

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7547205号

(P7547205)

(45)発行日 令和6年9月9日(2024.9.9)

(24)登録日 令和6年8月30日(2024.8.30)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

Z N A

A 6 1 K 47/68 (2017.01)

A 6 1 K 47/68

A 6 1 K 47/65 (2017.01)

A 6 1 K 47/65

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 38/06 (2006.01)

A 6 1 K 38/06

請求項の数 35 (全131頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-548783(P2020-548783)

(73)特許権者 510214045

(86)(22)出願日 平成31年3月12日(2019.3.12)

ザイムワークス ビーシー インコーポレ
イテッド(65)公表番号 特表2021-515793(P2021-515793
A)

カナダ ブイ5ティール 1ジー4 プリテ

(43)公表日 令和3年6月24日(2021.6.24)

イッシュ コロンビア州 バンクーバー

(86)国際出願番号 PCT/CA2019/050303

イースト フォース アベニュー 1 1 4

(87)国際公開番号 WO2019/173911

スイート 8 0 0

(87)国際公開日 令和1年9月19日(2019.9.19)

(74)代理人 100102978

審査請求日 令和4年3月10日(2022.3.10)

弁理士 清水 初志

(31)優先権主張番号 62/642,483

(74)代理人 100160923

(32)優先日 平成30年3月13日(2018.3.13)

弁理士 山口 裕孝

(33)優先権主張国・地域又は機関

(74)代理人 100119507

米国(US)

弁理士 刑部 俊

(31)優先権主張番号 62/658,477

(74)代理人 100142929

(32)優先日 平成30年4月16日(2018.4.16)

弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗HER2バイパラトピック抗体-薬物コンジュゲート及び使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

低い平均薬物抗体比(DAR)でリンカー(L)を介してオーリスタチン類似体にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体を含む抗体-薬物コンジュゲートであって、

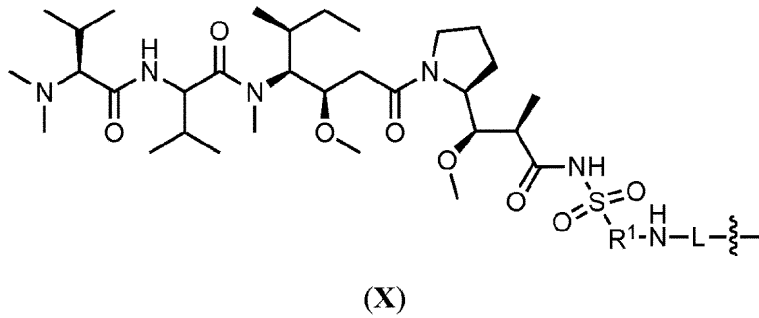
前記抗HER2バイパラトピック抗体は、

SEQ ID NO: 70、71及び72にそれぞれ示されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含むVHドメイン、並びにSEQ ID NO: 67、68、及び69にそれぞれ示されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含むVLドメインを含む、第1の抗原結合ポリペプチド構築物、並びに

SEQ ID NO: 39、41、及び40にそれぞれ示されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含むVHドメイン、並びにSEQ ID NO: 27、29、及び28にそれぞれ示されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含むVLドメインを含む、第2の抗原結合ポリペプチド構築物

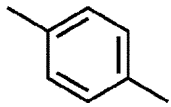
を含み、

オーリスタチン類似体およびリンカーは、一般式(X)：



10

を有し、
R¹が、



であり、
Lは、リンカーであり、



20

は、前記抗HER2バイパルトピック抗体へのリンカーの付着点を表し、
前記低い平均DARは、1.5～2.5の平均DARである、
前記抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項2】

前記平均DARが1.8～2.5である、請求項1に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項3】

前記平均DARが約2.0である、請求項1に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項4】

前記コンジュゲートが、DAR0の種を10%～25%含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

30

【請求項5】

前記コンジュゲートが、DAR0の種を15%～25%含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項6】

前記コンジュゲートが、DAR6以上の種を0%～10%含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項7】

Lが切断可能リンカーである、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

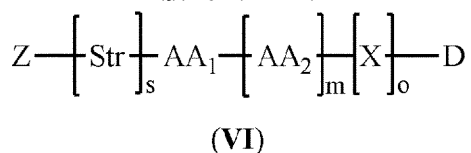
40

【請求項8】

Lが、プロテアーゼ切断可能リンカーである、請求項7に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項9】

Lが、一般式(VI)：



50

を有し、

式中、

Zは、前記抗HER2バイパトリック抗体上の標的基と反応できる官能基であり、

`Str` は、ストレッチャーであり；

AA₁及びAA₂は、それぞれ独立してアミノ酸であり、AA₁－[AA₂]_mは、プロテアーゼ切断部位を形成し；

X は、自壊性基であり；

Dは、前記オーリスタチン類似体への付着点であり；

s は、0 または 1 であり；

m は、 $1 \sim 4$ の整数であり、

$\circ$ は、 0 、 1 、または 2 である、

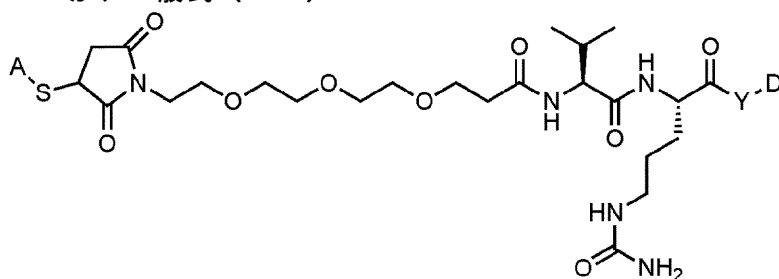
請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 10】

s が 1 であり、o が 0 である、請求項 9 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 1 1】

L が、一般式 (IX) :



(IX)

を有し、

式中、

A-S-は、前記抗HER2バイパロトピック抗体への前記付着点であり；

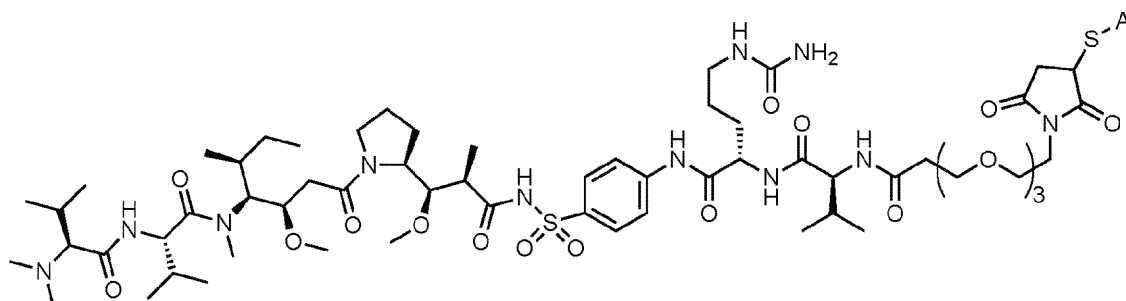
Yは、1つ以上の追加のリンカー構成要素であるか、または存在せず、

Dは、前記オーリスタチン類似体への前記付着点である、

請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 12】

前記オーリスタチン類似体およびリンカーが構造：



を有し、

A-S-は、前記抗HER2バイパロトピック抗体への前記付着点である、

請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 13】

前記抗HER2バイパラトピック抗体が、対応する二価の単一特異性抗体と比較して、HER2発現細胞へのより高い内在化を示す、請求項1～12のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 14】

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物が s c F v であり、前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物が F a b である、請求項1～13のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 15】

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物が、SEQ ID NO：66に示されるVH配列およびSEQ ID NO：65に示されるVL配列を含み、前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、SEQ ID NO：38に示されるVH配列およびSEQ ID NO：26に示されるVL配列を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

10

【請求項 16】

前記抗HER2バイパラトピック抗体が、第1鎖(H1)、第2鎖(H2)および第3鎖(L1)を含み、

H2が第1の抗原結合ポリペプチド構築物を含み、H1およびL1が第2の抗原結合ポリペプチド構築物を含み、

H1がSEQ ID NO：36に示される配列を含み、H2がSEQ ID NO：63に示される配列を含み、L1がSEQ ID NO：24に示される配列を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 17】

前記抗HER2バイパラトピック抗体が、IgG Fc領域である足場をさらに含み、前記第1及び第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、前記足場に作動可能に連結されている、請求項1～15のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

20

【請求項 18】

前記IgG Fc領域が、修飾CH3ドメインを含むヘテロ二量体Fc領域であり、前記修飾CH3ドメインが、第1のポリペプチド配列および第2のポリペプチド配列を含み、

(a) 前記修飾CH3ドメインの前記第1のポリペプチド配列は、アミノ酸修飾L351Y、F405A及びY407Vを含み、前記修飾CH3ドメインの前記第2のポリペプチド配列は、アミノ酸修飾T366L、K392M及びT394Wを含む；または

(b) 前記修飾CH3ドメインの前記第1のポリペプチド配列は、アミノ酸修飾L351Y、F405A及びY407Vを含み、前記修飾CH3ドメインの前記第2のポリペプチド配列は、アミノ酸修飾T366L、K392L及びT394Wを含む；または

30

(c) 前記修飾CH3ドメインの前記第1のポリペプチド配列は、アミノ酸修飾T350V、L351Y、F405A及びY407Vを含み、修飾CH3ドメインの前記第2のポリペプチド配列は、アミノ酸修飾T350V、T366L、K392M及びT394Wを含む；

または

(d) 前記修飾CH3ドメインの前記第1のポリペプチド配列は、アミノ酸修飾T350V、L351Y、F405A及びY407Vを含み、前記修飾CH3ドメインの前記第2のポリペプチド配列は、アミノ酸修飾T350V、T366L、K392L及びT394Wを含む；

40

または

(e) 前記修飾CH3ドメインの前記第1のポリペプチド配列は、アミノ酸修飾T350V、L351Y、S400E、F405A及びY407Vを含み、前記修飾CH3ドメインの前記第2のポリペプチド配列は、アミノ酸修飾T350V、T366L、N390R、K392M及びT394Wを含む、

請求項17に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

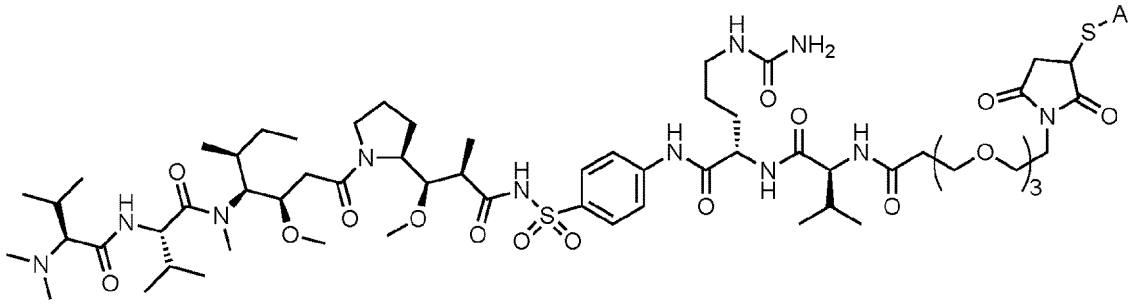
【請求項 19】

低い平均薬物抗体比(DAR)でリンカーを介してオーリスタチン類似体にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体を含む抗体－薬物コンジュゲートであって、

抗HER2バイパラトピック抗体は、SEQ ID NO：36に示される配列を含む第

50

1 鎖 (H 1)、SEQ ID NO: 63 に示される配列を含む第 2 鎖 (H 2)、および SEQ ID NO: 24 に示される配列を含む第 3 鎖 (L 1) を含み、
 オーリスタチン類似体およびリンカーは、構造：



10

を有し、

A-S-は、前記抗HER2バイパロトピック抗体への付着点であり、
 前記低い平均DARは、1.8～2.5の平均DARである、
 前記抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項20】

請求項1～19のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲート及び薬学的に許容される担体または希釈剤を含む、医薬組成物。

【請求項21】

HER2発現癌の治療のための医薬の製造における、請求項1～19のいずれか1項に記載の抗体-薬物コンジュゲートの使用。

【請求項22】

前記HER2発現癌が、乳癌、卵巣癌、肺癌または胃癌である、請求項21に記載の使用。

【請求項23】

前記HER2発現癌が乳癌である、請求項21に記載の使用。

【請求項24】

前記HER2発現癌が卵巣癌である、請求項21に記載の使用。

【請求項25】

以下の工程を含む、抗体-薬物コンジュゲートを調製する方法：

抗HER2バイパロトピック抗体を、低い平均薬物抗体比(DAR)でリンカー-毒素にコンジュゲートする工程であって、

前記抗HER2バイパロトピック抗体は、

SEQ ID NO: 70、71及び72にそれぞれ示されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含むVHドメイン、並びにSEQ ID NO: 67、68、及び69にそれぞれ示されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含むVLドメインを含む、第1の抗原結合ポリペプチド構築物、並びに

SEQ ID NO: 39、41、及び40にそれぞれ示されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含むVHドメイン、並びにSEQ ID NO: 27、29、及び28にそれぞれ示されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含むVLドメインを含む、第2の抗原結合ポリペプチド構築物

を含み、

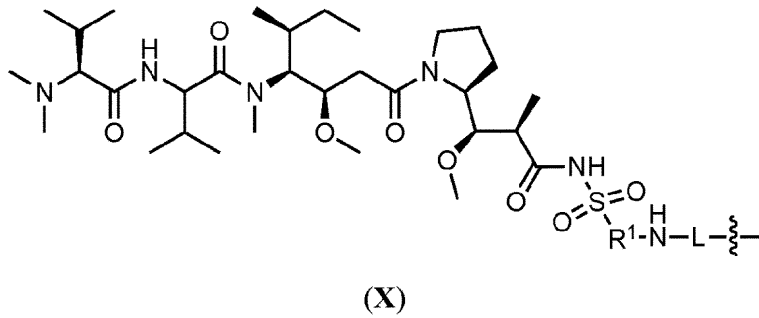
前記リンカー-毒素が、一般式(X)：

20

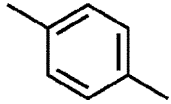
30

40

50



ここで、 R^1 が、



であり、

L は、リンカーであり、



は、前記抗HER2バイパルトピック抗体へのリンカーの付着点を表す、
を有する、オーリスタチン類似体およびリンカーであり、
前記低い平均DARは、1.5～2.5の平均DARである、工程。

【請求項26】

前記抗HER2バイパルトピック抗体によって含まれる1つ以上の鎖間ジスルフィド結合を還元すること、および前記リンカー-毒素をシステイン残基にコンジュゲートすることを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記抗HER2バイパルトピック抗体によって含まれる1つ以上の鎖間ジスルフィド結合を部分的に還元すること、および前記リンカー-毒素をシステイン残基にコンジュゲートすることを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項28】

前記平均DARが1.8～2.5である、請求項25～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

前記平均DARが約2.0である、請求項25～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

前記コンジュゲートが、DAR0の種を10%～25%含む、請求項25～29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】

前記コンジュゲートが、DAR6以上の種を0%～10%含む、請求項25～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

前記オーリスタチン類似体およびリンカーが構造：

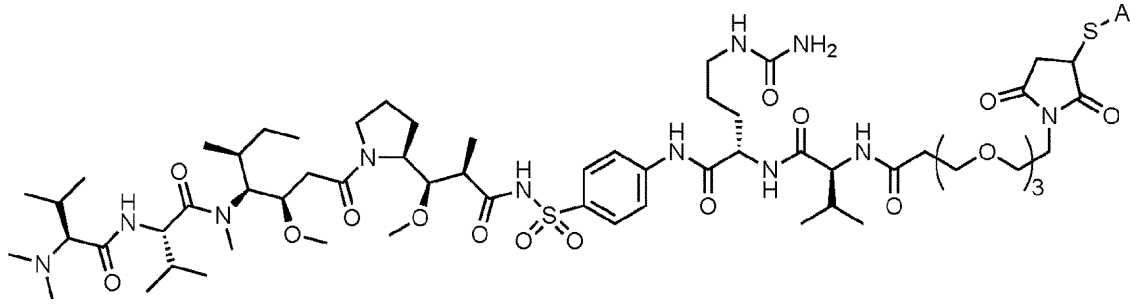
10

20

30

40

50



を有し、

A-S-は、前記抗HER2バイパラトピック抗体への前記付着点である、
請求項25～31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物がscFvであり、前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物がFabである、請求項25～32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項34】

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物が、SEQ ID NO：66に示されるVH配列およびSEQ ID NO：65に示されるVL配列を含み、前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、SEQ ID NO：38に示されるVH配列およびSEQ ID NO：26に示されるVL配列を含む、請求項25～33のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

前記抗HER2バイパラトピック抗体が、第1鎖(H1)、第2鎖(H2)および第3鎖(L1)を含み、

H2が第1の抗原結合ポリペプチド構築物を含み、H1およびL1が第2の抗原結合ポリペプチド構築物を含み、

H1がSEQ ID NO：36に示される配列を含み、H2がSEQ ID NO：63に示される配列を含み、L1がSEQ ID NO：24に示される配列を含む、
請求項25～33のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、がん治療の分野に関し、特に、バイパラトピック抗HER2抗体及びオーリストアチン類似体を含む抗体-薬物コンジュゲートに関する。

【背景技術】

【0002】

HER2 (ErbB2) は、膜貫通型表面結合型受容体チロシンキナーゼであり、受容体チロシンキナーゼのErbBファミリーのメンバーであり、通常、細胞成長及び分化を導くシグナル伝達経路に関与している。HER2は、乳癌患者の約4分の1で過剰発現していることが判明しているため、乳癌治療の有望なターゲットである (Bang et al, Nature Medicine 7:548 (2001) (非特許文献1))。

【0003】

ハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ、米国特許第5,821,337号 (特許文献1)) は、HER2陽性乳癌の治療のために開発された最初のモノクローナル抗体であり、患者の生存期間が延長されたため、現在では、HER2陰性乳癌の患者に対するものと同じである。ペルツズマブ (パージェタ (登録商標)、米国特許第7,862,817号 (特許文献2)) は、細胞の表面でHER2受容体が他のHER受容体 (EGFR/HER1、HER3及びHER4) とペアになる (二量体化する) のを防ぐように特別に設計されたヒト化モノクローナル抗体であり、腫瘍の成長及び生存において、ある役割を果たすと考えられているプロセスである。パージェタ、ハーセプチン、及び化学療法の組み合わせは、HERシグナル伝達経路のより包括的な遮断をもたらすと考えられている。

ペルツズマブは、二量体化に不可欠なHER2のドメインIIに結合し、トラストズマブは、HER2の細胞外ドメインIVに結合する。

【0004】

Li et al (Cancer Res., 73:6471-6483 (2013)) (非特許文献2) は、天然のトラストズマブ及びペルツズマブ配列に基づいており、トラストズマブ耐性を克服する、HER2に対する二重特異性二価抗体について記載している。他の二重特異性抗HER2抗体が記載されている（国際特許出願公開WO2015/077891号（特許文献3）及びWO2016/179707号（特許文献4）；米国特許出願公開第2014/0170148（特許文献5）、同第2015/0284463号（特許文献6）、同第2017/0029529号（特許文献7）、及び同第2017/0291955号（特許文献8）；米国特許第9,745,382号（特許文献9））。チューブリン誘導体に部位特異的にコンジュゲートした、HER2を標的とするバイパロトピック抗体を含む抗体-薬物コンジュゲートも記載されている（Li et al., Cancer Cell, 29:117-129 (2016)（非特許文献3））。

【0005】

オーリスタチンは、抗がん活性を有する強力な微小管阻害剤であるドラスタチン10の合成類似体である。モノメチルオーリスタチンE（MMAE）またはモノメチルオーリスタチンF（MMAF）などのオーリスタチンペイロードを含む抗体-薬物コンジュゲートが記載されている（米国特許第7,498,298号（特許文献10）及び同第7,659,241号（特許文献11）；国際特許出願公開第WO2002/088172号（特許文献12）及びWO2016/041082（特許文献13））。国際特許出願公開第WO2106/041082号（特許文献14）には、N-アシルスルホンアミド修飾オーリスタチン及び抗体-薬物コンジュゲートペイロードとしてのそれらの使用について記載している。

【0006】

この背景情報は、出願人が本開示に関連すると考える既知の情報を作成する目的で提供される。前述の情報のいずれかが、特許請求された発明に対する先行技術を構成することを認めることは必ずしも意図されておらず、そのように解釈されるべきでもない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】米国特許第5,821,337号

【文献】米国特許第7,862,817号

【文献】国際特許出願公開WO2015/077891号

【文献】WO2016/179707号

【文献】米国特許出願公開第2014/0170148

【文献】米国特許出願公開第2015/0284463号

【文献】米国特許出願公開第2017/0029529号

【文献】米国特許出願公開第2017/0291955号

【文献】米国特許第9,745,382号

【文献】米国特許第7,498,298号

【文献】米国特許第7,659,241号

【文献】国際特許出願公開第WO2002/088172号

【文献】WO2016/041082

【文献】国際特許出願公開第WO2106/041082号

【非特許文献】

【0008】

【文献】Bange et al, Nature Medicine 7:548 (2001)

【文献】Li et al, Cancer Res., 73:6471-6483 (2013)

【文献】Li et al., Cancer Cell, 29:117-129 (2016)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

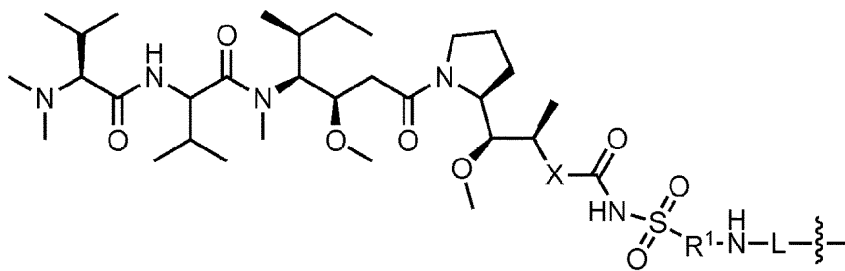
【0009】

本明細書に記載されているのは、抗HER2バイパラトピック抗体-薬物コンジュゲート及び使用方法である。一態様では、本開示は、低い平均薬物抗体比(DAR)でリンカー(L)を介してオーリスタチン類似体にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体を含む抗体-薬物コンジュゲートに関し、抗HER2バイパラトピック抗体は、第1のHER2エピトープに結合する第1の抗原結合ポリペプチド構築物及び第2のHER2エピトープに結合する第2の抗原結合ポリペプチド構築物を含み、第1及び第2のHER2エピトープは異なるエピトープであり、低い平均DARは3.9未満の平均DARである。

10

【0010】

抗体-薬物コンジュゲートの特定の実施形態では、オーリスタチン類似体-リンカーは、一般式(II)：



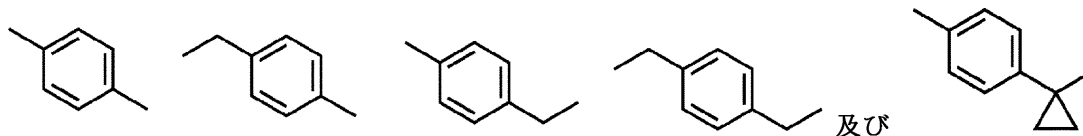
20

(II)

を有し、式中、

Xは $-C(O)NHCH(CH_2R^2)-$ であるか、またはXは存在せず；

R^1 は、



30

から選択され；

Lが、リンカーであり、

〜

は、抗HER2バイパラトピック抗体へのリンカー-毒素の付着点を表し、

抗HER2バイパラトピック抗体は、第1のHER2エピトープに結合する第1の抗原結合ポリペプチド構築物及び第2のHER2エピトープに結合する第2の抗原結合ポリペプチド構築物を含み、第1及び第2のHER2エピトープは異なるエピトープであり、低い平均DARは、3.9未満の平均DARである。

40

【0011】

特定の実施形態では、抗体-薬物コンジュゲートの低い平均DARは、0.5〜3.5または0.5〜2.5である。

【0012】

特定の実施形態では、抗体-薬物コンジュゲートは、DAR0の種を5%以上またはDAR0の種を15%以上含む。いくつかの実施形態では、抗体-薬物コンジュゲートは、DAR0の種を約5%〜約50%、またはDAR0の種を約10%〜約30%、またはD

50

A R Oの種を約10%～約25%、またはD A R Oの種を約15%～約25%含む。

【0013】

ある実施形態では、抗体－薬物コンジュゲートは、D A R 6以上の種を25%以下、またはD A R 6以上の種を15%以下含む。いくつかの実施形態では、抗体－薬物コンジュゲートは、D A R 6以上の種を0%～約15%、またはD A R 6以上の種を約0%～約10%含む。

【0014】

本開示の別の態様は、本明細書に記載の抗H E R 2バイパラトピック抗体－薬物コンジュゲート及び薬学的に許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物に関する。

【0015】

別の態様は、H E R 2発現癌細胞の成長を阻害する方法に関し、この方法は、癌細胞を、本明細書に記載の有効量の抗H E R 2バイパラトピック抗体－薬物コンジュゲートと接触させることを含む。

【0016】

別の態様は、H E R 2発現癌を有する対象に、本明細書に記載の有効量の抗H E R 2バイパラトピック抗体－薬物コンジュゲートを投与することを含む、H E R 2発現癌を治療する方法に関する。

【0017】

別の態様は、治療に使用するための本明細書に記載の抗体－薬物コンジュゲートに関する。

【0018】

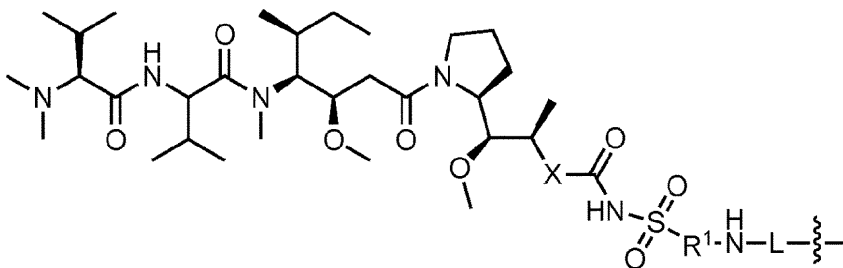
別の態様は、それを必要とする対象におけるH E R 2発現癌を治療するために使用するための、本明細書に記載の抗体－薬物コンジュゲートに関する。

【0019】

別の態様は、H E R 2発現癌を治療するための医薬の製造における、本明細書に記載の抗体－薬物コンジュゲートの使用に関する。

【0020】

別の態様は、リンカー（L）を介してオーリスタチン類似体にコンジュゲートした抗H E R 2バイパラトピック抗体を含む抗体－薬物コンジュゲート組成物に関し、オーリスタチン類似体－リンカーは、一般式（II）：

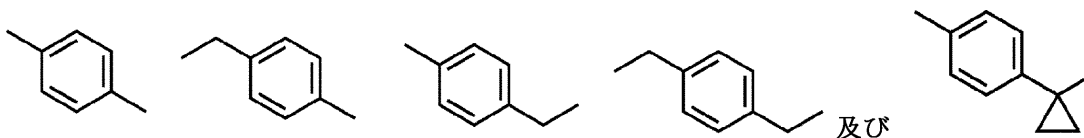


(II)

を有し、式中、

Xは存在せず；

R¹は、



及び

から選択され；

Lが、リンカーであり、

10

20

30

40

50

〜

は、抗HER2バイパラトピック抗体へのオーリスタチン類似体ーリンカーの付着点を表し、

抗HER2バイパラトピック抗体は、HER2のECD4の第1のHER2エピトープに結合する第1の抗原結合ポリペプチド構築物及びHER2のECD2の第2のHER2エピトープに結合する第2の抗原結合ポリペプチド構築物を含み、

抗体ー薬物コンジュゲート組成物は、0.5～2.5の平均DARを有し、かつDAR0の種を約10%～約30%およびDAR6以上の種を0%～約15%有する。

10

[本発明1001]

低い平均薬物抗体比（DAR）でリンカー（L）を介してオーリスタチン類似体にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体を含む抗体ー薬物コンジュゲートであって、

前記抗HER2バイパラトピック抗体は、第1のHER2エピトープに結合する第1の抗原結合ポリペプチド構築物及び第2のHER2エピトープに結合する第2の抗原結合ポリペプチド構築物を含み、前記第1及び第2のHER2エピトープは異なるエピトープであり、

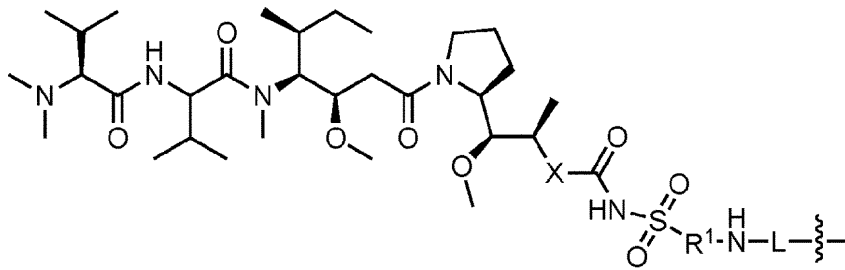
前記低い平均DARは、3.9未満の平均DARである、

前記抗体ー薬物コンジュゲート。

20

[本発明1002]

前記オーリスタチン類似体リンカーが、一般式（II）



(II)

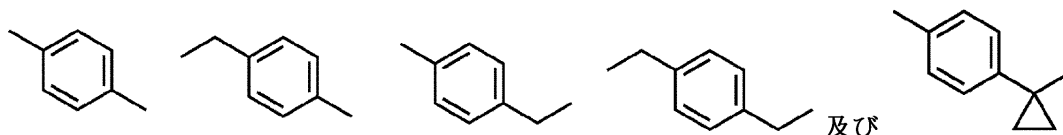
30

を有し、

式中、

Xは $-C(O)NHCH(CH_2R^2)-$ であるか、またはXは存在せず；

R¹は、



及び

40

から選択され；

Lが、リンカーであり、

〜

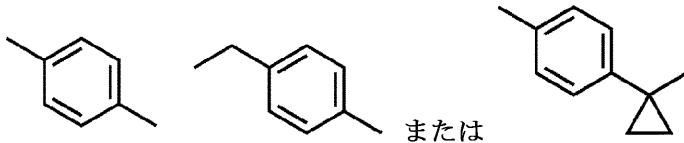
は、前記抗HER2バイパラトピック抗体への前記オーリスタチン類似体ーリンカーの付着点を表す、

本発明1001の抗体ー薬物コンジュゲート。

[本発明1003]

R¹が、

50



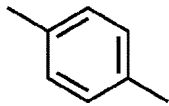
である、本発明1002の抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1004]

Xが存在しない、本発明1002の抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1005]

R¹が、



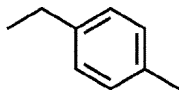
である、本発明1004の抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1006]

Xが $-C(O)NHCH(CH_2R^2)-$ である、本発明1002の抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1007]

R¹が、



である、本発明1006の抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1008]

前記平均DARが0.5～3.5である、本発明1001～1007のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1009]

前記平均DARが0.5～2.5である、本発明1001～1007のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1010]

前記コンジュゲートが、DAR0の種を5%以上含む、本発明1001～1009のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1011]

前記コンジュゲートが、DAR0の種を15%以上含む、本発明1001～1009のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1012]

前記コンジュゲートが、DAR0の種を約5%～約50%含む、本発明1001～1009のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1013]

前記コンジュゲートが、DAR0の種を約10%～約30%含む、本発明1001～1009のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1014]

前記コンジュゲートが、DAR0の種を約10%～約25%含む、本発明1001～1009のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1015]

前記コンジュゲートが、DAR0の種を約15%～約25%含む、本発明1001～1009のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1016]

前記コンジュゲートが、D A R 6以上の種を25%以下含む、本発明1001～1015のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1017]

前記コンジュゲートが、D A R 6以上の種を15%以下含む、本発明1001～1015のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1018]

前記コンジュゲートが、D A R 6以上の種を0%～約15%含む、本発明1001～1015のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1019]

前記コンジュゲートが、D A R 6以上の種を約0%～約10%含む、本発明1001～1015のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1020]

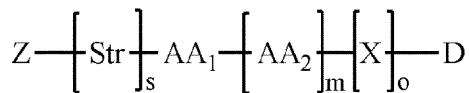
Lが切断可能リンカーである、本発明1001～1019のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1021]

Lが、プロテアーゼ切断可能リンカーである、本発明1020の抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1022]

Lが、一般式(VI)



(VI)

を有し、

式中、

Zは、前記抗HER2バイパラトピック抗体上の標的基と反応できる官能基であり、

Strは、ストレッチャーであり；

AA₁及びAA₂は、それぞれ独立してアミノ酸であり、AA₁-[AA₂]_mは、プロテアーゼ切断部位を形成し；

Xは、自壊性基であり；

Dは、前記オーリスタチン類似体への付着点であり；

sは、0または1であり；

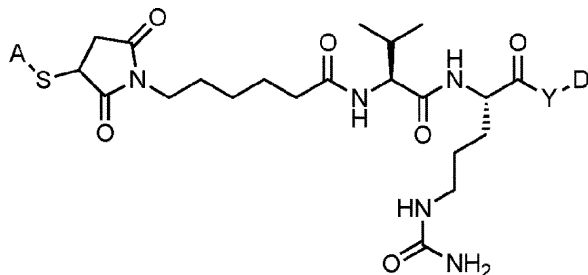
mは、1～4の整数であり、

oは、0、1、または2である、

本発明1001～1021のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1023]

Lが、一般式(VIII)：



(VIII)

を有し、

式中、

10

20

30

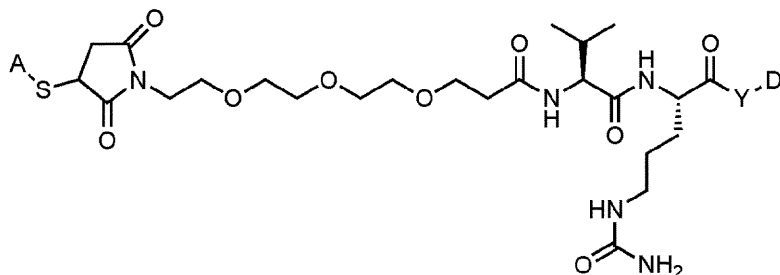
40

50

A-S-は、前記抗HER2バイパロトピック抗体への付着点であり；
Yは、1つ以上の追加のリンカー構成要素であるか、または存在せず、
Dは、前記オーリスタチン類似体への前記付着点である、
 本発明1001～1021のいずれかの抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1024]

Lが、一般式(IX)



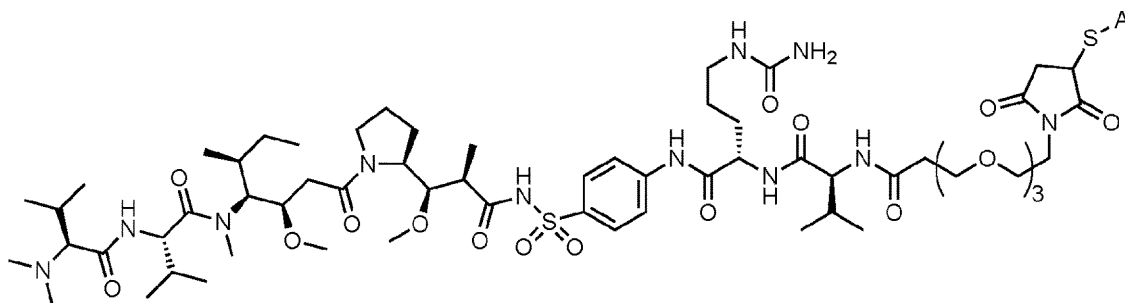
(IX)

を有し、
 式中、

A-S-は、前記抗HER2バイパロトピック抗体への前記付着点であり；
Yは、1つ以上の追加のリンカー構成要素であるか、または存在せず、
Dは、前記オーリスタチン類似体への前記付着点である、
 本発明1001～1021のいずれかの抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1025]

前記オーリスタチン類似体リンカーが構造：



を有し、

A-S-は、前記抗HER2バイパロトピック抗体への前記付着点である、
 本発明1001の抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1026]

前記平均DARが0.5～2.5である、本発明1025の抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1027]

前記コンジュゲートが、DAR0の種を5%以上含む、本発明1025または1026の抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1028]

前記コンジュゲートが、DAR0の種を約5%～約50%含む、本発明1025または1026の抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1029]

前記コンジュゲートが、DAR6以上の種を25%以下含む、本発明1025または1026の抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1030]

前記コンジュゲートが、DAR6以上の種を0%～約15%含む、本発明1025または1026の抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1031]

前記抗HER2バイパルトピック抗体が、対応する二価の単一特異性抗体と比較してより高い親和性でHER2に結合する、本発明1001～1030のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1032]

前記抗HER2バイパルトピック抗体が、対応する二価の単一特異性抗体と比較して、HER2発現細胞へのより高い内在化を示す、本発明1001～1031のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1033]

前記第1及び第2の抗原結合ポリペプチド構築物が独立して、scFv、Fab、Fab'またはsdAbである、本発明1001～1032のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1034]

前記第1及び第2の抗原結合ポリペプチド構築物が独立して、scFvまたはFabである、本発明1033の抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1035]

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物がscFvであり、前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物がFabである、本発明1034の抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1036]

前記第1及び第2のHER2エピトープが重複しないエピトープである、本発明1001～1035のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1037]

前記第1及び第2のHER2エピトープがHER2の異なるドメイン上にある、本発明1001～1036のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1038]

前記第1のHER2エピトープがHER2のECD4にあり、前記第2のHER2エピトープがHER2のECD2にある、本発明1037の抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1039]

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物が、HER2への結合についてトラスツマブと競合する、本発明1001～1038のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1040]

前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、HER2への結合についてペルツマブと競合する、本発明1001～1039のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1041]

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物が、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903またはv6717のいずれか1つのECD4結合アームからのCDR配列を含む、本発明1001～1038のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1042]

前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903、v6717、v7133、v15079、v15080、v15081、v15082、v15083、v15084、またはv15085のいずれか1つのECD2結合アームからのCDR配列を含む、本発明1001～1038および1041のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1043]

前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、v10000の前記ECD2結合アームからの前記CDR配列を含む、本発明1001～1038および1041のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明1044]

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物が、v10000の前記ECD4結合アームからの前記CDR配列を含み、前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、v10000の前記ECD2結合アームからの前記CDR配列を含む、本発明1001～1038のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

10

20

30

40

50

[本発明1045]

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物が、v10000の前記ECD4結合アームからのCDRのセットに対して90%以上の配列同一性を有する6つのCDRのセットを含み、前記抗原結合ポリペプチド構築物が、ECD4に結合する能力を保持している、本発明1001～1038のいずれかの抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1046]

前記第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、v10000の前記ECD2結合アームからのCDRのセットに対して90%以上の配列同一性を有する6つのCDRのセットを含み、前記抗原結合ポリペプチド構築物が、ECD2に結合する能力を保持している、本発明1001～1038および1045のいずれかの抗体-薬物コンジュゲート。

10

[本発明1047]

前記第1の抗原結合ポリペプチド構築物が、SEQ ID NO: 27、28、29、39、40及び41に示されるCDR配列を含み、かつ第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、SEQ ID NO: 67、68、69、70、71及び72に示されるCDR配列を含む、本発明1001～1038のいずれかの抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1048]

前記抗HER2バイパルトピック抗体が足場をさらに含み、前記第1及び第2の抗原結合ポリペプチド構築物が、前記足場に作動可能に連結されている、本発明1001～1047のいずれかの抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1049]

前記足場が、IgG Fc領域である、本発明1048の抗体-薬物コンジュゲート。

20

[本発明1050]

前記IgG Fc領域が、修飾されたCH3ドメインを含むヘテロ二量体Fc領域である、本発明1049の抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1051]

前記IgG Fc領域は、
F405位及びY407位のアミノ酸修飾を含みかつ任意でL351位のアミノ酸修飾をさらに含む第1のポリペプチド配列と、

T366位及びT394位のアミノ酸修飾を含みかつ任意でK392位のアミノ酸修飾をさらに含む第2のポリペプチド配列と

30

を有する修飾CH3ドメインを含むヘテロ二量体Fc領域であり、

F405位の前記アミノ酸修飾は、F405A、F405S、F405TまたはF405Vであり、Y407位の前記アミノ酸修飾は、Y407IまたはY407Vであり、T366位の前記アミノ酸修飾は、T366I、T366LまたはT366Mであり、T394位の前記アミノ酸修飾は、T394Wであり、L351位の前記アミノ酸修飾はL351Yであり、K392位の前記アミノ酸修飾はK392F、K392LまたはK392Mである、

本発明1049の抗体-薬物コンジュゲート。

[本発明1052]

(a) 前記修飾CH3ドメインの前記第1のポリペプチド配列は、前記アミノ酸修飾L351Y、F405A及びY407Vを含み、前記修飾CH3ドメインの前記第2のポリペプチド配列は、前記アミノ酸修飾T366L、K392M及びT394Wを含む；または

40

(b) 前記修飾CH3ドメインの前記第1のポリペプチド配列は、前記アミノ酸修飾L351Y、F405A及びY407Vを含み、前記修飾CH3ドメインの前記第2のポリペプチド配列は、前記アミノ酸修飾T366L、K392L及びT394Wを含む；または

(c) 前記修飾CH3ドメインの前記第1のポリペプチド配列は、前記アミノ酸修飾T350V、L351Y、F405A及びY407Vを含み、前記修飾CH3ドメインの前記第2のポリペプチド配列は、前記アミノ酸修飾T350V、T366L、K392M及びT394Wを含む；または

(d) 前記修飾CH3ドメインの前記第1のポリペプチド配列は、前記アミノ酸修飾T350V、L351Y、F405A及びY407Vを含み、前記修飾CH3ドメインの前記第2のポリ

50

ペプチド配列は、前記アミノ酸修飾 T 350 V、T 366 L、K 392 L 及び T 394 W を含む；
または

(e) 前記修飾 C H 3 ドメインの前記第 1 のポリペプチド配列は、前記アミノ酸修飾 T 350 V、L 351 Y、S 400 E、F 405 A 及び Y 407 V を含み、前記修飾 C H 3 ドメインの前記第 2 のポリペプチド配列は、前記アミノ酸修飾 T 350 V、T 366 L、N 390 R、K 392 M 及び T 394 W を含む、

本発明 1051 の抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明 1053]

本発明 1001～1052 のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート及び薬学的に許容される担体または希釈剤を含む、医薬組成物。

[本発明 1054]

H E R 2 発現癌細胞を有効量の本発明 1001～1052 のいずれかの抗体－薬物コンジュゲートと接触させることを含む、H E R 2 発現癌細胞の成長を阻害する方法。

[本発明 1055]

H E R 2 発現癌を有する対象に、有効量の本発明 1001～1052 のいずれかの抗体－薬物コンジュゲートを投与することを含む、H E R 2 発現癌を治療する方法。

[本発明 1056]

前記 H E R 2 発現癌が、乳癌、卵巣癌、肺癌または胃癌である、本発明 1055 の方法。

[本発明 1057]

前記 H E R 2 発現癌が乳癌である、本発明 1055 の方法。

[本発明 1058]

前記 H E R 2 発現癌が卵巣癌である、本発明 1055 の方法。

[本発明 1059]

前記 H E R 2 発現癌が免疫組織化学により H E R 2 陰性としてスコア付けされる、本発明 1055～1058 のいずれかの方法。

[本発明 1060]

治療に使用するための、本発明 1001～1052 のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明 1061]

H E R 2 発現癌の治療を必要とする対象において H E R 2 発現癌を治療するために使用するための、本発明 1001～1052 のいずれかの抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明 1062]

前記 H E R 2 発現癌が、乳癌、卵巣癌、肺癌または胃癌である、本発明 1061 の使用のための抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明 1063]

前記 H E R 2 発現癌が、乳癌である、本発明 1061 の使用のための抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明 1064]

前記 H E R 2 発現癌が、卵巣癌である、本発明 1061 の使用のための抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明 1065]

前記 H E R 2 発現癌が免疫組織化学により H E R 2 陰性としてスコア付けされる、本発明 1061～1064 のいずれかの使用のための抗体－薬物コンジュゲート。

[本発明 1066]

H E R 2 発現癌の前記治療のための医薬の製造における、本発明 1001～1052 のいずれかの抗体－薬物コンジュゲートの使用。

[本発明 1067]

前記 H E R 2 発現癌が、乳癌、卵巣癌、肺癌または胃癌である、本発明 1066 の使用。

[本発明 1068]

前記 H E R 2 発現癌が乳癌である、本発明 1066 の使用。

[本発明 1069]

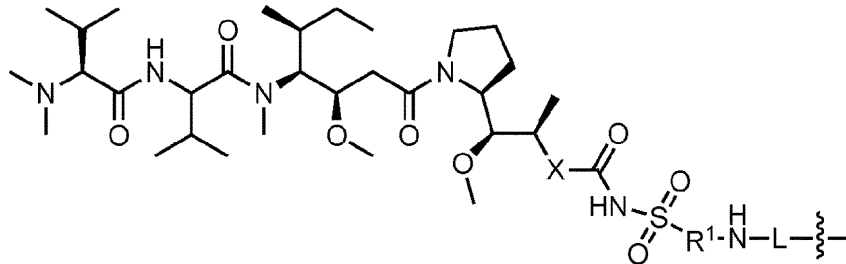
前記HER2発現癌が卵巣癌である、本発明1066の使用。

[本発明1070]

