

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-521273

(P2021-521273A)

(43) 公表日 令和3年8月26日(2021.8.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 47/54 (2017.01)</b>	A 6 1 K 47/54	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 47/68 (2017.01)</b>	A 6 1 K 47/68	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	T
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)		

(21) 出願番号	特願2021-504577 (P2021-504577)	(71) 出願人	520394643 メディアファーマ エス.アール.エル. イタリア国、66100 キューティ、ヴ ィア デッラ コロンネッタ 50/エー
(86) (22) 出願日	平成31年4月12日 (2019.4.12)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(85) 翻訳文提出日	令和2年10月9日 (2020.10.9)	(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
(86) 国際出願番号	PCT/EP2019/059505	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(87) 国際公開番号	W02019/197651	(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
(87) 国際公開日	令和1年10月17日 (2019.10.17)	(74) 代理人	100174296 弁理士 菅麻 博文
(31) 優先権主張番号	18166980.5		
(32) 優先日	平成30年4月12日 (2018.4.12)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 LGALS3BP抗体-薬剤結合体及びがん治療のためのその使用

(57) 【要約】

本発明は、LGALS3BPを特異的に標的とする特別な型の非内在化結合部分 - 薬剤結合体に関する。一つの態様において、本発明は、LGALS3BPに結合することができる抗体を含む抗体 - 薬剤結合体に関し、前記抗体は、細胞毒性薬剤に結合している。本発明はまた、開示された薬剤結合体及び医薬品を患者に投与することを含む、LGALS3BPを発現するがんの治療方法を含む。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

式：B-D

の標的治療剤、又はその薬学的に許容される塩であって、ここで、  
Bはがん関連タンパク質に対して特異的な非内在化結合部分であり；及び  
Dは細胞毒性剤部分である、  
標的治療剤。

**【請求項 2】**

前記結合部分Bが抗体又は抗体断片ではない、請求項 1 に記載の標的治療剤。

**【請求項 3】**

前記がん関連タンパク質が分泌されたLGALS3BPである、請求項 1 又は 2 に記載の標的治療剤。

**【請求項 4】**

前記結合部分Bが、標的エンティティに結合するための 2 つ以上のリガンドを有する多価結合部分である、先行する請求項の何れか 1 項に記載の標的治療剤。

**【請求項 5】**

前記結合部分Bが、非内在化IgG又はscFv又はFab又はSIP又はダイアボディー等の非内在化抗体を含む、請求項 1 に記載の標的治療剤。

**【請求項 6】**

非内在化抗体がLGALS3BPに対して特異的である、請求項 5 に記載の標的治療剤。

**【請求項 7】**

前記細胞毒性剤部分Dが、チューブリン攪乱剤、例えばメイタンシノイド、特にDM1、DM3、及びDM4から選択される、先行する請求項の何れか 1 項に記載の標的治療剤。

**【請求項 8】**

非内在化結合部分Bが、リンカーを介して細胞毒性剤部分Dと結合する、先行する請求項の何れか 1 項に記載の治療剤。

**【請求項 9】**

前記リンカーがジスルフィド結合を介して前記剤部分と連結するためのシステイン基を含む、請求項 8 に記載の標的治療剤。

**【請求項 10】**

活性型の前記細胞毒性剤部分Dが、前記化合物中のリンカー又は前記結合部分B（抗体若しくは他のもの）とのジスルフィド結合を形成するためのチオール基を含む、先行する請求項の何れか 1 項に記載の標的治療剤。

**【請求項 11】**

皮下 A375腫瘍を有するbalb/c nu/nuマウスに前記剤を投与したときに、連続 5 日間に毎日又は週に 2 回、合計 5 回注射した後に、少なくとも 50 日間続く有意な腫瘍の減少を引き起こす、先行する請求項の何れか 1 項に記載の標的治療剤。

**【請求項 12】**

皮下SKNAS腫瘍を有するbalb/c nu/nuマウスに前記剤を投与したときに、週に 2 回、合計 4 回注射した後に、有意な腫瘍の減少を引き起こす、先行する請求項の何れか 1 項に記載の標的治療剤。

**【請求項 13】**

SKNAS細胞又はKelly細胞の静脈内注射に由来する転移を有するNSG免疫不全マウスに前記剤を投与したときに、週に 2 回、合計 3 回注射した後に、転移性沈着物の数と大きさの有意な縮小を引き起こす、先行する請求項の何れか 1 項に記載の標的治療剤。

**【請求項 14】**

腫瘍性疾患の治療における使用のための、好ましくは腫瘍の治療における使用のための、より好ましくは黒色腫又は神経芽細胞腫の治療における使用のための、先行する請求項の何れか 1 項に記載の標的治療剤。

**【請求項 15】**

10

20

30

40

50

腫瘍性疾患がLGALS3BPを発現する腫瘍である、請求項14に記載の使用のための標的治療剤。

【請求項16】

先行する請求項の何れか1項に記載の標的治療剤を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、LGALS3BPに結合可能な結合部分 - 薬剤結合体に関する。一つの態様において本発明は、LGALS3BPに結合可能な非内在化抗体を含む抗体 - 薬剤結合体に関し、前記抗体は細胞毒性薬剤と結合している。本発明はまた、LGALS3BPを発現するがんの治療のための治療方法及び前記抗体 - 薬剤結合体の使用を含む。

10

【背景技術】

【0002】

細胞毒性剤の使用は、がん及び他の病態の医学的治療の根底である。これらの薬剤は腫瘍部位に優先的に蓄積するが、一定量は健康な器官に到達し、細胞毒性の副作用を引き起こす。細胞毒性剤の選択性の欠如を回避又は制限する1つの可能な解決策は、これら薬剤を抗体に結合して、がん細胞型に高発現している、又は特異的に細胞表面に発現している標的抗原を特異的に認識する抗体薬剤結合体(ADC)を形成することである。残念ながら、ADCアプローチではいくつかの技術的な問題に直面している。ADCアプローチの第一の欠点は、その標的がADC結合時に内在化される標的に制限されることである。ADCの標的が細胞表面に存在していても、内在化が起こらない場合がある。これにより、ADCアプローチは細胞型特異的及び標的特異的となる。これをさらに複雑にするのは、標的が発現して内在化が発生するが、この内在化が薬剤抗体の解離が発生しない区画内にあり、薬物が無効となる場合である。

20

【0003】

ADCアプローチが直面するもう一つの問題は、細胞内に送達できる活性薬物量に関連する。一般に、細胞表面にある疾患特異的に異なる抗原結合部位のコピー数は少量であり、抗原(標的)結合を妨害することなく単一の抗体に結合できる薬物分子の数は比較的少ない(2から10の間であり、抗体あたりの平均数は4)。これら2つの要因により、非常に強力な(典型的には非常に毒性の強い)薬物を使用する場合にのみADCアプローチが実用可能となっていた。

30

【0004】

これらすべての制約を考慮すると、腫瘍学に適用できるADCが限られていること、すなわち、ゲムツズマブオゾガマイシン(マイロターゲット(登録商標))、ブレンツキシマブペドチン(アドセトリス(登録商標))、トラスツズマブエムタンシン(カドサイラ(商標))、及びイノツズマブオゾガマイシン(ベスペンサ(登録商標))のみが市販されていることは驚くべきことではない。したがって、これらの要件を回避し、及び/又は既存の方法の困難性と欠点を克服する、改良ADCが引き続き必要とされている。

【0005】

近年、がん細胞を死滅させる又は抑制するためにがん細胞に内在化する必要がないタイプのADCが研究されている。これら非内在化ADCは、腫瘍細胞を取り囲む間質(環境)の構成要素である抗原を標的とする。例として、エクストラドメインAを含むフィブロネクチンスプライシングバリエーションを標的とする抗体及びテネイシンCを標的とする抗体が挙げられる(REFS)。

40

【0006】

ヒトレクチンガラクトシド-結合可溶性3-結合タンパク質(LGALS3BP)は、本発明の標的抗原である。以前に記載された(国際公開番号2010/097825A1)マウス抗LGALS3BP(90Kとして知られる)は、ヒト化され1959と命名された。本発明において、抗体は、3つのシステインを3つのセリンで置換することによりさらに設計されている。得られたADCは、標的細胞に十分な細胞毒性薬剤を送達する能力を有し、革新的で効果的ながん治療法を提

50

供する。

【0007】

90K及びMac-2結合タンパク質としても知られるLGALS3BPは、約90 kDaのサブユニットから成る、高度にグリコシル化された大きなオリゴマーのヒトタンパク質である。このタンパク質は元来、ヒト乳がん細胞の馴化培地から単離された(1)。

【0008】

機能的には、LGALS3BPは、同型細胞接着及び細胞と細胞外マトリックス(ECM)への接着など、接着プロセスを仲介することが示されている(2)。近年、このタンパク質は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)による経路とは独立した経路を介して腫瘍の血管新生を刺激することが示されている(3)。

10

【0009】

ガレクチン(4)、インテグリン(5)、テトラスパニン(6)、ECMタンパク質コラーゲンIV、V及びVI、フィブロネクチン及びニドゲン(7)、エンドシアリン(8)並びにCD33関連シグレック(9)を含む、LGALS3BPのいくつかの内因性リガンドが同定されている。これらのリガンドのいくつかは、がん細胞の原形質膜の安定な成分である。例えば、テトラスパニンCD9/CD82ウェブ(web)とLGALS3BPの相互作用が、結腸直腸がんで起こることが報告されている(10)。また、ガレクチン-3及びガレクチン-1の膜残基とLGALS3BPとの相互作用が、近接する黒色腫細胞の同型凝集を促進することを示すデータが報告されている(11)。これらの相互作用の多くは、腫瘍の進行と転移の形成を引き起こす(2)。

20

【0010】

LGALS3BPは、乳がん、非小細胞肺癌、リンパ腫、胸膜中皮腫、黒色腫、膵臓がん、神経芽細胞腫を含む多くのヒトのがんにおいて増加することが知られている(9)、分泌タンパク質である。特に、腫瘍細胞は、LGALS3BPを大量に産生して分泌する。血清及び腫瘍組織の両方におけるLGALS3BPの上昇は、さまざまな種類の悪性腫瘍に罹患した患者における、生存期間の短縮、転移の発生、又は化学療法への応答性の低下に大きく関係している(2)。LGALS3BPを発現するがん罹患している患者の多くは予後不良である。

【0011】

SP-2と呼ばれるマウス型または1959と呼ばれるヒト化バリエーションにおける抗LGALS3BP抗体の阻害効果が調べられた。ヒトがんの成長と進行を阻害する、LGALS3BPの接着性と血管新生促進性を中和する非結合型抗体の使用に焦点が当てられている。しかし、本アプローチの主要な欠点の1つは、腫瘍の成長に対する抑制効果が部分的であることであった(12)。したがって、LGALS3BPを発現するがんの増殖を中和するためのより強力なアプローチの開発が本技術分野において望まれている。

30

【発明の概要】

【0012】

本発明は、LGALS3BPを標的とする特別なタイプの非内在化薬剤結合体、特にADCに関する。本結合体は、LGALS3BPを発現する腫瘍細胞に結合すると、LGALS3BP発現腫瘍細胞に細胞毒性効果を発揮して該細胞を死滅させる。

【0013】

さらに本発明は、LGALS3BP発現がん患者の治療のための方法を提供する。本方法は、一般的に、LGALS3BPに結合する抗体を含む有効量のADCを患者に投与することを含む。本抗体は細胞毒性剤である薬剤と結合体を形成しており、腫瘍細胞を死滅させる。

40

【0014】

ある実施形態において、本抗体は、LGALS3BPに対するモノクローナル抗体である。他の実施形態において、重鎖可変領域は、配列番号1に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有し、軽鎖可変領域は、配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有する。

【0015】

他の実施形態では、本抗体はヒト化抗体1959に由来し、ここで本抗体1959のヒンジ領域

50

の220、226及び229位のシステインはセリンで置換され、1959-sss抗体を形成する。

【0016】

例示的な実施形態では、抗体-薬剤結合体は、1959-sss-DM1、1959-sss-DM3、及び1959-sss-DM4である。

【0017】

本発明はさらに、上記ADC及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0018】

本発明はさらに、それを必要とする患者においてLGALS3BPを発現するがんを治療する方法を提供し、該方法は、上記ADCを前記患者に投与することを含む。

【0019】

本発明はさらに、LGALS3BPを発現するがんを治療する方法を提供し、ここで、前記がんは、結腸直腸がん、乳がん、膵臓がん、非小細胞肺癌、黒色腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、がん腫、黒色腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫およびリンパ腫からなる群から選択される。

10

【0020】

本発明はさらに、治療に使用するための上記抗体-薬剤結合体を提供する。本発明はさらに、医薬品の製造のための上記抗体-薬剤結合体の使用を提供する。

【0021】

本発明はさらに、上記の使用を提供し、ここで前記使用は、LGALS3BP発現がんの治療のためであり、前記がんは、結腸直腸がん、乳がん、膵臓がん、非小細胞肺癌、黒色腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、がん腫、黒色腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫およびリンパ腫からなる群から選択される。

20

【0022】

本発明はさらに、ヒト化抗体1959のヒンジ領域の220、226および229位のシステインがセリンで置換されている抗LGALS3BP抗体をコードする核酸を提供する。

【0023】

本発明はさらに、抗LGALS3BP抗体-薬剤結合体を製造する方法を提供し、(a)細胞培養物から回収された抗LGALS3BP抗体に細胞毒性薬剤を結合する工程、及び(c)抗体-薬剤結合体を精製する工程を含む。

