

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-503657
(P2024-503657A)

(43)公表日 令和6年1月26日(2024.1.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	4 B 0 6 4	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	4 C 0 7 6	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	4 C 0 8 6	
A 6 1 K	31/5517(2006.01)	A 6 1 K	31/5517	4 H 0 4 5	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全193頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-541923(P2023-541923)			(71)出願人	500213834
(86)(22)出願日	令和4年1月13日(2022.1.13)				メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター
(85)翻訳文提出日	令和5年9月7日(2023.9.7)				アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6
(86)国際出願番号	PCT/IB2022/050219				5 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1
(87)国際公開番号	WO2022/153194				2 7 5 オフィス オブ ジェネラル カウンセル ボックス 2 0 8
(87)国際公開日	令和4年7月21日(2022.7.21)			(71)出願人	522009950
(31)優先権主張番号	63/136,928				ティーアールアイ-インスティテュショナル セラピューティクス ディスカバリー インスティテュート
(32)優先日	令和3年1月13日(2021.1.13)				アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				2 1 ニューヨーク イースト シックス
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く				ティーナインス ストリート 4 1 3 ボックス 3 0 0 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体ーピロロベンゾジアゼピン誘導体コンジュゲート

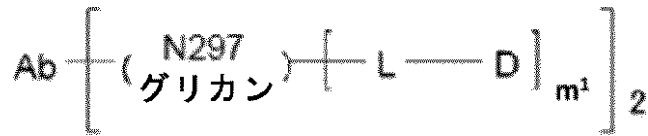
(57)【要約】
本発明は、新規の抗D L L 3抗体ーピロロジアゼピン誘導体及びそれを使用した新規の抗D L L 3抗体ーピロロジアゼピン誘導体コンジュゲートを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の式：

【化 1】



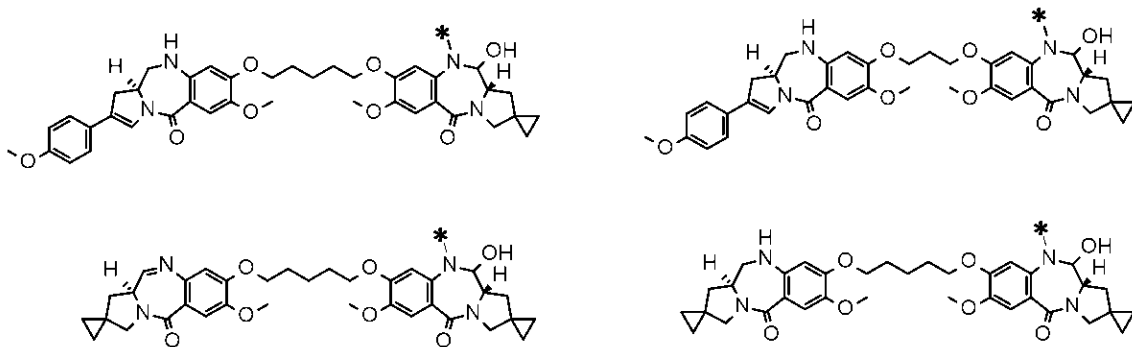
10

によって表される抗体－薬物コンジュゲートであって、
式中、

m^1 は、1～2の整数を表し；

D は、以下の式：

【化 2】



20

のうちの1つによって表される薬物を表し、式中、アスタリスクは、Lへの結合を表し；
Lは、AbのN297グリカンとDとを連結するリンカーであり；
N297グリカンは、任意選択でリモデリングされてもよく；
Abは、DLL-3に特異的に結合する抗DLL3抗体又は当該抗体の機能的な断片を表す、抗体－薬物コンジュゲート。

30

【請求項 2】

抗DLL3抗体が、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_H ）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_L ）を含み、

(a) V_H は、

(i) それぞれ、配列番号3、配列番号4、及び配列番号5；

(ii) それぞれ、配列番号13、配列番号14、及び配列番号15；

(iii) それぞれ、配列番号23、配列番号24、及び配列番号25；並びに

(iv) それぞれ、配列番号33、配列番号34、及び配列番号35

からなる群から選択される V_H -CDR1配列、 V_H -CDR2配列、及び V_H -CDR3配列を含み；及び／又は

40

(b) V_L は、

(i) それぞれ、配列番号8、配列番号9、及び配列番号10；

(ii) それぞれ、配列番号18、配列番号19、及び配列番号20；

(iii) それぞれ、配列番号28、配列番号29、及び配列番号30；並びに

(iv) それぞれ、配列番号38、配列番号39、及び配列番号40

からなる群から選択される V_L -CDR1配列、 V_L -CDR2配列、及び V_L -CDR3配列を含む、請求項1に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 3】

抗DLL3抗体が、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_H ）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_L ）を含み、

50

(a) V_H -CDR1配列、 V_H -CDR2配列、及び V_H -CDR3配列を含む V_H 及び(b) V_L -CDR1配列、 V_L -CDR2配列、及び V_L -CDR3配列を含む V_L の組合せは、

(i) それぞれ、(a) 配列番号3、配列番号4、及び配列番号5並びに(b) 配列番号8、配列番号9、及び配列番号10；

(ii) それぞれ、(a) 配列番号13、配列番号14、及び配列番号15並びに(b) 配列番号18、配列番号19、及び配列番号20；

(iii) それぞれ、(a) 配列番号23、配列番号24、及び配列番号25並びに(b) 配列番号28、配列番号29、及び配列番号30；並びに

(iv) それぞれ、(a) 配列番号33、配列番号34、及び配列番号35並びに(b) 配列番号38、配列番号39、及び配列番号40

からなる群から選択される、請求項1又は2に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項4】

抗DLL3抗体が、以下の特徴：

(a) 配列番号7、17、27、又は37のいずれか1つに存在する軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一な軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列；及び／又は

(b) 配列番号2、12、22、又は32のいずれか1つに存在する重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一な重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列
のうちの1つ又は複数を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項5】

抗DLL3抗体が、以下の特徴：

(a) 配列番号17、27又は37のいずれか1つに存在する軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一な軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列；及び

(b) 配列番号12、22又は32のいずれか1つに存在する重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一な重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列
のうちの1つ又は複数を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項6】

抗DLL3抗体が、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン(V_H)及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン(V_L)を含み、(a) V_H は、配列番号2、配列番号12、配列番号22、及び配列番号32からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；及び／又は(b) V_L は、配列番号7、配列番号17、配列番号27、及び配列番号37からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項7】

抗DLL3抗体が、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン(V_H)及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン(V_L)を含み、(a) V_H は、配列番号12、配列番号22又は配列番号32から選択されるアミノ酸配列を含み、(b) V_L は、配列番号17、配列番号27又は配列番号37から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項8】

V_H アミノ酸配列及び V_L アミノ酸配列が、それぞれ配列番号2及び配列番号7(7-I1-B)；それぞれ配列番号12及び配列番号17(2-C8-A)；それぞれ配列番号22及び配列番号27(10-O18-A)；並びにそれぞれ配列番号32及び配列番

10

20

30

40

50

号 3 7 (6 - G 2 3 - F) からなる群から選択される、請求項 6 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 9】

抗 D L L 3 抗体が細胞表面（例えば、腫瘍細胞表面）上で発現される D L L 3 ポリペプチドに結合すると、細胞内内化を受ける、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 10】

抗 D L L 3 が、I g G 1 又はそのバリエーション、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g M、I g D、及び I g E からなる群から選択されるアイソタイプの F c ドメインを含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

10

【請求項 11】

抗 D L L 3 が、配列番号 4 2、5 7 又は 5 8 の重鎖定常領域を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 12】

抗 D L L 3 抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体又は二重特異性抗体である、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 13】

抗体が、

(a) 配列番号 5 9 ～ 6 1 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

20

(b) 配列番号 6 3 ～ 6 5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖；又は

(c) 配列番号 6 7 ～ 6 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 7 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 14】

抗体が、

(a) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

(b) 配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖；又は

30

(c) 配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 7 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 15】

抗 D L L 3 抗体が、D L L 3 への結合に関して請求項 9 又は請求項 V に記載の抗体と競合する、請求項 1 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 16】

抗 D L L 3 抗体が、コンフォメーションエピトープ又は非コンフォメーションエピトープである D L L 3 上のエピトープに結合する、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

40

【請求項 17】

抗 D L L 3 抗体が、配列番号 5 0 又は配列番号 5 1 のアミノ酸残基 2 7 ～ 4 9 2 を含むアミノ酸配列を有する哺乳類 D L L 3 ポリペプチドに結合する、請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 18】

抗体の重鎖又は軽鎖が、N 結合型グリコシル化、O 結合型グリコシル化、N 末端プロセシング、C 末端プロセシング、脱アミド、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N 末端へのメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、重鎖の 2 3 4 位及び 2 3 5 位における 2 つのロイシン (L) 残基のアラニン (A) への置換 (E U の番号付け) (L

50

10

1 又は 2 アミノ酸が、重鎖のカルボキシル末端から欠失している、請求項 18 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

1つのアミノ酸が、重鎖の両方のカルボキシル末端のそれぞれから欠失している、請求項19に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

重鎖のカルボキシル末端におけるプロリン残基が、さらにアミド化されている、請求項 18～20 のいずれか 1 項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

抗DLL3抗体が、抗体依存性細胞傷害活性を強化するために調節されている糖鎖改変を含む、請求項1～21のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

20

【化 3】



【請求項 24】

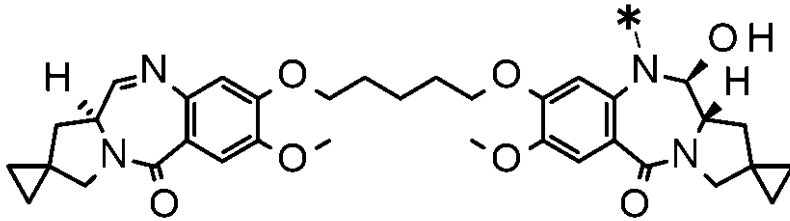
【化 4】



【請求項 25】

D が、

【化 5】



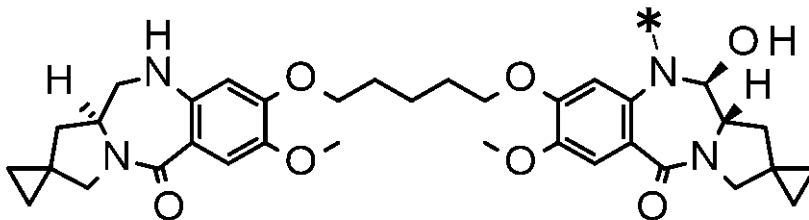
である、請求項 1 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

10

【請求項 26】

D が、

【化 6】



20

である、請求項 1 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 27】

－OH が、11' 位にある、請求項 23 ～ 26 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 28】

L が、 $-Lb-La-Lp-NH-B-CH_2-O(C=O)-^*$ によって表され、アスタリスクは、D への結合を表し；

B が、フェニル基又はヘテロアリール基を表し；

Lp が、標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを表し；

30

La が、以下の群：

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)n^3-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n^3-CH_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)n^3-CH_2-CH_2-C(=O)-$ 、及び
 $-(CH_2)n^4-O-C(=O)-$

から選択されるいずれか 1 つを表し；

40

n^2 が、1 ～ 3 の整数を表し、 n^3 は、1 ～ 5 の整数を表し、 n^4 は、0 ～ 2 の整数を表し；

Lb が、La と Ab のグリカン又はリモデリングされたグリカンとを結合するスペーサーを表す、請求項 1 ～ 27 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 29】

B が、1,4-フェニル基、2,5-ピリジル基、3,6-ピリジル基、2,5-ピリミジル基、及び 2,5-チエニル基から選択されるいずれか 1 つである、請求項 28 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 30】

B が、1,4-フェニル基である、請求項 29 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

50

【請求項 3 1】

L p が、2～7 個のアミノ酸で構成されるアミノ酸残基である、請求項 2 8～3 0 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 3 2】

L p が、グリシン、バリン、アラニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、イソロイシン、プロリン、シトルリン、ロイシン、セリン、リジン、及びアスパラギン酸から選択されるアミノ酸からなるアミノ酸残基である、請求項 2 8～3 1 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 3 3】

L p が、以下の群：－G G V A－（配列番号 8 5）、－G G－（D－）V A－、－V A－、－G G F G－（配列番号 8 6）、－G G P I－（配列番号 8 7）、－G G V C i t－（配列番号 8 8）、－G G V K－（配列番号 8 9）、－G G（D－）P I－、及び－G G P L－（配列番号 9 0）から選択される、請求項 2 8～3 2 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 3 4】

L a が、以下の群：

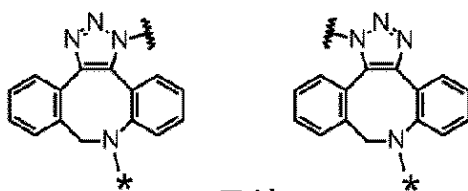
－C（＝O）－C H₂ C H₂－C（＝O）－、－C（＝O）－（C H₂ C H₂）₂－C（＝O）－、
 －C（＝O）－C H₂ C H₂－C（＝O）－N H－（C H₂ C H₂）₂－C（＝O）－、
 －C（＝O）－C H₂ C H₂－C（＝O）－N H－（C H₂ C H₂ O）₂－C H₂－C（＝O）－、
 －C（＝O）－C H₂ C H₂－N H－C（＝O）－（C H₂ C H₂ O）₄－C H₂ C H₂－C（＝O）－、
 －C H₂－O C（＝O）－、及び－O C（＝O）－

から選択される、請求項 2 8～3 3 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

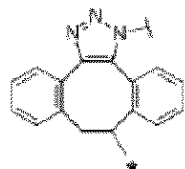
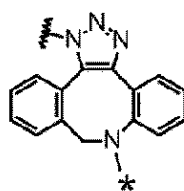
【請求項 3 5】

L b が、以下の式：

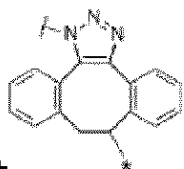
【化 7】



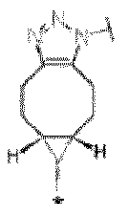
又は



又は



, 又は



又は



によって表され、上記に示される L b の各構造式において、

各アスタリスクは、L a への結合を表し、各波線は、A b のグリカン又はリモデリングされたグリカンへの結合を表す、請求項 28～34 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 36】

L が、 $-Lb-La-Lp-NH-B-CH_2-O(C=O)-^*$ によって表され、式中、

B が、1，4－フェニル基であり；

L p が、以下の群： $-GGVA-$ （配列番号 85）、 $-GG-(D-)VA-$ 、 $-VA-$ 、 $-GGFG-$ （配列番号 86）、 $-GGPI-$ （配列番号 87）、 $-GGVCi-$ （配列番号 88）、 $-GGVK-$ （配列番号 89）、及び $-GGPL-$ （配列番号 90）から選択されるいずれか 1 つを表し；

10

L a が、以下の群：

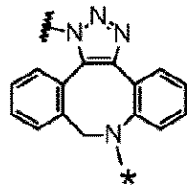
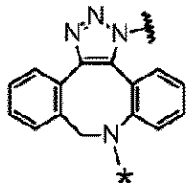
$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-CH_2-OC(=O)-$ 、及び $-OC(=O)-$

20

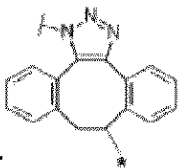
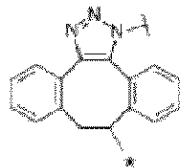
から選択されるいずれか 1 つを表し；

L b が、以下の式：

【化 8】

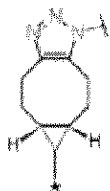


又は



又は

, 又は



又は

30

40

によって表され、式中、上記に示される L b の各構造式において、

各アスタリスクは、L a への結合を表し、各波線は、A b のグリカン又はリモデリングされたグリカンへの結合を表す、請求項 28～35 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 37】

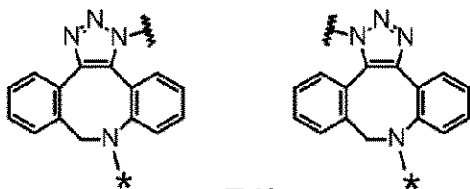
L が、以下の群：

50

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $(=O)-$ (配列番号 85 として開示される「GGVA」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GG-(D-)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-$
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-$
 $-Z^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-$
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPI-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $(=O)-$ (配列番号 87 として開示される「GGPI」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $(=O)-$ (配列番号 86 として開示される「GGFG」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $(=O)-$ (配列番号 88 として開示される「GGVCit」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVK-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $(=O)-$ (配列番号 89 として開示される「GGVK」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPL-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $(=O)-$ (配列番号 90 として開示される「GGPL」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$
 $-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-$
 $C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2C$
 $H_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-Z^2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 85
 として開示される「GGVA」)、及び
 $-Z^3-CH_2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番
 号 85 として開示される「GGVA」)
 から選択され、式中、

Z^1 は、以下の構造式：

【化 9】

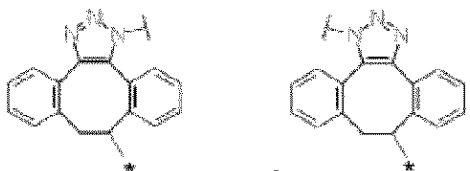


又は

を表し、

Z^2 は、以下の構造式：

【化 10】

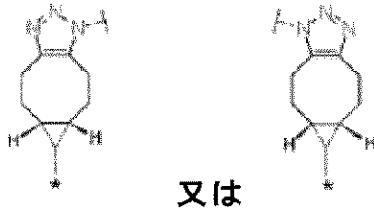


又は

を表し、

Z^3 は、以下の構造式：

【化 1 1】



を表し、式中、 Z^1 、 Z^2 、及び Z^3 の各構造式において、

各アスタリスクは、 $L a$ への結合を表し、各波線は、 $A b$ のグリカン又はリモデリングされたグリカンへの結合を表し；

B は、1，4-フェニル基を表す、請求項 28～36 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 38】

L が、以下の群：

－ Z^1 － $C(=O)$ － CH_2CH_2 － $C(=O)$ － $GGVA$ － NH － B － CH_2 － $OC(=O)$ －（配列番号 85 として開示される「 $GGVA$ 」）、

－ Z^1 － $C(=O)$ － CH_2CH_2 － $C(=O)$ － VA － NH － B － CH_2 － $OC(=O)$ －、

－ Z^1 － $C(=O)$ －（ CH_2CH_2 ）₂－ $C(=O)$ － VA － NH － B － CH_2 － $OC(=O)$ －、

－ Z^1 － $C(=O)$ － CH_2CH_2 － $C(=O)$ － $GGVCit$ － NH － B － CH_2 － $OC(=O)$ －（配列番号 88 として開示される「 $GGVCit$ 」）、

－ Z^1 － $C(=O)$ － CH_2CH_2 － $C(=O)$ － NH －（ CH_2CH_2 ）₂－ $C(=O)$ － VA － NH － B － CH_2 － $OC(=O)$ －、

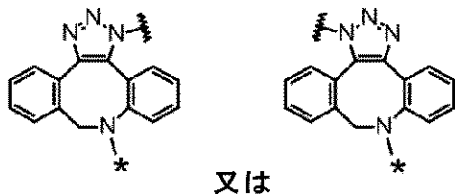
－ Z^1 － $C(=O)$ － CH_2CH_2 － $C(=O)$ － NH －（ CH_2CH_2O ）₂－ CH_2 － $C(=O)$ － VA － NH － B － CH_2 － $OC(=O)$ －、及び

－ Z^1 － $C(=O)$ － CH_2CH_2 － NH － $C(=O)$ －（ CH_2CH_2O ）₄－ CH_2CH_2 － $C(=O)$ － VA － NH － B － CH_2 － $OC(=O)$ －

から選択され、式中、

B は、1，4-フェニル基であり、 Z^1 は、以下の構造式：

【化 1 2】



を表し、 Z^1 の構造式において、

各アスタリスクは、 Z^1 に隣接する $C(=O)$ への結合を表し、各波線は、 $A b$ のグリカン又はリモデリングされたグリカンへの結合を表す、請求項 37 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 39】

抗体が、 IgG である、請求項 1～38 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 40】

抗体が、 $IgG1$ 若しくはそのバリエント、 $IgG2$ 、又は $IgG4$ である、請求項 3

10

20

30

40

50

9 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 4 1】

抗体が、腫瘍細胞に結合し、取り込まれ、腫瘍細胞に内在化する、請求項 1 ～ 4 0 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 4 2】

抗体が、抗腫瘍作用をさらに有する、請求項 4 1 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

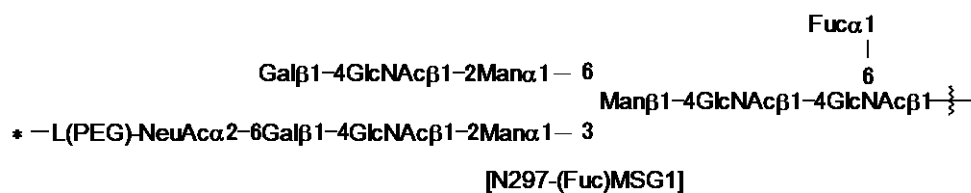
【請求項 4 3】

N 2 9 7 グリカンが、リモデリングされたグリカンである、請求項 1 ～ 4 2 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 4 4】

N 2 9 7 グリカンが、N 2 9 7－(F u c) M S G 1、N 2 9 7－(F u c) M S G 2、若しくはそれらの混合物、又は N 2 9 7－(F u c) S G であり、N 2 9 7－(F u c) M S G 1、N 2 9 7－(F u c) M S G 2、及び N 2 9 7－(F u c) S G は、以下の式：

【化 1 3】



10

20

(式中、

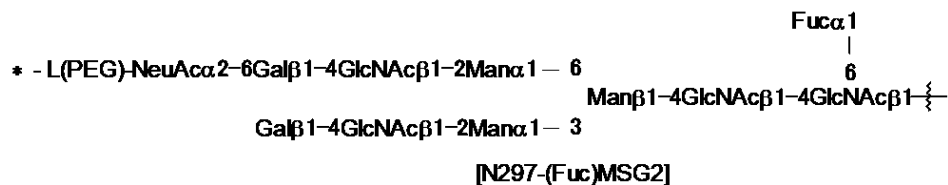
波線は、抗体の A s n 2 9 7 への結合を表し；

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$ を表し、式中、右の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける $\beta-\text{Man}$ の 1－3 分岐鎖における非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており；

アスタリスクは、リンカー L への結合を表し；

n^5 は、2 ～ 1 0 の整数を表す)

【化 1 4】



30

(式中、

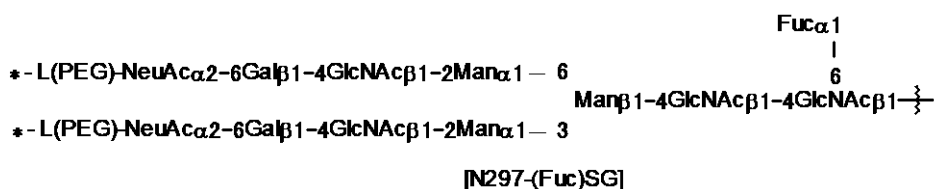
波線は、抗体の A s n 2 9 7 への結合を表し；

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^5}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$ を表し、式中、右の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける $\beta-\text{Man}$ の 1－6 分岐鎖における非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており；

アスタリスクは、リンカー L への結合を表し；

n^5 は、2 ～ 1 0 の整数を表す)、及び

【化 1 5】



40

50

(式中、

波線は、抗体の A s n 2 9 7 への結合を表し；

L (P E G) は、 $-(CH_2CH_2-O)_n^5-CH_2CH_2-NH-$ を表し、式中、右の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける β -M a n の 1-3 及び 1-6 分岐鎖のそれぞれにおける非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており；

アスタリスクは、リンカー L への結合を表し；

n^5 は、2 ~ 1 0 の整数を表す)

によって表される構造を有する、請求項 4 3 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 4 5】

n^5 が、2 ~ 5 の整数である、請求項 4 4 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 4 6】

m^2 が、1 又は 2 の整数を表し；

L は、以下の群：

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 8 5 として開示される「GGVA」)、

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、

$-Z^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 8 8 として開示される「GGVCit」)、

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、

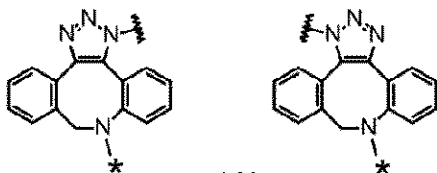
$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、及び

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$

から選択され、式中、

B は、1, 4-フェニル基であり、 Z^1 は、以下の構造式：

【化 1 6】



又は

を表し、 Z^1 の構造式において、

各アスタリスクは、 Z^1 に隣接する $C(=O)$ への結合を表し、各波線は、A b の N 2 9 7 グリカンへの結合を表し；

A b は、I g G 抗体を表し；

A b の N 2 9 7 グリカンは、N 2 9 7-(F u c) M S G 1、N 2 9 7-(F u c) M S G 2、及びそれらの混合物、並びに N 2 9 7-(F u c) S G のいずれか 1 つを表し、N 2 9 7-(F u c) M S G 1、N 2 9 7-(F u c) M S G 2、及び N 2 9 7-(F u c) S G は、以下の式：

10

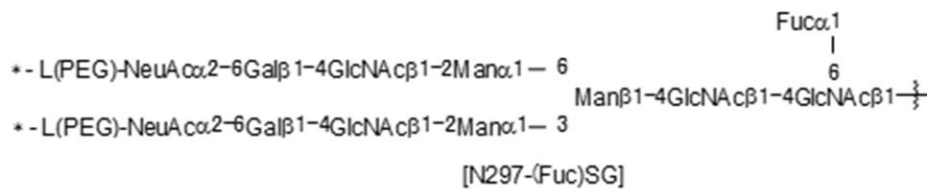
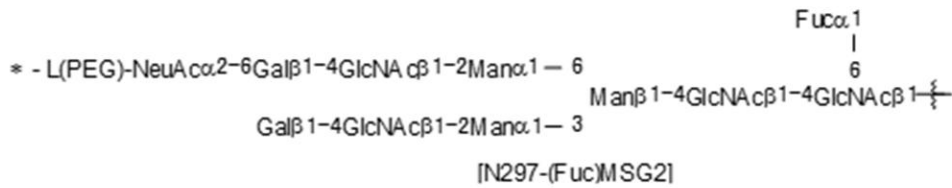
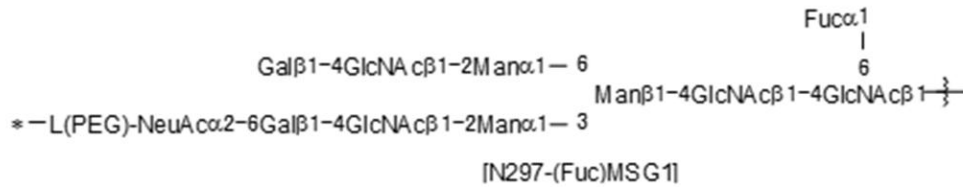
20

30

40

50

【化 1 7】



, 又は

10

20

30

40

50

(式中、

各波線は、抗体のAsn297への結合を表し、

N297グリカンにおけるL(PEG)は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_n^5-$ を表し、式中、

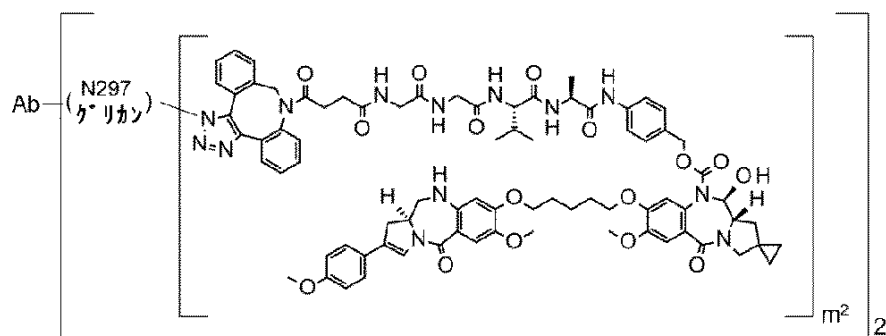
n^5 は、2～5の整数を表し、左の末端におけるアミノ基は、N297グリカンにおける β -Manの1-3及び1-6分岐鎖のそれぞれ又はいずれか1つにおける非還元末端におけるシアル酸の2位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており、各アスタリスクは、リンカーLにおけるZ¹のトリアゾール環の1又は3位における窒素原子への結合を表す)

によって表される構造を有する、請求項1～45のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項47】

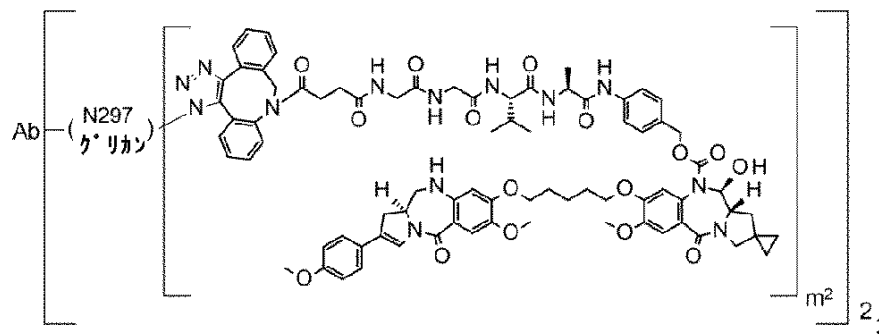
以下の群から選択される抗体-薬物コンジュゲート：

【化 18 - 1】

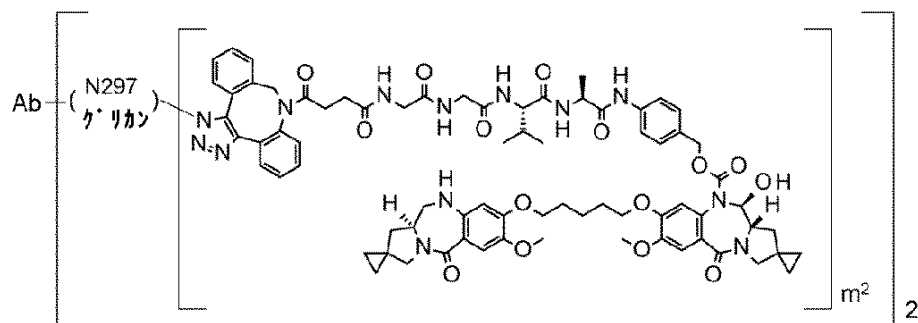


10

又は

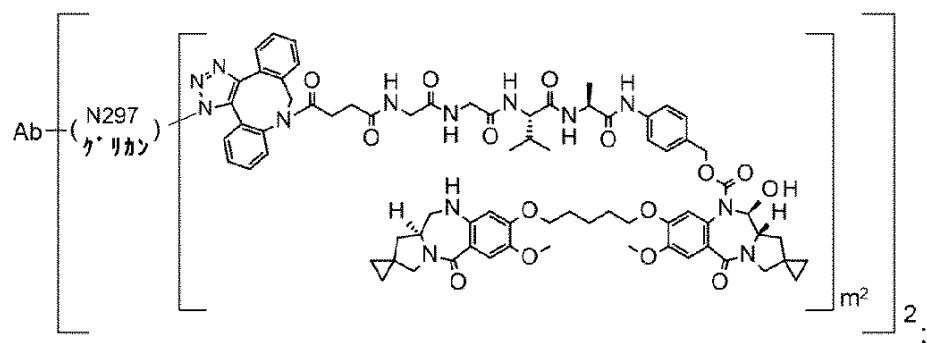


20



30

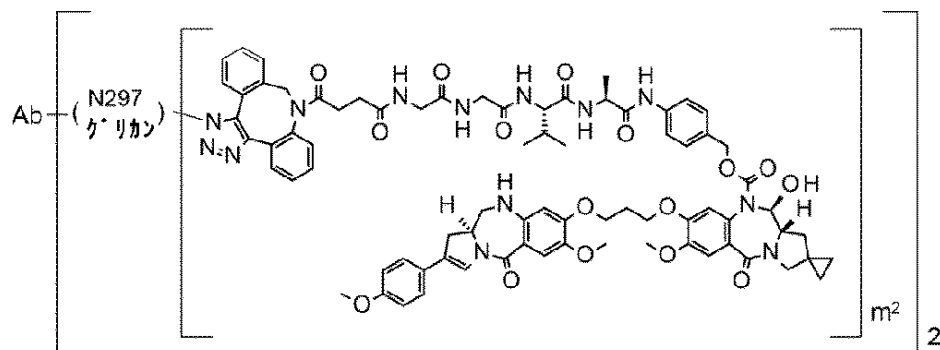
又は



40

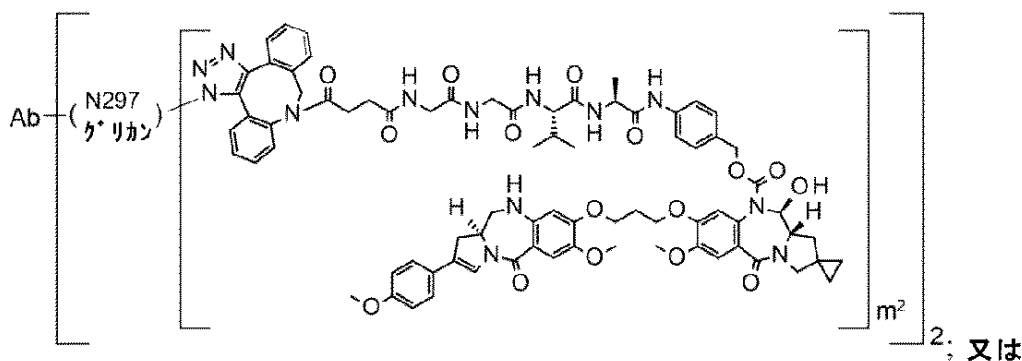
50

【化 18-2】



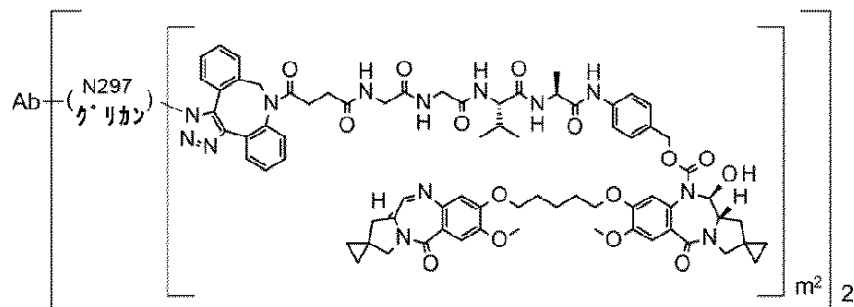
10

又は



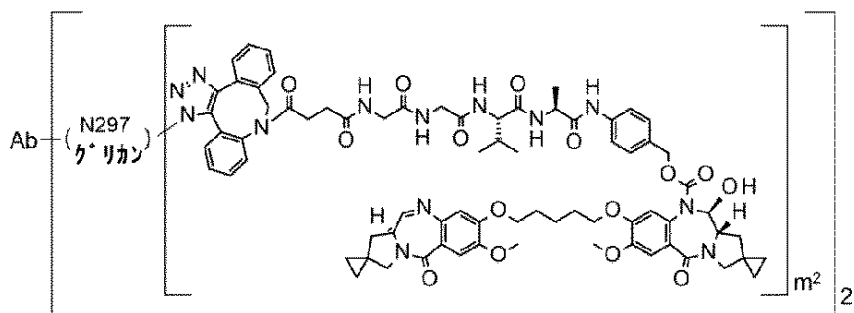
20

; 又は



30

又は



40

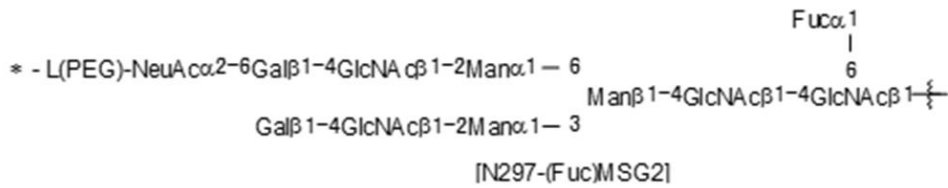
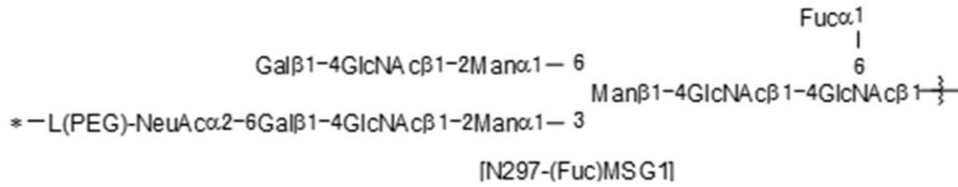
[式中、上記に示される各構造式において、

m^2 は、1 又は 2 の整数を表し；

Ab は、抗 D L L 3 I g G 抗体又は当該抗体の機能的な断片を表し；

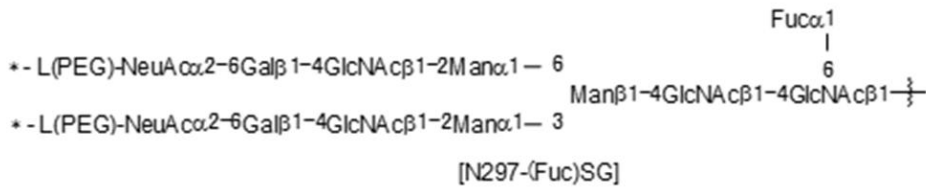
Ab の N 2 9 7 グリカンは、N 2 9 7 - (F u c) M S G 1、N 2 9 7 - (F u c) M S G 2、及びそれらの混合物、並びに N 2 9 7 - (F u c) S G のいずれか 1 つを表し、N 2 9 7 - (F u c) M S G 1、N 2 9 7 - (F u c) M S G 2、及び N 2 9 7 - (F u c) S G は、以下の式：

【化 1 9】



10

又は



20

(式中、

各波線は、抗体の Asn 297 への結合を表し、

N 2 9 7 グリカンにおける L (P E G) は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_3-$ を表し、式中、

左の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける β -Man の 1-3 及び 1-6 分岐鎖のそれぞれ又はいずれか 1 つにおける非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており、各アスタリスクは、対応する構造式におけるトリアゾール環の 1 又は 3 位における窒素原子への結合を表す) によって表される構造を有する]。

【請求項 4 8】

30

抗体が、ヒト Ig G 1 若しくはそのバリエーション、ヒト Ig G 2、又はヒト Ig G 4 の重鎖定常領域を含む、請求項 4 7 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 4 9】

抗体が、配列番号 4 2、5 7 又は 5 8 の重鎖定常領域を含む、請求項 4 7 又は 4 8 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 5 0】

抗 D L L 3 抗体が、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン (V_H) 及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン (V_L) を含み、

(a) V_H は、

(i) それぞれ、配列番号 3、配列番号 4、及び配列番号 5；

40

(i i) それぞれ、配列番号 1 3、配列番号 1 4、及び配列番号 1 5；

(i i i) それぞれ、配列番号 2 3、配列番号 2 4、及び配列番号 2 5；並びに

(i v) それぞれ、配列番号 3 3、配列番号 3 4、及び配列番号 3 5

からなる群から選択される V_H -CDR 1 配列、 V_H -CDR 2 配列、及び V_H -CDR 3 配列を含み；及び／又は

(b) V_L は、

(i) それぞれ、配列番号 8、配列番号 9、及び配列番号 1 0；

(i i) それぞれ、配列番号 1 8、配列番号 1 9、及び配列番号 2 0；

(i i i) それぞれ、配列番号 2 8、配列番号 2 9、及び配列番号 3 0；並びに

(i v) それぞれ、配列番号 3 8、配列番号 3 9、及び配列番号 4 0

50

からなる群から選択される V_L -CDR1 配列、 V_L -CDR2 配列、及び V_L -CDR3 配列を含む、請求項 46～49 のいずれか 1 項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 51】

抗 D L L 3 抗体が、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン (V_H) 及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン (V_L) を含み、(a) V_H -CDR1 配列、 V_H -CDR2 配列、及び V_H -CDR3 配列を含む V_H 及び (b) V_L -CDR1 配列、 V_L -CDR2 配列、及び V_L -CDR3 配列を含む V_L の組合せが、

(i) それぞれ、(a) 配列番号 3、配列番号 4、及び配列番号 5 並びに (b) 配列番号 8、配列番号 9、及び配列番号 10；

(i i) それぞれ、(a) 配列番号 13、配列番号 14、及び配列番号 15 並びに (b) 配列番号 18、配列番号 19、及び配列番号 20；

(i i i) それぞれ、(a) 配列番号 23、配列番号 24、及び配列番号 25 並びに (b) 配列番号 28、配列番号 29、及び配列番号 30；並びに

(i v) それぞれ、(a) 配列番号 33、配列番号 34、及び配列番号 35 並びに (b) 配列番号 38、配列番号 39、及び配列番号 40

からなる群から選択される、請求項 50 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 52】

抗体が、以下の組合せ (1)～(4)：

(1) 配列番号 7 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 2 の可変ドメイン配列を含む重鎖、

(2) 配列番号 17 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 12 の可変ドメイン配列を含む重鎖、

(3) 配列番号 27 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 22 の可変ドメイン配列を含む重鎖、並びに

(4) 配列番号 37 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 32 の可変ドメイン配列を含む重鎖

からなる群から選択されるいずれか 1 つの組合せで軽鎖及び重鎖を含む抗体であるか、又は当該抗体の機能的な断片である、請求項 47～51 のいずれか 1 項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 53】

抗体が、配列番号 17 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 12 の可変ドメイン配列を含む重鎖を含む抗体である、請求項 52 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 54】

抗体が、配列番号 27 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 22 の可変ドメイン配列を含む重鎖を含む抗体である、請求項 52 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 55】

抗体が、配列番号 37 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 32 の可変ドメイン配列を含む重鎖を含む抗体である、請求項 52 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 56】

抗体が、配列番号 7 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 2 の可変ドメイン配列を含む重鎖を含む抗体である、請求項 52 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 57】

抗体が、

(a) 配列番号 59～61 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 62 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

(b) 配列番号 63～65 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 66 のアミノ酸配列を含む軽鎖；又は

(c) 配列番号 67～69 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 70 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、請求項 47～56 のいずれか 1 項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 58】

抗体が、

(a) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 62 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

(b) 配列番号 65 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 66 のアミノ酸配列を含む軽鎖；又は

(c) 配列番号 69 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 70 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、請求項 47～57 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 59】

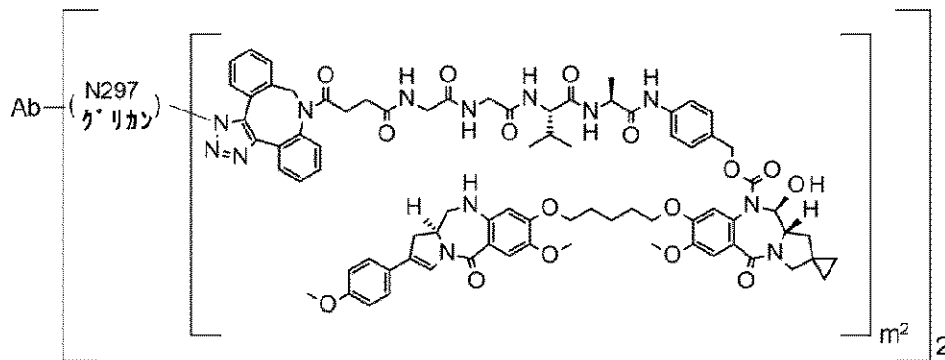
重鎖又は軽鎖が、N 結合型グリコシル化、O 結合型グリコシル化、N 末端プロセッシング、C 末端プロセッシング、脱アミド、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N 末端へのメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、重鎖の 234 位及び 235 位における 2 つのロイシン (L) 残基のアラニン (A) への置換 (E U インデックスに従った)

(L A L A)、重鎖のアミノ酸残基 356 位の G l u (E) 及び 358 位の M e t (M) のセット (E U インデックスに従った)、重鎖の 356 位の A s p (D) 及び 358 位のロイシン (L) のセット (E U インデックスに従った) 又はそれらのあらゆる組合せ、N 末端グルタミン又は N 末端グルタミン酸のピログルタミン酸への変換、並びにカルボキシル末端からの 1 又は 2 つのアミノ酸の欠失からなる群から選択されるアミノ酸残基の 1 若しくは 2 つ又はそれより多くの改変又はセットを有する、請求項 47～58 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

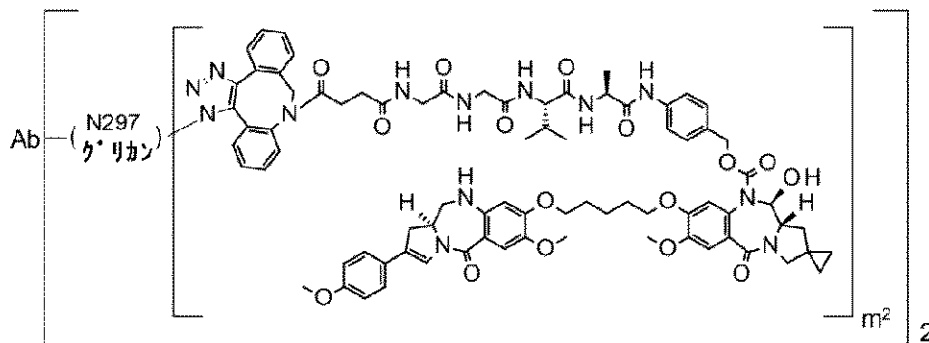
【請求項 60】

以下の式によって表される抗体－薬物コンジュゲート：

【化 20】



又は



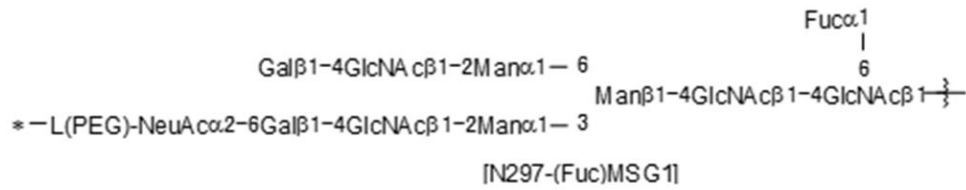
[式中、

m^2 は、1 又は 2 の整数を表し；

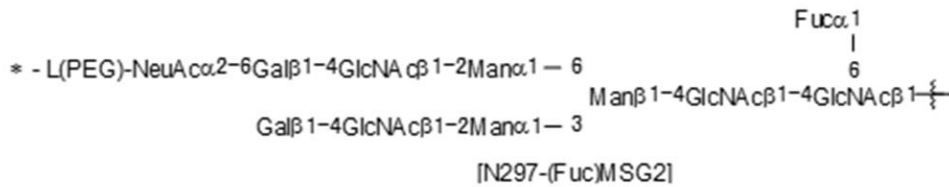
A b は、配列番号 61 のアミノ酸配列の重鎖及び配列番号 62 のアミノ酸配列の軽鎖を含む抗 D L L 3 I g G 抗体を表し；

A b の N 2 9 7 グリカン は、N 2 9 7 - (F u c) M S G 1、N 2 9 7 - (F u c) M S G 2、及びそれらの混合物、並びに N 2 9 7 - (F u c) S G のいずれか 1 つを表し、N 2 9 7 - (F u c) M S G 1、N 2 9 7 - (F u c) M S G 2、及び N 2 9 7 - (F u c) S G は、以下の式：

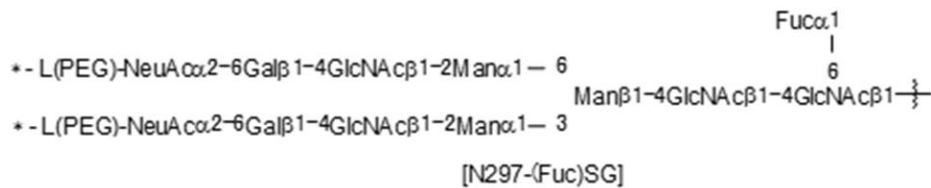
【化 2 1】



10



, 又は



20

(式中、

各波線は、抗体の A s n 2 9 7 への結合を表し、

N 2 9 7 グリカンにおける L (P E G) は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_3-$ を表し、式中、

左の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける β - M a n の 1 - 3 及び 1 - 6 分岐鎖のそれぞれ又はいずれか 1 つにおける非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており、各アスタリスクは、対応する構造式におけるトリアゾール環の 1 又は 3 位における窒素原子への結合を表す)

30

によって表される構造を有する】。

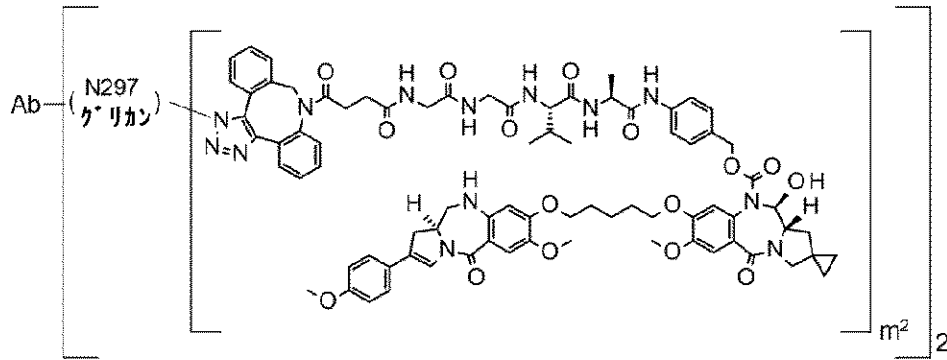
【請求項 6 1】

以下の式によって表される抗体 - 薬物コンジュゲート：

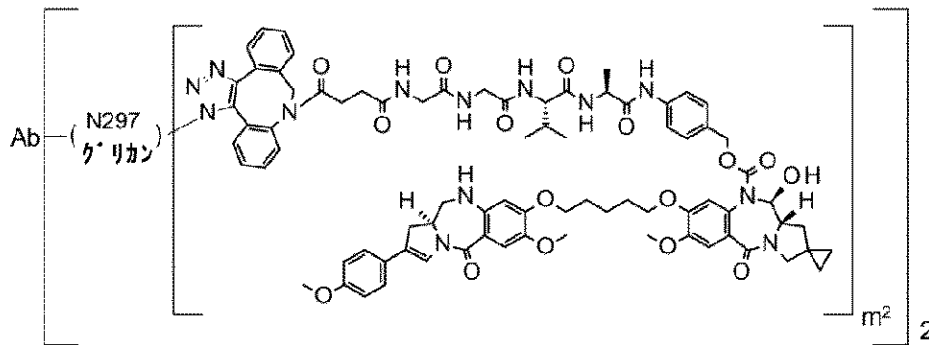
40

50

【化 2 2】



又は



【式中、

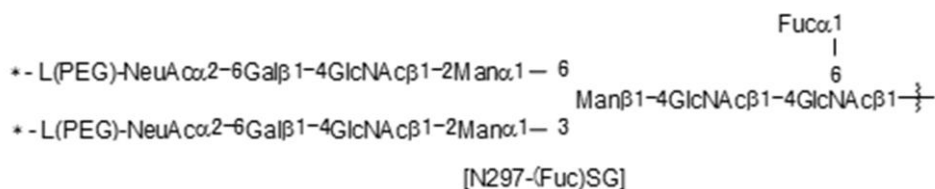
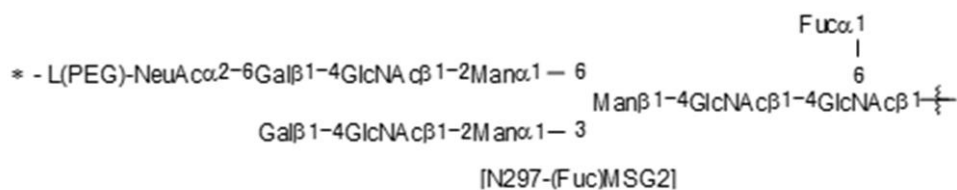
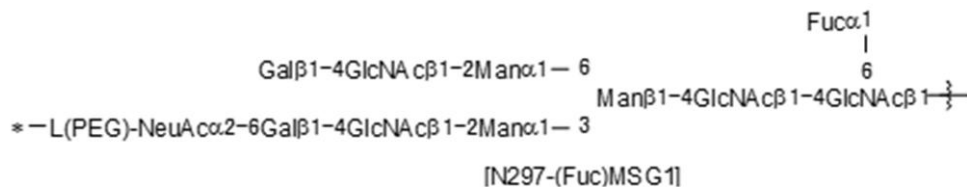
 m^2 は、1又は2の整数を表し；

Abは、配列番号65のアミノ酸配列の重鎖及び配列番号66のアミノ酸配列の軽鎖を含む抗DL3IgG抗体を表し；

AbのN297グリカンは、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、及びそれらの混合物、並びにN297-(Fuc)SGのいずれか1つを表し、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、及びN297-(Fuc)SGは、以下の式：

30

【化 2 3】



(式中、

各波線は、抗体の A s n 2 9 7 への結合を表し、

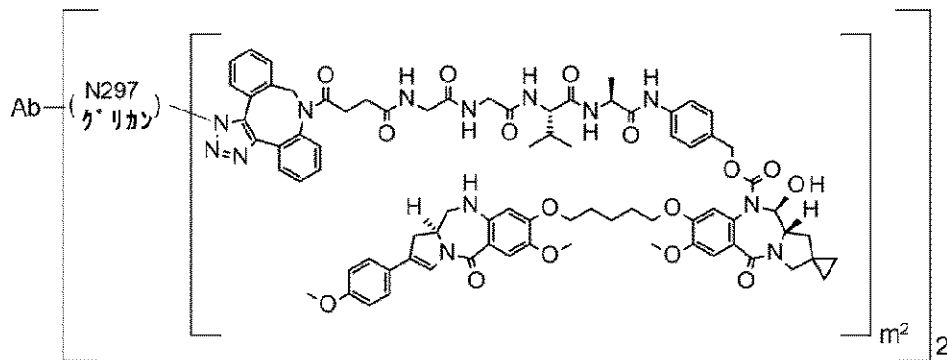
N 2 9 7 グリカンにおける L (P E G) は、 $-NH-CH_2CH_2-(O-CH_2CH_2)_3-$ を表し、式中、

左の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける β -M a n の 1-3 及び 1-6 分岐鎖のそれぞれ又はいずれか 1 つにおける非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており、各アスタリスクは、対応する構造式におけるトリアゾール環の 1 又は 3 位における窒素原子への結合を表す) によって表される構造を有する]。

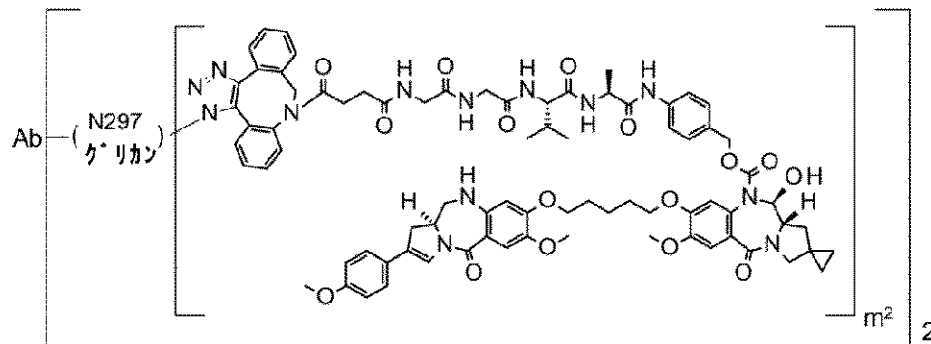
【請求項 6 2】

以下の式によって表される抗体-薬物コンジュゲート：

【化 2 4】



又は



[式中、

m^2 は、1 又は 2 の整数を表し；

A b は、配列番号 6 9 のアミノ酸配列の重鎖及び配列番号 7 0 のアミノ酸配列の軽鎖を含む抗 D L L 3 I g G 抗体を表し；

A b の N 2 9 7 グリカンは、N 2 9 7- (F u c) M S G 1、N 2 9 7- (F u c) M S G 2、及びそれらの混合物、並びに N 2 9 7- (F u c) S G のいずれか 1 つを表し、N 2 9 7- (F u c) M S G 1、N 2 9 7- (F u c) M S G 2、及び N 2 9 7- (F u c) S G は、以下の式：

10

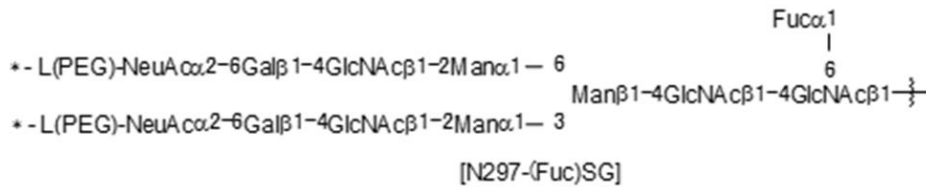
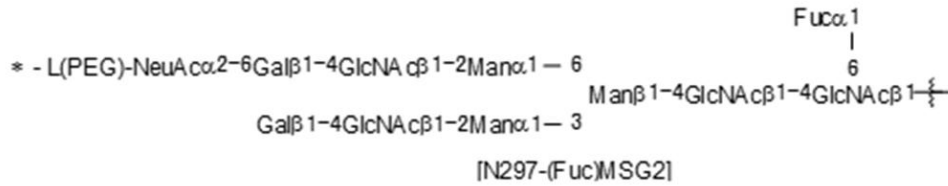
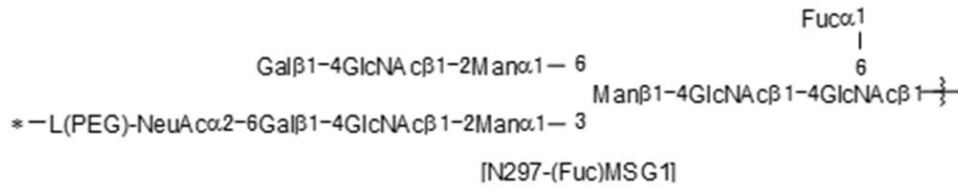
20

30

40

50

【化 2 5】



10

, 又は

20

(式中、

各波線は、抗体の Asn 297 への結合を表し、

N 2 9 7 グリカンにおける L (P E G) は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_3-$ を表し、式中、

左の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける β -Man の 1-3 及び 1-6 分岐鎖のそれぞれ又はいずれか 1 つにおける非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており、各アスタリスクは、対応する構造式におけるトリアゾール環の 1 又は 3 位における窒素原子への結合を表す) によって表される構造を有する]。

【請求項 6 3】

30

請求項 1 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の抗体-薬物コンジュゲート、その塩、又はコンジュゲート若しくは塩の水和物を含む医薬組成物。

【請求項 6 4】

抗腫瘍薬である、請求項 6 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 5】

腫瘍を処置することにおける使用のためのものであり、腫瘍は、DLL 3 を発現する腫瘍である、請求項 6 3 又は 6 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 6】

腫瘍が、小細胞肺癌 (SCLC) ; 大細胞神経内分泌癌 (LCNEC) ; 腎臓、尿生殖路 (膀胱、前立腺、卵巣、子宮頸、及び子宮内膜)、消化管 (胃、結腸)、甲状腺 (甲状腺髄様がん)、膵臓及び肺を含む様々な組織の神経内分泌腫瘍; 神経膠腫; 又は偽性神経内分泌腫瘍 (pNET) である、請求項 6 4 又は 6 5 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 6 7】

グリカンがリモデリングされた抗体を作製するための方法であって、

i) 抗 DLL 3 抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養し、得られた培養物から標的化された抗体を収集する工程;

ii) 工程 i) で得られた抗体をヒドロラーゼで処置して、(Fu α 1, 6)GlcNAc-抗体を作製する工程; 及び

iii) -1 トランスグリコシダーゼの存在下で、グリカンドナー分子及び (Fu α 1, 6)GlcNAc-抗体を反応させる工程であって、グリカンドナー分子は、アジ

50

ド基を有するPEGリンカーを、MSG (9) 又はSG (10) 中のシアル酸の2位におけるカルボン酸のカルボニル基に導入し、還元末端をオキサゾリン化することにより得られる、工程、又は

iii) -2 トランスグリコシダーゼの存在下で、(Fuc α 1, 6) GlcNAc-抗体及びグリカンドナー分子を反応させる工程であって、グリカンドナー分子は、アジド基を有するPEGリンカーを、 α -アミノ基が保護されていてもよい(MSG-) Asn又は(SG-) Asn中のシアル酸の2位におけるカルボン酸のカルボニル基及びAsn中のカルボン酸のカルボニル基に導入し、ヒドロラーゼの作用を引き起こし、次いで還元末端をオキサゾリン化することにより得られる、工程、又は

iii) -3 2種のグリコシルトランスフェラーゼの存在下で、(Fuc α 1, 6) GlcNAc-抗体及びグリカンドナー分子を反応させる工程であって、グリカンドナー分子は、そのシアル酸にアジド基が導入された(SG-) Asn又は(MSG-) Asnである、工程

を含む方法。

【請求項68】

工程ii)における反応溶液をヒドロキシアパタイトカラムで精製することによって(Fuc α 1, 6) GlcNAc-抗体を精製する工程をさらに含む、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

請求項1～62のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート形態を作製するための方法であって、

i) 請求項56又は57に記載の方法を使用することによって、グリカンがリモデリングされた抗体を作製する工程；及び

ii) DBCOを有する薬物リンカー及び工程i)で作製されたグリカンがリモデリングされた抗体のグリカン中のアジド基を反応させる工程を含む方法。

【請求項70】

請求項67又は68に記載の方法を使用することによって得られたグリカンがリモデリングされた抗体。

【請求項71】

請求項69に記載の方法を使用することによって得られた抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項72】

腫瘍を処置するための方法であって、請求項1～62のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート、当該抗体-薬物コンジュゲートの塩、又は当該抗体-薬物コンジュゲート若しくは塩の水和物を、腫瘍を有する個体に投与することを含む方法。

【請求項73】

腫瘍を処置するための方法であって、請求項1～62のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート、その塩、及び当該コンジュゲート又は塩の水和物から選択される少なくとも1つの成分、並びに少なくとも1つの抗腫瘍薬を含む医薬組成物を、同時に、別々に、又は連続的に個体に投与することを含む方法。

【請求項74】

腫瘍が、DLL3を発現する腫瘍である、請求項72又は73に記載の方法。

【請求項75】

腫瘍が、小細胞肺癌(SCLC)；大細胞神経内分泌癌(LCNEC)；腎臓、尿生殖路(膀胱、前立腺、卵巣、子宮頸、及び子宮内膜)、消化管(胃、結腸)、甲状腺(甲状腺髄様がん)、膵臓及び肺を含む様々な組織の神経内分泌腫瘍；神経膠腫；又は偽性神経内分泌腫瘍(pNET)である、請求項72～74のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年1月13日に提出された米国仮出願第63／136,928号の優先権を主張し、この開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含有し、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。前記ASCIIコピーは、2022年1月12日に作成され、098065-0303__SL.txtと名付けられ、153,716バイトのサイズである。

技術分野

本発明は、抗腫瘍薬として有用な抗体-薬物コンジュゲートであって、腫瘍細胞を標的化することが可能な抗体と、リンカー構造部分を介して互いにコンジュゲートされるピロロベンゾジアゼピン誘導体とを有する抗体-薬物コンジュゲートに関する。

【背景技術】

【0002】

本技術の背景の以下の説明は、単に本発明の技術の理解の補助に役立つものとして提供され、本発明の技術に対する先行技術を記載又は構成するものとして認められない。

抗体-薬物コンジュゲート(ADC)は、がん細胞の表面上に発現される抗原に結合する抗体にコンジュゲートした細胞傷害活性を有する薬物を有し、結合を介して抗原を細胞内在化させることが可能である。ADCは、効果的にがん細胞に薬物を送達することができ、したがって、がん細胞内で薬物を蓄積させ、がん細胞を殺滅することが期待される。

例えば、ADC Adcetris(商標)(ブレントキシマブベドチン)は、抗CD30モノクローナル抗体にコンジュゲートしたモノメチルオーリスタチンEを有し、ホジキンリンパ腫及び未分化大細胞型リンパ腫のための治療薬物として承認済みである。Kadcyla(商標)(トラスツズマブエムタンシン)は、抗HER2モノクローナル抗体にコンジュゲートしたエムタンシンを有し、HER2陽性の進行性及び再発性乳がんを処置するために使用される。

【0003】

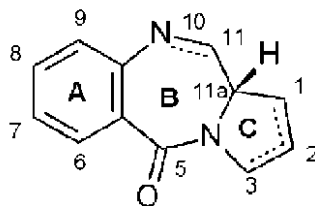
ADCのためにコンジュゲートされる薬物の有用な例は、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)である。PBDは、例えば、DNA副溝におけるPuGPu配列に結合することによって細胞傷害性を呈する。1965年に、天然に存在するPBDであるアントラマイシンが最初に発見され、この発見から、様々な天然に存在するPBD及びそれらのアナログPBDが発見されることになった(Mantaj, et al., Angewandte Chemie, International Edition 2016, 55, 2-29; Antonow, et al., Chemical Reviews, 2010, 111, 2815-2864; In Antibiotics III. Springer Verlag, New York, pp.3-11; 及びAccounts of Chemical Research, 1986, 19, 230を参照)。

PBDの一般構造式は、以下の式によって表される：

【0004】

【化1】

[式1]



A及びC環部分における置換基の数、タイプ、及び部位が異なるPBD、並びにB及びC環部分における不飽和の程度が異なるPBDが公知である。

【0005】

PBDは、二量体構造の形成を介して細胞傷害性が劇的に強化された状態になることが公知であり (Journal of the American Chemical Society, 1992, 114, 4939; Journal of Organic Chemistry, 1996, 61, 8141を参照)、二量体PBDを有する様々なADCが報告されている (WO2013/173496、WO2014/130879、WO2017/004330、WO2017/004025、WO2017/020972、WO2016/036804、WO2015/095124、WO2015/052322、WO2015/052534、WO2016/115191、WO2015/052321、WO2015/031693、WO2011/130613及びWO2019/065964を参照)。

二量体構造のPBDは、一部の公知のADCで使用される。例えば、DLL3を標的化する抗体に二量体構造のPBDがコンジュゲートされているADCが報告されている (WO2013/126746及びSaunders et al., Sci Translational Medicine 7(302): 302ra136 (2015)を参照)。

10

【0006】

DLL3 (すなわち、デルタ様リガンド3又はデルタ様タンパク質3) は、シングルパスI型膜貫通タンパク質であり、Notchリガンドの1つである (Owen et al. J Hematol Oncol 12, 61 (2019)を参照)。DLL3は、SCLC及びLCNECを含む高悪性度肺神経内分泌腫瘍において選択的に発現される。SCLC及びLCNEC患者由来の異種移植片腫瘍においてDLL3の発現増加が観察され、原発性腫瘍も確認された。Saunders et al., Sci Translational Medicine 7(302):302ra136 (2015)を参照されたい。DLL3の発現増加はまた、前立腺の神経内分泌癌を含む肺外神経内分泌がんでも観察された (Puca et al., Sci Transl Med 11(484): pii: eaav0891 (2019))。DLL3はこのような腫瘍細胞の表面上で発現されるが、その成人における正常な組織での発現は限定される。

20

活性成分として抗DLL3抗体を含有する様々な医薬組成物が公知である。Giffin et al., Clin Cancer Res 2021;27:1526-37、WO2011/093097、及びWO2013/126746を参照されたい。ただしこれまで、医薬物質としての使用について承認されたDLL3を標的化する薬物はない。

様々な種類のがんを処置するためのADCなどの効率的で有効な標的化治療剤が当業界で求められている。本出願はこの必要性を満たし、その例としては、PBDを利用するADCが挙げられる。

30

【発明の概要】

【0007】

本発明によって解決しようとする課題：本発明は、新規の抗DLL-3抗体-ピロロベンゾジアゼピン (PBD) 誘導体コンジュゲートを提供する。加えて、本発明は、抗DLL-3抗体-PBD誘導体コンジュゲートを含有する医薬組成物を提供する。さらに、本発明は、抗DLL3抗体-PBD誘導体コンジュゲートを使用することによってがんを処置するための方法を提供する。

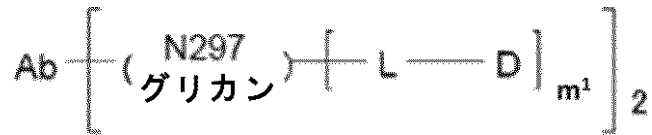
課題を解決する手段：本発明者らは、入念に検査して、新規の抗DLL-3抗体-ピロロベンゾジアゼピン (PBD) 誘導体コンジュゲートが、意外なことに強い抗腫瘍活性を有することを見出し、それによって本発明を完成させた。本発明は、以下の本発明の態様及び実施形態を含む：

40

【1】一態様において、本発明の開示は、以下の式によって表される抗体-薬物コンジュゲートを提供する：

【0008】

【化 2】



式中、

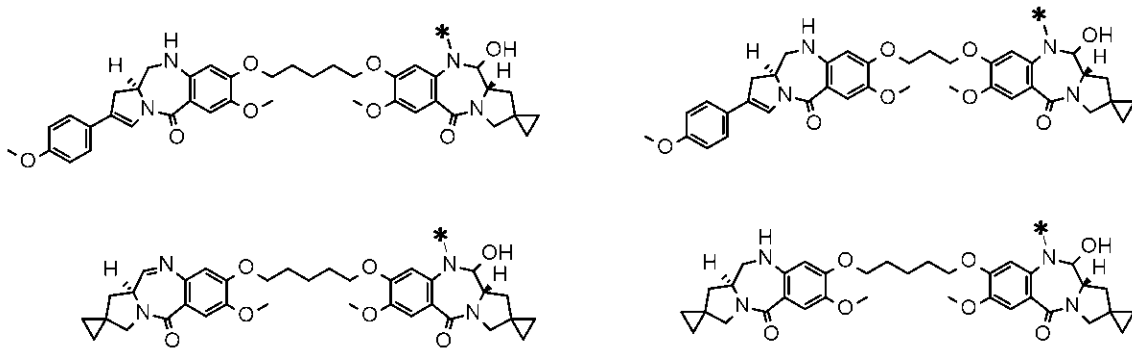
 m^1 は、1～2の整数を表し；

D は、以下の式のうちの1つによって表される薬物を表す：

10

【0009】

【化 3】



20

式中、アスタリスクは、L への結合を表し；

L は、Ab の N297 グリカンと D とを連結するリンカーであり；

N297 グリカンは、任意選択でリモデリングされてもよく；

Ab は、DLL-3 に特異的に結合する抗 DLL-3 抗体を表す。

【0010】

〔2〕〔1〕による一部の実施形態において、抗 DLL-3 抗体は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン (VH) 及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン (VL) を含み、

30

(a) VH は、

(i) それぞれ、配列番号 3、配列番号 4、及び配列番号 5；

(ii) それぞれ、配列番号 13、配列番号 14、及び配列番号 15；

(iii) それぞれ、配列番号 23、配列番号 24、及び配列番号 25；並びに

(iv) それぞれ、配列番号 33、配列番号 34、及び配列番号 35

からなる群から選択される VH-CDR1 配列、VH-CDR2 配列、及び VH-CDR3 配列を含み；及び／又は

(b) VL は、

(i) それぞれ、配列番号 8、配列番号 9、及び配列番号 10；

(ii) それぞれ、配列番号 18、配列番号 19、及び配列番号 20；

(iii) それぞれ、配列番号 28、配列番号 29、及び配列番号 30；並びに

(iv) それぞれ、配列番号 38、配列番号 39、及び配列番号 40

40

からなる群から選択される VL-CDR1 配列、VL-CDR2 配列、及び VL-CDR3 配列を含む。

【0011】

〔3〕〔1〕又は〔2〕による一部の実施形態において、抗 DLL-3 抗体は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン (VH) 及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン (VL) を含み、

(a) VH-CDR1 配列、VH-CDR2 配列、及び VH-CDR3 配列を含む VH 及び

(b) VL-CDR1 配列、VL-CDR2 配列、及び VL-CDR3 配列を含む VL の組合せは、

(i) それぞれ、(a) 配列番号 3、配列番号 4、及び配列番号 5 並びに (b) 配列番

50

号 8、配列番号 9、及び配列番号 10；

(i i) それぞれ、(a) 配列番号 13、配列番号 14、及び配列番号 15 並びに (b) 配列番号 18、配列番号 19、及び配列番号 20；

(i i i) それぞれ、(a) 配列番号 23、配列番号 24、及び配列番号 25 並びに (b) 配列番号 28、配列番号 29、及び配列番号 30；並びに

(i v) それぞれ、(a) 配列番号 33、配列番号 34、及び配列番号 35 並びに (b) 配列番号 38、配列番号 39、及び配列番号 40

からなる群から選択される。

【0012】

【4】 【1】又は【2】による一部の実施形態において、抗 D L L 3 抗体は、以下の特徴のうちの 1 つ又は複数を含む：

(a) 配列番号 7、17、27、37、62、66、又は 70 のいずれか 1 つに存在する軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 % 同一な軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列；及び／又は

(b) 配列番号 2、12、22、32、59、60、61、63、64、65、67、68、又は 69 のいずれか 1 つに存在する重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 % 同一な重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列。

【0013】

【5】 【1】～【4】のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、抗 D L L 3 抗体は、以下の特徴のうちの 1 つ又は複数を含む：

(a) 配列番号 17、27 又は 37 のいずれか 1 つに存在する軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 % 同一な軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列；及び

(b) 配列番号 12、22 又は 32 のいずれか 1 つに存在する重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 % 同一な重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列。

【6】 【1】～【5】のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、抗 D L L 3 抗体は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン (V_H) 及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン (V_L) を含み、(a) V_H は、配列番号 2、配列番号 12、配列番号 22、及び配列番号 32 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；及び／又は (b) V_L は、配列番号 7、配列番号 17、配列番号 27、及び配列番号 37 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0014】

【7】 【1】～【6】のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、抗 D L L 3 抗体は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン (V_H) 及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン (V_L) を含み、(a) V_H は、配列番号 12、配列番号 22 又は配列番号 32 から選択されるアミノ酸配列を含み、(b) V_L は、配列番号 17、配列番号 27 又は配列番号 37 から選択されるアミノ酸配列を含む。

【8】 【6】による一部の実施形態において、 V_H アミノ酸配列及び V_L アミノ酸配列は、それぞれ配列番号 2 及び配列番号 7 (7-I1-B)；それぞれ配列番号 12 及び配列番号 17 (2-C8-A)；それぞれ配列番号 22 及び配列番号 27 (10-O18-A)；及びそれぞれ配列番号 32 及び配列番号 37 (6-G23-F) からなる群から選択される。

