

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-529726

(P2022-529726A)

(43)公表日 令和4年6月23日(2022.6.23)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/32 (2006.01)	C 0 7 K 16/32	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全87頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-562911(P2021-562911)	(71)出願人	518445159
(86)(22)出願日	令和2年4月23日(2020.4.23)		マジエンタ セラピューティクス インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和3年12月3日(2021.12.3)		M A G E N T A T H E R A P E U T I C S , I N C .
(86)国際出願番号	PCT/US2020/029648		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139 ケンブリッジ テクノロジースクエア 100 フィフス フロア
(87)国際公開番号	WO2020/219770	(74)代理人	100147485
(87)国際公開日	令和2年10月29日(2020.10.29)		弁理士 杉村 憲司
(31)優先権主張番号	62/838,264	(74)代理人	230118913
(32)優先日	平成31年4月24日(2019.4.24)		弁護士 杉村 光嗣
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100167623
(31)優先権主張番号	62/841,733		弁理士 塚中 哲雄
(32)優先日	令和1年5月1日(2019.5.1)	(72)発明者	ラーフル パルチョウデュリー
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		最終頁に続く
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ANTI - CD117とその使用

(57)【要約】

本開示は、CD117+細胞の欠乏、および各種造血器疾患、代謝障害、癌、例えば急性骨髄性白血病(AML)および自己免疫疾患の治療に有用な成分および方法を提供する。ここに記載されているのは、例えば、ヒトのような患者においてCD117+細胞の集団を減少させることによって、これらの条件の治療に適用することができる抗体、抗原結合フラグメントおよびそれらの複合体である。本開示に記載されている成分及び方法は、たとえばCD117+癌細胞または自己感染細胞の集団を減少させることによって、障害を直接治療するために使用することができる。本開示に記載された成分及び方法は、また、患者の造血幹細胞移植治療の準備に使用され、移植手順の前に内在する造血幹細胞を選択的に欠乏させることにより、造血幹細胞の生着を改善するために使用することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、またはK129のうち少なくとも2つをヒトCD117に結合する単独の抗CD117抗原結合断片。

【請求項 2】

SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも3つに結合する請求項1の単離された抗CD117抗原、又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも4つに結合する請求項1の単離された抗CD117抗原、又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも5つに結合する請求項1の単離された抗CD117抗原、又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも6個と結合する請求項1の単離された抗CD117抗原、又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも7個と結合する請求項1の単離された抗CD117抗原、又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の各々に結合する請求項1の単離された抗CD117抗原、又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

SEQ ID NO: 2と約95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 6と約95%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでいる先行請求項のいずれかの1つである抗CD117抗原結合断片である単離された抗CD117抗原、又はその抗原結合断片。

【請求項 9】

SEQ ID NO: 2と少なくとも96%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 6と少なくとも96%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含んでいる先行請求項のいずれかの1つである抗CD117抗原、又はその抗原結合フラグメントである単離された抗CD117抗原、又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

SEQ ID NO: 2と約97%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 6と約97%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでいる先行請求項のいずれかの1つである抗CD117抗原結合断片である単離された抗CD117抗原、又はその抗原結合断片。

【請求項 11】

SEQ ID NO: 2と約99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 6と約99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでいる先行請求項のいずれかの1つである抗CD117抗原結合断片である単離された抗CD117抗原、又はその抗原結合断片。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:1の少なくともアミノ酸67-83および114-129内の残留物を有するエピトープに結合するCD117に結合することができる単独の抗CD117-CD117、またはそれらの抗原結合フラグメント。

【請求項13】

SEQ ID NO:1のCD117の2、3、4、5、6、7またはすべてのアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129からなるCD117のエピトープに結合するCD117を結合することができる単独の抗CD117。

【請求項14】

抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号2および配列番号6に記載のCDRまたは可変領域を含まない、請求項1～13のいずれか一項記載の抗体。

10

【請求項15】

抗CD117抗原、又はその抗原結合フラグメントが敵対的である、請求項1-14のいずれかの抗原。

【請求項16】

SEQ ID NO:1に記載されているCD117のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、またはK129の以下のアミノ酸残基のうち少なくとも2つと結合し、CD117の生物活動をブロックまたは抑制する単離された抗CD117(CD117に結合した場合、その抗原結合フラグメント)を含む医薬品組成物。

【請求項17】

SEQ ID NO:1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の少なくとも3つに結合し、CD117の生物活動をブロックまたは抑制するクレーム16の医薬品組成、すなわち抗原結合フラグメント。

20

【請求項18】

SEQ ID NO:1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の少なくとも4つに結合し、CD117の生物活動をブロックまたは抑制するクレーム16の医薬品組成、すなわち抗原結合フラグメント。

【請求項19】

SEQ ID NO:1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、またはK129の少なくとも5つに結合し、CD117の生物活動をブロックまたは抑制するクレーム16の医薬品組成、すなわち抗原結合フラグメント。

30

【請求項20】

SEQ ID NO:1に記載されているCD117のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の以下のアミノ酸残基のうち少なくとも6つと結合し、CD117の生物活動をブロックまたは抑制するクレーム16の医薬品組成、すなわち抗原結合フラグメント。

【請求項21】

SEQ ID NO:1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の少なくとも7個と結合し、CD117の生物活動をブロックまたは抑制するクレーム16の医薬品組成、すなわち抗原結合フラグメント。

【請求項22】

40

SEQ ID NO:1に記載されているCD117のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の各アミノ酸残基に結合し、CD117の生物活動をブロックまたは抑制するクレーム16の医薬品組成、すなわち抗原結合フラグメント。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本出願は、米国仮出願No.62/838,264を2019年4月24日に出願し、米国仮出願No.62/841,733を2019年5月1日に出願し、優先権を主張する。上記の優先出願の各々の含有量は、援用として組み込まれている。

【0002】

50

[配列リスト]

このインスタントアプリケーションは、ASCII形式で電子的に提出され、ここにその全体として参考文献に組み込まれた配列リストが含まれる。2020年4月20日に作成されたASCIIコピーは、M103034_2150WO_SL.txtと名付けられ、サイズが186,529バイトであることを伝えた。

【技術分野】**【0003】**

本開示は、抗CD117の抗抗CD、抗毒薬(ADC)、およびそれらの抗原結合フラグメント、ならびに、血液細胞のような血液細胞によって表現される抗原を結合することが可能な、抗毒薬(ADC)の投与により、血液疾患、代謝障害、ガン、および自己感染症のような様々な病理に苦しむ患者を治療する方法に関するものである。

10

【背景技術】**【0004】**

医学技術の進歩にもかかわらず、特に特定の血球の疾患、代謝障害、癌、および自己免疫状態などの造血系の病理を治療する要求が依然として存在する。造血幹細胞は重大な治療可能性を有する一方で、診療所での使用を妨げている限界は、宿主における造血幹細胞移植の確実な生着に伴う困難であった。

移植後、これらの細胞の多能性と造血機能を患者に保持するように、外生的な造血幹細胞グラフトを促進するための条件剤として使用できる比の内生幹細胞を標的とする組成物が現在必要である。

20

CD117(c-kitまたはStem Cell Factor Receptor (SCRF)とも呼ばれる)は、リガンドであるStem Cell Factor (SCF)と結合する1回膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼである。SCFは、PI3 AKTとMAPK経路(Kindblomら、Am J. Path. 1998 152(5):1259)の両方を通してチロシンキナーゼ活動と信号を活性化するcKITの二元化を誘発する。

【0005】

CD117はオンコジーンとして最初に発見され、オンコロジーの分野で研究されている(例えばStankovら(2014) Curr Pharm Des 20(17):2849-80を参照)。CD117に対する抗体薬物結合体(KTN158)は、現在、難治性消化管間質腫瘍(GIST)の治療のために検討されている(例えば、「ヒト化抗KITモノクローナル抗体、KTN0158」は、正常および悪性の両方のイヌ肥満細胞に対して生物学的活性を示す、Londonら(2016) Clin Cancer Res DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2152)。

30

CD117は造血幹細胞(HSC)に高発現している。この発現パターンは、CD117を幅広い病気の条件付けの潜在的な標的とする。しかしながら、骨髄移植のような移植のための患者のコンディショニングに有効な抗CD117ベースの治療が依然として必要である。

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

ここに記載されているのは、ヒトCD117(c-kitとしても知られている)を特に結合する抗原結合部、並びに当該抗生物質を使用する組成及び方法である。特に、ここに記載されている抗物質及び断片は、抗CD117(抗CD117)抗たん薬の共役剤(ADCs)に使用することができる。

40

【0007】

一実施形態では、本開示は、とりわけ数学系の様々な障害、代謝障害、ガン、及び自己感染症の直接的な治療のための組成物及び方法を提供する。本開示は、さらに、血液細胞生着の生着を促進するために、血液細胞移植治療を受ける前に、患者、例えば、人の患者のコンディショニングのための方法を特徴とする。患者は、異常ヘモグロビン症または他の造血病理のような1つまたは複数の血液疾患に罹患しており、したがって造血幹細胞移植を必要とするものであり得る。本稿で述べるように、血液型細胞は、血液型学的血統において多数の細胞型に分化することができ、また、患者に不足している細胞型を移住または

50

再定着させるために、患者に施術することができる。本開示は、血液障害、代謝病、ガン、自己感染症のような病気を、(i)本書に記載されている中で、CD117(例えば、GNK+CD117を含む)のような、血液細胞によって表現されるタンパク質を結合することができる、抗生物質及び薬物の上記体(ADCs)により、治療する方法を特徴とする。したがって、(i)異常な血球、ガン、細胞又は自己感染細胞のようなCD117を表現する細胞の集団を、選択的に減少させることにより、他(ii)患者内の内生の血液細胞の集団を減少させることにより、直接治療することができる。前者の活性は、CD117が、他の細胞型の中でも、白血病細胞、自己抗原と交差反応するT細胞レセプターを発現するT細胞のような自己免疫性リンパ球のような癌性細胞によって発現され得るので、造血系の細胞に関連する広範囲の障害の直接的な処理を可能にする。後者の活性、すなわち造血幹細胞の選択的枯渇は、次いで、外因性(例えば、自家、同種、または同系)造血幹細胞移植によって埋めることができる空洞を作り出す。したがって、本開示は、特に、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ファンコニ貧血、ヴィスコット-オールドリッチ症候群、アデノシンデアミナーゼ欠損-重度複合免疫不全症、異染性白質ジストロフィー、ダイヤモンド-ブラックファン貧血およびシュワックスマン-ダイヤモンド症候群、ヒト免疫不全ウイルス感染、および後天性免疫不全症候群などの種々の造血状態、ならびに癌および自己免疫疾患を治療する方法を提供する。

10

【0008】

1つの側面において、本開示は、分離された抗CD117検出法、すなわち抗原結合フラグメントを提供し、これは、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129のうち少なくとも2つに結合する。1つの実施形態において、分離された抗CD117抗原結合断片は、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の少なくとも3つに結合する。別の実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片が、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の少なくとも4つに結合する。1つの実施形態において、分離された抗CD117抗原結合断片は、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の少なくとも5つに結合する。1つの実施形態において、分離された抗CD117抗原結合断片は、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の少なくとも6つに結合する。1つの実施形態において、分離された抗CD117抗原結合断片は、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の少なくとも7個に結合する。1つの実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片が、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、およびK129の各々に結合する。

20

30

【0009】

一実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号2と約80%同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号6と約80%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。別の実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号2と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号6と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。一実施の形態では、分離された抗CD117抗原結合断片は、SEQ ID NO: 2と約85%同一のアミノ酸配列を同一重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 6と約85%同一のアミノ酸配列を同一軽鎖可変領域を含む。別の実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号2と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号6と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。一実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号2と約90%同一であるアミノ酸配列

40

50

を有する重鎖可変領域と、配列番号6と約90%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。別の実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号2と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号6と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。一実施の形態では、分離された抗CD117抗原結合断片は、SEQ ID NO: 2と約95%同一のアミノ酸配列を同一重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 6と約95%同一のアミノ酸配列を同一軽鎖可変領域を含む。別の実施の形態では、分離された抗CD117検出法又はその抗原結合フラグメントは、SEQ ID NO: 2と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 6と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含んでいる。一実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号2と約96%同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号6と約96%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。別の実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号2と少なくとも96%同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号6と少なくとも96%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。一実施の形態では、分離された抗CD117抗原結合断片は、SEQ ID NO: 2と約97%同一のアミノ酸配列を同一重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 6と約97%同一のアミノ酸配列を同一軽鎖可変領域を含む。別の実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号2と少なくとも97%同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号6と少なくとも97%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。一実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号2と約98%同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号6と約98%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。別の実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号2と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号6と少なくとも98%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。一実施の形態では、分離された抗CD117抗原結合断片は、SEQ ID NO: 2と約99%同一のアミノ酸配列を同一重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 6と約99%同一のアミノ酸配列を同一軽鎖可変領域を含む。別の実施の形態では、分離された抗CD117検出法又はその抗原結合フラグメントは、SEQ ID NO: 2と少なくとも99%同一のアミノ酸配列を同一重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 6と少なくとも99%同一のアミノ酸配列を同一軽鎖可変領域を含む。

【0010】

別の側面において、本開示は、SEQ ID NO: 1のCD117のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、およびK129のうち、少なくとも2、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、またはすべてのアミノ酸残留物で構成されるCD117に結合することができる、抗原結合フラグメントに関するものである。

【0011】

1つの側面において、本開示は、SEQ ID NO: 1の少なくともアミノ酸67-83および114-129内のアミノ酸残基を有するエピトープに結合するCD117に結合することができる、分離された抗CD117抗体、又はそれらの抗原結合フラグメントを提供する。

別の態様では、本開示は、配列番号1のCD117のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、およびK129のうちの2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、またはすべてを含むCD117中のエピトープに結合するCD117を結合することができる、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0012】

特定の実施例では、抗CD117の、又はその抗原結合断片は、CDRあるいはSEQ ID No: 2及びSEQ ID No: 6に記載されている様々な領域を含んでいない。別の実施形態では、抗CD117の、又はその抗原結合断片は、CDRあるいはSEQ ID No: 22及びSEQ ID No: 26に記載された可変領域を含んでいない。特定の実施例では、抗CD117の、又はその抗原結合断片は、CDRあるいはSEQ ID No: 30及びSEQ ID No: 31に記載された様々な領

【 0 0 1 3 】

別の態様において、本開示は、単離された抗CD117抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物を提供し、ここで、CD117に結合した場合、抗体、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1に列挙されるCD117の以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、またはK129のうちの少なくとも2つに結合し、CD117の生物学的活性をブロックまたは阻害する。一実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1に列挙されるCD117の以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の少なくとも3つに結合し、CD117の生物学的活性をブロックまたは阻害する。別の実施形態では、その、すなわち抗原結合フラグメントが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の少なくとも4つに結合し、CD117の生物活動をブロックまたは抑制する。いくつかの実施例では、その、又は抗原結合フラグメントが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも5つに結合し、CD117の生物学的活動をブロック又は抑制する。別の実施形態では、その、すなわち抗原結合フラグメントが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129の少なくとも6つに結合し、CD117の生物活動をブロックまたは抑制する。更に別の実施形態では、当該抗原結合フラグメントは、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119又はK129の少なくとも7個に結合し、CD117の生物活動をブロック又は抑制する。他の実施形態では、その抗原結合フラグメントが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、およびK129の各々に結合し、CD117の生物活動をブロックまたは抑制する。

10

20

【 0 0 1 4 】

1つの側面において、本開示は、SEQ ID NO: 7に記載されている以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、T114、T119又はK127のうち少なくとも2つのヒトCD117に結合する、SEQ ID NO: 3に記載されているアミノ酸配列を含むCDR1領域、及びSEQ ID NO: 7に記載されているアミノ酸配列を含むCDR2領域、並びにSEQ ID NO: 7に記載されているアミノ酸配列を含むCDR1領域、SEQ ID NO: 9に示されているアミノ酸の配列を含むライト重鎖可変領域を有していない。一実施形態において、単離された抗CD117抗体、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1に記載のCD117の次のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、またはK129の少なくとも3つに結合し、ここで、単離された抗CD117抗体、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号3に記載のアミノ酸配列を含むCDR1ドメイン、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むCDR2ドメイン、および配列番号5に記載のアミノ酸配列を含むCDR3ドメイン、ならびに配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むCDR1ドメインを含む軽鎖可変領域、配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むCDR2ドメイン、および配列番号9に記載のアミノ酸配列を含むCDR3ドメインを含んでいない。別の実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合断片は、配列番号1に記載されたCD117の以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、またはK129に結合し、ここで、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合断片は、配列番号3に記載されたアミノ酸配列を含むCDR1ドメインと、配列番号4に記載されたアミノ酸配列を含むCDR2ドメインと、配列番号5に記載されたアミノ酸配列を含むCDR3ドメインと、配列番号7に記載されたアミノ酸配列を含むCDR1ドメインと、配列番号8に記載されたアミノ酸配列を含むCDR2ドメインと、配列番号9に記載されたアミノ酸配列を含むCDR3ドメインとの少なくとも4つの重鎖可変領域を有さない。単離された抗CD117抗体またはその抗原結合断片は、配列番号1に記載されたCD117の少なくとも5つのアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、またはK129に結合し、ここで、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合断片は、配列番号3に記載されたアミノ酸配列を含むCDR1ドメイン

30

40

50

、配列番号4に記載されたアミノ酸配列を含むCDR2ドメイン、および配列番号5に記載されたアミノ酸配列を含むCDR3ドメイン、配列番号7に記載されたアミノ酸配列を含むCDR1ドメイン、配列番号8に記載されたアミノ酸配列を含むCDR2ドメイン、および配列番号9に記載されたアミノ酸配列を含むCDR3ドメインを含まない。CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1に記載のCD117の少なくとも6つのアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129に結合するが、ここで、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号3に記載のアミノ酸配列を含むCDR1ドメイン、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むCDR2ドメイン、および配列番号5に記載のアミノ酸配列を含むCDR3ドメイン、配列番号7に記載のアミノ酸配列を含むCDR1ドメイン、配列番号8に記載のアミノ酸配列を含むCDR2ドメイン、および配列番号9に記載のアミノ酸配列を含むCDR3ドメインを含まない。一実施形態では、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1に記載されたCD117の少なくとも7つのアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119またはK129に結合し、ここで、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号3に記載されたアミノ酸配列を含むCDR1ドメイン、配列番号4に記載されたアミノ酸配列を含むCDR2ドメイン、および配列番号5に記載されたアミノ酸配列を含むCDR3ドメイン、配列番号7に記載されたアミノ酸配列を含むCDR1ドメイン、配列番号8に記載されたアミノ酸配列を含むCDR2ドメイン、および配列番号9に記載されたアミノ酸配列を含むCDR3ドメインを含まない。一実施形態において、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1に記載されたCD117の以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、およびK129に結合する。ここで、単離された抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号3に記載されたアミノ酸配列を含むCDR1ドメイン、配列番号4に記載されたアミノ酸配列を含むCDR2ドメイン、および配列番号5に記載されたアミノ酸配列を含むCDR3ドメイン、配列番号7に記載されたアミノ酸配列を含むCDR1ドメイン、配列番号8に記載されたアミノ酸配列を含むCDR2ドメイン、および配列番号9に記載されたアミノ酸配列を含むCDR3ドメインを含まない。

10

20

30

40

50

【0015】

1つの側面において、本開示は、ヒトCD117に結合する単独の抗CD117型、すなわち抗原結合フラグメントを提供する。これは、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129のうち少なくとも2つに結合する。これは、単離された抗CD117型抗原結合フラグメントであり、SEQ ID NO: 2に記載されているようなアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、並びにSEQ ID NO: 6に記載されているようなアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を持たない。

【0016】

別の態様では、本開示は、隔離された抗CD117ボディ、またはその抗結合フラグメント、または抗CD117 ADCの有効量を患者に投与することによって、ヒトの血球幹細胞移植が必要な患者においてCD117+細胞集団を消耗させる方法を提供する。ここに、隔離された抗CD117ボディ、またはその抗結合フラグメント、または抗CD117 ADCは、ヒトCD117に結合し、以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、またはSEQ ID NO: 1に記載されたCD117のK129のうちの少なくとも2つを結合する、抗原結合フラグメント、または抗原結合フラグメントを含む。1つの実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又はその抗CD117 ADCが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも3つに結合する。別の実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又はその抗CD117 ADCが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも4個と結合する。1つの実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又はその抗CD117 ADCが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも5個に結

合する。1つの実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又はその抗CD117 ADCが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも6個と結合する。1つの実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又はその抗CD117 ADCが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも7個に結合する。1つの実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又はその抗CD117 ADCが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119及びK129の各々に結合する。

【0017】

別の側面において、本開示は、構成する方法を提供する。 単離された抗CD117の抗CD117の断片、又はその抗原結合の断片、又はそれらの抗CD117の断片を、ヒトのCD117に結合する抗CD117の断片、又はその抗原結合の断片を、ヒトのCD117の以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、K129のうち少なくとも二つに結合するヒトの患者に、ヒトの抗CD117を、ヒトの患者に、SEQ ID NO: 1及び、その後、血液細胞からなる移植を患者に実施した。1つの実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又はその抗CD117 ADCが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも3つに結合する。別の実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又はその抗CD117 ADCが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも4個と結合する。1つの実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又はその抗CD117 ADCが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも5個に結合する。一実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又はその抗CD117 ADCが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも6個と結合する。一実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又はその抗CD117 ADCが、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残留物T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、又はK129の少なくとも7個に結合する。1つの実施形態では、分離された抗CD117抗原結合断片、又は抗CD117 ADCは、SEQ ID NO: 1に記載されているCD117の以下のアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119及びK129の各々に結合する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1Aと1Bは、Ab85とCK6のアミノ酸配列の可変重(VH)および可変軽(VL)鎖領域を示す。(A) Ab85(SEQ ID NO: 2)とCK6(SEQ ID NO: 22)の可変重(VH)鎖領域のアラインメントを表す。(B) Ab85(SEQ ID NO: 6)とCK6(SEQ ID NO: 26)の可変軽(VL)鎖領域のアラインメントを表す。

【図2】CD117とAb85の間の分子インターフェイス(SEQ ID NOS 147-148、それぞれ、外観順)を特徴づけるエピトープマッピング分析の結果を図で示している。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本明細書に記載されているのは、ヒトCD117に結合する抗CD117である。ここに提供された抗生物質は、幹細胞移植のための患者のコンディショニング方法を含む、それらを治療に有利なものにする多くの特性を有している。例えば、特定の実施例において、本明細書に開示される抗生物質は、ヒトCD117に対して高い親和性と低いオフレートを有し、またCD117を表現する細胞において内部化する能力を有している。さらに、本明細書中に提示される抗体のあるものは、生物物理学的安定性が改善されている。これらの特徴はまた、ここに開示された抗CD117抗毒素は、細胞を発現するCD117にサイトトキシ

10

20

30

40

50

ンを送るための活用(抗薬物活用(ADC))において有利である。

本開示は、ヒトCD117の外領域に結合する、特に分離されたヒト抗CD117抗-CD117を提供する。ここで確認された分離された防CD117の結合領域は以下のとおりである。ここに記載されている抗CD117抗物質およびADCは、血液型の細胞型の病気、ガン、自己感染症、代謝障害および幹細胞障害などの様々な障害を治療する方法で使用することができる。ここに記載された組成及び方法は、(i)直接的に、がん細胞の集団(例、白血病細胞)及び自己反応性T細胞(例、自己反応性T細胞)のような病理を引き起こす細胞の集団を減少させ、(ii)生着した細胞が住むことができるニッチを提供することによって生着した血液細胞の生着を促進するために、内生血液細胞の集団を減少させることができる。上述の活性は、内生の病気を引き起こす細胞または血液細胞によって表現される抗原を結合することができるADC、抗原、またはそれらの抗原結合フラグメントの投与によって達成される。疾患を直接治療する場合、この投与は、関心の病理を生じる細胞の量の低下を引き起こすことができる。造血幹細胞移植治療のために患者を準備する場合、この投与は、内因性造血幹細胞の集団の選択的な枯渇を引き起こすことができ、それによって、移植された外因性造血幹細胞によって引き続いて充填され得る、骨髄のような造血組織における空隙を作り出すことができる。本開示は、一部、CD117(GNK+D117のような)を結合することができるADC、抗物質またはそれらの抗原結合フラグメントが、上記活動の両方に影響を与えるために患者に施されることができ、これを発見したことに基づく。癌または自己免疫疾患に罹患している患者にCD117を結合するADC、抗体、またはその抗原結合フラグメントを投与して、癌性細胞または自己免疫細胞の集団を直接枯渇させることができ、また、移植された造血幹細胞の生存および生着能を促進するために、造血幹細胞移植療法を必要とする患者に投与することができる。

【0020】

抗CD117ADC、抗毒素、又は抗原結合フラグメントの投与による血液細胞移植の移植は、様々な経験的測定において明らかになることができる。例えば、移植された造血幹細胞の生着は、CD117と結合することができるADC、抗体またはその抗原結合フラグメントの投与、およびその後の造血幹細胞移植の投与に続いて、患者の骨髄内に存在する競合的増殖単位(CRU)の量を評価することによって評価することができる。さらに、蛍光、発色性、または発光性産物を産出する化学反応を触媒する遺伝子のようなレポーター遺伝子を、ドナーの血液細胞がトランスフェクトされたベクトルに組み込み、その後、骨髄のような血液細胞がホームムードした組織内の対応する信号を監視することにより、血液細胞移植の生着を観察することができる。また、例えば、当業者に知られている蛍光活性細胞分類(FACS)分析法によって決定されるように、血液細胞および前駆細胞の量および生存率の評価によって、血液細胞生着を観察することもできる。生着はまた、移植後期間中の末梢血中の白血球数を測定すること、および/または骨髄吸引試料中のドナー細胞による骨髄細胞の回収を測定することによって決定することができる。

以下のセクションは、造血幹細胞移植片の生着を促進するために、癌(急性骨髄性白血病または骨髄異形成症候群など)もしくは自己免疫疾患に罹患している患者、または造血幹細胞移植治療を必要とする患者などの患者に投与することができる、ADC、抗体、またはその抗原結合フラグメント、ならびに患者にそのような治療薬を投与する方法(例えば、造血幹細胞移植前)の説明を提供する。

【0021】

定義

本明細書で使用される「約」という用語は、記載される値よりも10%上または下の値を指し、例えば、「約5 nM」という用語は、4.5 nM ~ 5.5 nMの範囲を示す。

ここで用いられるように、「アマトキシシン」という用語は、*Amanita phalloides mushrooms*によって生成されるペプチドのアマトキシシンファミリーの部材、またはそれらの派生物、すなわち、RNポリメラーゼII活性を抑制することができるその派生物または派生物を指す。ここに記載された組成および方法と関連して有用なアマトキシシンは、式(II)に従った化合物を含むが、これに限定されない。式(III)には、-アマニチン、ペー

10

20

30

40

50

タ-アマニチン、ゲーマニチン、イブ-アマニチン、イブ-アマニチン、アマニナミド、アマニナミド、アマヌリン、アマヌリン酸、またはプロアマヌリンが含まれる。ここに記載されるように、アマトキシンは、例えばリンカー湿度(L)を経由して(したがってADCを形成することにより)、抗原結合フラグメントに結合することができる。そのようなプロセスに有用なアマトキシ結合体およびリンカーの例示的な方法を以下に記載する。本書には、組成及び方法に従った、抗原結合フラグメントへの接合に有用なリンカーを含む例示的なアマトキシも記載されている。

【0022】

(III)式は次のとおりである。

[化1]

ここで、 R_1 は、H、OH、または OR_A であり、

R_2 はH、OH、または OR_B 、

R_A と R_B は、もし存在するなら、それらが結合している酸素と結合して、任意に置換された5-族のヘテロシクロアルキル基を形成し、

R_3 がHまたは R_D 、

R_4 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_5 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_6 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_7 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_8 はOH、 NH_2 、または OR_D 、

R_9 はH、OH、または OR_D 、

X-S-, -S(O)-, または-SO₂-、および R_D は、任意に置換されたアルキル(例えばC₁-C₆アルキル)、任意に置換されたヘテロアルキル(例えばC₁-C₆ヘテロアルキル)、任意に置換されたアルケニル(例えばC₂-C₆アルケニル)、任意に置換されたヘテロアルケニル(例えばC₂-C₆ヘテロアルケニル)、任意に置換されたアルキニル(例えばC₂-C₆アルキニル)、任意に置換されたヘテロアルキニル(例えばC₂-C₆ヘテロアルキニル)、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたヘテロシクロアルキル、任意に置換されたアリール、または任意に置換されたヘテロアリールである。

【0023】

例えば、本明細書に記載の組成物および方法と併せて有用なアマトキシは、以下の式(IIA)による化合物を含む。

[化2]

ここで、 R_1 は、H、OH、または OR_A であり、

R_2 はH、OH、または OR_B 、

R_A と R_B は、もし存在するなら、それらが結合している酸素と結合して、任意に置換された5-族のヘテロシクロアルキル基を形成し、

R_3 がHまたは R_D 、

R_4 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_5 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_6 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_7 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_8 はOH、 NH_2 、または OR_D 、

R_9 はH、OH、または OR_D 、

X-S-, -S(O)-, または-SO₂-、および R_D は、任意に置換されたアルキル(例えばC₁-C₆アルキル)、任意に置換されたヘテロアルキル(例えばC₁-C₆ヘテロアルキル)、任意に置換されたアルケニル(例えばC₂-C₆アルケニル)、任意に置換されたヘテロアルケニル(例えばC₂-C₆ヘテロアルケニル)、任意に置換されたアルキニル(例えばC₂-C₆アルキニル)、任意に置換されたヘテロアルキニル(例えばC₂-C₆ヘテロアルキニル)、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたヘテロシクロアルキル、任意に置換されたアリール、または任意に置換されたヘテロアリールである。

10

20

30

40

50

【0024】

本明細書に記載される組成物および方法と併せて有用なアマトキシンはまた、以下の式(I IIB)による化合物を含む。

[化3]

ここで、 R_1 は、H、OH、または OR_A であり、

R_2 はH、OH、または OR_B 、

R_A と R_B は、もし存在するなら、それらが結合している酸素と結合して、任意に置換された5-族のヘテロシクロアルキル基を形成し、

R_3 がHまたは R_D 、

R_4 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_5 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_6 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_7 はH、OH、 OR_D 、または R_D 、

R_8 はOH、 NH_2 、または OR_D 、

R_9 はH、OH、または OR_D 、

$X-S-$ 、 $-S(O)-$ 、または $-SO_2-$ 、および R_D は、任意に置換されたアルキル(例えば C_1-C_6 アルキル)、任意に置換されたヘテロアルキル(例えば C_1-C_6 ヘテロアルキル)、任意に置換されたアルケニル(例えば C_2-C_6 アルケニル)、任意に置換されたヘテロアルケニル(例えば C_2-C_6 ヘテロアルケニル)、任意に置換されたアルキニル(例えば C_2-C_6 アルキニル)、任意に置換されたヘテロアルキニル(例えば C_2-C_6 ヘテロアルキニル)、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたヘテロシクロアルキル、任意に置換されたアリール、または任意に置換されたヘテロアリールである。

【0025】

例えば、一実施の形態では、ここに記載された組成及び方法と関連して有用なアマトキシンには、式(IIC)に従った化合物が含まれる。

[化4]

R_4 、 R_5 、 X 、および R_8 は、それぞれ上記で定義されたものである。

【0026】

ここに記載されるように、アマトキシンは、例えばリンカー-湿度(L)を経由して(したがってADCを形成することにより)、抗原結合フラグメントに結合することができる。そのような過程に有用なアマトキシンの活用及びリンカーの例示的な方法、表1を含む以下に述べる。本明細書に記載の組成物および方法に従って、抗体または抗原結合フラグメントへの共役に有用な例示的リンカー含有アマトキシンは、本明細書に記載の構造式(I)、(IA)、(IB)、(II)、(IIA)、または(IIB)に示される。

ここで用いられるように、「抗菌」という用語は、特定の抗原に特別に結合するか、あるいは、特定の抗原に対して反応性である、イムグロブリン分子を意味する。抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、遺伝子操作された、および他に修飾された形態の抗体が挙げられ、これらに限定されないが、例えば、脱免疫抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヘテロコンジュゲート抗体(例えば、ピトリおよびクアッド特異的抗体、ジアポディ、トリアポディ、およびテトラポディ)、および抗体フラグメント(すなわち、抗体の抗原結合フラグメント)(例えば、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 Fab 、 Fv 、 $rlgG$ 、および $scFv$ フラグメントを含み、これらが所望の抗原結合活性を示す限り)が挙げられる。

【0027】

本開示の抗生物質は、通常、分離されているか、組換えされている。ここでいう「分離」とは、「分離」とは、ポリペプチド、例えば、それが表明された細胞又は細胞培養特定され、分離され、又は回収された、及び/又は回収された、例えば、「分離」とは、通常、1つ以上の精製工程によって分離された、ポリペプチドを指す。従って、「分離された」とは、異なる抗原性を有する他の抗物質を実質的にフリーとなる、「分離された」ことを意味する。たとえば、CD117に特別に結合する単離された抗生物質には、CD117以外

10

20

30

40

50

の抗原を特別に結合する抗物質は実質的に含まれていない。

ここで用いられる「モノクロナル・アブ」という用語は、当該技術で利用可能な、又は知られているどんな方法でも、真核、原核、又はファージ・クローンを含む、単一クローンに由来するものであり、ハイブリドマ・テクノロジーを通して生産される抗物質に限定されない。本開示で有用なモノクロナル・アブドウは、ハイブリドマ、再結合、及びファージ・ディスプレイ技術の使用、又はそれらの組み合わせを含む、本技術で知られている広範な技術を用いて調製することができる。「モノクロナル・アブドウ」という用語は、目的タンパク質に特に結合することが可能な、無傷の分子及び(例えば、Fab及びF(ab')₂の断片を含む)の両方を含むことを意図したものである。本項で使用するように、Fab及びF(ab')₂断片は、無傷の抗菌のFc断片を欠いている抗菌断片を指す。これらの断片の実施例は本稿に記載されている。

10

【0028】

一般的に、抗原結合領域を含む重鎖と軽鎖からなる。各重鎖は重鎖可変領域(本出願ではHCVRまたはVHと略)と重鎖定常領域で構成される。鎖定常領域は、CH1、CH2およびCH3の3つのドメインから構成されている。各軽鎖は軽鎖可変領域(本出願ではLCVRまたはVLと略)と軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は一つの領域であるCLから構成されている。VHとVL領域はさらに、補完性決定領域(CDR)と呼ばれる超変動の領域と、より保存されたフレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域に分けられることができる。VHとVLは3つのCDRと4つのFRで構成され、アミノ端からカーボキシル末までFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に並べられている。重鎖と軽鎖のいろいろな領域には、抗原と相互作用する結合領域がある。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第一成分(C1q)を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

20

本稿で使用する「無傷」または「全長」の「完全」の「抗菌」とは、2つの重(H)鎖ポリペプチドと、2つの軽(L)鎖のポリペプチドがジスルフィド結合によって相互に結合した「抗菌」を指す。各重鎖は重鎖可変領域(本出願ではHCVRまたはVHと略)と重鎖定常領域で構成される。鎖定常領域は、CH1、CH2およびCH3の3つのドメインから構成されている。各軽鎖は軽鎖可変領域(本出願ではLCVRまたはVLと略)と軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は一つの領域であるCLから構成されている。VHとVL領域はさらに、補完性決定領域(CDR)と呼ばれる超変動の領域と、より保存されたフレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域に分けられることができる。VHとVLは3つのCDRと4つのFRで構成され、アミノ端からカーボキシル末までFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に並べられている。重鎖と軽鎖のいろいろな領域には、抗原と相互作用する結合領域がある。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第一成分(C1q)を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

30

【0029】

ここで用いられる「Fc」、「Fc領域」および「Fcドメイン」という用語は、IgG分子のパペーン消化によって得られる結晶性フラグメントと相関するイグジー分子のような、イグロブリンの一部を指す。Fc領域は、ジスルフィド結合によって結合されたIgG分子の2つの重鎖のC-端子半分を構成する。それは抗原結合作用はないが、炭水化物潤沢を含み、FcRnレセプター(以下参照)を含む補完的およびFcレセプターの結合部位を含む。例えば、Fc領域には、第二の定常ドメインCH2(例、IgG1のEU位置231-340の残余)と第三の定常ドメインCH3(例、ヒトIgG1のEU位置341-447の残余)が含まれる。ここで用いられるように、Fc領域には「下ヒンジ領域」(例えば、IgG1のEU位置233-239の残渣)が含まれる。

40

Fcは、この領域、すなわち、この領域を、抗菌、抗菌断片、あるいはFc融合性たんぱく質という文脈において、単独で言及することができる。ポリモルフィスは、EUの位置270、272、312、315、356、358を含むが、限定されないFcドメインのいくつかの位置で観察されており、したがって、本技術で知られているインスタントアプリケーション

