

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5394246号  
(P5394246)

(45) 発行日 平成26年1月22日(2014.1.22)

(24) 登録日 平成25年10月25日(2013.10.25)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 07 K 16/30	(2006.01)	C 07 K 16/30 Z N A
C 12 N 15/02	(2006.01)	C 12 N 15/00 C
G 01 N 33/531	(2006.01)	G 01 N 33/531 A
G 01 N 33/577	(2006.01)	G 01 N 33/577 B
G 01 N 33/574	(2006.01)	G 01 N 33/574 A

請求項の数 57 (全 157 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-534901 (P2009-534901)	(73) 特許権者 509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(86) (22) 出願日	平成19年10月26日(2007.10.26)	(74) 代理人 100109726 弁理士 園田 吉隆
(65) 公表番号	特表2010-523469 (P2010-523469A)	(74) 代理人 100101199 弁理士 小林 義教
(43) 公表日	平成22年7月15日(2010.7.15)	(72) 発明者 デニス, マーク, エス. アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 70, サン カルロス, ブリマス 1 20
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/082726	
(87) 國際公開番号	W02008/052187	
(87) 國際公開日	平成20年5月2日(2008.5.2)	
審査請求日	平成22年10月25日(2010.10.25)	
(31) 優先権主張番号	60/921,300	
(32) 優先日	平成19年3月30日(2007.3.30)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	
(31) 優先権主張番号	60/937,857	
(32) 優先日	平成19年6月29日(2007.6.29)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗体及びイムノコンジュゲートとこれらの使用方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

- (1) 配列番号14のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - H 1、  
 (2) 配列番号15のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - H 2、  
 (3) 配列番号16のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - H 3、及び  
 (4) 配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 1  
 を含む、重鎖と、  
 (1) 配列番号11のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - L 1、  
 (2) 配列番号12のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - L 2、及び  
 (3) 配列番号13のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - L 3  
 を含む、軽鎖と

を含んでなる、STEP-1に結合するヒト化モノクローナル抗体。

## 【請求項2】

さらに、

- (1) 配列番号22、75又は76のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 2、  
 (2) 配列番号23、78又は79のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 3、及び  
 (3) 配列番号24のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 4  
 から選択される少なくとも1つ、2つ、又は3つの重鎖フレームワーク領域を含んでなる  
 、請求項1に記載の抗体。

## 【請求項3】

10

20

配列番号 6 の 軽鎖を含んでなる、請求項 1に記載の抗体。

【請求項 4】

重鎖が、配列番号 10 を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

抗体が、

- (1) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - H 1 ;
- (2) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - H 2 ;
- (3) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - H 3 ;
- (4) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 1 ;
- (5) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 2 ;
- (6) 配列番号 138 のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 3 ;
- (7) 配列番号 24 のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 4 ;

を含む、(a) 重鎖可変ドメインと

- (1) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - H 1 ;
- (2) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - H 2 ;
- (3) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む高頻度可変領域 - H 3 ;
- (4) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 1 ;
- (5) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 2 ;
- (6) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 3 ;
- (7) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む重鎖 - フレームワーク 4 ;

を含む、(b) 軽鎖可変ドメインとを含む、

請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

重鎖が、配列番号 10 を含む、請求項 3に記載の抗体。

【請求項 7】

Fab、Fab'-SH、Fv、scFv 又は (Fab')<sub>2</sub> 断片から選択される抗体断片である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

STEAP-1 への抗体の結合に許容される条件下で請求項 1 に記載の抗体に生体試料を接触させ、抗体と STEAP-1 との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、生体試料中の STEAP-1 の存在を検出する方法。

【請求項 9】

生体試料が、前立腺、肺、大腸、膀胱、卵巣の細胞、又はユーリング肉腫の細胞の増殖性疾患があると疑われる患者のものである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

細胞障害性剤に共有結合的に付着した請求項 1 に記載の抗体を含んでなるイムノコンジュゲート。

【請求項 11】

細胞障害性剤が、毒素、化学療法剤、薬剤成分、抗生物質、放射性同位体及び核酸分解酵素から選択される、請求項 10 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 12】

イムノコンジュゲートが、式  $A b - (L - D) p$  を有し、

- (a) A b が請求項 1に記載の抗体であり、
- (b) L がリンカーであり、
- (c) D が薬剤成分であり、そして
- (d) p が 1から 20である、

請求項 11 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 13】

L は、6-マレイミドカブロイル (MC)、マレイミドプロパノイル (MP)、バリン-シトルリン (val-cit)、アラニン-フェニルアラニン (ala-phe)、p

10

20

30

40

50

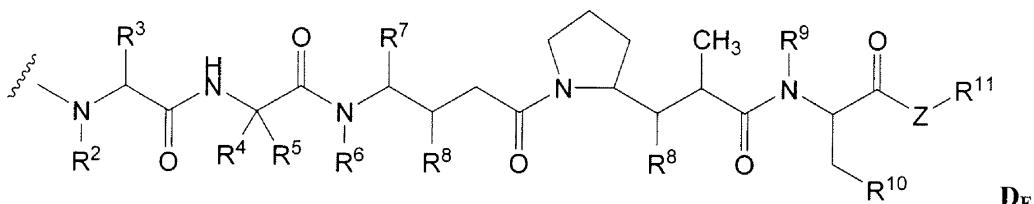
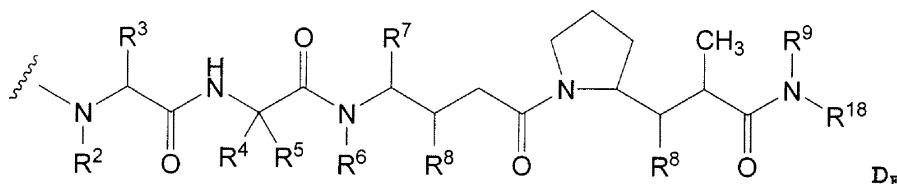
-アミノベンジルオキシカルボニル( P A B )、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート( S P P )、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート( S M C C )、N-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル( S I A B )、及び6-マレイミドカプロイル-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル( M C - v c - P A B )から選択される、請求項12に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項14】

Dがアリスタチン類及びドロスタチン類から選択される、請求項12に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項15】

Dが以下の式D<sub>E</sub>又はD<sub>F</sub>の薬剤成分であり、



ここにおいて、R<sup>2</sup>及びR<sup>6</sup>は各々メチルであり、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は各々イソプロピルであり、R<sup>5</sup>は-Hであり、R<sup>7</sup>はsec-ブチルであり、各々のR<sup>8</sup>はCH<sub>3</sub>、O-CH<sub>3</sub>、OH及びHから独立して選択され、R<sup>9</sup>はHであり、R<sup>10</sup>はアリールであり、Zは-O-又は-NH-であり、R<sup>11</sup>はH、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>であり、そしてR<sup>18</sup>は-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-アリールであり、そして、pはおよそ1から8である、

請求項14に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項16】

インピトロ又はインピボの細胞殺傷活性を有する、請求項12に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項17】

イムノコンジュゲートが式A b-(L-MMAE)pを有し、このときLはリンカーであり、pは2から5である、請求項12に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項18】

Lがval-citを含む、請求項17に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項19】

LがMCを含む、請求項17に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項20】

LがPABを含む、請求項17に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項21】

LがMC-vc-PABを含む、請求項17に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項22】

Dがメイタンシノイドである、請求項12に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項23】

10

20

30

40

50

D が D M 1 、 D M 3 及び D M 4 から選択される、請求項 2 2 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 2 4】

リンカーが抗体上のチオール基によって抗体に付着される、請求項 2 2 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 2 5】

リンカー L は、 N -スクシンイミジル 4 - ( 2 -ピリジルチオ ) ペンタノエート ( S P P ) 、 N -スクシンイミジル 4 - ( N -マレイミドメチル ) シクロヘキサン - 1 カルボキシレート ( S M C C ) 、及び N -スクシンイミジル ( 4 -イオド - アセチル ) アミノ安息香酸エステル ( S I A B ) から選択される、請求項 2 2 に記載のイムノコンジュゲート。 10

【請求項 2 6】

D が D M 4 である、請求項 2 5 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 2 7】

L が S P P を含む、請求項 2 6 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 2 8】

L が S M C C を含む、請求項 2 6 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 2 9】

p が 2 から 6 である、請求項 2 6 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 3 0】

請求項 1 2 に記載のイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体を含有してなる製薬的組成物。 20

【請求項 3 1】

請求項 3 0 に記載の製薬的組成物の有効量を含む、細胞増殖性疾患を治療する医薬。

【請求項 3 2】

細胞増殖性疾患が、前立腺、肺、大腸、膀胱、卵巣、及びユーディング肉腫の細胞増殖性疾患から選択される、請求項 3 1 に記載の医薬。

【請求項 3 3】

一又は複数のアミノ酸残基が 0.6 から 1.0 の範囲のチオール反応値を有する一又は複数の遊離したシステインアミノ酸に置換されている請求項 1 に記載の抗体を含んでなるシステイン改変抗体。 30

【請求項 3 4】

一又は複数の遊離システインアミノ酸残基が軽鎖に位置する、請求項 3 3 に記載の抗体。

【請求項 3 5】

一又は複数の遊離システインアミノ酸残基が重鎖に位置する、請求項 3 3 に記載の抗体。

【請求項 3 6】

共有結合で細胞障害性剤に付着した請求項 3 3 に記載の抗体を含むイムノコンジュゲート。

【請求項 3 7】

細胞障害性剤が、毒素、化学療法剤、薬剤成分、抗生物質、放射性同位体及び核酸分解酵素から選択される、請求項 3 6 に記載のイムノコンジュゲート。 40

【請求項 3 8】

抗体が、キャプチャ標識、検出標識又は固体担体に共有結合して付着される、請求項 3 3 に記載の抗体。

【請求項 3 9】

抗体が、アウリストチンないしはメイタンシノイドの薬剤成分に共有結合して付着される、請求項 3 3 に記載の抗体を含むイムノコンジュゲート。

【請求項 4 0】

請求項 3 3 に記載の抗体 ( A b ) とアウリストチンないしはメイタンシノイドの薬剤成 50

分 (D) とを含んでなり、このとき該システイン改変抗体はリンカー成分 (L) によって一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を介して D に付着しており、該化合物は以下の式 I を有し、

$$A \cdot b - (L - D) \cdot p = I$$

$p$  が 1 から 4 である、  
イムノコンジュゲート。

## 【請求項 4 1】

p が 2 である、請求項 4 0 に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項 4 2】

したが、以下の式を有し、

10

—A<sub>a</sub>—W<sub>w</sub>—Y<sub>v</sub>—

ここで、

Aはシステイン改変抗体(Ab)のシステインチオールに共有結合して付着されるストレッチャーユニットであり、

$a$  は 0 又は 1 であり、

各々のWはそれぞれアミノ酸ユニットであり、

20

w は 0 から 12 の整数であり、

とは薬剤成分に共存結合して付着されるスペーサーコニットであり、そして、

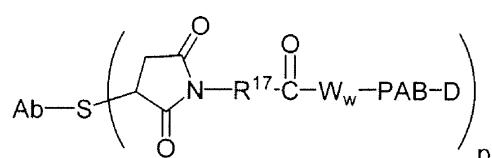
✓は0, 1又は2であり

但し、 $a$ 、 $w$ 、 $y$  が全て 0 であることはない。

#### 請求項 4.0 に記載のイントロコンジュゲート

### 【請求項 4 3】

以下の式を有し



30

このとき P A B がパラ-アミノベンジルカルバモイルであり、R<sup>1-7</sup> が、(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>カルボサイクリル、O-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>、アリーレン、(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-アリーレン、-アリーレン-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-、(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>カルボサイクリル)、(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>カルボサイクリル)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>ヘテロサイクリル、(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>ヘテロサイクリル)、-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>ヘテロサイクリル)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)NR<sup>b</sup>CH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)NR<sup>b</sup>CH<sub>2</sub>、及び-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>から選択される二価のラジカルであり、R<sup>b</sup>がH、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、フェニル又はベンジルであり、そして、rはそれぞれ1から10の整数である、請求項4-2に記載のイムノコンジュゲート。

## 【請求項 4 4】

W<sub>W</sub> がバリン・シトルリンである、請求項 4 2 に記載のイムノコンジュゲート。

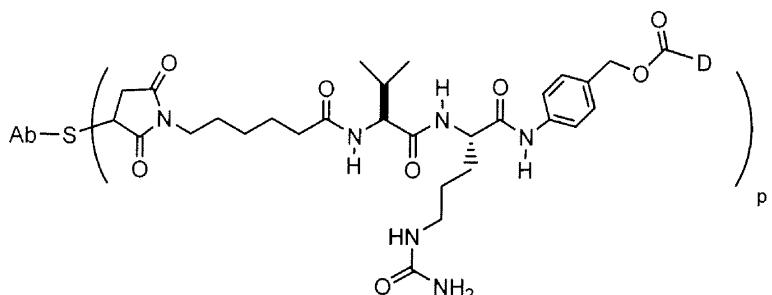
## 【請求項 4 5】

50

$R^{1-7}$  が  $(CH_2)_5$  又は  $(CH_2)_2$  である、請求項 4 3 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 4 6】

以下の式を有する、



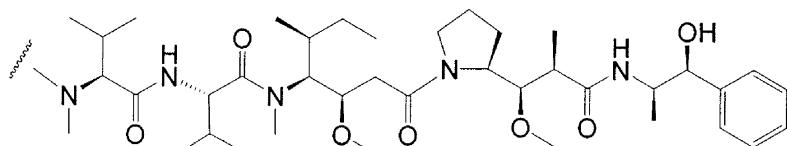
10

請求項 4 2 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 4 7】

D が以下の構造を有する MMAE であり、

20



ここで波線はリンカーリへの付着部位を示す、請求項 4 0 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 4 8】

請求項 3 9 に記載のイムノコンジュゲートと薬学的に許容可能な希釈液、担体又は賦形剤を含有してなる製薬的製剤。

30

【請求項 4 9】

請求項 4 8 に記載の薬学的製剤を含んでなる、癌の治療のための医薬。

【請求項 5 0】

癌が、前立腺癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、卵巣癌、及びユーディング肉腫からなる群より選択される、請求項 4 9 に記載の医薬。

【請求項 5 1】

患者に、抗体 - 薬剤コンジュゲート化合物と組み合わせた化学療法剤が投与され、化学療法剤が、レトロゾール、シスプラチニン、カルボプラチニン、タキソール、パクリタキセル、オキサリプラチニン、ドセタキセル、5-FU、ロイコボリン、ラパチニブ、及びゲムシタビンから選択される、請求項 4 9 に記載の医薬。

40

【請求項 5 2】

抗体が、カバット番号付け法による軽鎖の 15、43、110、144、168 及び 205 と、EU 番号付け法による重鎖の 41、88、115、118、120、171、172、282、375 及び 400 とから選択される一又は複数の位置にシステインを含む、請求項 3 3 に記載の抗体。

【請求項 5 3】

システインが、軽鎖の位置 205 に位置する、請求項 5 2 に記載の抗体。

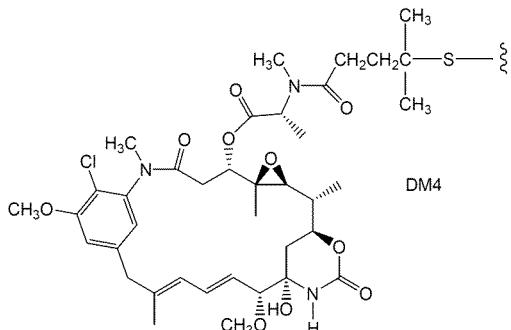
【請求項 5 4】

50

システインが、重鎖の位置 118 に位置する、請求項 52 に記載の抗体。

【請求項 55】

D が以下の構造を有する DM4 であり、



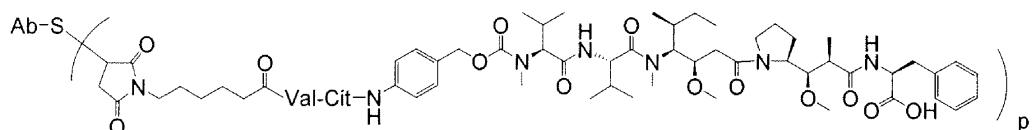
10

ここで波線はリンカー L への付着部位を示す、請求項 40 に記載の イムノコンジュゲート

。

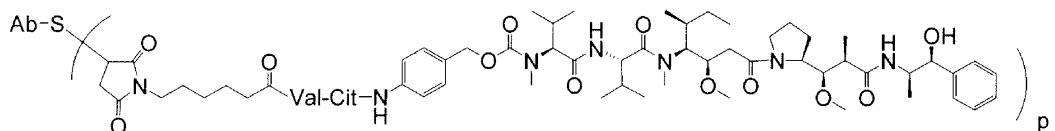
【請求項 56】

以下の構造から選択される イムノコンジュゲート であって、



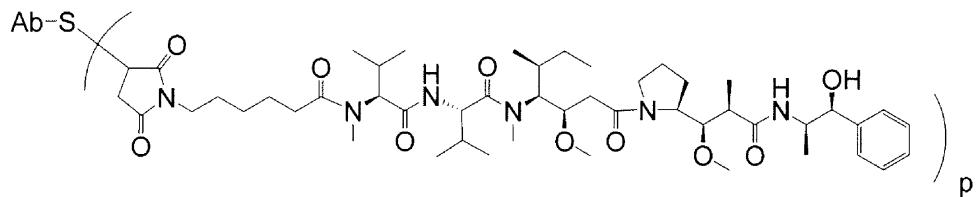
20

Ab-MC-vc-PAB-MMAF



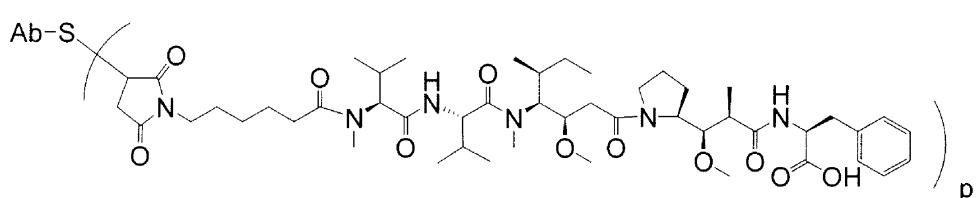
Ab-MC-vc-PAB-MMAE

30



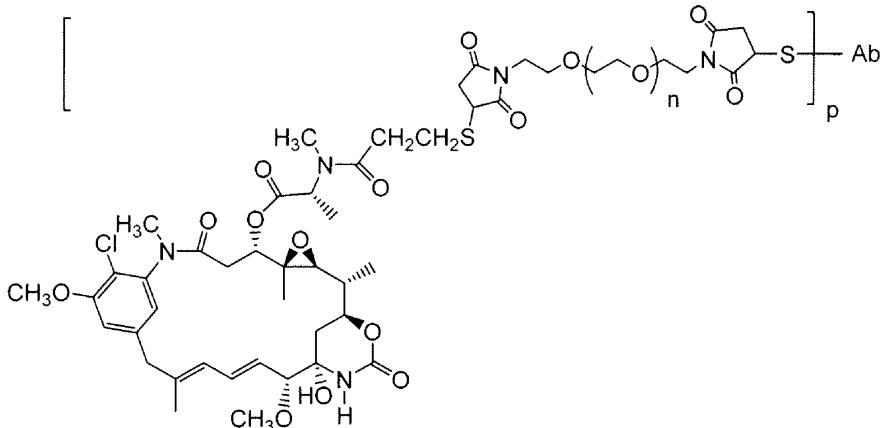
Ab-MC-MMAE

40



Ab-MC-MMAF

50



10

Ab-BMPEO-DM1

このとき V a 1 はバリンであり、C i t はシトルリンであり、p は 1 から 4 であり、そして A b は請求項 33 に記載の抗 S T E A P - 1 抗体である、イムノコンジュゲート。

## 【請求項 57】

軽鎖が、

- (1) 配列番号 90 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域、
- (2) 配列番号 92 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域、
- (3) 配列番号 93 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域、
- (4) 配列番号 94 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域、
- (5) 配列番号 95 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域、
- (6) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域、
- (7) 配列番号 97 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域、
- (8) 配列番号 98 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域、
- (9) 配列番号 99 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域、

(10) 配列番号 100 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域、又は

(11) 配列番号 101 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域

を含んでなる請求項 1 に記載の抗体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は抗 S T E A P - 1 抗体及びそのイムノコンジュゲートに関する。本発明はさらに、抗 S T E A P - 1 抗体及びそのイムノコンジュゲートを使用する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒトの前立腺癌は男性に最も多く診断される悪性腫瘍の一つであり、男性の癌に関連する死因の中で 2 番目に多い。米国癌協会 ( A C S ) の推定によれば、2000 年一年間で新しく前立腺癌と診断された患者は 180,400 例で、前立腺癌による死亡は 31,900 件に上る。進行期には、前立腺癌は骨に転移する。早期診断が進歩し、局所に限定された腫瘍の治療が行われてはいるものの、前立腺癌は一度転移すると不治である。ホルモン療法を受けている転移性前立腺癌患者は、最終的にはアンドロゲン不応性 ( アンドロゲン非依存性 ) 状態となり、疾病が進行して死に至る。現在、前立腺特異性抗原 ( P S A ) は、前立腺癌のスクリーニング、診断、及びモニタリングに最も広く使用される腫瘍マーカーである。しかしながら、P S A は良性と悪性の前立腺疾患を正確に区別できないため、スクリーニングのツールとして P S A が広く使用されることは議論の対象となっている。

20

30

40

50

前立腺癌及び膀胱癌の治療では、癌のステージに応じて、癌組織の除去、放射線療法、化学療法、及び前立腺癌の場合アンドロゲンの遮断（例えばホルモン療法）のうちの一つ又は組み合わせが行われる。外科的療法又は放射線療法が、疾病の早期にある患者の生存率を有意に向上させる一方、進行した症例、特にホルモン除去後に腫瘍が再発した場合の治療の選択肢は非常に限られている。ホルモン療法を受ける患者の大部分は、アンドロゲン非依存性疾病を発症するに至る。現在のところ、手術又は化学療法の後で疾病が再発した前立腺癌患者、又は診断時に癌が既に転移している前立腺癌患者の20～40%には有効な治療法が無い。化学療法は、特に高齢の患者に、毒性の副作用を有する。前立腺細胞腫への取り組みにおいて、特にアンドロゲン遮断に不応性の疾病的新形態の治療法を開発することが急ぎ必要とされている。

10

#### 【0003】

新規細胞表面抗原であるSTEAP-1の同定が開示されている（米国特許第6329503号）。STEAP-1は、細胞表面セルペンチン膜貫通抗原のメンバーである。これは前立腺癌に主に発現されるため、このファミリーのメンバーは「STEAP」（Six Transmembrane Epithelial Antigens of the Prostate：前立腺の六つの膜貫通上皮抗原）と命名された。ヒトSTEAPタンパク質は、ファミリー内に高度な構造保存を示すが、既知のヒトタンパク質のいずれにも有意な構造的相同意を示さない。STEAP-1は、正常なヒト組織の前立腺細胞に主に発現されるIII型膜タンパク質と思われる。構造的には、STEAP-1は、「セルペンチン」様に三つの細胞外ループと二つの細胞内ループに折り畳まれることを示唆する六つの膜貫通ドメイン、及び細胞内のN及びC末端という分子形態を特徴とする339のアミノ酸タンパク質である。STEAP-1タンパク質の発現は、前立腺癌の様々なステージに亘って高度に維持される。STEAP-1は、肺及び大腸といった他のヒト癌において高度に過剰発現される。ヒトSTEAP-1断片にマウス抗体が產生されており、この抗体は細胞表面上でSTEAP-1に結合することが示されている（米国特許出願公開第2004/0253232号参照）。

20

抗体に基づく治療法は、様々な癌に非常に有効であることが示されている。例えば、ハーセプチン（登録商標）及びリツキサン（登録商標）は（共に本出願人、サウスサンフランシスコ）は、それぞれ乳癌及び非ホジキンリンパ腫の治療に成功裏に使用されている。ハーセプチン（登録商標）は、ヒト上皮増殖因子レセプター2（HER2）癌原遺伝子の細胞外ドメインに選択的に結合する組換えDNA由来のヒト化モノクローナル抗体である。原発性乳癌の25～30%でHER2タンパク質の過剰発現が観察される。リツキサン（登録商標）は、正常な及び悪性のBリンパ球の表面に見られるCD20抗原を対象とする、遺伝子的に操作されたキメラマウス/ヒトモノクローナル抗体である。これらの抗体は共にCHO細胞中において產生される。

30

#### 【0004】

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、つまり、癌の治療において腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局所運搬のために抗体-薬剤コンジュゲートを使う(Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; 米国特許第4975278号)と、薬剤成分を腫瘍へ目的通りに運搬して、そこで細胞内蓄積させることが可能となる。コンジュゲートさせていない薬剤を全身投与すると、排除しようとする腫瘍細胞だけでなく正常な細胞に許容されないレベルの毒性が生じうる(Baldwin等, (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986): 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera等 (ed.s), pp. 475-506)。したがって、毒性を最小限にした最大限の有効性が追求される。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はこれらの計画に有用であることが報告されている(Rowland等, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。これらの方法に用いる薬剤には、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキセート及びビンデシンが含まれる(Rowland等, *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87 (1986))。

40

抗体-毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、リシン

50

などの植物毒、ゲルダナマイシン(Kerr等 (1997) *Bioconjugate Chem.* 8(6): 781-784 ; Mandler等 (2000) *Journal of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581 ; Mandler等 (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028 ; Mandler等 (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、メイタンシノイド(欧州特許第1391213号 ; Liu等, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン(Lode等, (1998) *Cancer Res.* 58:2928 ; Hinman等, (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)などの小分子毒素が含まれる。該毒素は、チューブリン結合、DNA結合又はトポイソメラーゼ阻害などの機能によりその細胞障害性及び細胞分裂停止性の効果に影響しうる(Meyer, D.L. and Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol 38 (2003) Chapter 23, 229-237)。ある種の細胞障害性剤は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に、不活性又は活性が低減する傾向がある。  
10

## 【0005】

ゼバリン(ZEVALIN(登録商標))(イブリツモマブチウキセタン(ibrutumomab tiuxetan), Biogen/Idec)は正常及び悪性のBリンパ球の細胞表面上にみられるCD20抗原に対するマウスIgG1モノクローナル抗体と<sup>111</sup>In又は<sup>90</sup>Y放射性同位体とがチオウレアリンカーキレート剤にて結合した抗体-放射性同位体コンジュゲートである(Wiseman等, (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77 ; Wiseman等, (2002) *Blood* 99(12):4336-42 ; Witzig等, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63 ; Witzig等, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69)。ゼバリンはB細胞非ホジキンリンパ球(NHL)に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症かつ長期の血球減少を引き起す。カリケアマイシンに連結したhuCD33抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターゲットM(MYLOTARG)(登録商標)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として2000年に認可された(Drugs of the Future (2000) 25(7):686 ; 米国特許第4970198号 ; 同第5079233号 ; 同第5585089号 ; 同第5606040号 ; 同第5693762号 ; 同第5739116号 ; 同第5767285号 ; 同第5773001号)。ジスルフィドリンカースPPPを介してメイタンシノイド薬剤成分DM1と連結しているhuC242抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)は、CanaG抗原を発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療用に開発されている。メイタンシノイド薬剤成分DM1と連結している抗前立腺特異的膜抗原(PSMA)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるMLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。同じメイタンシノイド薬剤成分であるDM1は非ジスルフィドリンカースMCCを介してマウスモノクローナル抗体であるTA.1に連結した(Chari等 (1992) *Cancer Research* 52:127-131)。このコンジュゲートは、対応するジスルフィドリンカーコンジュゲートの200分の1の強度であることが報告された。MCCリンカースは本明細書中で「切断可能でない」と考えた。  
20

## 【0006】

いくつかの短いペプチド化合物は海洋軟体類であるタツナミガイ(Dolabella auricularia)から単離され、生物学的な活性があることが明らかとされている(Pettit等 (1993) *Tetrahedron* 49:9151 ; Nakamura等 (1995) *Tetrahedron Letters* 36:5059-5062 ; Sone等 (1995) *Journal Org. Chem.* 60:4474)。これらの化合物のアナログも調製されており、いくつかは生物学的な活性を有することが明らかとされた(概要については、Pettit等 (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277を参照のこと)。例えば、アウリスタチンE(米国特許第5635483号)は、海洋天然生成物ドラスタチン10(抗癌薬ビンクリスチンと同じチューブリン上の部位に結合してチューブリン重合を阻害する薬剤)の合成類似体である(G. R. Pettit, (1997) *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 70:1-79)。ドラスタチン10、アウリスタチンP E及びアウリスタチンEは4つのアミノ酸を有する直鎖状ペプチドであり、これらのうちの3つは化合物のドラスタチン類及びC末端アミドに特有である。  
30  
40  
50

## 【0007】

アウリスタチンペプチドである、アウリスタチンE(AE)とドラスタチンの合成類似体であるモノメチルアウリスタチン(MMAE)は、(i) キメラモノクローナル抗体cBR96(カルチノーマ上のルイスYに特異的)、(ii) 血液の悪性腫瘍上のCD30に特異的であるcAC10(Klussman, 等 (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4): 765-773; Doronina等 (2003) *Nature Biotechnology* 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco等 (2003) *Blood* 102(4): 1458-1465; 米国公開特許2004/0018194)、(iii) CD20発現癌及び免疫不全の治療のためのリツキサン(登録商標)(リツキシマブ)(国際公開第04/032828号)などの抗CD20抗体、(iv) 結腸直腸癌の治療のための抗EpHB2抗体2H9及び抗IL-8(Mao, 等 (2004) *Cancer Research* 64(3): 781-788)、(v) Eセレクチン抗体(Bhaskar等 (2003) *Cancer Res.* 63: 6387-6394)、及び(vi) 他の抗CD30抗体(国際公開第03/043583号)にコンジュゲートした。モノメチルアウリスタチン(MMAE)もまた、マウスとヒトの間で近い相同性を有するタイプ1TMチロシンキナーゼセプターであり、結腸直腸癌細胞で過剰発現されるEpHB2Rに対する抗体である2H9にコンジュゲートされた(Mao等 (2004) *Cancer Res.* 64: 781-788)。

C末端にフェニルアラニンを有するアウリスタチンE(MMAE)の変異体であるモノメチルアウリスタチンMMAF(米国特許第5767237号; 米国特許第6124431号)は、MMAEより弱いが、モノクローナル抗体にコンジュゲートした場合により強いことが報告されている(Senter等, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004)。アウリスタチンFフェニレンジアミン(AFP); MMAEのフェニルアラニン変異体は、フェニレンジアミンスペーサーにより1F6のC末端を介して抗CD70mAbである1F6に連結した(Law等, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 625, presented March 28, 2004)。

## 【0008】

当分野では、前立腺、肺及び大腸の癌及び癌の転移といった様々な癌を治療するための更なる薬剤に対する需要がある。この目的のために特に有用な薬剤には、有意に毒性が低いが、有益な治療的有効性がある、前立腺、肺又は大腸細胞を標的とした抗STEAPE-1抗体-薬剤コンジュゲートが含まれる。これら及び他の制限ないし過去の問題点は本発明によって解決される。

本出願中のすべての文献の引用は、この文献が本出願の先行技術であることを認めるものではない。特許、特許出願及び刊行物を含む本明細書中で引用したすべての文献は、出典明記によってこれらの全体を援用する。

## 【発明の概要】

## 【0009】

本発明は抗STEAPE-1抗体及びその使用方法を提供する。

一態様では、STEAPE-1に結合する抗体であって、図2Aに示すアミノ酸配列(配列番号6)を含む軽鎖可変ドメイン、又は図2Bに示すアミノ酸配列(配列番号9)を含む重鎖可変ドメインを含んでなる抗体が提供される。一態様では、STEAPE-1に結合する抗体であって、図2Aに示すアミノ酸配列(配列番号6)を含む軽鎖可変ドメイン、又は図2Bに示すアミノ酸配列(配列番号9)を含む重鎖可変ドメインを含んでなる抗体が提供される。

## 【0010】

一態様では、STEAPE-1に結合する抗体であって、配列番号9又は10のアミノ酸配列に、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含んでなる抗体が提供される。一実施態様では、抗体は配列番号9又は10の重鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体は、配列番号25の重鎖可変ドメインフレームワーク領域1

、配列番号 75、76、又は77の重鎖可変ドメインフレームワーク領域2、或いは配列番号78又は79の重鎖可変ドメインフレームワーク領域3を含んでなる。

一態様では、抗体は、配列番号6のアミノ酸配列に、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体は配列番号6の軽鎖可変ドメインを含んでなる。

#### 【0011】

一態様では、S T E A P - 1に結合する抗体であって、配列番号9又は10のアミノ酸配列に、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含んでなる抗体が提供される。一実施態様では、抗体は配列番号9又は10の重鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体は、配列番号25の重鎖可変ドメインフレームワーク領域1、配列番号75、76、又は77の重鎖可変ドメインフレームワーク領域2、或いは配列番号78又は79の重鎖可変ドメインフレームワーク領域3を含んでなる。一実施態様では、抗体はさらに、配列番号6のアミノ酸配列に、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体は配列番号6の軽鎖可変ドメインを含んでなる。

#### 【0012】

ある実施態様では、前記の抗体のいずれかをコードするポリヌクレオチドが提供される。一実施態様では、ポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。一実施態様では、ベクターを含む宿主細胞が提供される。一実施態様では、宿主細胞は真核細胞である。一実施態様では、宿主細胞はチャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞である。一実施態様では、抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、抗体を単離することを含んでなる、抗S T E A P - 1抗体の作製方法が提供される。

一態様では、細胞の表面に発現されるS T E A P - 1に結合する抗体が提供される。一実施態様では、抗体は、ヒト又はマウスのS T E A P - 1の領域内のエピトープに結合する。一実施態様では、細胞は哺乳類の細胞である。一実施態様では、細胞はヒト細胞である。一実施態様では、細胞は癌細胞である。一実施態様では、細胞は前立腺、肺又は大腸細胞である。一実施態様では、癌細胞は前立腺癌細胞である。別の実施態様では、細胞は原発性の前立腺癌、肺癌又は大腸癌の転移由来の細胞である。

ある実施態様では、前記いずれかの抗体はモノクローナル抗体である。一実施態様では、抗体は、F a b、F a b'-S H、F v、s c F v又は(F a b')<sub>2</sub>断片から選択される抗体断片である。一実施態様では、抗体はヒト化抗体である。一実施態様では、抗体はヒト抗体である。

#### 【0013】

一態様では、S T E A P - 1への抗体の結合が許容される条件下で前記いずれかの抗体に生体試料を接触させ、抗体とS T E A P - 1との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、生体試料中のS T E A P - 1の存在を検出する方法が提供される。一実施態様では、生体試料は前立腺細胞を含む。一実施態様では、生体試料は、前立腺細胞障害及び/又は、限定するものではないが、前立腺癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌及び卵巣癌、ユーイング肉腫、並びに原発性前立腺癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌及び卵巣癌、ユーイング肉腫を含む、細胞又は組織の細胞増殖性疾患に罹っている哺乳動物又は罹っていると疑われる哺乳動物のものである。例えば、米国特許第6329503号、及びRodeberg, D. A.ら、Clin. Cancer Res. 11(12):4545-4552(2005)を参照のこと。

一態様では、S T E A P - 1の発現増加と関係している細胞増殖性疾患を診断する方法であって、前記いずれかの抗体に試験細胞を接触させ、S T E A P - 1への抗体の結合を

10

20

30

40

50

検出することによって S T E A P - 1 の発現レベルを決定し、そして、試験細胞による S T E A P - 1 の発現のレベルをコントロール細胞による S T E A P - 1 の発現のレベルと比較することを含み、コントロール細胞と比較して試験細胞による S T E A P - 1 の発現レベルが高い場合に、 S T E A P - 1 の発現増加と関係する細胞増殖性疾患の存在が示される方法が提供される。一実施態様では、試験細胞は、前立腺増殖性疾患などの細胞増殖性疾患があると疑われる患者のものである。一実施態様では、細胞増殖性疾患は、限定するものではないが、前立腺癌を含む前立腺の細胞異常から選択される。一実施態様では、前記方法は、試験細胞（例えば、前立腺癌細胞など）の表面上の S T E A P - 1 の発現レベルを決定して、試験細胞の表面上の S T E A P - 1 の発現レベルをコントロール細胞（例えば、異常増殖する前立腺細胞以外の正常な前立腺細胞）、の表面上の S T E A P - 1 の発現レベルと比較することを含んでなる。10

#### 【 0 0 1 4 】

一態様では、 S T E A P - 1 を発現する前立腺細胞などの細胞の増加に関連する細胞増殖性疾患を診断する方法であって、生体試料中の試験細胞を前記いずれかの抗体と接触させて、 S T E A P - 1 への抗体の結合を検出することによって、試料中の試験細胞に結合した抗体のレベルを決定し、そして、コントロール試料中の細胞に結合した抗体のレベルを比較することを含み、結合した抗体のレベルを、試験試料とコントロール試料中の S T E A P - 1 発現細胞の数に正規化し、コントロール試料と比較して試験試料中に結合した抗体のレベルが高い場合に、 S T E A P - 1 を発現する細胞と関連する細胞増殖性疾患の存在が示される方法が提供される。20

一態様では、血液又は血清中の可溶性 S T E A P - 1 を検出する方法であって、前立腺細胞増殖性疾患に罹っていることが疑われる哺乳動物の血液又は血清の試験試料を本発明の抗 S T E A P - 1 抗体と接触させ、そして、正常哺乳動物の血液又は血清のコントロール試料と比べて試験試料中の可溶性 S T E A P - 1 が増加していることを検出することを含む方法が提供される。ある実施態様では、検出する方法は、哺乳動物の血液又は血清中の可溶性 S T E A P - 1 の増加と関連する前立腺細胞増殖性疾患を診断する方法として有用である。

#### 【 0 0 1 5 】

一態様では、本発明の抗体は、国際公開第 2 0 0 6 / 0 3 4 4 8 8 (本明細書において出典明記によって全体が援用される)に開示されるように、親抗体の一又は複数のアミノ酸が遊離したシステインアミノ酸に置換された、システイン改変抗体を包含する。システイン改変抗体は、0.6 ~ 1.0 の範囲のチオール反応値を有する一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含む。遊離したシステインアミノ酸は、親抗体に改変されているシステイン残基であり、ジスルフィド架橋の一部でない。システイン改変抗体は、例えばマレイミド又はハロアセチルによる改変されたシステインの部位での、細胞障害性化合物及び/又は造影(イメージング)化合物の接着に有用である。C y s 残基のチオール官能基のマレイミド基に対する求核反応性は、リジン残基のアミノ基又はN末端アミノ基などのタンパク質の任意の他のアミノ酸官能基の、およそ 1 0 0 0 倍である。ヨードアセチル及びマレイミド試薬のチオール特異的官能基はアミン基と反応するが、更に高いpH(>9.0)と更に長い反応時間が必要とされるであろう (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).3040

#### 【 0 0 1 6 】

システイン改変抗体は癌の治療において有用であり、細胞表面及び膜貫通型レセプター、及び腫瘍関連抗原(T A A)に特異的な抗体が含まれる。このような抗体は、ネイキッド抗体(薬剤又は標識成分にコンジュゲートしていない)として、あるいは抗体-薬剤コンジュゲート(A D C)として用いられてもよい。本発明のシステイン改変抗体は、チオール反応性の試薬と、部位特異的かつ効率的にカップリングしうる。チオール反応性の試薬は、多機能リンカー試薬、キャプチャ標識試薬、蛍光体試薬又は薬剤-リンカー中間生成物であってもよい。システイン改変抗体は、検出可能な標識により標識され、固相担体に固定され、及び/又は、薬剤成分とコンジュゲートされもよい。L - 1 0 から L - 2 0 、 L - 350

8からL-48、L-105からL-115、L-139からL-149、L-163からL-173のアミノ酸範囲から選択される軽鎖の範囲内、及びH-35からH-45、H-83からH-93、H-114からH-127、及びH-170からH-184のアミノ酸範囲から選択される重鎖の範囲内、及びH-268からH-291、H-319からH-344、H-370からH-380、及びH-395からH-405から選択される範囲内のFc領域において、反応性のシステインアミノ酸によるアミノ酸の置換を持つ抗体に対してチオール反応が生じうる。このとき、アミノ酸位の番号付けはカバット番号付けシステム(Kabat等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)の位置1から始め、その後は国際公開第2006034488号に開示されるように、順次続ける。また、チオール反応は、抗体の特定のドメイン、例えば軽鎖定常ドメイン(CL)及び重鎖定常ドメイン、CH1、CH2及びCH3に対して生じうる。0.6以上のチオール反応値となるシステイン置換は、インタクト抗体、つまりIgGサブクラスIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2を含むIgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの重鎖定常ドメイン、及びμにあってもよい。このような抗体及びそれらの使用は、国際公開第2006/034488号に開示される。

#### 【0017】

本発明のシステイン改変抗体は、それらの野生型、親抗体相当物の抗原結合能を保持するのが好ましい。ゆえに、システイン改変抗体は、抗原へ結合することができる、好ましくは抗原に特異性がある。このような抗原には、例えば、腫瘍関連抗原(TAA)、細胞表面レセプタタンパク質及び他の細胞表面分子、膜貫通タンパク質、シグナル伝達タンパク質、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発達又は分化に関連する(例えば機能的に寄与することが公知であるか又は予測される)分子、リンホカイン、サイトカイン、細胞周期調節に伴う分子、脈管形成に伴う分子、及び血管新生に関連する(例えば機能的に寄与することが公知であるか又は予測される)分子が含まれる。

本発明の抗体は、反応基が例えばマレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、又は他のチオール反応性のコンジュゲートパートナーである場合に、他のチオール反応性剤にコンジュゲートされてもよい(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc. ; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London ; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2 ; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。パートナーは、細胞障害性剤(例えばドキソルビシン又は百日咳毒素などの毒素)、蛍光体、例としてフルオレセイン又はローダミンのような蛍光色素、造影又は放射線治療用金属のためのキレート剤、ペプチジル又は非ペプチジル標識又は検出用タグ、又は様々なアイソフォームのポリエチレングリコールなどのクリアランス-改善剤、第三成分に結合するペプチド、又は他の炭水化物又は親油性剤であってもよい。

#### 【0018】

一態様では、本発明の抗体は、反応性成分、活性化成分、又は反応性システインチオール基によって抗体に共有結合して付着されうる標識成分とコンジュゲートされてもよい(Singh等 (2002) Anal. Biochem. 304:147-15 ; Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL)。付着された標識は、(i) 検出可能なシグナルを提供する、(ii) 第二標識と反応して、例えばFRET(蛍光共鳴エネルギー転移)が生じるよう第一又は第二標識によって生じる検出可能なシグナルを改変する、(iii) 抗原又はリガンドとの相互作用を安定させるか又は結合の親和性を増加する、(iv) 電荷、疎水性、形状又は他の物理学的なパラメータによって可動性、例えば電気泳動易動度又は細胞透過性に作用する、又は(v) キャプチャ成分を与えて、リガンド親和性、抗体/抗原結合又はイオン錯体形成を調節する、ように機能しうる。

10

20

30

40

50

## 【0019】

標識したシステイン改変抗体は、例えば、特定の細胞、組織又は血清における対象の抗原の発現を検出するための診断的検査法に有用となりうる。診断用適用のために、抗体は一般的に検出可能な成分により標識されるであろう。多くの標識が利用可能であり、通常、以下のカテゴリに分類することができる：

ラジオアイソトープ(放射性核種)、例えば<sup>3</sup>H、<sup>11</sup>C、<sup>14</sup>C、<sup>18</sup>F、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>64</sup>Sc、<sup>68</sup>Ga、<sup>86</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>133</sup>Xe、<sup>177</sup>Lu、<sup>211</sup>At、又は<sup>213</sup>Bi。放射性同位体標識抗体は、レセプター標的撮像実験において有用である。抗体は、Immunology, Volumes 1 and 2, Coligan等, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991)のCurrent Protocolsに記載される技術を用いて、リガンド試薬が抗体の改変システインチオールと反応性がある場合に、キレートを結合するか、あるいはラジオアイソトープ金属と複合化する該リガンド試薬により標識することができる。金属イオンを複合化しうるキレートリガンドには、DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA及びTETA(Macrocyclics, Dallas, TX)が含まれる。放射性核種は、本発明の抗体-薬剤コンジュゲートとの複合体化によりターゲティングされうる(Wu等 (2005) Nature Biotechnology 23(9): 1137-1146)。

## 【0020】

DOTA-マレイミド(4-マレイミドブチルアミドベンジル-DOTA)などのリンカー試薬は、イソプロピルクロロフォルメート(Aldrich)によって活性化される4-マレイミド酪酸(Fluka)とアミノベンジル-DOTAを反応させて、その後Axworthy等 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4): 1802-1807の手順によって調製されうる。DOTA-マレイミド試薬は、システイン改変抗体の遊離したシステインアミノ酸と反応して、抗体上の金属錯体形成リガンドを提供する(Lewis等 (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86)。DOTA-NHS(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸モノ(N-ヒドロキシスクシニミドエステル)などのキレート化リンカー標識試薬は市販されている(Macrocyclics, Dallas, TX)。放射性核種標識抗体によるレセプター標的造影は、腫瘍組織の抗体の進行性蓄積の検出及び定量化によって経路活性化のマーカーとなりうる(Albert等 (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210)。コンジュゲートした放射性金属はリソソーム分解後に細胞内に残りうる。

造影実験のための抗体標識として好適な金属-キレート複合体は以下に開示される。米国特許第5342606号、米国特許第5428155号、米国特許第5316757号、米国特許第5480990号、米国特許第5462725号、米国特許第5428139号、米国特許第5385893号、米国特許第5739294号、米国特許第5750660号、米国特許第5834456号、Hnatowich等 (1983) J. Immunol. Methods 65: 147-157; Meares等 (1984) Anal. Biochem. 142:68-78; Mirzadeh等 (1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65; Meares等 (1990) J. Cancer 1990, Suppl. 10:21-26; Izard等 (1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350; Nikula等 (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90; Camera等 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62; Kukis等 (1998) J. Nucl. Med. 39: 2105-2110; Verel等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1663-1670; Camera等 (1994) J. Nucl. Med. 21: 640-646; Ruegg等 (1990) Cancer Res. 50: 4221-4226; Verel等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1663-1670; Lee等 (2001) Cancer Res. 61: 4474-4482; Mitchell等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1105-1112; Kobayashi等 (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111; Miedere等 (2004) J. Nucl. Med. 45: 129-137; DeNardo等 (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90; Blend等 (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363; Nikula等 (1999) J. Nucl. Med. 40: 166-76; Kobayashi等 (1998) J. Nucl. Med. 39: 829-36; Mardirossian等 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74; Roselli等 (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20。

## 【0021】

(b) 蛍光標識、例えば希有土類キレート(ユウロピウムキレート)、FITC、5-カルボ

10

20

30

40

50

キシフルオレセイン、6カルボキシフルオレセインを含むフルオレセイン種；TAMRAを含むローダミン種；ダンシル；リサミン；シアニン；フィコエリトリン；テキサスレッド；及びこれらの類似体。蛍光標識は、例えば、上記のImmunologyのCurrent Protocolsに開示される技術を用いて抗体にコンジュゲートすることができる。蛍光色素及び蛍光標識試薬には、Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) 及びPierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)から市販されているものが含まれる。

#### 【0022】

(c) 様々な酵素基質標識は利用可能であり、開示されてもいる(米国特許第4275149号)。一般に、酵素は、様々な技術を用いて測定することができる色素生産性基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は、分光測光法で測定することができる基質の変色を触媒するかもしれない。あるいは、酵素は、基質の蛍光又は化学発光を変えうる。蛍光の変化を定量化する技術は上記の通りである。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、測定することができる(例えば化学ルミノメーターを用いて)か、又はエネルギーを蛍光受容基に与える光を発しうる。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4737456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタルアジネジオン(dihydrophthalazinediones)、リンゴ酸酵素、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ(AP)、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、サッカライドオキシダーゼ(例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環のオキシダーゼ(例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが含まれる。抗体に酵素をコンジュゲートする技術は、O'Sullivan等, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzyme. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)に記載されている。

#### 【0023】

酵素基質の組合せの例には、例えば以下のものが含まれる：

- (i) 基質として水素ペルオキシダーゼを有する西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、ここで水素ペルオキシダーゼが染料前駆(例えば、オルソフェニレン(orthophenylene)ジアミン(OPD)又は3,3',5,5'テトラメチルのベンジジン塩酸塩(TMB))を酸化する；
- (ii) 色素生産性基質としてリン酸パラグラフ-ニトロフェニルを有するアルカリホスファターゼ(AP)；及び
- (iii) 色素生産性基質(例えばp-ニトロフェニル- -D-ガラクトシダーゼ)又は蛍光発生基質4-メチルウンベリフェリル(methylumbelliferyl)- -D-ガラクトシダーゼを有する- -D-ガラクトシダーゼ(- -D-Gal1)。

多数の他の酵素基質の組合せは当業者にとって利用可能である。これらの一般的な概要については、米国特許第4275149号及び同第4318980号を参照。

#### 【0024】

標識は、アミノ酸側鎖、活性化されたアミノ酸側鎖、システイン改変抗体などと間接的にコンジュゲートされてもよい。例えば、抗体は、ビオチンとコンジュゲートさせることができ、前述した大きな3つの分類のうちの何れかはアビジン又はストレプトアビジンとコンジュゲートさせることができ、その逆もまた可能である。ビオチンは選択的にストレプトアビジンと結合し、したがって、標識はこの間接的な方法で抗体にコンジュゲートさせることができる。あるいは、ポリペプチド変異体と標識とを間接的にコンジュゲートさせるために、ポリペプチド変異体は小ハプテン(例えばジゴキシン)とコンジュゲートさせ、前述した標識の異なるタイプのうちの1つは抗ハプテンポリペプチド変異体(例えば抗ジゴキシン抗体)とコンジュゲートさせる。したがって、ポリペプチド変異体と標識は間接的にコンジュゲートすることができる(Hermanson, G. (1996) in Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego)。

10

20

30

40

50

## 【0025】

本発明の抗体は、任意の公知のアッセイ方法、例えばELISA、競合結合アッセイ、直接的及び間接的なサンドイッチアッセイ及び免疫沈降アッセイに用いられてもよい(Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158, CRC Press, Inc.)。

検出標識は、結合又は認識事象を局所化し、視覚化して、数量化するために有用となる。本発明の標識抗体は細胞表面レセプターを検出しうる。検出可能に標識した抗体についての他の使用は、蛍光標識抗体とビーズをコンジュゲートさせ、リガンド結合時の蛍光シグナルを検出することを含む、ビーズに基づく免疫キャプチャの方法である。同様の結合検出方法論は、表面プラスモン共鳴(SPR)効果を利用して抗体-抗原相互作用を測定して検出するものである。

蛍光色素及び化学発光色素などの検出標識(Briggs等 (1997) "Synthesis of Functiona lised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058)は検出可能なシグナルを提供し、通常、好ましくは以下の特性により標識化抗体に応用することができる。(i) 標識抗体は、少量の抗体が無細胞アッセイ及び細胞に基づくアッセイにおいて敏感に検出されるように低いバックグラウンドで非常に高いシグナルを產生するものである、さらに、(ii) 標識抗体は、有意に写真を退色させることなく蛍光シグナルが観察され、モニターされ、記録されるように、光安定性を有するものである。膜又は細胞表面、特に生きている細胞への標識抗体の細胞表面結合を伴う用途では、標識は、(iii) 有効なコンジュゲート濃度と検出感度が達成されるように良好な水溶性であり、(iv) 細胞の正常な代謝過程が破壊されないか、又は早期に細胞死を引き起こさないように生きている細胞に対して毒性がないことが好ましい。

## 【0026】

細胞性蛍光強度の直接の定量化と蛍光標識事象、例えば、ペプチド-色素コンジュゲートの細胞表面結合の算出は、生きている細胞又はビーズによる非放射性アッセイである、混合と読み取り(mix-and-read)を自動化するシステム(FMAT(登録商標) 8100 HTSシステム、Applied Biosystems, Foster City, Calif.)で実施してもよい(Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4: 193-204)。また、標識抗体の使用には、細胞表面レセプター結合アッセイ、イムノキャプチャアッセイ、蛍光結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、カスパー切断(Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23; 米国特許第6372907号)、アポトーシス(Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51)及び細胞障害性アッセイが含まれる。蛍光定量的マイクロ体積アッセイ技術を用いて、細胞表面を標識とする分子によって上方制御又は下方制御を同定することができる(Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51)。

## 【0027】

本発明の標識抗体は、様々な方法及び以下のような生医学的かつ分子的撮像法の技術によってバイオマーカーやプローブを造影する際に有用である。(i) MRI(磁気共鳴画像法)、(ii) MicroCT(コンピューター断層撮影法)、(iii) SPECT(単一光子放射型コンピュータ断層撮影法)、(iv) PET(ポジトロン放出断層撮影) Chen等 (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49、(v) バイオルミネセンス、(vi) 蛍光、及び(vii) 超音波。イムノシンチグラフィは、放射性物質によって標識された抗体が動物又はヒト患者に投与される造影手順であり、画像は抗体が局在する身体の部位のものである(米国特許第6528624号)。造影バイオマーカーは、客観的に測定され、正常な生物学的プロセ

10

20

30

40

50

ス、病原性プロセス、又は治療的介入に対する薬理学的応答の指標として評価されてもよい。バイオマーカーはいくつかの種類がある。タイプ0は、疾患の自然な成長マーカーであって、公知の臨床指標、例えば関節リウマチの滑液炎症のM R I評価と縦方向に相關する。タイプIマーカーは、例えばメカニズムが臨床転帰と関係していなくても、作用のメカニズム(mechanism-of-action)の関係として介入の効果を捕らえる。タイプIIマーカーは代理のエンドポイントとして機能するものであり、該バイオマーカーの変化又は該バイオマーカーのシグナルから、関節リウマチの骨浸食をC Tで測定するなどの目的の応答を「有効と認める」ために臨床的な利点を予測する。したがって、造影バイオマーカーは、(i) 標的タンパク質の発現、(ii) 標的タンパク質に対する治療用の結合、すなわち選択性、及び(iii) クリアランス及び半減期の薬物動態学的データについての薬物動態学的(P D)治療的情報を提供しうる。研究室ベースのバイオマーカーと比較したときのインビオ造影バイオマーカーの利点には、非侵襲性処置、定量化できる、全身評価、反復性投与及び評価、すなわち複数の時点の投与と評価、及び臨床前(小動物)の結果を臨床(ヒト)の結果に潜在的に置き換えることができる結果が含まれる。用途によっては、バイオイメージングは、前臨床研究の多くの動物実験の代替となるか又は最小化する。

#### 【0028】

ペプチド標識方法は周知である。Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2 ; Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2 ; Glazer等 (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York ; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I and II, CRC Press, New York ; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin and New York ; 及びWong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.) ; De Leon-Rodriguez等 (2004) Chem.Eur. J. 10:1149-1155 ; Lewis等 (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324 ; Li等 (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115 ; Mier等 (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237を参照。

十分近接した蛍光レポーターとクエンチャラーの2つの成分にて標識されたペプチドとタンパク質は、蛍光共鳴エネルギー転移(F R E T)を受ける。レポーター基は、一般的に、特定の波長で光に励起され、エネルギーをアクセプター又はクエンチャラーに転移して、その結果、最大の明るさで発光するための適切なストークスシフトが生じる蛍光色素である。蛍光色素には、広範な芳香族性を有する分子、例としてフルオレセイン及びローダミン、ないしこれらの誘導体が含まれる。蛍光レポーターは、完全なペプチドのクエンチャー成分によって部分的あるいは有意に失活されうる。ペプチダーゼ又はプロテアーゼによるペプチドの切断時に、蛍光の検出可能な増加が測定されうる(Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34)。

#### 【0029】

また、本発明の標識抗体は親和性精製剤として用いられてもよい。この方法では、標識抗体は、当分野で公知の方法を用いて、セファデックス樹脂又は濾紙などの固相に固定される。固定された抗体は、精製される抗原を含む試料と接触させ、その後、支持体を、精製される抗原以外の試料中の実質的にすべての物質を取り除く適切な溶媒にて洗浄し、固定されたポリペプチド変異体に結合させる。最後に、抗原をポリペプチド変異体から放すように、支持体を他の適切な溶媒、例えはグリシンバッファ、p H 5.0にて洗浄する。

標識化試薬は、一般的に、(i) 標識抗体を形成するためにシスティン改変抗体のシスティンチオールと直接、(ii) リンカー-標識中間生成物を形成するためにリンカー試薬と、又は(iii) 標識抗体を形成するためにリンカー抗体と、反応しうる反応官能基を保持する

10

20

30

40

50

。標識試薬の反応性官能基には、マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシニミジルエステル(例えば、NHS、N-ヒドロキシスクシンイミド)、イソチオシアネット、スルホニルクロリド、2,6-ジクロロトリアジニル、ペニタフルオロフェニルエステル、及びホスホラミダイトが含まれるが、他の官能基も用いられてよい。

【0030】

例示的な反応性官能基は、検出可能な標識、例えばビオチンや蛍光色素のカルボキシル置換基のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(NHS)である。標識のNHSエステルを予め造っても、単離しても、及び/又は特徴付けてもよく、あるいはインサイツで形成して、抗体の求核基と反応させてもよい。典型的には、標識のカルボキシル型を、カルボジイミド試薬、例としてジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、又はユーロニウム試薬、例としてTS TU (O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルユーロニウム テトラフルオロボレート)、HBTU (O-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、又はHATU (O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、標識のNHSエステルを与えるためのアクチベーター、例えば1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)、及びN-ヒドロキシスクシンイミドのいくつかの組み合わせと反応させることによって活性化する。場合によって、標識のインサイツ活性化と抗体との反応によって標識と抗体をカップリングさせて、一工程で標識-抗体複合体を形成させてもよい。他の活性化試薬及びカップリング試薬には、TBTU (2-(1H-ベンゾトリアゾ-1-イル)-1-1,3,3-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、TFFH (N,N',N'',N'''-テトラメチルユーロニウム 2-フルオロ-ヘキサフルオロホスフェート)、PyBOP (ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート、EDQ (2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロ-キノリン)、DCC (ジシクロヘキシルカルボジイミド)；DIPCDI (ジイソプロピルカルボジイミド)、MSN T (1-(メチレン-2-スルホニル)-3-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾール、及びアリールスルホニル ハロゲン化物、例えばトリイソプロピルベンゼンスルホニル クロライドが含まれる。

【0031】

本発明のアルブミン結合ペプチド-Fab化合物：

一態様では、本発明の抗体はアルブミン結合タンパク質に融合される。血漿タンパク質結合は、生存が短い分子の薬物動態学的性質を向上させる有効な手段となりうる。アルブミンは血漿中で最も多いタンパク質である。血清アルブミン結合ペプチド類(ABP)は、組織取り込み、浸透及び拡散の変更を含む、融合した活性なドメインタンパク質の薬物動態を変えうる。これらの薬物動態学的パラメータは、適切な血清アルブミン結合ペプチド配列を特異的に選別することによって調製されうる(米国特許公開20040001827)。一連のアルブミン結合ペプチドは、ファージディスプレイスクリーニングによって同定された(Dennis等 (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043；国際公開第01/45746号)。本発明の化合物には、(i) Dennis等 (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 at Tables III and IV, page 35038、(ii) 米国特許公開20040001827の[0076]配列番号9から22、及び(iii) 国際公開第01/45746号の12～13頁に示されるABP配列が含まれ、これらの文献はすべて出典明記によって本明細書中に援用される。アルブミン結合(ABP)-Fabは、例えば、1:1の化学量比(1ABP/1Fab)で、Fab重鎖のC末端にアルブミン結合ペプチドを融合させることによって作製した。アルブミンとのこれらABP-Fabの会合により、抗体の半減期がウサギ及びマウスの25倍以上に増加したことが示された。したがって、上記の反応性のCys残基をこれらABP-Fabに導入し、細胞障害性剤と部位特異的にコンジュゲートさせた後にインビオ動物実験に用いることができる。

例示的なアルブミン結合ペプチド配列には、以下に列挙する配列番号80から84のア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列が含まれるが、これらに限定されるものではない。

C D K T H T G G G S Q R L M E D I C L P R W G C L W E D D F 配列番号 8 0

Q R L M E D I C L P R W G C L W E D D F 配列番号 8 1

Q R L I E D I C L P R W G C L W E D D F 配列番号 8 2

R L I E D I C L P R W G C L W E D D 配列番号 8 3

D I C L P R W G C L W 配列番号 8 4

### 【 0 0 3 2 】

#### 抗体 - 薬剤コンジュゲート

他の態様では、本発明は、化学療法剤、薬剤、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの細胞毒性剤にコンジュゲートした抗体を含む、抗体 - 薬剤コンジュゲート(ADC)を提供する。他の態様では、本発明はさらに、イムノコンジュゲートの使用方法を提供する。一態様では、イムノコンジュゲートは、細胞障害性剤又は検出可能な薬剤に共有結合して付着した前記いずれかの抗S T E A P - 1 抗体を含む。

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療における腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局部運搬に抗体 - 薬剤コンジュゲートを用いると(Syrigos及びEpenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; 米国特許第4,975,278号)、腫瘍への薬剤成分の標的とする運搬とそこでの細胞内集積が可能となるものであり、この非コンジュゲート薬物作用剤の全身性投与により正常細胞並びに除去しようとする腫瘍細胞への毒性が容認できないレベルとなりうる(Baldwin等, (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,」 in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pincheraら. (ed. s), pp. 475-506)。これによって、最小限の毒性で最大限の効果を求める。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はこの方策に有用であるとして報告されている(Rowland等, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。この方法に用いる薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート及びビンデジンが含まれる(Rowland等, (1986)、上掲)。抗体 - 毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、ゲルダナマイシン(Mandlerら(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandlerら(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandlerら(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、メイタンシノイド(EP 1391213; Liu等, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン(Lode等, (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman等, (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)などのリシン、小分子毒素などの植物毒が含まれる。該毒素は、チューブリン結合、DNA結合又はトポイソメラーゼ阻害を含む機能によりその細胞障害性及び細胞分裂停止性の効果に影響しうる。ある種の細胞障害性剤は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に、不活性又は活性が低減する傾向がある。

