

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6892826号  
(P6892826)

(45) 発行日 令和3年6月23日 (2021.6.23)

(24) 登録日 令和3年6月1日 (2021.6.1)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13 Z N A

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

請求項の数 36 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-548953 (P2017-548953)  
 (86) (22) 出願日 平成28年3月17日 (2016.3.17)  
 (65) 公表番号 特表2018-509908 (P2018-509908A)  
 (43) 公表日 平成30年4月12日 (2018.4.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/022943  
 (87) 国際公開番号 W02016/149535  
 (87) 国際公開日 平成28年9月22日 (2016.9.22)  
 審査請求日 平成31年1月24日 (2019.1.24)  
 (31) 優先権主張番号 62/134,981  
 (32) 優先日 平成27年3月18日 (2015.3.18)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 505314468  
 シージェン インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 ワシントン 98021  
 , ボセル, エス. イー., 30ティ  
 ーエイチ ドライブ - 21823  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (72) 発明者 ルイス, ティモシー  
 アメリカ合衆国 ワシントン 98021  
 , ボセル, 30ティーエイチ ドライ  
 ブ エスイー 21823

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD48抗体及びその複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトCD48タンパク質に特異的に結合するキメラまたはヒト化抗体であって、前記抗体が、配列番号3～5の重鎖CDR配列と、配列番号6～8の軽鎖CDR配列とを含み、前記抗体が、前記ヒトCD48タンパク質に特異的に結合し、かつ配列番号3～5の重鎖CDR配列と、配列番号6～8の軽鎖CDR配列とを含むマウス抗体と比較したとき、前記ヒトCD48タンパク質に対してより高い結合親和性を呈し、

前記抗体が、配列番号1の重鎖可変領域および配列番号2の軽鎖可変領域を含む、キメラまたはヒト化抗体。

【請求項2】

前記キメラまたはヒト化抗体が、前記マウス抗体と比較したとき、前記ヒトCD48タンパク質に少なくとも2倍高い結合親和性を呈する、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項1に記載の抗体。

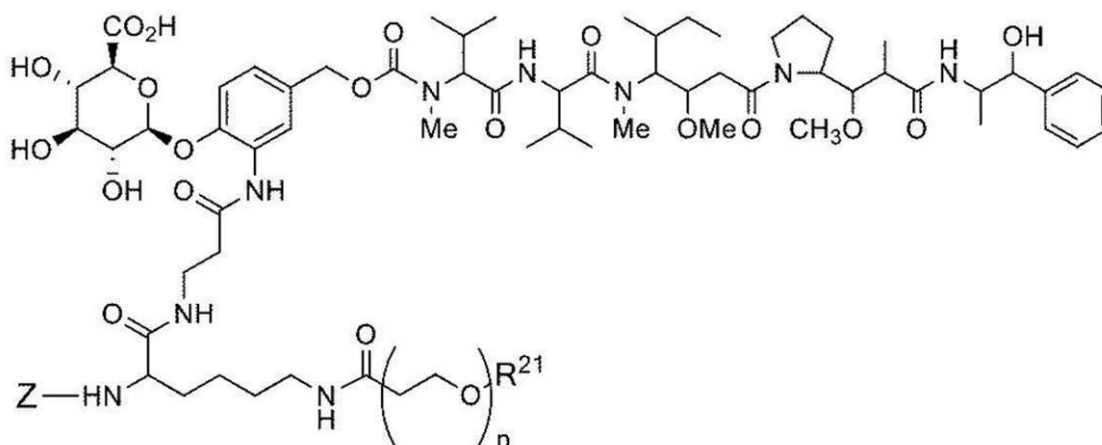
【請求項4】

請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体を含む抗体薬物複合体であって、前記抗体が、リンカーに結合された細胞傷害性薬物と複合体化される、抗体薬物複合体。

【請求項5】

前記薬物 - リンカーが、下式：

## 【化 4 1】



10

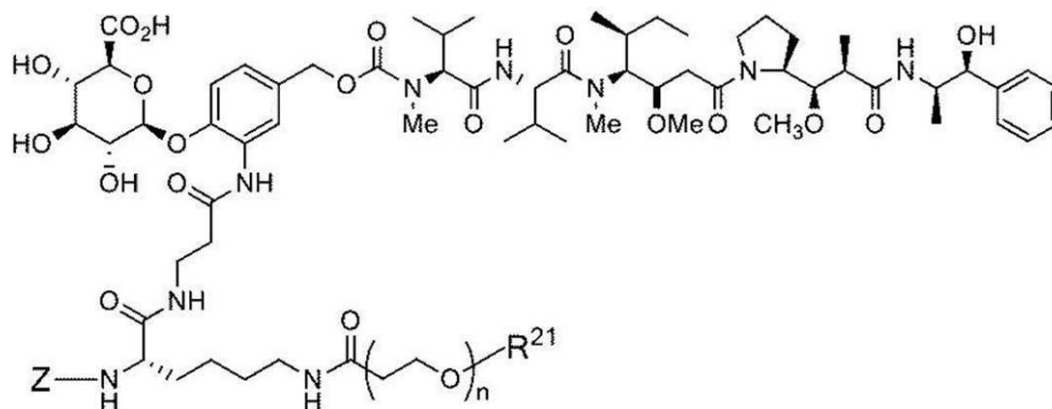
またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、Zが、前記抗体上の官能基と反応して、それとの共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、nが、8～36の範囲であり、R<sup>21</sup>が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である、請求項4に記載の抗体薬物複合体。

## 【請求項6】

20

前記薬物 - リンカーが、下式：

## 【化 4 3】



30

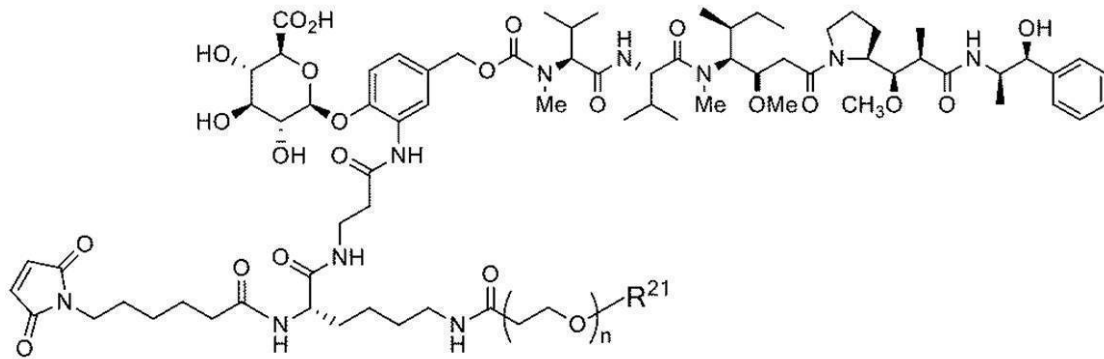
またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、Zが、前記抗体上の官能基と反応して、それとの共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、nが、8～36の範囲であり、R<sup>21</sup>が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である、請求項4に記載の抗体薬物複合体。

## 【請求項7】

40

前記薬物 - リンカーが、下式：

## 【化 4 5】



10

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、 $n$ が、8～36の範囲であり、 $R^{21}$ が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である、請求項4に記載の抗体薬物複合体。

## 【請求項 8】

$n$ が、8～14の範囲である、請求項5、6および7のいずれか一項に記載の抗体薬物複合体。

## 【請求項 9】

20

$n$ が、10～12の範囲である、請求項5、6および7のいずれか一項に記載の抗体薬物複合体。

## 【請求項 10】

$n$ が、12である、請求項5、6および7のいずれか一項に記載の抗体薬物複合体。

## 【請求項 11】

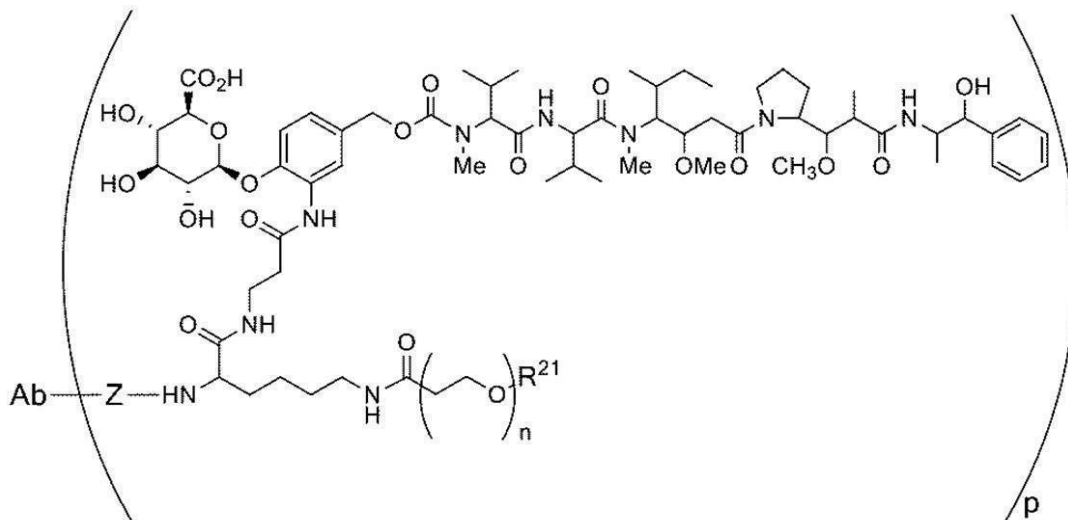
$R^{21}$ が、 $-CH_3$ または $-CH_2CH_2CO_2H$ である、請求項8～10のいずれか1項に記載の抗体薬物複合体。

## 【請求項 12】

下式

## 【化 4 6】

30



40

を有する抗CD48抗体-薬物複合体化合物であって、式中、 $Ab$ が、請求項1に記載の抗CD48抗体であり、 $Z$ が、前記抗体上の官能基と反応して、それと共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、 $n$ が、8～36の範囲であり、 $R^{21}$ が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位であり、 $p$ が、1～16である

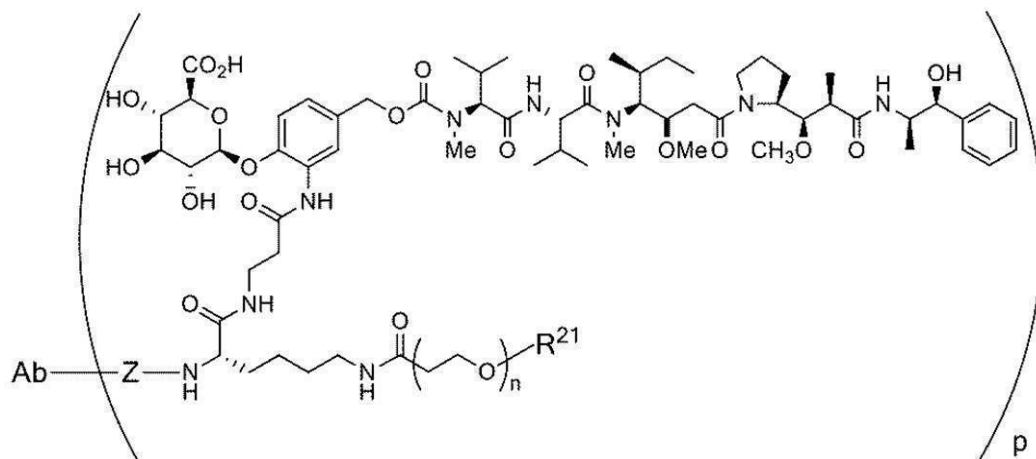
50

、抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 1 3】

下式

【化 4 7】



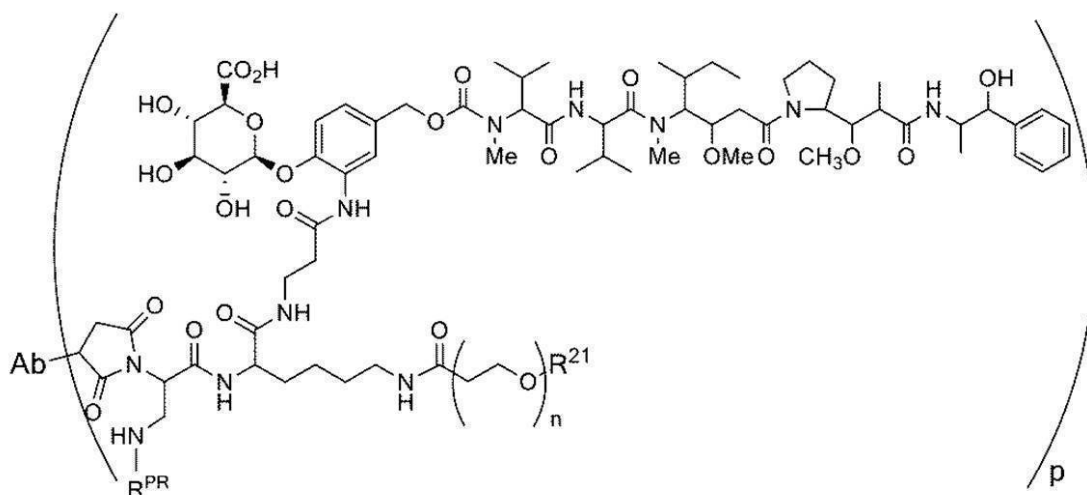
10

を有する請求項 1 2 に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 1 4】

下式

【化 4 8】



30

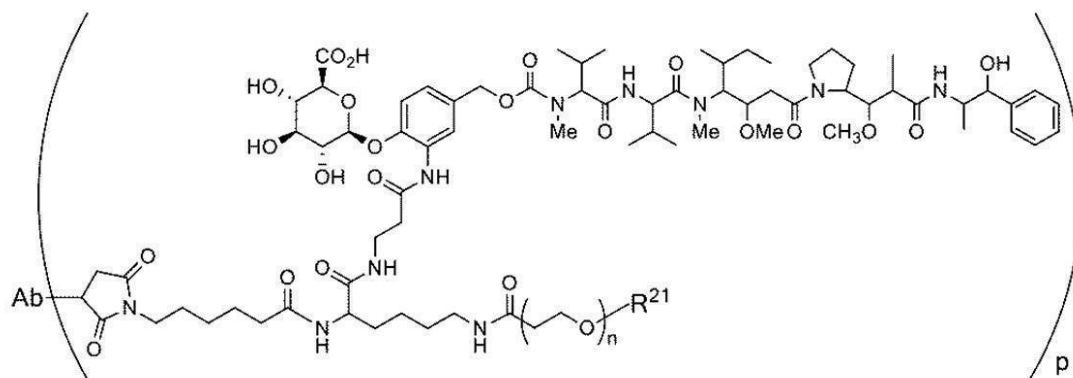
を有する請求項 1 2 に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物であって、式中、 $R^P$  が、水素または保護基である、抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 1 5】

下式

40

## 【化 4 9】



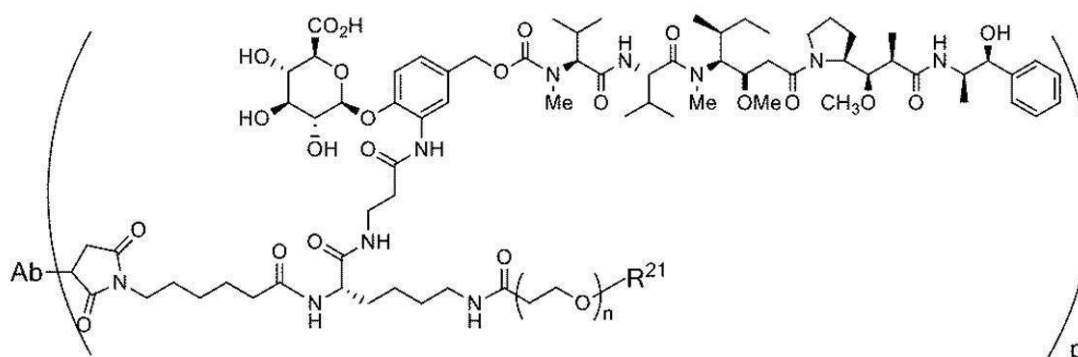
10

を有する請求項 1 2 に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

## 【請求項 1 6】

下式

## 【化 5 0】



20

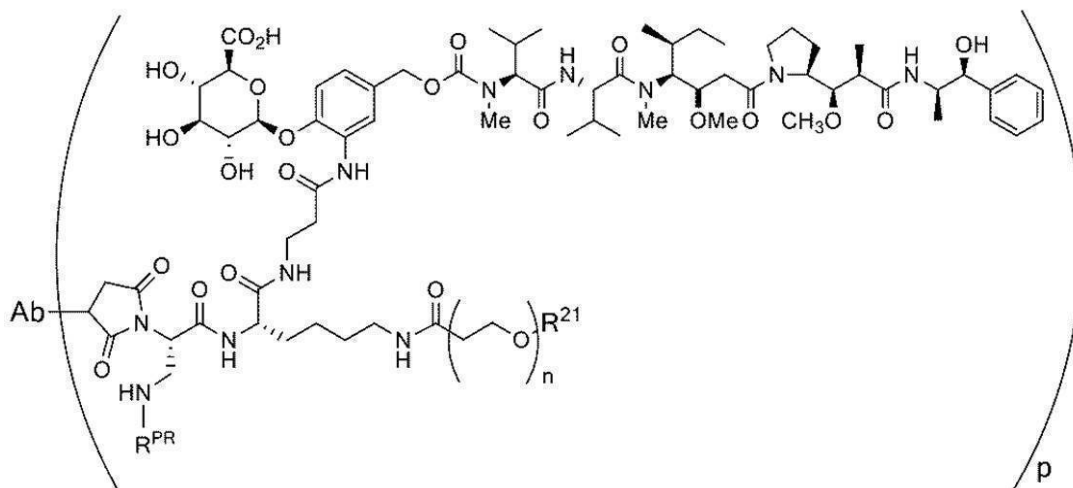
30

を有する請求項 1 2 に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

## 【請求項 1 7】

下式

## 【化 5 1】



40

50

を有する請求項 1 2 に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物であって、式中、 $R^P$  が、水素または保護基である、抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 1 8】

n が、8 ~ 1 4 の範囲である、請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物。

【請求項 1 9】

n が、1 0 ~ 1 2 の範囲である、請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物。

10

【請求項 2 0】

n が、1 2 である、請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物。

【請求項 2 1】

$R^{21}$  が、 $-CH_3$  または  $-CH_2CH_2CO_2H$  である、請求項 1 2 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物。

【請求項 2 2】

p が、8 である、請求項 1 2 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の抗体 - 薬物複合体化合物。

【請求項 2 3】

20

A b への結合が、前記抗体の鎖間ジスルフィド結合のシステイン残基を介する、請求項 1 2 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の抗体 - 薬物複合体化合物。

【請求項 2 4】

請求項 1 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体分子の集団を含む抗体 - 薬物複合体組成物であって、前記組成物の平均薬物負荷が 8 であり、前記組成物における主要薬物負荷が 8 である、抗体 - 薬物複合体組成物。

【請求項 2 5】

薬学的組成物である、請求項 2 4 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

C D 4 8 発現癌の患者を治療するための、請求項 2 4 に記載の組成物。

30

【請求項 2 7】

前記 C D 4 8 発現癌が、多発性骨髄腫である、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記 C D 4 8 発現癌が、B 細胞悪性腫瘍及び急性骨髄性白血病からなる群から選択される、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

ヒト C D 4 8 タンパク質に特異的に結合する抗体の配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とをコードする配列を含む、単離された核酸。

【請求項 3 0】

40

請求項 2 9 に記載の核酸を含む、単離されたベクター。

【請求項 3 1】

請求項 3 0 に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。

【請求項 3 2】

前記宿主細胞が、哺乳類宿主細胞である、請求項 3 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 3】

前記宿主細胞が、CHO、COS、HeLa、HEK 2 9 3、L、Sp 2 / 0、及び NS 0 からなる群から選択される、請求項 3 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 4】

抗 C D 4 8 抗体の作製方法であって

50

前記抗体をコードする核酸の発現に適した条件下で、請求項 3 1 に記載の宿主細胞を培養することと、

前記抗体を単離することと、を含む、方法。

【請求項 3 5】

抗 C D 4 8 抗体薬物複合体の作製方法であって、

前記抗体をコードする核酸の発現に適した条件下で、請求項 3 1 に記載の宿主細胞を培養することと、

前記抗体を単離することと、

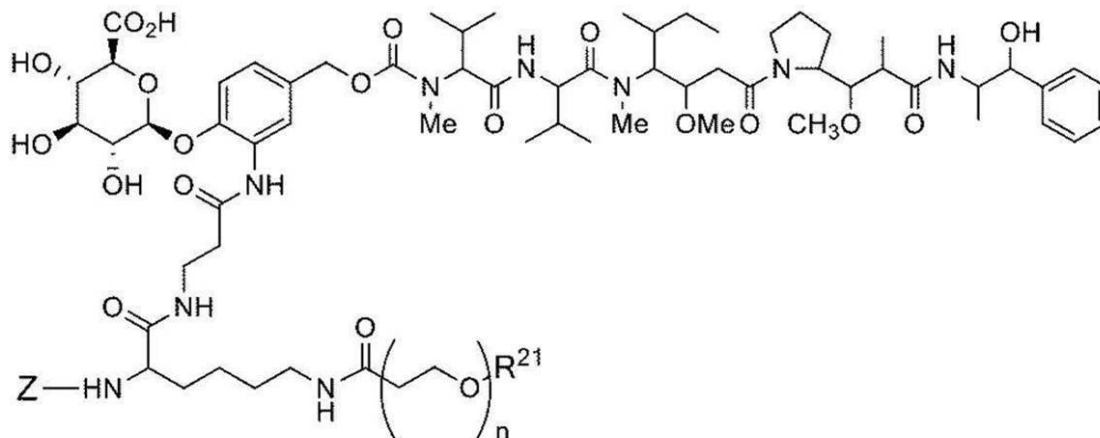
リンカーに結合された細胞傷害性薬物を前記抗体と複合体化することと、を含む、方法

。

【請求項 3 6】

前記薬物 - リンカーが、下式：

【化 5 3】



またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、Z が、前記抗体上の官能基と反応して、それとの共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、n が、8 ~ 36 の範囲であり、R<sup>21</sup> が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である、請求項 3 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、35 USC 119(e)の下、2015年3月18日に提出された米国仮特許出願第62/134,981号の利益を主張し、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、C D 4 8 及びその複合体に特異的に結合するマウス、キメラ、及びヒト化抗体を提供する。

【背景技術】

【0003】

C D 4 8 抗原（表面抗原分類 4 8）は、B リンパ球活性化マーカー（B L A S T - 1）またはシグナル伝達リンパ球活性化分子 2（S L A M F 2）としても知られる。C D 4 8 は、C D 8 4、C D 1 5 0、C D 2 2 9 及び C D 2 4 4 などの S L A M（シグナル伝達リンパ球活性化分子）タンパク質を含む、免疫グロブリンスーパーファミリー（I g S F）の C D 2 サブファミリーのメンバーである。C D 4 8 は、リンパ球及び他の免疫細胞の表面、ならびに樹状細胞に見られ、これらの細胞における活性化及び分化経路に関与する。

CD48は、多発性骨髄腫細胞及び他のB細胞起源の癌、例えば、非ホジキンリンパ腫（NHL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症（MGUS）、ワルデンストーム高ガンマグロブリン血症（WM）、原発性/全身性アミロイドーシス患者腫瘍細胞、及び濾胞性リンパ腫（FL）上に発現されることが知られている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

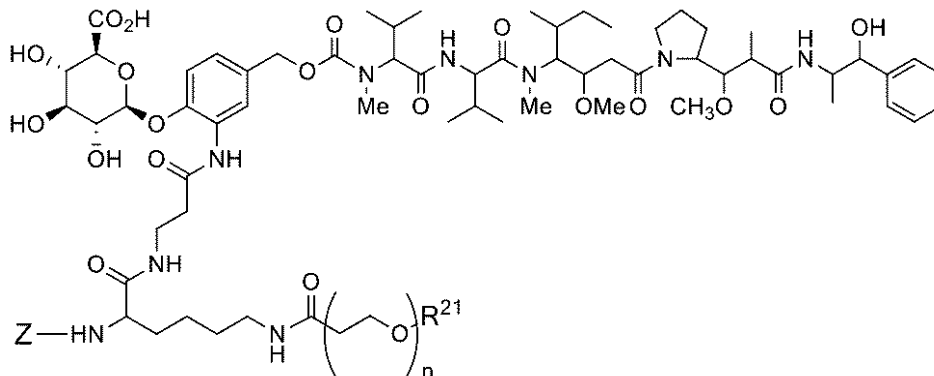
【0004】

一態様では、本開示は、ヒトCD48タンパク質に特異的に結合するキメラまたはヒト化抗体を提供する。本抗体は、配列番号3～5の重鎖CDR配列と、配列番号6～8の軽鎖CDR配列とを含む。本抗体は、ヒトCD48タンパク質に特異的に結合するマウス抗体と比較したとき、ヒトCD48タンパク質に対してより高い結合親和性を呈し、また配列番号3～5の重鎖CDR配列及び配列番号6～8の軽鎖CDR配列も含む。一実施形態では、キメラまたはヒト化抗体は、マウス抗体と比較したとき、ヒトCD48タンパク質に少なくとも2倍高い結合親和性を呈する。別の実施形態では、本抗体は、ヒト化抗体である。更なる実施形態では、本抗体は、配列番号1の重鎖可変領域を含む。別の実施形態では、本抗体は、配列番号2の軽鎖可変領域を含む。更なる実施形態では、本抗体は、配列番号1の重鎖可変領域と、配列番号2の軽鎖可変領域とを含む。一実施形態では、抗体は、リンカーに結合された細胞傷害性薬物と複合体化される。