50

に提示される配列と既知の配列とのわずかな差が存在することができる。したがって、「野生型IgG Fc ドメイン」または「WT IgG Fc ドメイン」とは、自然に発生するすべてのIgG Fc 領域(つまり任意のアレル)を指す。ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の重鎖の配列は、いくつかの順序データベース(www.uniprot.org)で、加入数P01857 (IGHG1_HUMAN)、P01859 (IGHG2_HUMAN)、P01860 (IGHG3_HUMAN)、P01861 (IGHG1_HUMAN)で見つけることができる。「WT」領域の例は、SEQ ID NO: 10 (Fc 領域を含む鎖定常領域提供する)で提供される。

【0030】

ここで用いられる用語「改良Fc領域」又は「変形Fc領域」は、1以上のアミノ酸の置換、削除、挿入又は改良を含むIgG Fc領域を指す。特定の態様において、変形IgG Fcドメインは、1以上のアミノ酸代替物を含まない野生型Fcドメインと比較して、FcガンマRおよび/またはC1qに対する1つ以上のアミノ酸代替物またはアブレーション結合親和性の減少またはアブレーション結合親和性をもたらす1つ以上のアミノ酸代替物を含む。さらに、Fc結合相互作用は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害(CDC)を含むが、これらに限定されない、様々なエフェクター機能および下流シグナル伝達イベントに必須である。従って、特定の態様において、変形したFcドメイン(例えば、接合性たんぱく質又は共役)を含む抗菌は、別の側面では同じアミノ酸配列を有するが、1以上のアミノ酸置換、削除、挿入又は変形、例えば、Fc領域内の対応する位置に天然に起こるアミノ酸残基を含む不変のFc領域を含まないようなものではない、少なくとも1つ以上のFc配位子(例えば、FcガンマRs)に対して変化した結合親和性を示すことができる。

様々なFc領域は、それらを構成するアミノ酸の改変によって定義される。Fc領域に関してここで議論したすべてのアミノ酸置換物について、数え方は常にカバトのようにEU指数に従う。したがって、例えば、D265Cは、EU位置265におけるアスパルチン酸(D)のFc変形例であり、親Fc領域に対してシスチン(C)で置き換えられる。置換が提供される順序は、任意であることに注意されたい。同様に、例えば、D265C/L234A/L235Aは、EU位置265(D~C)、234(L~A)、および、親のFcドメインに対する235(L~A)で代用した変形Fcを定義する。変種は、EUアミノ酸の変位位置における最終アミノ酸組成によっても指定することができる。たとえば、L234A/L235Aミュータントは「LA」と呼ばれることができる。さらに別の例として、E233P.L234V.L235A.delG236(236の削除)ミュータントは「EPLVLAdelG」と呼ばれることができる。また別の例として、I253A.H310A.H435Aミュータントは「IHH」と呼ばれることができる。置換が提供される順序は、任意であることに注意されたい。

【0031】

ここで用いられる用語「Fcガンマレセプター」または「FcガンマR」は、IgGの抗タンパク質領域を結合し、FcガンマR遺伝子によってエンコードされる、種族のどれかを指す。ヒトにおいて、この家庭は、アイソフォームFcガンマRI(CD64)、Fcガンマリブ、およびFcガンマRIcを含むFcガンマRII(CD32)、アイソフォームFcガンマRIIa(アロタイプH131およびR131を含む)、FcガンマRIIb(FcガンマRIIb-1およびFcガンマRIIb-2を含む)、およびFcガンマRIII(アイソフォームFcガンマRIIIa(アロタイプV158およびF158を含む)およびFcガンマRIIIb(アロタイプFcガンマRIIIb-NA1およびFcガンマRIIIb-NA2を含む)を含むFcガンマRII(CD64)、ならびにあらゆる未発見のヒトFcガンマRまたはFcガンマRアイソフォームまたはアロタイプを含む。FcガンマRは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含む、しかしそれに限らないあらゆる生き物から得られる。マウスFcガンマRには、FcガンマRI(CD64)、FcガンマRII(CD32)、FcガンマRII(CD16)、FcガンマRII-2(CD16-2)に限らず、未発見のマウスFcガンマRsまたはFcガンマR同型または同類型が含まれる。

ここで使用される「エフェクター関数」という用語は、FcレセプターとFcドメインの相互作用から結果生化学的事象を意味する。エフェクター関数には、ADCC、ADCP、CDCが含まれるが、これらに限定されない。ここで使用される「エフェクター細胞」とは、1

つ以上のFcレセプターを表現し、1つ以上のエフェクター関数を仲介する、エフェクター細胞を意味する。エフェクター細胞は、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、マスト細胞、血小板、B細胞、大型顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、およびガンマデルタT細胞を含むが、これらに限定されず、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルを含むがこれらに限定されない任意の生物由来であり得る。

【0032】

「サイレント」、「サイレンシング」、または「サイレンシング」という用語は、本明細書中で使用される場合、未修飾Fc領域を含む同一抗体のFcガンマRへの結合(例えば、BLIにより測定される、未修飾Fc領域を含む同一抗体のFcガンマRへの結合と比較して、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%のFcガンマRへの結合の減少)に対して、Fcガンマ受容体(FcガンマR)への結合が減少した、本明細書中に記載される修飾Fc領域を有する抗体を指す。いくつかの態様において、Fcサイレンシング抗体は、FcガンマRへの検出可能な結合を有さない。改良されたFc領域を有する抗菌のFcγ1Rへの結合は、例えば、平衡法(例えば、ELISA; KinExA, Rathanaswamiら、分析生化学Vol.373:52-60, 2008、または、ラジオエムアッセイ(RIA))または、表面プラズモン共鳴アッセイまたはその他のキネティクスに基づくアッセイ(例えば、BIACORE™分析またはOctet™分析(for eBIO))、および間接結合アッセイ、競争結合アッセイ、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、ゲル電気泳動法およびクロマトグラフィー(例えば、ジェルフィルトレーション)などの他の方法に限定されないが周知の様々な技術を用いて決定することができる。これらおよび他の方法は、検討中の成分の一つまたはそれ以上のラベルを利用することができ、および/または、発色性、蛍光、発光、または同位体標識を含むが、それに限らない多様な検出方法を使用することができる。結合する親和性と運動学についての詳細な記述は、Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)に見られる。競合結合アッセイの一例は、増大する量の非標識抗原の存在下での標識抗原と目的の抗体とのインキュベーション、および標識抗原に結合した抗体の検出を含むラジオイムノアッセイである。特定の抗原に対する興味のある標本の親和性と結合オフレートは、スキャッチャードプロット分析によりデータから決定することができる。また、ラジオイムノアッセイを用いて、第二の抗菌剤との競合を判断することもできる。この場合、この抗原は、標識されていない第2のビーンズの増加量の存在の中で、標識化された複合物に接合された興味のあるビーンズと共にインキュベートされる。

【0033】

ここで用いられるように、「非改良Fc領域を含む同一抗菌」という用語は、復唱されたアミノ酸の置換(例えば、D265C、H435A、L234Aおよび/またはL235A)が欠けているが、それ以外の場合には、それが比較されているFc改良抗菌と同じアミノ酸配列を有する。

「抗体依存性細胞媒介性細胞毒性」または「ADCC」という用語は、特定の細胞毒性細胞(例えば、主にNK細胞、好中球、およびマクロファージ)上に存在するFcレセプター(FcR)上に結合したFcドメイン、例えば抗体を含むポリペプチドを指し、これらの細胞毒性エフェクター細胞が抗原ペアリング「ターゲット細胞」に特異的に結合し、続いてターゲット細胞を細胞毒素で殺すことを可能にする細胞毒性の形態を指す。(Hogarth et al., *Nature review Drug Discovery* 2012, 11:313) 抗物質とそのフラグメントに加えて、Fc領域を含む他のポリペプチド、例えば、Fc融合タンパク質とFc結合たんぱく質であり、抗原ペアリングターゲット細胞に特別に結合する能力を有する他のポリペプチドが、細胞媒介の細胞毒性を作用させることができると考えられている。

【0034】

単純化のために、Fc領域を含むポリペプチドの活性から生じる細胞媒介の細胞毒を、ここではADCC活性と呼ぶ。ADCCによって標的細胞の溶解を媒介する本開示の特定のポリペプチドの能力は、アッセイすることができる。ADCC活性を評価するために、興味のある

10

20

30

40

50

るポリペプチド(例えば、抗菌剤)が、ターゲット細胞に、ターゲット細胞の細胞分解をもたらす、防除エフェクター細胞と組み合わせて、加えられる。細胞分解は通常、標識(たとえば放射性基質、蛍光染料、天然細胞内タンパク質)を分解した細胞から放出することによって検出される。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、周辺血液単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。in vitro ADCCアッセイの具体例は、Bruggemannら、J. Exp. Med. 166:1351 (1987)、Wilkinso J. Immunol. Methods 258:183 (2001)、Patel ら、J. Immunol. Methods 184:29 (1995)に記載されている。別に、または、追加に、関心のADCC活性は、例えばClynesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652 (1998)に開示されているような動物モデルにおいて、生体内で評価することができる。

10

ここで用いられている「抗原結合断片」という用語は、標的抗原に特定の結合する能力を持つ1つ以上の部分を指し、抗体の抗原結合機能は、たとえば、Fab, F(ab')₂, scFv, diabody, aptamer, aptamer、あるいは抗体によって実行できる。抗体の「抗原結合断片」という用語を包含する例としては、(i)VL, VH, CLとCH 1ドメインから成る単価断片、(ii)ヒンジ領域でディスフル化橋によって結ばれる2価なFab断片、(iii)VHとCH 1ドメインから成るFv断片、(iv)一つの部門から成るFv断片(vi)VH領域からなるdAb断片(例えば、VH, VL領域を含むdAb、(vi)Ward ら、Nature 341:544-546, 1989を参照)、(vii)VHまたは2領域からなるdAb、(viii)孤立補完決定領域(CDR)、(ix)2つ以上の結合(例えば、2、3、4、5、6)合成リンカーによって任意に結合されるかもしれない2つ以上の単独CDRの組合せである。さらに、Fvフラグメントの2つの領域、VLとVHは別個の遺伝子によってコード化されているが、それらは再結合法を用いて結合することができる。それはリンカーであり、VLとVH領域が一価分子(scFvとして知られている)を形成するための単一のタンパク質チェーンとして作られることを可能にする。たとえば、Birdら、Science 242:423-426, 1988 and Huston ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988を参照)。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来技術を使用して得ることができ、断片は、無傷の抗体と同じ様式で有用性についてスクリーニングすることができる。アンチゲン抗原結合フラグメントは、組換えDNA技術、無傷のイムノ免疫グロブリンのエンザイマティックまたは化学的な割断、または、ある場合には、当業者に知られている化学ペプチド合成手順によって作り出すことができる。

20

30

【0035】

ここで用いられるように、「抗CD117」又は「CD117に結合する抗菌」という用語は、CD117を標的とする際に診断及び/又は治療剤として有用であるような十分な親和性をもってCD117に結合することができる抗菌を意味する。

ここで使用する「敵対者」または「阻害者」という用語は、興味のある分子と接触すると、敵が存在しないときに観察される活動または機能の大きさに比べて、分子の特定の活動または機能の大きさまたは機能が減少することを意味する。興味のある敵対者は、ヒトCD117の生物学的または免疫学的活動をブロックまたは調整するものを含んでいる。「敵対者」の抗CD117 bindingは、SCF依存の拡散を抑制し、CD117に結合するSCFをブロックすることができる。ヒトCD117のアンタゴニストおよびインヒビターには、ヒトCD117に結合する、たんぱく質、核酸、炭水化物またはその他の分子が含まれるが、これらに限定されない。Ab85(またはAb85の結合領域を有する)は、アンタゴニストのAb85の実施例である。

40

「CD117への結合を抑制する」という用語は、CD117とSCF(幹細胞因子)との結びつきを防ぎ、および/またはCD117がCD117の更なる分子への結合および/または二重化を防ぐ、あるいはそれらの抗原結合フラグメントの能力を意味する。CD117のSCFとの会合および/またはCD117のさらなる分子への結合および/または二量体化のそのような防止は、CD117とSCFとの会合、またはCD117のさらなる分子への結合および/または二量体化によって媒介される生物学的活性の減少または消失をもたらすであろう。

【0036】

50

「規制」及び「調整」という用語は、互換的に使用され、また、ここで使用されるように、関心の活動の変化又は変化(例えば、人間のCD117の生物学的活動)を意味する。モジュレーションとは、関心の特定の活動または機能の程度の増加または減少のことである。分子の模範的な活動と機能には、結合特性、細胞活動、細胞受容体活性化、およびシグナル伝達が含まれるが、これらに限定されない。

それに応じて、「モジュレーター」という用語は、本稿で使用するように、関心のある分子の活動または機能(例えば、人間のCD117の生物学的活動)を変えたりすることができる複合体である。例えば、変調器は、変調器が存在しないときに観測される活動または機能の大きさに比べて、分子の特定の活動または機能の大きさの増加または減少を引き起こすことがある。特定の実施形態では、変調器は、分子の少なくとも1つの活動または機能の程度を減少させるインヒビターである。

本明細書で使用する場合、「二重特異性抗体」という用語は、同一または種々の抗原上にあり得る2つの異なるエピトープを結合することができる抗体、例えばモノクローナル、例えば、非免疫化、ヒトまたはヒト化抗体を指す。たとえば、結合特異性の1つは、CD117(例:GNK+ CD117)のような血液細胞表面抗原上のエピトープに向けられることができ、もう1つは、細胞成長を強力にするシグナル変換経路に参与するレセプターまたはレセプターサブユニットのような、異なる血液細胞表面抗原または他の細胞表面タンパク質上でエピトープを特別に結合することができる。いくつかの実施形態において、結合特異性は、同じ標的抗原上のユニークで重複していないエピトープ(すなわち、パイパラトピック・ピース・ピー・アフィンチ)に向けられることができる。

【0037】

ここで使用される「非予防接種」または「非予防接種」という用語は、当該野生型構築物(または親の抗菌)を、ヒトにおいて非予防接種であるか、あるいはより弱い予防接種であるようにすることによる、元の野生型構築物(または親の抗菌)の改変に関するものである。非ヒト起源のフレームワーク領域および/またはCDRを含む。本稿で使用するように、「非予防接種型」という用語は、被検者の耐性を作動させないように、突然接種によって非予防接種されたものを意味する(例えば、Nanusら、*J. Urology* 170: S84-S89, 2003; WO98/52976; WO00/34317)。

ここで用いられるように、「相補性決定領域」(CDR)とは、液体の軽鎖および重鎖の両方に見いだされる超可変領域を指す。様々なドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域(FRs)と呼ばれる。超可変領域を描写するアミノ酸位置は、当該技術における既知の文脈及び種々の定義に応じて変化し得る。可変ドメイン内のいくつかの位置は、異なる一連の基準の下では超可変ドメイン外であるとみなされる一方で、これらの位置は1組の基準の下で超可変ドメイン内であるとみなすことができる、というハイブリッド超可変位置とみなすことができる。これらの位置のうちの1つ以上は、拡大超可変領域にも見いだすことができる。ここに記載されている抗生物質は、これらのハイブリッド・ハイパーリアブル・ポジションの変化を含んでいる可能性がある。固有の重鎖とL鎖の可変ドメインは、それぞれ4つの骨格領域を含んでおり、主に3つのCDRで結ばれたベータシート構造を採用しており、それらは接続ループを形成し、場合によってはベータシート構造の一部を形成している。各チェーンのCDRは、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の骨格領域によって密接に結びついており、また、他の抗生物質チェーンからのCDRと共に、抗物質の標的結合サイトの形成に寄与する(Kabatら、参照、国立健康研究所、Bethesda, MD、1987)。特定の実施形態では、別途記載のない限り、カバトラの(IMGT及びチョチアに限定されないが、いずれかの抗菌番号づけスキームを使用することができるが)、イムグロブリンアミノ酸残基物の番号づけが、イムグロブリンアミノ酸残基物番号づけシステムに従って行われる。

【0038】

ここで使用する「条件」および「条件付け」という用語は、患者が移植を受け取るために準備される過程を指す。例えば、血液細胞を含む移植である。このような手順は、造血幹細胞移植の生着を促進する(例えば、コンディショニング手順およびその後の造血幹細胞

移植に続いて患者から単離された血液試料内の生存可能な造血幹細胞の量の持続的増加から推測される)。本明細書に上記の方法によれば、患者は、ADC、CD117(例えば、GNK K+ CD117)などの造血幹細胞によって発現される抗原に結合することができる抗体またはその抗原結合フラグメントの患者への投与によって、造血幹細胞移植治療のためにコンディショニングされ得る。ここに記載されているように、抗原薬の活用(ADC)を形成するために、この抗原薬はサイトトキシンと同様に結合することができる。血液細胞移植治療を必要とする患者に上記の抗原のうちの1つ以上を結合することが可能な、抗原結合フラグメント、又はADCの投与は、例えば、内生の血液細胞を選択的に枯渇させることによって、血液細胞移植の接木を促進し、それによって外生の血液細胞移植によって満たされた空白を作り出すことができる。

10

本明細書で使用される用語「コンジュゲート」または「抗体薬物コンジュゲート」または「ADC」は、細胞毒素に連結された抗体を指す。ADCは、ある分子の反応性のある機能群、例えば、抗原結合フラグメントと、ここに述べた細胞毒素のような別の分子の適切に反応性のある機能群との間の化学的結合によって形成される。共役には、例えば、抗菌と細胞毒素の間のように、互いに結合した2つの分子間のリンカーが含まれることがある。接合体の形成に使用できるリンカーの実施例には、ペプチドを含むリンカー、実施例例えば、上記に起きている、あるいはD-アミノ酸のような非自然に起きているアミノ酸を含むリンカーが含まれる。リンカーは、本技術に記載され、かつ本技術に知られている様々な戦略を用いて調製することができる。その中の反応性成分に応じて、リンカーは、例えば、加水分解、加水分解、酸性条件下の加水分解、基礎条件下の加水分解、酸化、ジスルフィド還元、核友性切断、または有機メタリック切断(例えば、Lericheら、Bioorg. Med. Chem., 20:571-582, 2012を参照)によって切断することができる。上述の接合体はまた、ここでは、「ドラッグ・共役」、「抗ドラッグ・コンジュゲート」、および「ADC」とも同様に呼ばれる。

20

【0039】

ここで用いられるように、「カップリング反応」という用語は、それぞれの置換体に結合した分子断片を(例えば、同様に)結合する化学的水を形成するように、互いに反応するのに適した2つ以上の置換体が反応する化学反応を意味する。カップリング反応とは、当該技術で知られている、又は、ここに記載されている細胞毒素のような、細胞毒素である断片に結合した反応性代替物が、当該技術で知られているCD117(GNK+ CD117のような)に特有の、抗原結合フラグメントのような、適切に反応性の代替物、又はその断片の抗原結合フラグメントに結合した代替物と反応するものを含む。適当に反応性の代替物の例としては、求核剤/電友対(例えば、チオール/ハロアルキンペア、アミン/カルボニールペア、またはチオール/、特に、非飽和カルボニールペア)、ジエン/ジエンフィルペア(例えば、アジド/アルキンペア、その他)などが含まれる。カップリング反応は、限定されるものではないが、チオールアルキル化、ヒドロキシアルキル化、アミンアルキル化、アミン縮合、アミド化、エステル化、ジスルフィド形成、環状付加(例えば、[4+2] Diels-Alder環状付加、[3+2] Huisgen環状付加、とりわけ)、求核芳香族置換、求電子芳香族置換、および本明細書に記載される他の反応様式を含む。

30

ここで用いられる「CRU(競合的再パリング単位)」とは、in-vivo移植後に検出される長期接木細胞の測定単位を指す。

40

【0040】

本明細書で使用される場合、「薬物対抗体比」または「DAR」は、ADCの抗体に結合した細胞毒素、例えばアマトキシンの数を指す。ADCのDARは1から8までの範囲があるが、それよりも高い負荷をかけることは、抗原上のリンク部位の数によっても可能である。したがって、ある実施例において、ここに記載されるADCは、1、2、3、4、5、6、7、または8のDARを有する。

ここで用いられるように、「供与者」という用語は、受取人に細胞またはその子孫を投与する前に、1つ以上の細胞から分離される人または動物を意味する。1つ以上の細胞は、例えば、数学的幹細胞の集団である。

50

本明細書中で使用される「ダイアボディ」という語は、2つのポリペプチド鎖を含む二価抗体を意味し、ここで、各々のポリペプチド鎖は、同じペプチド鎖上のV_HおよびV_L領域の分子内会合を可能にするには短すぎるリンカー(例えば、5つのアミノ酸からなるリンカー)によって連結されたV_HおよびV_L領域を含む。この構成によって、各ドメインは別のポリペプチド鎖上の相補的なドメインと対になり、ホモジメリックな構造を形成することになる。従って、「トリアボディ」という用語は、ペプチド・チェーン3つを含む三価の抗物質を意味し、それぞれは、同じペプチド・チェーン内でV_HおよびV_L・ドメインの分子内結合を可能にする非常に短いリンカー(例えば、1-2アミノ酸からなるリンカー)に結合した1つのV_H領域および1つのV_L領域を含む。その固有の構造に折り畳むために、このように構成されたペプチドは、通常、隣接するペプチド鎖のV_HおよびV_L領域を空間的に互いに近接するように位置付けるように三重化される(例えば、Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993を参照)。

【0041】

ここで用いられるように、「デュアル・バリアブル・ドメイン・イムグロブリン」(「DVD-Ig」)は、テトラバレント、デュアル・ターゲティング・シングル・エージェントを創造するためにリンカーを介して2つのモノクローナル・アビディングの変数領域のターゲット結合変数を結合している(例えば、Gu et al., Meth. Enzymol., 502:25-41, 2012を参照)。

本明細書で使用される場合、「内因性」という語は、ヒトのような特定の生物に自然に見出される、分子、細胞、組織、または臓器(例えば、造血幹細胞、または造血系列の細胞、例えば、巨核球、血小板、血小板、赤血球、マスト細胞、筋芽細胞、好塩基球、好中球、好酸球、ミクログリア細胞、顆粒球、単球、破骨細胞、抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、Tリンパ球、またはBリンパ球)のような物質を記載する。

ここで使用されるように、「生着電位」という用語は、そのような細胞が自然に循環しているか、移植によって提供されているかを問わず、組織を再現するための、血液細胞および前駆細胞の能力を指すために使用される。この用語は、細胞の組織への帰巢や、興味のある組織内での細胞の定着といった、接木を取り巻く、またはそれに至るすべての出来事を包含する。生着効率または生着率は、当業者に知られているような、医学的に受け入れられるパラメータを用いて評価または定量化することができ、また、例えば、競合的な再パルピングユニット(CRU)の評価を含むことができ、幹細胞が帰宅し、植え付けられ、生着された組織にマーカーを取り込みまたは表現することができ、あるいは病気の進行、血液系および前駆細胞の生存、または受領者の生存を通じた被検者の進展を評価することができる。生着は、移植後の時期に末梢血中の白血球血球数を測定することによっても判定できる。生着はまた、骨髓吸引試料中のドナー細胞による骨髓細胞の回収を測定することによって評価することができる。

【0042】

ここで用いられるように、「エピトープ」という用語には、結合性タンパク質に比結合することができるポリペプチドの行列式、例えば、それらの結合部またはそれらの抗原結合部が含まれる。特定の実施形態では、エピトープの決定要因には、アミノ酸、砂糖側鎖、ホスリル、またはスオニールのような分子の化学的に活性化された表面グルーピングが含まれ、また、特定の実施形態では、特定の立体的な構造特性および/または特定の電荷特性を有することがある。様々な実施形態において、エピトープは、抗原の主要構造、すなわちCD117の直線的又は連続的なエピトープ、すなわちアミノ酸の線状配列であってもよい。別の実施形態では、エピトープは、抗原が二次構造をとる場合に、特定の立体形状を持つ立体的なエピトープであってもよい。たとえば、立体エピトープは、抗原の非線形、すなわち非連続的なアミノ酸を含むことができる。

特定の実施の形態では、エピトープは、結合タンパク質によって結合される抗原の領域、例えば、それらを結合した抗原または抗原結合部である。特定の実施形態では、結合性たんぱく質、例えば、抗原結合部は、タンパク質と高分子の複合的な混合物において、その

標的抗原を優先的に認識するとき、抗原を特別に結合すると言われている。特定の実施例では、抗原、すなわちCD117のエピトープは、結合タンパク質が抗原に結合したとき、結合タンパク質の約4アングストローム(オルガン)内のアミノ酸残基、例えば、抗原結合部を含む。

【0043】

本明細書で使用される場合、「外因性」という語は、ヒトのような特定の生物に自然に見出されない、分子、細胞、組織、または臓器(例えば、巨核球、血小板、血小板、赤血球、マスト細胞、筋芽細胞、好塩基球、好中球、好酸球、ミクログリア細胞、顆粒球、単球、破骨細胞、抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、Tリンパ球、またはBリンパ球のような、造血幹細胞または造血系列の細胞)のような物質を記載する。被援助国の生物、例えば被援助国の生体に外来性の物質は、その物質が由来する供与国の被検者のような供与国の有機体に自然に存在することがある。たとえば、同種異系細胞移植には、受け手には外生的であるが、受け手には固有の細胞が含まれている。外生物質とは、外部から生命体に、あるいはそこから抽出された培養物質に供給される物質をいう。

10

ここで用いられるように、「骨格領域」又は「FW領域」は、抗原結合フラグメントのCDRに隣接するアミノ酸残留物を含む。FW領域残渣は、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、モノクローナル抗体、抗体断片、Fab断片、一本鎖抗体断片、scFv断片、抗体ドメイン、および二重特異性抗体中に存在し得る。

【0044】

また、ここに記載されたSEQ ID NOに記載された配列の「保守的な配列変更」、すなわち、核酸配列によってエンコードされた、あるいはアミノ酸配列を含む、抗原との結合を損なわない、ヌクレオチドおよびアミノ酸の配列変更も提供される。このような控えめな配列変化には、控えめなヌクレオチドとアミノ酸の置換、並びにヌクレオチドとアミノ酸の添加と削除が含まれる。例えば、現場指向の変調剤やPCRを媒介とした変調剤のような、本技術で知られる標準的な技術によって、ここに記載されるSEQ ID NOに変調を導入することができる。控えめな配列変化としては、控えめなアミノ酸の置換がある。この置換では、アミノ酸残基は、似たような側鎖をもつアミノ酸残基に置き換えられる。側鎖が類似しているアミノ酸残基のファミリーが本技術において定義されている。これらの家庭には、基礎的な側面鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側面鎖(例えば、アスパルチン酸、グルタミン酸)、非充電極性側面鎖(例えば、グリシン、アスパラジン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側面鎖(例えば、アラニン、バリン、レウシン、イソレウシン、プロリン、フェニールニン、メチオニン)、ベータ枝状の側面鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソレウシン)、及び芳香族側面鎖(例えば、チロシン、フェニールニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸が含まれる。したがって、抗CD117抗体中の予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖家庭由来の別のアミノ酸残基で置き換えられる。抗原結合を除去しないヌクレオチドとアミノ酸の保守的な置換を同定する方法は、本技術でよく知られている(例えば、Brummellら、Biochem. 32:1180-1187 (1993)、Kobayashiら Protein Eng. 12(10):879-884 (1999)、and Burksら Proc. Natl. A

20

30

40

cad. Sci. USA 94:412-417 (1997)を参照)。

ここで用いられるように、「半減期」とは、身体中の薬物のプラズマ濃度が、被検者、例えば、人間の被検者において1/2ないし50%減少するのに要する時間をいう。この50%の血清濃度低下は、薬物循環量を反映している。

【0045】

本明細書中で使用される、用語「造血幹細胞」(「HSC」)は、自己複製し、顆粒球(例えば、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球)、赤血球(例えば、網状赤血球、赤血球)、血小板(例えば、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板)、単球(例えば、単球、マクロファージ)、樹状細胞、ミクログリア、破骨細胞、およびリンパ球(例えば、NK細胞、B細胞およびT細胞)を含むがこれらに限定されない多様な系統を含む成熟血球に分化する能力

50

を有する未成熟血球を指す。このような細胞はCD34+細胞を含むことができる。CD34+細胞は、CD34セル表面マーカーを表す未成熟細胞である。ヒトでは、CD34+細胞は、上述の幹細胞特性を有する細胞の亜集団を含むと考えられているが、マウスでは、HSCはCD34-である。さらに、HSCは、長期再増殖HSC(LT HSC)および短期再増殖HSC(ST HSC)も指す。LT HSCsとST HSCsは、機能電位と細胞表面マーカー式に基づいて区別される。例えば、ヒトHSCは、CD34+、CD38-、CD45RA-、CD90+、CD49F+、lin(CD2、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11B、CD19、CD20、CD56、CD235Aを含む成熟した直線マーカーについては負の値である)。マウスにおいて、骨髄LT-HSCは、CD34-、SCA-1+、C-kit+、CD135-、Slamfl/CD150+、CD48-、およびlin(Ter119、CD11b、Gr1、CD3、CD4、CD8、B220、IL7raを含む成熟系統マーカーに対して陰性)であるのに対し、ST-HSCは、CD34+、SCA-1+、C-kit+、CD135-、Slamfl/CD150+、およびlin(Ter119、CD11b、Gr1、CD3、CD4、CD8、B220、IL7raを含む成熟系統加えて、ST HSCはホメオスタシス条件下でLT HSCよりも静止期が少なく、より増殖性である。しかしながら、LT-HSCはより大きな自己複製能を有する(すなわち、それらは成人期を通して生存し、連続した受取人を通して連続的に移植時間)のに対し、ST-HSCは限定された自己複製を有する(すなわち、それらは限られた期間のみ生存し、連続した移植能を有しない)。これらのHSCのどれも、ここに記載された方法で使用することができる。ST-HSCは、非常に拡散性があり、したがって、より迅速に差別化された子孫を生み出すことができるので、特に有用である。

本明細書中で使用される「造血幹細胞機能電位」という用語は、1)顆粒球(例えば、前骨髄球、好酸球、好塩基球)、赤血球(例えば、網状赤血球)、血小板(例えば、巨核球、血小板)、単球(例えば、単球、マクロファージ)、樹状細胞、ミクログリア、破骨細胞、およびリンパ球(例えば、NK細胞、B細胞およびT細胞)を含むが、これらに限定されない複数の異なる血液系統に分化する能力を指す、2)自己複製(母細胞として同等の電位を有する造血幹細胞の能力を指し、さらに、この能力は、枯渇することなく個々の寿命にわたって繰り返し生じ得ること、および3)移植レシピエントに再導入される造血幹細胞またはその後代の能力。それらは造血幹細胞ニッチに入り、生産的で持続的な造血を再確立する。

【0046】

ここで用いられる「人間の抗菌」という用語は、ヒトジェルムラインのイグロブリン配列に由来する様々で一定の領域を有する抗性質を含むことを意図している。ヒトの抗菌は、ヒトジェルムラインのイグロブリン配列によってエンコードされていないアミノ酸残基(例えば、無作為またはサイト特有の遺伝子組換え中に導入されたか、あるいは生体内での遺伝子組換え中または体交代中に導入された)を含み得る。しかしながら、ここで用いられる「人間の抗菌」という用語は、マウスのような他の哺乳動物のジェルムラインに由来するCDR配列をヒトのフレームワーク配列に接ぎ木したものを含むことを意図していない。ヒトの抗菌は、ヒトの細胞(たとえば組み換え式)の中で、あるいは、機能的に再配置されたヒトの遺伝子(たとえば重鎖やL鎖)を表すことができる、ヒト以外の動物や原核あるいは真核細胞によって作り出すことができる。ヒトの抗たんぱく質が単一の鎖である場合、それは天然のヒトの抗たんぱく質には見られないリンカーペプチドを含むことができる。例えば、Fvは、重鎖の可変領域とL鎖の可変領域とを結びつける2~8のグリシンまたは他のアミノ酸残基のようなリンカーペプチドを含むことができる。このようなリンカーペプチドは、人間の起源であると考えられている。ヒト抗毒素は、ヒトのイムグロブリン配列から派生した抗菌ライブラリーを用いたファージディスプレイ法を含む、当業者に知られている種々の方法によって作ることができる。ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンを発現することができないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを使用して作製され得る(例えば、PCT公開番号WO 1998/24893; WO 1992/01047; WO 1996/34096; WO 1996/33735; 米国特許第5,413,923号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; 第5,569,825号; 第5,661,016号; 第5,545,806号; 第5,814,318号; 第5,885,793号; 第5,916,771号; および第5,939,598号を参照のこと)。

10

20

30

40

50

非ヒト(例えば、ムリン又はラット)の「人為化」型の抗毒剤は、非ヒト・イムグロブリンに由来する最小限の配列を含んでいる。一般的に、ヒト化された抗原は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変領域の実質的な全てを含み、CDR領域の全部または実質的に全てが非ヒトゲルウリンの領域に対応し、FR領域の全部または実質的に全てがヒトゲルウリン配列の領域である。ヒト化された抗原はまた、少なくとも、通常、ヒト・イムグロブリンのコンセンサス配列の、イムグロブリン定常領域(Fc)を構成することができる。抗体のヒト化の方法は、当該技術分野で公知であり、例えば、Riechmannら、Nature 332:323-7, 1988; U.S.、Queenらに対する米国特許第5,530,101号;第5,585,089号;第5,693,761号;第5,693,762号;および第6,180,370号;EP239400号;PCT公開第WO 91/09967号;米国特許No. 5,225,539;EP592106;EP519596;Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28:489-498; Studnickaら、1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguskaら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973 米国特許No. 5,565,332に記載されている。

【0047】

ここで用いられるように、血液細胞移植を「必要としている」患者には、1種類以上の血球型に欠陥または欠陥がある患者、並びにここに記載されている幹細胞障害、自己感染症、ガン、または他の病理を有する患者が含まれる。造血幹細胞は、一般に、1)多分化能を示し、従って、次のように複数の異なる血液系統に分化することができる、顆粒球(例えば、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球)、赤血球(例えば、網状赤血球、赤血球)、血小板(例えば、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板)、単球(例えば、単球、マクロファージ)、樹状細胞、ミクログリア、破骨細胞、およびリンパ球(例えば、NK細胞、B細胞およびT細胞)、2)自己複製能を有し、したがって、母細胞として同等の可能性を有する娘細胞を生じ得る、3)移植レシピエントに再導入され、その際、それらが造血幹細胞ニッチに帰着し、再生産的かつ持続的な造血を確立する能力。このようにして、造血幹細胞を、インビボでの細胞の欠損または欠損集団を再構成するために、造血系列の1つ以上の細胞型において欠損または欠損している患者に投与することができる。例えば、患者はがんに苦しんでいるかもしれないし、その欠陥は、選択的または非特定的に、がん細胞集団を枯渇させる安価な母性剤または他の薬品の管理によって引き起こされるかもしれない。さらに、またはその代替として、患者は、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ファンコニ貧血、再生不良性貧血、およびヴィスコット-オールドリッチ症候群などの異常ヘモグロビン症(例えば、非悪性異常ヘモグロビン症)を患っていてもよい。この被検者は、アデノシンデアミナーゼ重度複合免疫不全症(ADA SCID)、HIV/AIDS、異染性白質ジストロフィー、ダイヤモンド-ブラックファン貧血、およびシュワックスマン-ダイヤモンド症候群に罹患しているものであり得る。被検者は、遺伝性の血液疾患(鎌状赤血球貧血など)または自己免疫疾患を有するか、またはその影響を受けている可能性がある。さらに、またはその代替として、被検者は、悪性腫瘍、例えば、神経芽細胞腫または血液癌を有するか、またはその影響を受けている可能性がある。例えば、被検者は、白血病、リンパ腫、または骨髄腫を有することができる。いくつかの実施形態において、被検者は、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、または非ホジキンリンパ腫を有する。いくつかの実施形態において、被検者は骨髄異形症候群を有する。幾つかの実施例において、被検者は、硬皮症、多発性硬化症、陶器性大腸炎、クローン病、1型糖尿病、またはここに記載されている他の自己感染病理のような自己感染性の病気を有する。いくつかの実施形態において、被検者はキメラ抗原レセプターT細胞(CART)療法を必要としている。いくつかの実施形態において、被検者は代謝貯蔵障害を有するか、あるいはそうでなければ影響を受ける。被験体は、糖原病、ムコ多糖類症、ゴーシェ病、スフィンゴ脂質症、異染性白質ジストロフィー、または本明細書に開示される治療および治療から有益であり得る任意の他の疾患または障害(限定されるわけではないが、重症複合免疫不全症、ウィスコット-オールドリッチ症候群、高免疫グロブリンM(IgM)症候群、チェディアック-東病、遺伝性リンパ組織球症、骨形成不全症、貯蔵疾患、サラセミア・メジャー、鎌状赤血球症、全身性エリテ