### 【 0 0 3 3 】

ゼバリン(登録商標)(ZEVALIN)(イブリツモマブチウキセタン(ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idec)は正常及び悪性のBリンパ球の細胞表面上にみられるCD20抗原に対するマウスIgG1モノクローナル抗体と<sup>111</sup>In又は<sup>90</sup>Y放射性同位体とがチオウレアリンカーキレート剤にて結合した抗体 - 放射性同位体コンジュゲートである(Wiseman等, (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman等, (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig等, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig等, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69)。ゼバリンはB細胞非ホジキン性リンパ球(NHL)に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症で長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイシンに連結したhuCD33抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターゲ<sup>TM</sup>(MYLOTARG)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)は、急性骨髓性白血病の治療用注射剤として2000年に認可された(Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 米国特許第4970198号; 同第5079233号)

；同第5585089号；同第5606040号；同第5693762号；同第5739116号；同第5767285号；同第5773001号)。ジスルフィドリンクーS P Pを介してメイタンシノイド薬剤分子DM1と連結しているh u C 2 4 2抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immuno gen, Inc.)は、C a n A gを発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療用に第I I相試験へと進んでいる。メイタンシノイド薬剤分子DM1と連結している抗前立腺特異的膜抗原(P S M A)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるM L N - 2 7 0 4 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。アウリストチン(auristatin)ペプチド、アウリストチンE(A E)及びモノメチルアウリストチン(M M A E)、ドラスタチン(dolastatin)の合成類似体は、キメラモノクローナル抗体c B R 9 6(癌細胞上のルイスYに特異的)及びc A C 1 0(血液系悪性腫瘍上のC D 3 0に特異的)(Doronina等, (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784)にコンジュゲートしており、治療的開発段階にある。  
10

#### 【0034】

イムノコンジュゲート(免疫複合体)の生成に有用な化学治療薬を本明細書中に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカナ(Phytolaca americana)タンパク質(P A P I、P A P I I、及びP A P - S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。例として1993年10月28日に公開の国際公開公報93/21232を参照のこと。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、<sup>2</sup><sub>1</sub><sup>2</sup> B i、<sup>1</sup><sub>3</sub><sup>1</sup> I、<sup>1</sup><sub>3</sub><sup>1</sup> I n、<sup>9</sup><sub>0</sub> Y及び<sup>1</sup><sub>8</sub><sup>6</sup> R eが含まれる。抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(S P D P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートH C L等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスペレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, *Science* 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(M X - D T P A)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である(国際公開94/11026)。  
20

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセン(trichothecene)及びC C 1 0 6 5、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。  
40

#### 【0035】

##### メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートしている本発明の抗体(完全長又は断片)を含んでなる。

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブ*Maytenus serrata*から単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国  
50

特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号；同4248870号；同4256746号；同4260608号；同4265814号；同4294757号；同4307016号；同4308268号；同4308269号；同4309428号；同4313946号；同4315929号；同4317821号；同4322348号；同4331598号；同4361650号；同4364866号；同4424219号；同4450254号；同4362663号；及び同4371533号に開示されている。

メイタンシノイド薬剤成分は、(i) 発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ii) 抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる共役に好適な官能基による誘導体化に従う、(iii) 血漿中で安定、そして(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。  
10

### 【0036】

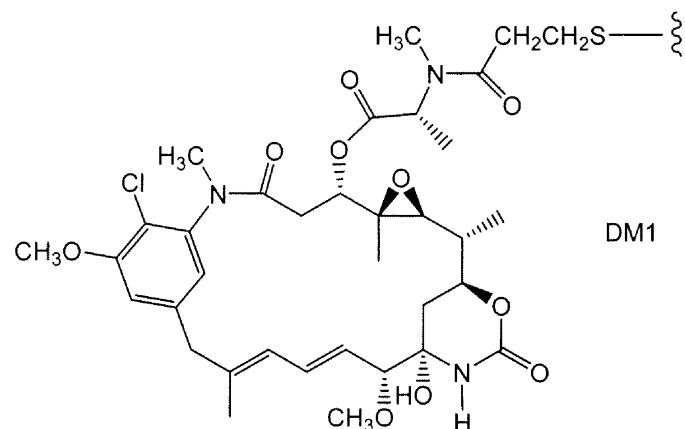
メイタンシノイド薬剤部分としての使用に適切なメイタンシン化合物は当分野で周知であり、公知の方法に従って天然の供給源から単離してもよいし、又は遺伝子工学技術を用いて產生してもよい(Yu等 (2002) PNAS 99:7968-7973を参照)。また、マイタンシノール及びマイタンシノール類似体は、公知の方法に従って合成して調製されてもよい。

例示的なメイタンシノイド薬剤部分には、修飾した芳香族環を有するもの、例えば、C - 19 - デクロロ(米国特許第4256746号)(アンサマイトシンP2のリチウムアルミニウム水素化物の還元によって調製される)；C - 20 - ヒドロキシ(又はC - 20 - デメチル) + / - C - 19 - デクロロ(米国特許第4361650号及び同第4307016号)(ストレプトミセス属ないしはアクチノミセス属を用いた脱メチル化又はLAHを用いた脱塩素により調製される)；及びC - 20 - デメトキシ、C - 20 - アシロキシ(-O COR)、+ / - デクロロ(米国特許第4294757号)(アシル塩化物を用いたアシル化により調製される)、及び他の位置に修飾を有するものが含まれる。  
20

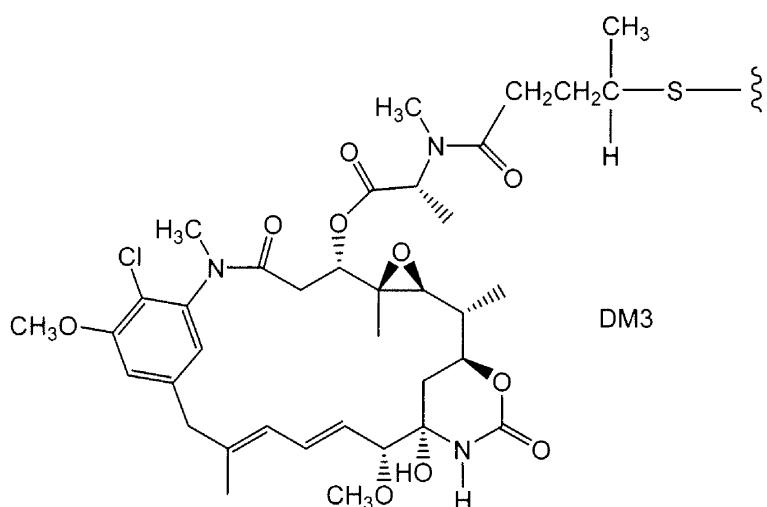
また、例示的なメイタンシノイド薬剤部分には、修飾を有するもの、例えば、C - 9 - SH(米国特許第4424219号)(H<sub>2</sub>S又はP<sub>2</sub>S<sub>5</sub>を有するメイタンシノールの反応により調製される)；C - 14 - アルコキシメチル(デメトキシ / CH<sub>2</sub> OR)(米国特許第4331598号)；C - 14 - ヒドロキシメチル又はアシロキシメチル(CH<sub>2</sub> OH又はCH<sub>2</sub> OAc)(米国特許第4450254号)；C - 15 - ヒドロキシ / アシロキシ(米国特許第4364866号)(ストレプトミセス属によるメイタンシノールの変換によって調製される)；C - 15 - メトキシ(米国特許第4313946号及び同第4315929号)(トレウイアヌドロフローラ(Trewia nudiflora)より単離)；C - 18 - N - デメチル(米国特許第4362663号及び第4322348号)(ストレプトミセス属によるメイタンシノールの脱メチル化により調製される)；及び、4,5 - デオキシ(米国特許第4371533号)(メイタンシノールの三塩化チタン / LAH還元により調製される)が含まれる。  
30

### 【0037】

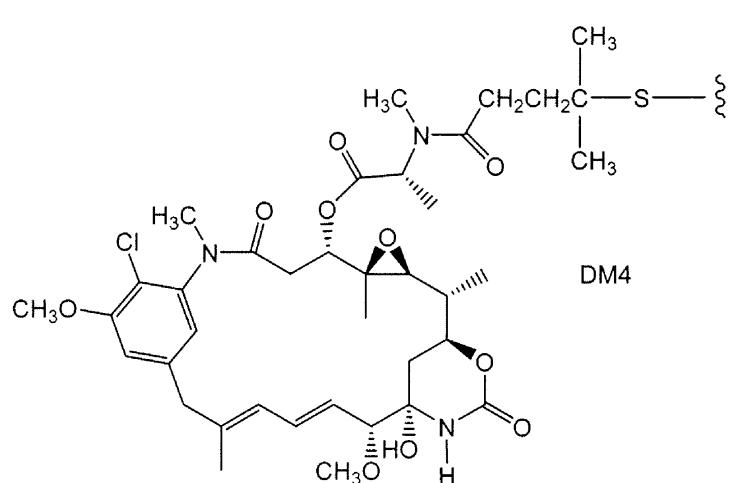
メイタンシノイド薬剤部分の例示的な実施態様には、以下の構造を有するDM1；DM3；及びDM4が含まれる。



10



20



30

40

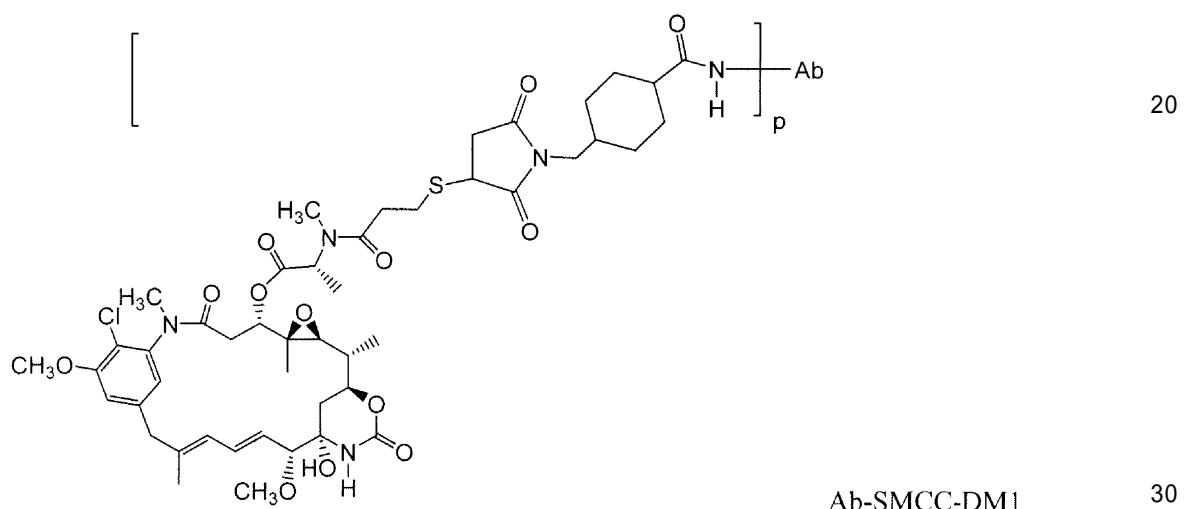
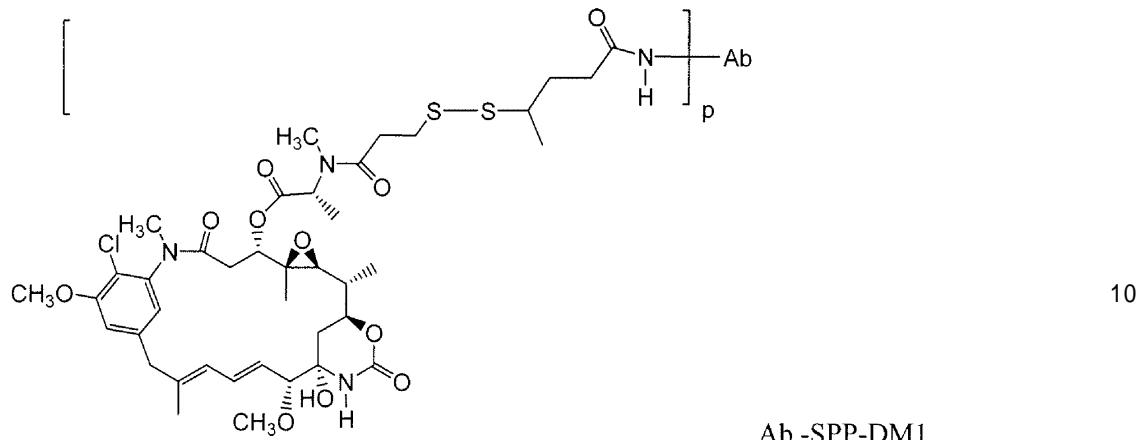
ここで、波線は、抗体 - 薬剤コンジュゲートのリンカー (L)への薬剤の硫黄原子の共有結合を示す。DM1に対してSMCCにより連結したハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)が報告されている(国際公開第2005/037992号、これは出典明記によって本明細書中にその全体が特別に援用される)。本発明の抗体薬剤コンジュゲートは本明細書中に開示した手順に従って調製されうる。

【0038】

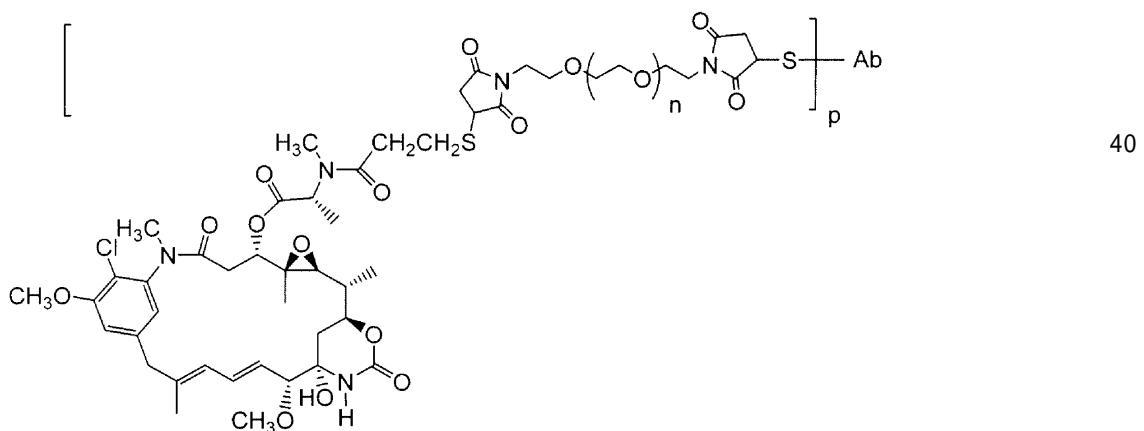
他の例示的メイタンシノイド抗体 - 薬剤コンジュゲートは以下のような構造と略記号を

50

有している。(ここで A b は抗体であり、 p は 1 ~ およそ 8 である。)



DM1 が抗体のチオール基に BMP EO リンカーにより連結されている例示的な抗体 - 薬剤コンジュゲートは、以下のような構造及び略記号を有する。



ここで、 A b は抗体であり、 n は 0 、 1 又は 2 であり、そして、 p は 1 、 2 、 3 又は 4 50

である。

【0039】

メイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲート、その作製方法及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5208020号、同5416064号、同第6441163号、及び欧州特許第0425235号B1に開示されており、その開示内容は出典を明示してここに援用する。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52: 127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合しているイムノコンジュゲートが記載されている。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞SK-BR-3におけるインビトロで試験され、細胞当たり $3 \times 10^5$  HER-2表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。

【0040】

抗STEEP-1抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製される。例えば、米国特許第5208020号(この開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)を参照。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることができると予期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5208020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

例えば、米国特許第5208020号、同第6441163号又は欧州特許第0425235号B1、Chari等, Cancer Research, 52: 127-131(1992)、及び米国特許公開第2005/0169933号A1(これらの開示内容は出典明記により特別に援用される)に開示されているもの等を含め、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。リンカー成分SMCCを含んでなる抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、2005年5月31日に出願の米国特許第11/141344号, "Antibody-drug conjugates and Methods."に開示されるように調製されうる。リンカーグループには、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれる。更なるリンカーグループを本願明細書中に記載し、例示する。

【0041】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウム

10

20

30

40

50

ベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。特に好適なカップリング剤には、ジスルフィド結合により提供されるN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD) (Carlsson等, Biochem. J. 173: 723-737[1978])が含まれる。

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。好適な実施態様では、結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

一実施態様では、本発明のいずれかの抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートされる。イムノコンジュゲートの一実施態様では、細胞障害性剤DはメイタンシノイドDM1である。イムノコンジュゲートの一実施態様では、リンカーは、SPDP、SMCC、IT、SPDP、及びSPPからなる群より選択される。

#### 【0042】

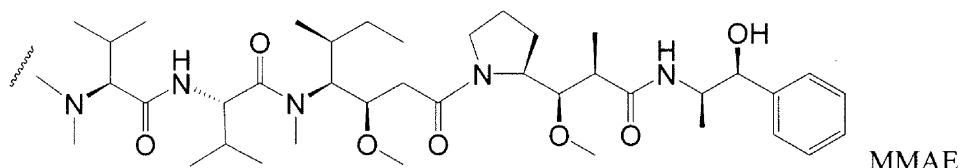
##### アウリスタチン類及びドラスタチン類

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチジル類似体及び誘導体、アウリスタチン(auristatin) (米国特許第5635483号；同第5780588号)にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke等 (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗癌活性(米国特許第5663149号)及び抗真菌性活性(Pettit等 (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端により抗体に接着しうる(国際公開第02/088172号)。

例示的なアウリスタチンの実施態様には、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤部分DE及びDFを含み、2004年3月28日に公開されたSenter等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に援用される。

#### 【0043】

例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAEである(ここで、波形の線は抗体薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す)。



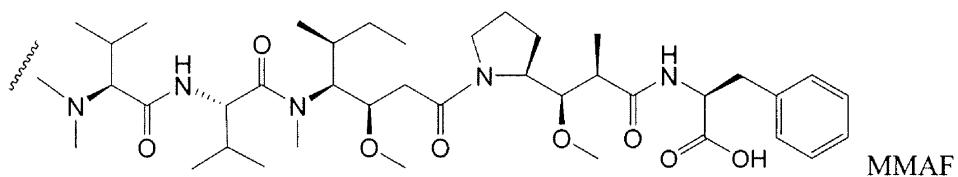
例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAFである(ここで、波形の線は抗体薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す)(米国特許公開2005/0238649)。

10

20

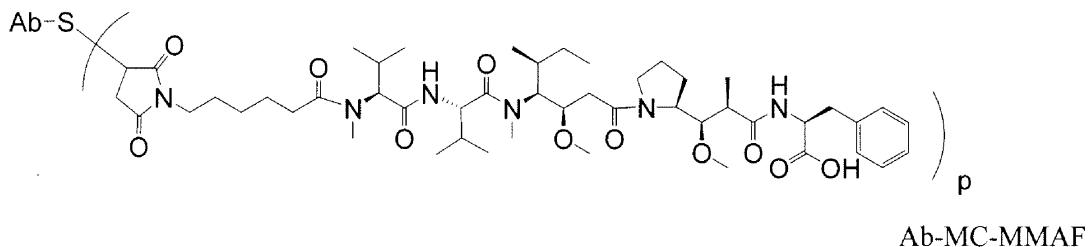
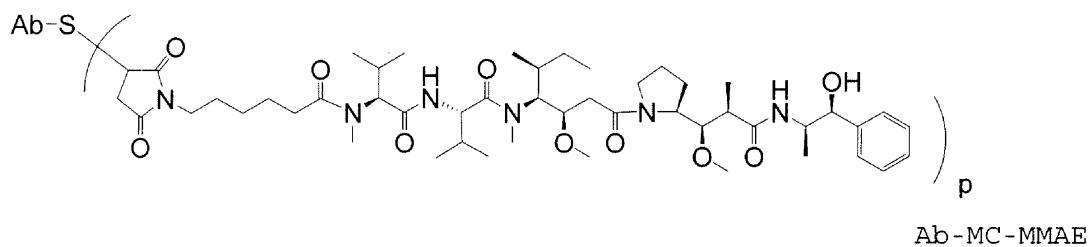
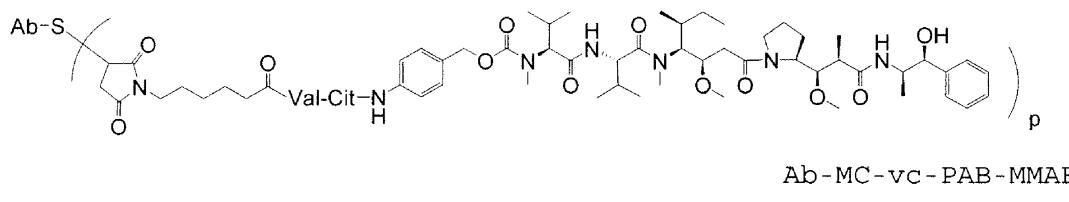
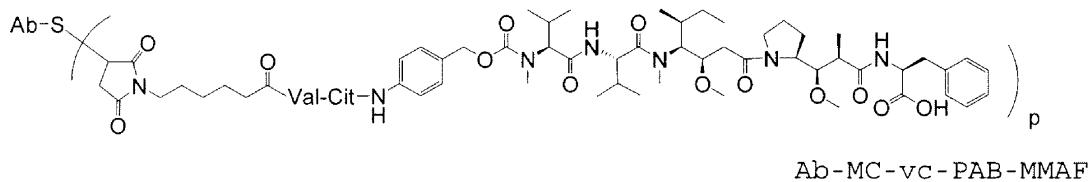
30

40



## 【 0 0 4 4 】

M M M A E 又は M M M A F 及び様々なリンカー構成成分(本明細書においてさらに記述される)を含んでなる更なる例示的な実施態様は、以下の構造及び略号を有する(ここで、 A b 10 は抗体を意味し、 p は 1 ~ 約 8 である) :



## 【 0 0 4 5 】

一般的に、ペプチドベースの薬剤成分は、2 以上 のアミノ酸及び / 又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press を参照)。アウリスタチン / ドラスタチン薬剤成分は、米国特許第 5 6 3 5 4 8 3 号 ; 米国特許第 5 7 8 0 5 8 8 号 ; Pettit 等 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465 ; Pet 50

tit 等 (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277 ; Pettit, G.R., 等 *Synthesis*, 1996, 719-725 ; Pettit 等 (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863 ; 及びDoroina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7): 778-784の方法に従って調製されうる。

#### 【0046】

##### カリケアマイシン

他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した本発明の抗体を含んでなる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、<sub>1</sub><sup>I</sup>、<sub>2</sub><sup>I</sup>、<sub>3</sub><sup>I</sup>、N-アセチル-<sub>1</sub><sup>I</sup>、PSAG及び<sub>1</sub><sup>I</sup>(Hinman等, *Cancer Research*, 53:3336-3342(1993)、Lode等 *Cancer Research*, 58:2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

#### 【0047】

##### 他の細胞障害剤

本発明の抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、BCNU、ストレプトゾイシン、ピンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されており、集合的にLL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第5877296号)が含まれる。

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolaca americana*)プロテイン(PAPI、PAPI I及びPAP-S)、モモルディカ・キャランティア(*momordica charantia*)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(*sapaonaria*)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(trichothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。

本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; DNAアーゼ)との間に形成されるイムノコンジュゲートをさらに考察する。

#### 【0048】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、<sup>At 211</sup>、<sup>I 131</sup>、<sup>I 125</sup>、<sup>Y 90</sup>、<sup>Re 186</sup>、<sup>Re 188</sup>、<sup>Sm 153</sup>、<sup>Bi 212</sup>、<sup>P 32</sup>、<sup>Pb 212</sup>及び<sup>Lu</sup>の放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えば<sup>Tc 99m</sup>又は<sup>I 123</sup>、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、MRIとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば<sup>Tc 99m</sup>又は<sup>I 123</sup>、<sup>Re 186</sup>、<sup>Re 188</sup>及び<sup>In 111</sup>は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能

10

20

30

40

50

である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【0049】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(S M C C)、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートH C L)、活性エステル類(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(10 例えば、グルタルアルデヒド)、ビスマジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(M X-D T P A)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, Cancer Research, 52: 127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

本発明の化合物は、限定するものではないが、架橋剤:市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)B M P S、E M C S、G M B S、H B V S、L C-S M C C、M B S、M P B H、S B A P、S I A、S I A B、S M C C、S M P B、S M P H、スルホ-E M C S、スルホ-G M B S、スルホ-K M U S、スルホ-M B S、スルホ-S I A B、スルホ-S M C C、及びスルホ-S M P B、及びS V S B(スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したA D Cが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照。

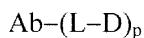
【0050】

30

抗体薬剤コンジュゲートの調製:

本発明の抗体薬剤コンジュゲート(A D C)において、抗体(A b)を、リンカー(L)を介して、一つ以上の薬剤部分(D)、例えば抗体につき約1~約20の薬剤部分にコンジュゲートする。一実施態様では、抗体一つ当たりの薬剤部分(D)の数が約1~約5であり、別の実施態様では約2~約6であり、別の実施態様では約2~約5であり、別の実施態様では約3~約4である。抗体一つ当たりの薬剤部分(D)の数は通常、抗体薬剤コンジュゲートの集団に含まれる全てのコンジュゲートの平均値であるので、抗体一つ当たりの薬剤部分(D)の数は整数でない場合もある。式IのA D Cはいくつかの手段、当業者に公知の有機化学反応、状態及び試薬を用いて調製されうる:(1)共有結合の後に薬剤部分Dと反応してA b-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた抗体の求核基の反応;及び(2)共有結合の後に抗体の求核基と反応してD-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた薬剤部分の求核基の反応、が含まれる。A D Cを調製するための更なる方法は本願明細書中に記載される。

40



式 I

リンカーは、一つ以上のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分は、6

50

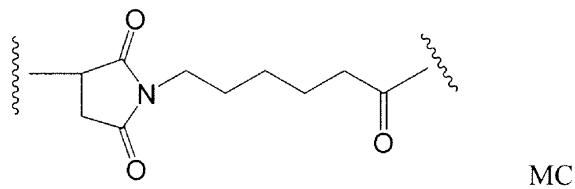
-マレイミドカプロイル(「M C」)、マレイミドプロパノイル(「M P」)、バリン-シトルリン(「val-cit」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボンイル(「P A B」)、N-スクシンイミジル4(2-ピリジルチオ)ペントノエート(「S P P」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「S M C C」)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「S I A B」)を含む。一実施態様では、リンカーはバリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル(「v c - P A B」)である。更なるリンカー成分は当分野で公知であり、そのいくつかは本願明細書において、記述される。

## 【0051】

いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸残基を含みうる。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペントペプチドなどがある。例示的なジペプチドは、バリン-シトルリン(v c 又はv a l - c i t)、アラニン-フェニルアラニン(a f 又はa l a - p h e)を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン-バリン-シトルリン(g l y - v a l - c i t)及びグリシン-グリシン-グリシン(g l y - g l y - g l y)を含む。アミノ酸リンカー成分を含んでなるアミノ酸残基は、天然に生じるもの、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

## 【0052】

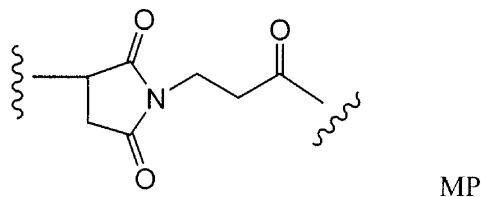
例示的なリンカー構成成分の構造を以下に示す(ここで、波形の線はA D Cの他の構成成分への共有結合の部位を示す)：



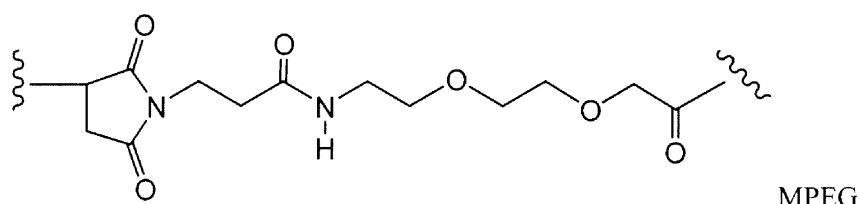
10

20

30



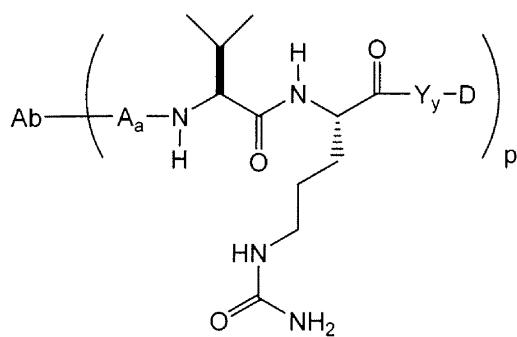
40



## 【0053】

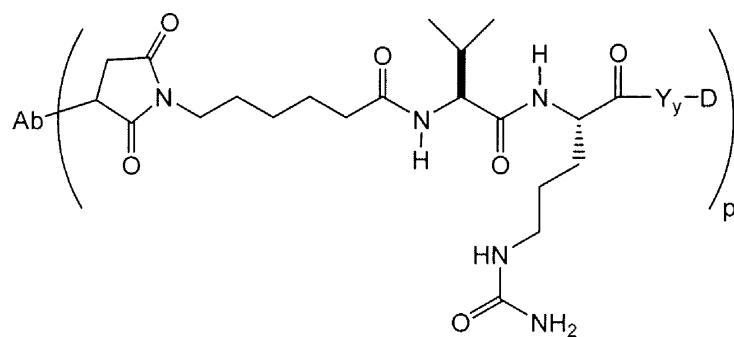
50

更なる例示的なリンカー構成成分及び略号は以下のものを含む(ここで、抗体(Ab)及びリンカーが示されており、pは1~約8である):



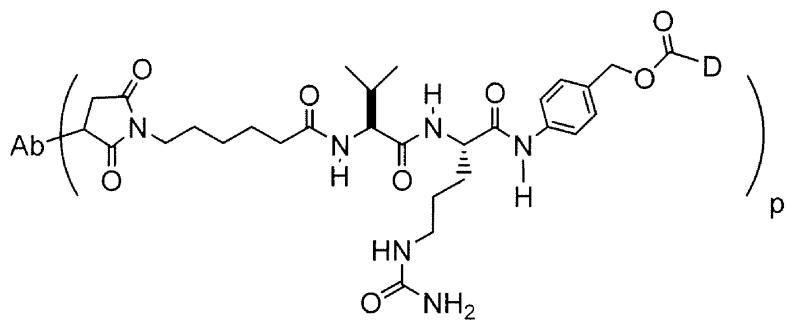
10

Val-cit



20

MC-val-cit



30

MC-val-cit-PAB

## 【0054】

抗体上の求核基には、限定するものでなく、以下のものを含む:(i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリシン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシスティン、及び(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオール及び水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群及びリンカー試薬により共有結合を形成することができる:(i) 活性エステル、例えばNHSエステル、HOBTエステル、ハロギ酸及び酸ハロゲン化物;(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド;(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド群、が含まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシスティン架橋を有する。抗体は、還元剤、例えばDTT(ジチオトレイイトール)による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシスティン架橋は、理論的には、2の反応性のチオール求核基を形成する。チオールにアミンを転換させることによって抗体に付加的な求核基を導入することができる。反応性のチオール基は、1、2、3、4又はそれ以上のシスティン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシスティンアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製する)ことによって抗体(又は、その断片)に導入されてもよい。

40

50

## 【0055】

また、本発明の抗体薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入する(リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる)ことによって生成してもよい。グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応するアルデヒド又はケトン基を形成させててもよい。生じたイミンシップ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができるタンパク質のカルボニル(アルデヒド及びケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含んでいるタンパク質はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応して、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; 米国特許第5362852号)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカー求核基と反応することができる。

10

## 【0056】

同様に、薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、以下のものを含む: 反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステル及びアリールヒドラジド基: (i) 活性エステル(例えばNHSエステル、HOBTエステル、ハロギ酸及び酸ハロゲン化物); (ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド; (iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。

20

抗体、イムノグロブリン又はこれらの断片などの細胞を標的とするタンパク質ヘリンカ- -薬剤成分をコンジュゲートするための方法は、例えば米国特許第5208020号、米国特許第6441163号、国際公開第2005037992号、国際公開第2005081711号、及び国際公開第2006/034488号に見られ、これらのすべては出典明記によって本明細書中に援用される。

## 【0057】

別法として、抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

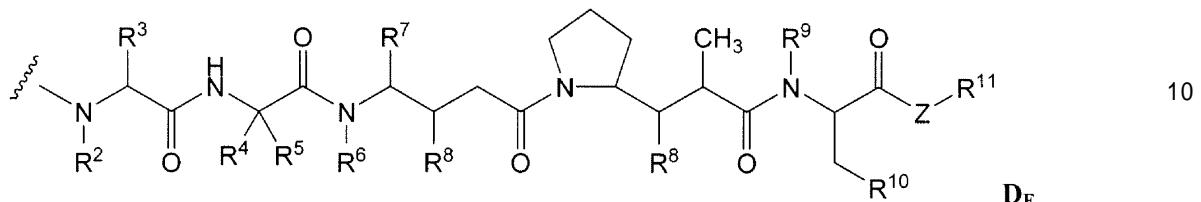
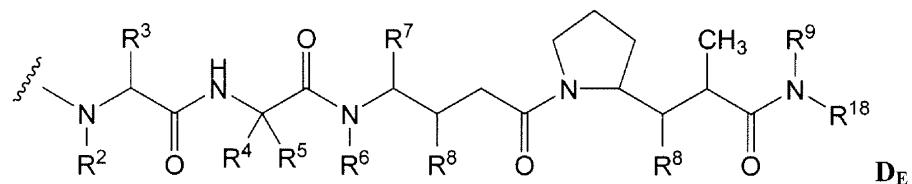
30

更なる他の実施態様では、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用して循環から非結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートさせた「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

## 【0058】

イムノコンジュゲートの一実施態様では、細胞障害性剤Dは式D<sub>E</sub>又はD<sub>F</sub>のアウリスタチンである。

40



このとき、 $R^2$  及び  $R^6$  それぞれがメチルであり、 $R^3$  及び  $R^4$  それぞれがイソプロピルであり、 $R^7$  が sec - プチルであり、それぞれの  $R^8$  が  $CH_3$ 、 $O - CH_3$ 、 $OH$  及び  $H$  から別々に選択され、 $R^9$  が  $H$  であり、 $R^{10}$  がアリールであり、 $Z$  が  $-O-$  又は  $-N$   $H-$  であり、 $R^{11}$  が  $H$ 、 $C_1 - C_8$  アルキル、又は  $-(CH_2)_2 - O - (CH_2)_2 - O$   $-(CH_2)_2 - O - CH_3$  であり、そして、 $R^{18}$  が  $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2 -$  アリールであり、

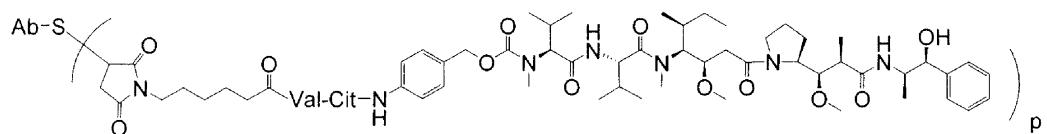
(d)  $p$  がおよそ 1 から 8 の範囲である。

【 0 0 5 9 】

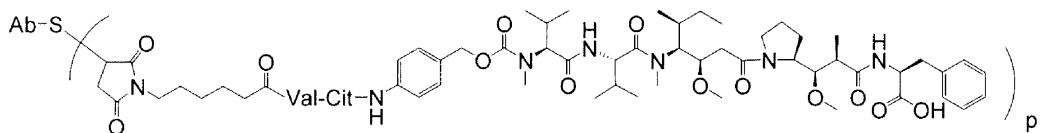
以下の実施態様は前記いずれかのイムノコンジュゲートをさらに提供する。ある実施態様では、イムノコンジュゲートはインビトロ又はインビボでの細胞殺傷活性を有する。ある実施態様では、リンカーは抗体のチオール基を介して抗体に付着している。ある実施態様では、リンカーはプロテアーゼによって切断可能である。ある実施態様では、リンカーは val-citジペプチドを含む。ある実施態様では、リンカーは p-アミノベンジルユニットを含む。ある実施態様では、p-アミノベンジルユニットは薬剤とリンカーのプロテアーゼ切断部位との間に配置する。ある実施態様では、p-アミノベンジルユニットは p-アミノベンジルオキシカルボニル(PAB)である。ある実施態様では、リンカーは 6-マレイミドカブロイルを含む。ある実施態様では、6-マレイミドカブロイルは抗体とリンカーのプロテアーゼ切断部位との間に配置する。前記の実施態様は単独で行われても、他のいずれかと組み合わせて行われてもよい。

[ 0 0 6 0 ]

ある実施態様では、薬剤はMMAE及びMMAFから選択される。ある実施態様では、イムノコンジュゲートは、式



を有し、このとき  $A_b$  は前記いずれかの抗 STEP-1 抗体であり、S は硫黄原子であり、p は 2 から 5 の範囲である。ある実施態様では、イムノコンジュゲートは、式



を有し、このとき A b は前記いずれかの抗 S T E A P - 1 抗体であり、 S は硫黄原子であり、 p はおよそ 1 からおよそ 6 、およそ 2 からおよそ 5 、およそ 2 からおよそ 6 、およそ 2 からおよそ 4 、およそ 2 からおよそ 3 、およそ 3 からおよそ 4 、およそ 3 からおよそ 5 、およそ 3 からおよそ 6 、およそ 4 からおよそ 6 の範囲である。 10

#### 【 0061 】

標識抗体造影方法 :

本発明の他の実施態様では、システイン改変抗体は、放射性核種、蛍光色素、バイオルミネセンスを誘発する基質成分、化学発光を誘発する基質成分、酵素、及び診断用、薬物動態用、治療用の適用の造影実験のための他の検出標識を有するシステインチオールによって標識されてもよい。一般に、標識されたシステイン改変抗体、すなわち「バイオマーカー」又は「プローブ」は、注入、灌流又は経口摂取によって生きている生物体、例えばヒト、げっ歯動物、又は他の小動物、灌流される臓器、又は組織試料に投与される。プローブの分布は経時的に検出され、画像に表される。 20

#### 【 0062 】

製造品 :

本発明の他の態様では、上記の疾患の治療に有用な物質を具備する製造品又は「キット」が提供される。該製造品は容器と該容器上又は該容器に付随するラベル又はパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、ブリスター包装などが含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成される。容器は、症状を治療するために有効な抗体 - 薬剤コンジュゲート (ADC) 組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる(例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストップバーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグでありうる)。組成物中の少なくとも一つの活性薬剤は ADC である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌などの選択された症状の治療に使用されることを示す。あるいは、もしくは付加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用の静菌水 (BWF1) 、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第二の(又は第三の)容器を更に具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業上及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。 30

#### 【 0063 】

製薬的組成物 :

ある態様では、前記いずれかのイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含有する製薬的組成物が提供される。ある態様では、製薬的組成物を個体に投与することを含む、前立腺、肺、大腸、膀胱、又は卵巣の細胞増殖性疾患、或いはユーリング肉腫の治療方法が提供される。一実施態様では、前立腺、肺、大腸、膀胱、又は卵巣の癌、並びにユーリング肉腫といった細胞増殖性疾患は、原発性の前立腺、肺、大腸、膀胱、又は卵巣の癌、或いはユーリング肉腫の転移である。一実施態様では、細胞増殖性疾患は、細胞の表面上の S T E A P - 1 の発現増加と関係している。 40

一態様では、 S T E A P - 1 へのイムノコンジュゲートの結合に許容される条件下で、前記いずれかのイムノコンジュゲートに細胞を曝すことを含む、細胞増殖の阻害方法が提供される。一実施態様では、前立腺、肺、大腸、膀胱、又は卵巣の細胞、或いはユーリング肉腫は腫瘍細胞である。一実施態様では、腫瘍細胞は、限定しないが、原発性の前立腺

10

20

30

40

50

、肺、大腸、膀胱の癌性腫瘍、或いはユーイング肉腫の転移を含む、前立腺、肺、大腸、膀胱の細胞、或いはユーイング肉腫の増殖性疾患に罹っているか、又は罹っていることが疑われる哺乳動物の、前立腺、肺、大腸、膀胱又は卵巣の腫瘍細胞、或いはユーイング肉腫の細胞である。一実施態様では、前立腺、肺、大腸、膀胱の細胞、又はユーイング肉腫は異種移植である。一実施態様では、インビトロで曝す。一実施態様では、インビボで曝す。

一態様では、前立腺、肺、又は大腸の細胞増殖性疾患（又はそのような疾患の原発発生の転移）に罹っている哺乳動物の血清可溶性 S T E A P - 1 をアッセイし、該疾患の臨床進行又は退行を測定するため、又は腫瘍の負荷や再発を評価するための本発明の抗 S T E A P - 1 抗体の使用方法が提供される。

10

【図面の簡単な説明】

【0064】

本特許又は出願は、少なくとも一つのカラーの図面を含む。カラーの図面を含む本特許又は特許出願の公開文献の写しは、請求及び必要な料金の支払いをもって特許庁により提供される。

【0065】

【図1】マウス及びカニクイザル(c y n o)(それぞれ配列番号：2及び3)のS T E A P - 1 と整列配位させたヒトS T E A P - 1 のアミノ酸配列(配列番号27)を示す。細胞外ドメイン1、2及び3を標識し、囲みで示す。

【図2A】キメラ抗体(120キメラ)及びヒト化抗体(120グラフト)と整列配位し、ヒトサブグループI I配列と整列配位させたマウス120.545抗S T E A P - 1 抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。C D Rを囲みで示す(C D R - L 1、C D R - L 2及びC D R - L 3)。C D Rを括弧で囲んでいる配列はフレームワーク配列である(F R - L 1からF R - L 4)。配列はカバット番号付けに従って番号付けする。囲ったC D Rの近くのK a b a t、C h o t h i a及びc o n t a c t C D Rを示す。

20

【図2B】キメラ抗体(120キメラ)及びヒト化抗体(120グラフト)と整列配位し、ヒトI配列と整列配位させたマウス抗S T E A P - 1 抗体(120.545)の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。ヒト化変異体24、37、48、67、及び37/48、67、71、及び78は、120グラフト抗体の重鎖に以下のアミノ酸変異：A 2 4 V、V 3 7 I、V 4 8 M、F 6 7 I、及びL 7 8 Fを作製して調製した。C D Rを囲みで示す。F R - H 1、F R - H 2、F R - H 3及びF R - H 4配列はC D R(C D R - H 1、C D R - H 2及びC D R - H 3)を囲んでいる。配列はカバット番号付けに従って番号付けする。囲ったC D Rの近くのK a b a t、C h o t h i a及びc o n t a c t C D Rを示す。

30

【図3A - 3B】以下に示す配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒト可変重鎖(V H)コンセンサスフレームワーク配列を示す。ここで、F Rの配列番号はF R - H 1、F R - H 2、F R - H 3、F R - H 4の順に列挙する。-ヒトV HサブグループIコンセンサスフレームワーク「A」からカバットC D Rを除いたもの(配列番号26、27、28、29)。-ヒトV HサブグループIコンセンサスフレームワーク「B」、「C」及び「D」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの(配列番号30、31、28、29；配列番号30、31、32、29；及び配列番号30、31、33、29)。-ヒトV HサブグループIIコンセンサスフレームワーク「A」からカバットC D Rを除いたもの(配列番号34、35、36、29)。-ヒトV HサブグループIIコンセンサスフレームワーク「B」、「C」及び「D」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの(配列番号37、38、36、29；配列番号37、38、39、29；及び配列番号37、38、40、29)。-ヒトV HサブグループIIIコンセンサスフレームワーク「A」からカバットC D Rを除いたもの(配列番号41、42、43、29)。-ヒトV HサブグループIIIコンセンサスフレームワーク「B」、「C」及び「D」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの(配列番号44、45、43、29；配列番号44、45、46、29；及び配列番号44、45、46、29)。-ヒトV Hアクセプター1フレームワーク「A」からカバットC D Rを除いたもの(配列番号48、42、49、29)。-ヒ

40

50

トV H アクセプターフレームワーク「B」及び「C」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの(配列番号 4 4、 4 5、 4 9、 2 9；及び配列番号 4 4、 4 5、 5 0、 2 9)。 - ヒトV H アクセプター 2 フレームワーク「A」からカバット C D R を除いたもの(配列番号 4 8、 4 2、 5 1、 2 9)。 - ヒトV H アクセプター 2 フレームワーク「B」、「C」及び「D」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの(配列番号 4 4、 4 5、 5 1、 2 9；配列番号 4 4、 4 5、 5 2、 2 9；及び配列番号 4 4、 4 5、 5 3、 2 9)。

【図 4 A - 4 B】以下に示す配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒト可変軽鎖(V L)コンセンサスフレームワーク配列を示す。 - ヒトV L サブグループI-1 コンセンサスフレームワーク( v 1-1)：配列番号 5 4、 5 5、 5 6、 5 7。 - ヒトV L サブグループI コンセンサスフレームワーク( v 1)：配列番号 5 4、 5 8、 5 6、 5 7。 - ヒトV L サブグループII コンセンサスフレームワーク( v 2)：配列番号 5 8、 5 9、 6 0、 5 7。 - ヒトV L サブグループIII コンセンサスフレームワーク( v 3)：配列番号 6 1、 6 2、 6 3、 5 7。 - ヒトV L サブグループIV コンセンサスフレームワーク( v 4)：配列番号 6 4、 6 5、 6 6、 5 7。

【図 5】天然配列ヒト Ig G Fc 領域配列、hum Ig G 1(非 A アロタイプ、配列番号 8 5 及び配列番号 8 5 内のアミノ酸配列 S R E E M が S R D E L に変化している A アロタイプ)、hum Ig G 2(配列番号 8 6)、hum Ig G 3(配列番号 8 7)及び hum Ig G 4(配列番号 8 8)のアラインメントを示す。配列間で異なる部分にアステリスクを付した。配列の上の数は EU 番号付けシステムを表す。例示的な 定常領域も示す。

【図 6 A】各抗体又はファージ上の変異体のディスプレイのレベルについて正規化した FACS 分析を示す。図 6 A は、4 つの例示的な抗体について STEAP - 1 発現細胞(L B 5 0)の FACS 变化を示す。

【図 6 B】各抗体又はファージ上の変異体のディスプレイのレベルについて正規化した FACS 分析を示す。図 6 B は、図及び実施例 1 に示すように、様々な抗体について STEAP - 1 非発現細胞(S 4 0 8)の FACS 变化を示す。

【図 6 C】各抗体又はファージ上の変異体のディスプレイのレベルについて正規化した FACS 分析を示す。ファージディスプレイレベルについて正規化した後の FACS 变化アラインメントである。

【図 6 D】各抗体又はファージ上の変異体のディスプレイのレベルについて正規化した FACS 分析を示す。ファージディスプレイレベルについて正規化した後の FACS 变化アラインメントである。

【図 7 A - C】細胞表面上に発現するヒト STEAP - 1 に対する、抗 STEAP - 1 マウス、キメラ及びヒト化バージョン 2 4 抗体の結合を示す FACS 分析をグラフで示す。図 7 A - C は、抗 STEAP - 1 マウス 1 2 0、キメラ 1 2 0 及びヒト化 1 2 0 v . 2 4 が、マウス STEAP - 1 でなくヒト及びカニクイザルの STEAP - 1 を結合することを示す。

【図 7 D - F】細胞表面上に発現するヒト STEAP - 1 に対する、マウス 1 2 0、1 2 0 キメラ、及びヒト化 1 2 0 v . 2 4 (クローン 6 7)の結合を示す FACS プロットである。外因性 STEAP - 1 は、2 9 3 細胞(L B 5 0 細胞と称する)及び PC 3 細胞(P S 5 . 4 細胞と称する)において安定して発現され(図 7 D 及び E)、LNCaP B R 細胞において内因的に発現された(図 7 F)。

【図 8 A】3 mg / kg のマウス抗 STEAP - 1 1 2 0 - M C - v c - P A B - M M A E の投与は、前立腺腫瘍(LNCaP - N e r 細胞)異種移植片モデルにおいて有効であったことを示すグラフである。

【図 8 B】ヒト化抗 STEAP - 1 抗体 1 2 0 v . 2 4 - M C - v c - P A B - M M A E (3 mg / kg)、1 2 0 v . 2 4 - M C - M M A F (6 mg / kg)、1 2 0 v . 2 4 - M C - M M A F (1 2 mg / kg)、及び抗 STEAP - 1 1 2 0 キメラ - M C - v c - P A B - M M A E (3 mg / kg)の単回用量投与は、LNCaP 細胞異種移植片前立腺腫瘍モデルにおいて有効であることが示されたことを示すグラフである。実施例 4 を参照のこと。

【図9】3mg/kgの抗STEAP-1抗体120キメラ-MC-vc-PAB-MM  
AE(抗STEAP vc MMAEと略す)、又は6mg/kgの抗STEAP-1 120  
キメラ-MC-MMAF(抗STEAP mc MMAFと略す)の投与は、LNCaP細胞  
を移植した去勢したSCIDベージュマウスの前立腺癌異種移植片モデルにおいて有効で  
あったことが示されたことを示す。実施例4を参照のこと。

【図10】抗STEAP-1抗体120キメラ-MC-vc-PAB-MM  
AE(抗STEAP vc MMAEと略す)(3mg/kg)の投与は、LuCap77細胞を移植したSCID  
ベージュ雄マウス(アンドロゲン依存性)の前立腺癌異種移植片モデルにおいて有効  
であったことが示されたことを示すグラフである。実施例4を参照のこと。

【図11】3mg/kgのヒト化抗STEAP-1抗体120v.24-MC-vc-P  
AB-MM  
AE、6mg/kg及び12mg/kgのヒト化抗STEAP-1抗体120  
v.24-MC-MMAFの、LuCap35V前立腺腫瘍を移植した去勢したSCID  
ベージュマウスへの投与は、コントロールと比較して有効であることが示されたことを示  
すグラフである。実施例4を参照のこと。

【図12】細胞膜に埋め込まれたSTEAP-1を図示する。抗STEAP-1抗体12  
0結合は構造依存的であり、STEAP-1(配列番号:102として開示されるペプチ  
ド)の線状エピトープを認識しない。

【図13A-D】図13は免疫組織化学によって検出される、細胞の表面上に発現される  
STEAP-1を示す。図13Aは、細胞表面上に外因性STEAP-1を発現する29  
3細胞の免疫組織化学的染色を示す。図13Bは、細胞表面上に外因性STEAP-1を  
発現するPC3細胞の免疫組織化学的染色を示す。図13Cは、細胞表面上に内因性ST  
EAP-1を発現するLNCaP細胞の免疫組織化学的染色を示す。図13Dは、細胞表  
面上に内因性STEAP-1を発現するLuCap77細胞の免疫組織化学的染色を示す  
。

【図14A-B】抗STEAP-1抗体120v.24-MC MMAF及び抗STEAP  
-1抗体120v.24-MC-vc-PAB-MM  
AEの、インビトロでのSTEAP  
-1発現細胞の殺傷における相対的な有効性を示すグラフである。PS5.4細胞(図14  
A)は、細胞表面上にSTEAP-1を発現するようにSTEAP-1をコードするベク  
ターにて形質転換したPC3細胞である。LB50細胞(図14B)は、細胞表面上にST  
EAP-1を発現するようにSTEAP-1をコードするベクターにて形質転換した29  
3細胞である。

【図14C-E】LNCaP細胞(図14C)はSTEAP-1を外因的に発現する。「P  
C3vec」(図14D)及び「293vec」(図14E)はそれぞれベクターコントロ  
ールにて形質転換した、293細胞及びPC3細胞を指す。

【図15】薬剤成分が、軽鎖(LC-ADC)、重鎖(HC-ADC)及びFc領域(Fc  
-ADC)内の改変したシステイン基に付着しているシステイン改変抗STEAP-1抗体  
薬剤コンジュゲート(ADC)を図示する。

【図16】(i)還元剤TCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩)によ  
つて、システイン改変抗STEAP-1抗体(Thiomab)内のシステインジスルフィド  
付加物及び鎖内ないし鎖間のジスルフィドを還元する、(ii)dhAA(デヒドロアスコル  
ビン酸)にて部分的に酸化させる、すなわち再酸化させて鎖内及び鎖間のジスルフィド再  
形成させる、そして、(iii)薬剤-リンカー中間物と再酸化した抗体をコンジュゲートさ  
せて、システイン改変抗STEAP-1抗体薬剤コンジュゲート(ADC)を形成させる、  
という工程を示す。

【図17A】システイン改変抗STEAP-1抗体(thiomab)を生成するため  
に作製したアミノ酸置換の部位を示す。図17Aは、カバットシステムに従って、対応する  
配列番号付け及び正規化した番号付けと共にthiomab-LC変異体V205Cを示す(掲  
載の順にそれぞれ配列番号:103-113)。

【図17B】EUシステムに従って、対応する配列番号付け及び正規化した番号付けと共に  
thiomab-HC変異体A118Cを示す(掲載の順にそれぞれ配列番号:114-12

10

20

30

40

50

4)。

【図17C】E Uシステムに従って、対応する配列番号付け及び正規化した番号付けと共にthio-Fc変異体S400Cを示す(掲載の順にそれぞれ配列番号:125-135)。

【図18A-F】抗STEAP-1 thio抗体薬剤コンジュゲート(TDC)が細胞表面に発現されるSTEAP-1に結合する能力を保持していることを示すFACS分析を示す。図18A-Cは、抗STEAP-1 TDC thio-human120-vc-PAB-MMAE(LCV205C)(huSteap1 TDC(L205C)vcEと略す)及びthio-human120-vc-PAB-MMAE(HCA118C)(huSteap1 TDC(HCA118C)vcEと略す)の、細胞表面上に発現されるヒトSTEAP-1に対する結合を示すFACSプロットを示す。外因性STEAP-1は293細胞(LB50細胞と称す)及びPC3細胞(PS5.4細胞と称す)において安定して発現され(図18A及び18B)、LNCaP B R細胞では内因的に発現される(図18C)。図18D、E及びFはそれぞれ図17A、B及びCに示すFACS変化のアラインメントである。

【図19A-C】抗STEAP-1 thio抗体薬剤コンジュゲート(TDC)であるthio-human120-vc-PAB-MMAE(LCV205C)(huSteap1 TDC(L205C)vcEと略す)及びthio-human120-vc-PAB-MMAE(HCA118C)(huSteap1 TDC(HCA118C)vcEと略す)の、インビトロでのSTEAP-1発現細胞の殺傷における相対的な有効性を示す。LB50細胞(図19A)は、細胞表面上にSTEAP-1を発現するようにSTEAP-1をコードするベクターにて形質転換した293細胞である。PS5.4細胞(図19B)は、細胞表面上にSTEAP-1を発現するようにSTEAP-1をコードするベクターにて形質転換したPC3細胞である。LNCaP細胞(図19C)はSTEAP-1を外因的に発現する。

【図20】3mg/kgの抗STEAP-1 TDC thio-human120-vc-PAB-MMAE(HCA118C)(huSteap1 HC TDC vcEと略す)の投与は、LNCaP細胞を移植した雄SCIDベージュマウス(アンドロゲン依存性)の前立腺癌異種移植片モデルにおいて、コントロールと比較して有効であることが示されたことを示すグラフである。実施例8を参照のこと。

【図21】3mg/kgの抗STEAP-1 TDC thio-human120-vc-PAB-MMAE(HCA118C)(huSteap1 HC TDC vcEと略す)又は、1、3又は6mg/kgのthio-human120-MC-MMAF(HCA118C)(huSteap1 HC TDC mcFと略す)の投与は、LNCaP細胞を移植した雄SCIDベージュマウス(アンドロゲン依存性)の前立腺癌異種移植片モデルにおいて、コントロールと比較して有効であったことが示されたことを示すグラフである。実施例8を参照のこと。

【図22】3mg/kgの抗STEAP-1 TDC thio-human120-vc-PAB-MMAE(HCA118C)(huSteap1 HC TDC vcEと略す)又は、3又は6mg/kgのthio-human120-MC-MMAF(HCA125C)(huSteap1 HC TDC mcFと略す)の投与は、LuCaP 35V前立腺腫瘍を移植した去勢したSCIDベージュマウスの前立腺癌異種移植片モデルにおいて、コントロールと比較して有効であったことを示すグラフである。

【図23】「シモンズIV」又は単に「SGIV」と称するシステイン改変抗STEAP-1抗体(thio-mAb)を生成するために作製したアミノ酸置換の部位を示す。SGIVの軽鎖アミノ酸配列(配列番号:90)を、mu120抗体の軽鎖(配列番号:5)及び120.v24抗体の軽鎖(配列番号:91)と整列配置して示す。カバットシステムに従って、対応する配列番号付け及び正規化した番号付けと共にthio-LC変異体SGIVを、カバットシステムに従って、対応する配列番号付け及び正規化した番号付けと共に親抗体mu120並びにthio-LC変異体120.v24と整列配置して示す。CDRを囲みで示す(CDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3)。CDRを括弧で囲んでいる配列はフレームワーク配列である(FR-L1からFR-L4)。配列はカバット番号付けに従って番号付けする。囲ったCDRの近くのKabat、Chothia及びcontact CDRを示す。実施例9を参照。

【図24】SGIV及び120.v.24抗体の様々なシステイン改変抗STEAP-1抗

10

20

30

40

50

体(thio-mAb)変異体を生成するために作製したフレームワークアミノ酸置換の部位を示す。SGIVの軽鎖のアミノ酸配列(配列番号: 136)は、カバットシステムに従った正規化した番号付けにより、変異体LSVLVH1(配列番号: 92); LSVLVH2(配列番号: 93); LSQ(配列番号: 94); 及びLSCH1(配列番号: 95)と整列配置させて示す。120.v24の軽鎖のアミノ酸配列(配列番号: 137)は、カバットシステムに従った正規化した番号付けにより、変異体EDFW1(配列番号: 96); EDFW2(配列番号: 97); EDFW3(配列番号: 98); EDa11(配列番号: 99); EDPrio(配列番号: 100); 及びEDp1(配列番号: 101)と整列配置させて示す。CDRを囲みで示す。配列はカバット番号付けに従って番号付けする。実施例9を参照のこと。

10

【図25A-H】LNCaP.BR細胞の表面上に発現するSTEAP-1に対する抗体結合のスキャッチャードプロットを示す。2通りの試料を120.v24抗体(図25A-D)及びSGIV変異体(図25E-H)を用いて測定した。実施例9を参照のこと。

【図26A-H】293.LB50細胞の表面上に発現するSTEAP-1に対する抗体結合のスキャッチャードプロットを示す。2通りの試料を120.v24抗体(図26A-D)及びSGIV変異体(図26E-H)を用いて測定した。実施例9を参照のこと。

【図27】PC-3-PS5.4、293-LB50及びLNCaP-BR細胞、並びに過渡的にSTEAP-1を発現する293細胞における、mu1789、mu120、Fcキメラ、ヒト化120.v24、thio-120.v24及びthio-SGIV抗体についての平均結合親和性を、スキャッチャード分析によって測定して比較した表である。実施例9を参照のこと。

20

【図28A-D】SGIV及び120.v24抗体試料を用いた、STEAP-1を安定して形質移入した細胞(293STEAP-1 LB48、293STEAP-1 LB50および293STEAP-1 LB53)のFACS変化を示すFACS分析を示す。実施例9を参照のこと。

【図29】SGIV及び120.v24抗体を産生する細胞の異なる生成物において観察される抗体力値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0066】

(本発明の実施態様の詳細な説明)

30

STEAP-1に結合する単離された抗体が提供される。さらに、抗STEAP-1抗体を含んでなるイムノコンジュゲートが提供される。本発明の抗体及びイムノコンジュゲートは、例えば、STEAP-1の発現の変更、例えば発現の増加と関係している疾患の診断又は治療に有用である。ある実施態様では、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、腫瘍又は癌などの細胞増殖性疾患の診断又は治療に有用である。ある実施態様では、STEAP-1は、前立腺、肺又は大腸の組織の腫瘍又は癌に発現される。ある実施態様では、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、STEAP-1、例えば細胞表面上に発現されるSTEAP-1の検出に有用である。ある実施態様では、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、前立腺、肺又は大腸組織の、正常細胞及び/又は腫瘍又は癌細胞の表面におけるSTEAP-1発現の検出に有用である。

40

抗STEAP-1抗体をコードするポリヌクレオチドが提供される。抗STEAP-1抗体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供され、さらに該ベクターを含む宿主細胞が提供される。また、本発明のポリヌクレオチド、抗STEAP-1抗体又はイムノコンジュゲートのいずれか一又は複数を含有する製剤を含む組成物が提供される。

【0067】

抗STEAP-1抗体、抗体と薬剤のコンジュゲート、又はイムノコンジュゲートを用いて腫瘍又は癌を含むがこれらに限定されない細胞増殖性疾患の治療方法が提供される。このような方法は、限定しないが、哺乳動物の前立腺、肺又は大腸における腫瘍及び癌の治療を含む。抗STEAP-1抗体、抗体と薬剤のコンジュゲート又はイムノコンジュゲートを用いて組織細胞上のSTEAP-1の発現を検出する方法が提供される。このよう

50

な方法は、限定しないが、非限定的な例として、前立腺、肺又は大腸細胞の正常細胞、腫瘍細胞、又は癌細胞上の、S T E A P - 1 の発現を検出を含む。

#### 【 0 0 6 8 】

##### 一般的技術

本願明細書中に記載又は引用される技術及び手順は、一般に十分に理解されるものであり、当業者によって従来の方法論を用いて共通して実施されるものである。その例として、以下の文献に記載される方法論が広く利用されている。Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, 等編集, (2003)) ; the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 10 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames 及び G. R. Taylor 編集 (1995))、Harlow and Lane, 編集 (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, 編集. (1987)) ; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, 編集, 1984) ; Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, 編集, 1998) Academic Press ; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), 編集, 1987) ; Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press ; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, 及び D. G. Newell, 編集, 1993-8) J. Wiley and Sons ; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir 及び C. C. Blackwell, 編集) ; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller 及び M. P. Calos, 編集, 1987) ; PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis 等, 編集, 1994) ; Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan 等, 編集, 1991) ; Short Protocols in Molecular Biology (Wiley 及び Sons, 1999) ; Immunobiology (C. A. Janeway 及び P. Travers, 1997) ; Antibodies (P. Finch, 1997) ; Antibodies: a practical approach (D. Catty., 編集, IRL Press, 1988-1989) ; Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd 及び C. Dean, 編集, Oxford University Press, 2000) ; Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow 及び D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; The Antibodies (M. Zanetti 及び J. D. Capra, 編集, Harwood Academic Publishers, 1995) ; 及び Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita 等, 編集, J. B. Lippincott Company, 1993)。 20 30