前記HER2発現癌が免疫組織化学によりHER2陰性としてスコア付けされる、本発明1066～1069のいずれかの方法。

[本発明1071]

リンカー（L）を介してオーリスタチン類似体にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体を含む抗体－薬物コンジュゲート組成物であって、
前記オーリスタチン類似体－リンカーは、一般式（II）：



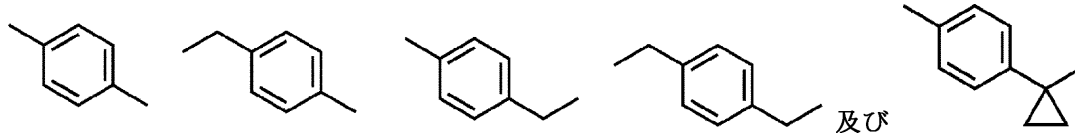
(II)

を有し、

式中、

Xは存在せず；

R¹は、



及び

から選択され；

Lが、リンカーであり、

〜

は、前記抗HER2バイパラトピック抗体への前記オーリスタチン類似体－リンカーの付着点を表し；

前記抗HER2バイパラトピック抗体は、HER2のECD4の第1のHER2エピトープに結合する第1の抗原結合ポリペプチド構築物及びHER2のECD2の第2のHER2エピトープに結合する第2の抗原結合ポリペプチド構築物を含み、

前記抗体－薬物コンジュゲート組成物は、0.5～2.5の平均DARを有し、かつDAR0の種を約10%～約30%およびDAR6以上の種を0%～約15%有する、

前記抗体－薬物コンジュゲート組成物。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】（A）v17597（DAR4でリンカー－毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体）及び（B）v21252（DAR2でリンカー－毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体）の非還元及び還元SDS-PAGEを示す図である。それぞれを親抗HER2バイパラトピック抗体（v10000）と比較した。

【図2A】（A）親抗HER2バイパラトピック抗体v10000の疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）トレース、（B）v17597（リンカー－毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体、平均DAR3.92を示す）、及び（

C) v 2 1 2 5 2 (リンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体、平均DAR2.07を示す)を示す図である。精製されたADCの平均DARに対するDAR0、DAR2、DAR4、及びDAR6の種の個々の寄与を(D)及び(E)に示す。

【図2B】(A)親抗HER2バイパルトピック抗体v10000の疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)トレース、(B)v17597(リンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体、平均DAR3.92を示す)、及び(C)v21252(リンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体、平均DAR2.07を示す)を示す図である。精製されたADCの平均DARに対するDAR0、DAR2、DAR4、及びDAR6の種の個々の寄与を(D)及び(E)に示す。

10

【図2C】(A)親抗HER2バイパルトピック抗体v10000の疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)トレース、(B)v17597(リンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体、平均DAR3.92を示す)、及び(C)v21252(リンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体、平均DAR2.07を示す)を示す図である。精製されたADCの平均DARに対するDAR0、DAR2、DAR4、及びDAR6の種の個々の寄与を(D)及び(E)に示す。

【図2D】(A)親抗HER2バイパルトピック抗体v10000の疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)トレース、(B)v17597(リンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体、平均DAR3.92を示す)、及び(C)v21252(リンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体、平均DAR2.07を示す)を示す図である。精製されたADCの平均DARに対するDAR0、DAR2、DAR4、及びDAR6の種の個々の寄与を(D)及び(E)に示す。

20

【図2E】(A)親抗HER2バイパルトピック抗体v10000の疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)トレース、(B)v17597(リンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体、平均DAR3.92を示す)、及び(C)v21252(リンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体、平均DAR2.07を示す)を示す図である。精製されたADCの平均DARに対するDAR0、DAR2、DAR4、及びDAR6の種の個々の寄与を(D)及び(E)に示す。

30

【図3】(A)親抗HER2バイパルトピック抗体v10000、(B)v17597(DAR4でリンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体)、及び(C)v21252(DAR2でリンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体)のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)トレースを示す図である。

【図4A】抗原陽性細胞に対するフローサイトメトリー結合アッセイの結果(v17597(DAR4でリンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体)ならびに(A)JIMT-1乳癌細胞及び(B)RT-112膀胱癌細胞に結合したv10000(親バイパルトピック抗HER2抗体)の比較、及び(C)v21252(DAR2でリンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体)及びJIMT-1乳癌細胞に結合したv10000(親抗HER2バイパルトピック抗体)の比較)を示す図である。

40

【図4B】抗原陽性細胞に対するフローサイトメトリー結合アッセイの結果(v17597(DAR4でリンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体)ならびに(A)JIMT-1乳癌細胞及び(B)RT-112膀胱癌細胞に結合したv10000(親バイパルトピック抗HER2抗体)の比較、及び(C)v21252(DAR2でリンカー-毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパルトピック抗体)及びJIMT-1乳癌細胞に結合したv10000(親抗HER2バイパルトピック

50

抗体)の比較)を示す図である。

【図4C】抗原陽性細胞に対するフローサイトメトリー結合アッセイの結果(v17597(DAR4でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)ならびに(A)JIMT-1乳癌細胞及び(B)RT-112膀胱癌細胞に結合したv10000(親バイパラトピック抗HER2抗体)の比較、及び(C)v21252(DAR2でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)及びJIMT-1乳癌細胞に結合したv10000(親抗HER2バイパラトピック抗体)の比較)を示す図である。

【図5A】v17597(DAR4でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)及びv21252(DAR2でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)によりHER2発現乳癌細胞株BT-474(A)、SK-BR-3(B)、HCC1954(C)、JIMT-1(D)及びZR-75-1(E)、及びHER2陰性細胞株MDA-MB-468(F)を治療した結果を示す図である。

10

【図5B】v17597(DAR4でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)及びv21252(DAR2でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)によりHER2発現乳癌細胞株BT-474(A)、SK-BR-3(B)、HCC1954(C)、JIMT-1(D)及びZR-75-1(E)、及びHER2陰性細胞株MDA-MB-468(F)を治療した結果を示す図である。

20

【図5C】v17597(DAR4でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)及びv21252(DAR2でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)によりHER2発現乳癌細胞株BT-474(A)、SK-BR-3(B)、HCC1954(C)、JIMT-1(D)及びZR-75-1(E)、及びHER2陰性細胞株MDA-MB-468(F)を治療した結果を示す図である。

【図5D】v17597(DAR4でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)及びv21252(DAR2でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)によりHER2発現乳癌細胞株BT-474(A)、SK-BR-3(B)、HCC1954(C)、JIMT-1(D)及びZR-75-1(E)、及びHER2陰性細胞株MDA-MB-468(F)を治療した結果を示す図である。

30

【図5E】v17597(DAR4でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)及びv21252(DAR2でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)によりHER2発現乳癌細胞株BT-474(A)、SK-BR-3(B)、HCC1954(C)、JIMT-1(D)及びZR-75-1(E)、及びHER2陰性細胞株MDA-MB-468(F)を治療した結果を示す図である。

【図5F】v17597(DAR4でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)及びv21252(DAR2でリンカー毒素001にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体)によりHER2発現乳癌細胞株BT-474(A)、SK-BR-3(B)、HCC1954(C)、JIMT-1(D)及びZR-75-1(E)、及びHER2陰性細胞株MDA-MB-468(F)を治療した結果を示す図である。

40

【図6A】HER2を発現する(A)卵巣癌細胞株SK-OV-3、及び(B)乳癌細胞株ZR-75-1及び(C)JIMT-1を様々な平均DARでリンカー毒素001にコンジュゲートしたv10000を含む抗体-薬物コンジュゲートにより治療した結果を示す図である。0.7、2.2、及び3.9の平均DARを有するADCの平均DARに対するDAR0、DAR2、DAR4、及びDAR6の種の個々の寄与を(D)に示す。

【図6B】HER2を発現する(A)卵巣癌細胞株SK-OV-3、及び(B)乳癌細胞

50

株 Z R-75-1 及び (C) J I M T-1 を様々な平均 D A R でリンカー-毒素 0 0 1 にコンジュゲートした v 1 0 0 0 0 を含む抗体-薬物コンジュゲートにより治療した結果を示す図である。0.7、2.2、及び 3.9 の平均 D A R を有する A D C の平均 D A R に対する D A R 0、D A R 2、D A R 4、及び D A R 6 の種の個々の寄与を (D) に示す。

【図 6 C】 H E R 2 を発現する (A) 卵巣癌細胞株 S K-O V-3、及び (B) 乳癌細胞株 Z R-75-1 及び (C) J I M T-1 を様々な平均 D A R でリンカー-毒素 0 0 1 にコンジュゲートした v 1 0 0 0 0 を含む抗体-薬物コンジュゲートにより治療した結果を示す図である。0.7、2.2、及び 3.9 の平均 D A R を有する A D C の平均 D A R に対する D A R 0、D A R 2、D A R 4、及び D A R 6 の種の個々の寄与を (D) に示す。

【図 6 D】 H E R 2 を発現する (A) 卵巣癌細胞株 S K-O V-3、及び (B) 乳癌細胞株 Z R-75-1 及び (C) J I M T-1 を様々な平均 D A R でリンカー-毒素 0 0 1 にコンジュゲートした v 1 0 0 0 0 を含む抗体-薬物コンジュゲートにより治療した結果を示す図である。0.7、2.2、及び 3.9 の平均 D A R を有する A D C の平均 D A R に対する D A R 0、D A R 2、D A R 4、及び D A R 6 の種の個々の寄与を (D) に示す。

【図 7 A】 H B C x-13 b 乳癌患者由来の異種移植マウスを、q 1 4 d x 2 にて記載した用量の (A) v 1 7 5 9 7 (D A R 4 でリンカー-毒素 0 0 1 にコンジュゲートした抗 H E R 2 バイパラトピック抗体) 及び (B) v 2 1 2 5 2 (D A R 2 で抗リンカー-毒素 0 0 1 にコンジュゲートした H E R 2 バイパラトピック抗体) により治療した結果を示す図である。v 1 5 4 9 6 = ビヒクル。

【図 7 B】 H B C x-13 b 乳癌患者由来の異種移植マウスを、q 1 4 d x 2 にて記載した用量の (A) v 1 7 5 9 7 (D A R 4 でリンカー-毒素 0 0 1 にコンジュゲートした抗 H E R 2 バイパラトピック抗体) 及び (B) v 2 1 2 5 2 (D A R 2 で抗リンカー-毒素 0 0 1 にコンジュゲートした H E R 2 バイパラトピック抗体) により治療した結果を示す図である。v 1 5 4 9 6 = ビヒクル。

【図 8 A】 S T-910 乳癌患者由来の異種移植マウスを、q d x 1 にて、(A) v 1 7 5 9 7 (D A R 4 でリンカー-毒素 0 0 1 にコンジュゲートした抗 H E R 2 バイパラトピック抗体) 及び (B) v 2 1 2 5 2 (D A R 2 で抗 H E R 2 リンカー-毒素 0 0 1 にコンジュゲートしたバイパラトピック抗体) により治療した結果を示す図である。v 1 5 4 9 6 = ビヒクル。

【図 8 B】 S T-910 乳癌患者由来の異種移植マウスを、q d x 1 にて、(A) v 1 7 5 9 7 (D A R 4 でリンカー-毒素 0 0 1 にコンジュゲートした抗 H E R 2 バイパラトピック抗体) 及び (B) v 2 1 2 5 2 (D A R 2 で抗 H E R 2 リンカー-毒素 0 0 1 にコンジュゲートしたバイパラトピック抗体) により治療した結果を示す図である。v 1 5 4 9 6 = ビヒクル。

【図 9】 雌カニクイザル (n=3) への 9 m g / k g または 1 2 m g / k g の v 2 1 2 5 2 の単回投与後の (A) 平均 (± S D) v 2 1 2 5 2 血清濃度-時間プロファイル、(B) 平均 (± S D) 全抗体血清濃度-時間プロファイルを示す図である。

【図 10】 カニクイザル (n=6) に 1 2 m g / k g または 9 m g / k g のいずれかで v 2 1 2 5 2 を隔週で注入した後、1 日目 (A) 及び 2 9 日目 (B) の平均 (± S D) v 2 1 2 5 2 血清濃度時間プロファイルを示す図である。

【図 11】 カニクイザル (n=6) に 1 2 m g / k g または 9 m g / k g のいずれかで v 2 1 2 5 2 を隔週で注入した後、1 日目 (A) 及び 2 9 日目 (B) の平均 (± S D) 全抗体血清濃度-時間プロファイルを示す図である。

【図 12】 v 2 1 2 5 2 及び 1 2 m g / k g または 9 m g / k g のいずれかでカニクイザル (n=6) に v 2 1 2 5 2 を隔週で注入した後の全抗体 (コンジュゲート及び非コンジュゲート) の両方の平均 (± S D) 血清濃度-時間プロファイルを示す図である。

【図 13】 (A) p H A b コンジュゲートトラスツズマブ-リンカー-毒素 0 0 1 及び陰性対照と比較した、p H A b コンジュゲート v 2 1 2 5 2 の S K B R 3 細胞及び (B) J I M T-1 細胞への内在化を示す図である。

【図 14】 p H A b コンジュゲートトラスツズマブ-リンカー-毒素 0 0 1 (B) と比較

10

20

30

40

50

した、示されている様々な時点でのSKBR3細胞へのpHAbコンジュゲートv21252 (A) の内在化を示す図である。核は灰色で表示し、pHAbは白で表示する。

【図15】指定用量のv21252により治療されたカニクイザル及びマウスでの曝露の比較：(A) 高HER2患者由来の腫瘍(HBCx-13b)を皮下移植されたカニクイザル及びマウスでの曝露、(B) 低HER2患者由来の腫瘍(ST-910)を皮下移植されたカニクイザル及びマウスでの曝露を示す図である。

【図16】LTL-654卵巣癌患者由来の異種移植マウスをqwkx4にて3mg/kgのビヒクルまたはv21252により治療した結果を示す図である。

【図17】ビヒクル、対照コンジュゲート(リンカー-毒素001にコンジュゲートした呼吸器多核体ウイルスに対するヒト化抗体)、v21252、v7155(T-DM1、DAR3.5)及びv24029(DAR8でエキサテカン誘導体トポイソメラーゼI阻害剤(DXd)にコンジュゲートしたトラスツズマブ)を毎週静脈内投与した(毎週各6mg/kgで合計12回の注射)後の、BT-474乳房腫瘍細胞を頭蓋内移植されたマウスの生存結果を示す図である。

【図18】ビヒクル、対照コンジュゲート(リンカー-毒素001にコンジュゲートした呼吸器多核体ウイルスに対するヒト化抗体)、もしくはv7155(T-DM1、DAR3.5)を毎週各6mg/kgで合計12回の注射、またはv21252もしくはv24029(DAR8でエキサテカン誘導体トポイソメラーゼI阻害剤(DXd)にコンジュゲートしたトラスツズマブ)を隔週各6mg/kgで合計6回の注射によるi.v.投与後のBT-474乳房腫瘍細胞を頭蓋内移植されたマウスの生存結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

詳細な説明

本開示は、薬物がオーリスタチン類似体でありかつ低い平均薬物抗体比(DAR)で抗体にコンジュゲートした、抗HER2バイパラトピック抗体-薬物コンジュゲート(ADC)に関する。本明細書に記載の低い平均DAR(<3.9)のADCでは、同じ毒素(オーリスタチン類似体)用量で投与された場合、 $DAR \geq 3.9$ を有する対応するADCと比較して、忍容性が改善され、毒性が低下した。特に興味深いのは、約2.5以下、例えば約1.8~2.5の平均DARを有するADCである。

【0023】

本開示はまた、HER2発現癌の治療において本明細書に記載のADCを使用する方法に関する。

【0024】

定義

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0025】

本明細書で使用される「対象」という用語は、治療、観察または実験の対象である動物、いくつかの実施形態では哺乳動物を指す。動物は、ヒト、非ヒト霊長類、コンパニオンアニマル(例えば、イヌ、ネコなど)、家畜(例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど)または実験室動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、非ヒト霊長類など)であってもよい。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0026】

本明細書で使用される「哺乳動物」という用語は、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ウシ、ウマ及びブタを含むが、これらに限定されない。ある実施形態では、哺乳類はヒトである。

【0027】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、所与の値からの変動がおよそ+/-10%であることを指す。こうした変動は、具体的に言及されているかにかかわらず、本明細書で提供される任意の所与の値に常に含まれることを理解されたい。

【0028】

添付の特許請求の範囲及び／または明細書中で用語「含む (comprising)」と組み合わせて使用する場合の用語「a」または「an」の使用は、「1つ」を意味し得るが、同時にある実施形態では、「1つ以上」、「少なくとも1つ」、及び「1つまたは複数の」の意味とも矛盾しない。

【0029】

本明細書で使用される場合、「備える (comprising)」、「有する (having)」、「含む (including)」及び「含有する (containing)」という用語、ならびにそれらの文法的変形は、包括的または制限のないものであり、追加の列挙されていない要素及び／または方法ステップを除外するものではない。「から本質的になる (consisting essentially of)」という用語は、組成物、使用または方法に関連して本明細書で使用される場合、追加の要素及び／または方法ステップが存在し得るが、これらの追加は、列挙された組成物、方法、または使用が機能する方法に実質的な影響を与えることはない。「からなる (consisting of)」という用語は、組成物、使用または方法に関連して本明細書で使用される場合、追加の要素及び／または方法ステップが存在しないものとする。特定の要素及び／またはステップを含むものとして本明細書に記載の組成物、使用及び／または方法はまた、ある実施形態では、本質的にそれらの要素及び／またはステップからなり得、他の実施形態では、これらの実施形態が具体的に参照されているか否かにかかわらず、これらの要素及び／またはステップからなる。

【0030】

本明細書で論じられるあらゆる実施形態は、本明細書で開示される任意の方法、使用、または組成物に関して実装できることが企図される。

【0031】

本明細書に開示される実施形態に関連して記載されている特定の機能、構造及び／または特徴は、1つ以上のさらなる実施形態を提供するために、任意の好適な方法で本明細書に開示されている別の実施形態に関連して記載されている機能、構造及び／または特徴と組み合わせてもよい。

【0032】

また、一実施形態における機能の明確な列挙は、代替的实施形態における特徴を除外するための基礎として機能することも理解されたい。例えば、選択肢のリストが所与の実施形態または請求項に対して提示される場合、こうした代替的实施形態が具体的にについて言及されるか否かにかかわらず、1つ以上の選択肢がリストから削除され、短縮リストが代替的实施形態を形成し得ることを理解されたい。

【0033】

抗HER2バイパラトピック抗体－薬物コンジュゲート

本開示の抗体－薬物コンジュゲート (ADC) は、リンカーを介して低い平均薬物抗体比 (DAR) で毒素にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体を含み、毒素はオーリスタチンベースの毒素 (または「オーリスタチン類似体」) である。オーリスタチンベースの毒素の例は、当技術分野で公知である。

【0034】

特定の実施形態では、オーリスタチン類似体は、一般式 (I) :

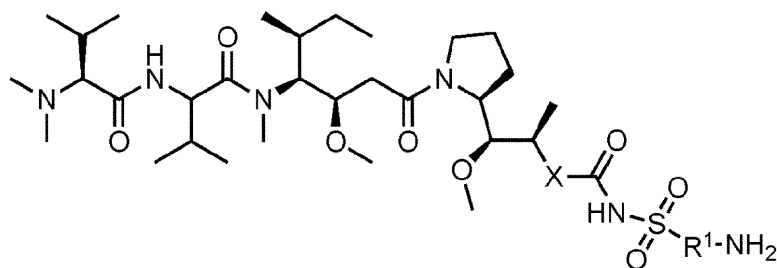
10

20

30

40

50



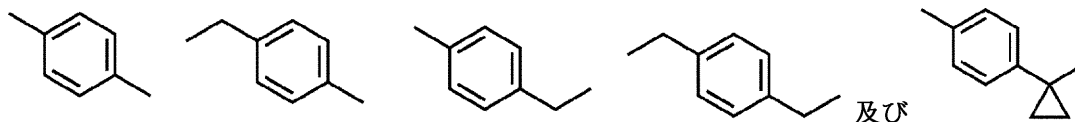
(I)

の化合物であり、

式中、

X は $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{R}^2)-$ であるか、または X は存在せず；

R^1 は、



から選択され、

R^2 は、フェニルである。

【0035】

本明細書で使用される「低いDAR」は、3.9未満であるが0.5を超える平均DARとして定義される。いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは3.5未満である。いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは、3.4未満、例えば、3.3未満、3.2未満、または3.1未満である。いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは3.0以下である。いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは、2.9以下、例えば、2.8以下、2.7以下、または2.6以下である。いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは、2.5以下、例えば、2.4以下、2.3以下、または2.2以下である。いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは約2.0である。

【0036】

いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは、0.5～3.8、例えば、0.5～3.5、または0.5～2.5である。いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは、0.7～3.8、例えば、0.7～3.5、0.7～3.0、または0.7～2.5である。いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは、1.0～3.8、例えば、1.0～3.5、1.0～3.0、または1.0～2.5である。いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは、1.5～3.8、例えば、1.5～3.5、1.5～3.0、または1.5～2.5である。いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは、1.6～3.8、例えば、1.6～3.5、1.6～3.0、または1.6～2.5である。いくつかの実施形態では、ADCの平均DARは、1.8～2.8、例えば、1.8～2.5である。

【0037】

上記のように、本明細書に記載の低い平均DAR (<3.9) のADCでは、同じ毒素用量で投与された場合、 $\text{DAR} \geq 3.9$ を有する対応するADCと比較して、忍容性が改善され、毒性が低下した。当技術分野で公知であるように、コンジュゲート法の大部分は、様々なDARの種を含むADC組成物をもたらし、報告されているDARは個々のDARの種の平均である。特定の理論に限定されるものではないが、低いDARのADCの忍容性が高くなり、毒性が低下することについては、ADC組成物中の高いDAR (6以上) の種の減少及び／またはADC組成物におけるDAR 0の種の増加の一方または両方が原因であり得る。

【0038】

ある実施形態では、特定の閾値を超えるDAR0の種の割合を含むADC組成物は、有利であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR0の種を5%以上含み得る。いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR0の種を10%以上含み得る。いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR0の種を15%以上、例えば、DAR0の種を20%以上含み得る。いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR0の種を約5%～約50%含み得る。いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR0の種を約10%～約50%、例えば、DAR0の種を約10%～約40%、DAR0の種を約10%～約30%、またはDAR0の種を約10%～約25%含み得る。いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR0の種を約12%～約28%、例えば、DAR0の種を約12%～約28%、またはDAR0の種を約15%～約25%含み得る。

10

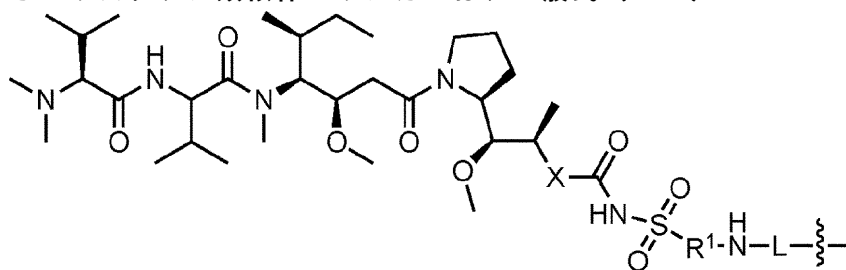
【0039】

特定の実施形態では、特定の閾値を下回る割合のDAR6以上の種を含むADC組成物が有利であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR6以上の種を約35%未満含み得る。いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR6以上の種を30%以下含み得る。いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR6以上の種を25%以下、例えば、DAR6以上の種を20%以下、15%以下、または10%以下含み得る。いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR6以上の種を9%以下、例えばDAR6以上の種を8%以下、7%以下、6%以下、または5%以下含み得る。いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR6以上の種を0%～約35%含み得る。いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR6以上の種を0%～約30%、例えば、DAR6以上の種を0%～約25%、または0%～約20%含み得る。いくつかの実施形態では、低いDARのADC組成物は、DAR6以上の種を0%～約15%、例えば、DAR6以上の種を約0%～約10%、約0%～約8%、または0%～約5%含み得る。

20

【0040】

ある実施形態は、低い平均薬物抗体比（DAR）でリンカー（L）を介してオーリスタチン類似体にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体を含むADCに関し、オーリスタチン類似体－リンカーは、一般式（II）



(II)

30

を有し、
式中、X及びR¹は、一般式（I）として定義され；
Lが、リンカーであり、
〜

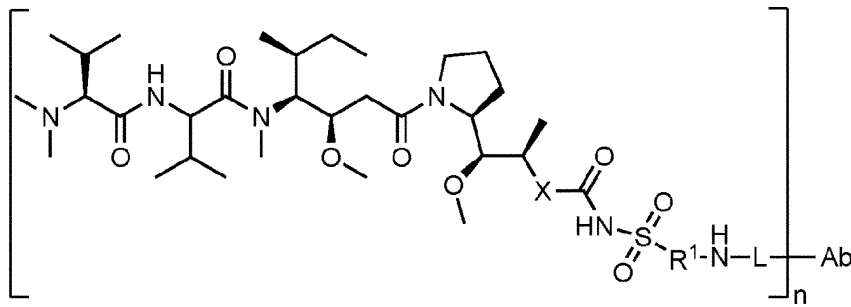
40

は、抗HER2バイパラトピック抗体へのオーリスタチン類似体－リンカーの付着点を表す。

【0041】

特定の実施形態は、一般式（III）：

50



(III)

10

を有するADCに関し、式中、X及びR¹は、一般式(I)として定義され；
Lが、リンカーであり、
nは、平均薬物抗体比(DAR)であり、3.9未満であり、
Abは、抗HER2バイパトリック抗体である。

【0042】

抗HER2バイパトリック抗体

本明細書に記載のADCは、HER2の2つの異なるエピトープに結合する抗HER2バイパトリック抗体を含む。

【0043】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、一般に、免疫グロブリン様機能を有するタンパク質性結合分子を指す。抗体の典型的な例は、免疫グロブリン、ならびに依然として結合特異性を保持しているその誘導体または機能的断片である。抗体を産生するための技法は、当該分野で周知である。「抗体」という用語には、異なるクラスの免疫グロブリン(すなわち、IgA、IgG、IgM、IgD及びIgE)及びサブクラス(IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂など)も含み得る。抗体の例示的な例は、全抗体及びその抗原結合断片、例えば、Fab断片、F(ab')₂、Fv断片、単鎖Fv断片(scFv)、ダイアボディ、ドメイン抗体、及びそれらの組み合わせである。ドメイン抗体は、単ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体または可変ドメインを1つのみ有する免疫グロブリン単一可変ドメインであってもよく、これらは、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインであり得、他の可変領域またはドメインとは関係なく、抗原またはエピトープに特異的に結合する。「抗体」という用語はまた、キメラ抗体、単鎖抗体、及びヒト化抗体などの実施形態を含む。

【0044】

典型的な全抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続される少なくとも2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖を含む。各重鎖は、重鎖可変領域(VH)及び重鎖定常領域(CH)から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメインCH1、CH2、及びCH3を含む。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、α(IgA)、δ(IgD)、ε(IgE)、γ(IgG)、及びμ(IgM)として公知である。各軽鎖は、軽鎖可変領域(VL)及び軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLを含む。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかに分類される。VH及びVL領域は、フレームワーク領域(FW)と称されるより保存された領域が散在している、相補性決定領域(CDR)と称される超可変性の領域にさらに細分化できる。各VH及びVLは、3つのCDR及び4つのFWから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端へと、次の順序: FW1、CDR1、FW2、CDR2、FW3、CDR3、FW4で配列される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメイン(パトリック)を含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(エフェクター細胞など)及び補体系の構成要素であるC1qなどの宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介できる。

【0045】

20

30

40

50

特定の実施形態では、本明細書に記載のADCに含めるための抗HER2バイパラトピック抗体は、それぞれがHER2の異なるエpitopeに結合する2つの抗原結合ポリペプチド構築物を含む。本明細書で使用される「抗原結合ポリペプチド構築物」は、免疫グロブリンベースの構築物、例えば、抗体断片であってもよく、またはそれは、アンチカリン、ファイノマー (fynomer)、アフィマー (affimer)、アルファボディ、DARPin、またはアビマー (avimer) などの非免疫グロブリンベースの抗体模倣フォーマットであってもよい。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンベースの構築物であり得る。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物は、抗体断片であり得る。

10

【0046】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物はそれぞれ独立して、Fab断片、Fab'断片、scFvまたはsdAbであり得る。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物はそれぞれ独立して、Fab断片またはscFvであり得る。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる1つの抗原結合ポリペプチド構築物はFab断片であり得、また他の抗原結合ポリペプチド構築物は、scFvであり得る。

【0047】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの少なくとも1つは、Fab断片またはFab'断片であり得る。「Fab断片」は、軽鎖の定常ドメイン (CL) 及び重鎖の第1の定常ドメイン (CH1) ならびに軽鎖及び重鎖の変域ドメイン (それぞれVL及びVH) を含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインなど、重鎖CH1ドメインのC末端での数個のアミノ酸残基が付加していることがFab断片とは異なる。Fab断片はまた、単鎖Fab分子、すなわち、Fab軽鎖及びFab重鎖がペプチドリンカーによって連結されて単一のペプチド鎖を形成するFab分子であってもよい。例えば、Fab軽鎖のC末端は、単鎖Fab分子内のFab重鎖のN末端に連結され得る。

20

【0048】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの少なくとも1つは、単鎖Fv (scFv) であり得る。「scFv」は、単一のポリペプチド鎖における抗体の重鎖変域ドメイン (VH) 及び軽鎖変域ドメイン (VL) を含む。任意により、scFvは、VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、これにより、scFvが抗原結合にとって望ましい構造を形成できるようになる。例えば、scFvは、ポリペプチドリンカーによってそのC末端からVHのN末端に接続されたVLを含み得る。あるいは、scFvは、そのC末端を介してポリペプチド鎖またはリンカーによってVLのN末端に接続されたVHを含み得る (Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) のレビューを参照されたい)。

30

40

【0049】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの少なくとも1つは、単一ドメイン抗体 (sdAb) フォーマットであり得る。sdAbフォーマットは、単一の免疫グロブリンドメインを指す。sdAbは、例えば、ラクダ科の起源であり得る。ラクダ科動物の抗体は軽鎖を有さず、その抗原結合部位は、「VHH」と呼ばれる単一のドメインで構成されている。sdAbは、抗原結合部位を形成する3つのCDR/超可変ループ (CDR1、CDR2、及びCDR3) を含む。sdAbはかなり安定しており、例えば抗体のFc鎖との融合物として発現しやすい (例えば、Harmsen & De Haard, Appl. Microbiol Biotechnol

50

chnol. 77 (1) : 13-22 (2007) を参照されたい)。

【0050】

抗体フォーマット

本明細書に記載されているADCに含めるための抗HER2バイパラトピック抗体は、様々なフォーマットを有し得る。抗HER2バイパラトピック抗体の最小成分は、第1のHER2エピトープに結合する第1の抗原結合ポリペプチド構築物、および、第2のHER2エピトープに結合する第2の抗原結合ポリペプチド構築物であり、第1のHER2エピトープと第2のHER2エピトープとは異なる。異なるHER2エピトープに結合する2つの抗原結合ポリペプチド構築物を含む抗体は、二価のバイパラトピック抗体であると見なされ得る。特定の実施形態は、二価の抗HER2バイパラトピック抗体に関する。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、それらのそれぞれが第1のHER2エピトープまたは第2のHER2エピトープのいずれかに結合する1つ以上の追加の抗原結合ポリペプチド構築物を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、三価または四価であってもよい。

【0051】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、第1の抗原結合ポリペプチド構築物及び第2の抗原結合ポリペプチド構築物を連結するリンカーをさらに含む。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、足場をさらに含み、第1の抗原結合ポリペプチド構築物及び第2の抗原結合ポリペプチド構築物は、足場に作動可能に連結される。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結される」という用語は、記載されている構成要素が、それらの意図される状態で機能し得る関係にあることを指す。

【0052】

したがって、抗HER2バイパラトピック抗体は、2つの抗原結合ポリペプチド構築物モジュール、及び任意によりリンカーモジュール及び足場モジュールの一方または両方を含むモジュール式アーキテクチャを有すると考えられ得る。当業者は、これらのモジュールは、異なるフォーマットを有する抗HER2バイパラトピック抗体を提供するために、様々な方法で組み合わせ得ることを理解するであろう。これらのフォーマットは、一般に、当技術分野で公知である抗体フォーマットに基づく(Brinkmann & Kontermann, MABS, 9 (2) : 182-212 (2017)、及びMuller & Kontermann「Bispecific Antibodies」、Handbook of Therapeutic Antibodies, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. (2014)によるレビューを参照されたい)。

【0053】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、足場に作動可能に連結された2つの抗原結合ポリペプチド構築物を含む。好適な足場は、以下に記載する。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、足場に作動可能に連結された2つの抗原結合ポリペプチド構築物を含み、抗原結合ポリペプチド構築物のうちの少なくとも1つは、scFvである。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、足場に作動可能に連結された2つの抗原結合ポリペプチド構築物を含み、抗原結合ポリペプチド構築物のうちの少なくとも1つは、Fabである。

【0054】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、3つまたは4つの抗原結合ポリペプチド構築物及び足場を含み得る。このフォーマットでは、少なくとも第1の抗原結合構築物及び第2の抗原結合構築物は、足場に作動可能に連結されている。第3及び任意の第4の抗原結合ポリペプチド構築物はそれぞれ独立して、足場または第1の抗原結合ポリペプチド構築物または第2の抗原結合ポリペプチド構築物に作動可能に連結され得る。

【0055】

足場を有さない抗HER2バイパラトピック抗体は、典型的には、1つ以上のリンカーによって作動可能に連結された2つの抗原結合ポリペプチド構築物を含む。抗原結合ポリ

ペプチド構築物は、 $scFv$ 、 Fab 、 $s dAb$ 、またはそれらの組み合わせの形態であり得る。例えば、抗原結合ポリペプチド構築物として $scFv$ を使用して、タンデム $scFv$ ($(scFv)_2$ または $taFv$)などのフォーマットが構築され得、 $scFv$ は、可撓性リンカーによって一緒に接続される。 $scFv$ は、短いリンカー（通常は、約5アミノ酸長）によって接続された2つの $scFv$ を含むダイアボディフォーマットを構築するためにも使用され得る。リンカーの長さが制限されているため、頭部から尾部への様態で $scFv$ が二量体化する。前述のいずれのフォーマットであっても、ドメイン間ジスルフィド結合を含めることにより、 $scFv$ がさらに安定化され得る。例えば、ジスルフィド結合は、各鎖に追加のシステイン残基を導入することにより、 VL と VH との間に導入され得る（例えば、 VH において44位、 VL において100位）（例えば、Fitzgerald et al., Protein Engineering, 10:1221-1225 (1997)を参照されたい）か、またはジスルフィド結合は、2つの VH の間に導入して、DARTフォーマットを有する構造を提供し得る（例えば、Johnson et al., J Mol. Biol., 399:436-449 (2010)を参照されたい）。

10

【0056】

同様に、いくつかの実施形態では、好適なリンカーを介して一緒に接続された、 VH または VHH などの2つの $s dAb$ を含むフォーマットを使用してもよい。

【0057】

足場を含まない抗HER2バイパラトピック抗体フォーマットの他の例としては、 Fab 断片がリンカーまたはIgGヒンジ領域を介して接続されている Fab 断片、例えば Fab_2 及び $F(ab')_2$ フォーマットに基づくものが挙げられる。

20

【0058】

異なる形態の抗原結合ポリペプチド構築物の組み合わせを使用して、代替の足場を含まないフォーマットを生成してもよい。例えば、 $scFv$ または $s dAb$ は、 Fab 断片の軽鎖及び重鎖の一方または両方のC末端に融合されて、二価($Fab-scFv/s dAb$)を構築してもよい。

【0059】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、2つの抗原結合ポリペプチド構築物及び1つ以上のリンカーを含んでもよく、足場は含まない。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、 $scFv$ 、 Fab 、 $s dAb$ 、またはそれらの組み合わせである2つの抗原結合ポリペプチド構築物、及び1つ以上のリンカーを含み、足場を含まない。

30

【0060】

足場

足場を含む抗HER2バイパラトピック抗体は、2つの抗原結合ポリペプチド構築物を好適な足場に連結することにより構築され得る。抗原結合ポリペプチド構築物は、上記の形態の1つまたは組み合わせであり得る（例えば、 $scFv$ 、 Fab 、及び/または $s dAb$ ）。好適な足場の例は、以下でより詳細に記載しており、これらに限定されないが、免疫グロブリンFc領域、アルブミン、アルブミン類似体及び誘導体、ヘテロ二量化ペプチド（ロイシンジッパー、Jun及びFos由来のヘテロ二量体形成「ジッパー」ペプチド、IgG CH1及びCLドメインまたはバルナーゼーバルスター（barnase-barstar）毒素）、サイトカイン、ケモカインまたは成長因子などが挙げられる。他の例としては、IBC Pharmaceuticals, Inc. 及びImmuno medics, Inc. によって開発されたDOCK-AND-LOCK（登録商標）（DNL（商標））技術に基づく抗体が挙げられる（例えば、Chang, et al., Clin Cancer Res 13:5586s-5591s (2007)を参照されたい）。

40

【0061】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、2つ以上の抗原結合ポ

50

リペプチド構築物及び足場を含む。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、足場に作動可能に連結された2つの抗原結合ポリペプチド構築物を含む。

【0062】

足場は、ペプチド、ポリペプチド、ポリマー、ナノ粒子または他の化学エンティティであってよい。足場がポリペプチドである場合、抗HER2バイパラトピック抗体の各抗原結合ポリペプチド構築物は、ポリペプチド足場のN末端またはC末端のいずれかに連結され得る。抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つ以上が、例えば、リンカーの有無にかかわらず、アミノ酸の側鎖を介して、NまたはC末端以外の領域に連結されているポリペプチド足場を含む抗HER2バイパラトピック抗体もまた、特定の実施形態において企図される。

10

【0063】

足場がペプチドまたはポリペプチドである実施形態では、抗原結合ポリペプチド構築物は、遺伝子融合または化学的コンジュゲートによって足場に連結されてもよい。典型的には、足場がペプチドまたはポリペプチドである場合、抗原結合ポリペプチド構築物は、遺伝子融合によって足場に連結される。足場がポリマーまたはナノ粒子であるいくつかの実施形態では、抗原結合ポリペプチド構築物は、化学的コンジュゲートによって足場に連結されてもよい。

【0064】

2つの異なるポリペプチドの選択的対を含む複数のタンパク質ドメインが当技術分野では公知であり、足場を形成するために使用され得る。一例は、Fos及びJunなどのロイシンジッパードメインであり、選択的にペアになっている(Kostelny, et al., J Immunol, 148:1547-53 (1992); Wranik, et al., J. Biol. Chem., 287:43331-43339 (2012))。他の選択的にペアリングする分子ペアとしては、例えば、バルナーゼバースターペア(Deyev, et al., Nat Biotechnol, 21:1486-1492 (2003))、DNA鎖ペア(Chaudri, et al., FEBS Letters, 450(1-2):23-26 (1999))及びスプリット蛍光タンパク質ペア(国際特許出願公開第WO2011/135040号)が挙げられる。

20

【0065】

タンパク質足場の他の例としては、免疫グロブリンFc領域、アルブミン、アルブミン類似体及び誘導体、毒素、サイトカイン、ケモカイン及び成長因子が挙げられる。抗原結合部分と組み合わせたタンパク質足場の使用が記載されている(例えば、Muller et al., J Biol Chem, 282:12650-12660 (2007); McDonaugh et al., Mol Cancer Ther, 11:582-593 (2012); Valleria et al., Clin Cancer Res, 11:3879-3888 (2005); Song et al., Biotech Appl Biochem, 45:147-154 (2006)、及び米国特許出願公開第2009/0285816号を参照されたい)。

30

【0066】

例えば、scFv、ダイアボディ、または一本鎖ダイアボディなどの抗原結合部分をアルブミンに融合させると、抗原結合部分の血清半減期が改善されることが示されている(Muller et al., 同書)。抗原結合部分は、任意でリンカーを介して、アルブミンのN末端及び／またはC末端に融合されてもよい。

40

【0067】

トランスポーターポリペプチドが自己集合して準ネイティブアルブミンを形成するように、アルブミンタンパク質をセグメント化することによって得た2つのトランスポーターポリペプチドを含むヘテロマルチマーの形態のアルブミンの誘導体について記載されている(国際特許出願公開WO2012/116453及びWO2014/012082を参照されたい)。アルブミンのセグメント化の結果として、ヘテロ多量体は4つの末端を含み、したがって、任意でリンカーを介して、最大4つの異なる抗原結合部分に融合され得

50

る。

【0068】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、タンパク質足場を含み得る。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、免疫グロブリンFc領域、アルブミンまたはアルブミン類似体または誘導体に基づくタンパク質足場を含み得る。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、免疫グロブリンFc領域、例えば、IgGFc領域に基づくタンパク質足場を含み得る。

【0069】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)、またはアルブミン類似体もしくは誘導体に基づくタンパク質足場を含み得る。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、国際特許出願公開WO2012/116453またはWO2014/012082に記載されているアルブミン誘導体に基づくタンパク質足場を含み得る。

【0070】

Fc領域

本明細書で使用する場合、「Fc領域」、「Fc」または「Fcドメイン」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を指す。この用語には、天然配列Fc領域及びバリエーションFc領域が含まれる。本明細書において別段明記されない限り、Fc領域または定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabata et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に記載されている、EUインデックスとも呼ばれるEUNanバリングシステムに従う。

【0071】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、免疫グロブリンFc領域に基づく足場を含み得る。いくつかの実施形態では、Fc領域は二量体であり得、2つのFcポリペプチドから構成され得る。いくつかの実施形態では、Fc領域は、単一のポリペプチドから構成されてもよい。

【0072】

二量体Fcの「Fcポリペプチド」は、二量体Fcドメインを形成する2つのポリペプチドのうちの1つ、すなわち、安定した自己会合が可能な免疫グロブリン重鎖の1つ以上のC末端定常領域を含むポリペプチドを指す。「第1のFcポリペプチド」及び「第2のFcポリペプチド」という用語は、Fc領域が1つの第1のFcポリペプチド及び1つの第2のFcポリペプチドを含むという条件で同義的に使用され得る。

【0073】

Fc領域は、CH3ドメインまたはCH3ドメイン及びCH2ドメインの両方を含む。例えば、二量体IgGFc領域のFcポリペプチドは、IgGCH2及びIgGCH3定常ドメイン配列を含む。CH3ドメインは、2つのCH3配列を含み、1つは、二量体Fc領域の2つのFcポリペプチドのそれぞれに由来する。CH2ドメインは、2つのCH2配列を含み、1つは、二量体Fc領域の2つのFcポリペプチドのそれぞれに由来する。

【0074】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、IgGFc領域に基づく足場を含み得る。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、ヒトFc領域に基づく足場を含み得る。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、ヒトIgGFc領域、例えば、ヒトIgG1Fc領域に基づく足場を含み得る。

【0075】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、それぞれがCH3配列、及

10

20

30

40

50

び任意により C H 2 配列を含む第 1 の F c ポリペプチド及び第 2 の F c ポリペプチドを含む、ヘテロ二量体 F c 領域である I g G F c 領域に基づく足場を含み得る。

【0076】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 バイパラトピック抗体は、第 1 及び第 2 の F c ポリペプチドを含む F c 領域に基づく足場を含み得、第 1 の抗原結合ポリペプチド構築物は、第 1 の F c ポリペプチドに作動可能に連結され、第 2 の抗原結合ポリペプチド構築物は、第 2 の F c ポリペプチドに作動可能に連結されている。

【0077】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 バイパラトピック抗体は、第 1 及び第 2 の F c ポリペプチドを含む F c 領域に基づく足場を含み得、第 1 の抗原結合ポリペプチド構築物は、第 1 の F c ポリペプチドに作動可能に連結され、第 2 の抗原結合ポリペプチド構築物は、第 2 の F c ポリペプチドに作動可能に連結され、第 1 及び第 2 の抗原結合ポリペプチド構築物は独立して、F a b 断片または s c F v である。

【0078】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 バイパラトピック抗体は、2 つの C H 3 配列を含み、そのうちの少なくとも 1 つが 1 つ以上のアミノ酸修飾を含む、F c 領域に基づく足場を含み得る。いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 バイパラトピック抗体は、2 つの C H 3 配列及び 2 つの C H 2 配列を含む F c 領域に基づく足場を含み得、C H 2 配列のうちの少なくとも 1 つは、1 つ以上のアミノ酸修飾を含む。

【0079】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 バイパラトピック抗体は、修飾された C H 3 ドメインを含むヘテロ二量体 F c 領域を含み、修飾された C H 3 ドメインは、非対称的に修飾された C H 3 ドメインである。一般に、ヘテロ二量体 F c の第 1 の F c ポリペプチドは第 1 の C H 3 配列を含み、第 2 の F c ポリペプチドは第 2 の C H 3 配列を含む。

