

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-529656

(P2015-529656A)

(43) 公表日 平成27年10月8日(2015.10.8)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A 61 K 39/395	Z N A C	4 B 0 6 4
<b>A61K 31/706 (2006.01)</b>	A 61 K 39/395	N	4 C 0 8 4
<b>A61K 31/5517 (2006.01)</b>	A 61 K 39/395	L	4 C 0 8 5
<b>A61K 45/00 (2006.01)</b>	A 61 K 39/395	D	4 C 0 8 6
<b>A61K 38/00 (2006.01)</b>	A 61 K 39/395	E	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-525601 (P2015-525601)	(71) 出願人	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25年8月1日 (2013.8.1)	(74) 代理人	110002077 園田・小林特許業務法人
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月24日 (2015.3.24)	(72) 発明者	アスンディ, ジョティー アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/053250	(72) 発明者	クラーク, スザンナ アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
(87) 國際公開番号	W02014/022680		
(87) 國際公開日	平成26年2月6日 (2014.2.6)		
(31) 優先権主張番号	61/678,913		
(32) 優先日	平成24年8月2日 (2012.8.2)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗ETBR抗体および免疫複合体

## (57) 【要約】

本発明は、抗ETBR抗体および免疫複合体ならびにそれらを使用する方法を提供する。いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤に共有結合されたETBRに結合する抗体を含む免疫複合体が提供され、この抗体は、配列番号10のアミノ酸64～101内のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、ネモルビシン誘導体である。

【選択図】 図9

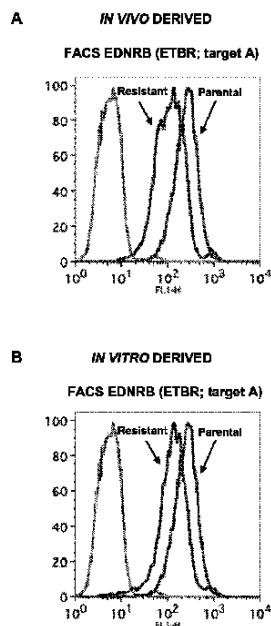


FIG. 9

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞傷害性薬剤に共有結合された E T B R に結合する抗体を含む、免疫複合体であって、前記抗体は、配列番号 10 のアミノ酸 64 ~ 101 内のエピトープに結合し、前記細胞傷害性薬剤は、ネモルビシン誘導体である、免疫複合体。

**【請求項 2】**

前記抗体は、(i) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(ii) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、および(iii) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を含む、請求項 1 に記載の免疫複合体。

**【請求項 3】**

前記抗体は、(i) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(ii) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および(iii) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の免疫複合体。

**【請求項 4】**

前記抗体は、(i) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(ii) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(iii) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(iv) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(v) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および(vi) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、請求項 1 に記載の免疫複合体。

**【請求項 5】**

前記抗体は、(i) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(ii) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および(iii) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

**【請求項 6】**

前記抗体は、  
 a) 配列番号 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する V H 配列、または  
 b) 配列番号 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する V L 配列、または  
 c) (a) に記載の V H 配列および(b) に記載の V L 配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

**【請求項 7】**

配列番号 8 または配列番号 9 のアミノ酸配列を有する V H 配列を含む、請求項 6 に記載の免疫複合体。

**【請求項 8】**

配列番号 7 のアミノ酸配列を有する V L 配列を含む、請求項 6 に記載の免疫複合体。

**【請求項 9】**

細胞傷害性薬剤に共有結合された E T B R に結合する抗体を含む、免疫複合体であって、前記抗体は、(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列を有する V H 配列および配列番号 7 のアミノ酸配列を有する V L 配列を含み、前記細胞傷害性薬剤は、ネモルビシン誘導体である、免疫複合体。

**【請求項 10】**

前記抗体は、IgG1、IgG2a、または IgG2b 抗体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

**【請求項 11】**

前記免疫複合体は、式 A b - (L - D) p を有し、式中、  
 (a) A b は、前記抗体であり、  
 (b) L は、リンカーであり、  
 (c) D は、前記細胞傷害性薬剤であり、  
 (d) p は、1 ~ 8 の範囲である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体

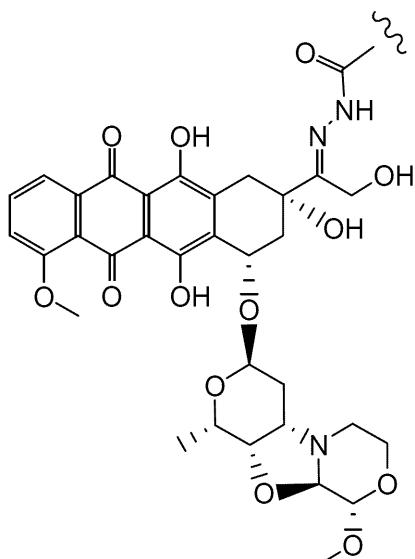
。

## 【請求項 1 2】

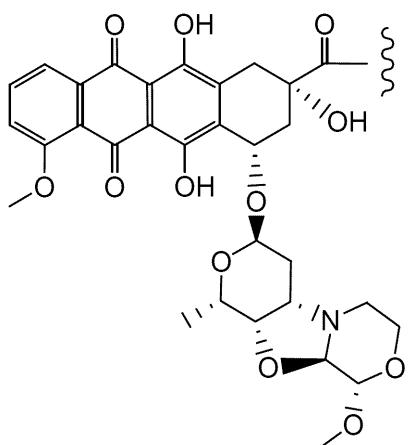
D は、ネモルビシン誘導体である、請求項 1 1 に記載の免疫複合体。

## 【請求項 1 3】

D は、



、および



10

20

30

から選択される構造を有する、請求項 1 2 に記載の免疫複合体。

## 【請求項 1 4】

前記リンカーは、プロテアーゼによって切断可能である、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

## 【請求項 1 5】

前記リンカーは、val - cit ジペプチドまたは Phe - ホモ Lys ジペプチドを含む、請求項 1 4 に記載の免疫複合体。

## 【請求項 1 6】

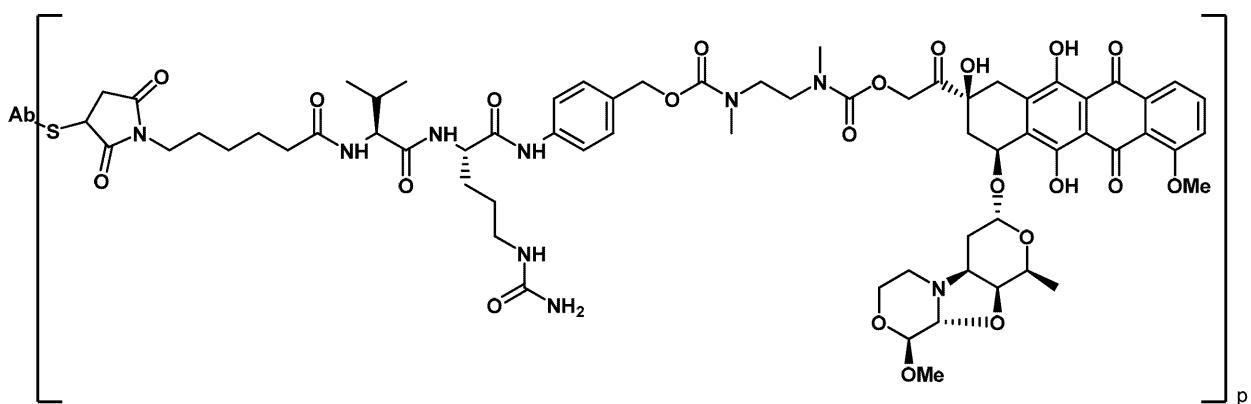
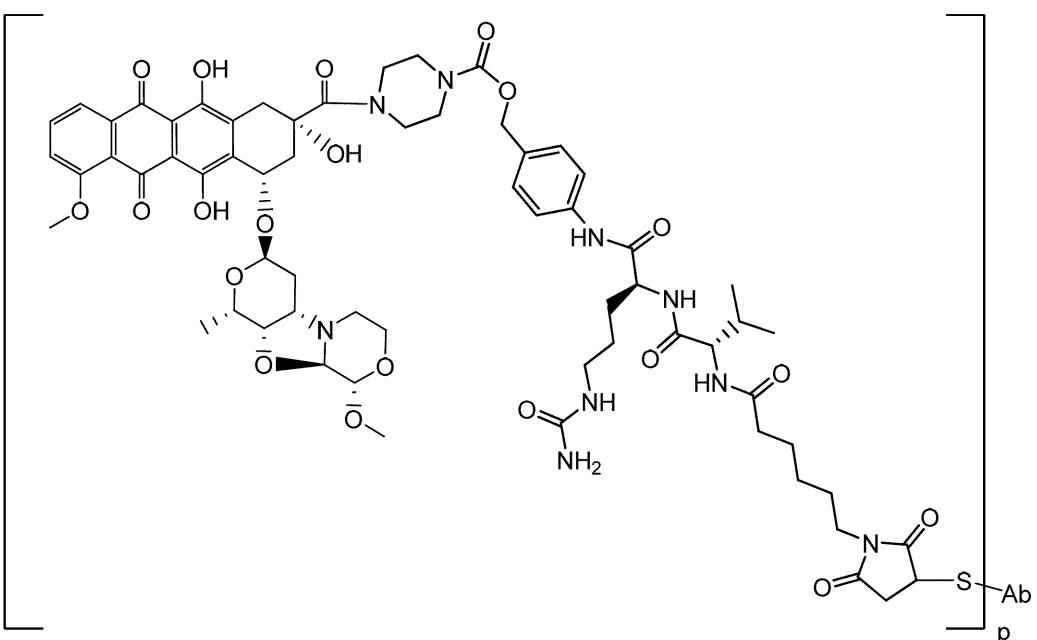
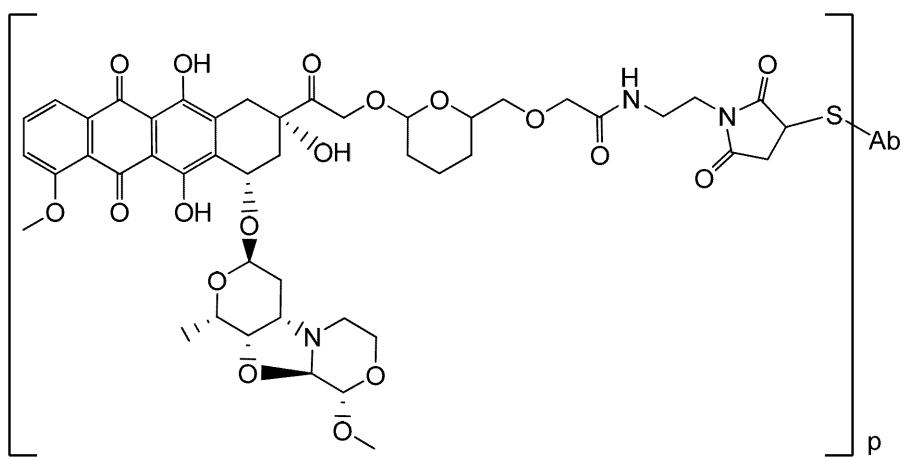
前記リンカーは、酸不安定性である、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

## 【請求項 1 7】

前記リンカーは、ヒドラゾンを含む、請求項 1 6 に記載の免疫複合体。

## 【請求項 1 8】

40

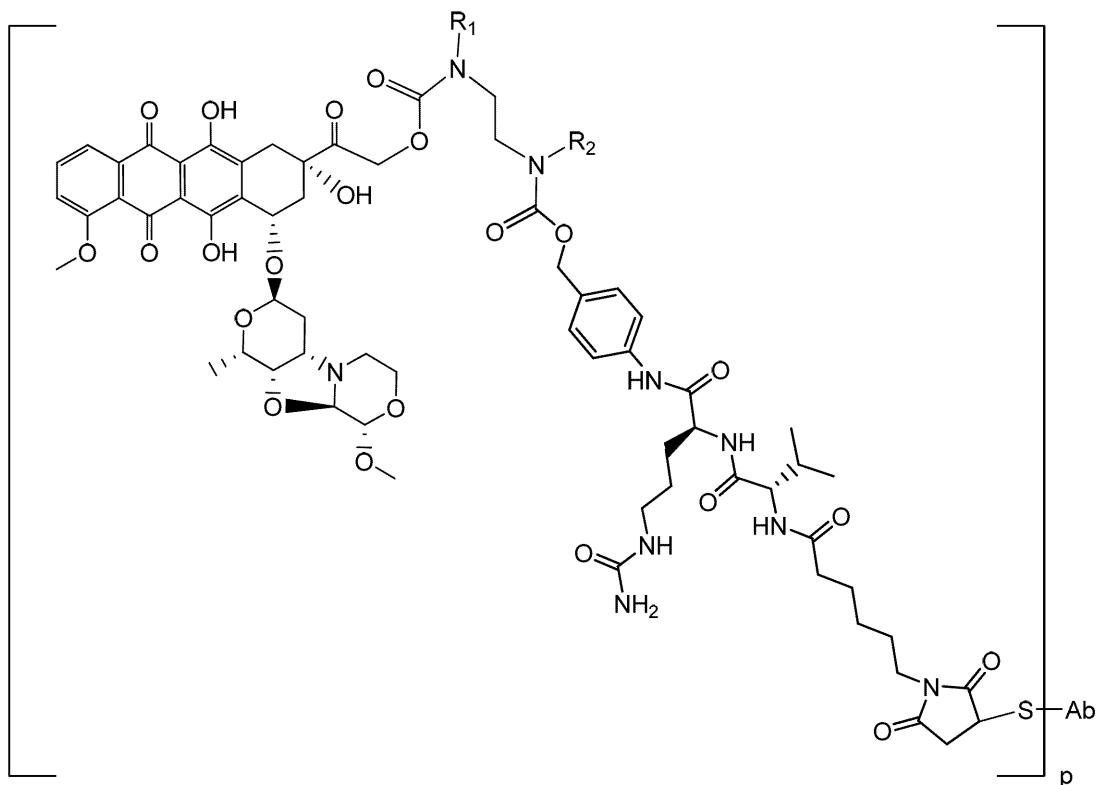


10

20

30

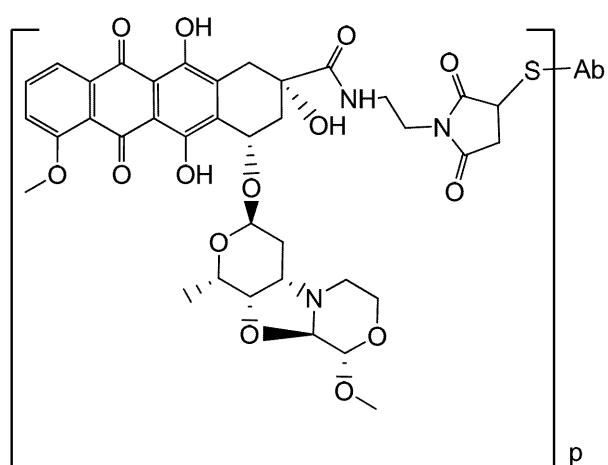
40



10

20

、および



30

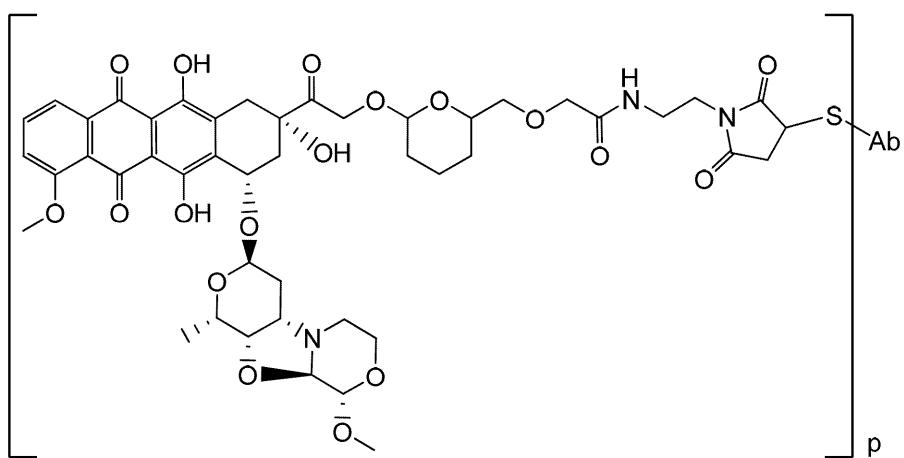
から選択される式を有し、式中、 $\text{R}_1$  および  $\text{R}_2$  は独立して、H および  $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$  アルキルから選択される、請求項 1 2 に記載の免疫複合体。

**【請求項 1 9】**

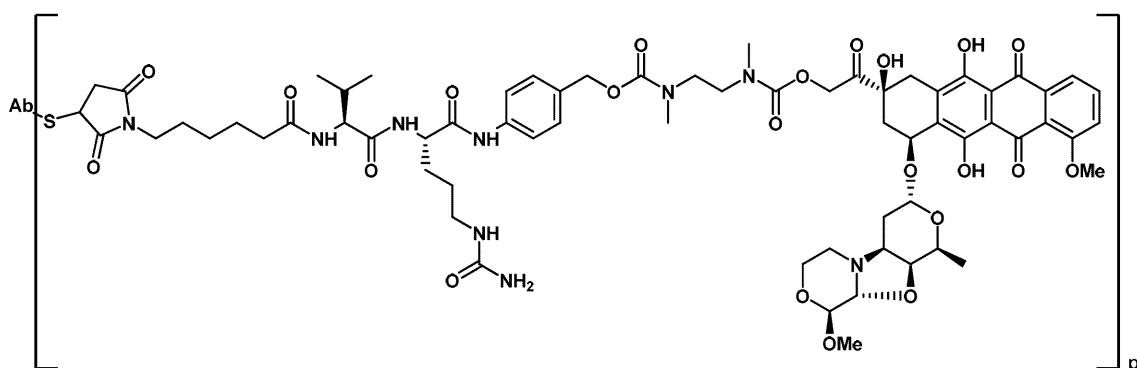
p は、1 ~ 3 の範囲である、請求項 1 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

40

**【請求項 2 0】**



、および



から選択される式を有し、式中、Abは、(i)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(iii)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(iv)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(v)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(vi)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、抗体であり、pは、1～3の範囲である、免疫複合体。

#### 【請求項21】

前記抗体は、配列番号8のVH配列および配列番号7のVL配列を含む、請求項20に記載の免疫複合体。

#### 【請求項22】

前記抗体は、配列番号6の重鎖および配列番号5の軽鎖を含む、請求項21に記載の免疫複合体。

#### 【請求項23】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項1～22のいずれか1項に記載の免疫複合体。

#### 【請求項24】

前記抗体は、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体である、請求項1～23のいずれか1項に記載の免疫複合体。

#### 【請求項25】

前記抗体は、ETBRに結合する抗体断片である、前請求項1～24のいずれか1項に記載の免疫複合体。

#### 【請求項26】

前記抗体は、ヒトETBRに結合する、請求項1～25のいずれか1項の請求項に記載の免疫複合体。

#### 【請求項27】

10

20

30

40

40

50

ヒト E T B R は、配列番号 1 0 または配列番号 1 1 の配列を有する、請求項 2 6 に記載の免疫複合体。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬製剤。

【請求項 2 9】

追加の治療剤をさらに含む、請求項 2 8 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 0】

E T B R 陽性がんを有する個体を治療する方法であって、前記方法は、前記個体に、有効量の、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体を投与することを含む、方法。

10

【請求項 3 1】

前記 E T B R 陽性がんは、黒色腫である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

追加の治療剤を前記個体に投与することをさらに含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記追加の治療剤は、P M E L 1 7 に結合する抗体を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記追加の治療剤は、細胞傷害性薬剤に共有結合された P M E L 1 7 に結合する抗体を含む免疫複合体である、請求項 3 3 に記載の方法。

20

【請求項 3 5】

E T B R 陽性細胞の増殖を阻害する方法であって、前記方法は、前記細胞を、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体に、前記細胞の表面上の E T B R への前記免疫複合体の結合を許容する条件下で曝露し、それによって前記細胞の増殖を阻害することを含む、方法。

【請求項 3 6】

前記細胞は、黒色腫細胞である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

E T B R 陽性がんを有する個体を治療する方法であって、前記 E T B R 陽性がんは、第 1 の治療薬に耐性であり、前記方法は、前記個体に、有効量の、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体を投与することを含む、方法。

30

【請求項 3 8】

前記 E T B R 陽性がんは、黒色腫である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記第 1 の治療薬は、E T B R 以外の抗原に結合する第 1 の抗体を含む、請求項 3 7 または請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記第 1 の治療薬は、E T B R 以外の抗原に結合する第 1 の抗体と、第 1 の細胞傷害性薬剤とを含む、第 1 の免疫複合体である、請求項 3 9 に記載の方法。

40

【請求項 4 1】

前記第 1 の抗体は、P M E L 1 7 、チロシナーゼ関連タンパク質 1 ( T Y R P 1 ) 、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 ( C T L A - 4 ) 、および糖タンパク質 N M B ( G P N M B ) から選択される抗原に結合する、請求項 3 9 または請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記第 1 の抗体は、P M E L 1 7 に結合する、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記第 1 の治療薬は、E T B R に結合する第 1 の抗体を含む、請求項 3 7 または請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記第 1 の治療薬は、E T B R に結合する第 1 の抗体と、第 1 の細胞傷害性薬剤とを含

50

む、第1の免疫複合体である、請求項43に記載の方法。

**【請求項45】**

前記第1の細胞傷害性薬剤と請求項1～27のいずれか1項に記載の免疫複合体の前記細胞傷害性薬剤とは、異なる、請求項40～44のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項46】**

前記第1の細胞傷害性薬剤は、MMAEである、請求項45に記載の方法。

**【請求項47】**

ETBR陽性がんを有する個体を治療する方法であつて、前記個体に、有効量の、請求項1～27のいずれか1項に記載の第1の免疫複合体を、PMEL17に結合する抗体を含む第2の免疫複合体と組み合わせて投与することを含む、方法。10

**【請求項48】**

PMEL17に結合する前記抗体は、配列番号21の配列を含むHVR-H1、配列番号22の配列を含むHVR-H2、配列番号23の配列を含むHVR-H3、配列番号24の配列を含むHVR-L1、配列番号25の配列を含むHVR-L2、および配列番号26の配列を含むHVR-L3を含む、請求項47に記載の方法。

**【請求項49】**

前記第2の免疫複合体は、オーリスタチン、ピロロベンゾジアゼピン、およびネモルビシン誘導体から選択される細胞傷害性薬剤を含む、請求項47または請求項48に記載の方法。

**【請求項50】**

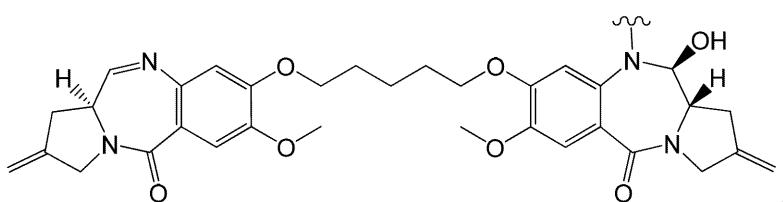
前記第2の免疫複合体は、オーリスタチンまたはピロロベンゾジアゼピンを含む、請求項47～49のいずれか1項に記載の方法。20

**【請求項51】**

前記第2の免疫複合体は、MMAEを含む、請求項47～50のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項52】**

前記第2の免疫複合体は、構造、



を有するPBD二量体を含み、式中、波線は、リンカーへの共有結合を示す、請求項47～50のいずれか1項に記載の方法。30

**【請求項53】**

前記第2の免疫複合体は、MC-val-cit-PAB-MMAEを含むリンカ- -薬物部分を含む、請求項47～51のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項54】**

前記第2の免疫複合体は、MC-val-cit-PABを含むリンカ- -を含む、請求項47～50および52のいずれか1項に記載の方法。40

**【請求項55】**

前記ETBR陽性がんは、黒色腫である、請求項47～54のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項56】**

前記ETBR陽性がんは、さらにPMEL17陽性である、請求項47～55のいずれか1項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

10

20

30

40

50

**【0001】**

本発明は、抗 E T B R 抗体を含む免疫複合体およびそれらを使用する方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

黒色腫は、最近、発生率が憂慮すべきほどに増加している、侵攻性型の皮膚がんである。治療は、局所病変の外科的切除により達成し得るが、進行期の黒色腫は、現在認可されている治療法に対して応答性が不十分でしかない。第 I V 期転移性黒色腫の 5 年生存率は、およそ 10 % である。B c 1 2 に対するアンチセンス、C T L A 4 に対する抗体、小分子R A F キナーゼ阻害剤、および養子免疫療法を含む、新たな治療的アプローチが、現在、転移性黒色腫に対して臨床試験段階にある。これらの最近の研究のうちのいくつかによる結果は、有望であるように思われるが、全体的な生存率に対する永続的な影響には、追加の新たな治療剤を含む治療薬の組み合わせを必要とする可能性が高い。10

**【0003】**

20 年よりも前に、エンドセリン - 1 ( E T - 1 ) が大動脈内皮細胞から単離され、強力な血管収縮活性を有することが見出された。エンドセリンのための受容体が、その後間もなくクローニングされ、メラニン細胞および黒色腫細胞を含む、種々の細胞型におけるそれらの発現は、内皮におけるそれらの役割から独立した機能を指摘した。エンドセリン B 受容体 ( E T B R 、 E D N B R ) が、胚発生中に神経堤から発生するメラニン細胞の忠実な誘導に必要不可欠であることは今ではよく認識されている。メラニン細胞前駆体は、増殖し、神経管からそれらの最終的な目的地へと遊走するために、 E T B R 活性に依存する。 E T B R またはエンドセリン - 3 ( E T - 3 ) をコードする遺伝子の欠陥を有するマウスは、それらの毛並における色素形成の欠損、および同じく神経堤に由来する、腸管神経節細胞の不足を示す。これらの特徴は、 E T - 3 または E T B R のいずれかにおける生殖細胞突然変異に起因するとされてきた、ヒトにおけるワールデンブルグ症候群の W S 4 変異形に関連する特徴と酷似する。この症候群の追加の変異形である W S 2 は、メラニン細胞発達の主要な調節因子および黒色腫のがん原遺伝子である、小眼球症関連転写因子 ( M I T F ) における遺伝的突然変異にマッピングされた。20

**【0004】**

E T B R 活性をメラニン芽細胞の結末に関連付ける強力な遺伝学的証明は、黒色腫の進行においてこの受容体についての可能性のある役割を強調する。 E T B R m R N A およびタンパク質の発現は、異形成母斑から転移性黒色腫への疾患進行中に増加することが報告された。2つの独立した小分子阻害剤による E T B R 活性の遮断は、黒色腫細胞および腫瘍異種移植片の成長および生存を干渉した。これらの前臨床研究は、 E T B R を、黒色腫進行の可能性のある駆動因子として関連付けている。30

**【0005】**

当該技術分野において、がん等の E T B R 関連病態の診断および治療のために、 E T B R を標的とする薬剤に対する必要性が存在する。本発明はその必要性を満たし、また他の便益を提供する。

**【発明の概要】****【0006】**

本発明は、抗 E T B R 抗体および免疫複合体ならびにそれらを使用する方法を提供する。40

**【0007】**

いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤に共有結合された E T B R に結合する抗体を含む、免疫複合体が提供され、この抗体は、配列番号 10 のアミノ酸 64 ~ 101 内のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、ネモルビシン ( n e m o r u b i c i n ) 誘導体である。

**【0008】**

いくつかの実施形態において、本抗体は、( i ) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 、( i i ) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、および( i i i )50

)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(i)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(iii)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(i)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(iii)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(iv)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(v)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(vi)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(i)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(iii)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、a)配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列、またはb)配列番号7のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列、またはc)(a)にあるようなVH配列および(b)にあるようなVL配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号8または配列番号9のアミノ酸配列を有するVH配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を有するVL配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、IgG1、IgG2a、またはIgG2b抗体である。

10

20

30

## 【0009】

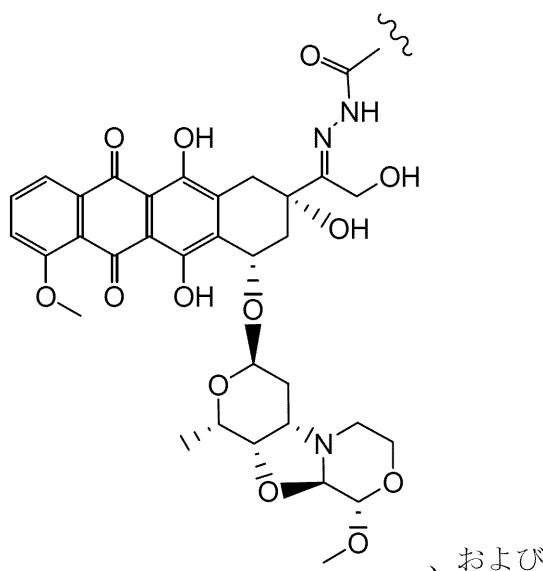
いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤に共有結合されたETBRに結合する抗体を含む、免疫複合体が提供され、この抗体は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を有するVH配列および配列番号7のアミノ酸配列を有するVL配列を含み、この細胞傷害性薬剤は、ネモルビシン誘導体である。

## 【0010】

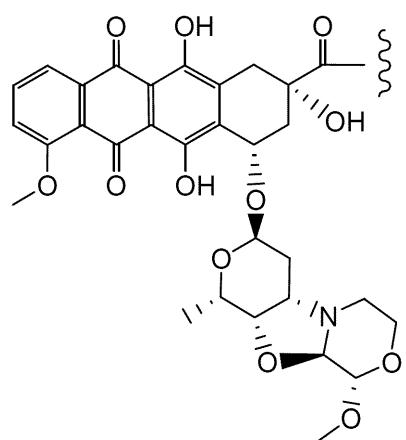
いくつかの実施形態において、本免疫複合体は、式A<sub>b</sub>-(L-D)<sub>p</sub>を有し、式中、(a)A<sub>b</sub>は、抗体であり、(b)Lは、リンカーであり、(c)Dは、細胞傷害性薬剤であり、(d)pは、1~8の範囲である。