マトーデス、多発性硬化症、若年性関節リウマチ、またはそれらの疾患、またはASH教育ブック、1:319-338(2000)。ここでは、その開示は、造血幹細胞移植治療の実施によって治療され得る病態に関するものであり、さらに、造血幹細胞移植を「必要としている」患者は、以下のいずれかに罹患しているか、または罹患していない それにもかかわらず、上述の病態は、巨核球、血小板、血小板、赤血球、肥満細胞、筋好酸球、好中球、好酸球、ミクログリア、顆粒球、単球、破骨細胞、抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、Tリンパ球、およびBリンパ球のような、造血系列内の1つ以上の内因性細胞型のレベルの低下(例えば、それ以外は健康な被験者のレベルと比較して)を示す。当業者の1つは、他の健全な被検者に関して、前記の細胞タイプの1つ以上の量が、フローサイトメトリー及び蛍光活性化セルソーティング(FACS)手法のように、既知の他の方法の中で、フローサイトメトリー及び蛍光活性化セルソーティング(FACS)手法により、削減されているかどうかを、容易に判断することができる。

10

【0048】

ここで用いられるように、「受領者」という用語は、移植を受ける患者、例えば、血液細胞の集団を含む移植を意味する。受取人に投与される移植細胞は、例えば、自家細胞、同系細胞、または同種異系細胞であり得る。

本明細書で使用される場合、「試料」という語は、被検者から採取された試料(例えば、血液、血液成分(例えば、血清または血漿)、尿、唾液、羊水、脳脊髄液、組織(例えば、胎盤または皮膚)、腓液、絨毛サンプル、および細胞)を指す。

【0049】

ここで用いられるように、「scFv」という用語は、重鎖の可変ドメインと抗原からのL鎖が一本の鎖を形成するために結合された単一の連鎖Fv(fv)を意味する。scFv断片は、 V_L (例:CDR-L1、CDR-L2、および/またはCDR-L3)の可変領域と、リンカーによって分離された V_H (例:CDR-H1、CDR-H2および/またはCDR-H3)の可変領域を含む単一のポリペプチドチェーンを含む。scFv断片の V_L と V_H 領域に結合するリンカーは、プロテイン生成アミノ酸からなるペプチドリンカーである。代替リンカーは、scFvフラグメント(たとえば、D-アミノ酸を含むリンカー)の溶解性を高めるために、scFvフラグメント(例えば、ポリエチレングリコールを含むリンカーまたは繰り返しのグリシンとセリン残基を含むポリペプチドのような親水性リンカー)の溶解性を高めるために、分子(たとえば、分子内または分子間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基物を含むリンカー)の生物物理学的安定性を改善するために、またはscFvフラグメント(たとえば、グリコシル化部位を含むリンカー)のウィンジエニック性を弱めるために、プロテオリトリック劣化に対するscFvフラグメントの耐性を高めるために、またはscFvフラグメント(たとえば、グリコシル化部位を含むリンカー)を弱めるために使用することができる。本明細書中に記載されるscFv分子の可変領域は、それらが由来した抗体分子からのアミノ酸配列が変化するように修飾され得ることも、当業者によって理解される。たとえば、保守的な置換や、アミノ酸残基の変化につながるヌクレオチドやアミノ酸の置換(たとえばCDRやフレームワーク残基)を作り、scFvが対応する抗原に結合する能力を維持または強化することができる。

20

30

【0050】

ここでいう「比バインディング」又は「特別バインディング」とは、一般に、タンパク質に対してではなく、比のタンパク質構造(エピトープ)を認識し、結合することを示す「ADC」の用語である。エピトープA(又は非ラベル化されたA)を含む分子の存在は、ラベル化された「A」及びその「A」を含む反応において、それらに結合されたラベル化されたAの量を減少させる。例として、もし、ラベル化された場合に、当該非ラベル化されたピールによって、当該のターゲットから離れて競争することができるならば、「比」をターゲットに結合する。ある実施の形態では、当該技術が、少なくとも約 $10M^{-4}$ 、 $10M^{-5}$ 、 $10M^{-6}$ 、 $10M^{-7}$ 、 $10M^{-7}$ 、 $10M^{-8}$ 、 $10M^{-9}$ 、 $10M^{-10}$ 、 $10M^{-11}$ 、 $10M$ の K_D 、またはそれ以下(例えば 10^{-4} 以下の数字を意味する、 10^{-5} のような)の標的に対する K_D を有するならば、当該技術は、標的に特別に結合する。一実施の形態

40

50

では、「CD117への比結合」又は「CD117への比結合」という用語は、本項で使用するように、CD117に結合し、表面プラズモン共鳴により決定されるように、酸解離定数(K_D)が 1.0×10^{-7} M以下のCD117への結合を有する(又はADC)を意味する。一実施形態では、 K_D (M)は、標準バイオ層干渉法に従って決定される。一実施の形態では、 K_{off} (1/s)は、標準のバイオ層干渉法(BLI)に従って決定される。しかしながら、この抗原は、連続して関連する2つ以上の抗原に特別に結合することができるかもしれないことを理解しなければならない。例えば、一実施の形態では、CD117のヒト及び非ヒト(例えば、マウス又は非ヒト霊長類)の両方のオーソログに、特定の結合することができる。

【0051】

ここで使用される「被検者」および「患者」という用語は、ここに記載されているように特定の病気または状態の治療を受けている人間のような有機体を指す。例えば、ヒト患者のような患者は、外因性造血幹細胞の生着を促進するために、造血幹細胞移植療法に先立って治療を受けることができる。

ここで用いられるように、「実質的に血液から除去される」という句は、患者から分離された血液サンプル中の治療薬の濃度が従来の方法では検出できないような場合(例えば、治療薬が治療薬の騒音の境界を越えて検出できない、または治療薬を検出するために使用された分析が検出できないような場合)、治療薬(例えば、抗CD117抗原結合断片、抗CD117 ADCのような)を患者に投与した後の時点を指す。当技術分野で公知の、または本明細書に記載のELISAベースの検出アッセイなどの、抗体、抗原結合フラグメント、およびADCを検出するために、当技術分野で公知の種々の技術を使用することができる。本技術分野で知られているものの中で、アッセイを用いて、抗毒剤、又は抗菌断片を検出することができる追加のアッセイには、予防接種技術及びイムプロットアッセイが含まれる。

【0052】

ここで用いられるように、「幹細胞障害」という用語は、広く、被検者の標的組織を整理し、また/又は標的組織内の内生の幹細胞集団を治癒すること(例えば、被検者の骨髓組織から内生の血液細胞または祖先細胞集団を治癒すること)、及び/又は被検者の標的組織に幹細胞を接木または移植することによって治療または治療することができる病気、障害または状態を指す。例えば、タイプ1糖尿病は血液細胞移植によって治癒されることが示されており、本書に記載された構成と方法に従った調整が有益であることが示されている。本書に記載された組成物及び方法を用いて治療することができる追加の障害には、限定されないが、鎌状赤血球症、サラセミア、ファンconi貧血、無弾性貧血、ウイスコット・アルドリッチ症候群、ADA SCID、HIV/AIDS、メタクロドロピストロフィー、ダイヤモンド・ブラックファン貧血およびシュワックマン・ダイヤモンド症候群が含まれる。本明細書に記載される患者の調整および/または造血幹細胞移植方法を用いて治療されるさらなる疾患は、遺伝性血液障害(例えば、鎌状赤血球症)および強皮症、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、およびクローン病のような自己免疫障害を流入する。ここに記載された調整及び/又は移植方法を用いて治療され上記追加の病気には、リンパ腫、肺、及び骨髓膜のような悪性又は血液がんが含まれる。例えば、癌は、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、または非ホジキンリンパ腫であり得る。ここに記載されている調整および/または移植方法を用いて治療可能な追加の病気には、骨髄細胞障害症候群が含まれる。いくつかの実施形態において、被検者は代謝貯蔵障害を有するか、あるいはそうでなければ影響を受ける。例えば、被検者は、糖原病、ムコ多糖症、ハーラー病、スフィンゴ脂質症、異染性白質ジストロフィー、または本明細書に開示される治療および治療から有益であり得る任意の他の疾患または障害(限定されるわけではないが、重度複合免疫不全症、ウイスコット・アルドリッチ症候群、高免疫グロブリンM (IgM)症候群、チェディアック-東病、遺伝性リンパ組織球症、骨形成不全症、蓄積症、サラセミアメジャー、鎌状赤血球症、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、若年性関節リウマチ、またはそれらの疾患、またはASH教育書籍、1:319-338(2000)、その開示は、造血幹細胞

移植療法の投与によって治療され得る病態に関するものであるため、ここではその全体を引用して組み込む。

【0053】

ここで用いられるように、「転換」という用語は、原核または真核宿主細胞への外生DNAの導入に一般的に用いられる、様々な技術の総称である。たとえば、エレクトロポレーション、リップフェクト、リン酸カルシウム沈降、DEAE-dextran転換などである。

ここで用いられる「治療」という用語は、病気の症状の重度および/または周波数を低減し、病気の症状および/または当該症状の根本的な原因を除去し、病気の症状および/またはその根本的な原因の周波数または可能性を減少させ、病気によって直接または間接に引き起こされる損害を向上または上記すること、あるいは、長生き、病気のような病気の結果の向上、あるいは、他の治療様式の副産物である副作用の軽減/またはその/または軽減を意味する。この技術で容易に理解されるように、病気の完全な根絶は好ましいが、治療法の必要性ではないにしても好まれる。有益な、または望ましい臨床結果には、本書およびその後の血液細胞移植治療に続く患者のための外生血液細胞の移植を促進することが含まれるが、これに限定されない。さらなる有益な結果には、コンディショニング療法およびその後の患者への外因性造血幹細胞移植片の投与に続く、造血幹細胞移植を必要とする患者における造血幹細胞の細胞数または相対濃度の増加が含まれる。本明細書に記載される治療の有益な結果はまた、コンディショニング療法およびその後の造血幹細胞移植療法に続いて、巨核球、血小板、血小板、赤血球、マスト細胞、筋芽細胞、好塩基球、好中球、好酸球、ミクログリア細胞、顆粒球、単球、破骨細胞、抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、Tリンパ球、またはBリンパ球などの造血系列の1つ以上の細胞の細胞数または相対濃度の増加を含み得る。さらなる有益な結果には、癌細胞の集団(例えば、CD117+白血病細胞)または自己免疫細胞の集団(例えば、CD117+自己免疫リンパ球、例えば、自己抗原と交差反応するT細胞レセプターを発現するCD117+ T細胞)のような障害を引き起こす細胞集団の量の低下が含まれ得る。本開示の方法が障害を防止することに向けられる限りにおいて、用語「防止する」は、障害状態を完全に阻止する必要はないと理解される。むしろ、ここで用いられるように、予防という用語は、当業者が障害に影響されやすい集団を特定する能力を意味し、したがって、本開示の化合物の投与は、病気の発生前に起こり得る。この用語は、病態が完全に回避されていることを意味するものではない。

10

20

30

【0054】

ここで用いられるように、「バリエーション」および「派生物」という用語は、互換的に使用され、また、ここに記載されている複合物、ペプチド、タンパク質、またはその他の物質の自然発生的、合成的および半合成アナログを指す。ここに記載されている複合物、ペプチド、タンパク質、またはその他の物質の変形または派生物は、元の物質の生物学的活性を維持または改善することができる。

ここで用いられるように、「ベクター」という用語は、プラスミド、DNAベクトル、プラスミド、RNベクトル、ウイルス、または他の適切なレプリコンのような核酸ベクトルを含む。ここに記載される表現ベクトルは、ポリヌクレオチド配列並びに、例えば、タンパク質の表現及び/又はこれらポリヌクレオチド配列を哺乳類細胞のゲノムに積分するのに用いられる追加の配列要素を含むことができる。本開示の抗生物質及び抗生物質断片の表現に用いることができる特定のベクターには、遺伝子転写を直接する促進剤及び向上剤のような規制配列を含むプラスミドが含まれる。他にも、抗生物質および抗生物質断片の表現に有用なベクターには、ポリヌクレオチド配列が含まれており、これはこれらの遺伝子の翻訳速度を高めるか、遺伝子転写から結果mrnaの安定性または核輸出を改善する。これらの配列要素は、例えば、発現ベクター上に担持された遺伝子の効率的な転写を指示するために、5'および3'非翻訳領域、ならびにポリアデニル化シグナル部位を含み得る。本明細書中に記載される発現ベクターはまた、そのようなベクターを含有する細胞の選択のためのマーカーを符号化するポリヌクレオチドを含有する。適切なマーカーの実施例には、アンピシリン、クロランフェニコール、カナマイシン、ノルソトリシンなどの抗生

40

50

物質に抵抗性を示す遺伝子が含まれる。

【0055】

本明細書中で使用される「アシル」という語は、 $-C(=O)R$ を指し、ここで、Rは、本明細書中で定義されるように、水素(「アルデヒド」)、アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルである。非限定的な実施例としては、フォルミル、アセチル、プロパノイル、ベンゾイル、およびアクリロイルが挙げられる。

ここで用いられるように、「アルキル」という用語は、例えば、鎖中の1から20の炭素原子を有する、直線又は枝分かれした鎖状のアルキル基を意味する。アルキル基の例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、tert-ペンチル、ヘキシル、イソヘキシルなどが挙げられる。

10

【0056】

ここで用いられるように、「アルキレン」という用語は、直線又は分岐鎖二価アルキル基を意味する。二価の位置は、アルキル鎖の中の同じまたは異なる原子の上にあってもよい。アルキレンの実施例には、メタレン、エチレン、プロピレン、イソプロピレン等が含まれる。

ここで用いられるように、「ヘテロアルキル」という用語は、例えば、チェーン内に1から20の炭素原子を持ち、さらにチェーン内に1つ以上のヘテロ原子(例えば、酸素、窒素、硫黄など)を含む、まっすぐな又は枝分かれした鎖状のアルキル基を意味する。

20

ここで用いられるように、「ヘテロアルキレン」という用語は、まっすぐな又は分岐鎖の二価ヘテロアルキル基を意味する。二価の位置は、ヘテロアルキル鎖の中の同じ原子または異なる原子の上にあってもよい。二価の位置は、1つ以上のヘテロ原子である。

【0057】

本明細書中で使用される場合、用語「アルケニル」は、鎖中に例えば2~20個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖のアルケニル基を指す。アルケニル基の例としては、ビニル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、tert-ブチレニル、ヘキセニルなどが挙げられる。

ここで用いられるように、「アルケニレン」という用語は、直線又は分岐鎖の二価アルケニル基を意味する。二価の位置は、アルケニル鎖内の同一または異なる原子上にあってもよい。アルケニレンの実施例には、エチレン、プロペニレン、イソプロペニレン、ブテニレンその他が含まれる。

30

ここで用いられるように、「ヘテロアルケニール」という用語は、例えば、チェーン内に2から20の炭素原子を持ち、さらにチェーン内に1つ以上のヘテロ原子(例えば、酸素、窒素、硫黄など)を含む、直線または枝分かれしたアルケニール基を意味する。

本明細書で使用される用語「ヘテロアルケニレン」は、直鎖または分岐鎖の二価のヘテロアルケニル基を指す。二価の位置は、ヘテロアルケニル鎖内の同一または異なる原子上にあってもよい。二価の位置は、1つ以上のヘテロ原子である。

【0058】

ここで用いられるように、「アルキニール」という用語は、例えば、チェーン内の2から20の炭素原子を有する、直線状または枝分かれしたアルキニール基を意味する。アルキニール基の実施例としては、プロパルギル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニルなどが挙げられる。

40

ここで用いられるように、「アルキン」という用語は、直線又は分岐鎖二価アルキニール基を意味する。二価の位置は、アルキニール鎖の中の同じ原子または異なる原子の上にあってもよい。

ここで用いられるように、「ヘテロアルキニール」という用語は、例えば、チェーン内に2から20の炭素原子を持ち、さらにチェーン内に1つ以上のヘテロ原子(例えば、酸素、窒素、硫黄など)を含む、直線または枝分かれしたアルキニール基を意味する。

本明細書中で使用される場合、用語「ヘテロアルキニレン」は、直鎖または分岐鎖の二価

50

ヘテロアルキニル基を指す。二価の位置は、ヘテロアルキニール鎖の中の同じ原子または異なる原子の上に存在することがある。二価の位置は、1つ以上のヘテロ原子である。

【0059】

本明細書中で使用される場合、用語「シクロアルキル」は、飽和であり、例えば、3~12個の炭素環原子を有する、単環式、または縮合、架橋、またはスピロ多環式環構造を指す。シクロアルキル系の実施例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、二環式[3.1.0]ヘキササン等がある。

ここで使用されるように、「シクロアルキレン」という用語は、二価シクロアルキル基を意味する。二価の位置は、環構造の中の同じまたは異なる原子の上にあってもよい。シクロアルキレンには、シクロプロピレン、シクロブチレン、シクロペンチレン、シクロヘキシレン等がある。

10

本明細書で使用する場合、「ヘテロシクロアルキル」という用語は、飽和し、例えば、炭素原子から選択される環構造あたり3~12個の環原子、および、とりわけ窒素、酸素、および硫黄から選択されるヘテロ原子を有する、単環式、または縮合、架橋、またはスピロ多環式環構造を指す。環構造は、例えば、炭素、窒素、硫黄リング部材上の1つ以上のオキソグループを含むことができる。ヘテロシクロアルキルの実施例としては、実施例として、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(ピペリジル)、テトラヒドロチオフェニル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、テトラヒドロフランニル、テトラヒドロピラニル、ビス-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、ピペラジニル、キヌクリジニル及びモルホリニルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0060】

本明細書中で使用される場合、用語「ヘテロシクロアルキレン」は、2価のヘテロシクロアルキル基を指す。二価の位置は、環構造の中の同じまたは異なる原子の上にあってもよい。

ここで用いられるように、「アリル」という用語は、例えば、6から19の炭素原子を含む単周期又は多周期の芳香族環系を意味する。アリール基には、フェニル基、フッ素ニール、ナフチル等が含まれるが、これらに限定されない。二価の位置は、1つ以上のヘテロ原子である。

30

ここで用いられるように、「アリーレン」は二価アリール基を意味する。二価の位置は同じか違う原子の上にあるかもしれない。

【0061】

本明細書で使用される場合、用語「ヘテロアリール」は、1つ以上の環原子がヘテロ原子、例えば、窒素、酸素または硫黄である、単環式複素芳香族、または二環式もしくは三環式縮合環複素芳香族基を指す。ヘテロアリール群には、ピリジル、ピロリル、イミゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,3-オキシアジアジアル、1,2,5-オキシアジアリル、1,3,4-トリアジール、1,3-トリアズリル、ベンゾフリル、[2,3-ジゾリル]ベンゾフリル、イソベンゾフリル、ベンゾトリアジール、ベンゾトリール、ベンゾリジル、1,2-2ピリド[3,4-b]ピリジル、ピリジル[4,3-b]ピリジル、キノリニル、ピリジル[4,3-b]ピリジル、キノリル、テトラゾリル、5,6,7,8-テトライソキノリル、プリニール、プテリジニール、カルバオリジニール、ベンゾノリルなどである。

40

ここで用いられるように、「ヘテロアリーレン」という用語は、二価ヘテロアリール基を意味する。二価の位置は同じか違う原子の上にあるかもしれない。二価の位置は、1つ以上のヘテロ原子である。

【0062】

上記の個々の置換基の定義によって別段制限されない限り、「アルキル」、「アルキレン」、「アルキン」、「アルキニール」、「アルキニール」、「アルキニール」、「シクロアルキル」、「ヘテロシクロアルキル」、「アリール」、「アリーレン」、「ヘテロアリール

50

」基は、例えば、アルキル、アルキニール、アルキル、ヘテロシクロアルキル、アルキルシクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アミノ、アンモニウム、アシルコキシ、アシルミノからなる基から選ばれた1~5の置換基で代用することができる。アミノカルボニール、アルコキシル、ウレイド、カルバメイト、アリール、ヘテロアリール、スフィニール、アルコキシ、スファニール、ハロゲン、トリハロメチル、シアノ、水銀、メルカプト、ニトロ等典型的な置換剤は、 $-XOBR)_3$, $-CX_3$, $-CN$, $-OCN$, $-SCN$, $-NCO$, $-NCS$, $-OOXH$, $-NC(=O)R$, $-C(=O)H$, $-C(=O)R$, $-C(=O)_2$, $-SO_3^-$, $-SO_3H$, $-S(=O)_2R$, $-OS(=O)FR)_2$, $-S(=O)R$, $-OP(=O)(OH)_2$, $-OP(=O)(OR)_2$, $-P(=O)(OR)_2$, $-PO_3$, $-PO_3H_2$, $-C(=O)(=S)OR$, $-C(=O)SR$, $-C(=S)SR$, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)OJS$, $-R$, $-OH$, $-OR$, $-SH$, $-SR$, NH_2 , $-NHR$, $-N(R)_2$, $-N^+$ ($-C(=NH)NH_2$, $-C(=O)N$ (および $-C(=NR)N(R)_2$ を含み、ここで、各々のXは、F、Cl、Br、およびIからのそれぞれのオカレンスに対して独立して選択され、各々のRは、オカレンス、アリール、ヘテロシクロアルクまたはヘテロアリールから独立して選択される。群が「任意に置換」と記述されるところでは、どこであれ、その群は、個々の場合とは独立に、上記置換体のうちの1つ以上で置換することができる。置換は、隣接する置換基が閉環を受けて、例えば、ラクタム、ラクトン、環状無水物、アセタール、ヘミアセタール、チオアセタール、アミナール、およびヘミアミナールを形成し、例えば、保護基を与えるために閉環によって形成される、隣接する官能性置換基の閉環などの状況を含み得る。

【0063】

特定のラジカル命名規則には、状況に応じて、モノラル・ラディカルまたはディ・ラディカルのどちらかが含まれることがあることを理解する必要がある。たとえば、置換基が分子の残りの部分に2つの付着点を必要とする場合、その置換基はジラジカルであることがわかる。例えば、2結合点を必要とする「アルキ」として識別される代替物は、 $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$, 等のような「ジラジカル」を含む。他の根本的な命名規則は、この急進的なものが、「アルキレン」、「アルケニレン」、「アリーレン」、「ヘテロシクロアルキレン」などのジラジカルであることを明確に示している。代替体がジラジカル(すなわち、分子の他の部分に2つの付着点を持つ)として描写される場合、他に示されない限り、代替体はどんな方向にも付着することができることを理解する必要がある。

「イソメリズム」とは、同一の分子式をもっているが、その原子の結合の順序や空間における原子の配列が異なっている化合物をいう。空間における原子の配置が異なっているイソマーを「立体異性体」と呼び、互いに鏡映しない立体異性体を「ジアステレオ異性体」と呼び、重ね合わせることができない鏡像他を「エナンチウム」、あるいは「光学異性体」と呼ぶこともある。

【0064】

4つの非同一の置換基に結合した炭素原子は「キラル中心」と呼ばれ、「キラルイソマー」は少なくとも1つのキラル中心を持つ複合体を意味し、複数のキラル中心を持つ複合体は、個々のジアステレオマーとして存在するか、「ジアステレオマー混合物」と呼ばれるジアステレオマーの混合物として存在することがある。一つのキラル中心が存在するとき、立体はそのキラル中心の絶対的な配置(RまたはS)によって特徴づけられる。絶対配置とは、キラル中心に付着した置換基の空間における配置をいう。検討中のキラル中心に付着した置換基は、Cahn, Ingold, Prelogの配列規則に従ってランク付けされた。(Cahn et al., *Angew. Chem. Inter. Edit.* 1966, 5, 385; errata 511; Cahn et al., *Angew. Chem.* 1966, 78, 413; Cahn and Ingold, *J. Chem. Soc.* 1951 (London), 612; Cahn et al., *Experientia* 1956, 12, 81; Cahn, *J. Chem. Educ.* 1964, 41, 116) 正反対のキラリティの個々のエナンチメリック形成を等量含む混合物を「ラセミック混合物」と呼ぶ。

【0065】

この説明及びクレームにおいて開示される化合物は、1つ以上の非対称中心を含み、また、各化合物の異なるジアステレオマー及び/又は鏡像異性体が存在することがある。この

説明及びクレームのどれかの化合物の記述は、特に記載のない限り、すべての鏡像異性体、ジアステレオマー、及びそれらの混合物を含むことを意図している。加えて、この説明及びクレームのどれかの化合物の記述は、別に記載されていない限り、鏡像異性体の、個々の鏡像異性体、並びに、ラセミック、その他の混合物の両方を含むことを意図したものである。複合物の構造が、特定のエンベンチマーとして描写される場合、本出願の開示は、その特定のエンベンチマーに限定されないことを理解する必要がある。したがって、本開示の構造式の各々の鏡像異性体、光学異性体、およびジアステレオマーが、本明細書中で企図される。本明細書では、複合物の構造式は、便宜上、ある種の異性体を表しているが、本明細書には、幾何学的異性体、非対称炭素に基づく光学異性体、立体異性体、トートマー等の全ての異性体が含まれており、全ての異性体と同じ活動レベルを持つとは限らないことが理解されている。化合物は、異なる互変異性体形態で生じ得る。本開示による化合物は、特に記載のない限り、すべての同性体形成を含むことを意図している。複合物の構造が特定のトートマーとして描写される場合、本出願の開示は、特定のトートマーに限定されないことを理解する必要がある。

10

20

30

40

50

【0066】

本明細書に記載される任意の式の化合物は、化合物自体、ならびにそれらの塩、および該当する場合にはそれらの溶媒和物を含む。例えば、塩は、開示の複合体上のアニオンと正電荷を帯びた群(例えば、アミノ)の間で形成することができる。適切なアニオンとしては、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硫酸塩、重硫酸塩、スルファミン、硝酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸塩、グルタメート、グルクロネート、グルクロネート、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、トシレート、サリチル酸エステル、乳酸塩、ナフタレンスルホン酸塩、および酢酸塩(例えば、トリフルオロ酢酸塩)が挙げられる。「薬学的に許容されるアニオン」という用語は、薬学的に許容される塩を形成するのに適したアニオンを意味する。同様に、開示の複合体上で、カチオンと負電荷を帯びたグループ(例えばカルボキシレート)の間で塩を形成することもできる。適当なイオンには、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、およびテトラエチランモニウムイオンのようなアンモニウムイオンが含まれる。いくつかの適切な置換アンモニウムイオンの実施例は、エチルアミン、ジエチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、トリエチルアミン、ブチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジン、ベンジルアミン、フェニルベンジルアミン、コリン、メグルミン、およびトロメタミン、ならびにアミノ酸、例えばリジンおよびアルギニンから誘導されるものである。開示される化合物にはまた、第四紀窒素原子を含むそれらの塩も含まれる。

【0067】

適当な無機アニオンの実施例としては、以下の無機酸から誘導されるものが挙げられるが、これらに限定されない、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、亜硫酸、硝酸、亜硝酸、リン酸、およびリンである。適切な有機アニオンの実施例としては、以下の有機酸が含まれるが、これらに限定されないが、以下の有機アニオンの実施例には以下が含まれ、2-アセチ安息香、コルビック、安息香、安息香、スルフォニック、ケティック、クエン酸、エタニスルフォニック、エタネスルフォニック、エタネスルフォニック、フマリック、グルプトニック、グルトニック、グルタミン、グルティック、グリコリック、ハイキシマレイク、ヒドロキシマレインカルボキシリック、チオン酸、乳酸、ラクチック、ラウリック、マレイク、マリック、メタネルフオニック、ムカリック、オキサリック、パルミチック、パモアチック、パトセニックである。適当なポリマー有機アニオンの実施例には、以下のポリマー酸から得られたものが含まれるが、これらに限定されない、タンニン酸、カルボキシミルセルロースである。

【0068】

加えて、本開示の化合物の化合物は、例えば、水分補給または水分補給されていない(無水)形態で存在することもあれば、他の溶媒分子と共にソルベートとして存在することもある。ハイドレートの無限の実施例には、単非、ジハイドレートなどがある。溶媒和物の

非限定的な例としては、エタノール溶媒和物、アセトン溶媒和物などが挙げられ、「溶媒和物」とは、化学量論的または非化学量論的な量の溶媒を含有する溶媒付加形態を意味する。いくつかの化合物は、結晶性固体状態において溶媒分子の固定されたモル比を捕捉し、したがって溶媒和物を形成する傾向を有する。溶媒が水の場合、生成する溶媒和物は水和物であり、溶媒がアルコールの場合、生成する溶媒和物はアルコールである。水化物は、水がH₂Oとしての分子状態を保っている物質の1分子と、1つ以上の水分子を組み合わせ形成される。水和物とは、例えば、一水和物、二水和物、三水和物などを指す。加えて、本明細書に開示される公式により表される化合物またはそれらの塩に対して結晶多型が存在することができる。本開示の範囲には、水晶形成、結晶形成、混合物、無水物化合物またはそのハイドレートが含まれることに注意されたい。

10

【0069】

抗CD117抗体

本開示は、一部は、治療目的に有用な新規反CD117抗生物質及び抗原結合部の発見に基づく。また、本開示は、GNNK+ CD117のようなCD117と結合することができる抗体、またはその抗原結合フラグメントが、(i)癌(急性骨髄性白血病または骨髄異形成症候群など)およびCD117+細胞を特徴とする自己免疫疾患を治療し、(ii)移植治療を必要とする患者において移植された造血幹細胞の生着を促進するための治療薬として単独で(またはADCとして)使用できるという発見に部分的に基づいている。これらの治療活性は、例えば、抗CD117抗体、またはその抗原結合フラグメントの、癌細胞、自己免疫細胞、または造血幹細胞のような細胞の表面上に発現され、続いて細胞死を誘導するCD117(例えば、GNNK+ CD117)への結合によって引き起こされ得る。内因性造血幹細胞の枯渇は、移植された造血幹細胞が帰宅できるニッチを提供し、続いて、生産的造血を確立することができる。このように、移植された血液細胞は、ここに記載された幹細胞障害に苦しむ人間のような患者において、接ぎ木に成功する可能性がある。

20

【0070】

ヒトCD117(c-Kit、mRNA NCBI参照配列: NM_000222.2、タンパク質BINC参照配列: NP_000213.1とも呼ばれる)に結合することができる抗体および抗原結合フラグメント(GNNK+ CD117に結合することができるものを含む)は、造血幹細胞移植治療のために患者をコンディショニングするために、本明細書に記載の組成物および方法と併せて使用することができる。集団のかなりの割合でCD117のコーディング領域または細胞外ドメインに影響を及ぼす多型は、現在、非腫瘍学的表示ではよく知られていない。CD117には少なくとも4つのアイソフォームが同定されており、腫瘍細胞に発現するさらなるアイソフォームの可能性もある。CD117アイソフォームのうち2つは蛋白質の細胞内ドメインに位置し、2つは外部傍膜領域に存在する。2つの細胞外アイソフォーム、GNNK+とGNNK-は、4アミノ酸配列の存在(GNNK+)または非存在(GNNK-)が異なる。これらの同質体はリガンド(SCF)と同じ親和性を持つと報告されているが、GNNKisoformに結合するリガンドは内部化と劣化を増加させると報告されている。GNNK+アイソフォームは、このアイソフォームに対して生成された抗体がGNNK+およびGNNKタンパク質を包含するので、CD117に結合することができる抗体を生成するための免疫原として使用することができる。

30

40

いくつかの実施例では、抗原、又はその抗原結合断片は、SEQ ID NO: 1のアミノ酸残留物の中にあるエピトープでヒトCD117を結合する。SEQ ID NO: 1はヒトCD117抗原に対応し、以下のアミノ酸配列を有する。

QPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCTDPGFVKWTFEILDETENKQNEWI
TEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVVRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTD
PEVTNYSKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKRAYHRLCLHCSVDQEGKSVLS
EKFILKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTKL
QEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYANNTFGSANVTTTLEVVDKG
FINIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAFFPKPEHQWIYMNRTFTDKWEDYPKSENE
SNIRYVSELHLTRLKGTGGTYTFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKPEILTYDRLVNGM

50

LQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAF KHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTHHHHH (SEQ ID NO: 1)。PCT/US2018/057180に記載されているように(その内容は本文中に参考文献に含まれる)、ヒト抗生物質のscFVファージディスプレイライブラリスクリーンを実施し、新規の抗CD117、並びにそれらのフラグメントを治療目的で使用した。Antibody 85(Ab85)などがこの画面で確認された。

【0071】

Ab85の重鎖可変領域(VH)アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2として提供される。Ab85のVH CDRアミノ酸配列は下線で示され、NYWIG (VH CDR1;配列番号:3); IINPRDS DTRYRPSFQG (VH CDR2;配列番号:4);およびHGRGYEGYEGAFDI (VH CDR3;配列番号:5)である。

10

Ab85 VHの配列

GSCKKKKKEQKKEVSKGEVSKGEVSQEVGEVSKEVVGEVWGLEGIDSINPRDPRDVS AYSTAYQSSWSSLKASDYCARGYEGEFGGTVSS (SEQ ID NO: 2)

Ab85の軽鎖可変領域(VL)アミノ酸配列は、SEQ ID No.6として提供される。Ab85のVL CDRアミノ酸配列は、RSSQGIRSDLG (VL CDR1; SEQ ID NO: 7); DASNLET (VL CDR2; SEQ ID NO: 8);QANGFPLT (VL CDR3; SEQ ID NO: 9)である。

Ab85 VL配列

QMTQDISSQDIRSQGSDQGS GDSRSQYGGQSPLS QYRSQWPKAPGPKAPLLFSTQ PEDFATYQCANGFPLTFGTGKVEIK (SEQ ID NO: 6)

20

【0072】

ヒト抗体Ab85は、アンタゴニスト抗CD117抗体である抗体CK6に由来した。図1A~1B(CDRも指定)には、Ab85とAb249とCK6の可変領域のアミノ酸配列の比較が示されている。Ab85抗原は、CK6を越えて、例えば、結合特性の改善などの特性を改善した。CK6には重鎖可変領域のCDR3領域の電位脱アミド化サイトが含まれる。抗体の将来の産生のために除去することは有利であるが、アスパラギンの位置は重要な課題である。しかし、アニトボディ(having Ab85重鎖および軽鎖CDR)がヒトCD117に対する高い親和性量特殊性と内部化能力を維持できるように、Ab85重鎖CDR3において、電位脱アミドサイトは成功裏に除去された。さらに、Ab85は親と比べて割引率が改善している。したがって、特定の実施例においては、抗CD117は、SEQ ID No:3、4、5に記載されたCDRセット(CDR1、CDR2、CDR3)からなる重鎖と、SEQ ID No:7、8、9に記載されたCDRからなるL鎖とで構成され、CD117を表現する細胞内に内在化する。

30

【0073】

ここに記載された抗CD117抗生物質又は結合フラグメントは、また、本技術で知られるように、半減期を増加させるもの、ADCCを増加または減少させるもの等の、抗生物質及び/又は断片の特性を変化させる改変及び/又は突然性を含んでいることがある。

【0074】

一実施形態では、当該変形例Fc領域は、野生型Fc領域に比較して少なくとも1つのアミノ酸変質を含み、当該分子はFcγR1に対する変質親和性を有する変形例Fc領域を含んでいる、反CD117の、又はそれらの結合フラグメントは、変形例Fc領域を含んでいる。Fc領域内のいくつかのアミノ酸位置は、Fcに対して直接接触するための結晶学研究を通して知られている。具体的には、アミノ酸234-239(ヒンジ領域)、アミノ酸265-269(B/Cループ)、アミノ酸297-299(C'/Eループ)、アミノ酸327-332(F/G)ループである。(Sondermannら、2000 Nature, 406: 267-273を参照)。例えば、Fc領域のアミノ酸位置234および235におけるアミノ酸置換は、Fcレセプター、特にFcγR1レセプター(FcγR1)に結合するIgG抗体の親和性の減少として同定されている。一実施の形態では、ここに記載された抗CD117の領域は、L234および/またはL235のアミノ酸代替物、例えばL234AおよびL235A (EU指数)からなるFc領域を含んでいる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗CD117抗体は、構造的および結晶学的分析に基づいて、FcγR1と直接接触する少なくとも1つの残渣の修飾を含む変形例Fc領

40

50

域を含み得る。一実施形態では、抗CD117のFc領域(又はそのフラグメントを含むFc)は、KabatらによるEU指数によれば、EU指数におけるアミノ酸265におけるアミノ酸置換を含んでいる。これは、引例によって明示的にここに含まれている、Kabatら、Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991)による。「カバトのようなEU指数」または「EU指数」は、ヒトIgG1 EU抗原薬のナンバリングを意味し、特に記載のない限り、本稿では、Fcアミノ酸位置を参考に使用する。

【0075】

一実施形態では、Fc領域はD265A突然異変を含む。1つの実施形態において、Fc領域はD265C突然異変を含む。

10

いくつかの実施形態において、反CD117のFc領域(又はそのフラグメント)は、カバトにおけるように、EU指数によれば、アミノ酸234におけるアミノ酸置換を含む。1つの実施形態において、Fc領域はL234A突然異変を含む。いくつかの実施形態において、反CD117のFc領域(又はそのフラグメント)は、カバトにおけるように、EU指数によれば、アミノ酸235におけるアミノ酸置換を含む。1つの実施形態において、Fc領域はL235A突然異変を含む。さらに別の実施形態では、Fc領域はL234AとL235Aの突然変異を含む。更なる実施の形態では、Fc領域はD265C、L234AおよびL235Aの突然変異を含む。