【0080】

本明細書で使用される場合、「非対称アミノ酸修飾」とは、第 1 の C H 3 配列上の特定の位置のアミノ酸が同じ位置の第 2 の C H 3 配列上のアミノ酸とは異なる修飾を指す。非対称アミノ酸修飾を含む C H 3 配列の場合、第 1 及び第 2 の C H 3 配列は、典型的に好ましくは、ホモ二量体というよりも、ヘテロ二量体を形成するためになる。これらの非対称アミノ酸修飾は、各配列の同じそれぞれのアミノ酸位置にある 2 つのアミノ酸のうちの 1 つのみが修飾されているか、または第 1 の及び第 2 の C H 3 配列のそれぞれの同じそれぞれの位置にある各配列の両方のアミノ酸の修飾が異なっている結果となり得る。ヘテロ二量体 F c の第 1 及び第 2 の C H 3 配列のそれぞれは、1 つ以上の非対称アミノ酸修飾を含み得る。

【0081】

いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 バイパラトピック抗体は、国際特許出願公開 W O 2 0 1 2 / 0 5 8 7 6 8 または W O 2 0 1 3 / 0 6 3 7 0 2 に記載されているように、修飾 F c 領域に基づく足場を含み得る。

【0082】

表 1 には、全長ヒト I g G 1 重鎖のアミノ酸 2 3 1 から 4 4 7 に対応する、ヒト I g G 1 F c 配列のアミノ酸配列 (S E Q I D N O : 1) を提供する。C H 3 配列は、全長ヒト I g G 1 重鎖のアミノ酸 3 4 1 ~ 4 4 7 を含む。

【0083】

特定の実施形態では、抗 H E R 2 バイパラトピック抗体は、ホモ二量体 F c ではなく、ヘテロ二量体 F c の形成を促進する非対称アミノ酸修飾を含む修飾 C H 3 ドメインを含むヘテロ二量体 F c 足場を含み得る。いくつかの実施形態では、抗 H E R 2 バイパラトピック抗体は、以下の位置 : L 3 5 1 、 F 4 0 5 、 Y 4 0 7 、 T 3 6 6 、 K 3 9 2 、 T 3 9 4 、 T 3 5 0 、 S 4 0 0 及び / または N 3 9 0 (E U ナンバリングを使用) のうちの 1 つ以上に修飾を含むヘテロ二量体 F c 足場を含み得る。

【0084】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、F405位及びY407位のアミノ酸修飾を含みかつ任意でL351位のアミノ酸修飾をさらに含む第1のポリペプチド配列と、T366位及びT394位のアミノ酸修飾を含みかつ任意でK392位のアミノ酸修飾をさらに含む第2のポリペプチド配列とを有する修飾CH3ドメインを含むヘテロ二量体Fcを含む。いくつかの実施形態では、修飾CH3ドメインの第1のポリペプチド配列は、F405位及びY407位のアミノ酸修飾を含みかつ任意でL351位のアミノ酸修飾をさらに含み得、修飾CH3ドメインの第2のポリペプチド配列は、T366位及びT394位のアミノ酸修飾を含みかつ任意でK392位のアミノ酸修飾をさらに含み、F405位のアミノ酸修飾は、F405A、F405I、F405M、F405S、F405TまたはF405Vであり、Y407位のアミノ酸修飾は、Y407IまたはY407Vであり、T366位のアミノ酸修飾はT366I、T366LまたはT366Mであり、T394位のアミノ酸修飾はT394Wであり、L351位のアミノ酸修飾はL351Yであり、K392位のアミノ酸修飾はK392F、K392LまたはK392Mである。いくつかの実施形態では、F405位でのアミノ酸修飾は、F405A、F405S、F405TまたはF405Vである。

【0085】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、F405位及びY407位のアミノ酸修飾を含みかつ任意でL351位のアミノ酸修飾をさらに含む第1のFcポリペプチド配列と、T366位及びT394位のアミノ酸修飾を含みかつ任意でK392位のアミノ酸修飾をさらに含む第2のFcポリペプチド配列とを有する修飾CH3ドメインを含むヘテロ二量体Fcを含み得、F405位のアミノ酸修飾は、F405A、F405I、F405M、F405S、F405TまたはF405Vであり、Y407位のアミノ酸修飾は、Y407IまたはY407Vであり、T366位のアミノ酸修飾は、T366I、T366LまたはT366Mであり、T394位のアミノ酸修飾は、T394Wであり、L351位のアミノ酸修飾は、L351Yであり、K392位のアミノ酸修飾は、K392F、K392LまたはK392Mであり、第1及び第2のFcポリペプチド配列の一方または両方は、アミノ酸修飾T350Vをさらに含む。いくつかの実施形態では、F405位でのアミノ酸修飾は、F405A、F405S、F405TまたはF405Vである。

【0086】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、上記のとおり、修飾CH3ドメインを含むヘテロ二量体Fcを含み得る。第1のFcポリペプチド配列は、F405位及びY407位のアミノ酸修飾を含みかつ任意でL351位のアミノ酸修飾をさらに含み、第2のFcポリペプチド配列は、T366位及びT394位のアミノ酸修飾を含みかつ任意でK392位のアミノ酸修飾をさらに含み、第1のFcポリペプチド配列は、S400位またはQ347位的一方または両方にアミノ酸修飾をさらに含み、及び／または第2のFcポリペプチド配列は、K360位またはN390位的一方または両方にアミノ酸修飾をさらに含み、S400位のアミノ酸修飾は、S400E、S400D、S400RまたはS400Kであり、Q347位のアミノ酸修飾は、Q347R、Q347EまたはQ347Kであり、K360位のアミノ酸修飾は、K360DまたはK360Eであり、N390位のアミノ酸修飾は、N390R、N390KまたはN390Dである。いくつかの実施形態では、F405位でのアミノ酸修飾は、F405A、F405S、F405TまたはF405Vである。

【0087】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、表1に示すとおり、バリエーション1、バリエーション2、バリエーション3、バリエーション4またはバリエーション5のうちのいずれか1つの修飾を含む修飾CH3ドメインを有するヘテロ二量体Fc足場を含み得る。

【0088】

(表1) IgG1 Fc配列

10

20

30

40

50

ヒトIgG1 Fc 配列231～447 (EU ナンバリング)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)	
バリエントIgG1 Fc配列	鎖	変異
1	A	L351Y_F405A_Y407V
	B	T366L_K392M_T394W
2	A	L351Y_F405A_Y407V
	B	T366L_K392L_T394W
3	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
	B	T350V_T366L_K392L_T394W
4	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
	B	T350V_T366L_K392M_T394W
5	A	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
	B	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

【0089】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、

L351Y、F405A、及びY407Vから選択される1つ以上のアミノ酸修飾を含む第1のCH3配列と、

アミノ酸修飾T366LまたはT366I；K392LまたはK392M、及びT394Wを含む第2のCH3配列と

を有する修飾CH3ドメインを有するヘテロ二量体Fc足場を含み得、第1及び第2のCH3配列の一方または両方は任意でアミノ酸修飾T350Vをさらに含み得る、

【0090】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、ヘテロ二量体CH3ドメインが野生型ホモ二量体CH3ドメインに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体Fcの形成を促進する、上記の非対称アミノ酸修飾を含む修飾CH3ドメインを有するヘテロ二量体Fc足場を含み得る。CH3ドメインの安定性は、例えば示差走査熱量測定(DSC)により、CH3ドメインの融解温度(Tm)を測定することにより評価され得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の非対称アミノ酸修飾は、ヘテロ二量体Fcドメインの形成を促進し、ここでは、CH3ドメインは、対応する対称的な野生型ホモ二量体のCH3ドメインについて観察される、約8℃、例えば、約7℃、約6℃、約5℃、または約4℃の範囲内である示差走査熱量測定試験における融解温度(Tm)を介して観察されたとおり、安定性を有する。

【0091】

修飾CH3配列を含むヘテロ二量体Fcは、発現産物中のホモ二量体Fcと比較して、少なくとも約75%の純度で形成され得る。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、約80%超、約85%超、約90%超、約95%超または約97%超の純度を有するヘテロ二量体Fcの形成を促進する非対称アミノ酸修飾を含む修飾CH3

ドメインを有するヘテロ二量体Fc足場を含み得る。

【0092】

ヘテロ二量体Fc形成を促進するために単量体Fcポリペプチドを修飾するための追加の方法は当技術分野で公知であり、例えば、国際特許出願公開WO96/027011 (knobs into holes); Gunasekaran et al. J Biol Chem, 285, 19637-46 (2010) (electrostatic design to achieve selective heterodimerization); Davis et al., Prot Eng Des Sel, 23 (4): 195-202 (2010) (strand exchange engineered domain (SEED) technology)、及びLabrijn et al., Proc Natl Acad Sci USA, 110 (13): 5145-50 (2013) (Fab-arm exchange) に記載されているものが挙げられる。

10

【0093】

抗HER2バイパルトピック抗体がヘテロ二量体Fc足場を含むいくつかの実施形態では、ヘテロ二量体FcもCH2ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CH2ドメインは、修飾CH2ドメインである。FcのCH2ドメインの一例は、表1に示される配列のアミノ酸231~340である。いくつかのエフェクター機能は、抗体のFcに結合するFc受容体(FcR)によって媒介される。

【0094】

Fc受容体(FcR)としては、これらの受容体の対立遺伝子バリエーション及び選択的スプライシングされた形態など、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIサブクラスの受容体が挙げられる。FcRという用語はまた、特定の実施形態では、新生児受容体、FcRnを含み得る。

20

【0095】

CH2ドメインでの修飾は、FcRのFcへの結合に影響を与え得る。異なるFcγ受容体に対するFcの親和性を選択的に変更する場合には、Fc領域における複数のアミノ酸修飾が当技術分野では公知である。抗HER2バイパルトピック抗体が修飾CH2ドメインを有するヘテロ二量体Fc足場を含むいくつかの実施形態では、修飾CH2ドメインは、Fcγ受容体の選択的結合を促進するための1つ以上の修飾を含み得る。

【0096】

FcRによるFcの結合を変化させる修飾の非限定的な例としては、S298A/E333A/K334A及びS298A/E333A/K334A/K326A (Lu, et al., J Immunol Methods, 365 (1-2): 132-41 (2011)); F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L及びF243L/R292P/Y300L/L235V/P396L (Stavénhagen, et al., Cancer Res, 67 (18): 8882-90 (2007) 及びNordstrom JL, et al., Breast Cancer Res, 13 (6): R123 (2011)); F243L (Stewart, et al., Protein Eng Des Sel, 24 (9): 671-8 (2011)); S298A/E333A/K334A (Shields, et al., J Biol Chem, 276 (9): 6591-604 (2001)); S239D/I332E/A330L及びS239D/I332E (Lazar, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 103 (11): 4005-10 (2006)); S239D/S267E及びS267E/L328F (Chu, et al., Mol Immunol, 45 (15): 3926-33 (2008)) が挙げられる。FcRによるFc結合に影響を与える追加の修飾については、Therapeutic Antibody Engineering (Strohl&Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Oct 2012, page 283) に記載されている。FcRによる結合に影響を与える非対称修飾を含むFc領域は、国際特許公開WO2014/190441に記載されている。

30

40

50

【0097】

エフェクター機能を媒介する能力を改善するために、Fc領域に追加の修飾を行ってもよい。こうした修飾は、当該技術分野で公知であり、非フコシル化 (afucosylation)、または活性化受容体、主にADCCのためのFcγRIIIaに対する、及びCDCのためのC1qに対するFcの親和性を操作することが挙げられる。特定の実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体は、エフェクター機能を媒介するその能力を改善するように修飾されたFc領域を含み得る。

【0098】

アミノ酸配列を変えることなく、Fcグリコシル化部位 (Asn297、EUナンバリング) にフコースをほとんどまたはまったく含まない抗体を作製する方法は、当技術分野で周知である。例えば、GlymaX (登録商標) technology (ProBio Gen AG) (von Horsten et al., Glycobiology, 20(12):1607-18 (2010) 及び米国特許第8,409,572号を参照のこと)。特定の実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体は、グリコシル化されていないFc領域を含み得る。この文脈において、抗HER2バイパルトピック抗体は、完全にフコシル化されていない (すなわち、検出可能なフコースを含まない) か、または部分的に非フコシル化され得、その結果、抗HER2バイパルトピック抗体は、哺乳動物発現系によって産生された類似の構築物について通常検出されるフコースの量の95%未満、85%未満、75%未満、65%未満、55%未満、45%未満、35%未満、25%未満、15%未満または5%未満、またはそれらの間の任意の量を含む。

【0099】

FcγRを減少させるFc修飾及び／または補体結合及び／またはエフェクター機能は、当技術分野で公知であり、上記のものを含む。様々な刊行物において、エフェクター活性が減少されたかまたは抑制された抗体を操作するために使用されてきた戦略について記載されている (例えば、Strohl, Curr Opin Biotech 20:685-691 (2009) 及びStrohl&Strohl「Antibody Fc engineering for optimal antibody performance」In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge:Woodhead Publishing (2012), pp225-249を参照のこと)。これらの戦略には、グリコシル化修飾によるエフェクター機能の低下、IgG2/IgG4足場の使用、またはFcのヒンジまたはCH2領域への変異の導入 (また、米国特許公開第2011/0212087号、国際特許公開WO2006/105338、米国特許公開第2012/0225058号、米国特許公開第2012/0251531号及び、Strop et al., J. Mol. Biol. 420:204-219 (2012) を参照のこと)。

【0100】

FcγRまたはFcへの相補的結合を減少させるための既知のアミノ酸修飾の特定の非限定的な例としては、表2において特定されたものが挙げられる。

【0101】

(表2) FcγRまたはFcへの相補的結合を減少させるための修飾

10

20

30

40

50

会社	変異
GSK	N297A
Ortho Biotech	L234A/L235A
Protein Design labs	IgG2 V234A/G237A
Wellcome Labs	IgG4 L235A/G237A/E318A
GSK	IgG4 S228P/L236E
Alexion	IgG2/IgG4コンボ
Merck	IgG2 H268Q/V309L/A330S/A331S
Bristol-Myers	C220S/C226S/C229S/P238S
Seattle Genetics	C226S/C229S/E3233P/L235V/L235A
Amgen	大腸菌産生、非グリコシル化
Medimmune	L234F/L235E/P331S
Trubion	ヒンジ変異体、可能であれば C226S/P230S

10

20

【0102】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、表2で特定される1つ以上の変異を有する修飾CH2ドメインを含むFc領域を含み得る。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、L234位、L235位及び／またはD265位のアミノ酸修飾を有する修飾CH2ドメインを含むFc領域を含み得る。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、アミノ酸修飾L234A、L235A及びD265Sを有する修飾CH2ドメインを含むFc領域を含み得る。

30

【0103】

HER2エピトープ

抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる2つの抗原結合ポリペプチド構築物は、それぞれHER2の異なるエピトープに結合する。すなわち、第1の抗原結合ポリペプチド構築物は第1のHER2エピトープに結合し、第2の抗原結合ポリペプチド構築物は第2のHER2エピトープに結合する。本開示の文脈において、抗原結合ポリペプチド構築物の各々は、その標的エピトープに特異的に結合する。

【0104】

「特異的に結合する」または「特異的結合」は、結合が抗原に対して選択的であり、望ましくない相互作用または非特異的相互作用から区別できることを意味する。特定のエピトープに結合する抗原結合ポリペプチド構築物の能力は、例えば、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、表面プラズモン共鳴(SPR)技術(BIAcore装置で分析)(Liljebland et al., Glyco J 17, 323-329 (2000))または従来結合アッセイ(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))で測定できる。いくつかの実施形態では、抗原結合ポリペプチド構築物の非関連タンパク質への結合の程度が、例えば、SPRによって測定されたとき、抗原結合ポリペプチド構築物のその標的エピトープへの結合の約10%未満である場合、抗原結合ポリペプチド構築物は、その標的エピトープに特異的に結合していると見なされる。

40

【0105】

「HER2」(ErbB2としても公知である)は、例えば、Sembal et al.

50

、PNAS (USA)、82:6497-6501 (1985) 及び Yamamoto et al., Nature, 319:230-234 (1986) (GenBank accession number X03363) 記載されているヒトHER2タンパク質を指す。「erbB2」及び「neu」という用語は、ヒトHER2タンパク質をコードする遺伝子を指す。p185またはp185neuという用語は、neu遺伝子のタンパク質産物を指すためにも使用され得る。

【0106】

HER2は、典型的には、HERリガンドと結合する細胞外ドメイン、親油性膜貫通ドメイン、保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン、及びリン酸化され得る複数のチロシン残基を有するカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを含む。HER2の細胞外（エクト）ドメインは、ドメインI～IVの4つのドメインで構成されている。HER2の配列を表3（SEQ ID NO:2）に提供する。細胞外ドメイン（ECD）境界は次のとおりである：ドメインIーアミノ酸約1～165；ドメインIIーアミノ酸約166～322；ドメインIIIーアミノ酸約323～488、ドメインIVーアミノ酸約489～607。

【0107】

（表3）ヒトHER2のアミノ酸配列（SEQ ID NO:2）

1	TQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQG
61	YVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPTVTGASPGGLRELQL
121	RSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGS
181	RCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNHSG
241	ICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPHNQEV
301	TAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFD
361	GDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYS
421	LTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPED
481	ECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVVARHCLP
541	CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPDFCVARCPGSKPDLSYMPIWKFPDEEGA
601	CQPCPIN

【0108】

「エピトープ2C4」は、抗体2C4が結合するHER2の細胞外ドメイン内の領域であり、HER2の細胞外ドメイン（ECD2とも呼ばれる）のドメインIIからの残基を含む。2C4及びペルツズマブは、ドメインI、II及びIIIの結合部でHER2の細胞外ドメインに結合する（Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)）。

【0109】

「エピトープ4D5」は、抗体4D5（ATCC CRL 10463）及びトラスツマブが結合するHER2の細胞外ドメイン内の領域である。このエピトープは、HER2の膜貫通ドメインに近くであり、HER2のドメインIV内にある（ECD4とも呼ばれる）。

【0110】

一般に、本開示の抗HER2バイパラトピック抗体は、HER2の細胞外ドメイン内のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の第1及び第2の抗原結合ポリペプチド構築物によって結合される第1及び第2のHER2エピトープは、重複しないエピトープである。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の第1及び第2の抗原結合ポリペプチド構築物によって結合される第1及び第2のHER2エピトープは、HER2の異なる細胞外ドメイン上にある。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の第1の抗原結合ポリペプチド構築物は、HER2の第1のドメイン上の第1のHER2エピトープに結合し、第2の抗原結合ポリペプチド構築物は、HER2の第2のドメイン上の第2のHER2エピトープに結合する。いくつかの実施形態では、HER2の第1のドメインはECD2であり、HER2の

第2のドメインはECD4である。

【0111】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、HER2への結合についてトラスツズマブと競合する。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、HER2への結合についてペルツズマブと競合する。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、HER2への結合についてトラスツズマブと競合し、他の抗原結合ポリペプチド構築物は、HER2への結合についてペルツズマブと競合する。

【0112】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、FabまたはscFvフォーマットであり、HER2への結合についてトラスツズマブと競合し、他の抗原結合ポリペプチド構築物は、FabまたはscFvフォーマットであり、HER2への結合についてペルツズマブと競合する。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、Fabフォーマットであり、HER2への結合についてトラスツズマブと競合し、他の抗原結合ポリペプチド構築物は、scFvフォーマットであり、HER2への結合についてペルツズマブと競合する。

【0113】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、トラスツズマブと同じHER2上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、ペルツズマブと同じHER2上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、トラスツズマブと同じHER2上のエピトープに結合し、他の抗原結合ポリペプチド構築物は、ペルツズマブと同じHER2上のエピトープに結合する。

【0114】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体に含まれる抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、HER2結合を増加させることが知られている1つ以上の変異を含むトラスツズマブまたはそのバリエーションのCDR配列を含み、他の抗原結合ポリペプチド構築物は、HER2結合を増加させることが知られている1つ以上の変異を含むペルツズマブまたはそのバリエーションのCDRを含む。トラスツズマブまたはペルツズマブによるHER2結合を増強することが公知である文献での変異としては、以下の表4及び5に列挙されているものが挙げられる（HC＝重鎖；LC＝軽鎖）。これらの変異の組み合わせも企図される。

【0115】

（表4）HER2への結合を増加させるトラスツズマブ変異

10

20

30

40

50

変異	報告されている改善
HC: D102W (HC: D98W)	3.2X
HC: D102Y	3.1X
HC: D102K	2.3X
HC: D102T	2.2X
HC: N55K	2.0X
HC: N55T	1.9X
LC: H91F	2.1X
LC: D28R	1.9X

10

【0116】

(表5) HER2への結合を増加させるペルツズマブ変異

変異	報告されている改善
LC: I31A	1.9X
LC: Y96A	2.1X
LC: Y96F	2.5X
HC: T30A	2.1X
HC: G56A	8.3X
HC: F63V	1.9X

20

【0117】

様々な抗HER2バイパルトピック抗体が当技術分野で公知であり、本明細書に記載されているADCに含めるために、好適である候補抗体であり得る。例としては、米国特許出願公開第2014/0170148号；同第2015/0284463号；同第2016/0289335号；同第2017/0029529号；同第2017/0291955号、及び同第2018/0022820号、及び国際特許出願公開WO2016/179707に記載されている抗体が挙げられる。

30

【0118】

特定の実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体は、米国特許出願公開第2016/0289335号に記載されているバイパルトピック抗体のうちの1つである。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体は、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903またはv6717のうちの1つである（表6、6A及び6B、ならびに配列一覧表を参照のこと）。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903またはv6717のうちの1つのECD2結合アームからのVH配列及びVL配列を含む。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903またはv6717のうちの1つのECD2結合アームからのVH配列及びVL配列を含み、他の抗原結合ポリペプチド構築物は、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903またはv6717のうちの1つのECD4結合アームからの

40

50

VH配列及びVL配列を含む。

【0119】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903またはv6717のうちの1つのECD2結合アームからのCDR配列を含む。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903またはv6717のうちの1つのECD2結合アームからのCDR配列、及び他の抗原結合ポリペプチド構築物は、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903、またはv6717のうちの1つのECD4結合アームからのCDR配列を含む。

10

【0120】

当業者は、抗体がその標的に結合する能力を失うことなく、限られた数のアミノ酸置換を既知の抗体のCDR配列またはVHもしくはVL配列に導入できることを理解するであろう。候補アミノ酸置換は、コンピューターモデリングによって、またはアラニンスキャニングなどの当技術分野において既知の技法によって同定することができ、得られたバリエーションは、標準的技法によって結合活性について試験される。したがって、特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903、またはv6717のうちの1つのECD2結合アームからのCDRのセットと90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、または100%の配列同一性を有するCDRのセット（すなわち、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3、ならびに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3）を含み、ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD2に結合する能力を保持している。特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、例えば、CDRにおいて1〜7個のアミノ酸置換、1〜5個のアミノ酸置換、1〜4個のアミノ酸置換、1〜3個のアミノ酸置換、1〜2個のアミノ酸置換、または1個のアミノ酸置換など、6つのCDRにおいて1〜10個のアミノ酸置換を含むこれらのCDR配列のバリエーションを含む（すなわち、CDRは、修飾されるCDRの任意の組み合わせを有する最大10個のアミノ酸置換を含めることによって修飾され得る）。バリエーションは、ECD2に結合する能力を保持している。典型的には、こうしたアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換となる。特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v10000のECD2結合アームからのCDRのセットと90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、または100%の配列同一性を有するCDRのセット（すなわち、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3、ならびに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3）を含む。ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD2に結合する能力を保持している。

20

30

【0121】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903、またはv6717のうちの1つのECD2結合アームからのVH配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるVH配列を含む。ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD2に結合する能力を保持している。特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903、またはv6717のうちの1つのECD2結合アームからのVL配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるV

40

50

L配列を含む。ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD2に結合する能力を保持している。

【0122】

特定の実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v10000のECD2結合アームからのVH配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるVH配列を含む。ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD2に結合する能力を保持している。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v10000のECD2結合アームからのVL配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるVL配列を含む。ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD2に結合する能力を保持している。

【0123】

特定の実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903、またはv6717のうちの1つのECD4結合アームからCDRのセットと90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、または100%の配列同一性を有するCDRのセット（すなわち、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3、ならびに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3）を含み、ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD4に結合する能力を保持している。特定の実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、例えば、CDRにおいて1~7個のアミノ酸置換、1~5個のアミノ酸置換、1~4個のアミノ酸置換、1~3個のアミノ酸置換、1~2個のアミノ酸置換、または1個のアミノ酸置換など、6つのCDRにおいて1~10個のアミノ酸置換を含むこれらのCDR配列のバリエーションを含む（すなわち、CDRは、修飾されるCDRの任意の組み合わせを有する最大10個のアミノ酸置換を含めることによって修飾され得る）。ここで、バリエーションは、ECD4に結合する能力を保持している。典型的には、こうしたアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換となる。特定の実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v10000のECD4結合アームからのCDRのセットと90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、または100%の配列同一性を有するCDRのセット（すなわち、重鎖CDR1、CDR2及びCDR3、ならびに軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3）を含む。ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD4に結合する能力を保持している。

【0124】

特定の実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903、またはv6717のうちの1つのECD4結合アームからのVH配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるVH配列を含む。ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD4に結合する能力を保持している。特定の実施形態では、抗HER2バイパルトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903、またはv6717のうちの1つのECD4結合アームからのVL配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるV

L配列を含む。ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD4に結合する能力を保持している。

【0125】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v10000の1つのECD4結合アームからのVH配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるVH配列を含む。ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD4に結合する能力を保持している。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v10000の1つのECD4結合アームからのVL配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるVL配列を含む。ここで、抗原結合ポリペプチド構築物は、ECD4に結合する能力を保持している。

【0126】

(表6) 例示的な抗HER2バイパラトピック抗体

10

20

30

40

50

バリエーション		鎖 A	鎖 B
5019	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	CH3 配列置換§	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W
5020	標的エピトープを含むドメイン	ECD4	ECD2
	フォーマット	scFv	Fab
	抗体名	トラスツズマブ	ペルツズマブ
	CH3 配列置換	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
7091	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
10000	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	Fab 配列置換*	HC: T30A_A49G_L69F LC: Y96A	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
6902	標的エピトープを含むドメイン	ECD4	ECD2
	フォーマット	Fab	Fab
	抗体名	トラスツズマブ	ペルツズマブ
	Fab 配列置換	HC: L143E_K145T LC: Q124R	HC: D146G_Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
6903	標的エピトープを含むドメイン	ECD4	ECD2
	フォーマット	Fab	Fab
	Fab 配列置換	HC: L143E_K145T LC: Q124R_Q1160K_T178R	HC: D146G_Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E
	抗体名	トラスツズマブ	ペルツズマブ
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W

10

20

30

40

バリエーション		鎖 A	鎖 B
6717	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	scFv	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W

50

* KabatによるFabまたは可変ドメインのナンバリング (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, p. 647, 1991)。

§ KabatなどEUインデックスによるCH3ナンバリング (Edelman et al., 1969, PNAS USA, 63:78-85)。

【0127】

(表6A) バリエントv5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903、及びv6717のECD2結合アームのCDR配列

バリエント	HC CDR	SEQ ID NO	LC CDR	SEQ ID NO
5019, 5020, 7091, 6902, 6903 & 6717	H1: GFTFTDYT	6	L1: QDVSIG	12
	H2: VNPNSGGS	8	L2: SAS	14
	H3: ARNLGPSFYFDY	7	L3: QQYYIYPYT	13
10000	H1: GFTFADYT	39	L1: QDVSIG	27
	H2: VNPNSGGS	41	L2: SAS	29
	H3: ARNLGPSFYFDY	40	L3: QQYYIYPAT	28

【0128】

(表6B) バリエントv5019、v5020、v7091、v10000、v6902、v6903、及びv6717のECD4結合アームのCDR配列

HC CDR	SEQ ID NO	LC CDR	SEQ ID NO
H1: GFNIKDTY	33	L1: QDVNTA	67
H2: IYPTNGYT	35	L2: SAS	68
H3: SRWGGDGFYAMDY	34	L3: QQHYTTPPT	69

【0129】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、国際特許出願公開WO2016/179707に記載されているバイパラトピック抗体のうちの1つである。本出願では、1つの抗原結合ドメインとして高親和性バリエントからの配列を含むバイパラトピック抗体など、抗HER2抗体のペルツズマブの高親和性バリエントについて記載している。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、v7133、v15079、v15080、v15081、v15082、v15083、v15084、またはv15085のうちの1つである(表7及び7A、ならびに配列一覧表を参照のこと)。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v7133、v15079、v15080、v15081、v15082、v15083、v15084、またはv15085のうちの1つのECD2結合アームからのVH配列及びVL配列を含む。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v7133、v15079、v15080、v15081、v15082、v15083、v15084、またはv15085のうちの1つのECD2結合アーム由来のVH配列及びVL配列を含み、他の抗原結合ポリペプチド構築物は、トラスツズマブ由来

のV H配列及びV L配列を含む。いくつかの実施形態では、抗H E R 2バイパラトピック抗体の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの1つは、v 7 1 3 3、v 1 5 0 7 9、v 1 5 0 8 0、v 1 5 0 8 1、v 1 5 0 8 2、v 1 5 0 8 3、v 1 5 0 8 4、またはv 1 5 0 8 5のうちの1つのE C D 2結合アーム由来のC D R配列を含み、他の抗原結合ポリペプチド構築物は、トラスツズマブ由来のC D R配列を含む。

【0130】

(表7) 追加の例示的な抗H E R 2バイパラトピック抗体

バリエーション		鎖 A	鎖 B
7133	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	Fab 配列置換*	HC: T30A LC: Y96A	
	CH3 配列置換§	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
15082	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	Fab 配列置換	HC: G56Y_K75W	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W

10

20

30

40

50

バリエーション		鎖 A	鎖 B
15085	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	Fab 配列置換	HC: T30Q_S99W	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
15083	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	Fab 配列置換	HC: T30Q LC: Y49W_Y96G	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
15080	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	Fab 配列置換	HC: T30Q_K75W LC: Y49W_Y96G	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
15079	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	Fab 配列置換	HC: T30Y_K75W LC: Y49W_Y96G	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
15084	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	Fab 配列置換	HC: T30Q_G56Y_S99W LC: Y49W	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W
15081	標的エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4

バリエーション		鎖 A	鎖 B
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	Fab 配列置換	HC: T30Q_G56Y LC: Y49W_Y96G	
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_T366L_K392L_T394W

* K a b a t による F a b または可変ドメインのナンバリング (K a b a t e t a l .

, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, p. 647, 1991)

§ KabatなどEUインデックスによるCH3ナンバリング (Edelman et al., 1969, PNAS USA, 63:78-85)。

【0131】

(表7A) バリエントv7133、v15079、v15080、v15081、v15082、v15083、v15084、及びv15085のECD2結合アームのCDR配列

バリエント	HC CDR	SEQ ID NO	LC CDR	SEQ ID NO
7133	H1: GFTFADYT	39	L1: QDVSIG	12
	H2: VNPNSGGS	8	L2: SAS	14
	H3: ARNLGPSFYFDY	7	L3: QQYYIYPAT	28
15082	H1: GFTFTDYT	6	L1: QDVSIG	12
	H2: VNPNSGYS	73	L2: SAS	14
	H3: ARNLGPSFYFDY	7	L3: QQYYIYPYT	13
15085	H1: GFTFQDYT	74	L1: QDVSIG	12
	H2: VNPNSGGS	8	L2: SAS	14
	H3: ARNLGPWFYFDY	75	L3: QQYYIYPYT	13
15083 & 15080	H1: GFTFQDYT	74	L1: QDVSIG	12
	H2: VNPNSGGS	8	L2: SAS	14
	H3: ARNLGPSFYFDY	7	L3: QQYYIYPGT	76
15079	H1: GFTFYDYT	77	L1: QDVSIG	12
	H2: VNPNSGGS	8	L2: SAS	14
	H3: ARNLGPSFYFDY	7	L3: QQYYIYPGT	76
15084	H1: GFTFQDYT	74	L1: QDVSIG	12
	H2: VNPNSGYS	73	L2: SAS	14
	H3: ARNLGPWFYFDY	75	L3: QQYYIYPYT	13
15081	H1: GFTFQDYT	74	L1: QDVSIG	12
	H2: VNPNSGYS	73	L2: SAS	14
	H3: ARNLGPSFYFDY	7	L3: QQYYIYPGT	76

【0132】

抗HER2バイパラトピック抗体の特性

低いDARでの毒素のコンジュゲーションは、対応する二価の単一特異性抗体と比較して、HER2への結合の増加及び／またはHER2発現細胞への高い内在化を示す抗HER2バイパラトピック抗体にとって特に有益である。対応する二価の単一特異性抗体は、バイパラトピック抗体に含まれる第1の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの2つ、または第2の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの2つを含み得る。

【0133】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、対応する二価の単一特異性

抗体と比較して、HER2への結合の増加（すなわち、より高い親和性での結合）を示す。結合の増加は、例えば、解離定数の減少及び／または最大結合の増加によって示され得る。

【0134】

解離定数 (K_D) は、抗体-抗原相互作用などの特定のリガンド-タンパク質相互作用の平衡解離定数を指す。 K_D は、2つのタンパク質（例えば、AB）がより小さい成分（ $A+B$ ）に可逆的に解離する傾向を測定し、解離速度（「オフレート」または k_{off} とも呼ばれる）対会合速度（「オンレート」または k_{on} とも呼ばれる）の比率として定義される。したがって、 K_D は k_{off}/k_{on} に等しく、モル濃度 (M) として表される。したがって、 K_D が小さいほど、結合の親和性は強くなる。抗体の K_D 値は、当技術分野で十分に確立されている方法を使用して決定することができる。そのような方法の例としては、典型的には *Biacore*（登録商標）システムなどのバイオセンサーシステムを使用する表面プラズモン共鳴 (SPR)、及び等温滴定熱量測定 (ITC) が挙げられる。

10

【0135】

見かけの K_D 、または見かけの平衡解離定数は、最大細胞結合の半分が観察される抗体濃度を表す。見かけの K_D は、細胞に発現する様々な受容体レベル及びインキュベーション条件などの細胞結合実験の条件に依存する。したがって、見かけの K_D は一般に、SPR 及び ITC などの無細胞分子実験から求められる K_D 値とは異なる。しかし、一般に、異なる方法間には十分な合意点がある。

【0136】

最大結合（または「 B_{max} 」）は、抗体の飽和濃度での細胞における最大抗体結合レベルを指す。このパラメータは、相対比較のために任意の単位 MFI で報告されるか、または標準曲線を使用して、細胞に結合した抗体の数に対応する絶対値に変換できる。

20

【0137】

B_{max} 及び見かけの K_D は、様々な技法で求めることができる。一例は、フローサイトメトリーにより、標的抗原発現細胞への結合を測定することである。典型的には、このような実験では、標的抗原発現細胞を様々な濃度で抗体と共にインキュベートし、洗浄し、抗体を検出するために二次試薬とインキュベートし、洗浄し、フローサイトメーターで分析して、蛍光強度の中央値 (MFI) を測定する。この値は、細胞上での検出信号の強さを表し、細胞に結合した抗体の数に関連する。抗体濃度対 MFI データを飽和結合方程式に当てはめて、 B_{max} 及び見かけの K_D を求める。

30

【0138】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、対応する参照抗体と比較して、HER2を提示する標的細胞に対して B_{max} の増加を示す。本明細書に記載の第1の抗原結合ポリペプチド構築物及び第2の抗原結合ポリペプチド構築物を含む抗HER2バイパラトピック抗体の場合、対応する参照抗体は、第1の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの2つまたは第2の抗原結合ポリペプチド構築物のうちの2つを含む二価の単一特異性抗体である。特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体について決定された B_{max} は、対応する参照抗体の B_{max} の少なくとも約110%である。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体について決定された B_{max} は、対応する参照抗体の B_{max} の少なくとも約125%、例えば、対応する参照抗体の B_{max} の約150%、または対応する参照抗体の B_{max} の少なくとも約200%である。

40

【0139】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体について決定された B_{max} は、参照抗体の B_{max} の1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9または2.0倍である。

【0140】

特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、対応する参照二価の単一特異性抗体よりもHER2発現細胞へのより高い内在化を示す。抗HER2バイパラトピック抗体は、受容体HER2への結合を介してHER2+細胞に内在化される。したがって

50

、抗HER2バイパラトピック抗体は、HER2+細胞において受容体の内在化を誘導できると考えることもできる。

【0141】

抗体の内在化は、当技術分野で既知の方法を使用して、例えば、Schmidt, M. et al., Cancer Immunol Immunother, 57:1879-1890 (2008) に詳述されているプロトコルに従って、直接内部化法によって測定してもよい。当技術分野で公知であるように、がん細胞は、様々なレベルでHER2を発現し得る。HER2発現細胞を分類する1つの方法は、HER2 1+、2+または3+（それぞれ低、中、および高）である。特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、3+レベルでHER2を発現する細胞において、対応する二価の参照単一特異性抗体よりも高い内在化を示す。特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、2+レベルでHER2を発現する細胞において、対応する二価の参照単一特異性抗体よりも高い内在化を示す。特定の実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、1+レベルでHER2を発現する細胞において、対応する二価の参照単一特異性抗体よりも高い内在化を示す。異なるレベルのHER2を発現する細胞株の例は、以下により詳細に記載する。

【0142】

本開示の文脈において、抗HER2バイパラトピック抗体は、HER2発現細胞に内在化された抗HER2バイパラトピック抗体の量が、同じHER2発現細胞に内在化された二価の参照単一特異性抗体の量よりも少なくとも1.2倍多い場合には、対応する二価の参照単一特異性抗体よりもHER2発現細胞へのより高い内在化を示すと考えられる。特定の実施形態では、内在化された抗体の量は、Schmidt, M. et al., Cancer Immunol Immunother, 57:1879-1890 (2008) で詳述されているプロトコルに従って、直接内在化法により決定される。いくつかの実施形態では、内在化された抗体の量は、2+レベルでHER2を発現するHER2発現細胞において決定される。

【0143】

いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、HER2発現細胞に内在化された抗HER2バイパラトピック抗体の量が、同じHER2発現細胞に内在化された二価の参照単一特異性抗体の量よりも少なくとも1.3倍多い場合には、対応する二価の参照単一特異性抗体よりもHER2発現細胞へのより高い内在化を示すと考えられる。いくつかの実施形態では、抗HER2バイパラトピック抗体は、HER2発現細胞に内在化された抗HER2バイパラトピック抗体の量が、同じHER2発現細胞に内在化された二価の参照単一特異性抗体の量よりも少なくとも1.4倍多い、例えば、少なくとも1.5倍多い、1.6倍多い、1.7倍多い、1.8倍多い、1.9倍多い、または2.0倍多い場合には、対応する二価の参照単一特異性抗体よりもHER2発現細胞へのより高い内在化を示すと考えられる。特定の実施形態では、内在化された抗体の量は、Schmidt, M. et al., Cancer Immunol Immunother, 57:1879-1890 (2008) で詳述されているプロトコルに従って、直接内在化法により決定される。いくつかの実施形態では、内在化された抗体の量は、2+レベルでHER2を発現するHER2発現細胞において決定される。

【0144】

オーリスタチン類似体

本明細書に記載されるADCは、オーリスタチンベースの毒素（または「オーリスタチン類似体」）を含む。様々なオーリスタチン類似体が当技術分野において公知である。例としては、これらに限定されないが、モノメチルオーリスタチンF（MMAF）、モノメチルオーリスタチンE（MMAE）、オーリスタチンEB（AEB）、オーリスタチンEV B（AEVB）、及びオーリスタチンFフェニレンジアミン（AFP）が挙げられる。様々なオーリスタチン類似体の合成及び構造は、米国特許第6,884,869号、第7,098,308号；同第7,256,257号及び同第7,498,298号に記載さ

10

20

30

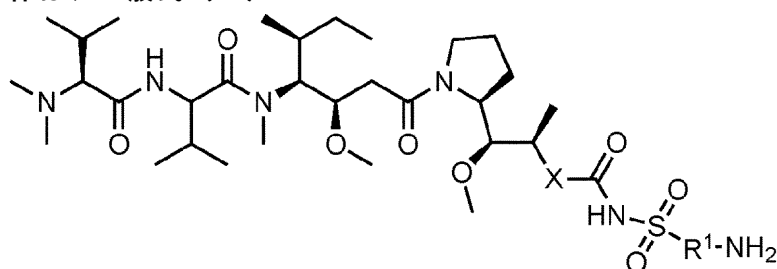
40

50

れている。

【0145】

特定の実施形態では、本明細書に記載されるADCに含まれるオーリスタチン類似体は、国際特許出願公開WO2016/041082号に記載されているオーリスタチン類似体であり得る。特定の実施形態では、本明細書に記載のADCを含むオーリスタチン類似体は、一般式(I)：



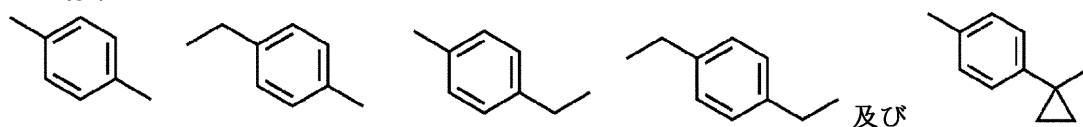
(I)

の化合物であり、

式中、

Xは $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{R}^2)-$ であるか、またはXは存在せず；

R^1 は、

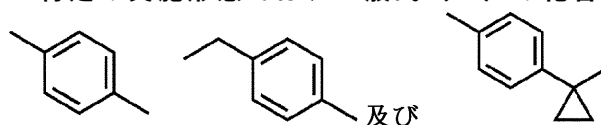


から選択され、

R^2 は、フェニルである。

【0146】

特定の実施形態では、一般式(I)の化合物において、 R^1 は、



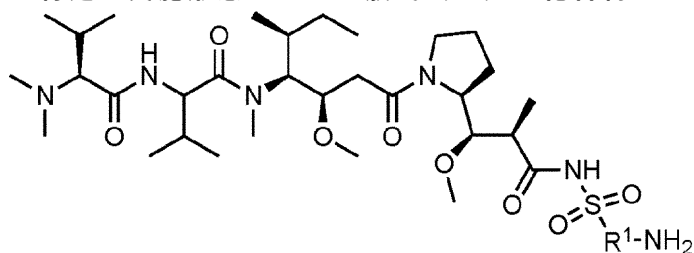
から選択される。

【0147】

特定の実施形態では、一般式(I)の化合物において、Xは存在しない。

【0148】

特定の実施形態では、一般式(I)の化合物は、一般式(IV)：



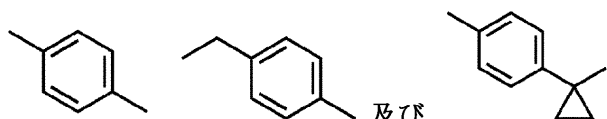
(IV)

を有し、

式中、 R^1 は、一般式(I)について定義されたとおりである。

【0149】

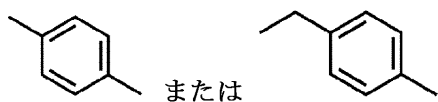
特定の実施形態では、式(IV)の化合物において、 R^1 は、



から選択される。

【0150】

特定の実施形態では、式（IV）の化合物において、 R^1 は：

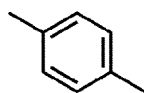


または

である。

【0151】

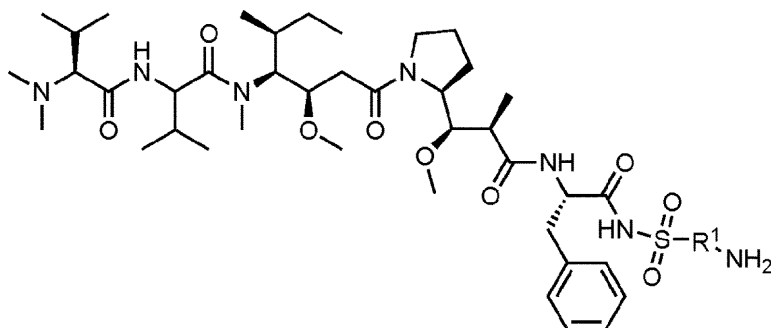
特定の実施形態では、式（IV）の化合物において、 R^1 は、



である。

【0152】

特定の実施形態では、一般式（I）の化合物は、一般式（V）：



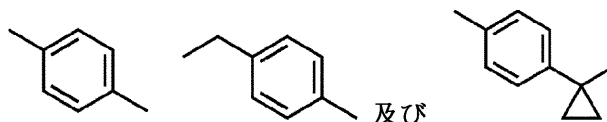
(V)

を有し、

式中、 R^1 は、一般式（I）について定義されたとおりである。

【0153】

特定の実施形態では、式（V）の化合物において、 R^1 は、



及び

から選択される。

【0154】

特定の実施形態では、式（V）の化合物において、 R^1 は：

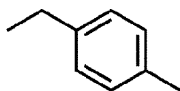


または

である。

【0155】

特定の実施形態では、式（V）の化合物において、 R^1 は、



である。

【0156】

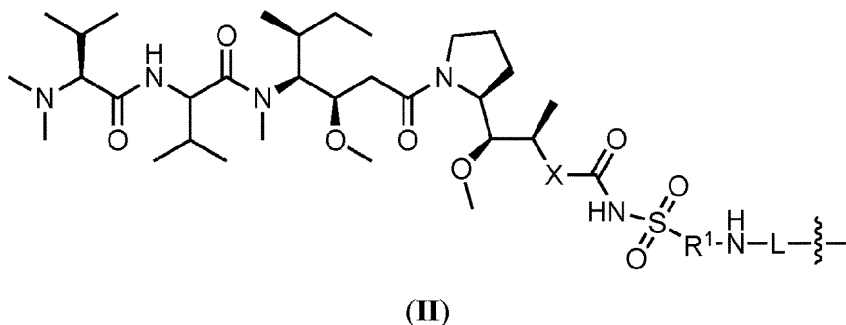
一般式（I）の化合物は、市販の出発物質から標準的な合成有機化学プロトコルによって調製されてもよい。例示的な方法は、国際特許出願公開WO2016/041082号に提供されており、以下の「実施例」セクションに示す。