【0005】

更なる実施形態では、抗体に結合された薬物-リンカーは、下式：

【化1】



またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、Zは、抗体上の官能基と反応して、それとの共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、nは、8～36の範囲であり、R<sup>P</sup>Rは、水素または保護基であり、R<sup>21</sup>は、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である。

【0006】

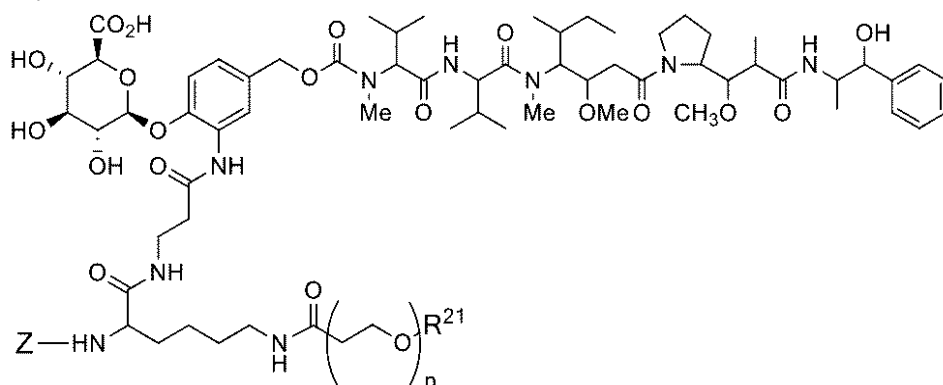
別の態様では、本開示は、配列番号1の重鎖可変領域と、配列番号2の軽鎖可変領域とを含む、ヒトCD48タンパク質に特異的に結合するヒト化抗体を提供する。

【0007】

抗体は、一実施形態では、リンカーに結合された細胞傷害性薬物と複合体化される。例示的な薬物-リンカーは、下式：



## 【化 2】



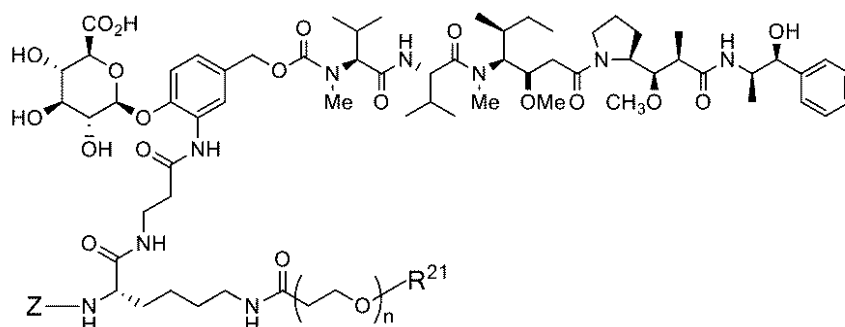
10

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、Zは、抗体上の官能基と反応して、それとの共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、nは、8～36の範囲であり、 $R^{PR}$ は、水素または保護基であり、 $R^{21}$ は、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である。

## 【0008】

本開示の抗体と複合体化するための別の例示的な薬物-リンカーは、下式：

## 【化 3】



20

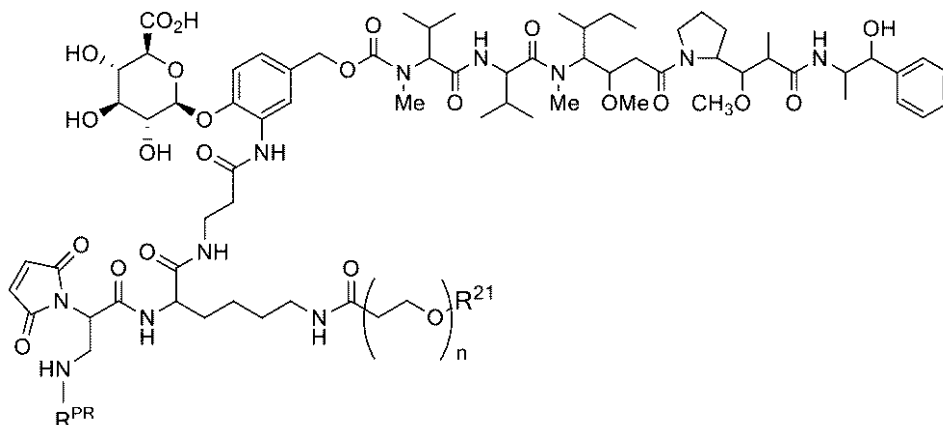
またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、Zは、抗体上の官能基と反応して、それとの共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、nは、8～36の範囲であり、 $R^{PR}$ は、水素または保護基であり、 $R^{21}$ は、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である。

30

## 【0009】

本開示の抗体と複合体化するための別の例示的な薬物-リンカーは、下式：

## 【化 4】



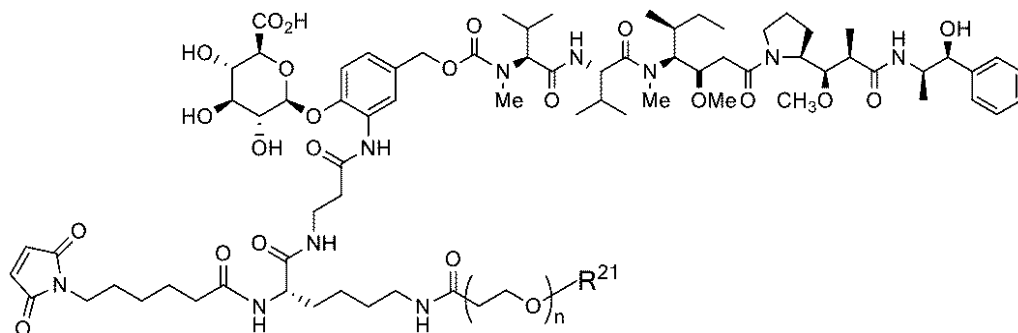
40

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、nは、8～36の範囲であり、 $R^{PR}$ は、水素または保護基であり、 $R^{21}$ は、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である。

本開示の抗体に複合体化するための別の例示的な薬物-リンカーは、下式：

50

## 【化 5】



10

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、 $n$ は、8～36の範囲であり、 $R^{P R}$ は、水素または保護基であり、 $R^{21}$ は、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である。

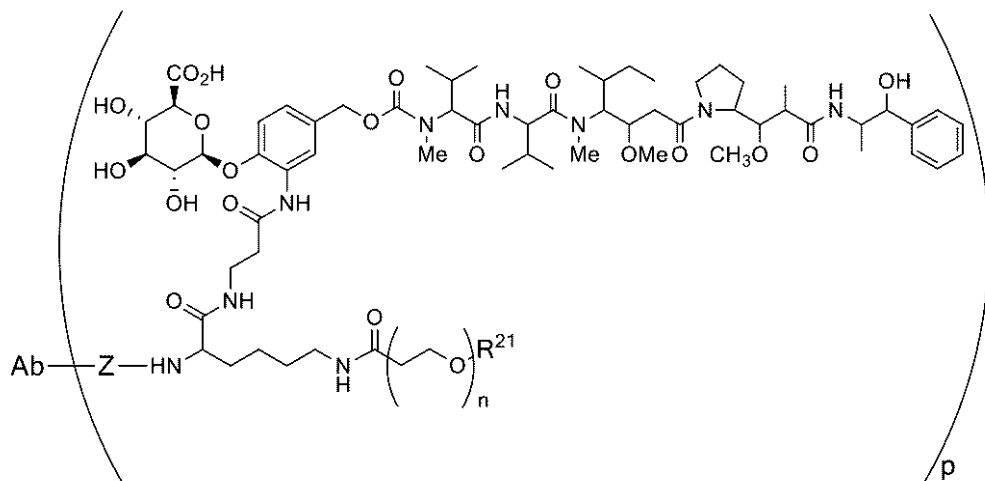
本開示のいくつかの実施形態では、値 $n$ は、8～14の範囲であり得る。本開示の他の実施形態では、値 $n$ は、10～12の範囲である。本開示の更なる実施形態では、 $n$ の値は、12である。別の実施形態では、 $R^{21}$ は、 $-CH_3$ または $-CH_2CH_2CO_2H$ である。

## 【0010】

別の態様では、本開示は、下式

## 【化 6】

20



30

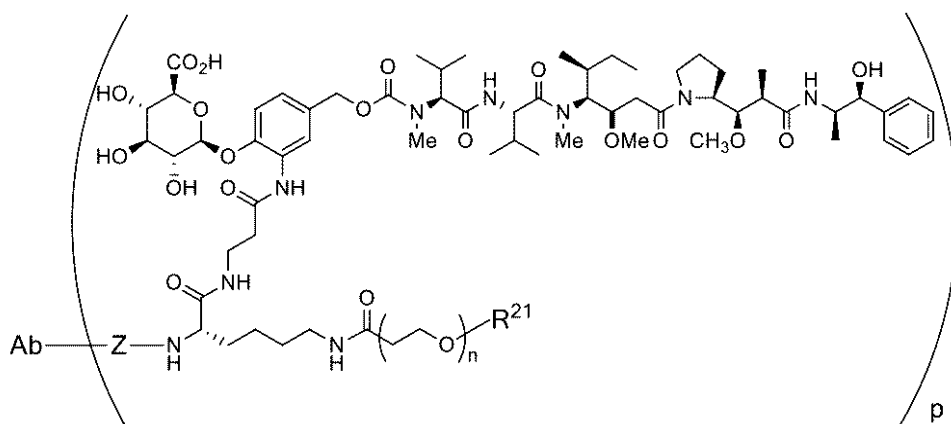
を有する抗CD48抗体-薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩であり、式中、 $Z$ は、共有結合を介して抗体及び薬物-リンカーの残部を連結する有機部分を表し、 $n$ は、8～36の範囲であり、 $R^{21}$ は、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位であり、 $p$ は、1～16である。本抗体は、開示の抗CD48抗体のうちのいずれかであってよい。好ましい実施形態では、本抗体は、配列番号1の重鎖可変領域と、配列番号2の軽鎖可変領域とを有する。

40

## 【0011】

本開示の抗体と複合体化するための別の例示的な薬物-リンカーは、下式：

## 【化 7】



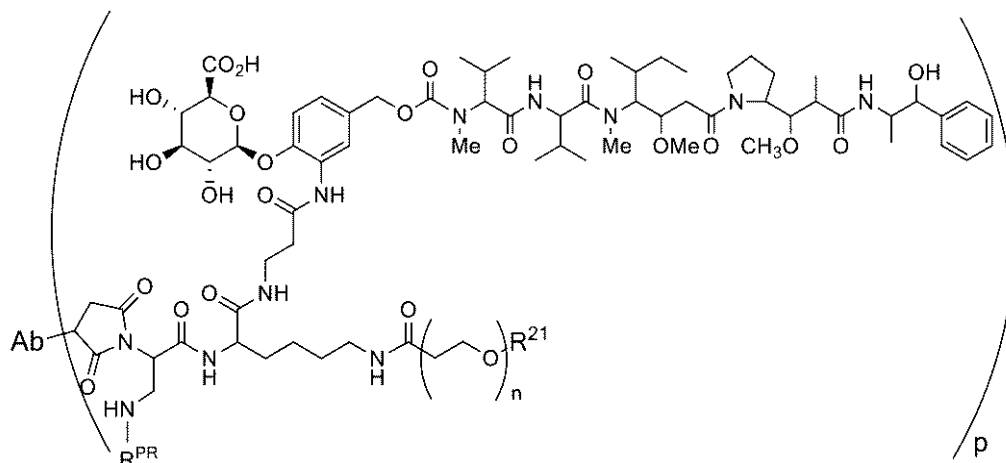
10

またはその薬学的に許容される塩を有する。

## 【 0 0 1 2 】

本開示の抗体と複合体化するための別の例示的な薬物 - リンカーは、下式：

## 【化 8】



20

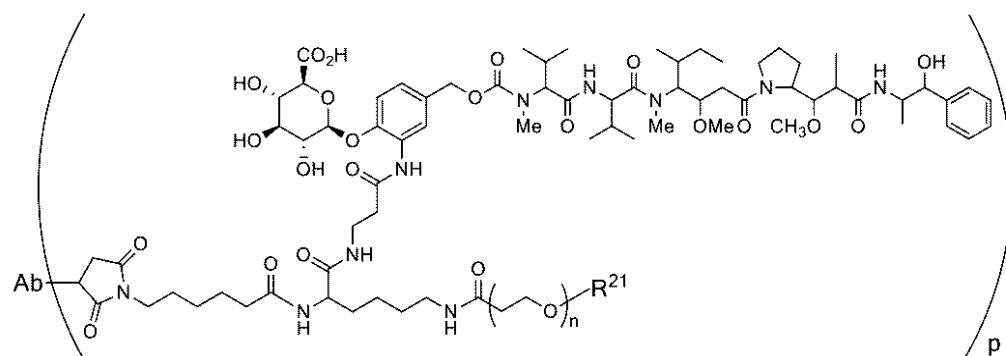
30

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、 $R^P R$  は、水素または保護基である。

## 【 0 0 1 3 】

本開示の抗体と複合体化するための別の例示的な薬物 - リンカーは、下式：

## 【化 9】



40

またはその薬学的に許容される塩を有する。

## 【 0 0 1 4 】

本開示の抗体と複合体化するための別の例示的な薬物 - リンカーは、下式：

The chemical structure shows a dendritic polymer. The main chain consists of a five-membered cyclic amide (lactam) attached to a long alkyl chain, which is further connected to a polyether chain (represented by a repeating unit in parentheses with a subscript  $n$ ) and a terminal group  $R^{21}$ . A side chain is attached to the main chain via an amide linkage. This side chain is a complex dendritic structure featuring a central benzene ring, multiple hydroxyl groups, a carboxylic acid group, and various other functional groups including amides, esters, and a terminal hydroxyl group.

10

本開示の抗体と複合体化するための別の例示的な薬物 - リンカーは、下式：

20

本開示のいくつかの実施形態では、値  $n$  は、 $8 \sim 14$  の範囲であり得る。本開示の他の実施形態では、値  $n$  は、 $10 \sim 12$  の範囲である。本開示の更なる実施形態では、 $n$  の値は、 $12$  である。別の実施形態では、 $R^{2-1}$  は、 $-CH_3$  または  $-CH_2CH_2CO_2H$  である。

30

別の実施形態では、本開示の抗体 - 薬物複合体のいずれかは、8 の p 値を有する。別の実施形態では、薬物 - リンカーは、抗体の鎖間ジスルフィド結合のシステイン残基を介して抗体に結合される。

別の実施形態では、抗体 - 薬物複合体組成物は、平均薬物負荷が 8 の抗 CD 48 抗体 - 薬物複合体分子の集団を含み、組成物における主要薬物負荷は 8 である。

## 40

別の態様では、本開示は、本明細書に開示される抗CD48抗体-薬物複合体を含む薬学的組成物及び製剤を提供する。

更なる態様では、CD48抗体-薬物複合体は、CD48を発現する癌を有する患者を治療するために使用される。CD48発現癌は、一実施形態では、多発性骨髄腫である。他の実施形態では、CD48発現癌は、B細胞悪性腫瘍、例えば、非ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症(MGUS)、ワルデンストーム高ガンマグロブリン血症(WM)、原発性/全身性アミロイドーシス患者腫瘍細胞、及び慢性リンパ球性白血病である。本明細書に開示される方法を使用して治療することができるCD48発現癌の別の例は、急性骨髄性白血病である。

50

## 【0021】

## 定義

「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体、すなわち、集団を含む個々の抗体が微量で存在し得る可能な天然に生じる突然変異を除き同一である集団から得られた抗体を指す。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体の集団から得られたときの抗体の性質を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されないものとする。例えば、本発明に従い使用されるモノクローナル抗体は、最初に Kohler et al. (1975) Nature 256: 495 により記載されたハイブリドーマ法により作製され得るか、または組換え DNA 法により（例えば、米国特許第 4816567 号を参照されたい）作製され得る。「モノクローナル抗体」は、例えば、C 10  
lackson et al. (1991) Nature, 352: 624 - 628 及び Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581 - 597 に記載される技法を使用してファージ抗体ライブラリーからも単離され得るか、または他の方法により作製され得る。本明細書に記載される抗体は、モノクローナル抗体である。

## 【0022】

抗体は典型的には、単離された形態で提供される。これは、抗体が典型的には、その産生または精製から生じる妨害タンパク質及び他の汚染物の少なくとも 50 % w / w 純粋であることを意味するが、その抗体がその使用を容易にすることを意図した過剰の薬学的に許容される担体（複数可）または他のビヒクルと組み合わせられる可能性を除外しない。時 20  
折、抗体は、産生または精製からの妨害タンパク質及び汚染物から少なくとも 60 %、70 %、80 %、90 %、95、または 99 % w / w 純粋である。単離された抗体を含む抗体は、細胞傷害性薬と複合体化され、抗体薬物複合体として提供され得る。

## 【0023】

「単離された」ポリヌクレオチドは、特定され、その天然の構成成分から分離及び／または回収されたポリヌクレオチドを指す。

## 【0024】

モノクローナル抗体の、その標的抗原への特異的結合は、少なくとも  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、または  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  の親和性を意味する。特異的結合は、検出可能に規模が高く、少なくとも 1 つの無関係の標的に生じる非特異的結合から区別可能である。 30  
特異的結合は、特定の官能基間の結合の形成または特定の空間的適合（例えば、ロック・アンド・キータイプ）の結果であり得るが、非特異的結合は通常、ファンデルワース力の結果である。CD48 指向抗体 - 薬物複合体及び抗 CD48 抗体は、CD48 に特異的に結合する。

## 【0025】

基本的な抗体構造単位は、サブユニットの四量体である。各四量体は、2 つの同一のポリペプチド鎖の対を含み、各対は、1 つの「軽」鎖（約 25 kDa）及び 1 つの「重」鎖（約 50 ~ 70 kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に關与する約 100 ~ 110 個以上のアミノ酸の可変領域を含む。切断可能なシグナルペプチドに連結されたこの可変領域が最初に発現される。シグナルペプチドを有しない可変領域は、時折 40  
、成熟可変領域と称される。よって、例えば、軽鎖成熟可変領域は、軽鎖シグナルペプチドを有しない軽鎖可変領域を意味する。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはエプシロンに分類され、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgD、及び IgE として抗体のアイソタイプを定義する。軽鎖及び重鎖内で、添字及び定常領域は、約 12 個以上のアミノ酸の「J」領域により結合され、重鎖も約 10 個以上のアミノ酸の「D」領域を含む。（一般的に、Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 を参照されたい、全ての目的に關して参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。各軽 / 重鎖対の成熟可変領域は、抗体結合部位を形成する。よって、無傷抗体は 2 つの結合部位を有する。鎖は全て、相補性決 50

定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域により結合された、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)の同じ一般構造を呈する。各対の2本の鎖からのCDRは、フレームワーク領域により整合され、特定のエピトープへの結合を可能にする。N末端からC末端まで、軽鎖及び重鎖両方は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割当は、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991) または Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989) の定義に従う。Kabat は、異なる重鎖可変領域間または異なる軽鎖可変領域間の対応する残基が同じ番号を割り当てられる、広く使用されている番付規則(Kabat番付システム)も提供する。重鎖定常領域の番付は、Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991) に記載されるEUインデックスによる。

#### 【0026】

「抗体」という用語は、無傷抗体及びその抗原結合断片を含む。「無傷抗体」は、抗原結合可変領域ならびに抗体クラスに適した軽鎖定常ドメイン(C<sub>L</sub>)及び重鎖定常ドメインC<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3及びC<sub>H</sub>4を含むものである。定常ドメインは、天然の配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)またはそのアミノ酸配列変異型であり得る。抗体断片は、それらが別個の重鎖、軽鎖Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>c</sub>、ダイアボディ、Dabs、ナノボディ、及びFvを含む標的への特異的結合について得られた無傷抗体と競合する。断片は、組換えDNA技術により、または無傷免疫グロブリンの酵素もしくは化学分離により産生され得る。「抗体」という用語は、二重特異性抗体または同様のものであるダイアボディ(ホモ二量体Fv断片)またはミニボディ(V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3)も含む。二重特異性または二重機能性抗体は、2つの異なる重/軽鎖対、及び2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である(例えば、Song & Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79: 315-321 (1990)、Kostelny et al., J. Immunol., 148: 1547-53 (1992)を参照されたい)。

#### 【0027】

「患者」という用語は、予防的または治療的処置のいずれかを受けるヒト及び他の哺乳類対象を含む。

#### 【0028】

アミノ酸置換を保存または非保存に分類する目的に関して、アミノ酸は、以下のようにグループ分けされる: グループI(疎水性側鎖): met, ala, val, leu, ile; グループII(中性親水性側鎖): cys, ser, thr; グループIII(酸性側鎖): asp, glu; グループIV(塩基性側鎖): asn, gln, his, lys, arg; グループV(鎖配向に影響を及ぼす残基): gly, pro; 及びグループVI(芳香族側鎖): trp, tyr, phe。保存的置換は、同じクラスのアミノ酸間の置換を伴う。非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のメンバーと交換することに相当する。

#### 【0029】

パーセント配列同一性は、Kabat番付規則により最大限に整合された抗体配列により決定される。整合後、対象抗体領域(例えば、重鎖または軽鎖の成熟可変領域全体)が参照抗体の同じ領域と比較される場合、対象と参照抗体領域との間のパーセント配列同一性は、対象及び参照抗体領域の両方において同じアミノ酸により占められる位置の数を、2つの領域の整合された位置の総数で除し(ギャップは数えられない)、100を乗じてパーセントに変換する。

## 【 0 0 3 0 】

1つ以上の列挙される要素を「含む」組成物または方法は、具体的に列挙されない他の要素を含み得る。例えば、抗体を含む組成物は、抗体のみを含むか、または他の成分との組み合わせであり得る。

## 【 0 0 3 1 】

「治療有効量」または「有効量」という用語は、哺乳動物における疾患または障害を治療するのに有効である抗体 - 薬物複合体の量を指す。癌の場合、複合体の治療有効量は、癌細胞の数を低減し得る、腫瘍サイズを低減し得る、末梢器官への癌細胞浸潤を阻害し得る（すなわち、ある程度緩徐化し、好ましくは停止させる）、腫瘍転移を阻害し得る（すなわち、ある程度緩徐化し、好ましくは停止させる）、腫瘍成長を阻害し得る、及び/または癌に関連する症状のうちの1つ以上を軽減し得る。癌療法に関して、有効性は、例えば、疾患進行までの時間（TTP）を評価し、かつ/または奏功率（RR）を決定することにより測定され得る。「有効なレジメン」という用語は、投与される複合体の量と障害の治療を達成するのに適切な投薬頻度との組み合わせを指す。

10

## 【 0 0 3 2 】

「治療する（treat）」または「治療（treatment）」という用語は、文脈により別途記載のない限り、目的が癌の発生もしくは広がりなど、望ましくない生理学的変化または障害を阻害もしくは緩徐化する（軽減する）ことである、治療的処置を指す。有益または所望の臨床結果は、限定されないが、検出可能または検出不能にかかわらず、症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の安定した（すなわち、悪化しない）状態、疾患進行の遅延もしくは緩徐化、疾患状態の改善もしくは緩和、及び寛解（部分的または完全にかかわらず）を含む。「治療」は、治療を受けない場合の予想生存期間と比較したときの生存期間の延長も意味し得る。治療を必要とするものは検出可能な疾患を有するものを含む。治療を必要とするものは、検出不能な疾患を有するもの、例えば、CD48発現障害の治療後に完全な奏功を達成したが、再発を防止するために療法を必要とする患者も含み得る。