## 【0011】

いくつかの実施形態において、Dは、ネモルビシン誘導体である。いくつかのかかる実施形態において、Dは、



、および



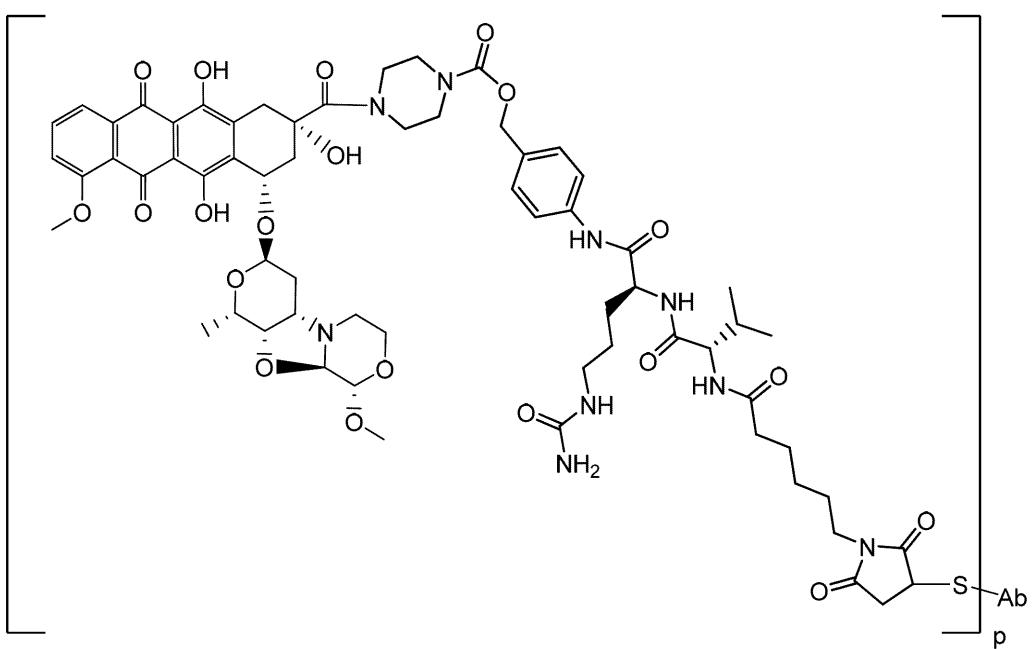
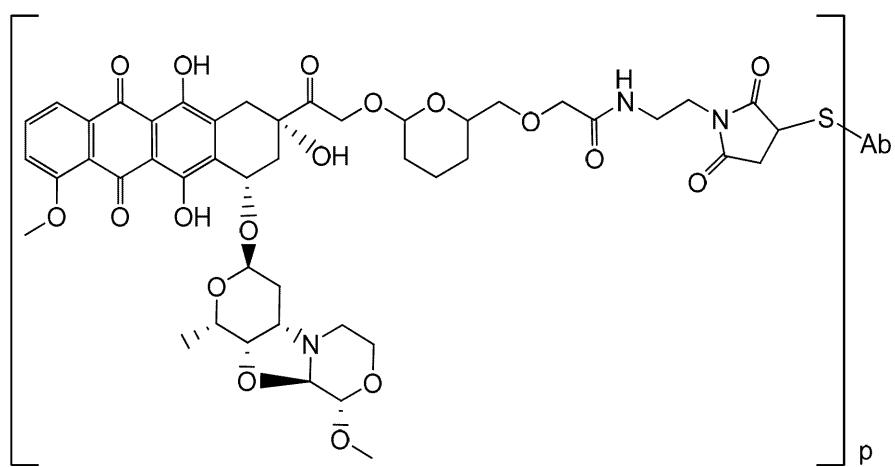
から選択される構造を有する。

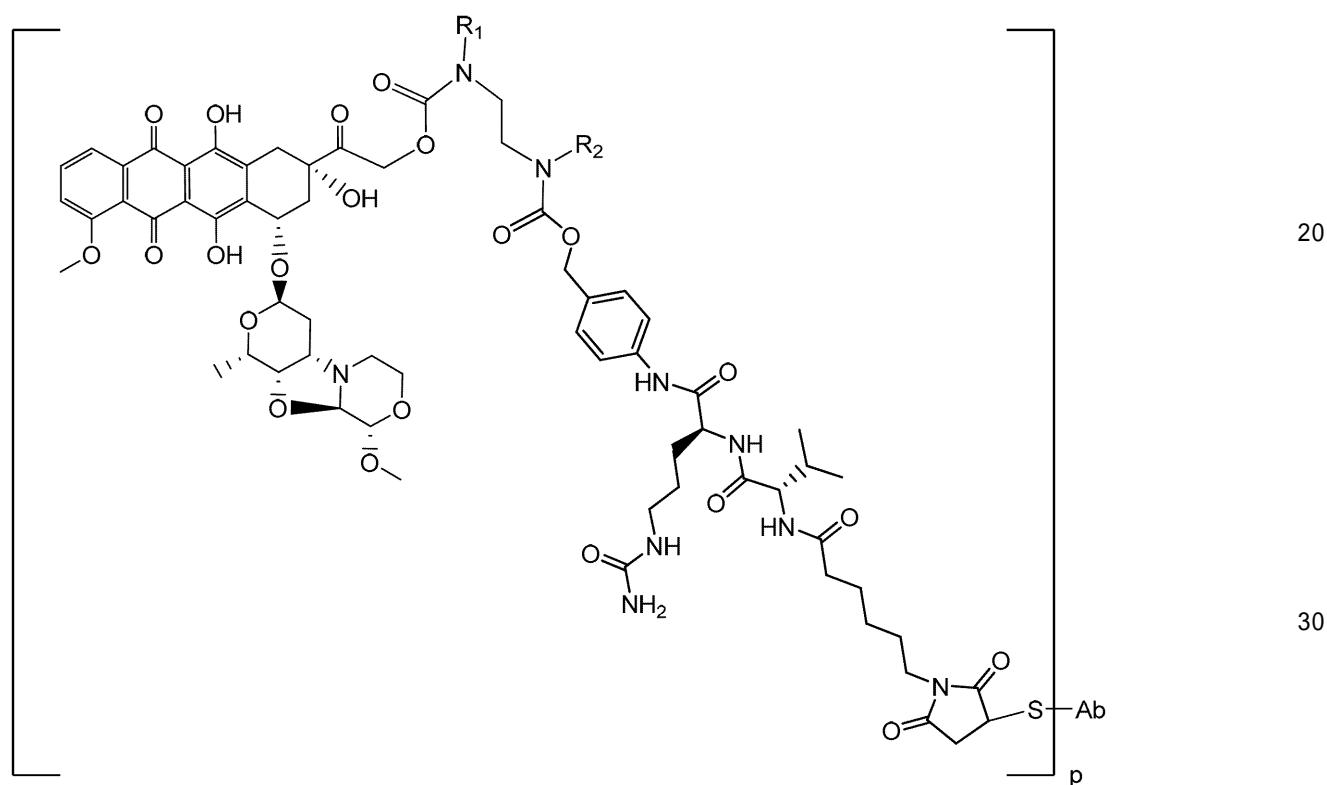
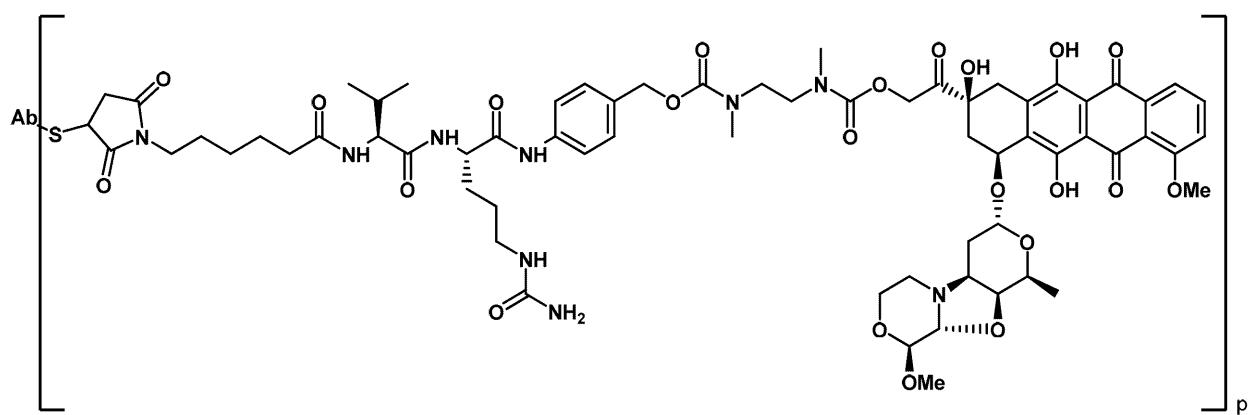
【0012】

いくつかの実施形態において、本免疫複合体は、プロテアーゼによって切断可能であるリンカーを含む。いくつかのかかる実施形態において、リンカーは、*v a l - c i t*ジペプチドまたは*P h e - H o m L y s*ジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、免疫複合体は、酸不安定性であるリンカーを含む。

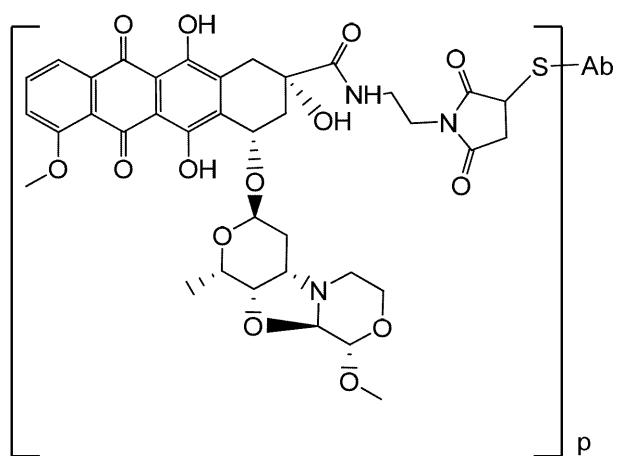
【0013】

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、





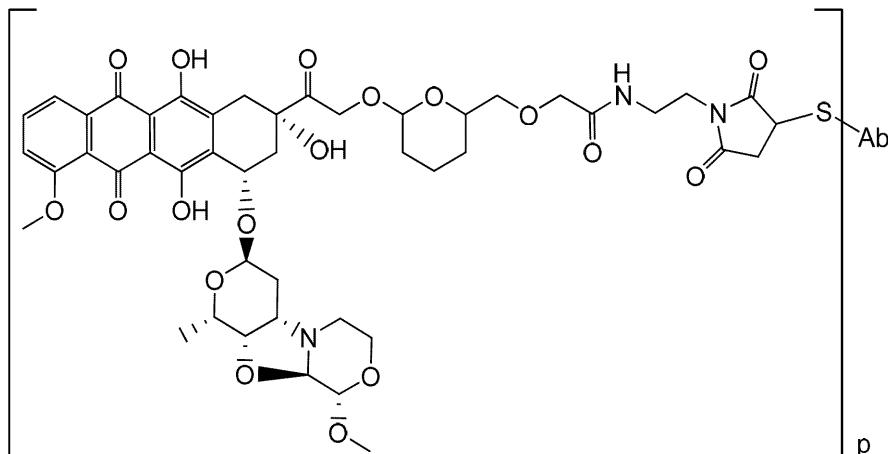
、および



から選択される式を有し、式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は独立して、HおよびC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルから選択される。いくつかの実施形態において、pは、1～3の範囲である。

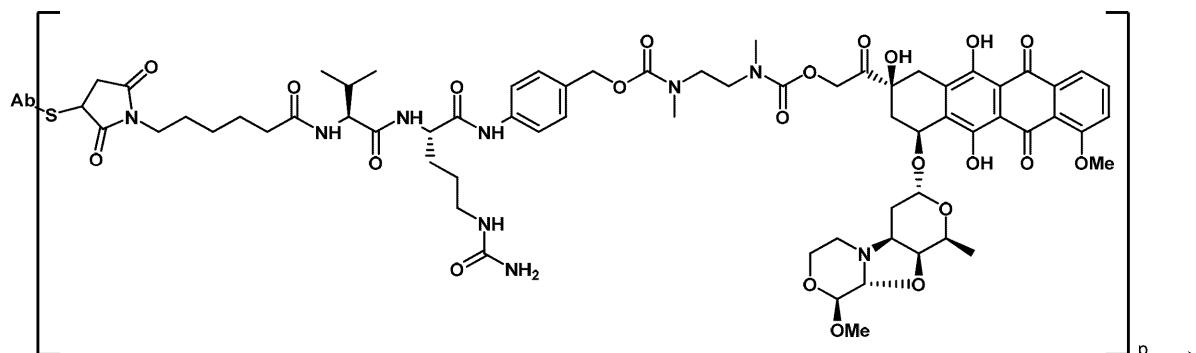
#### 【0014】

いくつかの実施形態において、免疫複合体が提供され、この免疫複合体は、



10

、および



20

から選択される式を有し、Abは、(i)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(iii)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(iv)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(v)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(vi)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、抗体であり、pは、1～8、または1～7、または1～6、または1～5、または1～4、または1～3の範囲である。いくつかのかかる実施形態において、本抗体は、配列番号8のVH配列および配列番号7のVL配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号6の重鎖および配列番号5の軽鎖を含む。

30

#### 【0015】

本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、本抗体は、モノクローナル抗体であってもよい。いくつかの実施形態において、本抗体は、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体であってもよい。いくつかの実施形態において、本抗体は、ETBRに結合する抗体断片である。いくつかの実施形態において、本抗体は、ヒトETBRに結合する。いくつかのかかる実施形態において、ヒトETBRは、配列番号10または配列番号11の配列を有する。

40

#### 【0016】

いくつかの実施形態において、医薬製剤が提供され、この製剤は、本明細書に記載される免疫複合体と、薬学的に許容される担体とを含む。いくつかの実施形態において、医薬製剤は、追加の治療剤を含む。

#### 【0017】

50

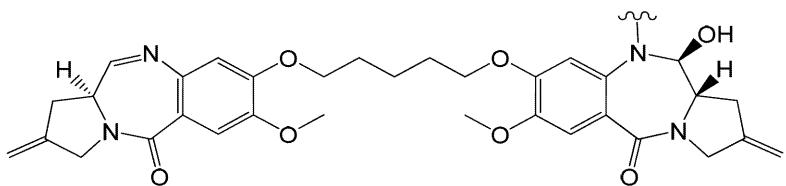
いくつかの実施形態において、ETBR陽性がんを有する個体を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、個体に、有効量の本明細書に記載される免疫複合体を投与することを含む。いくつかの実施形態において、ETBR陽性がんは、黒色腫および多発性骨髄腫から選択される。いくつかの実施形態において、本方法は、追加の治療剤を個体に投与することをさらに含む。いくつかのかかる実施形態において、追加の治療剤は、PMEL17に結合する抗体を含む。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、細胞傷害性薬剤に共有結合されたPMEL17に結合する抗体を含む、免疫複合体である。

### 【0018】

いくつかの実施形態において、ETBR陽性がんを有する個体を治療する方法であって、このETBR陽性がんが第1の治療薬に対して耐性である、方法が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、個体に、有効量の本明細書に記載される免疫複合体を投与することを含む。いくつかの実施形態において、ETBR陽性がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態において、第1の治療薬は、ETBR以外の抗原に結合する第1の抗体を含む。いくつかの実施形態において、第1の治療薬は、ETBR以外の抗原に結合する第1の抗体と、第1の細胞傷害性薬剤とを含む、第1の免疫複合体である。いくつかの実施形態において、第1の抗体は、メラニン細胞タンパク質PMEL17、チロシナーゼ関連タンパク質1(TYRP1)、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTL4-4)、および糖タンパク質NMB(GPNMB)から選択される抗原に結合する。いくつかの実施形態において、第1の治療薬は、ETBRに結合する第1の抗体を含む。いくつかの実施形態において、第1の治療薬は、ETBRに結合する第1の抗体と、第1の細胞傷害性薬剤とを含む、第1の免疫複合体である。いくつかの実施形態において、第1の細胞傷害性薬剤および本明細書に記載される免疫複合体の細胞傷害性薬剤は、異なる。いくつかの実施形態において、第1の細胞傷害性薬剤は、MMAEである。

### 【0019】

いくつかの実施形態において、ETBR陽性がんを有する個体を治療する方法が提供され、本方法は、個体に、本明細書に記載される有効量の第1の免疫複合体を、PMEL17に結合する抗体を含む第2の免疫複合体と組み合わせて投与することを含む。いくつかの実施形態において、PMEL17に結合する抗体は、配列番号21の配列を含むHVR-H1、配列番号22の配列を含むHVR-H2、配列番号23の配列を含むHVR-H3、配列番号24の配列を含むHVR-L1、配列番号25の配列を含むHVR-L2、および配列番号26の配列を含むHVR-L3を含む。いくつかの実施形態において、第2の免疫複合体は、オーリスタチン、ピロロベンゾジアゼピン、およびネモルビシン誘導体から選択される細胞傷害性薬剤を含む。いくつかの実施形態において、第2の免疫複合体は、オーリスタチンまたはピロロベンゾジアゼピンを含む。いくつかの実施形態において、第2の免疫複合体は、MMAEを含む。いくつかのかかる実施形態において、第2の免疫複合体は、MC-val-cit-PAB-MMAEを含むリンカー-薬物部分を含む。いくつかの実施形態において、第2の免疫複合体は、構造、



を有するPBD二量体を含み、式中、波線は、リンカーへの結合を示す。いくつかの実施形態において、第2の免疫複合体は、MC-val-cit-PABを含むリンカーを含む。前述の実施形態のうちのいずれかにおいて、ETBR陽性がんは、黒色腫であり得る。いくつかの実施形態において、ETBR陽性がんはまた、PMEL17陽性でもある。

### 【0020】

いくつかの実施形態において、ETBR陽性細胞の増殖を阻害する方法が提供される。

10

20

30

40

50

いくつかのかかる実施形態において、本方法は、細胞を、本明細書に記載される免疫複合体に、細胞の表面上の E T B R への免疫複合体の結合を許容する条件下で曝露し、それによって細胞の増殖を阻害することを含む。いくつかの実施形態において、細胞は、黒色腫細胞である。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0021】

【図1】マウス5E9モノクローナル抗体の完全長軽鎖（配列番号1）およびマウス5E9モノクローナル抗体の可変軽鎖（配列番号3）のアミノ酸配列を示す。

【図2】マウス5E9モノクローナル抗体の完全長重鎖（配列番号2）およびマウス5E9モノクローナル抗体の可変重鎖（配列番号4）のアミノ酸配列を示す。  
10

【図3】ヒト化hu5E9.v1抗体の完全長軽鎖（配列番号5）およびヒト化hu5E9.v1抗体の可変軽鎖（配列番号7）のアミノ酸配列を示す。

【図4】ヒト化hu5E9.v1抗体の完全長重鎖（配列番号6）およびヒト化hu5E9.v1抗体の可変重鎖（配列番号8）のアミノ酸配列を示す。

【図5】ヒト化hu5E9.v2抗体の可変重鎖（配列番号9）のアミノ酸配列を示す。

【図6】例となるヒトETBRタンパク質のアミノ酸配列（配列番号10）およびこのタンパク質の種々の特徴を示す。

【図7】(A) Ab - MC - val - cit - PAB - MMAE、(B) Ab - MC - アセタール - PNU - 159682、(C) Ab - MC - val - cit - PAB - PNU - 159682、および(D) Ab - PNU - 159682を含む、種々の抗体-薬物複合体の構造を示す。  
20

【図8】実施例Bに記載される、(A) UACC-257X2.2黒色腫細胞を接種され、様々な用量の抗ETBR-vc-MMAE（「5E9v1-vcE」）投与されたマウスにおける経時的な腫瘍体積、ならびに(B)漸増濃度の抗ETBR-vc-MMAE ADCの存在下で、体外で成長させられた親および耐性UACC-257X2.2細胞を示す。

【図9】実施例Bに記載される、体内(A)および体外(B)で誘導された親および耐性UACC-257X2.2細胞における、ETBR（「EDNRB」とも称される）の発現を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0022】

###### I. 定義

本明細書における目的のために、「アクセプターヒトフレームワーク」は、下に定義される、ヒト免役グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変ドメイン（VL）フレームワークまたは重鎖可変ドメイン（VH）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免役グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」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んでもよく、またはそれは、アミノ酸配列変化を含有し得る。いくつかの実施形態において、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、または2以下である。いくつかの実施形態において、VLアクセプターヒトフレームワークは、配列において、VLヒト免役グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と同一である。  
40

##### 【0023】

「親和性」は、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の、総計の非共有性相互作用の強度を指す。別途指定されない限り、本明細書で使用されるとき、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体および抗原）間の1:1の相互作用を反映する、本来の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数（Kd）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例示説明および例となる実施形態  
50

が、以下に記載される。

【0024】

「親和性成熟」抗体は、変化を有しない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域（HVR）において1つ以上の変化を有し、かかる変化が抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす、抗体を指す。

【0025】

「抗ETBR抗体」および「ETBRに結合する抗体」という用語は、抗体が、診断剤および／または治療剤として、ETBRを標的とすることにおいて有用であるように、ETBRに十分な親和性で結合可能である抗体を指す。一実施形態において、無関係の非ETBRタンパク質への抗ETBR抗体の結合の程度は、例えば、放射免疫測定法（RIA）によって測定するとき、ETBRへの抗体の結合の約10%未満である。ある特定の実施形態において、ETBRに結合する抗体は、1μM以下、100nM以下、10nM以下、5nM以下、4nM以下、3nM以下、2nM以下、1nM以下、0.1nM以下、0.01nM以下、または0.001nM以下（例えば、 $10^{-8}$ M以下、例えば、 $10^{-8}$ M～ $10^{-13}$ M、例えば、 $10^{-9}$ M～ $10^{-13}$ M）の解離定数（Kd）を有する。ある特定の実施形態において、抗ETBR抗体は、異なる種由来のETBRの間で保存されるETBRのエピトープに結合する。

10

【0026】

「抗体」という用語は、本明細書で最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を含むが、これらに限定されない、種々の抗体構造を包含する。

20

【0027】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部分を含み、インタクトな抗体が結合する抗原に結合する、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>；二重特異性抗体；線状抗体（lineар antibodies）；1本鎖抗体分子（例えば、scFv）；および抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0028】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、その抗原への参照抗体の結合を50%以上遮断する抗体、および逆に、競合アッセイにおいて、その抗原への抗体の結合を50%以上遮断する参照抗体を指す。例となる競合アッセイが本明細書に提供される。

【0029】

「がん」および「がん性」という用語は、未制御な細胞成長／増殖によって典型的に特徴付けられる、哺乳動物における生理的状態を指すか、または説明する。がんの例としては、黒色腫、がん腫、リンパ腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられるが、これらに限定されない。かかるがんのより特定の例としては、扁平上皮細胞がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺がん、肺の扁平上皮がん、腹膜のがん、肝細胞がん、消化器がん、脾臓がん、神経膠腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、肝細胞腫、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜または子宮がん腫、唾液腺がん、腎臓がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰部がん、甲状腺がん、肝臓がん、白血病および他のリンパ増殖性障害、ならびに種々の種類の頭頸部がんが挙げられる。

40

【0030】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖および／または軽鎖の一部が特定の源または種に由来する一方で、重鎖および／または軽鎖の残りの部分が異なる源または種に由来する、抗体を指す。

【0031】

抗体の「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域の型を

50

指す。5つの主要な抗体クラスIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMが存在し、これらのうちの数個は、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、およびIgA<sub>2</sub>にさらに分割され得る。免役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、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、および $\mu$ と呼ばれる。

### 【0032】

本明細書で使用される「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞機能を阻害するもしくは阻止する、および／または細胞死もしくは破壊を引き起こす、物質を指す。細胞傷害性薬剤には、放射性同位体（例えば、At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>、Pb<sup>212</sup>、およびLuの放射性同位体）；化学療法剤もしくは化学療法薬（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカアルカルイド（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、クロラムブシリ、ダウノルビシン、または他のインターフェラント剤）；成長阻害剤；核酸分解酵素等の酵素およびそれらの断片；抗生物質；細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素活性毒素（それらの断片および／または変異形を含む）等の毒素；ならびに下に記載される種々の抗腫瘍または抗がん薬剤が含まれるが、これらに限定されない。

### 【0033】

「化学療法剤」は、がんの治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例としては、チオテパおよびシクロスホスファミド（CYTOXAN（登録商標））等のアルキル化剤；ブスルファン、イムプロスルファン、およびピポスルファン等のスルホン酸アルキル；ベンゾドーパ、カルボクオン、メツレドーパ（meturedopa）、およびウレドーパ（uredopa）等のアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド（triethyleneephosphoramido）、トリエチレンチオホスホラミド、およびトリメチローロメラミン（trimethyloolamine）を含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン（methylamelines）；アセトゲニン（特にプラタシンおよびプラタシノン（bulatacionone））；デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINO L（登録商標））；ベータ-ラバコン；ラバコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン（合成類似体トポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPOTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトセシン、スコポレクチン（scopolectin）、および9-アミノカンプトセシンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン（callystatin）；CC-1065（そのアドレゼン、カルゼルシン（carzelesin）、およびビセレシン合成類似体を含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エリュテロビン；パンクラチスタチン（pancratistatin）；サルコジクチン（sarcolectyin）；スpongiastatin；クロラムブシリ、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンビキン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスター等の窒素マスター類；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン等のニトロソ尿素類；エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシン1IおよびカリケアマイシンI1（例えば、Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)を参照されたい）；ダイネマイシンAを含むダイネマイシン；エスペラマイシン；ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連する色素タンパクエンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン（carabacin）、カルミノ

10

20

30

40

50

マイシン ( carminomycin ) 、カルジノフィリン、クロモマイシン ( chroomomycinis ) 、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、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、およびデオキシドキソルビシンを含む ) 、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン ( marcellomycin ) 、マイトイマイシン、例えは、マイトイマイシン C 、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン ( quellungomycin ) 、ロドルビシン、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、ゾルビシン等の、抗生物質；メトレキサートおよび 5 - フルオロウラシル ( 5 - FU ) 等の代謝拮抗物質；デノブテリン ( denopterin ) 、メトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサート等の葉酸類似体；フルダラビン、6 - メルカブトブリソニン、チアミブリソニン、チオグアニン等のブリソニン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、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、フロクスウリジン等のピリミジン類似体；カルステロン、プロピオニ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、テストラクトン等のアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン等の抗副腎剤 ( anti-adrenalin ) ；葉酸等の葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミド ( aldophosphamide ) グリコシド；アミノレブリソニン酸；エニルウラシル ( eniluracil ) ；アムサクリン；ベストラブシル ( bestrabucil ) ；ビサントレン；エダトレキサート ( edatraxate ) ；デフォファミン ( defofamine ) ；デメコルチソニン；ジアジコン ( diaziquone ) ；エルフオルニチソニン；酢酸エリブチニウム；エポチロン ( epothilone ) ；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン ( lonidamine ) ；メイタンシン ( maytanine ) およびアンサミトシン ( ansamitocin ) 等のメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール ( moperidine ) ；ニトラエリン ( nitraerine ) ；ペントスタチン；フェナメト ( phenamet ) ；ピラルビシン；ロソキサントロン ( losoxanthrone ) ；2 - エチルヒドラジン；プロカルバジン；PSK ( 登録商標 ) 多糖類複合体 ( JHS Natural Products , Eugene , OR ) ；ラゾキサン；リゾキシン ( rhizoxin ) ；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2 , 2' , 2" - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン ( trichothecene ) ( 特に、T - 2 トキシン、ベラクリン A ( verracurin A ) 、ロリジン A ( roridin A ) 、およびアングイジン ( anguidine ) ) ；ウレタン；ビンデシン ( ELDISIN ( 登録商標 ) 、FILDESIN ( 登録商標 ) ) ；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン ( gacytosine ) ；アラビノシド ( 「 Ara - C 」 ) ；チオテバ；タキソイド、例えは、パクリタキセル ( TAXOL ( 登録商標 ) ) ；Bristol - Myers Squibb Oncology , Princeton , N.J. ) 、ABRAXANE ( 商標 ) クレモホールを含有しない、アルブミン操作されたパクリタキセルのナノ粒子製剤 ( American Pharmaceutical Partners , Schaumburg , Illinois ) 、およびドセタキセル ( TAXOTERE ( 登録商標 ) ) ；Rhone - Poulen Rorer , Antony , France ) ；クロラムブシル ( chlorambucil ) ；ゲムシタビン ( GEMZAR ( 登録商標 ) ) ；6 - チオグアニン；メルカブトブリソニン；メトレキセート；シスプラチンおよびカルボプラチソニン等の白金類似体；ビンブラスチソニン ( VELBAN ( 登録商標 ) ) ；白金；エトポシド ( VP - 16 ) ；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチソニン ( ONCOVIN ( 登録商標 ) ) ；オキサリプラチソニン；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 ) ；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノブテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000 ; 10 20 30 40 50

ジフルオロメチルオルニチン( D M F O ) ; レチノイン酸のレチノイド ; カペシタピン( X E L O D A (登録商標) ) ; 上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびに C H O P (シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾロンの併用療法の略語) ; C V P (シクロホスファミド、ビンクリスチン、およびプレドニゾロンの併用療法の略語) ; および F O L F O X (5-FU およびロイコボビンと組み合わせたオキサリプラチン( E L O X A T I N T M (商標) )を用いた治療レジメンの略語) 等の上記の 2 つ以上の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0034】

「エフェクター機能」は、抗体アイソタイプにより様々である、抗体の Fc 領域に起因し得る生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q 結合および補体依存性細胞傷害作用( C D C ) ; Fc 受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用( A D C C ) ; 食作用；細胞表面受容体( 例えば、B 細胞受容体 )の下方制御；ならびに B 細胞活性化が挙げられる。

10

## 【0035】

薬剤、例えば、医薬製剤の「有効量」は、必要な複数回投薬量で一定期間にわたる、所望の治療的または予防的結果を達成するために有効な量を指す。

## 【0036】

「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位を指す。

20

## 【0037】

本明細書における「Fc 領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含有する、免役グロブリン重鎖の C 末端領域を定義するように使用される。この用語は、天然配列 Fc 領域および変異形 Fc 領域を含む。一実施形態において、ヒト IgG 重鎖 Fc 領域は、Cys 226 から、または Pro 230 から、重鎖のカルボキシル末端までに及ぶ。しかしながら、Fc 領域の C 末端リジン( Lys 447 )は、存在することもあれば、しないこともある。本明細書で別途明記されない限り、Fc 領域または定常領域におけるアミノ酸残基の付番は、Kabat et al . , Sequences of Proteins of Immunological Interest , 5th Ed . Public Health Service , National Institutes of Health , Bethesda , MD , 1991 に記載される、EUインデックスとも呼ばれる、EU付番方式に従う。

30

## 【0038】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域( HVR )または相補性決定領域( CDR )残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインの FR は、一般に、4つの FR ドメイン FR1 、 FR2 、 FR3 、および FR4 からなる。したがって、HVR および FR 配列は、一般に、VH( または VL )において次の配列で現れる： FR1 - H1 ( L1 ) - FR2 - H2 ( L2 ) - FR3 - H3 ( L3 ) - FR4 。

## 【0039】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、および「全抗体」という用語は、本明細書で、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有する、または本明細書に定義される Fc 領域を含有する重鎖を有する、抗体を指すように交換可能に使用される。

40

## 【0040】

「ETBR のグリコシリ化型」という用語は、炭水化物残基の付加によって翻訳後修飾されている、ETBR の自然発生型を指す。

## 【0041】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」という用語は、交換可能に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞には、初代形質転換細胞および継代の数に関わらずそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれる。子孫は、核酸含量において親細胞と完全に同一でない場合があるが、突然変異を含有し得る。元々形質転換された細胞においてスクリーニ

50

ングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する突然変異体子孫が、本明細書に含まれる。

【0042】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生された、またはヒト抗体レパートリーを利用する非ヒト源に由来する、抗体のアミノ酸配列、または他のヒト抗体コード配列に対応する、アミノ酸配列を保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に除外する。

【0043】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免役グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を代表する、フレームワークである。一般に、ヒト免役グロブリンVLまたはVH配列の選択は、可変ドメイン配列の下位集団から行われる。一般に、配列の下位集団は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. にあるような下位集団である。一実施形態において、VLについて、下位集団は、上記のKabatらにあるような下位集団カッパIである。一実施形態において、VHについて、下位集団は、上記のKabatらにあるような下位集団IIである。

10

【0044】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基およびヒトFRからのアミノ酸残基を含む、キメラ抗体を指す。ある特定の実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、そのHVR(例えば、CDR)の全てまたは実質的に全てが、非ヒト抗体に対応し、そのFRの全てまたは実質的に全てが、ヒト抗体のそれらに対応する。ヒト化抗体は任意に、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでもよい。抗体、例えば非ヒト抗体の、「ヒト化型」は、ヒト化を経た抗体を指す。