いくつかの実施形態において、反CD117のFc領域(又はそのフラグメント)は、カバトにおけるように、EU指数によれば、アミノ酸239におけるアミノ酸置換を含む。1つの実施形態では、Fc領域はS239C突然異変を含む。

20

【0076】

一実施形態では、Fc領域は、D265、V205、H435、I253、および/またはH310のアミノ酸位置における突然異変を含む。例えば、これらの位置における特定の突然変わりには、D265C、V205C、H435A、I253A、および/またはH310Aが含まれる。

1つの実施形態において、Fc領域はL234A突然異変を含む。いくつかの実施形態において、反CD117のFc領域(又はそのフラグメント)は、カバトにおけるように、EU指数によれば、アミノ酸235におけるアミノ酸置換を含む。1つの実施形態において、Fc領域はL235A突然異変を含む。さらに別の実施形態では、Fc領域はL234AとL235Aの突然変異を含む。更なる実施の形態では、Fc領域はD265C、L234AおよびL235Aの突然変異を含む。さらに別の実施形態では、Fc領域はD265C、L234A、L235AおよびH435Aの突然変異を含む。更なる実施の形態では、Fc領域はD265CとH435Aの突然変異を含む。

30

【0077】

さらに別の実施形態では、Fc領域はL234AとL235Aの突然変異(ここでは「L234A.L235A」または「LA」とも呼ばれる)を含む。別の実施形態では、Fc領域は、Fc領域がP329G突然異変を含まないL234A及びL235A突然異変を含む。更なる実施の形態では、Fc領域は、D265C、L234AおよびL235Aの枝変わり(ここでは「D265C.L234A.L235A」とも呼ばれる)を構成する。別の実施形態では、Fc領域はD265C、L234AおよびL235Aの突然変異を含み、Fc領域はP329Gの突然変異を含まない。さらに別の実施形態では、Fc領域は、D265C、L234A、L235A、およびH435A変異(本明細書では、「D265C.L234A.L235A.H435A」とも呼ばれる)を含む。別の実施形態では、Fc領域はD265C、L234A、L235AおよびH435Aの突然変異を含み、Fc領域はP329G突然変異を含まない。更なる実施の形態では、Fc領域はD265CとH435Aの突然変異(ここでは「D265C.H435A」とも呼ばれる)を含む。さらに別の実施形態では、Fc領域は、D265A、S239C、L234AおよびL235Aの枝変わり(また、ここでは、「D265A.S239C.L234A.L235A」とも呼ばれる)を構成する。さらに別の実施形態では、Fc領域はD265A、S239C、L234AおよびL235Aの突然変異を含み、Fc領域はP329Gの突然変異を含まない。別の実施形態では、Fc領域は、D265C、N297GおよびH435Aの突然変異(本稿では「D265C.N297G.H435A」とも呼ばれる)を含む。別の実施形態では、Fc領域は、D265C、N297QおよびH435Aの突然変わり(ここでは「D265C.N297Q.H435A」とも呼ば

40

50

れる)を含む。別の実施形態では、Fc領域は、E233P、L234V、L235AおよびdelG236(236の削除)(ここでは「E233P.L234V.L235A.delG236」または「EPLVLAdeIG」としても参照される)からなる。別の実施形態では、Fc領域は、E233P、L234V、L235AおよびdelG236(236の削除)突然異変を含み、Fc領域はP329G突然異変を含まない。別の実施形態では、Fc領域は、E233P、L234V、L235A、delG236(236の削除)およびH435Aの突然異変(ここでは「E233P.L234V.L235A.delG236.H435A」または「EPLVLAdeIG.H435A」としても参照される)からなる。別の実施形態では、Fc領域はE233P、L234V、L235A、delG236(236の削除)およびH435Aの突然変異を含み、Fc領域はP329G突然異変を含まない。別の実施形態では、Fc領域はL234A、L235A、S239CおよびD265Aの突然変異を含む。別の実施形態では、Fc領域はL234A、L235A、S239CおよびD265Aの突然変異を含み、Fc領域はP329Gの突然変異を含まない。別の実施形態では、Fc領域は、H435A、L234A、L235AおよびD265C突然異変を含む。別の実施形態では、Fc領域はH435A、L234A、L235AおよびD265C突然異変を含み、Fc領域はP329G突然異変を含まない。

10

【0078】

いくつかの実施形態では、上記抗CD117の領域は、非修正Fc領域をFc Rに含む同一の反対抗物の結合に関連して、Fcレセプター(Fc R)への結合が減少するとともに、*in vitro*エフェクター機能アッセイにおけるエフェクター機能を減少させるような改良されたFc領域を有する。いくつかの実施形態では、抗CD117の領域は、上記修正Fc領域を含む同一の反対Fc領域とFcimRとの結合に関連して、Fcガンマレセプター(FcimR)への結合が減少するとともに、*in vitro*エフェクター機能アッセイにおけるエフェクター機能の機能を減少させるような改良されたFc領域を有する。いくつかの実施形態において、FcガンマRは、FcガンマR1である。いくつかの実施形態において、FcガンマRは、FcガンマR2Aである。いくつかの実施形態において、FcガンマRは、FcガンマR2Bである。他の実施形態において、FcガンマRは、FcガンマR2Cである。いくつかの実施形態において、FcガンマRは、FcガンマR3Aである。いくつかの実施形態において、FcガンマRは、FcガンマR3Bである。他の実施形態では、結合の減少は、FcガンマRに対する未修飾Fc領域を含む同一抗体の結合と比較して、FcガンマRに対する抗体結合の少なくとも70%の減少、少なくとも80%の減少、少なくとも90%の減少、少なくとも95%の減少、少なくとも98%の減少、少なくとも99%の減少、または100%の減少である。他の実施形態において、結合の減少は、FcガンマRに対する未修飾Fc領域を含む同一抗体の結合と比較して、FcガンマRに対する抗体結合の少なくとも70%~100%の減少、少なくとも80%~100%の減少、少なくとも90%~100%の減少、少なくとも95%~100%の減少、または少なくとも98%~100%の減少である。

20

30

【0079】

いくつかの実施形態において、抗CD117抗体は、未修飾Fc領域を含む同一抗体のサイトカイン放出と比較して少なくとも50%のサイトカイン放出の減少を伴う、*in vitro*サイトカイン放出アッセイにおいてサイトカイン放出を減少させるように、修飾Fc領域を有する。いくつかの実施形態において、非修正Fc領域を含むサイトカイン放出と比較して、サイトカイン放出の減少は少なくとも70%減少、少なくとも80%減少、少なくとも90%減少、少なくとも95%減少、少なくとも98%減少、少なくとも99%減少、又はサイトカイン放出の100%減少である。いくつかの実施形態において、サイトカインの放出の減少は、非修正Fc領域を含む同一のサイトカインの放出と比較して、少なくとも70%から100%減少、少なくとも80%から100%減少、少なくとも90%から100%減少、少なくとも95%から100%減少するサイトカインの放出の減少である。特定の実施形態では、サイトカイン放出は、免疫細胞による。

40

【0080】

いくつかの実施形態において、抗CD117抗体は、未修飾Fc領域を含む同一抗体のマスト細胞脱顆粒と比較して少なくとも50%のマスト細胞脱顆粒の減少を上記*in vitro*マスト細胞脱顆粒アッセイにおいてマスト細胞脱顆粒を減少させるように、修飾Fc領域を有す

50

る。いくつかの実施態様において、マスト細胞の減少は、非修正Fc領域を含む同一抗菌のマスト細胞の減少に対して、少なくとも70%減少、少なくとも80%減少、少なくとも90%減少、少なくとも95%減少、少なくとも98%減少、少なくとも99%減少、又はマスト細胞の減少を100%減少させる。いくつかの実施形態において、マスト細胞脱顆粒の減少は、非修飾Fc領域を含む同一抗体のマスト細胞脱顆粒と比較して、マスト細胞脱顆粒の少なくとも70%~100%の減少、少なくとも80%~100%の減少、少なくとも90%~100%の減少、または少なくとも95%~100%の減少である。

【0081】

いくつかの実施形態において、抗CD117抗体は、抗体が、未修飾Fc領域を含む同一抗体のADCPと比較して少なくとも50%のADCPの減少を伴う、インビトロ抗体依存性細胞食作用アッセイにおいて抗体依存性細胞食作用(ADCP)を減少または防止するように、修飾されたFc領域を有する。いくつかの実施態様において、ADCPの減少は、非修正Fc領域を含むサイトキンの同一の領域からのサイトキンの放出と比較して、少なくとも70%減少、少なくとも80%減少、少なくとも90%減少、少なくとも95%減少、少なくとも98%減少、少なくとも99%減少、又はサイトキンの放出の100%減少である。

一部の実施形態では、D265C, D265C / H435C / LA, D265C / LA / H235A / L235A, D265A / L235A / L235A, D265C / L235A / L235A, D265C / N297G / N927G / H435C, D265C / H265C / EPLVLAdelG / H265C / H265C, EPLVLAdelG / H435A, D265C / N2927Q / H435A, EPLVLAdelG / H435A EPLVLAdelG / D265A, N2927Q, EPLVLAdelG / N2927G, N2927Q. ここでの抗CD117抗体は、以下の変形または組み合わせからなるFc領域から成る。D265A, D265C / H265C / LA, D265C / LA, D265C / N2927G / H435A, D265C(IgG2) / H435C / N2927Q, EPLVLAdelG / H435A, N2927A, N297G すなわち、N297Qである。

【0082】

改良Fc領域とFcガンマレセプターとの結合または親和性は、例えば、平衡法(例えば、ELISA; KinExA, Rathanaswami et al. Analytical Biochemistry, Vol. 373:52-60, 2008; または radioimmunoassay (RIA))または、表面プラズモン共鳴アッセイ、またはその他のキネティックスペースのメカニズム(例えば、BIACORE.RTM分析またはOctetTM分析(forteBIO))、および他の方法、ならびに間接結合アッセイ、競争結合アッセイ、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、ゲル電気泳動法およびクロマトグラフィー(例えば、ジェルフィルトレーション)に限定されないが周知の様々な技術を用いて決定することができる。これらおよび他の方法は、検討中の成分の一つまたはそれ以上のラベルを利用することができる、および/または、発色性、蛍光、発光、または同位体標識を含むが、それに限らない多様な検出方法を使用することができる。結合する親和性と運動学についての詳細な記述は、Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)に見られる。競合結合アッセイの一例は、増大する量の非標識抗原の存在下での標識抗原と目的の抗体とのインキュベーション、および標識抗原に結合した抗体の検出を含むラジオイムノアッセイである。特定の抗原に対する興味のある標本の親和性と結合オフレートは、スキッチャードプロット分析によりデータから決定することができる。また、ラジオイムノアッセイを用いて、第二の抗菌剤との競合を判断することもできる。この場合、この抗原は、標識されていない第2のピーンズの増加量の存在の中で、標識化された複合物に接合された興味のあるピーンズと共にインキュベートされる。

一実施形態では、本明細書に記載されるFc未変性の(例えば、D265C、L234A、L235A、および/またはH435A)を有する抗原修飾は、Fcガンマ受容体への非修飾Fc領域を含む同一の抗菌剤の結合に対する、少なくとも70%減少、少なくとも80%減少、少なくとも90%減少、少なくとも95%減少、少なくとも98%減少、少なくとも99%減少、または100%減少を有する(例えば、バイオレイヤー干渉法(BLI)によって評価されるように)。

【0083】

いかなる理論にも拘束されることを望まないが、Fcガンマ受容体とのFc領域結合相互作用

用は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害(CDC)を含むが、これらに限定されない、様々なエフェクター機能および下流シグナル伝達事象に必須であると考えられる。従って、特定の態様において、改良されたFc領域(例えば、L234A、L235A、および/またはD265C突然異変からなる)を含む抗菌は、エフェクター機能を実質的に減少または廃止した。効果機能は、対象応答に応じて細胞反応(例えば、マスト細胞の退化またはサイトキンの放出)を測定することによって、当該技術に知られている様々な方法を用いて評価することができる。例えば、通常の方法を用いて、例えば、ヒト周辺血液単核細胞によるように、Fc改良型抗生物質は、マスト細胞退化を引き起こすか、あるいはサイトキン放出を引き起こす能力のために、アッセイすることができる。特定の態様において、変形IgG Fcドメインは、1以上のアミノ酸代替物を含まない野生型Fcドメインと比較して、FcγRおよび/またはC1qに対する1つ以上のアミノ酸代替物またはアプレーション結合親和性の減少またはアプレーション結合親和性をもたらす1つ以上のアミノ酸代替物を含む。Fc結合相互作用は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害(CDC)を含むが、これらに限定されない、様々なエフェクター機能および下流シグナル伝達イベントに必須である。従って、特定の態様において、改良されたFc領域(例えば、L234A、L235A、およびD265C突然異変からなる)を含む抗菌は、エフェクター機能を実質的に減少または廃止した。

10

【0084】

Fc領域への親和性は、例えば、平衡法(例えば、ELISA; KinExA, Rathanaswami et al. *Analytical Biochemistry*, Vol. 373:52-60, 2008; またはradioimmunoassay (RIA)) または、表面プラズモン共鳴アッセイまたは他のキネティクススペースのアッセイのメカニズム(例:BIACORE™分析またはOctet™分析(forteBIO))、および他の方法(間接結合アッセイ、競争結合アッセイ、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、ゲル電気泳動法およびクロマトグラフィー(例:ゲルろ過))に限定されないが周知の様々な技術を用いて決定することができる。これらおよび他の方法は、検討中の成分の一つまたはそれ以上のラベルを利用することができる、および/または、発色性、蛍光、発光、または同位体標識を含むが、それに限らない多様な検出方法を使用することができる。結合する親和性と運動学についての詳細な記述は、Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)に見られる。競合結合アッセイの一例は、増大する量の非標識抗原の存在下での標識抗原と目的の抗体とのインキュベーション、および標識抗原に結合した抗体の検出を含むラジオイムノアッセイである。特定の抗原に対する対象の標本の親和性と結合オフレートは、スキャッチャードプロット分析によりデータから決定することができる。また、ラジオイムノアッセイを用いて、第二の抗菌剤との競合を判断することもできる。この場合、この抗原は、標識されていない第2のピーズの増加量の存在の中で、標識化された複合物に接合された興味のあるピーズと共にインキュベートされる。

20

30

【0085】

一実施の形態では、ここに記載された抗CD117の領域は、L235A、L235AおよびD265C (EUインデックス)からなるFc領域を含む。本開示の抗性は、例えば、(Dall'Acqua他(2006) *J Biol Chem* 281: 23514-24)、(Zalevsky他(2010) *Nat Biotechnol* 28: 157-9)、(Hinton他(2004) *J Biol Chem* 279: 6213-6)、(Shields他(2001) *J Biol Chem* 276: 6591-604)、(Petkova他(2006) *Int Immunol* 18: 1759-69)、(Darug *Metab Dispos* 35: 86-94)、(Vaccaro他(2005) *Nat Biotechnol* 23: 1283-8)、(Yeung他(2010年 *Cancer Res* 70: 3269-77 と (Kim et al. (1999) *Eur J Immunol* 29: 2819-25) ポジションには、250、252、253、254、256、257、307、376、380、428、434、435が含まれる。特異的に、または組み合わせて行われ得る例示的な変異は、T250Q、M252Y、I253A、S254T、T256E、P257I、T307A、D376V、E380A、M428L、H433K、N434S、N434A、N434H、N434F、H435AおよびH435R変異である。

40

【0086】

50

このように、一実施形態では、Fc領域は、半減期をもたらす突然変異を含んでいる。短い半減期を有する抗菌剤は、短期間の治療として機能することが期待される場合には、ある場合には有利であろう。例えば、本書に記載されている条件付工程において、抗菌剤がHSCsによって管理されることが有利であろう。理想的には、HSCs(一般にはCD117も表現するが、内生の幹細胞とは異なり、反CD117の標的ではない)の送達前に、この抗HSCsは実質的にクリアされるであろう。1つの実施形態では、Fc領域は、位置435(カバトによるEUインデックス)の突然変異を含む。1つの実施形態において、この突然変異はH435Aの突然変異である。

【0087】

一実施形態では、ここに記載される抗CD117の半減期は、約24時間に等しいか、約22時間以下、約20時間以下、約18時間以下、約16時間以下、約14時間以下、約13時間以下、約12時間以下、又は約11時間以下である。1つの実施形態では、抗菌剤の半減期は約11時間から約24時間、約12時間から約22時間、約10時間から約20時間、約8時間から約18時間、又は約14時間から約24時間である。

いくつかの側面では、Fc領域は、半減期をもたらし、また、大幅に、および、抗菌の効果的な機能を減少または完全に廃止する2つ以上の突然変異で構成される。いくつかの実施形態では、Fc領域は、半減期の減少とFcirと直接接触できる少なくとも1つの残渣の突然変異をもたらすような(例えば、構造的及び結晶学的分析に基づく)突然変異を含む。1つの実施形態では、Fc領域はH435A突然変異、L234A突然変異、およびL235A突然変異を含む。1つの実施形態において、Fc領域はH435A突然変異とD265C突然変異を含む。1つの実施形態において、Fc領域は、H435A突然変異、L234A突然変異、L235A突然変異、およびD265C突然変異を含む。1つの実施形態では、Fc領域はS239C突然変異を含む。

【0088】

幾つかの実施例では、抗CD117の、又はその抗原結合フラグメントは、サイトトキシン(例えば、カリケアミン)に、抗原結合フラグメントのFc領域内のシステイン残留物又はその抗原結合フラグメントを経由して接合される。いくつかの実施例では、システイン残留物は、抗原結合フラグメントのFc領域における突然変異によって導入される。たとえば、システイン残基は、Cys118、Cys239(例、S239C)、およびCys265からなる群から選択することができる。一実施の形態では、抗CD117のFc領域(又はそのフラグメント)は、カバトにおけるように、EU指数によれば、アミノ酸265におけるアミノ酸置換を含む。1つの実施形態において、Fc領域はD265C突然変異を含む。1つの実施形態では、Fc領域はD265CとH435Aの突然変わりを含む。1つの実施形態では、Fc領域はD265C、L234AおよびL235Aの突然変異を含む。1つの実施形態では、Fc領域はD265C、L234A、L235AおよびH435Aの突然変異を含む。一実施の形態では、カバトにおけるように、EU指数によると、抗CD117抗原結合断片のFc領域は、アミノ酸239におけるアミノ酸置換を含む。1つの実施形態では、Fc領域はS239C突然変異を含む。1つの実施形態では、Fc領域はL234A突然変異、L235A突然変異、S239C突然変異およびD265A突然変異を含む。別の実施形態では、Fc領域はS239CとH435Aの突然変わりを含む。別の実施形態では、Fc領域はL234A突然変異、L235A突然変異、およびS239C突然変異を含む。さらに別の実施形態では、Fc領域は、H435A突然変異、L234A突然変異、L235A突然変異およびS239C突然変異を含む。さらに別の実施形態では、Fc領域は、H435A突然変異、L234A突然変異、L235A突然変異、S239C突然変異およびD265A突然変異を含む。

【0089】

特に、Fcアミノ酸の位置は、特に示されていない限り、EU番号指数を参考にしている。これらのアスペクトのいくつかの実施例において、システイン残留物は、アンチCD117のFc領域またはそれらの抗原結合フラグメントにおいて自然に生じている。例えば、Fcドメインは、ヒトIgG1 FcドメインのようなIgG Fcドメインであり、システイン残基は、Cys261、Cys321、Cys367およびCys425からなるグループから選択され得る。

ここに記載されている改良型Fc領域はそれらを構成するアミノ酸の改良に従って定義されている。Fc領域に関してここで議論したすべてのアミノ酸置換物について、番号は常にEU指数に従う。したがって、例えば、D265Cは、EU位置265におけるアスパルチン酸(D)のFc変形例であり、親Fc領域に対してシスチン(C)で置き換えられる。同様に、例えば、D265C/L234A/L235Aは、EU位置265(D~C)、234(L~A)、および、親のFcドメインに対する235(L~A)で代用した変形例Fcを定義する。変種は、EUアミノ酸の変位位置における最終アミノ酸組成によっても指定することができる。たとえば、L234A/L235AミュータントはLAと呼ぶことができる。置換が提供される順序は、任意であることに注意されたい。

【0090】

ここに記載される患者の調整方法と併用できる反CD117は、例えば、米国特許第5,489,516号に記載されているSR-1のように、ATCCのアクセシジョンNo.10716(BA7.3C.9に預けられている)から生成され、リリースされた抗CD117を含んでいる。このような抗CD117は、アンチCD117の関連としてここに含まれる。

一実施の形態では、ここに記載された抗CD117の領域は、L235A、L235A、D265CおよびH435A (EUインデックス)からなるFc領域を含む。

【0091】

本明細書中に記載される患者調整方法と併せて使用され得るさらなる抗CD117抗体は、例えば、ヒト化SR-1抗体を記載する米国特許第7,915,391号;例えば、抗CD117 A3C6E2抗体を記載する米国特許第5,808,002号;ならびに、例えば、ヒトCD117のPro317、Asn320、Glu329、Val331、Asp332、Lus358、Glu360、Glu376、His378、および/またはThr380を含むエピトープに結合する抗CD117抗体を記載する、例えば、WO 2015/050959に記載されるもの、ならびに、例えば、以下のCDR配列を有する抗CD117抗体CK6を記載する、米国特許第8,552,157号に記載されるものを含む。

アミノ酸配列SYWIG (SEQ ID NO: 23)を持つCDR-H1、

アミノ酸配列IIYPGDS DTRYSPSFQG (配列番号24)を有するCDR-H2、

アミノ酸配列HGRGYNGYEGAFDI (SEQ ID NO: 25)を有するCDR-H3、

アミノ酸配列RASQGISSALAを有するCDR-L1 (SEQ ID NO: 27)、

アミノ酸配列DASSLESを有するCDR-L2 (SEQ ID NO: 28)と、

アミノ酸配列CQQFN SYPLT (配列番号29)を有するCDR-L3、

CK6の重鎖可変領域アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 22に記載されている。

QVQLVQSGAAVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
DTRYSPSEFQQQVTI SAGKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARHGRGYNGYEGAFDI
WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 22、CDRは下線と太字で囲んでいる)

CK6のL鎖アミノ酸可変配列は、SEQ ID NO: 26に記載されている。

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKLLIYDASSLESGSV
PSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQ QFN SYPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID N
O: 26、CDRは下線と太字で囲んでいる)。

【0092】

ここに記載する組成物及び方法と併用することができる、追加の抗CD117の抗CD117および抗原結合断片には、クローン化9P3、NEG024、NEG027、NEG085、NEG086および20376のような、米国2015/0320880に記載されたものが含まれる。

上記の各々の開示は、抗CD117抗生物質に関するものとして、ここに参考文献として組み込まれている。上述の組成および方法と併用されることができる反体および抗原結合フラグメントには、上述の抗生物質および抗原結合フラグメント、並びに上述の非ヒト抗生物質および抗原結合フラグメントのヒト化改良版および抗原結合フラグメントが含まれ、これらは上述のものと同じエピトープを結合する、たとえば、競合するCD117結合アッセイによって評価される。

前記の抗原結合フラグメントの例としては、デュアルバリアブル・イムグロブリン・ドメイン、シングル・チェーンFv分子(scFv)、ダイアボディ、トライアボディ、ナノボディ

10

20

30

40

50

、Andi-like protein scaffold、Fv断片、Fb断片、F(ab')₂分子、およびタンデム・
ディ-scFvが含まれる。

【0093】

アンチボディーは、例えば米国特許4,816,567号に記載されているように、組み換え方法及び組成を用いて製造され得る。一実施の形態では、ここに記載されている反CD117抗をエンコードしている孤立した核酸が提供される。このような核酸は、VL及び/又は、VHを含むアミノ酸配列(例えば、上記の軽鎖及び/又は重鎖)を含んでいるアミノ酸配列をコード化することができる。更なる実施の形態では、上記核酸を含む1つ以上のベクトル(例えば、表現ベクトル)が提供される。更なる実施の形態では、上記核酸を含む宿主細胞が提供される。上記実施形態の一例では、宿主細胞は、(1) VLを含むアミノ酸の配列を含むアミノ酸配列と、VHを含むアミノ酸の配列を示すアミノ酸の配列を示すベクトル、(2) および(2) VLを含むアミノ酸の配列を示すアミノ酸を含む第1ベクトルと、および、(VHを含むアミノ酸の配列を示すアミノ酸の配列を示す第2ベクトルを含む、(1) 宿主細胞を構成するベクトルから成る。1つの実施例において、宿主細胞は真核生物である。例えば、中国のハムスターオヴァリー(CHO)細胞又はリンゴ細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20セル)。一実施の形態では、抗CD117抗体を作る方法が提供される。この方法は、上記のように、当該抗体の表現に適した条件下で、また任意にホスト細胞(又はホスト細胞培地)からの抗体を回収することにより、核酸からなるホスト細胞を作る。

10

【0094】

抗CD117の遺伝子組み換え生産のために、例えば、上述のように、抗CD117をエンコードする核酸は、単離されて、ホスト細胞内でさらなるクローン化および/または式のために、1つ以上のベクトルに挿入される。このような核酸は、従来の方法(例えば、上記の重鎖および軽鎖をコード化する遺伝子に特定の結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用すること)を用いて、容易に分離および配列決定される。抗体ベクトルのクローンまたは表現に適した宿主細胞には、ここに記載されている原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、特にグリコシル化とFcエフェクター機能が不要な場合、抗生物質がバクテリアで生産されることがある。バクテリア中の抗体断片及びポリペプチドの表現については、例えば、米国特許No.5,648,237, 5,789,199, 5,789,199、および5,840,523を参照されたい。(Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, *E. coli*の中の抗体断片の表現を参照のこと) 表現後、この抗体は溶解分に含まれる細胞ペーストから分離され、さらに浄化される可能性がある。

20

30

【0095】

垂直細胞宿主としても使用される。例えば、懸濁状態で成長するように適応した哺乳類細胞系が有用である。有用な哺乳類宿主細胞系の他の例としては、SV40(COS-7)によって変換されたサルのキドニー細胞(Grahamら、*J. Gen Virol.* 36:59(1977))、マウスセルトリ細胞(Mather, *Biol. Reprod* 23:243-251 (1980); サルのキドニー細胞(VERO-76); ヒトの内臓細胞(HELA); イヌのキドニー細胞(MDCK; バッファローの肝臓細胞(BRL 3A); ヒトの肺細胞(Hep G2); マウスのママリー細胞(MMT 060562); TRI細胞(Mather ら、*Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)、MRC 5細胞; およびFS4細胞などに記載されたTM4細胞)がある。その他の有用な哺乳類宿主細胞系には、DHFRCHO細胞(Urlaubら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))を含む中国ハムスター卵巣(CHO)細胞、およびY0、NS0およびSp2/0のような骨髄細胞系が含まれる。抗体製造に適した哺乳動物のホスト細胞系のレビューについては、例えば、Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003)を参照。

40

【0096】

一実施形態では、抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に開示される配列番号と少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%以上同一であるアミノ酸配列を有する可

50

変領域を含む。あるいは、抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に開示される配列番号と少なくとも約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%以上同一であるアミノ酸配列を有する本明細書に開示される可変領域のフレームワーク領域を含むCDRを含む。

一実施の形態では、抗CD117の、又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域と、本明細書で開示されるアミノ酸配列を有する重鎖不変領域を含む。別の実施の形態では、抗CD117の、又はその抗原結合断片は、本分野に開示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域と軽鎖不変領域を含む。更に別の実施形態では、抗CD117抗原、又はその抗原結合断片は、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、鎖定常領域分野に開示されるアミノ酸配列を有する軽鎖不変領域からなる。

10

【0097】

抗CD117抗体を識別する方法

CD117(例:GNK+ CD117)を結合することができる分子のためのライブラリー、すなわち、高いスループットスクリーニングのための方法は、本書に記載されているように、がん治療、自己感染症の治療、および血液細胞療法を必要とする患者(例:人間)のコンディショニングに有用な成熟した抗生物質を同定し親近感を示すために使用することができる。このような方法には、ファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母ディスプレイ、哺乳類細胞ディスプレイ、リボソームディスプレイ、mrnaディスプレイ、およびcDNAディスプレイなどのような、当業者に知られている体外ディスプレイ技術が含まれる。生物学的に関連のある分子を結合する配位子を分離するためのファージディスプレイの使用については、例えば、Feliciら、Biotechnol. Annual Rev. 1:149-183, 1995; Katz, Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45, 1997; and Hoogenboomら、Immunotechnology 4:1-20, 1998で検討されている。これらの開示は、それぞれがインビトロディスプレイ技術に関連するものとして本明細書に参考として採用される。ランダム化されたコンビナトリアル・ペプチド・ライブラリーは、Kay, Perspective Drug Discovery Des. 2:251-268, 1995 および Kayら、Mol. Divers. 1:139-140, 1996に記載されているように、細胞表面抗原を結合するポリペプチドを選ぶために構築されている。各開示は、抗原結合分子の発見に関するものであるので、ここに引用して参考文献に組み込まれている。多マー性たんぱく質のようなタンパク質は、機能分子としてファージ表示に成功した(例えば、EP 0349578、EP 4527839、および EP 0589877、ならびにChiswellとMcCafferty, Trends Biotechnol. 10:80-84 1992、これらの各開示は、抗原結合分子の発見のためのin vitroディスプレイ技術の使用に関連して、ここに含まれている)。さらに、FabやscFvのような機能的な抗菌断片は、in vitroディスプレイ形式で表現されている(例えば、McCaffertyら、Nature 348:552554, 1990; Barbasら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982, 1991; Clacksonら、Nature 352:624-628, 1991を参照)。これらの各々の開示は、抗原結合分子の発見のためのin vitroディスプレイプラットフォームに関連するものとして、ここに含まれる。これらの技術は、特に、CD117(例:GNK+CD117)を結合する抗物質の親和性を特定し、改善するために使用することができ、これらは、逆に、血液細胞移植治療を必要とする患者(例:ヒト患者)の内生血液細胞を枯渇させるために使用することができる。

20

30

40

【0098】

体外ディスプレイ技術に加えて、計算モデル技術は、CD117(例:GNK+ CD117)を結合するシリコ内で、抗生物質、すなわち、抗毒物の断片を設計し、識別するために使用することができる。例えば、当業者は、計算モデル技法を用いて、この抗原の細胞外エピトープのような特定のエピトープを結合することができる分子のために、シリコの中で、抗物質または抗物質の断片のライブラリーをスクリーニングすることができる。これらの計算技法によって確認された抗毒物又は抗原結合フラグメントは、ここに記載されているガン及び自己感染症の治療法及びここに記載されている患者の条件づけ手順のような、ここに記載されている治療法と併用することができる。

50

【0099】

追加の技法は、CD117(例:GNNK+ CD117)を細胞の表面(例:ガン細胞、自己感染細胞、血液細胞)に結合し、たとえば、レセプターを媒介とした内細胞によって内在化される抗原結合フラグメントを識別するために使用することができる。例えば、上述の*in vitro*ディスプレイ技術は、CD117(例えば、GNK+ CD117)をガン細胞、自己感染細胞、あるいは血液細胞の表面に結合し、その後内部化される抗原結合フラグメントをスクリーニングするのに適応することができる。フェイジ・ディスプレイは、この選別のパラダイムと併用できるそのような手法の一つである。CD117(例えば、GNNK+ CD117)を結合し、その後、ガン細胞、自己感染細胞、血液細胞によって内在化される、又はそのフラグメントを識別するために、当業者は、例えば、Williamsら、*Leukemia* 19:1432-1438、2005に記載されているファージディスプレイ技術を適応することができる。この開示は、その全体をここに引用することによりここに組み込まれている。例えば、本技術で知られているミューテーション・ファージ・ライブラリーは、ランダム化されたアミノ酸カセットを含む、他(例えば、CDRまたは同等の領域の1つ以上、またはすべてにおいて)scFvフラグメント、Fabフラグメント、ジアボディ、トリアボディ、および10のFn3ドメインのような、抗生物質、抗生物質フラグメントをエンコードする再結合ファージ・ライブラリーを作ることができる。フレームワーク領域、ヒンジ、Fcドメイン、および抗生他断片の他の領域は、例えば、ヒトのゲルムライン抗生他と比較してわずかな変化を示すヒトゲルムラインの配列を有することにより、それらがヒトにおいて非遺伝子性であるように設計されることができる。

10

20

【0100】

本技術に記載されている、又は本技術に知られているファージディスプレイ技術を用いて、ファージ粒子に同価結合している無作為化された抗物質、又は、ファージ粒子に同価結合しているファージライブラリーは、CD117(例えば、GNK+ CD117)抗原と共にインキュベートすることができる。これは、ファージライブラリーを、最初にブロッキング剤(例えば、ミルクプロテイン、ウビーンセラルアルバミン及び/又はIgG)と共にインキュベートし、ファージエンコード化されている抗物質、又はその断片を除去することにより、Fcドメインを結合している非特定のたんぱく結合及びファージを示し、その後、ファージライブラリーを数多くの血液細胞と共にインキュベートすることによりである。ファージライブラリーは、CD117特異的抗体またはその抗原結合フラグメント(例えば、GNNK+ CD117特異的抗体またはその抗原結合フラグメント)が細胞表面CD117(例えば、細胞表面GNNK+ CD117)抗原に結合し、その後癌細胞、自己免疫細胞、または造血幹細胞により内在化されるのに十分な時間(例えば、4で1時間など、4で30分から6時間)、標的細胞と共にインキュベートすることができ、これらの抗原の1つ以上に対して十分な親和性を示さない抗体またはその断片を含有し、癌細胞、自己免疫細胞、または造血幹細胞に結合し、内在化させるのに十分な親和性を示さないファージ含有抗体またはその断片は、その後、細胞を、例えば、pH 2.8で低温(4)0.1Mグリシン緩衝液で洗浄することにより除去することができる。たとえば、細胞を分解し、細胞内に内在するファージを細胞媒体から取り戻すことによって、抗物質、そのフラグメント、あるいは癌細胞、自己感染細胞、あるいは血液細胞によって内在化されたファージに結合されたファージを同定することができる。次に、ファージは、例えば、当業者に知られている方法を用いて、回収されたファージと一緒に2xYT媒体で菌細胞をインキュベートすることによって、細菌細胞内で増幅することができる。この媒体から回収されたファージは、例えば、ファージゲノム内に挿入された、抗物質をエンコードする遺伝子またはそのフラグメントの核酸配列を決定することによって特徴づけることができる。コード化された抗生物質、又はその断片、又はその後、化学合成(例えば、scFv断片のような抗生物質の断片)又は組換え式(例えば、全長の抗生物質)により新しく調製することができる。

30

40

【0101】

ここに記載された組成物及び方法で使用するための防CD117(例:防GNK+CD117)の体外進化のための例示的な方法は、ファージディスプレイである。ファージディスプレイラ

50

イブラリーは、抗体のCDRまたは抗体様スキフォールドの類似領域(例えば、10Fn3ドメインのBC、CD、およびDEループ)のコード配列内の設計された一連の変異または変異を作製することによって作製することができる。これらの突然変異が導入されるテンプレート・エコノミー・コード化のシークエンスは、例えば、純粋なヒトの生殖ラインシークエンスである。これらの突然変異は、当技術分野で公知の標準的突然変異誘発技術を用いて行うことができる。このようにして、各ミュータント配列は、1つ以上のアミノ酸の変形のための保存に対応するテンプレートに対応する1つの抗菌をコード化する。レトロウイルス及びファージディスプレイベクトルは、本技術で知られる通常のベクトル建設技術を用いてエンジニアリングすることができる。P3ファージディスプレイベクトルは、相性のあるタンパク質表現ベクトルとともに、ファージディスプレイベクトルを生成し、多様化させることができる。

10

【0102】

突然変異したDNAは配列の多様性を提供し、各形質転換ファージはDNAによってコードされる最初のテンプレートアミノ酸配列の1つの変形例を示し、膨大な数の変異が構造的に関連したアミノ酸配列を示すファージ集団(ライブラリー)を生じる。このように、各領域の特徴が明確になっているため、ファージディスプレイスクリーンに導入されたアミノ酸のバリエーションは、結合ペプチドや領域の結合特性を変化させるものであり、その全体的な分子構造を著しく変化させるものではないと考えられている。

【0103】

典型的なスクリーンでは、ファージライブラリーは上記の抗原の1つまたはそのエピトープと接触し、結合することができる。バインダと非バインダの分離を容易にするために、固い保持体で標的を固定することが便利である。ファージベアリングのCD117結合部は、固体保持体上の標的と錯体を形成することができるが、非結合ファージは、液体中に残り、余分な緩衝剤で洗い流すことができる。その後、緩衝液を極限のpH (pH 2またはpH 10)に変えたり、緩衝液のイオン強度を変えたり、デナチュランを加えたり、他の既知手段を加えたりして、パウンドファージを標的から放出することができる。