20

## 【 0 0 3 3 】

「薬学的に許容される」という用語は、米国の連邦もしくは州政府の規制機関により承認されたもしくは承認可能である、または動物、より具体的にはヒトにおいて使用するための米国薬局方もしくは他の一般的に認識されている薬局方に列記されていることを意味する。「薬学的に相溶性の成分」という用語は、抗CD48抗体または抗体 - 薬物複合体と共に対象に投与される薬学的に許容される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。

30

## 【 0 0 3 4 】

「薬学的に許容される塩」という句は、薬学的に許容される有機塩または無機塩を指す。例示的な塩には、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酒石酸水素塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩（gentisinate）、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、糖酸塩（saccharate）、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、pトルエンスルホン酸塩、及びパモ酸塩（すなわち、1,1'-メチレンビス-（2ヒドロキシ3ナフトエート））が含まれる。薬学的に許容される塩は、酢酸イオン、コハク酸イオンまたは他の対イオンなどの別の分子の包含を伴ってもよい。対イオンは、親化合物上の電荷を安定させる任意の有機または無機の部分であり得る。更に、薬学的に許容される塩は、その構造内に2つ以上の荷電原子を有し得る。複数の荷電原子が薬学的に許容される塩の一部である場合は、複数の対イオンを有し得る。したがって、薬学的に許容される塩は、1つ以上の荷電原子及び/または1つ以上の対イオンを有し得る。

40

## 【 0 0 3 5 】

50

本発明の文脈における溶媒和物は、溶媒分子との調整を通して固体または液体状態において複合体を形成する本発明の化合物のそれらの形態である。水和物は、溶媒和物の1つの特定の形態であり、調整は水と行われる。本発明の文脈における好ましい溶媒和物は、水和物である。

【0036】

文脈から別途明らかでない限り、「約」という用語は、規定値の標準偏差内の値を包含する。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

ヒトCD48タンパク質に特異的に結合するキメラまたはヒト化抗体であって、前記抗体が、配列番号3～5の重鎖CDR配列と、配列番号6～8の軽鎖CDR配列とを含み、前記抗体が、前記ヒトCD48タンパク質に特異的に結合し、かつ配列番号3～5の重鎖CDR配列と、配列番号6～8の軽鎖CDR配列とを含むマウス抗体と比較したとき、前記ヒトCD48タンパク質に対してより高い結合親和性を呈する、キメラまたはヒト化抗体。

10

(項目2)

前記キメラまたはヒト化抗体が、前記マウス抗体と比較したとき、前記ヒトCD48タンパク質に少なくとも2倍高い結合親和性を呈する、項目1に記載の抗体。

(項目3)

前記抗体がヒト化抗体である、項目1に記載の抗体。

20

(項目4)

前記抗体が、配列番号1の重鎖可変領域を含む、項目1に記載の抗体。

(項目5)

前記抗体が、配列番号2の軽鎖可変領域を含む、項目1に記載の抗体。

(項目6)

前記抗体が、配列番号1の重鎖可変領域を含む、項目4に記載の抗体。

(項目7)

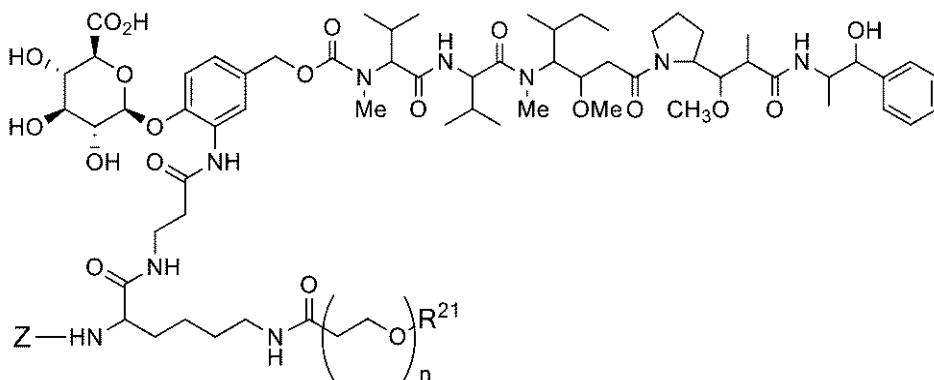
前記抗体が、リンカーに結合された細胞傷害性薬物と複合体化される、項目1～6のいずれか1項に記載の抗体。

(項目8)

前記薬物 - リンカーが、下式：

30

【化41】



40

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、Zが、前記抗体上の官能基と反応して、それとの共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、nが、8～36の範囲であり、R<sup>P</sup>Rが、水素または保護基であり、R<sup>21</sup>が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である、項目7に記載の抗体。

(項目9)

前記ヒトCD48タンパク質に特異的に結合するヒト化抗体であって、配列番号1の重

50



鎖可変領域と、配列番号 2 の軽鎖可変領域とを含む、ヒト化抗体。

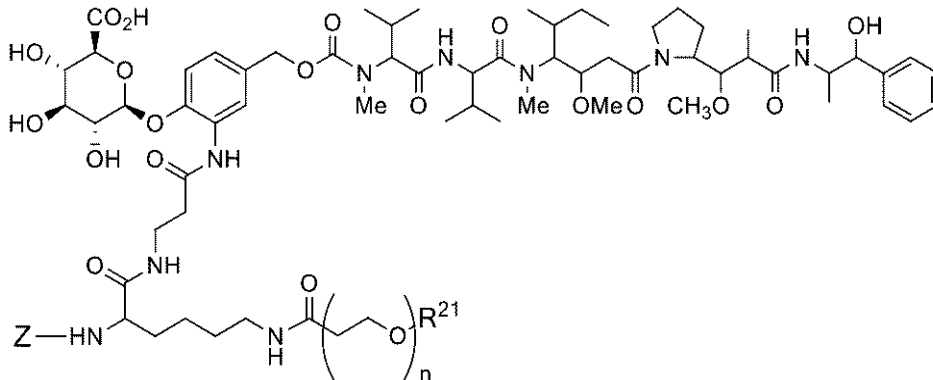
(項目 10)

前記抗体が、リンカーに結合された細胞傷害性薬物と複合体化される、項目 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 11)

前記薬物 - リンカーが、下式：

【化 4 2】



10

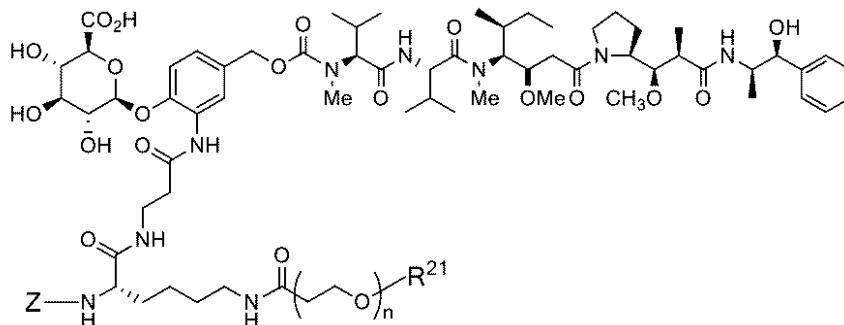
またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、Z が、前記抗体上の官能基と反応して、それとの共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、n が、8 ~ 36 の範囲であり、R<sup>P</sup> R が、水素または保護基であり、R<sup>2 1</sup> が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である、項目 10 に記載の抗体。

20

(項目 12)

前記薬物 - リンカーが、下式：

【化 4 3】



30

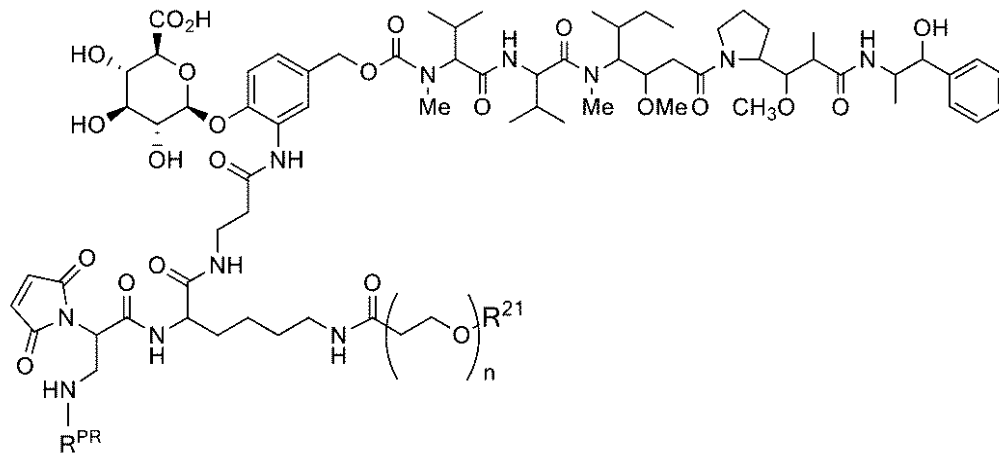
またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、Z が、前記抗体上の官能基と反応して、それとの共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、n が、8 ~ 36 の範囲であり、R<sup>P</sup> R が、水素または保護基であり、R<sup>2 1</sup> が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である、項目 10 に記載の抗体。

40

(項目 13)

薬物 - リンカーが、下式：

## 【化 4 4】



10

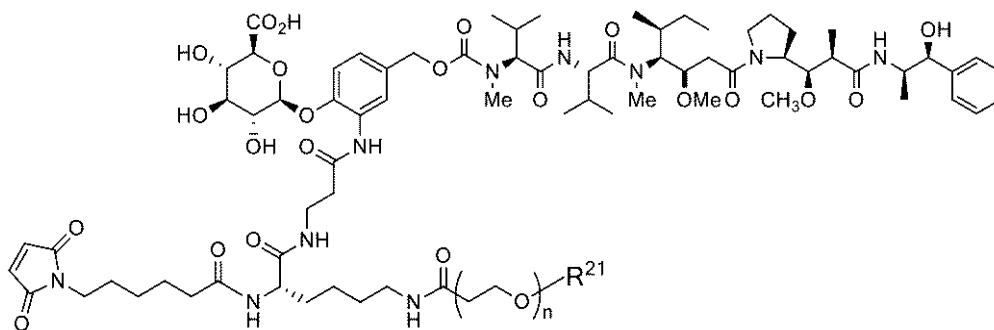
またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、 $n$ が、8～36の範囲であり、 $R^{PR}$ が、水素または保護基であり、 $R^{21}$ が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である、項目10に記載の抗体。

(項目14)

薬物-リンカーが、下式：

20

## 【化 4 5】



30

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、 $n$ が、8～36の範囲であり、 $R^{PR}$ が、水素または保護基であり、 $R^{21}$ が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である、項目10に記載の抗体。

(項目15)

$n$ が、8～14の範囲である、項目1または9に記載の抗体。

(項目16)

$n$ が、10～12の範囲である、項目1または9に記載の抗体。

(項目17)

$n$ が、12である、項目1または9に記載の抗体。

40

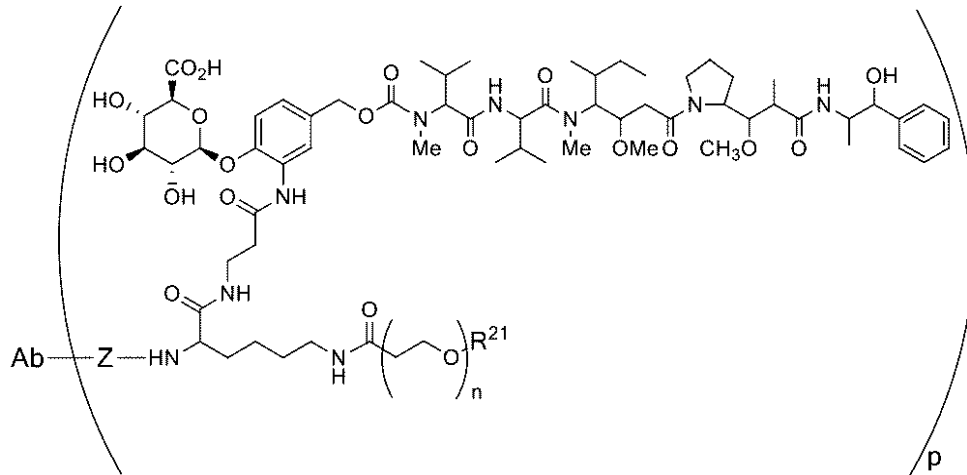
(項目18)

$R^{21}$ が、 $-CH_3$ または $-CH_2CH_2CO_2H$ である、項目15～17のいずれか1項に記載の抗体。

(項目19)

下式

## 【化 4 6】



10

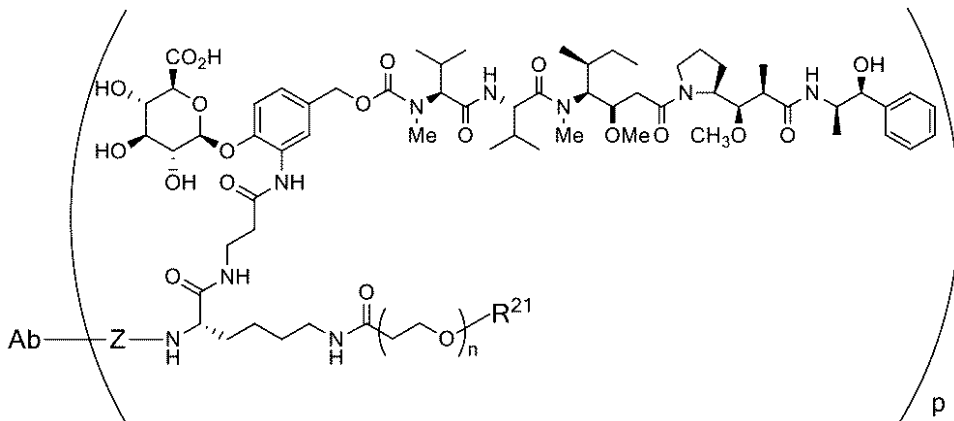
を有する抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物であって、式中、A b が、項目 1 または 9 に記載の抗 C D 4 8 抗体であり、Z が、共有結合を介して前記抗体及び前記薬物 - リンカーの残部を連結する有機部分を表し、n が、8 ~ 3 6 の範囲であり、R<sup>21</sup> が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位であり、p が、1 ~ 1 6 である、抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

20

( 項目 2 0 )

下式

## 【化 4 7】



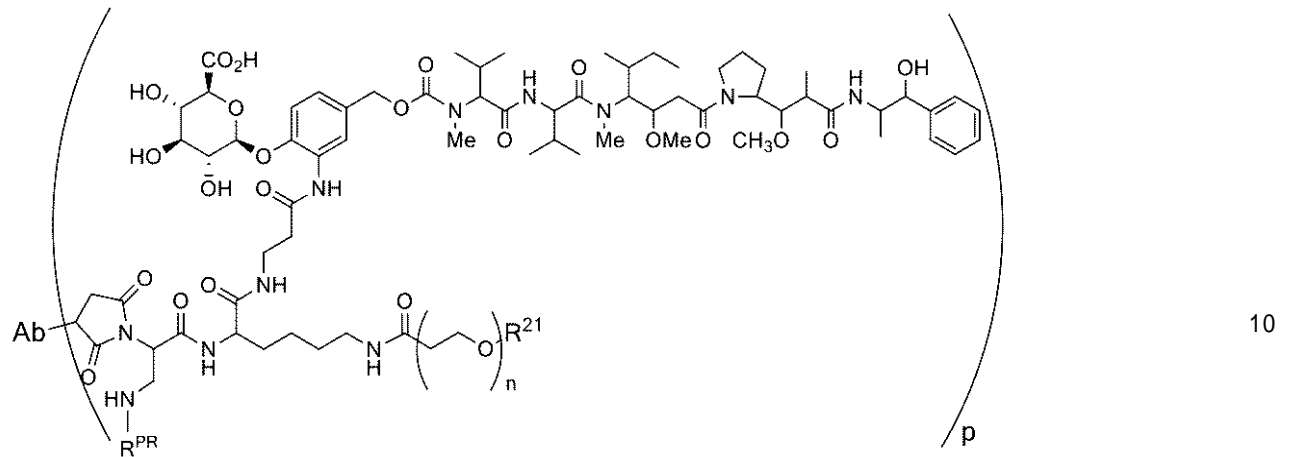
30

を有する項目 1 9 に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

( 項目 2 1 )

下式

## 【化 4 8】

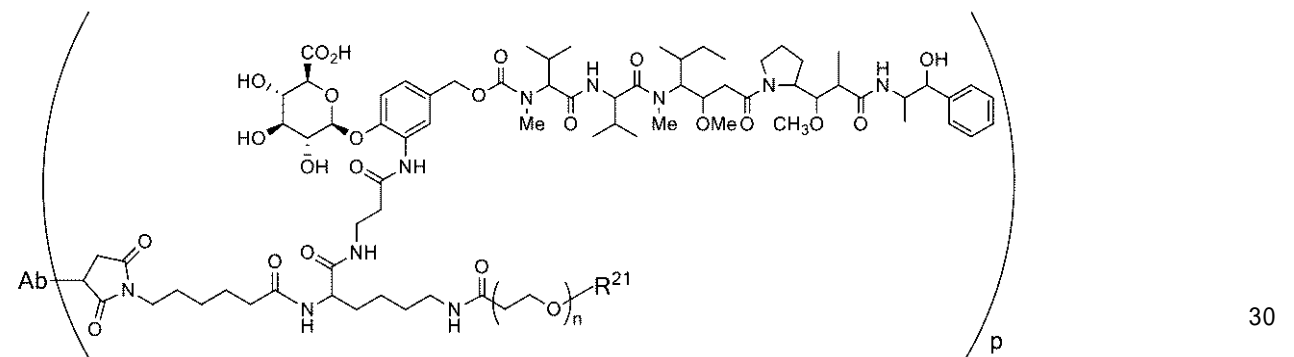


を有する項目 1 9 に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物であって、式中、 $R^{PR}$  が、水素または保護基である、抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

( 項目 2 2 )

下式

## 【化 4 9】

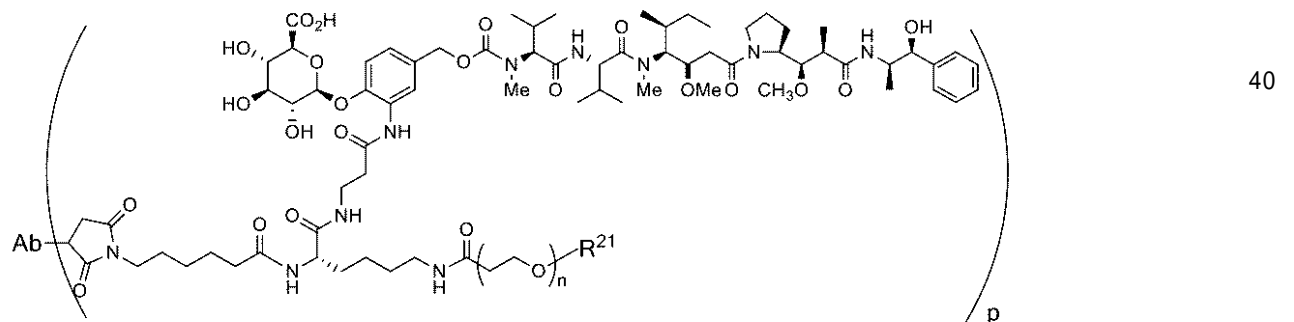


を有する項目 1 9 に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

( 項目 2 3 )

下式

## 【化 5 0】



を有する項目 1 9 に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

10

20

30

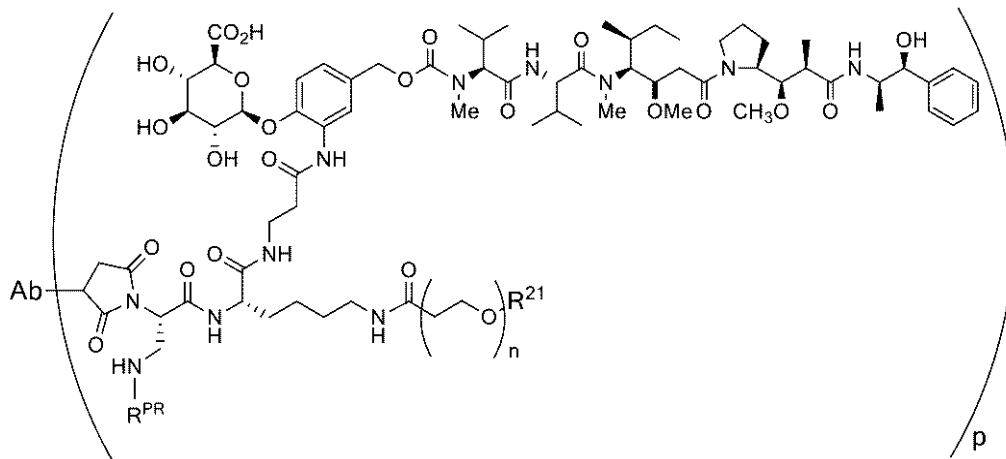
40

50

(項目 2 4 )

下式

【化 5 1】



10

を有する項目 1 9 に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物であって、式中、 $R^{PR}$  が、水素または保護基である、抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物、またはその薬学的に許容される塩。

20

(項目 2 5 )

$n$  が、8 ~ 1 4 の範囲である、項目 1 9 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物。

(項目 2 6 )

$n$  が、1 0 ~ 1 2 の範囲である、項目 1 9 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物。

(項目 2 7 )

$n$  が、1 2 である、項目 1 9 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物。

(項目 2 8 )

$R^{21}$  が、- C H 3 または - C H 2 C H 2 C O 2 H である、項目 1 9 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体化合物。

30

(項目 2 9 )

$p$  が、8 である、項目 1 9 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の抗体 - 薬物複合体化合物。

(項目 3 0 )

A b への結合が、前記抗体の鎖間ジスルフィド結合のシステイン残基を介する、項目 1 9 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体 - 薬物複合体化合物。

(項目 3 1 )

項目 1 9 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 8 抗体 - 薬物複合体分子の集団を含む抗体 - 薬物複合体組成物であって、前記組成物の平均薬物負荷が 8 であり、前記組成物における主要薬物負荷が 8 である、抗体 - 薬物複合体組成物。

40

(項目 3 2 )

薬学的組成物である、項目 3 1 に記載の組成物。

(項目 3 3 )

C D 4 8 発現癌の患者の治療方法であって、項目 3 1 に記載の組成物を、前記患者に投与するステップを含む、方法。

(項目 3 4 )

前記 C D 4 8 発現癌が、多発性骨髄腫である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5 )

前記 C D 4 8 発現癌が、B 細胞悪性腫瘍及び急性骨髄性白血病からなる群から選択され

50

る、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 6)

ヒト C D 4 8 タンパク質に特異的に結合する抗体の配列番号 3 ~ 5 のアミノ酸配列を有する C D R を含む重鎖可変領域と、配列番号 6 ~ 8 のアミノ酸配列を有する C D R を含む軽鎖可変領域とをコードする配列を含む、単離された核酸。

(項目 3 7)

項目 3 6 に記載の核酸を含む、単離されたベクター。

(項目 3 8)

項目 3 7 に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。

(項目 3 9)

前記宿主細胞が、哺乳類宿主細胞である、項目 3 8 に記載の宿主細胞。

(項目 4 0)

前記宿主細胞が、C H O、C O S、H e L A、H E K 2 9 3、L、S p 2 / 0、及び N S 0 からなる群から選択される、項目 3 9 に記載の宿主細胞。

(項目 4 1)

抗 C D 4 8 抗体の作製方法であって、

前記抗体をコードする核酸の発現に適した条件下で、項目 3 8 に記載の宿主細胞を培養することと、

前記抗体を単離することと、を含む、方法。

(項目 4 2)

抗 C D 4 8 抗体薬物複合体の作製方法であって、

前記抗体をコードする核酸の発現に適した条件下で、項目 3 8 に記載の宿主細胞を培養することと、

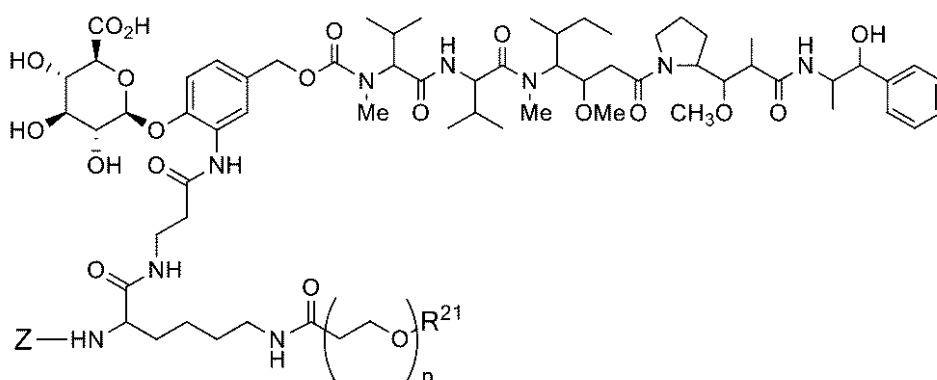
前記抗体を単離することと、

リンカーに結合された細胞傷害性薬物を前記抗体と複合体化することと、を含む、方法。

(項目 4 3)

