

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7179719号

(P7179719)

(45)発行日 令和4年11月29日(2022.11.29)

(24)登録日 令和4年11月18日(2022.11.18)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

Z N A

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 21 (全74頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-516285(P2019-516285)

(86)(22)出願日 平成29年6月6日(2017.6.6)

(65)公表番号 特表2019-527561(P2019-527561
A)

(43)公表日 令和1年10月3日(2019.10.3)

(86)国際出願番号 PCT/GB2017/051638

(87)国際公開番号 WO2017/212250

(87)国際公開日 平成29年12月14日(2017.12.14)

審査請求日 令和2年5月27日(2020.5.27)

(31)優先権主張番号 1609866.7

(32)優先日 平成28年6月6日(2016.6.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(31)優先権主張番号 1708105.0

(32)優先日 平成29年5月19日(2017.5.19)

最終頁に続く

(73)特許権者 514321622

ポリセリックス・リミテッド

イギリス・C B 2 2・3 A T・ケンブリ

ッジ・バブラハム・バブラハム・リサー

チ・キャンパス・(番地なし)

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 ティモシー・デイヴィッド・ジョーンズ

イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2

2・3 A J・ケンブリッジ・バブラハム

・ブリック・ロウ・27

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体、その使用及びそのコンジュゲート

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

PSMAと結合し、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとを含む抗体又は抗体の抗原結合部分であって、前記重鎖可変ドメインが配列番号13で示される配列を含み、前記軽鎖可変ドメインが配列番号18で示される配列を含む、抗体又はその抗原結合部分。

【請求項2】

請求項1に記載の抗体又はその抗原結合部分をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項3】

請求項2に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項4】

請求項3に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項5】

請求項1に記載の抗体又はその抗原結合部分と、ペイロードとを含む、抗体コンジュゲート。

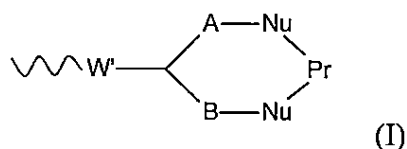
【請求項6】

前記ペイロードが、治療剤、診断剤若しくは標識剤及び/又はポリマーである、請求項5に記載の抗体又はその抗原結合部分を含む抗体コンジュゲート。

【請求項7】

前記ペイロードが、一般式：

【化 1】



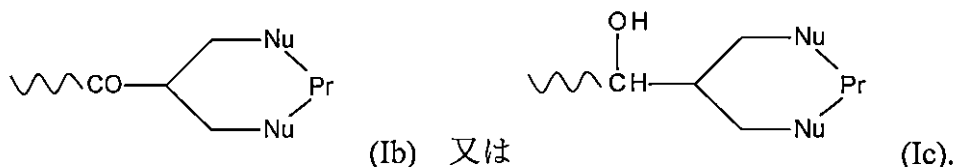
(式中、Prは、前記抗体又はその抗原結合部分を表し、各Nuは、前記抗体又はその抗原結合部分中に存在する又はそれに結合されている求核剤を表し、A及びBの各々は、C₁~4アルキレン又はアルケニレン鎖を独立して表し、W'は、電子求引基を表すか又は電子吸引基の還元により得られる基を表す)

を有する結合部分を介して前記抗体又はその抗原結合部分へ結合している、請求項5または6に記載の抗体コンジュゲート。

【請求項 8】

前記結合部分が、式：

【化 2】



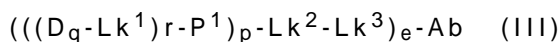
を有する、請求項7に記載のコンジュゲート。

【請求項 9】

Nuが、硫黄原子又はアミン基；又は前記抗体又はその抗原結合部分に結合されているポリヒスチジntag中に存在するヒスチジン残基中に存在するイミダゾール基を表す、請求項7または8に記載の抗体コンジュゲート。

【請求項 10】

一般式：



(式中、

Dは、ペイロードを表し；

qは、1~10の整数を表し；

Lk¹は、リンカーを表し；

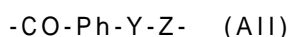
rは、1~10の整数を表し；

P¹は、結合又はc個の基-P²-NH-を表し、ここでcは、2~11であり、P²は、少なくとも1つのエチレン単位-CH₂-CH₂-又はエチレングリコール単位-O-CH₂-CH₂-を含有する基であり；

pは、1~10の整数を表し；

Lk²は、結合又はd個のリンカーを表し、ここでdは2~11であり、該リンカーは、1~9個のアスパラギン酸残基及び/又はグルタミン酸残基からなり；

Lk³は、下記一般式のリンカー：



(式中、Phは、置換されていてもよいフェニル基であり、Yは、CO基又はCH.OH基を表し、Zは、下記式の基：

10

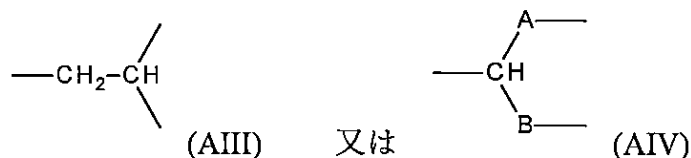
20

30

40

50

【化 3】



を表し、この式中のA及びBの各々は、 $C_1 \sim 4$ アルキレン又はアルケニレン基を表す)

を表し;

Abは、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合部分を表し、前記抗体又はその抗原結合部分中のジスルフィド結合に由来する2個の硫黄原子を介して Lk^3 と結合されており;

eは、1～sの整数を表し、ここでsは、 Lk^3 とコンジュゲートする前の前記抗体又はその抗原結合部分中に存在するジスルフィド結合の数である)

を有する、請求項5または6に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 1】

前記ペイロードが、アウリスタチン又はメイタンシノイドであるか、又はそれを含む、請求項5から10のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2】

放射性同位元素を含む、請求項5から11のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 3】

前記放射性同位元素が、ヨウ素-131、イットリウム-90、ルテチウム-177、銅-67、アスタチン-211、鉛-212/ビスマス-212、アクチニウム-225/ビスマス-213、及びトリウムからなる群から選択される、請求項12に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 4】

前記ペイロードが、放射性物質、色素、コントラスト剤、蛍光化合物、生物発光化合物、酵素、造影剤又はナノ粒子からなる群から選択される検出可能なマーカーであるか、又はそれを含む、請求項5から13のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 5】

診断又は治療での使用のための、請求項1に記載の抗体若しくはその抗原結合部分、又は請求項5から14のいずれか一項に記載の抗体コンジュゲート。

【請求項 1 6】

PSMAにより媒介される又はPSMAの発現増加を特徴とする疾患又は状態の診断、処置又は予防に使用するための、請求項1に記載の抗体若しくはその抗原結合部分、又は請求項5から14のいずれか一項に記載の抗体コンジュゲート。

【請求項 1 7】

前記PSMAにより媒介される疾患が、がんである、請求項16に記載の使用のための、請求項1に記載の抗体若しくはその抗原結合部分、又は請求項5から14のいずれか一項に記載の抗体コンジュゲート。

【請求項 1 8】

前記がんが、前立腺がんである、請求項17に記載の使用のための抗体若しくはその抗原結合部分、又は請求項17に記載の使用のための抗体コンジュゲート。

【請求項 1 9】

前記がんが、一過性細胞癌を含む膀胱がん;膵管癌を含む膵臓がん;非小細胞肺癌を含む肺がん;通常の腎細胞癌を含む腎臓がん;軟部組織肉腫を含む肉腫;転移性腺癌を含む肝臓がん;乳癌を含む乳がん;多形神経膠芽腫を含む脳がん;神経内分泌癌;結腸癌を含む結腸がん;精巣胎児性癌を含む精巣がん;及び悪性黒色腫を含む黒色腫からなる群から選択される、非前立腺がんである、請求項17に記載の使用のための抗体若しくはその抗原結合部分、又は請求項17に記載の使用のための抗体コンジュゲート。

【請求項 2 0】

PSMAにより媒介される又はPSMAの発現増加を特徴とする疾患又は状態を処置又は予防するための医薬の製造における、請求項1に記載の抗体若しくはその抗原結合部分の、又は請求項5から14のいずれか一項に記載の抗体コンジュゲートの使用。

【請求項21】

請求項1に記載の抗体若しくはその抗原結合部分、又は請求項5から14のいずれか一項に記載の抗体コンジュゲートを使用する、試料中のPSMA抗原の存在を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、PSMAと結合する新規ヒト化抗体、前記抗体の使用、及び前記抗体を含む化合物、例えば、抗体のコンジュゲート、例えば抗体-薬物コンジュゲートに関する。本発明の抗体及びコンジュゲートは、疾患、特にがん、特に前立腺がんの処置又は診断に使用される。

10

【背景技術】

【0002】

標的細胞及び分子の表面の特異的抗原に対する抗体の特異性により、抗体は様々な診断及び治療剤の担体として広範に使用されるようになってきた。例えば、フルオロフォア、放射性同位元素及び酵素等の標識及びレポーター基とコンジュゲートされた抗体は、標識付け及びイメージング用途に使用され、その一方で細胞傷害性薬剤及び化学療法薬とのコンジュゲーションは、特異的組織又は構造、例えば、特定の細胞型又は増殖因子へのそのような薬剤の標的化送達を可能にし、その結果、正常な健常組織に対する影響を最小にし、化学療法処置に関連する副作用を有意に低減させる。抗体-薬物コンジュゲートには、幾つかの疾病分野において広範な治療用途を有する可能性がある。

20

【0003】

前立腺がん、別名前立腺癌は、男性生殖器系の腺である前立腺におけるがんの発生である。世界的に見ると、前立腺がんは、2番目に多いがんのタイプであり、男性のがん関連死因の第5位である。進行前立腺がんの第一選択治療は、アンドロゲン遮断である。進行後の化学療法は効果があるが、奏効は一過性であり、最初の化学療法より優れて生存を改善することが証明されている治療法はない。転移性前立腺がんに対する従来の化学療法の奏効性は低い。それ故、改善された治療法が依然として必要とされている。

30

【0004】

前立腺特異的膜抗原(PSMA)発現は、前立腺がん及び他の固形腫瘍との関連性が高い。PSMAは、一部の正常前立腺上皮細胞、正常腎近位尿細管細胞、近位小腸及び一部のアストロサイト(脳内で見出されるもの)の細胞表面に存在する。PSMAは、前立腺がん(PCa)細胞上で高度にアップレギュレート/過剰発現される。PSMAの発現レベルは、前立腺がんの進行と共に増加し、早期前立腺がんにおける高いPSMAレベルは、再発可能性の増大を预示する。かなりの割合の固形腫瘍がそれらの新生血管系内でPSMAを発現するが、正常血管内皮はPSMA陰性である。PSMAは、グルタミン酸型葉酸を加水分解することにより利用可能な葉酸イオンを増加させることが観察されている。PSMAは、がん細胞が生存及び増殖のために使用するための葉酸イオンレベルを増加させることにより前立腺がんの発生を刺激すると仮定されている。

40

【0005】

抗PSMA抗体は以前に生成され(例えば、WO98/03973を参照されたい)、ヒトにおける免疫原性が低下した修飾抗体が調製されている(例えば、WO2004/098535を参照されたい)。PSMAに結合する脱免疫化IgGモノクローナル抗体の一例は、J591である。マウスJ591抗体の可変ドメイン重鎖のアミノ酸配列は、本明細書で配列番号23として示され、対応する軽鎖は、本明細書で配列番号24として示される。脱免疫化抗体J591の可変ドメイン重鎖のアミノ酸配列は、本明細書で配列番号25として示され、対応する軽鎖は、本明細書で配列番号26として示される。脱免疫化J591は、放射標識された形態で診療所において使用されており、耐容性良好であること及び非免疫原性であることが証明されている(

50

例えば、Tagawaら、Cancer、2010、116(4)、1075～1083頁を参照されたい)。

【0006】

PSMAに結合する抗体の更なる例は、WO03/034903、及び米国特許第8,470,330号Bを含むそのファミリーメンバーにおいて開示されている。例えば、抗体「AB-PG1-XG1-006」は、それらの公報では重鎖及び軽鎖配列番号15及び配列番号17を有し(本明細書で配列番号35及び36として示される)、抗体「AB-PG1-XG1-026」は、それらの公報では重鎖及び軽鎖配列番号19及び配列番号21を有する(本明細書で配列番号37及び38として示される)。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0007】

【文献】WO98/03973

WO2004/098535

WO03/034903

米国特許第8,470,330号B

英国特許第1418186.1号

PCT/GB2015/052952

WO2016/059377

WO 2004/113394

PCT/GB2015/052953

20

WO2016/063006

WO 2005/007197

WO 2009/047500

WO 2010/100430

WO 2014/064423

WO 2014/064424

米国特許第5,168,062号

米国特許第5,385,839号

米国特許第7,045,605号

【非特許文献】

30

【0008】

【文献】Tagawaら、Cancer、2010、116(4)、1075～1083頁

Smithら、J. Am. Chem. Soc.、2010、132、1960～1965頁

Schumacherら、Bioconj. Chem.、2011、22、132～136頁

Bioconj. Chem 1990(1)、36～50頁

Bioconj. Chem 1990(1)、51～59頁

J. Am. Chem. Soc. 110、5211～5212頁

Belchevaら、J. Biomater. Sci Polymer Edn. 9(3)、207～226頁

Simonsen及びLevinson 1983、PNAS 80:2495～2499頁

Nature Protocols、2006、1(54)、2241～2252頁

40

Lewis Phillips G.D、Cancer Res 2008; 68:9280～9290頁

R. Ian Freshney、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique、第3版、出版元Alan R. Liss社、N.Y. 1994

R. Ian Freshney、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique、第5版出版元Wiley-Liss社、N.Y. 2005

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

良好な標的結合親和性、低い非特異的結合及び低い免疫原性を有することに加えて、薬物としての候補となる抗体は(それ単独でにせよ、別の活性成分とコンジュゲートされてい

50

るにせよ)、良好な安定性を有するべきである。すなわち、そのような抗体は、低い変性若しくは凝集傾向を有するべきであり、又は成分断片に解離すべきである。要求の厳しいこの一連の特性を考えれば、更に有益な抗PSMA抗体を開発する必要性が依然としてある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、PSMAと結合する新規ヒト化抗体に関する。本発明は、PSMAと結合し、配列番号33で示される配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体又は抗体の抗原結合部分であって、

配列番号33が、

【0011】

【化1】

EVQLVQSGX⁹E X¹¹KKPGASVKV SCKX²⁴SGYTFT EYTIHWVX³⁸QA
X⁴¹GKGLEWIGN INPNX⁵⁵GGTTY NQKFEDRX⁶⁸TX⁷⁰ TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAAGW NFDYWGQGTT VTVSS

【0012】

(この配列中、

X⁹は、A又はPであり、

X¹¹は、V又はLであり、

X²⁴は、A又はTであり、

X³⁸は、R又はKであり、

X⁴¹は、P又はHであり、

X⁵⁵は、N又はQであり、

X⁶⁸は、V又はAであり、

X⁷⁰は、I又はLである)

であり、

それに従って、前記重鎖可変ドメインが、配列番号33の1～30位、36～49位、67～98位及び105～115位の間に3つ以下のアミノ酸配列修飾を含む、抗体又は抗体の抗原結合部分を提供する。

【0013】

好ましい実施形態では、本発明の抗体又はその抗原結合部分は、配列番号34で示される配列を含む軽鎖可変ドメインも含み、

配列番号34は、

【0014】

【化2】

DIX³MTQSPSX¹⁰ LSASVGDRVIT ITCKASQDVG TAVDWYQQKP GQAPKLLIYW
ASTRHTGVPD RFX⁶³GSGSGTD FTLTISRLQX⁸⁰ EDFAX⁸⁵YX⁸⁷CQQ YNSYPLTFGQ
GTX¹⁰³VDIK

【0015】

(この配列中、

X³は、Q又はVであり、

X¹⁰は、T又はFであり、

X⁶³は、S又はTであり、

X⁸⁰は、P又はSであり、

X⁸⁵は、V又はDであり、

10

20

30

40

50

X⁸⁷は、Y又はFであり、
X¹⁰³は、K又はMである）
であり、

それに従って、前記軽鎖可変ドメインは、配列番号34の1～23位、35～49位、57～88位及び98～107位の間に3つ以下のアミノ酸配列修飾を含む。

【0016】

本発明の抗体及び抗原結合部分は、PSMAとの強い結合、低い免疫原性、及び良好な安定性を有する。良好な安定性を有する抗体は、変性若しくは凝集傾向が低く、成分断片に解離することから、有利である。結果として、それらの抗体は、未変性の立体構造でより長く循環内に存在することができる。断片化した抗体(又は抗体-薬物コンジュゲート)は、標的抗原と結合するその能力を失うことから、断片化の低減は有利である。細胞傷害性薬物は、疎水性である傾向があり、したがって、溶液中で凝集傾向を示す。凝集する傾向の低下も抗体-薬物コンジュゲートの有利である。凝集体は、免疫応答を促すことができ、すなわち、免疫原性でありうる。本発明の抗体又は抗原結合部分を含む抗体-薬物コンジュゲートは、良好な安定性、及び溶液中での凝集傾向低下を有する。

【0017】

本発明の抗体及び抗原結合部分は、良好な高い選択性、力価及び/又は活性を提示する。高い選択性、力価及び活性を示す抗体は、特に好ましい。

【0018】

本発明の抗体及び抗原結合部分は、良好な発現効率も提示する。抗体の発現効率は、抗体又は抗体-薬物コンジュゲートの産生における重要な要因である。例えば、抗体の安定した高収率発現の達成は、大量の抗体が臨床試験を実施するために使用される、診断又は治療上の使用のための産生に重要である。したがって、軽鎖又は重鎖の発現レベル、及び発現及び精製全般にわたっての操作の容易さは、産生に選ばれる抗体の選択に影響しうる。溶解度が高く、凝集傾向が低い、良好に発現する抗体が、好ましい。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1a-1】図1(a)は、重鎖及び軽鎖抗体ドメインのpANT発現ベクターの構造を示す図である。

【図1a-2】図1(a)は、重鎖及び軽鎖抗体ドメインのpANT発現ベクターの構造を示す図である。

【図1b】図1(b)は、ヒトPSMA抗原のpANT発現ベクターの構造を示す図である。

【図2-1】図2は、トランスフェクト細胞株におけるPSMAの発現を示す図である。

【図2-2】図2は、トランスフェクト細胞株におけるPSMAの発現を示す図である。

【図3】図3は、FACSにより分析したPSMAへの本発明の抗体及び先行技術の抗体の競合的結合を示す図である。

【図4A】図4Aは、本発明の抗体を使用して調製した抗体-薬物コンジュゲートについての薬物抗体比(DAR)の分布を示す図である。

【図4B】図4Bは、本発明の抗体を使用して調製した抗体-薬物コンジュゲートについての薬物抗体比(DAR)の分布を示す図である。

【図5】図5は、本発明の抗体を使用して調製した抗体-薬物コンジュゲートで処置したときのLNCaP細胞についての細胞生存反応を示す図である。

【図6】図6は、本発明の抗体を使用して調製した異なる抗体-薬物コンジュゲートで処置したときのLNCaP細胞についての細胞生存率反応を示す図である。

【図7】図7は、本発明の抗体を使用して調製した抗体-薬物コンジュゲートの投与にตอบสนองしてのin vivo異種移植モデルにおける腫瘍体積の変化を示す図である。

【図8】図8は、本発明の抗体を使用して調製した抗体-薬物コンジュゲートの投与にตอบสนองしてのin vivo異種移植モデルにおける腫瘍体積の変化を示す図である。

【図9】図9は、本発明の抗体を使用して調製した抗体-薬物コンジュゲートの投与にตอบสนองしてのin vivo異種移植モデルにおける腫瘍体積の変化を示す図である。

10

20

30

40

50

【図10】図10は、本発明の抗体を使用して調製した抗体-薬物コンジュゲートの投与に
応答してのin vivo異種移植モデルにおける腫瘍体積の変化を示す図である。

【図11】図11は、本発明の抗体を使用して調製した抗体-薬物コンジュゲートの投与に
応答してのin vivo異種移植モデルにおける腫瘍体積の変化を示す図である。

【図12】図12は、本発明の抗体を使用して調製した抗体-薬物コンジュゲートの投与に
応答してのin vivo異種移植モデルにおける腫瘍体積の変化を示す図である。

【図13】図13は、本発明の抗体を使用して調製した抗体-薬物コンジュゲートの投与に
応答してのin vivo異種移植モデルにおける腫瘍体積の変化を示す図である。

【図14】図14は、本発明の抗体を使用して調製した抗体-薬物コンジュゲートの投与に
応答してのin vivo異種移植モデルにおける腫瘍体積の変化を示す図である。

10

【図15A】図15は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

【図15B】図15は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

【図16】図16は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

【図17A】図17は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

【図17B】図17は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

20

【図18A】図18は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

【図18B】図18は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

【図19A】図19は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

【図19B】図19は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

【図20A】図20は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

30

【図20B】図20は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

【図21】図21は、本発明及び先行技術の重鎖及び軽鎖抗体断片の核酸及びアミノ酸配
列、並びにPSMA抗原の核酸及びアミノ酸配列を示す図である。

【図22】図22は、本発明の重鎖及び軽鎖配列と先行技術配列のアラインメントを示す図
である。

【図23a】図23(a)は、AB-03抗体について得た融点生データからの一次導関数プロッ
トを示す図である。

【図23b】図23(b)は、AB-P1抗体について得た融点生データからの一次導関数プロッ
トを示す図である。

40

【図23c】図23(c)は、AB-P2抗体について得た融点生データからの一次導関数プロッ
トを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

上記の配列番号33及び34の配列内のCDR領域には下線が引かれている。本発明は、重
鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインの一方又は両方における上記で定義されたCDR領域外
に3つ以下のアミノ酸配列修飾を有する抗体及びそれらの抗原結合部分を包含する。例え
ば、そのような修飾は、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を向上させることが
できる。アミノ酸配列修飾は、抗体核酸に適切なヌクレオチド変化を導入することにより
、又はペプチド合成により調製することができる。そのような修飾としては、例えば、抗

50

体のアミノ酸配列からの残基の欠失、及び/又は前記配列への残基の挿入、及び/又は前記配列内の残基の置換が挙げられる。最終構築物が所望の特性を有するのであれば、欠失と挿入と置換のいかなる組合せを行って最終構築物に達してもよい。置換は、保存的置換であってもよく、又は非保存的置換であってもよい。アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数及び位置を変化させること等の、抗体の翻訳後プロセスを変更することもできる。

【0021】

例えば、アミノ酸配列修飾が置換である場合、それは、好ましくは、保存的置換、すなわち、抗体又はその抗原結合部分の抗原との特異的結合を(例えば、 K_D により測定して)実質的に低減させないアミノ酸置換(例えば、例えばELISA等の標準的結合アッセイにより決定して、結合を増加させる、結合を有意に変更しない、又は結合を約40%より大きく、典型的には約30%より大きく、より典型的には約20%より大きく、よりいっそう典型的には約10%より大きく、若しくは最も典型的には約5%より大きく低減させない、置換)である。

10

【0022】

例えば、重鎖内のCDR領域外の0、1又は2つの残基、及び軽鎖内のCDR領域外の0、1又は2つの残基を、別のアミノ酸により置換することができる。例えば、重鎖内のCDR領域外の0又は1つの残基を別のアミノ酸により置換することができる。例えば、軽鎖内のCDR領域外の0又は1つの残基を、別のアミノ酸により置換することができる。好ましくは、配列番号33及び34のいずれの残基も、具体的に述べたもの以外のアミノ酸残基に変更されない。例えば、配列番号33は、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13又は配列番号14の配列であってもよい。例えば、配列番号34は、配列番号15、配列番号16、配列番号17又は配列番号18の配列であってもよい。

20

【0023】

配列番号33中、
 X^9 はAであり、 X^{11} はVであり、 X^{24} はA又はTであり、 X^{38} はR又はKであり、 X^{41} はPであり、 X^{55} はN又はQであり、 X^{68} はV又はAであり、 X^{70} はIであることが好ましい。例えば、配列番号33は、配列番号11、配列番号12、配列番号13又は配列番号14の配列であってもよい。

【0024】

配列番号33中、
 X^9 はAであり、 X^{11} はVであり、 X^{24} はAであり、 X^{38} はRであり、 X^{41} はPであり、 X^{55} はN又はQであり、 X^{68} はVであり、 X^{70} はIであることが更に好ましい。例えば、配列番号33は、配列番号13又は配列番号14の配列であってもよい。

30

【0025】

特に、
 X^9 はAであり、 X^{11} はVであり、 X^{24} はAであり、 X^{38} はRであり、 X^{41} はPであり、 X^{55} はNであり、 X^{68} はVであり、 X^{70} はIであることが特に好ましい。例えば、配列番号33は、配列番号13の配列であってもよい。

【0026】

配列番号34中、
 X^3 はQ又はVであり、 X^{10} はTであり、 X^{63} はS又はTであり、 X^{80} はP又はSであり、 X^{85} はV又はDであり、 X^{87} はY又はFであり、 X^{103} はKであることが好ましい。例えば、配列番号43は、配列番号16、配列番号17又は配列番号18の配列であってもよい。

40

【0027】

配列番号34中、
 X^3 はQ又はVであり、 X^{10} はTであり、 X^{63} はSであり、 X^{80} はPであり、 X^{85} はV又はDであり、 X^{87} はYであり、 X^{103} はKであることが更に好ましい。例えば、配列番号34は、配列番号17又は配列番号18の配列であってもよい。

【0028】

配列番号34中、
 X^3 はQであり、 X^{10} はTであり、 X^{63} はSであり、 X^{80} はPであり、 X^{85} はVであり、 X^{87} は

50

Yであり、 X^{103} はKであることが特に好ましい。例えば、配列番号34は、配列番号18の配列であってもよい。

【0029】

好ましい実施形態では、本発明の抗体は、配列番号13の可変ドメイン重鎖及び配列番号17の可変ドメイン軽鎖(「VH4/VK3」とも称される);又は配列番号14の可変ドメイン重鎖及び配列番号17の可変ドメイン軽鎖(「VH5/VK3」とも称される);又は配列番号13の可変ドメイン重鎖及び配列番号18の可変ドメイン軽鎖(「VH4/VK4」とも称される);又は配列番号14の可変ドメイン重鎖及び配列番号18の可変ドメイン軽鎖(「VH5/VK4」とも称される)を含む。

【0030】

本発明の抗体は、PSMA(例えば、ヒトPSMA)と結合し、平衡解離定数(Kd)が 10^{-8} M以下、例えば、 10^{-9} M以下、例えば 750×10^{-12} M以下、例えば 500×10^{-12} M以下である、ヒト化抗体である。例えば、本発明の抗体は、ヒト前立腺がん細胞と特異的に結合する。

【0031】

本発明の抗体は、ある特定の以前のヒト化(又は脱免疫化)抗PSMA抗体と比較して向上した安定性を有する。したがって、本発明の抗体は、低い変性若しくは凝集傾向を有するか、又は成分断片に解離する。結果として、本発明の抗体は、未変性の立体構造でより長く循環内に存在すると仮定される。凝集傾向低下は、抗体-薬物コンジュゲートにとって及びこれらのコンジュゲートを生じさせる試薬にとって特別な利点である。細胞傷害性薬物は疎水性である傾向があり、したがって、細胞傷害性薬物を伴うコンジュゲーション試薬及び抗体-薬物コンジュゲートには溶液中で凝集する傾向があり、この凝集傾向は、それらの有効性を有意に低下させる。断片化した抗体(抗体-薬物コンジュゲートの一部を含む)は、標的抗原と結合するその能力を失う。したがって、断片化に対する感受性が低下した抗体も有利である。

【0032】

本発明の抗体は、アイソタイプIgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD又はIgEの重鎖を有してもよい。IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4は、特に好ましい。或いは、本発明の抗体は、例えば、Fc受容体への結合を増加若しくは減少させるように、又は補体への結合を増加若しくは低下させるように、変更されたIgG定常領域を有していてもよく、例えば、前記IgG定常領域は、IgG4k又はIgG1kであってもよい。本発明の抗体は、カップ軽鎖である抗体軽鎖を有していてもよい。

【0033】

本発明の化合物は、完全長抗体(例えば、IgG4又はIgG1抗体)であってもよい。或いは、本発明の化合物は、抗原結合部分のみを含むこともある。例えば、本発明の化合物は、Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fd鎖、Fv断片若しくは短鎖Fv(scFv)、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、V_Hドメインのみを含む断片(ナノボディ、又はラクダ、ラマ若しくはこれらに類するものからの断片を含む)であってもよい。本発明は、上記に記載の少なくとも1つの抗体又はその抗原結合部分を含む、二重特異性及び多重特異性抗体(2つ以上の異なる特異性をもたらすように互いに連結されている2つ以上の異なる抗体分子)も提供する。抗原結合部分は、例えば、scFv-Fc、scFv-Fc-scFv、(Fab' ScFv)₂、scダイアボディ-Fc、scダイアボディ-CH₃、scFv-CH₃、scFv-CH₂-CH₃融合タンパク質等のような、様々な順列のscFv断片又はダイアボディ及びFc断片又はC_Hドメインで構成されているミニボディであってもよい。抗体断片は、酵素的切断、合成又は組換え技術により産生することができる。