【9】 【1】～【8】のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、抗体-薬物コンジュゲートは、抗 D L L 3 抗体が細胞表面 (例えば、腫瘍細胞表面) 上で発現される D L L 3 ポリペプチドに結合すると、細胞内内化を受ける。

【0015】

【10】 【1】～【9】のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、抗 D L L 3 は

10

20

30

40

50

、I g G 1又はそのバリエーション、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g M、I g D、及びI g Eからなる群から選択されるアイソタイプのFcドメインを含む。

〔11〕〔1〕～〔10〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、抗DLL3は、配列番号42、57又は58の重鎖定常領域を含む。

〔12〕〔1〕～〔11〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、抗DLL3抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体又は二重特異性抗体である。

〔0016〕

〔13〕〔1〕～〔12〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、抗体は、

(a) 配列番号59～61のいずれか1つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号62のいずれか1つのアミノ酸配列を含む軽鎖；

(b) 配列番号63～65のいずれか1つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号66のいずれか1つのアミノ酸配列を含む軽鎖；及び／又は

(c) 配列番号67～69のいずれか1つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号70のいずれか1つのアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

〔14〕〔1〕～〔13〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、抗体は、

(a) 配列番号61のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号62のアミノ酸配列を含む軽鎖；

(b) 配列番号65のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号66のアミノ酸配列を含む軽鎖；又は

(c) 配列番号69のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号70のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

〔0017〕

〔15〕請求項1に記載の一部の実施形態において、抗DLL-3抗体は、DLL-3への結合に関して請求項9又は請求項Vに記載の抗体と競合する。

〔16〕〔1〕～〔15〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、抗DLL3抗体は、コンフォメーションエピトープ又は非コンフォメーションエピトープであるDLL3上のエピトープに結合する。

〔17〕〔1〕～〔16〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、抗DLL3抗体は、配列番号50又は配列番号51のアミノ酸残基27～492を含むアミノ酸配列を有する哺乳類DLL3ポリペプチドに結合する。

〔18〕〔1〕～〔17〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、抗体の重鎖又は軽鎖は、N結合型グリコシル化、O結合型グリコシル化、N末端プロセッシング、C末端プロセッシング、脱アミド、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N末端へのメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、重鎖の234位及び235位における2つのロイシン(L)残基のアラニン(A)への置換(EUの番号付け)(LALA)、重鎖のアミノ酸残基356位のGlu(E)及び358位のMet(M)のセット(EUの番号付け)、重鎖の356位のAsp(D)及び358位のロイシン(L)のセット(EUの番号付け)又はそれらのあらゆる組合せ、N末端グルタミン又はN末端グルタミン酸のピログルタミン酸への変換、並びにカルボキシル末端からの1又は2つのアミノ酸の欠失からなる群から選択されるアミノ酸残基の1若しくは2つ又はそれより多くの改変又はセットを有する。

〔0018〕

〔19〕〔18〕による一部の実施形態において、1又は2つのアミノ酸が、その重鎖のカルボキシル末端から欠失している。

〔20〕〔19〕による一部の実施形態において、1つのアミノ酸が、その重鎖の両方のカルボキシル末端のそれぞれから欠失している。

10

20

30

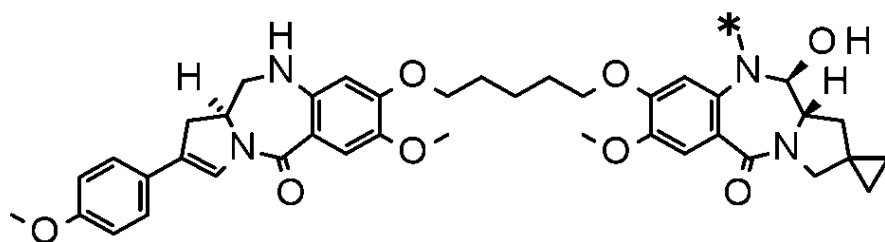
40

50

【21】 【18】～【20】のいずれか1つによる一部の実施形態において、その重鎖のカルボシル末端におけるプロリン残基は、さらにアミド化されている。

【22】 【1】～【21】のいずれか1つによる一部の実施形態において、抗DLL3抗体は、抗体依存性細胞傷害活性を強化するために調節されている糖鎖改変を含む。

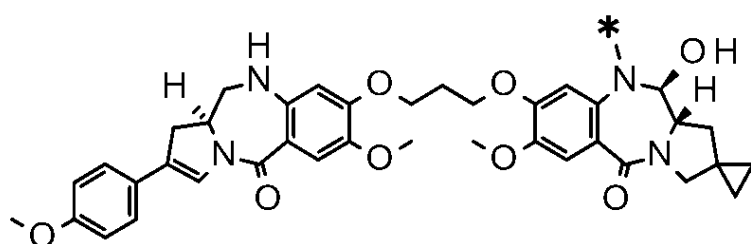
【23】 【1】～【22】のいずれか1つによる一部の実施形態において、Dは、
【0019】
【化4】



10

である。

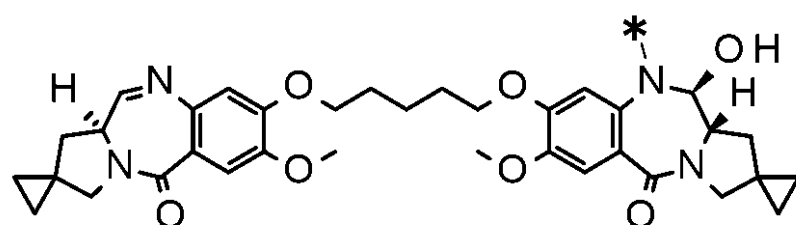
【24】 【1】～【22】のいずれか1つによる一部の実施形態において、Dは、
【0020】
【化5】



20

である。

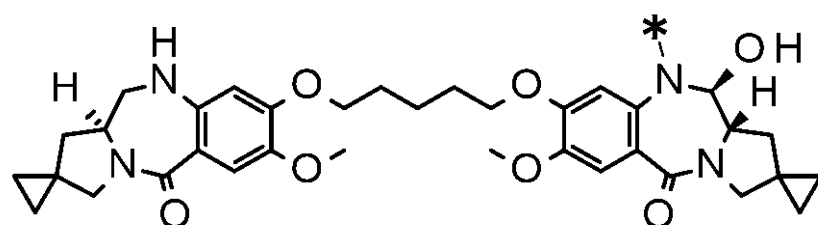
【25】 【1】～【22】のいずれか1つによる一部の実施形態において、Dは、
【0021】
【化6】



30

である。

【26】 【1】～【22】のいずれか1つによる一部の実施形態において、Dは、
【0022】
【化7】



40

50

である。

〔27〕〔23〕～〔26〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、 $-OH$ は、11'位にある。

〔28〕〔1〕～〔27〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、

L は、 $-Lb-La-Lp-NH-B-CH_2-O(C=O)-^*$ によって表され、アスタリスクは、 D への結合を表し；

B は、フェニル基又はヘテロアリール基を表し；

Lp は、標的細胞において切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを表し；

La は、以下の群：

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)n^3-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n^3-CH_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)n^3-CH_2-CH_2-C(=O)-$ 、及び
 $-(CH_2)n^4-O-C(=O)-$

から選択されるいずれか1つを表し；

n^2 は、1～3の整数を表し、 n^3 は、1～5の整数を表し、 n^4 は、0～2の整数を表し；

Lb は、 La と Ab のグリカン又はリモデリングされたグリカンとを結合するスペーサーを表す。

〔0023〕

〔29〕〔28〕による一部の実施形態において、 B は、1,4-フェニル基、2,5-ピリジル基、3,6-ピリジル基、2,5-ピリミジル基、及び2,5-チエニル基から選択されるいずれか1つである。

〔30〕〔29〕による一部の実施形態において、 B は、1,4-フェニル基である。

〔31〕〔28〕～〔30〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、 Lp は、2～7個のアミノ酸で構成されるアミノ酸残基である。

〔32〕〔28〕～〔31〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、 Lp は、グリシン、バリン、アラニン、フェニルアラニン、グルタミン酸、イソロイシン、プロリン、シトルリン、ロイシン、セリン、リジン、及びアスパラギン酸から選択されるアミノ酸からなるアミノ酸残基である。

〔33〕〔28〕～〔32〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、 Lp は、以下の群： $-GGVA-$ （配列番号85）、 $-GG-(D-)VA-$ 、 $-VA-$ 、 $-GGFG-$ （配列番号86）、 $-GGPI-$ （配列番号87）、 $-GGVCit-$ （配列番号88）、 $-GGVK-$ （配列番号89）、 $-GG(D-)PI-$ 、及び $-GGPL-$ （配列番号90）から選択される。

〔0024〕

〔34〕〔28〕～〔33〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、 La は、以下の群：

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-CH_2-OC(=O)-$ 、及び $-OC(=O)-$

から選択される。

10

20

30

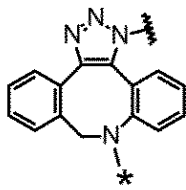
40

50

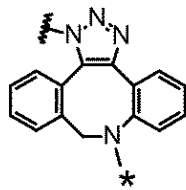
【35】 【28】 ～ 【34】 のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、L b は、以下の式：

【0025】

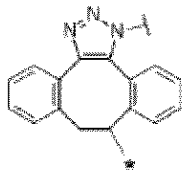
【化8】



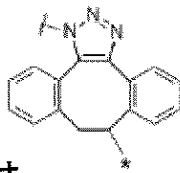
又は



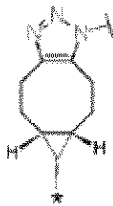
10



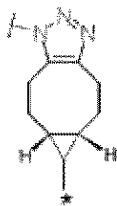
又は



、又は



又は



20

によって表され、式中、上記に示される L b の各構造式において、

各アスタリスクは、L a への結合を表し、各波線は、A b のグリカン又はリモデリングされたグリカンへの結合を表す。

【0026】

【36】 【28】 ～ 【35】 のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、

30

L は、 $-Lb-La-Lp-NH-B-CH_2-O(C=O)-^*$ によって表され、式中、

B は、1, 4-フェニル基であり；

L p は、以下の群： $-GGVA-$ （配列番号 85）、 $-GG-(D-)-VA-$ 、 $-VA-$ 、 $-GGFG-$ （配列番号 86）、 $-GGPI-$ （配列番号 87）、 $-GGVCit-$ （配列番号 88）、 $-GGVK-$ （配列番号 89）、及び $-GGPL-$ （配列番号 90）から選択されるいずれか 1 つを表し；

L a は、以下の群：

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-CH_2-OC(=O)-$ 、及び $-OC(=O)-$

40

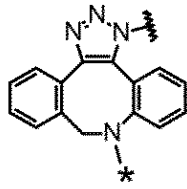
から選択されるいずれか 1 つを表し；

L b は、以下の式：

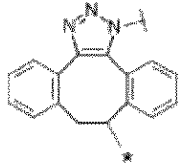
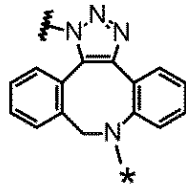
【0027】

50

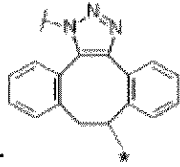
【化 9】



又は



又は



, 又は



又は



によって表され、式中、上記に示される L b の各構造式において、

各アスタリスクは、L a への結合を表し、各波線は、A b のグリカン又はリモデリングされたグリカンへの結合を表す。

【0028】

[37] [28] ~ [36] のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、

L は、以下の群：

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—GGVA—NH—B—CH₂—OC(=O)— (配列番号 85 として開示される「GGVA」)、

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—GG—(D—)VA—NH—B—CH₂—OC(=O)—、

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—VA—NH—B—CH₂—OC(=O)—、

—Z¹—C(=O)—(CH₂CH₂)₂—C(=O)—VA—NH—B—CH₂—OC(=O)—、

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—GGPI—NH—B—CH₂—OC(=O)— (配列番号 87 として開示される「GGPI」)、

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—GGFG—NH—B—CH₂—OC(=O)— (配列番号 86 として開示される「GGFG」)、

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—GGVCit—NH—B—CH₂—OC(=O)— (配列番号 88 として開示される「GGVCit」)、

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—GGVK—NH—B—CH₂—OC(=O)— (配列番号 89 として開示される「GGVK」)、

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—GGPL—NH—B—CH₂—OC(=O)— (配列番号 90 として開示される「GGPL」)、

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—NH—(CH₂CH₂)₂—C(=O)—VA—NH—B—CH₂—OC(=O)—、

—Z¹—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—NH—(CH₂CH₂O)₂—CH₂—C(=O)—VA—NH—B—CH₂—OC(=O)—、

10

20

30

40

50

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-Z^2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 85
 として開示される「GGVA」)、及び
 $-Z^3-CH_2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 85
 として開示される「GGVA」)

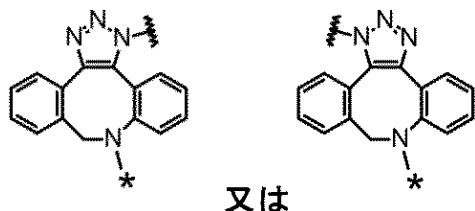
から選択され、式中、

Z^1 は、以下の構造式：

【0029】

【化10】

10



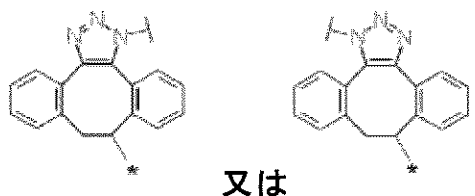
を表し、

Z^2 は、以下の構造式：

20

【0030】

【化11】



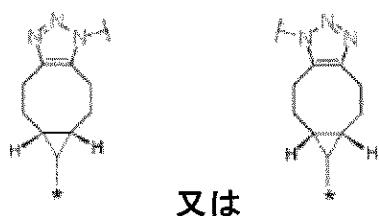
を表し、

Z^3 は、以下の構造式：

30

【0031】

【化12】



40

を表し、式中、 Z^1 、 Z^2 、及び Z^3 の各構造式において、

各アスタリスクは、Laへの結合を表し、各波線は、Abのグリカン又はリモデリングされたグリカンへの結合を表し；

Bは、1,4-フェニル基を表す。

【0032】

【38】【37】による一部の実施形態において、

Lは、以下の群：

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 85として開示される「GGVA」)、

50

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-Z^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 (配列番号 88 として開示される「GGVCit」)
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、及び
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$

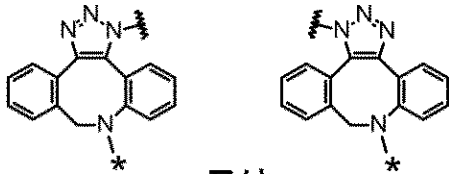
10

から選択され、式中、

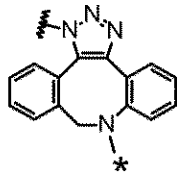
B は、1, 4-フェニル基であり、 Z^1 は、以下の構造式：

【0033】

【化13】



又は



20

を表し、 Z^1 の構造式において、

各アスタリスクは、 Z^1 に隣接する $C(=O)$ への結合を表し、各波線は、Ab のグリカン又はリモデリングされたグリカンへの結合を表す。

【0034】

【39】 [1] ~ 【38】 のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、

L は、 $-Lb-La-Lp-NH-B-CH_2-O(C=O)-^*$ によって表され、式中、

30

アスタリスクは、D への結合を表し；

B は、1, 4-フェニル基を表し；

Lp は、 $-GGVA-$ (配列番号 85) 又は $-VA$ を表し；

La は、 $-(CH_2)^{n^9}-C(=O)-$ 又は $-(CH_2CH_2)^{n^{10}}-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)^{n^{11}}-CH_2CH_2-C(=O)-$ を表し、 n^9 は、2 ~ 7 の整数を表し、 n^{10} は、1 ~ 3 の整数を表し、 n^{11} は、6 ~ 10 の整数を表し；

Lb は、 $-(スクシンイミド-3-イル-N)-$ である。

【0035】

【40】 【39】 による一部の実施形態において、

40

L は、以下の群：

$-(スクシンイミド-3-イル-N)-(CH_2)_5-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、

$-(スクシンイミド-3-イル-N)-(CH_2)_5-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 85 として開示される「GGVA」)、及び

$-(スクシンイミド-3-イル-N)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$

から選択されるいずれか 1 つを表し、式中、B は、1, 4-フェニル基である。

【41】 [1] ~ 【40】 のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、抗体は、IgG である。

50

【0036】

〔42〕〔41〕による一部の実施形態において、抗体は、IgG1若しくはそのバリエーション、IgG2、又はIgG4である。

〔43〕〔1〕～〔42〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、抗体は、腫瘍細胞に結合し、取り込まれ、腫瘍細胞に内在化する。

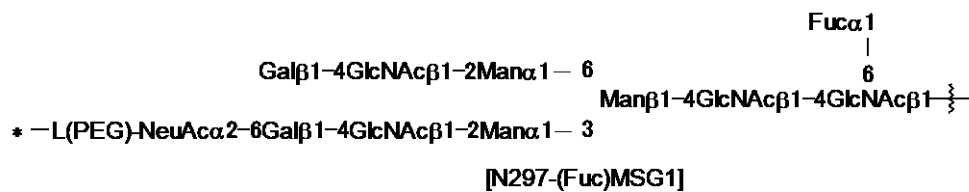
〔44〕〔43〕による一部の実施形態において、抗体は、抗腫瘍作用をさらに有する。

〔45〕〔1〕～〔44〕のいずれか1つによる一部の実施形態において、N297グリカンは、リモデリングされたグリカンである。

〔46〕〔45〕による一部の実施形態において、N297グリカンは、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、若しくはそれらの混合物、又はN297-(Fuc)SGであり、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、及びN297-(Fuc)SGは、以下の式：

【0037】

【化14】



10

20

(式中、

波線は、抗体のAsn297への結合を表し；

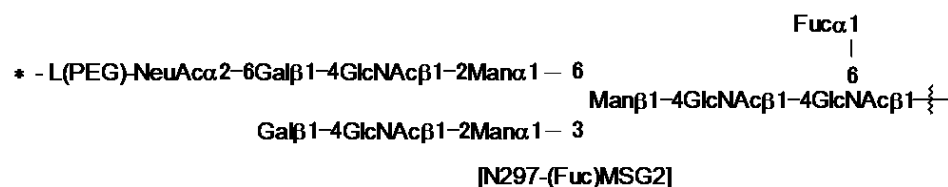
L(PEG)は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^{n^5}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$ を表し、式中、右の末端におけるアミノ基は、N297グリカンにおける $\beta\text{-Man}$ の1-3分岐鎖における非還元末端におけるシアル酸の2位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており；

アスタリスクは、リンカーLへの結合を表し；

n^5 は、2～10の整数を表す)

【0038】

【化15】



30

(式中、

波線は、抗体のAsn297への結合を表し；

L(PEG)は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^{n^5}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$ を表し、式中、右の末端におけるアミノ基は、N297グリカンにおける $\beta\text{-Man}$ の1-6分岐鎖における非還元末端におけるシアル酸の2位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており；

アスタリスクは、リンカーLへの結合を表し；

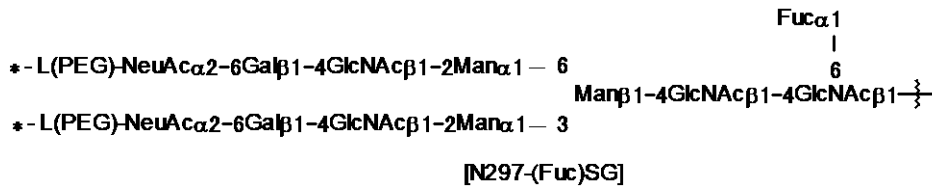
n^5 は、2～10の整数を表す)、及び

【0039】

40

50

【化 1 6】



(式中、

波線は、抗体の A s n 2 9 7 への結合を表し；

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^{n^5}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$ を表し、式中、右
の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける $\beta-\text{Man}$ の 1-3 及び 1-6 分
岐鎖のそれぞれにおける非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのアミド結合を介してカル
ボン酸に結合されており；

アスタリスクは、リンカー L への結合を表し；

 n^5 は、2 ~ 1 0 の整数を表す)

によって表される構造を有する。

【0 0 4 0】

【4 7】 【4 6】 による一部の実施形態において、 n^5 は、2 ~ 5 の整数である。

【4 8】 【1】 ~ 【4 7】 のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、

 m^2 は、1 又は 2 の整数を表し；

L は、以下の群：

$-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGVA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$
(配列番号 8 5 として開示される「GGVA」)、

$-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$
、

$-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$
、

$-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGVCit}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$
(配列番号 8 8 として開示される「GGVCit」)、

$-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-$
 $-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、

$-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2-$
 $\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$ 、及び

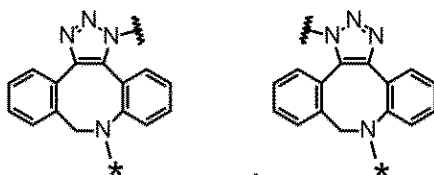
$-\text{Z}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CH}_2\text{C}$
 $\text{H}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{VA}-\text{NH}-\text{B}-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-$

から選択され、式中、

B は、1, 4-フェニル基であり、 Z^1 は、以下の構造式：

【0 0 4 1】

【化 1 7】

を表し、 Z^1 の構造式において、

各アスタリスクは、 Z^1 に隣接する $\text{C}(=\text{O})$ への結合を表し、各波線は、A b の N 2
9 7 グリカンへの結合を表し；

A b は、I g G 抗体を表し；

10

20

30

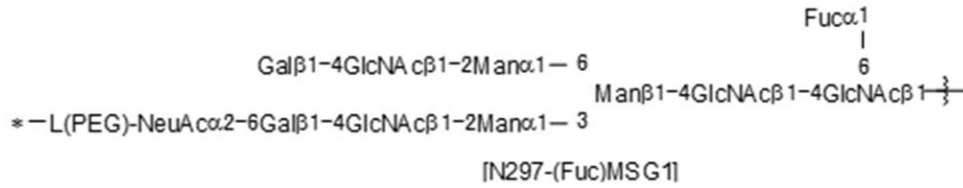
40

50

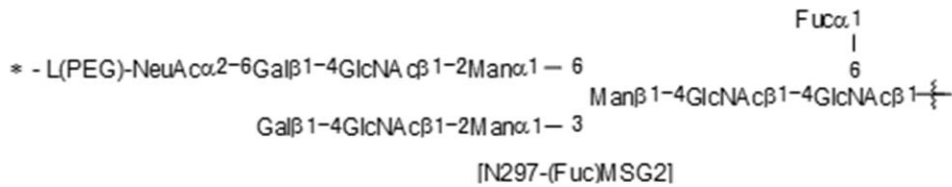
A b の N 2 9 7 グリカン は、N 2 9 7 - (F u c) M S G 1、N 2 9 7 - (F u c) M S G 2、及びそれらの混合物、並びに N 2 9 7 - (F u c) S G のいずれか 1 つを表し、N 2 9 7 - (F u c) M S G 1、N 2 9 7 - (F u c) M S G 2、及び N 2 9 7 - (F u c) S G は、以下の式：

【 0 0 4 2 】

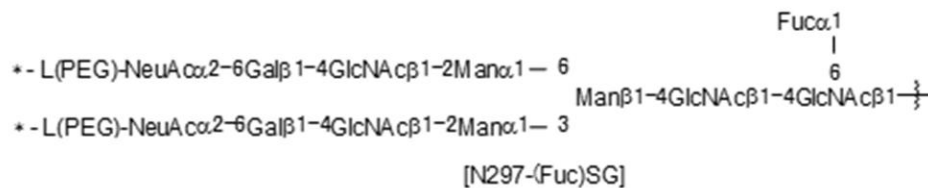
【 化 1 8 】



10



、又は



20

(式 中、

各波線は、抗体の A s n 2 9 7 への結合を表し、

N 2 9 7 グリカンにおける L (P E G) は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_n^5-$ を表し、式中、

n^5 は、2 ~ 5 の整数を表し、左の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける β -M a n の 1 - 3 及び 1 - 6 分岐鎖のそれぞれ又はいずれか 1 つにおける非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており、各アスタリスクは、リンカー L における Z¹ のトリアゾール環の 1 又は 3 位における窒素原子への結合を表す)

30

によって表される構造を有する。

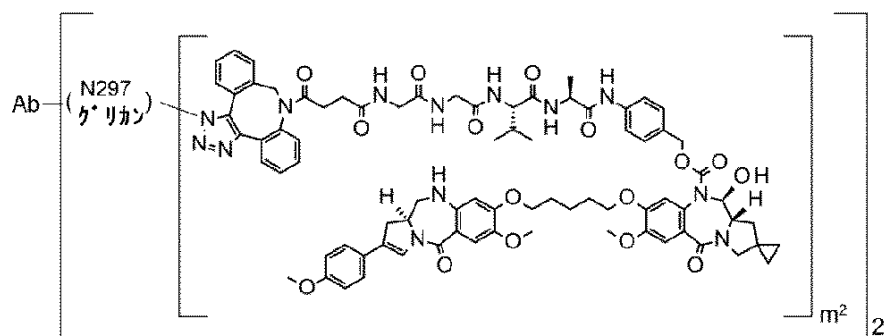
[4 9] 別の態様において、本発明の開示は、以下の群から選択される抗体-薬物コンジュゲートを提供する：

【 0 0 4 3 】

40

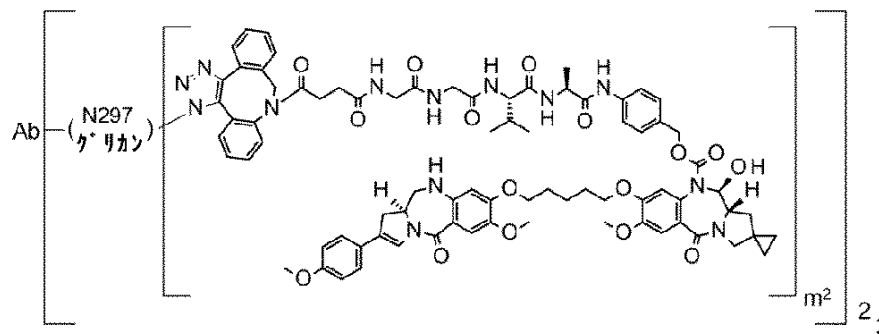
50

【化 1 9 - 1】

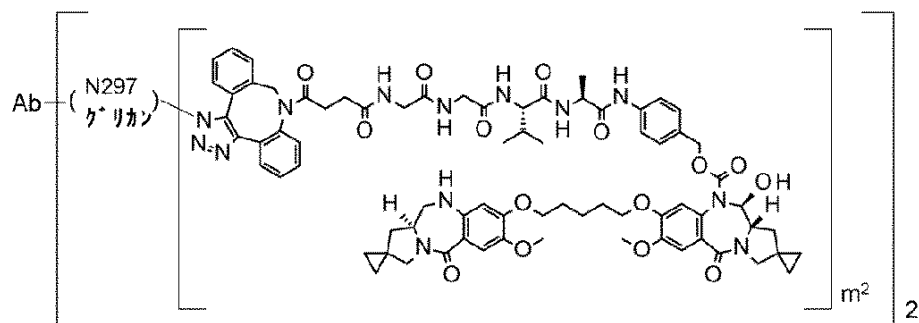


10

又は

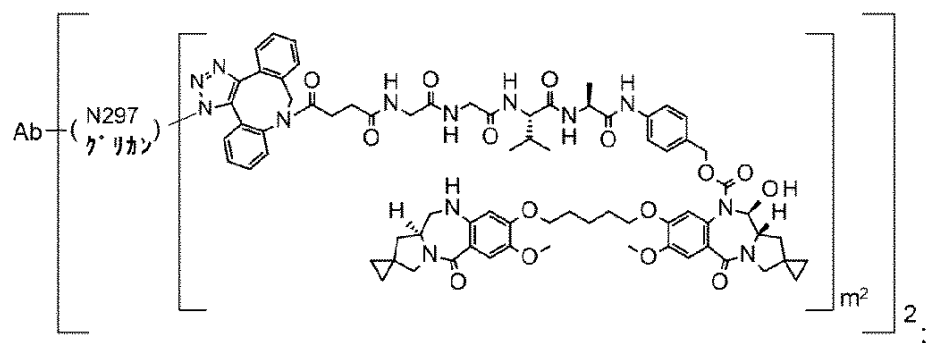


20



又は

30

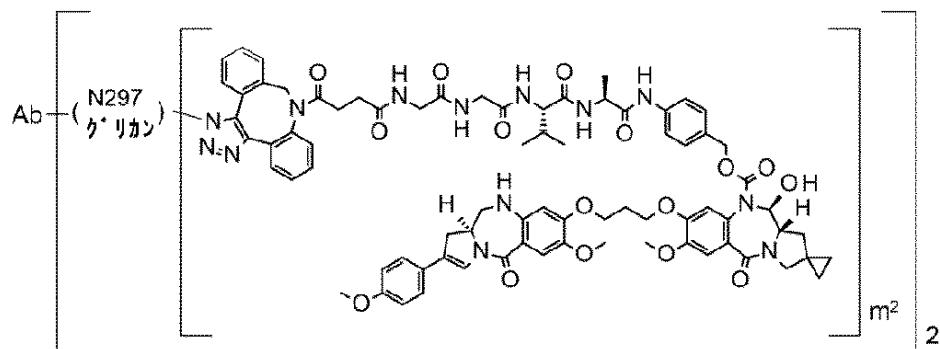


40

【 0 0 4 4】

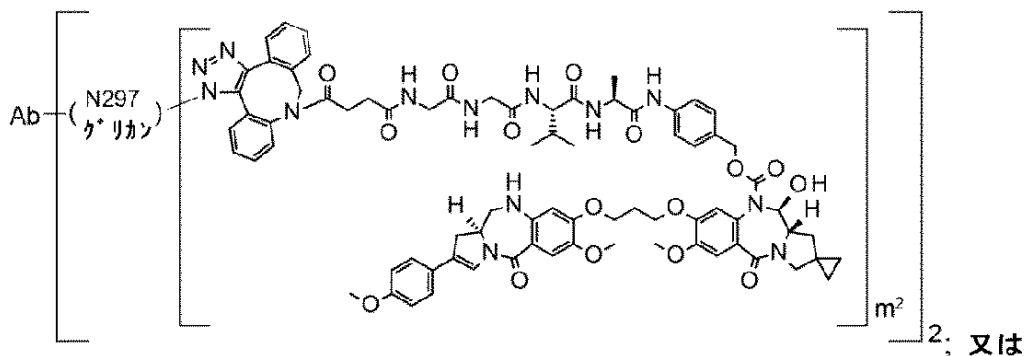
50

【化 19-2】



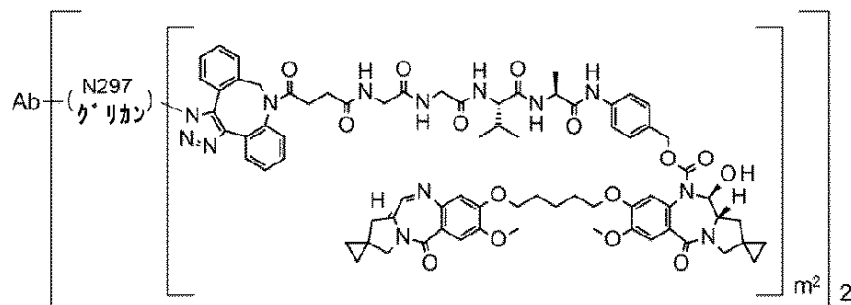
10

又は



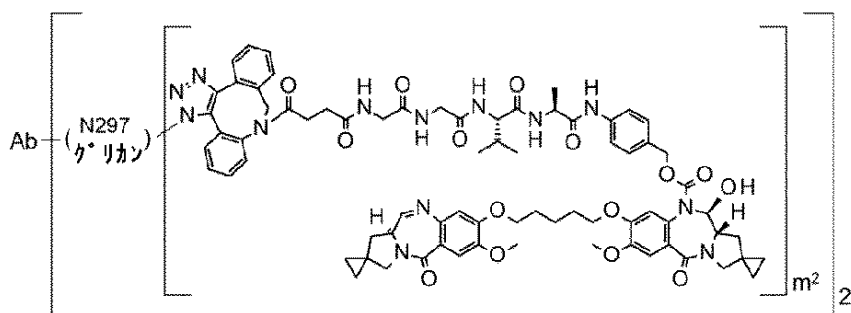
20

; 又は



30

又は



40

【0045】

式中、上記に示される各構造式において、

m^2 は、1 又は 2 の整数を表し；

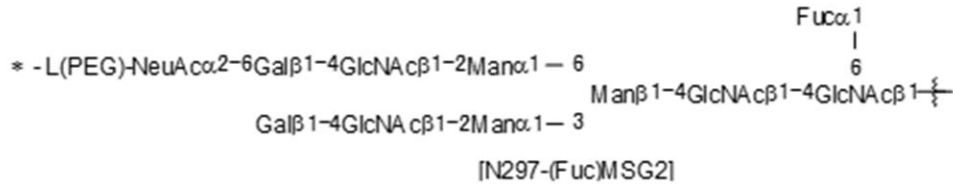
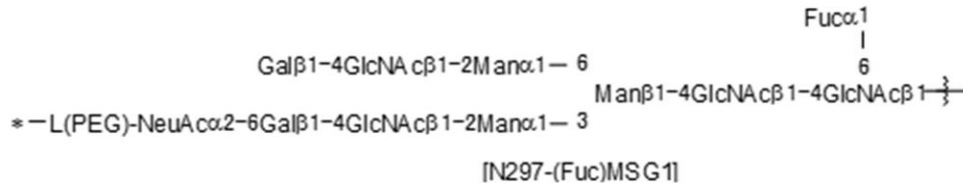
Ab は、抗 D L L 3 I g G 抗体又は当該抗体の機能的な断片を表し；

Ab の N 2 9 7 グリカンは、N 2 9 7 - (F u c) M S G 1、N 2 9 7 - (F u c) M S G 2、及びそれらの混合物、並びに N 2 9 7 - (F u c) S G のいずれか 1 つを表し、N 2 9 7 - (F u c) M S G 1、N 2 9 7 - (F u c) M S G 2、及び N 2 9 7 - (F u c) S G は、以下の式：

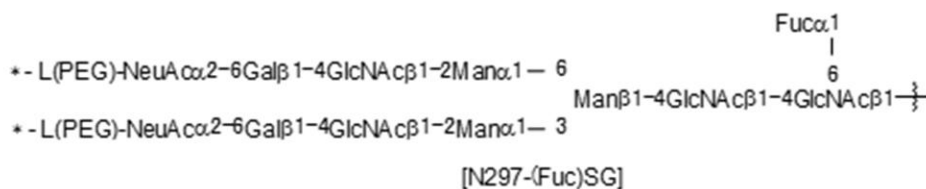
【0046】

50

【化 2 0】



10



, 又は

20

【0047】

(式中、

各波線は、抗体のAsn297への結合を表し、

N297グリカンにおけるL(PEG)は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_3-$ を表し、式中、

左の末端におけるアミノ基は、N297グリカンにおける β -Manの1-3及び1-6分岐鎖のそれぞれ又はいずれか1つにおける非還元末端におけるシアル酸の2位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており、各アスタリスクは、対応する構造式におけるトリアゾール環の1又は3位における窒素原子への結合を表す)

によって表される構造を有する。

30

【0048】

【50】 【49】 による一部の実施形態において、抗体は、ヒトIgG1若しくはそのバリエーション、ヒトIgG2、又はヒトIgG4の重鎖定常領域を含む。

【51】 【49】 による一部の実施形態において、抗体は、配列番号42、57又は58の重鎖定常領域を含む。

【0049】

【52】 【48】 ～ 【51】 のいずれか1つによる一部の実施形態において、抗DLL3抗体は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン(V_H)及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン(V_L)を含み、

(a) V_Hは、

40

(i) それぞれ、配列番号3、配列番号4、及び配列番号5；

(ii) それぞれ、配列番号13、配列番号14、及び配列番号15；

(iii) それぞれ、配列番号23、配列番号24、及び配列番号25；並びに

(iv) それぞれ、配列番号33、配列番号34、及び配列番号35

からなる群から選択されるV_H-CDR1配列、V_H-CDR2配列、及びV_H-CDR3配列を含み；及び／又は

(b) V_Lは、

(i) それぞれ、配列番号8、配列番号9、及び配列番号10；

(ii) それぞれ、配列番号18、配列番号19、及び配列番号20；

(iii) それぞれ、配列番号28、配列番号29、及び配列番号30；並びに

50

(i v) それぞれ、配列番号 38、配列番号 39、及び配列番号 40 からなる群から選択される V_L -CDR1 配列、 V_L -CDR2 配列、及び V_L -CDR3 配列を含む。

【0050】

【53】 【52】 による一部の実施形態において、抗 D L L 3 抗体は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン (V_H) 及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン (V_L) を含み、(a) V_H -CDR1 配列、 V_H -CDR2 配列、及び V_H -CDR3 配列を含む V_H 及び (b) V_L -CDR1 配列、 V_L -CDR2 配列、及び V_L -CDR3 配列を含む V_L の組合せは、
(i) それぞれ、(a) 配列番号 3、配列番号 4、及び配列番号 5 並びに (b) 配列番号 8、配列番号 9、及び配列番号 10；

10

(i i) それぞれ、(a) 配列番号 13、配列番号 14、及び配列番号 15 並びに (b) 配列番号 18、配列番号 19、及び配列番号 20；

(i i i) それぞれ、(a) 配列番号 23、配列番号 24、及び配列番号 25 並びに (b) 配列番号 28、配列番号 29、及び配列番号 30；並びに

(i v) それぞれ、(a) 配列番号 33、配列番号 34、及び配列番号 35 並びに (b) 配列番号 38、配列番号 39、及び配列番号 40 からなる群から選択される。

【0051】

【54】 【49】 ~ 【53】 のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、抗体は、以下の組合せ (1) ~ (4)：

20

(1) 配列番号 7 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 2 の可変ドメイン配列を含む重鎖、

(2) 配列番号 17 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 12 の可変ドメイン配列を含む重鎖、

(3) 配列番号 27 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 22 の可変ドメイン配列を含む重鎖、並びに

(4) 配列番号 37 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 32 の可変ドメイン配列を含む重鎖

からなる群から選択されるいずれか 1 つの組合せで軽鎖及び重鎖を含む抗体であるか、又は当該抗体の機能的な断片である。

30

【0052】

【55】 【54】 による一部の実施形態において、抗体は、配列番号 17 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 12 の可変ドメイン配列を含む重鎖を含む抗体である。

【56】 【54】 による一部の実施形態において、抗体は、配列番号 27 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 22 の可変ドメイン配列を含む重鎖を含む抗体である。

【57】 【54】 による一部の実施形態において、抗体は、配列番号 37 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 32 の可変ドメイン配列を含む重鎖を含む抗体である。

【58】 【54】 による一部の実施形態において、抗体は、配列番号 7 の可変ドメイン配列を含む軽鎖及び配列番号 2 の可変ドメイン配列を含む重鎖を含む抗体である。

40

【59】 【49】 ~ 【58】 のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、抗体は、
(a) 配列番号 59 ~ 61 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 62 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

(b) 配列番号 63 ~ 65 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 66 のアミノ酸配列を含む軽鎖；又は

(c) 配列番号 67 ~ 69 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 70 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0053】

【60】 【49】 ~ 【59】 のいずれか 1 つによる一部の実施形態において、抗体は、

(a) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 62 のアミノ酸配列を含む

50

軽鎖；

(b) 配列番号 65 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 66 のアミノ酸配列を含む軽鎖；又は

(c) 配列番号 69 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 70 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

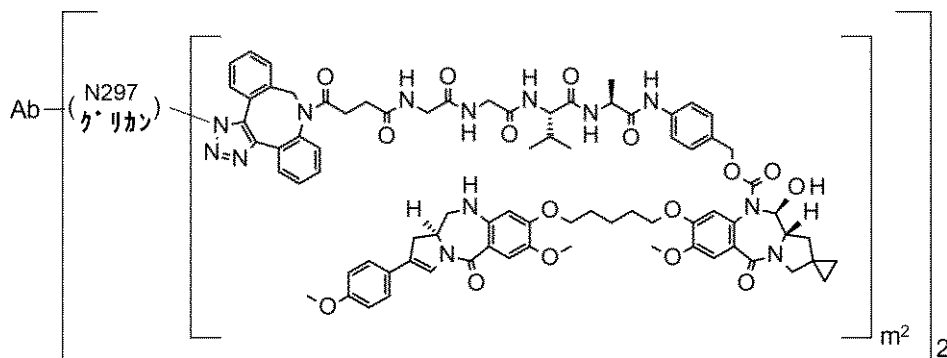
【0054】

【61】 【49】～【60】のいずれか1つによる一部の実施形態において、重鎖又は軽鎖は、N結合型グリコシル化、O結合型グリコシル化、N末端プロセッシング、C末端プロセッシング、脱アミド、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、N末端へのメチオニン残基の付加、プロリン残基のアミド化、重鎖の234位及び235位における2つのロイシン(L)残基のアラニン(A)への置換(EUインデックスに従った)(LALA)、重鎖のアミノ酸残基356位のGlu(E)及び358位のMet(M)のセット(EUインデックスに従った)、重鎖の356位のAsp(D)及び358位のロイシン(L)のセット(EUインデックスに従った)又はそれらのあらゆる組合せ、N末端グルタミン又はN末端グルタミン酸のピログルタミン酸への変換、並びにカルボキシル末端からの1又は2つのアミノ酸の欠失からなる群から選択されるアミノ酸残基の1若しくは2つ又はそれより多くの改変又はセットを有する。

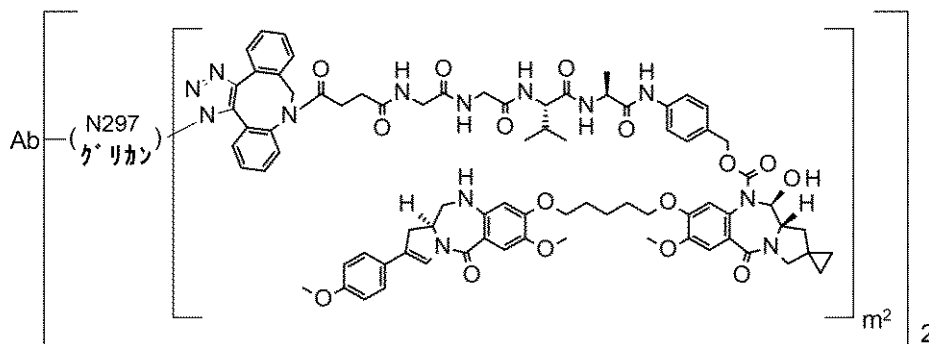
【62】別の態様において、本発明の開示は、以下の式によって表される抗体-薬物コンジュゲートを提供する：

【0055】

【化21】



又は



式中、

m^2 は、1又は2の整数を表し；

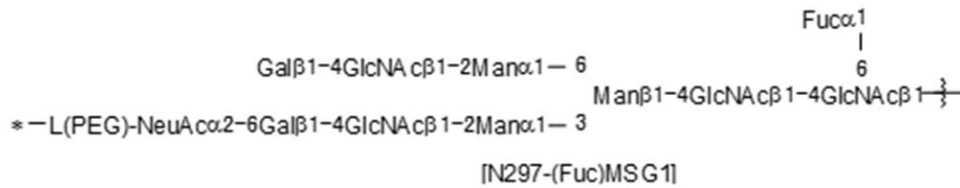
Abは、配列番号 61 のアミノ酸配列の重鎖及び配列番号 62 のアミノ酸配列の軽鎖を含む抗 D L L 3 I g G 抗体を表し；

AbのN297グリカンは、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、及びそれらの混合物、並びにN297-(Fuc)SGのいずれか1つを表し、

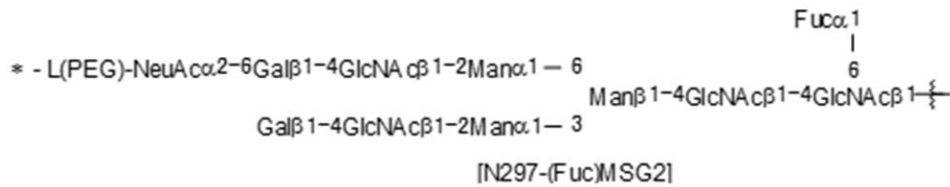
N 2 9 7 - (F u c) M S G 1、N 2 9 7 - (F u c) M S G 2、及び N 2 9 7 - (F u c) S G は、以下の式：

【 0 0 5 6 】

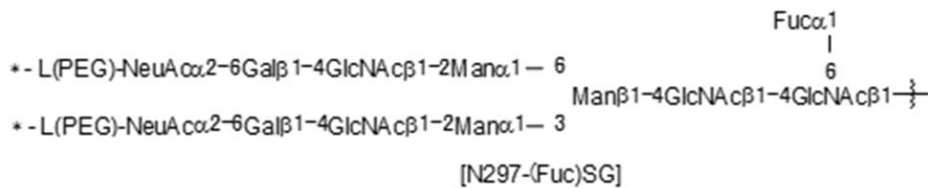
【 化 2 2 】



10



、又は



20

【 0 0 5 7 】

(式中、

各波線は、抗体の A s n 2 9 7 への結合を表し、

N 2 9 7 グリカンにおける L (P E G) は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_3-$ を表し、式中、

左の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける β -M a n の 1-3 及び 1-6 分岐鎖のそれぞれ又はいずれか 1 つにおける非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており、各アスタリスクは、対応する構造式におけるトリアゾール環の 1 又は 3 位における窒素原子への結合を表す)

30

によって表される構造を有する。

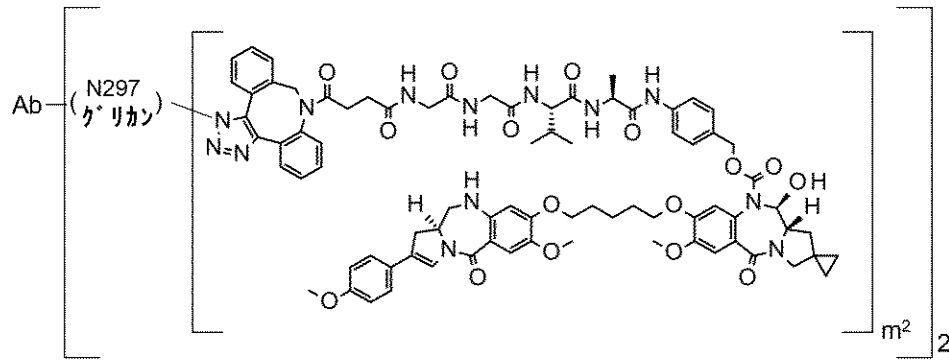
〔 6 3 〕 別の態様において、本発明の開示は、以下の式によって表される抗体-薬物コンジュゲートを提供する：

【 0 0 5 8 】

40

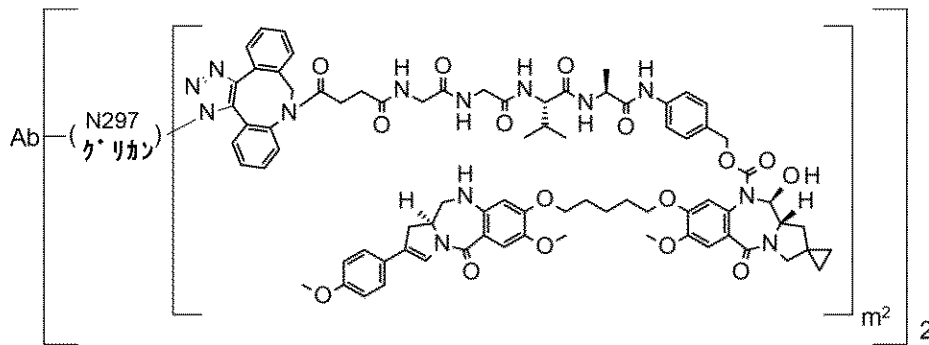
50

【化 2 3】



10

又は



20

(式中、

 m^2 は、1又は2の整数を表し；

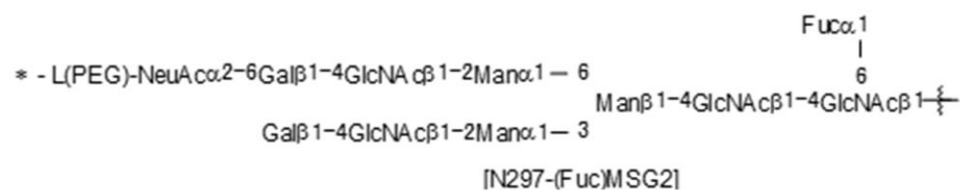
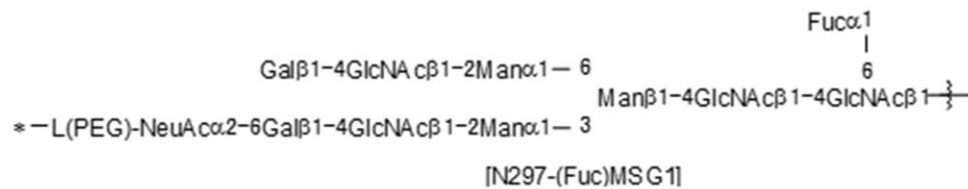
Abは、配列番号65のアミノ酸配列の重鎖及び配列番号66のアミノ酸配列の軽鎖を含む抗DLL3IgG抗体を表し；

AbのN297グリカンは、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、及びそれらの混合物、並びにN297-(Fuc)SGのいずれか1つを表し、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、及びN297-(Fuc)SGは、以下の式：

30

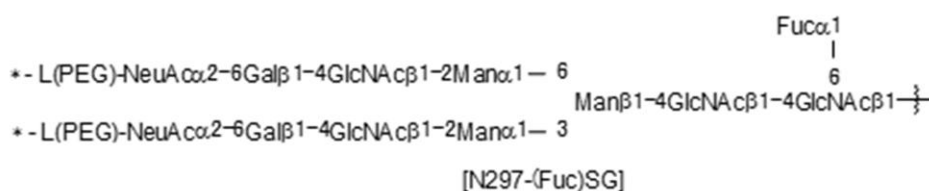
【0059】

【化 2 4】



40

、又は



50

【0060】

(式中、

各波線は、抗体のAsn297への結合を表し、

N297グリカンにおけるL(PEG)は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_3-$ を表し、式中、

左の末端におけるアミノ基は、N297グリカンにおける β -Manの1-3及び1-6分岐鎖のそれぞれ又はいずれか1つにおける非還元末端におけるシアル酸の2位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており、各アスタリスクは、対応する構造式におけるトリアゾール環の1又は3位における窒素原子への結合を表す)

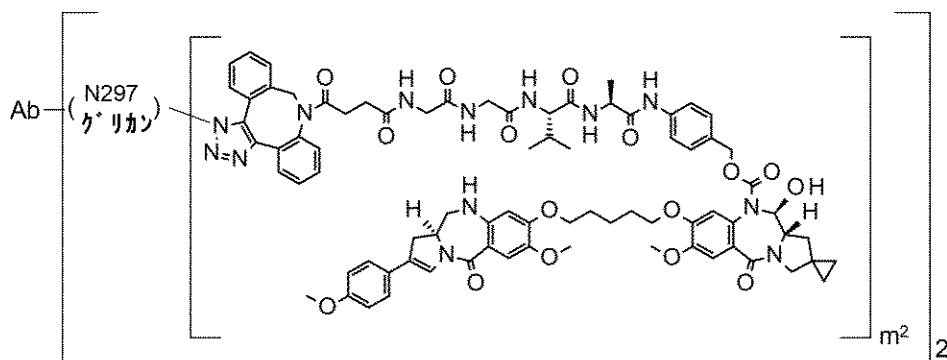
によって表される構造を有する。

10

〔64〕別の態様において、本発明の開示は、以下の式によって表される抗体-薬物コンジュゲートを提供する：

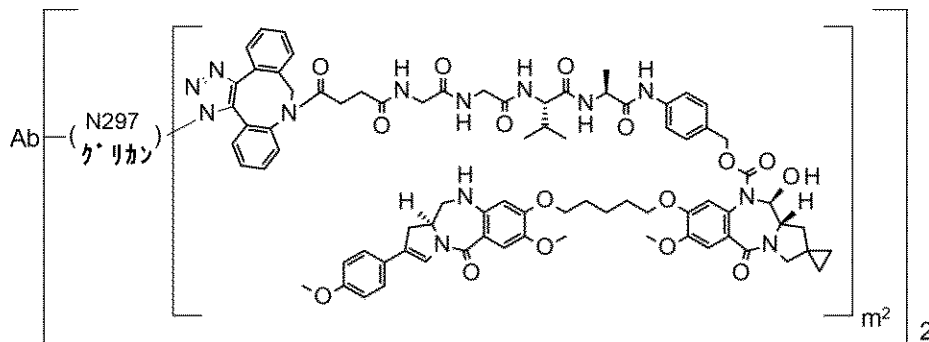
【0061】

【化25】



20

又は



30

(式中、

 m^2 は、1又は2の整数を表し；

Abは、配列番号69のアミノ酸配列の重鎖及び配列番号70のアミノ酸配列の軽鎖を含む抗DLL3IgG抗体を表し；

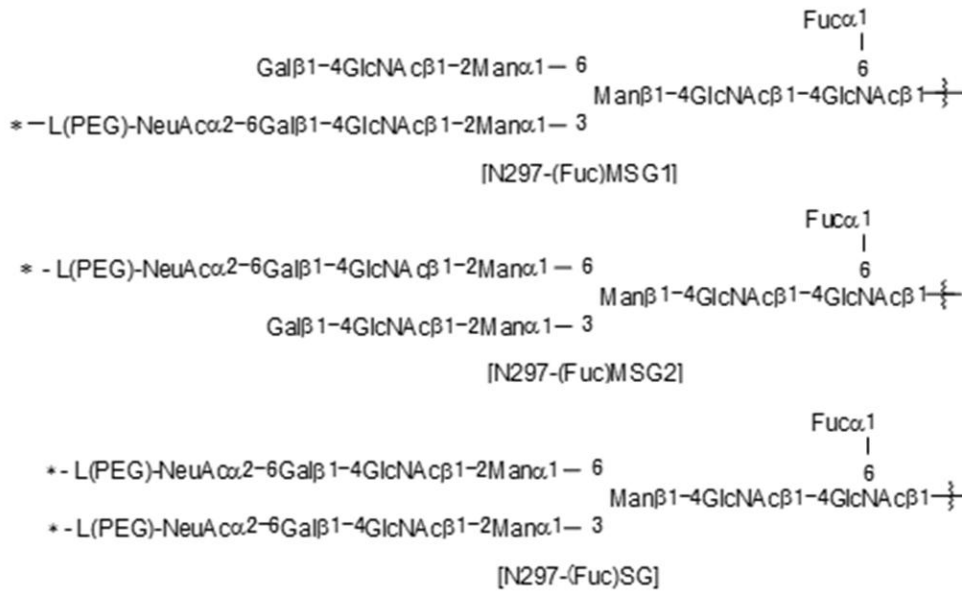
40

AbのN297グリカンは、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、及びそれらの混合物、並びにN297-(Fuc)SGのいずれか1つを表し、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、及びN297-(Fuc)SGは、以下の式：

【0062】

50

【化 2 6】



10

, 又は

(式中、

各波線は、抗体のAsn297への結合を表し、

N297グリカンにおけるL(PEG)は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_3-$ を表し、式中、

左の末端におけるアミノ基は、N297グリカンにおける β -Manの1-3及び1-6分岐鎖のそれぞれ又はいずれか1つにおける非還元末端におけるシアル酸の2位でのアミド結合を介してカルボン酸に結合されており、各アスタリスクは、対応する構造式におけるトリアゾール環の1又は3位における窒素原子への結合を表す)によって表される構造を有する。

【0063】

【65】別の態様において、本発明の開示は、[1]～[64]のいずれか1つに記載の抗体-薬物コンジュゲートを含む医薬組成物、その塩、又はコンジュゲート若しくは塩の水和物を提供する。

【66】【65】による一部の実施形態において、医薬組成物は、抗腫瘍薬である。

【67】【65】又は【66】による一部の実施形態において、医薬組成物は、腫瘍を処置することにおける使用のためのものであり、腫瘍は、DLL3を発現する腫瘍である。

【68】【66】又は【67】による一部の実施形態において、腫瘍は、小細胞肺癌(SCLC)；大細胞神経内分泌癌(LCNEC)；腎臓、尿生殖路(膀胱、前立腺、卵巣、子宮頸、及び子宮内膜)、消化管(胃、結腸)、甲状腺(甲状腺髄様がん)、脾臓及び肺を含む様々な組織の神経内分泌腫瘍；神経膠腫；又は偽性神経内分泌腫瘍(pseudoneuroendocrine tumor；pNET)である。

【0064】

【69】別の態様において、本発明の開示は、グリカンがリモデリングされた抗体を作製するための方法であって、

i) 抗DLL3抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養し、得られた培養物から標的化された抗体を収集する工程；

ii) 工程i)で得られた抗体をヒドロラーゼで処置して、(Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗体を作製する工程；及び

iii) -1 トランスグリコシダーゼの存在下で、グリカンドナー分子及び(Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗体を反応させる工程であって、グリカンドナー分子は、アジド基を有するPEGリンカーを、MSG(9)又はSG(10)中のシアル酸の2位にお

20

30

40

50

けるカルボン酸のカルボニル基に導入し、還元末端をオキサゾリン化することにより得られる、工程、又は

i i i) - 2 トランスグリコシダーゼの存在下で、(Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗体及びグリカンドナー分子を反応させる工程であって、グリカンドナー分子は、アジド基を有するPEGリンカーを、 α -アミノ基が保護されていてもよい(MSG-)Asn又は(SG-)Asn中のシアル酸の2位におけるカルボン酸のカルボニル基及びAsn中のカルボン酸のカルボニル基に導入し、ヒドロラーゼの作用を引き起こし、次いで還元末端をオキサゾリン化することにより得られる、工程を含む方法を提供する。

【0065】

[70] [69] による一部の実施形態において、方法は、工程i i)における反応溶液をヒドロキシアパタイトカラムで精製することによって(Fuc α 1, 6)GlcNAc-抗体を精製する工程をさらに含む。

[71] 別の態様において、本発明の開示は、[1] ~ [64] のいずれか1つに記載の抗体-薬物コンジュゲート形態を作製するための方法であって、

i) [69] 又は[70]に記載の方法を使用することによって、グリカンがリモデリングされた抗体を作製する工程；及び

i i) DBCOを有する薬物リンカー及び工程i)で作製されたグリカンがリモデリングされた抗体のグリカン中のアジド基を反応させる工程を含む方法を提供する。

[72] 別の態様において、本発明の開示は、[69] 又は[70]に記載の方法を使用することによって得られたグリカンがリモデリングされた抗体を提供する。

【0066】

[73] 別の態様において、本発明の開示は、[71]に記載の方法を使用することによって得られた抗体-薬物コンジュゲートを提供する。

[74] 別の態様において、本発明の開示は、腫瘍を処置するための方法であって、[1] ~ [64] のいずれか1つに記載の抗体-薬物コンジュゲート、当該抗体-薬物コンジュゲートの塩、又は当該抗体-薬物コンジュゲート若しくは塩の水和物を、腫瘍を有する個体に投与することを含む方法を提供する。

[75] 別の態様において、本発明の開示は、腫瘍を処置するための方法であって、[1] ~ [64] のいずれか1つに記載の抗体-薬物コンジュゲート、その塩、及びコンジュゲート又は塩の水和物から選択される少なくとも1つの成分、並びに少なくとも1つの抗腫瘍薬を含む医薬組成物を、同時に、別々に、又は連続的に個体に投与することを含む方法を提供する。

【0067】

[76] [74] 又は[75]による一部の実施形態において、腫瘍は、DLL3を発現する腫瘍である。

[77] [74] ~ [76] のいずれか1つによる一部の実施形態において、腫瘍は、小細胞肺癌(SCLC)、大細胞神経内分泌癌(LCNEC)、腎臓、尿生殖路(膀胱、前立腺、卵巣、子宮頸、及び子宮内膜)、消化管(胃、結腸)、甲状腺(甲状腺髄様がん)、膵臓及び肺を含む様々な組織の神経内分泌腫瘍、神経膠腫又は偽性神経内分泌腫瘍(pNET)である。

発明の有利な作用：本発明によって提供される新規の抗DLL-3抗体-ピロロベンゾジアゼピン(PBD)誘導体コンジュゲートは、抗腫瘍活性及び安全性において優れており、したがって抗腫瘍剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】本発明の薬物-コンジュゲート形態((I)の分子)の概略図である。(a)は、薬物Dを示し、(b)は、リンカーLを示し、(c)は、N₃-L(PEG)-を示し、(d)は、N297グリカン(白抜きの楕円：NeuAc(Sia)、白抜きの六角形

10

20

30

40

50

：ヒト、黒い六角形：G l c N A c、白抜きひし形：G a l、白抜きの逆三角形：F u c)を示す。(b)及び(c)は、一緒に組み合わせられて、(c)のアジド基(黒いティアドロップ形の形状)と、(b)のスペーサー(白抜きの半円)との反応によりトリアゾール環を形成する。Y字型の図形は、抗体A bを表す。便宜上、この概略的な図形において、N 2 9 7グリカンは、N 2 9 7-(F u c)M S Gとして示され、この図形は、N 2 9 7グリカンのそれぞれにおける2つの分岐のどちらか一方が、アジド基を有するP E Gリンカー(N₃-L(P E G)-)が結合するシアル酸を有し、他方の分岐は、非還元末端にシアル酸を有さない実施形態(すなわちN 2 9 7-(F u c)M S G)を示すが、N 2 9 7グリカンの2つの分岐のそれぞれが、非還元末端にアジド基を有するP E Gリンカーが結合するシアル酸を有する別の実施形態(すなわちN 2 9 7-(F u c)S G)も許容できる。別段の指定がない限り、このような図解の方式は、本明細書にわたり適用される。

10

【図2】本発明の薬物-コンジュゲート形態の生成中間体である(F u c α 1, 6)G l c N A c-抗体(図2の(I I)におけるAの分子)、及びM S G型のグリカンがリモデリングされた抗体(図2のBにおける(I I I)の分子)の構造を例示する概略的な図解である。図形のそれぞれにおいて、Y字型の図形は、図1の場合と同様に抗体A bを表す。図2のAにおいて、(e)は、αグリコシド結合を介してF u cの1位に接続された6位におけるG l c N A cのみからなるN 2 9 7グリカンを示す。図2のBにおいて、(d)は、図1に記載のものと同じN 2 9 7グリカンを示し、(f)は、アジド基、具体的には、末端のリンカーLに結合させるためのアジド基を有するP E Gリンカー部分の構造を示す。アジド基を有するP E Gリンカーの結合様式は、図1に関して記載された通りである。

20

【図3】動物細胞で作製された抗体からM S G型のグリカンがリモデリングされた抗体を作製する工程の概略図である。図2の場合と同様に、この図における分子(I I)及び(I I I)は、それぞれ(F u c α 1, 6)G l c N A c-抗体及びM S G型のグリカンがリモデリングされた抗体を表す。分子(I V)は、動物細胞で作製された抗体であり、不均一なN 2 9 7グリカン部分を有する分子の混合物である。図3Aは、E n d o Sなどのヒドロラーゼで(I V)の不均一なN 2 9 7グリカン部分を処理することによって均一な(F u c α 1, 6)G l c N A c-抗体(I I)を作製する工程を例示する。図3Bは、抗体(I I)中のN 2 9 7グリカンのG l c N A cをE n d o S D 2 3 3 Q/Q 3 0 3 Lバリエーションなどのトランスグリコシダーゼに曝して、M S G型グリカンドナー分子のグリカンをトランスグリコシル化することによって、(I I I)のM S G型のグリカンがリモデリングされた抗体を作製する工程を例示する。ここで使用されるM S G型グリカンドナー分子は、アジド基を有するP E Gリンカーで改変されたM S Gの非還元末端にシアル酸を有する。したがって、得られたM S G型のN 2 9 7グリカンがリモデリングされた抗体は、図2Bに記載されたのと同じ方式で改変された非還元末端にシアル酸も有する。便宜上、図3Bは、M S Gをドナー分子として示す。しかしながら、アジド基を有するリンカー分子がN 2 9 7グリカンの各非還元末端に結合しているグリカンがリモデリングされた抗体も、グリカンドナーとしてS G(10)を使用することによって、(I I I)のリモデリングされた抗体として合成することができる。

30

40

【図4A】それぞれ配列番号55及び配列番号50として表されたヒト(H o m o s a p i e n s)デルタ様の正規のN o t c hリガンド3(D L L 3)アイソフォーム1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。

【図4B】それぞれ配列番号56及び配列番号51として表されたヒトデルタ様の正規のN o t c hリガンド3(D L L 3)アイソフォーム2のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。

【図5A】それぞれ配列番号1及び配列番号2として表された抗体7-I 1-BのV_Hドメインのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。V_H C D R 1(配列番号3)は、ボールド体のフォントで示され、V_H C D R 2(配列番号4)は、下線で示され、V_H C D R 3(配列番号5)は、イタリックの下線付きのフォントで示される。

50

【図 5 B】それぞれ配列番号 6 及び配列番号 7 として表された抗体 7-I 1-B の V_L ドメインのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。 V_L CDR 1 (配列番号 8) は、ボールド体のフォントで示され、 V_L CDR 2 (配列番号 9) は、下線で示され、 V_L CDR 3 (配列番号 10) は、イタリックの下線付きのフォントで示される。

【図 6 A】それぞれ配列番号 11 及び配列番号 12 として表された抗体 2-C 8-A の V_H ドメインのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。 V_H CDR 1 (配列番号 13) は、ボールド体のフォントで示され、 V_H CDR 2 (配列番号 14) は、下線で示され、 V_H CDR 3 (配列番号 15) は、イタリックの下線付きのフォントで示される。

【図 6 B】それぞれ配列番号 16 及び配列番号 17 として表された抗体 2-C 8-A の V_L ドメインのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。 V_L CDR 1 (配列番号 18) は、ボールド体のフォントで示され、 V_L CDR 2 (配列番号 19) は、下線で示され、 V_L CDR 3 (配列番号 20) は、イタリックの下線付きのフォントで示される。

【図 7 A】それぞれ配列番号 21 及び配列番号 22 として表された抗体 10-O 18-A の V_H ドメインのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。 V_H CDR 1 (配列番号 23) は、ボールド体のフォントで示され、 V_H CDR 2 (配列番号 24) は、下線で示され、 V_H CDR 3 (配列番号 25) は、イタリックの下線付きのフォントで示される。

【図 7 B】それぞれ配列番号 26 及び配列番号 27 として表された抗体 10-O 18-A の V_L ドメインのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。 V_L CDR 1 (配列番号 28) は、ボールド体のフォントで示され、 V_L CDR 2 (配列番号 29) は、下線で示され、 V_L CDR 3 (配列番号 30) は、イタリックの下線付きのフォントで示される。

【図 8 A】それぞれ配列番号 31 及び配列番号 32 として表された抗体 6-G 23-F の V_H ドメインのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。 V_H CDR 1 (配列番号 33) は、ボールド体のフォントで示され、 V_H CDR 2 (配列番号 34) は、下線で示され、 V_H CDR 3 (配列番号 35) は、イタリックの下線付きのフォントで示される。

【図 8 B】それぞれ配列番号 36 及び配列番号 37 として表された抗体 6-G 23-F の V_L ドメインのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す図である。 V_L CDR 1 (配列番号 38) は、ボールド体のフォントで示され、 V_L CDR 2 (配列番号 39) は、下線で示され、 V_L CDR 3 (配列番号 40) は、イタリックの下線付きのフォントで示される。

【図 9】指定された抗体による D L L 3 の内在化をアッセイするために実行された細胞傷害性ベースの内在化アッセイである F a b Z A P アッセイの結果を示す図である。参照 D L L 3 モノクローナル抗体 S C 16 を、陽性対照として使用した。W O 2 0 1 5 1 2 7 4 0 7 を参照されたい。全ての試験した抗 D L L 3 抗体は、参照モノクローナル抗体に匹敵する殺滅活性を呈した。遊離の抗 D L L 3 が F a b Z A P に関して細胞に結合した抗 D L L 3 と競合したため、より高い濃度の抗 D L L 3 抗体でフック効果が観察された。

【図 10】図 10 A ~ 10 D は、結合緩衝剤として P B S 0.1% B S A 0.02% T w e e n 2 0、及び再生緩衝剤として 10 mM グリシン pH 1.7 を使用して、25°C で O c t e t H T X を介して測定した場合の、抗体 7-I 1-B (図 10 A)、6-G 23-F (図 10 B)、10-O 18-A (図 10 C)、及び 2-C 8-A (図 10 D) の結合曲線を示す図である。モノクローナル抗体 (各 5 μ g/mL) を、抗マウス F c センサー上にローディングし、ローディングされたセンサーを、7 回の連続する 1:3 希釈での 200 nM の開始濃度の組換えヒト D L L 3 タンパク質 (アミノ酸 A l a 27 ~ A l a 479、カタログ番号 9749-D L、R & D S y s t e m s) の指定された希釈物に浸漬した。各 D L L 3 希釈物につき、実際の測定及び曲線のフィットが示される。図 10 E は、本明細書に記載される 4 つのモノクローナル抗体 (6-G 23-F、2-C 8-

10

20

30

40

50

A、7-I1-B及び10-O18-A)の解離定数(K_D)の値を示し、これらは、図2A~2Dに示される結合曲線を使用し、1価(1:1)結合モデルを適用して計算された。

【図11】6-G23-F、10-O18-A、及び2-C8-Aモノクローナル抗体(mAb)が、DLL3と選択的に結合するが、DLL1又はDLL4と選択的に結合しないことを示す図である。7-I1-B mAbは、DLL3及びDLL4の両方と結合するが、DLL1と結合しない。

【図12】以下のセクションVI(E)に記載される「スキームR：抗体の調製」の反応スキームを示す図である。

【図13】H2-C8-Aのグリカンリモデリングスキームを示す図13(Fig. 13)は、。

【図14】H6-G23-Fのグリカンリモデリングスキームを示す図である。

【図15】H10-O18-Aのグリカンリモデリングスキームを示す図である。

【図16】H2-C8-A ADCを調製するための合成工程を示す図である。

【図17】H6-G23-F ADCを調製するための合成工程を示す図である。

【図18】H10-O18-A ADCを調製するための合成工程を示す図である。

【図19】3種のヒト抗DLL3-薬物抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-コンジュゲート、H6-G23-F-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート)、又は抗LPS抗体-コンジュゲートのインビボの抗腫瘍作用を示す図である。評価は、DLL3陽性ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H209を免疫不全マウスに接種した動物モデルを使用して実行された。横座標は、接種後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、標準誤差(SE)値を示す。矢印は、投与の日付を示す。

【図20】3種のヒト抗DLL3抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-コンジュゲート、H6-G23-F-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート)、又は抗LPS抗体-コンジュゲートのインビボの抗腫瘍作用を示す図である。評価は、DLL3陽性ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H524を免疫不全マウスに接種した動物モデルを使用して実行された。横座標は、接種後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、標準誤差(SE)値を示す。矢印は、投与の日付を示す。

【図21】3種のヒト抗DLL3抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-コンジュゲート、H6-G23-F-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート)、又は抗DLL3抗体-薬物コンジュゲート(SC16LD6.5)のインビボの抗腫瘍作用を示す図である。評価は、DLL3陽性ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H510Aを免疫不全マウスに接種した動物モデルを使用して実行された。横座標は、接種後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、標準誤差(SE)値を示す。矢印は、投与の日付を示す。

【図22】H2-C8-A-3のグリカンリモデリングスキームを示す図である。

【図23】H10-O18-A-3のグリカンリモデリングスキームを示す図である。

【図24】H2-C8-A-3 ADCを調製するための合成工程を示す図である。

【図25】H10-O18-A-3 ADCを調製するための合成工程を示す図である。

【図26】2種のヒト抗DLL3抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-3-コンジュゲート、H10-O18-A-3-コンジュゲート)、抗DLL3抗体-薬物コンジュゲート(SC16LD6.5)、又は抗LPS抗体-コンジュゲートのインビボの抗腫瘍作用を示す図である。評価は、DLL3陽性ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H510Aを免疫不全マウスに接種した動物モデルを使用して実行された。横座標は、投与後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、標準誤差(SE)値を示す。

【図27】2種のヒト抗DLL3抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-3-コンジュゲート、H10-O18-A-3-コンジュゲート)のインビボの抗腫瘍作用を示す図である。評価は、DLL3陽性ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H209を免疫不全マ

ウスに接種した動物モデルを使用して実行された。横座標は、投与後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、標準誤差（S E）値を示す。

【図 28】2 種のヒト抗 D L L 3 抗体－薬物コンジュゲート（H 2－C 8－A－3－コンジュゲート、H 10－O 18－A－3－コンジュゲート）、抗 D L L 3 抗体－薬物コンジュゲート（S C 16 L D 6 . 5）、又は抗 L P S 抗体－コンジュゲートのインビボの抗腫瘍作用を示す図である。評価は、D L L 3 陽性ヒト小細胞肺癌細胞株 N C I－H 8 2 を免疫不全マウスに接種した動物モデルを使用して実行された。横座標は、投与後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、標準誤差（S E）値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0069】

本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、腫瘍細胞を認識するか又はそれに結合することが可能な抗体にリンカー構造部分を介して抗腫瘍化合物がコンジュゲートされた抗腫瘍薬である。

【0070】

本発明の技術の実質的な理解を提供するために、本発明の技術の特定の態様、様式、実施形態、バリエーション及び特徴が様々な詳細のレベルで後述されることが理解されるものとする。

【0071】

本発明の技術を実施することにおいて、分子生物学、タンパク質生化学、細胞生物学、免疫学、微生物学及び組換え D N A における多くの従来の技術が使用される。例えば、S ambrook and Russell eds. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; the series Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) PCR 1: A Practical Approach (IR L Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) PCR 2: A Practical Approach; Harlow and Lane eds. (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th edition; Gait ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; 米国特許第 4, 683, 195 号; Hames and Higgins eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins eds. (1984) Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); 及び Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology を参照されたい。ポリペプチド遺伝子発現生成物のレベル（すなわち、遺伝子翻訳レベル）を検出及び測定する方法は、当業界において周知であり、抗体検出及び定量化技術などのポリペプチド検出方法の使用を含む。（Strachan & Read, Human Molecular Genetics, Second Edition. (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1999) も参照）。

以下、図面を参照しながら本発明を行うための好ましい実施形態を記載する。後述される実施形態は単に本発明の代表的な実施形態を例示したにすぎず、本発明の範囲は、これらの例によって狭義に解釈されないものとすることに留意されたい。