#### 【 0 0 6 9 】

##### 定義と省略記号

###### 定義

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び / 又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、抗体の研究、診断又は治療的な使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。ある実施態様では、タンパク質は、(1)例えばローリー法で測定した場合 95 % を超える抗体、ある実施態様では 99 重量 % を超えるまで、(2)例えばスピニングカップシーケエネーターを使用することにより、少なくとも 15 の N 末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに充分なほど、あるいは、(3)例えばクーマシープルーあるいは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下での SDS-PAGE により均一になるまで十分なほど精製される。抗体の自然環境の少なくとも一の成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイトでの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一の精製工程により調製される。 40

#### 【 0 0 7 0 】

「単離された」核酸分子は、例えば天然の環境に通常付随している少なくとも一の他の核酸分子から分離された核酸分子である。さらに、単離された核酸分子は、例えば、核酸分子を通常発現するが、その核酸分子がその天然の染色体位置と異なる染色体位置にあるか又は染色体外に存在する、細胞に含まれる核酸分子を含む。

「精製」とは、分子が、含まれる試料中の重量にして少なくとも 95%、又は重量にして少なくとも 98% の濃度で試料中に存在することを意味する。

【0071】

ここで用いる「実質的に類似」、「実質的に同じ」なる用語は、当業者が 2 つの数値(例えば、本発明の抗体に関連するもの、及び参照 / 比較抗体に関連する他のもの)の差異に、該値(例えば  $K_d$  値)によって測定される生物学的性質上わずかに又は全く生物学的及び / 又は統計学的有意差がないと認められるほど、2 つの数値が有意に類似していることを意味する。前記 2 つの値間の差異は、参照 / 比較値の例えは約 50% 以下、約 40% 以下、約 30% 以下、約 20% 以下、及び / 又は約 10% 以下である。

ここで用いる「実質的に減少」、又は「実質的に異なる」という句は、当業者が 2 つの数値(一般に、分子に関連するもの、及び参照 / 比較分子に関連する他のもの)の差異に、該値(例えば  $K_d$  値)によって測定される生物学的性質上統計学的に有意であると認められるほど、2 つの数値が有意に異なることを意味する。前記 2 つの値間の差異は、参照 / 比較分子の値の、例えは約 10% より大きく、約 20% より大きく、約 30% より大きく、約 40% より大きく、及び / 又は約 50% より大きい。

【0072】

ここで使用される「ベクター」という用語は、それが結合している他の核酸を輸送することのできる核酸分子を意味するものである。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは付加的な DNA セグメントが結合されうる円形の二本鎖 DNA を意味する。他の型のベクターはファージベクターである。他の型のベクターはウイルスベクターであり、付加的な DNA セグメントをウイルスゲノムへ結合させうる。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製することができる(例えは、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターとエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えは、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、宿主ゲノムと共に複製する。更に、所定のベクターは、それらが作用可能に結合している遺伝子の発現を指令し得る。このようなベクターはここでは「組換え発現ベクター」(又は単に「発現ベクター」と呼ぶ。一般に、組換え DNA 技術で有用な発現ベクターはしばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、プラスミドが最も広く使用されているベクターの形態であるので、「プラスミド」と「ベクター」を相互交換可能に使用する場合が多い。

【0073】

ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、DNA 及び RNA が含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び / 又はそれらの類似体(アナログ)、又は DNA もしくは RNA ポリメラーゼにより、もしくは合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質とすることができます。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えはメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。存在するならば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組み立ての前又は後になされ得る。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは合成後になされる修飾(一又は複数)、例えは標識との結合を含みうる。他のタイプの修飾には、例えは「キャップ(caps)」、類似体との自然に生じたヌクレオチドの一又は複数の置換、ヌクレオチド間修飾、例えは非荷電連結(例えはホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミダート、カルバマート等)及び荷電連結(ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等)を有するもの、ペンダント部分、例えはタンパク質(例えはヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、p 1 y - L - リジン等)を含むもの、インターラーカー(intercalators)を有するもの(例えはアクリジン、ソラレン等)、キレート剤(例えは金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等)を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾された連結を含むもの(例えはアルファアノマー核酸等)、並びにポリヌクレオチド(類)の未修飾形態が含まれる。更に、糖類中に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えはホスホナート基、ホスファート基で置き換えられてもよく、標準的な保護基

10

20

30

40

50

で保護されてもよく、又は付加的なヌクレオチドへのさらなる連結を調製するように活性化されてもよく、もしくは固体又は半固体担体に結合していてもよい。5'及び3'末端のOHはホスホリル化可能であり、又は1~20の炭素原子を有する有機キヤップ基部分又はアミンで置換することもできる。また他のヒドロキシルは標準的な保護基に誘導体化されてもよい。またポリヌクレオチドは当該分野で一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖類の類似形態のものをさらに含み得、これらには例えば2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロ又は2'-アジド-リボース、炭素環式糖の類似体、アルファ-アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース類又はリキソース類、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、及び非塩基性ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドが含まれる。一又は複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えてよい。これらの代替の連結基には、限定されるものではないが、ホスファートがP(O)S(「チオアート」)、P(S)S(「ジチオアート」)、「(O)NR<sub>2</sub>(「アミダート」)、P(OR)、P(OR')、CO又はCH<sub>2</sub>(「ホルムアセタール」)と置き換えられた実施態様のものが含まれ、ここでそれぞれのR及びR'は独立して、H又は、エーテル(-O-)結合を含んでいてもよい置換もしくは未置換のアルキル(1-20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラルジル(araldyl)である。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。先の記述は、RNA及びDNAを含むここで引用される全てのポリヌクレオチドに適用される。

ここで使用される「オリゴヌクレオチド」とは、短く、一般的に単鎖であり、また必ずしもそうではないが、一般的に約200未満のヌクレオチド長さの、一般的に合成のポリヌクレオチドを意味する。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」なる用語は、相互に排他的なものではない。ポリヌクレオチドについての上述した記載はオリゴヌクレオチドと等しく、十分に適用可能である。

#### 【0074】

ここで同定した参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定の参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を測定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegaalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作製され、ソースコードは米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、ソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好みしくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

#### 【0075】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うことができる)は次のように計算される:

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムアラ

10

20

30

40

50

インメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に断らない限りは、ここでの全ての%アミノ酸配列同一性値は、直ぐ上のパラグラフに示したようにA L I G N - 2 コンピュータプログラムを用いて得られる。

#### 【0076】

特に明記しない限り、本明細書で用いられる「S T E A P - 1」なる用語は、靈長類(例えばヒト、カニクイザル(c y n o))及び齧歯動物(例えばマウス及びラット)のような哺乳動物を含む任意の脊椎動物の供与源からの任意の天然のS T E A P - 1を指す。この用語は、細胞内のプロセシングから生じる任意の形態のS T E A P - 1だけでなく、「完全長の」プロセシングされていないS T E A P - 1を包含する。また、この用語は、天然に生じるS T E A P - 1の変異体、例えばスプライス変異体、対立遺伝子変異体及びアイソフォームも包含する。ヒトS T E A P - 1のアミノ酸配列を図1(配列番号1)に示す。一実施態様では、S T E A P - 1は、正常な前立腺、肺又は大腸細胞の表面などの細胞表面上に発現され、その発現は、前立腺、肺又は大腸癌細胞、或いはそのような癌細胞の転移部位において増大する。図1は、マウス及びカニクイザルのS T E A P - 1のアミノ酸配列(それぞれ配列番号2及び3)も表している。

#### 【0077】

「抗体」(A b)及び「免疫グロブリン」(I g)は、類似の構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体は、特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体と、一般に抗原特異性を欠く抗体様分子の双方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えばリンパ系では低レベルで、骨髄腫では高レベルで産出される。

「抗体」及び「免疫グロブリン」なる用語は、最も広義で相互に交換可能に使用され、モノクローナル抗体(例えば、全長又は無傷のモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多重特異性抗体(例えば、所望の生物活性を示す限り二重特異性抗体)が含まれ、さらにある種の抗体断片(ここに詳細に記載されるもの)も含まれ得る。抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化及び/又は親和成熟したものであってよい。

#### 【0078】

「抗S T E A P - 1抗体」又は「S T E A P - 1に結合する抗体」は、抗体がS T E A P - 1をターゲッティングする際に診断用及び/又は治療用の薬剤として有用である程度に十分な親和性を有してS T E A P - 1を結合することが可能である抗体を指す。好ましくは、関係がなくS T E A P - 1でないタンパク質への抗S T E A P - 1抗体の結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ(R I A)によって測定するところの、S T E A P - 1への抗体の結合のおよそ10%未満である。ある実施態様では、S T E A P - 1に結合する抗体は、1 μM、1 0 0 n M、1 0 n M、1 n M、又は0.1 n Mの解離定数(K d)を有する。ある実施態様では、抗S T E A P - 1抗体は、異なる種のS T E A P - 1間で保存されるS T E A P - 1のエピトープに結合する。

#### 【0079】

抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを意味する。重鎖の可変ドメインは「V H」と称されうる。軽鎖の可変ドメインは「V L」と称されうる。これらのドメインは一般に抗体の最も可変の部分であり、抗原結合部位を含む。

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の相補性決定領域(C D R)又は高頻度可変領域(H V R)と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(F R)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、

10

20

30

40

50

3つのCDRにより連結されたシート配置を主にとる4つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRによって近接して結合され、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性への抗体の関与を示す。

#### 【0080】

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ( )及びラムダ( )と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

10

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体(免疫グロブリン)は異なるクラスが割り当てられる。免疫グロブリンには5つの主なクラスがある: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、更にそれらは、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、及びIgA<sub>2</sub>等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 及び $\mu$ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られており、例えば、Abbas等. Cellular and Mol. Immunology, 第4版(2000)に概説されている。抗体は、抗体と1以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有結合性又は非共有結合性の会合により形成された融合大分子の一部であり得る。

#### 【0081】

20

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、ほぼインタクトな形態の抗体を指し、以下に定義するような抗体断片は意味しない。この用語は、特にFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

「抗体断片」は完全な抗体の一部のみを含んでなるものであり、その一部は、完全な抗体に存在する場合のその一部に通常関連する機能の少なくとも一、及び多ければその殆ど又は全てを保持する。一実施態様では、抗体断片は完全な抗体の抗原結合部位を含んでなるために、抗原結合能を有する。他の実施態様では、抗体断片は、例えばFc領域を含むものは、完全な抗体に存在する場合のFc領域に通常関連する生物学的な機能、例えばFcRn結合、抗体半減期の調節、ADC/C機能及び補体結合の少なくとも一を保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体と実質的に類似したインビボ半減期を有する一価性抗体である。例えば、このような抗体断片は、インビボ安定性を断片に与えることができるFc配列に結合した抗原結合アームを含んでもよい。

30

#### 【0082】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')<sub>2</sub>断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

「Fv」は、完全な抗原結合部位を含む最小抗体断片である。ある実施態様では、一本鎖Fv種は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖Fv(scfv)種では、柔軟なペプチドリンクによって1の重鎖及び1の軽鎖可変ドメインは共有結合性に連鎖することができ、よって軽鎖及び重鎖は、一本鎖Fv種におけるものと類似の「二量体」構造に連結することができる。この配置において、各可変ドメインの3つのCDRは相互に作用してVH-VL二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

40

#### 【0083】

またFab断片は、重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含み、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でFab

50

断片とは異なる。F a b '- S Hは、定常ドメインのシステイン残基が一つの遊離チオール基を担持しているF a b 'に対するここでの命名である。F ( a b ' )<sub>2</sub>抗体断片は、間にヒンジシステインを有するF a b '断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。

「一本鎖F v」又は「s c F v」抗体断片は、抗体のV H及びV Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。通常、s c F vポリペプチドはV H及びV Lドメイン間にポリペプチドリンクーを更に含み、それはs c F vが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。s c F vの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

10

#### 【 0 0 8 4 】

「ダイアボディ」なる用語は、2つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(V H - V L)内で軽鎖可変ドメイン(V L)に重鎖可変ドメイン(V H)が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で2つのドメインの対形成が可能であるリンクーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、2つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは二価でも二特異性であってもよい。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号；国際公開第93/11161号；Hudson等(2003) Nat. Med. 9:129-134；及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。トリアボディ及びテトラボディもまたHudson等(2003) Nat. Med. 9:129-134に記載されている。

20

#### 【 0 0 8 5 】

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在しうる可能性がある突然変異、例えば自然に生じる突然変異を除いて同一である。従って、「モノクローナル」との形容は、個別の抗体の混合物ではないという抗体の性質を示す。ある実施態様では、このようなモノクローナル抗体は、通常、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、この場合、標的に結合するポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスにより得られる。例えば、この選択プロセスは、雑種細胞クローン、ファージクローン又は組換えDNAクローンのプールのような複数のクローンからの、唯一のクローンの選択ができる。重要なのは、選択された標的結合配列を更に変化させることにより、例えば標的への親和性の向上、標的結合配列のヒト化、細胞培養液中におけるその產生の向上、インビボでの免疫原性の低減、多選択性抗体の生成等が可能になること、並びに、変化させた標的結合配列を含む抗体も、本発明のモノクローナル抗体であることである。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体の調製物とは異なり、モノクローナル抗体の調製物の各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体の調製物は、それらが他の免疫グロブリンで通常汚染されていないという点で有利である。

30

「モノクローナル」との形容は、抗体の、実質的に均一な抗体の集団から得られたものであるという特性を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作製することができ、それらの技術には、例えば、ハイブリドーマ法(例えば、Kohler等, Nature, 256:495 (1975) ; Harlow等, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) ; Hammerling等: Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981))、組換えDNA法(例えば、米国特許第4816567号参照)、ファージディスプレイ技術(例えば、Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991) ; Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992) ; Sidhu等, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004) ; Lee等, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004) ; Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004) ; 及びLee等, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004))、並びに、ヒト免疫グロブリン座位の

40

50

一部又は全部、或るいはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子を有する動物にヒト又はヒト様抗体を生成する技術(例えば、国際公開第98/24893号；国際公開第96/34096号；国際公開第96/33735号；国際公開第91/10741号；Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993)；Jakobovits等, *Nature* 362: 255-258 (1993)；Bruggemann等, *Year in Immunol.* 7:33 (1993)；米国特許第5545807号；同第5545806号；同第5569825号；同第5625126号；同第5633425号；同第5661016号；Marks等, *Bio. Technology* 10: 779-783 (1992)；Lonberg等, *Nature* 368: 856-859 (1994)；Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994)；Fishwild等, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996)；Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996)及びLonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)参照)が含まれる。  
10

#### 【0086】

ここでモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体を含み、それは特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致する又は類似する重鎖及び/又は軽鎖の一部であり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、抗体断片のように他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致するか又は類似するものである(米国特許第4816567号；及びMorrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855(1984))。

#### 【0087】

非ヒト(例えばマウス)の抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。一実施態様では、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び/又は能力を有する非ヒト靈長類のような非ヒト種(ドナー抗体)からの高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。例として、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFRが、ヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも一又は典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。また、ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、Jones等, *Nature* 321:522-525(1986)；Riechmann等, *Nature* 332:323-329(1988)；及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)を参照のこと。また次の文献とそこに引用されている文献を参考のこと：Vaswani及びHamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998)；Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995)；Hurle及びGross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。  
30

#### 【0088】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有するもの、及び/又はここに開示されたヒト抗体を作製する任意の技術を使用して製造されたものである。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を除く。  
40

ここで使用される「高頻度可変領域」、「HVR」又は「HV」なる用語は、配列において高頻度可変であり、及び/又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、抗体は6つの高頻度可変領域を含み；VHに3つ(H1、H2、H3)、VLに3つ(L1、L2、L3)である。天然の抗体では、H3及びL3は6つの高頻度可変領域のうちで最も高い多様性を示す、特にH3は抗体に良好な特異性を与える際に特有の役割を果たすように思われる。Xu等 (2000) *Immunity* 13:37-45；*Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ)のJohnson and Wu (2003)。実際、重鎖のみからなる天然に生じるラクダ科の抗体は機能的であり、軽鎖が  
50

無い状態で安定である。Hamers-Casterman等 (1993) *Nature* 363:446-448 ; Sheriff等 (1996) *Nature Struct. Biol.* 3:733-736。

### 【 0 0 8 9 】

多数の高頻度可変領域の描写が使用され、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(CDR)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置に言及している(Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM高頻度可変領域は、カバットCDRとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これら高頻度可変領域のそれぞれからの残基を以下に示す。

ループ	カバット	AbM	Chothia	接触
—	—	—	—	—
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (カバット番号付け)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia番号付け)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

### 【 0 0 9 0 】

高頻度可変領域は、次のような「拡大高頻度可変領域」を含むことができる、即ち、VLの24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)及び89-97又は89-96(L3)と、VHの26-35又は26-35A(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102、又は95-102(H3)である。可変ドメイン残基には、これら各々を規定するために、上掲のKabat等に従って番号を付した。本発明のヒト化抗STEEP-1 120V.24抗体のHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3高頻度可変領域は、カバット番号付けを用いると、H26-H35A、H49-H6、及びH95-H102である。本発明のヒト化抗STEEP-1 120V.24抗体のHVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3の高頻度可変領域は、カバット番号付けを用いると、L24-34、L50-56、及びL89-97である。ここで使用される「HVR」及び「CDR」という用語は互換可能である。

「フレームワーク」又は「FR」残基は、ここで定義する高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

### 【 0 0 9 1 】

「カバット(Kabat)による可変ドメイン残基番号付け」又は「カバットに記載のアミノ酸位番号付け」なる用語及びその異なる言い回しは、Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形ア

ミノ酸配列は、可変ドメインの F R 又は H V R 内の短縮又は挿入に相当する 2、3 のアミノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、重鎖 F R 残基 8 2 の後に挿入された残基(例えばカバットによる残基 8 2 a、8 2 b 及び 8 2 c など)と、H 2 の残基 5 2 の後に单一アミノ酸の挿入(Kabat による残基 5 2 a)を含んでもよい。残基のKabat番号は、「標準の」カバット番号付け配列によって抗体の配列の相同領域でアライメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい。

【0092】

「親和成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数の H V R において一又は複数の改変を持つものである。一実施態様では、親和成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はピコモルの親和性を有する。親和成熟抗体は、当該分野において知られている手順によって生産される。Marks等, *Bio/Technology*, 10: 779-783(1992)は、V H 及び V L ドメインシャッフリングによる親和成熟について記載している。H V R 及び / 又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘導は、Barbas等, *Proc Nat Acad. Sci., USA* 91: 3809-3813(1994); Schier等, *Gene*, 169: 147-155(1995); Yelton等, *J. Immunol.* 155: 1994-2004(1995); Jackson等, *J. Immunol.* 154(7): 3310-9(1995); 及び Hawkins等, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896(1992)に記載されている。

「阻止(ブロック)」抗体又は「アンタゴニスト」抗体とは、結合する抗原の生物学的活性を阻害するか又は低下させる抗体である。特定の阻止抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を、ほぼ又は完全に阻害する。

本明細書において使用する「アゴニスト」抗体は、対象とするポリペプチドの機能活性の少なくとも一つを模倣する抗体である。

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体の F c 領域(天然配列 F c 領域又はアミノ酸配列変異体 F c 領域)に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C 1 q 結合及び補体依存性細胞障害; F c レセプター結合性; 抗体依存性細胞媒介性細胞障害(A D C C); 貪食作用; 細胞表面レセプター(例えば、B 細胞レセプター)のダウンレギュレーション; 及び B 細胞活性化が含まれる。

【0093】

「F c レセプター」又は「F c R」は、抗体の F c 領域に結合するレセプターを記載するものである。ある実施態様では、F c R は天然のヒト F c R である。ある実施態様では、F c R は I g G 抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、F c R I 、F c R I I 及び F c R I I I サブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。F c R I I I レセプターには、F c R I I A(「活性型レセプター」)及び F c R I I B(「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプター F c R I I A は、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)を含んでいる。阻害型レセプター F c R I I B は、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)を含んでいる(Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)を参照)。F c R に関しては、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel等, *Immunology* 4:25-34 (1994); 及び de Haas等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)に概説されている。将来的に同定されるものも含む他の F c R はここでの「F c R」という言葉によって包含される。

また、「F c レセプター」又は「F c R」なる用語には、母性 I g G の胎児への移送と(Guyer等, *J. Immunol.* 117:587 (1976) Kim等, *J. Immunol.* 24:249 (1994))、免疫グロブリンのホメオスタシスの調節を担う新生児性レセプター F c R n も含まれる。F c R n への結合の測定方法は公知である(例として Ghetie 1997, Hinton 2004を参照)。インビボでのヒト F c R n への結合とヒト F c R n 高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒト F c R n を発現するトランスジェニックマウス又は形質転換されたヒト細胞株、

10

20

30

40

50

又は Fc 变異形ポリペプチドを投与された靈長類動物においてアッセイすることができる。

国際公開公報 00/42072 (Presta) に FcRへの結合を向上又は減弱させた抗体变異型が述べられている。この特許公開の内容はここに出典明記により具体的に組み込まれる。Shields等, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)も参照のこと。

【0094】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数の FcRs を発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。ある実施態様では、その細胞が少なくとも FcR III を発現し、ADCC エフェクター機能を実行することが望ましい。ADCC を媒介するヒト白血球の例として、末梢血液单核細胞 (PBMC)、ナチュラルキラー (NK) 細胞、单球、細胞障害性 T 細胞及び好中球が含まれる。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

【0095】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ADCC」とは、ある種の細胞障害細胞(例えば、ナチュラルキラー (NK) 細胞、好中球及びマクロファージ)上に存在する Fc レセプター (FcR) と結合した分泌 IgG により、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。ADCC を媒介する主要な細胞 NK 細胞は FcRII のみを発現するのに対し、单球は FcRI、FcRII 及び FcRIII を発現する。造血細胞での FcR の発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991) の 464 頁の表 3 に要約されている。対象の分子の ADCC 活性をアッセイするため、米国特許第 5500362 号又は同第 5821337 号に記載されているようなインビトロ ADCC アッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液单核細胞 (PBMC) 及びナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子の ADCC 活性は、例えば、Clynes 等, (USA) 95:652-656 (1998) において開示されているような動物モデルにおいて、インビトロで評価することが可能である。

【0096】

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系 (C1q) の第 1 補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラスの)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDC アッセイを、例えば Gazzano-Santoro 等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996) に記載されているように実施することができる。

Fc 領域アミノ酸配列を変更して C1q 結合能力が増大又は減少したポリペプチド变異体は、米特許第 6194551 号 B1 及び国際公開公報 99/51642 に記述される。それらの特許文献の内容は、出典明記によって、特別に本願明細書に組み込まれるものとする。また Idusogie 等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000) を参照のこと。

【0097】

「Fc 領域含有ポリペプチド」なる用語は、Fc 領域を含む抗体もしくはイムノアドヘンシンのようなポリペプチドを指す。Fc 領域の C 末端リジン (EU 番号付けシステムに従うと残基 447) は、例えば、ポリペプチドの精製中又はポリペプチドをコードする核酸を組み換え操作することによって除去してもよい。したがって、本発明の Fc 領域を有するポリペプチドを含んでなる組成物は、K447 を有するポリペプチド集団、すべての K447 が除去されたポリペプチド集団、又は K447 残基を有するポリペプチドと K447 残基を有さないポリペプチドの混合集団を包含しうる。

本願明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られる VL 又は VH フレームワークのアミノ酸配列を含有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「から得られる」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含有するか、又は既存のアミノ酸配列変化を含

10

20

30

40

50

有してもよい。ある実施態様では、既存のアミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下又は2以下である。既存のアミノ酸変化がVH中に存在する場合、好ましくは、それらの変化は位置71H、73H及び78H内の3つ、2つ又は1つのみ起こり、例えば、それらの位置のアミノ酸残基は、71A、73T及び/又は78Aであってよい。一実施態様では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【0098】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選別において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列は、可変ドメイン配列のサブグループから選別する。通常、Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)によると、配列のサブグループはサブグループである。一実施態様では、VLについて、上掲のKabat等によると、前記サブグループはサブグループIである。一実施態様では、VHについて、上掲のKabat等によると、前記サブグループはサブグループIIIである。

【0099】

「VHサブグループIIIコンセンサスフレームワーク」は、上掲のKabat等の可変重鎖サブグループIIIのアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含有する。一実施態様では、VHサブグループIIIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部又は全部を含む。

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S (FR - H1、配列番号21) - H V R - H1 - W V R Q A P G K G L E W V (FR - H2、配列番号22) - H V R - H2 - R F T I S R D T S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R (FR - H3、配列番号138) - H V R - H3 - W G Q G T L V T V S S (FR - H4、配列番号24)

「VLサブグループIコンセンサスフレームワーク」は、Kabat等の可変軽鎖サブグループIのアミノ酸配列から得られたコンセンサス配列を含んでなる。一実施態様では、VHサブグループIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部又は全部を含む。

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C (FR - L1、配列番号17) - H V R - L1 - W Y Q Q K P G K A P K L L I Y (FR - L2、配列番号18) - H V R - L2 - G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C (FR - L3、配列番号19) - H V R - L3 - F G Q G T K V E I K R (FR - L4、配列番号20)

「分泌シグナル配列」又は「シグナル配列」とは、細胞膜、通常は原核生物の内側の膜又は内側と外側の両方の膜を通して、対象となる新しく合成されたタンパク質の方向付けに使用することのできる短いシグナルペプチドをコードする核酸配列を意図する。このようにして、対象となるタンパク質、例えば免疫グロブリン軽鎖又は重鎖ポリペプチドは、原核宿主細胞の周辺に、あるいは培地中に分泌される。分泌シグナル配列によってコードされるシグナルペプチドは、宿主細胞に内在しても、あるいはそれらは外因性でもよく、発現されるポリペプチドに本来あるシグナルペプチドを含む。分泌シグナル配列は、典型的には発現されるポリペプチドのアミノ末端に存在し、典型的にはポリペプチドの生合成と分泌の間に細胞質から酵素的に取り除かれる。従って、シグナルペプチドは、通常、成熟タンパク質産物には存在しない。

【0100】

「遊離したシステインアミノ酸」は、親抗体内に変更されているシステインアミノ酸残基を指し、チオール官能基(-SH)を有し、対形成もしないし、分子内ないし分子間ジスルフィド架橋の一部にもならない。

「チオール反応値」なる用語は、遊離したシステインアミノ酸の反応性の定量的特徴

10

20

30

40

50

けである。チオール反応値は、チオール反応試薬と反応するシステイン改変抗体の遊離したシステインアミノ酸の割合であって、1の最大値に変換される。例えば、ビオチン-マレイミド試薬などのチオール反応試薬と100%の收率で反応してビオチン標識抗体を形成するシステイン改変抗体の遊離システインアミノ酸はチオール反応値が1.0となる。チオール反応試薬と80%の收率で反応する同じ又は異なる親抗体内で改変された他のシステインアミノ酸はチオール反応値が0.8となる。チオール反応試薬と完全に反応しない同じ又は異なる親抗体内で改変された他のシステインアミノ酸はチオール反応値が0となる。特定のシステインのチオール反応値の測定は、ELISAアッセイ、質量分析、液体クロマトグラフィ、オートラジオグラフィ、又は他の定量的な分析試験によって行ってもよい。システイン改変抗体のキャプチャやシステイン反応性の比較及び定量化を可能にするチオール反応試薬には、ビオチン-PEO-マレイミド(+)・ビオチニル-3-マレイミドプロピオナミジル-3,6-dioxaocetainediamine、Oda等 (2001) *Nature Biotechnology* 19:379-382, Pierce Biotechnology, Inc.) ビオチン-BMCC、PEO-ヨードアセチルビオチン、ヨードアセチル-LC-ビオチン、及びビオチン-HPDP (Pierce Biotechnology, Inc.) 及びN-(3-マレイミドイルプロピオンイル)ビオシチン(MPB, Molecular Probes, Eugene, OR)が含まれる。ビオチン化、二官能性及び多官能性リンカー試薬の他の商業的な供与源には、Molecular Probes, Eugene, OR、及びSigma, St. Louis, MOが含まれる。

「親抗体」は、一又は複数のアミノ酸残基が一又は複数のシステイン残基に置き換わっているアミノ酸配列を含む抗体である。親抗体は、天然の又は野生型の配列を含んでいてもよい。親抗体は、他の天然、野生型又は修飾した形態の抗体と比較して既存のアミノ酸配列修飾(例えば付加、欠失及び/又は置換)を有してもよい。親抗体は、対象の標的抗原、例えば生物学上重要なポリペプチドに対するものであってもよい。また、非ポリペプチド抗原(例えば腫瘍関連糖脂質抗原；米国特許第5091178号を参照)に対する抗体も考慮される。

#### 【0101】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の1:1相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子XのそのパートナーYに対する親和性は、解離定数( $K_d$ )として表される。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定することができる。低親和性抗体は抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は抗原により密接により長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何れかを本発明のために用いることができる。以下に具体的な例示的実施態様を記載する。

#### 【0102】

一実施態様では、本発明の「 $K_d$ 」又は「 $K_d$ 値」は、以下のアッセイで示されるような、所望の抗体のFab型(バージョン)とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(RIA)で測定される。段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の( $^{125}\text{I}$ )-標識抗原にてFabを均衡化して、抗Fab抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するFabの溶液結合親和性を測定する。アッセイの条件を決めるために、ミクロタイターブレート(Dynex)を5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の捕獲抗Fab抗体(Cappel Labs)を含む50mM炭酸ナトリウム(pH 9.6)にて一晩コートして、その後2%(w/v)のウシ血清アルブミンを含むPBSにて室温(およそ23℃)で2~5時間、プロックする。非吸着プレート(Nunc#269620)に、100pM又は26pMの[ $^{125}\text{I}$ ]抗原を段階希釈した所望のFabと混合する(例えば、Presta等, (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599の抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一致する)。ついで所望のFabを一晩インキュベートする;しかし、インキュベーションは平衡状態に達したことを確認するまでに長時間(例えばおよそ65時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば1時間)インキュベートする。そして、溶液を取り除き

10

20

30

40

50

、プレートを0.1%のTween 20を含むPBSにて8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150μl/ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTopcount 計測器(Packard)にて10分間計測する。最大結合の20%か又はそれ以下濃度のFabを選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。

他の実施態様によると、~10反応単位(RU)の固定した抗原CM5チップを用いて25のBIAcore<sup>TM</sup>-2000又はBIAcore<sup>TM</sup>-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラスモン共鳴アッセイを行ってKd又はKd値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。抗原を10mM酢酸ナトリウム(pH 4.8)で5μg/ml(~0.2μM)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(RU)がおよそ10になるように5μl/分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をロックするために1Mのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2倍の段階希釈したFab(0.78nMから500nM)を25、およそ25μl/分の流速で0.05%Tween 20(PBST)を含むPBSに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度( $k_{on}$ )と解離速度( $k_{off}$ )を算出した。平衡解離定数(Kd)を $k_{off}/k_{on}$ 比として算出した。例として、Chen, Y., 等, (1999) J. Mol Biol 293: 865-881を参照。上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

<sup>10</sup>を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS(pH 7.2)、25の、20nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起=295nm; 放出=340nm、帯域通過=16nm)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 $k_{on}$ 」は、~10反応単位(RU)の固定した抗原CM5チップを用いて25のBIAcore<sup>TM</sup>-2000又はBIAcore<sup>TM</sup>-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた前述と同じ表面プラスモン共鳴アッセイにて測定される。

#### 【0103】

「疾病」は、本発明の物質/分子又は方法を用いた治療によって利益を得る任意の症状又は疾患である。これには、問題とする疾患に哺乳動物がかかりやすくなる病理学的症状を含む慢性及び急性の疾患を含む。本明細書中で治療される疾患の非限定的な例には、前立腺、肺、及び大腸の癌又は転移などの癌性症状が含まれる。

「細胞増殖性疾患(障害)」及び「増殖性疾患(障害)」なる用語は、異常な細胞増殖にある程度関連している疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

本明細書中の「腫瘍」とは、悪性か良性かにかかわらず、すべての腫瘍性細胞成長及び増殖と、すべての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。「癌」「癌性」「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」なる用語は、本明細書に参照されるように相互に限定的なものでない。

#### 【0104】

「癌」及び「癌性」なる用語は、一般的に調節不可能な細胞増殖に特徴がある哺乳動物の生理学的状態を指すか又は表す。癌の例には細胞腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病又はリンパ系腫瘍が含まれるが、これに限定されるものではない。このような癌のより具体的な例には、扁平細胞癌(例えば扁平上皮細胞癌)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃又は腸の癌、肺癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、尿道の癌、肝腫瘍、乳癌、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮上皮癌、唾液腺上皮癌、腎臓癌又は腎癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝臓癌、及び肛門癌、陰茎癌、メラノーマ、多発性

10

20

30

40

50

メラノーマ、及びB細胞リンパ腫、脳並びに頭頸部癌と、これらに関連する転移とが含まれる。

【0105】

「S T E A P - 1 を発現する細胞」とは、細胞表面に内在性のS T E A P - 1 又は形質移入されたS T E A P - 1 を発現する細胞である。「S T E A P - 1 を発現する癌」とは、細胞表面にS T E A P - 1 タンパク質が存在する細胞を有する癌である。「S T E A P - 1 を発現する癌」がその細胞表面上に生成するS T E A P - 1 のレベルは、抗S T E A P - 1 抗体がそれに結合して癌に対して治療的效果を持つことができるのに十分なものである。S T E A P - 1 を「過剰発現する」癌では、同じ組織種類の非癌性細胞と比較して、その細胞表面におけるS T E A P - 1 のレベルが有意に高い。このような過剰発現は、10 遺伝子増幅か、或いは転写又は翻訳の増大によるものでありうる。S T E A P - 1 の過剰発現は、細胞表面上に存在するS T E A P - 1 タンパク質のレベルの上昇を評価することにより、診断アッセイ又は予後アッセイ（例えば、免疫組織化学アッセイ、F A C S 分析）で決定することができる。或いは又は加えて、例えば蛍光インサイトハイブリダイゼーション法（1998年10月公開のFISH；国際公開第98/45479号参照）、サザンプロット法、ノーザンプロット法、又は実時間定量P C R（R T - P C R）等のポリメラーゼ連鎖反応（P C R）技術により、細胞内のS T E A P - 1 コード化核酸又はm R N A のレベルを測定することができる。また、例えば抗体に基づくアッセイ（例えば、1990年6月12日発行の米国特許第4933294号、1991年4月18日公開の国際公開第91/05264号、1995年3月28日発行の米国特許5401638号、及びSiasらによるJ. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)参照）を用いて、血清等の生物学的流体に含まれる抗原を測定することにより、S T E A P - 1 の過剰発現を調査することができる。上記アッセイ以外にも、当業者であれば様々なインビオアッセイが利用できる。例えば、患者の体内の細胞を、放射性同位元素等の検出可能なラベルで随意に標識した抗体に曝すことができ、例えば外側から放射能をスキャンしたり、抗体に曝された患者から採取した生検を分析したりすることで、患者の細胞に対する抗体の結合を評価することができる。S T E A P - 1 を発現する癌には、前立腺癌、肺癌、及び大腸癌が含まれる。20

【0106】

ここで使用されるところの「治療」（及び「処置」又は「治療する」などの変形句）は、治療されている個体又は細胞の天然の過程を改変するための臨床的介入を意味し、予防のため又は臨床的病理の過程中に実施することができる。治療の望ましい効果には、疾病的発生又は再発の防止、症状の寛解、疾病的任意の直接的又は間接的病理的結果の低減、転移の防止、疾病的進行速度の低減、疾病状態の回復又は緩和、及び寛解又は改善された予後が含まれる。ある実施態様では、本発明の抗体は疾患又は疾病的進行を遅らせるため又は疾患又は疾病的進行をゆっくりにするために用いられる。30

治療の成功及び疾病的改善を評価する上記パラメータは、医師のよく知る日常的な手順により容易に測定可能である。癌の治療法の効率は、例えば腫瘍増殖停止時間（T T P）の評価及び/又は反応率（R R）の決定により測定することができる。前立腺癌の場合、治療法の進行は常套的な方法、通常は血清P S A（前立腺に特異的な抗原）のレベルを測定することにより評価することができ、血中P S Aのレベルが高い程、癌は重症である。P S Aを検出するためのアッセイは市販されており、例えばHybitech Tandem-E及びTandem-R P S Aアッセイキット、Yang ProsCheckポリクローナルアッセイ（Yang Labs、ワシントン州ベルビュ））、Abbott Imx（Abbott Labs、イリノイ州アボットパーク）等が入手可能である。転移の決定は、ステージ試験、骨のスキャン、並びにカルシウム及び骨への広がりを決定するその他酵素レベルの試験により行うことができる。領域内の骨盤及びリンパ節への広がりを探すためにC Tスキャンを行うこともできる。胸部レントゲン及び既知の方法による肝臓の酵素レベルの測定を使用して、それぞれ肺及び肝臓への転移を探すこともできる。疾病をモニタリングするためのその他の常套的な方法には、経直腸的超音波検査（T R U S）及び経直腸的針生検（T R N B）が含まれる。40

【0107】

「個体」は脊椎動物である。ある実施態様では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物には、限定するものではないが、家畜動物(ウシなど)、スポーツ用動物、愛玩動物(ネコ、イヌ及びウマ)、靈長類、マウス及びラットが含まれる。ある実施態様では、哺乳動物はヒトである。

「有効量」とは所望の治療又は予防結果を達成するために必要な用量及び時間の効果的な量を意味する。本発明の物質／分子の「治療的有効量」は、例えば個体の疾病ステージ、年齢、性別、及び体重、並びに個体に所望の応答を誘発する物質／分子の能力などの因子に従って変わりうる。また、治療的有効量は、物質／分子の任意の毒性又は有害な影響よりも治療的に恩恵のある効果が上回る量を包含する。「予防的有効量」とは所望の予防結果を達成するために必要な用量及び時間の効果的な量を意味する。必須ではないが一般的に、予防的用量は疾患の初期ステージ又はその前の患者に用いるので、予防的有効量は治療的有効量よりも少ないであろう。癌の場合、薬剤の治療的有効量は、癌細胞の数を減らし、腫瘍の大きさを低減し、癌細胞の周辺器官への浸潤を抑制し(つまり、或る程度遅らせ、好ましくは止め)、腫瘍の転移を抑制し(つまり、或る程度遅らせ、好ましくは止め)、腫瘍の成長をある程度抑制し、及び／又は癌に関連する症状の一又は複数をある程度緩和することができる。薬剤が既存の癌細胞の増殖を防止及び／又は死滅させることができる範囲まで、薬剤の細胞分裂停止能及び／又は細胞障害性は許容される。

#### 【0108】

「慢性」投与とは、急性モードの反対の意味で連続モードでの薬剤の投与であり、これにより初期治療効果(活性)を長期間に亘って維持しようとするものである。「断続的」投与とは、中断無く連続的に行われるのではなく、周期的に行われる性質を持つ処置である。

一又は複数の更なる治療的薬剤「との組合せ」投与には同時(併用)及びいずれかの順序での連続投与が含まれる。

#### 【0109】

ここで用いられる「担体」は、製薬上許容される担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、使用される用量及び濃度でそこに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性のものである。しばしば、生理学的に許容される担体の例は、水性pH緩衝溶液である。生理学的に許容される担体は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；マンニトール又はソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；及び／又はTWEEN(登録商標)、ポリエチレングリコール(PEG)、及びPLURONICS(登録商標)などの非イオン性界面活性剤を含む。

本明細書中で用いられる「標識」なる用語は、抗体などの試薬に直接的又は間接的にコンジュゲートされて「標識された」抗体を生成する、検出可能な化合物又は組成物を指す。標識自体が検出可能なもの(例えば放射性標識又は蛍光性標識)であってもよく、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物ないしは組成物の化学的変化を触媒するものであってもよい。

#### 【0110】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」と融合した抗PSCA抗体ポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有し、その長さは融合するIgポリペプチドの活性を阻害しないよう充分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくはそのような抗体が他のエピトープと実質的に交差反応しないよう十分に独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8～50のアミノ酸残基(好ましくは、約10～20のアミノ酸残基)を有する。

10

20

30

40

50

「小分子」とは、ここで、約500ダルトン未満の分子量を持つと定義される。

「パッケージ挿入物」という用語は、その治療薬の用途に関する效能、用途、服用量、投与方法、配合禁忌及び／又は警告についての情報を含む、治療薬の商業的包装に慣習的に含まれる指示書を指す。

【0111】

「単離された核酸」とは、RNA、DNA、又は混合ポリマーなどの核酸であり、天然配列に生来含まれる、リボソーム及びポリメラーゼ等の複合体又はタンパク質、並びに他のゲノムDNA配列から実質的に分離されている。この表現は、天然に生じる環境から除去された核酸配列を包含し、組換えDNA単離物又はクローニングされたDNA単離物、及び化学的に合成された類似体又は異種系により生物学的に合成された類似体を含む。実質的に純粋な分子には、分子の単離された形態が含まれる。

「ベクター」は、シャトルベクター及び発現ベクターを含む。一般に、プラスミドコンストラクトも複製起源（例えば、C<sub>o</sub>l E 1複製起源）及び選択マーカー（例えば、アンピシリン又はテトラサイクリン耐性）を、それぞれ細菌内のプラスミドの複製及び選択を目的として含むであろう。「発現ベクター」は必要なコントロール配列又は本発明の抗体断片を含む抗体の発現の調節因子を、細菌又は真核細胞内に含むベクターを表す。好適なベクターを以下に示す。

本発明の抗STEP-1抗体を生成する細胞は、親ハイブリドーマ細胞、例えばATCCに寄託されるハイブリドーマ、並びに当該抗体をコードする核酸が導入されている細菌及び真核宿主細胞を含む。好適な宿主細胞を以下に示す。

【0112】

ここで用いられる際の「増殖阻害剤」は、細胞、特にPSCAを発現する癌細胞の増殖を、インピトロ又はインピボで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、S期でPSCAを発現する細胞の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期プロッカーは、ビンカス(ビンクリスチン及びビンプラスチン)、タキサン類、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類(パクリタキセル及びドセタキセル)は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、ローン・プーラン ローラー)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、プリストル-マイヤー スクウェイブ)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

【0113】

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞死ないしは破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、<sup>211</sup>At、<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>90</sup>Y、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>153</sup>Sm、<sup>211</sup>Pb<sup>212</sup>及び<sup>138</sup>Luの放射性同位体)、化学治療薬、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド(ビンクリスチン、ビンプラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロランプシル、ダウノルビシン又はその他インターラート剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び／又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、毒素、増殖阻害剤、薬剤成分、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞障害性薬が下記に記

10

20

30

40

50

載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

「毒素」は、細胞の成長又は増殖に対して有害な作用を有することができる任意の物質である。

【0114】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテバ及びCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミドのようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoaramide)及びトリメチローロメラミン(trimethyloolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン)；デルタ-9-テトラヒドロカナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標))；ラバチョーネ；ラバコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン(合成アナログトポテカン(HYCANTIN(登録商標)、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン(scopolectin)及び9-アミノカンプトテシンを含む)；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；テニポシド；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン(合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エロイテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スponギスタチン；クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフオスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスターなどのナイトロジエンマスター；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、口ムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン1I及びカリケアマイシンI1(例えばAgnew Chem Int'l. Ed. Engl. 33:183-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin)Aを含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(au-thramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabacin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキソルビシン(モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシン、及びデオキシドキソルビシンを含む)、エビルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトイマイシンCのようなマイトイマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quela mycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノブテリン(denopterin)、メトトレキセート、ブテロブテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトブリン、チアミブリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)；アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)。

10

20

30

40

50

ne)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquine)；エルフォルニチン(el fornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エポシロン；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイタンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(ansamitocine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phena met)；ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K(登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニュアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquine)；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin)A、ロリジン(roridine)A及びアンガイジン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標))；ダカーバジン；マンノムスチニン(mannomustine)；ミトプロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピボブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytine)；アラビノシド(「Ara-C」)；チオテパ；タキソイド類、例えばTAXOL(登録商標)パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE<sup>TM</sup>パクリタキセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois)、及びTAXOTERE(登録商標)ドキセタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲムシタビン(GEMZAR(登録商標))；6-チオグアニン；メルカプトブリン；メトトレキサート；プラチナアナログ、例えばシスプラチニン及びカルボプラチニン；ビンプラスチニン(VELBAN(登録商標))；プラチナ；エトポシド(V P-16)；イホスファミド；マイトキサントロン；ビンクリスチニン(ONCOVIN(登録商標))；オキサリプラチニン；ロイコボビン(leucovovin)；ビノレルビン(NAVELBINE(登録商標))；ノバントロン(novantrone)；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノブテリニン；イバンドロナート(ibandronate)；トポイソメラーゼ阻害剤R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチニン(D M F O)；レチノイン酸のようなレチノイド；カペシタビン(XELOD A(登録商標))；上述したもののいずれかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体；並びに上記のうち2以上の組み合わせ、例えば、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチニン、及びプレドニソロン併用療法の略称であるC H O P、及び5-FU及びロイコボビン(leucovovin)とオキサリプラチニン(ELOXATIN<sup>TM</sup>)を組み合わせた治療法の略称であるFOLFOXが含まれる。

### 【0115】

またこの定義に含まれるものには、癌の成長を助けるホルモンの作用を調節、低減、遮断又は阻害するように働き、多くの場合全身処置の形態で使用される抗ホルモン剤がある。それらはそれ自体がホルモンであってもよい。それらは例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレータ(S E R M)を含み、例えば、タモキシフェン(NOLVADE X(登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン(raloxifene)(EVISTA(登録商標))、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びトレミフェン(FARESTON(登録商標))；抗プロゲステロン；エストロゲンレセプター下方調節剤(ERD)；卵巣を抑止又は停止させる機能がある作用剤、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニスト、例えば酢酸リュープロリド(LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標))、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテレリン(tripterelin)；その他抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ビカルタミド；並びに副腎のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、

【 0 1 1 6 】

ここで用いられる際の「増殖阻害剤」は、細胞(例えばS T E A P - 1を発現する細胞)の成長をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、S期で細胞(例えばS T E A P - 1を発現する細胞)の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカス(ビンクリスチン及びビンプラスチン)、タキサン類、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類(パクリタキセル及びドセタキセル)は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、ローン・ブーランローラー)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、ブリストル-マイヤー スクウェイブ)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

【 0 1 1 7 】

「細胞内代謝物」なる用語は、抗体-抗原コンジュゲート(ADC)上の細胞内部で代謝プロセス又は反応から生じている化合物に関する。代謝プロセス又は反応はADCのペプチドリンカーのタンパク質切断や、ヒドラゾン、エステル又はアミドなどの官能基の加水分解といった酵素的な過程であってもよい。細胞内代謝物には、限定するものではないが、細胞内への移行、拡散、取り込み又は輸送後に細胞内切断が行われた遊離薬剤及び抗体が含まれる。

「細胞内に切断される」及び「細胞内切断」なる用語は、抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)に対する細胞内の代謝プロセス又は反応であって、これによって薬剤成分(D)と抗体(Ab)間の共有結合、すなわちリンカーが壊れ、その結果、細胞内の抗体から遊離した薬剤が分離される。ゆえに、ADCの切断された成分は細胞内代謝物である。

【 0 1 1 8 】

「生物学的利用能」なる用語は、患者に投与される薬剤の所定の量の全身有効性(すな

10

20

30

40

わち、血液／血しょう濃度)を指す。生物学的利用能は、投与された用量形態から体循環に達する薬剤の時間(速度)と総量(程度)の測定値を示す絶対的な用語である。

「細胞障害活性」なる用語は、抗体 - 薬剤コンジュゲート又は抗体 - 薬剤コンジュゲートの細胞内代謝物の細胞殺傷効果、細胞増殖抑制効果又は増殖阻害効果を指す。細胞障害活性は、細胞の半分が生存する単位容量当たりの濃度(モル又は質量)である I C 5 0 値として表されてもよい。

【0119】

「アルキル」は、ノルマル、第2級、第3級、又は環式の炭素原子を含む C 1 - C 1 8 炭化水素である。例として、メチル (M e、 - C H 3)、エチル (E t、 - C H 2 C H 3) 10 、1 - プロピル (n - P r、 n - プロピル、 - C H 2 C H 2 C H 3)、2 - プロピル (i - P r、 i - プロピル、 - C H (C H 3) 2)、1 - ブチル (n - B u、 n - ブチル、 - C H 2 C H 2 C H 2 C H 3)、2 - メチル - 1 - プロピル (i - B u、 i - ブチル、 - C H 2 C H (C H 3) 2)、2 - ブチル (s - B u、 s - ブチル、 - C H (C H 3) C H 2 C H 3) 20 、2 - メチル - 2 - プロピル (t - B u、 t - ブチル、 - C (C H 3) 3)、1 - ペンチル (n - ペンチル、 - C H 2 C H 2 C H 2 C H 2 C H 3)、2 - ペンチル (- C H (C H 3) C H 2 C H 2 C H 3)、3 - ペンチル (- C H (C H 2 C H 3) 2)、2 - メチル - 2 - ブチル (- C (C H 3) 2 C H 2 C H 3)、3 - メチル - 2 - ブチル (- C H (C H 3) C H (C H 3) 2) 20 、3 - メチル - 1 - ブチル (- C H 2 C H 2 C H (C H 3) 2)、2 - メチル - 1 - ブチル (- C H 2 C H (C H 3) C H 2 C H 3)、1 - ヘキシル (- C H 2 C H 2 C H 2 C H 2 C H 2 C H 3)、2 - ヘキシル (- C H (C H 3) C H 2 C H 2 C H 2 C H 3)、3 - ヘキシル (- C H (C H 2 C H 3) (C H 2 C H 2 C H 3))、2 - メチル - 2 - ペンチル (- C (C H 3) 2 C H 2 C H 2 C H 3)、3 - メチル - 2 - ペンチル (- C H (C H 3) C H (C H 3) C H 2 C H 3)、4 - メチル - 2 - ペンチル (- C H (C H 3) C H 2 C H (C H 3) 2) 30 、3 - メチル - 3 - ペンチル (- C (C H 3) (C H 2 C H 3) 2)、2 - メチル - 3 - ペンチル (- C H (C H 2 C H 3) C H (C H 3) 2)、2, 3 - ジメチル - 2 - ブチル (- C (C H 3) 2 C H (C H 3) 2)、3, 3 - ジメチル - 2 - ブチル (- C H (C H 3) C (C H 3) 3) が、ある。

【0120】

本明細書中で用いる「C 1 - C 8 アルキル」なる用語は、1から8の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖の、飽和ないしは不飽和炭化水素を指す。典型的な「C 1 - C 8 アルキル」基には、限定するものではないが、- メチル、- エチル、- n プロピル、- n ブチル、- n ペンチル、- n ヘキシル、- n - ヘプチル、- n - オクチル、- n - ノニル、及び- n - デシルが含まれ、一方、分岐した C 1 - C 8 アルキルには、限定するものではないが、- イソプロピル、- s e c ブチル、- イソブチル、- t e r t ブチル、- イソペンチル、2 - メチルブチルが含まれ、不飽和の C 1 - C 8 アルキルには、限定するものではないが、- ビニル、- アリル、- 1 - プテニル、- 2 - プテニル、- イソブチレニル、- 1 - ペンテニル、- 2 - ペンテニル、- 3 - メチル - 1 - プテニル、- 2 - メチル - 2 - プテニル、- 2, 3 - ジメチル - 2 - プテニル、1 - ヘキシル、2 - ヘキシル、3 - ヘキシル、- アセチレニル、- プロピニル、- 1 - ブチニル、- 2 - ブチニル、- 1 - ペンチニル、- 2 - ペンチニル、- 3 - メチル - 1 - ブチニル、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n - ブチル、イソブチル、s e c - ブチル、t e r t - ブチル、n - ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n - ヘキシル、イソヘキシル、2 - メチルペンチル、3 - メチルペンチル、2, 2 - ジメチルブチル、2, 3 - ジメチルブチル、2, 2 - ジメチルペンチル、2, 3 - ジメチルペンチル、3, 3 - ジメチルペンチル、2, 3, 4 - トリメチルペンチル、3 - メチルヘキシル、2, 2 - ジメチルヘキシル、2, 4 - ジメチルヘキシル、2, 5 - ジメチルヘキシル、3, 5 - ジメチルヘキシル、2, 4 - ジメチルペンチル、2 - メチルヘブチル、3 - メチルヘブチル、n - ヘブチル、イソヘブチル、n - オクチル、及びイソオクチルが含まれる。C 1 - C 8 アルキル基は、限定するものではないが、置換されていなくてもよいし、- C 1 - C 8 アルキル、- O - (C 1 - C 8 アルキル)、- アリール、- C (O) R'、- O C (O) R'、- C (O) O R'、- C (O) N H 2 、- C (O) N H 40 50

$R'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NH C(O)R'$ 、 $-SO_3 R'$ 、 $-S(O)_2 R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含め、一又は複数の基によって置換されてもよく、各々の $R'$ は、 $H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル及びアリールから別々に選択される。

## 【0121】

「アルケニル」は、不飽和の少なくとも一部、すなわち炭素-炭素、 $s p^2$ 二重結合を有するノルマル、第2級、第3級、又は環式の炭素原子を含む $C_2-C_{18}$ 炭化水素である。例には、限定するものではないが、エチレン又はビニル( $-CH=CH_2$ )、アリル( $-CH_2CH=CH_2$ )、シクロペンテニル( $-C_5H_7$ )及び5-ヘキセニル( $-CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$ )などがある。10

「アルキニル」は、不飽和の少なくとも一部、すなわち炭素-炭素、 $s p$ 三重結合を有するノルマル、第2級、第3級、又は環式の炭素原子を含む $C_2-C_{18}$ 炭化水素である。例には、限定するものではないが、アセチレン( $-C-CH$ )及びプロパルギル( $-CH_2CH=CH$ )などがある。

「アルキレン」は、1~18の炭素原子であって、親のアルカンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する飽和した、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルキレン基には、限定するものではないが、メチレン( $-CH_2-$ )、1,2-エチル( $-CH_2CH_2-$ )、1,3-プロピル( $-CH_2CH_2CH_2-$ )、1,4-ブチル( $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ )などが含まれる。20

## 【0122】

「 $C_1-C_{10}$ アルキレン」は、式 $-(CH_2)_{1-10}-$ の直鎖の飽和した炭化水素基である。 $C_1-C_{10}$ アルキレンの例には、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレン、及びデカレンが含まれる。

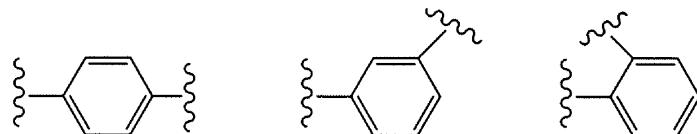
「アルケニレン」は、2~18の炭素原子であって、親のアルケンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する不飽和の、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルケニレン基には、限定するものではないが、1,2-エチレン( $-CH=CH-$ )が含まれる。

「アルキニレン」は、2~18の炭素原子であって、親のアルキンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する不飽和の、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルキニレン基には、限定するものではないが、アセチレン( $-C-C-$ )、プロパルギル( $-CH_2C-C-$ )、及び4-ペンチニル( $-CH_2CH_2CH_2C-C-$ )が含まれる。30

「アリール」は炭素環の芳香基を指す。アリール基の例には、限定するものではないが、フェニル、ナフチル及びアントラセニルが含まれる。炭素環の芳香基又はヘテロサイクリック芳香基は、置換されていなくてもよいし、限定するものではないが、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NH C(O)R'$ 、 $-S(O)_2 R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含む、一又は複数の基によって置換されてもよく、各々の $R'$ は、 $H$ 、 $-C_1-C_8$ アルキル及びアリールから別々に選択される。40

## 【0123】

「アリレン(arylene)」は2つの共有結合を有するアリール基であり、以下の構造で示すようなオルト、メタ又はパラの立体配置でありうる。



ここで、フェニル基は置換されていなくても、限定するものではないが、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-NHC(O)R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R')<sub>2</sub>、及び-CNを含む最大4つの基にて置換されてもよく、それぞれのR'は、H、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル及びアリールから個々に選択される。

「アリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端又はs p<sup>3</sup>炭素原子に結合した水素原子のうちの1つがアリール基に置換している非環式アルキル基を指す。代表的なアリールアルキル基には、限定するものではないが、ベンジル、2-フェニルエタン-1-イル、2-phenylethen-1-イル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-naphthylethen-1-イル、ナフトベンジル、2-ナフトフェニルエタン-1-イルなどが含まれる。アリールアルキル基は6~20の炭素原子を含み、例えば、アルカニル、アルケニル又はアルキニル基を含む、アリールアルキル基のアルキル部分は1~6の炭素原子であり、アリール部分は5~14の炭素原子である。

「ヘテロアリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端又はs p<sup>3</sup>炭素原子に結合した水素原子のうちの1つがヘテロアリール基に置換している非環式アルキル基を指す。典型的なヘテロアリールアルキル基には、限定するものではないが、2-ベンズイミダゾリルメチル、2-フリルエチルなどが含まれる。ヘテロアリールアルキル基は6~20の炭素原子を含み、例えば、アルカニル、アルケニル又はアルキニル基を含む、ヘテロアリールアルキル基のアルキル部分は1~6の炭素原子であり、ヘテロアリール部分は5~14の炭素原子であり、1~3のヘテロ原子はN、O、P及びSから選択される。ヘテロアリールアルキル基のヘテロアリール部分は3~7員環を有するモノシクロ(2~6の炭素原子)又は7~10員環を有するビシクロ(4~9の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1~3のヘテロ原子)、例えばビシクロ[4,5], [5,5], [5,6]、又は[6,6]システムであってもよい。

#### 【0124】

「置換されたアルキル」、「置換されたアリール」、「置換されたアリールアルキル」とは、アルキル、アリール及びアリールアルキルをそれぞれ意味し、一又は複数の水素原子がそれぞれ別々に置換基に置換している。典型的な置換基には、限定するものではないが、-X、-R、-O<sup>-</sup>、-OR、-SR、-S-、-NR<sub>2</sub>、-NR<sub>3</sub>、=NR、-CX<sub>3</sub>、-CN、-OCN、-SCN、-N=C=O、-NCS、-NO、-NO<sub>2</sub>、=N<sub>2</sub>、-N<sub>3</sub>、-NC(=O)R、-C(=O)R、-C(=O)NR<sub>2</sub>、-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、-SO<sub>3</sub>H、-S(=O)<sub>2</sub>R、-OS(=O)<sub>2</sub>OR、-S(=O)<sub>2</sub>NR、-S(=O)R、-OP(=O)(OR)<sub>2</sub>、-P(=O)(OR)<sub>2</sub>、-PO<sub>3</sub><sup>-</sup>、-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-C(=O)R、-C(=O)X、-C(=S)R、-CO<sub>2</sub>R、-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>、-C(=S)OR、-C(=O)SR、-C(=S)SR、-C(=O)NR<sub>2</sub>、-C(=S)NR<sub>2</sub>、-C(=N)NR<sub>2</sub>が含まれ、それぞれのXは個々にハロゲン：F、Cl、Br又はIであり、それぞれのRは個々に-H、C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>アルキル、C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>アリール、C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>複素環、保護基又はプロドラッグ部分である。上記のアルキレン、アルケニレン及びアルキニレン基もまた、同じように置換されてもよい。

#### 【0125】

「ヘテロアリール」及び「複素環」は、一又は複数の環原子がヘテロ原子、例えば窒素

10

20

30

40

50

、酸素及び硫黄である環式システムを指す。複素環基は、1～20の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1～3のヘテロ原子を含む。複素環は、3～7員環を有するモノシクロ(2～6の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1～3のヘテロ原子)又は7～10員環を有するビシクロ(4～9の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1～3のヘテロ原子)、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、又は[6,6]システムであってもよい。

複素環は、Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)、特に第1, 3, 4, 6, 7及び9章; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present)、特に13, 14, 16, 19及び28号; 及び、J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566に記載される。

複素環の例には、例示のためであって限定するものではなく、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(ペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、硫黄酸化型テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ペリジニル、4-ペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾチニル、トリアジニル、6H-1,2,5-チアジアジニル、2H,6H-1,5,2-ジチアジニル、チエニル、チアンスレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-インダゾリル、ブリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、チノリニル、ブテリジニル、4aH-カルバゾリル、カルバゾリル、-カルボリニル、フェナ NSRジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナ NSRリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンズオキサゾリニル、及びイサチノイルが含まれる。

#### 【0126】

例示的なものであって限定するものではなく、炭素結合複素環は、ピリジンの2、3、4、5、又は6位、ピリダジンの3、4、5、又は6位、ピリミジンの2、4、5、又は6位、ピラジンの2、3、5、又は6位、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフェン、ピロールないしはテトラヒドロピロールの2、3、4、又は5位、オキサゾール、イミダゾールないしはチアゾールの2、4、又は5位、イソキサゾール、ピラゾールないしはイソチアゾールの3、4、又は5位、アジリジンの2又は3位、アゼチジンの2、3、又は4位、キノリンの2、3、4、5、6、7、又は8位、又はイソキノリンの1、3、4、5、6、7、又は8位に結合する。さらにより典型的には、炭素結合複素環には、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、5-ピリジル、6-ピリジル、3-ピリダジニル、4-ピリダジニル、5-ピリダジニル、6-ピリダジニル、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、5-ピリミジニル、6-ピリミジニル、2-ピラジニル、3-ピラジニル、5-ピラジニル、6-ピラジニル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、又は5-チアゾリルが含まれる。

例示的なものであって限定するものではなく、窒素結合複素環は、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、2-ピロリン、3-ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2-イミダゾリン、3-イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2-ピラゾリン、3-ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、1H-インダゾールの1位、イソインドールないしはイソインドリンの2位、モルフォリンの4位、カル