【0034】

本発明の抗体又はその抗原結合部分は、哺乳動物細胞株、特にCHO又はNS0細胞により産生されうる。例えば、本発明の抗体は、モノクローナル抗体であってもよい。

【0035】

本発明の抗体又はそれらの抗原結合部分は、in vivo及びin vitroで診断又は治療剤として使用される。

【0036】

10

20

30

40

50

別の態様では、本発明は、本発明のヒト化抗体又はそれらの抗原結合部分をコードする核酸分子を提供する。したがって、本発明の抗体をコードする核酸を含む組換え発現ベクター、及びそのようなベクターがトランスフェクトされた宿主細胞も、本発明により包含され、これらの宿主細胞を培養することによる本発明の抗体の作製方法もまた包含される。例えば、本発明の抗体又はそれらの抗原結合部分は、配列番号1～配列番号5(重鎖)若しくは配列番号6～配列番号9(軽鎖)に記載の配列又はそれらの変異体を有する、ヒトIgG重鎖及びヒトカッパ軽鎖核酸によりコードされうる。

【0037】

例えば、変異核酸が、例えば、ストリンジェントな条件下で本発明の核酸、例えば、配列番号1～配列番号9の核酸にハイブリダイズするその能力により決定して、配列番号1～配列番号9を含有する又はそれらと実質的に同一である配列を含む場合、変異核酸は、本発明の範囲内であると決定されうる。用語「ハイブリダイズ」は、分子が特定のヌクレオチド配列と、その配列が複合混合物(例えば、全細胞又はライブラリーDNA又はRNA)中に存在するときにストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、結合すること、二本鎖を形成すること、又はハイブリダイズすることを指し、前記特定のヌクレオチド配列は、バックグラウンドの少なくとも約10倍検出される。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、例えば、被定義イオン強度及びpHで特定の配列の熱融解点(T_m)より5～10℃低くなるように選択されることになる。例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、

- ・ 50%脱イオン化ホルムアミド
- ・ 2×クエン酸ナトリウム食塩溶液(SSC)*
- ・ 50mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄緩衝液、pH7.0
- ・ 1mM EDTA
- ・ 標的DNA/RNA(各1mg/ml)
- ・ プローブ(おおよそ20～200ng/ml)

温度:37～42℃; ハイブリダイゼーション時間:5分～16時間

*SSC:1×SSC = 150mM NaCl、15mM クエン酸ナトリウム; pH7.0。

【0038】

コンジュゲート

本発明は、リンカーを介してペイロードとコンジュゲートされている本発明による抗体又はその抗原結合部分、例えばFabを更に提供し、前記ペイロードは、別の機能性分子、例えば、治療剤、診断剤若しくは標識剤、及び/又はポリマーであってもよい。別の機能性分子の単一の分子が存在してもよく、又は2つ以上の分子が存在してもよい。抗体薬物コンジュゲートは薬物の複数のコピーを含有するほうがよいことが、好ましいことが多い。機能性分子は、例えば、別のペプチド又はタンパク質、例えばFab'断片であってもよい。1つ又は複数の薬物分子、例えば、細胞傷害性薬剤又は毒素を含めることが、好ましい。アウリスタチン及びメイタンシノイドが代表的な細胞傷害性薬物である。標識剤(イメージング剤を含むと解されたい)としては、例えば、放射性核種、蛍光剤(例えば、アミン誘導体化蛍光プローブ、例えば、5-ジメチルアミノナフタレン-1-(N-(2-アミノエチル))スルホンアミド-ダンシルエチレンジアミン、Oregon Green(登録商標)488カダベリン(カタログ番号O-10465、Molecular Probes社)、ダンシルカダベリン、N-(2-アミノエチル)-4-アミノ-3,6-ジスルホ-1,8-ナフタルイミドニカリウム塩(ルシファーイエローエチレンジアミン)、若しくはローダミンBエチレンジアミン(カタログ番号L 2424、Molecular Probes社)、又はチオール誘導体化蛍光プローブ、例えば、BODIPY(登録商標) FL L-シスチン(カタログ番号B-20340、Molecular Probes社))を挙げることができる。標識剤は、色素、コントラスト剤、生物発光剤、酵素、造影剤、又はナノ粒子であることもある。ビオチンも使用してもよい。

【0039】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、治療剤とコンジュゲートされる。本明細書で使用する「治療剤」は、PSMAにより媒介される又はPSMAの発現増加を特

10

20

30

40

50

徴とする疾患又は状態の処置に有用である、原子、分子又は化合物である。治療剤の例としては、薬物、化学療法剤、治療用抗体及び抗体断片、毒素、放射性同位元素、酵素(例えば、抗原結合構築物結合部位で細胞傷害性薬剤に対するプロドラッグを切断する酵素)、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節薬、アンチセンスオリゴヌクレオチド、キレート剤、ホウ素化合物、光活性剤及び感光性色素、並びにナノ粒子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0040】

一部の実施形態では、治療アプローチは、標的組織に細胞傷害及び細胞死をもたらすことができる適切な放射標識、例えば、ヨウ素-131、ベータ放射体、例えば、イットリウム-90、ルテチウム-177、銅-67、アスタチン-211、鉛-212/ビスマス-212、アクチニウム-225/ビスマス-213、及びトリウムを結合させることによる放射免疫療法を含む。

10

【0041】

一部の実施形態では、ナノ粒子は、抗体又はその抗原結合部分とコンジュゲートされたとき、PSMAを過剰発現するがん細胞に化学療法剤、ホルモン治療剤、放射線療法剤、毒素又は当技術分野において公知の任意の他の細胞傷害性薬剤若しくは抗がん剤を送達する薬物担体として、治療用途に使用される。本明細書に記載の抗体又はそれらの抗原結合部分のいずれかを、1つ又は複数の治療剤、検出可能なマーカー、ナノ粒子、担体又はこれらの組合せと更にコンジュゲートさせてもよい。例えば、抗体又はその抗原結合部分をヨウ素-131で放射標識して脂質担体とコンジュゲートさせてもよく、その結果、抗PSMA-脂質コンジュゲートはミセルを形成する。このミセルは、1つ又は複数の治療マーカー又は検出可能なマーカーを含有することができる。或いは、担体に加えて、抗原結合構築物をヨウ素-131 Iで(例えば、チロシン残基に対して)標識して、薬物と(例えば、リジン残基のイプシロンアミノ基に)コンジュゲートさせてもよく、担体が追加の治療マーカー又は検出可能なマーカーを含有してもよい。

20

【0042】

一部の実施形態では、本発明の抗原結合部分は、治療剤とコンジュゲートされる。これらの抗原結合部分は、完全長抗体と比較して短い循環半減期を有することができる一方で、一部の実施形態では、これらの形式は、それらのより小さいサイズに基づいて腫瘍への浸透性向上を示すことができ、細胞傷害性薬物又は放射性同位元素を適切に備えていれば治療に有効でありうる。一部の実施形態では、抗体-薬物コンジュゲートアプローチを利用することができる。一部の実施形態では、細胞傷害性薬物又は放射性核種を備えているこれらの断片での処置は、それらの断片が身体からより迅速に排除されることになるため、結果的に非特異的毒性が低くなる。

30

【0043】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、検出可能なマーカーとコンジュゲートされる。本明細書で使用される「検出可能なマーカー」は、細胞、組織、器官又はこれらに類するもの中のPSMA抗原の位置及び/又は量の診断、検出又は可視化に有用である原子、分子又は化合物を含む。本明細書における実施形態に従って使用することができる検出可能なマーカーとしては、放射性物質(例えば、放射性同位元素、放射性核種、放射標識又は放射性トレーサー)、色素、コントラスト剤、蛍光化合物又は分子、生物発光化合物又は分子、酵素及び造影剤(例えば、常磁性イオン)が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、一部のナノ粒子、例えば、量子ドット及び金属ナノ粒子は、検出剤としての使用に好適であることが当技術分野において公知である。一部の実施形態では、検出可能なマーカーは、インドシアニンググリーン(ICG)、ジルコニウム-89、IR800、及び/又は別の近赤外色素である。

40

【0044】

本明細書における実施形態に従って検出可能なマーカーとして使用することができる例示的な放射性物質としては、 ^{18}F 、 ^{18}F -FAC、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{75}Sc 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 142

50

Pr、¹⁴³Pr、¹⁴⁹Pm、¹⁵³Sm、¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁹Er、¹⁷⁵Lu、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁹Re、¹⁹⁴Ir、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²¹¹At、²¹¹Pb、²¹²Bi、²¹²Pb、²¹³Bi、²²³Ra及び²²⁵Acが挙げられるが、これらに限定されない。検出可能なマーカーとして使用することができる例示的な常磁性イオン物質としては、遷移及びランタニド金属(例えば、6~9、21~29、42、43、44、又は57~71の原子番号を有する金属)が挙げられるが、これらに限定されない。これらの金属は、Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb及びLuのイオンを含む。

【0045】

本開示の実施形態に従って検出可能なマーカーとして使用することができる例示的なコントラスト剤としては、バリウム、ジアトリゾ酸塩、ヨード化ケシ油エチルエステル、クエン酸ガリウム、イオカルム酸、イオセタム酸、ヨードアミド、ヨージパミド、ヨードキサム酸、イオグラミド(iogulamide)、イオヘキシル(iohexyl)、イオパミドール、イオパノ酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセル酸、イオスラミドメグルミン、イオセメチン酸(iosemetetic acid)、イオタスル、イオテトル酸、イオタラム酸、イオトロクス酸、イオキサグル酸、イオキソトリゾ酸、イオボダート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾ酸塩、プロピリオドン、塩化タリウム、又はこれらの組合せが挙げられるが、それらに限定されない。

【0046】

本開示の実施形態に従って検出可能なマーカーとして使用することができる生物発光及び蛍光化合物又は分子及び色素としては、フルオレセイン、フルオレセインチオイソシアネート(FITC)、OREGON GREEN(商標)、ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート(TRITC)、Cy3、Cy5及びこれらに類するもの、蛍光マーカー(例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)、フィコエリトリン及びこれらに類するもの)、腫瘍関連プロテアーゼにより活性化される自己消光型蛍光化合物、酵素(例えば、ルシフェラーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びこれらに類するもの)、ナノ粒子、ビオチン、ジゴキシゲニン又はこれらの組合せが挙げられるが、それらに限定されない。

【0047】

本開示の実施形態に従って検出可能なマーカーとして使用することができる酵素としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ又は β -ラクタマーゼが挙げられるが、これらに限定されない。そのような酵素を色素原、蛍光発生化合物又は発光性化合物と組み合わせて使用して、検出可能なシグナルを生成してもよい。

【0048】

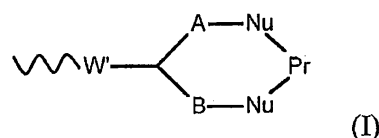
抗体又はその抗原結合部分にペイロードを結合させるのに好適なリンカーは、下記のコンジュゲート試薬のセクションで説明されるものである。リンカーは、下記で説明されるように、有利に分解することができる。一部の好ましい実施形態では、リンカーは、下記で説明されるようなポリマーを含む。

【0049】

本発明による好ましいコンジュゲートは、ペイロードの抗体又はその抗原結合部分への結合が、一般式:

【0050】

【化3】



10

20

30

40

50

【0051】

(式中、Prは、前記抗体又はその抗原結合部分を表し、各Nuは、前記抗体又はその抗原結合部分中に存在する又はそれに結合されている求核剤を表し、A及びBの各々は、 $C_1 \sim 4$ アルキレン又はアルケニレン鎖を独立して表し、W'は、電子求引基を表すか又は電子吸引基の還元により得られる基を表す)

を有する結合部分を介しての結合である、コンジュゲートである。

【0052】

電子求引基W'は、例えば、ケト基-CO-、エステル基-O-CO-又はスルホン基-SO₂-でありうる。好ましくは、W'は、これらの基のうちの1つを表すか、又は下記で説明されるようなこれらの基のうちの1つの還元により得ることができる基を表す。好ましくは、W'は、ケト基を表すか、又はケト基の還元により得ることができる基、特にCH.OH基を表す。

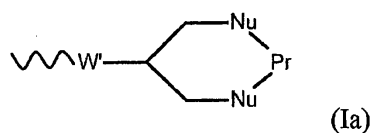
10

【0053】

好ましくは、この基は、式：

【0054】

【化4】



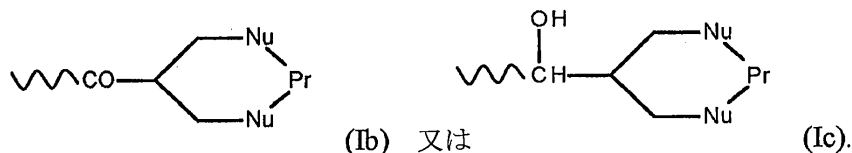
20

【0055】

特に、

【0056】

【化5】



30

【0057】

を有する。

【0058】

抗体又はその抗原結合部分中の求核基は、例えば、システイン、リジン又はヒスチジン残基により提供され、Nuは、例えば、硫黄原子又はアミン基でありうる。本発明の1つの好ましい実施形態では、各Nuは、抗体又はその抗原結合部分中に存在するシステイン残基中に存在する硫黄原子を表す。本発明による抗体は、4つの鎖間ジスルフィド結合を一般に含有することになる。これらの各々を還元して、求核剤として作用する遊離チオール基を得ることができる。これらのジスルフィド結合の各々が上記の式Iで示されるように架橋されれば、4の薬物-抗体比(DAR)を有するコンジュゲートが生成されることになる。別の実施形態では、各Nuは、前記抗体又はその抗原結合部分に結合されているポリヒスチジンタグ中に存在するヒスチジン残基中に存在するイミダゾール基を表す。

40

【0059】

本発明のコンジュゲートは、例えば、下記一般式のものであってもよい：



(式中、

Dは、ペイロードを表し；

qは、1～10の整数を表し；

Lk¹は、リンカーを表し；

50

rは、1～10の整数を表し；

P¹は、結合又はc個の基-P²-NH-を表し、ここでcは、2～11であり、P²は、少なくとも1つのエチレン単位-CH₂-CH₂-又はエチレングリコール単位-O-CH₂-CH₂-を含有する基であり；

eは、1～10の整数を表し；

Lk²は、結合又はd個のリンカーを表し、ここでdは2～11であり、該リンカーは、1～9個のアスパラギン酸残基及び/又はグルタミン酸残基からなり；

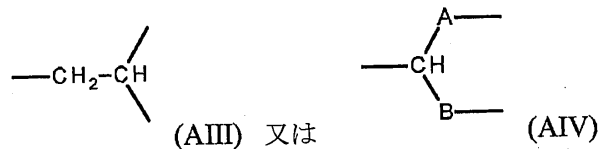
Lk³は、下記一般式のリンカー：

-CO-Ph-Y-Z- (AII)

(式中、Phは、置換されていてもよいフェニル基であり、Yは、CO基又はCH.OH基を表し、Zは、下記式の基：

【0060】

【化6】



【0061】

を表し、この式中のA及びBの各々は、C₁～4アルキレン又はアルケニレン基を表す)を表し；

Abは、本発明による抗体又はその抗原結合部分を表し、前記抗体又はその抗原結合部分中のジスルフィド結合に由来する2個の硫黄原子を介してLk³と結合されており；

eは、1～sの整数を表し、ここでsは、Lk³とコンジュゲートする前の前記抗体又はその抗原結合部分中に存在するジスルフィド結合の数である)。

【0062】

q、r、e、c及びdの意味により、存在するD基の総数が決まる。この数は、例えば20以下、例えば15以下、例えば10以下、例えば1、2、3又は4でありうる。

【0063】

コンジュゲート試薬

本発明によるコンジュゲートは、コンジュゲート試薬を本発明による抗体又はその抗原結合部分と反応させることにより調製することができる。コンジュゲーションは、例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合性会合又は他の方法により行うことができるが、好ましくは化学的カップリングにより行われる。典型的に、コンジュゲート試薬は、抗体又はその抗原結合部分中に存在する少なくとも1つの求電子剤又は特に求核剤と共有結合反応することができる官能基を含むことになり、この官能基がリンカーを介してペイロードに結合される。ペイロードを抗体又はその抗原結合部分とコンジュゲートさせるために使用することができる多くのコンジュゲート試薬が公知であり、これらのいずれを使用して本発明によるコンジュゲートを調製してもよい。

【0064】

例えば、試薬は、マレイミド基、クイックケミストリー基、例えばアジド若しくはアルキン基、アミン基、カルボキシル基、又は活性エステル基を含有しうる。他の可能なアプローチとしては、改変されたシステイン又は非天然アミノ酸等のアミノ酸を用いてコンジュゲーションのために特異的に組換え改変された抗体の使用、及び特異的酵素反応による、例えばトランスグルタミナーゼを用いる、酵素的コンジュゲーションが挙げられる。抗体又はその抗原結合部分の反応部位は、実際は、求核性又は求電子性のいずれであってもよい。一般的なタンパク質コンジュゲーション部位は、リジン若しくはシステインアミノ酸残基、又は糖鎖部分である。或いは、コンジュゲーションは、抗体又はその抗原結合部分に結合されているポリヒスチジンタグに対して行われることもある。

【 0 0 6 5 】

コンジュゲート試薬は、抗体又はその抗原結合部分中の求核剤と有利に反応することができ、それ故、前記求核剤と有利に化学結合することができる。そのため、コンジュゲート試薬は、求核剤との反応で失われる少なくとも1つの脱離基を概して含む。コンジュゲート試薬は、例えば、2つ以上の脱離基を含むこともある。好ましくは、コンジュゲート試薬は、2つの求核剤と反応することができる。有利には、コンジュゲート試薬は、少なくとも2つの脱離基を含む。2つ以上の脱離基が存在する場合、これらは同じであってもよく、又は異なってもよい。或いは、コンジュゲート試薬は、2つの脱離基と化学的に等価である単一の基であって、2つの求核剤と反応することができる単一の基を含有することもある。

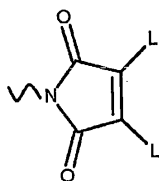
10

【 0 0 6 6 】

試薬の1つの基は、Smithら、J. Am. Chem. Soc., 2010、132、1960～1965頁、及びSchumacherら、Bioconj. Chem., 2011、22、132～136頁に記載されているようなビス-ハロ-又はビス-チオ-マレイミド及びそれらの誘導体に基づく。これらの試薬は、官能基：

【 0 0 6 7 】

【 化 7 】



20

【 0 0 6 8 】

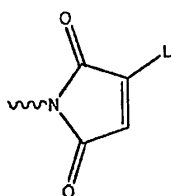
を含有し、この式中の各Lは、脱離基である。マレイミド環の窒素原子は、ペイロードを直接又は間接的に担持することができる。

【 0 0 6 9 】

同様に、単一の脱離基Lを含有するマレイミド：

【 0 0 7 0 】

【 化 8 】



30

【 0 0 7 1 】

を使用してもよい。この場合もやはり、マレイミド環の窒素原子は、ペイロードを直接又は間接的に担持する。

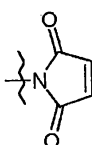
40

【 0 0 7 2 】

また、脱離基を欠くマレイミド：

【 0 0 7 3 】

【 化 9 】



50

【 0 0 7 4 】

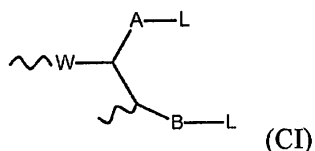
を使用してもよい。この場合もやはり、マレイミド環の窒素原子は、ペイロードを直接又は間接的に担持する。

【 0 0 7 5 】

好ましい実施形態では、コンジュゲート試薬は、官能基：

【 0 0 7 6 】

【 化 1 0 】



10

【 0 0 7 7 】

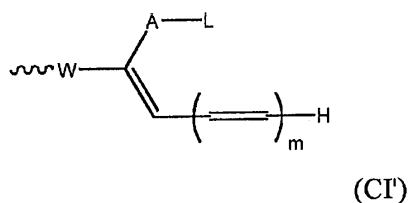
(式中、Wは、電子求引基、例えば、ケト基、エステル基-O-CO-、スルホン基-SO₂-、又はシアノ基を表し、Aは、C₁~5アルキレン又はアルケニレン鎖を表し、Bは、結合又はC₁~4アルキレン若しくはアルケニレン鎖を表し、各Lは、独立して脱離基を表すか、又は両方のLと一緒に脱離基を表す)

を含有する。このタイプの試薬は、Bioconj. Chem 1990(1)、36~50頁、Bioconj. Chem 1990(1)、51~59頁、及びJ. Am. Chem. Soc. 110、5211~5212頁に記載されている。そのような基を含有する試薬が抗体又はその抗原結合部分と反応すると、第1の脱離基Lが失われて、式：

20

【 0 0 7 8 】

【 化 1 1 】



30

【 0 0 7 9 】

(式中、mは、0~4である)

の官能基を含有するコンジュゲート試薬を原位置で形成し、それが第1の求核剤と反応する。すると第2の脱離基Lが失われ、第2の求核剤との反応が起こる。官能基CIを含有する試薬の出発物質としての使用の代案として、官能基CI'を含有する試薬を出発物質として使用してもよい。

【 0 0 8 0 】

好ましくは、Wは、ケト基を表す。好ましくは、Aは、-CH₂-を表し、Bは、結合を表す。

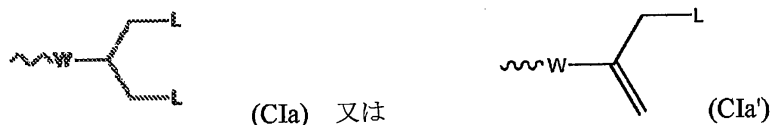
40

【 0 0 8 1 】

式CI及びCI'の特に好ましい官能基は、式：

【 0 0 8 2 】

【 化 1 2 】



【 0 0 8 3 】

50

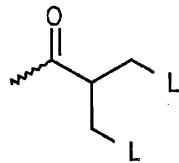
を有する。

【 0 0 8 4 】

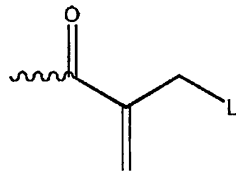
例えば、基は、式：

【 0 0 8 5 】

【 化 1 3 】



(C1b) 又は



(C1b')

10

【 0 0 8 6 】

のものであってもよい。

20

【 0 0 8 7 】

コンジュゲート試薬の別の群は、官能基：

~W-CR⁴R^{4'}-CR₄.L.L' (CII)

(式中、

Wは、上記で示された意味及び好ましい意味を有し、及び

各R⁴は、水素原子又はC₁~₄アルキル基を表し、R^{4'}は、水素原子を表し、各Lが独立して、脱離基を表すか若しくは両方のLと一緒に脱離基を表すのか;又は

各R⁴は、水素原子又はC₁~₄アルキル基を表し、Lは、脱離基を表し、R^{4'}とL'と一緒に結合を表す)

を含有する。

30

【 0 0 8 8 】

コンジュゲート試薬の別の群は、官能基：

~W-(CH=CH)_p-(CH₂)₂-L (CIII)又は

~W-(CH=CH)_p-CH=CH₂ (CIII')

(これらの式中、Wは、上記で示された意味及び好ましい意味を有し、pは、0、又は1~4の整数、好ましくは0を表す)

を含む。このタイプの特に好ましい試薬は、官能基：

~NH-CO-Ar-CO-(CH₂)₂-L (CIIIa)又は

~NH-CO-Ar-CO-CH=CH₂ (CIIIa')

(これらの式中、Arは、置換されていてもよいアリール、特にフェニル、基を表す)

を含む。

40

【 0 0 8 9 】

脱離基Lは、例えば、-SP、-OP、-SO₂P、-OSO₂P、-N⁺PR²R³、ハロゲン、-O であってもよく、この場合、Pは、水素原子、アルキル(好ましくはC₁~₆アルキル)、アリール(好ましくはフェニル)、若しくはアルキル-アリール(好ましくはC₁~₆アルキル-フェニル)基を表し、又は部分-(CH₂CH₂O)_n-(式中のnは、2以上、特に6以上の数である)を含む基であり、R²及びR³の各々は、独立して、水素原子、C₁~₄アルキル基、又は基Pを表し、

は、少なくとも1つの置換基、例えば、-CN、-CF₃、-NO₂、-CO₂R'、-COH、-CH₂OH、-COR'、-OR'、-OCOR'、-OCO₂R'、-SR'、-SOR'、-SO₂R'、-NHCOR'、-NR'COR'、-NHCO₂R'、-NR'CO₂R'、-NO、-NHOH、-NR'OH、-CH=N-NR'COR'、-N⁺R'₃、ハロゲ

50

ン、特に塩素若しくは特にフッ素、 $-C \equiv CR'$ 及び $-CH=CR'_2$ [ここで各 R' は、水素原子又はアルキル(好ましくは $C_1 \sim 6$ アルキル)、アリール(好ましくはフェニル)、若しくはアルキル-アリール(好ましくは $C_1 \sim 6$ アルキル-フェニル)基を表す]を含有する、置換されているアリール、特にフェニル、基を表す。電子求引性置換基の存在は好ましい。

【0090】

Pが部分 $-(CH_2CH_2O)_n-$ (式中の n は、2以上の数である)を含む基を表す、コンジュゲート試薬は、今ではWO2016/059377として発行されているPCT/GB2015/052952が優先権を主張する、本発明者らの同時係属出願である英国特許第1418186.1号の主題である。この出願には以下のことが開示されている：

「脱離基は、例えば、 $-(CH_2CH_2O)_n-R^1$ (式中の R^1 は、キャッピング基である)を含むことができる。非常に広範なキャッピング基を使用することができる。 R^1 は、例えば、水素原子、アルキル基、特に $C_1 \sim 4$ アルキル基、特にメチル基、又は置換されていてもよいアルキル基、例えば、置換されていてもよいフェニル基、例えばトシル基であってもよい。或いは、キャッピング基は、カルボキシ基又はアミン基等の官能基を含むこともある。そのようなキャッピング基は、例えば、式 $-CH_2CH_2CO_2H$ 又は $-CH_2CH_2NH_2$ を有することができる、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 鎖の末端単位を官能化することによりそのようなキャッピング基を調製することができる。或いは、キャッピング基を末端に有するのではなく、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 基は、コンジュゲート試薬中に2つの結合点を有することができる、したがって、化学的に等価の2つの脱離基が存在し、2つの求核剤に結合することができる。

【0091】

脱離基の $-(CH_2CH_2O)_n-$ 部分は、PEG、すなわちポリエチレングリコール、に基づく。PEGは、直鎖であってもよく又は分枝状であってもよく、どのように誘導体化又は官能化されていてもよい。 n は、2以上の数、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9又は10である。例えば、 n は、5～9であってもよい。或いは、 n は、10以上の数であってもよい。 n に特定の上限はない。 n は、例えば150以下、例えば120以下、例えば100以下であってもよい。例えば、 n は、2～150、例えば7～150、例えば7～120であってもよい。脱離基のPEG部分 $-(CH_2CH_2O)_n-$ は、例えば1～5kDaの分子量を有してもよく、例えば、1kDa、2kDa、3kDa、4kDa又は5kDaであってもよい。脱離基は、必要に応じて、1つ又は複数のスペーサーにより隔てられている2つ以上の部分 $-(CH_2CH_2O)_n-$ を含有してもよい。

【0092】

本発明による試薬中の脱離基は、好適には、式 $-SP$ 、 $-OP$ 、 $-SO_2P$ 、 $-OSO_2P$ 、 $-N^+PR^2R^3$ のものであり、ここで P は、部分 $-(CH_2CH_2O)_n-$ を含む基であり、 R^2 及び R^3 の各々は、水素原子、 $C_1 \sim 4$ アルキル基、又は基 P を独立して表す。好ましくは、 R^2 及び R^3 の各々は、 $C_1 \sim 4$ アルキル基、特にメチル基を表すか、又は、特に、水素原子を表す。或いは、コンジュゲート試薬は、式 $-S-P-S-$ 、 $-O-P-O-$ 、 $-SO_2-P-SO_2-$ 、 $-OSO_2-P-OSO_2-$ 、及び $-N^+R^2R^3-P-N^+R^2R^3-$ の基を含むことができる。このタイプの具体的な基としては、 $-S-(CH_2CH_2O)_n-S-$ 、 $-O-(CH_2CH_2O)_n-O-$ 、 $-SO_2-(CH_2CH_2O)_n-SO_2-$ 、 $-OSO_2-(CH_2CH_2O)_n-OSO_2-$ 、又は $-N^+R^2R^3-(CH_2CH_2O)_n-N^+R^2R^3-$ が挙げられる。それらは、次のタイプの基：