20

【0045】

本明細書で使用される「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列が高度に変化する、かつ/または構造的に規定されたループ(「超可変ループ」)を形成する、抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般に、天然4本鎖抗体は、6つのHVRを含み、このうち3つがVH(H1、H2、H3)にあり、3つがVL(L1、L2、L3)にある。HVRは一般に、超可変ループからのおよび/または「相補性決定領域」(CDR)からのアミノ酸残基を含み、このうち後者が、配列可変性が最も高く、および/または抗原認識に関与する。例となる超可変ループは、アミノ酸残基26~32(L1)、50~52(L2)、91~96(L3)、26~32(H1)、53~55(H2)、および96~101(H3)において生じる。(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))。例となるCDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3)は、アミノ酸残基L1の24~34、L2の50~56、L3の89~97、H1の31~35B、H2の50~65、およびH3の95~102において生じる。(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。VHにおけるCDR1を除いて、CDRは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRはまた、抗原に接触する残基である、「特異性決定残基」または「SDR」も含む。SDRは、短縮型(abbr eviated)CDR、またはa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含有される。例となるa-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、およびa-CDR-H3)は、アミノ酸残基L1の31~34、L2の50~55、L3の89~96、H1の31~35B、H2の50~58、およびH3の95~102において生じる。

30

40

50

02において生じる。(Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619 - 1633 (2008)を参照されたい)。別途指定されない限り、可変ドメインにおけるHVR残基および他の残基(例えば、FR残基)は、本明細書において上記のKabatに従って付番される。

#### 【0046】

「免疫複合体」は、細胞傷害性薬剤を含むが、これらに限定されない1個以上の異種性分子(複数可)に複合される抗体である。

#### 【0047】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物には、家畜(例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ)、靈長類(例えば、ヒト、およびサル等の非ヒト靈長類)、ウサギ、および齧歯類(例えば、マウスおよびラット)が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、個体または対象は、ヒトである。10

#### 【0048】

「単離抗体」は、その天然環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態において、本抗体は、例えば、電気泳動法(例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動(IEF)、キャピラリー電気泳動)またはクロマトグラフ法(例えば、イオン交換または逆相HPLC)によって決定するとき、95%超または99%超の純度まで精製される。抗体の純度の評価のための方法の概説については、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848: 79 - 87 (2007)を参照されたい。20

#### 【0049】

「単離核酸」は、その天然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離核酸には、核酸分子を通常含有する細胞内に含有される核酸分子が含まれるが、その核酸分子は、染色体外に、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に、存在する。

#### 【0050】

「抗ETBR抗体をコードする単離核酸」は、抗体重鎖および軽鎖(またはそれらの断片)をコードする1個以上の核酸分子を指し、それには单一のベクターまたは別個のベクターにおけるかかる核酸分子(複数可)が含まれ、かかる核酸分子(複数可)は、宿主細胞内の1つ以上の場所に存在する。

#### 【0051】

本明細書で使用される「ETBR」は、別途指定されない限り、靈長類(例えば、ヒトおよびカニクリザル(cyno))および齧歯類(例えば、マウスおよびラット)等の哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源由来の任意の天然ETBRを指す。この用語は、「完全長」のプロセシングされていないETBR、ならびに細胞内のプロセシングからもたらされるETBRの任意の形態を包含する。この用語はまた、ETBRの自然発生変異形、例えば、スプライス変異形、対立遺伝子変異形、およびアイソフォームを包含する。例となるヒトETBR前駆体(シグナル配列を含む)のアミノ酸配列は、配列番号10に示される。例となるヒト成熟ETBR(シグナル配列を含まない)のアミノ酸配列は、配列番号11に示される。30

#### 【0052】

「ETBR陽性がん」という用語は、細胞の表面上でETBRを発現する細胞を含むがんを指す。

#### 【0053】

「ETBR陽性細胞」という用語は、その表面上でETBRを発現する細胞を指す。

#### 【0054】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、かつ/または同じエピトープに結合するが、例えば、自然発生突然変異を含有する、またはモノクローナル抗体調製物の產生中に発生する、可能性のある変異形抗体は例外であり、かかる変異形は一般に少量で存在する。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗40

体を典型的に含む、ポリクローナル抗体製剤とは対照的に、モノクローナル抗体製剤の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対する。故に、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の產生を必要とするものとして解釈されないものとする。例えば、本発明による使用対象のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組み換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免役グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むが、これらに限定されない、多様な技法によって作製されてもよく、モノクローナル抗体を作製するためのかかる方法および他の例となる方法が、本明細書に記載されている。

## 【0055】

10

「裸の抗体」は、異種性部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識に複合されていない抗体を指す。裸の抗体は、医薬製剤中に存在してもよい。

## 【0056】

20

「天然抗体」は、様々な構造を有する、自然発生免役グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2つの同一の軽鎖および2つの同一の重鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端まで、各重鎖は、可変重ドメイン（variable heavy domain）または重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）、続いて3つの定常ドメイン（CH1、CH2、およびCH3）を有する。同様に、N末端からC末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメイン（variable light domain）または軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）、続いて定常軽（CL）ドメインを有する。抗体の軽鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ $\kappa$ ）およびラムダ（ $\lambda$ ）と呼ばれる2つの型うちの1つが割り当てられる。

## 【0057】

「添付文書」という用語は、かかる治療薬の適応症、使用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌症についての情報、および／またはその使用に関する警告を含有する、治療薬の商用のパッケージに通常含まれる指示書を指すように使用される。

## 【0058】

30

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（%）」は、配列をアライメントし、配列同一性最大パーセントを得るのに必要な場合はギャップを導入した後に、配列同一性の部分としていかなる保存的置換も考慮に入れずに、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、当該技術分野における技術の範囲内である種々の方式で、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign（DNASTAR）ソフトウェア等の、公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、達成することができる。当業者は、比較されている配列の完全長にわたる最大のアライメントを得るために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列をアライメントするために適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のために、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を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. によって記述され、ソースコードは、ユーザ文書と共に米国著作権庁（U.S. Copyright Office），Washington D.C., 20559に提出されており、米国著作権番号TXU510087の下に登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に利用可能であるか、またはソースコードから編集されてもよい。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムで使用する場合は編集すべきである。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、変更はない。

## 【0059】

50

アミノ酸配列比較のために A L I G N - 2 が用いられる場合、所与のアミノ酸配列 B に対する、それとの、またはそれと対比した、所与のアミノ酸配列 A のアミノ酸配列同一性 % (代替的に、所与のアミノ酸配列 B に対する、それとの、またはそれと対比したある特定のアミノ酸配列同一性 % を有する、またはそれを含む、所与のアミノ酸配列 A と表現され得る) は、次のように算出される：

$$100 \times \frac{X}{Y}$$

(式中、 X は、配列アライメントプログラム A L I G N - 2 によって、そのプログラムの A および B のアライメントにおいて完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、 Y は、 B 中のアミノ酸残基の総数である)。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さと等しくない場合、 B に対する A のアミノ酸配列同一性 % は、 A に対する B のアミノ酸配列同一性 % と等しくはならないことが理解されよう。特に別途定めのない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性 % 値は、直前の段落に記載されるように、 A L I G N - 2 コンピュータプログラムを使用して得られる。

10

#### 【0060】

「医薬製剤」という用語は、調製物の中に含有される活性成分の生物活性が有効になるような形態であり、製剤が投与されるであろう対象にとって許容できないほど有毒である追加の構成成分を何ら含有しない、調製物を指す。

#### 【0061】

「薬学的に許容される担体」は、対象にとって無毒である、活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤、または防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0062】

本明細書で使用されるとき、「治療」(および「治療する」または「治療すること」等のその文法上の変形形態)は、治療されている個体の自然過程を変えることを目的とした臨床介入を指し、予防のために、または臨床病理過程の間に行うことができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患進行速度の低減、病状の回復または一次緩和、および寛解または予後の改善が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本発明の免疫複合体は、疾患の発症を遅延するために、または疾患の進行を緩徐にするために使用される。

30

#### 【0063】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体を抗原に結合することに関与する、抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン(それぞれ、 V H および V L )は一般に、同様の構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域( F R )および3つの超可変領域( H V R )を含む。(例えば、 Kindt et al . Kuby Immunology , 6<sup>th</sup> ed . , W . H . Freeman and Co . , page 91 ( 2007 ) を参照されたい)。抗原結合特異性を付与するためには、単一の V H または V L ドメインで十分であり得る。さらに、抗原に結合する抗体からの V H または V L ドメインを使用して、それぞれ、相補的 V L または V H ドメインのライブラリをスクリーニングして、特定の抗原に結合する抗体を単離してもよい。例えば、 Portolano et al . , J . Immunol . 150 : 880 - 887 ( 1993 ) 、 Clarkson et al . , Nature 352 : 624 - 628 ( 1991 ) を参照されたい。

40

#### 【0064】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、連結している別の核酸を増殖することが可能な核酸分子を指す。この用語には、自己複製核酸構造としてのベクター、ならびに導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターが含まれる。ある特定のベクターは、作動的に連結された核酸の発現を導くことが可能である。かかるベクターは、本明細書で「発現ベクター」と称される。

#### 【0065】

50

「アルキル」は、直鎖(normal)、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する、C<sub>1</sub>～C<sub>18</sub>炭化水素である。例としては、メチル(Me、-CH<sub>3</sub>)、エチル(Et、-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、1-プロピル(n-Pr、n-プロピル、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-プロピル(i-Pr、i-プロピル、-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、1-ブチル(n-Bu、n-ブチル、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-ブチル(s-Bu、s-ブチル、-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-メチル-1-ブロピル(i-Bu、i-ブチル、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-メチル-2-ブチル(s-Bu、s-ブチル、-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、1-ペンチル(n-ペンチル、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-ペンチル(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-ペンチル(-CH(C<sub>H</sub><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2-メチル-2-ブチル(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-メチル-2-ブチル(-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、3-メチル-1-ブチル(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2-メチル-1-ブチル(-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、1-ヘキシル(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-ヘキシル(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-ヘキシル(-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-メチル-2-ペンチル(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-メチル-2-ペンチル(-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、4-メチル-2-ペンチル(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、3-メチル-3-ペンチル(-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2-メチル-3-ペンチル(-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2,3-ジメチル-2-ブチル(-C(C<sub>H</sub><sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、3,3-ジメチル-2-ブチル(-CH(CH<sub>3</sub>)C(C<sub>H</sub><sub>3</sub>)<sub>3</sub>がある。

## 【0066】

本明細書で使用される「C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル」という用語は、1～8個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖の飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル」基には、-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-ノニルおよび-n-デシルが含まれるが、これらに限定されない一方で、分岐鎖C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキルには、-イソプロピル、-sec-ブチル、-イソブチル、-tert-ブチル、-イソペンチル、2-メチルブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキルには、-ビニル、-アリル、-1-ブテニル、-2-ブテニル、-イソブチレニル、-1-ペンテニル、-2-ペンテニル、-3-メチル-1-ブチニル、-1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、-アセチレン、-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-ブチニルが含まれるが、これらに限定されない。C<sub>1</sub>～C<sub>12</sub>アルキル基は、置換されていないか、または-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)、-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'、-SO<sub>3</sub>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>、および-CNを含むが、これらに限定されない1個以上の基で置換されている可能性があり、式中、各R'は独立して、H、-C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>アルキル、およびアリールから選択される。

## 【0067】

本明細書で使用される「C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル」という用語は、1～6個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖の飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル」基には、-メチル、-エチル、-n-プロピル、-n-ブチル、-n-ペンチル、および-n-ヘキシルが含まれるが、これらに限定されない一方で、分岐鎖C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルには、-イソプロピル、-sec-ブチル、-イソブチル、-tert-ブチル、-イソペンチル、および2-メチルブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルには、-ビニル、-アリル、-1-ブテニル、-2-ブテニル、および-イソブチレニル、-1-ペンテニル、-2-ペンテニル、-3-メチル-1-ブチニル、

10

20

30

40

50

- 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、 および 3 - ヘキシルが含まれるが、これらに限定されない。C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル基は、置換されていないか、またはC<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル基について上述される、 1 個以上の基で置換されている可能性がある。

## 【0068】

本明細書で使用される「C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキル」という用語は、 1 ~ 4 個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖の飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキル」基には、 - メチル、 - エチル、 - n - プロピル、 - n - ブチルが含まれるが、これらに限定されない一方で、分岐鎖C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキルには、 - イソプロピル、 - s e c - ブチル、 - イソブチル、 - t e r t - ブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキルには、 - ビニル、 - アリル、 - 1 - ブテニル、 - 2 - ブテニル、 および - イソブチレニルが含まれるが、これらに限定されない。C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキル基は、置換されていないか、またはC<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル基について上述される、 1 個以上の基で置換されている可能性がある。  
10

## 【0069】

「アルコキシ」は、酸素に単結合されたアルキル基である。例となるアルコキシ基には、メトキシ (- OCH<sub>3</sub>) およびエトキシ (- OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) が含まれるが、これらに限定されない。「C<sub>1</sub> ~ C<sub>5</sub> アルコキシ」は、 1 ~ 5 個の炭素原子を有するアルコキシ基である。アルコキシ基は、置換されていないか、またはアルキル基について上述される、 1 個以上の基で置換されている可能性があり得る。  
20

## 【0070】

「アルケニル」は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素、 s p<sup>2</sup> 二重結合を有する直鎖、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する、 C<sub>2</sub> ~ C<sub>18</sub> 炭化水素である。例としては、エチレンまたはビニル (- CH = CH<sub>2</sub>)、アリル (- CH<sub>2</sub>CH = CH<sub>2</sub>)、シクロペンテニル (- C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>)、 および 5 - ヘキセニル (- CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH = CH<sub>2</sub>) が挙げられるが、これらに限定されない。「C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> アルケニル」は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素、 s p<sup>2</sup> 二重結合を有する 2 ~ 8 個の直鎖、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する、炭化水素である。  
。

## 【0071】

「アルキニル」は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素、 s p 三重結合を有する直鎖、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する、 C<sub>2</sub> ~ C<sub>18</sub> 炭化水素である。例としては、アセチレン系 (- C C H ) およびプロパルギル (- CH<sub>2</sub>CH C H ) が挙げられるが、これらに限定されない。「C<sub>2</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキニル」は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素、 s p 三重結合を有する 2 ~ 8 個の直鎖、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する、炭化水素である。  
30

## 【0072】

「アルキレン」は、 1 ~ 18 個の炭素原子からなり、親アルカンの同じまたは 2 個の異なる炭素原子からの 2 個の水素原子の除去によってもたらされる 2 つの一価ラジカル中心を有する、飽和の分岐鎖または直鎖または環状炭化水素ラジカルを指す。典型的なアルキレンラジカルには、メチレン (- CH<sub>2</sub> · ) 1 , 2 - エチル (- CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> · )、 1 , 3 - プロピル (- CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> · )、 1 , 4 - ブチル (- CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> · ) 等が含まれるが、これらに限定されない。  
40

## 【0073】

「C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキレン」は、式 - (CH<sub>2</sub>)<sub>1 ~ 10</sub> - の直鎖、飽和炭化水素基である。C<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub> アルキレンの例としては、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 (octylene)、ノニレン、 および デカレンが挙げられる。

## 【0074】

「アルケニレン」は、 2 ~ 18 個の炭素原子からなり、親アルケンの同じまたは 2 個の

異なる炭素原子からの 2 個の水素原子の除去によってもたらされる 2 つの一価ラジカル中心を有する、不飽和の分岐鎖または直鎖または環状炭化水素ラジカルを指す。典型的なアルケニレンラジカルには、1, 2 - エチレン (- C H = C H - ) が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 7 5 】

「アルキニレン」は、2 ~ 18 個の炭素原子からなり、親アルキンの同じまたは 2 個の異なる炭素原子からの 2 個の水素原子の除去によってもたらされる 2 つの一価ラジカル中心を有する、不飽和の分岐鎖または直鎖または環状炭化水素ラジカルを指す。典型的なアルキニレンラジカルには、アセチレン (- C C - )、プロパルギル (- C H<sub>2</sub> C C - )、および 4 - ペンチニル (- C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C C - ) が含まれるが、これらに限定されない。  
10

#### 【 0 0 7 6 】

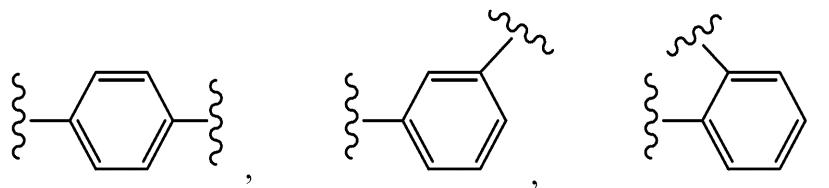
「アリール」は、炭素環式芳香族基を指す。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、およびアントラセニルが挙げられるが、これらに限定されない。炭素環式芳香族基または複素環式芳香族基は、置換されていないか、または - C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル、- O - (C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル)、- アリール、- C(O)R'、- OC(O)R'、- C(O)OR'、- C(O)NH<sub>2</sub>、- C(O)NHR'、- C(O)N(R')<sub>2</sub> - NHCO(O)R'、- S(O)<sub>2</sub>R'、- S(O)R'、- OH、- ハロゲン、- N<sub>3</sub>、- NH<sub>2</sub>、- NH(R')<sub>2</sub>、および - CN を含むが、これらに限定されない 1 個以上の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、H、- C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル、およびアリールから選択される。  
20

#### 【 0 0 7 7 】

「C<sub>5</sub> ~ C<sub>20</sub> アリール」は、炭素環式芳香族環内に 5 ~ 20 個の炭素原子を有する、アリール基である。C<sub>5</sub> ~ C<sub>20</sub> アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、およびアントラセニルが挙げられるが、これらに限定されない。C<sub>5</sub> ~ C<sub>20</sub> アリール基は、アリール基について上述されるように、置換されているか、または置換されていない可能性がある。「C<sub>5</sub> ~ C<sub>14</sub> アリール」は、炭素環式芳香族環内に 5 ~ 14 個の炭素原子を有するアリール基である。C<sub>5</sub> ~ C<sub>14</sub> アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、およびアントラセニルが挙げられるが、これらに限定されない。C<sub>5</sub> ~ C<sub>14</sub> アリール基は、アリール基について上述されるように、置換されているか、または置換されていない可能性がある。  
30

#### 【 0 0 7 8 】

「アリーレン」は、2 つの共有結合を有するアリール基であり、次の構造、



に示されるオルト、メタ、またはパラ配置にあり得、そのフェニル基は、置換されていないか、または - 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)、- アリール、- C(O)R'、- OC(O)R'、- C(O)OR'、- C(O)NH<sub>2</sub>、- C(O)NR'、- C(O)N(R')<sub>2</sub> - NHCO(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>、および - CN を含むが、これらに限定されない最大 4 個の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、H、- C<sub>1</sub> ~ C<sub>8</sub> アルキル、およびアリールから選択される。  
40

#### 【 0 0 7 9 】

「アリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端または s p<sup>3</sup> 炭素原子に結合した水素原子のうちの 1 個が、アリールラジカルと置き換えられている、非環状アルキルラジカルを指す。典型的なアリールアルキル基には、ベンジル、2 - フェニルエタン - 1 - イ  
50

ル、2-フェニルエテン-1-イル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-ナフチルエテン-1-イル、ナフトベンジル、2-ナフトフェニルエタン-1-イル等が含まれるが、これらに限定されない。アリールアルキル基は、6~20個の炭素原子を含み、例えば、アリールアルキル基のアルカニル、アルケニル、またはアルキニル基を含む、アルキル部分は、1~6個の炭素原子であり、アリール部分は、5~14個の炭素原子である。

#### 【0080】

「ヘテロアリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端またはsp<sup>3</sup>炭素原子に結合した水素原子のうちの1個が、ヘテロアリールラジカルと置き換えられている、非環状アルキルラジカルを指す。典型的なヘテロアリールアルキル基には、2-ベンズイミダゾリルメチル、2-フリルエチル等が含まれるが、これらに限定されない。ヘテロアリールアルキル基は、6~20個の炭素原子を含み、例えば、ヘテロアリールアルキル基のアルカニル、アルケニル、またはアルキニル基を含む、アルキル部分は、1~6個の炭素原子であり、ヘテロアリール部分は、5~14個の炭素原子ならびにN、O、P、およびSから選択される1~3個のヘテロ原子である。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個の環員を有する单環(2~6個の炭素原子、または7~10環員を有する二環(4~9個の炭素原子ならびにN、O、P、およびSから選択される1~3個のヘテロ原子)、例えば、ビシクロ[4,5],[5,5],[5,6]、または[6,6]系であり得る。

#### 【0081】

「置換アルキル」、「置換アリール」、および「置換アリールアルキル」は、1個以上の水素原子が各々独立して置換基と置き換えられている、それぞれ、アルキル、アリール、およびアリールアルキルを意味する。典型的な置換基には、-X、-R、-O<sup>-</sup>、-OR、-SR、-S<sup>-</sup>、-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<sup>-</sup><sub>3</sub>、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(=NR)NR<sub>2</sub>が含まれるが、これらに限定されず、式中、各Xは独立して、ハロゲン、すなわちF、Cl、Br、またはIであり、各Rは独立して、-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、またはプロドラッグ部分である。上述のアルキレン、アルケニレン、およびアルキニレン基もまた、同様に置換され得る。

#### 【0082】

「ヘテロアリール」および「複素環」は、1個以上の環原子がヘテロ原子、例えば、窒素、酸素、および硫黄である、環系を指す。複素環ラジカルは、3~20個の炭素原子ならびにN、O、P、およびSから選択される1~3個のヘテロ原子を含む。複素環は、3~7個の環員を有する单環(2~6個の炭素原子ならびにN、O、P、およびSから選択される1~3個のヘテロ原子)、または7~10環員を有する二環(4~9個の炭素原子ならびにN、O、P、およびSから選択される1~3個のヘテロ原子)、例えば、ビシクロ[4,5],[5,5],[5,6]、または[6,6]系であり得る。

#### 【0083】

例となる複素環は、例えば、Paquette, Leo A., "Principle of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968) の特に第1、3、4、6、7、および9章、"The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950~現在) の特に第13、14、16、19、および28巻、ならびにJ. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566に記載さ

10

20

30

40

50

れる。

#### 【0084】

複素環の例としては、限定ではなく例として、ピリジル、ジヒドロイピリジル (dihydroxydriopyridyl)、テトラヒドロピリジル (ピペリジル)、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、ビペリジニル、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、アゾシニル (azocinyl)、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、チアントレニル、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、シンノリニル、ブテリジニル、4aH - カルバゾリル、カルバヅリル、-カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナントロリニル、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、ベンゾキサゾリニル、およびイサチノイル (isatinoyl) が挙げられる。

#### 【0085】

限定ではなく例として、炭素が結合する複素環は、ピリジンの2、3、4、5、もしくは6位、ピリダジンの3、4、5、もしくは6位、ピリミジンの2、4、5、もしくは6位、ピラジンの2、3、5、もしくは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、もしくはテトラヒドロピロールの2、3、4、もしくは5位、オキサゾール、イミダゾール、もしくはチアゾールの2、4、もしくは5位、イソキサゾール、ピラゾール、もしくはイソチアゾールの3、4、もしくは5位、アジリジンの2もしくは3位、アゼチジンの2、3、もしくは4位、キノリンの2、3、4、5、6、7、もしくは8位、またはイソキノリンの1、3、4、5、6、7、もしくは8位において結合される。さらにより典型的に、炭素が結合した複素環には、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、または5 - チアゾリルが含まれる。

#### 【0086】

限定ではなく例として、窒素が結合した複素環は、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、インダゾールの1位、イソインドール、またはイソインドリンの2位、モルホリンの4位、およびカルバゾールまたは -カルボリンの9位において結合される。さらにより典型的に、窒素が結合した複素環には、1 - アジリジル、1 - アゼテジル (azetedyl)、1 - ピロリル、1 - イミダゾリル、1 - ピラゾリル、および1 - ピペリジニルが含まれる。

#### 【0087】

「C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> 複素環」は、環炭素原子のうちの1 ~ 4個が独立して、O、S、およびNからなる群からのヘテロ原子と置き換えられている、芳香族または非芳香族C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> 炭素環を指す。C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> 複素環の代表的な例としては、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェ

10

20

30

40

50

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、およびテトラゾリルが挙げられるが、これらに限定されない。 $C_3 \sim C_8$  複素環は、置換されていないか、または - $C_1 \sim C_8$  アルキル、- $O-(C_1 \sim C_8$  アルキル)、-アリール、- $C(O)R'$ 、- $OC(O)R'$ 、- $C(O)OR'$ 、- $C(O)NH_2$ 、- $C(O)NHR'$ 、- $C(O)N(R')_2$  - $NHC(O)R'$ 、- $S(O)_2R'$ 、- $S(O)R'$ 、-OH、-ハロゲン、- $N_3$ 、- $NH_2$ 、- $NH(R')$ 、- $N(R')_2$ 、および -CN を含むが、これらに限定されない最大 7 個の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、H、- $C_1 \sim C_8$  アルキル、およびアリールから選択される。

10

## 【0088】

「 $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロ」は、複素環基の水素原子のうちの 1 個が結合と置き換えられている、上に定義される  $C_3 \sim C_8$  複素環基を指す。 $C_3 \sim C_8$  ヘテロシクロは、置換されていないか、または - $C_1 \sim C_8$  アルキル、- $O-(C_1 \sim C_8$  アルキル)、-アリール、- $C(O)R'$ 、- $OC(O)R'$ 、- $C(O)OR'$ 、- $C(O)NH_2$ 、- $C(O)NHR'$ 、- $C(O)N(R')_2$  - $NHC(O)R'$ 、- $S(O)_2R'$ 、- $S(O)R'$ 、-OH、-ハロゲン、- $N_3$ 、- $NH_2$ 、- $NH(R')$ 、- $N(R')_2$ 、および -CN を含むが、これらに限定されない最大 6 個の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、H、- $C_1 \sim C_8$  アルキル、およびアリールから選択される。

20

## 【0089】

「炭素環」は、単環として 3 ~ 7 個の炭素原子、または二環として 7 ~ 12 個の炭素原子を有する、飽和または不飽和の環を意味する。単環式炭素環は、3 ~ 6 個の環原子、さらにより典型的には 5 または 6 個の環原子を有する。二環式炭素環は、例えば、ビシクロ [4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、もしくは [6, 6] 系として配置される、7 ~ 12 個の環原子、またはビシクロ [5, 6] もしくは [6, 6] 系として配置される、9 もしくは 10 個の環原子を有する。単環式炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1 - シクロペニタ - 1 - エニル、1 - シクロペニタ - 2 - エニル、1 - シクロペニタ - 3 - エニル、シクロヘキシリル、1 - シクロヘキサ - 1 - エニル、1 - シクロヘキサ - 2 - エニル、1 - シクロヘキサ - 3 - エニル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられる。

30

## 【0090】

「 $C_3 \sim C_8$  炭素環」は、3、4、5、6、7、または 8 員の飽和または不飽和の非芳香族炭素環式環である。代表的な  $C_3 \sim C_8$  炭素環には、-シクロプロピル、-シクロブチル、-シクロペンチル、-シクロペニタジエニル、-シクロヘキシリル、-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、および -シクロオクタジエニルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_3 \sim C_8$  炭素環基は、置換されていないか、または - $C_1 \sim C_8$  アルキル、- $O-(C_1 \sim C_8$  アルキル)、-アリール、- $C(O)R'$ 、- $OC(O)R'$ 、- $C(O)OR'$ 、- $C(O)NH_2$ 、- $C(O)NHR'$ 、- $C(O)N(R')_2$  - $NHC(O)R'$ 、- $S(O)_2R'$ 、- $S(O)R'$ 、-OH、-ハロゲン、- $N_3$ 、- $NH_2$ 、- $NH(R')$ 、- $N(R')_2$ 、および -CN を含むが、これらに限定されない 1 個以上の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、H、- $C_1 \sim C_8$  アルキル、およびアリールから選択される。

40

## 【0091】

「 $C_3 \sim C_8$  カルボシクロ」は、炭素環基の水素原子のうちの 1 個が結合と置き換えられている、上に定義される  $C_3 \sim C_8$  炭素環基を指す。

## 【0092】

50

「リンカー」は、共有結合、または抗体を薬物部分に共有結合する原子の鎖を含む、化学部分を指す。種々の実施形態において、リンカーには、アルキルジイル、アリールジイル、ヘテロアリールジイル等の二価ラジカル、 $- (C R_2)_n O (C R_2)_n -$ 等の部分、アルキルオキシ（例えば、ポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ）およびアルキルアミノ（例えば、ポリエチレンアミノ、Jeffamine（商標））の反復単位、ならびにコハク酸塩、コハク酸アミド、ジグリコール酸塩、マロン酸塩、およびカブロアミドを含む二酸エステルおよびアミドが含まれる。種々の実施形態において、リンカーは、バリン、フェニルアラニン、リジン、およびホモリジン等の1個以上のアミノ酸残基を含むことができる。

## 【0093】

10

「キラル」という用語は、鏡像パートナーの重ね合せできない（non-superimposability）特性を有する分子を指し、一方で「アキラル」という用語は、それらの鏡像パートナーと重ね合せできる（superimposability）分子を指す。

## 【0094】

「立体異性体」という用語は、同一の化学構成を有するが、空間内の原子または基の配置に関して異なる、化合物を指す。

## 【0095】

20

「ジアステレオマー」は、2つ以上のキラル性の中心を有し、それら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、異なる物理特性、例えば、融点、沸点、スペクトル特性、および反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動法およびクロマトグラフィー等の高解像度分析手順の下で分離されてもよい。

## 【0096】

「鏡像異性体」は、互いに重ね合せできない鏡像である、化合物の2つの立体異性体を指す。

## 【0097】

30

本明細書で使用される立体化学的な定義および慣例は、一般に、S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York、および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、光学活性型で存在し、すなわち、それらは、平面偏光の平面を回転させる能力を有する。光学活性化合物を説明する際、接頭辞DおよびL、またはRおよびSは、そのキラル中心（複数可）の周りの分子の絶対配置を表すように使用される。接頭辞dおよびlまたは(+)および(-)は、化合物による平面偏光の回転の徴候を表記するために用いられ、このうち(-)またはlは、化合物が左旋性であることを意味する。(+)またはdの接頭辞を有する化合物は、右旋性である。所与の化学構造について、これらの立体異性体は、それらが互いの鏡像であることを除いて同一である。特定の立体異性体はまた、鏡像異性体とも称され得、かかる異性体の混合物は、しばしば鏡像異性体混合物と呼ばれる。鏡像異性体の50:50混合物は、ラセミ混合物またはラセミ体と称され、それらは化学反応またはプロセスにおいて立体選択または立体特異性が存在していない場合に生じ得る。「ラセミ混合物」および「ラセミ体」という用語は、光学活性を欠く2つの鏡像異性体種の等モル混合物を指す。

40

## 【0098】

50

「脱離基」は、別の官能基によって置換され得る官能基を指す。ある特定の脱離基は、当該技術分野で周知であり、例としては、ハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物）、メタンスルホニル（メシリ）、p-トルエンスルホニル（トシリ）、トリフルオロメチルスルホニル（トリフル酸塩）、およびトリフルオロメチルスルホン酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0099】

「保護基」という用語は、特定の官能性を、化合物上の他の官能基を反応させながら、プロッキングするまたは保護するために一般的に用いられる置換基を指す。例えば、「アミノ保護基」は、化合物中のアミノ官能性をプロッキングするまたは保護する、アミノ基に結合した置換基である。好適なアミノ保護基には、アセチル、トリフルオロアセチル、t - ブトキシカルボニル (B O C) 、ベンジルオキシカルボニル (C B Z) 、および 9 - フルオレニルメチレンオキシカルボニル (f lu o r e n y l m e t h y l e n o x y c a r b o n y l) (F m o c) が含まれるが、これらに限定されない。保護基の一般的な説明およびそれらの使用については、T . W . G r e e n e , P r o t e c t i v e G r o u p s i n O r g a n i c S y n t h e s i s , John Wiley & Sons , New York , 1991 、またはより新しい版を参照されたい。