【0072】

I. 定義

本発明の説明において、用語「がん」は、用語「腫瘍」の意味と同じ意味を有するものとして使用される。

本発明の説明において、用語「遺伝子」は、D N A だけでなくその m R N A 及び c D N

10

20

30

40

50

A、並びにそれらのcRNAを含むものとして使用される。

本発明の説明において、用語「ポリヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」は、核酸の意味と同じ意味を有するものとして使用され、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含む。本発明の説明において、用語「ポリヌクレオチド」及び「ヌクレオチド」は、別段の規定がない限り、互いに同義的に使用することができる。

本発明の説明において、用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、互いに同義的に使用することができる。

本発明の説明において、用語「細胞」は、個々の動物の細胞、及び培養細胞を含む。

【0073】

本発明の説明において、用語「DLL3」は、DLL3タンパク質の意味と同じ意味を有するものとして使用することができる。本発明の説明において、ヒトDLL3はまた、「hDLL3」とも称される。

本発明の説明において、用語「細胞傷害活性」は、何らかの所与の方法で細胞に病理学的な変化をもたらされることを意味するものとして使用される。この用語は、直接の外傷を意味するだけでなく、細胞にもたらされる全てのタイプの構造的又は機能的なダメージも意味し、例えばDNA切断、塩基二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置へのダメージ、及び様々な種類の酵素の活性の低減が挙げられる。

【0074】

本発明の説明において、語句「細胞において毒性を発揮すること」は、毒性が何らかの所与の方法で細胞において呈されることを意味するものとして使用される。この用語は、直接の外傷を意味するだけでなく、細胞にもたらされる全てのタイプの構造的、機能的、又は代謝的な影響も意味し、例えばDNA切断、塩基二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置へのダメージ、様々な種類の酵素の活性の低減、及び細胞増殖因子の作用の抑制も意味する。

【0075】

本発明の説明において、用語「抗体の機能的な断片」は、「抗体の抗原結合断片」とも呼ばれ、これは、抗原に対する結合活性を有する抗体の部分的な断片を意味するのに使用され、抗体断片から形成された、Fab、F(ab')₂、scFv、ダイアボディ、線状抗体及び多重特異性抗体などを含む。Fab'は、還元条件下でF(ab')₂を処理することにより得られた抗体可変領域の1価断片であり、これも抗体の抗原結合断片に含まれる。しかしながら、抗体の抗原結合断片は、抗原結合断片が抗原と結合する能力を有する限り、これらの分子に限定されない。これらの抗原結合断片としては、抗体タンパク質の全長分子を適切な酵素で処理することにより得られるものだけでなく、遺伝子操作された抗体遺伝子を使用して適切な宿主細胞で作製されたタンパク質も挙げられる。

【0076】

本発明の説明において、用語「エピトープ」は、特異的な抗DLL3抗体が結合するDLL3の部分的なペプチド又は部分的な3次元構造を意味するのに使用される。このようなエピトープは、上述したDLL3の部分的なペプチドであり、当業者に周知の方法、例えばイムノアッセイによって決定することができる。最初に、抗原の様々な部分的な構造が作製される。このような部分的な構造の作製に関して、公知のオリゴペプチド合成技術を適用することができる。例えば、DLL3がそのC末端又はN末端から適切な長さで連続的に短縮化された一連のポリペプチドは、当業者に周知の遺伝子組換え技術によって作製される。その後、このようなポリペプチドに対する抗体の反応性を研究して、認識部位がおおまかに決定される。その後、さらにより短いペプチドを合成し、次いでこれらのペプチドに対するそれらの反応性を、エピトープが決定されるように研究することができる。複数の細胞外ドメインを有する膜タンパク質に結合する抗体が、エピトープとして複数のドメインで構成される3次元構造に対するものである場合、抗体が結合するドメインは、特異的な細胞外ドメインのアミノ酸配列を改変し、それによって3次元構造を改変することによって決定することができる。エピトープは、特異的な抗体に結合する抗原の部分的な3次元構造であり、これもまた、X線構造分析によって抗体に隣接する抗原のアミノ

10

20

30

40

50

酸残基を特定することによって決定することができる。

【0077】

本発明の説明において、「ヒト化抗体」は、ヒト抗体鎖からの可変領域フレームワーク残基を含む少なくとも1つの鎖及び非ヒト抗体（例えば、マウス）からの少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含む抗体を指す。

用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用される場合、ヒト免疫グロブリン配列由来の可変及び定常領域を有する抗体を含むことが意図される。しかしながら、用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用される場合、マウスなどの別の哺乳類種由来のCDR配列がヒトフレームワーク配列上にグラフト化された抗体を含むことは意図されない。

【0078】

本発明の説明において、語句「同じエピトープに結合する抗体」は、共通のエピトープに結合する抗体を意味するのに使用される。第2の抗体が、第1の抗体が結合する部分的なペプチド又は部分的な3次元構造に結合する場合、第1の抗体及び第2の抗体は同じエピトープに結合すると決定することができる。代替として、第2の抗体が、第1の抗体の抗原への結合に関して第1の抗体と競合すること（すなわち、第2の抗体が第1の抗体の抗原への結合に干渉する）を確認することによって、エピトープの特異的な配列又は構造が決定されていないとしても、第1の抗体及び第2の抗体は同じエピトープと結合すると決定することができる。本発明の説明において、語句「同じエピトープに結合する」は、これらの決定方法のどちらか一方又は両方によって第1の抗体及び第2の抗体が共通のエピトープに結合すると決定されるケースを指す。第1の抗体及び第2の抗体が同じエピトープに結合し、さらに第1の抗体が、抗腫瘍活性又は内在化活性などの特殊な作用を有する場合、第2の抗体は、第1の抗体の活性と同じ活性を有することを期待することができる。

【0079】

本発明の説明において、用語「CDR」は、相補性決定領域を意味するのに使用される。抗体分子の重鎖及び軽鎖はそれぞれ3つのCDRを有することが公知である。このようなCDRは高度可変領域とも称され、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域に配置される。これらの領域は、特に高度に可変性の一次構造を有し、重鎖及び軽鎖のそれぞれにおいて、ポリペプチド鎖の一次構造で3つの部位に分かれている。本発明の説明において、抗体のCDRに関して、重鎖のCDRは、重鎖のアミノ酸配列のアミノ末端側から、それぞれCDRH1、CDRH2及びCDRH3と称され、それに対して軽鎖のCDRは、軽鎖のアミノ酸配列のアミノ末端側から、それぞれCDRL1、CDRL2及びCDRL3と称される。これらの部位は、3次元構造において互いに近接して配置され、抗体が結合する抗原への抗体の特異性を決定する。

【0080】

用語「CDRグラフト化抗体」は、本明細書で使用される場合、「アクセプター」抗体の少なくとも1つのCDRが、所望の抗原特異性を有する「ドナー」抗体からのCDR「グラフト」で置き換えられた抗体を意味する。

用語「個体」、「患者」、又は「対象」は、本明細書で使用される場合、個体生物、脊椎動物、哺乳動物、又はヒトであり得る。一部の実施形態において、個体、患者又は対象は、ヒトである。

用語「医薬的に許容される担体」は、本明細書で使用される場合、医薬投与に適合性を有する、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌及び抗真菌化合物、等張性の、及び吸収を遅延させる化合物などを含むことが意図される。医薬的に許容される担体及びそれらの配合物は当業者公知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition, ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.)に記載される。

【0081】

「処置すること」又は「処置」は、本明細書で使用される場合、対象、例えばヒトにおける本明細書に記載される疾患又は障害の処置を網羅し、その例としては、（i）疾患又

10

20

30

40

50

は障害を阻害すること、すなわちその発生を停止させること；(i i) 疾患又は障害を緩和すること、すなわち障害の退行をもたらすこと；(i i i) 障害の進行を減速させること；及び／又は(i v) 疾患又は障害の1つ又は複数の症状を阻害すること、緩和すること、若しくはその進行を減速させることが挙げられる。一部の実施形態において、処置は、疾患に関連する症状が、例えば軽減される、低減される、治癒する、又は寛解の状態に置かれることを意味する。

「と特異的に結合する」は、本明細書で使用される場合、一方の分子（例えば、抗原）を認識し、それと結合するが、他方の分子を実質的に認識し、それと結合しない分子（例えば、抗体又はその抗原結合断片）を指す。特定の分子（例えば、ポリペプチド、又はポリペプチド上のエピトープ）への「特異的な結合」、それに「特異的に結合する」、又はそれに「特異的な」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、分子が、それが結合する分子に対して、約 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、又は 10^{-12} Mの K_D を有することによって呈される場合がある。用語「と特異的に結合する」はまた、分子（例えば、抗体又はその抗原結合断片）が、特定のポリペプチド（例えば、DLL3ポリペプチド）、又は特定のポリペプチド上のエピトープに結合するが、他のいずれのポリペプチド、又はポリペプチドエピトープとも実質的に結合しないような結合を指す場合もある。

10

【0082】

本発明の説明において、用語「1～複数」は、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、又は1若しくは2を意味するのに使用される。

20

本発明において、「ハロゲン原子」の例としては、これらに限定されないが、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、及びヨウ素原子が挙げられる。

【0083】

本発明において、「C1-C6アルキル基」は、1～6個の炭素原子を有する直鎖状又は分岐鎖状アルキル基を指す。「C1-C6アルキル基」の例としては、これらに限定されないが、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、i-ブチル基、s-ブチル基、t-ブチル、n-ペンチル基、及びn-ヘキシルが挙げられる。

本発明において、「C1-C6アルコキシ基」は、1～6個の炭素原子を有する直鎖状又は分岐鎖状アルキル基を有するアルコキシ基を指す。「C1-C6アルコキシ基」の例としては、これらに限定されないが、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、i-プロポキシ基、n-ブトキシ基、i-ブトキシ、s-ブトキシ基、n-ペンチルオキシ基、及びn-ヘキシルオキシが挙げられる。

30

本発明において、「C1-C6アルキルチオ基」は、1～6個の炭素原子を有する直鎖状又は分岐鎖状アルキル基を有するアルキルチオ基を指す。「C1-C6アルキルチオ基」の例としては、これらに限定されないが、メチルチオ基、エチルチオ基、n-プロピルチオ基、i-プロピルチオ基、n-ブチルチオ基、i-ブチルチオ基、s-ブチルチオ基、t-ブチルチオ基、n-ペンチルチオ基、及びn-ヘキシルチオ基が挙げられる。

【0084】

本発明において、「3～5員飽和炭化水素環」は、3～5個の炭素原子を有する飽和環状炭化水素基を指す。「3～5員飽和炭化水素環」の例としては、これらに限定されないが、シクロプロピル基、シクロブチル基、及びシクロペンチル基が挙げられる。

40

本発明において、「C3-C5シクロアルコキシ基」は、3～5個の炭素原子を有する飽和環状炭化水素基を有するシクロアルコキシ基を指す。「C3-C5シクロアルコキシ基」の例としては、これらに限定されないが、シクロプロポキシ基、シクロブトキシ基、及びシクロペンチルオキシ基が挙げられる。

本発明において、「3～5員飽和複素環」の例としては、これらに限定されないが、1,3-プロピレンオキシド、アザシクロブタン、トリメチレンスルフィド、テトラヒドロフラン、及びピロリジンが挙げられる。

【0085】

50

本発明において、「アリール基」の例としては、これらに限定されないが、フェニル基、ベンジル基、インデニル基、ナフチル基、フルオレニル基、アントラニル基、及びフェナントレニル基が挙げられる。

本発明において、「ヘテロアリール基」の例としては、これらに限定されないが、チエニル基、ピロリル基、ピラゾリル基、トリアゾリル基、オキサゾリル基、オキサジアゾリル基、チアゾリル基、ピリジル基、ピリミジル基、ピリダジル基、ピラジニル基、キノリル基、キノキサリル基、ベンゾチオフエニル基、ベンズイミダゾリル基、ベンゾトリアゾリル基、及びベンゾフラニル基が挙げられる。

本発明において、「6員複素環」の例としては、これらに限定されないが、ピリジン環、ピリミジン環、及びピリダジン環が挙げられる。

本発明において、「スピロ結合した」は、例で例示されるように、AとAが結合するピロリジン環、又はEとEが結合するピロリジン環がスピロ環を形成する状況を指す。

【0086】

II. デルタ様リガンド3 (DLL3)

DLL3 (すなわち、デルタ様リガンド3又はデルタ様タンパク質3)は、SCLC及びLCNECなどの高悪性度肺神経内分泌腫瘍で選択的に発現される。DLL3の発現の増加は、SCLC及びLCNEC患者由来の異種移植片腫瘍で観察され、原発性腫瘍でも確認された。Saunders et al., Sci Translational Medicine 7(302): 302ra136 (2015)を参照されたい。またDLL3の発現の増加は、前立腺神経内分泌癌などの肺外神経内分泌がんでも観察された (Puca et al., Sci Transl Med 11(484): pii: eaa v0891 (2019)。DLL3は、このような腫瘍細胞の表面で発現されるが、正常な組織では発現されない。本発明の開示は、免疫グロブリン関連組成物 (例えば、抗体又はその抗原結合断片) を提供し、これは、腫瘍細胞上のDLL3に結合すると内在化することから、これらの腫瘍細胞に毒性ペイロードを送達するのに有用である。本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物は、それを必要とする対象において、DLL3関連がんを検出又は処置するための方法において有用である。したがって、本発明の方法の様々な態様は、抗DLL3抗体の調製、特徴付け、及び操作に関する。本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物は、単独でも、又はがんを処置するための追加の治療剤と組み合わせても有用である。一部の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、ヒト化抗体、キメラ抗体、又は二重特異性抗体である。

【0087】

キイロショウジョウバエ属において、Notchシグナル伝達は、主としてNotch受容体により媒介される。デルタは、隣接する細胞でシグナル伝達を活性化するNotchのキイロショウジョウバエ属のリガンドの1つである。ヒトは、4つの公知のNotch受容体 (NOTCH1~NOTCH4)、並びにデルタ様リガンド: DLL1、DLL3及びDLL4と呼ばれるデルタの3つのホモログを有する。DLL3は、DLL1及びDLL4とは異なり、Notchシグナル伝達を活性化するのではなくむしろ阻害することが報告されている。

【0088】

DLL3 (デルタ様3又はSCDO1としても公知)は、Notch DSLリガンドのデルタ様ファミリーのメンバーである。代表的なDLL3タンパク質オーソログとしては、これらに限定されないが、以下が挙げられる:

ヒト (受託番号NP_058637:

MVSPRMSGLLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSGPGG
PGPGAPRSPCSARLPCLRFVRVCLKPGLSEEAASPCALG
AALSARGPVYTEQPGAPAPDLPPLPDGLLQVPFRDAWPGTF
SFIIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRLAAGGPWAR
DIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSPAPSRC
GPGGLRPCAPLEDECEAPLVCRAAGCSPEHGFCEQPGECL
EGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPCDG

N P C A N G G S C S E T P R S F E C T C P R G F Y G L R C E V S G V T C A D G P
C F N G G L C V G G A D P D S A Y I C H C P P G F Q G S N C E K R V D R C S L Q
P C R N G G L C L D L G H A L R C R C R A G F A G P R C E H D L D D C A G R A C
A N G G T C V E G G G A H R C S C A L G F G G R D C R E R A D P C A A R P C A H
G G R C Y A H F S G L V C A C A P G Y M G A R C E F P V H P D G A S A L P A A P
P G L R P G D P Q R Y L L P P A L G L L V A A G V A G A A L L L V H V R R R G H
S Q D A G S R L L A G T P E P S V H A L P D A L N N L R T Q E G S G D G P S S S
V D W N R P E D V D P Q G I Y V I S A P S I Y A R E V A T P L F P P L H T G R A
G Q R Q H L L F P Y P S S I L S V K (配列番号50)

及びNP__982353:

M V S P R M S G L L S Q T V I L A L I F L P Q T R P A G V F E L Q I H S F G P G
P G P G A P R S P C S A R L P C R L F F R V C L K P G L S E E A A E S P C A L G
A A L S A R G P V Y T E Q P G A P A P D L P L P D G L L Q V P F R D A W P G T F
S F I I E T W R E E L G D Q I G G P A W S L L A R V A G R R R L A A G G P W A R
D I Q R A G A W E L R F S Y R A R C E P P A V G T A C T R L C R P R S A P S R C
G P G L R P C A P L E D E C E A P L V C R A G C S P E H G F C E Q P G E C R C L
E G W T G P L C T V P V S T S S C L S P R G P S S A T T G C L V P G P G P C D G
N P C A N G G S C S E T P R S F E C T C P R G F Y G L R C E V S G V T C A D G P
C F N G G L C V G G A D P D S A Y I C H C P P G F Q G S N C E K R V D R C S L Q
P C R N G G L C L D L G H A L R C R C R A G F A G P R C E H D L D D C A G R A C
A N G G T C V E G G G A H R C S C A L G F G G R D C R E R A D P C A A R P C A H
G G R C Y A H F S G L V C A C A P G Y M G A R C E F P V H P D G A S A L P A A P
P G L R P G D P Q R Y L L P P A L G L L V A A G V A G A A L L L V H V R R R G H
S Q D A G S R L L A G T P E P S V H A L P D A L N N L R T Q E G S G D G P S S S
V D W N R P E D V D P Q G I Y V I S A P S I Y A R E A (配列番号51));

チンパンジー (受託番号XP__003316395:

M V S P R M S R L L S Q T V I L A L I F L P Q T R P A G V F E L Q I H S F G P G
P G P G A P R S P C S A R V P C R L F F R V C L K P G L S E E A A E S P C A L G
A A L S A R G P V Y T E Q P G A P A P D L P L P D G L L Q V P F R D A W P G T F
S F I I E T W R E E L G D Q I G G P A W S L L A R V A G R R R L A A G G T W A R
D I Q R A G A W E L R F S Y R A R C E P P A V G T A C T R L C R P R S A P S R C
G P G L R P C A P L E D E C E A P P V C R A G C S P E H G F C E Q P G E C R C L
E G W T G P L C T V P V S T S S C L S P R G P S S A T T G C L V P G P G P C D G
N P C A N G G S C S E T P G S F E C A C P R G F Y G L R C E V S G V T C A D G P
C F N G G L C V G G A D P D S A Y I C H C P P G F Q G S N C E K R V D R C S L Q
P C R N G G L C L D L G H A L R C R C R A G F A G P R C E H D L D D C A G R A C
A N G G T C V E G G G A H R C S C A L G F G G R D C R E R A D P C A A R P C A H
G G R C Y A H F S G L V C A C A P G Y M G A R C E F P V H P D G A S A L P A A P
P G L R P G D P Q R Y L L P P A L G L L V A A G V A G A A L L L V H V R R R G H
A Q D A G A R L L A G T P E P S V H A L P D A L N N L R T Q E G A G D G P S S S
V D W N R P E D V D P R G I Y V I S A P S I Y A R E A (配列番号52));

マウス (受託番号NP__031892:

M V S L Q V S P L S Q T L I L A F L L P Q A L P A G V F E L Q I H S F G P G P G
L G T P R S P C N A R G P C R L F F R V C L K P G V S Q E A T E S L C A L G A A
L S T S V P V Y T E H P G E S A A A L P L P D G L V R V P F R D A W P G T F S L
V I E T W R E Q L G E H A G G P A W N L L A R V V G R R R L A A G G P W A R D V
Q R T G T W E L H F S Y R A R C E P P A V G A A C A R L C R S R S A P S R C G P
G L R P C T P F P D E C E A P S V C R P G C S P E H G Y C E E P D E C R C L E G
W T G P L C T V P V S T S S C L N S R V P G P A S T G C L L P G P G P C D G N P
C A N G G S C S E T S G S F E C A C P R G F Y G L R C E V S G V T C A D G P C F

10

20

30

40

50

NGGLCVGGEDPD SAYVCHC PPGFQGSNCEKRVDRCSLQPC
QNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACAN
GGTCVEGGGSRRCSCALGFGRDCRERADPCASRPCAHGG
RCYAHFSGLVCA CAPGYMGVRC EF AVRPD GADAVPAAPRG
LRQADPQRFLLPALGLLVAAGLAGAALLVIHVRRRGPGQ
DTGTRL LSGTREPSVHTLPDALNNLRLQDGAGDGPSSSAD
WNHPEDGDSRSIYVIPAPSIYAREA (配列番号53))、

及びラット (受託番号NP__446118:

MVSLQVSSLPQTLILAFLLPQALPAGVFELQIHSFGPGPG
PGTSPRSPCNARGPCRLFFRVCLKPGVVSQEA AESLCALGAA
LSTSGPVYTEQPGVPAAALS LPDGLVRVPFLDAWPGTFSL
IIETWREQLGERAAGPAWNLLARVAGRRLAAGAPWARDV
QRTGAWELHFSYRARCEPPAVGAACARLCRSRSAPSRCGP
GLRPC TPF PDECEAPRESLTVCRAGCSPEHGYCEEPEDECH
CLEGWTGPLCTVPVSTSSSCLNSRVSGPAGTGCLLPGPGPC
DGNPCANGGSCSETPGSFECACPRGFYGP RCEVSGVTCAD
GPCFNGLCVGGEDPD SAYVCHC PPAFQGSNCE RRVDRCS
LQPCQNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGR
ACANGGTCVEGGGARRCSCALGFGRDCRERADPCASRPC
AHGGRCYAHFSGLVCA CAPGYMGVRC EF AVRPD GADAVPA
APRGLRQADSQRFLLPALGLLAAAALAGAALLLIHVRRR
GPGRDTGTRL LSGTREPSVHTLPDALNNLRLQDGAGDGP T
SSADWNHPEDGDSRSIYVIPAPSIYAREA (配列番号54))

10

20

30

40

50

【0089】

ヒトにおいて、DLL3遺伝子は、染色体19q13に配置された9.5kbpにわたる8つのエクソンからなる。最後のエクソン内の選択的スプライシングは、2389bpの転写物 (受託番号NM__016941 (配列番号55)) 及び2052bpの転写物 (受託番号NM__203486 (配列番号56)) を生じる。前者の転写物は、618アミノ酸の長さであるタンパク質 (受託番号NP__058637 (配列番号50)) をコードし、それに対して後者の転写物は、587アミノ酸の長さであるタンパク質 (受託番号NP__982353 (配列番号51)) をコードする。図4A~4Bを参照されたい。DLL3のこれらの2つのタンパク質アイソフォームは、それらの細胞外ドメイン及びそれらの膜貫通ドメインにわたり全体的な100%の同一性を有し、より長いアイソフォームが、タンパク質のカルボキシ末端に32個の追加の残基を含有する伸長した細胞質内のテールを含有する点でのみ異なっている。

【0090】

両方のアイソフォームは、腫瘍細胞で検出することができる。実際には、異常なDLL3発現 (遺伝子型及び/又は表現型の) は、様々な腫瘍形成性細胞部分集団、例えばがん幹細胞及び腫瘍始原細胞 (tumor initiating cell) に関連する。したがって、本発明の開示は、このような細胞 (例えば、がん幹細胞、腫瘍原始細胞、及びがん、例えば、小細胞肺癌、大細胞神経内分泌癌、肺神経内分泌がん、肺外神経内分泌がん、及び黒色腫) を標的化することに特に有用である可能性があり、それによって新生物形成性の障害の処置、管理又は防止を容易にするDLL3抗体を提供する。

【0091】

本発明で使用するDLL3タンパク質は、ヒト又は非ヒト哺乳動物 (例えば、ラット、マウス又はサル) のDLL3を発現する細胞から直接的に精製でき、次いで使用してもよいし、又は前述の細胞の細胞膜画分を調製して、DLL3タンパク質として使用してもよい。代替として、DLL3はまた、インビトロでそれを合成することによって、又は遺伝子操作によって宿主細胞にDLL3を作製させることによって得てもよい。このような遺伝子操作によって、DLL3タンパク質は、具体的には、DLL3 cDNAを発現す

ることが可能なベクターに D L L 3 c D N A を取り込むこと、次いで、転写及び翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー材料を含有する溶液中で D L L 3 を合成することによって、又は他の原核生物又は真核生物の宿主細胞を、それらが D L L 3 を発現できるように形質転換することによって得ることができる。また、上述した遺伝子操作に基づく D L L 3 を発現する細胞、又は D L L 3 を発現する細胞株も、D L L 3 タンパク質を提示させるために使用することができる。代替として、D L L 3 c D N A が取り込まれた発現ベクターは、免疫化しようとする動物に直接投与してもよく、D L L 3 は、このようにして免疫化された動物の体内で発現させてもよい。

さらに、上述した D L L 3 のアミノ酸配列における 1 つ又は数個のアミノ酸の置換、欠失及び／又は付加を含み、D L L 3 タンパク質の生物学的活性と同等の生物学的活性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質も、用語「D L L 3」に含まれる。

10

【0092】

I I I . 抗 D L L 3 抗体

本発明の技術は、抗 D L L 3 免疫グロブリン関連組成物（例えば、抗 D L L 3 抗体又はその抗原結合断片）の生成及び使用のための方法及び組成物を記載する。本発明の開示の抗 D L L 3 免疫グロブリン関連組成物は、D L L 3 関連がん（例えば、小細胞肺癌、大細胞神経内分泌癌、肺神経内分泌がん、肺外神経内分泌がん、及び黒色腫）の診断、又は処置において有用であり得る。本発明の技術の範囲内の抗 D L L 3 免疫グロブリン関連組成物としては、例えば、これらに限定されないが、標的ポリペプチド、そのホモログ、誘導体又は断片と特異的に結合する、モノクローナル、キメラ、ヒト化、ヒト、二重特異性抗体、及びダイアボディが挙げられる。本発明の開示はまた、F a b、F (a b) ' 2、F a b '、s c F v、及び F v からなる群から選択される、本明細書で開示される抗 D L L 3 抗体のいずれかの抗原結合断片も提供する。

20

【0093】

本発明の技術は、D L L 3 - 抗体複合体の内在化を促進することができ、したがって腫瘍細胞に毒性ペイロードを送達するのに有用な抗 D L L 3 抗体を開示する。

図 5 ～ 8 は、V H 及び V L のヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供し、加えて抗体の C D R 配列は、本明細書で開示される（配列番号 1 ～ 40）。以下の表はまた、V H 及び V L のアミノ酸配列も提供し、加えて抗体の C D R 配列は、本明細書で開示される。

【0094】

30

40

50

【表 1】

配列番号	説明	配列
配列番号 2	7-I1-B の V _H のアミノ酸配列	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNTWMSWVR QAPGKGLEWVGRIKSKSDGGTTDYAAPVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTQYYWNSFDYWGQGT LTVSS
配列番号 3	7-I1-B の V _H CDR1 のアミノ酸配列	GFTFSNTW
配列番号 4	7-I1-B の V _H CDR2 のアミノ酸配列	IKSKSDGGTT
配列番号 5	7-I1-B の V _H CDR3 のアミノ酸配列	TQYYWNSFDY
配列番号 7	7-I1-B の V _L のアミノ酸配列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYYCQYDNLPLTFGGGKVEIK
配列番号 8	7-I1-B の V _L CDR1 のアミノ酸配列	QASQDISNYLN
配列番号 9	7-I1-B の V _L CDR2 のアミノ酸配列	DASNLET
配列番号 10	7-I1-B の V _L CDR3 のアミノ酸配列	QYDNLPLT
配列番号 12	2-C8-A の V _H のアミノ酸配列	EVQLVESGGGLVQPGGSQLSCAASGFTFSSYWMNWVR QAPGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPGWAPFDYWGQGT LTVSS
配列番号 13	2-C8-A の V _H CDR1 のアミノ酸配列	GFTFSSY
配列番号 14	2-C8-A の V _H CDR2 のアミノ酸配列	KEDGSE
配列番号 15	2-C8-A の V _H CDR3 のアミノ酸配列	DPGWAPFDY
配列番号 17	2-C8-A の V _L のアミノ酸配列	DIQMSQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFQQ KPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSKFSGSGSGTDFTLAIS SLQPEDFATYYCQYNSFPYTFGQGTLEIK
配列番号 18	2-C8-A の V _L CDR1 のアミノ酸配列	RASQGISNYLA
配列番号 19	2-C8-A の V _L CDR2 のアミノ酸配列	AASSLQS
配列番号 20	2-C8-A の V _L CDR3 のアミノ酸配列	QYNSFPYT
配列番号 59	H2-C8-A の V _H のアミノ酸配列	EVQLVESGGGLVQPGGSQLSCAASGFTFSSYWMNWVR QAPGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPGWAPFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PVPVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

10

20

30

40

50

		QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 60	H2-C8-A-2 の V _H のア ミノ酸配列	EVQLVESGGGLVQPGGSQLSCAASGFTSSYWMNWVR QAPGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPGWAPFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKYDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 61	H2-C8-A-3 の V _H のア ミノ酸配列	EVQLVESGGGLVQPGGSQLSCAASGFTSSYWMNWVR QAPGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPGWAPFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKYDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 62	H2-C8-A、H2-C8-A- 2、及び H2-C8-A-3 の V _L のアミノ酸配列	DIQMSQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISNYLAWFQQ KPGKAPKSLIYAASSLSQSGVPSKFSGSGSGTDFTLAIS SLQPEDFATYYCQYNSFPYTFGGQTLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 22	10-018-A の V _H のア ミノ酸配列	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSYWSWIR QPPGKGLEWIGYIFYSGITNYPNPSLKSRVTISLDTSKN QFSLKLSSTVAADTAVYYCARIGVAGFYFDYWGQGLV TVSS
配列番号 23	10-018-A の V _H CDR1 のアミノ酸配列	GGINSY
配列番号 24	10-018-A の V _H CDR2 のアミノ酸配列	FYSGI
配列番号 25	10-018-A の V _H CDR3 のアミノ酸配列	IGVAGFYFDY
配列番号 27	10-018-A の V _L のア ミノ酸配列	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTIT SRLEPEDFAVYYCQQYGTSPITFGGGTKVEIK
配列番号 28	10-018-A の V _L CDR1 のアミノ酸配列	RASQSVSSSYLA
配列番号 29	10-018-A の V _L CDR2 のアミノ酸配列	GASSRAT
配列番号 30	10-018-A の V _L CDR3 のアミノ酸配列	QQYGTSPIT

10

20

30

40

50

配列番号 67	H10-018-A の V _H のアミノ酸配列	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSYYWSWIR QPPGKGLEWIGYIFYSGITNYPNPSLKSRTISLDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARIGVAGFYFDYWGGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 68	H10-018-A-2 の V _H のアミノ酸配列	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSYYWSWIR QPPGKGLEWIGYIFYSGITNYPNPSLKSRTISLDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARIGVAGFYFDYWGGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 69	H10-018-A-3 の V _H のアミノ酸配列	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSYYWSWIR QPPGKGLEWIGYIFYSGITNYPNPSLKSRTISLDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARIGVAGFYFDYWGGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 70	H10-018-A、H10-018-A-2、及びH10-018-A-3 の V _L のアミノ酸配列	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS SRLEPEDFAVYYCQYGTSPITFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIIPPSSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK KYYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 32	6-G23-F の V _H のアミノ酸配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVR QAPGQGLEWMGIIDPSDGSSTNYAQKFQGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARDREYNYYGLDVWGQGT TIVTVSS
配列番号 33	6-G23-F の V _H CDR1 のアミノ酸配列	GYTFTSY
配列番号 34	6-G23-F の V _H CDR2 のアミノ酸配列	DPSDGS
配列番号 35	6-G23-F の V _H CDR3 のアミノ酸配列	DREYNYYGLDV

10

20

30

40

50

配列番号 37	6-G23-F の V _L のアミノ酸配列	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYRDGNTYL NWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFRGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCMQGTHWPPTFGQGTKEIK
配列番号 38	6-G23-F の V _L CDR1 のアミノ酸配列	RSSQSLVYRDGNTYLN
配列番号 39	6-G23-F の V _L CDR2 のアミノ酸配列	KVSNRDS
配列番号 40	6-G23-F の V _L CDR3 のアミノ酸配列	MQGTHWPPT
配列番号 63	H6-G23-A の V _H のアミノ酸配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIIHWVR QAPGQGLEWMGIIDPSDGSNTYAQKFQGRVTMRDSTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARDREYNYYGLDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 64	H6-G23-A-2 の V _H のアミノ酸配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIIHWVR QAPGQGLEWMGIIDPSDGSNTYAQKFQGRVTMRDSTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARDREYNYYGLDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 65	H6-G23-A-3 の V _H のアミノ酸配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIIHWVR QAPGQGLEWMGIIDPSDGSNTYAQKFQGRVTMRDSTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARDREYNYYGLDVWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 66	H6-G23-A、H6-G23-A-2、及び H6-G23-A-3 の V _L のアミノ酸配列	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYRDGNTYL NWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFRGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCMQGTHWPPTFGQGTKEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

【0095】

一態様において、本発明の開示は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）を含む抗体又はその抗原結合断片であって、（a）V_Hは、（i）それぞれ、配列番号 3、配列番号 4、及び配列番号 5；（ii）それぞれ、配列番号 13、配列番号 14、及び配列番号 15；（iii）それぞれ、配列番号 23、配列番号 24、及び配列番号 25；並びに（iv）それぞれ、配列番号 33、配列番号 34、及び配列番号 35 からなる群から選択される V_H-CDR1 配列、V_H-CDR2 配列、及び V_H-CDR3 配列を含み；及び／又は（b）V_Lは、（i）それぞれ、配列番号 8、配列番号 9、及び配列番号 10；（ii）それぞれ、配列番号 18、配列番号 1

50

9、及び配列番号20；(iii)それぞれ、配列番号28、配列番号29、及び配列番号30；並びに(iv)それぞれ、配列番号38、配列番号39、及び配列番号40からなる群から選択されるVL-CDR1配列、VL-CDR2配列、及びVL-CDR3配列を含む、抗体又はその抗原結合断片を提供する。一部の実施形態において、本発明の開示は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン(VH)及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン(VL)を含む抗体又はその抗原結合断片であって、(a) VH-CDR1配列、VH-CDR2配列、及びVH-CDR3配列を含むVH及び(b) VL-CDR1配列、VL-CDR2配列、及びVL-CDR3配列を含むVLの組合せは、(i)(a)それぞれ、配列番号3、配列番号4、及び配列番号5並びに(b)配列番号8、配列番号9、及び配列番号10；(ii)(a)それぞれ、配列番号13、配列番号14、及び配列番号15並びに(b)配列番号18、配列番号19、及び配列番号20；(iii)(a)それぞれ、配列番号23、配列番号24、及び配列番号25並びに(b)配列番号28、配列番号29、及び配列番号30；並びに(iv)(a)それぞれ、配列番号33、配列番号34、及び配列番号35並びに(b)配列番号38、配列番号39、及び配列番号40からなる群から選択される、抗体又はその抗原結合断片を提供する。一部の実施形態において、抗体は、あらゆるアイソタイプ、例えば、これらに限定されないが、IgG(IgG1並びにバリエーション(配列番号42、57、及び58)、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む)、IgA(IgA1及びIgA2を含む)、IgD、IgE、又はIgM、及びIgYのFcドメインをさらに含む。一部の実施形態において、抗体は、配列番号42、57、又は58、好ましくは配列番号57、又は58、より好ましくは配列番号58の重鎖定常領域を含む。定常領域配列の非限定的な例としては、以下が挙げられる：

10

20

30

40

50

ヒトIgD定常領域、Uniprot:P01880(配列番号41)

A P T K A P D V F P I I S G C R H P K D N S P V V L A C L I T G Y H P T S V T V
T W Y M G T Q S Q P Q R T F P E I Q R R D S Y Y M T S S Q L S T P L Q Q W R Q G
E Y K C V V Q H T A S K S K K E I F R W P E S P K A Q A S S V P T A Q P Q A E G
S L A K A T T A P A T T R N T G R G G E E K K K E K E K E E Q E E R E T K T P E
C P S H T Q P L G V Y L L T P A V Q D L W L R D K A T F T C F V V G S D L K D A
H L T W E V A G K V P T G G V E E G L L E R H S N G S Q S Q H S R L T L P R S L
W N A G T S V T C T L N H P S L P P Q R L M A L R E P A A Q A P V K L S L N L L
A S S D P P E A A S W L L C E V S G F S P P N I L L M W L E D Q R E V N T S G F
A P A R P P P Q P G S T T F W A W S V L R V P A P P S P Q P A T Y T C V V S H E
D S R T L L N A S R S L E V S Y V T D H G P M K

ヒトIgG1定常領域、Uniprot:P01857(配列番号42)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K

ヒトIgG1バリエーション定常領域(配列番号57)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V

L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K

ヒト Ig G 1 バリエント定常領域（配列番号 58）

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K

10

ヒト Ig G 2 定常領域、Uniprot: P01859（配列番号 43）

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T
Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G
V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
Q V S L T C L V K G F Y P S D I S V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
S L S P G K

20

ヒト Ig G 3 定常領域、Uniprot: P01860（配列番号 44）

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y T C N V N H K P S N T K V D K R V E L K T P L G D T T H T C P R C P E P K S C
D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P
A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
P E V Q F K W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T F R V V S V L T V L H
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T
L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S S G Q P E N N
Y N T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H E
A L H N R F T Q K S L S L S P G K

30

ヒト Ig M 定常領域、Uniprot: P01871（配列番号 45）

G S A S A P T L F P L V S C E N S P S D T S S V A V G C L A Q D F L P D S I T L
S W K Y K N N S D I S S T R G F P S V L R G G K Y A A T S Q V L L P S K D V M Q
G T D E H V V C K V Q H P N G N K E K N V P L P V I A E L P P K V S V F V P P R
D G F F G N P R K S K L I C Q A T G F S P R Q I Q V S W L R E G K Q V G S G V T
T D Q V Q A E A K E S G P T T Y K V T S T L T I K E S D W L G Q S M F T C R V D
H R G L T F Q Q N A S S M C V P D Q D T A I R V F A I P P S F A S I F L T K S T
K L T C L V T D L T T Y D S V T I S W T R Q N G E A V K T H T N I S E S H P N A
T F S A V G E A S I C E D D W N S G E R F T C T V T H T D L P S P L K Q T I S R
P K G V A L H R P D V Y L L P P A R E Q L N L R E S A T I T C L V T G F S P A D
V F V Q W M Q R G Q P L S P E K Y V T S A P M P E P Q A P G R Y F A H S I L T V
S E E E W N T G E T Y T C V A H E A L P N R V T E R T V D K S T G K P T L Y N V
S L V M S D T A G T C Y

40

ヒト Ig G 4 定常領域、Uniprot: P01861（配列番号 46）

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T
Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P S C P A P E F L G G P S V

50

FLFPPKPKDTLMISRTP EVT C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D
G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K
N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
L S L S L G K

ヒトIgA1定常領域、Uniprot:P01876 (配列番号47)

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFFPQEPLSVT
WSESGQGVTARNFPSPSQDASGDLYTTS S Q L T L P A T Q C L A G
KSVTCHVKHYTNPSQDVTVP C P V P S T P P T P S P S T P P T P S P
SCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTF
TWTPSSSGKSAVQGP PERDLCGCYSVSSVLP G C A E P W N H G K
TFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEEL
ALNELVTLTCLARGFSPKDV L V R W L Q G S Q E L P R E K Y L T W A
SRQEPSQGTTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEAL
PLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

ヒトIgA2定常領域、Uniprot:P01877 (配列番号48)

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFFPQEPLSVT
WSESGQNV T A R N F P P S Q D A S G D L Y T T S S Q L T L P A T Q C P D G
KSVTCHVKHYTNPSQDVTVP C P V P P P P C C H P R L S L H R P A
LEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSSGKSAVQG
PPERDLCGCYSVSSVLP G C A Q P W N H G E T F T C T A A H P E L K T
PLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLAR
GFSPKDV L V R W L Q G S Q E L P R E K Y L T W A S R Q E P S Q G T T T F A
VTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMA
GKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

ヒトIgカッパ定常領域、Uniprot:P01834 (配列番号49)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC L L N N F Y P R E A K V Q W
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC

【0096】

一部の実施形態において、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物は、配列番号41-48、57、58に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、又は100%同一な重鎖定常領域を含む。加えて、又は代替として、一部の実施形態において、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物は、配列番号49に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、又は100%同一な軽鎖定常領域を含む。一部の実施形態において、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物は、DLL3の細胞外ドメインに結合する。一部の実施形態において、エピトープは、コンフォメーションルエピトープである。

【0097】

別の態様において、本発明の開示は、配列番号2、配列番号12、配列番号22、若しくは配列番号32を含む重鎖免疫グロブリン可変ドメイン(VH)アミノ酸配列、若しくは1つ若しくは複数の保存的アミノ酸置換を有するそれらのバリエーション、又は配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号67、配列番号68、若しくは配列番号69を含む重鎖アミノ酸配列若しくは1つ若しくは複数の保存的アミノ酸置換を有するそれらのバリエーションを含む、単離された免疫グロブリン関連組成物(例えば、抗体又はその抗原結合断片)を提供する。

加えて、又は代替として、一部の実施形態において、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物は、配列番号7、配列番号17、配列番号27、若しくは配列番号37を含む軽

10

20

30

40

50

鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V L）アミノ酸配列、若しくは1つ若しくは複数の保存的アミノ酸置換を有するそれらのバリエーション又は配列番号62、配列番号66、若しくは配列番号70を含む軽鎖アミノ酸配列若しくは1つ若しくは複数の保存的アミノ酸置換を有するそれらのバリエーションを含む。

【0098】

一部の実施形態において、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物は、それぞれ配列番号2及び配列番号7（7-I1-B）；それぞれ配列番号12及び配列番号17（2-C8-A）；それぞれ配列番号59及び配列番号62（H2-C8-A）；それぞれ配列番号60及び配列番号62（H2-C8-A-2）；それぞれ配列番号61及び配列番号62（H2-C8-A-3）；それぞれ配列番号22及び配列番号27（10-O18-A）；それぞれ配列番号67及び配列番号70（H10-O18-A）；それぞれ配列番号68及び配列番号70（H10-O18-A-2）；配列番号69及び配列番号70（H10-O18-A-3）；それぞれ配列番号32及び配列番号37（6-G23-F）からなる群から選択される、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V H）又は重鎖アミノ酸配列及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V L）又は軽鎖アミノ酸配列を含む。

10

【0099】

免疫グロブリン関連組成物の上記実施形態のいずれかにおいて、H C及びL C免疫グロブリン可変ドメイン配列は、D L L 3の細胞外ドメインに結合する抗原結合部位を構成する。免疫グロブリン関連組成物の上記実施形態のいずれかにおいて、H C及びL C免疫グロブリン可変ドメイン配列は、D L L 3に結合し、免疫グロブリン関連組成物の内在化を促進する抗原結合部位を構成する。一部の実施形態において、エピトープは、コンフォメーションナルエピトープである。

20

一部の実施形態において、H C及びL C免疫グロブリン可変ドメイン配列は、同じポリペプチド鎖の構成要素である。他の実施形態において、H C及びL C免疫グロブリン可変ドメイン配列は、異なるポリペプチド鎖の構成要素である。特定の実施形態において、抗体は、全長抗体である。

【0100】

一部の実施形態において、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物は、少なくとも1つのD L L 3ポリペプチドに特異的に結合する。一部の実施形態において、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物は、少なくとも1つのD L L 3ポリペプチドと、約 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、又は 10^{-12} Mの解離定数（K D）で結合する。特定の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、又は二重特異性抗体である。一部の実施形態において、抗体は、ヒト抗体フレームワーク領域を含む。

30

特定の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、以下の特徴のうちの1つ又は複数を含む：（a）配列番号7、17、27、37、62、66、又は70のいずれか1つに存在する軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一な軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列；及び／又は（b）配列番号2、12、22、32、59、60、61、63、64、65、67、68、又は69のいずれか1つに存在する重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一な重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列。別の態様において、本明細書で提供される免疫グロブリン関連組成物における1つ又は複数のアミノ酸残基は、別のアミノ酸で置換される。置換は、本明細書において定義されるような「保存的置換」であってもよい。

40

【0101】

特定の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、N297A及びK322Aからなる群から選択される1つ若しくは複数のアミノ酸置換若しくはアミノ酸残基のセット、重鎖の234位及び235位（E Uインデックスに従って）における2つのロイシン（

50

L) 残基のアラニン (A) への2つのアミノ酸置換 (L A L A)、重鎖のアミノ酸残基 356 位の G l u (E) 及び 358 位 (E U インデックスに従って) の M e t (M) のセット、又は重鎖の 356 位の A s p (D) 及び 358 位 (E U インデックスに従って) のロイシン (L) のセット若しくはそれらのあらゆる組合せを含む I g G 1 定常領域を含有する。加えて、又は代替として、一部の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、S 2 2 8 P 突然変異を含む I g G 4 定常領域を含有する。上記の L A L A 置換を含む操作された抗体は、F c 媒介エフェクター免疫機能によって引き起こされる毒性、P K プロファイル及び安定性の損失のいかなる望ましくない作用もなく、抗腫瘍作用を示す (Pharmacol Ther. 2019; 200: 110-125)。

【0102】

一部の態様において、本明細書に記載される抗 D L L 3 免疫グロブリン関連組成物は、迅速な結合及び細胞の取り込み並びに／又は遅延放出を容易にするために構造改変を含有する。一部の態様において、本発明の技術の抗 D L L 3 免疫グロブリン関連組成物 (例えば、抗体) は、迅速な結合及び細胞の取り込み並びに／又は遅延放出を容易にするために、C H 2 定常重鎖領域に欠失を含有していてもよい。一部の態様において、F a b 断片は、迅速な結合及び細胞の取り込み並びに／又は遅延放出を容易にするために使用される。一部の態様において、F (a b) ' 2 断片は、迅速な結合及び細胞の取り込み並びに／又は遅延放出を容易にするために使用される。

【0103】

本明細書に記載される抗 D L L 3 抗体のアミノ酸配列改変が予期される。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的な特性を改善することが望ましい場合がある。抗 D L L 3 抗体のアミノ酸配列バリエーションは、抗体核酸に適切なヌクレオチド変化を導入することによって、又はペプチド合成によって調製される。このような改変としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、及び／又はそれへの挿入及び／又はその置換が挙げられる。得られた抗体が所望の特性を有する限りは、目的の抗体を得るために欠失、挿入、及び置換のあらゆる組合せがなされる。改変はまた、タンパク質のグリコシル化のパターンの変化も含む。変異誘発のための最も興味のある部位としては、高度可変領域が挙げられるが、F R の変更も予期される。「保存的置換」は、以下の表に示される。

【0104】

10

20

30

40

50

【表 2】

アミノ酸置換		
元の残基	例示的な置換	保存的置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

10

20

【0105】

30

置換バリエーションの1つのタイプは、親抗体の1つ又は複数の高度可変領域の残基の置換を含む。このような置換バリエーションを生成するための便利な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性成熟を含む。具体的には、いくつかの高度可変領域部位（例えば、6～7つの部位）を突然変異させて、各部位でいずれかの可能なアミノ酸置換を生成する。このようにして生成した抗体バリエーションは、繊維状ファージ粒子から、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子III生成物への融合体として1価の様式で提示される。次いでファージディスプレイされたバリエーションは、本明細書において開示されたように、その生物学的活性（例えば、結合親和性）に関してスクリーニングされる。変更のための候補高度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング変異は、抗原結合に著しく関与する高度可変領域残基を同定するために実行してもよい。代替として、又は加えて、抗体と抗原との間の接触ポイントを同定するために、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することが有益であり得る。このような接触残基及び隣接する残基は、本明細書で詳述される技術による置換のための候補である。このようなバリエーションが生成されたら、バリエーションのパネルは、本明細書に記載されるようにスクリーニングに供され、類似の、又は優れた特性を有する抗体が、さらなる開発のために1つ又は複数の関連アッセイで選択することができる。

40

【0106】

一態様において、本発明の技術は、本明細書に記載される免疫グロブリン関連組成物のいずれかをコードする核酸配列を提供する。本明細書に記載される抗体のいずれかをコードする組換え核酸配列も本明細書で開示される。一部の実施形態において、核酸配列は、

50

配列番号 1、6、11、16、21、26、31、及び 36 からなる群から選択される。

別の態様において、本発明の技術は、本明細書に記載される免疫グロブリン関連組成物のいずれかをコードするいずれかの核酸配列を発現する宿主細胞又は発現ベクターを提供する。

【0107】

本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物（例えば、抗 D L L 3 抗体）は、単一特異性、二重特異性、三重特異性であってもよいし、又はそれより高次の多重特性であってもよい。多重特異性抗体は、1つ又は複数の D L L 3 ポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であってもよいし、又は D L L 3 ポリペプチドに加えて、異種組成物、例えば異種ポリペプチド又は固体支持体材料の両方に対して特異的であってもよい。例えば、W O 9 3 / 1 7 7 1 5 ; W O 9 2 / 0 8 8 0 2 ; W O 9 1 / 0 0 3 6 0 ; W O 9 2 / 0 5 7 9 3 ; Tutt et al., J. Immunol. 147: 60-69 (1991); 米国特許第 5, 573, 920 号、4, 474, 893 号、5, 601, 819 号、4, 714, 681 号、4, 925, 648 号; 6, 106, 835 号; Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992) を参照されたい。一部の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、キメラである。特定の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、ヒト化されている。

10

【0108】

本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物はさらに、N 又は C 末端で異種ポリペプチドに組換えによって融合していてもよいし、又はポリペプチド又は他の組成物に化学的にコンジュゲートされていてもよい（共有結合及び非共有結合によるコンジュゲーションを含む）。例えば、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物は、検出アッセイにおける標識として有用な分子、及び異種ポリペプチド、薬物、又は毒素などのエフェクター分子に、組換えによって融合又はコンジュゲートしていてもよい。例えば、W O 9 2 / 0 8 4 9 5 ; W O 9 1 / 1 4 4 3 8 ; W O 8 9 / 1 2 6 2 4 ; 米国特許第 5, 314, 995 号; 及び E P 0 3 9 6 3 8 7 を参照されたい。

20

本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物の上記実施形態のいずれかにおいて、抗体又は抗原結合断片は、任意選択で、同位体、色素、クロマゲン (chromagen)、造影剤、薬物、毒素、サイトカイン、酵素、酵素阻害剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、増殖因子、放射性核種、金属、リポソーム、ナノ粒子、RNA、DNA 又はそれらのあらゆる組合せからなる群から選択される薬剤にコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態において、本発明の技術の抗体又は抗原結合断片は、医薬的に許容される担体と組み合わせてもよい。化学結合又は物理的な結合の場合、免疫グロブリン関連組成物上の官能基は、典型的には、薬剤上の官能基と会合する。代替として、薬剤上の官能基は、免疫グロブリン関連組成物上の官能基と会合する。

30

【0109】

薬剤及び免疫グロブリン関連組成物上の官能基は、直接会合していてもよい。例えば、薬剤上の官能基（例えば、スルフヒドリル基）は、免疫グロブリン関連組成物上の官能基（例えば、スルフヒドリル基）と会合して、ジスルフィドを形成してもよい。代替として、官能基は、架橋剤（すなわち、リンカー）を介して会合していてもよい。架橋剤の一部の例は、後述される。架橋剤は、薬剤又は免疫グロブリン関連組成物のいずれかに付着していてもよい。コンジュゲート中の薬剤又は免疫グロブリン関連組成物の数はまた、他方に存在する官能基の数によっても限定される。例えば、コンジュゲートと会合した薬剤の最大数は、免疫グロブリン関連組成物上に存在する官能基の数によって決まる。代替として、薬剤と会合した免疫グロブリン関連組成物の最大数は、薬剤上に存在する官能基の数によって決まる。

40

さらに別の実施形態において、コンジュゲートは、1つの薬剤に会合した1つの免疫グロブリン関連組成物を含む。一実施形態において、コンジュゲートは、少なくとも1つの免疫グロブリン関連組成物に化学結合した（例えば、コンジュゲートした）少なくとも1つの薬剤を含む。薬剤は、当業者公知のあらゆる方法によって免疫グロブリン関連組成物

50

に化学結合していてもよい。例えば、薬剤上の官能基は、免疫グロブリン関連組成物上の官能基に直接付着されていてもよい。好適な官能基の一部の例としては、例えば、アミノ、カルボキシル、スルフヒドリル、マレイミド、イソシアナト、イソチオシアネート及びヒドロキシルが挙げられる。

【0110】

薬剤はまた、架橋剤、例えばジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミドなどによって免疫グロブリン関連組成物に化学結合していてもよい。架橋剤は、例えば、Pierce Biotechnology, Inc.、Rockford, IL から得ることができる。Pierce Biotechnology, Inc. のウェブサイトは、補助を提供することができる。追加の架橋剤としては、オランダ、アムステルダム、Kreatech Biotechnology, B.V. の米国特許第5,580,990号；5,985,566号；及び6,133,038号に記載される白金架橋剤が挙げられる。

10

代替として、薬剤及び免疫グロブリン関連組成物上の官能基は、同じであってもよい。同一な官能基を架橋するために、典型的には、ホモ二官能性架橋剤が使用される。ホモ二官能性架橋剤の例としては、EGS（すなわち、エチレングリコールビス[スクシンイミジルスクシネート]）、DSS（すなわち、スベリン酸ジスクシンイミジル）、DMA（すなわち、アジブイミド酸ジメチル・2HCl）、DTSSP（すなわち、3,3'-ジチオビス[スルホスクシンイミジルプロピオネート]）、DPDPB（すなわち、1,4-ジ[3'-(2'-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ボタン）、及びBMH（すなわち、ビスマレイミドヘキサン）が挙げられる。このようなホモ二官能性架橋剤も、Pierce Biotechnology, Incより入手可能である。

20

【0111】

他の例において、免疫グロブリン関連組成物から薬剤を切断することが有益な場合がある。上述したPierce Biotechnology, Inc. のウェブサイトはまた、細胞中で例えば酵素によって切断可能な好適な架橋剤を選ぶことにおける補助も当業者に提供することができる。したがって、薬剤は、免疫グロブリン関連組成物から分離されていてもよい。切断可能なリンカーの例としては、SMP T（すなわち、4-スクシンイミジルオキシカルボニル-メチル-a-[2-ピリジルジチオ]トルエン）、スルホ-LC-SPDP（すなわち、スルホスクシンイミジル6-(3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド)ヘキサノエート）、LC-SPDP（すなわち、スクシンイミジル6-(3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド)ヘキサノエート）、スルホ-LC-SPDP（すなわち、スルホスクシンイミジル6-(3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド)ヘキサノエート）、SPDP（すなわち、N-スクシンイミジル3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミドヘキサノエート）、及びAEDP（すなわち、3-[(2-アミノエチル)ジチオ]プロピオン酸HCl）が挙げられる。

30

【0112】

別の実施形態において、コンジュゲートは、少なくとも1つの免疫グロブリン関連組成物と物理的に結合した少なくとも1つの薬剤を含む。薬剤を免疫グロブリン関連組成物と物理的に結合させるために、当業者公知のあらゆる方法が採用できる。例えば、免疫グロブリン関連組成物及び薬剤は、当業者公知のあらゆる方法によって一緒に混合することができる。混合の順番は重要ではない。例えば、薬剤は、当業者公知のあらゆる方法によって免疫グロブリン関連組成物と物理的に混合することができる。例えば、免疫グロブリン関連組成物及び薬剤を容器に入れ、例えば容器を振盪することによってかき混ぜて、免疫グロブリン関連組成物及び薬剤を混合することができる。

40

免疫グロブリン関連組成物は、当業者公知のあらゆる方法によって改変することができる。例えば、免疫グロブリン関連組成物は、上述したように架橋剤又は官能基によって改変することができる。

【0113】

本発明の抗体はまた、抗体の改変も含む。改変は、本発明の抗体を化学的又は生物学的

50

に改変することを意味するのに使用される。このような化学的改変の例としては、アミノ酸骨格への化学部分の結合、及びN結合型又はO結合型炭水化物鎖の化学的改変が挙げられる。このような生物学的な改変の例としては、翻訳後修飾（例えば、N結合型又はO結合型グリコシル化、N末端又はC末端プロセッシング、脱アミド、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化、及びN末端グルタミン又はN末端グルタミン酸のピログルタミン酸への変換）を受けた抗体、及び原核生物の宿主細胞を使用して発現させた結果として、そのN末端にメチオニン残基が付加された抗体が挙げられる。加えて、このような改変はまた、本発明の抗体又は抗原の検出又は単離を可能にするための標識された抗体、例えば、酵素標識された抗体、蛍光標識された抗体、及び親和性標識された抗体を含むことも意味する。このような本発明の抗体の改変は、抗体の血中での安定性及び保持の改善；抗原性の低減；抗体又は抗原の検出又は単離などのために有用である。

10

さらに、本発明の抗体に結合する糖鎖改変を調節すること（グリコシル化、脱フコシル化など）によって、抗体依存性細胞傷害活性を強化することができる。抗体の糖鎖改変を調節する技術として、国際公報WO1999/54342号、WO2000/61739号、及びWO2002/31140号、WO2007/133855号などに記載されるものが公知であるが、技術は、それらに限定されない。本発明の抗体はまた、抗体に関する前述の糖鎖改変が調節された抗体も含む。

【0114】

抗体遺伝子が単離されたら、遺伝子を適切な宿主に導入して、宿主及び発現ベクターの適切な組合せを使用して抗体を作製することができる。抗体遺伝子の具体的な例は、本発明の説明に記載される抗体の重鎖配列をコードする遺伝子及びそこに記載された抗体の軽鎖配列をコードする遺伝子の組合せであり得る。宿主細胞の形質転換のとき、このような重鎖配列遺伝子及び軽鎖配列遺伝子は、単一の発現ベクターに挿入されてもよいし、又はその代わりに、これらの遺伝子は、それぞれ異なる発現ベクターに挿入されてもよい。

20

真核細胞が宿主として使用される場合、動物細胞、植物細胞又は真核微生物が使用されてもよい。特に、動物細胞の例としては、哺乳類細胞、例えばサル細胞であるCOS細胞（Gluzman, Y., Cell (1981) 23, p. 175-182, ATCC CRL-1650）、マウス線維芽細胞NIH3T3（ATCC番号CRL-1658）、チャイニーズハムスター卵巣細胞のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損細胞株（CHO細胞、ATCC CCL-61）（Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, p. 4126-4220）、及びFreeStyle 293F細胞（Invitrogen Corp.）を挙げることができる。

30

原核細胞が宿主として使用される場合、例えば大腸菌（*Escherichia coli*）又はバチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）を使用してもよい。

【0115】

目的の抗体遺伝子は、形質転換のためにこれらの細胞に導入され、次いで形質転換した細胞はインビトロで培養されて、抗体が得られる。前述の培養において、抗体の配列に応じて収量が異なる場合があることから、インジケータとして収量を使用して、等価な結合活性を有する抗体から、医薬として容易に作製される抗体を選択することが可能である。したがって、本発明の抗体はまた、形質転換宿主細胞を培養する工程、及び前述の工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能的な断片を収集する工程を含む、上述した抗体を作製するための方法により得られた抗体も含む。

40

【0116】

培養された哺乳類細胞で作製された抗体の重鎖のカルボキシル末端におけるリジン残基は欠失していることが公知であり（Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)）、重鎖カルボキシル末端における2つのアミノ酸残基、グリシン及びリジンが欠失していること、及びカルボキシル末端に新たに配置されたプロリン残基はアミド化されていることも公知である（Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)）。

しかしながら、これらの重鎖配列のこのような欠失及び改変は、抗体の抗原結合活性及

50

びエフェクター機能（補体の活性化、抗体依存性細胞傷害など）への影響を有さない。したがって、本発明による抗体はまた、前述の改変を受けた抗体、及びその抗体の機能的な断片も含み、このような抗体の具体的な例としては、重鎖カルボキシル末端に1又は2アミノ酸の欠失を含む欠失突然変異体、及び前述の欠失突然変異体をアミド化することによって形成された欠失突然変異体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）が挙げられる。しかしながら、本発明による抗体の重鎖のカルボキシル末端に欠失を含む欠失突然変異体は、それらが抗原結合活性及びエフェクター機能を保持する限り、上述した欠失突然変異体に限定されない。本発明による抗体を構成する2つの重鎖は、全長抗体からなる群から選択される重鎖及び上述した欠失突然変異体のいずれか一方のタイプであってもよいし、又は前述の群から選択されるいずれか2つのタイプの組合せであってもよい。個々の欠失突然変異体の比率は、本発明による抗体を作製する培養された哺乳類細胞のタイプや培養条件によって影響を受ける可能性がある。本発明による抗体の主要な成分の例としては、2つの重鎖のカルボキシル末端のそれぞれにおいて1つのアミノ酸残基が欠失した抗体を挙げることができる。

10

抗体の生物学的活性の例としては、一般的に、抗原結合活性、抗原に結合することによって抗原を発現する細胞に内在化する活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を強化する活性、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（CDC）活性、及び抗体依存性細胞貪食（ADCP）を挙げることができる。本発明による抗体の機能は、DLL3に対する結合活性であり、好ましくは、DLL3に結合することによってDLL3を発現する細胞に内在化する活性である。さらに、本発明の抗体は、ADCC活性、CDC活性及び／又はADCP活性、加えて、細胞内在化活性を有していてもよい。

20

【0117】

IV. 抗DLL3抗体の作製

本発明の抗DLL3抗体は、あらゆる種由来であってもよい。種の好ましい例としては、ヒト、サル、ラット、マウス及びウサギを挙げることができる。本発明の抗DLL3抗体がヒト以外の種から誘導される場合、周知の技術によって抗DLL3抗体をキメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいし、又はモノクローナル抗体であってもよく、モノクローナル抗体が好ましい。

本発明の抗DLL3抗体は、腫瘍細胞を標的化することができる抗体である。具体的には、本発明の抗DLL3抗体は、腫瘍細胞の認識が可能な特性、腫瘍細胞への結合が可能な特性、及び／又は細胞内取り込みによって腫瘍細胞に内在化される特性などを有する。したがって、本発明の抗DLL3抗体は、抗体-薬物コンジュゲートを調製するために、リンカーを介して抗腫瘍活性を有する化合物にコンジュゲートしていてもよい。

30

【0118】

腫瘍細胞に対する抗体の結合活性は、フローサイトメトリーによって確認することができる。腫瘍細胞への抗体の取り込みは、（1）抗体に結合する二次抗体（蛍光標識した）を使用して蛍光顕微鏡下で細胞に取り込まれた抗体を可視化するアッセイ（Cell Death and Differentiation, 2008, 15, 751-761）（2）抗体に結合する二次抗体（蛍光標識した）を使用して細胞に取り込まれた蛍光の量を測定するアッセイ（Molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, December 2004）又は（3）抗体に結合する免疫毒素を使用するMab-ZAPアッセイであって、毒素は、細胞成長を抑制するように細胞内取り込みのときに放出される、アッセイ（Bio Techniques 28: 162-165, January 2000）によって確認することができる。ジフテリア毒素の触媒領域及びプロテインGの組換えコンジュゲータタンパク質が、免疫毒素として使用される可能性がある。

40

【0119】

本発明の説明において、用語「高い内在化能力」は、前述の抗体及びサポリン標識された抗ラットIgG抗体が投与されたDLL3を発現する細胞の生存率（これは、100%と定義される抗体添加なしの場合の細胞生存率に対する比率によって示される）が、好ましくは70%又はそれ未満であり、より好ましくは60%又はそれ未満であることを意味

50

するものとして使用される。

本発明の抗腫瘍抗体－薬物コンジュゲートは、抗腫瘍作用を発揮するコンジュゲート化合物を含む。それゆえに、必ずしもそうとは限らないが、抗体それ自体が抗腫瘍作用を有することが好ましい。腫瘍細胞において抗腫瘍化合物の細胞傷害性を特異的及び／又は選択的に発揮する目的のために、抗体が、腫瘍細胞に内在化され移行される特性を有することが重要であり好ましい。

抗DLL3抗体は、この分野で通常実行される方法によって、抗原として作用するポリペプチドで動物を免疫化すること、次いで、その生体内で作製された抗体を収集及び精製することによって得ることができる。抗原としての3次元構造を保持するDLL3を使用することが好ましい。このような方法の例としては、DNA免疫化方法を挙げることができる。

10

【0120】

抗原の起源は、ヒトに限定されず、したがって、動物はまた、マウス又はラットなどの非ヒト動物由来の抗原で免疫化することもできる。この場合、ヒトの疾患に適用可能な抗体は、異種抗原に結合する得られた抗体の、ヒト抗原との交差反応性を検査することによって選択することができる。

さらに、抗原に対する抗体を作製する抗体産生細胞は、モノクローナル抗体が得られるようにハイブリドーマを確立するために、公知の方法により骨髓腫細胞と融合させてもよい（例えば、Kohler and Milstein, *Nature* (1975) 256, 495-497; 及びKennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980))。

20

以下、DLL3に対する抗体を得るための方法を具体的に記載する。

【0121】

一般的な概要。最初に、本発明の技術の抗体を生じさせる可能性がある標的ポリペプチドを選択する。例えば、抗体は、全長DLL3タンパク質に対して、又はDLL3タンパク質の細胞外ドメインの一部に対して生じ得る。このような標的ポリペプチドに対する抗体を生成するための技術は、当業者周知である。このような技術の例としては、例えば、これらに限定されないが、ディスプレイライブラリー、ゼノマウス又はヒトマウス、ハイブリドーマを含むものなどが挙げられる。本発明の技術の範囲内の標的ポリペプチドとしては、免疫応答を惹起することが可能な、細胞外ドメインを含有するDLL3タンパク質由来のあらゆるポリペプチドが挙げられる。

30

DLL3タンパク質に対する、組換え操作された抗体及び抗体断片、例えば抗体関連のポリペプチド及びそれらの断片は、本発明の開示に従った使用に好適であることが理解されるものとする。

本明細書に記載の技術に供することができる抗DLL3抗体としては、モノクローナル及びポリクローナル抗体、並びに抗体断片、例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fd、scFv、ダイアボディ、抗体軽鎖、抗体重鎖及び／又は抗体断片が挙げられる。抗体Fv含有ポリペプチド、例えば、Fab'及びF(ab')₂抗体断片の高収量生成に有用な方法がすでに記載されている。米国特許第5,648,237号を参照されたい。

【0122】

一般的に、抗体は、起源となる種から得られる。さらにとりわけ、標的ポリペプチド抗原への特異性を有する起源となる種の抗体の、軽鎖、重鎖又はその両方の可変部分の核酸又はアミノ酸配列が得られる。起源となる種は、本発明の技術の抗体又は抗体のライブラリーを生成するのに有用であったあらゆる種であり、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、サル、ヒトなどである。

40

ファージ又はファージミッドディスプレイ技術は、本発明の技術の抗体を得るのに有用な技術である。モノクローナル抗体を生成及びクローニングするための技術は、当業者周知である。本発明の技術の抗体をコードする配列の発現は、大腸菌(E. coli)で行うことができる。

【0123】

核酸コード配列の縮重により、本発明の技術の実施において、天然に存在するタンパク

50

質のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列をコードする他の配列を使用してもよいその例としては、これに限定されないが、上記のポリペプチドをコードする核酸配列の全部又は一部を含む核酸配列が挙げられ、このような核酸配列は、配列内の機能的に同等なアミノ酸残基をコードする異なるコドンの置換によって変更されており、したがってサイレントな変化を引き起こす。本発明の技術による免疫グロブリンのヌクレオチド配列は、標準的な方法 (Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, "Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127-149, 1998, Alan R. Liss, Inc.) によって計算した場合、このようなバリエーションが D L L 3 タンパク質を認識する有効な抗体を形成する限り、25% までの配列相同性のバリエーションを許容することが理解される。例えば、ポリペプチド配列内の 1 つ又は複数のアミノ酸残基は、機能的な等価体として作用する類似の極性を有する別のアミノ酸によって置換されていてもよく、結果としてサイレントな変更が生じる。配列内のアミノ酸の置換は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択することができる。例えば、非極性 (疎水性) アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンが挙げられる。極性中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンが挙げられる。正電荷を有する (塩基性) アミノ酸としては、アルギニン、リジン及びヒスチジンが挙げられる。負電荷を有する (酸性) アミノ酸としては、アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられる。また、例えば、グリコシル化、タンパク質分解による切断、抗体分子又は他の細胞性リガンドへの連結などによって、翻訳中又はその後差次的に改変されたタンパク質又はその断片若しくは誘導体も、本発明の技術の範囲内に含まれる。加えて、免疫グロブリンをコードする核酸配列は、翻訳、開始、及び／又は終結配列を作り出したり及び／若しくは破壊したりするために、又はコード領域中にバリエーションを作り出すために、及び／又は新しい制限エンドヌクレアーゼ部位を形成したり若しくは既存のそのような部位を破壊したりするために、さらにインビトロでの改変を容易にするために、インビトロ又はインビボで突然変異させてもよい。当業界において公知の変異誘発のためのあらゆる技術を使用でき、その例としては、これらに限定されないが、インビトロの部位特異的変異誘発、J. Biol. Chem. 253:6551、Tab リンカー (Pharmacia) の使用などが挙げられる。

10

20

30

【0124】

ポリクローナル抗血清及び免疫原の調製。本発明の技術の抗体又は当該抗体断片を生成する方法は、典型的には、精製した D L L 3 タンパク質若しくはその断片又は D L L 3 タンパク質又はその断片を発現する細胞で対象 (一般的に非ヒト対象、例えばマウス又はウサギ) を免疫化することを含む。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換え発現された D L L 3 タンパク質又は化学的に合成された D L L 3 ペプチドを含有していてもよい。D L L 3 タンパク質の細胞外ドメイン、又はその一部若しくは断片は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体調製のための標準的な技術を使用して、D L L 3 タンパク質、又はその一部若しくは断片に結合する抗 D L L 3 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。

40

【0125】

全長 D L L 3 タンパク質又はその断片は、免疫原としての断片として有用である。一部の実施形態において、ペプチドに対して生じた抗体が D L L 3 タンパク質との特異的な免疫複合体を形成するように、D L L 3 断片は、D L L 3 の細胞外ドメインを含む。

D L L 3 の細胞外ドメインは、全長 D L L 3 タンパク質のアミノ酸 27~492 にわたる 466 アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態において、抗原性 D L L 3 ペプチドは、少なくとも 5、8、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、又は 450 アミノ酸残基を含む。使用に応じて、当業者周知の方法によっては、より長い抗原性ペプチドが、より短い抗原性ペプチドより時には望ましい。所与のエピトープの多量体は、時には単量体より有効である。

50

【0126】

必要な場合、D L L 3 タンパク質（又はその断片）の免疫原性は、キーホールリンペットヘモシニアン（K L H）又はオボアルブミン（卵子）などの担体タンパク質への融合又はコンジュゲーションによって増加させることができる。多くのこのような担体タンパク質は、当業界において公知である。またD L L 3 タンパク質を、従来のアジュバント、例えばフロイント完全又は不完全アジュバントと組み合わせて、ポリペプチドに対する対象の免疫反応を増加させることもできる。免疫応答を増加させるのに使用される様々なアジュバントとしては、これらに限定されないが、フロイント（完全及び不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、ジニトロフェノールなど）、ヒトアジュバント、例えばカルメット・ゲラン桿菌（*Bacille Calmette-Guerin*）及びコリネバクテリウム・パルバム（*Corynebacterium parvum*）、又は類似の免疫刺激性化合物が挙げられる。これらの技術は、当業界において標準的である。

10

【0127】

本発明の技術を記載することにおいて、免疫応答は、「一次」又は「二次」免疫応答のいずれかとして記載することができる。一次免疫応答は、「防御的」免疫応答とも記載され、これは、特定の抗原、例えばD L L 3 タンパク質へのいくつかの最初の曝露（例えば、最初の「免疫化」）の結果として個体で生じた免疫応答を指す。一部の実施形態において、免疫化は、個体に抗原を含有するワクチンを接種した結果として起こり得る。例えば、ワクチンは、1種又は複数のD L L 3 タンパク質由来の抗原を含むD L L 3 ワクチンであり得る。一次免疫応答は、経時的に弱化又は減衰する可能性があり、さらには消失し、又は少なくとも検出できない程度に弱毒化することさえもあり得る。したがって、本発明の技術はまた、ここでは「メモリー免疫応答」とも記載される「二次」免疫応答にも関する。二次免疫応答という用語は、一次免疫応答がすでに生じた後に個体において惹起された免疫応答を指す。

20

【0128】

したがって、二次免疫応答を惹起することで、例えば、弱化又は減衰した状態になった既存の免疫応答を強化したり、又は消失したか又はもはや検出できなくなったかのいずれかの以前の免疫応答を再び生じさせたりすることができる。二次又はメモリー免疫応答は、体液性（抗体）応答又は細胞の応答のいずれかであり得る。二次又はメモリー体液性応答は、最初の抗原提示で生成したメモリーB細胞の刺激で起こる。遅延型過敏症（D T H）反応は、C D 4⁺ T細胞によって媒介される細胞性二次又はメモリー免疫応答の一種である。最初の抗原曝露は免疫系を刺激し、追加の曝露はD T Hを引き起こす。

30

適切な免疫化の後、抗D L L 3抗体は、対象の血清から調製することができる。必要に応じて、D L L 3タンパク質に対する抗体分子は、哺乳動物から（例えば、血液から）単離することができ、さらにポリペプチドAクロマトグラフィーなどの周知の技術によって精製して、I g G画分を得ることができる。

【0129】

モノクローナル抗体。本発明の技術の一実施形態において、抗体は、抗D L L 3モノクローナル抗体である。例えば、一部の実施形態において、抗D L L 3モノクローナル抗体は、ヒト又はマウス抗D L L 3モノクローナル抗体であり得る。D L L 3タンパク質、又はその誘導体、断片、アナログ又はホモログに対するモノクローナル抗体の調製のために、連続的な細胞株培養によって抗体分子の作製を提供するあらゆる技術を利用することができる。このような技術としては、これらに限定されないが、ハイブリドーマ技術（例えば、Kohler & Milstein, 1975. *Nature* 256: 495-497を参照）；トリオーマ技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（例えば、Kozbor, et al., 1983. *Immunol. Today* 4: 72を参照）及びヒトモノクローナル抗体を作製するためのE B Vハイブリドーマ技術（例えば、Cole, et al., 1985. In: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96を参照）が挙げられる。ヒトモノクロ