【0093】

10

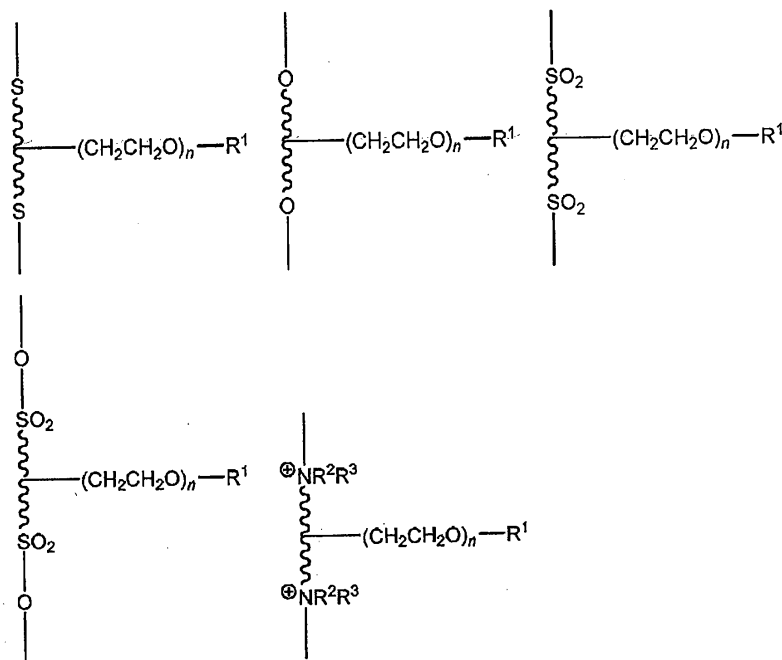
20

30

40

50

【化 1 4】



10

20

【 0 0 9 4】

を含むこともでき、この式中の $-(CH_2CH_2O)_n-$ 基は、任意の好適な連結基、例えばアルキル基により担持されている。これらの二価の基は、2つの求核剤と反応することができる2つの脱離基と化学的に等価である。」

【 0 0 9 5】

コンジュゲート試薬中に存在する特に好ましい脱離基Lは、 $-SP$ 又は $-SO_2P$ 、特に $-SO_2P$ である。この群の中で、1つの好ましい実施形態は、Pがフェニル又は特にトシル基を表す、ものである。別の好ましい実施形態は、Pが、部分 $-(CH_2CH_2O)_n-$ を含む基、特に、nが上述の値の1つ、特に7を有するものである。特に好ましい脱離基Lは、 $-SO_2-(CH_2CH_2O)_n-H/Me$ 、特に $-SO_2-(CH_2CH_2O)_7-H/Me$ である。本明細書を通して、脱離基Lへのいずれの言及も、これらの好ましい基、特に $-SO_2-(CH_2CH_2O)_n-H/Me$ 、更に特に $-SO_2-(CH_2CH_2O)_7-H/Me$ への具体的な言及を含むと解されたい。

30

【 0 0 9 6】

コンジュゲート試薬は、1つより多くの官能基を含有することができる。例えば、試薬は、分子の一方の末端に上記のタイプCの官能基を含有することができ、且つ該分子の他の箇所に、抗体若しくはその抗原結合部分とコンジュゲートすることができるか又は任意の他の分子とコンジュゲートすることができる1つ又は複数の更なる官能基を含有することができる。そのような構造は、例えば、Belchevaら、J. Biomater. Sci Polymer Edn. 9(3)、207～226頁に記載されており、複数のタンパク質を含有するコンジュゲートの合成に有用である。

40

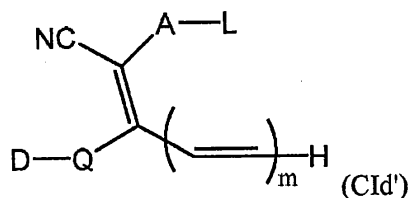
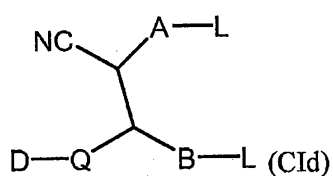
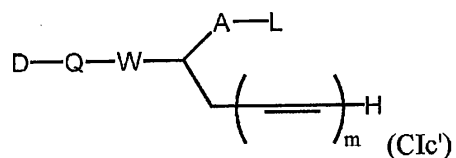
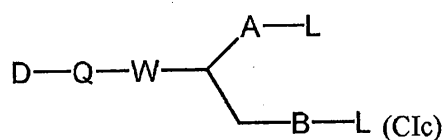
【 0 0 9 7】

式CI/CI'の単位を含有するコンジュゲート試薬は、下記の式(CIc)若しくは(CIc')を有することもあり、又は、Wがシアノ基を表す場合、(CId)若しくは(CId')を有することもある：

【 0 0 9 8】

50

【化 1 5】



10

【 0 0 9 9 】

(これらの式中、Dは、ペイロードを表し、Qは、連結基を表す)。

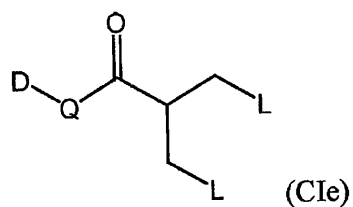
【 0 1 0 0 】

好ましいコンジュゲート試薬としては、以下のものが挙げられる:

【 0 1 0 1 】

20

【化 1 6】



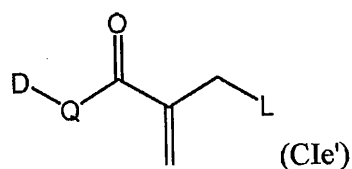
【 0 1 0 2 】

又は

30

【 0 1 0 3 】

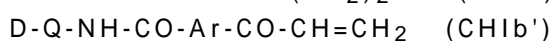
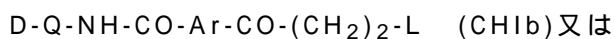
【化 1 7】



【 0 1 0 4 】

又は

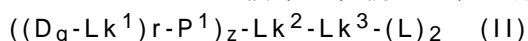
40



(これらの式中、Dは、ペイロードを表し、Qは、連結基を表す)。

【 0 1 0 5 】

コンジュゲート試薬は、例えば、一般式：



(式中、

Dは、ペイロードを表し:

qは、1～10の整数を表し;

Lk^1 は、リンカーを表し:

50

rは、1～10の整数を表し；

P¹は、結合又はc個の基-P²-H-を表し、ここでcは、2～11であり、P²は、少なくとも1つのエチレン単位-CH₂-CH₂-又はエチレングリコール単位-O-CH₂-CH₂-を含有する基であり；

zは、1～10の整数を表し；

Lk²は、結合又はd個のリンカーを表し、ここでdは2～11であり、該リンカーは、1～9個のアスパラギン酸残基及び/又はグルタミン酸残基からなり；

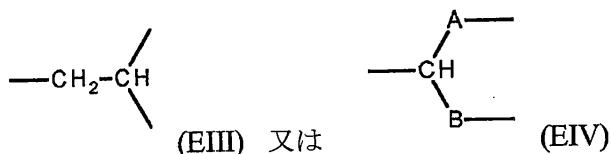
Lk³は、下記一般式のリンカー：

-CO-Ph-Y-Z- (EII)

(式中、Phは、置換されていてもよいフェニル基であり、Yは、CO基又はCH(OH)基を表し、Zは、下記式の基：

【0106】

【化18】



【0107】

を表し、この式中のA及びBの各々は、C₁～4アルキレン又はアルケニレン基を表す)を表し；

Lは、脱離基、例えば、下記で説明される脱離基の1つである)のものであってもよい。

【0108】

いずれの好適な連結基Q又はLk¹を使用してもよい。一実施形態では、Q又はLk¹は、例えば、直接結合、アルキレン基(好ましくはC₁～10アルキレン基)、又は置換されていてもよいアリール若しくはヘテロアリール基であってもよく、これらはいずれも、1つ又は複数の酸素原子、硫黄原子、-NR"基(ここでR"は、水素原子、又はアルキル(好ましくはC₁～6アルキル)、アリール(好ましくはフェニル)、若しくはアルキル-アリール(好ましくはC₁～6アルキル-フェニル)基を表す)、ケト基、-OCO-基、-COO-基、-O-CO-O-、-O-CO-NR"-、-NR"COO-、-CONR"-及び/又は-NR"CO-基を末端に有してもよく、或いはそれ又はそれらが割り込んでいてもよい。そのようなアリール及びヘテロアリール基Qは、本発明の1つの好ましい実施形態を形成する。好適なアリール基としては、フェニル及びナフチル基が挙げられ、その一方で、好適なヘテロアリール基としては、ピリジン、ピロール、フラン、ピラン、イミダゾール、ピラゾール、オキサゾール、ピリダジン、ピリミジン及びプリンが挙げられる。特に好適な連結基Q又はLk¹は、ヘテロアリール又は特にアリール基、特にフェニル基である。これらは、治療剤Dへの連結基、例えば、-NR"-CO-若しくは-CO-NR"-基、例えば-NH-CO-若しくは-CO-NH-基であるか又はそれを含有する基を有することができる。

【0109】

置換されていてもよいアリール、特にフェニル、又はヘテロアリール基上に存在しうる置換基としては、例えば、アルキル(好ましくは、OH若しくはCO₂Hにより置換されていてもよいC₁～4アルキル、特にメチル)、-CN、-NO₂、-CF₃、NR"2、-CO₂R"、-COH、-CH₂OH、-COR"、-OR"、-OCOR"、-OCO₂R"、-SR"、-SOR"、-SO₂R"、-NR"COR"、-NR".CO₂R"、-NO、-NHOH、-NR".OH、-CH=N-NR".COR"、-N⁺R"3、ハロゲン、例えばフッ素若しくは塩素、-C CR"及び-CH=CR"2から選択される1つ又は複数同じ若しくは異なる置換基が挙げられ、ここで各R"は、独立して、水素原子、又はアルキル(好ましくはC₁～6アルキル)、アリール(好ましくはフェニル)、若しくはアルキル-アリール(好ましくはC₁～6アルキル-フェニル)基を表す。電子求引性置換基の存在は、特に好ましい。好ましい

10

20

30

40

50

置換基としては、例えば、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{OR}''$ 、 $-\text{OCOR}''$ 、 $-\text{SR}''$ 、 $-\text{NR}''\text{COR}''$ 、 $-\text{NH}$
 OH 及び $-\text{NR}''\text{CO}_2\text{R}''$ が挙げられる。

【0110】

別の実施形態では、リンカーQ若しくは Lk^1 、又は本発明によるコンジュゲート中の任意の他のリンカーは、分解性基を含有することができ、すなわち、前記リンカーは、ペイロードとそのペイロードが結合されている抗体又はその抗原結合部分とを隔てる、生理条件下で切れる基を含有することができる。或いは、前記リンカーは、生理条件下で切断可能でないリンカーであってもよい。

【0111】

好適な分解性リンカーは、下記でより詳細に論じられる。

10

【0112】

q、r、z、c及びdの意味により、存在するD基の総数が決まる。この数は、例えば20以下、例えば15以下、例えば10以下、例えば1、2、3又は4であってもよい。

【0113】

リンカー

本発明のコンジュゲート、及びそれらの調製に好適なコンジュゲート試薬は、抗体又はその抗原結合部分をペイロードに連結するリンカーを含有する。このリンカーは、生理条件下で非分解性であってもよく、又は分解性であってもよい。コンジュゲートは、ペイロードとそのペイロードが結合されている又は最終的に結合されることになる抗体又はその抗原結合部分とを隔てる、生理条件下で切れる基を含有する、分解性リンカーを含むのが有利である。リンカーが生理条件下で切れる場合、細胞内条件下で切断可能であるのが好ましい。標的が細胞内にある場合、リンカーは、細胞外条件に対して実質的に非感受性である(すなわち、その結果、十分な用量の治療剤の細胞内標的への送達が妨げられない)のが好ましい。好適な分解性リンカーは、下記でより詳細に論じられる。

20

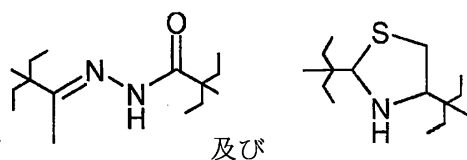
【0114】

リンカー、例えばQ又は Lk^1 が、分解性基を含有する場合、この基は、一般に加水分解条件に対して感受性であり、例えば、その基は、ある特定のpH値(例えば、酸性条件)で分解する基でありうる。加水分解/酸性条件は、例えば、エンドソーム又はリソソーム内で見出すことができる。酸性条件下で加水分解を受けやすい基の例としては、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シス-アコニットアミド、オルトエステル及びケタールが挙げられる。加水分解条件の影響を受けやすい基の例としては、

30

【0115】

【化19】



【0116】

が挙げられる。

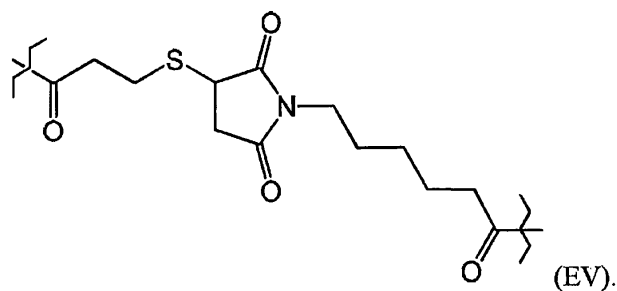
40

【0117】

好ましい実施形態では、リンカー、例えばQ又は Lk^1 は、

【0118】

【化 2 0】



10

【 0 1 1 9】

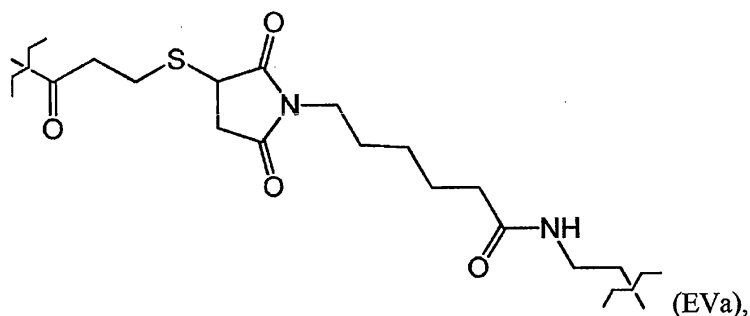
であるか、又はそれを含む。

【 0 1 2 0】

例えば、リンカー、例えばQ又はLk¹は、

【 0 1 2 1】

【化 2 1】



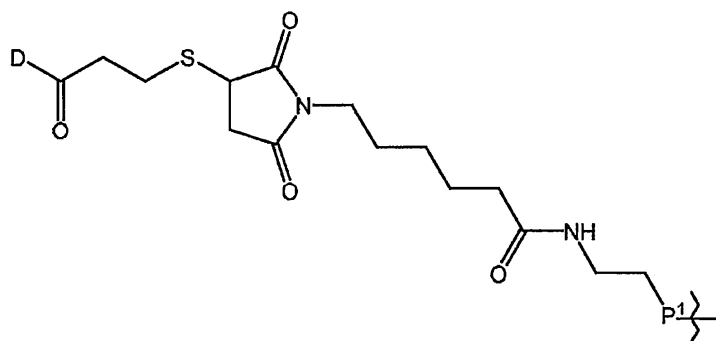
20

【 0 1 2 2】

であってもよく、この場合のリンカーは、好ましくは、次に示すようにD及びP¹基と結合される:

【 0 1 2 3】

【化 2 2】



40

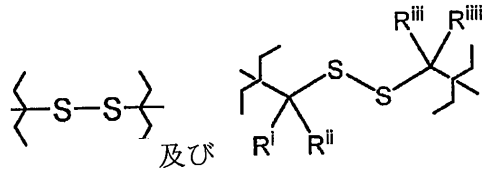
【 0 1 2 4】

リンカーは、還元条件下で分解されやすいこともある。例えば、リンカーは、チオール等の生物学的還元剤への曝露時に分解されうるジスルフィド基を含有することもある。ジスルフィド基の例としては、

【 0 1 2 5】

50

【化 2 3】



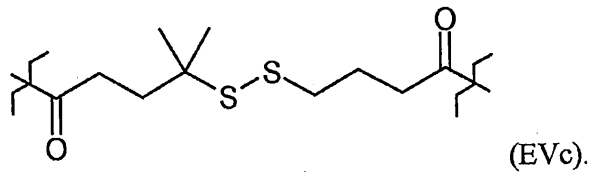
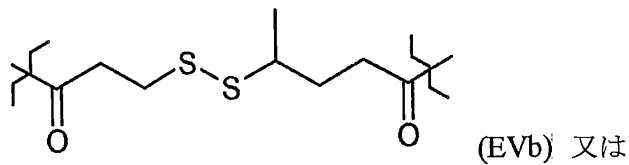
【 0 1 2 6】

(これらの式中の R^i 、 R^{ii} 、 R^{iii} 及び R^{iiii} は、各々独立して、水素又は $C_1 \sim 4$ アルキルである) 10

が挙げられる。好ましい実施形態では、リンカー、例えばQ又は Lk^1 は、

【 0 1 2 7】

【化 2 4】



【 0 1 2 8】

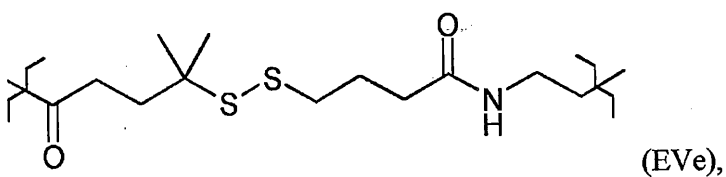
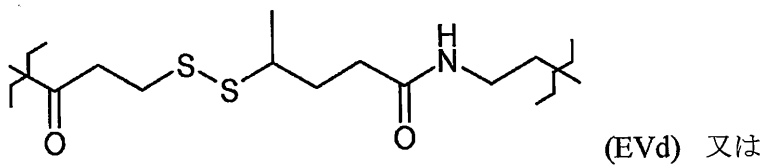
であるか、又はそれを含む。

【 0 1 2 9】

例えば、リンカーは、

【 0 1 3 0】

【化 2 5】

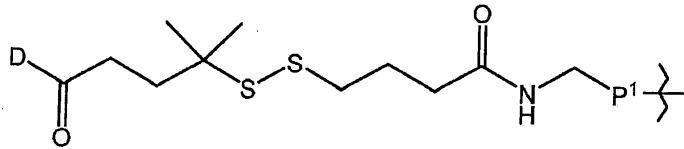
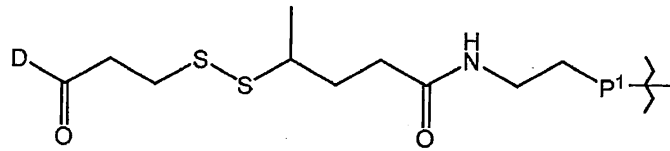


【 0 1 3 1】

であってもよく、この場合のリンカーは、好ましくは、次に示すようにD及び P^1 基と結合される:

【 0 1 3 2】

【化 2 6】



10

【0133】

リンカー、例えばQ又はLk¹は、酵素的分解を受けやすい基を含有することもあり、例えば、そのリンカーは、プロテアーゼ(例えば、リソソーム若しくはエンドソームプロテアーゼ)又はペプチダーゼによる分解を受けやすいこともある。例えば、リンカーは、少なくとも1つ、例えば、少なくとも2つ、又は少なくとも3つのアミノ酸残基(例えば、Phe-Leu、Gly-Phe-Leu-Gly、Val-Ala、Val-Cit、Phe-Lys)を含む、ペプチジル基を含有すること

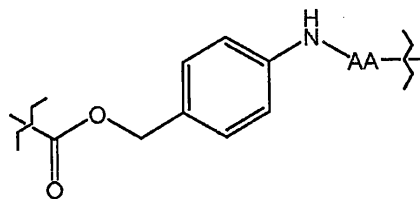
20

【0134】

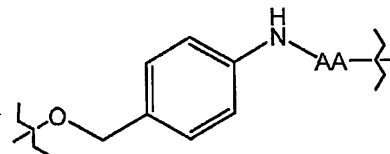
酵素的分解を受けやすい基の別の例は、

【0135】

【化 2 7】



, 又は



30

【0136】

(これらの式中、AAは、アミノ酸配列、特に、1又は2つのアミノ酸残基を含有するもの、特に、Val-Cit等の、2残基のプロテアーゼ特異的アミノ酸配列を表す)

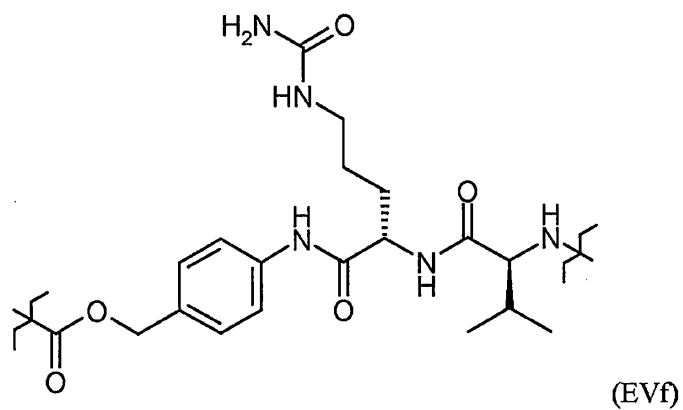
40

【0137】

好ましい実施形態では、リンカー、例えばQ又はLk¹は、

【0138】

【化 2 8】



10

【 0 1 3 9】

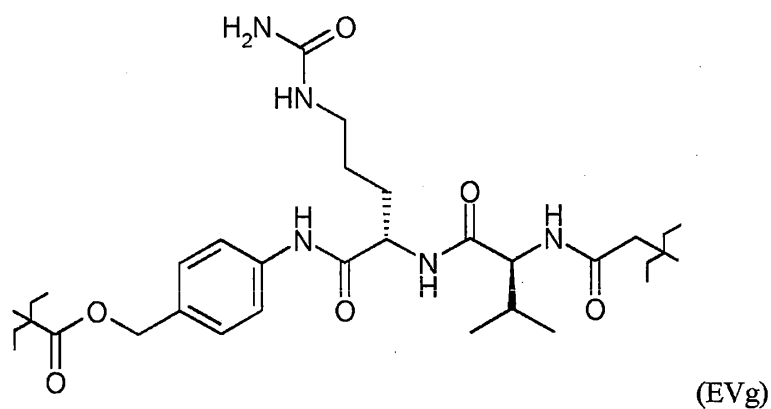
であるか、又はそれを含む。

【 0 1 4 0】

例えば、リンカーは、

【 0 1 4 1】

【化 2 9】



20

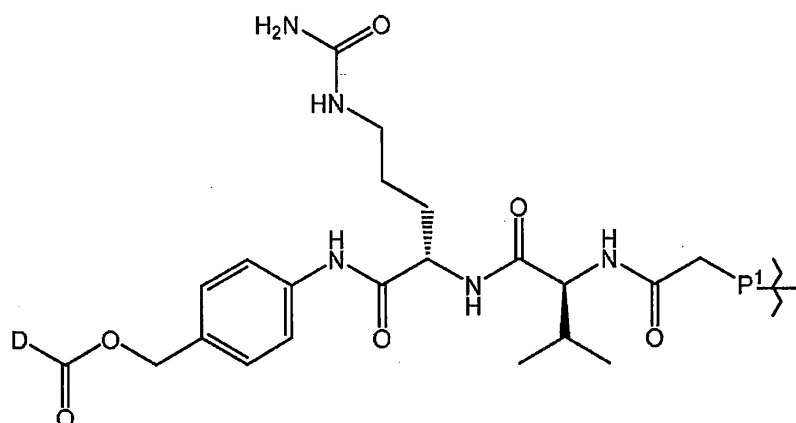
30

【 0 1 4 2】

であってもよく、この場合のリンカーは、好ましくは、下記に示すようにペイロードD及びP¹基と結合される：

【 0 1 4 3】

【化 3 0】



40

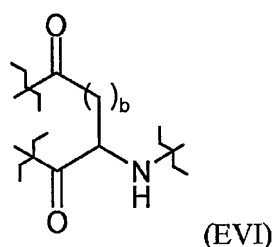
50

【 0 1 4 4 】

一実施形態では、リンカー、例えばQ又は Lk^1 は、単一のペイロードを担持する(すなわち、式(II)のコンジュゲート試薬中、 $q=1$)。上に示されている具体的なリンカー(EVa)、(EVd)及び(EVe)は、このタイプのものである。別の実施形態では、リンカーは、複数のペイロードを担持し(すなわち、式(II)のコンジュゲート試薬中、 $q \geq 1$ 、例えば2、3又は4)、このリンカーは、治療剤の1つより多くのコピーを本発明のコンジュゲートに組み込む手段として使用される。一実施形態では、この組み込みは、例えばアスパラギン酸残基、グルタミン酸残基又は類似の残基を含有しうる、分枝リンカー Lk^1 及び/又は Lk^2 の使用により、達成することができる。これにより、次の式の分枝要素:

【 0 1 4 5 】

【 化 3 1 】

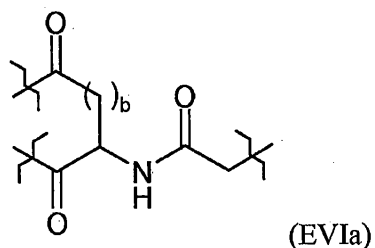


【 0 1 4 6 】

(式中、 b は、1、2又は3であり、 $b=1$ は、アスパラギン酸であり、 $b=2$ は、グルタミン酸であり、 $b=3$ は、1つの好ましい実施形態を表す)が導入される。式EVI中のアシル部分の各々は、好適なリンカー Lk^{1a} を介してペイロードとカップリングされていてもよく、ここで Lk^{1a} は、任意の好適なリンカー、例えば、上述の連結のうちの1つを含有する分解性リンカーである。特定の実施形態では、 Lk^{1a} は、上に示されている基(EVa)、(EVd)又は(EVe)を表す。アスパラギン酸残基又はグルタミン酸残基又は類似の残基のアミノ基は、いずれの好適な手段により P^1 と結合されていてもよく、例えば、連結は、アミノ基を介していてもよく、例えば、上記の分枝基は、 $-CO-CH_2-$ 基を介して、 P^1 に接続されていてもよく、したがって、

【 0 1 4 7 】

【 化 3 2 】



【 0 1 4 8 】

であってもよい。

【 0 1 4 9 】

必要に応じて、アスパラギン酸残基又はグルタミン酸残基又は類似の残基は、更なるアスパラギン酸残基及び/又はグルタミン酸残基及び/又は類似の残基とカップリングされていてもよく、例えば、

【 0 1 5 0 】

10

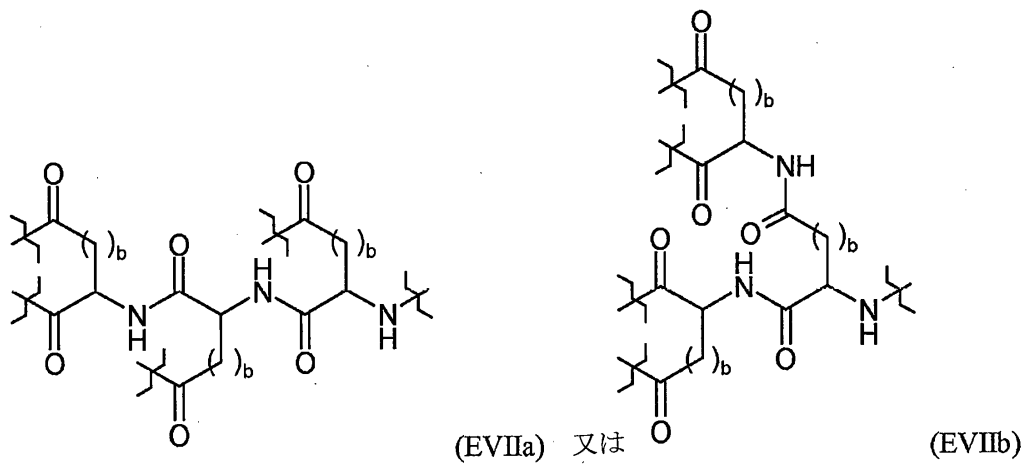
20

30

40

50

【化 3 3】



10

【 0 1 5 1】

等であってもよく、これにより、治療剤の多くの単位を組み込む可能性が得られる。上記の通り、各ペイロード単位は、いずれの好適なリンカー-Lk^{1a}を介してアスパラギン酸残基/グルタミン酸残基又は類似の残基に結合されていてもよい。

