

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-509152  
(P2025-509152A)

(43)公表日 令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	4 C 0 7 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	Z N A 4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L 4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全47頁)

(21)出願番号	特願2024-552013(P2024-552013)	(71)出願人	517037766
(86)(22)出願日	令和5年3月6日(2023.3.6)		イクスーダ セラピューティクス リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年10月18日(2024.10.18)		イギリス国 エヌイー4 5ピーエックス
(86)国際出願番号	PCT/GB2023/050522		ニューカッスル アボン タイン ニューカッスル ヘリックス ドレイマンズ ウェイザ バイオスフィア
(87)国際公開番号	WO2023/166322	(74)代理人	100147485
(87)国際公開日	令和5年9月7日(2023.9.7)		弁理士 杉村 憲司
(31)優先権主張番号	2203070.4	(74)代理人	230118913
(32)優先日	令和4年3月4日(2022.3.4)		弁理士 杉村 光嗣
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(74)代理人	100174001
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)	(72)発明者	ジェニー サールウェイ
	最終頁に続く		イギリス国 ワイオー32 2イーワイ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗C a n A g抗体複合体

(57)【要約】

本発明は、C a n A g抗原を標的とする抗体複合体、および抗体複合体を含む組成物(例えば、医薬組成物)に関する。がんの治療を含む、抗体複合体および組成物の使用方法も提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式 I で表される抗体複合体またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であって

## 【化 1】



10

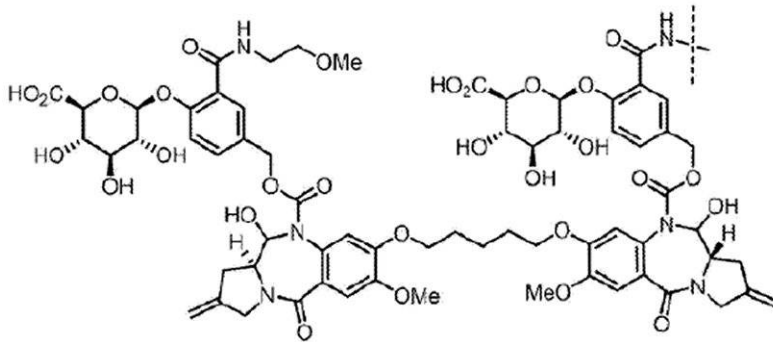
式中、

- A b はヒト化 C 2 4 2 抗体またはその抗原結合断片であり；
- D はピロロベンゾジアゼピン二量体プロドラッグであり；
- L は A b を D に結合するリンカーであり；
- n は 1 ~ 2 0 の整数であり；

ここで

- D は式 ( I I ) ；

## 【化 2】



20

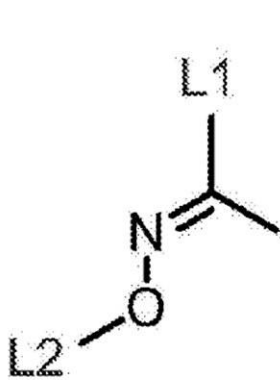
式 II

30

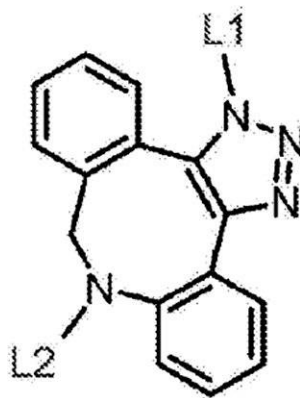
で表され

- 前記リンカーは、式 III、IV、V またはその異性体によって表される中心部分を含んでおり；

## 【化 3】



式 III



式 IV



式 V

40

50

式中、

- L 1 は、前記中心部分を A b に結合する第 1 の結合部分を含んでおり；
- L 2 は、前記中心部分を D に結合する第 2 の結合部分を含んでいる、

抗体複合体またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物。

【請求項 2】

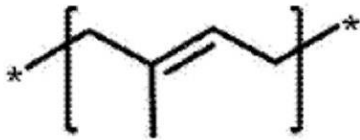
L がチオエーテル結合によって A b に共有結合しており、任意選択的に、前記チオエーテル結合は前記 A b のシステインの硫黄原子を含んでいる、請求項 1 に記載の抗体複合体。

【請求項 3】

前記第 1 の結合部分が式 V I I I :

10

【化 4】



式 V I I I

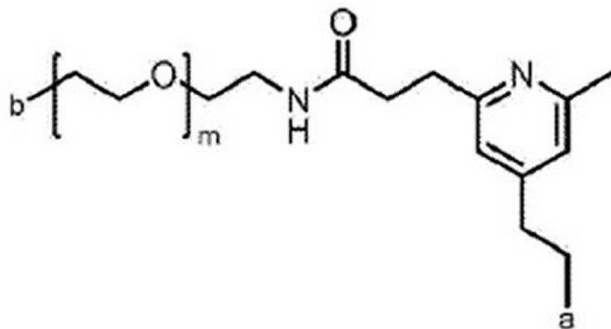
で表される少なくとも 1 つのイソプレニル単位を含んでいる、請求項 1 または請求項 2 に記載の抗体複合体。

20

【請求項 4】

前記第 1 の結合部分が式 I X :

【化 5】



30

式 I X

( 式中、

- a は A b への結合点を示し；
- b は前記中心部分への結合点を示し；
- m は 1 ~ 20 の整数である )

40

で表される、請求項 1 または請求項 2 に記載の抗体複合体。

【請求項 5】

前記第 2 の結合部分が式 X :

【化 6】

式 X



50

(式中、 $o$  は 1 ~ 10 の整数である)

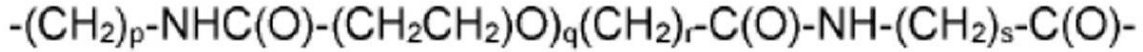
で表される少なくとも 1 つのポリエチレングリコール単位を含んでいる、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体複合体。

【請求項 6】

前記第 2 の結合部分が式 X I :

【化 7】

式 X I



10

式 X I

(式中、

$p$  は 1 ~ 10 の整数であり ;

$q$  は 0 ~ 20 の整数であり ;

$r$  は 1 ~ 10 の整数であり ;

$s$  は 1 ~ 10 の整数である)

で表される、請求項 1 ~ 4 に記載の抗体複合体。

【請求項 7】

A b がイソプレノイド転移酵素によって認識され得る 1 つまたは複数のアミノ酸モチーフを含んでいる、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体複合体。

20

【請求項 8】

前記イソプレノイド転移酵素が F T a s e (ファルネシルタンパク質転移酵素) または G G T a s e (ゲラニルゲラニル転移酵素) である、請求項 7 に記載の抗体複合体。

【請求項 9】

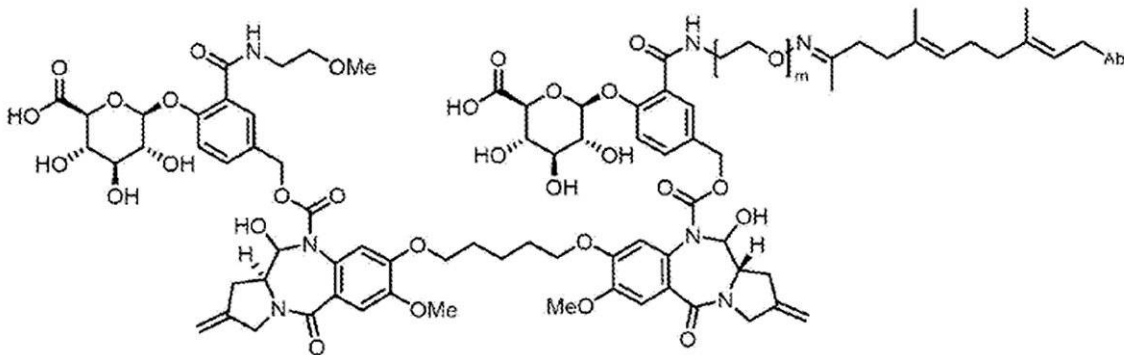
前記アミノ酸モチーフが C Y Y X、X X C C、X C X C、C X C または C X X であり、C はシステインを示し、Y は脂肪族アミノ酸を示し、X はイソプレノイド転移酵素の基質特異性を決定するアミノ酸を示す、請求項 7 または請求項 8 に記載の抗体複合体。

【請求項 10】

以下の :

30

【化 8】



40

または

50



。

【請求項 14】

前記がんが、肺がん、小細胞肺がん、消化器がん、結腸直腸がん、膀胱がん、膵臓がん、胆道がん、子宮頸がんおよび子宮がんからなる群から選択される、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記がんが膵臓がんである、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

がんの治療をそれを必要とする対象において行う方法であって、治療上有効な量の請求項 11 に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

10

【請求項 17】

前記がんが、肺がん、小細胞肺がん、消化器がん、結腸直腸がん、膀胱がん、膵臓がん、胆道がん、子宮頸がんおよび子宮がんからなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記がんが膵臓がんである、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CanAg 抗原を標的とする抗体複合体、および該抗体複合体を含む組成物に関する。がんの治療を含む、抗体複合体および組成物の使用方法も提供される。

20

【背景技術】

【0002】

抗体薬物複合体 (ADC) 技術は、健常組織と疾患組織を敏感に識別する抗体の能力を利用して、細胞毒性ペイロードを選択的に送達するターゲット志向性の技術である。ADC は、抗体、細胞傷害性薬物 (ペイロードとも呼ばれる)、薬物と抗体をつなぐリンカーという 3 つの重要な要素で定義される。ADC は抗がん剤としての使用が知られており、抗体を用いてがん細胞に関連する特定の抗原を標的とし、特定の条件下で薬物ペイロードを放出して細胞死を誘導することで機能する。こうすることで、非常に効果のある薬物を腫瘍に的を絞って送達することが可能となり、これによって全身への曝露および正常組織への毒性が軽減される。従って、ADC はがんのような疾患に苦しむ患者の治療と生存を改善する大きな可能性を秘めている。

30

【0003】

通常、患者が耐容できない毒性のペイロードを使用する可能性があるにもかかわらず、治療指数 (毒性用量と有効用量を比較した比率) が低いことが問題として残っており、臨床開発中の多くの ADC の中止の原因となっている。適切な標的、抗体、細胞傷害性ペイロードの選択、および抗体とペイロードの連結方法はすべて、ADC の安全性と有効性を決定する重要な因子として同定されている。このことは、適切な標的抗原、安定なリンカー、強力な細胞毒性ペイロード、そして効果的な放出技術の正しい組み合わせを達成する ADC の開発に関わる複雑さのレベルを示している。

40

【0004】

CanAg 抗原は、その好ましい発現パターンにより、抗体をベースとする選択的抗がん治療の適切な標的であることが示唆されている。CanAg は、ほとんどの膵臓がん、胆道がんおよび大腸がん、ならびに、胃がん、子宮がん、非小細胞肺がんおよび膀胱がんのかなりの割合で高発現している。対照的に、正常組織における CanAg の発現はわずかであることが報告されている。にもかかわらず、現在のところ、がん治療への使用が承認された抗 CanAg ADC はない。カンツズマブメルタンシンとカンツズマブラタンシンが、CanAg を標的とする 2 つの既知の ADC であるが、大腸がんおよび膵臓がんに対して認められる有効性が限られているためか、どちらの化合物も第 2 相臨床試験より先には進んでいない。

50

## 【 0 0 0 5 】

したがって、有効な有効性、薬物動態 / 薬力学的、および幅広い治療指数を有する抗体 - リンカー - 薬物の組み合わせを同定し、開発する必要性が残っている。

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 6 】

第 1 の態様において、式 I で表される抗体複合体、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物が提供され：

## 【 化 1 】

10



式中、

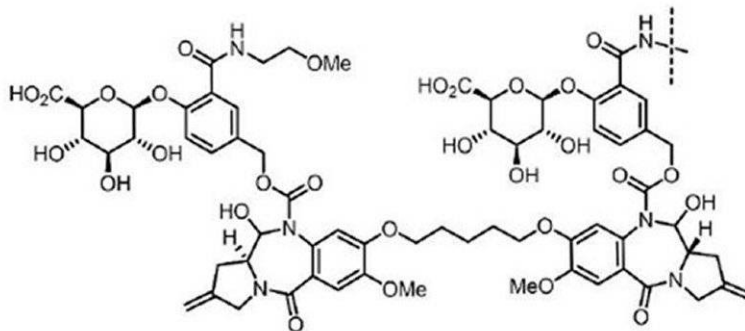
- A b はヒト化 C 2 4 2 抗体またはその抗原結合断片であり；
- D はピロロベンゾジアゼピン二量体プロドラッグであり；
- L は A b を D に結合するリンカーであり；
- n は 1 ~ 2 0 の整数であり；

ここで

- D は式 ( I I ) で表され：

20

## 【 化 2 】



30

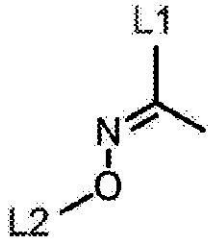
## 式 ( I I )

- リンカーは、式 I I I、I V、V、V I または V I I で表される中心部分を含んでおり：

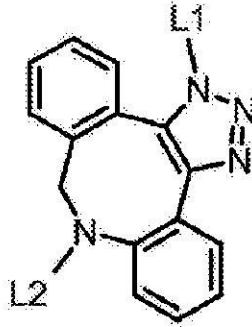
40

50

## 【化 3】



式 III

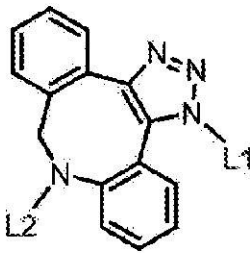


式 IV

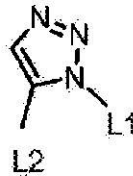


式 V

10



式 VI



式 VII

20

式中、

- L 1 は、中心部分を A b に結合する第 1 の結合部分を含んでおり；
- L 2 は、中心部分を D に結合する第 2 の結合部分を含んでいる。

30

## 【 0 0 0 7 】

あるいは、第 1 の結合部分 L 1 は中心部分を D に結合し、第 2 の結合部分 L 2 は中心部分を A b に結合してもよい。

## 【 0 0 0 8 】

本発明者らは、抗体、リンカーおよび薬物の特異的な組み合わせを見だし、それらが一緒になって所望の特徴を達成することを見いだした。有利なことに、本発明の特異的 A D C は驚くことに、既知の抗 C a n A g A D C と比較して改善された安全性と有効性を示す。

