

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-518493
(P2025-518493A)

(43)公表日 令和7年6月17日(2025.6.17)

(51)国際特許分類			F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 C 0 7 6
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 8 4
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 C 0 8 5
C 0 7 K	14/78	(2006.01)	C 0 7 K	14/78		4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/11	(2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	
			審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全89頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-566539(P2024-566539)			(71)出願人	506024489	
(86)(22)出願日	令和5年5月10日(2023.5.10)				エグゼリクス、 インコーポレイテッド	
(85)翻訳文提出日	令和7年1月10日(2025.1.10)				アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5	
(86)国際出願番号	PCT/US2023/066819				0 2 , アラメダ, ハーバー ベイ パー	
(87)国際公開番号	WO2023/220626				クウェイ 1 8 5 1	
(87)国際公開日	令和5年11月16日(2023.11.16)			(74)代理人	100078282	
(31)優先権主張番号	63/341,944				弁理士 山本 秀策	
(32)優先日	令和4年5月13日(2022.5.13)			(74)代理人	100113413	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 森下 夏樹	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(74)代理人	100181674	
					弁理士 飯田 貴敏	
				(74)代理人	100181641	
					弁理士 石川 大輔	
				(74)代理人	230113332	
					弁護士 山本 健策	
			最終頁に続く			
			最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 5 T 4 結合剤及びその使用

(57)【要約】

本開示は、5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体などの多重特異性抗体を含む抗体、及び抗体薬物複合体）及びその使用を提供する。本開示は、5 T 4 結合剤を含む組成物も提供する。かかる組成物は、いくつかの実施形態では、5 T 4 に結合する抗体、例えば、5 T 4 に結合する単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性）抗体及びA D Cを含む。かかる組成物は、一部の実施形態では、本明細書に記載のC D Rを含む抗体と本質的に同じヒト5 T 4のエピトープに結合する抗体及びA D Cを含む（例えば、表1〜3）。

【選択図】 図1 A

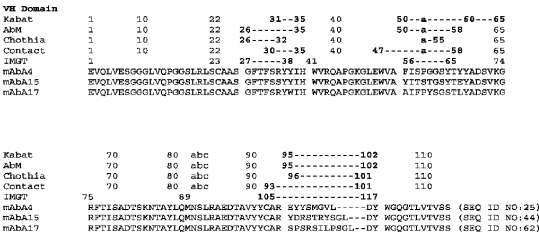


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5 T 4 に結合する抗体またはそのフラグメントであって、

(i) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む V H に記載の V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3、ならびに配列番号 26 のアミノ酸配列を含む V L に記載の V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3、

(i i) 配列番号 44 のアミノ酸配列を含む V H に記載の V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3、ならびに配列番号 45 のアミノ酸配列を含む V L に記載の V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3、もしくは

(i i i) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む V H に記載の V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3、ならびに配列番号 63 のアミノ酸配列を含む V L に記載の V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3、を含む、前記抗体またはそのフラグメント。

10

【請求項 2】

5 T 4 に結合する抗体またはそのフラグメントであって、

(a) (1) 配列番号 1、7、12、13、及び 18 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V H C D R 1、

(2) 配列番号 2、8、14、19、及び 24 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V H C D R 2、及び

(3) 配列番号 3、9、15、及び 20 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び

20

(b) (1) 配列番号 4、10、16、及び 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 1、

(2) 配列番号 5、11、及び 22 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び

(3) 配列番号 6、17、及び 23 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、を含む、前記抗体またはそのフラグメント。

【請求項 3】

5 T 4 に結合する抗体またはそのフラグメントであって、

(i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び配列番号 4 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、

30

(i i) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び配列番号 10 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、

(i i i) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び配列番号 4 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、

40

(i v) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、

(v) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H

50

領域、及び配列番号 21 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、または

(v i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び配列番号 4 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、を含む、前記抗体またはそのフラグメント。

【請求項 4】

5 T 4 に結合する抗体またはそのフラグメントであって、

(a) (1) 配列番号 27、31、34、35、及び 39 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V H C D R 1、

(2) 配列番号 28、32、36、40、及び 43 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V H C D R 2、及び

(3) 配列番号 29、33、37、及び 41 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び

(b) (1) 配列番号 4、10、16、及び 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 1、

(2) 配列番号 5、11、及び 22 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び

(3) 配列番号 30、38、及び 42 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、を含む、前記抗体またはそのフラグメント。

【請求項 5】

5 T 4 に結合する抗体またはそのフラグメントであって、

(i) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び配列番号 4 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び配列番号 30 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、

(i i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 32 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 33 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び配列番号 10 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び配列番号 30 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、

(i i i) 配列番号 34 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び配列番号 4 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び配列番号 30 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、

(i v) 配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 36 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び配列番号 38 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、

(v) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 40 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む V H 領域、及び配列番号 21 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び配列番号 42 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む V L 領域、または

(v i) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 43 のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を含むVH CDR2、配列番号29のアミノ酸配列を含むVH CDR3、を含むVH領域、及び配列番号4のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を含むVL CDR2、及び配列番号30のアミノ酸配列を含むVL CDR3、を含むVL領域、を含む、前記抗体またはそのフラグメント。

【請求項6】

5T4に結合する抗体またはそのフラグメントであって、

- (a) (1) 配列番号46、50、53、13、及び57からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVH CDR1、
- (2) 配列番号47、51、54、58、及び61からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVH CDR2、及び
- (3) 配列番号48、52、55、及び59からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVH CDR3、を含むVH領域、及び
- (b) (1) 配列番号4、10、16、及び21からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVL CDR1、
- (2) 配列番号5、11、及び22からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVL CDR2、及び
- (3) 配列番号49、56、及び60からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVL CDR3、を含むVL領域、を含む、前記抗体またはそのフラグメント。

10

【請求項7】

5T4に結合する抗体またはそのフラグメントであって、

- (i) 配列番号46のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号47のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号48のアミノ酸配列を含むVH CDR3、を含むVH領域、及び配列番号4のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を含むVL CDR2、及び配列番号49のアミノ酸配列を含むVL CDR3、を含むVL領域、
- (i i) 配列番号50のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号51のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号52のアミノ酸配列を含むVH CDR3、を含むVH領域、及び配列番号10のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号11のアミノ酸配列を含むVL CDR2、及び配列番号49のアミノ酸配列を含むVL CDR3、を含むVL領域、
- (i i i) 配列番号53のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号47のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号48のアミノ酸配列を含むVH CDR3、を含むVH領域、及び配列番号4のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を含むVL CDR2、及び配列番号49のアミノ酸配列を含むVL CDR3、を含むVL領域、
- (i v) 配列番号13のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号54のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号55のアミノ酸配列を含むVH CDR3、を含むVH領域、及び配列番号16のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号11のアミノ酸配列を含むVL CDR2、及び配列番号56のアミノ酸配列を含むVL CDR3、を含むVL領域、
- (v) 配列番号57のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号58のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号59のアミノ酸配列を含むVH CDR3、を含むVH領域、及び配列番号21のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号22のアミノ酸配列を含むVL CDR2、及び配列番号60のアミノ酸配列を含むVL CDR3、を含むVL領域、または
- (v i) 配列番号46のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号61のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号48のアミノ酸配列を含むVH CDR3、を含むVH領域、及び配列番号4のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を含むVL CDR2、及び配列番号49のアミノ酸配列を含むVL CDR3、を含むVL領域、を含む、前記抗体またはそのフラグメント。

20

30

40

50

【請求項 8】

前記抗体またはそのフラグメントが、さらに、配列番号 25、26、44、45、62、及び 63 のいずれか 1 つに記載されるフレームワーク 1 (FR1)、フレームワーク 2 (FR2)、フレームワーク 3 (FR3) 及び／またはフレームワーク 4 (FR4) 配列を含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 9】

前記抗体またはそのフラグメントが、ヒトフレームワーク配列をさらに含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 10】

前記抗体またはそのフラグメントが、

10

(i) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む VH、及び配列番号 26 のアミノ酸配列を含む VL、

(ii) 配列番号 44 のアミノ酸配列を含む VH、及び配列番号 45 のアミノ酸配列を含む VL、または

(iii) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む VH、及び配列番号 63 のアミノ酸配列を含む VL、を含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 11】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 12】

20

前記抗体が、ヒト化抗体、ヒト抗体、またはキメラ抗体である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 13】

Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、(scFv)₂、単鎖抗体分子、二重可変領域抗体、単一可変領域抗体、線状抗体、V 領域、または抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体である、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 14】

診断剤、検出可能な薬剤、または治療剤にコンジュゲートされるか、または組換え的に融合される、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント。

30

【請求項 15】

前記治療剤が、化学療法剤、サイトトキシン、または薬物である、請求項 14 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 16】

請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントと本質的に同じエピトープに結合する結合剤。

【請求項 17】

抗体またはそのフラグメントである、請求項 16 に記載の結合剤。

【請求項 18】

非抗体タンパク質の足場を含む、請求項 16 に記載の結合剤。

40

【請求項 19】

前記非抗体タンパク質の足場は、フィブロネクチン足場、アンチカリン、アドネクチン、アフイボディ、DARPin、フィノマー、アフイチン、アフイリン、アビマー、システインリッチノッティンペプチド、または操作された Kunitz 型阻害剤を含む、請求項 18 に記載の結合剤。

【請求項 20】

ヒト 5T4 に対する結合をめぐって請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントと競合する結合剤。

【請求項 21】

前記結合剤は、抗体またはそのフラグメントである、請求項 20 に記載の結合剤。

50

【請求項 2 2】

請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはそのフラグメントまたは相補ポリヌクレオチドをコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドを含む 1 つ以上のベクター。

【請求項 2 3】

請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントまたは請求項 1 6 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の結合剤、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 2 4】

対象におけるがんまたは腫瘍を治療するための方法であって、前記対象に、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項 2 3 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

10

【請求項 2 5】

対象におけるがんまたは腫瘍に関連する 1 つ以上の症状を緩和するための方法であって、前記対象に、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項 2 3 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 2 6】

腫瘍を有する対象において腫瘍のサイズを減少させるための方法であって、前記対象に、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項 2 3 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 2 7】

腫瘍を有する対象において腫瘍細胞の除去を増強させるための方法であって、前記対象に、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項 2 3 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

20

【請求項 2 8】

対象における 5 T 4 関連の疾患、障害、または状態を治療するための方法であって、前記対象に、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント、または請求項 2 3 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 2 9】

前記対象が、1 つ以上の治療剤を、前記抗体もしくはそのフラグメントまたは前記医薬組成物と組み合わせて投与される、請求項 2 4 ～ 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記対象が、ヒト対象である、請求項 2 4 ～ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 5 月 13 日に提出された米国仮出願第 63 / 341, 944 号の利益を主張する。当該仮出願の全開示は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、その内容全体が参照によって本明細書に組み込まれる、本出願と共に XML ファイルフォーマットで提出されたコンピュータで読み取り可能な配列表を含有する。本出願と共に提出された XML ファイルの配列リストは、「14529-107-228 SEQ LISTING. xml」という名称であり、2023 年 5 月 8 日に作成され、サイズが 102, 425 バイトである。

40

【0 0 0 3】

分野

本開示は概して、ヒト 5 T 4 を含む 5 T 4 に結合する抗体またはそのフラグメントなどの結合剤、及びその使用方法に関する。

【背景技術】

50

【0004】

5 T 4 は、8 個のロイシンリッチリピートを含む N-グリコシル化膜貫通型 72 kDa 糖タンパク質である。5 T 4 は、Wnt 活性化抑制因子 1 または W A I F 1 としても知られ、胎児栄養芽細胞（最初に発見された場所）で、または栄養芽細胞糖タンパク質（TPBG）として発現するため、がん胎児抗原と呼ばれることが多い。5 T 4 は、結腸直腸、卵巣、及び胃を含む腫瘍に見出される。その発現は、予後補助として使用されている。5 T 4 は、正常組織内での発現は非常に限定されているが、悪性腫瘍内ではその発現全体を通して広く分布している。その限定的な発現は、5 T 4 ががん治療の標的となる可能性を与えるように思われるが、5 T 4 を標的とする結合剤及びワクチンによる治療の成功はまだ達成されていない。

10

【0005】

したがって、当技術分野では、5 T 4 を標的化して、5 T 4 を発現する腫瘍細胞が関与するものを含む、5 T 4 媒介性疾患、障害、または状態を治療、予防、または緩和することができる薬剤が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

本開示は、ヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤を提供する。かかる薬剤には、5 T 4 に結合する抗体、例えば、5 T 4 に結合する単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性）抗体及び抗体薬物複合体（ADC）が含まれる。このような結合剤は、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の CDR（例えば、表 1～3）を含む抗体と同じヒト 5 T 4 のエピトープに結合する。このような結合剤は、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体と同じエピトープのヒト 5 T 4 に結合する（例えば、表 1～3）。

20

【0007】

本開示は、5 T 4 結合剤を含む組成物も提供する。かかる組成物は、いくつかの実施形態では、5 T 4 に結合する抗体、例えば、5 T 4 に結合する単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性）抗体及び ADC を含む。かかる組成物は、一部の実施形態では、本明細書に記載の CDR を含む抗体と本質的に同じヒト 5 T 4 のエピトープに結合する抗体及び ADC を含む（例えば、表 1～3）。かかる組成物は、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体と本質的に同じヒト 5 T 4 のエピトープに結合する抗体及び ADC を含む（例えば、表 1～3）。

30

【0008】

本開示はまた、5 T 4 媒介性疾患、障害もしくは状態の 1 つ以上の症状を含む 5 T 4 媒介性疾患、障害もしくは状態を、5 T 4 結合剤または 5 T 4 結合剤を含む組成物で、治療、予防、または緩和する方法も含む。かかる組成物は、5 T 4 に結合する抗体、例えば、5 T 4 に結合する単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性）抗体及び ADC を含む。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図 1A】VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び VL CDR3 を含む mAbA4、mAbA15、及び mAbA17 の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の配列アラインメントを示す。CDR の境界を、Kabat、AbM、Chothia、Contact、IMGT、及び AHon の番号付けによって示している。

40

【図 1B】VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、及び VL CDR3 を含む mAbA4、mAbA15、及び mAbA17 の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の配列アラインメントを示す。CDR の境界を、Kabat、AbM、Chothia、Contact、IMGT、及び AHon の番号付けによって示している。

【発明を実施するための形態】

50

【0010】

本開示は、5 T 4 結合剤を提供する。かかる薬剤には、ヒト 5 T 4 に結合する抗体及び A D C を含む、5 T 4 に結合する抗体（例えば、単一特異性または二重特異性を含む多重特異性）及び A D C が含まれる。かかる結合剤は、5 T 4 媒介性疾患、障害、または状態の 1 つ以上の症状を含む、疾患、障害、または状態を治療、予防、または緩和する組成物及び方法において有用である。5 T 4 媒介性疾患、障害もしくは状態には、腫瘍細胞が 5 T 4 を発現または過剰発現する任意のがんが含まれるがこれらに限定されない様々ながんが含まれる。本明細書で使用される場合、「過剰発現」という用語は、（正常細胞などにおいて）通常よりも多くの遺伝産物を転写及び翻訳することを意味し、そのプロセスはしばしばがん細胞の特徴である。さらに、本明細書に記載の 5 T 4 結合剤、例えば、5 T 4 結合抗体（例えば、単一特異性または二重特異性抗体を含む多重特異性抗体）及び 5 T 4 結合 A D C は、腫瘍細胞の殺傷及び／または除去に有用である。5 T 4 結合抗体（例えば、単一特異性または二重特異性抗体を含む多重特異性抗体）及び 5 T 4 結合 A D C 等の、本明細書に記載の 5 T 4 結合剤は、がんを治療するための組成物及び方法において有用である。

10

【0011】

「5 T 4」という用語は、別途示されない限り、ポリペプチド（本明細書において「ポリペプチド」と「タンパク質」とは互換的に使用される）、または、霊長類（例えば、ヒト、カニクイザル（c y n o）、イヌ、ならびにげっ歯類（例えば、マウス及びラット））等の哺乳類を含むいずれかの脊椎動物源由来のいずれかの天然 5 T 4 を指す。5 T 4、別名「5 T 4 腫瘍栄養芽細胞糖タンパク質」または「W n t 活性化阻害因子 1」または「5 T 4 腫瘍栄養芽細胞糖タンパク質」または「5 T 4 がん胎児抗原」または「W A I F 1」または「M 6 P 1」または「5 T 4 - A G」または 5 T 4 A G」または「T P B G」は、T P B G 遺伝子によってコードされる糖タンパク質である。用語 5 T 4 は、「完全長」5 T 4、ならびに細胞内の処理から生じる 5 T 4 の任意の形態、または任意のそのフラグメントを包含する。いくつかの実施形態では、5 T 4 は、シグナル配列を含む。いくつかの実施形態では、5 T 4 は、シグナル配列を含まない。いくつかの実施形態では、5 T 4 という用語は、5 T 4 細胞外ドメインを含む完全長 5 T 4 のフラグメントを指す。5 T 4 という用語は、5 T 4 の天然に存在する変異型、例えば、S N P、スプライス変異型及び対立遺伝子変異型も包含する。

ヒト 5 T 4 の全長アミノ酸配列を以下に示す（例示的なシグナル配列＝イタリック体、例示的な細胞外ドメイン＝下線）。

20

30

【化 1】

MPGGCSR GPA AGDGR LRLAR LALVLLGWVS SSSPTSSASS FSSSAPFLAS AVSAQPPLPD
QCPALCECSE AARTVKCVNR NLTEVPTDLP AYVRNLFLTG NQLAVLPAGA FARRPPLAEL
AALNLSGSRL DEVRAGAFEH LPSLRQLDLS HNPLADLSPF AFSGSNASVS APSPLVELIL
NHIVPPEDER QNRSFEGMVV AALLAGRALQ GLRRLELASN HFLYLPRDVL AQLPSLRHLD
LSNNSLVSLT YVSFRNLTHL ESLHLEDNAL KVLHNGTLAE LQGLPHIRVF LDNNPWVDCD
HMADMVTWLK ETEVVQ GKDR LTCAYPEKMR NRVLLELNSA DLDCDPILPP SLQTSYVFLG
IVLALIGAIF LLVLYLNRKG IKKWMHNIRD ACRDHMEGYH YRYEINADPR LTNLSSNSDV

40

(配列番号 6 4)

カニクイザル（c y n o）5 T 4 の全長アミノ酸配列を以下に示す（例示的なシグナル配列＝イタリック体、例示的な細胞外ドメイン＝下線）。

50

【化 2】

MPGGCSRGA AGDGRRLRLAR LALVLLGWVS SSSSTSSASS SSSSAPFLAS AASAQPPLPD
QCPALCECSE AARTVKCVNR NLTEVPTDLP LYVRNLFLTG NQLAVLPAGA FARRPPLAEL
AALNLSGSRL DEVRRGAFEH LPSLRQLDLS HNPLAYLSPF AFSGSNASIS APSPLVELIL
NHIVPPDDKR QNRSFEGMVA AALVAGRALQ GLHLEELASN HFLYLPRDVL AQLPSLRYLD
LSNNSLVSLT YVSFRNLTHL ESLHLEDNAL KVLHNGTLAE LQGLPHVRVF LDNNPWVDCD
HMADMVTWLK QTGVVQKDR LTCAFPEKMR NRVLLELNSA DLDCDPILPP SLQTSYVFLG
IVLALIGAIF LLVLYLNRKG IKKWMHNIRD ACRDHMEGYH YRYEINADPR LTNLSSNSDV

(配列番号 6 5)

10

マウス 5 T 4 の全長アミノ酸配列を以下に示す（例示的なシグナル配列＝イタリック体、例示的な細胞外ドメイン＝下線）。

【化 3】

MPGAGSRGPS *AGDGRRLRLAR* *LALVLLGWVS* ASAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE
RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL
EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL
NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP
SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLS LEDNALKVLH NSTLAWEHGL AHVKVFLDNN
PWVDCYIMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT
SYVFLGIVLA LIGAIFLLVL YLNKRGIKKW MHNIRDACRD HMEGYHYRYE INADPRLTNL
SSNSDV

20

(配列番号 6 6)

30

【0012】

本明細書で使用される、「結合剤」という用語またはその文法的等価物は、抗原に結合する 1 つ以上の抗原結合部位を有する分子（例えば、抗体）を指す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の 5 T 4 結合剤は、抗体、抗体フラグメント、または他のペプチドベースの分子、及び抗体、抗体フラグメント、またはペプチドベースの分子の複合体（例えば、ADC）であり、5 T 4、例えば、ヒト 5 T 4 に結合する。

【0013】

「抗体」、「免疫グロブリン」、または「Ig」という用語は、本明細書中で区別なく使用され、最も広い意味で使用され、具体的には、以下に記載されるように、例えば、モノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、中和抗体、全長モノクローナル抗体を含む）、ポリエピトープまたはモノエピトープ特異性を有する抗体組成物、組み換えで生産された抗体、単ドメイン（例えば、VHH）抗体、単一特性抗体多重特異性抗体（二重特異性抗体を含む）、合成抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または全長重鎖及び／または軽鎖を有する抗体のヒト化バージョンを包含する。本明細書で使用される VHH は、重鎖のみの抗体の可変領域由来のドメイン抗体を指す。単ドメイン抗体の例としては、ラクダ科の種（例えば、ラマ）に由来するものなどの軽鎖を天然に欠いている抗体、従来の 4 鎖抗体に由来する単ドメイン抗体、操作された抗体、及び抗体に由来するもの以外の単ドメイン足場が挙げられるが、これらに限定されない。単ドメイン抗体は、限定す

40

50

るものではないが、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤギ、ウサギ、及びウシを含む任意の種に由来し得る。VHHは、軽鎖を天然に欠く重鎖抗体を産生し得るラクダ科動物以外の他の種にも由来し得る。抗体には、5T4結合特性を保持する抗体フラグメント（及び／または抗体フラグメントを含むポリペプチド）も含まれる。抗体フラグメントの非限定的な例としては、抗体の抗原結合領域及び／またはエフェクター領域、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、(scFv)₂、単鎖抗体分子、二重可変ドメイン抗体、単一可変ドメイン、直鎖抗体、V領域、抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体、F(ab)₂、Fd、Fc、ダイアボディ、ジダイアボディ、ジスルフィド結合Fv(dsFv)、単ドメイン抗体（例えば、ナノボディ）または他のフラグメント（例えば、非共有結合している重鎖及び軽鎖の可変領域からなるフラグメント）が挙げられる。一般的に言えば、可変(V)領域ドメインは、免疫グロブリン重鎖(VH)及び／または軽鎖(VL)の可変ドメインの任意の好適な配置であり得る。例えば、抗体には、2つの重鎖分子及び2つの軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖単量体、及び抗体重鎖単量体も含まれる。従って、例えば、V領域ドメインは二量体であり得るとともに、5T4に結合するVHH-VHH、VH-VH、VH-VL、またはVL-VL二量体を含み得る。必要に応じて、VH及びVLは、直接またはリンカーを介してのいずれかで共有結合させて、単鎖Fv(scFv)を形成させてもよい。参照を容易にするために、scFvタンパク質は、本明細書では「抗体フラグメント」のカテゴリーに含まれるものとする。抗体フラグメントの別の形態は、抗体の1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含むペプチドである。CDR（「最小認識単位」または「超可変領域」とも呼ばれる）は、1つ以上の目的のCDRをコードするポリヌクレオチドを構築することによって得ることができる。かかるポリヌクレオチドは、例えば、ポリメラーゼ鎖反応を利用して、テンプレートとして抗体生産細胞のmRNAを使用して可変領域を合成することで調製される（例えば、Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2:106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in *Monoclonal Antibodies Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), page 166, Cambridge University Press (1995); and Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Bircher et al. (eds.), page 137, Wiley-Liss, Inc. (1995)を参照されたい）。抗体フラグメントは、例えば、単ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、新規抗原受容体の可変ドメイン(v-NAR)、及びビス単鎖Fv領域（例えば、Hollinger and Hudson, *Nature Biotechnology*, 23(9):1126-1136, 2005を参照されたい）。いくつかの実施形態では、VH及び／またはVLを含む抗体は、軽鎖及び／または重鎖定常領域、例えば、1つ以上のIgG1、IgG2、IgG3及び／またはIgG4定常領域を含む1つ以上の定常領域を含有する。いくつかの実施形態では、抗体は、上記のうちのいずれかのエピトープ結合フラグメントを含み得る。本明細書に記載される抗体は、免疫グロブリン分子の任意のクラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、及びIgA）または任意のサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）のものであり得る。

【0014】

結合剤（例えば、抗体またはADC）に関して本明細書において使用される場合の「単一特異性」という用語は、1つ以上の結合部位を有し、それらのそれぞれが同じ抗原の同じエピトープに結合する結合剤を指す。

10

20

30

40

50

【0015】

結合剤（例えば、抗体またはADC）に関して使用される場合の「二重特異性」という用語は、結合剤が、少なくとも2つの別個の抗原決定基に特異的に結合することができること、例えば、抗体重鎖可変ドメイン（VH）及び抗体軽鎖可変ドメイン（VL）、またはそれぞれ異なる抗原もしくは同じ抗原上の異なるエピトープに結合するVHHドメインの対によって形成されることを意味する。かかる二重特異性結合剤（例えば、抗体またはADC）は、1+1フォーマット（第1の抗原またはエピトープに対する1つの結合部位及び第2の抗原またはエピトープに対する1つの結合部位を含む）を有し得る。他の二重特異性結合剤（例えば、抗体またはADC）フォーマットは、2+1または1+2フォーマット（第1の抗原またはエピトープ用の2つの結合部位と、第2の抗原またはエピトープ用の1つの結合部位とを含む）または2+2フォーマット（第1の抗原またはエピトープに対する2つの結合部位及び第2の抗原またはエピトープに対する2つの結合部位を含む）であり得る。二重特異性結合剤（例えば、抗体またはADC）が2つの抗原結合部位を含む場合、各々が異なる抗原決定基に結合し得る。かかる二重特異性結合剤（例えば、抗体またはADC）は、同じ抗原上の2つの異なるエピトープ（例えば、5T4上のエピトープ）に結合し得る。

10

【0016】

2つ以上の核酸またはポリペプチドの文脈における「同一の」または「同一性」パーセントという用語は、配列同一性の一部としていかなる保存的アミノ酸置換も考慮せずに、最大の対応関係を得るために比較及びアラインした場合（必要に応じてギャップを導入）、同じであるか、または同じであるヌクレオチドまたはアミノ酸残基を指定の割合で有する2つ以上の配列または部分配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェアまたはアルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定することができる。アミノ酸配列またはヌクレオチド配列のアラインメントを得るために使用できる様々なアルゴリズム及びソフトウェアは、当技術分野で周知である。これらには、BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin Package、及びそれらのバリエーションが含まれるが、これらに限定されない。2つの核酸またはポリペプチドが実質的に同一であるとは、配列比較アルゴリズムを使用してまたは目視検査によって測定し、最大の対応関係を比較及びアラインした場合に、いくつかの実施形態では、それらが少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%の核酸またはアミノ酸残基の同一性を有し、いくつかの実施形態では、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の同一性を有することを意味する。いくつかの実施形態では、同一性は、アミノ酸配列の、少なくとも約10残基、少なくとも約20残基、少なくとも約40～60残基、少なくとも約60～80残基の長さ、またはその間の任意の整数値である領域にわたって存在する。いくつかの実施形態では、同一性は、60～80残基よりも長い領域、例えば、少なくとも約80～100残基にわたって存在し、いくつかの実施形態では、配列は、標的タンパク質または抗体のコード領域などの、比較される配列の全長にわたって実質的に同一である。いくつかの実施形態では、同一性は、少なくとも約10塩基、少なくとも約20塩基、少なくとも約40～60塩基、少なくとも約60～80塩基の長さ、またはそれらの間の任意の整数値であるヌクレオチド配列の領域にわたって存在する。いくつかの実施形態では、同一性は、60～80塩基よりも長い領域、例えば、少なくとも約80～1000塩基以上にわたって存在し、いくつかの実施形態では、配列は、目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列など、比較される配列の全長にわたって実質的に同一である。

20

30

40

【0017】

「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特徴を有する側鎖を有する別のアミノ酸残基に置換されている置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは、一般に当該技術分野において定義されており、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷

50

電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。例えば、フェニルアラニンをチロシンに置換することは保存的置換である。一般に、本開示のポリペプチド、可溶性タンパク質、及び／または抗体の配列における保存的置換は、アミノ酸配列を含有するポリペプチド、可溶性タンパク質、または抗体の標的結合部位への結合を阻害しない。結合を排除しないアミノ酸保存的置換を同定する方法は、当該技術分野において周知である。

10

【0018】

「ポリペプチド」という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは、直鎖状であっても分岐状であってもよく、修飾アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸を含んで（例えば、それによって中断されて）もよい。これらの用語はまた、天然にまたは介入によって修飾されているアミノ酸ポリマー、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは修飾、例えば、標識成分もしくは薬物（例えば、毒素）などの部分とのリンケージまたはコンジュゲーション等（直接的にまたは間接的に）によって修飾されているアミノ酸ポリマーを包含する。この定義に同様に含まれるのは、例えば、アミノ酸（例えば、非天然アミノ酸等を含む）の1つ以上の類似体を含むポリペプチド、及び当技術分野で既知の他の修飾である。本開示のポリペプチドは抗体または免疫グロブリンスーパーファミリーの他のメンバーに基づき得るため、いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、一本鎖または一本鎖の二量体として発生し得ることが理解される。