20

【0104】

その後、回収されたファージは細菌細胞の感染によって増幅することができ、スクリーニングプロセスを繰り返すことができる。新しいプールは、結合していない抗生物質ではなくなり、CD117を結合するように豊富になった(例:GNK+ CD117)。少数の結合したファージでさえ回復することは、その後のスクリーニングを繰り返すためにファージを増幅するのに十分である。何回かの選択の後、結合プールの中で選択されたファージクローンから派生した、抗物質又は抗原結合フラグメントをエンコードする遺伝子配列は、通常の方法により決定される。それゆえ、ファージの標的への結合親和性を付与するペプチド配列を明らかにする。パンニング処理の間、集団の配列の多様性は、望ましいペプチド結合抗薬が残るまで、選択ラウンドごとに減少する。シークエンスは、少数の関連する抗生物質またはそれらの抗原結合フラグメントに収束することがある。選択の各ラウンドで回収されるファージの数の増加は、ライブラリーの収束が画面に起こったことを示している。

30

【0105】

たとえば、以下の手順に従い、細胞表面の標的抗原(たとえばCD117)を結合する非人間の抗生物質を人間化することも、抗物質を識別するための別の方法である。コンセンサスのあるヒトの重鎖および軽鎖配列が本技術で知られている(例えば、「VBASE」のヒトゲルムライン配列データベース; Kabatらを参照)。Immunological Interestのタンパク質 Sequences、Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242, 1991、Tomlinsonら、J. Mol. Biol. 227:776-798, 1992、およびCox et al. Eur. J. Immunol. 24:827-836, 1994、これらの各々の開示は、本文中で引用することにより、それらが、コンセンサスである人間の検出重鎖および軽鎖配列に関するものであることを示している。確立された手順を用いて、当業者の1人は、コンセンサス・ニーズ・配列(例、配列・アラインメント)の可変ドメインフレームワーク残基およびCDRを識別することができる。本書に記載

40

50

されているように、ヒトのコンセンサスとなっているコンセンサスとなっているヒトの有する重鎖および/または軽鎖可変領域のCDRを、細胞表面抗原(例:CD117)を結合する非ヒトの1つ以上の対応するCDRに置き換えることができる。このCDR交換は、ここに記載された、又は本技術に知られている遺伝子編集技術を用いて行うことができる。

【0106】

人間化された抗生物質を生成するために、1つ以上の可変領域CDRがCD117を結合する非人的抗生物質の1つ以上の可変領域CDR配列に置き換えられた上記のコンセンサス配列を含むポリヌクレオチドを再結合して表現することができる(例、GNK+CD117)。血液細胞抗原への抗原の親和性は、主としてCDR配列によって決定されるので、その結果生まれたヒト化された抗原は、ヒト化された抗原の由来となった非ヒト化された抗原とほぼ同じ数の血液細胞抗原との親和性を示すことが期待される。標的抗原に対する抗菌の親和性を決定する方法は、特に、本技術で記載され周知のELISAに基づく技術、並びに表面プラズモン共鳴、蛍光アニソトロピー、同位体チレーションカロリメトリーを含む。

10

【0107】

例えば、既知の放射性核種内部化アッセイを用いて、調製された抗生物質の内部化能力、又はそのフラグメントを評価することができる。例えば、本明細書に記載される、または当技術分野で公知のインビトロディスプレイ技術を用いて同定される抗体またはその断片は、¹⁸F、⁷⁵Br、⁷⁷I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹²⁹I、²¹¹I、⁶⁷At、⁷²Ga、¹¹¹In、¹²²Tc、¹⁶⁹Yb、¹⁸⁶Re、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、²²⁵Lu、⁷⁷As、⁸⁶Y、⁹⁹Y、⁸⁹Zr、²¹²Bi、²¹³Bi、または⁶⁷Acなどの放射性同位元素の取り込みにより官能化することができる。例えば、¹⁸F、⁷⁵Br、⁷⁷Br、¹²²I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹²⁹I、¹³¹I、²¹¹Aなどの放射性ハロジェンは、電気的ハロジェン試薬(例えば、イオディネーションビード、サーモフィッシャーサイエンティフィック、ケンブリッジ、マサ)を含むポリスチレンビードなどのビードを使用して、上記のビーズ、またはフラグメントに組み込むことができる。放射性標識された抗体、またはそのフラグメントは、癌細胞、自己免疫細胞、または造血幹細胞と、内部移行を可能にするのに十分な時間(例えば、4で30分間~6時間、例えば、4で1時間)、インキュベートされ得る。その後、細胞を洗浄して、内蔵されていない抗非、またはそれらの断片を除去することができる(例えば、pH 2.8の冷(4°C)0.1Mのグリシン緩衝液を使用する)。内部化された抗体またはそのフラグメントは、回収された洗浄バッファの放出された照射(例えば、ガンマ照射)と比較して、得られた癌細胞、自己免疫細胞、または造血幹細胞の放出された照射(例えば、ガンマ照射)を検出することによって同定することができる。

20

30

【0108】

CD117 Epitopes

別の側面において、本開示は、SEQ ID NO:1のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119及びK129のアミノ酸残留物のうち少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、又は全8を含んでいるCD117のエピトープに結合することができる、抗原結合フラグメントに関するものである。ある実施形態では、CD117を結合することができる、抗原結合フラグメント、すなわち、CD117が、SEQ ID NO:1のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119およびK129の最低2つのアミノ酸残基からなるCD117のエピトープに結合する。ある実施形態では、CD117を結合することができる、抗原結合断片、すなわち抗原結合断片は、SEQ ID NO:1のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119およびK129の少なくとも3つのアミノ酸残基からなるCD117のエピトープに結合する。ある実施形態では、CD117を結合することができる、抗原結合断片、すなわち抗原結合断片は、SEQ ID NO:1のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119およびK129の最低4つのアミノ酸残基からなるCD117のエピトープに結合する。ある実施形態では、CD117に結合することができる、抗原結合フラグメント、すなわちCD117が、SEQ ID NO:1のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119およびK129のアミノ酸残基の少なくとも5つからなるCD117のエピトープに結合する。ある実施形態では、CD117を結合することができる、抗原結合断片、す

40

50

なわち抗原結合断片は、SEQ ID NO:1のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119およびK129の最低6つのアミノ酸残基からなるCD117のエピトープに結合する。ある実施形態では、CD117を結合することができる、抗原結合断片、すなわち抗原結合断片は、SEQ ID NO:1のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119およびK129の最低7個のアミノ酸残基からなるCD117のエピトープに結合する。別の実施形態では、CD117に結合することができる、結合タンパク質、例えば、抗原結合フラグメント、は、SEQ ID NO:1のすべてのアミノ酸残基T67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119およびK129を含むCD117のエピトープに結合する。

【0109】

別の側面において、本発明は、エピトープをCD117のエピトープに結合するCD117と結合することができる、抗原結合フラグメント、すなわち、エピトープが、SEQ ID NO:1のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、およびK129のうち少なくとも2、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、または各8のアミノ酸残基からなる群から選択されたアミノ酸残基を含む、本発明に関する。

10

別の側面において、本開示は、SEQ ID NO:1の少なくともアミノ酸67-83および114-129内の残渣を有するエピトープに結合するCD117を結合することができる、抗原結合フラグメントに関する。

参考番号P10721

202112031101312050_____2US2020029648__APH_0
(2019年4月24日現在)のプロテインデータバンク(PDB)に記載されているように、CD117の細胞外部分は、Ig様C2型1ドメイン(a.k.a.D1)、Ig様C2型2ドメイン(a.k.a.D2)、Ig様C2型3ドメイン(a.k.a.D3)、Ig様C2型4ドメイン(a.k.a.D4)、およびIg様C2型5ドメイン(a.k.a.D5)と呼ばれる5つのドメインを含む。別の側面において、本開示は、CD117のIg様C2-type 1ドメインおよびIg-like C2-type 2ドメイン(a.k.a.D2)発明エピトープに結合するCD117を結合することができる、抗原結合フラグメントに関する。いくつかの実施例では、当該、又はその抗原結合フラグメントが、Ig-like C2タイプ1ドメインのアミノ酸残基を含むエピトープと、少なくとも1、少なくとも2、又は3つのアミノ酸残基T114、T119、又はK129のいずれかを含むエピトープと結合する。別の実施形態では、CD117を結合することができる、CD117が、Ig様C2タイプ2ドメインのアミノ酸残基を含むエピトープに結合することができ、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、または5つのアミノ酸残基のすべてT67、K69、T71、S81およびY83を結合することができる、又は抗原結合フラグメントである。

20

30

【0110】

別の側面では、ここに記載される抗生物質は、CD117に対する実質的なアゴニスト活性を伴わない敵対的活性を有する。したがって、本開示に含まれるのは、Ab85の認識するエピトープに結合する抗物質である。特定の実施形態では、本開示は、単離された抗体、またはその抗原結合フラグメントを含み、ここで、前記抗体、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1のトポグラフィ領域T67-Y83および/またはT114-K129によって規定されるエピトープに結合したCD117が、SCF(幹細胞因子)とのCD117の会合を妨げるか、またはさらなるヒトCD117との二量体化を阻害するように、ヒトCD117に結合する。別の側面において、本開示は、SEQ ID NO:1のT67、K69、T71、S81、Y83、T114、T119、およびK129のアミノ酸残留物のうち、2、3、4、5、6、7またはすべてを含むヒトCD117のエピトープに結合するヒトCD117に結合することができる、抗原結合フラグメントに関する。

40

【0111】

抗体薬物コンジュゲート(ADC)

細胞毒素

本書に記載されている抗CD117抗菌および抗原結合フラグメントは、細胞毒素と結合(結合)することができる。特に、抗CD117ADCには、細胞中毒(又はサイトトキシン)に結合した(すなわちリンカーと同価に結合した)抗菌(又は抗原結合フラグメント)が含まれる

50

。様々な実施形態において、細胞毒性部分は、共役中で結合された場合、減少したまたは全く細胞毒性を示さないが、リンカーからの切断後に細胞毒性を再開する。種々の態様において、細胞毒性部分は、リンカーからの切断なしに細胞毒性を維持する。幾つかの実施例において、サイトトキシル分子は、本明細書に開示されているように、細胞を内部化する抗原結合フラグメントに接合され、このようにして、細胞内集積、又はその断片に続いて、細胞毒素は細胞内ターゲットにアクセスし、例えば、T細胞死を媒介することができる。

【0112】

ここに記載されているアンチボディおよびそれらの抗原結合フラグメント(例えば、CD117を認識し結合する抗原結合フラグメント)は、細胞毒素と結合する(または結合する)ことができる。

10

したがって、本開示のADCは、抗体またはその抗原結合フラグメント(Ab)が、化学部分(Z)を介してリンカー(L)に結合(共有結合)され、細胞傷害性部分(「薬物」、D)に結合している、一般式 $Ab-(Z-L-D)_n$ であり得、「n」は、抗体に結合している薬物の数を表し、一般に1~8の範囲である。

従って、それらの抗原結合フラグメントは、例えば約1から約20までの範囲のある、抗原毒素1個あたりの平均数を表す整合nによって示されるように、多くの薬物モイートに結合することができる。いくつかの実施形態において、nは1から4である。いくつかの実施形態において、nは1である。いくつかの実施形態において、nは2である。共役反応からのADCの調製における、1個当たりの薬物モイーターの平均数は、質量分析、ELISAアッセイ、およびHPLCのような従来の方法によって特徴づけられる。nでのADCの定量的分布も決定できる。場合によっては、nが他の薬物ロードを有するADCからある一定の価値である場合には、逆相HPLCまたは電気泳動によって分離、精製および均質ADCの特性化を達成することができる。

20

【0113】

抗CD117 ADCの中には、Anti-CD117の付着部位の数によって、1個当たりの細胞毒素の平均数が制限されるものもある。例えば、接着剤がシステインチオールである場合、1つか複数のシステインチオールグループを持つことができるか、またはリンカーと化学的な部分が付着することができる十分に反応するチオール基しか持たないことがある。一般的に、抗生物質には、薬物母性と結びついている可能性のある、多くの自由で反応性のあるシステインチオール基が含まれていない。主に、システインチオール残渣は、ジスルフィドブリッジ部として存在する。ある種の実施形態では、部分的又は全面的な減少条件下で、ジチオスレイトール(DTT)又はトリカルボンチルフォスフィン(TCEP)のような減少剤により、反応性システインチオールグループを生成するために、抗菌を減少させることができる。

30

ある種の実施形態では、共役反応の間に、薬物モイーターの理論的な最大値よりも少ない数が、抗菌に接合される。たとえば、以下で論じるように、抗菌剤は、薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬と反応しないリジン残渣を含むことができる。最も反応性のリジン基のみが、アミン反応性リンカー試薬と反応し得る。ある種の実施形態では、リジンまたはシステインのような反応性の核好性グループを明らかにするために、抗菌は劣化状態にさらされる。

40

【0114】

ADCの負荷(ドラッグ/ビーチ比)は、例えば、(i)抗たんぱく質リンカー中間体又はリンカー試薬のモル余剰を、たとえば、(ii)共役反応時間または温度を制限すること、(iii)システインチオール修飾の部分的または制限的な条件、(iv)再結合技術により、システイン残留物の数と位置を、リンカー薬物接合の数および/または位置を制御するために変えるような、その抗たんのアミノ酸配列を工学的に調整することによって、異なる方法で制御することができる。

いくつかの実施形態において、細胞傷害性分子は、抗体またはその断片の細胞取り込みに続いて、細胞毒素がその細胞内標的にアクセスし、造血細胞死を媒介することができるよ

50

うに、本明細書に開示されるような細胞内移行抗体またはその抗原結合フラグメントにコンジュゲートされる。どのような数の細胞毒素でも、例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8の抗CD117抗毒素と結合することができる。

【0115】

ここに記載された組成及び方法で使用するのに適した細胞毒素には、DNAを分解する剤(例えば、アントラサイクリン)、ミトテックスピンドル装置(例えば、ピンカアルカロイド、メイタンシン、メイタンシノイド、およびそれらの派生物)を破壊することができる剤、および、DNAポリメラーゼ阻害剤(例えば、 α -アマニチンのようなアマトキシシ、およびそれらの派生物)、ならびに、タンパク質の生合成を破壊することができる剤(例えば、サポリンおよびリシンA鎖のようなr看板N-グリコシダーゼ活性を示す剤)が含まれ、他にも知られている。

10

いくつかの実施形態において、細胞毒素は、微小管結合剤(例えば、メイタンシンまたはメイタンシノイド)、アマトキシシ、シュードモナス外毒素A、デボウガニン、ジフテリア毒素、サポリン、オーリスタチン、アントラサイクリン、カリケアマイシン、イリノテカン、SN-38、デュオカルマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、ピロロベンゾジアゼピン二量体、インドリノベンゾジアゼピン二量体、インドリノベンゾジアゼピン二量体、インドリノベンゾジアゼピン偽二量体、またはその変種、または当技術分野で本明細書に記載もしくは公知の別の細胞毒性化合物である。

【0116】

本書に記載されている抗CD117抗物質および抗原結合フラグメントは、微管結合剤である細胞毒素と結合することができる。ここで用いられる「微細管結合剤」という用語は、細胞内の分裂及び相間細胞機能に不可欠な微細管ネットワークを破壊することによって作用する複合物を意味する。マイクロチューブ結合剤の実施例としては、メイタシン、メイタンジノイド、およびそれらの派生物、実施例例えば本当業者に記載されているか、またはその派生物、ピンプラスチン、硫酸ピンプラスチン、ピンクリスチン、硫酸ピンクリスチン、ピンデシン、およびピノレルピン、ドセタキセルおよびパクリタキセルのようなタキサン、ディスコデルモリド、コチシンおよびエポチロンのようなマクロライド、およびそれらの派生物、エポチロンBまたはそれらの派生物が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0117】

メイタンシノイド

ここに記載されているアンチボディおよび抗原結合フラグメントは、微管結合剤である細胞毒素と結合することができる。いくつかの態様において、微小管結合剤は、メイタンシン、メイタンシノイドまたはメイタンシノイドアナログである。メイタンシノイドは、微小管と結合し、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。メイタンシンは、東アフリカの低木 *Maytenus serrata* (米国特許番号3,896,111) から最初に分離された。その後、ある種の微生物はメイタンシノールやC-3メイタンシノールエステル(米国特許第4,151,042号)のようなメイタンシノールをも生成することが発見された。合成メイタンシノール及びその誘導体並びにそれらの類似物は、例えば米国特許No.4,137,230; 4,248,870; 4,248,870; 4,248,746; 4,260,608; 4,265,14,294,57; 4,307,57; 4,307,16; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428,428,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,4に開示される。メイタンシノイド医薬品モイティーは、(i)発酵または化学修飾によって調製することが比較的容易である、(ii)非ジスルフィドリンカーを介して抗物質に接合するのに適した官能基をもって導出されることが可能である、(iii)プラズマ中で安定である、(iv)種々のがん細胞系に対して有効である、という理由から、抗薬物活用における麻薬モイティーが魅力的である。

30

40

適当なメイタンシノイドの実施例には、メイタンシノールのエステル、合成メイタンシノール、及びメイタンシノールアナログ及び誘導体が含まれる。ここに含まれる細胞毒素は、メイタンシノイド、メイタンシノール、メイタンシノール類似物、およびメイタンシノ

50

ール類似物、および派生物のように、微小管形成を抑制し、哺乳類細胞に極めて有毒である。

【0118】

適当なメイタンジノールエステルの実施例には、改良された芳香性のリングを有するもの及び他の位置で改変を有するものが含まれる。このような適当なメイタンシノイドは、米国特許No.4,137,230; 4,151,042; 4,151,042; 4,266,67; 4,266,408,57; 4,308,268; 4,309,4,313,94,29; 4,317,821; 4,322,348,064; 5,4,4,363; 5,416,064; 5,485,492; 5,846,410; 7,276,497および7,473,796に開示されるものであり、これらはメイタンシノイドおよびそれらの派生物に関するものである。

幾つかの実施例では、本開示の抗薬物結合体(ADCs)は、細胞傷害性剤としてチオールを含むメイタンシノイド(DM1)を使用している。これは、正式に「N²'-deacetyl-N²'-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine」と呼ばれている。DM1は構造式(V)で表される。

10

[化5]

【0119】

別の実施例では、本開示の活用者は、チオールを含むメイタンシノイドN²'-deacetyl-N²'(4-mel-4-mercapto-1-oxopentyl)-メイタンジン(例、DM4)を細胞傷害性剤として利用する。DM4は構造式(VI)で表される。

[化6]

立体的に阻害されたチオール結合を含む側鎖からなるもう一つのメイタンシノイドは、構造式(VII)で表されるN²'-deacetyl-N-2'(4-mercapto-1-oxopentyl)-maytansine (DM3と呼ばれる)である。

20

[化7]

メイタンシノイドの各々は、米国特許No.5,208,020 また、7,276,497で本開示の活用においても使用できる。これに関連して、米国特許No.5,208,020及び7,276,697のすべての開示がここに参考文献として組み込まれている。

【0120】

メイタンシノイド上の多くの位置は、結合部を化学的に結びつける位置として役立つことができる。例えば、水酸塩基を有するC-3の位置、水酸エチルで改良されたC-14の位置、水酸塩で改良されたC-15の位置、水酸基を有するC-20の位置は、いずれも有用であると期待される。いくつかの実施形態では、C-3の位置は、連結部を化学的に結ぶ位置であり、いくつかの特定の実施例では、メイタンジノールのC-3の位置は、結合部を化学的に結ぶ位置である。当該技術分野では、例えば米国特許で開示されたものを含む、Adbid-maytansinoid結合体を作ることによって知られている多くの結合したグループが存在する。No.5,208,020, 6,441,163, 6,441,163, and EP Patent No. 0425235 B1, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), and U.S. 2005/0169933 A1、これらの開示はここに引用により明確に組み込まれている。追加の結合基をここに説明し、例示した。

30

【0121】

本開示はまた、様々な異性体およびメイタンシノイドと共役体の混合物を含んでいる。本開示の幾つかの化合物及び共役は、種々の立体異性体、エナンチオメリック及びジアステレオメリックの形成で存在することができる。このようなメイタンシノイド共役を作るためのいくつかの記述が米国特許に提供されている。No.5,208,020, 5,416,064 5,416,064, 6,333,410, 6,441,163, 6,716,821、および7,368,565は、それぞれその全体が本明細書に組み込まれる。

40

抗体分子当たり結合したメイタンシノイド分子の治療的に有効な数は、252nmおよび280nmにおける吸光度の比を分光光度法で測定することによって決定することができる。特定の実施形態において、抗体分子当たりコンジュゲートされた平均3~4個のメイタンシノイド分子は、抗体の機能または溶解性に負の影響を与えることなく標的細胞の細胞毒性を増強し得るが、毒素/抗体の1分子は、抗体単独よりも細胞毒性を増強し得る。メ

50

イタンシノイド分子/抗原結合フラグメントの平均数は、例えば、1-10または2-5であることができる。

【0122】

アントラサイクリン

他の実施形態では、ここに記載されている抗物質及び抗原結合フラグメントは、アントラサイクリン分子である細胞毒素に結合することができる。アントラサイクリンは、細胞毒活性を示す抗生物質化合物である。研究は、アントラサイクリンが、以下を含む多くの異なるメカニズムによって細胞を殺すように作動する可能性があることを示している。1) 細胞のDNAへの薬物分子のインターカレーション、それによってDNA依存性核酸合成を阻害する。2) 次いで細胞への損傷を引き起こすフリーラジカルの薬物による製造、または3) 薬物分子と細胞膜との相互作用[例えば、C. Petersonら、Anthracycline In Experimental Systems and Human Leukemia]のAnthracycline Antibiotics In Cancer Therapy; N.R. Bachur、"Free Radical Damage" id. at pp.97-102。細胞毒性の可能性があるため、アントラサイクリン系薬物は、白血病、乳癌、肺癌、卵巣腺癌および肉腫などの多数の癌の治療に使用されている[例えば、アントラサイクリンのP. HWiernik、現在の状態と新たな展開p 11参照]。一般的に使用されるアントラサイクリンには、ドキソルピシン、エピルピシン、イダルピシンおよびダウノマイシンがある。いくつかの実施形態において、細胞毒素は、ダウノルピシン、ドキソルピシン、エピルピシン、およびイダルピシンからなる群より選択されるアントラサイクリンである。アントラサイクリンの代表的な例としては、ダウノルピシン(セルピジン;ベッドフォード研究所)、ドキソルピシン(アドリアマイシン;ベッドフォード研究所;ドキソルピシン塩化水素塩化物、水酸-ダウノルピシンおよびルベックスとも呼ばれる)、エピルピシン(エレンス;ファイザー)、イダルピシン(イダマイシン;ファイザー)があるが、これらに限らない。

【0123】

アントラサイクリンアナログ、ドキソルピシン(ADRIAMYCINO)は、転写のためにDNAを巻き戻す酵素トポイソメラーゼIIのインターカレーションおよび進行の抑制によりDNAと相互作用すると考えられている。ドキソルピシンは、複製のためのDNA鎖を切断した後、トポイソメラーゼII錯体を安定化し、DNA二重らせんが再結合するのを妨げ、それによって複製過程を停止させる。ドキソルピシンおよびダウノルピシン(DAUNOMYCIN)は、プロトタイプの細胞傷害性天然物アントラサイクリン化学療法薬(Sessaら、(2007) Cardiovasc. Toxicol. 7:75-79)である。

【0124】

本書で使用する適当なアントラサイクリンの非制限的な例は、PNU-159682("PNU")である。PNUは親nemorubicinと比較して3000倍以上の細胞毒を示す(Quintieriら、Clinical Cancer Research 2005, 11, 1608-1617)。PNUは構造式で表される。

[化8]

PNUのようなアントラサイクリン上の複数の位置は、結合分子を共有結合する位置として役立つことができ、したがって、本書に記載されているように、上記CD117抗物質または抗原結合フラグメントである。例えば、リンカーは、水酸エチルケトン側鎖に変形を通して導入することができる。

いくつかの実施形態において、細胞毒素は構造式によって表されるPNU誘導体である。

[化9]

ウェーブラインとは、以下に述べるように、ADCのリンカーへの等価な付着点を示す。いくつかの実施形態において、細胞毒素は構造式によって表されるPNU誘導体である。

[化10]

ウェーブラインとは、以下に述べるように、ADCのリンカーへの等価な付着点を示す。

【0125】

ベンゾジアゼピン系細胞毒素(例:ピロロベンゾジアゼピン系(PBD))

他の実施形態では、本記載の抗CD117抗生物質又は抗原結合フラグメントは、ピロロロンボンゾディアゼピン(PBD)又はPBDを含む細胞毒素に結合することができる。PBDは

、特定のアクチノミセートによって生成される天然産物であり、配列選択的DNAアルキル化合物であることが示されている。PBD細胞毒素は、アントラマイシン、ジメリックPBDおよび、例えばHartley, J.A. (2011)に開示されるものを含むが、これらに限定されない。「抗腫瘍剤としてのピロロベンゾジアゼピンの開発」Expert Opin. Inv. Drug, 20(6), 733-744; and Antonow, D.; Thurston, D.E. (2011) "Synthesis of DNA-interactive pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines (PBDs)." Chem. Rev. 111: 2815-2864。

いくつかの実施形態において、細胞毒素は、以下の公式に表されるピロロロンボゾジアゼピンダイマーであることができる。

[化11]

ウェーブラインはリンカーの付着点を示す。

幾つかの実施形態において、細胞毒素は、マレイミドカプロイルリンカーを経由して、抗原結合フラグメント、すなわちそれに対する接合体である。

10

【0126】

いくつかの実施形態では、リンカーは、ペプチド、オリゴ糖OBC=O)(CH₂CH₂O)_t-, -(NHCH₂CH₂)_u-, -PAB、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys(Ac)-PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys(Ac)-PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB、またはAla-PABのうちの1つ以上を含み、p、q、r、t、およびuのそれぞれは、発生ごとに独立して選択される1~12の整数である。

いくつかの実施形態において、リンカーは公式の構造を持つ。

20

[化12]

ここで、R₁はCH₃(Ala)または(CH₂)₃NH(CO)NH₂(Cit)である。

いくつかの実施形態では、リンカーは、抗菌への接合前に、L-Z'として一緒に取られた反応性代替物Z'を含む、構造を有する。

[化13]

ウェーブラインは細胞毒素(例えばPBD)への付着点を示す。特定の実施形態では、R₁はCH₃である。

【0127】

いくつかの実施形態において、細胞毒素リンカー活用物は、接合前に、反応性代替物Z'を含む、Cy-L-Z'としてまとめられた、公式の構造を有する。

30

[化14]

この特定の細胞毒素リンク剤はテシリン(SG3249)として知られており、例えば、Howardら、ACS Medに記載されている。Chem. Lett.2016, 7(11), 7(11)、983-987、その開示は、ここにその全体として参考文献に含まれる。

いくつかの実施形態において、細胞毒素は、式に代表されるピロロロンボゾジアゼピンダイマーであることができる。

[化15]

ウェーブラインはリンカーの付着点を示す。

いくつかの実施形態において、細胞毒素リンカー活用物は、接合前に、反応性代替物Z'を含む、Cy-L-Z'としてまとめられた、公式の構造を有する。

40

[化16]

【0128】

この特定の細胞毒素リンク剤はタリリンとして知られ、例えば、ADCバダスツキシマブタリリン(SGN-CD33A)、Mantaj他、Angewandte Chemie International Edition English 2017, 56, 462-488に関連して記述されている。この開示は、本文中でその全体に含まれている。

いくつかの実施形態において、細胞毒素は、公式の構造を有するインドリノベンゾジアゼピンの擬似物であることがある。

[化17]

ウェーブラインはリンカーの付着点を示す。

50

いくつかの実施形態において、細胞毒素リンカー活用物は、接合前に、反応性代替物Z'を含む、Cy-L-Z'としてまとめられた、公式の構造を有する。

[化18]

これは、例えば、参考文献に含まれる国際特許出願No. WO2017004026に開示されているADC IMGN632を構成する。

【0129】

カリケアマイシン

他の実施例では、ここに記載されているこれらの抗生物質及び抗原結合フラグメントは、エネジイン抗がん抗生物質であるサイトトキシン(例えば、カリケアミシン、オゾガミシン)に結合することができる。抗生物質のカリケミシンファミリーは、ピコモラル以下の濃度で、二鎖DNAされたDNAの破れを作ることができる。カリケミシンファミリーの活用の準備については、米国特許No.5,712,374; 5,714,586; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; 5,877,296を参照のこと。(すべて米国シアナミド会社)。使用されうるカリケミカルの構造的類似物は、例えば、Hinmanら、Cancer Research 53:3336-3342(1993)、Lodeら、Cancer Research 58:2925-2928(1998)、および前述の米国シアナミド特許を含むが、これに限定されない。

10

【0130】

ここでは単にガンマとして参照され、構造式を有する、例示的な₁は、ガンマとして指定されるカリケアマイシンである。

20

[化19]

【0131】

幾つかの実施例において、カリケアミシンは、ガンマ カリケアミシン派生体またはNアセチルガムマ カリケアミシン派生体であることができる。使用されうるカリケミカルの構造的類似物は、例えば、Hinmanら、Cancer Research 53:3336-3342(1993)、Lodeら、Cancer Research 58:2925-2928(1998)、および前述の米国特許を含んでいるが、これに限定されない。カリケアミシンは、ジスルフィドを形成するために適当なチオールと反応することができる三硫化塩基を含み、同時に、リンカーを経由して、本項に記載されているような反CD117の抗原結合フラグメントにカリケアミシン誘導体を付着させるのに有用な官能基を導入する。カリケミシンファミリーの活用の準備については、米国特許No.5,712,374; 5,714,586; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; 5,877,296を参照のこと。(すべて米国シアナミド会社)。使用されうるカリケミカルの構造的類似物は、例えば、Hinmanら、Cancer Research 53:3336-3342(1993)、Lodeら、Cancer Research 58:2925-2928(1998)、および前述の米国シアナミド特許を含むが、これに限定されない。

30

【0132】

一実施形態では、本明細書で開示されるようなADCの細胞毒素は、式で表されるカリケアマイシンジスルフィド誘導体であってもよい。

[化20]

ウェーブラインはリンカーの付着点を示す。

40

【0133】

リボソーム不活性化タンパク質(RIP)

いくつかの実施形態では、抗CD117の抗タンパク質にコンゲートされた細胞毒素はリボソーム不活性化タンパク質(RIP)である。リボソーム不活性化タンパク質はタンパク質合成インヒビターであり、通常は不可逆的にリボソームに作用する。RIPはバクテリアだけでなく植物にも見られる。RIPの実施例としては、サボリン、リシン、アブリン、ゲロニン、シュードモナス外毒素(または外毒素A)、トリコサンチン、ルフィン、凝集素およびジフテリア毒素が挙げられるが、これらに限定されない。

ここに開示されるADCおよび方法で使用され得るRIPの別の実施例は、志賀毒素(Stx)または志賀のような毒素(SLT)である。志賀毒素(Stx)は、Shigella dysenteriae 1およ

50

び *Escherichia coli* (大腸菌ではStx1と呼ばれる)の一部の血清群(血清型O157:H7、O104:H4を含む)で認められる強力な細菌毒素である。Stx1に加えて、一部の大腸菌株はStx/Stx1と同じ作用様式をもつが抗原的に異なる第2の型のStx (Stx2)を産生する。この毒素は志賀清志にちなんで命名されている。志賀清志は、赤痢菌による赤痢の細菌起源を最初に記述した。SLTは*Escherichia coli*が産生する毒素の類似または同一の歴史的用語である。各毒素のサブタイプが同定されているため、現在では各グループの原型毒素をStx1aまたはStx2aと命名している。Stx1aおよびStx2aは、様々な細胞型に対する細胞毒性の差を示し、受容体類似体または模倣体に異なって結合し、異なるケモカイン応答を誘導し、いくつかの特徴的な構造特性を有する。

【0134】

志賀毒素家庭の一員は、構造的および機能的に関連する自然起源のタンパク質毒素の家庭の一員であり、特に*S. dysenteriae*および*E. coli*から分離された毒素を指す(Johannes L, Romer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010))。例えば、志賀毒素家庭は、*S. dysenteriae*血清型1から単離された真の志賀毒素(Stx)、腸管出血性*E. coli*の血清型から単離された志賀様毒素1変異体(SLT1またはStx1またはSLT-1またはStx-1)、および腸管出血性*E. coli*の血清型から単離された志賀様毒素2変異体(SLT2またはStx2またはSLT-2)を包含する。SLT1はStxとは1つの残渣だけで異なり、どちらもVerotoxinsまたはVerotoxins (VTs) (O'Brien A et al., Curr Top Microbiol Immunol 180: 65-94 (1992))と呼ばれている。SLT1とSLT2変形例は、アミノ酸配列レベルではお互いにはほぼ53-60%しか似ていないが、それらは志賀毒素家庭のメンバーと共通している(Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010))。

【0135】

志賀毒素家庭のメンバーは、AサブユニットとBサブユニットの2つのサブユニットをもつ。毒素のBサブユニットは、糖脂質グロボトリアオシルセラミド(Gb3)として知られる細胞膜の成分に結合する。サブユニットBがGb3に結合すると、狭い管状の膜陥入が誘導され、バクテリアが細胞内に取り込まれるために内向きの膜細管が形成される。志賀毒素(非細孔形成毒素)は、ゴルジ網および小胞体を介して細胞質ゾルに移行する。ゴルジ体毒素から小胞体に輸送される。志賀毒素は、リコソーム(Sandvig and van Deurs)(2000) EMBO J 19(220:5943)と同様のメカニズムにより、標的細胞内のタンパク質合成を抑制する働きをする。細胞内に入った後、毒素のAサブユニットはリボソームの60Sサブユニットの28S Ranから特定のアデニンヌクレオジン塩基を分裂させ、それによってタンパク質合成を停止させる(Donohue-Rolfe et al. (2010)感染症13供給のレビュー4(7): S293-297)。

【0136】

本項で使用する志賀家庭毒素とは、自然発生性たんぱく質毒素(例、*S. dysenteriae*および*E. coli*から分離された毒素)の志賀家庭の一員のうち、構造的および機能的に関連するものをいう。例えば、志賀毒素家庭は、*S. dysenteriae*血清型1から単離された真の志賀毒素(Stx)、腸管出血性*E. coli*の血清型から単離された志賀様毒素1変異体(SLT1またはStx1またはSLT-1またはStx-1)、および腸管出血性*E. coli*の血清型から単離された志賀様毒素2変異体(SLT2またはStx2またはSLT-2)を包含する。本項でいう「志賀家毒素A」又は「志賀家毒素A」とは、志賀毒素又は志賀毒素を含む志賀家のいずれかの構成員の構成サブユニットAをいう。

【0137】

一実施形態において、抗CD117 ADCは、志賀家庭毒素サブユニットAに結合された抗CD117、又はサイトトキック活動、すなわちリボソーム抑制活動を有する志賀家庭毒素サブユニットAの一部を含む。志賀毒素サブユニットAのサイトトキック活性には、例えば、リボソーム不活化、たんぱく質合成抑制、N-グリコシダーゼ活性、ポリヌクレオチド:アデノシングリコシダーゼ活性、RNAase活性、およびDNAase活性が含まれる。志賀毒素エフェクター活性のアッセイの非限定的例は、タンパク質合成阻害活性、脱プリン活性、細胞増殖の阻害、細胞毒性、超らせんDNA緩和活性、およびヌクレアーゼ活性

10

20

30

40

50

を測定する。

特定の実施例では、抗CD117の、又はその抗原結合断片が、志賀ファミリーの毒素Aサブユニット、又はリボソーム抑制活性を有するその断片に結合される。志賀家庭毒素サブユニットAの実施例は、志賀様毒素1サブユニットA (SLT-1A)であり、そのアミノ酸配列を以下に示す。

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVVRGIDP
EEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLGDSSTYTT
LQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQ
IQRGFRTTLDDLSGRSYVM TAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSIN
AILGSVALILNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVVRGITHNKILWDSSTLGAILM
RRTISS(SEQ ID NO: 144)。

10

【0138】

志賀家庭毒素サブユニットAのもう一つの実施例は、志賀毒素サブユニットA (StxA)であり、そのアミノ酸配列を以下に示す。

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDNLFAVDVVRGIDP
EEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLGDSSTYTT
LQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQ
IQRGFRTTLDDLSGRSYVM TAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSIN
AILGSVALILNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVVRGITHNKILWDSSTLGAILM
RRTISS(SEQ ID NO: 145)。

20

志賀家庭毒素サブユニットAの別の実施例は、志賀様毒素2サブユニットA (SLT-2A)であり、そのアミノ酸配列を以下に示す

DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAISTPLGNISQGGVSVSVINHV LGGNYISLNVRLDP
YSERFNHLRLIMERNNLYVAGFINTE TNIFYRFSDFSHISVPDVITVSM TTDSSYS
SSLQRIADLERTGMQIGRHSLVGSYLDLMEFRGRSMTRASSRAMLRFVTVIAEALRFRQI
QRGFRPALSEASPLYTMTAQDVDLTLNWGRISNVLPEYRGE EGVRIGRISFNSLSAIL
GSVAVILNCHSTGSSYSVRSVSQKQKTECQIVGDRAAIKVNNVLWEANTIAALLNRKP
QDLTEPNQ(SEQ ID NO: 146)。