40

## 【 0 0 0 9 】

特に、ピロロベンゾジアゼピン ( P B D ) 二量体細胞毒性ペイロードは、式 ( I I ) によるプロドラッグの形態で採用される。P B D は、アウリスタチンおよびマイタンシノイドのチューブリン阻害剤クラスとは異なる細胞標的を利用し、カリケアマイシンのような他の D N A 相互作用性ペイロードとは異なる D N A 損傷様式を利用する、既知の高細胞毒性 D N A 架橋剤クラスである。式 ( I I ) による P B D 二量体のプロドラッグ形態は、投与後の血中安定性が低い従来の P B D 薬と比較して、より安定であり、より低い細胞毒性を示す。このプロドラッグは、 - グルクロニダーゼ酵素によるグルクロン酸部分の切断によって活性型に変換されるが、 - グルクロニダーゼ酵素はがん細胞において周囲の正常組織と比較して上方制御されることが知られている ( Fishman, W.H., J. Biol. Che

50

m., 1947, 169(2) p:449)。この結果、活性型薬物の腫瘍選択性が高くなり、正常細胞によるリンカーの早期分解による副作用の発生が減少すると考えられる。

【0010】

前述したように、リンカーの安定性は抗体-薬物複合体の有効性と毒性を決定する重要な因子である。広く使用されているマレイミド結合法のような既存のリンカーは、非腫瘍組織におけるペイロードの非特異的放出に悩まされる可能性があり、標的外毒性および治療域の制限につながる。有利なことに、上記のような本発明によるリンカーは、腫瘍細胞における薬物の効率的な切断を可能にしながら、抗体と薬物の間に安定した結合を提供する。

【0011】

抗体と薬物を結合するリンカーの中心部分は、式IIIによるO-置換オキシムを含んでいてよい。オキシムの炭素原子が、オキシムと抗体とを共有結合で連結する第1の結合基で置換されている場合、オキシムの酸素原子は、オキシムと薬物(D)を共有結合で連結する第2の結合基で置換されている。あるいは、オキシムの炭素原子がオキシムと薬物を共有結合で連結する結合基で置換されている場合、オキシムの酸素原子はオキシムと抗体を共有結合で連結する結合基で置換されている。

【0012】

他の実施形態では、リンカーの中心部分は、オキシムの代わりに、式IV、V、VIまたはVIIによる置換トリアゾールを含んでいてもよい。有利には、トリアゾールは、穏やかな条件下で実施されるクリックケミストリー反応によって形成され得、これは、変性が起こることなく抗体の存在下で実施され得る。さらに、例えば、アジド-アルキンクリックケミストリー反応は、高い収率および高い反応特異性でトリアゾールを生成することができる。したがって、抗体が様々な官能基(例えば、アミン、カルボキシル、カルボキサミド、グアニジニウム)を有していても、例えば、抗体のアミノ酸側鎖に影響を与えることなく、クリックケミストリー反応を行うことができる。当業者には理解されるように、式VIおよびVIIは、それぞれ式IVおよびVの位置異性体である。

【0013】

CanAgを標的とすることができるヒト化抗体またはその抗原結合断片であれば、本発明に従って使用することができる。好適には、抗体はヒト化C242抗体またはその抗原結合断片である。ヒト化C242(HuC242またはカンツズマブ)は、CanAg抗原の細胞外ドメイン上のCA242エピトープに結合する。本発明で使用するためのヒト化C242の例は、SEQ ID NO: 5-10または13-18からの1つまたは複数のアミノ酸配列を含み得る。

【0014】

好適には、リンカーはチオエーテル結合によって抗体に共有結合している。例えば、チオエーテル結合は抗体のシステインの硫黄原子を含んでいてもよい。システインをベースとするコンジュゲーション法は、リジンコンジュゲーション法と比較して、薬物負荷、すなわち薬物対抗体比(DAR)および均一性の制御がより良好である。ADCの均一性の向上は、薬物動態および有効性の向上ならびに標的外毒性の軽減につながるということが知られている。共有結合性のチオエーテル結合は、既存のチオール基を使用して、または前駆段階においてチオール基を導入することによって、例えば、抗体の1つまたは複数の官能基を反応させてチオール基を生成することによって、またはチオール基もしくはその前駆体を抗体に導入することによって形成することができる。例として、リンカーを抗体に結合させたい部位にシステイン残基を導入するステップを含むことがある。これは、本発明による反応に好都合なシステイン残基が、出発抗体または野生型抗体に存在しない場合に有用であり得る。好都合なことに、これは抗体の部位特異的突然変異誘発を用いて達成することができ、その使用法は当技術分野で確立されている。

【0015】

第1の結合部分は、式VIII:

10

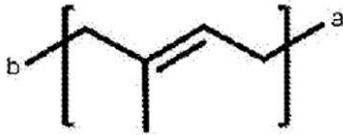
20

30

40

50

## 【化 4】



式 V I I I

で表されるイソプレニル単位を少なくとも 1 つ含むことができる

10

## 【0016】

第 1 の結合部分が式 V I I I で表される少なくとも 1 つのイソプレニル単位を含む場合、イソプレニル単位の炭素原子 ( a ) は抗体の、好ましくはシステインの硫黄原子とチオエーテル結合を形成し、それによりイソプレニル基と抗体を共有結合で連結する。イソプレニル基の炭素原子 ( b ) は、イソプレニル基とリンカーの中心部分を共有結合で連結する。

## 【0017】

有利なことに、C 末端アミノ酸配列の抗体プレニル化によって修飾イソプレニル単位を導入することについては記述されてきており、これによって穏やかで部位特異的な方法で薬物または他の活性薬剤を抗体に結合させることができる。これにより、薬物動態および有効性を改善することが知られており、規制の観点からもより望ましい、規定された数の薬物を有する均質な ADC を調製することが可能になる。

20

## 【0018】

抗体は、好ましくは抗体の C 末端に、イソプレノイド転移酵素によって認識されるアミノ酸モチーフを含んでもよい。アミノ酸モチーフは、C X X、C X C、X C X C、X X C C および C Y Y X から選択される配列であってよく、ここで、C はシステインを表し； Y は、各出現について独立して、脂肪族アミノ酸を表し； X は、各出現について独立して、グルタミン、グルタミン酸、セリン、システイン、メチオニン、アラニンまたはロイシンを表す。好適には、チオエーテル結合は、アミノ酸モチーフのシステインの硫黄原子を含んでもよい。

30

## 【0019】

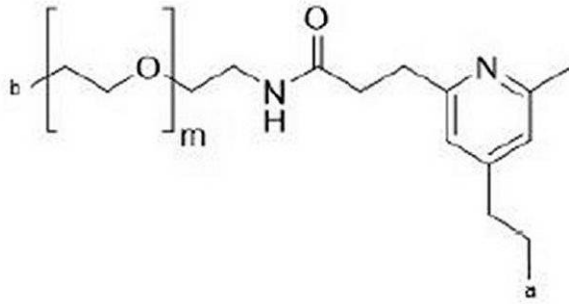
任意選択的に、アミノ酸モチーフは、配列 C Y Y X であってもよく、 Y は、各出現について独立して、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニンまたはバリンを表す。例えば、アミノ酸モチーフは C V I M または C V L L であってもよい。アミノ酸モチーフに先行する 7 個のアミノ酸のうち少なくとも 1 個はグリシンであってもよい。例えば、アミノ酸モチーフに先行する 7 個のアミノ酸のうち少なくとも 3 個は、各々独立して、グリシンおよびプロリンから選択される。好適には、アミノ酸モチーフに先行する 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個または 10 個のアミノ酸の各々はグリシンであり、好ましくは 7 個である。任意選択的に、抗体は、好ましくは C 末端にアミノ酸配列 G G G G G G G C V I M を含んでいる。

40

## 【0020】

あるいは、第 1 の結合部分は式 I X :

【化 5】



式 I X

10

で表され

式中、

- a は A b への結合点を示し；
- b は中心部分への結合点を示し；
- m は 1 ~ 10 の整数である。

【0021】

有利なことに、式 I X に従うビニルピリジンベースとするリンカーは、抗体上のチオール基と選択的かつ不可逆的に反応して、高度に安定なチオエーテル結合を形成することが示されている。上述のように、リンカーの安定性は A D C の有効性と毒性に極めて重要である。

20

【0022】

好適には、第 2 の結合部分は、式 X :

【化 6】

式 X



30

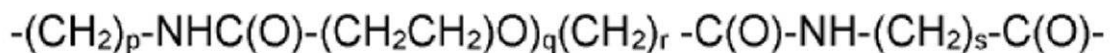
で表される少なくとも 1 つのポリエチレングリコール単位を含んでいてもよく、

式中、o は 1 ~ 10 の整数である。

【0023】

あるいは、第 2 の結合部分は式 X I :

【化 7】



式 X I

40

で表されることもあり

式中、

- p は 1 ~ 10 の整数であり；
- q は 1 ~ 20 の整数であり；
- r は 1 ~ 10 の整数であり；
- s は 1 ~ 10 の整数である。

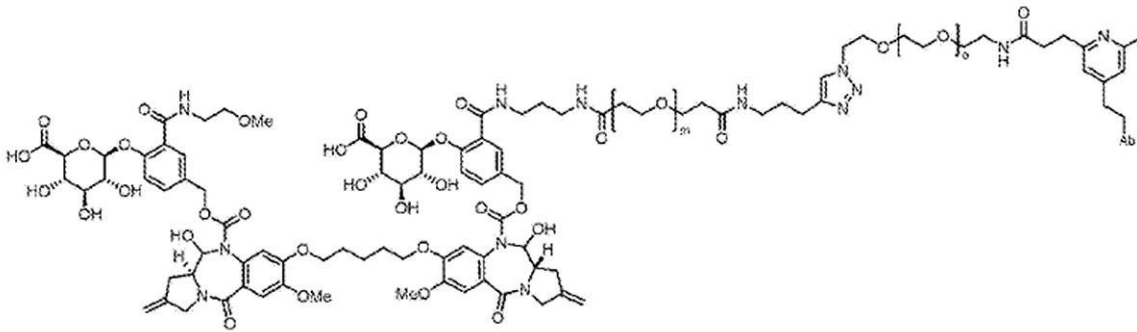
【0024】

好適には、抗体複合体は、以下の構造から選択され：

50



## 【化 1 1】



10

式中、

mは0～20の整数であり；

oは0～10の整数である。

## 【0025】

第2の態様では、第1の態様による抗体複合体と；1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤または担体とを含む医薬組成物が提供される。

## 【0026】

好適には、医薬組成物は医薬品として使用するためのものであり得る。例えば、医薬品は、がんの治療に使用するためのものであり得る。任意選択的に、がんは、肺がん、小細胞肺がん、消化器がん、結腸直腸がん、膀胱がん、膵臓がん、胆道がん、子宮頸がんおよび子宮がんからなる群から選択され得る。例えば、がんは膵臓がんであってもよい。

20

## 【0027】

別の態様では、がんの治療のための医薬品の調製における、第2の態様による医薬組成物の使用が提供される。

## 【0028】

別の態様では、第2の態様による医薬組成物の治療量を対象に投与するステップを含む、がん治療をそれを必要とする対象において行う方法が提供される。任意選択的に、がんは、肺がん、小細胞肺がん、消化器がん、結腸直腸がん、膀胱がん、膵臓がん、胆道がん、子宮頸がんおよび子宮がんからなる群から選択され得る。例えば、がんは膵臓がんであってもよい。

30

## 【0029】

以下、本発明の実施形態について、添付の図を参照して例示的に説明するが、これに限定されるものではない。

## 【0030】

添付の図面は、本開示の現在の例示的な実施形態を示し、上述した一般的な説明および以下に示す実施形態の詳細な説明とともに、例示として本開示の原理を説明するのに役立つ。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0031】

【図1】 CanAg 陽性 Colo205 細胞に対するヒト化抗体の結合を示す図である。

【図2】 DARが2.3のADC-1のPLRPクロマトグラム(A214nm)である。数字は軽鎖(L)または重鎖(H)に結合した薬物の量を示す。

【図3】 DARが2.3のADC-1のSECクロマトグラム(A214nm)である。

【図4】 化合物2をプレニル化HC1+LC1中間体に結合させ、セミ分取HICで精製した後の、DARが2のADC-2のHICクロマトグラム(A214nm)である。

【図5】 精製後のDARが2のADC-2のSECクロマトグラム(A214nm)である。

50

【図6】化合物5をプレニル化HC1LC1中間体に結合させ、セミ分取HICで精製した後の、DARが2のADC-3のHICクロマトグラム(A214nm)である。

【図7】精製後のDARが2のADC-3のSECクロマトグラム(A214nm)である。

【図8】280nmにおけるカンツズマブラブタンシンのSEC分析を示す図である。

【図9】SNU-16、Colo-205、HT29、BxPC3およびNCI-N87細胞におけるCanAg発現レベルを示す図である。

【図10】Colo-205、HT29、BxPC3およびNCI-N87細胞における-グルクロニダーゼ活性を示す図である。

【図11】Colo-205細胞に対するADC-2とADC非結合対照の*in vitro*活性を示す図である。 10

【図12】BxPC-3細胞に対するADC-2およびADC非結合対照の*in vitro*活性を示す図である。

【図13】HT-29細胞に対するADC-2およびADC非結合対照の*in vitro*活性を示す図である。

【図14】N87細胞に対するADC-2とADC非結合対照の*in vitro*活性を示す図である。

【図15】Colo-205細胞に対するADC-1、ADC-2およびADC-3の*in vitro*活性を示す図である。

【図16】Colo-205細胞に対するADC-3、カンツズマブラブタンシンおよびADC非結合対照の*in vitro*活性を示す図である。 20

【図17】(A)はColo-205異種移植片におけるADC-2およびADC-3の*in vivo*活性を示す図であり、(B)は体重の変化を示す図である。

【図18】(A)はColo-205異種移植片におけるADC-1、ADC-2およびADC-3の*in vivo*活性を示す図であり、(B)は体重の変化を示す図である。

【図19】(A)はColo-205異種移植片におけるカンツズマブラブタンシンの*in vivo*活性を示す図であり、(B)は体重の変化を示す図である。

【図20】(A)はBxPC-3異種移植片におけるADC-2、ADC-3およびカンツズマブラブタンシンの*in vivo*活性を示す図であり、(B)は体重の変化を示す図である。 30