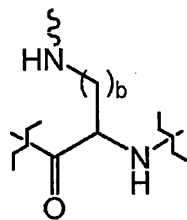
20

【 0 1 5 2】

同様に、アミノ酸リジン、セリン、スレオニン、システイン、アルギニン若しくはチロシン又は類似の残基を導入して、分枝を形成することができ、したがって、

【 0 1 5 3】

【化 3 4】



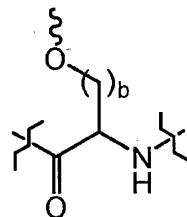
30

【 0 1 5 4】

(式中、リジンについて、bは4である)

【 0 1 5 5】

【化 3 5】



40

【 0 1 5 6】

(式中、セリンについて、bは1ある)
を形成することができる。

【 0 1 5 7】

ポリマー

50

本発明のコンジュゲートは、オリゴマー又はポリマー(本明細書では、便宜上、一緒に「ポリマー」と称される)を本発明による抗体又はその抗原結合部分と共に含有することができる。例えば、抗体又はその抗原結合部分は、リンカーを介してポリマーとコンジュゲートされていてよい。或いは、リンカーそれ自体がポリマーを含んでいてもよく、このポリマーが抗体又はその抗原結合部分とコンジュゲートされていてよい。ポリマーは、具体的には、水溶性の合成ポリマー、特にポリアルキレングリコールである。ポリマーは、例えば、ポリアルキレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、例えばポリアクリロイルモルホリン、ポリメタクリレート、ポリオキサゾリン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド又はポリメタクリルアミド、例えばポリカルボキシメタクリルアミド、又はHPMAコポリマーであってもよい。加えて、ポリマーは、酵素的又は加水分解的分解を受けやすいポリマーであってもよい。そのようなポリマーとしては、例えば、ポリエステル、ポリアセタール、ポリ(オルトエステル)、ポリカーボネート、ポリ(イミノカーボネート)、及びポリアミド、例えばポリ(アミノ酸)が挙げられる。ポリマーは、ホモポリマー、ランダムコポリマー、又は構造的に明確なコポリマー、例えばブロックコポリマーであってもよく、例えば、2つ以上のアルキレンオキシドから誘導されたブロックコポリマーであってもよく、又はポリ(アルキレンオキシド)及びポリエステル、ポリアセタール、ポリ(オルトエステル)若しくはポリ(アミノ酸)のいずれかから誘導されたブロックコポリマーであってもよい。使用することができる多官能性ポリマーとしては、ジビニルエーテル-無水マレイン酸のコポリマー及びスチレン-無水マレイン酸のコポリマーを挙げることができる。

【0158】

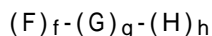
天然に存在するポリマー、例えば、多糖類、例えばキチン、デキストラン、デキストリン、キトサン、デンプン、セルロース、グリコーゲン、ポリ(シアル酸)、ヒアルロン酸及びこれらの誘導体も使用してもよい。ポリグルタミン酸等のポリマーも使用してもよく、糖類又はアミノ酸等の天然モノマー、及びエチレンオキシド又はメタクリル酸等の合成モノマーから誘導された、ハイブリッドポリマーも使用してもよい。

【0159】

ポリマーがポリアルキレングリコールである場合、このポリマーは、好ましくは、 C_2 及び/又は C_3 単位を含有するものであり、特に、ポリエチレングリコールである。ポリマー、特にポリアルキレングリコールは、単一の直鎖を含有してもよく、又は小さいか若しくは大きい多数の鎖で構成されている分枝した形態を有していてもよい。いわゆるプルロニックは、PEGブロックコポリマーの重要なクラスである。これらは、エチレンオキシド及びプロピレンオキシドブロックから誘導される。置換されている又はキャップされているポリアルキレングリコール、例えばメトキシポリエチレングリコールを使用してもよい。

【0160】

ポリマーは、例えば、その内容が参照により本明細書に組み入れられるWO 2004/113394に記載されている方法により生成された型ポリマーであってもよい。例えば、ポリマーは、一般式:



(式中、

Fは、存在する場合、Gに関して定義される通りのものではない1つ又は複数のオレフィン性不飽和モノマーの付加重合により得ることができ、

Gは、直鎖状、分枝状又は星形であり、置換されている又は非置換であり、オレフィン性不飽和部分を有する、複数のモノマーの付加重合により得ることができ、

Hは、存在する場合、Gに関して定義された通りのものではない1つ又は複数のオレフィン性不飽和モノマーの付加重合により得られ、

f及びhは、0～500の間の整数であり、

gは、0～1000の整数であり、

F及びGの少なくとも一方は存在する)

を有する型ポリマーであってもよい。

【0161】

ポリマーは、所望されるいずれの方法で誘導体化又は官能化されていてもよい。反応性基は、ポリマー末端若しくは末端基に連結されていてもよく、又はポリマー鎖に沿ってペンダント基によって連結されていてもよく、このような場合のポリマーは、例えば、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、又は無水マレイン酸コポリマーである。必要に応じて、従来の方法を使用してポリマーを固体支持体にカップリングさせてもよい。

【0162】

ポリマーの最適な分子量は、当然ながら、意図される用途によって決まる。長鎖ポリマーを使用してもよく、例えば、数平均分子量が約75,000、例えば、50,000、40,000又は30,000g/モル以下であってもよい。例えば、数平均分子量は、500g/モル～約75,000g/モルの範囲であってもよい。しかし、例えばわずか2個の繰り返し単位、例えば2～50個の繰り返し単位を有する、別個のPEG鎖からなる非常に小さいオリゴマーは、一部の用途に有用であり、本発明の1つの好ましい実施形態に存在する。例えば、2～48、例えば2～36、例えば2～24単位を含有するポリマーを使用してもよい。例えば、12、20、24、36、40又は48個の繰り返し単位を有する直鎖又は分枝状PEGを使用してもよい。コンジュゲートは、例えば悪性腫瘍、感染症若しくは自己免疫疾患に起因する又は外傷に起因する炎症の処置における使用のために、循環を離れて組織に浸透することが意図される場合、30,000g/モル以下の範囲のより低い分子量のポリマーを使用するほうが有利でありうる。コンジュゲートが循環内に残存することが意図される用途については、より高い分子量のポリマー、例えば、20,000～75,000g/モルの範囲を使用するほうが有利でありうる。

【0163】

好ましくは、ポリマーは、合成ポリマーであり、好ましくは、ポリマーは、水溶性ポリマーである。水溶性ポリエチレングリコールの使用は、多くの用途に特に好ましい。

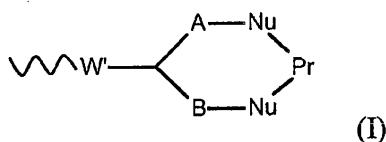
【0164】

WO2016/063006として発行されたPCT/GB2015/052953が優先権を主張する、本発明者らの同時係属出願である英国特許第1418986.4号は、特定の構造のPEG含有リンカーの使用に関するものであり、これらのリンカーを本発明で使用するができる。その出願には以下のことが開示されている：

「本発明は、タンパク質又はペプチドと治療剤、診断剤又は標識剤のコンジュゲートであって、タンパク質又はペプチド結合部分とポリエチレングリコール部分とを含有し、前記タンパク質又はペプチド結合部分が、一般式：

【0165】

【化36】



【0166】

(式中、Prは、前記タンパク質又はペプチドを表し、各Nuは、前記タンパク質若しくはペプチド中に存在する又はそれに連結されている求核剤を表し、A及びBの各々は、独立してC₁～4アルキレン又はアルケニレン鎖を表し、W'は、電子求引基を表すか、又は電子求引基の還元により得られる基を表す)

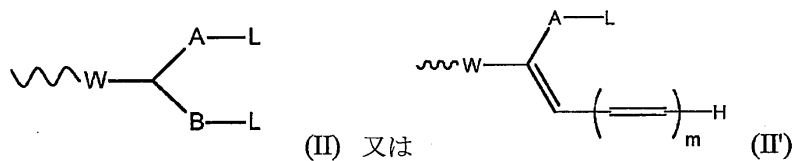
を有し、前記ポリエチレングリコール部分が、式-CH₂CH₂OR(この式中、Rは、水素原子、アルキル基、例えばC₁～4アルキル基、特にメチル基、又は置換されていてもよいアリール基、特にフェニル基、特に非置換フェニル基を表す)の末端基を有するペンダントポリエチレングリコール鎖であるか、又はそれを含む、コンジュゲートを提供する。

【0167】

本発明は、タンパク質又はペプチドと反応することができ、治療剤、診断剤又は標識剤とポリエチレングリコール部分とを含む、コンジュゲート試薬であって、下記式の基：

【0168】

【化37】



10

【0169】

(式中、Wは、電子求引基を表し、A及びBは、上記で示された意味を有し、mは、0～4であり、各Lは、独立して脱離基を表す)

を含み、前記ポリエチレングリコール部分が、式-CH₂CH₂OR(この式中、Rは、水素原子、アルキル基、例えばC₁～₄アルキル基、特にメチル基、又は置換されていてもよいアリール基、特にフェニル基、特に非置換フェニル基を表す)の末端基を有するペンダントポリエチレングリコール鎖であるか、又はそれを含む、コンジュゲート試薬も提供する。

【0170】

本発明は、本発明によるコンジュゲートの調製方法であって、タンパク質又はペプチドを本発明によるコンジュゲート試薬と反応させる工程を含む調製方法も提供する。

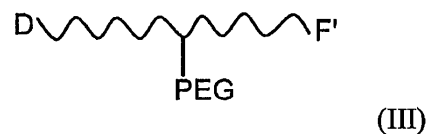
20

【0171】

本発明のコンジュゲートは、模式的に、式：

【0172】

【化38】



30

【0173】

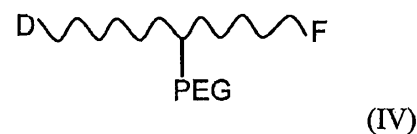
(式中、Dは、治療剤、診断剤又は標識剤を表し、F'は、式Iの基を表し、PEGは、式-CH₂CH₂ORの末端基を有するペンダントポリエチレングリコール鎖を表す)により表すことができる。

【0174】

本発明の試薬は、模式的に式：

【0175】

【化39】



40

【0176】

(式中、Dは、治療剤、診断剤又は標識剤を表し、Fは、式II又はII'の基を表し、PEGは、式-CH₂CH₂ORの末端基を有するペンダントポリエチレングリコール鎖を表す)により表すことができる。官能基Fは、下記で説明されるようなタンパク質又はペプチド中に存在する2つの求核剤と反応することができる。

【0177】

50

本発明のコンジュゲート及び試薬のポリエチレングリコール(PEG)部分は、式-CH₂CH₂OR(式中、Rは、水素原子、アルキル基、例えばC₁~₄アルキル基、特にメチル基、又は置換されていてもよいアリール基、特にフェニル基、特に非置換フェニル基を表す)の末端基を有するペンダントPEG鎖であるか、又はそれを含む。好ましくは、Rは、メチル基又は水素原子である。

【0178】

PEG部分の全サイズは、当然ながら、意図される用途に依存する。一部の用途には、高分子量PEGを使用してもよく、例えば、数平均分子量が約75,000g/モル以下、例えば、50,000、40,000又は30,000g/モル以下であってもよい。例えば、数平均分子量は、500g/モル~約75,000の範囲であってもよい。しかし、一部の用途にはより小さいPEGのほ

10

【0179】

1つの好ましい実施形態では、PEG部分中のPEGの全てがペンダントPEG鎖中に存在する。別の実施形態では、PEGは、分子の主鎖に存在することもあり、これは、下でより詳細に論じられる。

【0180】

PEG部分と同様に、ペンダントPEG鎖のサイズは、意図される用途に依存することになる。一部の用途には、高分子量ペンダントPEGを使用してもよく、例えば、数平均分子量が約75,000g/モル以下、例えば、50,000、40,000又は30,000g/モル以下であってもよい。例えば、数平均分子量は、500g/モル~約75,000の範囲であってもよい。しかし、多くの用途には、より小さいPEG鎖が使用されうる。例えば、前記PEG鎖は、3,000g/モル以下の分子量を有してもよい。しかし、例えばわずか2個の繰り返し単位、例えば2~50個の繰り返し単位を有する、別個のPEG鎖からなる非常に小さいオリゴマーは、一部の用途に有用であり、本発明の1つの好ましい実施形態に前記PEG鎖のように存在する。ペンダントPEG鎖は、直鎖であってもよく、分枝状であってもよい。12、20、24、36、40又は48個の繰り返し単位を有するPEG鎖、例えば直鎖又は分枝状の鎖を使用してもよい。

20

【0181】

コンジュゲーション方法

本発明による抗体又はその抗原結合部分と反応することができる官能基を含有するコンジュゲート試薬を前記抗体又はその抗原結合部分と反応させてコンジュゲートを形成することができ、そのような反応は、本発明の更なる態様を形成する。本発明のこの更なる態様の好ましい実施形態では、上記の構造CI、CI'、CII又はIII(好ましい部分構造の全てを含む)のうちの1つを有するコンジュゲート試薬を抗体又はその抗原結合部分と反応させて、コンジュゲートを形成する。これらの試薬のうちの1つを使用するコンジュゲーション方法の直接の生成物は、電子求引基Wを含有するコンジュゲートである。しかし、前記コンジュゲーション方法は、好適な条件下で可逆的である。これは、一部の用途、例えば、ペイロードの迅速な放出が求められる用途には望ましいこともあるが、他の用途には、ペイロードの迅速な放出が望ましくないこともある。それ故、ペイロードの放出を防止する部分をもたらすように電子求引性部分Wを還元することによりコンジュゲートを安定させることが望ましいことがある。したがって、上記の方法は、コンジュゲート中の電子求引基Wを還元する追加の任意選択の工程を含むことがある。水素化ホウ素類、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素カリウム又はトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムの還元剤としての使用は、特に好ましい。使用することができる他の還元剤としては、例えば、塩化スズ(II)、アルコキシド、例えばアルミニウムアルコキシド、及び水素化アルミニウムリチウムが挙げられる。

30

40

【0182】

したがって、例えば、ケト基を含有する部分Wを、CH(OH)基を含有する部分に還元することができ、エーテル基をヒドロキシ基とエーテル化剤の反応により得ることができ、エステル基をヒドロキシ基とアシル化剤の反応により得ることができ、アミン基をケトン

50

から還元的アミノ化により調製することができ、又はアミドをアミンのアシル化により形成することができる。スルホンのスルホキシド、スルフィド又はチオールエーテルに還元することができる。シアノ基をアミン基に還元することができる。

【0183】

上記の式CI又はCIIのコンジュゲート試薬の使用の重要な特徴は、 α -メチレン脱離基及び二重結合が、マイケル活性化部分として役立つ電子求引性官能基と交差共役していることである。交差機能性試薬(cross-functional reagent)中の脱離基が直接置換されやすいのではなく除去されやすく、電子求引基がマイケル反応に好適な活性化部分である場合には、連続したマイケル及びレトロマイケル反応により逐次的分子内ビスアルキル化が起こりうる。脱離基は、潜在的共役二重結合を隠蔽するのに役立ち、前記潜在的共役二重結合は、第1のアルキル化が起こって式CI'の試薬を生じてから露出され、ビスアルキル化が逐次的な相互作用性のマイケル及びレトロマイケル反応の結果として生じる。交差機能性アルキル化剤は、二重結合と共役する又は脱離基と電子求引基間で共役する複数の結合を含有しうる。

10

【0184】

抗体又はその抗原結合部分への結合が、その抗体又は抗原結合部分中のジスルフィド結合に由来する2個の硫黄原子を介したものである場合、上記方法は、ジスルフィド結合を原位置で還元することにより行うことができ、その後、還元生成物は、上記の構造Cのうちの1つを有するコンジュゲート試薬と反応する。好ましくは、ジスルフィド結合を還元し、一切の過剰な還元剤を例えば緩衝液交換により除去し、その後、コンジュゲート試薬を導入する。ジスルフィド結合は、例えば、従来の方法を使用してジチオトレイトール、メルカプトエタノール、又はトリス-カルボキシエチルホスフィンで還元することができる。

20

【0185】

コンジュゲーション反応は、先行技術で開示されている条件を含む、公知のコンジュゲーション方法と同様の条件下で行うことができる。例えば、上記の構造Cのうちの1つを有するコンジュゲート試薬を使用する場合、本発明によるコンジュゲーション反応は、WO 2005/007197、WO 2009/047500、WO 2010/100430、WO 2014/064423及びWO 2014/064424に記載されているものと同様の反応条件下で行うことができる。全ての反応物質が可溶である溶媒又は溶媒混合物中で方法を行うことができる。例えば、タンパク質を水性反応媒体中でポリマーコンジュゲート試薬と直接反応させることができる。求核剤のpH要件に依存して、この反応媒体を緩衝することもできる。反応に最適なpHは、一般に少なくとも4.5、典型的には約5.0～約8.5の間、好ましくは6.0～7.5であるであろう。最適な反応条件は、当然ながら、用いられる具体的な反応物質に依存することになる。

30

【0186】

水性反応媒体を使用する場合、3～40 °Cの間の反応温度が一般に好適である。有機媒体(例えば、THF、酢酸エチル、アセトン、アセトニトリル、DMF、DMSO)中で行われる反応は、概して室温以下の温度で行われる。1つの好ましい実施形態では、反応は、ある割合の有機溶媒、例えば20体積%の有機溶媒、典型的には5～20体積%有機溶媒を含有しうる、水性緩衝液中で行われる。

40

【0187】

化学量論量的当量の又はわずかに過剰なコンジュゲート試薬を使用して、抗体又は抗原結合部分を効果的にコンジュゲートすることができる。しかし、過剰なコンジュゲート試薬とのコンジュゲーション反応を行うことも可能であり、一部のタンパク質にはこれが望ましいこともある。過剰な試薬は、コンジュゲートのその後の精製中に従来手段、例えばイオン交換又はHPLCクロマトグラフィーによって容易に除去することができる。

【0188】

当然ながら、抗体が十分な好適な結合点を含有する場合、1つより多くのコンジュゲート試薬を抗体又は抗原結合部分とコンジュゲートさせることが可能である。例えば、2つ

50

の異なるジスルフィド結合を含有する抗体の場合、又は1つのジスルフィド結合を含有し、ポリヒスチジンタグも有する抗体の場合、抗体1分子当たり2分子の試薬をコンジュゲートさせることが可能である。抗体は、一般に4つの好適なジスルフィド結合を含有することから、反応条件の好適な選択により、ペイロードを担持している1つのリンカーを、各ジスルフィド結合を交差してコンジュゲートさせることが可能である。各リンカーが単一のペイロードを担持している場合、これにより、4の薬物抗体比(DAR)を有するコンジュゲートが得られる。上記で説明したような分枝状リンカーの使用により、ペイロードの更なるコピーを結合させてもよい。

【0189】

抗体又はその抗原結合断片を放射性金属又は常磁性イオンとコンジュゲートさせる場合には、一部の実施形態では、放射性金属又は常磁性イオンを、これらのイオンに結合するための1つ又は複数のキレート基が結合されている長いテールを有する試薬と反応させることができる。一部の実施形態では、前記試薬は、抗体又はその抗原結合部分を共有結合で係留するように設計された反応性基を有することができる。長いテールは、イオンに結合するためのキレート基と結合することができるペンダント基を有するポリマー、例えば、ポリリジン、多糖類、ポリエチレングリコール(PEG)又は他の誘導体化された若しくは誘導体化可能な鎖でありうる。本明細書における実施形態に従って使用することができるキレート基の例としては、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、DOTA、NOTA、NODAGA、ETA、デフェロキサミン(Df、これはDFOと称されることもある)、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビス-チオセミカルバゾン、ポリオキシム、及びこれらに類するものが挙げられるが、それらに限定されない。同キレートは、マンガン、鉄及びガドリニウム等の非放射性金属と錯化されている場合、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分及び担体と共に使用するとMRIに有用である。大環状キレート、例えばNOTA、NODAGA、DOTA及びTETAは、ガリウム、イットリウム及び銅の放射性核種を含むがこれらに限定されない様々な金属と共に、それぞれ利用される。RAIT用のラジウム-223等の放射性核種に安定的に結合させるために興味深い他の環型キレート、例えば大環状ポリエーテルを使用してもよい。ある特定の実施形態では、キレート部分を使用して、PET分析に使用するための標的化分子にPETイメージング剤、例えばアルミニウム- ^{18}F 又はジルコニウム-89錯体を結合させることができる。

【0190】

有用性及び組成物

本発明の抗体及びそれらの抗原結合部分、並びに本発明のコンジュゲートは、PSMAにより媒介される又はPSMAの発現増加を特徴とする疾患及び状態の処置、予防又は診断に使用される。したがって、本発明は、診断又は治療での使用のための、具体的には、PSMAにより媒介される又はPSMAの発現増加を特徴とする疾患又は状態の診断、処置又は予防に使用するための、本発明の抗体若しくはその抗原結合部分又は本発明のコンジュゲートを提供する。本発明は、PSMAにより媒介される又はPSMAの発現増加を特徴とする疾患又は状態を処置又は予防する方法であって、それを必要とする対象に、本発明の抗体若しくはその抗原結合部分又はコンジュゲートを、前記疾患又は状態の処置又は予防に有効な量で投与する工程を含む方法も提供する。本発明は、PSMAにより媒介される又はPSMAの発現増加を特徴とする疾患又は状態を診断、処置又は予防するための医薬の製造に使用するための、本発明による抗体若しくはその抗原結合部分又はコンジュゲートの使用も提供する。

【0191】

一部の実施形態では、PSMA媒介疾患は、がん、例えば、前立腺がん又は非前立腺がん(本明細書中の他の箇所に記載の非前立腺がんを含む)である。非前立腺がんは、好ましくは、一過性細胞癌を含む膀胱がん;膵管癌を含む膵臓がん;非小細胞肺癌を含む肺がん;通常の腎細胞癌を含む腎臓がん;軟部組織肉腫を含む肉腫;転移性腺癌を含む肝臓がん;乳癌を含む乳がん;多形神経膠芽腫を含む脳がん;神経内分泌癌;結腸癌を含む結腸がん;精巣胎児性癌を含む精巣がん;及び悪性黒色腫を含む黒色腫からなる群から選択される。最も有効ながん処

置は、一般に、幾つかの薬物の併用投与を必要とする。したがって、本発明の活性薬剤は、少なくとも1つの更なる化学療法剤と組み合わせて投与されることが好ましい。

【0192】

更に別の態様では、本発明は、例えばPSMA関連疾患(例えば、ヒトPSMA関連疾患)を診断するために、試料中のPSMA抗原の存在をin vitro又はin vivoで検出するために、本発明の抗体若しくはそれらの抗原結合部分又はコンジュゲートを使用する方法を提供する。一部の方法では、これは、試験すべき試料に加えて対照試料を、本発明の抗体又はその抗原結合部分又は本発明のコンジュゲート(二重特異性又は多重特異性分子を含む)と、抗体とPSMA間での複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより達成される。そのようなアッセイをin vitroで行うことができる。その場合、複合体形成が被験試料において(例えば、ELISAにより)検出され、被験試料と対照試料間の複合体形成の一切の統計的に有意な増加が被験試料中のPSMAの存在を示す。

10

【0193】

他の実施形態では、本発明は、PSMAにより媒介される又はPSMAの発現増加を特徴とする疾患又は状態を診断する方法であって、PSMAにより媒介される又はPSMAの発現増加を特徴とする疾患又は状態を有するか又は有する疑いがある対象に、診断剤コンジュゲートされた本発明の抗体若しくはその抗原結合部分又はコンジュゲートを投与する工程;前記対象にイメージング法を受けさせて、標識された抗体若しくはその抗原結合部分又はコンジュゲートを可視化する工程;及び前記対象が、PSMAにより媒介される又はPSMAの発現増加を特徴とする疾患又は状態を有することを決定する工程を含む方法に、使用することができる。

20

【0194】

in vivoでの診断のために、本発明の抗体又はその抗原結合部分は、上記で説明したような抗体が検出可能なマーカーで標識されているコンジュゲートの形態であるほうが好ましい。検出可能なマーカーとしては、放射性又は蛍光マーカーが挙げられる。投与されることになる抗体又は抗原結合抗体断片に対して使用することができる放射標識としては、例えば、アクチニウム(^{225}Ac)、アスタチン(^{211}At)、ビスマス(^{213}Bi 若しくは ^{212}Bi)、炭素(^{14}C)、コバルト(^{57}Co)、銅(^{67}Cu)、フッ素(^{18}F)、ガリウム(^{68}Ga 若しくは ^{67}Ga)、ホルミウム(^{166}Ho)、インジウム(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、若しくは ^{111}In)、ヨウ素(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、若しくは ^{121}I)、鉛(^{212}Pb)、ルテチウム(^{177}Lu)、パラジウム(^{103}Pd)、リン(^{32}P)、白金(^{195}Pt)、レニウム(^{186}Re 若しくは ^{188}Re)、ロジウム(^{105}Rh)、ルテニウム(^{97}Ru)、サマリウム(^{153}Sm)、スカンジウム(^{47}Sc)、テクネチウム(^{99}Tc)、イッテルビウム(^{169}Yb 若しくは ^{175}Yb)、又はイットリウム(^{90}Y)が挙げられる。抗体及び抗体断片と共に使用するのに好適な蛍光マーカーも、当技術分野において周知である。

30

【0195】

適切な放射性核種(例えば、PETイメージングのために陽電子放射体ヨウ素-124、銅-64、フッ素-18、ガリウム-68及び/若しくはジルコニウム-89)又はフルオロフォア(蛍光イメージングのために)で標識されている場合、抗体又はその抗原結合部分を患者の前臨床イメージングに及び/又は臨床イメージングに使用することができる。抗体又はその抗原結合部分は、単一光子を放出する放射性核種、例えば、インジウム-111、ヨウ素-123及びルテチウム-177に放射標識を単に変更することにより、可能性のあるSPECTイメージング剤として使用することもできる。

40

【0196】

別の態様では、本発明は、本発明による抗体若しくはその抗原結合部分又は本発明によるコンジュゲートを薬学的に許容される担体と共に含む、医薬組成物又は診断用組成物を提供する。前記組成物は、必要に応じて、更なる活性成分を含有することもできる。

【実施例】

【0197】

実施例で言及する市販の試薬は、別段の指示がない限り製造業者の説示に従って使用した。細胞源は、実施例中で及び本明細書全体を通してそのたびごとにECACC又はATCC受

50

託番号のどちらかにより特定する。ECACCは、欧州細胞カルチャーコレクション(European Collection of Cell Cultures)、Salisbury、Englandであり、その一方でATCCは、アメリカ合衆国細胞培養系統保存機関(American Type Culture Collection)、Manassas、USAである。別段の定義がない限り、本明細書で使用する全ての専門及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解されているのと同じ意味を有する。例示的な方法及び材料を下記で説明するが、本明細書に記載のものと同様又は等価の方法及び材料も本発明の実施又は試験の際に使用することができる。材料、方法及び例は、説明に役立つものに過ぎず、範囲の限定となることを意図したものではない。

【0198】

(実施例1)

抗体の生成

5つの重鎖及び4つの軽鎖配列(それぞれ、VH1～VH5、及びV₁～V₄と表記する)を選択した。それらのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号10～14及び15～18であり、それらの核酸配列は、それぞれ配列番号1～5及び6～9である。比較対照先行技術抗体も選択した:mJ591の重鎖及び軽鎖V領域配列(アミノ酸配列それぞれ配列番号23及び24、並びに核酸それぞれ配列番号19及び20)、並びに脱免疫化J591の重鎖及び軽鎖V領域配列(アミノ酸配列それぞれ配列番号25及び26、並びに核酸それぞれ配列番号21及び22)。