10

20

30

40

50

バゾールないしは - カルボリンの 9 位に結合する。さらにより典型的には、窒素結合複素環には、1 - アジリジル、1 - アゼテジル、1 - ピロリル、1 - イミダゾリル、1 - ピラゾリル、及び 1 - ピペリジニルが含まれる。

【 0 1 2 7 】

「C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> 複素環」は、1 ~ 4 の環状炭素原子が個々に O、S 及び N からなる群のヘテロ原子に置換されている芳香族ないしは非芳香族の C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> 複素環を指す。C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> 複素環の代表的な例には、限定するものではないが、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェン、インドリル、ベンゾピラゾリル、クマリニル、イソキノリニル、ピロリル、チオフェニル、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、ピリミジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル及びテトラゾリルが含まれる。C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> 複素環は置換されていなくても、限定するものではないが、- C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub> アルキル、- O - (C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub> アルキル)、- アリール、- C(O)R'、- OC(O)R'、- C(O)OR'、- C(O)NH<sub>2</sub>、- C(O)NH R'、- C(O)N(R')<sub>2</sub>、- NH C(O)R'、- S(O)<sub>2</sub> R'、- S(O)R'、- OH、- ハロゲン、- N<sub>3</sub>、- NH<sub>2</sub>、- NH(R')、- N(R')<sub>2</sub>、及び - CN を含む最大 7 基に置換されていてもよく、各々の R' は、H、- C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub> アルキル及びアリールからそれぞれ選択される。  
10

「C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> ヘテロシクロ」は、複素環基の水素原子のうちの 1 つが結合に置換されている上記の C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> 複素環基を指す。C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> ヘテロシクロは置換されていなくても、限定するものではないが、- C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub> アルキル、- O - (C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub> アルキル)、- アリール、- C(O)R'、- OC(O)R'、- C(O)OR'、- C(O)NH<sub>2</sub>、- C(O)NH R'、- C(O)N(R')<sub>2</sub>、- NH C(O)R'、- S(O)<sub>2</sub> R'、- S(O)R'、- OH、- ハロゲン、- N<sub>3</sub>、- NH<sub>2</sub>、- NH(R')、- N(R')<sub>2</sub>、及び - CN を含む最大 6 基に置換されていてもよく、各々の R' は、H、- C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub> アルキル及びアリールからそれぞれ選択される。  
20

【 0 1 2 8 】

「炭素環」は、単環として 3 ~ 7 の炭素原子又は二環として 7 ~ 12 の炭素原子を有する飽和ないしは不飽和の環を意味する。単環の炭素環は 3 ~ 6 の環状原子、より一般的には 5 又は 6 の環状原子を有する。二環式の炭素環は、例えばビシクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6] 又は [6, 6] システムとして配置した 7 ~ 12 の環状原子、又はビシクロ[5, 6] 又は [6, 6] システムとして配置した 9 又は 10 の環状原子を有する。単環の炭素環の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1 - シクロペント - 1 - エニル、1 - シクロペント - 2 - エニル、1 - シクロペント - 3 - エニル、シクロヘキシル、1 - シクロヘキス - 1 - エニル、1 - シクロヘキス - 2 - エニル、1 - シクロヘキス - 3 - エニル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが含まれる。  
30

「C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> 炭素環」は、3 -、4 -、5 -、6 -、7 - 又は 8 -員の飽和ないしは不飽和非芳香族炭素環である。代表的な C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> 炭素環には、限定するものではないが、- シクロプロピル、- シクロブチル、- シクロペンチル、- シクロペンタジエニル、- シクロヘキシル、- シクロヘキセニル、- 1, 3 - シクロヘキサジエニル、- 1, 4 - シクロヘキサジエニル、- シクロヘプチル、- 1, 3 - シクロヘプタジエニル、- 1, 3, 5 - シクロヘプタトリエニル、- シクロオクチル、及び - シクロオクタジエニルが含まれる。C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> 炭素環基は置換されていなくても、限定するものではないが、- C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub> アルキル、- O - (C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub> アルキル)、- アリール、- C(O)R'、- OC(O)R'、- C(O)OR'、- C(O)NH<sub>2</sub>、- C(O)NH R'、- C(O)N(R')<sub>2</sub>、- NH C(O)R'、- S(O)<sub>2</sub> R'、- S(O)R'、- OH、- ハロゲン、- N<sub>3</sub>、- NH<sub>2</sub>、- NH(R')、- N(R')<sub>2</sub>、及び - CN を含む一又は複数の基に置換されていてもよく、各々の R' は、H、- C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub> アルキル及びアリールからそれぞれ選択される。  
40

「C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> カルボシクロ」は、炭素環基の水素原子のうちの 1 つが結合に置換されている上記の C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> 炭素環基を指す。

【 0 1 2 9 】

「リンカー」は、共有結合を含む化学的な部分又は薬剤部分に抗体を共有結合させる原子の鎖を指す。様々な実施態様では、リンカーには、二価の基、例としてalkyldiyl、aryldiyl、heteroaryldiyl、アルキロキシ(例としてポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ)及びアルキラミノ(例えばポリエチレンアミノ、Jeffamine<sup>TM</sup>)の繰り返しユニットである-(CR<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O(CR<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-などの部分、及び、スクシナート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネート及びカプロアミドを含む二酸エステル及びアミドが含まれる。

「キラル」なる用語は、鏡像パートナーの重ね合わすことができない特性を有する分子を指し、一方、「アキラル」なる用語は、鏡像パートナーの重ね合わすことができる分子を指す。

「立体異性体」なる用語は、同一の化学構造を有するが、空間の原子又は基の配列に関しては異なる化合物を指す。

「ジアステレオマー」はキラリティの2以上の中心を有し、その分子が互いの鏡像でない立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理的性質、例えば融点、沸点、分光特性及び反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動及びクロマトグラフィなどの高分解能解析手順により分離されうる。

「鏡像異性体」は、互いに重ね合わせることができない鏡像である化合物の2つの立体異性体を指す。

#### 【0130】

本明細書中で用いる立体化学的定義及び慣例は、一般にS. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 及び、Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに従う。多くの有機化合物は光学的に活性な形態で存在する。すなわち直線偏光の平面を回転する能力を有する。光学的に活性な化合物を記載する場合、接頭語DとL又はRとSを用いて、キラル中心(一又は複数)の周りの分子の絶対配置を示す。接頭後dとl又は(+)と(-)は、化合物による直線偏光の回転のサインを示すために用いるものであって、(-)又は1は化合物が左旋性であることを意味する。(+)又はdを接頭に付した化合物は右旋性である。所定の化学構造では、互いの鏡像であることを除いて、これらの立体異性体は同一である。また、特定の立体異性体は鏡像異性体とも称され、この異性体の混合物は鏡像異性体混合物と称されることが多い。鏡像異性体の50:50混合物は、化学的反応又は過程において立体選別でも立体特異性でもなくなった場合に生じうるラセミ混合物又はラセミ化合物を指す。「ラセミ混合物」及び「ラセミ化合物」なる用語は、光学的活性を欠く、2つの鏡像異性種を指す。

「脱離基」は、他の官能基によって置換されうる官能基を指す。特定の脱離基は当分野で公知であり、例として、限定するものではないが、ハロゲン化物(例えば、クロライド、プロマイド、イオジド)、メタンスルホニル(メシル)、p-トルエンスルホニル(トルル)、トリフルオロメチルスルホニル(トリフレート)、及びトリフルオロメチルスルホネートなどがある。

#### 【0131】

##### 省略記号

リンカー成分：

MC = 6-マレイミドカプロイル

Va1-Cit又は「vc」=バリン-シトルリン(プロテアーゼにより切断可能なりンカーノの例示的なジペプチド)

シトルリン=2-アミノ-5ウレイドペンタン酸

PAB=p-アミノベンジルオキシカルボニル(「自己犠牲(self immolative)」リンカーノの例)

Me-Va1-Cit=N-メチル-バリン-シトルリン(リンカーペプチド結合が、カテプシンBによる切断を阻害するように修飾されているもの)

MC(PEG)6-OH=マレイミドカプロイル-ポリエチレングリコール(抗体システィ

10

20

30

40

50

インに結合しうる)

S P P = N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート

S P D P = N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート

S M C C = スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート

I T = イミノチオラン

細胞障害性剤：

M M A E = モノメチルアウリスタチンE(MW 718)

M M A F = 薬剤のC末端にフェニルアラニンを有するアウリスタチンE(M M A E)の変異体(MW 731.5)

M M A F - D M A E A = C末端のフェニルアラニンに対するアミド連結にD M A E A(ジメチルアミノエチルアミン)を有するM M A F(MW 801.5)

M M A F - T E G = フェニルアラニンにエステル化したテトラエチレングリコールを有するM M A F

M M A F - N t B u = M M A FのC末端にアミドとして結合した、N-t-ブチル

D M 1 = N(2')-デアセチル-N(2')-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン

D M 3 = N(2')-デアセチル-N 2 -(4-メルカプト-1-オキソベンチル)-メイタンシン

D M 4 = N(2')-デアセチル-N 2 -(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソベンチル)-メイタンシン

【0132】

さらに、略語は以下の通りである：A EはアウリスタチンEであり、B o cはN(tブトキシカルボニル)であり、c i tはシトルリンであり、d a pはドラプロイン(dolaproline)であり、D C Cは1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドであり、D C Mはジクロロメタンであり、D E Aはジエチルアミンであり、D E A Dはジエチルアゾジカルボキシレートであり、D E P Cはジエチルホスホリルシアニダートであり、D I A Dはジイソプロピルアゾジカルボキシレートであり、D I E AはN,N-ジイソプロピルエチルアミンであり、d i lはドライソロイシンであり、D M Aはジメチルアセトアミドであり、D M A Pは4-ジメチルアミノピリジンであり、D M Eはエチレングリコールジメチルエーテル(又は1,2-ジメトキシエタン)であり、D M FはN,N-ジメチルホルムアミドであり、D M S Oはジメチルスルホキシドであり、d o eはドラフェニン(dolaphenine)であり、d o vはN,N-ジメチルバリンであり、D T N Bは5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)であり、D T P Aはジエチレントリアミンペンタ酢酸であり、D T Tはジチオトレイトルであり、E D C Iは1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩であり、E E D Qは、2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリンであり、E S - M Sはエレクトロスプレー質量分析であり、E t O A cは酢酸エチルであり、F m o cはN-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)であり、g l yはグリシンであり、H A T Uは、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,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であり、H O B tは1-ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、H P L Cは高速液体クロマトグラフィであり、i l eはイソロイシンであり、1 y sはリジンであり、M e C N(C H <sub>3</sub> C N)はアセトニトリルであり、M e O Hはメタノールであり、M t rは4-アニシルジフェニルメチル(又は4-メトキシトリチル)であり、(1 S, 2 R)-(+)-ノルエフェドリンではなく、P B Sはリン酸塩緩衝生理食塩水(pH 7.4)であり、P E Gはポリエチレングリコールであり、P hはフェニルであり、P n pはp-ニトロフェニルであり、M Cは6-マレイミドカブロイルであり、p h eはL-フェニルアラニンであり、P y B r o pは、プロモトリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェイトであり、S E Cはサイズ排除クロマトグラフィであり、S uはスクシンイミドであり、T F Aはトリフルオロ酢酸であり、T L Cは薄層クロマトグラフィであり、U Vは紫外線であり、v a lはバリンである。

【0133】

10

20

30

40

50

### 組成物及びその作製方法

STEAP-1に結合する抗体が提供される。抗STEAP-1抗体を含んでなるイムノコンジュゲートが提供される。本発明の抗体及びイムノコンジュゲートは、例えば、STEAP-1の発現の増加などの発現の変更と関係する疾患の診断や治療に有用である。ある実施態様では、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、癌などの細胞増殖性疾患の診断や治療に有用である。

#### 【0134】

##### 抗STEAP-1抗体

一態様では、本発明はSTEAP-1に結合する抗体を提供する。いくつかの実施態様では、ヒト及びカニクイザル(cyno)のSTEAP-1の成熟形態に結合する抗体が提供される。そのような実施態様では、ヒトのSTEAP-1の成熟形態は配列番号1(図1)のアミノ酸配列を有する。cyno STEAP-1は配列番号3(図1)のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、STEAP-1に対する抗体は、細胞表面に発現されるSTEAP-1の成熟形態に結合する。いくつかの実施態様では、細胞表面に発現されるSTEAP-1の成熟形態に結合する抗体は、細胞の成長を阻害する。いくつかの実施態様では、抗STEAP-1抗体は、細胞表面に発現されるSTEAP-1の成熟形態に結合して、細胞増殖を阻害する。ある実施態様では、抗STEAP-1抗体は、細胞表面に発現されるSTEAP-1の成熟形態と結合して、細胞死を誘導する。いくつかの実施態様では、抗STEAP-1抗体は、癌細胞の表面に発現されるSTEAP-1の成熟形態に結合する。いくつかの実施態様では、抗STEAP-1抗体は、同じ組織起源の正常細胞と比較して癌細胞の表面に過剰に発現されるSTEAP-1の成熟形態に結合する。いくつかの実施態様では、抗STEAP-1抗体は、細胞毒素又は検出可能な標識にコンジュゲートされ、細胞表面上のSTEAP-1に結合する。いくつかの実施態様では、抗体-毒素コンジュゲートは細胞の成長を阻害する。いくつかの実施態様では、抗体-検出可能な標識コンジュゲートは、その表面上にSTEAP-1を発現する細胞をインピトロ又はインピボで検出可能にする。

#### 【0135】

一態様では、抗STEAP-1抗体はモノクローナル抗体である。一態様では、抗STEAP-1抗体は抗体断片、例えばFab、Fab'-SH、Fv、scFv又は(Fab')<sub>2</sub>断片である。一態様では、抗STEAP-1抗体はキメラ、ヒト化、又はヒトの抗体である。一態様では、本発明書中に記載のいずれかの抗STEAP-1抗体は精製される。

ファージライブラリから得られる例示的なモノクローナル抗体は、本願明細書において提供される。ライブラリをスクリーニングするために用いられる抗原は、STEAP-1及びの細胞外ドメイン(ecd)に対応する、配列番号28又は配列番号30のアミノ酸配列の配列を有するポリペプチドとした。ライブラリスクリーニングから生じる抗体は親和性成熟される。

一態様では、マウス120.545、120グラフト(120 graft)、及びヒト化120v.24とSTEAP-1への結合について競合するモノクローナル抗体が提供される。また、マウス120.545、120グラフト及びヒト化120v.24と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体が提供される。

本発明の一態様では、抗STEAP-1抗体をコードするポリヌクレオチドが提供される。ある実施態様では、抗STEAP-1抗体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。ある実施態様では、前記のベクターを含む宿主細胞が提供される。本発明の他の態様では、抗STEAP-1抗体をコードする抗STEAP-1抗体又はポリヌクレオチドを含有する組成物が提供される。ある実施態様では、本発明の組成物は、本明細書中で列挙したものなどの細胞増殖性疾患の治療のための製薬的製剤である。

#### 【0136】

例示的な抗STEAP-1抗体の詳細な解説は、以下の通りである：

##### 1. 抗STEAP-1抗体の具体的な実施態様

10

20

30

40

50

一態様では、本発明は、図2Bの配列番号9又は10を含む重鎖可変ドメインを含んでなる抗S T E A P - 1抗体を提供する。一態様では、本発明は、図2Aの配列番号6を含む軽鎖可ドメインを含んでなる抗S T E A P - 1抗体を提供する。

一態様では、本発明は、カバット位置A 2 4 V、V 3 7 I、V 4 8 M、F 6 7 I、及びL 7 8 Fにおけるアミノ変更のうちの一又は複数を有する、配列番号9を含む重鎖を含んでなる抗S T E A P - 1抗体を提供する。一実施態様では、重鎖は、配列番号2 5、7 5、7 6、7 7、7 8、及び7 9から選択された重鎖フレームワーク領域を含む。本明細書で使用する重鎖フレームワーク領域は、「F R - H 1 - H 4」又は「H C - F R 1 - F R 4」と表記され、軽鎖フレームワーク領域は、「F R - L 1 - L 4」又は「L C - F R 1 - F R 4」と表記される。一態様では、本発明は、配列番号6を含む軽鎖を含んでなる抗S T E A P - 1抗体を提供する。  
10

一態様では、本発明は、図2A及び2Bに示す抗体1 2 0 . v 2 4のH V R配列の1、2、3、4、5、又は6を含んでなる抗S T E A P - 1抗体を提供する。

#### 【0137】

抗S T E A P - 1抗体は、S T E A P - 1を結合する能力を保持する限り、任意の適切なフレームワーク可変ドメイン配列を含んでもよい。例えば、いくつかの実施態様では、本発明の抗S T E A P - 1抗体は、ヒトのサブグループIII重鎖フレームワークコンセンサス配列を含んでなる。これらの抗体の一実施態様では、重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置2 4、3 7、4 8、6 7及び/又は7 8に置換を含む。これらの抗体の一実施態様では、位置2 4はA又はVであり、位置3 7はI又はVであり、位置4 8はM又はVであり、位置6 7はI又はFであり、及び/又は、位置7 8はF又はLである。一実施態様では、これらの抗体は、h u M A b 4 D 5 - 8の重鎖可変ドメインフレームワーク配列、例えば配列番号2 1、2 2、2 3及び2 4(それぞれF R - H 1、F R - H 2、F R - H 3、F R - H 4)を含む。h u M A b 4 D 5 - 8はハーセプチン(登録商標)抗H E R 2抗体(Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA)として商業的に公知であり、米国特許第6 4 0 7 2 1 3号及び同第5 8 2 1 3 3 7号、及びLee等, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93においても言及される。このような実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトのI軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。このような実施態様では、これらの抗体は、h u M A b 4 D 5 - 8の軽鎖可変ドメインフレームワーク配列、例えば配列番号1 7、1 8、1 9及び2 0(それぞれF R - L 1、F R - L 2、F R - L 3、F R - L 4)を含む。  
20

#### 【0138】

一実施態様では、抗S T E A P - 1抗体は、フレームワーク配列及び高頻度可変領域を含む重鎖可変ドメインを含んでなり、このときフレームワーク配列はF R - H 1 - F R - H 4配列、それぞれ配列番号2 1又は2 5(F R - H 1)、2 2(F R - H 2)、2 3(F R - H 3)、及び2 4(F R - H 4)を含み、H V R - H 1は配列番号1 4のアミノ酸配列を含み、H V R - H 2は配列番号1 5のアミノ酸配列を含み、そしてH V R - H 3は配列番号1 6のアミノ酸配列を含んでいる。一実施態様では、抗S T E A P - 1抗体は、フレームワーク配列及び高頻度可変領域を含む軽鎖可変ドメインを含んでなり、このときフレームワーク配列はF R - L 1 - F R - L 4配列、それぞれ配列番号1 7、1 8、1 9及び2 0を含み、H V R - L 1は配列番号1 1、1 2及び1 3から選択されるアミノ酸配列を含む。これらの抗体の一実施態様では、重鎖可変ドメインは配列番号9又は1 0を含み、軽鎖可変ドメインは配列番号6を含む。  
40

いくつかの実施態様では、本発明は、アミノ酸配列配列番号9又は1 0に対して少なくとも9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %又は9 9 %の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含んでなる抗S T E A P - 1抗体を提供する。いくつかの実施態様では、少なくとも9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %又は9 9 %の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列と比較して置換、挿入又は欠失を含有するが、そのアミノ酸配列を含む抗体はS T E A P - 1に結合する能力を保持する。いくつかの実施態様では、合計1  
50

~10のアミノ酸が、配列番号9、10、14、15、16、21、22、23、24、25、75、76、77、78、及び/又は79の配列において置換されているか、挿入されているか、又は欠失されている。いくつかの実施態様では、置換、挿入又は欠失はHVR以外の領域(すなわちFR)で起こる。いくつかの実施態様では、抗STEAP-1抗体は、配列番号9又は10から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含んでなる。

いくつかの実施態様では、本発明は、図2B(配列番号9又は10)に示す重鎖可変ドメインを含む抗STEAP-1抗体を提供する。

【0139】

いくつかの実施態様では、重鎖HVR及びFR配列は以下を含む。

HVR-H1 (GYSITSDYAWN、配列番号14)  
 HVR-H2 (GYISNSGSTSYNPSLKS、配列番号15)  
 HVR-H3 (ERNYDYDDYYYAMDY、配列番号16)  
 FR-H1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS、配列番号21)  
 FR-H1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS、配列番号25)  
 FR-H2 (WVRQAPGKGLEWV、配列番号22)  
 FR-H2 (WIRQAPGKGLEWV、配列番号75)  
 FR-H2 (WVRQAPGKGLEWM、配列番号76)  
 FR-H2 (WIRQAPGKGLEWM、配列番号77)  
 FR-H3 (RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR、配列番号23)  
 FR-H3 (RITISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR、配列番号78)  
 FR-H3 (RFTISRDN SKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCAR、配列番号79)  
 FR-H4 (WGQGTLVTVSS、配列番号24)

【0140】

いくつかの実施態様では、本発明は、図2A(配列番号6)に示す軽鎖可変ドメインを含む抗STEAP-1抗体を提供する。

いくつかの実施態様では、軽鎖HVR配列は以下を含む。

HVR-L1 (KSSQSLLYRSNQKNYLA、配列番号11)  
 HVR-L2 (WASTRES、配列番号12)  
 HVR-L3 (QQYYNYPRT、配列番号13)

いくつかの実施態様では、軽鎖FR配列は以下を含む。

FR-L1 (DIQM T QSPSSLSASVGDRVTITC、配列番号17)；  
 FR-L2 (WYQQKPGKAPKLLIY、配列番号18)；  
 FR-L3 (GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDEFATYYC、配列番号19)  
 FR-L4 (FGQGTTKVEIKR、配列番号20)

【0141】

一態様では、本発明は、アミノ酸配列番号6に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる抗STEAP-1抗体を提供する。いくつかの実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列と比べて置換、挿入又は欠失を含有するが、そのアミノ酸配列を含む抗体はSTEAP-1への結合能を保持する。いくつかの実施態様では、合計1~10のアミノ酸が、配列番号6、11、12、13、17、18、19及び20から選択される配列において置換されているか、挿入されているか、又は欠失されている。いくつかの実施態様では、置換、挿入又は欠失はHVR以外の領域(すなわちFR)で起こる。いくつかの実施態様では、抗STEAP

10

20

30

40

50

- 1 抗体は、アミノ酸配列の配列番号 6 を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる。

一態様では、本発明は、(a)配列番号 9 及び 10 から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、(b) アミノ酸配列の配列番号 6 に少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参考配列と比べて置換、挿入又は欠失を含有するが、そのアミノ酸配列を含む抗体は STAP-1 への結合能を保持する。いくつかの実施態様では、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参考配列と比べて置換、挿入又は欠失を含有するが、そのアミノ酸配列を含む抗体は STAP-1 への結合能を保持する。いくつかの実施態様では、合計 1 ~ 10 のアミノ酸が、参考配列において置換されているか、挿入されているか、又は欠失されているか、この参考配列は、配列番号 9、10、14、15、16、21、22、23、24、25、75、76、77、78、79 から選択される配列を含むがこれら限定されない。いくつかの実施態様では、置換、挿入又は欠失は HVR 以外の領域(すなわち FR)で起こる。いくつかの実施態様では、抗 STAP-1 抗体は、配列番号 9 又は 10 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号 6 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを含んでなる。10

一態様では、本発明は、(a) 図 2B に示すものから選択される 1、2 又は 3 の VH HR、及び / 又は (b) 図 2A に示すものから選択される 1、2 又は 3 の VL HR を含んでなる抗 STAP-1 抗体を提供する。一態様では、本発明は、図 2B に示すものから選択される重鎖可変ドメインと、図 2A に示すものから選択される軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗 STAP-1 抗体を提供する。20

#### 【0142】

#### 2. 抗体断片

本発明は抗体断片を包含する。抗体断片は、酵素消化などの古典的な手段や組み換え技術によって生成されうる。特定の場合では、全抗体よりも抗体断片の利用に利点がある。より小さいサイズの断片によりクリアランスが速くなり、固体腫瘍へのアクセスが改善されうる。ある抗体断片の概説については、Hudson 等 (2003) *Nat. Med.* 9:129-134 を参照。30

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimoto 等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) 及び Brennan 等, *Science*, 229:81(1985) を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、Fab、Fv 及び scFv 抗体断片はすべて、大腸菌で発現され、分泌されるため、この断片の大規模産生が容易となる。抗体断片は上述において検討した抗体ファーチライブラリーから分離することができる。別法として、Fab'-SH 断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合して Fab(ab')<sub>2</sub> 断片を形成することができる(Carter 等, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、Fab(ab')<sub>2</sub> 断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含有する、インビボ半減期が増加した Fab 及び Fab(ab')<sub>2</sub> 断片は米国特許第 5 8 6 9 0 4 6 号に記載される。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。ある実施態様では、抗体は単鎖 Fv 断片 (scFV) である。国際公開第 93/16185 号; 米国特許第 5 5 7 1 8 9 4 号; 及び米国特許第 5 5 8 7 4 5 8 号を参照のこと。Fv 及び scFv は、定常領域が欠けている完全な結合部を有する唯一の種である; したがって、それらは、インビボでの使用の間の非特異的結合を減らすために適する。scFv 融合タンパク質は、scFv のアミノ末端又はカルボキシ末端の何れかで、エフェクタータンパク質の融合物を得るために構築されうる。上掲の *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck を参照。また、抗体断片は、例えば米国特許第 5 6 4 1 8 7 0 号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直線状の抗体は単特異的又は二重特異的であってもよい。40

## 【0143】

## 3. ヒト化抗体

本発明はヒト化抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化する様々な方法は従来からよく知られている。例えば、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と呼ばれる。ヒト化は、本質的にはヒト抗体の該当する高頻度可変領域配列を置換することによりウィンターと共同研究者の方法(Jonesほか, *Nature*, 321: 522-525 (1986)、Riechmannほか, *Nature*, 332:323-327 (1988)、Verhoevenほか, *Science*, 239:1534-1536(1988))を使用して実施することができる。よって、このような「ヒト化」抗体は、完全なヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の該当する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4 8 1 6 5 6 7号)である。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくつかの高頻度可変領域残基及び場合によってはいくらかのF R 残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。10

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方の可変ドメインの選択が非常に重要となりうる。「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワーク領域として受け入れる(Sims等, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993) ; Chothia等, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。他の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992) ; Presta等, *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。20

## 【0144】

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが一般的に望ましい。この目標を達成するべく、ある方法によって、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるよう、F R 残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接的かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。30

## 【0145】

## 4. ヒト抗体

本発明のヒト抗S T E A P - 1抗体は、上記のように、ヒト由来のファージディスプレイライブラリから選択したF v クローン可変ドメイン配列を公知のヒト定常ドメイン配列と結合することによって構築することができる。あるいは、本発明のヒトモノクローナル抗S T E A P - 1抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株は、例えば、Kozbor, *J. Immunol.* 133, 3001(1984) ; Brodeur等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) ; 及びBoerner等, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)によって記載されている。40

免疫化することで、内因性免疫グロブリンの生産なしに、ヒト抗体の完全なレパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物(例えばマウス)を生産することが現在は可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系変異体マウスでの抗体重鎖結合領域(J<sub>H</sub>)遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体の生産の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような生殖細胞系変異体マウスでのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子配列の転移は、抗原の挑戦によってヒト抗体の生産を引き起こす。例えば、Jakobovits等, *Pr*50

oc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551(1993) ; Jakobovits等, Nature 362, 255(1993) ; Bruggermann等, Year in Immunol., 7: 33 (1993)を参照のこと。

#### 【0146】

また、遺伝子シャフリングは、ヒト抗体が開始非ヒト、例えば齧歯類の抗体と類似した親和性及び特性を有している場合、非ヒト、例えば齧歯類の抗体からヒト抗体を得るために使用することもできる。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法により、本明細書中に記載のファージディスプレイ技術により得られた非ヒト抗体断片の重鎖可変領域遺伝子又は軽鎖可変領域遺伝子の何れかをヒトVドメイン遺伝子のレパートリーで置換し、非ヒト鎖 / ヒト鎖  $s_c F_v$  ないし  $F_{ab}$  キメラの集団を作成する。抗原を選択することにより、ヒト鎖が初めのファージディスプレイクローンにおいて一致した非ヒト鎖の除去により破壊された抗原結合部位を回復する、非ヒト鎖 / ヒト鎖キメラ  $s_c F_v$  ないし  $F_{ab}$  が単離される、つまり、エピトープがヒト鎖のパートナーの選択をつかさどる(インプリントする)。残りの非ヒト鎖を置換するためにこの工程を繰り返すと、ヒト抗体が得られる(1993年4月1日公開のPCT特許出願WO 93/06213を参照)。伝統的なCDR移植による非ヒト抗体のヒト化と異なり、この技術により、非ヒト起源のFR又はCDR残基を全く持たない完全なヒト抗体が得られる。

10

#### 【0147】

##### 5. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある実施態様では、二重特異性抗体はヒト又はヒト化の抗体である。ある実施態様では、結合特異性の一つはSTEA P - 1に対するものであり、他方は任意の他の抗原に対するものである。ある実施態様では、二重特異性抗体は、STEA P - 1の2つの異なるエピトープに結合しうる。また、二重特異性抗体はSTEA P - 1を発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はSTEA P - 1結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン-、ビンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えば  $F(ab')_2$  、二重特異性抗体)として調製することができる。

20

二重特異性抗体を作製する方法は当該分野において既知である。二重特異性抗体の伝統的な組み換え產生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの重鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を產生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が1993年5月13日に公開の国際公報第93/08829号及びTraunecker等、EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

30

#### 【0148】

異なるアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原 - 抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は例えば、少なくともヒンジの一部、CH2及びCH3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。ある実施態様では、軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)は、融合の少なくとも一つに存在する。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。これにより、コンストラクトに使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2又は3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

40

50

このアプローチ法の一実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公報第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を产生する更なる詳細については、例えばSuresh等, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

他のアプローチ法によれば、一対の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。界面は抗体定常ドメインのC<sub>H</sub>3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

#### 【0149】

二特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロ抱合抗体」を含む。例えば、ヘテロ抱合体の一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第4676980号)及びHIV感染の治療(国際公報第91/00360号、国際公報第92/00373号及び欧州特許第03089号)等の用途が提案されている。ヘテロ抱合抗体は適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第4676980号などに記されている。

抗体断片から二重特異性抗体を产生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, *Science*, 229:81 (1985) は完全な抗体をタンパク分解性に切断して F(a b')<sub>2</sub> 断片を产生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。產生された F a b' 断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b' - TNB 誘導体の一つをついでメルカブトエチルアミンでの還元により F a b' - チオールに再転換し、他の F a b' - TNB 誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

#### 【0150】

最近の進歩により大腸菌から F a b' - SH 断片を直接回収することが容易となっており、これにより化学的にカップリングされて二重特異性抗体にを形成する。Shalaby 等, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) は、完全なヒト化二重特異性抗体 F(a b')<sub>2</sub> 分子の产生について記述している。各々の F a b' 断片は大腸菌から別々に分泌されて、インピトロで化学的にカップリングされて、二重特異性抗体を形成する。したがって、形成された二重特異性抗体は、HER2 を過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞に結合するだけでなく、ヒト胸部腫瘍の標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解活性を引き起こすことができた。

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産された。Kostelnik 等, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の F a b' 部分に結合させられた。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズム

10

20

30

40

50

を提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )に重鎖可変ドメイン( $V_H$ )を結合してなる。従つて、一つの断片の $V_H$ 及び $V_L$ ドメインは他の断片の相補的 $V_L$ 及び $V_H$ ドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片製造方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttle等, J. Immunol. 147:60(1991)。

#### 【0151】

##### 6. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(IgMクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。ある実施態様では、二量化ドメインはFc領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はFc領域と、Fc領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ある実施態様では、多価抗体は3からおよそ8の抗原結合部位を有する。このような一実施態様では、多価抗体は4つの抗原結合部位を含む(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖(例えば2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)は $V_D 1 - (X_1)^n - V_D 2 - (X_2)^n - Fc$ を有し、ここで $V_D 1$ は第1の可変ドメインであり、 $V_D 2$ は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖の一つであり、 $X_1$ 及び $X_2$ はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は： $V_H - C_H 1 -$ 柔軟なリンカー- $V_H - C_H 1 - Fc$ 領域鎖；又は $V_H - C_H 1 - V_H - C_H 1 - Fc$ 領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、少なくとも2つ(例えば4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有してもよい。ここで多価抗体は、例えば約2～約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはCLドメインを更に有する。

#### 【0152】

##### 7. 単一のドメイン抗体

いくつかの実施態様では、本発明の抗体は单一のドメイン抗体である。单一のドメイン抗体は、抗体のすべてないしは一部の重鎖可変ドメイン又はすべてないしは一部の軽鎖可変ドメインを含んでなる单一ポリペプチドである。ある実施態様では、单一のドメイン抗体は、ヒトの单一のドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA；例として米国特許第6248516号B1を参照)。一実施態様では、单一のドメイン抗体は、抗体のすべてないしは一部の重鎖可変ドメインからなる。

#### 【0153】

##### 8. 抗体変異体

いくつかの実施態様では、ここに開示する抗体のアミノ酸配列の修飾を考える。例えば、抗体の結合親和性及び/又は生物学的特性を向上することができれば望ましい。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードする核酸に適切な変化を導入して、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、抗体のアミノ酸配列内の残基の、例えば、欠失型、又は挿入或いは置換を含む。最終構成物が所望する特徴を有していれば、欠失、挿入又は置換をどのように組合せてもよい。アミノ酸変化は、配列ができるときに被検体の抗体アミノ酸配列に導入されうる。

突然変異誘発に好ましい位置である抗体の特定の残基又は領域の同定に有益な方法は、Cunningham及びWellsによりScience, 244:1081-1085 (1989年)に開示されているように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的となる残基又は残基の組が同定され(例えば、arg、asp、his、lys、及びgluなどの荷電した残基)、中性の、又

10

20

30

40

50

は負に荷電したアミノ酸(例えばアラニン又はポリアラニン)で置換され、アミノ酸の抗原との相互作用に影響を与える。次いで、置換に対する機能的感受性を示しているそれアミノ酸位置を、置換の部位において、又は置換の部位のために、さらなる、又は他の変異体を導入することにより精製する。このように、アミノ酸配列変異体を導入する部位は予め決定されるが、突然変異自体の性質は予め決定する必要は無い。例えば、任意の部位における突然変異の機能を分析するために、標的コドン又は領域において a 1 a スキャンニング又はランダム突然変異誘発を実行し、発現した免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

【 0 1 5 4 】

アミノ酸配列挿入には、1残基から100以上の残基を有するポリペプチドまでの長さに亘るアミノ-末端融合及び/又はカルボキシ-末端融合、ならびに、单一又は多重アミノ酸残基の配列内挿入を含む。端末挿入の例には、N-末端メチオニル残基を持つ抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体には、抗体の血清半減期を増加させるポリペプチド又は(例えばA D E P Tのための)酵素の抗体のN-末端又はC-末端への融合が含まれる。

ある実施態様では、本発明の抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加又は低減するため変更する。ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N結合又はO結合の何れかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸)のトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への糖鎖部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作出される。O結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つが結合することを意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた用いられる。

【 0 1 5 5 】

抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、アミノ酸配列を、一又は複数の上述したトリペプチド配列(N結合グリコシル化部位のもの)が作られるか又は除かれるように変化させることによって簡便に達成される。該変化は、元の抗体の配列への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はこれによる置換によってもなされる(O-結合グリコシル化部位の場合)。

抗体がFc領域を含有する場合、それに接着する炭水化物を変更してもよい。例えば、抗体のFc領域に接着するフコースを欠損する成熟炭水化物構造の抗体は、米国公開特許第2003/0157108号(Presta, L.)に記載される。米国公開特許第2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)も参照のこと。抗体のFc領域に接着した炭水化物内のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を二分する抗体は、国際公報第03/0111878号、Jean-Mairet等、及び米国特許第6602684号、Umana等に参照されている。抗体のFc領域に接着するオリゴサッカライド内の少なくとも一のガラクトース残基を有する抗体は、国際公報第97/30087号、Patei等に報告される。また、抗体のFc領域に接着する変更された炭水化物を有する抗体については、国際公報第98/58964号(Raju, S.)及び国際公報第99/22764号(Raju, S.)も参照のこと。また、修飾されたグリコシル化を有する抗原結合分子については、米国公開特許第2005/0123546号(Umana等)を参照。

【 0 1 5 6 】

ある実施態様では、グリコシル化変異体はFc領域を含有し、Fc領域に接着される炭水化物構造はフコースを欠いている。このような変異形は改善されたADC機能を有する。場合によって、Fc領域は、更にADCを改善する一つ以上のアミノ酸置換、例えばFc領域の位置298、333及び/又は334の置換(Eu残基番号付け)を更に含む。「脱フコース化」又は「フコース欠失」抗体に関する文献の例には以下のものを含む:米国公開番号2003/0157108;国際公報2000/61739;国際公報20

10

20

30

40

50

0 1 / 2 9 2 4 6 ; 米国公開番号 2 0 0 3 / 0 1 1 5 6 1 4 ; 米国公開番号 2 0 0 2 / 0 1 6 4 3 2 8 ; 米国公開番号 2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1 ; 米国公開番号 2 0 0 4 / 0 1 3 2 1 4 0 ; 米国公開番号 2 0 0 4 / 0 1 1 0 7 0 4 ; 米国公開番号 2 0 0 4 / 0 1 1 0 2 8 2 ; 米国公開番号 2 0 0 4 / 0 1 0 9 8 6 5 ; 国際公報 2 0 0 3 / 0 8 5 1 1 9 ; 国際公報 2 0 0 3 / 0 8 4 5 7 0 ; 国際公報 2 0 0 5 / 0 3 5 5 8 6 ; 国際公報 2 0 0 5 / 0 3 5 7 7 8 ; 国際公報 2 0 0 5 / 0 5 3 7 4 2 ; Okazaki 等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004) ; 及び Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。脱フコース化抗体を產生する細胞株の例として、タンパク質フコース化欠失 L e c 1 3 C H O 細胞 (Ripka 等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986) ; 米国公開番号 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8 , Presta, L ; 及び国際公報 2 0 0 4 / 0 5 6 3 1 2 , Adams 等, 特に実施例 1 1 ) 10 、及びノックアウト細胞株、例として - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、F U T 8 , - ノックアウト C H O 細胞 (Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004) )などがある。

#### 【 0 1 5 7 】

一実施態様では、抗体が変更されてその血清半減期が改善される。抗体の血清半減期を増やすために、例えば米国特許第 5 7 3 9 2 7 7 号に記載のように、サルベージレセプター結合エピトープを抗体(特に抗体断片)に組み込んでよい。本明細書中で用いる「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、I g G 分子のインビボ血清半減期を増やす役割を担う I g G 分子(例えば I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 又は I g G 4 )の F c 領域のエピトープを指す(米国特許公開 2 0 0 3 / 0 1 9 0 3 1 1 、米国特許第 6 8 2 1 5 0 20 5 号 ; 米国特許第 6 1 6 5 7 4 5 号 ; 米国特許第 5 6 2 4 8 2 1 号 ; 米国特許第 5 6 4 8 2 6 0 号 ; 米国特許第 6 1 6 5 7 4 5 号 ; 米国特許第 5 8 3 4 5 9 7 号)。

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗体分子において少なくとも一つのアミノ酸残基に異なる残基が挿入されている。置換突然変異について関心ある部位は高度可変領域を含むが、F R 交互変化も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表 1 に示す。これらの置換が生物学的活性の望ましい変化をもたらす場合、表 1 に「例示的置換」と名前を付けた又はアミノ酸の分類を参照して以下に更に記載するような、より実質的な変化を導入して、生成物をスクリーニングしてよい。

#### 【 0 1 5 8 】

表 1

30

元の置換	例示的置換	好ましい置換
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)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; 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

30

## 【 0 1 5 9 】

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えはシート又は螺旋配置、(b)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の巣を維持するそれらの効果において実質的に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従ってグループ化することができる(A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975))：

(1) 無極性 : Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

40

(2) 無電荷極性 : Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) 酸性 : Asp (D), Glu (E)

(4) 塩基性 : Lys (K), Arg (R), His (H)

別法では、天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいて群に分けてよい：

(1) 疎水性 : ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；

(2) 中性の親水性 : cys、ser、thr、asn、gln；

(3) 酸性 : asp、glu；

(4) 塩基性 : his、lys、arg；

(5) 鎮配向に影響する残基 : gly、pro； 及び

(6) 芳香族 : trp、tyr、phe。

50

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。このような置換された残基も、保存的置換部位か、残存する(非保存的)部位に、導入することができる。

【0160】

ある型の置換変異体は、親抗体(例えば、ヒト化又はヒト抗体)の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、さらなる発展のために選択され、得られた変異体は、それらが作製された親抗体と比較して変更した(例えば向上した)生物学的特性を有している。そのような置換変異体を作製する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性突然変異を含む。簡潔に言えば、幾つかの高頻度可変領域部位(例えば6-7部位)を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された多価抗体は、纖維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたファージコートタンパク質の少なくとも一部(例えば、M13の遺伝子I I I 産物)への融合物としてディスプレイされる。ファージディスプレイ変異体は、ついで、それらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾のための候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、スキャニング突然変異誘発(例えばアラニンスキャニング)を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体と抗原の接点を特定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術を含む当分野で公知の技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されると、変異体のパネルにここに記載する技術を含む当分野で公知の技術を用いてスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択する。

10

【0161】

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、限定するものではないが、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又は初期に調製された抗体の変異体又は非変異体のオリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含む。

20

本発明の抗体のFc領域内に一以上のアミノ酸修飾を導入してFc領域変異型を生成することが望ましい。Fc領域変異体は、ヒンジシステイン修飾を含む、一以上のアミノ酸位置でのアミノ酸修飾(例えば、置換)を有するヒトFc領域配列(例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4 Fc領域)を含みうる。

30

【0162】

当分野での記載や教示に従って、ある実施態様では、本発明の抗体が野生型の対応抗体と比較して例えばFc領域内に一以上の変異を有することを考慮する。にもかかわらず、この抗体はその野生型対応物と比較して治療的有用性を示す実質的に同じ特徴を維持している。例えば、国際公開第99/51642号などに記載のようにC1q結合及び/又は補体依存性細胞障害(CDC)を変更する(すなわち改良又は減少する)結果となるFc領域内に特定の変異を生じさせることが考えられる。また、Fc領域変異型の他の例に関するDuncan & Winter Nature 322:738-40 (1988) ; 米国特許第5648260号 ; 米国特許第5624821号 ; 及び国際公開公報94/29351を参照。国際公開公報00/42072(Presta)及び国際公開公報2004/056312(Lowman)は、FcRへの結合が改善したか、減退した抗体変異体を開示している。これらの特許文献の内容は出典明記によって、本明細書に特別に組み込まれる。また、Shields等 J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照のこと。半減期が増加して、胎児への母性IgGの移送を担う(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976) 及びKim等, J. Immunol. 24:249 (1994))新生児Fcレセプター(FcRn)への結合が改善している抗体は、米国特許公開2005/0014934A1 (Hinton等)に開示されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を向上させる一又は複数の置換を有するFc領域を含んでなる。Fc領域アミノ酸配列が変更されてC1q結合能力が増加したか減少したポリペプチド変異体は、米国特許第6

40

50

194551号B1、国際公開公報99/51642に開示される。これらの特許文献の内容は出典明記によって、本明細書に特別に組み込まれる。また、Idusogie等J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

【0163】

一態様では、本発明は、Fc領域を含むFcポリペプチドの境界面に修飾を含む抗体を提供する。この修飾はヘテロ二量体化を容易にする及び/又は促進する。これらの修飾は第一Fcポリペプチドに隆起(protuberance)、そして第二Fcポリペプチドに腔(cavity)の導入を含み、この隆起は第1及び第2のFcポリペプチドの複合体形成を促進するよう腔に配置することができる。これらの修飾を有する抗体の生成方法は、例えば米国特許第5731168号に記載のように、当分野で公知である。

10

【0164】

9. 抗体誘導体

本発明の抗体は当該分野において知られ直ぐに利用できる更なる非タンパク質性部分を含むように更に修飾することができる。好ましくは、抗体の誘導体化に適した部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルビロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーかランダムコポリマー)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルビロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは水中におけるその安定性のために製造の際に有利であろう。ポリマーは任意の分子量であってよく、分枝状でも非分枝状でもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、一を超えるポリマーが結合する場合、それらは同じでも異なった分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又はタイプは、限定されるものではないが、その抗体誘導体が定まった条件下での治療に使用されるかどうか、改善される抗体の特定の性質又は機能を含む考慮事項に基づいて決定することができる。

20

【0165】

30

他の実施態様では、放射線に曝すことによって選択的に熱することができる非タンパク質性部分と抗体のコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク質性部分は炭素ナノチューブである(Kam等, Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005))。放射線はいずれの波長のものでもよく、限定するものではないが、通常の細胞に害を及ぼさないが、抗体-非タンパク質性部分に近位の細胞が死滅する温度にまで非タンパク質性部分を加熱する波長が含まれる。

【0166】

40

抗体の作製方法

1. ハイブリドーマベースの方法

本発明のS T E A P - 1モノクローナル抗体は、Kohler等, Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作製することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを免疫化し、免疫化に用いられるタンパク質と特異的に結合する抗体を生産するか又は生産することのできるリンパ球を誘導する。一般的に、S T E A P - 1への抗体は、S T E A P - 1とアジュバントを複数回皮下(s.c)又は腹腔内(i.p)に注射することにより動物内に生じる。S T E A P - 1は当分野で公知の方法を用いて調製されうる。その方法のいくつかは本明細書中でさらに記載される。例えば、S T E A P - 1は組み換えて生産されてもよい。一実施態様では、動物を、免疫グロブリン重鎖のFc部位に融合したS T E A P - 1の細胞外ドメイン(ecd)を含有するS T E A P - 1の誘導体で免疫化する。一実

50

施設様では、動物を、S T E A P - 1 - I g G 1 融合タンパク質で免疫化する。一実施態様では、動物は、一リン酸化リピドA(M P L) / トレハロースジクリノミコレート(trehalose dicrynomycolate)(T D M) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)により溶液中のS T E A P - 1 の免疫原性誘導体にて免疫化され、該溶液は複数の部位の皮下に注射される。2週後に、動物を追加免疫する。7~14日後、動物から採血して、血清を抗S T E A P - 1 力価について検定する。力価がプラトーになるまで動物を追加免疫する。

#### 【0167】

別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融剤を用いて骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、適当な培養培地、例えば融合していない親の骨髄腫細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を含む培地に播き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ(H G P R T 又はH P R T)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、H G P R T 欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノブテリン及びチミジンを含有するであろう(H A T 培地)。

#### 【0168】

ある実施態様では、骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの生産を支援し、H A T 培地のような培地に対して感受性である細胞である。例示的な骨髄腫株化細胞には、限定するものではないが、マウス骨髄腫系、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、San Diego, California USAから入手し得るM O P C - 2 1 及びM P C - 1 1 マウス腫瘍、及びアメリカ培養細胞系統保存機関、Rockville, Maryland USAから入手し得るS P - 2 又はX 6 3 - A g 8 - 6 5 3 細胞から誘導されたものが含まれる。ヒト骨髄腫及びマウス - ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、S T E A P - 1 に結合するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(R I A)又は酵素結合免疫吸着検定(E L I S A)によって測定する。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunsonほか, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキヤッチャード分析法によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び / 又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地には、例えば、D - M E M 又はR P M I - 1 6 4 0 培地が含まれる。加えて、該ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-SEPHAROSE、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティクロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

#### 【0169】

##### 2. ある一つのライプラリスクリーニング法

本発明の抗S T E A P - 1 抗体は、所望の活性(一又は複数)を有する抗体についてスクリーニングするためにコンビナトリアルライプラリを用いて作製することができる。例えば、ファージディスプレイライプラリを生成して、所望の結合特性を有する抗体についてこのライプラリをスクリーニングするためには当分野で様々な方法が公知である。このよ

10

20

30

40

50

うな方法は、一般にMethods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等, ed., Human Press, Totowa, NJ)のHoogenboom等 (2001)に、ある実施態様では、Lee等 (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093に記載される。

原則として、合成抗体クローニングを、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域 (Fv)の種々の断片を表示するファージを有するファージライブリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブリは、所望される抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別される。所望される抗原と結合することができるFv断片を発現するクローニングは抗原へ吸収され、それによって、ライブリの非結合クローニングから分離される。次いで、この結合クローニングは、抗原から溶出させることができ、抗原吸収 / 溶出の付加的サイクルによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗S T E A P - 1抗体は、興味の対象であるファージクローニングを選択するため10に適切な抗原スクリーニング手法を設計し、続いて、興味の対象であるファージクローニングからのFv配列、及びKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域(Fc)配列を用いての全長抗S T E A P - 1抗体クローニングの構築によって得ることができる。

#### 【0170】

ある実施態様では、抗体の抗原結合ドメインは、約110アミノ酸の2つの可変(V)領域である軽(VL)及び重(VH)鎖で形成され、その双方には、3つの高頻度可変ループ(HVR)又は相補鎖決定領域(CDR)が存在する。可変ドメインは、Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)に記載のように、VH及びVLが短くて柔軟なペプチドを介して共有結合している一本鎖Fv(scfv)断片として、又は定常ドメインと融合して非共有的に相互作用しているFab断片のいずれかとしてファージ上に機能的に表示することができる。ここで用いられているように、scfvコード化ファージクローニング、及びFabコード化ファージクローニングは、総称して「Fvファージクローニング」又は「Fvクローニング」と呼ぶ。

VH及びVL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって分離してクローニングし、ファージライブリにおいてランダムに組み換えられることが可能であり、それは、Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)に記載のように抗原結合クローニングについて探索することが可能である。免疫化したソースからのライブリは、ハイブリドーマを構成する必要がなく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、天然レパートリーをクローニングして、Griffiths等, EMBO J., 12: 725-734(1993)に記載のようにどんな免疫化もせずに、幅広い非自己及びまた自己抗原に対するヒト抗体の単一のソースを提供することが可能である。最終的には、天然ライブリは、また、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、及びランダム配列を有するPCRプライマーを利用して高度可変CDR3領域をコードし、インビトロでの再配列を完成させることによって合成的に作製することができる。

#### 【0171】

ある実施態様では、纖維状ファージは、マイナーコートタンパク質pIIIへの融合によって、抗体断片を表示するのに用いられる。この抗体断片は、一本鎖Fv断片として表示することができる、そのVH及びVLドメインは、例えば、Marks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)に記載のような、又は、例えば、Hoogenboom等, Nucl. Acids. Res., 19: 4133-4137(1991)に記載のような、1つの鎖はpIIIと融合し、もう一方の鎖は、幾つかの野生型コートタンパク質を置換することによってファージ表面上に表示されるようになるFabコートタンパク質構造のアセンブリがある細菌宿主細胞のペリプラズムへ分泌されるFab断片のように、柔軟なポリペプチドスペーサーによって同じポリペプチド鎖上に連結されている。

一般的に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒト又は動物から収集した免疫細胞から得られる。抗S T E A P - 1クローニングに有利になるように偏ったライブリが望ましい

10

20

30

40

50

場合には、検体を S T E A P - 1 で免疫化して抗体応答を生成させ、そして、脾臓細胞及び／又は他の末梢血リンパ球(P B L)である循環B細胞を、ライプラリ構築のために回収する。好ましい実施態様では、S T E A P - 1 免疫化により、S T E A P - 1 に対するヒト抗体を產生するB細胞が生じるように、抗S T E A P - 1 クローンに好ましいヒト抗体遺伝子断片ライプラリは、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを有する(及び、機能的な内因性抗体產生系を欠く)トランスジェニックマウスにおける抗S T E A P - 1 抗体応答を生成することによって得られる。ヒト抗体產生トランスジェニックマウスの作製は以下に記載する。

【 0 1 7 2 】

抗S T E A P - 1 反応細胞集団のさらなる濃縮は、適切なスクリーニング手法を利用してS T E A P - 1 特異的膜結合抗体を発現するB細胞を単離すること、例えば、S T E A P - 1 アフィニティクロマトグラフィーによる細胞分離、又は蛍光色素標識S T E A P - 1 への細胞の吸着とその後の蛍光標示式細胞分取器(F A C S)によって得ることができる。

あるいは、非免疫化供与体からの脾臓細胞及び／又はB細胞又は他のP B Lの利用によって可能性のある抗体レパートリーのより良い表示が提供され、また、S T E A P - 1 が免疫原ではない任意の動物(ヒト又は非ヒト)種を利用した抗体ライプラリの構築が可能となる。インビトロの抗体遺伝子コンストラクトを取り込むライプラリに関しては、幹細胞を被検体から収集して非再配列の抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。対象の免疫細胞は、種々の動物種、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ目、オオカミ、犬科、ネコ科、ブタ、ウシ、ウマ、及びトリ種等から得ることができる。

【 0 1 7 3 】

抗体可変遺伝子セグメント(V H 及びV L セグメントを含む)をコードする核酸を、興味の対象の細胞から回収して増幅した。再配列したV H 及びV L 遺伝子ライプラリの場合では、その所望するD N A は、Orlandi等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)に記載されているように、リンパ球からのゲノムD N A 又はm R N A を単離し、再配列したV H 及びV L 遺伝子の5'及び3'末端と一致するプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応(P C R)を行うことによって得ることが可能であり、よって発現のための多様なV 遺伝子レパートリーを作製することができる。このV 遺伝子は、Orlandi等, (1989)及びWard等, Nature, 341: 544-546(1989)に記載のように、成熟V ドメインをコードするエクソンの5'末端のバックプライマーとJ セグメントに基づいた前方向プライマーにより、c D N A 及びゲノムD N A から増幅することが可能である。しかしながら、c D N A からの増幅のためには、バックプライマーは、また、Jones等, Biotechnol., 9:88-89(1991)に記載のようにリーダーエクソンに、前方向プライマーは、Sastry等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:5728-5732(1989)に記載のように定常領域内に基づくことが可能である。相補性を最大にするために、Orlandi等(1989)又はSastry等(1989)に記載のように、縮重をプライマーへ取り込むことが可能である。ある実施態様では、例えば、Marks等, J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991)の方法に記載のように、又はOrum等, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498(1993)の方法に記載のように、免疫細胞の核酸試料に存在するすべての入手可能なV H 及びV L 配列を増幅するために、各V 遺伝子ファミリーを標的にしたP C R プライマーを用いて、そのライプラリの多様性を最大にする。発現ベクターへの増幅D N A のクローニングに関しては、希な制限部位を、Orlandi等(1989)に記載のように、又はClackson等, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにタグ付加したプライマーによるさらなるP C R 増幅によって、P C R プライマー内の1つの末端へタグとして導入することができる。

【 0 1 7 4 】

合成的に再配列したV 遺伝子のレパートリーは、V 遺伝子セグメントからインビオで誘導することができる。殆どのヒトV H 遺伝子セグメントはクローニング及び配列決定(Tomlinson等, J. Mol. Biol. 227: 776-798(1992)に報告されている)、そしてマッピングがされている(Matsudaら, Nature Genet., 3: 88-94(1993))；これらクローニングされたセ

10

20

30

40

50

メント(H 1 及び H 2 ループのすべての主要なコンホメーションを含む)は、Hoogenboom 及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、多様な配列と長さの H 3 ループをコードする P C R プライマーによる多様な V H 遺伝子レパートリーを作製するのに用いられる。V H レパートリーは、また、Barbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461(1992)に記載されているように、単一の長さの長い H 3 ループに焦点を合わせたすべての配列多様性をともなって作製することができる。ヒト V 及び V セグメントはクローニング及び配列決定がなされ(Williams及びWinter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461(1993))、合成軽鎖レパートリーを作製するのに利用することができる。V H 及び V L フォールドの範囲及び L 3 及び H 3 の長さに基づく合成的 V 遺伝子レパートリーは、相當に構造的多様性を有する抗体をコードする。D N A をコードする V 遺伝子の増幅に統いて、生殖系の V 遺伝子セグメントは、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)の方法に従ってインビトロで再配列することができる。10

#### 【 0 1 7 5 】

抗体断片のレパートリーは、幾つかの方法で V H 及び V L 遺伝子レパートリーを共に組み合わせることによって構築することができる。各レパートリーを異なるベクターで作製し、そのベクターを、例えばHogrefe等, Gene, 128: 119-126(1993)に記載のようにインビトロで、又はコンビナトリアル・インフェクション、例えばWaterhouse等, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266(1993)に記載の loxP 系によってインビオで作製することができる。このインビオの組み換え手法では、大腸菌の形質転換効率によって強いられるライブラリの大きさの限界を克服するために、二本鎖種の F a b フラグメントが利用される。ナイーブの V H 及び V L レパートリーは、1 つはファージミドへ、そして他はファージベクターへと個別にクローニングされる。この 2 つのライブラリは、その後、各細胞が異なる組み合わせを有し、そのライブラリの大きさが、存在する細胞の数(約  $10^{12}$  クローン)によってのみ限定されるように、ファージミド含有細菌のファージ感染によって組み合わせられる。双方のベクターは、V H 及び V L 遺伝子が单一のレプリコンへ組み換えられ、ファージビリオンへ共にパッケージされるように、インビオの組み換えシグナルを有する。これら巨大なライブラリは、良好な親和性(約  $10^{-8}$  M の  $K_d^{-1}$ )の多くの多様な抗体を提供する。20

別法として、このレパートリーは、例えばBarbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982(1991)に記載のように同じベクターへ連続してクローニング、又は、Clakson 等, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のように P C R 後に、クローニングすることでアセンブリすることができる。P C R アセンブリは、また、柔軟なペプチドスペーサーをコードしている D N A と V H 及び V L D N A を連結させて、単鎖の F v (s c F v) レパートリーを形成することに利用することができる。さらに他の技術では、「細胞内での P C R アセンブリ」は、Embleton等, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837(1992)に記載のように、P C R によってリンパ球内の V H 及び V L 遺伝子を組み合わせて、その後、連結した遺伝子のレパートリーをクローニングするのに利用される。30

#### 【 0 1 7 6 】

ナイーブのライブラリ(天然又は合成のいずれか)によって産生された抗体は中度の親和性(約  $10^6$  ~  $10^7$  M $^{-1}$  の  $K_d^{-1}$ )である可能性があるが、Winterら(1994)，上掲に記載のように第二番目のライブラリから構築して遊離することによって、親和性成熟をもインビトロで模倣することが可能である。例えば、Hawkins等, J. Mol. Biol. 226: 889-896(1992)の方法、又はGram等, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580(1992)の方法においてエラー・プローンポリメラーゼ(Leung等, Technique, 1:11-15(1989)で報告されている)を利用することによって、突然変異をインビトロでランダムに導入することができる。さらには、1 つ又はそれより多い C D R をランダムに変異させることによって、例えば、選択した個々の F v クローンにおいて、対象の C D R まで及ぶランダム配列を有するプライマーによる P C R を利用して、そしてより高い親和性クローンをスクリーニングすることで親和性成熟をおこなうことが可能である。国際公開第 9 6 0 7 7 5 4 号(1996 年 3 月 14 日に公開)は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域へ突然変異生成を誘4050

導して軽鎖遺伝子のライブラリを作製する方法を記載している。その他の有効な手法は、Marks等, *Biotechnol.* 10: 779-783(1992)に記載のように、非免疫化供与体から得られた天然で発生するVドメイン変異体のレパートリーによるファージディスプレイによって選択されたVH又はVLドメインを組み換えること、及び数回のチェーン・シャッフリングにおいてより高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術は、10<sup>-9</sup> Mの範囲の親和性の抗体及び抗体断片の產生を可能にする。

ライブラリのスクリーニングは当分野で公知の様々な技術によって達成されうる。例えば、STEAP-1は、吸収プレートのウェルをコーティングするために利用すること、吸収プレートへ付着させた宿主細胞上で発現させるか又はセルソーティングで利用すること、又はストレプトアビシンでコーティングしたビーズによる捕獲のためにビオチンとコンジュゲートすること、又はファージディスプレイライブラリをパニングするためのあらゆる他の方法において利用することが可能である。

#### 【0177】

吸着剤との少なくともファージ粒子の一部分の結合に適した条件下で、ファージライブラリの試料を固定化STEAP-1と接触させる。通常は、pH、イオン強度、温度等を含む条件を選択して、生理学的条件を模倣する。固相と結合したファージを洗浄し、その後、例えばBarbas等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982(1991)に記載されているように酸で、又は例えばMarks等, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597(1991)に記載されているようにアルカリで、又は例えばClackson等, *Nature*, 352: 624-628(1991)の抗原競合法に類似の手法であるSTEAP-1抗原競合によって溶出する。ファージは、1回目の選択で20~1000倍に濃縮することが可能である。さらには、この濃縮したファージを細菌培養液で生育させ、さらなる回の選択に供することが可能である。

選択の効率は多くの要因に依存し、それには、洗浄の間の解離の動力学、そして単一のファージ上の複数の抗体断片が同時に抗原と関われるかどうかということが含まれる。一次解離定数(及び弱い結合親和性)を有する抗体は、短い洗浄、多価ファージディスプレイ及び固相の抗原の高いコーティング密度の利用によって保持することが可能である。高い密度は、多価相互作用を介してファージを安定化するだけでなく、解離したファージの再結合に有利に作用する。遅い解離動力学(及び良好な結合親和性)を有する抗体の選択は、Bass等, *Proteins*, 8: 309-314(1990)及び国際公開第92/09690号に記載されているような長い洗浄と単価ファージディスプレイの利用、そしてMarks等, *Biotechnol.*, 10: 779-783(1992)に記載されているような抗原の低度のコーティング密度によって促進することが可能である。