20

【0019】

本明細書で使用される場合、「抗原」は、結合剤（例えば、抗体またはADC）が結合することができるエピトープを含む部分または分子である。かくして、抗原は抗体によって結合され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の結合剤（例えば、抗体またはADC）が結合する抗原は、5T4（例えば、ヒト5T4）、またはそのフラグメント、例えば、5T4の1つ以上のドメインを含む）である。

【0020】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」は、当技術分野における用語であり、抗体が結合することができる抗原の局在領域を指す。エピトープは、線状エピトープまたは立体構造、非線状、もしくは不連続エピトープであり得る。ポリペプチド抗原の場合、例えば、エピトープは、ポリペプチドの連続したアミノ酸であるか（「線状」エピトープ）、あるいは、エピトープは、ポリペプチドの2つ以上の非連続領域のアミノ酸（「立体構造」、「非線状」または「不連続」エピトープ）、例えばヒト5T4を含み得る。一般に、線状エピトープは、二次、三次、または四次構造に依存する場合もあれば、しない場合もあることが当業者には理解されるであろう。例えば、いくつかの実施形態において、抗体は、天然の三次元タンパク質構造に折り畳まれるかどうかに関係なく、アミノ酸の群に結合する。他の実施形態において、抗体は、エピトープを認識し結合するために、エピトープを構成するアミノ酸残基が特定の立体構造（例えば、屈曲、ねじれ、回転または折り畳み）を示すことを必要とする。

30

40

【0021】

2つの抗体が三次元空間内の同一の、重複する、または隣接するエピトープを認識する場合、抗体は、「エピトープ」または「本質的に同じエピトープ」もしくは「同じエピトープ」に結合する。2つの抗体が三次元空間内の同一のエピトープ、重複するエピトープ、または隣接するエピトープに結合するかどうかを決定するための最も広く使用されている迅速な方法は競合アッセイであり、この競合アッセイは、例えば、標識抗原または標識された抗体のいずれかをを用いた様々な異なるフォーマットで構成され得る。一部のアッセイでは、抗原を96ウェルプレートに固定化するか、または細胞表面に発現させ、標識さ

50

れていない抗体が標識された抗体の結合をブロックする能力を、放射性、蛍光、または酵素標識を使用して測定する。

【0022】

「エピトープビニング」は、抗体が認識するエピトープに基づいて抗体を分類するプロセスである。より具体的には、エピトープビニングは、そのエピトープ認識特性に基づいて抗体をクラスター化し、異なる結合特異性を有する抗体を同定するための計算プロセスと組み合わせた競合アッセイを使用して、異なる抗体のエピトープ認識特性を識別するための方法及びシステムを含む。抗体のエピトープビニング及びエピトープ結合の判定方法に関するさらなる詳細は、実施例5に示すように、本明細書に記載する。

【0023】

本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」、「特異的に認識する」、「免疫特異的に結合する」、「選択的に結合する」、「免疫特異的に認識する」、及び「免疫特異的」という用語は、抗体に関して類似した用語であり、このような結合は当技術分野の当業者によって理解されるため、抗原に結合する分子（例えば、エピトープ）を指す。いくつかの実施形態では、「特異的に結合する」とは、例えば、ポリペプチドまたは分子が、エピトープ、タンパク質、または標的分子に対して、関連する及び関連のないタンパク質を含む代替物質を用いた場合よりもより頻繁に、より迅速に、より長い持続時間で、より高い親和性で、または上記の何らかの組み合わせで相互作用することを意味する、例えば、抗原に特異的に結合する分子は、例えば、イムノアッセイ、Biacore（商標）、KinExA 3000機器（Sapidyne Instruments, Boise, ID）、Octet QK384システム（ForteBio, Menlo Park, CA）、または当技術分野で公知の他のアッセイで決定されるように一般的により低い親和性で他のペプチドまたはポリペプチドに結合し得る。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合ドメインは、ラジオイムノアッセイ（RIA）及び酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）などの実験技法を使用して決定したときに、いずれの交差反応性抗原よりも高い親和性で抗原に結合する場合に、抗原に結合する、または特異的に結合する。典型的に、特異的または選択的な反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍であり、バックグラウンドの10倍を超えてもよい。結合特異性に関する考察については、例えば、Fundamental Immunology 332-36（Paul ed., 2d ed., 1989）を参照されたい。いくつかの実施形態において、「非標的」タンパク質に対する抗体または抗原結合ドメインへの結合の程度は、例えば、蛍光標識細胞分取（FACS）分析またはRIAによって決定される場合、抗体または抗原結合ドメインのその特定の標的抗原に対する結合の約10%未満である。いくつかの実施形態では、抗原に特異的に結合する分子は、これらの分子が別の抗原に結合する場合の K_a よりも少なくとも2 log、2.5 log、3 log、4 log、またはそれより大きい K_a で抗原に結合する。いくつかの実施形態では、抗原に特異的に結合する分子は、他のタンパク質とは交差反応しない。別の特定の実施形態では、抗原に特異的に結合する分子は、他の非5 T4タンパク質と交差反応しない。いくつかの実施形態では、「特異的に結合する」とは、例えば、ポリペプチドまたは分子が、タンパク質または標的に約0.1 mM以下、しかしより通常は約1 μ M未満の K_D で結合することを意味する。いくつかの実施形態では、「特異的に結合する」とは、ポリペプチドまたは分子が、標的に少なくとも約0.1 μ M以下、少なくとも約0.01 μ M以下、または少なくとも約1 nM以下の K_D で結合することを意味する。異なる種における相同なタンパク質間の配列同一性のため、特異的結合は、複数の種においてタンパク質または標的を認識するポリペプチドまたは分子を含み得る。同様に、異なるタンパク質のポリペプチド配列のある特定の領域内での相同性のために、特異的結合は、複数のタンパク質または標的を認識するポリペプチドまたは分子を含み得る。いくつかの実施形態では、第1の標的に特異的に結合するポリペプチドまたは分子は、第2の標的に特異的に結合してもよいし、または結合しなくてもよいことが理解される。したがって、「特異的結合」は、排他的結合、例えば、単一の標的への結合を必ずしも必要としない（ただし、それを含むことができる）。したが

10

20

30

40

50

って、いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたは分子は、複数の標的に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態では、複数の標的は、ポリペプチドまたは分子上の同じ抗原結合部位によって結合され得る。例えば、特定の場合では、抗体は、2つの同一の抗原結合部位を含むことができ、その各々は、2つ以上のタンパク質上の同じエピトープに特異的に結合する。特定の別の実施形態では、抗体は二重特異性であり得、特異性の異なる少なくとも2つの抗原結合部位を含むことができる。概して、必ずしもではないが、「結合」への言及は、「特異的結合」を意味する。

【0024】

「結合親和性」は、一般に、分子（例えば、抗体またはADCなどの結合剤）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、5T4などの抗原）との間の非共有相互作用の総計の強度を指す。別途指定されない限り、本明細書で使用されるとき、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体および抗原）間の1:1の相互作用を反映する、本来の結合親和性を指す。結合分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数(K_D)で表し得る。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は、一般に、抗原にゆっくり結合し、容易に解離する傾向があるが、高親和性抗体は、一般に、抗原により早く結合し、より長く結合したままである傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当技術分野で既知であり、これらのいずれも、本開示の目的のために使用することができる。一実施形態では、「 K_D 」または「 K_D 値」は、例えばOctet QK384システム（*FortéBio, Menlo Park, CA*）を使用したバイオレイヤー干渉法（BLI）によって測定することができる。別の方法として、 K_D はまた、例えば、目的の抗体のFabバージョン及びその抗原で行われる、放射性標識抗原結合アッセイ（RIA）で測定してもよい（*Chen et al., (1999) J. Mol Biol 293: 865-881*）によって、または、例えば、BIACORE（商標）-2000またはBIACORE（商標）-3000（BIACORE, Inc., *Piscataway, NJ*）を使用して、BIACORE（商標）による表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイを使用して行ってもよい。「オンレート」または「結合の速度」または「結合速度」または「 k_{on} 」、ならびに「オフレート」または「解離の速度」または「解離速度」または「 k_{off} 」は、また、例えば、それぞれ、Octet QK384システム（*FortéBio, Menlo Park, CA*）またはBIACORE（商標）-2000もしくはBIACORE（商標）-3000（BIACORE（商標）, Inc., *Piscataway, NJ*）を使用して、上記に記載されているのと同じSPRまたはBLI技術によって決定することもできる。

【0025】

5T4結合剤（例えば、抗体またはADC）に関して使用される場合、「競合」という用語は、標的上の同じエピトープまたは結合部位をめぐる競合する結合剤を意味し、これには、試験中の結合剤が、共通抗原（例えば、5T4）に対する参照分子（例えば、参照リガンド、または参照抗体等の参照抗原結合タンパク質）の特異的結合を防止または阻害するアッセイによって決定される、そのような結合剤間の競合が含まれる。試験結合剤が5T4（例えば、ヒト5T4）に対する結合をめぐる参照分子と競合するか否かを判定するために、多数の種類の競合的結合アッセイを使用することができる。使用することができるアッセイの例としては、固相直接または間接ラジオイムノアッセイ（RIA）、固相直接または間接酵素イムノアッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（例えば、*Stahli et al., (1983) Methods in Enzymology 9: 242-253*）、固相直接ビオチン-アビジンEIA（例えば、*Kirkland et al., (1986) J. Immunol. 137: 3614-3619*、または*Cheung et al., (1990) Virology 176: 546-552*を参照されたい）、固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ（例えば、*Harlow and Lane, (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pre*

ssを参照されたい)、I-125標識を使用した固相直接標識RIA(例えば、Morel et al., (1988) Molec. Immunol. 25:7-15)、及び直接標識RIA(Moldenhauer et al., (1990) Scand. J. Immunol. 32:77-82を参照されたい)が含まれる。通常、かかるアッセイは、標識されていない試験抗原結合タンパク質(例えば、試験5T4抗体もしくはADC)または標識された抗原結合タンパク質(例えば、参照5T4抗体もしくはADC)のいずれかを有する固相表面または細胞に結合した精製抗原(例えば、ヒト5T4などの5T4)の使用を伴う。競合阻害は、試験抗原結合タンパク質の存在下で、固相表面または細胞に結合する標識の量を決定することによって測定することができる。通常、試験抗原結合タンパク質は過剰に存在する。競合アッセイによって同定される抗体(競合抗体)には、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体、及び/または抗体の立体障害が生じるための参照によって結合されるエピトープに十分に近い隣接エピトープに結合する抗体(例えば、類似のエピトープ重複するエピトープ)が含まれる。通常、競合抗体が過剰に存在すると、共通抗原に対する参照抗体の特異的結合が少なくとも20%、例えば、少なくとも20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、または75%阻害される。場合によっては、結合は、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上阻害される。

10

【0026】

本明細書において使用される「定常領域」または「定常ドメイン」という用語は、当技術分野において周知の抗体の用語であり、抗体の部分、例えば抗体の抗原への結合には直接関与しないが、Fc受容体との相互作用などの様々なエフェクター機能を呈する、軽鎖及び/または重鎖のカルボキシ末端部分を指す。この用語は、免疫グロブリン可変ドメインと比較して、一般的により保存されたアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子の部分を含む。

20

【0027】

抗体の「エフェクター機能」は、抗体のFc領域(例えば、天然配列のFc領域またはアミノ酸配列変異形Fc領域)に帰属する生物学的活性を指し、抗体のアイソタイプに応じて多様である。抗体のエフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞毒性、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)、ファゴサイトーシス、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方制御、ならびにB細胞活性化が挙げられる。

30

【0028】

本明細書における「Fc領域」という用語は、例えば、天然配列Fc領域、組み換えFc領域、及びバリエーションFc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界はさまざまに異なり得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域はしばしば、Cys226位(EU番号付けシステムによる)、またはPro230(EU番号付けシステムによる)のアミノ酸残基からそのカルボキシル末端まで延びると定義される。Fc領域のC末端リシン(EU番号付けシステムに従った残基447)は、例えば、抗体の産生もしくは精製時に、または抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え操作することによって、除去することができる。例示的なFc領域の配列を以下に提供する(CH2ドメイン=太字、CH3ドメイン=下線)。

40

【化 4】

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番

号 67)。

10

【0029】

「機能的 F c 領域」は、天然配列 F c 領域の「エフェクター機能」を有する。例示的な「エフェクター機能」としては、C1q 結合、補体依存性細胞傷害 (CDC)、F c 受容体結合、抗体依存性細胞傷害 (ADCC)、ファゴシトシス、細胞表面受容体 (例えば、B 細胞受容体、BCR) のダウンレギュレーションなどが挙げられる。これらのようなエフェクター機能は、F c 領域が結合領域または結合ドメイン (例えば、抗体可変領域またはドメイン) と組み合わせられることを一般的に必要とし、本明細書に開示されるようなさまざまなアッセイを使用して評価することが可能である。

【0030】

「天然配列 F c 領域」は、自然界に見出される F c 領域のアミノ酸配列と同一であり、人為的な操作、修飾及び／または変更 (例えば、単離、精製、選択、可変領域配列などの他の配列を含めるかまたはこれと組み合わせること) が行われていないアミノ酸配列を含む。天然配列ヒト F c 領域には、天然配列ヒト IgG1 の F c 領域 (非 A 及び A アロタイプ)、天然配列ヒト IgG2 の F c 領域、天然配列ヒト IgG3 の F c 領域、及び天然配列ヒト IgG4 の F c 領域、ならびにそれらの天然のバリエーションが含まれる。

20

【0031】

「バリエーション F c 領域」は、少なくとも 1 つのアミノ酸改変 (例えば、置換、付加、または欠失)、好ましくは 1 つ以上のアミノ酸置換 (複数可) によって天然配列 F c 領域のものとは異なるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、バリエーション F c 領域は、天然配列 F c 領域または親ポリペプチドの F c 領域と比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換、例えば、天然配列 F c 領域中または親ポリペプチドの F c 領域中に約 1 ～約 10 個のアミノ酸置換、好ましくは約 1 ～約 5 個のアミノ酸置換を有する。本明細書におけるバリエーション F c 領域は、天然配列 F c 領域及び／または親ポリペプチドの F c 領域と少なくとも約 80% の同一性、または少なくとも約 90% の同一性、例えば、少なくとも約 95% の同一性を有し得る。本明細書に記載されるバリエーション F c 領域は、エフェクター機能の喪失を有し得る (例えば、サイレント F c)。例示的なバリエーション F c 領域 (「サイレント F c」) 配列を以下に提供する (CH2 ドメイン = 太字でアミノ酸変化に下線、CH3 ドメイン = 下線テキスト)。

30

【化 5】

CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALKA¹APIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番

号 68)。

40

【0032】

本明細書において使用される「重鎖」という用語は、抗体に関して使用される場合、約

50

50～70 kDaのポリペプチド鎖を指し、アミノ末端部分は、約120～130以上のアミノ酸の変換領域を含み、カルボキシ末端部分は、1つ以上の定常領域を含む。「重鎖」とは、例えば、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、任意の別個のタイプ、例えば、アルファ（ α ）、デルタ（ δ ）、イプシロン（ ϵ ）、ガンマ（ γ ）、及びミュー（ μ ）を指し得る。これらはそれぞれ、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMクラスの抗体を生じさせ、IgGのサブクラス、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む。

【0033】

本明細書に使用される「軽鎖」という用語は、抗体に関して使用される場合、約25 kDaのポリペプチド鎖を指し、アミノ末端部分は、約100～約110以上のアミノ酸の変換領域を含み、カルボキシ末端部分は、定常領域を含む。軽鎖のおおよその長さは、211～217アミノ酸である。定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、例えば、カッパ（ κ ）またはラムダ（ λ ）の2つの異なるタイプがある。軽鎖アミノ酸配列は、当技術分野で周知である。

【0034】

「抗原結合フラグメント」、「抗原結合ドメイン」、「抗原結合領域」という用語、及び同様の用語は、抗原と相互作用して結合フラグメント、ドメイン、または領域に、抗原（例えば、CDR）に対するその特異性と親和性を付与するアミノ酸残基を含む抗体の部分を指す。本明細書で使用される「抗原結合性フラグメント」には、抗体の抗原結合性または変換領域などの1つ以上のCDRを含む抗体の部分を含む「抗体フラグメント」が含まれる。

【0035】

本明細書に記載される抗体としては、これらに限定されるものではないが、合成抗体、モノクローナル抗体、組換えにより作製された抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体を含む）、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、イントラボディ、単鎖Fv（scFv）（例えば、単一特異性、二重特異性などを含む）、ラクダ化抗体、Fabフラグメント、F（ab'）フラグメント、ジスルフィド結合Fv（sdFv）、抗イディオタイプ（抗Id）抗体、及び上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが挙げられる。

【0036】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体には、免疫グロブリン分子、及び5T4抗原に結合する1つ以上の抗原結合部位を含有する分子を含む免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分が含まれる。

【0037】

抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAまたはIgY）、任意のクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、またはIgA2）、または任意のサブクラス（例えば、IgG2aまたはIgG2b）のものであり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体は、IgG抗体（例えば、ヒトIgG）、またはそのクラス（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4）もしくはそのサブクラスのものである。

【0038】

いくつかの実施形態では、抗体は、2つの重（H）鎖／軽（L）鎖の対を含む4本鎖の抗体ユニットであり、H鎖のアミノ酸配列は同一であり、L鎖のアミノ酸配列は、同一である。いくつかの実施形態では、抗体は、VHH-VHH対を含む2本鎖の抗体ユニットであり、VHHのアミノ酸配列は同一である。いくつかの実施形態では、H及び／またはL鎖は、定常領域、例えば、ヒト定常領域を含む。いくつかの実施形態では、かかる抗体のL鎖定常領域は、カッパまたはラムダ軽鎖定常領域、例えば、ヒトカッパまたはラムダ軽鎖定常領域である。いくつかの実施形態では、かかる抗体のH鎖定常領域は、ガンマ重鎖定常領域、例えば、ヒトガンマ重鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態では、かかる抗体は、IgG定常領域、例えば、ヒトIgG定常領域（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及び／またはIgG4定常領域）を含む。

10

20

30

40

50

【0039】

抗体またはそのフラグメントは、ヒト5T4などの5T4に優先的に結合することができ、これは、抗体またはそのフラグメントが、5T4に、無関係の対照タンパク質に結合するよりも高い親和性で結合する、及び／またはヒト5T4に、無関係の対照タンパク質に結合するよりも高い親和性で結合することを意味する。例えば、抗体またはそのフラグメントは、5T4またはその一部を特異的に認識し、結合することができる。「特異的結合」とは、抗体またはそのフラグメントが、5T4に、無関係の対照タンパク質（例えば、ニワトリ卵白リゾチーム）に対する親和性よりも少なくとも5、10、15、20、25、50、100、250、500、1000、または10,000倍高い親和性で結合することを意味する。いくつかの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、5T4に実質的に排他的に結合することができる（例えば、結合親和性における測定可能な差によって、5T4を他の既知のポリペプチドと区別することができる）。いくつかの実施形態では、5T4結合剤（例えば、抗体またはADC）は、ヒト5T4配列以外の5T4配列（例えば、カニクイザル5T4配列）と反応することができる。

10

【0040】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、一般に軽鎖または重鎖のアミノ末端に位置し、重鎖が約120～130アミノ酸及び軽鎖が約100～110アミノ酸の長さを有する抗体の軽鎖または重鎖の部分を指し、特定の抗体のそれぞれの特定の抗原に対する結合及び特異性に使用される。重鎖の可変領域は、「VH」と称され得る。軽鎖の可変領域は、「VL」と称され得る。「可変」という用語は、可変領域のある特定のセグメントの配列が抗体間で大きく異なるという事実を指す。V領域は、抗原結合を媒介し、特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定義する。しかしながら、可変性は、可変領域の110アミノ酸範囲全体に均一に分散しているわけではない。むしろ、V領域は、「超可変領域」あるいは「相補性決定領域」と呼ばれる可変性のより大きい（例えば、極端な可変性の）短い領域によって隔てられた、約15～30アミノ酸のフレームワーク領域（FR）と呼ばれる可変性の低い（例えば、比較的不变である）ストレッチからなる。重鎖及び軽鎖の可変領域はそれぞれ、4つのフレームワーク（FR1、FR2、FR3及びFR4）を含み、これらのフレームワークは、βシート立体配置を主に採用し、3つの超可変領域によって接続され、これらの超可変領域は、βシート構造を接続するループを形成し、場合により、βシート構造の一部を形成する。各鎖における超可変領域は、フレームワークによって近接して一緒に保持されており、他の鎖の超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している（例えば、Kabata et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照されたい）。定常領域は、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、抗体の抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC）への関与などの様々なエフェクター機能を呈する。可変領域は、異なる抗体間で配列が大きく異なる。配列の可変性はCDRに集中している一方、可変領域の可変性の低い部分は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。軽鎖及び重鎖のCDRは、抗体と抗原との相互作用を主として担う。具体的実施形態において、可変領域は、ヒト可変領域である。

20

30

40

【0041】

本明細書で使用されるとき、「超可変領域」、「HVR」、「HV」、「相補性決定領域」または「CDR」という用語は、配列が超可変性であり、及び／または構造的に定義されたループを形成する抗体可変領域の領域を指す。一般に、抗体は、6つの超可変領域を含み、VHに3つ（H1またはVH CDR1、H2またはVH CDR2、H3またはVH CDR3）、及びVLに3つ（L1またはVL CDR1、L2またはVL CDR2、L3またはVL CDR3）を含む。いくつかの超可変領域記述法が使用されており、本明細書に包含される。Kabata CDRは、配列可変性に基づくものであり、最もよく使用されている（例えば、Kabata et al., Sequences

50

of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照されたい)。Chothiaはその代わりに、構造ループの位置を指す（例えば、Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)を参照されたい)。Kabatナンバリング規則を用いてナンバリングした場合、Chothia CDR-H1ループの末端は、ループの長さに応じてH32とH34の間で異なる（これは、KabatナンバリングスキームがH35AとH35Bに挿入を置くためであり、35Aも35Bも存在しない場合、このループは32で終わり、35Aのみが存在する場合、このループは33で終わり、35A及び35Bの両方が存在する場合、このループは34で終わる）。AbM超可変領域は、Kabat CDRとChothia構造ループとの間の妥協案を示すものであり、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアで使用されている（例えば、Martin, in Antibody Engineering Vol. 2, Chapter 3, Springer Verlagを参照されたい）。「Contact」超可変領域は、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらの超可変領域の各々に由来する残基を以下に示す。

10

【0042】

ユニバーサルナンバリングシステムは、開発され、広く採用されている（ImmunoGenetics (IMGT (登録商標)) Information System (Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27 (1): 55-77 (2003))。IMGTは、ヒト及び他の脊椎動物の免疫グロブリン（IG）、T細胞受容体（TR）、及び主要組織適合遺伝子複合体（MHC）に特化した総合情報システムである。本明細書において、CDRは、アミノ酸配列と、軽鎖または重鎖内での位置の両方について参照される。免疫グロブリン可変ドメインの構造内のCDRの「位置」は、種間で保存されており、ループと呼ばれる構造で存在していることから、構造的な特徴に従って可変ドメイン配列を整列させるナンバリングシステムを使用することによって、CDR及びフレームワーク残基は、容易に特定される。この情報は、ある種の免疫グロブリンに由来するCDR残基を、典型的にはヒト抗体に由来するアクセプターフレームワークにグラフト化及び置換する際に使用することができる。更なるナンバリングシステム（AHon）がHonegger and Pluckthun, J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001)によって開発されている。例えば、Kabatナンバリング及びIMGT独自ナンバリングシステムを含む、ナンバリングシステム間の対応関係は、当業者によく知られており、（例えば、Kabat（上掲）；Chothia and Lesk（上掲）；Martin（上掲）；Lefranc et al.（上掲）を参照されたい）下記にも説明される。当技術分野で知られている、または本明細書に記載されている様々なシステムは、CDRを画定する異なる方法を表しており、それらが同じ抗体を定義するために使用される場合、それらは同等であると見なされることが多い。本明細書に示される例示的なシステムは、KabatとChothiaを組み合わせたものである。

20

30

40

【表11】

	例	IMGT(登録商標)	Kabat	AbM	Chothia	Contact
V _H CDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

50

【0043】

超可変領域は、次の「伸長超可変領域」を含み得る：V_Lでは24～36または24～34（L₁）、46～56または50～56（L₂）、及び89～97または89～96（L₃）、ならびにV_Hでは26～35または26～35A（H₁）、50～65または49～65（H₂）、及び93～102、94～102、または95～102（H₃）。本明細書に使用される用語「超可変領域」、「HVR」、「HV」、「相補性決定領域」または「CDR」は互換的に使用される。

【0044】

「ベクター」という用語は、例えば、核酸配列を宿主細胞に導入するため、を含む、核酸配列を運搬または含むために使用される物質を指す。使用に適用可能なベクターとしては、例えば、発現ベクター、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター、エピソーム、及び人工染色体が挙げられ、宿主細胞の染色体に安定的に組み込むための選択配列または選択マーカーを含み得る。更に、ベクターは、1つ以上の選択マーカー遺伝子及び適切な発現制御配列を含み得る。含めることができる選択マーカー遺伝子は、例えば、抗生物質もしくは毒素に対する耐性を付与し、栄養要求性欠損を補完し、または培地中にはない重要な栄養素を供給する。発現制御配列は、当技術分野においてよく知られている構成的及び／または誘導性プロモーター、転写エンハンサー、転写ターミネーターなどを含み得る。2つ以上の核酸分子（例えば、抗体重鎖と軽鎖または抗体V_HとV_Lの両方）が共発現される場合、両方の核酸分子は、例えば、単一の発現ベクターまたは別個の発現ベクターに挿入され得る。単一のベクター発現の場合、コード核酸は、1つの共通する発現制御配列に機能的に連結されるか、または1つの誘導性プロモーター及び1つの構成的プロモーターなどの異なる発現制御配列に連結され得る。核酸分子の宿主細胞への導入は、当技術分野においてよく知られている方法を使用して確認することができる。そのような方法には、例えば、mRNAのノーザンブロットもしくはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅などの核酸分析、遺伝子産物の発現に関する免疫ブロット法、または導入された核酸配列もしくはその対応する遺伝子産物の発現を試験するのに好適な他の分析方法が含まれる。当業者は、核酸分子が所望の産物（例えば、本明細書に記載の5T4結合剤）を産生するのに十分な量で発現されることを理解し、更に、当技術分野においてよく知られている方法を使用して十分な発現が得られるように発現レベルを最適化することができることも理解している。

【0045】

「5T4媒介性疾患」、「5T4媒介性障害」、及び「5T4媒介性状態」は、互換的に使用され、5T4発現腫瘍細胞などの、5T4発現細胞に関連するまたはそれを特徴とする任意の疾患、障害または状態を指す。5T4媒介性疾患としては、5T4を発現または過剰発現するがんが含まれるがこれらに限定されないがんが挙げられる。

【0046】

「有効量」は、一般に、症状の重症度及び／または頻度を減少させ、症状及び／または根本的な原因を排除し、症状及び／またはその根本的な原因の発生を予防し、及び／または疾患、障害、もしくは状態に起因するか、またはそれに関連する損傷を改善または修復するのに十分な量である。いくつかの実施形態において、有効量とは、治療有効量または予防有効量である。

【0047】

「治療有効量」という用語は、本明細書で使用する場合、所定の疾患、障害もしくは状態、及び／またはそれに関連する症状の重症度及び／または期間を低減及び／または改善するのに充分である、薬剤（例えば、本明細書に記載の抗体またはADCまたは本明細に記載のいずれかの他の薬剤）の量を指す。治療剤を含む薬剤の治療上有効量は、（i）所定の疾患、障害、または状態の進行もしくは憎悪の低減もしくは改善、（ii）所定の疾患、障害もしくは状態の再発、発達もしくは発症の低減もしくは改善、及び／または（iii）別の療法（例えば、本明細書に記載の抗体またはADCの投与以外の療法）の予防または治療効果の向上または増進、に必要な量であり得る。本開示の物質／分子／薬剤（

例えば、5 T 4 抗体または A D C) の「治療有効量」は、個体の病態、年齢、性別、及び体重、及び個体において所望の応答を誘発する物質／分子／薬剤の能力等のいくつかの因子に基づいて変化し得る。治療有効量は、その物質／分子／薬剤のいかなる毒性または有害効果も治療有益な効果が上回る量を包含する。特定の実施形態では、「治療有効量」という用語は、対象または哺乳動物において、疾患、障害、または状態を「治療する」のに有効な抗体または他の薬剤（例えば、A D C または薬物）の量を指す。

【0048】

「予防有効量」は、対象に投与されたときに、例えば、疾患、障害もしくは状態の発症（もしくは再発）の予防もしくは遅延、あるいは疾患、障害もしくは状態、または関連する症状（複数可）の発症（もしくは再発）の可能性の低減などの、意図される予防効果を有するであろう薬物の量である。

10

【0049】

完全な治療または予防効果は、1 用量の投与によって必ずしも生じるとは限らず、一連の用量の投与後にのみ生じる場合もある。したがって、治療または予防有効量は、1 回以上の投与で投与してもよい。

【0050】

本明細書で使用される「薬学的に許容される」という用語は、動物における使用、より具体的にはヒトにおける使用について、連邦政府もしくは州政府の規制機関によって承認されているか、または米国薬局方、欧州薬局方、もしくは他の一般に認知されている薬局方に収載されていることを意味する。

