggtggtgtcagtgctgaccgtgttgcaccaggactggctc
aacggaaaggagtacaagtgcaaagtgtccaacaaggccctgcctgcaccaatcgaaaag
accattagcaaggccaaggggcagccccgggagccccaagtgtacactctgcccccgtca
cgggaagaaatgaccaagaaccaagtgtcactgacctgtcttgtgaagggtttctacccc
tccgacatcgccgtggagtgggagtccaacggacagccggagaacaattacaagactacc
ccgccggtgctggatagcgacggctccttcttcctgtactccaagctgaccgtggacaag
tcgagatggcagcaggggaacgtgttctcgtgctccgtgatgcacgaagcgctgcacaac
cactatacccagaagtccctgtgcctgtcccctgga

のヌクレオチド配列を有する。

【０２４０】

Ｖ．薬物コンジュケーション

本明細書に記載したメイタンシノイド化合物に共有結合的に結合した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントを含む免疫コンジュゲートは、当該技術分野で公知のあらゆる適切な方法に従って調製することができる。

【０２４１】

特定の実施形態では、第１の実施形態の免疫コンジュゲートは、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと、第２の実施形態に記載した式（ＩＩ）のメイタンシノイド化合物とを反応させる工程を含む第１の方法によって調製することができる。

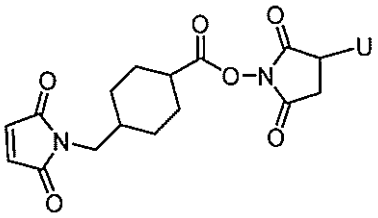
【０２４２】

特定の実施形態では、第１の実施形態の免疫コンジュゲートは：

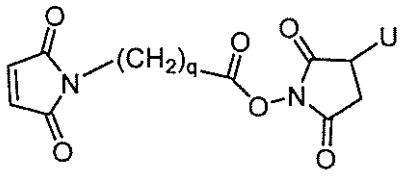
（ａ）式（ＩＩＩ）または（ＩＶ）のメイタンシノイド化合物と、本明細書に記載したリンカー化合物とを反応させて、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメント（または、ＣＢＡ）に対して共有結合的に結合することができる、アミン反応性基、または、チオール反応性基を結合してなる細胞傷害性薬－メイタンシノイド化合物を形

成する；及び
（ｂ）抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと、メイタンシノイド－リンカー化合物とを反応させて、免疫コンジュケートを形成する工程を含む、第２の方法によって調製することができる。
【０２４３】
特定の実施形態では、第１の実施形態の免疫コンジュゲートは：
（ａ）抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと、本明細書に記載したリンカー化合物とを反応させて、式（ＩＩＩ）または（ＩＶ）のメイタンシノイド化合物に対して共有結合的に結合することができる、アミン反応性基、または、チオール反応性基（例えば、式（ＩＩ）の化合物）を結合してなる改変した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントを形成する；及び
（ｂ）改変した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと、式（ＩＩＩ）または（ＩＶ）のメイタンシノイド化合物とを反応させて、免疫コンジュケートを形成する工程を含む、第３の方法によって調製することができる。
【０２４４】
特定の実施形態では、第１の実施形態の免疫コンジュケートは、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメント、リンカー化合物、及び、式（ＩＩＩ）または（ＩＶ）のメイタンシノイド化合物を反応させて、免疫コンジュケートを形成する、ことを含む第３の方法によって調製することができる。ある実施形態では、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと、式（ＩＩＩ）または（ＩＶ）のメイタンシノイド化合物をまず混合し、続いて、リンカー化合物を加える。
【０２４５】
特定の実施形態では、上記した第２、第３、または、第４の方法に関して、リンカー化合物は、式（ａ１Ｌ）～（ａ１０Ｌ）：

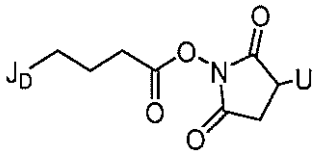
【化１１１】



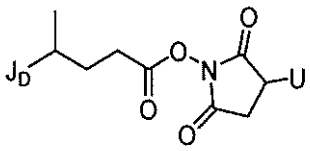
(a1L);



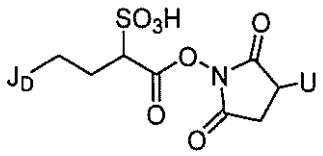
(a2L);



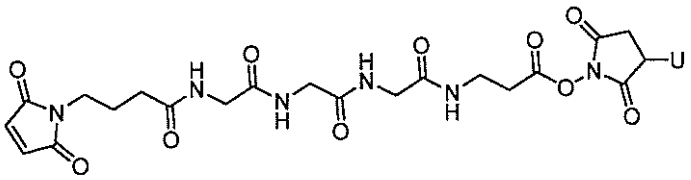
(a3L);



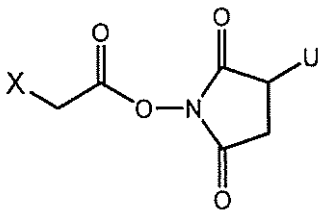
(a4L);



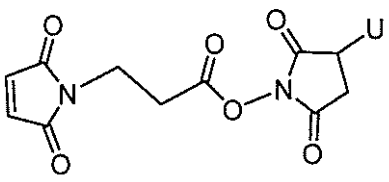
(a5L),



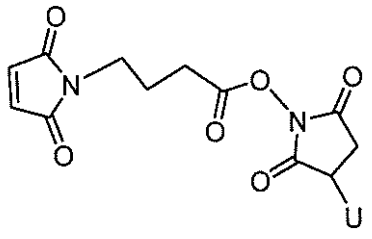
(a6L),



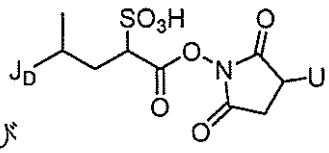
(a7L);



(a8L);



(a9L);及び



(a10L),

のいずれか１つによって表される：

式中、Ｘは、ハロゲンである；J_D　－ＳＨ、または、－ＳＳＲ^d；Ｒ^{d}は、フェニル、ニトロフェニル、ジニトロフェニル、カルボキシニトロフェニル、ピリジル、または、ニトロピリジルである；Ｒ^{g}は、アルキルである；及び、Ｕは、－Ｈ、または、SO_3H、または、医薬として許容可能なそれらの塩である。

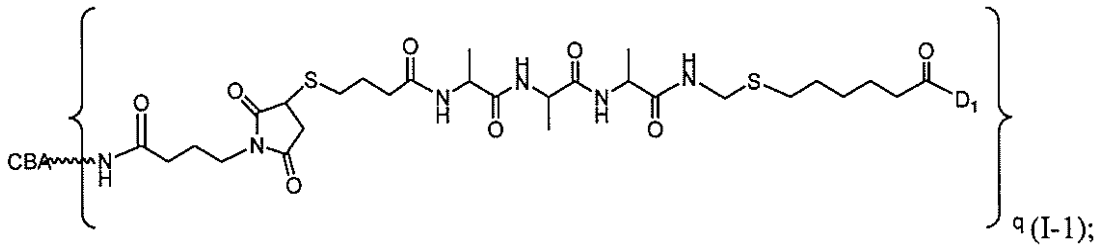
【０２４６】

ある実施形態では、リンカー化合物は、式（ａ９Ｌ）で表すＧＭＢＳ、または、スルホ－ＧＭＢＳであり、式中、Ｕは、－Ｈ、または、SO_3H、または、医薬として許容可能なそれらの塩である。

【０２４７】

特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュケートは、次の式：

【化１１２】

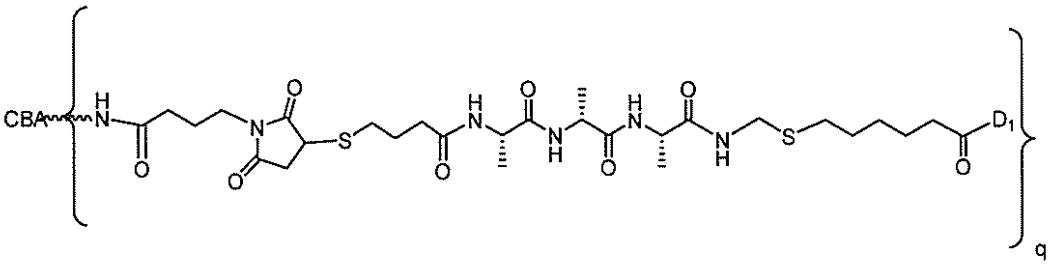


で表されるものであり、そして、免疫コンジュケートは、上記した第２、第３、または、第４の方法によって調製することができ、リンカー化合物は、式（ａ９Ｌ）で表されるＧＭＢＳまたはスルホ－ＧＭＢＳであり、式中、Ｕは、－Ｈ、または、SO_3H、または、医薬として許容可能なその塩であり；及び、メイタンシノイド化合物は、上記の式（Ｄ－１）で表される。より具体的な実施形態では、式（Ｉ－１）の免疫コンジュケートは、式（Ｄ－１）のメイタンシノイド化合物と、リンカー化合物ＧＭＢＳまたはスルホ－ＧＭＢＳとを反応させて、メイタンシノイド－リンカー化合物を形成し、続いて、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと、メイタンシノイドリンカー化合物とを反応させて調製する。なおも具体的な実施形態では、メイタンシノイドリンカー化合物は、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと反応させる前に、精製しない。

【０２４８】

別の特定の実施形態では、免疫コンジュケートは、次の式：

【化１１３】

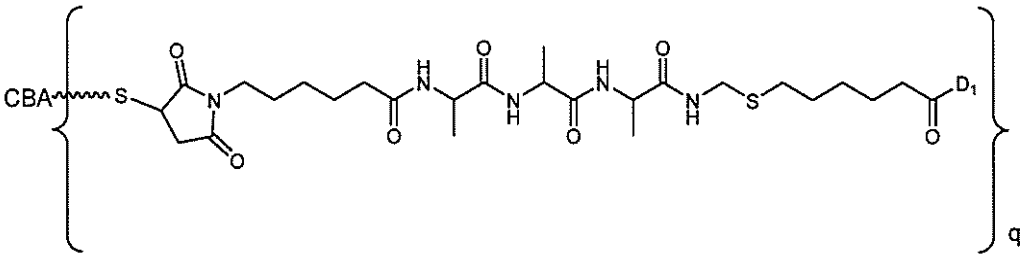


で表されるものであり、そして、免疫コンジュケートは、上記した第２、第３、または、第４の方法によって調製することができ、リンカー化合物は、式（ａ９Ｌ）で表されるＧＭＢＳまたはスルホ－ＧＭＢＳであり、式中、Ｕは、－Ｈ、または、SO_3H、または、医薬として許容可能なその塩であり；及び、メイタンシノイド化合物は、上記の式（Ｄ－２）で表される。より具体的な実施形態では、式（Ｉ－２）の免疫コンジュケートは、式（Ｄ－２）のメイタンシノイド化合物と、リンカー化合物ＧＭＢＳまたはスルホ－ＧＭＢＳとを反応させて、メイタンシノイド－リンカー化合物を形成し、続いて、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと、メイタンシノイドリンカー化合物とを反応させて調製する。なおも具体的な実施形態では、メイタンシノイドリンカー化合物は、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと反応させる前に、精製しない。

【０２４９】

別の特定の実施形態では、免疫コンジュケートは、次の式：

【化１１４】



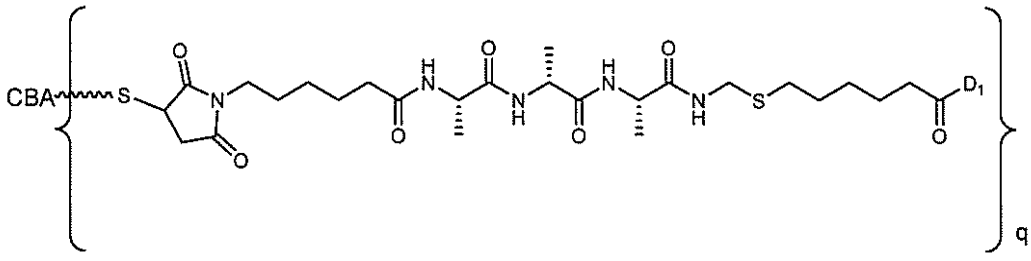
(I-3);

で表されるものであり、そして、免疫コンジュケートは、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと、上記の式（Ｄ－３）のメイタンシノイド化合物とを反応させて、上記した第１の方法によって調製することができる。

【０２５０】

別の特定の実施形態では、免疫コンジュケートは、次の式：

【化１１５】



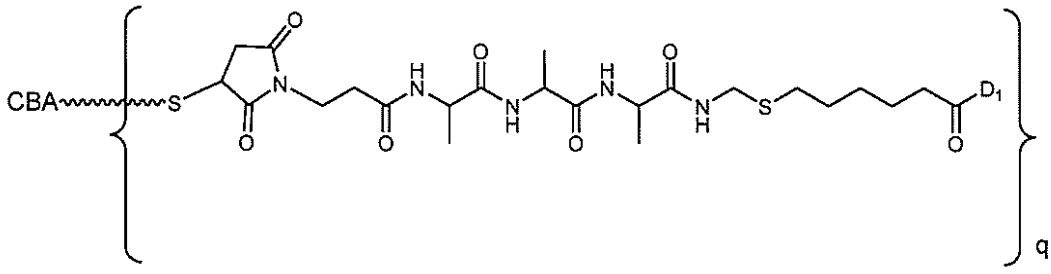
(I-4);

で表されるものであり、そして、免疫コンジュケートは、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと、上記の式（Ｄ－４）のメイタンシノイド化合物とを反応させて、上記した第１の方法によって調製することができる。

【０２５１】

別の特定の実施形態では、免疫コンジュケートは、次の式：

【化１１６】



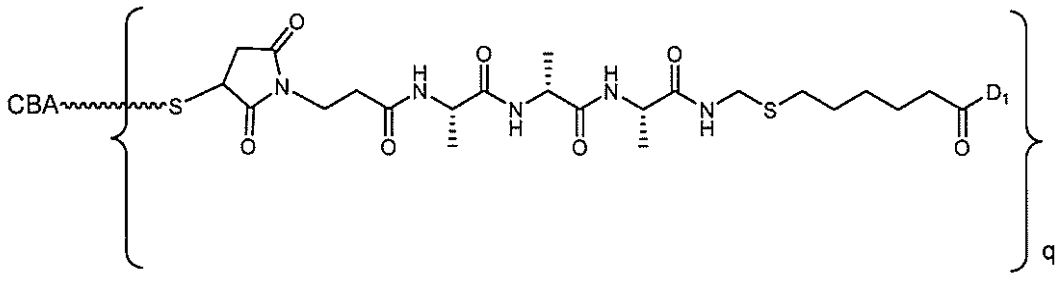
(I-5);

で表されるものであり、そして、免疫コンジュケートは、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと、上記の式（Ｄ－５）のメイタンシノイド化合物とを反応させて、上記した第１の方法によって調製することができる。

【０２５２】

別の特定の実施形態では、免疫コンジュケートは、次の式：

【化１１７】



(I-6);

で表されるものであり、そして、免疫コンジュケートは、抗ＡＤＡＭ９抗体、または、そのＡＤＡＭ９結合フラグメントと、上記の式（Ｄ－６）のメイタンシノイド化合物とを反応させて、上記した第１の方法によって調製することができる。

【０２５３】

一部の実施形態では、上記したいずれの方法で調製する免疫コンジュゲートも、精製工程に供する。この観点で、免疫コンジュゲートは、タンジェンシャルフローフィルトレーション（ＴＦＦ）、非吸着性クロマトグラフィー、吸着性クロマトグラフィー、吸着濾過、選択的な沈殿、または、あらゆるその他の適切な精製プロセス、及び、これらの組み合わせを用いて、混合物のその他の構成要素から精製することができる。

【０２５４】

一部の実施形態では、免疫コンジュゲートは、１回の精製工程（例えば、ＴＦＦ）を用いて精製する。好ましくは、コンジュゲートを精製し、１回の精製工程（例えば、ＴＦＦ）を用いて、適切な製剤へと交換する。本発明のその他の実施形態では、免疫コンジュゲートは、２つの連続的な精製工程を用いて精製する。例えば、免疫コンジュゲートは、まず、選択的沈殿、吸着濾過、吸着性クロマトグラフィー、または、非吸着性クロマトグラフィーを用いて精製を行い、その後、ＴＦＦを用いて精製することができる。当業者であれば、免疫コンジュゲートの精製によって、細胞傷害性薬に化学的にカップリングした細胞結合剤を含む安定なコンジュゲートの単離が可能になることを理解するだろう。

【０２５５】

精製のために、Ｐｅｌｌｉｃｏｎ型システム（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，Ｍａｓｓ．）、Ｓａｒｔｏｃｏｎ Ｃａｓｓｅｔｔｅシステム（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ ＡＧ，Ｅｄｇｅｗｏｏｄ，Ｎ．Ｙ．）、及び、Ｃｅｎｔｒａｓｅｔｔｅ型システム（Ｐａｌｌ Ｃｏｒｐ．，Ｅａｓｔ Ｈｉｌｌｓ，Ｎ．Ｙ．）など、あらゆる適切なＴＦＦシステムを利用し得る。

【０２５６】

あらゆる適切な吸着性クロマトグラフィー樹脂を、精製に利用し得る。好ましい吸着性クロマトグラフィー樹脂としては、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性電荷誘導クロマトグラフィー（ＨＣＩＣ）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）、イオン交換クロマトグラフィー、混合モードイオン交換クロマトグラフィー、固定した金属アフィニティクロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）、染料リガンドクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、及び、これらの組み合わせがある。適切なヒドロキシアパタイト樹脂の例として、セラミックヒドロキシアパタイト（ＣＨＴ Ｔｙｐｅ Ｉ、及び、Ｔｙｐｅ ＩＩ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）、ＨＡ Ｕｌｔｒｏｇｅｌヒドロキシアパタイト（Ｐａｌｌ Ｃｏｒｐ．，Ｅａｓｔ Ｈｉｌｌｓ，Ｎ．Ｙ．）、及び、セラミックフルオロアパタイト（ＣＦＴ Ｔｙｐｅ Ｉ、及び、Ｔｙｐｅ ＩＩ，Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）がある。適切なＨＣＩＣ樹脂の一例が、ＭＥＰ Ｈｙｐｅｒｃｅｌ樹脂である（Ｐａｌｌ Ｃｏｒｐ．、Ｅａｓｔ Ｈｉｌｌｓ，Ｎ．Ｙ．）。適切なＨＩＣ樹脂の例として、ブチル－セファロース、ヘキシル－セファロース、フェニル－セファロース、及び、オクチルセファロース樹脂、（すべ

て、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）、ならびに、Ｍａｃｒｏ－ｐｒｅｐ Ｍｅｔｈｙｌ、及び、Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ｔ－Ｂｕｔｙｌ樹脂（Ｂｉｏｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）がある。適切なイオン交換樹脂の例として、ＳＰ－セファロース、ＣＭ－セファロース、及び、Ｑ－セファロース樹脂（すべてＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）、及び、Ｕｎｏｓｐｈｅｒｅ Ｓ樹脂（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）がある。適切な混合モードイオン交換機の例として、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ ＡＢｘ樹脂（ＪＴ Ｂａｋｅｒ，Ｐｈｉｌｌｉｐｓｂｕｒｇ，Ｎ．Ｊ．）がある。適切なＩＭＡＣ樹脂の例として、Ｃｈｅｌａｔｉｎｇ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ樹脂（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）、及び、Ｐｒｏｆｉｎｉｔｙ ＩＭＡＣ樹脂（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）がある。適切な染料リガンド樹脂の例として、Ｂｌｕｅ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ樹脂（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）、及び、Ａｆｆｉ－ｇｅｌ Ｂｌｕｅ樹脂（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）がある。適切なアフィニティ樹脂の例として、抗体を細胞結合剤としているタンパク質Ａセファロース樹脂（例えば、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）、及び、細胞結合剤に適切なレクチン結合部位を担持させているレクチンアフィニティ樹脂、例えば、Ｌｅｎｔｉｌ Ｌｅｃｔｉｎ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ樹脂（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）がある。あるいは、細胞結合剤に特異的な抗体を使用し得る。このような抗体は、例えば、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ４ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ樹脂（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）に固定することができる。適切な逆相樹脂の例として、Ｃ４、Ｃ８、及び、Ｃ１８樹脂（Ｇｒａｃｅ Ｖｙｄａｃ，Ｈｅｓｐｅｒｉａ，　Ｃａｌｉｆ．）がある。

【０２５７】

あらゆる適切な非吸着性クロマトグラフィー樹脂を、精製に利用し得る。適切な非吸着性クロマトグラフィーの例として、ＳＥＰＨＡＤＥＸＴＭ　Ｇ－２５、Ｇ－５０、Ｇ－１００、ＳＥＰＨＡＣＲＹＬＴＭ樹脂（例えば、Ｓ－２００、及び、Ｓ－３００）、ＳＵＰＥＲＤＥＸＴＭ樹脂（例えば、ＳＵＰＥＲＤＥＸＴＭ　７５、及び、ＳＵＰＥＲＤＥＸＴＭ　２００）、ＢＩＯ－ＧＥＬ（登録商標）樹脂（例えば、Ｐ－６、Ｐ－１０、Ｐ－３０、Ｐ－６０、及び、Ｐ－１００）、及び、当業者に公知のその他のものがあるが、これらに限定されない。

【０２５８】

ＶＩ．本発明の免疫コンジュゲートの使用

本発明は、本発明の免疫コンジュゲートを含む医薬組成物などの組成物を含む。

【０２５９】

本明細書に記載した通り、本明細書に記載したヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９－ＶＬ、及び／または、ＶＨドメインを含む本発明の免疫コンジュゲートは、細胞の表面に存在するＡＤＡＭ９に結合し、そして、細胞死へと媒介する能力を有している。特に、薬理学的作用物質を含む本発明の免疫コンジュゲートは、インターナリゼーションされ、そして、薬理学的作用物質の活性によって細胞死を媒介する。このような細胞死活性は、抗体依存性の細胞が介在する細胞傷害性（ＡＤＣＣ）、及び／または、相補性依存性の細胞傷害性（ＣＤＣ）を誘発する免疫コンジュゲートによって強化し得る。

【０２６０】

したがって、本明細書に記載したヒト化／最適化した抗ＡＤＡＭ９－ＶＬ、及び／または、ＶＨドメインを含む本発明の免疫コンジュゲートは、ＡＤＡＭ９の発現と関連すること、または、ＡＤＡＭ９の発現によって特徴決定される、あらゆる疾患または病態を治療する能力を有している。上記した通り、ＡＤＡＭ９は、数多くの血液及び固形悪性腫瘍で発現するがん性胚細胞抗原であり、ほとんど分化しない形態を示す重度腫瘍と関係があり、そして、臨床転帰不良と相関関係がある。したがって、限定を意図するものではないが

、本発明の免疫コンジュゲートを、がんの治療、特に、ＡＤＡＭ９の発現によって特徴決定されるがんの治療に使用することができる。

【０２６１】

その他の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、大腸癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、腎細胞癌、前立腺癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌、子宮癌、卵巣癌、肝臓癌、子宮頸癌、甲状腺癌、精巣癌、骨髄癌、黒色腫、及び、リンパ癌の治療において有用であり得る。その他の特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、非小細胞肺癌、大腸癌、胃癌、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ））、または、膵臓癌の治療において有用であり得る。

【０２６２】

さらなる実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、非小細胞肺癌（扁平上皮細胞癌、非扁平上皮細胞癌、腺癌、または、大細胞未分化腺癌）、及び、大腸癌（腺癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、原発性大腸リンパ腫、平滑筋肉腫、または、扁平上皮細胞癌）、または、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ））の治療において有用であり得る。

【０２６３】

治療における有用性に加え、本発明の免疫コンジュゲートは、検出可能に標識し得るものであり、また、がんの診断、または、腫瘍、及び、腫瘍細胞の画像化に使用し得る。

【０２６４】

ＶＩＩ．医薬組成物

本発明の組成物は、医薬組成物の製造に有用なバルク薬物組成物（例えば、純粋ではなく、または、滅菌していない組成物）、及び、単位投薬形態の調製に使用可能な医薬組成物（すなわち、対象または患者に投与するのに適した組成物）を含む。このような組成物は、予防または治療に有効量の本発明の免疫コンジュゲート、または、これら作用物質の組み合わせと、医薬として許容可能な担体とを含む。好ましくは、本発明の組成物は、予防または治療に有効量の本発明の免疫コンジュゲートと、医薬として許容可能な担体とを含む。本発明はまた、特定のがん抗原に特異的な第２の治療抗体（例えば、腫瘍特異性のモノクローナル抗体）と、医薬として許容可能な担体とをさらに含む、このような医薬組成物を含む。

【０２６５】

特定の実施形態では、用語「医薬として許容可能な」は、連邦政府または州政府の規制機関によって承認されているか、または、動物への使用、より具体的にはヒトへの使用について、米国薬局方、または、その他の一般的に認識されている薬局方に列挙されていることを意味する。用語「担体」とは、治療薬と一緒に投与される希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントのアジュバント（完全または不完全）、賦形剤、または、ビヒクルのことを指す。一般的に、本発明の組成物の成分は、別個に供給されるか、または、例えば、活性薬剤の量を示すアンプルまたは小袋などの気密密封した容器において、凍結乾燥ドライ粉末、または、水を含まない濃縮物として、単位投薬形態で一緒に混合する。組成物を、注入して投与する場合、滅菌医薬グレード水、または、生理食塩水を含む注入瓶に分注することができる。組成物を、注射で投与する場合、投与前に成分を混合することができるように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルを備えておくことができる。

【０２６６】

本発明は、本発明の免疫コンジュゲートだけを入れた、または、医薬として許容可能な担体をも一緒に入れた１つ以上の容器を含む医薬パックまたはキットも提供する。さらに、疾患の治療に有用な１つ以上のその他の予防薬剤または治療薬剤も、医薬パックまたはキットに含めることができる。本発明は、本発明の医薬組成物の１つ以上の成分を入れた１つ以上の容器を含む医薬パックまたはキットも提供する。任意に、このような容器（複数可）に、医薬品または生物学的製品の製造、使用、または、販売を規制する政府機関が発出した所定様式の注意書を添付することができ、この注意書は、ヒトへの投与のための製造、使用、または、販売に関する当該機関による承認を反映している。

【０２６７】
本発明は、上記した方法で使用可能なキットを提供する。キットは、本発明のあらゆる免疫コンジュゲートを含むことができる。キットは、１つ以上の容器に、がんの治療に有用な１つ以上のその他の予防薬、及び／または、治療薬をさらに収納させることができる。
【０２６８】
ＶＩＩＩ．投与の方法
本発明の組成物は、対象に対して、有効量の本発明の免疫コンジュゲートを投与することで、疾患、障害に関連する１つ以上の症状の治療、予防、及び、軽減のために与え得る。好ましい態様では、このような組成物は、実質的に精製している（すなわち、その効果を制限するか、または、望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない）。特定の実施形態では、対象は、動物、好ましくは、哺乳動物、例えば、非霊長類（例えば、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、齧歯類など）、または、霊長類（例えば、サル、例えば、カニクイザル、ヒトなど）である。好ましい実施形態では、対象は、ヒトである。
【０２６９】
例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル、抗体、または、融合タンパク質を発現することが可能な組換え細胞への封入、受容体が介在するエンドサイトーシス（例えば、Ｗｕ ｅｔ ａｌ．（１９８７）“Ｒｅｃｅｐｔｏｒ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｂｙ Ａ Ｓｏｌｕｂｌｅ ＤＮＡ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍ”, Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２）、レトロウイルス、または、その他のベクターの一部としての核酸の構築など、様々な送達系が知られており、そして、本発明の組成物を投与するために使用可能である。
【０２７０】
本発明の免疫コンジュゲートを投与する方法として、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、及び、皮下）、硬膜外、及び、粘膜（例えば、経鼻、及び、口腔経路）があるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートを、筋肉内投与、静脈内投与、または、皮下投与する。組成物は、あらゆる簡便な経路、例えば、注入またはボーラス注射で投与し得るものであり、その他の生物学的に活性な作用物質と共に投与し得る。投与は、全身投与、または、局所投与で行うことができる。
【０２７１】
本発明は、本発明の免疫コンジュゲートの製剤を、分子の量が表示された密閉密封式容器、例えば、アンプルまたは小袋に封入して提供もする。ある実施形態では、このような分子は、密閉密封式容器において、乾燥滅菌した凍結乾燥粉末、または、水を含まない濃縮物として供給され、対象に投与するために、例えば、水または生理食塩水で適切な濃度になるまで再構築することができる。好ましくは、本発明の免疫コンジュゲートは、密閉密封式容器において、滅菌凍結ドライ粉末として供給する。
【０２７２】
本発明の免疫コンジュゲートの凍結乾燥した製剤は、その当初の容器において、２℃～８℃で保存すべきであり、分子は、再構築してから１２時間以内、好ましくは６時間以内、５時間以内、３時間以内、または、１時間以内に投与すべきである。別の実施形態では、このような分子は、分子、融合タンパク質、または、結合した分子の量及び濃度を示す、密閉密封式容器にて液体形態として供給する。好ましくは、このような免疫コンジュゲートを、液体形態で提供する場合、密閉密封式容器で供給する。
【０２７３】
本明細書で使用する医薬組成物の「有効量」とは、臨床結果、例えば、疾患に起因する症状の抑制、感染の症状（例えば、ウイルスの負荷、熱、痛み、敗血症など）、または、がんの症状（例えば、がん細胞の増殖、腫瘍の存在、腫瘍の転移など）を緩和して、疾患を患う者の生活の質を上げること、疾患を治療するのに必要なその他の医薬の投薬量を減らすこと、標的化、及び／または、インターナリゼーションなどによって別の医薬の効果

を高めること、疾患の進行を遅延させること、及び／または、個人の生存時間を延長するなど、有益な結果、または、望ましい結果を与えるのに十分な量のことを指すが、これらに限定されない。１回以上の投与で、有効量を投与し得る。本発明の目的のために、薬物、化合物、または、医薬組成物の有効量とは：がん細胞を死滅させ、及び／または、がん細胞の増殖を抑制し、及び／または、がんの原発性部位からの転移を解消、抑制し、及び／または、転移の進行を遅延させるのに十分な量のことである。

【０２７４】

本発明の医薬組成物は、治療が必要な領域に局所的に投与し得る；このことは、例えば、限定を意図するものではないが、局所的な注入、注射によって、または、移植手段によって達成し得るものであり、移植物は、シリコン膜などの膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性、または、ゼラチン状の材料で作られている。好ましくは、本発明の免疫コンジュゲートを投与する場合、分子を吸収しない材料を使用すること、に注意を払わなくてはならない。

【０２７５】

本発明の組成物は、小胞、特にリポソーム内に送達することができる（Ｌａｎｇｅｒ（１９９０）“Ｎｅｗ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ”，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３）；Ｔｒｅａｔ ｅｔ ａｌ，ＬＩＰＯＳＯＭＥＳ ＩＮ ＴＨＥ ＴＨＥＲＡＰＹ ＯＦ ＩＮＦＥＣＴＩＯＵＳ ＤＩＳＥＡＳＥ ＡＮＤ ＣＡＮＣＥＲ，Ｌｏｐｅｚ－Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｆｉｄｌｅｒ（ｅｄｓ．），Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．３５３－３６５（１９８９）；Ｌｏｐｅｚ－Ｂｅｒｅｓｔｅｉｎ，前出，ｐｐ．３１７－３２７を参照されたい）。

【実施例】

【０２７６】

本発明を概説的に記載してきたが、以下の実施例を参照することで、本発明の理解が容易に深まるであろう。以下の実施例は、本発明の診断方法または治療方法での組成物に関する様々な方法を示す。これらの実施例は、本発明の説明を意図しているものであって、本発明の範囲を、いかなる様式にも限定するものではない。

【０２７７】

実施例１

抗ＡＤＡＭ９抗体ＭＡＢ－Ａの腫瘍細胞特異性

マウス抗ＡＤＡＭ９抗体（本明細書ではＭＡＢ－Ａと称する）は：（１）ＡＤＡＭ９の標的タンパク質処理活性をブロックし；（２）内部移行し；及び、（３）抗腫瘍活性を有することが同定された（例えば、米国特許第８３６１４７５号を参照されたい）。ＭＡＢ－Ａの腫瘍細胞特異性を、ＩＨＣで観察した。腫瘍組織を、ＭＡＢ－Ａ（０．４μｇ／ｍＬ）と接触させ、または、アイソタイプ対照（０．４μｇ／ｍＬ）と接触させ、そして、染色の程度を視覚化した。ＭＡＢ－Ａは、様々な大細胞癌、扁平上皮細胞癌、及び、腺癌非小細胞肺癌細胞型（図１Ａ）、乳癌細胞、前立腺癌細胞、胃癌細胞（図１Ｂ）、ならびに、結腸癌試料（図１Ｃ）を強く標識することが認められた。正常組織を、ＭＡＢ－Ａ（１．２５μｇ／ｍＬ）と接触させ、そして、染色の程度を視覚化した。上記の表２にまとめたように、ＭＡＢ－Ａは、多種多様な正常組織の染色をほとんど示さず、または、全く示さなかった。これらの試験に使用したＭＡＢ－Ａの濃度は、腫瘍細胞の染色に使用したもののほぼ３倍であった、ことを注記しておく。これらのＩＨＣ試験の結果は、ＭＡＢ－Ａが、正常細胞よりも腫瘍細胞に対して、優先的で強力な結合を奏することを示している。

【０２７８】

実施例２

種の交差反応性

ヒトＡＤＡＭ９（ｈｕＡＤＡＭ９）、及び、カニクイザルＡＤＡＭ９（ｃｙｎｏＡＤＡＭ９）に対するＭＡＢ－Ａの結合を試験した。要するに、ｈｕＡＤＡＭ９、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９、無関係の抗原を一次的に発現する２９３－ＦＴ細胞、及び、ＣＨＯ－Ｋ細胞、ま

たは、トランスフェクトしていない親細胞を、ＭＡＢ－Ａと共にインキュベートし、その後、ヤギ抗マウスＰＥ二次抗体と共にインキュベートし、そして、ＦＡＣＳで分析した。図２に示したように、ＭＡＢ－Ａは、両方の細胞型を一時的に発現するｈｕＡＤＡＭ９に対して強力な結合を示す。ｃｙｎｏＡＤＡＭ９に対するＭＡＢ－Ａの結合は、芳しくない。ＭＡＢ－Ａは、親細胞または無関係な抗原を発現する細胞に対して結合しなかった。ＥＬＩＳＡアッセイでは、ｃｙｎｏＡＤＡＭに対する同様の低レベルの結合が認められた。

【０２７９】

実施例３

ヒト化、及び、初期最適化

ＭＡＢ－Ａのヒト化によって、本明細書で「ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（１）」と称するヒト化ＶＨドメイン、及び、本明細書で「ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（１）」と称するヒト化ＶＬドメインを得た。次いで、結合活性を高め、及び／または、以下にさらに詳述する潜在的に不安定なアミノ酸残基を除去するために、ヒト化可変ドメインを最適化した。この１回目の最適化によって、本明細書で「ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２）」、「ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（３）」、及び、「ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（４）」と称する３つのさらなるヒト化ＶＨドメインと、本明細書で「ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（２）」、「ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（３）」、及び、「ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（４）」と称する３つのさらなるヒト化ＶＬドメインとを得た。加えて、マウスＶＨドメイン、及び、ＶＬドメインと、ヒト定常領域とを有するＭＡＢ－Ａのキメラ態様（「ｃｈＭＡＢ－Ａ」）を作成した。マウス、及び、ヒト化／最適化したＶＨ、及び、ＶＬドメインのアミノ酸配列は前出の通りであり、アラインメントを、図３Ａ及び３Ｂに示している。これらのヒト化／最適化したＶＨ、及び、ＶＬドメインのコンセンサス配列は前出の通りである。複数のヒト化可変ドメインを作り出す場合、特定の抗ＡＤＡＭ９抗体（例えば、ＭＡＢ－Ａ）のヒト化重鎖、及び、軽鎖可変ドメインを、あらゆる組み合わせで使用することができ、そして、ヒト化鎖の特定の組み合わせは、特定のＶＨ／ＶＬドメインを参照して参考にしており、例えば、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（１）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（２）を含む抗体は、具体的に「ｈＭＡＢ－Ａ（１．２）」と称する。

【０２８０】

ヒト生殖細胞系列ＶＨ３－２１、及び、ＶＨ３－６４から誘導するフレームワーク領域を含むｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（１）、また、ヒト生殖細胞系列Ｂ３及びＬ６から誘導するフレームワーク領域を含むｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（１）を作成した。これらのヒト化可変ドメインに、マウスＣＤＲは保持されていた。

【０２８１】

潜在的な脱アミド化部位が、CDR_H2で同定されており（図３Ａで１本の下線で示している）、また、潜在的なアスパラギン酸異性化部位が、CDR_L1で同定された（図３Ｂで１本の下線で示している）。これらの位置でのアミノ酸置換を調べ、結合アフィニティを維持しつつ、これらの部位を除去するための置換を特定した。CDR_H2（ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２）に存在）の位置５４（Ｎ５４Ｆ）でのフェニルアラニンの置換と、CDR_L1（ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（２）に存在）の位置２８（Ｄ２８Ｓ）でのセリンでの置換を選択し、ここで、付番は、Ｋａｂａｔに従う。同定した置換を別個に使用してもよく、または、組み合わせても使用し得る。驚くべきことに、Ｎ５４Ｆ置換を含む抗体は、ヒトＡＤＡＭ９に対するアフィニティが約２倍にも増加しており（例えば、以下の表３を参照されたい）、また、カニクイザルＡＤＡＭ９に対しては、わずかに向上した結合を示すことがわかった。