【図21】(A)はBxPC-3異種移植片におけるカンツズマブラブタンシンの*in vivo*活性を示す図であり、(B)は体重の変化を示す図である。

【図22】(A)はNCI-N87異種移植片におけるADC-3と非結合ADC対照の*in vivo*活性を示す図であり、(B)は体重の変化を示す図である。

【図23】(A)はNCI-N87異種移植片におけるカンツズマブラブタンシンADCの*in vivo*活性を示す図であり、(B)はNCI-N87異種移植片におけるエンハーツADCの*in vivo*活性を示す図であり、(C)および(D)はそれぞれ体重変化を示す図である。

【図24】抗体ヒト化のための重鎖(HC)と軽鎖(LC)配列のアライメントを示す図である。CDR領域には下線を引いてある。シグナルペプチドに属するアミノ酸は太字で示す。 40

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明は、CanAg抗原を標的とする抗体複合体、および該抗体複合体を含む組成物(例えば、医薬組成物)に関する。がんの治療を含む、抗体複合体および組成物の使用方法も提供される。

【0033】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を通じて、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、またはこれらの組み合わせなどの標的を認識し、特異的に結合する免疫グロブリン分 50

子を意味する。免疫グロブリンは、天然のものであれ、一部または全部が合成されたものであれ、抗体に含まれる。また、この用語には、抗原結合ドメインを含むポリペプチドまたはタンパク質も含まれる。本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、抗体断片（F a b、F a b'、F ( a b' ) 2、F v断片など）、単鎖F v ( s c F v ) 変異体、少なくとも2つのインタクトな抗体から生成される二重特異性抗体などの多重特異性抗体、抗体の抗原決定部分を含んでいる融合タンパク質、および抗体が所望の生物学的活性を示す限りは、抗原認識部位を含んでいるその他の修飾免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、免疫グロブリンの5つの主要クラス：I g A、I g D、I g E、I g G、およびI g M（それぞれ、 、 、 、 およびμと呼ばれる重鎖定常ドメインの同一性に基づく）、またはそのサブクラス（アイソタイプ）（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1およびI g A 2）のいずれであってもよい。免疫グロブリンの異なるクラスは、それぞれ異なる、周知のサブユニット構造と三次元配置を持っている。

10

## 【0034】

「抗体断片」という用語は、インタクトな抗体の一部を指し、インタクトな抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例としては、F a b、F a b'、F ( a b' ) 2およびF v断片、直鎖抗体、ナノボディ、一本鎖抗体、抗体断片から形成される二重特異性および多重特異性抗体などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

## 【0035】

「プロドラッグ」とは、投与後に宿主内で代謝、例えば加水分解されて、生物学的に活性な分子を形成する化合物を指す。プロドラッグの典型的な例としては、活性化化合物の官能性部分に生物学的に不安定な保護基または切断可能な保護基を有する化合物が挙げられる。

20

## 【0036】

「がん」および「がん性」という用語は、細胞集団が無秩序な細胞増殖によって特徴づけられる、哺乳動物における生理的状态を指す、またはそれを表す。がんの例としては、がん腫、リンパ腫、胚腫、肉腫および白血病などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。そのようながんのより具体的な例としては、扁平上皮がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、肺扁平上皮がん、腹膜がん、肝細胞がん、消化器がん、膵臓がん、膠芽腫、子宮頸がん、卵巣がん、卵管がん、肝臓がん、膀胱がん、肝細胞がん、乳がん、大腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜または子宮がん、唾液腺がん、腎臓がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝がんおよび各種頭頸部がんが挙げられる。

30

## 【0037】

「腫瘍」とは、前がん病変を含む良性（非がん性）または悪性（がん性）のいずれであっても、過剰な細胞の成長または増殖から生じる組織の塊を指す。

## 【0038】

「対象」という用語は、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類などを含むがこれらに限定されない、特定の治療の受け手となる任意の動物（例えば、哺乳動物）を指す。典型的には、本明細書において、「対象」および「患者」という用語は、ヒト対象に関しては互換的に使用される。

40

## 【0039】

「医薬組成物」という用語は、有効成分の生物学的活性が有効であるような形態であり、製剤が投与される対象にとって許容できないほど有毒な追加成分を含まない製剤を指す。このような製剤は無菌であり得る。

## 【0040】

本明細書で開示される「有効量」とは、具体的に記載された目的を遂行するのに十分な量である。「有効量」は、記載された目的に関連して、経験的かつ日常的な方法で決定することができる。

## 【0041】

「治療上有効な量」という用語は、対象または哺乳動物における疾患または障害を「治

50

療」するのに有効なADCまたは他の薬物の量を指す。がんの場合、治療有効量の薬物は、がん細胞の数を減少させ；腫瘍サイズを縮小させ；末梢臓器へのがん細胞の浸潤を阻害し（すなわち、ある程度遅くし、ある実施形態では停止させ）；腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度遅くし、ある実施形態では停止させ）；腫瘍増殖をある程度阻害し；および/または、がんに関連する1つまたは複数の症状をある程度緩和することができる。以下の「治療する」の定義を参照のこと。薬物が増殖を阻止し、および/または既存のがん細胞を死滅させることができる範囲において、それは細胞静止性および/または細胞毒性を有することができる。「予防的に有効な量」とは、所望の予防的結果を得るために必要な投与量および期間において有効な量をいう。一般的に、必ずしもそうではないが、予防的用量は、疾患の前段階またはより早い段階の対象に使用されるため、予防的に有効な量は、治療上有効な量よりも少なくなる。

10

#### 【0042】

「治療すること」または「治療」または「治療すること」または「緩和」または「緩和すること」などの用語は、1) 診断された病理学的状態または障害を治癒する、遅らせる、症状を軽くする、および/または進行を止める治療的措置と、2) 対象となる病理学的状態または障害の発症を予防および/または遅らせる予防的措置または防止的措置の両方を指す。従って、治療を必要とする者には、既に障害を有する者；障害を有しやすい者；および障害が予防されるべき者が含まれる。特定の実施形態において、対象は、患者が以下の1つまたは複数を示す場合、本発明の方法に従ってがんの「治療」に成功したことになる：がん細胞の数の減少もしくは完全な消失；腫瘍サイズの減少；例えば、軟組織および骨へのがんの広がりを含む末梢器官へのがん細胞の浸潤の阻害もしくは消失；腫瘍転移の阻害もしくは消失；腫瘍増殖の阻害もしくは消失；特定のがんに関連する1つもしくは複数の症状の緩和；罹患率および死亡率の減少；生活の質の改善；腫瘍の腫瘍原性、腫瘍原性頻度もしくは腫瘍原性能力の減少；腫瘍中のがん幹細胞の数もしくは頻度の減少；腫瘍原性細胞の非腫瘍原性状態への分化；または効果のいくつかの組み合わせ。

20

#### 【0043】

本開示は、CanAg抗原に結合する抗体の抗体-薬物複合体を提供する。CanAgは、ほとんどの膵臓がん、胆道がんおよび大腸がん強く発現している。また、胃がん、子宮がん、非小細胞肺癌および膀胱がんのかなりの割合でも発現している。対照的に、正常組織におけるCanAgの発現はわずかであることが報告されている。そのため、CanAgはmAbベースの抗がん剤の候補として適していると思われる。しかしながら、現在のところCanAgを標的とするADCは市販されていない。カンツズマブメルタンシンとカンツズマブラブタンシンが、CanAgを標的とする2つの既知のADCであるが、どちらの化合物も第2相臨床試験より先に進んでいない。本発明は、驚くべきことに、特許請求した特定のADCが、CanAgを標的とする改善されたADCを提供することを見出した。

30

#### 【0044】

CanAgを標的とすることができるヒト化抗体またはその抗原結合断片であれば、本発明に従って使用することができる。結合親和性を維持するために、ヒト化プロセスは、CDR領域およびCDRと相互作用する残基、またはVH-VL界面にある残基を同定することと、ヒト化抗体中にこれらの領域を保存することとを含み得る。好適には、本発明による抗体は、図24に下線を引いたCDRが保存されたヒト化抗体、またはこれらの領域を含む抗原結合断片である。本発明で使用するためのヒト化C242の例は、SEQ ID NO: 5 - 10または13 - 18からの1つまたは複数のアミノ酸配列を含み得る。

40

#### 【0045】

本発明による抗体複合体は、がんの治療のような治療的処置方法を含むがこれに限定されない様々な用途において有用であり得る。特定の実施形態において、この薬剤は、腫瘍増殖の阻害、分化誘導、腫瘍体積の減少および/または腫瘍の腫瘍原性の減少に有用である。使用方法は、*in vitro*法、*ex vivo*法、または*in vivo*法であり得る。特定の実施形態において、抗体複合体または抗体複合体を含む組成物で治療され

50

る疾患は、がんである。特定の実施形態において、がんは、CanAgを発現する腫瘍によって特徴付けられる。

【0046】

本発明は、治療有効量の抗体複合体またはその組成物を対象（例えば、治療を必要とする対象）に投与することを含む、がんを治療する方法を提供する。特定の実施形態において、がんは、肺がん、小細胞肺がん、消化器がん、結腸直腸がん、膀胱がん、膵臓がん、胆道がん、子宮頸がんおよび子宮がんからなる群から選択されるがんである。特定の実施形態において、がんは膵臓がんである。特定の実施形態において、がんは大腸がんである。特定の実施形態において、対象はヒトである。

【0047】

本発明の薬学的組成物は、局所的または全身的治療のいずれかのために、任意の数の方法で投与することができる。投与は、肺投与（例えば、ネブライザーによるものを含む、粉末もしくはエアロゾルの吸入もしくは送気によるもの；気管内投与、経鼻投与、表皮投与および経皮投与）；経口投与；または静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注射もしくは注入を含む非経口投与；または頭蓋内投与（例えば、髄腔内投与もしくは脳室内投与）であり得る。

【0048】

疾患の治療のために、本発明の抗体または薬剤の適切な投与量は、治療される疾患のタイプ、疾患の重症度および経過、疾患の反応性、抗体結合体が治療目的で投与されるかまたは予防目的で投与されるか、以前の治療、患者の臨床歴などに、すべて治療医の裁量で依存する。抗体結合体またはその組成物は、1回もしくは数日から数ヶ月にわたる一連の治療にわたって、または治癒が達成されるまで、または病状の軽減（例えば腫瘍サイズの縮小）が達成されるまで投与することができる。最適な投与スケジュールは、患者の体内における薬物蓄積の測定値から計算することができ、個々の抗体または薬剤の相対的な効力によって異なるだろう。投与する医師は、最適な投与量、投与方法および反復割合を容易に決定することができる。

【0049】

実験データと考察

本発明は以下の実施例によりさらに説明されるが、これらは添付の特許請求の範囲により定義される本発明の範囲に制限を課すものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0050】

実施例1．ヒト化抗CanAg抗体の開発

親抗体のヒト化デザインは、インシリコ解析を用いて行った。ホモロジーモデリングを用いて親抗体の3D構造を作成した。アクセプターフレームワークは、フレームワーク全体の配列同一性、一致する界面位置および同様に分類されたCDRのカノニカル位置に基づいて同定した。3つの重鎖（HC）フレームワークと3つの軽鎖（LC）フレームワークがヒト化デザイン用を選択した。

【0051】

ヒト化抗体は、親抗体配列の選択部分をヒトフレームワーク配列と融合させた複数のハイブリッド配列を作成することにより設計した。3D構造を用いて、これらのヒト化配列を目とコンピューターモデリングによって系統的に分析して、抗原結合を保持する可能性が最も高い配列を分離した（CDRループとVH-VL界面を支える主要な残基に注目した）。最終的なヒト化抗体におけるヒト配列の量を、元の抗体の特異性を保持しながら最大化することが目標であった。

【0052】

3つのヒト化VHおよび3つのヒト化VL配列を設計した：「HV1-18BM（HC1）」、「HV1-46BM（HC2）」および「HV1-8BM（HC3）」、「KV2-40BM（LC1）」および「KV2-28BM（LC2）」および「KV2D-29BM（LC3）」。

ヒト化抗体のヒト性スコア（T20スコア）は、Gao et al（Mo

10

20

30

40

50

noclonal antibody humanness score and its applications; BMC Biotechnology, 13:55, 2013) に記載された方法を用いて可変領域の一次配列を分析することにより算出した。

【 0 0 5 3 】

その後、ヒト化した重鎖と軽鎖を組み合わせて、完全ヒト化抗体を作製した。ヒト化した重鎖と軽鎖の9つの組み合わせについて、その発現レベルと抗原結合親和性を試験して、キメラ親抗体と同様に機能する抗体を同定した。試験した抗体を以下の表1に示す。9つのヒト化変異体とキメラ親抗体について、0.01Lの一過性産生(TunaCHO(商標)7day)を行った。すべてのクローンはプロテインAで精製した(産生収率は表1を参照)。

10

【 0 0 5 4 】

【表1】

抗体名	収率
HC1+LC1	35
HC1+LC2	31
HC1+LC3	39
HC2+LC1	36
HC2+LC2	37
HC2+LC3	33
HC3+LC1	36
HC3+LC2	36
HC3+LC3	33

20

表1. 抗体の産生収率 (mg/L)

30

【 0 0 5 5 】

CanAg陽性Colo-205細胞に対する9つのヒト化抗体の組み合わせの親和性は、フローサイトメトリーで以下のように評価した。20×10<sup>5</sup>個のColo205細胞を各ウェルに等分し、FACSバッファー(PBS中2%FBS)で1回洗浄した。ヒト化抗体およびアイソタイプ対照抗体(抗HELヒトIgG1(N297A)、カタログ:B109801、ブランド:BIOTRON)をFACSバッファーで希釈し(100μg/mLから始めて2倍希釈で8濃度)、細胞を入れた各ウェルに100μLずつ加えた。細胞を4で60分間インキュベートした後、FACSバッファーで2回洗浄した。二次抗体AF488ヤギ抗ヒトIgG(H+L)(カタログ:A11013、ブランド:Invitrogen)をFACSバッファーで1:1000に希釈し、各ウェルに100μLずつ加え、4で30分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を200μLのFACSバッファーに再懸濁し、フローサイトメトリー解析を行った。EC50の算出にはMFI(平均蛍光強度)を用いた。FACSでもとめたヒト化抗体とColo205細胞の結合のEC50値を表2に示す。