【0157】

本開示の他の全体における一般式（I）の化合物への言及は、様々な実施形態において、一般式（IV）及び（V）の化合物を、これらの式のそれぞれを個別に引用する実施形態が、具体的に引用された場合と同程度に含むことを理解されたい。

【0158】

特定の実施形態では、本開示のADCは、リンカー（L）を介してオーリスタチン類似体（毒素）にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体を含み、リンカー-毒素は一般式（II）：

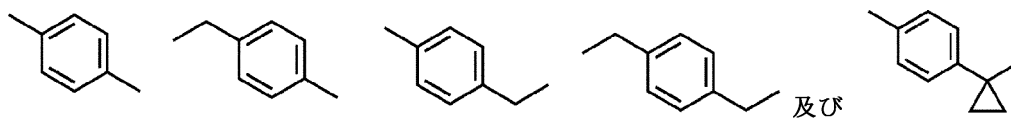


を有し、

式中、

Xは $-C(O)NHCH(CH_2R^2)-$ であるか、またはXは存在せず；

R^1 は、



から選択され；

R^2 はフェニルであり；

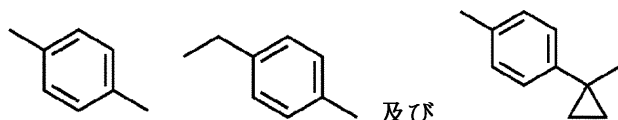
Lが、リンカーであり、

~~~~~

は、抗HER2バイパラトピック抗体へのリンカー-毒素の付着点を表す。

【0159】

いくつかの実施形態では、一般式（II）のリンカー-毒素において、 $R^1$ は、



から選択される。

【0160】

いくつかの実施形態では、一般式（II）のリンカー毒素において、Xは存在しない。

【0161】

いくつかの実施形態では、一般式（II）のリンカー毒素において、Lは、切断可能リンカーである。

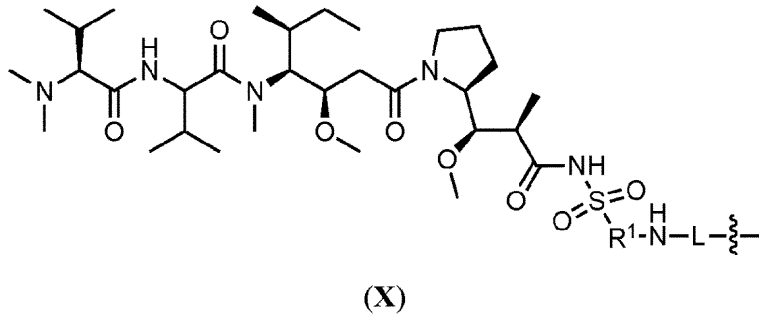
【0162】

いくつかの実施形態では、一般式（II）のリンカー毒素において、Lは、ペプチド含有リンカーである。

【0163】

特定の実施形態では、一般式（II）のリンカー毒素は、一般式（X）：

10



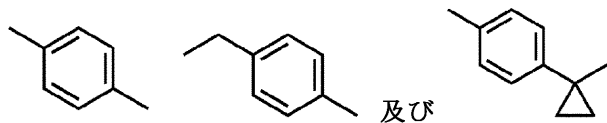
20

を有し、  
式中、 $R^1$ 、L及び

は、一般式（II）について上記で定義したとおりである。

【0164】

いくつかの実施形態では、一般式（X）のリンカー毒素において、 $R^1$ は、

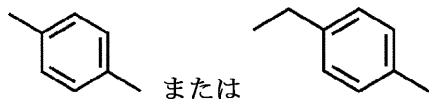


30

から選択される。

【0165】

いくつかの実施形態では、一般式（X）のリンカー毒素において、 $R^1$ は：

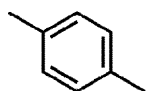


である。

40

【0166】

いくつかの実施形態では、式（X）の化合物において、 $R^1$ は：



である。

【0167】

いくつかの実施形態では、一般式（X）のリンカー毒素において、Lは、切断可能リンカーである。

50

【0168】

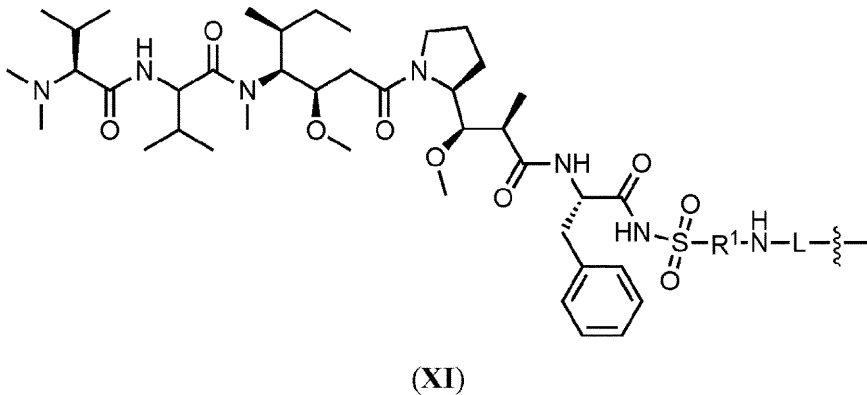
いくつかの実施形態では、一般式（X）のリンカー毒素において、Lはペプチド含有リンカーである。

【0169】

いくつかの実施形態では、一般式（X）のリンカー毒素において、Lは、プロテアーゼ切断可能リンカーである。

【0170】

特定の実施形態では、一般式（II）のリンカー毒素は、一般式（XI）：



10

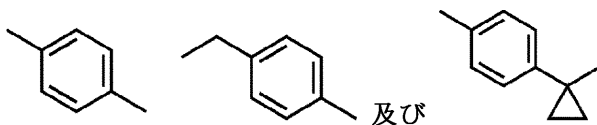
を有し、  
式中、 $R^1$ 、L及び  
~~~~~

20

は、一般式（II）について上記で定義したとおりである。

【0171】

いくつかの実施形態では、一般式（XI）のリンカー毒素において、 R^1 は、

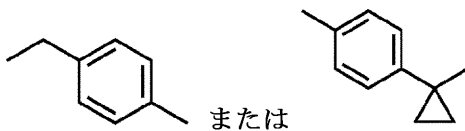


30

から選択される。

【0172】

いくつかの実施形態では、一般式（XI）のリンカー毒素において、 R^1 は：

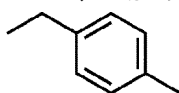


40

である。

【0173】

いくつかの実施形態では、一般式（XI）のリンカー毒素において、 R^1 は：



である。

【0174】

いくつかの実施形態では、一般式（XI）のリンカー毒素において、Lは、切断可能

50

リンカーである。

【0175】

いくつかの実施形態では、一般式（XI）のリンカー毒素において、Lは、ペプチド含有リンカーである。

【0176】

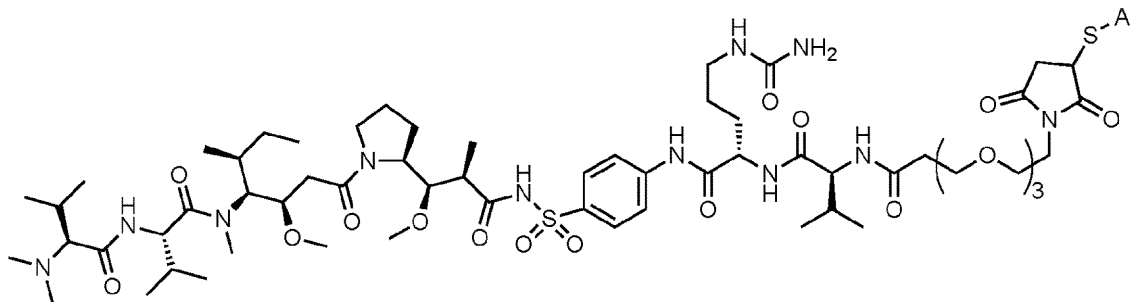
いくつかの実施形態では、一般式（XI）のリンカー毒素において、Lは、プロテアーゼ切断可能リンカーである。

【0177】

以下に示すとおり、リンカーが一般式（VII）または（IX）を有する一般式（I）、式（X）または式（XI）のリンカー毒素にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体を含むADCも本明細書で企図される。

【0178】

特定の実施形態では、ADCは、構造

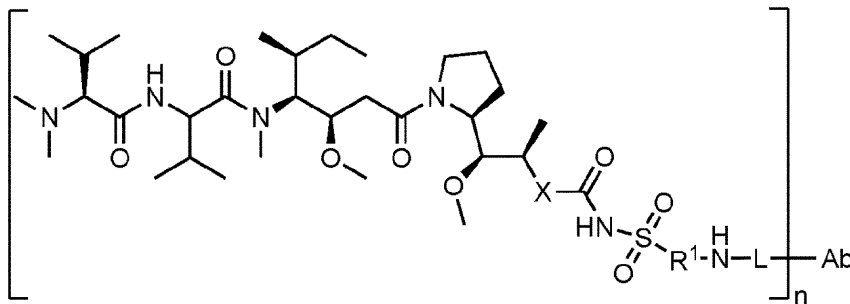


を有するリンカー毒素を含み、

A-S-は、抗HER2バイパラトピック抗体への付着点である。

【0179】

特定の実施形態では、リンカー（L）を介してオリスタチン類似体（毒素）にコンジュゲートした抗HER2バイパラトピック抗体を含む本開示のADCは、一般式（III）：



(III)

を有し、

式中、X及びR¹は、一般式（I）として定義されたとおりであり；

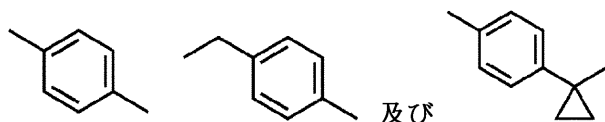
Lが、リンカーであり、

nは、平均薬物抗体比（DAR）であり、3.9未満であり、

Abは、抗HER2バイパラトピック抗体である。

【0180】

いくつかの実施形態では、一般式（III）のADCにおいて、R¹は、



10

20

30

40

50

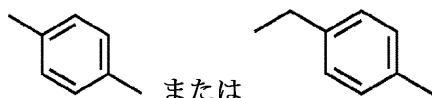
から選択される。

【0181】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) のADCにおいて、Xは存在しない。

【0182】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) のADCにおいて、 R^1 は：

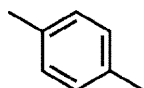


であり、

Xは存在しない。

【0183】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) のADCにおいて、 R^1 は：



であり、

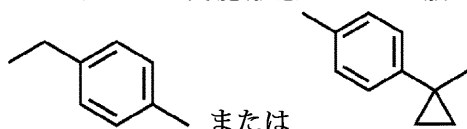
Xは存在しない。

【0184】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) のADCにおいて、Xは、 $-C(O)NHCH(CH_2R^2)-$ である。

【0185】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) のADCにおいて、 R^1 は：

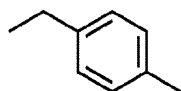


であり、

Xは、 $-C(O)NHCH(CH_2R^2)-$ である。

【0186】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) のADCにおいて、 R^1 は：



であり、

Xは、 $-C(O)NHCH(CH_2R^2)-$ である。

【0187】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) のADCにおいて、Lは、切断可能リンカーである。

【0188】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) のADCにおいて、Lは、ペプチド含有リンカーである。

【0189】

一部の実施形態では、一般式 (III) のADCにおいて、Lは、プロテアーゼ切断可能リンカーである。

【0190】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) のADCにおいて、nは、0.5～3.8

10

20

30

40

50

である。

【0191】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) の ADC において、n は、0.7 ~ 3.8、0.7 ~ 3.5、0.7 ~ 3.0、または 0.7 ~ 2.5 である。

【0192】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) の ADC において、n は、1.0 ~ 3.8、1.0 ~ 3.5、1.0 ~ 3.0、または 1.0 ~ 2.5 である。

【0193】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) の ADC において、n は、1.5 ~ 3.8、1.5 ~ 3.5、1.5 ~ 3.0、または 1.5 ~ 2.5 である。

【0194】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) の ADC において、n は、1.6 ~ 3.8、1.6 ~ 3.5、1.6 ~ 3.0、または 1.6 ~ 2.5 である。

【0195】

いくつかの実施形態では、一般式 (III) の ADC において、n は、1.8 ~ 2.8、または 1.8 ~ 2.5 である。

【0196】

一般式 (III) の化合物についての前述の実施形態の組み合わせはいずれも企図され、各組み合わせは、本開示の目的のために別個の実施形態を形成する。

【0197】

リンカー

本明細書に記載の ADC において、抗 HER2 バイパルトピック抗体は、リンカーによってオースタチン類似体 (毒素) に連結される。リンカーは、1つ以上の毒素分子を抗体に連結できる二機能性部分または多機能性部分である。リンカーは、単一の薬物を抗体の単一の部位に連結するように二機能性 (または一価) であっても、2つ以上の毒素分子を抗体の単一の部位に連結するように多機能性 (または多価) であってもよい。1つの毒素分子を抗体上の2つ以上の部位に連結することができるリンカーもまた、多機能性であると見なされ得る。

【0198】

リンカーの抗体への付着は、抗体上の表面リジン、抗体の酸化された炭水化物への還元的カップリング、または鎖間ジスルフィド結合の還元により遊離した抗体のシステイン残基など、様々な方法で達成できる。あるいは、抗体へのリンカーの付着は、追加のシステイン残基 (例えば、米国特許第 7,521,541 号、8,455,622 号及び 9,000,130 号を参照) または、セレノメチオニン、p-アセチルフェニルアラニン、ホルミルグリシンまたは p-アジドメチル-L-フェニルアラニンなど、反応性ハンドルを提供する非天然アミノ酸を含むように抗体を修飾することにより達成して (例えば、Hofer et al., Biochemistry, 48:12047-12057 (2009); Axup et al., PNAS, 109:16101-16106 (2012); Wu et al., PNAS, 106:3000-3005 (2009); Zimmerman et al., Bioconj. Chem., 25:351-361 (2014) を参照)、部位特異的コンジュゲーションが可能になる。

【0199】

リンカーは、抗体上の標的基 (複数可) と反応することができる官能基、及び毒素上の標的基と反応し得る1つ以上の官能基を含む。好適な官能基は当技術分野において公知であり、例えば、Bioconjugate Techniques (G. T. Hermanson, 2013, Academic Press) に記載されているものが挙げられる。

【0200】

遊離システインまたはチオールと反応するための官能基の非限定的な例としては、マレイミド、ハロアセトアミド、ハロアセチルのほか、コハク酸イミドエステル、4-ニトロ

10

20

30

40

50

フェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステルなどの活性化エステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアン酸塩、及びイソチオシアン酸塩が挙げられる。この文脈においても有用であるのは、Lyon et al., Nat. Biotechnol., 32:1059-1062 (2014) に記載されている「自己安定化」マレイミドである。

【0201】

抗体の表面リジン及び毒素の遊離アミンと反応するための官能基の非限定的な例としては、N-ヒドロキシスクシンアミド (NHS) エステルなどの活性化エステル、スルホ-NHS エステル、トラウト試薬などのイミドエステル、イソチオシアネート、アルデヒド及びジエチレントリアミン五酢酸無水物 (DTPA) などの酸無水物が挙げられる。他の例としては、スクシンイミド-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート (TSTU) 及びベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP) が挙げられる。

10

【0202】

抗体または毒素の求電子基（アルデヒド基またはケトンカルボニル基など）と反応できる官能基の非限定的な例としては、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート及びアリアルヒドラジドが挙げられる。

【0203】

他のリンカーとしては、ThioBridge (商標) リンカー (Badescu et al., Bioconjug. Chem., 25:1124-1136 (2014))、ジチオマレイミド (DTM) リンカー (Behrens et al., Mol. Pharm., 12:3986-3998 (2015))、ジチオアリアル (TCEP) ピリダジンジオンベースのリンカー (Lee et al., Chem. Sci., 7:799-802 (2016))、ジブロモピリダジンジオンベースのリンカー (Maruani et al., Nat. Commun., 6:6645 (2015)) 及び当技術分野で知られている他のものなど、抗体上の2つの鎖間システインの架橋を可能にする官能基を有するリンカーが挙げられる。

20

【0204】

リンカーは、1つ以上のリンカー構成要素を含んでもよい。典型的には、リンカーは2つ以上のリンカー構成要素を含む。例示的なリンカー構成要素としては、抗体と反応するための官能基、毒素と反応するための官能基、ストレッチャー、ペプチド構成要素、自壊性基 (self-immolative group)、自己脱離基、親水性部分などが挙げられる。様々なリンカー構成要素が当該技術分野で既知であり、このうちのいくつかは以下に記載される。

30

【0205】

特定の有用なリンカー構成要素は、Pierce Biotechnology, Inc. (現在のThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 及びMolecular Biosciences Inc. (Boulder, Colo.) などの様々な商用供給源から取得できるか、または当技術分野において記述されている手順に従って合成されてもよい (例えば、Toki et al., J. Org. Chem., 67:1866-1872 (2002); Dubowchik, et al., Tetrahedron Letters, 38:5257-60 (1997); Walker, M. A., J. Org. Chem., 60:5352-5355 (1995); Frisch, et al., Bioconjugate Chem., 7:180-186 (1996); 米国特許第6, 214, 345号及び同第7, 553, 816号、ならびに国際特許出願公開第WO02/088172号を参照されたい)。

40

【0206】

リンカー構成要素の例としては、これらに限定されないが、N-(β-マレイミドプロピルオキシ)-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (BMPS)、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ) スクシンイミドエステル (EMCS)、N-[γ-マレイミドブ

50

チリルオキシ] スクシンイミドエステル (G M B S)、1, 6-ヘキサン-ビス-ビニル
スルホン (H B V S)、スクシンイミジル 4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン
-1-カルボキシ- (6-アミドカプロエート) (L C-S M C C)、m-マレイミドベン
ゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (M B S)、4- (4-N-マレイミ
ドフェニル) 酪酸ヒドラジド (M P B H)、スクシンイミジル 3- (プロモアセトアミド
) プロピオネート (S B A P)、スクシンイミジルヨードアセテート (S I A)、スク
シンイミジル (4-ヨードアセチル) アミノ安息香酸塩 (S T A B)、N-スクシンイミ
ジル-3- (2-ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P)、N-スクシンイミジル-
4- (2-ピリジルチオ) ペンタノエート (S P P)、スクシンイミジル 4- (N-マレ
イミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (S M C C)、スクシンイミジル
4- (p-マレイミドフェニル) ブチレート (S M P B)、スクシンイミジル 6- [(β
-マレイミドプロピオンアミド) ヘキサノエート] (S M P H)、イミノチオラン (I T
)、スルホ- E M C S、スルホ- G M B S、スルホ- K M U S、スルホ- M B S、スルホ
- S I A B、スルホ- S M C C、スルホ- S M P B 及びスクシンイミジル- (4-ビニル
スルホン) ベンゾエート (S V S B) が挙げられる。

10

【0207】

追加の例としては、ジチオビスマレイミドエタン (D T M E)、ビス-マレイミド-ト
リオキシエチレングリコール (B M P E O)、1, 4-ビスマレイミドブタン (B M B)
、1, 4-ビスマレイミジル-2, 3-ジヒドロキシブタン (B M D B)、ビスマレイミド
ヘキサン (B M H)、ビスマレイミドエタン (B M O E)、B M (P E G)₂ 及び B M (P E G)
₃ などのビスマレイミド試薬; イミドエステルの二官能性誘導体 (アジブイミド
酸ジメチル H C l など)、活性エステル (スベリン酸ジサクシニミジルなど)、アルデヒ
ド (グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物 (ビス (p-アジドベンゾイル) ヘ
キサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (ビス- (p-ジアゾニウムベンゾイ
ル) -エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート (トルエン 2, 6-ジイソシアネート
など)、及びビス-活性フッ素化合物 (1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン
など) が挙げられる。

20

【0208】

好適なリンカーは、典型的には、細胞内の条件よりも細胞外の条件に対して化学的に安
定であるが、毒素が選択的または標的であり、正常細胞に対する毒性が低い場合など、特
定の状況では安定性の低いリンカーが企図される。リンカーは、「切断可能リンカー」ま
たは「切断不可リンカー」であり得る。切断可能リンカーは、典型的には、例えば、リソ
ソームプロセスを通じて、細胞内条件下で切断を受けやすい。例としては、プロテアーゼ
感受性、酸感受性、還元感受性または光不安定性であるリンカーが挙げられる。対照的に
、切断不可リンカーは、細胞内での抗体の分解に依存しており、これは典型的には、アミ
ノ酸-リンカー-毒素部分の放出をもたらす。

30

【0209】

好適な切断可能リンカーとしては、例えば、2つ以上のアミノ酸を含み、リソソームプ
ロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼなどの細胞内プロテアーゼによって切断可能
なペプチド構成要素を含むリンカーが挙げられる。ペプチド構成要素には、自然発生アミ
ノ酸残基及び/または微量アミノ酸、及び/またはシトルリンなどの非自然発生アミノ酸
類似体を含んでもよい。ペプチド構成要素は、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアー
ゼ、カテプシン B、C、もしくは D、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の
ために設計及び最適化され得る。

40

【0210】

特定の実施形態では、A D C に含まれるリンカーは、バリン-シトルリン (V a l - C i t)
またはフェニルアラニン-リジン (P h e - L y s) を含むリンカーなどのジペプ
チド含有リンカーであり得る。リンカーに含めるのに好適であるジペプチドの他の例とし
ては、V a l - L y s、A l a - L y s、M e - V a l - C i t、P h e - h o m o L y s、P h e - C i t、L e u - C i t、I l e - C i t、T r p - C i t、P h e - A r

50

g、Ala-Phe、Val-Ala、Met-Lys、Asn-Lys、Ile-Pro、Ile-Val、Asp-Val、His-Val、Met-(D)Lys、Asn-(D)Lys、Val-(D)Asp、NorVal-(D)Asp、Ala-(D)Asp、Me₃Lys-Pro、PhenylGly-(D)Lys、Met-(D)Lys、Asn-(D)Lys、Pro-(D)Lys及びMet-(D)Lysが挙げられる。切断可能リンカーは、トリペプチド、テトラペプチド、またはペンタペプチドなどのより長いペプチド構成要素も含み得る。例としては、これらに限定されないが、Met-Cit-Val、Gly-Cit-Val、(D)Phe-Phe-Lys及び(D)Ala-Phe-Lys、ならびにテトラペプチドGly-Phe-Leu-Gly及びAla-Leu-Ala-Leuが挙げられる。

10

【0211】

切断可能リンカーのさらなる例としては、例えば、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート(SPBD)及びN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホブタノエート(スルホ-SPBD)などのジスルフィド含有リンカーが挙げられる。ジスルフィド含有リンカーは任意で、リンカーの細胞外安定性、例えばジェミナルジメチル基の包含を改善するために、ジスルフィド結合に隣接して立体障害をもたらす追加の基を含むことができる。他の好適なリンカーとしては、ヒドラゾンリンカーなど、特定のpHまたはあるpH範囲内で加水分解可能なリンカーが挙げられる。これらの官能基の組み合わせを含むリンカーもまた有用であり得、例えば、ヒドラゾン及びジスルフィドの両方を含むリンカーが当該分野で公知である。

20

【0212】

切断可能リンカーのさらなる例としては、β-グルクロニドを含むリンカーであり、β-グルクロニダーゼによって切断され得、リソソーム及び腫瘍間質に存在する酵素である(例えば、De Graaf et al., Curr. Pharm. Des., 8:1391-1403 (2002))を参照のこと)。

【0213】

切断可能リンカーは任意で、自壊性基及び自己脱離基、ストレッチャーまたは親水性部分などの1つ以上の追加の構成要素をさらに含むことができる。

【0214】

リンカーでの用途がわかっている自壊性及び自己脱離基としては、例えばp-アミノベンジルオキシカルボニル(PABC)及びp-アミノベンジルーエテル(PABE)基、メチル化エチレンジアミン(MED)などが挙げられる。自壊性基の他の例としては、これらに限定されないが、例えば、米国特許第7,375,078号に記載されている2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体などの複素環式誘導体など、PABC基またはPABE基に電子的に類似した芳香族化合物が挙げられる。他の例としては、置換及び非置換4-アミノ酪酸アミド(Rodrigues et al., Chemistry Biology, 2:223-227 (1995))及び2-アミノフェニルプロピオン酸アミド(Amsberry, et al., J. Org. Chem., 55:5867-5877 (1990))などの、アミド結合加水分解時に環化を受ける基が挙げられる。

30

【0215】

ADCのリンカーでの用途がわかっているストレッチャーとしては、例えば、アルキレン基、及び脂肪酸、二酸、アミンまたはジアミンに基づくストレッチャー、例えばジグリコレート、マロネート、カプロエート及びカプロアミドが挙げられる。他のストレッチャーとしては、例えば、グリシンベースのストレッチャー、ポリエチレングリコール(PEG)ストレッチャー及びモノメトキシポリエチレングリコール(mPEG)ストレッチャーが挙げられる。PEG及びmPEGストレッチャーも親水性部分として機能する。

40

【0216】

いくつかの実施形態では、本開示のADCにおいて用途が見い出され得る切断可能リンカーにおいて一般的に見られる構成要素の例としては、これらに限定されないが、SPBD、スルホ-SPBD、ヒドラゾン、Val-Cit、マレイドカプロイル(MCまたは

50

mc)、mc-Val-Cit、mc-Val-Cit-PABC、Phe-Lys、mc-Phe-Lys、mc-Phe-Lys-PABC、マレイミドトリエチレングリコレート (MT)、MT-Val-Cit、MT-Phe-Lys 及びアジピン酸 (AD) が挙げられる。

【0217】

特定の実施形態では、本開示のADCに含まれるリンカーは、一般式 (VI)



(VI)

10

を有するペプチドベースのリンカーであり、
式中、

Zは、抗体上の標的基と反応できる官能基であり；

Strは、ストレッチャーであり；

AA₁ 及び AA₂ はそれぞれ独立して、アミノ酸であり、AA₁-[AA₂]_mは、プロテアーゼ切断部位を形成し；

Xは、自壊性基であり；

Dは、オーリスタチン類似体への付着点であり；

sは、0 または 1 であり；

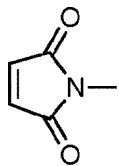
mは、1～4の整数であり、

oは、0、1、または2である。

20

【0218】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI) において、Zは：

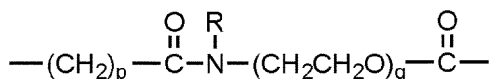
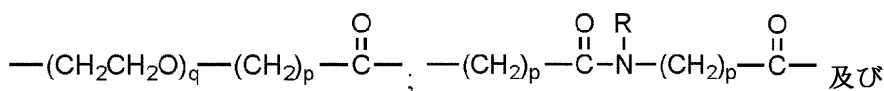
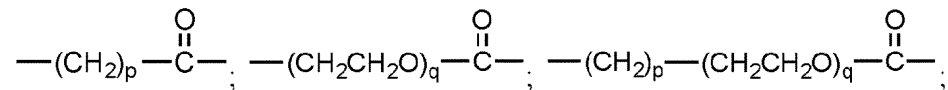


30

である。

【0219】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI) において、Strは、



40

、から選択され；

式中、

Rは、HまたはC₁～C₆アルキルであり、

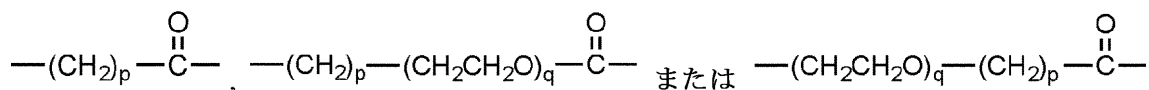
pは、2～10の整数であり、

qは、1～10の整数である。

【0220】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI) において、Strは：

50

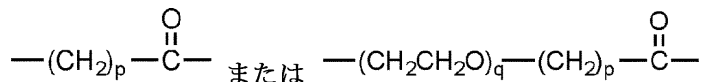


であり、

p 及び q は、上記で定義したとおりである。

【0221】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI) において、Str は：



10

であり、

p は、2～6の整数であり、

q は、2～8の整数である。

【0222】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI) において、AA₁ - [AA₂]_m は、Val-Lys、Ala-Lys、Phe-Lys、Val-Cit、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Arg、Ala-Phe、Val-Ala、Met-Lys、Asn-Lys、Ile-Pro、Ile-Val、Asp-Val、His-Val、Met-(D)Lys、Asn-(D)Lys、Val-(D)Asp、NorVal-(D)Asp、Ala-(D)Asp、Me₃Lys-Pro、PhenylGly-(D)Lys、Met-(D)Lys、Asn-(D)Lys、Pro-(D)Lys、Met-(D)Lys、Met-Cit-Val、Gly-Cit-Val、(D)Phe-Phe-Lys、(D)Ala-Phe-Lys、Gly-Phe-Leu-Gly 及び Ala-Leu-Ala-Leu から選択される。

20

【0223】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI) において、m は 1 である（すなわち、AA₁ - [AA₂]_m は、ジペプチドである）。

【0224】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI) において、AA₁ - [AA₂]_m は、Val-Lys、Ala-Lys、Phe-Lys、Val-Cit、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit 及び Trp-Cit から選択されるジペプチドである。

30

【0225】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI) において、各 X は、p-アミノベンジルオキシカルボニル (PABC)、p-アミノベンジルーテル (PABE) 及びメチル化エチレンジアミン (MED) から独立して選択される。

【0226】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI) において、m は、1、2 または 3 である。

【0227】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI) において、s は 1 である。

40

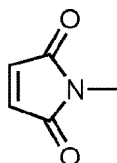
【0228】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI) において、o は 0 である。

【0229】

いくつかの実施形態では、一般式 (VI)：

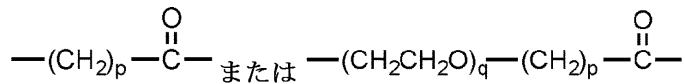
Z は、



50

であり；

Strは、



であり、

pは2～6の整数であり、qは2～8の整数であり；

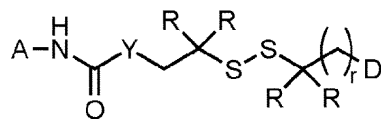
mは1であり、 $\text{AA}_1\text{---}[\text{AA}_2]_m$ は、Val-Lys、Ala-Lys、Phe-Lys、Val-Cit、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit及びTrp-Citから選択されるジペプチドであり；

sは、1であり；

oは、0である。

【0230】

いくつかの実施形態では、リンカーはジスルフィド含有リンカーであり、ADCは一般式(VII)：



(VII)

(VII)を有し、

式中、

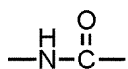
Aは、抗体であり；

Dは、オーリスタチン類似体であり；

Yは、 $\text{---}(\text{CH}_2)_p\text{---}$ または $\text{---}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{---}$ であり、p及びqはそれぞれ独立して1～10の整数であり；

各Rは独立して、Hまたは $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルであり；

rは、1、2、または3であり、



は、リンカーと抗体上の表面リジンのε-アミノ基との間に形成されたアミド結合を表す。

【0231】

一般式(VII)のいくつかの実施形態では、p及びqはそれぞれ独立して、1～4の整数である。

【0232】

いくつかの実施形態では、一般式(VII)において、Yは $\text{---}(\text{CH}_2)_p\text{---}$ であり、pは1～4の整数である。

【0233】

いくつかの実施形態では、一般式(VII)においては、各Rは独立して、HまたはMeである。

【0234】

いくつかの実施形態では、一般式(VII)においては、rは、1または2である。

【0235】

薬物を抗体に連結するための様々な切断不可リンカーは、当該技術分野で公知であり、特定の実施形態では、本開示のADCにおいて有用であり得る。切断不可リンカーの例としては、抗体との反応のためのN-スクシンイミジルエステルまたはN-スルホスクシンイミジルエステル部分、ならびに毒素との反応のためのマレイミドまたはハロアセチルペースの部分、またはその逆が挙げられる。そのような切断不可リンカーの例としては、ス

ルホスクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)をベースとする。こうしたリンカーの他の非限定的な例としては、N-スクシンイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(SMCC)、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシ(6-アミドカプロエート)(「長鎖」SMCCまたはLC-SMCC)、 κ -マレイミドウンデカン酸N-スクシンイミジルエステル(KMUA)、 γ -マレイミド酪酸N-スクシンイミジルエステル(GMBS)、 ϵ -マレイミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(EMCS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル(AMAS)、スクシンイミジル-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート(SMPH)、N-スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート(SMPB)、及びN-(p-マレイミドフェニル)イソシアネート(PMPI)をベースとするものが挙げられる。他の例としては、N-スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾエート(SIAB)、N-スクシンイミジルヨードアセテート(SIA)、N-スクシンイミジルブromoアセテート(SBA)、及びN-スクシンイミジル-3-(ブromoアセトアミド)プロピオネート(SBAP)などのハロアセチルベースの官能基を含むものが挙げられる。

【0236】

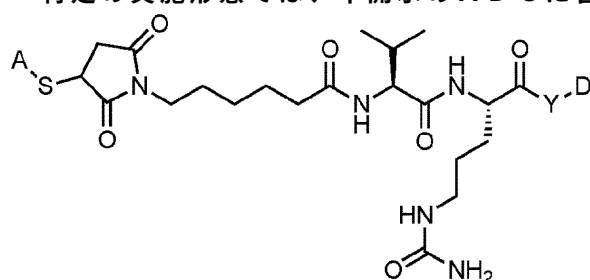
切断不可リンカーの他の例としては、マレイミドカプロイル(MC)などのマレイミドカルボン酸が挙げられる。

【0237】

所定のADCのための適切なリンカーの選択は、当技術分野の知識を有し、抗体への付着部位、毒素のあらゆる構造的制約及び毒素の疎水性などの関連要因を考慮に入れて、当業者によって容易に行われ得る(例えば、Noltting, Chapter 5, Antibody-Drug Conjugates: Methods in Molecular Biology, 2013, Ducry (Ed.), Springerのレビューを参照のこと)。

【0238】

特定の実施形態では、本開示のADCに含まれるリンカーは、一般式(VIII)：



(VIII)

を有し、

式中、

A-S-は、抗HER2バイパラトピック抗体への付着点であり；

Yは、1つ以上の追加のリンカー構成要素であるか、または存在せず、

Dは、オーリスタチン類似体への付着点である。

【0239】

特定の実施形態では、本開示のADCに含まれるリンカーは、一般式(IX)：

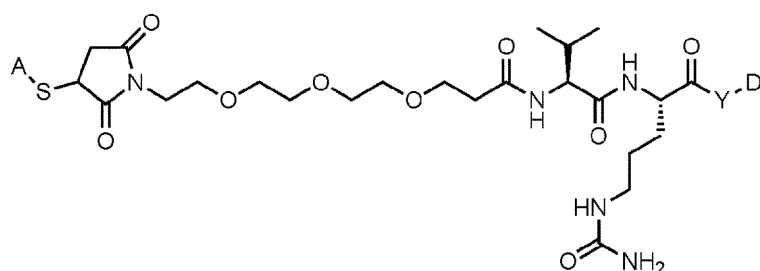
10

20

30

40

50



(IX)

を有し、

式中、

A-S-は、抗HER2バイパルトピック抗体への付着点であり；

Yは、1つ以上の追加のリンカー構成要素であるか、または存在せず、

Dは、オーリスタチン類似体への付着点である。

【0240】

抗体-薬物コンジュゲートの調製

本開示のADCは、当業者に公知である有機化学反応、条件、及び試薬を使用して、当技術分野で公知であるいくつかの経路のうちの1つによって調製することができる（例えば、Bioconjugate Techniques (G. T. Hermanson, 2013, Academic Press及び本明細書において提供されている実施例を参照のこと）。例えば、コンジュゲーションは、(1) 抗体の求核基または求電子基と二官能性リンカーとの反応により共有結合を介して抗体-リンカー中間体A b-Lを形成し、その後活性化オーリスタチン類似体(D)と反応させることにより達成できるか、または(2) オーリスタチン類似体の求核基または求電子基とリンカーとの反応により共有結合を介してリンカー-毒素D-Lを形成し、その後抗体の求核基または求電子基と反応させることにより達成できる。コンジュゲーション方法(1)及び(2)は、本明細書に記載のADCを調製するために、様々な抗体、オーリスタチン類似体、及びリンカーと共に使用されてもよい。

【0241】

上記のように、オーリスタチン類似体は、適切なリンカーを介して抗体上の様々な基にコンジュゲートして、ADCをもたらすことができる。例えば、コンジュゲーションは、表面リジンを介して、酸化された炭水化物を介して、または1つ以上の鎖間ジスルフィド連結を還元することによって遊離されたシステイン残基を介してもよい。あるいは、抗体は、セレノメチオニン、p-アセチルフェニルアラニン、ホルミルグリシンまたはp-アジドメチル-L-フェニルアラニンなどの反応性ハンドルを提供する追加のシステイン残基または非天然アミノ酸を含むように修飾されてもよい。こうした修飾は、当技術分野で周知である（例えば、米国特許第7,521,541号；同第8,455,622号及び同第9,000,130号；Hofer et al., Biochemistry, 48:12047-12057 (2009)；Axup et al., PNAS, 109:16101-16106 (2012)；Wu et al., PNAS, 106:3000-3005 (2009)；Zimmerman et al., Bioconj. Chem., 25:351-361 (2014)を参照のこと）。

【0242】

特定の実施形態では、本開示のADCは、1つ以上の鎖間ジスルフィド連結を還元することによって遊離されたシステイン残基に適切なリンカーを介してコンジュゲートしたオーリスタチン類似体を含む。

【0243】

本明細書に記載のADCでは、抗HER2バイパルトピック抗体は、低い平均薬物抗体比(DAR)で、リンカーを介して、毒素にコンジュゲートしている。低いDARは、具

体的には0.5を超え、3.9未満であり、例えば、特定の実施形態では、約1.5～約2.5である。

【0244】

低い平均DARでADCを調製するための様々な方法が当該技術分野では公知である（例えば、McCombs and Owenによるレビュー、The AAPS Journal, 17(2):339-351(2015)及びそれらの参考文献；Boutureira & Bernardes, Chem. Rev., 115:2174-2195(2015)を参照のこと）。

【0245】

例えば、システイン残基へのコンジュゲーションのために、抗体鎖間ジスルフィド結合の部分的な還元が行われ、その後、リンカー毒素へのコンジュゲートが行われ得る。部分的な還元は、還元反応で使用される還元剤の量を制限することによって達成できる（例えば、Lyon et al., Methods in Enzymology, 502:123-138(2012)、及びその中に記載の実施例、及び本明細書に記載の実施例を参照のこと）。好適な還元剤は、当該技術分野で公知であり、例えば、ジチオスレイトール(DTT)、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、2-メルカプトエタノール、システアミン及び複数の水溶性ホスフィンが挙げられる。あるいは、またはさらに、低い平均DARを得るために、より少ない当量のリンカー毒素を使用することができる。

【0246】

あるいは、鎖間ジスルフィド結合を構成するシステイン残基のうちの1つ以上がセリン残基で置換され、コンジュゲーションに利用できるシステイン残基が少なくなるように、操作された抗体を使用してもよい(McDonagh et al., Protein Eng. Des. Sel. PEDS, 19(7):299-307を参照のこと)。次に、操作された抗体は、還元剤で処理し、リンカー毒素にコンジュゲートさせることができる。

【0247】

別のアプローチでは、通常は鎖間ジスルフィド結合を構成する2つのシステインを架橋するビスチオールリンカーを使用する。毒素分子を1つのみ有するビスチオールリンカーを使用することで、4つの鎖間ジスルフィド結合がすべて還元されて、ビスチオールリンカーに置き換わると、フルサイズの抗体で最大DAR4のADCが生成される。DARをさらに減少させるために、鎖間ジスルフィド結合の部分的還元及び／またはより少ない当量のリンカーをビスチオールリンカーと組み合わせて使用することができる。様々なビスチオールリンカーが当該技術分野で公知である（例えば、Badescu et al., Bioconjug. Chem., 25(6):1124-1136(2014)；Behrens et al., Mol. Pharm., 12:3986-3998(2015)；Lee et al., Chem. Sci., 7:799-802(2016)；Maruani et al., Nat. Commun., 6:6645(2015)を参照されたい）。

【0248】

低い平均DARを有するADCを生成するために、システイン操作アプローチを使用してもよい。こうしたアプローチは、コンジュゲーションのための部位特異的ハンドルを提供するために、溶媒にアクセス可能なシステインを抗体に対して操作することを伴う。システイン残基の導入に適切な複数の部位がIgG構造で同定されており、Junutula et al., J. Immunol. Methods, 332(1-2):41-52(2008)；Junutula, et al., Nat. Biotechnol., 26(8), 925-932(2008)、及び米国特許第9,315,581号；同第9,000,130号；同第8,455,622号；同第8,507,654号及び同第7,521,541号のものが挙げられる。

【0249】

低い平均DARのADCは、限られた量の活性化リンカー毒素を用いたリジンコンジュゲーションによっても調製され得る。抗体のN末端アミノ酸での選択的反応も使用できる。例えば、N末端セリンは過ヨウ素酸塩でアルデヒドに酸化され、次にリンカー毒素と反応し得る（例えば、Thompson, et al., Bioconjug. Chem., 26(10):2085-2096(2015)を参照のこと）。同様に、N末端システイン残基は、アルデヒドと選択的に反応して、チアゾリジノンを得ることができる（例えば、Bernardes, et al., Nature Protocols, 8:2079-2089を参照のこと）。

【0250】

追加のアプローチとしては、p-アセチルフェニルアラニン(pAcPhe)またはセレノシステイン(Sec)などの1つ以上の非天然アミノ酸を含めるように抗体を操作することが挙げられる。pAcPheのケト基は、末端アルコキシアミンまたはヒドラジドを含むリンカー毒素と反応して、オキシムまたはヒドラゾン結合を形成することができる（例えば、Axup, et al., PNAS USA, 109:16101-16106(2012)を参照のこと）。Sec含有抗体は、マレイミドまたはヨードアセトアミドを含むリンカー毒素と反応して、セレノエーテルコンジュゲートを形成することができる（例えば、Hofer, et al., Biochemistry, 48:12047-12057(2009)を参照されたい）。

【0251】

抗体はまた、特定の酵素によって認識されるペプチドタグを含むように操作され、酵素触媒コンジュゲーションが可能になり得る。例えば、Sortase-A(SortA)は、LPXTG配列を認識する。このペプチドタグは、抗体のN末端またはC末端に操作して、SortA媒介コンジュゲーションが可能になり得る（例えば、米国特許出願公開第2016/0136298号; Kornberger and Skerra, mAbs, 6(2):354-366(2014)を参照されたい）。トランスグルタミナーゼは、N297位で脱グリコシル化された抗体（酵素的結合のためにQ295を露出させる）を使用するか、抗体を操作して「グルタミンタグ」(LLQG)を含めるようにすることによってDAR2のADCを生成するためにも使用されている(Jeger, et al., Angew. Chem., 49:9995-9997(2010); Strop, et al., Chem. Biol., 20(2):161-167(2013))。別のアプローチでは、適切なコンセンサス配列を抗体に操作して、操作された抗体をホルミルグリシン生成酵素(FGE)と共発現させることにより、ホルミルグリシン残基を抗体に導入することができる。導入されたホルミルグリシンのアルデヒド官能基は、毒素をコンジュゲートするためのハンドルとして使用されてもよい（例えば、Drake, et al., Bioconjug. Chem., 25(7):1331-1341(2014)を参照のこと）。

【0252】

DAR2のADCを生成するために使用される別のアプローチは、グリコシル化抗体に見られる天然の糖へのリンカー毒素のコンジュゲーションによるものである。グリコシル化抗体へのコンジュゲーションは、例えば、末端糖残基を過ヨウ素酸酸化させてアルデヒドを生成し、次に適切なリンカー毒素にコンジュゲートさせることによって、または天然糖を末端シアル酸残基で修飾し、次に、これを酸化してアルデヒドを生成し、リンカー毒素とコンジュゲートさせることができる糖鎖工学的アプローチによって達成され得る(Zhou, et al., Bioconjug. Chem., 25(3):510-520(2014))。

【0253】

抗体に対して活性部分をコンジュゲートするためのUV架橋の使用も報告されている。この方法では、ヌクレオチド結合部位(NBS)を使用して、反応性チオール部分を有する抗体の部位特異的共有官能化を行う。システインのインドール-3-酪酸(IBA)コンジュゲート型を使用して、NBSにおいて反応性チオール部分を抗体に部位特異的に光

10

20

30

40

50

架橋した。次に、チオール部分を使用して、チオール反応性基を有するリンカー毒素をコンジュゲートさせてもよい (Alves, et al., Bioconj. Chem., 25 (7) : 1198-1202 (2014))。