【０２８２】

さらに、ＣＤＲに存在するリシン残基の数を最小限にするために、最適化した変異体を作成した。２つのリシン残基がCDR_H2に存在しており（図３Ａで二重下線で示している）、また、１つのリシンがCDR_L1に存在する（図３Ｂに二重下線で示している）。これらの位置でのアミノ酸置換を調べ、結合アフィニティを維持した置換を特定した。位置６２でのアルギニンの置換（Ｋ６２Ｒ）、位置６４でのグルタミンの置換（Ｋ６４Ｑ）

、及び、位置６５でのセリンの置換（Ｓ６５Ｇ）を、ＣＤＲ$_{H}$２（ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（３）に存在する）のために選択し、ここで、付番は、Ｋａｂａｔに従う。位置２４でのアルギニンの置換（Ｋ２４Ｒ）を、ＣＤＲ$_{L}$１（ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（３）に存在する）のために選択した。同定した置換を別個に使用してもよく、または、組み合わせても使用し得る。

【０２８３】

ＣＤＲに存在するその他の潜在的に不安定な残基を同定しており（図３Ａ～３Ｂに点線下線で示している）、１つは、ＣＤＲ$_{H}$１内の位置３４にあるメチオニン残基（Ｍ３４）であり、１つは、ＣＤＲ$_{L}$１内の位置３３にあるメチオニン残基（Ｍ３３）であり、そして、ＣＤＲ$_{L}$３内の位置９２（Ｈ９３）、９３（Ｅ９３）、及び、９４（Ｄ９４）にあるヒスチジン、グルタミン酸、及び、アスパラギン酸残基であり、付番は、Ｋａｂａｔに従う。これらの位置でのアミノ酸置換を調べ、結合アフィニティを維持した置換を特定した。位置３４でのイソロイシンの置換（Ｍ３４Ｉ）を、ＣＤＲ$_{H}$１のために選択し、そして、ＣＤＲ$_{L}$３の位置３３（Ｍ３３Ｌ）、９２（Ｈ９３Ｙ）、９３（Ｅ９３Ｓ）、及び、９４（Ｄ９４Ｔ）でのロイシン、チロシン、セリン、及び、トレオニンの置換を選択し、付番は、Ｋａｂａｔに従う。これらのそれぞれの位置を、前出の詳述した置換のすべてと組み合わせて容易に置換を行って、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（４）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ　ＶＬ（４）を得て、これらが互いに対を形成して、親マウス抗体と比較して、わずかながらも向上したアフィニティを保持した抗体を生成する場合には、脱アミド化または酸化の可能性が大きく下がり、そして、ＣＤＲにはリシン残基が存在しない。

【０２８４】

ｈｕＡＤＡＭに対するヒト化／最適化した抗体ｈＭＡＢ－Ａ（１．１）、ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）、ｈＭＡＢ－Ａ（２．３）、ｈＭＡＢ－Ａ（３．３）、ｈＭＡＢ－Ａ（４．４）、及び、キメラｃｈＭＡＢ－Ａ（マウスＶＨ／ＶＬドメインを含む）の相対的な結合アフィニティを、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）分析を用いて観察を行ったところ、Ｈｉｓタグ化可溶性ヒトＡＤＡＭ９（ヒスチジンを含有するタンパク質に融合するヒトＡＤＡＭ９の細胞外部分を含む「ｓｈＡＤＡＭ９－Ｈｉｓ」）は、固定した抗体でコーティングをした表面を通過した。要するに、それぞれの抗体を、Ｆａｂ２ヤギ抗ヒトＦｃ表面に捕捉し、次いで、異なる濃度（６．２５～１００ｎＭ）のｓｈＡＤＡＭ９－Ｈｉｓタンパク質存在下でインキュベートした。結合の速度論は、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）分析結合（正規化した１：１　Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル）によって決定した。これらの試験から計算したk_{a}、k_{d}、及び、K_{D}を表３に示す。ｃｙｎｏＡＤＡＭ９に対する結合を、上記した通り、ＦＡＣＳ、そして、ＥＬＩＳＡで試験した。

【表４】

表３

抗体	ｐＩ	ｈｕＡＤＡＭ９		
		k_{a}（×１０^{6}）	k_{d}（×１０$^{-3}$）	ＫＤ（ｎＭ）
ｃｈＭＡＢ－Ａ	6.61	1.3	4.7	3.6
ｈＭＡＢ－Ａ（１．１）	6.44	1.5	5.2	3.5
ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）	6.58	1.1	1.5	1.4
ｈＭＡＢ－Ａ（２．３）	6.58	1.3	1.7	1.3
ｈＭＡＢ－Ａ（３．３）	6.44	1.1	1.5	1.4
ｈＭＡＢ－Ａ（４．４）	6.73	1.0	2.0	2.0

【０２８５】

これらの試験の結果は、ヒト化／最適化した抗体が、親マウス抗体と比較して、ヒトＡＤＡＭ９に対して同じ、または、高い結合アフィニティを有することを示している。特に、ヒト化抗体にＮ５４Ｆ突然変異を導入すると、ｈｕＡＤＡＭ９（すなわち、ｈＭＡＢ－

Ａ（２．２）、ｈＭＡＢ－Ａ（２．３）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（３．３））に対する結合が向上することが認められた。この突然変異は、ＦＡＣＳ、及び、ＥＬＩＳＡで決定したように、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９に対する結合もわずかに向上させたが、これらの抗体は、依然としてｃｙｎｏＡＤＡＭ９に対する良好な結合を示さなかった。これらの試験は、アフィニティを抑制することなく、ＣＤＲからリシン残基を除去するために導入し得るさらなる置換も特定した。アフィニティに対する影響を最小限にしつつ、その他の潜在的に不安定な残基を除去するために、さらなる置換を同定した。

【０２８６】

実施例４

非ヒト霊長類ＡＤＡＭ９に対する結合の最適化

ランダム突然変異を使用して、ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）の重鎖CDR_H2（Ｋａｂａｔ位置５３～５８）、及び、CDR_H3（Ｋａｂａｔ位置９５～１００、及び、１００ａ～１００ｆ）ドメイン内に置換を導入した。これらの変異体をスクリーニングして、非ヒト霊長類ＡＤＡＭ９（例えば、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９）に対する結合が向上し、かつ、ｈｕＡＤＡＭ９に対する高アフィニティ結合を保持するクローンを同定した。CDR_H3（Ｋａｂａｔ位置１００ａ～１００ｆ）内の突然変異の２種類の独立したスクリーニングから、４８種類のクローンを選択した。表４は、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９に対する結合の向上に関して、２つの独立したスクリーニングから選択したｈＭＡＢ－Ａ（２．２）クローン由来のCDR_H3　Ｋａｂａｔ残基１００ａ～ｆのアミノ酸配列のアラインメントを示す。さらなるクローンアラインメントを、表５に示している。これらの表で示したように、各実験で、別個の置換パターンに含まれる同様のクローンが発生した。

【表５－１】

表４
ＭＡＢ－Ａの重鎖ＣＤＲＨ３のサブドメイン内の置換
（Ｋａｂａｔ位置　１００ａ～１００ｆ）

スクリーン１			スクリーン２		
クローンＩＤ	配列番号	CDR_H3サブドメイン配列	クローンＩＤ	配列番号	CDR_H3サブドメイン配列
ＭＡＢ－Ａ	81	GSRDYF	ＭＡＢ－Ａ	81	GSRDYF
1	82	DGEGVM	1	112	DGKAVL
2	82	DGEGVM	2	113	FNKAVL
3	83	FHSGLL	3	84	FNSATL
4	84	FNSATL	4	114	FNSGTW
5	85	FNSGTL	5	115	FNTGVF
6	86	FNSSTL	6	116	GKSRFH
7	87	GKSKWL	7	91	IGKGVF
8	88	GMGGTL	8	92	IGKGVL
9	89	HAKGGM	9	117	IGKNVY
10	90	IGEAVL	10	118	MGKGVM
11	91	IGKGVF	11	119	NGESVF
12	91	IGKGVF	12	120	PDFGWM
13	92	IGKGVL	13	121	PGSGVM
14	93	KHDSVL	14	122	PKDAWL
15	94	LNTAVM	15	99	PKFGWK
16	95	NGEGTL	16	99	PKFGWK
17	96	NGKNTL	17	123	PKFGWL
18	97	NSAGIL	18	124	PKIGWH
19	98	PKEGWM	19	124	PKIGWH
20	99	PKFGWK	20	124	PKIGWH
21	100	PKMGWV	21	125	PKMGWA
22	101	PRLGHL	22	126	PKMGWM
23	102	PSFGWA	23	126	PKMGWM
24	103	QAKGTM	24	126	PKMGWM
25	104	RGMGVM	25	126	PKMGWM
26	105	RKEGWM	26	127	PQMGWL
27	106	TGKGVL	27	128	PRFGWL
28	107	TGMGTL	28	128	PRFGWL
29	108	TGNGVM	29	128	PRFGWL
30	108	TGNGVM	30	129	PRMGFL
31	109	WNAGTF	31	130	PRMGFM
32	110	YHHTPL	32	131	PSFGWM

【表５－２】

33	110	YHHTPL	33	132	RREGWM
34	111	YQSATL	34	133	SGEGVL
			35	134	SGNGVM
			36	135	VGKAVL

【表６】

表５
ＭＡＢ－Ａの重鎖ＣＤＲＨ３のサブドメイン内の置換
（Ｋａｂａｔ位置　１００ａ～１００ｆ）

クローンＩＤ	配列番号	CDR_H3 サブドメイン 配列
ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ａ）	85	FNSGTL
ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｂ）	92	IGKGVL
ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｃ）	128	PRFGWL
ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｄ）	106	TGKGVL
ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｅ）	136	DSNAVL
ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｆ）	137	FHSGTL
ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｇ）	113	FNKAVL
ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｈ）	138	GGSGVL
ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）	139	PRQGFL
ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｊ）	140	YNSGTL

【０２８７】

試験したすべてのクローンについて、位置４（Ｐ４）で、Ｇｌｙ及びＡｌａが好ましいアミノ酸残基であり、そして、位置６（Ｐ６）で、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ及びＰｈｅが好ましいアミノ酸残基である。その他の位置（例えば、位置２（Ｐ２）、位置３（Ｐ３）、及び、位置５（Ｐ５））の好ましいアミノ酸残基は、Ｐ１で認められるアミノ酸残基によって変化する。位置１（Ｐ１）にＰｒｏ残基を有するクローンについて、Ｐ２にはＬｙｓ及びＡｒｇが好ましく、Ｐ３にはＰｈｅ及びＭｅｔ、Ｐ４にはＧｌｙ、Ｐ５にはＴｒｐまたはＰｈｅが好ましい。Ｐ１にＰｈｅ、Ｔｙｒ、または、Ｔｒｐを有するクローンの場合、Ｐ２にＡｓｎ及びＨｉｓが好ましく、Ｐ３にはＳｅｒ及びＨｉｓ、及び、Ｐ６にはＬｅｕが好ましい。Ｐ１にＩｌｅ、Ｌｅｕ、または、Ｖａｌを有するクローンの場合、Ｐ２にはＧｌｙが好ましく、Ｐ３にはＬｙｓ、Ｐ５にはＶａｌ、そして、Ｐ６には疎水性のものが好ましい。加えて、表４からわかるように、Ｐ１にＴｈｒ残基を有する場合、Ｐ２にはＧｌｙが好ましく、Ｐ３にはＬｙｓ、Ｍｅｔ、及び、Ａｓｎが好ましく、Ｐ４にはＧｌｙが好ましく、Ｐ５にはＶａｌ、または、Ｔｈｒが好ましく、及び、Ｐ６にはＬｅｕ、及び、Ｍｅｔが好ましい。Ｐ１にＡｓｐ、Ｇｌｙ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、または、Ｓｅｒ残基を有するさらなるクローンも、さらに低い頻度で同定した（表４及び表５を参照されたい）。

【０２８８】

表５に示した１０種類のクローンのＶＨドメインを使用して、ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）のさらなる最適化した変異体を作成し、このものを、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ａ．２）－（２Ｊ．２）と称した。選択したクローンの結合を、ＥＬＩＳＡアッセイで試験した。要するに、ヒスチジン含有ペプチドに結合し、マイクロタイタープレートにコーティングした抗体を使用して、Ｈｉｓペプチドタグ化可溶性ｃｙｎｏＡＤＡＭ９（「ｃｙｎｏＡＤＡＭ９－Ｈｉｓ」）（１μｇ／ｍＬ）、または、Ｈｉｓペプチドタグ化可溶性ｈｕＡＤＡＭ９（１

μｇ／ｍＬ）を捕捉し、そして、親ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）、及び、１０種類のＣＤＲ$_{H}$３　ｈＭＡＢ－Ａ（２Ａ．２）変異体の段階的希釈物の結合を試験した。ｃｙｎｏＡＤＡＭ９、及び、ｈｕＡＤＡＭ９の結合曲線を、それぞれ、図４Ａ及び４Ｂに示した。ｃｙｎｏＡＤＡＭ９に対する、ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｂ）、ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｃ）、ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｄ）、及び、ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ）の改善した結合を示す選択したＶＨドメインのそれぞれを含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ａ．２）変異体は、親ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）抗体と同様のｈｕＡＤＡＭ９に対する結合を維持しつつ、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９結合において最も高い改善を示した。

【０２８９】

ｈｕＡＤＡＭ９－Ｈｉｓ、及び、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９－Ｈｉｓに対するヒト化／さらに最適化した抗体ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｂ．２）、ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｃ．２）、ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｄ．２）、及び、ＭＡＢ－Ａ　ＶＨ（２Ｉ．２）、及び、親のｈＭＡＢ－Ａ（２．２）の相対的な結合アフィニティを、本質的に上記したようにして、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）分析を用いて観察した。これらの試験から計算したk_a、k_d及びK_Dを表６に示す。

【表７】

表６

抗体	ｈｕＡＤＡＭ９			ｃｙｎｏＡＤＡＭ９		
	k_a（×１０^5）（$M^{-1}s^{-1}$）	k_d（×１０$^{-4}$）（s^{-1}）	ＫＤ（ｎＭ）	k_a（×１０^5）（$M^{-1}s^{-1}$）	k_d（×１０$^{-4}$）（s^{-1}）	ＫＤ（ｎＭ）
ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）	9.0	5.5	0.6	2.0	220	110
ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｂ．２）	6.1	3.9	0.6	3.4	0.66	0.2
ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｃ．２）	5.9	8.1	1.4	3.5	<0.1	<0.3
ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｄ．２）	6.9	5.8	0.8	4.2	3.0	0.7
ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）	6.6	2.3	0.4	4.0	0.85	0.2

【０２９０】

結合試験は、４種類の上位のクローンが、親抗体としてｈｕＡＤＡＭ９に対して結合するのと同じ高さのアフィニティを維持しつつ、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９に対する結合アフィニティにおいて、１５０～５５０倍の改善を示したことを実証している。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｃ．２）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）を、さらなる試験のために選択した。

【０２９１】

実施例５

抗体ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）の免疫組織化学試験

ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）の細胞特異性を、ＩＨＣで観察した。陽性対照、及び、陰性対照細胞、及び、正常なヒト及びカニクイザル組織を、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（２．５μｇ／ｍＬ）、または、アイソタイプ対照（２．５μｇ／ｍＬ）と接触させ、そして、染色の程度を視覚化した。この試験の結果を、表７にまとめている。

【表８－１】

表７

細胞／組織	ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（２．５μｇ／ｍｌ）	ＩｇＧ１陰性対照（２．５μｇ／ｍｌ）
Ｃｈｏ－Ｋ親細胞	－	－
Ｃｈｏ－Ｋ／ｈｕＡＤＡＭ９中低度の発現Ｐ：１	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで、及び１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生	－
Ｃｈｏ－Ｋ／ｈｕＡＤＡＭ９高度な発現	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）頻繁	－
Ｃｈｏ－Ｋ／ｃｙｎｏＡＤＡＭ９クローン２	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）頻繁	－
Ｃｈｏ－Ｋ／ｃｙｎｏＡＤＡＭ９クローン１６番	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）頻繁	－
Ａ４９８細胞	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで、及び１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生から頻繁に発生まで	－
直腸ＭＧ０６－ＣＨＴＮ－９６Ｂ	－	マクロファージと一致する多くの２－４＋（ｇｒ　ｃ）細胞
肺ＭＧ０６－ＣＨｔＮ－１６２Ｂ１　Ａ	－	マクロファージと一致する時折発生する２－４＋（ｇｒ　ｃ）細胞
肝臓ＩＬＳ１１１０３Ｂ	－	肝細胞１＋（ｇｒ　ｃ）稀から時々発生まで
膵臓ＩＬＳ１０２６６	－	－
Ｈｅａｒｔ　Ｌｉｆｅ　Ｌｅｇａｃｙ　０９１００３５Ｄ	－	多くの１－３＋リポフスチン顔料と一致する（ｇｒ　ｃ）の小さな病巣を有する心筋細胞
腎臓ＩＬＳ１０２４１Ｂ	－	尿細管上皮１＋（ｇｒ　ｃ）稀
膀胱ＩＬＳＤ８０１１Ｊ	－	マクロファージと一致する時折発生する２－４＋（ｇｒ　ｃ）細胞

【表８－２】

Ｃｙｎｏ結腸１番	－	粘膜上皮（管腔膜）２－４＋稀から時々発生まで、及び１＋稀から時々発生まで；ＬＰ内の優先的なマクロファージと一致する多くの２－３＋（ｇｒ　ｃ）細胞
Ｃｙｎｏ肺１番	－	マクロファージと一致する非常に稀な２－４＋（ｇｒ　ｃ）細胞
Ｃｙｎｏ肝臓１番	－	－
Ｃｙｎｏ膵臓１番	－	－
Ｃｙｎｏ心臓１番	－	－
Ｃｙｎｏ腎臓０７０３６８Ｍ番	－	尿細管上皮２＋（ｇｒ　ｃ）稀、及び１＋（ｇｒ　ｃ）稀から時々発生まで
Ｃｙｎｏ膀胱１番	移行細胞上皮＋（ｇｒ　ｃ）稀	マクロファージと一致する稀な１－４＋（ｇｒ　ｃ）細胞
肺ＣＡ　ＩＬＳ１０１０８	Ｈスコア１５０	ｔｕ－
肺ＣＡ　ＩＬＳ７２２３	Ｈスコア１８０	ｔｕ－
肺ＣＡ　ＩＬＳ２１５６　Ａ	Ｈスコア８０	ｔｕ－
肺ＣＡ　ＩＬＳ７２９５　Ａ	Ｈスコア６０	ｔｕ－

【０２９２】

ＩＨＣ研究も行って、ヒト化／最適化したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）の結合を、１２．５μｇ／ｍＬの濃度（５ｘ最適染色濃度）で評価した。陽性対照細胞、及び、陰性対照細胞、及び、通常のヒト及びカニクイザルの組織を、この試験で使用した。この試験の結果を、表８にまとめている。

【表９－１】

表８

細胞／組織	ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（１２．５μｇ／ｍｌ）	ＩｇＧ１陰性対照（１２．５μｇ／ｍｌ）
Ｃｈｏ－Ｋ親細胞	－	－
Ｃｈｏ－Ｋ／ｈｕＡＤＡＭ９中低度の発現Ｐ：１	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生から頻繁に発生まで	－
Ｃｈｏ－Ｋ／ｈｕＡＤＡＭ９高度な発現	３－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生から頻繁に発生まで	－
Ｃｈｏ－Ｋ／ｃｙｎｏＡＤＡＭ９クローン２	３－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）頻繁	－
Ｃｈｏ－Ｋ／ｃｙｎｏＡＤＡＭ９クローン１６番	３－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）頻繁	－
Ａ４９８細胞	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生から頻繁に発生まで	－
直腸ＭＧ０６－ＣＨＴＮ－９６Ｂ	ｅｐｉ±－１＋稀から時々発生まで	試験物品及び陰性対象において、ＬＰ内の優先的なマクロファージと一致する多くの２－４＋（ｇｒ　ｃ）細胞
肺ＭＧ０６－ＣＨｔＮ－１６２Ｂ１　Ａ	肺胞細胞（望ましい肺細胞）２－３＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀、１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで；ＥＣ２－４＋（ｃ，ｍ）稀、１＋（ｃ，ｍ）稀	試験物品及び陰性対象において、マクロファージと一致する時々発生し播種された２－４＋（ｇｒ　ｃ）細胞
肝臓ＩＬＳ１１１０３Ｂ	－	試験物品及び陰性対象において、マクロファージと一致する時々発生し播種された２－４＋（ｇｒ　ｃ）細胞
膵臓ＩＬＳ１０２６６	導管上皮１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）非常に稀	細胞（望ましい腺房細胞）１＋（ｇｒ　ｃ）非常に稀；試験物品及び陰性対象において、マクロファージと一致する時々発生し播種された２－４＋（ｇｒ　ｃ）細胞

【表９－２】

Ｈｅａｒｔ　Ｌｉｆｅ　Ｌｅｇａｃｙ　０９１００３５Ｄ	－	リポフスシン顔料と一致する心筋細胞を含む多くの小さな病巣１－３＋顆粒染色は、試験物品及び陰性対照において、アーチファクトと一致した。
腎臓ＩＬＳ１０２４　１Ｂ	尿細管上皮１＋（ｇｒ　ｃ）稀から時々発生まで	尿細管上皮±（ｇｒ　ｃ）稀
膀胱ＩＬＳＤ８０１　１Ｊ	移行細胞上皮１＋（ｇｒ　ｃ）稀	試験物品及び陰性対象において、マクロファージと一致する稀な２－４＋（ｇｒ　ｃ）細胞
Ｃｙｎｏ結腸１番	－	粘膜上皮（管腔膜）２－４＋時々発生、及び１＋稀から時々発生まで
Ｃｙｎｏ肺１番	気管支上皮１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで、及び±（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生から頻繁に発生まで	－
Ｃｙｎｏ肝臓１番	－	－
Ｃｙｎｏ膵臓１番	－	－
Ｃｙｎｏ心臓１番	－	－
Ｃｙｎｏ腎臓０７０３６８Ｍ番	－	尿細管上皮１＋（ｇｒ　ｃ）稀、及び±（ｇｒ　ｃ）稀
Ｃｙｎｏ膀胱１番	移行細胞上皮２＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀及び１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで	－
肺ＣＡ　ＩＬＳ１０１０８	Ｈスコア１８０	ｔｕ－
肺ＣＡ　ＩＬＳ７２２３	Ｈスコア１８０	ｔｕ－
肺ＣＡ　ＩＬＳ２１５６　Ａ	Ｈスコア１１５	ｔｕ－
肺ＣＡ　ＩＬＳ７２９５　Ａ	Ｈスコア１１５	ｔｕ－

【０２９３】

２．５μｇ／ｍＬ、または、５μｇ／ｍＬで、ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）、ｈＭＡＢ－Ａ（２．３）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｃ．２）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）による結合の差を評価するために、比較ＩＨＣアッセイを行った。陽性対照細胞、及び、陰性対照細胞、及び、通常のヒト及びカニクイザルの組織を、この試験で使用した。この試験の結果を、表９にまとめている。

【表１０－１】

表9

組織	ｈＭＡＢ－Ａ（２．３）５ｕｇ／ｍＬ	ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）２．５μｇ／ｍＬ	ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｃ．２）２．５μｇ／ｍＬ	ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）２．５μｇ／ｍＬ	アイソタイプ対照５μｇ／ｍＬ
Ｃｈｏ－Ｋ親Ｐ：３	－	－	－	－	－
Ｃｈｏ－Ｋ／ｈｕ　ＡＤＡＭ９．２　中程度の発現Ｐ：１	１＋（ｃ）時々発生	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀及び１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで、及び１＋（ｇｒｃ＞ｍ）稀から時々発生まで	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで、及び１＋（ｇｒｃ＞ｍ）時々発生	－
Ｃｈｏ－Ｋ／ｈｕ　ＡＤＡＭ９．１８高度の発現Ｐ：１	３＋（ｍ，ｃ）頻繁	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生から頻繁に発生まで、及び１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生から頻繁に発生まで、及び１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）頻繁	－
Ｃｈｏ－Ｋ Ｃｙｎｏ２番	１＋（ｃ）時々発生	－	３－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）頻繁	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）頻繁	－
Ｃｈｏ－Ｋ Ｃｙｎｏ１６番	２＋（ｃ，ｍ）時々発生から頻繁に発生まで	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀及び１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで	３－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）頻繁	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）頻繁	－
Ａ４９８０７２２１０	３－４＋（ｃ，ｍ）頻繁	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀、及び１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生から頻繁に発生まで	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀、及び１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生	２－４＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで、及び１＋（ｇｒｃ＞ｍ）時々発生から頻繁に発生まで	－

【表１０－２】

肺ＣＡ　ＩＬＳ１０１０８	ＩＨＣスコア３	Ｈスコア５５	Ｈスコア１７	Ｈスコア１５０	－
肺ＣＡ　ＩＬＳ７２２３	ＩＨＣスコア３	Ｈスコア２０５	Ｈスコア１６０	Ｈスコア１８０	－
肺ＣＡ　ＩＬＳ２１５６　Ａ	ＩＨＣスコア１	Ｈスコア５	Ｈスコア０	Ｈスコア８０	－
肺ＣＡ　ＩＬＳ７２９５　Ａ	ＩＨＣスコア１	Ｈスコア１	Ｈスコア０	Ｈスコア６０	－

【０２９４】

２．５μｇ／ｍＬ、５μｇ／ｍＬ、または、１２．５μｇ／ｍＬで、ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）、ｈＭＡＢ－Ａ（２．３）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｃ．２）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）、及び、マウスＭＡＢ－Ａによる結合の差異を評価するために、さらなる比較ＩＨＣアッセイを行った。陽性対照細胞、及び、陰性対照細胞、及び、通常のヒト及びカニクイザルの組織をこの試験で使用した。この試験の結果を、表１０にまとめている。

【表１１－１】

表１０

組織	ｈＭＡＢ－Ａ（２．３）５ｕｇ／ｍＬ	ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）２．５μｇ／ｍＬ	ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｃ．２）２．５μｇ／ｍＬ	ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）１２．５μｇ／ｍＬ	ＭＡＢ－Ａ５μｇ／ｍＬ
結腸ＭＧ０６－ＣＨＴＮ－９６Ｂ	上皮１＋（ｃ，ｍ）稀；ｓｍ陰性	－	－	ｅｐｉ±－１＋稀から時々発生まで	上皮１－３＋［ｍ，ｃ］（時々発生から頻繁に発生まで）；その他（Ｎｅｇ）
肺ＭＧ０６－ＣＨｔＮ－１６２Ｂ１Ａ	肺細胞／マクロファージ２＋（ｃ，ｍ）時々発生	－	－	肺胞細胞（望ましい肺細胞）２－３＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀、１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで；ＥＣ２－４＋（ｃ，ｍ）稀、１＋（ｃ，ｍ）稀	単球１＋［ｃ］（稀から時々発生まで）；その他（Ｎｅｇ）
肝臓ＩＬＳ１１１０３Ｂ	肝細胞１＋（ｃ）稀から時々発生まで	肝細胞１＋（ｇｒ　ｃ）頻繁に発生	肝細胞２＋（ｇｒ　ｃ）稀、及び１＋（ｇｒ　ｃ）頻繁に発生	－	クッパー細胞３＋［ｃ］（時々発生）；その他（Ｎｅｇ）
膵臓ＩＬＳ１０２６６	上皮１＋（ｃ）稀；島細胞１＋（ｃ）非常に稀	－	－	導管上皮１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）非常に稀	導管上皮１－２＋［ｃ，ｍ］（稀から時々発生まで）；原線維２＋（稀）；その他（Ｎｅｇ）

【表１１－２】

Ｈｅａｒｔ Ｌｉｆｅ Ｌｅｇａｃｙ ０９１００３５Ｄ	±	－	－	－	Ｎｅｇ
腎臓ＩＬＳ１０２４１Ｂ	上皮２－３＋（ｃ，ｍ）頻繁に発生	尿細管上皮２＋（ｇｒ ｃ）稀から時々発生まで、及び１＋（ｇｒｃ）時々発生から頻繁に発生まで	尿細管上皮２＋（ｇｒ ｃ）稀から時々発生まで、及び１＋（ｇｒｃ）時々発生から頻繁に発生まで	尿細管上皮１＋（ｇｒ ｃ）稀から時々発生まで	上皮１＋［ｃ］（ｒａｒｅ）；その他（Ｎｅｇ）
膀胱ＩＬＳＤ８０１１Ｊ	移行上皮１＋（ｃ）稀から時々発生まで	－	－	移行細胞上皮１＋（ｇｒｃ）稀	移行上皮２＋［ｃ，ｍ］（稀から頻繁まで）；間質細胞３＋［ｃ］（稀）；その他（Ｎｅｇ）
Ｃｙｎｏ結腸１番	上皮１＋（ｃ，ｍ）稀	－	－	－	
Ｃｙｎｏ肺１番	マクロファージ及び肺細胞１＋（ｃ）非常に稀	－	気管支上皮３－４＋（ｇｒｃ）稀、２＋（ｇｒ ｃ）時々発生、及び１＋（ｇｒｃ）時々発生	気管支上皮１＋（ｇｒ ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで、及び±（ｇｒ ｃ＞ｍ）時々発生から頻繁に発生まで	

【表１１－３】

Ｃｙｎｏ肝臓１番	肝細胞１＋（ｃ）頻繁	肝細胞２＋（ｇｒ　ｃ）稀から時々発生まで、及び１＋（ｇｒｃ）稀から時々発生まで	肝細胞２＋（ｇｒ　ｃ）稀から時々発生まで、及び１＋（ｇｒｃ）時々発生；導管上皮１＋（ｇｒ　ｃ）時々発生	－	
Ｃｙｎｏ膵臓１番	上皮及び島細胞１＋（ｃ）非常に稀	－	島細胞±（ｇｒ　ｃ）頻繁に発生；導管上皮１＋（ｇｒ　ｃ）稀から時々発生まで	－	陽性
Ｃｙｎｏ心臓１番	心筋１＋（ｃ）頻繁	－	－	－	
Ｃｙｎｏ腎臓#070368M	上皮２＋（ｃ）頻繁に発生	尿細管上皮２＋（ｇｒ　ｃ）稀から時々発生まで、及び１＋（ｇｒｃ）稀から時々発生まで	尿細管上皮２＋（ｇｒ　ｃ）稀から時々発生まで、及び１＋（ｇｒｃ）時々発生から頻繁に発生まで	－	陽性
Ｃｙｎｏ膀胱１番	移行上皮±（ｃ）；マクロファージ非常に稀	－	移行細胞上皮２－３＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀、及び１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）時々発生	移行細胞上皮２＋（ｇｒｃ＞ｍ）稀、及び１＋（ｇｒ　ｃ＞ｍ）稀から時々発生まで	

【０２９５】

したがって、この結果は、ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）が、最適濃度でヒト肝細胞、及び、尿細管の全体的に低レベルの染色を示し、陰性対照で観察された肝細胞及び尿細管では、低い染色強度／反応頻度を有していることを実証している。ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）は、最適濃度でカニクイザルの肝細胞、及び、尿細管の同様の低レベルの染色を示し、陰性対照で観察された尿細管では、低度の染色強度／反応頻度を有していた。

【０２９６】

この結果は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｃ．２）も、最適濃度でヒト肝細胞、及び、尿細管の全体的に低レベルの染色を示し、陰性対照で観察された肝細胞、及び、尿細管では、低度の

染色強度／反応頻度を有していることを実証している。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｃ．２）は、最適濃度でカニクイザルの肝細胞、及び、尿細管で同様の低レベルの染色を示した。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｃ．２）について、カニクイザルの肺上皮、膵臓島／上皮、及び、膀胱上皮におけるさらなる小さな知見は、対応するヒト組織では観察されなかった：肺上皮、尿細管、膀胱上皮、陰性対照では、低度の染色強度／反応頻度が認められた。この結果は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）が、最適濃度でヒトまたはカニクイザルの組織を染色しないことを示し、稀な＋／－膀胱移行細胞上皮染色を伴っていたことも実証している。また、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）は、ヒト肺肺胞細胞、膵管上皮、尿細管、膀胱以降細胞上皮に、５倍の最適濃度で全体的に低レベルで低頻度の染色を示し、そして、カニクイザルの気管支上皮、及び、膀胱移行細胞上皮に５倍の最適濃度で、全体的に低レベルの染色を示した。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）は、試験したヒト正常組織で全体的に望ましいＩＨＣプロフィールを示し、そして、対応するカニクイザル組織で同様のプロファイルを示す。

【０２９７】

実施例６

変異体Ｆｃ領域を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）

ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）は、カッパ軽鎖定常領域を有する軽鎖（配列番号６８）と、野生型ＩｇＧ重鎖定常領域を有する重鎖（配列番号５２）とを含む。次の置換：Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ（例えば、配列番号７８を参照されたい）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＡＡ）と称する；Ｓ４４２Ｃ（例えば、配列番号７９を参照されたい）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（Ｃ）と称する；及び、Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ／Ｓ４４２Ｃ（例えば、配列番号８０を参照されたい）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＡＡ／Ｃ）と称する、をＦｃ領域に導入してＦｃ変異体を作成した。ｈｕＡＤＡＭ９－Ｈｉｓ、及び、ｃｙｎｏＡＤＡＭ９－Ｈｉｓに対する各Ｆｃ変異体の結合を、ＥＬＩＳＡアッセイで試験した。要するに、ヒスチジン含有ペプチドに結合し、そして、マイクロタイタープレートにコーティングした抗体を使用して、Ｈｉｓペプチドタグ化可溶性ｃｙｎｏＡＤＡＭ９、または、Ｈｉｓペプチドタグ化可溶性ｈｕＡＤＡＭ９（０．５μｇ／ｍＬ）を捕捉し、親ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）、及び、Ｆｃ変異体の段階的希釈物の結合を試験した。結合曲線ｈｕＡＤＡＭ９及びｃｙｎｏＡＤＡＭ９を、図５Ａ及び図５Ｂに示しており、それぞれ、Ｆｃ変異体が、野生型Ｆｃ領域を有するｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）の結合アフィニティを保持していたことを示している。

【０２９８】

実施例７

標的発現分析

異なる適応症の間でＡＤＡＭ９発現を評価するために、２０種類の異なる腫瘍型を用いた組織マイクロアレイ（ＴＭＡ）を、まず、予備研究使用のために、ＩｍｍｕｎｏＧｅｎが開発したＡＤＡＭ９　ＩＨＣアッセイを用いて評価した。

【０２９９】

分析したすべての試料は、ＦＦＰＥ（ホルマリン固定、及び、パラフィン埋込）試料であった。５００コア２０がんＴＭＡを、Ｆｏｌｉｏ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（カタログ番号ＡＲＹ－ＨＨ０２１２）から購入した。腺癌について８０コア、扁平上皮細胞癌について８０コアを有するＮＳＣＬＣ　ＴＭＡを、ＵＳ　Ｂｉｏｍａｘ（カタログ番号ＬＣ１９２１Ａ）から購入した。腺癌について８０コアを有する大腸癌ＴＭＡを、Ｐａｎｔｏｍｉｃｓ　Ｉｎｃ．（カタログ番号ＣＯＣ１２６１）から購入した。胃癌試料は、Ａｖａｄｅｎ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入した。

【０３００】

ＡＤＡＭ９の免疫組織化学染色を、Ｖｅｎｔａｎａ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｕｌｔｒａ自動染色機を用いて行った。ＡＤＡＭ９の一次抗体は、市販のウサギモノクローナル抗体であった。すべての試料を評価し、スコアリングアルゴリズムで訓練を受け、当局から資格が与えられた病理学者がスコア付けした。スコア付けのために、少なくとも１００の生存可能な腫瘍細胞の存在が必要であった。染色強度は、０～３までの半定量的な整数スケ

ールでスコアが付けられ、０は染色が無いことを表し、１は弱い染色を表し、２は中程度、及び、３は強い染色を表す。各強度レベルで陽性に染色した細胞の割合を記録した。スコア付けは、細胞膜だけに対するＡｄａｍ９の局在化、ならびに、細胞質と膜の両方に対する局在化の評価に基づいている。染色の結果を、Ｈスコアによって分析し、これを染色強度の構成成分と、陽性細胞の割合と合わせた。０～３００の値を有し、以下のように定義する。

１＊（１＋強度で染色する細胞の割合）
＋２＊（２＋強度で染色する細胞の割合）
＋３＊（３＋強度で染色する細胞の割合）
＝Ｈスコア。

【０３０１】

各腫瘍型について、５の通常組織対照を含む５００コア２０がんＴＭＡを染色し、２つの異なる様式でスコア付けした：（１）膜染色のみに基づく、または、（２）膜及び細胞質染色に基づくもの。以下の表１１及び図６Ａは、２０すべての適応症についての膜染色に基づいたＡＤＡＭ９の罹患率をまとめたものである。表１２及び図６Ｂは、８種類の選択した適応症についての膜と細胞質の染色の結果をまとめたものである。

【０３０２】

複数のがんＴＭＡからの結果に基づいて、罹患率の拡大分析のために、非小細胞胚癌（ＮＳＣＬＣ）、大腸癌（ＣＲＣ）、及び、胃癌の３種類の適応症を選択した。ＮＳＣＬＣの場合、腺癌について８０コア、扁平上皮細胞癌について８０コアを有する１種類のＴＭＡを染色し、そして、評価を行った。ＣＲＣの場合、腺癌について８０コアを有する１種類のＴＭＡを分析し、その内の７８が評価可能であった。胃癌の場合、腺癌の１５の組織全体切片を分析した。これらすべての試料を、膜と細胞質の染色についてスコア付けし、そして、結果を、表１３にまとめている。これらの予備試験の結果は、ＡＤＡＭ９が、多種多様な固形がんで発現し、数多くの異なるＡＤＡＭ９を発現する固形腫瘍における抗ＡＤＡＭ９薬物コンジュゲートの使用を裏付けている。