【0024】

抗体薬剤結合体において、該抗体は、細胞毒性剤に直接又はリンカーを介して結合することができる。直接的な結合は、SH誘導体化ペイロード(payload)と抗体のシステイン残基の間のジスルフィド結合の形成を介してもよい。適切なリンカーとして、例えば、ジスルフィド結合を含むあるいは含まない、切断可能なリンカー及び切断不可能なリンカーが挙げられる。

30

【0025】

なおさらなる態様において、LGALS3BP発現がんの治療のための医薬組成物が提供される。前記医薬組成物は、抗体薬剤結合体と少なくとも1つの薬学的に適合する成分を含む。

【0026】

本発明は、本発明の以下の詳細な説明、本発明の特定の実施形態の非限定的な実施例及び添付の図面を参照することによって、より十分に理解されるであろう。

40

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】DTNBで誘導体化した抗体1959-sssの吸光度スペクトル。

【図2】未反応遊離DM3からの1959-sss-DM3複合体のG25カラム分離。

【図3】DM3と反応後の抗体1959-sssの吸光度スペクトル。

【図4】HPLCによる検量線の作成。

【図5a】TCEPによる還元後の1959-sss-DM3結合体からのDM3遊離のHPLC分析。

【図5b】TCEPによる還元後の1959-sss-DM3結合体からのDM3遊離のHPLC分析。

【図6】非結合1959-sssと1959-sss-DM3のHIC-HPLC分析。

50

【図7】ネイキッド1959-sss（上パネル）と結合型1959-sss-DM3（下パネル）のMALDIマ  
ススペクトロメトリー分析。

【図8】ネイキッド1959-sss（上パネル）と結合型1959-sss-DM3（下パネル）の軽鎖MALD  
Iマススペクトロメトリー分析。

【図9】TCEPによる還元後の1959-sssのMALDIマススペクトロメトリー分析。

【図10】1959-sss-DM3（上パネル）、TCEPで還元後の1959-sss-DM3（中央パネル）、ネ  
イキッド1959-sssのHICクロマトグラフィー。

【図11】非結合1959-sssと1959-sss-DM3の、LGALS3BPとの結合。

【図12】ヒト腫瘍細胞株におけるLGALS3BPの発現。

【図13a】ヒト黒色腫細胞膜のGal-3BP、CD63及びCD81の共局在性。1959-sssを単独で  
、あるいはCD63とCD81と組み合わせてインキュベートした後、抗ヒト蛍光標識IgG又は抗  
マウス蛍光標識IgGにより染色。LGALS3BPは、細胞膜でエクソソームマーカートンパク質  
と共局在する。染色は粒状であり、おそらくは分泌時にLGALS3BPによって引き起こされる  
凝集を示している。

10

【図13b】ヒト黒色腫細胞膜のGal-3BP、CD63及びCD81の共局在性。1959-sssを単独で  
、あるいはCD63とCD81と組み合わせてインキュベートした後、抗ヒト蛍光標識IgG又は抗  
マウス蛍光標識IgGにより染色。LGALS3BPは、細胞膜でエクソソームマーカートンパク質  
と共局在する。染色は粒状であり、おそらくは分泌時にLGALS3BPによって引き起こされる  
凝集を示している。

【図14】黒色腫の異種移植モデルにおける、1959-sss-DM1及び1959-sss-DM3の *in vivo*  
治療効果。

20

【図15】黒色腫の異種移植モデルにおける1959-sss-DM3及び1959-sss-DM4の *in vivo*治  
療効果。

【図16】黒色腫の異種移植モデルにおける1959-sss-DM3の用量反応。

【図17】神経芽細胞腫細胞によるLGALS3BP（Gal-3BP）の発現と分泌の評価。（A）RT-P  
CR、（B）ウエスタンブロット（C）ELISAを示す。

【図18】膜染色。1959抗体は、LGALS3BP陽性の膜においてLGALS3BPを特異的に染色する  
が、陰性の神経芽細胞腫細胞は染色しない。

【図19】神経芽細胞腫細胞におけるメイタンシン誘導体SH-DM3の活性。

【図20】1959-sss/DM3：神経芽細胞腫における治療活性は標的依存的である。（A）：S  
KNAS（Gal-3BP陽性）；ADC投与：4回投与、週2回、10 mg/kg。（B）：hNB（Gal-2BP陰性  
）；ADC投与：4回投与、週2回、10 mg/kg。（C）：*in vivo* 1959-sss/DM3蓄積。SKNAS（G  
al-3BP陽性）。

30

【図21】1959-sss/DM3：試験的転移神経芽細胞腫モデルにおける治療活性。（A）：試  
験的転移アッセイ。（B）：SKNAS神経芽細胞腫細胞モデルにおけるアッセイ。（C）：ケ  
リー神経芽細胞腫細胞モデルにおけるアッセイ。

【図22】マウス血清における1959-sss/DM3薬物動態試験の結果。

【0028】

ヒト化SP-2バリエーションは、記載のように、ヒト抗体フレームワークに移植したマウスの  
相補性決定領域（CDR）を特定することによって作製した（13、14）。

40

【0029】

マウスSP2抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SP2抗体を産生する  
ハイブリドーマ細胞株のcDNAシーケンシングにより決定された。VL及びVHの相補性決定  
領域（CDR）を特定し、ヒトIgGフレームワークに融合した。ヒト化HCとLC 1959抗体のア  
ミノ酸配列は、それぞれ配列番号9及び配列番号10に示す。下線はCDRを示す。HC 1959-ss  
sのアミノ酸配列は、配列番号11に示す。下線はCDRを示し、イタリック体の太字の残基は  
システイン セリン置換を示す。

【0030】

配列番号11

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSISSGYWTWIRQPPGKGLEWIGYITYDGKNNYSPSLKNRVTISVDTSKNQFS

50

LKLSSVTAADTAVYYCAREGSSVITGFTFWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTSPSPAPPELLG  
GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT

【発明を実施するための形態】

【0031】

本明細書に記載の方法および組成物は、(a) LGALS3BPを特異的に標的とし、(b) LGALS3BPを発現するがん細胞を死滅させる、非内在化ADC又は誘導体の使用を包含する。本明細書中で使用される用語「誘導体」は、抗LGALS3BP抗体との関連において、(i) 抗LGALS3BP抗体の抗原結合領域、又はそれに由来する領域（例えば、保存的置換により）、及び抗LGALS3BP抗体と異種の少なくとも1つのポリペプチド領域又はその他の部分を有し、並びに、(ii) 抗原結合領域又はそれに由来する領域を介してLGALS3BPに特異的に結合する分子を言う。特定の実施形態では、抗LGALS3BP抗体は、抗体1959若しくは1959-sss又はその誘導体である。

10

【0032】

典型的な実施形態において、抗LGALS3BP抗体又はその誘導体は、細胞毒性剤に結合すると、LGALS3BP発現がん細胞を死滅させる。

本組成物および方法に従って使用するために適した抗LGALS3BP抗体は、典型的にはモノクローナルであり、例えば、キメラ（例えば、ヒト定常領域およびマウス可変領域を有する）、ヒト化、又はヒト抗体；一本鎖抗体；などを含むことができる。免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子のいかなる型（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）、又はサブクラスであってもよい。

20

【0033】

特定の実施形態において、抗体は、例えば抗原結合抗体フラグメントであり、例えば、Fab、F(ab')、F(ab')<sub>2</sub>、Fd鎖、単鎖Fv(scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、V<sub>L</sub>又はV<sub>H</sub>ドメインのいずれかを含むフラグメント、Fab発現ライブラリーによって生成されたフラグメント、又は上記の抗体のいずれかのLGALS3BP結合フラグメントである。一本鎖抗体を含む抗原結合抗体フラグメントは、可変領域を単独で、又は下記：ヒンジ領域、CH1、CH2、CH3及びCLドメインの全体若しくは一部と組み合わせて含むことができる。

30

また、抗原結合フラグメントは、可変領域と、ヒンジ領域、CH1、CH2、CH3、及びCLドメインの任意の組み合わせを含むことができる。典型的には、抗体は、ヒト、げっ歯類（例えば、マウスとラット）、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ類、ウマ、又はニワトリである。本明細書中で使用される「ヒト」抗体は、下記と例えば米国特許番号5,939,598と6,111,166において記載される、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、及び、ヒト免疫グロブリンライブラリーから、ヒトB細胞から、又は1つ以上のヒト免疫グロブリンについて形質転換された動物から単離された抗体を含む。

【0034】

抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、又はそれ以上の多重特異性のものであってもよい。多重特異性の抗体は、LGALS3BPの種々のエピトープに特異的であってもよく、又はLGALS3BPと異種タンパク質の両方に対して特異的であってもよい（15、16、17、18、19、20）。

40

【0035】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントを作製する技術もまた、当該技術分野において一般的に知られている。例えば、FabとF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、パバイン（Fabフラグメントを生成するために）又はペプシン（F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを生成するために）などの酵素を用いて、免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断により作製することができる。F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域、及び重鎖のCH1ドメインを含む。例えばPCT公開公報の中に開示される方法を用いて、組換えによってFab、Fab'及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを作製する技術を使用することができる（21、22、23、24）。

50

## 【0036】

一本鎖Fvと抗体を作製するために使用できる技術の例には、25、26、27、28、29に記載されているものが含まれる。

## 【0037】

特定の実施形態において、抗LGALS3BP抗体はキメラ抗体である。キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する可変領域及びヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体などである。キメラ抗体を作製する方法は当該技術分野で知られている（30、31、32、33、34、35）。

## 【0038】

抗LGALS3BP抗体はまた、ヒト化抗体であってもよい。ヒト化抗体は、所望の抗原に結合し、非ヒト種由来の1つ以上のCDR及びヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワークと定常領域を有する抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体由来の対応する残基によって置換され、抗原結合を変更、好ましくは改善することができる。これらのフレームワーク置換は、当該技術分野で周知の方法、例えば、CDRとフレームワーク残基の相互作用をモデリングして抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定し、配列比較によって特定の位置の異常なフレームワーク残基を特定する方法によって同定される（36、37）。例えば、CDRグラフティング（38、39、40、41、42）；ペニアリング又はリサーフェシング（43、44、45、46、47）、及びチェーンシャッフリング（48）を含む、当該技術分野で知られている様々な技術を用いて、抗体をヒト化することができる。

## 【0039】

さらに他の実施形態において、抗LGALS3BP抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、例えば、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いたファージディスプレイ法（上記参照）を含む、当該技術分野で公知の様々な方法によって作製することができる（49、50、51、52、53、54、55、56、57）。加えて、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体を用いて、同じエピトープを認識する、完全なヒト抗体の選択を誘導する「誘導選択（guided selection）」と呼ばれる技術を使用して、選択されたエピトープを認識するヒト抗体を作製することができる（58）。ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する形質転換マウスを使用して、ヒト抗体を作製することもできる。抗原に対するモノクローナル抗体を、従来のハイブリドーマ技術を使用して、免疫化した形質転換マウスから得ることができる。ヒト抗体を作製するための本技術の概要については、参考文献（59）を参照されたい。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を作製するための技術、並びにこのような抗体を作製するためのプロトコルの詳細な議論については、参考文献53、60、55、56、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71を参照されたい。加えて、Abgenix社（フリーモント、カリフォルニア州）やMedarex社（プリンストン、ニュージャージー州）などの企業は、上記と同様の技術を使用して、選択された抗原に対するヒト抗体を提供することができる。

## 【0040】

上記記載の通り、抗LGALS3BP抗体の誘導体はまた、本方法の実施に際して使用することができる。一般的に、抗LGALS3BP抗体の誘導体は、抗LGALS3BP抗体（例えば、抗原結合フラグメント又は保存的に置換されたポリペプチドを含む）、及び抗LGALS3BP抗体に対して異種の少なくとも1つのポリペプチド領域又は他の部分を含む。一例として、抗LGALS3BP抗体を、例えば、任意のタイプの分子と共有結合することにより改変し、それによって、抗体誘導体が、抗原結合領域やそれに由来する領域を介してLGALS3BPに特異的に結合することができる、あるいは、結合薬剤が（a）LGALS3BPを発現するがん細胞に細胞増殖抑制効果または細胞毒性効果を及ぼすことができる。典型的な改変には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドや他のタンパク質への結合などが含まれる。限定されるものではないが、特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などの、多数の化学修飾の方法が既知の技術によって実施され得る。加えて

、本誘導体は、1つ以上の非古典的なアミノ酸を有してもよい。

【0041】

ある実施形態において、抗体誘導体は、例えば二量体などの、一以上の単量体を含む多量体であり、ここで各単量体は、(i)抗LGALS3BP抗体の抗原結合領域、又はそれに由来するポリペプチド領域(例えば、1つまたは複数のアミノ酸の保存的置換などによる)、及び

(ii)多量体化(例えば、二量体化)ポリペプチド領域を含んでもよく、その結果、抗体誘導体は、LGALS3BPに特異的に結合する多量体(例えば、ホモ二量体)を形成することができる。典型的な実施形態において、抗LGALS3BP抗体の抗原結合領域、又はそれに由来するポリペプチド領域は、組換えにより又は化学的に異種タンパク質と融合し、本異種タンパク質は二量体化または多量体化ドメインを含む。本抗体誘導体をホモ二量体またはヘテロ二量体の形成を可能にする状態に供した後、LGALS3BPを発現するがんを治療または予防する目的で、本抗体誘導体を被験体に投与する。本明細書で使用されるヘテロダイマーは、異なるLGALS3BP抗原結合領域を有する同一の二量体化ドメイン、同一のLGALS3BP抗原結合領域を有する異なる二量体化ドメイン、又は異なるLGALS3BP抗原結合領域及と二量体化ドメインを含んでもよい。