40

50

ーナル抗体は、本発明の技術の実施で利用することができ、ヒトハイブリドーマを使用することによって（例えば、Cote, et al., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030を参照）、又はインビトロでヒトB細胞をエプスタインバーウイルスで形質転換することによって（例えば、Cole, et al., 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96を参照）作製することができる。例えば、抗体の領域をコードする核酸の集団は、単離されてもよい。抗体の保存された領域をコードする配列由来のプライマーを利用するPCRを使用して、集団から抗体の一部をコードする配列を増幅し、次いで抗体又はその断片、例えば可変ドメインをコードするDNAが、増幅した配列から再構成される。このような増幅した配列はまた、ファージ又は細菌での融合ポリペプチドの発現及び提示のために、他のタンパク質をコードするDNA、例えば、バクテリオファージコート、又は細菌細胞表面タンパク質をコードするDNAに融合されていてもよい。次いで増幅した配列は、発現させることができ、さらに、例えば、DLL3タンパク質上に存在する抗原又はエピトープに関する発現した抗体又はその断片の親和性に基づいて選択又は単離することができる。代替として、抗DLL3モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマは、対象を免疫化し、次いで慣例的な方法を使用して対象の脾臓からハイブリドーマを単離することによって調製することができる。例えば、Milstein et al., (Galfre and Milstein, Methods Enzymol (1981) 73: 3-46) を参照されたい。標準的な方法を使用してハイブリドーマをスクリーニングすることは、多様な特異性（すなわち、異なるエピトープに対する）及び親和性を有するモノクローナル抗体を作製すると予想される。所望の特性、例えばDLL3結合を示す選択されたモノクローナル抗体は、ハイブリドーマによって発現された状態で使用してもよいし、ポリエチレングリコール（PEG）などの分子に結合させてその特性を変更してもよいし、又はそれをコードするcDNAを単離し、シーケンシングし、様々な方法で操作してもよい。合成のデンドリマー状のツリー（dendromeric tree）を反応性アミノ酸側鎖、例えばリジンに付加して、DLL3タンパク質の免疫原性特性を強化することができる。またCPG-ジヌクレオチド技術を使用しても、DLL3タンパク質の免疫原性特性を強化することができる。他の操作としては、貯蔵中又は対象への投与後の抗体の不安定さに寄与する特定のアミノアシル残基を置換するか又は欠失させること、及びDLL3タンパク質の抗体の親和性を改善するための親和性成熟技術が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0130】

ハイブリドーマ技術。一部の実施形態において、本発明の技術の抗体は、トランスジェニック非ヒト動物、例えば、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスから得られたB細胞を含むハイブリドーマによって作製された抗DLL3モノクローナル抗体である。ハイブリドーマ技術としては、当業界において公知のもの、及びHarlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 349 (1988); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas, 563-681 (1981)で教示されたものが挙げられる。ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体を作製するための他の方法は、当業者周知である。

【0131】

ファージディスプレイ技術。上述したように、本発明の技術の抗体は、組換えDNA及びファージディスプレイ技術の適用を介して作製することができる。例えば、抗DLL3抗体は、当業界において公知の様々なファージディスプレイ方法を使用して調製することができる。ファージディスプレイ方法において、機能的な抗体ドメインは、それをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面上に提示される。所望の結合特性を有するファージは、抗原、典型的には固体表面又はビーズに結合又は捕捉された抗原を用いて直接選択することによって、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒト又はマウスの）から選択される。これらの方法で使用されるファージは、典型的には、ファージ遺伝子III又は遺伝子VIIタンパク質のいずれかに組換えに

よって融合された F a b、F v 又はジスルフィドで安定化された F v 抗体ドメインを有する f d 及び M 1 3 などの繊維状ファージである。加えて、方法は、F a b 発現ライブラリーの構築に適合させることができ（例えば、Huse, et al., Science 246: 1275-1281, 1989を参照）、それにより、D L L 3 ポリペプチド、例えば、そのポリペプチド又は誘導体、断片、アナログ又はホモログに対する所望の特異性を有するモノクローナル F a b 断片の迅速で有効な同定を可能にする。本発明の技術の抗体の作製に使用できるファージディスプレイ方法の他の例としては、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A., 85: 5879-5883, 1988; Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A., 87: 1066-1070, 1990; Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182: 41-50, 1995; Ames et al., J. Immunol. Methods 184: 177-186, 1995; Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24: 952-958, 1994; Persic et al., Gene 187: 9-18, 1997; Burton et al., Advances in Immunology 57: 191-280, 1994; P C T / G B 9 1 / 0 1 1 3 4 ; W O 9 0 / 0 2 8 0 9 ; W O 9 1 / 1 0 7 3 7 ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 ; W O 9 2 / 1 8 6 1 9 ; W O 9 3 / 1 1 2 3 6 ; W O 9 5 / 1 5 9 8 2 ; W O 9 5 / 2 0 4 0 1 ; W O 9 6 / 0 6 2 1 3 ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 (M e d i c a l R e s e a r c h C o u n c i l e t a l .) ; W O 9 7 / 0 8 3 2 0 (M o r p h o s y s) ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 (C A T / M R C) ; W O 9 1 / 1 7 2 7 1 (A f f y m a x) ; 並びに米国特許第 5, 698, 426号、5, 223, 409号、5, 403, 484号、5, 580, 717号、5, 427, 908号、5, 750, 753号、5, 821, 047号、5, 571, 698号、5, 427, 908号、5, 516, 637号、5, 780, 225号、5, 658, 727号及び5, 733, 743号で開示されたものが挙げられる。ジスルフィド結合を介してポリペプチドを付着させることによってバクテリオファージ粒子の表面上にポリペプチドを提示させるのに有用な方法は、Lohning によって、米国特許第 6, 753, 136号に記載されている。上記の参考文献に記載されたように、ファージ選択の後、ファージから抗体コード領域を単離し、それを使用して、ヒト抗体を含む全抗体、又は他のあらゆる所望の抗原結合断片を生成し、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌などのいずれかの所望の宿主で発現させることができる。例えば、F a b、F a b' 及び F (a b')₂断片を組換えによって作製する技術はまた、当業界において公知の方法例えば、W O 9 2 / 2 2 3 2 4 ; Mullinax et al., BioTechniques 12: 864-869, 1992; 及び Sawai et al., AJRI 34: 26-34, 1995; 及び Better et al., Science 240: 1041-1043, 1988で開示されたものを使用しても採用することができる。

【0132】

一般的に、抗体又は当該抗体断片は、ファージ又はファージミド粒子の表面上に存在すると予想されることから、提示ベクターにクローニングされるハイブリッド抗体又はハイブリッド抗体断片は、優れた結合活性を維持するバリエーションを同定するために、適切な抗原に対して選択することができる。例えば、Barbas III et al., Phage Display, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001)を参照されたい。しかしながら、他のベクター様式は、このプロセスに使用でき、例えば、選択及び／又はスクリーニングのための溶菌性ファージベクター（改変された T 7 又はラムダ Z a p 系）に抗体断片ライブラリーをクローニングすることを使用できる。

【0133】

組換え抗 D L L 3 抗体の発現。上述したように、本発明の技術の抗体は、組換え D N A 技術の適用を介して作製することができる。本発明の技術の抗 D L L 3 抗体をコードする組換えポリヌクレオチド構築物は、典型的には、天然に関連する又は異種プロモーター領域などの、抗 D L L 3 抗体鎖のコード配列に作動可能に連結された発現制御配列を含む。したがって、本技術の別の態様は、本発明の技術の抗 D L L 3 抗体をコードする 1 つ又は複数の核酸配列を含有するベクターを含む。本発明の技術のポリペプチドのうちの 1 つ又は複数の組換え発現のために、抗 D L L 3 抗体をコードするヌクレオチド配列の全部又は

一部を含有する核酸は、当業界において周知の組換えDNA技術によって、さらに以下で詳述されるように、適切なクローニングベクター、又は発現ベクター（すなわち、挿入されたポリペプチドコード配列の転写及び翻訳に必要なエレメントを含有するベクター）に挿入される。ベクターの多様な集団を作製するための方法は、Lerner et al. によって米国特許第6,291,160号及び6,680,192号に記載される。

【0134】

一般的に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。本発明の開示において、プラスミドは最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、「プラスミド」及び「ベクター」は、同義的に使用することができる。しかしながら、本発明の技術は、このような技術的にはプラスミドではない発現ベクターの他の形態、例えばウイルスベクター（例えば、複製欠損性レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）を含むことが意図され、これらは、同等の機能を提供する。このようなウイルスベクターは、対象の感染及びその対象における構築物の発現を許容する。一部の実施形態において、発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトすることが可能なベクターにおいて、真核生物プロモーター系である。ベクターが適切な宿主に取り込まれると、宿主は、抗DLL3抗体をコードするヌクレオチド配列の高レベル発現、並びに抗DLL3抗体、例えば交差反応性抗DLL3抗体の収集及び精製に好適な条件下で維持される。一般的に、U.S. 2002/0199213を参照されたい。これらの発現ベクターは、典型的には、エピソームとして、又は宿主染色体のDNAの構成部分としてのいずれかで、宿主生物中で複製可能である。一般的に、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換した細胞を検出できるように、選択マーカー、例えば、アンピシリン耐性又はハイグロマイシン耐性選択マーカーを含有する。ベクターはまた、シグナルペプチドをコードしていてもよく、例えば、細胞外抗体断片の分泌を指示するのに有用なペクチン酸リアーゼをコードしていてもよい。米国特許第5,576,195号を参照されたい。

【0135】

本発明の技術の組換え発現ベクターは、DLL3結合特性を有するタンパク質をコードする核酸を、宿主細胞における核酸の発現に好適な形態で含み、これは、組換え発現ベクターが、発現させる核酸配列に作動可能に連結された、発現に使用される宿主細胞に基づき選択された1つ又は複数の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内において、「作動可能に連結された」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする方式で（例えば、インビトロの転写／翻訳系において、又はベクターが宿主細胞に導入される場合、宿主細胞において）調節配列に連結されていることを意味することが意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。このような調節配列は、例えば、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載される。調節配列としては、多くのタイプの宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの、及び特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指示するもの（例えば、組織特異的調節配列）が挙げられる。当業者であれば、発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のポリペプチドの発現レベルなどのような要因に依存する可能性があるとして理解されると予想される。組換えポリペプチド発現（例えば、抗DLL3抗体）のプロモーターとして有用な典型的な調節配列としては、例えば、これらに限定されないが、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ及び他の糖分解酵素のプロモーターが挙げられる。誘導性酵母プロモーターとしては、なかでも、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソチトロムC、並びにマルトース及びガラクトース利用に関与する酵素からのプロモーターが挙げられる。一実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体をコードするポリヌクレオチドは、araBプロモーターに作動可能に連結され、宿主細胞において発現可能である。米国特許第5,028,530号を参照されたい。本発明の技術の発現ベクターを宿主細胞に導入することによって、本明細書に記載される核酸によってコ

ードされた融合ポリペプチドを含むポリペプチド又はペプチド（例えば、抗 D L L 3 抗体など）を作製することができる。

【0136】

本発明の技術の別の態様は、1つ又は複数の抗 D L L 3 抗体をコードする核酸を含有する、抗 D L L 3 抗体を発現する宿主細胞に関する。本発明の技術の組換え発現ベクターは、原核又は真核細胞における抗 D L L 3 抗体の発現のために設計することができる。例えば、抗 D L L 3 抗体は、細菌細胞、例えば大腸菌、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用して）、真菌細胞、例えば酵母、酵母細胞又は哺乳類細胞で発現させることができる。好適な宿主細胞は、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)でさらに論じられる。代替として、組換え発現ベクターは、インビトロで、例えば、T7プロモーター調節配列及びT7ポリメラーゼを使用して、転写及び翻訳させることができる。これまでに、確率論的に生成したポリヌクレオチド配列の発現を介した、予め決定された特性を有するポリペプチド、例えば抗 D L L 3 抗体の調製及びスクリーニングに有用な方法が記載されている。米国特許第5,763,192号;5,723,323号;5,814,476号;5,817,483号;5,824,514号;5,976,862号;6,492,107号;6,569,641号を参照されたい。

10

【0137】

原核生物におけるポリペプチドの発現は、ほとんどの場合、融合又は非融合ポリペプチドのいずれかの発現を指示する構成的又は誘導性プロモーターを含有するベクターを用いて、大腸菌で行われる。融合ベクターは、そこにコードされたポリペプチドに、通常、組換えポリペプチドのアミノ末端に、所定数のアミノ酸を追加する。このような融合ベクターは、典型的には、3つの目的：(i)組換えポリペプチドの発現を増加させること；(ii)組換えポリペプチドの溶解性を増加させること；及び(iii)組換えポリペプチドの精製において、親和性精製におけるリガンドとして作用することによって補助することに役立つ。多くの場合、融合発現ベクターにおいて、融合部分と組換えポリペプチドとのジャンクションにタンパク質分解による切断部位が導入されることで、融合ポリペプチドの精製の後、融合部分からの組換えポリペプチドの分離が可能になる。このような酵素、及びその同族認識配列としては、第Xa因子、トロンビン及びエンテロキナーゼが挙げられる。典型的な融合発現ベクターとしては、それぞれグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合ポリペプチド、又はポリペプチドAを標的組換えポリペプチドに融合させる、pGEX (Pharmacia Biotech Inc;Smith and Johnson, 1988. Gene 67: 31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.)、及びpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N. J.)が挙げられる。

20

30

【0138】

好適な誘導性非融合大腸菌発現ベクターの例としては、pTrc (Amrann et al., (1988) Gene 69: 301-315) 及びpET 11d (Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89) が挙げられる。ポリペプチド融合を介して多官能性ポリペプチドを得るための別個の活性なペプチド又はタンパク質ドメインの標的化されたアセンブリのための方法は、Pack et al. によって、米国特許第6,294,353号;6,692,935号に記載されている。大腸菌における組換えポリペプチド発現、例えば、抗 D L L 3 抗体を最大化する1つの戦略は、タンパク質分解によって組換えポリペプチドを切断する機能が損なわれた宿主細菌中でポリペプチドを発現させることである。例えば、Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128を参照されたい。別の戦略は、各アミノ酸の個々のコドンが、発現宿主、例えば大腸菌で優先的に利用されるものであるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである（例えば、Wada, et al., 1992. Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118を

40

50

参照)。このような本発明の技術の核酸配列の変更は、標準的なDNA合成技術によって行うことができる。

【0139】

別の実施形態において、抗DLL3抗体発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母サッカロマイセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) における発現のためのベクターの例としては、pYepSec1 (Baldari, et al., 1987, EMBO J. 6: 229-234)、pMFA (Kurjan and Herskowitz, Cell 30: 933-943, 1982)、pJRY88 (Schultz et al., Gene 54: 113-123, 1987)、pYES2 (Invitrogen社、San Diego, Calif.)、及びpicZ (Invitrogen社、San Diego, Calif.) が挙げられる。代替として、抗DLL3抗体は、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞で発現させることができる。培養された昆虫細胞（例えば、SF9細胞）において、ポリペプチド、例えば抗DLL3抗体の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAcシリーズ (Smith, et al., Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165, 1983) 及びpVLシリーズ (Lucklow and Summers, 1989, Virology 170: 31-39) が挙げられる。

10

【0140】

さらに別の実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体をコードする核酸は、哺乳類発現ベクターを使用して、哺乳類細胞において発現される。哺乳類発現ベクターの例としては、例えば、これらに限定されないが、pCDM8 (Nature 329: 840, 1987) を参照) 及びpMT2PC (Kaufman, et al., EMBO J. 6: 187-195, 1987) が挙げられる。哺乳類細胞で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、ウイルス調節エレメントによって提供されることが多い。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、及びシミアンウイルス40から誘導される。本発明の技術の抗DLL3抗体の発現に有用な、原核及び真核細胞の両方のための他の好適な発現系に関して、例えば、Chapters 16 and 17 of Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989を参照されたい。

20

【0141】

別の実施形態において、組換え哺乳類発現ベクターは、特定の細胞型において核酸の発現を指示することが可能である（例えば、組織特異的調節エレメント）。組織特異的調節エレメントは、当業界において公知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkert, et al., Genes Dev. 1: 268-277, 1987）、リンパ球特異的プロモーター (Calame and Eaton, Adv. Immunol. 43: 235-275, 1988)、T細胞受容体のプロモーター (Winoto and Baltimore, EMBO J. 8: 729-733, 1989) 及び免疫グロブリン (Banerji, et al., 1983, Cell 33: 729-740; Queen and Baltimore, Cell 33: 741-748, 1983.)、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；Byrne and Ruddle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477, 1989）、膵臓特異的プロモーター (Edlund, et al., 1985, Science 230: 912-916)、並びに乳腺特異的プロモーター（例えば、ミルクホエイプロモーター；米国特許第4,873,316号及び欧州特許出願公開第264,166号）が挙げられる。発生的に調節されるプロモーターも包含され、例えば、マウスhoxプロモーター (Kessel and Gruss, Science 249: 374-379, 1990) 及び α -フェトプロテインプロモーター (Campes and Tilghman, Genes Dev. 3: 537-546, 1989) である。

30

40

【0142】

本発明の方法の別の態様は、本発明の技術の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」及び「組換え宿主細胞」は、本明細書において同義的に使用される。このような用語は、特定の対象細胞を指すだけでなく、このような細胞の後代又

50

は発生し得る後代も指すことが理解される。突然変異又は環境の影響のいずれかによって後の世代で特定の改変が起こる可能性があるため、このような後代は、実際には親細胞と同一ではない可能性があるが、それでもなお本明細書で使用される用語の範囲内に含まれる。

【0143】

宿主細胞は、いずれの原核又は真核細胞であってもよい。例えば、抗DLL3抗体は、細菌細胞、例えば大腸菌、昆虫細胞、酵母又は哺乳類細胞で発現させることができる。哺乳類細胞は、免疫グロブリン又はその断片をコードするヌクレオチドセグメントを発現させるための好適な宿主である。Winnacker, *From Genes To Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987)を参照されたい。無傷の異種タンパク質を分泌することが可能な多数の好適な宿主細胞株が当業界で開発されており、その例としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株、様々なCOS細胞株、HeLa細胞、L細胞及び骨髓腫細胞株が挙げられる。一部の実施形態において、細胞は、非ヒトである。これらの細胞のための発現ベクターは、発現制御配列、例えば複製起点、プロモーター、エンハンサー、及び必要なプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写ターミネーター配列を含んでいてもよい。Queen et al., *Immunol. Rev.* 89: 49, 1986。例示的な発現制御配列は、内因性遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス由来のプロモーターなどである。Co et al., *J Immunol.* 148: 1149, 1992。他の好適な宿主細胞は当業者公知である。

10

20

【0144】

ベクターDNAは、従来の形質転換又はトランスフェクション技術を介して原核又は真核細胞に導入することができる。用語「形質転換」及び「トランスフェクション」は、本明細書で使用される場合、宿主細胞に外来核酸（例えば、DNA）を導入するための様々な当業界で認識されている技術を指すことが意図され、その例としては、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、遺伝子銃又はウイルスベースのトランスフェクションが挙げられる。哺乳類細胞を形質転換するのに使用される他の方法としては、ポリブレイン、プロトプラスト融合、リポソーム、エレクトロポレーション、及びマイクロインジェクションの使用が挙げられる（一般的に、Sambrook et al., *Molecular Cloning* を参照）。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするための好適な方法は、Sambrook, et al. (*MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)、及び他の実験室マニュアルに見出すことができる。目的のDNAセグメントを含有するベクターは、細胞宿主のタイプに応じて、周知の方法によって宿主細胞に移行させることができる。

30

【0145】

哺乳類細胞の安定なトランスフェクションのために、ことが公知である使用される発現ベクター及びトランスフェクション技術に応じて、ごくわずかな細胞だけが、外来DNAをそのゲノムに組み込むことができる。これらの組み込み体を同定及び選択するために、一般的に、選択可能マーカー（例えば、抗生物質耐性）をコードする遺伝子が目的の遺伝子と共に宿主細胞に導入される。様々な選択可能マーカーとしては、薬物、例えばG418、ハイグロマイシン及びメトトレキセートに対する耐性を付与するものが挙げられる。選択可能マーカーをコードする核酸は、抗DLL3抗体をコードするものと同じベクターで宿主細胞に導入してもよいし、又は別々のベクターで導入してもよい。導入された核酸が安定してトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定することができる（例えば、選択可能マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は、生存すると予想され、一方で他の細胞は死滅する）。

40

【0146】

培養物中の本発明の技術の抗DLL3抗体を含む宿主細胞、例えば原核又は真核宿主細胞

50

胞は、組換え抗D L L 3抗体を作製する（すなわち、発現させる）のに使用することができる。一実施形態において、本方法は、抗D L L 3抗体が作製されるように、好適な培地中で宿主細胞（抗D L L 3抗体をコードする組換え発現ベクターが導入された）を培養することを含む。別の実施形態において、本方法は、培地又は宿主細胞から抗D L L 3抗体を単離する工程をさらに含む。一旦発現されたら、抗D L L 3抗体、例えば、抗D L L 3抗体又は抗D L L 3抗体関連のポリペプチドの収集は、培養培地及び宿主細胞から精製される。抗D L L 3抗体は、H P L C精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当分野の標準的手順に従って、精製することができる。一実施形態において、抗D L L 3抗体は、B o s s e t a l .、米国特許第4, 816, 397号の方法によって宿主生物で作製される。通常、抗D L L 3抗体鎖は、シグナル配列と共に発現され、したがって、培養培地に放出される。しかしながら、抗D L L 3抗体鎖が宿主細胞によって天然に分泌されない場合、抗D L L 3抗体鎖は、穏やかな界面活性剤での処理によって放出させることができる。組換えポリペプチドの精製は当業界において周知であり、その例としては、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークロマトグラフィー精製技術、カラムクロマトグラフィー、イオン交換精製技術、ゲル電気泳動などが挙げられる（一般に、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982を参照)。

10

【0147】

抗D L L 3抗体をコードするポリヌクレオチド、例えば、抗D L L 3抗体コード配列は、トランスジェニック動物のゲノムへの導入及びそれに続くトランスジェニック動物の乳での発現のために、導入遺伝子に取り込まれていてもよい。例えば、米国特許第5, 741, 957号、5, 304, 489号、及び5, 849, 992号を参照されたい。好適な導入遺伝子としては、カゼイン又はβ-ラクトグロブリンなどの乳腺特異的な遺伝子からのプロモーター及びエンハンサーと作動可能に連結された軽鎖及び／又は重鎖のコード配列が挙げられる。トランスジェニック動物の作製のために、導入遺伝子は、受精した卵母細胞にマイクロインジェクションされてもよいし、又は胚性幹細胞のゲノムに取り込ませてもよく、このような細胞の核が、除核した卵母細胞に移行される。

20

【0148】

単鎖抗体。一実施形態において、本発明の技術の抗D L L 3抗体は、単鎖抗D L L 3抗体である。本発明の技術に従って、D L L 3タンパク質に特異的な単鎖抗体の作製に技術を適合させることができる（例えば、米国特許第4, 946, 778号を参照）。単鎖F v s及び本発明の技術の抗体を作製するのに使用することができる技術の例としては、米国特許第4, 946, 778号及び5, 258, 498号；Huston et al., Methods in Enzymology, 203: 46-88, 1991; Shu, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7995-7999, 1993;並びにSkerra et al., Science 240: 1038-1040, 1988に記載されるものが挙げられる。

30

【0149】

キメラ及びヒト化抗体。一実施形態において、本発明の技術の抗D L L 3抗体は、キメラ抗D L L 3抗体である。一実施形態において、本発明の技術の抗D L L 3抗体は、ヒト化抗D L L 3抗体である。本発明の技術の一実施形態において、ドナー及びアクセプター抗体は、異なる種からのモノクローナル抗体である。例えば、アクセプター抗体は、ヒト抗体であり（ヒトにおいてその抗原性を最小化するために）、この場合、得られたC D Rグラフト化抗体は、「ヒト化」抗体と呼ばれる。

40

【0150】

組換え抗D L L 3抗体、例えばヒト及び非ヒト部分の両方を含むキメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、標準的な組換えDNA技術を使用して作製でき、本発明の技術の範囲内である。インビボでのヒトにおける本発明の技術の抗D L L 3抗体の使用、加えて、インビトロでの検出アッセイにおけるこれらの薬剤の使用などの一部の使用に関して、キメラ又はヒト化抗D L L 3抗体を使用することが可能である。このようなキメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、当業界において公知の組換えDNA技術によって作製することができる。このような有用な方法としては、例えば、これらに限定されないが、国際特許出

50

願 PCT/US 86/02269 号；米国特許第 5,225,539 号；欧州特許第 184187 号；欧州特許第 171496 号；欧州特許第 173494 号；PCT 国際公報 WO 86/01533 号；米国特許第 4,816,567 号；5,225,539 号；欧州特許第 125023 号；Better, et al., 1988. Science 240: 1041-1043; Liu, et al., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu, et al., 1987. J. Immunol. 139: 3521-3526; Sun, et al., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 84: 214-218; Nishimura, et al., 1987. Cancer Res. 47: 999-1005; Wood, et al., 1985. Nature 314: 446-449; Shaw, et al., 1988. J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; Morrison (1985) Science 229: 1202-1207; Oi, et al. (1986) BioTechniques 4: 214; Jones, et al., 1986. Nature 321: 552-525; Verhoeyan, et al., 1988. Science 239: 1534; Morrison, Science 229: 1202, 1985; Oi et al., BioTechniques 4: 214, 1986; Gillies et al., J. Immunol. Methods, 125: 191-202, 1989;米国特許第 5,807,715 号；及び Beidler, et al., 1988. J. Immunol. 141: 4053-4060 に記載される方法が挙げられる。例えば、抗体は、CDR グラフティング (EP 0239400; WO 91/09967; 米国特許第 5,530,101 号；5,585,089 号；5,859,205 号；6,248,516 号；EP 460167)、ペニアリング又はリサーフェイシング (EP 0592106; EP 0519596; Padlan E. A., Molecular Immunology, 28: 489-498, 1991; Studnicka et al., Protein Engineering 7: 805-814, 1994; Roguska et al., PNAS 91: 969-973, 1994)、及びチェーンシャッフリング (米国特許第 5,565,332 号) などの様々な技術を使用してヒト化することができる。一実施形態において、マウス抗 D L L 3 モノクローナル抗体をコードする c D N A が、F c 定常領域をコードする配列を除去するように特異的に選択された制限酵素で消化され、ヒト F c 定常領域をコードする c D N A の等価な部分が置換される (Robinson et al., PCT/US 86/02269; Akira et al., 欧州特許出願第 184,187 号；Taniguchi、欧州特許出願第 171,496 号；Morrison et al., 欧州特許出願第 173,494 号；Neuberger et al., WO 86/01533; Cabilly et al., 米国特許第 4,816,567 号；Cabilly et al., 欧州特許出願第 125,023 号；Better et al. (1988) Science 240: 1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu et al. (1987) J Immunol 139: 3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res 47: 999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314: 446-449; 及び Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; 米国特許第 6,180,370 号；米国特許第 6,300,064 号；6,696,248 号；6,706,484 号；6,828,422 号を参照。

【0151】

一実施形態において、本発明の技術は、ヒト抗マウス抗体（以下「HAMA」と称する）応答を誘導する可能性が低いが、それでもなお有効な抗体エフェクター機能を有するヒト化抗 D L L 3 抗体の構築を提供する。用語「ヒト」及び「ヒト化」は、抗体に関して、本明細書で使用される場合、ヒト対象において治療上許容できる弱い免疫原性応答を惹起すると予測されるあらゆる抗体に関する。一実施形態において、本発明の技術は、ヒト化抗 D L L 3 抗体、重鎖及び軽鎖免疫グロブリンを提供する。

【0152】

CDR グラフト化抗体。一部の実施形態において、本発明の技術の抗 D L L 3 抗体は、抗 D L L 3 C D R グラフト化抗体である。一般的に、抗 D L L 3 C D R 抗体を生成するのに使用されるドナー及びアクセプター抗体は、異なる種からのモノクローナル抗体である；典型的には、アクセプター抗体は、ヒト抗体であり（ヒトにおけるその抗原性を最小化するために）、この場合、得られた C D R グラフト化抗体は、「ヒト化」抗体と呼ばれる。詳細には、「ヒト化抗体」は、ヒト抗体鎖からの可変領域フレームワーク残基を含

む少なくとも1つの鎖及び非ヒト抗体（例えば、マウス）からの少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含む抗体を指す。用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用される場合、ヒト免疫グロブリン配列由来の変及び定常領域を有する抗体を含むことが意図される。しかしながら、用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用される場合、マウスなどの別の哺乳類種由来のCDR配列がヒトフレームワーク配列上にグラフト化された抗体を含むことは意図されない。グラフトは、アクセプター抗体の単一のV_H又はV_L以内の単一のCDRのグラフトであってもよいし（又は単一のCDRの一部であってもよい）、又はV_H及びV_Lの一方又は両方以内の複数のCDR（又はそれらの一部）のグラフトであってもよい。多くの場合、アクセプター抗体の全ての可変ドメイン中の全ての3つのCDRが、対応するドナーCDRで置き換えられることになるが、得られたCDRグラフト化抗体のD L L 3タンパク質への十分な結合を許容するのに必要な程度分だけ置き換える必要がある。CDRグラフト化及びヒト化抗体を生成するための方法は、Queen et al. の米国特許第5, 585, 089号；米国特許第5, 693, 761号；米国特許第5, 693, 762号；並びにWinterのU. S. 5, 225, 539；及びEP 0 682 040によって教示される。V_H及びV_Lポリペプチドを調製するのに有用な方法は、Winter et al. の米国特許第4, 816, 397号；6, 291, 158号；6, 291, 159号；6, 291, 161号；6, 545, 142号；EP 0 368 684；EP 0 451 216；及びEP 0 120 694によって教示される。

【0153】

同じファミリー及び／又は同じファミリーメンバーから好適なフレームワーク領域候補を選択した後、重鎖及び軽鎖可変領域のいずれか又は両方は、起源となる種からのCDRをハイブリッドフレームワーク領域にグラフト化することによって作製される。上記の態様のいずれかに関するハイブリッド可変鎖領域を有するハイブリッド抗体又はハイブリッド抗体断片のアセンブリは、当業者公知の従来の方法を使用して達成することができる。例えば、本明細書に記載されるハイブリッド可変ドメイン（すなわち、標的種に基づくフレームワーク及び起源となる種からのCDR）をコードするDNA配列は、オリゴヌクレオチド合成及び／又はPCRによって作製することができる。CDR領域をコードする核酸はまた、好適な制限酵素を使用して起源となる種の抗体から単離し、好適なライゲーション酵素でライゲートすることによって、標的種のフレームワークにライゲートすることもできる。代替として、起源となる種の抗体の可変鎖のフレームワーク領域は、部位特異的変異誘発によって変更してもよい。

ハイブリッドは、各フレームワーク領域に対応する複数の候補から選択されたもので構成されているため、本明細書に記載される原理に従って構築するのに適した配列の多くの組合せが存在する。したがって、個々のフレームワーク領域の異なる組合せを有するメンバーを有するハイブリッドのライブラリーをアセンブリすることができる。このようなライブラリーは、配列の電子データベースコレクション又はハイブリッドの物理的なコレクションであってもよい。

【0154】

このプロセスは、典型的には、グラフト化されたCDRに隣接するアクセプター抗体のFRを変更しない。しかしながら、当業者は、時には、ドナー抗体の対応するFRにより類似したFRを作製するために所与のFRの特定の残基を置き換えることによって、得られた抗D L L 3 CDRグラフト化抗体の抗原結合親和性を改善してもよい。置換の好適な位置としては、CDRに隣接するアミノ酸残基、又はCDRと相互作用することが可能なアミノ酸残基が挙げられる（例えば、US 5, 585, 089、特に12～16列を参照）。又は当業者は、ドナーFRから開始して、アクセプターFR又はヒトコンセンサスFRにより類似したものにそれを改変してもよい。これらの改変を作製するための技術は、当業界において公知である。とりわけ、得られたFRが、その位置に関してヒトコンセンサスFRに適合するか、又はこのようなコンセンサスFRに少なくとも90%又はそれより高度に同一である場合、そのようにすることは、完全ヒトFRを有する同じ抗体と比較して、得られた改変された抗D L L 3 CDRグラフト化抗体の抗原性を著しく増加さ

せない可能性がある。

【0155】

二重特異性抗体（BsAb）。二重特異性抗体は、別個 of 構造を有する2つの標的、例えば2つの異なる標的抗原、同じ標的抗原上の2つの異なるエピトープと同時に結合できる抗体である。BsAbは、例えば、同一又は異なる抗原の異なるエピトープを認識する重鎖及び／又は軽鎖を組み合わせてることによって作製することができる。一部の実施形態において、分子機能によって、二重特異性の結合剤は、その2つの結合アームの一方の上の1つの抗原（又はエピトープ）と結合し（1つのVH／VL対）、その第2のアーム上の異なる抗原（又はエピトープ）と結合する（異なるVH／VL対）。この定義によれば、二重特異性結合剤は、2つの別個の抗原結合アーム（特異性及びCDR配列の両方において）を有し、それが結合する各抗原に対して1価である。

10

本発明の技術の二重特異性抗体（BsAb）及び二重特異性抗体断片（BsFab）は、例えばDLL3に特異的に結合する少なくとも1つのアーム、及び第2の標的抗原に特異的に結合する少なくとも1つの他のアームを有する。特定の実施形態において、BsAbは、細胞表面上にDLL3抗原を発現する腫瘍細胞に結合することが可能である。

【0156】

様々な二重特異性融合タンパク質は、分子工学を使用して作製することができる。例えば、完全免疫グロブリンフレームワーク（例えば、IgG）、単鎖可変断片（scFv）、又はそれらの組合せのいずれかを利用するBsAbが構築されている。一部の実施形態において、二重特異性融合タンパク質は、2価であり、例えば、1つの抗原につき単一の結合部位を有するscFv及び第2の抗原のための単一の結合部位を有するFab断片を含む。一部の実施形態において、二重特異性融合タンパク質は、2価であり、例えば、1つの抗原につき単一の結合部位を有するscFv及び第2の抗原のための単一の結合部位を有する別のscFv断片を含む。他の実施形態において、二重特異性融合タンパク質は、4価であり、例えば、1つの抗原につき2つの結合部位を有する免疫グロブリン（例えば、IgG）及び第2の抗原のための2つの同一なscFvを含む。タンデム状の2つのscFv単位で構成されるBsAbは、臨床的に成功した二重特異性抗体様式であることが示されている。一部の実施形態において、BsAbは、タンデム状の2つの単鎖可変断片（scFvs）を含み、腫瘍抗原（例えば、DLL3）と結合するscFvが、異なる標的抗原に結合するscFvと連結されるように設計されている。

20

30

【0157】

近年のBsAbを作製するための方法としては、より一般的な免疫グロブリンアイソタイプより強くそれらが架橋するように、追加のシステイン残基を有する操作された組換えモノクローナル抗体が挙げられる。例えば、FitzGerald et al., Protein Eng. 10(10):1221-1225 (1997)を参照されたい。別のアプローチは、必要な二重特異性を有する、2つ又はそれより多くの異なる単鎖抗体又は抗体断片セグメントを連結する組換え融合タンパク質を操作することである。例えば、Coloma et al., Nature Biotech. 15:159-163 (1997)を参照されたい。様々な二重特異性融合タンパク質が、分子工学を使用して作製することができる。

【0158】

2つ又はそれより多くの異なる単鎖抗体又は抗体断片を連結する二重特異性融合タンパク質は、類似の方式で作製される。組換え方法は、様々な融合タンパク質を作製するのに使用することができる。一部の特定の実施形態において、本発明の技術によるBsAbは、免疫グロブリンを含み、免疫グロブリンは、重鎖及び軽鎖、並びにscFvを含む。一部の特定の実施形態において、scFvは、本明細書で開示されるいずれかのDLL3免疫グロブリンの重鎖のC末端に連結されている。一部の特定の実施形態において、scFvは、本明細書で開示されたいずれかのDLL3免疫グロブリンの軽鎖のC末端に連結されている。様々な実施形態において、scFvは、リンカー配列を介して重鎖又は軽鎖に連結されている。重鎖FdのscFvへのフレーム内接続に必要な適切なリンカー配列は、PCR反応を介してVL及びVkappaドメインに導入される。次いでscFvをコード

40

50

するDNA断片は、CH1ドメインをコードするDNA配列を含有するステージングベクター (staging vector) にライゲートされる。得られたscFv-CH1構築物は切り出され、DLL3抗体のV_H領域をコードするDNA配列を含有するベクターにライゲートされる。得られたベクターは、二重特異性融合タンパク質の発現のために適切な宿主細胞、例えば哺乳類細胞をトランスフェクトするのに使用することができる。

【0159】

一部の実施形態において、リンカーは、長さが、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100又はそれより多くのアミノ酸である。一部の実施形態において、リンカーは、硬い3次元構造をとらずに、むしろポリペプチド (例えば、第1及び／又は第2の抗原結合部位) にフレキシビリティを提供する傾向があることを特徴とする。一部の実施形態において、リンカーは、例えば安定性の増加などのBsAbに付与された具体的な特性に基づいて、本明細書に記載されるBsAbで採用される。一部の実施形態において、本発明の技術のBsAbは、G₄Sリンカー (配列番号82) を含む。一部の特定の実施形態において、本発明の技術のBsAbは、(G₄S)_nリンカーを含み、式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15であるか、又はそれより大きい (配列番号83)。

【0160】

Fc改変。一部の実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体は、バリエーションFc領域を含み、前記バリエーションFc領域は、野生型Fc領域 (又は親のFc領域) と比べて少なくとも1つのアミノ酸改変を含むことによって、前記分子は、Fc受容体 (例えば、FcγR) に対して変更された親和性を有し、ただし、前記バリエーションFc領域は、Sondermann et al., Nature, 406:267-273 (2000) によって開示されたものなどのFc-Fc受容体相互作用の結晶学的及び構造的な分析に基づいて、Fc受容体との直接の接触をもたらす位置に置換を有さない。FcγRなどのFc受容体との直接の接触をもたらすFc領域内の位置の例としては、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 (C7Eループ)、及びアミノ酸327~332 (F/G) ループが挙げられる。

【0161】

一部の実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体は、活性化及び／又は阻害性受容体に対する変更された親和性を有し、1つ又は複数のアミノ酸改変を有するバリエーションFc領域を有し、前記1つ又は複数のアミノ酸改変は、アラニンでのN297置換、又はアラニンでのK322置換である。

グリコシル化改変。一部の実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体は、親Fc領域と比較して、バリエーショングリコシル化を有するFc領域を有する。一部の実施形態において、バリエーショングリコシル化は、フコスの非存在を含み；一部の実施形態において、バリエーショングリコシル化は、GnT1欠乏CHO細胞における発現に起因する。

一部の実施形態において、本発明の技術の抗体は、抗体の機能性、例えば抗原への結合活性を変更することなく、目的の抗原 (例えば、DLL3) に結合する適切な参照抗体と比べて改変されたグリコシル化部位を有していてもよい。「グリコシル化部位」は、本明細書で使用される場合、オリゴ糖 (すなわち、互いに連結された2個又はそれより多くの単糖を含有する炭水化物) が特異的に共有結合で付着すると予想される抗体中のあらゆる特異的なアミノ酸配列を含む。

【0162】

オリゴ糖側鎖は、典型的には、N又はO結合のいずれかを介して抗体の主鎖に連結される。N結合型グリコシル化は、オリゴ糖部分のアスパラギン残基の側鎖への付着を指す。O結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、例えば、セリン、スレオニンへのオリゴ糖部分の付着を指す。例えば、フコース及び末端N-アセチルグルコサミンなどの特定のオリゴ糖が欠如したFc-グリコフォーム (hDLL3-IgG₁) は、特殊なCHO

細胞中で作製でき、強化されたADCエフェクター機能を呈することができる。

【0163】

一部の実施形態において、本明細書で開示される免疫グロブリン関連組成物の炭水化物含量は、グリコシル化部位を付加したり又は欠失させたりすることによって改変される。抗体の炭水化物含量を改変するための方法は当業界において周知であり、本発明の技術内に含まれ、例えば、米国特許第6,218,149号；EP0359096B1；米国特許公開US2002/0028486号；国際特許出願公開WO03/035835；米国特許公開第2003/0115614号；米国特許第6,218,149号；米国特許第6,472,511号を参照されたい；これらは全て、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。一部の実施形態において、抗体（又はその関連する部分又は成分）の炭水化物含量は、抗体の1つ又は複数の内因性炭水化物部分を欠失させることによって改変される。一部の特定の実施形態において、本発明の技術は、297位をアスパラギンからアラニンに改変することによって、抗体のFc領域のグリコシル化部位を欠失させることを含む。

10

【0164】

操作されたグリコフォームは、これらに限定されないが、エフェクター機能を強化すること又は低減させることなどの様々な目的のために有用であり得る。操作されたグリコフォームは、当業者公知のあらゆる方法によって生成することができ、例えば、操作された又はバリエーションを発現株を使用することによって、1つ又は複数の酵素、例えばN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIII（GnTIIII）との共発現によって、様々な生物又は様々な生物からの細胞株においてFc領域を含む分子を発現することによって、又はFc領域を含む分子が発現された後に炭水化物を改変することによって生成することができる。操作されたグリコフォームを生成するための方法は当業界において公知であり、その例としては、これらに限定されないが、それらのそれぞれが参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17: 176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294; Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-3473；米国特許第6,602,684号；米国特許出願第10/277,370号；米国特許出願第10/113,929号；国際特許出願公開WO00/61739A1；WO01/292246A1；WO02/311140A1；WO02/30954A1；POTILLEGENT（商標）技術（Biowa, Inc., Princeton, N. J.）；GLYCOMAB（商標）グリコシル化操作技術（GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland）に記載されるものが挙げられる。例えば、国際特許出願公開WO00/061739；米国特許公開公報第2003/0115614号；Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49を参照されたい。

20

30

【0165】

融合タンパク質。一実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体は、融合タンパク質である。本発明の技術の抗DLL3抗体は、第2のタンパク質に融合する場合、抗原性タグとして使用することができる。ポリペプチドに融合できるドメインの例としては、異種シグナル配列だけでなく、他の異種の機能的な領域も挙げられる。融合は、必ずしも直接的な融合でなくてもよいが、リンカー配列を介して生じるものでもよい。さらに、本発明の技術の融合タンパク質はまた、抗DLL3抗体の特徴を改善するように操作することもできる。例えば、追加のアミノ酸、とりわけ荷電アミノ酸の領域を抗DLL3抗体のN末端に付加して、宿主細胞からの精製又はそれに続く取り扱い及び貯蔵中の安定性及び持続性を改善することができる。またペプチド部分を抗DLL3抗体に付加して、精製を容易にすることもできる。このような領域は、抗DLL3抗体の最終的な調製の前に除去することができる。ポリペプチドの取り扱いを容易にするためのペプチド部分の付加は、当業界においてよく知られた慣例的な技術である。本発明の技術の抗DLL3抗体は、マーカ配列、例えば融合したポリペプチドの精製を容易にするペプチドに融合していても

40

50

よい。選択された実施形態において、マーカーのアミノ酸配列は、なかでも p Q E ベクター (Q I A G E N, I n c.、C h a t s w o r t h、C a l i f) に提供されるタグなどのヘキサヒスチジンペプチド (配列番号 84) であり、これらの多くは商業的に入手可能である。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824, 1989 に記載されたように、例えば、ヘキサヒスチジン (配列番号 84) は、融合タンパク質の便利な精製をもたらす。精製に有用な別のペプチドタグである「H A」タグは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質由来のエピトープに対応する。Wilson et al., Cell 37: 767, 1984。

【0166】

したがって、これらの上記の融合タンパク質はいずれも、本発明の技術のポリヌクレオチド又はポリペプチドを使用して操作することができる。また一部の実施形態において、本明細書に記載される融合タンパク質は、インビボにおける半減期の増加も示す。

ジスルフィド結合した二量体構造を有する融合タンパク質 (I g G による) は、単量体の分泌されたタンパク質又はタンパク質断片単独と比較して、他の分子と結合すること及びそれを中和することにおいてより効率的であり得る。Fountoulakis et al., J. Biochem. 270: 3958-3964, 1995。

【0167】

同様に、E P - A - O 4 6 4 5 3 3 (カナダの対応出願 2 0 4 5 8 6 9) は、免疫グロブリン分子の定常領域の様々な部分を別のヒトタンパク質又はその断片と共に含む融合タンパク質を開示する。多くの場合において、融合タンパク質における F c 部分は、療法及び診断において有益であり、したがって、例えば改善した薬物動態学的特性をもたらすことができる。E P - A 0 2 3 2 2 6 2 を参照されたい。代替として、融合タンパク質が発現され、検出され、精製された後に F c 部分を欠失させること又は改変することが望ましい場合がある。例えば、融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、F c 部分は、療法及び診断を妨害する可能性がある。創薬において、例えば、ヒトタンパク質、例えば h I L - 5 は、h I L - 5 のアンタゴニストを同定するためのハイスループットスクリーニングアッセイの目的のために F c 部分と融合されている。Bennett et al., J. Molecular Recognition 8: 52-58, 1995; Johanson et al., J. Biol. Chem., 270: 9459-9471, 1995。

【0168】

抗原の調製: D L L 3 抗原は、宿主細胞が遺伝子操作に従って抗原タンパク質をコードする遺伝子を作製できるようにすることにより得ることができる。具体的には、抗原遺伝子を発現することが可能なベクターが作製され、次いでベクターは、遺伝子がそこで発現されるように宿主細胞に導入され、その後、発現された抗原を精製することができる。抗体はまた、上述した遺伝子操作に基づき抗原を発現する細胞で、又は抗原を発現する細胞株で動物を免疫化する方法によっても得ることができる。

代替として、抗体はまた、抗原タンパク質を使用せずに、抗原タンパク質の c D N A を発現ベクターに取り込み、次いで免疫化される動物に発現ベクターを投与し、抗原タンパク質に対する抗体がそこで作製されるように、そのようにして免疫化された動物の体内で抗原タンパク質を発現させることによって得ることもできる。

【0169】

本発明で使用される抗 D L L 3 抗体は、特に限定されない。例えば、本出願の配列表に示されるアミノ酸配列によって特定された抗体が、好適に使用することができる。本発明で使用される抗 D L L 3 抗体は、望ましくは、以下の特性を有する抗体である:

(1) 以下の特性を有する抗体:

(a) D L L 3 に特異的に結合すること、及び

(b) D L L 3 に結合することによって D L L 3 を発現する細胞に内在化される活性を有すること; 又は

(2) 上記の (1) に記載の抗体であって、D L L 3 は、ヒト D L L 3 である、抗体。

本発明の D L L 3 に対する抗体を得るための方法は、抗 D L L 3 抗体を得ることができ

10

20

30

40

50

る限りは、特に限定されない。抗原として、そのコンフォメーションを保持する D L L 3 を使用することが好ましい。

【0170】

抗体を得るための方法の一例としては、DNA免疫化方法を挙げることができる。DNA免疫化方法は、動物（例えば、マウス又はラット）個体を抗原発現プラスミドでトランスフェクトすること、次いで個体中で抗原を発現させて、抗原に対する免疫性を誘導することを含むアプローチである。トランスフェクションアプローチとしては、プラスミドを筋肉に直接注射する方法、トランスフェクション試薬、例えばリポソーム又はポリエチレンジイミンを静脈に注射する方法、ウイルスベクターを使用するアプローチ、ジーンガンを使用してプラスミドを付着させた金粒子を注射するアプローチ、静脈にプラスミド溶液を大量に急速に注射する流体力学的方法などが挙げられる。発現プラスミドを筋肉注射するトランスフェクション方法に関して、インビボの電圧ポレーションと呼ばれる技術は、プラスミドの筋肉内注射部位への電圧ポレーションを適用することを含み、これは、発現レベルを改善するためのアプローチとして公知である (Aihara H, Miyazaki J. Nat Biotechnol. 1998 Sep; 16 (9): 867-70又はMir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Apr 13; 96 (8): 4262-7。このアプローチは、プラスミドの筋肉内注射の前に筋肉をヒアルロニダーゼで処置することによって発現レベルをさらに改善する (McMahon JM1, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ., Gene Ther. 2001 Aug; 8 (16): 1264-70)。さらに、ハイブリドーマ作製は、公知の方法によって実行してもよいし、また例えばHybridoma Production System (Cytosol Sciences, Inc.) を使用して実行してもよい。

【0171】

モノクローナル抗体を得る具体的な例は、以下の手順を含んでもよい：

(a) 免疫応答は、発現ベクター（例えば、pcDNA3.1; Thermo Fisher Scientific Inc.）にDLL3 cDNAを取り込むこと、及び動物の体内でDLL3を発現するように、電圧ポレーション又はジーンガンなどの方法によって、免疫化される動物（例えば、ラット又はマウス）にベクターを直接投与することにより誘導することができる。電圧ポレーションなどによるベクターの投与は、抗体力価を強化するために必要に応じて、1回又はそれより多く、好ましくは複数回、実行してもよい；

(b) 免疫応答が誘導された前述の動物からの抗体産生細胞を含有する組織（例えば、リンパ節）の収集；

(c) 骨髄腫細胞（以下、「骨髄腫」と称する）（例えば、マウス骨髄腫SP2/O-ag14細胞）の調製；

(d) 抗体産生細胞と骨髄腫との細胞融合；

(e) 目的の抗体を作製するハイブリドーマ群の選択；

(f) 単一細胞クローンへの分裂（クローニング）；

(g) 任意選択で、モノクローナル抗体の大量作製のためのハイブリドーマの培養、若しくはハイブリドーマを接種する動物の繁殖；並びに／又は

(h) このようにして作製されたモノクローナル抗体の生理学的活性（内在化活性）及び結合特異性の研究、若しくは標識試薬としての抗体の特性の検査。

【0172】

本明細書において使用される抗体力価を測定するための方法の例としては、これらに限定されないが、フローサイトメトリー及びCell-ELISAを挙げることができる。

本発明の抗体はまた、ヒトに対する異種遺伝子型の抗原性を低減させる目的のために人工的に改変された、遺伝学的に組換えられた抗体、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体、加えてDLL3に対する上述したモノクローナル抗体も含む。これらの抗体は、公知の方法によって作製することができる。

キメラ抗体の例としては、可変領域及び定常領域が互いに異種である抗体、例えば、マウス又はラット由来の抗体の可変領域をヒト由来の定常領域にコンジュゲートすることによって形成されたキメラ抗体を挙げることができる (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851-6855, (1984)を参照)。

【0173】

ヒト化抗体の例としては、ヒト由来の抗体に相補性決定領域 (CDR) のみを取り込むことによって形成された抗体 (Nature (1986) 321, p. 522-525を参照)、CDR グラフティング方法に従ってヒト抗体に一部のフレームワーク、加えてCDR配列からのアミノ酸残基を取り込むことによって形成された抗体 (国際公開WO90/07861号)、及び抗原と結合する能力を維持しながら一部のCDRのアミノ酸配列を改変することによって形成された抗体を挙げることができる。

10

【0174】

本発明の抗体のさらなる例としては、DLL3に結合するヒト抗体を挙げることができる。抗DLL3ヒト抗体は、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗DLL3ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖及び軽鎖遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを使用する方法により得ることができる (Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, p. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, p. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, p. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p. 722-727などを参照)。

20

【0175】

このようなヒト抗体産生マウスは、その内因性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座を破壊し、次いで、その代わりに酵母人工染色体 (YAC) ベクターなどを使用して、ヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子改変動物を使用し、次いでこのような遺伝子改変された動物からノックアウト動物及びトランスジェニック動物を作製し、次いでこのような動物を互いに繁殖させることによって、特異的に作製してもよい。

それ以外の方法で、抗DLL3ヒト抗体はまた、遺伝学的組換え技術に従って、このようなヒト抗体の重鎖及び軽鎖のそれぞれをコードするcDNAで、又は好ましくは、cDNAを含むベクターで真核細胞を形質転換すること、次いで、培養上清から抗体が得られるように、遺伝子改変されたヒトモノクローナル抗体を作製する形質転換した細胞を培養することによっても得ることもできる。

30

【0176】

この状況において、真核細胞、好ましくは、哺乳類細胞、例えばCHO細胞、リンパ球又は骨髓腫は、例えば、宿主として使用することができる。

さらに、ヒト抗体ライブラリーから選択されたファージディスプレイ由来のヒト抗体を得る方法 (Wormstone, I. M. et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), p. 2301-2308; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), p. 189-203; Siriwardena, D. et al., Ophthalmology (2002) 109 (3), p. 427-431などを参照) もまた公知である。

40

【0177】

例えば、ヒト抗体の可変領域を単鎖抗体 (scFv) としてファージの表面上に発現させ、次いで抗原に結合するファージを選択することを含むファージディスプレイ方法を用いることができる (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), p. 1105-1116)。

抗原へのその結合能力のために選択されたファージ遺伝子を分析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。

抗原に結合するscFvのDNA配列が決定されたら、前述の配列を有する発現ベクターが作製され、作製された発現ベクターは次いで適切な宿主に導入され、そこで発現させ

50

ることができ、それによってヒト抗体が得られる（国際公報WO92/01047号、WO92/20791号、WO93/06213号、WO93/11236号、WO93/19172号、WO95/01438号、及びWO95/15388号、Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), p. 1105-1116）。

【0178】

本発明の説明におけるアミノ酸置換は、好ましくは、保存的アミノ酸置換である。保存的アミノ酸置換は、特定のアミノ酸側鎖に関連するアミノ酸グループ内で起こる置換である。好ましいアミノ酸グループは、以下の通りである：酸性グループ＝アスパラギン酸及びグルタミン酸；塩基性グループ＝リジン、アルギニン、及びヒスチジン；非極性グループ＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、及びトリプトファン；及び非荷電極性ファミリー＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、及びチロシン。他の好ましいアミノ酸グループは、以下の通りである：脂肪族ヒドロキシ基＝セリン及びスレオニン；アミドを含有するグループ＝アスパラギン及びグルタミン；脂肪族グループ＝アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；及び芳香族グループ＝フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン。このようなアミノ酸置換は、好ましくは、元のアミノ酸配列を有する物質の特性を損なうことなく行われる。

【0179】

V. 抗DLL3抗体の同定及び特徴付け

本発明の技術の抗DLL3抗体を同定及び／又はスクリーニングするための方法。DLL3タンパク質に対する所望の特異性を有するもの（例えば、DLL3の細胞外ドメインに結合するもの）に関してDLL3ポリペプチドに対する抗体を同定及びスクリーニングするのに有用な方法は、当業界公知のあらゆる免疫学的に媒介される技術を含む。免疫応答の成分は、当業者周知の様々な方法によって、インビトロで検出することができる。例えば、（１）細胞傷害性Ｔリンパ球を、放射標識された標的細胞と共にインキュベートし、これらの標的細胞の溶解物は、放射活性の放出によって検出することができる；（２）ヘルパーＴリンパ球を、抗原及び抗原提示細胞と共にインキュベートし、サイトカインの合成及び分泌を標準的な方法によって測定することができる（Windhagen A et al., Immunity, 2: 373-80, 1995）；（３）抗原提示細胞をタンパク質抗原全体と共にインキュベートし、MHC上におけるその抗原の提示を、Ｔリンパ球活性化アッセイ又は生物物理学的な方法のいずれかによって検出することができる（Harding et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 4230-4, 1989）；（４）肥満細胞を、そのFc-γR3受容体を架橋する試薬と共にインキュベートし、ヒスタミン放出を酵素免疫検査法によって測定することができる（Siraganian et al., TIPS, 4: 432-437, 1983）；及び（５）酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）。

【0180】

同様に、モデル生物（例えば、マウス）又はヒト対象のいずれかにおける免疫応答の生成物も、当業者周知の様々な方法によって検出することができる。例えば、（１）ワクチン接種に応答する抗体の作製は、臨床実験室で現在使用されている標準的な方法、例えばELISAによって容易に検出することができる；（２）免疫細胞の炎症部位への移動は、皮膚表面を引っ掻き、滅菌容器に入れて、引っ掻いた部位にわたり移動する細胞を捕獲することによって検出することができる（Peters et al., Blood, 72: 1310-5, 1988）；（３）マイトジェン又は混合リンパ球反応に応答する末梢血単核細胞（PBMC）の増殖は、³H-チミジンを使用して測定することができる；（４）顆粒球、マクロファージ、及びPBMC中の他の食細胞の食細胞能力は、ウェル中にPBMCを標識された粒子と共に入れることによって測定することができる（Peters et al., Blood, 72: 1310-5, 1988）；及び（５）免疫系細胞の分化は、CD分子、例えばCD4及びCD8に対する抗体でPBMCを標識付け、これらのマーカーを発現するPBMCの割合を測定することによって測定することができる。

【0181】

一実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体は、複製可能な遺伝学的パッケージの表面上へのDLL3ペプチドの提示を使用して選択される。例えば、米国特許第5,514,548号;5,837,500号;5,871,907号;5,885,793号;5,969,108号;6,225,447号;6,291,650号;6,492,160号;EP585287;EP605522;EP616640;EP1024191;EP589877;EP774511;EP844306を参照されたい。所望の特異性を有する結合分子をコードするファージミドゲノムを含有する糸状バクテリオファージ粒子を作製／選択するのに有用な方法が記載されている。例えば、EP774511;US5871907;US5969108;US6225447;US6291650;US6492160を参照されたい。

10

【0182】

一実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体は、酵母宿主細胞の表面上へのDLL3ペプチドの提示を使用して選択される。酵母表面ディスプレイによるscFvポリペプチドの単離に有用な方法が、Kiecke et al., Protein Eng. 1997 Nov; 10(11): 1303-10によって記載されている。

【0183】

一実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体は、リボソームディスプレイを使用して選択される。リボソームディスプレイを使用してペプチドライブラリーにおいてリガンドを同定するのに有用な方法は、Mattheakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9022-26, 1994;及びHanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4937-42, 1997によって記載されている。

20

特定の実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体は、DLL3ペプチドのtRNAディスプレイを使用して選択される。インビトロにおけるtRNAディスプレイを使用するリガンドの選択に有用な方法は、Merryman et al., Chem. Biol., 9: 741-46, 2002によって記載されている。

一実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体は、RNAディスプレイを使用して選択される。RNAディスプレイライブラリーを使用してペプチド及びタンパク質を選択するのに有用な方法は、Roberts et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12297-302, 1997; and Nemoto et al., FEBS Lett., 414: 405-8, 1997によって記載されている。非天然RNAディスプレイライブラリーを使用してペプチド及びタンパク質を選択することに有用な方法は、Frankel et al., Curr. Opin. Struct. Biol., 13: 506-12, 2003によって記載されている。

30

【0184】

一実施形態において、本発明の技術の抗DLL3抗体は、グラム陰性細菌のペリプラズムで発現され、標識されたDLL3タンパク質と混合される。WO02/34886を参照されたい。DLL3タンパク質に親和性を有する組換えポリペプチドを発現するクローンにおいて、Harvey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 22: 9193-98 2004及び米国特許公開第2004/0058403号に記載されたように、抗DLL3抗体に結合した標識されたDLL3タンパク質の濃度は増加し、細胞をライブラリーの残りから単離することが可能になる。

40

所望の抗DLL3抗体の選択の後、前記抗体は、当業者公知のあらゆる技術によって、例えば原核又は真核細胞発現などによって大量に作製できることが予期される。抗DLL3抗体は、例えば、これらに限定されないが、抗DLL3ハイブリッド抗体又は断片であり、これは、抗体重鎖をコードする発現ベクターを構築するための従来の技術を使用することによって作製することができ、それにおいて、元の種抗体結合特異性を保持するのに必要なCDR、及び必要に応じて可変領域フレームワークの最小部分（本明細書に記載される技術によって操作されたものなど）が、起源となる種抗体から誘導され、抗体の残部が、本明細書に記載される通りに操作することができる標的種の免疫グロブリンから誘導され、それによって、ハイブリッド抗体重鎖の発現のためのベクターが作製される。

50

【0185】

D L L 3 結合の測定。一部の実施形態において、D L L 3 結合アッセイは、D L L 3 タンパク質及び抗 D L L 3 抗体を、D L L 3 タンパク質と抗 D L L 3 抗体との結合に好適な条件下で混合し、D L L 3 タンパク質と抗 D L L 3 抗体との結合の量を評価するアッセイ様式を指す。結合の量は、好適な対照と比較され、対照は、D L L 3 タンパク質の非存在下における結合の量、非特異的な免疫グロブリン組成物の存在下における結合の量、又はその両方であり得る。結合の量は、あらゆる好適な方法によって評価することができる。結合アッセイ方法としては、例えば、E L I S A、ラジオイムノアッセイ、シンチレーション近接アッセイ、蛍光エネルギー移動アッセイ、液体クロマトグラフィー、膜ろ過アッセイなどが挙げられる。抗 D L L 3 抗体に結合する D L L 3 タンパク質の直接的な測定のための生物物理学的なアッセイは、例えば、核磁気共鳴、蛍光、蛍光偏光、表面プラズモン共鳴（B I A C O R E チップ）、バイオレイヤー干渉法などである。特異的な結合は、当業界において公知の標準的なアッセイによって、例えば、放射性リガンド結合アッセイ、E L I S A、F R E T、免疫沈降、S P R、N M R（2 D - N M R）、質量分析法などによって決定される。候補抗 D L L 3 抗体の特異的な結合が、候補抗 D L L 3 抗体の非存在下で観察される結合より少なくとも 1 パーセント大きい場合、候補抗 D L L 3 抗体は、本発明の技術の抗 D L L 3 抗体として有用である。

10

【0186】

上述した重鎖アミノ酸配列及び軽鎖アミノ酸配列に高い同一性を示す配列と一緒に組み合わせることによって、上述した抗体のそれぞれの生物学的活性と同等の生物学的活性を有する抗体を選択することが可能になる。このような同一性は、一般的に 80 % 又はそれより高い、好ましくは 90 % 又はそれより高い、より好ましくは 95 % 又はそれより高い、最も好ましくは 99 % 又はそれより高い同一性である。さらに、重鎖又は軽鎖のアミノ酸配列と比べて、それらの 1 つの又はいくつかのアミノ酸残基の置換、欠失又は付加を含む重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上述した抗体のそれぞれの生物学的活性と同等な生物学的活性を有する抗体を選択することが可能になる。

20

2 つのタイプのアミノ酸配列間の同一性は、C l u s t a l W バージョン 2 のデフォルトパラメーターを使用して配列をアライメントすることによって決定することができる（Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG (2007), “Clustal W and Clustal X version 2.0”, Bioinformatics. 23 (21): 2947-2948）。

30

【0187】

新たに作製されたヒト抗体が、いずれか 1 つの本発明の説明に記載されるラット抗ヒト D L L 3 抗体、キメラ抗ヒト D L L 3 抗体又はヒト化抗ヒト D L L 3 抗体が結合する部分的なペプチド又は部分的な 3 次元構造に結合する場合、ヒト抗体が、ラット抗ヒト D L L 3 抗体、キメラ抗ヒト D L L 3 抗体又はヒト化抗ヒト D L L 3 抗体が結合するのと同じエпитープに結合することを決定できる。代替として、ヒト抗体が、抗体の D L L 3 への結合において本発明の説明に記載されるラット抗ヒト D L L 3 抗体、キメラ抗ヒト D L L 3 抗体又はヒト化抗ヒト D L L 3 抗体と競合することを確認することによって、エпитープの特異的な配列又は構造が決定されていない場合であっても、ヒト抗体が、本発明の説明に記載されるラット抗ヒト D L L 3 抗体、キメラ抗ヒト D L L 3 抗体又はヒト化抗ヒト D L L 3 抗体が結合するのと同じエпитープに結合することを決定できる。本発明の説明において、これらの決定方法のうちの少なくとも 1 つによって、ヒト抗体が「同じエпитープに結合する」ことが決定される場合、本発明の説明に記載されるラット抗ヒト D L L 3 抗体、キメラ抗ヒト D L L 3 抗体又はヒト化抗ヒト D L L 3 抗体に関するものと同様に、新たに調製されたヒト抗体は、「同じエпитープに結合する」と結論付けられる。ヒト抗体が同じエпитープに結合することが確認される場合、ヒト抗体は、ラット抗ヒト D L L 3 抗体、キメラ抗ヒト D L L 3 抗体又はヒト化抗ヒト D L L 3 抗体の生物学的活性と同等の生物学的活性を有することが予測される。

40

50

【0188】

上述した方法により得られたキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体は、好ましい抗体が選択できるように、公知の方法などにより、抗原に対するそれらの結合活性に関して評価される。

抗体の特性の比較のための別のインジケータの一例としては、抗体の安定性を挙げるができる。示差走査熱量計（DSC）は、タンパク質の相対的な構造的安定性のための優れたインジケータとして役立つ熱変性中点（T_m）を敏速及び正確に測定することが可能な装置である。DSCを使用してT_m値を測定し、得られた値に関する比較を行うことによって、熱安定性の差を比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性と特定の相関を有することが公知であり（Lori Burton, et al., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, p. 265-273）、したがって、好ましい抗体は、インジケータとして熱安定性を使用して選択することができる。抗体の選択のためのインジケータの他の例としては、好適な宿主細胞における高い収量、及び水溶液中での低い凝集を挙げるができる。例えば、収量が最大の抗体が、必ずしも最大の熱安定性を呈するとは限らないため、前述のインジケータに基づいてそれを包括的に決定することによって、ヒトへの投与に最も好適な抗体を選択することが必要である。

10

【0189】

得られた抗体は、同質の状態になるまで精製してもよい。抗体の分離及び精製のために、通常のタンパク質のために使用される分離及び精製方法を使用することができる。例えば、カラムクロマトグラフィー、ろ過、限外ろ過、塩析、透析、分取ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及び等電点分画法が適切に選択され、抗体を分離及び精製できるように互いに組み合わせられるが（*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); and *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)）、分離及び精製方法の例は、それらに限定されない。

20

【0190】

クロマトグラフィーの例としては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、及び吸収クロマトグラフィーを挙げるができる。

30

これらのクロマトグラフ技術は、液体クロマトグラフィー、例えばHPLC又はFPLCを使用して行うことができる。

アフィニティークロマトグラフィーに使用されるカラムの例としては、プロテインAカラム及びプロテインGカラムを挙げるができる。プロテインAの使用を含むカラムの例としては、ハイパーD（Hyper D）、POROS、及びセファロースF.F.（Sephacrose F.F.）（Pharmacia）を挙げることができる。

また抗原が固定された担体を使用して、抗原への抗体の結合活性を利用することによって、抗体を精製することもできる。

【0191】

V I . 抗D L L 3抗体-薬物コンジュゲート（ADC）

40

本明細書に記載される抗D L L 3抗体（例えば、2-C8-A、6-G23-F、及び10-O18-A又はヒト抗体：H2-C8-A、H2-C8-A-2、H2-C8-A-3、H6-G23-F、H6-G23-F-2、H6-G23-F-3、H10-O18-A、H10-O18-A-2、及びH10-O18-A-3）を、薬物にリンカー構造部分を介してコンジュゲートして、抗D L L 3抗体-薬物コンジュゲート（ADC）を調製することができる。薬物は、それがリンカー構造に接続できる置換基又は部分構造を有する限り、特に限定されない。抗D L L 3抗体-薬物コンジュゲート（ADC）は、コンジュゲートした薬物に応じて様々な目的のために使用することができる。このような薬物の例としては、抗腫瘍活性を有する物質、血液疾患に有効な物質、自己免疫疾患に有効な物質、抗炎症性物質、抗微生物物質、抗真菌物質、抗寄生虫物質、抗ウイルス物質、及

50

び抗麻痺物質 (anti-anesthetic substance) を挙げることができる。

本発明の抗体-薬物コンジュゲートは、以下の式：

【0192】

【化27】

[式 36]



10

によって表され、 m_1 は、抗体-薬物コンジュゲート中の抗体分子1個当たりのコンジュゲートした薬物分子の数を表し、Abは、抗体又は当該抗体の機能的な断片を表し、Lは、AbとDとを連結するリンカーを表し、Dは、薬物を表す。

【0193】

A. 薬物

本発明の抗体-薬物コンジュゲートにコンジュゲートした薬物Dが本明細書に記載される。本発明の薬物Dは、好ましくは、抗腫瘍化合物である。抗腫瘍化合物は、腫瘍細胞においてリンカーの一部又は全体が切断され、抗腫瘍化合物部分が放出されると、抗腫瘍作用を生じる。リンカー及び薬物が結合部分で切り離される場合、元の構造の抗腫瘍化合物が放出され、元の抗腫瘍作用が発揮される。

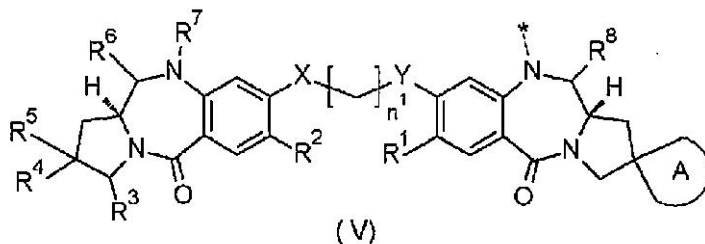
20

本発明の抗体-薬物コンジュゲートにおける抗腫瘍化合物は、一般式(V)によって表されるピロロベンゾジアゼピン誘導体(PBD誘導体)である：

【0194】

【化28】

[式 37]



30

式の可変基は、以下でより詳細に記載される。

【0195】

アスタリスクは、リンカーLへの結合を表す。

n^1 は、2～8の整数を表し、好ましくは、2～6の整数、より好ましくは3～5の整数である。

40

アルキル鎖は、下付き文字 n^1 が2～8の整数、好ましくは2～6の整数、より好ましくは3～5の整数であり、二重結合を含んでもよい。

Aは、スピロ結合した3～5員飽和炭化水素環又は3～5員飽和複素環を表し、好ましくは、3～5員飽和炭化水素環（シクロプロパン、シクロブタン、又はシクロペンタン）、より好ましくはシクロプロパン又はシクロブタン、最も好ましくはシクロプロパンである。

スピロ結合した3～5員飽和炭化水素環は、1～4個のハロゲン原子で置換されていてもよく、好ましくは、1又は2個のフッ素原子で置換されていてもよい（例えば、2,2-ジフルオロシクロプロパン）。

R^1 及び R^2 は、それぞれ独立して、C1-C6アルコキシ基、C1-C6アルキル基

50

、水素原子、ヒドロキシ基、チオール基、C 1－C 6アルキルチオ基、ハロゲン原子、又は－NR' R''を表し、それぞれ好ましくは、C 1－C 6アルコキシ基、C 1－C 6アルキル基、又はヒドロキシ基、より好ましくは、C 1－C 3アルコキシ基、最も好ましくは、メトキシ基である。

R³、R⁴、及びR⁵は、以下の(i)～(iii)のいずれかに記載された通りである。

i. 化合物の実施形態 1

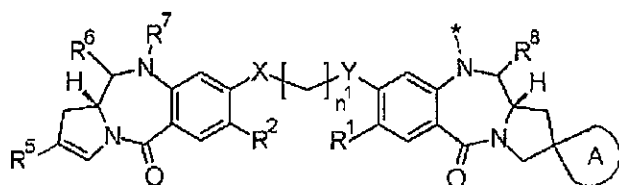
R³及びR⁴が、以下で示されるように、R³及びR⁴が結合して二重結合を形成している炭素原子と一緒に組み合わせられる場合：

【0196】

10

【化29】

[式38]



20

R⁵は、任意選択でグループ1から選択される1つ又は複数の置換基を有するアリール基又はヘテロアリール基、又は任意選択でグループ2から選択される1つ又は複数の置換基を有するC 1－C 6アルキル基を表し、好ましくは、任意選択でグループ1から選択される1つ又は複数の置換基を有するアリール基である。

【0197】

R⁵に関する「任意選択でグループ1から選択される1つ又は複数の置換基を有するアリール基又はヘテロアリール基」における「アリール基」は、好ましくは、フェニル基又はナフチル基であり、より好ましくは、フェニル基である。

R⁵に関する「任意選択でグループ1から選択される1つ又は複数の置換基を有するアリール基又はヘテロアリール基」における「ヘテロアリール基」は、好ましくは、チエニル基、ピリジル基、ピリミジル基、キノリル基、キノキサリル基、又はベンゾチオフェニル基、より好ましくは、2-チエニル基、3-チエニル基、2-ピリジル基、3-ピリジル基、又は4-ピリジル基であり、より一層好ましくは、3-ピリジル基又は3-チエニル基である。

30

【0198】

R⁵に関するアリール基又はヘテロアリール基の置換基の例としては、これらに限定されないが、以下のa)～j)が挙げられる：

a) 任意選択で1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよいC 1－C 6アルコキシ基、

b) 任意選択で1～3個のハロゲン原子、ヒドロキシ基、－OCOR'、－NR' R''、－C(=NR')－NR' R''、及び－NH C(=NR')－NR' R''から選択されるれか1つで置換されていてもよいC 1－C 6アルキル基、

c) ハロゲン原子、

d) C 3－C 5シクロアルコキシ基、

e) C 1－C 6アルキルチオ基、

f) －NR' R''、

g) －C(=NR')－NR' R''、

h) －NH C(=NR')－NR' R''、

i) －NH COR'、及び

j) ヒドロキシ基。

50

ここで、b) 及び f) ～ i) における R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又は C1-C6 アルキル基を表し、好ましくは、それぞれ独立して、水素原子又は C1-C3 アルキル基である。

【0199】

a) ～ j) は、好ましくは、以下の通りである：

- a) 任意選択で 1 ～ 3 個のハロゲン原子で置換されていてもよい C1-C3 アルコキシ基、より好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、*i*-プロポキシ基、又はトリフルオロメトキシ、より一層好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、又はトリフルオロメトキシ基、最も好ましくは、メトキシ基；
- b) 任意選択で 1 ～ 3 個のハロゲン原子で置換されていてもよい C1-C3 アルキル基、
ヒドロキシ基、 $-OCOR'$ 、 $-C(=NR')-NR''R'''$ 、又は $-NHC(=NR')-NR''R'''$ [式中、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又は C1-C3 アルキル基であり、より好ましくは、任意選択で、1 ～ 3 個のハロゲン原子、ヒドロキシ基、 $-OCOR'$ 、 $-C(=NR')-NR''R'''$ 、及び $-NHC(=NR')-NR''R'''$ から選択されるいずれかで置換されていてもよい C1-C3 アルキル基であり、式中、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又はメチル基であり、より一層好ましくは、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、フルオロメチル基、ジフルオロメチル基、トリフルオロメチル基、ヒドロキシメチル基、 $-CH_2OCO Me$ 、 $-CH_2-NHC(=NH)-NH_2$ 、又は $-CH_2-NHC(=NMe)-NH_2$ である]；
- c) ハロゲン原子、好ましくはフッ素原子又は塩素原子；
- d) C3-C5 シクロアルコキシ基、より好ましくはシクロプロポキシ基；
- e) C1-C3 アルキルチオ基、より好ましくはメチルチオ基又はエチルチオ基；
- f) $-NR'R''$ [式中、 R' 及び R'' は、それぞれ独立して、水素原子又は C1-C3 アルキル基であり、より好ましくは、 $-NH_2$ 、 $-NHMe$ 、 $-NMe_2$ 、 $-NH Et$ 、又は $-NEt_2$ である]；
- g) $-C(=NR')-NR''R'''$ [式中、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又は C1-C3 アルキル基であり、より好ましくは、 $-C(=NH)-NH_2$ 又は $-C(=NMe)-NH_2$ である]；
- h) $-NHC(=NR')-NR''R'''$ [式中、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又は C1-C3 アルキル基であり、より好ましくは、 $-NHC(=NH)-NH_2$ 又は $-NHC(=NMe)-NH_2$ である]；
- i) $-NHCOR'$ [式中、 R' は、水素原子又は C1-C3 アルキル基であり、より好ましくは、 $-NHCOMe$ 又は $-NHCO Et$ である]；及び
- j) ヒドロキシ基。