40

【 0 0 5 6 】

50

【表 2】

クローン	結合 EC50 (μg/ml)
	MFI 曲線
HC1+LC1	0.2737
HC1+LC2	0.2676
HC1+LC3	0.3048
HC2+LC1	0.3506
HC2+LC2	0.4078
HC2+LC3	0.3540
HC3+LC1	0.2664
HC3+LC2	0.3269
HC3+LC3	0.2940

10

表 2. FACSでもとめたヒト化抗体とColo205細胞の結合のEC50値

20

## 【0057】

表 2 からわかるように、試験したすべてのヒト化抗体 (HC1+LC1、HC1+LC2、HC1+LC3、HC2+LC1、HC2+LC2、HC2+LC3、HC3+LC1、HC3+LC2 および HC3+LC3) は、TunaCHO (商標) 細胞一過性発現系で同等の親和性と発現収率を示した。

## 【0058】

実施例 2. ADC - 1

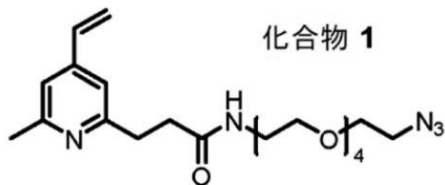
ADC - 1 を、以下の化合物 1 および化合物 2 を用いて、ビニルピリジンを紹介したシステイン修飾により産生した。

30

## 【0059】

化合物 1 の合成

## 【化 1 2】



40

## 【0060】

リチウム 3 - (6 - メチル - 4 - ビニルピリジン - 2 - イル) プロパノエート (17.5 g、87.6 mmol) および 2 - (2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ) エタン - 1 - アミン (23.0 g、87.6 mmol、Broad Pharm 社より商業的に利用可能、カタログ番号: BP - 21615) をジメチルホルムアミド (525.0 mL) に溶解した。N - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N - エチルカルボジイミド塩酸塩 (33.6 g、175 mmol) を 0 で少量ずつ加えた。ジソプロピルエチルアミン (61.0 mL、350.0 mmol) を滴下し、混合物を 12 時間攪拌した。水性 LiCl (1.0 L、5.0% w/v) を加えて反応をクエンチし、酢酸エチル (3 x 5

50

00 mL) で洗浄した。有機抽出物を合わせ、MgSO<sub>4</sub>上で乾燥させ、蒸発乾固して、粗N-(2-(2-アジドエトキシ)エチル)-3-(6-メチル-4-ビニルピリジン-2-イル)プロペンアミド(化合物1)を得た。粗生成物をカラムクロマトグラフィー(Si<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ジクロロメタン:メタノールグラジエント98:2-96:4)で精製して、化合物1をオレンジ色のオイルとして得た(21.5 g、収率56%)。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 6.97(2H, d) 6.53(1H, t), 5.90(1H, d), 5.42(1H, d), 3.63(14H, m), 3.44(2H, d), 3.40(4H, m), 3.04(2H, t), 2.62(2H, t), 2.45(3H, s). LCMS(ESI+): Compound 1(C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>) Theoretical: 436.25 [M+1]<sup>1+</sup>. Found: 436.28 [M+1]<sup>1+</sup>.

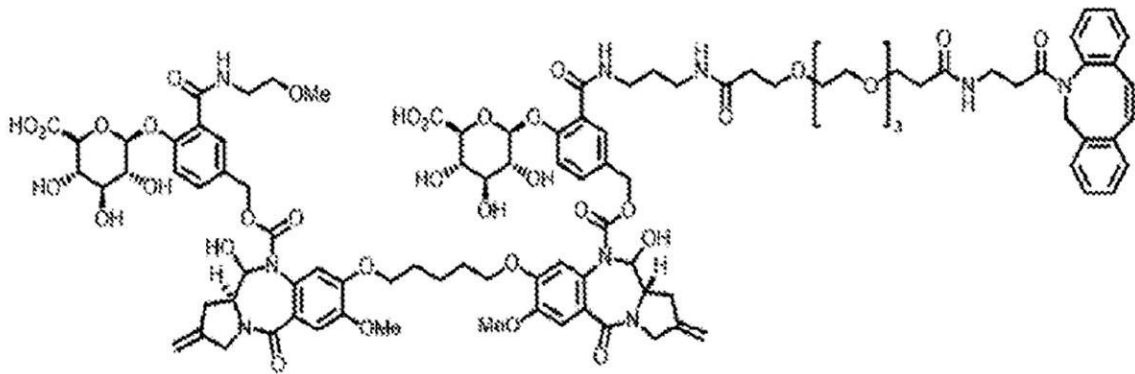
【0061】

10

以下に示す化合物2は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第2018/182341号に記載されている方法により合成した。

【0062】

【化13】



20

化合物2

【0063】

30

ADC-1生成

HC1+LC1抗体を2.8モル当量のTCEPで部分的に還元し、1.2%(v/v)ジメチルアセトアミド(DMA)の存在下、pH7.4で、4倍モル過剰で化合物1に25で18時間結合させた。脱塩により単離した後、得られた中間体を、0.7%(v/v)ジメチルアセトアミド(DMA)の存在下、pH7.4で、2.5倍モル過剰で化合物2に25で4時間結合させた。この複合体を脱塩カラムで精製して、過剰の遊離薬物と溶媒を除去し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、pH7.4に再緩衝した。

【0064】

ADC-1の薬物抗体比(DAR)の測定

平均薬物負荷量および薬物負荷量分布の測定は、これらの因子がADCの力価および薬物動態に影響を及ぼすため、ADCの生成において極めて重要である。ADC-1のDAR測定は、Agilent PLRP-S(1000A、2.1x50mm、5μm)カラムを用いたポリマー連結(polymer-linked)逆相(PLRP)クロマトグラフィーにより達成された。PLRPカラムを用いたジチオスレート(DTT)還元複合体の分離では、図2に示すように、非結合または薬剤結合抗体の軽鎖および重鎖に対応するピークがよく分離された。ADC-1のDAR値は2.3と測定された。ピーク分離は以下の手順で行った;バッファ-A(H<sub>2</sub>O+0.1%TFA)とバッファ-B(MeCN+0.1%TFA);グラジエント;0-3分25%バッファ-B;3-28分=25-50%バッファ-B;28-31分=95%バッファ-B;31-40分=25%バッファ-B。

40

50

## 【0065】

A D C - 1 のモノマー含量の測定

サイズ排除クロマトグラフィー ( S E C ) は、M A b P a c ( 商標 ) S E C - 1 カラム ( 5  $\mu$  M、300、7.8  $\times$  300 mm ) を用いて、複合体の結合時の凝集の程度を測定した。溶出は 20 m M M E S ナトリウム塩、150 m M N a C l、5 % M e C N、p H 6.0 で行った。図 3 に示すように、A D C - 1 は 96 % 超のモノマー含量を示した。

## 【0066】

実施例 3 . A D C - 2

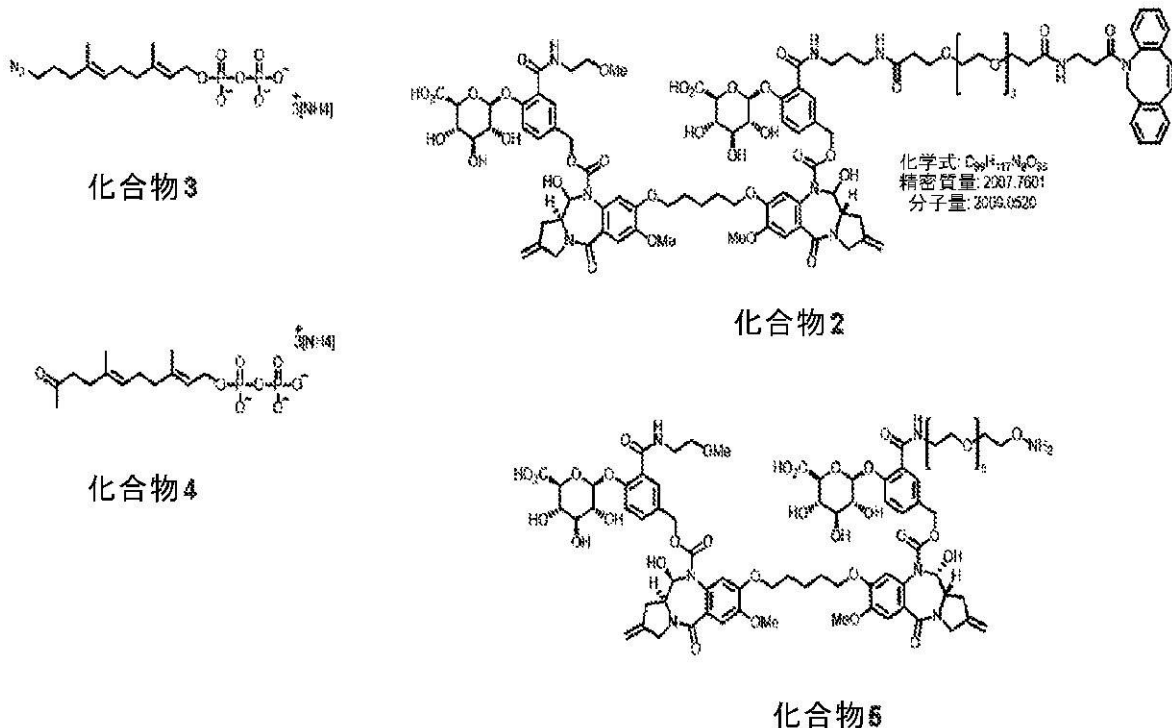
A D C - 2 は、C 末端アミノ酸配列のタンパク質プレニル化を用いて調製され、修飾イソプレノイド単位を導入することで、穏やかにかつ部位特異的に薬物を抗体に結合させることができる。抗体のこのようなプレニル化は、例えば、米国特許公開第 2012/0308584 号明細書、米国特許第 9919057 号明細書、P C T 公開国際公開第 2017/089890 号および P C T 公開国際公開第 2017/089895 号に記載されており、これらの内容は参照により本明細書に完全に組み込まれるものとする。

## 【0067】

この例では、以下に示す手順を用いてクリックケミストリーにより化合物 2 とカップリングさせるため、化合物 3 として以下に示すアジド基で官能基化したイソプレノイド誘導体で抗体を修飾した。化合物 3 は米国特許出願公開第 2012/0308584 号明細書に記載されている方法で調製した。

## 【0068】

## 【化 1 4】



## 【0069】

A D C - 2 生成

0.2  $\mu$  M F T a s e、100  $\mu$  M D T T、500 m M T r i s - H C l、0.1 m M Z n C l<sub>2</sub> および 50 m M M g C l<sub>2</sub> の存在下、p H 7.4 で、8.3 モル当量の化合物 3 で C A A X タグを持つ H C 1 L C 1 抗体を 30 で 4 時間プレニル化した。

得られた中間体をPBS、pH 7.4に脱塩した。プレニル化中間体を2.5モル当量の化合物2と0.45%DMAの存在下で、30 で2時間結合させた。ADC-2は、フェニル相HICカラム(東ソーバイオサイエンス、L×I.D 7.5 cm×7.5 mm)を用い、以下の手順でセミ分取HICにより精製した;バッファ-A(50 mMリン酸カリウム+0.5 M硫酸アンモニウム、pH 7.0)およびバッファ-B(50 mMリン酸カリウム+30%(v/v)MeCN、pH 7.0);グラジエント-0-30分=0-100%バッファ-B;30-32分=100%バッファ-B;32-32.1分=100-0%バッファ-B;32.1-49分=0%バッファ-B;流速-0.8 mL/分。サンプルをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、pH 7.4に脱塩した。

#### 【0070】

10

ADC-2の薬物抗体比(DAR)の測定

ADC-2のDAR測定は、東ソーバイオサイエンスのHICカラム(ブチル相、L×I.D 3.5 cm 4 4.6 mm、2.5 μM粒子径)を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)により行った。HICカラムを用いた複合体サンプルの分離では、図4に示すように、2つの薬物と結合した抗体に対応する1つのピークが得られた。溶出は以下の手順で行った:バッファ-A(25 mMリン酸ナトリウム、1.5 M硫酸アンモニウム、pH 7.0)およびバッファ-B(25 mMリン酸ナトリウム、25%イソプロパノール、pH 7.0);グラジエント-0-30分=0-100%バッファ-B;30-35分=0%バッファ-B。

#### 【0071】

20

ADC-2のモノマー含量の測定

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)は、MAbPac(商標)SEC-1カラム(5 μM、300、7.8×300 mm)を用いて、複合体の結合時の凝集の程度を測定した。溶出は20 mM MESナトリウム塩、150 mM NaCl、5% MeCN、pH 6.0で行った。図5に示すように、ADC-2は99%超のモノマー含量を示した。

#### 【0072】

実施例4. ADC-3

この例では、以下に示す手順を用いてオキシム形成ケミストリーにより化合物5とカップリングさせるため、化合物4として上に示したケトン基で官能基化したイソプレノイド誘導体で抗体を修飾した。化合物4は米国特許出願公開第2012/0308584号明細書に記載されている方法で調製した。化合物5は、国際公開第2018182341号に記載の方法により合成した。

30

#### 【0073】

ADC-3生成

0.2 μM FTase、250 μM DTT、500 mM Tris-HCl、0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>、50 mM MgCl<sub>2</sub>の存在下、pH 7で、6.25モル当量の化合物4でCAAXタグを持つHC1LC1抗体を30 で>18時間プレニル化した。得られた中間体をPBS、pH 7.4に脱塩した。プレニル化した中間体を10%DMSOの存在下で、10モル当量の化合物5と30 で6時間結合させた。ADC-3は、フェニル相HICカラム(東ソーバイオサイエンス、L×I.D 7.5 cm×7.5 mm)を用い、以下の手順でセミ分取HICにより精製した;バッファ-A(50 mMリン酸カリウム+0.5 M硫酸アンモニウム、pH 7.0)およびバッファ-B(50 mMリン酸カリウム+30%(v/v)MeCN、pH 7.0);グラジエント-0-30分=0-100%バッファ-B;30-32分=100%バッファ-B;32-32.1分=100-0%バッファ-B;32.1-49分=0%バッファ-B;流速-0.8 mL/分。サンプルをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、pH 7.4に脱塩した。