10

【0042】

さらに他の実施形態において、二量体化ドメインは、例えば、重鎖定常領域又はそのドメイン(例えば、CH1ドメイン、CH2ドメイン、又はCH3ドメイン)などの免疫グロブリン定常領域である(72、73、74、75、76、77)。

20

【0043】

他の実施形態において、抗LGALS3BP抗体誘導体は、二次抗体に結合した抗LGALS3BP抗体(「抗体ヘテロ複合体」)である(78)。本方法を実施するために有用なヘテロ複合体は、LGALS3BPに結合する抗体を含み、ここで当該抗体は、例えば、モノクローナル抗体1959又は1959-sssの重鎖及び/又はCDRを有する抗体、並びに、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、TNF受容体スーパーファミリーメンバー、インテグリン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、主要組織適合性タンパク質、レクチン(C型、S型、I型)、又は補体制御タンパク質などの表面受容体又は受容体複合体に結合する抗体であってもよい。

【0044】

LGALS3BPとの特異的結合について、抗体を様々な既知の方法のいずれかによりアッセイすることができる。使用可能なイムノアッセイは、例えば、ほんの数例を挙げれば、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイなどの技術を用いた、競合及び非競合的なアッセイシステムを含む。このようなアッセイは常法であり、当該技術分野でよく知られている(79、80)。

30

【0045】

本発明の特に好ましい態様によれば、抗LGALS3BP抗体は抗体1959である。したがって、好適な抗LGALS3BP抗体は、配列番号9に示されるような重鎖アミノ酸配列と、配列番号10に示されるような軽鎖アミノ酸を含む。さらに好適な抗LGALS3BP抗体は、1959の少なくとも重鎖と軽鎖の可変領域を含む。重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号1に示される通りであり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号2に示される。他の実施形態において、抗LGALS3BP抗体は、配列番号1に示されるアミノ酸配列と、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び、配列番号2に示されるアミノ酸配列と、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。さらに好適な抗LGALS3BP抗体は、抗体1959の6つのCDR配列を含むものとして特徴付けられる。重鎖のCDR配列は、配列番号3に示されるCDRH1、配列番号4に示されるCDRH2及び配列番号5に示されるCDRH3である。軽鎖のCDR配列は、配列番号6に示されるCDRL1、配列番号7に示されるCDRL2、及び配列番号8に示されるCDR

40

50

L3である。

【 0 0 4 6 】

別の好適な実施形態において、抗LGALS3BP抗体は、抗体1959-sssである。抗体1959-sssにおいて、ヒト化抗体1959のヒンジ領域の220、226、229位のシステインがセリンで置換されている。1959-sssの重鎖アミノ酸配列を配列番号11に示す。したがって、好適な抗LGALS3BP抗体は、配列番号11に示されるような重鎖アミノ酸配列と、配列番号10に示されるような軽鎖アミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 7 】

別の実施形態において、腫瘍細胞からひとたび分泌されたLGALS3BPは原形質膜の近くに留まり、そこでいくつかの膜関連LGALS3BP内因性リガンドと結合してもよい。

10

【 0 0 4 8 】

さらなる実施形態において、抗LGALS3BP抗体又はその誘導体は、LGALS3BPを発現し、分泌をする腫瘍細胞を標的とすることができる。

【 0 0 4 9 】

本方法において有用な抗LGALS3BP抗体およびその誘導体は、当該技術分野で公知のタンパク質の合成のための任意の方法によって、典型的には、例えば組換え発現技術によって作製することができる。例えば、抗LGALS3BP抗体の組換え発現のために、発現ベクターは、プロモーターに作動可能に連結された、その重鎖若しくは軽鎖、又は重鎖若しくは軽鎖の可変ドメインをコードしてもよい。発現ベクターは、例えば、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでもよく（81、82、83）、そして重鎖又は軽鎖全体を発現するために、抗体の可変ドメインを当該ベクターにクローニングしてもよい。従来技術により発現ベクターを宿主細胞に移し、遺伝子導入した細胞を従来技術により培養し、抗LGALS3BP抗体を作製した。二本鎖抗体の発現のための典型的な実施形態において、重鎖と軽鎖の両方をコードするベクターを、免疫グロブリン分子全体の発現のために、宿主細胞で同時発現させてもよい。

20

【 0 0 5 0 】

様々な原核生物及び真核生物の宿主発現ベクター系を使用して、抗LGALS3BP抗体又はその誘導体を発現させることができる。典型的には、特に組換え抗LGALS3BP抗体分子全体を発現させるために、真核細胞が組換えタンパク質の発現に使用される。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターと組み合わせた、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）などの哺乳動物細胞は、抗LGALS3BP抗体及びその誘導体の作製に有効な発現系である（84、85）。

30

【 0 0 5 1 】

典型的には、組換え抗LGALS3BP抗体又はその誘導体の、長期間で高収率の産生のために、安定した発現系が使用される。例えば、抗LGALS3BP抗体又はその誘導体を安定的に発現する細胞株において、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位）により制御されるDNAと選抜マーカーを用いて宿主細胞を形質転換し、その後選抜培地で当該形質転換細胞を増殖させることができる。選抜マーカーによって細胞は選抜に対する耐性を獲得し、細胞内の染色体に当該DNAが安定的に組み込まれた後増殖し、クローン化、細胞株への拡大を可能とする。例えば、ヘルペスシンプレックスウイルスチミジンキナーゼ、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む、多くの選抜システムが使用可能であり、これらはそれぞれtk-、hgprt-、又はaprt-細胞において使用することができる。また、代謝拮抗薬耐性は、以下の遺伝子；メトトレキサートに対する耐性を与えるdhfr、ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt、アミノグリコシドG-418に対する耐性を与えるneo、及びハイグロマイシンに耐性を与えるhygro遺伝子の選抜に使用することができる。組換えDNA技術の分野で一般的に知られている方法を、所望の組換えクローンの選抜のために常法として適用することができ、このような方法は、例えば、86、87、88、89に記載される。

40

【 0 0 5 2 】

50

抗体又は誘導体の発現量は、ベクターを増幅することにより増加させることができる(90)。抗LGALS3BP抗体またはその誘導体を発現するベクターシステムのマーカが増幅可能な場合、宿主細胞の培養培地に存在する阻害剤の量が増加すると、当該阻害剤に耐性を付与するマーカ遺伝子のコピー数が増加した宿主細胞が選抜される。関連する抗体遺伝子のコピー数もまた増加し、それにより抗体又はその誘導体の発現量が増加する(91)。

#### 【0053】

抗LGALS3BP抗体が重鎖と軽鎖の両方又はそれらの誘導体を含む場合、宿主細胞は、重鎖タンパク質をコードする第1のベクターと軽鎖タンパク質をコードする第2のベクターの、2つの発現ベクターによって同時に遺伝子導入されてもよい。この2つのベクターは、重鎖と軽鎖タンパク質を同等に発現させる同一の選抜マーカを含んでもよい。あるいは、重鎖と軽鎖タンパク質の両方をコードし、かつ発現することができる単一のベクターを使用してもよい。このような場合、有毒な遊離の重鎖が過剰にならないように、軽鎖は通常重鎖の前に配置される(92、93)。重鎖と軽鎖のコード配列は、cDNA又はゲノムDNAを含んでもよい。

#### 【0054】

抗LGALS3BP抗体又はその誘導体が作製されると(例えば、動物、化学合成、又は組換え発現により)、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換やアフィニティークロマトグラフィー(例えば、完全なFc領域を有する抗体の精製のためのプロテインAクロマトグラフィーのような))、遠心分離、溶解度差などのタンパク質の精製の方法を適宜選択することによって、あるいは、タンパク質の精製のための他の任意の標準的な技術を用いることによって、精製することができる。抗LGALS3BP抗体またはその誘導体は、例えば、ペプチドなどのマーカ配列と融合することによって、アフィニティークロマトグラフィーにより容易に精製することができる。利用可能なマーカアミノ酸配列として、例えば、ヘキサヒスチジンペプチド、pQEベクター(QIAGEN社、9259 Eton Avenue、Chatsworth、CA、91311)で提供されるようなタグ、インフルエンザヘマゲグルチニンタンパク質に由来するエピトープに対応する「HA」タグ(94)、及び「フラグ」タグを含んでもよい。

#### 【0055】

##### 抗LGALS3BP抗体 - 薬剤結合体の構築

LGALS3BPを発現するがんの治療に有用な組成物は、抗LGALS3BP抗体-薬剤結合体(ADC)又は抗LGALS3BP ADC誘導体を含む。本明細書で使用される「抗LGALS3BP ADC」とは、治療剤に結合した抗LGALS3BP抗体を言う。本明細書で使用される「抗LGALS3BP誘導体ADC」とは、治療剤に結合した抗LGALS3BP抗体の誘導体を言う。ある実施形態において、ADCは、抗LGALS3BP抗体(例えば、1959抗体若しくはそのフラグメント、又はその誘導体)を含む。本明細書に記載されるADC又はADC誘導体は、LGALS3BPを発現するがんの患者に、典型的には単独で、また他の治療剤と組み合わせて投与された場合、LGALS3BPを発現する細胞に臨床的に有益な効果をもたらす。

#### 【0056】

典型的な実施形態において、抗LGALS3BP抗体又はその誘導体を細胞毒性剤と結合させ、その結果得られるADC又はADC誘導体は、LGALS3BPを発現するがん細胞に対して殺傷効果を奏する。抗体又は抗体誘導体との結合に特に適した部分は、化学療法剤、プロドラッグ変換酵素、放射性同位元素若しくは化合物、又は毒素である。例えば、抗LGALS3BP抗体又はその誘導体は、化学療法剤又は又は毒素(例えば、アプリン、リシンA、シュードモナス外毒素、又はジフテリア毒素などの細胞増殖抑制剤や細胞破壊剤)などの細胞毒性剤に結合させることができる。抗LGALS3BP分子との結合に有用な追加の薬剤の例は、以下に示される。

#### 【0057】

治療剤をタンパク質と、特に抗体と結合させるための技術はよく知られてる(95、96、97、98、99、100)。

#### 【0058】

本明細書に記載の方法によると、抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体は内在化することなく

10

20

30

40

50

、むしろLGALS3BP発現細胞の表面の細胞外に蓄積する。

【 0 0 5 9 】

他の実施形態において、抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体は内在化することなく、治療剤が細胞膜でLGALS3BP発現細胞に結合するのに有効である。さらに他の実施形態において、還元性環境である細胞外環境のため、薬剤はADCから放出されてがん細胞の内部に拡散し、それを死滅させる。

【 0 0 6 0 】

LGALS3BPを発現するがん細胞の外で治療剤の活性を最大化するために、LGALS3BPに特異的に結合する1959抗体を使用することができる。LGALS3BPは継続的に分泌され、細胞膜の近くに留まるため、治療剤はLGALS3BPを発現するがん細胞の細胞表面で濃縮される。より典型的な実施形態において、治療剤の結合様式は、ジスルフィド結合の還元によって抗体から切断されたときにその活性を示す。そのような実施形態において、腫瘍細胞の外的環境における還元条件に感受性のジスルフィド結合によって、治療剤は抗体に結合している。

10

【 0 0 6 1 】

細胞毒性剤

適切な細胞毒性剤は、例えば、オーリスタチン、DNA副溝結合剤、DNA副溝アルキル化剤、エンジン、レキシトロブシン、デュオカルマイシン、タキサン、ピューロマイシン、ドラスタチン、メイタンシノイド、及びピンカアルカロイドであってもよい。特定の実施形態において、薬剤は細胞毒性剤であり、DM1、DM3、DM4、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB、オーリスタチンE、パクリタキセル、ドセタキセル、CC-1065、SN-38、トポテカン、モルホリノドキシソルピシン、リゾキシシン、シアノモルホリノドキシソルピシン、ドラスタチン-10、エキノマイシン、コンプレタスタチン、カリキアマイシン、メイタンシン、DM-1、又はネトロブシンである。他の適した細胞毒性剤には、オーリスタチン、ピンカアルカロイド、ポドフィロトキシシン、タキサン、バッカチン誘導体、クリプトフィジン、メイタンシノイド、コンプレタスタチン、またはドラスタチンなどの抗チューブリン剤が含まれる。特定の実施形態において、抗チューブリン剤は、メイタンシノイドDM1、DM3、及びDM4である。

20

【 0 0 6 2 】

特定の実施形態において、治療剤は<sup>131</sup>ヨウ素を含むラジオアイソトープである。

30

【 0 0 6 3 】

他のLGALS3BP - 標的化部分とタンパク質 - 薬剤結合体

上記の通り、他の実施形態において、LGALS3BP - 標的化部分は、本明細書に記載の方法に従って使用できる抗体である必要はない。従って、LGALS3BP - 標的化部分は、LGALS3BPに結合する抗体に由来する1以上のCDRを含み、細胞毒性剤に結合した場合には腫瘍細胞を死滅させることができる。典型的にはタンパク質は多量体であり、最も典型的には二量体である。