20

【0051】

本明細書で使用される「担体」は、用いられる投与量及び濃度でそれに曝露されている細胞または哺乳動物に非毒性の薬学的に許容される担体、賦形剤、安定剤、または防腐剤を含む。多くの場合、担体は、p H 緩衝水溶液である。担体の例としては、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（例えば、約 10 アミノ酸残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、もしくはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む単糖、二糖、及び他の炭水化物；E D T A などのキレート剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；及び／または T W E E N（商標）、ポリエチレングリコール（P E G）、及び P L U R O N I C S（商標）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。「担体」という用語は、それらとともに治療薬が投与される希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント（完全または不完全））、賦形剤、またはビヒクルも指し得る。かかる担体は、水及び油などの滅菌された液体であてよく、石油、動物、植物、または合成由来のもの、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などを含む。水は、組成物（例えば、医薬組成物）が静脈内投与される場合の例示的な担体である。生理食塩水ならびに水性デキストロース及びグリセロール溶液はまた、液体担体、特に注射可能な溶液として使用することができる。適当な賦形剤（例えば、薬学的賦形剤）としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物はまた、必要に応じて、微量の湿潤剤または乳化剤、または p H 緩衝剤を含有し得る。組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性製剤などの形態を有することができる。製剤を含む経口組成物は、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含むことができる。適当な担体の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences（1990）Mack Publishing Co., Easton, P A. に記載されている。医薬化合物を含む組成物は、例えば、単離または精製された形態の予防的または治療

30

40

50

的有効量の 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）を、対象（例えば、患者）に適切に投与するための形態を与えるのに適当な量の担体とともに含むことができる。製剤は、投与様式に適したものである必要がある。

【0052】

いくつかの実施形態では、本開示は、治療剤として本明細書で使用され得る 5 T 4 結合剤を提供する。かかる薬剤には、ヒト 5 T 4 に結合する抗体（例えば、単一特異性または二重特異性を含む多重特異性）及び A D C が含まれる。例示的な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、ヒト、二重特異性、及びヘテロコンジュゲート抗体、ならびに親和性または他の特性の増加または減少を有するそれらのバリエーションが含まれる。

【0053】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、5 T 4 ポリペプチド、5 T 4 ポリペプチドフラグメント、5 T 4 ペプチドまたは 5 T 4 エピトープを含む、5 T 4 に結合する 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）である。いくつかの実施形態では、5 T 4 結合剤は、5 T 4 ポリペプチド、5 T 4 ポリペプチドフラグメント、5 T 4 ペプチドまたは 5 T 4 エピトープを含む、5 T 4 に結合するヒトまたはヒト化抗体（例えば、ヒト定常領域を含む）である。いくつかの実施形態では、ヒト 5 T 4 結合剤などの 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）は、5 T 4 発現腫瘍細胞を含む哺乳類（例えば、ヒト）細胞の表面で発現される 5 T 4 に結合することができる。いくつかの実施形態では、5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）は、腫瘍細胞等の細胞で発現する 5 T 4 細胞外エピトープ（例えば、5 T 4 エピトープ）に結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、ヒト 5 T 4 またはその一部などの 5 T 4 に結合する 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）である。いくつかの実施形態では、5 T 4 は、ヒト 5 T 4 である。いくつかの実施形態では、5 T 4 結合剤は、ヒト 5 T 4 結合剤（例えば、ヒト 5 T 4 に結合する抗体または A D C）である。ヒト 5 T 4 の例示的なアミノ酸配列を本明細書に記載する。

【0054】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）は、ヒト 5 T 4 などの 5 T 4 への結合を、表 1～3 に示される V H 領域、V L 領域、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 のアミノ酸配列などの、本明細書に記載されるいずれか 1 つの抗体の V H 領域、V L 領域、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 を含む 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）と競合する。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）は、ヒト 5 T 4 などの 5 T 4 への結合をめぐって、表 1～3 に示される（a）m A b A 4 と特定される抗体、（b）m A b A 1 5 と特定される抗体、及び（c）m A b A 1 7 と特定される抗体からの 1、2、及び／または 3 つの V H C D R 及び／または 1、2、及び／または 3 つの V L C D R を含む 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）と競合する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）は、ヒト 5 T 4 などの 5 T 4 への結合をめぐって、表 1～3 に示される（a）m A b A 4 と特定される抗体、（b）m A b A 1 5 と特定される抗体、及び（c）m A b A 1 7 と特定される抗体からの 1、2、及び／または 3 つの V H C D R 及び 1、2、及び／または 3 つの V L C D R を含む 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）と競合する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）は、ヒト 5 T 4 などの 5 T 4 への結合をめぐって、（a）配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む V H 領域及び配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む V L 領域、（b）配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V H

10

20

30

40

50

領域及び配列番号 45 のアミノ酸配列を含む V L 領域、及び (c) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む V H 領域及び配列番号 63 のアミノ酸配列を含む V L 領域を含む 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体または A D C) と競合する。

【0055】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体) は、本明細書に記載するいずれか 1 つの抗体の V H 領域、V L 領域、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3、例えば、表 1～3 に示される V H 領域、V L 領域、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 のアミノ酸配列を含む。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体または A D C) は、表 1～3 に示される (a) m A b A 4 と特定される抗体、(b) m A b A 15 と特定される抗体、及び (c) m A b A 17 と特定される抗体からの 1、2、及び／または 3 つの重鎖 C D R 及び／または 1、2、及び／または 3 つの軽鎖 C D R を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体または A D C) は、(a) m A b A 4 と特定される抗体、(b) m A b A 15 と特定される抗体、及び (c) m A b A 17 と特定される抗体からの 1、2、及び／または 3 つの重鎖 C D R 及び 1、2、及び／または 3 つの軽鎖 C D R を含む。

10

【0056】

いくつかの実施形態では、5 T 4 結合剤 (例えば、抗体または A D C) は、本明細書に記載の結合剤のいずれか 1 つ (例えば、表 1～3 のいずれか 1 つを参照されたい) の V H C D R 1、V H C D R 2、及び／または V H C D R 3 を含む V H 領域、及び／または V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 を含む V L 領域を含む。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体または A D C) は、表 1 の 1 つ、2 つ、及び／または 3 つの重鎖 C D R 及び／または 1 つ、2 つ、及び／または 3 つの軽鎖 C D R を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体または A D C) は、表 2 の 1、2、及び／または 3 つの重鎖 C D R 及び／または 1、2、及び／または 3 つの軽鎖 C D R を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体または A D C) は、表 3 の 1、2、及び／または 3 つの重鎖 C D R 及び／または 1、2、及び／または 3 つの軽鎖 C D R を含む。

20

30

【0057】

m A b A 4 と特定される抗体は、配列番号 25 の V H 配列及び配列番号 26 の V L 配列を含む。

【0058】

m A b A 15 と特定される抗体は、配列番号 44 の V H 配列及び配列番号 45 の V L 配列を含む。

【0059】

m A b A 17 と特定される抗体は、配列番号 62 の V H 配列及び配列番号 63 の V L 配列を含む。

40

【表 1 - 1】

表 1 : 抗体mAbA4

		例	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH C DR1	VH C DR2	GFTFSRY IH (配列番号1)	GFTFSRY Y (配列番号7)	RYYIH (配列番号12)	GFTFSRY (配列番号13)	SRYYIH (配列番号18)	GFTFSRY YIH (配列番号1)
		FISPGGSY TYYADSVK G (配列番号2)	ISPGGSY T (配列番号8)	FISPGGSY TYYADSVK G (配列番号2)	PGGG (配列番号14)	WVAFISPG GSYTY (配列番号19)	FISPGGS YTY (配列番号2 4)
		EYYSMGVL DY (配列番号3)	AREYYSM GVLDY (配列番号9)	EYYSMGVL DY (配列番号3)	YYSMGVLD (配列番号15)	AREYYSMG VLD (配列番号20)	EYYSMGV LDY (配列番号3)
VL C DR1	VL C DR2	RASQSVSS AVA (配列番号4)	QSVSSA (配列番号1 0)	RASQSVSS AVA (配列番号4)	SQSVSSA (配列番号16)	SSAVAWY (配列番号21)	RASQSVS SAVA (配列番号4)
		SASSLYS (配列番号5)	SAS (配列番号1 1)	SASSLYS (配列番号5)	SAS (配列番号11)	LLIYSASS LY (配列番号22)	SASSLYS (配列番号5)
		QQAYESPY T (配列番号6)	QQAYESP YT (配列番号6)	QQAYESPY T (配列番号6)	AYESPY (配列番号17)	QQAYESPY (配列番号23)	QQAYESP YT (配列番号6)

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

VH配列： EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSRYYIHWVRQAPGKGLEWVAFISPGGSYTTYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYYSMGVLDYWGQGTLVTVSS (配列番号 25)	VL配列： DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYESPYTFGGGTKVEIK (配列番号26)
--	--

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2 : 抗体mAb A15

		例	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH C DR1	VH C DR2	GFTFSSYY IH (配列番号27)	GFTFSSY Y (配列番号31)	SSYYIH (配列番号34)	GFTFSSY (配列番号35)	SSYYIH (配列番号39)	GFTFSSY YIH (配列番号27)
		YITSTGSY TEYADSVK G (配列番号28)	ITSTGSY T (配列番号32)	YITSTGSY TEYADSVK G (配列番号28)	STGS (配列番号36)	WVAYITST GSYTE (配列番号40)	YITSTGS YTE (配列番号43)
		YDRSTRYS GLDY (配列番号29)	ARYDRST RYSGLDY (配列番号33)	YDRSTRYS GLDY (配列番号29)	DRSTRYS LD (配列番号37)	ARYDRSTR YSGLD (配列番号41)	YDRSTRY SGLDY (配列番号29)

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

VL C DR 1	RASQSVSS AVA (配列番号4)	QSVSSA (配列番号1 0)	RASQSVSS AVA (配列番号4)	SQSVSSA (配列番号16)	SSAVAWY (配列番号21)	RASQSVS SAVA (配列番号4)
	SASSLYS (配列番号5)	SAS (配列番号1 1)	SASSLYS (配列番号5)	SAS (配列番号11)	LLIYSASS LY (配列番号22)	SASSLYS (配列番号5)
	QQAYATPV T (配列番号30)	QQAYATP VT (配列番号3 0)	QQAYATPV T (配列番号30)	AYATPV (配列番号38)	QQAYATPV (配列番号42)	QQAYATP VT (配列番号3 0)
VL C DR 2	VH配列： EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYIHWVRQAPGKGLEWVAYITSTGSYTEYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDRSTRYSGLDYWGGTLVTVSS (配列 番号44)					
VL C DR 3	VL配列： DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKAPKLLIYSASSLYSGVPSRF SGSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYATPVTFGGGTKVEIK (配列番号45)					

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3 : 抗体mAb A17

		例	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH C DR1	VH C DR2	GFTFSRYW IH (配列番号46)	GFTFSRYW (配列番号50)	RYWIH (配列番号53)	GFTFSRY (配列番号13)	SRYWIH (配列番号57)	GFTFSRYW IH (配列番号46)
		AIFPYSGS TLYADSVK G (配列番号47)	IFPYSGST (配列番号51)	AIFPYSGS TLYADSVK G (配列番号47)	PYSG (配列番号54)	WVAAIFF YSGSTL (配列番号58)	AIFPYSGS TL (配列番号61)
		SPSRSIILP SGLDY (配列番号48)	ARSPSRSI LP SGLDY (配列番号52)	SPSRSIILP SGLDY (配列番号48)	PSRSIILP SGLD (配列番号55)	ARSPSR IILPSGLD (配列番号59)	SPSRSIILP SGLDY (配列番号48)

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

VL C DR 1	RASQSVSS AVA (配列番号4)	QSVSSA (配列番号10)	RASQSVSS AVA (配列番号4)	SQSVSSA (配列番号16)	SSAVAWY (配列番号21)	RASQSVSS AVA (配列番号4)
	SASSLYS (配列番号5)	SAS (配列番号11)	SASSLYS (配列番号5)	SAS (配列番号11)	LLIYSAS SLY (配列番号22)	SASSLYS (配列番号5)
	QQGDGSPY T (配列番号49)	QQGDGSPY T (配列番号49)	QQGDGSPY T (配列番号49)	GDGSPY (配列番号56)	QQGDGSPY Y (配列番号60)	QQGDGSPY T (配列番号49)
VL C DR 2	VH配列： EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSRYWIHWVRQAPGKGLEWVAAIFPYSGSTLYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPRSILPSGLDYWGQGTLVTVSS (配 列番号62)					
VL C DR 3	VL配列： DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASSLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGDGSPYTFGGQGTKVEIK (配列番号63)					

10

20

30

40

【0060】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、二重特異性抗体またはADC等の抗体）は、VH領域またはVHドメインを含む。付加的または代替的に、いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体またはADC）は、VL領域またはVLドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体またはADC）は、（i）VHドメインまたはVH領域、及び／または（ii）VLドメインもしくはVL領域の組み合わせを有する。

50

【0061】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、二重特性抗体等の抗体またはADC）は、（i）表1～3のいずれか1つに記載されるVH、及び（ii）1つ以上の重鎖定常ドメイン（例えば、CH1、ヒンジ、CH2、及びCH3）の組み合わせを有する重鎖を含む。例示的なIgGの重鎖は、本明細書に記載の任意のVH配列ならびに以下のCH1、ヒンジ、CH2、及びCH3アミノ酸配列を含む：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYT
QKSLSLSLSPGK（配列番号69）。

10

他の例示的なIgGの重鎖は、本明細書に記載の任意のVH配列ならびに以下のCH1、ヒンジ、CH2、及びCH3を含む：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPEAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALKAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYT
QKSLSLSLSPGK（配列番号70）。

20

【0062】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるヒト5T4結合剤を含む、5T4結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体またはADC）は、（i）表1～3のいずれか1つに記載されるVLドメイン、及び（ii）軽鎖定常ドメイン（CL）を含む。例示的な軽鎖（例えば、IgG重鎖と対合する軽鎖）は、本明細書に記載される任意のVL配列及び以下のCLアミノ酸配列を含む：

RTVAAPS VFI FPPSDS QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号71）。

30

【0063】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体またはADC）は、（a）（i）表1～3のいずれか1つに記載されるVHと、（ii）1つ以上の重鎖定常ドメイン（例えば、CH1、ヒンジ、CH2、及びCH3）との組み合わせを有する重鎖、及び（b）（i）表1～3のいずれか1つに記載されるVLと、（ii）IgG形式の軽鎖定常ドメイン（CLまたはCL1）との組み合わせを有する軽鎖を含む。例示的な5T4結合剤（例えば、抗体またはADC）は、本明細書に記載の任意のVH配列及び配列番号69または70のアミノ酸配列を含むIgG重鎖、ならびに本明細書に記載の任意のVL配列及び配列番号71のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

40

【0064】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む、5T4結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体またはADC）は、6つのCDR、例えば、表1に特定されるVH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CD

50

R 2、及び／または V L C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、6 つの C D R、例えば、表 2 に特定される V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R を含む。いくつかの実施形態では、5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、6 つの C D R、例えば、表 3 に特定される V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R を含む。いくつかの実施形態では、5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、6 つの C D R、例えば、表 1、2 及び／または 3 に特定される V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R を含む。

10

【0065】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、3 つの V H C D R、例えば、表 1 に記載の V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3 を含む 1 つ以上の V H C D R を含む。他の実施形態では、本明細書に記載のヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、3 つの V L C D R、例えば、表 1 に記載の V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 を含む 1 つ以上の V L C D R を含む。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、表 1 に列挙された 3 つの V H C D R、例えば、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R、ならびに表 1 に列挙された 3 つの V L C D R、例えば、V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R を含む。

20

【0066】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、3 つの V H C D R、例えば、表 2 に列挙される V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R を含む。他の実施形態では、本明細書に記載のヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、3 つの V L C D R、例えば、表 2 に列挙される V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R を含む。さらにいくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、3 つの V H C D R、例えば、表 2 に列挙される V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R、ならびに 3 つの V L C D R、例えば、表 2 に列挙される V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R を含む。

30

【0067】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、3 つの V H C D R、例えば、表 3 に列挙される V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R を含む。他の実施形態では、本明細書に記載のヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、3 つの V L C D R、例えば、表 3 に列挙される V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R を含む。さらにいくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体等の抗体または A D C）は、3 つの V H C D R、例えば、表 3 に列挙される V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R、ならびに 3 つの V L C D R、例えば、表 3 に列挙される V L C D R 1、V L C D R 2、及び／または V L C D R 3 を含む 1 つ以上の C D R を含む。

40

【0068】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の 5 T 4 結合剤（例えば、二重特異性抗体な

50

どの抗体)は、配列番号1~24、27~43、または46~61からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、配列番号1~24、27~43、または46~61からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む2つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、配列番号1~24、27~43、または46~61からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む3つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、配列番号1~24、27~43、または46~61からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む4つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、配列番号1~24、27~43、または46~61からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む5つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、配列番号1~24、27~43、または46~61からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む6つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。

10

【0069】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、表1~3に列挙される1つ以上(例えば、1つ、2つ、または3つ)のVH CDRを含む。他の実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、表1~3に列挙される1つ以上(例えば、1つ、2つ、または3つ)のVL CDRを含む。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、表1~3に列挙される1つ以上(例えば、1つ、2つ、または3つ)のVH CDR及び表1~3に列挙される1つ以上のVL CDRを含む。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、配列番号1、7、12、13、18、27、31、34、35、39、46、50、53、及び57のいずれか1つを含むアミノ酸配列を含むVH CDR1を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、配列番号2、8、14、19、24、28、32、36、40、43、47、51、54、58、及び61のいずれか1つのアミノ酸配列を含むVH CDR2を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、配列番号3、9、15、20、29、33、37、41、48、52、55、及び59のいずれか1つのアミノ酸配列を含むVH CDR3を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、表1~3に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに示されるVH CDR1、VH CDR2、VH CDR3から独立して選択されるVH CDR1及び/またはVH CDR2及び/またはVH CDR3を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、配列番号4、10、16、及び21のいずれか1つのアミノ酸配列を含むVL CDR1を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、配列番号5、11、及び22のいずれか1つのアミノ酸配列を含むVL CDR2を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、配列番号6、17、23、30、38、42、49、56、及び60のいずれか1つのアミノ酸配列を含むVL CDR3を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される5T4結合剤(例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC)は、表1~3に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに示されるVL CDR1、VL CDR2、VL CDR3から独立して選択されるVL CDR1及び/またはVL CDR2及び/またはVL CDR3を

20

30

40

50

含む。

【0070】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤（例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC）は、（1）（i）配列番号1、27、もしくは46、（ii）配列番号7、31、もしくは50、（iii）配列番号12、34、もしくは53、（iv）配列番号13もしくは35、及び（v）配列番号18、39、または57からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVH CDR1、（2）（i）配列番号2、28、もしくは47、（ii）配列番号8、32、もしくは51、（iii）配列番号14、36、もしくは54、（iv）配列番号19、40、もしくは58、及び（v）配列番号24、43、もしくは61からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVH CDR2、及び（3）（i）配列番号3、29、もしくは48、（ii）配列番号9、33、もしくは52、（iii）配列番号15、37、もしくは55、及び（iv）配列番号20、41、もしくは59からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVH CDR3、を含む重鎖可変（VH）領域及び／または、（1）（i）配列番号4、（ii）配列番号10、（iii）配列番号16、及び（iv）配列番号21からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVL CDR1、（2）（i）配列番号5、（ii）配列番号11、及び（iii）配列番号22からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVL CDR2、及び（3）（i）配列番号6、30、もしくは49、（ii）配列番号17、38、もしくは56、及び（iii）配列番号23、42、もしくは60からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVL CDR3、を含む軽鎖可変（VL）領域、を含む。

10

20

【0071】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤（例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC）は、（1）（i）配列番号1、27、もしくは46、（ii）配列番号7、31、もしくは50、（iii）配列番号12、34、もしくは53、（iv）配列番号13、もしくは35、及び（v）配列番号18、39、もしくは57、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVH CDR1、（2）（i）配列番号2、28、もしくは47、（ii）配列番号8、32、もしくは51、（iii）配列番号14、36、もしくは54、（iv）配列番号19、40、もしくは58、及び（v）配列番号24、43、もしくは61からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVH CDR2、及び（3）（i）配列番号3、29、もしくは48、（ii）配列番号9、33、もしくは52、（iii）配列番号15、37、もしくは55、及び（iv）配列番号20、41、もしくは59からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVH CDR3、を含む重鎖可変（VH）領域を含む。

30

【0072】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤（例えば、二重特異性抗体などの抗体またはADC）は、（1）（i）配列番号4、（ii）配列番号10、（iii）配列番号16、及び（iv）配列番号21からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVL CDR1及び、（2）（i）配列番号5、（ii）配列番号11、及び（iii）配列番号22からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVL CDR2、及び（3）（i）配列番号6、30、もしくは49、（ii）配列番号17、38、もしくは56、及び（iii）配列番号23、42、または60からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVL CDR3、を含む軽鎖可変（VL）領域を含む。

40

【0073】

いくつかの実施形態では、本明細書には、5T4に結合する抗体またはそのフラグメントが記載され、抗体またはそのフラグメントは、（a）（1）（i）配列番号1、27、もしくは46、（ii）配列番号7、31、もしくは50、（iii）配列番号12、34、もしくは53、（iv）配列番号13もしくは35、及び（v）配列番号18、39、または57からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVH CDR1、（2）（i）配列番号2、28、もしくは47、（ii）配列番号8、32、もしくは51、（iii）配列番号14、36、もしくは54、（iv）配列番号19、40、もしくは58、

50

及び (v) 配列番号 24、43、もしくは 61 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V H C D R 2、及び (3) (i) 配列番号 3、29、もしくは 48、(i i) 配列番号 9、33、もしくは 52、(i i i) 配列番号 15、37、もしくは 55、及び (i v) 配列番号 20、41、もしくは 59 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む重鎖可変 (V H) 領域、及び／または (1) (i) 配列番号 4、(i i) 配列番号 10、(i i i) 配列番号 16 及び (i v) 配列番号 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(2) (i) 配列番号 5、(i i) 配列番号 11、及び (i i i) 配列番号 22 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び (3) (i) 配列番号 6、30、もしくは 49、(i i) 配列番号 17、38、もしくは 56、及び (i i i) 配列番号 23、42、または 60 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む軽鎖可変 (V L) 領域を含む。
【0074】

10

いくつかの実施形態では、本明細書には、5 T 4 に結合する抗体またはそのフラグメントが記載され、抗体またはそのフラグメントは、(1) (i) 配列番号 1、27、もしくは 46、(i i) 配列番号 7、31、もしくは 50、(i i i) 配列番号 12、34、もしくは 53、(i v) 配列番号 13 もしくは 35、及び (v) 配列番号 18、39、もしくは 57 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V H C D R 1、(2) (i) 配列番号 2、28、もしくは 47、(i i) 配列番号 8、32、もしくは 51、(i i i) 配列番号 14、36、もしくは 54、(i v) 配列番号 19、40、もしくは 58、及び (v) 配列番号 24、43、もしくは 61 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V H C D R 2、及び (3) (i) 配列番号 3、29、もしくは 48、(i i) 配列番号 9、33、もしくは 52、(i i i) 配列番号 15、37、もしくは 55、及び (i v) 配列番号 20、41、もしくは 59 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V H C D R 3、を含む重鎖可変 (V H) 領域を含む。

20

【0075】

いくつかの実施形態では、本明細書には、5 T 4 に結合する抗体またはそのフラグメントが記載され、抗体またはそのフラグメントは、(1) (i) 配列番号 4、(i i) 配列番号 10、(i i i) 配列番号 16、及び (i v) 配列番号 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 1 及び、(2) (i) 配列番号 5、(i i) 配列番号 11、及び (i i i) 配列番号 22 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 2、及び (3) (i) 配列番号 6、30、もしくは 49、(i i) 配列番号 17、38、もしくは 56、及び (i i i) 配列番号 23、42、または 60 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 3、を含む軽鎖可変 (V L) 領域を含む。

30

【0076】

いくつかの実施形態では、本明細書には、配列番号 25 の V H 配列及び配列番号 26 の V L 配列を含む m A b A 4 と特定される抗体、配列番号 44 の V H 配列及び配列番号 45 の V L 配列を含む m A b A 15 と特定される抗体、または配列番号 62 の V H 配列及び配列番号 63 の V L 配列を含む m A b A 17 と特定される抗体に由来する 3 つの重鎖相補性決定領域 (C D R) すべて及び／または 3 つの軽鎖 C D R すべてを含む、5 T 4 に結合する抗体またはそのフラグメントが記載される。いくつかの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、m A b A 4 と特定される抗体に由来する 3 つの重鎖 C D R すべて及び／または 3 つの軽鎖 C D R すべてを含む。いくつかの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、m A b A 15 と特定される抗体に由来する 3 つの重鎖 C D R すべて及び／または 3 つの軽鎖 C D R すべてを含む。いくつかの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは、m A b A 17 と特定される抗体に由来する 3 つの重鎖 C D R すべて及び／または 3 つの軽鎖 C D R すべてを含む。

40

【0077】

いくつかの実施形態では、本明細書には、5 T 4 に結合する抗体またはそのフラグメントが記載され、抗体は、(a) 表 1～3 に示される V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変 (V H) 領域、及び／または (b) 表 1

50

～ 3 に示される V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変（V L）領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、表 1 ～ 3 に示される V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変（V H）領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、表 1 ～ 3 に示される V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変（V L）領域を含む。

【 0 0 7 8 】

一部の実施形態では、本明細書には、（a）（1）配列番号 1、7、12、13、及び 18 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V H C D R 1、（2）配列番号 2、8、14、19、及び 24 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V H C D R 2、ならびに（3）配列番号 3、9、15、及び 20 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含む、重鎖可変（V H）領域、及び（b）（1）配列番号 4、10、16、及び 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V L C D R 1、（2）配列番号 5、11、及び 22 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V L C D R 2、ならびに（3）配列番号 6、17、及び 23 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V L C D R 3、を含む、軽鎖可変（V L）領域、を含む抗体が記載される。

10

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書には、（a）（1）配列番号 1 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、（2）配列番号 2 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び（3）配列番号 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変（V H）領域、及び（b）（1）配列番号 4 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、（2）配列番号 5 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び（3）配列番号 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3、を含む軽鎖可変（V L）領域、を含む抗体が記載される。

20

【 0 0 8 0 】

いくつかの実施形態では、本明細書には、（a）（1）配列番号 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、（2）配列番号 8 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び（3）配列番号 9 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変（V H）領域、及び（b）（1）配列番号 10 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、（2）配列番号 11 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び（3）配列番号 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3、を含む軽鎖可変（V L）領域、を含む抗体が記載される。

30

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態では、本明細書には、（a）（1）配列番号 12 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、（2）配列番号 2 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び（3）配列番号 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変（V H）領域、及び（b）（1）配列番号 4 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、（2）配列番号 5 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び（3）配列番号 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3、を含む軽鎖可変（V L）領域、を含む抗体が記載される。

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態では、本明細書には、（a）（1）配列番号 13 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、（2）配列番号 14 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び（3）配列番号 15 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変（V H）領域、及び（b）（1）配列番号 16 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、（2）配列番号 11 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び（3）配列番号 17 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3、を含む軽鎖可変（V L）領域、を含む抗体が記載される。

40

【 0 0 8 3 】

いくつかの実施形態では、本明細書には、（a）（1）配列番号 18 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、（2）配列番号 19 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び（3）配列番号 20 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変（V H）領域、及び（b）（1）配列番号 21 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、（2）配

50

列番号 22 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び (3) 配列番号 23 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3、を含む軽鎖可変 (V L) 領域、を含む抗体が記載される。

【0084】

いくつかの実施形態では、本明細書には、(a) (1) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、(2) 配列番号 24 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び (3) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変 (V H) 領域、及び (b) (1) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、(2) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び (3) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3、を含む軽鎖可変 (V L) 領域、を含む抗体が記載される。

【0085】

一部の実施形態では、本明細書には、(a) (1) 配列番号 27、31、34、35、及び 39 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V H C D R 1、(2) 配列番号 28、32、36、40、及び 43 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V H C D R 2、ならびに (3) 配列番号 29、33、37、及び 41 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含む重鎖可変 (V H) 領域、ならびに (b) (1) 配列番号 4、10、16、及び 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V L C D R 1、(2) 配列番号 5、11、及び 22 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V L C D R 2、ならびに (3) 配列番号 30、38、及び 42 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を含む、軽鎖可変 (V L) 領域、を含む抗体が記載される。

【0086】

いくつかの実施形態では、本明細書には、(a) (1) 配列番号 27 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、(2) 配列番号 28 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び (3) 配列番号 29 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変 (V H) 領域、及び (b) (1) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、(2) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び (3) 配列番号 30 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3、を含む軽鎖可変 (V L) 領域、を含む抗体が記載される。

【0087】

いくつかの実施形態では、本明細書には、(a) (1) 配列番号 31 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、(2) 配列番号 32 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び (3) 配列番号 33 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変 (V H) 領域、及び (b) (1) 配列番号 10 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、(2) 配列番号 11 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び (3) 配列番号 30 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3、を含む軽鎖可変 (V L) 領域、を含む抗体が記載される。

【0088】

いくつかの実施形態では、本明細書には、(a) (1) 配列番号 34 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、(2) 配列番号 28 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び (3) 配列番号 29 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変 (V H) 領域、及び (b) (1) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、(2) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び (3) 配列番号 30 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3、を含む軽鎖可変 (V L) 領域、を含む抗体が記載される。

【0089】

いくつかの実施形態では、本明細書には、(a) (1) 配列番号 35 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、(2) 配列番号 36 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び (3) 配列番号 37 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変 (V H) 領域、及び (b) (1) 配列番号 16 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、(2) 配列番号 11 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び (3) 配列番号 38 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3、を含む軽鎖可変 (V L) 領域、を含む抗体が記載される。

【0090】

いくつかの実施形態では、本明細書には、(a) (1) 配列番号 39 のアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