前記薬物 - リンカーが、下式：

【化 5 2】



またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、Z が、前記抗体上の官能基と反応して、それとの共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、n が、8 ~ 36 の範囲であり、R<sup>P R</sup> が、水素または保護基であり、R<sup>2 1</sup> が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とをコードする配列を含む、単離された核酸。

(項目 4 5)

項目 4 4 に記載の核酸を含む、単離されたベクター。

## (項目46)

項目45に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。

## (項目47)

前記宿主細胞が、哺乳類宿主細胞である、項目46に記載の宿主細胞。

## (項目48)

前記宿主細胞が、CHO、COS、HeLa、HEK293、L、Sp2/0、及びNS0からなる群から選択される、項目47に記載の宿主細胞。

## (項目49)

抗CD48抗体の作製方法であって

前記抗体をコードする核酸の発現に適した条件下で、項目46に記載の宿主細胞を培養することと、

前記抗体を単離することと、を含む、方法。

## (項目50)

抗CD48抗体薬物複合体の作製方法であって、

前記抗体をコードする核酸の発現に適した条件下で、項目46に記載の宿主細胞を培養することと、

前記抗体を単離することと、

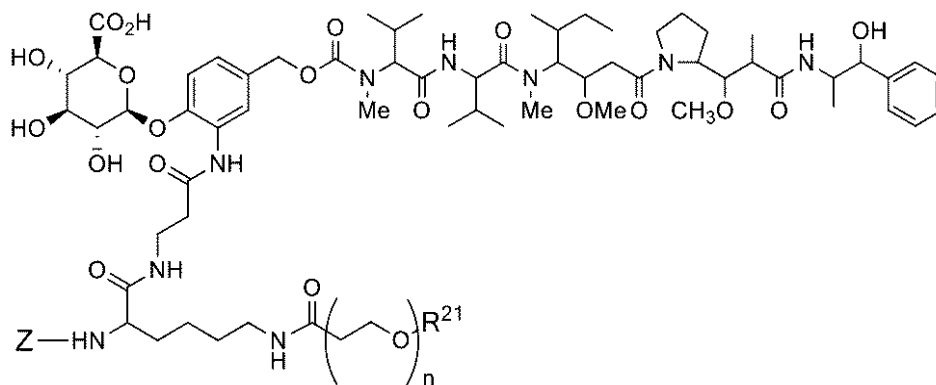
リンカーに結合された細胞傷害性薬物を前記抗体と複合体化することと、を含む、方法

。

## (項目51)

前記薬物 - リンカーが、下式：

## 【化53】



またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、Zが、前記抗体上の官能基と反応して、それとの共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、nが、8～36の範囲であり、 $R^P$ が、水素または保護基であり、 $R^{21}$ が、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である、項目50に記載の方法。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0037】

【図1】マウスMEM102抗体の重鎖可変領域ならびにヒト化vHA、vHB、及びvHC重鎖のアミノ酸配列、ならびに選択されたヒト生殖系列アクセプター可変領域配列を示す。

【図2】マウスMEM102抗体の軽鎖可変領域ならびにヒト化vLA、vLB、及びvLC軽鎖のアミノ酸配列、ならびに選択されたヒト生殖系列アクセプター可変領域配列を示す。

【図3】ヒトU-266多発性骨髄腫細胞上のMEM102抗体の飽和結合曲線を示す。

【図4】カニクイザル(cynomolgous monkey)CD48をトランスフェクトされたCHO細胞上のMEM102抗体の飽和結合曲線を示す。

【図5】MEM-102 ADCで処置した後のヒトNCI-H929多発性骨髄腫細胞におけるカスパーゼ3/7活性化(アポトーシスによる細胞死)を示す。

【図6】MEM-102 ADCで処置した後のヒトU-266多発性骨髄腫細胞におけるカスパーゼ3/7活性化を示す。

【図7】NCI-H929細胞を移植したマウス異種移植片モデルにおけるhMEM102 ADCのインビボ活性を示す。これは、多発性骨髄腫の播種性モデルである。

【図8】NCI-H929細胞を移植したマウス異種移植片モデルにおけるhMEM102 ADCのインビボ活性を示す。これは、多発性骨髄腫の皮下モデルである。

【図9】MM-1R細胞を移植したマウス異種移植片モデルにおけるhMEM102 ADCのインビボ活性を示す。これは、多発性骨髄腫の播種性モデルである。

【図10】MM-1R細胞を移植したマウス異種移植片モデルにおけるhMEM102 ADCのインビボ活性を示す。これは、多発性骨髄腫の皮下モデルである。

【図11】EJM細胞を移植したマウス異種移植片モデルにおけるhMEM102 ADCのインビボ活性を示す。これは、多発性骨髄腫の播種性モデルである。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明は一部、CD48を標的とするペグ化MMAE抗体-薬物複合体を含む抗体-薬物複合体がCD48+発現細胞の死滅に特に有効であるという発見に基づく。特に、高親和性MEM102ヒト化抗体が重鎖可変領域アクセプター配列としてhIgG-VH7-4-1/hIgG-JH5重鎖可変領域ヒト生殖系列を使用して構築され得ることが分かった。軽鎖可変領域に関して、好ましアクセプター配列は、hIgG-VK6-21/hIgG-JK4軽鎖可変領域ヒト生殖系列である。特に、高親和性MEM102ヒト化抗体は、親和性成熟を行う必要がなく、またマウス抗体のCDRの同一性を維持しながら構築された。高親和性MEM102ヒト化抗体は、抗体薬物複合体の一部としての薬物送達にも有効であった。SGD-5088ペグ化MMAE薬物-リンカーと複合体化されたとき、得られるhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷複合体は、多発性骨髄腫細胞系のパネルに対して非常に活性であった。

【0039】

標的分子

別途記載のない限り、CD48は、ヒトCD48を指す。例示的なヒト配列は、Gen Bank受入番号CAG33293.1を割り当てられている。

【0040】

本発明の抗体

ヒト化抗体は、非ヒト「ドナー」抗体からのCDRがヒト「アクセプター」抗体配列にグラフトされる遺伝子組換えされた抗体である(例えば、Queen, US5,530,101及び5,585,089、Winter, US5,225,539、Carter, US6,407,213、Adair, US5,859,205、ならびにFootte, US6,881,557を参照されたい)。アクセプター抗体配列は、例えば、成熟ヒト抗体配列、かかる配列の複合体、ヒト抗体配列のコンセンサス配列、または生殖系列領域配列であり得る。

【0041】

よって、ヒト化抗体は、完全にまたは実質的に非ヒトドナー抗体ならびに可変領域フレームワーク配列及び定常領域から、存在する場合、完全にまたは実質的にヒト抗体配列からの一部または全てのCDRを有する抗体である。同様に、ヒト化重鎖は、完全にまたは実質的にドナー抗体重鎖ならびに重鎖可変領域フレームワーク配列及び重鎖定常領域から、存在する場合、実質的にヒト重鎖可変領域フレームワーク及び定常領域配列からの少なくとも1つ、2つ、及び通常3つ全てのCDRを有する。同様に、ヒト化軽鎖は、完全にまたは実質的にドナー抗体軽鎖ならびに軽鎖可変領域フレームワーク配列及び軽鎖定常領域から、存在する場合、実質的にヒト軽鎖可変領域フレームワーク及び定常領域配列からの少なくとも1つ、2つ、及び通常3つ全てのCDRを有する。ナノボディ及びダイアボ

10

20

30

40

50



ディ以外、ヒト化抗体は典型的には、ヒト化重鎖及びヒト化軽鎖を含む。ヒト化またはヒト抗体におけるCDRは、対応する残基（Kabatにより定義されるように）の少なくとも60%、85%、90%、95%、または100%がそれぞれのCDR間で同一であるとき、実質的に非ヒト抗体において対応するCDRからであるか、またはそれに実質的に同一である。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体またはヒト抗体におけるCDRは、各CDRにおいて3つ以下の保存アミノ酸置換があるとき、実質的に非ヒト抗体において対応するCDRからであるか、またはそれに実質的に同一である。抗体鎖の可変領域フレームワーク配列または抗体鎖の定常領域は、Kabatにより定義される対応する残基の少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、または100%が同一であるとき、それぞれ、実質的にヒト可変領域フレームワーク配列またはヒト定常領域からである。本発明のいくつかのヒト化抗体において、本抗体の重鎖可変フレームワーク領域において逆突然変異はなく、また本抗体の軽鎖可変領域において逆突然変異はない。

10

#### 【0042】

ヒト化抗体は、マウス抗体からの6つ全てのCDR（好ましくはKabatにより定義されるように）を組み込むことが多いが、それらは、マウス抗体からの全てより少ないCDR（例えば、少なくとも3つ、4つ、または5つ）とでも作製され得る（例えば、Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002、Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320:415-428, 2002、Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999、Tamura et al., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000）。

20

#### 【0043】

ヒト可変領域フレームワーク残基からのある特定のアミノ酸は、CDR構造及び/または抗原への結合に対するそれらの可能な影響に基づく置換に関して選択され得る。かかる可能な影響の研究は、モデル化、特定の位置でのアミノ酸の特性の検査、または特定のアミノ酸の置換もしくは突然変異誘発の作用の経験的観察によるものである。

#### 【0044】

本発明は、CD48抗原に対して指向された抗体を提供する。好ましい抗体は、マウスMEM102抗体に由来するキメラまたはヒト化抗体である。

重鎖可変領域の好ましいアクセプター配列は、hIgG VH7-4-1/hIgG-JH5重鎖可変領域ヒト生殖系列である。軽鎖可変領域に関して、好ましいアクセプター配列は、hIgG-VK6-21/hIgG-JK4軽鎖可変領域ヒト生殖系列である。

30

#### 【0045】

例示的な抗CD48抗体は、配列番号1に記載される重鎖CDRと、配列番号2に記載される軽鎖CDRとを含み、加えて、配列番号1に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、または95%同一性を有する成熟重鎖可変領域、及び配列番号2に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、または95%同一性を有する成熟軽鎖可変領域を有するヒト化抗体である。CDRは、Kabatに定義される通りである。

#### 【0046】

マウスMEM102抗体のヒト化形態は、3つの例示されたヒト化重鎖成熟可変領域（HA-HC）と、3つの例示されたヒト化軽鎖成熟可変領域（LA-LC）とを含む。これらの鎖の順列は、HALA、HALB、HALC、HBLA、HBLB、HBLC、HCLA、HCLB、及びHCLCを含む。これらの順列のうち、HALAが好ましい。HALAは、配列番号1に記載される重鎖と、配列番号2に記載される軽鎖とを含む。しかしながら、HALAの代わりに、HALB、HALC、HBLA、HBLB、HBLC、HCLA、HCLB、及びHCLCのうちのいずれか1つを使用することができる。

40

#### 【0047】

いくつかの態様では、ヒトCD48に対するヒト化MEM102抗体の見かけ解離定数（kd）は、好ましくは、0.1 nM～10 nMの範囲内、更により好ましくは0.1 nM～5 nMの範囲内、更に好ましくは1 nM～3 nMまたは2 nM～約3 nMの範囲内で

50

ある。いくつかの態様では、本発明の抗体は、ヒトCD48に対するマウスMEM102抗体の見かけ解離定数の0.1~2.0倍、または更には0.5~4倍の範囲内の見かけ解離定数を有する。いくつかの態様では、ヒトCD48に対する本抗体の見かけ解離定数(kd)は、5.0である。

#### 【0048】

##### 定常領域の選択

ヒト化MEM102抗体の重鎖及び軽鎖可変領域は、ヒト定常領域の少なくとも一部に連結され得る。定常領域の選択は、一部、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性、抗体依存性細胞食作用、及び/または補体依存性細胞傷害性が所望されるかどうかに依存し得る。例えば、ヒトアイソタイプIgG1及びIgG3は強い補体依存性細胞傷害性を有し、ヒトアイソタイプIgG2は弱い補体依存性細胞傷害性を有し、ヒトIgG4は補体依存性細胞傷害性を欠く。ヒトIgG1及びIgG3は、ヒトIgG2及びIgG4よりも強い細胞媒介エフェクター機能も誘導する。軽鎖定常領域は、ラムダまたはカッパであり得る。抗体は、2つの軽鎖及び2つの重鎖を含有する四量体として、別個の重鎖、軽鎖として、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及びFvとして、または重鎖及び軽鎖添字ドメインがスパーサーを通して連結される単鎖抗体として発現され得る。

#### 【0049】

ヒト定常領域は、異なる個体間でアロタイプ多様性及びイソアロタイプ多様性を示す、つまり、定常領域は1つ以上の多型位置で異なる個体において異なり得る。イソアロタイプは、イソアロタイプを認識する血清が1つ以上の他のアイソタイプの非多型領域に結合するという点でアロタイプとは異なる。

#### 【0050】

重鎖のC末端リジンなどの軽鎖及び/もしくは重鎖のアミノまたはカルボキシ末端の1個またはいくつかのアミノ酸は、ある比率で、もしくは分子の全てを欠損するか、または誘導体化され得る。置換は、補体媒介細胞傷害性もしくはADCCなどのエフェクター機能を低減または増加させるために(例えば、Winterら、米国特許第5,624,821号;Tsora、米国特許第5,834,597号;及びLazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006を参照されたい)、あるいはヒトにおける半減期を延長するために(例えば、Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004を参照されたい)定常領域において行われ得る。

#### 【0051】

定常領域は、薬物-リンカーの部位特異的複合体化を可能にするように修飾され得る。かかる技法は、天然に生じるまたは改変システイン残基、ジスルフィド架橋、ポリ-ヒスチジン配列、糖鎖改変タグ、及びトランスグルタミナーゼ認識配列の使用を含む。細菌性トランスグルタミナーゼを使用する部位特異的複合体化の例示的な置換は、N297SまたはN297Qである。改変システミンを使用する部位特異的複合体化の例示的な置換は、S239Cである。抗体断片も薬物-リンカーの部位特異的複合体化のために修飾されてもよく、例えば、Kim et al., Mol. Cancer Ther. 2008;7(8)を参照されたい。

#### 【0052】

##### 組換え抗体の発現

ヒト化またはキメラMEM102抗体は、組換え発現により産生され得る。組換えポリヌクレオチド構築物は典型的には、自然に会合した、または異種プロモーター領域を含む、抗体鎖のコード配列に動作可能に連結された発現制御配列を含む。好ましくは、発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることが可能なベクターにおける真核プロモーター系である。ベクターが適切な宿主内に組み込まれたら、宿主は高レベルのヌクレオチド配列の発現、ならびに交差反応抗体の回収及び精製に適した条件下で維持される。

#### 【0053】

哺乳類細胞は、免疫グロブリンまたはその断片をコードするヌクレオチドセグメントを発現するための好ましい宿主である。Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987)を参照されたい。無傷異種タンパク質をスクリーニングすることが可能ないくつかの好適な宿主細胞系が当該技術分野において開発されており、CHO細胞系（例えば、DG44）、様々なCOS細胞系、HeLa細胞、HEK293細胞、L細胞、及び非抗体産生骨髓腫（Sp2/0及びNS0を含む）を含む。好ましくは、細胞は非ヒトである。これらの細胞の発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサー（Queen et al., Immunol. Rev. 89: 49 (1986)）などの発現制御配列、及びリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位などの必要なプロセシング情報部位、ならびに転写終結配列を含み得る。好ましい発現制御配列は、内因性遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルスなどに由来するプロモーターである。Cotter et al., J. Immunol. 148: 1149 (1992)を参照されたい。

#### 【0054】

発現されたら、抗体は、HPLC精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、当該技術分野の標準的な手順に従い精製され得る（一般的に、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)を参照されたい）。

#### 【0055】

##### 核酸

本発明は、本明細書に記載されるヒト化重鎖及び軽鎖のうちのいずれかをコードする核酸を更に提供する。典型的には、核酸は、成熟重鎖及び軽鎖可変領域に融合した単一ペプチドもコードする。核酸上のコード配列は、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終結シグナルなど、コード配列の発現を確実にするために、調節配列と動作可能な連結にあってもよい。重鎖及び軽鎖をコードする核酸は単離された形態で生じるか、または1つ以上のベクターにクローニングされ得る。核酸は、例えば、固体状態の合成または重複オリゴヌクレオチドのPCRにより合成され得る。重鎖及び軽鎖をコードする核酸は、例えば発現ベクター内で1つの隣接核酸として結合され得るか、または例えば、各々がそれ自体の発現ベクター内にクローニングされる、別個であり得る。

#### 【0056】

一実施形態では、本開示は、HA、HB、またはHCに記載されるアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。例えば、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号1のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域をコードし得る。この単離されたポリヌクレオチドは、ヒトIgG重鎖定常領域を更にコードし得る。IgG定常領域のアイソタイプは、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である。一実施形態では、IgG定常領域のアイソタイプは、IgG1である。別の実施形態では、コードされたIgG1定常領域は、Kabatsystemに記載されるEUIンデックスに従い、残基239、すなわち、S239Cに置換を含むアミノ酸配列を有する。本開示は、HA、HB、またはHCに記載されるアミノ酸配列（例えば、配列番号1またはその変異型）を含む抗体重鎖可変領域をコードする単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び更にその発現ベクターを含む宿主細胞も提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、哺乳類宿主細胞、例えば、CHO細胞である。

#### 【0057】

別の実施形態では、本開示は、LA、LB、またはLCに記載されるアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。例えば、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域をコードする。この単離されたポリヌクレオチドは、ヒトIgG軽鎖定常領域を更にコードし得る。IgG軽鎖定常領域のアイソタイプは、例えば、カッパ定常領域である。本開示は、LA、LB、またはLCに記載されるアミノ酸配列（例えば、配列番号2またはその変異型

)を含む抗体軽鎖可変領域をコードする単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び更にその発現ベクターを含む宿主細胞も提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、哺乳類宿主細胞、例えば、CHO細胞である。

#### 【0058】

別の実施形態では、本開示は、配列番号1のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域と、配列番号2のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域とをコードする単離されたポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを提供し、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、ヒトCD48に特異的に結合する抗体または抗原結合断片を形成する。本開示は、配列番号1のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域、及び配列番号2のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域をコードする単離されたポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含む、発

10

#### 【0059】

別の実施形態では、本開示は、配列番号1のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドと、配列番号2のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域とをコードするポリヌクレオチドを含む第1及び第2のベクターを提供し、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、ヒトCD48に特異的に結合する抗体または抗原結合断片を形成する。ベクターを含む宿主細胞、好ましくは、CHO細胞などの哺乳類宿主細胞が提供される。

#### 【0060】

20

#### 抗体-薬物複合体

抗CD48抗体は、治療薬、診断薬、または安定剤に複合体化されて、抗体複合体を形成し得る。治療薬に複合体化された抗CD48抗体は、本明細書において、抗体-薬物複合体(ADC)と称される。例示的な治療薬は、細胞増殖抑制または細胞傷害作用を有し、細胞傷害性薬または細胞増殖抑制薬とも称され得る。例示的な細胞傷害性薬としては、例えば、アウリスチン、カンプトテシン、カリチアマイシン、デュオカルマイシン、エトポシド、マイタンシノイド(例えば、DM1、DM2、DM3、DM4)、タキサン、ベンゾジアゼピン(例えば、ピロロ[1,4]ベンゾジアゼピン二量体、インドリノベンゾジアゼピン二量体、及びオキサゾリジノベンゾジアゼピン二量体を含む、ピロロ[1,4]ベンゾジアゼピン、インドリノベンゾジアゼピン、及びオキサゾリジノベンゾジアゼ

30

#### 【0061】

治療薬をタンパク質、特に抗体と複合体化するための技法は周知である。(例えば、Alley et al., Current Opinion in Chemical Biology 2010 14:1-9、Senter, Cancer J., 2008, 14(3):154-169を参照されたい。)典型的には、治療薬は、リンカー単位を介して抗体に複合体化される。リンカー単位は、切断可能または切断不可能であり得る。例えば、治療薬は、複合体が、CD48発現癌細胞によって内在化されるときに抗体から切断されるように(例えば、エンドソーム、リソソーム環境において、またはカベオラ(caveolar)環境において)、CD48発現癌細胞の細胞内環境における切断に感受性であるが、細胞外環境に実質的に感受性ではない切断可能なリンカーを有する抗体に結合され得る。別の例では、治療薬は、切断不可能なリンカーを介して抗体と複合体化され得、薬物放出はCD48発現癌細胞による内在化後の完全な抗体分解による。

40

#### 【0062】

典型的には、ADCは、細胞傷害性薬または細胞増殖抑制薬と抗CD48抗体との間にリンカー領域を含む。上記のように、典型的には、リンカーは、リンカーの切断が細胞内環境(例えば、リソソームまたはエンドソームまたはカベオラ(caveolar)内)において抗体から治療薬を放出するように、細胞内条件下で切断可能であり得る。リンカーは、例えば、リソソームまたはエンドソームプロテアーゼを含む、細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素により切断されるペプチジルリンカーであり得る。切断剤は、カ

50

テブシンB及びD、ならびにプラスミンを含み得る（例えば、Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999を参照されたい）。最も典型的なのは、CD48発現細胞に存在する酵素により切断可能であるペプチジルリンカーである。例えば、癌性組織において高度に発現されるチオール依存性プロテアーゼカテブシンBにより切断可能であるペプチジルリンカー（例えば、Phe-LeuまたはVal-Citペプチドを含むリンカー）を使用することができる。リンカーは、細胞内グリコシダーゼにより切断される糖リンカー（例えば、グルクロニダーゼにより切断可能なグルクロニドリンカー）を含む炭水化物リンカーでもあり得る。

#### 【0063】

10

リンカーは、治療薬に直接結合され、抗体のタンパク質分解により解放されるマレイミド-アルキレンまたはマレイミド-アリールリンカーなどの切断不可能なリンカーでもあり得る。

#### 【0064】

抗CD48抗体は、抗体のヘテロ原子を介してリンカーと複合体化され得る。これらのヘテロ原子は、その天然の状態で抗体上に存在し得るか、または抗体に導入され得る。いくつかの態様では、抗CD48抗体は、リジン残基の窒素原子を介してリンカーと複合体化される。他の態様では、抗CD48抗体は、システイン残基の硫黄原子を介してリンカーと複合体化される。システイン残基は、天然に生じるか、または抗体内に操作されるものであり得る。リジン及びシステイン残基を介して抗体とリンカー及び薬物-リンカーを複合体化する方法は、当該技術分野において既知である。

20

#### 【0065】

例示的な抗体-薬物複合体は、アウリスタチン系抗体-薬物複合体を含む（すなわち、薬物構成成分がアウリスタチン薬物である）。アウリスタチンは、チューブリンに結合し、微小管の動態ならびに核及び細胞分裂に干渉することが示されており、抗癌活性を有する。典型的に、アウリスタチン系抗体-薬物複合体は、アウリスタチン薬物と抗CD48抗体との間のリンカーを含む。リンカーは、例えば、切断可能なリンカー（例えば、ペプチジルリンカー、炭水化物リンカー）または切断不可能なリンカー（例えば、抗体の分解により解放されるリンカー）であり得る。アウリスタチンは、MMAF及びMMAEを含む。例示的なアウリスタチンの合成及び構造は、米国公開第7,659,241号、第7,498,298号、第2009-0111756号、第2009-0018086号、及び第7,968,687号に記載されており、それらの各々は、その全体が参照により、及び全ての目的に関して、本明細書に組み込まれる。

30

#### 【0066】

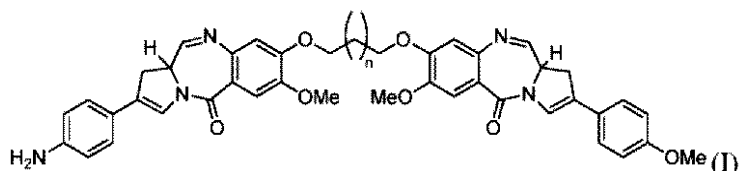
他の例示的な抗体-薬物複合体は、メイタンシノイド抗体-薬物複合体（すなわち、薬物構成成分がメイタンシノイド薬物である）、及びベンゾジアゼピン抗体薬物複合体（すなわち、薬物構成成分がベンゾジアゼピン（例えば、ピロロ[1,4]ベンゾジアゼピン二量体（PBD二量体）、インドリノベンゾジアゼピン二量体、及びオキサゾリジノベンゾジアゼピン二量体）である）を含む。