【 0 0 6 4 】

さらに、本明細書で提供される方法に従って使用できるLGALS3BP - 結合タンパク質は、融合タンパク質、すなわち、(典型的には少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90又は少なくとも100アミノ酸の)異種タンパク質に、組換えにより融合した又は化学的に結合した(共有結合及び非共有結合の両方を含む)タンパク質を含む。この融合は、必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して行ってもよい。

40

【 0 0 6 5 】

例えば、本発明の方法において使用できるLGALS3BP - 標的化部分は、抗LGALS3BP抗体の1つ以上のCDRのコード領域を、異種タンパク質をコードする配列とインフレームで融合することによって、組換えにより作製することができる。異種タンパク質は、治療における利点の付与、安定的発現の促進、組換え発現の高収率化の手段、及び/又は多量化ドメインの提供、の1つ以上の特性を提供することができる。

【 0 0 6 6 】

50

本発明との関連において、抗体を含まないが、LGALS3BP結合部分を含む別のタイプの結合体もまた「ADC」と呼ばれる。従って、用語「ADC」は、抗体が含まれるものに限定されるとみなされるべきではなく、特に明記しない限り、抗体又は他の結合部分を含むことができる結合体も、前記用語に含まれる。

【0067】

抗LGALS3BP ADC及びADC誘導体を含む医薬組成物並びにその投与

本発明の方法に従って、本明細書に記載の抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体を含む組成物は、LGALS3BP発現がんを有する被験体に投与される。本明細書で使用される用語「被験体」は、ヒト及び非ヒト哺乳動物、例えば霊長類、げっ歯類、及びイヌなどを含む、LGALS3BP - 結合タンパク質 - 薬剤結合体が投与され得る任意の哺乳動物患者を意味する。本明細書に記載の方法を用いて治療を特に意図する被験体には、ヒトが含まれる。ADC又はADC誘導体は、LGALS3BPを発現するがんの予防または治療において、単独で又は他の組成物と組み合わせて投与することができる。

10

【0068】

様々な送達システムが知られており、抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体を投与するために使用することができる。導入方法には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、及び経口経路が含まれるが、これらに限定されない。ADC又はADC誘導体は、例えば、点滴又はボラス注射によって、上皮又は粘膜皮膚内層（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜など）を介した吸収によって投与することができ、化学療法剤などの他の生物学的に活性な薬剤と共に投与することができる。投与は全身的又は局所的であってもよい。

20

【0069】

特定の実施形態において、抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体組成物は、注射により、カテーテルの手段により、座薬の手段により、又はインプラントの手段により投与され、インプラントは、多孔性、非多孔性、又はゼラチン状であり、シラスティックメンブレンなどの膜、又はファイバーを含む。典型的には、本組成物を投与する際には、ADC又はADC誘導体が吸着しない材料が使用される。

【0070】

他の実施形態において、ADC又はADC誘導体は放出制御システムで送達される。一つの実施形態において、ポンプを使用してもよい（101、102、103、104）。他の実施形態において、ポリマー性材料を使用してもよい（105、106、107、108、109、110）。他の放出制御システムは、例えば、上記のLangerの中で議論されている。

30

【0071】

抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体は、治療有効量のADC又はADC誘導体、及び1つ以上の薬学的に適合性のある成分を含む医薬組成物として投与される。例えば、医薬組成物は、典型的には、1つ以上の医薬担体（例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などの石油、動物、植物、又は合成由来のものを含む、水及び油などの滅菌された液体など）を含む。医薬組成物が静脈内投与される場合、水はより典型的な担体である。生理食塩水並びにデキストロース及びグリセロール水溶液も、特に注射可能な溶液として、液体担体として使用することができる。適した医薬賦形剤には、例えば、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。組成物は、必要に応じて、少量の湿潤剤、乳化剤、又はpH緩衝剤を含んでもよい。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳剤、錠剤、丸薬、カプセル、粉末、徐放性製剤などの形態をとることができる。組成物は、トリグリセリドなどの従来の担体及び結合剤と共に、座薬として処方することができる。経口製剤は、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含んでもよい。適した医薬担体の例は、参考文献111に記載される。本組成物は、患者に適切に投与するための形態を提供するために、治療有効量の核酸またはタンパク質を、典型的には精製された形態で、適切な量の担体と共に含み得る

40

50

。製剤は投与方法に対応している。

【0072】

典型的な実施形態において、医薬組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した医薬組成物として通常の手順に従って処方される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌された等張の水性緩衝液中の溶液である。必要に応じて、医薬品には、注射部位の痛みを和らげるために、リグノカインなどの局所麻酔薬や可溶化剤を含んでもよい。一般に、成分は、別々に供給されるか又は単位剤形で一緒に混合され、例えば、活性剤の量を示すサシット又はアンプルなどの、密閉容器内の乾燥凍結粉末又は水を含まない濃縮物として供給される。医薬品が点滴によって投与される場合、滅菌医薬品グレードの水又は生理食塩水を含む点滴ボトルを使用してもよい。医薬品が注射によって投与される場合、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルを使用して、投与前に成分を混合できるようにすることができる。

10

【0073】

特定の実施形態において、抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体を含む医薬組成物は、第2の治療剤（例えば、第2のADC、ADC誘導体、非結合性細胞毒性剤、又は免疫抑制剤など、例えば本明細書に記載の任意のもの）をさらに含み得る。LGALS3BPを発現するがんの治療に有効なADC又はADC誘導体の量は、標準的な臨床技術によって決定することができる。加えて、最適な投与量範囲を特定するために、任意にインビトロアッセイを使用してもよい。製剤に使用する正確な用量はまた、投与経路やLGALS3BPを発現するがんのステージに依存し、開業医の判断や患者それぞれの状態に応じて決定する必要がある。有効量は、*in vitro*試験又は動物モデル試験から得られた用量反応曲線から推定することができる。

20

【0074】

例えば、ADC又はADC誘導体の毒性及び治療効果は、LD<sub>50</sub>（50%致死量）やED<sub>50</sub>（50%治療有効量）を決定するための標準的な製薬的手段によって、細胞培養や実験動物によって決定することができる。毒性効果と治療効果の用量比は治療指数であり、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>比として表すことができる。大きな治療指数を示すADC又はADC誘導体が好ましい。ADC又はADC誘導体が毒性の副作用を示す場合、影響を受けた組織の部位にADC又はADC誘導体を標的化する送達システムを使用することにより、LGALS3BPを発現しない細胞への損傷の可能性を最小限に抑え、それによって副作用を減らすことができる。

30

【0075】

動物実験で得られたデータは、ヒトに使用する際の投与量の範囲を決める際に用いることができる。抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体の投与量の血中濃度は、典型的には、毒性がほとんどないか又は全くないED<sub>50</sub>を含む範囲内である。投与量は、使用される剤形や採用される投与経路に応じて、この範囲内で変動してもよい。本方法で使用されるADC又はADC誘導体の治療上の有効量は、まず細胞培養アッセイから推定され得る。細胞培養で決定されたIC<sub>50</sub>（すなわち、症状の50%を抑制する試験化合物の濃度）を含む血中血漿濃度範囲に到達するように、動物モデルで用量を決めることができる。これらの情報は、人間における有効量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中の量は、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

40

【0076】

一般的に、LGALS3BPを発現するがんの患者に投与される抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体の投与量は、典型的には、対象の体重の0.1mg/kgから100mg/kgである。より典型的には、対象に投与される投与量は、対象の体重の0.1mg/kgから50mg/kgであり、さらにより典型的には、対象の体重の1mg/kgから30mg/kg、1mg/kgから20mg/kg、1mg/kgから15mg/kg、又は1mg/kgから10mg/kgである。一般的に、ヒト又はヒト化抗体は、外来タンパク質に対する免疫応答のために、他の種からの抗体よりもヒト体内における半減期が長い。したがって、ヒト化、キメラ、又はヒト抗体を含むADCの低用量化や、より頻度の低い投与が可能となる。

【0077】

抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体は、LGALS3BPを発現するがんの治療のための1つ以上の

50

他の治療剤と組み合わせ投与してもよい。例えば、併用療法は、第2の細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、又は免疫抑制剤（例えば、がん又は免疫疾患の治療に従来から使用されているような、非結合型の細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、又は免疫抑制剤など）を含むことができる。併用療法はまた、例えば、LGALS3BPを発現するがん細胞の表面上のLGALS3BP以外の受容体や受容体複合体を標的とする薬剤の投与を含んでもよい。このような薬剤の例として、LGALS3BPを発現するがん細胞の表面の分子に結合する第2の非LGALS3BP抗体が挙げられる。別の例として、このような受容体や受容体複合体を標的とするリガンドが挙げられる。典型的には、このような抗体又はリガンドは、LGALS3BPを発現するがん細胞の細胞表面受容体に結合し、LGALS3BPを発現するがん細胞に細胞毒性シグナルを送ることによって抗LGALS3BP抗体の細胞毒性効果を増強する。

10

**【0078】**

このような組み合わせ投与は、疾患パラメーター（例えば、症状の重症度、症状の数、又は再発の頻度）に相加的又は相乗的な効果をもたらす可能性がある。

**【0079】**

特定の実施形態において、組み合わせ投与のための治療レジメンに関して、抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体は、第2の治療剤と同時に投与される。別の特定の実施形態において、第2の治療剤は、抗LGALS3BP ADC又はADC誘導体の投与の前又は後に投与され、少なくとも1時間から最大数ヶ月、例えば、少なくとも1時間、5時間、12時間、1日、1週間、1か月又は3か月、ADC又はADC誘導体の投与の前又は後に投与される。

20

**【0080】**

本発明の1995-sss-DM3 ADC及び本1995-sss-DM3 ADCを含む医薬組成物は、優れた安全性プロファイルを有する。例えば、ADCを単独の静脈内注射として交雑種ウサギに5 mg/Hg投与した場合に、投与後7日目まで観察の結果、毒性所見は観察されなかった。

**【0081】**

本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態によってその範囲が限定されることはない。本明細書の記載に加えて、前述の説明及び付随する図面から得られる本発明の様々な変形例は、当業者にとって明らかであろう。このような変形例は、添付の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

**【0082】**

本発明は、以下の実施例にさらに記載されるが、本発明の範囲を限定する意図ではない。以下の実施例に記載の細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) 又はDeutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Braunschweig, Germany) によって指定された条件に従って培養を維持した。細胞培養試薬は、Invitrogen Corp. (Carlsbad, Calif) から入手した。

30

**【実施例】****【0083】**

(出発物質)

1. 抗体1959-sss (C220S-C226S-C229S)、PBS、pH7.4中11mg/ml

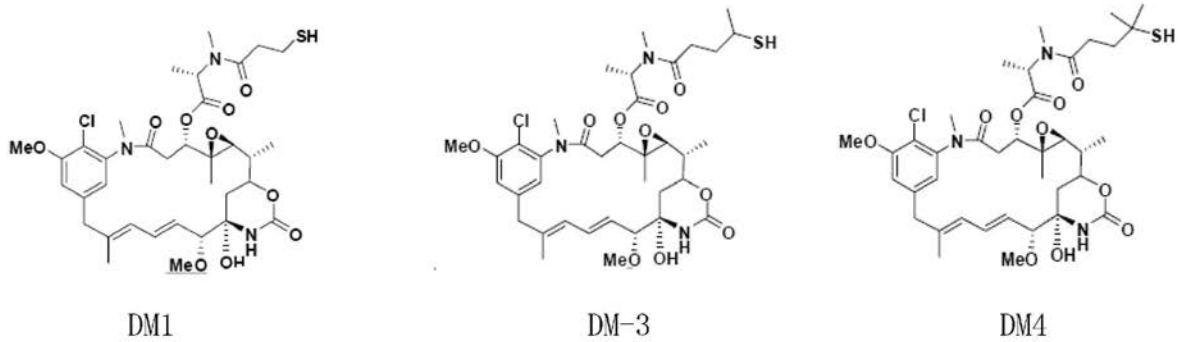
抗体1959-sssは、PBS pH7.4中、11mg/mlの濃度で使用した。

2. SH誘導体としてのメイタンシノイドDM1、DM3、及びDM4は、XDCEXPLORER CO., LTD (Shanghai, China) から購入した。

40

**【0084】**

## 【化1】



10

## 【0085】

細胞毒性薬としてDM3を使用した場合の、1959-sss抗体にメイタンシノイドを結合する方法を以下に示す。DM1又はDM4を使用する場合の方法も同じである。

## 【0086】

実施例1. 抗体1959-sssの還元とそれに続くDTNB誘導体化

(材料及び方法)

抗体1959-sssは、60モル過剰のTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(Sigma-Aldrich)、リン酸緩衝生理食塩水に溶解したストック、pH = 7.4(PBS))を使用して還元した。反応は室温(約25℃)で一晩行った。

20

## 【0087】

DTNB誘導体化として、1Mリン酸緩衝液pH7.4から始めて最終100mMリン酸塩となるようにTCEP還元抗体に添加した。次に、DTNB(5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(Sigma-Aldrich)ストック(EtOH中26.7 mg/ml)を抗体よりも100モル過剰に添加した。反応は室温で一晩行った。1959-sss/DTNB混合物を、PBS/5%スクロース/10%DMA(NN'-ジメチルアセトアミド、SIGMA)で平衡化したG25セファデックスカラムに通して反応を停止し、未反応のDTNBを除去した。タンパク質濃度は、抗体の存在を示す280nmのピークを測定するUV-VISスペクトルにより分析した(図1)。

## 【0088】

(結果)

1959-sssを100モル過剰のDTNBと反応させ、G25カラムを通して反応を停止した。スペクトルはG25カラム後のタンパク質を表し、誘導体化反応がタンパク質を不安定化することはないことを示す。