40

#### 【0074】

ADC-3の薬物抗体比(DAR)の測定

ADC-3のDAR測定は、東ソーバイオサイエンスのHICカラム(ブチル相、L×

50

I . D 3 . 5 c m 4 4 . 6 m m、2 . 5  $\mu$  M 粒子径) を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) により行った。H I C カラムを用いて複合体サンプルの分離では、図 6 に示すように、2 つの薬物と結合した抗体に対応する 1 つのピークが得られた。溶出は以下の手順で行った: バッファ A (25 m M リン酸ナトリウム、1 . 5 M 硫酸アンモニウム、p H 7 . 0) とバッファ B (25 m M リン酸ナトリウム、25 % イソプロパノール、p H 7 . 0) ; グラジエント - 0 - 30 分 = 0 - 100 % バッファ B ; 30 - 35 分 = 0 % バッファ B。サンプルをリン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、p H 7 . 4 に脱塩した。

#### 【0075】

A D C - 3 のモノマー含量の測定

10

サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) は、M A b P a c (商標) S E C - 1 カラム (5  $\mu$  M、300、7 . 8 x 300 m m) を用いて、複合体の結合時の凝集の程度を測定した。アイソクラティック溶出は、20 m M M E S ナトリウム塩、150 m M N a C l、5 % M e C N、p H 6 . 0 で行った。図 7 に示すように、A D C - 3 は 99 % 超のモノマー含量を示した。

#### 【0076】

実施例 5 . 対照薬カンツズマブラブタンシン

上述のように、カンツズマブラブタンシンは C a n A g を標的とするヒト化抗体 - 薬物複合体である。カンツズマブラブタンシンは、下記の化合物 6 として示される細胞毒性メイトンシノイド薬であるラブタンシンに結合したカンツズマブを含んでいる。

20

#### 【0077】

カンツズマブラブタンシンの調製

P B S バッファ中 5 . 35 m g / m L の H u C 2 4 2 (カンツズマブ抗体) を、5 % v / v 0 . 5 M ホウ酸塩 25 m M E D T A を加えて p H 8 . 2 とし、結合用に前処理した。

#### 【0078】

抗体に対して 6 当量の化合物 6 を、D M A 中の 50 m M ストックとして加え、最終的に 5 % v / v の D M A となるように追加の D M A をあらかじめ加えた。反応を 20 で 3 時間インキュベートした後、水中の 50 m M ストック溶液から抗体に対して 6 当量のグリシンを加えてクエンチした。D A R 4 . 0 の複合体を G 2 5 脱塩で精製し、次いで 30 K D a V i V a 膜濃縮器を用いて 25 m M ヒスチジン / C l、p H 6 . 0、200 m M スクロースに 6 容量のバッファ交換を行った。2 % w / v のポリソルベート 20 (P S 20) を加え、25 m M H i s / C l、p H 6 . 0、200 m M スクロース中、最終的に 0 . 02 % w / v の P S 20 を得た。

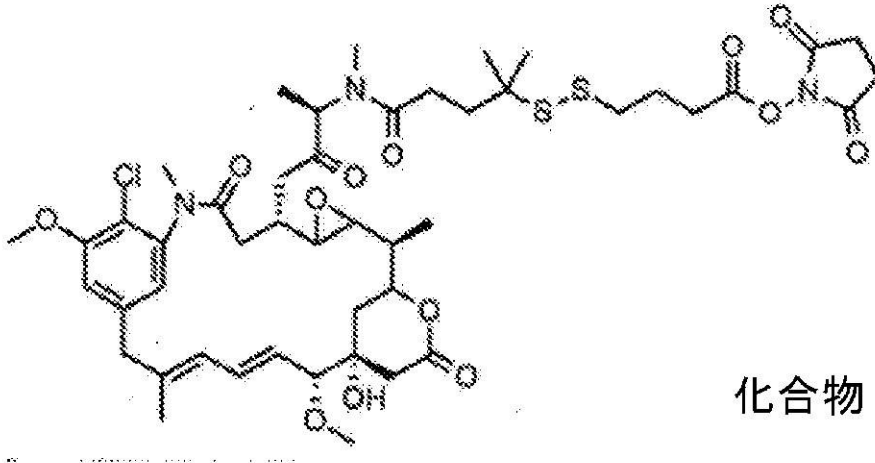
30

#### 【0079】

40

50

【化 15】



化合物 6

10

20

【0080】

UV-VISによるカンツマブラブタンシンの薬物抗体比(DAR)の測定  
 カンツマブラブタンシンのDAR値は、252nm、280nm、320nmのUV-VIS分析を用いて測定した。希釈は、製剤バッファーのみによるブランク補正を行い、1cmパス長の石英キュベットを用いて製剤バッファー中で行った。ADCサンプル中のDM4のモル濃度は、 $[DM4] = DM4 \text{モル濃度}$ 、 $A_{280} = 280 \text{nmの吸光度} - 320 \text{nmの吸光度} \times \text{希釈度}$ 、 $A_{252} = 252 \text{nmの吸光度} - 320 \text{nmの吸光度} \times \text{希釈度}$ 、 $DM4_{252} = 26159 \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ 、 $DM4_{280} = 5180 \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ として、式1に従って計算した。

【0081】

【数1】

30

$$[DM4] = \frac{A_{252} - A_{280} * \left(\frac{A_{252}}{A_{280}}\right) Ab}{\epsilon_{DM4,252} - \epsilon_{DM4,280} * \left(\frac{A_{252}}{A_{280}}\right) Ab}$$

式1：DM4の濃度(mol/L)を決定するための計算

40

【0082】

ADCサンプル中のタンパク質のモル濃度は、式1より $[Ab] = \text{タンパク質モル濃度}$ 、 $A_{280} = 280 \text{nmの吸光度} - 320 \text{nmの吸光度} \times \text{希釈度}$ 、 $DM4_{280} = 5180 \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ 、 $Ab_{280} = 223400 \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ 、 $[DM4] = \text{ADCサンプル中のDM4のモル濃度}$ とし、式2に従って算出した。

【0083】

【数2】

50

$$[Ab] = \frac{A_{280} - \epsilon_{DM4,280} * [DM4]}{\epsilon_{Ab,280}}$$

10

式 2 : DM 4 の寄与を差し引いた、ADC のタンパク質濃度 (mol / L) を決定するための計算

【 0 0 8 4 】

UV 分析で DAR を算出するには、式 3 のように、ADC サンプル中の DM 4 のモル濃度を ADC のモルタンパク質濃度で割る。

【 0 0 8 5 】

式 1 より [ DM 4 ] = ADC サンプル中の DM 4 のモル濃度、式 2 より [ A b ] = モルタンパク質濃度。DAR 4 . 0 4 が式 1 ~ 3 を用いて算出され、その結果は表 3 に示す。

【 0 0 8 6 】

【 数 3 】

20

$$DAR = \frac{[DM4]}{[Ab]}$$

式 3 : 式 1 と 2 の結果を組み合わせた UV 分析による DAR 計算

30

【 0 0 8 7 】

40

50

【表 3】

複製物	A320	A280	A252	A280-A320	A252-A320
1	0.002	0.4270	0.3280	0.425	0.326
2	0.002	0.4180	0.3210	0.416	0.319
3	0.002	0.4187	0.3220	0.417	0.320
平均	0.002	0.4212	0.3236	0.419	0.321
希釈倍率	20				
[DM4]	1.3247-04				
【抗体】	3.27333E-05				
DAR 平均	4.04				

10

20

## 【0088】

表 3 は、カンツズマブラブタンシンの 3 連 UV - vis 測定値と、式 1、2 および 3 に基づいて算出された DAR 値の要約である。

## 【0089】

対照薬カンツズマブラブタンシンのモノマー含量の測定

A DC について、サイズ排除クロマトグラフィー (T O S O H T S K g e l G 3 0 0 0 S W X L 7 . 8 m m x 3 0 c m、5 μ m カラム) を用いて、単量体含量と高分子量 (H M W) 凝集体、二量体および断片 (L M W) の存在を評価した。運転条件: 1 0 % I P A、0 . 2 M リン酸カリウム、0 . 2 5 M 塩化カリウム、p H 6 . 9 5 中、0 . 5 m L / 分で流す。カンツズマブラブタンシンの分析では、図 8 に示すように、9 8 . 6 % の単量体 A DC が示された。

30

## 【0090】

実施例 6 . フローサイトメトリーを用いた S N U - 1 6、C o l o 2 0 5、B x P C 3、H T 2 9 および N 8 7 細胞株における C a n A g 発現レベルの測定

5 つの異なる細胞株における C a n A g の発現を、フローサイトメトリーに基づく結合アッセイを用いて、フィコエリトリン (P E) 結合 H C 1 L C 1 抗体とフィコエリトリン結合アイソタイプ適合対照抗体 (B i o l e g e n d、N o : 4 0 3 5 0 4) との比較により評価した。フィコエリトリン結合 H C 1 L C 1 抗体は、P E / R - フィコエリトリン結合キット - L i g h t n i n g - L i n k (登録商標) キット (A b c a m、a b 1 0 2 9 1 8) を用い、製造の指示に従って調製した。試験した 5 つの細胞株は、S N U - 1 6 (胃がん細胞株)、C o l o - 2 0 5 (ヒト大腸がん細胞株)、B x P C - 3 (ヒト膵臓上皮腺がん細胞)、N 8 7 (ヒト胃がん細胞) および H T 2 9 (ヒト大腸腺がん細胞) であった。細胞を回収し、F A C S バッファーで再懸濁し、計数した。2 x 1 0 <sup>5</sup> 個の細胞を等分し、3 m L の F A C S バッファーで一度洗浄した。その後、細胞を 2 μ L (2 0 μ g / m L) の H C 1 L C 1 抗体 - P E またはアイソタイプ対照 - P E を含む 1 0 0 μ L の F A C S バッファーで再懸濁した。細胞を P E - 複合体とともに 4 で 3 0 分間インキュベートし、その後 3 m L の F A C S バッファーで 2 回洗浄した。細胞を 5 0 0 μ L の F A C S バッファーに再懸濁し、フローサイトメトリー解析を行った。B D Q u a n t i b r i t e (商標) P E ビーズ (B D B i o s c i e n c e s、3 4 0 4 9 5) を 0 . 5 % B S A 0 . 5 m L で再構成し、製造元の指示に従って分析した。

40

50

## 【 0 0 9 1 】

異なるHC1LC1抗体-PE濃度のPE幾何平均値をエクスポートし、Log10値を計算した。製造元から提供されたロット固有の値に基づいて、ビーズあたりのPE分子数に対するLog10値も計算した。ビーズあたりのPE分子数に対するPE幾何平均のLog10値の線形回帰を作成した。細胞あたりのPE分子をもとめるために、Log10PE幾何平均値を式に代入し、アンチLogを決定した。図9と表4に示すように、SNU-16とColo-205細胞は、細胞あたり平均1,150万個と260万個のPE分子を持つCanAgの最も高い発現者であることが判明した。HT-29は中程度のCanAg発現を示し、細胞当たりの平均PE分子は626,000個であった。BxPC-3はCanAgの低発現を示し、細胞あたりの平均PE分子は75,000個であった。N87細胞は、CanAgの発現が非常に低く、細胞あたりの平均PE分子は2,500個であった。

10

## 【 0 0 9 2 】

## 【 表 4 】

細胞株	HC1-LC1-PE (20 µg/mL)
SNU-16	11487166
Colo205	2613723
HT-29	625956.4
BxPC3	75335.7
N87	2566.6

20

30

## 【 0 0 9 3 】

表4は、SNU-16Colo205、BxPC3およびHT29細胞株におけるPE分子の計算を示す。

## 【 0 0 9 4 】

実施例7. 蛍光測定法を用いたColo205、BxPC3、HT29およびN87細胞株における - グルクロニダーゼ活性の測定

- グルクロニダーゼ活性測定キット (Abcam、Ab234625) を用いて、細胞株における - グルクロニダーゼ酵素活性を測定した。細胞を数え、 $1 \times 10^7$  個の細胞を回収した。細胞を1 mLのDPBSで1回洗浄し、 $400 \times g$  で5分間遠心した。上清を捨て、細胞を500 µLのアッセイバッファー (Colo205、HT-29およびBxPC3細胞) または300 µLのアッセイバッファー (N87細胞) で溶解し、超音波細胞破壊機でホモジナイズした。可溶化液を $10,000 \times g$ 、5分間、4 で遠心し、上清を回収した。50 µLの上清を黒色96ウェルプレートのウェルに入れた。 - グルクロニダーゼアッセイバッファーで容量を90 µLに調整した。陽性対照を - グルクロニダーゼアッセイバッファーと混ぜて90 µL溶液にした。4 - メチルウンベリフェロン (4 - MU) 標準溶液200 µMを - グルクロニダーゼアッセイバッファー中で調製し、0、0.5、1、2、4、6、8、10 µLの200 µM 4 - MU標準物質を一連のウェルに入れ、各反応物の容量を - グルクロニダーゼアッセイバッファーで100 µL

40

50

に調整して、ウェルあたりそれぞれ0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6および2.0 nmolの4-MUを生成した。基質溶液をβ-グルクロニダーゼアッセイバッファーで10倍希釈した。陽性対照およびテストサンプルに基質10 μLを加えた。蛍光(Ex/Em = 330/450 nm)は、基質添加直後から60分間、37℃で測定し、2分ごとに記録した。

#### 【0095】

結果は、図10に、4つの細胞株におけるβ-グルクロニダーゼレベルを体積で正規化して示した。HT29細胞がβ-グルクロニダーゼ酵素の活性が最も高いことがわかった。Colo-205細胞とBxPC3細胞は同程度のβ-グルクロニダーゼ活性を示し、N87細胞は最も低い酵素活性を示した。

10

#### 【0096】

##### 実施例8. *in vitro* 活性アッセイ

*in vitro* 活性は、ATPの存在量を生存細胞の尺度として定量化する発光ベースのCell Titre-Glo (CTG) アッセイ (Promega, No: G7572) を用いて評価した。細胞死滅の特異性は、同じペイロードからなる非結合性ADC対照と細胞をインキュベートすることにより示された。

#### 【0097】

抗CanAg ADCの*in vitro* 活性は、大腸がん細胞株Colo-205 (ATCC: CCL-222) およびHT-29 (ATCC: HTB-38)、膵臓腺がん細胞株BxPC-3 (ATCC: CRL-1687) およびN87胃がん (ATCC: CRL-5822) で評価した。ADC非結合対照は、ADC-3と同じリンカーと薬物の組み合わせからなる抗CD19 ADC (DAR2.0) であった。