【表１２】

表１１：膜染色に基づく２０種類の異なる適応症におけるＡＤＡＭ９の罹患率

腫瘍型	陽性率％（Ｈスコア≧１）	Ｈスコア：１～１００	Ｈスコア：１０１～２００
膵臓（ｎ＝１７）	95%	24%	71%
子宮（ｎ＝１８）	89%	67%	22%
甲状腺（ｎ＝１７）	88%	88%	0%
腎臓（ｎ＝１７）	88%	59%	29%
精巣（ｎ＝１７）	83%	65%	18%
前立腺（ｎ＝２０）	80%	45%	35%
結腸（ｎ＝１６）	76%	38%	38%
膀胱（ｎ＝１６）	76%	63%	13%
乳房（ｎ＝２０）	75%	65%	10%
脳（ｎ＝１９）	68%	63%	5%
胃（ｎ＝１７）	59%	24%	35%
肺（ｎ＝１９）	58%	58%	0%
食道（ｎ＝１９）	43%	32%	11%
子宮頸管（ｎ＝２０）	40%	40%	0%
卵巣（ｎ＝１８）	39%	33%	6%
頭頸部（ｎ＝２０）	35%	30%	2%
肝臓（ｎ＝１９）	32%	32%	0%
皮膚（ｎ＝２０）	10%	10%	0%
軟組織（ｎ＝２０）	0%	0%	0%
リンパ腫（ｎ＝２０）	0%	0%	0%

表１１：膜染色に基づく２０種類の異なる適応症におけるＡＤＡＭ９の罹患率

【表１３】

表１２：膜及び細胞質染色に基づく８種類の選択した適応症におけるＡＤＡＭ９の罹患率

腫瘍型	陽性率％（Ｈスコア≧１）	Ｈスコア：１～１００	Ｈスコア：１０１～２００	Ｈスコア：２０１～３００
結腸	100%	31%	63%	6%
肺	100%	58%	42%	0%
膵臓	100%	18%	76%	6%
前立腺	95%	25%	55%	15%
食道	95%	58%	37%	0%
胃	94%	18%	71%	6%
乳房	70%	50%	20%	0%
卵巣	61%	44%	17%	0%

表１２：膜及び細胞質染色に基づく８種類の選択した適応症におけるＡＤＡＭ９の罹患率

【表１４】

表１３：膜及び細胞質染色に基づくＮＳＣＬＣ、ＣＲＣ、及び、胃癌のさらなる試料についてのＡＤＡＭ９の罹患率

腫瘍型	試料数	陽性率％（Ｈスコア≧１）	Ｈスコア分布		
			１～１００	１０１～２００	２０１～３００
ＮＳＣＬＣ腺癌	80	90%	46%	39%	5%
ＮＳＣＬＣ扁平上皮	80	81%	65%	13%	3%
ＣＲＣ腺癌	78	91%	51%	41%	0%
胃腺癌	15	100%	27%	53%	20%

【０３０３】

実施例８

抗ＡＤＡＭ９抗体インターナリゼーション試験

本発明の抗ＡＤＡＭ９抗体のインターナリゼーションを評価するために、フローサイトメトリーに基づいたインターナリゼーション実験を、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８に結合したｈＭＡＢ－Ａ（２．２）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ抗体で行った。

【０３０４】

製造業者（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）の指示に従って、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８テトラフルオロフェニルエステルを用いて、ｈＭＡＢ－Ａ（２．２）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃのための抗ＡＤＡＭ９　Ａｌｅｘａ４８８抗体コンジュゲートを作成した。インターナリゼーションアッセイを実行するために、コンジュゲートを、ナトリウムアジドを含まないＰＢＳ（ｐＨ７．２）に溶出させた。標識の濃度及び程度は、２８０ｎｍ及び４９４ｎｍでの吸光度測定から計算した。Ａｌｅｘａ４８８標識が標的結合に悪影響を及ぼさないことを確実にするために、ＦＡＣＳ結合アッセイを行った。

【０３０５】

抗ＡＤＡＭ９－Ａｌｅｘａ４８８コンジュゲートのインターナリゼーションは、蛍光にコンジュゲートを連続的に、または、パルス状態で曝した後に決定した。連続的な実験の場合、ＮＣＩ－Ｈ１７０３細胞を、飽和濃度の所定のＡｌｅｘａ４８８標識した抗体で、氷上で、または、３７℃で、所定の全時間をかけて処理した。一方、パルス実験の場合、抗ＡＤＡＭ９－Ａｌｅｘａ４８８コンジュゲートを、氷上の細胞にあらかじめ結合させておき、過剰なコンジュゲートを洗い流した後に、３７℃に調節して、インターナリゼーションを監視した。連続的な曝露、または、パルス状態の曝露の後の所定の時点で、細胞をヴェルセン（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）と共に取り出し、そして、氷冷したＰＢＳで２回洗浄し、次いで、複製物のウェルを、３００ｎＭの抗Ａ４８８抗体を使用せずに（クエンチしていない試料）、または、使用して（クエンチした試料）、氷冷したＰＢＳに再懸濁させた。すべての試料を、氷上で、３０分間、インキュベートした。次いで、細胞をペレット化し、１％パラホルムアルデイドで固定し、そして、フローサイトメトリーで分析した。氷上で、３０分間、インキュベートし、次いで、抗Ａｌｅｘａ４８８抗体と共にインキュベートした細胞の蛍光を、消光しない蛍光フラクションが出現して、インターナリゼーションを計算する前に、すべてのその他の試料から控除した。インターナリゼーションの割合を、消光した試料の蛍光を、不完全な表面消光（細胞内蛍光）について補正し、これを消光していない細胞（全蛍光）で割り算して得た。抗ＡＤＡＭ９抗体コンジュゲートのインターナリゼーションをグラフにし、そして、単相指数減衰式を用いてデータをフ

ィッティングした（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ、ｖｅｒ．５．０１）。

【０３０６】

表面に結合したＡｌｅｘａ４８８で標識した抗ＡＤＡＭ９抗体のインターナリゼーションを、ＮＣＩ－Ｈ１７０３細胞におけるパルス治療、及び、連続治療の後に評価した。試験した３種類すべての抗ＡＤＡＭ９－Ａｌｅｘａ４８８コンジュゲートは、迅速なインターナリゼーションを示し、コンジュゲートの約３９％が、最初の１５分でインターナリゼーションし、全部で約７７％が６時間後にインターナリゼーションした（図７Ａ）。興味深いことに、２４時間連続曝露した後にインターナリゼーションした蛍光シグナルは、３０分間細胞表面に結合した初期の全蛍光シグナルよりも約７倍強かった（図７Ｂ）。したがって、ＡＤＡＭ９は、３７℃でインキュベートしている間に、細胞表面で細胞内プールから補充されているようであり、複数回の抗ＡＤＡＭ９抗体コンジュゲートインターナリゼーションを可能にしている。抗ＡＤＡＭ９免疫コンジュゲートの効能は、インターナリゼーション、細胞内トラフィッキング、及び、免疫コンジュゲートの分解に応じて変化する。抗ＡＤＡＭ９免疫コンジュゲートの有効性は、一部には、抗ＡＤＡＭ９免疫コンジュゲートの高いインターナリゼーションによって説明することができ、おそらくは、多量の細胞傷害性異化生成物を生成する。

【０３０７】

実施例９

抗ＡＤＡＭ９抗体細胞処理試験

細胞での標的結合、ｃｈＭＡＢ－Ａの取り込み、リポソーム分解を評価するために、前出の^{3}Ｈ－プロピオンアミド標識した抗体を処理する方法を使用した（Ｌａｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｈａｒｍ　Ｒｅｓ．２０１５　Ｎｏｖ；３２（１１）：３５９３－６０３）。この方法を用いて、ＡＤＡＭ９を標的とするｃｈＭＡＢ－Ａ抗体を、リシン残基を介したトリチウム化プロピオネートを用いてわずかに標識した。細胞結合、取り込み、リポソームへのトラフィッキングの時に、［^{3}Ｈ］プロピオネート標識したＡｂ（^{3}Ｈ－Ａｂ）が分解し、リシン－［^{3}Ｈ］プロピオンアミドが、細胞成長培地に放出されることを以前に示している。有機溶媒を加えると、インタクトな標識した抗体が沈殿し、そして、リシン－［^{3}Ｈ］プロピノアミド溶液が残存しており、これは、抗体処理の程度の簡便かつ正確な指標となる。

【０３０８】

ｃｈＭＡＢ－Ａを、前出の［^{3}Ｈ］－プロピオネートで標識した。ＮＳＣＬＣ株、ＮＣＩ－Ｈ１７０３、及び、ＣＲＣ株、ＤＬＤ－１を、結合曲線を介して抗原飽和量を決定した後に、１０ｎＭ　^{3}Ｈ－ｃｈＭＡＢ－Ａ抗体で処理した。一部の細胞試料を、標的ではないトリチウム化アイソタイプ対照抗体、^{3}Ｈ－ｃｈＫＴＩで処理し、一方で、その他は未処理のままとした。細胞を、６ウェルプレートに接種し、一晩かけて成長させ、次いで、前述した通り、試薬（複数可）でパルス処理した。要するに、細胞を、^{3}Ｈ－ｃｈＭＡＢ－Ａ抗体、または、^{3}Ｈ－ｃｈＫＴＩと共に、２０分間、インキュベートした後に、新鮮な培地で３回洗浄した。細胞を、３７℃、５％CO_2と共に一晩インキュベートした。２０～２４時間のインキュベートの後に、細胞を集め、タンパク質を、４：３体積のアセトン：培地／細胞混合物を用いて沈殿させた。試料を、－８０℃で、短くとも１時間かけて凍結させた後に、解凍し、そして、遠心分離処理で分離した。ペレットを処理してタンパク質を溶解し、Ｔｒｉ－Ｃａｒｂ液体シンチレーションカウンター（ＬＳＣ）で、５分間、計測した。製造プロトコルあたり、１ｍＬのＳＯＬＶＡＢＬＥ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を、各ウェル試料に加え、そして、５０℃の水浴で、一晩インキュベートした。試料を水浴から取り出し、２０ｍＬのガラスシンチレーションバイアルに移し、そして、ＥＤＴＡ及びH_2O_2を試料に加え、次いで、５０℃で、さらに１時間インキュベートした。試料をＨＣｌでクエンチし、１５ｍＬのＯｐｔｉｍａ　Ｇｏｌｄ液体シンチレーション液（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を加え、そして、試料を十分にボルテックス撹拌した。ＬＳＣで計数する前に、試料を暗室に短くとも４時間保持した。タンパク質を含まないアセトン抽出物試料を、真空下、体積が１ｍＬ未満になるまで乾燥させ、そして、ＬＳＣ

前に、前出のＳｏｌｖａｂｌｅを用いて処理した。得られた試料のＣＰＭ値から、結合し、分解し、そして、標識したインタクトな抗体の量を計算した。

【０３０９】

^{3}Ｈ－ｃｈＭＡＢ－Ａ抗体の処理レベルを決定した後に、パルス処置を行い、３７℃で、一晩インキュベートした。ＮＣＩ－Ｈ１７０３細胞は、９３％の^{3}Ｈ－ｃｈＭＡＢ－Ａを、２４時間以内に処理したことを示しており、そして、ＤＬＤ－１細胞は、９２％の^{3}Ｈ－ｃｈＭＡＢ－Ａを、同じ期間で処理したことを示している。^{3}Ｈ－ｃｈＫＴＩの結合及び処理は、無視できるものであった（標的とした抗体よりも、全ＣＰＭが１００倍超小さい）。これらの細胞株の処理値は高く、特に、本発明の抗ＡＤＡＭ９抗体を有効な薬物コンジュゲートとして支持している、その他のＡＤＣ標的／抗体について既に報告されている２４時間パルス処理値と比較すると高い。

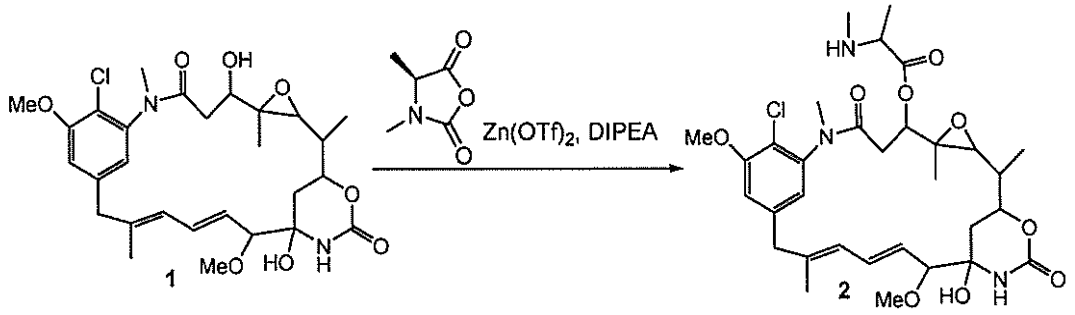
【０３１０】

実施例１０

本発明のメイタンシノイド誘導体の合成

実施例１０ａ．ＤＭ－Ｈ（７）原液の調製

【化１１８】



メイタンシノール（５．０ｇ、８．８５ｍｍｏｌ）を、無水ＤＭＦ（１２５ｍＬ）に溶解し、次いで、氷浴で冷却した。次に、Ｎ－メチルアラニン（５．７ｇ、４４．２５ｍｍｏｌ）、無水ＤＩＰＥＡ（７．７０ｍＬ、４４．２５ｍｍｏｌ）、及び、トリフルオロメタンスルホン酸亜鉛（２２．５ｇ、６２ｍｍｏｌ）のＮ－カルボキシ無水物を、アルゴン雰囲気下で、磁気撹拌しながら加えた。氷浴を取り除き、そして、反応物を撹拌しながら温めた。１６時間後に、脱イオン水（１０ｍＬ）を添加した。３０分後に、飽和重炭酸ナトリウム水溶液：飽和塩化ナトリウム水溶液の１：１溶液（１９０ｍＬ）と、酢酸エチル（２５０ｍＬ）とを、激しく撹拌しながら加えた。混合物を分液漏斗に移し、そして、有機層を保持した。水層を、酢酸エチル（１００ｍＬ）で抽出し、次いで、有機層を合わせ、そして、飽和塩化ナトリウム水溶液（５０ｍＬ）で洗浄した。有機層は、エバポレーターバスを加熱せずに、真空下での回転蒸発によって、その体積が約１／４になるまで濃縮し、精製は行わなかった。溶液の濃度は、反応に使用したメイタンシノールのｍｍｏｌ（１．７７ｍｍｏｌ）を、体積（１５０ｍＬ）で割って、ＤＭ－Ｈ原液（０．０６ｍｍｏｌ／ｍＬ）を得て推定した。原液のアリコートを、直ちに分注して、反応に使用するか、または、－８０Ｃの冷凍庫に保存し、必要に応じて、解凍した。

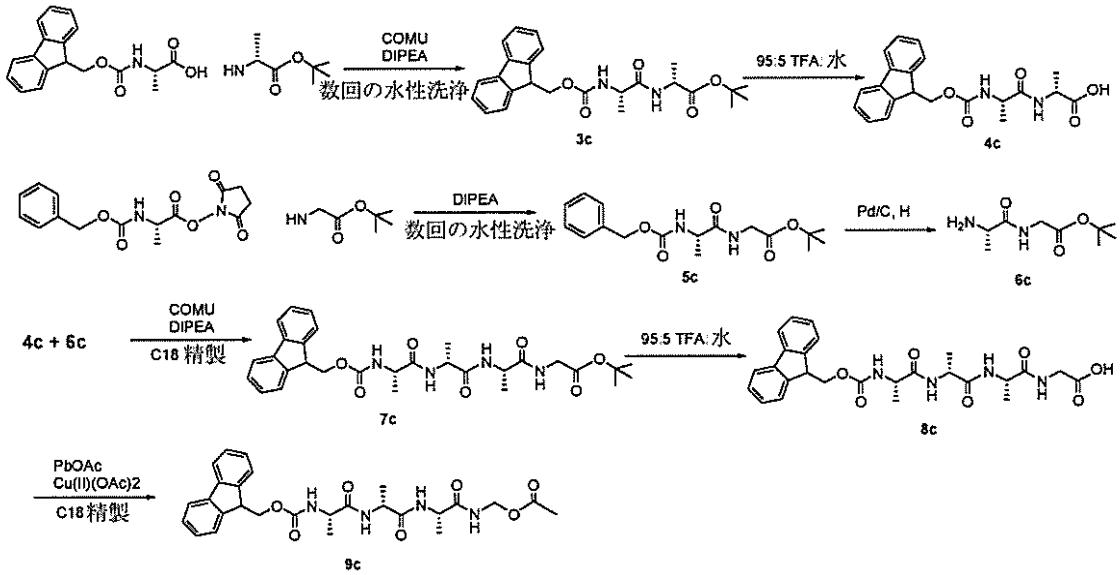
【０３１１】

実施例１０ｂ．チオ－ペプチド－メイタンシノイドの合成

１．ＦＭｏｃ－ペプチド－ＮＨ－ＣＨ$_{2}$－ＯＡｃ化合物（化合物９ａ～ｊ）

ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_{2}$－ＯＡｃ（９ｃ）の合成

【化１１９】



【０３１２】

ステップ１：ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－ＯｔＢｕ（３ｃ）：

ＦＭｏｃ－Ｌ－アラニン（１０ｇ、３２．１ｍｍｏｌ）、及び、Ｄ－Ａｌａ－ＯｔＢｕ、ＨＣｌ（７．００ｇ、３８．５ｍｍｏｌ）を、ＣＨ２Ｃｌ２（１００ｍｌ）に溶解し、ＣＯＭＵ（２０．６３ｇ、４８．２ｍｍｏｌ）、及び、ＤＩＰＥＡ（１１．２２ｍｌ、６４．２ｍｍｏｌ）で処理した。反応を、アルゴン下、室温で、進行させた。２時間後に、ＵＰＬＣで反応の完了を確認し、２－ＭｅＴＨＦ（５０ｍｌ）で希釈し、１０％クエン酸水溶液（２×１００ｍＬ）、水（１００ｍＬ）で洗浄し、続いて、飽和食塩水（１００ｍＬ）で洗浄した。有機層を、硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして、濃縮して、粗ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－ＯｔＢｕを生成し、１００％の収率を推定した。

【０３１３】

ステップ２：ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ（４ｃ）

ＦＭｏｃ－ＬＡｌａ－ＤＡｌａ－ＯｔＢｕ（１１．２５ｇ、２５．７ｍｍｏｌ）を、ＴＦＡ：水（９５：５）（５０ｍｌ）で処理した。反応を、アルゴン雰囲気下、室温で、進行させた。４時間後に、ＵＰＬＣで反応の完了を確認し、トルエン（２５ｍＬ）で希釈し、そして、３回共蒸発させて、ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａを生成し、１００％の収率を推定した。

【０３１４】

ステップ３：ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－ＯｔＢｕ（５ｃ）

Ｚ－Ｌ－Ａｌａ－ＯＮＨＳ（１０ｇ、３１．２ｍｍｏｌ）、及び、グリシン酸ｔｅｒｔ－ブチル（６．２８ｇ、３７．５ｍｍｏｌ）を、ＣＨ２Ｃｌ２（１００ｍｌ）に溶解し、ＤＩＰＥＡ（１０．９１ｍｌ、６２．４ｍｍｏｌ）で処理した。反応を、アルゴン下、室温で、進行させた。２時間後に、ＵＰＬＣで完了を確認し、反応物を、２－ＭｅＴＨＦ（５０ｍＬ）で希釈し、そして、１０％クエン酸水溶液（１００ｍＬ）、飽和重炭酸ナトリウム（２ｘ１００ｍＬ）、水（１００ｍＬ）、飽和食塩水（１００ｍＬ）で洗浄した。有機層を、硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、濃縮して、Ｚ－Ｌ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－ＯｔＢｕを生成し、１００％の収率を推定した。

【０３１５】

ステップ４．Ｌ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－ＯｔＢｕ（６ｃ）

Ｚ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－ＯｔＢｕ（１０．０５ｇ、２９．９ｍｍｏｌ）を、９５：５　ＭｅＯＨ：水（５０ｍｌ）に溶解し、水素が入ったフラスコに移し、Ｐｄ／Ｃ（１．２７２ｇ、１１．９５ｍｍｏｌ）で処理した。この水素が入ったフラスコを、シェーカー上に置き、フラスコを振とうしながら、真空化して空気を除去した。水素を３０ｐｓｉまで入れたフラスコを、２分間振とうし、そして、真空化して水素を除去した。これを、さらに２

回繰り返した。フラスコに、水素を３０ｐｓｉまで入れ、そして、振とうさせた。４時間後に、ＵＰＬＣで完了を確認し、反応物を、セライトプラグを通して濾過し、真空内で、２－ＭｅＴＨＦに再溶解させ、濃縮してＬＡＬａ－Ｇｌｙ－ＯｔＢｕを生成し、１００％の収率を推定した。

【０３１６】

ステップ５：ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－ＯｔＢｕ（７ｃ）

ＦＭｏｃ－ＬＡｌａ－Ｄ－ＡＬａ－ＯＨ（０．９５９ｇ、２．５０８ｍｍｏｌ）、及び、Ｌ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－ＯｔＢｕ（０．７１８ｇ、３．０１ｍｍｏｌ）を、ＣＨ２Ｃｌ２（１０ｍｌ）に溶解し、ＣＯＭＵ（１．１８１ｇ、２．７６ｍｍｏｌ）、及び、ＤＩＰＥＡ（０．８７６ｍｌ、５．０２ｍｍｏｌ）で処理した。反応を、アルゴン下、室温で進行させた。２時間後に、反応は完了した。反応物を濃縮してＣＨ２Ｃｌ２を除去し、２ｍＬＤＭＦに再溶解し、そして、線形勾配を使用してＣ１８　Ｃｏｍｂｉｆｌａｓｈで精製し、生成物を合わせて、ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－ＯｔＢｕ（６６０ｍｇ、４６％収率）を得た。

【０３１７】

ステップ６．ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－ＯＨ（８ｃ）

ＦＭｏｃ－ＬＡｌａ－ＤＡｌａ－ＬＡｌａ－ＧｌｙＯｔＢｕ（２００ｍｇ、０．３５３ｍｍｏｌ）を、ＴＦＡ：水（９５：５）（２ｍｌ）で処理した。反応を、アルゴン下、室温で進行させた。１時間後に、反応の完了をＵＰＬＣで確認した。粗産物を、トルエン（１ｍＬ）で希釈し、トルエンで２回共蒸発させて、ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－ＯＨを得て、１００％の収率を推定した。

【０３１８】

ステップ７．ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－CH_2－ＯＡｃ（９ｃ）

ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－ＯＨ（２．６５ｇ、５．１９ｍｍｏｌ）を、ＤＭＦ（２０ｍＬ）に溶解し、酢酸銅（ＩＩ）（０．０９４ｇ、０．５１９ｍｍｏｌ）と酢酸（０．４４６ｍｌ、７．７９ｍｍｏｌ）とで処理し、すべての試薬が溶解したら、反応物を、四酢酸鉛（３．４５ｇ、７．７８５ｍｍｏｌ）で処理した。反応を、アルゴン下、６０℃で、３０分間、進行させた。粗反応物を、Ｃ１８　４５０ｇカラムを使用するＣｏｍｂｉｆｌａｓｈ　Ｒｆ２００ｉを介して、流速を１２５ｍＬ／分とし、溶媒を０．１％ギ酸を含む脱イオン水とアセトニトリルとし、次の勾配（分単位の時間、アセトニトリルパーセント）（０，５）（８，５０）（２６，５５）を使用して精製した。保持時間が１１分の所望の産物を含む生成物画分を直ちに凍結し、そして、凍結乾燥をして、ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＣＨ２－ＯＡｃ（８４３ｍｇ、１．６０７ｍｍｏｌ、３１．０％収率）を得た。ＨＲＭＳ　$(M+Na)^+$ 計算値５４７．２１６３，実測値５４７．２１６７．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ １．２３（ｄｄ，Ｊ＝１２．５，７．４ Ｈｚ，９Ｈ），１．９５（ｓ，２Ｈ），４．００－４．１３（ｍ，１Ｈ），４．１７－４．３８（ｍ，６Ｈ），５．０６（ｑ，Ｊ＝８．８ Ｈｚ，２Ｈ），７．３３（ｔ，Ｊ＝７．３ Ｈｚ，２Ｈ），７．４２（ｔ，Ｊ＝７．４ Ｈｚ，２Ｈ），７．６２（ｄ，Ｊ＝６．８ Ｈｚ，１Ｈ），７．７１（ｔ，Ｊ＝８．６ Ｈｚ，２Ｈ），７．８５－８．０１（ｍ，３Ｈ），８．２１（ｄ，Ｊ＝７．０ Ｈｚ，１Ｈ），８．６９（ｄ，Ｊ＝６．９ Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３１９】

タイプＦＭｏｃ－ペプチド－ＮＨ－CH_2－ＯＡｃの次の化合物を、図９Ａに示したように、かつ、上記ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－ＯＡｃ（９ｃ）に例示したようにして調製した。

【０３２０】

ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－ＯＡｃ（９ａ）：Ｆ

Ｍｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－ＯＨ（配列番号１６３）（５００ｍｇ、０．９７９ｍｍｏｌ）を、ＤＭＦ（２ｍＬ）に溶解し、このものに対して、アルゴン下で磁気撹拌しながら、酢酸銅（ＩＩ）（１７．８ｍｇ、０．０９８ｍｍｏｌ）と、酢酸（８４μＬ、１．４７ｍｍｏｌ）を加えた。固体が溶解したら、四酢酸鉛（４３４ｍｇ、０．９７９ｍｍｏｌ）を加えた。反応を、６０℃で、２０分間、進行させ、次いで、０．１％ギ酸を含む脱イオン水でもってして、１２５ｍＬ／分の流速で、２６分間にわたって、５％～５５％の直線アセトニトリル勾配で溶出する、Ｃ１８、３０ミクロン４５０ｇカラムカートリッジで精製した。純粋な所望の産物を含む画分を凍結、及び、凍結乾燥して、１７８ｍｇ（３４％の収率）の白色固体を得た。ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｎａ）$^{+}$計算値．５４７．２１６３；実測値５４７．２１６０．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ １．２０（ｑｄ，Ｊ＝７．５，６．９，４．２Ｈｚ，９Ｈ），１．９１－２．０５（ｍ，３Ｈ），３．２６－３．３８（ｍ，１Ｈ），４．０５（ｑ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，１Ｈ），４．２３（ｔｄ，Ｊ＝１１．９，１０．７，６．４Ｈｚ，５Ｈ），５．０７（ｄｄｄ，Ｊ＝１１．２，６．９，４．３Ｈｚ，２Ｈ），７．３２（ｑ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．４１（ｑ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），７．５２（ｔ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，１Ｈ），７．７１（ｑ，Ｊ＝７．５，７．０Ｈｚ，２Ｈ），７．８２－８．０８（ｍ，４Ｈ），８．８４（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３２１】

ＦＭｏｃ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－ＯＡｃ（９ｂ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｎａ）$^{+}$計算値．５４７．２１６３，実測値５４７．２１６７．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ １．２３（ｄｄ，Ｊ＝１２．５，７．４Ｈｚ，９Ｈ），１．９５（ｓ，２Ｈ），４．００－４．１３（ｍ，１Ｈ），４．１７－４．３８（ｍ，６Ｈ），５．０６（ｑ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，２Ｈ），７．３３（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），７．４２（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），７．６２（ｄ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，１Ｈ），７．７１（ｔ，Ｊ＝８．６Ｈｚ，２Ｈ），７．８５－８．０１（ｍ，３Ｈ），８．２１（ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１Ｈ），８．６９（ｄ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３２２】

ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－ＯＡｃ（９ｄ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｎａ）$^{+}$計算値．５４７．２１６３，実測値５４７．２１６７．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ １．１８－１．２５（ｍ，９Ｈ），１．９７（ｓ，３Ｈ），３．９６－４．１５（ｍ，１Ｈ），４．１７－４．３６（ｍ，５Ｈ），５．０９（ｄ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，２Ｈ），７．３４（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），７．４２（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），７．５７（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１Ｈ），７．７１（ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），７．９０（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），８．０７（ｓ，２Ｈ），８．８６（ｓ，１Ｈ）．

【０３２３】

ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－ＯＡｃ（９ｆ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｎａ）$^{+}$計算値．４７６．１７９２，実測値４７６．１７８６．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ １．１３（ｄｄ，Ｊ＝７．１，１．４Ｈｚ，６Ｈ），１．８９（ｓ，３Ｈ），３．９９（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，１Ｈ），４．１０－４．２９（ｍ，４Ｈ），４．９５－５．０８（ｍ，２Ｈ），７．２６（ｔ，Ｊ＝７．４，１．３Ｈｚ，２Ｈ），７．３５（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），７．４９（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１Ｈ），７．６６（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，

２Ｈ），７．８２（ｄ，Ｊ＝７．５　Ｈｚ，２Ｈ），８．１１（ｄ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），８．７６（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３２４】

ＦＭｏｃ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－ＯＡｃ（９ｇ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｎａ）$^+$計算値．４７６．１７９２，実測値４７６．１７８８．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ１．２１（ｄｄ，Ｊ＝７．１，１．４Ｈｚ，６Ｈ），１．９６（ｓ，３Ｈ），４．０８（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，１Ｈ），４．１７－４．３６（ｍ，４Ｈ），５．０５－５．１４（ｍ，２Ｈ），７．２６－７．３８（ｍ，２Ｈ），７．４２（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），７．５６（ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，１Ｈ），７．７３（ｔ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ），７．９０（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ），８．１８（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，１Ｈ），８．８３（ｔ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３２５】

ＦＭｏｃ－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－ＯＡｃ（９ｈ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値．４５５．４８７７，実測値４５５．２０５１ ^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ１．１４（ｄｄ，Ｊ＝７．１，３．３Ｈｚ，６Ｈ），１．２１（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１Ｈ），１．８１（ｓ，１Ｈ），１．９１（ｓ，２Ｈ），４．０１（ｑ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），４．０９－４．２７（ｍ，５Ｈ），４．９５－５．１０（ｍ，１Ｈ），７．２６（ｔｄ，Ｊ＝７．４，１．２Ｈｚ，３Ｈ），７．３５（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，３Ｈ），７．４５（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，１Ｈ），７．６５（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，３Ｈ），７．８２（ｄ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，２Ｈ），７．９６（ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，１Ｈ），８．７８（ｔ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３２６】

２．ＦＭｏｃ－ペプチド－ＣＯＯＨ化合物（化合物１０ａ～１０ｊ）

タイプＦＭｏｃ－ペプチド－ＮＨ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_n$－CO_2Ｈの化合物を、図９Ａに示したように、かつ、ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_5$－CO_2Ｈに例示したようにして調製した。

【０３２７】

ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_5$－CO_2Ｈ（１０ａ）：６－メルカプトヘキサン酸（２８７μＬ、２．０７ｍｍｏｌ）を、１：４　ＴＦＡ：ジクロロメタン（５ｍＬ）の溶液に溶解し、ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－ＯＡｃ（１７８ｍｇ、０．３３９ｍｍｏｌ）を含むバイアルに加えた。反応を、アルゴン雰囲気下、室温で、２０分間、磁気撹拌しながら進行させた。粗物質を真空内で濃縮し、最小量のＤＭＦに再溶解し、そして、０．１％ギ酸を含む脱イオン水でもってして、３５ｍＬ／分の流速で、１３分間にわたって、５％～９５％のアセトニトリルの直線勾配で溶出する、Ｃ１８　３０ミクロン３０ｇカラムカートリッジで精製した。純粋な所望の産物を含む画分を凍結及び凍結乾燥して、２００ｍｇ（９６％収率）の白色固体を得た。ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値．６１３．２６９０；実測値６１３．２６８６．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ１．２０（ｄｔ，Ｊ＝７．１，４．９Ｈｚ，１０Ｈ），１．３１（ｔｔ，Ｊ＝１０．１，６．０Ｈｚ，２Ｈ），１．４９（ｄｑ，Ｊ＝１２．５，７．４Ｈｚ，４Ｈ），２．１８（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），４．０５（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，１Ｈ），４．１６－４．３０（ｍ，７Ｈ），７．３３（ｔｄ，Ｊ＝７．４，１．２Ｈｚ，２Ｈ），７．４２（ｔｄ，Ｊ＝７．３，１．１Ｈｚ，２Ｈ），７．５４（ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，１Ｈ），７．７２（ｔ，Ｊ＝

7.0 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.94 − 8.07 (m, 2H), 8.44 (t, J = 6.1 Hz, 1H).

【0328】

FMoc−D−Ala−L−Ala−L−Ala−NH−CH_2−S−(CH_2)$_5$−CO_2H（10b）：HRMS（M+Na）$^+$ 計算値. 635.2510, 実測値 635.2515. ^{1}H NMR（400 MHz, DMSO−d6）δ 1.15 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.18− 1.25 (m, 10H), 2.18 (q, J = 7.5 Hz, 4H), 2.40 − 2.48 (m, 1H), 2.70 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.15− 4.30 (m, 6H), 6.29 (s, 2H), 7.34 (q, J = 7.3 Hz, 3H), 7.42 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 7.63 − 7.78 (m, 1H), 7.85 (d, J= 7.3 Hz, 2H), 7.89 (d, J= 7.5 Hz, 3H), 8.37 − 8.46 (m, 1H).

【0329】

FMoc−L−Ala−D−Ala−L−Ala−NH−CH_2−S−(CH_2)$_5$−CO_2H（10c）：HRMS（M+Na）$^+$ 計算値. 635.2510, 実測値 635.2514. ^{1}H NMR（400 MHz, DMSO−d6）δ 1.18 − 1.23 (m, 10H), 1.34 (q, J= 3.4 Hz, 5H), 2.24 (s, 2H), 2.44 (s, 2H), 4.05 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 4.16−4.35 (m, 8H), 7.33 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.42 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.71 (t, J=8.4 Hz, 2H), 7.90 (s, 1H), 7.98 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.39 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 11.98 (s, 1H).

【0330】

FMoc−L−Ala−L−Ala−D−Ala−NH−CH_2−S−(CH_2)$_5$−CO_2H（10d）：HRMS（M+Na）$^+$ 計算値. 635.2510, 実測値 635.2510. ^{1}HNMR（400 MHz, DMSO−d6）δ 1.15 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.21 (d, J = 7.1 Hz, 9H), 1.28 − 1.38 (m, 3H), 1.44 − 1.60 (m, 5H), 2.13 − 2.22 (m, 3H), 3.33 (q, J= 6.9 Hz, 1H), 4.20 (s, 2H), 6.29 (s, 2H), 7.29 − 7.40 (m, 3H), 7.38 − 7.47 (m, 3H), 7.85 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 8.26 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.48 (d, J = 6.2 Hz, 1H).