10

## 【0100】

## I I . 組成物および方法

一態様において、本発明は、部分的に、E T B R に結合する抗体およびかかる抗体を含む免疫複合体に基づく。本発明の抗体および免疫複合体は、例えば、E T B R 陽性がんの診断または治療に有用である。

## 【0101】

## A . 例となる抗 E T B R 抗体

いくつかの実施形態において、E T B R に結合する単離抗体が提供される。E T B R は、メラニン細胞内で発現されるGタンパク質共役受容体である。

20

## 【0102】

シグナル配列（アミノ酸 1 ~ 26）を含む、例となる自然発生ヒト E T B R 前駆体配列は、配列番号 10 に提供され、対応する成熟 E T B R 配列は、配列番号 11 （配列番号 10 のアミノ酸 27 ~ 442 に対応する）に示される。

30

## 【0103】

ある特定の実施形態において、抗 E T B R 抗体は、配列番号 10 のアミノ酸 64 ~ 101 内のエピトープに結合する。非限定的な例となるかかる抗体には、5 E 9 およびそのヒト化バージョンが含まれる。いくつかの実施形態において、抗 E T B R 抗体は、ヒト E T B R に結合する。いくつかの実施形態において、抗 E T B R 抗体は、ヒト E T B R およびカニクイザル E T B R に結合する。

## 【0104】

いくつかの実施形態において、抗 E T B R 抗体は、ヒト E T B R に、10 nM 以下、または 7 nM 以下、または 6 nM 以下、または 5 nM 以下、または 4 nM 以下、かつ任意に 0 . 0 0 0 1 nM 以上、または 0 . 0 0 1 nM 以上、または 0 . 0 1 nM 以上の親和性で結合する。非限定的な例となるかかる抗体には、m u 5 E 9 および h u 5 E 9 . v 1 が含まれ、それは、ヒト E T B R に、それぞれ 5 nM および 3 . 7 nM の親和性で結合する。

30

## 【0105】

## アッセイ

抗 E T B R 抗体が「配列番号 10 のアミノ酸 64 ~ 101 内のエピトープに結合する」かどうかを決定するために、N末端およびC末端欠失を伴う E T B R ポリペプチドを、哺乳類細胞（C H O 細胞または 293 細胞等）内で発現させ、切頭型ポリペプチドへの抗体の結合を F A C S によって試験する。細胞内で発現される完全長 E T B R への結合と比べた、切頭型ポリペプチドへの抗体の結合の実質的な低減（70 % 以上の低減）または排除は、抗体がその切頭型ポリペプチドに結合しないことを示す。代替的に、いくつかの実施形態において、抗 E T B R 抗体が「配列番号 10 のアミノ酸 64 ~ 101 内のエピトープに結合する」かどうかは、E L I S A アッセイを使用して決定される。細胞外ドメイン等の、E T B R のより長い部分への結合と比べた、切頭型ポリペプチドへの抗体の結合の実質的な低減（70 % 以上の低減）または排除は、抗体がその切頭型ポリペプチドに結合しないことを示す。

40

## 【0106】

50

抗 E T B R 抗体が 10 nM 以下、または 7 nM 以下、または 6 nM 以下、または 5 nM 以下、または 4 nM 以下「の親和性で結合する」かどうかは、表面上で E T B R を発現する哺乳類細胞 (CHO 細胞または 293 細胞等) を使用して、段階希釈された未標識抗 E T B R 抗体を使用する競合アッセイにおいて、決定されてもよい。抗体の結合親和性、K<sub>D</sub> は、非線形曲線当てはめプログラムを利用して行われる標準のスキヤッチャード解析に従って決定されてもよい(例えば、Munson et al., Anal Biochem, 107: 220 - 239, 1980 を参照されたい)。いくつかの実施形態において、抗 E T B R 抗体が 10 nM 以下、または 7 nM 以下、または 6 nM 以下、または 5 nM 以下、または 4 nM 以下「の親和性で結合する」かどうかは、Biacore (商標) アッセイ等の表面プラスモン共鳴アッセイ、または結合平衡除外アッセイ (KinExA (登録商標)、Sapidyne Instruments, Boise, ID) を使用して、決定されてもよい。

10

## 【0107】

抗体 5E9 および他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、(b) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、(c) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3、(d) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、(e) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、および(f) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 から選択される、少なくとも 1、2、3、4、5、または 6 つの HVR を含む、抗 E T B R 抗体または免疫複合体を提供する。

20

## 【0108】

一様において、本発明は、(a) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、(b) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、および(c) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての VH HVR 配列を含む、抗体または免疫複合体を提供する。一実施形態において、本抗体は、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 を含む。別の実施形態において、本抗体は、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 および配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、および配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR-H2 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、(b) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、および(c) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 を含む。

30

## 【0109】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、および(c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての VL HVR 配列を含む、抗体または免疫複合体を提供する。別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、および(c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全ての VL HVR 配列を含む、抗体または免疫複合体を提供する。一実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、および(c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を含む。一実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、および(c) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を含む。

40

## 【0110】

別の態様において、本発明の抗体または免疫複合体は、(a)(i) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、(ii) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-H

50

2、および( i i i )配列番号14から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVH HVR配列を含む、VHドメイン、ならびに( b )( i )配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( i i )配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVL HVR配列を含む、VLドメイン、ならびに( c )配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。別の態様において、本発明の抗体または免疫複合体は、( a )( i )配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( i i )配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および( i i i )配列番号14から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVH HVR配列を含む、VHドメイン、ならびに( b )( i )配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( i i )配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVL HVR配列を含む、VLドメイン、ならびに( c )配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

10

20

30

40

50

## 【0111】

別の態様において、本発明は、( a )配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b )配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、( c )配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、( d )配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( e )配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および( f )配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、抗体または免疫複合体を提供する。別の態様において、本発明は、( a )配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b )配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、( c )配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、( d )配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( e )配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および( f )配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、抗体または免疫複合体を提供する。

20

30

40

50

## 【0112】

上の実施形態のいずれにおいても、抗ETBR抗体は、ヒト化されている。一実施形態において、抗ETBR抗体は、上の実施形態のいずれかにあるようなHVRを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免役グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒトVLカッパIVコンセンサス(VL<sub>KI</sub>)フレームワークおよび/またはVHフレームワークVH<sub>I</sub>I<sub>I</sub>である。いくつかの実施形態において、ヒト化抗ETBR抗体は、( a )配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b )配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、( c )配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、( d )配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( e )配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および( f )配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。いくつかの実施形態において、ヒト化抗ETBR抗体は、( a )配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、( b )配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、( c )配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、( d )配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、( e )配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および( f )配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

40

50

## 【0113】

別の態様において、抗ETBR抗体は、配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する、VH配列は、参照配列と比べて、置換(例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ETBR抗体は、ETBRに結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、総計1~10個のアミノ酸が、配列番号8において置換され

、挿入され、および／または欠失されている。ある特定の実施形態において、総計1～5個のアミノ酸が、配列番号8において置換され、挿入され、および／または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域で（すなわち、FRにおいて）生じる。

#### 【0114】

任意に、抗ETBR抗体は、配列番号4、8、および9から選択されるVH配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、VHは、（a）配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および（c）配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、1つ、2つ、または3つのHVRを含む。10

#### 【0115】

いくつかの実施形態において、抗ETBR抗体が提供され、この抗体は、配列番号7のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。ある特定の実施形態において、配列番号7のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する、VL配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ETBR抗体は、ETBRに結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、総計1～10個のアミノ酸が、配列番号7において置換され、挿入され、および／または欠失されている。ある特定の実施形態において、総計1～5個のアミノ酸が、配列番号7において置換され、挿入され、および／または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域で（すなわち、FRにおいて）生じる。任意に、抗ETBR抗体は、配列番号3または配列番号7のVH配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、VLは、（a）配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（b）配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および（c）配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、1つ、2つ、または3つのHVRを含む。20

#### 【0116】

別の態様において、抗ETBR抗体が提供され、この抗体は、上に提供される実施形態のいずれかにあるようなVH、および上に提供される実施形態のいずれかにあるようなVLを含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号8および配列番号7におけるVHおよびVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号9および配列番号7におけるVHおよびVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号6および配列番号5における重鎖および軽鎖配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号6および配列番号18における重鎖および軽鎖配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号19および配列番号5における重鎖および軽鎖配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号20および配列番号5における重鎖および軽鎖配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。30

#### 【0117】

さらなる態様において、本発明は、本明細書に提供される抗ETBR抗体と同じエピトープに結合する、抗体または免疫複合体を提供する。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号8のVH配列および配列番号7のVL配列を含む抗ETBR抗体と同じエピトープに結合する、抗体または免疫複合体が提供される。ある特定の実施形態において、アミノ酸64～101からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号10のエピトープに結合する、抗体が提供される。40

#### 【0118】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗 E T B R 抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一実施形態において、抗 E T B R 抗体は、抗体断片、例えば、F v、F a b、F a b'、sc F v、ダイアボディ、またはF(a b')<sub>2</sub>断片である。別の実施形態において、本抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、本明細書に定義されるIg G 1 抗体または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

#### 【0119】

上述の免疫複合体のうちのいずれにおいても、本抗体は、薬物部分に複合され得る。いくつかの実施形態において、本抗体は、細胞傷害性薬剤に複合される。いくつかのかかる実施形態において、細胞傷害性薬剤は、PNU-159682等のネモルビシン誘導体である。種々の非限定的な例となるネモルビシン誘導体が、本明細書で考察される。10

#### 【0120】

さらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗 E T B R 抗体または免疫複合体は、下の第1～7節に記載される特長のうちのいずれをも、単独でまたは組み合わせて、組み込んでもよい。

#### 【0121】

##### 1. 抗体親和性

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、1 μM以下、100 nM以下、10 nM以下、1 nM以下、0.1 nM以下、0.01 nM以下、または0.001 nM以下の、および任意に、10<sup>-1</sup><sup>3</sup> M以上である、解離定数(Kd)を有する。(例えは、10<sup>-8</sup> M以下、例えは、10<sup>-8</sup> M～10<sup>-1</sup><sup>3</sup> M、例えは、10<sup>-9</sup> M～10<sup>-1</sup><sup>3</sup> M)。20

#### 【0122】

一実施形態において、Kdは、目的の抗体のF a bバージョンおよびその抗原と共に行われる、放射標識抗原結合アッセイ(RIA)によって、次のアッセイによって記載されるように測定される。抗原に対するF a bの溶液結合親和性は、F a bを、未標識抗原の一連の滴定の存在下で、最小濃度の(<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>5</sup>I)標識抗原と平衡化し、次いで抗F a b抗体コーティングプレートと結合した抗原を捕捉することによって、測定される(例えは、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881(1999)を参照されたい)。アッセイのための条件を確立するために、MICROTRITER(登録商標)マルチウェルプレート(Thermo Scientific)を、50 mMの炭酸ナトリウム(pH 9.6)中5 μg/mLの捕捉抗F a b抗体(Cappel Labs)で一晩コーティングし、その後、PBS中2%(w/v)ウシ血清アルブミンにより、室温(およそ23℃)で2～5時間ブロッキングする。非吸着性のプレート(Nunc番号269620)中で、100 pMまたは26 pM [<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>5</sup>I]-抗原を、目的のF a bの段階希釈液と混合する(例えは、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599(1997)における、抗VEGF抗体F a b-12の評価と一致)。目的のF a bを次いで一晩インキュベートするが、インキュベーションは、平衡に到達することを確実にするために、より長い期間(例えは、約65時間)継続してもよい。その後、混合物を、室温での(例えは、1時間にわたる)インキュベーションのために、捕捉プレートに移す。溶液を次いで除去し、プレートを、PBS中0.1%ポリソルベート20(TWEEN-20(登録商標))で8回洗浄する。プレートが乾燥したとき、150 μL/ウェルのシンチラント(scintillant)(MICROSCINT-20(商標); Packard)を添加し、プレートをTOPCOUNT(商標)計数器(Packard)により10分間計数する。最大結合の20%以下をもたらす各F a bの濃度を、競合結合アッセイにおいて使用するために選定する。30

#### 【0123】

別の実施形態によれば、Kdは、BIACORE(登録商標)-2000またはBIACORE(登録商標)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を使用した表面プラスモン共鳴アッセイを使用して、25℃で、約10応答単位(40

R U ) で固定化された抗原 C M 5 チップを用いて測定される。簡潔に述べると、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ ( C M 5 、 B I A C O R E , I n c . ) を、 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 ( E D C ) および N - ヒドロキシコハク酸イミド ( N H S ) により、供給業者の指示に従って活性化する。抗原を 1 0 m M の酢酸ナトリウム ( p H 4 . 8 ) で 5  $\mu$  g / m L ( 約 0 . 2  $\mu$  M ) まで希釈した後、 5  $\mu$  L / 分の流速で注射して、カップリングされたタンパク質のおよそ 1 0 応答単位 ( R U ) を達成する。抗原の注射後、 1 M のエタノールアミンを注射して、未反応の基をブロッキングする。動態測定のために、 F a b の 2 倍段階希釈液 ( 0 . 7 8 n M ~ 5 0 0 n M ) を、 0 . 0 5 % ポリソルベート 2 0 ( T W E E N - 2 0 ( 商標 ) ) 界面活性剤を含む P B S ( P B S T ) 中、 2 5 で、およそ 2 5  $\mu$  L / 分の流速で注射する。会合速度 ( k o n ) および解離速度 ( k o f f ) を、単純な 1 対 1 Langmuir 結合モデル ( B I A C O R E ( 登録商標 ) E v a l u a t i o n S o f t w a r e 第 3 . 2 版 ) を使用して、会合センサグラムおよび解離センサグラムを同時に適合することによって、算出する。平衡解離定数 ( K d ) は、比率 k o f f / k o n として算出する。例えば、 C h e n et al . , J . M o l . B i o l . 2 9 3 : 8 6 5 - 8 8 1 ( 1 9 9 9 ) を参照されたい。オン速度が、上の表面プラスモン共鳴アッセイによって、 1 0 6 M - 1 s - 1 を超える場合、オン速度は、攪拌されたキュベットを備えるストップトフロー装着分光光度計 ( A v i v I n s t r u m e n t s ) または 8 0 0 0 - シリーズ S L M - A M I N C O ( 商標 ) 分光光度計 ( T h e r m o S p e c t r o n i c ) 等の分光計において測定される、漸増濃度の抗原の存在下で、 2 5 で、 P B S ( p H 7 . 2 ) 中 2 0 n M 抗 - 抗原抗体 ( F a b 型 ) の蛍光発光強度 ( 励起 = 2 9 5 n m 、発光 = 3 4 0 n m 、 1 6 n m 帯域通過 ) の増加または減少を測定する、蛍光消光技法を使用することによって、決定することができる。

## 【 0 1 2 4 】

## 2 . 抗体断片

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片には、 F a b 、 F a b ' 、 F a b ' - S H 、 F ( a b ' ) 2 、 F v 、および s c F v 断片、ならびに下に記載される他の断片が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の抗体断片の概説については、 H u d s o n et al . N a t . M e d . 9 : 1 2 9 - 1 3 4 ( 2 0 0 3 ) に記載される。 s c F v 断片の概説については、例えば、 P l u c k t h u n , i n T h e P h a r m a c o l o g y o f M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s , v o l . 1 1 3 , R o s e n b u r g a n d M o o r e ed s . , ( S p r i n g e r - V e r l a g , N e w Y o r k ) , p p . 2 6 9 - 3 1 5 ( 1 9 9 4 ) を参照されたく、また、国際公開第 9 3 / 1 6 1 8 5 号、ならびに米国特許第 5 , 5 7 1 , 8 9 4 号および同第 5 , 5 8 7 , 4 5 8 号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、増加した体内半減期を有する、 F a b および F ( a b ' ) 2 断片の考察については、米国特許第 5 , 8 6 9 , 0 4 6 号を参照されたい。

## 【 0 1 2 5 】

ダイアボディは、二価性または二重特異性であり得る、 2 つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧洲特許第 4 0 4 , 0 9 7 号、国際公開第 1 9 9 3 / 0 1 1 6 1 号、 H u d s o n et al . , N a t . M e d . 9 : 1 2 9 - 1 3 4 ( 2 0 0 3 ) 、および H o l l i n g e r et al . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 ( 1 9 9 3 ) を参照されたい。トリアボディ ( T r i a b o d i e s ) およびテトラボディ ( t e t r a b o d i e s ) もまた、 H u d s o n et al . , N a t . M e d . 9 : 1 2 9 - 1 3 4 ( 2 0 0 3 ) に記載される。

## 【 0 1 2 6 】

單一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部分または軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部分を含む、抗体断片である。ある特定の実施形態において、單一ドメイン抗体は、ヒト单ードメイン抗体である ( D o m a n t i s , I n c . , W a l t h a m , M A 、例えば、米国特許第 6 , 2 4 8 , 5 1 6 B 1 号を参照されたい)。

## 【0127】

抗体断片は、本明細書に記載される、インタクトな抗体のタンパク質分解消化、ならびに組み換え宿主細胞（例えば、大腸菌またはファージ）による產生を含むが、これらに限定されない、種々の技法によって作製することができる。

## 【0128】

## 3. キメラおよびヒト化抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、およびMorrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984)に記載される。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサル等の非ヒト靈長類に由来する可変領域）およびヒト定常領域を含む。さらなる実施例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のそれから変更された、「クラススイッチされた」抗体である。キメラ抗体には、それらの抗原結合断片が含まれる。

10

## 【0129】

ある特定の実施形態において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的に、非ヒト抗体は、親の非ヒト抗体の特異性および親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減するために、ヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR（またはそれらの部分）が非ヒト抗体に由来し、FR（またはそれらの部分）がヒト抗体配列に由来する、1つ以上の可変ドメインを含む。任意にヒト化抗体はまた、ヒト定常領域の少なくとも一部分も含む。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元するまたは改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）由來の対応する残基で置換される。

20

## 【0130】

ヒト化抗体およびそれらを作製する方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008)に概説され、また例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-329(1988)、Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033(1989)、米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号、および同第7,087,409号、Kashmiri et al., Methods 36:25-34(2005)(SDR(a-CDR)グラフティングを記載する)、Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498(1991)（「リサーフェシング(resurfacing)」を記載する）、Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60(2005)（「FRシャーフリング」を記載する）、ならびにOsbourne et al., Methods 36:61-68(2005)およびKlimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260(2000)（FRシャーフリングへの「誘導選択(guided selection)」アプローチを記載する）にさらに記載される。

30

## 【0131】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、次のものが含まれるが、これらに限定されない：「最良適合(best-fit)」法を使用して選択されるフレームワーク領域（例えば、Sims et al. J. Immunol. 151:2296(1993)を参照されたい）、軽鎖または重鎖可変領域の特定の下位集団のヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992)、およびPresta et al. J. Immunol., 151:2623(1993)を参照されたい）、ヒト成熟（体細胞突然変異した）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞株フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008)を参照されたい）、ならびにFRラ

40

50

イブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域（例えば、Baca et al., J. Biol. Chem. 272: 10678 - 10684 (1997) およびRosok et al., J. Biol. Chem. 271: 22611 - 22618 (1996) を参照されたい）が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0132】

##### 4. ヒト抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で既知の種々の技法を使用して產生することができる。ヒト抗体は、一般に、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368 - 74 (2001) およびLonberg, Curr. Opin. Immunol. 20: 450 - 459 (2008) に記載される。10

#### 【0133】

ヒト抗体は、免疫原を、抗原投与に応答してインタクトなヒト抗体またはヒト可変領域を含むインタクトな抗体を產生するように修飾されたトランスジェニック動物に投与することによって、調製されてもよい。かかる動物は典型的に、内因性免役グロブリン遺伝子座を置き換える、または染色体外に存在するか、もしくは動物の染色体中に無作為に組み込まれる、ヒト免役グロブリン遺伝子座の全てまたは一部分を含有する。かかるトランスジェニックマウスにおいて、内因性免役グロブリン遺伝子座は一般に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23: 1117 - 1125 (2005) を参考されたい。20 また、例えば、米国特許第6,075,181号および同第6,150,584号(XENOMOUSE(商標)技術を記載する)、米国特許第5,770,429号(HuMab(登録商標)技術を記載する)、米国特許第7,041,870号(K-MOUSE(登録商標)技術を記載する)、ならびに米国特許出願公開第US 2007/0061900号(VelociMouse(登録商標)技術を記載する)を参考されたい。かかる動物によって生成されるインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって、さらに修飾されてもよい。

#### 【0134】

ヒト抗体はまた、ハイブリドーマベースの方法によって作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体の產生のためのヒト骨髄腫細胞株およびマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株が記載されている。（例えば、Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、およびBoerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991) を参考されたい）。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されるヒト抗体もまた、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557 - 3562 (2006) に記載される。追加の方法には、例えば、米国特許第7,189,826号（ハイブリドーマ細胞株由来のモノクローナルヒトIgM抗体の產生を記載する）、およびNi, Xiandai Mianyixue, 26(4): 265 - 268 (2006)（ヒト-ヒトハイブリドーマを記載する）に記載されるものが含まれる。ヒトハイブリドーマ技術(Trioma technology)はまた、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3): 927 - 937 (2005) およびVollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3): 185 - 91 (2005) にも記載される。40

#### 【0135】

ヒト抗体はまた、ヒト由来ファージディスプレイイブラリから選択されるFvクローネ可変ドメイン配列を単離することによって、生成されてもよい。かかる可変ドメイン配

10

20

30

40

50

列は次いで、所望のヒト定常ドメインと組み合わされてもよい。抗体ライプラリからヒト抗体を選択するための技法が、下に記載される。

#### 【0136】

##### 5. ライプラリ由来抗体

本発明の抗体は、コンビナトリアルライプラリを、所望の活性（単数または複数）を有する抗体についてスクリーニングすることによって、単離されてもよい。例えば、ファージディスプレイライプラリを生成し、かかるライプラリを、所望の結合特性を保有する抗体についてスクリーニングするための、多様な方法が当該技術分野で知られている。かかる方法は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) に概説され、またさらに、例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554、Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)、Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992)、Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338 (2): 299-310 (2004)、Lee et al., J. Mol. Biol. 340 (5): 1073-1093 (2004)、Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467-12472 (2004)、およびLee et al., J. Immunol. Methods 284 (1-2): 119-132 (2004) に記載される。  
10  
20  
2004年1月20日

#### 【0137】

ある特定のファージディスプレイ法において、VHおよびVL遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって別個にクローニングされ、ファージライプラリ中で無作為に組み換えられ、それを次いで、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994) に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは典型的に、1本鎖Fv (scFv) 断片としてまたはFab断片としてのいずれかで、抗体断片を提示する。免疫された源からのライプラリは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。代替的に、Griffiths et al., EMBO J., 12:725-734 (1993) によって記載されるように、ナイーブレパートリーをクローニングして（例えば、ヒトから）、いかなる免疫化も伴わずに、広範な非自己抗原およびまた自己抗原に対する抗体の単一の源を提供することができる。最後に、ナイーブライプラリはまた、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992) に記載されるように、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、無作為配列を含有するPCRプライマーを使用して高度可変CDR3領域をコードし、体外で再配列を達成することによって、合成的に作製することができる。ヒト抗体ファージライプラリを記載する特許公開には、例えば、米国特許第5,750,373号、および米国特許公開第2005/0079574号、同第2005/0119455号、同第2005/0266000号、同第2007/0117126号、同第2007/0160598号、同第2007/0237764号、同第2007/0292936号、および同第2009/0002360号が含まれる。  
30  
40  
2004年1月20日

#### 【0138】

ヒト抗体ライプラリから単離された抗体または抗体断片は、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされる。

#### 【0139】

##### 6. 多重特異性抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば

、二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有する、モノクローナル抗体である。ある特定の実施形態において、結合特異性のうちの一方は、ETBR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。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、ETBRの2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体をまた使用して、細胞傷害性薬剤を、ETBRを発現する細胞に限局させてもよい。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製することができる。

#### 【0140】

多重特異性抗体を作製するための技法には、異なる特異性を有する2つの免役グロブリン重鎖-軽鎖対の組み換え共発現 (Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983))、国際公開第93/08829号、およびTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991) を参照されたい)、「ノブ・イン・ホール(knob-in-hole)」操作(例えば、米国特許第5,731,168号を参照されたい)が含まれるが、これらに限定されない。多重特異性抗体はまた、静電的ステアリング(electrostatic steering)効果を操作して抗体Fc-ヘテロ二量体分子を作製すること(国際公開第2009/089004A1号)、2つ以上の抗体または断片を架橋すること(例えば、米国特許第4,676,980号、およびBrennan et al., Science, 229: 81 (1985) を参照されたい)、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を產生すること(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148 (5): 1547-1553 (1992) を参照されたい)、「ダイアボディ」技術を使用して二重特異性抗体断片を作製すること(例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) を参照されたい)、および1本鎖Fv(sFv)二量体を使用すること(例えば、Gruuber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994) を参照されたい)、ならびに例えば、Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991) に記載される三重特異性抗体を調製することによって、作製されてもよい。

#### 【0141】

「オクトパス(Octopus)抗体」を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作された抗体もまた、本明細書に含まれる(例えば、米国公開特許第2006/0025576A1号を参照されたい)。

#### 【0142】

本明細書における抗体または断片にはまた、ETBRならびに別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む、「二重作用(Dual Acting)Fab」または「DAF」が含まれる(例えば、米国公開特許第2008/0069820号を参照されたい)。

#### 【0143】

### 7. 抗体変異形

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列変異形が企図される。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが望ましいことがある。抗体のアミノ酸配列変異形は、適切な修飾を、抗体をコードするヌクレオチド配列中に導入することによって、またはペプチド合成によって、調製されてもよい。かかる修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列からの残基の欠失、および/またはそこへ残基の挿入、および/またはその内の残基の置換が含まれる。欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせを作製して、最終構築物に到達することができるが、但し、その最終構築物が、所望の特性、例えば、抗原結合性を保有することを条件とする。

#### 【0144】

##### a) 置換、挿入、および欠失変異形

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異形が提供される。置換型突然変異生成に対する目的の部位には、HVRおよびFRが含まれる。保存的置換は、表1において、「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化は

10

20

20

30

40

50

、表1において、「例となる置換」の見出しの下に提供され、またアミノ酸側鎖クラスを参照して下にさらに記載される。アミノ酸置換が目的の抗体中に導入され、産物が、所望の活性、例えば、保持／改善された抗原結合、減少した免疫原性、または改善されたADCもしくはCDCについて、スクリーニングされてもよい。

【表1】

元の残基	例となる置換	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

アミノ酸は、次の一般的な側鎖特性に従って分類されてもよい：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile、
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、
- (3) 酸性：Asp、Glu、
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg、
- (5) 鎮配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro、
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0145】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換すること

10

20

30

40

50

を伴うであろう。

#### 【0146】

置換型変異形の1つの種類は、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の1個以上の超可変領域残基を置換することを伴う。一般に、さらなる研究のために選択される、結果として生じる変異形（複数可）は、親抗体と比べて、ある特定の生物学的特性における修飾（例えば、改善）（例えば、増加した親和性、低減された免疫原性）を有することになり、および／または親抗体の、実質的に保持されたある特定の生物学的特性を有することになる。例となる置換型変異形は、例えば、本明細書に記載されるもの等のファージディスプレイベースの親和性成熟技法を使用して、好都合に生成され得る、親和性成熟抗体である。簡潔に述べると、1個以上のHVR残基が突然変異させられ、変異形抗体がファージ上で提示され、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

10

#### 【0147】

変化（例えば、置換）をHVRにおいて行って、例えば、抗体親和性を改善してもよい。かかる変化は、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で突然変異を経るコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207: 179 - 196 (2008) を参照されたい）、および／またはSDR（a-CDR）において行われてもよく、結果として生じる変異形VHまたはVLが、結合親和性について試験される。二次ライブリを構築し、そこから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178: 1 - 37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)) に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施形態において、多様性が、多様な方法（例えば、エラープローンPCR、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指向性突然変異生成）のうちのいずれかによって、成熟のために選定された可変遺伝子中に導入される。二次ライブリが次いで作り出される。ライブリは次いで、所望の親和性を有する任意の抗体変異形を特定するために、スクリーニングされる。多様性を導入するための別の方は、数個のHVR残基（例えば、1回に4～6個の残基）が無作為化される、HVR指向性アプローチを伴う。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング突然変異生成またはモデリングを使用して、具体的に特定されてもよい。特にCDR-H3およびCDR-L3が、しばしば標的とされる。

20

#### 【0148】

ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、かかる変化が、抗原に結合する抗体の能力を実質的に低減しない限り、1つ以上のHVR内で生じてもよい。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的変化（例えば、本明細書に提供される保存的置換）が、HVRにおいて行われてもよい。かかる変化は、HVR「ホットスポット」またはSDRの外側にあってもよい。上に提供される変異形VHおよびVL配列のある特定の実施形態において、各HVRは、変化させられないか、またはわずか1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換を含有するにすぎないかのいずれかである。

30

#### 【0149】

突然変異生成のための標的とされ得る、抗体の残基または領域の特定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081 - 1085 によって記載される、「アラニンスキャニング変異生成」と呼ばれるものである。この方法において、標的残基（例えば、arg、asp、his、lys、およびglu等の荷電残基）のうちのある残基または基が特定され、中性または負荷電アミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）によって置き換えられて、抗体の抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定する。さらなる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の場所に導入されてもよい。代替的に、または追加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造を使用して、抗体と抗原との間の接觸点が特定される。かかる接觸残基および隣接する残基は、置換の候補として標的とされるか、または排除されても

40

50

よい。変異形をスクリーニングして、それらが所望の特性を含有するかどうかを決定してもよい。

#### 【0150】

アミノ酸配列挿入には、1個の残基から100個以上の残基を含有するポリペプチドの範囲の長さである、アミノ末端および／またはカルボキシル末端融合、ならびに单一のまたは多数のアミノ酸残基の配列内(*intrasequence*)挿入が含まれる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入型変異形には、抗体の血清半減期を増加させる酵素(例えば、AD E P Tのための)またはポリペプチドに対する抗体のN末端もしくはC末端への融合が含まれる。

#### 【0151】

##### b) グリコシル化変異形

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるように変化させられる。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作り出されるか、または除去されるように、アミノ酸配列を変化させることによって、好都合に遂行されてもよい。

#### 【0152】

抗体がFc領域を含む場合、そこに結合した炭水化物が変化させられてもよい。哺乳類細胞によって産生される天然抗体は、典型的に、一般にN-結合によって、Fc領域のCH2ドメインのAsn297に結合される、分岐した二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wright et al. TIBTECH 15:26-32(1997)を参照されたい。オリゴ糖類には、種々の炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、およびシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖類構造の「システム」においてGlcNAcに結合したフコースが含まれる。いくつかの実施形態において、抗体におけるオリゴ糖の修飾は、ある特定の改善された特性を有する抗体変異形を作り出すために行われてもよい。

#### 【0153】

一実施形態において、Fc領域に(直接的にまたは間接的に)結合されるフコースを欠いた炭水化物構造を有する、抗体変異形が提供される。例えば、かかる抗体におけるフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%、または20%~40%であってもよい。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されるように、MALDI-TOF質量分析法によって測定するとき、Asn297に結合した全ての糖鎖構造(例えば、複合体、ハイブリッド、および高マンノース構造)の合計と比べた、Asn297における糖鎖内のフコースの平均量を算出することによって決定される。Asn297は、Fc領域における約297位(Fc領域残基のEu付番)に位置するアスパラギン残基を指すが、Asn297はまた、抗体における小規模な配列変異に起因して、297位から約±3アミノ酸上流または下流、すなわち、294位~300位の間に位置する。かかるフコシル化変異形は、改善されたADC C機能を有し得る。例えば、米国特許公開第US 2003/0157108号(Presta, L.)、同第US 2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異形に関連する刊行物の例としては、米国公開特許第2003/0157108号、国際公開第2000/61739号、国際公開第2001/29246号、米国公開特許第2003/0115614号、米国公開特許第2002/0164328号、米国公開特許第2004/0093621号、米国公開特許第2004/0132140号、米国公開特許第2004/0110704号、米国公開特許第2004/0110282号、米国公開特許第2004/0109865号、国際公開第2003/085119号、国際公開第2003/084570号、国際公開第2005/035586号、国際公開第2005/035778号、国際公開第2005/053742号、国際公開第2002/031140号、Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249(2004)、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 50