【0199】

変異V領域をコードするDNAを合成し、pANT抗体発現ベクター(図1a)にサブクローニングし、重鎖及び軽鎖V領域は、それぞれ、pANT17.2及びpANT13.2にクローニングした。重鎖V領域遺伝子は、ヒト₁重鎖遺伝子(G1m3(G1m(f))アロタイプ)とインフレーションで、MluI及びHindIII部位を介してpANT17.2にクローニングし、軽鎖V領域遺伝子は、ヒトカッパ軽鎖定常領域遺伝子(Km3アロタイプ)とインフレーションで、BssHII及びBamHI部位を介してpANT13.2にクローニングした。重鎖遺伝子と軽鎖遺伝子の両方の転写は、CMV I/Eプロモーター(米国特許第5168062号及び米国特許第5385839号、University of Iowa)の制御下にあり、pANT17プラスミドは、SV40プロモーターの制御下の突然変異型dhfrミニ遺伝子(Simonsen & Levinson 1983、PNAS 80:2495～2499頁)、及び真核細胞における選択のためのポリA配列を含有していた。pANT17.2とpANT13.2の両方が、原核生物選択のための^R-ラクターゼ(Ap^R)遺伝子、及び原核細胞での増殖のためのpMB1複製起点を含有していた。全てのプラスミドを大腸菌(E. coli) XL1-blue(Stratagene社カタログ番号200130)で増殖させた。次いで、重鎖及び軽鎖発現構築物をエレクトロポレーションによりNS0細胞に安定的にコトランスフェクトし、増殖培地にメトトレキサートを含めることにより抗体発現クローンを選択した。キメラ、脱免疫化、並びにヒト化VH及びV₁鎖の全ての組合せ(すなわち、mJ591のヒト化変異体の合計20の対合)をNS0細胞にトランスフェクトし、分泌された抗体を上記の通り培養上清からプロテインAクロマトグラフィーにより精製した。

【0200】

調製した抗体をTable 1(表1)に示す:

【0201】

10

20

30

40

50

【表 1】

Table 1:

抗体名	重鎖	軽鎖
AB-P1	配列番号 35	配列番号 36
AB-P2	配列番号 37	配列番号 38
AB-01 [VH4/VK3]	配列番号 13	配列番号 17
AB-02 [VH5/VK3]	配列番号 14	配列番号 17
AB-03 [VH4/VK4]	配列番号 13	配列番号 18
AB-04 [VH5/VK4]	配列番号 14	配列番号 18
AB-05 [VH1/VK1]	配列番号 10	配列番号 15
AB-06 [VH1/VK2]	配列番号 10	配列番号 16
AB-07 [VH1/VK3]	配列番号 10	配列番号 17
AB-08 [VH1/VK4]	配列番号 10	配列番号 18
AB-09 [VH2/VK1]	配列番号 11	配列番号 15
AB-10 [VH2/VK2]	配列番号 11	配列番号 16
AB-11 [VH2/VK3]	配列番号 11	配列番号 17
AB-12 [VH2/VK4]	配列番号 11	配列番号 18
AB-13 [VH3/VK1]	配列番号 12	配列番号 15
AB-14 [VH3/VK2]	配列番号 12	配列番号 16
AB-15 [VH3/VK3]	配列番号 12	配列番号 17
AB-16 [VH3/VK4]	配列番号 12	配列番号 18
AB-17 [VH4/VK1]	配列番号 13	配列番号 15
AB-18 [VH4/VK2]	配列番号 13	配列番号 16
AB-19 [VH5/VK1]	配列番号 14	配列番号 15
AB-20 [VH5/VK2]	配列番号 14	配列番号 16
AB-21 [キメラ]	配列番号 23	配列番号 24
AB-22 [脱免疫化]	配列番号 25	配列番号 26

【0202】

精製の前に、0.4M NaOHを使用して管類及びプロテインAカラムの両方を脱バイロジェン処理した。カラムを20カラム体積の1×PBS pH7.4で再平衡させた。細胞培養上清を採取し、10×PBSを使用して1×PBS pH7.4に調整し、滅菌濾過した。濾過した上清を0.5 mL/分でポンプで送ってカラムに通した。1×PBS pH7.4でカラムを洗浄し、滅菌0.1M クエン酸ナトリウム pH3を使用してIgGを溶出し、0.9mL画分収集し、0.1mLの滅菌1M Tris-HCl pH 9で中和した。滅菌条件下で、産物の緩衝液をPBS pH7.4に交換して、一切の溶出緩衝液を除去した。その後、変性PBS(20mM リン酸塩、150mM NaCl、20mM EDTA、pH7.5)を移動相として使用して、プロテインA精製材料をHiLoad(商標)26/60 Su

perdex(商標) 200pg分取SECカラム(GE Healthcare社)に流した。抗体を単量体画分に溶離し、その後、ピーク画分をプールし、濃縮し、滅菌濾過した。濃縮後、各抗体の予測アミノ酸配列に基づく吸光係数、 $E_{c}(0.1\%)$ 、を使用してOD280nmにより抗体を定量した。

【0203】

(実施例2)

PSMA発現NS0細胞株の生成

完全長ヒトPSMA抗原(FOLH1_HUMAN ECACC受託番号Q04609)をコドン最適化し(DNA配列番号31 アミノ酸配列番号32)、合成し、BglII及びEagI部位(重鎖発現カセットを除去する)を介して発現ベクターpANT17.2にサブクローニングした(図1b)。PSMA遺伝子の転写は、CMV I/Eプロモーター(米国特許第5168062号及び米国特許第5385839号、University of Iowa)の制御下にあり、pANT17.2プラスミドは、SV40プロモーターの制御下の突然変異型dhfrミニ遺伝子(Simonsen & Levinson 1983、PNAS 80:2495~2499頁)、及び真核細胞における選択のためのポリA配列を含有していた。pANT17.2は、原核性選択のための λ -ラクターゼ(Ap^R)遺伝子、及び原核細胞での増殖のためのpMB1複製起点も含有していた。全てのプラスミドを大腸菌XL1-blue(Stratagene社カタログ番号200130)で増殖させた。次いで、PSMA発現構築物をエレクトロポレーションによりNS0細胞に安定的にコトランスフェクトし、増殖培地にメトトレキサートを含めることによりPSMA発現クローンを選択した。PSMA発現クローンを、FACSに基づくアッセイにより分析した。

【0204】

対照PSMA結合抗体(脱免疫化J415-配列番号27~30)をコードするDNAを合成し、以前に記載されたように(米国特許第7,045,605号参照)、発現ベクターpANT17.2及びpANT13.2にサブクローニングした。次いで、重鎖及び軽鎖発現構築物をエレクトロポレーションによりNS0細胞に安定的にコトランスフェクトし、増殖培地にメトトレキサートを含めることにより抗体発現クローンを選択した。分泌された抗体を細胞培養上清からプロテインAクロマトグラフィーにより精製した。精製された抗体を使用して、下で説明するようにトランスフェクトNS0細胞株のPSMA発現を評定した。

【0205】

NS0細胞上でのPSMA抗原の発現を、参照抗体として脱免疫化J415を使用してFACS結合ELISAで評定した。無発現又はPSMA発現NS0細胞(1染色当たり細胞 5×10^5 個)を採取し、ダルベッコPBS(PAA Laboratories社、Yeovil、UK)で1回洗浄し、ブロッキング緩衝液(1%BSA/0.05%アジ化ナトリウム、2.5%ヤギ血清を含有する、PBS)に再浮遊させ、室温で30分間インキュベートした。次いで、ブロックされた細胞を、FACS緩衝液(1%BSA/0.05%アジ化ナトリウムを含有する、PBS)で希釈した脱免疫化J591($5 \mu\text{g/mL}$)又はアイソタイプ適合陰性対照($5 \mu\text{g/mL}$)の50 μL ウェルに再浮遊させ、氷上で1時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、次いで、FACS緩衝液で1:100希釈した抗ヒト-PE(Sigma社)の50 μL /ウェルに再浮遊させ、氷上で1時間インキュベートした。インキュベーション後、FACS緩衝液で2回洗浄し、FACSチューブに移し、Becton Dickinson (Becton Dickinson社、Oxford、UK)FACSscalibur装置で分析して1チューブ当たり15000事象を収集した。図2に示す通り、トランスフェクトされていないヌル細胞株と比較して有意なPSMA発現を示すリード細胞株(6/2F4)を同定した。

【0206】

(実施例3)

ヒト化抗体の分析

NS0由来J591変異体のPSMA抗原への結合を、親キメラJ591及び脱免疫化J591参照抗体に対する競合FACS ELISAで評定した。AlexaFluor 488抗体標識キット(Molecular Probes社、Paisley、UK)を使用して、脱免疫化J591抗体を蛍光標識した。PSMA発現NS0細胞(クローン6/2F4、1染色当たり細胞 3×10^5 個)を採取し、ダルベッコPBS (PAA Laboratories社、Yeovil、UK)で1回洗浄し、ブロッキング緩衝液(1%BSA/0.05%アジ化ナ

トリウム、2.5%ヤギ血清を含有する、PBS)に再浮遊させ、室温で30分間インキュベートした。様々な濃度の被験ヒト化抗体を一定濃度のAlexa-fluor 488標識脱免疫化J591抗体(最終濃度0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)と予混した。次いで、ブロックされた細胞を、事前に希釈した抗体の150 $\mu\text{L}/\text{well}$ に再浮遊させ、氷上で1時間インキュベートした。インキュベーション後、1%FACS/0.05%アジ化ナトリウムを含有するBPSで細胞を2回洗浄し、FACSチューブに移し、Becton Dickinson (Becton Dickinson社、Oxford、UK) FACScalibur装置で分析して1チューブ当たり15000事象を収集した。被験抗体濃度に対して幾何平均蛍光強度をプロットすることによりデータを分析した。図3に示す通り、全てのリードヒト化PSMA変異体は、mJ591キメラ及び脱免疫化抗体と同様の競合結合プロファイルを示した。

10

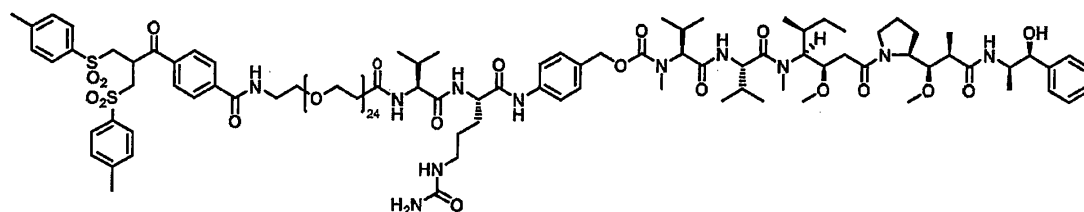
【0207】

(実施例4)

アウリスタチン細胞傷害性ペイロードを含むコンジュゲーション試薬の合成。

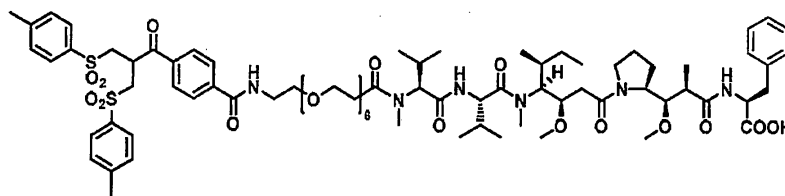
【0208】

【化40】



20

1



30

2

【0209】

ビススルホン試薬1及び2は、WO2014064423の中で説明されているように調製した。試薬2は、MMAFが結合された時点でビス-スルホンに酸化されるビス-スルフィド形を使用して、試薬1に類似した方法で調製した。

【0210】

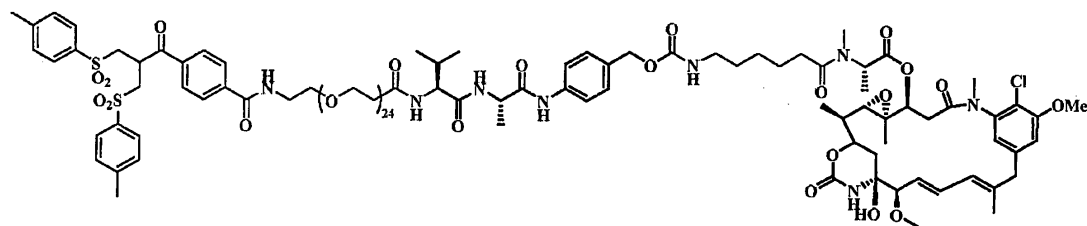
(実施例5)

メイタンシン細胞傷害性ペイロードを含むコンジュゲーション試薬の合成。

40

【0211】

【化 4 1】

5

10

【 0 2 1 2】

ビス-スルホンPEG(24)-val-ala-PAB-AHX-DM1コンジュゲーション試薬5は、WO2014064424の中で説明されているような、実施例4の試薬1に類似した方法で、ビス-スルホン-PEG(24)-酸のval-ala-PAB-AHX-DM1とのカップリング経由で調製した。

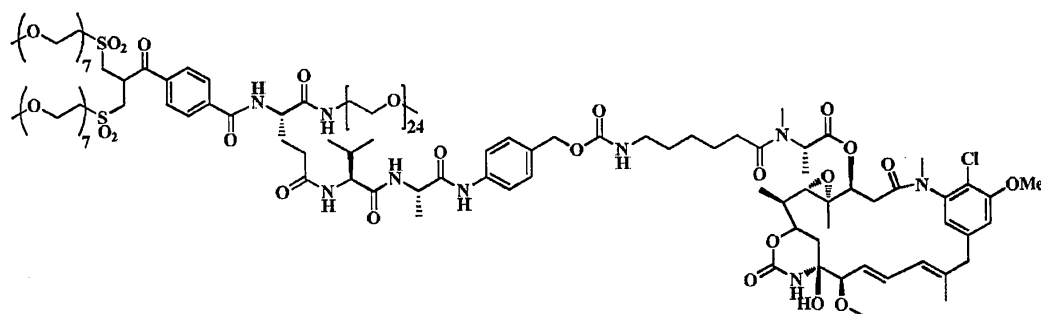
【 0 2 1 3】

(実施例6)

メイタンシン細胞傷害性ペイロードを含むコンジュゲーション試薬7の合成。

【 0 2 1 4】

【化 4 2】

7

20

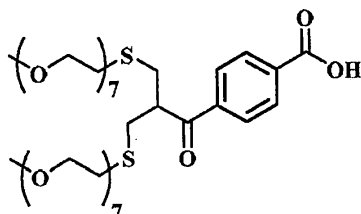
30

【 0 2 1 5】

工程1:化合物8の合成

【 0 2 1 6】

【化 4 3】

8

40

【 0 2 1 7】

ジメチルホルムアミド(DMF、70mL)中の4-[2,2-ビス[(p-トリルスルホニル)-メチル]アセチル]安息香酸(1.50g、Nature Protocols、2006、1(54)、2241~2252頁)の攪拌溶液に、アルファ-メトキシ-オメガ-メルカプトヘプタ(エチレングリコール)(3.20g)及びトリエチルアミン(2.50mL)を添加した。得られた反応混合物を不活性窒素雰囲気下、室温で攪拌した。19時間後、揮発分を真空下で除去した。得られた残留物を水(2.4mL)に溶

50

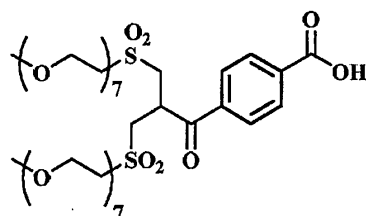
解し、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸(100:0v/v~0:100v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、化合物8を濃稠な透明無色の油(1.77g)として得た。m/z [M+H]⁺ 901。

【0218】

工程2:試薬9の合成

【0219】

【化44】



9

【0220】

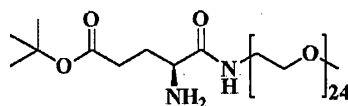
室温でメタノール:水(18mL、9:1v/v)中の8(1.32g)の攪拌溶液にOxone(登録商標)(2.70g)を添加した。2.5時間後、揮発分を真空下で除去した。得られた残留物をジクロロメタン(3×10mL)に溶解し、硫酸マグネシウムのカラムに通して濾過し、ジクロロメタン(2×7mL)で洗浄した。溶出液と洗液を併せ、揮発分を真空下で除去して、濃稠な透明淡黄色の油1.29gを得た。残留物の一部分(700mg)を水:アセトニトリル(1.50mL、3:1v/v)に溶解し、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸(100:0v/v~0:100v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、試薬9を濃稠な透明無色の油(524mg)として得た。m/z [M+H]⁺ 965。

【0221】

工程3:化合物10の合成。

【0222】

【化45】



10

【0223】

DMF(2mL)中のFmoc-L-Glu-(OtBu)-OH(36mg)の溶液をアルゴン雰囲気下で0℃に冷却し、(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリス-(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩(BOP)(41mg)を添加し、続いてNH₂-PEG(24u)-OMe(100mg)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)(19μL)を添加した。その溶液を放置して室温に温め、22時間後、揮発分を真空下で除去した。得られた残留物をジクロロメタン(1mL)に溶解し、ジクロロメタン:メタノール(100:0v/v~80:20v/v)で溶出する順相カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去して、Fmoc-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe]を無色の油(84mg)として得た。ピペリジン(49μL)をDMF(2mL)中の化合物Fmoc-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe](74mg)の溶液にアルゴン雰囲気下で添加し、得られた溶液を室温で22時間攪拌し、その後、揮発分を真空下で除去した。得られた残留物を

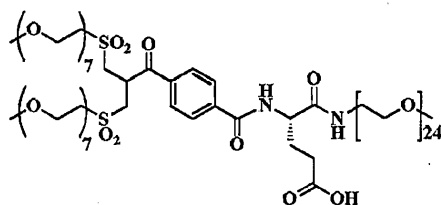
ヘキサン(3 × 0.7 mL)で粉碎した。有機溶媒を毎回デカントし、得られた残留物を真空中で乾燥させて、化合物10を白色固体(61 mg)として得た。m/z [M+H]⁺(1274、70%), [M+2H]²⁺(638、100%)。

【0224】

工程4:化合物11の合成。

【0225】

【化46】



11

【0226】

DMF(550 μL)中の化合物9(26.6 mg)の溶液をアルゴン雰囲気下で0 °Cに冷却し、これにHATU(10.5 mg)を添加し、その溶液を0.5時間、0 °Cで撹拌した。これにDMF(550 μL)中の試薬10(32 mg)の溶液を添加した。得られた溶液を5分間、0 °Cで撹拌し、その後、NMM(2.9 μL)及びHATU(10.5 mg)を添加した。反応溶液を0 °Cで2時間撹拌させておき、その後、室温に温め、更に3.5時間撹拌した。この時間の後、揮発分を真空中で除去した。得られた残留物を水及びアセトニトリル(v/v; 1/1、1.2 mL)に溶解し、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.1%ギ酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.1%ギ酸(100:0 v/v ~ 0:100 v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空中で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、ビス-mPEG(7u)スルホン-プロパノイル-ベンズアミド-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe]を無色の油(30.5 mg、55%)として得た。

【0227】

【数1】

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄) 8.19 (2H, d), 8.04

(2H, d), 4.83 – 4.71 (1H, m), 4.58 (1H, dd), 3.92 – 3.83 (6H, m), 3.78 – 3.56 (140H, m), 3.57 – 3.51 (6H, m), 3.40 (4H, dd), 3.36 (3H, s), 3.35 (6H, s), 2.41 (2H, t), 2.24 – 2.13 (1H, m), 2.10 – 1.98 (1H, m), 1.45 (9H, s); m/z [M+Na]⁺ (2243, 50%), [M+H]⁺ (2221, 40%), [M+Na+2H]³⁺ (747, 100%).

【0228】

アルゴン雰囲気下でジクロロメタン(2 mL)中のビス-mPEG(7u)スルホン-プロパノイル-ベンズアミド-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe](30 mg)の溶液を0 °Cに冷却し、これにトリフルオロ酢酸(500 μL)を添加し、得られた溶液を1.5時間撹拌した。反応混合物を放置して室温に温め、更に1時間撹拌した。この時間の後、揮発分を真空中で除去した。得られた残留物を水及びアセトニトリル(v/v; 1/1、0.6 mL)に溶解し、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸(100:0 v/v ~ 0:100 v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空中で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、化合物11を無色の油(20 mg)として得た。

【0229】

【数 2】

¹H NMR (400 MHz, MeOH-

δ) 8.19 (2H, d), 8.04 (2H, d), 4.81 – 4.72 (1H, m), 4.59 (1H, dd), 3.92 – 3.84 (6H, m), 3.67 – 3.50 (146H, m), 3.40 (4H, dd), 3.36 (3H, s), 3.35 (6H, s), 2.48 (2H, t), 2.26 – 2.15 (1H, m), 2.15 – 2.03 (1H, m); m/z [M+H]⁺ (2165, 55%), [M+2H]²⁺ (1083, 60%), [M+2H+Na]³⁺ (729, 100%).

10

【0 2 3 0】

工程5:試薬7の合成

DMF(600 μ L)中の化合物11(15.0mg)の溶液をアルゴン雰囲気下で0℃に冷却した。HATU(2.9mg)を添加し、0.5時間、0℃で撹拌した。これに、室温で0.5時間撹拌しておいた、DMF(600 μ L)中のval-ala-PAB-AHX-DM1(Concortis/Levena Biopharma社、9.2mg)及びNMM(0.8 μ L)の溶液を添加した。5分後、追加量のHATU(2.9mg)及びNMM(0.8 μ L)を添加し、反応混合物を0℃で撹拌した。3時間後、追加量のHATU(0.7mg)を添加し、反応混合物を0℃で撹拌した。更に2時間後、反応物を-20℃で16時間保管した。得られた反応溶液を真空下で濃縮し、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸(100:0v/v ~ 0:100v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、試薬7を濃稠な透明無色の油(14.3mg)として得た。

20

【0 2 3 1】

【数 3】

¹H NMR (600

MHz, MeOH- δ) (選択した特徴的シグナル) 5.69 (1H, dd), 6.59 (1H, dd), 6.68 (1H, s), 6.69 (1H, d), 7.10 (1H, s), 7.28 (2H, d), 7.57 (2H, d), 8.01 (2H, d), 8.16 (2H, d).

30

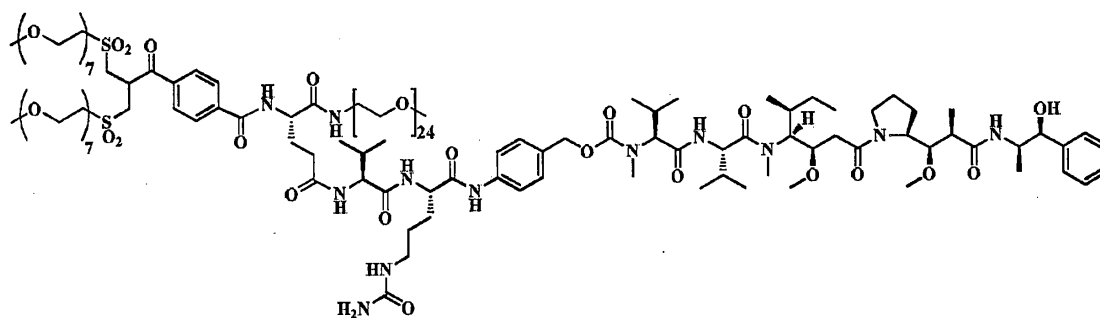
【0 2 3 2】

(実施例7)

アウリスタチン細胞傷害性ペイロードを含むコンジュゲーション試薬12の合成。

【0 2 3 3】

【化 4 7】

**12**

40

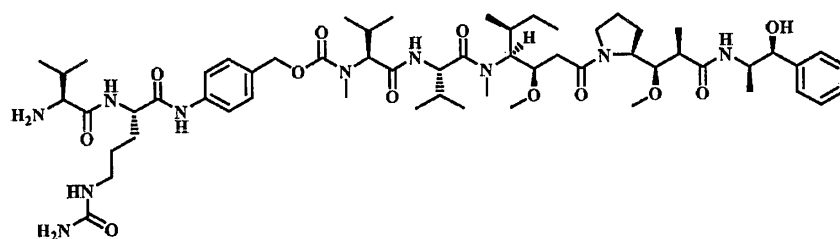
【0 2 3 4】

試薬12は、実施例4の試薬1に類似した方法で、化合物11、及び下記の構造を有するval-cit-PAB-MMAE TFA塩(Concortis/Levena Biopharma社)から合成した:

50

【 0 2 3 5 】

【 化 4 8 】



10

【 0 2 3 6 】

試薬12を無色の油として単離した。m/z $[M+H]^+$ (3270、12%)、 $[M+2H]^{2+}$ (1636、50%)、 $[M+3H]^{3+}$ (1091、100%)。

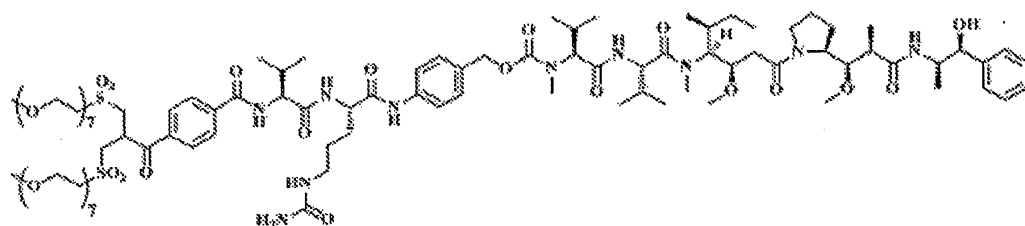
【 0 2 3 7 】

(実施例8)

アウリスタチン細胞傷害性ペイロードを含むコンジュゲーション試薬13の合成。

【 0 2 3 8 】

【 化 4 9 】



20

13

【 0 2 3 9 】

val-cit-PAB-MMAE塩のTFA塩(25.0mg)に、DMF(1.5mL)中の試薬9(15.6mg)の溶液を添加し、不活性窒素雰囲気下、室温で5分間撹拌した。その混合物を0℃に冷却し、HATU(6.1mg)及びNMM(1.8μL)の分割量を20分ごとに合計5回添加で添加した。1.5時間後、反応混合物を室温に温めた。2時間後、揮発分を真空下で除去した。得られた残留物を水及びアセトニトリル(v/v; 1/1、0.6mL)に溶解し、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸(100:0v/v ~ 0:100v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、試薬13を白色粉末(22.4mg)として得た。m/z $[M+2H]^{2+}$ 1035。

30

【 0 2 4 0 】

(実施例9)

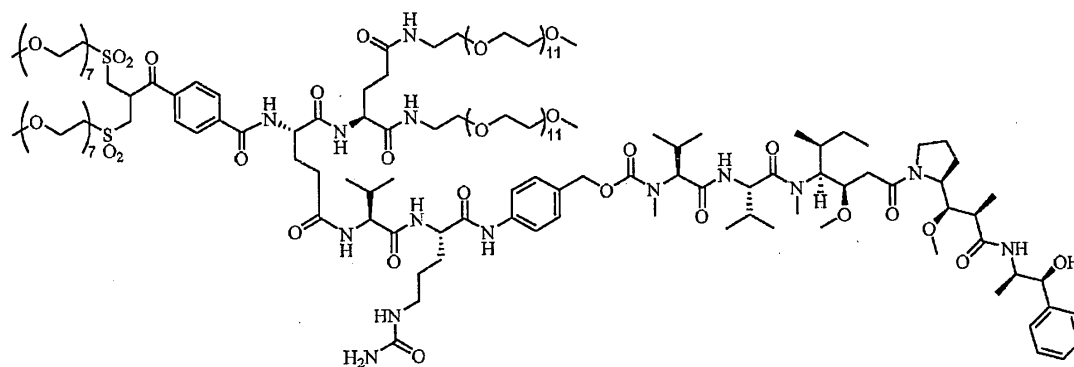
アウリスタチン細胞傷害性ペイロードを含むコンジュゲーション試薬14の合成。

40

【 0 2 4 1 】

50

【化 5 0】

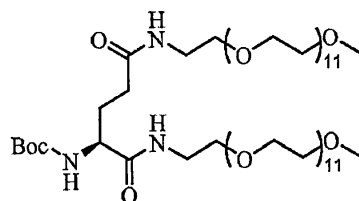
14

【 0 2 4 2】

工程1:化合物15の合成。

【 0 2 4 3】

【化 5 1】

15

【 0 2 4 4】

Boc-L-Glu(134.9mg)及びBOP(724mg)を無水DMF(4mL)に溶解し、0℃、窒素雰囲気下で攪拌した。次いで、この溶液を、事前に75分間攪拌しておいた、DMF(3mL)中のH₂N-PEG(12u)-Me(685mg)及びNMM(179.8μL)の溶液に添加した。次いで、併せた溶液を窒素下、0℃で4.5時間攪拌した。追加のBOP(241mg)及びNMM(60μL)を添加し、反応混合物を24時間、4℃で放置した。揮発分を真空下で除去し、得られた残留物を、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.1%ギ酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.1%ギ酸(100:0v/v～65:35v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去した。その材料を、酢酸エチル:メタノール(100:0v/v～0:100v/v)で溶出する順相フラッシュクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、化合物15を無色の油(450mg)として得た。m/z [M+H]⁺(1331、100%), [M+2H]²⁺(666、100%)。