有するVH CDR1、(2)配列番号40のアミノ酸配列を有するVH CDR2、及び(3)配列番号41のアミノ酸配列を有するVH CDR3、を含む重鎖可変(VH)領域、及び(b)(1)配列番号21のアミノ酸配列を有するVL CDR1、(2)配列番号22のアミノ酸配列を有するVL CDR2、及び(3)配列番号42のアミノ酸配列を有するVL CDR3、を含む軽鎖可変(VL)領域、を含む抗体が記載される。
【0091】

いくつかの実施形態では、本明細書には、(a)(1)配列番号27のアミノ酸配列を有するVH CDR1、(2)配列番号43のアミノ酸配列を有するVH CDR2、及び(3)配列番号29のアミノ酸配列を有するVH CDR3、を含む重鎖可変(VH)領域、及び(b)(1)配列番号4のアミノ酸配列を有するVL CDR1、(2)配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2、及び(3)配列番号30のアミノ酸配列を有するVL CDR3、を含む軽鎖可変(VL)領域、を含む抗体が記載される。

10

【0092】
一部の実施形態では、本明細書には、(a)(1)配列番号13、46、50、53、及び57からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH CDR1、(2)配列番号47、51、54、58、及び61からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH CDR2、ならびに(3)配列番号48、52、55、及び59からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH CDR3、を含む重鎖可変(VH)領域、ならびに(b)(1)配列番号4、10、16、及び21からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVL CDR1、(2)配列番号5、11、及び22からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVL CDR2、ならびに(3)配列番号49、56、及び60からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVL CDR3、を含む軽鎖可変(VL)領域、を含む抗体が記載される。

20

【0093】
いくつかの実施形態では、本明細書には、(a)(1)配列番号46のアミノ酸配列を有するVH CDR1、(2)配列番号47のアミノ酸配列を有するVH CDR2、及び(3)配列番号48のアミノ酸配列を有するVH CDR3、を含む重鎖可変(VH)領域、及び(b)(1)配列番号4のアミノ酸配列を有するVL CDR1、(2)配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2、及び(3)配列番号49のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む、軽鎖可変(VL)領域、を含む抗体が記載される。

30

【0094】
いくつかの実施形態では、本明細書には、(a)(1)配列番号50のアミノ酸配列を有するVH CDR1、(2)配列番号51のアミノ酸配列を有するVH CDR2、及び(3)配列番号52のアミノ酸配列を有するVH CDR3、を含む重鎖可変(VH)領域、及び(b)(1)配列番号10のアミノ酸配列を有するVL CDR1、(2)配列番号11のアミノ酸配列を有するVL CDR2、及び(3)配列番号49のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む、軽鎖可変(VL)領域、を含む抗体が記載される。

【0095】
いくつかの実施形態では、本明細書には、(a)(1)配列番号53のアミノ酸配列を有するVH CDR1、(2)配列番号47のアミノ酸配列を有するVH CDR2、及び(3)配列番号48のアミノ酸配列を有するVH CDR3、を含む重鎖可変(VH)領域、及び(b)(1)配列番号4のアミノ酸配列を有するVL CDR1、(2)配列番号5のアミノ酸配列を有するVL CDR2、及び(3)配列番号49のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む、軽鎖可変(VL)領域、を含む抗体が記載される。

40

【0096】
いくつかの実施形態では、本明細書には、(a)(1)配列番号13のアミノ酸配列を有するVH CDR1、(2)配列番号54のアミノ酸配列を有するVH CDR2、及び(3)配列番号55のアミノ酸配列を有するVH CDR3、を含む重鎖可変(VH)領域、及び(b)(1)配列番号16のアミノ酸配列を有するVL CDR1、(2)配列番号11のアミノ酸配列を有するVL CDR2、及び(3)配列番号56のアミノ酸

50

配列を有する V L C D R 3 を含む、軽鎖可軽鎖可変 (V L) 領域、を含む抗体が記載される。

【0097】

いくつかの実施形態では、本明細書には、(a) (1) 配列番号 57 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、(2) 配列番号 58 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び (3) 配列番号 59 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変 (V H) 領域、及び (b) (1) 配列番号 21 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、(2) 配列番号 22 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び (3) 配列番号 60 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を含む、軽鎖可変 (V L) 領域、を含む抗体が記載される。

【0098】

いくつかの実施形態では、本明細書には、(a) (1) 配列番号 46 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、(2) 配列番号 61 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び (3) 配列番号 48 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、を含む重鎖可変 (V H) 領域、及び (b) (1) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、(2) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び (3) 配列番号 49 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を含む、軽鎖可変 (V L) 領域、を含む抗体が記載される。

【0099】

いくつかの実施形態では、本明細書には、本明細書に記載の V H 領域及び／または V L 領域が記載され、V H 及び／または V L は、ヒトフレームワーク配列を含む。いくつかの実施形態では、V H 領域及び／または V L 領域は、フレームワーク 1 (F R 1)、フレームワーク 2 (F R 2)、フレームワーク 3 (F R 3)、及び／またはフレームワーク 4 (F R 4) 配列、例えば、ヒト F R 1、ヒト F R 2、ヒト F R 3、及び／またはヒト F R 4 を含む。

【0100】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、ヒト化抗体、ヒト抗体、またはキメラ抗体である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体は、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、s c F v、(s c F v)₂、単鎖抗体、二重可変領域抗体、単一可変領域抗体、線状抗体、V 領域または抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体である。

【0101】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、本明細書に記載される抗体のいずれか 1 つの抗体またはそのフラグメントと本質的に同じエピトープに結合する結合剤である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、ヒト 5 T 4 への結合をめぐる本明細書に記載されるいずれか 1 つの抗体またはそのフラグメントと競合する結合剤である。一部の実施形態では、結合剤は、抗体もしくはそのフラグメント、または抗体もしくはそのフラグメントを含む A D C である。

【0102】

特定の態様では、ヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体または A D C) は、K a b a t システムによって決定され得る (K a b a t e t a l. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 及び K a b a t e t a l. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。

【0103】

特定の態様では、ヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体または A D C) は、C h o t h i a システムによって決定することができ、これは、本明細書では「C h o t h i a C D R」と呼ばれる (例えば、C h o t h i a a n d L e s k, 1987, J. Mol. Biol., 196:901-917、A l - L a z i k a n i e t

10

20

30

40

50

al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948、Chothia et al., 1992, J. Mol. Biol., 227:799-817、Tramontano A. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215 (1): 175-82、及び米国特許第7,709,226号を参照されたい)。

【0104】

特定の態様では、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤(例えば、抗体またはADC)のCDRは、例えば、Lefranc, M.-P., 1999, The Immunologist, 7:132-136及びLefranc, M.-P. et al., 1999, Nucleic Acids Res., 27:209-212(「IMGT CDR」)に記載のImmunoGeneTics(IMGT(登録商標))システムによって決定され得る。

10

【0105】

特定の態様では、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤(例えば、抗体またはADC)のCDRは、AbMシステムによって決定することができ、これは、本明細書では「AbM CDR」と呼ばれ、例えば、MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745に記載されている。例えば、Martin, A., "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," in Antibody Engineering, Kontermann and Dubel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001)も参照されたい。

20

【0106】

特定の態様では、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤(例えば、抗体またはADC)のCDRは、Contactのシステムによって決定することができ、これは、本明細書では「Contact CDR」と呼ばれる(例えば、MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol. 5:732-745を参照されたい)。Contact CDRは、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。

【0107】

いくつかの実施形態では、明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤(例えば、抗体またはADC)のVH(例えば、CDR1、CDR2、もしくはCDR3)及び／またはVL(例えば、CDR1、CDR2、もしくはCDR3)領域に沿った1つ以上のCDRの位置は、5T4(例えば、ヒト5T4)への結合が維持される(例えば、実質的に維持される、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%)ことを条件として、1、2、3、4、5、または6のアミノ酸位置によって異なり得る。例えば、いくつかの実施形態では、表1、2、または3のうちのいずれかのCDRを定義する位置は、5T4(例えば、ヒト5T4)への結合が維持される(例えば、実質的に維持される、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%)ことを条件として、現在のCDRの位置に対して、CDRのN末端及び／またはC末端境界を1、2、3、4、5または6つのアミノ酸分シフトすることによって異なり得る。他の実施形態では、本明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤(例えば、抗体またはADC)のVH(例えば、CDR1、CDR2、またはCDR3)及び／またはVL(例えば、CDR1、CDR2、またはCDR3)領域に沿った1つ以上のCDRの長さは、5T4(例えば、ヒト5T4)への結合が維持される(例えば、実質的に維持される、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%)ことを条件として、1、2、3、4、5またはそれ以上のアミノ酸分異なり得る(例えば、より短くまたは長く)。例えば、いくつかの実施形態では、5T4(例えば、ヒト5T4)への結合が維持される(例えば、実質的に維持される、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なく

30

40

50

とも95%)ことを条件として、本明細書に記載のVH及び／またはVLのCDR1、CDR2、及び／またはCDR3は、配列番号1～24、27～43、または46～61によって記載される1つ以上のCDRに比べて、1、2、3、4、5またはそれ以上のアミノ酸分短くてもよい。他の実施形態では、5T4(例えば、ヒト5T4)への結合が維持される(例えば、実質的に維持される、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%)ことを条件として、本明細書に記載されるVH及び／またはVLのCDR1、CDR2、及び／またはCDR3は、配列番号1～24、27～43、または46～61によって記載される1つ以上のCDRに比べて、1、2、3、4、5、またはそれ以上のアミノ酸分長くてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるVH及び／またはVLのCDR1、CDR2、及び／またはCDR3のアミノ末端は、5T4(例えば、ヒト5T4)への結合が維持される(例えば、実質的に維持される、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%)ことを条件として、配列番号1～24、27～43、または46～61によって記載される1つ以上のCDRに比べて、1、2、3、4、5、またはそれ以上のアミノ酸分短縮または延長されてもよい。付加的または代替的に、いくつかの実施形態では、VH及び／またはVLのCDR1、CDR2、及び／またはCDR3のカルボキシ末端は、5T4(例えば、ヒト5T4)への結合が維持される(例えば、実質的に維持される、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%)ことを条件として、配列番号1～24、27～43、または46～61によって記載される1つ以上のCDRに比べて、1、2、3、4、5、またはそれ以上のアミノ酸分短縮または延長することができる。5T4(例えば、ヒト5T4)への結合が維持されているかどうかを確認するためには、例えば、本明細書に記載の「実施例」の節に記載される結合アッセイ及び条件のような、当技術分野で公知の任意の方法を使用することができる。例えば、本明細書に記載の実施例2では、5T4(例えば、ヒト5T4)への結合を測定するためのアッセイを記載する。

【0108】

他の実施形態では、本明細書において提示される、5T4に結合する、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤(例えば、抗体またはADC)は、保存的配列修飾をさらに含む。ヒト5T4結合剤などの5T4結合剤(例えば、抗体)であるポリペプチドに関して、保存的配列修飾には、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる保存的アミノ酸置換が含まれる。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当技術分野において定義されている。したがって、いくつかの実施形態では、5T4における予測される非必須アミノ酸残基が、同じ側鎖ファミリーに由来する別のアミノ酸残基で置き換えられる。抗原結合とそのヌクレオチドのコーディングを排除しない、アミノ酸の保存的置換を特定する方法は当技術分野では周知のものである(例えば、Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12 (10): 879-884 (1999); 及びBurks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997)を参照されたい)。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の保存的配列修飾は、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤(例えば、抗体またはADC)のアミノ酸配列を、50%、または55%、または60%、または65%、または70%、または75%、または80%、または85%、または90%、または95%、または98%、または99%修飾する。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列修飾は、表1～3のいずれか1つに記載されるもの等の、CDRに対する、最大で1、2、3、4、5、または6つのアミノ酸置換を指す。したがって、例えば、かかるCDRの各々は、最大5個の保存的アミノ酸置換、例えば、最大4(それ以下)の保存的アミノ酸置換、例えば、最大3(それ以下)の保存的アミノ酸置換、例えば、最大2(それ以下)の保存的アミノ酸置換、または1以下の保存的アミノ酸置換を含み得る。いくつかの実施形態では、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤(例えば、抗体)は、mAbA4、mAbA1

10

20

30

40

50

5、またはm A b A 1 7のC D Rに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する、6つを含む1つ以上のC D Rを含む（例えば、表1、2、または3を参照されたい）。いくつかの実施形態では、ヒト5 T 4結合剤を含む5 T 4結合剤（例えば、抗体）は、m A b A 4、m A b A 1 5、またはm A b A 1 7のものと同一のC D Rを含むV H及びV Lを含有する（例えば、表1、2、または3を参照されたい）。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列修飾は、S D R内のいかなる修飾も含まない。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列修飾は、C D R（C D R 1、C D R 2、C D R 3、またはそれらの任意の組み合わせなど）内のいかなる修飾も含まない。さらなる実施形態では、アミノ酸配列修飾は、フレームワークまたは定常領域内にある。

10

【0109】

いくつかの実施形態では、本明細書には、配列番号25に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むV H、及び配列番号26に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体またはそのフラグメントが提供され、5 T 4（例えば、ヒト5 T 4）に対する抗体またはそのフラグメントの結合が、維持される（例えば、実質的に維持される、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%）。

【0110】

いくつかの実施形態では、本明細書には、配列番号44に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むV H、及び配列番号45に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体またはそのフラグメントが提供され、5 T 4（例えば、ヒト5 T 4）に対する抗体またはそのフラグメントの結合が、維持される（例えば、実質的に維持される、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%）。

20

【0111】

いくつかの実施形態では、本明細書には、配列番号62に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むV H、及び配列番号63に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むV Lを含む抗体またはそのフラグメントが提供され、5 T 4（例えば、ヒト5 T 4）に対する抗体またはそのフラグメントの結合が、維持される（例えば、実質的に維持される、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%）。

30

【0112】

本開示はまた、マスキング部分及び／または開裂可能な部分を有する5 T 4結合剤（例えば、抗体）を提供し、5 T 4結合剤（例えば、抗体）の1つ以上の5 T 4結合ドメインがマスクされ（例えば、マスキング部分を介して）及び／または活性化可能である（例えば、開裂可能な部分を介して）。5 T 4結合剤（例えば、抗体）をマスキングするための技術は当技術分野では周知のものであり、S A F E b o d yマスキング技術（例えば、米国特許出願公開第2019/0241886号を参照されたい）及びP r o b o d yマスキング技術（例えば、米国特許出願公開第2015/0079088を参照されたい）が含まれる。かかる技術を使用して、マスクされた及び／または活性化可能な5 T 4結合剤（例えば、抗体）を作製することができる。かかるマスクされた及び／または活性化可能な5 T 4結合剤（例えば、抗体）は、薬物などの別の薬剤に直接的または間接的に結合されたものを含む、本開示のヒト5 T 4結合剤などの5 T 4結合剤（例えば、抗体）のいずれか1つを含む、免疫複合体、A D C、マスクされたA D C及び活性化可能な抗体薬物複

40

50

合体（AADC）を含む複合体の調製に有用である。例えば、本開示のヒト5T4結合剤などの5T4結合剤（例えば、抗体）は、合成リンカーによって薬物などの1つ以上の薬剤に共有結合を介して結合させることができる。

【0113】

必要に応じて、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）は、細胞傷害活性（例えば、化学療法部分または放射性同位元素）または免疫動員活性などのエフェクター機能を有する部分と（直接的または間接的に）リンクまたは結合される。（直接的または間接的に）リンクまたは結合される部分としては、細胞傷害性の薬物（例えば、オーロスタチンなどの毒素）または非細胞傷害性（例えば、キナーゼなどのシグナル伝達調節因子、または5T4結合剤（例えば、抗体）の1つ以上の結合ドメインをマスクするマスキング部分、または開裂可能な部分を開裂させることで、腫瘍微小環境中のマスクされた複合体の形態として、5T4結合剤（例えば、抗体）の1つ以上の結合ドメインのマスキング部分を除去させることで5T4結合剤を活性化させる開裂可能な部分が挙げられる。免疫動員を促進する部分は、自然及び／または適応免疫系の細胞に選択的に結合するウイルスタンパク質などの他の抗原結合剤を含み得る。あるいは、またはさらに、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）は、場合により、混合物からの単離を容易にする部分（例えば、タグ）またはレポーター活性を有する部分（例えば、検出標識またはレポータータンパク質）と（直接的または間接的に）リンクまたはコンジュゲートされる。本明細書に記載される、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）の特徴は、5T4結合剤フラグメントを含むポリペプチドにも及ぶことが理解されよう。

【0114】

いくつかの実施形態では、ヒト5T4に結合する本明細書に記載の5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）は、ポリペプチドに（直接的または間接的に）リンクまたはコンジュゲートされ得、これにより活性化可能な抗体が生成され得る。いくつかの実施形態では、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）は、追加の薬剤に（直接的または間接的に）リンクまたはコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、追加の物質は薬物であり、ADCの抗体がマスキング部分及び開裂可能な部分を含む場合、ADCまたはAADCをもたらす。

【0115】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）は、治療剤（例えば、細胞傷害剤）または診断薬もしくは検出可能な薬剤と（直接的または間接的に）コンジュゲートまたは組み換え可能にリンクされる。マスクされた、または活性化可能な複合体を含む、コンジュゲートまたは組換えによりリンクされた抗体は、例えば、5T4媒介性疾患、障害または状態などの疾患、障害もしくは状態の治療または予防に有用であり得る。マスクされたまたは活性化可能な複合体を含む、コンジュゲートされたまたは組換え的にリンクされた5T4結合剤（例えば、抗体）は、例えば、5T4媒介性疾患、障害、または状態の発症、発達、進行、及び／または重症度を監視または予知するために有用であり得る。

【0116】

かかる診断及び検出は、例えば、5T4結合剤（例えば、抗体）を、検出可能な物質、例えば、これらに限定されるものではないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含む酵素；ストレプトアビジン／ビオチンまたはアビジン／ビオチンを含む（ただし、これらに限定されない）補欠分子族；ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンを含む（ただし、これらに限定されない）蛍光物質；ルミノールを含む（ただし、これに限定されない）発光物質；ルシフェラーゼ、ルシフェリン、またはエクオリンを含む（ただし、これらに限定されない）生物発光物質；アクリジニウムベースの化合物またはHALOTAGを含む（ただし、これらに限定されない）化学発光材料；ヨウ素（¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、及び¹²¹I）、炭素（¹⁴C）、硫黄（

^{35}S ）、トリチウム (^3H)、インジウム (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、及び ^{111}In)、テクネチウム (^{99}Tc)、タリウム (^{201}Tl)、ガリウム (^{68}Ga 及び ^{67}Ga)、パラジウム (^{103}Pd)、モリブデン (^{99}Mo)、キセノン (^{133}Xe)、フッ素 (^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、または ^{117}Sn を含む（ただし、これらに限定されない）放射性物質；さまざまな陽電子放出断層撮影法を使用した陽電子放出金属；及び非放射性常磁性金属イオンと結合することによって行うことができる。

【0117】

さらに本明細書で提供されるのは、融合タンパク質を生成するために、異種タンパク質またはポリペプチド（またはそのフラグメント、例えば、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、または約100アミノ酸のポリペプチド）に、組み換え的にリンクまたはコンジュゲート（共有結合性または非共有結合性コンジュゲーション、直接的にまたは間接的に）された5T4結合剤（例えば、抗体）、及びその使用である。特に、本明細書に記載されるのは、本明細書に記載のヒト5T4結合剤（例えば、VH及び／またはVLのCDR1、CDR2、及び／またはCDR3）と、異種タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドとを含む5T4結合剤（例えば、抗体）の抗原結合フラグメントを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、5T4結合剤（例えば、抗体）がリンクされた異種タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドは、特定の細胞（例えば、腫瘍細胞を含む5T4発現細胞）に5T4結合剤を標的化するのに有用である。5T4結合剤（例えば、抗体）がリンクされる他の非限定的な異種タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドは、内部移行シグナルまたは免疫細胞エンゲージャーとして有用であり得る。

【0118】

さらに、本明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）は、精製を容易にするために、マーカーまたは「タグ」配列、例えば、ペプチドに（直接的または間接的に）リンクされ得る。いくつかの実施形態では、マーカーまたはタグアミノ酸配列は、とりわけヘキサヒスチジンペプチド、例えば、pQEベクターで提供されるタグ（例えば、QIAGEN, Inc. を参照されたい）であり、その多くは市販されている。例えば、Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-24に記載されているように、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグとしては、限定するものではないが、インフルエンザの血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する血球凝集素（「HA」）タグが挙げられる（Wilson et al., 1984, Cell 37: 767-78）、及び「FLAG」タグが挙げられる。

【0119】

部分（ポリペプチドを含む）を抗体にリンクまたはコンジュゲート（直接的または間接的に）するための方法は、当技術分野で周知であり、これらのいずれも、本明細書に記載の抗体薬物複合体または融合タンパク質を作製するために使用することができる。

【0120】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤（例えば、抗体）は、融合タンパク質である。本明細書で使用される、「融合タンパク質」という用語は、結合剤（例えば、抗体）のアミノ酸配列及び異種ポリペプチドまたはタンパク質（例えば、通常は抗体の一部ではないポリペプチドまたはタンパク質）のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、5T4結合剤の生物活性を保持する。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、5T4抗体のVH領域、VL領域、VH CDR（1、2、または3つのVH CDR）、及び／またはVL CDR（1、2、または3つのVL CDR）を含み、融合タンパク質は、5T4エピトープ、5T4フラグメント、及び／または5T4ポリペプチドに結合する。

【0121】

融合タンパク質は、例えば、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エクソンシャッフリング、及び／またはコドンシャッフリング（「DNAシャッフリング」と総称される）の技術により生成され得る。DNAシャッフリングは、例えば、より高い親和性及びより低い解離速度の5T4結合剤を含む、本明細書に記載されるヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）の活性を改変するために採用され得る（例えば、米国特許第5,605,793号；同第5,811,238号；同第5,830,721号；同第5,834,252号；及び同第5,837,458号；Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33；Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82；Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76；ならびにLorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-13を参照されたい）。いくつかの実施形態では、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤は、組み換え前に、エラープローンPCR、ランダムヌクレオチド挿入、または他の方法によるランダム変異導入を行うことによって、改変され得る。本明細書に記載される5T4結合剤をコードするポリヌクレオチドは、1つ以上の異種分子の1つ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、フラグメントなどと組み換えられてもよい。

10

【0122】

本明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）はまた、標的抗原のイムノアッセイまたは精製に有用な固体支持体に結合させてもよい。かかる固体支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0123】

本明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）はまた、抗体ヘテロ複合体を形成するために、二次抗体に（直接的または間接的に）リンクまたはコンジュゲートされ得る。

【0124】

リンカーは、リンクまたはコンジュゲートされた薬剤が細胞内で放出されるのを容易にする「開裂可能な部分」であり得るが、開裂可能ではないリンカーも本明細書で企図される。本開示の複合体（例えば、ADCまたはAADC）で使用するためのリンカーには、限定するものではないが、酸不安定性リンカー（例えば、ヒドラゾンリンカー）、ジスルフィド含有リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー（例えば、アミノ酸、例えば、シトルリン-バリンまたはフェニルアラニン-リシンなどのバリン及び／またはシトルリンを含むペプチドリンカー）、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー、チオエーテルリンカー、または多剤トランスポーター媒介性耐性を回避するように設計された親水性リンカーが含まれる。

30

【0125】

抗体及び薬剤の複合体（薬剤は、ADCまたはAADCの調製のための薬物であるものを含む）は、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-（β-マレイミドプロピルオキシ）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（ECMS）、N-γ-マレイミドカプロイル-オキシスクシンイミドエステル（GMBs）、1,6-ヘキサン-ビス-ビニルスルホン（HBVS）、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）（LC-SMCC）、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）、4-（4-N-マレイミドフェニル）酪酸ヒドラジド（MPBH）、3-（プロモアセトアミド）プロピオン酸スクシンイミジル（SBAP）、ヨード酢酸スクシンイミジル（SIA）、（4-ヨードアセチル）アミノ安息香酸スクシンイミジル（SIAB）、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（SMCC）、4-（p-マレイミド-フ

40

50

エニル) 酪酸スクシンイミジル (SMPB)、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-(ϵ -マレイミドカプロイルオキシ) スルホスクシンイミドエステル (スルホ-ECMS)、N-(γ -マレイミドブトリルオキシ) スルホスクシンイミドエステル (sulfo-GMBS)、N-(κ -マレイミドウンデカノイルオキシ) スルホスクシンイミドエステル (sulfo-KMUS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル (スルホ-MBS)、スルホスクシンイミジル (4-ヨード-アセチル) アミノベンゾエート (sulfo-SIAB)、4-(N-マレイミド-メチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸スルホスクシンイミジル (sulfo-SMCC)、4-(p-マレイミドフェニル) 酪酸スルホスクシンイミジル (sulfo-SMPB)、及びスクシンイミジル-(4-ビニルスルホン) 安息香酸スクシンイミジル (SVSB) を使用して作製され得る。

10

【0126】

本開示ではさらに、抗体と薬剤とのコンジュゲート (薬剤がADCまたはAADCの調製のための薬物である場合を含む) を当技術分野で開示される任意の適当な方法を使用して調製できることを企図している (例えば、Bioconjugate Techniques (Hermanson ed., 2d ed. 2008))。

【0127】

抗体と薬剤との従来のコンジュゲーションの戦略 (薬剤がADCまたはAADCを調製するための薬物である場合を含む) は、Lys残基の ϵ -アミノ基またはCys残基のチオール基が関与するランダムコンジュゲーション化学に基づいており、異種複合体を与えるものである。近年開発された技術により、抗体への部位特異的結合が可能になり、均一なローディングが得られ、抗原結合性または薬物動態が変化した複合体の亜集団が回避される。これらの技術には、反応性チオール基を与え、かつ免疫グロブリンのフォールディング及びアセンブリを破壊したり、抗原結合性を変化させない重鎖及び軽鎖上の位置にシステイン置換を含む「チオマップ」の操作が含まれる (例えば、Junutula et al., 2008, J. Immunol. Meth. 332: 41-52; 及び Junutula et al., 2008, Nature Biotechnol. 26: 925-32 を参照されたい)。別の方法では、終止コドンUGAを終止からセレノシステインの挿入に再コードすることにより、セレノシステインを抗体配列に翻訳と同時に挿入することで、他の天然アミノ酸の存在下でセレノシステインの求核性セレノール基における部位特異的な共有結合が可能となる (例えば、Hofer et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 12451-56; 及び Hofer et al., 2009, Biochemistry 48 (50): 12047-57)。

20

30

【0128】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤 (例えば、抗体) は、細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤 (例えば、抗体) は、ADCまたはAADCを生成するために、任意選択で、本明細書に開示される1つ以上の細胞傷害性薬 (複数可) とコンジュゲートされてもよい。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬は、メトトレキサート、アドリアマイシン、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン、または他の挿入剤が挙げられるがこれらに限定されない化学療法剤である。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬は、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素活性のある毒素またはそのフラグメントであり、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンシンタンパク質、Phytolacca americanaタンパク質 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、Momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、Sapaonarria officinalis阻害剤、ゼロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセン類

40

50

を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、細胞傷害性薬は、放射性複合体または放射性複合体化薬剤を生成するための放射性同位体である。 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{131}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、及び ^{212}Bi を含むが、これらに限定されない様々な放射性核種が、放射性複合剤の生産のために利用可能である。ポリペプチドまたは分子と、1つ以上の小分子毒素、例えば、カリケアマイシン、マイタンシノイド、トリコテセン、及びCC1065、ならびに毒素活性を有する、これらの毒素の誘導体との複合体も使用できる。ポリペプチドまたは分子と細胞傷害性薬との複合体は、N-サクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオン酸塩(SPD P)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジプイミド酸ジメチルHCL等)、活性エステル(スベリン酸ジサクシニミジル等)、アルデヒド(グルタレルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、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)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トルエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)等の多様な二機能性タンパク質カップリング剤を使用して作製される。

10

20

30

40

50

【0129】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤(例えば、抗体)は、シグナル伝達調節因子、アポトーシス促進剤、有糸分裂阻害剤、抗腫瘍抗生物質、免疫調節剤、遺伝子治療用の核酸、アルキル化剤、抗血管新生剤、代謝拮抗薬、ホウ素含有剤、化学保護剤、ホルモン剤、抗ホルモン剤、コルチコステロイド、光活性治療剤、オリゴヌクレオチド、放射性核種剤、放射線増感剤、トポイソメラーゼ阻害剤、及びチロシンキナーゼ阻害剤等の薬物にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、有糸分裂阻害剤は、ドラスタチン、アウリスタチン、マイタンシノイド、及び植物アルカロイドである。いくつかの実施形態では、薬物は、ドラスタチン、アウリスタチン、マイタンシノイド、及び植物アルカロイドである。アウリスタチンの例は、モノメチルアウリサチンF(MMAF)またはモノメチルアウリスタチンE(MMAE)である。マイタンシノイドの例としては、DM1、DM2、DM3、及びDM4が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、抗腫瘍抗生物質は、アクチノマイシン、アントラサイクリン、カリケアマイシン、及びデュオカルマイシンからなる群から選択される。アクチノマイシンの例は、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)である。アントラサイクリンの例は、PNU-159682または誘導体などのPNU-アントラサイクリンである。