【0331】

FMoc−D−Ala−L−Ala−NH−CH_2−S−(CH_2)$_5$−CO_2H（10g）：HRMS（M+H）$^+$ 計算値. 542.2319, 実測値 542.2316. ^{1}H NMR（400 MHz, DMSO−d6）δ 1.13 (dd, J= 7.1, 1.7 Hz, 6H), 1.16 −1.25 (m, 2H), 1.32 − 1.47 (m, 4H), 2.08 (t, J= 7.3 Hz, 2H), 3.25 (s, 2H), 3.99 (p, J= 7.0 Hz, 1H), 4.07 − 4.27 (m, 6H), 7.26 (t, J= 7.4, 1.2 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.65 (t,

Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），７．８２（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），８．０８（ｄ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），８．２７（ｔ，Ｊ＝６．２Ｈｚ，１Ｈ），１１．８２（ｓ，１Ｈ）．

【０３３２】

ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_5$－ＣＯ$_2$Ｈ（１０ｆ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値．５４２．２３１９，実測値５４２．２３２１．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ １．１３（ｄｄ，Ｊ＝７．１，１．８Ｈｚ，７Ｈ），１．１７－１．２６（ｍ，２Ｈ），１．３２－１．４８（ｍ，５Ｈ），２．０８（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），３．９９（ｐ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，１Ｈ），４．０７－４．２６（ｍ，７Ｈ），７．２６（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），７．３５（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），７．５３（ｄ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，１Ｈ），７．６５（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），７．８２（ｄ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），８．１０（ｄ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），８．２８（ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３３３】

ＦＭｏｃ－Ｄ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_5$－ＣＯ$_2$Ｈ（１０ｈ）：（１６．７ｍｇ、０．０３１ｍｍｏｌ、７０％収率）。ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値５４２．２３１９，実測値５４２．２３１８．

【０３３４】

ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＯ$_2$Ｈ（１０ｊ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値．５８５．２３７７，実測値５８５．２３６７．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ １．１４－１．２６（ｍ，９Ｈ），１．７５（ｐ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），２．２７（ｔ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，２Ｈ），２．５４（ｄ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，２Ｈ），３．９７－４．１０（ｍ，１Ｈ），４．１３－４．３４（ｍ，７Ｈ），７．３３（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．４２（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．５７（ｄ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，１Ｈ），７．７１（ｔ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ），７．８９（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，２Ｈ），７．９７（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），８．１４（ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１Ｈ），８．４１（ｓ，１Ｈ），１２．０６（ｓ，１Ｈ）．

【０３３５】

ＦＭｏｃ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ）$_2$－ＣＯ$_2$Ｈ（１０ｉ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値．５００．１８５０，実測値５００．１８４３．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ １．２０（ｄｄ，Ｊ＝７．２，１．９Ｈｚ，６Ｈ），２．５３（ｄ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），２．７０（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），４．０７（ｑ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１Ｈ），４．１７－４．２６（ｍ，４Ｈ），４．２９（ｄ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，２Ｈ），７．３３（ｔ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），７．４１（ｔ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），７．５６（ｄ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，１Ｈ），７．７２（ｔ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，２Ｈ），７．８９（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，２Ｈ），８．１４（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，１Ｈ），８．４２（ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，１Ｈ），１２．２２（ｓ，１Ｈ）．

【０３３６】

３．ＦＭｏｃ－ペプチド－Ｍａｙ－ＮＭＡ化合物（化合物１１ａ～１１ｊ）

タイプＦＭｏｃ－ペプチド－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＯ$_2$－ＤＭの化合物を、図９Ａに示したように、かつ、ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_5$－ＣＯ－ＤＭに例示したようにして調製した。

【０３３７】
ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_5$－ＣＯ－ＤＭ（１１ａ）：ＤＭ－Ｈ原液（８．２ｍＬ、０．４９ｍｍｏｌ）に対して、ＦＭｏｃ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_5$－ＣＯＯＨ（３００ｍｇ、０．４９ｍｍｏｌ）、ＥＤＣ（９４ｍｇ、０．４９０ｍｍｏｌ）、及び、ＤＩＰＥＡ（９０μＬ、０．４９ｍｍｏｌ）を加えた。反応を、アルゴン雰囲気下、室温で、２時間、磁気撹拌しながら進行させた。粗物質を、真空下、ロータリーエバポレーターで濃縮し、そして、残留物を最小量のＤＭＦで取り、次いで、０．１％ギ酸を含む脱イオン水でもってして、２５分間にわたって、５％～５０％のアセトニトリルの直線勾配で溶出する、Ｃ１８　３０ミクロン、３０ｇカラムカートリッジで精製した。純粋な所望の産物を含む画分を凍結及び凍結乾燥して、１５１ｍｇ（３７．２％の収率）の白色固体を得た。ＨＲＭＳ　（Ｍ　＋　Ｎａ）$^+$　計算値．　１２６６．５１７０；実測値　１２６６．５１４１．　^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（４００　ＭＨｚ，　ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　０．７７　（ｓ，　３Ｈ），　１．１２　（ｄ，　Ｊ　＝　６．４　Ｈｚ，　３Ｈ），　１．１４　－　１．２２　（ｍ，　１２Ｈ），　１．２２　－　１．３０　（ｍ，　３Ｈ），　１．３５　－　１．４９　（ｍ，　４Ｈ），　１．５０　－　１．５５　（ｍ，　１Ｈ），　１．５９　（ｓ，　３Ｈ），　２．００　－　２．０７　（ｍ，　１Ｈ），　２．１４　（ｄｄｄ，　Ｊ　＝　１５．６，　８．７，　５．９　Ｈｚ，　１Ｈ），　２．４０　（ｄｔｄ，　Ｊ　＝　１７．０，　７．９，　７．０，　４．９　Ｈｚ，　３Ｈ），　２．６９　（ｓ，　３Ｈ），　２．７９　（ｄ，　Ｊ　＝　９．６　Ｈｚ，　１Ｈ），　３．０８　（ｓ，　３Ｈ），　３．２０　（ｄ，　Ｊ　＝　１２．６　Ｈｚ，　１Ｈ），　３．２４　（ｓ，　３Ｈ），　３．４３　（ｄ，　Ｊ　＝　１２．４　Ｈｚ，　２Ｈ），　３．４８　（ｄ，　Ｊ　＝　８．９　Ｈｚ，　１Ｈ），　３．９２　（ｓ，　３Ｈ），　４．０８　（ｄｄｄ，　Ｊ　＝　２０．８，　１０．８，　５．０　Ｈｚ，　３Ｈ），　４．１４　－　４．２４　（ｍ，　４Ｈ），　４．２６　（ｄ，　Ｊ　＝　６．０　Ｈｚ，　３Ｈ），　４．５２　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１２．０，　２．８　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．３４　（ｑ，　Ｊ　＝　６．７　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．５６　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１４．７，　９．０　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．９１　（ｓ，　１Ｈ），　６．５０　－　６．６６　（ｍ，　３Ｈ），　６．８８　（ｓ，　１Ｈ），　７．１７　（ｄ，　Ｊ　＝　１．８　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．３３　（ｔｄ，　Ｊ　＝　７．５，　１．２　Ｈｚ，　２Ｈ），　７．４１　（ｔ，　Ｊ　＝　７．４　Ｈｚ，　２Ｈ），　７．５３　（ｄ，　Ｊ　＝　７．４　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．７２　（ｔ，　Ｊ　＝　７．０　Ｈｚ，　２Ｈ），　７．８９　（ｄ，　Ｊ　＝　７．５　Ｈｚ，　３Ｈ），　７．９９　（ｄ，　Ｊ　＝　７．３　Ｈｚ，　１Ｈ），　８．３６　（ｔ，　Ｊ　＝　６．３　Ｈｚ，　１Ｈ）．

【０３３８】
ＦＭｏｃ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_5$－ＣＯ－ＤＭ（１１ｂ）：ＨＲＭＳ　（Ｍ＋Ｎａ）$^+$　計算値．　１２６６．５１７０，実測値　１２６６．５１６４．　^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（４００　ＭＨｚ，　ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　０．７８　（ｓ，　３Ｈ），　１．１４　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１４．６，　６．５　Ｈｚ，　６Ｈ），　１．２２　（ｔ，　Ｊ　＝　６．８　Ｈｚ，　１０Ｈ），　１．３３　－　１．５７　（ｍ，　４Ｈ），　１．５９　（ｓ，　３Ｈ），　２．０４　（ｄ，　Ｊ　＝　１３．５　Ｈｚ，　１Ｈ），　２．２７　－　２．４４　（ｍ，　１Ｈ），　２．６９　（ｓ，　３Ｈ），　２．８０　（ｄ，　Ｊ　＝　９．７　Ｈｚ，　１Ｈ），　３．０８　（ｓ，　３Ｈ），　３．１４　－　３．２８　（ｍ，　５Ｈ），　３．３７　－　３．５５　（ｍ，　３Ｈ），　３．９２　（ｓ，　３Ｈ），　３．９８　－　４．１６　（ｍ，　３Ｈ），　４．２０　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１５．６，　７．６　Ｈｚ，　７Ｈ），　４．５２　（ｄ，　Ｊ　＝　１２．７　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．３４　（ｄ，　Ｊ　＝　６．９　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．５７　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１４．７，　９．０　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．９２　（ｓ，　１Ｈ），　６．４６　－　６．７２　（ｍ，

4H), 6.88 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.33 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 7.41 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 7.60 - 7.75 (m, 4H), 7.80 - 7.93 (m, 4H), 8.12 (t, 1H), 8.29 (d, J = 6.9 Hz, 1H).

【0339】

FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM(11c):HRMS (M+Na)$^+$ 計算値. 1266.5170, 実測値 1266.5170. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.71 (s, 3H), 0.96 - 1.16 (m, 10H), 1.16 - 1.51 (m, 10H), 1.52 (s, 4H), 1.82 - 2.16 (m, 1H), 2.17 - 2.56 (m, 11H), 2.62 (d, J = 5.8 Hz, 4H), 2.68 - 2.87 (m, 3H), 2.92 - 3.04 (m, 4H), 3.09 - 3.22 (m, 7H), 3.24 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 3.33 - 3.50 (m, 2H), 3.73 - 3.89 (m, 4H), 3.92 - 4.07 (m, 2H), 4.07 - 4.25 (m, 2H), 4.45 (dd, J = 12.0, 2.8 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.40 - 5.55 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.33 - 6.66 (m, 4H), 6.81 (s, 2H), 7.03 - 7.19 (m, 1H), 7.19 - 7.43 (m, 2H), 7.62 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 7.73 - 7.85 (m, 1H).

【0340】

FMoc-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM(11d):HRMS (M+Na)$^+$ 計算値. 1266.5170, 実測値 1266.5158. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.78 (s, 3H), 1.06 - 1.33 (m, 16H), 1.44 (d, J = 10.3 Hz, 11H), 1.59 (s, 3H), 1.99 - 2.22 (m, 3H), 2.35 - 2.45 (m, 2H), 2.55 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 2.69 (s, 3H), 2.80 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.08 (s, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.39 - 3.52 (m, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.99 - 4.40 (m, 4H), 4.52 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 5.34 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.57 (dd, J = 14.5, 9.2 Hz, 1H), 5.92 (s, 1H), 6.53 - 6.64 (m, 2H), 6.88 (s, 2H), 7.17 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.33 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 7.42 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 7.57 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.72 (s, 3H), 7.89 (d, J = 7.6 Hz, 3H), 7.99 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.35 (s, 1H).

【0341】

FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM(11g):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1173.4980, 実測値 1173.4964. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.79 (s, 3H), 1.06 - 1.34 (m, 13H), 1.36 - 1.54 (m, 4H), 1.60 (s, 2H), 1.88 - 2.10 (m, 1H), 2.10 - 2.23 (m, 1H), 2.31 - 2.51

（m，13H），2.71（s，3H），2.80（d，J＝9.6 Hz，1H），3.10（s，3H），3.26（s，4H），3.33－3.66（m，3H），3.98－4.32（m，4H），4.53（dd，J＝12.0，2.8 Hz，1H），5.35（q，J＝6.7 Hz，1H），5.49－5.65（m，1H），6.51－6.67（m，3H），6.89（s，1H），7.19（d，J＝1.8 Hz，1H），8.25（s，2H），8.34（d，J＝7.1 Hz，1H），8.58（t，J＝6.3 Hz，1H）．

【0342】

FMoc－L－Ala－D－Ala－NH－CH_2－S－$(CH_2)_5$－CO－DM（11f）：HRMS（M＋H）$^+$ 計算値．1173.4980，実測値 1173.4969．

【0343】

FMoc－D－Ala－D－Ala－NH－CH_2－S－$(CH_2)_5$－CO－DM（11h）：HRMS（M＋Na）$^+$ 計算値．1195.4907，実測値 1195.4799．^{1}H NMR（400 MHz，DMSO－d6）δ 0.71（s，3H），1.00－1.22（m，13H），1.28－1.45（m，2H），1.52（s，3H），1.91－2.14（m，1H），2.26（t，J＝1.9 Hz，5H），2.48（t，J＝1.8 Hz，2H），2.62（s，3H），2.66－2.77（m，2H），3.01（s，2H），3.10－3.21（m，5H），3.28－3.47（m，2H），3.86（d，J＝6.7 Hz，4H），3.93－4.25（m，10H），4.37－4.54（m，1H），5.27（d，J＝6.7 Hz，1H），5.40－5.56（m，1H），5.85（s，1H），6.31－6.66（m，3H），6.81（s，1H），7.11（d，J＝1.8 Hz，1H），7.26（t，J＝7.4 Hz，2H），7.35（t，J＝7.4 Hz，2H），7.45（d，J＝7.5 Hz，1H），7.65（t，J＝7.1 Hz，2H），7.82（d，J＝7.5 Hz，2H），7.89（d，J＝7.3 Hz，1H）．

【0344】

FMoc－L－Ala－D－Ala－L－Ala－NH－CH_2－S－$(CH_2)_3$－CO－DM（11j）：HRMS（M＋H）$^+$ 計算値．1216.5038，実測値 1216.4999．^{1}H NMR（400 MHz，DMSO－d6）δ 0.78（s，3H），0.95－1.29（m，16H），1.37（d，J＝3.4 Hz，1H），1.46（t，J＝12.5 Hz，2H），1.59（s，3H），1.62－1.90（m，1H），1.99－2.07（m，1H），2.08（s，2H），2.18－2.43（m，1H），2.50－2.59（m，1H），2.69（s，3H），2.73－2.83（m，1H），3.10（s，2H），3.25（s，3H），3.38－3.55（m，2H），3.91（s，3H），3.99－4.13（m，4H），4.12－4.35（m，7H），4.52（dd，J＝12.0，2.9 Hz，1H），5.34（q，J＝6.7 Hz，1H），5.48－5.65（m，1H），5.92（s，1H），6.48－6.70（m，3H），6.88（s，1H），7.17（d，J＝1.7 Hz，1H），7.33（t，J＝7.5 Hz，2H），7.41（t，J＝7.4 Hz，2H），7.58（d，J

= 7.0 Hz, 1H), 7.71 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 7.5 Hz, 3H), 7.95 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.29 - 8.38 (m, 1H), 8.41 (s, 1H).

【0345】

FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_2$-CO-DM(11i):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1131.4510, 実測値 1131.4507. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.76 (s, 3H), 1.08 - 1.21 (m, 12H), 1.24 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 1.38 - 1.52 (m, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.99 - 2.09 (m, 1H), 2.33 - 2.44 (m, 1H), 2.68 (s, 3H), 2.80 (dd, J = 14.4, 8.6 Hz, 2H), 3.08 (s, 3H), 3.17 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 3.23 (s, 3H), 3.46 (t, J = 10.3 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 4.00 - 4.13 (m, 3H), 4.13 - 4.34 (m, 5H), 4.52 (dd, J = 12.0, 2.9 Hz, 1H), 5.30 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 5.55 (dd, J = 13.4, 9.1 Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 6.55 (dd, J = 7.4, 5.7 Hz, 3H), 6.87 (s, 1H), 7.16 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.32 (tt, J = 7.4, 1.5 Hz, 2H), 7.41 (tt, J = 7.5, 1.5 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 10.5, 7.5 Hz, 2H), 7.88 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 8.14 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.37 (t, J = 6.3 Hz, 1H).

【0346】

4.アミノ-ペプチド-メイタンシノイド(化合物12a～12j)

タイプH_2N-ペプチド-NH-CH_2-S-$(CH_2)_n$-CO_2-DMの化合物を、図9Aに示したように、かつ、H_2N-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DMに例示したようにして調製した。

【0347】

H_2N-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM(12a):FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-$(CH_2)_5$-CO-DM(151mg、0.121mmol)を、20%モルホリンを含むDMF(2mL)で処理した。反応を、アルゴン下、室温で、1時間、磁気撹拌しながら進行させた。粗物質を、0.1%ギ酸を含む脱イオン水でもってして、26分間にわたって、5%～50%のアセトニトリルの直線勾配で溶出する、C18、30ミクロン、150gカラムカートリッジで精製した。純粋な所望の産物を含む画分を直ちに凍結し、そして、凍結乾燥して、46mg(37.1%の収率)の無色の油状物を得た。HRMS (M + H)$^+$ 計算値. 1022.4670;実測値 1022.4669. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.78 (s, 3H), 1.12 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.13 - 1.21 (m, 10H), 1.21 - 1.31 (m, 3H), 1.37 - 1.50 (m, 4H), 1.51 - 1.57 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 2.04 (dd, J = 14.4, 2.8 Hz, 1H), 2.15 (ddd, J = 15.9, 8.7, 6.0 Hz, 1H), 2.38 (td, J = 7.0, 3.6 Hz, 2H), 2.70 (s, 3H), 2.79 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.21 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 3.25

（ｓ，３Ｈ），３．３３－３．５５（ｍ，８Ｈ），３．９３（ｓ，３Ｈ），４．０１－４．３３（ｍ，５Ｈ），４．５２（ｄｄ，Ｊ＝１２．０，２．８Ｈｚ，１Ｈ），５．３４（ｑ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，１Ｈ），５．５７（ｄｄ，Ｊ＝１４．６，９．０Ｈｚ，１Ｈ），５．９５（ｓ，１Ｈ），６．４８－６．６５（ｍ，３Ｈ），６．８９（ｓ，１Ｈ），７．１８（ｄ，Ｊ＝１．８Ｈｚ，１Ｈ），８．０７（ｄ，Ｊ＝７．５Ｈｚ，１Ｈ），８．１３（ｓ，１Ｈ），８．３１（ｓ，１Ｈ），８．４０（ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３４８】

H_2N－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－$(CH_2)_5$－ＣＯ－ＤＭ（１２ｂ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値．１０２２．４６７０，実測値１０２２．４６７５．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７１（ｓ，３Ｈ），１．０５（ｄｄ，Ｊ＝６．７，３．１Ｈｚ，７Ｈ），１．０８－１．１６（ｍ，１０Ｈ），１．１９（ｔ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，３Ｈ），１．３０－１．５０（ｍ，６Ｈ），１．５２（ｓ，３Ｈ），１．９７（ｄ，Ｊ＝１３．３Ｈｚ，１Ｈ），２．０１－２．２１（ｍ，２Ｈ），２．３４（ｓ，３Ｈ），２．６３（ｓ，３Ｈ），２．７３（ｄ，Ｊ＝９．８Ｈｚ，１Ｈ），３．０２（ｓ，３Ｈ），３．１４（ｄ，Ｊ＝１２．５Ｈｚ，１Ｈ），３．３３－３．４８（ｍ，２Ｈ），３．８６（ｓ，３Ｈ），３．９５－４．２３（ｍ，７Ｈ），４．４５（ｄｄ，Ｊ＝１３．１Ｈｚ，１Ｈ），５．２７（ｑ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，１Ｈ），５．４１－５．５８（ｍ，１Ｈ），５．８５（ｓ，１Ｈ），６．３９－６．６３（ｍ，４Ｈ），６．８１（ｓ，１Ｈ），７．１２（ｄ，Ｊ＝１．８Ｈｚ，１Ｈ），８．０２（ｓ，１Ｈ），８．１３（ｄ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），８．２６（ｓ，１Ｈ），８．３６（ｔ，Ｊ＝６．２Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３４９】

H_2N－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－$(CH_2)_5$－ＣＯ－ＤＭ（１２ｃ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値．１０２２．４６７０，実測値１０２２．４６８０．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７１（ｓ，３Ｈ），１．０１－１．２６（ｍ，１９Ｈ），１．２５－１．５０（ｍ，６Ｈ），１．５２（ｓ，３Ｈ），１．９７（ｄ，Ｊ＝１３．７Ｈｚ，１Ｈ），２．０２－２．２２（ｍ，１Ｈ），２．３５（ｄｄ，Ｊ＝１７．２，９．５Ｈｚ，２Ｈ），２．４７（ｄ，Ｊ＝１１．５Ｈｚ，１Ｈ），２．６３（ｓ，４Ｈ），２．７３（ｄ，Ｊ＝９．６Ｈｚ，１Ｈ），３．０２（ｓ，３Ｈ），３．１０－３．２４（ｍ，６Ｈ），３．３２－３．５０（ｍ，２Ｈ），３．８６（ｓ，３Ｈ），３．９５－４．１８（ｍ，４Ｈ），４．４５（ｄｄ，Ｊ＝１２．１，２．６Ｈｚ，１Ｈ），５．２７（ｑ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，１Ｈ），５．４４－５．５５（ｍ，１Ｈ），５．８５（ｓ，１Ｈ），６．４２－６．５９（ｍ，４Ｈ），６．８１（ｓ，１Ｈ），７．１２（ｄ，Ｊ＝１．７Ｈｚ，１Ｈ），８．０２（ｓ，１Ｈ），８．１３（ｄ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），８．３６（ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３５０】

H_2N－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－$(CH_2)_5$－ＣＯ－ＤＭ（１２ｄ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値．１０２２．４６７０，実測値１０２２．４６７５．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７１（ｓ，３Ｈ），０．９８－１．１４（ｍ，１３Ｈ），１．１４－１．２６（ｍ，２Ｈ），１．３０－１．４９（ｍ，４Ｈ），１

.52 (s, 3H), 2.24 - 2.41 (m, 2H), 2.44 (d, J = 1.8 Hz, 16H), 2.63 (s, 2H), 2.73 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.02 (s, 2H), 3.08 - 3.21 (m, 4H), 3.32 - 3.49 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.92 - 4.23 (m, 3H), 4.45 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 5.26 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 5.40 - 5.57 (m, 1H), 5.86 (s, 1H), 6.41 - 6.66 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 8.10 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.35 (t, J = 6.3 Hz, 1H).

【0351】

H_2N-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(12g):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 951.4299, 実測値 951.4289. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.79 (s, 3H), 1.06 - 1.34 (m, 13H), 1.36 - 1.54 (m, 4H), 1.60 (s, 2H), 1.88 - 2.10 (m, 1H), 2.10 - 2.23 (m, 1H), 2.31 - 2.51 (m, 13H), 2.71 (s, 3H), 2.80 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.10 (s, 3H), 3.26 (s, 4H), 3.33 - 3.66 (m, 3H), 3.98 - 4.32 (m, 4H), 4.53 (dd, J = 12.0, 2.8 Hz, 1H), 5.35 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.49 - 5.65 (m, 1H), 6.51 - 6.67 (m, 3H), 6.89 (s, 1H), 7.19 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.25 (s, 2H), 8.34 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 8.58 (t, J = 6.3 Hz, 1H).

【0352】

H_2N-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(12f):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 951.4226, 実測値 951.1299. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.71 (s, 3H), 1.00 - 1.13 (m, 11H), 1.19 (t, J = 8.9 Hz, 3H), 1.29 - 1.45 (m, 4H), 1.52 (s, 3H), 1.92 - 2.03 (m, 1H), 2.07 (dd, J = 15.7, 8.7 Hz, 1H), 2.23 - 2.39 (m, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.07 - 3.32 (m, 14H), 3.34 - 3.47 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.95 - 4.21 (m, 4H), 4.45 (dd, J = 11.9, 2.8 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 5.50 (dd, J = 14.7, 9.0 Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.40 - 6.61 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.41 (t, J = 6.1 Hz, 1H).

【0353】

H_2N-D-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(12h):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 950.4226, 実測値 951.4299. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.71 (s, 3H), 0.96 - 1.14 (m, 14H), 1.19 (t, J = 8.9 Hz, 3H), 1.38 (q, J = 10.5, 7.0 Hz

, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.88 - 2.02 (m, 1H), 2.02 - 2.18 (m, 1H), 2.22 - 2.41 (m, 2H), 2.48 (s, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.08 - 3.22 (m, 4H), 3.34 - 3.48 (m, 2H), 3.86 (s, 4H), 3.95 - 4.23 (m, 5H), 4.45 (dd, J = 11.9, 2.8 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.41 - 5.60 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.40 - 6.65 (m, 4H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.44 (t, J = 6.1 Hz, 1H).

【0354】

H_2N-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_3$-CO-DM(12j):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 994.4357, 実測値 994.4330.

【0355】

H_2N-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_2$-CO-DM(12i):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 909.3830, 実測値 909.3826. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.77 (s, 3H), 1.12 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 1.17 (dd, J = 7.0, 5.2 Hz, 6H), 1.25 (d, J = 13.3 Hz, 1H), 1.40 - 1.51 (m, 2H), 1.59 (s, 3H), 2.04 (dd, J = 14.4, 2.9 Hz, 1H), 2.41 (ddt, J = 18.6, 10.1, 5.4 Hz, 1H), 2.61 - 2.70 (m, 1H), 2.72 (s, 3H), 2.76 - 2.90 (m, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.20 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.33 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 3.39 - 3.64 (m, 3H), 3.93 (s, 3H), 4.03 - 4.16 (m, 2H), 4.24 (dt, J = 15.1, 7.6 Hz, 2H), 4.53 (dd, J = 12.0, 2.9 Hz, 1H), 5.32 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 5.51 - 5.64 (m, 1H), 5.93 (s, 1H), 6.49 - 6.62 (m, 2H), 6.88 (s, 1H), 7.19 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.55 (t, J = 6.3 Hz, 1H).

【0356】

5. SPDB-ペプチド-メイタンシノイド(化合物13a～13j)

タイプSPDB-ペプチド-NH-CH_2-S-(CH_2)$_n$-CO_2-DMの化合物を、図9Aに示したように、かつ、SPDB-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DMに例示したようにして調製した。

【0357】

SPDB-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(13a):H_2N-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(46mg、0.045mmol)を、DMF(2mL)に溶解し、それに対して、SPDB(14.7mg、0.045mmol)を加え、反応を、アルゴン雰囲気下、室温で、1時間、磁気撹拌しながら進行させた。粗物質を、0.1%ギ酸を含む脱イオン水でもってして、35分間にわたって、5%～95%のアセトニトリルの直線勾配で溶出する、C18、430ミクロン、30gカラムカートリッジで精製した。純粋な所望の産物を含む画分を凍結及び凍結乾燥して、38mg(68.5%の収率)の白色固体を得た。HRMS (M + H)$^+$ 計算値. 1233.4796

；実測値 1233.4783. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.78 (s, 3H), 1.12 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.14 - 1.21 (m, 10H), 1.22 - 1.30 (m, 3H), 1.44 (qd, J = 10.2, 4.5 Hz, 5H), 1.50 - 1.56 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.84 (p, J = 7.3 Hz, 2H), 2.04 (dd, J = 14.4, 2.7 Hz, 1H), 2.15 (ddd, J = 15.8, 8.6, 5.9 Hz, 2H), 2.24 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.39 (dtdd, J = 18.1, 13.2, 8.1, 4.7 Hz, 3H), 2.70 (s, 3H), 2.76 - 2.86 (m, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.21 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.43 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.48 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 4.13 (s, 2H), 4.19 (h, J = 6.6 Hz, 4H), 4.52 (dd, J = 12.1, 2.8 Hz, 1H), 5.34 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 5.56 (dd, J = 14.7, 9.0 Hz, 1H), 5.92 (s, 1H), 6.49 - 6.66 (m, 3H), 6.85 - 6.97 (m, 2H), 7.18 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.23 (ddd, J = 7.3, 4.8, 1.2 Hz, 1H), 7.76 (dt, J = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.78 - 7.91 (m, 2H), 8.00 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.33 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.44 (dt, J = 4.7, 1.3 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H).

【0358】

SPDB-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(13b)：HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1233.4796, 実測値 1233.4799. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.71 (s, 3H), 1.01 - 1.22 (m, 13H), 1.27 - 1.45 (m, 2H), 1.52 (s, 3H), 1.91 - 2.16 (m, 1H), 2.26 (d, J = 7.4 Hz, 7H), 2.26 (t, J = 1.9 Hz, 4H), 2.48 (t, J = 1.8 Hz, 2H), 2.57 - 2.65 (m, 3H), 2.65 - 2.77 (m, 2H), 3.01 (s, 2H), 3.13 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.32 - 3.47 (m, 2H), 3.86 (d, J = 6.7 Hz, 4H), 3.93 - 4.11 (m, 3H), 4.18 (t, J = 11.2 Hz, 7H), 4.39 - 4.50 (m, 1H), 5.27 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 5.50 (dd, J = 14.7, 8.8 Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.37 - 6.61 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.26 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.65 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 7.3 Hz, 1H).

【0359】

SPDB-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(13c)：HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1233.4796, 実測値 1233.4795. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.71 (s, 3H), 1.02 - 1.25 (m, 18H), 1.

29 － 1.50 (m, 6H), 1.52 (s, 3H), 1.70 － 1.87 (m, 2H), 1.87 － 2.14 (m, 2H), 2.13 － 2.22 (m, 2H), 2.27 － 2.40 (m, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.69 － 2.84 (m, 4H), 3.02 (s, 3H), 3.14 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.32 － 3.45 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.95 － 4.07 (m, 2H), 4.07 － 4.19 (m, 4H), 4.45 (dd, J = 11.9, 2.7 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.44 － 5.55 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.42 － 6.59 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.13 － 7.19 (m, 1H), 7.68 (d, J = 8.2, 2.7 Hz, 1H), 7.72 － 7.80 (m, 1H), 7.88 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.25 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.37 (dd, J = 5.0, 1.9 Hz, 1H).

【0360】

SPDB－L－Ala－L－Ala－D－Ala－NH－CH_2－S－(CH_2)$_5$－CO－DM(13d)：HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1233.4796, 実測値 1233.4797. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO－d6) δ 0.72 (d, J = 3.3 Hz, 3H), 0.98 － 1.28 (m, 22H), 1.30 － 1.46 (m, 3H), 1.53 (s, 3H), 1.78 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.86 － 2.16 (m, 2H), 2.19 (q, J = 7.4, 5.6 Hz, 2H), 2.26 － 2.41 (m, 2H), 2.41 － 2.55 (m, 4H), 2.64 (d, J = 3.2 Hz, 2H), 2.81 － 2.92 (m, 1H), 3.02 (s, 2H), 3.14 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.26 (s, 1H), 3.31 － 3.48 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.97 － 4.30 (m, 7H), 4.46 (dd, J = 11.8, 3.2 Hz, 1H), 5.24 － 5.36 (m, 1H), 5.45 － 5.62 (m, 1H), 5.86 (s, 1H), 6.40 － 6.65 (m, 3H), 6.82 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 12.1, 6.1, 4.9 Hz, 2H), 7.69 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.75 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 7.8, 3.2 Hz, 1H), 7.95 － 8.04 (m, 2H), 8.26 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 8.33 － 8.47 (m, 1H).

【0361】

SPDB－D－Ala－L－Ala－NH－CH_2－S－(CH_2)$_5$－CO－DM(13g)：HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1162.4425, 実測値 1162.4405. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO－d6) δ 0.71 (s, 3H), 1.08 (dt, J = 13.9, 6.9 Hz, 15H), 1.15 － 1.25 (m, 3H), 1.28 － 1.44 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.77 (p, J = 7.2 Hz, 2H), 1.91 － 2.02 (m, 1H), 2.02 － 2.13 (m, 1H), 2.17 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.22 － 2.40 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.68 － 2.80 (m, 3H), 3.02 (s, 3H), 3.13 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.33 － 3.45 (m,

2H), 3.85 (s, 3H), 3.95 − 4.16 (m, 5H), 4.45 (dd, J = 12.1, 2.8 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.44 − 5.56 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.43 − 6.60 (m, 3H), 6.82 (s, 1H), 7.11 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.12 − 7.18 (m, 1H), 7.65 − 7.79 (m, 2H), 8.06 − 8.16 (m, 2H), 8.30 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.35 − 8.40 (m, 1H).

【0362】

SPDB−L−Ala−D−Ala−NH−CH_2−S−$(CH_2)_5$−CO−DM(13f):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1162.4399, 実測値 1162.455. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO−d6) δ 0.71 (s, 3H), 1.02 − 1.13 (m, 12H), 1.14 − 1.25 (m, 3H), 1.31 − 1.44 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.77 (p, J = 7.3 Hz, 2H), 1.97 (d, J = 14.3, 2.7 Hz, 1H), 2.02 − 2.13 (m, 1H), 2.17 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.28 − 2.40 (m, 3H), 2.43 (m, J = 3.2 Hz, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.69 − 2.80 (m, 3H), 3.02 (s, 3H), 3.13 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.39 (dd, J = 21.0, 10.7 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.96 − 4.18 (m, 5H), 4.45 (dd, J = 12.1, 2.8 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.45 − 5.55 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.43 − 6.60 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.10 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.16 (t, J = 7.2, 4.9 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.71 − 7.79 (m, 1H), 8.02 − 8.15 (m, 2H), 8.28 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.37 (d, J = 4.8, 1.7 Hz, 1H).

【0363】

SPDB−D−Ala−D−Ala−NH−CH_2−S−$(CH_2)_5$−CO−DM(13h):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1162.4399, 実測値 1162.455. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO−d6) δ 0.71 (s, 3H), 1.02 − 1.16 (m, 13H), 1.14 − 1.25 (m, 3H), 1.28 − 1.49 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.77 (p, J = 7.2 Hz, 2H), 1.92 − 2.14 (m, 2H), 2.17 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.23 − 2.40 (m, 2H), 2.46 − 2.54 (m, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.65 − 2.85 (m, 4H), 3.02 (s, 3H), 3.03 − 3.16 (m, 2H), 3.18 (s, 3H), 3.28 − 3.45 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.95 − 4.20 (m, 5H), 4.45 (dd, J = 12.1, 2.8 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.44 − 5.55 (m, 1H), 5.82 − 5.88 (m, 1H), 6.42 − 6.59 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.14 − 7.20 (m, 1H), 7.67 − 7.72 (m, 1H), 7.72 − 7.80 (m, 1H), 7.88 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 8.28 (t, J = 6.3 Hz,

１Ｈ），８．３５－８．４０（ｍ，１Ｈ）．
【０３６４】
ＳＰＤＢ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－$(CH_2)_3$－ＣＯ－ＤＭ（１３ｊ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値．１２０３．４３３７，実測値１２０３．４３１５．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７１（ｓ，３Ｈ），０．９４－１．２４（ｍ，２０Ｈ），１．３８（ｓ，３Ｈ），１．５２（ｓ，３Ｈ），１．５７－１．８７（ｍ，１Ｈ），１．８９－２．０８（ｍ，１Ｈ），２．２６（ｔ，Ｊ＝１５．１ Ｈｚ，１Ｈ），２．５０（ｄ，Ｊ＝５．２ Ｈｚ，２Ｈ），２．５４－２．７９（ｍ，７Ｈ），３．０５（ｄ，Ｊ＝３．８ Ｈｚ，３Ｈ），３．１８（ｓ，５Ｈ），３．２９－３．４６（ｍ，３Ｈ），３．８６（ｄ，Ｊ＝６．１ Ｈｚ，４Ｈ），４．００（ｓ，３Ｈ），４．０５－４．２４（ｍ，４Ｈ），４．３３－４．５４（ｍ，１Ｈ），５．１７－５．３８（ｍ，１Ｈ），５．３９－５．５８（ｍ，１Ｈ），５．８５（ｓ，１Ｈ），６．２９－６．５８（ｍ，４Ｈ），６．６３（ｓ，１Ｈ），６．８１（ｓ，１Ｈ），７．０４－７．１９（ｍ，１Ｈ），７．９０（ｓ，１Ｈ），８．１４－８．３９（ｍ，１Ｈ），８．４５（ｓ，１Ｈ）．
【０３６５】
ＳＰＤＢ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－$(CH_2)_2$－ＣＯ－ＤＭ（１３ｉ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値．１１２０．３９５５，実測値１１２０．３９５１．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７４－０．８２（ｍ，３Ｈ），１．１０－１．２２（ｍ，１３Ｈ），１．２５（ｄ，Ｊ＝１４．１ Ｈｚ，１Ｈ），１．４６（ｔ，Ｊ＝１０．９ Ｈｚ，２Ｈ），１．５６－１．６３（ｍ，３Ｈ），１．８５（ｄｄｄ，Ｊ＝１４．４，９．０，５．１ Ｈｚ，２Ｈ），２．００（ｄｄｄ，Ｊ＝１４．７，９．３，５．４ Ｈｚ，９Ｈ），２．２４（ｄｔ，Ｊ＝１０．８，５．０ Ｈｚ，２Ｈ），２．７２（ｄ，Ｊ＝３．６ Ｈｚ，２Ｈ），２．９４（ｄｑ，Ｊ＝１０．７，７．２，５．７ Ｈｚ，９Ｈ），３．１０（ｄ，Ｊ＝３．７ Ｈｚ，３Ｈ），３．２０（ｄ，Ｊ＝３．４ Ｈｚ，１Ｈ），３．２５（ｄ，Ｊ＝３．６ Ｈｚ，３Ｈ），３．３２（ｄ，Ｊ＝３．７ Ｈｚ，１Ｈ），３．４７（ｔｄ，Ｊ＝１０．７，１０．０，３．８ Ｈｚ，２Ｈ），３．９３（ｔ，Ｊ＝４．６ Ｈｚ，３Ｈ），４．０２－４．２５（ｍ，６Ｈ），４．４９－４．５７（ｍ，１Ｈ），５．２８－５．３７（ｍ，１Ｈ），５．５３－５．６２（ｍ，１Ｈ），５．９２（ｄ，Ｊ＝３．６ Ｈｚ，１Ｈ），６．５７（ｑ，Ｊ＝５．４，４．５ Ｈｚ，３Ｈ），６．８５－６．９３（ｍ，１Ｈ），７．１７（ｄ，Ｊ＝３．３ Ｈｚ，１Ｈ），７．２５（ｄｑ，Ｊ＝８．０，４．９ Ｈｚ，６Ｈ），７．７２－７．８７（ｍ，１１Ｈ），８．１６（ｄｔ，Ｊ＝１５．４，４．９ Ｈｚ，２Ｈ），８．４５（ｔｔ，Ｊ＝９．９，５．９ Ｈｚ，６Ｈ）．
【０３６６】
６．チオ－ペプチド－メイタンシノイド（化合物１４ａ～１４ｊ）
タイプＨＳ－$(CH_2)_3$－ＣＯ－ペプチド－ＮＨ－CH_2－Ｓ－$(CH_2)_n$－CO_2－ＤＭの化合物を、図９Ａに示したように、かつ、ＨＳ－$(CH_2)_3$ＣＯ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－$(CH_2)_5$－ＣＯ－ＤＭに例示したようにして調製した。
【０３６７】
ＨＳ－$(CH_2)_3$ＣＯ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－

（CH_2）$_5$－ＣＯ－ＤＭ（１４ａ）：ＳＰＤＢ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_5$－ＣＯ－ＤＭ（３８ｍｇ、０．０３１ｍｍｏｌ）を、ＤＭＳＯ（１ｍＬ）に溶解し、それに対して、ＤＴＴ（１９ｍｇ、０．１２ｍｍｏｌ）を含む１００ｍＭリン酸カリウムの溶液、２ｍＭ　ＥＤＴＡ　ｐＨ７．５緩衝剤（１ｍＬ）を加えた。反応を、アルゴン下、室温で、１時間、磁気撹拌しながら進行させた。粗反応物を、０．１％ギ酸を含む脱イオン水でもってして、３５分間にわたって、５％～９５％のアセトニトリルの直線勾配で溶出する、Ｃ１８、３０ミクロン、３０ｇカラムカートリッジで精製した。所望の産物を含む画分を直ちに凍結し、及び、凍結乾燥して、１８．２ｍｇ（５２．５％収率）の白色固体を得た。ＨＲＭＳ　（Ｍ　＋　Ｈ）$^+$　計算値．１１２４．４８０９；実測値　１１２４．４７９８．　^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（４００　ＭＨｚ，　ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　０．７８　（ｓ，　３Ｈ），　１．１２　（ｄ，　Ｊ　＝　６．４　Ｈｚ，　３Ｈ），　１．１４　－　１．２１　（ｍ，　１０Ｈ），　１．２２　－　１．３０　（ｍ，　３Ｈ），　１．３７　－　１．５０　（ｍ，　５Ｈ），　１．５１　－　１．５７　（ｍ，　１Ｈ），　１．５９　（ｓ，　３Ｈ），　１．７４　（ｐ，　Ｊ　＝　７．２　Ｈｚ，　２Ｈ），　２．０４　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１４．４，　２．８　Ｈｚ，　１Ｈ），　２．０９　－　２．１８　（ｍ，　１Ｈ），　２．１８　－　２．２４　（ｍ，　２Ｈ），　２．２７　（ｔ，　Ｊ　＝　７．６　Ｈｚ，　１Ｈ），　２．３８　（ｔｄ，　Ｊ　＝　７．１，　４．７　Ｈｚ，　２Ｈ），　２．４４　（ｔ，　Ｊ　＝　７．３　Ｈｚ，　２Ｈ），　２．７０　（ｓ，　３Ｈ），　２．７９　（ｄ，　Ｊ　＝　９．６　Ｈｚ，　１Ｈ），　３．０９　（ｓ，　３Ｈ），　３．２１　（ｄ，　Ｊ　＝　１２．６　Ｈｚ，　１Ｈ），　３．２５　（ｓ，　３Ｈ），　３．４３　（ｄ，　Ｊ　＝　１２．４　Ｈｚ，　１Ｈ），　３．４９　（ｄ，　Ｊ　＝　９．０　Ｈｚ，　１Ｈ），　３．９３　（ｓ，　３Ｈ），　４．０８　（ｄｄｄ，　Ｊ　＝　２１．６，　１１．４，　４．１　Ｈｚ，　２Ｈ），　４．１３　－　４．２８　（ｍ，　４Ｈ），　４．５２　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１２．１，　２．８　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．３４　（ｑ，　Ｊ　＝　６．７　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．５６　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１４．７，　９．０　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．９１　（ｄ，　Ｊ　＝　１．４　Ｈｚ，　１Ｈ），　６．４８　－　６．６６　（ｍ，　３Ｈ），　６．８８　（ｓ，　１Ｈ），　７．１８　（ｄ，　Ｊ　＝　１．８　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．８６　（ｄ，　Ｊ　＝　７．５　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．９６　（ｄ，　Ｊ　＝　７．３　Ｈｚ，　１Ｈ），　８．０５　（ｄ，　Ｊ　＝　７．１　Ｈｚ，　１Ｈ），　８．３３　（ｔ，　Ｊ　＝　６．３　Ｈｚ，　１Ｈ）．

【０３６８】

ＨＳ－（CH_2）$_3$ＣＯ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_5$－ＣＯ－ＤＭ（１４ｂ）：ＨＲＭＳ　（Ｍ＋Ｎａ）$^+$　計算値．１１４６．４６２９，実測値　１１４６．４５９１．　^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（４００　ＭＨｚ，　ＤＭＳＯ－ｄ６）　δ　０．７１　（ｓ，　３Ｈ），　１．０３　－　１．２５　（ｍ，　１９Ｈ），　１．３０　－　１．４５　（ｍ，　６Ｈ），　１．５２　（ｓ，　４Ｈ），　１．６５　（ｐ，　Ｊ　＝　７．３　Ｈｚ，　２Ｈ），　１．９１　－　２．０２　（ｍ，　１Ｈ），　２．０２　－　２．１３　（ｍ，　１Ｈ），　２．１２　－　２．１９　（ｍ，　４Ｈ），　２．２９　－　２．３９　（ｍ，　４Ｈ），　２．６３　（ｓ，　３Ｈ），　２．７３　（ｄ，　Ｊ　＝　９．６　Ｈｚ，　１Ｈ），　３．０２　（ｓ，　３Ｈ），　３．１４　（ｄ，　Ｊ　＝　１２．５　Ｈｚ，　１Ｈ），　３．３３　－　３．４７　（ｍ，　２Ｈ），　３．８６　（ｓ，　３Ｈ），　４．０１　（ｔｄ，　Ｊ　＝　１０．４，　９．７，　４．３　Ｈｚ，　２Ｈ），　４．０４　－　４．１６　（ｍ，　５Ｈ），　４．４５　（ｄｄ，　Ｊ　＝　１２．０，　２．９　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．２７　（ｑ，　Ｊ　＝　６．７　Ｈｚ，　１Ｈ），　５．４３　－　５．５６　（ｍ，　１Ｈ），　５．８５　（ｓ，　１Ｈ），　６．３８　－　６．６１　（ｍ，　４Ｈ），　６．８１　（ｓ，　１Ｈ），　７．１１　（ｄ，　Ｊ　＝　１．８　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．８２　（ｄ，　Ｊ　＝　７．７　Ｈｚ，　１Ｈ），　７．９７　（ｔ，　Ｊ　＝

6.3 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 6.9 Hz, 1H).