【 0 2 4 5】

工程2:化合物16の合成。

【 0 2 4 6】

10

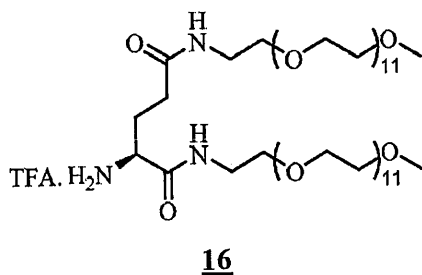
20

30

40

50

【化 5 2】



10

【 0 2 4 7】

化合物15(450mg)をジクロロメタン(25mL)に溶解し、これにトリフルオロ酢酸(2.5mL)を添加した。その溶液を室温で5時間撹拌した。この後、揮発分を真空下で除去した。得られた残留物を、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸(100:0v/v ~ 60:40v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、化合物16を透明無色の個体(320mg)として得た。m/z [M+Na]⁺(1253、10%) [M+H]²⁺(617、100%)

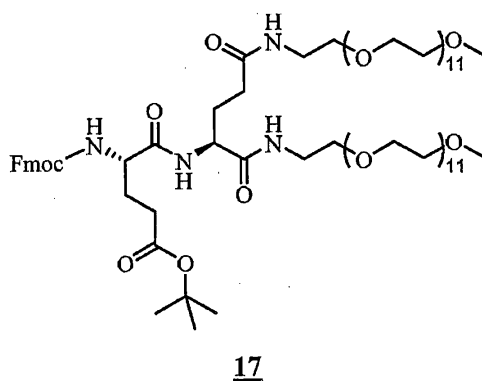
【 0 2 4 8】

20

工程3:化合物17の合成。

【 0 2 4 9】

【化 5 3】



30

【 0 2 5 0】

無水DMF(2mL)中のFmoc-L-Glu-(OtBu)-OH(36.6mg)の撹拌溶液にHATU(37.30mg)を添加した。反応混合物を0℃、窒素雰囲気下で1時間撹拌し、次いでDMF(1mL)中の化合物16(103.5mg)及びNMM(19.2μL)の溶液を添加した。追加のDMF(1mL)を添加した。その撹拌溶液を5時間にわたって放置して室温に温めた。揮発分を真空下で除去した。得られた淡黄色の油を、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.1%ギ酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.1%ギ酸(100:0v/v ~ 50:50v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、化合物17を白色固体(173mg)として得た。m/z [M+H]⁺(1638、100%)、[M+Na]⁺(1661、60%)。

40

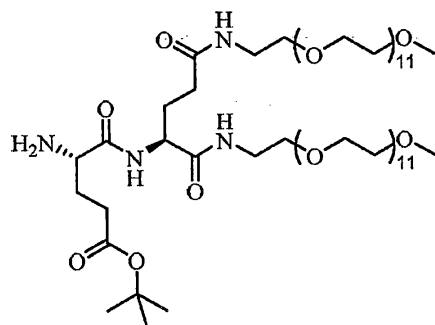
【 0 2 5 1】

工程4:化合物18の合成。

【 0 2 5 2】

50

【化 5 4】

**18**

10

【 0 2 5 3】

無水DMF(3.2mL)中の化合物17(173mg)の攪拌溶液に、ピペリジン(104.4 μ L)を添加した。その溶液を室温、アルゴン下で1.5時間攪拌した。溶媒を真空下で除去し、残留物をヘキサン(5 \times 10mL)で繰り返し粉碎した。生成物を真空下で乾燥させて、化合物18(152mg)を透明無色の油として得た。m/z [M+H]⁺(1417、85%)、[M+2H]²⁺(709、100%)、[M+Na]⁺(1439、30%)

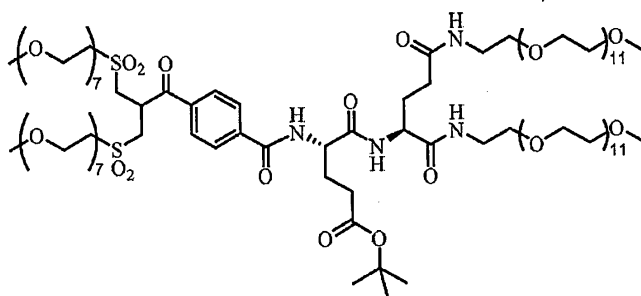
【 0 2 5 4】

工程5:化合物19の合成。

【 0 2 5 5】

【化 5 5】

20

**19**

30

【 0 2 5 6】

無水DMF(3mL)中の化合物9(114mg)の攪拌溶液にHATU(51.4mg)を添加した。反応混合物を0 で0.5時間攪拌し、次いでDMF(3mL)中の化合物18(152.0mg)の溶液に添加し、続いてNMM(14.8 μ L)を添加した。反応混合物を氷浴内で3.5時間攪拌し、その後、揮発分を真空下で除去した。得られた残留物を、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.1%ギ酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.1%ギ酸(100:0v/v ~ 55:45v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、化合物19を透明無色の油(160.6mg)として得た。m/z [M+H]⁺(2367、95%)、[M+2H]²⁺(1184、80%)。

【 0 2 5 7】

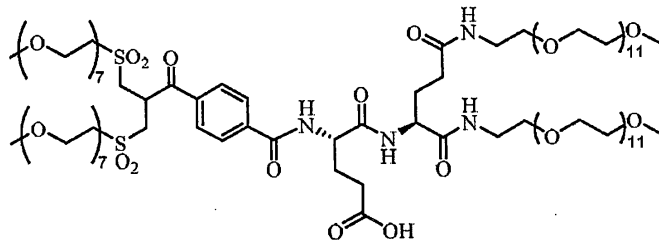
工程6:化合物20の合成。

【 0 2 5 8】

40

50

【化 5 6】

20

10

【 0 2 5 9】

無水ジクロロメタン(6mL)中の化合物19(156mg)の攪拌溶液に、トリフルオロ酢酸(6 mL)を添加した。反応混合物を室温で2時間攪拌し、その後、揮発分を真空下で除去し、残留物を水(25mL)に溶解し、凍結乾燥させて化合物20を透明無色の油(156mg)として得た。m/z [M+H]⁺(2307、90%)、[M+2H]²⁺(1153、100%)。

【 0 2 6 0】

工程7:試薬14の合成。

試薬14は、実施例4の試薬1に類似した方法で、化合物20及びval-cit-PAB-MMAE TF A塩から合成した。試薬14を無色の油として単離した。m/z [M+H]⁺(3410、40%)、[M+2H]²⁺(1706、60%)、[M+3H]³⁺(1137、85%)、[M+4H]⁴⁺(854、70%)。

20

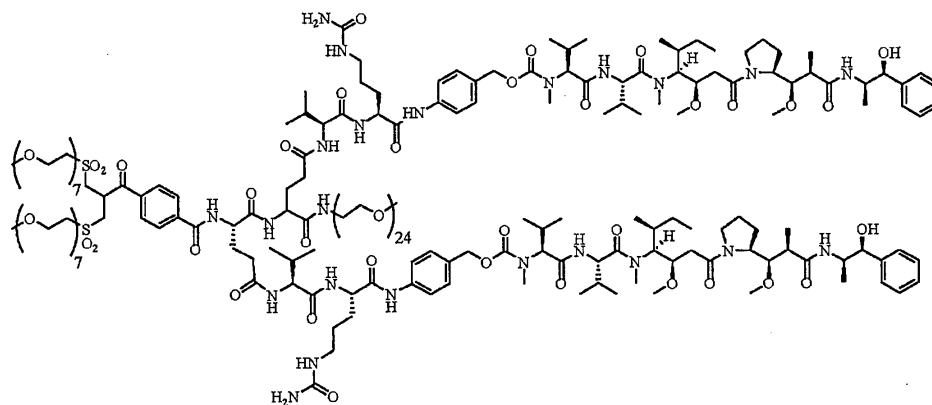
【 0 2 6 1】

(実施例10)

アウリスタチン細胞傷害性ペイロードを含むコンジュゲーション試薬21の合成。

【 0 2 6 2】

【化 5 7】



30

21

40

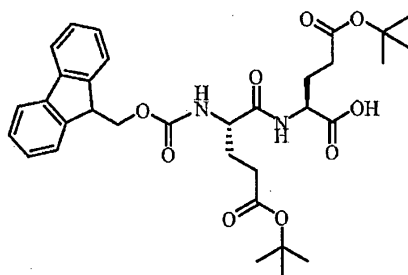
【 0 2 6 3】

工程1:化合物22の合成。

【 0 2 6 4】

50

【化 5 8】

22

10

【 0 2 6 5】

無水DMF(18mL)中のFmoc-L-Glu-(OtBu)-OH(2g)の攪拌溶液にHOBt(666mg)及びN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)(768 μ L)を添加した。反応混合物を0 で10分間攪拌し、次いで2.5時間、室温で攪拌した。H-L-Glu-(OtBu)-OH(1.19g)及びDIPEA(2.46mL)を添加し、反応混合物を18時間、室温で攪拌した。反応混合物を水(100mL)で希釈し、希塩酸の添加によりpH2.0に酸性化した。水性層を酢酸エチル(3 \times 100mL)で抽出し、有機相を併せ、水(2 \times 50mL)及び飽和ブライン溶液(1 \times 50mL)で洗浄した。酢酸エチル層を硫酸ナトリウムで2時間乾燥させ、濾過し、濾液を真空下で濃縮した。生成物を、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.1%ギ酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.1%ギ酸(100:0v/v ~ 80:20v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより単離した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、化合物22を白色固体(875mg)として得た。m/z [M+H]⁺(611、85%)、[M+Na]⁺(633、55%)、[2M+Na]⁺(1243、55%)。

20

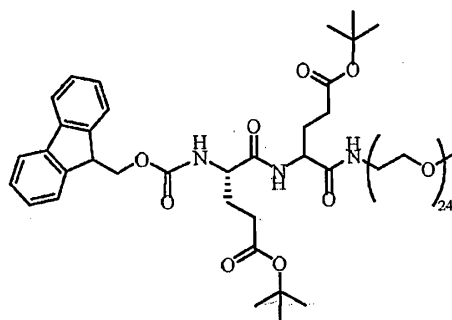
【 0 2 6 6】

工程2:化合物23の合成。

【 0 2 6 7】

【化 5 9】

30

23

40

【 0 2 6 8】

無水DMF(5mL)中の化合物22(510mg)及びNH₂-PEG(24u)-OMe(1g)の攪拌溶液に、DIPEA(43.8 μ L)及びHATU(47.6mg)を添加した。反応混合物を0 で10分間攪拌し、次いで16時間、室温で攪拌した。その溶液を真空下で2mLに濃縮し、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.1%ギ酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.1%ギ酸(100:0v/v ~ 83:17v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、化合物23を白色固体(644mg)として得た。m/z [M+H]⁺(1681、40%)、[M+Na]⁺(1703、30%)及び[M+2H]²⁺(841、55%)。

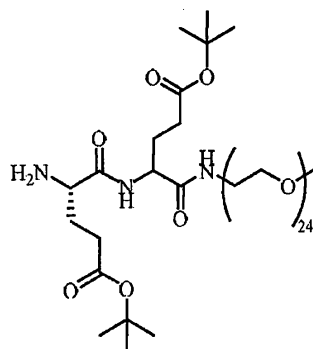
【 0 2 6 9】

50

工程3:化合物24の合成。

【0270】

【化60】



10

24

【0271】

無水DMF(900 μ L)中の化合物23(193mg)の攪拌溶液に、ピペリジン(34 μ L)を添加し、反応混合物を1時間、室温で攪拌した。溶液を真空下で濃縮乾固させ、残留物をジエチルエーテル(2 \times 2.5mL)で粉碎した。生成物を真空下で乾燥させて、化合物24をオフホワイト色の固体(166mg)として得た。

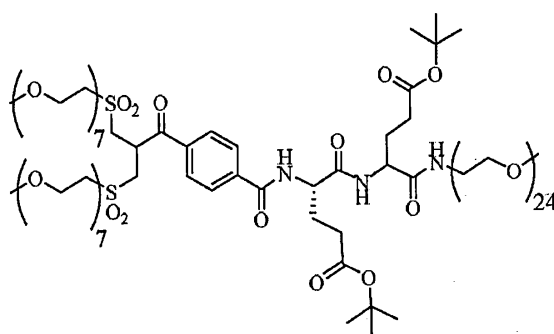
20

【0272】

工程4:化合物25の合成。

【0273】

【化61】



30

25

【0274】

試薬25は、実施例9の試薬19に類似した方法で、化合物24及び化合物9から合成した。試薬25を無色の油として単離した。m/z [M+H]⁺(2407、25%)、[M+Na]⁺(2429、70%)。

40

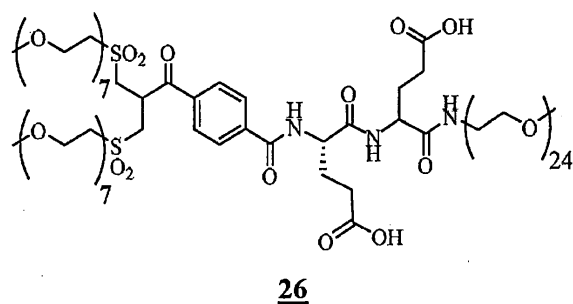
【0275】

工程5:試薬26の合成。

【0276】

50

【化 6 2】



10

【 0 2 7 7】

試薬26は、実施例9の試薬20に類似した方法で、試薬25から合成した。試薬26を無色の油として単離した。m/z [M+H]⁺(2294、20%)、[M+Na]⁺(2317、10%)。

【 0 2 7 8】

工程6:試薬21の合成。

DMF(1.5mL)中の試薬26(28.1mg)、val-cit-PAB-MMAE・TFA塩(30.6mg)及びHATU(13.9mg)の攪拌溶液に、NMM(6.7 μL)を添加し、反応混合物を0 で5時間攪拌した。その溶液を水(1mL)で希釈し、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.1%TFA、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.1%TFA(100:0v/v ~ 60:40v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、試薬21を白色固体(36.1mg)として得た。m/z [M+2H]²⁺(2253、40%)、[M+3H]³⁺(1502、60%)及び[M+4H]⁴⁺(1127、100%)。

20

【 0 2 7 9】

(実施例11)

DAR4を有する抗体薬物コンジュゲート(ADC)を生成するために試薬を抗PSMA抗体とコンジュゲートさせるための一般プロトコール

反応緩衝液(20mM リン酸ナトリウム、150mM NaCl、20mM EDTA、pH7.5)中5.2 mg/mLの濃度の抗PSMA抗体(例えば、AB-03)の溶液を15分間、40 に加熱した。TCEP(mAb 1当量当たり6当量)をmAb溶液に添加し、穏やかに混合し、40 で1時間インキュベートし、その後、放置して22 に冷却した。コンジュゲーション試薬1、2、5、7、12、13、14及び21をMeCN又はDMFに溶解して、1.6mM保存液を得た。還元mAb溶液を反応緩衝液で4.2mg/mLに希釈した。コンジュゲーション試薬(mAb 1当量当たり6当量)をmAb溶液に添加し、その反応物を穏やかに混合し、22 で6~22時間インキュベートした。インキュベーション後、50mM N-アセチル-L-システイン(試薬に対して20当量)を用いて22 で1時間、反応物を処理した。

30

【 0 2 8 0】

TOSOH TSK-gel Butyl-PRカラムを使用して疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)により反応試料を分析した。分離した、(薬物及び抗体のUV吸光度最大値の比及びピーク溶出の順序により同定した)、薬物抗体比(DAR)変異体の各々について得た各ピークの面積を棒グラフにプロットした。ADC 3及び4をそれぞれ生じさせる、試薬1及び2とのコンジュゲーションの結果を、図4A及び図4Bにそれぞれ示す。各反応の主生成物は、DAR4コンジュゲートであった。

40

【 0 2 8 1】

緩衝液A:50mM リン酸ナトリウム、2.0M NaCl、pH7.0、及び緩衝液B:80% 50mM リン酸ナトリウム、20%イソプロパノール、pH7.0で平衡させたToyoPearl Phenyl 65 0S樹脂を使用する分取HICにより、反応混合物を精製した。等体積の、50mM リン酸ナトリウム、pH7.0、中の4.0M NaClを、コンジュゲーション混合物に添加し、次いでそれをカラムに注入し、その後、0~100%緩衝液B勾配を使用して溶出した。溶出ピークの画分を収集し、分析用HICにより分析した。DAR4を含有する画分を併せ、緩衝液をPBS pH

50

7.4に交換し、VivaSpin 20(10kDa MWCO PES膜)濃縮装置で濃縮した。最終試料をブラッドフォードアッセイにより定量し、その後、更に評価した。コンジュゲーション試薬1、2、5、7、12、13、14及び21は、それぞれ、ADC 3、4、6、27、28、29、30及び31を生成した。

【0282】

(実施例12)

平均DAR4を有するコンジュゲート32を生成するための抗PSMA抗体のマレイミド試薬mc-vc-PAB-MMAEとのコンジュゲーション。

反応緩衝液中5.2mg/mLの濃度の抗PSMA抗体AB-03を15分間、40℃に加熱した。TC-EP(2当量)をmAb溶液に添加し、穏やかに混合し、次いで、40℃で1時間インキュベートし、放置して22℃に冷却した。マレイミド試薬、mc-val-cit-PAB-MMAE(Concortis/Leverna Biopharma社)、をMeCNに溶解して、2.1mM保存溶液を得た。還元mAb溶液を反応緩衝液で4.2mg/mLに希釈した。mc-val-cit-PAB-MMAE(mAb 1当量当たり4当量)をmAb溶液に添加し、その反応物を穏やかに混合し、22℃で1時間インキュベートした。50mM N-アセチル-L-システイン(20当量超の試薬)を用いて反応物を処理し、22℃で1時間放置して反応を進行させた。粗製コンジュゲーション混合物を疎水性相互作用クロマトグラフィーにより分析した。粗製反応物を透析して(Vivaspin 20、10kDa PES膜)、反応物質を除去し、コンジュゲートを濃縮した。濃縮された試料の緩衝液をDPBS、pH7.1~7.5に交換し、次いで滅菌濾過した(0.22µm PVDF膜)。

【0283】

(実施例13)

平均DAR4のコンジュゲート33及び34を生成するための、抗体AB-P1及びAB-P2のmc-vc-PAB-MMAEとのコンジュゲーション。

実施例12のコンジュゲート32の生成に類似した手法でコンジュゲーションを行った。

【0284】

(実施例14)

ビス-スルホン-PEG(24u)-val-cit-PAB-MMAEコンジュゲーション試薬1から調製した、抗PSMA ADC 3のin vitro細胞殺滅分析。

細胞傷害性薬物又はADCでのin vitroでの処置後の腫瘍細胞生存率の減少は、漸増濃度の薬物又はADCの存在下で細胞株を増殖させること、及びCellTiter Glo(登録商標)発光試薬(Promega社、Technical Bulletin TB288; Lewis Phillips G.D、Cancer Res 2008; 68:9280~9290頁)を使用して増殖又は代謝活性の減少を定量することにより、測定することができる。このプロトコールは、細胞播種、薬物処置、及びウェル内に存在する細胞数に直接関連付けられるATP合成に基づく未処置細胞に関する細胞生存率の決定を記載するものである。

【0285】

PSMA陽性LNCaP(クローンFGC)及びC4-2細胞並びにPSMA陰性PC-3細胞をTrypLEで剥離させ、完全培地に再浮遊させた。使い捨てのノイバウエル計数盤を使用して細胞を計数し、細胞密度をLNCaPについては細胞 10×10^4 個/mL、C4-2については細胞 2×10^4 個/mL、及びPC-3については細胞 1×10^4 個/mLにそれぞれ調整した。組織培養処理されている(C4-2)又はポリD-リジンでコーティングされており(LNCaP及びPC-3)、不透明な壁を有する、白色96ウェルプレートに、細胞を播種し(100µL/ウェル)、24時間、37℃及び5%CO₂でインキュベートした。腫瘍細胞株LNCaP(CRL-1740)及びPC-3(CRL-1435)は、アメリカ合衆国細胞培養系統保存機関(ATCC)から購入した。LNCaP及びC4-2細胞は、2mM グルタミン(Life Technologies(登録商標)社)と10%ウシ胎仔血清と100U/mLのペニシリンと100µg/mLのストレプトマイシンとを含有するRPMI-1640培地で増殖させた。PC-3細胞は、ハムF-12K(Life Technologies(登録商標)社)、10%ウシ胎仔血清、100UI/mLのペニシリン及び00µg/mLのストレプトマイシン(Invitrogen社)中で増殖させた。製品情報シートに記載の通りに、及び組織培養についてのATCCの一般推奨に従って、細胞を維持した。ATCCの推奨、並びにそこに引用されている参考文献、例えば、R. I

10

20

30

40

50

an Freshney、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique、第3版、出版元Alan R. Liss社、N.Y. 1994、又はR. Ian Freshney、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique、第5版出版元Wiley-Liss社、N.Y. 2005に従って、細胞を培養した。

【0286】

細胞生存率アッセイは、Cell-Titer Glo(登録商標)発光試薬を製造業者の説示(Promega社、Technical Bulletin TB288; Lewis Phillips G.D、Cancer Res 2008; 68:9280~9290頁)による記載の通りに使用して行った。プレートリーダー(例えば、Molecular Devices Spectramax M3プレートリーダー)を使用して発光を記録し、その後、4変数非線形回帰モデルを使用してデータを分析した。

【0287】

グラフとしてプロットする場合、生存率を未処置細胞に対する%として表し、次の式を使用して算出した:

【0288】

【数4】

$$\text{生存率\%} = 100 \times \frac{\text{発光}_{\text{試料}} - \text{発光}_{\text{無細胞対照}}}{\text{発光}_{\text{未処置}} - \text{発光}_{\text{無細胞対照}}}$$

【0289】

生存率% (Y軸)をnMでの薬物濃度の対数(X軸)に対してプロットして、全てのコンジュゲートについてのIC₅₀値は当然ながら、遊離薬物についてのIC₅₀値も推定した。

【0290】

ADC 3のin vitro活性は、PSMA受容体過剰発現がん細胞株LNCaPの細胞増殖に対する阻害効果を測定することにより決定した。抗原選択的細胞殺滅を立証するために、対照DAR4非結合mAb薬物コンジュゲートも研究に含めた。非結合対照は、3を調製するために使用した方法によりコンジュゲーション試薬1から調製したトラスツズマブADCであった。トラスツズマブは、LNCaP細胞上の、存在しないか又は非常に低レベルで存在する、標的HER-2に結合する。したがって、トラスツズマブADCは、これらの細胞を特異的に標的とせず、非特異的細胞傷害効果しか有さないはずである。

【0291】

カラム3~10からの96ウェルプレート全体にわたってのピペッティングによりADC又は遊離薬物(MMAE)の段階希釈を3回ずつ行い、MMAE又はMMAE DAR4コンジュゲートについては希釈剤としての細胞培養培地でそれぞれ2~2.5倍希釈を行った。LNCaP細胞を、table 2(表2)に示す遊離薬物又は薬物コンジュゲート濃度で処置した。その後、細胞を薬物(総体積200 µL/ウェル)と共に、37 °C及び5%CO₂で更に96時間インキュベートした。

【0292】

【表2】

Table 2

細胞株	薬物/薬物コンジュゲート	濃度範囲
LNCaP	MMAE	0.01-20nM
LNCaP	DAR 4 ADC <u>3</u>	0.01-5nM

10

20

30

40

50

【 0 2 9 3 】

結果を図5に示し、IC₅₀値をTable 3(表3)に示す。これらの図表は、LNCaP細胞内のADC 3又は遊離薬物のどちらかでの処置に対する細胞生存反応の例証となる。ADC 3は、PSMA陽性LNCaP細胞株内で活性であるが、非結合トラスツズマブ対照ADCは、これらの細胞に対して細胞傷害効果を殆ど又は全く示さない。トラスツズマブADCデータによりIC₅₀値を決定することはできなかった。

【 0 2 9 4 】

【表 3】

Table 3

試料	LNCaP IC ₅₀ (nM)
MMAE	0.81
ADC <u>3</u>	0.33

【 0 2 9 5 】

(実施例15)

ビス-スルホン-PEG(24u)-val-ala-PAB-AHX-DM1コンジュゲーション試薬5から調製した、抗PSMA ADC 6のin vitro細胞殺滅分析。

DAR4 ADC 6のinvtro活性を、実施例14においてADC 3について説明したように決定した。カラム3~10からの96ウェルプレート全体にわたってのピペッティングによりADCの段階希釈を3回ずつ行い、ADC 6又はトラスツズマブ対照コンジュゲートについては希釈剤として細胞培養培地を使用してそれぞれ2.5~3倍希釈を行った。実施例14中でのように、ADC 6による抗原選択的細胞殺滅を立証するために非結合対照トラスツズマブADCを使用した。非結合対照は、6を調製するために使用したのと同じ方法によりコンジュゲーション試薬5から調製した。トラスツズマブは、LNCaP細胞上の、存在しないか又は非常に低レベルで存在する、標的HER-2に結合する。したがって、トラスツズマブADCは、これらの細胞を特異的に標的とせず、非特異的細胞傷害効果しか有さないはずである。

【 0 2 9 6 】

PSMA陽性細胞を、table 4(表4)に示す通りの遊離薬物又はコンジュゲート濃度で処置した。

【 0 2 9 7 】

【表 4】

Table 4

細胞株	ADC	濃度範囲
LNCaP	トラスツズマブ対照 ADC	0.005-10nM
LNCaP	ADC <u>6</u>	0.005-10nM

【 0 2 9 8 】

結果を図6に示す。この図は、LNCaP細胞内のADC 6又はトラスツズマブ対照ADCでの処置に対する細胞生存反応の例証となる。生存率を未処置細胞に対する%として表す。%生存率(Y軸)をnMでの薬物濃度の対数(X軸)に対してプロットして、両方のコンジュゲート

についての IC_{50} 値を決定する。 IC_{50} 値をTable 5(表5)に示す:

【 0 2 9 9 】

【 表 5 】

Table 5:

試料	LNCaP IC_{50} (nM)
トラスツズマブ対照 ADC	未決定
DAR 4 ADC <u>6</u>	0.44

10

【 0 3 0 0 】

図6及びTable 5(表5)に示したように、ADC 6は、PSMA陽性LNCaP細胞株において活性である。

【 0 3 0 1 】

(実施例16)

in vitro細胞生存率アッセイによる抗体薬物コンジュゲート及び遊離ペイロードの分析

実施例11の中で説明したように調製したADC 27、28、29、30及び31、並びに実施例12及び13の中でそれぞれ説明したように調製したADC 32、33及び34のin vitroでの有効性を、実施例14で説明したように、PSMA過剰発現がん細胞の細胞増殖に対するそれらの阻害効果を測定することにより決定した。

20

【 0 3 0 2 】

ADC及び遊離薬物の8点段階希釈物を適切な培養培地で調製した。3つの細胞株全てを、50 ~ 0.00064 nMのADC濃度で処置した。MMAEは、C4-2細胞に対して500 ~ 0.0064 nMで、及びLNCaP細胞とPC-3細胞の両方に対して10,000 ~ 0.128 nMで使用した。接着細胞が入っているプレートから培地を除去し、100 μ L/ウェルの段階希釈化合物に置き換えた。次いで、細胞を37 °C及び5%CO₂で更に96時間インキュベートした。

【 0 3 0 3 】

Table 6(表6)に示すように、試験した濃度範囲で、全てのADCは、PSMA発現LNCaP及びC4-2細胞の増殖を特異的に阻害することができ、PSMA陰性PC-3細胞に対しては殆ど効果を示さなかった。

30

【 0 3 0 4 】

40

50

【表 6】

Table 6. LNCaP細胞、C4-2細胞及びPC-3細胞(陰性対照)に対するADC及び遊離ペイロードの抗増殖効果を示すIC₅₀値。

試料	LNCaP IC ₅₀ (nM)	C4-2 IC ₅₀ (nM)	PC-3 IC ₅₀ (nM)
<u>27</u>	0.61	0.02	>50
<u>28</u>	0.38	0.06	>50
<u>30</u>	0.47	0.11	>50
<u>31</u>	0.17	0.03	>50
<u>29</u>	0.59	0.08	>50
<u>32</u>	0.84	0.11	>10
<u>33</u>	0.18	0.06	>50
<u>34</u>	0.27	0.07	>50
MMAE		0.28	8.2
AHX-DM1	341	57	>1000

10

20

【0305】

(実施例17)

in vivo有効性研究における抗体薬物コンジュゲート(ADC)及び遊離ペイロードの評価。

健常雌重症複合免疫不全症(SCID)マウス(C.B-17/lcr-Prkdcscid、Charles River Laboratories社)を使用した。管理された環境条件下の飼育室でFELASAガイドラインに従ってSPF健康状態で動物を維持した。床敷材、飼料及び水を有し、環境及び社会的エンリッチメントが施された無菌の適切な空間を提供するように、動物舎を設計した。