#### 【0067】

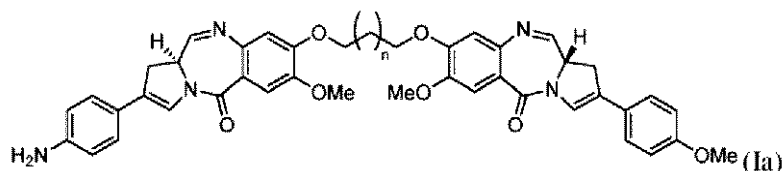
40

本発明に使用するための好ましいPBD二量体は、式Iにより表される。PBD二量体の好ましい立体化学は、式Ia:

#### 【化12】



## 【化 1 3】

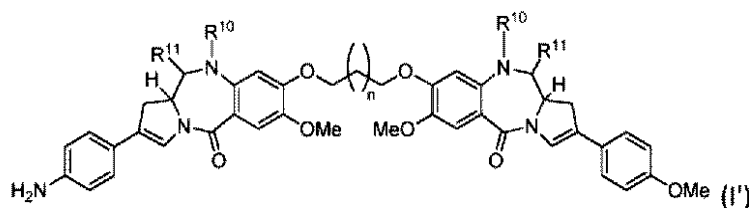


に示される通りであるか、または薬学的な塩、溶媒和物、もしくは塩の溶媒和物であり、式中、添字  $n$  は、1 または 3 である。

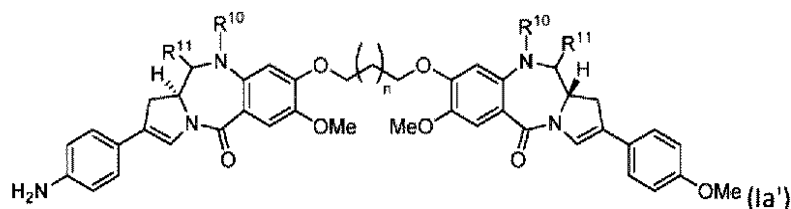
## 【0068】

式 (I) 及び (Ia) の溶媒和物は、典型的には、1 つのまたは両方の PBD 単量体のイミン官能基にわたって水またはアルコール溶媒を添加して、カルピノールアミン (複数可) 及び / またはカルピノールアミンエーテルを形成することから形成される。例えば、N10 - C11 位置で、下式 I' 及び Ia' により表されるように、イミン ( $N=C$ )、カルピノールアミン ( $NH-CH(OH)$ )、またはカルピノールアミンエーテル ( $NH-CH(OMe)$ ) であり得、

## 【化 1 4】



## 【化 1 5】



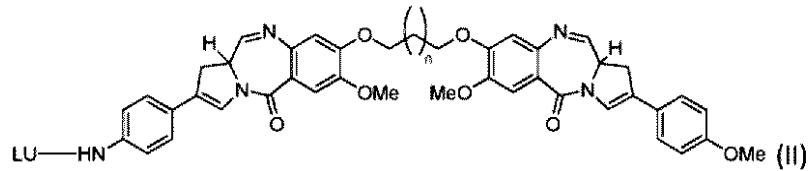
式中、

- (a)  $R^{10}$  が H であり、 $R^{11}$  が、OH もしくは  $OR^A$  であり、式中、 $R^A$  が、飽和  $C_{1-4}$  アルキル (好ましくはメチル) であるか、または
- (b)  $R^{10}$  及び  $R^{11}$  が、それらが結合される窒素と炭素原子との間に窒素 - 炭素 2 重結合を形成するか、または
- (c)  $R^{10}$  の一方が H であり、 $R^{11}$  が、OH もしくは  $OR^A$  であり、式中、 $R^A$  が、飽和  $C_{1-4}$  アルキル (好ましくはメチル) であり、 $R^{10}$  の他方及び  $R^{11}$  が、それらが結合される窒素と炭素原子との間に窒素 - 炭素 2 重結合を形成するかのいずれかである。

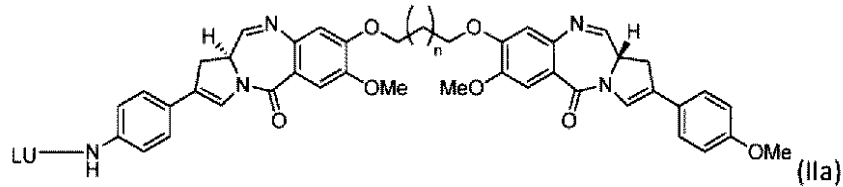
## 【0069】

式 I または Ia (またはその薬学的な塩、溶媒和物、塩の溶媒和物) の PBD 二量体は、典型的には、リンカー単位 LU を介して抗体に連結される。リンカー単位は、式 I または Ia (またはその薬学的な塩、溶媒和物、塩の溶媒和物) の PBD 二量体を標的部位 (例えば、癌細胞内部) で放出するように作用する。本発明において使用するための PBD 薬物 - リンカー化合物は、式 II により以下に表され (好ましい立体化学は IIa に示される)、式中、LU は、リンカー単位である。リンカー単位は、例えば、切断可能なペプチドリリンカー単位 (例えば、バリン - アラニンペプチドを含むリンカー) または切断可能なジスルフィドリリンカー単位

## 【化 1 6】



## 【化 1 7】



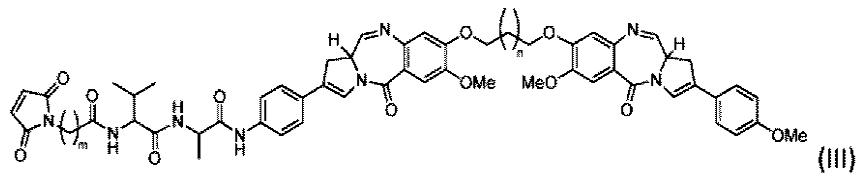
10

であるか、または薬学的な塩、溶媒和物、もしくは塩の溶媒和物であり得、式中、添字  $n$  は、1 または 3 である。

## 【0 0 7 0】

本発明に使用するための好ましい P B D 薬物 - リンカー化合物は、下式 I I I :

## 【化 1 8】



20

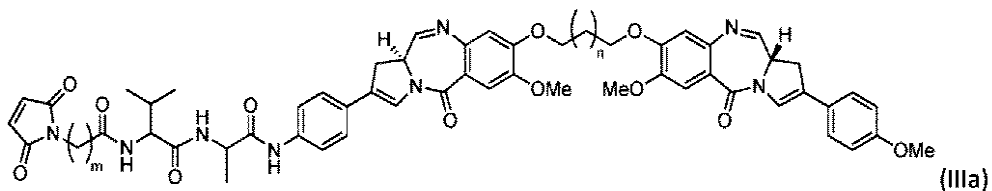
により表されるか、または薬学的な塩、溶媒和物、もしくは塩の溶媒和物であり得、式中、添字  $n$  は、1 または 3 であり、添字  $m$  は、2 ~ 5 の整数である。

## 【0 0 7 1】

薬物 - リンカーの P B D 薬物構成成分の好ましい立体化学は、下式 I I I a に示される通りである。

30

## 【化 1 9】

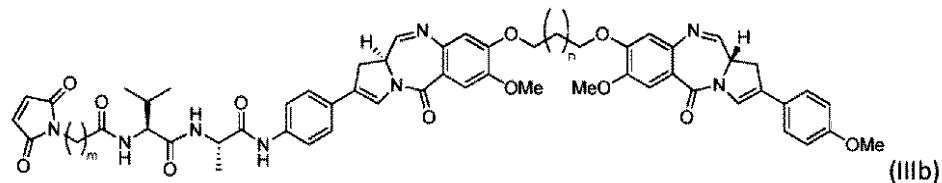


## 【0 0 7 2】

P B D 薬物及びリンカーの構成成分の好ましい立体化学は、下式 I I I b に示される通りである。

40

## 【化 2 0】



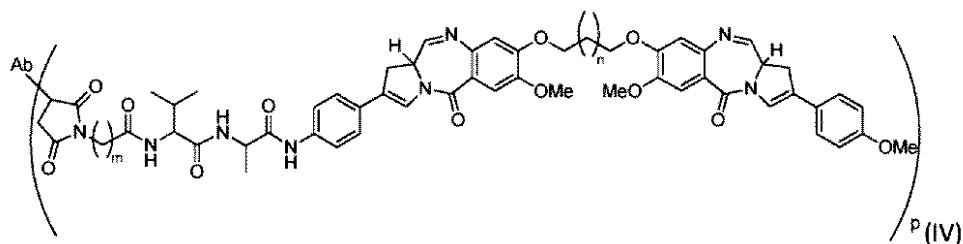
## 【0 0 7 3】

P B D 薬物 - リンカーは、抗 C D 4 8 抗体と複合体化されて、C D 4 8 標的抗体 - 薬物複合体を産生する。例えば、本抗体は、式 I I または式 I I I の薬物 - リンカーと複合体

50

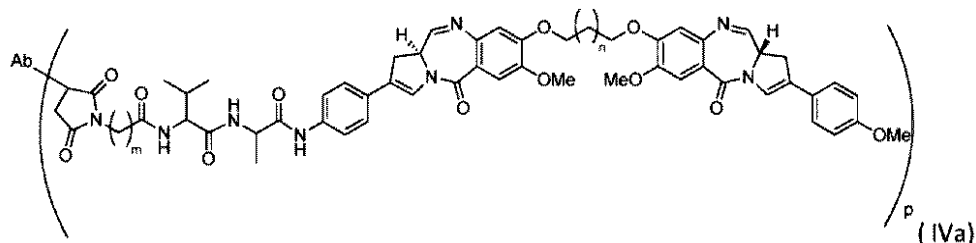
化され得る。例示的な C D 4 8 標的抗体 - 薬物複合体は、以下に、式 I V、I V a、及び I V b：

【化 2 1】

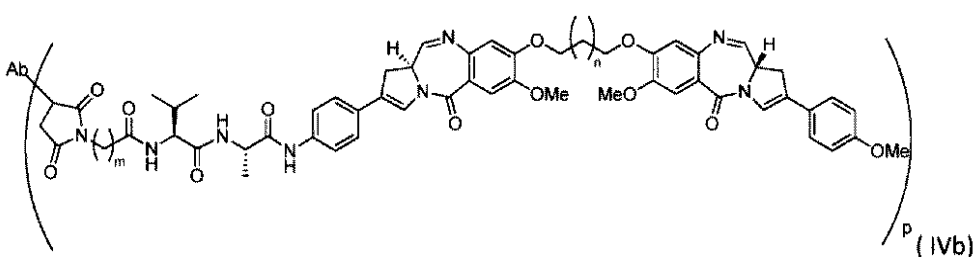


10

【化 2 2】



【化 2 3】



20

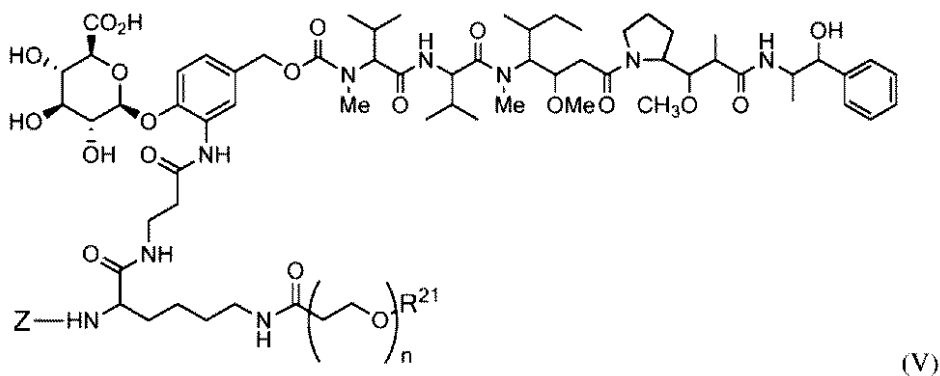
により示されるか、または薬学的な塩、溶媒和物、もしくは塩の溶媒和物であり得、式中、添字 n は、1 または 3 であり、添字 m は、2 ~ 5 の整数であり、添字 p は、1 ~ 4 である。

【0074】

30

例示的な薬物 - リンカーは、MMAE 薬物 - リンカーを含む。本発明者は、側鎖としてポリエチレングリコールポリマーを切断可能な - グルクロニド MMAE 薬物 - リンカーに組み込むことにより、非 PEG 化対照と比較したとき、異種移植片モデルにおいて、減少した血漿クリアランス及び増加した抗腫瘍活性を有する抗体薬物複合体が得られることを発見した。したがって、本発明の抗体を結合するための特に有益な薬物 - リンカーは、以下：

【化 2 4】



40

の通りであるか、またはその薬学的に許容される塩である。

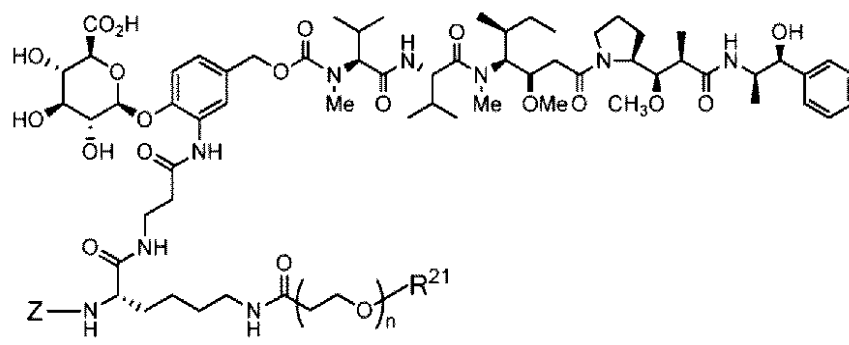
【0075】

かかる薬物 - リンカーのための好ましい立体化学は、以下：

50



## 【化 2 5】



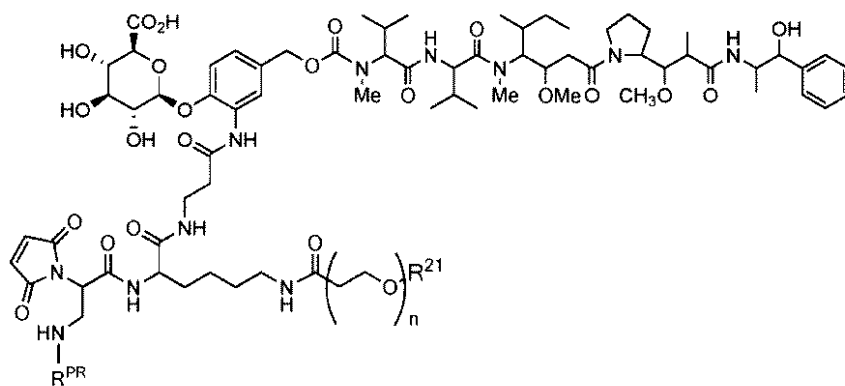
10

またはその薬学的に許容される塩に示され、式中、式 V 及び V a に関して、Z は、抗体上の官能基と反応して、それと共有結合を形成することが可能な反応性部位を有する有機部分を表し、n は、8 ~ 36 の範囲、最も好ましくは 8 ~ 14 の範囲であり（最も好ましくは 12）、 $R^{21}$  は、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位、好ましくは -CH<sub>3</sub> または -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H である。

## 【0076】

好ましい Z 部分は、マレイミド含有部分である。特に好ましい Z 部分は、以下の薬物 - リンカー：

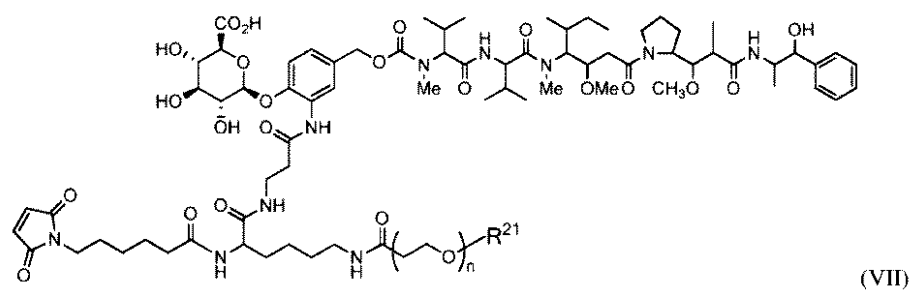
## 【化 2 6】



20

30

## 【化 2 7】



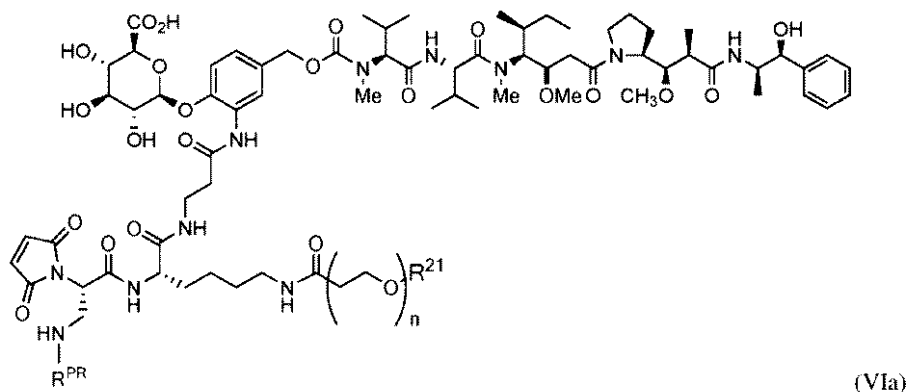
40

またはその薬学的に許容される塩に示される。

## 【0077】

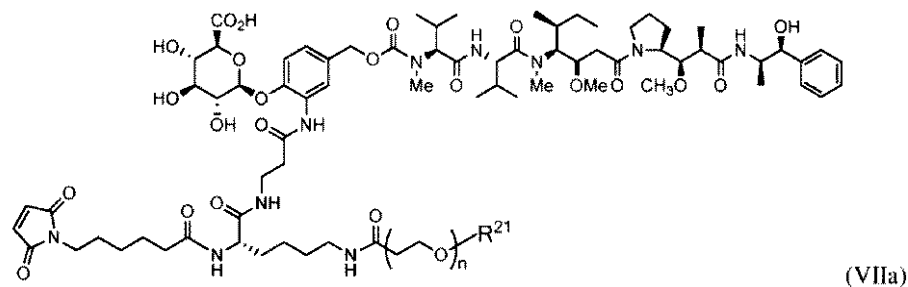
かかる薬物 - リンカーのための好ましい立体化学は、以下：

## 【化 28】



10

## 【化 29】



20

またはその薬学的に許容される塩に示され、式中、式 V I、V I a、V I I、及び V I I a に関して、 $n$  は、8 ~ 36 の範囲、最も好ましくは 8 ~ 14 の範囲であり（最も好ましくは 12）、 $R^{PR}$  は、水素または保護基、例えば、酸不安定性保護基、例えば、BOC であり、 $R^{21}$  は、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位、好ましくは  $-CH_3$  または  $-CH_2CH_2CO_2H$  である。

## 【0078】

上述のように、 $R^{PR}$  は、水素または保護基であり得る。本明細書で使用される場合、保護基は、一時的または永久的のいずれかで、多官能化合物の反応性部位を選択的に遮断する基を指す。保護基は、分子の他の箇所でも望む化学変換をもたらすのに必要な反応条件下で、及び所望される場合、新しく形成された分子の精製中に望ましくない副反応または保護基の早期喪失を阻止または回避することが可能であり、その新しく形成された分子の構造または立体化学の一体性に悪影響を及ぼさない条件下で除去され得る場合、好適な保護基である。好適なアミン保護基は、Isidro-Llobel et al., "Amino acid-protecting groups" Chem. Rev. (2009) 109: 2455-2504 により提供されるものを含む、酸不安定性窒素保護基を含む。典型的には、酸不安定性窒素保護基は、一級または二級アミノ基をその対応するカルバメートに変換し、*t*-ブチル、アリル、及びベンジルカルバメートを含む。

30

## 【0079】

上述のように、 $R^{21}$  は、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位である。当業者に理解されるように、ポリエチレングリコール単位は、多種多様の有機部分、典型的には比較的無反応性であるもので末端キャップされ得る。アルキル及び置換アルキル基が好ましく、例えば、 $-C_{1-10}$  アルキル、 $-C_{2-10}$  アルキル- $CO_2H$ 、 $-C_{2-10}$  アルキル- $OH$ 、 $-C_{2-10}$  アルキル- $NH_2$ 、 $C_{2-10}$  アルキル- $NH(C_{1-3}$  アルキル)、または  $C_{2-10}$  アルキル- $N(C_{1-3}$  アルキル) $_2$  を含む。

40

## 【0080】

一般に、各抗体に 1 ~ 16 の薬物-リンカーが結合される。

## 【0081】

薬物負荷 - 「p」

CD48 標的抗体-薬物複合体を参照すると、添字  $p$  は薬物負荷を表し、文脈により、

50

個々の抗体分子に結合された薬物 - リンカー分子の分子数を表し得るため整数値であるか、または平均薬物負荷を表し得るため、整数値または非整数値であってもよいが、典型的には非整数値である。平均薬物負荷は、集団における抗体当たりの薬物 - リンカー分子の平均数を表す。必ずではないが、多くの場合、抗体、例えばモノクローナル抗体を指すとき、抗体分子の集団を指す。抗体 - 薬物複合体分子の集団を含む組成物において、平均薬物負荷は、標的細胞に送達され得る薬物の量を決定するため、重要な品質特性である。組成物における非複合体化抗体分子のパーセントは、平均薬物負荷値に含まれる。

#### 【 0 0 8 2 】

本発明の好ましい態様では、抗体 - 薬物複合体化合物の集団を含む組成物を指すとき、平均薬物負荷は、1 ~ 約 16、好ましくは約 2 ~ 約 14、より好ましくは約 2 ~ 約 10 である。本明細書に例示されるものなど、PBD抗体薬物複合体に関して、特に好ましい平均薬物負荷は、約 2 である。いくつかの態様では、抗体 - 薬物複合体化合物の集団における個々の抗体分子の実際の薬物負荷は、1 ~ 4、1 ~ 3、または 1 ~ 2 であり、主要薬物負荷は 2 である。好ましい態様では、2 の平均薬物負荷は、部位特異的複合体化技法（例えば、EUインデックス番付システムに従う位置 239 を含む抗体に導入された改変システミン）を介して得られる。

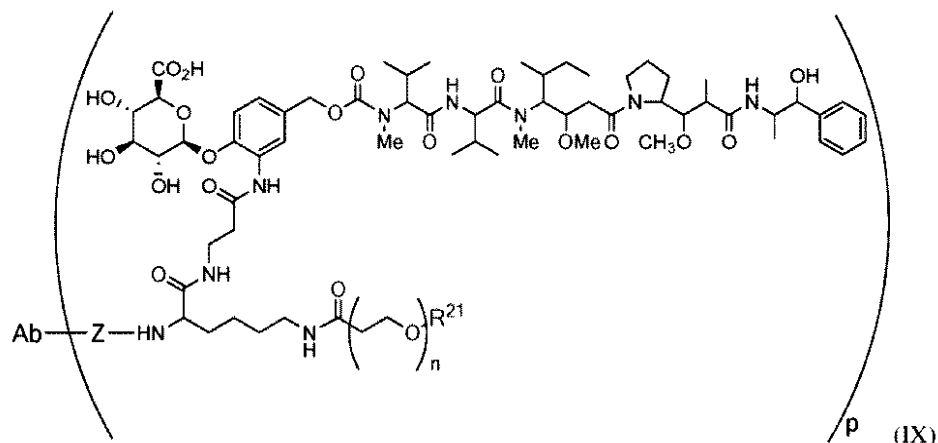
#### 【 0 0 8 3 】

本明細書に例示されるものなど、MMAE PEG化ADCに関して、特に好ましい平均薬物負荷は、約 8 である。例示的な実施形態では、薬物 - リンカーは、還元鎖間ジスルフィドのシステミン残基と複合体化される。いくつかの態様では、抗体 - 薬物複合体化合物の集団における個々の抗体分子の実際の薬物負荷は、1 ~ 10（または 6 ~ 10、または 6 ~ 8）であり、主要薬物負荷は 8 である。例えば、鎖間ジスルフィドに加えて、薬物 - リンカーが導入されたシステイン残基（EUインデックスに従う位置 239 に導入されたシステイン残基など）と複合体化される場合、より高い薬物負荷を得ることができる。