20

#### 【0098】

細胞をトリプシン処理し、96ウェルマイクロプレート中の適切な完全培地 (Colo-205、BxPC-3、N87-20%熱不活化ウシ胎児血清 (FBS) 入りRPMI-1640; HT-29-20%熱不活化FBS入りMcCoy's-5A培地) に、37℃、5%CO<sub>2</sub>で24時間播種した。細胞は、1ウェル当たり4000 (Colo-205) または5000 (BxPC-3、HT-29、N87) 細胞の密度で、100 μLの容量で播種した。インキュベーション後、培地を除去し、新鮮な適切な増殖培地100 μLと交換した。ADC-2を適切な増殖培地において3倍または5倍に連続希釈し、100 μL中のADC濃度を以下の範囲とした: BxPC-3およびHT-29-1000 nM、333.3 nM、111.1 nM、37 nM、12.34 nM、4.1 nM、1.37 nM、0.45 nM、0.15 nM、0.051 nM; Colo-205-1000 nM、200 nM、40 nM、0.8 nM、0.16 nM、0.032 nM、0.0064 nM、0.0013 nM、0.00026 nM、0.000051 nM; N87-1000 nM、200 nM、40 nM、8 nM、1.6 nM、0.32 nM、0.06 nM、0.013 nM、0.0026 nM、0.0013 nM。

30

#### 【0099】

ADC-1、ADC-2、ADC-3の比較のために、細胞をトリプシン処理し、96ウェルマイクロプレート中の適切な完全培地 (10% FBS入りRPMI-1640) に、37℃、5%CO<sub>2</sub>で24時間播種した。細胞は1ウェル当たり4000 (Colo-205) 細胞の密度で、100 μLの容量で播種した。インキュベーション後、培地を除去し、新鮮な適切な増殖培地100 μLと交換した。ADCを適切な増殖培地において5倍に連続希釈し、100 μL中のADC濃度を次の範囲とした: 50 nM、10 nM、2 nM、0.40 nM、0.08 nM、0.016 nM、0.0032 nM、0.00064 nM、0.000128 nM、0.0000256 nM、0.0000051 nM、0.000001 nM。

40

#### 【0100】

ADC-3とカンツズマブラブタンシンおよび非結合性ADC対照細胞との比較のために、細胞をトリプシン処理し、96ウェルマイクロプレート中の適切な完全培地 (10%

50

FBS入りRPMI-1640)に、37℃、5%CO<sub>2</sub>で24時間播種した。細胞は1ウェル当たり4000(Colo-205)細胞の密度で、100μLの容量で播種した。培養後、培地を除去し、新鮮な適切な増殖培地100μLと交換した。すべてのADCを適切な増殖培地において3倍に連続希釈し、100μL中のADC濃度を次の範囲とした: 50nM、16.67nM、5.56nM、1.85nM、0.62nM、0.206nM、0.069nM、0.023nM、0.0076nM、0.0025nM、0.00085nM、0.00028nM。細胞をADCとともに3日間(72時間)インキュベートした。ADC処理後、CTG試薬を添加する前に、CTG試薬と細胞プレートを30分間RTに保った。100μLのCTG試薬を各ウェルに入れ、プレートを30秒間振盪した。その後、プレートをRTで20分間インキュベートした後、発光測定を行った。

#### 【0101】

結果を図11~16に示す。ADC-2のIC<sub>50</sub>は、Colo205、BxPC3およびN87細胞のCanAg発現レベルと相関する(図11、12および14参照)。Colo205とBxPC3細胞株は、-グルクロニダーゼの活性が同じである(図10参照)。N87細胞は、-グルクロニダーゼ活性とCanAg発現レベルの量が最も低く(図10および9参照)、ADC-2はN87細胞に対して非常に限られた活性しか示さなかった(図14参照)。HT-29に対するADC-2の活性は、HT-29におけるCanAgの発現レベルが低いにもかかわらず、Colo205細胞に対する活性と同様であった(図13参照)が、-グルクロニダーゼ活性はHT-29で最も高かった(図10参照)。このことは、-グルクロニダーゼ活性も観察されたADC活性に寄与する因子であることを示している。ADC-2は、Colo-205、HT-29およびBcPC3において100%の細胞死滅を誘導した。非結合性ADCとともに細胞をインキュベートすることで、ADC-2の特異的活性が確認された(図11~14参照)。

#### 【0102】

図15に示すように、ADC1、ADC-2およびADC-3はいずれもColo205細胞に対して同様の強力な活性を示し、これは、ADCの*in vitro*活性がこの細胞株で使用されたコンジュゲーション化学とは無関係であることを示している。重要なことは、カンツズマブラブタンシンはColo205がん細胞を死滅させる効率が低く、75%の細胞しか死滅しなかったことである(図16参照)。

#### 【0103】

実施例9. Colo-205異種移植片モデルにおける*in vivo*有効性研究  
ADC1、ADC-2、ADC-3およびカンツズマブラブタンシンを、Colo-205異種移植片を有する雌性CB17-SCIDマウスで評価した。マウスに、BDマトリゲルと1:1で混合した0.2mLのDPBS中に5×10<sup>6</sup>個のColo-205細胞を右脇腹に皮下接種した。担がんマウスを5匹ずつの群に無作為に割り付け、平均腫瘍体積が約170mm<sup>3</sup>(カンツズマブラブタンシン)または190mm<sup>3</sup>(ADC-1、ADC-2、ADC-3)に達した時点で、ADCの単回静脈内投与、または代わりに溶媒溶液(30mMヒスチジン、200mMソルビトール、0.02%PS20(w/v))で処置した。Colo-205異種移植片試験では、ADC-1、ADC-2、ADC-3については1mg/kg(13nmol薬物/kg)の複合体用量を、カンツズマブラブタンシンについては2mg/kg(53nmol薬物/kg)の複合体用量を使用した。腫瘍サイズはキャリパーを用いて二次元的に毎週3回測定し、体積は式:

[数4]

$$V = 0.5 a \times b^2$$

(式中、aおよびbはそれぞれ腫瘍の長径および短径である)を用いてmm<sup>3</sup>で表した(図17A、18Aおよび19Aを参照)。次に腫瘍サイズをTGI(%)値の計算に用いた(表5参照)。抗腫瘍効果を表すTGIは、式

[数5]

$$TGI(\%) = [1 - (V_{\text{処置-t}} - V_{\text{処置-1}}) / (V_{\text{対照-t}} - V_{\text{対照-1}})] \times 100$$

0

を用いて計算し、式中、 $V_{処置-1}$ および $V_{対照-1}$ は、群分けした日の処置群および対照群の平均体積であり； $V_{処置-t}$ および $V_{対照-t}$ は、所与の日の処置群および対照群の平均体積である。腫瘍体積が $2000\text{ mm}^3$ に達した時点で動物を安楽死させた。体重も、化合物の毒性の指標として週3回測定した（図17B、18Bおよび19B参照）。

【0104】

Colo205腫瘍異種移植片に対するADCの*in vivo*効果を図17、18および19に示す。ADC-1、ADC-2およびADC-3は、 $1\text{ mg/kg}$ （ペイロード $13\text{ nmol/kg}$ （ADC-2およびADC-3）またはペイロード $15\text{ nmol/kg}$ （ADC-1）で、観察可能な毒性はなく、実質的な腫瘍増殖抑制（それぞれ79%、103%および102%のTGI）を誘導した（例えば図17および18ならびに表5を参照）。カンツズマブラブタンシンは、薬物負荷量としてADC-2およびADC-3の $4\text{ mg/kg}$ に相当する $2\text{ mg/kg}$ （ペイロード $53\text{ nmol/kg}$ ）で40%の腫瘍増殖阻害を示した（図19Aおよび表5参照）。

10

【0105】

【表5】

ADCタイプ	15日目のTGI [%]
カンツズマブラブタンシン (2 mg/kg, 薬物 53 nmol/kg)	40*
ADC-1 (1 mg/kg, 15 nmol/kg)	79
ADC-2 (1 mg/kg, 薬物 13 nmol/kg)	103
ADC-3 (1 mg/kg, 薬物 13 nmol/kg)	102

20

【0106】

表5はColo-205異種移植片モデルでテストしたADCの試験15日目の腫瘍増殖抑制（TGI）を示す。\*カンツズマブラブタンシンのTGI計算は16日目に基づく。

30

【0107】

実施例10. BxPC3異種移植片モデルにおける*in vivo*有効性研究

ADC-2、ADC-3およびカンツズマブラブタンシンを、BxPC3異種移植片を有する雌性CB17 SCIDマウスで評価した。マウスに、50%BDマトリゲルを含む $0.2\text{ mL}$ のDPBS中、 $5 \times 10^6$ 個のBxPC3細胞を右脇腹に皮下接種した。担がんマウスを5匹ずつの群に無作為に割り付け、平均腫瘍体積が約 $150 \sim 180\text{ mm}^3$ に達した時点で、ADCの単回静脈内投与、または代わりにPBS pH7.4（図20参照）または $30\text{ mM}$ ヒスチジン、 $200\text{ mM}$ ソルビトール、 $0.02\%$ PS20（w/v）（図21参照）を含む溶媒溶液で処置した。ADC-2およびADC-3については $0.4\text{ mg/kg}$ （結合薬 $5.3\text{ nmol/kg}$ ）、 $1\text{ mg/kg}$ （結合薬 $13\text{ nmol/kg}$ ）の複合体用量を、カンツズマブラブタンシンについては $0.2\text{ mg/kg}$ （結合薬 $5.3\text{ nmol/kg}$ ）および $0.5\text{ mg/kg}$ （結合薬 $13\text{ nmol/kg}$ ）の複合体用量を使用した。腫瘍サイズはキャリパーを用いて2次元的に週3回測定し、体積は式：

40

[数6]

$$V = 0.5 a \times b^2$$

（式中、aおよびbはそれぞれ腫瘍の長径および短径である）

を用いて $\text{mm}^3$ で表した（図20Aおよび21A参照）。次に腫瘍サイズをTGI（%）値の計算に用いた（表6参照）。抗腫瘍効果を表すTGIは、式

[数7]

50

$$TGI(\%) = [1 - (V_{\text{処置-t}} - V_{\text{処置-1}}) / (V_{\text{対照-t}} - V_{\text{対照-1}})] \times 100$$

を用いて計算し、式中、 $V_{\text{処置-1}}$ および $V_{\text{対照-1}}$ は、群分けした日の処置群および対照群の平均体積であり； $V_{\text{処置-t}}$ および $V_{\text{対照-t}}$ は、所与の日の処置群および対照群の平均体積である。腫瘍体積が $2000\text{ mm}^3$ に達した時点で動物を安楽死させた。体重も、化合物の毒性の指標として週3回測定した（図20Bおよび21B参照）。

【0108】

B x P C 3 腫瘍異種移植片に対するADCの*in vivo*効果を図20～21に示す。ADC-2は $0.4\text{ mg/kg}$ （結合薬 $5.3\text{ nmol/kg}$ ）および $1\text{ mg/kg}$ （結合薬 $13\text{ nmol/kg}$ ）などの用量で腫瘍増殖阻害（ $66.7$ および $107\%$  TGI）を誘導した（図20Aおよび表6参照）。ADC-3によるB x P C 3異種移植片の処置は、 $0.4\text{ mg/kg}$ （結合薬 $5.3\text{ nmol/kg}$ ）および $1\text{ mg/kg}$ （結合薬 $13\text{ nmol/kg}$ ）の用量で、ADC-2よりも低い活性（ $57\%$ および $101\%$  TGI）を示した。対照薬カンツズマブラブタンシン、 $0.2\text{ mg/kg}$ （結合薬 $5.3\text{ nmol/kg}$ ）および $0.5\text{ mg/kg}$ （結合薬 $13\text{ nmol/kg}$ ）は、同用量のADC-2およびADC-3処置と比較して弱い抗腫瘍応答を示した（図20参照）。

10

【0109】

対照薬カンツズマブラブタンシンでは、 $2\text{ mg/kg}$ （薬物 $53\text{ nmol/kg}$ ）の用量で腫瘍の完全な抑制を誘導したが、32日後に腫瘍が再増殖し始めたため、抗がん活性は維持されなかった（図21A参照）。

20

【0110】

表6は、B x P C 3異種移植片モデルで試験したADCの研究29日目または32日目の腫瘍増殖抑制（TGI）を示している。

【0111】

【表6】

ADC名	29または32*日目の TGI [%]
ADC-2 (0.4 mg/kg, 5.3 nmol/kg)	66.7
ADC-2 (1 mg/kg, 13 nmol/kg)	107
ADC-3 (0.4 mg/kg, 薬物 5.3 nmol/kg)	57.6
ADC-3 (1 mg/kg, 薬物 13 nmol/kg)	101.8
カンツズマブラブタンシン (0.2 mg/kg, 薬物 5.3 nmol/kg)	24.3
カンツズマブラブタンシン (0.5 mg/kg, 薬物 13 nmol/kg)	34.6
カンツズマブラブタンシン (2 mg/kg, 薬物 53 nmol/kg)	104*

30

40

【0112】

実施例11. NCI-N87異種移植片モデルを用いた*in vivo*有効性試験  
ADC-3、ADC非結合対照、カンツズマブラブタンシンおよびエンハーツを、NCI-N87胃がん異種移植片を持つ雌性CB17SCIDマウスで評価した。

【0113】

エンハーツはトラスツズマブデルクステカンの商品名であり、ヒト化抗Her2抗体トラスツズマブ（ハーセプチン）とトポイソメラーゼI阻害剤デルクステカン（DAR8.0）を共有結合させたADCである。エンハーツは乳がん、胃がんまたは胃もしくは胃食

50

道腺がんの治療向けに米国食品医薬品局（FDA）より承認されている。

【0114】

ADC非結合対照は、ADC-3と同じリンカーと薬剤の組み合わせからなる抗CD19 ADC（DAR2.0）であった。マウスに、50%BDマトリゲルを含む0.1mLのDPBS中、 $5 \times 10^6$ 個のNCI-N87細胞を右脇腹に皮下接種した。担がんマウスを5匹ずつの群に無作為に割り付け、平均腫瘍体積が約170-175mm<sup>3</sup>に達した時点で、ADCの単回静脈内投与、または代わりに溶媒溶液（30mMヒスチジン、200mMソルビトール、0.02%PS20（w/v））で処置した。ADC-3については0.2mg/kg（結合薬2.6nmol/kg）、0.5mg/kg（結合薬6.7nmol/kg）および1mg/kg（結合薬13nmol/kg）の複合体用量を；ADC非結合対照については0.5mg/kg（結合薬6.7nmol/kg）および1mg/kg（結合薬13nmol/kg）の複合体用量を；エンハーツについては0.2mg/kg（結合薬10nmol/kg）、0.5mg/kg（結合薬26nmol/kg）および1mg/kg（結合薬53nmol/kg）の複合体用量を；カンツズマブラプタンシンについては2mg/kg（結合薬53nmol/kg）の複合体用量を使用した。腫瘍サイズはキャリパーを用いて2次元的に週3回測定し、体積は式：