30

## 【0089】

実施例2. 未反応遊離DM3からの1959-sss-DM3複合体の分離

(材料及び方法)

DM3結合体。1959-sss DTNB誘導体化抗体を、PBS/5%スクロース/10%DMA中、10モル過剰のDM3(DMA中1mg/mlストック、Sigma-aldrich)と室温で一晩反応した。混合物に500モル過剰のヨードアセトアミド(Sigma-aldrich)を加えて反応を停止した。

## 【0090】

1959-sss-DM3の精製には、PBS/5%スクロース/10%DMAで平衡化したG25セファデックスカラムに反応混合物を1ml/minの流速でイソクラティックに通し、1ml画分を回収した(図2)。

40

## 【0091】

10モル過剰のDM3とインキュベーションした後、1959-sss-DM3複合体を未反応遊離DM3からゲルろ過によって分離した。クロマトグラムの最初のピーク(15~20分)は1959-sss-DM3を含み、2番目のピーク(30~40分)は未反応の遊離DM3を含んでいた。

## 【0092】

(結果)

1959-sss-DM3複合体は、ゲルろ過によって未反応の遊離DM3から分離された。クロマト

50

グラムの最初のピーク（15～20分）は1959-sss-DM3を含み、2番目のピーク（30～40分）は未反応の遊離DM3を含んでいた。

【0093】

実施例3. DM3との反応後の1959-sss抗体の吸光度スペクトル  
（材料及び方法）

1959-sssを10モル過剰のDM3と反応し、G25カラムに通過して反応を停止した。

【0094】

（結果）

スペクトルはG25カラム後のタンパク質を表し、この2回目の誘導体化反応でもタンパク質は不安定化しないことを示す（図3）。

【0095】

実施例4. HPLCによる検量線の作成  
（材料及び方法）

60モル過剰のTCEPで還元した後のDM3放出について254nmでのHPLC-C18（Vertex plusカラム、Knauer）分析の結果、抗体分子あたり2つのDM3分子のDARが推定された。使用したプロトコルは次の通りである：

TFA 0.1%（Sigma-Aldrich）

TFA 0.1% + アセトニトリル80%（Sigma-Aldrich）

以下のグラジエントを用いて、254（0.80ml/min）で検出した（表1）。

【0096】

【表1】

Step	A %	B %	Time (min)
I	100	0	(LOAD)
1	100	0	0-10
2	0	100	10-40
3	0	100	40-45
4	100	0	45-50
5	100	0	50-60

【0097】

（結果）

種々の量の遊離DM3を含む500ml溶液を、C18カラムのHPLCクロマトグラフィーで分析した。33分におけるピーク面積を使用して検量線を決定し、1959-sss-DM3結合体から放出されるDM3を推定した（図4）。

【0098】

実施例5. 1959-sss-DM3結合体からのDM3放出のHPLC分析並びにTCEPによる還元及びDAR（薬剤抗体比）の計算  
（材料及び方法）

還元及び非還元の1959-sss-DM3 500 ml（0.4 mg/ml）を、C18 HPLCカラムで分析し、還元1959-sss-DM3から放出されたDM3に対応するピーク（33分）（図5）を検量線で内挿した。

【0099】

（結果）

Ab1959-SSS -DM3のDARは2と計算された。

【0100】

## 実施例 6. 非結合1959-sss及び1959-sss-DM3のHIC-HPLC分析

(材料及び方法)

ネイキッド1959-sss抗体及び結合型1959-sss-DM3を、以下の条件でHICクロマトグラフィーによって分析した：

A：1.5 M硫酸アンモニウム、50mMリン酸ナトリウムpH7.0、5%イソプロパノール

B：50 mMリン酸ナトリウムpH7、20%イソプロパノール。グラジエントは表2に示す。

【0101】

【表2】

Step	A %	B %	Time (min)
I	100	0	(LOAD)
1	0	100	0-20
2	100	0	20,1-35

10

【0102】

(結果)

両方のサンプルに単一種が存在することをクロマトグラムは示し(図6)、遊離した(非結合の)1959-sss抗体を完全に回避する均一な生成物(緑色のピーク)が、結合反応によって生じることを示す。

20

【0103】

## 実施例 7. MALDIマスペクトロメトリー分析

(材料及び方法)

抗体1959-sss及びADC1959-sss-DM3をPD Spin TrapG25によって脱塩し、数マイクロリットルをMALDIマス分析に使用した。簡単に説明すると、蒸留水/アセトニトリル(50:50)の0.1%TFA中、s-DHB飽和溶液2マイクロリットルと2マイクロリットルの各サンプルを混合した。混合物をステンレススチールターゲットに置き、乾燥させた。Ultraflex MALDI TOF/TOF (Bruker、GmbH)を線形ポジティブモードで使用して、質量スペクトルを取得した。

30

【0104】

(結果)

ネイキッド1959-sss抗体及び結合型1959-sss抗体で、MALDIマスペクトロメトリーを実施した。予想通り(図7)、重鎖と軽鎖は還元しなくても容易に分離し、設計された抗体には鎖間ジスルフィドが存在しなかった。重鎖は、両方のサンプルにおいて51200 Daの質量ピークとして現れた。一方、軽鎖はネイキッド1959-sss抗体において不均一であったが(図8も参照)、結合型1959-sss-DM3抗体では単一のピークを示した。

【0105】

## 実施例 8. ネイキッド1959-sss及び結合型1959-sss-DM3の軽鎖MALDIマスペクトロメトリー分析

40

(材料及び方法)

実施例7を参照。

【0106】

(結果)

図8に示すように、ネイキッド1959-sss由来の軽鎖は、質量23276と23582の2つのピークで表され、1959-sss-DM3由来の軽鎖は、質量24053 Daの単一のピークで表される。

【0107】

## 実施例 9. TCEPによる還元後の1959-sssのMALDIマスペクトロメトリー分析

(材料及び方法)

50

実施例7を参照。

【0108】

(結果)

このプロファイルは、TCEPで還元すると、1959-sssネイキッド抗体で観察された2つのピークが、質量23261 Daの単一のピークに均一にシフトすることを示す(図9)。軽鎖間の約320 Daの違いは、グルタチオンの放出が原因である可能性があり、おそらくCHO細胞での組換え1959-sssの発現から残っているであろう。

【0109】

実施例10. 1959-sss-DM3、TCEPで還元した後の1959-sss-DM3、ネイキッド1959-sssのHICクロマトグラフィー

10

(材料及び方法)

実施例6を参照。

【0110】

(結果)

図10は、ネイキッド1959-sss(下のパネル)と比較して、還元前(上のパネル)と還元後(中央のパネル)の抗体1959-sss-DM3を示す。1959-sss-DM3のTCEP還元により、ピーク的位置がネイキッド抗体に対応する位置にシフトダウンする。

【0111】

実施例11. 非結合の1959-sss及び1959-sss-DM3のLGALS3BPへの結合

20

(材料及び方法)

ヒト組換えLGALS3BP(2 µg/ml)を、96ウェルプレートNUNC Maxisorp モジュールに4で一晩プレコートした。0.1%Tween-20を含むPBS中、1%BSAで、室温で1時間ブロッキングした後、非結合1959-sss抗体又は1959-sss-DM3を添加し、所定の濃度で室温で2時間インキュベートした。PBS-0.1%Tween-20で数回洗浄した後、抗ヒトIgG-HRPを添加し、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、安定化色素原を暗所で少なくとも10分間添加した後、1NのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して反応を停止した。得られた492nmの色を、Elisaリーダーで読み取った。

【0112】

(結果)

非結合の1959-sssと1959-sss DM3は、LGALS3BPに対して同じ結合作用を示す(図11)。

30

【0113】

実施例12. ヒト腫瘍細胞株におけるLGALS3BPの発現

(材料及び方法)

ヒト腫瘍細胞をガラスのカバーガラス上で24時間増殖させた。カバーガラスを1959-sss又は1959-sss-DM3と室温で2時間インキュベートした。インキュベーションの終わりに、4%パラホルムアルデヒドで15分間室温で細胞を固定し、0.25%Triton X-100で5分間透過処理した後、室温で1時間、0.1%BSAでブロッキングした。続いて、カバーガラスを、結合抗ヒトIgG-Alexa Fluor488とインキュベートした。核を視覚化するためにDRAQ5を使用した。488nmと633nmのレーザーを使用したZeiss LSM 510メタ共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。

40

A、C、E、G、非結合1959-sss; B、D、F、H、1959-sss-DM3

A-B; MDA-MB-231 乳がん; C-D、A375 黒色腫; E-F、FADU、H&Nがん;

G-H、HBF、正常な気管支線維芽細胞

【0114】

(結果)

図12は、正常細胞ではないヒト腫瘍細胞の細胞膜における、1959-sss-ADC又は非結合抗体と、それに続く抗ヒト蛍光標識IgGとのインキュベーションによる染色の結果を示す。染色は粒状であり、おそらく分泌時にLGALS3BPによって引き起こされる凝集を示している。

【0115】

50

## 実施例 13. ヒト黒色腫細胞におけるCD63とCD81を伴ったLGALS3BPの共局在性

## (材料及び方法)

A375ヒト腫瘍細胞をガラスカバーガラス上で24時間増殖させた。カバーガラスをPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで室温15分間、細胞を固定した。PBSで2回洗浄した後、細胞を3%ウシ血清アルブミンを含むPBS中、室温で20分間インキュベートした。次に、細胞を以下の抗体とともに4℃で一晩インキュベートした：(A)、抗CD63(マウス由来、Thermo Fisher、1:50希釈)、(B)、抗ヒトCD81(マウス由来、Thermo Fisher、1:20希釈)、抗ヒトGal-3BP(1959-sss、2 $\mu$ g/mlに希釈)。PBSで洗浄した後、カバーガラスをAlexa Fluor 633抗ヒトIgG(Invitrogen)又はAlexa Fluor 488抗マウスIgG(Invitrogen)のいずれかと、室温で30分間インキュベートした。核を視覚化するためにDAPIを使用した。TCS SP5 Leica-共焦点顕微鏡を用いて画像を取得した。

10

## 【0116】

## (結果)

図13は、1959-sssを単独で、又はCD63とCD81と組み合わせて、抗ヒト蛍光標識IgG又は抗マウス蛍光標識IgGのいずれかと組み合わせてインキュベートした場合の、ヒト黒色腫細胞の細胞膜における染色を示す。LGALS3BPは、細胞膜でエクソソームマーカータンパク質と共局在する。染色は粒状であり、おそらく分泌時にLGALS3BPによって引き起こされる凝集を示している。

## 【0117】

実施例 14. 黒色腫の異種移植モデルにおける1959-sss-DM1及び1959-sss-DM3のin vivo治療効果

20

## (材料及び方法)

5~6週齢のCD-1 nu/nuヌードマウスに5 $\times 10^6$ のA375細胞を皮下注射することによってヒト黒色腫異種移植を行った。グループ内の平均腫瘍サイズが約100mm<sup>3</sup>の場合、各グループにおける腫瘍サイズの範囲が同様となるように、マウスを4つのグループに分けた。各グループは、PBS(コントロール)、非結合1959-sss抗体(10 mg/kg)、1959-sss-DM1(10 mg/kg)、又は1959-sss-DM3(10 mg/kg)で実施した。5日間毎日の静脈内注射の治療を行った(矢印)。腫瘍体積は、次の式に従って計算した。：腫瘍体積 = (長さ $\times$ 幅<sup>2</sup>)/2。腫瘍体積は毎週モニターした。A、腫瘍増殖曲線。データは平均腫瘍体積(±SEM)、n=5又は6マウス/グループを表す。B、パネルAに示されるマウスグループの体重。

30

## 【0118】

## (結果)

図14は、非結合1959-sss抗体で処理をしたマウスでは治療活性がないことを示す。1959-sss-DM1グループの腫瘍増殖率は、対照グループ又は非結合1959-sss抗体グループのいずれとも有意差がなく、1959-sss-DM1の治療活性はほとんど検出されなかった。1959-sss-DM3の治療は、マウスの腫瘍の成長を有意に抑制した。1959-sss DM3とコントロールの差、P < 0.00001。

## 【0119】

実施例 15. 黒色腫の異種移植モデルにおける1959-sss-DM3および1959-sss-DM4のin vivo治療効果

40

## (材料及び方法)

A、PBS(対照)、1959-sss-DM3(10 mg/kg)を毎日若しくは週に2回(t/w)、合計5回の注射、又は1959-sss-DM4(10 mg/Kg) t/w、合計5回の注射で処理したヌードマウスにおける、皮下移植ヒトA375黒色腫異種移植片の増殖。データは平均腫瘍体積(±SEM)、n=5又は6マウス/グループを表す。B、パネルAに示す治療群の生存を示す Kaplan-Meier プロット。

## 【0120】

## (結果)

図15は、1959-sss-DM3又は1959-sss-DM4によってマウスを治療した結果、腫瘍増殖の有意な阻害が引き起こされたことを示す。1959-sssDM3と1959-sss-DM4の差。

50

## 【 0 1 2 1 】

1959-sss ADCで治療したマウスは、対照マウスよりも長く生存した。1959-sssDM3又は1959-sss-DM4、t/w vs. コントロールとの差、 $P < 0.00001$ ; 1959-sss-DM3毎日 vs. コントロール、 $P < 0.0001$ 。