【0139】

ある状況下では、自然に発生する志賀家庭毒素サブユニットAは、それらのアミノ端子における約22のアミノ酸のシグナル配列を含む前駆体または形態を含んでおり、それらは、成熟した志賀家庭毒素Aサブユニットを作るために除去され、熟練した作業者に認識されることができる。志賀家庭毒素サブユニットAのサイトトキシック・フラグメントまたは切り詰めたものもまた、ここに開示されるADCおよび方法において使用され得る。

30

【0140】

特定の実施形態では、志賀家庭毒素サブユニットAは、天然に存在する志賀毒素Aサブユニットとは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40個以上のアミノ酸残基(ただし、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を保持するもの以下)まで異なる。いくつかの実施形態において、志賀家庭毒素サブユニットAは、天然に存在する志賀家庭毒素Aサブユニットとは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40個以上のアミノ酸残基(ただし、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%以上のアミノ酸配列同一性を保持するもの以下)まで異なる。したがって、志賀毒素家庭の部材Aから得られるポリペプチド領域は、自然に発生する志賀家庭毒素部材ユニットAに少なくとも約85%、少なくとも約90%、約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%以上のアミノ酸配列同一性が維持されている限り、元の配列からの添加、削除、切り詰めまたはその他の変更を含むことができる。

40

【0141】

50

したがって、特定の実施形態では、志賀家庭毒素サブユニットAは、SLT-1A(配列番号144)、StxA(配列番号145)、および/またはSLT-2A(配列番号146)などの天然に存在する志賀家庭毒素サブユニットAと少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、少なくとも約99.6%、少なくとも約99.7%、少なくとも約99.8%、少なくとも約99.9%以上の全配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、または本質的にからなる。

適切な志賀毒素及び細胞毒素として適するRIPは、例えば、US20180057544に開示されており、これは、ここにその全体として参考文献に組み込まれている。

10

【0142】

オーリスタチン

ここに記載されている抗CD117、および抗原結合断片は、オーリスタチンであるサイトトキシン(米国特許番号5,635,483; 5,780,588)と結合することができる。オーリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解、および核と細胞分裂を妨害する抗有糸分裂剤である(Woykeら(2001) *Antimicrob Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584)。抗癌剤(米国特許第5,663,149号)および抗真菌活性(Pettit et al (1998) *Antimicrob Agents Chemother.* 42:2961-2965)を有する。(米国特許番号5,635,483; 5,780,588)。アウリスタチンの薬物基質は、ペプティックドラッグモイアのN(アミノ)ターミナルまたはC(カルボキシル)ターミナル(WO 02/088172)を通して、抗菌に付着することができる。

20

例証的なアウリスタチンの実施形態としては、Nターミス結合モノミロリスタチンドラッグモアティーズDEおよびDFが含まれる。これは、Senterら、米国がん研究協会の会報、第45巻、要約数623、2004年3月28日に提出され、その開示は、その全体として明示的に参考文献に組み込まれている。

例示的なオーリスタチン実施形態は、MMAEである。

[化21]

ここでいう「波線」とは、リンカー結合体(-L-Z-Ab、以下のように)のリンカーへの等価な付着点を示す。

【0143】

もう一つの典型的なレストランの実施形態はMMAFである。

30

[化22]

ここで、ウェーブラインとは、US 2005/0238649に開示されているように、リンカー結合体(-L-Z-Ab、以下に記載)のリンカーへの同価な付着点を示す。

オーリスタチンは、米国特許No.5,635,483;米国特許No. 5,780,588; Pettit et al (1989) *J. Am.化学協会* 111:5463-5465; Pettit et al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G. R., et al.統合、1996, 719-725; Pettit et al (1996) *J. Chem Soc.パーキントランス* 15:859-863; and Doronina (2003) *Nat.バイオテクノル.* 21(7):778-784の方法に従って調製することができる。

【0144】

アマトキシシン

幾つかの実施例において、抗たん薬活用物の細胞毒素は、リボンポリメラーゼ阻害剤である。いくつかの態様において、RNAポリメラーゼ阻害剤は、アマトキシシンまたはその誘導体である。

幾つかの実施例において、細胞毒素は、アマトキシシンまたはその派生物であり、例えば、 α -アマニチン、 β -アマニチン、 γ -アマニチン、イブタマニチン、アマニニン、アマニナミド、アマナリン、アマヌリン、アマヌリン酸およびプロアマヌリンである。種々の自然に発生するアマトキシシンの構造は式IIIに代表され、例えばZanotti et al., *Int. J. ペプティドプロテイン研究所* 30, 1987, 450-459で開示される。一実施形態において、細胞毒素はアマニチンである。

40

50

いくつかの態様において、細胞毒素は、式III、IIIA、IIIB、またはIIICのアマトキシンである。例えば、ここに記載されている抗原結合フラグメント、又は抗原結合フラグメントは、Abが自己、又はその抗原結合フラグメントであるAb-Z-L-Amに代表される接合体を形成するために、アマトキシシンに結合してもよい。Lはリンカーであり、Zは化学潤滑剤であり、Amはアマトキシンである。アマトキシンまたはその派生物に関する多くの位置は、結合部L、したがって、それらの抗毒素または抗原結合フラグメントを同価に結合する位置として役立つことができる。いくつかの実施形態において、Am-L-Zは式(1)で表される。

[化23]

ここで、 R_1 は、H、OH、 OR_A 、または OR_C である；

10

R_2 はH、OH、 OR_B 、または OR_C 、

R_A と R_B は、もし存在するなら、それらが結合している酸素と結合して、任意に置換された5-族のヘテロシクロアルキル基を形成する。

R_3 はH、 R_C 、または R_D 、

R_4 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_5 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_6 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_7 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_8 はOH、 NH_2 、 OR_C 、 OR_D 、 NHR_C 、または NRC R_D 、

20

R_9 はH、OH、 OR_C 、または OR_D 、

X は-S-、-S(O)-、または-SO₂-、

R_C は-L-Z、

R_D は、必要に応じて置換されたアルキル(例えばC₁-C₆アルキル)、必要に応じて置換されたヘテロアルキル(例えばC₁-C₆ヘテロアルキル)、必要に応じて置換されたアルケニル(例えばC₂-C₆アルケニル)、必要に応じて置換されたヘテロアルケニル(例えばC₂-C₆ヘテロアルケニル)、必要に応じて置換されたアルキニル(例えばC₂-C₆アルキニル)、必要に応じて置換されたヘテロアルキニル(例えばC₂-C₆ヘテロアルキニル)、必要に応じて置換されたシクロアルキル、必要に応じて置換されたヘテロシクロアルキル、必要に応じて置換されたアリール、または必要に応じて置換されたヘテロアリールである。

30

Lは、場合により置換されたアルキレン(例えばC₁-C₆アルキレン)、場合により置換されたヘテロアルキレン(例えばC₂-C₆アルケニレン)、場合により置換されたヘテロアルケニレン(例えばC₂-C₆ヘテロアルケニレン)、場合により置換されたヘテロアルキニレン(例えばC₂-C₆アルキニレン)、場合により置換されたヘテロアルキニレン(例えばC₂-C₆アルキニレン)、場合により置換されたヘテロアルキニレン(例えばOOCヘテロアルキニレン)、場合により置換されたシクロアルキレン、場合により置換されたヘテロシクロアルキレン、場合により置換されたアリーレン、場合により置換されたヘテロアリーレン、ペプチド、(C=O)-、ジペプチド、チオエーテル、ヒドラゾン、またはそれらの組合せなどのリンカーであり；そしてZは、L上に存在する反応性置換基と抗体内に存在する反応性置換基との間のカップリング反応から形成される化学部分、またはCD117(GNK+C

40

【0145】

いくつかの実施形態において、Amは正確に1 R_C の置換基を含む。

いくつかの実施形態において、リンカーは-(CH)_{2n}-単位を構成し、nは2-6の整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、nが6である-(CH₂)_nを含む。いくつかの実施形態において、L-Zは、

[化24]

ここで、Sは、CD117(例えば、システイン残基の-SHグループからの)を結合する、抗原結合断片、すなわち、抗原結合の中に存在する反応性代替物を表す硫黄原子である。

いくつかの実施形態において、L-Zは、

50

[化 2 5]

ここで、Sは、CD117(例えば、システイン残基の-SHグループからの)を結合する、抗原結合断片、すなわち、抗原結合の中に存在する反応性代替物を表す硫黄原子である。いくつかの実施形態において、Am-L-Z-Abは以下の1つである。

[化 2 6]

ここで、Xは-S-, -S(O)-,または-SO₂-であり、Abは、Abアタッチメントの点を示すために示される。

【 0 1 4 6 】

いくつかの実施形態において、Am-L-Z-Abは、

[化 2 7]

いくつかの実施形態において、Am-L-Z-Abは、

[化 2 8]

いくつかの実施形態において、Am-L-Z-Abは、

【 0 1 4 7 】

いくつかの実施形態において、Am-L-Z=Abは式(IA)で表される。

[化 2 9]

ここで、R₁は、H、OH、OR_A、またはOR_Cである。

R₂はH、OH、OR_B、またはOR_C、

R_AとR_Bは、もし存在するなら、それらが結合している酸素と結合して、任意に置換された5-族のヘテロシクロアルキル基を形成する。

R₃はH、R_C、またはR_D、

R₄はH、OH、OR_C、OR_D、R_C、またはR_D、

R₅はH、OH、OR_C、OR_D、R_C、またはR_D、

R₆はH、OH、OR_C、OR_D、R_C、またはR_D、

R₇はH、OH、OR_C、OR_D、R_C、またはR_D、

R₈はOH、NH₂、OR_C、OR_D、NHR_C、またはNR_CR_D、

R₉はH、OH、OR_C、またはOR_D、

Xは-S-, -S(O)-,または-SO₂-、

R_Cは-L-Z、

R_Dは、必要に応じて置換されたアルキル(例えばC₁-C₆アルキル)、必要に応じて置換されたヘテロアルキル(例えばC₁-C₆ヘテロアルキル)、必要に応じて置換されたアルケニル(例えばC₂-C₆アルケニル)、必要に応じて置換されたヘテロアルケニル(例えばC₂-C₆ヘテロアルケニル)、必要に応じて置換されたアルキニル(例えばC₂-C₆アルキニル)、必要に応じて置換されたヘテロアルキニル(例えばC₂-C₆ヘテロアルキニル)、必要に応じて置換されたシクロアルキル、必要に応じて置換されたヘテロシクロアルキル、必要に応じて置換されたアリール、または必要に応じて置換されたヘテロアリールである。

Lは、必要に応じて置換されたアルキレン(例えばC₁-C₆アルキレン)、必要に応じて置換されたヘテロアルキレン(例えばC₂-C₆アルケニレン)、必要に応じて置換されたアルケニレン(例えばC₂-C₆アルケニレン)、必要に応じて置換されたヘテロアルケニレン(例えばC₂-C₆ヘテロアルケニレン)、必要に応じて置換されたアルキニレン(例えばC₂-C₆アルキニレン)、必要に応じて置換されたヘテロアルキニレン(例えばOOCアルキニレン)、必要に応じて置換されたシクロアルキレン、必要に応じて置換されたヘテロシクロアルキレン、必要に応じて置換されたアリーレン、ペプチド、ジペプチド、-(C=O)-、ジスルフィド、チオエーテル、ヒドラゾン、またはそれらの組合せなどのリンカーである。

Zは、Lに存在する反応性代替物と、それに含まれる反応性代替物、すなわちCD117を結合する抗原結合フラグメント(GNK+ CD117のような)とのカップリング反応から形成される化学物質である。

Amには正確に1つのR_C置換基が含まれている。

【 0 1 4 8 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、リンカーは、 n が6である $-(CH_2)_n$ を含む。いくつかの実施形態において、L-Zは、

[化30]

いくつかの実施形態において、L-Zは、

[化31].

いくつかの実施形態において、 A_m-L-Z は式(1B)で表される。

[化32]

ここで、 R_1 は、H、OH、 OR_A 、または OR_C である。

R_2 はH、OH、 OR_B 、または OR_C 、

R_A と R_B は、もし存在するなら、それらが結合している酸素と結合して、任意に置換された5-族のヘテロシクロアルキル基を形成する。 10

R_3 はH、 R_C 、または R_D 、

R_4 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_5 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_6 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_7 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_8 はOH、 NH_2 、 OR_C 、 OR_D 、 NHR_C 、または $NR_C R_D$ 、

R_9 はH、OH、 OR_C 、または OR_D 、

Xは-S-、-S(O)-、または-SO₂-、

R_C は-L-Z、 20

R_D は、必要に応じて置換されたアルキル(例えばC₁-C₆アルキル)、必要に応じて置換されたヘテロアルキル(例えばC₁-C₆ヘテロアルキル)、必要に応じて置換されたアルケニル(例えばC₂-C₆アルケニル)、必要に応じて置換されたヘテロアルケニル(例えばC₂-C₆ヘテロアルケニル)、必要に応じて置換されたアルキニル(例えばC₂-C₆アルキニル)、必要に応じて置換されたヘテロアルキニル(例えばC₂-C₆ヘテロアルキニル)、必要に応じて置換されたシクロアルキル、必要に応じて置換されたヘテロシクロアルキル、必要に応じて置換されたアリール、または必要に応じて置換されたヘテロアリールである。

Lは、必要に応じて置換されたアルキレン(例えばC₁-C₆アルキレン)、必要に応じて置換されたヘテロアルキレン(例えばC₂-C₆アルケニレン)、必要に応じて置換されたアルケニレン(例えばC₂-C₆アルケニレン)、必要に応じて置換されたヘテロアルケニレン(例えばC₂-C₆ヘテロアルケニレン)、必要に応じて置換されたアルキニレン(例えばC₂-C₆アルキニレン)、必要に応じて置換されたヘテロアルキニレン(例えばOOCアルキニレン)、必要に応じて置換されたシクロアルキレン、必要に応じて置換されたヘテロシクロアルキレン、必要に応じて置換されたアリーレン、ペプチド、ジペプチド、-(C=O)-、ジスルフィド、チオエーテル、ヒドラゾン、またはそれらの組合せなどのリンカーである。 30

Zは、Lに存在する反応性代替物と、それに含まれる反応性代替物、すなわちCD117を結合する抗原結合フラグメント(GNK+ CD117のような)とのカップリング反応から形成される化学物質である。

A_m には正確に1つの R_C 置換基が含まれている。 40

【0149】

いくつかの実施形態において、L-ZとしてまとめられたリンカーLと化学物質Zは、以下のとおりである。

[化33]

いくつかの実施形態において、L-Zは、

[化34]

いくつかの実施例において、 R_A と R_B は、それらが結合している酸素原子と結合し、5個のヘテロシクロアルキル基を形成する。

[化35]

ここで、Yは-(C=O)-、-(C=S)-、-(C=NR_E)-、または-(CR_ER_E)-、 50

R_E および R_E は、それぞれ独立して、任意選択的に置換された $C_1 - C_6$ アルキレン、任意選択的に置換された $C_1 - C_6$ ヘテロアルキレン- R_C 、任意選択的に置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルケニレン、任意選択的に置換された $C_2 - C_6$ アルキニレン- R_C 、任意選択的に置換された- R_C ヘテロアルキレン- R_C 、任意選択的に置換されたシクロアルキレン- R_C 、任意選択的に置換されたヘテロシクロアルキレン $C_2 - C_6$ 、任意選択的に置換されたアルキレン- R_C 、または任意選択的に置換されたヘテロアルキレン- R_C である。

いくつかの実施形態では、 $Am-L-Z$ は式(IA)または式(IB)で表され、

ここで、 R_1 は、H、OH、 OR_A 、または OR_C である。

R_2 はH、OH、 OR_B 、または OR_C 、

R_A と R_B が存在する場合、それらがバインドされているアトムと一緒に結合して形成される。

10

[化36]

R_3 がHまたは R_C 、

R_4 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_5 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_6 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_7 はH、OH、 OR_C 、 OR_D 、 R_C 、または R_D 、

R_8 はOH、 NH_2 、 OR_C 、または NHR_C 、

R_9 がHまたはOH、

X は-S-, -S(O)-, または-SO₂-; であり、

20

ここで、 R_C および R_D は、それぞれ上記で定義されたものである。

いくつかの実施形態では、 $Am-L-Z$ は式(IA)または式(IB)で表され、

ここで、 R_1 は、H、OH、 OR_A 、または OR_C である。

R_2 はH、OH、 OR_B 、または OR_C 、

R_A と R_B が存在する場合、それらがバインドされているアトムと一緒に結合して形成される。

[化37]

R_3 がHまたは R_C 、

R_4 と R_5 はそれぞれ個別にH、OH、 OR_C 、 R_C 、または OR_D 、

R_6 と R_7 はそれぞれH、

30

R_8 はOH、 NH_2 、 OR_C 、または NHR_C 、

R_9 がHまたはOH、

X は-S-, -S(O)-, または-SO₂-; であり、

ここで、 R_C は上記で定義されたとおりである。

いくつかの実施形態では、 $Am-L-Z$ は式(IA)または式(IB)で表され、

ここで、 R_1 は、H、OH、または OR_A である。

R_2 はH、OH、または OR_B 、

R_A と R_B が存在する場合、それらがバインドされているアトムと一緒に結合して形成される。

[化38]

40

R_3 、 R_4 、 R_6 、および R_7 はそれぞれH、

R_5 が OR_C 、

R_8 がOHまたは NH_2 、

R_9 がHまたはOH、

X は-S-, -S(O)-, または-SO₂-; であり、

ここで、 R_C は上記で定義されたとおりである。このようなアマトキシン活用上記は、例えば、特許出願公開第2016/0002298号に記載されているが、この開示は、その全体としてここに参考文献に含まれる。

【0150】

いくつかの実施形態では、 $Am-L-Z$ は式(IA)または式(IB)で表され、

50

ここで、 R_1 と R_2 はそれぞれ独立にHまたはOHである。

R_3 が R_C 、

R_4 、 R_6 、および R_7 はそれぞれH、

R_5 は、H、OH、または $OC_1 - C_6$ のバイトである。

R_8 がOHまたは NH_2 、

R_9 はHまたはOHである。

ここで、 R_C は上記で定義されたとおりである。上記アマトキシン共役は、例えば、米国特許出願公開第2014/0294865号に記載されており、その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0151】

いくつかの実施形態では、Am-L-Zは式(IA)または式(IB)で表され、

ここで、 R_1 と R_2 はそれぞれ独立にHまたはOHである。

R_3 、 R_6 、および R_7 はそれぞれH、

R_4 と R_5 はそれぞれ個別にH、OH、 OR_C 、または R_C 、

R_8 がOHまたは NH_2 、

R_9 はHまたはOHである。

ここで、 R_C は上記で定義されたとおりである。上記アマトキシン共役は、例えば、米国特許出願公開第2015/0218220号に記載されており、その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0152】

いくつかの実施形態では、Am-L-Zは式(IA)または式(IB)で表され、

ここで、 R_1 と R_2 はそれぞれ独立にHまたはOHである。

R_3 、 R_6 、および R_7 はそれぞれH、

R_4 と R_5 はそれぞれ独立してHまたはOHである。

R_8 はOH、 NH_2 、 OR_C 、または NHR_C 、

R_9 はHまたはOHである。

ここで、 R_C は上記で定義されたとおりである。

上記アマトキシン共役は、例えば、米国特許番号9,233,173そして9,399,681、および米国2016/0089450では、各開示が参考文献全体としてここに組み込まれている。

【0153】

いくつかの実施形態において、Am-L-Z'は、

[化39]

ここに記載された組成及び方法に従い、Amatoxins(抗原結合フラグメント)への接合に使用されうる追加のAmatoxinsは、例えば、WO 2016/142049、WO 2016/071856、WO 2017/046658、及びWO2018/115466に記載されており、各の開示は、各の全体として、ここに参考文献に含まれている。

【0154】

いくつかの実施形態において、Am-L-Zは、式(II)、式IIA、または式IIBで表される。

[化40]

Xが、S、SO又は SO_2 ； R_1 であり、 R_2 が、リンカー上に存在する反応性代替物と、その中に存在する反応性代替物との結合反応、又はその抗原結合断片から形成された、リンカー上に存在する反応性代替物又はその抗原結合断片との結合反応により、H又はリンカー上に存在する反応性代替物とその中に存在する反応性代替物との結合反応、又はその抗原結合断片から形成されたH又はその抗原結合断片を介して、H又はその抗原結合断片をH又はそれに同価に結合したリンカーであり、 R_2 がHであるとき、 R_1 がリンカーである。いくつかの実施形態において、 R_1 はリンカーであり、 R_2 はHであり、L-Zと同様に、リンカーとケミカルマテュートは、以下である。

[化41]

【0155】

いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(CH_2)_n$ -単位を含む。ここで、nは、2-6

10

20

30

40

50

からの整数である。いくつかの実施形態において、 R_1 はリンカーであり、 R_2 はHであり、L-Zと同様に、リンカーとケミカルマテュートは、以下である。

[化42]

いくつかの実施形態において、 $A_m-L-Z-Ab$ は、

[化43]

いくつかの実施形態において、 $A_m-L-Z-Ab$ は、：

[化44]

【0156】

いくつかの実施形態において、 $A_m-L-Z-Ab$ 前兆現象(すなわち、 A_m-L-Z')は次のうちの1つである。

[化45]

ここでマレイミドは、抗原中のシステインに発見されたチオール基と反応する。

いくつかの実施形態において、細胞毒素は α -アマニチンである。いくつかの実施形態において、 α -アマニチンは式IIIの複合体である。いくつかの実施形態において、式IIIの

α -アマニチンは、リンカー-Lを介して抗CD117抗体に結合され、リンカー-Lは、いくつかの考えられる位置のいずれか1つ(例えば、 R^1-R^9 のいずれか)で式IIIの α -アマニチンに結合されて、式I、IA、IB、II、IIA、IIB、IV、IVAまたはIVBの α -アマニチン-リンカー複合体を提供することができる。また、実施形態によっては、 R^1 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^2 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^3 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^4 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^5 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^6 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^7 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^8 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^9 の位置にリンカーを取り付けることもある。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドロジン、ジスルフィド、チオエーテルまたはジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、Val-AlaおよびVal-Citから選ばれたジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーはパラ・アミノベンジル基(PAB)を含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Cit-Valを含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Ala-Valを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(C=O)(CH_2)_n$ -単位を含み、ここでnは、1~6の整数である。

【0157】

いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(CH_2)_n$ -単位を含む。ここで、nは、2-6からの整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n$ -である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-PAB-Ala-Val-(C=O)(CH_2)_n$ -である。いくつかの実施形態において、L-Zとしてまとめられたリンカー-Lと化学物質Zは、以下のとおりである。

[化46]

【0158】

いくつかの実施形態において、細胞毒素は、 β -アマニチンである。いくつかの実施形態において、 β -アマニチンは式IIIの複合体である。いくつかの実施例では、式IIIの β -アマニチンはリンカー-Lを介して反CD117のイノベーションに付着する。リンカー-Lは、式I、IB、III、IIIA、またはIIBの β -アマニチン-リンカーコンジュゲートを提供するために、いくつかの可能な位置のいずれか(例、 R^1-R^9 のどれか)で、式IIIの β -アマニチン-リンカーに付着することができる。また、実施形態によっては、 R^1 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^2 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^3 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^4 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^5 の位置にリンカーを取り付けることもある。

10

20

30

40

50

また、実施形態によっては、R⁶の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁷の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁸の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁹の位置にリンカーを取り付けることもある。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドラジン、ジスルフィド、チオエーテルまたはジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、Val-AlaおよびVal-Citから選ばれたジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーはパラ・アミノベンジル基(PAB)を含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Cit-Valを含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Ala-Valを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(C=O)(CH_2)_n$ -単位を含み、ここでnは、1~6の整数である。

10

【0159】

いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(CH_2)_n$ -単位を含む。ここで、nは、2-6からの整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n$ -である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-PAB-Ala-Val-(C=O)(CH_2)_n$ -である。いくつかの実施形態において、L-ZとしてまとめられたリンカーLと化学物質Zは、以下のとおりである。

[化47]

【0160】

いくつかの実施形態において、細胞毒素は、 γ -アマニチンである。いくつかの実施形態では、 γ -amanitinは式IIIの複合体である。いくつかの実施形態において、式IIIのガンマ-アマニチンは、リンカーLを介して抗CD117抗体に結合され、リンカーLは、いくつかの考えられる位置のうちのいずれか1つ(例えば、R¹-R⁹のいずれか)で式IIIのガンマ-アマニチンに結合されて、式I、IA、IB、II、IIA、またはIIBのガンマ-アマニチン-リンカー複合体を提供し得る。また、実施形態によっては、R¹の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R²の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R³の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁴の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁵の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁶の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁷の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁸の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁹の位置にリンカーを取り付けることもある。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドラジン、ジスルフィド、チオエーテルまたはジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、Val-AlaおよびVal-Citから選ばれたジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーはパラ・アミノベンジル基(PAB)を含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Cit-Valを含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Ala-Valを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(C=O)(CH_2)_n$ -単位を含み、ここでnは、1~6の整数である。

20

30

【0161】

いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(CH_2)_n$ -単位を含む。ここで、nは、2-6からの整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n$ -である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-PAB-Ala-Val-(C=O)(CH_2)_n$ -である。いくつかの実施形態において、L-ZとしてまとめられたリンカーLと化学物質Zは、以下のとおりである。

40

[化48]

【0162】

いくつかの実施形態において、細胞毒素は、 γ -アマニチンである。いくつかの実施形態では、 γ -amanitinは式IIIの複合体である。いくつかの実施形態において、式IIIの γ -アマニチンは、リンカーLを介して抗CD117抗体に結合され、リンカーLは、いくつかの考えられる位置のうちのいずれか1つ(例えば、R¹-R⁹のいずれか)で式IIIの γ -アマニチ

50

ンに結合されて、式I、IA、IB、II、IIA、またはIIBの -アマニチン-リンカー結合体を提供し得る。また、実施形態によっては、R¹の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R²の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R³の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁴の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁵の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁶の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁷の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁸の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁹の位置にリンカーを取り付けることもある。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドロジン、ジスルフィド、チオエーテルまたはジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、Val-AlaおよびVal-Citから選ばれたジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーはパラ・アミノベンジル基(PAB)を含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Cit-Valを含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Ala-Valを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、-((C=O)(CH₂)_n -単位を含み、ここでnは、1~6の整数である。

【0163】

いくつかの実施形態において、リンカーは、-(CH₂)_n -単位を含む。ここで、nは、2-6からの整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH₂)_n -)である。いくつかの実施形態において、リンカーは、-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH₂)_n -)である。いくつかの実施形態において、L-ZとしてまとめられたリンカーLと化学物質Zは、以下のとおりである。

[化49]

【0164】

いくつかの実施形態において、細胞毒素はアマニンである。いくつかの実施形態において、アマニンは式IIIの複合体である。いくつかの実施例では、式IIIのアマニンはリンカーLを介して反CD117のイノベーショに添付される。リンカーLは、式I、IB、III、IIIA、またはIIBのアマニンリンカー活用形を提供するために、いくつかのありうる位置のいずれか(例、R¹ -R⁹のどれか)で、式IIIのアマニンに付着することができる。また、実施形態によっては、R¹の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R²の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R³の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁴の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁵の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁶の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁷の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁸の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁹の位置にリンカーを取り付けることもある。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドロジン、ジスルフィド、チオエーテルまたはジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、Val-AlaおよびVal-Citから選ばれたジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーはパラ・アミノベンジル基(PAB)を含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Cit-Valを含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Ala-Valを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、-((C=O)(CH₂)_n -単位を含み、ここでnは、1~6の整数である。

【0165】

いくつかの実施形態において、リンカーは、-(CH₂)_n -単位を含む。ここで、nは、2-6からの整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH₂)_n -)である。いくつかの実施形態において、リンカーは、-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH₂)_n -)である。いくつかの実施形態において、L-ZとしてまとめられたリンカーLと化学物質Zは、以下のとおりである。

[化50]

【0166】

いくつかの態様において、細胞毒素はアミノアミドである。いくつかの態様において、アミノアミドは、式IIIの化合物である。いくつかの実施例では、式IIIのアミノアミドはリンカー-Lを介して反CD117のイノベーションに付着する。リンカー-Lは、式I、IB、II、IIIA、またはIIBのアミノアミドリンカー活用形を提供するために、いくつかのありうる位置のいずれか(例、R¹-R⁹のどれか)で、式IIIのアミノアミドに付着することができる。また、実施形態によっては、R¹の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R²の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R³の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁴の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁵の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁶の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁷の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁸の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁹の位置にリンカーを取り付けることもある。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドラジン、ジスルフィド、チオエーテルまたはジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、Val-AlaおよびVal-Citから選ばれたジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーはパラ・アミノベンジル基(PAB)を含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Cit-Valを含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Ala-Valを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、-((C=O)(CH₂)_n-単位を含み、ここでnは、1~6の整数である。

10

20

【0167】

いくつかの実施形態において、リンカーは、-(CH₂)_n-単位を含む。ここで、nは、2-6からの整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH₂)_n-)である。いくつかの実施形態において、リンカーは、-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH₂)_n-)である。いくつかの実施形態において、L-Zとしてまとめられたリンカー-Lと化学物質Zは、以下のとおりである。

[化51]

【0168】

いくつかの実施形態において、細胞毒素はアマンリンである。いくつかの実施形態において、アマンリンは、式IIIの化合物である。いくつかの実施形態において、式IIIのアマンリンは、リンカー-Lを介して抗CD117抗体に結合され、リンカー-Lは、いくつかの考えられる位置のいずれか1つ(例えば、R¹-R⁹のいずれか)で式IIIのアマンクリンに結合されて、式I、IA、IB、II、IIA、またはIIBのアマンクリン-リンカー結合体を提供することができる。また、実施形態によっては、R¹の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R²の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R³の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁴の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁵の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁶の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁷の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁸の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、R⁹の位置にリンカーを取り付けることもある。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドラジン、ジスルフィド、チオエーテルまたはジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、Val-AlaおよびVal-Citから選ばれたジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーはパラ・アミノベンジル基(PAB)を含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Cit-Valを含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Ala-Valを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、-((C=O)(CH₂)_n-単位を含み、ここでnは、1~6の整数である。

30

40

【0169】

50

いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(\text{CH}_2)_n$ -単位を含む。ここで、 n は、2-6からの整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-\text{PAB-Cit-Val}-((\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_n)$ -である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-\text{PAB-Ala-Val}-((\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_n)$ -である。いくつかの実施形態において、L-ZとしてまとめられたリンカーLと化学物質Zは、以下のとおりである。

[化52]

【0170】

いくつかの実施形態において、細胞毒素はアマヌリン酸である。いくつかの態様において、アマニリン酸は、式IIIの化合物である。いくつかの実施形態において、式IIIのアマニリン酸は、リンカーLを介して抗CD117抗体に結合され、リンカーLは、いくつかの考えられる位置のうちのいずれか1つ(例えば、 R^1 - R^9 のいずれか)で式IIIのアマニリン酸に結合されて、式I、IA、IB、II、IIA、またはIIBのアマニリン酸-リンカー結合体を提供することができる。また、実施形態によっては、 R^1 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^2 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^3 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^4 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^5 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^6 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^7 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^8 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^9 の位置にリンカーを取り付けることもある。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドラジン、ジスルフィド、チオエーテルまたはジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、Val-AlaおよびVal-Citから選ばれたジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーはパラ・アミノベンジル基(PAB)を含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Cit-Valを含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Ala-Valを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_n$ -単位を含み、ここで n は、1~6の整数である。

10

20

30

40

50

【0171】

いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(\text{CH}_2)_n$ -単位を含む。ここで、 n は、2-6からの整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-\text{PAB-Cit-Val}-((\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_n)$ -である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-\text{PAB-Ala-Val}-((\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_n)$ -である。いくつかの実施形態において、L-ZとしてまとめられたリンカーLと化学物質Zは、以下のとおりである。

[化53]

【0172】

いくつかの実施形態において、細胞毒素はプロアマヌリンである。いくつかの実施形態において、プロアマヌリンは式IIIの複合体である。いくつかの実施形態において、式IIIのプロアマヌリンは、リンカーLを介して抗CD117抗体に結合され、リンカーLは、いくつかの考えられる位置のうちのいずれか1つ(例えば、 R^1 - R^9 のいずれか)で式IIIのプロアマヌリンに結合されて、式I、IA、IB、II、IIA、またはIIBのプロアマヌリン-リンカー結合体を提供することができる。また、実施形態によっては、 R^1 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^2 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^3 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^4 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^5 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^6 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^7 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^8 の位置にリンカーを取り付けることもある。また、実施形態によっては、 R^9 の位置にリンカーを取り付けることもある。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドラジン、ジスルフィド、チオエーテルまたはジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカ

ーは、Val-AlaおよびVal-Citから選ばれたジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーはパラ・アミノベンジル基(PAB)を含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Cit-Valを含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Ala-Valを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(C=O)(CH_2)_n$ -単位を含み、ここでnは、1~6の整数である。

【0173】

いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(CH_2)_n$ -単位を含む。ここで、nは、2-6からの整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-PAB-Cit-Val-(C=O)(CH_2)_n$ -である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-PAB-Ala-Val-(C=O)(CH_2)_n$ -である。いくつかの実施形態において、L-ZとしてまとめられたリンカーLと化学物質Zは、以下のとおりである。

10

[化54]

【0174】

アマトキシンの合成方法は、米国特許第9,676,702号に記載されており、これはここに含まれる。

ここに記載された組成及び方法で使用するために、抗原、又は抗原結合フラグメントは、当該技術で知られている又はここに記載されている接合技術を用いて、 α -アマニチンのようなアマトキシンまたはそれらの変形物に結合することができる。例えば、CD117を認識米国結合する抗原結合フラグメント(GNK+ CD117のような)は、US 2015/0218220に記載されているように、アマトキシン、或いはその変形物にコンジュゲートすることができ、その開示は、例えば、アマトキシン、例えば、 α -アマニチン米国その変形物、並びにそれらのコバレント結合に使用できるコバレント共役、本文に含まれる引用により組み込まれている。

20

【0175】

本明細書に記載の方法と組み合わせる有用な例示的な抗体-薬物結合体は、抗体またはその抗原結合フラグメントと、抗体上の反応性残基との反応に適した置換基を含有するリンカーと結合したアマトキシン、またはその抗原結合フラグメントとの反応によって形成され得る。本書に記載されている、反応性残留物、またはそれらの抗原結合断片との反応に適したリンカーにコンジュゲートされるアマトキシンには、限定なく、以下が含まれる。

7'C-(4-(6-(マレイミド)ピペラジン-1-アマキシン);7'C-(6-(マレイミド)ピペラジン-1-イリル)アマキシン;7'C-(4-(マレイミド)ピペラジン-1-イリル)シクロヘキサナミド-1-イリル;7'C-(4-(6-(マレイミド)ピペラジン-1-イリル)アマキシン);7'C-(2-(6-(マレイミド)ヘキサナミド)ピペリジン-1-イリル);7'C-(4-(2-(6-(6-(メレミド)ヘキサナミド)エチル)ピペリジン-1-アマキシン、(4-(2-(マレイミド)メキシコ)ピペリジン-1-イリド、7'C-(4-(3-カルボキシプロパナミド)ピペリジン-1-イリド)-アマキシン、7'C-(4-(2-ブromoアセタミド)ピペリジン-1-イリド)-アマキシン 7'C-(2-(ピリジン-2-イリルフェニール)プロパナミド)ピペリジン-1-アマトキシン、7'C-(2-(4-(マレイミド)ブタナミド)) (4-(2-(マレイミド)ピペリジン-1-yl);7'C-(マレイミド)ピペリジン-1-yl);7'C-(マレイミド)ピペリジン-1-yl);7'C-(4-(マレイミド)ピペリジン-1-yl)ピペリジン-1-amatoxin ;7'C-(3-(6-(マレイミド)ヘキサナミド)mel)pyrrolidin-1-amatoxin; (7'(C-(6-(マレイミド)ヘキサナミド)メル)ピロリジン-1-アマキシン、(4-(マレイミド)メル)シクロヘキサミド)ピロリジン-1 (- (6-(2-(6-(2-(マレイミド)メキシコ)ピロヘキサミド);7-(2-(2-)アマゾン)ピロリジン-1)イリ-アマキシン;7'(- (2-(2-(アマノキシ)エチル)ピペリジン-1)イリ);7'C-(2-(アマノキシ)ピペラジン-1-イリ)アマキシン;7'C-(6-(2-(アマノキシ)ヘキサノイリ)ピペラジン-1-イリ)アマキシン;(7'C-(6-(マレイミド)ヘキサナミド)ピペリジン-1-yl)アマキシン、7'C-(4-(6-(マレイミド)ヘキサナミド)(6-(マレイミド)エチル)-アマトキシン;(6-(6-(マレイミド)メキシコ)ピラジン-1-イリル)メキシコ;(- (6-(マレイミド)メキシコ)ピロリジン-1-イリル)アマキシン;(- (6-(6-(マレイミド)ヘキサナミド)メキシコ)ピペリジン-1-イリル);アマキシン;(- (6-(6-(マレイミド)メキシコ)7'(C-(4-(マレイミド)メトル)ピペリジン-1-yl)アマトキシン、7'(C-(2-(6-(4-(マレ