【0306】

30

SCIDマウスにおいて皮下注射によりC4-2ヒト前立腺癌細胞の異種移植を開始した。腫瘍誘導当日、各被験マウスの右側腹部に200 µLのRPMI 1640中のC4-2細胞10⁷個を投与した。ノギスを使用して二次元で腫瘍を測定し、次の式を使用して体積を算出した：

【0307】

【数5】

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

【0308】

40

(式中、w=腫瘍のmmでの幅、及びl=腫瘍のmmでの長さ)。

【0309】

腫瘍埋め込みから18日後(この日を研究の1日目に指定した)、各々がマウス5匹からなり群平均腫瘍体積が100~200mm³である群に、動物を分けた。処置は、全ての群において1日目に開始した。処置群には、1日目に6mg/kgで抗体-薬物コンジュゲート27、28、30、31、29、32並びにまた抗体-薬物コンジュゲート33及び34の静脈内注射(i.v.)を施した。溶媒処置対照群のマウスにはPBSを施した。

【0310】

マウスを個別にモニターし、その腫瘍が2000mm³の終点体積に達したときに安楽死させた。体重測定、及び処置に関連する副作用の臨床徴候の観測頻度により、処置に対する

50

耐容性を評価した。

【0311】

腫瘍体積の百分率変化を57日目に各マウスについて算出し、%平均±標準誤差として表した。全てのレジメンは良好な耐容性を示し、有効性について評価することができた。結果を図7～14に示す。これらの図は、抗体-薬物コンジュゲート27、28、30、31、29、32並びにまた抗体-薬物コンジュゲート33及びADC 34についての腫瘍体積の百分率変化を示す。いずれの場合も、これらの図は、抗体-薬物コンジュゲートの投与にตอบสนองしての腫瘍体積の経時変化を示す。体積を%平均±標準誤差として表す。

【0312】

(実施例18)

熱ストレス試験による抗PSMA抗体の安定性の比較

抗体試料(PBS中0.5mg/mL)を75℃で30分間インキュベートし、その後、氷浴内で5分間インキュベートした後にそれらの凝集の程度について分析した。抗体溶液の分析は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により及び濁度測定により行った。

【0313】

SEC:

SECは、TOSOH Bioscience TSK gel Super SW 3000カラムを使用して行った。280nmでのUV吸光度を、0.2M リン酸カリウム緩衝液、pH6.8(0.2M 塩化カリウム及び15%イソプロパノール)での均一濃度溶出中にモニターした。溶出時間及びピーク数は、試料が、凝集した抗体を含有するのか、分解した抗体を含有するのか、又は未変性の抗体を含有するのかを示す。曲線下面積(Abs280)を使用して、このSEC分析に存在する各々の種の量を決定した。

【0314】

結果:

SEC測定の結果をTable 7(表7)に示す。

【0315】

【表7】

Table 7:

ストレス試験後の抗体分析	未変性の立体構造の Ab(%)	凝集形態の Ab(%)
AB-03	75	25
AB-P1	0	100
AB-P2	0	100
AB-22	0	100

【0316】

このSEC分析から、抗体AB-22、AB-P1及びAB-P2は、AB-03に比べて安定性が低く、加熱及び冷却時にはるかに大きい凝集傾向を示すことが分かる。

【0317】

(実施例19)

熱シフトアッセイによる抗PSMA抗体の安定性の比較

抗体をDPBS、pH7.1～7.5で1.5mg/mLに希釈し、Nanodrop装置を使用して280nmでのODを測定することにより濃度を決定した。SEC分析を行った後、熱シフト分析を行って、各抗体の99%より多くがそれらの未変性の形態で存在することを確認した。

【0318】

RT-PCR装置(StepOnePlus、Applied Biosystems社)を、Sypro Orange色素を蛍光レポーターとして使用する蛍光に基づく熱シフトアッセイ用に構成した。PCR 96ウェル

プレートにおいて抗体試料ごとに5反復、及び1ウェル当たり20 μ Lの最終反応体積を用いるアッセイを構成した。13.5 μ LのDPBSを各ウェルにピペティングし、その後、4 μ Lの抗体を添加した。最後に、Sypro Orange試薬をDPBSで5000倍(保存溶液)から40倍に希釈し、2.5 μ Lの40倍溶液を各ウェルに添加した。4 μ Lの抗体試料の代わりに4 μ LのDPBSを使用するブランクの5反復もプレートに含めた。マルチチャンバピペットを使用してアッセイ混合物を混合した。プレートを光学的に透明なフィルムで密封し、1分間、1000 rpmで遠心分離し、RT-PCR装置に入れた。1%ランプ速度で25 から99 までの連続ランプモードを使用して、試料を加熱した。470nmの励起フィルター及び610nmの発光フィルターを使用して、温度ランプ中ずっと蛍光データを収集した。全アッセイ時間は、およそ45分であった。抗体の熱変性中に装置ソフトウェアにより生成される融解曲線は、10
 蛍光の温度に対するプロットの結果として得られる。融解温度(T_m)は、抗体分子の半分が変性する、(蛍光の50%増加により示される)、温度であり、融解曲線の屈曲点から T_m を決定することができる。 T_m は、従来、微分プロットのプロットングにより算出される。これは、X軸の温度に対してY軸にプロットされた時間の变化(百分率変化)で割った、蛍光の変化である。このプロットから得られたピークの最大値から、各抗体の値を決定した。得られた融解曲線の分析は、GraphPad Prismソフトウェア(v.5.04)を使用して行った。

【0319】

蛍光バックグラウンド補正は、 T_m の適合値に対して殆ど影響を及ぼさないと決定されたことから、(緩衝液成分及び遊離色素に起因する)バックグラウンド蛍光を補正する必要は20
 非常に少ないと判断し、生データを微分値のプロットングに直接使用した。図23に示すように、アッセイした3つの抗体の各々について、それらの複数のドメイン構造の結果として、2つのピークが観察された。第1の遷移ピーク(T_{m1})は、CH2及びFabドメインの変性を表し、第2の遷移ピーク(T_{m2})は、CH3ドメインの変性を表す。抗体AB-03、AB-P1及びAB-P2の T_{m1} 及び T_{m2} の値をTable 8(表8)に示す。これらの T_m データは、これら3つの抗体のFab及びCH2ドメインが同様の安定性レベルを示す一方で、AB-03のCH3ドメインがAB-P1及びAB-P2に比べて、融解温度がおおよそ12~15 高いことから、はるかに安定性が高いことを示す。

【0320】

【表8】

Table 8:

	AB-03	AB-P1	AB-P2
T_{m1} (°C)	68.9 \pm 0.1	69.8 \pm 0.1	68.9 \pm 0.1
T_{m2} (°C)	87.5 \pm 0.1	72.6 \pm 0.1	75.2 \pm 0.1

【0321】

(実施例20)

アミド-6'- β -シクロデキストリン及びメイタンシノイド細胞傷害性ペイロードを含む、コンジュゲーション試薬35の合成。

【0322】

10

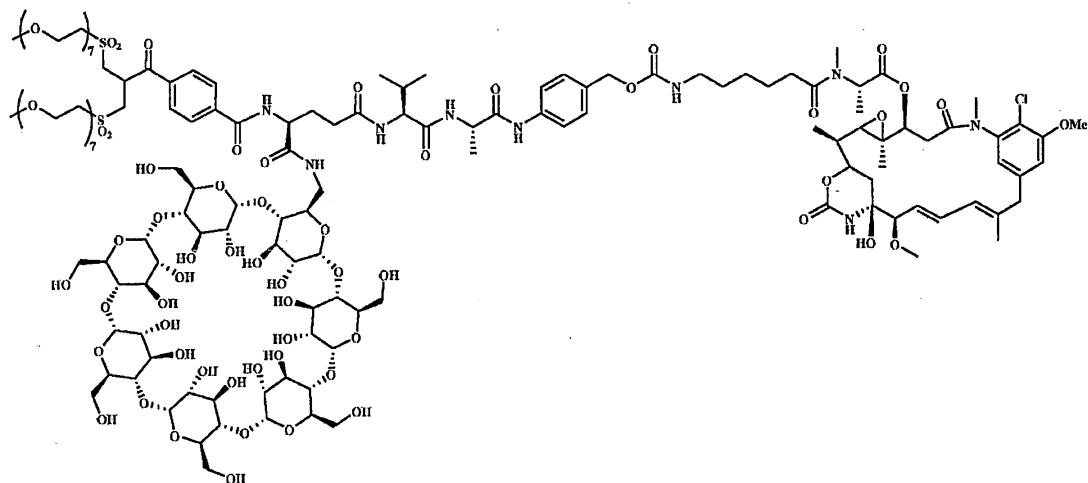
20

30

40

50

【化 6 3】



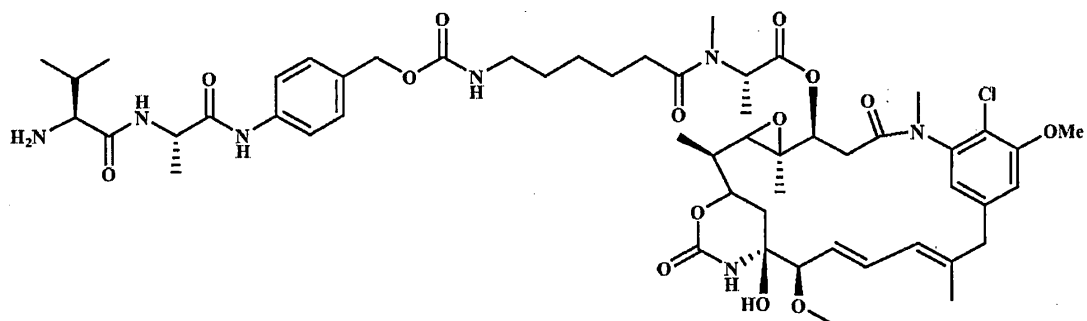
10

35

【 0 3 2 3 】

【化 6 4】

20



Val-Ala-PAB-AHX-DM1

30

【 0 3 2 4 】

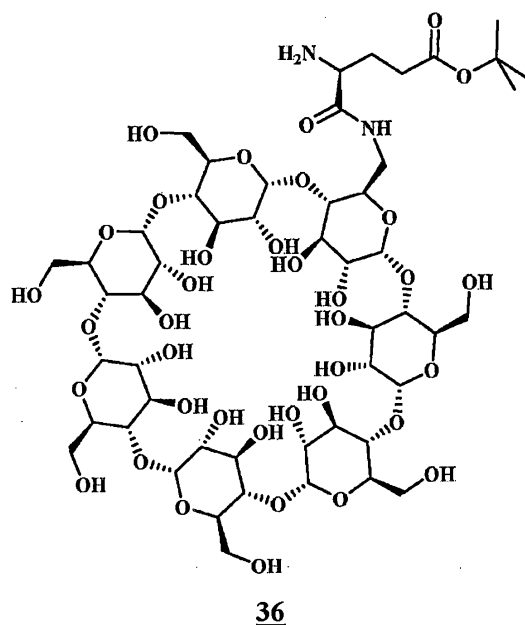
工程 1: 化合物 36 の合成。

【 0 3 2 5 】

40

50

【化 6 5】



【 0 3 2 6】

DMF(1mL)中のFmoc-Glu-(OtBu)-OH(55mg)の溶液に、DMF(1mL)中のHATU(116mg)の溶液と、NMM(34 μ L)と、DMF(2mL)中の6-モノデオキシ-6-モノアミノ- α -シクロデキストリン塩酸塩(150mg)の溶液とを添加した。反応混合物を16時間、室温で撹拌した後、NMM(13 μ L)を添加し、続いて更に1時間後、DMF(200 μ L)中の6-モノデオキシ-6-モノアミノ- α -シクロデキストリン塩酸塩(8mg)を添加した。3時間後、揮発分を真空下で除去した。残留物をDMF(5mL)に溶解し、その溶液にピペリジン(151 μ L)を添加し、その溶液を1時間室温で撹拌した。次いで、反応溶液を真空下で濃縮し、得られた油を室温でジエチルエチル(4 \times 200mL)に沈殿させ、濾過して36を白色固体として得た、 m/z [M+H]⁺(1320、50%)。

【 0 3 2 7】

工程2:化合物37の合成。

【 0 3 2 8】

10

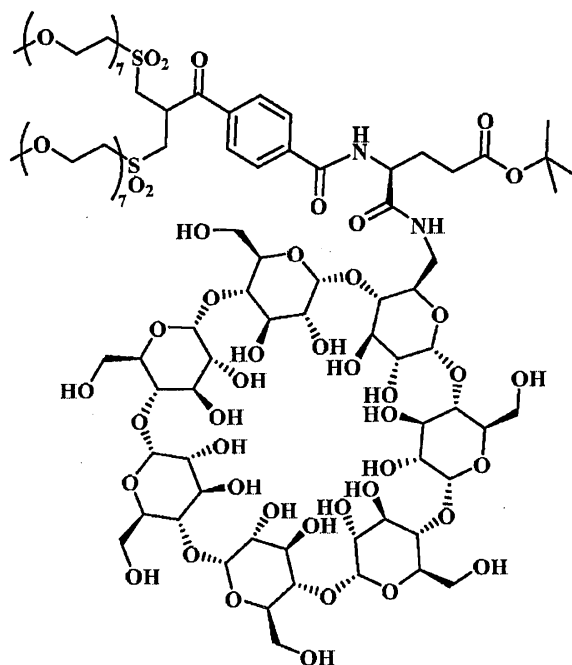
20

30

40

50

【化 6 6】

37

【 0 3 2 9】

DMF(2mL)中の試薬9(156mg)の溶液に、DMF(1mL)中HATU(141mg)の溶液と、NM M(41 μ L)と、DMF(2.5mL)中の化合物36(196mg)の溶液とを添加した。2.5時間、0で攪拌した後、DMF(500 μ L)中の追加の試薬9(19mg)を添加した。20分後、溶液を真空下で濃縮し、残留物を、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸(100:0v/v ~ 0:100v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、化合物37を無色の油(76mg)として得た。m/z [M+H]⁺(2267、20%), [M+2H]²⁺(1134、100%)。

【 0 3 3 0】

工程3:化合物38の合成。

【 0 3 3 1】

10

20

30

40

50

The chemical structure shows a central benzene ring. Two side chains are attached to the ring via carbonyl groups: one is a sulfonate-terminated chain $-(CH_2)_2-SO_3^-(OCH_2CH_2)_7-$ and the other is an amide-linked chain $-(CH_2)_2-NH-C(=O)-CH(CH_2OH)-CH_2COOH$. The amide nitrogen is also part of a larger branched structure consisting of multiple glucose units linked by glycosidic bonds, forming a complex dendritic-like architecture.

38

THF:クロロホルム(5mL、1:4v/v)中の化合物37(33mg)の溶液に、p-トルエンスルホン酸(14mg)を添加し、得られた懸濁液を室温で攪拌した。3.5時間後、揮発分を真空下で除去し、得られた残留物を、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸(100:0v/v~0:100v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、化合物38を無色の油(26mg)として得た。m/z [M+H]⁺(2212、25%), [M+2H]²⁺(1106、100%)。

工程4:試薬35の合成。

不活性アルゴン雰囲気下、室温で、DMF(250 μ L)中の化合物38(18mg)の攪拌溶液に、HATU(6mg)を添加した。1時間後、追加のHATU(6mg)及びNMM(1.1 μ L)を添加し、その溶液を放置して更に0.5時間攪拌した。DMF(100 μ L)中のVal-Ala-PAB-AHX-DMI・TFA塩(Concortis/Levena Biopharma社、7.5mg)及びNMM(1.7 μ L)の別の溶液を調製し、20分間、室温で攪拌し、その後、2つの溶液を併せた。追加のHATU(6mg)及びNMM(1.7 μ L)を添加し、その溶液を室温で攪拌した。2時間後、追加のHATU(6mg)を添加し、その溶液を放置して更に4時間、室温で攪拌し、その後、追加のNMM(1.7 μ L)を添加した。3.5時間後、揮発分を真空下で除去し、得られ残留物を、緩衝液A(v/v):水:5%アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸、及び緩衝液B(v/v):アセトニトリル:0.05%トリフルオロ酢酸(100:0v/v ~ 0:100v/v)で溶出する逆相C18カラムクロマトグラフィーにより精製した。有機溶媒を真空下で除去し、水性溶媒を凍結乾燥により除去して、試薬35(2.7mg)を得た。 m/z $[M+Na+2H]^+ (1100, 65\%)$ 。 $[M+3H]^+ (1094, 100\%)$ 。

代替シクロデキストリン環、例えば、3-シクロデキストリンを使用して、同様の化合物を作製することができることは、理解されるであろう。

(实施例 21)

平均DAR4を有する抗体薬物コンジュゲートを生成するための抗PSMA抗体の試薬35とのコンジュゲーション。

コンジュゲーション試薬35を抗PSMA抗体とコンジュゲートさせて、ADC 39を生じさせた。20mM リン酸ナトリウム、pH 7.5(150mM NaCl及び20mM EDTAを含有する)中、5.2mg/mLの濃度の抗PSMA抗体AB-03を、加熱ブロックの中で15分間、40℃に加熱した。TCEP(mAb 1当量当たり6当量)をmAb溶液に添加し、穏やかに混合し、40℃で1時間インキュベートし、その後、放置して22℃に冷却した。コンジュゲーション試薬35をDMFに溶解して、1.5mM溶液を得た。その還元mAb溶液を20mM リン酸ナトリウム、pH 7.5(150mM NaCl及び20mM EDTAを含有する)で4.4mg/mLに希釈した。コンジュゲーション試薬(mAb 1当量当たり5.6当量)をmAb溶液に添加し、その反応物を穏やかに混合し、22℃で6~22時間インキュベートした。この後、50mM N-アセチル-L-システイン(20当量超の試薬)を用いて22℃で1時間、反応を処理した。粗製コンジュゲーション混合物を疎水性相互作用クロマトグラフィーにより分析した。その粗製反応物を、等体積の50mM リン酸ナトリウム、pH 7(4M NaCl)と混合し、得られた溶液を、50mM リン酸ナトリウム、pH 7(2M NaCl)で平衡させたToyoPearl Phenyl-650S HICカラムに負荷した。ADCをカラムから50mM リン酸ナトリウム、pH 7(20%イソプロパノール)の勾配で溶出させた。DAR4 ADCを含有する画分をプールし、濃縮した(Vivaspin 20、10kDa PES膜)。濃縮された試料の緩衝液をPBS、pH 7.1~7.5に交換し、滅菌濾過した(0.22 µm PVDF膜)。DAR指定は、A248/A280吸収比に基づいた。コンジュゲートの平均DARは、280nmでのHIC分析後の個々のDAR種の相対ピーク面積から算出した。

【0336】

(実施例22)

in vitro細胞生存率アッセイによる抗体薬物コンジュゲート39の分析。

実施例21で調製した抗体薬物コンジュゲート39のin vitroでの有効性を、標的過剰発現がん細胞株の細胞増殖に対するコンジュゲートの阻害効果を測定することにより決定した。

【0337】

ADC又は遊離ペイロードでのin vitroでの処置後の腫瘍細胞生存率の減少は、漸増濃度の化合物の存在下で細胞株を増殖させること、及びCell-Titer Glo(登録商標)発光試薬(Promega社)を使用して増殖又は代謝活性の減少を定量することにより測定することができる。このプロトコールは、細胞播種、薬物処置、及びウェル内に存在する細胞数と直接相関しているATP合成に基づく未処置細胞に関する細胞生存率の決定を記載するものである。

【0338】

細胞株の特徴及びアッセイのための播種密度を下の表に記載する。

【0339】

使い捨てのノイバウエル計数盤を使用して細胞を計数し、下の表で詳述する通り細胞密度を調整した。組織培養処理されおり、不透明な壁を有する、96ウェル白色プレートに、LNCaP細胞を50 µL/ウェルで播種し、24時間、37℃及び5%CO₂でインキュベートした。

【0340】

【表9】

細胞株	標的	増殖培地	播種密度
LNCaP クローン FGC	PSMA	RPMI-1640 培地(Life Technologies(登録商標)社)、10%ウシ胎仔血清、100U/mL のペニシリン、及び 100 µg/mL のストレプトマイシン	1 ウェル当たり細胞 1×10 ⁴ 個

【0341】

化合物の8点段階希釈物を適切な培養培地で調製した。滴定範囲を化合物/細胞株の組合せごとに調整した。LNCaPについては、増殖培地を除去し、100 µL/ウェルの1倍ADC希釈物に置き換えた。次いで、細胞を37℃及び5%CO₂で更に96時間インキュベートした。

【 0 3 4 2 】

Cell-Titer Glo(登録商標)発光試薬(Promega社)を製造業者による説明通りに使用して、細胞生存率アッセイを行った。

【 0 3 4 3 】

Molecular Devices SpectramaxM3プレートリーダーを使用して発光を記録し、その後、GraphPad Prism 4変数非線形回帰モデルを使用してデータを分析した。生存率を未処置細胞に対する%として表し、次の式を使用して算出した:

【 0 3 4 4 】

【 数 6 】

$$\text{生存率\%} = 100 \times \frac{\text{発光}_{\text{試料}} - \text{発光}_{\text{無細胞対照}}}{\text{発光}_{\text{未処置}} - \text{発光}_{\text{無細胞対照}}}$$

10

【 0 3 4 5 】

生存率%をnMでの薬物濃度の対数に対してプロットして、コンジュゲートのIC₅₀値を推定した。コンジュゲートについて使用した濃度範囲は、50nM~3.1pMであり、得られたIC₅₀値は、1.3nMであった。

【 0 3 4 6 】

コンジュゲート39について得られたIC₅₀値は、本発明のADCがin vitroで強力な細胞殺滅特性を有することを示す。

20

【 符号の説明 】

【 0 3 4 7 】

AB-PG1-XG1-006 PSMAに結合する抗体[配列番号35(重鎖)及び配列番号36(軽鎖)]を参照されたい]

AB-PG1-XG1-026 PSMAに結合する抗体[配列番号37(重鎖)及び配列番号38(軽鎖)]を参照されたい]

ADC 抗体薬物コンジュゲート

DAR 薬物抗体比

Df デフェロキサミン

DFO デフェロキサミン

DMF ジメチルホルムアミド

DTPA ジエチレントリアミン五酢酸

EDTA エチレンジアミン四酢酸

HIC 疎水性相互作用クロマトグラフィー

LnCaP PSMA受容体過剰発現がん細胞株

Kd 平衡解離定数

PCa 前立腺がん

PEG ポリエチレングリコール

PSMA 前立腺特異的膜抗原

SCC クエン酸ナトリウム食塩溶液

SCDI 重症複合免疫不全症

scFv 短鎖Fv

sdFv ジスルフィド結合Fv

SEC サイズ排除クロマトグラフィー

30

40

50

【図面】
【図 1 a - 1】

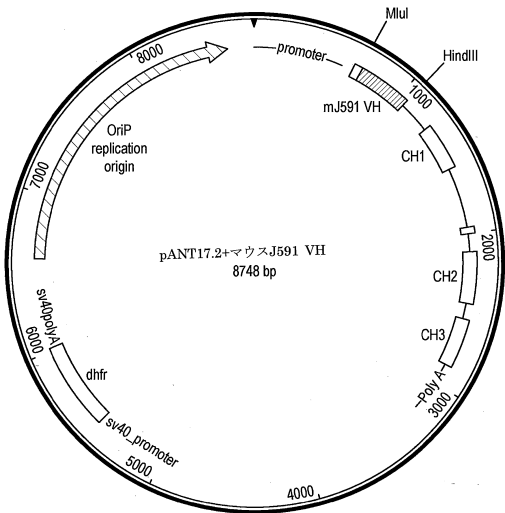


FIG. 1(a)

【図 1 a - 2】

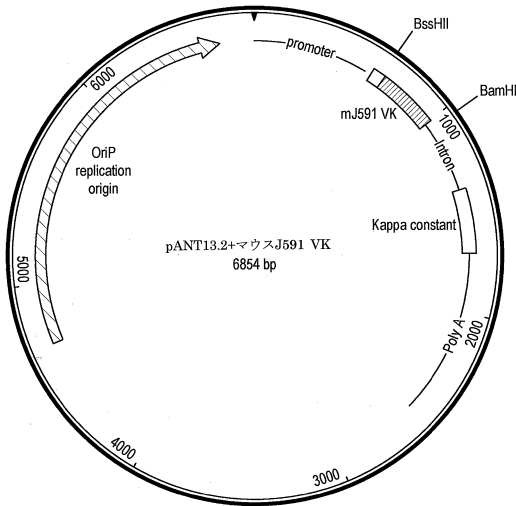


FIG. 1(a) Cont'd

【図 1 b】

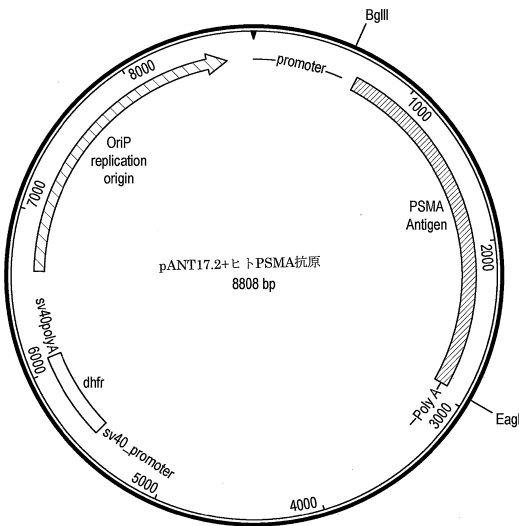


FIG. 1(b)