【0369】

HS-(CH_2)$_3$CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(14c):HRMS (M+Na)$^+$ 計算値. 1146.4629, 実測値 1146.4553. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.71 (s, 3H), 0.99 - 1.26 (m, 21H), 1.31 - 1.45 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.67 (p, J = 7.2 Hz, 2H), 1.89 - 2.02 (m, 1H), 2.02 - 2.24 (m, 4H), 2.25 - 2.46 (m, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 3.32 - 3.51 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.96 - 4.18 (m, 7H), 4.45 (dd, J = 12.0, 2.9 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 5.44 - 5.63 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.37 - 6.59 (m, 4H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.27 (t, J = 6.3 Hz, 1H).

【0370】

HS-(CH_2)$_3$CO-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(14d):HRMS (M+Na)$^+$ 計算値. 1146.4629, 実測値 1146.4519. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.71 (s, 3H), 0.95 - 1.24 (m, 20H), 1.27 - 1.45 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.67 (p, J = 7.3 Hz, 2H), 1.93 - 2.01 (m, 1H), 2.02 - 2.22 (m, 4H), 2.22 - 2.41 (m, 5H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.18 (s, 4H), 3.39 (dd, J = 21.4, 10.7 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.94 - 4.24 (m, 6H), 4.45 (dd, J = 12.0, 2.8 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.44 - 5.57 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.37 - 6.65 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.93 - 8.05 (m, 2H), 8.26 (t, J = 6.4 Hz, 1H).

【0371】

HS-(CH_2)$_3$CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(14g):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1053.4438, 実測値 1053.4426. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.71 (s, 3H), 1.01 - 1.15 (m, 13H), 1.15 - 1.27 (m, 3H), 1.31 - 1.44 (m, 5H), 1.53 (s, 3H), 1.67 (p, J = 7.1 Hz, 2H), 1.93 - 2.03 (m, 1H), 2.03 - 2.23 (m, 4H), 2.22 - 2.41 (m, 5H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.14 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.32 - 3.46 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.92 -

4.20 (m, 6H), 4.45 (dd, J = 11.9, 2.8 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.42 - 5.58 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.42 - 6.60 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.30 (t, J = 6.3 Hz, 1H).

【0372】

HS-(CH_2)$_3$CO-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(14f):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1053.4366, 実測値 1053.4438. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.71 (s, 3H), 1.02 - 1.14 (m, 13H), 1.19 (t, J = 9.7 Hz, 3H), 1.31 - 1.43 (m, 6H), 1.53 (s, 3H), 1.67 (p, J = 7.3 Hz, 2H), 1.91 - 2.02 (m, 1H), 2.02 - 2.22 (m, 4H), 2.34 - 2.39 (m, 4H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.19 (d, J = 4.2 Hz, 4H), 3.30 - 3.47 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.94 - 4.20 (m, 6H), 4.45 (d, J = 11.8, 2.8 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.44 - 5.56 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.40 - 6.61 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 8.03 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.29 (t, J = 6.2 Hz, 1H).

【0373】

HS-(CH_2)$_3$CO-D-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_5$-CO-DM(14h):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1053.4366, 実測値 1053.4438. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSFO-d6) δ 0.71 (s, 3H), 1.02 - 1.15 (m, 13H), 1.14 - 1.24 (m, 3H), 1.30 - 1.45 (m, 5H), 1.53 (s, 3H), 1.67 (p, J = 7.1 Hz, 2H), 1.90 - 2.01 (m, 1H), 2.01 - 2.24 (m, 4H), 2.27 - 2.33 (m, 1H), 2.33 - 2.42 (m, 4H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.10 - 3.21 (m, 4H), 3.33 - 3.46 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.95 - 4.18 (m, 6H), 4.45 (dd, J = 11.9, 2.8 Hz, 1H), 5.27 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.44 - 5.55 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.42 - 6.59 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.30 (t, J = 6.3 Hz, 1H).

【0374】

HS-(CH_2)$_3$CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)$_3$-CO-DM(14j):HRMS (M+H)$^+$ 計算値. 1096.4496, 実測値 1096.4464. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.78 (s, 3H), 1.02 - 1.31 (m, 19H), 1.35 - 1.55 (m, 2H), 1.60 (s, 3H),

1．７４（ｐ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，３Ｈ），１．７８－１．９３（ｍ，１Ｈ），２．１４－２．３３（ｍ，４Ｈ），２．４１－２．４９（ｍ，２Ｈ），２．７１（ｓ，３Ｈ），２．８０（ｄ，Ｊ＝９．６Ｈｚ，１Ｈ），３．１２（ｓ，３Ｈ），３．２２（ｄ，Ｊ＝１２．７Ｈｚ，１Ｈ），３．２６（ｓ，３Ｈ），３．４７（ｄｄ，Ｊ＝２１．３，１０．６Ｈｚ，２Ｈ），３．９３（ｓ，４Ｈ），４．０３－４．１３（ｍ，３Ｈ），４．１３－４．２５（ｍ，３Ｈ），４．５２（ｄｄ，Ｊ＝１２．０，２．８Ｈｚ，１Ｈ），５．３５（ｑ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，１Ｈ），５．５０－５．６４（ｍ，１Ｈ），５．９２（ｓ，１Ｈ），６．４７－６．６９（ｍ，４Ｈ），６．８８（ｓ，１Ｈ），７．１８（ｄ，Ｊ＝１．７Ｈｚ，１Ｈ），７．９４（ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，１Ｈ），８．０９（ｄ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，１Ｈ），８．１５（ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，１Ｈ），８．３２（ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３７５】

ＨＳ－（ＣＨ$_2$）$_3$ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＯ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_2$－ＣＯ－ＤＭ（１４ｉ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$計算値．１０１１．３９６９，実測値１０１１．３９６１．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７７（ｓ，３Ｈ），１．１２（ｄ，Ｊ＝６．４Ｈｚ，３Ｈ），１．１７（ｄｄ，Ｊ＝７．０，５．１Ｈｚ，９Ｈ），１．２５（ｄ，Ｊ＝１３．０Ｈｚ，１Ｈ），１．４０－１．５１（ｍ，２Ｈ），１．５９（ｓ，３Ｈ），１．７４（ｑ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，２Ｈ），２．００－２．０８（ｍ，１Ｈ），２．２３（ｄｔ，Ｊ＝１６．８，７．６Ｈｚ，３Ｈ），２．４３（ｑ，Ｊ＝７．４Ｈｚ，２Ｈ），２．６２－２．６９（ｍ，１Ｈ），２．７２（ｓ，３Ｈ），２．７６－２．８８（ｍ，２Ｈ），３．１０（ｓ，３Ｈ），３．２０（ｄ，Ｊ＝１２．６Ｈｚ，１Ｈ），３．２５（ｓ，３Ｈ），３．３１（ｓ，３Ｈ），３．３９－３．５４（ｍ，２Ｈ），３．９３（ｓ，３Ｈ），４．０１－４．２６（ｍ，５Ｈ），４．５３（ｄｄ，Ｊ＝１２．０，２．８Ｈｚ，１Ｈ），５．３２（ｑ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，１Ｈ），５．４９－５．６３（ｍ，１Ｈ），５．９２（ｄ，Ｊ＝１．４Ｈｚ，１Ｈ），６．４８－６．６２（ｍ，３Ｈ），６．８８（ｓ，１Ｈ），７．１８（ｄ，Ｊ＝１．８Ｈｚ，１Ｈ），８．１０（ｄ，Ｊ＝６．５Ｈｚ，１Ｈ），８．１６（ｄ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），８．４１（ｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３７６】

７．ＨＯＯＣ－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＯ－ペプチド－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＯ$_2$－ＤＭ（化合物１９ａ～１９ｊ）

タイプＨＯＯＣ－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＯ－ペプチド－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＯ$_2$－ＤＭの化合物を、図９Ｂに示したように、かつ、ＨＯＯＣ－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＯ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_5$－ＣＯ－ＤＭに例示したようにして調製した。

【０３７７】

ＨＯＯＣ－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＯ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_5$－ＣＯ－ＤＭ（１９ａ）：Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_5$－ＣＯ－ＤＭ（１７．２５ｍｇ、０．０１７ｍｍｏｌ）を、無水グルタル酸（３８．５ｍｇ、０．３３７ｍｍｏｌ）で処理し、そして、アルゴン下、室温で、一晩、磁気撹拌しながら反応させた。粗反応物を、０．１％ギ酸を含む脱イオン水でもってして、３０分間にわたって、２０ｍｌ／分で、５％～９５％のアセトニトリルの直線勾配で溶出する、ＸＤＢ－Ｃ１８、２１．２×５ｍｍ、５ミクロンカラムを使用

するＨＰＬＣで精製した。純粋な所望の産物を含む画分を直ちに合わせ、凍結し、そして、凍結乾燥して、３ｍｇ（１５％収率）の白色固体を得た。ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$計算値．１１３６．４９８７，実測値１１３６．４９５４．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７１（ｓ，３Ｈ），０．９２－１．２７（ｍ，２０Ｈ），１．２６－１．４８（ｍ，５Ｈ），１．５２（ｓ，３Ｈ），１．６３（ｑ，Ｊ＝７．１ Ｈｚ，２Ｈ），１．８３－２．２０（ｍ，７Ｈ），２．２３－２．４１（ｍ，５Ｈ），２．６３（ｓ，４Ｈ），２．７３（ｄ，Ｊ＝９．５ Ｈｚ，１Ｈ），３．０２（ｓ，３Ｈ），３．３６－３．５０（ｍ，２Ｈ），３．８６（ｓ，３Ｈ），３．９１－４．２４（ｍ，７Ｈ），４．４５（ｄ，Ｊ＝１１．８ Ｈｚ，１Ｈ），５．２７（ｑ，Ｊ＝６．７ Ｈｚ，１Ｈ），５．４１－５．５７（ｍ，１Ｈ），５．８６（ｓ，１Ｈ），６．３２－６．６６（ｍ，３Ｈ），６．８１（ｓ，１Ｈ），７．１２（ｓ，１Ｈ），８．０６（ｔ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，２Ｈ），８．３５（ｄ，Ｊ＝１１．６ Ｈｚ，１Ｈ），８．６２（ｓ，１Ｈ）．

【０３７８】

ＨＯＯＣ－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＣＯ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_{2}$－Ｓ－（ＣＨ$_{2}$）$_{5}$－ＣＯ－ＤＭ（１９ｇ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$計算値．１１３６．４９８７，実測値１１３６．４９６２．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７１（ｓ，３Ｈ），０．９７－１．１４（ｍ，１３Ｈ），１．１４－１．２６（ｍ，３Ｈ），１．２８－１．４５（ｍ，５Ｈ），１．５２（ｓ，３Ｈ），１．６２（ｐ，Ｊ＝７．５ Ｈｚ，２Ｈ），１．９３－２．００（ｍ，１Ｈ），２．０８（ｄｔ，Ｊ＝１３．１，７．４ Ｈｚ，６Ｈ），２．２５－２．４１（ｍ，３Ｈ），２．６３（ｓ，３Ｈ），２．７３（ｄ，Ｊ＝９．５ Ｈｚ，１Ｈ），３．０２（ｓ，３Ｈ），３．１８（ｓ，３Ｈ），３．３１－３．４８（ｍ，２Ｈ），３．８６（ｓ，３Ｈ），３．９３－４．１９（ｍ，６Ｈ），４．４５（ｄｄ，Ｊ＝１２．０，２．８ Ｈｚ，１Ｈ），５．２７（ｑ，Ｊ＝６．８ Ｈｚ，１Ｈ），５．４３－５．５８（ｍ，１Ｈ），５．８５（ｓ，１Ｈ），６．４０－６．６１（ｍ，３Ｈ），６．８１（ｓ，１Ｈ），７．１１（ｄ，Ｊ＝１．８ Ｈｚ，１Ｈ），８．０３（ｄ，Ｊ＝６．５ Ｈｚ，１Ｈ），８．１３（ｄ，Ｊ＝７．８ Ｈｚ，１Ｈ），８．３４（ｔ，Ｊ＝６．３ Ｈｚ，１Ｈ），１１．９４（ｓ，１Ｈ）．

【０３７９】

ＨＯＯＣ－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＣＯ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_{2}$－Ｓ－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＣＯ－ＤＭ（１９ｉ）：ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$計算値．１１０８．４６７４，実測値１１０８．４６３４．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７８（ｓ，３Ｈ），１．０４－１．３２（ｍ，１６Ｈ），１．４５（ｄ，Ｊ＝１２．６ Ｈｚ，２Ｈ），１．６０（ｓ，３Ｈ），１．６９（ｐ，Ｊ＝７．２ Ｈｚ，３Ｈ），１．７７－１．９５（ｍ，１Ｈ），１．９９－２．０７（ｍ，１Ｈ），２．１１－２．２０（ｍ，４Ｈ），２．２０－２．３９（ｍ，１Ｈ），２．５５（ｓ，１Ｈ），２．７１（ｓ，３Ｈ），２．８０（ｄ，Ｊ＝９．５ Ｈｚ，１Ｈ），３．１２（ｓ，３Ｈ），３．４０（ｄ，Ｊ＝２１．０ Ｈｚ，８Ｈ），３．４９（ｄ，Ｊ＝９．１ Ｈｚ，１Ｈ），３．９３（ｓ，３Ｈ），４．０２－４．２７（ｍ，６Ｈ），４．４８－４．６１（ｍ，１Ｈ），５．３４（ｑ，Ｊ＝６．６ Ｈｚ，１Ｈ），５．４８－５．６５（ｍ，１Ｈ），５．９２（ｓ，１Ｈ），６．５０－６．７１（ｍ，３Ｈ），６．８８（ｓ，１Ｈ），７．１８（ｓ，

1H），7.99（d，J＝7.6 Hz，1H），8.08（d，J＝6.5 Hz，1H），8.22（d，J＝7.4 Hz，1H），8.30（s，1H），8.42（s，1H）．

【0380】

8．NHS－OOC－（CH_2）$_3$－CO－ペプチド－NH－CH_2－S－（CH_2）$_n$－CO_2－DM（化合物20a～20j）

タイプNHS－OOC－（CH_2）$_3$－CO－ペプチド－NH－CH_2－S－（CH_2）$_n$－CO_2－DMの化合物を、図9Bに示したように、かつ、NHS－OOC－（CH_2）$_3$－CO－D－Ala－L－Ala－NH－CH_2－S－（CH_2）$_5$－CO－DMに例示したようにして調製した。

【0381】

NHS－OOC－（CH_2）$_3$－CO－D－Ala－L－Ala－NH－CH_2－S－（CH_2）$_5$－CO－DM（20g）：HOOC－（CH_2）$_3$－CO－D－Ala－L－Ala－NH－CH_2－S－（CH_2）$_5$－CO－DM（8mg 7.5μmol）を、DMSO（1mL）に溶解し、NHS（0.9mg、7.51μmol）、及び、EDC（1.4mg、7.51μmol）で処理した。反応を、アルゴン雰囲気下、室温で、2時間、磁気撹拌しながら進行させた。粗物質を、0.1％ギ酸を含む脱イオン水でもってして、30分間にわたって、20ml／分で、5％～95％のアセトニトリルの直線勾配で溶出する、XDB－C18、21.2×5mm、5μmカラムを使用するHPLCで精製した。所望の産物を含む画分を合わせ、直ちに凍結し、そして、凍結乾燥して、6.5mg（74％収率）の白色固体を得た。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO－d6）δ 0.71（s，3H），1.00－1.14（m，13H），1.14－1.25（m，3H），1.29－1.46（m，5H），1.52（s，3H），1.75（p，J＝7.5 Hz，2H），1.92－2.12（m，2H），2.16（t，J＝7.3 Hz，2H），2.22－2.39（m，3H），2.62（d，J＝10.8 Hz，5H），2.73（d，J＝10.5 Hz，5H），3.02（s，3H），3.18（s，3H），3.32－3.47（m，2H），3.86（s，3H），3.95－4.19（m，6H），4.45（dd，J＝12.0，2.8 Hz，1H），5.27（q，J＝6.8 Hz，1H），5.42－5.57（m，1H），5.82－5.87（m，1H），6.41－6.60（m，4H），6.81（s，1H），7.11（d，J＝1.7 Hz，1H），8.05（d，J＝6.5 Hz，1H），8.10（d，J＝7.7 Hz，1H），8.20（d，J＝4.8 Hz，1H），8.29（t，J＝6.3 Hz，1H）．

【0382】

NHS－OOC－（CH_2）$_3$－CO－L－Ala－D－Ala－L－Ala－NH－CH_2－S－（CH_2）$_5$－CO－DM（20g）：HRMS（M＋H）$^+$ 計算値．1233.5151，実測値 1233.5135．

【0383】

NHS－OOC－（CH_2）$_3$－CO－L－Ala－D－Ala－L－Ala－NH－CH_2－S－（CH_2）$_3$－CO－DM（20i）：HRMS（M＋H）$^+$ 計算値．1205.4838，実測値 1205.4808．

【0384】

9．Mal－（CH_2）$_3$－CO－ペプチド－NH－CH_2－S－（CH_2）$_n$－CO－DM（化合物23a～23j）

化合物23a～23jを、図9Bに示したように、かつ、化合物23cに例示したようにして調製した。

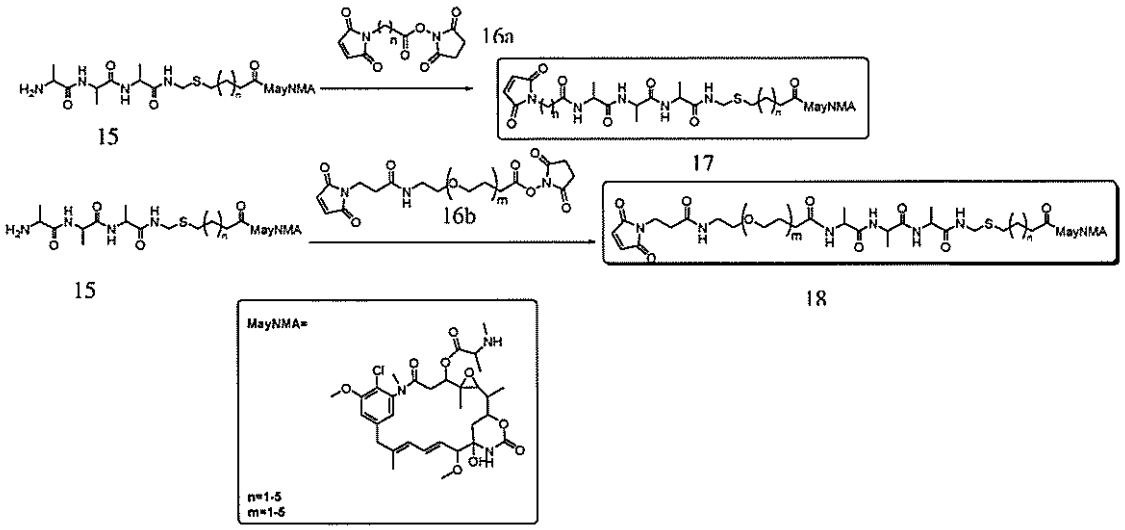
【0385】

Ｍａｌ－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＣＯ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_5$－ＣＯ－ＤＭ、または、Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２３ｃ）：Ｈ$_2$Ｎ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＣＨ$_2$－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_5$－ＣＯ－ＤＭ（８ｍｇ、７．８２μｍｏｌ）を、ＤＭＦ（２ｍＬ）に溶解し、３－マレイミドプロパン酸（１．３２ｍｇ、７．８２μｍｏｌ）、ＥＤＣ（２．２５ｍｇ、０．０１２ｍｍｏｌ）、及び、ＨＯＢｔ（１．１９８ｍｇ、７．８２μｍｏｌ）で処理した。反応を、アルゴン雰囲気下、室温で、２時間、磁気撹拌しながら進行させた。粗物質を、０．１％ギ酸を含む脱イオン水でもってして、３０分間にわたって、２０ｍｌ／分で、５％～９５％のアセトニトリルの直線勾配で溶出する、ＸＤＢ－Ｃ１８、２１．２×５ｍｍ、５μｍカラムを使用するセミ分取ＨＰＬＣで精製した。所望の産物を含む画分を直ちに合わせ、凍結し、そして、凍結乾燥して、１．８ｍｇ（１９．６０％収率）の白色固体を得た。ＨＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$ 計算値．１１７３．４９４０，実測値１１７３．４９３１．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７１（ｓ，３Ｈ），１．０２－１．１４（ｍ，１５Ｈ），１．１６－１．２５（ｍ，３Ｈ），１．３０－１．４４（ｍ，５Ｈ），１．５２（ｓ，３Ｈ），１．９２－２．０３（ｍ，１Ｈ），２．０３－２．１７（ｍ，１Ｈ），２．２３－２．３９（ｍ，４Ｈ），２．６３（ｓ，３Ｈ），２．７３（ｄ，Ｊ＝９．６ Ｈｚ，１Ｈ），３．０２（ｓ，３Ｈ），３．１８（ｓ，４Ｈ），３．３３－３．４６（ｍ，２Ｈ），３．５２（ｔ，Ｊ＝７．３ Ｈｚ，２Ｈ），３．８６（ｓ，３Ｈ），３．９５－４．１７（ｍ，７Ｈ），４．４５（ｄｄ，Ｊ＝１２．０，２．９ Ｈｚ，１Ｈ），５．２７（ｑ，Ｊ＝６．７ Ｈｚ，１Ｈ），５．４４－５．５６（ｍ，１Ｈ），５．８５（ｓ，１Ｈ），６．３９－６．６４（ｍ，３Ｈ），６．８１（ｓ，１Ｈ），６．８６（ｓ，１Ｈ），６．９２（ｓ，２Ｈ），７．１１（ｄ，Ｊ＝１．７ Ｈｚ，１Ｈ），７．８９（ｄ，Ｊ＝７．４ Ｈｚ，１Ｈ），８．１０（ｄ，Ｊ＝７．３ Ｈｚ，１Ｈ），８．１７（ｄ，Ｊ＝６．７ Ｈｚ，１Ｈ），８．２８（ｔ，Ｊ＝６．３ Ｈｚ，１Ｈ），８．４３（ｓ，１Ｈ）．

【０３８６】

１０．その他の化合物

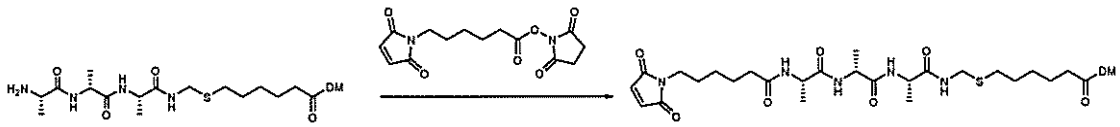
【化１２０】



【０３８７】

Ｍａｌ２－ＬＡｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｉｍｍ－Ｃ６－Ｍａｙ

【化１２１】



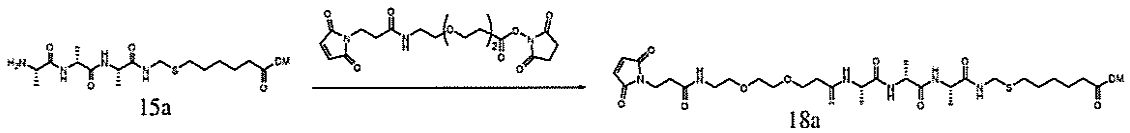
15a　　17a

Ｍａｌ－Ｃ５－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｉｍｍ－Ｃ６－Ｍａｙ：Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_5$－ＣＯ－ＭａｙＮＭＡ（化合物Ｉ－１ａ）（２５ｍｇ、０．０２４ｍｍｏｌ）と、２，５－ジオキソピロリジン－１－イル６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサノエート（７．５４ｍｇ、０．０２４ｍｍｏｌ）との間の反応は、Ｍａｌ－Ｃ５－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－Ｉｍｍ－Ｃ６－Ｍａｙ（化合物Ｉ－２ａ）（２０．８ｍｇ、０．０１７ｍｍｏｌ、７０．０％収率）を生成した。ＬＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$ 計算値１２１５．５２，実測値１２１６．４．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７１（ｓ，３Ｈ），１．０５（ｄ，Ｊ＝６．４ Ｈｚ，３Ｈ），１．０７－１．１４（ｍ，１４Ｈ），１．１５－１．２５（ｍ，３Ｈ），１．３９（ｔ，Ｊ＝９．２ Ｈｚ，１０Ｈ），１．５２（ｓ，３Ｈ），２．０１（ｔ，Ｊ＝７．６ Ｈｚ，３Ｈ），２．２６（ｔ，Ｊ＝１．９ Ｈｚ，１Ｈ），２．２８－２．３８（ｍ，２Ｈ），２．５７－２．６２（ｍ，１Ｈ），２．６３（ｓ，３Ｈ），２．７３（ｄ，Ｊ＝９．６ Ｈｚ，１Ｈ），３．０２（ｓ，３Ｈ），３．１４（ｄ，Ｊ＝１２．５ Ｈｚ，１Ｈ），３．１８（ｓ，３Ｈ），３．２９（ｔ，Ｊ＝７．１ Ｈｚ，２Ｈ），３．３６（ｄ，Ｊ＝１２．５ Ｈｚ，１Ｈ），３．４２（ｄ，Ｊ＝９．０ Ｈｚ，１Ｈ），３．８６（ｓ，３Ｈ），３．９６－４．０５（ｍ，１Ｈ），４．０４－４．１５（ｍ，４Ｈ），４．４１－４．４８（ｍ，１Ｈ），５．２７（ｑ，Ｊ＝６．７ Ｈｚ，１Ｈ），５．４６－５．５４（ｍ，１Ｈ），５．８２－５．８８（ｍ，１Ｈ），６．４７－６．５０（ｍ，２Ｈ），６．５４（ｔ，Ｊ＝１１．４ Ｈｚ，２Ｈ），６．８２（ｓ，１Ｈ），６．９２（ｓ，２Ｈ），７．１１（ｄ，Ｊ＝１．８ Ｈｚ，１Ｈ），７．８６－７．９３（ｍ，２Ｈ），７．９５（ｓ，１Ｈ），８．０５（ｄ，Ｊ＝７．４ Ｈｚ，１Ｈ），８．２４（ｔ，Ｊ＝６．２ Ｈｚ，１Ｈ）．

【０３８８】

Ｍａｌ－（CH_2）$_2$－ＰＥＧ$_2$－ＣＯ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－ＡＬａ－ＮＨ－ＣＨ２－Ｓ－（ＣＨ２）５－ＣＯ－ＭａｙＮＭＡ

【化１２２】



15a　　18a

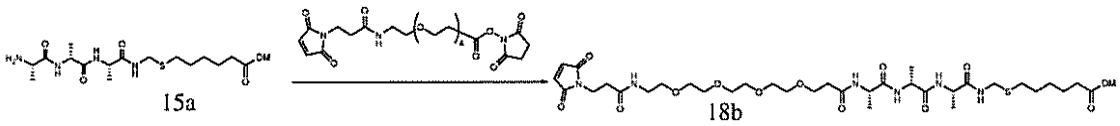
Ｍａｌ－（CH_2）$_2$－ＰＥＧ$_2$－ＣＯ－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－ＡＬａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_5$－ＣＯ－ＭａｙＮＭＡ：Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－Ａｌａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_5$－ＣＯ－ＭａｙＮＭＡ（化合物Ｉ－１ａ）（２５ｍｇ、０．０２４ｍｍｏｌ）と、Ｍａｌ－アミド－ＰＥＧ$_2$－ＮＨＳ（１０．４０ｍｇ、０．０２４ｍｍｏｌ）との反応は、Ｍａｌ－（ＣＨ２）$_2$－ＰＥＧ$_2$－ＣＯ２－Ｌ－Ａｌａ－Ｄ－Ａｌａ－Ｌ－ＡＬａ－ＮＨ－CH_2－Ｓ－（CH_2）$_5$－ＣＯ－ＭａｙＮＭＡ（化合物Ｉ－３ａ）（１４．１ｍｇ、１０．５８μｍｏｌ、４３．３％収率）を生成した。ＬＲＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$ 計算値１３３２．５８，実測値１３３２．９５．^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ０．７１（ｓ，４Ｈ），１

.05（d，J＝6.3 Hz，4H），1.07－1.14（m，15H），1.18（d，J＝9.0 Hz，2H），1.37（d，J＝11.8 Hz，6H），1.52（s，3H），2.23－2.38（m，5H），2.63（s，4H），2.72（d，J＝9.7 Hz，1H），3.02（s，3H），3.07（q，J＝5.7 Hz，2H），3.18（s，3H），3.39（s，4H），3.41（d，J＝9.9 Hz，2H），3.47－3.56（m，4H），3.86（s，4H），3.95－4.08（m，2H），4.08－4.19（m，3H），4.41－4.51（m，1H），5.23－5.31（m，1H），5.44－5.54（m，1H），5.85（s，1H），6.46－6.50（m，2H），6.54（t，J＝11.3 Hz，2H），6.83（s，1H），6.93（s，2H），7.12（s，1H），7.88－8.00（m，2H），8.01－8.08（m，2H），8.27（t，J＝6.2 Hz，1H）.

【0389】

Mal－（CH_2）$_2$－PEG_4－CO－L－Ala－D－Ala－L－ALa－NH－CH_2－S－（CH_2）$_5$－CO－MayNMA

【化123】



Mal－（CH_2）$_2$－PEG_4－CO_2－L－Ala－D－Ala－L－ALa－NH－CH_2－S－（CH_2）$_5$－CO－MayNMA：L－Ala－D－Ala－L－Ala－NH－CH_2－S－（CH_2）$_5$－CO－MayNMA（化合物I－1a）（25mg、0.024mmol）と、Mal－アミド－PEG4－NHS（12.55mg、0.024mmol）との反応は、Mal－（CH_2）$_2$－PEG_4－CO2－L－Ala－D－Ala－L－ALa－NH－CH_2－S－（CH_2）$_5$－CO－MayNMA Mal－PEG4－CO2－C6－LDL－DM（化合物I－3b）（22.3mg、0.016mmol、64.2％収率）を生成した。

LRMS（M＋H）$^+$ 計算値 1420.63，実測値 1420.06

^{1}H NMR（400 MHz，DMSO－d6）δ 0.71（s，4H），1.05（d，J＝6.4 Hz，3H），1.07－1.16（m，14H），1.19（t，J＝8.1 Hz，2H），1.31－1.50（m，2H），1.52（s，4H），1.98（s，1H），2.02－2.17（m，2H），2.20－2.40（m，7H），2.63（s，4H），2.73（d，J＝9.6 Hz，1H），3.02（s，3H），3.05－3.12（m，2H），3.18（s，3H），3.28－3.36（m，1H），3.37－3.45（m，15H），3.47－3.57（m，4H），3.86（s，4H），3.94－4.08（m，2H），4.12（ddt，J＝14.5，7.3，3.6 Hz，4H），4.41－4.49（m，1H），5.27（q，J＝6.7 Hz，1H），5.45－5.55（m，1H），5.86（s，1H），6.42－6.60（m，4H），6.83（s，1H），6.94（s，1H），7.12（d，J＝1.8 Hz，1H），7.89－8.00（m，2H），8.00－8.09（m，2H），8.26（t，J＝6.2 Hz，1H）.