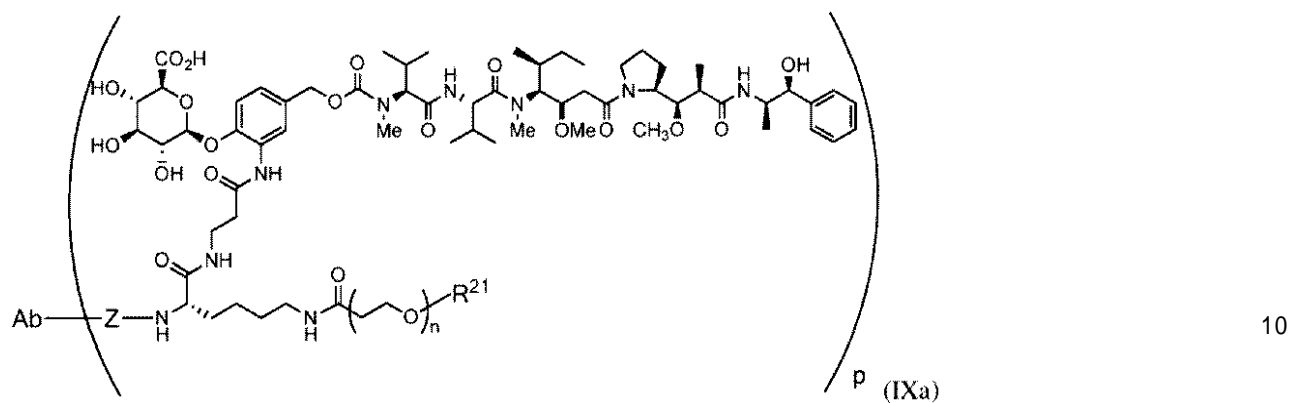
#### 【 0 0 8 4 】

例示的なADCは、以下：

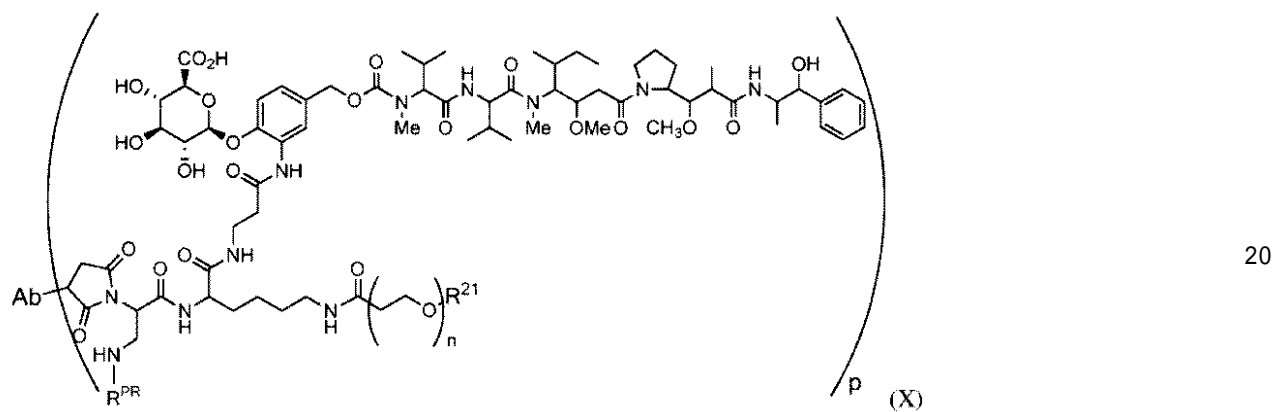
#### 【 化 3 0 】



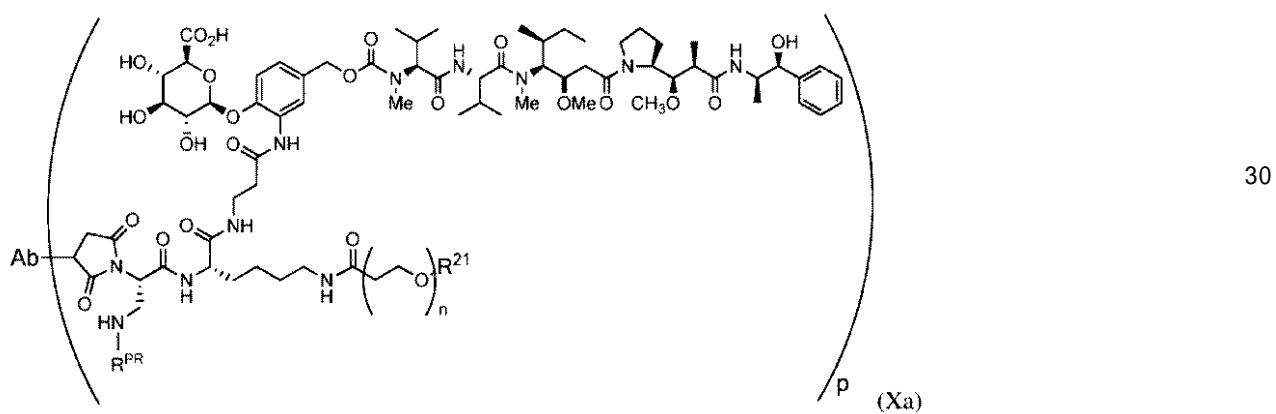
## 【化 3 1】



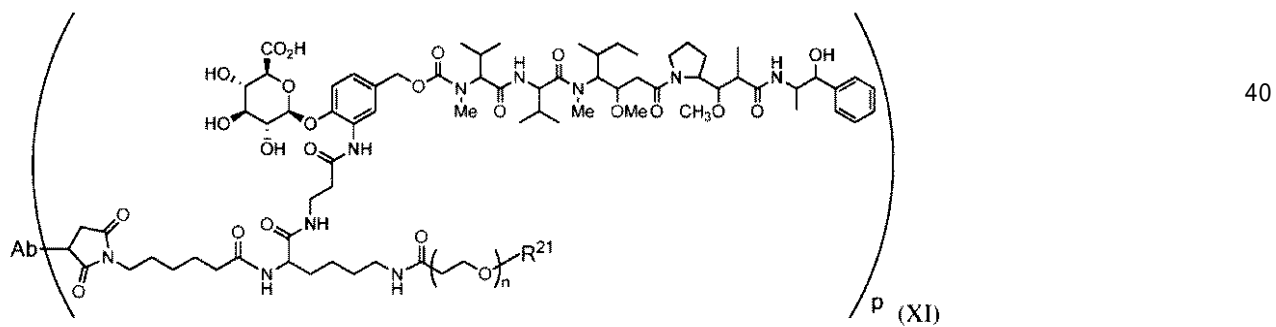
## 【化 3 2】



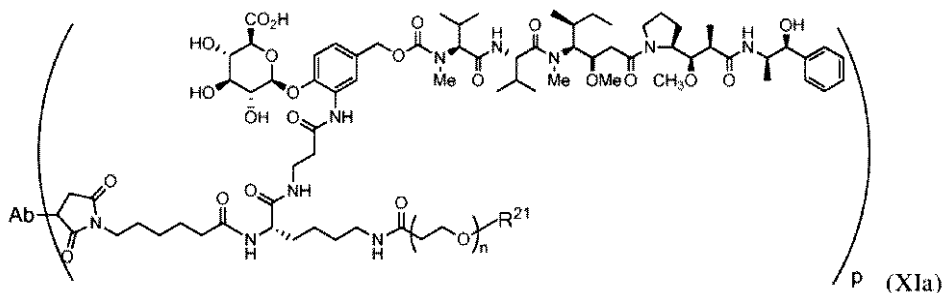
## 【化 3 3】



## 【化 3 4】



## 【化 3 5】



またはその薬学的に許容される塩を含み、式中、 $n$ は、8～36の範囲、最も好ましくは8～14の範囲（最も好ましくは12）であり、 $R^P$ は、水素または保護基、例えば、酸不安定性保護基、例えば、BOCであり、 $R^{21}$ は、ポリエチレングリコール部分のキャッピング単位、好ましくは $-CH_3$ または $-CH_2CH_2CO_2H$ であり、Abは、抗CD48抗体を表し、 $p$ は、個々の抗体分子を指す場合、1～16、好ましくは1～14、6～12、6～10、または8～10の範囲の整数を表し、抗体分子の集団を指す場合、約4または約6～約14、好ましくは約8の平均薬物負荷を表す。

## 【0085】

上述のように、薬物リンカーのPEG（ポリエチレングリコール）部分は、8～36の範囲であり得るが、12エチレンオキシド単位のPEGが特に好ましいことが分かった。より長いPEG鎖は、より緩徐なクリアランスをもたらし得る一方で、より短いPEG鎖は縮小した活性をもたらし得ることが分かった。したがって、上記の実施形態の全てにおいて、添字 $n$ は、好ましくは8～14、8～12、10～12、または10～14であり、最も好ましくは12である。

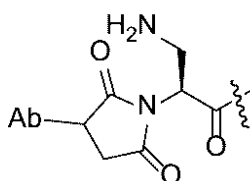
## 【0086】

多分散PEGs、単分散PEGs、及び個別のPEGは、本発明のPEG化抗体薬物複合体を作製するために使用され得る。多分散PEGは、不均質なサイズ及び分子量の混合物である一方で、単分散PEGは、典型的には、不均質な混合物から精製され、したがって、単一の鎖長及び分子量を提供する。好ましいPEG単位は、段階的に合成され、重合プロセスを介さない化合物である、個別のPEGである。個別のPEGは、規定の及び特定の鎖長を有する単一分子を提供する。添字「 $p$ 」と同様に、抗体-薬物複合体の集団を指す場合、添字「 $n$ 」の値は平均数であってもよく、整数または非整数であってもよい。

## 【0087】

好ましい実施形態では、抗体の薬物-リンカーへの共有結合は、薬物リンカーのマレイミド官能基と相互作用して、チオ置換スクシンイミドを形成する抗体のスルフィド官能基を通して達成される。スルフィド官能基は、リガンドの天然状態、例えば、天然に生じる残基（鎖間ジスルフィド残基）におけるリガンド単位上に存在し得るか、または化学修飾を介して、もしくは生物学的改変により、もしくはその2つの組み合わせでリガンドに導入され得る。抗体置換スクシンイミドが加水分解形態（複数可）で存在し得ることが理解される。例えば、好ましい実施形態では、ADCは、抗体に結合されたとき、

## 【化 3 6】



の構造により表されるスクシンイミド部分で構成されるか、または抗体に結合されたとき、

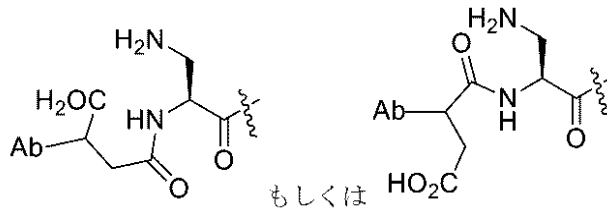
10

20

30

40

## 【化 37】



の構造により表されるその対応する酸 - アミド部分で構成される。

波線は、薬物 - リンカーの残部への連結を示す。

## 【0088】

10

治療の適用

本明細書に記載されるCD48標的抗体 - 薬物複合体は、CD48発現癌などのCD48発現障害を治療するために使用され得る。典型的には、かかる癌は、タンパク質（例えば、免疫アッセイにより）またはRNAレベルで測定された検出可能レベルのCD48を示す。いくつかのかかる癌は、同じ種類、好ましくは同じ患者からの非癌性組織に対して上昇したレベルのCD48を示す。任意選択で、癌におけるCD48のレベルは、治療を行う前に測定される。

## 【0089】

CD48発現に関連する癌の例としては、多発性骨髄腫、ならびにホジキン病、非ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、マントル細胞リンパ腫、ワルデンストーム高ガンマグロブリン血症、原発性/全身性アミロイドーシス患者腫瘍細胞、MGUS、及びアミロイドーシスを含む、他のB細胞悪性腫瘍が挙げられる。いくつかの急性骨髄性白血病（AML）細胞系（例えば、AML患者の白血病性芽球細胞）は、CD48を発現することが観察され、よって、CD48を発現するAML癌を有する患者は、開示のCD48 ADCを使用して治療され得る。

20

## 【0090】

本発明の方法は、患者に本発明の抗体 - 薬物複合体を投与することを含む、CD48を発現する癌を有する患者を治療することを含む。癌は、例えば、多発性骨髄腫を含む、任意のCD48発現癌であり得る。

## 【0091】

30

CD48指向抗体 - 薬物複合体は、有効なレジメン、つまり、癌の少なくとも1つの徴候または症状の発症を遅延する、その重症度を低減する、その更なる悪化を阻害する、及び/またはそれを寛解する投薬量、投与経路、及び投与頻度で投与される。

## 【0092】

CD48指向ペグ化MMAE複合体の例示的な投薬量は、一般的に、約1.0 µg/kg ~ 10.0 mg/kg、または約0.1 mg/kg ~ 5.0 mg/kg、または約0.5 mg/kg ~ 1.0、2.0、もしくは4.0 µg/kgであるが、代替の投薬量が想定される。好ましい用量範囲は、約0.3 mg/kg ~ 約2.0 mg/kgである。

## 【0093】

投与は、様々な投与経路によるものであってよい。ある特定の実施形態では、複合体は、静脈内、筋肉内、または皮下など、非経口投与される。癌の治療のためのADCの投与に関して、静脈内または皮下投与による全身循環への送達であり得る。特定の実施形態では、投与は、静脈内送達を介したものである。静脈内投与は、例えば、30 ~ 90分などの期間にわたる注入により、または単一ボラス注射によるものであり得る。いくつかの態様では、投与は、末梢挿入中心カテーテルにおける緩徐なIVプッシュ（すなわち、30 ~ 60秒にわたって）を介したものである。

40

## 【0094】

投与頻度は、患者がヒトまたは動物にかかわらず、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、及び投与される他の薬剤を含む、多くの異なる要因に依存する。頻度は、患者の状態または治療される癌の進行の変化に応じて、毎日、毎週、毎月、3ヶ月ごと、または

50

不規則な間隔であり得る。静脈内投与の例示的な頻度は、継続的な治療過程にわたって週に2回～3ヶ月ごとであるが、より頻繁な、またはより少ない頻度の投薬も可能である。静脈内投与の他の例示的な頻度は、継続的な治療過程にわたって3週間ごと、または毎週もしくは毎月の間であるが、より頻繁な、またはより少ない頻度の投薬も可能である。別の例示的な頻度は、6週間ごとの投与である。皮下投与に関して、例示的な投薬頻度は、毎日～毎月であるが、より頻繁な、またはより少ない頻度の投薬も可能である。

#### 【0095】

非経口投与用の薬学的組成物は、好ましくは、滅菌かつ実質的に等張性であり、GMP状態下で製造される。薬学的組成物は、単位剤形で（すなわち、単一投与用の投薬量）提供され得る。薬学的組成物は、1つ以上の生理学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、または助剤を使用して製剤化され得る。製剤は、選択される投与経路による。注射に関して、複合体は、水性溶液、好ましくはハンス液、リンゲル液、もしくは生理学的生理食塩水などの生理学的に適合性の緩衝液、または酢酸緩衝液（注射部位の不快感を低減するため）に製剤化され得る。溶液は、懸濁剤、安定剤、及び/または分散剤などの製剤用作用物質を含有し得る。あるいは、本抗体は、使用前に、好適なビヒクル、例えば、滅菌発熱物質不含水で構築するために、凍結乾燥形態であり得る。液体製剤中の複合体の濃度は、広く変動し得る。いくつかの態様では、ADCは、約0.5mg/ml～約30mg/ml、約0.5mg/ml～約10mg/ml、約1mg/ml～約10mg/ml～約2mg/ml～約10mg/ml、または約2mg/ml～約5mg/mlの濃度で存在する。

#### 【0096】

本発明の複合体を用いた治療は、化学療法、放射線、幹細胞治療、外科手術、及び治療される特定の障害の標準治療を含む、治療される障害に対して有効な他の治療と組み合わせることができる。したがって、本発明は、単独療法としての、または例えば、本明細書に記載される疾患及び障害の標準療法もしくは治験薬との併用療法での、かかる疾患及び障害の治療方法を包含する。癌の治療方法は、それを必要とする患者に、追加の抗癌剤または癌を治療するための他の薬剤と組み合わせて、有効量の本発明のCD48指向抗体-薬物複合体を投与することを含む。

#### 【0097】

併用療法の例示的な薬剤は、多発性骨髄腫を治療するために使用されるプロテアーゼ阻害剤であるカルフィルゾミブ（例えば、KYPROLIS（登録商標））である（Siegel DS et al. A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. Blood 2012; 120: 2817-2825を参照されたい）。カルフィルゾミブは、静脈内/IV注入として投与され得る。ある実施形態では、カルフィルゾミブは、本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、カルフィルゾミブは、本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、カルフィルゾミブは、本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE8-負荷との併用療法で投与される。

#### 【0098】

カルフィルゾミブは、本発明のCD48指向抗体-薬物複合体及び追加の薬剤との併用療法でも投与され得る。ルフィルゾミブは、多発性骨髄腫を治療するための様々な追加の薬剤と組み合わせられてきた。例えば、カルフィルゾミブは、レナリドミド及びデキサメタゾンと組み合わせられてきた（Stewart KA et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. N Engl J Med. 2015; 372: 142-152を参照されたい）。ある実施形態では、カルフィルゾミブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療

法で投与される。更なる実施形態では、カルフィルゾミブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、カルフィルゾミブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。

【0099】

カルフィルゾミブは、デキサメタゾンとも組み合わされてきた(Dimopoulos MD et al. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. Lancet Oncology 2016; 17: 27-38を参照されたい)。ある実施形態では、カルフィルゾミブは、デキサメタゾン及び本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、カルフィルゾミブは、デキサメタゾン及び本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、カルフィルゾミブは、デキサメタゾン及び本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。

【0100】

カルフィルゾミブは、パノビノスタットとも組み合わされてきた(Berdeja J G et al. Phase I/II study of the combination of panobinostat and carfilzomib in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. Haematologica 2015; 100: 670-676を参照されたい)。ある実施形態では、カルフィルゾミブは、パノビノスタット及び本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、カルフィルゾミブは、パノビノスタット及び本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。カルフィルゾミブは、ポマリドミド及びデキサメタゾンとも組み合わされてきた(Shah J et al. Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone (CPD) in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. Blood 2015; 126: 2284-2290を参照されたい)。ある実施形態では、カルフィルゾミブは、ポマリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、カルフィルゾミブは、ポマリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、カルフィルゾミブは、ポマリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。

【0101】

併用療法の別の例示的な薬剤は、CD38(多発性骨髄腫細胞上に高度に発現される糖タンパク質)に結合するヒトモノクローナル抗体であるダラツムマブ(例えば、DARZALEX(商標))である。ダラツムマブは、多発性骨髄腫を治療するために静脈内注入により患者に投与される(Lokhorst HM et al. Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. N Engl J Med 2015; 373: 1207-1219を参照されたい)。ある実施形態では、ダラツムマブは、本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ダラツムマブは、本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態で



は、ダラツムマブは、本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。

【0102】

ダラツムマブは、本発明のCD48指向抗体-薬物複合体及び追加の薬剤との併用療法でも投与され得る。ダラツムマブは、多発性骨髄腫を治療するための様々な追加の薬剤と組み合わされてきた。例えば、ダラツムマブは、ボルテゾミブ及びレナリドミドと組み合わされてきた(Phipps C et al. Daratumumab and its potential in the treatment of multiple myeloma: overview of the preclinical and clinical development. Ther Adv Hematol 2015; 6: 120-127を参照されたい)。ある実施形態では、ダラツムマブは、ボルテゾミブ、レナリドミド、及び本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ダラツムマブは、ボルテゾミブ、レナリドミド、及び本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ダラツムマブは、ボルテゾミブ、レナリドミド、及び本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。

10

【0103】

ダラツムマブは、ボルテゾミブ及びデキサメタゾンとも組み合わされてきた(Phipps Cらを参照されたい)。ある実施形態では、ダラツムマブは、ボルテゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ダラツムマブは、ボルテゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ダラツムマブは、ボルテゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。

20

【0104】

併用療法の別の例示的な薬剤は、悪性多発性骨髄腫細胞のマーカーであるCD319またはシグナル伝達リンパ球活性化分子F7(SLAMF7)に結合するモノクローナル抗体である、エロツズマブ(例えば、EMPLICITI(商標))である。エロツズマブは、多発性骨髄腫を治療するために静脈内注入により患者に投与され得る(Zonder JA et al. A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. Blood 2012; 120: 552-559)。を参照されたい)。ある実施形態では、エロツズマブは、本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、エロツズマブは、本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、エロツズマブは、本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。

30

【0105】

エロツズマブは、本発明のCD48指向抗体-薬物複合体及び追加の薬剤との併用療法でも投与され得る。エロツズマブは、多発性骨髄腫を治療するための様々な追加の薬剤と組み合わされてきた。例えば、エロツズマブは、レナリドミド及びデキサメタゾンと組み合わされてきた(Lonial S et al. Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. N Engl J Med 2015; 373: 621-631;を参照されたい)。ある実施形態では、エロツズマブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、エロツズマブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、エロツズマブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。

40

50

c - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

【0106】

併用療法の別の例示的な薬剤は、多発性骨髄腫を治療するために患者に与えられる免疫調節薬であるレナリドミド（例えば、REVLIMID（登録商標））である（Richardson PG, A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. Blood 2006, 108: 3458 - 3464を参照されたい）。レナリドミドは、経口投与用にカプセル、ピル、または錠剤としてパッケージ化され得る。ある実施形態では、レナリドミドは、本発明のCD48指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、レナリドミドは、本発明のhMEM102抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、レナリドミドは、本発明のhMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

10

【0107】

レナリドミドは、本発明のCD48指向抗体 - 薬物複合体及び追加の薬剤との併用療法でも投与され得る。レナリドミドは、多発性骨髄腫を治療する様々な追加の薬剤と組み合わされてきた。例えば、レナリドミドは、ボルテゾミブ及びデキサメタゾンと組み合わされてきた（Richardson PG et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. Blood 2010; 116: 679 - 686を参照されたい）。ある実施形態では、レナリドミドは、ボルテゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のCD48指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、レナリドミドは、ボルテゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、レナリドミドは、ボルテゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

20

【0108】

レナリドミドは、カルフィルゾミブ及びデキサメタゾンとも組み合わされてきた（Stewart KAらを参照されたい）。ある実施形態では、レナリドミドは、カルフィルゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のCD48指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、レナリドミドは、カルフィルゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、レナリドミドは、カルフィルゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

30

【0109】

レナリドミドは、ダラツムマブ及びボルテゾミブとも組み合わされてきた（Phipps Cらを参照されたい）。ある実施形態では、レナリドミドは、ダラツムマブ、ボルテゾミブ、及び本発明のCD48指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、レナリドミドは、ダラツムマブ、ボルテゾミブ、及び本発明のhMEM102抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、レナリドミドは、ダラツムマブ、ボルテゾミブ、及び本発明のhMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

40

【0110】

レナリドミドは、エロツズマブ及びデキサメタゾンとも組み合わされてきた（Lonial S et al. Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. N Engl J Med 2015; 373: 621 - 631;を参照されたい）。ある実施形態で

50

は、レナリドミドは、エロツズマブ、デキサメタゾン、及び本発明のCD48指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、レナリドミドは、エロツズマブ、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、レナリドミドは、エロツズマブ、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

【0111】

併用療法の別の例示的な薬剤は、多発性骨髄腫及びマントル細胞リンパ腫を治療するために患者に与えられるプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブ（例えば、VELCADE（登録商標））である（Richardson PG et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. N Engl J Med 2003; 348: 2609 - 2617を参照されたい）。ボルテゾミブは、静脈内注射により患者に投与され得る。ある実施形態では、ボルテゾミブは、本発明のCD48指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、本発明のhMEM102抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、本発明のhMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

【0112】

ボルテゾミブは、本発明のCD48指向抗体 - 薬物複合体及び追加の薬剤との併用療法でも投与され得る。ボルテゾミブは、多発性骨髄腫を治療するための様々な追加の薬剤と組み合わされてきた。例えば、ボルテゾミブは、サリドマイド及びデキサメタゾンと組み合わされてきた（Kapoor P et al. Bortezomib combination therapy in multiple myeloma. Semin Hematol 2012; 3: 228 - 242を参照されたい）。ある実施形態では、ボルテゾミブは、サリドマイド、デキサメタゾン、及び本発明のCD48指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、サリドマイド、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、サリドマイド、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

ボルテゾミブは、デキサメタゾン、サリドマイド、シスプラチン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、及びエトポシドとも組み合わされてきた（Kapoor Pらを参照されたい）。ある実施形態では、ボルテゾミブは、デキサメタゾン、サリドマイド、シスプラチン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、及び本発明のCD48指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、デキサメタゾン、サリドマイド、シスプラチン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、及び本発明のhMEM102抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、デキサメタゾン、サリドマイド、シスプラチン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、及び本発明のhMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