【0254】

あるいは、低い平均DARを有するADCは、疎水性相互作用クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー分離法を使用して、DARの種の混合物を含むADC調製物から単離され得る (例えば、Hamblett, et al., Clin. Cancer Res., 10 : 7063-7070 (2004) ; Sun, et al., Bioconj. Chem., 28 : 1371-81 (2017) ; 米国特許出願公開第2014/0286968号を参照のこと)。

10

【0255】

低い平均DARを有するADC調製物は、非コンジュゲート (すなわち、DAR0) 抗体を平均DAR $\geq$ 3.9のADC調製物に追加することによっても生成できる。当技術分野で知られているように、コンジュゲーション法の大部分は、様々なDARの種を含むADC調製物をもたらし、報告されているDARは個々のDARの種の平均である。特定の実施形態では、ある割合のDAR0の種を含むADC調製物が有利であり得る。いくつかの実施形態では、3.9未満の平均DARを有するADC調製物は、DAR0の種を少なくとも5%含み得る。いくつかの実施形態では、ADC調製物は、DAR0の種を少なくとも10%、例えば、DAR0の種を少なくとも15%またはDAR0の種を少なくとも20%含み得る。いくつかの実施形態では、ADC調製物は、DAR0の種を約5%~約50%含み得る。いくつかの実施形態では、ADC調製物は、DAR0の種を約10%~約50%、例えば、DAR0の種を約10%~約40%、または約10%~約30%含み得る。

20

【0256】

ADCの平均DARは、UV/VIS分光分析、ELISAベースの手法、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)、UV-MALDI質量分析 (MS)、及びMALDI-TOF MSなどのクロマトグラフィー技法などの標準的技法で決定され得る。さらに、薬物連結型 (例えば、DAR0、DAR1、DAR2などの種の分画) の分布は、MS (付随するクロマトグラフィー分離ステップの有無にかかわらず)、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相HPLCまたは等電点電気泳動ゲル電気泳動 (IEF) など、当技術分野で公知である様々な技法によって分析されてもよい (例えば、Sun et al., Bioconj. Chem., 28 : 1371-81 (2017) ; Wakankar et al., mAbs, 3 : 161-172 (2011) を参照のこと)。

30

【0257】

特定の実施形態では、ADCの平均DARは、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 法によって決定される。

【0258】

コンジュゲーション後に、ADCは、当該技術分野で既知の精製方法によって精製され、コンジュゲートしていない反応物質及び／またはあらゆるコンジュゲート凝集体から分離され得る。こうした方法としては、これらに限定されないが、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)、イオン交換クロマトグラフィー、クロマト分画、限外濾過、遠心限外濾過、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

40

【0259】

テスト

HER2発現癌細胞におけるADCの抗癌活性は、標準的技法を用いて、in vitro及び／またはin vivoで試験を行ってもよい。

【0260】

例えば、ADCの細胞毒性活性は、HER2発現癌細胞を細胞培養培地中でADCに曝露し、細胞を適切な期間 (例えば、約6時間~約7日間) 培養し、その後、細胞生存率を

50

測定することにより、測定することができる。非HER2発現細胞は、対照として含めることができる。

【0261】

ADCを試験するために使用され得る、HER2を様々なレベルで発現する様々な癌細胞株は、当技術分野で公知であり、その多くは市販されている（例えば、American Type Culture Collection, Manassas, VA; Addexbio Technologies, San Diego, CA; DSMZ, Braunschweig, Germanyから）。例えば、BT-474（3+）、SK-BR-3（3+）、HCC1954（3+）、JIMT-1（2+）及びZR-75-1（1+）細胞株が挙げられる。これら及び他の例を表8にまとめる。

【0262】

（表8）目的の細胞株におけるHER2の相対的発現レベル

細胞株	説明	IHC スコア付け	HER2 受容体／細胞
NCI-N87	ヒト胃癌	3+	評価なし
A549	ヒト肺癌（非小細胞肺癌）	0/1+	評価なし
BxPC-3	ヒト膵腺癌	1+	評価なし
MIA PaCa-2	ヒト膵管腺癌	2+	評価なし
FaDu	ヒト咽頭扁平上皮癌	2+	評価なし
HCT-116	ヒト結腸直腸上皮癌	1+	評価なし
MDA-MB-231	ヒトトリプルネガティブ乳房上皮腺癌	0/1+	1.7x10E4 – 2.3x10E4
MCF-7	ヒトエストロゲン受容体陽性乳房上皮腺癌	1+	4x10E4 – 7x10E4
JIMT-1	トラスツズマブ耐性乳房上皮癌、増幅HER2癌遺伝子	2+	2x10E5 - 8x10E5
ZR-75-1	エストロゲン受容体陽性乳管癌	2+	3x10E5
SKOV-3	ヒト卵巣上皮腺癌、HER2遺伝子増幅	2/3+	5x10E5 - 1x10E6
SK-BR-3	ヒト乳房上皮腺癌	3+	> 1x10E6
BT-474	ヒト乳管上皮管癌	3+	> 1x10E6
MDA-MB-468	転移部位由来のヒト乳癌：胸水	0	検出不能(≤ 1000)

【0263】

in vivoでの腫瘍成長を阻害するADCの能力は、当技術分野で公知の標準的技法を使用して適切な動物モデルで決定することができる（例えばEnna, et al., Current Protocols in Pharmacology, J. Wiley & Sons, Inc., New York, NYを参照のこと）。一般に、抗腫瘍化合物をスクリーニングするための現在の動物モデルは異種移植モデルであり、このモデルでは、ヒト腫瘍が動物、典型的にはげっ歯類に移植されている。

【0264】

例えば、ADCは、腫瘍断片を皮下移植されたマウス、または適切な数の癌細胞が移植されたマウスを使用して、HER2発現腫瘍について、0日目に、*in vivo*で試験が行われてもよい。腫瘍は、所望のサイズまで成長させることができ、腫瘍の発達が不十分である動物は除去される。ADC治療は一般に、腫瘍の種類に応じて、移植後3～22日に開始する。ADCは、例えば、静脈内（*iv*）注射によって動物に投与され得る。腫瘍は、所定の期間の後、または継続的に（例えば、週に2回または3回）本研究の所定のエンドポイントまで、例えば、腫瘍が所定のサイズまたは重量に到達したときに測定される。異種移植モデルでは、様々なレベルで、HER2を発現する腫瘍を使用できる。患者由来の異種移植片（PDX）は、特に有用である。

【0265】

*in vivo*でのADCの毒性作用は、最初はげっ歯類、例えばマウスまたはラットで、治療中の動物の体重へのそれらの作用を測定することによって評価できる。動物から採取した血液サンプルについて、血液学的プロファイル及び肝酵素分析を行うこともできる。

【0266】

*in vivo*毒性及び薬物動態は、標準プロトコルに従って、適切な動物モデル、例えば、ラットまたは非ヒト霊長類でさらに分析することができる。ヒト及びカニクイザルのHER2は、98%の配列相同性を共有するため、カニクイザルは、この点において特に有用である。

【0267】

本明細書に記載のADCは、同じ毒素用量で投与された場合、 $DAR \geq 3.9$ を有する対応するADCと比較して、改善された忍容性及びより低い毒性を有する。特定の実施形態では、ADCは、同じ毒素用量で投与された場合、 $DAR \geq 3.9$ を有する対応するADCの2倍を超える忍容性の改善を示す。いくつかの実施形態では、ADCは、同じ毒素用量で投与された場合、 $DAR \geq 3.9$ を有する対応するADCの忍容性の2.2倍超、例えば2.3倍、2.4倍または2.5倍の忍容性の改善を示す。忍容性の改善は、例えば、本開示のADC及び $DAR \geq 3.9$ を有する対応するADCの最大耐量（MTD）、無有害作用量（NOAEL）または毒性が発現しない最高投与量（HNSTD）の比較により決定され得る。MTD、NOAEL及び／またはHNSTDは、適切な動物モデル、例えば、げっ歯類または非ヒト霊長類における標準的技法によって測定され得る。

【0268】

医薬組成物

治療的使用のために、ADCは、ADC及び薬学的に許容可能な担体または希釈剤を含む組成物の形態で提供され得る。組成物は、周知の容易に入手できる成分を使用して、既知の手順によって調製することができる。

【0269】

医薬組成物は、例えば、経口（例えば、頬側または舌下など）、局所、非経口、直腸または膣経路によるか、または吸入またはスプレーによる対象への投与のために配合され得る。本明細書で使用される場合、「非経口」という用語としては、皮下注射、及び皮内、関節内、静脈内、筋肉内、血管内、胸骨内、髄腔内の注射または注入が挙げられる。医薬組成物は、典型的には、例えば、シロップ、エリキシル、錠剤、トローチ、ロゼンジ、ハードまたはソフトカプセル、ピル、坐剤、油性または水性懸濁液、分散性粉末または顆粒、エマルジョン、注射剤または溶液として、対象への投与に好適である形式で配合される。医薬組成物は、単位投与配合物として提供されてもよい。

【0270】

特定の実施形態では、ADCを含む医薬組成物は、例えば凍結乾燥配合物または水溶液として、単位投与量の注射可能な形態で、非経口投与用に配合される。

【0271】

薬学的に許容される担体は、一般に、用いられる投薬量及び濃度において、レシピエントにとって非毒性である。こうした担体の例としては、これらに限定されないが、緩衝液

10

20

30

40

50

、例えば、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸及びメチオニン；保存剤、例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルアルコール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチルまたはプロピルパラベンなど）、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール及びm-クレゾール；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミンまたはゼラチン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン；単糖類、二糖類、及び他の炭水化物、例えばグルコース、マンノース、またはデキストリン；キレート剤、例えば、EDTA；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩を形成する対イオン、例えば、ナトリウム；金属複合体、例えば、亜鉛タンパク質複合体；ならびに非イオン性界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）が挙げられる。

10

【0272】

特定の実施形態では、ADCを含む組成物は、無菌の注射可能な水性または油性の溶液または懸濁液の形態であってもよい。こうした懸濁液は、当技術分野で公知である好適な分散剤または湿潤剤及び／または懸濁剤を使用して配合してもよい。無菌の注射可能な溶液または懸濁液は、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または担体中にADCを含んでもよい。使用できる許容可能な希釈剤及び担体としては、例えば、1,3-ブタンジオール、水、リンガー溶液または等張塩化ナトリウム溶液が挙げられる。さらに、無菌の固定油を担体として使用してもよい。本目的のために、合成モノまたはジグリセリドなど、様々な無刺激性固定油が利用されてもよい。加えて、オレイン酸などの脂肪酸が注入可能な調製物中で使用されることが分かっている。局所麻酔薬、防腐剤及び／または緩衝剤などのアジュバントもまた、注射可能な溶液または懸濁液として挙げることができる。

20

【0273】

特定の実施形態では、ADCを含む組成物は、ヒトへの静脈内投与のために配合され得る。典型的には、静脈内投与用の化合物は、滅菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要な場合、組成物は可溶化剤及び／または注射部位での痛みを和らげるためのリグノカインなどの局所麻酔剤を含んでもよい。概して、成分は、単位剤形で、例えば、活性剤の量を示すアンプルもしくはサシェなどの気密封止容器内に凍結乾燥粉末または水不含濃縮物として、別々に供給されるか、または一緒に混合されて供給される。本組成物は、注入によって投与される場合、例えば、薬学的グレードの無菌の水または食塩水を含む注入ボトルで分注され得る。本組成物を注射によって投与する場合、投与の前に成分を混合することができるように、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルを提供することができる。

30

【0274】

他の医薬組成物及び医薬組成物を調製する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」（公式には「Remingtons Pharmaceutical Sciences」）；Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000)に記載されている。

40

【0275】

使用方法

本明細書に記載のADCは、HER2発現腫瘍細胞の成長を阻害する方法で使用されてもよい。細胞は、in vitroまたはin vivoであり得る。特定の実施形態では、ADCは、対象のHER2発現癌または腫瘍を治療する方法において使用されてもよい。

【0276】

HER2発現癌の治療は、症状の緩和、腫瘍径の縮小、腫瘍の成長の阻害、疾患の1つ以上の直接的もしくは間接的な病理学的結果の減少、転移の防止、疾患進行速度の低下、病状の改善もしくは緩和、生存率の改善、無増悪生存期間の延長、寛解、及び／または予後の改善のうちの1つ以上をもたらす得る。

50

【0277】

特定の実施形態では、本明細書に記載のADCによるHER2発現癌の治療により、疾患の進行を遅らせる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のADCによるHER2発現癌の治療により、腫瘍退縮がもたらされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のADCによるHER2発現癌の治療により、腫瘍成長の阻害がもたらされる。

【0278】

HER2発現癌は、典型的には、固形腫瘍である。HER2発現固形腫瘍の例としては、これらに限定されないが、乳癌、卵巣癌、肺癌、胃癌、食道癌、結腸直腸癌、尿路上皮癌、膵癌、唾液腺癌及び脳癌が挙げられる。HER2発現乳癌としては、エストロゲン受容体ネガティブ（ER-）、及び／またはプロゲステロン受容体ネガティブ（PR-）乳癌及びトリプルネガティブ（ER-、PR-、低HER2）乳癌が挙げられる。HER2発現肺癌としては、非小細胞肺癌（NSCLC）及び小細胞肺癌が挙げられる。

【0279】

特定の実施形態では、本明細書に記載のADCは、HER2発現乳癌、卵巣癌、肺癌または胃癌の治療に使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のADCは、HER2発現乳癌の治療に使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のADCは、エストロゲン受容体及びプロゲステロン受容体も陰性であるHER2発現乳癌の治療に使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のADCは、HER2発現トリプルネガティブ乳癌（TNBC）の治療に使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のADCは、脳に転移したHER2発現乳癌の治療に使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のADCは、HER2発現卵巣癌の治療に使用され得る。

【0280】

当該技術分野で公知であるように、HER2発現癌は、それらが発現するHER2のレベルによって（すなわち、「HER2状態」によって）特徴付けられ得る。HER2状態は、免疫組織化学（IHC）、蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）、発色in situハイブリダイゼーション（CISH）などによって評価できる。

【0281】

IHCでは、細胞膜上でのHER2タンパク質の発現を同定する。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織片は、IHCアッセイに供され、以下のようなHER2タンパク質染色強度基準に一致し得る：

スコア0：染色は観察されないか、または腫瘍細胞の10%未満（典型的には、<20,000受容体／細胞）において膜染色が観察される。

スコア1+：わずかな／ほとんど認識不可能な膜染色が、腫瘍細胞の10%超で検出される。細胞は、それらの膜の一部分が染色されるのみである。典型的には、約100,000受容体／細胞。

スコア2+：弱～中度の完全膜染色が、腫瘍細胞の10%超（典型的には、約500,000受容体／細胞）で観察される。

スコア3+：中～強度の完全膜染色が、腫瘍細胞の10%超（典型的には、約2,000,000受容体／細胞）で観察される。

【0282】

0または1+のHER2発現スコアを有する腫瘍は、HER2陰性の特徴であるが、2+または3+のスコアを有するこれらの腫瘍は、HER2陽性の特徴である。

【0283】

IHCを使用したHER2検出に利用できるFDA承認の市販キットの例としては、HerceptTest（商標）（Dako Denmark A/S）；PATHWAY（Ventana Medical Systems, Inc.）；InSite（商標）HER2／NEUキット（Biogenex Laboratories, Inc.）及びBond Oracle HER2 IHCシステム（Leica Biosystems）が挙げられる。

【0284】

本明細書に記載のADCは、HER2を様々なレベルで発現するがんの治療に有用であり得る。特定の実施形態では、ADCは、高レベルのHER2（IHC3+）を発現する癌の治療に使用することができる。いくつかの実施形態では、ADCは、高レベルのHER2（3+IHC）または中程度レベルのHER2（2+IHCまたは2+／3+IHC）を発現するがんの治療に使用することができる。いくつかの実施形態では、ADCは、高レベルのHER2（3+IHC）、中程度レベルのHER2（2+IHCまたは2+／3+IHC）、または低レベルのHER2（1+IHCまたは1+／2+IHC）を発現する癌の治療に使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のADCは、IHCによりHER2陰性とスコア付けされた癌の治療に使用することができる。

10

【0285】

特定の実施形態では、ADCで治療される癌のHER2レベルは、IHCによって決定される。いくつかの実施形態では、ADCで治療される癌のHER2レベルは、Herceptest（商標）アッセイを使用して実施されるIHCによって決定される。

【0286】

HER2発現癌は、本質的に均一であり得る（すなわち、腫瘍細胞の大部分がほぼ同じ量のHER2を発現する）か、または本質的に不均一であり得る（すなわち、異なるレベルのHER2を発現する異なる腫瘍細胞集団を含む）。ADCは、HER2レベルに関して同種または異種のいずれかであるHER2発現癌を治療するために使用され得ることが企図される。

20

【0287】

特定の実施形態では、ADCは、他の標準治療法に耐性があるかまたは耐性を有するようになるHER2発現癌を有する対象を治療するための方法に用途を見出す。いくつかの実施形態では、ADCは、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））、ペルツズマブ（ペルジェタ（登録商標））、T-DM1（カドサイラ（登録商標））もしくはトラスツズマブエムタンシン）またはタキサン（パクリタキセル、ドセタキセル、カバジタキセルなど）などの1つ以上の現在の治療法に応答しないHER2発現癌を有する対象を治療する方法に用途を見出す。いくつかの実施形態では、ADCは、トラスツズマブに耐性であるHER2発現癌を有する対象を治療するための方法に用途を見出す。いくつかの実施形態では、ADCは、ペルツズマブに耐性であるHER2発現癌を有する対象を治療するための方法に用途を見出す。いくつかの実施形態では、ADCは、T-DM1に耐性であるHER2発現癌を有する対象を治療するための方法に用途を見出す。いくつかの実施形態では、患者が以前の抗HER2療法で進行した場合、ADCは転移性癌の治療に用途を見出す。

30

【0288】

ADCが、耐性があるか、または難治性であるHER2発現癌を有する対象の治療に使用される場合、及び／または別の治療剤による治療から再発した場合、ADCは、対象が受けた以前の治療の数に応じて、二次治療、または三次治療または四次治療の一部となり得る。

【0289】

特定の実施形態では、本明細書に記載のADCは、HER2発現癌を有する対象の治療において、追加の抗腫瘍剤と併せて使用されてもよい。追加の抗腫瘍剤は、上記のものなどの治療用抗体、または化学療法剤であってよい。HER2発現癌の治療に一般的に使用される化学療法剤としては、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、アルブミン結合パクリタキセルアブラキサン（登録商標）、ドセタキセル、ゲムシタビン、ビンORELビン、イリノテカン、エトポシド、ビンBLASTチン、ペメトレキセド、5-フルオロウラシル（フォリン酸を含むかまたは含まない）、カペシタビン、カルボプラチン、エピルビシン、オキサリプラチン、フォルフィリノックス、シクロホスファミド、及び当技術分野で公知であるこれらの剤の様々な組み合わせが挙げられる。追加の剤（複数可）は、ADCと同時にまたは逐次的に対象に投与することができる。

40

50

【0290】

特定の実施形態では、本明細書に記載のADCを使用して、以前にいかなる抗癌治療も受けていないHER2発現癌を有する対象を治療できることが企図される（すなわち、ADCを一次治療として使用してもよい）。

【0291】

特定の実施形態では、上記の方法においてADCにより治療される対象は、ヒト、非ヒト霊長類または他の哺乳動物であり得る。いくつかの実施形態では、上記の方法においてADCにより治療されている対象は、ヒト対象である。

【0292】

対象に投与されるADCの量は、治療される状態、選択された投与経路、投与される実際の化合物、個々の対象の年齢、体重、及び応答、ならびに対象の症状の重症度など、関連する状況を考慮して変化するが、治療有効量である。

【0293】

本明細書で使用される「治療有効量」という用語は、列挙された方法の目的、例えば治療される疾患の症状の1つ以上の改善を達成するために投与する必要があるADCの量を指す。HER2発現癌の治療に有効であろう本明細書に記載のADCの量は、標準臨床技法によって決定することができる。さらに、*in vitro*アッセイを任意で、最適な投薬量範囲の同定を補助するために使用してもよい。有効用量は、*in vitro*または動物モデル試験系から誘導された用量反応曲線から外挿する。

【0294】

医薬キット

特定の実施形態は、本明細書に記載のADCを含む医薬キットを提供する。

【0295】

キットには、典型的には、容器、及び容器上のまたは容器と関連したラベル及び／または添付文書を含む。ラベルまたは添付文書には、治療薬の商業用パッケージに通例含まれる指示を指し、これには、かかる治療薬の適応症、使用、投薬量、投与、禁忌、及び／またはその使用に関する警告に関する情報が提供される。ラベルまたは添付文書には、医薬または生物学的産物の製造、使用、または販売を管轄する政府機関により規定された書式の説明書をさらに含み得、この説明書には、ヒトまたは動物の投与に関する製造、使用、または販売の政府機関による承認が織り込まれている。ラベルまたは添付文書には、ADCがHER2発現癌の治療に使用されるためのものであることも示している。容器には、ADCを含む組成物を保持し、いくつかの実施形態では、無菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通され得るストッパーを有するバイアルであり得る）。

【0296】

ADCを含む組成物を含む容器に加えて、キットは、キットの他の成分を含む1つ以上の追加の容器を含み得る。例えば、注射用静菌水（BWFI）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液またはデキストロース溶液などの薬学的に許容される緩衝液、他の緩衝液または希釈剤。

【0297】

好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、静注液バッグなどが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの多様な材料から形成され得る。必要に応じて、キットの1つ以上の構成要素を凍結乾燥させるか、粉末または顆粒などの乾燥形態で提供し得る。キットには、凍結乾燥または乾燥構成要素（複数可）を再構成するための好適な溶媒を追加で含めることができる。

【0298】

このキットには、フィルター、針、及びシリンジなど、商業的及びユーザの立場から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

【0299】

以下の実施例は、例証目的のために提供されており、本発明の範囲を限定することを意

10

20

30

40

50

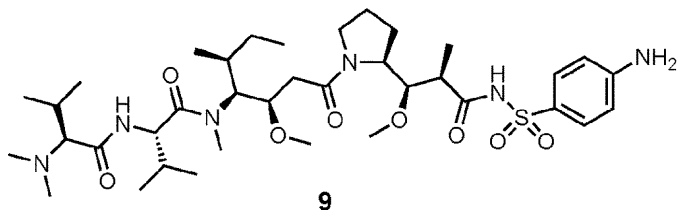
図するものではない。

【実施例】

【0300】

実施例1：リンカー毒素の合成

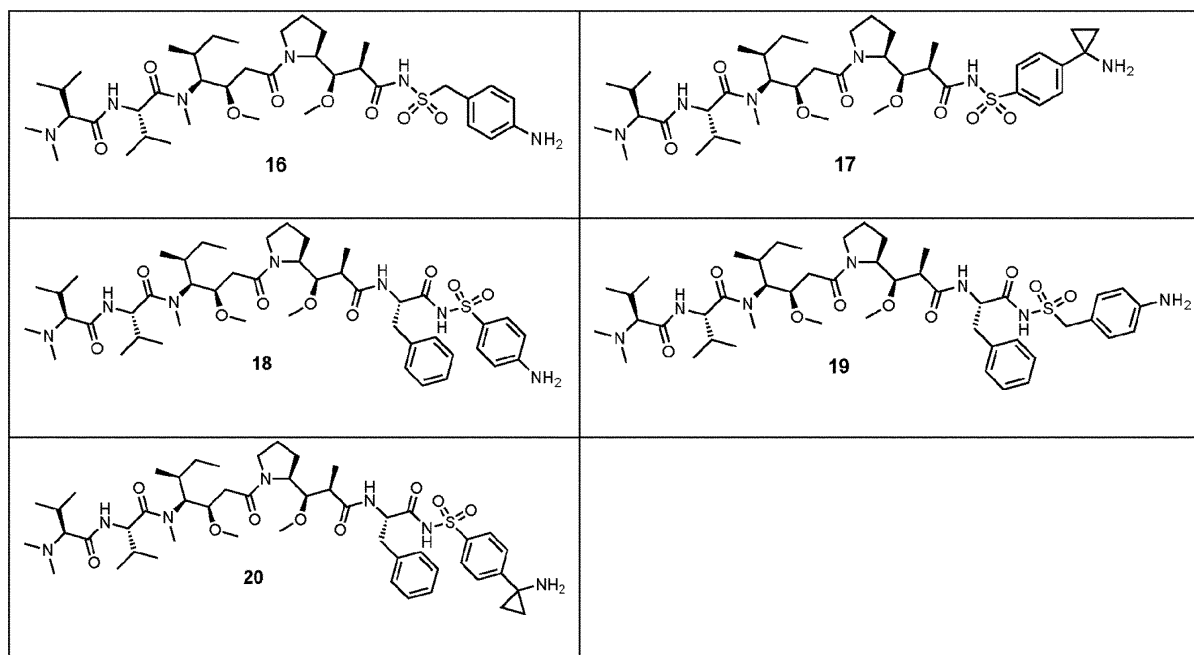
次の例では、次のオーリスタチン類似体（化合物9）を含む例示的なリンカー毒素（リンカー毒素001）の調製について記載する。



10

【0301】

同様のプロトコルを使用して、以下の例示的な化合物など他のオーリスタチン類似体を含むリンカー毒素を調製することができる（国際特許出願公開WO2016/041082も参照のこと）：

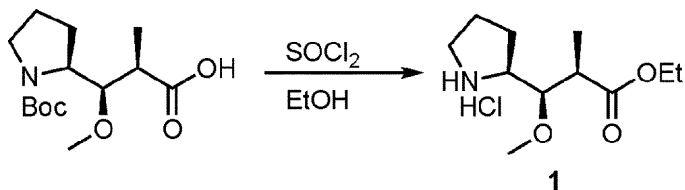


20

30

【0302】

1. 1 (2R, 3R) - 3 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - ((S) - ピロリジン - 2 - イル) プロパン酸塩（化合物1）



40

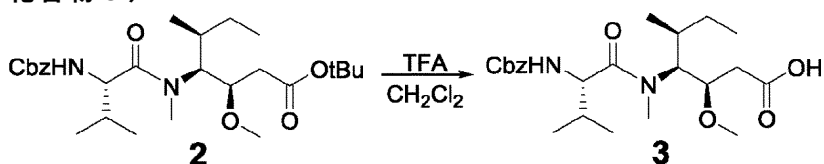
(2R, 3R) - 3 - ((S) - 1 - (tert - ブトキシカルボニル) ピロリジン - 2 - イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパン酸 (Boc - Dap - OH、4.31 g、15.0 mmol) を含む無水エタノール (27.0 mL) に塩化チオニル (3.0 mL) を 0℃ で滴下した。得られた溶液を室温まで加温し、進行を HPLC - MS でモニターした。18 時間後、残留している出発物質は検出されず、溶液を減圧下で濃縮乾固した

50

。得られた油をトルエン（10 mL）に懸濁し、2回減圧濃縮し、次にジエチルエーテル（5 mL）に懸濁し、2回減圧濃縮して、白色固体泡（3.78 g、定量%）を得た。MS m/z obs. = 216.5 (M+1)

【0303】

1.2 (3R, 4S, 5S) - 4 - ((S) - 2 - ((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - N, 3 - ジメチルブタンアミド) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタン酸 (化合物3)



10

化合物2は、国際特許出願公開WO2016/041082に記載されているように調製した。

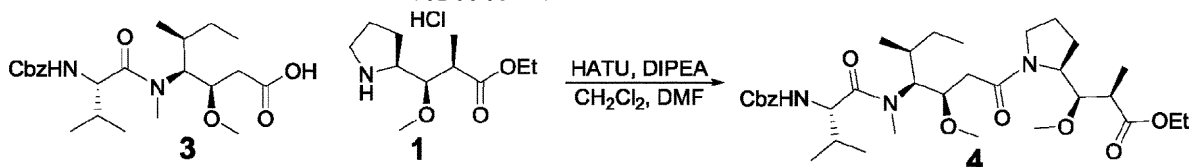
【0304】

化合物2（6.965 g、14.14 mmol）を含むジクロロメタン（20 mL）攪拌溶液に、トリフルオロ酢酸（5.0 mL）を加えた。反応の完了をHPLC-MSでモニターし、40時間後、出発物質は残留していなかった。反応物を減圧濃縮し、トルエン（2 x 10 mL）及びジクロロメタン（2 x 10 mL）で共蒸発させて、泡状の白色固体（6.2 g、残留TFAを含む定量収率）を得た。この材料を200 mLの高温の1:3のEtOAc:ヘキサンに溶解し、室温まで冷却した。冷却中に、いくつかの小さい結晶と同様に沈殿物が形成された。5 mLのEtOAcを加え、懸濁液を再度加熱して、沈殿を完全に溶解させた。室温まで冷却するとさらに結晶が形成され、フラスコを-30°Cに一晩置いた。翌朝、母液をデカントし、結晶を2 x 50 mLヘキサンですすぎ、高真空下で乾燥した。結晶性生成物5.67 gを回収した。MS m/z obs. = 405.7 (M+1)

20

【0305】

1.3 エチル(2R, 3R) - 3 - ((S) - 1 - ((3R, 4S, 5S) - 4 - ((S) - 2 - ((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - N, 3 - ジメチルブタンアミド) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパノエート (化合物4)



30

化合物3（6.711 g、15.37 mmol、1.025当量）を含むジクロロメタン（5.0 mL）及びN, N-ジメチルホルムアミド（5.0 mL）の混合物の攪拌溶液に、室温で、HATU（5.732 g、15.07 mmol、1.005当量）及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン（7.84 mL、3当量）を加えた。室温で30分攪拌後、化合物1（3.776 g、15.00 mmol、1.0当量）を含むジクロロメタン（1.0 mL）及びN, N-ジメチルホルムアミド（1.0 mL）の混合物の溶液を滴下し、追加の3 mLの1:1ジクロロメタン:N, N-ジメチルホルムアミドを含む残留化合物1ですすいだ。反応をHPLC-MSでモニターし、15分後に残留化合物1は観察されなかった。反応物を減圧濃縮し、酢酸エチルで希釈し（約125 mL）、有機相を1 M HCl（2 x 50 mL）、1 x d H₂O（1 x 50 mL）、飽和NaHCO₃（3 x 50 mL）、ブライン（25 mL）で抽出した。酸性及び塩基性の水性層を両方とも25 mLのEtOAcで洗浄した。次に、すべての有機物をプールし、MgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮して、赤い油を得た。残留物を最小量のジクロロメタン（約10 mL）に溶

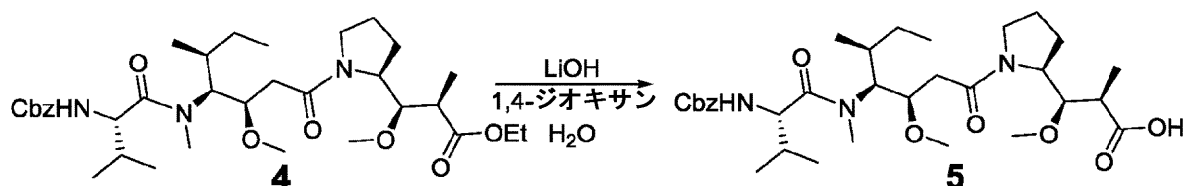
40

50

解し、精製するために（20～100% EtOAcを含むヘキサン、10カラム容量）、Biotage（登録商標）SNAP Ultra 360gシリカゲルカラム（Isolera（商標）Flash System; Biotage AB, Sweden）にロードした。純粋な生成物を含有する画分をプールして、7.9gの泡状の白色固体を回収した。純粋でない画分を、Biotage（登録商標）SNAP Ultra 100gシリカゲルカラムで第2の精製に供し、純粋な生成物と共にプールし、白色泡状固体（8.390g、88.3%）を回収した。MS m/z obs. = 634.7 (M+1)

【0306】

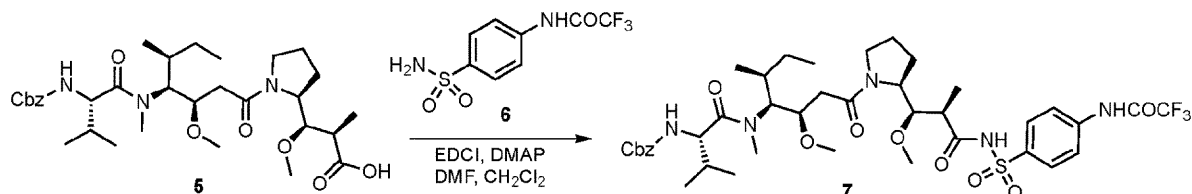
1.4 (2R, 3R) - 3 - ((S) - 1 - ((3R, 4S, 5S) - 4 - ((S) - 2 - ((ベンジルオキシ)カルボニル)アミノ) - N, 3 - ジメチルブタンアミド) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイル)ピロリジン - 2 - イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパン酸 (化合物5)



化合物4（8.390g、13.24mmol）を含む1,4-ジオキサン（158mL）の攪拌溶液に、 dH_2O （39.7mL）及び水酸化リチウム水和物（ H_2O 中1M、39.7mL、3当量）を加えた。反応物を4℃で攪拌し、出発物質の消費についてHPLC-MSでモニターした。これは、微量の化合物4のみが残存するまで3日を要した。反応の過程で、望ましい材料に加えて、メタノールの損失に対応する新規生成物（β-脱離、<2%）が小さい割合で形成された。反応物に1M HCl水溶液（50mL）を加えて酸性化し、減圧濃縮してジオキサンを除去した。残りの反応混合物を酢酸エチル（4×50mL）で抽出し、有機相をプールし、ブライン（15mL+2mLの2M HCl）で洗浄し、 $MgSO_4$ で乾燥させ、濾過し、減圧濃縮して、淡色の油を得た。油をジエチルエーテル（約50mL）に再溶解し、減圧濃縮（3倍）して、残留ジオキサンの除去を促進し、硬い油として表題生成物（7.81g、収率97%、若干の残留ジオキサン及び化合物4）を得た。MS m/z obs. = 606.7 (M+1)

【0307】

1.5 ベンジル((S) - 1 - ((3R, 4S, 5S) - 3 - メトキシ - 1 - ((S) - 2 - ((1R, 2R) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソ - 3 - ((4 - (2, 2, 2 - トリフルオロアセトアミド)フェニル)スルホンアミド)プロピル)ピロリジン - 1 - イル) - 5 - メチル - 1 - オキソヘプタン - 4 - イル) (メチル)アミノ) - 3 - メチル - 1 - オキソブタン - 2 - イル)カルバメート (化合物7)



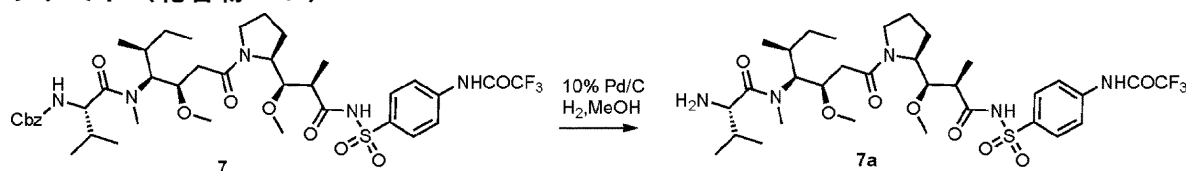
化合物6は、国際特許出願公開WO2016/041082に記載されているように調製した。

【0308】

化合物5（7.12g、11.754mmol）を含むジクロロメタン（20mL）攪拌溶液に、2,2,2-トリフルオロ-N-(4-スルファモイルフェニル)アセトアミド（化合物6、4.095g、1.3当量、3mL DMFに溶解）、N,N-ジメチルピリジン（1.867g、1.3当量）及びN,N-ジメチルホルムアミド（1.5mL）を加え、淡黄色の懸濁液を生成した。5mLのDMFをさらに加えたが、溶液は浄化さ

れなかった。N-（3-ジメチルアミノプロピル）-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩（EDCI）（2.817 g、1.25当量）を一部加え、その反応をHPLC-MSによりモニターした。48時間後、反応はそれ以上進行しなくなり、さらに400 mgのEDCIを添加した。18時間後、残留出発物質は観察されず、反応物を減圧濃縮して、黄色の油を得た。油を酢酸エチル（約150 mL）及び1 M HCl（20 mL）に溶解し、その有機相を冷2 M HCl（2 x 10 mL）、飽和NaHCO₃（1 x 10 mL）、ブライン（20 mL + 5 mL 2 M HCl）で洗浄した。酸性及び塩基性の水性画分をEtOAc（1 x 20 mL）で抽出し、すべての有機画分をプールし、MgSO₄で乾燥させ、減圧濃縮して油状の粗固体（13 g）を得た。残留物をジクロロメタン（約10 mL）に溶解し、Biotage（登録商標）SNAP Ultra 360 gシリカゲルカラムにロードし、50% EtOAcで3カラム容量のプラトーを用いて、12カラム容量でのヘキサングラジエント中の10~100% EtOAc（2% AcOH）で精製した。純粋な生成物を含む画分をプールし、減圧濃縮し、トルエン（2 x 10 mL）及びジエチルエーテル（2 x 10 mL）から溶解し、濃縮して、所望の生成物である泡状の白色固体7.1 gを得た。不純な画分は、Isolera（商標）機器のBiotage（登録商標）SNAP Ultra 100 gシリカゲルカラムを用いて浅いグラジエント条件下で繰り返し精製に供した。すべての純粋な画分をプールして、純粋な生成物を泡状の白色固体（8.60 g、86%）として回収した。MS m/z obs. = 856.7 (M+1) [0309]

1.6 (S)-2-アミノ-N-((3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-((S)-2-((1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-((4-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)フェニル)スルホンアミド)プロピル)ピロリジン-1-イル)-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル)-N,3-ジメチルブタンアミド (化合物7a)



化合物7（3.71 g、4.33 mmol）を、マグネチックスターラーを備え、三方ガスラインアダプターを取り付けた丸底フラスコ内で10% N,N-ジメチルホルムアミドを含む酢酸エチル（30 mL）に溶解した。容器を2回減圧排気し、窒素ガスを充填した。10%パラジウムカーボン（0.461 g、0.1当量）を一部添加し、三方アダプターをフラスコに取り付け、アダプターに水素バルーンを取り付け、容器を2回減圧排気し、水素を充填した。反応物を2日間攪拌し、その間、水素バルーンに時々再充填した。約48時間後、HPLC-MS分析により、出発物質が残留していないことが示された。反応物をメタノール（20 mL）で希釈して、セライトのプラグを介して濾過した。セライトをメタノール（2 x 50 mL）で洗浄した。すべての濾液をプールし、減圧濃縮し、得られた油を溶解し、ジクロロメタンから濃縮した。減圧乾燥後、表題化合物が無色の粉末（3.10 g、99%）として単離された。MS m/z obs. = 722.6 (M+1)

[0310]

1.7 (S)-2-((S)-2-(ジメチルアミノ)-3-メチルブタンアミド)-N-((3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-((S)-2-((1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-((4-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)フェニル)スルホンアミド)プロピル)ピロリジン-1-イル)-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル)-N,3-ジメチルブタンアミド (化合物8)

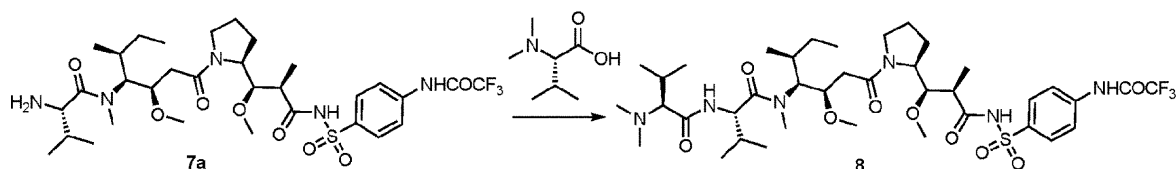
10

20

30

40

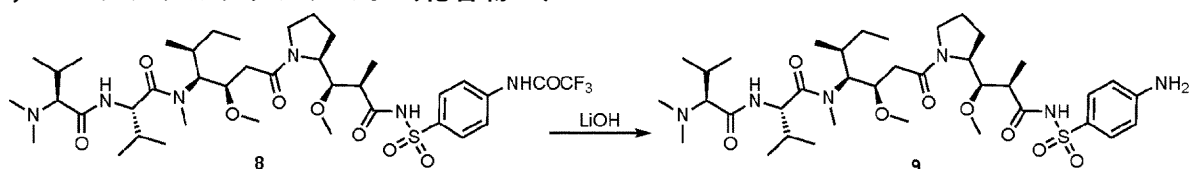
50



N, N- (L) -ジメチルバリン (1.696 g、9.35 mmol) を含むN, N-ジメチルホルムアミド (10 mL) の攪拌溶液に、HATU (3.216 g、8.46 mmol) 及びジイソプロピルエチルアミン (3.10 mL、17.8 mmol) を添加した。5分後に透明な黄色の溶液を得た。さらに10分間攪拌を継続し、次いで化合物7a (3.213 g、4.45 mmol) を一部添加した。さらに1時間攪拌後、HPLC-MSにより、微量の化合物7aが残留していることが示され、反応は16時間であった。次に反応物を減圧濃縮し、酢酸エチル (120 mL) 及び40 mL 1:1 NaHCO₃ (飽和): 5% LiClで希釈し、分液漏斗に移した。水層を除去し、有機相をLiCl (1 x 20 mL)、NaHCO₃ (飽和、2 x 20 mL) で洗浄した。水層をプールし、EtOAc (3 x 50 mL) で抽出した。有機層をプールし、ブライン (1 x 20 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮して、DMF含有油を得、これをロータリーエバポレーターで濃縮して残留DMFを除去し、ストロー色の粗油7 gを得た。油を最小量の10%メタノールを含むジクロロメタン (約11 mL) に溶解し、Biotage (登録商標) SNAP Ultra 360 gシリカゲルカラムにロードして、精製した (15カラム容量で2~20% MeOHを含むCH₂Cl₂溶液、約10~13%の溶出物)。所望の生成物を含有する画分をプールし、減圧濃縮して、表題化合物を無色の泡として得た。不純な画分を合わせ、蒸発させ、Isolera (商標) 機器でのBiotage (登録商標) SNAP Ultra 100 gシリカゲルカラム上で繰り返し精製に供し、最初のカラムからの純粋な生成物と組み合わせて、無色の泡状固体 (3.78 g) を得た。MS m/z obs. = 850.6 (M+1)

【0311】

1.8 (S) -N- ((3R, 4S, 5R) -1- ((S) -2- ((1R, 2R) -3- ((4-アミノフェニル) スルホンアミド) -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) -3-メトキシ-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル) -2- ((S) -2- (ジメチルアミノ) -3-メチルブタンアミド) -N, 3-ジメチルブタンアミド (化合物9)



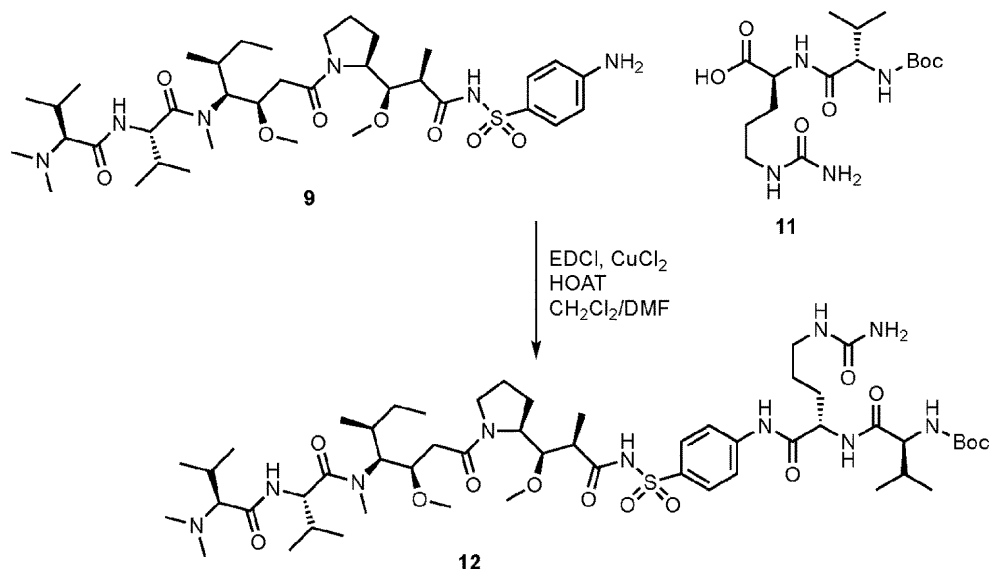
化合物8 (0.980 g、1.154 mmol) を含む1, 4-ジオキサン (15 mL) の攪拌溶液に、水 (3.5 mL) 及び1 M水酸化リチウム-水和物 (3当量、3.46 mL) を添加した。得られた淡色の懸濁液を4℃で攪拌し、出発物質の消費についてHPLC-MSによりモニターした。変換が完了したら (約5日)、反応物を3.46 mLの1 M HClで中和し、減圧濃縮してジオキサンを除去した。得られた水相を60 mLのEtOAc及び5 mLのブラインで希釈し、次いで酢酸エチル (2 x 30 mL) で抽出した。有機画分をプールし、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、蒸発させて、黄褐色の固体 (0.930 g) として表題化合物を得た。R_f = 0.5 (8% MeOHを含むCH₂Cl₂)。MS m/z obs. = 753.7 (M+1)