87 : 614 (2004) が挙げられる。脱フコシル化抗体を產生することが可能な細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損した Lec13 CHO 細胞 (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249 : 533 - 545 (1986) )、米国特許出願第 US 2003 / 0157108 A1 号 (Presta, L.)、および国際公開第 2004 / 056312 A1 号 (Adamsら) (特に実施例 11 で) )、および -1, 6 - フコシルトランスクエラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウト CHO 細胞等のノックアウト細胞株 (例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87 : 614 (2004) 、Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94 (4) : 680 - 688 (2006) )、および国際公開第 2003 / 085107 号を参照されたい) が挙げられる。

10

#### 【0154】

二分されたオリゴ糖類を有する、例えば、抗体の Fc 領域に結合した二分岐オリゴ糖類が GlcNAc によって二分される、抗体変異形がさらに提供される。かかる抗体変異形は、低減されたフコシル化および / または改善された ADC C 機能を有し得る。かかる抗体変異形の例は、例えば、国際公開第 2003 / 011878 号 (Jean-Mairet ら)、米国特許第 6,602,684 号 (Umana ら)、および米国公開特許第 2005 / 0123546 号 (Umana ら) に記載される。Fc 領域に結合したオリゴ糖類において少なくとも 1 個のガラクトース残基を有する、抗体変異形もまた提供される。かかる抗体変異形は、改善された CDC 機能を有し得る。かかる抗体変異形は、例えば、国際公開第 1997 / 30087 号 (Patel ら)、国際公開第 1998 / 58964 号 (Raju, S.)、および国際公開第 1999 / 22764 号 (Raju, S.) に記載される。

20

#### 【0155】

##### c) Fc 領域変異形

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体の Fc 領域に導入され、それによって Fc 領域変異形を生成してもよい。Fc 領域変異形は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾 (例えば、置換) を含む、ヒト Fc 領域配列 (例えば、ヒト IgG1、IgG2、IgG3、または IgG4 Fc 領域) を含んでもよい。

30

#### 【0156】

ある特定の実施形態において、本発明は、いくつかのエフェクター機能を保有するが、全てのエフェクター機能は保有せず、それにより、体内での抗体の半減期が重要であるが、なおもある特定のエフェクター機能 (補体および ADC C 等) が不必要または有害である場合の適用に対する望ましい候補となる、抗体変異形を企図する。体外および / または体内細胞傷害性アッセイを実行して、CDC および / または ADC C 活性の低減 / 枯渇を確認することができる。例えば、Fc 受容体 (FcR) 結合アッセイを実行して、抗体が Fc R 結合を欠いている (よって、ADC C 活性を欠いている可能性が高い) が、Fc Rn 結合能力を保持していることを確実にすることができる。ADC C を媒介するための主要な細胞である NK 細胞は、Fc R I II のみを発現するが、一方で単球は、Fc RI、Fc RII、および Fc RIII を発現する。造血細胞上での FcR 発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 : 457 - 492 (1991) の 464 ページの表 3 に要約される。目的の分子の ADC C 活性を評価するための体外アッセイの非限定的な例は、米国特許第 5,500,362 号 (例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83 : 7059 - 7063 (1986) を参照されたい) および Hellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82 : 1499 - 1502 (1985) 、同第 5,821,337 号 (Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 : 1351 - 1361 (1987) を参照されたい) に記載される。代替的に、非放射性アッセイ法が用いられてもよい (例えば、

40

50

フローサイトメトリーのためのACTI(商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA、およびCytoT ox 96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照されたい。かかる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(PBMC)およびナチュラルキラー細胞が含まれる。代替的に、または追加的に、目的の分子のADCC活性は、体内で、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652-656(1998)に開示されるもの等の動物モデルにおいて、評価されてもよい。C1q結合アッセイをまた行って、抗体がC1qに結合不可能であり、よってCDC活性を欠いていることを確認してもよい。例えば、国際公開第2006/029879号および国際公開第2005/100402号におけるC1qおよびC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい(例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163(1996)、Cragg, M. S. et al., Blood 101: 1045-1052(2003)、およびCragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103: 2738-2743(2004)を参照されたい)。FcRn結合および体内クリアランス/半減期決定もまた、当該技術分野で既知の方法を使用して行うことができる(例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12): 1759-1769(2006)を参照されたい)。

10

20

30

40

50

## 【0157】

低減されたエフェクター機能を有する抗体には、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、および329のうちの1つ以上の置換を有するものが含まれる(米国特許第6,737,056号)。かかるFc突然変異体には、アラニンへの残基265および297の置換を有するいわゆる「DANA」Fc突然変異体を含む(米国特許第7,332,581号)、アミノ酸265、269、270、297、および327位のうちの2つ以上において置換を有するFc突然変異体が含まれる。

## 【0158】

FcRへの改善されたまたは減少した結合を有する、ある特定の抗体変異形が記載される。(例えば、米国特許第6,737,056号、国際公開第2004/056312号、およびShields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604(2001)を参照されたい)。

## 【0159】

ある特定の実施形態において、抗体変異形は、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298、333、および/または334位(残基のEU付番)における置換を有する、Fc領域を含む。

## 【0160】

いくつかの実施形態において、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開第99/51642号、およびIdusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184(2000)に記載されるように、変化した(すなわち、改善されたかまたは減少したかのいずれか)C1q結合および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)をもたらす変化が、Fc領域において行われる。

## 【0161】

母体IgGの胎児への移入に関する、増加した半減期および新生児型Fc受容体(FcRn)への改善された結合を有する抗体(Guyer et al., J. Immunol. 117: 587(1976)およびKim et al., J. Immunol. 24: 249(1994))が、米国公開特許第2005/0014934A1号(Hintonら)に記載される。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する、1つ以上の置換を内部に有するFc領域を含む。かかるFc変異形には、Fc領域残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、

424、または434のうちの1つ以上における置換、例えば、Fc領域残基434の置換(米国特許第7,371,826号)を有するものが含まれる。

#### 【0162】

また、Fc領域変異形の他の例に関して、Duncan & Winter, Nature 322: 738-40 (1988)、米国特許第5,648,260号、米国特許第5,624,821号、および国際公開第94/29351号も参照されたい。

#### 【0163】

##### d) システイン操作された抗体変異形

ある特定の実施形態において、抗体の1個以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作された抗体、例えば、「チオMab」を作り出すことが望ましい場合がある。特に実施形態において、置換残基は、抗体の利用しやすい部位において生じる。それらの残基をシステインで置換することによって、反応性のチオール基はそれによって、抗体の利用しやすい部位に位置付けられ、それを使用して、抗体を、薬物部分またはリンカー-薬物部分等の他の部分に複合して、本明細書にさらに記載される、免疫複合体を作り出してもよい。ある特定の実施形態において、次の残基のうちの任意の1個以上が、システインで置換されてもよい：軽鎖のV205(Kabat付番)、重鎖のA118(EU付番)、および重鎖Fc領域のS400(EU付番)。非限定的な例となるシステイン操作された抗ETBR抗体の重鎖および軽鎖は、配列番号18、19、および20に示される。システイン操作された抗体は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されるように生成されてもよい。

10

20

30

40

#### 【0164】

##### e) 抗体誘導体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、当該技術分野で既知であり、容易に入手可能な、追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに修飾されてもよい。抗体の誘導体化に好適な部分には、水溶性ポリマーが含まれるが、これらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、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、ポリビニルピロリドン、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(ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、およびデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレン(propylene)グリコールホモポリマー、プロリプロピレン(propylpropylene)オキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性に起因して、製造における利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量のものであってもよく、分岐していても非分岐であってもよい。抗体に結合したポリマーの数は、様々であってもよく、1つを超えるポリマーが結合される場合、それは、同じ分子または異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数および/または種類は、改善対象の抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が規定の条件下で療法において使用されるかどうか等を含むが、これらに限定されない考慮に基づいて、決定することができる。

#### 【0165】

別の実施形態において、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る、抗体および非タンパク質性部分の複合体が提供される。一実施形態において、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブ(Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005))である。放射線は、任意の波長のものであってもよく、一般の細胞を害さないが、非タンパク質性部分を、抗体-非タンパク質性部分に近位の細胞が死滅させられる温度まで加熱する波長が含まれるが、これらに限定されない。

50

## 【0166】

## B. 組み換え法および組成物

抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載される、組み換え法および組成物を使用して產生されてもよい。一実施形態において、本明細書に記載される抗ETBR抗体をコードする単離核酸が提供される。かかる核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および／またはVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖および／または重鎖）をコードし得る。さらなる実施形態において、かかる核酸を含む1つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。さらなる実施形態において、かかる核酸を含む宿主細胞が提供される。1つかかる実施形態において、宿主細胞は、（1）抗体のVLを含むアミノ酸配列および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または（2）抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター、および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む（例えば、それらで形質転換されている）。一実施形態において、宿主細胞は、真核性、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはリンパ系細胞（例えば、Y0、NS0、Sp20細胞）である。一実施形態において、抗ETBR抗体を作製する方法が提供され、本方法は、上に提供される抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に好適な条件下で培養することと、任意に、抗体を宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から回収することとを含む。

10

## 【0167】

抗ETBR抗体の組み換え産生のために、例えば、上述の、抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニングおよび／または発現のために、1つ以上のベクター中に挿入される。かかる核酸は、慣例の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能である、オリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）、容易に単離され、配列決定され得る。

20

## 【0168】

抗体コードベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞には、本明細書に記載される原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、特にグリコシリ化およびFcエフェクター機能が必要とされない場合に、細菌において產生されてもよい。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号、および同第5,840,523号を参照されたい。（また、大腸菌における抗体断片の発現を記載する、Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照されたい）。発現後、抗体は、可溶性画分において細菌細胞ペーストから単離されてもよく、またさらに精製することができる。

30

## 【0169】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核微生物は、抗体コードベクターに好適なクローニングまたは発現宿主であり、それには、グリコシリ化経路が「ヒト化」されており、部分的または完全ヒトグリコシリ化パターンを有する抗体の产生をもたらす、真菌および酵母株が含まれる。Geringross, Nat. Biotech. 22: 1409-1414 (2004)、およびLi et al., Nat. Biotech. 24: 210-215 (2006)を参照されたい。

40

## 【0170】

グリコシリ化抗体の発現に好適な宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物および脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物および昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と併せて、特にヨトウガ細胞のトランスフェクションのために、使用され得る、多数のバキュロウイルス株が特定されている。

## 【0171】

植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,12

50

5, 978号、および同第6, 417, 429号(トランスジェニック植物において抗体を产生するためのPL抗体(商標)技術を記載している)を参照されたい。

#### 【0172】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で成長するように適合される哺乳類細胞株が、有用であり得る。有用な哺乳類宿主細胞株の他の例としては、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7)；ヒト胚性腎臓株(例えば、Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)に記載される、293または293細胞)；ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)；マウスセルトリ細胞(例えば、Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)に記載される、TM4細胞)；サル腎臓細胞(CV1)；アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)；ヒト子宮頸がん細胞(HELA)；イヌ腎臓細胞(MDCK)；バッファローラット肝臓細胞(BRL-3A)；ヒト肺細胞(W138)；ヒト肝がん細胞(Hep G2)；マウス乳腺腫瘍/MMT 060562)；例えば、Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)に記載される、TRI細胞；MRC 5細胞；およびFS4細胞がある。他の有用な哺乳類宿主細胞株には、DHFR-CHO細胞(Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)を含む、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞；ならびにY0、NS0、およびSp2/0等の骨髄腫細胞株が含まれる。抗体产生に好適なある特定の哺乳類宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)を参照されたい。  
。

#### 【0173】

##### C. アッセイ

本明細書に提供される抗ETBR抗体は、それらの物理／化学特性および／または生物活性について、当該技術分野で既知の種々のアッセイによって、特定され、スクリーニングされ、または特徴付けられてもよい。

#### 【0174】

一態様において、本発明の抗体は、その抗原結合活性について、例えば、ELISA、BIACore(登録商標)、FACS、またはウェスタンプロット等の既知の方法によって、試験される。

#### 【0175】

別の態様において、競合アッセイを使用して、ETBRへの結合に対して本明細書に記載される抗体のいずれかと競合する抗体を特定してもよい。ある特定の実施形態において、かかる競合抗体は、本明細書に記載される抗体によって結合される、同じエピトープ(例えば、直線状または立体配座エピトープ)に結合する。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となる方法は、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)に提供される。

#### 【0176】

例となる競合アッセイにおいて、固定化されたETBRは、ETBRに結合する第1の標識抗体(例えば、本明細書に記載される抗体のいずれか)、およびETBRへの結合に対して第1の抗体と競合するその能力について試験されている第2の未標識抗体を含む、溶液中でインキュベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定化されたETBRが、第1の標識抗体を含むが、第2の未標識抗体を含まない、溶液中でインキュベートされる。ETBRへの第1の抗体の結合を許容する条件下でのインキュベーション後、過剰の非結合抗体が除去され、固定化されたETBRに関連する標識の量が測定される。固定化されたETBRに関連する標識の量が、対照試料

10

20

30

40

50

と比べて試験試料中で実質的に低減される場合、それは、第2の抗体がETBRへの結合に対して第1の抗体と競合していることを示す。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照されたい。

### 【0177】

#### D. 免疫複合体

本発明はまた、本明細書において、化学療法剤もしくは化学療法薬、成長阻害性薬剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはそれらの断片）、または放射性同位体（すなわち、放射性物質複合体（radioconjugate））等の、1つ以上の細胞傷害性薬剤に複合される抗ETBR抗体を含む、免疫複合体も提供する。

10

### 【0178】

免疫複合体は、腫瘍への薬物部分の標的化された送達を可能にし、いくつかの実施形態においては、複合されていない薬物の全身投与が、正常な細胞にとって許容できないレベルの毒性をもたらし得る場合に、腫瘍中の細胞内蓄積を可能にする（Polakiss P. (2005) Current Opinion in Pharmacology 5: 382 - 387）。

### 【0179】

抗体-薬物複合体（ADC）は、強力な細胞傷害性薬物の標的を抗原発現腫瘍細胞に定め（Teicher, B. A. (2009) Current Cancer Drug Targets 9: 982 - 1004）、それによって、有効性を最大限にし、オフターゲット毒性を最小限にすることにより治療指数を増強することによって、抗体および細胞傷害性薬物の両方の特性を組み合わせる、標的を定められた化学療法分子である（Carter, P. J. and Senter P. D. (2008) The Cancer Jour. 14 (3): 154 - 169、Charri, R. V. (2008) Acc. Chem. Res. 41: 98 - 107）。

20

### 【0180】

本発明のADC化合物には、抗がん活性を有するものが含まれる。いくつかの実施形態において、ADC化合物には、薬物部分に複合された、すなわち、共有結合された、抗体が含まれる。いくつかの実施形態において、本抗体は、リンカーを通じて薬物部分に共有結合される。本発明の抗体-薬物複合体（ADC）は、有効用量の薬物を腫瘍組織に選択的に送達し、それによって、治療指數（「治療濃度域」）を増加させながら、より高い選択性、すなわちより低い効果的用量が、達成され得る。

30

### 【0181】

抗体-薬物複合体（ADC）の薬物部分（D）は、細胞傷害性または細胞静止効果を有する任意の化合物、部分、または基を含んでもよい。例となる薬物部分には、細胞傷害性活性を有する、PNU-159682等の、ネモルビシンおよびその誘導体が含まれるが、これらに限定されない。かかる免疫複合体の非限定的な例が、下にさらに詳細に考察される。

40

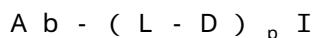
### 【0182】

#### 1. 例となる抗体-薬物複合体

抗体-薬物複合体（ADC）化合物の例となる実施形態は、腫瘍細胞を標的とする抗体（Ab）、薬物部分（D）、およびAbをDに結合するリンカー部分（L）を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、リジンおよび/またはシステイン等の1個以上のアミノ酸残基を通じて、リンカー部分（L）に結合される。

### 【0183】

例となるADCは、式I、



を有し、式中、pは、1～約20である。いくつかの実施形態において、抗体に複合され

50

得る薬物部分の数は、遊離システイン残基の数によって限定される。いくつかの実施形態において、遊離システイン残基は、本明細書に記載される方法によって抗体アミノ酸配列中に導入される。式Iの例となるADCには、1、2、3、または4個の操作されたシステインアミノ酸を有する抗体が含まれるが、これらに限定されない(Lyon, R. et al (2012) Methods in Enzym. 502: 123-138)。いくつかの実施形態において、1個以上の遊離システイン残基が、操作を使用することなく、抗体においてすでに存在しており、その場合、既存の遊離システイン残基を使用して、抗体を薬物に複合してもよい。いくつかの実施形態において、本抗体は、1個以上の遊離システイン残基を生成するために、抗体の複合前に還元条件に曝露される。

## 【0184】

10

## a) 例となるリンカー

「リンカー」(L)は、1個以上の薬物部分(D)を抗体(Ab)に連結して、式Iの抗体-薬物複合体(ADC)を形成するために使用することができる、二機能性または多機能性部分である。いくつかの実施形態において、抗体-薬物複合体(ADC)は、薬物および抗体に共有結合するための反応性官能基を有するリンカーを使用して、調製することができる。例えば、いくつかの実施形態において、抗体の(Ab)システインチオールは、リンカーの反応性官能基または薬物-リンカー中間体との結合を形成して、ADCを作製することができる。

## 【0185】

20

一様において、リンカーは、抗体上に存在する遊離システインと反応して、共有結合を形成することが可能である、官能性を有する。非限定的な例となるかかる反応性官能基には、マレイミド、ハロアセトアミド、-ハロアセチル、コハク酸イミドエステル、4-ニトロフェニルエステル、ペント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等の活性化エステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアニ酸塩、およびイソチオシアニ酸塩が含まれる。例えば、Klussmann, et al (2004), Bioc conjugate Chemistry 15 (4): 765-773の766ページにおける複合方法、およびその中の実施例を参照されたい。

## 【0186】

30

いくつかの実施形態において、リンカーは、抗体上に存在する求電子基と反応することができる、官能性を有する。例となるかかる求電子基には、アルデヒド基およびケトンカルボニル基が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、リンカーの反応性官能基のヘテロ原子が、抗体上の求電子基と反応し、抗体単位との共有結合を形成することができる。非限定的な例となるかかる反応性官能基には、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、ヒドラジンカルボン酸塩、およびアリールヒドラジドが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0187】

40

リンカーは、1つ以上のリンカー構成要素を含んでもよい。例となるリンカー構成要素には、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」または「vc」)、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(「PAB」)、N-コハク酸イミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタン酸塩(「SPP」)、および4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボン酸塩(「MCC」)が含まれる。種々のリンカー構成要素が当該技術分野で知られており、このうちのいくつかが下に記載される。

## 【0188】

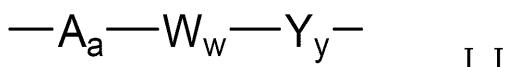
50

リンカーは、薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であってもよい。非限定的な例となる切断可能なリンカーには、酸不安定性リンカー(例えば、ヒドラゾンを含む)、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、またはジスルフィド含有リンカー(Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)、米国公開特許第5208020号)が含まれる。

れる。

【0189】

ある特定の実施形態において、リンカーは、次の式II、



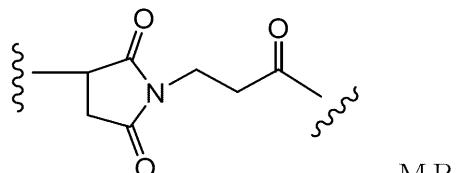
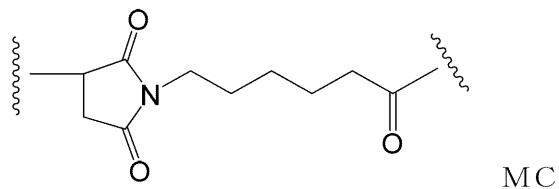
を有し、式中、Aは、「ストレッチャー(stretcher)単位」であり、aは、0~1の整数であり、Wは、「アミノ酸単位」であり、wは、0~12の整数であり、Yは、「スペーサ単位」であり、yは、0、1、または2である。式IIのリンカーを含むADCは、式I(A)、すなわちAb-(A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-Y<sub>y</sub>-D)pを有し、式中、Ab、D、およびpは、式Iについて上にあるように定義される。かかるリンカーの例となる実施形態は、米国特許第7,498,298号に記載され、それは参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

10

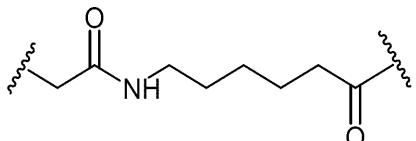
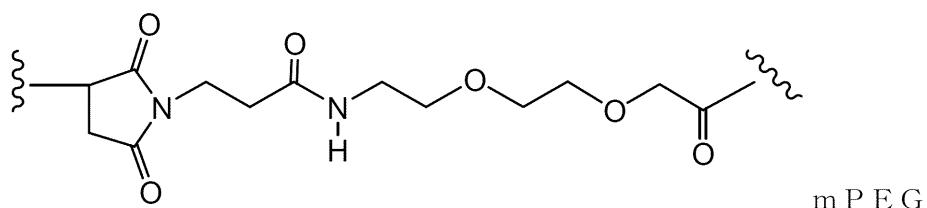
【0190】

いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、抗体を別のリンカー構成要素にまたは薬物部分に連結する、「ストレッチャー単位」(A)を含む。非限定的な例となるストレッチャー単位が下に示される(ここで波線は、抗体、薬物、または追加のリンカー構成要素への共有結合の部位を示す)：

20



30



40

【0191】

いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、「アミノ酸単位」(W)を含む。いくつかのかかる実施形態において、アミノ酸単位は、プロテアーゼによるリンカーの切断を可能にし、それによって、リソソーム酵素等の細胞内プロテアーゼへの曝露時に免疫複合体からの薬物の放出を容易にする(Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21: 778-784)。例となるアミノ酸単位には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、およびペントペプチドが含まれるが、これらに限定されない。例となるジペプチドには、バリン-シトルリン(vcまたはval-c

50

i t ) 、アラニン - フェニルアラニン ( a f または a l a - p h e ) 、フェニルアラニン - リジン ( f k または p h e - l y s ) 、フェニルアラニン - ホモリジン ( p h e - h o m o l y s ) 、および N - メチル - バリン - シトルリン ( M e - v a l - c i t ) が含まれるが、これらに限定されない。例となるトリペプチドには、グリシン - バリン - シトルリン ( g l y - v a l - c i t ) およびグリシン - グリシン - グリシン ( g l y - g l y - g l y ) が含まれるが、これらに限定されない。アミノ酸単位は、自然発生アミノ酸残基、ならびに / または微量アミノ酸、および / もしくはシトルリン等の非自然発生アミノ酸類似体を含んでもよい。アミノ酸単位は、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、および D、またはプラスミンプロテアーゼによる、酵素的切断のために設計し、最適化することができる。

10

## 【0192】

典型的に、ペプチド型リンカーは、2つ以上のアミノ酸および / またはペプチド断片の間にペプチド結合を形成することによって、調製することができる。かかるペプチド結合は、例えば、液相合成法に従って、調製することができる（例えば、E. Schröder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76 - 136, Academic Press）。

## 【0193】

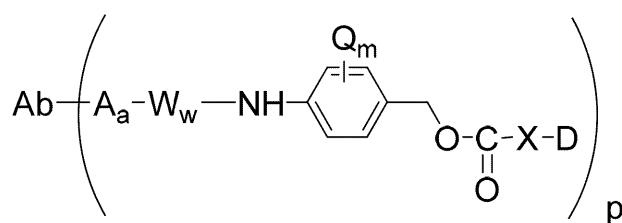
いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、直接、またはストレッチャー単位および / もしくはアミノ酸単位を通じてのいずれかで、抗体を薬物部分に連結する、「スペーサ単位」 (Y) を含む。スペーサ単位は、「自己犠牲型 (self-immolative)」または「非自己犠牲型」であり得る。「非自己犠牲型」スペーサ単位は、ADC の切断時にスペーサ単位の一部または全てが薬物部分に結合したままであるものである。非自己犠牲型スペーサ単位の例としては、グリシンスペーサ単位およびグリシン - グリシンスペーサ単位が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、腫瘍細胞関連プロテアーゼによる、グリシン - グリシンスペーサ単位を含有する ADC の酵素的切断は、ADC の残りの部分からのグリシン - グリシン - 薬物部分の放出をもたらす。いくつかのかかる実施形態において、グリシン - グリシン - 薬物部分は、腫瘍細胞内で加水分解ステップを受け、故にグリシン - グリシンスペーサ単位を薬物部分から切断する。

20

## 【0194】

「自己犠牲型」スペーサ単位は、薬物部分の放出を可能にする。ある特定の実施形態において、リンカーのスペーサ単位は、p - アミノベンジル単位を含む。いくつかのかかる実施形態において、p - アミノベンジルアルコールは、アミド結合を介してアミノ酸単位に結合し、カルバミン酸塩、メチルカルバミン酸塩、または炭酸塩が、ベンジルアルコールと薬物との間に作製される (Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15: 1087 - 1103)。いくつかの実施形態において、スペーサ単位は、p - アミノベンジルオキシカルボニル (PAB) を含む。いくつかの実施形態において、自己犠牲型リンカーを含む ADC は、構造、

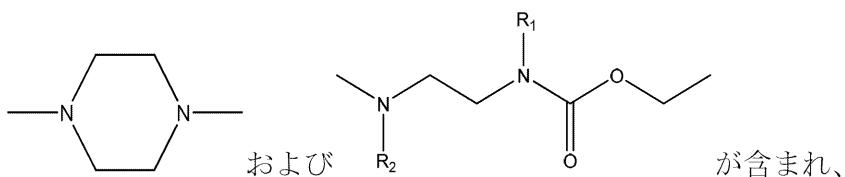
30



40

を有し、式中、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、または - シアノであり、m は、0 ~ 4 範囲の整数であり、X は、1 つ以上の追加のスペーサ単位であり得るか、または不在であり得、p は、1 ~ 約 20 の範囲である。いくつかの実施形態において、p は、1 ~ 10、1 ~ 7、1 ~ 5、または 1 ~ 4 の範囲である。非限定的な例となる X スペーサ単位には、

50



式中、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は独立して、H および C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから選択される。いくつかの実施形態において、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は各々、-CH<sub>3</sub> である。

#### 【0195】

自己犠牲型スペーサの他の例としては、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体等の、PAB 基と電子的に同様である芳香族化合物（米国特許第7,375,078号、Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 2237）およびオルト-またはパラ-アミノベンジルアセタールが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、置換および非置換4-アミノ酪酸アミド（Rodrigues et al. (1995) Chemistry Biology 2: 223）、適切に置換されたビシクロ[2.2.1]およびビシクロ[2.2.2]環系（Storm et al. (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94: 5815）、ならびに2-アミノフェニルプロピオン酸アミド（Amesberry, et al. (1990) J. Org. Chem. 55: 5867）等の、アミド結合加水分解時に環化を経るスペーサを使用することができる。グリシン残基の-炭素への薬物の結合は、ADCにおいて有用であり得る自己犠牲型スペーサの別の例である（Kingsbury et al. (1984) J. Med. Chem. 27: 1447）。

10

20

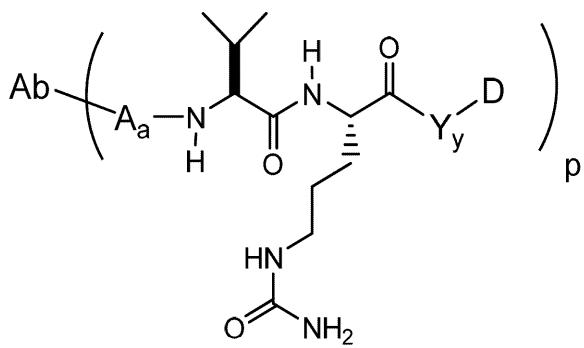
30

#### 【0196】

いくつかの実施形態において、リンカー L は、分岐する多機能性リンカー部分を通じた、抗体への1つを超える薬物部分の共有結合のための、樹状型リンカーであり得る（Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12: 2213-2215、Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 1761-1768）。樹状リンカーは、ADCの効力に関連する、薬物対抗体のモル比、すなわち、負荷を増加させることができる。故に、抗体が1個のみの反応性システィンチオール基を担持する場合、多数の薬物部分が、樹状リンカーを通じて結合され得る。

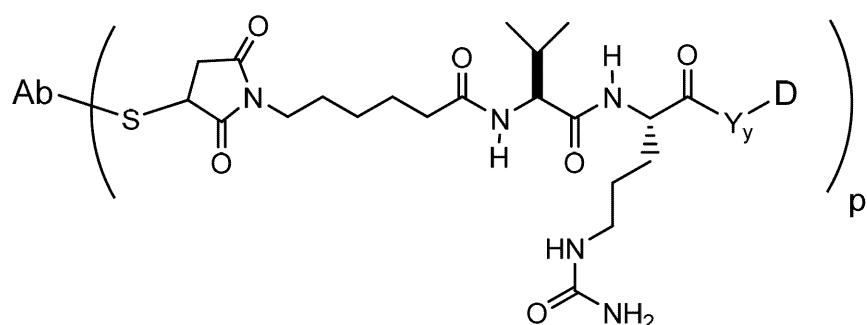
#### 【0197】

非限定的な例となるリンカーが、式 I の ADC の関連において下に示される：



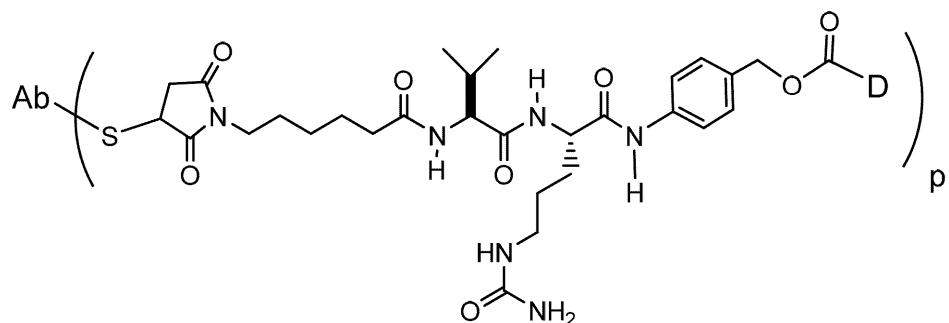
v a l - c i t

10



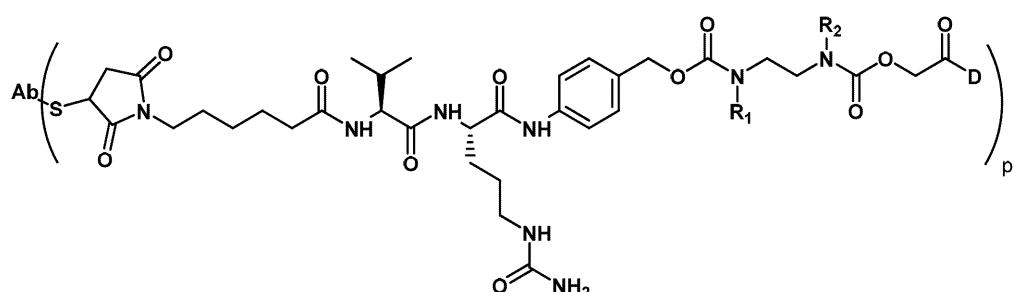
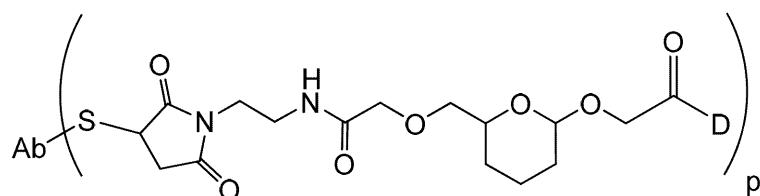
MC - v a l - c i t