【0130】

本明細書に記載されるヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤(例えば、抗体)は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、またはより高次の多重特異性であってもよい。かかる薬剤は、単一特異性もしくは多重特異性抗体またはADCを含み得る。二重特異性抗体のような多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる標的(例えば、抗原)または同じ標的上の2つの異なるエピトープ(例えば、5T4の第1のエピトープに対する第1の結合ドメインと、5T4の第2のエピトープに対する第2の結合ドメインとを有する、5T4に向けた二重特異性抗体)に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、単一特異性及び多重特異性(例えば、二重特異性)抗体またはADCは、本明細書に記載の抗体の配列、例えば、表1~3に列挙されるCDR配列、に基づいて構築することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、マウス、キメラ、ヒトまたはヒト化抗体である。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の結合特異性のうちの一方は5T4に対するものであり、他方は任意の他の標的(例えば、抗原)に対するものである。いくつかの実施形態では、多重特異性(例えば、二重特異性)抗体は、複数の標的(例えば、抗原)結合ドメインを含むことができ、異なる結合ドメインは異なる標的に対して特異的である(例えば、5T4に結合する第1の結合ドメインと、免疫チェックポイント制御因子(例えば、ネガティブチェックポイント制御因子)などの別の標

的（例えば、抗原）に結合する第2の結合ドメイン）。いくつかの実施形態では、多重特異性（例えば、二重特異性）抗体分子は、同じ標的（例えば、抗原）上の複数（例えば、2つ以上）のエピトープに結合することができる。いくつかの実施形態では、結合特異性の一方は5T4に対するものであり、他方は、細胞傷害性Tリンパ球抗原-4（CTLA-4）、CD80、CD86、プログラム細胞死1（PD-1）、プログラム細胞死リガンド2（PD-L2）、リンパ球活性化遺伝子3（LAG-3、CD223としても知られる）、ガレクチン-3、B及びTリンパ球アテニュエーター（BTLA）、T細胞膜タンパク質3（TIM3）、ガレクチン-9（GAL9）、B7-H1、B7-H3、B7-H4、Ig及びITIMドメインを有するT細胞免疫受容体（TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9）、T細胞活性化のVドメインIgサプレッサー（VISTA）、グルココルチコイド誘発性腫瘍壊死因子受容体関連（GITR）タンパク質、ヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）、OX40、CD27、CD28、CD137、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15027、CGEN-15049、CGEN-15052、及びCGEN-15092のうち1つ以上である。

10

【0131】

多重特異性抗体を作製するための方法は当技術分野では周知のものであり、例えば、2本の重鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖のペアの同時発現によるものがある（例えば、Milstein and Cuello, 1983, Nature 305: 537-40を参照されたい）。多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）の生成のさらなる詳細については、例えば、Bispecific Antibodies (Kontermann ed., 2011)を参照されたい。

20

【0132】

多重特異性抗体の例示的な構造は、当技術分野で公知であり、Weidle et al., 2013, Cancer Genomics & Proteomics 10: 1-18、Brinkman et al., 2017, MABS, 9: 2, 182-212、Godar et al., 2018, Expert Opinion on Therapeutic Patents, 28: 3, 251-276、及びSpiess et al., 2015, Mol. Immunol. 67 95-106に記載されている。

【0133】

例えば、二重特異性抗体分子は、異なる構造群に分類することができる：(i) 二重特異性免疫グロブリンG（BsIgG）、(ii) 追加の抗原結合部分が付加されたIgG、(iii) 二重特異性抗体フラグメント、(iv) 二重特異性融合タンパク質、及び(v) 二重特異性抗体複合体。非限定的な例として、BsIgGフォーマットとしては、crossMab、DAF（2イン1）、DAF（4イン1）、DutaMab、DT-IgG、ノブインホール共通LC、ノブインホールアセンブリ、電荷対、Fab-アーム交換、SEEDbody、トリオマブ、LUZ-Y、Fcab、κλ-ボディ、及び/または直交Fabが挙げられ得る。

30

【0134】

いくつかの実施形態では、BsIgGは、ヘテロ二量体化用に操作された重鎖を含む。例えば、重鎖は、「ノブイントゥホール」戦略、SEEDプラットフォーム、共通の重鎖（例えば、κλボディ中）、及びヘテロ二量体Fc領域の使用、を用いて、ヘテロ二量体化用に操作され得る。BsIgGにおいてホモ二量体の重鎖対合を回避するための戦略は、当技術分野で既知であり、これには、ノブイントゥホール、デュオボディ、アジメトリック、電荷対、HA-TF、SEEDbody、及びプロテインA親和性の差異が含まれる。

40

【0135】

別の二重特異性抗体のフォーマットは、追加の抗原結合部分が付加されたIgGである。例えば、単一特異性IgGは、追加の抗原結合単位を単一特異性IgGに、例えば、重鎖または軽鎖のいずれかのN末端またはC末端で付加することによって、二重特異性を有

50

するように操作することができる。例示的なさらなる抗原結合単位としては、単一ドメイン抗体（例えば、可変重鎖または可変軽鎖）、操作されたタンパク質の足場、及び対抗体可変ドメイン（例えば、単鎖可変フラグメントまたは可変フラグメント）が挙げられる。付加されたIgG形式の非限定的な例としては、二重可変ドメインIgG（DVD-Ig）、IgG（H）-scFv、scFv-（H）IgG、IgG（L）-scFv、scFv-（L）IgG、IgG（L，H）-Fv、IgG（H）-V、V（H）-IgG、IgG（L）-V、V（L）-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、zybody、及びDVI-IgG（4イン1）が挙げられる。Spiess et al. Mol Immunol. 67（2015）：95-106を参照されたい。いくつかの実施形態では、単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性抗体）の例示的な抗体フォーマットは、例えば、国際特許出願公開第WO2018/075692号及び米国特許出願公開第2018/0118811号に記載されるように、B-Bodyフォーマットである。

10

20

30

40

50

【0136】

二重特異性抗体フラグメント（BsAb）は、抗体の定常ドメインの一部またはすべてを欠く二重特異性抗体分子のフォーマットである。例えば、いくつかのBsAbはFc領域を欠く。実施形態では、二重特異性抗体フラグメントは、単一の宿主細胞におけるBsAbの効率的な発現を可能にするペプチドリンカーによって接続された重鎖及び軽鎖領域を含む。二重特異性抗体フラグメントの非限定的な例としては、ナノボディ、ナノボディ-HAS、BiTE、ダイアボディ、DART、TandAb、scダイアボディ、scダイアボディ-CH3、ダイアボディ-CH3、三重体、ミニ抗体、ミニボディ、TriBiミニボディ、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F（ab'）₂、F（ab'）₂-scFv₂、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四価HCAb、scダイアボディ-Fc、ダイアボディ-Fc、直列型scFv-Fc、及びイントラボディが挙げられるが、これらに限定されない。

【0137】

二重特異性融合タンパク質は、他のタンパク質にリンクされた抗体フラグメントを含む。例えば、二重特異性融合タンパク質は、さらなる特異性及び／または機能性を追加するために他のタンパク質にリンクされ得る。いくつかの実施形態では、ドックアンドロック（DNL）法を使用して、価数がより高い二重特異性抗体分子を生成することができる。例えば、アルブミン結合タンパク質またはヒト血清アルブミンへの二重特異性抗体融合は、抗体フラグメントの血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、化学的コンジュゲーション、例えば、抗体及び／または抗体フラグメントの化学的コンジュゲーションを使用して、BsAb分子が創出され得る。例示的な二重特異性抗体複合体には、低分子量薬物が、各Fabアームまたは抗体もしくはそのフラグメントにおける単一の反応性リジンに部位特異的にコンジュゲートされるCovX-bodyフォーマットが含まれる。いくつかの実施形態では、コンジュゲーションは血清半減期を改善する。

【0138】

二重特異性抗体を含む多重特異性抗体の産生方法は、当技術分野で既知である。例えば、二重特異性抗体を含む多重特異性抗体は、異なる宿主細胞内での成分抗体の別々の発現及びその後の精製／アセンブリによって、または単一の宿主細胞内での成分抗体の発現によって産生され得る。多重特異性（例えば、二重特異性）抗体分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィーを含む、当技術分野で既知の様々な方法によって行うことができる。

【0139】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）は、本明細書で開示される、または当技術分野で公知の任意の抗体フォーマットで提供され得る。非限定的な例として、いくつかの実施形態では、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）は、Fab-in-tandem-lg（FIT-lg）、DVD-lg、ハイブリッドハイブリドーマ（クワドロマまたはテトラド-

マ)、アンチカリンプラットフォーム (Pieris)、ダイアボディ、単鎖ダイアボディ、直列型単鎖Fvフラグメント、TandAb、三重特異性Ab (Affimed)、ダーツ二重親和性再標的化 (Macrogenics)、二重特異性Xmab (Xencor)、二重特異性T細胞エンゲージャー (Bites、Amgen、55kDa)、Triplebodies、Tribody=Fab-scFv融合タンパク質多機能組換え抗体誘導体 (Creative Biolabs)、デュオボディプラットフォーム (Genmab)、ドックアンドロックプラットフォーム、ノブイントゥホール (KIH) プラットフォーム、ヒト化二重特異性IgG抗体 (REGN1979) (Regeneron)、Mab2二重特異性抗体 (F-Star)、DVD-Ig=二重可変ドメイン免疫グロブリン (Abbott)、カッパーラムダボディ、TBTI=四価の二重特異性直列型Ig、及びCrossMab (Roche) から選択され得る。

10

【0140】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される多重特異性 (例えば、二重特異性) 抗体は、5T4結合ドメイン、及び5T4ではない1つ以上の標的に結合する1つ以上の追加の結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される多重特異性 (例えば、二重特異性) 抗体は、本明細書で開示される、表1、表2、または表3などのVH及び／またはVLアミノ酸配列を含む5T4結合ドメインを含む。

【0141】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、本明細書で開示されるVH及びVL CDR、表1、表2、または表3などに記載のものを含む5T4に結合する結合ドメインを含む多重特異性 (例えば、二重特異性) 抗体である。

20

【0142】

5T4に結合する抗体は、5T4を含む全腫瘍細胞による免疫化及び抗体の採取、組換え技法、または5T4細胞外ドメインエピトープを使用した抗体もしくは抗体フラグメントのスクリーニングライブラリなどの任意の適切な方法によって得てもよい (が、これらに限定されない)。モノクローナル抗体は、様々な既知の技術を使用して生成することができ (例えば、Coligan et al. (eds.), Current Protocols in Immunology, 1:2.5.12.6.7 (John Wiley & Sons 1991); Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn, and Bechtol (eds.) (1980); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); and Picklesley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli," in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al. (eds.), page 93 (Oxford University Press 1995) を参照されたい)。モノクローナル抗体を生成するための1つの例示的な技術は、動物をヒト5T4抗原で免疫化し、その動物から採取した脾臓細胞からハイブリドーマを生成することを含む。ハイブリドーマは、5T4に結合するモノクローナル抗体または抗体フラグメントを産生し得る。

30

40

【0143】

さらなる実施形態では、モノクローナル抗体または抗体フラグメントは、例えば、Antibody Phage Display: Methods and Protocols, P. M. O'Brien and R. Aitken, eds, Humana Press, Totawa NJ, 2002に記載される技術を使用して生成された抗体ファージライブラリから単離され得る。原則として、合成抗体クローンは、ファージコートタンパク質に融合した抗体可変領域 (Fv) の様々なフラグメントをディスプレイするファ

50

ージを含むファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。かかるファージライブラリは、所望の抗原に対してスクリーニングされる。所望の抗原に結合することができるFvフラグメントを発現するクローンは、抗原に吸着し、それ故に、ライブラリ内の非結合クローンから分離される。その後、結合クローンは、抗原から溶出し、追加の抗原吸着／溶出サイクルによってさらに富化され得る。

【0144】

可変ドメインは、例えば、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)に記載されるように、VH及びVLが短い柔軟性ペプチドを介して共有結合される一本鎖Fv (scFv) フラグメントとして、またはそれらが各々定常ドメインに融合して非共有結合的に相互作用するFabフラグメントとしてのいずれかで、ファージ上に機能的にディスプレイされ得る。

10

【0145】

VH及びVL遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって別個にクローニングされ、ファージライブラリ内でランダムに組換えられ得、その後、これは、Winter et al. (上掲)に記載されるように、抗原結合クローンについて検索され得る。免疫された源からのライブラリは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、ナイーブレパートリーは、Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)に記載されるように、クローニングされて、いずれの免疫化も伴うことなく、単一のヒト抗体源を広範囲の非自己抗原及び自己抗原に提供することができる。最後に、ナイーブラライブラリはまた、例えば、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)に記載されるように、幹細胞に由来する再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、無作為配列を含有するPCRプライマーを使用して高度可変CDR3領域をコードし、インビトロで再配列を達成することによって、合成的に作製することができる。

20

【0146】

ライブラリのスクリーニングは、当技術分野で周知の様々な技術によって達成可能である。例えば、5T4 (例えば、5T4ポリペプチド、フラグメント、またはエピトープ) は、吸着プレートのウェルをコーティングするのに使用され得るか、吸着プレートに付着した宿主細胞上で発現または細胞選別で使用され得るか、またはストレプトアビジン被覆ビーズで捕捉するためにビオチンにコンジュゲートされ得るか、またはディスプレイライブラリをパニングするための任意の他の方法で使用され得る。遅い解離速度 (例えば、良好な結合親和性) を有する抗体の選択は、Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990) 及びWO92/09690に記載されるように、長時間の洗浄及び一価ファージディスプレイの使用によって、ならびにMarks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)に記載されるように、抗原の低被覆密度によって促進され得る。

30

【0147】

5T4結合剤 (例えば、抗体) は、目的とするファージクローンを選択するのに好適な抗原スクリーニング手順を設計し、続いて、目的とするファージクローン及びKabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD. (1991), vols. 1-3に記載される好適な定常領域 (例えば、Fc) 配列に由来するVH及び／またはVL配列 (例えば、Fv配列)、またはVH及びVL配列に由来する様々なCDR配列を用いて、完全長5T4結合剤 (例えば、抗体) クローンを構築することにより、得ることができる。

40

【0148】

同様に、5T4に結合するヒト抗体は、ヒト末梢血細胞 (例えば、Bリンパ球を含む) のエプスタイン・バーウイルス (EBV) 形質転換、ヒトB細胞のインビトロ免疫化、挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子を有する免疫化トランスジェニックマウスからの脾臓

50

細胞の融合、ヒト免疫グロブリンV領域ファージライブラリからの単離、または当技術分野で既知であり、本明細書の開示に基づいている他の手順を含むがこれらに限定されない、いくつかの技術のいずれかによって生成され得る。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法はさらに、例えば、Bruggemann et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8:455-58, 1997; Jakobovits et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 764:525-35, 1995; Green et al., Nature Genet., 7:13-21, 1994; Lonberg et al., Nature, 368:856-859, 1994; Taylor et al., Int. Immun., 6:579-591, 1994 及び米国特許第5,877,397号に記載されている。

10

【0149】

例えば、5T4に結合するヒト抗体は、抗原投与に応答して特異的なヒト抗体を産生するように操作されたトランスジェニック動物から得ることができる。例えば、国際特許公開第WO98/24893号は、ヒトIg遺伝子座を有するトランスジェニック動物を開示しており、これらの動物は、内因性重鎖及び軽鎖遺伝子座の不活性化のために、機能的な内因性免疫グロブリンを産生しない。抗体が霊長類の定常領域及び／または可変領域を有し、内因性免疫グロブリンをコードする遺伝子座が置換または不活性化されている、免疫原に対する免疫応答を開始することができるトランスジェニック非霊長類哺乳類宿主も記載されている。国際特許公開第WO96/30498号は、定常領域または可変領域の全てまたは一部を置き換えて修飾抗体分子を形成するような、哺乳動物における免疫グロブリン遺伝子座を修飾するためのCre/Loxシステムの使用を開示する。国際特許公開第WO94/02602号は、不活性化された内因性Ig遺伝子座及び機能的ヒトIg遺伝子座を有する非ヒト哺乳動物宿主を開示する。米国特許第5,939,598号は、マウスが内因性重鎖を欠き、1つ以上の異種定常領域を含む外因性免疫グロブリン遺伝子座を発現するトランスジェニックマウスの作製方法を開示する。本明細書に記載のトランスジェニック動物などのトランスジェニック動物を使用して、選択された抗原性分子に対して免疫応答をもたらすことができ、抗体産生細胞を動物から取り出し、これを使用して、ヒト由来のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを産生することができる。免疫化プロトコル、アジュバントなどは当技術分野で既知であり、例えば、国際特許公開第WO96/33735号に記載されているように、トランスジェニックマウスの免疫化に使用される。モノクローナル抗体は、対応するタンパク質の生物活性または生理学的効果を阻害または中和する能力について試験することができる。

20

30

【0150】

本開示は、ヒト5T4を含む5T4に結合するヒト化抗体を提供する。本開示のヒト化抗体は、表1～3に示すもの等、本明細書に開示されるVH及び／またはVLに由来する1つ以上のCDRを含み得る。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、さまざまなものが当技術分野において知られている。例えば、ヒト化抗体は、非ヒト由来源から導入される1つ以上のアミノ酸残基を有し得る。これらの非ヒトアミノ酸残基はしばしば「インポート」残基と呼ばれ、通常は「インポート」可変ドメインに由来する。5T4に結合するヒト化抗体は、当業者には周知の技術を使用して作製することができる(Zhang et al., Molecular Immunology, 42(12):1445-1451, 2005; Hwang et al., Methods, 36(1):35-42, 2005; Dall'Acqua et al., Methods, 36(1):43-60, 2005; Clark, Immunology Today, 21(8):397-402, 2000、及び米国特許第6,180,370号、同第6,054,927号、同第5,869,619号、同第5,861,155号、同第5,712,120号、及び同第4,816,567号)。

40

【0151】

いくつかの場合において、ヒト化抗体は、親非ヒト抗体(例えば、げっ歯類)のVH及びVLの6つのCDRのアミノ酸配列が、ヒト抗体フレームワーク上にグラフトされる、

50

CDRグラフト化によって構築される。例えば、Padlan et al. (FASEB J. 9:133-139, 1995) は、抗原に実際に接触するのはCDR中の残基の約3分の1のみであることを実証し、これらを「特異性決定残基」またはSDRと名付けた。SDRグラフト化の技術では、SDR残基のみがヒト抗体フレームワークにグラフトされる(例えば、Kashmiri et al., Methods 36:25-34, 2005を参照されたい)。

【0152】

ヒト化抗体を作製するのに使用される軽及び重の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低減するのに重要であり得る。例えば、いわゆる「ベストフィット」法では、非ヒト(例えば、げっ歯類)抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリに対してスクリーニングする。げっ歯類の配列に最も近いヒト配列をヒト化抗体のためのヒトフレームワークとして選択することができる(Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901)。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークが、いくつかの異なるヒト化抗体のために使用されてもよい(Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623)。いくつかの場合において、フレームワークは、最も豊富なヒトサブクラスであるV_L6サブグループI(V_L6I)及びV_HサブグループIIII(V_HIIII)のコンセンサス配列に由来する。別の方法において、ヒト生殖細胞系列遺伝子が、フレームワーク領域の供給源で使

10

20

【0153】

超ヒト化と呼ばれるCDRの比較に基づく代替パラダイムでは、フレームワークの相関性は関係しない。この方法は、非ヒト配列と機能的なヒト生殖細胞系列遺伝子レパートリーとの比較からなる。次いで、マウス配列と同じまたは密接に関係する標準的な構造をコードする遺伝子を選択する。次に、非ヒト抗体と標準的な構造を共有する遺伝子のうち、CDRと最も相関性の高い遺伝子をフレームワークドナーとして選択する。最後に、これらのフレームワーク上に非ヒトCDRをグラフトする(例えば、Tan et al., J. Immunol. 169:1119-1125, 2002を参照されたい)。

30

【0154】

更に、抗体は、抗原に対する親和性及び他の好ましい生物学的特性を維持したままヒト化されることが一般に望ましい。この目的を達成するために、ある方法では、親配列及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列と種々の概念上のヒト化産物について分析するプロセスによって、ヒト化抗体が調製される。三次元免疫グロブリンモデルが一般に利用可能であり、当業者にはよく知られている。選択された免疫グロブリン候補配列から推定される三次元高次構造を例示及び表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらには、例えば、WAM(Whitelegg and Rees, Protein Eng. 13:819-824, 2000)、Modeller(Sali and Blundell, J. Mol. Biol. 234:779-815, 1993)、及びSwiss PDB Viewer(Guex and Peitsch, Electrophoresis 18:2714-2713, 1997)が挙げられる。これらの表示を検討することにより、免疫グロブリン候補配列の機能において、その残基が果たすと思われる役割の分析、例えば、免疫グロブリン候補の抗原に結合する能力に影響を与える残基を分析することが可能となる。このように、フレームワーク残基は、標的抗原(複数可)に対する親和性の増加などの所望の抗体特性が達成されるように、レシピエント配列及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般に、超可変領域残基は、抗原結合への影響に直接的かつ最も実質的に関与している。

40

【0155】

抗体ヒト化の別の方法には、ヒトストリング含有量(HSC)と呼ばれる抗体ヒト化の

50

尺度に基づくものがある。この方法は、マウス配列をヒト生殖細胞系列遺伝子のレパートリーと比較し、差異をHSCとしてスコア化する。次いで、グローバルな同一性指標を使用するのではなく、そのHSCを最大化することによって標的配列をヒト化して、複数の多様なヒト化バリエーションが生成される (Lazar et al., Mol. Immunol. 44:1986-1998, 2007)。

【0156】

上記の方法に加えて、経験的方法を使用して、ヒト化抗体を生成及び選択することができる。これらの方法には、ヒト化バリエーションの大規模なライブラリ生成、及び濃縮技術またはハイスループットスクリーニング技術を使用した最良クローンの選択に基づくものが含まれる。抗体バリエーションは、ファージ、リボソーム、及び酵母ディスプレイライブラリから、ならびに細菌コロニースクリーニングによって単離され得る (例えば、Hoogenboom, Nat. Biotechnol. 23:1105-1116, 2005; Dufner et al., Trends Biotechnol. 24:523-529, 2006; Feldhaus et al., Nat. Biotechnol. 21:163-70, 2003; Schlapschky et al., Protein Eng. Des. Sel. 17:847-60, 2004を参照されたい)。

【0157】

フレームワークライブラリアプローチでは、残基バリエーションのコレクションをフレームワークの特定の位置に導入し、続いて、ライブラリを選択して、グラフト化CDRを最も良く支えるフレームワークが選択される。置換される残基は、CDR構造に寄与する可能性があると特定された「Vernier」残基のいくつかもしくは全てを含み得るか (例えば、Foote and Winter, J. Mol. Biol. 224:487-499, 1992を参照されたい) またはBaca et al. (J. Biol. Chem. 272:10678-10684, 1997) により特定されるより制限された標的残基のセットからのものが含まれてもよい。

【0158】

フレームワークシャッフリングでは、選択された残基バリエーションのコンビナトリアルライブラリを作製するのではなく、フレームワーク全体を非ヒトCDRと組み合わせる (例えば、Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60, 2005を参照されたい)。ライブラリは、最初にVLをヒト化し、続いてVHをヒト化する2ステップの選択プロセスで結合についてスクリーニングしてもよい。あるいは、1ステップのフレームワークシャッフリングプロセスを使用してもよい。そのようなプロセスは、得られる抗体が、発現の増大、親和性及び熱安定性の増加を含む、生化学的及び物理化学的特性の改善を示すことから、2ステップスクリーニングに比べてより効率的であることが示されている (例えば、Damschroder et al., Mol. Immunol. 44:3049-60, 2007を参照されたい)。

【0159】

「ヒューマニアリング」法は、必須最小特異性決定基 (MSD) の実験的な特定に基づくものであり、ヒトフレームワークのライブラリへの非ヒトフラグメントの逐次的置換及び結合の評価に基づく。これは、非ヒトVH鎖及びVL鎖のCDR3の領域から始まり、VH及びVLの両方のCDR1及びCDR2を含む非ヒト抗体の他の領域をヒトフレームワークに徐々に置き換える。この方法により、典型的には、エピトープが保持され、ヒトVセグメントCDRが異なる複数のサブクラスの抗体が特定される。ヒューマニアリングにより、ヒト生殖細胞系列遺伝子抗体と91~96%の相同性をもつ抗体の単離が可能になる。(例えば、Alfenito, Cambridge Healthtech Institute's Third Annual PEGS, The Protein Engineering Summit, 2007を参照されたい)。

【0160】

「ヒトエンジニアリング」法は、ヒトにおいて免疫原性が減少しているが、それでもなお元の非ヒト抗体の所望の結合特性を保持している改変抗体を生成するように、抗体のA

10

20

30

40

50

ミノ酸配列に特定の変化をもたらすことによって、マウスまたはキメラ抗体または抗体フラグメントなどの非ヒト抗体または抗体フラグメントを改変することを伴う。一般に、この技術は、非ヒト（例えば、マウス）抗体のアミノ酸残基を「低リスク」、「中リスク」、または「高リスク」残基として分類することを伴う。分類は、置換が、特定の置換を行う（例えば、ヒトにおける免疫原性のために）結果として得られる抗体の折り畳みに影響が及ぶ、及び／またはヒト残基で置換されるリスクに対する予想される利益を評価する、グローバルなリスク／リワードの算出を使用して実施される。非ヒト（例えば、マウス）抗体配列の所与の位置（例えば、低または中リスク）で置換される特定のヒトアミノ酸残基は、非ヒト抗体の可変領域に由来するアミノ酸配列を特定のヒト抗体配列またはコンセンサスヒト抗体配列の対応する領域とアラインさせることによって選択することができる。非ヒト配列中の低または中リスク位置にあるアミノ酸残基は、アライメントに従って、ヒト抗体配列中の対応する残基に置き換えることができる。ヒトエンジニアリングタンパク質を作製するための技術は、Studnicka et al., Protein Engineering 7: 805-814 (1994); 米国特許第5,766,886号; 同第5,770,196号; 同第5,821,123号; 及び同第5,869,619号; ならびにPCT公開第WO93/11794号に更に詳細に記載されている。

10

【0161】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5T4結合剤は、非抗体タンパク質の足場を含む。かかる非抗体タンパク質の足場の非限定的な例としては、フィブロネクチン足場、アンチカリン、アドネクチン、アフィボディ、DARPin、フィノマー、アフィチン、アフィリン、アビマー、システインリッチノッティンペプチド、または操作されたKunitz型阻害剤が含まれる。そのような非抗体タンパク質の足場を生成する方法は、当技術分野で周知であり、それらのいずれか1つを使用して、非抗体タンパク質足場を含む5T4結合剤を生成することができる（例えば、Simeon and Chen, Protein Cell, 9(1): 3-14 (2018)、Yang et al., Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif). 10(1): 293-320 (2017)を参照されたい）。

20

【0162】

加えて、本明細書に開示される5T4結合剤（例えば、抗体または抗体フラグメント）または融合ポリペプチドをコードする核酸、それに相補的な核酸、本明細書で開示される核酸を含むベクター、本明細書で開示される核酸またはベクターを含む細胞が提供される。いくつかの実施形態では、細胞は、5T4結合剤を発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、核酸またはベクターを複製する。いくつかの実施形態では、5T4結合剤、例えば、ヒト5T4結合剤、及びそのフラグメントを生成するための材料が提供される。例えば、単離された細胞は、5T4結合剤（例えば、抗体または抗体フラグメント）を産生し得る。この点で、細胞（例えば、単離された細胞）は、本明細書に開示されるVH及びVLを含む抗体またはそのフラグメントを産生することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、5T4結合剤（例えば、抗体、または抗体フラグメント）をコードする1つ以上の核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、単離及び／または組み換えポリヌクレオチドである。様々な態様では、単離されたポリヌクレオチドは、VH及び／またはVLをコードするヌクレオチド配列を含み、そのVH及びVLは、本明細書で開示されているCDRと同一の相補性決定領域（CDR）を含む。

30

40

【0163】

いくつかの実施形態では、1つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）は、適切な宿主細胞において1つ以上のポリヌクレオチドを発現させるための1つ以上のポリヌクレオチドを含み得る。かかるベクターは、例えば、宿主細胞内のポリヌクレオチドを増幅させて有用な量を創出するために、及び結合剤、例えば、抗体または抗体フラグメントを、組換え技法を使用して発現させるために有用である。

【0164】

50

いくつかの実施形態では、1つ以上のベクターは、1つ以上のポリヌクレオチドが、発現制御配列を含む1つ以上のポリヌクレオチドに作動可能にリンクされる発現ベクターである。5'に結合する抗体配列をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを組み込んだプラスミド及びウイルスDNAベクターなどの自己複製組み換え発現構築物が具体的に企図される。発現対照DNA配列には、プロモーター、エンハンサー、及びオペレーターが含まれ、一般に、発現構築物が利用される発現系に基づいて選択される。プロモーター及びエンハンサー配列は一般に、遺伝子発現を増加させる能力のために選択されるが、オペレーター配列は、一般に、遺伝子発現を調節する能力のために選択される。発現構築物はまた、構築物を保有する宿主細胞の同定を可能にする1つ以上の選択可能マーカーをコードする配列を含んでもよい。発現構築物はまた、宿主細胞における相同組換えを容易にする、好ましくは促進する、配列を含むこともできる。いくつかの実施形態では、発現構築物はまた、宿主細胞における複製に必要な配列も含み得る。

10

【0165】

例示的な発現制御配列は、プロモーター／エンハンサー配列、例えば、サイトメガロウイルスプロモーター／エンハンサー (Lehner et al., J. Clin. Microbiol., 29:2494-2502, 1991; Boshhart et al., Cell, 41:521-530, 1985); ラウス肉腫ウイルスプロモーター (Davis et al., Hum. Gene Ther., 4:151, 1993)、タイプロモーター (Korhonen et al., Blood, 86(5):1828-1835, 1995)、サルウイルス40プロモーター、DRA (down regulated in adenoma; Alrefai et al., Am. J. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 293:G923-G934, 2007); MCT1 (モノカルボキシレートトランスポーター1; Cuff et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., G977-G979, 2005)、及びMath1 (mouse atonal homolog1; Shroyer et al., Gastroenterology, 132:2477-2478, 2007)を含み、哺乳類細胞での発現のため、プロモーターはポリペプチドコード配列の上流 (例えば、5') に作動可能にリンクされる。他のバリエーションでは、プロモーターは、上皮特異的プロモーターまたは内皮特異的プロモーターである。ポリヌクレオチドはまた、任意選択で、ポリペプチドコード配列の下流 (例えば、3') に作動可能にリンクされた好適なポリアデニル化配列 (例えば、SV40またはヒト成長ホルモン遺伝子ポリアデニル化配列) を含む得る。