【0312】

1.9 2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェニル3- (2- (2- (2- (2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) エトキシ) エトキシ) エトキシ

NCCCCOCCOCCOCC(=O)O (14)
 $\xrightarrow[\text{DMF}]{\text{無水マレイン酸, TFP-OH, TFAA, syn-コリジン}}$
O=C1C(=O)N(CCCOCCOCCOCC(=O)Oc2cc(F)c(F)c(F)c2F)C1=O (15)

1. 10 Tert-ブチル ((S)-1-((S)-1-((4-(N-((2R, 3R)-3-((S)-1-((3R, 4S, 5S)-4-((S)-2-((S)-2-((ジメチルアミノ)-3-メチルブタンアミド)-N, 3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル)スルファモイル)フェニル)アミノ)-1-オキソ-5-ウレイドペンタン-2-イル)アミノ)-3-メチル-1-オキソブタン-2-イル)カルバメート(化合物12)



化合物 11 は、国際特許出願公開 WO 2016 / 041082 に記載されているように調製した。

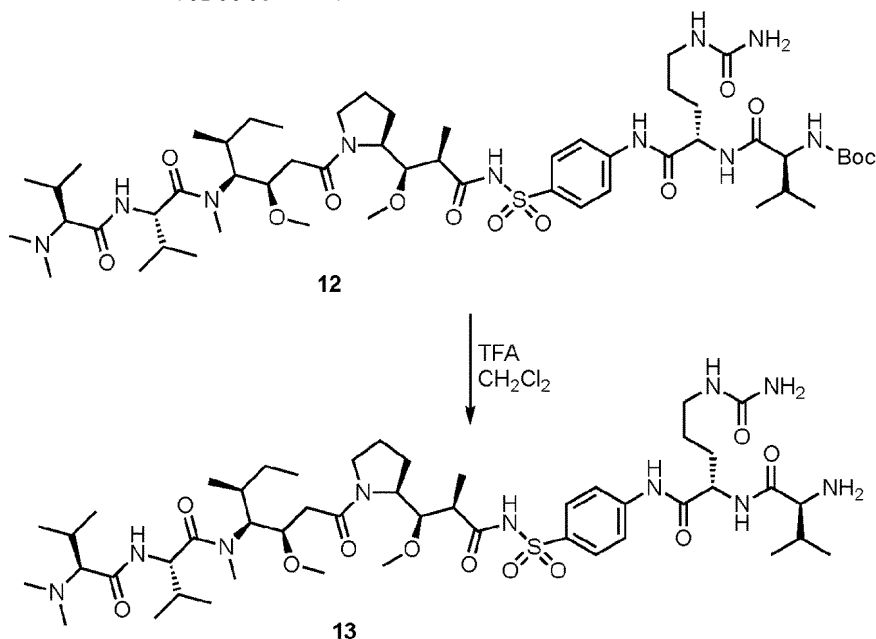
【0314】

空の 25 mL ナシ型フラスコに、化合物 11 (1.342 g、3.58 mmol、3.0 当量)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (0.664 g、3.46 mmol、2.9 当量) 及び 7-ヒドロキシアザベンゾトリアゾール (HOAT) (0.472 g、3.46 mmol、2.9 当量) を添加した。これらの固体を、N,N-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) とジクロロメタン (4.5 mL) との混合物に、室温で 30 分間撹拌しながら溶解させた。別に、化合物 9 (0.900 g、1.20 mmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (0.2 mL) とジクロロメタン (1.8 mL) との混合物に溶解し、ナシ型フラスコに添加し、ジクロロメタン (1.0 mL) ですすいだ。撹拌速度を 1000 rpm に上げて、渦を生成した。化合物 9 を添加して 2 分以内に、塩化銅 (II) (0.514 g、3.83 mmol、3.2 当量) を、狭い粉末漏斗を介して直接渦の中心に一部を添加した。最初は淡黄色の溶液が暗褐色の懸濁液になって、10 分以上かけて濃い緑色の懸濁液に変化した。反応の完了を HPLC-MS によりモニターし、30 分及び 1 時間で採取したサンプル間で反応の進行にかなる変化も観察されなかった (約 95% 完了)。反応物を室温で一晩撹拌し、次に 2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール (0.483 mL、4.781 mmol、4 当量)、EtOAc (10 mL) 及び dH₂O (5 mL) を撹拌懸濁液に添加、変色して濃い青色となった。懸濁した固体が徐々に溶解して、二相性混合物となるので、懸濁液を 4 時間激しく撹拌した。この混合物を分液漏斗に移し、EtOAc (100 mL) 及びブライン (10 mL) で希釈し、水層を 10% IPH / EtOAc (4 x 50 mL) で抽出した。有機層をプールし、ブライン (10 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、蒸発させて、かすかに青色の粗固体を得た。この粗固体をメタノール (0.5 mL) とジクロロメタン (6 mL) との混合物に溶解し、Biotage (登録商標) SNAP Ultra 100 g シリカゲルカラム (10 カラム容量で 2~20% MeOH を含む CH₂Cl₂、その後、20% MeOH での 8 カラム容量のプラトー) で精製した。生成物は、約 20% MeOH を含む CH₂Cl₂ で、1~2 カラム容量の後、幅広いピークとして溶出された。所望の材料を含有する画分をプールし、減圧濃縮して、表題化合物を白色固体として得た (1.105 g、83%)。MS m/z obs. = 555.9 ((M+2)/2), 1109.8 (M+1)。

【0315】

1.11 (S)-2-((S)-2-アミノ-3-メチルブタンアミド)-N-(4-(N-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5R)-4-((S)-

2 - ((S) - 2 - (ジメチルアミノ) - 3 - メチルブタンアミド) - N , 3 - ジメチルブタンアミド) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイル) ピロリジン - 2 - イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパノイル) スルファモイル) フェニル) - 5 - ウレイドペンタンアミド (化合物 1 3)



化合物 1 2 (0 . 9 2 6 g 、 0 . 8 3 4 m m o l) の溶液に、ジクロロメタン (1 0 m L) とトリフルオロ酢酸 (2 . 0 m L) との混合物を加えた。出発物質の消費について、反応物を H P L C - M S でモニターした (約 4 5 分) 。反応物を減圧下でアセトニトリル (2 x 1 0 m L) 及びジクロロメタン (2 x 1 0 m L) と共蒸発させて、過剰のトリフルオロ酢酸を除去した。得られた残留物を最少量のジクロロメタン及びメタノール (3 : 1 、 v / v 、 約 2 m L) に溶解し、ジエチルエーテル (2 0 0 m L) 及びヘキサン (1 0 0 m L) の攪拌溶液にピペットで滴下し、淡白色の固体の懸濁液を得た。固体を濾過し、真空乾燥させて、トリフルオロ酢酸塩として白色粉末の形態で表題化合物を得た (1 . 0 4 g 、 いくつかの残留溶媒を用いた定量的収率) 。 M S m / z o b s . = 5 0 5 . 8 ((M + 2) / 2)

【 0 3 1 6 】

1 . 1 2 (S) - N - (4 - (N - ((2 R , 3 R) - 3 - ((S) - 1 - ((3 R , 4 S , 5 R) - 4 - ((S) - 2 - ((S) - 2 - (ジメチルアミノ) - 3 - メチルブタンアミド) - N , 3 - ジメチルブタンアミド) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイル) ピロリジン - 2 - イル) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパノイル) スルファモイル) フェニル) - 2 - ((S) - 1 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) - 1 4 - イソプロピル - 1 2 - オキソ - 3 , 6 , 9 - トリオキサ - 1 3 - アザペンタデカンアミド) - 5 - ウレイドペンタンアミド (リンカー - 毒素 0 0 1)

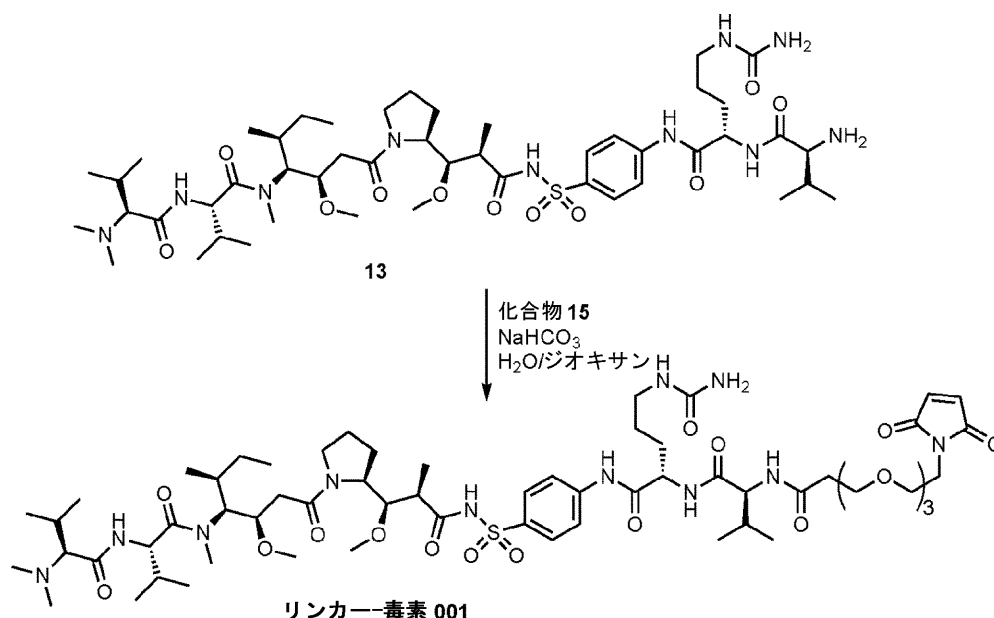
10

20

30

40

50



化合物 13 (0.722 g、0.584 mmol) を含む N, N-ジメチルホルムアミド (4 mL) の攪拌溶液に、化合物 15 (0.314 g、1.2 当量) 及びジイソプロピルエチルアミン (0.305 mL、3.0 当量) を加えた。2 時間での HPLC-MS 分析は、出発物質が残留していないことを示した。反応物を TFA (300 μ L) で酸性化し、次に d i H₂O + 0.1% TFA (9 mL) で希釈した。得られた溶液を 120 g の B i o t a g e (登録商標) S N A P U l t r a C18 カラム (B i o t a g e, U p s a l a, S w e d e n) にロードし、ACN/H₂O + 0.1% TFA グラジエント：10 カラム容量で 20~60% ACN、5 カラム容量で 60~100% ACN で精製した。生成物は、40% ACN 付近で溶出した。LCMS により同定された純粋な画分をプールし、凍結乾燥した。凍結乾燥機から白色粉末固体を回収した。より高い濃度でバイアルに入れて凍結乾燥を繰り返し (約 50 mg/mL、2:1 H₂O/ACN)、より密度が高く、凝集性の低い凍結乾燥固体 (754.2 mg、91%) を生成した。MS m/z o b s. = 647.4 ((M+2)/2), 1292.8 (M+1)

【0317】

実施例 2：リンカー-毒素のバイパトリック抗体へのコンジュゲート

バイパトリック抗 HER2 mAb、v10000、及びリンカー-毒素 001 の抗体-薬物コンジュゲート (ADC) は、抗体の鎖間ジスルフィド結合を部分的に還元し、その後、リンカー-毒素のマレイミド成分との反応より遊離システイン残基をキャッピングすることによって生成した。抗体を還元するために使用される TCEP の量を変化させることにより、平均薬物抗体比が 0~6 である ADC を得ることができる。ADC を精製して汚染小分子を除去し、DAR、純度、単量体含有量、エンドトキシンレベル、及び抗原陽性腫瘍細胞への結合を実証するために特徴を明らかにした。

【0318】

v10000 の調製は、国際特許出願公開 WO2015/077891 に記載されている。この抗体の詳細を以下の表 9 に示す。配列は配列一覧表に提供する。

【0319】

(表 9)

バリエーション		鎖 A	鎖 B
10000	エピトープを含むドメイン	ECD2	ECD4
	フォーマット	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブー VL領域においてY96A*、 VH領域において T30A/A49G/L69Fを有する	トラスツズマブ
	CH3 配列置換 [§]	T350V/L351Y/F405A/Y407V	T350V/T366L/K392L/T394W

10

* KabatによるFabまたは可変ドメインのナンバリング (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, p. 647, 1991)

[§] KabatなどEUインデックスによるCH3ナンバリング (Edelman et al., 1969, PNAS USA, 63: 78-85)。

20

【0320】

2.1 鎖間ジスルフィド結合の部分的還元による抗HER2抗体のコンジュゲート (v17597; DAR3.9)

抗体v10000 (2.0g)を含む10mM酢酸ナトリウム溶液 (138.9mL)、9% (w/v) スクロース、pH4.5は、新たに調製した200mM Na₂HPO₄、pH8.9 (1

5.4mL)、5mM DTPA溶液 (PBS中39.5mL、pH7.4)、及び10mM TCEP溶液 (3.68mL、2.3当量)混合物を添加することによって還元した。37℃で90分後、反応物を氷冷し、20mM DMSOストック溶液からの過剰のリンカー毒素001 (6.41mL; 8当量)を添加した。コンジュゲーション反応は、90分後に過剰の20mM N-アセチルシステイン溶液 (4.81mL; 6当量)を添加することによりクエンチさせた。

30

【0321】

2.2 鎖間ジスルフィド結合の部分的還元による抗HER2抗体のコンジュゲーション (v21252; DAR2.1)

抗体v10000 (2.0g)を含む10mM酢酸ナトリウムの溶液 (138.9mL)、9% (w/v) スクロース、pH4.5は、200mM Na₂HPO₄、pH8.9 (15.4mL)を添加してpH調整した。DTPA溶液 (PBS中44mL、pH7.4、最終濃度1.0mM)を添加後、10mM TCEP水溶液 (1.68mL、1.05当量)を添加することにより、鎖間ジスルフィドの還元を開始した。37℃で90分後、反応物を氷冷し、20mM DMSOストック溶液から過剰のリンカー毒素001 (4.81mL; 6当量)を添加した。コンジュゲーション反応は、90分後に過剰の20mM N-アセチルシステイン溶液 (4.81mL; 6当量)を添加することによりクエンチさせた。

40

【0322】

2.3 抗体-薬物コンジュゲートv17597及びv21252の精製

クエンチさせた抗体-薬物コンジュゲート (ADC) 溶液は、9~15ダイアボリウム (登録商標) XL限外ろ過モジュール (Ultracel (登録商標) 30kD

50

a 0.005m²; Millipore Sigma) を使用して、Millipore Lab scale (商標) タンジェンシャルフローろ過器で精製した。溶出されたADCを滅菌濾過した(0.22μm)。小規模で生成されたADCは、PBSまたは10mM酢酸ナトリウム、9% (w/v) スクロース、pH4.5により前処理した40kDa MWCO Zeba (商標) カラム (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) で精製した。

【0323】

精製後、ADCの濃度は、v10000から作成した標準曲線を参照して、BCAアッセイによって決定した。あるいは、濃度は280nmにおける吸収を測定することによって推定した($\epsilon = 195065 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。

10

【0324】

ADCのサンプルは、非還元及び還元SDS-PAGEによって評価した(図1を参照)。外来のバンドは観察されなかった。

【0325】

2.4 疎水性相互作用クロマトグラフィー

抗体及びADCを疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)で分析して、薬物抗体比(DAR)を推定した。クロマトグラフィーは、グラジエント80%MPA/20%MPBから35%MPA/65%MPBを使用したProteomix (登録商標) HIC Ethyl カラム(7.8x50mm、5μm) (Sepax Technologies Inc., Newark, DE) で、流量1mL/分で13.5分かけて行った(MPA=1.5M (NH₄)₂SO₄、25mM Na_xPO₄、及びMPB=75%25mM Na_xPO₄、25%イソプロパノール)。

20

【0326】

ADCの平均薬物抗体比(DAR)は、抗体の還元中に遊離するジスルフィド結合の数によって変化し得る。特定の平均DARを有するADCを生成する単一のコンジュゲーション反応物には、種の混合物を含む。v17597及びv21252では、4種の混合物：非コンジュゲート抗体、DAR2を有するADC、DAR4を有するADC、及びDAR6を有するADCが生成された。

【0327】

HICの結果を図2に示す。これは、v17597の平均DARが3.92(図2A)であり、v21252の平均DARが2.07(図2B)であることを示している。

30

【0328】

精製されたADCの平均DARに対するDAR0、DAR2、DAR4、及びDAR6の種の個々の寄与は、HPLC-HICクロマトグラムを統合して評価した。HICクロマトグラムの各ピークを分取クロマトグラフィーで分離し、ピークの同一性をLC-MSにより検証した。各バリエーションの個々のDARの種の含有率%(HICによって決定)を表10及び図2Dに示す。表10及び図2Dからわかるように、v17597はv21252よりもはるかに多くのDAR6の種を含み、v21252は、v17597よりもはるかに多くのDAR0の種を含む。

【0329】

図2Eは、0.5~6の範囲の平均DAR値を有する一連のADC調製物におけるv10000-リンカー-毒素001内のDAR0、2、4、及び6の種の相対量の変化を示している。

40

【0330】

(表10) v17597及びv21252のDAR分布

50

DAR	面積%	
	v17597	v21252
0	2	23
2	35	56
4	26	17
6	36	4

10

【0331】

2.5 サイズ排除クロマトグラフィー

抗体及びADCの凝集の程度（約15 µg、5 µLの注射量）は、移動相（150 mM リン酸、pH 6.8、及び流量400 µL/分）を用いてACQUITY UPLC（登録商標）Protein BEH SECカラム（200 オングストローム、1.7 µm、4.6 x 150 mm）（Waters Corporation, Milford, MA）のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により評価した。検出は280 nmでの吸光度によるものであった。

【0332】

これらの結果を図3に示し、表11に要約する。mAb v10000は、SEC分析によるとほとんどが単量体である。リンカー毒素001へのコンジュゲート時に、凝集の有意な増加は観察されなかった。v21252とv17597とを比較すると、凝集の程度は、DARが2から4に増加することによる影響はない。

20

【0333】

（表11）SEC結果の概要

バリエーション	ピーク#	保持時間 (min)	幅 (min)	面積 (mAU*s)	面積 %
v10000	1	2.557	0.1243	86.8	1.16
	2	2.938	0.1101	7387.6	98.40
	3	3.516	0.1452	3.8	0.44
v17597	1	2.532	0.1343	31.0	0.68
	2	2.914	0.1370	4491.3	98.69
	3	3.477	0.1370	28.6	0.63
v21252	1	2.549	0.1376	76.4	0.98
	2	2.936	0.1212	7685.8	98.47
	3	3.477	0.1456	43.4	0.56

30

40

【0334】

2.6 LC-MS-MSによる遊離毒素及びリンカー毒素の定量

ADC配合物中の遊離毒素（化合物9）、リンカー毒素001、及びクエンチされた薬物リンカーN-アセチルシステイン-リンカー毒素001の残留濃度は、各分析物の標準曲線を参照して、液体クロマトグラフィー（LC）分離及び質量検出によって評価した。分離は、Polymer X（商標）RP-1カラム（3 µm、100 オングストローム、50 x 4 mm）（Phenomenex Inc., Torrance, CA）で流量0.4 mL/分、7.8分にわたってカラム温度30℃、グラジエント75%MPA/25%MPB~60%MPA/40%MPB（MPA=0.1%ギ酸水溶液、及びMPB

50

= 0.1%ギ酸を含むアセトニトリル)を用いて行った。ポジティブモードESI-MRM質量検出は、Agilent 6470トリプル四重極質量分析計(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)で行った。

【0335】

すべてのサンプルが、コンジュゲートペイロード全体に対して0.1mol%未満の分析物を含んだ。

【0336】

2.7 抗原陽性細胞のフローサイトメトリー結合アッセイ

ADCと抗原陽性腫瘍細胞株JIMT-1(乳癌、Addexbio Technologies, San Diego, CA)及びRT-112/84(膀胱癌、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)の結合は、フローサイトメトリーによって親抗体(v10000)結合と比較した。細胞は、供給業者の指示に従って培養した。簡単に言えば、細胞(50,000細胞/ウェル)を抗体またはADCの連続希釈液と氷上で90分間インキュベートした。このインキュベーション後、細胞を2回洗浄し、AlexaFluor(登録商標)647コンジュゲート抗hIgG(Jackson ImmunoResearch Inc., Westgrove, PA)二次試薬と共に氷上で60分間インキュベートした。次に細胞を2回洗浄し、フローサイトメトリー(LSRFortessa(商標)X-20フローサイトメーター、BD, San Jose, CA)で蛍光を分析した。

【0337】

これらの結果を図4に示す。v17597及びv21252の抗原陽性細胞への結合は毒素への結合による影響を受けず、両方のADCが親抗体v10000に対して同様の結合を示している。

【0338】

2.8 エンドトキシン試験

配合されたADCのエンドトキシンレベルは、Limulus Amebocyte Lysate(LAL)ゲル化エンドポイントアッセイ(Genscript Toxin Sensor(商標)Single Test Kit; GenScript, Piscataway, NJ)を閾値0.125EU/mLで使用して評価した。in vivo実験で使用されたすべてのADC(下記)は、体重1キログラムあたり5エンドトキシン単位未満で投与した。

【0339】

実施例3: バイパラトピックADCのin vitro活性

v17597及びv21252のin vitro効力は、抗原陽性腫瘍細胞BT-74(乳癌、ATCC, Manassas, VA(HTB-20))、SK-BR-3(乳癌、ATCC, Manassas, VA(HTB-30))、HCC-1954(乳癌、ATCC(CRL-2338))、JIMT-1(乳癌、Addexbio Technologies, San Diego, CA(C0006005))、ZR-75-1(乳癌、ATCC(CRL-1500))及び抗原陰性腫瘍細胞MDA-MB-468(乳癌、Addexbio Technologies(C0006003))の細胞増殖アッセイによって測定した。細胞は、供給業者の指示に従って培養した。簡潔に述べると、ADCを添加する前日に、細胞(50uL/細胞、1000細胞/ウェル)を処理した無菌の組織培養(TC)(384ウェルプレート)(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)に添加し、37°C/5%CO₂で一晩インキュベートして、細胞をプレート表面に接着させた。U底の滅菌96ウェルプレートで、ADCを完全成長培地において所望の最終最大濃度の4.3倍に希釈し、同じ培地で1:3に滴定し、10点用量反応滴定とした。ADCを含まない対照ウェル(成長培地のみ)を各マイクロタイター96ウェルプレートに含めた。10点用量反応滴定の15uLは、三連で、播種細胞を含む384ウェルの各ウェルに添加し、そのプレートを37°C/5%CO₂で5日間インキュベートした。5日間のインキュベーション後、CellTiter

ーGlo（登録商標）（Promega, Madison, WI）20 uL／ウェルを添加し、室温で30分間インキュベートして、細胞生存率を定量した。発光は、マイクロプレート照度計を使用して測定した。収集された相対光量単位（RLU）は、上記の成長培地のみの対照を使用して、細胞毒性%（細胞毒性% = $1 - [\text{ウェルRLU} / \text{平均媒体のみの対照RLU}]$ ）に変換した。データは、Prism（登録商標）ソフトウェア（GraphPad Software, La Jolla, CA）で利用可能な非線形回帰法を使用して曲線に当てはめた。

【0340】

これらの結果を図5に示し、表12にまとめる。これらの結果は、v17597及びv21252の両方が選択的な細胞殺害を実証していることを示している。HER2発現細胞株BT-474、SK-BR-3、HCC1954、JIMT-1、及びZR-75-1（図5A～E）は、v17597及びv21252の両方に対して感受性があった。v17597及びv21252はいずれも、HER2陰性乳癌細胞株に由来するMDA-MB-468細胞（図5F）に対しては無効であった。

【0341】

（表12）v17597及びv21252の*in vitro*活性

バリエーション	EC ₅₀ (nM)					
	BT-474	SK-BR-3	HCC1954	JIMT-1	ZR-75-1	MDA-MB-468
v17597	0.04	0.04	0.05	0.19	0.21	NA
v21252	0.03	0.04	0.06	0.36	0.47	NA

【0342】

実施例4：異なる平均DARでのv10000-リンカー-毒素001の*in vitro*増殖アッセイ

リンカー-毒素001にコンジュゲートしたv10000を含み、0.7～3.9の範囲の平均DARを有するADCは、還元反応で使用するTCEPの量（0.5～10モル当量）を変化させて調製した。コンジュゲーション反応は、実施例2に概説される手順に従って行い、得られたADCは、PBS pH 7.4で予め平衡化させた40 kDa Zeba（商標）カラムを使用して精製した。

【0343】

ADCの*in vitro*効力は、抗原陽性腫瘍細胞SK-OV-3（卵巣癌、ATCC, Manassas, VA (HTB-77)）、JIMT-1（乳癌、DSMZ, Braunschweig, Germany (ACC589)）及びZR-75-1（乳癌、ATCC (CRL-1500)）での細胞増殖アッセイによって測定した。細胞は、供給業者の指示に従って培養した。簡潔に述べると、ADCを添加する前日に、細胞（100 uL／細胞、2500細胞／ウェル）を処理した無菌の組織培養（TC）（96ウェル不透明な壁のプレート）（Corning 3904）に添加し、37℃／5% CO₂で一晩インキュベートして、細胞をプレート表面に接着させた。翌日、ADCを完全成長培地（U底の96ウェルプレート）において所望の最終最大濃度の5倍に希釈し、同じ培地で1：3に滴定し、8ステップとした（合計9つの化合物滴定ポイント）。成長培地のみの含む対照滴定点も含まれ、合計で10点の用量反応滴定を作成した。播種細胞を含む96ウェルプレートの各ウェルに、10点の用量反応滴定から25 uLを3重に添加し、プレートを37℃／5% CO₂で5日間インキュベートした。インキュベーション後、25 uL／ウェルCellTiter-Glo（登録商標）（Promega Corporation, Madison, WI）を添加し、30分間室温でインキュベートすることによって細胞生存率を定量した。次に、マイクロプレートルミノメーターを使用して発光を測定し、収集した相対光量単位（RLU）を実施例3に記載されている細胞毒性率%に変換した。

【0344】

これらの結果を図6に示す。平均DAR 3.9～1.6を有するADCは、3つの細胞

株で同等の効力を示したが、平均DAR0.7のADCは、効力の大幅な低下を示した。DAR0.7、DAR2.2、及びDAR3.9のADCを構成する個々のDARの種のおおよその量を表13及び図6Dに示す。DAR0.7のADCには、DAR1.9のADCの約3倍のDAR0の種が含まれていることが確認できる（約65%対約20%）。次に、DAR2.2 ADCには、DAR3.9の種よりもはるかに多くのDAR0の種が含まれている（約20%対3%未満）が、DAR2.2 ADCはDAR3.9 ADCに匹敵する*in vitro*効力を示した。これらの結果は、ADCの効力が影響を受ける前に、ADC調製物に含まれ得るDAR0の種の割合に閾値があり得ることを示唆している。

【0345】

（表13）ADCのおおよそのDAR分布

ADCの 平均DAR	DAR 分布 (%)			
	DAR 0	DAR 2	DAR 4	DAR 6
0.7	65	33	2	0
1.6	33	54	11	2
2.2	20	55	19	5
2.6	13	55	22	10
3.2	7	47	26	21
3.9	3	35	27	35

【0346】

実施例5：バイパラトピックADCのHER2発現細胞への内在化

v21252の内在化を決定するために、pHAb染料（Promega Corporation, Madison, WI）をv21252のアミン残基、トラスツズマブーリンカー毒素001及び陰性対照ADCに製造業者の推奨プロトコルに従って結合した。陰性対照ADCは、リンカー毒素001にコンジュゲートした抗RSVプロテインF抗体であった。

【0347】

pHAbコンジュゲート抗体は、受容体を介した抗体の内在化をモニターするために使用できる。細胞膜の抗原に結合したpHAb染料とコンジュゲートした抗体は、最小限の蛍光を呈するが、エンドソーム及びリソソーム系を介した受容体媒介内在化及び動員（*trafficking*）の後、抗体-pHAbコンジュゲートは、より酸性のpHにさらすことで、抗体-pHAbコンジュゲートが蛍光を発するようになった。

【0348】

pHAbコンジュゲートv21252、pHAbコンジュゲートトラスツズマブーリンカー毒素001及びpHAbコンジュゲート対照を、HER2発現細胞株SKBR3及びJIMT-1とインキュベートした。簡潔に述べると、SKBR3及びJIMT-1 HER2+腫瘍細胞を、アッセイ培地において、5,000細胞/ウェルで、384ウェルの黒色の光学底プレート（ThermoFisher Scientific, Waltham, MA）に播種した。プレートは、37℃+5%CO₂で一晩インキュベートした。翌日、pHAbコンジュゲート抗体を、アッセイ培地において最終10 µg/mL及び1 µg/mLでプレートに添加した。Vybrant（登録商標）DyeCycle（商標）バイオレット染色を含む培地（ThermoFisher Scientific, Waltham, MA）は、核を視覚化するために2 µM最終濃度で添加した。プレートは、時点間で37℃+5%CO₂でインキュベートした。サンプルウェルは、様々な時点でCellInsight（商標）CX5 High Content Screening（HCS）Platform（ThermoFisher Scientific, Waltham, MA）によりスキャンした。プレートは、2チャンネルを有するSpot Analysis Bioapplicationにおいて、20x対物レンズを使用

してスキャンした。チャンネル1 (385 nm、Vybrant Dye Cycle Violet) をフォーカスチャンネルとして使用し、チャンネル2 (560 nm、pHAb) を使用して内在化データを得た。内在化pHAbコンジュゲートの蛍光は、「平均総スポット強度 (Mean Total Spot Intensity)」パラメータを使用して測定した。

【0349】

これらの結果を図13及び図14に示す。v21252は、HER2発現細胞内のリソソームを内在化し、単一特異的トラスツズマブーリンカー毒素001よりも高いレベルまで動員することを示している。

【0350】

実施例6：バイパラトピックADCのin vivo活性

6.1 ADC v17597及びv21252は、HBCx-13b乳癌患者由来の異種移植片の成長を阻害する

雌の無胸腺マウス (Envigo, Huntingdon, UK) に20mm³の腫瘍断片を皮下移植した (n=7/群)。腫瘍径が75~200mm³に達すると、動物を治療群に割り当て、図7に示すように、v17597、v21252またはビヒクルに1日目及び15日目 (q14dx2) に合計2用量を静脈内注射した。腫瘍測定は、隔週でキャリパーを用いて行った。腫瘍径が1764mm³に達したときに、マウスを倫理的に殺した。腫瘍体積は、各群の平均±SEMとして報告している。

【0351】

図7Aは、ビヒクルまたはv17597の静脈内投与後にHBCx-13b腫瘍断片を皮下移植されたマウスにおける腫瘍応答の結果を提供する。図7Bは、ビヒクルまたはv21252の静脈内投与後にHBCx-13b腫瘍断片を皮下移植されたマウスにおける腫瘍応答の結果を提供する。これらの結果は、HBCx-13b生着マウスをv17597またはv21252のいずれかで治療すると、腫瘍体積が用量依存的様態で減少することを示している。

【0352】

6.2 ADC v17597及びv21252がST-910乳癌患者由来の異種移植片の成長を阻害する

雌の無胸腺ヌードマウス (Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA) に約70mg腫瘍断片 (n=6/群) を皮下移植した。腫瘍径が125~250mm³に達すると、動物を治療群に割り当て、図8に示すように、v17597、v21252またはビヒクルに、静脈内単回注入を行った。腫瘍測定は、隔週でデジタルキャリパーを用いて行った。腫瘍径が2000mm³に達したときに、マウスを倫理的に殺した。腫瘍体積は、各群の平均±SEMとして報告している。

【0353】

図8Aは、ビヒクルまたはv17597の静脈内投与後に、ST-910腫瘍断片を皮下移植されたマウスにおける腫瘍応答の結果を提供する。図8Bは、ビヒクルまたはv21252の静脈内投与後に、ST-910腫瘍断片を皮下移植されたマウスにおける腫瘍応答の結果を提供する。これらの結果は、ST-910生着マウスをv17597またはv21252のいずれかで治療すると、腫瘍体積が用量依存的様態で減少することを示している。

【0354】

ST-910は、HER2 1+乳癌を表す患者由来の異種移植片 (PDX) であり、HBCx-13b (実施例6.1で使用) は、HER2 3+乳癌を表すPDXである。実施例6.1及び6.2は、v17597及びv21252の両方がHER2 3+及びHER2 1+腫瘍の両方で活性であることを示している。

【0355】

6.3 薬物動態分析

患者由来の異種移植片、HBCx-13b及びST-910のでは、全抗体 (非コンジ

10

20

30

40

50

ュゲート抗体及びコンジュゲート抗体)の薬物動態サンプルを事前に指定された時点で収集し、全抗体定量のために、ELISAベースのアッセイを使用して評価した。v21252またはv17597のいずれかの全抗体の血清濃度は、ヤギ抗ヒトIgG Fc抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)を含むPBS pH7.4を含む最初のコーティング384ウェルELISAプレートにより、4℃で一晩インキュベートして分析した。翌日、アッセイ希釈剤を使用してプレートを洗浄し、かつブロックして、RTで1時間インキュベートした。ブロッキング後、標準曲線サンプル、対照、及び希釈血清サンプルをプレートに添加し、RTで1時間インキュベートした。次に、検出抗体であるHRP-ヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂コンジュゲート(Jackson ImmunoResearch)をプレートに添加し、RTで1時間インキュベートした後、HRP基質、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)をプレートに添加した。HClを使用してTMBをクエンチし、吸光度は、プレートリーダーを使用して、450nmで測定した。図15には、HBCx-13b(A)及びST-910(B)の全抗体血清濃度-時間プロファイルを示している。

【0356】

実施例7：カニクイザルにおけるv17597及びv21252の単回投与での薬物動態／忍容性の研究

本研究の目的は、単回静脈内(IV)注入投与後のカニクイザルにおけるv17597及びv21252の薬物動態(PK)及び忍容性の特徴を明らかにすることであった。カニクイザルは、配列相同性及び結合親和性に基づいて、v17597及びv21252の両方の非臨床安全性評価のために選択した。ヒト及びカニクイザルのHER2は、98%の配列相同性を共有しているが、イヌ及びマウス／ラットHER2の配列相同性は、それぞれ、93%及び88%である。さらに、v17597及びv21252は、カニクイザルHER2にヒトHER2と同様の親和性で結合する(サルK_D=0.55×10⁻⁹;ヒトK_D=0.83×10⁻⁹)、イヌ、マウス、またはラットHER2には結合しない。

【0357】

この研究では、3mg/kg、6mg/kg、または9mg/kgの用量でのv17597の単回用量では、忍容性が良好であり、9mg/kgまたは12mg/kgの用量でのv21252の単回用量では、忍容性が良好であった。

【0358】

材料及び方法

忍容性

v17597の単回投与(3mg/kg、6mg/kg、もしくは9mg/kg)またはv21252(9mg/kgもしくは12mg/kg)を雌カニクイザル(N=3)に60分かけてIV注入により投与した。一般的な忍容性は、臨床所見、体重、摂食量、及び臨床病理学(血液学及び臨床化学)で評価した。v17597またはv21252、全抗体、及び遊離毒素(化合物9)の生物学的分析のために、研究全体を通して血液を採取した。研究デザインは表14にまとめる。

【0359】

(表14) カニクイザルの単回投与による薬物動態及び一般忍容性試験のデザイン

10

20

30

40

50

群	v17597 用量 (mg/kg)	v21252 用量 (mg/kg)	雌の数
1	0	0	3
2	3	--	3
3	6	--	3
4	9	--	3
5	--	9	3
6	--	12	3

10

【0360】

生物学的分析法

v17597 及び v21252 : v17597 または v21252 (DAR が 1 以上) の血清濃度は、捕捉剤として抗毒素マウス IgG、及び検出剤として抗ペルツズマブスルホタグを用いて、Meso Scale Discovery platform (ECL / MSD) を備えた電気化学発光アッセイを使用して分析した (Meso Scale Diagnostics, LLC, Rockville, MD)。

20

【0361】

全抗体：全抗体生物学的分析アッセイでは、抗体成分 v17597 または v21252 が毒素にコンジュゲートしているかに関係なく (すべての DAR において)、抗体成分を測定した。全抗体の血清濃度は、捕捉剤として抗ペルツズマブ抗体、検出剤として抗トラスツズマブスルホタグを用いて、Meso Scale Discovery platform (ECL / MSD) を備えた電気化学発光アッセイを使用して分析した。

【0362】

毒素 (化合物 9) : 毒素の血清濃度は、LC-MS / MS 方法を用いて分析した。血清サンプルをアセトニトリル / メタノールで沈殿させて (50 : 50、v / v)、その上澄みを分析した。使用した液体クロマトグラフィーシステムは、水 / 酢酸 (100 / 0.05、v / v) 及びアセトニトリルで構成されているグラジエントフローの逆相カラムであった。毒素及び内部標準 (毒素-d4 ; 重水素化化合物 9) は、ポジティブイオンモードで動作するエレクトロスプレーイオン化 (ESI) ソースを備えたトリプル四重極質量分析計システムを使用して検出した。

30

【0363】

薬物動態分析

血清サンプルの生体分析結果の非コンパートメント分析を使用して、PK パラメータ (最大血清濃度 [C_{max}]、終末半減期 [T_{1/2}]、クリアランス [CL] 及び見かけの分布量 [V_{ss}]) を求めた。

【0364】

結果

40

薬物動態

v17597 : v17597 の曝露は、一般に 3 ~ 9 mg / kg の容量に比例した。C_{max} は、60 分の注入終了時に達成され (T_{max} 中央値)、用量比例様態で上昇した。全身曝露 (AUC_{0-∞}) は、用量比例様態でわずかに増加した。暫定平均終末半減期 (T_{1/2}) は、一般に用量の増加に伴って延長するように見え、クリアランス (CL) は、一般に用量の増加に伴って減少するように見え、見かけの分布容積 (V_{ss}) は、一般に用量と共に変化するように見えなかった。

【0365】

v21252 : v21252 への曝露は一般に 9 ~ 12 mg / kg の用量に比例した。C_{max} は、60 分の注入終了時に達成され (T_{max} 中央値)、用量比例様態で上昇した

50

。v 2 1 2 5 2 血清濃度－時間プロファイルを図 9 A に示す。全身曝露 ($AUC_{0-\infty}$) は、用量比例様態でわずかに増加した。暫定平均終末半減期 ($T_{1/2}$)、クリアランス (CL) 及び見かけの分布容積 (V_{ss}) は、一般に用量によって変化するとは考えられなかった。

【0366】

全抗体 (コンジュゲート及び非コンジュゲート) : 全抗体の最大血清濃度 (C_{max}) は、60 分の注入終了時に達成された (T_{max} 中央値)。v 2 1 2 5 2 の全抗体血清濃度－時間プロファイルを図 9 B に示す。非コンパートメントモデルを使用して、PK パラメータを導出した。 C_{max} は、用量比例様態で上昇したが、 $AUC_{0-\infty}$ は、v 1 7 5 9 7 及び v 2 1 2 5 2 の両方で用量比例様態でわずかに増加した。v 1 7 5 9 7 の平均終末半減期は用量の増加に伴って延長したが、血清クリアランス (CL) 及び全抗体の見かけの分布の総容積 (V_{ss}) は用量の増加に伴って減少した。v 2 1 2 5 2 の平均終末半減期及び全抗体の見かけの総分布容積 (V_{ss}) は、用量の増加に伴って増加したが、全抗体の血清クリアランス (CL)、用量の増加に伴って減少した。

【0367】

毒素 (化合物 9) : v 1 7 5 9 7 の単回投与後 (3 mg/kg、6 mg/kg、もしくは 9 mg/kg) または v 2 1 2 5 2 (9 mg/kg または 12 mg/kg)、すべての毒素血清濃度は、定量下限 (LLQ 、 $< 5.00 \text{ ng/mL}$) であった。

【0368】

忍容性

単回用量 (3 mg/kg、6 mg/kg、もしくは 9 mg/kg) の v 1 7 5 9 7 または 9 mg/kg もしくは 12 mg/kg の用量での v 2 1 2 5 2 の忍容性は、良好であった。研究の過程で死亡はなかった。臨床観察、摂食量、または体重において、治療関連の影響は認められなかった。

【0369】

一部の動物では、治療に関連すると見なされた臨床病理学パラメータの最小から軽度の変化が観察された。いずれの治療群においても、血液学のエンドポイントに被験物質関連の影響はなかった。すべての変動は、個々の値間のいかなる明らかな差異にもかかわらず、生物学的関連及び／または手順関連の変動の予測範囲内であると考えられた。

【0370】

実施例 8 : カニクイザルにおける v 1 7 5 9 7 の非 GLP 毒性試験

カニクイザルにおける v 1 7 5 9 7 の毒物動態及び毒性を調査するために、非 GLP 毒性研究を行った。本研究は、雌カニクイザルにおける単回投与による薬物動態／忍容性研究の結果に基づいてデザインした (実施例 6)。

【0371】

この研究では、雄及び雌のカニクイザルでは、用量 2.25 mg/kg 及び 4.5 mg/kg で毎週、ならびに用量 4.5 mg/kg 及び 9 mg/kg で隔週 v 1 7 5 9 7 を投与して、忍容性が良好でなかったことを実証した。6 週までの毎週または隔週の投与後の v 1 7 5 9 7 の無有害作用量 ($NOAEL$) 及び毒性が発現しない最高投与量 ($HNSTD$) は、毎週投与した場合には 2.25 mg/kg 未満、または隔週投与した場合には 4.5 mg/kg 未満と見なされた。

【0372】

材料及び方法

ビヒクルまたは v 1 7 5 9 7 は、1 時間の IV 点滴により 1 日目、8 日目、15 日目、22 日目、29 日目、及び 36 日目に毎週 0 mg/kg、2.25 mg/kg、及び 4.5 mg/kg の用量で投与し、隔週 1 回、1 日目、15 日目、及び 29 日目に、4.5 mg/kg 及び 9 mg/kg の用量で投与した。すべての動物において、臨床徴候、摂食量、体重、血圧、心電図、呼吸数 (視覚)、臨床病理学 (血液学、臨床化学、凝固、尿検査)、臓器重量及び組織の肉眼／顕微鏡検査の変化について評価した。トキシコキネティクス分析及び抗薬物抗体 (ADA) 分析のために血液を採取した。毎週投与された動物は 4

2 日目に 殺し、隔週投与された動物は 3 6 日目に 殺した。研究デザインを表 1 5 に示す。

【0 3 7 3】

(表 1 5) 研究デザイン

群	用量(mg/kg)	投薬レジメン	動物の数
1	0	毎週	3M/3F
2	2.25	毎週	3M/3F
3	4.5	毎週	3M/3F
4	4.5	隔週	3M/3F
5	9	隔週	3M/3F

10

【0 3 7 4】

結果

体重、臨床観察、及び臨床病理所見に基づいて、v 1 7 5 9 7 は、この試験において試験されたすべての用量で有害であると見なした。動物 9 m g / k g / 用量 (隔週) での動物及び 4 . 5 m g / k g / 用量での雌 1 匹 (隔週) を早期に 殺し、1 日目及び 1 5 日目にのみ投与を受けた。

20

【0 3 7 5】

この試験の結果に基づいて、6 週までの毎週または隔週の投与後の v 1 7 5 9 7 の無有害作用量 (NOAEL) 及び毒性が発現しない最高投与量 (HNSTD) は、毎週投与では 2 . 2 5 m g / k g 未満、隔週投与では、4 . 5 m g / k g 未満であると見なした。

【0 3 7 6】

実施例 9 : カニクイザルにおける v 2 1 2 5 2 の非 GLP 毒性試験

本研究の目的は、v 2 1 2 5 2 のトキシコキネティクス及び毒性の特徴をさらに明らかにすることであった。

【0 3 7 7】

本研究では、雄及び雌のカニクイザルにおいて、1 2 m g / k g までの用量で 1 日目、1 5 日目、及び 2 9 日目に v 2 1 2 5 2 を投与したところ、臨床的に十分に忍容性を示すことが示された。無有害作用量 (NOAEL) は 1 2 m g / k g であり、毒性が発現しない最高投与量 (HNSTD) は、1 2 m g / k g 超であった。

30

【0 3 7 8】

材料及び方法

この研究では、ビヒクルまたは v 2 1 2 5 2 を、隔週 1 回、1 日目、1 5 日目、2 9 日目に、0 m g / k g 、9 m g / k g 、及び 1 2 m g / k g の用量で、1 時間の IV 注入によって雌及び雄のカニクイザルに投与した (各用量レベルで各性別 3 匹)。すべての動物において、臨床徴候、摂食量、体重、血圧、心電図、呼吸数 (視覚)、臨床病理学 (血液学、臨床化学、凝固、尿検査)、臓器重量及び組織の肉眼 / 顕微鏡検査の変化について評価した。トキシコキネティクス (TK) 分析 (v 2 1 2 5 2 、全抗体、及び遊離毒素 (化合物 9)) ならびに抗薬物抗体 (ADA) 分析のために血液を採取し、3 6 日目に動物を 殺した。動物の別の群は、1 日目に v 2 1 2 5 2 1 2 m g / k g の単回用量の投与を受け、投与後 4 日目、8 日目、1 5 日目に 殺した (n = 2 / 時点) した。研究デザインを表 1 6 に示す。