#### 【0178】

親和性に僅かな違いがあったとしても、STEAP-1に対する異なる親和性のファージ抗体の中で選択することは可能である。しかしながら、選択した抗体のランダム変異(例えば、幾つかの親和性成熟の技術で行われているような)は、多くの変異を生じやすく、その殆どが抗原と結合し、僅かがより高い親和性である。STEAP-1を限定すると、希な高い親和性のファージが競合して除かれることが可能である。すべてのより高い親和性の変異を保持するために、ファージは、過度のビオチン化STEAP-1とインキュベートすることが可能であるが、STEAP-1に対する標的モル濃度親和定数よりも低いモル濃度のビオチン化STEAP-1とインキュベートできる。次いで、高親和性結合ファージをストレプトアビシンでコーティングした常磁性体ビーズによって捕獲することが可能である。そのような「平衡捕獲」は、結合の親和性に従い、親和性の低い過度のファージから、僅かに2倍高い親和性の変異体クローンの単離を可能にする感度で抗体を選択することを可能にする。固相と結合したファージを洗浄するのに用いる条件を操作して、解離定数を基礎として識別することも可能である。

抗STEAP-1クローンは活性を元に選択されうる。ある実施態様では、本発明は、STEAP-1を天然に発現する生細胞に結合する抗STEAP-1抗体を提供する。一実施態様では、本発明は、STEAP-1リガンドとSTEAP-1との結合をブロックするが、STEAP-1リガンドと第二タンパク質との結合をブロックしない抗STEAP-1

10

20

30

40

50

P - 1 抗体を提供する。このような抗 S T E A P - 1 抗体に対応する F v クローンは、(1) 上記のようなファージライブリから抗 S T E A P - 1 クローンを単離して、場合によって、好適な宿主細胞で個体集団を成長させることによって、ファージクローンの単離した母集団を増幅する、(2) 望ましいブロック活性及び非ブロック活性のそれについて S T E A P - 1 と第二タンパク質を選択する、(3) 固定された S T E A P - 1 に抗 S T E A P - 1 ファージクローンを吸着する、(4) 過剰量の第二タンパク質を用いて、第二タンパク質の結合決定基と共有するかオーバーラップする S T E A P - 1 - 結合決定基を認識する任意の望ましくないクローンを溶出する、そして、(5) 工程(4)の後に吸着されたまま残ったクローンを溶出する、ことによって選別できる。場合によって、所望のブロック / 非ブロック特性を有するクローンを、本明細書に記載の選別手順を一又は複数回繰り返すことによって、さらに濃縮できる。 10

#### 【 0 1 7 9 】

ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体をコードする D N A 又は本発明のファージディスプレイ F v クローンは、常法を用いて(例えば、ハイブリドーマの対象の領域をコードする重鎖及び軽鎖又はファージ D N A 鑄型を特異的に増幅するように設定したオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ひとたび分離されたならば、 D N A を発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外では抗体タンパク質を産生しない大腸菌細胞、サル C O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣( C H O )細胞、又は骨髄腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードする D N A の細菌での組み換え発現に関する概説論文には、 Skerra 等, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-2 20 62(1993) 及び Pluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188(1992) が含まれる。

本発明の F v クローンをコードする D N A は、重鎖及び / 又は軽鎖定常領域をコードする公知の D N A 配列(例えば好適な D N A 配列は上掲のカバット等から得ることができる)と組み合わせて、完全長ないし一部の重鎖及び / 又は軽鎖をコードするクローンを形成できる。このために、何れかのアイソタイプの定常領域、例えば I g G 、 I g M 、 I g A 、 I g D 及び I g E 定常領域を用いることができることが理解されるであろう。このような定常領域は任意のヒト又は動物種から得ることができる。ある動物(例えばヒト)種の可変ドメイン D N A から得て、次いで「ハイブリッド」である完全長重鎖及び / 又は軽鎖のコード配列を形成するために他の動物種の定常領域 D N A に融合した F v クローンは、本明細書で用いられる「キメラ」及び「ハイブリッド」抗体の定義に含まれる。ある実施態様では、ヒト可変 D N A から得た F v クローンをヒト定常領域 D N A に融合して、完全長ないし一部のヒト重鎖及び / 又は軽鎖のコード配列を形成する。 30

#### 【 0 1 8 0 】

また、本発明のハイブリドーマ由来の抗 S T E A P - 1 抗体をコードする D N A は、例えば、ハイブリドーマクローン由来の相同的マウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を置換すること(例えば Morrison 等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984) の方法)によって修飾することができる。ハイブリドーマ又は F v クローン由来の抗体ないし抗体断片をコードする D N A は、免疫グロブリンコード化配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード化配列の全て又は一部を共有結合させることによってさらに修飾することができる。そのように、「キメラ」又は「ハイブリッド」抗体は、本発明の F v クローン又はハイブリドーマクローン由来の抗体の結合特異性を有するように調製される。 40

#### 【 0 1 8 1 】

##### 3. ベクター、宿主細胞及び組換え方法

本発明の抗体の組み換え生成のために、コードする核酸を単離して、更なるクローニング( D N A の増幅)又は発現のために複製ベクターに挿入する。抗体をコードする D N A は従来の手順で簡単に単離し、配列決定される(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて)。多くのベクターが利用可能である。用いる宿主細胞にある程度依存してベクターを選択する。 50

一般的に、宿主細胞は原核生物又は真核生物(一般的に哺乳動物)由来の細胞である。IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE定常領域を含め、任意のアイソタイプの定常領域がこの目的のために使われてもよく、このような定常領域はヒト又は動物種の何れかから得られることは理解されるであろう。

【0182】

原核生物の宿主細胞を用いた抗体生成

ベクターの構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードしているポリヌクレオチド配列は標準的な組換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列はハイブリドーマ細胞のような抗体産生細胞から単離し配列決定することができる。あるいは、ポリヌクレオチドはヌクレオチド合成機又はPCR法を使用して合成することができる。ひとたび得られると、ポリペプチドをコードしている配列は原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製し、発現することが可能な組換えベクター中に挿入される。当該分野において入手でき知られている多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主として、ベクターに挿入される核酸のサイズとベクターで形質転換される特定の宿主に依存する。各ベクターは、機能(異種性ポリヌクレオチドの増幅又は発現ないしその両方)及び属する特定の宿主細胞への適合性に応じて、様々な成分を含む。一般的に、限定するものではないが、ベクター成分には複製起源、選択マーカー遺伝子、プロモータ、リボゾーム結合部位(RBS)、シグナル配列、異種性核酸挿入及び転写終末配列が含まれる。

10

【0183】

一般には、レブリコン及び宿主細胞と適合性のある種に由来するコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターが、宿主細胞と関連して使用される。そのベクターは、通常、複製開始点並びに形質転換細胞において表現型の選択を提供可能なマーキング配列を有する。例えば、一般的に大腸菌は、大腸菌種由来のプラスミドであるpBR322を用いて形質転換する。pBR322はアンピシリン(Amp)及びテトラサイクリン(Tet)耐性のコード遺伝子を含んでいるため、形質転換細胞を容易に同定することができる。pBR322、その誘導体又は他の微生物プラスミド又はバクテリオファージも外来性タンパク質を発現する微生物によって使用可能なプロモータを含むか、含むように変更される。特定の抗体の発現に使用されるpBR322誘導体の例はCarter等の米国特許第5648237号に詳細に記載されている。

20

また、レブリコン及び宿主微生物と適合性のあるコントロール配列を含んでいるファージベクターを、これらの宿主との関連でトランスフォーミングベクターとして使用することができる。例えば、GEM.TM.-11のようなバクテリオファージを、大腸菌LE392のような感受性の宿主細胞を形質転換するために使用できる組換えベクターを作製する際に利用することができる。

30

【0184】

本発明の発現ベクターは各ポリペプチド成分をコードする2又はそれ以上のプロモータ-シストロン(翻訳単位)対を含みうる。プロモーターはその発現を調節するシストロンの上流(5')に位置している非翻訳配列である。原核生物のプロモーターは典型的には誘導性と構成的との二つのクラスのものがある。誘導性プロモーターは、例えば栄養分の有無又は温度の変化のような、培養条件の変化に応答してその調節下でシストロンの転写レベルを増大させるように誘導するプロモーターである。

40

様々な潜在的宿主細胞によって認識されるプロモータが非常にたくさん公知となっている。選択したプロモーターを、制限酵素消化によって供給源DNAからプロモータを除去し、本発明のベクター内に単離したプロモータを挿入することによって軽鎖又は重鎖をコードするシストロンDNAに作用可能に連結することができる。天然プロモーター配列と多くの異種プロモーターの双方を、標的遺伝子の増幅及び/又は発現を生じさせるために使用することができる。ある実施態様では、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、一般的に発現する標的遺伝子をより多く転写させ、効率をよくするので、異種プロ

50

モーターが有用である。

【0185】

原核生物宿主での使用に好適なプロモーターには、PhoAプロモーター、ガラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン(trp)プロモーター系及びハイブリッドプロモーター、例えば tac 又は trc プロモーターが含まれる。しかし、細菌中で機能性である他のプロモーター(例えば他の既知の細菌又はファージプロモーター)も好適である。そのヌクレオチド配列は発表されており、よって当業者は、任意の必要とされる制限部位を供給するリンカー又はアダプターを使用して標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンにそれらを作用可能に結合させることができる(Siebenlist等 (1980) Cell 20:269)。

本発明の一態様では、組換えベクター内の各シストロンは、膜を貫通して発現されるポリペプチドの転写を誘導する分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列はベクターの成分でありうるか、ベクター中に挿入される標的ポリペプチドDNAの一部でありうる。この発明の目的のために選択されるシグナル配列は宿主細胞によって認識されプロセシングされる(つまりシグナルペプチダーゼにより切断される)ものでなければならない。異種ポリペプチドに天然のシグナル配列を認識せずプロセシングする原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ippあるいは熱安定性エンテロトキシンII(STII)リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpA及びMBPからなる群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。一実施態様では、発現系の双方のシストロンに使用されるシグナル配列はSTIシグナル配列又はその変異体である。

【0186】

他の態様では、本発明による免疫グロブリンは宿主細胞の細胞質内で產生されるので、各シストロン内に分泌シグナル配列の存在は必要でない。この点において、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖は発現され、折り畳まれ、集合して細胞質内に機能的免疫グロブリンを形成する。ジスルフィド結合形成に好適な細胞質条件を示し、発現したタンパク質サブユニットを好適に折り畳み、集合することができる宿主系が存在する(例として大腸菌trxB-系)。Proba及びPluckthun Gene, 159:203 (1995)。

また、本発明の抗体は、発現されるポリペプチド成分の量的な比を変更することにより、分泌されて適切に集合体化(アセンブル)される本発明の抗体の産出を最大化することができる発現系を用いても生成することができる。このような変更は、少なくとも部分的にはポリペプチド成分の翻訳強度を同時に変更することにより行われる。

【0187】

翻訳の強度を変更するための一つの技術は、Simmons等の米国特許第5840523号に開示されている。この方法は、シストロン内の翻訳開始領域(TIR)の変異体を利用する。任意のTIRについて、一連のアミノ酸又は核酸配列の変異体を一定の範囲の翻訳強度を有するように作製することができ、これにより特定の鎖に所望の発現レベルが得られるようにこの因子を調節する便利な手段が提供される。TIR変異体は、アミノ酸配列を変更しうるコドンの変化を起こす常套的な変異原性技術により生成することができる。特定の実施態様では、ヌクレオチド配列における変化はサイレントである。TIRにおける変更は、例えば、シャイン・ダルガノ配列の数又はスペーシングの変更、並びにシグナル配列の変更を含みうる。変異シグナル配列を生成するための一つの方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変更しない(つまり、変化がサイレントである)コード配列の始めに「コドンバンク」を生成することである。これは、各コドンの3番目のヌクレオチド位置を変更することにより達成することができる。さらに、いくつかのアミノ酸、例えばロイシン、セリン、及びアルギニンは、1番目及び2番目の位置を複数有しており、これによって前記バンクの作製が複雑になり得る。変異原性の方法は、Yansura等(1992)METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。

一実施態様では、含有される各シストロンについて一定の範囲のTIR強度を有する一組のベクターを生成する。この限定された組により、各鎖の発現レベル、及び種々のTIR

10

20

30

40

50

R強度の組み合わせにおける所望の抗体産物の産出を比較することができる。TIR強度は、Simmons等による米国特許第5840523号に詳細に記載されているレセプター遺伝子の発現レベルを定量化することにより決定することができる。翻訳強度の比較に基づいて、所望の個々のTIRを選択し、本発明の発現ベクターコンストラクトと組み合わせる。

#### 【0188】

本発明の抗体を発現するのに適した原核生物宿主細胞には、古細菌及び真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物が含まれる。有用な細菌の例には、エシェリキア属(例えば大腸菌)、バシラス属(例えば枯草菌)、エンテロバクター属、シュードモナス種(例えば緑膿菌)、ネズミチフス菌、靈菌(*Serratia marcescans*)、クレブシエラ属、プロテウス属、赤痢菌、根粒菌、ビトレオシラ(*Vitreoscilla*)又はパラコッカス(*Paracoccus*)が含まれる。一実施態様では、グラム陰性菌が使用される。一実施態様では、大腸菌細胞が本発明の宿主として使用される。大腸菌株の例として、遺伝子型W3110 fhuA ( tonA) ptr3 lac Iq lacL8 ompT (nmpc-fepE) degP41 kanR を有する 33D3 株(米国特許第5,639,635号)を含むW3110株 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219頁 ; ATCC寄託番号27, 325)及びその誘導体が含まれる。また、大腸菌294 (ATCC 31,446), 大腸菌B, 大腸菌 1 776 (ATCC 31,537)及び大腸菌RV308(ATCC 31,608) など、他の株及びその誘導体も好適である。この例は限定的なものでなく例示的なものである。定義した遺伝子型を有する上記の何れかの細菌の誘導体の構築方法は当業者に公知であり、例として、Bass等, *Proteins*, 8:309-314 (1990)に記載されている。一般的に、細菌細胞中でのレプリコンの複製能を考慮して適した細菌を選択することが必要である。pB R 322、pB R 325、pA C Y C 177、又はpK N 410のようなよく知られたプラスミドを使用してレプリコンを供給する場合、例えば、大腸菌、セラシア属、又はサルモネラ種を宿主として好適に用いることができる。典型的に、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌しなければならず、望ましくは更なるプロテアーゼインヒビターを細胞培養中に導入することができる。

#### 【0189】

##### 抗体産生

上述した発現ベクターで宿主細胞を形質転換又は形質移入し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように修飾された通常の栄養培地中で培養する。

形質転換とは、DNAを原核生物宿主中に導入し、そのDNAを染色体外要素として、又は染色体組込みによって複製可能にすることを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適した標準的技術を使用してなされる。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は実質的な細胞壁障害を含む細菌細胞のために一般に使用される。形質転換のための他の方法はポリエチレングリコール / DMSOを用いる。さらに別の方法はエレクトロポレーションである。

本発明のポリペプチドを生産するために使用される原核生物細胞は当該分野で知られ、選択された宿主細胞の培養に適した培地中で増殖させられる。好適な培地の例には、ルリア培地(LB)プラス必須栄養分サプリメントが含まれる。ある実施態様では、培地は発現ベクターを含む原核生物細胞の増殖を選択的に可能にするために、発現ベクターの構成に基づいて選択される選択剤をまた含む。例えば、アンピシリンがアンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖用培地に加えられる。

#### 【0190】

炭素、窒素及び無機リン酸源の他に任意の必要なサプリメントを、単独で、又は複合窒素源のような他のサプリメント又は培地との混合物として導入される適切な濃度で含有させられうる。場合によっては、培養培地はグルタチオン、システイン、システミン、チオグリコレート、ジチオエリトリトール及びジチオトレイトールからなる群から選択される一又は複数の還元剤を含みうる。

10

20

30

40

50

原核生物宿主細胞は適切な温度で培養される。ある実施態様では、例えば、大腸菌の増殖に対しては、温度は約20から約39、約25から約37の範囲、又は約30である。培地のpHは、主として宿主生物に応じて、約5から約9の範囲の任意のpHでありうる。ある実施態様では、大腸菌に対しては、pHは好ましくは約6.8から約7.4、又は約7.0である。

#### 【0191】

本発明の発現ベクターに誘導性プロモータが用いられる場合、プロモータの活性に適する条件下でタンパク質発現を誘導する。本発明の一態様では、ポリペプチドの転写制御のためにPhoAプロモータが用いられる。したがって、形質転換した宿主細胞を誘導のためにリン酸限定培地で培養する。ある実施態様では、リン酸限定培地はC.R.A.P培地である(例として、Simmons等, J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147を参照)。様々な他の誘導因子は用いるベクターコンストラクトに応じて当業者に知りうるよう用いてよい。

一実施態様では、発現された本発明のポリペプチドは宿主細胞の細胞膜周辺中に分泌され、そこから回収される。タンパク質の回収は、一般的には浸透圧ショック、超音波処理又は溶解のような手段によって典型的には微生物を破壊することを含む。ひとたび細胞が破壊されると、細胞片又は全細胞を遠心分離又は濾過によって除去することができる。タンパク質は、例えばアフィニティー樹脂クロマトグラフィーによって更に精製することができる。あるいは、タンパク質は培養培地に輸送しそこで分離することができる。細胞を培養物から除去することができ、培養上清は濾過され、生成したタンパク質の更なる精製のために濃縮される。発現されたポリペプチドを更に単離し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)及びウェスタンプロットアッセイ法のような一般的に知られている方法を使用して同定することができる。

#### 【0192】

本発明の一側面では、抗体産生は発酵法によって多量に受け継がれる。組換えタンパク質の生産には様々な大規模流加発酵法を利用することができる。大規模発酵は少なくとも1000リットルの容量、ある実施態様では約1000から10000リットルの容量である。これらの発酵槽は、酸素と栄養分、特にグルコース(好ましい炭素/エネルギー源)を分散させる攪拌翼を使用する。小規模発酵とは一般におよそ100リットル以下の容積で、約1リットルから約100リットルの範囲でありうる発酵槽での発酵を意味する。

発酵法では、タンパク質の発現の誘導は、典型的には、細胞が適切な条件下にて、初期定常期に細胞があるステージで、所望の密度、例えば約180-220のOD<sub>550</sub>まで増殖したところで開始される。当該分野で知られ上述されているように、用いられるベクターコンストラクトに応じて、様々なインデューサーを用いることができる。細胞を誘導前の短い時間の間、増殖させてもよい。細胞は通常約12-50時間の間、誘導されるが、更に長い又は短い誘導時間としてもよい。

#### 【0193】

本発明のポリペプチドの生産収量と品質を改善するために、様々な発酵条件を変更することができる。例えば、分泌される抗体ポリペプチドの正しい組み立てとフォールディングを改善するために、例えばDsbタンパク質(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及び/又はDsbG)又はFkpA(シャペロン活性を持つペプチジルプロピルシス、トランス-イソメラーゼ)のようなシャペロンタンパク質を過剰発現する更なるベクターを用いて宿主原核細胞を同時形質転換させることができる。シャペロンタンパク質は細菌宿主細胞中で生産される異種性タンパク質の適切な折り畳みと溶解性を容易にすることが実証されている。Chen等 (1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou等, 米国特許第6083715号; Georgiou等, 米国特許第6027888号; Bothmann及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie等 (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

発現された異種タンパク質(特にタンパク分解を受けやすいもの)のタンパク質分解を最

10

20

30

40

50

小にするために、タンパク質分解酵素を欠くある種の宿主株を本発明に用いることができる。例えば、原核生物宿主細胞株を改変して、プロテアーゼ I I I 、 O m p T 、 D e g P 、 T s p 、プロテアーゼ I 、プロテアーゼ M i 、プロテアーゼ V 、プロテアーゼ V I 及びその組合せのような既知の細菌プロテアーゼをコードしている遺伝子に遺伝子突然変異を生じさせることができる。幾つかの大腸菌プロテアーゼ欠損株が利用でき、例えば、上掲のJoly等 (1998) ; Georgiou等、米国特許第 5 2 6 4 3 6 5 号 ; Georgiou等、米国特許第 5 5 0 8 1 9 2 号 ; Hara等 (1996) Microbial Drug Resistance 2:63-72に記載されている。

ある実施態様では、タンパク質溶解性酵素を欠損した、一以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換した大腸菌株を本発明の発現系の宿主細胞として用いる。

#### 【 0 1 9 4 】

##### 抗体精製

一実施態様では、本明細書中で產生した抗体タンパク質は、更なるアッセイや使用のために実質的に均一である調製物を得るためにさらに精製される。当分野で公知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の方法は好適な精製手順の例である：免疫親和性又はイオン交換カラムによる分画化、エタノール沈降法、逆相 H P L C 、シリカ又は D E A E などの陽性交換樹脂によるクロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、 S D S - P A G E 、硫酸アンモニウム沈降法及び、例えば Sephadex G-75 を用いたゲル滌過法。

一態様では、 固形層に固定したプロテイン A を本発明の抗体産物の免疫親和性精製法に用いる。プロテイン A は抗体の F c 領域に高い親和性で結合する黄色ブドウ球菌から単離した 4 1 k D の細胞壁タンパク質である。Lindmark等 (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。プロテイン A を固定した固形層は、ガラス又はシリカ表面、又は孔を調節したガラスカラム又はケイ酸カラムを含むカラムでありうる。ある方法では、カラムは非特異的な混入物の接着を防ぐ可能性があるグリセロールなどの試薬でコートされている。

精製の初めの工程では、上記に記載のように細胞培養物からの調製物をプロテイン A 固定固形層に適応し、プロテイン A に対象とする抗体を特異的に結合させる。ついで、固形層を洗浄して、固形層に非特異的に結合した混入物を除去してもよい。最後に、対象とする抗体を溶出により固形層から除去する。

#### 【 0 1 9 5 】

##### 真核生物の宿主細胞を用いた抗体の生成

一般的に、真核生物宿主細胞で用いるためのベクターは、以下の非限定的な成分の一以上を含む：シグナル配列、複製起点、一以上のマーカー遺伝子、エンハンサー因子、プロモータ及び転写終末因子。

#### 【 0 1 9 6 】

##### シグナル配列成分

真核生物の宿主細胞に用いるベクターは、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいは対象とするポリペプチドの N 末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドを含んでもよい。選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものであってもよい。哺乳動物細胞での発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペス g D シグナルが利用できる。このような前駆体領域の D N A は、多価抗体をコードする D N A に読み取り枠を一致させて結合される。

#### 【 0 1 9 7 】

##### 複製開始点

一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である。例えば、 S V 4 0 開始点は典型的にはただ初期プロモーターを有しているために用いられる。

#### 【 0 1 9 8 】

##### 選択遺伝子成分

10

20

30

40

50

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)必要があれば栄養要求性欠陥を補い、又は(c)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

選択方法の一例では、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

## 【0199】

10

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、抗体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することを可能にするもの、例えばD H F R、チミジンキナーゼ、メタロチオネインI及びII、好ましくは、靈長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。

例えば、D H F R選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、D H F Rの競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(M t x)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型D H F Rを用いた場合の好適な宿主細胞は、D H F R活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣(C H O)株化細胞である(例として、ATCC CRL-9096)。

あるいは、抗体をコードするD N A配列、野生型D H F Rタンパク質、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(A P H)のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性D H F Rを含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはG 4 1 8のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第4 9 6 5 1 9 9号を参照のこと。

## 【0200】

20

## プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは通常は宿主生物体によって認識され対象のポリペプチド(例えば抗体)をコードする核酸に作用可能に結合しているプロモーターを含む。真核生物のプロモーター配列が知られている。例えば、実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ25ないし30塩基上流に見出されるA Tリッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から70ないし80塩基上流に見出される他の配列は、Nが任意のヌクレオチドであるC N C A A T領域である。大部分の真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端へのポリA尾部の付加に対するシグナルであるA A T A A配列がある。ある実施態様では、これらの配列のいずれか又は全ては真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

## 【0201】

30

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス40(S V 4 0)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

S V 4 0ウイルスの初期及び後期プロモーターは、S V 4 0ウイルスの複製起点を更に含むS V 4 0制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、H i n d I I I E制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウイルスを用いて哺乳動物宿主中でD N Aを発現させる系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の変形例は米国特許第4601978号に開示されている。また、単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒ

40

50

ト - インターフェロン c DNA の発現を記載している、Reyes等、Nature 297:598-601 (1982)を参照。あるいは、ラウス肉腫ウイルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【 0 2 0 2 】

エンハンサー要素成分

より高等の真核生物によるこの発明の抗体をコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強される。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスター、アルブミン、

- フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側の SV 40 エンハンサー(100 - 270 塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーター-エンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。また、真核生物プロモーターの活性化のためのエンハンサー要素を記載している、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)も参照のこと。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列の 5' 又は 3' 位でベクター中にスプライシングされうるが、一般にはプロモーターから 5' 位に位置している。

【 0 2 0 3 】

転写終末成分

また、真核生物宿主細胞に用いられる発現ベクターは、典型的には、転写の終結及び mRNA の安定化に必要な配列を含みうる。このような配列は、真核生物又はウイルスの DNA 又は c DNA の 5'、時には 3' の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗体をコードしている mRNA の非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第 94 / 11026 号とそこに開示された発現ベクターを参照のこと。

【 0 2 0 4 】

宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、脊椎動物の宿主細胞を含む本明細書中に記載の高等真核生物細胞を含む。培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV 40 によって形質転換されたサル腎臓 CV 1 株 (COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株(293 又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された 293 細胞、Graham 等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); ハムスター乳児腎細胞 (BHK, ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞 (TM 4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); サルの腎細胞 (CV 1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザルの腎細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト子宮頸癌細胞 (HELA, ATCC CCL 2); イヌ腎細胞 (MDCK, ATCC CCL 34); バッファローラット肝細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞 (WI 38, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065); マウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 細胞 (Mather 等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); MRC 5 細胞; FS 4 細胞; 及びヒト肝癌株 (Hep G2) である。

宿主細胞は、抗体生産のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。

【 0 2 0 5 】

宿主細胞の培養

本発明の抗体を产生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)の F 10 (シグマ)、最小必須培地((ME

10

20

30

40

50

M), (シグマ)、RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DME M), シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4767704号; 同4657866号; 同4927762号; 同4560655号; 又は同5122469号; 国際公開第90/03430号; 国際公開第87/00195号; 又は米国再発行特許第30985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCIN<sup>TM</sup>薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

#### 【0206】

##### 抗体の精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内で生成され、又は培地内に直接分泌される。抗体が細胞内に生成された場合、第1の工程として、宿主細胞が溶解された断片の何れにしても、粒子状の細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去されうる。抗体が培地に分泌された場合は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はPelliconの限外濾過装置を用いて濃縮してもよい。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めて、タンパク質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティーコロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティクロマトグラフィーが従来の技術である。アフィニティーリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト1、2、又は4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト3に推奨されている(Guss等, EMBO J. 5: 1657-1575 (1986))。アフィニティーリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであってもよく、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC<sub>H</sub>3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX<sup>TM</sup>樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上でのSEPHAROSE<sup>TM</sup>クロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

予備的精製工程に続いて、目的の抗体及び混入物を含む混合液を、例えばpH約2.5-4.5、好ましくは低塩濃度(例として、約0.0.25M塩)の溶出緩衝液を用いた低pH疎水性作用クロマトグラフィによってさらに精製してもよい。

一般に、研究、試験及び臨床において使用するための抗体を調製するために、上記の方法と一致しており、及び/又は当業者が対象の特定の抗体にふさわしいと思われる、様々な方法が当分野で確立されている。

#### 【0207】

##### イムノコンジュゲート

また、本発明は、化学療法剤、薬剤、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コン

10

20

30

40

50

ジュゲート)などの一又は複数の細胞毒性剤にコンジュゲートした本発明の何れかの抗 S T E A P - 1 抗体を含む、イムノコンジュゲート(「抗体 - 薬剤コンジュゲート」又は「A D C」と交換可能に称される)を提供する。

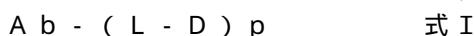
ある実施態様では、イムノコンジュゲートは抗 S T E A P - 1 抗体と化学療法剤又は他の毒素とを含む。イムノコンジュゲートの生成に有用な化学治療薬を本明細書中(例えば、上記)に記載した。酵素活性毒素及びその断片も用いられてもよく、本明細書中に記載する。

ある実施態様では、イムノコンジュゲートは抗 S T E A P - 1 抗体と一又は複数の小分子毒素、限定するものではないが、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセン(trichothene)及び C C 1 0 6 5、及び毒性活性を有するこれら薬剤の誘導体などの小分子薬剤とを含む。このようなイムノコンジュゲートの例は以降にさらに詳細に検討される。

【 0 2 0 8 】

1 - 抗体薬剤コンジュゲート

本発明のイムノコンジュゲート(又は「抗体 - 薬剤コンジュゲート」(「A D C」))は、以下の式 I のものであり、任意のリンカー(L)を介して、一又は複数の薬剤部分(D)に抗 S T E A P - 1 抗体がコンジュゲート(すなわち共有結合)しているものである。



したがって、抗 S T E A P - 1 抗体は直接又はリンカーを介して薬剤にコンジュゲートしうる。式 I では、p は抗体当たりの薬剤部分の平均数であり、例えば 1 抗体当たりおよそ 1 ~ およそ 2 0 の薬剤部分、ある実施態様では、抗体当たり 1 ~ およそ 8 の薬剤部分の範囲でありうる。

【 0 2 0 9 】

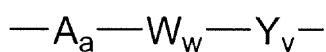
例示的なリンカー

例示的なリンカーと薬剤成分を本明細書中において開示する。リンカーは、一又は複数のリンカー成分を含みうる。例示的なリンカー成分には、6-マレイミドカブロイル(「M C」)、マレイミドプロパノイル(「M P」)、バリン-シトルリン(「val-cit」又は「v c」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「P A B」)、N-スクシンイミジル 4 (2-ピリジルチオ)ペントノエート(「S P P」)、N-スクシンイミジル 4 -(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「S M C C」)、N-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「S I A B」)、及び一又は複数の反復単位(「E O」又は「P E O」)としてのエチレンオキシ-C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> O-が含まれる。様々なリンカー成分が当分野で公知であり、そのいくつかを以下に記載する。

リンカーは、細胞内での薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」でもよい。例えば、酸に弱いリンカー(例えばヒドラゾン)、プロテアーゼ感受性(例えばペプチダーゼ感受性)リンカー、感光性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー(Chari 等, Cancer Research 52:127-131[1992]; 米国特許第 5 2 0 8 0 2 0 号)を使用してもよい。

【 0 2 1 0 】

一実施態様では、A D C のリンカー L は以下の式を有する。



このとき、

- A - は、抗体(A b)のシステインチオールに共有結合にて付着したストレッチャーユニットであり、

10

20

30

40

50

a は 0 又は 1 であり、

各々の - W - は、独立したアミノ酸ユニットであり、

w はそれぞれ、0 から 12 の整数であり、

- Y - は、薬剤成分に共有結合にて付着したスペーサーユニットであり、そして、y は 0 、1 又は 2 である。

### 【0211】

#### ストレッチャーユニット

ストレッチャーユニット(- A -)は、存在する場合には、抗体ユニットをアミノ酸ユニット(- W -)に連結することができる。この点に関しては、抗体(A b)は、ストレッチャーユニットの求電子性の官能基と結合することができる遊離システインチオール基を有する。天然ないし化学的操作のいずれにかによって抗体に存在することができる有用な官能基には、スルフヒドリル(- SH)、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシ、炭水化物のアノマー水酸基及びカルボキシルが含まれるがこれらに限定されるものではない。一態様では、抗体官能基はスルフヒドリル又はアミノである。スルフヒドリル基は、抗体の分子内ジスルフィド結合の還元によって生成される。あるいは、2-イミノチオラン(トラウトの試薬)又は他のスルフヒドリル生成試薬を用いて、抗体のリジン成分のアミノ基を反応させることによって、スルフヒドリル基を生成することができる。一実施態様では、抗体(A b)は、ストレッチャーユニットの求電子性の官能基と結合することができる遊離したシステインチオール基を有する。式 I のコンジュゲートの例示的なストレッチャーユニットは、式 I I 及び式 I I I で示すものであり、このとき A b、- W -、- Y -、- D、w 及び y は前記に定義した通りであり、R<sup>1</sup>~<sup>7</sup> は、(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>、C<sub>3</sub>~C<sub>8</sub> カルボシクリル、O-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>、アリーレン、(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-アリーレン、-アリーレン-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-、(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>- (C<sub>3</sub>~C<sub>8</sub> カルボシクリル)、(C<sub>3</sub>~C<sub>8</sub> カルボシクリル)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>、C<sub>3</sub>~C<sub>8</sub> ヘテロシクリル、(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(C<sub>3</sub>~C<sub>8</sub> ヘテロシクリル)、-(C<sub>3</sub>~C<sub>8</sub> ヘテロシクリル)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>、及び-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>から選択される二価の基であり、R<sup>b</sup> は H、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub> アルキル、フェニル又はベンジルであり、そして、r はそれぞれ、1 から 10 の範囲の整数である。

### 【0212】

アリーレンには、芳香族環システムから 2 つの水素原子を除去して得られる 6~20 の炭素原子の二価の芳香族炭化水素基が含まれる。代表的なアリーレン基には、ベンゼン、置換されたベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニルなどから得られる基が含まれるが、これらに限定されるものではない。

ヘテロシクリル基には、一又は複数の環原子がヘテロ原子、例えば窒素、酸素及び硫黄である環式システムが含まれる。複素環基は、1~20 の炭素原子と N、O、P 及び S から選択される 1~3 のヘテロ原子を含む。複素環は、3~7 員環を有するモノシクロ(2~6 の炭素原子と N、O、P 及び S から選択される 1~3 のヘテロ原子)又は 7~10 員環を有するビシクロ(4~9 の炭素原子と N、O、P 及び S から選択される 1~3 のヘテロ原子)、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、又は[6,6]システムであってもよい。複素環は、Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)、特に第 1, 3, 4, 6, 7 及び 9 章; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present)、特に 13, 14, 16, 19 及び 28 号; 及び、J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:556 に記載される。

### 【0213】

複素環の例には、例示のためであって限定するものではなく、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(ペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、

10

20

30

40

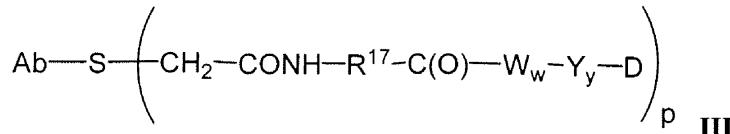
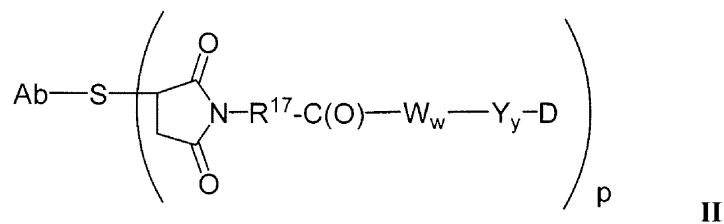
50

硫黄酸化型テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾチニル、トリアジニル、6H-1,2,5-チアジアジニル、2H,6H-1,5,2-ジチアジニル、チエニル、チアンスレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサンテニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-インダゾリル、ブリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、チノリニル、ブテリジニル、4aH-カルバゾリル、カルバゾリル、-カルボリニル、フェナ NSRリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナ NSRロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンズオキサゾリニル、及びイサチノイルが含まれる。  
10

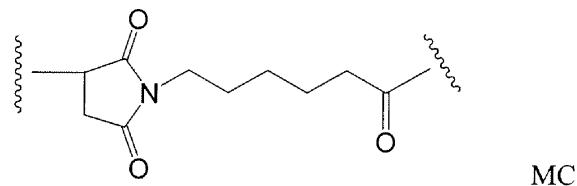
「カルボシクリル基(Carbocyclyl)」には、単環として3~7の炭素原子又は二環として7~12の炭素原子を有する飽和ないしは不飽和の環が含まれる。単環の炭素環は3~6の環状原子、より一般的には5又は6の環状原子を有する。二環式の炭素環は、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]又は[6,6]システムとして配置した7~12の環状原子、又はビシクロ[5,6]又は[6,6]システムとして配置した9又は10の環状原子を有する。単環の炭素環の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロ pentyl、1-シクロ pent-1-エニル、1-シクロ pent-2-エニル、1-シクロ pent-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキス-1-エニル、1-シクロヘキス-2-エニル、1-シクロヘキス-3-エニル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが含まれる。  
20

【0214】

I I からV I などの式 I のADCのすべての例示的な実施態様から、明確に示していない場合であっても、改変したシスティン残基の数に応じて、1から4の薬剤成分が抗体に連結している(p=1~4)ことが理解される。  
30

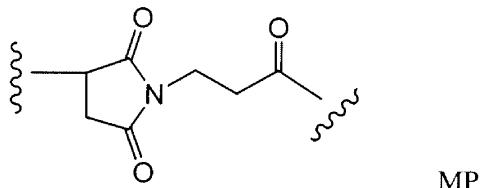


図示する式 I I のストレッチャーユニットは、R<sup>17</sup>が-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-である、マレイミド-カプロイル(MC)から得られる。



図示する式IIのストレッチャーユニットは、 $R^{1-7}$ が $-(CH_2)_2-$ である、マレイ  
ミド-プロパノイル(MP)から得られる。

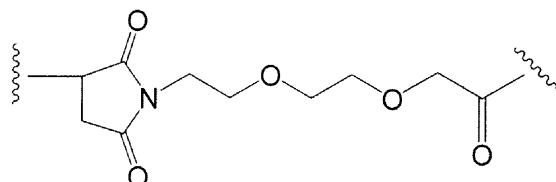
10



【0215】

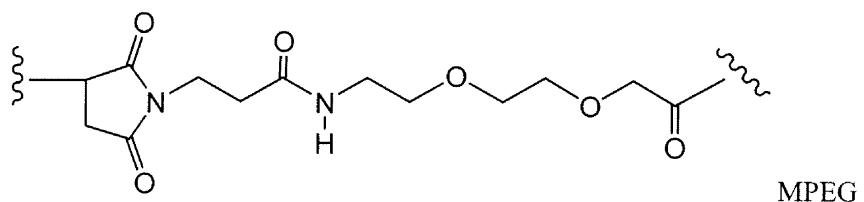
他の図示する式IIのストレッチャーユニットは、 $R^{1-7}$ が $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ であり、 $r$ が2である。

20



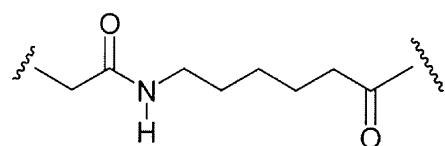
他の図示する式IIのストレッチャーユニットは、 $R^{1-7}$ が $-(CH_2)_rC(O)NR^b$   
 $(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ であり、 $R^b$ がHであり、各々の $r$ が2である。

30



図示する式IIIのストレッチャーユニットは、 $R^{1-7}$ が $-(CH_2)_5-$ である。

40

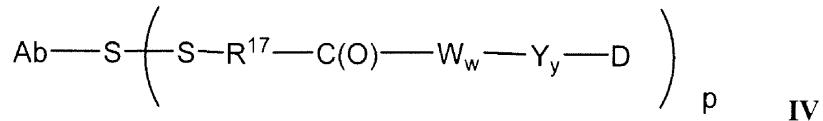


【0216】

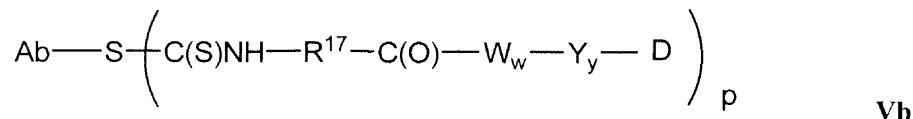
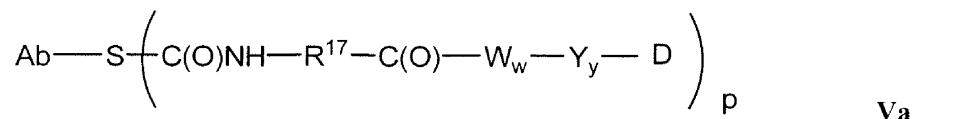
他の実施態様では、ストレッチャーユニットは、抗体の改変されたシステイン硫黄原子  
とストレッチャーユニットの硫黄原子との間のジスルフィド結合により、システイン改変

50

抗抗体に連結する。この実施態様の代表的なストレッチャー単位は、式IVで表され、R<sup>17</sup>、Ab-、-W-、-Y-、-D、w及びyは前記に定義する通りである。



さらに他の実施態様では、ストレッチャーの反応基は、抗体の遊離したシステインチオールと結合することができるチオール反応性の官能基を含む。チオール反応性の官能基の例には、限定するものではないが、マレイミド、-ハロアセチル、活性エステル、例として、スクシンイミドエステル、4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸クロリド、塩化スルホニル、イソシアネート及びイソチオシアネートが含まれる。この実施態様の代表的なストレッチャー単位は、式Va及びVbに表され、このとき、-R<sup>17</sup>-、Ab-、-W-、-Y-、-D、w及びyは前記に定義した通りである。



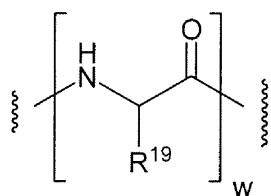
他の実施態様では、リンカーは、分岐した多機能性リンカー成分を介して一より多い薬剤成分を抗体へ共有結合的に付着させるために樹枝状型である(Sun等 (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215 ; Sun等 (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-176 ; King (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990)。樹枝状のリンカーは抗体に対する薬剤のモル比を増やす、すなわち負荷することができ、これはADCの力価に関連がある。したがって、システイン改変抗体は1つの反応性のシステインチオール基のみを有する場合、多くの薬剤成分が樹枝状のリンカーを介して付着されうる。

### 【0217】

#### アミノ酸ユニット

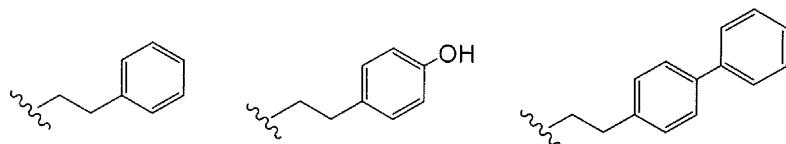
リンカーはアミノ酸残基を含んでいてもよい。アミノ酸ユニット(-Ww-)は、存在する場合には、抗体(Ab)を本発明のシステイン改変抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)の薬剤成分(D)に連結する。

-Ww-は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペニタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチド又はドデカペプチドのユニットである。アミノ酸ユニットを含むアミノ酸残基には、天然に生じるもの、並びにシトルリンなどの微量アミノ酸及び天然に生じないアミノ酸類似体が含まれる。各々の-W-ユニットはそれぞれ、以下の角括弧で示す式を有し、wは、0から12の範囲の整数である。

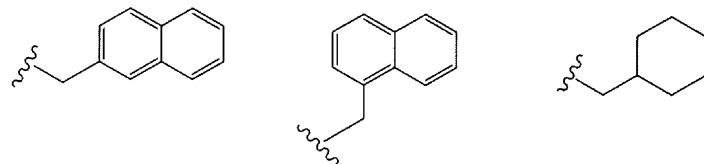


このとき、R<sup>19</sup>は、ヒドロゲン、メチル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、ベンジル、p-ヒドロキシベンジル、-CH<sub>2</sub>OH、-CH(OH)CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>COOH、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>、2-pyridylmethyl-、3-ピリジルメチル-、4-ピリジルメチル-、フェニル、シクロヘキシル、

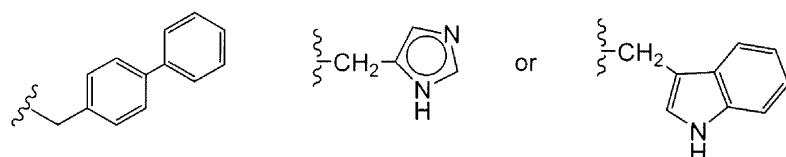
10



20



30



であり、

R<sup>19</sup>が水素以外である場合に、R<sup>19</sup>が付着される炭素原子はキラルである。R<sup>19</sup>が付着される各々の炭素原子は、独立して(S)又は(R)配位又はラセミ混合物にある。したがって、アミノ酸ユニットは、鏡像異性的に純粋であるか、ラセミ性であるか、又はジアステレオ異性であってもよい。

40

#### 【0218】

例示的な-Ww-アミノ酸ユニットには、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペントペプチドが含まれる。例示的なジペプチドには、バリン-シトルリン(vc又はval-cit)、アラニン-フェニルアラニン(af又はala-phe)が含まれる。例示的なトリペプチドには、グリシン-バリン-シトルリン(gly-val-cit)及びグリシン-グリシン-グリシン(gly-gly-gly)が含まれる。アミノ酸リンカーニーを含むアミノ酸残基には、天然に生じるもの、並びにシトルリンなどの微量アミノ酸及び天然に生じないアミノ酸類似体が含まれる。

50

アミノ酸ユニットは、腫瘍関連プロテアーゼを含む一又は複数の酵素によって切断され、薬剤成分(-D)を遊離する。この薬剤成分は、一実施態様では、薬剤(D)を提供するために、放出時にインピボでプロトン化される。アミノ酸リンカー構成成分は、特定の酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD、又はプラスミンプロテアーゼによって酵素的に切断されるために設定し、その選択性が最適化されうる。

## 【0219】

## スペーサーユニット

スペーサーユニット(-Y<sub>y</sub>-)は、存在する場合(y=1又は2)には、アミノ酸ユニットが存在する(w=1~12)場合に、アミノ酸ユニット(-Ww-)を薬剤部分(D)に連結する。あるいは、アミノ酸ユニットがない場合には、スペーサーユニットはストレッチャーユニットを薬剤成分に連結する。アミノ酸ユニット及びストレッチャーユニットがともにない(w,y=0)場合には、スペーサーユニットも薬剤成分を抗体ユニットに連結する。スペーサーユニットは、自己犠牲型及び非自己犠牲型の2つの一般的なタイプである。非自己犠牲的なスペーサーユニットは、抗体-薬剤コンジュゲート又は薬剤成分-リンカーからアミノ酸ユニットが切断、特に酵素的に切断された後に、スペーサーユニットの一部ないしはすべてが薬剤成分に結合したままとなるものである。グリシン-グリシンスペーサーユニット又はグリシンスペーサーユニットを含むADCが腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼ又はリンパ球関連プロテアーゼによって酵素切断される場合、グリシン-グリシン-薬剤成分又はグリシン-薬剤成分がAb-A<sub>a</sub>-Ww-から切断される。一実施態様では、独立した加水分解反応が標的細胞の中で起こり、グリシン-薬剤成分の結合が切断され、薬剤が遊離される。

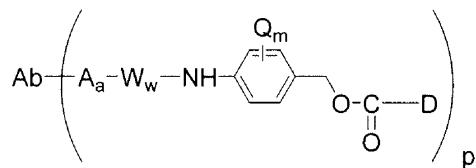
他の実施態様では、-Y<sub>y</sub>-は、フェニレン部分がQ<sub>m</sub>に置換しているp-アミノベンジルカルバモイル(PAB)ユニットであり、このときQは-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、そして、mは0~4の範囲の整数である。

## 【0220】

非自己犠牲型スペーサーユニット(-Y-)の例示的な実施態様は、-Gly-Gly-、-Gly-、-Ala-Phen-、-Val-Cit-である。

一実施態様では、スペーサーユニットがない(y=0)、又は薬学的に許容可能な塩ないしはその溶媒和化合物である、薬剤成分-リンカー又はADCが提供される。

あるいは、自己犠牲的なスペーサーユニットを含むADCは-Dを放出しうる。一実施態様では、-Y-はPABグループのアミノ窒素原子を介して-Ww-に連結されるPABグループであり、カルボナート、カルバメート又はエーテル基を介して-Dに直接連結しており、このときADCは以下のようない例示的な構造を有する。



このとき、Qは、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、mは0~4の範囲の整数であり、そして、pは1から4の範囲である。

## 【0221】

自己犠牲的なスペーサーの他の例には、PABグループに電子的に類似している芳香族

10

20

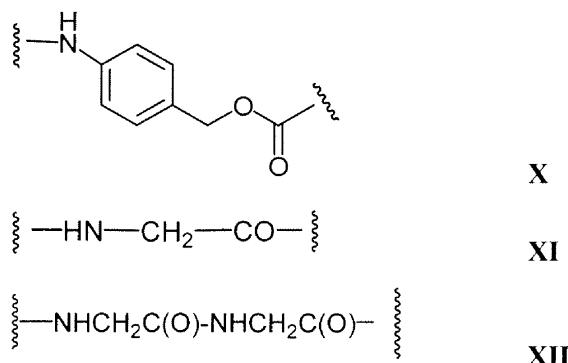
30

40

50

化合物、例として、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体(Hay等 (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237)、複素環式のPAB類似体(米国公開特許2005/0256030)、-グルクロニド(国際公開2007/011968)、及びオルトないしはパラ-アミノベンジルアセタールが含まれるが、これらに限定されるものではない。アミド結合加水分解の際に環化されるスペーサー、例として、置換した、及び、置換していない4-アミノ酪酸アミド(Rodrigues等 (1995) *Chemistry Biology* 2:223)、適切に置換されたビシクロ[2.2.1]、及び、ビシクロ[2.2.2]環システム(Storm等 (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94: 5815)、及び2-アミノフェニルプロピオン酸アミド(Amsberry等 (1990) *J. Org. Chem.* 55:5867)などが使われてもよい。また、グリシンで置換されるアミン含有薬剤の除去(Kingsbury等 (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447)は、ADCに有用な自己犠牲的スペーサーの例である。

例示的なスペーサーユニット(-Yy-)を式X~XIIに示す。

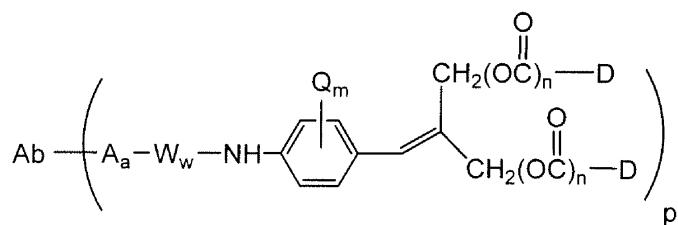


### 【0222】

#### 樹枝状リンカー

他の実施態様では、リンカーLは、分岐状の、多機能リンカー成分により一又は複数の薬剤成分が抗体に共有結合するために樹枝型のリンカーであってもよい(Sun等 (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun等 (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768)。樹枝状のリンカーは抗体に対する薬剤のモル比を増す、すなわち負荷することができ、これはADCの力価に関連がある。したがって、システイン改変抗体は1つの反応性のシステインチオール基のみを有する場合、多くの薬剤成分が樹枝状のリンカーを介して付着されうる。分岐状の、樹枝状リンカーの例示的な実施態様には、2,6-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール及び2,4,6-トリス(ヒドロキシメチル)-フェノールデンドリマーユニット(国際公開2004/01993; Szalai等 (2003) *J. Amer. Chem. Soc.* 125: 15688-15689; Shamis等 (2004) *J. Amer. Chem. Soc.* 126: 1726-1731; Amir等 (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 4494-4499)が含まれる。

一実施態様では、スペーサーユニットは分岐状ビス(ヒドロキシメチル)スチレン(BHMS)であり、これを用いて複数の薬剤を取り込み、放出することができ、以下の構造を有し、



10

20

30

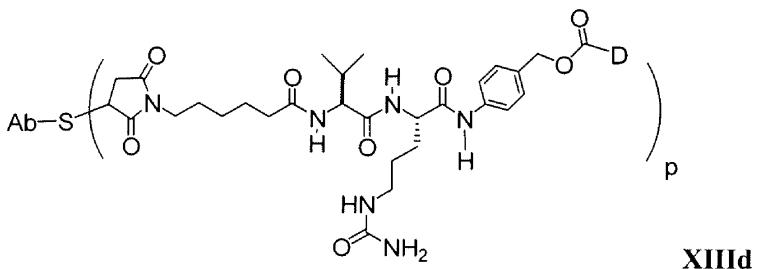
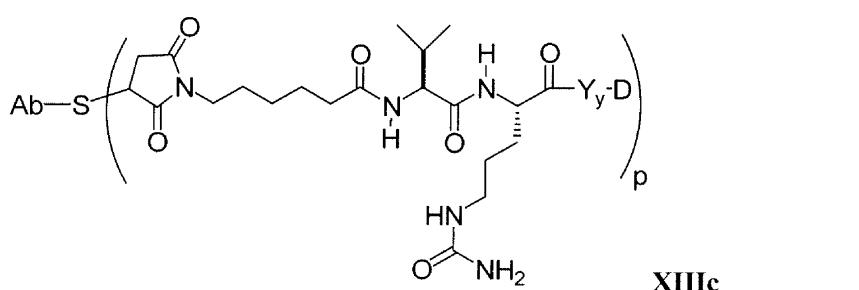
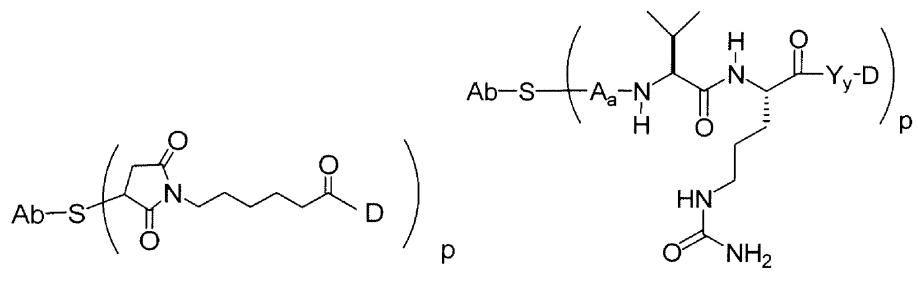
40

50

2-(4-アミノベンジリデン)プロパン 1,3-ジオールデンドリマーコンピュニットを含み(国際公開 2004/043493; de Groot 等 (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 4490-4494)、Q は、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、m は 0 ~ 4 の範囲の整数であり、n は 0 又は 1 であり、そして、p は 1 から 4 の範囲である。

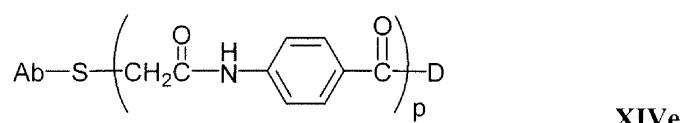
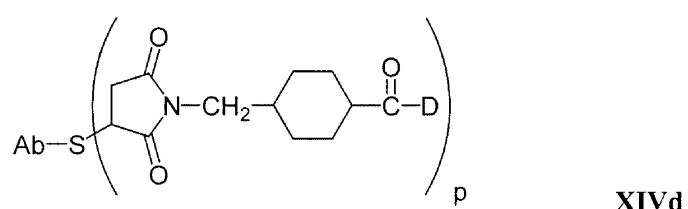
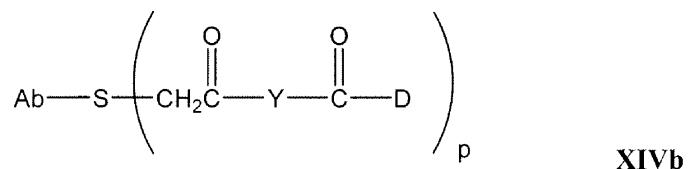
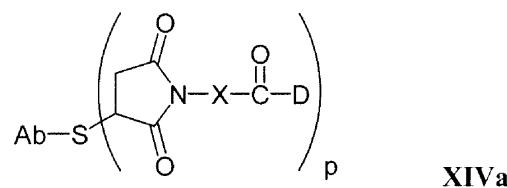
【 0 2 2 3 】

式 I の抗体 - 薬剤コンジュゲート化合物の例示的な実施態様には、X I I I a (M C)、X I I I b (v a l - c i t)、X I I I c (M C - v a l - c i t)、及び X I I I d (M C - v a l - c i t - P A B) が含まれる。

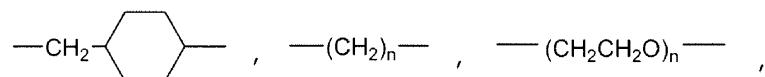


【 0 2 2 4 】

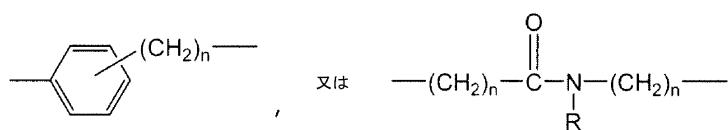
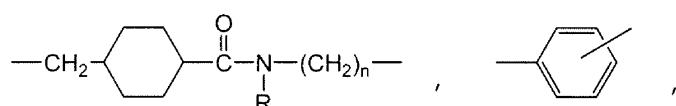
式 I a の抗体 - 薬剤コンジュゲート化合物の他の例示的な実施態様には、XIVa - e が含まれる。



このとき、X は以下のものであり、

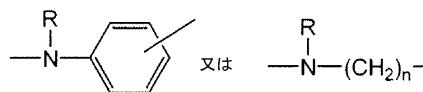


30



40

Y は以下の通りであり、



10

そして、RはそれぞれH又はC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキルであり、そして、nは1~12である。

【0225】

他の実施態様では、リンカーは、抗体に存在する求電子性の基に反応することができる求核基を有する反応性の官能基を有する。抗体上の有用な求電子性の基は、アルデヒド及びケトンカルボニル基が含まれるが、これらに限定されるものではない。リンカーの求核基のヘテロ原子は抗体上の求電子性の基と反応して、抗体ユニットに共有結合することができる。リンカーの有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート及びアリールヒドラジドが含まれるが、これらに限定するものではない。抗体の求電子性の基は、リンカーへの付着に都合の良い部位を提供する。

20

一般的に、ペプチド-タイプのリンカーは、2以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野では周知である液相合成方法(E. Schroder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press)に従って調製されうる。リンカー中間生成物は、スペーサー、ストレッチャー及びアミノ酸ユニットを含む反応のいずれかの組合せ又は連続によってアセンブリされてもよい。スペーサー、ストレッチャー及びアミノ酸ユニットは、天然で求電子性、求核性、又は遊離の基である反応性官能基を用いる。反応性官能基には、カルボキシル、ヒドロキシル、パラ-ニトロフェニルカルボネート、イソチオシアネート、及びO-メシリル、O-トシリル、-C1、-Br、-Iなどの脱離基、又はマレイミドが含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

他の実施態様では、リンカーは、溶解性又は反応性を変更した基に置換されてもよい。例えば、ADCを調製するために用いる合成手段に応じて、スルホン酸(-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)又はアンモニウムなどの荷電性の置換基は、試薬の水溶性を増し、抗体又は薬剤成分とリンカー-試薬とのカップリング反応を容易にしうるか、又はDとAb-L(抗体-リンカー中間生成物)とのカップリング反応、又はAbとD-L(薬剤-リンカー中間生成物)とのカップリング反応を容易にしうる。

【0226】

例示的な薬剤部分

メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している本発明の抗体(完全長又は断片)を含んでなる。メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号; 同4248870号; 同4256746号; 同4260608号; 同4265814号; 同4294757号; 同4307016号; 同4308268号; 同4308269号; 同4309428号; 同4313946号; 同4315929号; 同4317821号; 同4322348号; 同4331598号; 同4361650号; 同4364866号;

40

50

同4424219号；同4450254号；同4362663号；及び同4371533号に開示されている。

メイタンシノイド薬剤成分は、(i) 発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ii) 抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる共役に好適な官能基による誘導体化に従う、(iii) 血漿中で安定、そして(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。

メイタンシノイド薬剤部分としての使用に適切なメイタンシン化合物は当分野で周知であり、公知の方法に従って天然の供給源から単離してもよいし、又は遺伝子工学技術を用いて產生してもよい(Yu等 (2002) PNAS 99:7968-7973を参照)。また、マイタンシノール及びマイタンシノール類似体は、公知の方法に従って合成して調製されてもよい。

メイタンシノイド薬剤部分の例示的な実施態様には、本明細書中において開示した構造を有するDM1；DM3；及びDM4が含まれる。

【0227】

アウリスタチン類及びドラスタチン類

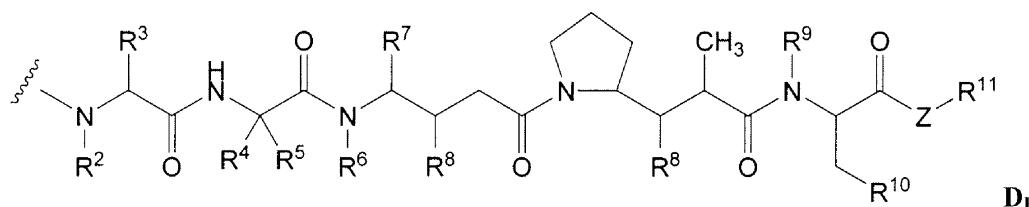
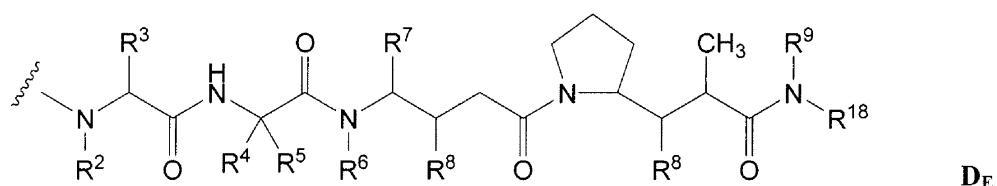
いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチジル類似体ないしは誘導体、例えばアウリスタチン(auristatin) (米国特許第5635483号；同第5780588号)にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。

ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke等 (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗癌活性(米国特許第5663149号)及び抗真菌性活性(Pettit等 (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端により抗体に接着しうる(国際公開第02/088172号)。

例示的なアウリスタチンの実施態様には、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤部分DE及びDFを含み、2004年3月28日に公開されたSenter等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に援用される。

【0228】

ペプチド性薬剤部分は以下の式DE及びDFから選択されうる。



ここで、DE及びDFの波線は、独立して各々の位置で、抗体又は抗体-リンカー成分への共有結合部位を示す。

R<sup>2</sup>は、H及びC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルから選択され、

R<sup>3</sup>は、H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環式化合物、アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環式化合物)、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>ヘテロ環及びC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>ヘテロ環)から選択され、

R<sup>4</sup>は、H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環式化合物、アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環式化合物)、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>ヘテロ環及びC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>ヘテロ環)から選択され、

10

20

30

40

50

$R^5$  は、H 及びメチルから選択され、

又は  $R^4$  及び  $R^5$  は共同で環状炭素を形成し、 $R^a$  及び  $R^b$  がH、 $C_1 - C_8$  アルキル及び $C_3 - C_8$  炭素環式化合物からそれぞれ選択される式 -  $(CR^aR^b)_n$  - を有し、nは2、3、4、5及び6から選択され、