【0390】

実施例１１
抗ＡＤＡＭ９抗体のリシンが結合したＤＭコンジュゲートの調製
ａ．ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４の調製
ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）は、配列番号６８の軽鎖配列と、配列番号５２の重鎖配列（配列番号５２でのＸは、Ｋである）とを含むヒト化／最適化した抗体である。
【０３９１】
ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４コンジュゲートを調製するために、スルホ－ＳＰＤＢ（ｓＳＰＤＢ）、及び、ＤＭ４付加を、工程ごとに進める様式で行った。まず、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）抗体を含み、５０ｍＭの４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンプロパンスルホン酸（ＥＰＰＳ）を用いてｐＨ８．１に緩衝化した溶液に、５０ｍＭの塩化ナトリウムを、ＤＭＡ、及び、ＤＭＡ原液由来の１１．５当量のｓＳＰＤＢと混合し、最終溶媒組成を、１０％（ｖ／ｖ）ＤＭＡ、及び、９０％（ｖ／ｖ）緩衝剤水溶液とした。第１の反応工程を、２５℃で、４時間進めた後に、ＤＭＡ原液由来の１７．３当量のＤＭ４、ＤＭＡ、及び、５００ｍＭのＥＰＰＳ／５００ｍＭの塩化ナトリウム、ｐＨ８．１の緩衝剤を反応混合物に加えて、第１の反応工程に由来する最終溶媒組成を、１０％（ｖ／ｖ）ＤＭＡ、及び、９０％（ｖ／ｖ）緩衝剤の水溶液とし、そして、これを維持した。第２の反応工程を、２５℃で、一晩進めた。
【０３９２】
コンジュゲートを、１０ｍＭのコハク酸塩、２５０ｍＭのグリシン、０．５％のショ糖、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ５．５にて、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５脱塩カラムで精製し、この緩衝剤に対して、１０ｋＤａの分子量カットオフ値を有するメンブレンを用いて透析を行い、そして、０．２２μｍシリンジフィルターで濾過した。
【０３９３】
コンジュゲートは、ＵＶ－ｖｉｓでは平均で３．５ｍｏｌ　ＤＭ４／抗体ｍｏｌであり、ＳＥＣでは９９．２％がモノマーであり、そして、混合モードのＨＰＬＣでは、１．７％以下が結合していないＤＭ４であった。脱グリコシル化したコンジュゲートのＬＣ－ＭＳは示していない。
【０３９４】
ｂ．ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭの調製
ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃは、配列番号６８の軽鎖配列と、配列番号１４２の重鎖配列（配列中、Ｘは、Ｋである）とを含むヒト化／最適化した抗体である。
【０３９５】
還元状態で（重鎖ＣＨ３領域のＣ４４２位置で）対を形成しない２つのシステイン残基を有するｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ抗体を、標準的な手順を使用して調製し、そして、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）ｐＨ７．４、２ｍＭ　ＥＤＴＡで精製した。還元及び再酸化した抗体溶液を、Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（化合物１７ａ）に対するコンジュケーションのために直ちに使用した。
【０３９６】
再酸化したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ抗体に、ＰＢＳ　ｐＨ６．０、２ｍＭ　ＥＤＴＡを添加し、そして、１０％Ｎ－Ｎ－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ、ＳＡＦＣ）、及び、５当量のＭａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（化合物１７ａ）を含む、９０％水溶液でコンジュゲーションを行った。反応物を、２５℃で、一晩、インキュベートした。
【０３９７】
反応後に、コンジュゲートを、ＮＡＰ脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、１０ｍＭ　酢酸塩、９％スクロース、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ５．０製剤用緩衝剤で精製し、そして、０．２２μｍ　ＰＶＤＦメンブレンを備えたシリンジフィルターで濾過した。
【０３９８】
精製したコンジュゲートは、ＵＶ－Ｖｉｓでは、２．１ｍｏｌ　ＬＤＬ－ＤＭ／抗体ｍｏｌであり、ＳＥＣでは９５％がモノマーであり、そして、ＳＥＣ／逆相ＨＰＬＣデュア

ルカラム分析では、１％未満の遊離薬物を有することが認められた。

【０３９９】

ｃ．ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ、３．１ＤＡＲの調製

コンジュゲーションの前に、ｓＧＭＢＳ（図９Ｃ）を含むＮ－Ｎ－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ、ＳＡＦＣ）の原液と、ＬＤＬ－ＤＭ（図９Ａの化合物１４ｃ）を含むＤＭＡの原液とを、コハク酸緩衝剤ｐＨ５．０の存在下で混合してｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭを調製して、６０：４０の有機：水溶液と、最終濃度が３ｍＭのスルホＧＭＢＳ、及び、３．９ｍＭのＬＤＬ－ＤＭを得た。反応物を、２５℃で、２時間インキュベートした。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）抗体を含むリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）ｐＨ７．４を含有する溶液に、粗ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ混合物を加えた。当該リン酸緩衝生理食塩水に、３００ｍＭ　４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンプロパンスルホン酸（ＥＰＰＳ）ｐＨ８．５と、１０％ＤＭＡ（ｖ／ｖ）との５×溶液を加えて、７．８ｍｏｌのスルホ－ＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭに対して、１ｍｏｌのｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）抗体とする最終比率とした。反応物を、２５℃で、一晩、インキュベートした。

【０４００】

反応物を、ＮＡＰ脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、１０ｍＭヒスチジン、２５０ｍＭ　グリシン、１％スクロース、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ２０、ｐＨ５．５製剤用緩衝剤で精製し、そして、０．２２μｍ　ＰＶＤＦメンブレンを備えたシリンジフィルターで濾過した。

【０４０１】

精製したコンジュゲートは、ＵＶ－Ｖｉｓでは、３．１ｍｏｌ　ＬＤＬ－ＤＭ／抗体ｍｏｌであり、ＳＥＣでは９７％がモノマーであり、そして、ＳＥＣ／逆相ＨＰＬＣデュアルカラム分析では、４％未満の遊離薬物を有することが認められた。

【０４０２】

ｄ．ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ、２．０ＤＡＲの調製

コンジュゲーションの前に、ｓＧＭＢＳを含むＮ－Ｎ－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ、ＳＡＦＣ）の原液と、ＬＤＬ－ＤＭ（図９Ａの化合物１４ｃ）を含むＤＭＡの原液とを、コハク酸緩衝剤ｐＨ５．０の存在下で混合してｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭを調製して、６０：４０の有機：水溶液と、最終濃度が３ｍＭのスルホＧＭＢＳ、及び、３．９ｍＭのＬＤＬ－ＤＭを得た。反応物を、２５℃で、２時間インキュベートした。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）抗体を含むリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）ｐＨ７．４を含有する溶液に、粗ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ混合物を加えた。当該リン酸緩衝生理食塩水に、３００ｍＭ　４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンプロパンスルホン酸（ＥＰＰＳ）ｐＨ８．５と、１０％ＤＭＡ（ｖ／ｖ）との５×溶液を加えて、３ｍｏｌのスルホ－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭに対して、１ｍｏｌのｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）抗体とする最終比率とした。反応物を、２５℃で、一晩、インキュベートした。

【０４０３】

反応物を、ＮＡＰ脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、１０ｍＭ酢酸塩、９％スクロース、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ２０、ｐＨ５．０製剤用緩衝剤で精製し、そして、０．２２μｍ　ＰＶＤＦメンブレンを備えたシリンジフィルターで濾過した。

【０４０４】

精製したコンジュゲートは、ＵＶ－Ｖｉｓでは、２．０ｍｏｌ　ＬＤＬ－ＤＭ／抗体ｍｏｌであり、ＳＥＣでは９９％がモノマーであり、そして、ＳＥＣ／逆相ＨＰＬＣデュアルカラム分析では、１％未満の遊離薬物を有することが認められた。

【０４０５】

ｅ．ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭの調製

ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）は、配列番号６８の軽鎖配列と、配列番号１５６の重鎖配列とを含むヒト化抗体である。

【０４０６】

還元状態で（重鎖ＣＨ３領域のＣ４４２位置で）対を形成しない２つのシステイン残基を有するｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）抗体を、標準的な手順を使用して調製し、そして、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）ｐＨ７．４、２ｍＭ　ＥＤＴＡで精製した。還元及び再酸化した抗体溶液を、Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭに対するコンジュケーションのために直ちに使用した。

【０４０７】

再酸化したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）抗体に、ＰＢＳ　ｐＨ６．０、２ｍＭ　ＥＤＴＡを添加し、そして、１０％Ｎ－Ｎ－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ、ＳＡＦＣ）、及び、５当量のＭａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（化合物１７ａ）を含む、９０％水溶液でコンジュゲーションを行った。反応物を、２５℃で、一晩、インキュベートした。

【０４０８】

反応後に、コンジュゲートを、ＮＡＰ脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、１０ｍＭ　酢酸塩、９％スクロース、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ５．０製剤用緩衝剤で精製し、そして、０．２２μｍ　ＰＶＤＦメンブレンを備えたシリンジフィルターで濾過した。

【０４０９】

精製したコンジュゲートは、ＵＶ－Ｖｉｓでは、２．０ｍｏｌ　ＬＤＬ－ＤＭ／抗体ｍｏｌであり、ＳＥＣでは９９％がモノマーであり、そして、ＳＥＣ／逆相ＨＰＬＣデュアルカラム分析では、５％未満の遊離薬物を有することが認められた。

【０４１０】

ｆ．ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／－Ｋ）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭの調製

ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／－Ｋ）は、配列番号６８の軽鎖配列と、配列番号１５５の重鎖配列とを含むヒト化抗体である。

【０４１１】

コンジュゲーションの前に、スルホ－ＧＭＢＳを含むＮ－Ｎ－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ、ＳＡＦＣ）の原液と、ＬＤＬ－ＤＭを含むＤＭＡの原液とを、コハク酸緩衝剤ｐＨ５．０の存在下で混合してｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭを調製して、６０：４０の有機：水溶液と、最終濃度が３ｍＭのスルホ－ＧＭＢＳ、及び、３．９ｍＭのＬＤＬ－ＤＭ（化合物１４ｃ）を得た。反応物を、２５℃で、２時間インキュベートした。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／－Ｋ）抗体を含むリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）ｐＨ７．４を含有する溶液に、粗ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ混合物を加えた。当該リン酸緩衝生理食塩水に、３００ｍＭ　４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンプロパンスルホン酸（ＥＰＰＳ）ｐＨ８．５と、１０％ＤＭＡ（ｖ／ｖ）との５×溶液を加えて、５ｍｏｌのスルホ－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭに対して、１ｍｏｌのｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／－Ｋ）抗体とする最終比率とした。反応物を、２５℃で、一晩、インキュベートした。

【０４１２】

反応物を、ＮＡＰ脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、１０ｍＭ　酢酸塩、９％スクロース、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ２０、ｐＨ５．０製剤用緩衝剤で精製し、そして、０．２２μｍ　ＰＶＤＦメンブレンを備えたシリンジフィルターで濾過した。

【０４１３】

精製したコンジュゲートは、ＵＶ－Ｖｉｓでは、３．６ｍｏｌ　ＬＤＬ－ＤＭ／抗体ｍｏｌであり、ＳＥＣでは９９％がモノマーであり、そして、ＳＥＣ／逆相ＨＰＬＣデュアルカラム分析では、４％未満の遊離薬物を有することが認められた。

【０４１４】

実施例１２

抗ＡＤＡＭ９抗体薬物コンジュゲートの結合アフィニティ

抗原結合に対するコンジュケーションの結果を評価するために、ＡＤＡＭ９に対するそれぞれの抗ＡＤＡＭ９　ＡＤＣ、及び、その各々の未結合の抗体の相対結合アフィニティ

を、ＦＡＣＳ分析によって、ヒトＡＤＡＭ９を内因的に発現するＮＣＩ－Ｈ１７０３細胞で決定した。要するに、ＡＤＡＭ９を発現するＮＣＩ－Ｈ１７０３細胞を、段階希釈した抗ＡＤＡＭ９抗体、または、ＡＤＣと共に、ＦＡＣＳ緩衝剤（ＰＢＳ、０．１％　ＢＳＡ、０．０１％　ＮａＮ３）で、４℃で、３０分間、インキュベートした。次いで、試料を洗浄し、そして、蛍光標識した二次抗体と共に、４℃で、３０分間インキュベートした。各濃度での蛍光強度を正規化した平均値をプロットし、そして、結合のＥＣ５０を、非線形回帰分析を用いて計算した（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　７．０）。この試験から得た結果を、表１４にまとめている。

【０４１５】

すべての抗ＡＤＡＭ９抗体、及び、ＡＤＣは、同様のアフィニティで、ヒトＡＤＡＭ９に結合しており、フローサイトメトリーで測定すると、EC_{50}は、約０．３ｎＭであり、このことは、コンジュケーションが、抗体の結合アフィニティを適切には変えなかった、ことを示している図１０。

【表１５】

表１４

抗体/ADC	EC_{50} (nM)
	NCI-H1703
hMAB-A(2I.2)	0.37
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	0.33
hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM	0.31
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM	0.33

【０４１６】

実施例１３

抗ＡＤＡＭ９抗体薬物コンジュゲートのインビトロ細胞傷害性

ＡＤＡＭ９を発現する３つの肺癌細胞株に対する抗ＡＤＡＭ９　ＡＤＣのインビトロ細胞傷害性を、ＬＤＬ－ＤＭリンカー／ペイロードを使用して、標的でないＩｇＧ１　ＡＤＣ、または、コンジュケートしていない抗体であらかじめブロックした細胞のいずれかと比較した。比較のために、ＤＭ４ペイロードを使用する抗ＡＤＡＭ９　ＡＤＣを利用した。具体的には、治療の２４時間前に、５００～２０００細胞／ウェルを、９６ウェルプレートに接種した。コンジュゲートを、段階的な３倍希釈を用いて、培養培地で希釈し、そして、ウェルあたり１００μＬを加えた。細胞を含むが、コンジュゲートを含まない対照ウェルと、培地だけを含むウェルを、各アッセイプレートに設けた。各データ点について、アッセイを３回ずつ実施した。プレートを、加湿した５％CO_2インキュベータにて、３７℃で、５日間インキュベートした。次いで、ＷＳＴ－８に基づいたＣｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ－８を用いて、各ウェルでの生存可能な細胞の相対数を決定した。まず、培地バックグラウンド吸光度で補正し、次いで、それぞれの値を、対照ウェル（未処理細胞）の値の平均で割り算して、各ウェルでの細胞の生存している分率を計算した。生存している細胞の割合を、コンジュゲート濃度に対してプロットし、そして、活性のEC_{50}を、非線形回帰分析（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　７．０）を用いて計算した。これらの結果を、表１５、及び、図１１Ａ～１１Ｂに示す。ＬＤＬ－ＤＭコンジュゲートは強力であり、また、ＤＭ４コンジュゲートと比較して、大きな特異性ウィンドウを示す。

【表１６】

表１５

細胞株	疾患型	抗ＡＤＡＭ９　ＡＤＣ	薬物によるインビトロ細胞傷害性（IC_{50} nM）	特異性の倍数（ＩＣ５０対照ＡＤＣ／ＩＣ５０抗ＡＤＡＭ９ ＡＤＣ）、または、（ＩＣ５０ブロックした抗ＡＤＡＭ９　ＡＤＣ／ＩＣ５０抗ＡＤＡＭ９ ＡＤＣ）
NCI-H1703	NSCLC－扁平上皮細胞癌	hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	7.13E-11	134
		hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM	2.56E-10	>1000
		hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM	3.73E-10	>1000
		hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM	3.10E-10	>1000
NCI-H2110	NSCLC－腺癌	hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	1.65E-09	4.4
		hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM	1.20E-08	>1000
Calu-3	NSCLC－腺癌	hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	3.07E-09	13
		hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM	1.42E-09	>1000

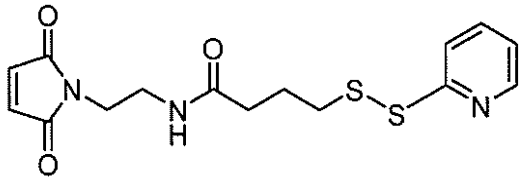
【０４１７】

実施例１４

Ｃａｌｕ－３ヒト非小細胞肺腺癌異種移植片を有するＳＣＩＤマウスにおける抗ＡＤＡＭ９抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性

ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８　ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭ（メイタンシノイド）ペイロードの５０μｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を、ヒト肺腺癌皮下異種移植モデルであるＣａｌｕ－３細胞を担持した雌ＳＣＩＤマウスで評価した。免疫コンジュケートｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４は、Ｍａｌ－ＳＰＤＢリンカーを介してＤＭ４に結合した、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ抗体を含む。

【化１２４】



(Mal-SPDB)..

【０４１８】

接種のためにＣａｌｕ－３細胞を集め、トリパンブルー排除によって１００％生存率を決定した。マウスに、５×１０６個のＣａｌｕ－３細胞を含む０．２ｍｌの５０％Ｍａｔｒｉｇｅｌ／５０％無血清培地を、右後側の脇腹領域に、皮下注射で接種した。８８匹の雌ＣＢ．１７　ＳＣＩＤマウス（６週齢）を得た。入手でき次第、試験開始前に７日間、動物を観察した。動物は、到着時、または、治療前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。

【０４１９】

５６匹のマウスを、腫瘍体積によって、７グループ（８匹のマウス／グループ）に無作為に分けた。腫瘍体積は、７８．９２～１２３．６２（９８．６０±１２．９０、平均±ＳＤ）ｍｍ３の範囲であった。マウスを測定し、そして、移植から７日後の腫瘍体積に基づいて、無作為に分けた。移植から７日後（２０１７／１２／１９）に、マウスに投薬した。マウスの体重は、１６．９９～２１．５７（１８．８９±０．９３、平均±ＳＤ）グラムであった。それぞれのグループでのマウスは、パンチ法で特定した。試験薬剤、及び、ビヒクルの投与は、２７ゲージ、１／２インチ針を取り付けた１．０ｍｌのシリンジを用いて、静脈内で行った。抗体薬物コンジュケート試験薬を、５０μｇ／ｋｇ　ＤＭペイロードで、ｑｄ×１投与を行い、このものは、ＤＡＲが約３．５のコンジュゲートでは、約２．５ｍｇ／ｋｇの抗体、そして、ＤＡＲが約２．０のコンジュゲートでは、約４．３ｍｇ／ｋｇの抗体となる。グループを以下のように分けた：ビヒクル（ＰＢＳ、１５０μＬ）を投与する対照群、２．６ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６　ＤＡＲ）、２．９ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）、４．３ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、５．１ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）、５．３ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８　ＤＡＲ）、及び、５．３ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）。

【０４２０】

カリパスを用いて、１週間に２回、腫瘍サイズを三次元で測定した。体積＝長さ×幅×高さ×１／２の式を用いて、腫瘍体積を、ｍｍ３で表した。マウスに関して、腫瘍体積が５０％以上減っていると、部分的な退縮（ＰＲ）とし、明確な腫瘍が認められないときに、完全な腫瘍退縮（ＣＲ）とし、そして、試験終了時に明確な腫瘍が無ければ、腫瘍を持たない生存動物（ＴＦＳ）とする。腫瘍体積は、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。

【０４２１】

腫瘍成長阻害（％Ｔ／Ｃ）とは、所定の時間（例えば、対照腫瘍のメジアン腫瘍体積（ＴＶ）が、約１０００ｍｍ^{3}の最大腫瘍体積に達する時間、つまり、マウスを安楽死させる時間）での対照群（Ｃ）のメジアンＴＶに対する、治療群（Ｔ）のメジアンＴＶの比率である。％Ｔ／Ｃは、接種して５８日後に、対照群のメジアンＴＶが、９５３ｍｍ^{3}に達したときに計算した。ＮＣＩ基準によると、Ｔ／Ｃ≦４２％は、抗腫瘍活性の最小レベルであり、また、Ｔ／Ｃ＜１０％は、高い抗腫瘍活性レベルと見なされる。腫瘍増殖遅延（Ｔ－Ｃ）とは、治療群（Ｔ）と対照群の腫瘍（Ｃ）が、所定のサイズの１０００ｍｍ^{3}に

達するまでの時間のメジアン値（日数）の差のことである（腫瘍を持たない生存動物を除く）。腫瘍倍加時間（Ｔｄ）は、対照腫瘍成長の毎日のメジアン値の非線形指数曲線フィッティングから概算しており、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定する。Ｔｄは、１６．９日であり、Ｒ２＝０．９９８であった。Ｌｏｇ１０細胞死（ＬＣＫ）は、式ＬＣＫ＝（Ｔ－Ｃ）／Ｔｄ×３．３２を用いて計算するものであり、式中、３．３２は、細胞増殖のｌｏｇあたりの細胞倍加の数である。ＬＣＫに関するＳｏｕｔｈｅｒｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＳＲＩ）の活性基準は、＜０．７：－（不活性）、０．７～１．２：＋、１．３～１．９：＋＋、２．０～２．８：＋＋＋、＞２．８：＋＋＋＋（高活性）である。

【０４２２】

すべてのマウスの体重（ＢＷ）を、薬物毒性の大まかな指標として、週に２回測定を行い、そして、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。マウスの体重を、次の式：％ＢＷ変化＝［（ＢＷｐｏｓｔ／ＢＷｐｒｅ）－１］×１００、式中、ＢＷｐｏｓｔは、治療後の体重であり、及び、ＢＷｐｒｅは、治療前の開始時の体重である式でもってして、治療前の体重に基づいた体重の変化率として表した。体重減少（ＢＷＬ）の割合は、治療後の体重の平均変化として表した。腫瘍体積が１０００ｍｍ^{3}を超える、腫瘍が壊死する、マウスの当初の体重の２０％を超える体重の減少が認められる、または、試験のいずれかの時点でマウスが瀕死状態になれば、動物を安楽死させた。

【０４２３】

この試験の結果を、図１２に示している。ＬＤＬ－ＤＭ　ＡＤＣは、すべて、対応するＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６　ＤＡＲ）コンジュケートは、腫瘍成長阻害（Ｔ／Ｃ）値が３０％（活性）であり、腫瘍増殖遅延（Ｔ－Ｃ）値が３４日であり、そして、ｌｏｇ１０細胞死（ＬＣＫ）値が６．７（＋＋＋）であり、８匹のマウスの内、１匹に部分的な退縮が認められ、また、完全な退縮は認められなかった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）コンジュケートは、Ｔ／Ｃ値が７％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が＞６６日であり、そして、ＬＣＫ値が＞１３．０（＋＋＋＋）であり、８匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、また、完全な退縮は認められなかった。このことは、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭが、約３．５のＤＡＲで、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であることを示している。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が５８％（不活性）であり、Ｔ－Ｃ値が２０日であり、そして、ＬＣＫ値が４．０（＋＋＋）であり、８匹のマウスの内、０匹に部分的な退縮が認められ、また、完全な退縮は認められなかった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が１５％（活性）であり、Ｔ－Ｃ値が４７日であり、そして、ＬＣＫ値が９．２（＋＋＋＋）であり、８匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、また、１匹に完全な退縮が認められた。このことは、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭが、約２．０のＤＡＲで、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であることを示している。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が９７％（不活性）であり、Ｔ－Ｃ値が３日であり、そして、ＬＣＫ値が０．６（－）であり、８匹のマウスの内、０匹に部分的な退縮が認められ、また、完全な退縮は認められなかった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が１５％（活性）であり、Ｔ－Ｃ値が３９日であり、そして、ＬＣＫ値が７．７（＋＋＋＋）であり、８匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、また、２匹に完全な退縮が認められた。このことは、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭが、約２．０のＤＡＲで、部位特異的コンジュケーションによって、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であることを示している。ここに示した用量のいずれのＡＤＣでも有意な体重減少は認められなかったので、この研究では、６つのコンジュゲートすべてが、マウスでは十分に忍容性であった。

【０４２４】
加えて、ＤＡＲが約２．０のＡＤＣは、ＤＡＲが約３．５であるそれらの対応物と同様の活性を示した。具体的には、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）とほぼ同様の活性を示した。忍容性と毒性は、ペイロード濃度によって決まるので、ＤＡＲが２．０のＡＤＣは、ＤＡＲが３．５であるＡＤＣよりも高濃度の抗体を投与することができる。ＤＡＲが２．０であるＡＤＣの曝露を増やすと、標的を介した薬物動態（ＴＭＤＤ）を飽和させ、及び／または、腫瘍の浸透を高めることで、有効性を改善し得る。この試験の結果は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）コンジュゲートが、納得のいく抗腫瘍活性を示し、かつ、Ｃａｌｕ－３非小細胞肺腺癌腫瘍異種移植片モデルにおいて非常に有効である、ことを示唆している。

【０４２５】
実施例１５
Ｈ１７０３ヒト非小細胞肺扁平上皮細胞癌異種移植片を有するＮｕｄｅマウスにおける抗ＡＤＡＭ９抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性
ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８　ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの５０μｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を、ヒト非小細胞肺扁平上皮細胞癌異種移植モデルであるＨ１７０３細胞を担持した雌Ｎｕｄｅマウスで評価した。

【０４２６】
接種のためにＨ１７０３細胞を集め、トリパンブルー排除によって１００％生存率を決定した。マウスに、５×１０６個のＨ１７０３細胞を含む０．２ｍｌの５０％Ｍａｔｒｉｇｅｌ／５０％無血清培地を、右後側の脇腹領域に、皮下注射で接種した。６６匹の雌の無胸腺Ｎｕｄｅ－Ｆｏｘｎ１ｎｕマウス（６週齢）を得た。入手でき次第、試験開始前に３日間、動物を観察した。動物は、到着時、または、治療前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。

【０４２７】
４２匹のマウスを、腫瘍体積によって、７グループ（６匹のマウス／グループ）に無作為に分けた。腫瘍体積は、６１．８４～３１０．１７（１２８．０５±４６．６１、平均±ＳＤ）mm^3の範囲であった。マウスを測定し、そして、移植から２６日後の腫瘍体積に基づいて、無作為に分けた。移植から２７日後（２０１７／１２／２８）に、マウスに投薬した。マウスの体重は、１９．６９～２６．５９（２３．５４±１．６１、平均±ＳＤ）グラムであった。それぞれのグループでのマウスは、パンチ法で特定した。試験薬剤、及び、ビヒクルの投与は、２７ゲージ、１／２インチ針を取り付けた１．０ｍｌのシリンジを用いて、静脈内で行った。抗体薬物コンジュゲート試験薬を、５０μｇ／ｋｇ　ＤＭペイロードで、ｑｄ×１投与を行い、このものは、ＤＡＲが約３．５のコンジュゲートでは、約２．５ｍｇ／ｋｇの抗体、そして、ＤＡＲが約２．０コンジュゲートでは、約４．３ｍｇ／ｋｇの抗体となる。グループを以下のように分けた：ビヒクル（ＰＢＳ、１５０μＬ）を投与する対照群、２．６ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６　ＤＡＲ）、２．９ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）、４．３ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、５．１ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）、５．３ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－

ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８　ＤＡＲ）、及び、５．３ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）。

【０４２８】

カリパスを用いて、１週間に２回、腫瘍サイズを三次元で測定した。体積＝長さ×幅×高さ×１／２の式を用いて、腫瘍体積を、mm^3で表した。マウスに関して、腫瘍体積が５０％以上減っていると、部分的な退縮（ＰＲ）とし、明確な腫瘍が認められないときに、完全な腫瘍退縮（ＣＲ）とし、そして、試験終了時に明確な腫瘍が無ければ、腫瘍を持たない生存動物（ＴＦＳ）とする。腫瘍体積は、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。

【０４２９】

腫瘍成長阻害（％Ｔ／Ｃ）とは、所定の時間（例えば、対照腫瘍のメジアン腫瘍体積（ＴＶ）が、約１０００mm^3の最大腫瘍体積に達するまでの時間、つまり、マウスを安楽死させるまでの時間）での対照群（Ｃ）のメジアンＴＶに対する、治療群（Ｔ）のメジアンＴＶの比率である。％Ｔ／Ｃは、接種して４４日後に、対照群のメジアンＴＶが、１２０６mm^3に達したときに計算した。ＮＣＩ基準によると、Ｔ／Ｃ≦４２％は、抗腫瘍活性の最小レベルであり、また、Ｔ／Ｃ＜１０％は、高い抗腫瘍活性レベルと見なされる。腫瘍増殖遅延（Ｔ－Ｃ）とは、治療群（Ｔ）と対照群の腫瘍（Ｃ）が、所定のサイズの１０００mm^3に達するまでの時間のメジアン値（日数）の差のことである（腫瘍を持たない生存動物を除く）。腫瘍倍加時間（Ｔｄ）は、対照腫瘍成長の毎日のメジアン値の非線形指数曲線フィッティングから概算しており、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定する。Ｔｄは、７．６０日であり、Ｒ２＝０．９９４であった。Ｌｏｇ１０細胞死（ＬＣＫ）は、式ＬＣＫ＝（Ｔ－Ｃ）／Ｔｄ×３．３２を用いて計算するものであり、式中、３．３２は、細胞増殖のｌｏｇあたりの細胞倍加の数である。ＬＣＫに関するＳｏｕｔｈｅｒｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＳＲＩ）の活性基準は、＜０．７：－（不活性）、０．７～１．２：＋、１．３～１．９：＋＋、２．０～２．８：＋＋＋、＞２．８：＋＋＋＋（高活性）である。

【０４３０】

すべてのマウスの体重（ＢＷ）を、薬物毒性の大まかな指標として、週に２回測定を行い、そして、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。マウスの体重を、次の式：％ＢＷ変化＝［（ＢＷｐｏｓｔ／ＢＷｐｒｅ）－１］×１００、式中、ＢＷｐｏｓｔは、治療後の体重であり、及び、ＢＷｐｒｅは、治療前の開始時の体重である式でもってして、治療前の体重に基づいた体重の変化率として表した。体重減少（ＢＷＬ）の割合は、治療後の体重の平均変化として表した。腫瘍体積が１０００ｍｍ３を超える、腫瘍が壊死する、マウスの当初の体重の２０％を超える体重の減少が認められる、または、試験のいずれかの時点でマウスが瀕死状態になれば、動物を安楽死させた。

【０４３１】

この試験の結果を、図１３に示している。ＬＤＬ－ＤＭ　ＡＤＣは、すべて、対応するＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６　ＤＡＲ）コンジュケートは、腫瘍成長阻害（Ｔ／Ｃ）値が５％（高活性）であり、腫瘍増殖遅延（Ｔ－Ｃ）値が３２日であり、そして、ｌｏｇ１０細胞死（ＬＣＫ）値が１．３（＋＋）であり、６匹のマウスの内、３匹に部分的な退縮が認められ、また、１匹は腫瘍を持たない生存動物であった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）コンジュケートは、Ｔ／Ｃ値が０％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が＞８５日であり、そして、ＬＣＫ値が＞３．４（＋＋＋＋）であり、６匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、６匹に完全な退縮が認められ、また、５匹は腫瘍を持たない生存動物であった。このことは、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭが、約３．５のＤＡＲで、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であることを示している。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が１％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が＞６６日であり、そして、ＬＣＫ値が＞２．６（＋＋＋）であり、６匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認め

られ、５匹に完全な退縮が認められ、また、２匹は腫瘍を持たない生存動物であった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が１％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が６４日であり、そして、ＬＣＫ値が２．５（＋＋＋）であり、６匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、５匹に完全な退縮が認められ、また、１匹は腫瘍を持たない生存動物であった。このことは、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭが、約２．０　のＤＡＲで、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であることを示している。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が３６％（活性）であり、Ｔ－Ｃ値が１３日であり、そして、ＬＣＫ値が０．５（－）であり、６匹のマウスの内、１匹に部分的な退縮が認められ、また、完全な退縮は認められなかった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が１％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が３８日であり、そして、ＬＣＫ値が１．５（＋＋）であり、６匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、また、５匹に完全な退縮が認められ、そして、４匹は腫瘍を持たない生存動物であった。このことは、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭが、約２．０のＤＡＲで、部位特異的コンジュケーションによって、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であることを示している。ここに示した用量のいずれのＡＤＣでも有意な体重減少は認められなかったので、この研究では、６つのコンジュゲートすべてが、マウスでは十分に忍容性であった。

【０４３２】

加えて、ＤＡＲが約２．０のＡＤＣは、ＤＡＲが約３．５であるそれらの対応物と同様の活性を示した。具体的には、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）とほぼ同様の活性を示した。忍容性と毒性は、ペイロード濃度によって決まるので、ＤＡＲが２．０のＡＤＣは、ＤＡＲが３．５であるＡＤＣよりも高濃度の抗体を投与することができる。ＤＡＲが２．０であるＡＤＣの曝露を増やすと、標的を介した薬物動態（ＴＭＤＤ）を飽和させ、及び／または、腫瘍の浸透を高めることで、有効性を改善し得る。この試験の結果は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）コンジュゲートが、納得のいく抗腫瘍活性を示し、かつ、Ｈ１７０３非小細胞肺扁平上皮癌腫瘍異種移植片モデルにおいて非常に有効である、ことを示唆している。

【０４３３】

実施例１６

ＳＮＵ－５ヒト胃癌異種移植片を有するＮｕｄｅマウスにおける抗ＡＤＡＭ９抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性

ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８　ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの５０μｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を、ヒト胃癌異種移植モデルであるＳＮＵ－５細胞を担持した雌Ｎｕｄｅマウスで評価した。

【０４３４】

接種のためにＳＮＵ－５細胞を集め、トリパンブルー排除によって１００％生存率を決定した。マウスに、５×１０^{6}個のＳＮＵ－５細胞を含む０．１ｍｌの５０％Ｍａｔｒｉｇｅｌ／５０％無血清培地を、右後側の脇腹領域に、皮下注射で接種した。６６匹の雌の無胸腺Ｎｕｄｅ－Ｆｏｘｎ１ｎｕマウス（６週齢）を得た。入手でき次第、試験開始前に６日間、動物を観察した。動物は、到着時、または、治療前に、疾患または疾病の徴候を

示さなかった。

【０４３５】

４２匹のマウスを、腫瘍体積によって、７グループ（６匹のマウス／グループ）に無作為に分けた。腫瘍体積は、６１．８４～３１０．１７（１２８．０５±４６．６１、平均±ＳＤ）mm^3の範囲であった。マウスを測定し、そして、移植から１８日後の腫瘍体積に基づいて、無作為に分けた。移植から２０日後（２０１８／１／７）に、マウスに投薬した。マウスの体重は、１９．６９～２６．５９（２３．６３±１．５７、平均±ＳＤ）グラムであった。それぞれのグループでのマウスは、パンチ法で特定した。試験薬剤、及び、ビヒクルの投与は、２７ゲージ、１／２インチ針を取り付けた１．０ｍｌのシリンジを用いて、静脈内で行った。抗体薬物コンジュケート試験薬を、５０μｇ／ｋｇ　ＤＭペイロードで、ｑｄ×１投与を行い、このものは、ＤＡＲが約３．５のコンジュゲートでは、約２．５ｍｇ／ｋｇの抗体、そして、ＤＡＲが約２．０コンジュゲートでは、約４．３ｍｇ／ｋｇの抗体となる。グループを以下のように分けた：ビヒクル（ＰＢＳ、１５０μＬ）を投与する対照群、２．６ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６　ＤＡＲ）、２．９ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）、４．３ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、５．１ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）、５．３ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８　ＤＡＲ）、及び、５．３ｍｇ／ｋｇの抗体を含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）。

【０４３６】

カリパスを用いて、１週間に２回、腫瘍サイズを三次元で測定した。体積＝長さ×幅×高さ×１／２の式を用いて、腫瘍体積を、mm^3で表した。マウスに関して、腫瘍体積が５０％以上減っていると、部分的な退縮（ＰＲ）とし、明確な腫瘍が認められないときに、完全な腫瘍退縮（ＣＲ）とし、そして、試験終了時に明確な腫瘍が無ければ、腫瘍を持たない生存動物（ＴＦＳ）とする。腫瘍体積は、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。

【０４３７】

腫瘍成長阻害（％Ｔ／Ｃ）とは、所定の時間（例えば、対照腫瘍のメジアン腫瘍体積（ＴＶ）が、約１０００mm^3の最大腫瘍体積に達するまでの時間、つまり、マウスを安楽死させるまでの時間）での対照群（Ｃ）のメジアンＴＶに対する、治療群（Ｔ）のメジアンＴＶの比率である。％Ｔ／Ｃは、接種して７０日後に、対照群のメジアンＴＶが、１１２２mm^3に達したときに計算した。ＮＣＩ基準によると、Ｔ／Ｃ≦４２％は、抗腫瘍活性の最小レベルであり、また、Ｔ／Ｃ＜１０％は、高い抗腫瘍活性レベルと見なされる。腫瘍増殖遅延（Ｔ－Ｃ）とは、治療群（Ｔ）と対照群の腫瘍（Ｃ）が、所定のサイズの１０００mm^3に達するまでの時間のメジアン値（日数）の差のことである（腫瘍を持たない生存動物を除く）。腫瘍倍加時間（Ｔｄ）は、対照腫瘍成長の毎日のメジアン値の非線形指数曲線フィッティングから概算しており、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定する。Ｔｄは、１９．７日であり、Ｒ２＝０．９８６であった。Ｌｏｇ１０細胞死（ＬＣＫ）は、式ＬＣＫ＝（Ｔ－Ｃ）／Ｔｄ×３．３２を用いて計算するものであり、式中、３．３２は、細胞増殖のｌｏｇあたりの細胞倍加の数である。ＬＣＫに関するＳｏｕｔｈｅｒｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＳＲＩ）の活性基準は、＜０．７：－（不活性）、０．７～１．２：＋、１．３～１．９：＋＋、２．０～２．８：＋＋＋、＞２．８：＋＋＋＋（高活性）である。

【０４３８】

すべてのマウスの体重（ＢＷ）を、薬物毒性の大まかな指標として、週に２回測定を行い、そして、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。マウスの体重を、次の式：％ＢＷ変化＝［（ＢＷｐｏｓｔ／ＢＷｐｒｅ）－１］×１００、式中、ＢＷｐｏｓｔは、治療後の体重であり、及び、ＢＷｐｒｅは、治療前の開始時の体重である式でもってして、治

療前の体重に基づいた体重の変化率として表した。体重減少（ＢＷＬ）の割合は、治療後の体重の平均変化として表した。腫瘍体積が１０００ｍｍ^{3}を超える、腫瘍が壊死する、マウスの当初の体重の２０％を超える体重の減少が認められる、または、試験のいずれかの時点でマウスが瀕死状態になれば、動物を安楽死させた。