## 【 0 1 2 2 】

治療開始から140日における、完全寛解 (CR) を示す、すなわち触知可能な腫瘍がないマウスの数を表3に示す。

## 【 0 1 2 3 】

## 【表 3】

	Cut-off (TV about 1.5 cm <sup>3</sup> )	CR (not palpable tumor)
PBS	6/6	
1959sss-DM3 (daily)	5/6	0
1959sss-DM3 (t/w)	1/6	5/6
1959sss-DM4 (t/w)	3/6	3/6

10

20

## 【 0 1 2 4 】

実施例 1 6 . 黒色腫の異種移植モデルにおける1959-sss-DM3の用量反応

(材料及び方法)

PBS (コントロール) 又は1959-sss-DM3を10、3、若しくは1 mg/Kg、t/w、合計5回注射して処理したヌードマウスにおける、皮下移植ヒトA375黒色腫異種移植片の増殖。

## 【 0 1 2 5 】

(結果)

3 mg/Kg又は10 mg/Kgの1959-sssDM3でマウスを治療した場合に、対照と比較して同様の腫瘍増殖阻害を引き起こした ( $P < 0.0001$ ) (図16)。

## 【 0 1 2 6 】

実施例 1 7 . LGALS3BP (Gal-3BP) は、神経芽細胞腫細胞によって発現して分泌される

(材料及び方法)

神経芽細胞腫細胞株を完全培地で培養した。48時間後、細胞ペレットと上清を回収した。リアルタイムPCR (A) の場合、RNeasy Mini Kitを用いて細胞からトータルRNAを抽出し、製造元の指示に従い、1 µgのRNAをHyperScript (商標) 逆転写酵素で逆転写した。RNAの量と質をNanoDrop分光計によって評価した。SsoAdvanced Universal SYBR (登録商標) Green Supermixにより、以下のプライマーを使用してリアルタイムPCRを行った: LGALS3BP Fw 5'-gaacccaaggcgtgaacgat-3' (配列番号12)、Rw 5'-gtccacaggttgatcacaca-3' (配列番号13)。LGALS3BP mRNAの発現は、ハウスキーピング遺伝子のヒト  $\beta$ -アクチンと比較して計算した; 使用したプライマーは、Act Fw 5'-cagctcaccatggatgatgatc-3' (配列番号14) 及びRw 5'-aagccggccttgacat -3' (配列番号15) であり、以下の増幅プロトコルを用いた: リアルタイム検出システムCFX96により、95 °Cで30秒間の1サイクル、及び95 °Cで15秒間と60 °Cで30秒間の40サイクル。内在性コントロールの  $\beta$ -アクチンによって標準化した相対的なmRNAの発現量は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法にて決定した。

30

40

## 【 0 1 2 7 】

ウェスタンブロット (B) の場合、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤を添加したRIPA溶解バッファーで、ペレットを4 °Cで10分間溶解した。不溶性物質を遠心分離 (13,000 rpm、4 °Cで10分間) によって除去し、タンパク質濃度をBradford法で評価した。等量の総タンパク質をSDS-PAGEにかけた後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。5%の脱脂粉乳を含む0.1% Tween 20含有PBSでメンブレンをブロッキングし、抗  $\beta$ -アクチン及び

50

抗LGALS3BP抗体を使用して一晩インキュベートした。上清細胞中の循環LGALS3BPを、製造元の指示に従って、Diesse Diagnostica Senese Spa (Siena, Italy) が提供するサンドイッチELISA (C) によって測定した。

Chaiwatanasikul et al (Cell Death Dis. 2011 Oct20; 2 : e219. doi : 10.1038/cddis.2011.99) に記載の初代HB細胞株を除いて、すべての細胞株はAmerican Type Culture Collection (ATCC) から入手した。

【 0 1 2 8 】

(結果)

調べた7つの神経芽細胞腫細胞株のうち6細胞株は、(A) RNA及び(B) WBによって、又はELISA (C) によって、培地中の分泌タンパク質として検出されたことより、LGALS3BPを発現して分泌する。Gal-3BPが陰性となった初代ヒトNB細胞株を除いて、発現と分泌は神経芽細胞腫細胞株間で異なる。

10

【 0 1 2 9 】

実施例 1 8 . 1995抗体は、LGALS3BP陽性であるが陰性ではない神経芽細胞腫細胞の膜においてLGALS3BPを特異的に染色する

(材料及び方法)

神経芽細胞腫細胞株(ケリー、SKNAS及びhNB)をカバーガラスに置き、完全培地で24時間増殖させた。その後、細胞を10 µg/mlの1959-sss抗体とともに37 °Cで90分間インキュベートした。インキュベーションの最後に、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗ヒトAlexaFluor488標識二次抗体で染色した。核を視覚化するためにDraq5を使用した。

20

【 0 1 3 0 】

(結果)

1959抗体は、LGALS3BPに陽性であるが陰性ではない細胞の膜でLGALS3BPを染色する。

【 0 1 3 1 】

実施例 1 9 . メイタンシン誘導体SH-DM3は神経芽細胞腫細胞で活性を示す

(材料及び方法)

神経芽細胞腫細胞株(SHSY5Y、ケリー及びhNB)並びにA375m黒色腫細胞株をプレATINGし、SH-DM3の濃度を増加させて72時間処理した。薬剤の細胞殺傷活性は、MTTアッセイによって評価した。

【 0 1 3 2 】

(結果)

SH-DM3は、陽性コントロールとして使用した、A375m黒色腫細胞に関する神経芽細胞腫細胞株に対してin vitroで強力な細胞殺傷活性を示す。

30

【 0 1 3 3 】

実施例 2 0 . 1959-sss / DM3 : 神経芽細胞腫の治療活性は標的に依存する

(材料及び方法)

A) SKNAS細胞(LGALS3BP陽性)およびhNB細胞(LGALS3BP陰性)由来の異種移植モデルを、200 µl PBS中の $3 \times 10^6$ 個の細胞をマウスの右脇腹へ皮下注射して作製した。異種移植片が触知可能になったとき、各グループにおいて同じ大きさの腫瘍サイズとなるように、動物を2つのグループに分けた。治療群は、1959-sss/DM3(10 mg/kg)を週2回、4回静脈内注射し、コントロール群はPBSのみを投与した。腫瘍体積をカリパスによって毎週監視し、次の式で計算した: 腫瘍体積(mm<sup>3</sup>) = (長さ × 幅<sup>2</sup>) / 2。2cm<sup>3</sup>の腫瘍体積に達した時点で、マウスを屠殺した。生存曲線は、カプランマイヤー推定から導き出され、ログランク検定(GraphPad Prism 5)によって比較した。B) 腫瘍組織における1959-sss/DM3の蓄積を、SKNAS及びhNB腫瘍異種移植片の免疫蛍光分析によって評価した。腫瘍を有する動物に1959-sss/DM3を10 mg/kgの用量で単回注射し、その後、72時間後に屠殺した。新鮮な腫瘍組織を凍結包埋培地で凍結し、クリオスタット切片を抗CD31/CD105抗体(赤)で染色して血管を可視化した; 細胞核はDRAQ5(青)で染色した。スケールバー: 50 µm。

40

【 0 1 3 4 】

(結果)

50

10 mg/kgの用量で1959sss/DM3を投与すると、LGALS3BP陽性であるが陰性ではない神経芽細胞腫細胞由来の腫瘍異種移植片が減少する。これと一致して、1959sss/DM3の静脈内注射から72時間後、LGALS3BP陰性ではなく、LGALS3BP陽性の腫瘍組織の免疫蛍光は、抗体薬剤結合体の蓄積を示す。これらのデータは、1959-sss/DM3のin vivo治療に応答する腫瘍縮小の主要な決定因子がLGALS3BPの発現である可能性を示唆する。

#### 【0135】

実施例 2 1. 1959-sss/DM3：試験的転移神経芽細胞腫モデルにおける治療活性

(材料及び方法)

SKNAS (B) 及びケリー (C) 神経芽細胞腫細胞モデルで実施した試験的転移アッセイ (A) の概略図。神経芽細胞腫細胞を生後8週のNSGマウスの尾静脈に注射し、注射から14日後に静脈内治療 (1959-sss/DM3又は所定の用量の遊離DM3、対照としてPBS) を開始し、週2回、4回注射した。28日後、マウスを屠殺し、臓器 (肝臓、腎臓、肺、骨髄) の転移分析を行った。肝臓、腎臓、肺を採取して、10%中性緩衝ホルマリンで固定した後パラフィン包埋して切片化し、ヘマトキシリンとエオシンで染色した。すべての神経芽細胞腫の転移性病変を分析し、グラフにプロットした (上図)。代表的な画像を示す (下図)。骨髄分析については、屠殺後、大腿骨と脛骨をマウスから切り出し、軟組織を確実に除去し、針付き1mlシリンジを使用して、1mlの冷PBSでシャフトを洗い流すことにより骨髄細胞懸濁液をチューブに収集した。骨髄細胞を再懸濁し、数回洗浄した後、細胞を抗ヒトGD2で染色し、続いてフローサイトメトリー分析のために蛍光二次抗体で染色した。GD2陽性細胞率をドットプロットで示す。

10

20

#### 【0136】

(結果)

10 mg/kgの用量の1959-sss/DM3で治療すると、神経芽細胞腫の転移性病変の形成は強力に阻害されるが、10 mg/kgでADCの遊離薬剤量と同等の用量で治療しても、転移性病変の減少に有意な影響はなく、これは、1959-sss/DM3を使用すると治療上の利点があることを裏付ける。

#### 【0137】

実施例 2 2. 1959-sss/DM3薬物動態

(材料及び方法)

腫瘍のない無胸腺CD-1 nu/nuマウスに、1959-sss/DM3 (10 mg/kg) を1回静脈内注射し、その後さまざまな時点で血液サンプルを採取した。全抗体の血清濃度は、検出用の捕捉抗原組換えLGALS3BPとヤギ抗ヒトIgG-HRPを使用して、サンドイッチELISAにより測定した。半減期 ( $t_{1/2}$ ) とAUC値をKinetic 5.0 ソフトウェアにより取得した。

30

#### 【0138】

(結果)

マウス血清の薬物動態研究により、1959 sss/DM3 ADCの半減期が約97.9時間であることが明らかとなった。

#### 参考文献

1. Iacobelli S, Bucci I, D'Egidio M, Giuliani C, Natoli C, Tinari N, Rubinstein M, Schlessinger J. Purification and characterization of a 90 kDa protein released from human tumors and tumor cell lines. FEBS Lett. 1993 Mar 15;319(1-2):59-65.
2. Grassadonia A, Tinari N, Iurisci I, Piccolo E, Cumashi A, Innominato P, D'Egidio M, Natoli C, Piantelli M, Iacobelli S. 90K (Mac-2 BP) and galectins in tumor progression and metastasis.
3. Piccolo E, Tinari N, Semeraro D, Traini S, Fichera I, Cumashi A, La Sorda R, Spinella F, Bagnato A, Lattanzio R, D'Egidio M, Di Risio A, Stampolidis P, Piantelli M, Natoli C, Ullrich A, Iacobelli S. LGALS3BP, lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein, induces vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells and promotes angiogenesis. J Mol Med (Berl). 2013 Jan;91(1):83

40

50

-94.

4. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 2002 Jun;23(6):313-20.
5. Stampolidis P, Ullrich A, Iacobelli S. LGALS3BP, lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein, promotes oncogenic cellular events impeded by antibody intervention. *Oncogene.* 2015 Jan 2;34(1):39-52.
6. Lee JH, Bae JA, Lee JH, Seo YW, Kho DH, Sun EG, Lee SE, Cho SH, Joo YE, Ahn K Y, Chung IJ, Kim KK. Glycoprotein 90K, downregulated in advanced colorectal cancer tissues, interacts with CD9/CD82 and suppresses the Wnt/beta-catenin signaling via ISGylation of beta-catenin. *Gut.* 2010 Jul;59(7):907-17. 10
7. Sasaki T, Brakebusch C, Engel J, Timpl R. Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds beta1 integrins, collagens and fibronectin. *EMBO J.* 1998 Mar 16;17(6):1606-13.
8. Becker et al. Tumor stroma marker endosialin (Tem1) is a binding partner of metastasis-related protein Mac-2 BP/90K. *FASEB J.* 2008 Aug;22(8):3059-67.
9. Laubli H, Alisson-Silva F, Stanczak MA, Siddiqui SS, Deng L, Verhagen A, Varki N, Varki A. Lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein (LGALS3BP) is a tumor-associated immunomodulatory ligand for CD33-related Siglecs. *J Biol Chem.* 2014 Nov 28;289(48):33481-91. 20
10. Piccolo E, Tinari N, D'Addario D, Rossi C, Iacobelli V, La Sorda R, Lattanzio R, D'Egidio M, Di Risio A, Piantelli M, Natali PG, Iacobelli S. Prognostic relevance of LGALS3BP in human colorectal carcinoma. *J Transl Med.* 2015 Jul 30;13:248.
11. Inohara H<sup>1</sup>, Akahani S, Kohts K, Raz A. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Res.* 1996 Oct 1;56(19):4530-4.
12. Traini S, Piccolo E, Tinari N, Rossi C, La Sorda R, Spinella F, Bagnato A, Lattanzio R, D'Egidio M, Di Risio A, Tomao F, Grassadonia A, Piantelli M, Natoli C, Iacobelli S. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by SP-2, an anti-lectin, galactoside-binding soluble 3 binding protein (LGALS3BP) antibody. *Mol Cancer Ther.* 2014 Apr;13(4):916-25. 30
13. WO2012052230A1
14. Sala G, Rapposelli IG, Ghasemi R, Piccolo E, Traini S, Capone E, Rossi C, Pelliccia A, Di Risio A, D'Egidio M, Tinari N, Muraro R, Iacobelli S. EV20, a Novel Anti-ErbB-3 Humanized Antibody, Promotes ErbB-3 Down-Regulation and Inhibits Tumor Growth In Vivo. *Transl Oncol.* 2013 Dec 1;6(6):676-84
15. WO 93/17715
16. WO 92/08802 40
17. WO 91/00360
18. WO 92/05793
19. Tutt, A., Stevenson, G., and Glennie, M. (1991) Trispecific F(ab')<sub>3</sub> derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 147, 60-69
20. Kostelny, S. A., M. S. Cole, and J. Y. Tso. 1992. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J. Immunol.* 148: 1547-1553. 29.
21. WO 92/22324
22. R.L. Mullinax, E.A. Gross, B.N. Hay, J.R. Amberg, M.M. Kubitz, J.A. Sorge. Expression of a heterodimeric Fab antibody protein in one single cloning step. *B* 50

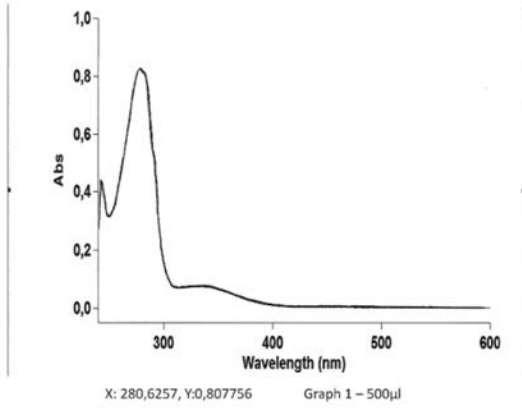
ioTechniques, 12(1992), pp. 864-869.

23. Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH. Escherichia Coli secretion of an active chimeric antibody fragment. Science. 1988 May 20; 240(4855):1041-3.
24. Sawai et al, AJRI, vol. 34, 1995, pages 26 - 34
25. US4946778A
26. US5258498A
27. Huston JS, Mudgett-Hunter M, Tai MS, McCartney J, Warren F, Haber E, Oppermann H. Methods Enzymol. 1991;203:46-88. Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins.
28. Shu L, Qi CF, Schlom J, et al. Secretion of a single-gene-encoded immunoglobulin from myeloma cells. Proc Natl Acad Sci USA.1993;90:7995-7999. 28. 10
29. Skerra, A., and A. Pluckthun. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. Science 240:1038-1040
30. L. Morrison, Transfectomas provide novel chimeric antibodies, Science 229: 1202 (1985).
31. Oi VT, Morrison SL. Chimeric antibodies. Biotechniques 1986;4:214. 228
32. Gillies SD, Lo KM, Wesolowski J. High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes. J Immunol Methods 1989; 125: 191-202
33. US5807715A 20
34. US4816567A
35. US4816397A
36. US5585089A
37. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Nature. 1988 Mar 24;332(6162):323-7. Reshaping human antibodies for therapy.
38. EP 0 239 400
39. WO 91/09967
40. US5225539A
41. US5530101A
42. US5585089A 30
43. EP 0 592 106
44. EP 0 519 596
45. Padlan EA. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody ... Mol Immunol 1991;28(4-5):489-498
46. Studnicka et al. Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. 'PROTEIN ENGINEERING, vol. 7, no. 6, June 1994 OXFORD, GB, pages 805-814,
47. Roguska et al., Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing" 1994, PNAS 91:969-973.
48. US5565332A 40
49. US4444887A
50. US4716111A
51. WO 98/46645
52. WO 98/50433
53. WO 98/24893
54. WO 98/16654
55. WO 96/34096
56. WO 96/33735
57. WO 91/10741
58. Jespers LS, et al., Guiding the selection of human antibodies from phage display 50

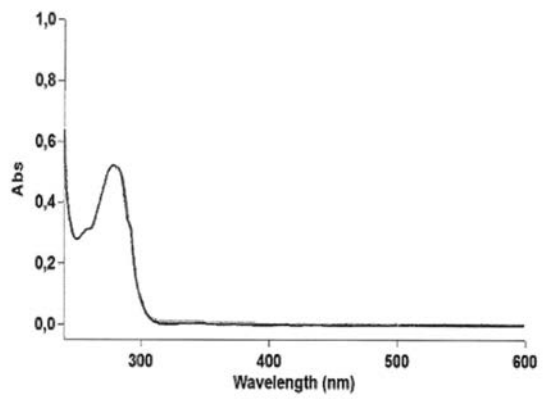
- play repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology* 1994; 12:899-903
59. Lonberg N, Huszar D. *Int Rev Immunol.* 1995;13(1):65-93. Human antibodies from transgenic mice. ;
60. WO 92/01047;
61. EP 0 598, 877;
62. US5413923A;
63. US5625126A;
64. US5633425A;
65. US5569825A 10
66. US5661016A;
67. US5545806A;
68. US5814318A;
69. US5885793A;
70. US5916771A;
71. US5939598A
72. US5155027A;
73. US5336603A;
74. US5359046A
75. US5349053A; 20
76. EP 0 367 166;
77. WO 96/04388
78. US4676980A
79. Ausubel et al., eds., *Short Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., New York, 4th ed. 1999)
80. Harlow & Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999.)
81. WO 86/05807;
82. WO 89/01036;
83. US5122464A 30
84. Foecking MK, Hofstetter H. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene* 1986; 45:101-105. 52
85. Cockett MI, Bebbington CR, Yarranton GT. 1990. High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification. *Bio/Technology* 8: 662-667.
86. *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, N.Y., 1993)
87. *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual* (Stockton Press, N.Y., 1990);
88. *Current Protocols in Human Genetics* (Dracopoli et al. eds., John Wiley & Sons, N.Y., 1994, Chapters 12 and 13) 40
89. Colberre-Garapin, F., F. Horodniceanu, P. Kourilsky, and A. C. Garapin. 1981. A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.* 150:1-14. 9.
90. Bebbington & Hentschel, *The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning, Vol. 3* (Academic Press, New York, 1987).
91. Crouse, G. F., R. N. McEwan, and M. L. Pearson. 1983. Expression and amplification of engineered mouse dihydrofolate reductase minigenes. *Mol. Cell. Biol.* 3:257-266. 50

92. Proudfoot, N., Transcriptional Interference and Termination Between Duplicated  $\alpha$ -Globin Gene Constructs Suggest a Novel Mechanism for Gene Regulation, *Nature* 322:52, 1986.
93. Kohler G., Immunoglobulin Chain Loss in Hybridoma Lines, *PNAS* 77:2197, 1980.
94. Wilson, I. A., Niman, H. L., Houghten, R. A., et al., 1984, The structure of an antigenic determinant in a protein, *Cell* 37:767-778
95. Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy, " in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985)
96. Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987) 10
97. Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera et al. eds., 1985)
98. "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985)
99. Thorpe P. E. & Ross W. C. J. (1982) The preparation and cytotoxic properties of antibody-toxin conjugates. *Immunol. Rev.* 62, 119-58
100. WO 89/12624 20
101. Langer, R., 1990, New methods of drug delivery, *Science* 249:1527-1533. Lewis, D. H., 1990
102. Sefton MV *Crit Rev Biomed Eng.* 1987;14(3):201-40. Implantable pumps.
103. Buchwald, H., Rohde, T.D., Warco, R.L., et al.: Long-term continuous intravenous heparin administration by an implantable infusion pump in ambulatory patients with recurrent venous thrombosis. *Surgery.* 88:507-516, 1980
104. Saudek, C. D., J. L., Selam, H. A., Pitt, et al. 1989. A preliminary trial of the programmable implantable medication system for insulin delivery. *N. Engl. J. Med.* 321: 574-579
105. *Medical Applications of Controlled Release* (Langer & Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974) 30
106. *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance* (Smolen & Ball eds., Wiley, New York, 1984)
107. Ranger & Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61
108. Levy RJ, Wolfrum J, Schoen FJ, et al: Inhibition of calcification of bioprosthetic heart valves by local controlled release diphosphonate. *Science* 228:190-192, 1985
109. During J, Freese A, Sabel B, Saltzman W, Deutch A, Roth R, Langer R, Controlled release of dopamine from a polymeric brain implant: In vivo characterization. 1989, *Ann. Neurol.* 25:351 40
110. Howard, M. A. et al. 1989. Intracerebral drug delivery in rats with lesion-induced memory deficits. *J. Neurosurg* 71:105
111. Remington's pharmaceutical sciences. XIII ed. Editor-in-Chief Eric W. Martin