$R^6$  は、H 及び $C_1 - C_8$  アルキルから選択され、

$R^7$  は、H、 $C_1 - C_8$  アルキル、 $C_3 - C_8$  炭素環式化合物、アリール、 $C_1 - C_8$  アルキル-アリール、 $C_1 - C_8$  アルキル-( $C_3 - C_8$  炭素環式化合物)、 $C_3 - C_8$  ヘテロ環及び $C_1 - C_8$  アルキル-( $C_3 - C_8$  ヘテロ環)から選択され、

各々の  $R^8$  は、H、OH、 $C_1 - C_8$  アルキル、 $C_3 - C_8$  炭素環及びO-( $C_1 - C_8$  アルキル)からそれぞれ選択され、

$R^9$  は、H 及び $C_1 - C_8$  アルキルから選択され、

$R^{10}$  は、アリール又は $C_3 - C_8$  ヘテロ環から選択され、

$Z$  はO、S、NH、又は  $R^{12}$  が $C_1 - C_8$  アルキルである  $NR^{12}$  であり、

$R^{11}$  は、H、 $C_1 - C_2$  アルキル、アリール、 $C_3 - C_8$  ヘテロ環、- $(R^{13}O)_m - R^{14}$ 、又は- $(R^{13}O)_m - CH(R^{15})_2$  から選択され、

mは、1~1000の範囲の整数であり、

$R^{13}$  は $C_2 - C_8$  アルキルであり、

$R^{14}$  は、H又は $C_1 - C_8$  アルキルであり、

各々の  $R^{15}$  の発生は、独立してH、 $COOH$ 、- $(CH_2)_n - N(R^{16})_2$ 、- $(CH_2)_n - SO_3H$ 、又は- $(CH_2)_n - SO_3 - C_1 - C_8$  アルキルであり、

各々の  $R^{16}$  の発生は、独立してH、 $C_1 - C_8$  アルキル、又は- $(CH_2)_n - COO$  Hであり、

$R^{18}$  は、- $C(R^8)_2 - C(R^8)_2$  - アリール、- $C(R^8)_2 - C(R^8)_2 (C_3 - C_8$  ヘテロ環)、及び- $C(R^8)_2 - C(R^8)_2 (C_3 - C_8$  炭素環式化合物)から選択され、そして、nは0から6の範囲の整数である。

### 【0229】

一実施態様では、 $R^3$ 、 $R^4$  及び  $R^7$  は、それぞれイソプロピル又はsec-ブチルであり、 $R^5$  は-H又はメチルである。ある例示的な実施態様では、 $R^3$  及び  $R^4$  は各々イソプロピルであり、 $R^5$  は-Hであり、そして  $R^7$  はsec-ブチルである。

さらに他の実施態様では、 $R^2$  及び  $R^6$  はそれぞれメチルであり、 $R^9$  は-Hである。

さらに他の実施態様では、各々の  $R^8$  の発生は- $OCH_3$  である。

例示的な実施態様では、 $R^3$  及び  $R^4$  は各々イソプロピルであり、 $R^2$  及び  $R^6$  はそれぞれメチルであり、 $R^5$  は-Hであり、 $R^7$  はsec-ブチルであり、各々の  $R^8$  の発生は- $OCH_3$  であり、そして  $R^9$  は-Hである。一実施態様では、 $Z$  は-O-又は-NH-である。

一実施態様では、 $R^{10}$  はアリールである。

ある例示的な実施態様では、 $R^{10}$  は-フェニルである。

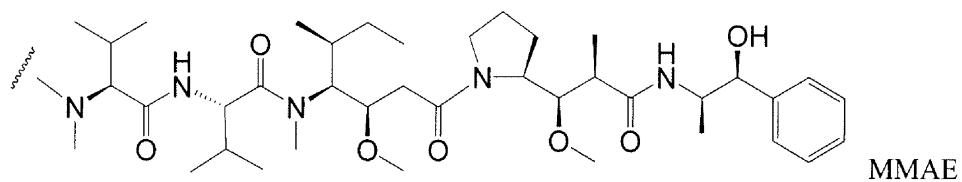
ある例示的な実施態様では、 $Z$  が-O-の場合、R11は-H、メチル又はt-ブチルである。

一実施態様では、 $Z$  が-NHである場合に、 $R^{11}$  は- $CH(R^{15})_2$  である。この  $R^{15}$  は- $(CH_2)_n - N(R^{16})_2$  であり、 $R^{16}$  は- $C_1 - C_8$  アルキル又は- $(CH_2)_n - COOH$  である。

他の実施態様では、 $Z$  が-NHである場合に、 $R^{11}$  は- $CH(R^{15})_2$  である。この  $R^{15}$  は- $(CH_2)_n - SO_3H$  である。

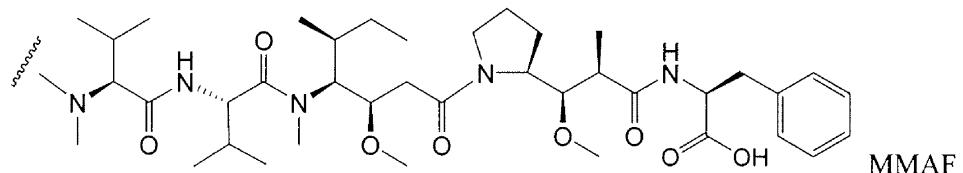
### 【0230】

式D<sub>E</sub>の例示的なアクリル酸の実施態様はMMAEである。ここで、波線は抗体-薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す。



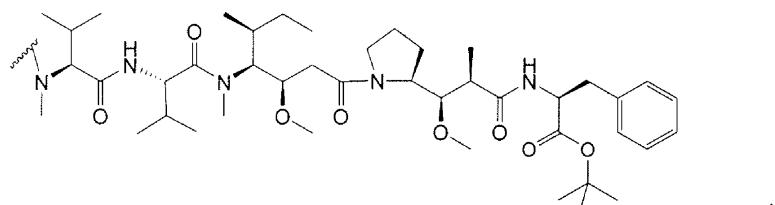
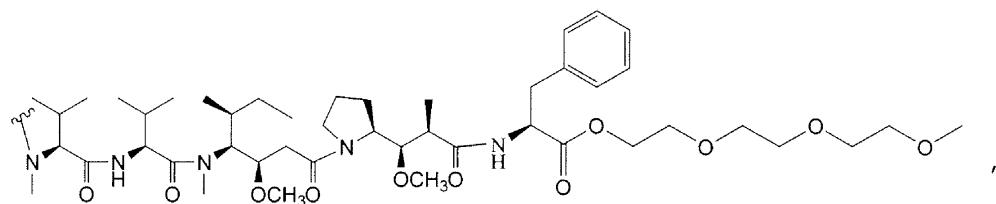
式 D<sub>F</sub> の例示的なアウリストチンの実施態様は MMAF である。ここで、波線は抗体 - 薬剤コンジュゲートのリンカー (L)への共有結合を示す(米国特許公開第 2005/0238649 号及び Doronina 等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124)を参照)。

10

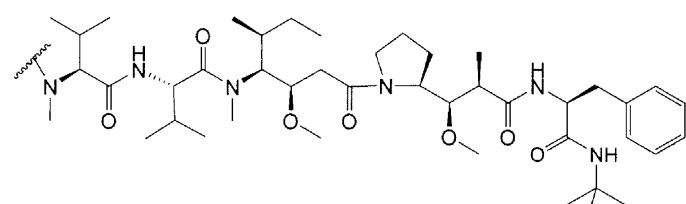


【 0 2 3 1 】

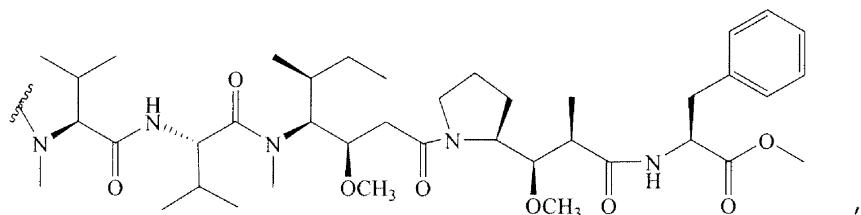
他の薬剤部分には以下の MMAF 誘導体が含まれる。ここで、波線は抗体 - 薬剤コンジュゲートのリンカー (L)への共有結合を示す。



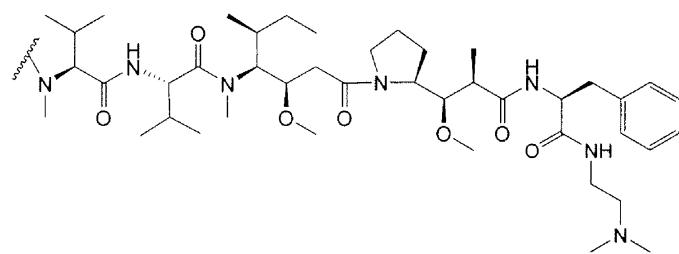
10



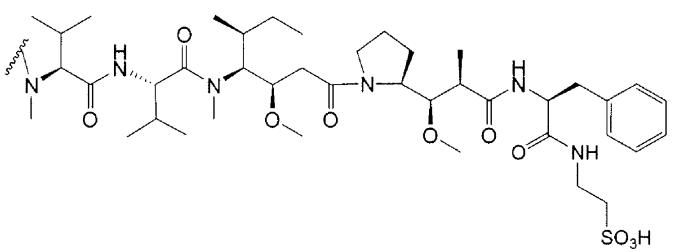
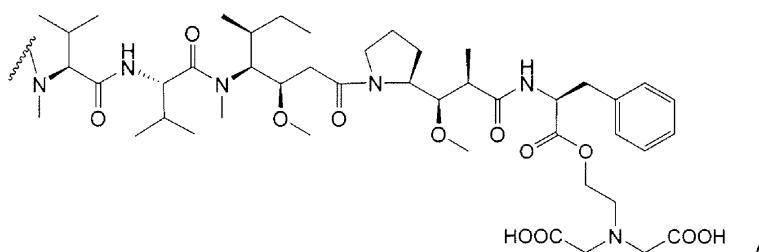
20



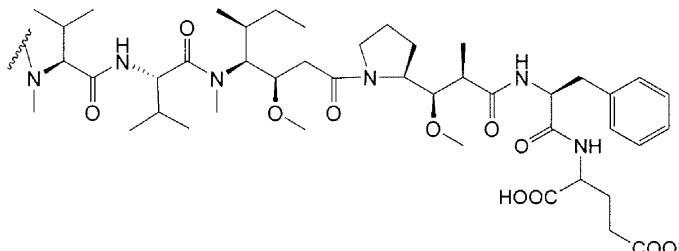
30



10

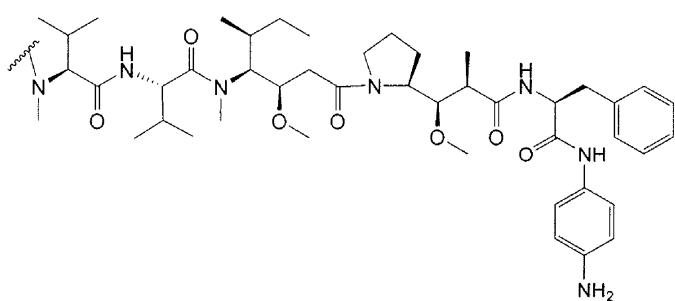


20



30

及び



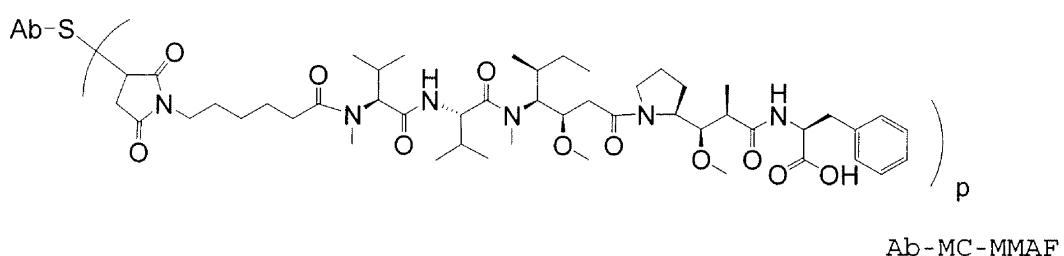
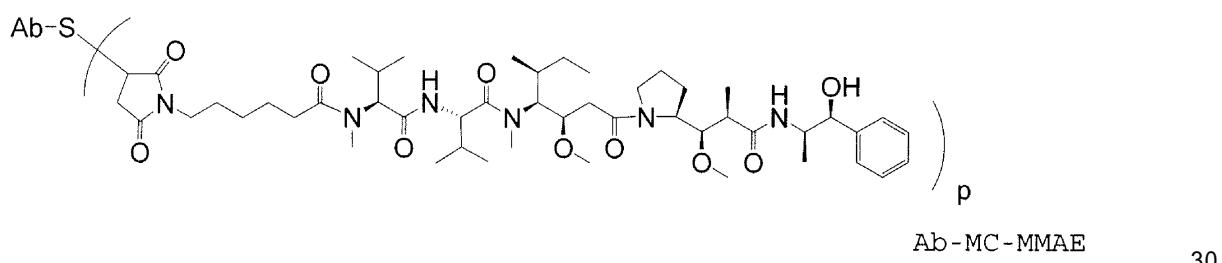
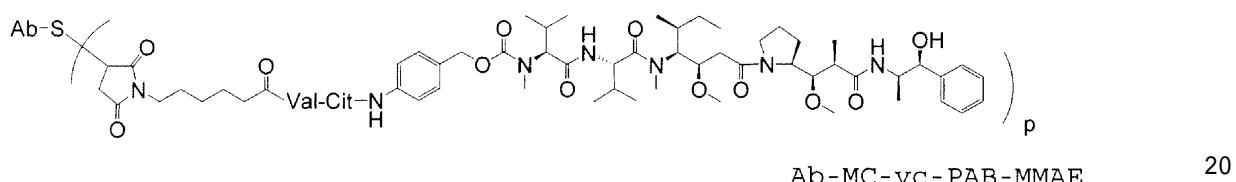
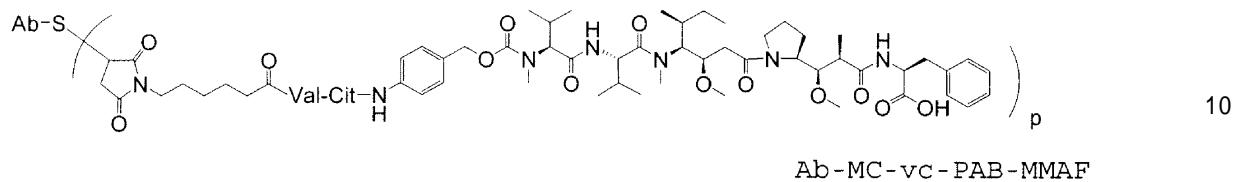
40

## 【0232】

一態様では、限定するものではないが、上記のようなトリエチレングリコールエステル (T E G) を含む親水基は  $R^{1-1}$  で薬剤部分に結合することができる。ある特定の理論に縛られるものではないが、親水基は薬剤部分の内在化及び非凝集に存在する。

アウリストチン / ドラストチン又はその誘導体を含む式IのADCの例示的な実施態様は、米国特許公開第2005-0238649号A1及びDoronina等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124に記載されており、これは出典明記によってここに明確に援用される

MMAE又はMMAFと様々なリンカー成分を含む式IのADCの例示的な実施態様は、以下の構造及び略記号を有する(ここで、「Ab」は抗体であり、pは1～およそ8であり、「Val-Cit」はバリン-シトルリンジペプチドであり、そして「S」は硫黄原子である。



### 【0233】

さらに、MMAFと様々なリンカー成分を含む式IのADCの例示的な実施態様には、Ab-MC-PAB-MMAF及びAb-PAB-MMAFが含まれる。興味深いことに、タンパク質分解性の切断を受けないリンカーによって抗体に結合しているMMAFを含むイムノコンジュゲートは、タンパク質分解で切断可能なリンカーによって抗体に結合しているMMAFを含むイムノコンジュゲートに比べて活性を有することが示されている。Dornina等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124を参照。このような場合、薬剤放出は細胞内の抗体分解に影響を受けると思われる。同上。

一般的に、ペプチドベースの薬剤部分は、2以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press 50

を参照)。アウリスタチン / ドラスタチン薬剤部分は、米国特許公開第2005-0238649号A1 ; 米国特許公開第5635483号 ; 米国特許第5780588号 ; Pettit 等 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465 ; Pettit 等 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277 ; Pettit, G.R., 等 Synthesis, 1996, 719-725 ; 及びPettit 等 (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863 ; 及びDoronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7): 778-784の方法に従つて調製されうる。

特に、式 D<sub>F</sub> のアウリスタチン / ドラスタチン薬剤部分、例えばMMAF 及びその誘導体は、米国特許公開第2005-0238649号A1 及びDoronina等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124に記載の方法を用いて調製されうる。式 D<sub>E</sub> のアウリスタチン / ドラスタチン薬剤部分、例えばMMAE 及びその誘導体は、Doronina等 (2003) Nat. Biotech. 21:778-784に記載の方法を用いて調製されうる。薬剤 - リンカー部分であるMC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF、及びMC-vc-PAB-MMAE は、例えばDoronina等 (2003) Nat. Biotech. 21:778-784、及び米国特許公開第2005 / 0238649号A1 に記載のような常套的な方法によって都合よく合成され、その後対象の抗体にコンジュゲートされてもよい。

#### 【0234】

##### 薬剤ローディング(Drug Loading)

薬剤ローディングは、式Iの分子において、抗体当たりの薬剤部分の平均数であり、p によって表される。薬剤ローディングは抗体当たり 1 ~ 20 の薬剤部分(D)の範囲であつてもよい。式IのADCには、1 から 20 の薬剤部分の範囲でコンジュゲートされる抗体の集まりが含まれる。コンジュゲート反応からのADCの調製において抗体当たりの薬剤部分の平均数は、質量分析、ELISA アッセイ及びHPLC などの従来の方法によって特徴付けられうる。p に関するADCの定量的分布も決定されうる。いくつかの場合では、p が他の薬剤ローディングを有するADCの一定の値である場合の均質なADCの分離、精製及び特徴づけは、逆相HPLC 又は電気泳動などの手段によって達成されうる。

ある抗体 - 薬剤コンジュゲートでは、p は抗体上の結合部位の数によって限定されうる。例えば、結合がシステインチオールである場合、上記の例示的な実施態様のように、抗体はたった1つ又は複数のシステインチオール基を有してもよいし、結合しうるリンカーによってたった1つ又は複数の十分に活性なチオール基を有してもよい。ある実施態様では、薬剤ローディングが高いと、例えば p > 5 であると、特定の抗体 - 薬剤コンジュゲートの凝集、難溶性、毒性又は細胞透過性の喪失が起こりうる。ある実施態様では、本発明のADCの薬剤ローディングは、1 からおよそ 8 、およそ 2 からおよそ 6 、およそ 3 からおよそ 5 、およそ 3 からおよそ 4 、およそ 3.1 からおよそ 3.9 、およそ 3.2 からおよそ 3.8 、およそ 3.2 からおよそ 3.7 、およそ 3.2 からおよそ 3.6 、およそ 3.3 からおよそ 3.8 、又はおよそ 3.3 からおよそ 3.7 の範囲である。実際、あるADCでは、抗体当たりの薬剤部分の適切な比は、8 未満であってもよいし、およそ 2 ~ よおよそ 5 であってもよい。米国特許公開第2005-0238649号A1(出典明記によってこの全体が本明細書中に援用される)を参照。

#### 【0235】

ある実施態様では、理論的な最大よりも少ない薬剤部分がコンジュゲート反応の間に抗体にコンジュゲートされる。抗体は、例えば、以下に検討するように、薬剤 - リンカー中間体又はリンカー試薬と反応しないリジン残基を含みうる。一般に、抗体は薬剤部分に結合しうる多くの遊離した反応性のシステインチオール基を含まず、実際、抗体のほとんどのシステインチオール残基はジスルフィド架橋として存在する。ある実施態様では、抗体は、反応性のシステインチオール基を生成するために、部分的ないしは完全に還元な条件下で、ジチオトレイトール(DTT)又はトリカルボニルエチルホスフィン(TECP)などの還元剤により還元されうる。ある実施態様では、抗体は変性条件下に曝されるとリジンやシステインなどの反応性の求核基を現す。

ADCのローディング(薬剤 / 抗体比率)は、例えば、(i) 抗体に対して薬剤 - リンカー中間体又はリンカー試薬のモル過剰量を限定する、(ii) コンジュゲートの反応時間又は

10

20

30

40

50

温度を限定する、(iii) システインチオール修飾のための還元条件を限定する、(iv) システイン残基がリンカー - 薬剤接着の数及び / 又は位置の制御のために変更されるよう<sup>10</sup>に、抗体のアミノ酸配列を組み換え技術によって改変する(例えば、本明細書及び国際公開第 2006 / 034488 号(出典明記によって本明細書中に全体が援用される)において開示されるように調製した thiomab 又は thiocab)ことによるなど、異なる方法で制御しうる。

【0236】

1 以上の場合、その結果生じる生成物は、抗体に結合した一又は複数の薬剤部分を有する ADC 化合物の混合物であると考えられる。抗体当たりの薬剤の平均数は、抗体特異的かつ薬剤特異的である二重 ELISA アッセイによって混合物から算出されうる。個々の ADC 分子は、質量分析によって混合物中で識別され、HPLC、例えば疎水性相互作用クロマトグラフィによって分離されうる(例として Hamblett, K.J., 等 "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., 等 "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004 を参照)。ある実施態様では、単一のローディング値をもつ均質な ADC は、電気泳動又はクロマトグラフィによってコンジュゲート混合物から単離してもよい。<sup>20</sup>

【0237】

イムノコンジュゲートの調製方法

式 I の ADC は、当業者に公知の有機化学的反応、条件及び試薬を用いた様々な手段、例えば、(1) 共有結合によって Ab - L を形成するための二価のリンカーと抗体の求核基との反応とその後の薬剤部分 D との反応、及び(2) 共有結合によって D - L を形成するための二価のリンカーと薬剤部分の求核基との反応とその後の抗体の求核基との反応などによって調製されてもよい。後者の手段による式 I の ADC を調製するための例示的な方法は米国特許公開第 2005-0238649 号 A1 に記載されており、出典明記によって本明細書中に明確に援用される。<sup>30</sup>

抗体の求核基には、限定するものではないが、(i) N 末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリジン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基が含まれる。アミン、チオール及び水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性基により共有結合を形成することができる。このリンカー部分及びリンカー試薬には、(i) 活性エステル類、例えば NHS エステル類、HOBt エステル類、ハロギ酸類及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類；(iii) アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、抗体が完全ないしは部分的に還元されるように、還元剤、例えば DTT (ジチオトレイトール) 又はトリカルボニルエチルホスフィン (TCEP) による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、2 つの反応性のチオール求核基を形成する。あるいは、リジン残基の修飾によって、例えば、チオールにアミンを転換させる 2-イミノチオラン(トラウトの試薬)を用いてリジンを反応させることによって、抗体にスルフヒドリル基を導入することができる。反応性のチオール基は、1、2、3、4 又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製することによって抗体に導入されてもよい)。

【0238】

また、本発明の抗体 - 薬剤コンジュゲートは、アルデヒドないしはケトンカルボニル基

10

20

30

40

50

などの抗体上の求電子性基とリンカー試薬や薬剤上の求核基との間の反応によって生成してもよい。リンカー試薬上の有用な求核基には、限定するものではないが、ヒドラジド、おきしむ、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及びアリールヒドラジドが含まれる。一実施態様では、抗体を修飾して、リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる求電子性の部分を導入する。他の実施態様では、グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応しうるアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシップ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができる抗体のカルボニル(アルデヒド及びケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含む抗体はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応して、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146 ; US 5362852)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカーリー求核基と反応することができる。

薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、反応して、リンカーリー部分及びリンカーリー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステル及びアリールヒドラジド基が含まれる。このリンカーリー部分及びリンカーリー試薬には、(i)活性エステル類、例えばNHSエステル類、HOBTエステル類、ハロギ酸類及び酸ハロゲン化物；(ii)アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類；(iii)アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。

#### 【0239】

本発明の化合物は、限定するものではないが、以下の架橋剤：市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)B M P S、E M C S、G M B S、H B V S、L C - S M C C、M B S、M P B H、S B A P、S I A、S I A B、S M C C、S M P B、S M P H、スルホ-E M C S、スルホ-G M B S、スルホ-K M U S、スルホ-M B S、スルホ-S I A B、スルホ-S M C C、及びスルホ-S M P B、及びS V S B (スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したA D Cが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照。

また、抗体と細胞障害性剤のイムノコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カッティング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(S M C C)、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートH C L)、活性エステル類(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスマジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(M X - D T P A)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。

#### 【0240】

別法として、抗体と細胞障害性剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。組み換えD N A分子は、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの抗体と細胞障害性の部分をコードする領域を含みうる。

10

20

30

40

50

更なる他の実施態様では、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用して循環から非結合コンジュゲートを除去し、細胞障害性剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与してもよい。

【0241】

システイン改変抗S T E A P - 1 抗体の調製

本発明の設定、選別及び調製方法により、さらに、求電子性の官能性と反応するシステイン改変抗S T E A P - 1 抗体が可能である。これらの方法によりさらに、所定の設定した選択した部位に薬剤分子を有する抗体-薬剤コンジュゲート(A D C)化合物などの抗体複合体化合物が可能である。抗体表面上の反応性のシステイン残基により、マレイミド又はハロアセチルなどのチオール反応基を介した薬剤成分の特異的なコンジュゲートが可能である。マレイミド基に対するC y s 残基のチオール官能基の求核反応性は、リジン残基のアミノ基又はN-末端アミノ基などのタンパク質内の任意の他のアミノ酸官能性の、およそ1000倍である。ヨードアセチル及びマレイミド試薬のチオール特異的官能性はアミン基と反応するが、より高いp H (> 9.0)とより長い反応時間が必要である(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。タンパク質内の遊離チオールの量は、標準的なエルマンのアッセイによって推定されてもよい。免疫グロブリンMはジスルフィド結合五量体の例であるのに対し、免疫グロブリンGは、サブユニットと一緒に結合している内部ジスルフィド架橋を有するタンパク質の例である。このタンパク質では、ジチオトレイトール(D T T)又はs e l e n o l (Singh等 (2002) Anal. Biochem. 304:147-156)などの試薬によるジスルフィド結合の還元は、反応性の遊離チオールを生成するために必要である。この手法により、抗体立体構造及び抗原結合特異性が失われうる。

【0242】

P h e s e l e c t o r (反応性チオールの選別のためのファージE L I S A)アッセイにより、E L I S A ファージ様式での抗体の反応性システイン基の検出が可能であり、これによってシステイン改変抗体の設定の助けとなる(国際公開第2006/034488号)。システイン改変抗体をウェルの表面にコートし、ファージ粒子とインキュベートして、H R P 標識した二次抗体を添加して、吸光度を検出する。ファージにディスプレイされる変異タンパク質は、迅速で、強力な、ハイ-スループット方法でスクリーニングされる。システイン改変抗体のライプラリを生成して同じ手法を用いて結合選別を行い、抗体又は他のタンパク質のランダムなタンパク質-ファージライプラリから遊離C y s 取込みの反応性の部位を適切に同定することができる。この技術は、ファージにディスプレイされるシステイン変異タンパク質を、チオール反応性でもあるレポーターグループ又は親和性試薬と反応させることを含む。

P H E S E L E C T O R アッセイにより、抗体の反応性のチオール基のスクリーニングが可能である。この方法によるA 1 2 1 C 変異の同定は一例である。完全なF a b 分子は、反応性チオール基を有するT h i o F a b 変異体をより多く同定するために、効果的に検索されうる。パラメーターである断片的な表面のアクセス容易性を用いて、ポリペプチド内のアミノ酸残基に対する溶媒のアクセスしやすさを同定して、定量化した。表面のアクセス容易性は、溶媒分子、例えば水が接触することができる表面積(  $\text{Å}^2$  )として表されうる。水が占める面積は1.4 半径球として概算される。アルゴリズムを用いて公知のX線結晶学由来の座標によりタンパク質の各アミノ酸の表面アクセス容易性を算出する結晶学プログラムのC C P 4 S u i t e として("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50: 760-763)、ソフトウェアは入手自由であるか許可されている(Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, or by internet: [www CCP4.ac.uk/dist/html/INDEX.html](http://www CCP4.ac.uk/dist/html/INDEX.html))。B. Lee and F. M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55:379-400のアルゴリズムに基づいて、表面アクセス容易性の算出を実行する2つの例示的なソフトウェアモジュ

10

20

30

40

50

ルは、「AREAIMOL」及び「SURFACE」である。AREAIMOLは、タンパク質のヴァンデルワールス表面を転がるので、プローブ球(溶媒分子を表す)の中心の座標としてタンパク質の溶媒にアクセスする表面を定義する。AREAIMOLは、各原子の周りの拡がった球上(原子とプローブの半径の合計に等しい原子中心からの距離)に表面ポイントを生成して、周囲の原子と関連する同等の球内にあるものを除くことによって溶媒にアクセス容易な表面を算出する。AREAIMOLは、PDB座標ファイルに原子の溶媒にアクセス容易な領域を見つけ、残基、鎖、及び全分子がアクセス容易な領域をまとめる。個々の原子がアクセス容易な領域(又は、領域の相違)は、偽PDB出力ファイルに書き込まれる。AREAIMOLは各エレメントについて単一の半径を仮定し、限られた数の異なるエレメントを認識するのみである。

10

## 【0243】

AREAIMOL及びSURFACEは、絶対的なアクセス容易性、すなわち正方形のオングストローム( )の数を示す。部分的な表面アクセス容易性は、ポリペプチド内のアミノ酸に関する標準の状態を参照することで算出される。基準状態はトリペプチドG1y-X-G1yであり、ここで、Xは対象のアミノ酸であり、基準状態は「伸展した」高次構造、すなわち鎖内の高次構造様でなければならない。伸展した高次構造はXのアクセス容易性を最大にする。算出したアクセス容易な領域をG1y-X-G1yトリペプチド基準状態のアクセス容易な領域で割って、比率を比率を示す。これが部分的なアクセス容易性となる。アクセス容易性の割合は、100を乗じた部分的アクセス容易性である。表面アクセス容易性を算出するための他の例示的なアルゴリズムは、ポリペプチドのX線座標に基づいて水球体に対するアミノ酸残基の部分的アクセス容易性を算出するプログラムxsae (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel)のSOLVモジュールに基づく。抗体のすべてのアミノ酸の部分的表面アクセス容易性は、利用できる結晶構造情報を使用して算出されてもよい(Eigenbrot等 (1993) J Mol Biol. 229:969-995)。

20

システイン改変抗体をコードするDNAを容易に単離し、従来の手順を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)配列決定される。ハイブリドーマ細胞はこのようなDNAの供与源として役立つ。単離した後、DNAを発現ベクターに入れ、ついでそれを、大腸菌、サルのCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CH0)細胞、又は他の哺乳動物の宿主細胞、例えば抗体タンパク質を産生しない骨髄腫細胞(米国特許第5807715号; 米国公開特許第2005/0048572号; 米国公開特許第2004/0229310)などの宿主細胞に形質移入して、組み換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成を得てもよい。

30

## 【0244】

設定及び選別の後、改変された、非常に反応性のある対になっていないCys残基を有するシステイン改変抗体、例えばThiophabが、(i)細菌、例えば大腸菌システム(Skerra等 (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262; Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188)又は哺乳類の細胞培養システム(国際公開第01/00245号)、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞(CH0)における発現、及び(ii)一般的なタンパク質精製技術を用いた精製(Lowman等 (1991) J. Biol. Chem. 266(17): 10982-10988)によつて産生されてもよい。

40

改変されたCysチオール基は、求電子性リンカー試薬及び薬剤-リンカー中間生成物と反応して、システイン改変抗体薬剤コンジュゲート及び他の標識したシステイン改変抗体を形成する。親抗体に存在し、鎖内及び鎖間のジスルフィド結合を形成するシステイン改変抗体Cys残基は、反応性チオール基を全く持っておらず(還元剤で処理されない限り)、求電子性のリンカー試薬又は薬剤-リンカー中間生成物と反応しない。新規に改変されたCys残基は対形成せずに、反応することができる。すなわち求電子性のリンカー試薬又は薬剤-マレイミドなどの薬剤-リンカー中間生成物にコンジュゲートすることができる。例示的な薬剤-リンカー中間生成物には、MC-MMAE、MC-MMAF、MC-vc-PAB-MMAE及びMC-vc-PAB-MMAFが含まれる。重鎖及び軽

50

鎖の改変した Cys 残基の構造位置は連続する番号付けシステムに従って番号付けする。この連続する番号付けシステムは、N 末端から始まるカバット番号付けシステム(Kabat 等, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)に関連しており、a, b, c で示す挿入がカバット番号付けスキーム(下列)とは異なる。カバット番号付けシステムを用いると、実際の直鎖のアミノ酸配列は、可変ドメインの FDR ないし CDR が短くなっているアミノ酸か、又は FDR ないし CDR に挿入を含むアミノ酸を含みうる。システイン改変重鎖変異体部位は連続する番号付け及びカバット番号付けスキームによって同定される。

## 【0245】

10

一実施態様では、システイン改変抗 STEAP-1 抗体は、

- (a) システインによって親抗 STEAP-1 抗体の一又は複数のアミノ酸残基を置換する、そして、
- (b) チオール反応性の試薬とシステイン改変抗体を反応させることによって、システイン改変抗 STEAP-1 抗体のチオール反応性を決定することを含む方法によって調製される。

システイン改変抗体は親抗体よりチオール反応性の試薬との反応性が高くてよい。

遊離システインアミノ酸残基は、重鎖ないし軽鎖、又は定常ドメインないし可変ドメインに位置してもよい。また、抗体断片、例えば Fab は、抗体断片のアミノ酸を置換する一又は複数のシステインアミノ酸によって改変して、システイン改変抗体断片を形成してもよい。

20

本発明の他の実施態様は、

- (a) 一又は複数のシステインアミノ酸を親抗 STEAP-1 抗体に導入して、システイン改変抗 STEAP-1 抗体を生成する、そして、
- (b) チオール反応性の試薬によりシステイン改変抗体のチオール反応性を決定することを含み、

このとき、システイン改変抗体は親抗体よりもチオール反応性の試薬と反応性が高いものである、システイン改変抗 STEAP-1 抗体を調製する(作製する)方法を提供する。

## 【0246】

30

システイン改変抗体を調製する方法の工程(a)は、

- (i) システイン改変抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発する、
- (ii) システイン改変抗体を発現させる、そして、
- (iii) システイン改変抗体を単離して、精製することを含む。

システイン改変抗体を調製する方法の工程(b)は、ファージ又はファージミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン改変抗体を発現させることを含んでもよい。

また、システイン改変抗体を調製する方法の工程(b)は、

- (i) システイン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン改変抗体を生成させる、そして、
- (ii) 親和性標識したシステイン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定することを含んでもよい。

40

本発明の他の実施態様は、

- (a) 親抗体に一又は複数のシステインアミノ酸を導入して、システイン改変抗体を生成する、
- (b) システイン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン改変抗体を生成させる、そして、
- (c) 親和性標識したシステイン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定する、そして、
- (d) チオール反応性の試薬によりシステイン改変抗体のチオール反応性を決定することを含む、チオール反応のために高い反応性を有し、対形成をしないシステインアミノ酸を有するシステイン改変抗体をスクリーニングする方法である。

50

## 【0247】

- システィン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(a)は、
- (i) システィン改変抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発する、
  - (ii) システィン改変抗体を発現させる、そして、
  - (iii) システィン改変抗体を単離して、精製する
- ことを含んでもよい。

システィン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(b)は、ファージ又はファージミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシスティン改変抗体を発現させることを含んでもよい。

また、システィン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(b)は、

- (i) システィン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システィン改変抗体を生成させる、そして、
  - (ii) 親和性標識したシスティン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定する
- ことを含んでもよい。

## 【0248】

## 標識したシスティン改変抗 S T E A P - 1 抗体

システィン改変抗 S T E A P - 1 抗体は部位特異的であり、チオール反応性の試薬と効率よくカップリングしうる。チオール反応性の試薬は、多機能性リンカー試薬、キャプチャ、すなわち親和性、標識試薬(例えばビオチン-リンカー試薬)、検出標識(例えば蛍光体試薬)、固相固定化試薬(例えば S E P H A R O S E <sup>T M</sup>、ポリスチレン又はガラス)、又は薬剤-リンカー中間生成物であってもよい。チオール反応性試薬の一例は N - エチルマレイミド(N E M)である。ある例示的な実施態様では、ビオチン-リンカー試薬との Th i o F a b の反応によりビオチン化された Th i o F a b が生じ、これによって改変されたシスティン残基の存在及び反応性が検出され、測定されうる。多機能リンカー試薬との Th i o F a b の反応により、薬剤成分試薬又は他の標識とさらに反応しうる官能化されたリンカーを有する Th i o F a b が生じる。薬剤-リンカー中間生成物との Th i o F a b の反応により、 Th i o F a b 薬剤コンジュゲートが生じる。

本明細書中で記述される例示的な方法は一般に、抗体の同定及び產生、さらに一般的には、本明細書中に記載の設定及びスクリーニングの工程によって他のタンパク質に応用されてもよい。

## 【0249】

このような手法は、反応基が例えばマレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、又は他のチオール反応性の結合パートナーである他のチオール反応性試薬のコンジュゲーションに応用されてもよい(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc. ; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2 ; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London ; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2 ; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。チオール反応性の試薬は、薬剤成分、フルオロホア、例としてフルオレセイン又はローダミンのような蛍光染料、イメージング又は放射性治療用金属のためのキレート剤、ペプチジル又は非ペプチジル標識ないしは検出用タグ、又はポリエチレングリコールの各種アイソフォームなどのクリアランス-改変剤、第三成分に結合するペプチド、又は他の炭水化物又は親油性剤であってもよい。

## 【0250】

## システィン改変抗 S T E A P - 1 抗体の使用

システィン改変抗 S T E A P - 1 抗体とそのコンジュゲートは治療用及び/又は診断用の薬剤としての使用が明らかにされうる。本発明はさらに、 S T E A P - 1 関連疾患と関係する一又は複数の症状を予防するか、管理するか、治療するか又は、寛解する方法を提供する。特に、本発明は、癌、例えば前立腺癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、卵巣癌、及びユーリング肉腫などの細胞増殖性疾患と関係する一又は複数の症状を予防するか、管理する

10

20

30

40

50

か、治療するか又は、寛解する方法を提供する。本発明はまた更に、S T E A P - 1 関連の疾患又はこのような疾患を発達させる素因を診断するための方法、並びに好ましくは細胞関連のS T E A P - 1 ポリペプチドを結合する抗体、及び抗体の抗原結合断片を同定するための方法を提供する。

本発明の他の実施態様は、S T E A P - 1 関連の疾患に応答する状態の治療において有用な医薬の調製のためのシステイン改変抗S T E A P - 1 抗体の使用に関する。

### 【0251】

#### システイン改変抗S T E A P - 1 抗体 - 薬剤コンジュゲートの調製

式IのADCは、当業者に公知の有機化学的反応、条件及び試薬を用いた様々な手段、例えば、(1) システイン改変抗体のシステイン基をリンカー試薬と反応させて、共有結合によって抗体 - リンカー中間生成物A b - Lを形成させ、その後に薬剤成分Dと反応させる、及び(2) 薬剤成分の求核基をリンカー試薬と反応させて、共有結合によって薬剤 - リンカー中間生成物D - Lを形成させ、その後にシステイン改変抗体のシステイン基と反応させる、などによって調製されてもよい。コンジュゲート方法(1)及び(2)は、様々なシステイン改変抗体、薬剤成分及びリンカーを用いて行い、式Iの抗体 - 薬剤コンジュゲートを調製してもよい。

抗体システインチオール基は求核基であり、反応して、リンカー試薬及び薬剤 - リンカー中間生成物の求電子基と共有結合することができる。このリンカー試薬及び薬剤 - リンカー中間生成物には、(i) 活性エステル類、例えばNHSエステル類、HOBtエステル類、ハロギ酸類及び酸ハロゲン化物、(ii) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類、(iii) アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、及び(iv) スルフィド交換による、ピリジルジスルフィドを含むジスルフィドが含まれる。薬剤成分の求核基には、リンカー成分及びリンカー試薬の求電子基と共有結合するために反応することができる、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステル及びアリールヒドラジド基が含まれるが、これらに限定されるものではない。

### 【0252】

システイン改変抗体は、DTT(クリーランド試薬、ジチオトレイトール)又はTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロライド; Getz等 (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA)などの還元剤にて処理した後に、鎖間及び鎖内のジスルフィド結合を再形成させるために再酸化させることによって、リンカー試薬とのコンジュゲートに対して反応性にしてもよい。例えば、CHO細胞に発現される完全長のシステイン改変モノクローナル抗体(Thi o Mab)を、新たに導入したシステイン残基と培養培地中に存在するシステインとの間で形成しうるシステイン付加物のジスルフィド結合を還元するために、およそ50倍の過剰なTCEPにて37℃で3時間かけて還元する。還元されたThi o Mabを希釈して、10mM酢酸ナトリウム、pH5にてHiTrap Sカラムに流し、0.3M塩化ナトリウムを含むPBSにて溶出する。希釈(200nM)硫酸銅水(CuSO<sub>4</sub>)、室温に終夜置くことにより親Mabに存在するシステイン残基間にジスルフィド結合が再構築された。あるいは、デヒドロアスコルビン酸(DHAA)は、システイン付加物の還元分解反応の後にシステイン改変抗体の鎖内ジスルフィド基を再構築させるための有効な酸化体である。当分野で公知の他の酸化体、すなわち酸化剤及び酸化条件が用いられてもよい。外気酸化も有効である。この低刺激性の部分的な再酸化工程により、高品位の鎖内ジスルフィドが効率よく形成され、新たに導入されたシステイン残基のチオール基が維持される。およそ10倍過剰な薬剤 - リンカー中間生成物、例えばMC - VC - PAB - MMAEを添加し、混合して、室温におよそ1時間置いて、コンジュゲートに作用させ、抗体 - 薬剤コンジュゲートを形成させた。コンジュゲート混合物をゲル濾過し、HiTrap Sカラムに流して溶出させ、過剰な薬剤 - リンカー中間生成物と他の不純物を除去した。

### 【0253】

図16は、コンジュゲートのために細胞培養物から発現されるシステイン改変抗体を調

10

20

30

40

50

製するための一般的な方法を示す。細胞培養培地にシステインを含む場合、新たに導入されたシステインアミノ酸と培地のシステインとの間にジスルフィド付加物が形成しうる。これらのシステイン付加物(図12の例示的なThiomab(左)に示す)は、コンジュゲートのために反応するシステイン変換抗体を生成するために還元されなければならない。システイン付加物は、おそらく様々な鎖間ジスルフィド結合とともに、TCEPなどの還元剤によって抗体の還元型を生じさせるために、還元により切断される。対形成したシステイン残基間の鎖間ジスルフィド結合は、硫酸銅、DHAAs又は周囲酸素への曝露による不完全酸化条件下で再形成される。新たに導入され、変換され、対形成しないシステイン残基は、リンカーテスト薬や薬剤-リンカーミド生成物と反応して本発明の抗体コンジュゲートを形成するために利用されうる状態にある。哺乳類の細胞株において発現されるThiomabは、-S-S-結合形成によって外部からコンジュゲートされた変換CysへのCys付加物となる。したがって、精製されたThiomabを、実施例5に記載の還元及び再酸化の手順にて処理して、反応性のThiomabsを生産する。これらのThiomabを用いて、細胞障害性剤、蛍光体及び他の標識を含むマレイミドとコンジュゲートさせる。

図15は、アウリスタチン薬剤成分が、変換されたシステイン基の軽鎖(LC-ADC)、重鎖(HC-ADC)、及びFc領域(Fc-ADC)に付着している、システイン変換抗体-1抗体薬剤コンジュゲート(ADC)の実施態様を示す。

#### 【0254】

##### 薬学的製剤

###### 抗体薬剤コンジュゲートの投与

本発明の抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)は、治療される症状に適切な任意の手段によって投与されてもよい。典型的にADCは、非経口的に、すなわち注入、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、くも膜下腔内及び硬膜外投与される。

前立腺、肺及び/又は大腸等の癌を治療するために、一実施態様では、抗体-薬剤コンジュゲートは静脈内注入により投与される。注入により投与される用量は、1用量当たりおよそ1μg/m<sup>2</sup>からおよそ10000μg/m<sup>2</sup>の範囲で、一般に週1回、合計1、2、3又は4回の用量である。あるいは、用量範囲は、およそ1μg/m<sup>2</sup>からおよそ1000μg/m<sup>2</sup>、およそ1μg/m<sup>2</sup>からおよそ800μg/m<sup>2</sup>、およそ1μg/m<sup>2</sup>からおよそ600μg/m<sup>2</sup>、およそ1μg/m<sup>2</sup>からおよそ400μg/m<sup>2</sup>、およそ10μg/m<sup>2</sup>からおよそ500μg/m<sup>2</sup>、およそ10μg/m<sup>2</sup>からおよそ300μg/m<sup>2</sup>、およそ10μg/m<sup>2</sup>からおよそ200μg/m<sup>2</sup>、及びおよそ1μg/m<sup>2</sup>からおよそ200μg/m<sup>2</sup>である。投薬は、1日1回、1週間に1回、1週間に複数回(1日1回より少ない)、1か月に複数回(1日1回より少ない)、1か月に複数回(1週間に1回より少ない)、1か月に1回又は疾患の症状が寛解又は緩和するように間欠的に投与されてもよい。投与は、腫瘍又はリンパ腫の症状、治療される白血病が寛解するまで開示したいずれかの間隔で継続されてもよい。このような寛解又は軽減がこのような継続的な投与によって延長される症状の寛解又は軽減が達成される後に、投与を続けてもよい。

#### 【0255】

また、本発明は、前立腺癌、肺癌、又は大腸癌に罹っている患者に、治療的に有効な量の前記実施態様のいずれか一のヒト化120v.24抗体であって、細胞障害性分子や検出可能な分子にコンジュゲートされていない抗体を投与することを含む、前立腺癌、肺癌、又は大腸癌、及び/又はそれら癌の転移を緩和する方法を提供する。抗体は一般的に、およそ1μg/m<sup>2</sup>からおよそ1000mg/m<sup>2</sup>の用量範囲で投与される。

また、本発明は、前立腺癌、肺癌、又は大腸癌に罹っている患者に、治療的に有効な量の前記実施態様のいずれか一のヒト化120v.24抗体であって、細胞障害性分子や検出可能な分子にコンジュゲートされている抗体を投与することを含む、前立腺癌、肺癌、又は大腸癌、及び/又はそれら癌の転移を緩和する方法を提供する。抗体は一般的に、およそ1μg/m<sup>2</sup>からおよそ1000mg/m<sup>2</sup>の用量範囲で投与される。

10

20

30

40

50

## 【0256】

一態様では、本発明はさらに、少なくとも一の本発明の抗S T E A P - 1抗体及び/又は少なくとも一のこのイムノコンジュゲート及び/又は少なくとも一の本発明の抗S T E A P - 1抗体-薬剤コンジュゲートを含有する薬学的製剤を提供する。いくつかの実施態様では、薬学的製剤は、1) 抗S T E A P - 1抗体及び/又は抗S T E A P - 1抗体-薬剤コンジュゲート及び/又はこのイムノコンジュゲートと、2) 薬学的許容性のある担体とを含有する。いくつかの実施態様では、薬学的製剤は、1) 抗S T E A P - 1抗体及び/又はこのイムノコンジュゲートと、場合によって2) 少なくとも一の付加的治療剤とを含有する。

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲート又は本発明の抗体-薬剤コンジュゲートを含んでなる治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体又は抗体-薬剤コンジュゲートと、場合によっては生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))、水溶液又は凍結乾燥又は他の乾燥製剤の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトロン酸、ヒスチジン及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサンノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体)；及び/又はTWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。インビオ投与に用いられる薬学的製剤は一般に滅菌されている。これは滅菌濾過メンブレンによる滅菌によって容易に達成される。

## 【0257】

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルション、ナノ-粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルションに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の好ましい例は、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートを含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT<sup>TM</sup>(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、分子を100日以上かけて放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短い時間で放出する。カプセル化された抗体ないしイムノコンジュゲートが体内に長時間残ると、37の水分に暴露された結果として変性又は凝集し、生物活性を喪失させ免疫原性を変化させるおそれがある。合理的な戦略を、関与するメカニズムに応じて安定化の

10

20

30

40

50

ために案出することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間 S-S 結合の形成であることが見いだされた場合、安定化はスルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥させ、水分含有量を制御し、適当な添加剤を使用し、また特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成されうる。

#### 【 0 2 5 8 】

##### 抗体 - 薬剤コンジュゲート治療

本発明の抗体 - 薬剤コンジュゲート(ADC)を用いて、例えば腫瘍抗原の過剰発現に特徴がある様々な疾患ないしは疾病を治療することが考慮される。例示的な症状又は過剰増殖性疾患には、良性ないし悪性の腫瘍；白血病及びリンパ系の悪性腫瘍が含まれる。他には、神経系、神経膠、星状性、視床下部、腺性、マクロファージ性、上皮性、間質性、胚盤胞性、炎症性、血管形成性、及び、自己免疫性を含む免疫性の疾患が含まれる。他にも、前立腺癌、肺癌、及び大腸癌が含まれる。

動物モデル及び細胞に基づくアッセイにおいて同定される ADC 化合物はさらに、腫瘍を有する高次壘長類及びヒトの臨床試験で試験されうる。ヒトの臨床試験は、前立腺、肺又は大腸の細胞増殖性疾患、例えば限定するものではないが、前立腺癌、肺癌及び大腸癌、並びにこれら癌の転移を経験する患者において、本発明の抗 STEAP-1 モノクローナル抗体ないしイムノコンジュゲートの有効性を試験するために設定されうる。臨床試験は、公知の治療的投薬計画、例えば放射線及び／又は公知の化学療法剤及び／又は細胞障害性剤を伴う化学療法と組み合わせて ADC の有効性を評価するように設定されてもよい。

#### 【 0 2 5 9 】

癌は STEAP-1 発現細胞を含んでおり、本発明の ADC は癌細胞に結合することが可能である。癌の STEAP-1 発現を決定するために、様々な診断用／予後用のアッセイが利用できる。一実施態様では、STEAP-1 過剰発現は IHC によって分析されてもよい。腫瘍生検のパラフィン包埋組織切片は IHC アッセイに用い、試験した腫瘍細胞の割合や染色の程度に関して、STEAP-1 タンパク質染色強度判定基準に照らし合わせてもよい。

疾患の予防又は治療のために、ADC の好適な用量は、上記のように、治療する疾患のタイプ、疾患の重症度及び経過、分子を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体への応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。分子は一時的又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 1 μg / kg ~ 15 mg / kg (例えば 0.1 ~ 20 mg / kg) の分子が、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初回候補用量である。ある典型的な 1 日量は、上記の要因に応じて、約 1 μg / kg ~ 約 100 mg / kg 以上の範囲であろう。患者に投与される ADC の例示的な用量は、およそ 0.1 からおよそ 10 mg / 患者体重 kg の範囲である。

症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。例示的な用量投薬計画は、およそ 4 mg / kg の初回負荷投与量の後に、およそ 2 mg / kg の抗 STEAP-1 抗体の維持用量を毎週投与することを含む。他の投与計画も有用でありうる。この治療の経過は従来技術及びアッセイにより容易にモニターアーされる。

#### 【 0 2 6 0 】

##### 併用療法

本発明の抗体 - 薬剤コンジュゲート(ADC)は、薬学的組合せ製剤又は併用療法としての用量投薬計画において、抗癌性質を有する少なくとも一つの追加の化合物を組み合わせてもよい。薬学的併用製剤又は用量投薬計画の少なくとも一つの追加の化合物は、それらが互いに悪影響を与えないように、併用の ADC に対して相補的な活性を有するのが好ましい。

少なくとも一つの追加の化合物は、化学療法剤、細胞障害性剤、サイトカイン、増殖阻害性剤、抗ホルモン剤及び／又は心臓保護剤であってもよい。このような分子は、意図す

10

20

30

40

50

る目的のために有効である量で好適に組み合わされる。また、本発明のADCを含有する製薬的組成物は、治療的に有効な量の化学療法剤、例えばチューブリン形成インヒビター、トポイソメラーゼインヒビター又はDNA結合剤を有してもよい。

【0261】

一態様では、第一の化合物は本発明の抗STEEP-1 ADCであり、少なくとも一つの追加の化合物は抗STEEP-1抗体(ネイキッド抗体ないしはADC)である。一実施態様では、少なくとも一つの追加の化合物は、抗PSCA抗体である。一実施態様では、少なくとも一つの追加の化合物は、抗HER2抗体のトラスツズマブ(ハーセプチニ<sup>10</sup>ン(登録商標)、ジェネンテック・インク、カリフォルニア州サウスサンフランシスコ)である。一実施態様では、少なくとも一つの追加の化合物は、抗HER2抗体のペルツズマブ(オムニターグ(TM)、ジェネンテック・インク、カリフォルニア州サウスサンフランシスコ、米国特許第6949245号参照)である。一実施態様では、少なくとも一つの追加の化合物は抗VEGF抗体である(例えば、アバスチン(登録商標)、ジェネンテック・インク)である。いずれの場合も、少なくとも一つの追加の化合物は、ネイキッド抗体ないしはADCである。一実施態様では、少なくとも一つの追加の化合物は抗体であり(ネイキッド抗体ないしはADC)、追加の抗体は、第2、第3、第4、第5、第6、又はそれ以上の抗体であり、第2、第3、第4、第5、第6、又はそれ以上の追加の抗体(ネイキッド抗体ないしはADC)を組み合わせることが、STEEP-1を発現する組織中の細胞増殖性疾患の治療に効果的である。

【0262】

他の治療的投薬計画は、放射線療法及び/又は骨髄及び末梢血液移植、及び/又は細胞障害性剤、化学療法剤又は増殖阻害性剤を含むがこれらに限定されない本発明に従って同定される抗癌剤の投与と組み合わされてもよい。前記のうちの一実施態様では、化学療法剤は、例えば、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキソルビシン、ビンクリスチシン(オンコビン<sup>TM</sup>)、ブレドニゾロン、CHOP、CVPないしはCOP、又は抗PSCA、抗HER2(例えばハーセプチニ<sup>TM</sup>(登録商標)、オムニターグ<sup>TM</sup>)ないしは抗VEGF(例えばアバスチン(登録商標))などの免疫治療法などの薬剤又は薬剤の組合せである。併用療法は同時又は連続的な投薬計画として投与されてもよい。連続して投与される場合、組合せは2以上の投与で投与されてもよい。組合せ投与には、別々の製剤又は単一の製薬的製剤を用いての同時投与や、いずれかの順序での連続投与が含まれ、このとき、両方(又はすべて)の活性剤が同時にその生物学的活性を及ぼす一定時間があるのが好ましい。

一実施態様では、ADCによる治療は、本明細書において同定される抗癌剤、及び異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む一又は複数の化学療法剤又は増殖阻害性剤の併用投与を伴う。化学療法剤には、タキサン(例えばパクリタキセル及びドセタキセル)及び/又はアンスラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤のための調製や投薬計画は、製造業者の指示に従って使われてもよいし、又は経験的に熟練した専門家によって測定されうる。このような化学療法の調製や投薬計画は、"Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. にも記載される。

【0263】

前記いずれかの同時投与される薬剤の好適な用量は現在用いられている通りでもよいし、新規に同定される薬剤と他の化学療法剤ないしは治療の組み合わされる作用(相乗)に応じて低くしてもよい。

併用療法により「相乗効果」が生じ得、「相乗的」、すなわち、同時に用いた活性成分が別々に該化合物を用いて生じる効果の合計よりも多い場合に生じる効果が生じうる。活性成分が、(1)組み合わせた単位用量製剤に同時に製剤化され、投与されるか、又は同時に送達される場合、(2)別々の製剤として交互に又は同時に送達される場合、又は、(3)いくつかの他の投薬計画によってなされる場合に、相乗効果が達成されうる。交替療法で送達される場合、例えば異なる注射器での異なる注入によって、化合物が投与されるか又は順次送達される場合に、相乗効果が達成されてもよい。通常は、交替療法の間、各々の

10

20

30

40

50

活性成分の有効用量は順次、すなわち連続的に投与されるのに対して、併用療法では、2以上の活性成分の有効用量は一緒に投与される。

#### 【0264】

##### 抗体 - 薬剤コンジュゲートの代謝産物

代謝産物が先行技術に対して新規性及び非自明性を有する限りにおいて、本明細書中に記載のADC化合物のインビボ代謝産物も、本発明の権利内である。このような生成物は、投与された化合物の、例えば酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化、酵素切断などから生じうる。したがって、本発明は、代謝産物が生じるために十分な時間、本発明の化合物を哺乳動物と接触させることを含む方法によって生成される新規の自明でない化合物を包含する。

典型的には、代謝産物は、放射性標識した(例えば<sup>1-4</sup>C又は<sup>3</sup>H)ADCを調製して、ラット、マウス、モルモット、サルなどの動物又はヒトに検出可能な用量(例えば、およそ0.5mg/kg以上)で非経口投与し、代謝が生じるために十分な時間(典型的にはおよそ30秒から30時間)をあいて、尿、血液又は他の生体試料から変換生成物を単離することによって同定される。標識されているので、これら生成物は容易に単離される(他のものは、代謝産物中に残っているエピトープを結合することができる抗体を用いて単離される)。代謝産物の構造は従来の様式、例えばMS、LC/MS又はNMR分析によって決定される。通常、当分野の技術者に周知の従来の薬物代謝研究と同じ方法で代謝産物の分析が行われる。インビボで見られない限り、変換生成物は本発明のADC化合物の治療的投薬のための診断検査法において有用である。

#### 【0265】

##### 抗STEAP-1抗体及びイムノコンジュゲートの更なる使用方法

###### 診断法と検出の方法

一態様では、本発明の抗STEAP-1抗体及びイムノコンジュゲートは、生体試料中のSTEAP-1の存在を検出するために有用である。本明細書中で用いる「検出する」なる用語は、定量的又は定性的な検出を包含する。ある実施態様では、生体試料は、細胞又は組織を含む。ある実施態様では、このような組織には、他の組織、例えば前立腺、肺及び大腸と比較して高いレベルでSTEAP-1を発現する正常及び/又は癌性組織が含まれる。

一態様では、本発明は、生体試料中のSTEAP-1の存在を検出する方法を提供する。ある実施態様では、前記方法は、STEAP-1への抗STEAP-1抗体の結合に許容される条件下で抗STEAP-1抗体と生体試料を接触させ、抗STEAP-1抗体とSTEAP-1との間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む。

#### 【0266】

一態様では、本発明は、STEAP-1の発現増加と関係している疾患を診断する方法を提供する。ある実施態様では、前記方法は、抗STEAP-1抗体と試験細胞を接触させ、STEAP-1への抗STEAP-1抗体の結合を検出することによって試験細胞によるSTEAP-1の発現レベル(量的に又は質的に)を測定し、そして、試験細胞によるSTEAP-1の発現レベルをコントロール細胞(例えば、試験細胞と同じ組織起源の正常細胞、又はこの正常細胞と同等のレベルでSTEAP-1を発現する細胞)によるSTEAP-1の発現レベルと比較することを含み、コントロール細胞と比べて試験細胞によるSTEAP-1の発現レベルが高い場合にSTEAP-1の発現の増加に関連する細胞増殖性疾患の存在が示される。ある実施態様では、試験細胞は、STEAP-1の発現の増加に関連する疾患があると疑われる患者から得られる。ある実施態様では、前記疾患は、癌又は腫瘍などの細胞増殖性疾患である。

本発明の抗体を用いて診断されうる例示的な細胞増殖性疾患には、前立腺癌、肺癌及び大腸癌、又はこれら癌の転移が含まれる。

#### 【0267】

ある実施態様では、上記のような診断ないし検出の方法は、表面にSTEAP-1を発現する細胞から得た膜調製物中又は細胞の表面において発現されるSTEAP-1に対する

10

20

30

40

50

る抗 S T E A P - 1 抗体の結合を検出することを含む。ある実施態様では、前記方法は、S T E A P - 1 への抗 S T E A P - 1 抗体の結合に許容される条件下で抗 S T E A P - 1 抗体と細胞を接触させ、抗 S T E A P - 1 抗体と細胞表面上の S T E A P - 1 との間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む。細胞の表面上に発現された S T E A P - 1 への抗 S T E A P - 1 抗体の結合を検出するための例示的なアッセイは「F A C S」アッセイである。

ある他の方法は、S T E A P - 1 に対する抗 S T E A P - 1 抗体の結合を検出するため 10 に用いてもよい。前期の方法には、限定するものではないが、当分野で周知である抗原-結合アッセイ、例えばウェスタンプロット、放射性免疫アッセイ、E L I S A(抗体結合免疫吸着検定)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ、及び免疫組織化学(I H C)が含まれる。

ある実施態様では、抗 S T E A P - 1 抗体は標識される。標識には、限定するものではないが、直接検出される標識又は分子(例えば、蛍光、発色、高電子密度、化学発光、及び放射性標識)、並びに、例えば酵素反応又は分子相互作用によって間接的に検出される酵素ないしはリガンドなどの分子が含まれる。例示的な標識には、限定するものではないが、放射性同位体である<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H及び<sup>131</sup>I、フルオロフォア、例えば希有土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ(米国特許第4737456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタルアジネジョン(dihydrophthalazinediones)、西洋わさびペルオキシダーゼ(H R P)、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、サッカライドオキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、複素環のオキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、H R P、ラクトペルオキシダーゼ又はマイクロペルオキシダーゼなどの色素前駆体を酸化するために水素ペルオキシダーゼを用いる酵素とカップリングさせたもの、ビオチン/アビジン、スピノ標識、バクテリオファージ標識、安定した遊離基などが含まれる。