[数8]

$$V = 0.5 a \times b^2$$

（式中、aおよびbはそれぞれ腫瘍の長径および短径である）を用いてmm<sup>3</sup>で表した（図22A、23AおよびB参照）。次に腫瘍サイズをTGI（%）値の計算に用いた（表7参照）。抗腫瘍効果を表すTGIは、式

[数9]

$$TGI(\%) = [1 - (V_{\text{処置-t}} - V_{\text{処置-1}}) / (V_{\text{対照-t}} - V_{\text{対照-1}})] \times 100$$

を用いて計算し、式中、 $V_{\text{処置-1}}$ および $V_{\text{対照-1}}$ は、群分けした日の処置群および対照群の平均体積であり； $V_{\text{処置-t}}$ および $V_{\text{対照-t}}$ は、所与の日の処置群および対照群の平均体積である。腫瘍体積が2000mm<sup>3</sup>に達した時点で動物を安楽死させた。体重も、化合物の毒性の指標として週3回測定した（図22B、23CおよびD参照）。

【0115】

NCI-N87腫瘍異種移植片に対するADCのin vivo効果を図22および23に示す。興味深いことに、上述のNCI-N87細胞に対するADC-2のin vitro解析では、in vitro細胞培養でのCanAg発現の欠如により特異的活性は示されなかった（図14および9参照）。しかしながら、このin vivo異種移植片では、ADC-3は、ADC非結合対照の反応と比較して、NCI-N87において標的特異的活性を示した。このことは、in vitroで培養したN87細胞とin vivo異種移植片におけるCanAg発現の違いを示している。

【0116】

ADC-3は0.2mg/kg（結合薬2.6nmol/kg）という低用量で53%の特異的腫瘍増殖抑制を誘導した（図22Aおよび表7参照）。対照的に、カンツズマブラプタンシンおよびエンハーツは、それぞれ43%および46%の腫瘍増殖抑制を達成するのに、より高用量（すなわち、カンツズマブラプタンシンでは2mg/kg（薬物53nmol/kg）；エンハーツでは0.5mg/kg（薬物26nmol/kg））を必要とした（図23A-B、表7参照）。さらに、1mg/kg用量のエンハーツは99%のTGIを誘導したが、28日後に腫瘍の再増殖が観察された。一方、0.5mg/kg（結合薬6.7nmol/kg）のADC-3用量および1mg/kg（薬物13nmol/kg）のADC-3用量は40日目までに100%のTGIを誘導し、1mg/kg用量ではその後の腫瘍再発は認められなかった（図22Aおよび表7参照）。

【0117】

10

20

30

40

50

【表 7】

ADC名	33日目のTGI [%]
ADC-3 (0.2 mg/kg, 2.6 nmol/kg)	53
ADC-3 (0.5 mg/kg, 6.7 nmol/kg)	104
ADC-3 (1 mg/kg, 薬物 13 nmol/kg)	108
非結合ADC対照 (0.5 mg/kg, 6.7 nmol/kg)	24
非結合ADC対照 (1 mg/kg, 薬物 13 nmol/kg)	48
カンツズマブラブタンシン (2mg/kg, 薬物 53 nmol/kg)	43
エンハーツ (0.2 mg/kg, 10 nmol/kg)	4
エンハーツ (0.5 mg/kg, 26 nmol/kg)	46
エンハーツ (1 mg/kg, 53 nmol/kg)	99

10

## 【0118】

表7は、研究33日目にNCI-N87異種移植片モデルで試験したADCの腫瘍増殖抑制(TGI)を示す。

## 【0119】

したがって、試験したすべての細胞株において、本発明によるADCは、対照薬の抗CanAg ADCであるカンツズマブラブタンシンと比較して優れたTGIを示した。さらに、ADC-3は、胃癌異種移植片において、胃癌の治療に使用するためにFDAに承認されたADCであるエンハーツと比較して、約8分の1の結合薬濃度で同等のTGIを示した。さらに、エンハーツはより高い結合薬濃度(すなわち1mg/kg、53nmol/kg)で99%のTGIを誘導したものの、腫瘍の再増殖が投与後28日目に観察されたのに対し、1mg/kg(薬物13nmol/kg)用量のADC-3投与後55日目でも観察可能な腫瘍の再増殖は検出されなかった。この結果は、使用された薬物の相対的な濃度、つまり、ADC-3が13nmol/kg結合薬であるのに対しエンハーツは53nmol/kg結合であることを考慮すると、さらに驚くべき結果である。

20

## 【0120】

当業者であれば、上記の実施形態は例示として記載したものであって、限定的な意味ではなく、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正が可能であることが理解されよう。

30

## 【0121】

## 配列表

以下の配列表では、シグナルペプチドに属するアミノ酸を太字で示す。

## 【0122】

## 1. ヒト化に使用されたマウスの親配列

SEQ ID NO 1 - マウスc242 HC (CDR領域は下線で示す)

**MDWLRNLLFLMAAAQSIQAQVQLVQSGPELKKPGETVKISKASDYTFYYGMN**  
**VWKQAPGKGLKWMGWIDTTTGEPTYAEDFKGRIAFSLETSASTAYLQIKNLKNET**  
**ATYFCARRGPYNWYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVYP**

40

## 【0123】

SEQ ID NO 2 - マウスc242 LC (CDR領域は下線で示す)

**MRCLAEFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSPVPTPGESVSISCRSSKLLHNSGNTY**  
**LYWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLVSGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC**  
**LQHLEYPTFGPGTKLELKRADAAPT**

## 【0124】

50

2 . h I g G 1 ( G 1 m 1 7 ) バックボーン中のマウス c 2 4 2 配列

SEQ ID NO 3 - p L E V 1 2 3 - 親マウスHC - h I g G 1 - マウスAb ( Mu )

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASDYTFYY
GMNWWKQAPGKGLKWMGWIDTTTGEPTYAEDFKGRIAFSLETSASTAYLQIKNLK
NEDTATYFCARRGPYNWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\*

10

【 0 1 2 5 】

SEQ ID NO 4 - p L E V 1 2 3 - 親マウスLC - h K a p p a

METDTLLLWVLLLVPGSTGDIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKLLHSNGNT
YLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLVSGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYY
CLQHLEYPFTFGPGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC\*

20

【 0 1 2 6 】

3 . C a n A g 標的に対するヒト化抗体

SEQ ID NO 5 - p L E V 1 2 3 - H C 1 - h I g G 1 ( G 1 m 1 7 )

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASDYTFY
YGINWVRQAPGQGLEWMGWIDTTTGEPNYAQKLQGRVTFITLDTASTAYMELRSL
RSDDTAVYYCARRGPYNWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN

30

QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\*

【 0 1 2 7 】

SEQ ID NO 6 - p L E V 1 2 3 - H C 2 - h I g G 1 ( G 1 m 1 7 )

40

**MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASDYTFTY**  
**YGMNWVRQAPGQGLEWMGWIDTTTGEPSYAQKFQGRVTFTLDTASTVYMESS**  
**LRSEDTAVYYCARRGPYNWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG**  
**GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL**  
**GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD**  
**TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS**  
**VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK**  
**NQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR**  
**WQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\***

10

**【 0 1 2 8 】**

**SEQ ID NO 7 - pLEV 1 2 3 - HC 3 - h I g G 1 ( G 1 m 1 7 )**

**MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASDYTFTY**  
**YGINWVRQATGQGLEWMGWIDTTTGEPTYAQKFQGRVTFTLETSISTAYMELSSL**  
**RSEDTAVYYCARRGPYNWYFDVWGAGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT**  
**AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT**  
**QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**  
**MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL**  
**TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ**  
**VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ**  
**QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\***

20

**【 0 1 2 9 】**

**SEQ ID NO 8 - pLEV 1 2 3 - LC 1 - h K a p p a**

**METDTLLLWVLLWVPGSTGDIVMTQTPLSLPVTGPASPISCRSSKSLLSHNGNT**  
**YLYWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY**  
**YCLQHLEYPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE**  
**AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH**  
**QGLSSPVTKSFNRGEC\***

30

**【 0 1 3 0 】**

**SEQ ID NO 9 - pLEV 1 2 3 - LC 2 - h K a p p a**

**METDTLLLWVLLWVPGSTGDIVMTQSPLSLPVTGPASPISCRSSKSLLSHNGNT**  
**YLYWYLQKPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY**  
**CLQHLEYPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA**  
**KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ**  
**GLSSPVTKSFNRGEC\***

40

**【 0 1 3 1 】**

**SEQ ID NO 10 - pLEV 1 2 3 - LC 3 - h K a p p a**

**METDTLLLWVLLWVPGSTGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSKSLLSHNGNT**  
**YLYWYLQKPGQSPQLLIYRMSNLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY**  
**CLQHLEYPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA**  
**KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ**  
**GLSSPVTKSFNRGEC\***

50

## 【 0 1 3 2 】

4 . H u C 2 4 2 ( カンツズマブ ) 抗体

S E Q I D N O 1 1 - H - G A M M A - 1

QVQLVQSGAEVKKPGETVKISCKASDYFTFTYYGMNWWKQAPGQGLKWMGWIDTT  
 TGEPTYAQKFQGRIFASLETSASTAYLQIKSLKSEDTATYFCARRGPYNWYFDVWG  
 QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC  
 DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN  
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP  
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS  
 LSPGK

10

## 【 0 1 3 3 】

S E Q I D N O 1 2 - L - K A P P A

DIVMTQSPLSVPVTPGEPVVISCRSSKSLLSHNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRM  
 SNLVSGVPDFRFSGSGSFTAFTLRISRVEAEDVGVYVYCLQHLEYPTFTFGPGTKLELK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
 VTEQDSKDYSLSTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

## 【 0 1 3 4 】

5 . L C の C 末 端 に C A A X タ グ ( G G G G G G C V I M ) を 持 つ ヒ ト 化 抗 体

S E Q I D N O 1 3 - p L E V 1 2 3 - H C 1 - h I g G 1 ( G 1 m 1 7 )

**MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASDYFTY**  
 YGINWVRQAPGQGLEWMGWIDTTTGEPNYAQKLQGRVTFTLDTASTAYMELRSL  
 RSDDTAVYYCARRGPYNWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG  
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT  
 LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\*

30

## 【 0 1 3 5 】

S E Q I D N O 1 4 - p L E V 1 2 3 - H C 2 - h I g G 1 ( G 1 m 1 7 )

**MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASDYFTY**  
 YGMNWRQAPGQGLEWMGWIDTTTGEPSYAQKFQGRVTFTLDTASTVYMELSS  
 LRSEDTAVYYCARRGPYNWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG  
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL  
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV  
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK  
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\*

40

## 【 0 1 3 6 】

50

SEQ ID NO 15 - pLEV123 - HC3 - hI g G 1 ( G 1 m 1 7 )

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASDYTTY  
YGINWVRQATGQGLEWMGWIDTTTGEPTYAQKFQGRVFTLETISISTAYMELSSL  
RSEDTAVYYCARRGPYNWYFDVWGAGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT  
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT

QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVL  
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQ  
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\*

10

【 0 1 3 7 】

SEQ ID NO 16 - pLEV123 - LC1 - h K a p p a

METDTLLLWVLLWVPGSTGDIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHNSGNT  
YLYWYLQKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY  
YCLQHLEYPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE  
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH  
QGLSSPVTKSFNRGECGGGGGGGCVIM

20

【 0 1 3 8 】

SEQ ID NO 17 - pLEV123 - LC2 - h K a p p a

METDTLLLWVLLWVPGSTGDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHNSGNT  
YLYWYLQKPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY  
CLQHLEYPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
GLSSPVTKSFNRGECGGGGGGGCVIM

30

【 0 1 3 9 】

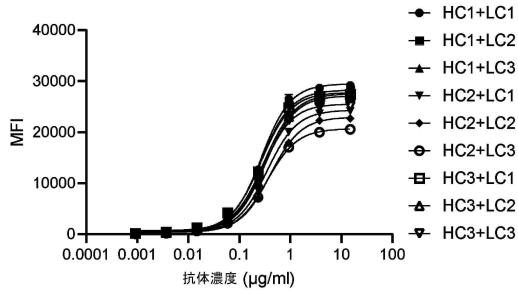
SEQ ID NO 18 - pLEV123 - LC3 - h K a p p a

METDTLLLWVLLWVPGSTGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSKSLHNSGNT  
YLYWYLQKPGQSPQLLIYRMSNLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY  
CLQHLEYPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
GLSSPVTKSFNRGECGGGGGGGCVIM