【0200】

R^5 に関するアリール基（好ましくは、フェニル基）又はヘテロアリール基（好ましくは、ピリジル基）は、いずれの位置に少なくとも 1 つの置換基を有していてもよい。複数の置換基が存在する場合、置換基は、同一であってもよいし又は異なってもよい。

R^5 がアリール基である場合、各置換基は、好ましくは、a)、b)、d)、g)、h) 、又は j) であり、より好ましくは a)、b)、d)、又は j) である。

R^5 がフェニル基である場合、 R^5 は、いずれの位置に置換基を有していてもよく、複数の置換基を有していてもよく、好ましくは、1 又は 2 つの置換基は、3 位及び／又は 4 位に存在し、より好ましくは、1 つの置換基は、4 位に存在する。 R^5 がナフチル基である場合、 R^5 は、いずれの位置に置換基を有していてもよく、複数の置換基を有していてもよく、好ましくは、1 つの置換基は、6 位に存在する。

【0201】

R^5 がフェニル基である場合、 R^5 は、より好ましくは、フェニル基、4-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-エトキシフェニル基、4-(*n*-プロポキシ)-フェニル基、4-(*i*-プロポキシ)-フェニル基、4-シクロプロポキシ-フェニル

10

20

40

50

基、4-トリフルオロメチルフェニル基、4-ヒドロキシメチルフェニル基、4-アセトキシメチルフェニル基、又は4-カルバミミドアミドメチル(carbamimidomethyl)-フェニル基であり、より一層好ましくは、フェニル基、4-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-シクロプロポキシフェニル基、4-ヒドロキシメチルフェニル基、4-アセトキシメチルフェニル基、4-カルバミミドアミドメチルフェニル基、又は4-トリフルオロメチルフェニル基である。

【0202】

R⁵がナフチル基である場合、R⁵は、より好ましくは、ナフチル基又は6-メトキシ-2-ナフチル基である。

最も好ましくは、4-メトキシフェニル基である。

R⁵がヘテロアリール基である場合、各置換基は、好ましくは、a)、b)、d)、g)、h)、又はj)であり、より好ましくはa)又はb)である。

R⁵がヘテロアリール基である場合、R⁵は、いずれの位置に少なくとも1つの置換基を有していてもよい。R⁵が3-ピリジル基である場合、その置換基は、好ましくは、6位及び／又は5位に存在する。R⁵が2-ピリジルである場合、その置換基は、好ましくは、5位及び／又は4位に存在するか、又は5位及び／又は6位に存在する。R⁵が4-ピリジルである場合、その置換基は、好ましくは、2位及び／又は6位に存在する。

【0203】

R⁵がヘテロアリール基である場合、R⁵は、複数の置換基を有していてもよく、好ましくは、1又は2つの置換基を有し、好ましくは、1つの置換基を有する。

R⁵がピリジル基である場合、R⁵は、好ましくは、6-メトキシ-3-ピリジル基又は6-メチル-3-ピリジル基である。

R⁵が3-チエニル基又は6-キノキサリル基である場合、R⁵は、好ましくは、非置換である。

R⁵に関する「任意選択でグループ2から選択される1つ又は複数の置換基を有するC1-C6アルキル基」における「C1-C6アルキル基」は、好ましくは、C1-C3アルキル基であり、より好ましくは、メチル基又はエチル基である。

【0204】

R⁵に関する「任意選択でグループ2から選択される1つ又は複数の置換基を有するC1-C6アルキル基」における置換基は、それぞれハロゲン原子、ヒドロキシ基、又はC1-C6アルコキシ基（好ましくは、C1-C3アルコキシ基）であり、好ましくはヒドロキシ基、メトキシ基、又はエトキシ基であり、より好ましくはヒドロキシ基である。

ii. 化合物の実施形態2

R³が水素原子を表す場合、R⁴及びR⁵は、R⁴及びR⁵が結合している炭素原子と一緒に組み合わせられて、以下で示されるように3～5員飽和炭化水素環若しくは3～5員飽和複素環、又はCH₂=を形成する：

【0205】

10

20

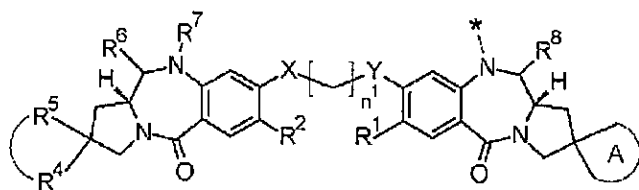
30

40

50

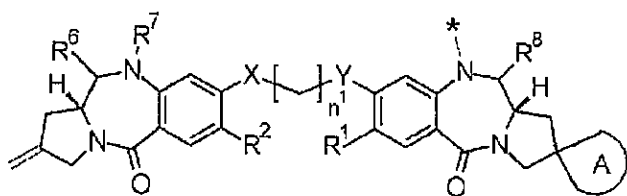
【化 3 0】

[式 39]



又は

[式 49]



3～5員飽和炭化水素環は、1～4個のハロゲン原子で置換されていてもよく、好ましくは、1又は2個のフッ素原子で置換されていてもよい。

【0206】

R^4 及び R^5 は、好ましくは、組み合わされて、3～5員飽和炭化水素環又は $CH_2=$ を形成し、より好ましくは、シクロプロパン、シクロブタン、又は $CH_2=$ （エキソメチレン基）を形成し、より一層好ましくは、シクロプロパンを形成する。

R^4 及び R^5 が組み合わされて、3～5員飽和炭化水素環又は3～5員飽和複素環を形成する場合、3～5員飽和炭化水素環又は3～5員飽和複素環は、好ましくは、Aと同じである。より好ましくは、Aは、3～5員飽和炭化水素環であり、 R^4 及び R^5 は、組み合わされて、3～5員飽和炭化水素環を形成し、より一層好ましくは、Aは、シクロプロパン環であり、 R^4 及び R^5 は、組み合わされて、シクロプロパン環を形成する。

【0207】

i i i . 化合物の実施形態 3

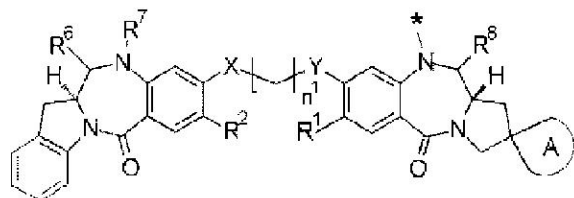
R^3 、 R^4 、及び R^5 は、 R^3 が結合している炭素原子と R^4 及び R^5 が結合している炭素原子と一緒に組み合わされて、任意選択でグループ3から選択される1つ又は複数の置換基を有するベンゼン環又は6員複素環を形成する。

以下の式は、 R^3 及び R^4 が組み合わされて、任意選択で1つ又は複数の置換基を有するベンゼン環を形成するケースを示す：

【0208】

【化 3 1】

[式 41]



10

20

30

40

50

ベンゼン環又は複素環は、いずれの位置に少なくとも1つの置換基を有していてもよい。複数の置換基が存在する場合、置換基は、同一であってもよいし又は異なってもよい。

ベンゼン環又は複素環の各置換基は、ハロゲン原子、任意選択で1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよいC1～C6アルキル基、又はC1～C6アルコキシ基であり、好ましくは、ハロゲン原子、任意選択で1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよいC1～C3アルキル基、又はC1～C3アルコキシであり、より好ましくは、ハロゲン原子、メチル基、又はメトキシ基である。

「任意選択で1つ又は複数の置換基を有するベンゼン環又は6員複素環」は、好ましくは、非置換ベンゼン環である。

10

【0209】

R^3 、 R^4 及び R^5 は、最も好ましくは、上記のサブセクション(i)「化合物の実施形態1」を満たす。

R^6 及び R^7 はそれぞれ、水素原子を表すか、又は R^6 及び R^7 は、組み合わせられて、イミン結合($C=N$)を表す。

R^8 は、ヒドロキシ基又はC1～C3アルコキシ基であり、好ましくは、ヒドロキシ基又はメトキシ基であり、より好ましくはヒドロキシ基である。 R^8 は、亜硫酸水素塩付加物(OSO_3M 、式中、Mは、金属カチオンである)であってもよい。

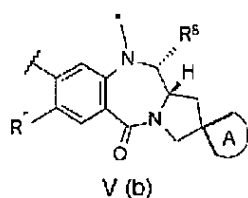
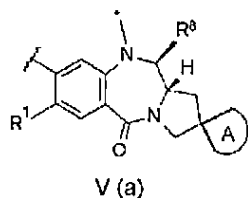
R^8 は不斉炭素原子に結合しているため、以下の部分構造(Va)又は(Vb)によって表される立体配置が提供される。一般式(V)において、各波線は、Yへの結合を表し、各アスタリスクは、Lへの結合を表す。

20

【0210】

【化32】

[式42]



30

X及びYは、それぞれ独立して、酸素原子、窒素原子、又は硫黄原子であり、好ましくは酸素原子である。

本発明の薬物Dは、好ましくは、以下の群から選択されるいずれか1つの化合物である：

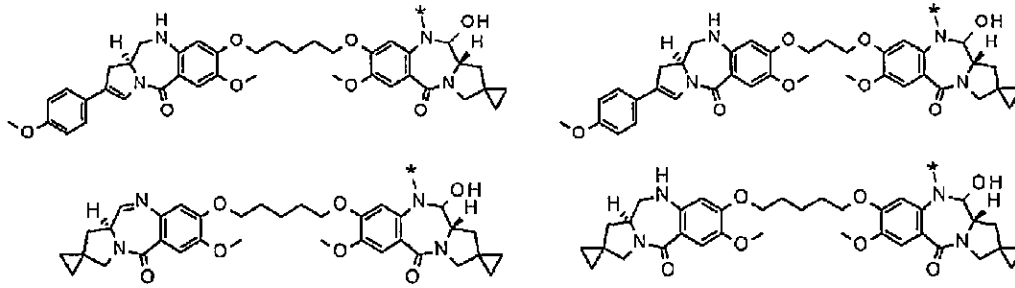
【0211】

40

50

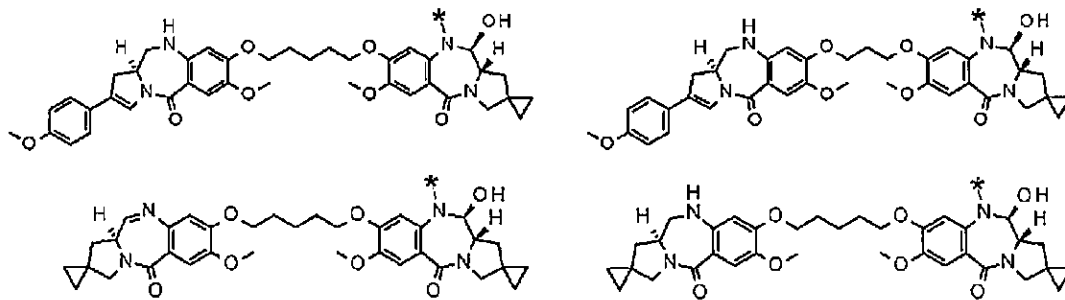
【化 3 3】

[式 43]



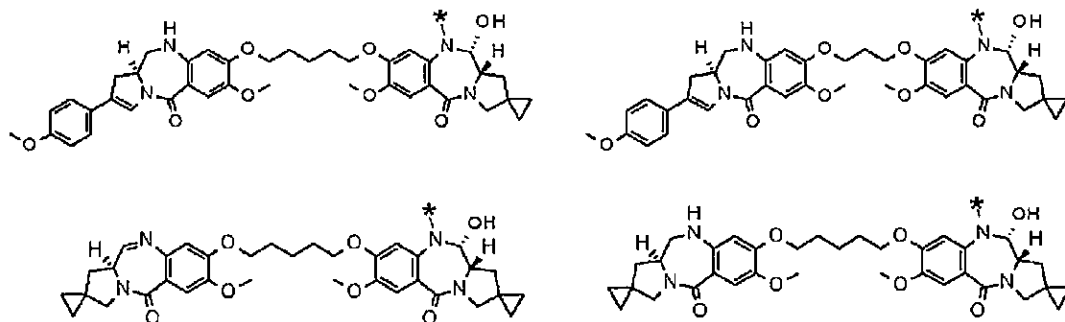
10

[式 44]



20

[式 45]



30

式中、各アスタリスクは、薬物がリンカー構造（L）に結合するところを表す。

【0 2 1 2】

一部の実施形態において、 $-OH$ は、1 1' 位にある。

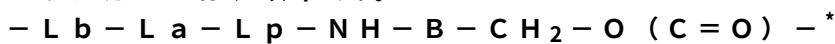
【0 2 1 3】

40

B. リンカー構造

本発明の抗体-薬物コンジュゲートにおいて抗腫瘍薬を抗体に結合させるためのリンカー構造を説明する。

リンカーLは、以下の式：



によって表され、式中、アスタリスクは、薬物DのN10'位における窒素原子への結合を表し、Lbは、LaをAbのグリカン又はリモデリングされたグリカンに接続するスペーサーを表す。

【0 2 1 4】

Bは、フェニル基又はヘテロアリール基を表し、好ましくは、1,4-フェニル基、2

50

、5-ピリジル基、3,6-ピリジル基、2,5-ピリミジル基、又は2,5-チエニル基であり、より好ましくは、1,4-フェニル基である。

L pは、インビボ又は標的細胞で切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを表す。L pは、例えば、エステラーゼやペプチダーゼなどの酵素の作用によって切断される。

L pは、2～7個（好ましくは、2～4個）のアミノ酸で構成されるペプチド残基である。すなわち、L pは、2～7個のアミノ酸がペプチド結合を介して接続されるオリゴペプチド残基で構成される。

L pは、N末端において、L b-L a-の形態でL aのカルボニル基に結合され、C末端において、リンカーの-NH-B-CH₂-O (C=O)-部分のアミノ基(-NH-)と共にアミド結合を形成する。L pのC末端と-NH-との間の結合は、エステラーゼなどの酵素によって切断される。

10

【0215】

L pを構成するアミノ酸は、特定のアミノ酸に限定されず、例えば、L-又はD-アミノ酸であり、好ましくは、L-アミノ酸である。アミノ酸は、α-アミノ酸だけでなく、例えばβ-アラニン、ε-アミノカプロン酸、又はγ-アミノ酪酸の構造を有するアミノ酸も含んでいてもよく、非天然アミノ酸、例えばN-メチル化アミノ酸をさらに含んでいてもよい。

L pのアミノ酸配列は、特定のアミノ酸配列に限定されず、L pを構成するアミノ酸の例としては、これらに限定されないが、グリシン (Gly; G)、バリン (Val; V)、アラニン (Ala; A)、フェニルアラニン (Phe; F)、グルタミン酸 (Glu; E)、イソロイシン (Ile; I)、プロリン (Pro; P)、シトルリン (Cit)、ロイシン (Leu; L)、セリン (Ser; S)、リジン (Lys; K)、及びアスパラギン酸 (Asp; D) が挙げられる。それらのなかでも好ましくは、グリシン (Gly; G)、バリン (Val; V)、アラニン (Ala; A)、及びシトルリン (Cit) である。

20

【0216】

これらのアミノ酸のいずれかは、複数回出現する可能性があり、L pは、任意に選択されるアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する。薬物放出パターンは、アミノ酸のタイプを介して制御することができる。

リンカーL pの具体的配列としては、これらに限定されないが、-GGVA- (配列番号85)、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG- (配列番号86)、-GGPI- (配列番号87)、-GGVCit- (配列番号88)、-GGVK- (配列番号89)、-GG-(D-)PI-、-GGPL- (配列番号90)、-EGGVA (配列番号91)、-PI-、-GGF-、DGGF- (配列番号92)、(D-)D-GGF-、-EGGF- (配列番号93)、-SGGF- (配列番号94)、-KGGF- (配列番号95)、-DGGFG- (配列番号96)、-GGFGG- (配列番号97)、-DDGGFG- (配列番号98)、-KDGGFG- (配列番号99)、及び-GGGFGGFGF- (配列番号100) が挙げられる。

30

ここで、「(D-)V」は、D-バリンを示し、「(D-)P」は、D-プロリンを示し、「(D-)D」は、D-アスパラギン酸を示す。

40

【0217】

リンカーL pは、好ましくは、以下のうちのいずれかである：

-GGVA- (配列番号85)、-GG-(D-)VA-、-VA-、-GGFG- (配列番号86)、-GGPI- (配列番号87)、-GGVCit- (配列番号88)、-GGVK- (配列番号89)、-GG-(D-)PI-、及び-GGPL- (配列番号90)。

リンカーL pは、より好ましくは、以下のうちのいずれかである：

-GGVA- (配列番号85)、-GGVCit- (配列番号88)、及び-VA-。

L bは、L aをA bのグリカン又はリモデリングされたグリカンに接続するスペーサーを表す。一部の実施形態において、L bは、以下の群：

50

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2$
 $-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)n^3-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n^3-CH_2$
 $-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)n^3-CH_2$
 $CH_2-C(=O)-$ 、 $-(CH_2)n^4-O-C(=O)-$

から選択されるいずれか1つを表し、

式中、 n^2 は、1～3の整数を表し（好ましくは、1又は2）、 n^3 は、1～5の整数
 を表し（好ましくは、2～4の整数、より好ましくは、2又は4）、 n^4 は、0～2の整
 数を表す（好ましくは、0又は1）。

10

【0218】

一部の実施形態において、Laは、好ましくは、以下の群：

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)$
 $-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-CH_2-OC(=O)-$ 、及び $-OC(=O)-$

20

から選択されるいずれか1つを表し、Laは、より好ましくは、 $-C(=O)-CH_2CH_2$
 $CH_2-C(=O)-$ 又は $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ である。

スペーサーLbは、特定のスペーサーに限定されず、それらの例としては、これらに限
 定されないが、以下の式によって表されるスペーサーが挙げられる。

【0219】

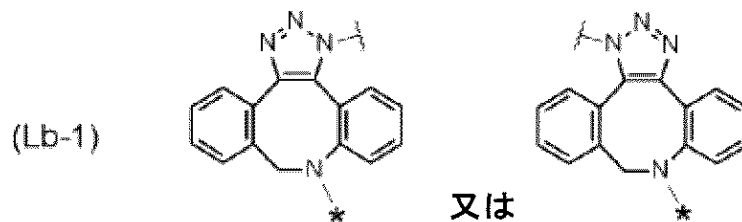
30

40

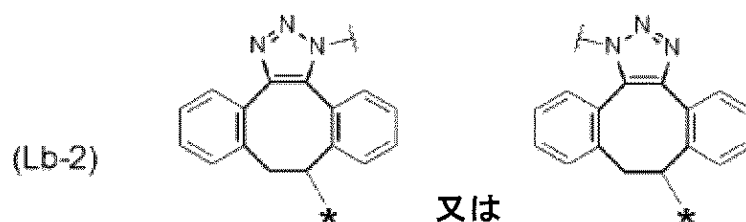
50

【化 3 4】

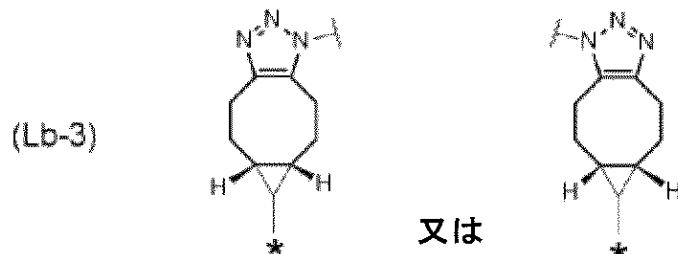
[式 46]



[式 47]



[式 48]



【0220】

上記に示される L b の構造式において、各アスタリスクは、L a の左の末端における $-(C=O)$ 又は $-(CH_2)_n$ への結合を表し、各波線は、A b のグリカン又はリモデリングされたグリカンへの結合を表す。

【0221】

上記に示される L b (L b-1、L b-2、又は L b-3) の各構造式において、アジド基及び D B C O のクリック反応を介して形成されたトリアゾール環部位は、幾何異性体の構造を提供し、L b の分子は、2つの構造のどちらか一方として、又はそれら両方の混合物として存在する。本発明の抗体-薬物コンジュゲートの分子 1 個当たり m^1 個の「-L-D」部分が存在し、 m^1 個の「-L-D」部分のそれぞれの L において、L b (L b-1、L b-2、又は L b-3) として、2つの構造のどちらか一方が存在するか、又はそれらの両方が同時に存在する。

【0222】

一部の実施形態において、L は、好ましくは、 $-L b-L a-L p-NH-B-CH_2-O(C=O)-^*$ によって表され、式中、

B は、1,4-フェニル基であり、

L p は、以下の群：

$-GGVA-$ (配列番号 85)、 $-GG-(D)-VA-$ 、 $-VA-$ 、 $-GGFG-$ (配列番号 86)、 $-GGPI-$ (配列番号 87)、 $-GGVCit-$ (配列番号 88)、 $-GGVK-$ (配列番号 89)、 $-GG(D)-PI-$ 、及び $-GGPL-$ (配列番号 90)

10

20

30

40

50

から選択されるいずれか 1 つを表し、

L a は、以下の群：

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-CH_2-OC(=O)-$ 、 $-OC(=O)-$

から選択されるいずれか 1 つを表し、

L b は、L b に関する上記の構造式のいずれかを表す。

【0223】

一部の実施形態において、L は、より好ましくは、以下の群：

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 85 として開示される「GGVA」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GG-(D-)VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPI-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 87 として開示される「GGPI」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 86 として開示される「GGFG」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 88 として開示される「GGVCit」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVK-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 89 として開示される「GGVK」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPL-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 90 として開示される「GGPL」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、
 $-Z^2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 85 として開示される「GGVA」)、
 $-Z^3-CH_2-OC(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 85 として開示される「GGVA」)；

から選択されるいずれか 1 つであり、式中、 Z^1 は、L b に関して記載された通り、以下の構造式：

【0224】

10

20

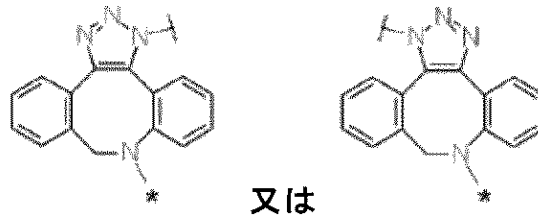
30

40

50

【化 3 5】

[式 49]



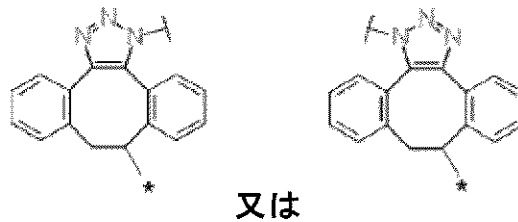
10

を表し、 Z^2 は、L b に関して記載された通り、以下の構造式：

【0 2 2 5】

【化 3 6】

[式 50]



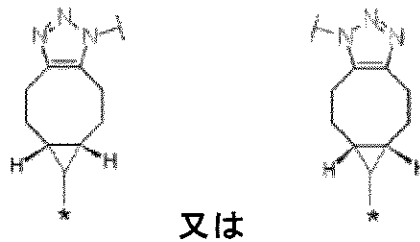
20

を表し、 Z^3 は、L b に関して記載された通り、以下の構造式：

【0 2 2 6】

【化 3 7】

[式 51]



30

を表し、B は、1, 4-フェニル基である。

【0 2 2 7】

L は、最も好ましくは、以下：

40

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 85 として開示される「GGVA」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-$
 $-Z^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$
 $-$
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ (配列番号 88 として開示される「GGVCit」)、
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$

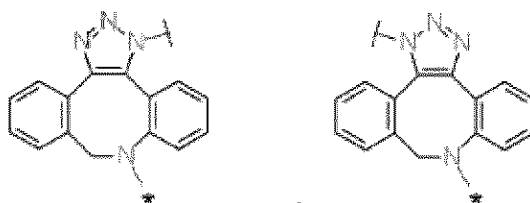
50

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ 、及び
 $-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$ のいずれかであり、式中、Bは、1,4-フェニル基であり、 Z^1 は、Lbに関して記載された通り、以下の構造式：

【0228】

【化38】

[式52]



又は

を表す。

本発明の抗体-薬物コンジュゲートは、抗体-薬物コンジュゲートのほとんどの分子が腫瘍細胞に移動し、次いでリンカーの一部（例えば、Lp）が酵素などによって切断されて、抗体-薬物コンジュゲートが活性化され、それにより薬物Dの一部（以下、遊離の薬物と称する（後述される））が放出されるプロセスを介して、抗腫瘍活性を呈すると推論される。

それゆえに、本発明の抗体-薬物コンジュゲートは、腫瘍細胞の外側で安定であることが好ましい。

【0229】

C. 抗体

開示された抗体-薬物コンジュゲート（ADC）で使用される抗体は、抗DLL3抗体（例えば、2-C8-A、6-G23-F、及び10-O18-A、又はヒト抗体H2-C8-A、H6-G23-F、H10-O18-A、H2-C8-A-3、及びH10-O18-A-3）である。開示されたADCに取り込むことができる開示された抗体は、上記のセクションIII「抗DLL3抗体」で詳述される。

【0230】

簡単に言えば、一部の実施形態において、ADCの抗DLL3抗体は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_H ）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_L ）を含んでいてもよく、（a） V_H は、（i）それぞれ、配列番号3、配列番号4、及び配列番号5；（ii）それぞれ、配列番号13、配列番号14、及び配列番号15；（iii）それぞれ、配列番号23、配列番号24、及び配列番号25；並びに（iv）それぞれ、配列番号33、配列番号34、及び配列番号35からなる群から選択される V_H -CDR1配列、 V_H -CDR2配列、及び V_H -CDR3配列を含み；及び／又は（b） V_L は、（i）それぞれ、配列番号8、配列番号9、及び配列番号10；（ii）それぞれ、配列番号18、配列番号19、及び配列番号20；（iii）それぞれ、配列番号28、配列番号29、及び配列番号30；並びに（iv）それぞれ、配列番号38、配列番号39、及び配列番号40からなる群から選択される V_L -CDR1配列、 V_L -CDR2配列、及び V_L -CDR3配列を含む。

【0231】

一部の実施形態において、ADCの抗DLL3抗体は、以下の特徴：（a）配列番号7、17、27、37、62、66、又は70のいずれか1つに存在する軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一な軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列；及び

／又は（b）配列番号 2、12、22、32、59、60、61、63、64、65、67、68、又は69のいずれか1つに存在する重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一な重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列のうちの1つ又は複数を含んでいてもよい。

【0232】

一部の実施形態において、ADCの抗DLL3抗体は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）又は重鎖及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）又は軽鎖を含んでいてもよく、（a）V_H又は重鎖は、配列番号2、配列番号12、配列番号22、配列番号32、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号67、配列番号68、及び配列番号69からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；及び／又は（b）V_L又は軽鎖は、配列番号7、配列番号17、配列番号27、配列番号37、配列番号62、配列番号66、及び配列番号70からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、V_H又は重鎖アミノ酸配列及びV_L又は軽鎖アミノ酸配列は、それぞれ配列番号2及び配列番号7（7-I1-B）；それぞれ配列番号12及び配列番号17（2-C8-A）；それぞれ配列番号59及び配列番号62（H2-C8-A）；それぞれ配列番号60及び配列番号62（H2-C8-A-2）；それぞれ配列番号61及び配列番号62（H2-C8-A-3）；それぞれ配列番号22及び配列番号27（10-O18-A）；それぞれ配列番号67及び配列番号70（H10-O18-A）；それぞれ配列番号68及び配列番号70（H10-O18-A-2）；配列番号69及び配列番号70（H10-O18-A-3）；それぞれ配列番号32及び配列番号37（6-G23-F）；それぞれ配列番号63及び配列番号66（H6-G23-F）；それぞれ配列番号64及び配列番号66（H6-G23-F-2）；並びにそれぞれ配列番号65及び配列番号66（H6-G23-F-3）からなる群から選択される。

【0233】

一部の実施形態において、ADCの抗DLL3抗体は、以下でより詳細に論じられるように、グリカンがリモデリングされていてもよいし、又はグリカンが改変されていてもよい。

本発明の機能的な断片としては、IgG重鎖のFc領域中のN結合型グリカンで改変されることになる十分保存されたアスパラギン（Asn297）及びAsn297周辺のアミノ酸を有する、同時に抗原への結合活性を保持する機能的な断片が挙げられる。

【0234】

i. 開示された抗DLL3抗体のグリカンリモデリング：

近年、酵素反応などによって抗体の不均一な糖タンパク質をリモデリングして、官能基を有するグリカンを均一に導入するための方法が報告されている（ACS Chemical Biology 2012, 7, 110, ACS Medicinal Chemistry Letters 2016, 7, 1005）。薬物を部位特異的に導入して均一なADCを合成するために、このグリカンリモデリング技術の使用を試みが行われてきた（Bioconjugate Chemistry 2015, 26, 2233, Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 2361-2367, US 2016361436）。

本発明のグリカンリモデリングでは、ヒドロラーゼを使用して、タンパク質（例えば、抗体）に付加された不均一なグリカンを切り離して、各末端でGlcNAcのみを残し、それによって、GlcNAcを有する同質のタンパク質部分（以下、「アクセプター」と称する）が作製される。その後、別々に調製された任意のグリカン（以下、「ドナー」と称する）が提供され、アクセプター及びドナーは、トランスグリコシダーゼを使用することによって互いに連結される。それによって、任意のグリカン構造を有する均一な糖タンパク質を合成することができる。

【0235】

本発明において、「グリカン」は、グリコシド結合を介して互いに結合した2個又はそれより多くの単糖の構造単位を指す。具体的な単糖及びグリカンは、場合によっては、例

例えば、「G l c N A c -」、「M S G -」などのように略記される。これらの略語のいずれかが構造式で 사용되는場合、その略語は、具体的に定義されない限り、別の構造単位への還元末端におけるグリコシド結合に関与する酸素原子又は窒素原子は、グリカンを示す略語に含まれないという意図のもとに示される。

【0236】

本発明において、グリカンの基本単位としての単糖類は、別段の規定がない限り、便宜上、環構造において、環を構成する酸素原子に結合する炭素原子及びヒドロキシ基（又はグリコシド結合に関与する酸素原子）に直接結合する炭素原子の位置が1位（シアル酸の場合のみ2位）と定義されるように示される。実施例における化合物の名称はそれぞれ、化学構造を全体として考慮して提供されたものであり、そのルールが必ずしも適用されるとは限らない。

10

グリカンが、本発明において記号（例えば、G L Y、S G、M S G、G l c N A c）として示される場合、その記号は、別段の指定がない限り、還元末端までの範囲の炭素原子を含むことが意図され、N-又はO-グリコシド結合に関与するN又はOを含むことは意図されない。

本発明において、具体的に述べられない限り、グリカンがアミノ酸の側鎖に連結されている場合の部分構造は、側鎖の一部が括弧内に示されるような方式で示され、例えば、「(S G -) A s n」のように示される。

【0237】

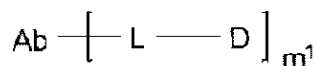
D. 抗体-薬物コンジュゲート (A D C)

20

一部の実施形態において、本発明の抗D L L 3抗体-薬物コンジュゲートは、以下の式：

【化39】

[式53]



によって表され、式中、抗体A b又は当該抗体の機能的な断片は、そのアミノ酸残基の側鎖（例えば、システイン、リジン）から直接Lへの結合であってもよいし、又はA bのグリカン又はリモデリングされたグリカンを介したLへの結合であってもよいし、好ましくは、A bのグリカン又はリモデリングされたグリカンを介したLへの結合であってもよいし、より好ましくは、A bのリモデリングされたグリカンを介したLへの結合であってもよいし。

30

本発明のA b中のグリカンは、N結合型グリカン又はO結合型グリカンであり、好ましくはN結合型グリカンである。N結合型グリカン及びO結合型グリカンは、それぞれN-グリコシド結合及びO-グリコシド結合を介して抗体のアミノ酸側鎖に結合する。

【0238】

一部の実施形態において、本発明の抗体(A b)は、I g Gであり、好ましくは、I g G 1、I g G 2、又はI g G 4である。一部の実施形態において、抗体(A b)は、2-C 8-A、6-G 2 3-F、10-O 1 8-A、H 2-C 8-A、H 2-C 8-A-2、H 2-C 8-A-3、H 6-G 2 3-F、H 6-G 2 3-F-2、H 6-G 2 3-F-3、H 1 0-O 1 8-A、H 1 0-O 1 8-A-2、又はH 1 0-O 1 8-A-3である。

40

I g Gは、重鎖のF c領域の297位におけるアスパラギン残基上によく保存されたN結合型グリカン（以下、「A s n 2 9 7又はN 2 9 7」と称する）を有し、N結合型グリカンは、抗体分子の活性及び速度論に寄与することが知られている。(Biotechnol. Prog., 2012, 28, 608-622, Sanglier-Cianferani, S., Anal. Chem., 2013, 85, 715-736)。

【0239】

50

I g G の定常領域におけるアミノ酸配列は、よく保存されており、各アミノ酸は、Edelman et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 63, No.1 (May 15, 1969), pp. 78-85)において、Eu インデックスの番号付けにより特定される。例えば、Asn 297 は、Fc 領域ではN 結合型グリカンがそこに付加され、これは、Eu インデックスの番号付けでは297 位に対応し、各アミノ酸は、アミノ酸の実際の位置が分子の断片化又は領域の欠失によって変化していたとしても、Eu インデックスの番号付けによって固有に特定される。

【0240】

本発明の抗体－薬物コンジュゲートの一部の実施形態において、抗体又は当該抗体の機能的な断片は、そのAsn 297 の側鎖に結合するグリカン（以下、「N 297 グリカン」と称する）を介してL に結合することができ、より一層好ましくは、抗体又は当該抗体の機能的な断片は、N 297 グリカンを介してL に結合し、N 297 グリカンは、リモデリングされたグリカンである。

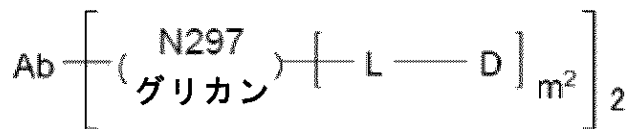
10

以下の式は、本発明の抗体－薬物コンジュゲート又は当該抗体の機能的な断片がN 297 グリカンを介してL に結合している状況を例示する。

【0241】

【化40】

[式 54]



20

リモデリングされたグリカンを有する抗体は、グリカンがリモデリングされた抗体と称される。

SGP は、シアリル糖ペプチドの略語であり、代表的なN 結合型複合グリカンである。SGP は、例えば、WO 2011 / 027868 1 に記載される方法を使用することによって、雌鶏の卵の卵黄から分離／精製することができる。SGP の精製された生成物は、商業的に入手可能であり（東京化成工業株式会社、株式会社伏見製薬所）、購入してもよい。例えば、ジシアロ八糖（disialooctasaccharide）（東京化成工業株式会社）は、SG のグリカン部分の還元末端において1つのGlcNAc を欠失させることによって形成されたグリカンであり（以下、「SG (10)」と称する）、商業的に入手可能である。

30

本発明において、SG (10) におけるβ-Man の分岐鎖のどちらか一方のみの非還元末端においてシアル酸を欠失させることによって形成されたグリカン構造は、MSG (9) を指し、1－3 分岐鎖にのみシアル酸を有する構造は、MSG 1 と呼ばれ、1－6 分岐鎖にのみシアル酸を有する構造は、MSG 2 と呼ばれる。

【0242】

本発明のリモデリングされたグリカンは、N 297－(Fuc) MSG 1、N 297－(Fuc) MSG 2、又はN 297－(Fuc) MSG 1 及びN 297－(Fuc) MSG 2 の混合物、又はN 297－(Fuc) SG であり、好ましくは、N 297－(Fuc) MSG 1、N 297－(Fuc) MSG 2、又はN 297－(Fuc) SG であり、より好ましくは、N 297－(Fuc) MSG 1 又はN 297－(Fuc) MSG 2 である。

40

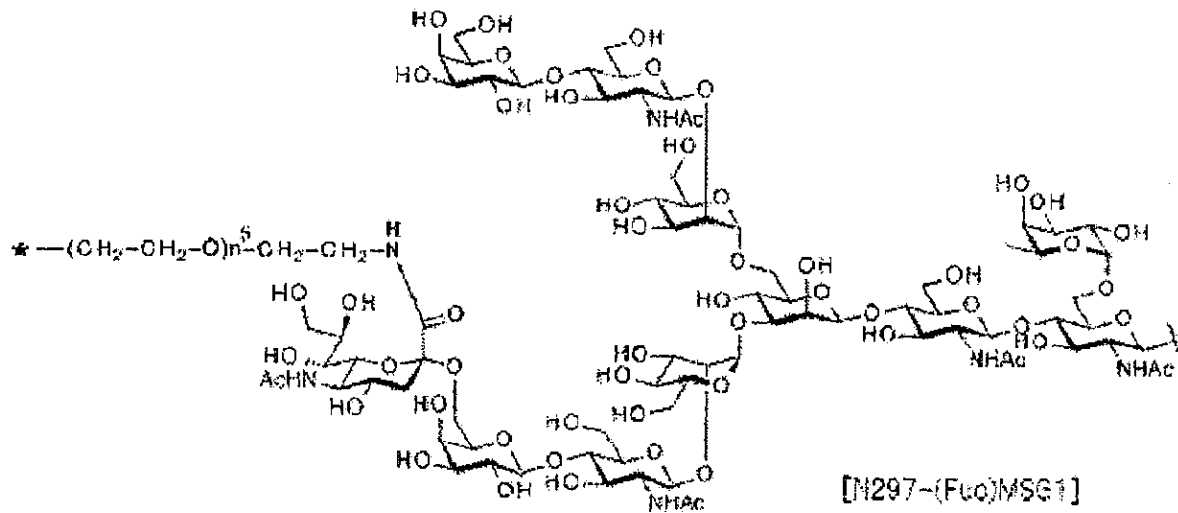
N 297－(Fuc) MSG 1 は、以下の構造式又は配列の式によって表される：

【0243】

50

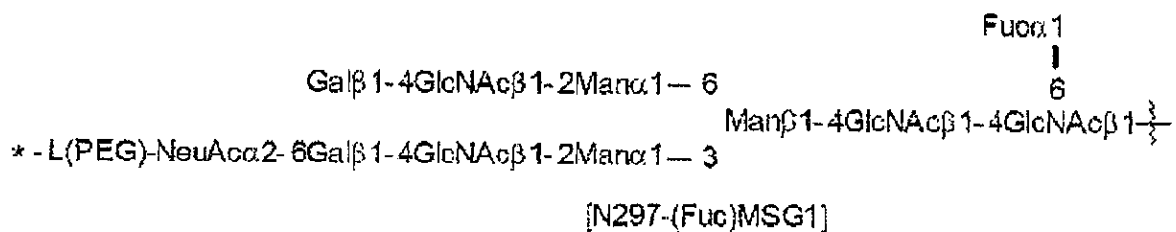
【化 4 1】

[式 55]



10

[式 56]



20

【0 2 4 4】

上記の式において：

各波線は、抗体の A s n 2 9 7 への結合を表し、

30

L (P E G) は、 $-(CH_2CH_2-O)^{n^5}-CH_2CH_2-NH-$ を表し、式中、右の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける β -M a n の 1-3 分岐鎖における非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのカルボン酸へのアミド結合を表し、

各アスタリスクは、リンカー L への結合を表し、特に、リンカー L 中の L b の 1, 2, 3-トリアゾール環の 1 又は 3 位における窒素原子を表し、

n^5 は、2 ~ 1 0 の整数であり、好ましくは 2 ~ 5 の整数である。

N 2 9 7 - (F u c) M S G 2 は、以下の構造式又は配列の式によって表される：

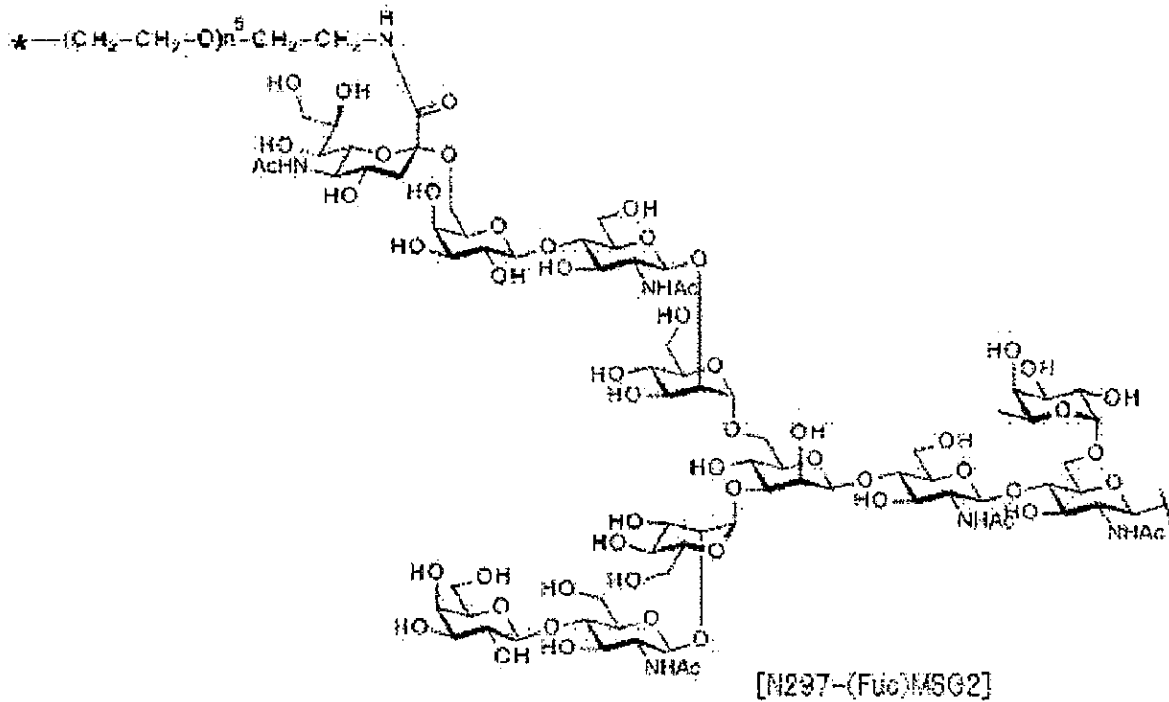
【0 2 4 5】

40

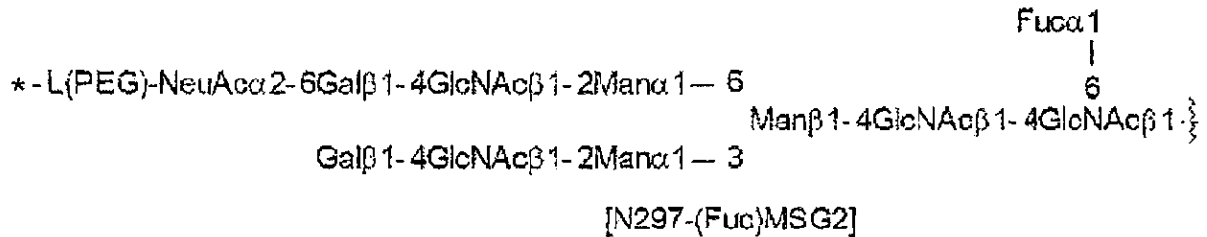
50

【化 4 2】

[式 57]



[式 58]



【0 2 4 6】

上記の式において：

各波線は、抗体の A s n 2 9 7 への結合を表し、

L (P E G) は、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$ を表し、式中、右の末端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける β -M a n の 1-6 分岐鎖における、非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのカルボン酸へのアミド結合を表し、

各アスタリスクは、リンカー L への結合を表し、特に、リンカー L 中の L b の 1, 2, 3-トリアゾール環の 1 又は 3 位における窒素原子を表し、

n^5 は、2 ~ 1 0 の整数であり、好ましくは 2 ~ 5 の整数である。

N 2 9 7 - (F u c) S G は、以下の構造式又は配列の式によって表される：

【0 2 4 7】

10

20

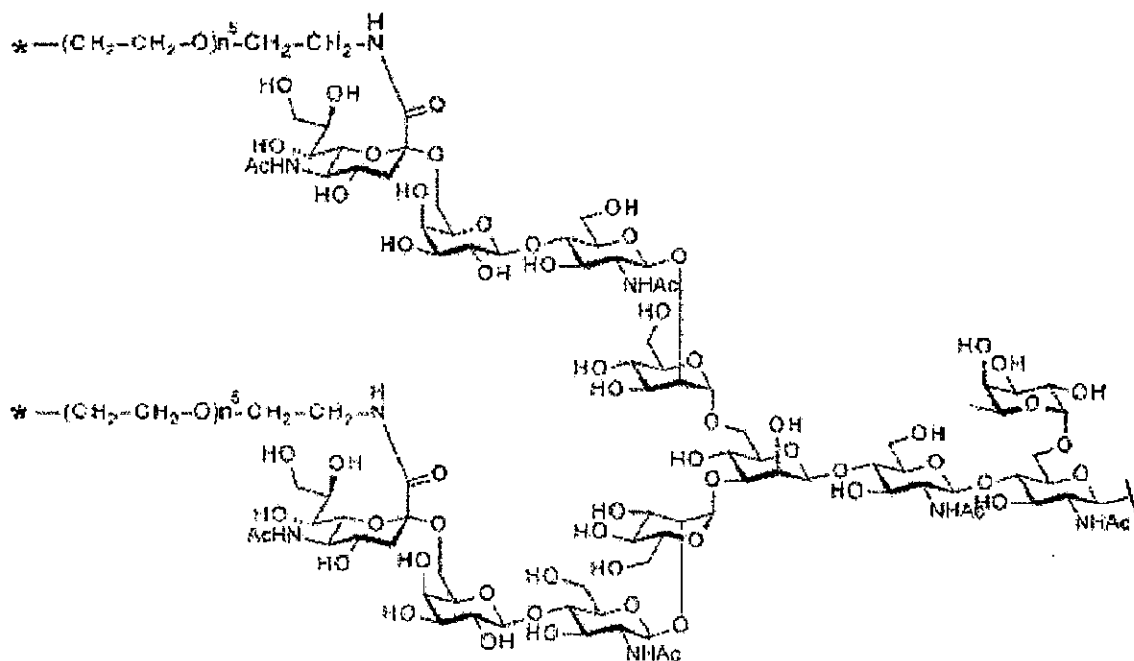
30

40

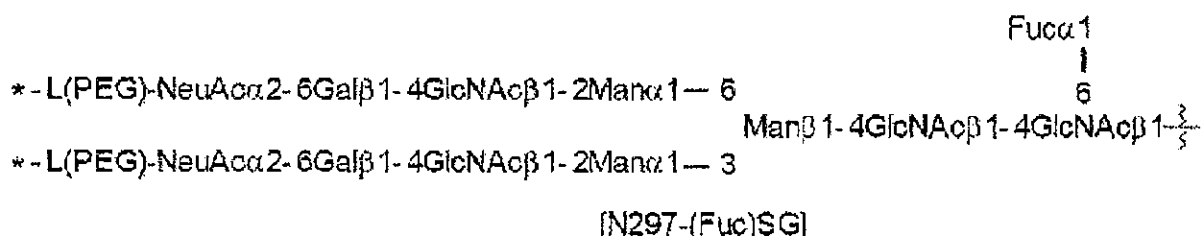
50

【化 4 3】

[式 59]



[式 60]



【 0 2 4 8 】

上記の式において：

各波線は、抗体の A s n 2 9 7 への結合を表し、

L (PEG) は、 $-(CH_2CH_2-O)_n^5-CH_2CH_2-NH-$ を表し、式中、右の末端におけるアミノ基は、N297グリカンにおける β -Manの1-3及び1-6分岐鎖のそれぞれにおける、非還元末端におけるシアル酸の2位でのカルボン酸へのアミド結合を表し、

各アスタリスクは、リンカー L への結合を表し、特に、リンカー L 中の L b の 1, 2, 3-トリアゾール環の 1 又は 3 位における窒素原子を表し、

n^5 は、 $2 \sim 10$ の整数であり、好ましくは $2 \sim 5$ の整数である。

【 0 2 4 9 】

本発明の抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体のN297グリカンが、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、又はそれらの混合物である場合、抗体-薬物コンジュゲートは、抗体が二量体であるため、リンカーLの2つの分子及び薬物Dの2つの分子がコンジュゲートした分子($m^2=1$)である(図1を参照)。

【 0 2 5 0 】

本発明の抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体のN297グリカンがN297-(Fuc)SGである場合、抗体-薬物コンジュゲートは、リンカーLの4つの分子及び薬物

Dの4つの分子がコンジュゲートした分子である ($m^2 = 2$)。N297グリカンは、好ましくは、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、又はN297-(Fuc)SGであり、より好ましくは、N297-(Fuc)MSG1又はN297-(Fuc)MSG2である。

【0251】

本発明の抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体のN297グリカンがN297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、又はN297-(Fuc)SGである場合、均一なADCを得ることができる。

本発明の抗体-薬物コンジュゲートは、最も好ましくは以下の群から選択される1つの抗体-薬物コンジュゲートである：

【0252】

10

20

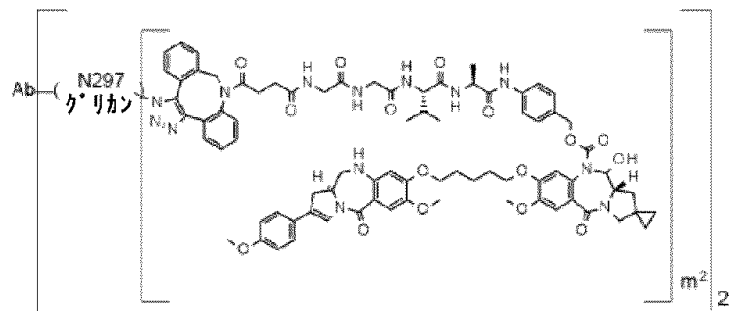
30

40

50

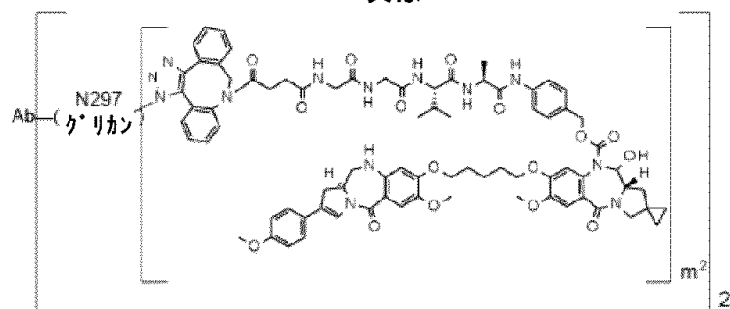
【化 4 4 - 1】

[式 61]



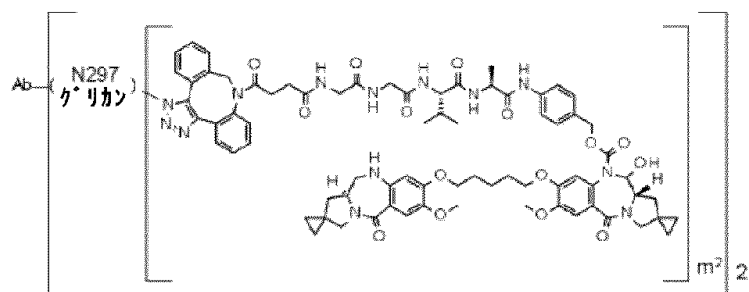
10

又は



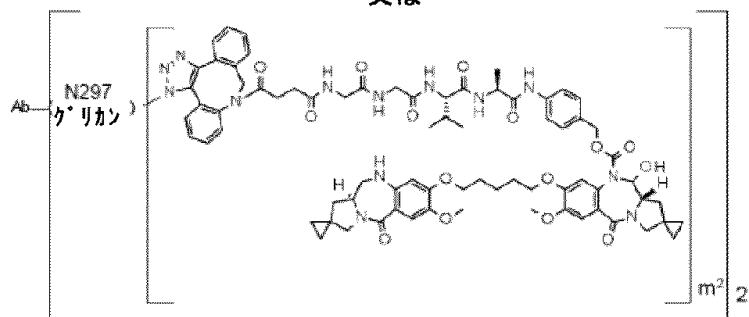
20

[式 62]



30

又は



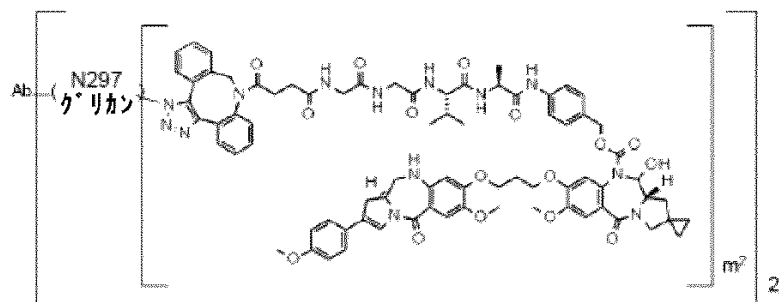
40

【 0 2 5 3】

50

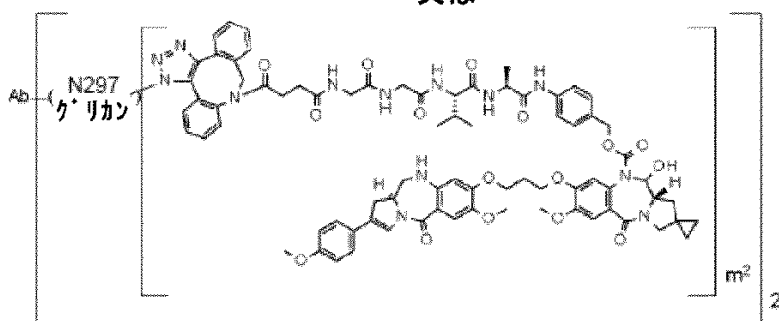
【化 4 4 - 2】

[式 63]



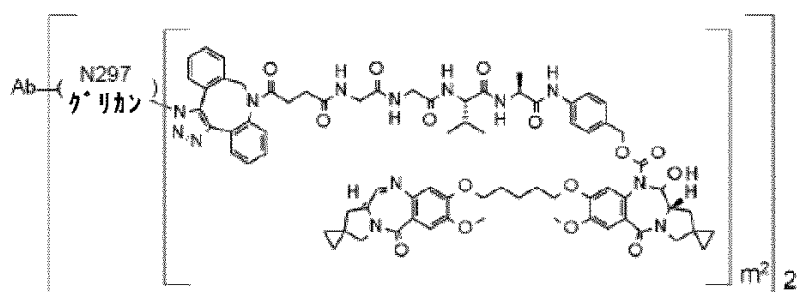
10

又は



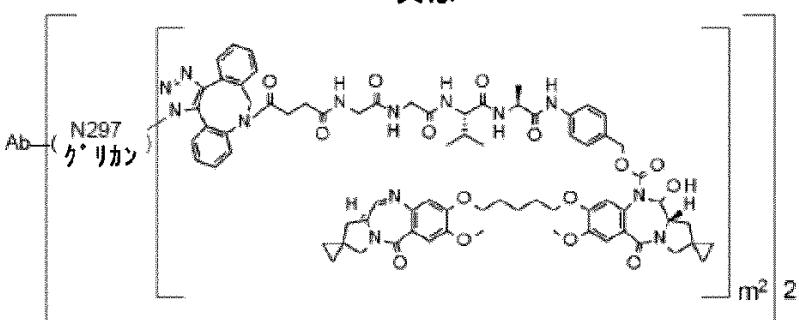
20

[式 64]



30

又は



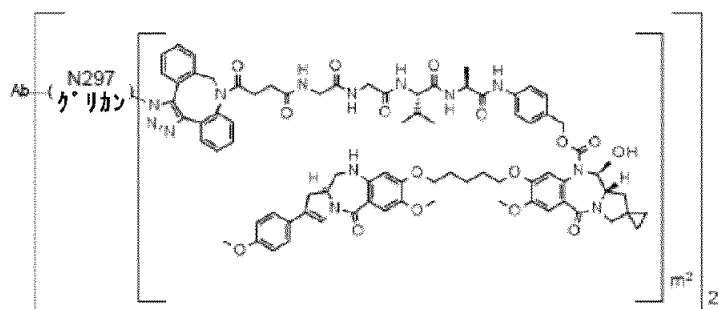
40

【 0 2 5 4】

50

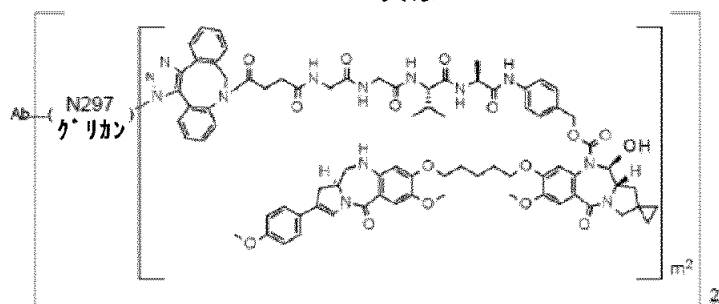
【化 4 4 - 3】

[式 65]



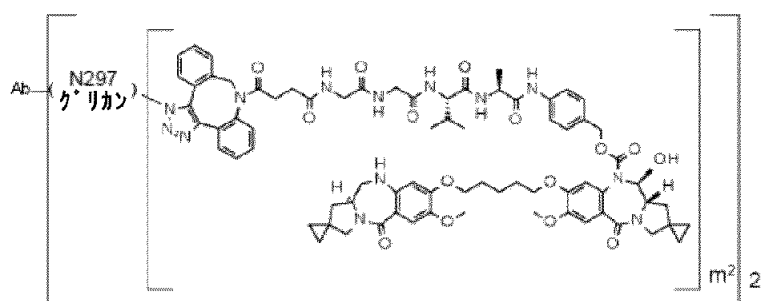
10

又は



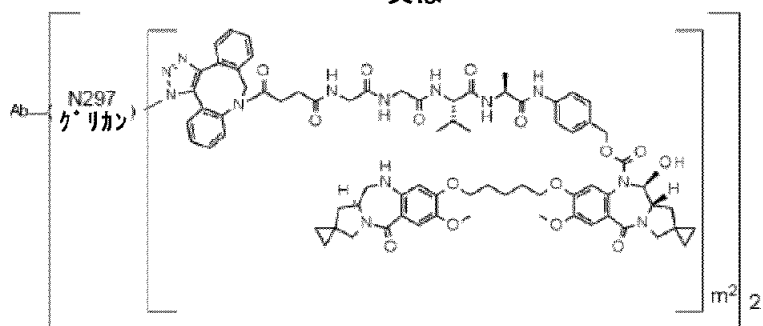
20

[式 66]



30

又は



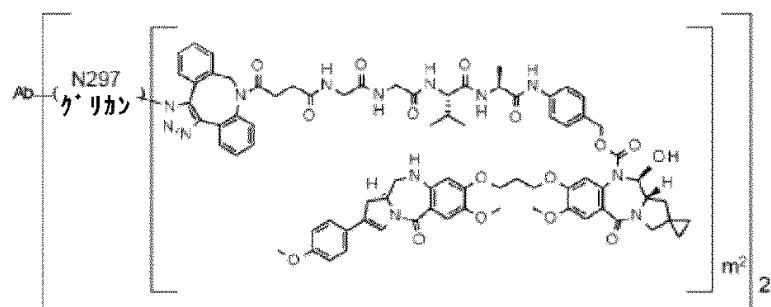
40

【 0 2 5 5】

50

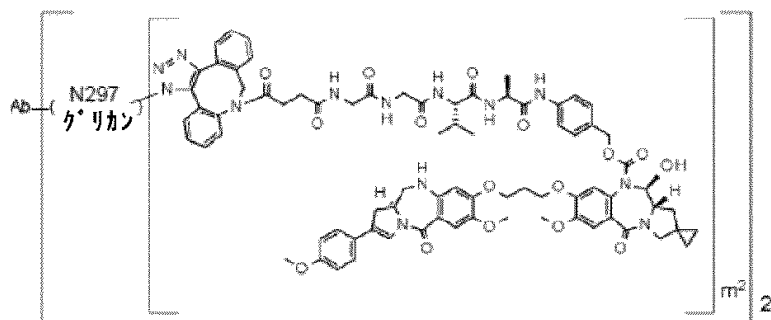
【化 4 4 - 4】

[式 67]



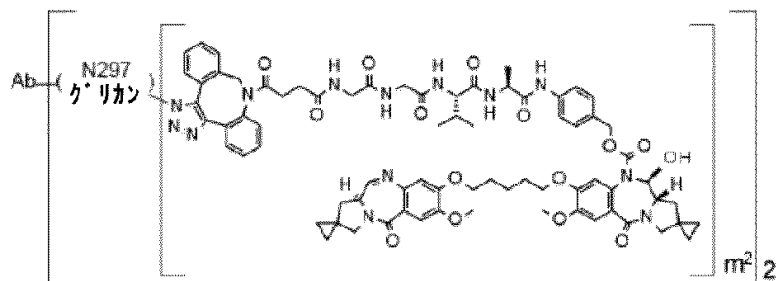
10

又は



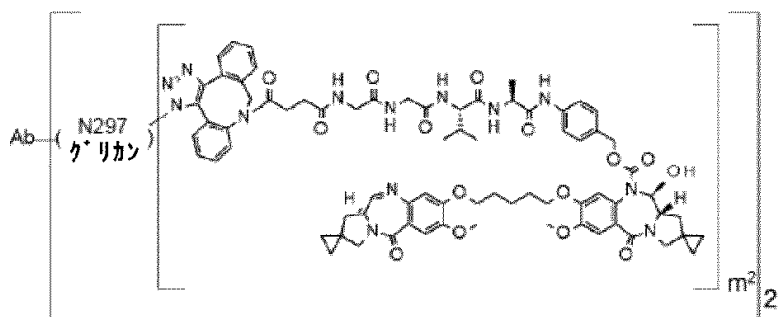
20

[式 68]



30

又は



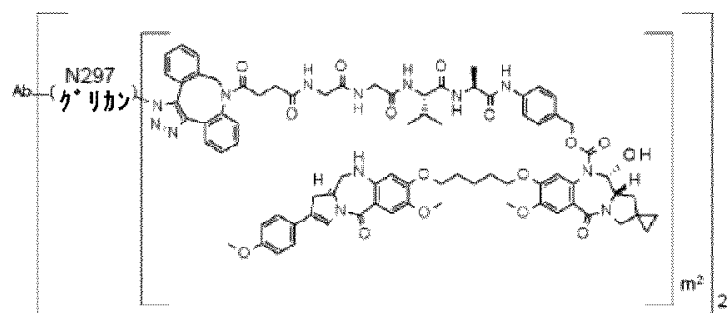
40

【 0 2 5 6】

50

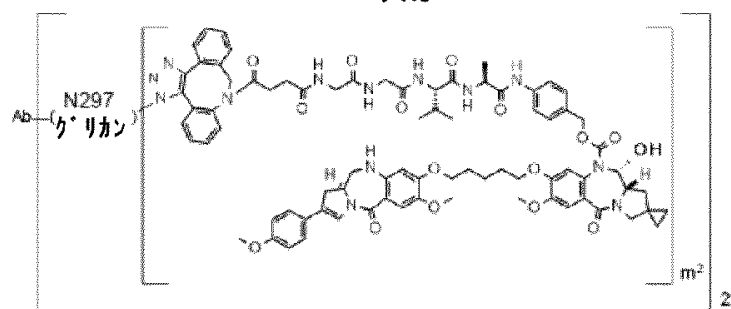
【化 4 4 - 5】

[式 69]



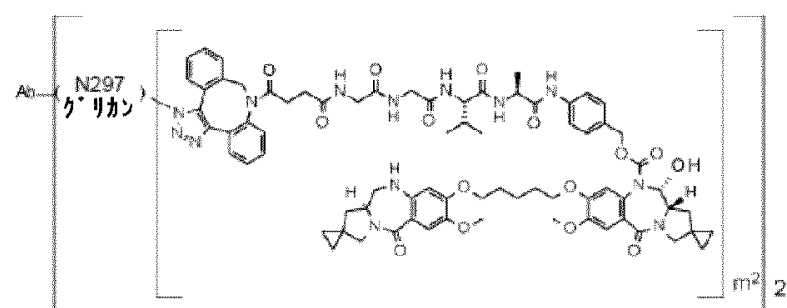
10

又は



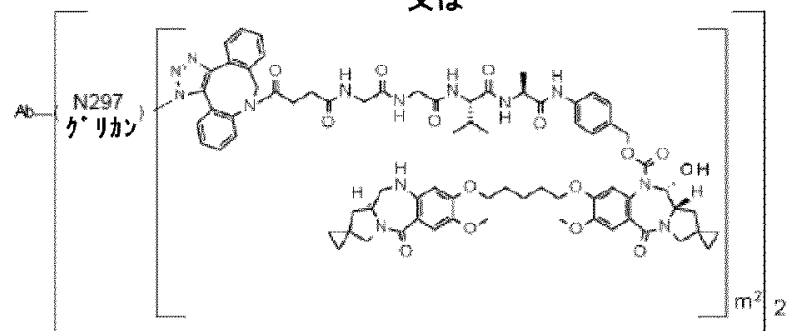
20

[式 70]



30

又は



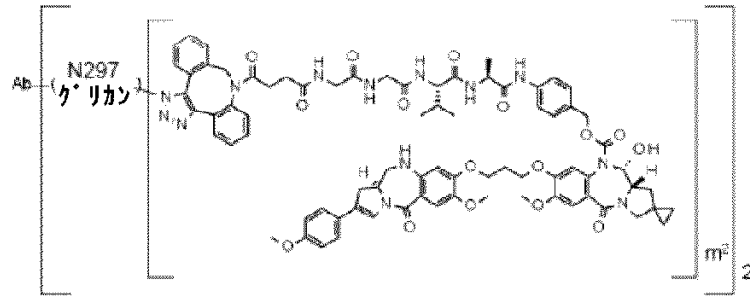
40

【 0 2 5 7】

50

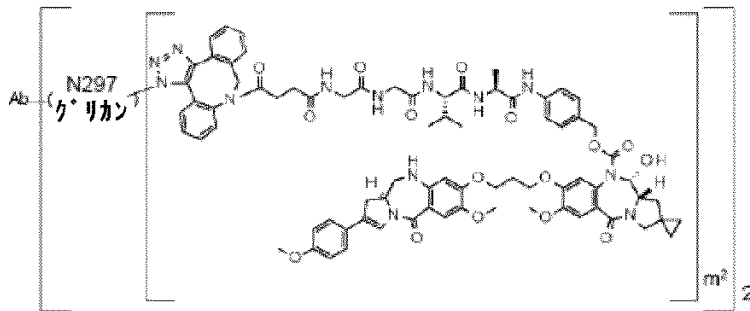
【化 4 4 - 6】

[式 71]



10

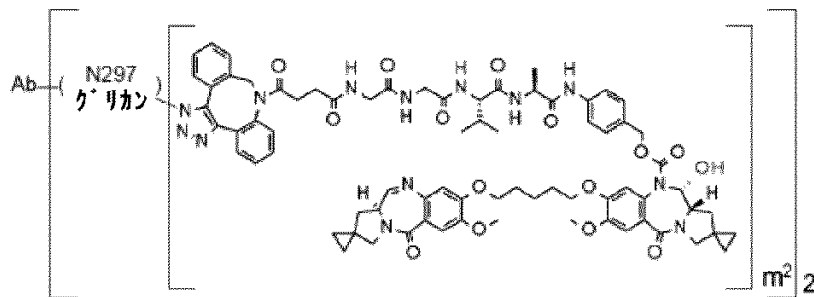
又は



20

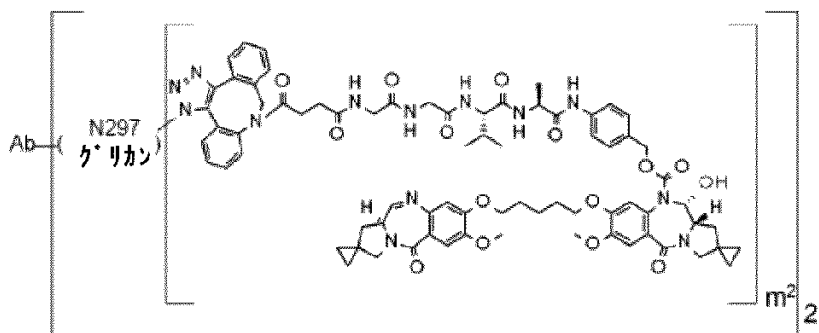
, 又は

[式 72]



30

又は



40

【0258】

上記の構造式のそれぞれにおいて、

 m^2 は、1又は2を表し（好ましくは、 m^2 は、1である）、

抗体Abは、抗DLL3IgG抗体（好ましくは、IgG1、IgG2、又はIgG4、より好ましくは、IgG1）、又は当該抗体の機能的な断片であり、

N297グリカンは、N297-(Fuc)MSG1、N297-(Fuc)MSG2、及びそれらの混合物、並びにN297-(Fuc)SGのいずれか1つを表し（好ましくは、N297-(Fuc)MSG1）、

L(PEG)は、 $-NH-CH_2CH_2-(O-CH_2CH_2)_3-^*$ を表し、式中、左の末

50

端におけるアミノ基は、N 2 9 7 グリカンにおける β -Man の 1-3 及び 1-6 分岐鎖のそれぞれ又はいずれか 1 つ（好ましくは、1-3 分岐鎖）の非還元末端におけるシアル酸の 2 位でのカルボン酸へのアミド結合を表し、アスタリスクは、リンカー L 中の L b のトリアゾール環の 1 又は 3 位における窒素原子への結合を表す。一部の実施形態において、抗 D L L 3 抗体は、例えば、2-C 8-A、6-G 2 3-F、10-O 1 8-A、H 2-C 8-A、H 2-C 8-A-2、H 2-C 8-A-3、H 6-G 2 3-F、H 6-G 2 3-F-2、H 6-G 2 3-F-3、H 1 0-O 1 8-A、H 1 0-O 1 8-A-2、又は H 1 0-O 1 8-A-3 である。

【0259】

便宜上、最も好ましい抗体-薬物コンジュゲートとして、それぞれにおいて N 2 9 7 グリカンが 1 つのコンジュゲート分子中の L における L b のトリアゾール環の 1 位の窒素原子に結合している「-(N 2 9 7 グリカン)-L-D」の 2 若しくは 4 つの単位を有する構造 ($m^2=1$ 又は 2)（「(N 2 9 7 グリカン)-(N 1 L b)-L-D」）、又はそれぞれにおいて N 2 9 7 グリカンが 1 つのコンジュゲート分子中の L における L b のトリアゾール環の 3 位の窒素原子に結合している「-(N 2 9 7 グリカン)-L-D」の 2 若しくは 4 つの単位を有する構造 ($m^2=1$ 又は 2)（「(N 2 9 7 グリカン)-(N 3 L b)-L-D」）が例示されているが、1 つのコンジュゲート分子中に、「(N 2 9 7 グリカン)-(N 1 L b)-L-D」（ $m^2=1$ の場合、1 つの単位、 $m^2=2$ の場合、1、2、又は 3 つの単位）及び「(N 2 9 7 グリカン)-(N 3 L b)-L-D」（ $m^2=1$ の場合、1 つの単位、 $m^2=2$ の場合、3、2、又は 1 つの単位）の両方を有する抗体-薬物コンジュゲートも含まれる。言い換えれば、1 つのコンジュゲート分子中に、「(N 2 9 7 グリカン)-(N 1 L b)-L-D」及び「(N 2 9 7 グリカン)-(N 3 L b)-L-D」のいずれか一方が存在するか、又はそれらの両方が同時に存在する。

【0260】

本発明の抗体-薬物コンジュゲート及び本発明の抗 D L L 3 抗体-薬物コンジュゲートは、強い腫瘍活性（インビボの抗腫瘍活性、インビトロの抗細胞活性）及び十分なインビボの速度論及び物理的特性を呈し、高い安全性を有し、したがって、医薬品として有用である。

【0261】

本発明の抗体-薬物コンジュゲートの、立体異性体、不斉炭素原子による光学異性体、幾何異性体、互変異性体、又は d 体、l 体などの光学異性体、及びアトロプ異性体が存在する可能性があり、抗体-薬物コンジュゲートの遊離の薬物又は生成中間体、並びにこれらの異性体、光学異性体、及びそれらの混合物は全て本発明に含まれる。本発明の P B D 誘導体 (V) 又は (V I) は、1 1' 位に不斉炭素を有し、光学異性体が存在する。本明細書において、これらの異性体及びこれらの異性体の混合物は全て、単一の式で、すなわち、一般式 (V) 又は (V I) で表される。したがって、(V) 又は (V I) は、全ての光学異性体及びあらゆる比率での光学異性体の混合物を含む。(V) 又は (V I) の 1 1' 位での絶対立体配置は、その結晶性の生成物若しくは中間体、又はそれらの誘導体の、X 線結晶構造分析又は NMR、例えばモッシャー法によって決定することができる。次いで、絶対立体配置は、立体配置が公知の不斉中心を有する試薬で誘導体化された結晶性の生成物又は中間体を使用することによって決定することができる。要求に応じて、本発明による合成された化合物の立体異性体は、一般的な光学的な解像方法又は分離方法で単離することにより得てもよい。

【0262】

抗体分子 1 個当たりのコンジュゲートした薬物分子の数は、本発明の抗体-薬物コンジュゲートの効能及び安全性への影響を有する重要な要素である。抗体-薬物コンジュゲートは、一定したコンジュゲートした薬物分子の数が得られるように特定された、反応させる原材料及び試薬の量などの反応条件を用いて作製されるが、低分子量化合物の化学反応とは対照的に、典型的には異なる多数のコンジュゲートした薬物分子を含む混合物が得られる。抗体分子 1 個当たりのコンジュゲートした薬物分子の数は、平均値として、すなわ

10

20

30

40

50

ち、コンジュゲートした薬物分子の平均数（DAR：薬物対抗体の比率）として特定される。抗体分子にコンジュゲートしたピロロベンゾジアゼピン誘導体分子の数は、制御可能であり、抗体分子1個当たりのコンジュゲートした薬物分子の平均数（DAR）として、1～10個のピロロベンゾジアゼピン誘導体分子がコンジュゲートできるが、好ましくは、その数は、1～8個であり、より好ましくは1～5個である。