20

30

【0166】

必要に応じて、1つ以上のポリヌクレオチドは、ポリペプチド配列とインフレイムで融合された分泌シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を任意でさらに含むことができる。分泌シグナルペプチドは、1つ以上のポリヌクレオチドを発現する細胞による抗体ポリペプチドの分泌を導き、分泌されたポリペプチドから細胞によって開裂する。1つ以上のポリヌクレオチドは、さらに、任意選択で、ベクターの大量生産を容易にするための意図される機能である配列を含み得る。種々の導入遺伝子に関する文献に記載されている手順を使用して、遺伝子治療用のポリヌクレオチドを製造及び投与することができる。例えば、Isner et al., Circulation, 91:2687-2692, 1995、及びIsner et al., Human Gene Therapy, 7:989-1011, 1996を参照されたい。

40

【0167】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、宿主細胞による取り込み及び抗体もしくはそのフラグメント (及び／または任意の他のペプチド) の発現を容易にするための追加の配列をさらに含む得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体またはそのフラグメントをコードする「裸の」導入遺伝子 (例えば、トランスフェクションを容易にするためのウイルス、リボソーム、または他のベクターを含まない導入遺伝子) が用いら

50

れる。

【0168】

任意の適切なベクターを使用して、抗体またはそのフラグメントをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを宿主に導入することができる。記載されている例示的なベクターとしては、レンチウイルスベクター (Kim et al., J. Virol., 72 (1) : 811-816, 1998、Kingsman & Johnson, Scrip Magazine, October 1998, pp. 43-46)、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターなどのパルボウイルスベクター (米国特許第5, 474, 935号; 同第5, 139, 941号; 同第5, 622, 856号; 同第5, 658, 776号; 同第5, 773, 289号; 同第5, 789, 390号; 同第5, 834, 441号; 同第5, 863, 541号; 同第5, 851, 521号; 同第5, 252, 479号; Gnatenko et al., J. Invest. Med., 45: 87-98, 1997)、アデノウイルス (AV) ベクター (米国特許第5, 792, 453号、同第5, 824, 544号、同第5, 707, 618号、同第5, 693, 509号、同第5, 670, 488号、同第5, 585, 362号、Quentin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2581-2584, 1992、Stratford Perricaudet et al., J. Clin. Invest., 90: 626-630, 1992、及び Rosenfeld et al., Cell, 68: 143-155, 1992)、アデノウイルスアデノ随伴ウイルスキメラ (米国特許第5, 856, 152号)、またはワクシニアウイルスもしくはヘルペスウイルスベクター (米国特許第5, 879, 934号、同第5, 849, 571号、同第5, 830, 727号、同第5, 661, 033号、同第5, 328, 688号)、リポフェクチン媒介性遺伝子導入 (BRL)、リポソームベクター (米国特許第5, 631, 237号)、及びそれらの組み合わせが含まれる。これらのいずれの発現ベクターも、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)、及び Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N. Y. (1994) に記載される標準的な組み換えDNA技術を使って調製することができる。任意選択で、ウイルスベクターは、例えば、ウイルスの複製に必要な選択遺伝子を欠失または破壊することによって複製欠損にされる。

【0169】

企図される他の非ウイルス送達メカニズムとしては、リン酸カルシウム沈殿が挙げられる (Graham and Van Der Eb, Virology, 52: 456-467, 1973、Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7: 2745-2752, 1987、Rippe et al., Mol. Cell Biol., 10: 689-695, 1990) DEAE-dextran (Gopal, Mol. Cell Biol., 5: 1188-1190, 1985)、エレクトロポレーション (Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6: 716-718, 1986、Potter et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81: 7161-7165, 1984)、直接マイクロインジェクション (Harland and Weintraub, J. Cell Biol., 101: 1094-1099, 1985、DNA負荷リポソーム (Nicolau and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721: 185-190, 1982、Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3348-3352, 1979; Felgner, Sci Am., 276 (6): 102-6, 1997、Felgner, Hum Gene Ther., 7 (15): 1791-3, 1996)、細胞超音波処理 (Fechheimer et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8463-8467, 1987)、高速マイクロプロジェクトイルを使用した遺伝子ボンバードメント (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 9568-9572, 1990)、及び受容体介在性トランスフェクション (Wu and Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432, 1987、Wu and Wu, Biochemistry, 27: 887-892, 1988、Wu and Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12: 159-167, 1993を参照されたい)。

【0170】

ベクター (または本明細書で論じられる抗体もしくはそのフラグメントまたは核酸) は、リポソームに封入されてもよい。例えば、Ghosh and Bachhawat, In: Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands, Wu G, Wu C ed., New York: Marcel Dekker, pp. 87-104 (1991)、Radler et al., Science, 275 (5301): 810-814, 1997)を参照されたい。「リポフェクション」技術を伴う様々な商業的なアプローチもまた企図される。いくつかの実施形態では、リポソームは、赤血球凝集ウイルス (H V J) と複合体化され得る。これにより、細胞膜との融合が促進され、リポソーム封入 DNA の細胞進入が促進されることが示されている (Kaneda et al., Science, 243: 375-378, 1989)。一部の実施形態では、リポソームは、核内非ヒストン染色体タンパク質 (H M G - 1) と複合体を形成するか、またはそれと併せて用いられる (Kato et al., J. Biol. Chem., 266: 3361-3364, 1991)。いくつかの実施形態では、リポソームは、H V J 及び H M G - 1 の両方と複合体化されるか、または併用される。そのような発現構築物は、インビトロ及びインビボでの核酸の移入及び発現において成功裏に使用されている。いくつかの実施形態では、ヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体) は、表面で 5 T 4 を発現している細胞 (腫瘍細胞等) にリポソームを標的化するために、リポソームに含められる。

【0171】

細胞は、1つ以上のポリヌクレオチドまたは1つ以上のベクターを含み得、例えば、細胞は、ヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体) または1つ以上のポリヌクレオチドを含むベクターをコードする1つ以上のポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトされている。いくつかの実施形態では、細胞は、m A b A 4、m A b A 15、または m A b A 17 (例えば、表 1、2、及び／または 3 を参照されたい) の C D R に対して、少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する、6つの C D R を含む1つ以上の C D R を含む、ヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体) を発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、m A b A 4、m A b A 15、及び／または m A b A 17 (例えば、表 1、2、及び／または 3 を参照されたい) の C D R と同一の C D R を含む V H 及び V L を含有するヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体) を発現する。細胞は、原核細胞、例えば、Escherichia coli (例えば、Pluckthun et al., Methods Enzymol., 178: 497-515, 1989を参照されたい)、または真核細胞、例えば、動物細胞 (例えば、骨髄腫細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、もしくはハイブリドーマ細胞)、酵母 (例えば、Saccharomyces cerevisiae)、または植物細胞 (例えば、タバコ、トウモロコシ、ダイズ、もしくはコメ細胞) が挙げられる。哺乳類宿主細胞の使用は、組換え発現産物に最適な生物活性を与えることが望ましい場合がある翻訳修飾 (例えば、グリコシル化、トランケーション、脂質化、及びリン酸化) を提供することができる。同様に、ポリペプチド (例えば、ヒト 5 T 4 結合剤を含む 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体)) は、グリコシル化もしくは非グリコシル化されていてもよく、及び／またはポリエチレングリコール

、ポリオキシエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールなどの1つ以上の水溶性ポリマーアタッチメントを含むように共有結合修飾されていてもよい。

【0172】

DNAまたはRNAを宿主細胞に導入するための方法は周知であり、形質転換、形質移入、エレクトロポレーション、核内注射、またはリポソーム、ミセル、シャドウ細胞、及びプロトプラストなどの担体との融合が含まれる。かかる宿主細胞は、ポリヌクレオチドを増幅させるのに、及びポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを発現させるのにも有用である。この点で、5T4結合剤（例えば、抗体）生産のためのプロセスは、宿主細胞を培養し、5T4結合剤を単離することを含み得る。裸のDNA発現構築物の細胞への移入は、粒子衝撃を使用して達成することができ、これは、DNAコーティングされたマイクロプロジェクティルを高速に加速する能力に依存し、これにより、それらが細胞膜を貫通して、細胞を殺傷することなく細胞に進入することが可能になる（Klein et al., Nature, 327:70-73, 1987を参照されたい）。小粒子を加速するための装置がいくつか開発されている。そのような装置の1つは、高電圧放電に依存して電流を発生させ、これが次に動力を提供する（Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9568-9572, 1990）。使用されているマイクロプロジェクティルは、タングステンまたはゴールドビーズなどの生物学的に不活性な物質で構成されている。宿主細胞は、単離及び／または精製され得る。宿主細胞はまた、インビボでポリペプチドの一過性または永続的な発現を引き起こすようにインビボで形質転換された細胞であり得る。宿主細胞はまた、エクスピボで形質転換され、例えば治療目的でインビボでポリペプチドを産生するために形質転換後に導入される単離された細胞であってもよい。宿主細胞の定義は、トランスジェニックヒトを明示的に除外する。

【0173】

ポリヌクレオチドから抗体を生産するための様々な方法が一般的に周知である。例えば、基本的な分子生物学手順は、Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989 (Maniatis et al., 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001も参照されたい)に記載されている。さらに、多数の刊行物が、DNAの操作、発現ベクターの作製、ならびに適切な細胞の形質転換及び培養による抗体の調製に適した技術を記載している（例えば、Mountain and Adair, Chapter 1 in Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Tombs ed., Intercept, Andover, UK, 1992）、及び Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel ed., Wiley Interscience, New York, 1999を参照されたい）。

【0174】

ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）は、例えば、上記も含めて、免疫動物から単離されるか、組換え的にもしくは合成的に生成されるか、または遺伝子操作されるかなどの任意の適切な方法を使用して産生される。抗体に由来する抗体フラグメントは、例えば、抗体のタンパク質分解加水分解によって得られる。例えば、全抗体のパインまたはペプシン消化は、それぞれ、 $F(ab')_2$ と呼ばれる5Sフラグメントまたは2つの一価Fabフラグメント及びFcフラグメントをもたらす。 $F(ab)_2$ を、チオール還元剤を使用してさらに開裂して、3.5S Fab一価フラグメントを生成することができる。抗体フラグメントを生成する方法は、例えば、Edelman et al., Methods in Enzymology, 1:422 Academic Press (1967)、Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys., 89:230-244, 1960; Porter, Biochem

. J. , 73 : 119 - 127 , 1959、米国特許第4,331,647号、及び Andrews, S. M. and Titus, J. A. in Current Protocols in Immunology (Coligan et al., eds) , John Wiley & Sons, New York (2003) , pages 2.8.1 2.8.10 and 2.10A.1 2.10A.5に記載されている。

【0175】

ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）は、遺伝子操作され得る。例えば、ヒト5T4結合剤を含む5T4結合剤（例えば、抗体）は、例えば、組み換えDNA工学技術によって生成された可変領域ドメインを含む。この点で、可変領域は、抗体のアミノ酸配列の挿入、欠失、または変化によって任意に修飾され、上記を含む目的の抗体を生成する。目的のCDRをコードするポリヌクレオチドは、例えば、ポリメラーゼ鎖反応を利用して、テンプレートとして抗体生産細胞のmRNAを使用して可変領域を合成することで調製される（例えば、Courtenay Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), page 166 (Cambridge University Press 1995); Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al., (eds.), page 137 (Wiley Liss, Inc. 1995); 及び Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2: 106-110, 1991を参照されたい）。現在の抗体操作技術では、少なくとも1つのCDR及び、任意で、第1の抗体に由来する1つ以上のフレームワークアミノ酸と、第2の抗体に由来する可変領域ドメインの残りの部分とを含有する操作された可変領域ドメインの構築が可能になる。かかる技術は、例えば、抗体をヒト化するため、または結合標的に対するその親和性を改善するために使用される。

【0176】

「ヒト化抗体」は、非ヒト免疫グロブリンの重及び軽可変鎖のCDRがヒト可変ドメインに移されている抗体である。定常領域は存在する必要はないが、存在する場合、それらは任意に、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一であり、いくつかの実施形態では、例えば、少なくとも約85~90%、約95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上、同一である。したがって、場合によっては、ヒト化免疫グロブリンのすべての部分（おそらくCDRを除く）は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。例えば、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（例えば、宿主抗体）であり、宿主抗体の超可変領域由来の残基が、所望の抗体特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類等の非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域由来の残基により置き換えられている。

【0177】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される5T4結合剤（例えば、抗体またはADC）は、5T4媒介性疾患、障害、または状態の1つ以上の症状を含む、疾患、障害、または状態を治療、予防、または緩和する組成物及び方法において有用である。5T4媒介性疾患、障害、及び状態には、腫瘍細胞が5T4を過剰発現する任意のがんが含まれるがこれらに限定されないがんが含まれる。

【0178】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、対象における腫瘍免疫を治療するための方法であり、方法は、対象に、本明細書に記載される5T4結合剤（例えば、抗体もしくはADC）もしくはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体またはADC）を含む医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態で

は、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体またはA D C）またはそのフラグメントまたは対象における腫瘍免疫の治療に使用するための、本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）を含む医薬組成物である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、対象における腫瘍免疫を治療するための薬剤の生産における、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体またはA D C）またはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体またはA D C）を含む医薬組成物の使用である。

【0179】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、対象におけるがんまたは腫瘍を治療するための方法であり、方法は、対象に、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）もしくはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体またはA D C）を含む医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、対象におけるがんまたは腫瘍の治療に使用するための、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体またはA D C）またはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）を含む医薬組成物である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、対象におけるがんまたは腫瘍を治療するための薬剤の生産における、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体またはA D C）またはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体またはA D C）を含む医薬組成物の使用である。

10

【0180】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、対象におけるがんまたは腫瘍に関連する1つ以上の症状を緩和するための方法であり、方法は、対象に、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）もしくはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体またはA D C）を含む医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、対象におけるがんまたは腫瘍に関連する1つ以上の症状を緩和するための使用における、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体またはA D C）またはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）を含む医薬組成物である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、対象におけるがんまたは腫瘍に関連する1つ以上の症状を緩和するための薬剤の生産における、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体またはA D C）またはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）を含む医薬組成物の使用である。

20

30

【0181】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、腫瘍を有する対象における腫瘍のサイズを減少させる方法であり、方法は、対象に、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）もしくはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体またはA D C）を含む医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、腫瘍を有する対象における腫瘍のサイズを減少させるための使用における、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）またはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）を含む医薬組成物である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、腫瘍を有する対象における腫瘍のサイズを減少させるための薬剤の生産における、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）またはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）を含む医薬組成物の使用である。

40

【0182】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、腫瘍を有する対象において、腫瘍細胞の除去を増強するための方法であり、方法は、対象に、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体またはA D C）もしくはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体またはA D C）を含む医薬組成物を投与することを含む。い

50

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、腫瘍を有する対象において、腫瘍細胞の除去を増強するための使用における、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）またはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）を含む医薬組成物である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるのは、腫瘍を有する対象において、腫瘍細胞の除去を増強するための薬剤の生産における、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）またはそのフラグメントまたは本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）を含む医薬組成物の使用である。

【0183】

本明細書に記載される方法の対象は、本明細書に記載される5 T 4 結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）もしくはそのフラグメント、または本明細書に記載される結合剤（例えば、抗体もしくはA D C）を含む医薬組成物と組み合わせて、本明細書に記載される1つ以上の治療剤を投与され得る。

【0184】

いくつかの実施形態では、抗体は、フレームワーク及びC D Rの両方が、例えば、Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242に記載されるようにヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を含むが、それに限定されない、ヒト抗体である。抗体が定常領域を含有する場合、定常領域もまた、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来することが好ましい。ヒト抗体は、例えば、抗体の活性を増強するために、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基を含む場合があるが、他の種に由来するC D R（例えば、ヒト可変フレームワーク領域内に配置されたマウスC D R）を含まない。

【0185】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法のがん細胞または腫瘍細胞は、細胞表面等で5 T 4を発現する。いくつかのさらなる実施形態では、がん細胞または腫瘍細胞は、5 T 4を過剰発現する。いくつかの実施形態では、5 T 4 結合剤（例えば、抗体またはA D C）は、細胞培養中の腫瘍細胞に対して細胞傷害性である。かかる細胞培養は、5 T 4を発現または過剰発現する腫瘍細胞を含み得る。腫瘍細胞としては、乳癌細胞、膀胱癌細胞、黒色腫細胞、前立腺癌細胞、中皮腫細胞、肺癌細胞、精巣癌細胞、甲状腺癌細胞、扁平上皮癌細胞、神経膠芽腫細胞、神経芽細胞腫細胞、子宮癌細胞、結腸直腸癌細胞、及び膵臓癌細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0186】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるのは、対象における腫瘍細胞の除去を増強させる方法である。例えば、方法は、腫瘍細胞の除去を増強するのに有効な量の5 T 4 結合剤（例えば、抗体またはA D C）、例えば、本明細書に記載のヒト5 T 4 結合剤を投与することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、5 T 4 結合剤（例えば、抗体またはA D C）を投与することを含み、5 T 4 結合剤は、(i) m A b A 4、m A b A 1 5、及び／またはm A b A 1 7（例えば、表1、2、及び／または、を参照されたい）と結合をめぐって競合する、(i i) ヒト5 T 4に結合する、及び／または(i i i) m A b A 4、m A b A 1 5、及び／またはm A b A 1 7（例えば、表1、2、及び／または3のC D R及びV H／V Lを参照のこと）に認識される5 T 4の領域に結合する、5 T 4 結合剤を含み、結果として腫瘍細胞の除去が増強される。いくつかの実施形態では、上記の1つ以上の結合剤（例えば、抗体）、ポリヌクレオチド、ベクター、及び／または細胞は、インビボでの腫瘍細胞の除去を増強する方法（例えば、対象においてがんを治療する方法）で使用され得る。

【0187】

対象における腫瘍成長を調節する（例えば、阻害、低減、防止する）方法も提供される

。例えば、方法は、対象に対して、対象における腫瘍増殖を調節するのに有効な量で 5 T 4 結合剤（例えば、抗体または A D C）を含む組成物を投与することを含む。

【0188】

「腫瘍」は、本明細書に使用されるとき、悪性または良性に関わらず、任意の腫瘍細胞成長または増殖、及びあらゆる前がん性及びがん性の細胞及び組織を指す。「がん」及び「がん性」という用語は、制御されていない細胞成長を典型的に特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指すか、または説明する。がんの例としては、これらに限定されるものではないが、乳癌、結腸癌、腎癌、肺癌、扁平上皮性骨髄性白血病、血管腫、黒色腫、星細胞腫、及び神経膠芽腫、ならびに、これらに限定されるものではない、他の細胞増殖性疾患状態が含まれる：心臓：肉腫（血管肉腫、繊維肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫）、粘液腫、横紋筋腫、線維腫、脂肪腫、及び奇形腫；肺：気管支原性癌（扁平上皮癌、未分化小細胞癌、未分化大細胞癌、腺癌）、肺泡（気管支）癌、気管支腺腫、肉腫、リンパ腫、軟骨腫性過誤腫、中皮腫；消化器系：食道癌（扁平上皮癌、腺癌、平滑筋肉腫、リンパ腫）、胃（癌腫、リンパ腫、平滑筋肉腫）、膵臓（乳管腺癌、インシュリノルナ、グルカゴ腫、ガストリ腫、カルチノイド腫瘍、ビポーマ）、小腸（腺癌、リンパ腫、カルチノイド腫瘍、カボジ肉腫、平滑筋腫、血管腫、脂肪腫、神経線維腫、線維腫）、大腸（腺癌、尿管状腺腫、絨毛性腺腫、過誤腫、平滑筋腫）、尿生殖器管：腎臓（腺癌、ウィルムス腫瘍（腎芽細胞腫）、リンパ腫、白血病、腎細胞癌）、膀胱及び尿道（扁平上皮癌、移行細胞癌、腺癌）、前立腺（前立腺の腺癌、肉腫、小細胞癌）、精巣（精上皮腫、奇形腫、胚芽腫、奇形癌、絨毛腫、肉腫、間質細胞癌、線維腫、線維腺腫、腺腫様腫瘍、脂肪腫）、肝臓：肝癌（肝細胞癌）、胆管癌、肝芽腫、血管肉腫、肝細胞腺腫、血管腫；骨：骨形成肉腫（骨肉腫）、線維肉腫、悪性線維性組織細胞腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性リンパ腫（細網細胞肉腫）、悪性巨細胞腫瘍脊髄腫、骨髄性外骨格筋（骨軟骨性外骨）、良性軟骨腫、軟骨芽細胞腫、軟骨粘線維腫、骨髄腫及び巨細胞腫瘍；神経系：頭蓋骨（骨腫、血管腫、肉芽腫、黄色腫、骨髄炎）、髄膜（髄膜腫、髄膜肉腫、神経膠腫症）、脳（星細胞腫、髄芽腫、神経膠腫、上衣腫、生殖細胞腫（松果体腫）、多形膠芽腫、乏突起細胞神経膠腫、神経鞘腫、網膜芽細胞腫、先天性腫瘍）、脊髓神経線維腫、髄膜腫、神経膠腫、肉腫）、婦人科：子宮（子宮内膜癌）、子宮頸部（子宮頸癌、前腫瘍子宮頸部異形成）、卵巣（卵巣癌）漿液性嚢胞腺癌、粘液性嚢胞腺癌、未分類癌腫、顆粒細胞腫瘍、セルトリ・ライディグ細胞腫瘍、生殖細胞腫、悪性奇形腫）、外陰部（扁平上皮癌、上皮内癌、腺癌、線維肉腫、黒色腫）、膣（明細胞癌、扁平上皮癌、延在性肉腫（胚性横紋筋肉腫））、卵管（癌腫）、血液学：血液（骨髄性白血病（急性及び慢性）、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、骨髄増殖性疾患、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群）、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（悪性リンパ腫）、皮膚：悪性黒色腫、基底細胞癌、扁平上皮癌、カボジ肉腫、ほ符号異形成母斑、脂肪腫、血管腫、皮膚線維腫、ケロイド、乾癬；ならびに副腎：神経芽細胞腫、及び甲状腺髄様癌を含む甲状腺のがんが含まれる。一部の実施形態では、腫瘍またはがんは、再発性腫瘍またはがんである。一部の実施形態では、腫瘍またはがんは、転移性腫瘍またはがんである。いくつかの実施形態では、腫瘍またはがんは、原発性腫瘍またはがんである。付加的または代替的に、腫瘍またはがんは、化学療法または他の非 5 T 4 標的抗がん療法に対して抵抗性である。

【0189】

同様に提供するのは、ヒト 5 T 4 結合剤などの 5 T 4 結合剤（例えば、抗体）を、それを必要とする対象に単独で、または別の薬剤と組み合わせて投与することによって、がんを治療する方法である。

【0190】

腫瘍細胞の除去を「増強させる」ことは、除去を 100% 増強することを必要としない。除去の割合の何らかの増強が企図される。同様に、腫瘍増殖を「調節する」とは、腫瘍サイズを縮小すること、腫瘍増殖を減速させること、または既存の腫瘍のサイズの増加を阻害することを指す。腫瘍を完全に排除する必要はない。腫瘍サイズの任意の減少または腫瘍増殖の減速は、対象における有益な生物学的効果を構成する。この点で、腫瘍細胞の

除去は、本方法を用いない場合（例えば、本方法の薬剤に曝露されていない生物学的にマッチする対照である対象または標本）において観察される除去の程度に比べて、例えば、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、または少なくとも約２０％増強することができる。この効果は、例えば、腫瘍サイズの縮小、腫瘍マーカーのレベルの低下もしくは維持、または腫瘍細胞集団の低減もしくは維持によって検出される。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の除去は、５Ｔ４結合剤（例えば、抗体）の非存在下での腫瘍細胞の除去と比較して、例えば、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、またはそれ以上（約１００％）増強される。

【０１９１】

さらに、例えば、骨の劣化、脊椎の虚脱、及び麻痺等のがんに関連する副作用を緩和または低減するために、５Ｔ４結合剤（例えば、抗体またはＡＤＣ）を使用することができる。一態様では、対象は、骨転移を患っているか、または骨転移に罹患するリスクがあり、５Ｔ４結合剤（例えば、抗体またはＡＤＣ）を周囲の骨の劣化を低減する量で投与する。したがって、一部の態様では、５Ｔ４結合剤は、骨転移による骨の劣化を予防し、腫瘍細胞増殖は低減するか、または低減しない。いくつかの態様では、５Ｔ４結合剤（例えば、抗体またはＡＤＣ）は、骨転移による骨の劣化を防止するとともに、腫瘍細胞増殖を低減させる。一般に、腫瘍細胞増殖に対する効果（例えば、増殖の阻害または増殖への影響なし）は、特定の転移の微小環境に依存する。例えば、実質的な量の１型コラーゲンを有する微小環境に位置する転移の増殖を阻害することができる。対照的に、実質的な量の１型コラーゲンを欠く微小環境に位置する転移の増殖は阻害することができないが、転移近傍の骨の劣化は軽減または防止される。

【０１９２】

特定の対象に対する５Ｔ４結合剤（例えば、抗体またはＡＤＣ）の特定の投与レジメンは、使用される薬剤、投与される薬剤の量、投与経路、ならびに任意の副作用の原因及び程度に部分的に依存する。対象（例えば、ヒト等の哺乳動物）に投与される薬剤（例えば、抗体またはＡＤＣ）の量は、合理的な時間枠にわたって所望の応答をもたらすのに十分であるべきである。したがって、いくつかの実施形態では、対象に投与される、本明細書に記載の５Ｔ４結合剤（例えば、抗体またはＡＤＣ）または医薬組成物の量は、有効量である。

【０１９３】

ヒト５Ｔ４結合剤（例えば、抗体またはＡＤＣ）等の５Ｔ４結合剤（例えば、抗体またはＡＤＣ）を含む組成物を投与する適切な経路は、当該技術分野で周知である。薬剤（例えば、抗体またはＡＤＣ）を投与するために複数の経路を使用することができるが、特定の経路は、別の経路よりも即時的かつ効果的な反応を提供し得る。

【０１９４】

本開示は、ヒト５Ｔ４結合剤などの５Ｔ４結合剤（例えば、抗体またはＡＤＣ）及び担体（例えば、薬学的に許容される担体）を含む、医薬組成物などの組成物を提供する。使用される特定の担体は、結合剤または共療法との溶解性及び反応性の欠如など、ならびに投与経路によって化学物理的考慮事項に依存し得る。薬学的に許容される担体は、当該技術分野で周知であり、その例が本明細書に記載されている。注射用途に好適な実例となる医薬形態には、注入可能な滅菌溶液または分散液を即時調製するための滅菌水溶液または分散液及び滅菌粉末が含まれる。注射用製剤については、例えば、Pharmaceuticals and Pharmacy Practice, J B Lippincott Co., Philadelphia, Pa., Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982)、及びASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)) にさらに記載されている。本明細書に提供される医薬組成物の調製及びそれらの様々な投与経路は、当該技術分野で周知の方法に従って実施することができる。本発明の文脈において有用な送達システムには、徐放性、遅延放出、及

10

20

30

40

50

び持続放出送達システムが含まれ、これにより、組成物の送達は、治療される部位の増感化より前に、かつそれを引き起こすのに十分な時間をかけて行われる。多くのタイプの放出送達システムが利用可能であり、当業者に公知である。適切な放出送達システムには、ポリ（ラクチド-グリコリド）、コポリシュウ酸塩、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸、及びポリ無水物などのポリマー塩基系が含まれる。薬物を含有する前述のポリマーのマイクロカプセルが、例えば、米国特許第5,075,109号に記載されている。送達系にはまた、コレステロール、コレステロールエステルなどのステロール、ならびにモノグリセリド及びトリグリセリドなどの脂肪酸または中性脂肪などの脂質である非ポリマー系、ヒドロゲル放出システム、サイロティックシステム、ペプチドベースの系、ワックスコーティング、従来の結合剤及び賦形剤を使用した圧縮錠剤、部分的に融合したインプラントなどが含まれる。具体的な例としては、限定されるものではないが、（a）活性組成物がマトリックス内の形態で含有される浸食システム、例えば、米国特許4,452,775、4,667,014、4,748,034、及び5,239,660に記載されるもの、ならびに（b）有効成分が、米国特許第3,832,253号及び同第3,854,480号に記載されているように、ポリマーから制御された速度で透過する拡散システム、が挙げられる。さらに、ポンプベースのハードウェア送達システムを使用することができ、これらのいくつかは植え込みに適合している。ヒト5T4結合剤などの5T4結合剤（例えば、抗体またはADC）を含む医薬組成物は、一態様では、かかる医薬組成物の使用に関する説明書を提供する包装材料とともに容器内に入れられる。一般に、そのような説明書は、試薬濃度を説明する有形の表現、ならびにいくつかの実施形態では、医薬組成物を再構成するのに必要であり得る賦形剤成分または希釈剤（例えば、水、生理食塩水、またはPBS）の相対量を含む。