#### 【0268】

ある実施態様では、抗 S T E A P - 1 抗体は不溶性基質に固定される。固定化は、溶液中で遊離したままであるいはれかの S T E A P - 1 から抗 S T E A P - 1 抗体を分離することを伴う。これは従来、水不溶性基質ないしは表面に吸着させる(Bennich等、米国特許第372760号)又は共有的にカップリングさせる(例えば、グルタールアルデヒド架橋結合を使用する)などしてアッセイ手順の前に抗 S T E A P - 1 抗体を不溶化するか、又は抗 S T E A P - 1 抗体と S T E A P - 1 との複合体の形成の後に、例えば免疫沈降によつて抗 S T E A P - 1 抗体を不溶化することによって達成される。

診断ないし検出の上記いはれかの実施態様は、抗 S T E A P - 1 抗体の代わりに、ないしは抗 S T E A P - 1 抗体に加えて本発明のイムノコンジュゲートを用いて行われうる。

#### 【0269】

##### 治療法

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、例えばインビトロ、エクスピボ、及びインビボの治療法で使われてもよい。一態様では、本発明は、S T E A P - 1 へのイムノコンジュゲートの結合が許容される条件下で抗 S T E A P - 1 抗体ないしはそのイムノコンジュゲートに細胞を曝すことを含む、インビボ又はインビトロでの細胞の成長ないしは増殖を阻害するための方法を提供する。「細胞成長又は増殖を阻害する」ことは、細胞の成長ないしは増殖を少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 又は 100% 低減することを意味し、細胞死を誘導することを含む。ある実施態様では、細胞は腫瘍細胞である。ある実施態様では、細胞は前立腺、肺、大腸、膀胱、又は卵巣の細胞、或いはユーリング肉腫の細胞である。ある実施態様では、細胞は、例えば本明細書中に例示したような異種移植片である。

一態様では、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、前立腺癌、肺癌、大腸癌、

10

20

30

40

50

膀胱癌、又は卵巣癌の細胞、或いはユーイング肉腫の細胞の増殖性疾患を治療するか又は予防するために用いる。ある実施態様では、細胞増殖性疾患は、S T E A P - 1 の発現及び/又は活性の増加と関係している。例えば、ある実施態様では、前立腺、肺、大腸、膀胱、又は卵巣の細胞、或いはユーイング肉腫の細胞増殖性疾患は、前立腺、肺、大腸、膀胱、又は卵巣の細胞、或いはユーイング肉腫の細胞の表面上のS T E A P - 1 の発現増加と関係している。ある実施態様では、前立腺、肺、大腸、膀胱、又は卵巣の細胞、或いはユーイング肉腫の細胞増殖性疾患は腫瘍又は癌、或いはこれら癌の転移である。

#### 【 0 2 7 0 】

一態様では、本発明は、抗S T E A P - 1 抗体ないしイムノコンジュゲートの有効量を個体に投与することを含む、前立腺、肺、又は大腸の細胞の増殖性疾患を治療するための方法を提供する。ある実施態様では、前立腺、肺又は大腸の細胞の増殖性疾患を治療するための方法は、抗S T E A P - 1 抗体又は抗S T E A P - 1 イムノコンジュゲートと、本明細書に挙げるような少なくとも一の付加的治療剤とを含有する薬学的製剤の有効量を個体に投与することを含む。

一態様では、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートの少なくともいくつかは、ヒト以外の種のS T E A P - 1 を結合しうる。したがって、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、例えば、S T E A P - 1 を含む細胞培養物において、ヒトにおいて、又は、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートが交差反応するS T E A P - 1 を有する他の哺乳動物(例えばチンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザル及びアカゲザル、イヌ、ブタ、ラット又はマウス)においてS T E A P - 1 を結合するために用いてもよい。一実施態様では、抗S T E A P - 1 抗体ないしイムノコンジュゲートは、イムノコンジュゲートのコンジュゲートした細胞毒素が細胞内部に送達するように、S T E A P - 1 を抗体ないしイムノコンジュゲートと接触させて抗体ないしイムノコンジュゲート-抗原複合体を形成させることによって、前立腺、肺又は大腸の細胞上のS T E A P - 1 をターゲティングするために使われてもよい。一実施態様では、抗S T E A P - 1 抗体が結合するS T E A P - 1 はヒトS T E A P - 1 である。一実施態様では、抗S T E A P - 1 抗体が結合するS T E A P - 1 はカニクイザルS T E A P - 1 である。一実施態様では、ヒト化抗S T E A P - 1 抗体はヒト及び/又はカニクイザルS T E A P - 1 に結合する。

#### 【 0 2 7 1 】

一実施態様では、抗S T E A P - 1 抗体ないしイムノコンジュゲートは、個体のS T E A P - 1 が結合されるように抗体ないしイムノコンジュゲートを個体に投与することを含む、S T E A P - 1 発現及び/又は活性の増加と関係する疾患を患っている個体において抗体を結合させるための方法に用いられる。一実施態様では、結合した抗体ないしイムノコンジュゲートはS T E A P - 1 を発現する前立腺、肺、大腸、膀胱、又は卵巣の細胞、或いはユーイング肉腫の細胞内に取り込まれる。一実施態様では、S T E A P - 1 はヒトのS T E A P - 1 であり、個体はヒト個体である。あるいは、個体は、抗S T E A P - 1 抗体が結合するS T E A P - 1 を発現している哺乳動物であってもよい。また更に、個体は、S T E A P - 1 が(例えば、S T E A P - 1 の投与によって、又はS T E A P - 1 をコードする導入遺伝子の発現によって)導入された哺乳動物であってもよい。

抗S T E A P - 1 抗体ないしイムノコンジュゲートは、治療目的のためにヒトに投与されうる。さらに、抗S T E A P - 1 抗体ないしイムノコンジュゲートは、獣医学的目的のため又はヒト疾患の動物モデルとして、抗体が交差反応するS T E A P - 1 を発現する非ヒト哺乳動物(例えば、靈長類、イヌ、ブタ、ラット又はマウス)に投与されうる。後者に関して、このような動物モデルは、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートの治療有効性を評価するため(例えば、投与の用量及び時間経過の試験する)に有用となりうる。

#### 【 0 2 7 2 】

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートが、治療において単独、又は他の組成物と組み合わせて使われてもよい。例えば、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、少なくとも一の付加的治療剤及び/又はアジュバントと同時に投与されてもよい。ある実施態様では、付加的治療剤は、細胞障害性剤、化学療法剤又は増殖阻害性剤である。このよう

10

20

30

40

50

な実施態様のうちの一つでは、化学療法剤は、例えば、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン(オンコビンTM)、プレドニゾロン、CHOP、CVPないしはCOP、又は抗PSCA(例えば米国特許第6824780号参照)、抗VEGF(例えばアバスチン(登録商標)、ジェネンテック・インク)、抗HER2(例えば、ハーセプチニン(登録商標)、オムニターグTM、ジェネンテック・インク)、又は抗HER2とタキソール(登録商標)(例えば、BioWorld Today、1999年11月17日、1頁)の組み合わせなどの免疫治療法などの薬剤又は薬剤の組合せであって、この併用療法は、前立腺、肺及び/又は大腸の細胞増殖性疾患、癌及び/又は癌の転移の治療に有用である。

## 【0273】

10

上記の併用治療には、併用投与(2以上の治療剤が同じか又は別の製剤に包含される)、及び別々の投与、別々の場合には、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは付加的治療剤及び/又はアジュバントの前、同時及び/又はその後に投与することができる。また、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、放射線療法と組み合わせて使われてもよい。

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、非経口的、皮下、腹膜内、肺内、及び鼻腔内、そして、必要に応じて局所の治療のために、病巣内投与を含む任意の好適な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下的な投与を含む。加えて、抗体ないしイムノコンジュゲートを、特に抗体ないしイムノコンジュゲートの用量を減少して、パルス注入によって好適に投与する。投与が短期のものであるか長期のものであるかにある程度依存して、任意の好適な経路、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射によって投与することができる。

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、医学的実用性に合わせた様式で調製し、1回分に分けて、投与される。ここで考慮する要因は、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の運搬部位、投与の方法、投与の日程計画、及び医師が知る他の因子を含む。必要ではないが場合によっては、問題の疾患を予防するか又は治療するために一般に用いられる一つ以上の作用剤と抗体ないしイムノコンジュゲートとを調製する。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中の抗体ないしイムノコンジュゲートの量、疾患の型又は治療、及び上記の他の因子に依存する。これらは、一般的に、ここに記載されるものと同じ用量及び投与経路で、又はここに記載される用量の1~99%で、或いは経験的/臨床的に適切と判断される任意の用量及任意の投与経路で、用いられる。

## 【0274】

20

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートの好適な用量は(単独で用いる場合、又は化学療法剤などの一又は複数の他の付加的な治療剤と組み合わせて用いる場合)、治療する疾患のタイプ、抗体ないしイムノコンジュゲートのタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体ないしイムノコンジュゲートを予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体ないしイムノコンジュゲートへの応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。抗体ないしイムノコンジュゲートは一時的又は一連の治療にわたって適切に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約1μg/kg~100mg/kg(例えば0.1mg/kg~20mg/kg)の抗体ないしイムノコンジュゲートを、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量とすることができます。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約1μg/kg~100mg/kg以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、通常、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。抗体ないしイムノコンジュゲートの用量の例は、約0.05mg/kg~約10mg/kgの範囲であろう。ゆえに、約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg又は10mg/kgの抗体ないしイムノコンジュゲートの一以上の用量を(又はそれらを組み合わせて)患者に投与してもよい。このような用量は、間欠的に、例えば週ごと又は3週ごとに投与してもよい(例えば患者に約2~約20、例えば約6用量の抗体ないしイムノコンジュゲー

30

40

50

トが投与される)。初期のより高い負荷投与量の後、一以上のより低い用量を投与してもよい。例示的用量療法は、約 4 mg / kg の初期負荷投与量の後、約 2 mg / kg の毎週の維持用量抗体を投与することを含む。しかしながら、他の投与計画が有効かもしれない。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターすることができる。

#### 【 0 2 7 5 】

##### アッセイ

本発明の抗 S T E A P - 1 抗体及びイムノコンジュゲートは、当分野で公知の様々なアッセイによって、それらの物理的 / 化学的な性質及び / 又は生物活性について特徴付けされうる。

#### 【 0 2 7 6 】

##### 活性アッセイ

一態様では、アッセイは、生物学的な活性を有する抗 S T E A P - 1 抗体ないしそのイムノコンジュゲートを同定するために提供される。生物学的な活性には、例えば、細胞成長又は増殖の阻害能(例えば「細胞殺傷」活性)、又はプログラムされた細胞死(アポトーシス)を含む細胞死誘導能が含まれうる。また、インビポ及び / 又はインビトロでのこのような生物学的な活性を有する抗体ないしイムノコンジュゲートが提供される。

ある実施態様では、抗 S T E A P - 1 抗体又はそのイムノコンジュゲートは、インビトロでの細胞成長又は増殖を阻害する能力について試験される。細胞成長又は増殖の阻害のためのアッセイは当分野で周知である。本明細中に記載の「細胞殺傷」アッセイにて例示した細胞増殖のためのあるアッセイは、細胞生存度を測定する。このようなあるアッセイは、Promega (Madison, WI) から市販されている CellTiter-Glo<sup>TM</sup> 発光細胞生存率アッセイである。このアッセイは、代謝活性のある細胞の指標である A T P の存在の量に基づいて生細胞数を決定する。Crouch等 (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88、米国特許第 6 6 0 2 6 7 7 号を参照。アッセイは、自動ハイスループットスクリーニング (H T S) に用いられるように 96- 又は 3 8 4 - ウェルフォーマットで行ってもよい。Cree等 (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404 を参照。アッセイ手順は、単一の試薬 (CellTiter-Glo (登録商標) 試薬) を直接培養細胞に加えることを伴う。この結果細胞溶解が生じ、ルシフェラーゼ反応によって生産される発光シグナルが生成される。この発光シグナルは、培養物中に存在する生細胞の数に直接比例している、 A T P の存在の量に比例する。データは、ルミノメーター又は C C D カメラ画像デバイスによって記録することができる。発光の結果は相対的な光の単位 (R L U) として表す。

#### 【 0 2 7 7 】

細胞増殖についての他のアッセイは「 M T T 」アッセイであり、これは、ミトコンドリアレダクターゼによる 3 -(4 , 5 -ジメチルチアゾール-2 -イル)-2 , 5 -ジフェニルテトラゾリウムプロマイドのホルマザンへの酸化を測定する比色アッセイである。CellTiter-Glo<sup>TM</sup> アッセイのように、このアッセイは、細胞培養物に存在する代謝活性のある細胞の数を表す。例として Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63 及び Zhang 等 (2005) Cancer Res. 65: 3877-3882 を参照。

一態様では、抗 S T E A P - 1 抗体は、インビトロでの細胞死を誘導する能力について試験される。細胞死の誘導についてのアッセイは当分野で周知である。いくつかの実施態様では、このようなアッセイは、例えば、プロピジウムヨウ素 (P I) トリパンブルー (Moor 等 (1995) Cytotechnology, 17:1-11 を参照)、又は 7 A A D の取り込みによって示される膜統合性の喪失を測定する。例示的な P I 取り込みアッセイでは、細胞は、10 % の熱不活性化 F B S (Hyclone) と 2 m M の L - グルタミンを添加した、ダルベッコ変更イーグル培地 (D - M E M) : ハム F - 1 2 (5 0 : 5 0) 中で培養する。したがって、このアッセイは、補体と免疫エフェクター細胞の非存在下で行う。1 0 0 × 2 0 m m のディッシュにディッシュ当たり  $3 \times 10^6$  の密度で細胞を播き、終夜接着させる。培地を取り除き、新鮮な培地のみ、又は様々な濃度の抗体ないしイムノコンジュゲートを含む培地と交換する。細胞を 3 日間インキュベートする。処置後、単層を P B S にて洗浄し、トリプシン処理によって脱離させる。次いで、1 2 0 0 r p m で 4 で 5 分間遠心して、ペレットを 3 m l の

10

20

30

40

50

冷却  $\text{Ca}^{2+}$  結合バッファ(10 mM HEPES、pH 7.4、140 mM NaCl、2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ )に再懸濁し、細胞凝集塊を取り除くために35 mMのストレーナーを取り付けた12 × 75 mmチューブ(チューブ当たり1 ml、1処理群につき3チューブ)に分注する。次いで、チューブにPI(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を加える。試料は、FACSCAN<sup>TM</sup>フローサイトメーター及びFACSCONVERT<sup>TM</sup>CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)を用いて分析される。次いで、PI取り込みによって定まる統計学的に有意なレベルの細胞死を誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートを同定する。

#### 【0278】

一態様では、抗STEAP-1抗体ないしイムノコンジュゲートは、インビトロでのアポトーシス(プログラムされた細胞死)を誘導する能力について試験される。アポトーシスを誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートの例示的なアッセイはアネキシン結合アッセイである。例示的なアネキシン結合アッセイでは、細胞を培養し、前段落で述べたようにディッシュに播く。培地を取り除き、新鮮培地のみ、又は0.001~10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体ないしイムノコンジュゲートを含む培地と交換する。3日間のインキュベート後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理によって脱離させる。次いで、細胞を遠心して、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合バッファに再懸濁し、前段落で述べたようにチューブに分注する。その後、チューブに標識したアネキシン(例えばアネキシンV-FITC)(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を加える。試料は、FACSCAN<sup>TM</sup>フローサイトメーター及びFACSCONVERT<sup>TM</sup>CellQuestソフトウェア(BD Biosciences)を用いて分析される。次いで、コントロールと比べて統計学的に有意なレベルのアネキシン結合を誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートを同定する。アポトーシスを誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートの他の例示的なアッセイは、ゲノムDNAのヌクレオソーム間分解を検出するためのヒストンDNA ELSA比色アッセイである。このアッセイは、例えば細胞死検出ELISAキット(Roche, Palo Alto, CA)を用いて行うことができる。

上記いずれかのインビトロアッセイに用いるための細胞には、天然でSTEAP-1を発現する又はSTEAP-1を発現するように操作された細胞ないしは細胞株が含まれる。このような細胞には、同じ細胞起源の正常細胞と比べてSTEAP-1を過剰発現する腫瘍細胞が含まれる。また、このような細胞には、STEAP-1を発現する細胞株(腫瘍細胞株を含む)や、正常にSTEAP-1を発現しないがSTEAP-1をコードする核酸を形質移入してある細胞株が含まれる。

#### 【0279】

一態様では、抗STEAP-1抗体ないしそのイムノコンジュゲートは、インビオでの細胞成長又は増殖を阻害する能力について試験される。ある実施態様では、抗STEAP-1抗体ないしそのイムノコンジュゲートは、インビオでの腫瘍成長を阻害する能力について試験される。異種移植片モデルなどのインビオモデルシステムが前記の試験のために用いられる。例示的な異種移植片システムでは、好適に免疫を低下させた非ヒト動物、例えばSCIDマウスにヒト腫瘍細胞が導入される。本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは動物に投与される。抗体ないしイムノコンジュゲートの腫瘍成長を阻害するか又は減少させる能力が測定される。上記の異種移植片システムのある実施態様では、ヒト腫瘍細胞はヒト患者の腫瘍細胞である。このような異種移植片モデルを調製するために有用な細胞には、ヒトの前立腺、肺、又は大腸の腫瘍細胞株が含まれ、これには、限定されるものではないが、外来性のSTEAP-1を発現するPC3細胞と、天然にSTEAP-1を発現する細胞が含まれ、天然にSTEAP-1を発現する細胞には、限定されるものではないが、LnCAP細胞(Southern Research Institute、アラバマ州バーミンガム)、LuCAP 77細胞、及びLuCAP 35V細胞(ワシントン大学、ワシントン州シアトル)が含まれる。ある実施態様では、皮下投与や、哺乳動物の脂肪体などの好適な部位に移植することによって好適に免疫を低下させた非ヒト動物にヒト腫瘍細胞を導入する。

#### 【0280】

10

20

30

40

50

### 結合アッセイ及び他のアッセイ

一態様では、抗S T E A P - 1抗体はその抗原結合活性について試験される。例えば、ある実施態様では、抗S T E A P - 1抗体は、細胞の表面に発現される外来性又は内在性のS T E A P - 1に結合する能力について試験される。F A C Sアッセイが前記の試験に用いられてもよい。

一態様では、競合アッセイを用いて、S T E A P - 1への結合について、120v. 24抗体を含むがこれに限定されない、120グラフト又はそのヒト化変異体と競合するモノクローナル抗体を同定してもよい。ある実施態様では、前記の競争する抗体は、変異1220v. 24ヒト化抗S T E A P - 1抗体を含む、120グラフト抗体、又はヒト化120グラフト抗体が結合する同じエピトープ(例えば線形エピトープペプチド又は細胞表面上のS T E A P 1の発現により形成される立体のエピトープ)に結合する。例示的な競合アッセイには、限定するものではないが、Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)に挙げられるものなどの常套的アッセイが含まれる。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法は、*Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)のMorris (1996) "Epitope Mapping Protocols,"に示される。2つの抗体のそれが50%以上他の結合をブロックする場合、これらの抗体は同じエピトープに結合すると言える。

#### 【0281】

例示的な競合アッセイでは、固定されたS T E A P - 1は、S T E A P - 1に結合する第一標識抗体(例えばマウス120.545抗体、120グラフト抗体、又はヒト化120v. 24抗体)と、S T E A P - 1への結合について第一抗体と競合する能力について試験されている第二非標識抗体とを含む溶液中でインキュベートされる。二次抗体はハイブリドーマ上清に存在してもよい。コントロールとして、固定したS T E A P - 1を第一標識抗体を含むが第二非標識抗体は含まない溶液中でインキュベートする。S T E A P - 1への第一抗体の結合に許容される条件下でのインキュベートの後、過剰な結合していない抗体を取り除き、固定されたS T E A P - 1と結合している標識の量を測定する。固定されたS T E A P - 1と結合している標識の量がコントロール試料と比較して試験試料において実質的に減少している場合、二次抗体がS T E A P - 1への結合について第一抗体と競合していることが示唆される。ある実施態様では、固定されたS T E A P - 1は、細胞の表面上に、又はその表面上にS T E A P - 1を発現する細胞から得た膜調製物中に存在する。

一態様では、精製した抗S T E A P - 1抗体はさらに、限定するものではないが、N末端配列決定法、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィ(H P L C)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィ及びパパイン消化を含む、一連のアッセイによって特徴付けることができる。

#### 【0282】

一実施態様では、本発明は、全てではないが幾つかのエフェクター機能を有する変更された抗体を考慮し、この抗体は、抗体のインビボ半減期が重要であり、更に特定のエフェクター機能(補体又はA D C Cなど)が不要又は有害である多くの用途の好ましい候補となる。特定の実施態様では、抗体のF c活性を測定して、所望の特性だけが維持されていることを確認する。インビボ及び/又はインビトロ細胞障害アッセイを行って、C D C及び/又はA D C C活性の減少/枯渇を確認することができる。例えば、F c レセプター(F c R)結合アッセイを行って、抗体がF c R結合を欠損している(すなわちA D C C活性を欠損していると思われる)が、F c R n結合能は維持していることを確認することができる。A D C Cを仲介する第一細胞であるN K細胞は、F c R IIIのみを発現し、その一方で単核細胞はF c R I, F c R II及びF c R IIIを発現する。造血系細胞でのF c R発現については、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象とする分子のA D C C活性を評価するためのインビトロアッセイの一例は、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されてい

10

20

30

40

50

る。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞( P B M C )及びナチュラルキラー( N K )細胞が含まれる。あるいは、又は加えて、対象とする分子の A D C C 活性は、例えばClynes 等のPNAS ( USA ) 95:652-656 ( 1998 )に開示されているような動物モデルにおいてインビボに評価することができる。また、 C 1 q 結合アッセイを行って、抗体が C 1 q に結合できない、つまり C D C 活性を欠損していることを確認してもよい。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202 :163 ( 1996 )に記載のように、 C D C アッセイを行ってもよい。また、 F c R n 結合及びインビボクリアランス / 半減期測定を、当分野で公知の方法を用いて行うことができる。

【実施例】

【 0 2 8 3 】

以下は本発明の方法及び組成物の例である。前述の一般的な記載から、様々な他の実施態様が実施されうることが理解されるであろう。

【 0 2 8 4 】

実施例 1 : ヒト化抗 S T E A P - 1 抗体の調製

抗体、抗体断片、 V L ドメイン又は V H ドメインのアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子を、当分野で公知の様々な方法によって調製する。これらの方法には、限定するものではないが、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又は初期に調製された抗体、抗体断片、 V L ドメイン又は V H ドメインの変異体ないしは非変異体の、オリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、 P C R 突然変異誘発、及びカセツト突然変異誘発による調製が含まれる。例えば、キュンケル法を用いた変異アミノ酸を有するアミノ酸置換のために、 V H 内、場合によって一又は複数の C D R 内の V L の利用可能なアミノ酸位置をターゲットとすることによってライプラリを作製することができる。例えば、Kunkel等, Methods Enzymol. ( 1987 ), 154:367-382及び本明細書中の実施例を参考のこと。また、ランダム化配列の生成も以下の実施例に記載する。

【 0 2 8 5 】

オリゴヌクレオチド配列は、本発明のポリペプチドの C D R ( H V R )又は F R 領域の特定の位置に対して設定されたコドンセットの一又は複数を含む。コドンセットは所望の変異体アミノ酸をコードするのに用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列である。コドンセットは、 I U B コードによって下で示すように、特定のヌクレオチド又はヌクレオチドの等モル混合物を示すために符号を使って表される。

I U B コード

G ゲアニン

A アデニン

T チミン

C シトシン

R ( A 又は G )

Y ( C 又は T )

M ( A 又は C )

K ( G 又は T )

S ( C 又は G )

W ( A 又は T )

H ( A 又は C 又は T )

B ( C 又は G 又は T )

V ( A 又は C 又は G )

D ( A 又は G 又は T ) H

N ( A 又は C 又は G 又は T )

【 0 2 8 6 】

例えば、コドンセット D V K では、 D はヌクレオチド A 又は G 又は T であり、 V は A 又は G 又は C であり、 K は G 又は T である。このコドンセットは 18 個の異なるコドンを表し、アミノ酸 A l a 、 T r p 、 T y r 、 L y s 、 T h r 、 A s n 、 L y s 、 S e r 、 A r

10

20

30

40

50

g、A s p、G l u、G l y 及びC y sをコードすることができる。

オリゴヌクレオチド又はプライマーのセットは、標準の方法を使って合成できる。一組のオリゴヌクレオチドは、例えば、コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットの可能な組合せのすべてを代表し、所望のアミノ酸群をコードする配列を含む固相法によって合成することができる。ある位置での選ばれたヌクレオチド「縮退」を有するオリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で公知である。そのようなある種のコドンセットを有しているヌクレオチドのセットは、市販の核酸シンセサイザー (Applied Biosystems, Foster City, CAなどから入手可能) を使って合成することができ、又は市販品を入手することができる(例えば、Life Technologies, Rockville, MDから)。したがって、特定のコドンセットを有する合成オリゴヌクレオチドセットは、一般的に異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドを含み、この相違は配列全体の中のコドンセットによるものである。本発明で使用されるように、オリゴヌクレオチドは可変ドメイン核酸鑄型へのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、また、クローニングに役立つ制限酵素部位を含むこともできる。

#### 【0287】

1つの方法では、変異体アミノ酸をコードする核酸配列は、オリゴヌクレオチドが媒介する突然変異誘発によって作製することができる。この手法はZoller等, Nucleic Acids Res. 10:6487-6504頁(1987)が記載しているように、当技術分野で公知である。つまり、変異体アミノ酸をコードしている核酸配列は所望のコドンセットをコードしているオリゴヌクレオチドセットをDNA鑄型とハイブリダイズすることによって作製され、前記鑄型は可変部核酸鑄型配列を含むプラスミドの一本鎖型である。ハイブリダイゼーションの後、DNAポリメラーゼを用いて鑄型の二次相補鎖すべてを合成し、この相補鎖はオリゴヌクレオチドプライマーを取り込み、前記オリゴヌクレオチドセットによって提供されるコドンセットを含むようになる。

通常、長さが少なくとも25ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドが使われる。最適オリゴヌクレオチドは、突然変異体をコードするヌクレオチドの両側が鑄型と完全に相補性である12から15個のヌクレオチドを持つ。これにより、オリゴヌクレオチドが正しく一本鎖DNA鑄型分子にハイブリダイズするようになる。オリゴヌクレオチドは、当技術分野で公知の手法、例えばCrea等, Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA, 75:5765頁(1978)に記載の手法を使って容易に合成される。

#### 【0288】

DNA鑄型はバクテリオファージM13ベクター(市販のM13mp18及びM13mp19ベクターが適当)に由来するベクター、又はViera等, Meth. Enzymol. 153:3頁(1987)に記載されている一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成される。このように、突然変異させるべきDNAは、一本鎖鑄型を生成するためにこれらのベクターの1つに挿入することができる。一本鎖鑄型の生産は、上掲Sambrook等のセクション4.21~4.41で記載されている。

天然のDNA配列を変えるために、オリゴヌクレオチドが適当なハイブリダイゼーション条件の下で一本鎖鑄型にハイブリダイズされる。DNA重合酵素、通常、T7DNAポリメラーゼ又はDNAポリメラーゼIのクレノー断片を次に加え、合成のためのプライマーとしてオリゴヌクレオチドを使って鑄型の相補鎖を合成する。こうしてDNAの1つの鎖は遺伝子1の突然変異した形態をコードし、他の鎖(元の鑄型)は遺伝子1の未変性、未変更の配列をコードするようにヘテロ二本鎖分子が形成される。このヘテロ二本鎖分子は、次に適当な宿主細胞、通常大腸菌JM101のような原核生物に形質転換される。細胞を増殖させた後にアガロースプレートの上へプレートし、突然変異したDNAを含む細菌コロニーを同定するために32リン酸塩で放射性標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを使ってスクリーニングする。

#### 【0289】

上記の方法は、プラスミドの両方の鎖が突然変異を含むホモ二本鎖分子が作製されるように修正することができる。この修正は以下の通りである。一本鎖オリゴヌクレオチドを

先に述べたように一本鎖型にアニールする。3つのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン(dATP)、デオキシリボグアノシン(dGTP)及びデオキシリボチミジン(dTTP)の混合物を、dCTP-(aS)と呼ばれる修飾されたチオデオキシリボシトシン(Amershamから入手できる)と合わせる。この混合物を錆型-オリゴヌクレオチド複合体に加える。DNAポリメラーゼをこの混合物へ追加すると、突然変異した塩基以外は錆型と同一のDNA鎖が生成する。さらに、この新しいDNA鎖はdCTPの代わりにdCTP-(aS)を含み、これはDNA鎖を制限酵素による消化作用から保護するのに役立つ。二本鎖へテロ二本鎖の錆型鎖に適当な制限酵素でニックを入れた後、突然変異を起こさせる部位を含む領域の後方で錆型鎖はExoIIIヌクレアーゼ又は適当な他のヌクレアーゼで消化することができる。反応を終了すると、部分的にだけ一本鎖の分子が残る。次に、完全な二本鎖DNA亦モニ本鎖が、4つのデオキシリボヌクレオチド三磷酸のすべて、ATP及びDNAリガーゼの存在下でDNAポリメラーゼを使って形成される。このヘテロ二本鎖分子は、次に適当な宿主細胞に形質転換することができる。

前に示したように、オリゴヌクレオチドセットの配列の長さは錆型核酸にハイブリダイズするために十分な長さであり、また、必須ではないが制限部位を含むこともできる。DNA錆型はバクテリオファージM13ベクターに由来するベクター、又はViera等((1987), Meth. Enzymol. 153:3頁)に記載されている一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成される。このように、突然変異させるべきDNAは、一本鎖錆型を生成するためにこれらのベクターの1つに挿入する必要がある。一本鎖錆型の生産は、上掲Sambrook等のセクション4.21~4.41で記載されている。

#### 【0290】

他の方法によると、ライプラリーは上流及び下流のオリゴヌクレオチドセットを提供することによって生成することができ、各セットは、オリゴヌクレオチドの配列内で提供されたコドンセットによって確立された異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを持つ。上流及び下流のオリゴヌクレオチドセットは、可変ドメイン錆型核酸配列と共に、PCR産物の「ライプラリー」を作製するためにPCR法で使うことができる。PCR産物は確立された分子生物学的手法を使って他の関連した、又は無関係な核酸配列、例えばウイルスのコートタンパク質構成成分及び二量体化ドメインと融合することができるので、「核酸力セット」と呼ぶこともある。

オリゴヌクレオチドセットは、核酸力セットを作製するための錆型として可変ドメイン核酸錆型配列を使ってPCR法で使うことができる。可変ドメイン核酸錆型配列は、対象核酸配列(すなわち、置換の対象となるアミノ酸をコードしている核酸配列)を含む免疫グロブリンの軽鎖又は重鎖のいかなる部分でもよい。可変ドメイン核酸錆型配列は、第1の核酸鎖及び相補性の第2の核酸鎖を有する二本鎖DNA分子の一部である。可変ドメイン核酸錆型配列は、少なくとも可変ドメインの一部を含み、また少なくとも1つのCDRを持つ。場合によっては、可変ドメイン核酸錆型配列は複数のCDRを含む。可変ドメイン核酸錆型配列の上流部及び下流部は、上流域のオリゴヌクレオチドセット及び下流域のオリゴヌクレオチドセットの構成メンバーによるハイブリダイゼーションの対象とすることができます。

#### 【0291】

上流のプライマーセットの第1のオリゴヌクレオチドは第1の核酸鎖にハイブリダイズすることができ、下流のプライマーセットの第2のオリゴヌクレオチドは第2の核酸鎖にハイブリダイズすることができる。オリゴヌクレオチドプライマーは1つ又は複数のコドンセットを含むことができ、可変部核酸錆型配列の一部にハイブリダイズするように設計することができる。これらのオリゴヌクレオチドの使用により、PCR後に2つ以上のコドンセットをPCR産物(すなわち核酸力セット)に導入することができる。抗体可変ドメインをコードしている核酸配列の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーは、アミノ酸置換の対象となるCDR残基をコードする部分を含む。

上流域及び下流域のオリゴヌクレオチドセットは、オリゴヌクレオチド配列内に制限部

10

20

30

40

50

位を含むように合成することもできる。これらの制限部位は、さらなる抗体配列を有している発現ベクターへの核酸カセット（すなわち P C R 反応生成物）の挿入を容易にする。一実施態様では、制限部位は外来の核酸配列を導入することなく、又は元の C D R 又はフレームワーク核酸配列を取り除くことなく核酸カセットのクローニングを容易にするようになっている。

【 0 2 9 2 】

核酸カセットは、 P C R 反応によって作製した対象アミノ酸置換を含む軽鎖又は重鎖の配列の一部又はすべての発現のために、いかなる適当なベクターにもクローニングすることができる。本発明で詳述される方法によると、核酸カセットはウイルスコートタンパク質のすべて又は一部と融合した軽鎖又は重鎖配列の一部又はすべて（すなわち、融合タンパク質を形成）の生産を可能にしているベクターにクローニングされるか、あるいは、粒子又は細胞の表面で提示される。数種類のベクターが入手でき、それらは本発明の実施に用いることができるが、ファージミドベクターが本明細書での使用には好ましいベクターであり、その訳はそれらが相対的に容易に構築し、また容易に増幅することができるからである。当業者に公知のように、ファージミドベクターは、通常、プロモーター、シグナル配列、表現型選択遺伝子、複製起点部位及び他の必要な構成成分を含む様々な構成成分を含む。

特定の変異体アミノ酸の組合せが発現される場合、核酸カセットは、重鎖又は軽鎖の可変ドメインのすべて又は一部をコードすることができ、また変異体アミノ酸の組合せをコードすることができる配列を含む。ライブラリーの場合のようにこれらの変異体アミノ酸又は変異体アミノ酸の組合せを含んでいる抗体の作製のために、核酸カセットは、さらなる抗体配列、例えば軽鎖及び重鎖可変部の可変又は定常ドメインのすべて又は一部を含んでいる発現ベクターに挿入することができる。これらのさらなる抗体配列は他の核酸配列、例えばウイルスコートタンパク質をコードする配列と融合することができ、したがって融合タンパク質の生産を可能にする。

ここでは、マウス抗ヒト S T E A P - 1 抗体のヒト化について記載する。

【 0 2 9 3 】

材料と方法

残基番号はカバットに従う(Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。一文字アミノ酸略記号を用いる。DNA 縮重は I U B コードを用いて表す(N = A / C / G / T、D = A / G / T、V = A / C / G、B = C / G / T、H = A / C / T、= G / T K、M = A / C、R = A / G、S = G / C、W = A / T、= C / T Y)。

【 0 2 9 4 】

マウス 1 2 0 可変ドメインのクローニングとキメラ 1 2 0 抗体の生成 -

標準的な方法を用いて、M 2 - 1 2 0 . 5 4 5 を產生するハイブリドーマ細胞(本明細書において「マウス 1 2 0 」又は「m u 1 2 0 」と称する)から総 R N A を抽出した。可変軽鎖(V L)および可変重鎖(V H)ドメインを、重鎖および軽鎖に対する変性プライマーによる R T - P C R を用いて増幅した。フォワードプライマーは、V L および V H の領域の N 末端アミノ酸配列に特異的とした。それぞれ L C および H C のリバースプライマーは、種間で高度に保存されている定常軽鎖(C L)および定常重鎖ドメイン 1(C H 1)の領域にアニールするように設定した。増幅された V L および V H は、哺乳動物発現ベクタにクローンをつくられた。インサートのポリヌクレオチド配列は、慣例的な配列決定法を用いて決定した。M 2 - 1 2 0 . 5 4 5(「m u 1 2 0 」) V L および V H のアミノ酸配列はそれぞれ図 2 A および 2 B に示す。

マウス 1 2 0 キメラの生成 - ヒト I g G の定常ドメインに、マウス 1 2 0 の可変重鎖(V H)及び可変軽鎖(V L)の領域を融合させることによって、キメラ抗 S T E A P - 1 を調製した。結果として生じる抗体を本明細書において「 1 2 0 キメラ」、「キメラ 1 2 0 」、「キメラ 1 2 0 I g G」又は「 F c キメラ」と称する。

10

20

30

40

50

## 【0295】

アクセプターヒトコンセンサスフレームワークへの直接高頻度可変領域移植 -

マウス120のヒト化の間に構築された変異体を、IgGの形態のタンパク質として又はファージ上にディスプレイされるFabとして評価した。

この試験に用いるファジミドは、一価性Fab-g3ディスプレイベクターであって、phoAプロモーターの制御下にある2つのオープンリーディングフレームからなる。第一オープンリーディングフレームは、アクセプター軽鎖のVL及びCH1ドメインに融合したstIISignal配列からなり、第二オープンリーディングフレームは、微量ファージコートタンパク質P3が続くアクセプター重鎖のVH及びCH1ドメインに融合したstIISignal配列からなる。

マウス120のVLおよびVHドメインを、ヒトVL(I(huKI)およびヒトVHサブグループIIII(huIII)コンセンサス配列と配列比較した。CDRグラフトを作製するために、マウス120抗体の高頻度可変領域を、huKIおよびhuIIIアクセプターフレームワークに移植した。

## 【0296】

マウス120抗体(mu120)の高頻度可変領域をアクセプターヒトコンセンサスフレームワークに操作して、直接CDR-グラフト(本明細書中において「120グラフト」又は「グラフト120」)を生成した。VLドメインでは、以下の領域をヒトコンセンサスアクセプターに移植した:位置24-34(L1)、50-56(L2)および89-97(L3)。VHドメインでは、位置26-35a(H1)、49-65(H2)および95-102(H3)を融合した。120グラフトの軽鎖および重鎖の可変領域の配列を図2A-2Bに示す。CDR(本明細書中ではHVRとも称される)は囲みで示す(図2A-2B)。これらCDR定義には、それら配列の超可変性(カバット参照)、それらの構造的位置(Chothia参照)および抗原-抗体接触への関与によって決定される位置が含まれる(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))。

ファージ上にディスプレイされるFabとして又はIgGとして発現される直接グラフト変異体は、各々の高頻度可変領域のために異なるオリゴヌクレオチドを用いたキュンケル突然変異誘発によって生成した。DNA塩基配列決定法によって正しいクローンを評価した。

## 【0297】

ヒト化120ファージ変異体の生成 -

キュンケル突然変異誘発によってファージにディスプレイされるFabとして、ヒト化120変異体を生成した。リン酸化オリゴヌクレオチドを、50mM Tris pH7.5、10mM MgCl<sub>2</sub>中の300ngのキュンケルテンプレートに添加して、終体積を10μlにした。混合物を90℃で2分、50℃で5分アニールさせ、次いで氷上で冷ました。次いで、アニールさせたテンプレートに、0.5μlの10mM ATP、0.5μlの10mM dNTP(各々10mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP)、1μlの100mM DTT、1μlの10×TMバッファ(0.5MトリスpH7.5、0.1M MgCl<sub>2</sub>)、80UのT4リガーゼ、及び4UのT7ポリメラーゼを添加して充填し、総量20μlにし、室温に2時間置いた。次いで充填してライゲートさせた生成物にてXL1-ブルー細胞(Stratagene)を形質転換した。DNA塩基配列決定法によって正しいクローンを同定した。

正しいファージクローンを50μg/mlのカルベニシリン及びM13/KO7ヘルバーファージ(MOI 10)を含む25mlの2YT中で37℃で終夜生育させた。

## 【0298】

ヒト化120変異体の評価 -

IgGとして発現されるヒト化変異体を、Step1ポジティブ(293Step1NTLB50)及びネガティブ(293ベクターS408)細胞株を用いたFACS分析によって評価した。

また、ファージにディスプレイされるFabとして発現されるヒト化変異体を、FAC

10

20

30

40

50

S分析によって評価した。まずF a b変異体を発現するファージを、F a bの軽鎖に融合されるf 1 a g - t a gを検出するために使用するファージE L I S Aを用いてそれらのF a bディスプレイレベルについて評価した。MaxiSorpマイクロタイタープレートを、PBS中10 μg / mlの抗g D 1 7 6 6にて終夜をかけてコートし、その後カゼインプロッカーにてブロックした。培養物上清からのファージを、組織培養マイクロタイタープレート中で0.5%BSAを含むPBSにて段階的に希釈し、コートしたウェルに移し、1時間おいて、F a bディスプレイファージを捕獲した。PBSにてプレートを洗浄し、HRPコンジュゲート抗M 1 3 (Amersham Pharmacia Biotech)を添加して40分間置いた(0.5%BSAを含むPBSに1:5000)。PBSにてプレートを洗浄し、テトラメチルベンジン基質(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)を添加して反応させた。405 nmの吸光度を、ファージの表面上のF a bディスプレイレベルの推量として用いた。ファージ調製物を、希釈によってディスプレイについて正規化した。低ディスプレイファージ(例えばキメラ)をF A C S分析のために適切に用いた。

#### 【0299】

ファージ結合のF A C S分析のために、細胞を、2 mM EDTAを用いてプレートから取り出し、15 mlの円錐形底のチューブに回収し、遠心分離法によってペレット化した。細胞(1試料につき5 × 10<sup>5</sup>細胞)は、F A C Sバッファ(2 mM EDTAを含む1%FBS、PBS)中の100 μlのファージ(ディスプレイレベルによって正規化したもの)に再懸濁し、氷上で1~2時間インキュベートした。遠心分離法によって試料をF A C Sバッファにて2回洗浄した。2 μg / mlの抗M 1 3 5 G 7コントロール抗体(Genentech, Inc. South San Francisco, CA)を加え、少なくとも45分間氷上でインキュベートした。遠心分離法によって試料をF A C Sバッファにて2回洗浄した。抗マウスPE(R-フィコエリトリンヤギ抗マウスIgG Fcγ断片、Jackson Immunoresearch)の1:200希釈物を加え、氷上で30分間インキュベートした。遠心分離法によって試料をF A C Sバッファにて再度2回洗浄し、F A C Sにて分析した。

F A C SによるIgGの分析のために、ファージF A C Sなどの目的で細胞を調製した。5 μg / mlの各IgGを加え、氷上に1時間おいた。遠心分離法によって試料をF A C Sバッファにて2回洗浄し、抗ヒトPEコンジュゲート(R-フィコエリトリンヤギ抗ヒトIgG Fcγ断片、Jackson Immunoresearch)の1:200希釈物を加え、30分間おいた。遠心分離法によって試料をF A C Sバッファにて再度2回洗浄し、F A C Sにて分析した。

#### 【0300】

##### IgG産生および親和性測定 -

プロテインG親和性クロマトグラフィにてIgGを精製した。親和性測定は、293 STEAP-1 NT LB 50細胞上のスキヤッチャード分析によって行った。

#### 【0301】

##### 結果と考察

##### マウス120可変ドメイン配列およびCDRアサインメントグラフト設定 -

M 2 - 1 2 0 . 5 4 5 のヒト化のために用いるヒトアクセプターフレームワークは、コンセンサスヒト I V L ドメインおよびヒトサブグループI I I コンセンサスV H ドメインに基づく。マウスM 2 - 1 2 0 . 5 4 5 のV LおよびV H ドメインを、ヒト I およびサブグループI I I ドメインとそれぞれ配列比較した。各々の相補性領域(C D R)を同定し、ヒトアクセプターフレームワークに移植して、ファージ上のF a bとしてディスプレイされ、IgGとして発現されうるCDRグラフトを生成した。ヒト化抗STEAP-1抗体バージョン24可変領域の配列を図2Aおよび2Bに示す。ファージ上にディスプレイされる120-グラフトF a b及び120-グラフトIgGを、F A C S分析によって外因性STEAP-1発現細胞(293 STEAP-1 NT LB 50)への結合について試験した。120-グラフトIgGはSTEAP-1発現細胞に特異的に結合したが、120-グラフトIgGについて観察されるF A C Sシグナルは、結合親和性に欠損を示すキメ

10

20

30

40

50

ラ 1 2 0 Ig Gについて観察されるシグナルよりも小さかった。また、1 2 0 - グラフト Ig Gをディスプレイするファージは、S T E A P - 1 発現細胞上でのみ観察されたF A C Sシグナルを生成した。この変化は、キメラ1 2 0 Ig Gについて観察される変化よりも小さかった。1 2 0 - グラフト Ig Gのスキャッチャード分析からも、結合親和性の有意な(およそ50倍)欠失が示された(1 2 0 v . 7 8 についてはK D = 3 6 n M、1 2 0 グラフトについてはK D = 2 6 0 n M)。

### 【0302】

#### M 2 - 1 2 0 . 5 4 5 のヒト化 -

C D R構造及びV L : V Hドメインパッキングに影響するおよそ30バーニヤ位置が同定されており、抗体のヒト化の際にはドナーとヒトフレームワーク間の位置での変化を考慮しなくてはならない(Foote, J. and Winter, G., J. Mol. Biol.224(2): 487-499 (1992))。マウスM 2 - 1 2 0 . 5 4 5とコンセンサスヒト I V Lドメイン及びヒトサブグループII I IコンセンサスV Hドメインとの配列比較を評価すると、V Hドメイン内の6つの重要なバーニヤ位置: 2 4、3 7、4 8、6 7、7 3、7 8での配列相違が明らかとなつた(図2Bを参照)。これらの位置の影響を評価するために、マウスの残基を、ファージ上のF a bのヒトコンセンサスサブグループII I V Hドメインに、別々に導入した。ファージ上にディスプレイされる1 2 0 - グラフトF a bに対して以下の突然変異をそれぞれ行った: A 2 4 V(1 2 0 . v 2 4)、V 3 7 I(1 2 0 . v 3 7)、V 4 8 M(1 2 0 . v 4 8)、F 6 7 I(1 2 0 . v 6 7)およびL 7 8 F(1 2 0 . v 7 8)。N 7 3 Tは試験しなかつた。各ファージ変異体は、ファージ上にディスプレイされる軽鎖に融合されるエピトープタグの力価によって決定される等量F a bディスプレイレベルに対して希釈により正規化し、S T E A P - 1 発現細胞(2 9 3 S T E A P - 1 N T L B 5 0)及び非発現(2 9 3ベクターS 4 0 8)細胞のF A C S分析によってS T E A P - 1への結合について評価した。「2°」なる用語はF A C S分析の二次抗体を指す。「- 1 2 0」なる用語はマウス1 2 0抗S T E A P - 1抗体を指す。「- 1 0 H 1」なる用語はコントロール抗体を指す。「2 4 ファージ」、「3 7 ファージ」などの用語は、ファージにディスプレイされる本明細書において開示されるヒト化抗S T E A P - 1変異体を指す。「C h 1 2 0 ファージ」はファージ上にディスプレイされる1 2 0キメラを指し、「1 2 0 . グラフトファージ」はファージにディスプレイされる1 2 0グラフトを指す。(図6)。これらのF a bディスプレイレベルによる正規化したファージクローンの重要性は、異なるファージ力価(図6の $7 \times 1 0^{12}$ ファージ / m l および図6の $2 \times 1 0^{11}$ ファージ / m l)の1 2 0 - グラフトのF A C S分析により例証される。いったん低いファージ濃度に希釈すると、1 2 0 - グラフトファージは観察可能なF A C S変化を示さない。したがって、これらディスプレイレベルの異なるファージクローンの正規化は、S t e a p 1についてのそれらの親和性相違を評価するための重要な処置であった。

### 【0303】

F a bディスプレイレベルについての正規化の後、更なる突然変異A 2 4 Vを含む1 2 0 - グラフト(1 2 0 . v 2 4)の変異体は他の変異体を上回るF A C S変化を示した(図6)。I g Gとして発現される場合、1 2 0 . v 2 4は試験されるすべての濃度のキメラ1 2 0抗体に類似のF A C S変化を示した。1 2 0 . v 2 4の続くスキャッチャード分析では、2 9 3 S T E A P - 1 N T L B 5 0細胞への結合について2 . 2 n MのK dが示され、1 2 0キメラ及び原型のマウスM 2 - 1 2 0 . 5 4 5の2倍の改善を示した(表2)。表2:細胞表面S T E A P - 1に対する抗S T E A P - 1抗体結合親和性(K d(n M))

10

20

30

40

細胞株	マウス抗-STEAP-1 MAb 120.545 nM	120 キメラ	ヒト化抗-STEAP-1 120v.24
PC3-PS5.4 (外因性 STEAP-1)	17.5 nM 187,256 部位／細胞	9.9 nM 103,204 部位／細胞	---
293.LB50 (外因性 STEAP-1)	4.7 nM 301,100 部位／細胞	4.9 nM 252,892 部位／細胞	2.2 nM 264,172 部位／細胞
LNCaP-BR (外因性 STEAP-1)	1.5 nM 37,207 部位／細胞	0.9 nM 22,021 部位／細胞	---

抗STEAP-1ネイキッド抗体、マウス120およびキメラ120の結合活性も、FACS分析を用いて試験した。結合は、293安定性STEAP-1NT LB50、P C3安定性STEAP-1PS5.4における外因性STEAP-1、およびLNCaP細胞における内因性STEAP-1について比較した。図7D-Fに結果を示す。細胞表面上に外因性ヒトSTEAP-1を発現するNT LB50細胞は、ヒトSTEAP-1DNAにより安定して293細胞(ATCC CRL-1573)を形質転換することによって調製した。細胞表面上に外因性ヒトSTEAP-1を発現するPS5.4細胞は、ヒトSTEAP-1DNAにより安定してPC3(ATCC CRL-1435)を形質転換することによって調製した。LNCaP細胞(ATCC CRL-1740)は内因的にSTEAP-1を発現する。

#### 【0304】

##### 実施例2：抗STEAP-1抗体の特徴づけ

抗STEAP-1抗体(本明細書において開示されるネイキッド抗体および抗体薬剤コンジュゲート)を特徴付けた、または、標準的な方法によって特徴付けてもよい。

ELISAに基づくアッセイ：ELISAによる抗STEAP-1抗体のスクリーニングを以下のように行い、すべて室温でインキュベートする。試験プレート(Nunc Immunoplate)を、精製したSTEAP-1を含む50 mM炭酸ナトリウムバッファ pH 9.6にて2時間かけてコートし、その後、0.5%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて30分間かけてブロックし、その後0.05%ツイーン20を含むPBS(PBST)にて4回洗浄する。試験抗体上清を加え、振とうしながら2時間インキュベートし、その後PBSTにて4回洗浄する。25 mlのリン酸クエン酸バッファ、pH 5.0中に10 mgのo-フェニレンジアミンジヒドロクロライド(Sigma, #P8287)と10 μlの30%過酸化水素溶液を含む溶液を100 μl/ウェル添加して15分間インキュベートしてプレートを反応させる。2.5 M硫酸を100 μl/ウェル添加して反応を止める。自動ELISAプレート読み取り機にてプレートの490 nmの吸光度を読み取ってデータを得る。

#### 【0305】

##### スキヤッチャード分析による抗STEAP-1結合の特徴づけ：

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、関連分野において公知の標準的な技術を用いて、Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)において記述されるスキヤッチャード分析によって決定されうる。またScatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660 (1947)も参照のこと。

#### 【0306】

##### 実施例3：抗-STEAP-1抗体薬剤コンジュゲートの產生

抗STEAP-1アウリスタチンADCの產生 - 抗STEAP-1抗体マウス120.545、120キメラ、120グラフト、及びヒト化120フレームワーク変異体を以下の薬剤リンカー成分：spp-DM1、smcc-DM1、MC-vc-PAB-MMAE；MC-vc-PAB-MMAF；MC-MMAE、MC-MMAF、vc-MMAEおよびvc-MMAFにコンジュゲートさせることによって抗STEAP-1ADCを生成した。この薬剤とリンカー成分及び接着方法は、本明細書中、並びに2004年2月5日に公開の国際公開2004/010957、2005年9月9日公開の国際公開2006/034488、及びDoronina, S.O. et al., Nature Biotechnol. 21:778-784 (2003

10

20

30

40

50

)において開示されている(これらの文献は出典明記によってその全体が援用される)。国際公開2004/010957に記載の方法論に従って標準的な方法を用いて、結合の前に、抗体をTCEPにて部分的に還元した。Doronina et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784および米国公開特許2005/0238649A1に記載の方法論に従って標準的な方法を用いて、部分的に還元した抗体を上記の薬剤-リンカー成分にコンジュゲートした。簡単に言うと、部分的に還元した抗体を薬剤リンカー成分と組み合わせて、該成分をシステイン残基にコンジュゲートさせた。コンジュゲート反応を止め、ADCを精製した。各々のADCについての薬剤負荷(抗体当たりの薬剤成分の平均数)をHPLCにて測定した。本明細書中で用いる、ADCのリンカー-薬剤構成成分である「-MC-vc-PAB-MMAE」又は「-MC-vc-PAB-MMAF」は「-vcMMAE」又は「-vcMMAF」と略されることもあり、構成成分である「-MC-MMAF」は「MCMMAF」又は「mcMMAF」と略されることもある。  
10

抗STEAP-1メイタンシノイドADCの產生-抗STEAP-1抗体、マウス120、120キメラ、120グラフト及びヒト化120フレームワーク変異体をリンカー-薬剤成分-smcc-DM1にコンジュゲートさせることによって抗STEAP-1ADCを生成した。ハーセプチン(登録商標)抗HER2抗体のコンジュゲートについては、国際公開2005/037992において開示される方法に従って前記のコンジュゲートを行ってもよい。

#### 【0307】

#### 実施例4：インビボ腫瘍体積減少アッセイ

20

インビボ及びインビトロでの腫瘍体積低減能についての毒素コンジュゲート抗STEAP-1モノクローナル抗体又は非コンジュゲート抗STEAP-1モノクローナル抗体の有効性を試験するために、以下のプロトコールを用いた。

哺乳類細胞株およびヒト腫瘍異種移植片：293はヒト不死化胎仔腎臓細胞株(ATCC参照CRL1573)であり、PC-3はヒト前立腺腺癌細胞株(ATCC参照CRL1435)であり、LNCaPは前立腺カルチノーマ細胞株(ATCC CRL1740)である。すべての細胞は、50/50ダルベッコ変更イーグル高グルコース培地、10%ウシ胎児血清(FBS)、2mMグルタミン、1%ペニシリントママイシンを添加したハムF12中で生育させ、5%CO<sub>2</sub>下、37で培養した。293およびPC-3安定性細胞株は、完全長STEAP1のいずれか(それぞれLBC50およびPS5.4)をコードするサイトメガロウイルス作動性ベクター又は空のベクターによる形質移入(Fugene, Roche)によって生成し、400μg/mlのG418(Genticin, Life Technologies)において選択した。ヒト前立腺の外植片モデルであるLUCAP77およびLUCAP35Vは、シアトル大学から得た。  
30

細胞表面上の外因性及び内因性のSTEAP-1の発現は、以下の通りに免疫組織化学(IHC)およびFACS分析によって示した。ヒツジおよびマウスの抗STEAP-1抗体(Agensys, Inc., Santa Monica, CA)は、STEAP-1の細胞内アミノ末端ペプチドに対して生成した(Hubert, R.S., Vivanco, I. et al., PNAS 25:14523-14528 (1999)を参照)。STEAP-1(Agensys, Inc.)の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体は、STEAP-1によって過渡的に形質移入した293T細胞によってマウスを免疫化して生成した。IHC分析のために、一次ヒツジ抗STEAP-1抗体を検出に用いた。FACS分析のために、細胞を90%集密度まで生育させ、2mM EDTAを含むPBSを用いてプレートから取り除いた。細胞を洗浄して、FACSバッファ(1%BSAを含むPBS)に再懸濁し、抗STEAP-1抗体と室温で60分間インキュベートした後、フィコエリトリンにコンジュゲートさせた適切な二次抗体と60分間インキュベートした。分析はFACScan(BD Biosciences)にて行った。免疫蛍光法のために、細胞をチャンバースライドにて終夜生育させ、その後一次抗体と37で60分間インキュベートした。細胞をパラホルムアルデヒドに固定し、1%BSAにてブロックし、蛍光にコンジュゲートさせた適切な二次抗体とインキュベートした。  
40

#### 【0308】

50

インビボ前立腺癌異種移植片モデルを用いて、抗S T E A P - 1 A D Cの有効性を試験した。これらのモデルにはヒト細胞株L N C a P (A T C C C R L - 1 7 4 0 又はSouthern Research Institute, Birmingham, AL)が含まれる。前立腺の外植片モデルには、L u C a P 7 7 およびL u C a P 3 5 V (University of Washington, Seattle, WA)が含まれる。各前立腺の外植片モデルは、Charles River Labの去勢した雄S C I Dベージュマウス(アンドロゲン非依存性モデル、L u C A P 3 5 V)、又は去勢されていない雄S C I Dベージュマウス(アンドロゲン依存性モデル、L u C A P 7 7)に続けて移植して維持した。去勢していないマウスには腫瘍移植の前にテストステロンペレットを与え、腫瘍移植の少なくとも2週間前に去勢を行って、テストステロンレベルを最低にした。ドナー マウスの腫瘍が800～1000mm<sup>3</sup>に達した時に、腫瘍組織を無菌的に取り出し、研究動物のために小さい移植可能な大きさの切片(およそ20mm<sup>3</sup>)に解体した。腫瘍は着床部位のくぼみに置き、皮膚は傷用クリップを用いて閉じた。L N C a P 細胞株モデルのために、インビトロ成長L N C a P 細胞を、テストステロンペレットを与えた雄S C I Dベージュマウスに、50%マトリゲル中1マウスにつき800万個～1000万個の細胞で皮下投与した。平均腫瘍サイズが100～200mm<sup>3</sup>に達したら、マウスをランダムに10匹づつのグループに分け、試験抗体A D C又はコントロール抗体(ネイキッド又はコントロール)を単回I V投与した。いくつかの実験において、試験抗体又はコントロール抗体を複数回投与した(図8 A、9および10を参照)。いくつかの実験において、図8 B及び11に示すように試験抗体およびコントロール抗体を単回投与した。前立腺の外植片モデルはL u C a p 7 7 であり、テストステロンペレットは外因性腫瘍の移植のおよそ3～7日前に移植した。週に2回、4週間腫瘍を測定し、その後試験の残りの期間は週に1回か2回、又は試験期間中ずっと週に1回測定した。時間が経つに連れて試験動物の中で有意に低い腫瘍体積示したもの有用であるとみなした。いくつかの症例において、腫瘍体積は初期体積から有意に減少し、試験期間中低いままであった。図8 - 11に結果を示す。

### 【0309】

抗S T E A P - 1 アウリスタチン薬剤コンジュゲートはインビボで前立腺腫瘍体積を低減する

3 mg / k g のマウス抗S T E A P - 1 1 2 0 - M C - v c - P A B - M M A E の投与は、前立腺腫瘍(L N C a P - N e r 細胞)異種移植片モデルに有効であった。P B S 及び抗g p 1 2 0 - M C - v c - P A B - M M A E (3 mg / k g)をコントロールとして用いた。0、7および14日目に投与を行った。図8 Aを参照。

ヒト化抗S T E A P - 1 抗体1 2 0 v . 2 4 - M C - v c - P A B - M M A E (3 mg / k g)、1 2 0 v . 2 4 - M C - M M A F (6 mg / k g)、1 2 0 v . 2 4 - M C - M M A F (1 2 m g / k g)、及び抗S T E A P - 1 1 2 0 キメラ - M C - v c - P A B - M M A E (3 mg / k g)の、L N C a p - N e r 腫瘍を移植したS C I Dベージュマウスへの投与は、有効であることが示された。ベヒクル、抗ブタクサ - M C - v c - P A B - M M A E (3 mg / k g)及び抗ブタクサ - M C - M M A F (1 2 m g / k g)をコントロールとして用いた。図8に示す日に投与を行った。図8 Bに結果を示す。

### 【0310】

抗S T E A P - 1 抗体1 2 0 キメラ - M C - v c - P A B - M M A E (3 mg / k g)及び抗S T E A P - 1 1 2 0 キメラ - M C - M M A F (6 mg / k g)の投与は、L N C a P 細胞を移植したS C I Dベージュマウスの前立腺癌異種移植片モデルにおいて有効であったことが示された。およそ15、25および30日目に、3 mg / k g (抗S T E A P - v c M M A E)又は6 mg / k g (抗S T E A P - m c M M A F)の3用量をマウスに投与した。コントロール抗ブタクサ - M C - v c - P A B - M M A E (3 mg / k g)及び抗ブタクサ - M C - M M A F (6 mg / k g)を用いた。図9を参照。

抗S T E A P - 1 抗体1 2 0 キメラ - M C - v c - P A B - M M A E (3 mg / k g)の投与は、L u C a p 7 7 細胞を移植したS C I Dベージュ雄マウス(アンドロゲン依存性)の前立腺癌異種移植片モデルにおいて有効であったことが示された。ベヒクル及び抗ブ

10

20

30

40

50

タクサ - M C - v c - P A B - M M A E をコントロールとした。3 m g / k g の試験抗体およびコントロール抗体の3用量を投与した。図10を参照。

3 m g / k g のヒト化抗 S T E A P - 1 抗体 1 2 0 v . 2 4 - M C - v c - P A B - M M A E 、6 m g / k g 及び 1 2 m g / k g の抗 S T E A P - 1 抗体 1 2 0 v . 2 4 - M C - M M A F の、L u C a p 3 5 V 前立腺腫瘍を移植した去勢した S C I D ベージュマウスへの投与は、コントロールと比較して有効であることが示された。薬剤負荷は1抗体につき3.1であった。コントロール抗体は、1 2 m g / k g で投与した抗ブタクサ - M C - M M A F と、6 m g / k g で投与した抗 g p 1 2 0 - M C - v c - P A B - M M A E とした。図11を参照。