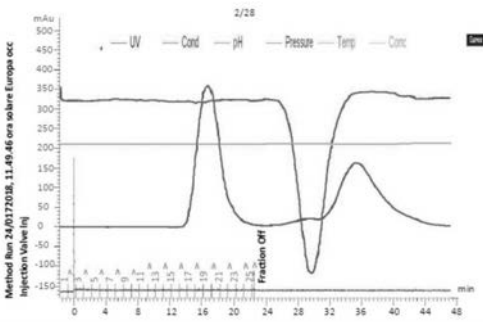
【 1 】



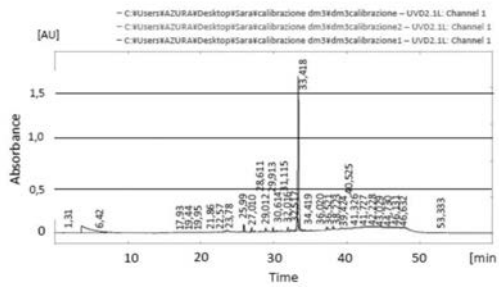
【 3 】



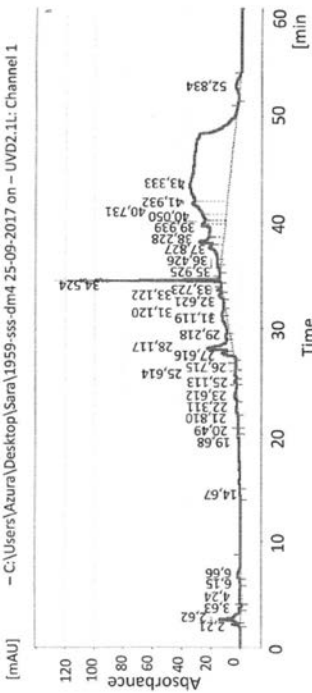
【 2 】



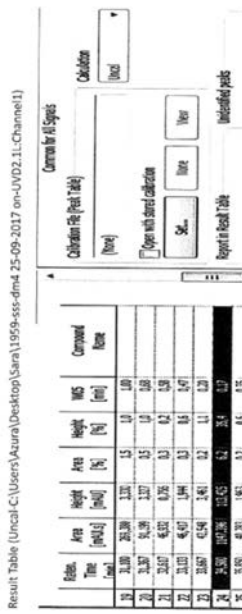
【 4 】



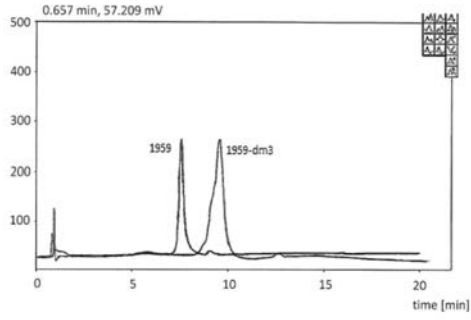
【 5 a 】



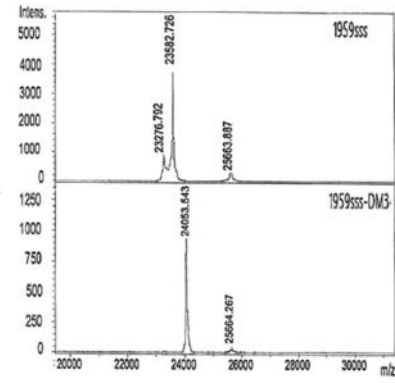
【 5 b 】



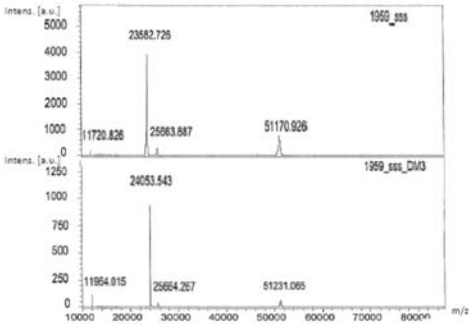
【 図 6 】



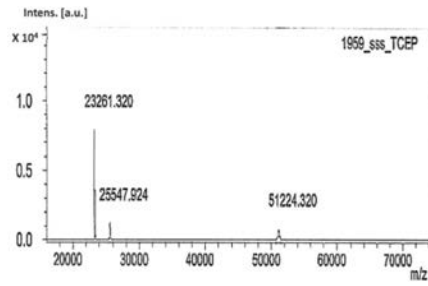
【 図 8 】



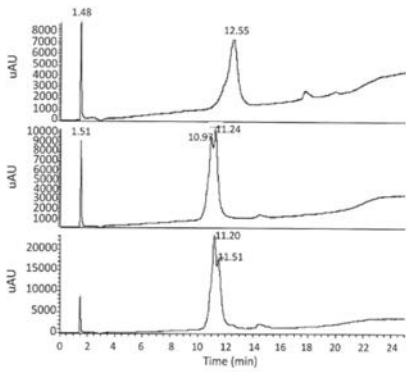
【 図 7 】



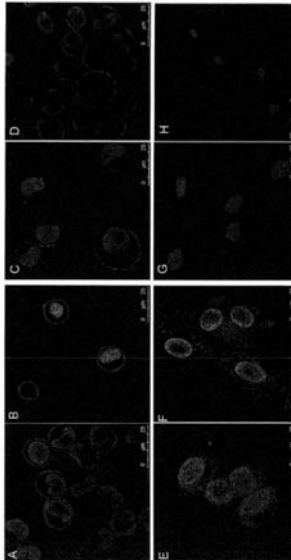
【 図 9 】



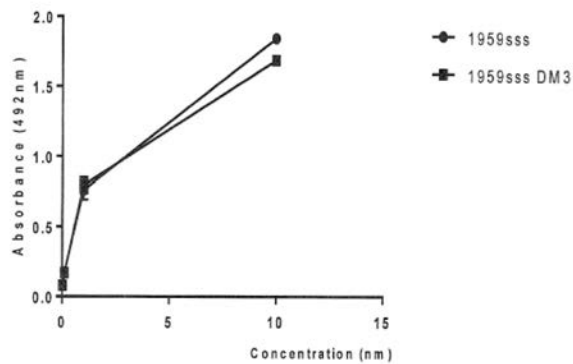
【 図 1 0 】



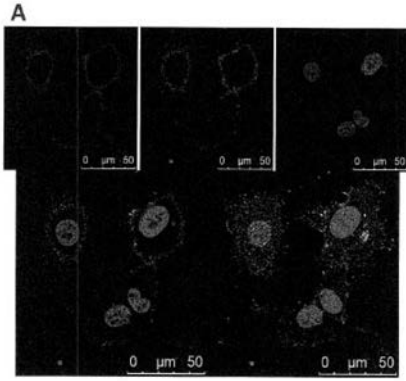
【 図 1 2 】



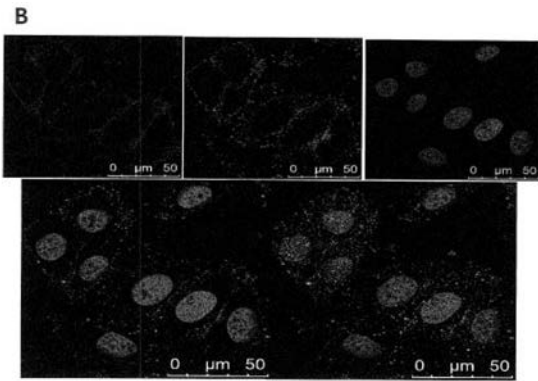
【 図 1 1 】



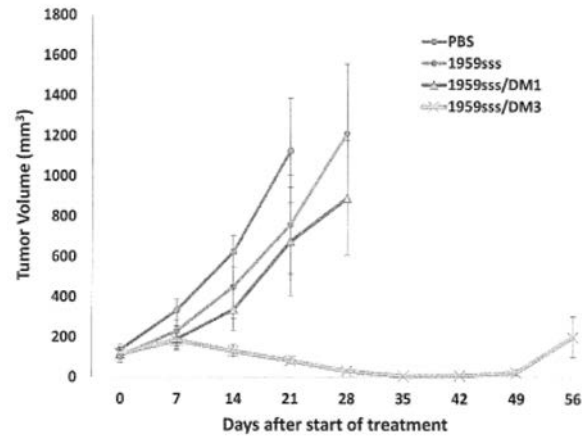
【 図 1 3 a 】



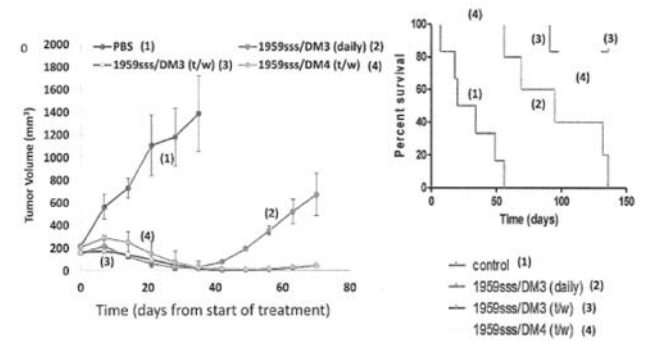
【 図 1 3 b 】



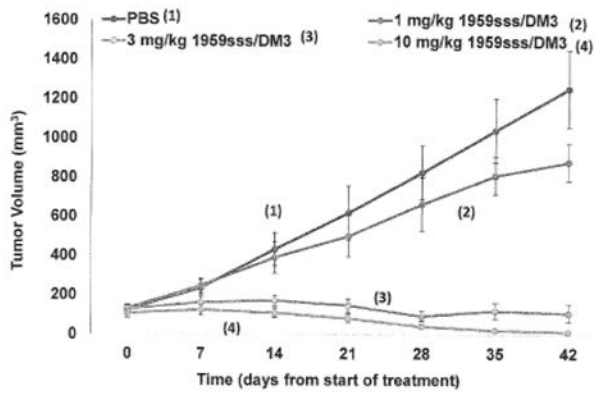
【 図 1 4 】



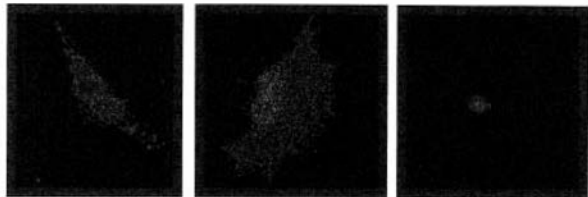
【 図 1 5 】



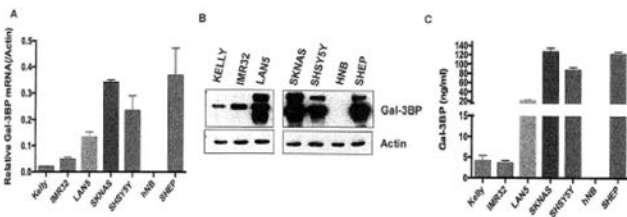
【 図 1 6 】



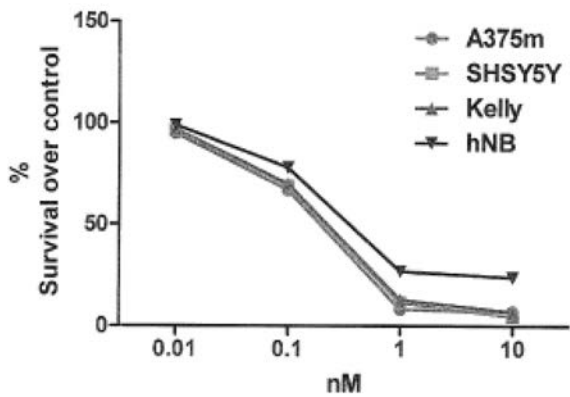
【 図 1 8 】



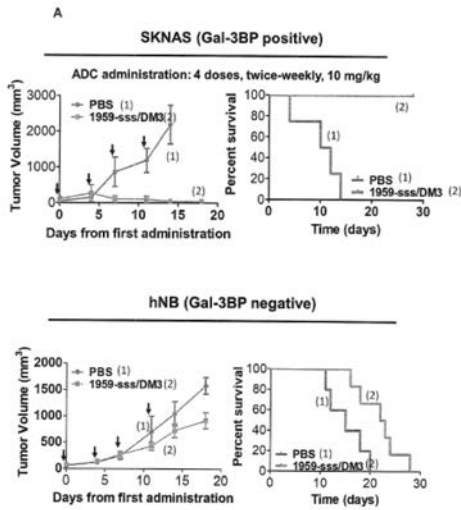
【 図 1 7 】



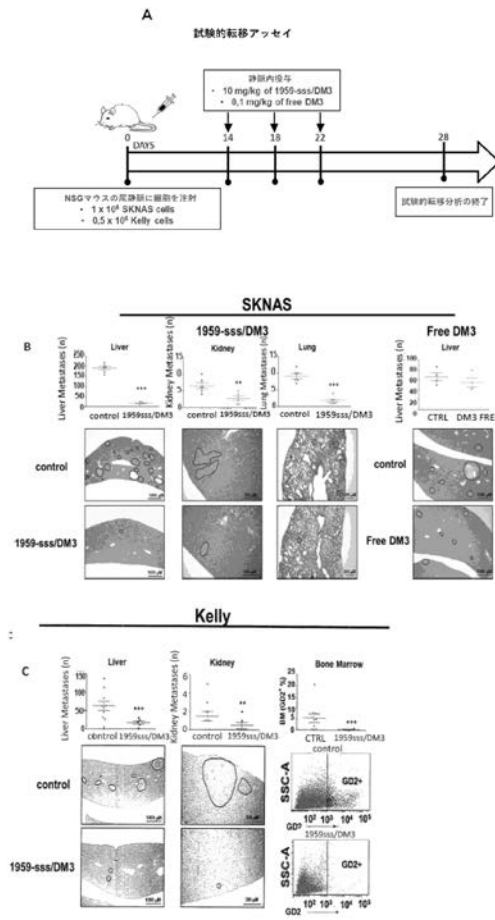
【 図 1 9 】



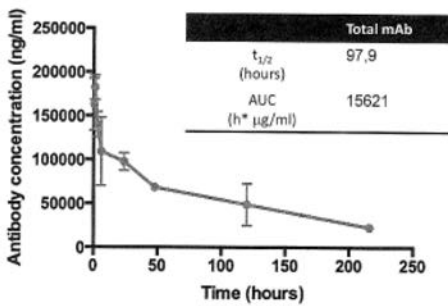
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



【配列表】

2021521273000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2019/059505
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K47/68 A61P35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAMBERT J M ET AL: "Antibody-Drug Conjugates for Cancer Treatment", ANNUAL REVIEW OF MEDICINE 20180129 ANNUAL REVIEWS INC. USA, vol. 69, 29 January 2018 (2018-01-29), pages 191-207, XP55596096, ISSN: 0066-4219	1,4,5,7-16
Y	abstract tables 1,2 ----- -/--	3,6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  15 July 2019		Date of mailing of the international search report  22/07/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bliem, Barbara

3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2019/059505
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YOSI GILAD ET AL: "Recent Innovations in Peptide Based Targeted Drug Delivery to Cancer Cells", BIOMEDICINES, vol. 4, no. 2, 26 May 2016 (2016-05-26), page 11, XP55596108, DOI: 10.3390/biomedicines4020011 abstract tables 1-5	1,2,7,8, 11-16
X	----- YANQIN LIANG ET AL: "A Nanosystem of Amphiphilic Oligopeptide-Drug Conjugate Actualizing Both [alpha]v[beta]3 Targeting and Reduction-Triggered Release for Maytansinoid", THERANOSTICS, vol. 7, no. 13, 1 January 2017 (2017-01-01), pages 3306-3318, XP55596102, AU ISSN: 1838-7640, DOI: 10.7150/thno.20242 abstract scheme 1	1,2,7,8, 10-16
Y	----- WO 2010/097825 A1 (IACOBELLI STEFANO [IT]) 2 September 2010 (2010-09-02) cited in the application claims 1-3 page 6, line 16 - page 7, line 22	3,6
Y	----- S. TRAINI ET AL: "Inhibition of Tumor Growth and Angiogenesis by SP-2, an Anti-Lectin, Galactoside-Binding Soluble 3 Binding Protein (LGALS3BP) Antibody", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 13, no. 4, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 916-925, XP55130464, ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1117 abstract	3,6
X,P	----- SALA G ET AL: "Abstract 748: Non-internalizing site-specific antibody-drug conjugates based on maytansinoids display curative properties", CANCER RES, vol. 78, no. 13, Supplement 1, 1 July 2018 (2018-07-01), XP55596254, ISSN: 1538-7445 the whole document	1-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/059505

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010097825 A1	02-09-2010	EP 2400983 A1	04-01-2012
		US 2012003157 A1	05-01-2012
		WO 2010097825 A1	02-09-2010
-----			

## フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 カボネ、エミリー

イタリア国、レッチェ、73020 カヴァッリーノ、23、ヴィア アルチーデ デ ガスペリ

(72)発明者 ジアンサンティ、フランチェスコ

イタリア国、ラクイラ、67019 スコッピート、266、ヴィア ローマ

(72)発明者 イッポリーティ、ロドルフォ

イタリア国、00155 ローマ、16、ヴィア ラッファエーレ チアスカ

(72)発明者 ジェンティーレ、ロベルタ

イタリア国、ラクイラ、67100 ラクイラ、20、ヴィア マドンナ フォレ

(72)発明者 イアコベッリ、ステファノ

イタリア国、00198 ローマ、48、ヴィア キアーナ

(72)発明者 ビッコロ、エンザ

イタリア国、キエーティ、66034 ランチャーノ、104、ヴィア イッポリート サビーノ

(72)発明者 ボンツィアニ、サラ

イタリア国、テーラモ、64039 ペンナ サンタンドレーア、190、ヴィア ナツィオナーレ

(72)発明者 サラ、ジャンルカ

イタリア国、ペスカーラ、65125 ペスカーラ、4、ヴィア エマヌエーレ ディ シモーネ

Fターム(参考) 4C076 AA95 BB11 CC27 EE41 EE59 FF67 FF68

4C085 AA26 AA27 BB01 BB11 CC21 DD62 EE01 GG01