10

20

30

40

50

【0195】

いくつかの態様では、本明細書に記載される方法は、さらに、治療剤を含む1つ以上の追加の薬剤を投与することを含み、これは、組成物中に存在してもよいし、ヒト5T4結合剤のような5T4結合剤（例えば、抗体またはADC）とともに投与されてもよいし、または同じもしくは異なる投与経路を使用して別個の組成物として提供され得る。治療剤を含む1つ以上の追加の薬剤は、5T4結合剤（例えば、抗体またはADC）と一緒にまたは別々に（例えば、同時に、代替的に、連続して）投与され得る（例えば、併用療法のため）。このような追加の治療剤としては、治療用抗体、免疫療法及び免疫療法剤、細胞傷害性薬剤、化学療法剤、及び阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0196】

本明細書に記載される5T4結合剤（例えば、抗体またはADC）とともに（例えば、併用療法のために）使用され得る治療用抗体としては、トラスツズマブ、アビキシマブ、ダクリズマブ、BEC2、IMC-C22、ビタキシン、Campath 1H/LDP-03、Smart M195、エブラツズマブ、ベクツモマブ、ビシリズマブ、CM3、ヒト化抗ICAM3抗体、IDEC-114、イブリツモマブチウキセタン、IDEC-131、IDEC-151、IDEC-152、SMART抗CD3、エクリズマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、IDEC-151、MDX-CD4、CD20-トレプトダビジン、CDP571、LDP-02、Orthoclone OKT4A、ルプリズマブ、ナタリズマブ、及びレルデリムマブ、またはそのバイオ後続品が挙げられるが、これらに限定されない。

【0197】

本明細書に記載される（例えば、併用療法のために）5T4結合剤（例えば、抗体またはADC）とともに使用され得る免疫療法及び免疫療法剤としては、顆粒球コロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロファージ炎症性タンパク質（MIP）-1-アルファなどのサイトカイン、インターロイキン（IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、及びIL-27を含む）、腫瘍壊死因子（TNF-アルファを含む）、ならびにインターフェロン（IFN-アルファ、IFN-ベータ、及びIFN-

ガンマを含む)、水酸化アルミニウム(alum)、カルメットゲラン桿菌(BCG)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、不完全フロイントアジュバント(IFA)、QS-21、DETOX、レバミソール、及びジニトロフェニル(DNP)、ならびにそれらの組み合わせ、例えば、インターロイキン、例えば、IL-2と他のサイトカイン、例えばIFN-アルファの組み合わせ、が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、免疫療法には、免疫応答を調節する免疫療法剤、例えば、チェックポイント阻害剤またはチェックポイントアゴニストが含まれる。いくつかの実施形態では、免疫療法剤は、当技術分野で周知の中でもとりわけPD-1、5T4、PD-L2、CEACAM(例えば、CEACAM-1、-3及び/または-5)、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、TGFBeta、OX40、41BB、LIGHT、CD40、GITR、TGFBeta、TIM-3、SIRP-アルファ、VSIG8、BTLA、SIGLEC7、SIGLEC9、ICOS、B7H3、B7H4、FAS、及び/またはBTNL2を標的とする抗体調節因子である。いくつかの実施形態では、免疫療法剤はナチュラルキラー(NK)細胞の活性を高める薬剤である。いくつかの実施形態では、免疫療法剤は免疫応答の抑制を阻害する薬剤である。いくつかの実施形態では、免疫療法剤はサブレッサー細胞またはサブレッサー細胞の活性を阻害する薬剤である。いくつかの実施形態では、免疫療法剤はTreg活性を阻害する薬剤または療法である。いくつかの実施形態では、免疫療法剤は阻害性免疫チェックポイント受容体の活性を阻害する薬剤である。

10

20

30

40

50

【0198】

いくつかの実施形態では、免疫療法剤としては、共刺激分子のアゴニストまたは活性化因子から選択されるT細胞またはNK細胞またはNKT細胞調節因子が挙げられる。一実施形態では、共刺激分子のアゴニストは、GITR、OX40、ICOS、SLAM(例えば、SLAMF7)、HVEM、LIGHT、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、CD30、CD40、BAFFR、CD7、NKG2C、Nkp80、CD160、B7-H3、またはCD83リガンドのアゴニスト(例えば、アゴニスト抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または可溶性融合体)から選択される。他の実施形態では、エフェクター細胞の組み合わせは二重特異性T細胞エンゲージャー(例えば、CD3及び腫瘍抗原(例えば、とりわけEGFR、PSCA、PSMA、EpCAM、HER2)に結合する二重特異性抗体分子)または二重特異性NK細胞エンゲージャーを含む。

【0199】

本明細書に記載される(例えば、併用療法のために)5T4結合剤(例えば、抗体またはADC)とともに使用され得る細胞傷害性薬剤は、細胞機能を阻害するもしくは阻止する、及び/または細胞死もしくは破壊を引き起こす物質を含む。例示的な細胞傷害性剤としては、放射性同位体(例えば、At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212、及びLuの放射性同位体)、成長阻害剤、核酸分解酵素などの酵素及びそれらのフラグメント、ならびに細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素活性毒素(それらのフラグメント及び/または変異型を含む)などの毒素が含まれるが、これらに限定されない。他の例示的な細胞傷害性薬剤は、抗微小管剤、白金配位錯体、アルキル化剤、抗生物質剤、トポイソメラーゼII阻害剤、代謝拮抗薬、トポイソメラーゼI阻害剤、ホルモン及びホルモン類似体、シグナル伝達経路阻害剤、非受容体チロシンキナーゼ血管新生阻害剤、免疫療法剤、アポトーシス促進薬、LDH-A阻害剤、脂肪酸生合成阻害剤、細胞周期シグナル阻害剤、HDAC阻害剤、プロテアソーム阻害剤、及び癌代謝阻害剤から選択され得る。

【0200】

本明細書に記載される5T4結合剤(例えば、抗体またはADC)とともに(例えば、併用療法のために)使用され得る化学療法剤は、がんの治療に有用な化学的化合物を含む。化学療法剤の例としては、エルロチニブ、ボルテゾミブ、ジスルフィラム、没食子酸エ

ピガロカテキン、サリノスボラミド A、カーフィルゾミブ、17-AAG（ゲルダナマイシン）、ラディシコール、乳酸デヒドロゲナーゼ A（LDH-A）、フルベストラント、スニチブ、レトロゾール、メシル酸イマチニブ、フマスネート（fmasunate）、オキサリプラチン、5-FET（5-フルオロウラシル）、ロイコボリン、ラパマイシン、ラパチニブ、ロナファミブ（SCH 66336）、ソラフェニブ、Bayer Labs）、ゲフィチニブ、AG1478、アルキル化剤、例えばチオテパ及びCYTOXAN（登録商標）、シクロホスファミド、アルキルスルホネート、例えばブスルファン、インプロスルファン、及びビボスルファン、アジリジン、例えばベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、及びウレドーパ、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホルアミド、及びトリメチロメラミンを含むエチレンイミン及びメチラメラミン、アセトゲニン（特に、ブラタシン及びブラタシノン）、カンプトテシン（トポテカン及びイリノテカンを含む）、プリオスタチン、カリストアチン、CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、及びビゼレシン合成類似体を含む）、クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）、副腎皮質ステロイド（プレドニゾン及びプレドニゾロンを含む）、酢酸シプロテロン、フィナステリド及びデュタステリドを含む5 α -還元酵素）、ポリノスタット、ロミデプシン、パノビノスタット、バルプロ酸、モセチノスタットドラスタチン、アルデスロイキン、タルクデュオカルマイシン（合成類似体KW-2189及びCB1-TM1を含む）、エロイテロビン、パンクラチスタチン、サルコジクチン、スポンジスタチン、ナイトロジェンマスタート、例えばクロラムブシル、クロマファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタート、ニトロソ尿素、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムヌスチン、抗生物質、例えばエンジン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシン γ II及びカリケアマイシン ω I（Angew Chem. Int. Ed. Engl. 1994 33:183-186）、ダイネミシンAを含むダイネミシン、クロドロネートなどのビスホスホネート、エスペラミシン、ならびにネオカルジノスタチンクロモフォア及び関連色素タンパク質エネジン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシニス、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ- ϵ -ノルロイシン、ドキシソルビシン、モルホリノードキシソルビシン、シアノモルホリノードキシソルビシン、2-ピロリノードキシソルビシン、及びデオキシドキシソルビシン）、エビルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCなどのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシン、メトトレキサート及び5-フルオロウラシル（5-FU）などの抗代謝物、デノブテリン、メトトレキサート、プテロブテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体、アンシタビン、アザシチジン、アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジンなどのピリミジン類似体、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタノール、テストラクトンなどのアンドロゲン、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタノールなどの抗副腎剤、フロリン酸などの葉酸補液、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレプリン酸、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル、ピサントレン、エダトレキサート、デフォファミン、デメコルシン、ジアジクオン、エルホミチン、酢酸エリブチニウム、エポチロン、エトグルシド、硝酸ガリウム、ヒドロキシウレア、レンチナン、ロニダイニン、マイタンシン及びアンサミトシンなどのマイタンシノイド、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダンノール、ニトラエリン、ペントスタチン、フ

10

20

30

40

50

エナメト、ピラルピシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジド、
 プロカルバジン、PSK（登録商標）多糖複合体（JHS Natural Products, Eugene, Ore.）、ラゾキサン、リゾキシン、シゾフラン（sizo-
 furan）、スピロゲルマニウム、テヌアゾン酸、トリアジコン、2, 2', 2''-トリ
 クロロトリエチルアミン、トリコテセン（特にT-2毒素、ベラキュリンA、ロリジンA
 、及びアングイジン）、ウレタン、ビンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、ミトブ
 ロニトール、ミトラクトール、ピボプロマン、ガシトシン、アラビノシド（「Ara-C
 」）、シクロホスファミド、チオテパ、タキソイド、例えば、パクリタキセル、ABRA
 XANE（登録商標）（発色団不含）、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤（
 American Pharmaceutical Partners, Schaumb 10
 erg, Ill.）、及びドセタキセル／ドキシタキセル、クロランブシル、ゲムシタビ
 ン、6-チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキサート、シスプラチン及びカルボ
 プラチンなどの白金類似体、ビンブラスチン、エトポシド（VP-16）、イホスファミ
 ド、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルビン、ノバントロン、テニポシド、エ
 ダトレキサート、ダウノマイシン、アミノプテリン、カペシタビン、イバンドロネート、
 CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000、ジフルオロメチルオルニチン
 （DMFO）、レチノイン酸などのレチノイド、ならびに上記のうちのいずれかの薬学的
 に許容される塩、酸、及び誘導体が挙げられる。化学療法剤には、（i）抗エストロゲン
 剤及び選択的エストロゲン受容体調整薬（SERM）などの、腫瘍に対してホルモン作用
 を制御または阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば、タモキシフェン（クエン酸 20
 タモキシフェンを含む）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ヨードキシフェン、4-
 ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オ
 ナプリストン、及びクエン酸トレミファイン、（ii）副腎におけるエストロゲン産生を
 制御するアロマターゼ酵素を阻害する、アロマターゼ阻害剤、例えば、4（5）-イミダ
 ゴール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール、エキセメスタン、フォルメスタニー
 （formestanie）、ファドロゾール、ボロゾール、レトロゾール、及びアナス
 トロゾール、（iii）抗アンドロゲン剤、例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタ
 ミド、ロイプロリド、及びゴセレリンなど、ブセレリン、トリプテレリン（trip-
 tere- 30
 relin）、酢酸メドロキシプロゲステロン、ジエチルスチルベストロール、プレマリ
 ン、フルオキシメステロン、全てのトランスレチオニン酸（transret-
 ionic acid）、フェンレチニド、ならびにトロキサシタビン（1, 3-ジオキソランヌクレ
 オシドシトシン類似体）、（iv）タンパク質キナーゼ阻害剤、（v）脂質キナーゼ阻害
 剤、（vi）アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関与するシグナ
 ル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、PKC-アルファ、Ral-
 f及びH-Ras、（vii）リボザイム、例えば、VEGF発現阻害剤（例えば、ANG
 IOZYME（登録商標））及びHER2発現阻害剤、（viii）遺伝子療法ワクチン
 などのワクチン、例えば、ALLOVECTIN（登録商標）、LEUVECTIN（登
 録商標）、及びVAXID（登録商標）、PROLEUKIN（登録商標）、rIL-2
 、トポイソメラーゼ1阻害剤、例えば、LEIRTOTECAN（登録商標）、ABAR
 ELIX（登録商標）、ならびに（ix）上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、 40
 及び誘導体も含まれる。

【0201】

化学療法剤としてはまた、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマ
 ブ、リツキシマブ、ペルツズマブ、トシツモマブ、及び抗体薬物複合体、ゲムツズマブオ
 ゾガマイシンを含む上記の抗体も含まれる。本明細書に記載の5T4結合剤（例えば、抗
 体）と組み合わせて薬剤としての治療可能性を有する追加のヒト化モノクローナル抗体に
 は、アボリズマブ、アセリズマブ（aselizumab）、アトリズマブ、バピネオズ
 マブ、ビバツズマブメルタンシン（bivatuzumab mertansine）、
 カンツズマブメルタンシン、セデリズマブ（cedelizumab）、セルトリズマブ
 ペゴール、シドフシツズマブ（cidfusituzumab）、シドツズマブ（cid 50

tuzumab)、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、エブラツズマブ、エルリズマブ(erlizumab)、フェルビズマブ(felvizumab)、フォントリズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、イノツズマブオゾガマイシン、イピリムマブ、ラベツズマブ、リンツズマブ、マツズマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、モトビズマブ(motovizumab)、ナタリズマブ、ニモツズマブ(nimotuzumab)、ニボルマブ、ノロビズマブ(nolovizumab)、ヌマビズマブ(numavizumab)、オクレリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パスコリズマブ(pascelizumab)、ペクフシツズマブ(pectusituzumab)、ペクツズマブ(pectuzumab)、ペキセリズマブ、ラリビズマブ(ralivizumab)、ラニビズマブ、レスリビズマブ(reslivizumab)、レスリズマブ、レシビズマブ(resyvizumab)、ロベリズマブ(rovelizumab)、ルブリズマブ(ruplizumab)、シブロツズマブ(sibrotuzumab)、シブリズマブ、ソントツズマブ(sontuzumab)、タカツズマブテトラキセタン(tacatuzumab tetraxetan)、タドシズマブ(tadocizumab)、タリズマブ、テフィバズマブ(tefibazumab)、トシリズマブ、トラリズマブ(toralizumab)、ツコツズマブセルモロイキン(tucotuzumab celmoleukin)、ツクシツズマブ(tucusituzumab)、ウマビズマブ(umavizumab)、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、ビジリズマブ、及びインターロイキン-12 p40タンパク質を認識するように遺伝子修飾された排他的ヒト配列、完全長IgG1λ抗体の組み換えである、抗インターロイキン-12 (ABT-8744695, Wyeth Research and Abbott Laboratories)が含まれる。化学療法剤としては、デキサメタゾン、インターフェロン、コルヒチン、メトプリン、シクロスポリン、アンホテリシン、メトロニダゾール、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アロプリノール、アミホスチン、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、BCG生、ベバクジマブ(bevacuzimab)、ベキサロテン、クラドリビン、クロファラビン、ダルベポエチンアルファ、デニロイキン、デクスラゾキサン、エポエチンアルファ、エロチニブ(elotinib)、フィルグラスチム、酢酸ヒストレリン、イブリツモマブ、インターフェロンアルファ-2a、インターフェロンアルファ-2b、レナリドミド、レバミゾール、メスナ、メトキサレン、ナンドロロン、ネララビン、ノフェツモマブ、オブレルベキン、パリフェルミン、パミドロネート、ペガデマーズ、ペグアスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、ペメトレキセド二ナトリウム、プリカマイシン、ポルフィマーナトリウム、キナクリン、ラスブリカーゼ、サルグラモスチム、テモゾロミド、VM-26、6-TG、トレミフェン、トレチノイン、ATRA、バルルピシン、ゾレドロネート、及びゾレドロロン酸、ならびにこれらの薬学的に許容される塩も挙げられる。

10

20

30

【0202】

化学療法剤としては、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸コルチゾン、ピバリン酸チクソコルトール、トリウムシノロンアセトニド、トリウムシノロンアルコール、モメタゾン、アムシノニド、ブデソニド、デソニド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、ベタメタゾン、リン酸ベタメタゾンナトリウム、デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、フルオコルトロン、ヒドロコルチゾン-17-ブチレート、ヒドロコルチゾン-17-バレレート、プロピオン酸アクロメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、ジプロピオン酸ベタメタゾン、プレドニカルベート、クロベタゾン-17-ブチレート、クロベタゾン-17-プロピオネート、カプロン酸フルオコルトロン、ピバリン酸フルオコルトロン及び酢酸フルプレドニデン、免疫選択的抗炎症ペプチド(ImSAIDs)、例えばフェニルアラニン-グルタミン-グリシン(FEG)及びそのD体形態(feG)(IMULAN BioTherapeutics, LLC)、抗リウマチ薬、例えばアザチオプリン、シクロスポリン(シクロスポリンA)、D-ペニシラミン、金塩、ヒドロキシクロロキン、レフルノミドミノシクリン、スルファサラジン、腫瘍壊死因子アルファ(TNFα)遮断剤、例えばエタネルセプト、インフリキシマブ、アダリムマブ、セト

40

50

リズマブペゴール、ゴリムマブ (S i m p o n i)、インターロイキン 1 (I L - 1) 遮断剤、例えばアナキンラ、T 細胞共刺激遮断剤、例えばアバタセプト、インターロイキン 6 (I L - 6) 遮断剤、例えば、トシリズマブ、インターロイキン 13 (I L - 13) 遮断剤、例えばレプリキズマブ、インターフェロナルファ (I F N) 遮断剤、例えばロンタリズマブ、ベータ 7 インテグリン遮断剤、例えば r h u M A b B e t a 7、I g E 経路遮断剤、例えば抗 M 1 プライム、分泌ホモ三量体 L T a 3 及び膜結合ヘテロ三量体 L T a l / l 3 2 遮断剤、例えば抗リンホトキシナルファ (L T a)、種々の調査剤、例えばチオプラチン、P S - 3 4 1、フェニルブチレート、E T - 1 8 - O C H 3、またはファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (L - 7 3 9 7 4 9、L - 7 4 4 8 3 2)、ポリフェノール、例えばケルセチン、レスベラトロール、ピセアタンノール、没食子酸エピガロカテキン、テアフラビン、フラバノール、プロシアニジン、ベツリン酸及びその誘導体、オートファジー阻害剤、例えばクロロキン、デルター 9 - テトラヒドロカンナビノール (ドロナビノール)、ベーターラパコン、ラパコール、コルチシン、ベツリン酸、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン、及び 9 - アミノカンプトテシン)、ポドフィロトキシシン、テガフル、ベキサロテン、ビスホスホネート、例えばクロドロネート、エチドロネート、N E - 5 8 0 9 5、ゾレドロネート／ゾレドロネート、アレンドロネート、パミドロネート、チルドロネート、またはリセドロネート、ならびに上皮成長因子受容体 (E G F - R)、ワクチン、例えば T H E R A T O P E (登録商標) ワクチン、ペリフォシン、C O X - 2 阻害剤 (例えば、セレコキシブまたはエトリコキシブ)、プロテオソーム阻害剤 (例えば、P S 3 4 1)、C C I - 7 7 9、チピファルニブ (R 1 1 5 7 7)、オラフェニブ、A B T 5 1 0、B c l - 2 阻害剤、例えばオブリメルセンナトリウムピキサントロン、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、例えばロナファルニブ (S C H 6 6 3 6)、及び上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体、ならびに上記のうちの 2 つ以上の組み合わせ、例えば C H O P (シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、及びプレドニゾロンの併用療法の省略形)、及び F O L F O X (5 - F U 及びロイコボリンと組み合わせたオキサリプラチンを用いる治療レジメンの省略形) が挙げられる。化学療法剤としては、ポリ A D P リボースポリメラーゼ (P A R P) 阻害剤：オラパリブ、ルカプリブニラパリブ、タルゾパリブも挙げられる。

10

20

30

40

50

【0203】

本明細書に記載される 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体) とともに (例えば、併用療法に対して) 使用され得る阻害剤としては、イマチニブ、バリシチニブゲフィチニブ、エルロチニブ、ソラフェニブ、ダサチニブ、スニチニブ、ラパチニブ、ニロチニブ、ピルフェニドン、パゾパニブ、クリゾチニブ、ベムラフェニブ、バンデタニブ、ルキシロチニブ、アキシチニブ、ボスチニブ、レゴラフェニブ、トファシチニブ、カボザンチニブ、ポナチニブ、トラメチニブ、ダブラフェニブ、アフアチニブ、イブルチニブ、セリチニブ、イデラリシブ、ニンテダニブ、パルボシクリブ、レンバチニブ、コビメチニブ、アベマシクリブ、アカラブルチニブ、アレクチニブ、ビニメチニブ、ブリガチニブ、エンコラフェニブ、エルダフィチニブ、エベロリムス、フォスタマチニブ、ギルテル、ラロトレクチニブ、ロルラチニブ、ネタルスジル、オシメルチニブ、ペミガチニブ、ペキシダルチニブ、リボシクリブ、テムシロリムス、X L - 0 9 2、X L - 1 4 7、X L - 7 6 5、X L - 4 9 9、及び X L - 8 8 0 などのキナーゼ阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物は、がんなどの本明細書に開示される疾患の治療のために、H S P 9 0 阻害剤 (例えば、X L 8 8 8)、肝臓 X 受容体 (L X R) モジュレーター、レチノイド関連オーファン受容体ガンマ (R O R y) モジュレーター、C K 1 阻害剤または C K 1 α 阻害剤等のチェックポイント阻害剤、W n t 経路阻害剤 (例えば、S S T - 2 1 5)、またはミネラロコルチコイド受容体阻害剤 (例えば、エサセレノン)、もしくは X L - 8 8 8 と組み合わせて使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される 5 T 4 結合剤 (例えば、抗体) は、がんの治療のために以下のキナーゼの 1 つ以上の阻害剤と組み合わせることができる：A k t 1、A k t 2、A k t 3、T G F - β R、P K A、P K G、P K C、C a M - キナーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、M E K

K、ERK、MAPK、mTOR、EGFR、HER2、HER3、HER4、INSR、IGF-1R、IR-R、PDGFR α R、PDGFR β /R、CSF1R、KIT、FLK-II、KDR/FLK-1、FLK-4、flt-1、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、Ron、Sea、TRKA、TRKB、TRKC、FLT3、VEGFR/Flt2、Flt4、EphA1、EphA2、EphA3、EphB2、EphB4、Tie2、Src、Fyn、Lck、Fgr、Btk、Fak、SYR、FRK、JAK（JAK1及びまたはJAK2）、ABL、ALK、CDK7、CDK12、KRAS及びB-Raf。

【0204】

本明細書に記載の5T4結合剤（例えば、抗体またはADC）とともに、例えば、がんの治療（例えば、併用療法）に使用され得る阻害剤の追加の非限定的な例としては、FGFR阻害剤（FGFR1、FGFR2、FGFR3、またはFGFR4、例えば、ペミガチニブ、EGFR阻害剤（ErB-1またはHER-1としても知られる、例えば、エルロチニブ、ゲフィチニブ、パニダニブ、オリシメルチニブ、セツキシマブ、ネシツムマブ、またはパニツムマブ）、VEGFR阻害剤もしくは経路遮断剤（例えば、ベバシズマブ、パゾパニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、アキシチニブ、レゴラフェニブ、ポナチニブ、パニダニブ、ラムシルマブ、レンバチニブ、ziv-アフリベルセプト）、PARP阻害剤（例えば、オラパリブ、ルカパリブ、ベリパリブまたはニラパリブ）、JAK阻害剤（例えば、ルキシロチニブ、バリシチニブ、イタシチニブ）、IDO阻害剤（例えば、エパカドスタット、NLG919、またはBMS-986205、MK7162）、LSD1阻害剤、TDO阻害剤、PI3K-デルタ阻害剤（例えば、パルサクリシブ）、PI3K-ガンマ選択的阻害剤などのPI3K-ガンマ阻害剤、ピム阻害剤、CSF1R阻害剤、TAM受容体チロシンキナーゼ（Tyro-3、Axl、及びMer）、アデノシン受容体アンタゴニスト（例えば、A2a/A2b受容体アンタゴニスト）、HPK1阻害剤、ケモカイン受容体阻害剤（例えば、CCR2またはCCR5阻害剤）、SHP1/2ホスファターゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤（HDAC）、例えば、HDAC8阻害剤、血管新生阻害剤、インターロイキン受容体阻害剤、プロモ及びエクストラ末端ファミリーメンバー阻害剤（例えば、プロモドメイン阻害剤またはBET阻害剤、またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0205】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される5T4結合剤（例えば、抗体またはADC）は、PD-1の阻害剤または5T4の阻害剤、例えば、抗PD-1モノクローナル抗体または抗5T4モノクローナル抗体、例えば、ニボルマブ（Opdivo）、ペムブロリズマブ（Keytruda、MK-3475）、アテゾリズマブ、アベルマブ、セミプリマブ、スパルタリズマブ、カムレリズマブ、セトレリマブ、トリパリマブ、シンチリマブ、AB122、JTX-4014、BGB-108、BCD-100、BAT1306、LZM009、AK105、HLX10、及びTSR-042、AMP-224、AMP-514、PDR001、デュルバルマブ、ピディリズマブ（Imfinzi（登録商標）、CT-011）、CK-301、BMS 936559、MPDL3280A、チレリズマブ、BMS-935559、MEDI4736、FAZ053、KN035、CS1001、CBT-502、A167、STI-A101、BGB-A333、MSB-2311、HLX20、AUNP12、CA-170、BMS-986189、LY3300054、及びMSB0010718Cと組み合わせて使用することができる。

【0206】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される多重特異性結合剤は、CTLA-4阻害剤、例えば、抗CTLA-4抗体、例えば、イピリムマブ（Yervoy）、トレメリムマブ及びAGEN1884と組み合わせて、またはホスファチジルセリン阻害剤、例えば、バビツキシマブ（PGN401）、または抗体と、サイトカイン（IL-10、TGFB等）に対して、または5T4及びCTLA-4（例えば、AK104）またはPD-1及びCTLA-4に結合する二重特異性抗体とともに、またはセミプリマブなどの他

の抗がん剤と組み合わせて使用することができる。

【0207】

追加の薬剤は、上述のこれらの治療剤または他の薬剤のいずれかの薬学的に許容される塩、エステル、アミド、水和物、及び／またはプロドラッグであり得る。

【0208】

本発明のさまざまな実施形態のアクティビティに実質的に影響を及ぼさない修飾はまた、本明細書で提供される本発明の定義内で提供されることが理解される。したがって、以下の実施例は、本発明を例示することを意図しているが、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0209】

実施例 1. 抗体生成

ヒト 5 T 4 に対するバインダーを得るために、抗体発見をファージディスプレイによって行った。

【0210】

A. ファージディスプレイ

ヒト 5 T 4 に対するバインダーを得るために、抗体発見を、ヒト Fab ライブラリのファージディスプレイによって行い、標準的なプロトコルを使用して行った。ヒト 5 T 4 の細胞外ドメインは、Acro Biosystems (ビオチン化ヒト 5 T 4 His-Avitag Acro カタログ番号 TPG-H83Eb) から購入するか、または作製した。産生された抗原は、ヒト 5 T 4、カニクイザル 5 T 4、及びマウス 5 T 4 からなり、すべて C 末端 6-his-Avitag を含むベクターにクローニングされ、可能であれば標準的な手順を使用して、共発現したビオチンリガーゼ酵素を使用してインビトロでビオチン化された。

【0211】

ファージクローンを、ビオチン化ヒト 5 T 4 に結合する能力についてスクリーニングした。簡潔に述べると、ファージ (ファージミドとも呼ばれる) での複製及び発現が可能な発現ベクターを使用して、Fab 形式のファージライブラリを構築した。重鎖と軽鎖との両方を同じ発現ベクター内でコードし、そこで重鎖をファージコートタンパク質 pIII のトランケート型バリエーションに融合した。軽鎖及び重鎖-pIII 融合物を別個のポリペプチドとして発現させ、細菌ペリプラズムでアSEMBルし、そこでレドックスポテンシャルによりジスルフィド結合形成が可能となり、候補抗体の抗原結合ドメイン (Fab) が形成される。

【0212】

このライブラリは、特定のヒト重鎖可変ドメイン及び特定のヒト軽鎖可変ドメインに由来する配列を使用して作製された。スクリーニングしたライブラリ内の軽鎖可変ドメインを多様性を用いて生成し、VL CDR3 (L3) に導入し、軽鎖 VL CDR1 (L1) 及び CDR2 (L2) で、ヒト生殖系列配列が残った。スクリーニングしたライブラリについて、VH ドメインの 3 つ全ての CDR を多様化し、ヒト抗体レパートリーに見出された CDR 長による位置的アミノ酸周波数を一致させた。ライブラリで使用されたファージディスプレイ重鎖 (配列番号 72) 及び軽鎖 (配列番号 73) 足場を以下に列挙し、ここで、「x」は、ライブラリを作成するために変化させた CDR アミノ酸を表し、太字の斜体は定常的であった CDR 配列を表す。

配列番号 72 の配列は、

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSXXXXXXWVRQAPGKGLEWVAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXWGQGDTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCであった。

10

20

30

40

50

配列番号 73 の配列は、

【化 6】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGV
PSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCXXXXXXXXXXFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDSQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLS
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