30

40

50

イミド)メトル)) (4-(2-(6-(メルヘキサナミド)ピペリド:2-(6-(メルヘキサナミド)エチル)アマジン;7-(2-(6-(メルヘキサナミド)エチル)ピペリド:7-(6-(メルヘキサナミド)エチル)ペピラジン-1-イリル)アマキシン;7'(-(2-(6-(マレイミド)メル)シクロヘキサナミド)ピペラジン-1-イリル)(7'(C-(6-(マレイミド)ヘキサナミド)-S-メトル)ピロリジン-1-yI)アマキシン、7'C-(-(3) (-6-(6-(マレイミド)-(6-(マレイミド)-メル)ピロリジン-1)メキシコ(-6-(マレイミド)-R-メキシコ)ピロリジン-1-イリル)アマトキシ、7'(-(6-(4-(マレイミド)メキシコ)シクロヘキサナミド)メキシコ)ピロリジン-1-イリル、(6-(6-(マレイミド)メキシコ)ピロリジン-1-イリル)アマキシン 7'(C-(2-(3-カルボキシプロパナミド)エチル)ピペラジン-1-yI)アマキシン、7'(-(6-(マレイミド)ヘキサノミド)ピペラジン-1-yI)アマキシン、7'C-(-(4-(4) (-4-(マレイミド)メキシコ)ピペラジン-1-イリル(4-(マレイミド)ピペラジン-1)メキシコ;(4-(マレイミド)ピペラジン-1-イリル)メキシコ;(-4-(マレイミド)ピペラジン-1-イリル)メキシコ;7'C-(-(4-(4-(マレイミド)ブタナミド)ピペリジン-1-イリル)メキシコ;(7'(C-(2-(4-(マレイミド)メキシコヘキサナミド)エチル)ピペリジン-1-イリド)アマトキシ、7 (-3-(6-(マレイミド)メキシ)アゼチジン-(2-(6-(マレイミド)メキシ)アマトキシ)(7-(6-(マレイミド)メキシ)アゼチジン-1イリ)メキシ、7'(-(2-(4-(マレイミド)メキシ)シクロヘキサミド)アゼチジン-1イリ)メキシ、7'(C-(2-(6-(マレイミド)メキシコヘキサナミド)エチル)アゼチジン-1-イリ)アマトキシ、7'(-(2-(6-(マレイミド)-N-メルヘキサナミド)エチル)-アマトキシ、7'(-(4-(6-(マレイミド)) (-2-(2-(6-(メルヘキサナミド)エチル)アマトキシ);7'C-(2-(メルヘキサナミド)エチル)アマキシン-1-yI)アマキシン;7'(-(6-(2-(アマノキシ)ヘキサノミド)ヘキサノミド)ペラジン-1-yI)メキシコ;7'(C-(1-(アミノキシ)-2-オキシ-6,9,12-テトラオキサ-3-アゼブタデカン-17-オイル)ピペラジン-1)イリル;7'(-(2-(アミノキシ)アセタミド)ピペラジン-1-イリル)アマキシン;7'C-(-) (3-(2-(2-(アミノキシ)プロパノキシ-1)ベタミド;7'(2-(アミノキシ)ベタミド-イリル)ベタミド;7'(-(2-(2-(アミノキシ)イリル)アセタミド)ピペリジン-1-イリル)アマキシン;7'C-(-(4-(2-(アミノキシ)ブタミド)エチル)ピペリジン-1-イリル;(7'C-(20-(アミノキシ)-4,19-ジオクソ-6,9,12-テトラオキサ-3,18-ジアザイコシル)ピペリジン-1-イリ)アマキシン; (-2-(2-(6-(2-(アミノキシ)エチル)アマミド:7-(2-(アミノキシ)ナミド)(2-(N-(アミノキシ)エチル)-アマド)(6-(メル)メキシコ)プトキシ-1)-アマキシン;7'(-(6-(4-(マレイミド)メキシコ)カルボヘキサナミド)-R-ピロリジン-1)メキシコ;(7'(-(6-(4-(メレイミド)メキシコ)ヘキサナミド)-R-メキシコ)7'(C-(2-プロモアセタミド)ピペラジン-1-yI)アマキシン、7'(-(2-プロモアセタミド)ピペリジン-1-yI) (4-(2-(2-(ピリジン-2-イリジル)プロパナミド:7-(オ-(6-(マレイミド)プロパナミド)エチル)-アマキシン;6'O-(6-(マレイミド)ヘキシル)-アマキシン;6'O-(6-(マレイミド)ヘキシル)カルバモキシ;6'O-(6-(マレイミド)メキシコ)-アマキシン;6'O-(6-(4-(マレイミド)メルシクロヘキサミド)カルバモイル)アマキシン;6'(6-(2-プロモアセタミド)ヘキシ;7'C-(6-(アジド)ヘキサナミド)ピペリジン-1-イリル;7'C-(4-(ヘクス-5-イノイラミノ) (2-(6-(6-(2-(6-)マレイミド)ペイパニド-1-アマキシン;7-(マレイミド)ペイパナミド)ペラジン-1-イリル;6-(6-ジハイドロ-5,6-ジハイドロ-ジベンズ[b,f]アゾシン-5-イリ)-ヘキシル)-アマキシン;6'O-(6-(ヘキシル-5-イノラミノ)-アマキシン;6'O-(2-(アミノキシ)ヘキシル)-アマキシン;6-(2-ヨードアセタミド)ヘキシである。上述のリンクは、特に、ここに記載された組成物及び方法と関連して有用であり、例えば、特許出願公開第2015/0218220号に記載されている。この特許出願は、その全体を引用してここに含まれている。

10

20

30

40

【0176】

癌を直接的に治療するため、または造血幹細胞移植治療のために患者(例えば、ヒト患者)をコンディショニングするために、CD117(例えば、GNK+CD117)に結合し得る追加の細胞毒素は、限定されるわけではないが、5-エチニルウラシル、アビラテロン、アドゼレシン、アルデスロイキン、アルトレタミン、アムバムスチン、アミドックス、アミノレプリン酸、アムサクリン、アナストロゾール、アントログリコリド、血管新生阻害剤、アンタレリクス、抗背側形成タンパク質-1、前立腺癌、アンチエストロゲン、アンチネオ

50

プラストン、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アフィジコリン酸、アポトーシス遺伝子モジュレーターを含むアポトーシス調節因子、アプリン酸、アキシナスタチン2、アキシナスタチン3、アザセトロン、アザトキシン、アザチロシン、バカチンIII誘導体、バラノール、バチマスタット、BCR/ABL拮抗薬、ベンゾクロリン、ベンゾイルスタウロスポリン、 β -アレチン、ベタクラマイシンB、ベツリン酸、bFGF阻害薬、ビスルタミド、ビスアジリジニルスペルミン、ビスナフィド、プレオマイシンA2、プレオマイシンB2、ブドチオニン、カルシポトリオール、カルシポトリオールC、カンプトテシン誘導体(例えば、10-ヒドロキシ-カンプトテシン)、カペシタビン、カルボキシアミドトリアゾール、カルゼレシン、カスタノスペルミン、セクロピンB、セトロレリクス、クロロキノキサリンスルホンアミド、シカプロスト、シス-ポルフィリン、クラミフェンおよびその類似体、クロトリマゾール、コリスマイシンA、コムプレタスタチンA4、コンプレタスタチン類似体、コナゲニン、クランベシジン816、クリプトフィシン、クリプトフィシンA誘導体、シクロペンタクラシンA、シクロペンタマイシン、シクロプラタミンB、デヒドロジデムニン、デシタビン、2'-デヒドロキシコホルマイシン(DCF)、デスロレリン、デクスラゾキサソ、デクスラパミル、ジアジクオン、ジデムニンB、ジデヒドロノルスペルミン、ジヒドロ-5-アザシチジン、ジヒドロキサマイシン、ジフェニルスピロムスチン、ドコサノール、ドキシフルリジン、ドロキシフェン、ドロナビノール、エブセレン、エドレコムスチン、エレクロマブ、エレメン、エポシド、エピチオロン、エピチロン、ファザラビン、フェンレチニド、フラボピリド、フラゼラスチン、フルダラビン、フルオロダウノルニシン塩酸塩、ホルメスタン、フォストリエシン、ホテムスチン、ガドリニウムテキサフィリン、硝酸ガリウム、ガロシタビン、ゲラチナーゼ阻害薬、ゲムシタビン、グルタチオン阻害薬、ヘブスルファム、ホモリントニン(HHT)、ヒペリシン、イバンドロン酸、イルモシン、イロマスタット、イミダゾクリドン、免疫刺激ペプチド、イオベングアンヨードキソルピシン、イリノテカン、イリノテカン、ジャスフラゾール、イソベガリドF、ランレオチド、レノグラスチン、レプトロゾール、親油性白金化合物、リスソクリンアミド7、ロメトレキサール、ロキサントロン、ロキサソリピン、ルテチウムテキサフィリン、リソフィリン、マスピン、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤、メノガリン、メテロシナーゼ、メチオニナーゼ、メトクロプラミド、MIF阻害剤、イフェプリストン、ミルテホシン、ミリモスチム、ミトガゾン、ミトラクトール、マイトマイシンおよびそれらの類似体、ミトキサントロン、ミトキサントロン、ミトキサントロンB、ミトキサントロン、ナファレチン、ナフレチム、ネモルピシン、ニルトロン酸、ニサマイシン、ニトルリン、オクトレオチド、オクイセノン、オンダンセトロン、オラシン、オキサリプラチン、オキサウノマイシン、パクリタキセルおよびその類似体、パルアミン、パナキシトリオール、パナキシトリオール、パラバクチン、パゼリブチン、ペグアスパラガーゼ、ペントサンポリ硫酸ナトリウム、ペントスタチン、ペントロゾール、パーフルブロン、フェナジノマイシン、ピシバニールピルピシン、ポドフィロトキシン、ポドフィロトキシン、ロヒツキン、ルビギノン、サルコフィトールB1、サルコフィトールA、サルグラモスチム、ソブゾキサソ、ソネルミン、スパロムシンD、スピロムスチン、スルフィノシン、タリムスチン、テモゾロミド、テニポシド、チオコラリン、トポテカン、トプセンチン、トリシリピン、トリメトレキサート、ベラミン、ビノレルピン、ボロゾール、ゼニプラチン、ジラスコルブ、その他が含まれる。

10

20

30

40

【0177】

化学結合のためのリンカー

種々のリンカーは、本説明されるように、CD117(例えば、GNK+CD117のような)を細胞傷害性分子と認識し結合する、抗原結合フラグメント(例えば、抗生物質又は抗原結合フラグメント)を結合するために使用することができる。

【0178】

ここで使用される「リンカー」という用語は、本開示の(ADCs; Ab-Z-L-D、ここでDが細胞毒素である場合)において、薬物モイティー(D)に等価な結合またはそれらの断片(Ab)を同価に付着させる原子の連鎖を含む同価な化学物質を意味する。適切なリンカーは2

50

つの反応性末端を有し、一方は抗体への結合のためであり、他方は細胞毒素への結合のためである。リンカーの共役反応性ターミナル(反応性モア、Z)は、典型的には、抗菌にシステインチオール又はリジンアミングループを通して共役できるサイトであり、それゆえ、典型的には、チオール反応性グループ(マレイミドの場合のような)、又はクロロ、ブロモ、ヨード又はR-スファニールグループのような離脱グループ、又はカーボキシルグループのようなアミネ反応性グループである。一方、リンカーの共役反応性ターミナルは、典型的には、サイトトキシングループ上の基礎アミネ又はカルボキシルグループとのアミド結合を通してサイトトキシンに共役することができるサイトであり、上記典型的には、カルボキシル又は基礎アミネグループである。リンカーを活用形で説明する際に「リンカー」という用語を使用する場合、反応性ターミニの一方又は両者は、リンカーと細胞毒素の間の結合の形成、並びにリンカー及び/又はそれらのリンカー又はそれらの抗原結合フラグメントの間の結合のために、不完全(例えば、反応性モイジーZが化学モイティーZに変換された)又は不完全(例えば、カルボキシル酸のカルボニールのみである)ではなくなる。このような上記反応については、ここでさらに詳しく説明する。

10

【0179】

一般的には、本開示に適したリンカーは、循環において実質的に安定しているが、標的細胞内または近接において細胞毒素(例えば、本開示されたようなアマトキシシン)の放出を可能にする。いくつかの実施形態では、リンカーはある種の細胞内条件下で切り離すことができ、このようにして、リンカーの切り離しにより、細胞内環境中の抗菌から薬物ユニットを放出することができる。他の実施形態においては、リンカーユニットはクリーニング可能ではなく、薬物は、例えば、抗生物質分解によって放出され得る。一般に、切り離すことができるリンカーは、生理学的環境に応じて切り離される1つ以上の官能基を含んでいる。例えば、クレーパブルリンカーには、細胞内エンザイム(例えば、カテプシンB)の存在で分解するエンザイマティック基材(例えば、パリン・アラニン)、細胞区画の酸性環境で分解する酸性クレーパブル基(例えば、ヒドロゾン)、または細胞内還元環境で分解する還元性基(例えば、ジスルフィド)を含むことができる。コンテストにより、一般に、非切断性リンカーは、標的細胞内のADCの抗体部分の劣化(例えば、リソソーム劣化)中にADCから放出される。いくつかの実施形態では、リンカーは標的セルの外で実質的に安定であり、細胞内で何らかの効果的な速度で切り離されることができる。いくつかの実施形態において、効果的なリンカーは、(i)抗毒素の特定の結合特性を維持すること、(ii)共役体または薬物の部分の細胞内伝達を許可すること、(iii)安定で無傷のままであること、すなわち、共役体はその標的となる場所に配達または輸送されるまで、割れていないこと、および(iv)サイトトキシック、細胞殺菌効果またはサイトトキシック作用を維持することができること、である。上記ADCの安定性は、標準的な分析技術(例えば、質量分析法、HPLC、および分離/分析技術LC/MS)により測定され得る。いくつかの実施形態では、薬物とドラッグモイティーの同価な結合は、リンカーが2つの反応性官能基、すなわち反応性の意味での二価性を持つことを必要とする。ペプチド、核酸、薬方法、毒素、抗毒素、ハプテン、およびレポーターグループのような、2つ以上の機能的または生化学的に活発なモイティを付着させるのに有用な二価リンカー試薬が知られており、その結果として生じた結合方法(Hermanson, G. T. (1996) バイオコンジュゲートテクニック; アカデミックプレス: ニューヨーク、234-242ページ)が記載されている。

20

30

40

【0180】

いくつかの実施形態において、リンカーは、例えば、酵素的加水分解、光分解、酸性条件下での加水分解、基本条件加水分解、酸化、ジスルフィド還元、求核切断、または有機金属切断によって切断され得るものを含む(例えば、Leriche et al., Bioorg. Med. Chem., 20:571-582, 2012を参照のこと、その開示は、共有共役共役に適したリンカーに関連するとして、参照により本明細書に組み込まれる)。

酸性条件下で加水分解可能なリンカーには、例えば、ヒドラゾン化合物、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、cis-アコニットアミド、オルトエステル、アセタール、ケタールなどが含まれる。(例えば米国特許No.5,122,368; 5,824,805; 5,824,805; 5,6

50

22,929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm.Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol.Chem. 264:14653-14661を参照。)各開示は、同価活用に適したリンカーに関連するので、ここにその全体として参考文献に含まれる。このようなリンカーは血液中のような中性のpH条件下では比較的安定であるが、pH 5.5または5.0(リソソームの上記pH)以下では不安定である。

【0181】

還元条件下で掃除可能なリンカーには、例えばジスルフィドが含まれる。例えば、アドバンステクノロジーアタッチメント (N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート)、S PDP (N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート)、SPDB (N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)酪酸)及びSMPT (N-スクシンイミジル-オキシカルボニル-メチル-(2-ピリジルジチオ)トルエン)、SPDB及びSMPTを用いて形成することができるものを含む、種々のジスルフィドリンカーが当該技術分野において公知である(例えば、Thorpe et al., 1987, Cancer Res 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987.米国特許No. 4,880,935も参照のこと)。各々の開示が、共有結合共役に適したリンカーに関連するので、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0182】

酵素的加水分解に感受性のリンカーは、例えば、細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素(リソソームまたはエンドソームプロテアーゼを含むが、これらに限定されない)によって切断されるペプチド含有リンカーであり得る。治療薬剤の細胞内プロテオリズム放出を使用することの1つの利点は、その薬品が接合されたときに典型的に減衰され、接合体の美容安定性が一般的に高いことである。いくつかの実施形態において、ペプチルリンカーは少なくとも2つのアミノ酸が長い少なくとも3つのアミノ酸が長い。典型的なアミノ酸リンカーには、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペンタペプチドが含まれる。適切なペプチドの例には、バリン、アラニン、シトルリン、フェニルアラニン、リジン、ロイシン、およびグリシンのようなアミノ酸を含有するものが含まれる。アミノ酸リンカー成分を構成するアミノ酸残留物には、天然のものに加え、マイナーなアミノ酸や、シトルリン等の非天然のアミノ酸類似物が含まれる。典型的なジペプチドには、フェニルアラニン-シトルリン(valまたはval-cit)およびアラニン-フェニルアラニン(afまたはala-phe)が含まれる。例示的なトリペプチドには、グリシン-フェニルアラニン-シトルリン(gly-val-cit)とグリシン-glycine-glycine (gly-gly-gly)が含まれる。いくつかの実施形態において、リンカーは、Val-Cit、Ala-Val、又はPhe-Lys、Val-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Arg又はTrp-Citのようなジペプチドを含む。Val-CitやPhe-Lysのようなジペプチドを含むリンカーは、例えば米国特許に開示される。No.6,214,345。この開示は、本引用文献全体として、同価活用に適したリンカーに関するものであるから、ここに組み込まれている。いくつかの実施形態において、リンカーは、Val-AlaおよびVal-Citから選ばれたジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、ジペプチドは、自己不滅リンカーと組み合わせて使用される。

20

30

【0183】

本稿に記載されているように、薬物-抗菌共役の合成に適した追加リンカーとしては、P-aminobenzylアルコール(PABC)、p-aminobenzyl (PAB)、6-maleimidohexanoic acid、pH-seciency 炭酸、およびJain et al., Pharmに記載されている他の試薬のように、1,6-elimination process(自己消毒)過程によって細胞毒素を放出することができるものが含まれる。研究32:3526-3540, 2015,これらの開示は、本引用文献全体に含まれている。

40

【0184】

いくつかの態様において、リンカーは、例えば、Carlら、J. Med Chem. (1981) 24:479-480; Chakravarty et al (1983) J. Med.Chem. 26:638-644; US 6214345; US20030130189; US20030096743; US6759509; US20040052793; U

50

S6218519; US6835807; US6268488; US20040018194; W098/13059; US20040052793; US6677435; US5621002; US20040121940; W02004/032828)に開示されている、前述のPABまたはPABC (パラ-アミノベンジルオキシカルボニル)などの自己非揮発性基を含む。このプロセスが可能な他のそのような化学部分(「自己非揮発性リンカー」)には、メチレンカルバメートおよびアミノチアゾール、アミノイミダゾール、アミノピリミジンなどのヘテロアリアル基が含まれる。このようなヘテロ循環的な自己グループを含むリンカーは、例えば、米国特許公開番号20160303254および20150079114、ならびに米国特許第7,754,681号; Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237; US 2005/0256030; de Groot et al (2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830; およびUS 7223837に開示される。本明細書での使用に適したリンカーは、さらに、C₁-C₆アルキレン、C₁-C₆ヘテロアルキレン、C₂-C₆アルケニレン、C₂-C₆ヘテロアルケニレン、C₂-C₆アルキニレン、C₂-C₆ヘテロアルキニレン、C₃-C₆シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、ヘテロアルリレン、およびそれらの組合せから選択される1つ以上の群を含み、それらの各々は任意に置換されてもよい。このようなグループの非限定的な例は、(CH₂)_n, (CH₂CH₂O)_n, および-(C=O)(CH₂)_n-ユニットを含み、ここでnは、各場面に対して独立に選択される1から6の整数である。

10

【0185】

適切なリンカー、溶解性を高める特性を有するグループを含むことができる。例えば、(CH₂CH₂O)_p単位(ポリエチレングリコール、PEG)を含むリンカーは、アミノ、硫酸、リン酸またはリン酸残渣で置換されたアルキル鎖のように、溶解性を高めることができる。このようなモイティを含むリンカーは、例えば、米国特許番号に開示される。8,236,319そして、9,504,756であり、それらの各開示は、同価活用に適したリンカーに関連するので、ここにその全体として参考文献に含まれる。さらなる溶解性強化基は、例えば、アシルおよびカルバモイルスルファミド基を含み、その構造を有する。

20

[化55]

aが0または1であること。

R¹⁰は、水素、C₁-C₂₄アルキル基、C₃-C₂₄シクロアルキル基、C₁-C₂₄(ヘテロ)アリアル基、C₁-C₂₄アルキル(ヘテロ)アリアル基及びC₁-C₂₄(ヘテロ)アリアルアルキル基、C₃-C₂₄シクロアルキル基、C₂-C₂₄(ヘテロ)アリアル基、C₃-C₂₄アルキル(ヘテロ)アリアル基及びC₃-C₂₄(ヘテロ)アリアルアルキル基からなる群から選択され、これらの各々は、O、S及びNR¹¹R¹²から選択される1つ以上のヘテロ原子によって置換され及び/又は場合により中断されてもよく、ここで、R¹¹及びC₁-C₂₄は、水素及びC₁-C₄アルキル基からなる群から独立して選択され;又はR¹⁰はサイトトキシンであり、サイトトキシンは、スペーサ部分を介してNに任意に連結されている。このようなグループを含むリンカーについては、例えば、米国特許第9,636,421号及び特許出願公開第2017/0298145号において記載されているが、これらの開示は、細胞毒素及び抗原結合フラグメントへの同様な活用に適したリンカーに関するものとして、ここにその全体として参考文献に含まれている。

30

【0186】

いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドラジン、ジスルフィド、チオエーテル、ジペプチド、p-アミノベンジル(PAB)基、複素環式自己不溶性基、必要に応じて置換されたC₁-C₆アルキル、必要に応じて置換されたC₁-C₆ヘテロアルキル、必要に応じて置換されたC₂-C₆アルケニル、必要に応じて置換されたC₂-C₆ヘテロアルケニル、必要に応じて置換されたC₂-C₆アルキニル、必要に応じて置換されたC₂-C₆ヘテロアルキニル、必要に応じて置換されたC₃-C₆シクロアルキル、必要に応じて置換されたヘテロシクロアルキル、必要に応じて置換されたアリール、必要に応じて置換されたヘテロアリアル、アシル、-(C=O)-、または-(CH₂CH₂O)-基のうちの1つまたは複数を含み得、ここでnは1~6の整数である。当業者は、リストされたグループのうちの1つ以上が、二価(ジラディカル)種、例えばC₁-C₆アルキレン等の形で存在する

40

50

ことを認識するであろう。

【0187】

いくつかの実施形態において、リンカーLは、部分*-L₁ L₂ -*を含む。

L₁がないか-(CH₂)_m NR¹³C(=O)-, -(CH₂)_m NR¹³ -, -(CH₂)_mX₃ (CH₂)_mである。
[化56]

L₂が存在しないか、-(CH₂)_m -, -(CH₂)R¹³ C(=O)Nm -, -(CH₂)¹³ C(=O)Nm -, -(CH₂)C(=O)X₄, -((CH₂)CH₂)_m -((CH₂)_m -(CH₂)_m n -(CH₂)_m -, -(NR¹³) (CH₂)X₃ (CH₂)_m -, -NR¹³(CH₂)_m X₃ (CH₂)_m -, -X₁ X₂ C(=O)_m -, -(CH₂)_m -(CH₂)_m -, -(CH₂)_m (CH₂)_n, -(CH₂)_m NR¹³(_m)_m -, -(CH₂)_m NR¹³ C(=O)(CH₂)_m X₃ (CH₂)_m -(CH₂)_mC(=O)NR¹³ (CH₂)_m NR¹³ C(=O)(CH₂)_m -, -(CH₂)_m C(=O)-, - (_m)_m NR¹³(CH₂)_m C(=O)X₂ X₁ C(=O)-, -(CH₂)_mX₂X₁ C(=O)-, -(CH₂)_mm -, -(CH₂)_mC(=O)NR¹³ (CH₂)_m X₃ (CH₂)_mCH₂)_m NR¹³ C(=O)(CH₂)_m -, -(CH₂)_m X₃ (CH₂)_mC(=O)NR¹³ (CH₂)_m -, -(CH₂)_mO)_n (CH₂)_m NR¹³ C(=O)_m X₃(CH₂)_m C(=O)_m X₃ (O(CH₂)_m)_nm(O(CH₂)_m)_n -, -(CH₂)_m(O(CH₂)_m C(=O)NR¹³ (CH₂))_nC(=O)-, -(-, -(CH₂)_m X₃ (CH₂)_mNR¹³ (CH₂)_m C(=O)-, -(CH₂)_mC(=O)NR¹³ (CH₂)_m NR¹³ C(=O)-, -(CH₂)_m(O(CH₂)CH₂)_n X₃ (CH₂)_m -, -(CH₂)(CH₂)_m -, -(CH₂) X₃((_m C(=O)NR¹³ (CH₂))_m O)C H₂)_mX₃ (CH₂)_m C(=O)-, -(CH₂)_mC(=O)NR¹³ (CH₂)_m O)_n (CH₂)_mX₃ (CH₂)_m -, -(CH₂)_m X₃(CH₂)_m (O(CH₂)_m)_n NR¹³C(=O)(CH₂)_m -, -(CH₂)_m X₃(CH₂)_m (O(CH₂)_m)_n C_mCH₂)_mn -, -(CH₂)_m C(=O)_n (CH₂)_m -, -(CH₂ -, -(CH₂)_m C(=O)NR¹³ (CH₂)_m(O(CH₂)_m)_n C(=O)-, -((_m)_mO)_n (CH₂)_m NR¹³ C(=O)(=O)-, -(CH₂)_mX₃ (CH₂)_m (O(CH₂)_mm -, -(CH₂)_mNR¹³ C(=O)(CH₂)_m NR¹³ C(=O)(CH₂) -(CH₂)NR¹³ (CH₂)_m C(=O))NR¹³ -, -(CH₂)_m C(=O)NR¹³ -, -(CH₂)_mX₃ -, -C(R¹³)₂ (CH₂)_m -, -(CH₂)_m C(R¹³)₂ NR¹³ -, -(CH₂)_m (CH₂)_m -, -(CH₂)_m C(=O)NR¹³ (CH₂)_mC(=O)NR¹³(CH₂)_m X₃ (CH₂)_mC(=O=O)X₂ X₁ C(=O)-, - C(R¹³)₂ (CH₂)_mNR¹³ C(=O)(CH₂)_m -, -(CH₂)CH₂mC(R¹³)₂ NR¹³ -, - C(R¹³)₂(CH₂)C(=O)NR¹³ (CH₂)_mNR¹³ -, -(CH₂)_m C()_mNR¹³ (CH₂)_mNR¹³ C(=O NR¹³ -, -(CH₂)_m C(NR¹³(CH₂)_m -, -(CH₂)_m NR¹³C(=O)O(CH₂)_m C(R¹³)₂ NR¹³ -, -(CH₂)_mm C(=O)NR¹³ (CH₂)CH₂)_mX₃ (CH₂)_m -, -()CH₂)_m X₃(CH₂)_m C(R¹³)₂ NR¹³ -, -C(R¹³)₂ (CH₂)_m OC(=O)O)NR¹³(C H₂)_m (O(CH₂)_m)X₃ (CH₂)_mNR¹³ -, -()_m S(=O)₂ -, -(CH₂)_mC(=O)NR¹³_n NR¹³ -, -(CH₂)_m(CH₂)_m X₃ (CH₂)_m (O(CH₂)_mn NR¹³ -, -(CH₂)_m NR¹³ -, -(CH₂)_m C(=)(CH₂)_m S(=O)₂O(_m)O(CH₂)_m -, -(CH₂)) -, -(CH₂)_m X₃ (CH₂)_nC(=O)X₂ X₁ C(=O(_m S(=O)₂ -, -))_mnX₂ X₁ C(=O)-, - -, -(CH₂)_m (O(CH₂)_mn X₂ X₁ C(=O)-, -)_n NR¹³ -, -(CH₂ CH₂ O)_n (CH₂)_m -, -(CH₂))(CH₂)_m X₃ (CH₂)_mCO)--=(CH₂)_m X₂ X₁C(=O) -, -(CH₂)_m (O(C(=O)(_m (OCH₂CH₂)_n); -(CH₂)_m)(_mO)(=O)-, -(CH₂)C(=O)-, -(CH₂O)_m X₃(CH₂)_m C(=O ((CH₂)_m X₃(CH₂)_m X₂ X₁)C(=O)-, -(CH₂- またはCH₂m (O(CH₂)_m)_nC C(=O)-、

(式中、

X₁は

[化57]

X₂は

[化58]

X₃は

[化59]

X₄は

[化60]

(式中、

R¹³は、HおよびC₁-C₆のアルキルからそれぞれ独立に選択される。

mは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10の各機会ごとに選択される。

10

20

30

40

50

n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 からそれぞれの機会に独立して選択される。

単一の星印(*)は細胞毒素(例:アマトキシシン)への付着点を示し、二重の星印(**)は反応性代替物質Z'または化学物質Zへの付着点を示し、L₁とL₂の両方が欠けていないことを条件とする。

【0188】

いくつかの実施形態において、リンカーは、p-aminobenzyl基(PAB)を含む。ある実施形態では、p-アミノベンジル基は、リンカー内の部位トキシック薬物とプロテアーゼ切断部位の間に処分される。1つの実施形態において、p-アミノベンジル基はp-アミノベンジルオキシカルボニル単位の一部である。一実施の形態では、p-aminobenzyl基は、p-aminobenzylamido単位の一部である。

10

いくつかの実施形態において、リンカーはPAB、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys(Ac)-PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys(Ac)-PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB、またはAla-PABを含む。

いくつかの実施形態において、リンカーは、ペプチド、オリゴ糖化、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 、PAB、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys(Ac)-PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys(Ac)-PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB、又はAla-PABの1つ以上の組合せを含む。

いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(C=O)(CH_2)_n-$ 単位を含み、nは、1~6の整数である。

20

【0189】

ある実施形態では、リンカーは $-(CH_2)_n-$ ユニットを含み、nは2から6の整数である。一つの具体的な実施例において、リンカーは、構造を構成する。

[化61]

波線は細胞毒素と反応性のある部分Z'への付着点を示している。別の具体的な実施の形態では、リンカーは構造を構成する。

[化62]

波線は細胞毒素と反応性のある部分Z'への付着点を示している。このようなPAB-ジペプチド-プロピオニールリンカーは、例えば、特許出願第WO2017/149077に開示されているが、これは、その全体としてここに参考文献に組み込まれている。さらに、WO2017/149077に開示された細胞毒素は、援用として組み込まれている。

30

【0190】

ある態様において、ADCのリンカーは、マレイミドカプロイル-Val-Ala-パラ-アミノベンジル(mc-Val-Ala-PAB)である。

ある態様において、ADCのリンカーは、マレイミドカプロイル-Val-Cit-パラ-アミノベンジル(mc-vc-PAB)である。

いくつかの実施形態において、リンカーは、

[化63]

を構成する。

いくつかの実施形態において、リンカーはMCC (4-[N-maleimidomethyl]シクロヘキサン-1-カルボキシレート)を含む。

40

【0191】

リンカーの上記の端にあるサイトトキシック剤と同価に結合し、リンカーの他端にあるサイトトキシック剤に結合するリンカー、又はその抗原結合フラグメントを含んでいるリンカーには、リンカーに存在する反応性代替物と、その中に存在する反応性代替物との結合反応、又はCD117(GNK+ CD117のような)を結合する抗原結合フラグメントとの間で形成された化学的な混乱を含んでいるリンカーが含まれる。CD117(例えば、GNK+ CD117)に結合する抗体またはその抗原結合フラグメント内に存在し得る反応性置換基としては、限定されるものではないが、セリン、トレオニン、およびチロシン残基のヒドロキシル部分;リジン残基のアミノ部分;アスパラギン酸およびグルタミン酸残基のカルボキ

50

シル部分;ならびにシステイン残基のチオール部分;ならびにプロパルギル、アジド、ハロアリール、ハロヘテロアリール(例えば、フルオロヘテロアリール)、ハロアルキル、および非天然アミノ酸のハロヘテロアルキル部分が挙げられる。

麻薬 抗菌の合成に有用なリンカーの実施例としては、特に、アミンやチオールモイティ-のような抗原結合フラグメントまたは抗原結合内に存在する核基質との反応に適した、マイケルアクセプター(実施例、マレイミデス)、活性化エステル、電子欠乏カルボニール化合物、アルデハイドなどのような、求心剤を含むリンカーが含まれる。例えば、薬物-抗体結合体の合成に適したリンカーとしては、特に限定されるものではないが、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキササン-L-カルボキシレート(SMCC)、Nスクシンイミジルヨードアセテート(SIA)、スルホ-SMCC、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(MBS)、スルホ-MBS、およびスクシンイミジルヨードアセテートが挙げられ、これらの開示は、例えば、Liuら、18:690-697、1979に記載されており、これらの開示は、化学結合のためのリンカーに関連するものとして参照により本明細書に組み込まれる。さらなるリンカーは、非切断性マレイミドカプロイルリンカーを含み、これは、オーリスタチンなどの微小管破壊剤の結合に特に有用であり、Doroninaら、Bioconjugate Chem. 17:14-24、2006により記載されており、その開示は、化学的結合のためのリンカーに関連するように、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0192】

本分野の当業者は、本分野で開示されるどれかの化学グループ、モイティーおよび特徴のいずれかが、本分野で開示されるように、抗毒素および細胞毒素の活用に必要なリンカーを形成するために、複数の方法で結合することができることを認識するであろう。ここに記載された組成物及び方法と関連して有用な更なるリンカーが、例えば、米国特許出願公報第2015/0218220号に記載されており、これは、その全体としてここに参考文献に含まれている。

20

本明細書中に記載される抗体-薬物と組み合わせる有用なリンカーは、以下の表1に示されるようなカップリング反応によって形成される化学的部分を含有するリンカーを含むが、これらに限定されない。曲線は、それぞれ、抗原結合フラグメント、抗原結合分子への付着点を示している。

【0193】

カップリング反応させて、抗菌薬を形成することによって形成される模範的な化学物質モイティズ

30

[表1]

【0194】

当業者の1人は、リンカーに「付着した反応性代替物Z」と、それに付着した反応性代替物または抗原結合フラグメントが、化学水分Zを生成するための同価カップリング反応に従事しており、反応性代替物Zを認識することを認識するであろう。したがって、本明細書に記載の方法と併せて有用な抗体-薬物結合体は、本明細書に記載のリンカーまたは細胞毒素-リンカー結合体と、抗体上の反応性置換基またはその抗原結合フラグメントとの反応に適した反応性置換基Z'を含むリンカーまたは細胞毒素-リンカー結合体、またはその抗原結合フラグメントとの反応によって形成されて、化学部分Zを形成することができる。

40

【0195】

いくつかの実施形態において、Z'は、 $-NR^{13}C(=O)CH=CH_2$ 、 $-N_3$ 、 $-SH$ 、 $-S(=O)_2(CH=CH_2)$ 、 $-(CH_2)_2S(=O)_2(CH=CH_2)$ 、 $-NR^{13}S(=O)_2(CH=CH_2)$ 、 $-NR^{13}C(=O)CH_2R^{14}$ 、 $-NR^{13}C(=O)CH_2Br$ 、 $-NR^{13}C(=O)CH_2I$ 、 $-NHC(=O)CH_2Br$ 、 $-NHC(=O)CH_2I$ 、 $-ONH$ 、 $-C(O)NHNH_2$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C=O)$ 、 $-NC(=S)$ 、

[化64]

(式中、

R¹³は、HおよびC₁-C₆のアルキルからそれぞれ独立に選択される。

50

R¹⁴が-S(CH₂)_nCHR¹⁵NHC(=O)R¹³、

R¹⁵がR¹³または-C(=O)OR¹³、

R¹⁶は、H、C₁-C₆ Alk、F、Cl、および-OH からそれぞれ個別に選択される。

R¹⁷は、H、C₁-C₆ alkyl、F、Cl、-NH₂、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-CN、-NO₂、-OHからそれぞれ独立に選択される。

R¹⁸は、H、-C(=O)OHで置換されたC₁-C₆ Oik、F、ベンジロキシ、-C(=O)OHで置換されたベンジル、-C(=O)OHで置換されたC₁-C₄ アルコキシ基、-C(=O)OHで置換されたC₁-C₄ アルコキシ基から、それぞれ個別に選択される。