20



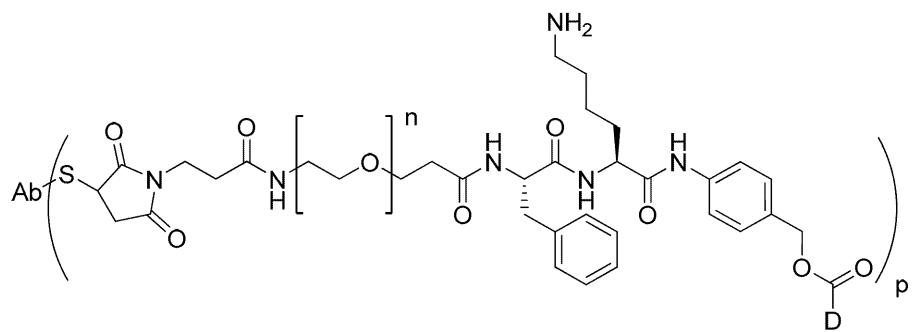
30

MC - v a l - c i t - P A B



40

(式中、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は独立して、H および C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルから選択される。いくつかの実施形態において、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は各々、-CH<sub>3</sub> である。



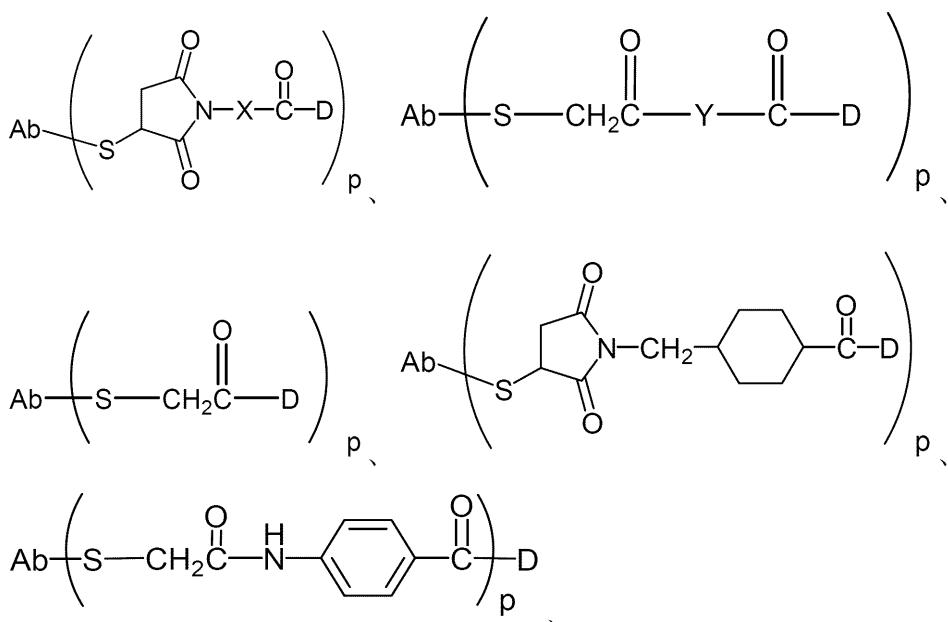
P h e - ホモ L y s - P A B - A b ,

10

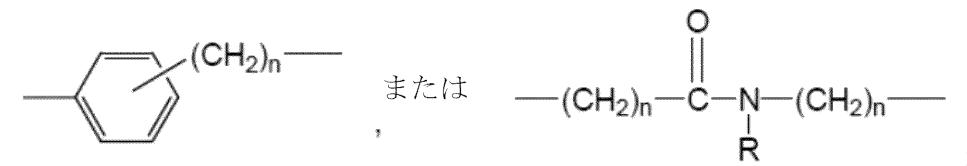
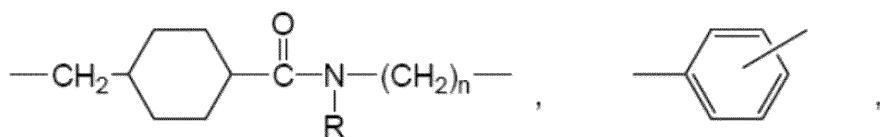
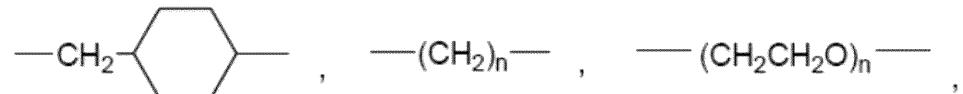
(式中、nは、0～12である)。いくつかの実施形態において、nは、2～10である。いくつかの実施形態において、nは、4～8である。

【0198】

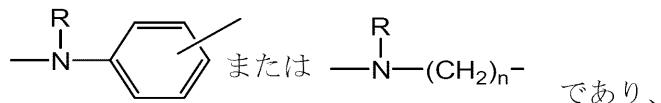
さらなる非限定的な例となるADCには、次の構造が含まれる：



(式中、 Xは、



であり、 Yは、



各 R は独立して、 H または C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルであり、 n は、 1 ~ 12 である)。

#### 【0199】

いくつかの実施形態において、リンカーは、溶解度および / または反応性を調節する基で置換される。非限定的な例として、スルホン酸塩 (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) またはアンモニウム等の荷電置換基は、リンカー試薬の水溶性を増加させ、抗体および / もしくは薬物部分とのリンカー試薬のカップリング反応を促進し得るか、またはADCを調製するために用いられる合成経路に応じて、DとのAb-L(抗体-リンカー中間体)、もしくはAbとのD-L(薬物-リンカー中間体)のカップリング反応を促進し得る。いくつかの実施形態において、リンカーの一部分が抗体にカップリングされ、リンカーの一部分が薬物にカップリングされ、次いでAb-(リンカー部分)<sup>a</sup>が薬物-(リンカー部分)<sup>b</sup>にカップリングされて、式IのADCを形成する。

#### 【0200】

本発明の化合物は、次のリンカー試薬、すなわちビス・マレイミド・トリオキシエチレ

10

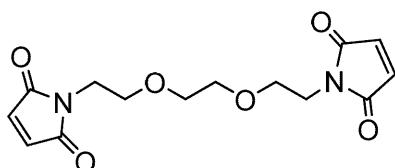
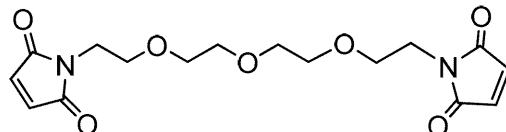
20

30

40

50

ングリコール( B M P E O )、N - ( - マレイミドプロピルオキシ) - N - ヒドロキシコハク酸イミドエステル( B M P S )、N - ( - マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミドエステル( E M C S )、N - [ - マレイミドブチリルオキシ]コハク酸イミドエステル( G M B S )、1 , 6 - ヘキサン - ビス - ビニルスルホン( H B V S )、コハク酸イミジル4 - ( N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシ - ( 6 - アミドカプロン酸塩)( L C - S M C C )、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシコハク酸イミドエステル( M B S )、4 - ( 4 - N - マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド( M P B H )、コハク酸イミジル3 - ( プロモアセトアミド)プロピオン酸塩( S B A P )、コハク酸イミジルヨード酢酸塩( S I A )、コハク酸イミジル( 4 - ヨードアセチル)アミノ安息香酸塩( S I A B )、N - コハク酸イミジル - 3 - ( 2 - ピリジルジチオ)プロピオン酸塩( S P D P )、N - コハク酸イミジル - 4 - ( 2 - ピリジルチオ)ペンタン酸塩( S P P )、コハク酸イミジル4 - ( N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボン酸塩( S M C C )、コハク酸イミジル4 - ( p - マレイミドフェニル)酪酸塩( S M P B )、コハク酸イミジル6 - [ ( - マレイミドプロピオンアミド)ヘキサン酸塩]( S M P H )、イミノチオラン( I T )、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 、およびスルホ - S M P B 、ならびにコハク酸イミジル - ( 4 - ビニルスルホン)安息香酸塩( S V S B )を用いて、また次のビス - マレイミド試薬、すなわちジチオビスマレイミドエタン( D T M E )、1 , 4 - ビスマレイミドブタン( B M B )、1 , 4 ビスマレイミジル - 2 , 3 - デヒドロキシブタン( B M D B )、ビスマレイミドヘキサン( B M H )、ビスマレイミドエタン( B M O E )、B M ( P E G )<sub>2</sub>( 下に示される)、およびB M ( P E G )<sub>3</sub>( 下に示される)；イミドエステルの二機能性誘導体( アジブイミド酸ジメチルH C 1等)、活性エステル( スペリン酸ジスクシンイミジル等)、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 - ジアゾニウムソイル等) - エチレンジアミン)、ジイソシアニ酸塩( トルエン2 , 6 - デイソシアニ酸塩等)、およびビス活性フッ素化合物( 1 , 5 - デフルオロ - 2 , 4 - デニトロベンゼン等)を含めて、調製される、A D C を明示的に企図するが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ビス - マレイミド試薬は、チオール含有薬物部分、リンカー、またはリンカー - 薬物中間体への、抗体におけるシステインのチオール基の結合を可能にする。チオール基と反応性である他の官能基には、ヨードアセトアミド、プロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアニ酸塩、およびイソチオシアニ酸塩が含まれるが、これらに限定されない。

BM(PEG)<sub>2</sub>BM(PEG)<sub>3</sub>

## 【 0 2 0 1 】

ある特定の有用なリンカー試薬は、P i e r c e B i o t e c h n o l o g y , I n c . ( R o c k f o r d , I L ) , M o l e c u l a r B i o s c i e n c e s I n c . ( B o u l d e r , C O ) 等の、種々の商業的供給源から得るか、または当該技術分野において、例えば、T o k i et al ( 2 0 0 2 ) J . O r g . C h e m . 6 7 : 1 8 6 6 - 1 8 7 2 、D u b o w c h i k , et al . ( 1 9 9 7 ) T e t r a h e d r o n L e t t e r s , 3 8 : 5 2 5 7 - 6 0 、W a l k e r , M . A . ( 1 9 9 5 ) J . O r g . C h e m . 6 0 : 5 3 5 2 - 5 3 5 5 、F r i s c h et al ( 1 9 9 6 ) B i o c o n j u g a t e C h e m . 7 : 1 8 0 - 1 8 6 、米国公開特許第 6 2 1 4 3 4 5 号、国際公開第 0 2 / 0 8 8 1 7 2 号、米国公開特許第 2 0 0 3 1 3 0 1 8 9 号

10

20

30

40

50

、米国公開特許第2003096743号、国際公開第03/026577号、国際公開第03/043583号、および国際公開第04/032828号に記載される手順に従って、合成することができる。

### 【0202】

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ペニタ酢酸(MX-DTPA)は、抗体への放射性ヌクレオチドの複合のための、例となるキレート剤である。例えば、国際公開第94/11026号を参照されたい。

### 【0203】

#### b) 例となる薬物部分

いくつかの実施形態において、ADCは、アントラサイクリンを含む。アントラサイクリンは、細胞傷害性活性を示す抗生物質化合物である。いかなる特定の理論にも拘束されることを意図するものではないが、研究は、アントラサイクリンが、1)細胞のDNA中の薬物分子のインターラーニングによって、DNA依存性核酸合成を阻害すること、2)薬物により遊離ラジカルが產生され、それが次いで細胞巨大分子と反応して、細胞への損傷を引き起こすこと、および/または3)薬物分子の細胞膜との相互作用を含む、いくつかの異なる機構によって、細胞を死滅させるように作動し得ることを示してきた(例えば、C. Peterson et al., "Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia" in Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy; N. R. Bachur, "Free Radical Damage" id. at pp. 97-102を参照されたい)。それらの細胞傷害性の可能性のために、アントラサイクリンは、白血病、乳がん、肺がん腫、卵巣腺がん、および肉腫等の多数のがんの治療において使用してきた(例えば、P. H. Wiernik, in Anthracycline: Current Status And New Developments p 11を参照されたい)。

10

20

50

30

40

50

### 【0204】

非限定的な例となるアントラサイクリンには、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ダウノマイシン、ネモルビシン、およびそれらの誘導体が含まれる。ダウノルビシンおよびドキソルビシンの免疫複合体およびプロドラッグが、調製され、研究されてきた(Kratz et al (2006) Current Med. Chem. 13: 477-523、Jeffrey et al (2006) Bioorganic & Med. Chem. Letters 16: 358-362、Torgov et al (2005) Bioconj. Chem. 16: 717-721、Nagy et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 829-834、Dubowchik et al (2002) Bioorg. & Med. Chem. Letters 12: 1529-1532、King et al (2002) J. Med. Chem. 45: 4336-4343、欧洲特許第0328147号、米国公開特許第6630579号)。抗体-薬物複合体BR96-ドキソルビシンは、腫瘍関連抗原Lewis-Yと特異的に反応し、第I相およびII相研究において評価してきた(Salehe et al (2000) J. Clin. Oncology 18: 2282-2292、Ajani et al (2000) Cancer Jour. 6: 78-81、Tolcher et al (1999) J. Clin. Oncology 17: 478-484)。

### 【0205】

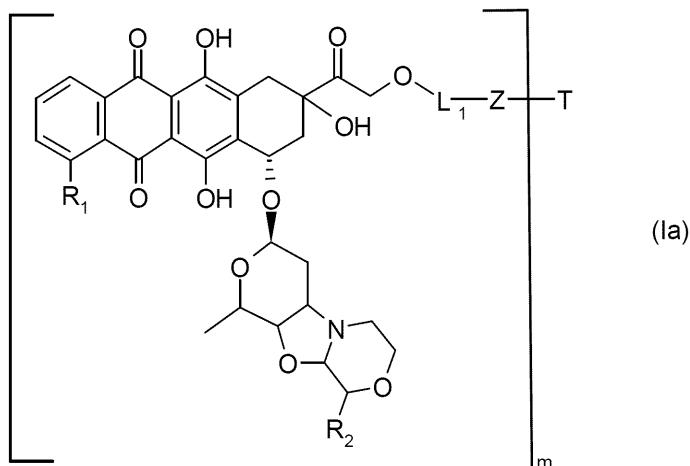
PNU-159682は、ネモルビシンの強力な代謝産物(または誘導体)である(Quintieri, et al. (2005) Clinical Cancer Research 11 (4): 1608-1617)。ネモルビシンは、ドキソルビシンのグリコシドアミノ上に2-メトキシモルホリノ基を有する、ドキソルビシンの半合成類似体であり、臨床評価段階にあり(Grandi et al (1990) Cancer T

reat. Rev. 17: 133、Ripamonti et al (1992) Brit. J. Cancer 65: 703;）、それには肝細胞癌に対する第II/III相治療が含まれる（Sun et al (2003) Proceedings of the American Society for Clinical Oncology 22, Abs 1448、Quintieri (2003) Proceedings of the American Association of Cancer Research, 44: 1st Ed, Abs 4649、Pacciaroni et al (2006) Jour. Clin. Oncology 24: 14116）。

## 【0206】

ネモルビシンまたはネモルビシン誘導体を含む非限定的な例となるADCは、式Ia、

10



20

に示され、式中、R<sub>1</sub>は、水素原子、ヒドロキシ、またはメトキシ基であり、R<sub>2</sub>は、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>アルコキシ基であるか、またはその薬学的に許容される塩であり、L<sub>1</sub>およびZは共に、本明細書に記載されるリンカー（L）であり、Tは、本明細書に記載される抗体（Ab）であり、mは、1～約20である。いくつかの実施形態において、mは、1～10、1～7、1～5、または1～4である。

## 【0207】

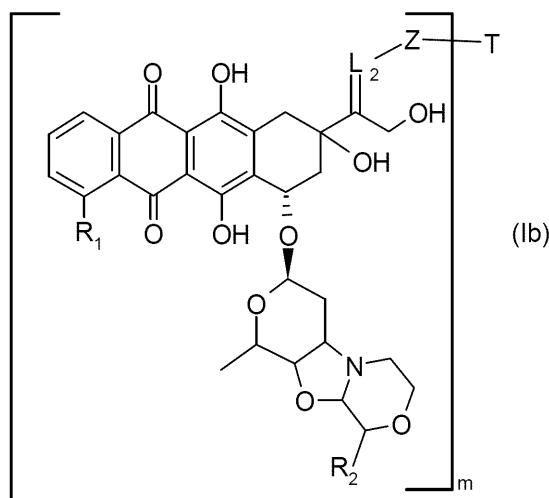
30

いくつかの実施形態において、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は両方とも、メトキシ（-OME）である。

## 【0208】

30

ネモルビシンまたはネモルビシン誘導体を含むさらなる非限定的な例となるADCは、式Ib、



40

に示され、式中、R<sub>1</sub>は、水素原子、ヒドロキシ、またはメトキシ基であり、R<sub>2</sub>は、C

50

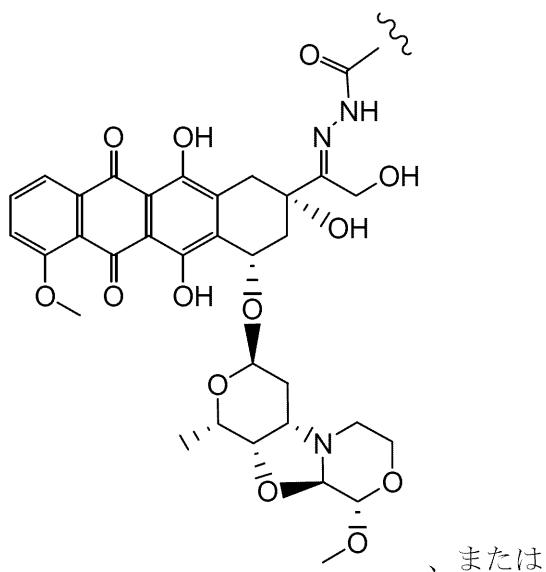
$L_1$  -  $C_5$  アルコキシ基であるか、またはその薬学的に許容される塩であり、  
 $L_2$  および  $Z$  は共に、本明細書に記載されるリンカー ( $L$ ) であり、  
 $T$  は、本明細書に記載される抗体 ( $A_b$ ) であり、  
 $m$  は、1 ~ 約 20 である。いくつかの実施形態において、 $m$  は、1 ~ 10、1 ~ 7、1 ~ 5、または 1 ~ 4 である。

## 【0209】

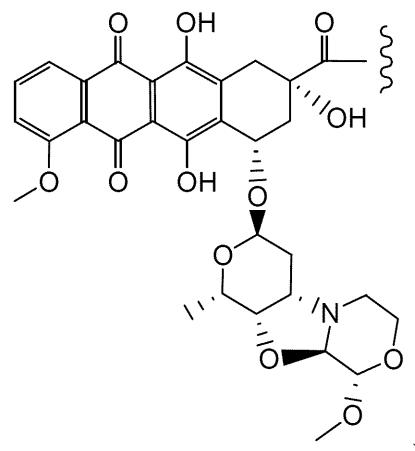
いくつかの実施形態において、 $R_1$  および  $R_2$  は両方とも、メトキシ (-OME) である。

## 【0210】

いくつかの実施形態において、ネモルビシン含有ADCのネモルビシン構成要素は、PNU-159682である。いくつかのかかる実施形態において、ADCの薬物部分は、次の構造のうちの1つを有し得る：



、または



、

(式中、波線は、リンカー ( $L$ ) への結合を示す)。

## 【0211】

PNU-159682を含む、アントラサイクリンは、数個の結合部位、および本明細書に記載されるリンカーを含む多様なリンカー（米国公開特許第2011/0076287号、国際公開第2009/099741号、米国公開特許第2010/0034837号、国際公開第2010/009124号）を通じて、抗体に複合されてもよい。

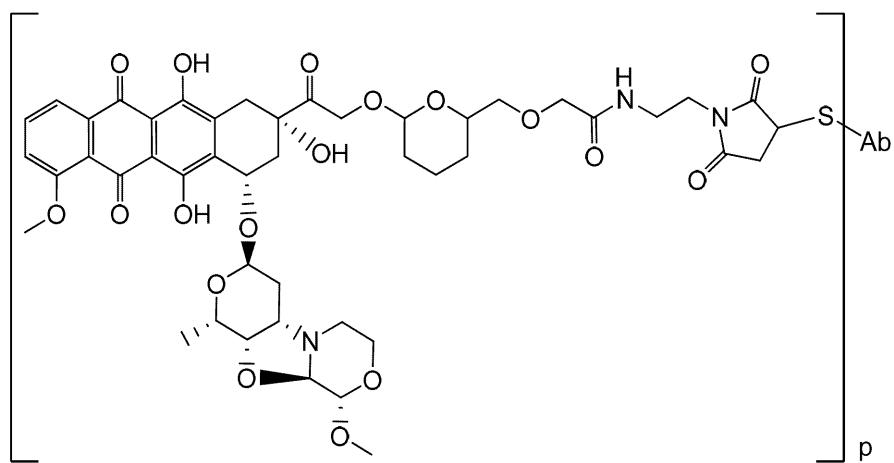
## 【0212】

ネモルビシンおよびリンカーを含む例となるADCには、次のものが含まれるが、これらに限定されない：

20

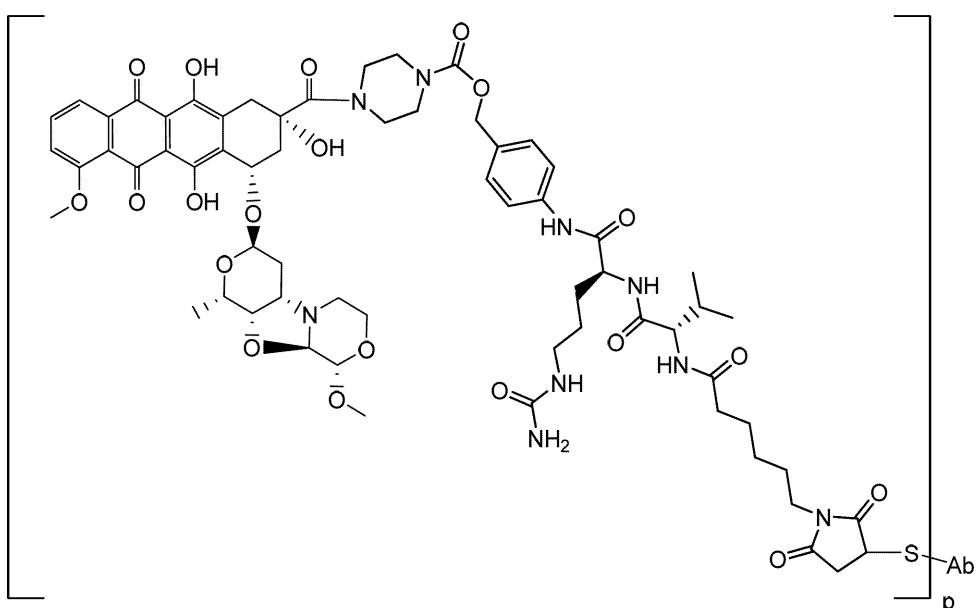
30

40



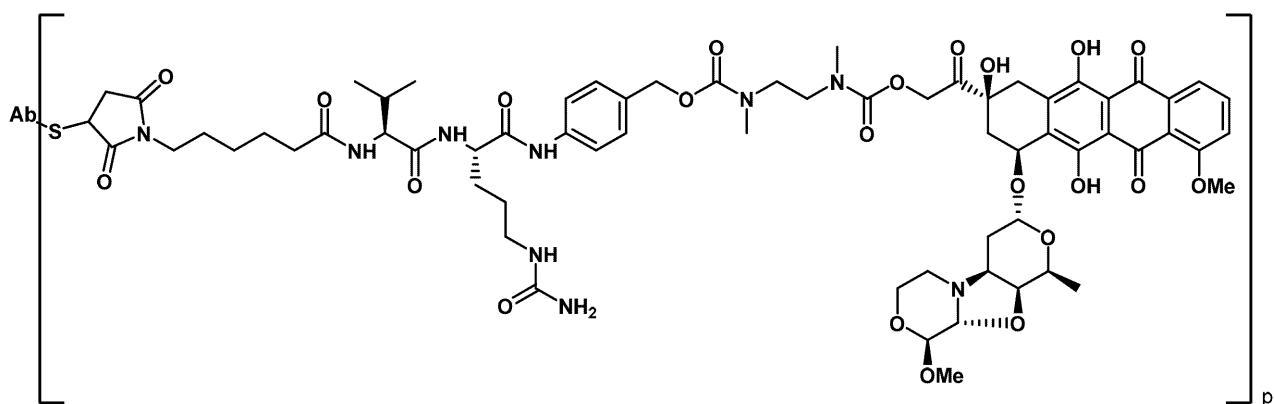
10

PNU-159682マレイミドアセタール-A b、



20

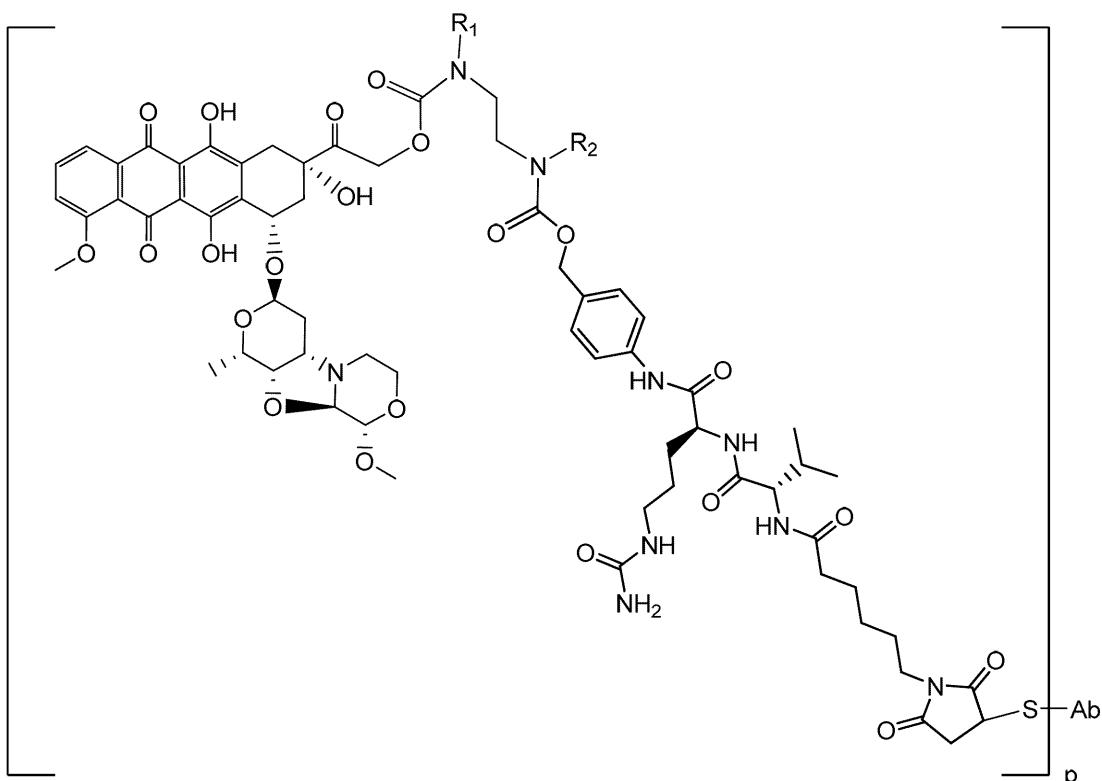
PNU-159682-val-cit-PAB-A b、



30

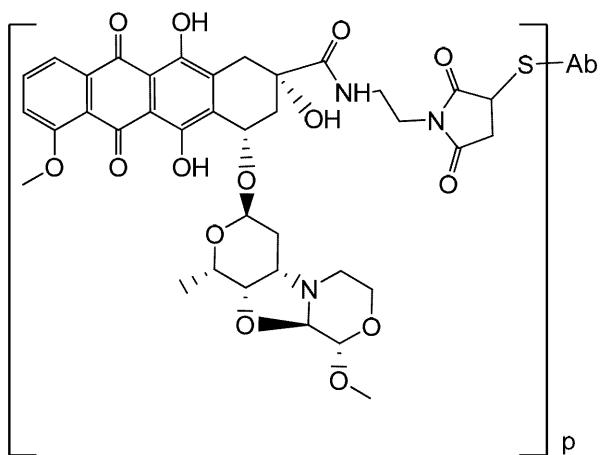
40

PNU-159682-val-cit-PAB-Spe-A b、



PNU-159682-val-cit-PAB-ス

ペーサ ( $R^1 R^2$ ) -Ab (式中、 $R_1$ および $R_2$ は独立して、HおよびC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルから選択される)、および



PNU-159682-マレイミド-Ab。

40

## 【0213】

PNU-159682マレイミドアセタール-Abのリンカーは、酸不安定性である一方で、PNU-159682-val-cit-PAB-Ab、PNU-159682-val-cit-PAB-スペーサ-Ab、およびPNU-159682-val-cit-PAB-スペーサ( $R^1 R^2$ )-Abのリンカーは、プロテアーゼ切断可能である。

## 【0214】

## c) 薬物負荷

薬物負荷は、式Iの分子における1抗体当たりの薬物部分の平均数である、pによって表される。薬物負荷は、1抗体当たり1～20個の薬物部分(D)の範囲であり得る。式

50

I の A D C は、1 ~ 2 0 個の範囲の薬物部分と共に複合された抗体の集団を含む。複合反応からの A D C の調製における、1 抗体当たりの薬物部分の平均数は、質量分析法、E L I S A アッセイ、および H P L C 等の従来の手段によって特徴付けられてもよい。p の単位での A D C の定量分布がまた決定されてもよい。いくつかの事例において、p がある特定の値である同種の A D C の、他の薬物負荷を有する A D C からの分離、精製、および特性評価は、逆相 H P L C または電気泳動等の手段によって達成されてもよい。

#### 【 0 2 1 5 】

いくつかの抗体 - 薬物複合体について、p は、抗体上の結合部位の数によって限定され得る。例えば、上のある特定の例となる実施形態にあるように、結合がシステインチオールである場合、抗体は、1 個のみもしくは数個のシステインチオール基を有し得るか、または、1 個のみもしくは数個の十分に反応性のチオール基を有し得、それを通じてリンカーが結合され得る。ある特定の実施形態において、より高い薬物負荷、例えば、5 超の p は、ある特定の抗体 - 薬物複合体において凝集、不溶性、毒性、または細胞透過性の喪失を引き起こし得る。ある特定の実施形態において、A D C についての平均薬物負荷は、1 ~ 約 8 、すなわち約 2 ~ 約 6 、または約 3 ~ 約 5 の範囲である。実際、ある特定の A D C について、1 抗体当たりの薬物部分の最適な比率は、8 未満であり得、また約 2 ~ 約 5 であり得ることが示されてきた（米国公開特許第 7 4 9 8 2 9 8 号）。

10

#### 【 0 2 1 6 】

ある特定の実施形態において、理論上の最大数よりも少ない薬物部分が、複合反応中に抗体に複合される。抗体は、下に考察されるように、例えば、薬物 - リンカー中間体またはリンカー試薬と反応しないリジン残基を含有し得る。一般に、抗体は、薬物部分に連結し得る多くの遊離および反応性システインチオール基を含有せず、実際、抗体における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。ある特定の実施形態において、抗体は、ジチオスレイトール (D T T) またはトリカルボニルエチルホスフィン (T C E P) 等の還元剤により、部分または完全還元条件下で還元されて、反応性システインチオール基を生成し得る。ある特定の実施形態において、本抗体は、リジンまたはシステイン等の反応性求核基を現わすために、変性条件に供される。