【0263】

抗体が、抗体のリモデリングされたグリカンを紹介して、本発明の抗体－薬物コンジュゲートにおけるLに結合する場合、抗体－薬物コンジュゲート中の抗体分子1個当たりのコンジュゲートした薬物分子の数である m^2 は、1又は2の整数である。グリカンがN297グリカンであり、グリカンが、N297－(Fuc)MSG1、N297－(Fuc)MSG2、又はN297－(Fuc)MSG1及びN297－(Fuc)MSG2の混合物である場合、 m^2 は、1であり、DARは、1～3の範囲内である（好ましくは、1.0～2.5の範囲内であり、より好ましくは、1.2～2.2の範囲内である）。N297グリカンがN297－(Fuc)SGである場合、 m^2 は、2であり、DARは、3～5の範囲内である（好ましくは、3.2～4.8の範囲内であり、より好ましくは、3.5～4.2の範囲内である）。

【0264】

前述の実施形態のいずれかにおいて、抗DLL3抗体（すなわち、「抗体」又は「Ab」）は、2－C8－A、6－G23－F、10－O18－A、H2－C8－A、H2－C8－A－2、H2－C8－A－3、H6－G23－F、H6－G23－F－2、H6－G23－F－3、H10－O18－A、H10－O18－A－2、又はH10－O18－A－3から選択することができる。一部の実施形態において、ADCの抗DLL3抗体は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_H ）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_L ）を含んでいてもよく、(a) V_H は、(i) それぞれ、配列番号3、配列番号4、及び配列番号5；(ii) それぞれ、配列番号13、配列番号14、及び配列番号15；(iii) それぞれ、配列番号23、配列番号24、及び配列番号25；並びに(iv) それぞれ、配列番号33、配列番号34、及び配列番号35からなる群から選択される V_H －CDR1配列、 V_H －CDR2配列、及び V_H －CDR3配列を含み；及び／又は(b) V_L は、(i) それぞれ、配列番号8、配列番号9、及び配列番号10；(ii) それぞれ、配列番号18、配列番号19、及び配列番号20；(iii) それぞれ、配列番号28、配列番号29、及び配列番号30；並びに(iv) それぞれ、配列番号38、配列番号39、及び配列番号40からなる群から選択される V_L －CDR1配列、 V_L －CDR2配列、及び V_L －CDR3配列を含む。一部の実施形態において、ADCの抗DLL3抗体は、以下の特徴のうちの1つ又は複数を含んでいてもよい：(a) 軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列若しくは配列番号7、17、27、37、62、66、若しくは70のいずれか1つに存在する軽鎖配列に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは少なくとも99%同一な軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列；及び／又は(b) 重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列若しくは配列番号2、12、22のいずれか1つに存在する重鎖配列に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは少なくとも99%同一な重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列。一部の実施形態において、ADCの抗DLL3抗体は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_H ）又は重鎖及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_L ）又は軽鎖を含んでいてもよく、(a) V_H 又は重鎖は、配列番号2、配列番号12、配列番号22、配列番号32、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号67、配列番号68、及び配列番号69からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；及び／又は(b) V_L は、配列番号7、配列番号17、配列番号27、配列番号37、配列番号62、配列番号66、及び配列番号70からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、 V_H 又は重鎖アミノ酸配列及び V_L 又は軽鎖アミノ酸配列は、それぞれ配列番号2及び配列番号7（7－I1－B）；それぞれ配列番号12及び配列番号17（2－C8－A）；それぞれ配列

10

20

30

40

50

番号 59 及び配列番号 62 (H2-C8-A) ; それぞれ配列番号 60 及び配列番号 62 (H2-C8-A-2) ; それぞれ配列番号 61 及び配列番号 62 (H2-C8-A-3) ; それぞれ配列番号 22 及び配列番号 27 (10-O18-A) ; それぞれ配列番号 67 及び配列番号 70 (H10-O18-A) ; それぞれ配列番号 68 及び配列番号 70 (H10-O18-A-2) ; 配列番号 69 及び配列番号 70 (H10-O18-A-3) ; それぞれ配列番号 32 及び配列番号 37 (6-G23-F) ; それぞれ配列番号 63 及び配列番号 66 (H6-G23-F) ; それぞれ配列番号 64 及び配列番号 66 (H6-G23-F-2) ; 並びにそれぞれ配列番号 65 及び配列番号 66 (H6-G23-F-3) からなる群から選択される。

【0265】

当業者は、本明細書の実施例における説明に基づき各抗体分子に必要な数の薬物分子をコンジュゲートし、コンジュゲートしたピロロベンゾジアゼピン誘導体分子の制御された数を有する抗体を得るための反応方法を設計することができる。

本発明の抗体-薬物コンジュゲート、遊離の薬物、又は生成中間体は、大気中に放置されると、水分を吸収し、吸着した水の付着を可能にしたり、又は水和物になったり、又は再結晶したりする可能性があり、このような水を含む化合物及び塩も本発明に含まれる。

【0266】

本発明の抗体-薬物コンジュゲート、遊離の薬物、又は生成中間体は、アミノ基などの塩基性基を有する場合、要求に応じて、医薬的に許容される塩に変換してもよい。このような塩の例としては、これらに限定されないが、ハロゲン化水素塩、例えば塩酸塩及びヨウ化水素酸塩；無機酸塩、例えば硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、及びリン酸塩；低級アルカンスルホン酸塩、例えばメタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、及びエタンスルホン酸塩；アリールスルホン酸塩 (arylsulfonate)、例えばベンゼンスルホン酸塩及びp-トルエンスルホン酸塩；有機酸塩、例えばギ酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、及びマレイン酸塩；並びにアミノ酸性塩、例えばオルニチン酸塩 (ornithinate)、グルタミン酸塩、及びアスパラギン酸塩を挙げることができる。

【0267】

本発明の抗体-薬物コンジュゲート、遊離の薬物、又は生成中間体が、カルボキシ基などの酸性基を有する場合、一般的には塩基付加塩が形成され得る。医薬的に許容される塩の例としては、これらに限定されないが、アルカリ金属塩、例えばナトリウム塩、カリウム塩、及びリチウム塩；アルカリ土類金属塩、例えばカルシウム塩及びマグネシウム塩；無機塩、例えばアンモニウム塩；並びに有機アミン塩、例えば、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン酸塩 (methylglucamate)、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジリエチレンジアミン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル-N-(2-フェニルエトキシ)アミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、及びトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩を挙げることができる。

【0268】

本発明の抗体-薬物コンジュゲート、遊離の薬物、又は生成中間体は、例えば、空気中の水分を吸収することによって、水和物として存在し得る。本発明の溶媒和物は、特定の溶媒和物に限定されず、あらゆる医薬的に許容される溶媒和物であってもよく、具体的には、水和物、エタノール溶媒和物、2-プロパノール溶媒和物などが好ましい。本発明の抗体-薬物コンジュゲート、遊離の薬物、又は生成中間体は、そこに窒素原子が存在する場合、そのN-酸化物の形態であってもよく、これらの溶媒和物及びN-酸化物の形態は、本発明の範囲に含まれる。

【0269】

本発明は、様々な放射性又は非放射性同位体で標識された化合物を含む。本発明の抗体

10

20

30

40

50

ー薬物コンジュゲート、遊離の薬物、又は生成中間体は、1つ又は複数の成分原子を、原子同位体の天然ではない比率で含有していてもよい。原子同位体の例としては、これらに限定されないが、重水素 (^2H)、トリチウム (^3H)、ヨウ素-125 (^{125}I)、及び炭素-14 (^{14}C) を挙げることができる。本発明の化合物は、トリチウム (^3H)、ヨウ素-125 (^{125}I)、及び炭素-14 (^{14}C) などの放射性同位体で放射標識されていてもよい。放射標識した化合物は、治療剤又は予防剤、アッセイ試薬などの調査のための試薬、及び診断剤、例えばインビボでの画像化のための診断剤として有用である。本発明の抗体-薬物コンジュゲートの同位体バリエーションは全て、それらが放射性であるか又はそうでないかに関係なく、本発明の範囲に含まれる。

【0270】

10

E. 作製方法

本発明の抗体-薬物コンジュゲート及びその遊離の薬物又は生成中間体を作製するための代表的な方法が本明細書で開示され、それを説明する。以下において、反応式に示される化合物の番号は、化合物を互いに識別するのに使用される。具体的には、「式(1)の化合物」、「化合物(1)」などの形態での言及がなされると予想される。他の番号を有する化合物も同じ方式で示されることになる。

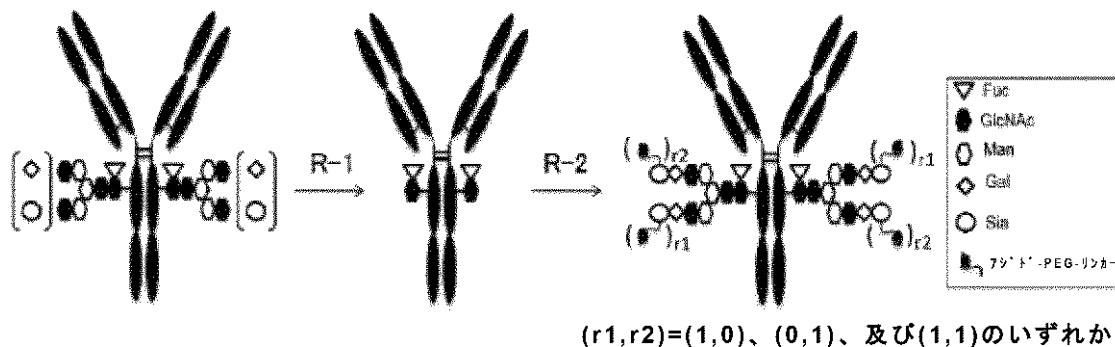
スキームR：抗体の調製

グリカンがリモデリングされた抗体は、例えば、WO 2013 / 120066に記載される方法に従って、図3で例示される方法を使用することによって作製することができる。合成の工程R1及びR2の以下の説明は、図12及び以下のスキームに関連してなされる。

20

【0271】

【化45】



30

工程R-1：還元末端におけるキトビオース構造のGlcNAc β 1-4 GlcNAcにおけるグリコシド結合の加水分解

この工程は、公知の酵素反応の使用により、標的化された抗体のアミノ酸配列の297位におけるアスパラギンへのN結合型グリカン結合(N297連結グリカン)を切断することによって、グリカン短縮化抗体を調製する工程である。

【0272】

40

緩衝剤溶液(例えば、50 mMリン酸緩衝剤溶液)中の標的化された抗体(20 mg/mL)は、0°C~40°Cでの、酵素EndoSなどのヒドロラーゼの使用による、還元末端におけるキトビオース構造のGlcNAc β 1と4 GlcNAcとのグリコシド結合の加水分解反応に供される。反応時間は、10分~72時間であり、好ましくは1時間~6時間である。使用される野生型酵素EndoSの量は、抗体100 mgに対して、0.1~10 mgであり、好ましくは0.1~3 mgである。反応が完了した後、それぞれ後述されるアフィニティークロマトグラフィーでの精製及び/又はヒドロキシアパタイトカラムでの精製を行って、GlcNAc β 1と4 GlcNAcとの間でグリカンが加水分解された(Fuc α 1, 6) GlcNAc抗体を作製する。

【0273】

50

工程 R-2 : グリコシル転移反応

この工程は、(Fuc α 1, 6)GlcNAc抗体を、アジド基を含むPEGリンカーを有するMSG (MSG1、MSG2)型又はSG型グリカンオキサゾリン形態(以下、「アジドグリカンオキサゾリン形態」と称する)に酵素反応の使用により結合させることによって、グリカンがリモデリングされた抗体を作製する工程である。

緩衝剤溶液(例えば、リン酸緩衝剤溶液)中のグリカン短縮化抗体は、0℃~40℃で、触媒的な量のトランスグリコシダーゼ、例えばEndoS (D233Q/Q303L)の存在下で、アジドグリカンオキサゾリン形態と反応させることによるグリコシル転移反応に供される。反応時間は、10分~72時間であり、好ましくは1時間~6時間である。使用される酵素EndoS (D233Q/Q303L)の量は、抗体100mgに対して、1~10mgであり、好ましくは1~3mgであり、使用されるアジドグリカンオキサゾリン形態の量は、2当量から過剰な当量であり、好ましくは2当量~20当量である。

10

【0274】

反応が完了した後、アフィニティークロマトグラフィーでの精製及びヒドロキシアパタイトカラムでの精製を行って、グリカンがリモデリングされた抗体を精製する。

アジドグリカンオキサゾリン(例えば[N3-PEG(3)]-MSG1-Ox、WO19065964の実施例56)形態は、WO19065964の実施例55~57に記載される方法に従って調製してもよい。合成有機化学の分野で公知の反応(例えば、縮合反応)を使用することによって、N₃-(CH₂CH₂-O)ⁿ-CH₂CH₂-NH₂、アジド基を含むPEGリンカー(N₃-L(PEG))が、MSG (MSG1、MSG2)又はジシアロ八糖(東京化成工業株式会社)に導入されてもよい。具体的には、シアル酸の2位におけるカルボン酸及びN₃-(CH₂CH₂-O)ⁿ-CH₂CH₂-NH₂の右の末端におけるアミノ基が縮合反応を受けて、アミド結合を形成する。

20

【0275】

縮合反応の使用における縮合剤の例としては、これらに限定されないが、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCI)、カルボニルジイミダゾール(CDI)、2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノール(BOP)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)、及びO-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU)を挙げることができ、反応のための溶媒の例としては、これらに限定されないが、ジクロロメタン、DMF、THF、酢酸エチル、及びそれらの混合溶媒を挙げることができる。

30

【0276】

反応温度は、典型的には、-20℃~100℃又は溶媒の沸点であり、好ましくは、-5℃~50℃の範囲内である。必要に応じて、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、及び4-ジメチルアミノピリジンなどの有機塩基、又は炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素カリウム、及び炭酸水素ナトリウムなどの無機塩基が付加されてもよい。さらに、例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール又はN-ヒドロキシスクシンイミドが反応促進剤として付加されてもよい。

40

MSG、MSG1、又はMSG2は、EndoMなどのヒドロラーゼを用いた(MSG-1)Asn又は分離/精製した(MSG1-1)Asn又は(MSG2-1)Asnの加水分解により得ることができる。

オキサゾリン化は、公知の論文によるMSG型(MSG1、MSG2)又はSG型グリカンの還元末端におけるGlcNAcから調製してもよい(J. Org. Chem., 2009, 74(5), 2210-2212. Helv. Chim. Acta, 2012, 95, 1928-1936.)。

【0277】

工程 R-3 : グリコシル転移反応

50

工程 R-2 の代わりに、以下の工程が、WO 2018/003983 に記載される 2 つの酵素を使用して、本方法と共に上記のグリカンがリモデリングされた抗体を作製するのに適用してもよい。工程 R-1 から得られた (Fuc α 1, 6) GlcNAc 抗体を、2 種のグリコシルトランスフェラーゼ (酵素 A 及び酵素 B) の存在下で、そのシアル酸にアジド基が導入された (SG-) Asn、(MSG-) Asn などのグリカンドナー分子との反応に供して、アジド基がシアル酸に導入された SG 型のグリカンがリモデリングされた Fc 含有分子を合成する。酵素 A の例としては、EndoM、EndoOm、及び EndoCC、並びに低減した加水分解活性を呈する EndoM 突然変異体、EndoOm 突然変異体、及び EndoCC 突然変異体を挙げることができる。酵素 A は、好ましくは、EndoMN175Q、EndoCC N180H、又は EndoOm N194Q である。酵素 B の例としては、EndoS 及び EndoS2 (EndoS49)、並びに低減した加水分解活性を呈する EndoS 突然変異体及び EndoS2 (EndoS49) 突然変異体を挙げることができる。酵素 B は、好ましくは、EndoS D233Q、EndoS D233Q/Q303L、EndoS D233Q/E350A、EndoS D233Q/E350Q、EndoS D233Q/E350D、EndoS D233Q/E350N、EndoS D233Q/D405A、EndoS2D184M、EndoS2T138Q などである。グリカンがリモデリングされた抗体の調製において、抗体の水溶液の濃縮、濃度の測定、及び緩衝剤交換は、以下の一般的なオペレーション A~C に従って行われてもよい。

10

20

30

40

50

【0278】

i. 一般的なオペレーション A：抗体の水溶液の濃縮

抗体又は抗体-薬物コンジュゲートの溶液を、Amicon Ultra (30,000~50,000 MWCO、Millipore 社) の容器に入れ、後述される抗体又は抗体-薬物コンジュゲートの溶液を、遠心分離機 (Allegra X-15R、Beckman Coulter, Inc.) を使用した遠心分離オペレーション (2000G~4000G で 5~20 分の遠心分離) を介して濃縮した。

ii. 一般的なオペレーション B：抗体濃度の測定

抗体濃度の測定を、製造元によって特定された方法に従って、UV 測定装置 (Nanodrop 1000、Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用することによって行った。次いで、抗体間で異なる 280nm の吸収係数 (1.3 mL $\cdot$ mg $^{-1}\cdot$ cm $^{-1}$ ~1.8 mL $\cdot$ mg $^{-1}\cdot$ cm $^{-1}$) を使用した。

iii. 一般的なオペレーション C：抗体ごとの緩衝剤交換

緩衝剤溶液 (例えば、リン酸緩衝食塩水 (pH 6.0)、リン酸緩衝剤 (pH 6.0)) を抗体の水溶液に添加し、これを一般的なオペレーション A に従って濃縮した。このオペレーションを数回行い、次いで抗体濃度を、一般的なオペレーション B を使用することによって測定し、緩衝剤溶液 (例えば、リン酸緩衝食塩水 (pH 6.0)、リン酸緩衝剤 (pH 6.0)) で 10~20 mg/mL に調整した。

【0279】

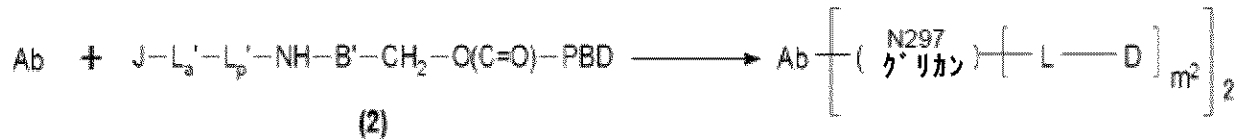
スキーム S：コンジュゲーション

作製方法は、SPAAC (歪み促進型アルキンアジド付加環化：J. AM. CHEM. SOC. 2004, 126, 15046-15047) 反応を介して、上述したグリカンがリモデリングされた抗体を生成中間体 (2) にコンジュゲートすることによる、抗体-薬物コンジュゲートを作製するための方法である。式中、Ab は、グリカンがリモデリングされた抗体を表す。

【0280】

【化 4 6】

[式 73]



S P A A C 反応は、抗体 A b の緩衝剤溶液（酢酸ナトリウム溶液、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム溶液など、又はそれらの混合物）、及び適切な溶媒（ジメチルスルホキシド（DMSO）、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルアセトアミド（DMA）、N-メチル-2-ピリドン（NMP）、プロピレングリコール（PG）、など、又はそれらの混合物）に化合物（2）を溶解させる溶液を混合することによって進行する。

【0281】

使用される化合物（2）のモル量は、抗体 1 モル当たり、2 モルから過剰なモル量であり、好ましくは、1 モル～30 モルであり、有機溶媒の比率は、好ましくは、抗体の緩衝剤に対して 1～200 % v / v である。反応温度は、0℃～37℃であり、好ましくは、10℃～25℃であり、反応時間は、1～150 時間であり、好ましくは、6 時間～100 時間である。反応中の pH は、好ましくは、5～9 である。

抗体-薬物コンジュゲート化合物（ADC）は、上述した一般的なオペレーション A～C 及び後述される一般的なオペレーション D～F に従って、緩衝剤交換、精製、及び抗体濃度及び抗体分子 1 個当たりのコンジュゲートした薬物分子の平均数の測定を介して互いに同定することができる。

【0282】

i v . 一般的なオペレーション D : 抗体-薬物コンジュゲートの精製

N A P-25 カラム（G E H e a l t h c a r e）を、商業的に入手可能なソルビトール（5%）を含有する酢酸緩衝剤溶液（10 mM、pH 5.5；本明細書では A B S と称される）で平衡化した。この N A P-25 カラムに、抗体-薬物コンジュゲートの水性反応溶液（約 1.5～2.5 mL）を適用し、製造元によって特定された量で緩衝剤で溶出させて、抗体画分を分離及び収集した。分離及び収集した画分を再び N A P-25 カラムに適用し、緩衝剤で溶出させるためのゲルろ過精製オペレーションを合計 2 回又は 3 回繰り返して、抗体-薬物コンジュゲートを得て、未結合の薬物リンカー、ジメチルスルホキシド、及びプロピレングリコールを除去した。必要に応じて、抗体-薬物コンジュゲートの溶液の濃度を、一般的なオペレーション A～C を介して調整した。

【0283】

v . 一般的なオペレーション E : 抗体-薬物コンジュゲートの抗体濃度の測定

抗体-薬物コンジュゲートにおけるコンジュゲートした薬物の濃度は、以下に示すランバート-ベールの法則を使用することによって計算することができる。ランバート-ベールの法則を使用した式（I）は以下の通りである。

【0284】

【数 1】

[式 I]

$$\begin{aligned} A_{280} &= \varepsilon_{280} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot C (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) \cdot l (\text{cm}) \\ \text{吸光度} &= \text{モル吸収係数} \times \text{モル濃度} \times \text{光路長} \end{aligned} \quad \text{式(I)}$$

ここで、A 280 は、280 nm における抗体-薬物コンジュゲートの水溶液の吸光度を意味し、ε 280 は、280 nm における抗体-薬物コンジュゲートのモル吸収係数を

意味し、 C ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) は、抗体－薬物コンジュゲートのモル濃度を意味する。式 (I) から、抗体－薬物コンジュゲートのモル濃度、 C ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) は、以下の式 (II) を使用することによって決定することができる。

【0285】

【数2】

[式 II]

$$C(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{A_{280}}{\epsilon_{280}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot l(\text{cm})} \quad \text{式(II)}$$

10

さらに、両側に抗体－薬物コンジュゲートのモル質量、 MW ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) を掛けて、抗体－薬物コンジュゲートの重量濃度、 C' ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) を決定する (式 (III))。

【数3】

[式 III]

$$C'(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = MW(\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}) \cdot C(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{A_{280} \cdot MW(\text{g} \cdot \text{mol}^{-1})}{\epsilon_{280}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot l(\text{cm})} \quad \text{式(III)}$$

20

【0286】

式に使用される値及び実施例に適用される値を説明する。

使用された吸光度 A_{280} は、 280 nm における抗体－薬物コンジュゲートの水溶液の UV 吸光度の測定値であった。モル質量に関して、抗体の分子量の推定値である MW ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) は、抗体のアミノ酸配列から計算され、抗体－薬物コンジュゲートのモル質量の概算値として使用した。測定で使用される光路長、 l (cm) は 1 cm であった。

抗体－薬物コンジュゲートのモル吸収係数、 ϵ_{280} は、以下の式 (IV) を使用することによって決定することができる。

30

【0287】

【数4】

[式 IV]

$$\epsilon_{280} = \frac{\text{抗体のモル吸収係数}}{\text{抗体のモル吸収係数}} \cdot \frac{\text{薬物のモル吸収係数}}{\text{薬物のモル吸収係数}} \cdot \epsilon_{\text{DL},280} \times \frac{\text{コンジュゲートした薬物分子の数}}{\text{抗体のモル吸収係数}} \quad \text{式(IV)}$$

40

ここで、 $\epsilon_{Ab,280}$ は、 280 nm における抗体のモル吸収係数を意味し、 $\epsilon_{DL,280}$ は、 280 nm における薬物のモル吸収係数を意味する。

【0288】

公知の計算方法 (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423) を使用することによって、 $\epsilon_{Ab,280}$ は、抗体のアミノ酸配列から推測することができる。実施例において、使用される D L L 3 抗体 (H 2 - C 8 - A) のモル吸収係数は、 $\epsilon_{Ab,280} = 220378$ (計算された推定値) であり、使用される D L L 3 抗体 (H 6 - G 2 3 - F) のモル吸収係数は、 $\epsilon_{Ab,280} = 215353$ (計算された推定値) であり、使用される D L L 3 抗体 (H 1 0 - O 1 8 - A) のモル吸収係数は、 $\epsilon_{Ab,280} = 215424$ (計算された推定値) であり、使用される L P S 抗体のモル吸収係数は、 $\epsilon_{Ab,280} = 23028$

50

0（計算された推定値）であり、使用されるD L L 3抗体（H 2 - C 8 - A - 3）のモル吸収係数は、 $\epsilon_{Ab,280} = 220420$ （計算された推定値）であり、使用されるD L L 3抗体（H 1 0 - O 1 8 - A - 3）のモル吸収係数は、 $\epsilon_{Ab,280} = 215380$ （計算された推定値）であった。

使用のために $\epsilon_{DL,280}$ を各UV測定で得られた測定値から計算した。具体的には、特定のモル濃度でコンジュゲート前駆体（薬物）が溶解している溶液の吸光度を測定し、それに式（I）、ランバートーベールの法則を適用し、得られた値を使用した。

【0289】

v i . 一般的なオペレーションF：抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体分子1個当たりのコンジュゲートした薬物分子の平均数の測定

抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体分子1個当たりのコンジュゲートした薬物分子の平均数は、以下の方法を用いて、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を介して決定することができる。

〔F-1. HPLC分析のためのサンプルの調製（抗体-薬物コンジュゲートの還元）〕

抗体-薬物コンジュゲートの溶液（約1mg/mL、60μL）を、ジチオスレイトール（DTT）の水溶液（100mM、15μL）と混合する。混合物を37℃で30分インキュベートして、抗体-薬物コンジュゲートのL鎖とH鎖との間のジスルフィド結合が切断されたサンプルを調製し、このサンプルをHPLC分析のために使用する。

【0290】

〔F-2. HPLC分析〕

HPLC分析は、以下の条件下で行われる。

HPLCシステム：Agilent 1290HPLCシステム（Agilent Technologies）

検出器：紫外線吸収分光計（測定波長：280nm、329nm）

カラム：BEHフェニル（2.1×50mm、1.7μm、Waters Acuity）

カラム温度：75℃

移動相A：0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）-15%イソプロピルアルコール水溶液

移動相B：0.075%TFA-15%イソプロピルアルコールアセトニトリル溶液

勾配プログラム1：14%～36%（0分から15分）、36%～80%（15分から17分）、80%～14%（17分から17.1分）、14%～14%（17.1分から23分）

勾配プログラム2：14%～50%（0分から15分）、50%～80%（15分から17分）、80%～14%（17分から17.1分）、14%～14%（17.1分から23分）

サンプル注入体積：5μL。

【0291】

〔F-3. データ分析〕

〔F-3-1〕コンジュゲートした薬物分子を有するL鎖（1つのコンジュゲートした薬物分子を有するL鎖：L₁）及びコンジュゲートした薬物分子を有するH鎖（1つのコンジュゲートした薬物分子を有するH鎖：H₁、2つのコンジュゲートした薬物分子を有するH鎖：H₂、3つのコンジュゲートした薬物分子を有するH鎖：H₃）は、コンジュゲートした薬物分子の数に比例して増加する疎水性を有し、いかなるコンジュゲートした薬物分子も有さない抗体のL鎖（L₀）及びH鎖（H₀）と比較してより長い保持時間を有し、したがってL₀、L₁、H₀、H₁、H₂、及びH₃は、示された順番で溶出される。一部のケースではL₁及びH₀の順番は逆であるが、コンジュゲートした薬物分子を有さないH₀は、薬物に特徴的な329nmの波長で吸収しない。それゆえに、L₁及びH₀は、329nmの波長で吸収をチェックすることによって区別できる。L₀とH₀との保持

10

20

30

40

50

時間の比較を介して、検出される各ピークは、 L_0 、 L_1 、 H_0 、 H_1 、 H_2 、又は H_3 に割り当てることができる。

【0292】

【F-3-2】各薬物リンカーがUVを吸収するため、ピーク面積の値は、コンジュゲートした薬物リンカー分子の数に従って、L鎖、H鎖、及び薬物リンカーのモル吸収係数を用いた以下の式を使用することによって補正される。

【0293】

【数5】

[式V]

$$\begin{aligned} \text{補正された L 鎖} &= \text{ピーク面積} \times \frac{\text{L 鎖のモル吸収係数}}{\text{L 鎖のモル吸収係数} + \text{コンジュゲートした薬物分子の数} \times \text{薬物-リンカーのモル吸収係数}} \\ \text{ピーク面積}(Li) & \\ \text{補正された H 鎖} &= \text{ピーク面積} \times \frac{\text{H 鎖のモル吸収係数}}{\text{H 鎖のモル吸収係数} + \text{コンジュゲートした薬物分子の数} \times \text{薬物-リンカーのモル吸収係数}} \\ \text{ピーク面積}(Hi) & \end{aligned}$$

10

【0294】

ここで、各抗体のL鎖及びH鎖のモル吸収係数（280nm）に関して、公知の計算方法（Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423）を使用することによって抗体のL鎖及びH鎖のアミノ酸配列から推測された値を使用することができる。DLL3抗体（H2-C8-A）のケースにおいて、26123を、アミノ酸配列から推測されたL鎖のモル吸収係数として使用し、84150を、アミノ酸配列から推測されたH鎖のモル吸収係数として使用した。DLL3抗体（H6-G23-F）のケースにおいて、30105を、アミノ酸配列から推測されたL鎖のモル吸収係数として使用し、77423を、アミノ酸配列から推測されたH鎖のモル吸収係数として使用した。DLL3抗体（H10-O18-A）のケースにおいて、26166を、アミノ酸配列から推測されたL鎖のモル吸収係数として使用し、81340を、アミノ酸配列から推測されたH鎖のモル吸収係数として使用した。DLL3抗体（H2-C8-A-3）のケースにおいて、26212を、アミノ酸配列から推測されたL鎖のモル吸収係数として使用し、83993を、アミノ酸配列から推測されたH鎖のモル吸収係数として使用した。DLL3抗体（H10-O18-A-3）のケースにおいて、26212を、アミノ酸配列から推測されたL鎖のモル吸収係数として使用し、81478を、アミノ酸配列から推測されたH鎖のモル吸収係数として使用した。

20

30

【F-3-3】補正されたピーク面積の合計に対する各鎖のピーク面積比（%）は、以下の式を使用することによって計算される。

【0295】

【数6】

[式VI]

$$\begin{aligned} \text{L 鎖ピーク面積比} &= \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{Li}} \times 100 \\ \text{H 鎖ピーク面積比} &= \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100 \end{aligned}$$

A_{Li}, A_{Hi} : L_i, H_i は、それぞれ補正されたピーク面積である。

40

50

〔F-3-4〕抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体分子1個当たりのコンジュゲートした薬物分子の平均数は、以下の式を使用することによって計算される。

コンジュゲートした薬物分子の平均数 = $(L_0 \text{ピーク面積比} \times 0 + L_0 \text{ピーク面積比} \times 1 + H_0 \text{ピーク面積比} \times 0 + H_1 \text{ピーク面積比} \times 1 + H_2 \text{ピーク面積比} \times 2 + H_3 \text{ピーク面積比} \times 3) / 100 \times 2$ 。

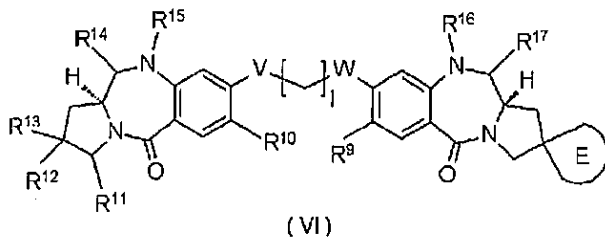
VII. 遊離の薬物及び生成中間体

本発明の抗体-薬物コンジュゲートの中間体及び遊離の薬物は、以下の式によって表される：

〔0296〕

〔化47〕

〔式74〕



これは、以下で説明される。

〔0297〕

本発明の遊離の薬物は、抗体-薬物コンジュゲートが腫瘍細胞に移動し、次いで抗体-薬物コンジュゲートにおけるリンカーLの一部が切断されるプロセスを介して生成される。

本発明の抗体-薬物コンジュゲートは、生成中間体を使用することによって作製される。

本発明の抗体-薬物コンジュゲートの遊離の薬物は、(a) R^{16} 及び R^{17} が、組み合わされて、イミン結合($N=C$)を形成するケースに相当する。

本発明の抗体-薬物コンジュゲートの生成中間体は、(b) R^{16} が $J-La'-Lp'-NH-B'-CH_2-O(C=O)-^*$ によって表されるケースに相当する。

したがって、式における l 及び n^1 、 E 及び A 、 R^9 及び R^1 、 R^{10} 及び R^2 、 R^{11} 及び R^3 、 R^{12} 及び R^4 、 R^{13} 及び R^5 、 R^{14} 及び R^6 、 R^{15} 及び R^7 、 V 及び X 、 W 及び Y 、グループ7及びグループ1、グループ8及びグループ2、グループ9及びグループ3、グループ10及びグループ4、グループ11及びグループ5、及びグループ12及びグループ6は、それぞれ同義語である。

l は、2～8の整数を表し、好ましくは、2～6の整数であり、より好ましくは、3～5の整数である。 l が2～8の整数であり、好ましくは2～6の整数であり、より好ましくは3～5の整数であるアルキル鎖は、二重結合を含む場合がある。

〔0298〕

E は、スピロ結合した3～5員飽和炭化水素環又は3～5員飽和複素環を表し、好ましくは、3～5員飽和炭化水素環（シクロプロパン、シクロブタン、又はシクロペンタン）であり、より好ましくはシクロプロパン又はシクロブタンであり、最も好ましくは、シクロプロパンである。スピロ結合した3～5員飽和炭化水素環は、1～4個のハロゲン原子で置換されていてもよく、好ましくは、1又は2個のフッ素原子で置換されていてもよい（例えば、2,2-ジフルオロシクロプロパン）。

R^9 及び R^{10} は、それぞれ独立して、C1-C6アルコキシ基、C1-C6アルキル基、水素原子、ヒドロキシ基、チオール基、C1-C6アルキルチオ基、ハロゲン原子、又は $-NR'R''$ を表し、それぞれ好ましくは、C1-C6アルコキシ基、C1-C6アルキル基、又はヒドロキシ基であり、より好ましくはC1-C3アルコキシ基であり、最も

10

20

40

50

好ましくは、メトキシ基である。

R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} は、以下の(i)～(iii)のいずれかに記載された通りである。

【0299】

A. 化合物の実施形態1

R^{11} 及び R^{12} が、 R^3 及び R^4 が結合している炭素原子と共に組み合わせられて、二重結合を形成する場合、 R^{13} は、任意選択でグループ7から選択される1つ又は複数の置換基を有するアリール基又はヘテロアリール基、又は任意選択でグループ8から選択される1つ又は複数の置換基を有するC1-C6アルキル基を表し、好ましくは、任意選択でグループ7から選択される1つ又は複数の置換基を有するアリール基である。

10

【0300】

R^{13} に関する「任意選択でグループ7から選択される1つ又は複数の置換基を有するアリール基又はヘテロアリール基」における「アリール基」は、好ましくは、フェニル基又はナフチル基であり、より好ましくは、フェニル基である。

R^{13} に関する「任意選択でグループ7から選択される1つ又は複数の置換基を有するアリール基又はヘテロアリール基」における「ヘテロアリール基」は、好ましくは、チエニル基、ピリジル基、ピリミジル基、キノリル基、キノキサリル基、又はベンゾチオフェニル基であり、より好ましくは、2-チエニル基、3-チエニル基、2-ピリジル基、3-ピリジル基、又は4-ピリジル基であり、より一層好ましくは、3-ピリジル基又は3-チエニル基である。

20

【0301】

R^{13} に関するアリール基又はヘテロアリール基の置換基の例としては、これらに限定されないが、以下のa)～j)が挙げられる：

a) 任意選択で1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C6アルコキシ基

b) 任意選択で1～3個のハロゲン原子、ヒドロキシ基、 $-OCOR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-C(=NR')-NR'R''$ 、及び $-NHC(=NR')-NR'R''$ から選択されるれか1つで置換されていてもよいC1-C6アルキル基、

30

c) ハロゲン原子、

d) C3-C5シクロアルコキシ基、

e) C1-C6アルキルチオ基、

f) $-NR'R''$ 、

g) $-C(=NR')-NR'R''$ 、

h) $-NHC(=NR')-NR'R''$ 、

i) $-NHCOR'$ 、及び

j) ヒドロキシ基。

【0302】

ここで、b)及びf)～i)における R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又はC1-C6アルキル基を表し、好ましくは、それぞれ独立して、水素原子又はC1-C3アルキル基である。

40

a)～j)は、好ましくは、以下の通りである：

a) 任意選択で1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C3アルコキシ基、より好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、i-プロポキシ基、又はトリフルオロメトキシ基、より一層好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、又はトリフルオロメトキシ基、最も好ましくは、メトキシ基；

b) 任意選択で1～3個のハロゲン原子、ヒドロキシ基、 $-OCOR'$ 、 $-C(=NR')$ 、 $-NR'R''$ 、及び $-NHC(=NR')-NR'R''$ から選択されるいずれかで置換されていてもよいC1-C3アルキル基〔式中、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又はC1-C3アルキル基であり、より好ましくは、任意選択で、1～3個のハロゲン原子、ヒドロキシ基、 $-OCOR'$ 、 $-C(=NR')$ 、 $-NR'R''$ 、及び $-NHC(=NR')-NR'R''$ 、及び $-NHCOR'$ から選択されるれか1つで置換されていてもよいC1-C6アルキル基、より好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、i-プロポキシ基、又はトリフルオロメトキシ基、より一層好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、又はトリフルオロメトキシ基、最も好ましくは、メトキシ基；

50

$\text{HC} (= \text{NR}') - \text{NR}'', \text{R}', \text{R}''$ から選択されるいずれかで置換されていてもよい $\text{C}1 - \text{C}3$ アルキル基であり、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又はメチル基であり、より一層好ましくは、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、 i -プロピル基、フルオロメチル基、ジフルオロメチル基、トリフルオロメチル基、ヒドロキシメチル基、 $-\text{CH}_2\text{OCOMe}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NHC} (= \text{NH}) - \text{NH}_2$ 、又は $-\text{CH}_2-\text{NHC} (= \text{NMe}) - \text{NH}_2$ である]；

c) ハロゲン原子、好ましくは、フッ素原子又は塩素原子；

d) $\text{C}3 - \text{C}5$ シクロアルコキシ基、より好ましくはシクロプロポキシ基；

e) $\text{C}1 - \text{C}3$ アルキルチオ基、より好ましくはメチルチオ基又はエチルチオ基；

f) $-\text{NR}'\text{R}''$ [式中、 R' 及び R'' は、それぞれ独立して、水素原子又は $\text{C}1 - \text{C}3$ アルキル基であり、より好ましくは、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHMe}$ 、 $-\text{NMe}_2$ 、 $-\text{NHEt}$ 、又は $-\text{NEt}_2$ である]；

g) $-\text{C} (= \text{NR}') - \text{NR}'', \text{R}', \text{R}''$ [式中、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又は $\text{C}1 - \text{C}3$ アルキル基であり、より好ましくは、 $-\text{C} (= \text{NH}) - \text{NH}_2$ 又は $-\text{C} (= \text{NMe}) - \text{NH}_2$ である]；

h) $-\text{NHC} (= \text{NR}') - \text{NR}'', \text{R}', \text{R}''$ [式中、 R' 、 R'' 、及び R''' は、それぞれ独立して、水素原子又は $\text{C}1 - \text{C}3$ アルキル基であり、より好ましくは、 $-\text{NHC} (= \text{NH}) - \text{NH}_2$ 又は $-\text{NHC} (= \text{NMe}) - \text{NH}_2$ である]；

i) $-\text{NHCOR}'$ [式中、 R' は、水素原子又は $\text{C}1 - \text{C}3$ アルキル基であり、より好ましくは、 $-\text{NHCOMe}$ 又は $-\text{NHCOEt}$ である]；及び

j) ヒドロキシ基。

20

[0303]

R^{13} に関するアリール基（好ましくは、フェニル基）又はヘテロアリール基（好ましくは、ピリジル基）は、いずれの位置に少なくとも1つの置換基を有していてもよい。複数の置換基が存在する場合、置換基は、同一であってもよいし又は異なってもよい。

R^{13} がアリール基である場合、各置換基は、好ましくは、a)、b)、d)、g)、h)、又は j) であり、より好ましくは、a)、b)、d)、又は j) である。

R^{13} がフェニル基である場合、 R^{13} は、いずれの位置に置換基を有していてもよく、複数の置換基を有していてもよく、好ましくは、1又は2つの置換基は、3位及び／又は4位に存在し、より好ましくは、1つの置換基は、4位に存在する。

30

[0304]

R^5 がナフチル基である場合、 R^5 は、いずれの位置に置換基を有していてもよく、複数の置換基を有していてもよく、好ましくは、1つの置換基は、6位に存在する。

R^{13} がフェニル基である場合、 R^{13} は、より好ましくは、フェニル基、4-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-エトキシフェニル基、4-(n -プロポキシ)-フェニル基、4-(i -プロポキシ)-フェニル基、4-シクロプロポキシフェニル基、4-トリフルオロメチルフェニル基、4-ヒドロキシメチルフェニル基、4-アセトキシメチルフェニル基、又は4-カルバミミドアミドメチルフェニル基であり、より一層好ましくは、フェニル基、4-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-シクロプロポキシフェニル基、4-ヒドロキシメチルフェニル基、4-アセトキシメチルフェニル基、4-カルバミミドアミドメチルフェニル基、又は4-トリフルオロメチルフェニル基である。

40

[0305]

R^{13} がナフチル基である場合、 R^{13} は、より好ましくは、ナフチル基又は6-メトキシ-2-ナフチル基である。最も好ましいは、4-メトキシフェニル基である。

R^{13} がヘテロアリール基である場合、各置換基は、好ましくは、a)、b)、d)、g)、h)、又は j) であり、より好ましくは、a) 又は b) である。

R^{13} がヘテロアリール基である場合、 R^{13} は、いずれの位置に少なくとも1つの置換基を有していてもよい。 R^{13} が3-ピリジル基である場合、その置換基は、好ましくは、6位及び／又は5位に存在する。 R^{13} が2-ピリジルである場合、その置換基は、好

50

ましくは、5位及び／若しくは4位又は5位及び／若しくは6位に存在する。 R^{13} が4-ピリジルである場合、その置換基は、好ましくは、2位及び／又は6位に存在する。

R^{13} がヘテロアリアル基である場合、 R^{13} は、複数の置換基を有していてもよく、好ましくは、1又は2つの置換基を有し、好ましくは、1つの置換基を有する。

【0306】

R^{13} がピリジル基である場合、 R^{13} は、好ましくは、6-メトキシ-3-ピリジル基又は6-メチル-3-ピリジル基である。

R^{13} が3-チエニル基又は6-キノキサリル基である場合、 R^{13} は、好ましくは、非置換である。

R^{13} に関する「任意選択でグループ8から選択される1つ又は複数の置換基を有するC1-C6アルキル基」における「C1-C6アルキル基」は、好ましくは、C1-C3アルキル基であり、より好ましくは、メチル基又はエチル基である。

R^{13} に関する「任意選択でグループ8から選択される1つ又は複数の置換基を有するC1-C6アルキル基」における置換基は、それぞれ、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、又はC1-C6アルコキシ基（好ましくは、C1-C3アルコキシ基）であり、好ましくは、ヒドロキシ基、メトキシ基、又はエトキシ基であり、より好ましくは、ヒドロキシ基である。

【0307】

B. 化合物の実施形態2

R^{11} が水素原子を表す場合、 R^{12} 及び R^{13} は、 R^{12} 及び R^{13} が結合している炭素原子と一緒に組み合わせられて、3～5員飽和炭化水素環若しくは3～5員飽和複素環、又は $CH_2=$ を形成する。

3～5員飽和炭化水素環は、1～4個のハロゲン原子で置換されていてもよく、好ましくは、1又は2個のフッ素原子で置換されていてもよい。

R^{12} 及び R^{13} は、好ましくは、組み合わせられて、3～5員飽和炭化水素環又は $CH_2=$ を形成し、より好ましくは、シクロプロパン、シクロブタン、又は $CH_2=$ （エキソメチレン基）を形成し、より一層好ましくは、シクロプロパンを形成する。

R^{12} 及び R^{13} が組み合わせられて3～5員飽和炭化水素環又は3～5員飽和複素環を形成する場合、3～5員飽和炭化水素環又は3～5員飽和複素環は、好ましくは、Eと同じである。より好ましくは、Eは、3～5員飽和炭化水素環であり、 R^{12} 及び R^{13} は、組み合わせられて、3～5員飽和炭化水素環を形成し、より一層好ましくは、Eは、シクロプロパン環であり、 R^{12} 及び R^{13} は、組み合わせられて、シクロプロパン環を形成する。

【0308】

C. 化合物の実施形態3

R^{11} 、 R^{12} 、及び R^{13} は、 R^{11} が結合している炭素原子と R^{12} 及び R^{13} が結合している炭素原子と一緒に組み合わせられて、任意選択でグループ9から選択される1つ又は複数の置換基を有するベンゼン環又は6員複素環を形成する。

ベンゼン環又は複素環は、いずれの位置に少なくとも1つの置換基を有していてもよい。複数の置換基が存在する場合、置換基は、同一であってもよいし又は異なってもよい。

ベンゼン環又は複素環の各置換基は、ハロゲン原子、任意選択で1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C6アルキル基、又はC1-C6アルコキシ基であり、好ましくは、ハロゲン原子、任意選択で1～3個のハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C3アルキル基、又はC1-C3アルコキシ基であり、より好ましくはハロゲン原子、メチル基、又はメトキシ基である。

「任意選択で1つ又は複数の置換基を有するベンゼン環又は6員複素環」は、好ましくは、非置換ベンゼン環である。

R^{11} 、 R^{12} 及び R^{13} は、最も好ましくは、上記の(i)を満たす。

【0309】

D. 他の可変基及び実施形態

10

20

30

40

50

R^{14} 及び R^{15} はそれぞれ、水素原子を表すか、又は R^{14} 及び R^{15} は、組み合わせられて、イミン結合 ($C=N$) を表す。

V 及び W は、それぞれ独立して、酸素原子、窒素原子、又は硫黄原子であり、好ましくは酸素原子である。

R^{16} 及び R^{17} は、

(a) R^{16} 及び R^{17} が、組み合わせられて、イミン結合 ($N=C$) を形成するようなものであるか；又は

(b) R^{16} が、 $J-L a'-L p'-NH-B'-\text{C}HO (C=O)-^*$ を表し、 R^{17} が、ヒドロキシ基又は $C1-C3$ アルコキシ基を表すようなものである。

(b) R^{16} が $J-L a'-L p'-NH-B'-\text{C}HO (C=O)-^*$ であるケースにおいて、式中のアスタリスクは、上記の式によって表されるピロロベンゾジアゼピン環の $N10'$ 位への結合を表す。

【0310】

B' は、フェニル基又はヘテロアリール基を表し、好ましくは、1,4-フェニル基、2,5-ピリジル基、3,6-ピリジル基、2,5-ピリミジル基、又は2,5-チエニル基であり、より好ましくは、1,4-フェニル基である。

$L p'$ は、インピボで、又は標的細胞中で切断可能なアミノ酸配列からなるリンカーを表す。 $L p$ は、例えば、エステラーゼ及びペプチダーゼなどの酵素の作用によって切断される。

リンカー $L p'$ の具体的な例としては、これらに限定されないが、 $-GGVA-$ (配列番号85)、 $-GG-(D-)VA-$ 、 $-VA-$ 、 $-GGFG-$ (配列番号86)、 $-GGPI-$ (配列番号87)、 $-GGVCit-$ (配列番号88)、 $-GGVK-$ (配列番号89)、 $-GG-(D-)PI-$ 、 $-GGPL-$ (配列番号90)、 $-EGGVA$ (配列番号91)、 $-PI-$ 、 $-GGF-$ 、 $DGGF-$ (配列番号92)、 $(D-)D-GGF-$ 、 $-EGGF-$ (配列番号93)、 $-SGGF-$ (配列番号94)、 $-KGGF-$ (配列番号95)、 $-DGGFG-$ (配列番号96)、 $-GGFGG-$ (配列番号97)、 $-DDGGFG-$ (配列番号98)、 $-KDGGFG-$ (配列番号99)、及び $-GGFGGGF-$ (配列番号100) が挙げられる。

【0311】

ここで、「 $(D-)V$ 」は、D-バリンを示し、「 $(D-)P$ 」は、D-プロリンを示し、「 $(D-)D$ 」は、D-アスパラギン酸を示す。

リンカー $L p'$ は、好ましくは、以下の通りである：

$-GGVA-$ (配列番号85)、 $-GG-(D-)VA-$ 、 $-VA-$ 、 $-GGFG-$ (配列番号86)、 $-GGPI-$ (配列番号87)、 $-GGVCit-$ (配列番号88)、 $-GGVK-$ (配列番号89)、 $-GG-(D-)PI-$ 、又は $-GGPL-$ (配列番号90)。

より好ましい例は、 $-GGVA-$ (配列番号85)、 $-GGVCit-$ (配列番号88)、及び $-VA-$ である。

【0312】

La' は、以下の群：

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^6-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^6$
 $-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)n^7-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^6-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n^7-CH_2$
 $-C(=O)-$ 、
 $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^6-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)n^7-CH_2$
 $CH_2-C(=O)-$ 、 $-(CH_2)n^8-O-C(=O)-$ 、
 $-(CH_2)n^{12}-C(=O)-$ 、及び、 $-(CH_2CH_2)n^{13}-C(=O)-NH-$
 $(CH_2CH_2O)n^{14}-CH_2CH_2-C(=O)-$

から選択されるいずれか1つを表し、式中、 n^6 は、1～3の整数を表し（好ましくは、1又は2）、 n^7 は、1～5の整数を表し（好ましくは、2～4、より好ましくは、2又

10

20

30

40

50

は4の整数)、 n^8 は、0～2の整数を表し（好ましくは、0又は1）、 n^{12} は、2～7の整数を表し（好ましくは、2～5、より好ましくは、2又は5の整数）、 n^{13} は、1～3の整数（好ましくは、1）を表し、 n^{14} は、6～10の整数を表す（好ましくは、8）。

【0313】

La' は、好ましくは、以下の群：

—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—、—C(=O)—(CH₂CH₂)₂—C(=O)—、
—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—NH—(CH₂CH₂)₂—C(=O)—、
—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—NH—(CH₂CH₂O)₂—CH₂—C(=O)—、
—C(=O)—CH₂CH₂—NH—C(=O)—(CH₂CH₂O)₄—CH₂CH₂—C(=O)—、
—CH₂—OC(=O)—、—OC(=O)—、
—(CH₂)₂—C(=O)—、—(CH₂)₅—C(=O)—、及び—CH₂CH₂—C(=O)—NH—(CH₂CH₂O)₈—CH₂CH₂—C(=O)—
から選択されるいずれか1つを表す。

10

【0314】

La' は、より好ましくは、—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—、—C(=O)—(CH₂CH₂)₂—C(=O)—、又は—(CH₂)₅—C(=O)—である。

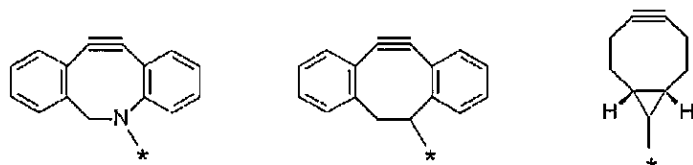
Jは、特定の構造に限定されず、アジド基と反応して1, 2, 3-トリアゾール環を形成するアルキン構造などのどのような環状構造であってもよく、その例としては、これらに限定されないが、以下の式によって表される化合物が挙げられる：

20

【0315】

【化48】

[式75]



30

上記に示されるJの構造式において、各アスタリスクは、 La' の左の末端における—C(=O)又は—(CH₂) n^8 への結合を表す。

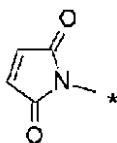
代替として、Jは、抗体Abのアミノ酸残基の側鎖（例えば、システイン、又はリジン）、又はハロゲン原子に結合する化合物であってもよく、Jの例としては、これらに限定されないが、以下の式によって表されるマレイミジル(maleimidy l)基が挙げられる：

【0316】

【化49】

40

[式76]



上記に示されるマレイミジル基において、アスタリスクは、 La' の左の末端における—(CH₂) n^{12} 又は—(CH₂CH₂) n^{13} への結合を表す。

50

【0317】

R^{16} は、好ましくは、 $J-La'-Lp'-NH-B'-\text{CHO}(C=O)-^*$ によって表され、式中、

B' は、1,4-フェニル基であり；

Lp' は、以下の群：

—GGVA—（配列番号85）、—GG—（D—）VA—、—VA—、—GGFG—（配列番号86）、—GGPI—（配列番号87）、—GGVCit—（配列番号88）、—GGVK—（配列番号89）、GG（D—）PI—、及び—GGPL—（配列番号90）から選択されるいずれか1つを表し；

La' は、以下の群：

—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—、—C(=O)—(CH₂CH₂)₂—C(=O)—、
—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—NH—(CH₂CH₂)₂—C(=O)—、
—C(=O)—CH₂CH₂—C(=O)—NH—(CH₂CH₂O)₂—CH₂—C(=O)—、
—C(=O)—CH₂CH₂—NH—C(=O)—(CH₂CH₂O)₄—CH₂CH₂—C(=O)—、
—OC(=O)—、—CH₂—OC(=O)—、
—(CH₂)₅—C(=O)—、及び—CH₂CH₂—C(=O)—NH—(CH₂CH₂O)₈—CH₂CH₂—C(=O)—

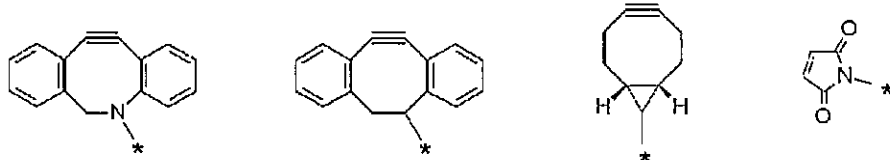
から選択されるいずれか1つを表し；

J は、下記の構造式のいずれかを表す：

【0318】

【化50】

[式77]



30

式中、 J の構造式において、

各アスタリスクは、 La' への結合を表す。

【0319】

R^{16} は、より好ましくは、以下の群：

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ （配列番号85として開示される「GGVA」）、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GG-(D-)VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、

$J^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ 、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGPI-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ （配列番号87として開示される「GGPI」）、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ （配列番号86として開示される「GGFG」）、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$ （配列番号88として開示される「GGVCit」）、

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVK-NH-B'-CH_2-OC(=O)-$

50

) - (配列番号 89として開示される「GGVK」)、
 $J^1 - C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - GGPL - NH - B' - CH_2 - OC(=O)$
) - (配列番号 90として開示される「GGPL」)、
 $J^1 - C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (CH_2CH_2)_2 - C(=O) - VA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$
 $J^1 - C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (CH_2CH_2O)_2 - CH_2 - C(=O) - VA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$
 $J^1 - C(=O) - CH_2CH_2 - NH - C(=O) - (CH_2CH_2O)_4 - CH_2CH_2 - C(=O) - VA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$
 $J^2 - OC(=O) - GGVA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$ (配列番号 85として開示される「GGVA」)、
 $J^3 - CH_2 - OC(=O) - GGVA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$ (配列番号 85として開示される「GGVA」)、
 $J^4 - (CH_2)_5 - C(=O) - GGVA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$ (配列番号 85として開示される「GGVA」)、
 $J^4 - (CH_2)_5 - C(=O) - VA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$ 、及び
 $J^4 - CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (CH_2CH_2O)_8 - CH_2CH_2 - C(=O) - VA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$
 から選択されるいずれか 1つであり、

10

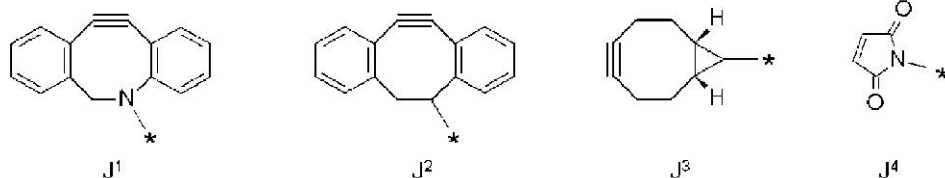
式中、 J^1 、 J^2 、 J^3 、及び J^4 は、以下によって表される構造式を表す：

20

【0320】

【化51】

[式 78]



30

式中、 J^1 、 J^2 、 J^3 及び J^4 の構造式において、

各アスタリスクは、 J^1 、 J^2 、 J^3 、又は J^4 に隣接する基への結合を表し、

B' は、1, 4-フェニル基である。

【0321】

R^{16} は、最も好ましくは、以下：

$J^1 - C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - GGVA - NH - B' - CH_2 - OC(=O)$
) - (配列番号 85として開示される「GGVA」)、
 $J^1 - C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - VA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$
 、
 $J^1 - C(=O) - (CH_2CH_2)_2 - C(=O) - VA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$
 $J^1 - C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - GGVCit - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$
) - (配列番号 88として開示される「GGVCit」)、
 $J^1 - C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (CH_2CH_2)_2 - C(=O) - VA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$
 $J^1 - C(=O) - CH_2CH_2 - C(=O) - NH - (CH_2CH_2O)_2 - CH_2 - C(=O) - VA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$
 $J^1 - C(=O) - CH_2CH_2 - NH - C(=O) - (CH_2CH_2O)_4 - CH_2CH_2 - C(=O) - VA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$
 $J^4 - (CH_2)_5 - C(=O) - VA - NH - B' - CH_2 - OC(=O) -$

40

50

のいずれかであり、

式中、

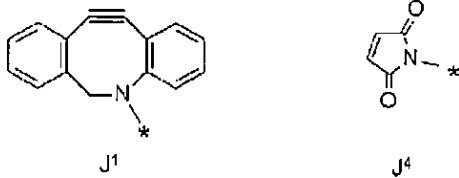
B' は、1, 4-フェニル基であり、

J¹及びJ⁴は、Jに関する以下の構造式によって表される：

【0322】

【化52】

[式79]



10

式中、J¹及びJ⁴の構造式において、

各アスタリスクは、J¹又はJ⁴に隣接する基への結合を表す。

【0323】

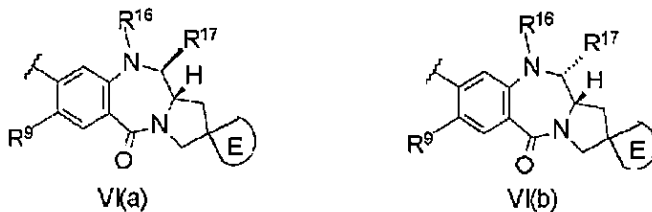
R¹⁷は、ヒドロキシ基又はC1-C3アルコキシ基であり、好ましくは、ヒドロキシ基又はメトキシ基である。R¹⁷は、亜硫酸水素塩付加物（OSO₃M、式中、Mは、金属カチオンである）であってもよい。R¹⁷は不斉炭素原子に結合しているため、以下の部分構造（VIa）又は（VIb）によって表される立体配置が提供される。各波線は、中間体におけるWへの結合を表し、遊離の薬物は一般式（VI）によって表される。

20

【0324】

【化53】

[式80]



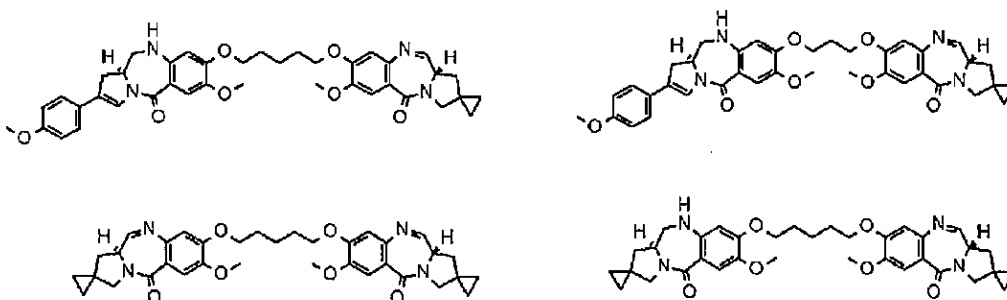
30

遊離の薬物は、好ましくは、以下の群から選択される1種の化合物である：

【0325】

【化54】

[式81]



40

遊離の薬物は、一部のケースにおいて、リンカーLの一部と共に腫瘍細胞で放出されるが、このような状況でさえも優れた抗腫瘍作用を発揮する優れた薬物である。遊離の薬物

50

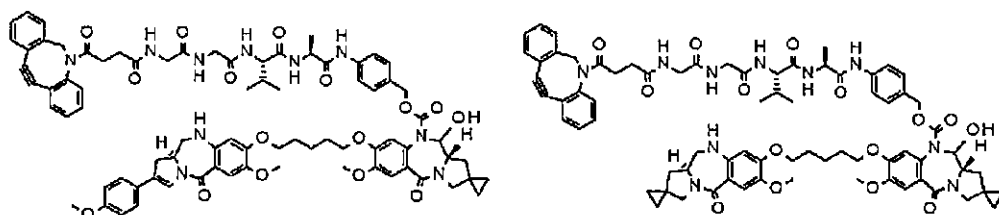
は、腫瘍細胞に移動した後、一部のケースにおいて、さらに酸化されて R^{16} 及び R^{17} の脱水素を引き起こすが、このような状況でさえも優れた抗腫瘍作用を発揮する。

生成中間体はまた、以下の群から選択される 1 種の化合物であってもよい：

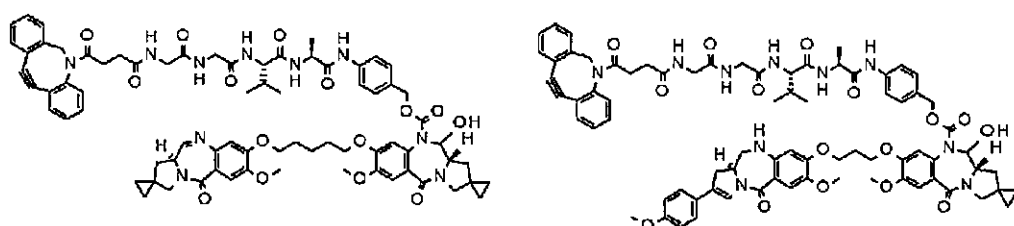
【0326】

【化55】

[式 82]

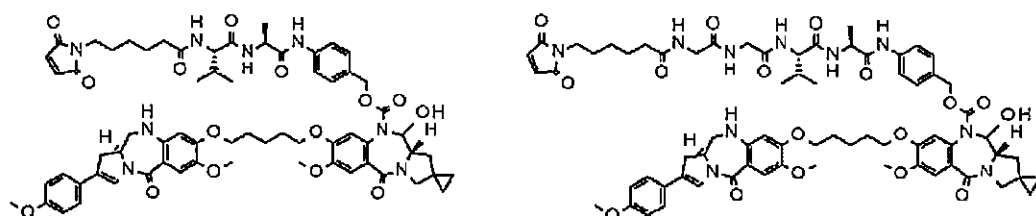


10



20

[式 83]



30

生成中間体はまた、以下の群から選択される 1 種の化合物であってもよい：

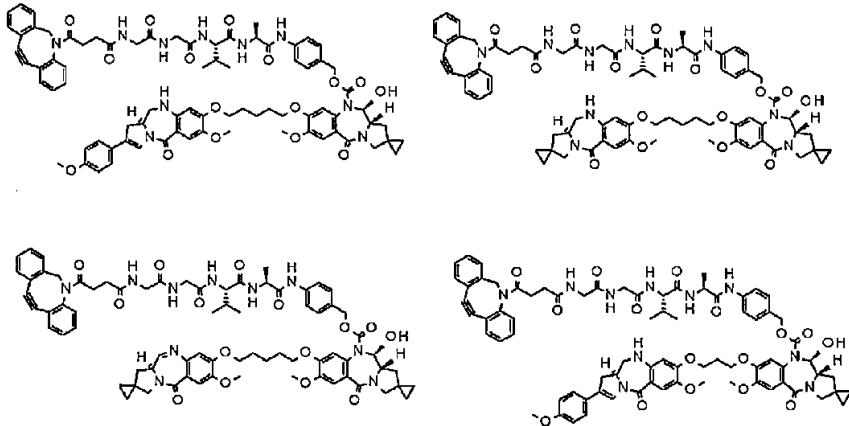
【0327】

40

50

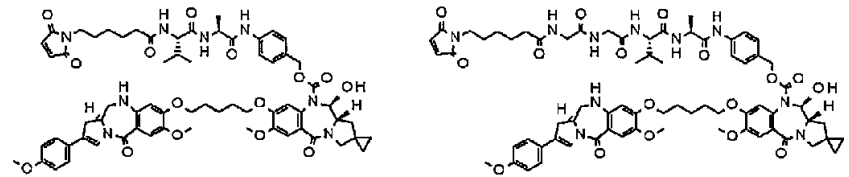
【化 5 6】

[式 84]



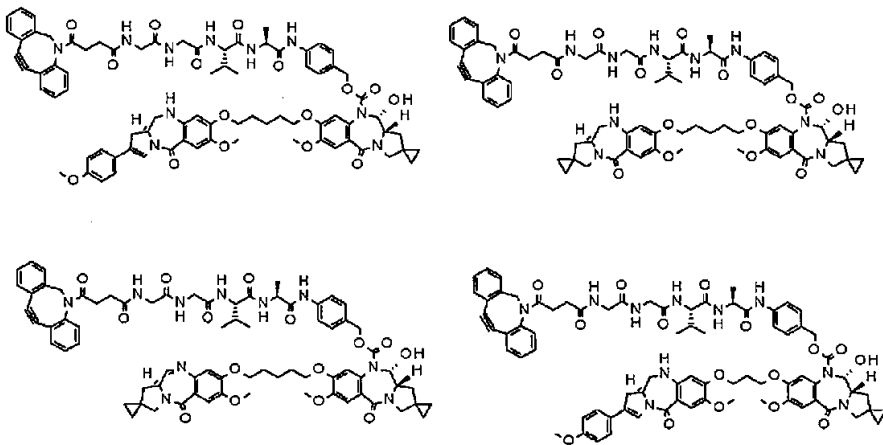
10

[式 85]



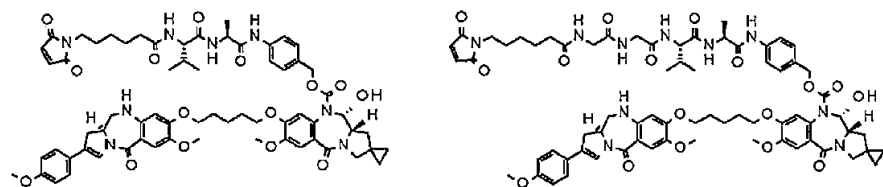
20

[式 86]



30

[式 87]



40

【0328】

V I I I . 医 薬

本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、がん細胞に対する細胞傷害活性を呈することから、薬として、特に、がんのための治療剤及び／又は予防剤として使用される可能性がある。一部の実施形態において、がんは、DLL3を発現するか、又はDLL3を過剰発現する。

本発明の抗体－薬物コンジュゲートが適用されるがんの例としては、小細胞肺がん（SCLC）、大細胞神経内分泌癌（LCNEC）、腎臓、尿生殖路（膀胱、前立腺、卵巣、子宮頸、及び子宮内膜）、消化管（胃、結腸）、甲状腺（甲状腺髄様がん）、膵臓及び肺

50

を含む様々な組織の神経内分泌腫瘍、神経膠腫又は偽性神経内分泌腫瘍（pNET）を挙げることができるが、治療標的としてのがん細胞が、抗体－薬物コンジュゲート中の抗体が認識可能なタンパク質を発現している限りはこれらに限定されない。

【0329】

本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、好ましくは哺乳動物投与することができ、より好ましくは、ヒトに投与される。

本発明の抗体－薬物コンジュゲートを含有する医薬組成物で使用される物質は、好適には、投与のための用量又は濃度を考慮して、一般的に当分野で使用される製剤補助剤などからの選択および適用することができる。

【0330】

本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、1つ又は複数の医薬的に適用できる成分を含有する医薬組成物として投与されてもよい。例えば、医薬組成物は、典型的には、1種又は複数の製剤用担体（例えば、滅菌した液体（例えば水及び油（石油、及び動物性、植物性、又は合成油（例えば落花生油、ダイズ油、鉱油、及びゴマ油）など）））を含有する。上記の医薬組成物が静脈内投与される場合、より典型的な担体は、水である。また食塩溶液、デキストロース水溶液、及びグリセロール水溶液も、液体担体として、特に注射溶液のための液体担体として使用することができる。好適な医薬用ビヒクルは当業界において公知である。必要に応じて、上記の組成物はまた、微量の保湿剤、乳化剤、又はpH緩衝剤を含有していてもよい。好適な製剤用担体の例は、E. W. Martinによる“Remington's Pharmaceutical Sciences”に開示されている。配合物は、投与様式に対応する。

【0331】

本発明の抗DLL3抗体－薬物コンジュゲートが適用されるがんのタイプは、処置しようとするがん細胞においてがんがDLL3を発現する限りは特に限定されない。その例としては、小細胞肺癌（SCLC）、大細胞神経内分泌癌（LCNEC）、腎臓、尿生殖路（膀胱、前立腺、卵巣、子宮頸、及び子宮内膜）、消化管（胃、結腸）、甲状腺（甲状腺髄様がん）、脾臓及び肺を含む様々な組織の神経内分泌腫瘍、神経膠腫又は偽性神経内分泌腫瘍（pNET）を挙げることができる。しかしながら、がんは、がんがDLL3を発現する限りは限定されない。がんのより好ましい例としては、小細胞肺癌（SCLC）、大細胞神経内分泌癌（LCNEC）、及び様々な組織の神経内分泌腫瘍を挙げることができる。

本発明の抗DLL3抗体－薬物コンジュゲートは、好ましくは哺乳動物に投与でき、より好ましくはヒトに投与できる。

様々な送達系が公知であり、それらは、本発明の抗体－薬物コンジュゲートを投与するために使用することができる。投与経路の例としては、これらに限定されないが、皮内、筋肉内、腹膜内、静脈内、及び皮下経路を挙げることができる。投与は、例えば注射又はボラス注射によってなされてもよい。具体的な好ましい実施形態に従って、上記のリガンド－薬物コンジュゲート形態の投与は、注射によってなされる。好ましい投与経路は、非経口投与である。

【0332】

代表的な実施形態によれば、医薬組成物は、従来の手順に従って、ヒトへの静脈内投与に好適な医薬組成物として処方される。静脈内投与のための組成物は、典型的には、滅菌及び等張水性緩衝剤中の溶液である。必要に応じて、薬は、注射部位の痛みを軽減するための可溶化剤及び局所麻酔剤（例えば、リグノカイン）を含有していてもよい。一般的に、上記の成分は、活性薬剤の量の指示に従ってアンプル又は小容器中に密封することにより得られる、各容器に入れられた乾燥させた凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として個々に、又は単位剤形での混合物としてのいずれかで提供される。医薬組成物は、注射によって投与されることになる場合、滅菌医薬品グレードの水又は食塩水を含有する注射ボトルから投与されてもよい。薬は、注射によって投与される場合、注射のための滅菌水又は食塩水のアンプルは、投与前に前述の成分が互いに混合されるように提供されてもよい。

【0333】

本発明の医薬組成物は、本発明の抗体－薬物コンジュゲートのみを含有する医薬組成物、又は抗体－薬物コンジュゲート及び抗体－薬物コンジュゲート以外の少なくとも1種のがんを処置する薬剤を含有する医薬組成物であり得る。本発明の抗体－薬物コンジュゲートは、他のがんを処置する薬剤と組み合わせて投与してもよく、それによって抗がん作用を強化することができる。このような目的のために使用される他の抗がん剤が、抗体－薬物コンジュゲートと同時に、別々に、又はその後に個体に投与されてもよく、それぞれの間の投与間隔を変化させて投与されてもよい。このようながんを処置する薬剤の例としては、アブラキサン、カルボプラチン、シスプラチン、ゲムシタビン、イリノテカン（CPT-11）、パクリタキセル、ペメトレキセド、ソラフェニブ、ビンブラスチン、国際公開WO2003/038043号に記載される薬剤、LH-RHアナログ（例えば、リュープロレリン、ゴセレリン）、エストラムスチンリン酸エステル、エストロゲンアンタゴニスト（例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン）、及びアロマターゼ阻害剤（例えば、アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン）を挙げることができるが、抗腫瘍活性を有する薬剤である限りは、それらに限定されない。

10

【0334】

医薬組成物は、選択された組成物及び必要な純度を有する配合物として、凍結乾燥配合物又は液体配合物に製剤化することができる。凍結乾燥配合物として製剤化される場合、医薬組成物は、当業界で使用される好適な製剤補助剤を含有する配合物であり得る。液体配合物の場合も、医薬組成物は、当業界で使用される様々な製剤補助剤を含有する液体配合物として製剤化されてもよい。

20

【0335】

医薬組成物の組成物及び濃度は、投与方法に応じて変更することができる。しかしながら、本発明の医薬組成物に含有される抗体－薬物コンジュゲートは、抗体－薬物コンジュゲートが、抗原により高い親和性を有する場合、すなわち、抗原に対する解離定数（Kd値）に関してより高い親和性（より低いKd値）を有する場合、低い投薬量でも医薬作用を呈することができる。したがって、抗体－薬物コンジュゲートの投薬量を決定するために、投薬量は、抗体－薬物コンジュゲートの抗原との親和性に関する状況を考慮して設定することができる。本発明の抗体－薬物コンジュゲートがヒトに投与される場合、例えば、約0.001～100mg/kgを1回で投与してもよいし、又は1～180日の間隔で数回に分けて投与してもよい。

30

【0336】

まとめると、開示された免疫グロブリン関連組成物（例えば、抗体又はその抗原結合断片、例えば2-C8-A、6-G23-F、10-O18-A、H2-C8-A、H6-G23-F、又はH10-O18-A）及びそれらの抗体－薬物コンジュゲートは、DLL3関連がんの処置に有用である。このような処置は、病理学的に高いレベルのDLL3を有するとして同定された患者（例えば、本明細書に記載される方法によって診断された者）又はこのような病理学的レベルに関連することが公知の疾患と診断されている患者において使用することができる。一態様において、本発明の開示は、DLL3関連がんを、それを必要とする対象において処置するための方法であって、有効量の本発明の技術の抗体（又はその抗原結合断片）を対象に投与することを含む方法を提供する。本発明の技術の抗体によって処置することができるがんの例としては、これらに限定されないが、小細胞肺癌（SCLC）、大細胞神経内分泌癌（LCNEC）、腎臓、尿生殖路（膀胱、前立腺、卵巣、子宮頸、及び子宮内膜）、消化管（胃、結腸）、甲状腺（甲状腺髄様がん）、脾臓及び肺を含む様々な組織の神経内分泌腫瘍、神経膠腫又は偽性神経内分泌腫瘍（pNET）が挙げられる。本発明の技術の組成物は、任意選択で、単一のボーラス剤としてそれを必要とする対象に投与することができる。代替として、用量レジメンは、腫瘍の出現後に様々な回数で実行される複数回の投与を含んでいてもよい。投与は、経口、鼻腔内、非経口（静脈内、筋肉内、腹腔内、又は皮下）、直腸、頭蓋内、腫瘍内、クモ膜下、又は局所などのあらゆる好適な経路によって行うことができる。投与としては、自己投与及び他者による投与が挙げられる。また、記載される医学的状態の様々な処置様式は、「実