【0113】

ボルテゾミブは、ダラツムマブ及びレナリドミドとも組み合わされてきた（Phipps Cらを参照されたい）。ある実施形態では、ボルテゾミブは、ダラツムマブ、レナリドミド、及び本発明のCD48指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、ダラツムマブ、レナリドミド、及び本発明のhMEM102抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、ダラツムマブ、レナリドミド、及び本発明のhMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

【0114】

10

20

30

40

50

ボルテゾミブは、レナリドミド及びデキサメタゾンとも組み合わせられてきた (Richardson PG et al. 2010 を参照されたい)。ある実施形態では、ボルテゾミブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明の hMEM102 抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明の hMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

#### 【0115】

ボルテゾミブは、パノピノスタット及びデキサメタゾンとも組み合わせられてきた (Richardson P et al. PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. Blood 2013; 122: 2331 - 2337 を参照されたい)。ある実施形態では、ボルテゾミブは、パノピノスタット、デキサメタゾン、及び本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、パノピノスタット、デキサメタゾン、及び本発明の hMEM102 抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ボルテゾミブは、パノピノスタット、デキサメタゾン、及び本発明の hMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

#### 【0116】

併用療法の別の例示的な薬剤は、癌 (多発性骨髄腫、白血病、及びリンパ腫を含む)、炎症、アレルギー、及び悪心を治療するために使用されるグルココルチコステロイドであるデキサメタゾン (例えば、DECADRON (登録商標)) である。デキサメタゾンは、経口投与用の錠剤、ピル、もしくはカプセルとして、または静脈内注入により投与され得る。ある実施形態では、デキサメタゾンは、本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、デキサメタゾンは、本発明の hMEM102 抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、デキサメタゾンは、本発明の hMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。デキサメタゾンは、本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体及び追加の薬剤との併用療法でも投与され得る。

#### 【0117】

併用療法の別の例示的な薬剤は、癌 (特に、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、乳癌、ならびに肺癌を含む) を治療するために使用されるアルキル化剤であるシクロホスファミド (例えば、CYTOXAN (登録商標)) である。シクロホスファミドは、注射、注入により、経口投与用の錠剤、ピル、もしくはカプセルとして、または筋肉内、腹膜内、もしくは肺膜内への注射により投与され得る。ある実施形態では、シクロホスファミドは、本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、シクロホスファミドは、本発明の hMEM102 抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、シクロホスファミドは、本発明の hMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。シクロホスファミドは、本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体及び追加の薬剤との併用療法でも投与され得る。

#### 【0118】

併用療法の別の例示的な薬剤は、癌 (多発性骨髄腫及び卵巣癌を含む) を治療するために使用されるアルキル化剤であるメルファランである。メルファランは、経口的に、注射剤または点滴として投与され得る。ある実施形態では、メルファランは、本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、メルファランは、本発明の hMEM102 抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形

態では、メルファランは、本発明の hMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

【0119】

メルファランは、本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体及び追加の薬剤との併用療法でも投与され得る。

【0120】

併用療法の別の例示的な薬剤は、多発性骨髄腫を治療するために使用される免疫調節薬であるポマリドミド（例えば、POMALYST（登録商標））である。ポマリドミドは、経口投与用にカプセル、ピル、または錠剤として投与され得る。ある実施形態では、ポマリドミドは、本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ポマリドミドは、本発明の hMEM102 抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ポマリドミドは、本発明の hMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

【0121】

ポマリドミドは、本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体及び追加の薬剤との併用療法でも投与され得る。ポマリドミドは、多発性骨髄腫を治療するための様々な追加の薬剤と組み合わされてきた。ポマリドミドは、デキサメタゾンと組み合わされてきた（Richardson P et al. Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. Blood 2014; 123: 1826 - 1832 を参照されたい）。ある実施形態では、ポマリドミドは、デキサメタゾン及び本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ポマリドミドは、デキサメタゾン及び本発明の hMEM102 抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ポマリドミドは、デキサメタゾン及び本発明の hMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

【0122】

ポマリドミドは、カルフィルゾミブ及びデキサメタゾンとも組み合わされてきた（Shah J et al. Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone (CPD) in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. Blood 2015; 126: 2284 - 2290 を参照されたい）。ある実施形態では、ポマリドミドは、カルフィルゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ポマリドミドは、カルフィルゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明の hMEM102 抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、ポマリドミドは、カルフィルゾミブ、デキサメタゾン及び本発明の hMEM102 - MDpr - PEG(12) - gluc - MMAE 8 - 負荷との併用療法で投与される。

【0123】

併用療法の別の例示的な薬剤は、癌（多発性骨髄腫を含む）を治療するために使用されるヒストン脱アセチル化（HDAC）阻害剤であるパノピノスタット（例えば、FARYDAK（登録商標））である（Wolf JL et al. A phase II study of oral panobinostat (LBH589) in adult patients with advanced refractory multiple myeloma. ASH Annual Meeting Abstracts, 2008 を参照されたい）。パノピノスタットは、経口投与用に、ピル、カプセル、または錠剤として投与され得る。ある実施形態では、パノピノスタットは、本発明の CD48 指向抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、パノピノスタットは、本発明の hMEM102 抗体 - 薬物複合体との併用療法で投与される。更なる

実施形態では、パノビノスタットは、本発明の hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。

【0124】

パノビノスタットは、本発明のCD48指向抗体-薬物複合体及び追加の薬剤との併用療法でも投与され得る。パノビノスタットは、多発性骨髄腫を治療するための様々な追加の薬剤と組み合わせられてきた。例えば、パノビノスタットは、カルフィルゾミブと組み合わせられてきた(Berdeja JGらを参照されたい)。ある実施形態では、パノビノスタットは、カルフィルゾミブ及び本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、パノビノスタットは、カルフィルゾミブ及び本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、パノビノスタットは、カルフィルゾミブ及び本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。パノビノスタットは、ボルテゾミブ及びデキサメタゾンとも組み合わせられてきた(Richardson P et al, 2013を参照されたい)。ある実施形態では、パノビノスタットは、ボルテゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、パノビノスタットは、ボルテゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、パノビノスタットは、ボルテゾミブ、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。

【0125】

併用療法の別の例示的な薬剤は、癌(多発性骨髄腫を含む)を治療するために使用されるプロテアソーム阻害剤であるイキサゾミブ(NINLARO(登録商標))である。イキサゾミブは、経口投与され得る。ある実施形態では、イキサゾミブは、本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、イキサゾミブは、本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、イキサゾミブは、本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。イキサゾミブは、本発明のCD48指向抗体-薬物複合体及び追加の薬剤との併用療法でも投与され得る。イキサゾミブは、多発性骨髄腫を治療するための様々な追加の薬剤と組み合わせられてきた。例えば、イキサゾミブは、レナリドミド及びデキサメタゾンと組み合わせられてきた(Moreau P et al, Ixazomib, an investigational oral proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone, significantly extends progression-free survival for patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma: the phase 3 tourmaline-MM1 study, ASH Annual Meeting Abstracts, 2015を参照されたい)。ある実施形態では、イキサゾミブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のCD48指向抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、イキサゾミブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102抗体-薬物複合体との併用療法で投与される。更なる実施形態では、イキサゾミブは、レナリドミド、デキサメタゾン、及び本発明のhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE 8-負荷との併用療法で投与される。

【0126】

本発明の任意の特徴、工程、要素、実施形態、または態様は、具体的に別途記載のない限り、任意のそのその他と組み合わせ使用され得る。本発明は、明確性及び理解の目的のため、図示及び例によりある程度詳細に記載されてきたが、ある特定の変更及び修正が付属の特許請求の範囲の範囲内で実践され得ることは明らかであろう。

【実施例】

## 【0127】

以下の実施例は、図示のために提供され、特許請求の発明を制限するものではない。

## 実施例1：抗体の選択及びヒト化

マウスMEM102抗体は、ヒトCD48タンパク質に結合し、Bazil et al., Folia Biologica 35:289-297(1989)に最初に開示された。マウスMEM102抗体をコードする核酸が配列決定され、コードされた重鎖及び軽鎖CDR配列、すなわち、配列番号3~8が特定された。いくつかのヒト化MEM102抗体は、ヒトアクセプター配列として、hIgG-VH7-4-1/hIgG-JH5重鎖可変領域ヒト生殖系列及びhIgG-VK6-21/hIgG-JK4軽鎖可変領域ヒト生殖系列を使用して構築された。本抗体は、マウス抗体に戻して突然変異されるアミノ酸残基の選択またはマウス生殖系列配列において異なった。HALA(配列番号1に記載される重鎖(vHA)及び配列番号2に記載される軽鎖(vLA)と命名された抗体は、その(i)結合特性、(ii)薬物を送達する能力、及び(iii)他の変異型と比較したときの逆突然変異の数に基づいて、リードヒト化MEM102抗体として選択された。ヒト化MEM102抗体は、hMEM102とも称される。

10

## 【0128】

HCLA(vHCと命名された重鎖可変領域と、vLAと命名された軽鎖可変領域とを有する抗体)、HALB(vHAと命名された重鎖可変領域と、vLBと命名された軽鎖可変領域とを有する抗体)、HBLA(vHBと命名された重鎖可変領域と、vLAと命名された軽鎖可変領域とを有する抗体)、HBLB(vHBと命名された重鎖可変領域と、vLBと命名された軽鎖可変領域とを有する抗体)、HCLB(vHCと命名された重鎖可変領域と、vLBと命名された軽鎖可変領域とを有する抗体)と命名された抗体が、本発明において、HALA抗体の代わりに使用され得る。vHA、vHB、vHC、vLA、vLB、及びvLC配列に関しては図1及び2を参照されたい。MEM102の様々なヒト化形態の結合親和性は、ヒトまたはcyno CD48を過剰発現する細胞に対して試験されたか否かにかかわらず、類似する。

20

## 【0129】

## 実施例2：hMEM102結合特性

方法：抗CD48抗体の飽和結合を決定するために、ヒトU-266多発性骨髄腫の腫瘍細胞またはカニクイザルCD48の安定してトランスフェクトされたCHO-DG44クローン細胞を、抗体当たり約2~4フルオロフォアを負荷した滴定したAlexa Fluor-647複合体化抗体(0.8ng/ml~50µg/mL)で染色した。氷上で1時間インキュベートした後、細胞を、2%ウシ胎児血清及び0.02%アジ化ナトリウムを含有するリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄した。蛍光をLSRIIFローサイトメトリーで検出し、GraphPad Prismの1部位結合(双曲線)非線形回帰を使用して、Kd値を決定した。

30

## 【0130】

結果：表1ならびに図3及び4は、低Kd値により示されるように、hMEM102-HALA抗体がU-266細胞におけるcMEM102と比較して類似する結合親和性を有することを示す。安定してトランスフェクトされたCHO-DG44クローン細胞におけるhMEM102-HALA及びcMEM102の、カニクイザルCD48に対する結合親和性も比較可能であった。hMEM102-HALA及びcMEM102の両方は、両細胞系において、mMEM102と比較して4倍超低いKdを有する。抗CD48抗体は、カニクイザルCD48と比較して、ヒトCD48に対して約6倍強い結合親和性を有した。

40

【表 1】

表 1

抗体	ロット#	K <sub>d</sub> (nM)	
		U-266	CHO-DG44- カニクイザルCD48
hMEM102- HALA	9915029F	5.0	31.1
cMEM102	7713039A	5.8	40.5
mMEM102	275036T	20.8	164.7

10

## 【0131】

実施例 3 : MDpr-PEG(12)-glyc-MMAE の合成及び hMEM102 との複合体化

一般的な情報全ての市販の無水溶媒は更に精製することなく使用された。PEG 試薬は、Quanta BioDesign (Powell, OH) から得た。分析薄層クロマトグラフィーは、シリカゲル 60 F254 アルミニウムシート (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) で行われた。円形クロマトグラフィーは、クロマトロン装置 (Harris Research, Palo Alto, CA) で行われた。カラムクロマトグラフィーは、Biotage Isolera One フラッシュ精製システム (Charlotte, NC) で行われた。分析 HPLC は、Varian ProStar 330 PDA 検出器で構成された Varian ProStar 210 溶媒送達系で行われた。C12 Phenomenex Synergi 2.0 × 150 mm、4 μm、80 逆相カラム上で試料を溶出した。酸性移動相は、両方とも 0.05% トリフルオロ酢酸または 0.1% ギ酸のいずれかを含有するアセトニトリル及び水からなった。化合物は、注射後 1 分で 5% ~ 11 分で 95% の酸性アセトニトリル、続いて 15 分まで均一濃度の 95% アセトニトリルの直線勾配で溶出された (流量 = 1.0 mL / 分)。LC-MS は 2 つの異なるシステムで行われた。LC-MS システム 1 は、C12 Phenomenex Synergi 2.0 × 150 mm、4 μm、80 逆相カラムを装備した HP Agilent 1100 HPLC 機器に接続された ZMD Micromass 質量分析計からなった。酸性溶離剤は、10 分にわたって 0.1% 水性ギ酸中 5% ~ 95% のアセトニトリル、続いて 5 分間の均一濃度の 95% アセトニトリルの直線勾配からなった (流量 = 0.4 mL / 分)。LC-MS システム 2 は、Waters 2996 Photodiode Array Detector を備えた Waters 2695 Separations Module に接続された Waters Xevo G2 ToF 質量分析計からなり、カラム、移動相、勾配、及び流量は、LC-MS のシステム 1 と同じであった。UPLC-MS は、Acquity UPLC BEH C18 2.1 × 50 mm、1.7 μm 逆相カラムを装備した Acquity Ultra Performance LC に接続された Waters SQ 質量検出器で実行された。酸性移動相 (0.1% ギ酸) は、3% アセトニトリル / 97% 水 ~ 100% アセトニトリルの勾配からなった (流量 = 0.5 mL / 分)。分取 HPLC は、Varian ProStar 330 PDA 検出器で構成された Varian ProStar 210 溶媒送達系で実行された。産物は、水中 0.1% ギ酸 (溶媒 A) 及びアセトニトリル中 0.1% ギ酸 (溶媒 B) で溶出する、C12 Phenomenex Synergi 10.0 × 250 mm、4 μm、80 逆相カラム上で精製された。精製方法は、以下の溶媒 A : 溶媒 B の勾配からなった : 0 ~ 5 分間 90 : 10、5 分 ~ 80 分間 90 : 10 ~ 10 : 90、続いて、5 分間均一濃度の 10 : 90。流量は 4.6 mL / 分であり、254 nm で監視した。スキーム 3 及び 4 の化合物の分取 HPLC は、両移動相において、0.1% ギ酸の代わりに、0.1% トリフルオロ酢酸で実行された。

20

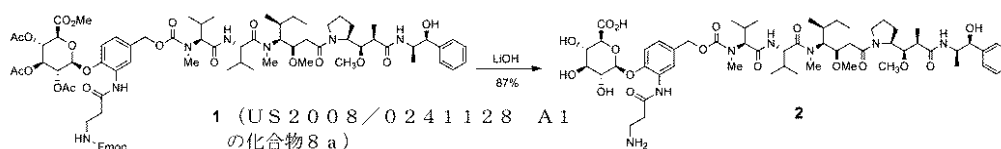
30

40



## 【化 3 8】

## スキーム 1

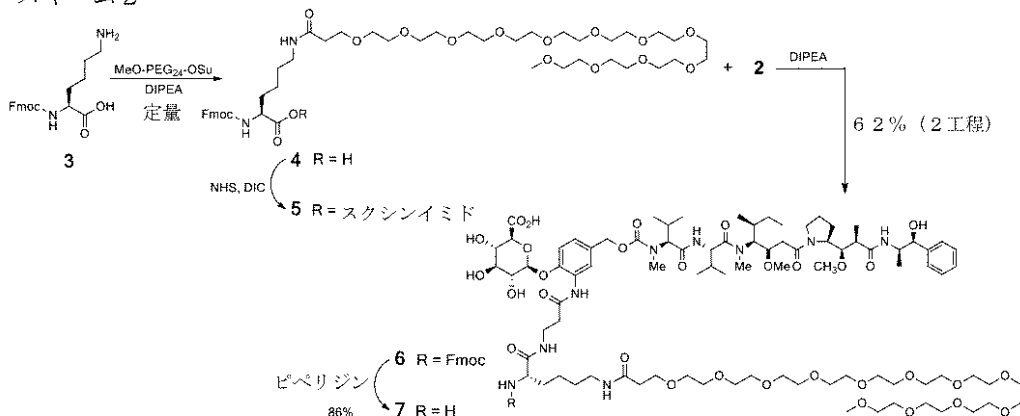


## 【0132】

(2S, 3S, 4S, 5R, 6S) - 6 - (2 - (3 - アミノプロパンアミド) - 4 - ((5S, 8S, 11S, 12R) - 11 - ((S) - sec - ブチル) - 12 - (2 - ((S) - 2 - ((1R, 2R) - 3 - (((1S, 2R) - 1 - ヒドロキシ - 1 - フェニルプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソプロピル) ピロリジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) - 5, 8 - ジイソプロピル - 4, 10 - ジメチル - 3, 6, 9 - トリオキソ - 2, 13 - ジオキサ - 4, 7, 10 - トリアザテトラデシル) フェノキシ) - 3, 4, 5 - トリヒドロキシテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - カルボン酸 (2) : 既知 (US 2008/0241128 A1 の化合物 8 a) のグルクロニド - MMAE 中間体 2 (40 mg、26.8  $\mu\text{mol}$ ) を入れたフラスコに、0.9 mL のメタノール及び 0.9 mL のテトラヒドロフランを加えた。次いで、溶液を氷浴中で冷却し、水酸化リチウム水和物 (6.8 mg、161  $\mu\text{mol}$ ) を、0.9 mL の水中の溶液として、滴下して加えた。次いで、反応物を氷上で 1.5 時間攪拌し、その時点で、LC/MS は産物への完全な変換を明らかにした。次いで、氷酢酸 (9.2  $\mu\text{L}$ 、161  $\mu\text{mol}$ ) を加え、乾燥状態に濃縮した。分取 HPLC により、油状残留物として完全に脱保護されたグルクロニド - MMAE リンカー 中間体 3 (26 mg、87%) を得た。分析 HPLC (0.1% 酢酸) :  $t_R$  9.3 分。LC-MS システム 1 :  $t_R$  11.10 分、 $m/z$  (ES<sup>+</sup>) 実測値 1130.48 (M + H)<sup>+</sup>、 $m/z$  (ES<sup>-</sup>) 実測値 1128.63 (M - H)<sup>-</sup>。

## 【化 3 9】

## スキーム 2



## 【0133】

((S) - 4 - (((9H - フルオレン - 9 - イル) メトキシ) カルボニル) アミノ) - 38 - オキソ - 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35 - ドデカオキサ - 39 - アザペンタテトラコンタン - 45 - オイック酸 (4) : N - Fmoc - リジン 3 (59 mg、161  $\mu\text{mol}$ ) を入れたフラスコに、2.9 mL の無水ジクロロメタン、続いてメトキシ - PEG 12 - OSu (100 mg、146  $\mu\text{mol}$ ) を加えた。次いで、DIPEA (127  $\mu\text{L}$ 、730  $\mu\text{mol}$ ) を加え、反応物を室温の窒素下で攪拌し、続いて TLC 及び LC/MS を行った。2 時間後、LC/MS は産物への変換を明らかにした。反応溶液をジクロロメタンに希釈し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。メタノールの量を増加して (0% から 20%)、固定相をジクロロメタンで溶出し、所望の産物 4 (153 mg、112%) を得た。UPLC-MS :  $t_R$

$t_R$  1.77分、 $m/z$  ( $ES^+$ ) 実測値 939.58 ( $M+H$ ) $^+$ 。

【0134】

(S)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル44-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-38-オキソ-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-ドデカオキサ-39-アザペンタテトラコンタン-45-オエート(5): フラスコにN-Fmoc-リジン(PEG12)-OH 4(153mg、163 $\mu$ mol)及び1.6mLの無水テトラヒドロフランを入れた。N-ヒドロキシスクシンイミド(28mg、245 $\mu$ mol)、続いてジイソプロピルカルボジイミド(38 $\mu$ L、245 $\mu$ mol)を加えた。反応物を窒素下で密封し、一晚攪拌した。粗反応物をジクロロメタンに希釈し、メタノールの量を増加して(0%から10%)、ジクロロメタンで溶出したシリカゲル上で精製し、所望の活性化エステル5(155mg)を得た。更に特徴付けすることなく、材料を次に進めた。UPLC-MS:  $t_R$  1.92分、 $m/z$  ( $ES^+$ ) 実測値 1036.48 ( $M+H$ ) $^+$ 。

【0135】

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-38,45-ジオキソ-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-ドデカオキサ-39,46-ジアザノナテトラコンタンアミド)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-ブチル)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-ヒドロキシ-1-フェニルプロパン-2-イル)アミノ)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル)ピロリジン-1-イル)-2-オキソエチル)-5,8-ジイソプロピル-4,10-ジメチル-3,6,9-トリオキソ-2,13-ジオキサ-4,7,10-トリアザテトラデシル)フェノキシ)-3,4,5-トリヒドロキシテトラヒドロ-2H-ピラン-2-カルボン酸(6): 脱保護グルクロニド-MMAEリンカー中間体2(92mg、81 $\mu$ mol)を無水ジメチルホルムアミド(1.6mL)に溶解し、N-Fmoc-リジン(PEG12)-OSu5(101mg、97 $\mu$ mol)を入れたフラスコに加えた。次いで、ジイソプロピルエチルアミン(70 $\mu$ L、405 $\mu$ mol)を加え、次いで、反応物を室温の窒素下で攪拌した。4.5時間後、LC-MSは産物への変換を明らかにした。分取HPLCにより産物を精製し、油状残留物としてFmoc-Lys(PEG12)-グルクロニド-MMAE中間体6(2工程にわたって111mg、62%)を得た。UPLC-MS:  $t_R$  2.01分、 $m/z$  ( $ES^+$ ) 実測値 2050.92 ( $M+H$ ) $^+$ 。

【0136】

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-アミノ-38,45-ジオキソ-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-ドデカオキサ-39,46-ジアザノナテトラコンタンアミド)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-ブチル)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-ヒドロキシ-1-フェニルプロパン-2-イル)アミノ)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル)ピロリジン-1-イル)-2-オキソエチル)-5,8-ジイソプロピル-4,10-ジメチル-3,6,9-トリオキソ-2,13-ジオキサ-4,7,10-トリアザテトラデシル)フェノキシ)-3,4,5-トリヒドロキシテトラヒドロ-2H-ピラン-2-カルボン酸(7): Fmoc-Lys(PEG12)-グルクロニド-MMAE中間体6(111mg、54 $\mu$ mol)を2.2mLの無水ジメチルホルムアミドに溶解し、続いて0.5mLのピペリジンを加えた。反応物を窒素下で3時間攪拌し、次いで乾燥状態に濃縮した。分取HPLCにより産物を精製し、油状残留物としてH-Lys(PEG12)-グルクロニド-MMAE中間体7(85mg、86%)を得た。UPLC-MS:  $t_R$  1.50分、 $m/z$  ( $ES^+$ ) 実測値 1829.31 ( $M+H$ ) $^+$ 。

【0137】

(S)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル3-((tert-ブトキシカルボニ

10

20

30

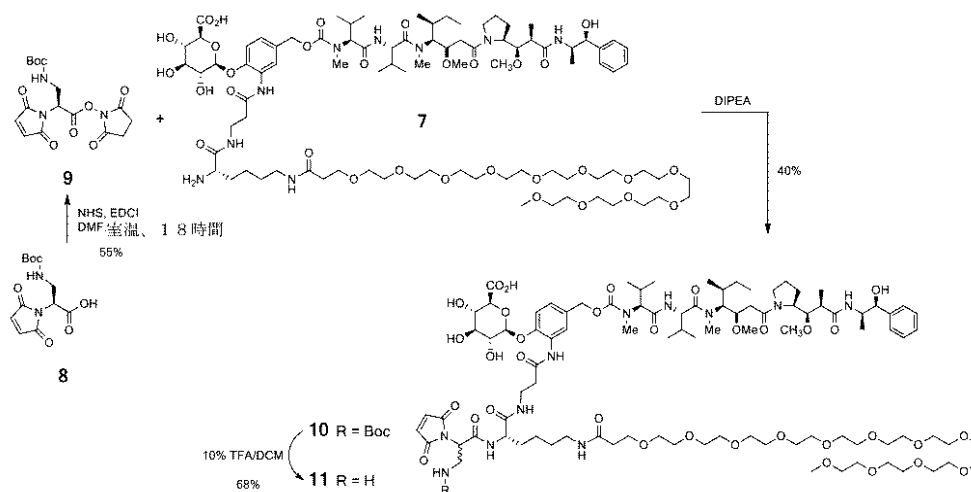
40

50

ル)アミノ)-2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)プロパノエート(9):(S)-N-マレイミド-N-Boc-ジアミノプロパン酸8(Nature Biotechnology, 2014, 32, 1059-1062)(400mg、1.4mmol)を7mLの無水ジメチルホルムアミドに溶解した。N-ヒドロキシスクシンイミド(178mg、1.5mmol)、続いて1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(298mg、1.5mmol)を加えた。反応物を窒素下で3時間、室温で攪拌した。水性処理は120mLの水への希釈を通して達成され、次いで、水層を、60mLの酢酸エチルで3回抽出した。次いで、混合有機層を鹼水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、乾燥状態に濃縮した。ヘキサン:酢酸エチル(50:50~0:100)の溶出混合物のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより、産物を精製し、(S)-N-マレイミド-N-Boc-ジアミノプロパン酸NHSEステル[MDpr(Boc)-OSu]9(297mg、55%)を得た。LC-MSシステム1:t<sub>R</sub>12.23分、m/z(ES<sup>+</sup>)実測値282.0599(M+H-Boc基)<sup>+</sup>。LC-MSシステム2:t<sub>R</sub>11.30分、m/z(ES<sup>+</sup>)実測値2580.2515(M+H)<sup>+</sup>。