20

#### 【 0 2 1 7 】

A D C の負荷（薬物 / 抗体比）は、異なる方式で、ならびに例えば、( i ) 抗体と比べてモル過剰の薬物 - リンカー中間体またはリンカー試薬を限定すること、( i i ) 複合反応時間または温度を限定すること、および( i i i ) システインチオール修飾のための部分または限定的還元条件によって、制御されてもよい。

30

#### 【 0 2 1 8 】

1 個を超える求核基が薬物 - リンカー中間体またはリンカー試薬と反応する場合、結果として生じる生成物は、1 個以上の薬物部分の分布が抗体に結合した、A D C 化合物の混合物であることを理解されたい。1 抗体当たりの平均数薬物は、抗体に特異的および薬物に特異的である、二重 E L I S A 抗体アッセイによって混合物から算出されてもよい。個々の A D C 分子は、質量分析法によって混合物中で特定され、H P L C 、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって、分離されてもよい（例えば、McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19 (7) : 299 - 307 、 Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10 : 7063 - 7070 、 Hamblett, K. J., et al . "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. , et al . "Controlling the location of drug attachment in

40

50

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を参照されたい)。ある特定の実施形態において、単一の負荷値を有する同種のADCが、電気泳動またはクロマトグラフィーによって複合混合物から単離されてもよい。

### 【0219】

#### d) 免疫複合体を調製するある特定の方法

式IのADCは、(1)抗体の求核基を二価リンカー試薬と反応させて、共有結合を介してAb-Lを形成し、続いて薬物部分Dと反応させることと、(2)薬物部分の求核基を二価リンカー試薬と反応させて、共有結合を介してD-Lを形成し、続いて抗体の求核基と反応させることとを含む、いくつかの経路によって、当業者に既知の有機化学反応、条件、および試薬を用いて調製されてもよい。後者の経路を介して式IのADCを調製するための例となる方法は、米国公開特許第7498298号に記載され、それは参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

### 【0220】

抗体上の求核基には、(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、および(iv)抗体がグリコシル化される糖ヒドロキシルまたはアミノ基が含まれるが、これらに限定されない。アミン、チオール、およびヒドロキシル基は、求核性であり、(i) NHSエステル、HOBrエステル、ハロホルメート(haloformates)、および酸ハロゲン化物等の、活性エステル、(ii)ハロアセトアミド等のアルキルおよびベンジルハロゲン化物、ならびに(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含む、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と反応して、共有結合を形成することが可能である。ある特定の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、抗体が完全または部分還元されるように、DTT(ジチオスレイトール)またはトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)等の還元剤での処理によって、リンカー試薬との複合に対して反応性にされ得る。各システイン架橋はこのようにして、理論上、2つの反応性のチオール求核剤を形成するであろう。追加の求核基は、リジン残基の修飾を通じて、例えば、リジン残基を2-イミノチオラン(トラウト試薬(Traut's reagent))と反応させて、アミンのチオールへの変換をもたらすことによって、抗体中に導入することができる。反応性のチオール基もまた、1個、2個、3個、4個、またはそれよりも多いシステイン残基を導入することによって(例えば、1個以上の非天然システインアミノ酸残基を含む変異形抗体を調製することによって)、抗体中に導入され得る。

### 【0221】

本発明の抗体-薬物複合体はまた、アルデヒドまたはケトンカルボニル基等の抗体上の求電子基と、リンカー試薬または薬物上の求核基との間の反応によって產生されてもよい。リンカー試薬上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、ヒドラジンカルボン酸塩、およびアリールヒドラジドが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、本抗体は、リンカー試薬または薬物部分のアミン基と反応し得るアルデヒド基またはケトン基を形成してもよい。結果として生じるイミンシップ塩基群は、安定した結合を形成し得るか、または例えば、水素化ホウ素試薬によって還元されて、安定したアミン結合を形成し得る。一実施形態において、グリコシル化された抗体の炭水化物部分の、ガラクトースオキシダーゼまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとの反応は、抗体において、薬物上の適切な基と反応することができるカルボニル(アルデヒドおよびケトン)基を生み出し得る(Herm

10

20

30

40

50

anson、Bioconjugate Techniques)。別の実施形態において、N末端セリンまたはスレオニン残基を含有する抗体は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応して、第1のアミノ酸の代わりにアルデヒドの產生をもたらすことができる(Geoghegan & Stroh、(1992) Bioconjugate Chem. 3: 138-146、米国公開特許第5362852号)。かかるアルデヒドは、薬物部分またはリンカー求核剤と反応させることができる。

#### 【0222】

薬物部分上の例となる求核基には、(i) NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、および酸ハロゲン化物等の、活性エステル、(ii) ハロアセトアミド等のアルキルおよびベンジルハロゲン化物、ならびに(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含む、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と反応して、共有結合を形成することが可能な、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塩、およびアリールヒドラジド基が含まれるが、これらに限定されない。

10

#### 【0223】

ADCを調製するために使用され得る、非限定的な例となるクロスリンカー試薬は、本明細書における「例となるリンカー」と題される節に記載される。かかるクロスリンカー試薬を使用して、タンパク質性部分および化学部分を含む、2つの部分を連結する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、抗体および細胞傷害性薬剤を含む融合タンパク質は、例えば、組み換え技法またはペプチド合成によって作製されてもよい。組み換えDNA分子は、互いに隣接しているか、または複合体の所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって隔離されているかのいずれかの、複合体の抗体および細胞傷害性部分をコードする領域を含んでもよい。

20

#### 【0224】

なお別の実施形態において、抗体は、腫瘍の事前標的化(pree - 標的ing)において利用するために「受容体」(ストレプトアビシン等)に複合されてもよく、その腫瘍の事前標的化において抗体-受容体複合体が、患者に投与され、続いて除去剤を使用した血液循環からの非結合複合体の除去、次いで細胞傷害性薬剤(例えば、薬物または放射性ヌクレオチド)に複合されている「リガンド」(例えば、アビシン)の投与が行われる。

30

#### 【0225】

##### E. 診断および検出のための方法および組成物

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗ETBR抗体のいずれも、生体試料中のETBRの存在を検出するため有用である。本明細書で使用される「検出すること」という用語は、定量または定性検出を包含する。「生体試料」は、例えば、細胞または組織(例えば、黒色腫を有するかまたはそれを有することが疑われる対象からの組織を含む、癌性のまたは癌性の可能性がある皮膚組織を含む、生検材料)を含む。

#### 【0226】

一実施形態において、診断または検出方法において使用するための抗ETBR抗体が提供される。さらなる態様において、生体試料中のETBRの存在を検出する方法が提供される。ある特定の実施形態において、本方法は、生体試料を、本明細書に記載される抗ETBR抗体と、ETBRへの抗ETBR抗体の結合を許容する条件下で接触させること、複合体が、生体試料中で、抗ETBR抗体とETBRとの間で形成されるかどうかを検出することとを含む。かかる方法は、体外方法であっても、体内方法であってもよい。一実施形態において、例えば、ETBRが患者の選択のためのバイオマーカーである場合、抗ETBR抗体を使用して、抗ETBR抗体での治療法にふさわしい対象を選択する。さらなる実施形態において、生体試料は、例えば、細胞または組織(例えば、黒色腫を有するかまたはそれを有することが疑われる対象の組織を含む、癌性のまたは癌性の可能性がある皮膚組織を含む)である。

40

#### 【0227】

さらなる実施形態において、抗ETBR抗体は、例えば、がんを診断する、がんの予後

50

を判定する、もしくはがんを病期分類する、適切な治療過程を決定する、または治療法に対するがんの反応を監視する目的のために、体内で使用されて、例えば、体内画像法によって、対象における E T B R 陽性がんを検出する。体内検出のための当該技術分野で既知の 1 つの方法は、例えば、van Dongen et al., The Oncologist 12 : 1379 - 1389 (2007) および Verel et al., J. Nucl. Med. 44 : 1271 - 1281 (2003) に記載される、免疫 - 陽電子放出断層撮影（免疫 - PET）である。かかる実施形態において、対象において E T B R 陽性がんを検出するための方法が提供され、本方法は、標識された抗 E T B R 抗体を、E T B R 陽性がんを有するかまたはそれを有することが疑われる対象に投与することと、対象における標識された抗 E T B R 抗体を検出することとを含み、その標識された抗 E T B R 抗体の検出は、対象における E T B R 陽性がんを示す。かかる実施形態のある特定のものにおいて、標識された抗 E T B R 抗体は、<sup>68</sup>Ga、<sup>18</sup>F、<sup>64</sup>Cu、<sup>86</sup>Y、<sup>76</sup>Br、<sup>89</sup>Zr、および<sup>124</sup>I 等の陽電子放出体に複合される抗 E T B R 抗体を含む。特定の実施形態において、陽電子放出体は、<sup>89</sup>Zr である。

10

#### 【0228】

さらなる実施形態において、診断または検出方法は、基質に固定化された第 1 の抗 E T B R 抗体を、E T B R の存在について試験されるべき生体試料と接触させることと、その基質を第 2 の抗 E T B R 抗体に曝露することと、その第 2 の抗 E T B R が、生体試料中で、第 1 の抗 E T B R 抗体と E T B R との間の複合体に結合されるかどうかを検出することとを含む。基質は、任意の支持培地、例えば、ガラス、金属、セラミック、ポリマービーズ、スライド、チップ、および他の基質であってもよい。ある特定の実施形態において、生体試料は、細胞または組織（例えば、黒色腫を有するかまたはそれを有することが疑われる対象からの組織を含む、癌性のまたは癌性の可能性がある皮膚組織を含む、生検材料）を含む。ある特定の実施形態において、第 1 または第 2 の抗 E T B R 抗体は、本明細書に記載される抗体のいずれかである。

20

#### 【0229】

上の実施形態のいずれかにより診断または検出され得る、例となる障害には、E T B R 陽性黒色腫等の、E T B R 陽性がんが含まれる。いくつかの実施形態において、E T B R 陽性がんは、「0」（腫瘍細胞の 90 % 超における非常に弱いまたはゼロの染色に対応する）を超える、抗 E T B R 免疫組織化学（IHC）スコアを受けるがんである。いくつかの実施形態において、E T B R 陽性がんは、1+、2+、または 3+ レベルで E T B R を発現し、ここで 1+ は、新生物細胞の 50 % 超における弱い染色に対応し、2+ は、新生物細胞の 50 % 超における中程度の染色に対応し、3+ は、新生物細胞の 50 % 超における強い染色に対応する。いくつかの実施形態において、E T B R 陽性がんは、インサイツハイブリダイゼーション（ISH）アッセイに従って、E T B R を発現するがんである。いくつかのかかる実施形態において、IHC について使用されるものと同様のスコアリング体系が使用される。いくつかの実施形態において、E T B R 陽性がんは、E T B R mRNA を検出する逆転写酵素 PCR (RT-PCR) アッセイに従って、E T B R を発現するがんである。いくつかの実施形態において、RT-PCR は、定量 RT-PCR である。

30

#### 【0230】

ある特定の実施形態において、標識された抗 E T B R 抗体が提供される。標識には、直接検出される標識または部分（蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、および放射性標識等）、ならびに例えば、酵素反応または分子相互作用を通じて、間接的に検出される酵素またはリガンド等の部分が含まれるが、これらに限定されない。例となる標識には、放射性同位体<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、および<sup>131</sup>I、希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体等のフルオロフォア、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルセリフェラーゼ（luciferase）、例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第 4,737,456 号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフラジンジオン、西洋ワサビペルオキ

40

50

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、リゾチーム、糖質オキシダーゼ、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、およびグルコース - 6 - リン酸塩デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化させる酵素、例えば H R P 、ラクトペルオキシダーゼ、またはマイクロペルオキシダーゼとカップリングされた、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ等の複素環式オキシダーゼ、ビオチン / アビジン、スピノ標識、バクテリオファージ標識、安定した遊離ラジカル等が含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態において、標識は、陽電子放出体である。陽電子放出体には、<sup>6</sup><sup>8</sup> Ga 、<sup>1</sup><sup>8</sup> F 、<sup>6</sup><sup>4</sup> Cu 、<sup>8</sup><sup>6</sup> Y 、<sup>7</sup><sup>6</sup> Br 、<sup>8</sup><sup>9</sup> Zr 、および<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>4</sup> I が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、陽電子放出体は、<sup>8</sup><sup>9</sup> Zr である。

10

## 【0231】

## F . 医薬製剤

本明細書に記載される E T B R 抗体または免疫複合体の医薬製剤抗は、所望の程度の純度を有するかかる抗体または免疫複合体を、1つ以上の任意の薬学的に許容される担体 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition , Osol , A . Ed . (1980)) と混合することによって、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、調製される。薬学的に許容される担体は、一般に、用いられる投薬量および濃度で、受容者に対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム等；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール；メチルもしく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；シクロヘキサノール；3 - ペンタノール；および m - クレゾール等）；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、もしくは免役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、もしくはリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTA 等のキレート薬剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール等の糖類；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属複合体（例えば、Zn - タンパク質複合体）；ならびに / また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が含まれるが、これらに限定されない。本明細書における例となる薬学的に許容される担体には、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (S H A S E G P ) 、例えば、r H u P H 2 0 (HYLINE X (登録商標) 、Baxter International , Inc . ) 等のヒト可溶性 PH - 2 0 ヒアルロニダーゼ糖タンパク質等の、介在性 (in st er s t i t i a l ) 薬物分散剤がさらに含まれる。r H u P H 2 0 を含む、ある特定の例となる S H A S E G P および使用方法は、米国特許公開第 2 0 0 5 / 0 2 6 0 1 8 6 号および同第 2 0 0 6 / 0 1 0 4 9 6 8 号に記載される。一態様において、S H A S E G P は、コンドロイチナーゼ等の1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーと組み合わされる。

20

## 【0232】

例となる凍結乾燥抗体または免疫複合体製剤は、米国特許第 6 , 2 6 7 , 9 5 8 号に記載される。水性抗体または免疫複合体製剤には、米国特許第 6 , 1 7 1 , 5 8 6 号および国際公開第 2 0 0 6 / 0 4 4 9 0 8 号に記載されるものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン - 酢酸緩衝液を含む。

30

## 【0233】

本明細書における製剤はまた、治療されている特定の適応症に対する必要に応じて、1つを超える活性成分、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない相補的活性を有する成分を含有してもよい。

40

## 【0234】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合によって調製される、マイクロカプセル、例えば、それぞれ、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソ

50

ーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子およびナノカプセル)中またはマクロエマルション中の、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン・マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート(methylmethacrylate))マイクロカプセル中に、封入されてもよい。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示される。

#### 【0235】

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例としては、抗体または免疫複合体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、そのマトリクスは、造形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。

10

#### 【0236】

体内投与のために使用されるべき製剤は、一般に滅菌されている。滅菌状態は、例えば、滅菌濾過膜を通じた濾過によって、容易に遂行され得る。

#### 【0237】

#### G. 治療方法および組成物

本明細書に提供される抗ETBR抗体または免疫複合体のいずれも、方法、例えば、治療方法において使用され得る。

#### 【0238】

一態様において、本明細書に提供される抗ETBR抗体または免疫複合体は、ETBR陽性細胞の増殖を阻害する方法において使用され、本方法は、細胞を、抗ETBR抗体または免疫複合体に、細胞の表面上のETBRへの抗ETBR抗体または免疫複合体の結合を許容する条件下で曝露し、それによって細胞の増殖を阻害することを含む。ある特定の実施形態において、本方法は、体外方法または体内方法である。いくつかの実施形態において、細胞は、黒色腫細胞である。

20

#### 【0239】

体外での細胞増殖の阻害は、Promega (Madison, WI) から市販されている、CellTiter-Glo (商標) Luminescent Cell Viability アッセイを使用してアッセイされてもよい。そのアッセイは、代謝的に活性な細胞を示す、存在するATPの定量に基づいて、培養物中の生存細胞の数を決定する。

Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88、米国特許第6602677号を参照されたい。アッセイは、自動化高処理スクリーニング(HTS)を受けやすくする、96ウェルまたは384ウェル形式で行われてもよい。Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6: 398-404を参照されたい。アッセイ手順は、単一の試薬(CellTiter-Glo (登録商標) 試薬)を培養細胞に直接添加することを伴う。これは、細胞溶解およびルシフェラーゼ反応によって生み出される発光シグナルの生成をもたらす。発光シグナルは、培養物中に存在する生存細胞の数に直接比例する、存在するATPの量に比例する。データは、ルミノメーターまたはCCDカメラ画像化デバイスによって記録することができる。発光出力は、相対発光量(RLU)として表される。

30

#### 【0240】

別の態様において、薬として使用するための抗ETBR抗体または免疫複合体が提供される。さらなる態様において、治療方法において使用するための抗ETBR抗体または免疫複合体が提供される。ある特定の実施形態において、ETBR陽性がんを治療することにおいて使用するための抗ETBR抗体または免疫複合体が提供される。ある特定の実施形態において、本発明は、ETBR陽性がんを有する個体を治療する方法において使用するための抗ETBR抗体または免疫複合体を提供し、本方法は、個体に、有効量の抗ETBR抗体または免疫複合体を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、例えば、下に記載される、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。

40

#### 【0241】

50

さらなる態様において、本発明は、薬の製造または調製における、抗ETBR抗体または免疫複合体の使用を提供する。一実施形態において、薬は、ETBR陽性がんの治療のためのものである。さらなる実施形態において、薬は、ETBR陽性がんを治療する方法において使用するためのものであり、本方法は、ETBR陽性がんを有する個体に、有効量の薬を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、例えば、下に記載される、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。

#### 【0242】

さらなる態様において、本発明は、ETBR陽性がんを治療するための方法を提供する。一実施形態において、本方法は、かかるETBR陽性がんを有する個体に、有効量の抗ETBR抗体または免疫複合体を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、下に記載されるような、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。10

#### 【0243】

上の実施形態のいずれかによるETBR陽性がんは、例えば、黒色腫であり得る。いくつかの実施形態において、ETBR陽性がんは、「0」(腫瘍細胞の90%超における非常に弱いまたはゼロの染色に対応する)を超える、抗ETBR免疫組織化学(IHC)またはインサイトハイブリダイゼーションISHスコアを受けるがんである。別の実施形態において、ETBR陽性がんは、1+、2+、または3+レベルでETBRを発現し、ここで1+は、新生細胞の50%超における弱い染色に対応し、2+は、新生細胞の50%超における中程度の染色に対応し、3+は、新生細胞の50%超における強い染色に対応する。いくつかの実施形態において、ETBR陽性がんは、ETBR mRNAを検出する逆転写酵素PCR(RT-PCR)アッセイに従って、ETBRを発現するがんである。いくつかの実施形態において、RT-PCRは、定量RT-PCRである。20

#### 【0244】

いくつかの実施形態において、ETBR陽性がんを有する個体を治療する方法が提供され、このETBR陽性がんは、第1の治療薬に対して耐性である。いくつかの実施形態において、本方法は、個体に、ETBRに結合する抗体を含む有効量の免疫複合体を投与することを含む。いくつかの実施形態において、ETBR陽性がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態において、第1の治療薬は、ETBR以外の抗原に結合する第1の抗体を含む。いくつかの実施形態において、第1の治療薬は、ETBR以外の抗原に結合する第1の抗体と、第1の細胞傷害性薬剤とを含む、第1の免疫複合体である。いくつかの実施形態において、第1の抗体は、メラニン細胞タンパク質PMEL17、チロシナーゼ関連タンパク質1(TYRP1)、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)、および糖タンパク質NMB(GPNMB)から選択される抗原に結合する。いくつかの実施形態において、第1の抗体は、PMEL17に結合する。いくつかの実施形態において、第1の細胞傷害性薬剤およびETBRに結合する抗体を含む免疫複合体の細胞傷害性薬剤は、異なる。いくつかのかかる実施形態において、第1の細胞傷害性薬剤は、MMAE、カリケアマイシン、およびピロロベンゾジアゼピンから選択される。いくつかのかかる実施形態において、第1の細胞傷害性薬剤は、MMAEであり、ETBRに結合する抗体を含む免疫複合体の細胞傷害性薬剤は、ネモルビシン誘導体である。30

#### 【0245】

いくつかの実施形態において、第1の抗体は、ETBRに結合する。いくつかのかかる実施形態において、第1の細胞傷害性薬剤は、MMAE、カリケアマイシン、およびピロロベンゾジアゼピンから選択され、本明細書に記載される免疫複合体の細胞傷害性薬剤は、ネモルビシン誘導体である。いくつかの実施形態において、第1の細胞傷害性薬剤は、MMAEであり、本明細書に記載される免疫複合体の細胞傷害性薬剤は、ネモルビシン誘導体である。40

#### 【0246】

いくつかの実施形態において、がんを有する個体を治療する方法が提供され、このがん

10

20

30

40

50

は、第1の治療薬に対して耐性である。いくつかの実施形態において、第1の治療薬は、第1のリンカーを通じて第1の細胞傷害性薬剤に連結された第1の抗体を含む、第1の免疫複合体である。いくつかの実施形態において、第1の治療薬（第1の免疫複合体等）に対して耐性であるがんを有する個体を治療する方法は、第2のリンカーを通じて第2の細胞傷害性薬剤に連結された第2の抗体を含む、第2の免疫複合体を投与することを含む。いくつかの実施形態において、第1の抗体および第2の抗体は、異なる抗原に結合し、第1の細胞傷害性薬剤および第2の細胞傷害性薬剤は、同じであるか、または異なる。いくつかの実施形態において、第1の抗体および第2の抗体は、同じ細胞のうちの少なくともいくつかの上に存在する、異なる抗原に結合する。いくつかの実施形態において、第1の抗体および第2の抗体は、異なる抗原に結合し、第1の細胞傷害性薬剤および第2の細胞傷害性薬剤は、異なる。いくつかの実施形態において、第1の抗体および第2の抗体は、同じ抗原に結合し、第1の細胞傷害性薬剤および第2の細胞傷害性薬剤は、異なる。前述の実施形態のうちのいずれかにおいて、第1のリンカーおよび第2のリンカーは、同じであっても、異なってもよい。いくつかの実施形態において、第1の抗体および第2の抗体は、異なる抗原に結合し、第1および第2のリンカーは、異なり、第1および第2の細胞傷害性薬剤は、異なる。

10

#### 【0247】

上の実施形態のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

#### 【0248】

さらなる態様において、本発明は、例えば、上の治療方法のいずれかにおいて使用するための、本明細書に提供される抗ETBR抗体または免疫複合体のいずれかを含む、医薬製剤を提供する。一実施形態において、医薬製剤は、本明細書に提供される抗ETBR抗体または免疫複合体のいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む。別の実施形態において、医薬製剤は、本明細書に提供される抗ETBR抗体または免疫複合体のいずれかと、例えば、下に記載される、少なくとも1つの追加の治療剤とを含む。

20

#### 【0249】

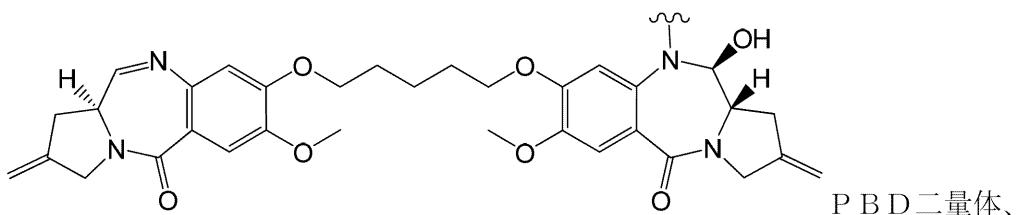
本発明の抗体または免疫複合体は、治療法において、単独で、または他の薬剤と組み合わせてのいずれかで使用することができる。例えば、本発明の抗体または免疫複合体は、少なくとも1つの追加の治療剤と同時投与されてもよい。

30

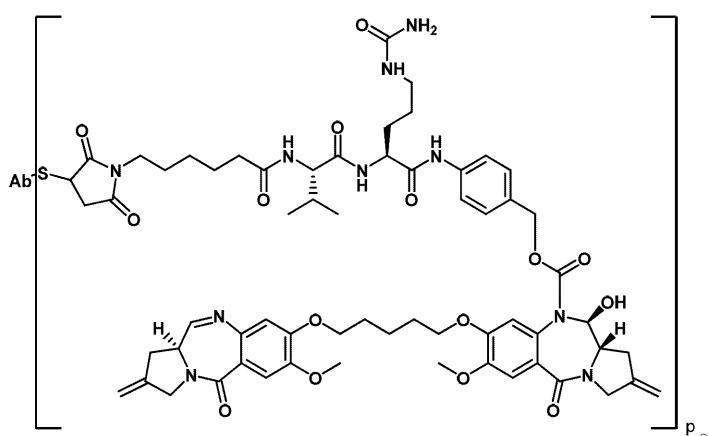
#### 【0250】

いくつかの実施形態において、がんを治療する方法は、本明細書に記載される免疫複合体を、メラニン細胞タンパク質PME17、チロシナーゼ関連タンパク質1(TYRP1)、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)、および糖タンパク質NMB(GPNMB)から選択される抗原抗原に結合する抗体を含む第2の免疫複合体と組み合わせて、投与することを含む。いくつかのかかる実施形態において、第2の免疫複合体の細胞傷害性薬剤は、MMAE、カリケアミシン、ネモルビシン誘導体、およびピロロベンゾジアゼピンから選択される。いくつかのかかる実施形態において、第2の免疫複合体の細胞傷害性薬剤は、MMAE、カリケアマイシン、およびピロロベンゾジアゼピンから選択される。いくつかの実施形態において、第2の免疫複合体の細胞傷害性薬剤は、MMAEである。例となるMMAE構造が図7Aに示される。MMAE含有免疫複合体のリンカー部分は、図7Aに示されるMC-val-cit-PABリンカーであってもよく、または本明細書に記載されるリンカーのうちのいずれか等の異なるリンカーであってもよい。いくつかの実施形態において、第2の免疫複合体の細胞傷害性薬剤は、ピロロベンゾジアゼピンである。非限定的な例となるピロロベンゾジアゼピンには、次の構造、

40



を有するPBD二量体が含まれ、式中、波線は、リンカー(L)への結合を示す。例えば、国際公開第2009/016516号、米国公開特許第2009/304710号、米国公開特許第2010/047257号、米国公開特許第2009/036431号、米国公開特許第2011/0256157号、および国際公開第2011/130598号を参照されたい。PBD含有免疫複合体のリンカー部分は、いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるリンカーであってもよい。いくつかの実施形態において、リンカーは、例えば、次の構造におけるような、MC-val-cit-PABを含む：



#### 【0251】

いくつかの実施形態において、がんを治療する方法は、本明細書に記載される免疫複合体を、PMEL17に結合する抗体を含む第2の免疫複合体と組み合わせて、投与することを含む。いくつかのかかる実施形態において、がんは、ETBR陽性がん、およびまたPMEL17陽性がんでもある。がんがまたPMEL17陽性でもあるかどうかの決定は、がんがETBR陽性であるかどうかを決定することについて本明細書に記載される方法、および米国公開第U.S. 2011/0206702号に記載される方法を含むが、これらに限定されない任意の方法によって行われてもよい。いくつかの実施形態において、PMEL17に結合する抗体は、配列番号21の配列を含むHVR\_H1、配列番号22の配列を含むHVR\_H2、配列番号23の配列を含むHVR\_H3、配列番号24の配列を含むHVR\_L1、配列番号25の配列を含むHVR\_L2、および配列番号26の配列を含むHVR\_L3を含む。

#### 【0252】

「併用」投与は、組み合わせた投与(2つ以上の治療剤が同じまたは別個の製剤中に含まれる)、および別個の投与を包含し、別個の投与の場合、本発明の抗体または免疫複合体の投与は、追加の治療剤(抗PMEL17免疫複合体等)および/またはアジュバントの投与の前、それと同時、および/またはその後に生じ得る。いくつかの実施形態において、抗ETBR免疫複合体の投与および抗PMEL17免疫複合体の投与は、互いの約1ヶ月以内、または約1、2、もしくは3週間以内、または約1、2、3、4、5、もしくは6日以内に生じる。本発明の抗体または免疫複合体はまた、放射線療法と組み合わせて使用することもできる。

#### 【0253】

本発明の抗体または免疫複合体(および任意の追加の治療剤)は、非経口、肺内、およ

10

20

30

40

50

び鼻腔内、ならびに局所両方のために所望される場合、病変内投与を含む、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、腹腔内、または皮下投与が含まれる。投薬は、任意の好適な経路による、例えば、投与が短時間であるか慢性的であるかに部分的に応じて、静脈内または皮下注射等の、注射によるものであり得る。単回または種々の時点にわたる複数回投与、ボーラス投与、およびパルス注入を含むが、これらに限定されない、種々の投薬スケジュールが本明細書で企図される。

#### 【0254】

本発明の抗体または免疫複合体は、良好な医療行為と一致した様式で、製剤化され、投薬され、投与されるであろう。この文脈における考慮の要因には、治療されている特定の障害、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的病態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール管理、および医療従事者に既知の他の要因が含まれる。抗体または免疫複合体は、必要ではないが、任意に、問題の障害を予防または治療するために現在使用される1つ以上の薬剤と共に製剤化される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体または免疫複合体の量、障害または治療の種類、および上に考察された他の要因に依存する。これらは、一般に、本明細書に記載されるのと同じ投薬量で、本明細書に記載される投与経路により、または本明細書に記載される投薬量の約1~99%、または適切であると経験的/臨床的に決定される任意の投薬量で、任意の経路によって、使用される。

10

#### 【0255】

疾患の予防または治療のために、本発明の抗体または免疫複合体の適切な投薬量（単独でまたは1つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用されるとき）は、治療対象の疾患の種類、抗体または免疫複合体の種類、疾患の重症度および経過、抗体または免疫複合体が予防目的または治療目的で投与されるかどうか、以前の治療法、患者の病歴および抗体または免疫複合体への反応、ならびに主治医の裁量に依存するであろう。抗体または免疫複合体は、患者に、1回で、または一連の治療にわたって、好適に投与される。疾患の種類および重症度に応じて、例えば、1回以上の別個の投与によってであれ、連続注入によってであれ、約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $15\text{ mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1\text{ mg}/\text{kg}$ ~ $10\text{ mg}/\text{kg}$ ）の抗体または免疫複合体が、患者への投与のための初回の候補投薬量であり得る。1つの典型的な1日投薬量は、上述の要因に応じて、約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $100\text{ mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であり得る。病態に応じて数日間またはより長い日数にわたる反復投与について、治療は、一般に、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続されるであろう。抗体または免疫複合体の1つの例となる投薬量は、約 $0.05\text{ mg}/\text{kg}$ ~約 $10\text{ mg}/\text{kg}$ の範囲内であろう。故に、約 $0.5\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{ mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{ mg}/\text{kg}$ 、または $10\text{ mg}/\text{kg}$ （またはそれらの任意の組み合わせ）の1回以上の用量が患者に投与されてもよい。かかる用量は、断続的に、例えば、毎週または3週間毎に（例えば、患者が抗体の約2~約20回、または例えば、約6回用量を受容するように）投与されてもよい。初回よりも高い負荷用量、続いて1回以上のより低い用量が投与されてもよい。しかしながら、他の投薬レジメンが有用な場合がある。この治療法の進行は、従来の技術およびアッセイによって容易に監視される。