40

50

質的」であることを意味することが意図されることも理解されるものとし、実質的とは、全ての処置を含むが、全てに満たない処置も含み、ある程度の生物学的又は医学的に関連する結果が達成されることを含む。

【実施例】

【0337】

本発明の技術は、以下の実施例によってさらに例示されるが、これらはいかなる意味においても限定として解釈されるべきではない。以下の実施例は、本発明の技術の例示的な抗DLL3抗体及び抗体-薬物コンジュゲート(ADC)の調製、特徴付け、及び使用を実証する。しかしながら、これらの実施例は、発明の範囲を限定することは意図されない。さらに、これらの実施例は、いずれの手段によっても限定された方式で解釈されるべきではない。以下の実施例において、別段の規定がない限り、遺伝子操作に関する個々のオペレーションは、“Molecular Cloning”(Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., published by Cold Spring Harbor Laboratory Press in 1989)に記載される方法、又は当業者によって使用される実験マニュアルに記載される他の方法に従って行われ、又は商業的に入手可能な試薬又はキットが使用されている場合、その実施例は、商業的に入手可能である製品に含まれる説明書に従って行われたことに留意されたい。本発明の説明において、試薬、溶媒及び出発材料は、商業的に入手可能な供給源、別段の規定がない限りから容易に入手可能である。

10

【0338】

(実施例1)

20

モノクローナル抗体の生成

全長DLL3を安定して発現するHEK293T細胞で作製されたC末端の6×Hisタグ(配列番号84)を有するアミノ酸Ala27-Ala479に対応するDLL3の細胞外ドメイン(ECD)(GenBank受託番号Q9NYJ7-1)を、免疫原として使用した。ヒト免疫グロブリンレパートリーを内包するAblexis AlivaMAb Kappa Mice(Ablexis, San Diego, CA)を、標準的な免疫化技術に従って、3週間の期間にわたり、可溶性DLL3-ECD又は安定な細胞のいずれかで免疫化した。DLL3に特異的な高い血清力価を有するマウスからの脾細胞及び流入領域リンパ節細胞を回収し、マウス骨髄腫細胞と融合させて、電気融合を使用してハイブリドーマを生成した。次いでこれらのハイブリドーマをスクリーニングして、ELISAによって可溶性DLL3-ECDに特異的に結合した抗体の存在を同定し、親の293細胞に対するフローサイトメトリーによって安定して発現する293細胞における全長DLL3タンパク質の存在を同定した。さらなる調査のために、後述するように4℃/37℃の染色と共に293DLL3形質転換体における染色強度に関するフローサイトメトリーでのランク付けによってハイブリドーマを選択した。

30

【0339】

(実施例2)

モノクローナル抗体6-G23-F、2-C8-A、7-I1-B及び10-O18-Aを用いた4/37内在化アッセイ

4種のモノクローナル抗体(6-G23-F、2-C8-A、7-I1-B及び10-O18-A)を、4℃での染色を37℃での染色と比較することによって、DLL3を内在化するそれらの能力に関して比較した。参照モノクローナル抗体SC16は、DLL3を介して内在化し、ADC活性を有することが公知であり、文献でこれまでに報告されており、これを、内在化の陽性対照として使用した。指数増殖中のNCI-H82細胞をトリプシン/EDTAを用いて回収し、10%ウシ胎児血清(FCS)を含有するRPMI中で1回洗浄し、10%FCSが補充されたDMEMに細胞 2×10^7 個/mLで再懸濁した。100 μ L(細胞 2×10^6 個)を、U底96ウェルプレートに添加した。試験モノクローナル抗体(6-G23-F、2-C8-A、7-I1-B又は10-O18-A)又は参照モノクローナル抗体を別々のウェルに添加して、2連のプレートで10 μ g/mLの最終濃度を得た。両方のプレートを4℃で30分保持したその後、両方のプレート

40

50

を、10% FCSが補充された冷RPMIで2回洗浄し、10% FCSが補充されたRPMIに再懸濁した。一方のプレートを4℃で保持し（対照プレート）、他方のプレートを、CO₂インキュベーター中で、37℃でインキュベートした（実験プレート）。CO₂インキュベーター中、実験プレートでは37℃、対照プレートでは4℃で、4時間インキュベーションの後、細胞を、冷洗浄緩衝剤（0.5% BSAを含有するPBS）で、4℃で3回洗浄した。次いでサンプルを、洗浄緩衝剤中7 μg/mlの最終濃度での冷洗浄緩衝剤＋R-フィコエリトリン-AffiniPure F(ab')₂断片ヤギ抗マウスIgG（Jackson 115-116-071）に再懸濁した。4℃で30分のインキュベーション後、細胞を冷洗浄緩衝剤で3回洗浄し、どちらもPBS 0.5%パラホルムアルデヒド中で固定し、48時間以内にフローサイトメトリーによって分析した。対照プレート（4℃で抗体と共にインキュベートした）から得られたMFIを、実験プレート（37℃で抗体と共にインキュベートした）から得られた対応するMFIで割ることによって計算した平均蛍光強度（MFI）比を、内在化の相対的な尺度として採用した。高い値は、より大きい内在化を示した。以下の表で示されるように、モノクローナル抗体（6-G23-F、2-C8-A、7-I1-B及び10-O18-A）の全てが、結合するDLL3で内在化することができたが、参照モノクローナル抗体の程度までは内在化できなかった。

10

【0340】

【表3】

クローン	MFI比
6-G23-F	1.67
2-C8-A	1.76
7-I1-B	1.68
10-O18-A	1.56
参照モノクローナル抗体	2.66
マウスIgG1	1.28

20

これらの結果は、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物が、DLL3に結合することを介して内在化を受けることを実証する。したがって、本明細書で開示された免疫グロブリン関連組成物は、DLL3陽性がん細胞に治療剤を送達することに有用である。

30

【0341】

（実施例3）

モノクローナル抗体6-G23-F、2-C8-A、7-I1-B及び10-O18-Aのためのクエンチング内在化アッセイ

内在化に関してモノクローナル抗体をランク付けするために、クエンチング内在化アッセイを使用した。この方法は、エンドソーム／リソソーム経路への内在化及び侵入を反映する。ヤギ抗マウスIgG1 F(ab)（Jackson ImmunoResearch 115-007-185）を、DyLight Dy650 NHSエステル（ThermoFisher 02206）及びLICOR IRDye QC1 NHSエステル（LICOR 929-7030）で二重標識した（二重に標識された抗体は、本明細書において「F(ab) Dy650-QC1」と称される）。このアッセイの原理は、以下の通りである：DyLight Dy650蛍光はIRDye QC1によって消光されるため、F(ab) Dy650-QC1は蛍光を発しない。しかしながら、内在化されると、F(ab) Dy650-QC1はエンドソーム／リソソーム経路を介して分解され、その結果起こるIRDye QC1の放出が、DyLight Dy650の蛍光を観察可能にする。したがって、DyLight Dy650蛍光シグナルを、リソソームを介した内在化の尺度として採用した。簡単に言えば、指数増殖中のNCI-H82細胞を、トリプシン／EDTAを用いて回収し、10% FCSが補充された増殖培地RPMI中で1回洗浄し、増殖培地に再懸濁し、ウェル当たり細胞1.25×10⁶個（8

40

50

0 μ l) を添加した。200 μ g / ml 濃度でのモノクローナル D L L 3 抗体を、ヤギ抗マウス I g G 1 D y 6 5 0 Q C 1 と、200 μ g / ml で、室温で 20 分混合し、混合物の 20 μ l を細胞に添加した。4 $^{\circ}$ C で 30 分のインキュベーションの後、細胞を増殖培地で 2 回洗浄し、増殖培地に再懸濁し、C O ₂ インキュベーター中で 4 時間にわたり 37 $^{\circ}$ C に移行させ、内在化させた。次いで細胞を、0.5 % B S A を含有する氷冷 P B S で 2 回洗浄し、フローサイトメトリーによって分析し、平均蛍光強度を決定した。対照参照モノクローナルの平均蛍光強度を、100 % 内在化に設定した。以下の表で示されるように、4 種の全てのモノクローナル抗体が、エンドソーム / リソソーム経路への内在化及び侵入を実証した。

【0342】

【表 4】

クローン	Dy light Dy658 蛍光(対照参照モノクローナル抗体の%)
6-G23-F (10 μ g/ml)	76.5
7-I1-B (10 μ g/ml)	70.1
2-C8-A (10 μ g/ml)	62.9
10-O18-A (10 μ g/ml)	62.2
アイソタイプ対照	20

【0343】

これらの結果は、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物が、D L L 3 に結合することを介して内在化を受け、細胞のファゴソーム / リソソーム区画に侵入することを実証する。したがって、本明細書で開示された免疫グロブリン関連組成物は、D L L 3 陽性がん細胞に治療剤を送達することに有用である。

【0344】

(実施例 4)

抗 D L L 3 モノクローナル抗体のための F a b Z A P アッセイ

F a b Z A P アッセイを、内在化を測定する別の方法として使用した。F a b Z A P アッセイは、抗 D L L 3 モノクローナル抗体の内在化を介した細胞への毒素の送達を測定する。F a b Z A P アッセイは、毒素でモノクローナル抗体をタグ付けするのにサポリン毒素コンジュゲート F (a b) 抗マウス重鎖及び軽鎖を使用する。A d v a n c e d T a r g e t i n g S y s t e m s からのキットを使用し、F a b Z A P アッセイプロトコルに従って、抗 D L L 3 モノクローナル抗体のパネルを特徴付けた。簡単に言えば、指数増殖中の N C I - H 8 2 細胞を、トリプシン / E D T A を用いて回収し、10 % F C S が補充された R M P I 中で 1 回洗浄し、100 μ l の 10 % F C S が補充された R P M I 中の、96 ウェル白色固体プレートに細胞 5000 個 / ウェルでプレーティングする。次の日、25 μ l の精製されたモノクローナル抗体 (G 2 3 - F 、 2 - C 8 - A 、 7 - I 1 - B 又は 10 - O 1 8 - A) 又は参照モノクローナル抗体を、10 μ g / ml の開始濃度で添加し、連続する 3 倍希釈を実行した。サポニンコンジュゲート F (a b) 抗マウス I g H L (F a b Z A P) を 25 μ l に添加して、4.4 n M の最終濃度を得た。3 ~ 4 日後、等しい体積の C e l l T i t r e G l o w (P r o m e g a G 7 5 7 1) をプレートに添加し、これをオービタルシェーカーで 2 分振盪し、さらに室温で 10 分後、発光を、プレートリーダーを使用して読んだ。プロゾーン作用を打ち消すために、モノクローナル抗体の全てを完全な滴定として試験した。図 9 及び以下の表で示されるように、モノクローナル抗体の全てが、参照モノクローナル抗体に匹敵する細胞傷害活性を呈した。これらのモノクローナル抗体を用いた他の実験において、マウス I g G 1 対照モノクローナル抗体は、細胞傷害活性を呈しなかった。したがって、これらの結果は、細胞傷害活性が、D L L 3 の認識を介して媒介され、F c R s を介して媒介されないことを実証する。

【 0 3 4 5 】

【表 5】

	FAB ZAP % SC16 最大致死率
6-G23-F (10 μ g/ml)	94.0
7-I1-B (10 μ g/ml)	97.0
10-O18-A (10 μ g/ml)	88.0
2-C8-A (10 μ g/ml)	89.0

10

これらの結果は、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物が、その細胞表面上に D L L 3 を発現する腫瘍に治療剤を送達できることを実証する。したがって、本明細書で開示された免疫グロブリン関連組成物は、D L L 3 陽性がん細胞に治療剤を送達することにより有用である。

【 0 3 4 6 】

(実施例 5)

抗 D L L 3 抗体のエピトープ結合

精製された抗 D L L 3 モノクローナル抗体及び参照モノクローナル抗体のパネルを、C a r t e r r a (登録商標) アレイ表面プラズモン共鳴 (S P R) アッセイプラットフォーム (C a r t e r r a (登録商標) I n c . , S a l t L a k e C i t y U T) でのペアになったエピトープビニングに供し、そこで、ヒスチジンタグを有する D L L 3 抗原 (D L L 3 - H i s) の捕捉に関して、さらに、D L L 3 - H i s への結合のためのパネル中の他の全ての抗体との競合に関しても、各モノクローナル抗体を試験した。抗体を、プリントアレイ方法による標準的なアミンカップリング技術を介して H C 2 0 0 M チップ (リガンド) に固定した。次いで各サイクルにおいて、アレイ全体にわたり抗原を注入し、続いて単一抗体 (分析物) を注入した。各サイクルの最後に、新しいサイクルが始まる前に、表面を再生して、抗原及び分析物を除去した。以下の表で示されるように、パネルを用いて 3 つの異なるピンを同定したところ、7 - I 1 - B 及び 2 - C 8 - A はピン 2 にマッピングされ、一方で 6 - G 2 3 - F はピン 3 に、1 0 - O 1 8 - A はピン 1 にマッピングされた。

20

30

【 0 3 4 7 】

【表 6】

モノクローナル	エピトープピン
10-O18-A	1
7-I1-B	2
2-C8-A	2
6-G23-F	3

これらの結果は、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物が、D L L 3 タンパク質に存在する 3 つの別個のエピトープに結合することを実証する。したがって、本明細書で開示された免疫グロブリン関連組成物は、D L L 3 を発現する腫瘍細胞に複数の治療剤を送達するために、互いに組み合わせて使用することができる。

40

【 0 3 4 8 】

(実施例 6)

親和性測定。

4 種のモノクローナル抗体 (6 - G 2 3 - F、2 - C 8 - A、7 - I 1 - B 及び 1 0 - O 1 8 - A) の結合親和性を、結合緩衝剤として P B S 0 . 1 % B S A、0 . 0 2 % T w e e n 2 0、及び再生緩衝剤として 1 0 m M グリシン、p H 1 . 7 を使用した、2 5 ° C での O c t e t H T X 装置を使用したバイオレイヤー干渉法 (B L I) によって決定し

50

た。4種の精製されたモノクローナル抗体（各 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を、抗マウスFcセンサー上にローディングした。ローディング済みのセンサーを、7回の連続する1:3希釈での 200nM の開始濃度での組換えヒトDLL3タンパク質（アミノ酸Ala27～Ala479、カタログ番号9749-DL、R&D Systems）の連続希釈物に浸漬した。図10A～10Dで示されるように、結合は濃度依存性であった。解離定数（KD）を、1価（1:1）結合モデルを使用して計算した。図10Eで示されるように、全てのモノクローナル抗体が、ナノモル濃度未満の範囲で親和性を有していた。図11は、6-G23-F、10-O18-A、及び2-C8-Aモノクローナル抗体（mAb）が、DLL3と選択的に結合するが、DLL1又はDLL4と結合しないことを示す。7-I1-B mAbは、DLL3及びDLL4の両方と結合するが、DLL1と結合しない。

10

これらの結果は、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物が、高親和性でDLL3と特異的に結合することを実証する。したがって、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物は、生物学的サンプルにおいてDLL3タンパク質を検出するための方法において有用である。

【0349】

（実施例7）

トランスフェクトされた及び初代細胞へのモノクローナル抗体の結合。

4種のモノクローナル抗体（6-G23-F、2-C8-A、7-I1-B及び10-O18-A）を、フローサイトメトリーによって、マウス及びカニクイザルDLL3に加えて内因性ヒトDLL3に結合するそれらの能力に関して試験した。この目的のために、HEK293細胞を、全長ヒト、マウス又はカニクイザルDLL3をコードするプラスミドDNAでトランスフェクトし、これを実験で使用した。簡単に言えば、 10^6 個のトランスフェクトされたHEK293細胞又はNCI-H82初代細胞を、FACS緩衝剤PBS 0.5% BSA中で、96ウェルU底プレートのウェルに添加し、精製されたモノクローナルを $10\mu\text{g}/\text{mL}$ まで添加した。 4°C で30分のインキュベーションの後、細胞をFACS緩衝剤で3回洗浄し、PE標識F(ab)2抗マウスIgG H及びL第2ステージと共にインキュベートした。さらに 4°C で30分間のインキュベーションの後、細胞をFACS緩衝剤中で3回洗浄し、フローサイトメーターで分析した。データは、第2ステージを用いたバックグラウンド染色で割ったモノクローナル抗体の平均蛍光強度比で提示される。以下の表で示されるように、モノクローナル抗体の全てがカニクイザルDLL3と交差反応し、NCI-H82細胞において内因性DLL3を検出したが、マウスDLL3に結合した6-G23-F及び7-I1-Bのみであった。

20

30

【0350】

【表7】

モノクローナル	293 hDLL3	293 cyno DLL3	293 mDLL3	293 (陰性対照)	NCI-H82
6-G23-F	6.33	13.06	3.97	1.32	11.10
7-I1-B	9.74	18.67	4.70	1.46	19.21
10-O18-A	4.74	9.85	0.99	0.60	9.40
2-C8-A	7.71	15.03	1.50	0.59	11.89

40

これらの結果は、本発明の技術の免疫グロブリン関連組成物が、生物学的サンプルにおいてDLL3タンパク質を検出するための方法において有用であることを実証する。

【0351】

（実施例8）

－シーケンシング

4種のモノクローナル抗体の可変重鎖及び可変軽鎖を、RACE（cDNA末端の迅速増幅）によって、7-I1-B、6-G23-F、2-C8-A及び10-O18-Aの対応するハイブリドーマから単離した。RNAを、RNA Easyキット（Qiagen

50

を用いて溶解したハイブリドーマから単離した。cDNA合成のためにmRNAを単離し、RACEキットを使用してPCR産物を生成した。次いでPCR産物をTOPOベクターにクローニングし、PCR増幅し、その後シーケンシングのためにゲルで分離した。重鎖可変ドメイン（V_H）及び軽鎖可変ドメイン（V_L）のヌクレオチド及びアミノ酸配列は、以下の表及び図5A～5D（7-I1-B）、図6A～6D（2-C8-A）、図7A～7D（10-O18-A）、及び図8A～8D（6-G23-F）に示される。

【0352】

【表8】

配列番号	説明	配列
配列番号 1	7-I1-B の V _H のヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACACCTGGATGAGCTGGGTCCGCAGGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGACTGGGTGGCCGTATTAAGCAAATCTGATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATCAAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCCAGTATTATTGGAATCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCGTGTCACCGTCTCCTCA
配列番号 2	7-I1-B の V _H のアミノ酸配列	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNTWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKSDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTQYYWNSFDYWGQGLTVTVSS
配列番号 3	7-I1-B の V _H CDR1 のアミノ酸配列	GFTFSNTW
配列番号 4	7-I1-B の V _H CDR2 のアミノ酸配列	IKSKSDGGTT
配列番号 5	7-I1-B の V _H CDR3 のアミノ酸配列	TQYYWNSFDY
配列番号 6	7-I1-B の V _L のヌクレオチド配列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCATCCAATTTGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGTATGATAATCTCCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGAACAAGGTGGAGATCAAA
配列番号 7	7-I1-B の V _L のアミノ酸配列	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYCQYYDNLPLTFGGGKVEIK
配列番号 8	7-I1-B の V _L CDR1 のアミノ酸配列	QASQDISNYLN
配列番号 9	7-I1-B の V _L CDR2 のアミノ酸配列	DASNLET
配列番号 10	7-I1-B の V _L CDR3 のアミノ酸配列	QQYDNLPLT
配列番号 11	2-C8-A の V _H のヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAAGCCTGGGGGGTCCCAGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAGCTATTGGATGAAGTGGGTCCGCAGGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAGGAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCGGGCTGGGCTCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA

10

20

30

40

50

配列番号 12	2-C8-A の V _H のアミノ酸配列	EVQLVESGGGLVQPGGSQLSCAASGFTFSSYWMNWVR QAPGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPGWAPFDYWGQGLV TVSS
配列番号 13	2-C8-A の V _H CDR1 のアミノ酸配列	GFTFSSY
配列番号 14	2-C8-A の V _H CDR2 のアミノ酸配列	KEDGSE
配列番号 15	2-C8-A の V _H CDR3 のアミノ酸配列	DPGWAPFDY
配列番号 16	2-C8-A の V _L のヌクレオチド配列	GACATCCAGATGTCCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGC ATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGA GTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAG AAACCAGGGAAGCCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGC ATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAAGTTCAGCG GCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCGCCATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTATTACTGCCA ACAGTATAATAGTTTCCCGTACACTTTTGCCAGGGGA CCACGCTGGAGATCAAA
配列番号 17	2-C8-A の V _L のアミノ酸配列	DIQMSQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWFQQ KPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSKFSGSGSGTDFTLAIS SLQPEDFATYYCQYNSFPYTFGQGTITLEIK
配列番号 18	2-C8-A の V _L CDR1 のアミノ酸配列	RASQGISNYLA
配列番号 19	2-C8-A の V _L CDR2 のアミノ酸配列	AASSLQS
配列番号 20	2-C8-A の V _L CDR3 のアミノ酸配列	QYNSFPYT
配列番号 21	10-018-A の V _H のヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAA GCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTG GTGGCTCCATCAATAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGG CAGCCCCAGGGAAGGACTGGAGTGGATTGGGTATAT CTTTACAGTGGGATCACCACTACAACCCCTCCCTCA AGAGTCGAGTCACCATATCATTAGACACGTCCAAGAAC CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTACCGCTGCGGA CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAATCGGCGTGGCTG GTTTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
配列番号 22	10-018-A の V _H のアミノ酸配列	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSYYWSWIR QPPGKGLEWIGYIFYSGITNYPNPSLKSRTISLDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARIGVAGFYFDYWGQGLV TVSS
配列番号 23	10-018-A の V _H CDR1 のアミノ酸配列	GSINSY
配列番号 24	10-018-A の V _H CDR2 のアミノ酸配列	FYSGI
配列番号 25	10-018-A の V _H CDR3 のアミノ酸配列	IGVAGFYFDY
配列番号 26	10-018-A の V _L のヌクレオチド配列	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTT GTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCTGCAGGGCCA GTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAG CAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGG

10

20

30

40

50

		TGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTG TCAGCAGTATGGTACCTCACCCTCCTTTCGGCGGAG GGACCAAGGTGGAGATCAAA
配列番号 27	10-018-A の V _L のア ミノ酸配列	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYGTSPITFGGGTKVEIK
配列番号 28	10-018-A の V _L CDR1 のアミノ酸配列	RASQSVSSSYLA
配列番号 29	10-018-A の V _L CDR2 のアミノ酸配列	GASSRAT
配列番号 30	10-018-A の V _L CDR3 のアミノ酸配列	QQYGTSPIT
配列番号 31	6-G23-F の V _H のヌク レオチド配列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTG GATACACCTTCACCAGCTACTATATACTGGGTGCGA CAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAAT CGACCCAAAGTGATGGTAGCACAACCTACGCACAGAAGT TCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACG AGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGGAAT ATAACTACTACGGTTTGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACC ACGGTCACCGTCTCTCTCA
配列番号 32	6-G23-F の V _H のアミ ノ酸配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVR QAPGQGLEWMGIIDPSDGSSTNYAQKFQGRVTMTDST STVYMELSSLRSEDVAVYCARDREYNYYGLDVWGQGT TVTVSS
配列番号 33	6-G23-F の V _H CDR1 のアミノ酸配列	GYTFTSY
配列番号 34	6-G23-F の V _H CDR2 のアミノ酸配列	DPSDGS
配列番号 35	6-G23-F の V _H CDR3 のアミノ酸配列	DREYNYYGLDV
配列番号 36	6-G23-F の V _L のヌク レオチド配列	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGT CACCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTA GTCAAAGCCTCGTATACCGTGATGGAACACCTACTTG AATTGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCG CCTAATTTATAAGGTTTCTAACCGGACTCTGGGGTCC CAGACAGATTCCGCGGCAGTGGGTGAGGCACTGATTTC ACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGG GGTTTATTACTGCATGCAAGGTACACACTGGCCTCCGA CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
配列番号 37	6-G23-F の V _L のアミ ノ酸配列	DVVMTQSPPLSPVTLGPASISCRSSQSLVYRDGNTYL NWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFRGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCMQGTWPPITFGQGTKVEIK
配列番号 38	6-G23-F の V _L CDR1 のアミノ酸配列	RSSQSLVYRDGNTYLN
配列番号 39	6-G23-F の V _L CDR2 のアミノ酸配列	KVSNRDS
配列番号 40	6-G23-F の V _L CDR3 のアミノ酸配列	MQGTHWPPIT

10

20

30

40

【 0 3 5 3 】

(実施例 8 - 1)

組換え抗 D L L 3 抗体 H 2 - C 8 - A 、 H 2 - C 8 - A - 2 、 及び H 2 - C 8 - A - 3 の
作製

重鎖の構築：抗 D L L 3 抗体 H 2 - C 8 - A （配列番号 5 9 ）の重鎖を、実施例 8 で得
られた可変領域（配列番号 1 2 ）を I g G 1 のヒトガンマ鎖定常領域（配列番号 4 2 ）と
接続することによって構築した。抗 D L L 3 抗体 H 2 - C 8 - A - 2 の重鎖（配列番号 6
0 ）及び H 2 - C 8 - A - 3 の重鎖（配列番号 6 1 ）も、実施例 8 で得られた可変領域（
配列番号 1 2 ）を I g G 1 のヒトガンマ鎖定常領域バリエーション（配列番号 5 7 及び 5 8 ）

50

と接続することによって構築した。

【0354】

EVQLVESGGGLVQPGGSQRLSCAASGFTFS SYWMNWVRQA
PGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARDPGWAPFDYWGQG GTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPS SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGV E VHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D
SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号59)

10

EVQLVESGGGLVQPGGSQRLSCAASGFTFS SYWMNWVRQA
PGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARDPGWAPFDYWGQG GTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPS SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGV E VHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D
SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号60)

20

EVQLVESGGGLVQPGGSQRLSCAASGFTFS SYWMNWVRQA
PGKGLEWVANIKEDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARDPGWAPFDYWGQG GTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPS SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEEAAGGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGV E VHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D
SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号61)

30

【0355】

軽鎖の構築：抗DLL3抗体H2-C8-Aの軽鎖を構築した。抗DLL3抗体H2-C8-A-2及びH2-C8-A-3の軽鎖は、実施例8で得られた可変領域を、IgG1のヒトカッパ鎖定常領域（配列番号17及び49）と接続することによって構築することができる（配列番号62）。

40

DIQMSQSPSSLSASVGD RVTITCRASQG ISNYLAWFQQKP
GKAPKSLIYAASSLQSGVPSKFS GSGSGSGTDFTLA ISSSLQP
EDFATYYCQQYNSFPYTFGQGTTLEIKRTVAAPS VFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSSPVTKSFNRGEC (配列番号62)

【0356】

50

発現ベクター pCMA-G1 の構築：ヒト重鎖シグナル配列及びヒトガンマ鎖定常領域をコードする DNA 配列を含む発現ベクター pCMA-G1 の構築物は、特許出願 WO 2017/051888 号に記載されたものであった。

発現ベクター pCMA-LK の構築：ヒト軽鎖シグナル配列及びヒトカップ鎖定常領域をコードする DNA 配列を含む発現ベクター pCMA-LK の構築物は、特許出願 WO 2017/051888 号に記載されたものであった。

【0357】

発現ベクター pCMA-G1-1 の構築：DNA 断片（配列番号 75）を合成した（Eurofins Genomics、人工遺伝子合成サービス）。DNA 断片を、XbaI 及び PmeI の制限酵素で消化した。得られた 1.1 kb の断片をアガロースゲル電気泳動によって分離し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System（Promega）を用いて精製した。pCMA-G1 の発現ベクターもの XbaI 及び PmeI 制限酵素で消化して、アガロースゲル電気泳動によってヒト重鎖シグナル配列及びヒトガンマ鎖定常領域をコードする DNA 配列を除去した。得られた pCMA-G1 の 3.4 kb の XbaI/PmeI 断片も、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製した。精製した 1.1 kb 及び 3.4 kb の XbaI/PmeI 断片を、Ligation High（東洋紡株式会社）を用いてライゲートして、発現ベクター pCMA-G1-1 を構築した。

【0358】

GGGTCTAGAGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCTCC
TGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTGCA
ATTGTGCAGGCGGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAA
GCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
CGGCACAGCCGCGCCCTGGGGCTGCCTGGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCCTGTGACCGGTGAGCTGGAACTCAGGCGGCCCTGA
CCAGCGGCGGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTCTGCAGTCTCTC
AGGACTCTACTCTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGGTGCCCTCC
AGCAGCTTGGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTTGAATC
ACAAAGCCCAAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGGTTTGAGCC
CAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCAACCCTGCCCA
GCACCTGAACCTCCTGGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTCTTCC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTCAACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
TGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAA
CAGCACGTACCGGGGTGGTCAAGCGTCTCTCACCGTCTCTGCAC
CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAAGTGCAGGTTCT
CCAAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAAGCCCAAAGGCCCAGCCCCGGGAACCAACAGGTGTACACC
CTGCCCCCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCTCCAGCGACAT
CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCCGAGGAACAAC
TACAAGACCAACCCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCTCT
TCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
GCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGTCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAAACCACTACACCCAGAAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCCCGGCAAAATGAGATATCGGGGCCCGTTTAAACGGGG（配列
番号 75）

【0359】

抗 D L L 3 抗体 H 2 - C 8 - A - 2 重鎖の発現ベクターの構築：5' - 部位（AGCT

CCCAGATGGGTGCTGAGC；配列番号76のヌクレオチド36～57）及び3' - 部位（AGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC；配列番号76のヌクレオチド406～428）の両方におけるIn-Fusion反応のための隣接する組換え部位を有するヌクレオチド位置58～405（配列番号76中）におけるヌクレオチドからなるDNA断片を合成した（GENEART、人工遺伝子合成サービス）。In-Fusion HD PCRクローニングキット（Takara Bio USA）を使用して、合成したDNA断片を、制限酵素BipIで切断されたpCMA-G1-1の部位に挿入することで、抗DLL3抗体H2-C8-A-2重鎖の発現ベクターが構築された。

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTC
CCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGG
CGGAGGACTGGTTTCAGCCTGGCGGATCTCAGAGACTGTCT
TGTGCCGCCAGCGGCTTCACTCTCAGCAGCTACTGGATGA
ACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCCTTGAATGGGT
CGCCAAACATCAAAGAGGACGGCAGCAGGAAGTACTACGTG
GACAGCGTGAAAGGGCAGATTTCACCATCTCCAGAGACAACG
CCAAGAACAGCCTGTACTCTGCAGATGAACCTCCCTGAGAGC
CGAGGACACCGCGCTGTACTACTGTGCCAGAGATCCTGGC
TGGGCCCTTTTCGATTATTGGGGGCCAGGGCACACTGGTCA
CCGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCCAAGCGTCTTCCC
CCTGGCACCTCTCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGGCACAGCC
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAACCCG
TGACCGTGAAGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAAGCGCGT
GCACACCTTCCCCGCTGTCTCTGCAGTCTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGGCCCTCCAGCAGCTTGG
GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCCAAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAGCCCAAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACATGCCCACCTTGCCAGCACCTGAAC
TCTTGGGGGGACCTCAGTCTTCTCTCTCCCCCAAAACC
CAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTAC
CGGGTGGTCAAGCGTCTCAACCGTCTGCAACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGAGC
CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAA
GGCCAGCCCCGGGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCCAT
CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAAACAACCTACAAGACCA
CCCCCTCCCGTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGC
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACCCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAA
A（配列番号76）

【0360】

抗DLL3抗体H2-C8-A-3重鎖の発現ベクターの構築：配列番号77（CCAGCCTCCGGACTCTAGAGCCACC；配列番号101）の外側の5' - 部位及び配列番号77（TGAGTTTAAACGGGGGAGGCTAACT；配列番号102）の外側の3' - 部位の両方におけるIn-Fusion反応のための隣接する組換え部位を有するヌクレオチド位置1～1401（配列番号77中）におけるヌクレオチド

10

20

30

40

50

からなるDNA断片を合成した（GENEART、人工遺伝子合成サービス）。In-Fusion HD PCRクローニングキットを使用して、増幅したDNA断片を、制限酵素XbaI/PmeIで切断されたpCMA-LKの部位に挿入することで、抗DLL3抗体H2-C8-A-3重鎖の発現ベクターが構築された。

【0361】

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTC
CTAGATGGGTGCTGTCTGAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGG
CGGAGGACTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCAGAGACTGTCT
TGTGCCCGCCAGCGGCTTCAACCTTCAAGCAGCTACTGGATGA
ACTGGGTCCGACAGGCCCTTGGCAAAGGCCCTTGAATGGGT
CGCCAACATCAAAGAGGACGGCAGCGAGAAAGTACTACGTG
GACAGCGTGAAAGGGCAGATTCAACCATCTCCAGAGACAACG
CCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGCGCGC
CGAAGATAACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGATCCTGGC
TGGGCCCTTTTCGATTATTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCA
CCGTGTCTATCTGCCTCCACCAAGGGGCCCAAGCGTCTTCCC
CCTGGCACCTCTCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGGCACAGCC
GCCCTGGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCG
TGACCGTGAAGCTGGAACCTCAGGCGGCCCTGACCAAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGCTGTCTCTGCAGTCTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGGCCCTCCAGCAGCTTGG
GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCCAAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGTGAGCCCCAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACATGCCCAACCTTGGCCAGCACCTGAAG
CCGCGGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCA
AGTTCAAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTAC
CGGGTGGTCAAGCGTCTTCAACCGTCTTGCACCAAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGGTGCAAGGTCTCCAACAAGC
CCTCCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
GGCCAGCCCCGGGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCCAT
CCC GGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCTCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAAACAACCTACAAGACCA
CCCCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGC
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACCCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAA
A（配列番号77）

【0362】

抗DLL3抗体H2-C8-A-2及びH2-C8-A-3軽鎖の発現ベクターの構築：5'-部位（CTGTGGATCTCCGGCGCGGTACGGC；配列番号80のヌクレオチド37～60）及び3'-部位（CGTACGGTGGCCCGCCCCCTCC；配列番号80のヌクレオチド382～402）の両方におけるIn-Fusion反応のための隣接する組換え部位を有するヌクレオチド位置61～381（配列番号80中）におけるヌクレオチドからなるDNA断片を合成した（GENEART、人工遺伝子合成サービス）。In-Fusion HD PCRクローニングキット（Takara Bio USA）を使用して、合成したDNA断片を、制限酵素BsiWIで切断されたp

10

20

30

40

50

CMA-LKの部位に挿入することで、抗DLL3抗体H2-C8-A-2及びH2-C8-A-3軽鎖の発現ベクターが構築された。

【0363】

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGT
GGATCTCCGGCGCGGTACGGCGACATCCAGATGTCTCAGAG
CCCTAGCAGCCTGTCTTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGAACC
ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTACCTGG
CCTGGTTTCCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGAGCCT
GATCTATGCCGCTAGCTCTCTGTCAGTCTGGCGGTGCCCTCT
AAGTTTATGCGGCTCTGGCAGCGGCGACCGATTTCACACTGG
CCATATCTAGCCTGTCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTA
CTGCCAGCAGTACAACAGCCTTCCCCCTACACCTTTCGGCCAG
GGCACCACTGGAAATCAAGCGTACGGGTGGCCCGCCCCCT
CCGTGTTTCATCTTCCCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTC
CGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCTGTGAATAACTTCTAC
CCCAGAGAGGGCCAAGGTGTCAGTGGAAAGGTGGACAACGCC
TGCAGTCCGGGAACCTCCAGGAGAGCGTGAACCGAGCAGGA
CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACC
CTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCCT
GCGAGGTGACCCACCAGGGGCCTGAGCTCCCCCGTCAACCAA
GAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT (配列番号80)

10

20

【0364】

発現及び精製：H2-C8-Aの重鎖及び軽鎖の対応するDNA配列をコードする発現ベクターを構築し（トランスフェクショングレードのプラスミド、Genscript）、HEK293細胞（HD293F、Genscript）にトランスフェクトした。それに続いて培養及び回収し、得られた上清から、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって抗体を精製した。

【0365】

代替として、H2-C8-A-3に関して、マニュアルに従って、FreeStyle 293F細胞（Thermo Fisher Scientific）を培養し、継代させた。対数増殖期のFreeStyle 293F細胞を、3Lのエルレンマイヤーフラスコ（CORNING）上に植え付け、FreeStyle 293発現培地（Thermo Fisher Scientific）で、細胞 $2.0 \sim 2.4 \times 10^6$ 個/mLで総体積580mLまで希釈した。その間に、300 μ gのH2-C8-A-3の重鎖発現ベクター、300 μ gのH2-C8-A-3の軽鎖発現ベクター及び1.8mgのポリエチレンイミン（Polysciences）を、20mLのOpti-Pro SFM培地（Thermo Fisher Scientific）に添加し、得られた混合物を穏やかに攪拌した。5分間のインキュベーションの後、混合物を、FreeStyle 293F細胞に添加した。細胞を、インキュベーター（37℃、8%CO₂）中で、95rpmで振盪しながら4時間インキュベートし、その後、480mLの、4mMのGlutaMAXサプリメントI（Thermo Fisher Scientific）を含むBalanced（R）HEK293（FUJIFILM Irvine Scientific）及び120mLの、4mMのGlutaMAXサプリメントIを含むBalanced（R）HEK293フィード（FUJIFILM Irvine Scientific）を、培養物に添加した。細胞を、インキュベーター（37℃、8%CO₂）中で、95rpmで振盪しながら6日間さらにインキュベートした。培養上清を回収し、500mLフィルターシステム（Thermo Fisher Scientific）でろ過した。

30

40

【0366】

一方で、H2-C8-A-2に関して、マニュアルに従って、FreeStyle 2

50

93F細胞を培養し、ミドルスケールバイオリアクターBCP (Biot)を備えたスピナーフラスコで、37℃で、8%CO₂で継代させた。FreeStyle 293F細胞のトランスフェクション及び培養を、WAVE BIOREACTOR (GE Healthcare)を用いて行った。2.5Lの、対数増殖期の細胞2.0~2.4×10⁶個/mLでのFreeStyle 293F細胞を、WAVE CELLBAG10L (Cytiva)上に植え付けた。その間に、1.25mgのH2-C8-A-2の重鎖発現ベクター、1.25mgのH2-C8-A-2の軽鎖発現ベクター及び7.5mgのポリエチレンイミン (Polyscience)を、160mLのOpti-Pro SFM培地 (Thermo Fisher Scientific)に添加し、得られた混合物を穏やかに攪拌した。5分間のインキュベーションの後、混合物を、WAVE CELLBAG10L中のFreeStyle 293F細胞に添加した。細胞を、WAVE CELLBAG10L (37℃、8%CO₂)中で、4時間振盪しながら培養し、その後、1.92Lの、4mMのGluTAMAXサプリメントIを含むBalanced (R) HEK293及び480mLの、4mMのGluTAMAXサプリメントIを含むBalanced (R) HEK293フィードを、培養物に添加した。細胞をさらにWAVE CELLBAG10L (37℃、8%CO₂)中で6日間振盪しながら培養した。培養上清を回収し、遠心分離し、カプセルカートリッジフィルター (細孔サイズ: 0.45 μm、ADVANTEC)でろ過した。

10

【0367】

抗DLL3抗体の精製：ろ過した培養上清を、rProtein Aアフィニティークロマトグラフィー及びセラミックヒドロキシアパタイトの2工程プロセスによって精製した。

20

精製方法の詳細は、特許出願WO2020/013170号に記載されたものであった。

【0368】

(実施例8-2)

組換え抗DLL3抗体H6-G23-F、H6-G23-F-2、及びH6-G23-F-3のMAB2作製

重鎖の構築：抗DLL3抗体H6-G23-Fの重鎖 (配列番号63)を、実施例8で得られた可変領域 (配列番号32)をIgG1のヒトガンマ鎖定常領域 (配列番号42)と接続することによって構築した。また抗DLL3抗体H6-G23-F-2及びH6-G23-F-3の重鎖 (それぞれ配列番号64及び65)も、実施例8で得られた可変領域 (配列番号32)をIgG1のヒトガンマ鎖定常領域バリエーション (配列番号57及び58)と接続することによって構築した。

30

【0369】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTSYYYIHWVRQAPGQGLEWMGIIDPSDGSNTNYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARDREYNYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号63)

40

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFFTSYYYIHWVRQAPGQGLEWMGIIDPSDGSNTNYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARDREYNYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSS

50

WNSGALTS G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T

Q K S L S L S P G K (配列番号 64)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y Y I H W V R Q A
P G Q G L E W M G I I D P S D G S T N Y A Q K F Q G R V T M T R D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R D R E Y N Y Y G L D V W G Q G T T V T V S S
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
WNSGALTS G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T

Q K S L S L S P G K (配列番号 65)

【0370】

軽鎖の構築：抗 D L L 3 抗体 H 6 - G 2 3 - F の軽鎖を構築した。抗 D L L 3 抗体 H 6 - G 2 3 - F - 2 及び H 6 - G 2 3 - F - 3 の軽鎖は、実施例 8 で得られた可変領域を、I g G 1 のヒトカップ鎖定常領域（配列番号 37 及び 49）と接続することによって構築することができる（配列番号 66）。

D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L V Y R D G N T Y L N W
F Q Q R P G Q S P R R L I Y K V S N R D S G V P D R F R G S G S G T D F T L K I
S R V E A E D V G V Y Y C M Q G T H W P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V
F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 66)

【0371】

発現及び精製：上述した H 6 - G 2 3 - F の重鎖及び軽鎖の対応する D N A 配列をコードする発現ベクターを調製し（トランスフェクショングレードのプラスミド、G e n s c r i p t）、H E K 2 9 3 細胞（H D 2 9 3 F、G e n s c r i p t）にトランスフェクトした。それに続いて培養及び回収し、得られた上清から、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーによって抗体を精製した。

【0372】

（実施例 8 - 3）

組換え抗 D L L 3 抗体 H 1 0 - O 1 8 - A、H 1 0 - O 1 8 - A - 2、及び H 1 0 - O 1 8 - A - 3 の M A B 3 作製

重鎖の構築：抗 D L L 3 抗体 H 1 0 - O 1 8 - A の重鎖（配列番号 67）を、実施例 8 で得られた可変領域（配列番号 22）を I g G 1 のヒトガンマ鎖定常領域（配列番号 42）と接続することによって構築した。抗 D L L 3 抗体 H 1 0 - O 1 8 - A - 2 及び H 1 0 - O 1 8 - A - 3 の重鎖（それぞれ配列番号 68 及び 69）は、実施例 8 で得られた可変領域（配列番号 22）を I g G 1 のヒトガンマ鎖定常領域バリエーション（配列番号 57 及び 58）と接続することによって構築することができる。

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I N S Y Y W S W I R Q P
P G K G L E W I G Y I F Y S G I T N Y N P S L K S R V T I S L D T S K N Q F S L
K L S S V T A A D T A V Y Y C A R I G V A G F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S

TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGV E VHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D
SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号 67)

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSINSYYWSWIRQP
PGKGLEWIGYIFYSGITNYPNPSLKSRVTISLDTSKNQFSL
KLSSSVTAADTAVYYCARIGVAGFYFDYWGQGGLTLTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGV E VHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D
SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号 68)

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSINSYYWSWIRQP
PGKGLEWIGYIFYSGITNYPNPSLKSRVTISLDTSKNQFSL
KLSSSVTAADTAVYYCARIGVAGFYFDYWGQGGLTLTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGV E VHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL D
SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号 69)

【0373】

軽鎖の構築：抗DLL3抗体H10-O18-Aの軽鎖を構築した。抗DLL3抗体H10-O18-A-2及びH10-O18-A-3の軽鎖は、実施例8で得られた可変領域を、IgG1のヒトカッパ鎖定常領域（配列番号27及び49）と接続することによって構築することができる（配列番号70）。

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK
PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDFAVYYCQQYGTSPITFGGGTKVEIKRTVAAPS VFI F P
PSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 70)

【0374】

抗DLL3抗体H10-O18-A-2重鎖の発現ベクターの構築：5' - 部位 (AGCTCC CAGATGGGTGCTGAGC; 配列番号78のヌクレオチド36~57) 及び3' - 部位 (AGCTCAGCCTCCACCAAGGGCC C; 配列番号78のヌクレオチド406~428) の両方におけるIn-Fusion反応のための隣接する組換え部位を有するヌクレオチド位置58~405 (配列番号78中) におけるヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドからなるDNA断片を合成した（GENEART、人工遺伝子合成サービス）。In-Fusion HD PCRクローニングキット（Takara Bio USA）を使用して、合成したDNA断片を、制限酵素BipIで切断されたpCMA-G1-1の部位に挿入することで、抗DLL3抗体H10-O18-A-2重鎖の発現ベクターが構築された。

```
ATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCTCCTGCTGGTGGCAGCTC
CCAGATGGGTGCTGAGCCAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGG
CCTTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAAACACTGAGCCTGACC
TGTACCGTGTCTGGCGGCGAGCATCAACAGCTACTACTGGT
CCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCAAAGGACTGGAAATGGAT
CGGCTACATCTTCTACAGCGGCATCACCAACTACAACCCC
AGCCTGAAGTCCAGAGTGAACCATCAGCCTGGACACCAGCA
AGAACCAGTTCTTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGC
CGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAATCGGCGGTGGCC
GGCTTCTACTTTCGATTATTGGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCA
CAGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCCAAGCGTCTTCCC
CCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGGCACAGCC
GCCCTGGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCG
TGACCGGTGAGCTGGAACCTCAGGCGGCCCTGACCAAGCGGCGT
GCACACCTTCCCCGCTGTCTCTCAGTCTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCCAAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAGCCCCAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACATGCCCAACCCCTGCCCAGCACCTGAAC
TCCTGGGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTCTTCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAA
TGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAA
AGTTCAAACCTGGTACGTGGACGGCGGTGGAGGTTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTAC
CGGGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCTCTGCACCAAGGACTGGC
TGAAATGGCAAAGGAGTACAAGTGCAAAGGTCTCCAACAAGC
CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
GGCCAGCCCCGGGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCCAT
CCC GGGAAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGCTGGAG
TGGGAGAGGCAATGGCCAGCCCGAGAAACAACCTACAAGACCA
CCCCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTCTA
CAGCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGC
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACCCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
A（配列番号78）
```

【0375】

抗DLL3抗体H10-O18-A-3重鎖の発現ベクターの構築：配列番号79（CAGCCTCCGGACTCTAGAGCCACC；配列番号101）の外側の5'部位及び配列番号79（TGAGTTTAAACGGGGGAGGCTAACT；配列番号102）の外側の3'部位の両方におけるIn-Fusion反応のための隣接する組換え部位を有するヌクレオチド位置1～1401（配列番号79中）におけるヌクレオチドからなるDNA断片を合成した（GENEART、人工遺伝子合成サービス）。In-Fusion HD PCRクローニングキットを使用して、増幅したDNA断片を、制限酵素PmeI/XbaIで切断されたpCMA-LKの部位に挿入することで、抗D

10

20

30

40

50

LL3抗体H10-O18-A-3重鎖の発現ベクターが構築された。

【0376】

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGTGCTGCTGGTGGCCGCTC
CTAGATGGGTGCTGTCTCAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGG
CCCTGGCCCTGGTCAAGCCCTAGCGAAACACTGAGCCCTGACC
TGTAACCGTGTCTGGCGGCAGCATCAACAGCTACTACTGGT
CCTGGATCCGGCAGCCCTCCTGGCAAGGACTGGGAATGGAT
CGGCTACATCTTCTACAGCGGCATCACCAACTACAACCCC
AGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCCCTGGACACCAGCA
AGAACCCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGC
CGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAATCGGCGGTGGCC
GGCTTCTACTTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCA
CCGTTTCTTCTGCTCCACCAAGGGGCCCAAGCGTCTTCCC
CCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGGCACAGCC
GCCCTGGGCTGCTGTGCTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCG
TGACCGGTGAGCTGGAACCTCAGGCGGCCCTGACCAGCGGGCT
GCACACCTTCCCCGCTGTCTCTGAGTCTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCCAAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAGCCCAAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACATGCCCAACCCTGCCCAGCACCTGAAG
CCGCGGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAC
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
CGGGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCTTGCAACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGC
CCTCCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
GGCCAGCCCCGGGAACCAACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCC GGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAAACAACCTACAAGACCA
CCCCCTCCCGTGTGCTGGACTCCGACGGCTCTCTTCTTCTCTA
CAGCAAAGCTCACCGGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGC
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACCCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAA
A (配列番号79)

【0377】

抗DLL3抗体H10-O18-A-2及びH10-O18-A-3軽鎖の発現ベクターの構築：5' - 部位 (CTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGC; 配列番号81のヌクレオチド37~60) 及び3' - 部位 (CGTACGGTGGCCCGCCCCCTCC; 配列番号81のヌクレオチド385~405) の両方におけるIn-Fusion反応のための隣接する組換え部位を有するヌクレオチド位置61~384 (配列番号81中) におけるヌクレオチドからなるDNA断片を合成した (GENEART、人工遺伝子合成サービス)。In-Fusion HD PCRクローニングキット (Takara Bio USA) を使用して、合成したDNA断片を、制限酵素BsiWIで切断されたpCMA-LKの部位に挿入することで、抗DLL3抗体H10-O18-A-2及びH10-O18-A-3軽鎖の発現ベクターが構築された。

【0378】

10

20

30

40

50

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGT
GGATCTCCGGCGCGGTACGGCGAGATCGTGCTGACACAGAG
CCCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAAAGAGCCACA
CTGAGCTGTAGAGCCAGCCAGAGCGTGTCCAGCTCTTACC
TGGCTTTGGTATCAGCAGAAGGCCCGGACAGGCTCCCACT
GCTGATCTATGGCGCCTCTTCTAGAGCCACAGGCGATCCCC
GATAGATTTCAGCGGCTCTGGCAGCGGCAACCGATTTTACCC
TGACAATCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTTCGCCGTGTA
CTACTGTCAAGCAGTACGGGCACAAGCCCTCTGACCTTTGGC
GGCGGAACAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGGTGGCCGCC
CCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAA
GTCCGGCACCCGCCCTCCGTGGTGTGCCCTGCTGAATAACTTC
TACCCCAAGAGAGGCCAAGGTGCAAGTGGAAAGGTGGACAACG
CCCTGCAGTCCGGGAACCTCCCAAGGAGAGCGTGAACCGAGCA
GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTG
ACCCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACG
CCTGCGAGGTGACCCACCAAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCA
CAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGT (配列番号 81)

【0379】

発現及び精製：H10-O18-Aの重鎖及び軽鎖の対応するDNA配列をコードする発現ベクターを構築し（トランスフェクショングレードのプラスミド、Genscript）、HEK293細胞（HD293F、Genscript）にトランスフェクトした。それに続いて培養及び回収し、得られた上清から、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって抗体を精製した。

【0380】

代替として、H10-O18-A-3に関して、マニュアルに従って、FreeStyle 293F細胞（Thermo Fisher Scientific）を培養し、継代させた。対数増殖期のFreeStyle 293F細胞を、3Lのエルレンマイヤーフラスコ（CORNING）上に植え付け、FreeStyle 293発現培地（Thermo Fisher Scientific）で、細胞 $2.0 \sim 2.4 \times 10^6$ 個/mLで総体積580mLまで希釈した。その間に、300 μ gのH10-O18-A-3の重鎖発現ベクター、300 μ gのH10-O18-A-3の軽鎖発現ベクター及び1.8mgのポリエチレンイミン（Polyscience）を、20mLのOpti-Pro SFM培地（Thermo Fisher Scientific）に添加し、得られた混合物を穏やかに攪拌した。5分間のインキュベーションの後、混合物を、FreeStyle 293F細胞に添加した。細胞を、インキュベーター（37℃、8%CO₂）中で、95rpmで振盪しながら4時間インキュベートし、その後、480mLの、4mMのGlutaMAXサプリメントI（Thermo Fisher Scientific）を含むBalanced (R) HEK293（FUJIFILM Irvine Scientific）及び120mLの、4mMのGlutaMAXサプリメントIを含むBalanced (R) HEK293フィード（FUJIFILM Irvine Scientific）を、培養物に添加した。細胞を、インキュベーター（37℃、8%CO₂）中で、95rpmで振盪しながら6日間さらにインキュベートした。培養上清を回収し、500mLフィルターシステム（Thermo Fisher Scientific）でろ過した。

【0381】

一方で、H10-O18-A-2に関して、マニュアルに従って、FreeStyle 293F細胞を培養し、ミドルスケールバイオリアクターBCP（Biot）を備えたスピナーフラスコで、37℃で、8%CO₂で継代させた。FreeStyle 293F細胞のトランスフェクション及び培養を、WAVE BIOREACTOR（GE H

healthcare)を用いて行った。2.5 Lの、対数増殖期の細胞 $2.0 \sim 2.4 \times 10^6$ 個/mLでのFreeStyle 293F細胞を、WAVE CELLBAG 10 L (Cytiva)上に植え付けた。その間に、1.25 mgのH10-O18-A-2の重鎖発現ベクター、1.25 mgのH10-O18-A-2の軽鎖発現ベクター及び7.5 mgのポリエチレンイミン (Polyscience)を、160 mLのOpti-Pro SFM培地 (Thermo Fisher Scientific)に添加し、得られた混合物を穏やかに攪拌した。5分間のインキュベーションの後、混合物を、WAVE CELLBAG 10 L中のFreeStyle 293F細胞に添加した。細胞を、WAVE CELLBAG 10 L (37℃、8% CO₂)中で、4時間振盪しながら培養し、その後、1.92 Lの、4 mMのGlutaMAXサプリメントIを含むBalanced (R) HEK293及び480 mLの、4 mMのGlutaMAXサプリメントIを含むBalanced (R) HEK293フィードを、培養物に添加した。細胞をさらにWAVE CELLBAG 10 L (37℃、8% CO₂)中で6日間振盪しながら培養した。培養上清を回収し、遠心分離し、カプセルカートリッジフィルター (細孔サイズ: 0.45 µm、ADVANTEC)でろ過した。

10

抗DLL3抗体の精製：ろ過した培養上清を、rProtein Aアフィニティークロマトグラフィー及びセラミックヒドロキシアパタイトの2工程プロセスによって精製した。精製方法の詳細は、特許出願WO2020/013170号に記載されたものであった。

20

【0382】

(実施例9)

グリカンリモデリング (H2-C8-A抗体-[MSG1-N₃]₂)

図13のスキームで示されるように、抗DLL3抗体H2-C8-Aのグリカンリモデリングを実行した。この図は、MSG1型のN297グリカンのアジド基が非還元末端におけるシアル酸に導入されたリンカー構造を用いたスキームを示す。N297グリカンにアジド基を導入することによって形成された中間体のリンカー構造は、式によって表される構造と全て同じである。

【0383】

工程1: (Fucα1, 6) GlcNAc-H2-C8-A抗体の調製

H2-C8-A抗体溶液 (PBS中の8.02 mg/mL (pH 7.2)、12.0 mL)を、一般的なオペレーションCに従って、50 mMのリン酸緩衝剤 (pH 6.0)への緩衝剤交換に供した。得られたH2-C8-A抗体溶液 (50 mMのリン酸緩衝剤中の20.2 mg/mL (pH 6.0)、2.50 mL)に、0.0335 mLの野生型EndoS溶液 (PBS中の7.52 mg/mL)を添加し、溶液を37℃で4時間インキュベートした。

30

反応の進行を、マイクロチップ電気泳動システム (Bioanalyzer 2100、Agilent)によってチェックした。

反応が完了した後、以下の手順に従って、アフィニティークロマトグラフィーによる精製及びヒドロキシアパタイトカラムでの精製を実行した。

【0384】

(1) 精製装置: AKTA pure 150 (GE Healthcareによって作製された)

カラム: HiTrap rProtein A FF (5 mL) (GE Healthcareによって作製された)。

流速: 5 mL/分 (チャージ中、1.25 mL/分)。

3 CVの結合緩衝剤 (20 mMのリン酸緩衝剤 (pH 6.0))を、1.25 mL/分で流し、その5 CVを、5 mL/分でさらに流した。中間の洗浄において、15 CVの洗浄溶液 (20 mMのリン酸緩衝剤 (pH 7.0)、0.5 Mの塩化ナトリウム溶液)を流した。溶出において、6 CVの溶出緩衝剤 (ImmunoPure IgG溶出緩衝剤、Pierceによって作製された)を流した。溶出液を1 Mのトリス緩衝剤 (pH 9.0

50

）で即座に中和した。所望の化合物を含有する画分を、一般的なオペレーションCを使用することによって、5 mMのリン酸緩衝剤／50 mMの2-モルホリノエタンスルホン酸（MES）溶液（pH 6.8）への緩衝剤交換に供した。

【0385】

（2）ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製

精製装置：AKTA avant 25（GE Healthcareによって作製された）

カラム：Bio-Scale Mini CHT Type Iカートリッジ（5 mL）（Bio-Rad Laboratories, Inc.によって作製された）

流速：5 mL／分（チャージ中、1.25 mL／分）。

工程1で得られた溶液をカラムの上部に添加し、3 CVの溶液（5 mMのリン酸緩衝剤、50 mMの2-モルホリノエタンスルホン酸（MES）溶液（pH 6.8））を、1.25 mL／分で流し、その3 CVを5 mL／分でさらに流した。その後、溶出を、溶液A及び溶液B（5 mMのリン酸緩衝剤／50 mMの2-モルホリノエタンスルホン酸（MES）溶液（pH 6.8）、2 Mの塩化ナトリウム溶液）を用いて実行した。溶出条件は、溶液A：溶液B＝100：0～0：100（15 CV）であった。さらに、5 CVの洗浄溶液（500 mMのリン酸緩衝剤（pH 6.5））を流した。所望の化合物を含有する画分を、一般的なオペレーションCを使用することによって、緩衝剤交換に供して、（Fucα1, 6）GlcNAc-H2-C8-A抗体溶液（50 mMのリン酸緩衝剤中の19.4 mg／mL（pH 6.0）、2.10 mL）を得た。

【0386】

工程2：H2-C8-A抗体-[MSG1-N3]2の調製

工程1で得られた（Fucα1, 6）GlcNAc-H2-C8-A抗体溶液（50 mMのリン酸緩衝剤中の19.4 mg／mL（pH 6.0）、2.10 mL）に、50 mMのリン酸緩衝剤中のオキサゾリン（6.46 mg）、[N3-PEG(3)]-MSG1-Ox（WO19065964の実施例56）の溶液（pH 6.0）（0.129 mL）及び0.170 mLのEndoS D233Q/Q303L溶液（PBS中の4.80 mg／mL）を添加し、混合物を30℃で4.5時間インキュベートした。反応の進行を、マイクロチップ電気泳動システム（Bioanalyzer 2100、Agilent）によってチェックした。反応が完了した後、アフィニティークロマトグラフィーによる精製及びヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる精製を工程1と同様にして実行し、次いで所望の化合物を含有する画分を、一般的なオペレーションCを使用することによって、10 mMの酢酸緩衝剤、5%のソルビトール（pH 5.5）への緩衝剤交換に供して、H2-C8-A抗体-[MSG1-N3]2溶液（10 mMの酢酸緩衝剤、5%ソルビトール中の11.1 mg／mL（pH 5.5）、3.00 mL）を得た。

【0387】

（実施例10）

グリカンリモデリング（H6-G23-F抗体-[MSG1-N3]2）

抗DLL3抗体H6-G23-Fのグリカンリモデリングを、図14のスキームで示されるようにして実行した。この図は、MSG1型のN297グリカンのアジド基が非還元末端におけるシアル酸に導入されたリンカー構造を用いたスキームを示す。N297グリカンにアジド基を導入することによって形成された中間体のリンカー構造は、式によって表される構造と全て同じである。

【0388】

工程1：（Fucα1, 6）GlcNAc-H6-G23-F抗体の調製

H6-G23-F抗体溶液（PBS中の6.22 mg／mL（pH 7.2）、16.5 mL）を、一般的なオペレーションCに従って、50 mMのリン酸緩衝剤（pH 6.0）への緩衝剤交換に供した。得られたH6-G23-F抗体溶液（50 mMのリン酸緩衝剤中の19.9 mg／mL（pH 6.0）、2.50 mL）を使用して、実施例9の工程1と同じオペレーションを実行して、（Fucα1, 6）GlcNAc-H6-G23-

F抗体溶液（PB中の19.9mg/mL（pH6.0）、2.00mL）を得た。

工程2：H6-G23-F抗体-[MSG1-N₃]₂の調製

実施例9の工程2の場合と同じオペレーションを、上記の工程1で得られた（Fucα1, 6）GlcNAc-H6-G23-F抗体溶液（PB中の19.9mg/mL（pH6.0）、2.00mL）を使用して実行して、H6-G23-F抗体-[MSG1-N₃]₂溶液（10mMの酢酸緩衝剤、5%のソルビトール中の9.24mg/mL（pH5.5）、3.50mL）を得た。

【0389】

（実施例11）

グリカンリモデリング（H10-O18-A抗体-[MSG1-N₃]₂）

抗DLL3抗体H10-O18-Aのグリカンリモデリングを、図15のスキームで示されるようにして実行した。この図は、MSG1型のN297グリカンのアジド基が非還元末端におけるシアル酸に導入されたリンカー構造を用いたスキームを示す。N297グリカンにアジド基を導入することによって形成された中間体のリンカー構造は、式によって表される構造と全て同じである。

【0390】

工程1：（Fucα1, 6）GlcNAc-H10-O18-A抗体の調製

H10-O18-A抗体溶液（PBS中の6.87mg/mL（pH7.2）、16.0mL）を、一般的なオペレーションCに従って、50mMのリン酸緩衝剤（pH6.0）への緩衝剤交換に供した。得られたH10-O18-A抗体溶液（50mMのリン酸緩衝剤中の20.1mg/mL（pH6.0）、2.50mL）を使用して、実施例9の工程1と同じオペレーションを実行して、（Fucα1, 6）GlcNAc-H10-O18-A抗体溶液（PB中の21.0mg/mL（pH6.0）、2.00mL）を得た。

工程2：H10-O18-A抗体-[MSG1-N₃]₂の調製

実施例9の工程2の場合と同じオペレーションを、工程1で得られた（Fucα1, 6）GlcNAc-H10-O18-A抗体溶液（PB中の21.0mg/mL（pH6.0）、2.00mL）を使用して実行して、H10-O18-A抗体-[MSG1-N₃]₂溶液（10mMの酢酸緩衝剤、5%のソルビトール中の10.7mg/mL（pH5.5）、3.50mL）を得た。

【0391】

（実施例12）

H2-C8-A-コンジュゲートの合成

ADCを、以下の反応式で例示されるようにして、実施例9の工程2で得られた抗体及びWO2019/065964に従って合成した薬物リンカーをコンジュゲートすることによって合成した。合成の第1の工程は、図16に示される。工程1で形成されることになるトリアゾール環は、幾何異性化を有し、工程1で得られた化合物は、図16でRとして示される2つの構造の混合物としてリンカーを有する。

【0392】

工程1：抗体H2-C8-A-[MSG1-N₃]₂及び薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例9の工程2で得られたH2-C8-A抗体-（MSG1-N₃）₂（11.1mg/mL、1.5mL）の10mMの酢酸緩衝剤、5%のソルビトール（pH5.5）の溶液に、1,2-ブロパンジオール（1.43mL）、及びWO2019/065964の実施例3の手順に従って調製されたN-[4-（11,12-ジデヒドロジベンゾ[b,f]アゾシン-5（6H）-イル）-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-ル-バリル-N-[4-（{[(11'S,11')として]-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[（5-{[(11aS)-7-メトキシ-2-（4-メトキシフェニル）-5-オキソ-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル）オキシ]-5'-オキソ-11',

10

20

30

40

50

、11'-a-ジヒドロ-1'H, 3'H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5'H) -カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] -L-アラニンアミド (配列番号85として開示される「GGVA」) の10mMのジメチルスルホキシド溶液 (0.0690mL; 抗体分子1個当たり6当量) を室温で添加し、結果物を、チューブローテーター (MTR-103、AS ONE 社) を使用して室温で48時間反応させた。

【0393】

精製オペレーション：溶液を、一般的なオペレーションDを使用することによって精製して、7.0mLの所望の化合物の溶液を得た。

特徴付け：以下の特徴的な値を、一般的なオペレーションE (ϵA 、 $280=220378$ 、 ϵA 、 $329=0$ 、 ϵD 、 $280=23155$ 及び ϵD 、 $329=19492$ を使用して) 及びF (勾配プログラム1) を使用することによって得た。 10

抗体濃度：1.77mg/mL、抗体収量：12.4mg (74%)、抗体分子1個当たりのコンジュゲートした薬物分子の平均数 (n) : 1.8。

【0394】

(実施例13)

H6-G23-F-コンジュゲートの合成

ADCを、以下の反応式で例示されるようにして、実施例10の工程2で得られた抗体と、WO2019/065964の実施例3の手順に従って調製されたN-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-({ [(11'S, 11' として) -11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{ [(11aS) -7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル) -5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} ペンチル) オキシ] -5'-オキソ-11', 11'-a-ジヒドロ-1'H, 3'H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5'H) -カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] -L-アラニンアミド (配列番号85として開示される「GGVA」) とをコンジュゲートすることによって合成した。合成の第1の工程は、図17に示される。工程1で形成されることになるトリアゾール環は、幾何異性化を有し、工程1で得られた化合物は、図17でRとして示される2つの構造の混合物としてリンカーを有する。 20 30

【0395】

工程1：抗体H6-G23-F-[MSG1-N₃]₂及び薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例12と同じオペレーションを、H6-G23-F-[MSG1-N₃]₂溶液 (10mMの酢酸緩衝剤、5%のソルビトール中の9.24mg/mL (pH5.5)、1.1mL) を使用して実行した。その結果として、H6-G23-F ADC 溶液 (6.0mL) を得た。

特徴付け：以下の特徴的な値を、一般的なオペレーションE (ϵA 、 $280=215353$ 、 ϵA 、 $329=0$ 、 ϵD 、 $280=23155$ 及び ϵD 、 $329=19492$ を使用して) 及びF (勾配プログラム1) を使用することによって得た。 40

抗体濃度：1.38mg/mL、抗体収量：8.30mg (82%)、抗体分子1個当たりのコンジュゲートした薬物分子の平均数 (n) : 1.8。

【0396】

(実施例14)

H10-O18-A-コンジュゲートの合成

ADCを、以下の反応式で例示されるようにして、実施例11の工程2で得られた抗体と、WO2019/065964の実施例3の手順に従って調製されたN-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-({ [(11'S, 11' として) - 50

1 1' - ヒドロキシ - 7' - メトキシ - 8' - [(5 - { [(1 1 a S) - 7 - メトキシ - 2 - (4 - メトキシフェニル) - 5 - オキソ - 5 , 1 0 , 1 1 , 1 1 a - テトラヒドロ - 1 H - ピロロ [2 , 1 - c] [1 , 4] ベンゾジアゼピン - 8 - イル] オキシ } ペンチル) オキシ] - 5' - オキソ - 1 1' , 1 1' a - ジヒドロ - 1' H , 3' H - スピロ [シクロプロパン - 1 , 2' - ピロロ [2 , 1 - c] [1 , 4] ベンゾジアゼピン] - 1 0' (5' H) - カルボニル] オキシ } メチル) フェニル] - L - アラニンアミド (配列番号 8 5 として開示される「GGVA」) とをコンジュゲートすることによって合成した。合成の第 1 の工程は、図 1 8 に示される。工程 1 で形成されることになるトリアゾール環は、幾何異性を有し、工程 1 で得られた化合物は、図 1 8 で R として示される 2 つの構造の混合物としてリンカーを有する。

10

【0397】

工程 1 : 抗体 H 1 0 - O 1 8 - A - [M S G 1 - N 3] ₂ 及び薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例 1 2 と同じオペレーションを、H 1 0 - O 1 8 - A - [M S G 1 - N 3] ₂ 溶液 (1 0 m M の酢酸緩衝剤、5 % のソルビトール中の 1 0 . 7 m g / m L (p H 5 . 5) 、1 . 0 m L) を使用して実行した。その結果として、H 1 0 - O 1 8 - A ADC 溶液 (5 . 0 m L) を得た。

特徴付け：以下の特徴的な値を、一般的なオペレーション E (ϵA 、2 8 0 = 2 1 5 4 2 4 , ϵA 、3 2 9 = 0 、 ϵD 、2 8 0 = 2 3 1 5 5 及び ϵD 、3 2 9 = 1 9 4 9 2 を使用して) 及び F (勾配プログラム 2) を使用することによって得た。

20

抗体濃度：1 . 6 8 m g / m L 、抗体収量：8 . 4 1 m g (7 9 %) 、抗体分子 1 個当たりのコンジュゲートした薬物分子の平均数 (n) : 1 . 8 。

【0398】

(実施例 1 5)

抗 L P S ADC (抗 L P S 抗体 - コンジュゲート) の合成

抗 L P S 抗体 - コンジュゲートは、D L L 3 と関係のない抗原を認識するヒト I g G から作製された抗体 - 薬物コンジュゲートであり、これを、陰性対照として使用した。

【0399】

国際公開 W O 2 0 1 5 / 0 4 6 5 0 5 号に記載される h # 1 G 5 - H 1 L 1 の以下で配列番号 7 3 及び 7 4 で示される重鎖全長及び軽鎖全長アミノ酸配列 (国際公開 W O 2 0 1 5 / 0 4 6 5 0 5 号の配列番号 5 7 及び 6 7 に相当する) を参照しながら、抗 L P S 抗体を作製した。W O 2 0 1 9 / 0 6 5 9 6 4 の実施例 2 1 及び 3 6 を参照して、グリカンリモデリング及びコンジュゲーション反応を実行して、抗 L P S ADC (抗 L P S 抗体 - コンジュゲート) を得た。

30

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y W I N W V R Q A
P G Q G L E W M G N I Y P G S S S I N Y N E K F K S R V T I T A D T S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R T I Y N Y G S S G Y N Y A M D Y W G Q G T L
V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E
P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S
L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P
E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E
V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D
W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P
P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K
T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L
H N H Y T Q K S L S L S P G K

40

(L P S 重鎖 ; 配列番号 7 3)

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K A S E N V G N S V S W Y Q Q K P
G Q P P K L L I Y G A S N R Y T G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q A
E D V A V Y Y C G Q S Y S Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P

50

SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (LPS—軽鎖；配列番号74)

【0400】

(実施例16)

抗DLL3 ADC、SC16LD6.5の作製

抗DLL3 ADC、SC16LD6.5を、以下の工程によって調製した；抗DLL3抗体、hSC16.56を、WO2017/031458を参照しながら作製した。hSC16.56 (SC16)の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列は、以下の配列番号71及び72として表される（これらは、国際公開第WO2017/031458号の配列番号7及び8に対応する）。薬物リンカー、SG3249を、これまでに報告されている手順に従って合成した (Med. Chem. Lett. 2016, 7, 983-987)。hSC16.56 (SC16)を、WO2014/130879の報告されている手順、実施例7(a)マレイミドコンジュゲーションに従って、SG3249とコンジュゲートして、SC16LD6.5 (ADC1)を得た。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTNYGMNWVRQA
PGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFKGRVTMTTDTSTSTAY
MELRSLRSDDTAVYYCARIGDSSPSDYWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPLD
SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK (配列番号71)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSNQDVVWYQQKPK
GQAPRLLIYYASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQS
EDFAVYYCQQDYTSPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVPFI
FP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (配列番号72)

【0401】

(実施例17)

インビボにおける抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍作用

抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍作用を、免疫不全マウス由来の動物モデルを使用して、DLL3陽性ヒト腫瘍細胞株の細胞を接種させることによって評価した。4～5週齢のBALB/cヌードマウス (CAnN.Cg-Foxnl[nu]/CrLCrLj[Foxnlnu/Foxnlnu]、日本チャールス・リバー株式会社)を、実験で使用する前に、SPF条件下で、3日間又はそれより長く順化させた。マウスに、滅菌した固体食物 (FR-2、株式会社フナバシファーム) 及び所与の滅菌した水道水 (これは、5～15ppmの次亜塩素酸ナトリウム溶液を水道水に添加することによって調製された) を給餌した。接種を受けた腫瘍の長径と短径を、電子デジタルノギス (CD-15CX、株式会社ミットヨ) を使用して週2回測定し、次いで腫瘍の体積を、以下の式に従って計算した。

腫瘍体積 (mm³) = 1/2 × 長径 (mm) × [短径 (mm)]²

【0402】

各抗体-薬物コンジュゲートを、ABS緩衝剤 (10mMの酢酸緩衝剤、5%のソルビトール、pH5.5) (ナカライテスク株式会社) で希釈し、各マウスの尾部に、希釈物

10

20

30

40

50

を、各研究に示される用量で静脈内投与した。対照グループ（ビヒクルグループ）に、上記と同じ方式でABS緩衝剤を投与した。グループ1つ当たり6匹のマウスを実験に使用した。3000mm³を超える推測の腫瘍体積を有するグループを、その時点で安楽死させた。

【0403】

17) - 1 抗腫瘍作用 - (1)

DLL3陽性ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H209(ATCC)を、Matrigel(Corning Inc.)に懸濁し、細胞懸濁液を、各雌ヌードマウスの右脇腹の領域に細胞 4×10^6 個の用量で皮下接種させた(0日目)。11日目に、マウスをランダムにグループ分けした。グループ分けの日に、3種の抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-コンジュゲート、H6-G23-F-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート)のそれぞれ、又は抗LPS抗体-コンジュゲートを、各マウスの尾部に0.4mg/kgの用量で静脈内投与した。図19に結果を示す。横座標は、接種後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、SE値を示す。矢印は、投与の日付を示す。

10

20

【0404】

この腫瘍モデルにおいて、抗LPS抗体-コンジュゲートは、有意な抗腫瘍作用を呈しなかった。3種の抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-コンジュゲート、H6-G23-F-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート)の全てが、投与後に腫瘍体積を減少させ、有意な腫瘍退縮を引き起こし、投与後の28日間にわたり腫瘍退縮作用を持続させた(図19)。加えて、各抗体-薬物コンジュゲートで処置したマウスは、体重の減少の有意な兆候を示さなかったことから、3種の抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-コンジュゲート、H6-G23-F-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート)は、毒性が低く安全であることが示唆される。グループのマウスのうちの少なくとも1匹の推測された腫瘍体積が3000mm³を超えた場合、ビヒクル及び抗LPS抗体-コンジュゲートグループを安楽死させた。