#### 【0311】

10

抗 S T E A P - 1 アウリスタチン薬剤コンジュゲートはインビトロ前立腺腫瘍体積を低減する

インビトロ細胞殺傷アッセイを行って、抗 S T E A P - 1 薬剤コンジュゲートの、S T E A P - 1 を発現する細胞の増殖の阻害及び/又は殺傷についての有効性を評価した。簡単に言うと、S T E A P - 1 を発現する細胞を、9 6 ウェルプレートにおよそ 2 , 0 0 0 個の細胞 / ウェルで播き、2通り、抗体薬剤コンジュゲートにて24時間後に処理した。プレートは、3 7 で 5 ~ 7 日間インキュベートし、C e l l T i t e r - G l o (登録商標)発光細胞生存率測定キット(Promega, Madison, WI, USA)にて反応させた。試験細胞には、P S 5 . 4 (外因性 S T E A P - 1 を発現する P C 3 細胞)、L B 5 0 (外因性 S T E A P - 1 を発現する 2 9 3 細胞)、ベクターのみを形質移入した P C 3 細胞、ベクターのみを形質移入した 2 9 3 細胞、および内因性 S T E A P - 1 を発現する L N C a P 細胞が含まれる。試験された抗体薬剤コンジュゲートには、コントロール抗体 - M C - M M A F 、コントロール抗体 - v c - M M A E 、抗 S T E A P - 1 抗体 1 2 0 キメラ - v c - M M A E 、抗 S T E A P - 1 抗体 1 2 0 - キメラ - M C - M M A F (2つの異なるロットの材料)、および抗 S T E A P - 1 抗体キメラ - v c - M M A F が含まれる。図14 A - E に結果を示す。

20

#### 【0312】

実施例5：還元及び再酸化によるコンジュゲートのためのシステイン改変抗 S T E A P - 1 抗体の調製

C H O 細胞に発現する完全長のシステイン改変抗 S T E A P - 1 モノクローナル抗体( T h i o M a b )を、およそ p H 8 . 0 の 5 0 0 m M ホウ酸ナトリウム及び 5 0 0 m M 塩化ナトリウムに溶解し、およそ 5 0 ~ 1 0 0 倍過剰な 1 m M T C E P (トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンハイドロクロライド; Getz et al (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA)にて 3 7 でおよそ 1 ~ 2 時間かけて還元する。還元した T h i o M a b を希釈し、1 0 m M 酢酸ナトリウム、p H 5 にて H i T r a p S カラムに流し、0 . 3 M 塩化ナトリウムを含む P B S にて溶出する。溶出した還元 T h i o M a b を p H 7 の 2 m M デヒドロアスコルビン酸( d h A A )にて 3 時間、又は 2 m M 硫酸銅水溶液( C u S O 4 )にて室温で終夜をかけて処理する。外気酸化も有効であるかもしれない。S e p h a d e x G 2 5 樹脂に溶出することによってバッファを交換し、1 m M D T P A を有する P B S にて溶出する。この溶液の 2 8 0 n m の吸光度から還元した抗体の濃度を決定し、D T N B (Aldrich, Milwaukee, WI)と反応させて 4 1 2 n m の吸光度を決定することによってチオールの濃度を決定することによってチオール / A b 値を確認する。

30

#### 【0313】

実施例6：システイン改変抗 S T E A P - 1 抗体と薬剤リンカー中間生成物のコンジュゲートによるシステイン改変抗 S T E A P - 1 抗体薬剤コンジュゲートの調製

実施例5の還元及び再酸化の手順の後に、システイン改変抗 S T E A P 抗体を P B S (リン酸緩衝生理食塩水)バッファに溶解し、氷上で冷却する。マレイミドなどのチオール反応性官能基を有する、アウリスタチン薬剤リンカー中間生成物、例として M C - M M A E (マレイミドカプロイル - モノメチル アウリスタチン E )、M C - M M A F 、M C - v

40

50

a 1 - c i t - P A B - M M A E、又はM C - v a l - c i t - P A B - M M A Fの抗体当たりの改変システィンと比較したときのおよそ1.5モル等価物をD M S Oに溶解し、アセトニトリルと水にて希釈し、P B S中の冷却した還元、再酸化抗体に加える。およそ1時間後、過剰のマレイミドを加えて、反応を止め、任意の反応していない抗体チオール基をキャップする。遠心限外濾過によって反応混合物を濃縮し、システィン改変抗S T E A P - 1抗体薬剤コンジュゲートを精製し、P B SのG 2 5樹脂により溶出して脱塩し、滅菌条件下にて0.2μmフィルターにより濾過し、貯蔵のために凍結する。

【 0 3 1 4 】

上記の手順によって、以下のシステイン改変抗S T E A P - 1 抗体薬剤コンジュゲートを調製した(本明細書中及び図17に示すように変異体の番号付けを標準化した(軽鎖についてはカバット番号付け、重鎖についてはE u番号付け))。

軽鎖 V 2 0 5 C t h i o h u 1 2 0 および M C - M M A F のコンジュゲートによる t h i o h u m a n 1 2 0 - M C - M M A F :

重鎖 A 1 1 8 C th i o h u 1 2 0 および MC - MMAF のコンジュゲートによる th i o human 1 2 0 - MC - MMAF :

軽鎖V205C thio hu120 及びMC-val-cit-PAB-MMAE のコンジュゲートによる thio human120-MC-val-cit-PAB-MM AE ; 重鎖A118C thio hu120 及びMC-val-cit-PAB-MMAE のコンジュゲートによる thio human120-MC-val-cit-PAB - MMAE 。

〔 0 3 1 5 〕

## 実施例 7：システイン改変抗 S T E A P - 1 抗体の特徴付け

上記のように調製したシステイン改変抗STEAP-1抗体薬剤コンジュゲート(TDC)をアッセイして、インビトロで親抗体の活性を保持したことを確認した。抗STEAP-1 TDC thi o - human 120 - vc - PAB - MMAE(LCV205C)(husSteap1 TDC(L205C)vcEと略す)及びthi o - human 120 - vc - PAB - MMAE(HCA118C)(husSteap1 TDC(HCA118C)vcEと略す)を、STEAP-1発現細胞(293 STEAP-1 NT LB50)及び非発現細胞(293ベクターS408)のFACS分析によって、STEAP-1への結合について評価した。「2<sup>nd</sup> only」なる用語はFACS分析の二次抗体を指す。TDCコントロール(vcE)及びADC stdコントロール(vcE)をそれぞれコントロール抗体thi o及び非-thi o vc-PAB-MMAE薬剤コンジュゲートとした。husSteap1 ADC(std)は、親ヒト抗STEAP-1抗体由来のvc-PAB-MMAE薬剤コンジュゲートである。示すように、TDCは、親husSteap1 ADCの変化と類似のFACS変化を示した。

【 0 3 1 6 】

また、インピトロ細胞殺傷アッセイを行って、システイン改変抗S T E A P - 1 抗体薬剤コンジュゲートの、S T E A P - 1 を発現する細胞の増殖の阻害及び／又は殺傷についての有効性を評価した。簡単に言うと、S T E A P - 1 を発現する細胞を、96 ウェルプレートによそ 2,000 個の細胞／ウェルで播き、2 通り、抗体薬剤コンジュゲートにて 24 時間後に処理した。プレートは、37 度 5~7 日間インキュベートし、Cell Titter-Glo (登録商標) 発光細胞生存率測定キット (Promega, Madison, WI, USA) にて反応させた。試験細胞には、PS5.4 (外因性S T E A P - 1 を発現するPC3細胞)、LB50 (外因性S T E A P - 1 を発現する293細胞)、および内因性S T E A P - 1 を発現するLNCaP細胞が含まれる。試験された抗体薬剤コンジュゲートには、コントロール抗体 - v c - MMAE (ADC std コントロール (v c E))、コントロール thio 抗体 - v c - MMAE (TDC コントロール (v c E))、抗 - S T E A P - 1 TDC thio - human 120 - v c - PAB - MMAE (LCV205C) (hussteap1 TDC (L205C) v c E と略す) 及び thio - human 120 - v c - PAB - MMAE (HCA118C) (hussteap1 TDC (HCA118C) v c E と略す)

す)、及び huSteap1 ADC (std)、親ヒト抗STEAP-1抗体由来のvc-PAB-MMAE薬剤コンジュゲートが含まれる。図19A-Cに示すように、抗STEAP-1 TCDは、インビトロでの親ADCの活性を保持する。

【0317】

実施例8：システイン改変抗STEAP-1抗体薬剤コンジュゲートについてのインビトロ腫瘍体積の低減

インビトロ前立腺癌異種移植片モデルを用いて、システイン改変抗STEAP-1 ADCの有効性を試験した。これらのモデル及び用いた試験プロトコールは、実施例4に記載のものと対応する。

抗STEAP-1 TDC thio-human120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huSteap1 HC TDC vcEと略す) (3mg/kg)の、LNCaP-Ner腫瘍を移植した(本明細書中に記載のようにテストステロンペレットにて処理した)SCIDベージュマウスへの投与は、有効であることが示された。ベヒクル(PBS)、コントロール抗体-vc-MMAE (ADC std ctrl vcE)及びコントロールthio抗体-vc-MMAE (TDC HC ctrl vcE)をコントロールとして用いた。また、抗STEAP-1 TDCの効果を、ポジティブコントロールとしてのヒト抗STEAP-1抗体120-MC-vc-PAB-MMAE (huSteap1 std ADC vcE)と比較した。0日目に単回用量を投与した。すべての抗体は3mg/kgで投与した。図20に結果を示す。

【0318】

図21は、3mg/kgの抗STEAP-1 TDC thio-human120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huSteap1 HC TDC vcEと略す)及び、1、3又は6mg/kgの抗STEAP-1 TDC thio-human120-MC-MMAF (HCA118C) (huSteap1 HC TDC mcFと略す)の投与は、LNCaP細胞を移植したSCIDベージュマウスの前立腺癌異種移植片モデルにおいて有効であったことが示されたことを示す。0日目に、0.3、1又は3mg/kg (huSteap1 HC TDC vcE)又は1、3又は6mg/kg (huSteap1 HC TDC mcF)の単回用量をマウスに投与した。ベヒクル(PBS)、コントロール抗体-vc-MMAE (ADC std ctrl vcE)およびコントロールthio抗体-vc-MMAE (TDC HC ctrl vcE)をコントロールとして用いた。

図22は、3mg/kgの抗STEAP-1 TDC thio-human120-vc-PAB-MMAE (HCA118C) (huSteap1 HC TDC vcEと略す)及び3又は6mg/kgの抗STEAP-1 TDC thio-human120-MC-MMAF (HCA118C) (huSteap1 HC TDC mcFと略す)の投与は、LuCap35V細胞を移植したSCIDベージュ雄マウス(アンドロゲン依存性)の前立腺癌異種移植片モデルにおいて有効であったことが示されたことを示す。0日目に、0.3、1又は3mg/kg (huSteap1 HC TDC vcE)又は1、3又は6mg/kg (huSteap1 HC TDC mcF)の単回用量をマウスに投与した。ベヒクル(PBS)、コントロール抗体-vc-MMAE (ADC std ctrl vcE)およびコントロールthio抗体-vc-MMAE (TDC HC ctrl vcE)をコントロールとして用いた。

【0319】

実施例9：抗体120変異体24由来の抗STEAP-1抗体SGIVの調製と特徴付け  
改善した抗体発現レベルを得るように軽鎖及びフレームワーク領域がさらに修飾されている他のLC抗STEAP-1抗体変異体を調製した。

材料と方法

残基番号はカバットに従った(Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。一文字アミノ酸略号を用いる。DNA縮重はIUBコードを用いて表す(N=A/C/G/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=C/G/T, H=A/

10

20

30

40

50

C / T、K = G / T、M = A / C、R = A / G、S = G / C、W = A / T、Y = C / T)  
。

修正した軽鎖変異体の調製：120.v24抗体の変異体(「シモンズIV」又は単に「SGIV」と称する)を生成して特徴付けた。SGIV軽鎖のアミノ酸配列は配列番号：90に示す。この配列はmu120抗体の対応する領域(配列番号：5)及び120.v24抗体の対応する領域(配列番号：91)と整列配置して、図23に示す。

### 【0320】

変異体120.v24と比較したときの変異体SGIVの評価 -

SGIVおよび120.v24抗体をIgGとして発現させ、内因性STEAP-1を10  
発現する、安定形質転換Steap1ポジティブ細胞株293Steap1NTLB4  
8、293Steap1NTLB50、及び293Steap1NTLB53、並びにLNCaP細胞を用いたFACS分析によって評価した(図28)。実施例1に記載のように細胞を調製した。5μg/mlの各IgGを加え、氷上に1時間置いた。遠心分離法によって試料をFACSバッファにて2回洗浄し、抗ヒトPEコンジュゲート(R-フィコエリトリンヤギ抗ヒトIgG Fcγ断片、Jackson Immunoresearch)の1:200希釈物を加え、30分間置いた。遠心分離法によって試料をFACSバッファにて再度2回洗浄し、試料をFACSにて分析した。

### 【0321】

STEAP-1に対するSGIV及び120.v24結合のスキヤッチャードに基づく親和性決定 -

STEAP-1に対する120.v24およびシモンズIV(「SGIV」)抗体の結合親和性を、標準的な方法に従ってスキヤッチャード分析を用いて決定した。プロテインG親和性クロマトグラフィにてIgGを精製した。親和性測定は、2通りのPC-3-PS5.4、293-LB50およびLNCaP-BR細胞のスキヤッチャード分析によって行った。LNCaP-BR細胞および293.LB50細胞における120.v24およびSGIVのスキヤッチャードプロットは、それぞれ図25および26に示す。PC-3-PS5.4、293-LB50及びLNCaP-BR細胞、並びに過渡的にSTEAP-1を発現する293細胞における、mu1789、mu120、Fcキメラ、ヒト化120.v24、thio-120.v24及びthio-SGIVについての平均結合親和性を比較した表を図27に示す。

### 【0322】

SGIVおよび120.v24の部位特異的突然変異誘発：SGIVおよび120.v24抗体の変異体は、上記の標準的な突然変異誘発プロトコールを用いて調製した。変異体の第一クラスは、さらに結合親和性を向上させるためにシモンズIV(「SGIV」)の特定の残基を120.v24の対応する残基に置換する、部位特異的突然変異誘発に起因した。生産された特定の変異体は、図24に示すように以下の通りであった。

- (1) LS.VLVH1、残基42(「Q」)及び43(「P」)をそれぞれ「K」及び「A」に修飾した(配列番号：92)。
- (2) LS.VLVH2、残基3(「V」)を「Q」に修飾し、残基42(「Q」)及び43(「P」)をそれぞれ「K」及び「A」に修飾し、残基85(「V」)を「T」に修飾した(配列番号：93)。
- (3) LS.Q、残基3(「V」)を「Q」に修飾した(配列番号：94)。
- (4) LS.CH1、残基15(「L」)を「V」に修飾し、残基83(「V」)を「F」に修飾した(配列番号：95)。

### 【0323】

変異体の第二クラスは、抗体発現レベルを向上させる目的で、120.v24の特定の残基をシモンズIV(SGIV)の対応する残基に置換する、部位特異的突然変異により生成した。特定の変異体は、図24に示すように以下の通りであった。

- (1) E D . F W 1、残基3(「Q」)を「V」に修飾し、残基9(「S」)を「D」に修飾し、残基12(「S」)を「A」に修飾し、残基13(「A」)を「V」に修飾し、残基15(

10

20

30

40

50

「V」)を「L」に修飾し、残基17(「D」)を「E」に修飾し、残基19(「V」)を「A」に修飾し、そして残基22(「T」)を「N」に修飾した(配列番号：96)。

(2) E D . F W 2 、 1 2 0 . v 2 4 の残基42(「K」)及び43(「A」)をそれぞれ「Q」及び「P」に修飾した(配列番号：97)。

(3) E D . F W 3 、 残基60(「S」)を「D」に修飾し、残基80(「P」)を「A」に修飾し、残基83(「F」)を「V」に修飾し、そして、残基85(「T」)を「V」に修飾した(配列番号：98)。

(4) E D . a 1 1 、 残基3(「Q」)を「V」に修飾し、残基9(「S」)を「D」に修飾し、残基12(「S」)を「A」に修飾し、残基13(「A」)を「V」に修飾し、残基15(「V」)を「L」に修飾し、残基17(「D」)を「E」に修飾し、残基19(「V」)を「A」に修飾し、残基22(「T」)を「N」に修飾し、120.v24の残基42(「K」)及び43(「A」)をそれぞれ「Q」及び「P」に修飾し、残基60(「S」)を「D」に修飾し、残基80(「P」)を「A」に修飾し、残基83(「F」)を「V」に修飾し、そして、残基85(「T」)を「V」に修飾した(配列番号：99)。

(5) E D . P r o 、 残基43(「A」)を「P」に修飾し、残基80(「P」)を「A」に修飾した(配列番号：100)。

(6) E D . p l 、 残基9(「S」)を「D」に修飾し、残基42(「K」)を「Q」に修飾し、残基60(「S」)を「D」に修飾した(配列番号：101)。

### 【0324】

#### 結果と考察

20

##### S G I V 抗体の調製 -

抗S T E A P - 1 抗体バージョン24(120.v24)の可変領域の配列を図23および24(配列番号：91)に示す。部位特異的突然変異誘発を使用して、「シモンズIV」又は単に「S G I V」と称する他の変異体を、上記の標準的な突然変異誘発プロトコールを用いて調製した。図23および24は、S G I V 軽鎖の配列をm u 1 2 0 抗体および120.v24の配列と整列配位させて示す。S G I V 抗体の様々な生成物の力値を図29に示す。

### 【0325】

F A C を用いた、S T E A P - 1 に対するS G I V および120.v24の結合の比較

30

細胞表面に発現されるS T E A P - 1 に対する両抗体(120.v24およびS G I V)の結合能を、F A C を用いて測定した。外因性S T E A P - 1 (2 9 3 S T E A P - 1 L B 4 8 、 2 9 3 S T E A P - 1 L B 5 0 および2 9 3 S T E A P - 1 L B 5 3 )又は内因性S T E A P - 1 (L N C a P . B r )のいずれかを発現する細胞株に対する抗体結合を、2通り測定した。結果を図28にまとめる。図28に示すように、両抗体は、4つすべての細胞株のS T E A P - 1 を結合することが可能であった。

### 【0326】

S T E A P - 1 に対するS G I V 抗体の結合親和性と120.v24との比較 -

S T E A P - 1 に対するS G I V および120.v24の結合親和性を、スキヤッチャード分析を用いて調べた。L N C a P . B R 細胞および2 9 3 . L B 5 0 細胞における120.v24およびS G I V のスキヤッチャードプロットをそれぞれ図25および26に示す。P C - 3 - P S 5 . 4 、 2 9 3 - L B 5 0 およびL N C a P - B R 細胞、並びに過渡的にS T E A P - 1 を発現する2 9 3 細胞における、m u 1 7 8 9 、 m u 1 2 0 、 F c キメラ、ヒト化120.v24、t h i o - 1 2 0 . v 2 4 およびt h i o - S G I V 抗体の平均結合親和性を比較する表を、図27に示す。結果から、2 9 3 - L B 5 0 およびL N C a P . B R 細胞における120.v24抗体の結合親和性がS G I V 変異体の結合親和性のおよそ1.5倍であることが示される。

### 【0327】

前述の本発明は、理解を明確にするために図と例とを挙げていくらか詳細に記述されているが、この記載及び実施例は本発明の範囲を制限するものと解されるべきではない。本

50

明細書において引用されるすべての特許及び科学文献の開示は、出典明記によって特別に本明細書中に援用される。

【図1】

Figure 1 consists of three phylogenetic trees (EC01, EC02, EC03) showing the relationships between various isolates. The trees are rooted and show the distribution of different genotypes across various locations and years. The isolates are color-coded by genotype: EC01 (red), EC02 (blue), EC03 (green), and others (black). The x-axis represents the year of isolation, and the y-axis represents the location. The trees show a clear separation between the three main genotypes (EC01, EC02, EC03) and their sub-lineages.

## 【図2A】

【 図 2 B 】

### 【図3A】

### 【図3B】

【図4】

W G Q S T L V T V S S 48 42 51  
W G Q S T L V T V S S 44 45 52  
W G Q S T L V T V S S 44 45 52  
W G Q S T L V T V S S 44 45 50  
W G Q S T L V T V S S 44 45 47

1 DIVWQSPSSLSASVGDRVITIC\_MWYQQKPGKAKRLLY -12- GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQPL  
1 DIVWQSPSSLSASVGDRVITIC\_MWYQQKPGKAKRLLY -12- GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQPL  
2 DIVWQSPSSLSVTEGEPAISC\_MWYQQKGQSGSQQPKLLY -12- GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQPL  
2 DIVWQSPSSLSVTEGEPAISC\_MWYQQKGQSGSQQPKLLY -12- GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQPL  
3 DIVWQSPSTLSLSPGERATLSC\_MWYQQKGQAPRLLY -12- GIPDRFSGSGSGTDFLTISLQPL  
3 DIVWQSPSTLSLSPGERATLSC\_MWYQQKGQAPRLLY -12- GIPDRFSGSGSGTDFLTISLQPL  
4 DIVWQSPDSLAVSLEGERATC\_MWYQQKGQPKLLY -12- GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQPL  
4 DIVWQSPDSLAVSLEGERATC\_MWYQQKGQPKLLY -12- GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQPL

EDFATYYC -13- FGCGTKEVK	配列番号: 54, 55, 56, 57
EDFATYYC -13- FGCGTKEVK	配列番号: 54, 55, 56, 57
EDVAVYYC -13- FGCGTKEVK	配列番号: 58, 59, 60, 57
EDFAVYYC -13- FGCGTKEVK	配列番号: 61, 62, 63, 57
EDVAVYYC -13- FGCGTKEVK	配列番号: 64, 65, 66, 57

【図5】

humIgG1 230 240 250 260 270  
 PAPELLGCPSPVLPPEPKPKDTLMISRTPEVTCVWVNDVSHEDPEVFKPNWYV  
 humIgG2 PAP- PVAGCPSVLPWPKPKDTLMISRTPEVTCVWVNDVSHEDPEVFKPNWYV  
 humIgG3 PAPELLGGPSVLPPLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVNDVSHEDPEVFKPNWYV  
 humIgG4 PAPFLLGGPSVLPFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVNDVSHEDPEVFKPNWYV  
 \*\*\*

humIgG1 280 290 300 310 320  
 DGVEVHNNAKTKPREEQCNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
 humIgG2 DGVEVHNNAKTKPREEQCNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
 humIgG3 DGVEVHNNAKTKPREEQCNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
 humIgG4 DGVEVHNNAKTKPREEQCNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
 \* \*

humIgG1 330 340 350 360 370  
 APIEKTISSAKGQPPQVYTLPPSGREEMTKNQVSLTCLVKGVGFYPSDIAV  
 humIgG2 APIEKTISSAKTGGQPPQVYTLPPSGREEMTKNQVSLTCLVKGVGFYPSDIAV  
 humIgG3 APIEKTISSAKTGGQPPQVYTLPPSGREEMTKNQVSLTCLVKGVGFYPSDIAV  
 humIgG4 SSIEKTISSAKGQPPQVYTLPPSGREEMTKNQVSLTCLVKGVGFYPSDIAV  
 \*\* \*

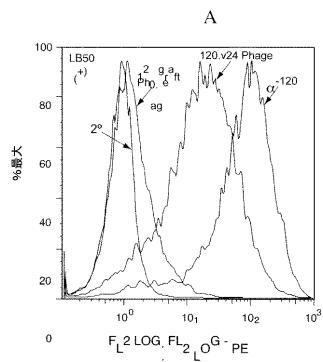
humIgG1 380 390 400 410 420  
 EWESNGQQPENNYKTTTPVPLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVMH  
 humIgG2 EWESNGQQPENNYKTTTPVPLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVMH  
 humIgG3 EWESNGQQPENNYKTTTPVPLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVMH  
 humIgG4 EWESNGQQPENNYKTTTPVPLSDGSFFLYSPRLTVDKSRWQQGNVFSCSVVMH  
 \* \*

humIgG1 430 440  
 EALHHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号: 85)  
 humIgG2 EALHHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号: 86)  
 humIgG3 EALHHNFTQKSLSLSPGK (配列番号: 87)  
 humIgG4 EALHHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号: 88)  
 \*\* \*

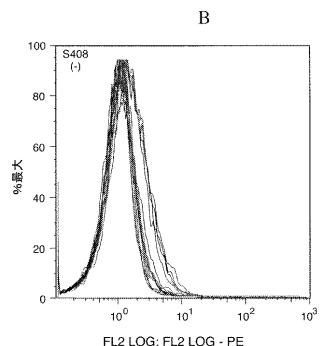
カッバ軽鎖定常領域コンセンサス配列

PTVAAPSVFIFPPSDEQIKSGCARSVCLNNNFYPREAKVQWIK  
 VDNAL2SGNSQESVTEQDSKDTYSLSSTLTLSKADYEKHKV  
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEK (配列番号: 89)

【図6 A】

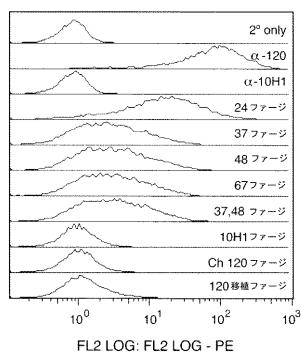


【図6 B】



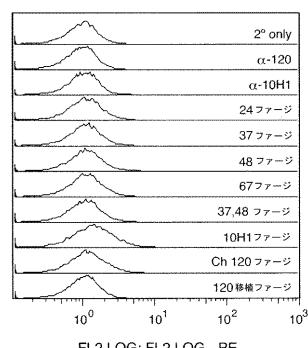
【図6 C】

C

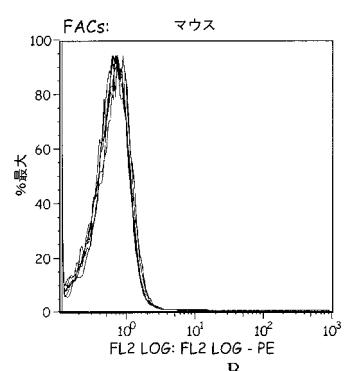
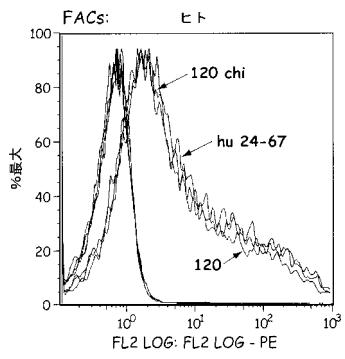


【図6 D】

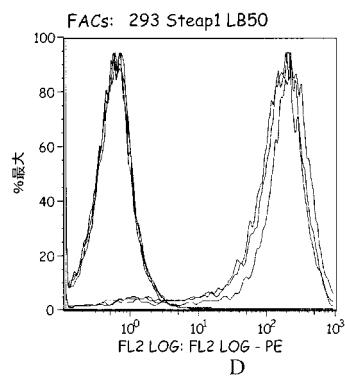
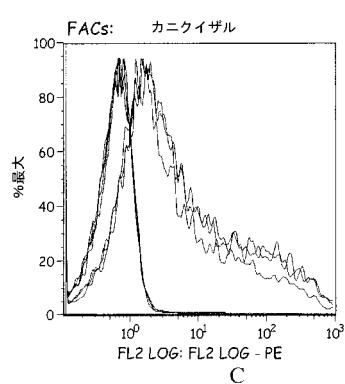
D



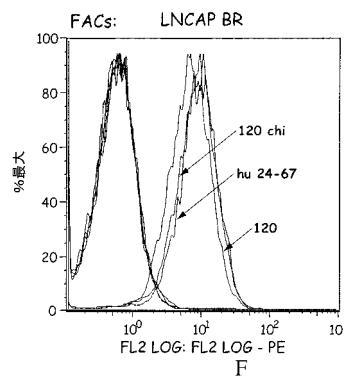
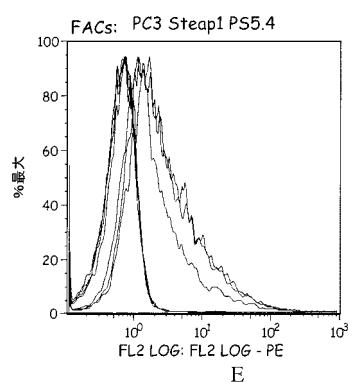
【図7 A - B】



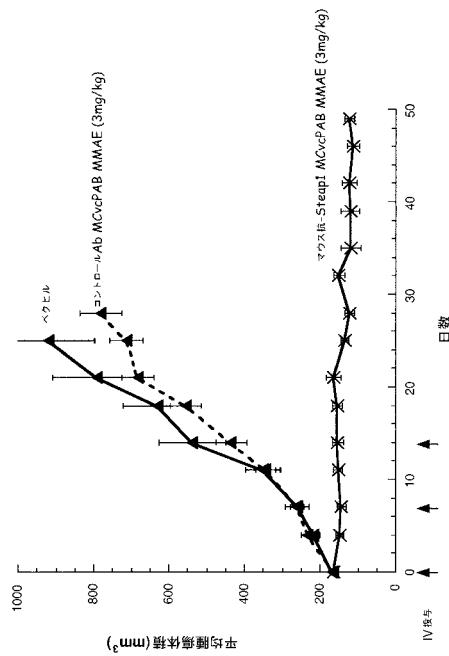
【図 7 C - D】



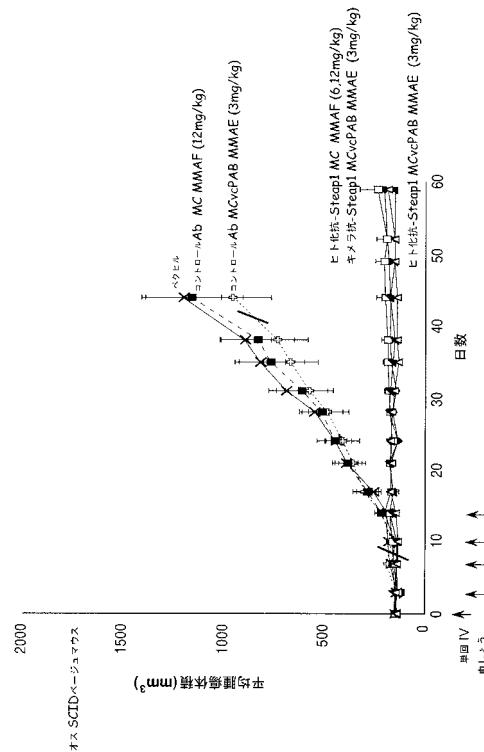
【図 7 E - F】



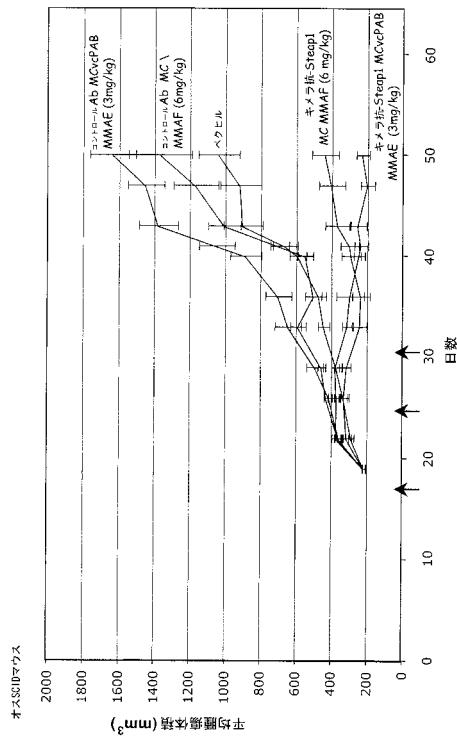
【図 8 A】



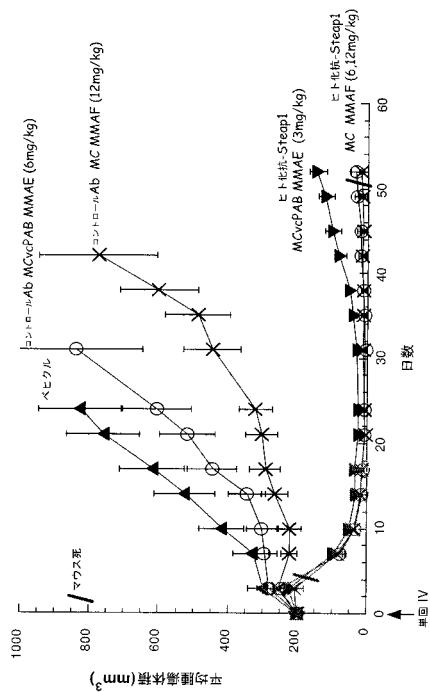
【図 8 B】



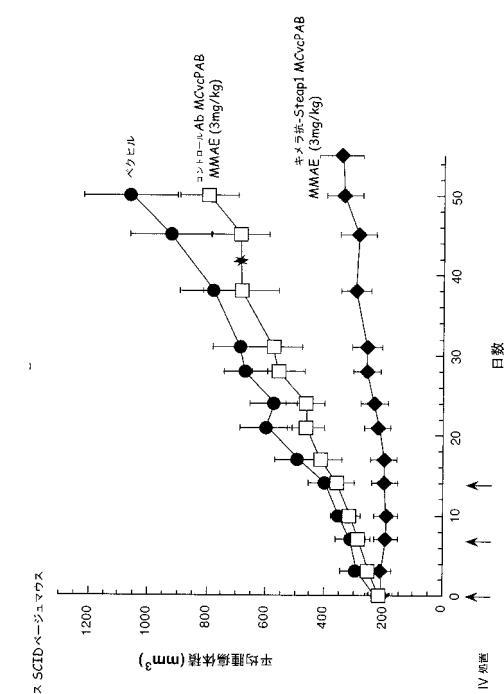
【図9】



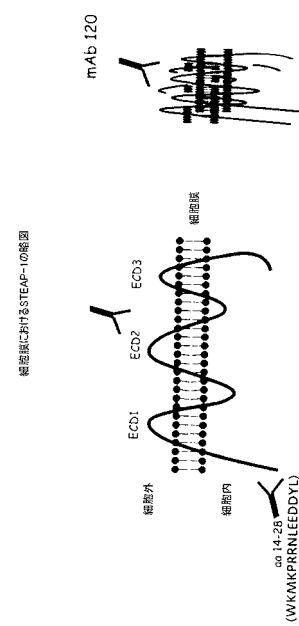
### 【図 1 1】



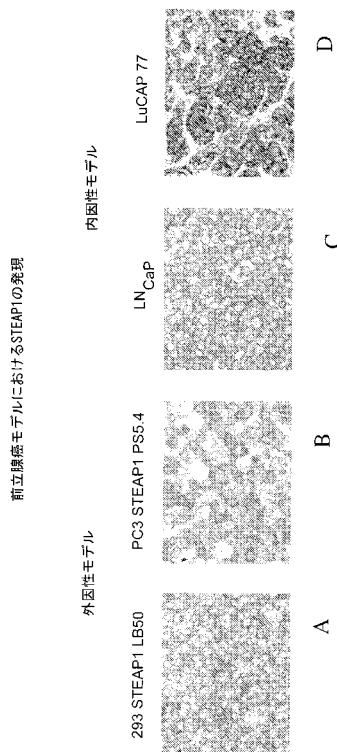
【図10】



【 図 1 2 】

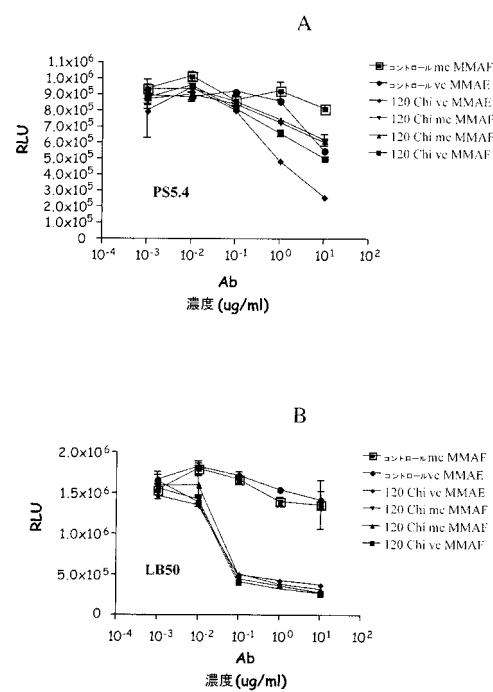


【図13】

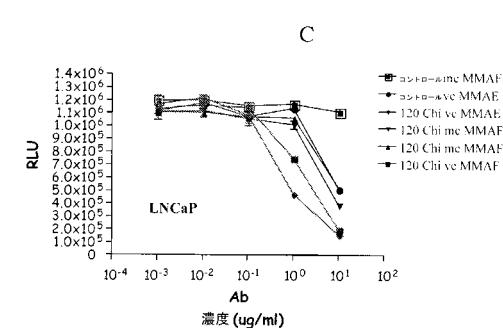


前立腺癌モデルにおけるSTEAP1の発現

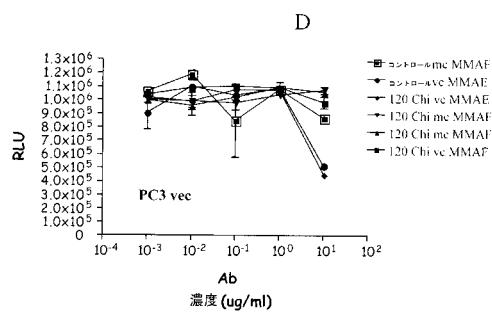
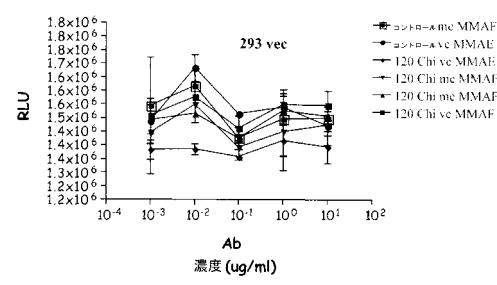
【図14 A - B】



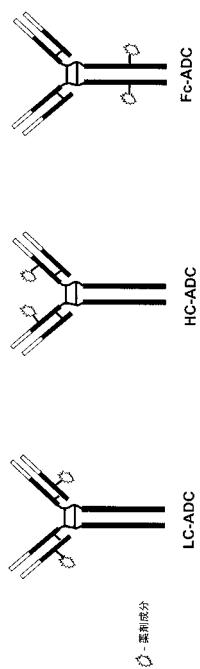
【図14 C - D】



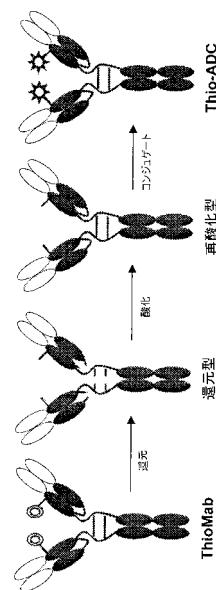
【図14 E】



## 【図15】



【 図 1 6 】



【図17A】

### 【図17B】

対応して配列番号付けしたThio-LC変異体(V205C)

C-V205C (カバシト番号付) 22

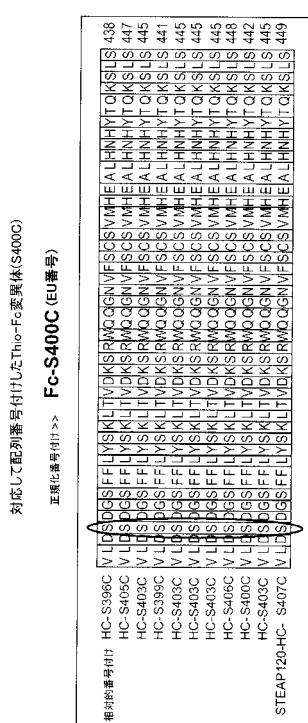
相对的位置	LC-V210C	EVT	H	Q	G	L	S	S	P	T	K	S	F	N	R	G	E	C	219	
	LC-V209C	EVT	H	O	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	213
	LC-V211C	EVT	H	O	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	220
	LC-V208C	EVT	H	O	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	214
	LC-V206C	EVT	H	O	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	214
	LC-V205C	EVT	H	O	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	220
STEAP120-LC-	V211C	EVT	H	O	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	214

非常に配列番号付いた有<sup>14</sup>Cラベル体(A121C)

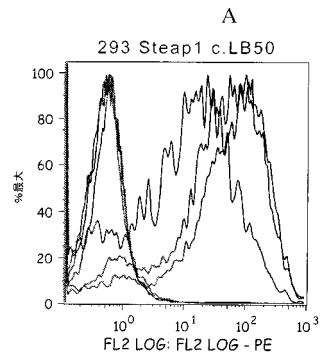
HC-A118C (EU)番号付(1)

相关试剂盒	HC-A114C	- - - - -	L YLWQGTVSS	S TKGPSVFT	P APSSSKTS	S66TAI	138	
	HC-A123C	- - - - -	NSYWFDWQGQT	LTVSS	S TKGPSVFT	P APSSSKTS	SGTAAI	147
	HC-A122C	- - - - -	I PRHANVFWQGQT	LTVSS	S TKGPSVFT	P APSSSKTS	SGTAAI	145
	HC-A111C	- - - - -	WTSGLDYQWQGQT	LTVSS	S TKGPSVFT	P APSSSKTS	SGTAAI	141
	HC-A121C	- - - - -	DGF1AMDYQWQGQT	LTVSS	S TKGPSVFT	P APSSSKTS	SGTAAI	145
	HC-A120C	- - - - -	I S1AGMDYQWQGQT	LTVSS	S TKGPSVFT	P APSSSKTS	SGTAAI	145
	HC-A212C	- - - - -	SMWDWYFDWQGQT	LTVSS	S TKGPSVFT	P APSSSKTS	SGTAAI	145
	HC-A211C	- - - - -	RSHVG1FDWQGQT	LTVSS	S TKGPSVFT	P APSSSKTS	SGTAAI	148
	HC-A124C	- - - - -	1RLDYM1QWQGQT	LTVSS	S TKGPSVFT	P APSSSKTS	SGTAAI	142
	HC-A122C	- - - - -	RGD1SMDYQWQGQT	LTVSS	S TKGPSVFT	P APSSSKTS	SGTAAI	145
STEAP120-HC-A125C	YDDYYAMDYQWQGQT	LTVSS	S TKGPSVFT	P APSSSKTS	SGTAAI	149		

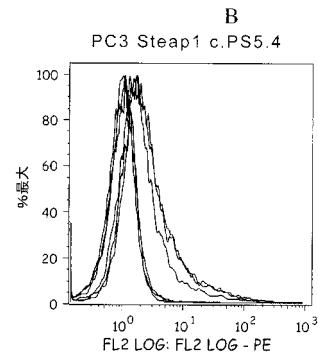
【図17c】



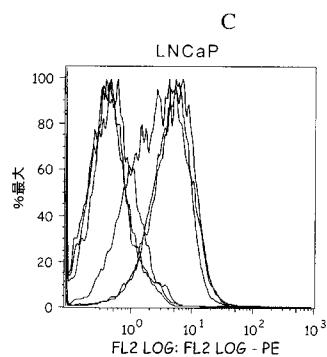
【 18A 】



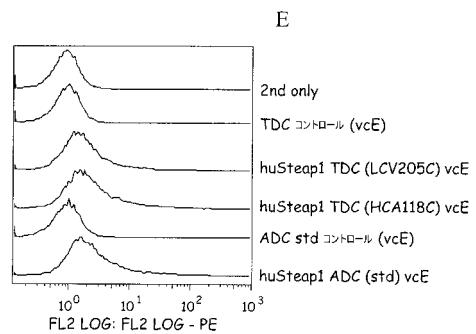
【図18B】



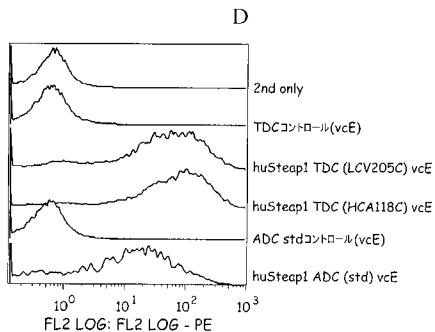
【図18C】



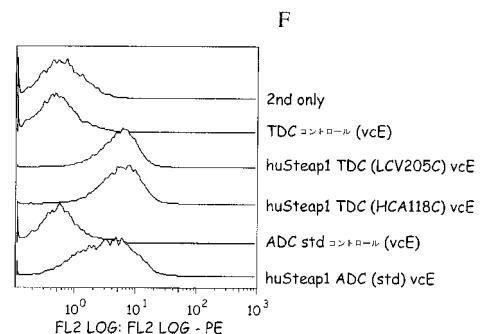
### 【図18E】



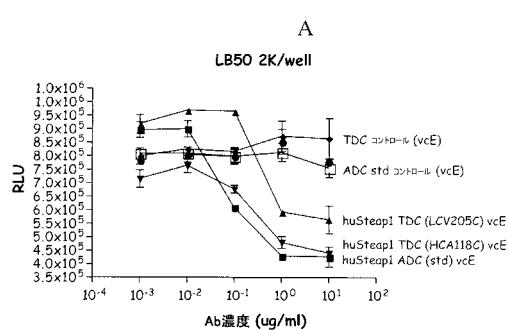
【図18D】



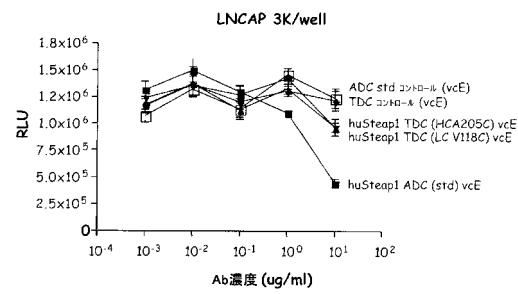
【図18F】



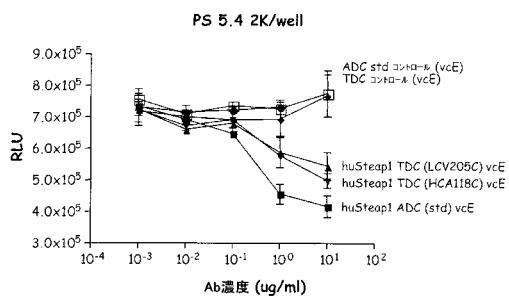
【図 19 A - B】



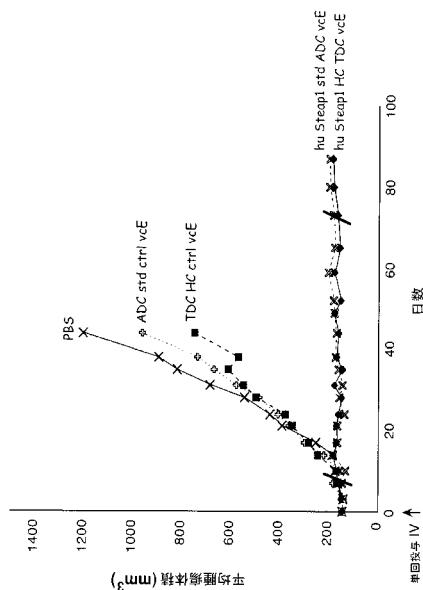
【図 19 C】



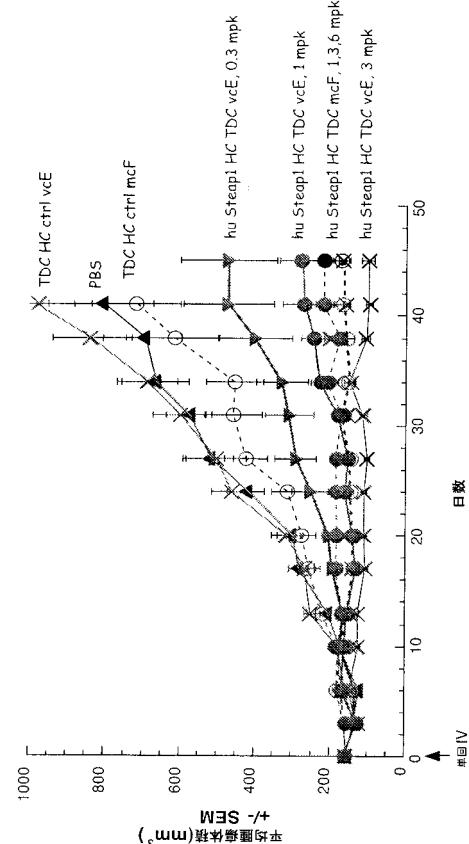
B



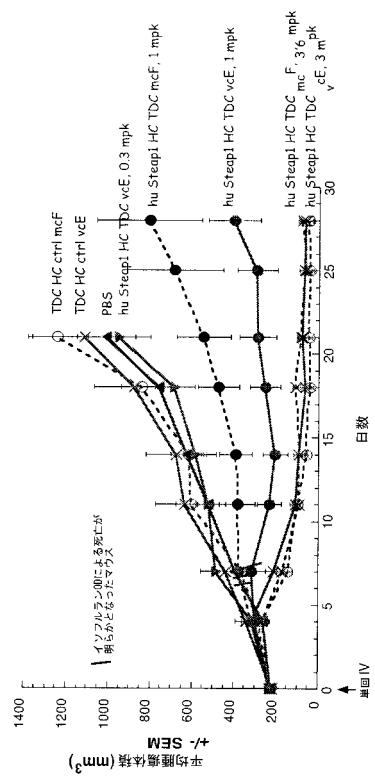
【図 20】



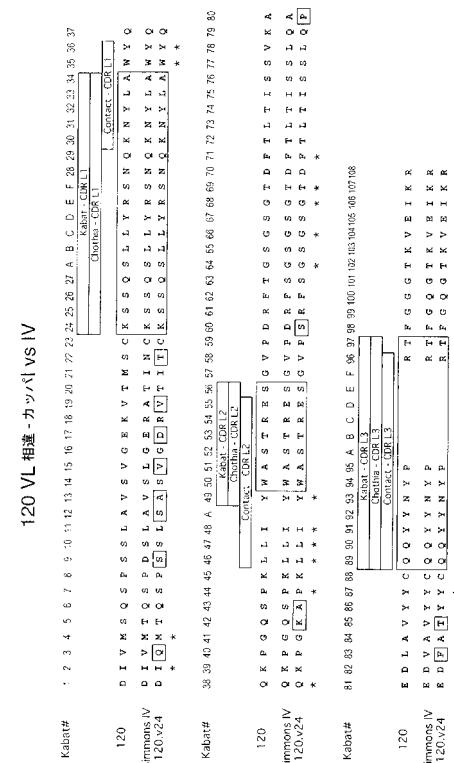
【図 21】



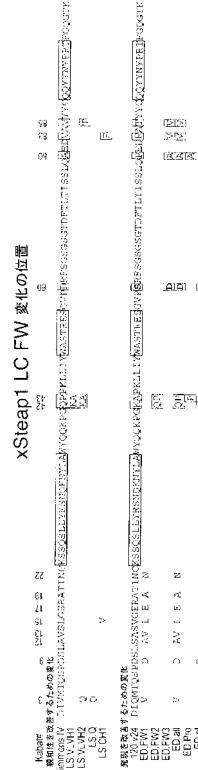
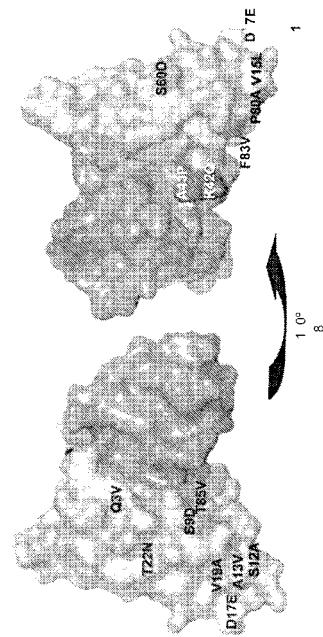
【図22】



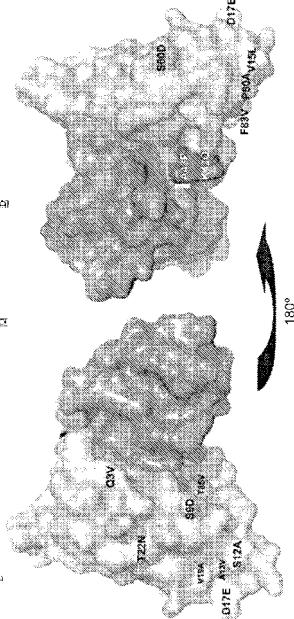
【図23A】



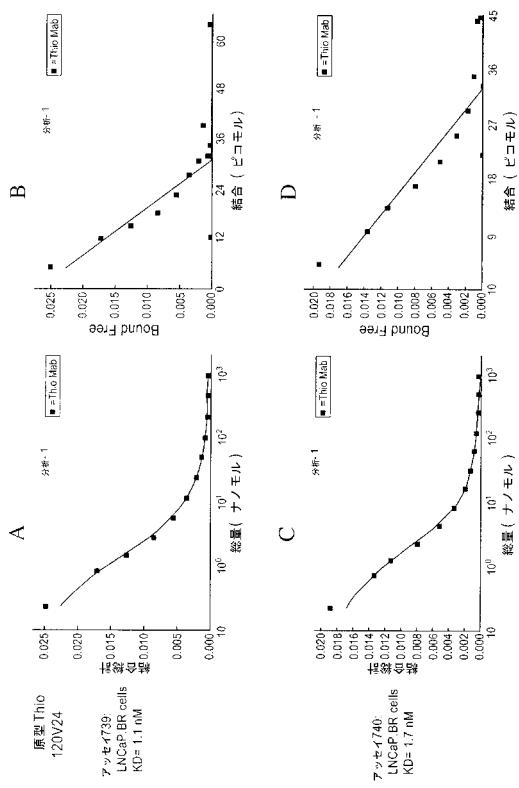
【図23B】



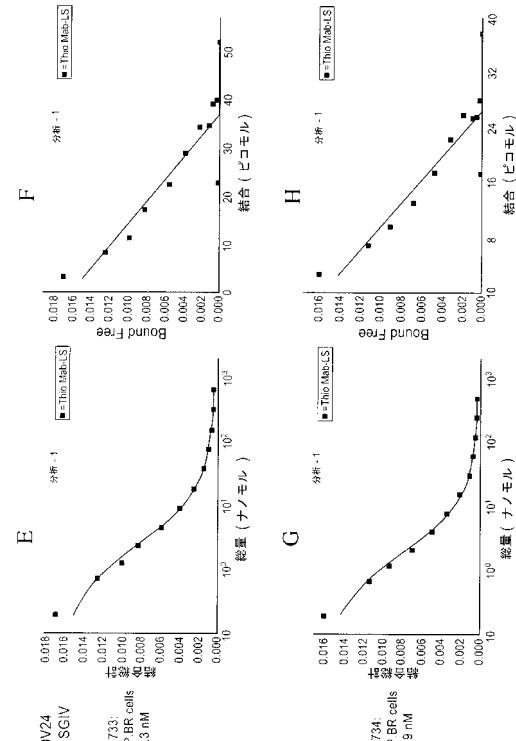
【図24】



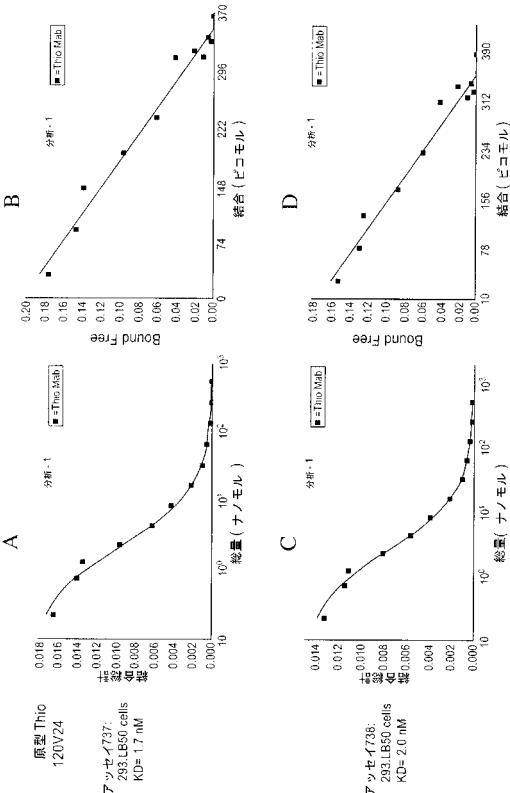
【図 25 A - D】



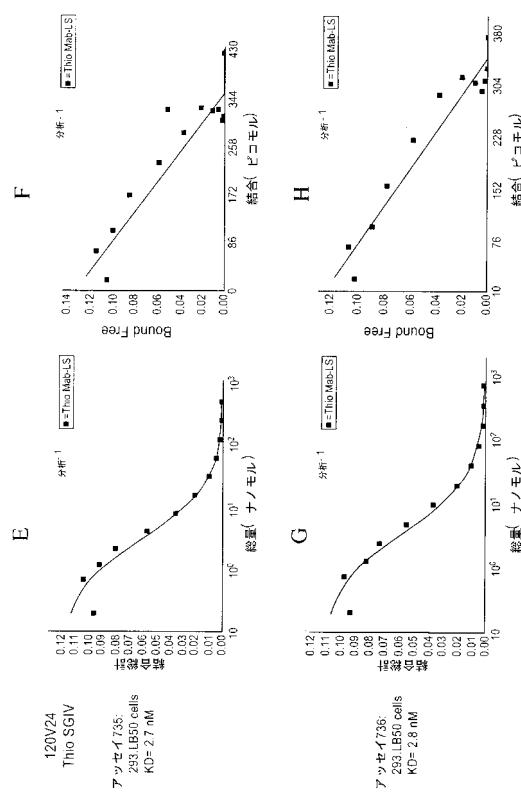
【図 25 E - H】



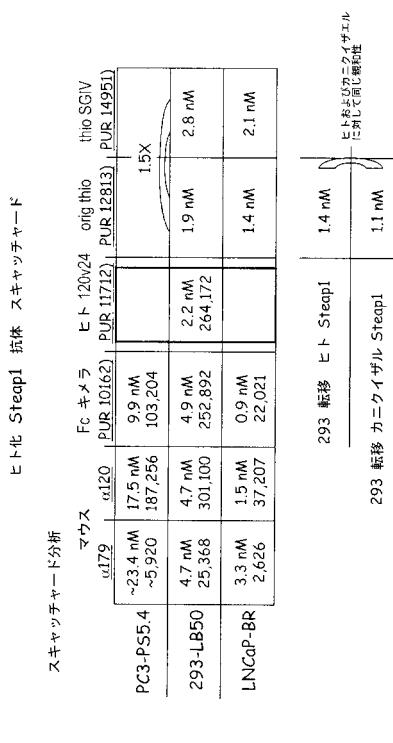
【図 26 A - D】



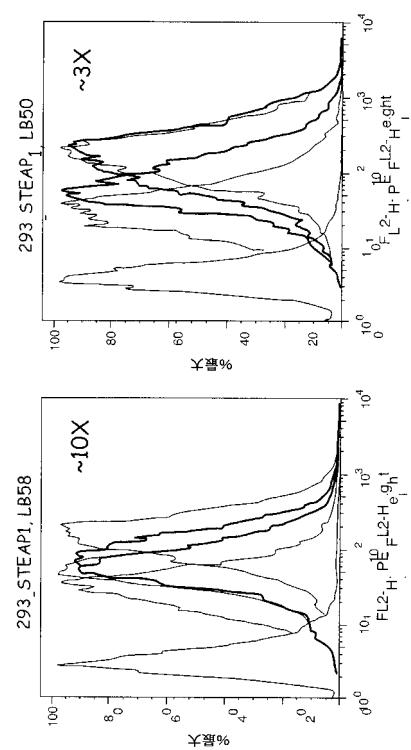
【図 26 E - H】



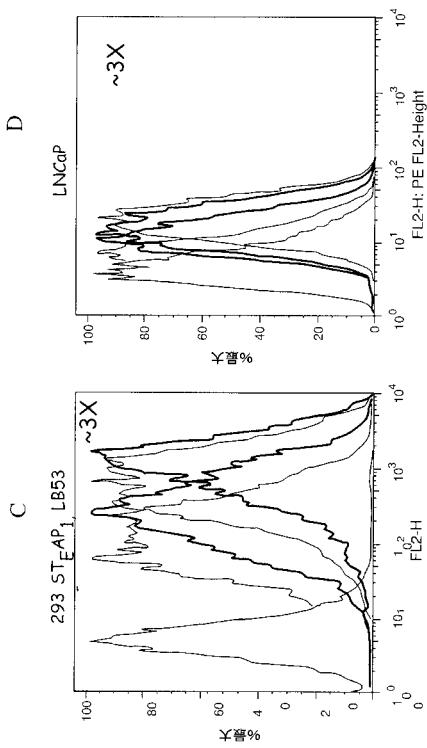
【図27】



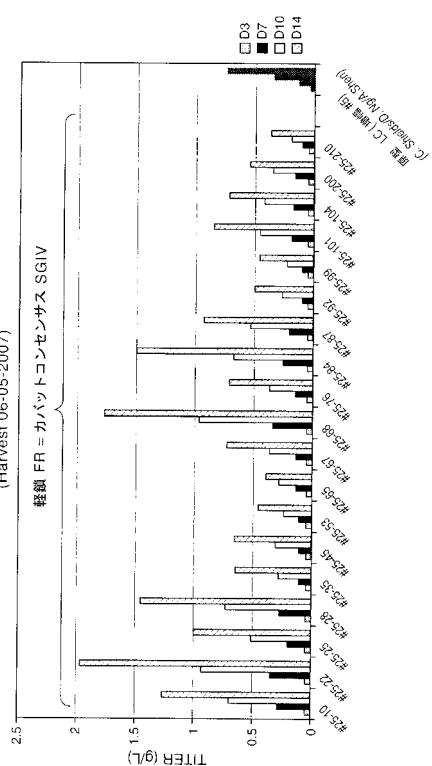
【図28A-B】



### 【図2.8C-D】



【図29】



【配列表】

0005394246000001.app

## フロントページの続き

		F I		
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/574	D
<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	T
<b>C 1 2 P</b>	<b>21/08</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	N
			A 6 1 K 39/395	C
			A 6 1 K 39/395	L
			A 6 1 P 35/00	
			C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 ルビンフェルド, ボニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94506, ダンビル, クウェイル ラン ドライブ 4  
186

(72)発明者 ポラキス, ポール

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94941, ミル ヴァレイ, ウエスト ブライズデイル  
アヴェニュー 265

(72)発明者 ヤコボビッツ, アヤ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90210, ビバリー ヒルズ, ハットン ドライブ 3  
135

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 國際公開第2005/113601 (WO, A1)

國際公開第2006/034488 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 0 0 - 15 / 9 0  
C 0 7 K 1 / 0 0 - 19 / 0 0  
UniProt/GenSeq  
PubMed  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)  
Caplus/BIOSIS(STN)  
Thomson Innovation