40

【0 3 7 9】

(表 1 6) 非 GLP 毒性試験デザイン

50

群	v21252 用量 (mg/kg)	動物を屠殺した日 (雄/雌)			
		4	8	15	36
1	0	-	-	-	3/3
2	12	1/1	1/1	1/1	-
3	9	-	-	-	3/3
4	12	-	-	-	3/3

10

【0380】

結果

薬物動態

v21252：薬物動態は、v21252の反復投与後に算出した。 C_{max} は、60分間注入の終了時または注入終了60分後のいずれかで達成された(T_{max} 中央値)。v21252血清濃度-時間プロファイルを図10に示す。1日目に、 C_{max} 及び全身曝露(AUC_{0-168h})は、用量比例様態でわずかに増加した。29日目に、 C_{max} 及び AUC_{0-168h} は、ほぼ用量比例様態で増加した。全身曝露及び AUC_{0-168h} は、変化がないようであり、反復投与後も蓄積は示されなかった。平均消失半減期($T_{1/2}$)は、9mg/kg群から12mg/kg群までで延長した。v21252の可飽和クリアランスメカニズムは、低用量(9mg/kg)群と高用量群(12mg/kg)との間の $T_{1/2}$ 及びクリアランスの差を説明し得る。

20

【0381】

全抗体(コンジュゲート及び非コンジュゲート)：全抗体は、v21252の反復投与後にカニクイザルにおいて測定した。全抗体の C_{max} は、60分注入終了時に達成した(T_{max} 中央値)。全抗体血清濃度-時間プロファイルを図11に示す。1日目に、 C_{max} 及び全身曝露(AUC_{0-168h})は、用量比例様態でわずかに増加した。29日目に、 C_{max} 及び AUC_{0-168h} は、ほぼ用量比例様態で増加した。全身曝露 AUC_{0-168h} は変化せず、反復投与後の蓄積は認められなかった。v21252と同様に、全抗体の平均消失半減期($T_{1/2}$)は、9mg/kg群から12mg/kg群まで延長した。

30

【0382】

v21252及び全抗体の血清濃度時間プロファイルで示されるv21252の薬物動態では、*in vivo*でのv21252からのリンカー-毒素の損失が最小限であることが示されている(図12を参照のこと)。

【0383】

毒素(化合物9)：カニクイザルでのv21252の反復投与後に遊離毒素を測定した。すべてのペイロード(化合物9)の血清濃度は、1日目の雌1匹の12mg/kg、29日目の雌1匹の9mg/kg、29日目の雄1匹の12mg/kgを除いて、定量限界($<0.500ng/mL$)未満であった。

【0384】

抗薬物抗体(ADA)：抗v21252抗体は、カニクイザルにおいてv21252の反復投与後にスクリーニングされた。ADAは、9mg/kg投与コホートにおいて1匹の雌の血清で検出された。

40

【0385】

毒性

全体として、v21252の投与は、試験を行ったすべての用量で臨床的に十分に忍容性を示した。尿検査、ECGパラメータ、または呼吸数の治療関連の変化は観察されなかった。

【0386】

12mg/kg/用量でv21252の反復投与を受けた動物では、個々の体重に対す

50

る散発的な最小限の影響が認められた。これらの動物はすべて、35日目までに部分的にまたは完全に回復した。他のすべての動物は、研究全体を通じて体重が維持されたかまたは増加した。

【0387】

一部の動物では、臨床徴候、臨床病理学、臓器重量または組織の肉眼／顕微鏡検査の最小から軽度までの変化が観察された。v21252に関連して検討された肉眼観察は、対照を含むすべての動物の注入部位で観察された赤い変色に限定された。被験物質関連の臓器重量の変化は、脾臓に限定されていた。隔週3用量投与後36日目に殺した動物では、顕微鏡による治療関連の影響には、胃腸管、肝臓、脾臓、リンパ節、膀胱、皮膚、及び静注部位での変化を含む。すべてが、最小または軽度に分類された。12mg/kgの単回投与後、様々な時点で殺した動物では、最小から軽度の被験物質関連の同様の影響が観察された。

【0388】

PK分析により、v21252で治療された動物の全身曝露が確認され、v21252及び全抗体の用量比例様態で、用量の増加に伴って平均全身曝露が増加したが、遊離毒素（化合物9）への曝露は、少数の動物でのみ低レベルで見られた。

【0389】

表17～20には、PK／忍容性試験ならびにv17597及びv21252の非GLP反復投与試験の結果を比較したものを示す。

【0390】

（表17）カニクイザルにおけるv17597及びv21252の単回投与及び反復投与試験で観察された死亡率の比較

用量	v17597			v21252	
	PK/ 忍容性	反復投与		PK/ 忍容性	反復 投与
		毎週	隔週		
12 mg/kg	--	--	--	0/3	0/6
9 mg/kg	0/3	--	3/6	0/3	0/6
6 mg/kg	0/3	--	--	--	--
4.5 mg/kg	--	0/6	1/6	--	--
3 mg/kg	0/3	--	--	--	--
2.25 mg/kg	--	0/6	--	--	--

【0391】

（表18）カニクイザルでのv17597及びv21252の反復投与試験で決定されたNOAEL及びHNSTDの比較

	v17597		v21252
	毎週	隔週	
NOAEL	決定できなかった (<2.25 mg/kg)	決定できなかった (<4.5 mg/kg)	12 mg/kg
HNSTD	決定できなかった (<2.25 mg/kg)	決定できなかった (<4.5 mg/kg)	>12 mg/kg

【0392】

（表19）ADCの生物学的分析

10

20

30

40

50

薬物及び用量	AUC _{0-336hr} 初回投与 (hr*ug/mL)	AUC _{0-336hr} 初回投与の 差異倍率 [#]	AUC _{0-168hr} 最終投与 (hr*ug/mL)	AUC _{0-168hr} 最終投与の 差異倍率 [#]
v17597 4.5 mg/kg	9,920	1	7,180	1
v17597 9 mg/kg	24,600	2.2	N/A	N/A
v21252 9 mg/kg	18,800	1.9	18,700	2.60
v21252 12 mg/kg	34,900	3.5	17,700	2.47

10

v 1 7 5 9 7 @ 4 . 5 m g / k g との比較

【 0 3 9 3 】

(表 2 0) 全抗体の生物学的分析

薬物及び用量	AUC ₀₋₃₃₆ 初回投与 (hr*ug/mL)	AUC _{0-336hr} 初回投与の 差異倍率	AUC ₀₋₁₆₈ 最終投与 (hr*ug/mL)	AUC _{0-168hr} 最終投与の 差異倍率
v17597 4.5 mg/kg	8,090	1	7,530	1
v17597 9 mg/kg	18,700	2.3	N/A	N/A
v21252 9 mg/kg	17,400	2.2	13,900	1.8
v21252 12 mg/kg	37,400	4.6	20,600	2.7

20

v 1 7 5 9 7 @ 4 . 5 m g / k g との比較

【 0 3 9 4 】

結論

一般式 (I) のオーリスタチン類似体は、マウスに投与された場合、良好な *in vivo* 忍容性を有することが示されている。化合物 9 の平均 D A R 4 での単一特異性抗 H E R 2 抗体トラスツズマブへのコンジュゲーションにより、カニクイザルにおいて優れた忍容性を示し、毒性が発現しない最高投与量 (H N S T D) が 1 8 m g / k g である A D C が生成された。対照的に、平均 D A R 4 (v 1 7 5 9 7) で、抗 H E R 2 バイパラトピック抗体 v 1 0 0 0 0 にコンジュゲートした化合物 9 を含む A D C では、H N S T D が 4 . 5 m g / k g 未満であり、忍容性が大幅に低下したことを示した (実施例 8)。特定の理論に限定されるものではないが、v 1 7 5 9 7 について観察された忍容性の低下は、以下が一部原因であり得ることが提唱されている；単一特異性トラスツズマブと比較して、オンターゲット結合及びバイパラトピック抗体の内在化が増加し、これによりオンターゲット毒性が増加する、及び／または平均 D A R 2 (v 2 1 2 5 2) と比較して、平均 D A R 4 (v 1 7 5 9 7) における D A R 0 もしくは裸の種の割合が減少し、これにより、より高い D A R の種 (D A R 2、D A R 4、及び D A R 6) に関連する毒性が増加する、及び／または平均 D A R 2 と比較して、平均 D A R 4 における D A R 6 の種の割合が増加し、これにより最も高い D A R の種に関連する毒性が増加する。

40

【 0 3 9 5 】

しかし、驚くべきことに、平均 D A R 2 (v 2 1 2 5 2) において v 1 0 0 0 0 にコンジュゲートした化合物 9 を含む A D C は、はるかに改善された忍容性を示し、H N S T D が 1 2 m g / k g であった (実施例 9)。モノメチルオーリスタチン E (M M A E) また

50

はメイタンシノイドのいずれかを含むADCの毒性は、抗体に付着した薬物の総量と直接相関する、すなわち、ADCについて、DARと最大耐量との関係は線形であることがこれまでに示されているため、この結果は予想外であった(Hamblett, et al., Clin. Cancer Res., 10:7063-7070(2004); Sun, et al., Bioconj Chem., 28:1371-81(2017))。具体的には、抗体あたり8つの薬物分子を有するADCの最大耐量は50mg/kgであり、抗体あたり4つの薬物分子(すなわち、毒素の半分の量)を有するADCの最大耐量は100mg/kgであった(Hamblett, et al., 同書)。すなわち、同じ抗体用量で投与した場合、DAR8 ADCの毒素の半分の量を有するADCは、DAR8 ADCの2倍のMTDを示した。

10

【0396】

v21252は、DAR2を有するため、同じ抗体用量で投与した場合、毒素の量はv17597の半分になる。したがって、v17597でのこれまでの研究に基づいて、許容されるv21252の量は9mg/kg未満であると予想された(すなわち、v17597で許容される最大用量の2倍)。しかし、実施例9に示すように、9mg/kgまたは12mg/kgのいずれかの用量で2週間ごとにv21252を3回投与されたカニクイザルでは、忍容性を示し、12mg/kgは、無有害作用量(NOAE L)として指定した。

【0397】

重要なことに、隔週で投与した場合、v21252の方が曝露量が多いにもかかわらず、v21252は、v17597と比較して毒性が低く、忍容性が高い。カニクイザルの非GLP毒性学研究(実施例8)に基づいて、v17597は、隔週投与量4.5mg/kg及び9mg/kgの両方で有害な所見を有すると見なされた。しかし、同様の非GLP研究(実施例9)では、v21252は、9mg/kg及び12mg/kgの両方の隔週での投与において、4.5mg/kgのv17597と比較して曝露が約1.8~4.6倍増加しているにもかかわらず、有害な所見を有するとは見なされなかった(初回投与後AUC_{0-336hr}または最終投与AUC_{0-168hr}) (表19及び20にまとめる)。

20

【0398】

さらに、v21252について、カニクイザルにおいて忍容性があることが示されている曝露レベルでのin vivoでの有効性を実証した。具体的には、図15に要約されているように、カニクイザルで忍容される曝露において高HER2腫瘍及び低HER2腫瘍の両方の患者由来異種移植片モデルにおいて完全な応答が得られた(実施例6も参照)。

30

【0399】

実施例10：カニクイザルにおけるv21252のGLP毒性試験

その後のGLP毒性試験では、v21252をカニクイザルに2週間ごとに4用量(0mg/kg、6mg/kg、12mg/kg、及び18mg/kg)で投与し、回復期を6週とした。非重篤毒性量の最大値(HNSTD)は、18mg/kgに決定した。v21252は、すべての用量で忍容性が良好であった。このGLP研究では、臨床所見は有害とは見なされず、死亡は観察されなかった。一貫していた唯一の臨床所見は、下痢の増加であった。すべての用量において体重の変化は観察されず、臨床病理所見(肝機能-アスパラギン酸トランスアミナーゼ及びアラントランスアミナーゼ及び血液学-好中球、血小板、ヘモグロビン、及びリンパ球)では有害と見なされなかった。v21252の曝露(C_{max}及びAUC_{0-168hr})は、v10000(抗体のみ)の曝露と実質的に同一であった。本研究の詳細を以下に示す。

40

【0400】

このGLP研究の目的は、カニクイザルに4回静脈内投与されたv21252の毒物動態及び毒性の特徴をさらに明らかにすることであった。

【0401】

GLP毒性試験では、雄、雌のカニクイザルに1日目、15日目、29日目、及び43

50

日目にv 2 1 2 5 2が0mg/kg、6mg/kg、12mg/kg、及び18mg/kgの用量で投与され、回復期間を6週とした。無有害作用量（NOAEL）は12mg/kgであり、毒性が発現しない最高投与量（HNSTD）は18mg/kgであった。

【0402】

材料及び方法

本研究では、ビヒクルまたはv 2 1 2 5 2は、隔週1回、1日目、15日目、29日目、及び43日目に用量0mg/kg、6mg/kg、12mg/kg、及び18mg/kgで1時間のIV注入によって雄及び雌のカニクイザルに投与された（各用量レベルで性別ごとに動物4匹、及び回復評価用に0mg/kg、12mg/kg、及び18mg/kgで性別ごとにさらに動物2匹）。すべての動物において、臨床徴候、摂食量、体重、血圧、心電図、呼吸数（視覚）、臨床病理学（血液学、臨床化学、凝固、尿検査）、臓器重量及び組織の肉眼／顕微鏡検査の変化について評価した。トキシコキネティクス（TK）分析（v 2 1 2 5 2、全抗体、及び遊離毒素（化合物9））及び抗薬物抗体（ADA）分析のために血液を採取し、50日目、及び6週間の回復後92日目に動物を殺した。研究デザインを表21に示す。

【0403】

（表21）GLP毒性研究デザイン

群	v21252 用量 (mg/kg)	動物屠殺日（雄／雌）	
		D50	D92
1	0	4/4	2/2
2	6	4/4	--
3	12	4/4	2/2
4	18	4/4	2/2

【0404】

結果

薬物動態

v 2 1 2 5 2：v 2 1 2 5 2血清濃度のピーク中央値は、1日目及び43日目の注入開始（SOI）後1時間までに観察された。v 2 1 2 5 2の隔週投与後、v 2 1 2 5 2のC_{max}及びAUCの平均値は、用量の増加と共に上昇した。C_{max}の上昇は、1日目の用量にほぼ比例した。1日目では、v 2 1 2 5 2用量が1：2：3倍増量することにより、C_{max}値がほぼ1：2.3：3.3倍上昇し、平均AUC_{0-168hr}値がほぼ1：2.6：3.8倍上昇し、AUC_{0-336hr}値がほぼ1：2.9：4.5倍上昇した。43日目では、C_{max}及びAUC_{0-168hr}が、ほぼ用量比例様態であった。43日目では、v 2 1 2 5 2用量が1：2：3倍増量することにより、C_{max}値がほぼ1：2.5：3.5倍上昇し、AUC_{0-168hr}値がほぼ1：3.2：4.7倍上昇した。v 2 1 2 5 2への全身曝露は、隔週、6mg/kgのIV注入を繰り返しても変化しないようであったが、曝露は一般に、隔週、12mg/kg及び18mg/kgのIV注入を繰り返した後に増加するように見えた。平均AUC_{0-168hr}累積比は、6mg/kg、12mg/kg、及び18mg/kgでそれぞれ1.20、1.47、及び1.50であった。個々のAUC_{0-168hr}の累積比は、6mg/kgで1.01～1.64、12mg/kgで1.17～1.95、及び18mg/kgで0.983～2.08の範囲であった。

【0405】

全抗体（コンジュゲート及び非コンジュゲート）：全抗体のピークの中央値は、1日目及び43日目にv 2 1 2 5 2のSOIの1時間後に観察された。v 2 1 2 5 2の隔週投与後、全抗体のC_{max}及びAUC_{0-168hr}の平均値は、用量の増加と共に上昇した。

1日目では、v 2 1 2 5 2の用量が1 : 2 : 3倍増量することにより、C_{max}値がほぼ1 : 2 . 1 : 3 . 3倍上昇し、AUC_{0-168hr}値がほぼ1 : 2 . 4 : 3 . 8倍上昇し、平均AUC_{0-336hr}値がほぼ1 : 2 . 8 : 4 . 5倍上昇した。43日目では、v 2 1 2 5 2の用量が1 : 2 : 3倍増量することにより、C_{max}値がほぼ1 : 2 . 6 : 3 . 9倍上昇し、AUC_{0-168hr}値がほぼ1 : 3 . 1 : 4 . 8倍上昇した。全抗体への全身曝露は、隔週、6mg/kgのv 2 1 2 5 2のIV注入を繰り返しても変化しないようであったが、曝露は一般に、隔週、12mg/kg及び18mg/kgのv 2 1 2 5 2のIV注入を繰り返した後に増加するように見えた。平均AUC_{0-168hr}累積比は、6mg/kg、12mg/kg、及び18mg/kgでそれぞれ1 . 20、1 . 47、及び1 . 50であった。

【0406】

毒素（化合物9）：v 2 1 2 5 2の反復投与後に遊離毒素を測定した。ほとんどの毒素（化合物9）の血清濃度は、定量限界（<0 . 500ng/mL）未満であった。以下の例外点に留意のこと：雌一匹、12mg/kg、43日目には、定量可能な単一の毒素（化合物9）濃度（投与後72時間で0 . 513ng/mL）を有していた；雄一匹、18mg/kg、29日目には、定量可能な単一の毒素（化合物9）濃度（SOI 1時間後で0 . 532ng/mL）を有していた；雄二匹及び雌二匹、18mg/kg、43日目には、それぞれ定量可能な単一の毒素（化合物9）濃度（それぞれ、SOI 24時間後で0 . 555ng/mL、0 . 505ng/mL、0 . 556ng/mL、及び0 . 653ng/mL）を有していた；雄一匹、18mg/kg、43日目には、4つの連続した定量可能な毒素（化合物9）濃度を有し、AUC_{0-168hr}値は125hr*ng/mLであった。

【0407】

抗薬物抗体（ADA）：すべての投薬コホートから合計144のサンプルをADAについてスクリーニングした。確認／免疫不全アッセイにおいて、1匹の対照動物及び治療された動物からの事前テストサンプルを含む7つのサンプルで陽性が確認された。これらの後者の2つのサンプルは、既存の反応性抗体によるものであり、v 2 1 2 5 2の曝露とは関係ないと思われている。残りの5つの陽性サンプルについては、18mg/kgを投与された雌一匹が43日目に検出可能な力価を有し、残りの四匹の動物（12mg/kgで投与された雌二匹ならびに18mg/kgで投与された雄一匹及び雌一匹）は、92日目の回復点で検出可能な力価を有していた。実際の抗v 2 1 2 5 2抗体の結果は、ほとんどの動物において強い免疫原性反応を示唆するものではないが、循環v 2 1 2 5 2では、抗v 2 1 2 5 2抗体と結合している可能性があり、このアッセイフォーマット内での抗体の検出が制限される。しかし、投与1日目と比較して、投与43日目に血清濃度時間データへの変更は観察されなかったため、ADAがv 2 1 2 5 2のPKに有意に影響を与えることはないようである。

【0408】

毒性

v 2 1 2 5 2の反復投与（隔週4回）は、一般的に忍容性が良好であった。v 2 1 2 5 2関連の死亡はなく、眼科的評価及び心電図評価、視覚呼吸数、尿検査、またはトロポニンI評価ではいかなる影響も認められなかった。v 2 1 2 5 2の投与後の治療期間または回復期間中に、v 2 1 2 5 2関連の体重パラメータの変化も見られなかった。

【0409】

軟便／水便の発生率の増加は、v 2 1 2 5 2を6mg/kg以上で反復投与された動物において認められた。さらに、18mg/kgにおいて、雄及び雌の動物に散発的な食欲不振が認められ、18mg/kgにおいて、雌の動物に散発的な姿勢の乱れが認められた。回復期間後、食欲不振及び姿勢の乱れは消失し、軟便／水便の発生は減少するかまたは解消されており、これは、v 2 1 2 5 2関連の影響が逆転していることを示唆している。研究中、動物には、繰り返し観察された軟便／水便の原因である、水分／栄養（frozen Gatorade及びPeptoPro（登録商標）diet）サプリメントを提

供した。v 2 1 2 5 2 の反復投与を受けた雌は、4日目（6 mg / k g 及び 1 8 m g / k g）または8日目（1 2 m g / k g）から治療期間の終わりまで水分及び／または栄養サプリメントを受けた。同様に、v 2 1 2 5 2 の反復投与を受けた雄は、8日目（1 2 m g / k g）または7日目（1 8 m g / k g）から治療期間の終わりまで水分及び／または栄養サプリメントを受けた。回復中には、水分補給は行わなかった。

【0 4 1 0】

臨床病理学的所見では、限定された重症度及び所見の可逆性のため、有害であるとは見なされなかった。被験物質に関連した血液学の変化としては、単球数の増加、好中球の形態学的変化、網赤血球数の減少、及び赤血球分布幅の増大に伴う赤血球量（RBC、ヘモグロビン及びヘマトクリット）の減少が挙げられる。雄では1 8 m g / k g、雌では1 2 m g / k g 以上において、8日目～5 0 日目までに、ベースライン平均と比較して、平均フィブリノーゲン濃度の最小から軽度の増加があった。これらの変化は、被験物質関連であり、免疫または炎症刺激を示していた。これらの変化は9 2 日目に解消した。治療関連の変化は、AST、リン、総タンパク質、アルブミン、グロブリン、及びシトルリンで観察された。

【0 4 1 1】

表 2 2 ～ 2 5 は、v 1 7 5 9 7 及び v 2 1 2 5 2 の非GLP反復投与量研究ならびに v 2 1 2 5 2 のGLP研究の結果の比較を示している。

【0 4 1 2】

（表 2 2）カニクイザルにおける v 1 7 5 9 7 及び v 2 1 2 5 2 の隔週での反復投与試験で観察された死亡率の比較

用量	v17597 - DAR 4		v21252 - DAR 2	
	死亡数／ 動物総数	死亡前の 累積毒素量	死亡数／ 動物総数	累積毒素量
18 mg/kg	--	--	0/12	1.44 mg/kg
12 mg/kg	--	--	0/6 0/12	0.72 mg/kg 0.96 mg/kg
9 mg/kg	3/6	0.36 mg/kg	0/6	0.54 mg/kg
6 mg/kg	--	--	0/12	0.48 mg/kg
4.5 mg/kg	1/6	0.36 mg/kg	--	--

【0 4 1 3】

（表 2 3）カニクイザルにおける v 1 7 5 9 7 及び v 2 1 2 5 2 の隔週での反復投与試験で測定されたNOAELとHNSTDとの比較

	v17597 - DAR 4 (累積毒素量)	v21252 - DAR 2 (累積毒素量)
NOAEL	決定できなかった <4.5 mg/kg (<0.54 mg/kg)	12 mg/kg (0.96 mg/kg)
HNSTD	決定できなかった <4.5 mg/kg (<0.54 mg/kg)	18 mg/kg (1.44 mg/kg)

【0 4 1 4】

（表 2 4）v 1 7 5 9 7 DAR 4 及び v 2 1 2 5 2 DAR 2 のADC PKパラメータの比較（毒素用量は一致）

10

20

30

40

50

毒素量	薬物 (用量)	AUC _{0-336hr} 初回投与 (hr*ug/mL)	差異倍率 [#]	半減期 初回投与 (時間)	差異倍率 [#]
0.18 mg/kg	v17597 DAR4 (4.5 mg/kg)	9,920	1	39	1
	v21252 DAR2 (9 mg/kg)	18,800	1.9	85.6	2.2
0.36 mg/kg	v17597 DAR4 (9 mg/kg)	24,600	1	103	1
	v21252 DAR2 (18 mg/kg)	49,800	2.0	179	1.7

10

v 1 7 5 9 7 D A R 4 @ 4 . 5 及び 9 m g / k g と比較
【 0 4 1 5 】

(表 2 5) v 1 7 5 9 7 D A R 4 及び v 2 1 2 5 2 D A R 2 の全抗体 P K パラメータ
の比較 (毒素用量は一致)

毒素量	薬物 (用量)	AUC ₀₋₃₃₆ 初回投与 (hr*ug/mL)	投与の 差異倍率	半減期 初回投与 (時間)	差異倍率 [#]
0.18 mg/kg	v17597 DAR 4 (4.5 mg/kg)	8,090	1	37.3	1
	v21252 DAR 2 (9 mg/kg)	17,400	2.2	67.4	1.8
0.36 mg/kg	v17597 DAR 4 (9 mg/kg)	18,700	1	81.9	1
	v21252 DAR2 (18 mg/kg)	50,300	2.7	155	1.9

20

v 1 7 5 9 7 @ 4 . 5 及び 9 m g / k g と比較
【 0 4 1 6 】

結論

v 2 1 2 5 2 の毒性が発現しない最高投与量 (H N S T D) は 1 8 m g / k g と決定した。v 2 1 2 5 2 では、すべての用量で忍容性は良好であった。この G L P 研究では、臨床所見は有害とは見なされず、死亡は観察されなかった。一貫していた唯一の臨床所見は、下痢の増加であった。すべての用量において体重の変化は観察されず、臨床病理所見 (肝機能 - アスパラギン酸トランスアミナーゼ及びアラニントランスアミナーゼ及び血液学 - 好中球、血小板、ヘモグロビン、及びリンパ球) では有害と見なされなかった。これらの G L P 毒物学の結果は、ヒトにおける予測された有効用量を超える臨床投薬をサポートするものである。

30

【 0 4 1 7 】

驚くべきことに、平均 D A R 2 (v 2 1 2 5 2) で v 1 0 0 0 0 にコンジュゲートした化合物 9 を含む A D C は、H N S T D が 1 8 m g / k g である平均 D A R 4 (v 1 7 5 9 7) を有する A D C と比較して、忍容性の改善を示した。毒素用量 0 . 3 6 m g / k g で投与した場合、平均 D A R 4 (v 1 7 5 9 7) で v 1 0 0 0 0 にコンジュゲートした毒素化合物 9 が、急性投与 (9 m g / k の単回投与) または亜慢性 (2 週間で区切られた 4 . 5 m g / k g の 2 回投与) のいずれかで投与された場合、死亡率と関連していたことが以前に示されているため (実施例 8)、この結果は予想外である。対照的に、v 2 1 2 5 2 (D A R 2) を、毒素 (化合物 9) 0 . 3 6 m g / k g の用量で 4 用量分 (累積毒素用量

40

50

1. 44 mg/kg) を投与した場合、v 17597 と比較して、死亡はなく、毒性は大幅に減少した。例えば、累積毒素（化合物 9）用量 0.96 mg/kg で投与された v 21252 では、有害所見には関連しなかったため、無有害作用量（NOAEL）として指定された。さらに、1.44 mg/kg の累積毒素用量（化合物 9）は、4 用量以上の 18 mg/kg の v 21252 であり、忍容された。これは、死亡に関連していた v 17597 の用量の 4 倍以上の用量（0.36 mg/kg）である。

【0418】

重要なことは、毒素に一致する用量で比較したときに、およそ 2 倍以上の曝露（最初の投与後 AUC_{0-336hr}）及び最初の投与後 2 倍長い半減期を有していても（v 17597 4.5 mg/kg 対 v 21252 9 mg/kg 及び v 17597 9 mg/kg 対 v 21252 18 mg/kg）、2 つずつ毎週投与したとき、v 21252 は、v 17597 と比較して低い毒性、より高い忍容性を有することである（表 24 及び 25 に要約）。

【0419】

実施例 11：v 21252 により、in vivo において低い HER2 患者由来異種移植片成長が阻害される

LTL-654 は、卵巣漿液性腺癌患者の転移に由来し、免疫組織化学（IHC）により HER2 陰性とスコア付けされた。以前の生検は、HER2 曖昧性として IHC によってスコア付けされた。

【0420】

雌の NOD Rag ガンマ（NRG）マウスに、それぞれ約 15 mm³ の 2 つの LTL-654 腫瘍断片が腎被膜を介して皮下移植された。平均腫瘍体積が 70.3 ~ 77.8 mm³ に達したときに、動物を 2 つの盲検治療群（6 匹ずつ）のうちの 1 つにランダムに割り当てた。

【0421】

動物は、ビヒクルまたは 3 mg/kg の v 21252 のいずれかで週に 1 回静脈内投与され、合計 4 回の注射（qwx4）を行った（表 21）。腫瘍径は、Vevo（登録商標）3100 imaging system（FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Canada）を使用して、三次元（3D）モードを使用して測定した。腫瘍全体の複数の画像（70 ~ 100 枚/腫瘍）を記録し、Vevo（登録商標）LAB ソフトウェア v 2.1.0（FUJIFILM VisualSonics, Inc.）を使用して分析した。腫瘍径は、無作為化後 24 日目まで毎週 1 回測定した。個々の腫瘍のサイズが 1500 mm³ に達したときに、マウスを倫理的に殺した。腫瘍体積は、各群の平均 ± SEM として報告される。

【0422】

図 16 は、ビヒクルまたは v 21252 の iv 投与後に LTL-654 腫瘍断片を皮下移植されたマウスにおける腫瘍応答の結果を提供し、これは v 21252 による LTL-654 移植マウスの治療により、LTL-654 腫瘍異種移植片の成長速度が阻害されたことを示すものである。

【0423】

この例は、v 21252 が患者由来の異種移植片に有効であり、HER2 発現が、HER2 陰性として IHC によってスコア付けされるほど十分に少ないことを示している。

【0424】

（表 21）LTL-654 卵巣癌 PDX モデル研究デザイン

試験物質	用量 (mg/kg)	投与経路	投与日	動物数／ 群
ビヒクル	N/A	IV	0, 7, 14, 21	6
v21252	3	IV	0, 7, 14, 21	6

10

20

30

40

50

N/A = 該当なし。

【0425】

実施例12: *in vivo*における、v21252によるマウスの頭蓋内移植ヒト乳房腫瘍の生存期間の延長

この実施例で使用した構築物は、対照コンジュゲート（リンカー毒素001にコンジュゲートした呼吸器多核体ウイルスに対するヒト化抗体）、v21252、v7155（T-DM1、DAR3.5）、及びv24029（DAR8でエキサテカン誘導トポイソメラーゼⅠ阻害剤（DXd）にコンジュゲートしたトラスツズマブ）とした。この実施例で利用される頭蓋内移植BT-474ヒト乳房腫瘍は、HER2陽性乳癌脳転移モデルとして機能する。

【0426】

雌Balb/cヌードマウス（CByJ、Cg-Foxn1nu/J）マウスにγ線源（2Gy、⁶⁰Co、BioMep, Bretenieres, France）を照射した。麻酔したマウスに、フェノールレッドを含まない2マイクロリットルのRPMI 1640培地に 1×10^5 BT-474細胞を定位固定法で注射した。動物をランダムに治療群に分け、8日目から開始して、ビヒクル、対照コンジュゲート、v21252、v7155またはv24029の注射を6mg/kgで毎週、合計12回静脈内投与した（表26）。体重は、18日目まで週2回、その後は毎日記録した。体重減少が3日間連続して20%以上になると、倫理的にマウスを殺した。

【0427】

図17には、ビヒクル、対照コンジュゲート、v21252、v7155、またはv24029のiv投与後の、BT-474腫瘍細胞を頭蓋内移植されたマウスの生存結果を提供する。

【0428】

BT-474細胞を頭蓋内移植された動物の2つの追加コホートもランダムに治療群に分け、8日目から開始して、v21252またはv24029のいずれかの注射を6mg/kgで2週ごとに、合計6回静脈内投与した。体重は、18日目まで週2回、その後は毎日記録した。体重減少が3日間連続して20%以上になると、倫理的にマウスを殺した。

【0429】

図18は、ビヒクル、対照コンジュゲートもしくはv7155を毎週（qw）iv投与後、またはv21252もしくはv24029のいずれかを2週間ごとに（q2w）iv投与後の、BT-474腫瘍細胞を頭蓋内移植されたマウスの生存結果を提供する。

【0430】

この実施例は、v21252が、BT-474乳房腫瘍細胞を頭蓋内移植されたマウスの生存を延長するのに効果的であることを示している。

【0431】

（表26）頭蓋内移植されたBT-474ヒト乳癌モデル研究デザイン

10

20

30

40

50

試験物質	用量 (mg/kg)	投与経路	投与日	動物数／ 群
ビヒクル	N/A	IV	8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85	7
v21252	6	IV	8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85	7
v7155	6	IV	8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85	7
v24029	6	IV	8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85	7
対照 コンジュゲート	6	IV	8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, 85	7

N / A = 該当なし。

【 0 4 3 2 】

本明細書で参照されているすべての特許、特許出願、刊行物、及びデータベースエントリの開示は、これらの個々の特許、特許出願、刊行物、及びデータベースエントリが各々具体的かつ個別に、参照により組み込まれると示されているのと同じ程度に、その全体が参照により具体的に組み込まれる。

【 0 4 3 3 】

本明細書に記載されている、当業者には明らかであろう特定の実施形態の修正は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されている。

【 0 4 3 4 】

配列一覧表

(表 A) バリエント v 5 0 1 9、v 5 0 2 0、v 7 0 9 1、v 1 0 0 0 0、v 6 9 0 3、v 6 9 0 2 及び v 6 7 1 7 のクローン番号

バリエント	H1 クローン#	H2 クローン#	L1 クローン#	L2 クローン#
5019	3057	720	1811	--
5020	719	3041	--	1811
7091	3057	5244	1811	--
10000	6586	5244	3382	--
6903	5065	3468	5037	3904
6902	5065	3468	5034	3904
6717	3317	720	--	--

【 0 4 3 5 】

(表 B) クローン番号別のバリエント v 5 0 1 9、v 5 0 2 0、v 7 0 9 1、v 1 0 0 0 0、v 6 9 0 3、v 6 9 0 2 及び v 6 7 1 7 の配列

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
3	3468	完全	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKGYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLY SLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSL CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
4	3468	完全	GAAGTGCAGCTGGTCAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGG AGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGCCGCTAGTGGCTTCACTTTTAC CGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCC TGGAGTGGGTGCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATC TACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTCACCCTGTCAGTGGACCG GAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCG AAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCT TCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAATCTGGTCAACGTGAGCT CCGCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTA GTAAATCCACATCTGGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTG AAGGGCTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTCTTGGAACAGTGG CGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCTGCAGTGTGAAGTC AAGCGGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTGGTCAACGTGCCAAGTTC AAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGC CATCCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACCAAGTCTTGT GATAAAACCCATACATGCCCCCCTTGTCTGCACCAGAGCTGCTG GGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGATAC ACTGATGATTAGTAGGACCCAGAAAGTCACATGCGTGGTCGTGG

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
			ACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTG GACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGG AACAGTACAACAGTACCTATCGCGTCGTGTCAGTCCTGACAGTG CTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAGAGTATAAGTGCAAAGT GAGCAATAAGGCTCTGCCCCGACCTATCGAGAAAACAATTTCCA AGGCAAAAGGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCT CCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAACCAGGTCAGCCTGCTGTG TCTGGTGAAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGA AAGTAATGGCCAGCCTGAGAACCAATTACCTGACCTGGCCCCCTG TGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCG TCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTCA GTCATGCACGAGGCACTGCACAACCATTACACCCAGAAAGTCACT GTCCTGTCACCAGGG
5	3468	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVVRQAPGKGL EWVADVNPNSGGSIIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSS
6	3468, 3057, 3041, 3317	H1	GFTFTDYM
7	3468, 3057, 3041, 3317	H3	ARNLGPSFYFDY
8	3468, 3057, 3041, 3317	H2	VNPNSGGS
9	1811	完全	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIY PYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	1811	完全	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTG GGCGACCGAGTCACCATCACATGCAAGGCTTCCCAGGATGTGTC TATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCA AGCTGCTGATCTATAGCGCCTCCTACCGGTATACCGGCGTGCCCT CTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACTCTGACCA TCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACCTACTATTGCCAGC AGTACTATATCTACCCATATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTG GAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCC CCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGCCAGCGTGGTCTG TCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGA AGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGTCTGTG ACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTGTCAAGCAC ACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATG

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
			CCTGCGAAGTCACACATCAGGGGCTGTCCTCTCCTGTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
11	1811	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIK
12	1811, 3904, 3317	L1	QDVSIG
13	1811, 3904, 3317	L3	QYYIYPYT
14	1811, 3904, 3317	L2	SAS
15	5034	完全	DYKDDDDKDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDESLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
16	5034	完全	GACTACAAAGACGACGATGACAAAGATATCCAGATGACCCAGTCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTCACTATTACCTGCCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACAGTGCA TCATTCCTGTATTTCAGGAGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGCACCGATTTTCACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATAACCACACCCCC TACTTTCCGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAGCGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAGTCCGGCACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTTACC CCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGACAACGCTCTGCA GAGTGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAA GACTCTACTTATAGTCTGTCAAGCACCTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTACACATCAGGGGCTGTCATCACCAGTCACCAAATCATTCAATCGGGGGGAGTGC
17	5034	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYYTPPTFGQGTKVEIK
18	5037	完全	DYKDDDDKDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYYTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDESLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSKESVTEQDSKDSSTLSLSSRLTSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
19	5037	完全	GACTACAAAGACGACGATGACAAAGATATCCAGATGACCCAGTCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTCACTATTACCTGCCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACAGTGCA

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
			TCATTCCTGTATTTCAGGAGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCAG ATCTGGCACCATTTCACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGA GGACTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATAACACACCCCC TACTTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAGCGAACTGTGG CCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGA AGTCCGGCACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTACC CCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGACAACGCTCTGCA GAGTGGCAACAGCAAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAA GACTCTACTTATAGTCTGTCAAGCAGACTGACACTGAGCAAGGC AGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTCACACATC AGGGGCTGTCATCACCAGTCACCAAATCATTCAATCGGGGGGAG TGC
20	5037	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIK
21	5037	L1	QDVNTA
22	5037	L3	QQHYTTPPT
23	5037	L2	SAS
24	3382	完全	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPFSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIY PATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
25	3382	完全	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTG GGCGACCGAGTCACCATCACATGCAAGGCTTCCCAGGATGTGTC TATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCA AGCTGCTGATCTATAGCGCTCCTACCGGTATACCGGCGTGCCCT CTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGAACAGACTTTACTCTGACCA TCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTTCGCTACCTACTATTGCCAGC AGTACTATATCTACCCAGCCACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTG GAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCC CCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGCCAGCGTGGTCTG TCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGA AGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGTCTGTG ACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTGTCAAGCAC ACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATG CCTGCGAAGTCACACATCAGGGGCTGTCCTCTCCTGTGACTAAG AGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
26	3382	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPFSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIY PATFGQGTKVEIK
27	3382	L1	QDVSIG
28	3382	L3	QQYYIYPAT

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
29	3382	L2	SAS
30	5065	完全	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	5065	完全	GAGGTGCAGCTGGTTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAG GAGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGCTTCAACATC AAGGACACCTACATTCACTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGAAAAGG CCTGGAGTGGGTGGCACGAATCTATCCAATAATGGATACACCC GGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATTTCTGCAGAT ACAAGTAAAAACACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGC CGAAGATACAGCCGTGTACTATTGCAGCCGATGGGGAGGCGACG GCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAACCTGGTGCACA GTGAGCTCCGCATCAACAAAGGGGCCTAGCGTGTTTCCACTGGC CCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGGGGAACAGCAGCCCTGGGAT GTGAGGTGACCGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACTGTGAGCTGG AACTCCGGCGCCCTGACATCTGGGGTCCATACTTTTCTGCTGTG CTGCAGTCAAGCGCCTGTACAGCCTGTCCTCTGTGGTCACTGTG CCAAGTTCAAGCCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCATCCAATACCAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACCCA AGTCTTGTGATAAAACACATACTTGCCCCCTTGTCTGTCACCAG AGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCT AAAGACACCCTGATGATTAGTAGGACTCCAGAAGTCACCTGCGT GGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCGAAGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCC AGGGAGGAACAGTACAACCTCACTTATCGCGTCGTGTCTGTCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGT GCAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCCGACCTATCGAGAAAACA ATTTCCAAGGCTAAAGGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGT GTACCTTCCATCTAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGTC TGACATGTCTGGTGAAAGGGTTCTATCCCAGCGATATCGCAGTG GAGTGGGAATCCAATGGACAGCCTGAGAACAAATTACAAGACCAC ACCCCTGTGCTGGACTCTGATGGAAGTTTCGCCCTGGTGAGTAA GCTGACCGTCGATAAATCACGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGTTCAGTGATGCACGAAGCACTGCACAACCACTACACCCAG AAAAGCCTGTCCCTGTCCCCCGGC
32	5065	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
33	5065, 720, 719	H1	GFNIKDTY
34	5065, 720, 719	H3	SRWGGDGFYAMDY
35	5065, 720, 719	H2	IYPTNGYT
36	6586	完全	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYTMDWVRQAPGKGL EWVGDVNPNSGGSIYNQRFKGRFTFSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSTFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
37	6586	完全	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGAGGGGGCCTGGTGCAGCCCCG GAGGGTCTCTGCGACTGTATGTGCCGCTTCTGGGTTCACITTCG CAGACTACACAATGGATTGGGTGCGACAGGCCCCCGAAAGGG ACTGGAGTGGGTGGGCGATGTCAACCCTAATTCTGGCGGGAGTA TCTACAACCAGCGGTTCAAGGGGAGATTCACTTTTTCAGTGAGAC AGAAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGC CGAAGATACCGCTGTCTACTATTGCGCTCGCAATCTGGGCCCCAG TTTCTACTTTGACTATTGGGGGCGAGGAACCCTGGTGACAGTCAG CTCCGCTAGCACTAAGGGGCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTC TAGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTCTGG TGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTTGGAACCTCA GGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCGCAGTGCTGCA GTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTCAACGTGCCTAG TTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCACA AGCCATCAAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAGCCCCAAGAG CTGTGATAAACTCATACCTGCCACCTTGTCCGGCGCCAGAACT GCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAG ACACCCTGATGATTTCCCGGACTCCTGAGGTACCTGCGTGGTTCG TGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCGGGA GGAACAGTACAACCTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCTGACAG TGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAGTGTAAG GTGAGCAACAAAGCCCTGCCCGCCCCAATCGAAAAACAATCTC TAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGAACCACAGGTCTACGTCTACC CCCCATCAAGAGATGAACTGACAAAAAATCAGGTCTCTCTGACA TGCCTGGTCAAAGGATTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGG GAAAGTAACGGCCAGCCCGAGAAACAATTACAAGACCACACCCCC TGTCTGGACTCTGATGGGAGTTTCGCTCTGGTGTCAAAGCTGAC

10

20

30

40

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
			CGTCGATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTAGCTGCT CCGTCATGCACGAAGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCC CTGAGCCTGAGCCCTGGC
38	6586	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYTMDWVRQAPGKGL EWVGDVNPNSGGSIYNQRFKGRFTFSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
39	6586	H1	GFTFADYT
40	6586	H3	ARNLGPSFYFDY
41	6586	H2	VNPNSGGS
42	3904	完全	YPYDVPDYATGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVA WYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEELKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSEESVTEQDSKSTYS LSSTLELSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
43	3904	完全	TATCCCTACGATGTGCCTGACTACGCTACTGGCTCCGATATCCAG ATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCTGAGTGCATCAGTGGGGGACCG AGTCACCATCACATGCAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGT CGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGCTGCTGA TCTACAGCGCCTCCTACCGGTATACTGGGGTGCCTTCCAGATTCT CTGGCAGTGGGTCAGGAACCGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTC TGCAGCCCGAGGATTTCCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACTATA TCTACCCTTATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAG AGGACAGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCCCCTTCCGAC GAAGAGCTGAAAAGTGGAACTGCTTCAGTGGTCTGTCTGTGAA CAATTTCTACCCCCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAAGGTGCGATA ACGCTCTGCAGAGCGGCAATTCCGAGGAGTCTGTGACAGAACAG GACAGTAAAGATTCAACTTATAGCCTGTCAAGCACACTGGAGCT GTCTAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAG TCACCCATCAGGGGCTGTCCTCTCCCGTGACAAAGAGCTTTAACA GAGGAGAGTGT
44	3904	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIY PYTFGQGTKVEIK
45	719	完全	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYTTP PTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGLTVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
46	719	完全	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACGTTAA CACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTCAGTGGCAGTCGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAA CAGCATTACACTACCCACCCACTTTTCGGCCAAGGGACCAAAGT GGAGATCAAAGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTG GTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGAAGTGCAGCTGGTGGAG TCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTCAACATTAAGATACTTATATCCACTG GGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTGCGCACGTA TTATCCCACAAATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAG GGCCGATTACCATCTCCGCAGACACTTCCAAGAACACCGCGTA TCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTTTATT ACTGTTCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTAC TGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCGCCGAGCC CAAGAGCAGCGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTC CAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCTCCCTAAGC CAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGC GTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAA CTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAAC CAAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTCTGTGAGCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAA GTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAA CCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTAC ACATACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGTGTC CCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGT GGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACC ACACCTCCAGTGCTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCTGGTGTG CAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGT TTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTC AGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
47	719	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIK
48	719	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
49	720	完全	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGLTVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