表1に示すように、リンカー上の適切に反応性の代替物及びその抗原結合フラグメントの例には、求核/エレクトロフィルペア(例えば、チオール/ハロアルキルペア、アミン/カルボニールペア、またはチオール/、非飽和型カルボニールペア等)、ジエン/ジエノフィルペア(例えば、アザイド/アルキンペア、あるいはジエン/、非飽和型カルボニールペア等)等が含まれる。化学部分Zを形成するための反応性置換基間のカップリング反応としては、チオールアルキル化、ヒドロキシルアルキル化、アミンアルキル化、アミンまたはヒドロキシルアミン縮合、ヒドラジン形成、アミド化、エステル化、ジスルフィド形成、環状付加(例えば、とりわけ、[4+2] Diels-Alder環状付加、[3+2] Huisgen環状付加)、芳香族求核置換、芳香族求電子置換、および本明細書に記載される他の反応様式が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、リンカーは、反応のために、反応のために、核酸官能基を、又はそれらの抗原結合フラグメントを含む電気親水性基を含む。

10

20

【0196】

本明細書に開示されているように、抗原結合フラグメント、すなわち、抗原結合フラグメントに存在しうる反応性代替物には、(i)N-端子アミン基、(ii)側鎖アミン基、例えばリジン、(iii)側鎖チオール基、例えばシステイン、(iv)糖水酸基又はその抗原がグリコシル化されるアミノ基を含むが、これに限定されない。本明細書に開示されるように、抗体またはその抗原結合フラグメント内に存在し得る反応性置換基は、限定されるものではないが、セリン、トレオニン、およびチロシン残基のヒドロキシル部分;リジン残基のアミノ部分;アスパラギン酸およびグルタミン酸残基のカルボキシル部分;ならびにシステイン残基のチオール部分;ならびにプロパルギル、アジド、ハロアリール、ハロヘテロアリール(例えば、フルオロヘテロアリール)、ハロアルキル、および非天然アミノ酸のハロヘテロアルキル部分を含む。いくつかの態様において、抗体内に存在する反応性置換基、または本明細書に開示されるその抗原結合フラグメントは、アミンまたはチオール部分を含む。ある種の抗体は還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステインブリッジ部を有する。抗体は、DTT (ジチオトレイトール)などの還元剤で処理することによって、リンカー試薬との結合のために反応性にされ得る。このように、システインのブリッジ部はそれぞれ、理論的には二つの反応性のあるチオールヌクレオフィルを形成する。さらに、2-イミノチオラン(Trautの試薬)によるリジンの反応を通して、アミンをチオールに変換させることによって、抗物質に加えた核基を導入することができる。反応性チオール基は、1、2、3、4、またはそれ以上のシステイン残留物(例えば、1つ以上の非ネイティブシステインアミノ酸残留物からなる交配抗物質を調製すること)を導入することによって、その(またはそれらの断片)に導入され得る。米国特許No.7,521,541は反応性システインアミノ酸の導入による工学的な抗生物質を教えている。

30

40

【0197】

いくつかの態様において、リンカーに結合した反応性部分Z'は、抗体上に存在する求電子性と反応性である求核基である。抗体上の有用な親電子性基は、限定されるものではないが、アルデヒドおよびケトンカルボニル基を含む。求核基のヘテロ原子は抗体上の求電子性と反応し、抗体と共有結合を形成する。有用な求核基としては、ヒドラジド、オキシム、アミノ、水酸基、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、カルボン酸ヒドラジン、およびアリールヒドラジドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0198】

50

幾つかの実施例において、Zは、アミン及びチオールモイティのような、抗原結合フラグメント、並びに反応性の電好性代替物Z'の中に存在する反応性の核塩基置換体の間の反応の産物である。例えば、Z'はマイケル受け入れ子(例えばマレイミド)、活性化エステル、電子欠乏カルボニール複合体、あるいはアルデハイドなどである。いくつかの実施例では、リンカーLに付着する反応性代替物Z'はマレイミド、アジドまたはアルキンである。マレイミドを含むリンカーの実施例は、非開けられないマレイミドカプロイルベースリンカーであり、これは、アウリスタチンのような微小管破壊剤の活用特に有用である。いくつかの実施例において、反応性代替物Z'は、 $-(C=O)$ 又は $-NH(C=O)-$ であり、このようなことから、リンカーは、それぞれ、アミドまたは尿素不安によって、上記リンカーを、抗原結合フラグメントに結合することができる。これは、それらの $-(C=O)$ 又は $-NH(C=O)$ グループが、それらの抗原結合フラグメントのアミノ基を有する反応の結果である($C=O$)又は $-NH(C=O)$ グループである。

10

【0199】

いくつかの態様において、ADCは、本明細書に開示されるような式III、IIIA、IIIB、またはIIICのいずれかのアマトキシニンに結合した抗CD117抗体を含み、本明細書に開示されるような式I、IA、IB、II、IIIA、またはIIBのいずれかのリンカー-アマトキシニンまたは抗体薬物結合体を、本明細書に開示されるようなリンカーおよび化学部分Zを介して形成する。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヒドラジン、ジスルフィド、チオエーテルまたはジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、Val-AlaおよびVal-Citから選ばれたジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーはパラ・アミノベンジル基(PAB)を含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Cit-Valを含む。幾つかの実施例において、リンカーは、湿気PAB-Ala-Valを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-((C=O)(CH_2)_n-$ 単位を含み、ここでnは、1~6の整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n-$ である。

20

【0200】

いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(CH_2)_n-$ 単位を含む。ここで、nは、2-6からの整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-PAB-Cit-Val-((C=O)(CH_2)_n-$ である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-PAB-Ala-Val-((C=O)(CH_2)_n-$ である。いくつかの実施形態において、リンカーは $-(CH_2)_n-$ である。ある実施形態では、リンカーは $-(CH_2)_n-$ であり、nは6である。いくつかの実施形態において、化学物質Zは表1から選択される。いくつかの実施形態において、化学物質Zは、以下のとおりである。

30

[化65]

ここで、Sは、CD117(例えば、システイン残基の-SHグループからの)を結合する、抗原結合断片、すなわち、抗原結合の中に存在する反応性代替物を表す硫黄原子である。いくつかの実施形態において、L-ZとしてまとめられたリンカーLと化学物質Zは、以下のとおりである。

[化66]

【0201】

当業者の1人は、当該関連代替基の構造を、当該技術の接合または抗原結合フラグメントに先立って認識し、グループZ'としてマレイミドを含む。いくつかの実施例では、リンカー反応性代替体群構造L-Z'は、それが、抗原結合フラグメントと接合する前に、以下のとおりである。

40

[化67]

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるようなアマトキシニンは、以下の式を有するリンカー反応性部分-L-Z'にコンジュゲートされる。

[化68]

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるようなアマトキシニンは、以下の式を有するリンカー反応性部分-L-Z'にコンジュゲートされる。

50

[化69]

上述のリンカモイティ及びアマトキシリンク剤は、特にここに記載された組成物及び方法と関連して有用であるが、例えば、米国特許出願公報第2015/0218220号及び特許出願第WO2017/149077号に記載されている。これらは、ここにその全体として参考文献に含まれている。

【0202】

抗体-薬物結合体の調製

ここに開示された公式IのADCにおいて、リンカーL及び本明細書で開示されている化学物質Zを通して、1つ以上のサイトトキシック・ドラッグ・モイティ(D)、例えば、1個から約20個のドラッグ・モイティ(D)に、抗CD117抗原結合断片又はその抗原結合断片が接合される。本開示のADCは、当業者に知られた有機化学反応、条件、及び試薬を用いて、幾つかの経路によって作成され得る。例えば、(1)本項に記載されているように、Ab-Z-Lを形成するための二価リンカー試薬との反応性代替物又はその抗原結合フラグメントの反応、続いて、(2)D-L-Zを形成するための二価リンカー試薬との反応性代替物の反応、続いて、本項に記載されているように、Am-Z-L-Abのような公式D-L-Z-AbのADCを形成するための反応性代替物又は抗原結合フラグメントとの反応である。ADCを準備するための追加の方法をここに述べる。

10

【0203】

もう1つの側面において、当該抗CD117抗原結合断片は、1つ以上のスルフヒドリル基を導入するために化学的に改変することができる1つ以上のリジン残渣を有する。次いで、ADCは、本明細書中上記のように、スルフヒドリル基の硫黄原子を通る共役によって形成される。リジンを修飾するために使用できる試薬には、N-スクシンイミジルS-アセチルチオアセテート(SATA)および2-イミノチオラン塩酸塩(Traut試薬)が含まれるが、これらに限定されない。

20

別の側面では、抗CD117の、又はその抗原結合断片は、1以上のスルフヒドリル基を有するように化学的に改変することができる1つ以上の炭水化物グループを有することができる。次いで、ADCは、本明細書中上記のように、スルフヒドリル基の硫黄原子を通る共役によって形成される。

更に別の側面では、抗CD117検出法は、アルデハイド(-CHO)グループを提供するために酸化することができる1つ以上の炭水化物グループを有することができる(例えば、Laguzza, et al., J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55を参照)。次いで、ADCは、本明細書中上記のように、対応するアルデヒドを通る共役によって形成される。細胞毒素の付着または結合のためのタンパク質の改変のための他のプロトコールはColiganら、現在のタンパク質サイエンスのプロトコール、vol2, John Wiley & Sons (2002)に記載され、ここに参考文献として含んでいる。

30

例えば、米国特許No.5,208,020;米国特許.No.6,441,163;WO2005037992;WO2005081711;およびWO2006/034488には、細胞をターゲットとしたタンパク質(例えば、抗物質、イムグロブリン、又はそのフラグメント)へのリンカードラッグ・モイティの活用法が発見されているが、これらすべてを引用文献全体に明示的に組み入れたものである。

40

別の方法として、例えば組換え技術またはペプチド合成によって、抗CD117-cytotoxic agentを含む融合タンパク質が作られることができる。DNAの長さは、結合体の2つの部分をコードするそれぞれの領域を、互いに隣接するか、または結合体の所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって分離されてもよい。

【0204】

処遇方法

本稿に述べるように、血液細胞移植治療は、治療を必要とする被検者に1種類以上の血球を移入または再定着させるために実施することができる。造血幹細胞は一般的に多分化能を示し、したがって、顆粒球(例えば、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球)、赤血球(例えば、網状赤血球、赤血球)、血小板(例えば、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板)

50

、単球(例えば、単球、マクロファージ)、樹状細胞、ミクログリア、破骨細胞、およびリンパ球(例えば、NK細胞、B細胞およびT細胞)を含むが、これらに限定されない複数の異なる血液系統に分化することができる。さらに、造血幹細胞は、自己複製能力を有し、したがって、母細胞と同等の能力を有する娘細胞を生じさせることができ、また、移植レシピエントに再導入される能力を特徴とし、その際、それらが造血幹細胞ニッチに帰着し、再増殖的かつ持続的な造血を確立することができる。

したがって、造血幹細胞は、インビボで細胞の欠損または欠損集団を再構成するために、造血系列の1つ以上の細胞型が欠損または欠損している患者に投与することができ、それにより、内因性血球集団における欠損または欠損に関連する病理を治療する。したがって、本明細書に記載の組成物および方法は、非悪性異常ヘモグロビン症(例えば、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ファンコニ貧血、再生不良性貧血、およびウイスコットアルドリッチ症候群からなる群から選択される異常ヘモグロビン症)を治療するために使用することができる。加えて、または、代替的に、ここに記載される組成物及び方法は、例えば先天性のウイルスのような、ウイルスを治療するために使用することができる。加えて、または、代替的に、ここに記載される組成物及び方法は、後天的なウイルス(例えば、HIV及び助剤から成るグループから選択された後天的なウイルス)を治療するために使用することができる。本明細書に記載の組成物および方法は、代謝障害(例えば、グリコーゲン蓄積症、ムコ多糖症、ゴーシェ病、ハーラーズ病、スフィンゴ脂質症、および異染性白質ジストロフィーからなる群から選択される代謝障害)を治療するために使用することができる。

加えて、または、代替的に、ここに記載される組成物及び方法は、悪性または拡散性障害、例えば、数学的ガン、ミロコロリフェラティブ病を治療するために使用することができる。癌治療の場合には、移植細胞が内生細胞枯渇工程によって作られたニッチに帰着し、生産的な血液細胞を確立することができる、血液細胞移植治療の前に内生血液細胞の集団を減少させるために、ここに記載された組成及び方法を患者に施すことができる。これは、次に、全身化学療法の間のような、癌細胞根絶の間に枯渇した細胞の集団を再構成することができる。本明細書に記載される組成物および方法を用いて治療することができる例示的な血液がんには、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、および非ホジキンリンパ腫、ならびに神経芽細胞腫を含む他の癌性状態が含まれるが、これらに限定されるものではない。

本明細書に記載される組成物および方法で治療することができるさらなる疾患は、限定されるものではないが、アデノシンデアミナーゼ欠損症および重度複合免疫不全症、高免疫グロブリンM症候群、チェディアック-東病、遺伝性リンパ組織球症、大理石骨病、骨形成不全症、蓄積症、主要サラセミア、全身性硬化症、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、および若年性関節リウマチを含む。

【0205】

本書に記載されている抗CD117抗生物質、抗原結合フラグメント、および共役(すなわち、ADC)は、固形臓器移植寛容を誘発するために使用されることができる。例えば、ここに記載された組成物及び方法は、標的組織からの細胞の集団を枯渇させるか、または消耗させるために使用され得る(例えば、骨髄細胞ニッチからの赤血球細胞を枯渇させるため)。標的組織からの細胞がこのように枯渇した後、臓器供与者(例えば、臓器供与者からの造血幹細胞)の集団を移植受取人に施すことができ、また、そのような茎または前駆細胞の接ぎ木後、一時的または安定した混合キメリズムが達成され、それによって、さらなる予防剤の必要なしに長期的な移植臓器耐性を可能にする。例えば、ここに記載された組成物及び方法は、固形臓器移植の受取人(例えば、移植、肺移植、肝臓移植、心臓移植など)に移植耐性を誘発するために用いられることができる。本書に記載されている組成物及び方法は、固形臓器移植耐性の誘導に接続して使用するのに適している。例えば、一時的又は安定した供与者の接ぎ木の割合が低く、移植臓器の長期耐性を誘発するのに適しているからである。

10

20

30

40

50

【0206】

加えて、ここに記載された組成物及び方法は、CD117+の細胞によって特徴づけられるガンのような、がんを直接治療するために使用することができる。例えば、本書に記載された組成物及び方法は、特にCD117+白血球細胞を示す患者において、白血球を治療するために使用することができる。白血球のようなCD117+のガン細胞を枯渇させることによって、本書に記載される組成物及び方法は、様々なガンを直接治療するために使用することができる。このようにして治療され得る例示的な癌は、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、および非ホジキンリンパ腫などの血液がんを含む。

【0207】

急性骨髄性白血病(AML)は血球の骨髄系のがんで、異常な白色血球が急速に成長して骨髄中に蓄積し、正常な血球の産生を妨げることを特徴とする。AMLは大人が罹患する最も一般的な急性白血病であり、その発生率は年齢とともに増加する。急性骨髄性白血球の症状は、正常な骨髄が白血球細胞に置換されることによって引き起こされ、その結果、赤血球、血小板、正常な白血球の血球が低下する。急性白血病として、AMLは急速に進行し、放置すると数週間またはヶ月以内に致死的となることがある。一実施の形態において、ここに記載される反CD117ADCは、それを必要としている人間の患者のAMLを治療するために使用される。特定の実施形態において、反CD117 ADC処理は、処理された被検者のAML細胞を枯渇させる。ある実施例では、AML細胞の約50%以上が枯渇する。他の実施形態では、AML細胞の約60%以上が枯渇し、AML細胞の約70%以上が枯渇し、又は約80%以上、又は約9割以上が枯渇し、又は約95%以上が枯渇している。特定の実施形態においては、CD117 ADC対策は1回の治療である。特定の実施形態において、シングルドレッジ・防CD117 ADC処理は、AML細胞の約60%、約70%、約80%、約90%、約95%以上を減少させる。

【0208】

加えて、本書に記載された組成物及び方法は、自治体障害を治療するために使用することができる。たとえば、CD117+の細胞を殺すために、自己感染症に苦しむ人間のような被検者に、抗CD117の、またはその抗原結合断片を与えることができる。CD117+免疫細胞は、T細胞レセプターを発現し、自己抗原に対する免疫応答を実行するT細胞のような自己反応性リンパ球であってもよい。自己反応性のCD117+細胞を枯渇させることによって、本書に記載されている組成物及び方法は、以下に述べるような自己反応性病理を治療するために使用することができる。さらに、または、代替的に、ここに記載される組成物と方法は、移植細胞が内生細胞枯渇工程によって作られたニッチに帰着し、生産的な血液貯留を確立することができる、血液細胞移植治療の前に内生の血液細胞の集団を減少させることによって、自己感染病を治療するために使用することができる。これは、次に、自己免疫細胞根絶の間に枯渇した細胞の集団を再構成することができる。

【0209】

本明細書に記載される組成物および方法を用いて治療することができる自己免疫疾患には、限定されるものではないが、乾癬、1型糖尿病(RA)、関節リウマチ(SLE)、ヒト全身性ループス(MS)、炎症性腸疾患(IBD)、リンパ球性大腸炎、急性散在性脳脊髄炎(ADEM)、アジソン病、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群(APS)、再生不良性貧血、自己免疫性内耳疾患(AIED)、自己免疫性リンパ増殖性症候群(ALPS)、自己免疫性卵巣炎、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、慢性疲労性免疫不全症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーが含まれるクローン病、癩痕性類天疱瘡、コエリアックスブルー皮膚炎、寒冷凝集素症、デゴス病、円板状エリテマトーデス、自律神経異常症、本態性混合クリオグロブリン血症、線維筋痛症-線維筋炎、グッドパスチャー症候群、Guillain-Barre症候群(GBS)、橋本甲状腺炎、化膿性汗腺炎、特発性及び/又は急性血小板減少性紫斑病、IgAニューロパチー、若年性関節炎、川崎病、ライム病、メニエール病、混合性結合組織病(MCTD)、重症筋無力症、神経筋強直症、視神経炎、尋常性天疱瘡、悪性貧血、多発性軟骨炎及び皮膚筋炎、原発性胆汁性肝硬変、結節性多発動脈炎、リウマチ

10

20

30

40

50

性多発筋痛症、原発性無ガンマグロブリン血症、レイター症候群、リウマチ熱、強皮症、シェーグレン症候群、こわばり人症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎(「巨細胞性動脈炎」としても知られる)、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、血管炎、白斑、外陰部痛(「外陰前庭炎」)、ヴェーゲナー肉芽腫症が含まれる。

【0210】

投与経路および投与方法

ADC、抗毒物又はその抗原結合フラグメントは、本書に記載されている(例えば、ガンに苦しむ人、自己感染症に苦しむ人、又は血液細胞移植治療を必要とする人)に様々な量の形態で施術することができる。例えば、ここに記載されている抗毒物又は抗原結合フラグメントは、ガンに苦しむ患者、自治病に苦しむ患者、又は血液細胞移植治療を必要とする患者に、1種以上の薬事的に許容可能な補助剤を含む水性液体のような水性液体の形成で施すことができる。本明細書中に記載される組成物および方法と共に使用するための薬学的に許容される賦形剤は、粘度-変性剤を含む。水溶液は、既知の技術を用いて殺菌することができる。

ここに記載されているような抗CD117ADCまたは抗物質からなる製剤は、上記ADCまたは抗CD117の抗CDを、1つ以上の任意の薬事的に薬学的に許容可能な担体(レミントンの薬事科学第16版、Osol, A. Ed. (1980))と、凍結剤または水性ソリューションの形で混合して調製する。薬学的に許容される担体は、一般に、使用される用量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝液;酸化防止(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライドなど;塩化ベンザルコニウム;フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール;メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン;カテコール;レゾルシノール;3-ペンタノール;およびm-クレゾール);低分子量(約10残基未満)ポリペプチド;タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン);親水性ポリマー(例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、またはリジン);単糖、二糖類を含むが、これらに限定されないおよびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物;EDTAのようなキレート剤;スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールのような糖;ナトリウムのような塩を形成する対イオン;金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体);および/または非イオン性界面活性剤 ポリエチレングリコール(PEG)などが含まれる。

【0211】

本書に記載されている、抗CD117ADC、抗毒剤または抗原結合フラグメントは、口頭、経皮下、皮下、内鼻、静脈、筋肉中、眼内、または両親を含む様々な経路によって管理され得る。任意の所与の場合における投与のための最も適切な経路は、投与される特定の抗体、または抗原結合フラグメント、患者、医薬製剤方法、投与方法(例えば、投与時間および投与経路)、患者の年齢、体重、性別、治療される疾患の重症度、患者の食事、および患者の排泄速度に依存する。

ここに記載されている抗CD117 ADC、すなわち、抗原結合断片の有効量は、例えば、約0.001~約100kg/kg/1枚の体重(例えば、ボラス)、複数の投与、又は継続的な投与、又は、最適な血清濃度(例えば、0.0001~5000mm/mlの血清濃度)、すなわち、抗原結合断片を達成することができる。抗CD117 ADCの投与量は、がん、自己免疫疾患に罹患している、または造血幹細胞移植の受領に備えて前処置療法を受けている被検者(例えば、ヒト)に、1日当たり1回以上(例えば、2~10回)、1週間または1ヶ月間投与してもよい。造血幹細胞移植前のコンディショニング手順の場合、抗CD117 ADC、抗体またはその抗原結合フラグメントは、外因性造血幹細胞の生着を最適に促進する時間、例えば、外因性造血幹細胞移植の投与前の約1時間~約1週間(例えば、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、または約7日)以上、患者に投与することができる。

【0212】

10

20

30

40

50

ここに開示される方法を用いれば、当業者は、血液細胞移植治療を必要とする人の患者に、CD117(例えば、GNK+CD117を結合する抗原結合フラグメント)を結合するような、血液細胞によって表現される抗原を結合することができるADC、抗CD117または抗原結合フラグメント(例えば、GNK+CD117を結合する抗原結合フラグメント)を管理することができる。このようにして、内因性造血幹細胞の集団を、外因性造血幹細胞移植片の投与前に枯渇させて、造血幹細胞移植片の生着を促進することができる。

上記のように、抗体は、本明細書に記載されるか、または当技術分野で公知の細胞傷害性分子などの毒素に共有結合的に結合され得る。例えば、抗CD117抗体またはその抗原結合フラグメント(抗GNK+CD117抗体またはその抗原結合フラグメントなど)は、細胞毒素、例えばシュードモナス外毒素A、デボウガニン、ジフテリア毒素、アマトキシ、
 10 例例えばガンマ-アマニチン、 β -アマニチン、サポリン、メイタンシン、メイタンシノイド、アウリスタチン、アントラサイクリン、カリケアマイシン、イリノテカン、SN-38、デュオカルマイシン、志賀毒素、ピロロベンゾジアゼピン、ピロロベンゾジアゼピン二量体、インドリノベンゾジアゼピン、インドリノベンゾジアゼピン二量体、またはそれらの変形例に共有結合的に結合させることができる。この共役は、本明細書に記載されるか、または当技術分野で公知の共有結合形成技術を使用して行うことができる。その後、患者に外生の造血幹細胞(例えば、自生細胞、シナジェニック細胞、あるいは異種の造血幹細胞)を移植する前に、例えば静脈内注射によって、抗原結合フラグメント体、又は薬物-共役を使用することができる。

【0213】

抗CD117(例えば、抗GNK+CD117)抗体、その抗原結合フラグメント、または薬物-抗体結合体は、造血幹細胞移植治療の前に、例えば、内因性造血幹細胞の量を約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、またはそれ以上減少させるのに十分な量で投与することができる。血液細胞数の低下は、例えば、コンディショニング・セラピーの間、様々な間隔で患者から引き出された血液試料中に特徴的な血液細胞表面抗原を表現する細胞のFACS分析によって、この技術に知られている通常の技法を用いてモニターすることができる。例えば、当業者は、コンディショニング・療法の間、様々な時点で患者から血液試料を引き出すことができ、また、FACS分析を実施することにより、血液細胞マーカー抗原に結合する抗薬を用いて、試料中の血液幹細胞の相対濃度を解明することにより、内生の血液細胞減少の程度を決定することができる。幾つかの実施例によれば、抗CD117(例:Anti-GNK+CD117)を用いたコンディショニングセラピー、その抗原結合フラグメント、又は薬物-Adg-Binding preparing Traperyに対応して、血液細胞細胞の濃度が最低値に達したとき、医師はコンディショニングセラピーを結論付け、患者の血液細胞移植セラピーの準備を開始することができる。
 20

【0214】

抗CD117(例:抗GNK+CD117)の抗原結合フラグメント、又はドラッグ・コンジュゲートは、粘度改良剤のような1つ以上の薬事的に受け入れられる補助剤を含む水性液中で、患者に施術することができる。水溶液は、本技術に記載された、又は本技術に知られている技術を用いて殺菌することができる。患者に血液細胞接種を施術する前に、例えば0.0
 40 01ag/kgから100mm/kgまでの量で、抗原結合フラグメント、又は薬物-抗原共役を患者に施術することができる。抗体、その抗原結合フラグメント、または薬物-抗体結合体は、外因性造血幹細胞の生着を最適に促進する時間、例えば、外因性造血幹細胞移植の投与前に、約1時間~約1週間(例えば、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、または約7日)以上、患者に投与することができる。

【0215】

前処置療法の終了後、患者は、その後、前処置療法を実施した同じ医師または別の医師が
 50

らのような、外因性造血幹細胞の注入(例えば、静脈内注入)を受けることができる。医師は、例えば、 1×10^3 から 1×10^9 の造血幹細胞/kgまでの量で、自生、シナジェニック、あるいは異系の造血幹細胞の注入を行うことができる。医師は、例えば、患者から血液サンプルを採取し、移植の投与後に造血幹細胞または造血系列の細胞(巨核球、血小板、血小板、赤血球、マスト細胞、骨髓芽球、好塩基球、好中球、好酸球、ミクログリア、顆粒球、単球、破骨細胞、抗原提示細胞、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、Tリンパ球、およびBリンパ球など)の濃度の増加を測定することによって、造血幹細胞移植の生着を監視することができる。この分析は、例えば、造血幹細胞移植療法(例えば、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、約8週間、約9週間、約10週間、約11週間、約12週間、約13週間、約14週間、約15週間、約16週間、約17週間、約18週間、約19週間、約20週間、約21週間、約22週間、約23週間、約24週間、またはそれ以上。造血幹細胞または造血系統の細胞の濃度が、移植療法前の対応する細胞型の濃度と比較して、移植療法後に増加した(例えば、約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約200%、約500%、またはそれ以上)という発見は、抗CD117(例えば、抗GNK+CD117)抗体、その抗原結合フラグメント、または薬物-抗体結合体での処置が、移植された造血幹細胞移植片の移植を首尾よく促進したという1つの指標を提供する。

10

20

【実施例】

【0216】

以下の実施例は、ここに記載された組成物及び方法がどのように使用され、作られ、評価され、本開示の純粋に模範的なものであることを意図し、発明者が発明とみなす範囲を限定することを意図したものではないことを、当業者に提供するために、提示されている。

【0217】

(実施例1)

抗CD117抗体85(Ab85)の識別

30

抗CD117 bid 85(すなわちAb85)の同定は、PCT/US2018/057180に記載されているヒトCK6 abid(すなわちAb1)の派生物に基づいて作成された(これは、その完全性においてここに含まれる)。Antibody 85は、以下に述べるアミノ酸配列からなる当業者に知られているCD117を介在する活性化を阻止するためのAb85の能力を分析することによって決定される、敵対的な抗争である。簡単に言うと、CD117、SCF1のリガンドに依存した細胞(一次CD34+細胞またはMo7e細胞)はCD117結合抗剤の存在下でインキュベートされ、CD117とSCF1の間の相互作用を遮断する能力を評価することができ、それによって細胞拡散の測定可能な減少につながる。あるいは、CD117およびSCF1結合事象の対立を測定するために、簡単な結合実験を行うことができる。

40

【0218】

アンチボディHC-85/LC-85 (Ab 85)

Ab85の重鎖可変領域(VH)アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2として提供される。以下に下線を付したAb85のVH CDRアミノ酸配列は、NYWIG (VH CDR1;配列番号3); IINPRDSDTRYRPSFQG (VH CDR2;配列番号4);およびHGRGYEGYEGAFDI (VH CDR3;配列番号5)である。

Ab85 VHの配列

GSCKKKKKEQKKEVSKGEVSKGEVSQEVGGEVSKEVVGEVWGLEGIDSINPRDPRDVS
AYSTAYQSSWSSLKASDYCARGYEGEFGGTVSS (SEQ ID NO: 2)

Ab85の軽鎖可変領域(VL)アミノ酸配列は、SEQ ID No.6として提供される。以下に下線を引いたAb85のVL CDRアミノ酸配列は以下のとおりである: RSSQGIRSDLG (VL

50

CDR1; SEQ ID NO: 7); DASNLET (VL CDR2; SEQ ID NO: 8); QANGFPLT (VL CDR3; SEQ ID NO: 9)。

Ab85 VL配列

QMTQDISSQDIRSQGSDQGS GDSRSQYGQGSPLS QYRSQWPKAPGPKAPLLFSTQ
PEDFATYQCANGFPLTFGTGKVEIK (SEQ ID NO: 6)

Ab85とAb1の重鎖可変領域と軽鎖可変領域のアミノ酸配列とCDRの比較を図1Aと1Bに示した。

【0219】

(実施例2)

Ab85のエピトープ分析

化学架橋実験

クロスリンク実験は、高質量MALDI質量分析による非同価相互作用の直接分析を可能にする。非同価相互作用を含むタンパク質試料と特別に開発されたクロスリンク混合物(Bich, C et al. Anal. Chem., 2010, 82 (1), pp 172-179)を混ぜることで、高感度の非同価錯体を特定の検出することができる。生成された同価結合は、相互に作用する種がサンプルの準備過程とMALDIイオン化を生き残ることを可能にする。特別な高質量検出システムは、高質量範囲の相互作用を特徴づけることができる。

【0220】

Ab85の試料を2.7mg/mLの濃度になるように蒸留水中で希釈し、次いで、希釈したAb85の1 μ Lを、アセトニトリル/水(1:1, v/v)、TFA (0.1% (K200 MALDI Kit))中の再結晶シナピン酸マトリックス(10mg/mL)からなるマトリックス1 μ Lと混合した。この混合物は、CovalXのK200 MALDI MS分析キットを用いてクロスリンクするために提出された。タンパク質溶液にK200安定剤試薬(2mm/ml)1mmを混ぜ、室温でインキュベートした。インキュベーション時間(180分)の後、試料をMALDI分析のために準備した。試料は室温での結晶化直後にHigh-Mass MALDI MSで分析した。

MALDI ToF MS分析は、標準窒素レーザーとのCovalXのHM4相互作用モジュールを用いて行われ、異なる質量に焦点を当てて0~1500kDaの範囲で行われた。

【0221】

ペプチド質量指紋実験

CD117の特徴を明らかにするために、CD117のサンプルを、LTQ Orbitrap質量分析計(Thermo Scientific)を用いたnLC Ultimate 3000 RSLCシステムを用いて、nLC LTQ Orbitrap MS/MS分析に続いて、トリプシン、キモトリプシン、Asp N、エラスターゼおよびサーマル分解を行った。

室温180分のインキュベーション時間の前に、CD117(6.8mm)の10 μ LをDSS d0/d12(2mm/ml;DMF)の1 μ Lと混ぜた。インキュベーション後、室温での1時間のインキュベーション時間の前に、アンモニウムピカーボネート(20mM最終濃度)の1mLを加えて反応を停止した。その後、H₂O 8M尿素懸濁(10mm)の前にスピードバックを用いて乾燥させた。混ぜた後、DTT (500mM)1mmを加えた。その後、37°Cで1時間インキュベートした。インキュベーション後、暗い室内の室温で1時間のインキュベーション時間の前にヨードアセタミド(1M)1mmを加えた。インキュベーション後、100 μ Lのタンパク質分解緩衝液を添加した。トリプシンバッファーには50mM Ambic pH 8.5%、アセトニトリプシン5%が含まれ、キモトリプシンバッファーにはトリス HCL100mM, CaCl₂ 10mM pH 7.8が含まれ、ASP-NバッファーにはPhosphatase バッファー50MM pH 7.8が含まれ、エラスターゼバッファーにはトリス HCL 50mM pH 8.0が含まれ、サーモリシンバッファーにはトリス HCL 50mM, CaCl₂ 0.5mM pH 9.0が含まれている。

【0222】

トリプシン・プロテオリシス:減少/アルキルドCD117の100ミュールに、1/100比のトリプシン(Roche Diagnostic)の1ミュールを混ぜた。タンパク質分解物を37°Cで一晩インキュベートした。

10

20

30

40

50

キモトリブシン分解:減少/アルキルドCD117の100ミュールに、1/200比のキモトリブシン(Roche Diagnostic)の0.5ミュールを混ぜた。タンパク質分解物を25°Cで一晩インキュベートした。

ASP Nプロテオリシス:減少/アルキルドCD117の100ミュールにASP N(ロシュ社診断)の0.5ミュールを1/200比と混ぜた。タンパク質分解物を37°Cで一晩インキュベートした。

Elastase Proteolysis:減少した/アルキル化CD117の100マイクロルに、エラストラーゼ(Roche Diagnostic)の1マイクロルと比率1/100を混ぜた。タンパク質分解物を37°Cで一晩インキュベートした。

【0223】

サーモリシン蛋白質分解:100µlの還元/アルキル化CD117を2µlのサーモリシン(ロシュ社診断用)と1/50の比率で混合した。タンパク質分解物を70°Cで一晩インキュベートした。

消化後、ギンギク1%の最終的な液体を加えた。プロテリゼーションの後、プロテリゼーションによって生成されたペプチド液10mmをナノ液体クロマトグラフィーシステム(Ultimate 3000-RSLC)に積載した。Xquest version 2.0とStavrox 3.6.ソフトウェアを用いて、相互に関連したペプチドを分析した。LTQ Orbitrap質量分析計(Thermo Scientific)に沿ったnLC Ultimate 3000 RSLCシステムを用いたnLC LTQ Orbitrap MS/MS分析を行った。

【0224】

結果

High-Mass MALDI質量分析および化学的断面リンキングを用いて、Ab85抗原の非同価集合体または抗原CD117の多量体を検出しなかった。化学的断面リンク、高質量MALDI質量分析およびnLC オービトラップ質量分析を用いて、CD117とAb85の間の分子インターフェイスを決定した。この分析に基づき、相互作用にはCD117上の以下のアミノ酸が含まれる: T67、K69、T71、S81、Y83およびT114、T119、K129(図2)。

【0225】

アミノ酸性発明の概要

[表2]

【0226】

その他の実施形態

本明細書で言及されている全ての出版物、特許、特許出願は、各独立出版物又は特許出願が、引用により具体的かつ個別に組み込まれることを指摘されたかのように、ここに同程度の引用文献として組み込まれている。

本開示は、その特定の実施形態に関連して発明されてきたが、それはさらなる修正が可能であり、本出願は、本開示の原則に従い、また、本開示に関する既知の又は慣習的な実施からの逸脱を含む、本開示のあらゆるバリエーション、使用、又は、本開示の適応をカバーすることを意図していると理解される。本開示は、先にここに記載された本来の特徴に関連しており、上記、本請求の範囲に従うであろう本技術における本開示からの逸脱を含む。

他の実施形態は、請求項の範囲内である。

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/29648

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 9-11, 14-15
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

20

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/29648

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
IPC - A61K 39/395; C07K 14/435, 16/28 (2020.01)	
CPC - A61K 39/395; C07K 14/435, 14/71, 16/28, 16/2803	
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) See Search History document	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X ----- A	US 2012/0288506 A1 (AMATULLI et al.) 15 November 2012; paragraphs [0007], [0009], [0020], [0026]
A	US 8,552,157 B2 (AMATULLI et al.) 08 October 2013; column 5, lines 40-41
A	US 2016/0264647 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al.) 15 September 2016; paragraph [0015]
	Relevant to claim No. 1-7, 12-13, 16-22 8/1-7 8/1-7 8/1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.	
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"D" document cited by the applicant in the international application</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>	
Date of the actual completion of the international search 12 August 2020 (12.08.2020)	Date of mailing of the international search report 26 AUG 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/00

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

D

C 0 7 K 16/30 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

C 0 7 K 16/30

Z N A

,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,D
 K,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),O
 A(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,B
 B,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,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,
 RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 3 サマービル スプリングフィールド ストリート
 4 6 アpartment 1

(72)発明者 アンソニー ボイタノ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 6 8 ニュートン イブリン ロード 2 7

(72)発明者 マイケル クック

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 0 ボストン パーキンズ ドライブ 2 4 1 ビー 2 0 1

(72)発明者 ブラッドリー アール ピアース

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 2 ウォータータウン プリースト ロード 1 8

F ターム (参考) 4C085 AA13 AA14 BB31 CC22 CC23 EE01 GG02 GG03 GG04 GG08

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74