## 【化40】

スキーム3



## 【0138】

(2R/S, 3S, 4S, 5R, 6S)-6-(2-((S)-44-((S)-3-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-2-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)プロパンアミド)-38,45-ジオキソ-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-ドデカオキサ-39,46-ジアザノナテトラコンタンアミド)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-sec-ブチル)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-ヒドロキシ-1-フェニルプロパン-2-イル)アミノ)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル)ピロリジン-1-イル)-2-オキソエチル)-5,8-ジイソプロピル-4,10-ジメチル-3,6,9-トリオキソ-2,13-ジオキサ-4,7,10-トリアザテトラデシル)フェノキシ)-3,4,5-トリヒドロキシテトラヒドロ-2H-ピラン-2-カルボン酸(10):MDpr(Boc)-OSu9(20mg、53μmol)を2.2mLの無水ジメチルホルムアミドに溶解し、H-Lys(PEG12)-グルクロニド-MMAEリンカー中間体7(86mg、44μmol)を入れたフラスコに加えた。次いで、ジイソプロピルエチルアミン(15μL、88μmol)を加え、次いで、反応物を室温の窒素下で2.5時間攪拌した。反応物を15μLの氷酢酸でクエンチし、分取HPLCにより精製し、ジアステレオマーの混合物としてMDpr(Boc)-Lys(PEG12)-グルクロニド-MMAE中間体10(37mg、40%)を得た。ジアステレオマーはキラルクロマトグラフィーによ

り分離可能であった。UPLC-MS:  $t_R$  1.84分、 $m/z$  ( $ES^+$ ) 実測値 2095.44 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

【0139】

(2R/S, 3S, 4S, 5R, 6S) - 6 - (2 - ((S) - 44 - ((R) - 3 - アミノ - 2 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) プロパンアミド) - 38, 45 - ジオキソ - 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35 - ドデカオキサ - 39, 46 - ジアザノナテトラコンタンアミド) - 4 - ((5S, 8S, 11S, 12R) - 11 - ((S) - sec - ブチル) - 12 - (2 - ((S) - 2 - ((1R, 2R) - 3 - ((1S, 2R) - 1 - ヒドロキシ - 1 - フェニルプロパン - 2 - イル) アミノ) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソプロピル) ピロリジン - 1 - イル) - 2 - オキソエチル) - 5, 8 - ジイソプロピル - 4, 10 - ジメチル - 3, 6, 9 - トリオキソ - 2, 13 - ジオキサ - 4, 7, 10 - トリアザテトラデシル) フェノキシ) - 3, 4, 5 - トリヒドロキシテトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - カルボン酸 (11): MDpr (Boc) - Lys (PEG12) - グルクロニド - MMAE 中間体 10 (34 mg、16  $\mu$ mol) を入れたフラスコを、窒素下の氷浴で 0 に冷却した。ジクロロメタン (0.8 mL) 中 10% トリフルオロ酢酸の溶液を滴下して加えた。次いで、反応物を 0 で 2 時間攪拌し、その時点で、LC-MS は完全な Boc 脱保護を明らかにした。次いで、反応物を粗残留物に濃縮し、分取 HPLC により精製し、MDpr - Lys (PEG12) - グルクロニド - MMAE リンカー 11 (22 mg、68%) を得た。UPLC-MS:  $t_R$  1.50分、 $m/z$  ( $ES^+$ ) 実測値 1995.18 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

【0140】

化合物 11 は、当該技術分野において既知の方法を使用して、抗体当たり 8 薬物の平均薬物負荷で、その鎖間チオールを介して抗 CD48 抗体と複合体化された (例えば、米国特許第 7,659,241 号を参照されたい)。

【0141】

実施例 4: 多発性骨髄腫細胞系に対する hMEM-102 ADC の細胞傷害性。

方法: ヒト多発性骨髄腫細胞系 EJM (DSMZ; IMDM + 20% FBS)、L363 (DSMZ; RPMI 1640 + 15% FBS)、MM.1R (ATCC; RPMI 1640 + 10% FBS)、NCI-H929 (ATCC; RPMI 1640 + 10% FBS)、U-266 (ATCC; RPMI 1640 + 15% FBS)、及び LP-1 (DSMZ; IMDM + 20% FBS) を 37、5% CO<sub>2</sub> で培養した。抗 CD48 アウリスチン抗体薬物複合体を、10 ポイント用量曲線 (1,000 ng/mL ~ 0.05081 ng/mL) をもたらすために、培地に 3 倍に系列希釈し、96 ウェルアッセイプレート (200  $\mu$ L の培地のウェル当たり 10,000 ~ 15,000 細胞) 中で培養された多発性骨髄腫細胞に適用した。ADC と共に、37、5% CO<sub>2</sub> で合計 96 時間、細胞をインキュベートした。Cell Titer Glo 発光細胞傷害性アッセイ (Promega) を使用して、細胞生存性をアッセイし、EnVision プレートリーダー (PerkinElmer) を使用してデータを収集した。全ての細胞傷害性アッセイは 4 つ組データ点で行われ、2 ~ 3 の独立した実験からの平均 IC<sub>50</sub> 値が報告される。

【0142】

アポトーシス細胞死は、上述と同一のアッセイ条件を使用して、Caspase-Glo 3/7 アッセイ (Promega) を使用して測定された。

【0143】

結果: 結果を表 2 に示す。hMEM102 抗体は、vcMMAE (4 - 負荷)、mcMMAF (4 - 負荷)、及び hMEM102-5088 (8) とともに称される、8 負荷として MDpr - PEG (12) - gluc - MMAE と複合体化された。類似する複合体化が対照抗体の非 CD48 結合抗体で行われた。hMEM102-5088 (8) は、vcMMAE (4) 及び mcMMAF (4) と複合体化された同じ抗体と比較したとき、改善された細胞傷害性活性を呈した。陰性対照として、CD48、LP-1 を発現しない細胞系

も含まれた。

【表 2】

表 2

抗体	薬物リンカー	薬物 負荷	多発性骨髄腫細胞系 (#CD48受容体/細胞)					
			EJM (135,000)	L363 (460,000)	MM.1R (336,000)	NCI-H929 (483,000)	U-266 (270,000)	LP-1 (0)
hMEM102	vcMMAE	4	8.7	36	12	13	6.0	>1000
hMEM102	mcMMAF	4	4.0	34	7.0	試験せず	3.0	>1000
hMEM102	MDpr- PEG(12)- gluc-MMAE	8	2.0	11	2.0	2.5	1.0	>1000
hMEM102	アウリスタチンT	8	1.0	15	1.7	1.5	1.0	>1000
hIgG	vcMMAE	4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	mcMMAF	4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	MDpr- PEG(12)- gluc-MMAE	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	アウリスタチンT	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

【0144】

アポトーシス細胞死に関して、NCI-H929及びU-266の2つの細胞系を評価した。結果を図5及び6に示す。両細胞系において、hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)複合体は、薬物への曝露数時間後にアポトーシス細胞死を誘導した。MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)と複合体化された対照抗体で処置された細胞において、アポトーシス死は見られなかった。図において、薬物リンカーは5088として言及され、抗体当たり8つの薬物リンカーが複合体化される。図5及び6の両方において、hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)複合体は塗りつぶされた四角で表され、一方対照抗体のMDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)複合体は白四角で表される。

【0145】

実施例5：インビボ多発性骨髄腫異種移植片研究

雌NSG(NOD scidガンマ;NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>t</sup>m1Wjl/SzJ)マウスに、動物当たり250万個のNCI-H929細胞を静脈内移植し、多発性骨髄腫の播種性モデルを生成した。腫瘍細胞移植5日後に、処置群当たりn=8マウスに、hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADCもしくは非結合対照hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADC、またはhMEM102-アウリスタチンT(4830)もしくは非結合対照hIgG-アウリスタチンT(4830)の単一腹腔内注射を行った。検査したADC用量レベルは、0.33mg/kg及び1.0mg/kgであった。進行した腫瘍負荷のマウスは、後肢麻痺、頭蓋腫大、及び/または瀕死の症状を示したときに屠殺した。図7に示されるように、両ADCは、全ての用量レベル(単一用量)の8/8マウスにおいて持続的な完全奏功をもたらし、一方、非結合対照ADC投薬マウスは、研究

の60日目までに、疾患により全て屠殺された。

【0146】

雌NSG (NOD scidガンマ; NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) マウスに、動物当たり100万個のNCI-H929多発性骨髄腫細胞を皮下移植した。平均腫瘍体積が100mm<sup>3</sup>に達したときに、処置群当たりn=7マウスに、hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADCもしくは非結合対照hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADC、またはhMEM102-アウリスタチンT(4830)もしくは非結合対照hIgG-アウリスタチンT(4830)、またはhMEM102-vcMMAE(1006)ADCもしくは非結合対照hIgG-vcMMAE(1006)の単一腹腔内注射を行った。検査したADC用量レベルは、0.33mg/kg及び1.0mg/kgであった。個々のマウスは、皮下NCI-H929腫瘍体積が1,000mm<sup>3</sup>に達したときに屠殺された。図8に示されるように、hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADCのは、1.0mg/kg用量レベルの全てのマウスにおいて持続的な完全奏功をもたらした。0.33mg/kgの低用量レベルで、hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)は腫瘍遅延をもたらした。vcMMAE及びアウリスタチンT ADCは、高用量でのみ腫瘍遅延を誘導した。

10

【0147】

雌NSG (NOD scidガンマ; NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) マウスに、動物当たり100万個のMM.1R細胞を静脈内移植し、多発性骨髄腫の播種性モデルを生成した。腫瘍細胞移植5日後に、処置群当たりn=7マウスに、hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADCもしくは非結合対照hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADC、またはhMEM102-アウリスタチンT(4830)もしくは非結合対照hIgG-アウリスタチンT(4830)の単一腹腔内注射を行った。検査したADC用量レベルは、1.0mg/kg及び3.0mg/kgであった。進行した腫瘍負荷のマウスは、後肢麻痺、頭蓋腫大、及び/または瀕死の症状を示したときに屠殺した。図9に示されるように、両ADCは、試験した全ての用量レベル(単一用量)のマウスにおいて持続的な完全奏功をもたらし、一方、非結合対照ADC投薬マウスは、研究の60日目までに、疾患により全て屠殺された。

20

30

【0148】

雌NSG (NOD scidガンマ; NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) マウスに、動物当たり500万個のMM.1R多発性骨髄腫細胞を皮下移植した。平均腫瘍体積が100mm<sup>3</sup>に達したときに、処置群当たりn=7マウスに、hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADCもしくは非結合対照hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADC、またはhMEM102-アウリスタチンT(4830)もしくは非結合対照hIgG-アウリスタチンT(4830)、またはhMEM102-vcMMAE(1006)ADCもしくは非結合対照hIgG-vcMMAE(1006)の単一腹腔内注射を行った。検査したADC用量レベルは、0.33mg/kg及び1.0mg/kgであった。個々のマウスは、皮下MM.1R腫瘍体積が1,000mm<sup>3</sup>に達したときに屠殺された。図10に示されるように、hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADCのは、最も強い抗腫瘍応答及び最も長い腫瘍遅延をもたらした。

40

【0149】

雌NSG (NOD scidガンマ; NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) マウスに、動物当たり500万個のEJM細胞を静脈内移植し、多発性骨髄腫の播種性モデルを生成した。腫瘍細胞移植5日後に、処置群当たりn=8マウスに、hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)A

50

DCもしくは非結合対照hIgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADC、またはhMEM102-アウリスタチンT(4830)もしくは非結合対照hIgG-アウリスタチンT(4830)の単一腹腔内注射を行った。検査したADC用量レベルは、0.33mg/kg及び1.0mg/kgであった。進行した腫瘍負荷のマウスは、後肢麻痺、頭蓋腫大、及び/または瀕死の症状を示したときに屠殺した。図11に示されるように、hMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADCのは、最も強い抗腫瘍応答、0.33mg/kgで6/8の完全奏功、及び1.0mg/kgで7/8の完全奏功をもたらした。非結合対照ADC投薬マウスは、研究の60日目までに、疾患により全て屠殺された。

【0150】

10

#### 実施例6：エフェクター機能

WIL2-S標的細胞の方法に関して、抗体依存細胞傷害性(ADCC)は、抗体コーティングされたCD48陽性標的細胞と組み合わせられた精製ナチュラルキラー(NK)細胞を使用して、クロム-51放出を通して測定された。WIL2-S腫瘍細胞をクロム-51で標識し、抗体(0.1ng/mL~10µg/mL)と共に30分間予めインキュベートした。次いで、標的細胞をNKエフェクター細胞(エフェクター/標的比10:1)と組み合わせ、37℃、5%CO<sub>2</sub>で更に4時間インキュベートした。次いで、上清中のクロム-51を、Perkin Elmer TopCountプレートリーダーで定量化した。ADCC活性は、1%トリトンX-100処置対照標的細胞に対する最大溶解のパーセントとして測定される。ADCCは、同じNK細胞エフェクター比及び上述の抗CD48抗体またはADC滴定範囲を使用して、正常なヒト休止T細胞(All Cells)に関してアッセイされたが、細胞膜を標識するために(クロム-51ではない)、PKH2緑色蛍光細胞リンカーキット(Sigma)が使用された。LSRIIFローサイトメトリー(Becton Dickinson)を使用して、フローサイトメトリーによりT細胞生存性を測定するために、7-AAD色素が使用された。

20

【0151】

補体依存性細胞傷害は、正常なヒトT細胞またはWIL2-S腫瘍細胞を、10%熱不活性化ヒトAB血清及び5µM Sytox緑色蛍光色素を含有するRPMI1640培養培地に系列希釈した抗体(0.02~50µg/mL)と共にインキュベートすることにより測定された。次いで、37℃、5%CO<sub>2</sub>で合計2時間、細胞をインキュベートした。溶解細胞からの蛍光がEnvisionプレートリーダーで測定された。標的細胞の最大比溶解は、1%トリトンX-100処置対照細胞のパーセントとして計算された。

30

【0152】

抗体依存性細胞食作用は、エフェクター細胞として単球由来マクロファージ及びPKH26赤色蛍光色素標識された正常なヒトT細胞(All Cells)、WIL2-S、またはラージ腫瘍細胞を使用して、測定された。標的細胞は、系列希釈された抗体(0.2ng/mL~2µg/mL)と共に30分間予めインキュベートされ、次いでリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄した。10%低IgGウシ胎仔血清を含有するRPMI1640培養培地中4:1の比率でマクロファージを標的細胞に加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>で2時間インキュベートした。次いで、マクロファージをAlexa Fluor(登録商標)-488複合体化マウス抗ヒトCD11b抗体で標識した。FACSCaliburフローサイトメーターで、緑色及び赤色の2重蛍光を示す事象として腫瘍細胞陽性マクロファージを検出した。最大比食作用活性は、非結合アイソタイプ対照背景活性を差し引いた後の腫瘍陽性マクロファージのパーセントとして提示される。

40

【0153】

結果：非複合体化hMEM102抗体及びhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADCのADCC活性が評価され、CAMPATH(登録商標)(アレムツズマブ、抗CD52抗体)及びリツキシマブ(抗CD20抗体)のADCC活性と比較された。表3に示されるように、ヒト化MEM102-HALA抗体は、正常な休止T細胞及びWIL2-S腫瘍細胞系に対して中程度のADCC活性を有す

50

る。ADCC活性は、5088複合体化時に大幅に低減され、裸抗体と比較して、T細胞において2.7倍低いADCC活性をもたらす。

【表3】

表3：ADCC

細胞型	最大%比細胞溶解						
	CD4 8受容 体#	CD5 2受容 体#	CD2 0受容 体#	hMEM1 02-- HALA	hMEM10 2-HALA- 5088	キャンパス (CD52)	リツキシマブ (CD20)
正常なヒトT細胞 (n=2)	38,900	115,200		65±3.1	24±4.4	60±3.5	
WIL2-5 (n=2)	359,558	34,200	502,700	43±0.6	17±1.0		42±6.0

10

【0154】

CDC活性の結果を表4に示す。非複合体化hMEM102抗体またはhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADCのいずれも正常な休止T細胞及びWIL2-S腫瘍細胞に対してCDC活性を呈さなかった。アレムツマブ及びリツキシマブの両方が標的細胞に対して実質的なCDC活性を呈した。

【表4】

表4：CDC

細胞型	最大%比細胞溶解						
	CD4 8受容 体#	CD5 2受容 体#	CD2 0受容 体#	hMEM1 02-- HALA	hMEM102- HALA- 5088	キャンパス (CD52)	リツキシマブ (CD20)
正常なヒトT細胞 (n=2)	38,900	115,200		2.4±0.6	1.9±2.7	108±5.2	
WIL2-5 (n=2)	359,558	34,200	502,700	0.9±0.2	1.4±0.9		66±1.4

20

30

【0155】

ADCPの結果を表5に示す。非複合体化hMEM102抗体及びhMEM102-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(5088)ADCの両方が正常な休止T細胞またはWIL2-S及びラージ腫瘍細胞系に対して中程度のADCP活性を呈し、キャンパス及びリツキシマブで観察されたレベルと一致した。



## 【表 5】

表 5 : ADCP

細胞型	最大%比細胞溶解						
	CD 4 8 受容 体 #	CD 5 2 受容 体 #	CD 2 0 受容 体 #	hMEM1 02-- HALA	hMEM10 2-HALA- 5088	キャンパス (CD 5 2)	リツキンマブ (CD 2 0)
正常なヒトT細胞 (n = 2)	38,900	115,200		56	54	57	
W I L 2 - 5 (n = 2)	359,558	34,200	502,700	62	60		56
ラージ	249,023 (24%)	29,200	394,100	37	34		57

10

本明細書に記載される実施例及び実施形態は単に図示の目的のためであり、それらの観点から様々な修正または変更が当業者に示唆され、本出願の趣旨及び範囲ならびに付属の特許請求の範囲の範囲内に含まれることを理解する。本明細書に引用される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、全ての目的において、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

## 非公式配列表

## 配列番号 1、hMEM102 HA - 重鎖可変領域

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

## 配列番号 2、hMEM102 LA - 軽鎖可変領域

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

30

## 配列番号 3、重鎖 CDR 1

D F G M N

## 配列番号 4、重鎖 CDR 2

W I N T F T G E P S Y G N V F K G

## 配列番号 5、重鎖 CDR 3

R H G N G N V F D S

40

## 配列番号 6、軽鎖 CDR 1

R A S Q S I G S N I H

## 配列番号 7、軽鎖 CDR 2

Y T S E S I S

## 配列番号 8、軽鎖 CDR 3

Q Q S N S W P L T

50

## 配列番号 9、hMEM102 HA H鎖 G1

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYTFITDFGMNWVRQA  
PGQGLEWMGWINTFTGEPSTYGNVFKGRFVFSLDTSVSTAY  
LQISSSLKAEDTAVYYCARRHGNGNVFDSWGQGTLLVTVSSA  
STKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY  
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP  
SVFLFPKPKDITLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL  
DSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS C SVMHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

10

## 配列番号 10、hMEM102 LA L鎖

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSNHWHYQQKP  
DQSPKLLIKYTSEISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEA  
EDAATYYCQQSNSWPLTFGGGTKEIKRTVAAPS VFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGEC

20

## 配列番号 11、天然に生じる重鎖定常領域

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT  
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
PSVFLFPKPKDITLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE  
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV  
LDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS C SVMHEALHNHYT  
QKSLSLSPG

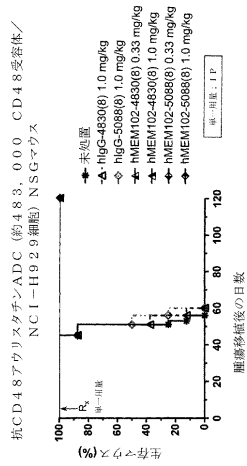
30

## 配列番号 12、軽鎖定常領域

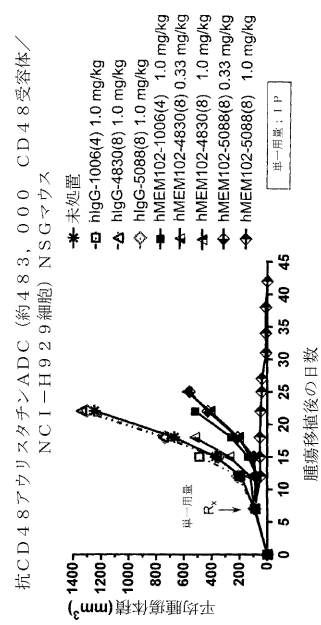
TVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW  
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK  
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC



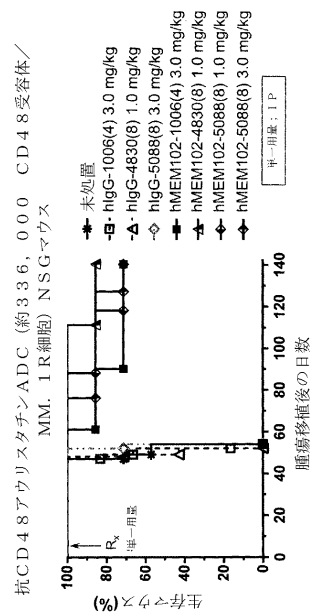
【図 7】



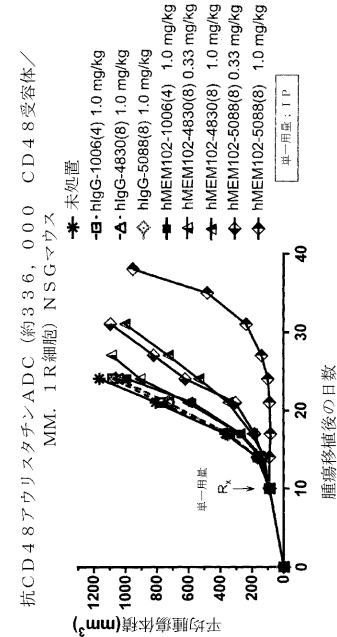
【図 8】



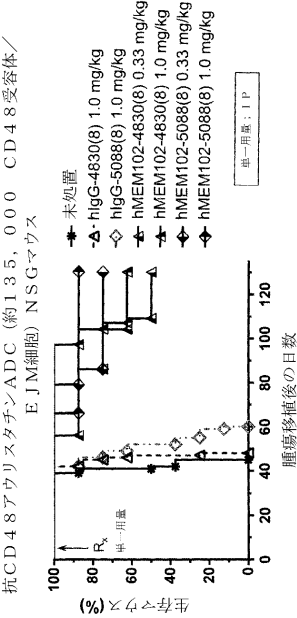
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【配列表】

0006892826000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	47/65	(2017.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
			A 6 1 P	35/02	

(72)発明者 ゴードン , クリスティーン  
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 2 1 , ボセル , 3 0 ティーエイチ ドライブ エスイー  
 2 1 8 2 3

(72)発明者 ウェステンドルフ , ローリ  
 アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 2 1 , ボセル , 3 0 ティーエイチ ドライブ エスイー  
 2 1 8 2 3

審査官 斉藤 貴子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 9 4 8 8 6 ( W O , A 1 )  
 特表 2 0 0 0 - 5 0 9 0 1 5 ( J P , A )  
 特表 2 0 0 9 - 5 0 1 8 0 0 ( J P , A )  
 特表 2 0 1 5 - 5 2 1 1 8 7 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
 C 0 7 K C 1 2 N A 6 1 K A 6 1 P  
 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 )  
 U n i P r o t / G e n e S e q