10

20

30

40

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
			TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLICLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
50	720	完全	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACGTAA CACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCAT CAAGGTTCAGTGGCAGTCGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAA CAGCATTACACTACCCACCCACTTTTCGGCCAAGGGACCAAAGT GGAGATCAAAGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTG GTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGAAGTGCAGCTGGTGGAG TCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTCAACATTAAGATACTTATATCCACTG GGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTGCGACGTA TTTATCCCAAAATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAG GGCCGATTCACCATCTCCGCAGACACTTCCAAGAACCCGCGTA TCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTTTATT ACTGTTCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTAC TGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCGCCGAGCC CAAGAGCAGCGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTC CAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCTCCCTAAGC CAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCAGGTTGACCTGC GTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAA CTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAAC CAAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAA GTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAA CCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTAC ACACTGCCACCCAGCAGAGACGAAGTACCAAGAACCAGGTGTC CCTGATCTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGT GGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACATGACC TGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTATTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTT TAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCA GAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAA
51	720	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIK
52	720	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGL WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
53	3041	完全	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP

10

20

30

40

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
			PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPISRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
54	3041	完全	GAAGTGCAGCTGGTCTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGG AGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGCCGCTAGTGGCTTCACCTTTTAC CGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCC TGGAGTGGGTGCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATC TACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTCACCTGTCACTGGACCG GAGCAAAAACACCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCG AAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCT TCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACCTGGTCAACCGTGAGCT CCGCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTA GTAAATCCACATCTGGGGGAACCTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTG AAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTCTTGGAACAGTGG CGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCTGCAGTGTGCAGTC AAGCGGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTGGTCAACGTGCCAAGTTC AAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGC CATCCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACCCAAAGTCTTGT GATAAAACCCATACATGCCCCCTTGTCTGCAACAGAGCTGCTG GGAGGACCAAGCGTGTTCTGTTCCACCAAGCCTAAAGATAC ACTGATGATTAGTAGGACCCCAAGTACATGCGTGGTCTGTGG ACGTGAGCCACGAGGACCCCAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTG GACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGG AACAGTACAACAGTACCTATCGCGTCGTGTCACTCCTGACAGTG CTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAGAGTATAAGTGCAAAGT GAGCAATAAGGCTCTGCCCCGACCTATCGAGAAAACAATTTCCA AGGCAAAAGGACAGCCTAGAGAACACAGGTGTACGTGCTGCCT CCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAACCAGGTCACGCTGTGTG TCTGGTGAAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGA AAGTAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTG TGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCG TCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTCA GTCATGCACGAGGCACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACT GTCCTGTCAACAGGG
55	3041	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
56	3057	完全	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPISRDELTKNQVSLT

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
			CLVKGFPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDFSALVSKLTV DKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG
57	3057	完全	GAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGG AGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGCCGCTAGTGGCTTCACTTTTAC CGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCC TGGAGTGGGTGCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATC TACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTACCCCTGTCAGTGGACCG GAGCAAAAACACCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCG AAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCT TCTACTTTGACTATTGGGGGCGAGGAACTCTGGTCAACGTGAGCT CCGCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTA GTAAATCCACATCTGGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTG AAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTCTTGAAACAGTGG CGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCTGCAGTGTCTGCAGTC AAGCGGGCTGTACAGCCTGTCTCTGTGGTCAACGTGCCAAGTTC AAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGC CATCCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACCCAAAGTCTTGT GATAAAACCCATACATGCCCCCTTGTCTCTGCACCAGAGCTGCTG GGAGGACCAAGCGTGTCTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGATAC ACTGATGATTAGTAGGACCCCAAGTCAATGCGTGGTCTGCTGG ACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTG GACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGG AACAGTACAACAGTACCTATCGCGTCTGTCTAGTCTGACAGTG CTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAGAGTATAAGTGCAAAGT GAGCAATAAGGCTCTGCCCCGACCTATCGAGAAAACAATTTCCA AGGCAAAAGGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTATCCT CCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAACCAGGTGACCTGACTTG TCTGGTGAAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGA AAGTAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTG TGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCGCGCTGGTGAGCAAGCTGACC GTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTT AGTCATGCACGAGGCACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCAC TGTCCTGTCAACAGGG
58	3057	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSS
59	3317	完全	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPKAPKL LIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIY PYTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQ RFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY WGQGLVTVSSAAEPKSSDKTHCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDFSALVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEA LHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
60	3317	完全	GACATTTCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCCCTGAGTGCCTCAGT CGGGGACAGGGTGACTATCACCTGCAAGGCTTCACAGGATGTCA GCATTGGCGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCACCC AAGCTGCTGATCTATAGCGCCTCCTACAGGTATACAGGCGTGCC ATCCCGCTTCTCTGGCAGTGGGTTCAGGAACTGACTTTACACTGAC TATTTCTAGTCTGCAGCCCGAAGATTTGCCACATACTATTGCCA GCAGTACTATATCTACCTTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAGT GGAGATTAAGGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGGTCTGGA GGAGGAGGAAGTGAGGTCCAGCTGGTGGAACTCTGGAGGAGGAC TGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGAGGCTGTCTTGTCGCGCTAGT GGCTTCACCTTTACAGACTACACAATGGATTGGGTGCGCCAGGC ACCAGGAAAGGGACTGGAATGGGTGCTGATGTGAACCCATAA GCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAAGGACGGTTACCC CTGTCACTGGACCGGAGCAAGAACACCCTGTATCTGCAGATGAA CAGCCTGAGAGCCGAGGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCAGGA ATCTGGGCCCCAAGCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACA CTGGTCACTGTGTCAAGCGCAGCCGAACCCAAATCCTCTGATAA GACTCACACCTGCCCACCTTGTCCAGCTCCAGAGCTGCTGGGAG GACCTAGCGTGTTCTGTTCACCCAAAGCCAAAAGACACTCTGA TGATTTCTAGAACCCCTGAAGTGACATGTGTGGTCTGGACGTCA GTCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGC GTCGAGGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCGAGAGGAACAGT ACAACTCAACCTATCGGGTCGTGAGCGTCTCTGACAGTGCTGCAT CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCA ACAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAGACCATTTCCAAGGCT AAAGGGCAGCCCCGCGAACCTCAGGTCTACGTGTATCCTCCAAG CCGAGATGAGCTGACAAAAAACAGGTCTCCCTGACTTGTCTGG TGAAGGGATTTTACCCAAGTGACATCGCAGTGGAGTGGGAATCA AATGGCCAGCCCGAAAAACAATTATAAGACCACACCCCTGTGCT GGACTCTGATGGGAGTTTCGCACTGGTCTCCAAACTGACCCGTGG ACAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTTAGCTGTTCCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAATCTCTGAG TCTGTCACCTGGCAAG
61	3317	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQKPKGKAPKL LIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIY PYTFGQGTKVEIK
62	3317	VH	EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGSGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
63	5244	完全	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQKPKGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQP GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGLTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
			TISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYLTWPPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
64	5244	完全	GACATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCTCCCTGAGTGCTTCAGT CGGCGACAGGGTGACTATCACCTGCCGCGCATCCCAGGATGTCA ACACCGCTGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAAGCCCCA AAGCTGCTGATCTACAGCGCTTCCTTCTGTATTCTGGCGTGCCA AGTCGGTTTTCTGGAAGTAGATCAGGCACTGACTTCACACTGACT ATCTCTAGTCTGCAGCCCGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAG CAGCACTATACCACACCCCCTACATTCGGACAGGGCACTAAAGT GGAGATTAAGGGCGGGTCAGGCGGAGGGAGCGGAGGAGGGTCC GGAGGAGGGTCTGGAGGAGGGAGTGGAGAGGTCCAGCTGGTGG AATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGGTCACTGCGACTG AGCTGTGCCGCTTCCGGCTTTAACATCAAAGACACATACATTCAT TGGGTCAGGCAGGCACCAGGGAAGGGACTGGAATGGGTGGCCC GCATCTATCCCAAAATGGGTACACTCGATATGCCGACAGCGTG AAAGGACGGTTTACCATTCTGCTGATACCAGTAAGAACACAGC ATACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCAGAGGATACAGCCGTGT ACTATTGCAGTCGATGGGGGGGAGACGGCTTCTACGCGCAGCCGA TATTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACCGTGTCAAGCGCAGCCGA ACCTAAATCCTCTGACAAGACCCACACATGCCACCCCTGTCCTGC TCCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCTCCAAA GCCTAAAGATACACTGATGATTAGCCGCACTCCCGAAGTCACCT GTGTGGTTCGTGGACGTGTCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAA ACCAAGAGAGGAACAGTACAATTCAACCTATAGGGTTCGTGAGCG TCCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTAT AAGTGCAAAGTGTCTAACAAGGCCCTGCCCGCTCCTATCGAGAA GACTATTAGCAAGGCAAAAAGGGCAGCCACGGGAACCCAGGTCT ACGTGCTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTGACCAAAAACCAGGTC TCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGCTTTTATCCTAGTGATATCGCT GTGGAGTGGGAATCAAATGGGCAGCCAGAAAACAATTACCTGAC ATGGCCACCCGTGCTGGACAGCGATGGGTCCCTTCTTTCTGTATT CAAACCTGACTGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGAAACGTCT TCAGCTGTTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACCC AGAAGTCTCTGAGTCTGTCAACCCGGC
65	5244	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIK
66	5244	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
67	5244, 5034, 719, 720	L1	QDVNTA

10

20

30

40

50

SEQ ID NO.	クローン #	説明	配列 (アミノ酸またはDNA)
68	5244, 5034, 719, 720	L2	SAS
69	5244, 5034, 719, 720	L3	QQHYTTPPT
70	5244	H1	GFNIKDTY
71	5244	H2	IYPTNGYT
72	5244	H3	SRWGGDGFYAMDY

10

【 0 4 3 6 】

(表C) バリエント v 7 1 3 3、v 1 5 0 8 2、v 1 5 0 8 5、v 1 5 0 8 3、v 1 5 0 8 0、v 1 5 0 7 9、v 1 5 0 8 4 及び v 1 5 0 8 1 の V H 及び V L 領域の配列

SEQ ID NO	バリエント	説明	配列
78	7133	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYTMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWQGGLTVTVSS
79	7133	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIY PATFGQGQTKVEIK
80	15082	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGYSIYNQRFKGRFTLSVDRSWNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWQGGLTVTVSS
81	15082 & 15085	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIY PYTFGQGQTKVEIK
82	15085	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFQDYTMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPWFYFDYWQGGLTVTVSS
83	15083	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFQDYTMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWQGGLTVTVSS
84	15083, 15080, 15079 & 15081	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKL LIWSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIY PGTFGQGQTKVEIK

20

30

40

50

SEQ ID NO	バリエーション	説明	配列
85	15080	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFQDYTMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSWNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
86	15079	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYDYTMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSWNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
87	15084	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFQDYTMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGYSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPFYFDYWGQGTLVTVSS
88	15084	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKL LIWSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIY PYTFGQGTKVEIK
89	15081	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFQDYTMDWVRQAPGKGL EWVADVNPNSGYSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS

10

20

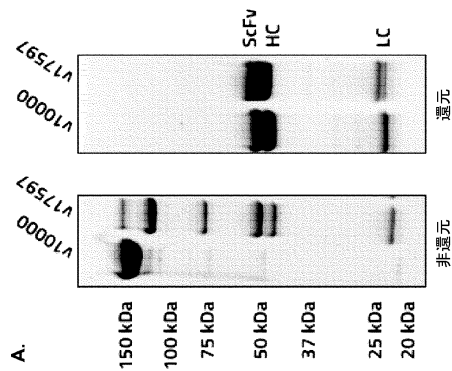
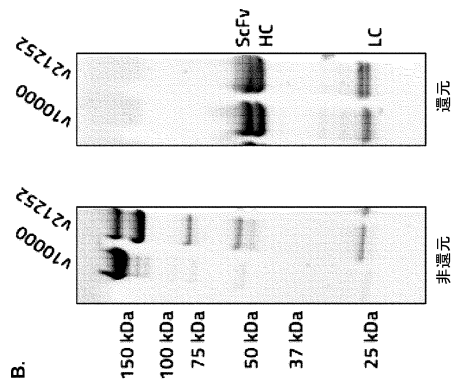
30

40

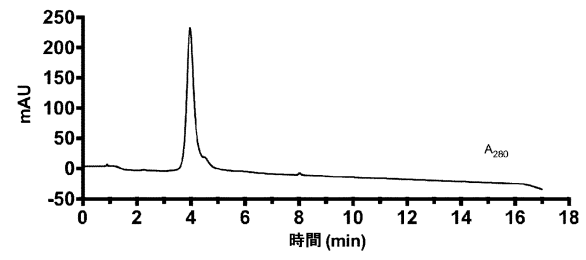
50

【図面】

【図 1】



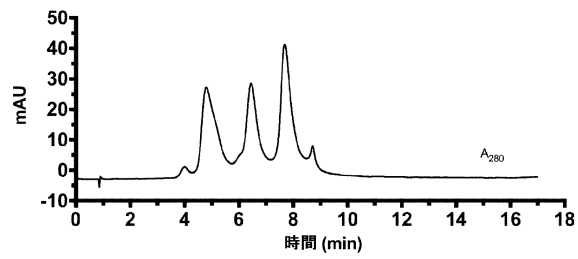
【図 2 A】



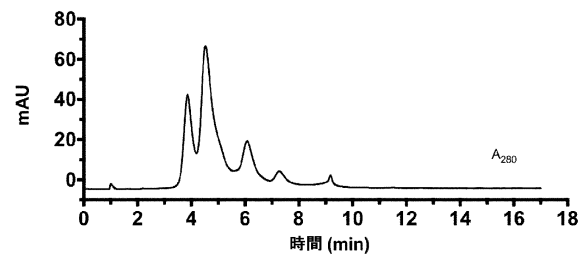
10

20

【図 2 B】



【図 2 C】

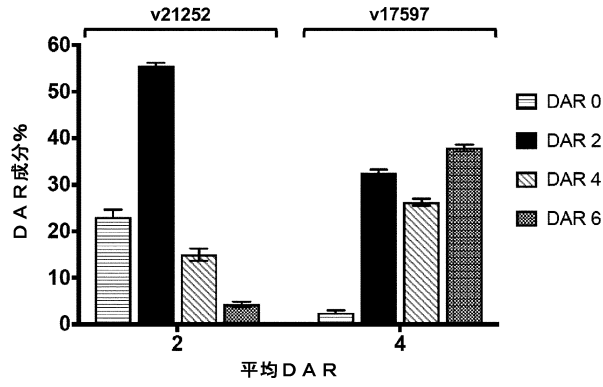


30

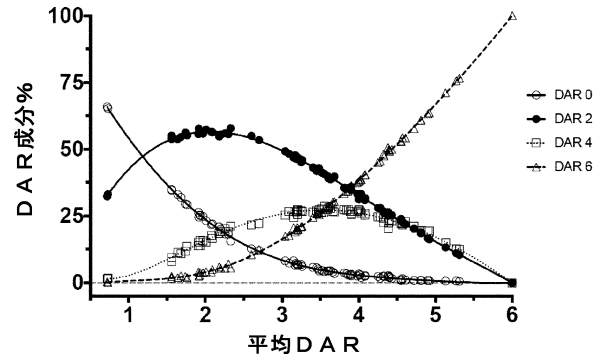
40

50

【図 2 D】

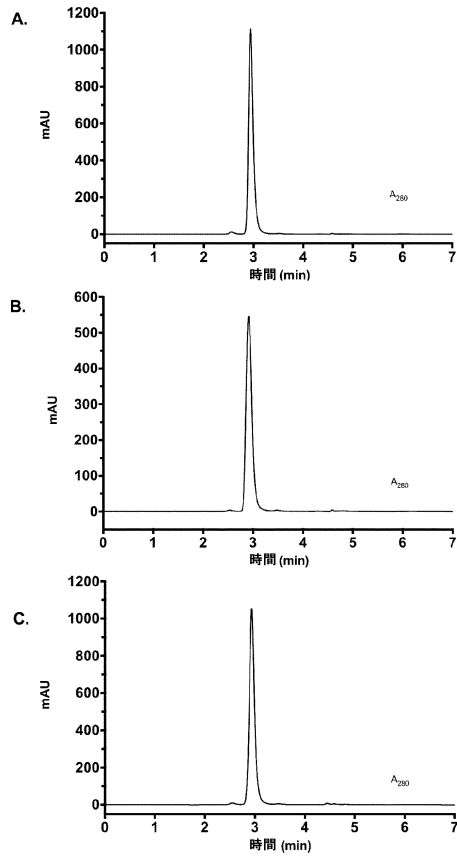


【図 2 E】

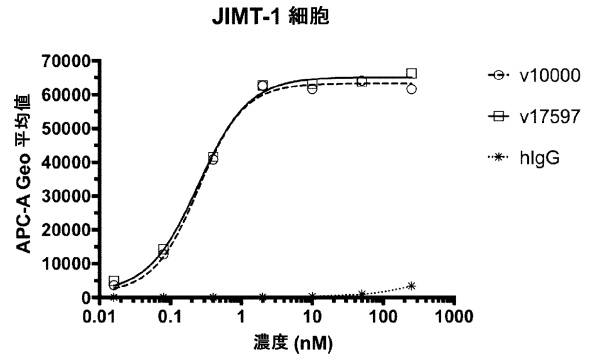


10

【図 3】



【図 4 A】



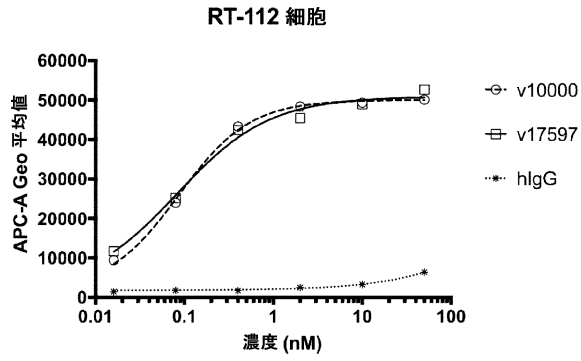
20

30

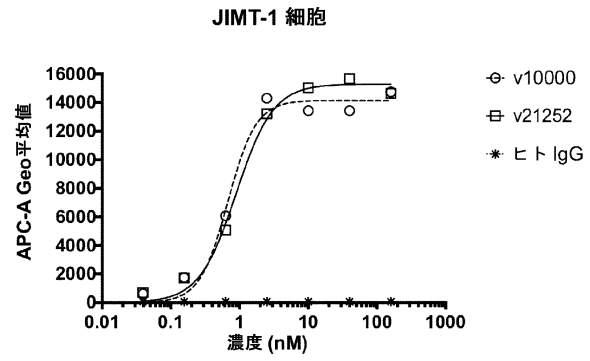
40

50

【図 4 B】

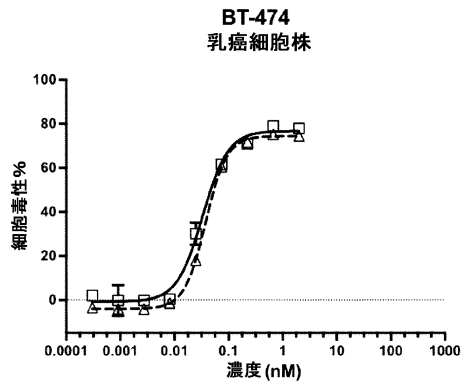


【図 4 C】

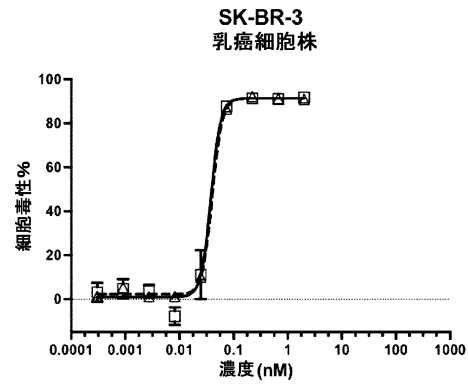


10

【図 5 A】

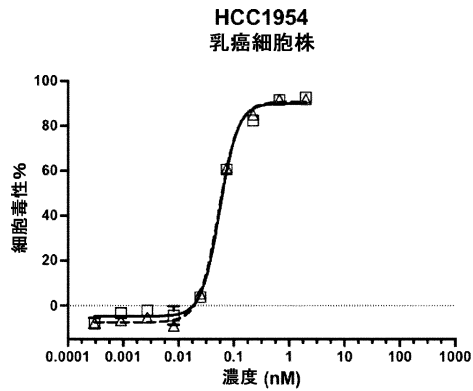


【図 5 B】

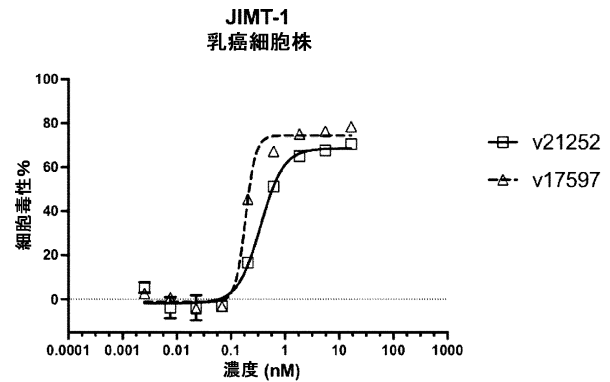


20

【図 5 C】



【図 5 D】

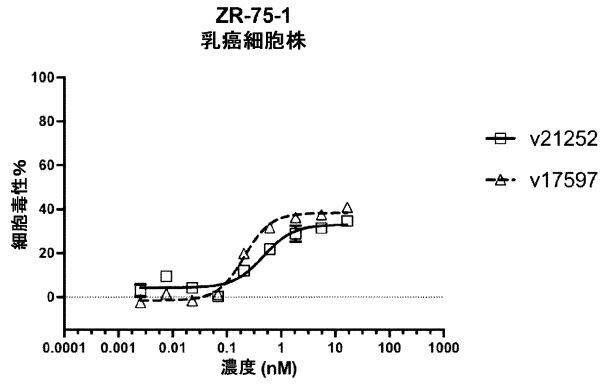


30

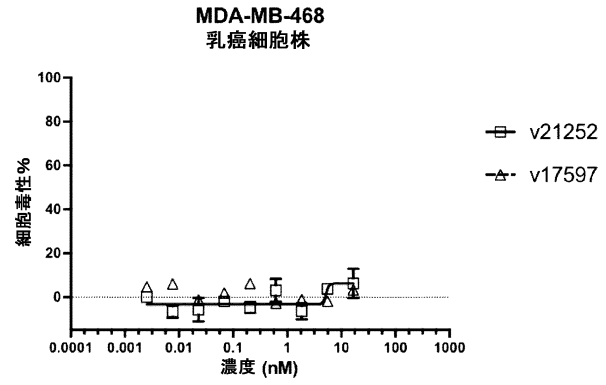
40

50

【図 5 E】

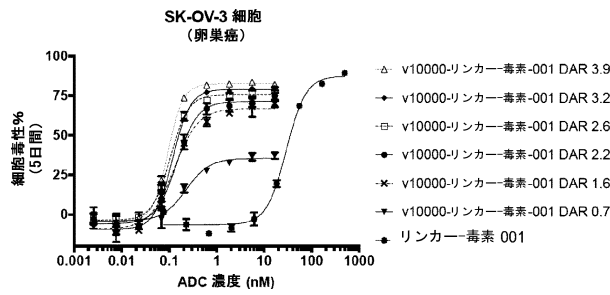


【図 5 F】

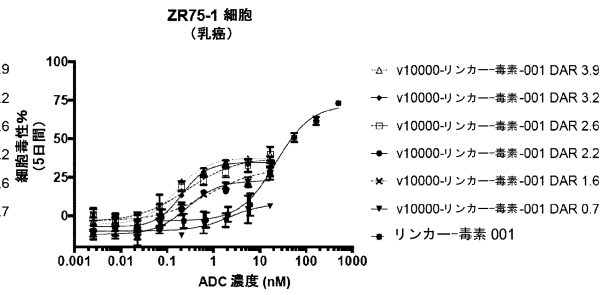


10

【図 6 A】

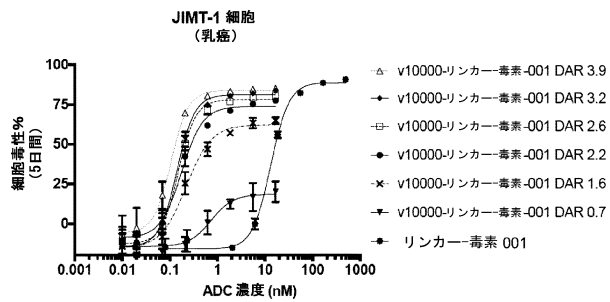


【図 6 B】

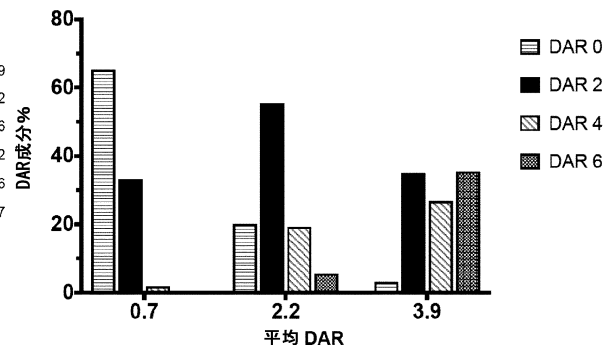


20

【図 6 C】



【図 6 D】



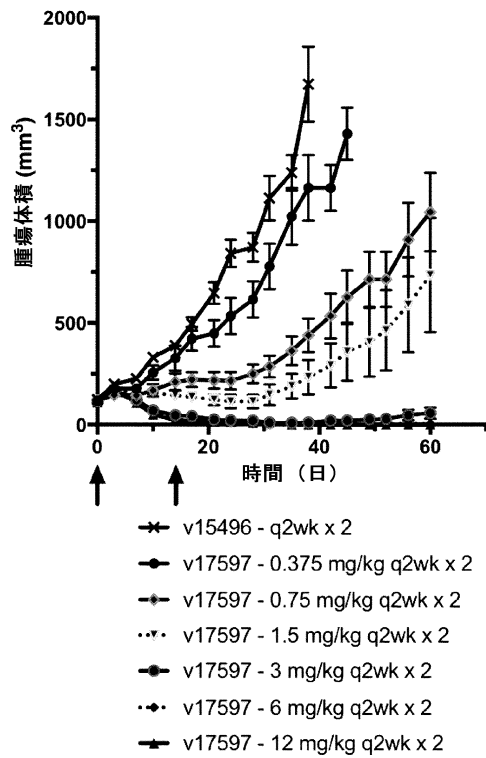
30

40

50

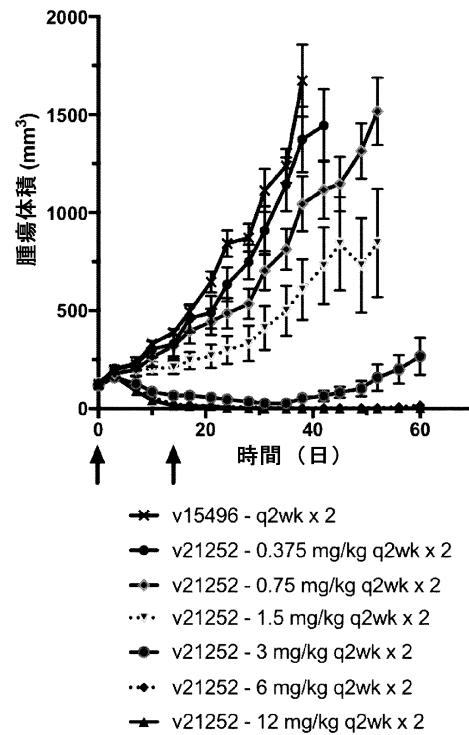
【図 7 A】

HBCx-13B 腫瘍体積



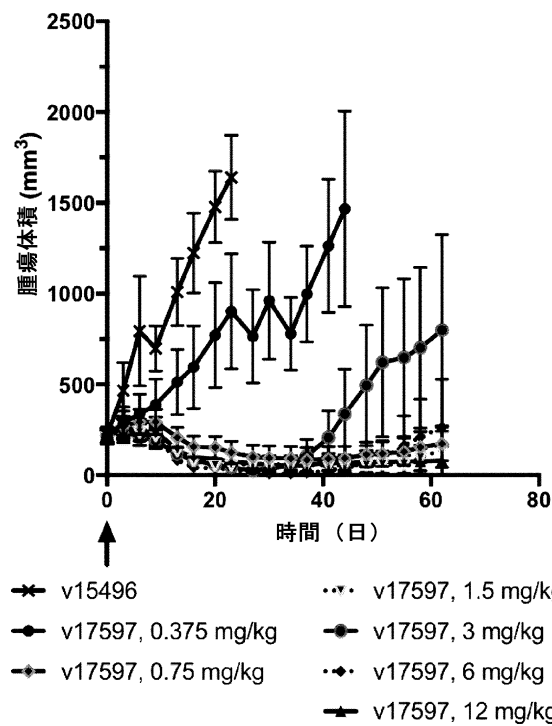
【図 7 B】

HBCx-13B 腫瘍体積



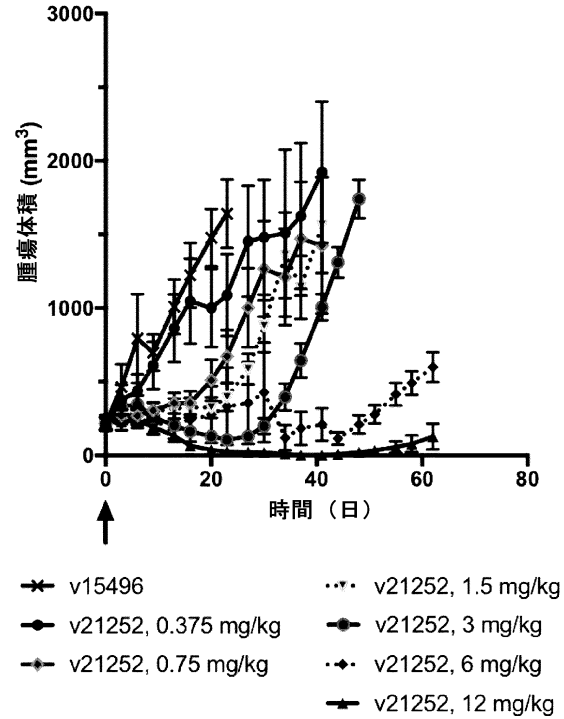
【図 8 A】

ST910 腫瘍体積



【図 8 B】

ST910 腫瘍体積



10

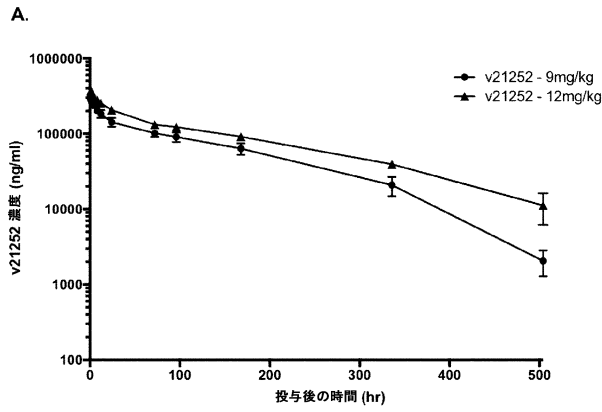
20

30

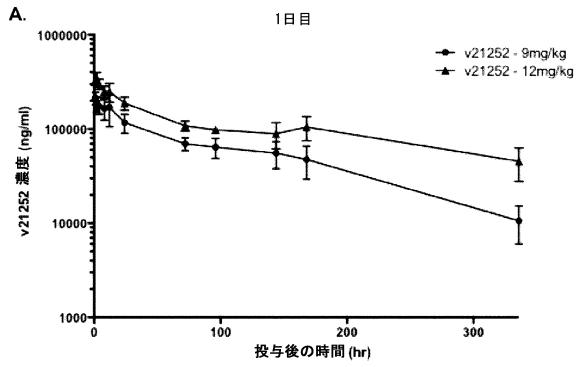
40

50

【図 9】

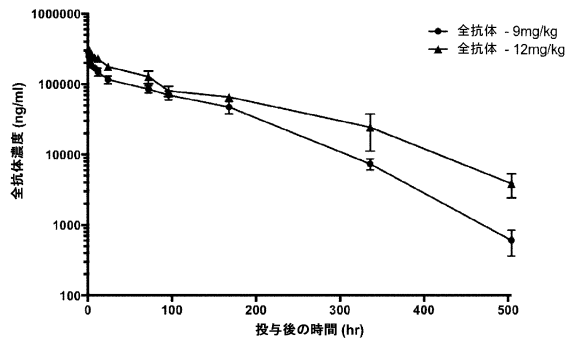


【図 10】

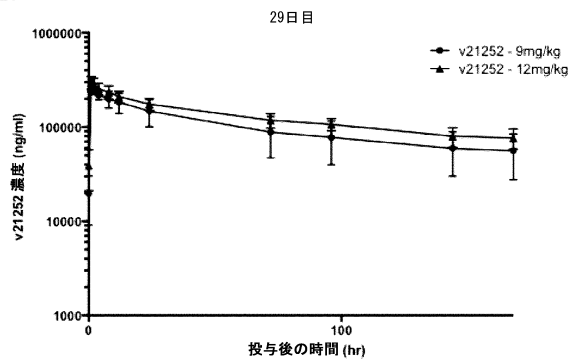


10

B.

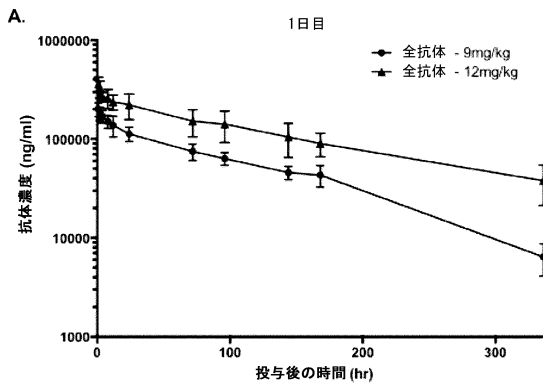


B.

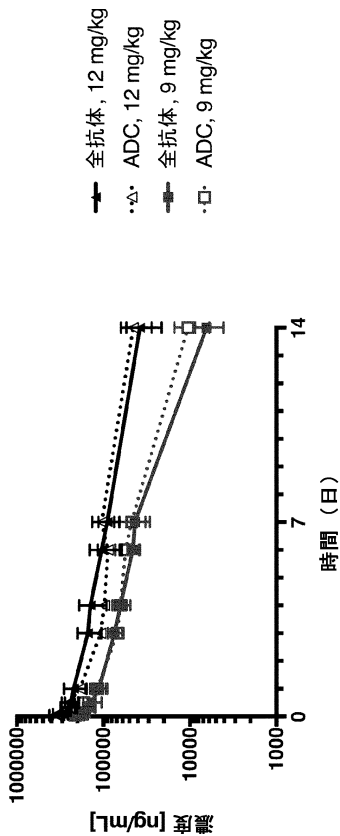


20

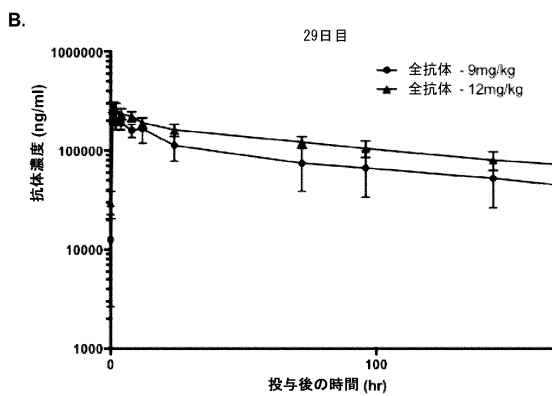
【図 11】



【図 12】



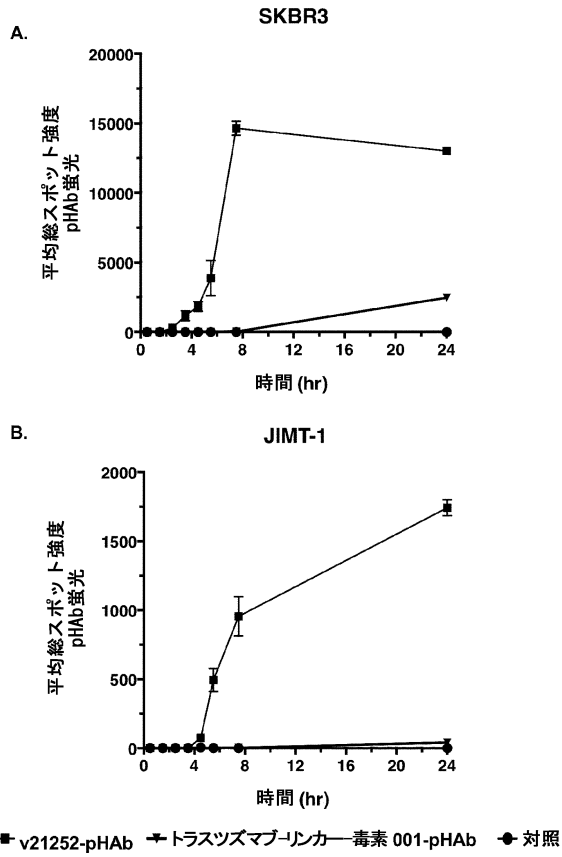
30



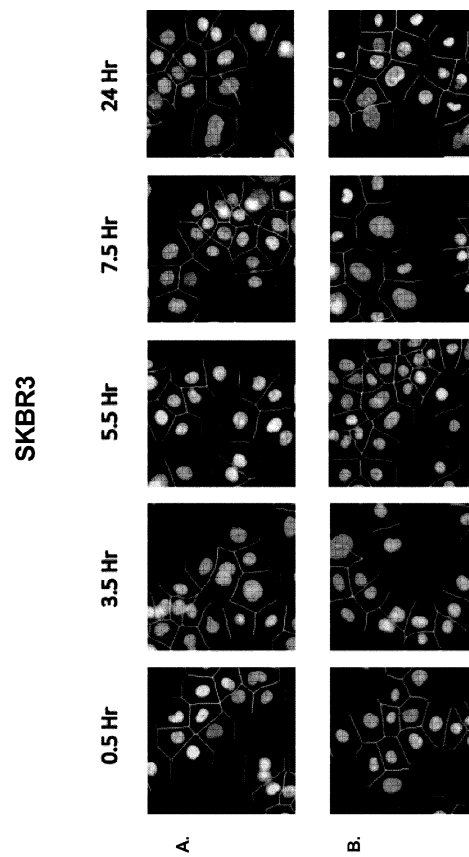
40

50

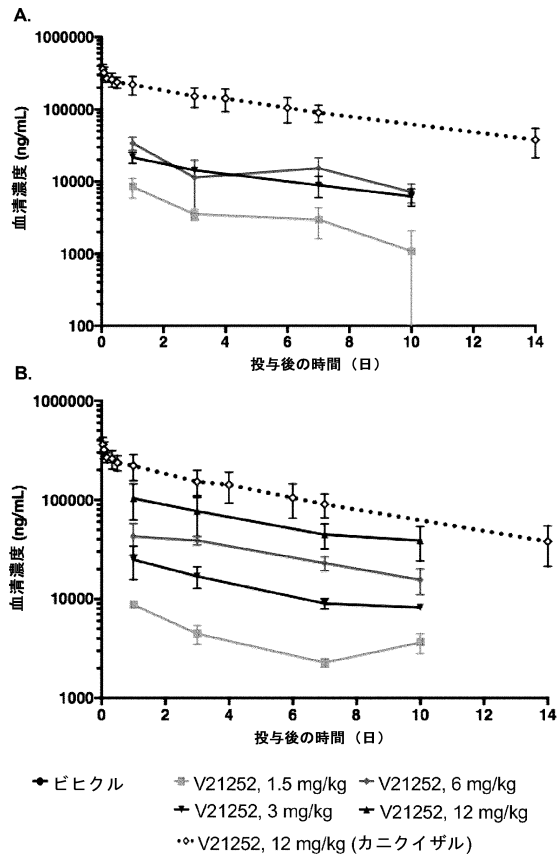
【図 1 3】



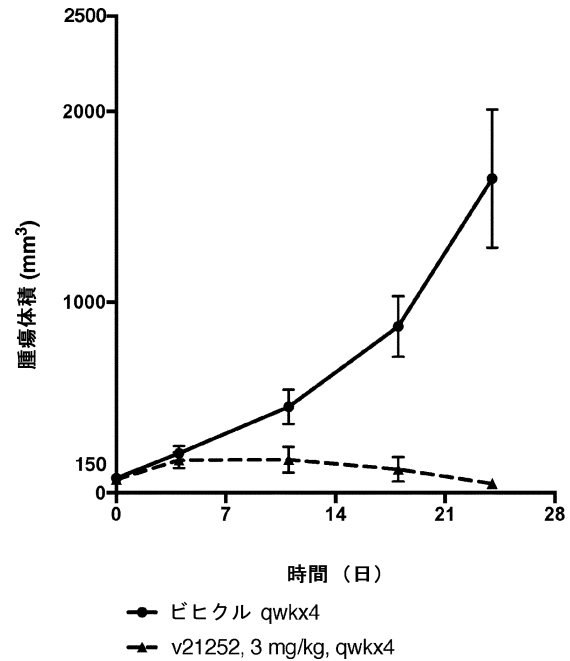
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

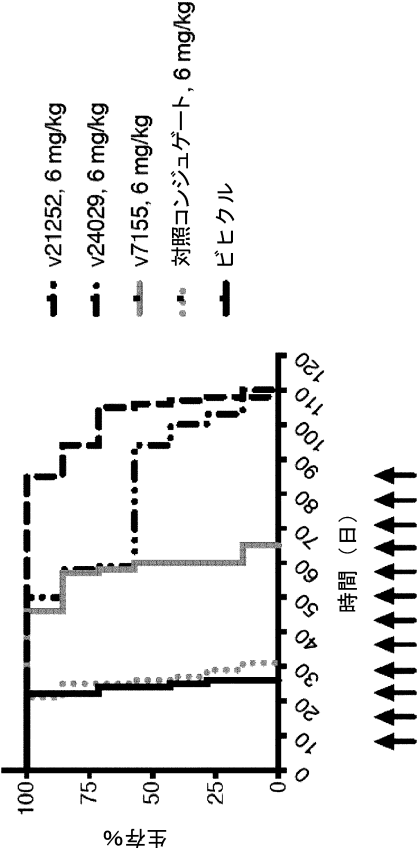
20

30

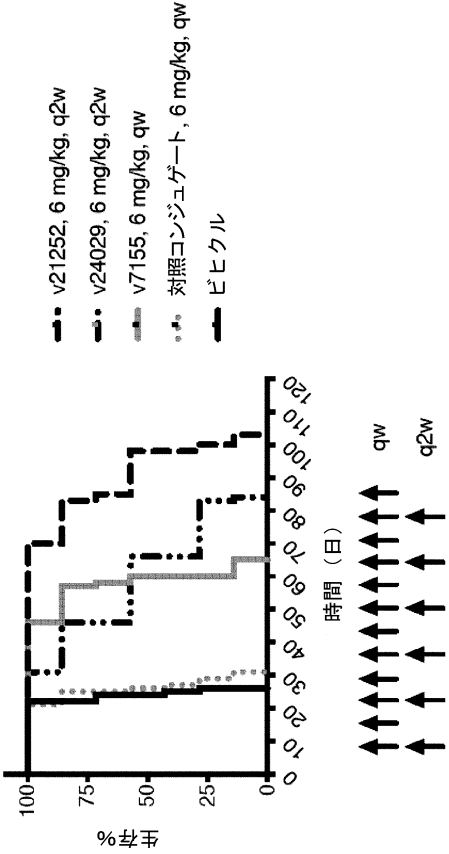
40

50

【図 17】



【図 18】



【配列表】

0007547205000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
		C 1 2 N	15/62	Z

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/743,884

(32)優先日 平成30年10月10日(2018.10.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ハンブレット ケヴィン

カナダ ブイ6エイチ 3ブイ9 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト エイス
アベニュー 1385 540 ザイムワークス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 デイヴィース ルパート エイチ.

カナダ ブイ6エイチ 3ブイ9 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト エイス
アベニュー 1385 540 ザイムワークス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 リッチ ジェームス アール.

カナダ ブイ6エイチ 3ブイ9 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト エイス
アベニュー 1385 540 ザイムワークス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ロウズ ジェラルト ジェイ.

カナダ ブイ6エイチ 3ブイ9 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト エイス
アベニュー 1385 540 ザイムワークス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ファン ヴィンセント ケイ. シー.

カナダ ブイ6エイチ 3ブイ9 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト エイス
アベニュー 1385 540 ザイムワークス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 バーンズシャー スチュアート ディー.

カナダ ブイ6エイチ 3ブイ9 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト エイス
アベニュー 1385 540 ザイムワークス, インコーポレイテッド内

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特表2018-501211 (JP, A)

特表2017-533886 (JP, A)

特表2015-521615 (JP, A)

Plos one, 2014年, Vol.9, Issue 1, e83865

Protein Enginnering, Design and Selection, 2006年, Vol.19, p.299-307

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C12N 15/00-15/90

A61K 47/68

A61K 47/65

A61P 35/00

A61K 38/06

A61K 39/395

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)