20

30

#### 【0256】

上の製剤または治療方法のうちのいずれも、本発明の免疫複合体および抗ETBR抗体の両方を使用して行われ得ることが理解される。

40

#### 【0257】

##### H. 製品

本発明の別の態様において、上述の障害の治療、予防、および/または診断に有用な物質を含有する製品が提供される。製品は、容器、および容器上のまたは容器と関連したラベルまたは添付文書を含む。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグ等が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチック等の多様な材料から形成され得る。容器は、組成物を、それ自体で、または障害を治療する、予防する、および/もしくは診断するのに有効な別の組成物と組み合わせて保有し、また滅菌アクセスポート

50

を有し得る（例えば容器は、静脈注射用溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性な薬剤は、本発明の抗体または免疫複合体である。ラベルまたは添付文書は、組成物が選定した病態を治療するために使用されることを表示する。さらに、製品は、(a)組成物がその中に含有された第1の容器（この組成物は本発明の抗体または免疫複合体を含む）、および(b)組成物がその中に含有された第2の容器（この組成物はさらなる細胞傷害性薬剤または治療剤を含む）を含んでもよい。本発明のこの実施形態の製品は、組成物が特定の病態を治療するために使用され得ることを表示する、添付文書をさらに含んでもよい。代替的に、または追加的に、製品は、注射用静菌水（BWFⅠ）、リン酸緩衝食塩水、リングル液またはデキストロース溶液等の、薬学的に許容される緩衝液を含む、第2の（または第3の）容器をさらに含んでもよい。それは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジを含む、商業的およびユーザの立場から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

10

## 【0258】

## I I I . 実施例

以下は、本発明の方法および組成物の実施例である。上に提供される一般的説明を考慮すると、種々の他の実施形態が実施され得ることが理解される。

## 【0259】

## A . 抗 E T B R 抗体薬物複合体の產生

抗 E T B R 抗体 - 薬物複合体（ADC）を、hu5E9.v1（配列番号5および6）またはch5E9（配列番号27および28）を、本明細書に描写される薬物 - リンカー部分MC - vc - PAB - MMAEに複合することによって產生した。便宜上、薬物 - リンカー部分MC - vc - PAB - MMAEはときに、これらの実施例においておよび図において、「vcMMAE」または「VCE」と称される。

20

## 【0260】

複合前に、抗体を、TCPにより、国際公開第2004/010957 A2号に記載される手法に従った標準方法を使用して、部分的に還元した。部分的に還元された抗体を、例えば、Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21: 778 - 784および米国公開特許第2005/0238649 A1号に記載される手法に従った標準方法を使用して、薬物 - リンカー部分に複合した。簡潔に述べると、部分的に還元された抗体を薬物 - リンカー部分と組み合わせて、抗体の還元されたシステイン残基への薬物 - リンカー部分の複合を可能にした。複合反応を、いずれの遊離リンカー - 薬物部分とも反応する過剰のN - アセチル - システインを添加することによって反応停止処理し、ADCを精製した。抗 E T B R - vc - MMAE（抗 E T B R - MC - val - cit - PAB - MMAEとも称される）の構造が図7Aに示される。また、米国公開第US 2011/0206702号も参照されたい。

30

## 【0261】

プロテアーゼ切断可能なval - citリンカーおよび薬物PNU - 159682を含む、抗 E T B R 抗体 - 薬物複合体（ADC）を、実質的に上述されるように、ch5E9を薬物 - リンカー部分MC - vc - PAB - PNU - 159682に複合することによって產生した。抗 E T B R - MC - val - cit - PAB - PNU - 159682の構造が図7Cに示される。

40

## 【0262】

酸不安定性アセタールリンカーおよび薬物PNU - 159682を含む、抗 E T B R 抗体 - 薬物複合体（ADC）を、実質的に上述されるように、ch5E9を薬物 - リンカー部分MC - acetal - PNU - 159682に複合することによって產生した。抗 E T B R - MC - acetal - PNU - 159682の構造が図7Bに示される。

## 【0263】

切断不可能なリンカーおよび薬物PNU - 159682を含む、抗 E T B R 抗体 - 薬物複合体（ADC）を、実質的に上述されるように、ch5E9を薬物 - リンカー部分MC - PNU - 159682に複合することによって產生した。抗 E T B R - PNU - 159

50

682の構造が図7Dに示される。

【0264】

B. 抗ETBR-vc-MMAEに対して耐性のUACC-257X2.2黒色腫細胞における、ネモルビシン誘導体を含む抗ETBR免疫複合体の有効性

抗ETBR-vc-MMAEに対して耐性を発達した黒色腫における、ネモルビシン誘導体を含む抗ETBR免疫複合体の有効性を決定するために、抗ETBR-vc-MMAE（抗EDNRB-vc-MMAE、抗ETBR-MC-vc1-cit-PAB-MM

10

A等とも称される；例えば、米国公開第US 2011/0206702号を参照されたい）に対して耐性であるUACC-257X2.2黒色腫細胞を体内および体外で発達させた。

【0265】

体内で発達する耐性について、NCrヌードマウス（Taconic, Hudson, NY）に、マトリゲルを含むHBSS中、500万個のUACC-257X2.2細胞を背側右脇腹から皮下接種した。UACC-257X2.2細胞は、UACC-257細胞（国立癌研究所）に由来し、それを体内成長のために次のように最適化する。UACC-257細胞をメスNCrヌードマウスの右脇腹から皮下注射して、腫瘍成長を誘導した。1つの腫瘍を採取し、体外で成長させた（UACC-257X1.2細胞株と称される）。UACC-257X1.2株をメスNCrヌードマウスの右脇腹から再び皮下注射して、体内の細胞株の成長を改善させた。第2回目の注射からの腫瘍を収集し、体外成長のために再び適応させてUACC-257X2.2を生成した。UACC-257X2.2細胞株およびこの株に由来する腫瘍は、親細胞株UACC-257と同等のレベルでETBRを発現する。

20

【0266】

UACC-257X2.2細胞を接種した10匹のマウスに、3mg/kgのhu5E9.v1-MC-vc-PAB-MMAEを、0日目に静脈内投薬した。マウスにいつ再投薬するか、およびどの用量で投薬するかを決定するために、次の事項を考慮した：腫瘍が最初の処置後に再成長（すなわち、成長して0日目の最初の腫瘍体積まで戻った腫瘍）するか否か、および再成長の速度。投与された用量の頻度は、経時的に様々であったが、2回用量/週を超えることはなかった。静脈内投薬は、300μLを超えることはなかった。投与された用量の範囲は、3mg/kg、6mg/kg、8mg/kg、および10mg/kgであった。腫瘍が、一連の漸増用量に対してもはや反応しなくなる（すなわち、それが耐性を示す）と、投薬を中止した。

30

【0267】

図8Aに示されるように、UACC-257X2.2腫瘍番号359は、約120日後に抗ETBR-vc-MMAEに対して耐性を発達したが、一方で腫瘍番号368は、より緩徐に耐性を発達した。腫瘍番号359を採取し、細胞を体外成長のために分離した（本明細書で体内由来の耐性UACC-257X2.2細胞と称される）。

【0268】

体外で発達する耐性について、UACC-257X2.2細胞を、培養皿中、漸増濃度の抗ETBR-vc-MMAEに2か月間の経過にわたって適応させた。図8Bは、最大で少なくとも10μg/mLの濃度の抗ETBR-vc-MMAEによって比較的影響を受けなかった、体外由来の耐性UACC-257X2.2細胞株（本明細書で体外由来の耐性UACC-257X2.2細胞と称される）を示す。図8Bはまた、対照ADCである-gD-vc-MMAEと共にインキュベートした体外由来の耐性UACC-257X2.2細胞、および-gETBR-vc-MMAEと共にインキュベートした親UACC-257X2.2細胞も示す。

40

【0269】

体内由来および体外由来のUACC-257細胞および親UACC-257細胞の表面上でのETBRの発現を次いで、FACSによって決定した。細胞を抗ETBR抗体（hu5E9.v1またはch5E9）で染色し、続いて抗ヒトA1exa 488抗体複合

50

体で染色した。図9AおよびBに示されるように、体内由来および体外由来の両方の耐性UACC-257X2.2細胞は、親細胞株と比べて細胞の表面上でETBRの減少した発現を有した。各図における対照ピークは、二次抗体のみでの染色を示す。

#### 【0270】

体内由来および体外由来の耐性UACC-257X2.2細胞を次いで、漸増濃度の抗ETBR-vc-MMAEに対する感受性についてアッセイした。

#### 【0271】

免疫複合体の存在下での細胞株の体外細胞増殖を評価した。細胞を、96ウェルの透明底プレート中、50μLの通常の成長培地中に1ウェル当たり1,500細胞でプレートした。24時間後、免疫複合体(ch5E9-vc-MMAEまたは対照抗gD-vc-MMAE)の段階希釈液を含む追加の50μLの培養培地を3連のウェルに添加した。5日後、細胞生存率を、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Reagent(G7572, Promega Corporation, Madison, WI)を使用し、EnVision 2101 Multilabel Reader(Perkin-Elmer, Waltham, MA)を使用して決定した。  
10

#### 【0272】

表2は、細胞株の各々に関して、抗ETBR-vc-MMAEおよびリンカー-薬物(抗体を含まない)について観察されたEC50を示す。

#### 【表2】

20

感受性および耐性UACC-257X2.2細胞における抗ETBR-vc-MMAEのEC50

細胞	EC50(抗ETBR-vc-MMAE)	EC50(遊離MC-vc-PAB-MMAE)
親 UACC-257X2.2	45ng/mL	0.28nM
体内由来耐性 UACC-257X2.2	235ng/mL	0.77nM
体外由来耐性 UACC-257X2.2	n.d.*	3.5nM

30

\*抗ETBR-vc-MMAEによる細胞死滅は、対照ADCである抗gD-vc-MM  
AEによる死滅と同等であった。

#### 【0273】

この実験の結果は、耐性の少なくともいくらかがADCの薬物部分に対して発達することを示唆することから、この薬物を異なる薬物と置き換えることにより、耐性細胞内でいくらかの感受性が回復し得ることが示唆される。

#### 【0274】

ADCの薬物部分を変更することによっていくらかの感受性が回復され得るかどうかを決定するために、体内および体外由来の耐性UACC-257X2.2細胞を、耐性細胞を発達させるために使用されたものとは異なるリンカーおよび異なる薬物を含むADCに対する感受性についてアッセイした。この実験において試験されたADCは、切断不可能なリンカーを通じてPNU-159682に連結された抗ETBR(ch5E9-PNU)であった。図7Dを参照されたい。表3は、細胞株の各々に関して、抗ETBR-PNUおよびリンカー-薬物(抗体を含まない)について観察されたEC50を示す。

40

## 【表3】

感受性および耐性UACC-257X2.2細胞における抗ETBR-PNUのEC50

細胞	EC50 (抗 ETBR-PNU)	EC50 (遊離 MC-PNU-159682)
親 UACC-257X2.2	4.2ng/mL	0.18nM
体内由来耐性 UACC-257X2.2	14.3ng/mL	0.133nM
体外由来耐性 UACC-257X2.2	14.6ng/mL	0.15nM

## 【0275】

10

この実験の結果は、少なくともいくらかの感受性が、ADCの薬物部分を置き換えることによって耐性細胞内で回復され得ることを実証する。

## 【0276】

体内由来および体外由来の耐性UACC-257X2.2細胞を、酸不安定性アセタールリンカーを通じてPNU-159682に連結された抗ETBR(ch5E9-アセタール-PNU)に対する感受性についてアッセイした。図7Bを参照されたい。表4は、細胞株の各々に関して、抗ETBR-アセタール-PNUおよびリンカー-薬物(抗体を含まない)について観察されたEC50を示す。

## 【表4】

感受性および耐性UACC-257X2.2細胞におけるETBR-アセタール-PNU

20

のEC50抗

細胞	EC50 (抗 ETBR-アセタール-PNU)	EC50 (遊離 MC-アセタール-PNU-159682)
親 UACC-257X2.2	4.4ng/mL	7.2nM
体内由来耐性 UACC-257X2.2	18.4ng/mL	2.4nM
体外由来耐性 UACC-257X2.2	15ng/mL	15.8nM

## 【0277】

30

上記のように、この実験の結果は、少なくともいくらかの感受性が、ADCの薬物部分を置き換えることによって耐性細胞内で回復され得ることを実証する。

## 【0278】

体内由来および体外由来の耐性UACC-257X2.2細胞を、MMAE免疫複合体において使用されたvcリンカーを通じてPNU-159682に連結された抗ETBR(ch5E9-vc-PNU)に対する感受性についてアッセイした。図7Cを参照されたい。表5は、細胞株の各々に関して、抗ETBR-vc-PNUおよびリンカー-薬物(抗体を含まない)について観察されたEC50を示す。

## 【表5】

感受性および耐性UACC-257X2.2細胞における抗ETBR-vc-PNUの

40

EC50

細胞	EC50 (抗 ETBR-vc-PNU)	EC50 (遊離 MC-vc-PAB-PNU-159682)
親 UACC-257X2.2	3ng/mL	2nM
体内由来耐性 UACC-257X2.2	23ng/mL	4.24nM
体外由来耐性 UACC-257X2.2	41ng/mL	6.6nM

## 【0279】

50

上記のように、この実験の結果は、少なくともいくらかの感受性が、A D C の薬物部分を置き換えることによって耐性細胞内で回復され得ることを実証する。加えて、この結果は、いくらかの耐性がまた、A D C のリンカー部分にも起因することを示唆する。体外由来の耐性細胞に関して、抗 E T B R - P N U および抗 E T B R - アセタール - P N U についての E C 5 0 を、抗 E T B R - v c - P N U についての E C 5 0 と比較されたい。

【 0 2 8 0 】

上述の発明は、明確な理解のための例示説明および例としてある程度詳細に記載されたが、これらの説明および例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書で引用される全ての特許および科学文献の開示は、参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる。

配列表

配列番号	説明	配列			
1	mu5E9 軽鎖	DVVMTQTPLT LLQRPGQSPK TRVEAEDLGV SIFPPSSEQL QNGVLNSWTD ATHKTSTSPI	LSVTIGQPAS RLIYLVSKLD YYCWQGTHFP TSGGASVVCF QDSKDSTYSM VKSFNRNEC	ISCKSSQSLL SGVPDRFTGS YTFGGTKLE LNNFYPKDN SSTLT廖KDE	DSDGKTYLNW GSGTDFTLKI IKRADAAPTV VKWKIDGSER YERHNSYTCE
2	mu5E9 重鎖	QVQLLQSGAE PGQGLEWIGT MQLSSLASED TKGPSVYPLA SGSLSSGVHT NVAHPASSTK VFIFPPKIKD NNVEVHTAQ KCKVNNKDLP KKQVTLTCMV SDGSYFMYSK SFSRTPGK	LARPGASVKL IYPGDGDTSY SAVYYCARWG PVCGDTTGSS FPAVLQSDLY VDKKIEPRGP VLMISLSPIV QTHREDYNST APIERTISKP TDFMPEDIYV LRVEKKNWVE	SCKASGYTFT AQKFKGKATL YAYDIDNWGQ VTLGCLVKGY TLSSSVTVTS TIKPCPPCKC TCVVVDVSED LRVVSALPIQ KGSRAPQVY EWTNNGKTEL RNSYSCSVVH	SYWMQWVKQR TTDKYSSTAY GTTVTVSSAS FPEPVTLTWN STWPSQSITC PAPNLLGGPS DPDVQISWFV HQDWMSGKEF VLPPPEEEMT NYKNTEPVLD EGLHNHHTK
3	mu5E9 軽鎖可変領域	DVVMTQTPLT LLQRPGQSPK TRVEAEDLGV YYCWQGTHFP YTFGGTKLE IK	LSVTIGQPAS RLIYLVSKLD YYCWQGTHFP YTFGGTKLE IK	ISCKSSQSLL SGVPDRFTGS	DSDGKTYLNW GSGTDFTLKI
4	mu5E9 重鎖可変領域	QVQLLQSGAE PGQGLEWIGT MQLSSLASED	LARPGASVKL IYPGDGDTSY SAVYYCARWG	SCKASGYTFT AQKFKGKATL	SYWMQWVKQR TTDKYSSTAY
5	hu5E9.v1 軽鎖	DIQMTQSPSS LQQKPGKAPK SSLQPEDFAT FIFPPSDEQL SGNSQESVTE VTHQGLSSPV	LSASVGDRV RLIYLVSKLD YYCWQGTHFP KSGTASVCL QDSKDSTYSL TKSFNRGEC	ITCKSSQSLL SGVPSRFSGS YTFGQGTKVE LNNFYPREAK SSTLTLSKAD	DSDGKTYLNW GSGTDFTLTI IKRTVAAPSV VQWKVDNALQ YEKHKVYACE
6	hu5E9.v1 重鎖	EVQLVESGGG PGKGLEWIGT LQMNSLRAED	LVQPGGSLRL IYPGDGDTSY TAVYYCARWG	SCAASGYTFT AQKFKGRTL YAYDIDNWGQ	SYWMQWVRQA STDKSNTAY GTLVTVSSAS

10

20

30

40

		TKGPSVFPLA SGALTSGVHT CNVNHKPSNT VFLFPPKPKD DGVEVHNAKT KCKVSNKALP KNQVSLTCLV SDGSFFLYSK SLSLSPGK	PSSKSTSGGT FPAVLQSSGL KVDKKVEPKS TLMISRTPEV KPREEQYNST APIEKTISKA KGQPREPQVY LTVDKSRWQQ	AALGCLVKDY YSLSSVVTVP CDKTHTCPPC TCVVVDVSHE YRVVSVLTVL EWESNGQOPEN GNVFSCSVMH	FPEPVTVSWN SSSLGTQTYI PAPELLGGPS DPEVKFNWYV HQDWLNGKEY TLPPSREEMT NYKTPPVLD EALHNHYTQK
7	hu5E9.v1 軽鎖 可変領域	DIQMTQSPSS LQQKPGKAPK SSLQPEDFAT YYCWQGTHFP YTGFQGTKVE IK	LSASVGDRVT RLIYLVSKLD	ITCKSSQSLL SGVPSRFSGS	DSDGKTYLNW GSGTDFTLTI
8	hu5E9.v1 重鎖 可変領域	EVQLVESGGG PGKGLEWIGT LQMNSLRRAED TAVYYCARWG YAYDIDNWG	LVQPG GSLRL IYPGDGDTSY	SCAASGYTFT AQKFGRATL	SYWMQWVRQA STDKSNTAY
9	hu5E9.v2 重鎖 可変領域	EVQLVQSGAE PGQGLEWIGT LELSSLRSED TAVYYCARWG YAYDIDNWG	VKKPGASVKV IYPGDGDTSY	SCKASGYTFT AQKFGRVTI	SYWMQWVRQA TRDTSTSTAY
10	例となるヒト エンドセリン B 受容体タン パク質	MQPPPSLCGR QTAEIMTPPT PPRTISPPPC QGPIEIKETF KYINTVVSCl VFVLGIIGNS TLLRIIYKNK CMRNGPNILI AEMCKLVPFI GIGVPKWTAV YLRICLLHPV FFYTLMTCEM VFALCWLPPLH GINMASLNSC KQSLEEKQSC LKFKANDHGY DNFRSSNKYS SS	ALVALVLACG KTLWPKG SNA ASLALGDL LH QKASVG ITVL EIVLIW VSV QKTA FMQFY K LRKKSGM QIA LSRILK LTLY INPI ALYL VS LPSL EKQSC L	LSRIWGEERG SLARSLAPAE IVIDIPINVY SLCALSIDRY VLA VPEA IGF TAKDW WLFS F LNDHLK QRRE NQNDPNRCEL KRFKNCFKSC	FPPDRATPLL VPKG DRTAGS KLLAEDWPFG RAVASWSRIK DIITMDYKGS YFCLPLAITA VAKTVFCLVL LSFLLVLDYI LCCWCQSFE
11	シグナル配列 を含まない、 例となるヒト エンドセリン B 受容体タン パク質	EERGFPPDRA APAEVPKGDR VSCLVFVLGI IGNSTLLRII YKNKCMRNGP NILIASLALG DLLHIVIDIP INVYKLLAED IDRYRAVASW AIGFDIITMD LFSFYFCLPL	TPLLQTAEIM TAGSPPRTIS PPP CQGPIE I WTAVEIVLIW VPFIQKASVG SRIKGIGVPK YKG SYL RICL AITAFFY TLM	TPPTKTLWP K PPPCQGPIE I KETFKYINTV VVS VVLA VPE ITV LSLCALS QFYKTA KDW W TCEMLRK KSG MQIALNDHL K	GSNASLARSL KETFKYINTV VVS VVLA VPE ITV LSLCALS QFYKTA KDW W TCEMLRK KSG MQIALNDHL K

10

20

30

40

		QRREVAKTVF RCELLSFLLV FKSCLCCWCQ	CLVLVFALCW LDYIGINMAS SFEEKQSLEE	LPLHLSRILK LNSCINPIAL KQSCLKFKAN	LTLYNQNDPN YLVSKRKFNC DHGYDNFRSS NKYSSS
12	5E9 HVR H1	GYTFTSYWMQ			
13	5E9 HVR H2	TIYPGDGDTSYAQKFKG			
14	5E9 HVR H3	WGYAYDIDN			
15	5E9 HVR L1	KSSQSLLSDGKTYLN			
16	5E9 HVR L2	LVSKLDS			
17	5E9 HVR L3	WQGTHFPYT			
18	hu5E9.v1 V205C システ イン操作され た軽鎖(Igκ)	DIQMTQSPSS LQQKPGKAPK SSLQPEDFAT FIFPPSDEQL SGNSQESVTE VTHQGLSSPC	LSASVGDRVT RLIYLVSKLD YYCWQGTHFP KSGTASVVCL QDSKDSTYSL TKSFNRGEC	ITCKSSQSLL SGVPSRFSGS YTFGQGTKVE LNNFYPREAK SSTLTL SKAD	DSDGKTYLNW GSGTDFTLTI IKRTVAAPSV VQWKVDNALQ YEKHKVYACE
19	hu5E9.v1 A118C システ イン操作され た重鎖(IgG1)	EVQLVESGGG PGKGLEWIGT LQMNSLRAED CSTKGPSVFP WNSGALTSGV YICNVNHKPS PSVFLFPPKP YVDGVEVHNA EYKCKVSNKA MTKNQVSLTC LSDGSFFLY QKSLSLSPGK	LVQPGGSLRL IYPGDGDTSY TAVYYCARWG LAPSSKSTSG HTFPAVLQSS NTKVDKKVEP KDTLMISRTP KTKPREEQYN LPAPIEKTI LVKGFYPSDI SKLTVDKSRW	SCAASGYTFT AQKFKGRATL YAYDIDNWG GTAALGCLVK GLYSLSSVVT KSCDKTHTCP EVTCVVVDVS STYRVSVLT KAKGQPREPQ AVEWESNGQP QQGNVFSCSV	SYWMQWVRQA STDKSNTAY QGTLTVVSS DYFPEPVTVS VPSSSLGTQT PCPAPELLGG HEDPEVKFNW VLHQDWLNGK VYTLPPSREE ENNYKTPPPV MHEALHNHYT
20	hu5E9.v1 S400C システ イン操作され た重鎖 Fc 領域 (IgG1)	EVQLVESGGG PGKGLEWIGT LQMNSLRAED ASTKGPSVFP WNSGALTSGV YICNVNHKPS PSVFLFPPKP YVDGVEVHNA EYKCKVSNKA	LVQPGGSLRL IYPGDGDTSY TAVYYCARWG LAPSSKSTSG HTFPAVLQSS NTKVDKKVEP KDTLMISRTP KTKPREEQYN LPAPIEKTI	SCAASGYTFT AQKFKGRATL YAYDIDNWG GTAALGCLVK GLYSLSSVVT KSCDKTHTCP EVTCVVVDVS STYRVSVLT KAKGQPREPQ	SYWMQWVRQA STDKSNTAY QGTLTVVSS DYFPEPVTVS VPSSSLGTQT PCPAPELLGG HEDPEVKFNW VLHQDWLNGK VYTLPPSREE

10

20

30

40

		MTKNQVSLTC LCDGSFFLY QKSLSLSPGK	LVKGFYPSDI SKLTVDKSRW	AWEWESNGQP QQGNVFSCSV	ENNYKTPPV MHEALHNHYT
21	17A9 HVR H1	GYSFTRYTMN			
22	17A9 HVR H2	VINPYNGGTVYNQKFKG			
23	17A9 HVR H3	TDYDGYAMDY			
24	17A9 HVR L2	SGSTLQS			
25	17A9 HVR L3	QQHNEYPYT			
26	17A9 HVR L2	SGSTLQS			
27	ch5E9 軽鎖	DVVMTQTPLT LLQRPGQSPK TRVEAEDLGV FIFPPSDEQL SGNSQESVTE VTHQGLSSPV	LSVTIGQPAS RLIYLVSKLD YYCWQGTHFP KSGTASVVCL QDSKDSTYSL TKSFNRGEC	ISCKSSQSLL SGVPDRFTGS YTFGGGTKLE LNNFYPREAK SSTLTLISKAD	DSDGKTYLNW GSGTDFTLKI IKRTVAAPSV VQWKVDNALQ YEKHKVYACE
28	ch5E9 重鎖	QVQLLQSGAE PGQGLEWIGT MQLSSLASED TKGPSVFPLA SGALTSGVHT CNVNHKPSNT VFLPPPKPD DGVEVHNAKT KCKVSNKALP KNQVSLTCLV SDGSFFLYSK SLSLSPGK	LARPGASVKL IYPGDGDTSY SAVYYCARWG PSSKSTSGGT FPAVLQSSGL KVDKKVEPKS TLMISRPEV KPREEQYNST APIEKTISKA KGFYPSDIAV LTVDKSRWQQ	SCKASGYTFT AQKFKGKATL YAYDIDNWGQ AALGCLVKDY YSLSSVVTVP CDKTHTCPPC TCVVVDVSHE YRVSVLTVL KGQPREPQVY EWESNGQOPEN GNVFSCSVMH	SYWMQWVKQR TTDKYSSTAY GTLTVSSAS FPEPVTVSWN SSSLGTQTYI PAPELLGGPS DPEVKFNWYV HQDWLNGKEY TLPPSREEMT NYKTPPVLD EALHNHYTQK

10

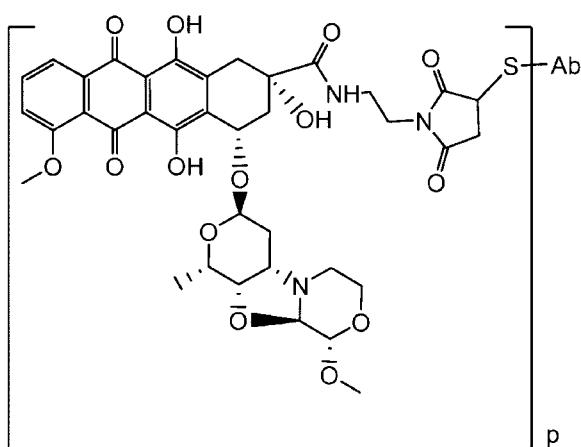
20

30



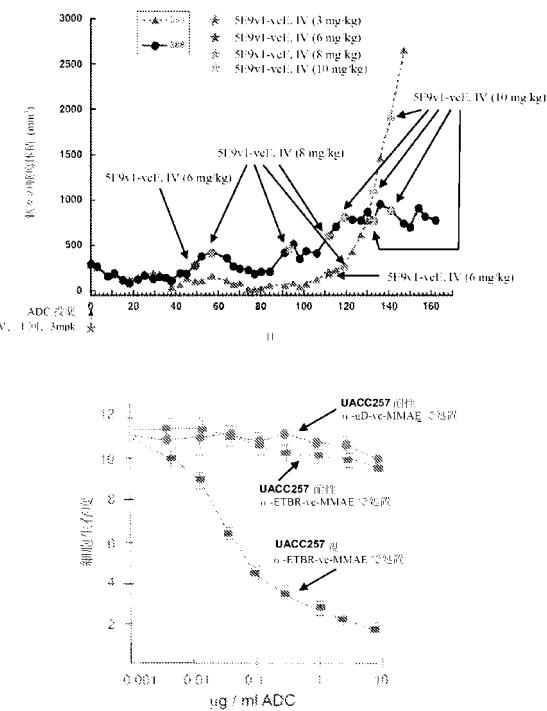
【図 7 D】

D Ab-PNU-159682

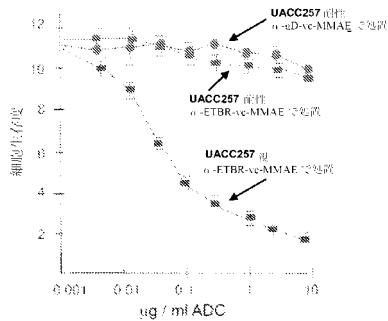


【図 8】

A

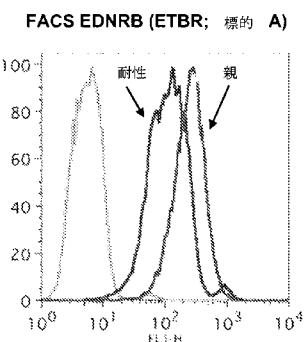


B

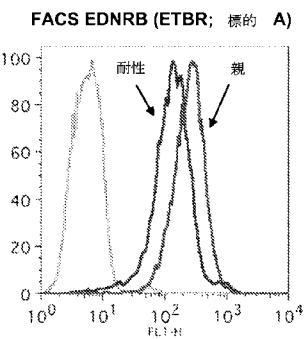


【図 9】

A 体内由来



B 体外由来



【配列表】

2015529656000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/053250
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/395 (2013.01) USPC - 424/181.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 31/551, 31/5517, 39/05, 39/395, 47/42, 47/48; A61P 35/00; C07D 487/04, 519/00 (2013.01) USPC - 424/178.1, 181.1; 530/391.7, 391.9		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 47/48246, 47/48407, 47/48561, 47/48584, 47/48638 (2013.01)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed, Google, SureChem		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0206702 A1 (POLAKIS et al) 25 August 2011 (25.08.2011) entire document	1-4, 9, 20-22
Y	US 2012/0130059 A1 (BERIA et al) 24 May 2012 (24.05.2012) entire document	1-4, 9, 20-22
A	ASUNDI et al., "An Antibody–Drug Conjugate Targeting the Endothelin B Receptor for the Treatment of Melanoma," Clinical Cancer Research, 18 January 2011 (18.01.2011), Vol. 17, Pgs. 965-976. entire document	1-4, 9, 20-22
T, X	US 2013/0295007 A1 (CHEN et al) 07 November 2013 (07.11.2013) entire document	1-4, 9, 20-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  18 December 2013	Date of mailing of the international search report  10 JAN 2014	
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2013/053250

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

## a. (means)

- on paper  
 in electronic form

## b. (time)

- in the international application as filed  
 together with the international application in electronic form  
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

## 3. Additional comments:

Specifically, SEQ ID NOs: 5-8, 10, and 12-17 were searched.

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US2013/053250						
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>								
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:								
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:							
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:							
3.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 5-8, 10-19, 23-56 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).							
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>								
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:								
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.							
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.							
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:							
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:							
<b>Remark on Protest</b> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2009)

## フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 T
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y
C 0 7 K 16/18	(2006.01)	A 6 1 K 31/706
C 0 7 K 16/46	(2006.01)	A 6 1 K 31/5517
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	A 6 1 K 45/00 A 6 1 K 37/02 A 6 1 P 35/00 C 0 7 K 16/28 C 0 7 K 16/18 C 0 7 K 16/46 C 1 2 P 21/08

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNI X

(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 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーワエイ 1

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01  
 4C084 AA01 AA02 AA19 BA01 BA44 MA02 NA13 ZB261 ZB262 ZC751  
 4C085 AA14 AA16 AA33 BB01 BB36 BB41 BB43 CC02 EE03  
 4C086 AA01 AA02 CB11 EA11 MA02 MA04 NA13 ZB26 ZC75  
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74