【0405】

17) - 2 抗腫瘍作用 - (2)

DLL3陽性ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H524(ATCC)を、Matrigel(Corning Inc.)に懸濁し、細胞懸濁液を、各雌ヌードマウスの右脇腹の領域に細胞 2.5×10^6 個の用量で皮下接種させた(0日目)。13日目に、マウスをランダムにグループ分けした。グループ分けの日に、3種の抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-コンジュゲート、H6-G23-F-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート)のそれぞれ、又は抗LPS抗体-コンジュゲートを、各マウスの尾部に0.4mg/kgの用量で静脈内投与した。図20に結果を示す。横座標は、接種後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、SE値を示す。矢印は、投与の日付を示す。

30

40

【0406】

この腫瘍モデルにおいて、抗LPS抗体-コンジュゲートは、抗腫瘍作用を呈しなかった。3種の抗体-薬物コンジュゲートの全て(H2-C8-A-コンジュゲート、H6-G23-F-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート)が、投与後に腫瘍体積を減少させ、腫瘍退縮を引き起こし、H2-C8-A-コンジュゲート及びH10-O18-A-コンジュゲート投与後の29日間にわたり腫瘍退縮作用を持続させた(図20)。加えて、各抗体-薬物コンジュゲートで処置したマウスは、体重の減少の有意な兆候を示さなかったことから、3種の抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-コンジュゲート、H6-G23-F-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート)は、毒性が低く安全であることが示唆される。グループのマウスのうちの少なくとも1匹の推測された腫瘍体積が3000mm³を超えた場合、ビヒクル及び抗LPS抗体-コンジュゲートグループを安楽死させた。

【0407】

50

17) - 3 抗腫瘍作用 - (3)

DLL3 陽性ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H510A (ATCC) を、Matrigel (Corning Inc.) に懸濁し、細胞懸濁液を、各雌ヌードマウスの右脇腹の領域に細胞 2.5×10^6 個の用量で皮下接種させた (0 日目)。15 日目に、マウスをランダムにグループ分けした。グループ分けの日に、3 種の抗体-薬物コンジュゲート (H2-C8-A-コンジュゲート、H6-G23-F-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート) のそれぞれ、又は参照抗DLL3 抗体-コンジュゲート (SC16LD6.5) を、各マウスの尾部に 0.2 mg/kg の用量で静脈内投与した。図21に結果を示す。横座標は、接種後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、SE 値を示す。矢印は、投与の日付を示す。

10

この腫瘍モデルにおいて、参照抗DLL3-薬物コンジュゲート (SC16LD6.5) は、ある程度の腫瘍増殖阻害を呈し、腫瘍退縮作用を生じなかった。一方で、H2-C8-A-コンジュゲート、及びH10-O18-A-コンジュゲートは、投与後に腫瘍体積を減少させ、腫瘍退縮を引き起こし、投与後の27日間にわたり腫瘍退縮作用を持続させた。H2-C8-A-コンジュゲート及びH10-O18-A-コンジュゲートは、SC16LD6.5 より腫瘍体積をさらに減少させた。したがって、本発明の2種の抗体-薬物コンジュゲート (H2-C8-A-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート) は、SC16LD6.5 抗体薬物コンジュゲートと比較して、抗腫瘍剤として作用する抗体-薬物コンジュゲートとして優れている。(図21)。加えて、各抗体-薬物コンジュゲートで処置したマウスは、体重の減少の有意な兆候を示さなかったことから、3 種の抗体-薬物コンジュゲート (H2-C8-A-コンジュゲート、H6-G23-F-コンジュゲート、H10-O18-A-コンジュゲート) は、毒性が低く安全であることが示唆される。

20

【0408】

(実施例18)

グリカンリモデリング (H2-C8-A-3 抗体-[MSG1-N₃]₂)

抗DLL3 抗体H2-C8-A-3 のグリカンリモデリングを、図22のスキームで示されるようにして実行した。この図は、MSG1 型のN297グリカンのアジド基が非還元末端におけるシアル酸に導入されたリンカー構造を用いたスキームを示す。N297グリカンにアジド基を導入することによって形成された中間体のリンカー構造は、式によって表される構造と全て同じである。

30

【0409】

工程1: (Fuc α 1, 6) GlcNAc-H2-C8-A-3 抗体の調製

H2-C8-A-3 抗体溶液 (HBSor (ヒスチジン緩衝剤ソルビトール (Histidine Buffer Sorbitol)) 中の 30.0 mg/mL 、 3.43 mL) を、一般的なオペレーションCに従って、 50 mM のリン酸緩衝剤 (pH 6.0) への緩衝剤交換に供した。得られたH2-C8-A-3 抗体溶液 (50 mM のリン酸緩衝剤中の 20.0 mg/mL (pH 6.0)、 5.00 mL) を使用して、実施例9の工程1と同じオペレーションを実行して、(Fuc α 1, 6) GlcNAc-H2-C8-A-3 抗体溶液 (PB中の 19.8 mg/mL (pH 6.0)、 4.95 mL) を得た。

40

工程2: H2-C8-A-3 抗体-[MSG1-N₃]₂ の調製

実施例9の工程2の場合と同じオペレーションを、上記の工程1で得られた (Fuc α 1, 6) GlcNAc-H2-C8-A-3 抗体溶液 (PB中の 19.8 mg/mL (pH 6.0)、 4.95 mL) を使用して実行して、H2-C8-A-3 抗体-[MSG1-N₃]₂ 溶液 (10 mM の酢酸緩衝剤、5%のソルビトール中の 9.88 mg/mL (pH 5.5)、 9.30 mL) を得た。

【0410】

(実施例19)

グリカンリモデリング (H10-O18-A-3 抗体-[MSG1-N₃]₂)

抗DLL3 抗体H10-O18-A-3 のグリカンリモデリングを、図23のスキーム

50

で示されるようにして実行した。この図は、MSG1型のN297グリカンのアジド基が非還元末端におけるシアル酸に導入されたリンカー構造を用いたスキームを示す。N297グリカンにアジド基を導入することによって形成された中間体のリンカー構造は、式によって表される構造と全て同じである。

【0411】

工程1：(Fucα1, 6)GlcNAc-H10-O18-A-3抗体の調製

H10-O18-A-3抗体溶液(HBSor中の37.8mg/mL、2.20mL)を、一般的なオペレーションCに従って、50mMのリン酸緩衝剤(pH6.0)への緩衝剤交換に供した。

得られたH10-O18-A-3抗体溶液(50mMのリン酸緩衝剤中の20.0mg/mL(pH6.0)、3.86mL)を使用して、実施例9の工程1と同じオペレーションを実行して、(Fucα1, 6)GlcNAc-H10-O18-A-3抗体溶液(PB中の19.5mg/mL(pH6.0)、3.77mL)を得た。

工程2：H10-O18-A-3抗体-[MSG1-N₃]₂の調製

実施例9の工程2の場合と同じオペレーションを、工程1で得られた(Fucα1, 6)GlcNAc-H10-O18-A-3抗体溶液(PB中の19.5mg/mL(pH6.0)、3.77mL)を使用して実行して、H10-O18-A-3抗体-[MSG1-N₃]₂溶液(10mMの酢酸緩衝剤、5%のソルビトール中の10.6mg/mL(pH5.5)、6.50mL)を得た。

【0412】

(実施例20)

H2-C8-A-3-コンジュゲートの合成

ADCを、以下の反応式で例示されるようにして、実施例18の工程2で得られた抗体と、WO2019/065964の実施例3の手順に従って調製されたN-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-({[(11'S, 11'として)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{ [(11aS)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル)オキシ]-5'-オキソ-11', 11'a-ジヒドロ-1'H, 3'H-スピロ[シクロロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-カルボニル]オキシ}メチル)フェニル]-L-アラニンアミド(配列番号85として開示される「GGVA」)とをコンジュゲートすることによって合成した。合成の第1の工程は、図24に示される。工程1で形成されることになるトリアゾール環は、幾何異性を有し、工程1で得られた化合物は、図24でRとして示される2つの構造の混合物としてリンカーを有する。

【0413】

工程1：抗体H2-C8-A-3-[MSG1-N₃]₂及び薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例12と同じオペレーションを、H2-C8-A-3-[MSG1-N₃]₂溶液(10mMの酢酸緩衝剤、5%のソルビトール中の9.88mg/mL(pH5.5)、3.50mL)を使用して実行した。その結果として、H2-C8-A-3 ADC溶液(17.5mL)が得られ、さらに長期にわたり安定であった。

特徴付け：以下の特徴的な値を、一般的なオペレーションE(εA、280=220420、εA、329=0、εD、280=23155及びεD、329=19492を使用して)及びF(勾配プログラム1)を使用することによって得た。

抗体濃度：1.65mg/mL、抗体収量：29.0mg(84%)、抗体分子1個当たりのコンジュゲートした薬物分子の平均数(n)：1.9。

【0414】

(実施例21)

10

20

40

50

H 1 0 - O 1 8 - A - 3 - コンジュゲートの合成

A D Cを、以下の反応式で例示されるようにして、実施例 1 9 の工程 2 で得られた抗体と、W O 2 0 1 9 / 0 6 5 9 6 4 の実施例 3 の手順に従って調製された N - [4 - (1 1 , 1 2 - ジデヒドロジベンゾ [b , f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - バリル - N - [4 - ({ [(1 1 ' S , 1 1 ' として) - 1 1 ' - ヒドロキシ - 7 ' - メトキシ - 8 ' - [(5 - { [(1 1 a S) - 7 - メトキシ - 2 - (4 - メトキシフェニル) - 5 - オキソ - 5 , 1 0 , 1 1 , 1 1 a - テトラヒドロ - 1 H - ピロロ [2 , 1 - c] [1 , 4] ベンゾジアゼピン - 8 - イル] オキシ } ペンチル) オキシ] - 5 ' - オキソ - 1 1 ' , 1 1 ' a - ジヒドロ - 1 ' H , 3 ' H - スピロ [シクロプロパン - 1 , 2 ' - ピロロ [2 , 1 - c] [1 , 4] ベンゾジアゼピン] - 1 0 ' (5 ' H 1 0) - カルボニル] オキシ } メチル) フェニル] - L - アラニンアミド (配列番号 8 5 として開示される「G G V A」) とをコンジュゲートすることによって合成した。合成の第 1 の工程は、図 2 5 に示される。工程 1 で形成されることになるトリアゾール環は、幾何異性を有し、工程 1 で得られた化合物は、図 2 5 で R として示される 2 つの構造の混合物としてリンカーを有する。

【 0 4 1 5 】

工程 1 : 抗体 H 1 0 - O 1 8 - A - 3 - [M S G 1 - N ₃] ₂ 及び薬物リンカーのコンジュゲーション

実施例 1 2 と同じオペレーションを、H 1 0 - O 1 8 - A - 3 - [M S G 1 - N ₃] ₂ 溶液 (1 0 m M の酢酸緩衝剤、5 % のソルビトール中の 1 0 . 6 m g / m L (p H 5 . 5) 、3 . 5 0 m L) を使用して実行した。その結果として、H 1 0 - O 1 8 - A - 3 A D C 溶液 (1 7 . 5 m L) が得られ、さらに長期にわたり安定であった。

特徴付け：以下の特徴的な値を、一般的なオペレーション E (ϵA 、2 8 0 = 2 1 5 3 8 0、 ϵA 、3 2 9 = 0、 ϵD 、2 8 0 = 2 3 1 5 5 及び ϵD 、3 2 9 = 1 9 4 9 2 を使用して) 及び F (勾配プログラム 2) を使用することによって得た。

抗体濃度：1 . 7 9 m g / m L、抗体収量：3 1 . 3 m g (8 4 %)、抗体分子 1 個当たりのコンジュゲートした薬物分子の平均数 (n) : 1 . 9。

【 0 4 1 6 】

(実施例 2 2)

インビボにおける抗体 - 薬物コンジュゲートの抗腫瘍作用

実施例 1 7 と実質的に同じプロトコルを使用した。 2 2) - 1 抗腫瘍作用 - (1) D L L 3 陽性ヒト小細胞肺癌細胞株 N C I - H 5 1 0 A (A T C C) を、M a t r i g e l (C o r n i n g I n c .) に懸濁し、細胞懸濁液を、各雌ヌードマウスの右脇腹の領域に細胞 2 . 3 × 1 0 ⁶ 個の用量で皮下接種させた。腫瘍が定着した後、マウスをランダムにグループ分けした (グループ 1 つ当たり 6 匹のマウス) 。グループ分けの日、2 種の抗体 - 薬物コンジュゲート (H 2 - C 8 - A - 3 - コンジュゲート、H 1 0 - O 1 8 - A - 3 - コンジュゲート)、参照抗 D L L 3 抗体 - コンジュゲート (S C 1 6 L D 6 . 5)、又は抗 L P S 抗体 - コンジュゲートのそれぞれを、各マウスの尾部に 0 . 2 m g / k g の用量で静脈内投与した。図 2 6 に結果を示す。横座標は、投与後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、S E 値を示す。

【 0 4 1 7 】

この腫瘍モデルにおいて、抗 L P S 抗体 - コンジュゲートは、有意義な抗腫瘍作用を呈しなかった。この腫瘍モデルにおいて、参照抗 D L L 3 - 薬物コンジュゲート (S C 1 6 L D 6 . 5) は、ある程度の腫瘍増殖阻害を呈し、腫瘍退縮作用を生じなかった。一方で、これらのグループにおいて、2 種の両方の抗体 - 薬物コンジュゲート (H 2 - C 8 - A - 3 - コンジュゲート、H 1 0 - O 1 8 - A - 3 - コンジュゲート) が、腫瘍体積を減少させ、腫瘍の全てが、投与後の 2 8 日に、それらの最初の体積より小さくなった。H 2 - C 8 - A - 3 - コンジュゲート及び H 1 0 - O 1 8 - A - 3 - コンジュゲートはさらに、S C 1 6 L D 6 . 5 より腫瘍体積を減少させた。したがって、本発明の 2 種の抗体 - 薬物コンジュゲート (H 2 - C 8 - A - 3 - コンジュゲート、H 1 0 - O 1 8 - A - 3 - コン

ジュゲート)は、SC16LD6.5抗体薬物コンジュゲートと比較して、抗腫瘍剤として作用する抗体-薬物コンジュゲートとして優れている(図26)。加えて、各抗体-薬物コンジュゲートで処置したマウスは、わずかな体重の減少を示すか又は体重の減少を示さず、これは、これらの抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-3-コンジュゲート、H10-O18-A-3-コンジュゲート)は、毒性が低く安全であることを示唆している。グループのマウスのうちの少なくとも1匹の推測された腫瘍体積が3000mm³を超えるか、又はグループのマウスのうちの少なくとも1匹の腫瘍の長径が20mmを超えた場合、ビヒクル及び抗LPS抗体-コンジュゲートグループを安楽死させた。

【0418】

22)-2抗腫瘍作用-(2)

DLL3陽性ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H209(ATCC)を、Matrigel(Corning Inc.)に懸濁し、細胞懸濁液を、各雌ヌードマウスの右脇腹の領域に細胞4×10⁶個の用量で皮下接種させた。腫瘍が定着した後、マウスをランダムにグループ分けした(グループ1つ当たり5匹のマウス)。グループ分けの日に、2種の抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-3-コンジュゲート、H10-O18-A-3-コンジュゲート)のそれぞれを、各マウスの尾部に0.4mg/kgの用量で静脈内投与した。図27に結果を示す。横座標は、投与後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、SE値を示す。

【0419】

これらのグループにおいて、2種の両方の抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-3-コンジュゲート、H10-O18-A-3-コンジュゲート)が、腫瘍体積を減少させ、腫瘍の全てが、投与後の28日に、それらの最初の体積より小さくなった。加えて、各抗体-薬物コンジュゲートで処置したマウスは、わずかな体重の減少を示すか又は体重の減少を示さず、これは、2種の両方の抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-3-コンジュゲート、H10-O18-A-3-コンジュゲート)は、毒性が低く安全であることを示唆している。

【0420】

22)-3抗腫瘍作用-(3)

DLL3陽性ヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H82(ATCC)を、Matrigel(Corning Inc.)に懸濁し、細胞懸濁液を、各雌ヌードマウスの右脇腹の領域に細胞1×10⁶個の用量で皮下接種させた。腫瘍が定着した後、マウスをランダムにグループ分けした(グループ1つ当たり6匹のマウス)。グループ分けの日に、2種の抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-3-コンジュゲート、H10-O18-A-3-コンジュゲート)、参照抗DLL3抗体-コンジュゲート(SC16LD6.5)又は抗LPS抗体-コンジュゲートのそれぞれを、各マウスの尾部に0.4mg/kgの用量で静脈内投与した。図28に結果を示す。横座標は、投与後の日数を示し、縦座標は、推測された腫瘍体積を示す。誤差範囲は、SE値を示す。

【0421】

この腫瘍モデルにおいて、抗LPS抗体-コンジュゲートは、有意義な抗腫瘍作用を呈しなかった。この腫瘍モデルにおいて、参照抗DLL3-薬物コンジュゲート(SC16LD6.5)は、ある程度の腫瘍増殖阻害を呈し、腫瘍退縮作用を生じなかった。一方で、これらのグループにおいて、2種の両方の抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-3-コンジュゲート、H10-O18-A-3-コンジュゲート)が、腫瘍体積を減少させ、腫瘍の全てが、投与後の28日に、それらの最初の体積より小さくなった。H2-C8-A-3-コンジュゲート及びH10-O18-A-3-コンジュゲートはさらに、SC16LD6.5より腫瘍体積を減少させた。したがって、本発明の2種の抗体-薬物コンジュゲート(H2-C8-A-3-コンジュゲート、H10-O18-A-3-コンジュゲート)は、SC16LD6.5抗体薬物コンジュゲートと比較して、抗腫瘍剤として作用する抗体-薬物コンジュゲートとして優れている。加えて、各抗体-薬物コンジュゲートで処置したマウスは、わずかな体重の減少を示すか又は体重の減少を示さず、これ

10

20

30

40

50

は、2種の両方の抗体-薬物コンジュゲート（H2-C8-A-3-コンジュゲート、H10-O18-A-3-コンジュゲート）は、毒性が低く安全であることを示唆している。グループのマウスのうちの少なくとも1匹の推測された腫瘍体積が3000mm³を超えた場合、抗LPS抗体-コンジュゲートグループを安楽死させた。

【0422】

（実施例23）

ICRマウスにおける抗体-薬物コンジュゲートの毒性又は許容できる用量

23)-1 ICRマウスにおける許容できる用量-(1)

対照：5週齢のCD1（ICR）雄マウス（日本チャールス・リバー株式会社）をランダムにグループ分けした（グループ1つ当たり5匹のマウス）。グループ分けの日に、2種の抗体-薬物コンジュゲート（H2-C8-A-3-コンジュゲート、又はH10-O18-A-3-コンジュゲート）のそれぞれを、各マウスの尾部に、3、6、又は10mg/kgの用量で静脈内投与した。マウスを、死亡率に関して週数回観察し、投与後の41日間、体重を測定した。

【0423】

この実験の間、H2-C8-A-3-コンジュゲートで処置したマウスは全て生存した。H2-C8-A-3-コンジュゲートで処置したマウスは、この実験の間、試験されたとの用量でも（3、6、10mg/kg）、わずかな体重の減少を示すか又は体重の減少を示さなかった。この実験の間、H10-O18-A-3-コンジュゲートで処置したマウスは全て生存した。H10-O18-A-3-コンジュゲートで処置したマウスは、この実験の間、試験されたとの用量でも（3、6、10mg/kg）、わずかな体重の減少を示すか又は体重の減少を示さなかった。

【0424】

23)-2 ICRマウスにおける許容できる用量-(2)

対照：5週齢のCD1（ICR）雌マウス（日本チャールス・リバー株式会社）をランダムにグループ分けした（グループ1つ当たり5匹のマウス）。グループ分けの日に、のそれぞれ2種の抗体-薬物コンジュゲート（H2-C8-A-3-コンジュゲート、又はH10-O18-A-3-コンジュゲート）のそれぞれを、各マウスの尾部に、3、6、又は10mg/kgの用量で静脈内投与した。マウスを、死亡率に関して週数回観察し、投与後の41日間、体重を測定した。

【0425】

この実験の間、H2-C8-A-3-コンジュゲートで処置したマウスは全て生存した。H2-C8-A-3-コンジュゲートで処置したマウスは、この実験の間、試験されたとの用量でも（3、6、10mg/kg）、体重の減少を示さなかったか又はわずかな体重の減少を示した。この実験の間、H10-O18-A-3-コンジュゲートで処置したマウスは全て生存した。H10-O18-A-3-コンジュゲートで処置したマウスは、この実験の間、試験されたとの用量でも（3、6、10mg/kg）、わずかな体重の減少を示すか又は体重の減少を示さなかった。

【0426】

産業上の利用可能性：本発明は、内在化活性を有する抗DLL3抗体及びその抗体を含む抗体-薬物コンジュゲートを提供する。抗体-薬物コンジュゲートは、がんなどのための治療薬物として使用することができる。実際に、前述の実施例及び開示は、本発明の技術のADC組成物が、DLL3関連がん（例えば、小細胞肺癌（SCLC）、大細胞神経内分泌癌（LCNEC）、腎臓、尿生殖路（膀胱、前立腺、卵巣、子宮頸、及び子宮内膜）、消化管（胃、結腸）、甲状腺（甲状腺髄様がん）、脾臓及び肺を含む様々な組織の神経内分泌腫瘍、神経膠腫又は偽性神経内分泌腫瘍（pNET））に罹っている対象を処置するための方法において有用であることを実証する。

10

20

30

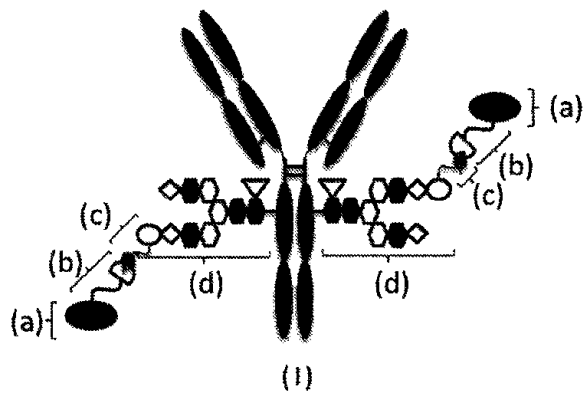
40

50

【図面】

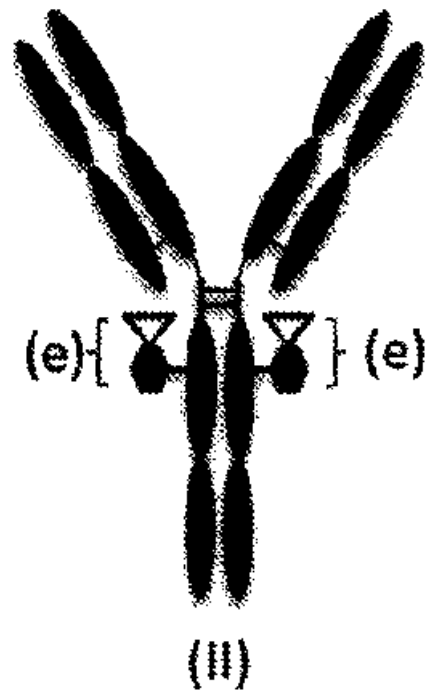
【図 1】

FIG. 1



【図 2 A】

A

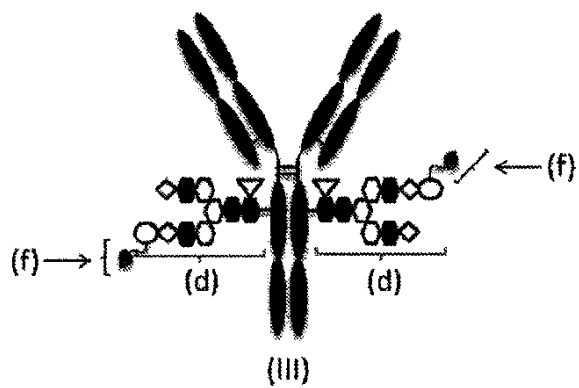


10

20

【図 2 B】

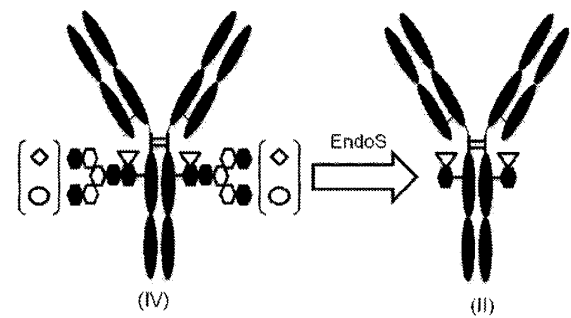
B



【図 3】

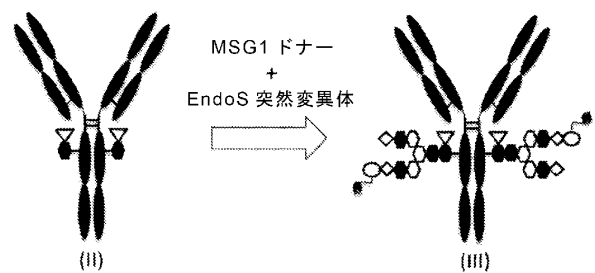
FIG. 3

A



30

B



40

50

【図 4 A - 1】

FIG. 4A

>NM_016941.4 ヒトデルタ様の正規の Notch リガンド 3(DLL3)、
転写バリエーション 1、mRNA(配列番号 55)

```
ACTCCGAGACCCCCACCAGAGGCGATGGTCTCCCAACGAGTGTCCGGGCTCCTCTCCAGACTGTG
ATCCTAGCGCTCATTTTCCTCCCCAGACAGCCGCGTGGCGTCTTCGAGCTGCAGATCCACTCTTTTCG
GGCGGGGTCCAGGCCCTGGGGCCCCGGTCCCCCTGCAGCGCCCGGCTCCCTGCCGCTCTCTTCAG
AGTCTGCTGAAGCCTGGGCTCTCAGAGAGAGCGCCGAGTCCCGTGCAGCTGGCGGCTGGCGCGCGCTGAGT
GCGCGCGGACCGGTCTACACGAGCAGCCCGGAGCGCCGCGCTGATCTCCCACTGCCGAGCGGCTCT
TGCAGGTGCCCTTCCGGAGCGCTGGCTGGCACTTCTCTTTCATCATCGAAACCTGAGAGAGAGATT
AGGAGACAGATTGGAGGGCCCGCTGGAGCGCTGTGGCGCGCTGGCTGGCAGGGCGGCTTGGCAGCC
GGAGGCCGCTGGGCCCGGACATTACGCGCGCAGCGCGCTGGAGCTGCGCTTCTGTACCGCGCGGCT
GGAGCGCGCTGCCGTGGGACCGCTGCAGCGCTTGCCTGCCGCGCAGCGCCCTCGCGGTGCGG
TCCGGGACTGCGCCCTGCGCCGCTCGAGGACGAATGTAGGCGCGCTGGTGTGCGGAGCAGGCTGC
AGCCTGAGCATGGCTTCTGTGAACAGCCCGTGAATCCGATGCCAGAGGCTGGACTGGACCCCTCT
GCAGGTCCTCTGTCTCCACGAGCGCTGCCCTCAGCCCCAGGGGCCGCTCTCTGCTACACCGGATGCT
TGTCTCTGGGCTTGGGCCCTGTGAGGAAACCGTGTGCCAATGGAGGACGCTGTAGTGAGACACCCAGG
TCTTTGAATGCACCTGCCCGCTGGTCTACGGGCTGCGGTGTGAGGTGAGCGGGGTGACATGTGCAG
ATGAGCCCTGCTTCAACGGCGGCTTGTGTGCGGGGTGCAGACCTGACTTGCCTACATCTGCCACTG
CCACCCGGTTTCCAAGGCTCCAATGTGAGAAGAGGGTGACCGGTGCAGCTGCAGCCATGCCGAAT
GGCGGACTTGCCTGGAACCTGGGCGACGCGCTGCGCTGCCGCTGCCGCGCGGCTTCCGGGTCTCTGCT
GCGAGCAGGACTTGCAGGACTGCGCGGCGCGGCTGCGCTAACGCGCGCAGCTGTGTGAGGGCGGCGG
CGCGCACGCTGCTCTGCGCGCTGGGCTTGGCGGCGCGGACTGCCGCGAGCGCGGACCGCTGCCGCG
GCGCGCCCTGTGCTCAGCGCGCGCGCTGCTACGCGCACTTCTCCGCGCTGCTGCGCTTGGCTTCCG
GCTACATGGGAGCGCGGTGTAGTTCCCATGTCACCGCGAGCGCGCAAGCGCTTCCCGCGCGCGCGG
GGGCTCAGGCCCGGGACCTCAGCGCTACCTTTTGGCTCCGGCTTGGGACTGCTGTCGCGCGCGGCG
GTGGCCGGCGCTGCGCTTGTGCTGTGCTACAGTGCAGCGCGGCTGGCGCACTCCAGGATGCTGGGCTGCGT
TGCTGGCTGGGACCCCGGAGCGCTCAGTCCACGCACTCCCGGATGCATCAACAACCTAAGGACGAGGA
GGGTTCGGGGATGGTCCGAGCTGCTCCGTAGATTGGAATGCGCTGAAGATGTAGACCTCAAGGGATT
```

【図 4 B - 1】

FIG. 4B

>NM_203486.3 ヒトデルタ様の正規の Notch リガンド 3(DLL3)、
転写バリエーション 2、mRNA(配列番号 56)

```
ACTCCGAGACCCCCACCAGAGGCGATGGTCTCCCAACGAGTGTCCGGGCTCCTCTCCAGACTGTG
ATCCTAGCGCTCATTTTCCTCCCCAGACAGCCGCGTGGCGTCTTCGAGCTGCAGATCCACTCTTTTCG
GGCGGGGTCCAGGCCCTGGGGCCCCGGGCTCCCCCTGCAGCGCCCGGCTCCCTGCCGCTCTCTTCAG
AGTCTGCTGAAGCCTGGGCTCTCAGAGAGGCGCCGAGTCCCGGTGCGGCTGGCGCGCGGCTGAGT
GCGCGCGGACCGGTCTACACGAGCAGCCCGGAGCGCGCGCTGATCTCCCACTGCCGAGCGGCTCT
TGCAGGTGCCCTTCCGGGACGCTGGCTGGCACTTCTCTTTCATCATCGAAACCTGAGAGAGAGATT
AGGAGACAGATTGGAGGGCCCGCTGGAGCTGCTGGCGCGGCTGGCAGCGCGGCTTGGCAGCC
GGAGGCCGCTGGGCCCGGACATTACGCGCGCAGCGGCTGGAGGCTGGCTTCTGTCAGCGCGCGCT
GCGAGCGGCTGCCGTGGGACCGGCTGCAGCGGCTTGGCGCGGAGCGCCCTCGCGGTGCGG
TCCGGGACTGCGCCCTGCGCACCGCTCGAGGACGAATGTGAGGCGCGCTGGTGTGCCGAGCAGGCTGC
AGCCTGAGCATGGCTTCTGTGAACAGCGCGGTGAATGCCGATGCCAGAGGCTGGACTGAGCCCTCT
GCAGGTCCTGCTCCACGAGCAGCTGCCCTCAGCCCCAGGGGCCGCTCTCTGCTACACCGGATGCCCT
TGTCTCTGGGCTGGGCCCTGTGAGGGGAACCGGTGTGCCAATGGAGGACGCTGTAGTGAGACACCCAGG
TCTTTGAATGCACCTGCCCGCTGGTCTACGGGCTGCGGTGTGAGGTGAGCGGGGTGACATGTGCAG
ATGAGCCCTGCTTCAACGGCGGCTTGTGTGCGGGGTGCAGACCTGACTTGCCTACATCTGCCACTG
CCACCCGGTTTCCAAGGCTCCAATGTGAGAAGAGGTTGACCGGTCAGGCTGCAGCATGCCGAAT
GGCGGACTTGCCTGGAACCTGGGCGACGCGCTGCGTGCAGTGGCGCGCGGCTTGGCGGCTCTCGCT
GCGAGCAGCAGCTTGCAGACTTGGCGGGCGCGCTGCGCTGAGGCTGAGCGCGGCGGCTGTGTGAGGGCGGCGG
CGCGCACGCTGCTCTGCGCGCTGGGCTTGGCGGCGGAGCTGCCGCGAGCGCGGACCGCTGCGCG
GCGCGCCCTGTGCTCAGCGCGCGCGCTGCTACGCCACTTCTCGGCGCTGCTGCGGCTTGGCTCCCG
GCTACATGGGAGCGCGGTGTGAGTTCCAGTGCACCGGAGCGCGCAAGCGCTTGCCGCGGCGCGCG
GGGCTCAGGCCCGGGACCTCAGCGCTACCTTTTGGCTCCGGCTTGGGACTGCTGTCGCGCGGCGG
GTGGCGGGCGCTGCGCTTGTGCTGTGCTACAGTGCAGCGCGGCTGGCGCACTCCAGGATGCTGGGCTCTGCT
TGCTGGCTGGGACCCCGGAGCGGCTCAGTCCACGCACTCCCGGATGCATCAACAACCTAAGGACGAGGA
GGGTTCGGGGATGGTCCGAGCTGCTCCGTAGATTGGAATGCGCTGAAGATGTAGACCTCAAGGGATT
```

【図 4 B - 2】

FIG. 4B

>NM_203486.3 ヒトデルタ様の正規の Notch リガンド 3(DLL3)、
転写バリエーション 2、mRNA(配列番号 56)

```
ACTCCGAGACCCCCACCAGAGGCGATGGTCTCCCAACGAGTGTCCGGGCTCCTCTCCAGACTGTG
ATCCTAGCGCTCATTTTCCTCCCCAGACAGCCGCGTGGCGTCTTCGAGCTGCAGATCCACTCTTTTCG
GGCGGGGTCCAGGCCCTGGGGCCCCGGGCTCCCCCTGCAGCGCCCGGCTCCCTGCCGCTCTCTTCAG
AGTCTGCTGAAGCCTGGGCTCTCAGAGAGGCGCCGAGTCCCGGTGCGGCTGGCGCGCGGCTGAGT
GCGCGCGGACCGGTCTACACGAGCAGCCCGGAGCGCGCGCTGATCTCCCACTGCCGAGCGGCTCT
TGCAGGTGCCCTTCCGGGACGCTGGCTGGCACTTCTCTTTCATCATCGAAACCTGAGAGAGAGATT
AGGAGACAGATTGGAGGGCCCGCTGGAGCTGCTGGCGCGGCTGGCAGCGCGGCTTGGCAGCC
GGAGGCCGCTGGGCCCGGACATTACGCGCGCAGCGGCTGGAGGCTGGCTTCTGTCAGCGCGCGCT
GCGAGCGGCTGCCGTGGGACCGGCTGCAGCGGCTTGGCGCGGAGCGCCCTCGCGGTGCGG
TCCGGGACTGCGCCCTGCGCACCGCTCGAGGACGAATGTGAGGCGCGCTGGTGTGCCGAGCAGGCTGC
AGCCTGAGCATGGCTTCTGTGAACAGCGCGGTGAATGCCGATGCCAGAGGCTGGACTGAGCCCTCT
GCAGGTCCTGCTCCACGAGCAGCTGCCCTCAGCCCCAGGGGCCGCTCTCTGCTACACCGGATGCCCT
TGTCTCTGGGCTGGGCCCTGTGAGGGGAACCGGTGTGCCAATGGAGGACGCTGTAGTGAGACACCCAGG
TCTTTGAATGCACCTGCCCGCTGGTCTACGGGCTGCGGTGTGAGGTGAGCGGGGTGACATGTGCAG
ATGAGCCCTGCTTCAACGGCGGCTTGTGTGCGGGGTGCAGACCTGACTTGCCTACATCTGCCACTG
CCACCCGGTTTCCAAGGCTCCAATGTGAGAAGAGGTTGACCGGTCAGGCTGCAGCATGCCGAAT
GGCGGACTTGCCTGGAACCTGGGCGACGCGCTGCGTGCAGTGGCGCGGCTTGGCGGCTCTCGCT
GCGAGCAGCAGCTTGCAGACTTGGCGGGCGCGCTGCGCTGAGGCTGAGCGCGGCGGCTGTGTGAGGGCGGCGG
CGCGCACGCTGCTCTGCGCGCTGGGCTTGGCGGCGGAGCTGCCGCGAGCGCGGACCGCTGCGCG
GCGCGCCCTGTGCTCAGCGCGCGCGCTGCTACGCCACTTCTCGGCGCTGCTGCGGCTTGGCTCCCG
GCTACATGGGAGCGCGGTGTGAGTTCCAGTGCACCGGAGCGCGCAAGCGCTTGCCGCGGCGCGCGG
GGGCTCAGGCCCGGGACCTCAGCGCTACCTTTTGGCTCCGGCTTGGGACTGCTGTCGCGCGGCGG
GTGGCGGGCGCTGCGCTTGTGCTGTGCTACAGTGCAGCGCGGCTGGCGCACTCCAGGATGCTGGGCTCTGCT
TGCTGGCTGGGACCCCGGAGCGGCTCAGTCCACGCACTCCCGGATGCATCAACAACCTAAGGACGAGGA
GGGTTCGGGGATGGTCCGAGCTGCTCCGTAGATTGGAATGCGCTGAAGATGTAGACCTCAAGGGATT
```

【図 4 A - 2】

FIG. 4A CON'T

```
TATGTGCATATCTGCTCCTCCATCTACGCTCGGGAGGTAGCGAGCGCCCTTTCCCCCGGTACACACTG
GGCGCGCTGGGCAGAGGCGAGCACTGCTTTTCCCTACCTCTCCCTGATCTGCTCGGTGAAATGAATTGG
GTAGAGTCTCTGGAAGGTTTAAAGCCATTTTCAGTTCTTACTTTCATCCTATTTTGCATCCCTCT
TATCGTTTTCGAGTACCTGCACTCTCTCTTTGAAAAACCTATGGGCTTGAGGAGGTACGATGCCGACT
CCGCCAGAGCTTTTCCACTGATTGTACTCAGCGGGGAGGCGAGGGGAGGAGGGGCGAGCCTCTCTAATG
CTTCTACTCATTTTGTGTTTCTAGGCTGACGCGTCTCTCCATCCGCACTGGAGTCAGAGCGTGGATT
TTGTATTTTGCCTGGTGGTCCAGTCTCTGCCCGAGAGGCTTTGGAGTTCAATCTTGAAGGGGTGCTGG
GGGAACCTTACTGTTGCAAGTTGTAATAATGGTTATTTATATCTATTTTCTCACCCCATCTCTCTA
GAAACACCTATAAAGGCTATTATTGTGATCA
```

>NP_058637.1 デルタ様タンパク質 3 アイソフォーム 1 前駆体[ヒト](配列番号 50)

```
MVSPRMSGSLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQHSFPGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSE
EAAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVFRDWPWGTFSSFIETWREELGDQIGGPAW
SLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRAREPFAVGTAACRLCRPSAPSRGCGPLRCPAPL
EDECAPIVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSATTGCLVPGPGPCDG
NPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPFNGGLCVGGADPDSAYICHCPFGFGSSNC
EKVRDRCSLQPCRNGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSALG
FGGRDCRERADPCARPACAHGGRCYAHFSLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGSALPAAPPGLRPGDPQR
YLLPAPLGLLVAAGVAGAAALLLVHVRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRQTGEGSGDGPSS
VDWNRPEVDVDPQGIYVISAFSIYAREVATPLFPPIHTGRAGQQRHLLFPYPSILSVK
```

【図 4 B - 2】

FIG. 4B CON'T

```
TATGTGCATATCTGCTCCTCCATCTACGCTCGGGAGGCTGACGCGTCTCTCCATCCGCACTGGAGTC
AGAGCTGGATTTTTGTATTTGCTCGGTGGTCCGAGTCTCTGCCCGAGAGGCTTTGGAGTTCAATCTTG
AAGGGGTGCTGGGGGAACCTTACTGTTGCAAGTTGTAATAATGGTTATTTATATCTATTTTCTCA
CCCCATCTCTAGAAACACCTATAAAGGCTATTATTGTGATCA
```

>NP_282353.1 デルタ様タンパク質 3 アイソフォーム 2 前駆体[ヒト](配列番号 51)

```
MVSPRMSGSLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQHSFPGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSE
EAAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVFRDWPWGTFSSFIETWREELGDQIGGPAW
SLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRAREPFAVGTAACRLCRPSAPSRGCGPLRCPAPL
EDECAPIVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSATTGCLVPGPGPCDG
NPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPFNGGLCVGGADPDSAYICHCPFGFGSSNC
EKVRDRCSLQPCRNGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSALG
FGGRDCRERADPCARPACAHGGRCYAHFSLVCACAPGYMGARCEFPVHPDGSALPAAPPGLRPGDPQR
YLLPAPLGLLVAAGVAGAAALLLVHVRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRQTGEGSGDGPSS
VDWNRPEVDVDPQGIYVISAFSIYAREVATPLFPPIHTGRAGQQRHLLFPYPSILSVK
```

10

20

30

40

50

【図 5 A】

FIG. 5A

7-I1-B の重鎖可変ドメイン(V_H)のヌクレオチド配列(配列番号 1)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTT
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAACACCTGGATGAGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTATTTAAAGCAAT
CTGATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTGAAAGGCAGATTACCATCT
CAAGAGATGATTCAAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCG
AGGACACAGCCGTATTACTGTACCCAGTATTATTGGAACCTCTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA

7-I1-B の重鎖可変ドメイン(V_H)のアミノ酸配列(配列番号 2)

EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSNTWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKS
DGGTIDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTQYTWNSFDIWGQ
GTLVTVSS

【図 6 A】

FIG. 6A

2-C8-A の重鎖可変ドメイン(V_H)のヌクレオチド配列(配列番号 11)。

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCAG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGAACCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGGAAGAT
GGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAACGCCAAGAACTACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC
ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCCGGGCTGGGCTCCCTTTGACTACTGGG
GCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA

2-C8-A の重鎖可変ドメイン(V_H)のアミノ酸配列(配列番号 12)。

EVQLVESGGGLVPGGSQLRLSCAASGFTFSYWMNWVRQAPGKGLEWVANIKEDG
SEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYQMNSLRAEDTAVYYCARDPGWAFDIEWGQ
GTLVTVSS

【図 5 B】

FIG. 5B

7-I1-B の軽鎖可変ドメイン(V_L)のヌクレオチド配列(配列番号 6)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACTATTTAAATTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAGGCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCATCCAATTTGGA
AACAGGGGTCCCAICAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTCATTTC
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGTATG
ATAATCTCCCGTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

7-I1-B の軽鎖可変ドメイン(V_L)のアミノ酸配列(配列番号 7)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLETG
VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLPLTFGGGTKEIK

【図 6 B】

FIG. 6B

2-C8-A の軽鎖可変ドメイン(V_L)のヌクレオチド配列(配列番号 16)。

GACATCCAGATGTCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAG
TCACCATCACTTGTTCGGGCGAGTCAGGGCATTAGCAATTATTAGCCTGGTTTCA
GCAGAAACCAGGGAAGGCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGA
AAGTGGGGTCCCATCAAAGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCCTCTC
GCCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGAACCTATTACTGCCAACAGTATA
ATAGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCACGCTGGAGATCAAA

2-C8-A の軽鎖可変ドメイン(V_L)のアミノ酸配列(配列番号 17)。

DIQMSQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWFQKPGKAPKSLIYAASSLQSGV
PSKFSGSGSGTDFTLAISSIQPEDFATYYCQQYNSFPYIFGQGTTLFIK

10

20

30

40

50

【図 7 A】

FIG. 7A

10-O18-A の重鎖可変ドメイン(V_H)のヌクレオチド配列(配列番号 21)。
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTG
TCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAATAGTTACTACTGGAGCTGGA
TCCGGCAGCCCCAGGGAAGGACTGGAGTGGATTGGGTATATCTTTTACAGTG
GGATCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCATTAGACAC
GTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATCGGCGTGGCTGGTTTTACTTTGACTACTGGGGCC
AGGGAACCCTGGTACCGCTCTCTCA

10-O18-A の重鎖可変ドメイン(V_H)のアミノ酸配列(配列番号 22)。

QVQI.QFSGPGLVKPSETI.SI.TCTVSGGSINSYVSWIRQPPGKGLFWIGVIFYSGITN
YNPSLKSRVTISLDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARRLAGFTFDWGQGLVT
VSS

【図 8 A】

FIG. 8A

6-G23-F の重鎖可変ドメイン(V_H)のヌクレオチド配列(配列番号 31)。
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGIGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTG
AAGGTTTCTGCAAGGCACTGGATACACCTTACCAGCTACTATATACACTGGG
TGCGACAGGCCCCGAGCAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCGACCCAAGTG
ATGGTAGCACAACACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGG
ACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGGAATATACTACTACGGTTTGGACGT
CTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCA

6-G23-F の重鎖可変ドメイン(V_H)のアミノ酸配列(配列番号 32)。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWMGHIDPSD
GSTNYAQKFQGRVTIMRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDREYNYYGLDFWG
QGTTTVSS

【図 7 B】

FIG. 7B

10-O18-A の軽鎖可変ドメイン(V_L)のヌクレオチド配列(配列番号 26)。
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTA
CCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG
GGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAGTGCCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC
TCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAG
TATGGTACCTACCGCTCACTTTTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAGATCAAA

10-O18-A の軽鎖可変ドメイン(V_L)のアミノ酸配列(配列番号 27)。

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLIYGASSRATG
IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSLPTFGGGTKVEIK

10

【図 8 B】

FIG. 8B

6-G23-F の軽鎖可変ドメイン(V_L)のヌクレオチド配列(配列番号 36)。
GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCITGGACAGCCGG
CCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACCGTGATGGAAACACCTA
CTTGAATTGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAG
GTTTCTAACCGGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCCGCGGCAGTGGGTCAGGC
ACTGATTTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT
ACTGCATGCAAGGTACACACTGGCCTCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGG
AAATCAAA

6-G23-F の軽鎖可変ドメイン(V_L)のアミノ酸配列(配列番号 37)。

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYRDGNTYLNWFQRPQSPRRLIYKVS
NRDSGVPDRFRGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPPTFGGGTKVEIK

20

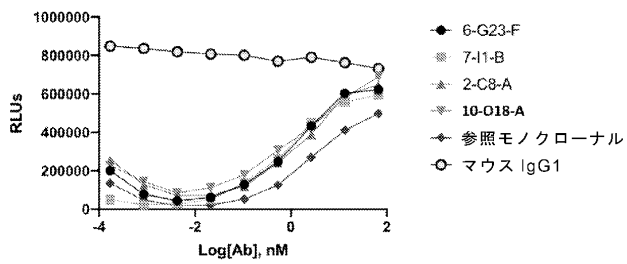
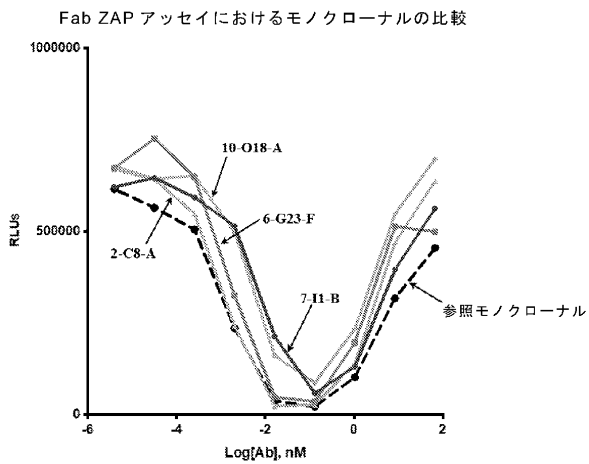
30

40

50

【図 9】

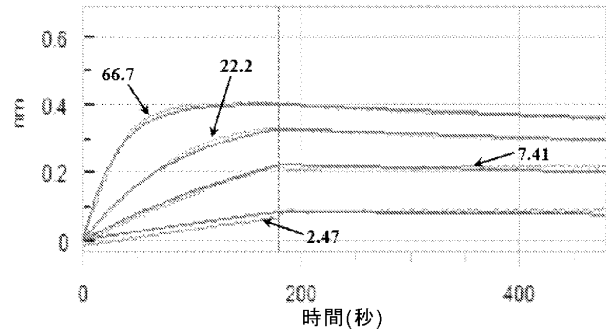
FIG. 9



【図 10 A】

FIG. 10A

ローディングサンプル番号:7-I1-B;サンプル番号:hDLL3;
KD(M):6.856E-10-濃度単位(nM)



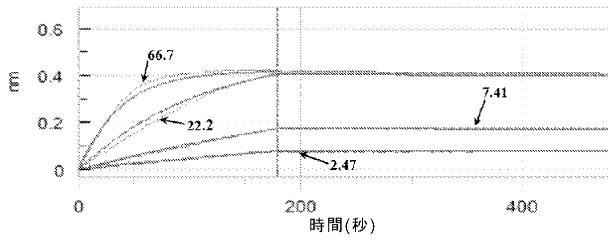
10

20

【図 10 B】

FIG. 10B

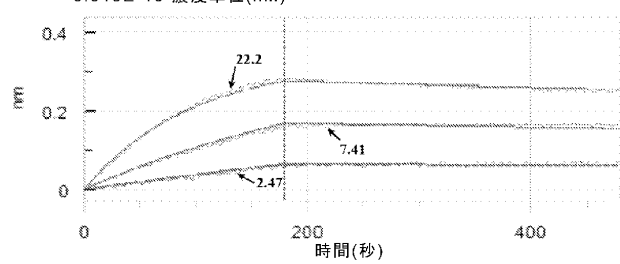
ローディングサンプル番号:6-G23-F;サンプル番号:hDLL3;KD(M):
1.604E-10-濃度単位(nM)



【図 10 C】

FIG. 10C

ローディングサンプル番号:10-O18-A;サンプル番号:hDLL3;KD(M):
6.015E-10-濃度単位(nM)



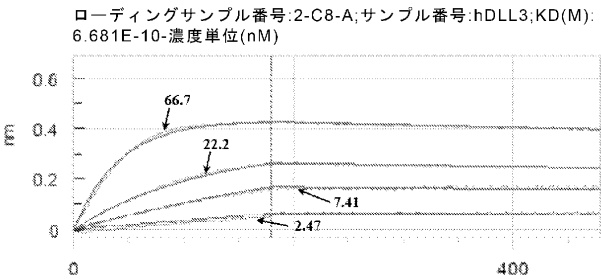
30

40

50

【図 10 D】

FIG. 10D



【図 10 E】

FIG. 10E

	Kd nM	Kon (1/Ms)	Kdis(1/s)	全 X^2	全 R^2
7-I1-B	0.68	5.02E+05	3.44E-04	0.168	0.99
10-O18-A	0.62	4.49E+05	2.67E-04	0.038	0.97
6-G23-F	0.16	4.05E+05	6.49E-05	0.15	0.97
2-C8-A	0.668	3.63E+05	2.42E-04	0.073	0.99

【図 11】

FIG. 11

モノクローナル	DLL3	DLL4	DLL1
10-O18-A	1.361	0.056	0.126
2-C8-A	1.359	0.07	0.098
6-G23-F	1.459	0.05	0.206
7-I1-B	1.302	0.96	0.127
バックグラウンド[抗マウス IgG HRPO]	0.085	0.085	0.095

【図 12】

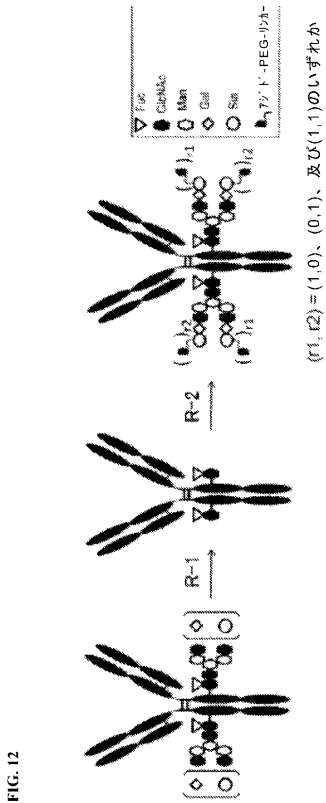
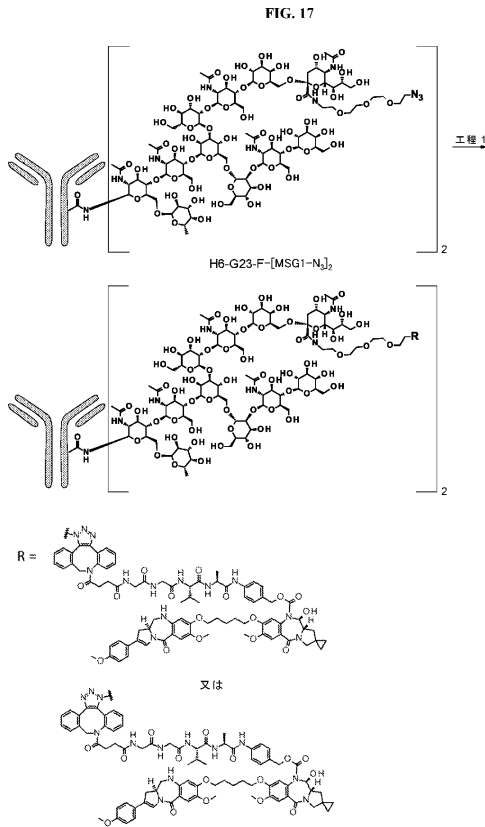
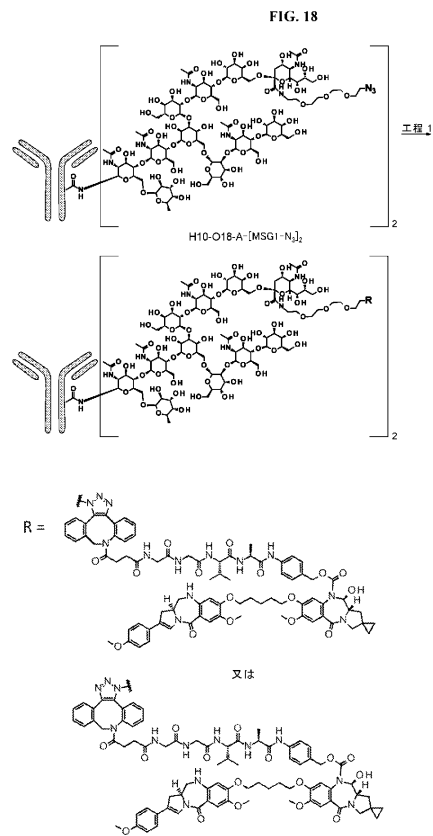


FIG. 12

【図 17】



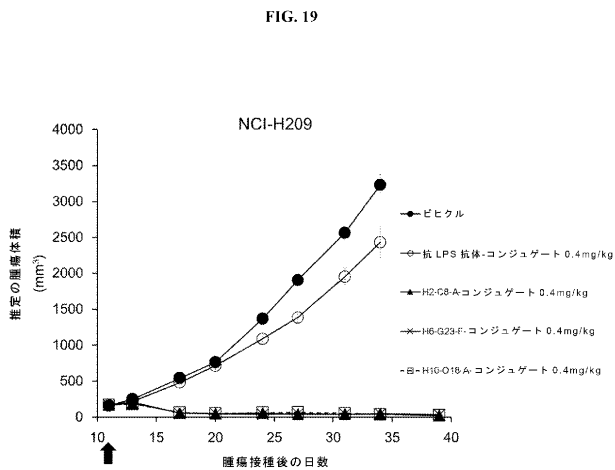
【図 18】



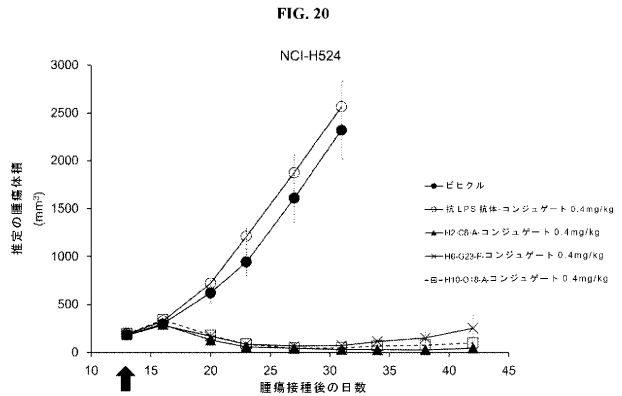
10

20

【図 19】



【図 20】

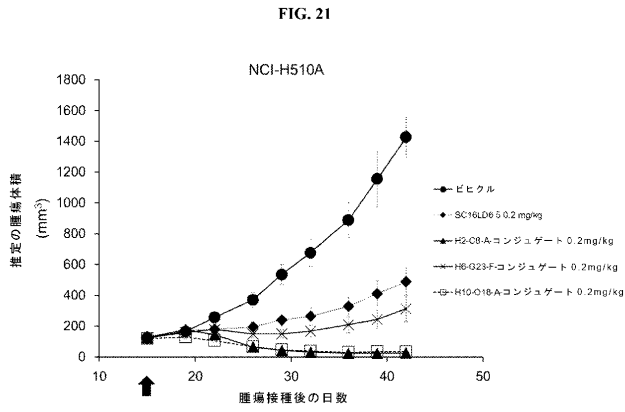


30

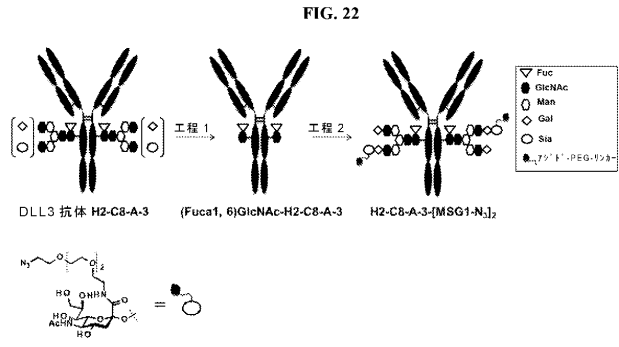
40

50

【図 2 1】

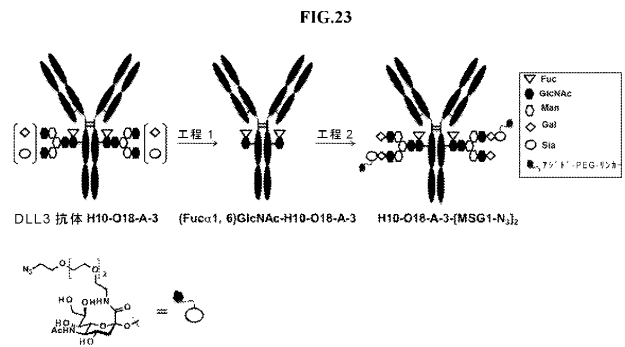


【図 2 2】

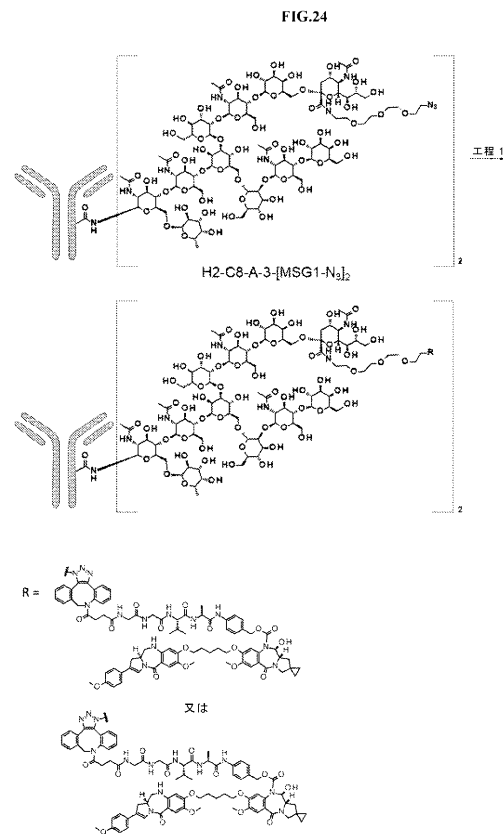


10

【図 2 3】



【図 2 4】



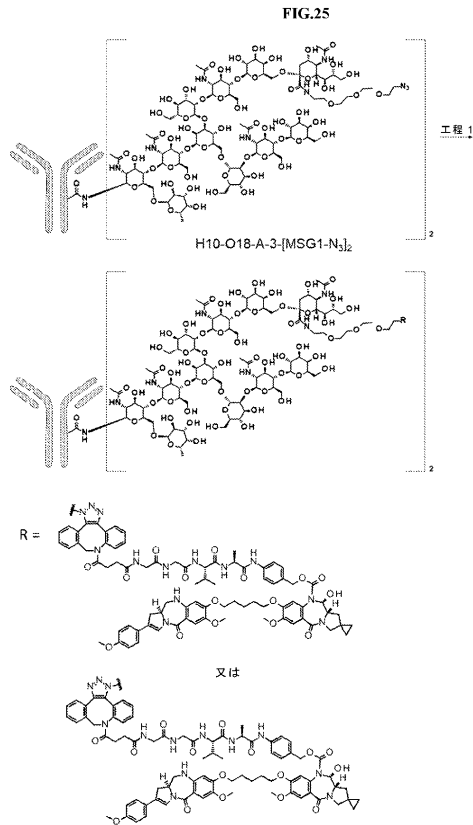
20

30

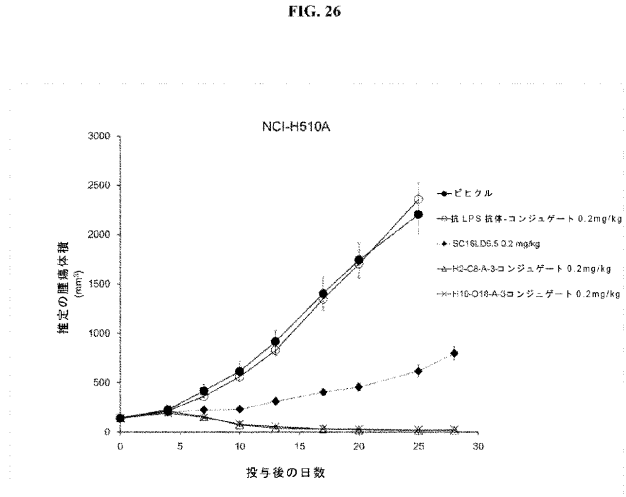
40

50

【図 25】



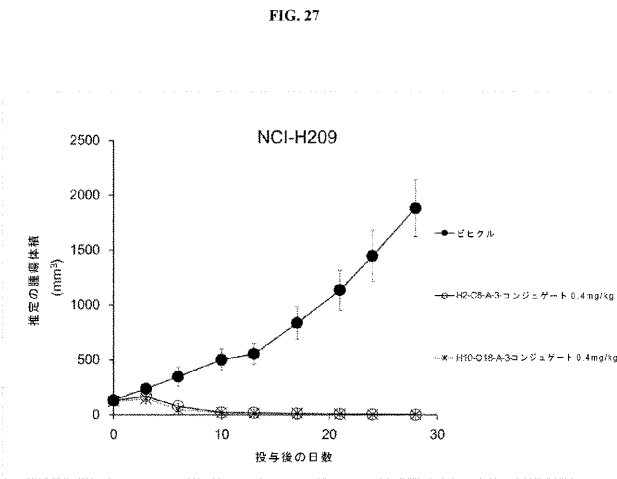
【図 26】



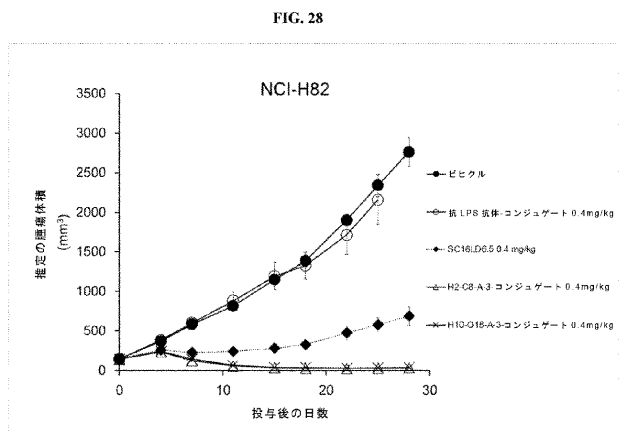
10

20

【図 27】



【図 28】



30

40

【配列表】

202450365700001.app

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/050219

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K A61P

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3 690 038 A1 (DAIICHI SANKYO CO LTD [JP]) 5 August 2020 (2020-08-05)	1, 9-12, 15-49, 59, 63-75
Y	paragraphs [0195], [0336]	2-8, 13, 14,
A	page 11, lines 33-36	50-58, 61
	page 19, lines 44-45	60, 62
	page 20, line 54 - page 21, line 4	
	paragraphs [0183], [0190], [0193], [0298], [0299]	
	paragraphs [1239], [1240]; example 139	
	claims 1-29, 55-57, 60-76, 79-82	

Y	WO 2019/234220 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]) 12 December 2019 (2019-12-12)	2-6, 8, 50-52, 56
	sequences 7, 8, 25-27, 40, 74, 152, 210, 224, 243	

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 2022

Date of mailing of the international search report

21/04/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Villard, Anne-Laure

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/050219

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2017/218078 A1 (RAUM TOBIAS [DE] ET AL) 3 August 2017 (2017-08-03) sequence 194 -----	2-6, 8, 50-52, 56
Y	WO 2019/131988 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 4 July 2019 (2019-07-04) sequence 95 -----	2-6, 8, 50-52, 56
Y	WO 2014/130879 A2 (STEM CENTRX INC [US]; SPIROGEN SARL [CH]) 28 August 2014 (2014-08-28) cited in the application examples -----	2-6, 8, 51, 52, 56
Y	L. R. SAUNDERS ET AL: "A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 7, no. 302, 26 August 2015 (2015-08-26), pages 1-15, XP055288294, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aac9459 cited in the application the whole document -----	2-6, 8, 50-52, 56
E	EP 3 950 061 A1 (DAIICHI SANKYO CO LTD [JP]) 9 February 2022 (2022-02-09) paragraphs [0047], [0138], [0246] paragraphs [0044], [0045], [0127], [0133], [0134], [0215], [0216] claims 1-15, 38-49 -----	1, 9, 10, 12, 15, 18-21, 23-48, 59, 63-66, 70-75
E	EP 3 949 988 A1 (DAIICHI SANKYO CO LTD [JP]) 9 February 2022 (2022-02-09) paragraphs [0016], [0142], [0244] paragraphs [0138], [-141], [0191] claims ----- -/--	1, 9, 10, 12, 15, 18-21, 23-48, 59, 63-66, 70-75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/050219

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P A,P	WO 2021/007371 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER [US] ET AL.) 14 January 2021 (2021-01-14) paragraphs [0089], [0109] - [0111], [0115], [0116], [0163], [0164], [0234], [0235], [0276] examples -----	2-8, 13, 14, 50-58, 61 60, 62

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2022/050219

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/050219

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3690038	A1	05-08-2020	AU 2018342527 A1	02-04-2020
			BR 112020004126 A2	08-09-2020
			CA 3078218 A1	04-04-2019
			CA 3125713 A1	04-04-2019
			CA 3126646 A1	04-04-2019
			CN 111164208 A	15-05-2020
			CO 2020004921 A2	05-05-2020
			EP 3690038 A1	05-08-2020
			JP 2022036943 A	08-03-2022
			JP WO2019065964 A1	10-09-2020
			KR 20200061376 A	02-06-2020
			PH 12020500398 A1	04-01-2021
			SG 11202001430S A	29-04-2020
			TW 201922788 A	16-06-2019
			US 2020261594 A1	20-08-2020
			WO 2019065964 A1	04-04-2019
WO 2019234220	A1	12-12-2019	AU 2019280900 A1	19-11-2020
			BR 112020022898 A2	23-02-2021
			CA 3099956 A1	12-12-2019
			CL 2020003105 A1	11-06-2021
			CN 112513092 A	16-03-2021
			CO 2020015172 A2	21-12-2020
			CR 20200601 A	26-01-2021
			EC SP20084864 A	31-05-2021
			EP 3802598 A1	14-04-2021
			JP 2021526816 A	11-10-2021
			KR 20210018311 A	17-02-2021
			MA 52742 A	14-04-2021
			PE 20210321 A1	16-02-2021
			PH 12020552080 A1	31-05-2021
			SG 11202011134X A	30-12-2020
			TW 202016151 A	01-05-2020
			US 2019375849 A1	12-12-2019
			WO 2019234220 A1	12-12-2019
US 2017218078	A1	03-08-2017	AR 107520 A1	09-05-2018
			AU 2017214251 A1	26-07-2018
			BR 112018015670 A2	18-12-2018
			CA 3010685 A1	10-08-2017
			CL 2018002046 A1	21-12-2018
			CL 2021000299 A1	02-07-2021
			CN 109071662 A	21-12-2018
			CO 2018009112 A2	31-08-2018
			CR 20180417 A	15-01-2019
			EA 201891749 A1	31-01-2019
			EP 3411403 A1	12-12-2018
			HK 1257748 A1	25-10-2019
			JP 7016217 B2	04-02-2022
			JP 2017163973 A	21-09-2017
			KR 20180104137 A	19-09-2018
			MA 43956 A	12-12-2018
			PE 20181537 A1	26-09-2018
			PH 12018501548 A1	10-06-2019
			SG 10202007213Q A	28-08-2020
			SG 11201805870Y A	30-08-2018
			TN 2018000265 A1	16-01-2020
			TW 201734050 A	01-10-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/050219

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2017218078 A1	03-08-2017
		UY 37104 A	29-09-2017
		WO 2017134140 A1	10-08-2017
WO 2019131988 A1	04-07-2019	EP 3732195 A1	04-11-2020
		JP 2021509403 A	25-03-2021
		TW 201936636 A	16-09-2019
		US 2021363250 A1	25-11-2021
		WO 2019131988 A1	04-07-2019
WO 2014130879 A2	28-08-2014	AR 094867 A1	02-09-2015
		AU 2014218730 A1	08-10-2015
		AU 2019201688 A1	04-04-2019
		CA 2901114 A1	28-08-2014
		CL 2015002357 A1	11-03-2016
		CL 2017002110 A1	04-05-2018
		CL 2019000334 A1	07-06-2019
		CN 105164159 A	16-12-2015
		DK 2958944 T3	24-06-2019
		EP 2958944 A2	30-12-2015
		EP 3556400 A1	23-10-2019
		ES 2731681 T3	18-11-2019
		HK 1217956 A1	27-01-2017
		HR P20191169 T1	04-10-2019
		HU E043851 T2	30-09-2019
		JP 6462591 B2	30-01-2019
		JP 2016510002 A	04-04-2016
		JP 2019069983 A	09-05-2019
		KR 20160037130 A	05-04-2016
		LT 2958944 T	10-07-2019
		ME 03394 B	20-01-2020
		PE 20151901 A1	13-01-2016
		PH 12015501846 A1	07-12-2015
		PL 2958944 T3	30-09-2019
		PT 2958944 T	27-06-2019
		RU 2015140122 A	28-03-2017
		RU 2019109456 A	10-04-2019
		SG 11201506650P A	29-09-2015
		SI 2958944 T1	30-08-2019
		TR 201908761 T4	22-07-2019
		TW 201442728 A	16-11-2014
		US 2016015828 A1	21-01-2016
		US 2018318441 A1	08-11-2018
		WO 2014130879 A2	28-08-2014
EP 3950061 A1	09-02-2022	CN 113631229 A	09-11-2021
		EP 3950061 A1	09-02-2022
		JP WO2020196474 A1	01-10-2020
		KR 20210143237 A	26-11-2021
		TW 202102228 A	16-01-2021
		WO 2020196474 A1	01-10-2020
EP 3949988 A1	09-02-2022	CA 3139180 A1	01-10-2020
		CN 113631191 A	09-11-2021
		EP 3949988 A1	09-02-2022
		JP WO2020196712 A1	01-10-2020
		KR 20210143839 A	29-11-2021
		TW 202102226 A	16-01-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

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 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
	A 6 1 K 39/395	T
	A 6 1 K 39/395	Y
	C 1 2 N 15/13	Z N A

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. プルロニック

- (71)出願人 307010166
第一三共株式会社
東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号
- (74)代理人 100094569
弁理士 田中 伸一郎
- (74)代理人 100103610
弁理士 ▲吉▼田 和彦
- (74)代理人 100109070
弁理士 須田 洋之
- (74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
- (74)代理人 100123766
弁理士 松田 七重
- (74)代理人 100154988
弁理士 小林 真知
- (72)発明者 ポワリエ ジョン ティー
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 6 5 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1 2 7 5 メモリ
アル スローン ケタリング キャンサー センター内
- (72)発明者 ルディン チャールズ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 6 5 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1 2 7 5 メモリ
アル スローン ケタリング キャンサー センター内
- (72)発明者 ルイス ジェイソン
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 6 5 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1 2 7 5 メモリ
アル スローン ケタリング キャンサー センター内
- (72)発明者 カーン アブドゥル
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 2 1 ニューヨーク イースト シックスティーナインス
ストリート 4 1 3 ボックス 3 0 0 ティーアールアイーインスティテューショナル セラビュー
ティクス ディスカバリー インスティテュート内
- (72)発明者 アンドリュウ デヴィッド
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 2 1 ニューヨーク イースト シックスティーナインス

- ストリート 413 ボックス 300 ティーアールアイーインスティテューショナル セラピュー
ティクス ディスカバリー インスティテュート内
- (72)発明者 チェン シンレイ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10021 ニューヨーク イースト シックスティーナインス
ストリート 413 ボックス 300 ティーアールアイーインスティテューショナル セラピュー
ティクス ディスカバリー インスティテュート内
- (72)発明者 ロレンツ イヴォ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10021 ニューヨーク イースト シックスティーナインス
ストリート 413 ボックス 300 ティーアールアイーインスティテューショナル セラピュー
ティクス ディスカバリー インスティテュート内
- (72)発明者 松永 大典
東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内
- F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4C076 AA11 AA29 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 CC27 EE59
4C085 AA13 AA14 AA25 AA26 BB11 CC23 EE01 GG01 GG02 GG03
GG04 GG06 GG08
4C086 AA01 AA02 CB11 MA01 MA02 MA04 MA05 MA16 MA17 MA44
MA52 MA55 MA56 MA59 MA60 MA66 NA14 ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA50 DA76 EA28 FA74 GA15