【０４３９】

この試験の結果を、図１４に示している。ＬＤＬ－ＤＭ　ＡＤＣは、すべて、対応するＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（３．６　ＤＡＲ）コンジュケートは、腫瘍成長阻害（Ｔ／Ｃ）値が６６％（不活性）であり、腫瘍増殖遅延（Ｔ－Ｃ）値が０日であり、そして、ｌｏｇ１０細胞死（ＬＣＫ）値が０．０（－）であり、６匹のマウスの内、２匹に部分的な退縮が認められ、そして、完全な退縮は認められなかった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）コンジュケートは、Ｔ／Ｃ値が１４％（活性）であり、Ｔ－Ｃ値が４５日であり、そして、ＬＣＫ値が０．７（＋）であり、６匹のマウスの内、４匹に部分的な退縮が認められ、１匹に完全な退縮が認められ、また、１匹は腫瘍を持たない生存動物であった。このことは、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭが、約３．５のＤＡＲで、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であることを示している。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が４７％（不活性）であり、Ｔ－Ｃ値が１０日であり、そして、ＬＣＫ値が０．２（－）であり、６匹のマウスの内、１匹に部分的な退縮が認められ、１匹に完全な退縮が認められ、また、１匹は腫瘍を持たない生存動物であった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が４１％（活性）であり、Ｔ－Ｃ値が１０日であり、そして、ＬＣＫ値が０．２（－）であり、６匹のマウスの内、２匹に部分的な退縮が認められ、１匹に完全な退縮が認められ、また、１匹は腫瘍を持たない生存動物であった。このことは、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭが、約２．０のＤＡＲで、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であることを示している。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＢＤ－ＤＭ４（１．８　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が１０７％（不活性）であり、Ｔ－Ｃ値が－１１日であり、そして、ＬＣＫ値が－０．２（－）であり、６匹のマウスの内、１匹に部分的な退縮が認められ、１匹に完全な退縮が認められ、また、１匹は腫瘍を持たない生存動物であった。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が２２％（活性）であり、Ｔ－Ｃ値が２８日であり、そして、ＬＣＫ値が０．４（－）であり、６匹のマウスの内、２匹に部分的な退縮が認められ、１匹に完全な退縮が認められ、また、１匹は腫瘍を持たない生存動物であった。このことは、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭが、約２．０のＤＡＲで、部位特異的コンジュケーションによって、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であることを示している。ここに示した用量のいずれのＡＤＣでも有意な体重減少は認められなかったので、この研究では、６つのコンジュゲートすべてが、マウスでは十分に忍容性であった。

【０４４０】

加えて、ＤＡＲが約２．０のＡＤＣは、ＤＡＲが約３．５であるそれらの対応物と同様の活性を示した。具体的には、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（３．３　ＤＡＲ）は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＧＭＢＳ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．９　ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）とほぼ同様の活性を示した。忍容性と毒性は、ペイロード濃度によって決まるので、ＤＡＲが２．０のＡＤＣは、ＤＡＲが３．５であるＡＤＣよりも高濃度の抗体を投与することができる。ＤＡＲが２．０であるＡＤＣの曝露を増やすと、標的を介した薬物動態（ＴＭＤＤ）を飽和させ、及び／または、腫瘍の浸透を高めることで、有効性を改善し得る。この試験の結果は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）コンジュゲートが、抗腫瘍活性を示し、かつ、ＳＮＵ－５胃癌異種移植片モデルにおいて有効である、ことを示唆している。

【０４４１】
実施例１７
ＥＢＣ－１ヒト非小細胞肺扁平上皮細胞癌異種移植片を有するＳＣＩＤマウスにおける抗ＡＤＡＭ９抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性
ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を、ヒト非小細胞肺扁平上皮細胞癌異種移植モデルであるＥＢＣ－１細胞を担持した雌ＳＣＩＤマウスで評価した。
【０４４２】
接種のためにＥＢＣ－１細胞を集め、トリパンブルー排除によって１００％生存率を決定した。マウスに、5×10^{6}個のＥＢＣ－１細胞を含む０．２ｍｌの５０％Ｍａｔｒｉｇｅｌ／５０％無血清培地を、右後側の脇腹領域に、皮下注射で接種した。６６匹の雌のＣＢ．１７　ＳＣＩＤマウス（６週齢）を得た。入手でき次第、試験開始前に６日間、動物を観察した。動物は、到着時、または、治療前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。
【０４４３】
４２匹のマウスを、腫瘍体積によって、７グループ（６匹のマウス／グループ）に無作為に分けた。腫瘍体積は、７９．３８～１２４．２９（９５．８１±１１．８３、平均±ＳＤ）mm^3の範囲であった。マウスを測定し、無作為に分け、そして、移植から７日後（２０１８／４／１６）に腫瘍体積に基づいて投薬した。マウスの体重は、１５．９４～２１．１０（１８．５５±１．１７、平均±ＳＤ）グラムであった。それぞれのグループでのマウスは、パンチ法で特定した。試験薬剤、及び、ビヒクルの投与は、２７ゲージ、１／２インチ針を取り付けた１．０ｍｌのシリンジを用いて、静脈内で行った。抗体薬物コンジュケート試験薬を、２５、５０、または、１００μｇ／ｋｇ　ＤＭペイロードで、ｑｄ×１投与を行い、このものは、ＤＡＲが約２．０のコンジュゲートでは、約２、４、及び、９ｍｇ／ｋｇの抗体（Ａｂ）となる。グループを以下のように分けた：ビヒクル（ＰＢＳ、２００μＬ）を投与する対照群、２．１８、４．３６、及び、８．７６ｍｇ／ｋｇのＡｂを含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、及び、２．１４、４．２８、及び、８．５７ｍｇ／ｋｇのＡｂを含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）。
【０４４４】
カリパスを用いて、１週間に２回、腫瘍サイズを三次元で測定した。体積＝長さ×幅×高さ×１／２の式を用いて、腫瘍体積を、mm^3で表した。マウスに関して、腫瘍体積が５０％以上減っていると、部分的な退縮（ＰＲ）とし、明確な腫瘍が認められないときに、完全な腫瘍退縮（ＣＲ）とし、そして、試験終了時に明確な腫瘍が無ければ、腫瘍を持たない生存動物（ＴＦＳ）とする。腫瘍体積は、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。
【０４４５】
腫瘍成長阻害（％Ｔ／Ｃ）とは、所定の時間（例えば、対照腫瘍のメジアン腫瘍体積（ＴＶ）が、約１０００mm^3の最大腫瘍体積に達するまでの時間、つまり、マウスを安楽死させるまでの時間）での対照群（Ｃ）のメジアンＴＶに対する、治療群（Ｔ）のメジアンＴＶの比率である。％Ｔ／Ｃは、接種して２８日後に、対照群のメジアンＴＶが、１２７９mm^3に達したときに計算した。ＮＣＩ基準によると、Ｔ／Ｃ≦４２％は、抗腫瘍活性の最小レベルであり、また、Ｔ／Ｃ＜１０％は、高い抗腫瘍活性レベルと見なされる。腫瘍増殖遅延（Ｔ－Ｃ）とは、治療群（Ｔ）と対照群の腫瘍（Ｃ）が、所定のサイズの１０００mm^3に達するまでの時間のメジアン値（日数）の差のことである（腫瘍を持たない生存動物を除く）。腫瘍倍加時間（Ｔｄ）は、対照腫瘍成長の毎日のメジアン値の非線形指数曲線フィッティングから概算しており、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定する。Ｔｄは、６．０４日であり、Ｒ２＝０．９９５であった。Ｌｏｇ１０細胞死（ＬＣＫ）

は、式ＬＣＫ＝（Ｔ－Ｃ）／Ｔｄ×３．３２を用いて計算するものであり、式中、３．３２は、細胞増殖のｌｏｇあたりの細胞倍加の数である。ＬＣＫに関するＳｏｕｔｈｅｒｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＳＲＩ）の活性基準は、＜０．７：－（不活性）、０．７～１．２：＋、１．３～１．９：＋＋、２．０～２．８：＋＋＋、＞２．８：＋＋＋＋（高活性）である。

【０４４６】

すべてのマウスの体重（ＢＷ）を、薬物毒性の大まかな指標として、週に２回測定を行い、そして、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。マウスの体重を、次の式：％ＢＷ変化＝［（ＢＷｐｏｓｔ／ＢＷｐｒｅ）－１］×１００、式中、ＢＷｐｏｓｔは、治療後の体重であり、及び、ＢＷｐｒｅは、治療前の開始時の体重である式でもってして、治療前の体重に基づいた体重の変化率として表した。体重減少（ＢＷＬ）の割合は、治療後の体重の平均変化として表した。腫瘍体積が１０００ｍｍ^{3}を超える、腫瘍が壊死する、マウスの当初の体重の２０％を超える体重の減少が認められる、または、試験のいずれかの時点でマウスが瀕死状態になれば、動物を安楽死させた。

【０４４７】

この試験の結果を、図１５に示している。ＬＤＬ－ＤＭ ＡＤＣは、対応するＳＰＤＢ－ＤＭ４よりも活性であった。２５μｇ／ｋｇのＤＭ（２．１８ｍｇ／ｋｇ Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が１７％（活性）であり、Ｔ－Ｃ値が２１日であり、そして、ＬＣＫ値が１．０６（＋）であり、腫瘍の退縮は認められず、腫瘍を持たない生存動物も認められなかった。５０μｇ／ｋｇのＤＭ（４．３６ｍｇ／ｋｇ Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が２％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が３４日であり、そして、ＬＣＫ値が１．６８（＋＋）であり、６匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、１匹に完全な退縮が認められたが、腫瘍を持たない生存動物は認められなかった。１００μｇ／ｋｇのＤＭ（８．７６ｍｇ／ｋｇ Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が２％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が＞６５日であり、そして、ＬＣＫ値が＞３．２６（＋＋＋＋）であり、６匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、６匹に完全な退縮が認められ、また、２匹は腫瘍を持たない生存動物であった。２５μｇ／ｋｇのＤＭ（２．１４ｍｇ／ｋｇ Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１ ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が２％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が５６日であり、そして、ＬＣＫ値が２．７９（＋＋）であり、６匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、３匹に完全な退縮が認められたが、腫瘍を持たない生存動物は認められなかった。５０μｇ／ｋｇのＤＭ（４．２８ｍｇ／ｋｇ Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１ ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が２％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が＞６５日であり、そして、ＬＣＫ値が＞３．２６（＋＋＋＋）であり、６匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、６匹に完全な退縮が認められたが、腫瘍を持たない生存動物は認められなかった。１００μｇ／ｋｇのＤＭ（８．５７ｍｇ／ｋｇ Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１ ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が１％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が＞６５日であり、そして、ＬＣＫ値が＞３．２６（＋＋＋＋）であり、６匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、６匹に完全な退縮が認められ、また、６匹は腫瘍を持たない生存動物であった。ここに示した用量のいずれのＡＤＣでも有意な体重減少は認められなかったので、この研究では、６つのコンジュゲートすべてが、マウスでは十分に忍容性であった。この試験の結果は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１ ＤＡＲ）コンジュゲートの両方が、用量依存的な抗腫瘍活性を示し、かつ、ＥＢＣ－１ヒト非小細胞肺扁平上皮細胞癌腫瘍異種移植片モデルにおいて有効である、ことを示唆している。

【０４４８】

実施例１８

ＳＷ４８ヒト大腸腺癌異種移植片を有するＣＤ１　Ｎｕｄｅマウスにおける抗ＡＤＡＭ９抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性

ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）のＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇ、及び、非結合対照ｈｕＫＴＩ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．０　ＤＡＲ）コンジュケートのＤＭペイロードの１００ｕｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を、ヒト大腸腺癌異種移植モデルであるＳＷ４８細胞を担持した雌ＣＤ１　Ｎｕｄｅ免疫不全マウスで評価した。

【０４４９】

接種のためにＳＷ４８（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－２３１）細胞を集め、トリパンブルー排除によって９０％超の生存率を決定した。マウスに、５×１０^{6}個のＳＷ４８細胞を含む０．１ｍｌの５０％Ｍａｔｒｉｇｅｌ／５０％無血清培地を、右後側の脇腹領域に、皮下注射で接種した。雌のＣＤ１　Ｎｕｄｅマウス（５～７週齢）を、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒｓ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから入手した。入手でき次第、試験開始前に３～４日間、動物を観察した。動物は、到着時、または、治療前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。

【０４５０】

４０匹のマウスを、腫瘍体積によって、５グループ（８匹のマウス／グループ）に無作為に分けた。腫瘍体積は、移植から１９日後で、１２１．３３～１８６．５９（１５２．４９±１８．５０、平均±ＳＤ）ｍｍ^{3}の範囲であった。マウスを測定し、次いで、移植から１９日後の腫瘍体積に基づいて無作為に分け、そして、移植から２１日後に投薬した。マウスの体重は、１９日後で、１８．８０～２９．９０（２５．７５±２．５０、平均±ＳＤ）グラムであった。それぞれのグループでのマウスは、耳標法で特定した。試験薬剤、及び、ビヒクルの投与は、２８ゲージ、１／２インチ針を取り付けた０．５ｍｌのシリンジを用いて、尾静脈内注射で行った。抗体薬物コンジュケート試験薬を、２５、５０、または、１００μｇ／ｋｇ　ＤＭペイロードで、ｑｄ×１投与を行い、このものは、ＤＡＲが約２．０のコンジュゲートでは、約２、４、及び、９ｍｇ／ｋｇの抗体（Ａｂ）となる。グループを以下のように分けた：ビヒクル（１×　ＰＢＳ、１００μＬ）を投与する対照群、２．１８、４．３６、及び、８．５７ｍｇ／ｋｇのＡｂを含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）、及び、８．５７ｍｇ／ｋｇのＡｂを含むｈｕＫＴＩ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．０　ＤＡＲ）。

【０４５１】

電子カリパスを用いて、１週間に１回、腫瘍サイズの直交測定を行い、そして、投与を始めると、１週間に２回の測定を行った。体積＝長さ×幅×高さ×１／２の式を用いて、腫瘍体積を、ｍｍ^{3}で表した。マウスに関して、投与の日から腫瘍体積が５０％以上減っていると、部分的な退縮（ＰＲ）とし、連続する３～４度の測定で明確な腫瘍が認められないとき（≦１４．０８ｍｍ^{3}）に、完全な腫瘍退縮（ＣＲ）とし、そして、試験終了時に明確な腫瘍が無ければ（≦１４．０８ｍｍ^{3}）、腫瘍を持たない生存動物（ＴＦＳ）とする。腫瘍体積は、Ｓｔｕｄｙ　Ｄｉｒｅｃｔｏｒソフトウェアに記録した。

【０４５２】

腫瘍成長阻害（％Ｔ／Ｃ）とは、所定の時間（例えば、すべてのビヒクル対照動物が研究対象となっている時点）での対照群（Ｃ）のメジアンＴＶに対する、治療群（Ｔ）のメジアン腫瘍体積（ＴＶ）の比率である。％Ｔ／Ｃは、接種して５６日後に、対照群のメジアンＴＶが、６６３．０４ｍｍ^{3}に達したときに計算した。ＮＣＩ基準によると、Ｔ／Ｃ≦４２％は、抗腫瘍活性の最小レベルであり、また、Ｔ／Ｃ＜１０％は、高い抗腫瘍活性レベルと見なされる。

【０４５３】

すべてのマウスの体重（ＢＷ）を、薬物毒性の大まかな指標として、投薬の前に、週に１回測定を行い、次いで、投薬の後に、週に２回測定を行い、そして、Ｓｔｕｄｙ　Ｄｉｒｅｃｔｏｒソフトウェアに記録した。マウスの体重を、次の式：％ＢＷ変化＝［（ＢＷ

ｐｏｓｔ／ＢＷｐｒｅ）－１］×１００、式中、ＢＷｐｏｓｔは、治療後の体重であり、及び、ＢＷｐｒｅは、治療前の開始時の体重である式でもってして、治療前の体重に基づいた体重の変化率として表した。体重減少（ＢＷＬ）の割合は、治療後の体重の平均変化として表した。腫瘍体積が２０００ｍｍ^{3}を超える、腫瘍が顕著な潰瘍形成または壊死を示す、マウスの当初の体重の２０％を超える体重の減少が認められる、または、試験のいずれかの時点でマウスが瀕死状態になれば、動物を安楽死させた。

【０４５４】

この試験の結果を、図１６に示している。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）は、１００μｇ／ｋｇ　ＤＭ（８．５７ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）の用量で高活性を示しており、８／８匹に部分的な退縮が認められ、７／８匹に完全な退縮が認められ、７／８匹は腫瘍を持たない生存動物であり、そして、％Ｔ／Ｃは１％であった。５０μｇ／ｋｇ　ＤＭ（４．３６ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）の用量では、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）は、活性であり、５／８匹に部分的な退縮が認められ、２／８匹に完全な退縮が認められ、２／８匹は腫瘍を持たない生存動物であり、そして、％Ｔ／Ｃは１５％であった。ＮＣＩ基準に照らすと、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）は、２５μｇ／ｋｇ　ＤＭ（２．１８ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）では不活性であり、１／８匹に部分的な退縮が認められ、０／８匹に完全な退縮が認められ、０／８匹は腫瘍を持たない生存動物であり、そして、％Ｔ／Ｃは５１％であった。結果は、非結合対照ｈｕＫＴＩ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．０　ＤＡＲ）コンジュゲートが、１００μｇ／ｋｇ　ＤＭ（８．５７ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）の用量で不活性であり、０／８匹に部分的な退縮が認められ、０／８匹に完全な退縮が認められ、０／８匹は腫瘍を持たない生存動物であり、そして、％Ｔ／Ｃは９３％であったので、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）が、ＡＤＡＭ９を標的としていることを実証した。ここに示した用量のいずれのＡＤＣでも有意な体重減少は認められなかったので、この研究では、コンジュゲートすべてが、マウスでは十分に忍容性であった。この試験の結果は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）コンジュゲートが、用量依存的な標的化抗腫瘍活性を示し、かつ、ＳＷ４８大腸腺癌異種移植モデルにおいて有効である、ことを示唆している。

【０４５５】

実施例１９

ＨＰＡＦ－ＩＩヒト膵臓腺癌異種移植片を有するＣＤ１　Ｎｕｄｅマウスにおける抗ＡＤＡＭ９抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性

ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）のＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇ、及び、非結合対照ｈｕＫＴＩ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．０　ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの１００ｕｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を、ヒト膵臓腺癌異種移植モデルであるＨＰＡＦ－ＩＩ細胞を担持した雌ＣＤ１　Ｎｕｄｅ免疫不全マウスで評価した。

【０４５６】

接種のためにＨＰＡＦ－ＩＩ（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１９９７）細胞を集め、トリパンブルー排除によって９０％超の生存率を決定した。マウスに、５×１０^{6}個のＨＰＡＦ－ＩＩ細胞を含む０．１ｍｌの５０％Ｍａｔｒｉｇｅｌ／５０％無血清培地を、右後側の脇腹領域に、皮下注射で接種した。雌のＣＤ１　Ｎｕｄｅマウス（５～７週齢）を、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒｓ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから入手した。入手でき次第、試験開始前に３～４日間、動物を観察した。動物は、到着時、または、治療前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。

【０４５７】

３５匹のマウスを、腫瘍体積によって、５グループ（７匹のマウス／グループ）に無作為に分けた。腫瘍体積は、移植から１５日後で、８１．６４～１３６．７７（１０４．９

４±１３．８９、平均±ＳＤ）ｍｍ^{3}の範囲であった。マウスを測定し、次いで、移植から１５日後の腫瘍体積に基づいて無作為に分け、そして、移植から１６日後に投薬した。マウスの体重は、１５日後に、２１．００～２８．６０（２５．２１±１．７０、平均±ＳＤ）グラムであった。それぞれのグループでのマウスは、耳標法で特定した。試験薬剤、及び、ビヒクルの投与は、２８ゲージ、１／２インチ針を取り付けた０．５ｍｌのシリンジを用いて、尾静脈内注射で行った。抗体薬物コンジュケート試験薬を、２５、５０、または、１００μｇ／ｋｇ　ＤＭペイロードで、ｑｄ×１投与を行い、このものは、ＤＡＲが約２．０のコンジュゲートでは、約２、４、及び、９ｍｇ／ｋｇの抗体（Ａｂ）となる。グループを以下のように分けた：ビヒクル（１×　ＰＢＳ、１００μＬ）を投与する対照群、２．１８、４．３６、及び、８．５７ｍｇ／ｋｇのＡｂを含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）、及び、８．５７ｍｇ／ｋｇのＡｂを含むｈｕＫＴＩ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．０　ＤＡＲ）。

【０４５８】

電子カリパスを用いて、１週間に１回、腫瘍サイズの直交測定を行い、そして、投与を始めると、１週間に２回の測定を行った。体積＝長さ×幅×高さ×１／２の式を用いて、腫瘍体積を、ｍｍ^{3}で表した。マウスに関して、投与の日から腫瘍体積が５０％以上減っていると、部分的な退縮（ＰＲ）とし、連続する３～４度の測定で明確な腫瘍が認められないとき（≦１４．０８ｍｍ^3）に、完全な腫瘍退縮（ＣＲ）とし、そして、試験終了時に明確な腫瘍が無ければ（≦１４．０８ｍｍ^3）、腫瘍を持たない生存動物（ＴＦＳ）とする。腫瘍体積は、Ｓｔｕｄｙ　Ｄｉｒｅｃｔｏｒソフトウェアに記録した。

【０４５９】

腫瘍成長阻害（％Ｔ／Ｃ）とは、所定の時間（例えば、すべてのビヒクル対照動物が研究対象になっている時点）での対照群（Ｃ）のメジアンＴＶに対する、治療群（Ｔ）のメジアン腫瘍体積（ＴＶ）の比率である。％Ｔ／Ｃは、接種して４７日後に、対照群のメジアンＴＶが、８８２．８３ｍｍ^{3}に達したときに計算した。ＮＣＩ基準によると、Ｔ／Ｃ≦４２％は、抗腫瘍活性の最小レベルであり、また、Ｔ／Ｃ＜１０％は、高い抗腫瘍活性レベルと見なされる。

【０４６０】

すべてのマウスの体重（ＢＷ）を、薬物毒性の大まかな指標として、投薬の前に、週に１回測定を行い、次いで、投薬の後に、週に２回測定を行い、そして、Ｓｔｕｄｙ　Ｄｉｒｅｃｔｏｒソフトウェアに記録した。マウスの体重を、次の式：％ＢＷ変化＝［（ＢＷｐｏｓｔ／ＢＷｐｒｅ）－１］×１００、式中、ＢＷｐｏｓｔは、治療後の体重であり、及び、ＢＷｐｒｅは、治療前の開始時の体重である式でもってして、治療前の体重に基づいた体重の変化率として表した。体重減少（ＢＷＬ）の割合は、治療後の体重の平均変化として表した。腫瘍体積が２０００ｍｍ^{3}を超える、腫瘍が顕著な潰瘍形成または壊死を示す、マウスの当初の体重の２０％を超える体重の減少が認められる、または、試験のいずれかの時点でマウスが瀕死状態になれば、動物を安楽死させた。

【０４６１】

この試験の結果を、図１７に示している。ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）は、１００μｇ／ｋｇ　ＤＭ（８．５７ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）の用量で高活性を示しており、７／７匹に部分的な退縮が認められ、３／７匹に完全な退縮が認められ、３／７匹は腫瘍を持たない生存動物であり、そして、％Ｔ／Ｃは３％であった。５０μｇ／ｋｇ　ＤＭ（４．３６ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）の用量では、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）は、活性であり、５／７匹に部分的な退縮が認められ、１／７匹に完全な退縮が認められ、１／７匹は腫瘍を持たない生存動物であり、そして、％Ｔ／Ｃは１１％であった。ＮＣＩ基準に照らすと、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）は、２５μｇ／ｋｇ　ＤＭ（２．１８ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）では不活性であり、０／７匹に部分的な退縮が認められ、０／７匹に完全な退縮が認められ、０／７匹は腫瘍を持たない生存動物であり、そして、％Ｔ／Ｃは５６％であった。

結果は、非結合対照ｈｕＫＴＩ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．０　ＤＡＲ）コンジュゲートが、ＮＣＩ基準に照らすと、１００μｇ／ｋｇ　ＤＭ（８．５７ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）の用量で不活性であり、０／７匹に部分的な退縮が認められ、０／７匹に完全な退縮が認められ、０／７匹は腫瘍を持たない生存動物であり、そして、％Ｔ／Ｃは４８％であったので、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）が、ＡＤＡＭ９を標的としていることを実証した。ここに示した用量のいずれのＡＤＣでも有意な体重減少は認められなかったので、この研究では、コンジュゲートすべてが、マウスでは十分に忍容性であった。この試験の結果は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）（ＹＴＥ／Ｃ／－Ｋ）－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（１．８　ＤＡＲ）コンジュゲートが、用量依存的な標的化抗腫瘍活性を示し、かつ、ＨＰＡＦ－ＩＩ膵臓腺癌異種移植モデルにおいて有効である、ことを示唆している。

【０４６２】

実施例２０

Ｈ１９７５ヒト非小細胞肺腺癌異種移植片を有するＮｕｄｅマウスにおける抗ＡＤＡＭ９抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性

ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を、ヒト非小細胞肺腺癌異種移植モデルであるＨ１９７５細胞を担持した雌のＮｕｄｅマウスで評価した。

【０４６３】

接種のためにＨ１９７５細胞を集め、トリパンブルー排除によって１００％生存率を決定した。マウスに、3×10^{6}個のＨ１９７５細胞を含む０．２ｍｌの５０％Ｍａｔｒｉｇｅｌ／５０％無血清培地を、右後側の脇腹領域に、皮下注射で接種した。６６匹の雌の無胸腺Ｆｏｘｎ１^{nu}マウス（６週齢）を得た。入手でき次第、試験開始前に７日間、動物を観察した。動物は、到着時、または、治療前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。

【０４６４】

４２匹のマウスを、腫瘍体積によって、７グループ（６匹のマウス／グループ）に無作為に分けた。腫瘍体積は、７９．４３～１１９．６１（９２．４４±１０．３６、平均±ＳＤ）mm^{3}の範囲であった。マウスを測定し、無作為に分け、そして、移植から７日後（２０１８／４／１０）の腫瘍体積に基づいて投薬した。マウスの体重は、１８．８７～２６．３０（２２．９２±１．５０、平均±ＳＤ）グラムであった。それぞれのグループでのマウスは、パンチ法で特定した。試験薬剤、及び、ビヒクルの投与は、２７ゲージ、１／２インチ針を取り付けた１．０ｍｌのシリンジを用いて、静脈内で行った。抗体薬物コンジュゲート試験薬を、２５、５０、または、１００μｇ／ｋｇ　ＤＭペイロードで、ｑｄ×１投与を行い、このものは、ＤＡＲが約２．０のコンジュゲートでは、約２、４、及び、９ｍｇ／ｋｇの抗体（Ａｂ）となる。グループを以下のように分けた：ビヒクル（ＰＢＳ、２００μＬ）を投与する対照群、２．１８、４．３６、及び、８．７６ｍｇ／ｋｇのＡｂを含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、及び、２．１４、４．２８、及び、８．５７ｍｇ／ｋｇのＡｂを含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）。

【０４６５】

カリパスを用いて、１週間に２回、腫瘍サイズを三次元で測定した。体積＝長さ×幅×高さ×１／２の式を用いて、腫瘍体積を、mm^{3}で表した。マウスに関して、腫瘍体積が５０％以上減っていると、部分的な退縮（ＰＲ）とし、明確な腫瘍が認められないときに、完全な腫瘍退縮（ＣＲ）とし、そして、試験終了時に明確な腫瘍が無ければ、腫瘍を持たない生存動物（ＴＦＳ）とする。腫瘍体積は、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。

【０４６６】

腫瘍成長阻害（％Ｔ／Ｃ）とは、所定の時間（例えば、対照腫瘍のメジアン腫瘍体積（ＴＶ）が、約１０００ｍｍ^{3}の最大腫瘍体積に達するまでの時間、つまり、マウスを安楽死させるまでの時間）での対照群（Ｃ）のメジアンＴＶに対する、治療群（Ｔ）のメジアンＴＶの比率である。％Ｔ／Ｃは、接種して２０日後に、対照群のメジアンＴＶが、７２９ｍｍ^{3}に達したときに計算した。ＮＣＩ基準によると、Ｔ／Ｃ≦４２％は、抗腫瘍活性の最小レベルであり、また、Ｔ／Ｃ＜１０％は、高い抗腫瘍活性レベルと見なされる。腫瘍増殖遅延（Ｔ－Ｃ）とは、治療群（Ｔ）と対照群の腫瘍（Ｃ）が、所定のサイズの１０００ｍｍ^{3}に達するまでの時間のメジアン値（日数）の差のことである（腫瘍を持たない生存動物を除く）。腫瘍倍加時間（Ｔｄ）は、対照腫瘍成長の毎日のメジアン値の非線形指数曲線フィッティングから概算しており、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定する。Ｔｄは、３．８４日であり、Ｒ２＝０．９９８であった。Ｌｏｇ１０細胞死（ＬＣＫ）は、式ＬＣＫ＝（Ｔ－Ｃ）／Ｔｄ×３．３２を用いて計算するものであり、式中、３．３２は、細胞増殖のｌｏｇあたりの細胞倍加の数である。ＬＣＫに関するＳｏｕｔｈｅｒｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＳＲＩ）の活性基準は、＜０．７：－（不活性）、０．７～１．２：＋、１．３～１．９：＋＋、２．０～２．８：＋＋＋、＞２．８：＋＋＋＋（高活性）である。

【０４６７】

すべてのマウスの体重（ＢＷ）を、薬物毒性の大まかな指標として、週に２回測定を行い、そして、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。マウスの体重を、次の式：％ＢＷ変化＝［（ＢＷｐｏｓｔ／ＢＷｐｒｅ）－１］×１００、式中、ＢＷｐｏｓｔは、治療後の体重であり、及び、ＢＷｐｒｅは、治療前の開始時の体重である式でもってして、治療前の体重に基づいた体重の変化率として表した。体重減少（ＢＷＬ）の割合は、治療後の体重の平均変化として表した。腫瘍体積が１０００ｍｍ^{3}を超える、腫瘍が壊死する、マウスの当初の体重の２０％を超える体重の減少が認められる、または、試験のいずれかの時点でマウスが瀕死状態になれば、動物を安楽死させた。

【０４６８】

この試験の結果を、図１８に示している。ＬＤＬ－ＤＭ ＡＤＣは、すべて、対応するＳＰＤＢ－ＤＭ４ ＡＤＣよりも活性であった。２５μｇ／ｋｇのＤＭ（２．１８ｍｇ／ｋｇ Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が２６％（活性）であり、Ｔ－Ｃ値が１０日であり、そして、ＬＣＫ値が０．７９（＋）であり、腫瘍の退縮は認められず、また、腫瘍を持たない生存動物もいなかった。５０μｇ／ｋｇのＤＭ（４．３６ｍｇ／ｋｇ Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が８％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が３５日であり、そして、ＬＣＫ値が２．７２（＋＋＋）であり、６匹のマウスの内、５匹に部分的な退縮が認められ、１匹に完全な退縮が認められたが、腫瘍を持たない生存動物はいなかった。１００μｇ／ｋｇのＤＭ（８．７６ｍｇ／ｋｇ Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１ ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が７％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が＞３８日であり、そして、ＬＣＫ値が＞２．９８（＋＋＋＋）であり、６匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められたが、完全な退縮は認められず、また、腫瘍を持たない生存動物もいなかった。２５μｇ／ｋｇのＤＭ（２．１４ｍｇ／ｋｇ Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１ ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が６％（高活性）であり、６匹のマウスの内、４匹に部分的な退縮が認められ、１匹に完全な退縮が認められたが、腫瘍を持たない生存動物はいなかった。腫瘍壊死、または、最低でも７％の体重減少（注射の１０日後に、グループ内の１匹の動物を、２０％を超える体重減少が故に安楽死させなければならなかった）を起因とする本グループでの動物の欠員が故に、Ｔ－Ｃ、及び、ＬＣＫ値を算出できなかった。５０μｇ／ｋｇのＤＭ（４．２８ｍｇ／ｋｇ Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１ ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が４％（高活性）であり、６匹のマウスの内、５匹に部分的な退縮が認められたが、完全な退縮も、腫瘍を持たない生存動物も認められなかった。最低でも３５％の体重減少

（注射の２０日後に、本グループ内のすべての動物は、採水器の目詰まりが原因で、２０％を超える体重減少に至ったので、安楽死させなければならなかった）を起因とする本グループでの動物の欠員が故に、Ｔ－Ｃ、及び、ＬＣＫ値を算出できなかった。１００μｇ／ｋｇのＤＭ（８．５７ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が６％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が＞３８日であり、そして、ＬＣＫ値が＞２．９８（＋＋＋＋）であり、６匹のマウスの内、６匹に部分的な退縮が認められ、２匹に完全な退縮は認められ、また、２匹が腫瘍を持たない生存動物であった。ここに示したいずれの用量のｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、または、１００μｇ／ｋｇという最高用量のｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）では、有意な体重減少は認められなかったので、この研究では、両方のコンジュゲートが、マウスでは十分に忍容性であった。この試験の結果は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）コンジュゲートの両方が、用量依存的な抗腫瘍活性を示し、かつ、Ｈ１９７５非小細胞肺腺癌腫瘍異種移植モデルにおいて有効である、ことを示唆している。

【０４６９】

実施例２１

Ｈｓ　７４６Ｔヒト胃癌異種移植片を有するＳＣＩＤ　Ｎｕｄｅマウスにおける抗ＡＤＡＭ９抗体薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性

ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）コンジュゲートのＤＭペイロードの２５、５０、及び、１００μｇ／ｋｇの抗腫瘍活性を、ヒト胃癌異種移植モデルであるＨｓ　７４６Ｔ細胞を担持した雌のＳＣＩＤマウスで評価した。

【０４７０】

接種のためにＨｓ　７４６Ｔ細胞を集め、トリパンブルー排除によって１００％生存率を決定した。マウスに、5×10^{6}個のＨｓ　７４６Ｔ細胞を含む０．１ｍｌの無血清培地を、右後側の脇腹領域に、皮下注射で接種した。６０匹の雌のＣＢ．１７　ＳＣＩＤマウス（６週齢）を得た。入手でき次第、試験開始前に７日間、動物を観察した。動物は、到着時、または、治療前に、疾患または疾病の徴候を示さなかった。

【０４７１】

４２匹のマウスを、腫瘍体積によって、７グループ（６匹のマウス／グループ）に無作為に分けた。腫瘍体積は、６９．０９～１３６．７５（１０１．４０±１９．１６、平均±ＳＤ）mm^{3}の範囲であった。マウスを測定し、無作為に分け、そして、移植から１３日後（２０１８／７／１１）の腫瘍体積に基づいて投薬した。マウスの体重は、１８．０３～２３．２１（１９．６６±１．２１、平均±ＳＤ）グラムであった。それぞれのグループでのマウスは、パンチ法で特定した。試験薬剤、及び、ビヒクルの投与は、２７ゲージ、１／２インチ針を取り付けた１．０ｍｌのシリンジを用いて、静脈内で行った。抗体薬物コンジュゲート試験薬を、２５、５０、または、１００μｇ／ｋｇ　ＤＭペイロードで、ｑｄ×１投与を行い、このものは、ＤＡＲが約２．０のコンジュゲートでは、約２、４、及び、９ｍｇ／ｋｇの抗体（Ａｂ）となる。グループを以下のように分けた：ビヒクル（ＰＢＳ、２００μＬ）を投与する対照群、２．１８、４．３６、及び、８．７６ｍｇ／ｋｇのＡｂを含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、及び、２．１４、４．２８、及び、８．５７ｍｇ／ｋｇのＡｂを含むｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）。

【０４７２】

カリパスを用いて、１週間に２回、腫瘍サイズを三次元で測定した。体積＝長さ×幅×高さ×１／２の式を用いて、腫瘍体積を、mm^{3}で表した。マウスに関して、腫瘍体積が５０％以上減っていると、部分的な退縮（ＰＲ）とし、明確な腫瘍が認められないときに、完全な腫瘍退縮（ＣＲ）とし、そして、試験終了時に明確な腫瘍が無ければ、腫瘍を持

たない生存動物（ＴＦＳ）とする。腫瘍体積は、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。

【０４７３】

腫瘍成長阻害（％Ｔ／Ｃ）とは、所定の時間（例えば、対照腫瘍のメジアン腫瘍体積（ＴＶ）が、約１０００ｍｍ^{3}の最大腫瘍体積に達するまでの時間、つまり、マウスを安楽死させるまでの時間）での対照群（Ｃ）のメジアンＴＶに対する、治療群（Ｔ）のメジアンＴＶの比率である。％Ｔ／Ｃは、接種して２５日後に、対照群のメジアンＴＶが、１５３６ｍｍ^{3}に達したときに計算した。ＮＣＩ基準によると、Ｔ／Ｃ≦４２％は、抗腫瘍活性の最小レベルであり、また、Ｔ／Ｃ＜１０％は、高い抗腫瘍活性レベルと見なされる。腫瘍増殖遅延（Ｔ－Ｃ）とは、治療群（Ｔ）と対照群の腫瘍（Ｃ）が、所定のサイズの１０００ｍｍ^{3}に達するまでの時間のメジアン値（日数）の差のことである（腫瘍を持たない生存動物を除く）。腫瘍倍加時間（Ｔｄ）は、対照腫瘍成長の毎日のメジアン値の非線形指数曲線フィッティングから概算しており、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定する。Ｔｄは、３．３８日であり、Ｒ２＝０．９９１であった。Ｌｏｇ１０細胞死（ＬＣＫ）は、式ＬＣＫ＝（Ｔ－Ｃ）／Ｔｄ×３．３２を用いて計算するものであり、式中、３．３２は、細胞増殖のｌｏｇあたりの細胞倍加の数である。ＬＣＫに関するＳｏｕｔｈｅｒｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＳＲＩ）の活性基準は、＜０．７：－（不活性）、０．７～１．２：＋、１．３～１．９：＋＋、２．０～２．８：＋＋＋、＞２．８：＋＋＋＋（高活性）である。