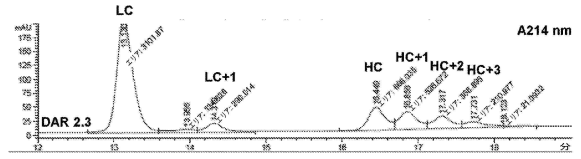
40

【 図 面 】

【 図 1 】



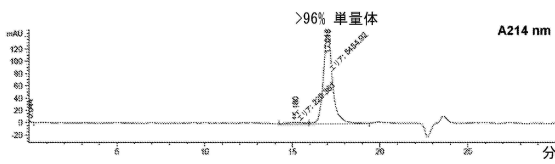
【 図 2 】



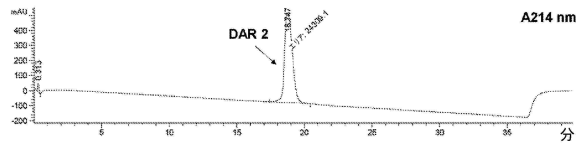
10

20

【 図 3 】



【 图 4 】

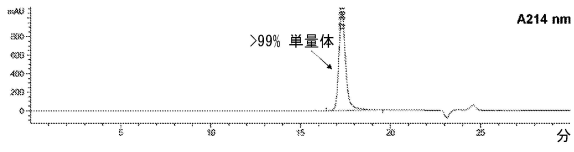


30

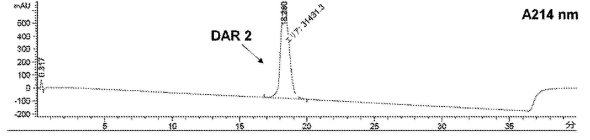
40

50

【 5 】

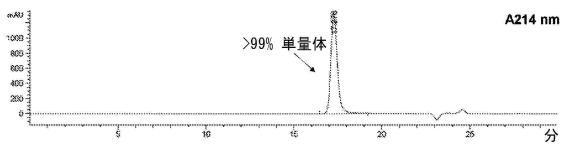


【 6 】

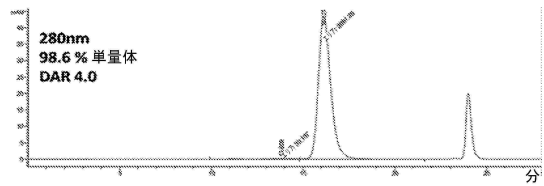


10

【 7 】



【 8 】



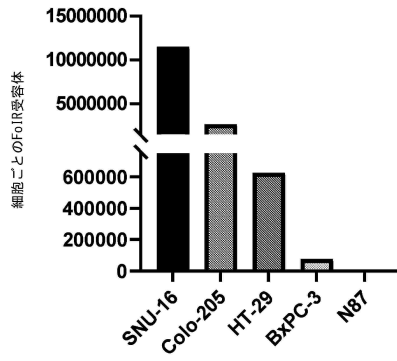
20

30

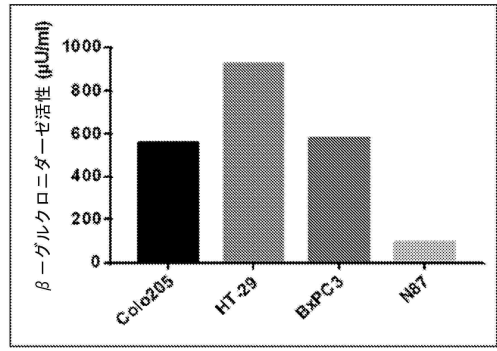
40

50

【 図 9 】



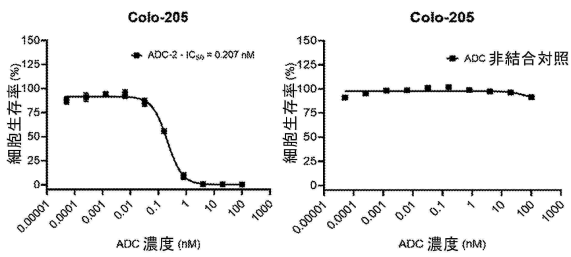
【 図 10 】



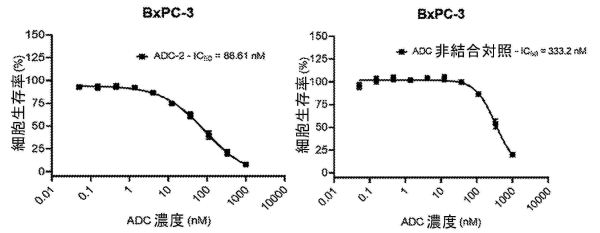
10

20

【 図 11 】



【 図 12 】

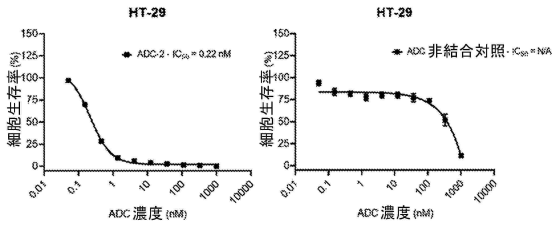


30

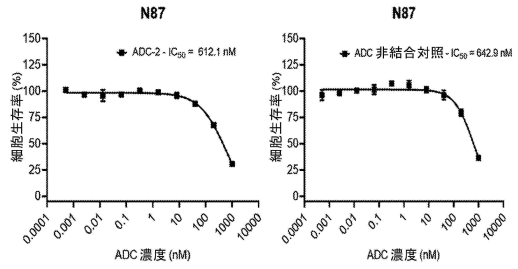
40

50

【 図 1 3 】



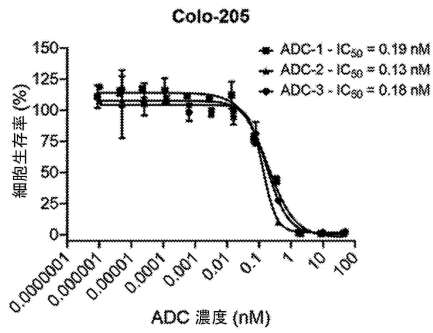
【 図 1 4 】



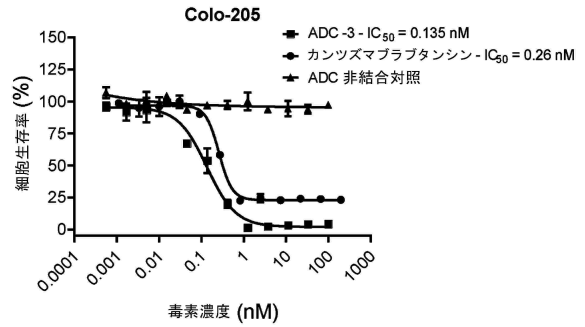
10

20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

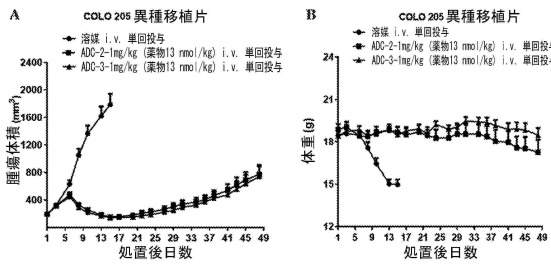


30

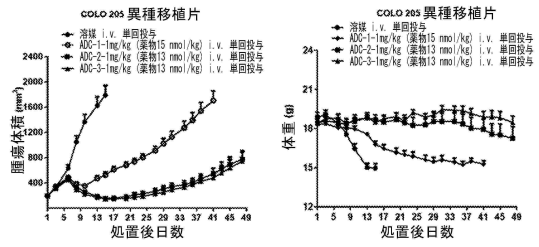
40

50

【 図 1 7 】

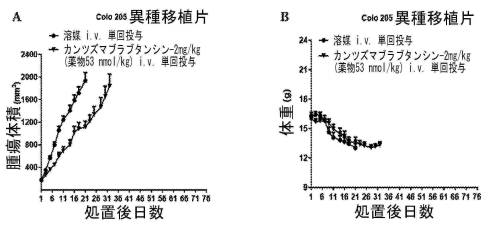


【 図 1 8 】

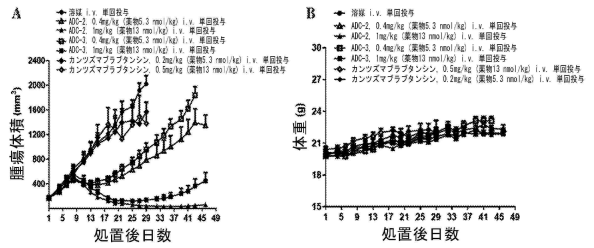


10

【 図 1 9 】

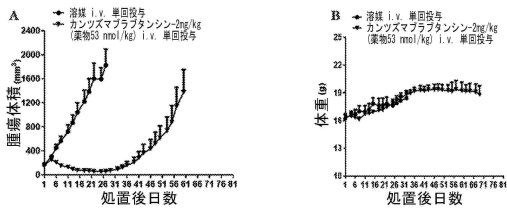


【 図 2 0 】

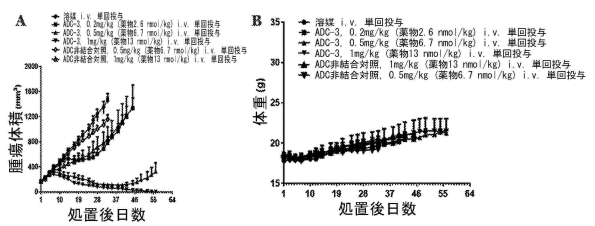


20

【 図 2 1 】



【 図 2 2 】

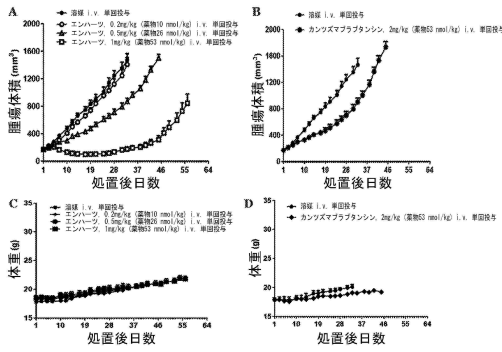


30

40

50

【 図 2 3 】



【 図 2 4 】

HC アライメント

HC3 MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASDYITFTYYGINW 60  
 HC1 MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASDYITFTYYGINW 60  
 HC2 MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASDYITFTYYGINW 60

HC3 VRQATDQGLEWNGWIDITITTEPTIAQKFGGRVFTTLETISSTAYMELSSLRSEDVAIYYC 120  
 HC1 VRQAPGQGLEWNGWIDITITTEPTIAQKFGGRVFTTLETISSTAYMELSSLRSDDTAVIYYC 120  
 HC2 VRQAPGQGLEWNGWIDITITTEPTIAQKFGGRVFTTLETISSTAYMELSSLRSEDVAIYYC 120

HC3 ARRGPNWYFDVWGAGTLVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV 180  
 HC1 ARRGPNWYFDVWGAGTLVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV 180  
 HC2 ARRGPNWYFDVWGAGTLVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV 180

HC3 TVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK 240  
 HC1 TVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK 240  
 HC2 TVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK 240

HC3 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK 300  
 HC1 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK 300  
 HC2 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK 300

HC3 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK 360  
 HC1 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK 360  
 HC2 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK 360

HC3 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT 420  
 HC1 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT 420  
 HC2 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT 420

HC3 PPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG- 472  
 HC1 PPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG- 472  
 HC2 PPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG- 472

LC アライメント

LC1 METDTLLWLLLLWPGSTGDIVMTQTPLSLVPTGPGEPAISCRSSKLLHNSGNTLYW 60  
 LC2 METDTLLWLLLLWPGSTGDIVMTQTPLSLVPTGPGEPAISCRSSKLLHNSGNTLYW 60  
 LC3 METDTLLWLLLLWPGSTGDIVMTQTPLSLVPTGPGEPAISCRSSKLLHNSGNTLYW 60

LC1 YLQKPGQSPQLLYRMSNLRASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYYCLOHLEVP 120  
 LC2 YLQKPGQSPQLLYRMSNLRASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYYCLOHLEVP 120  
 LC3 YLQKPGQSPQLLYRMSNLRASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVIYYCLOHLEVP 120

LC1 ITFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ 180  
 LC2 ITFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ 180  
 LC3 ITFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ 180

LC1 SGNQSQSVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 239  
 LC2 SGNQSQSVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 239  
 LC3 SGNQSQSVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 239

10

20

30

40

50

【 配列表 】

2025509152000001.xml

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和 7 年 2 月 5 日 ( 2 0 2 5 . 2 . 5 )

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2025509152000001.xml

10

20

30

40

50

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No <b>PCT/GB2023/050522</b>
--

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>INV. A61K47/68 A61P35/00</b> <b>ADD.</b>  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) <b>A61K</b>												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <b>EPO-Internal</b>												
<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 A	<b>EP 3 950 061 A1 (DAIICHI SANKYO CO LTD [JP]) 9 February 2022 (2022-02-09) paragraphs [0245], [0246] claims 1-15</b> -----	<b>1-9, 11-18 10</b>										
Y A	<b>EP 3 604 311 A1 (LEGOCHEM BIOSCIENCES INC [KR]) 5 February 2020 (2020-02-05) compound 171 on page 79 examples 8, 58</b> -----	<b>1-9, 11-18 10</b>										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report										
<b>2 June 2023</b>		<b>13/06/2023</b>										
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <b>Birikaki, LEMONIA</b>										

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
**PCT/GB2023/050522**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
<b>EP 3950061</b>	<b>A1</b>	<b>09-02-2022</b>	<b>CN 113631229 A</b>	<b>09-11-2021</b>		
			<b>EP 3950061 A1</b>	<b>09-02-2022</b>		
			<b>JP WO2020196474 A1</b>	<b>01-10-2020</b>		
			<b>KR 20210143237 A</b>	<b>26-11-2021</b>		
			<b>TW 202102228 A</b>	<b>16-01-2021</b>		
			<b>US 2022168440 A1</b>	<b>02-06-2022</b>		
			<b>WO 2020196474 A1</b>	<b>01-10-2020</b>		
-----						
<b>EP 3604311</b>	<b>A1</b>	<b>05-02-2020</b>	<b>AU 2018246806 A1</b>	<b>17-10-2019</b>		
			<b>BR 112019020136 A2</b>	<b>22-04-2020</b>		
			<b>CA 3058360 A1</b>	<b>04-10-2018</b>		
			<b>CN 109790171 A</b>	<b>21-05-2019</b>		
			<b>EP 3604311 A1</b>	<b>05-02-2020</b>		
			<b>JP 2020512270 A</b>	<b>23-04-2020</b>		
			<b>KR 20180110645 A</b>	<b>10-10-2018</b>		
			<b>KR 20180110649 A</b>	<b>10-10-2018</b>		
			<b>KR 20210058795 A</b>	<b>24-05-2021</b>		
			<b>KR 20220010048 A</b>	<b>25-01-2022</b>		
			<b>US 2022218830 A1</b>	<b>14-07-2022</b>		
			-----			

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

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

ヨークシャー ヨーク ハクスビー イーストフィールド アヴェニュー 1 1 0

(72)発明者 ダニエル ジョン ウィリアムソン

イギリス国 エルエイ6 2 ピーピー ランカシャー ラプトン トンプソン フォールド 1

(72)発明者 ユッタ デッカー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 2 0 レキシントン イートン ロード 1 6

(72)発明者 ユスティナ ミスリーヴィ

イギリス国 エヌイー5 3 キューユー タイン アンド ウィア ニューカッスル アボン タイン ライラック クレセント 2 3

(72)発明者 ロバート ルッツ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 7 7 8 ウェイランド オールド コネチカット パス 2 1 8

Fターム(参考) 4C076 AA12 AA95 BB13 CC27 EE59

4C085 AA21 BB01 EE01 GG02

4H045 AA11 AA30 BA10 BA72 DA76 EA20 FA74