【図 2 - 1】

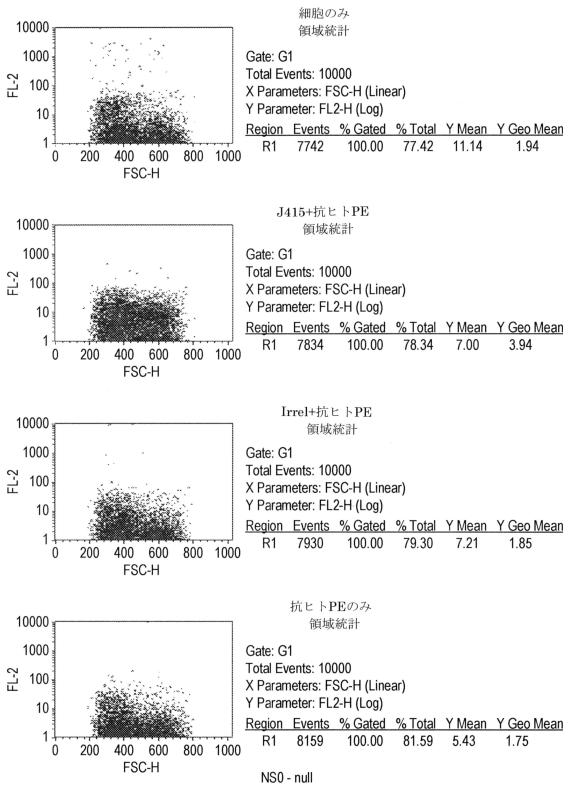


FIG. 2

10

20

30

40

50

【 図 2 - 2 】

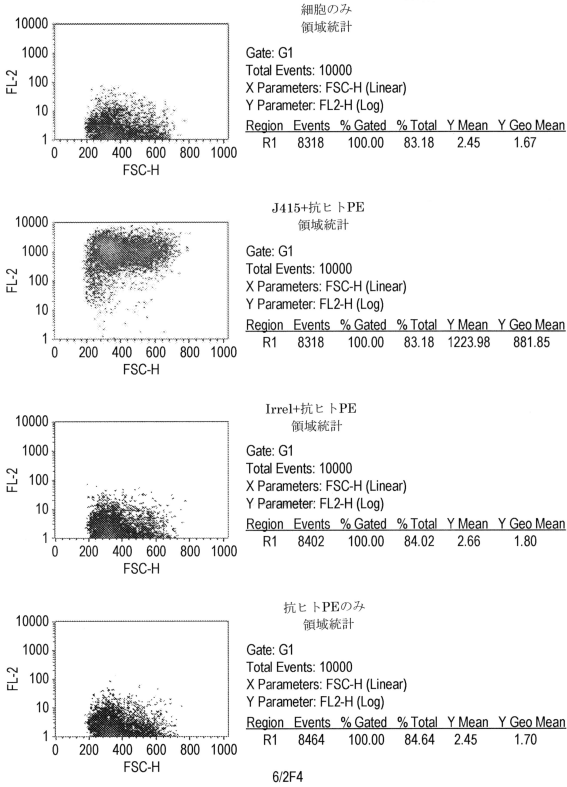


FIG. 2 Cont'd

【 図 3 】

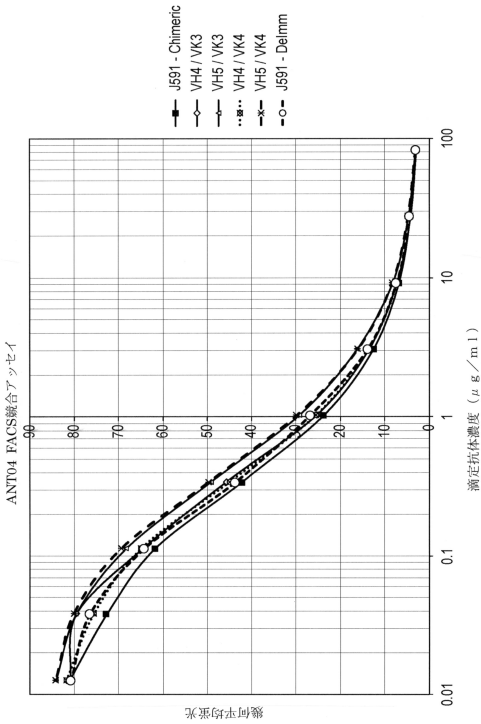


FIG. 3

【 図 4 A 】

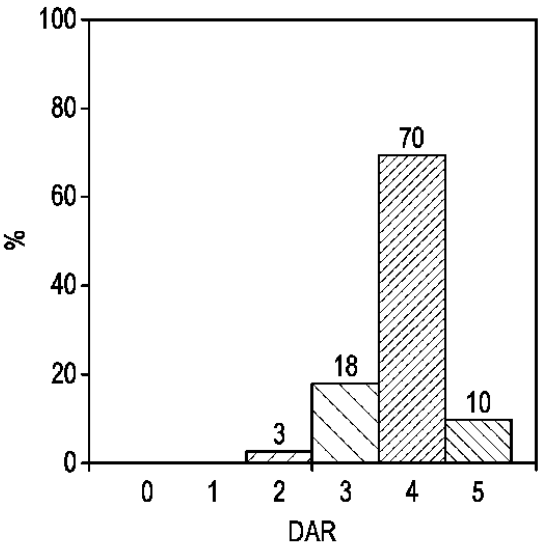


FIG. 4A

【 図 4 B 】

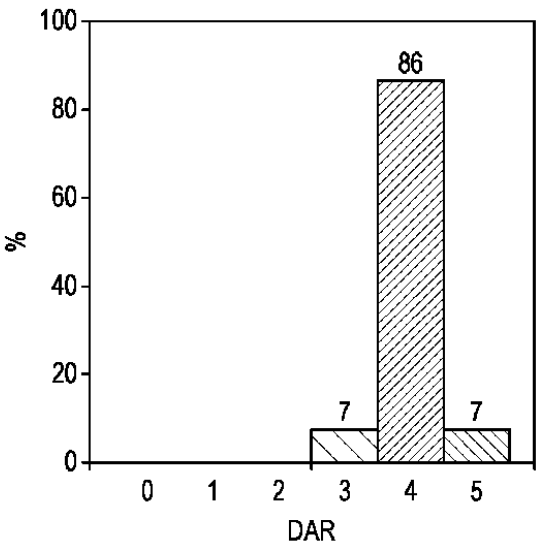


FIG. 4B

10

20

30

40

50

【 図 5 】

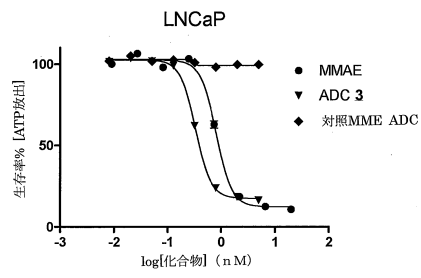


FIG. 5

【 図 6 】

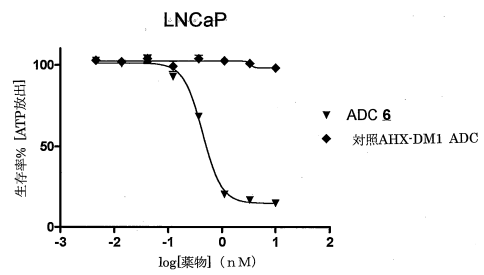


FIG. 6

10

【 図 7 】

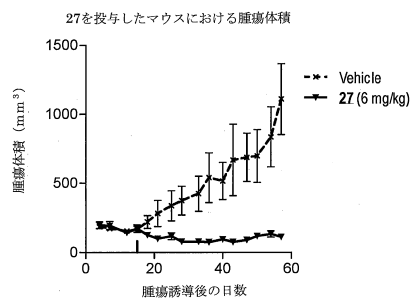


FIG. 7

【 図 8 】

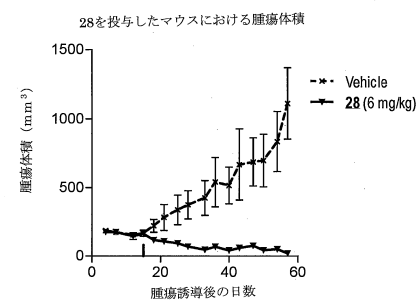


FIG. 8

20

【 図 9 】

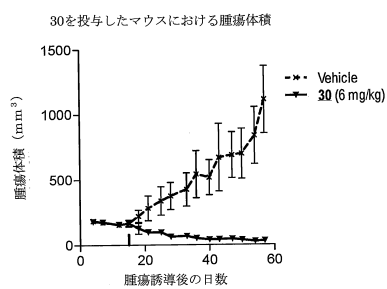


FIG. 9

【 図 10 】

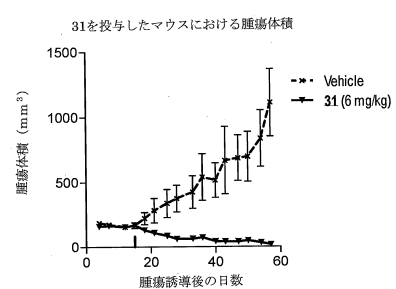


FIG. 10

30

40

50

【図 1 1】

【図 1 2】

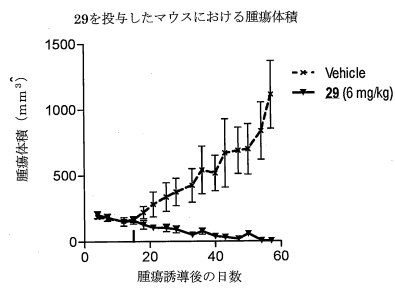


FIG. 11

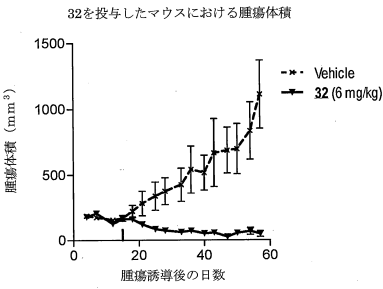


FIG. 12

10

【図 1 3】

【図 1 4】

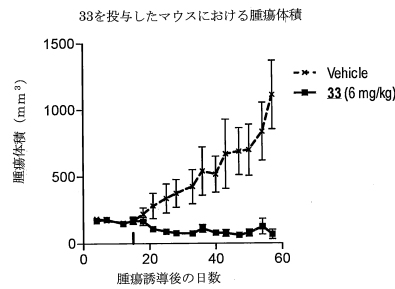


FIG. 13

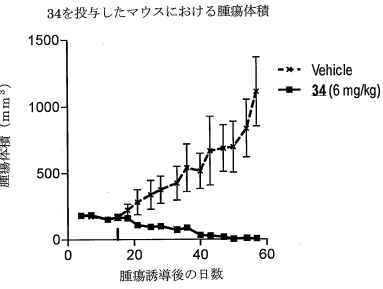


FIG. 14

20

30

40

50

【図 15 A】

J591ヒト化VH変異体1 DNA > 配列番号1

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGG
TGAAGCAGGCCCCATGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGCCACATTGACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
CACGGTCCACCGTCTCTCTCA

J591ヒト化VH変異体2 DNA > 配列番号2

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGG
TGAAGCAGGCCCCATGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGCCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
CACGGTCCACCGTCTCTCTCA

FIG. 15

【図 15 B】

J591ヒト化VH変異体3 DNA > 配列番号3

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGCCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
CACGGTCCACCGTCTCTCTCA

J591ヒト化VH変異体4 DNA > 配列番号4

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
CACGGTCCACCGTCTCTCTCA

FIG. 15 Cont'd

【図 16】

J591ヒト化VH変異体5 DNA > 配列番号5

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAACATTAATCCTAACC
AGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
CACGGTCCACCGTCTCTCTCA

J591ヒト化VK変異体1 DNA > 配列番号6

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCTTCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGGG
TCACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCA
ACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTACTGGGCATCCACCCGGCA
CACTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTC
ACCATCAGCAGACTGCAGTCTGAAGACTTTGCAGATTATTCTGTGCAATATA
ACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGCCAGGGGACCATGGTGGATATCAAA

J591ヒト化VK変異体2 DNA > 配列番号7

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCACCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGCAGTCTGAAGACTTTGCAGATTATTCTGTGCAATATA
AACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA

J591ヒト化VK変異体3 DNA > 配列番号8

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCACCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGCAGTCTGAAGACTTTGCAGATTATTCTGTGCAATATA
AACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA

FIG. 16

【図 17 A】

J591ヒト化VK変異体4 DNA > 配列番号9

GACATTCAAGTACCCAGTCTCCAGCACCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTTGCAGTTTATTACTGTGCAATATA
AACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA

J591ヒト化VH変異体1 アミノ酸 > 配列番号10

EVQLVQSGPELKKPGASVKVSKTSGYTFTEYTHWVKQAHGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS

J591ヒト化VH変異体2 アミノ酸 > 配列番号11

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTEYTHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS

J591ヒト化VH変異体3 アミノ酸 > 配列番号12

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTEYTHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS

FIG. 17

10

20

30

40

50

【図 17 B】

J591ヒト化VH変異体4 アミノ酸 > 配列番号13

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS

J591ヒト化VH変異体5 アミノ酸 > 配列番号14

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKLEWIGNINPNQG
GTTYNQKFEDRVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS

J591ヒト化VK変異体1 アミノ酸 > 配列番号15

DIVMTQSPSTLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISRLQSEDAFYFCQQYNSYPLTFGQGTMTVDIK

J591ヒト化VK変異体2 アミノ酸 > 配列番号16

DIVMTQSPSTLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISRLQSEDAFYFCQQYNSYPLTFGQGTMTVDIK

FIG. 17 Cont'd

【図 18 A】

J591ヒト化VK変異体3 アミノ酸 > 配列番号17

DIVMTQSPSTLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISRLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFGQGTMTVDIK

J591ヒト化VK変異体4 アミノ酸 > 配列番号18

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYCQQYNSYPLTFGQGTMTVDIK

マウスJ591 VH DNA > 配列番号19

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGACTTCAGTG
AGGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCAGTGAATACACCATCCACTGGG
TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTGACTGTAG
ACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTC
TGCAGTCTATTACTGTGACGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGCCAAGGCACC
ACGCTCACCGTCTCCTCA

マウスJ591 VK DNA > 配列番号20

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGG
GTCAGCATCATCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAAGGCCAATCTCCTAACTACTGATTACTGGGCATCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCCTCT
CACCATCACCAATGTGACGCTGGAAGACCTGGCAGATTATTCTGTGACGAATAT
AACAGCTATCCTCTCAGTTCCGCGCCGGGACCATGCTGGATCTCAAA

FIG. 18

【図 18 B】

脱免疫化J591 VH DNA > 配列番号21

GAGGTCCAACCTGGTACAGTCTGGACCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCTACAGTG
AAGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCAGTGAATATACCATACACTGGG
TGAAGCAGGCCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAACATCAATCCTAACA
ATGGTGGTACCACCTACAATCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACACTAAGTGTAG
ACAAGTCCACCGATACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTAAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTATTGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCCAAGGGAC
CCTGCTCACCGTCTCCTCA

脱免疫化J591 VK DNA > 配列番号22

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCCTCATCCCTGTCCACATCAGTAGGAGACAGGG
TCACCCTCACCTGTAAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCA
ACAGAAACCAAGGACCATCTCCTAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCAC
ACTGGAATCCCTAGTCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCA
CCATTTCTAGTCTTCAGCCTGAAGACTTTGCAGATTATTACTGTCAGCAATATAAC
AGCTATCCTCTCAGCTCGGTCTCGGACCAAGGTGGACATCAAA

FIG. 18 Cont'd

【図 19 A】

マウスJ591 VH アミノ酸 > 配列番号23

EVQLQQSGPELKKPGTISRICKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLWIGNINPNNGGT
TYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLTV
SS

マウスJ591 VK アミノ酸 > 配列番号24

DIVMTQSHKPMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLK

脱免疫化J591 VH アミノ酸 > 配列番号25

EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKLEWIGNINPNNGG
TTYNQKFEDKATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDAVYYCAAGWNFDYWGQGTLLT
VSS

脱免疫化J591 VK アミノ酸 > 配列番号26

DIQMTQSPSSLSTSVGDRVLTCKASQDVGTAVDWYQQKPGPSKLLIYWASTRHT
GIPSRFTGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFPGTKVDIK

脱免疫化J415 VH DNA > 配列番号27

GAAGTGAAACTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGGTCCATG
AAAATCTCTGTGTGCTCTGGATTCACTTCAGTAATTACTGGATGAAGTGGGT
CCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTGCTGAAATTAGATCGCAATCT
AATAATTTTGCAACACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGGTCATCATCTCAA
GAGATGATTCCAAGAGTAGTGTCTACCTGCAAAATGAACAGTTTGAGAGCTGAAG
ACACTGCCGTTTATTACTGTACCGCGATGGAATAATTTCTGGGGCCAAGGCAC
CACTGTACAGTCTCCTCA

FIG. 19

10

20

30

40

50

【図 19 B】

脱免疫化J415 VK DNA > 配列番号28

AACATTGTAATGACCCAATTCCCAAATCCATGTCCGCCTCAGCAGGAGAGAGG
ATGACCTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAAATGTGGGTACTTATGTGTCTGGTATC
AACAGAAACCAACACAGTCTCCTAAGATGTTGATATACGGGGCATCCAACCGGT
TCACTGGGGTCCCAGATCGCTTCTCCGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCATTCT
GACCATCAGCAGTGTGACGGCAGAAGACCTTGTAGATTATTACTGTGGACAGAG
TTACACCTTTCCGTACAGTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAATGAAG

脱免疫化J415 VH アミノ酸 > 配列番号29

EVKLEESGGGLVQPGGSMKICVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKLEWVAEIRSQSN
NFATHYAESVKGRVIISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRWNFWGQGITV
TVSS

脱免疫化J415 VK アミノ酸 > 配列番号30

NIVMTQFPKSMASASAGERMTLTCKASENVGTYYVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFT
GVPDFRSGSGSGTDFILTISSVQAEDLVDDYCYGQSYTFPYTFGGGTLKLEMK

FIG. 19 Cont'd

【図 20 A】

PSMA抗原 DNA > 配列番号31

ATGTGGAACTGCTGCACGAGACAGACAGCGCCGTGGCCACCGCCAGACGGCCT
AGATGGCTGTGTGCCGGCGCTCTGGTGCTGGCTGGCGGCTTCTTCTGCTGGGCT
TCCTGTTCGGCTGGTTCATCAAGAGCAGCAACGAGGCCACCAACATCACCCCCA
AGCACACATGAAGGCCTTTCTGGACGAGCTGAAGGCCGAGAATATCAAGAAGT
TCCTGTACAACCTTCAACCAGATCCCCACCTGGCCGGCACCGAGCAGAATTCCA
GCTCGCCAAGCAGATCCAGGCCAGTGGAAGAAGTTCGGCCTGGACAGCGTGGA
ACTGGCCCACTACGACGTGCTGCTGAGCTACCCCAACAGACCCACCCCACTA
CATCAGCATCATCAACGAGGACGGCAACGAGATTTTCAACACACGCTGTTCGA
GCCCCCTCCACCCGGCTACGAGAAGCTGTCCGACATCGTGCCCCATTACGGCC
TTCAGTCCACAAGGCATGCCGAGGGCGACCTGGTGACGTGAACATACGCCCGG
ACCGAGGACTTCTCAAGCTGGAACGGGACATGAAGATCACTGCTCCGGCAAG
ATCGTGATCGCCAGATACGGCAAGGTGTTCGGGGGCAACAAAGTGAAGAACGCC
CAGCTCGCTGGGGCCAAAGGCGGTGATCCTGTACAGCGACCCCGCGGACTACTTC
GCCCTGGCGTGAACTCTACCCCGACGGCTGGAATCTGCCTGGCGGCGGAGTG
CAGCGGGGCAACATCCTGAACCTGAACGGCGCTGGCGACCCCTGACACCTGGC
TACCCCGCCAACGAGTACGCTACAGACGGGGAATCGCCGAGGCGCTGGGCCCTG
CCTAGCATCCTGTGCACCCCATCGGCTACTACGACGCCAGAAATGCTGGAAA
AGATGGCGGCGAGCGCCCTCCCGACAGCTCTTGAGAGGCGAGCTGAAGGTGC
CCTACAACGTGGGCCCTGGCTTACCGGGCAACTTCAGCACCCAGAAAGTGAAGA
TGCACATCCACAGCACCACGAAGTGACCCGGATCTACAACGTGATCGGCACCC
TGAGAGGCGCGGTGGAACCCGACAGATACGTGATCTGGCGGGCACCGGGGATA
GCTGGGTGTTCGGCGGCATCGACCCCTCAGTCTGGCGCCGCTGTGGTGACAGAT
CGTGCGGAGCTTTGGCACCTGAAGAAAGAGGGCTGGCGGCCAGACGGACCAT
CCTGTTCGCCTCTTGGGACCGCGAGGAATTCGGCCTGCTGGGCAGCACCGAGTGG
GCCGAGGAAAACAGCAGACTGCTCCAGGAACGGGGCGCTGCCTACATCAACGCC
GACAGCAGCATCGAGGGCAACTACACCTCGCGGTGGAGTGCACCCCGCTGATG
TACAGCCTGGTGACACAACCTGACCAAGAGCTGAAGTCCCGGACGAGGCGTTC
GAGGGCAAGAGCCTGTACGAGAGCTGGACCAAGAAGTCCCCAGCCCCGAGTTC
AGCGGCATGCCAGAATCAGCAAGCTGGGCGAGCGGCAACGACTTCGAGGTGTTC
TTCCAGCGGCTGGGAATCGCCAGCGGCAGAGCCCGGTACACCAAGAACTGGGAG
ACAAACAAGTTCTCCGGCTACCCCTGTACCACAGCGTGTACGAGACATACGAG

FIG. 20

【図 20 B】

CTGGTGGAAAAGTTCTACGACCCCATGTTCAAGTACCACCTGACCGTGGCCAAAG
TGCGCGGAGGCATGGTGTTCTGAGCTGGCCAACAGCATCGTGCTGCCCTTCGACTG
CCGGGACTACGCCGTGGTGCTGCGGAAGTACGCCGACAAAATCTACAGCATCAG
CATGAAGCACCCCAAGAAATGAAGACCTACAGCGTGTCTTCGACAGCCTGTT
CAGCGCGGTGAAGAAATTTACCGAGATCGCCAGCAAGTTACGCGAGCGGCTCCA

PSMA抗原 DNA > 配列番号31-続き

GGACTTCGACAAGAGCAACCCCATCGTGCTGAGAATGATGAACGACGAGTCAT
GTTCTGGAAACGGGCTTCTACGACCCCTGGGCTGCCGACCGGCCCTTCTAC
AGACACGTGATCTATGCCCCAGCAGCCACAACAATACGCCGGCGAGAGCTTC
CCCGGAATCTACGATGCCCTGTTTCGACATCGAGAGCAAGGTGGACCCAGCAAG
GCCTGGGGCGAAGTGAAGCGGCAATCTACGTGGCGCCTTCACAGTGCAGGCC
GCTGCCGAGACACTGAGCGAAGTGGCCTAG

PSMA抗原 アミノ酸 > 配列番号32

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGLFGWFIKSSNEATNITPKH
NMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFLDVELAHY
DVLLSYPNKTHPNYIINEDGNEIFNTSLFPPPPGYENVSDIVPPSAFSPQGMPEGD
LVVYNYARTEDFFKLERDMKINCSGKVIARYGKVFRGNKVKNALAGAKGVILYS
DPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNAGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAE
AVGLPSIPVHPIGGYDAQKLEKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYNVPGFTGNFSTQKV
KMHJHSTNEVTRIYVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIV
RSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIE
GNYTLRVDCITPLMYSLVHNLTKELSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSEFGMPRISK
LGSNDFFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETVELVEKFYDPMF
KYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYA VVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTY
VSFDSLFSVAKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDR
PFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQA
AAETLSEVA.

FIG. 20 Cont'd

【図 21】

AB-P1 VH アミノ酸 > 配列番号35

MELGLRWGFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPGRLRLS CAASGFAFSR
YGMHWVRQAP GKGLEWVAI WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTQYL
QMNSLRAEDT AVYYCARGGD FLYYYYYGMD VWGQGITTVT SS

これは、米国特許第8,470,332号Bにおいて配列番号15として提示された配列である。

AB-P1 VK アミノ酸 > 配列番号36

MRVPAQLLGL LLLWLPDTRC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS
NYLAWYQQKT GKVPKFLIYE ASTLQSGVPS RFSGGSGSTD FTLTISSLQ
EDVATYYCQN YNSAPFTFGP GTKVDIK

これは、米国特許第8,470,332号Bにおいて配列番号17として提示された配列である。

AB-P2 VH アミノ酸 > 配列番号37

MELGLRWVLL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPGRLRLS CAASGFTFSN
YVMHWVRQAP GKGLEWVAII WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
QMNSLRAEDT AVYYCAGGYN WNYEYHYGYM DVWGQGITTVT VSS

これは、米国特許第8,470,332号Bにおいて配列番号19として提示された配列である。

AB-P2 VK アミノ酸 > 配列番号38

MRVPAQLLGL LLLCFPGARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIT
NYLAWFQQKP GKAPKSLIYA ASSLQSGVPS KFSGSGSGSTD FSLTISSLQ
EDFATYYCQY YNSYPITFGQ GTRLEIK

これは、米国特許第8,470,332号Bにおいて配列番号21として提示された配列である。

FIG. 21

10

20

30

40

50

【図 2 2】

配列番号23	EVQLQDSGP	ELKKPGTSVRI	SCKTSGYTF	EYTI	HWKQSHGKSLEW	GNI	NPNNGGTTY
配列番号25	EVQLVQSGPEV	KKPGATVKI	SCKTSGYTF	EYTI	HWKQAPGKGLEW	GNI	NPNNGGTTY
配列番号10	EVQLVQSGPEL	KKPGASVKV	SCKTSGYTF	EYTI	HWKQAHGKGLEW	GNI	NPNNGGTTY
配列番号11	EVQLVQSGAEV	KKPGASVKV	SCKTSGYTF	EYTI	HWKQAPGKGLEW	GNI	NPNNGGTTY
配列番号12	EVQLVQSGAEV	KKPGASVKV	SCKTSGYTF	EYTI	HWKQAPGKGLEW	GNI	NPNNGGTTY
配列番号13	EVQLVQSGAEV	KKPGASVKV	SCKASGYTF	EYTI	HWKQAPGKGLEW	GNI	NPNNGGTTY
配列番号14	EVQLVQSGAEV	KKPGASVKV	SCKASGYTF	EYTI	HWKQAPGKGLEW	GNI	NPNNGGTTY

配列番号23	NQKFED	KATLTVDKSSSTAYMEL	RSLS	SEDS	AVYYCAA	GWNF	DYWGQGTLLTVSS
配列番号25	NQKFED	KATLTVDKSTDTAYMEL	SSLR	SEDT	AVYYCAA	GWNF	DYWGQGTLLTVSS
配列番号10	NQKFED	KATLTVDKSTSTAYMEL	SSLR	SEDT	AVYYCAA	GWNF	DYWGQGTLLTVSS
配列番号11	NQKFED	RATITVDKSTSTAYMEL	SSLR	SEDT	AVYYCAA	GWNF	DYWGQGTLLTVSS
配列番号12	NQKFED	RATITVDKSTSTAYMEL	SSLR	SEDT	AVYYCAA	GWNF	DYWGQGTLLTVSS
配列番号13	NQKFED	RVITITVDKSTSTAYMEL	SSLR	SEDT	AVYYCAA	GWNF	DYWGQGTLLTVSS
配列番号14	NQKFED	RVITITVDKSTSTAYMEL	SSLR	SEDT	AVYYCAA	GWNF	DYWGQGTLLTVSS

配列番号24	DI	VMTQSHKFMSTSVGDRVSI	IQKASQDVGTAVD	WYQKPGQSPKLLI	YWASTRHTIGV	PD
配列番号26	DI	QMTQSPSSLSTSVGDRVTLT	QKASQDVGTAVD	WYQKPGQSPKLLI	YWASTRHTIGI	PS
配列番号15	DI	VMTQSPSFLSASVGDRTVIT	QKASQDVGTAVD	WYQKPGQAPKLLI	YWASTRHTIGV	PD
配列番号16	DI	VMTQSPSTLSASVGDRTVIT	QKASQDVGTAVD	WYQKPGQAPKLLI	YWASTRHTIGV	PD
配列番号17	DI	VMTQSPSTLSASVGDRTVIT	QKASQDVGTAVD	WYQKPGQAPKLLI	YWASTRHTIGV	PD
配列番号18	DI	QMTQSPSTLSASVGDRTVIT	QKASQDVGTAVD	WYQKPGQAPKLLI	YWASTRHTIGV	PD

配列番号24	RFTGSGSGTDFTLTI	TNVS	QSEDLADYFCQQYNSYPLTF	FGAGTMLDLK
配列番号26	RFSGSGSGTDFTLTI	SSL	QPEDFADYFCQQYNSYPLTF	FGPGTKVDIK
配列番号15	RFTGSGSGTDFTLTI	SRL	QSEDFADYFCQQYNSYPLTF	FGQGTMTVDIK
配列番号16	RFTGSGSGTDFTLTI	SRL	QSEDFADYFCQQYNSYPLTF	FGQGTMTVDIK
配列番号17	RFSGSGSGTDFTLTI	SRL	QPEDFADYFCQQYNSYPLTF	FGQGTMTVDIK
配列番号18	RFSGSGSGTDFTLTI	SRL	QPEDFADYFCQQYNSYPLTF	FGQGTMTVDIK

FIG. 22

【図 2 3 a】

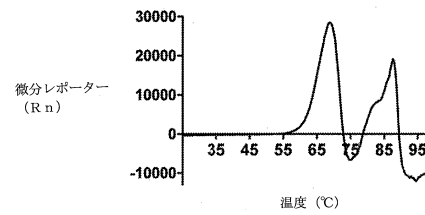


FIG. 23(a)

10

【図 2 3 b】

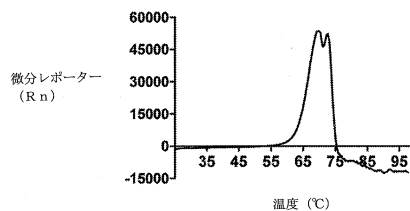


FIG. 23(b)

【図 2 3 c】

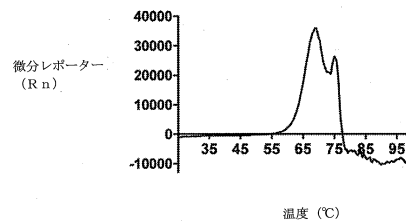


FIG. 23(c)

30

【配列表】

0007179719000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	31/537 (2006.01)	A 6 1 K	31/537	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00	
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	51/00	2 0 0
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(72)発明者 ロバート・ジョージ・エドワード・ホルゲート

イギリス・ハートフォードシャー・S G 8・7 D D・ハートフォードシャー・ロイストン・スタン
フォード・アヴェニュー・2 2

(72)発明者 フランシス・ジョセフ・カー

イギリス・アバディーンシャー・A B 2 3・8 W U・アバディーン・バルミディ・バーチリー・(
番地なし)・ザ・ホールディングス

審査官 上村 直子

(56)参考文献

特表 2 0 1 3 - 5 1 2 9 2 0 (J P , A)
 特表 2 0 0 8 - 5 0 4 2 1 5 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 6 / 0 3 3 5 4 7 (W O , A 1)
 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 3 1 1 5 5 0 (U S , A 1)
 特表 2 0 1 5 - 5 3 3 8 4 7 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
 N)