【０４７４】

すべてのマウスの体重（ＢＷ）を、薬物毒性の大まかな指標として、週に２回測定を行い、そして、ＳｔｕｄｙＬｏｇソフトウェアで決定した。マウスの体重を、次の式：％ＢＷ変化＝［（ＢＷｐｏｓｔ／ＢＷｐｒｅ）－１］×１００、式中、ＢＷｐｏｓｔは、治療後の体重であり、及び、ＢＷｐｒｅは、治療前の開始時の体重である式でもってして、治療前の体重に基づいた体重の変化率として表した。体重減少（ＢＷＬ）の割合は、治療後の体重の平均変化として表した。腫瘍体積が１０００ｍｍ^{3}を超える、腫瘍が壊死する、マウスの当初の体重の２０％を超える体重の減少が認められる、または、試験のいずれかの時点でマウスが瀕死状態になれば、動物を安楽死させた。

【０４７５】

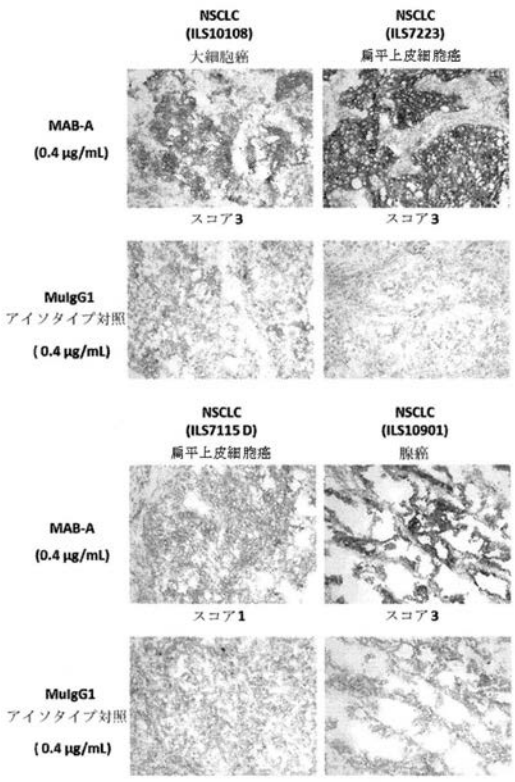
この試験の結果を、図１９に示す。ＬＤＬ－ＤＭ　ＡＤＣは、すべて、対応するＳＰＤＢ－ＤＭ４　ＡＤＣよりも活性であった。２５μｇ／ｋｇのＤＭ（２．１８ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が７７％（不活性）であり、Ｔ－Ｃ値が１日であり、そして、ＬＣＫ値が０．１２（－）であり、腫瘍の退縮は認められず、また、腫瘍を持たない生存動物もいなかった。５０μｇ／ｋｇのＤＭ（４．３６ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が６７％（不活性）であり、Ｔ－Ｃ値が３日であり、そして、ＬＣＫ値が０．２４（－）であり、腫瘍の退縮は認められず、また、腫瘍を持たない生存動物もいなかった。１００μｇ／ｋｇのＤＭ（８．７６ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が１２％（活性）であり、Ｔ－Ｃ値が１５日であり、そして、ＬＣＫ値が１．３５（＋＋）であり、６匹のマウスの内、１匹に部分的な退縮が認められたが、完全な退縮は認められず、また、腫瘍を持たない生存動物もいなかった。２５μｇ／ｋｇのＤＭ（２．１４ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が５８％（不活性）であり、Ｔ－Ｃ値が４日であり、そして、ＬＣＫ値が０．３３（－）であり、腫瘍の退縮は認められず、また、腫瘍を持たない生存動物もいなかった。５０μｇ／ｋｇのＤＭ（４．２８ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が２６％（活性）であり、Ｔ－Ｃ値が１２日であり、そして、ＬＣＫ値が１．０９（＋）であり、腫瘍の退縮は認められず、また、腫瘍を持たない生存動物もいなかった。１００μｇ／ｋｇのＤＭ（８．５７ｍｇ／ｋｇ　Ａｂ

）で投与したｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）は、Ｔ／Ｃ値が６％（高活性）であり、Ｔ－Ｃ値が２９日であり、そして、ＬＣＫ値が２．５９（＋＋＋）であり、６匹のマウスの内、４匹に部分的な退縮が認められたが、完全な退縮は認められず、また、腫瘍を持たない生存動物もいなかった。ここに示したいずれの用量のＡＤＣにも、有意な体重減少は認められなかったので、この研究では、６つのコンジュゲートすべてが、マウスでは十分に忍容性であった。この試験の結果は、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－ｓＳＰＤＢ－ＤＭ４（２．１　ＤＡＲ）、及び、ｈＭＡＢ－Ａ（２Ｉ．２）－Ｓ４４２Ｃ－Ｍａｌ－ＬＤＬ－ＤＭ（２．１　ＤＡＲ）コンジュゲートの両方が、用量依存的な抗腫瘍活性を示し、かつ、Ｈｓ　７４６Ｔ胃癌腫瘍異種移植モデルにおいて有効である、ことを示唆している。

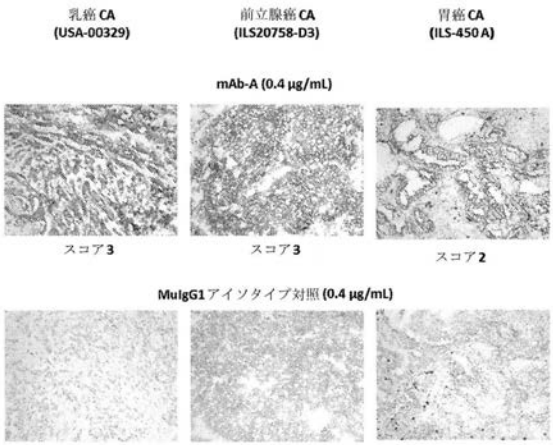
【０４７６】

本明細書に記載したあらゆる刊行物及び特許は、個々の刊行物または特許明細書が、具体的かつそれぞれに、全体的に本明細書に参照により組み込まれることが示されるのと同程度にまで、本明細書に参照により組み込まれる。本発明を、その特定の実施形態と組み合わせて説明してきたが、さらなる改変が可能であること、そして、本出願が、一般的に、本発明の原理に従って、本発明のあらゆる変形、使用、または、適応を含むことを意図しており、本開示からのそのような逸脱が、本発明が属する技術分野で周知であり、または、通常の実施の範囲内のものであり、そして、本明細書で既に示した本質的な特徴に適用し得るものである、ことが理解されよう。

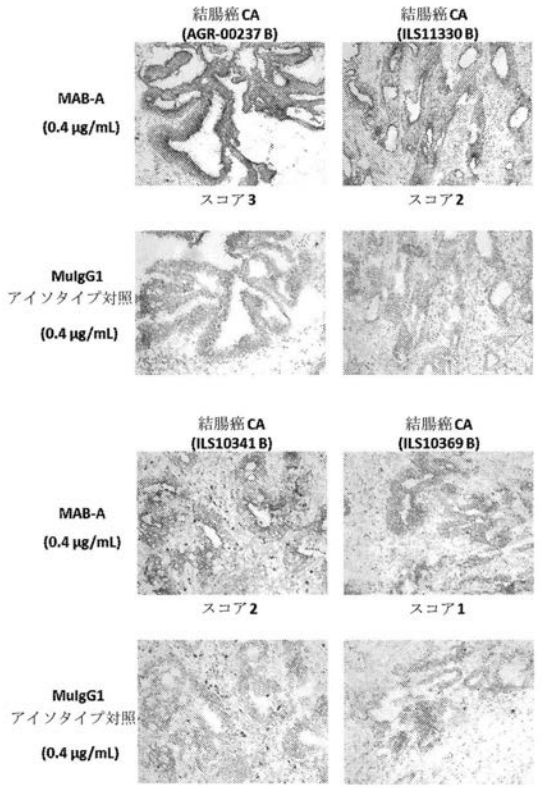
【図１Ａ】



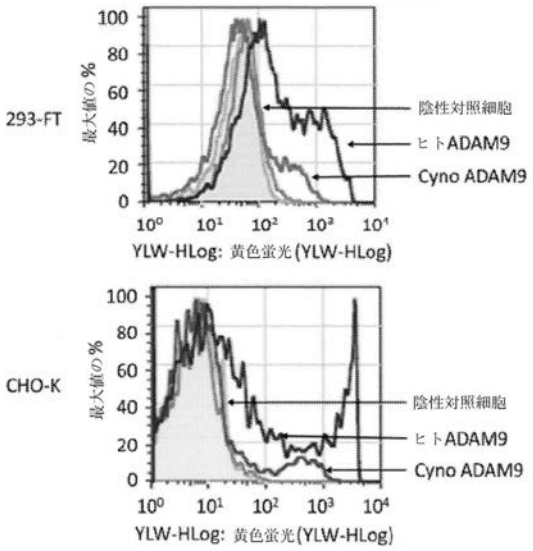
【図１Ｂ】



【図１Ｃ】



【図２】



【図３Ａ】

		FR1	CDR1
マウスMAB-A VH	配列番号7	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT SYWMH	
hMAB-A VH(1)	配列番号16	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(2)	配列番号17	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(3)	配列番号18	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(4)	配列番号19	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S ...I.	
hMAB-A VH(2B)	配列番号21	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(2C)	配列番号22	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(2D)	配列番号23	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	
hMAB-A VH(2I)	配列番号28	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	

FR2	CDR2	FR3
WVKQRPGQGLEWIG	EIIPINGHINYNEKFKS	KATLTLDKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCAR
..R.A..K....V.	.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....R.QG	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....R.QG	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....
..R.A..K....V.	.....F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....

CDR3	FR4
GGYYYYGSRDYFDY	WGQGTTLTVSS
.....	.....V....
.....	.....V....
.....	.....V....
.....	.....V....
.....IGKGVL..	.....V....
.....FRFGWL..	.....V....
.....TGKGVL..	.....V....
.....PRQGFL..	.....V....

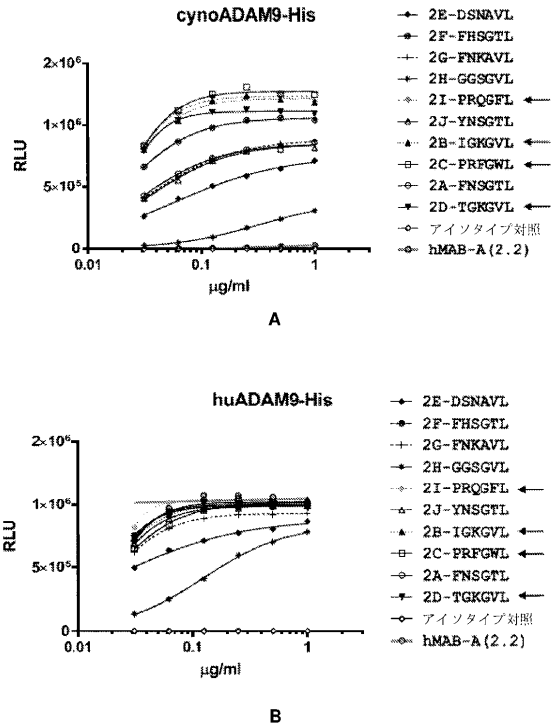
【図３Ｂ】

		FR1	CDR1
マウスMAB-A VL	配列番号11	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC KASQSVDYDGDSYMN	
hMAB-A VL(1)	配列番号54	...M....D.......E.....	
hMAB-A VL(2)	配列番号55	...M....D.......E..... .....S.....	
hMAB-A VL(3)	配列番号56	...M....D.......E..... R.....S.....	
hMAB-A VL(4)	配列番号57	...M....D.......E..... R.....S.....L.	

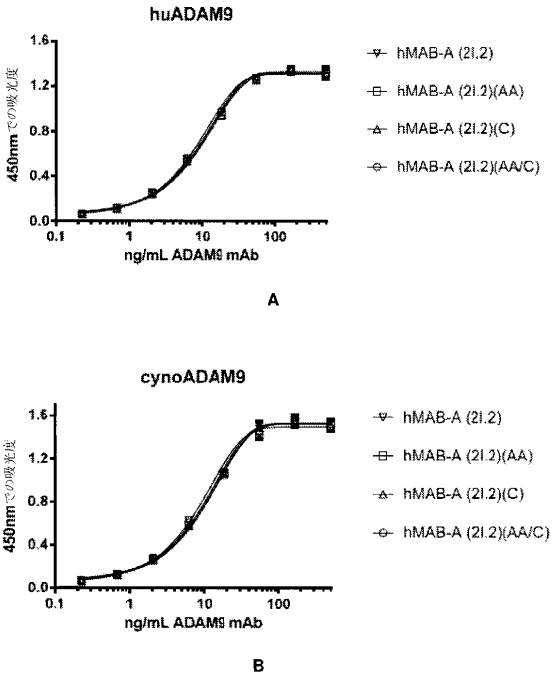
FR2	CDR2	FR3	CDR3
WYQQIPGQPPKLLIY	AASDLES	GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	QQSNEDPFT
....K.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	.....
....K.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	.....
....K.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	.....
....K.....	.....	.....T.SSL.P..F.....	...YST...

FR4
FGGGTKLEIK
.....
.....
.....
.....

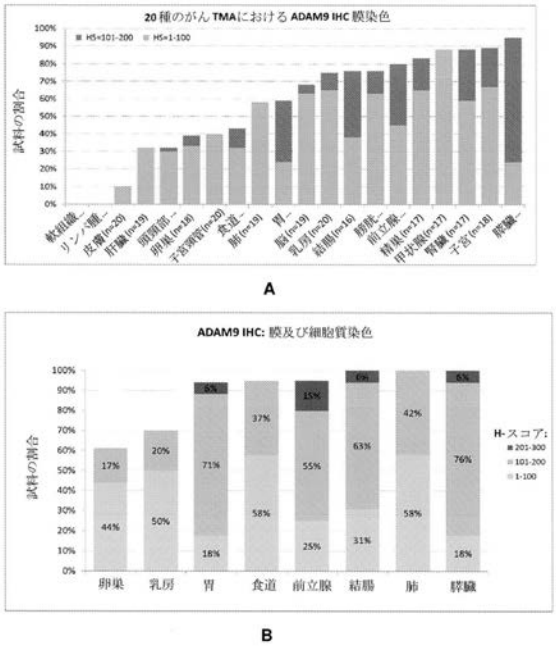
【図４】


cynoADAM9-His
RLU
μg/ml
2E-DSNAVL
2F-FHSGTL
2G-FNKAVL
2H-GGSGVL
2I-PRQGFL
2J-YNSGTL
2B-IGKGVL
2C-PRFGWL
2A-FNSGTL
2D-TGKGVL
アイソタイプ対照
hMAB-A(2.2)
A
huADAM9-His
RLU
μg/ml
2E-DSNAVL
2F-FHSGTL
2G-FNKAVL
2H-GGSGVL
2I-PRQGFL
2J-YNSGTL
2B-IGKGVL
2C-PRFGWL
2A-FNSGTL
2D-TGKGVL
アイソタイプ対照
hMAB-A(2.2)
B

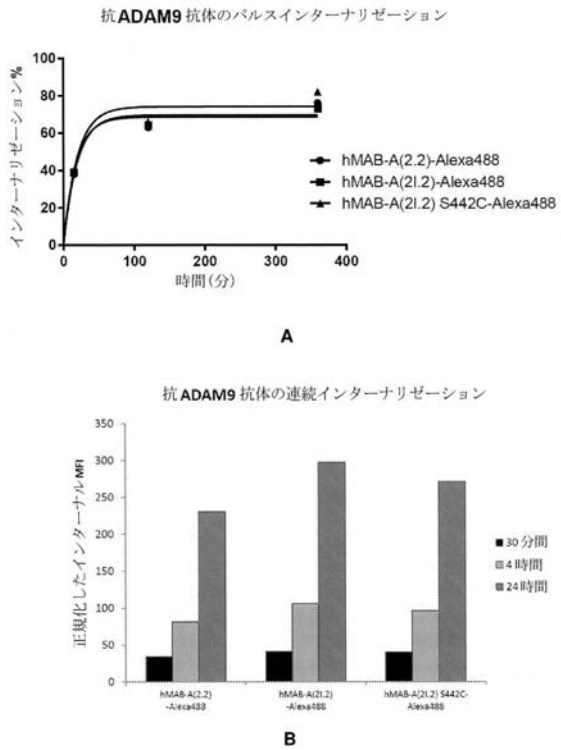
【図５】


huADAM9
450nmでの吸光度
ng/mL ADAM9 mAb
hMAB-A (2I.2)
hMAB-A (2I.2)(AA)
hMAB-A (2I.2)(C)
hMAB-A (2I.2)(AA/C)
A
cynoADAM9
450nmでの吸光度
ng/mL ADAM9 mAb
hMAB-A (2I.2)
hMAB-A (2I.2)(AA)
hMAB-A (2I.2)(C)
hMAB-A (2I.2)(AA/C)
B

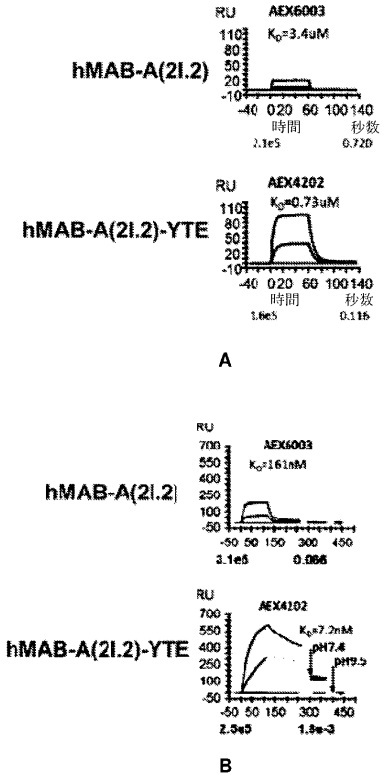
【図６】


20種のがんTMAにおけるADAM9 IHC膜染色
試料の割合
A
ADAM9 IHC: 膜及び細胞質染色
試料の割合
H-スコア:
卵巣
乳房
胃
食道
前立腺
結腸
肺
膵臓
B

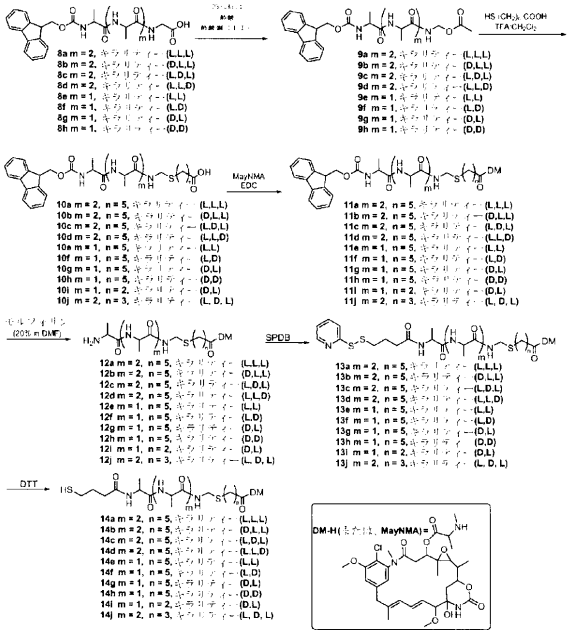
【図７】


抗ADAM9抗体のパルスインターナリゼーション
インターナリゼーション%
時間(分)
hMAB-A(2.2)-Alexa488
hMAB-A(2I.2)-Alexa488
hMAB-A(2I.2) S442C-Alexa488
A
抗ADAM9抗体の連続インターナリゼーション
正規化したインターナルMFI
30分間
4時間
24時間
B

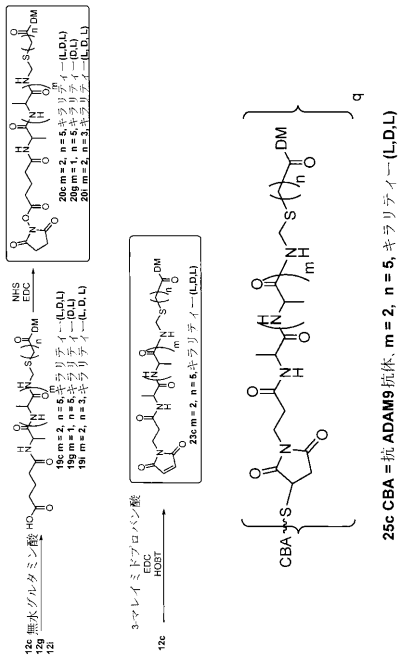
【図８】



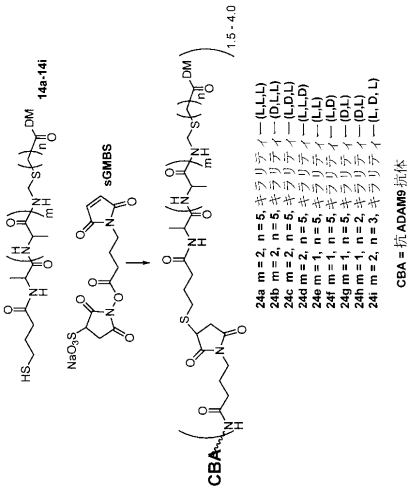
【図９Ａ】



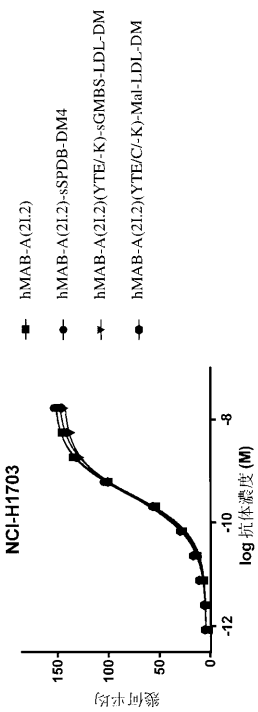
【図９Ｂ】



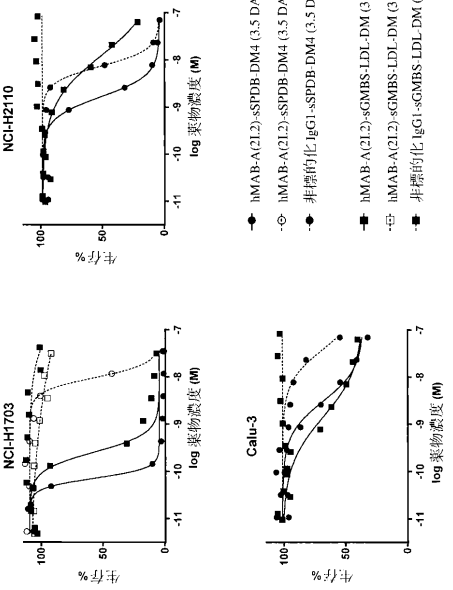
【図９Ｃ】



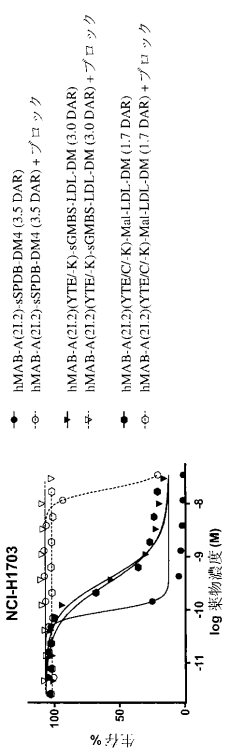
【図１０】



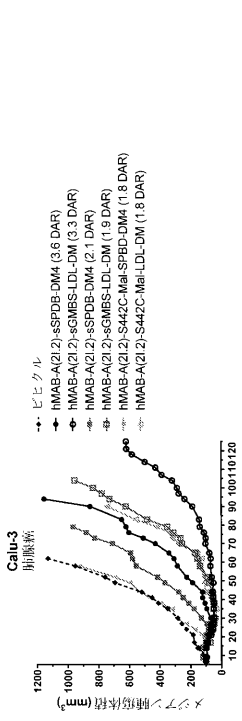
【図１１Ａ】



【図１１Ｂ】

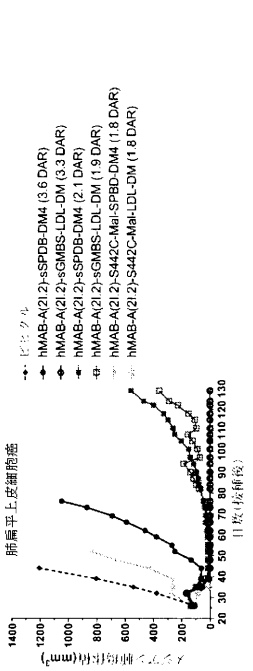


【図１２】



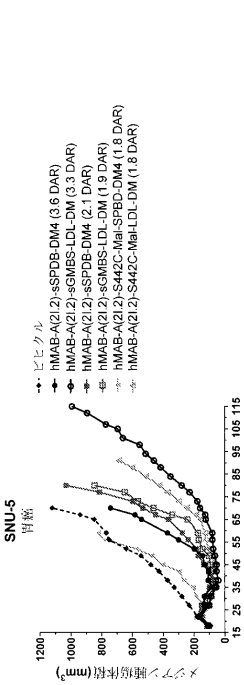
活性 (7日目に 50 μg/kg の DM)	%T/C (58日目)	% T/C 結果	T-C (日数)	LCK	LCK 結果	退縮 PR	退縮 CR	TFS
hMAB-A(2l.2)-sSPDB-DM4 (3.6 DAR)	30%	活性	34	6.7	++++	1/8	0/8	0/8
hMAB-A(2l.2) sGMBS-LDL-DM (3.3 DAR)	7%	高活性	>66	>13.0	++++	6/8	0/8	0/8
hMAB-A(2l.2)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	58%	不活性	20	4.0	++++	0/8	0/8	0/8
hMAB-A(2l.2)-sGMBS-LDL-DM (1.9 DAR)	15%	活性	47	9.2	++++	6/8	1/8	0/8
hMAB-A(2l.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (1.8 DAR)	97%	不活性	3	0.6	-	0/8	0/8	0/8
hMAB-A(2l.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	15%	活性	39	7.7	++++	6/8	2/8	0/8

【図１３】



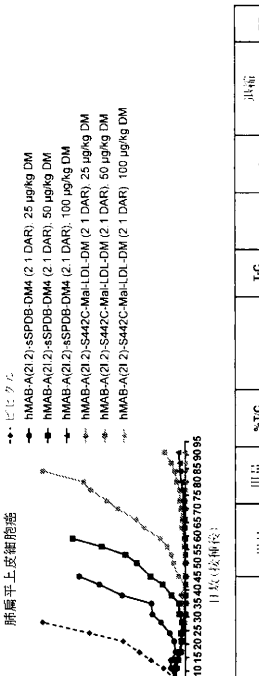
治療(7日目に 50 μg/kg の DM)	%T/C (44日目)	% T/C 結果	T-C (日数)	LCK	LCK 結果	退縮 PR	退縮 CR	TFS
hMAB-A(2l.2)-sSPDB-DM4 (3.6 DAR)	5%	感受性	32	1.3	++	3/6	1/6	1/6
hMAB-A(2l.2)-sGMBS-LDL-DM (3.3 DAR)	0%	感受性	>85	>3.4	++++	6/6	6/6	5/6
hMAB-A(2l.2)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	1%	感受性	>68	>2.6	+++	6/6	5/6	2/6
hMAB-A(2l.2)-sGMBS-LDL-DM (1.9 DAR)	1%	感受性	64	2.5	+++	6/6	5/6	1/6
hMAB-A(2l.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (1.8 DAR)	36%	感性	13	0.5		1/6	0/6	0/6
hMAB-A(2l.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	1%	感受性	38	1.5	++	6/6	5/6	4/6

【図１４】



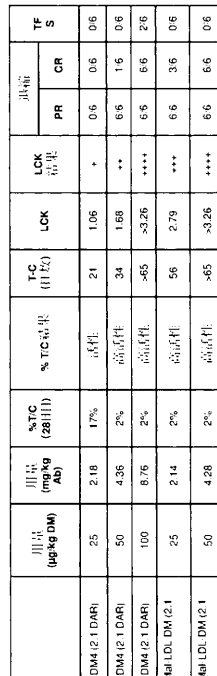
治療(7日目に 50 μg/kg の DM)	%T/C (70日目)	% T/C 結果	T-C (日数)	LCK	LCK 結果	退縮 PR	退縮 CR	TFS
hMAB-A(2l.2)-sSPDB-DM4 (3.6 DAR)	66%	不活性	0	0.0	-	2/6	0/6	0/6
hMAB-A(2l.2)-sGMBS-LDL-DM (3.3 DAR)	14%	活性	45	0.7	+	4/6	1/6	1/6
hMAB-A(2l.2)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	47%	不活性	10	0.2	-	1/6	1/6	1/6
hMAB-A(2l.2)-sGMBS-LDL-DM (1.9 DAR)	41%	活性	10	0.2	-	2/6	1/6	1/6
hMAB-A(2l.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (1.8 DAR)	10.7%	不活性	-11	-0.2	-	1/6	1/6	1/6
hMAB-A(2l.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	22%	活性	28	0.4	-	2/6	1/6	1/6

【図１５】



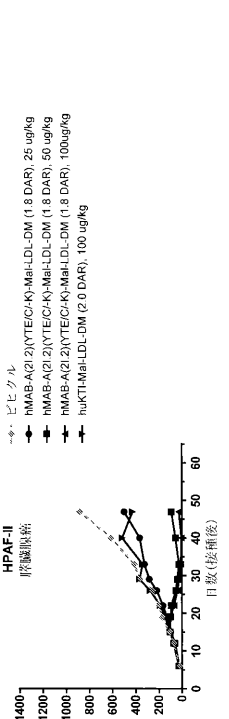
治療	用量 (μg/kg DM)	用量 (mg/kg Ab)	%T/C (28日目)	% T/C 結果	T-C (日数)	LCK	LCK 結果	退縮 PR	退縮 CR	TFS
huMAB A(2l.1) sSPDB DM4 (2.1 DAR)	25	2.18	17%	活性	21	1.06	+	0/6	0/6	0/6
huMAB A(2l.1) sSPDB DM4 (2.1 DAR)	50	4.36	2%	感受性	34	1.68	++	6/6	1/6	0/6
huMAB A(2l.1) sSPDB DM4 (2.1 DAR)	100	8.76	2%	感受性	>65	>3.26	++++	6/6	6/6	2/6
huMAB A(2l.1) S442C Mal LDL DM (2.1 DAR)	25	2.14	2%	感受性	56	2.79	+++	6/6	3/6	0/6
huMAB A(2l.1) S442C Mal LDL DM (2.1 DAR)	50	4.28	2%	感受性	>65	>3.26	++++	6/6	6/6	0/6
huMAB A(2l.1) S442C Mal LDL DM (2.1 DAR)	100	8.57	1%	感受性	>65	>3.26	++++	6/6	6/6	6/6

【図１６】



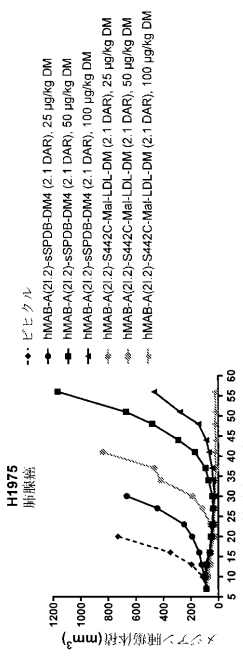
治療	用量 (μg/kg DM)	用量 (mg/kg Ab)	%T/C (56日目)	% T/C 結果	退縮 PR	退縮 CR	TFS
hMAB-A(2l.2)(YTE/C-K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	25	2.18	51	不活性	1/8	0/8	0/8
hMAB-A(2l.2)(YTE/C-K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	50	4.36	15	活性	5/8	2/8	2/8
hMAB-A(2l.2)(YTE/C-K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	100	8.57	1	感活性	8/8	7/8	7/8
huKTI-Mal-LDL-DM (2.0 DAR)	100	8.57	93	不活性	0/8	0/8	0/8

【図１７】



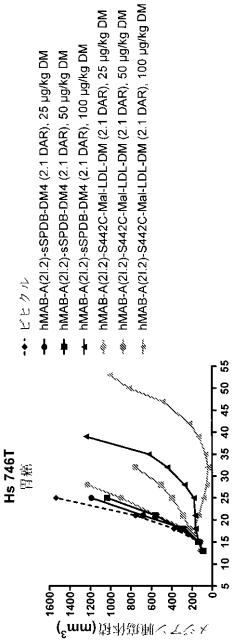
治療	用量 (μg/kg DM)	用量 (mg/kg Ab)	%T/C (47日目)	% T/C 結果	退縮 PR	退縮 CR	TFS
hMAB-A(2l.2)(YTE/C-/K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	25	2.18	56	不活性	0/7	0/7	0/7
hMAB-A(2l.2)(YTE/C-/K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	50	4.36	11	活性	5/7	1/7	1/7
hMAB-A(2l.2)(YTE/C-/K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	100	8.57	3	高活性	7/7	3/7	3/7
huKTI-Mal-LDL-DM (2.0 DAR)	100	8.57	48	不活性	0/7	0/7	0/7

【図１８】



治療	用量 (μg/kg DM)	用量 (mg/kg Ab)	%T/C (20日目)	% T/C 結果	T-C (日数)	LCK	LCK 結果	退縮 PR	退縮 CR	TFS
huMAB-A(2l.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	25	2.18	29%	活性	10	0.79	+	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2l.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	50	4.36	8%	高活性	35	2.72	+++	5/6	1/6	0/6
huMAB-A(2l.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	100	8.78	7%	高活性	>38	>2.08	++++	6/6	0/6	0/6
huMAB-A(2l.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	25	2.14	8%	高活性	ND	ND	ND	4/6	1/6	0/6
huMAB-A(2l.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	50	4.28	4%	高活性	ND	ND	ND	5/6	0/6	0/6
huMAB-A(2l.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	100	8.57	6%	高活性	>38	>2.98	++++	6/6	2/6	2/6

【図１９】



治療	用量 (μg/kg DM)	用量 (mg/kg Ab)	%T/C (25日目)	% T/C 結果	T-C (日数)	LCK	LCK 結果	退縮 PR	退縮 CR	TFS
hMAB-A(2l.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	25	2.18	77%	不活性	1	0.12	-	0/6	0/6	0/6
hMAB-A(2l.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	50	4.36	67%	不活性	3	0.24	-	0/6	0/6	0/6
hMAB-A(2l.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	100	8.78	12%	活性	15	1.35	++	1/6	0/6	0/6
huMAB-A(2l.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	25	2.14	58%	不活性	4	0.33	-	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2l.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	50	4.28	25%	活性	12	1.09	+	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2l.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	100	8.57	6%	高活性	29	2.59	+++	4/6	0/6	0/6

【配列表】
2021528471000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/038992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61P35/00 C07K16/40 A61K47/68 A61K39/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KYOJI TSUCHIKAMA ET AL: "Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries", PROTEIN & CELL, vol. 9, no. 1, 14 October 2016 (2016-10-14), pages 33-46, XP055461467, Beijing, CN ISSN: 1674-800X, DOI: 10.1007/s13238-016-0323-0 e.g. figure 1, 2, 8; table 1; the whole document ----- -/--	1-47

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 September 2019	07/10/2019

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gruber, Andreas

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/038992

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STUART W HICKS ET AL: "Abstract 37: Novel antibody-drug conjugates targeting ADAM9-expressing solid tumors demonstrate potent preclinical activity ¦ Cancer Research", PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING 2017, vol. 77, no. 13 Suppl, 1 July 2017 (2017-07-01), XP055464261, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-37 the whole document	1-47
Y	STUART W HICKS ET AL: "Abstract 38: Target validation, antibody discovery and preclinical data supporting ADAM9 as an antibody-drug conjugate therapeutic target for solid tumors ¦ Cancer Research", PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING 2017, vol. 77, no. 13 Suppl, 1 July 2017 (2017-07-01), XP055464262, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-38 the whole document	1-47
X,P	WO 2018/119196 A1 (IMMUNOGEN INC [US]; MACROGENICS INC [US]) 28 June 2018 (2018-06-28) e.g. claims 1-115; the whole document	1-47

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2019/038992

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018119196 A1	28-06-2018	CN 110267685 A	20-09-2019
		TW 201822821 A	01-07-2018
		WO 2018119196 A1	28-06-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	FI		テーマコード（参考）
	Ａ６１Ｋ　39/395	Ｔ	
	Ａ６１Ｐ　35/02		

(31)優先権主張番号　62/810,703
(32)優先日　平成31年2月26日(2019.2.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ
２．ＣｏｍｂｉＦｌａｓｈ

(74)代理人　100196508
弁理士　松尾　淳一
(74)代理人　100187540
弁理士　國枝　由紀子
(72)発明者　ヒックス，スチュアート・ウィリアム
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１８４５，ノース・アンドーバー，マサチューセッツ・アベニュー　４１５
(72)発明者　ヨーダー，ニコラス・シー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４４６，ブルックライン，エグモント・ストリート　２０，ナンバー　６
(72)発明者　バラット，バスワティ
アメリカ合衆国メリーランド州２０８５５，ダーウッド，ビリスカ・テラス　１５５０４
(72)発明者　ボンビニ，エツィオ
アメリカ合衆国メリーランド州２０８５４，ポトマック，パウダー・ホーン・ドライブ　１１１３６
(72)発明者　ディードリッヒ，グンド
アメリカ合衆国メリーランド州２０８７８，ノース・ポトマック，ボニー・デイル・ドライブ　１３４０９
(72)発明者　ジョンソン，レスリー・エス
アメリカ合衆国メリーランド州２０８７４，ダーンズタウン，ポプラー・ヒル・ロード　１４４１１
(72)発明者　ルー，デリック
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４００２，ベルモント，パイン・ノール・ドライブ　１５０９
(72)発明者　スクリブナー，ジュニパー・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４０１０，バーリンゲーム，オーク・グローブ・アベニュー　１２１７，アパートメント・ナンバー・４

Ｆターム(参考) 4C076 CC27 EE59

4C085 AA26 BB11
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA72 CA42 DA76 EA28 FA51 FA52
FA74