であった。

10

【0213】

多様性は、縮重 DNA オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、V L C D R 3 (L 3) 及び V H C D R 1 (H 1) 、 C D R 2 (H 2) 及び C D R 3 (H 3) に多様性を導入し、自然抗体レパートリーに見られる多様性を模倣するように、参照によりその全体が本明細書に援用される K u n k e l , T A (P N A S J a n u a r y 1 , 1 9 8 5 . 8 2 (2) 4 8 8 - 4 9 2) により詳細に記載されるように、変異誘発によって創出した。簡潔に述べると、ウラシルが組み込まれた一本鎖環状 DNA を、単離されたファージから標準的な手順を使用して調製し、クンケル変異誘発を行って、4 つの C D R に多様性を導入した。次いで、化学的に合成した DNA を T G 1 細胞にエレクトロポレーションし、続いて回収した。回収した細胞を継代培養し、M 1 3 K 0 7 ヘルパーファージに感染させて、ファージライブラリを生成した。

20

【0214】

ファージパニングは、標準的な手順を使用して実施した。簡潔に述べると、第 1 回目のファージパニングは、ストレプトアビジン磁気ビーズ上に固定化した標的を用いて行い、これを、P B S T - 2 % B S A 中の容量 1 m L で調製したライブラリからの約 1×10^{12} 個のファージに供した。1 時間のインキュベーション後、磁気スタンドを使用してビーズ結合ファージを上清から分離した。ビーズを 3 回洗浄して、非特異的に結合したファージを除去し、次いで、O D 6 0 0、約 0.6 で E R 2 7 3 8 細胞 (5 m L) に加えた。室温で 2 0 分間インキュベートした後、感染細胞を 2 5 m L の 2 x Y T + アンピシリン及び M 1 3 K 0 7 ヘルパーファージ (約 1×10^{10} p f u / m L の最終濃度) で継代培養し、激しく振盪しながら 3 7 ° C で一晚増殖させた。翌日、P E G 沈殿により標準的な手順を使用してファージを調製した。S A V でコーティングしたビーズに特異的なファージの事前の排除を、パニングの前に行った。第 2 回目のパニングは、K i n g F i s h e r 磁気ビーズハンドラーを使用し、5 0 n M または 1 0 0 n M のビーズ固定化 5 T 4 抗原を用いて、標準的な手順を用いて行った (第 3 回目には 1 0 0 n M の 5 T 4、第 4 回目には 5 0 n M の 5 T 4) 。合計で、3 ~ 4 回のファージパニングを行って、5 T 4 抗原に特異的なファージ提示 F a b を濃縮した。ポリクローナル E L I S A を使用して 5 T 4 特異的濃縮を確認し、個々のクローンを単離し、モノクローナルファージ E L I S A を実施することによってさらに検証した。DNA 配列を使用して、候補抗体を含む単離された F a b クローンの C D R の配列を決定した。

30

40

【0215】

候補抗体の重鎖及び軽鎖可変ドメインをコードする遺伝子を、哺乳類細胞における完全長 I g G として発現させるため、哺乳類発現ベクターに別々にクローニングした。完全長 I g G の場合、重鎖定常領域 (例えば、C H 1 = 通常のテキスト、ヒンジ = イタリック体のテキスト、C H 2 = 太字、及び C H 3 = 下線) には、以下のアミノ酸配列を含んだ。

50

【化 7】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVWVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 7 4)。

10

完全長 I g G の場合、軽鎖定常領域 (例えば、C L) は、以下のアミノ酸配列を含んだ：
R T V A A P S V F I F P P S D S Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 7 5)。

【0 2 1 6】

I g G 抗体を、プロテイン A 樹脂を使用して培養上清から精製した。

【0 2 1 7】

実施例 2 . スクリーニングアッセイ

二価結合アッセイを用いて、実施例 1 のファージディスプレイによって得られた V H /
V L を有する抗体が、臨床的に関連する 3 種、ヒト、カニクイザル (c y n o)、及びマ
ウスのすべてに由来する固定化 5 T 4 に結合するかどうかに関するデータを提供する。二
価結合及び交差反応性アッセイのために、5 T 4 ヒト、カニクイザル、及びマウス抗原を
、タンパク質データベースからの配列を使用して合成し、h i s - a v i タグを使用して
ビオチン化タンパク質として発現させ、共発現した B i r A 酵素とのインビボでのビオチ
ン化を行った。

20

【0 2 1 8】

標準的な O c t e t ベースのアッセイを使用して、各抗体が各抗原に結合するかどうか
を定性的に決定した。これらのアッセイのために、2 0 0 n M のビオチン化抗原を 1 X キ
ネティックバッファー (F o r t e B i o) 中でストレプトアビジンバイオセンサに固定
化した。次いで、ロードしたセンサを、目的の抗体を 5 0 0 n M で含有するウェルに浸漬
し、会合結合シグナルを観察した。陰性対照を上回る会合ステップ中のシグナルの増加を
、抗原への結合とみなした。

30

【0 2 1 9】

O c t e t を使用した定性的結合親和性では、試験した 2 7 個の抗体すべてがヒト 5 T
4 への結合を示し、抗体のうち 1 3 個はカニクイザル 5 T 4 への結合も示し、抗体のうち
1 3 個はマウス 5 T 4 への結合も示した。例示的な抗体のデータを以下の表 4 に示す。

【表 4】

表 4. O c t e t による定性的二価結合親和性

抗体	ヒト 5 T 4 O c t e t (二価)	カニクイザル 5 T 4 O c t e t (二価)	マウス 5 T 4 O c t e t (二価)
m A b A 4	+	+	—
m A b A 1 5	+	+	+
m A b A 1 7	+	+	+

40

【0 2 2 0】

一価結合アッセイを用いて、実施例 1 においてファージディスプレイによって得られた
各 5 T 4 バインダーのヒト 5 T 4 に対する相対親和性を決定した。ヒト 5 T 4 は、A c r

50

o Biosystems (Acro カタログ番号 TPGH52E) から購入し、別個にも生産した。Octet (Pall ForteBio) 機器を使用して、ヒト5T4に対するバインダーの一価の相互作用を監視した。これらのアッセイでは、36 nMの抗体を1Xキネティックバッファー (ForteBio) 中で抗ヒトFc (AHC) センサに固定化した。次に、1 μ M ~ 1.37 nMの範囲のヒト5T4の3倍の連続希釈物を含むウェルにセンサを浸漬させた。会合を平衡に達させた。次いで、センサを1倍のキネティックバッファーのみを含むウェルに移動し、平衡化するために解離させた。会合及び解離速度を測定し、これらから、オンボード分析ソフトウェア (ForteBio) を使用して一価 K_D を計算した。

【0221】

試験した27個の抗体すべてのうち、それらの大部分は、一価結合親和性—内部 (ロット20-019-62) のアッセイにおいて弱い結合を示した。mAbA4、mAbA15、及びmAbA17は、その中でも、3つのロットすべてにおいて強いまたは中程度の結合を示すものである。データを下の表5に示す。

【表5】

表5. Octetによる定性的一価結合親和性

抗体	一価の結合親和性—Acro TPGH52E5 (ロットB465-87AF1-K2)	一価の結合親和性—内部 (ロット20-019-62)	一価の結合親和性—Acro TPGH52E5 (ロットB465-87AF1-JP)
	Octet	Octet	Octet
	K_D (nM)	K_D (nM)	K_D (nM)
mAbA4	0.01	83	30.2
mAbA15	3.62	10.4	11.2
mAbA17	2.81	9.34	21.1

【0222】

実施例3：追加のスクリーニング及び選択

5T4に結合するために選択された抗体、例えば、実施例2に記載のものを、5T4を発現する細胞への結合について評価した。

【0223】

アッセイの日に70~90%のコンフルエンスで細胞を回収した。v底96ウェルプレート (Costar 3897) において、1ウェル当たり100,000個の細胞を、+4℃で30分間、1ウェル当たり50 μ Lの8点または12点の抗体希釈シリーズとインキュベートした。インキュベーション後、細胞を200 $\times$ gで5分間の遠心分離によってPBSで1回洗浄した。次に、細胞を+4℃で30分間、1ウェル当たり50 μ Lの1:100希釈のAlexa Fluor 488ヤギ抗ヒトIgG Fab (Jackson Immuno Research 109-547-003) と共にインキュベートした。細胞を200 $\times$ gで5分間遠心分離することによってPBSで2回洗浄し、iQue Screener Plus (Sartorius) で取得した。BL1 (Alexa-Fluor-488) チャンネルの平均蛍光強度を抗体濃度に対してプロットして、用量反応曲線及びEC50値を作成した。

【0224】

試験した27個の抗体のうち、26個の抗体がHEK-5T4細胞への結合親和性を示し、16個の抗体がMCF-7細胞への結合親和性を示し、26個の抗体がHEK-cyno-5T4細胞への結合親和性を示した。

【0225】

HEK-5T4、MCF-7、及びHEK-cyno-5T4細胞株 (mAbA4、m

A b A 1 5、及びm A b A 1 7を含む) の3つすべてに結合するように選択される抗体を、H E K - 5 T 4 及びM C F - 7 細胞を用いた内部移行アッセイでさらに評価した。

【0226】

接着細胞を70~90%のコンフルエンスで採取し、96ウェルの黒色、透明/平底半面積プレート(Corning 3882)にて、50µLの培地に20,000細胞/ウェルで、37℃にて一晚プレートした。浮遊細胞株については、96ウェルプレートポリ-L-オルニチン溶液(Millipore-Sigma)で37℃にて1時間コーティングし、アッセイの約1~2時間前に、細胞を50µLの培地に40,000細胞/ウェルの密度で播種した。抗体を細胞培養培地で希釈し、3倍モル濃度のIncucyteヒトFabFluor-pH赤抗体標識試薬と混合し、室温で15分間インキュベートした。抗体/FabFluorミックスのすべての希釈液の2倍最終濃度を調製した。次いで、50µLの2X抗体/FabFluorミックスを、事前に播種した細胞を含む各ウェルに二連で直接添加し、プレートを迅速にIncucyteに移した。その後、プレートを30分ごとに最大24時間スキャンした。抗体/FabFluorミックスを細胞に添加してから2~3分以内に最初のスキャン(0時間)を開始するように注意した。プレートを、経時的に生成された赤色シグナルを読み取ることによって分析し、そのウェル内の細胞のコンフルエンス%に対して正規化した。いくつかの抗体を標的細胞株上で異なる濃度で試験し、良好な信号:ノイズ比に基づいて最良の濃度を選択した。

10

【0227】

内部移行アッセイでは、6つの抗体(mAbA4及びmAbA15を含む)がHEK-5T4細胞において強力な内部移行を示し、1つの抗体がHEK-5T4細胞において中程度の内部移行を示し、7つの抗体がHEK-5T4細胞において内部移行または非特異的内部移行を示さなかった。さらなるアッセイでは、2つの抗体はMCF-7細胞において強力な内在化を示し、4つの抗体はHEK-5T4細胞において中程度の内部移行を示し、8つの抗体はMCF-7細胞において内部移行または非特異的を示さなかった。

20

【0228】

実施例4:開発可能性アッセイ

5T4に結合するために選択された抗体、例えば、実施例2及び3に記載されるものを様々な開発可能性の方法で試験した。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)、及びスタンドアップ単層吸着クロマトグラフィー(SMAC)を含む様々なクロマトグラフィー方法を使用して、モノマーの百分率、溶解性、及び抗体の凝集または沈殿などの開発可能性因子を評価した。

30

【0229】

Agilent 1100 HPLCにて、7.8mmID×30cm TSK gel G3000SWXLカラム(Tosoh Bioscience LLC、PN08541)を使用して、6mm×4cmガードカラム(PN08543)を用いてサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析を行った。抗体をダルベッコPBS(pH7.4、Ca²⁺/Mg²⁺を含まない)中1mg/mL濃度に正規化し、可溶性凝集体を保持しながら、遠心分離を介して微粒子化することにより清澄化した。移動相緩衝液は、2倍濃度(10倍の原液濃度から希釈した)ダルベッコPBS(pH7.4、Ca²⁺/Mg²⁺を含まない)であった。各試料について、10µLをロードし、周囲温度で20分間にわたって1.0mL/分で均一的に溶出した。吸光度を280nmでモニタリングした。クロマトグラフィーのピークを積分して、均一性のパーセンテージと保持時間とを決定した。カラムの固定相と選択した移動相は、分子サイジングに加えて疎水性及び静電相互作用もサポートする(二次相互作用はSMACと比較してはるかに穏やかである)。Agilent ChemStation B.04.03 SP1を用いて、データ分析を行った。

40

【0230】

結果は、mAbA4、mAbA15、及びmAbA17(他の試験した抗体の中でも)が、SEC分析に基づいて高い開発可能性を有することを示した。

【0231】

50

疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）分析を、Agilent 1100 HPLCにて4.6mmID×3.5cm TSK gelブチル-NPRカラム（Tosoh Bioscience LLC、PN14947）を使用して行った。抗体をダルベッコPBS（pH7.4、Ca²⁺／Mg²⁺を含まない）中1mg／mL濃度に正規化した。カラムを100%移動相緩衝液A（2M硫酸アンモニウム／20mMリン酸ナトリウム、pH7.0）を用いて、周囲温度にて1mL／分の流速で平衡化した。各試料について、10μLをロードし、100%移動相緩衝液Aから100%移動相緩衝液B（20mMリン酸ナトリウム、pH7.0）の勾配を使用して、1.0mL／分で15分間にわたって溶出し、100%Bで3分間保持してカラムを洗浄し、平衡化のために2分間100%Aに戻した。吸光度を280nmでモニタリングした。サンプル保持時間を計算し、標準対照のセットと比較して、保持時間が増加した（疎水性が増加した）抗体及び複数の種の存在を同定した。Agilent ChemStation B.04.03 SP1を用いて、データ分析を行った。

10

【0232】

疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）分析からの結果は、特定の抗体が強力な開発可能性を有し、他の抗体が中程度の開発可能性を有することを示した。mAbA4、mAbA15、及びmAbA17は、HIC分析に基づいて強力な開発可能性を有するものに含まれる。抗体の疎水性は、抗体の凝集、溶解性、及び粘度に影響を与え得る。結果は、これらの抗体の凝集及び沈殿の傾向が低いことを示している。

【0233】

スタンドアップ単層吸着クロマトグラフィー（SMAC）分析を、Agilent 1100 HPLCで4.6mm×50mmガードカラム（PN213300P-4605）と共に4.6mmID×300mm Zenix SEC 300カラム（Sepax Technologies、PN213300P-4630）を使用して行った。抗体をダルベッコPBS（pH7.4、Ca²⁺／Mg²⁺を含まない）中1mg／mL濃度に正規化し、可溶性凝集体を保持しながら、遠心分離を介して微粒子化することにより清澄化した。移動相緩衝液は、2倍濃度（10倍の原液濃度から希釈した）ダルベッコPBS（pH7.4、Ca²⁺／Mg²⁺を含まない）であった。各試料について、10μLをロードし、周囲温度で32分間にわたって0.4mL／分で均一的に溶出した。吸光度を280nmでモニタリングした。カラム固定相と移動相の選択により、分子サイジングに加えて二次相互作用が促進されるため、サンプル保持時間を計算し、標準対照のセットと比較して、保持時間が増加した（凝集体を形成する傾向が増加した及び／または疎水性／静電相互作用が増加した）抗体を同定した。Agilent ChemStation B.04.03 SP1を用いて、データ分析を行った。

20

30

【0234】

スタンドアップ単層吸着クロマトグラフィー（SMAC）分析の結果は、特定の抗体が強い開発可能性を有する一方、他の抗体は中程度の開発可能性を有することが示された。mAbA4、mAbA15、及びmAbA17は、SMAC分析に基づいて強力な産生を有するものに含まれる。この測定は、コロイドの安定性及び低い凝集傾向を示す良好な保持時間に基づいた。

40

【0235】

実施例5：エピトープビニングアッセイ

エピトープビニングアッセイを用いて、実施例1でファージディスプレイによって得られた各抗体が5T4のどのエピトープに結合するかを決定した。

【0236】

5T4タンパク質の全体的な構造を維持しながら、依然としてエピトープ結合の測定を可能にするために、マウスーヒトキメラを、ヒト5T4の7つの連続配列（エピトープ1～7）の各々をクローニングして、対応するマウス配列の各々を置き換えることによって生成した。キメラ生成のため、完全長ヒト及びマウス5T4遺伝子をGenScriptによって合成し、6-His-Aviタグを含む哺乳動物ベクターにクローニングした。

50

次いで、本明細書に記載の7つの配列（エピトープ1～7）の各々をヒト遺伝子から除去し、適切なプライマーを使用してマウス遺伝子に別々にクローニングした。ヒト5T4（H1）のエピトープ1は、SSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECSEAART（配列番号76）に対応し、ヒト5T4（H2）のエピトープ2は、VKCVNRNLTEVPDLPAYVRNLF LTGNQLAVLPAGAFARRPPLAELAA LNL S GSR LDEV R（配列番号77）に対応し、ヒト5T4（H3）のエピトープ3は、AGAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSG（配列番号78）に対応し、ヒト5T4（H4）のエピトープ4は、SNASVSAPSPLELILNHI VPPEDERQNR SFEGMVVAALLAGRALQGLRRLE（配列番号79）に対応し、ヒト5T4（H5）のエピトープ5は、LASNHFLYLPRDVL AQLP SLRHL DLSNNSLVSLTYVSFRNLTHLESL（配列番号80）に対応し、ヒト5T4（H6）のエピトープ6は、HLEDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRVFL（配列番号81）に対応し、ヒト5T4（H7）のエピトープ7は、DNNPWVCDCHMADMVTWLKETEVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVLLELNSADLDCDPI LPPSLQTS（配列番号82）に対応する。抗原を、Exp i 293タンパク質発現系（Thermo Fisher）を使用して一過性に発現させ、共発現したBirAビオチンリガーゼを使用してインビトロでビオチン化し、Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製した。表6に示すように、生成されたヒト（H）及びマウス（M）配列の7つのキメラ構築物は以下の通りであった：（1）H1 M2 M3 M4 M5 M6 M7（配列番号83）、（2）M1 H2 M3 M4 M5 M6 M7（配列番号84）、（3）M1 M2 H3 M4 M5 M6 M7（配列番号85）、（4）M1 M2 M3 H4 M5 M6 M7（配列番号86）、（5）M1 M2 M3 M4 H5 M6 M7（配列番号87）、（6）M1 M2 M3 M4 M5 H6 M7（配列番号88）、及び（7）M1 M2 M3 M4 M5 M6 H7（配列番号89）。次いで、各抗体を、キメラ構築物の各々及び完全長ヒトタンパク質への結合について試験した。キメラへの任意の有意な結合シグナルは、抗体が特異的に結合する領域を示す。

10

20

30

40

50

【表6-1】

表6. 5T4キメラ構築物

ヒト5T4 エピトープ 1	<u>H1</u> M2 M3 M4 M5	<u>SSPTSSASS</u> <u>FSSSAPFLAS</u> <u>AVSAQPPLPD</u> <u>QCPALCECSE</u>
	M6 M7 (配列番号83)	<u>AART</u> <u>TVKCVNR</u> <u>NLLEVPADLP</u> <u>PYVRNLF LTG</u> <u>NQMTVLPAGA</u> FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVDCYMD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S

【表 6 - 2】

ヒト 5 T 4 エピトープ 2	M1 <u>H2</u> M3 M4 M5 M6 M7 (配列番号 8 4)	SAPSSSVPS SSTSPAFLA SGSAQPPPAE RCPAAECSE AARTVKCVNR NLTEVPTDLP AYVRNLFLTG <u>NQLAVLPAGA</u> <u>FARRPPLAEL</u> AALNLSGSRL <u>DEV</u> RAGAFEH LPGLRRDLDS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLRLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAWEHGL AHVKVFLDNN PWVDCYMD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S
ヒト 5 T 4 エピトープ 3	M1 M2 <u>H3</u> M4 M5 M6 M7 (配列番号 8 5)	SAPSSSVPS SSTSPAFLA SGSAQPPPAE RCPAAECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL <u>KEVCAGAFEH</u> <u>LPSLRQLDLS</u> <u>HNPLADLSPF</u> AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLRLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAWEHGL AHVKVFLDNN PWVDCYMD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S
ヒト 5 T 4 エピトープ 4	M1 M2 M3 <u>H4</u> M5 M6 M7 (配列番号 8 6)	SAPSSSVPS SSTSPAFLA SGSAQPPPAE RCPAAECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL <u>KEVCAGAFEH</u> LPGLRRDLDS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLVELIL NHIVPPEDER <u>QNRSFEGMVV</u> <u>AALLAGRALQ</u> GLRRLELASN HFLFLPRDLL AQLPSLRYLD LRNNSLVSLT YASFRNLTHL ESLHLEDNAL KVLHNSTLAE WHGLAHVKVF LDNNPWVDCD YMADMVAWLK ETEVVPDKAR LTCAFPEKMR NRGLLDLNSS DLDCDAVLPQ SLQTS

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

ヒト 5 T 4 エピトープ 5	M1 M2 M3 M4 <u>H5</u> M6 M7 (配列番号 8 7)	SAPSSSVPS SSTS PAAFLA SGSAQPPPAE RCPAAECCESE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTGT NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLY <u>LPRDVLAQLP SLRHLDLSEN SLVSLTYVSF RNLTHLES LH</u> LEDNALKVLH NSTLAEWHL AHVKVFLDNN PWVCD CYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S	10
ヒト 5 T 4 エピトープ 6	M1 M2 M3 M4 M5 <u>H6</u> M7 (配列番号 8 8)	SAPSSSVPS SSTS PAAFLA SGSAQPPPAE RCPAAECCESE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTGT NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF <u>LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLES LH</u> LEDNALKVLH <u>NGTLAELQGL</u> PHIRVFLDNN PWVCD CYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S	20
ヒト 5 T 4 エピトープ 7	M1 M2 M3 M4 M5 M6 <u>H7</u> (配列番号 8 9)	SAPSSSVPS SSTS PAAFLA SGSAQPPPAE RCPAAECCESE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTGT NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF <u>LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLES LH</u> LEDNALKVLH NSTLAEWHL AHVKVFLDNN PWVCD CHMAD <u>MVTWLKETEV VQGKDRLTCA YPEKMRNRVL LELNSADLDC</u> <u>DPILPPSLQT S</u>	30

【0 2 3 7】

標準的な Octet ベースのアッセイをエピトープビニングアッセイに使用して、各抗体のエピトープピンを確立した。これらのアッセイのために、50 nM のビオチン化抗原を 1 X キネティックバッファー (Fort e Bio) 中でストレプトアビジンバイオセンサに固定化した。次いで、目的の抗体を 100 nM で含有するウェルにセンサを浸漬させ、会合シグナルをモニターした。抗体の結合を効果的にロックアウトしたキメラ (複数可) は次に、抗体が結合する特定のエピトープ (複数可) に対応する。参照のために、完全長ヒト 5 T 4 をアッセイに含めた。

【0 2 3 8】

結果は、9 つの抗体が 5 T 4 のエピトープ 4 に特異的に結合し、3 つの抗体が 5 T 4 のエピトープ 7 に特異的に結合し、3 つの抗体が 5 T 4 のエピトープ 2 に特異的に結合し、1 つの抗体が 5 T 4 のエピトープ 4 とエピトープ 6 との両方に特異的に結合し、11 個の抗体が完全長 5 T 4 (FL) に結合することを示した。例示的なエピトープビニングの結

10

20

30

40

50

果（mAbA4、mAbA15、及びmAbA17の）を表7にまとめる。

【表7】

表7. エピトープビニングアッセイ

抗体	エピトープビニング
mAbA4	4
mAbA15	2
mAbA17	7

10

【0239】

実施例6：抗体の選択

上記の通り、実施例1に記載されるようにファージライブラリからスクリーニングされたすべての抗体の中で、IgGにフォーマット化した後になおも5T4に結合することができた27個の抗体を、実施例2～5に記載されるようにさらに試験した。mAbA4、mAbA15、及びmAbA17と特定される3つの抗体を、ヒト5T4結合に対するそれらの特異性、cyno5T4への結合、それらの細胞表面結合シグナル、及びSEC、HIC、及びSMACなどの様々な方法で評価された強力な開発可能性を含む、多数のアクティビティに基づいて選択した。これらの抗体のVH配列、VL配列、及びCDR配列は、表1～3に示されている。

20

【0240】

実施例7：抗体のヒト5T4への結合（ELISA）

A. 通常の結合

【0241】

選択された抗体を、ELISAを使用して、hu5T4に結合するそれらの能力に関して試験した。1日目に、c末端ポリヒスチジン及びAvi（AVITAG（商標））タグ（AcroBiosystems（Newark, DE, USA）、カタログ番号TPG-H52E5）を有する非コンジュゲートヒトTPBG/5T4タンパク質を、PBSで2μg/mLに希釈し、完全に混合し、96ウェルプレート（Nunc MAXISORP（登録商標））に1ウェル当たり100μLをプレートし、4℃で一晩インキュベートした。

30

【0242】

2日目に、プレートを0.1%のTween（登録商標）-20を含むPBS（「PBST」）で4回洗浄した。ウェルを200μLのPBS中のカゼイン（Blocker（商標）Casein、ThermoFisher Scientificから入手可能）でブロックし、振盪しながら室温で2時間インキュベートした。

【0243】

IgG-ADCの1：3希釈系列をPBS中に調製し、96ウェルプレートの1ウェル当たり100μLの体積で添加した。プレートを振盪しながら室温で1時間インキュベートした。

40

【0244】

ヤギ抗ヒトIgG FCガンマ特異的HRPコンジュゲート（Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-035-098）をPBSで1：15000の倍率に希釈した。ELISAプレートをPBSTでプレート洗浄器（Bio Tek ELx405）で6回洗浄し、その後、100μLのヤギ抗ヒトIgG FCガンマ特異的HRPコンジュゲートを各ウェルに添加した。プレートを、振盪しながら室温にて30分間インキュベートした。

【0245】

ELISAプレートをPBSTでプレート洗浄器（Bio Tek ELx405）を使用して6回洗浄した後、100μLの3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（50

TMB)を各ウェルに添加した。プレートを濃青色が見えるようになるまで発色させた。次いで、 H_2SO_4 (2N、 $100\mu L$)を加えて反応をクエンチし、各ウェルの吸光度をプレートリーダー (Molecular Devicesから入手可能なSoftMax Proソフトウェアを備えたSpectraMax M5)で読み取った。

【0246】

B. ストレス試験

【0247】

1. 高pHストレス試験。抗体を、塩基性 (高pH) 条件下でELISAを使用して、5T4に結合するそれらの能力について試験した。0.1%w/w H_2O_2 / 1xPBS中の $1mg/mL$ の抗体を暗所で室温で24~48時間保存した後、50mMのメチオニンを追加した。分析前に保管するためにサンプルを凍結させ、分析を上記パートAで説明したようにELISAによって実施した。以下の表8は、試験した各抗体について算出した EC_{50} を報告する。

10

【表8】

表8. 高pH下でのhu5T4への抗体の結合

mAb	条件	EC_{50} (nM)
mAbA4	pH8.5 0日目	0.120
mAbA4	pH8.5 1日目	0.127
mAbA4	pH8.5 4日目	0.114
mAbA4	pH8.5 7日目	0.128
mAbA4	pH8.5 14日目	0.136
mAbA15	pH8.5 0日目	0.134
mAbA15	pH8.5 1日目	0.128
mAbA15	pH8.5 4日目	0.133
mAbA15	pH8.5 7日目	0.143
mAbA15	pH8.5 14日目	0.131
mAbA17	pH8.5 0日目	0.153
mAbA17	pH8.5 1日目	0.174
mAbA17	pH8.5 4日目	0.150
mAbA17	pH8.5 7日目	0.158
mAbA17	pH8.5 14日目	0.167

20

30

【0248】

2. 低pHストレス試験。抗体を、酸性 (低pH) 条件下でもELISAを使用して、5T4に結合するそれらの能力についても試験した。20mM Tris / 10mM EDTA中 $1mg/mL$ ~ $10mg/mL$ の抗体溶液 (pH8.5)を調製し、37℃で1~2週間保存した。分析前に保管するためにサンプルを凍結させ、分析を上記パートAで説明したようにELISAによって実施した。下記の表9は、試験した各抗体の EC_{50} を報告する。

40

50

【表 9】

表9. 低pH下でのh u 5 T 4への抗体の結合

mAb	条件	EC ₅₀ (nM)
mAb A 4	pH 5. 5 0日目	0. 1 3 3
mAb A 4	pH 5. 5 1日目	0. 1 3 2
mAb A 4	pH 5. 5 4日目	0. 1 2 5
mAb A 4	pH 5. 5 7日目	0. 1 2 4
mAb A 4	pH 5. 5 14日目	0. 1 2 2
mAb A 1 5	pH 5. 5 0日目	0. 1 2 4
mAb A 1 5	pH 5. 5 1日目	0. 1 3 4
mAb A 1 5	pH 5. 5 4日目	0. 1 2 3
mAb A 1 5	pH 5. 5 7日目	0. 1 3 2
mAb A 1 5	pH 5. 5 14日目	0. 1 3 8
mAb A 1 7	pH 5. 5 0日目	0. 1 6 4
mAb A 1 7	pH 5. 5 1日目	0. 1 5 9
mAb A 1 7	pH 5. 5 4日目	0. 1 5 7
mAb A 1 7	pH 5. 5 7日目	0. 1 9 0
mAb A 1 7	pH 5. 5 14日目	0. 1 5 3

【0 2 4 9】

3. 酸化ストレス。抗体を、酸化的環境においてELISAを使用して、5 T 4に結合するそれらの能力について試験した。20 mMのクエン酸塩／50 mMのNaCl中1 mg／mL～10 mg／mLの抗体溶液をpH 5. 5で調製し、37℃で1～2週間保存した。分析前に保管するためにサンプルを凍結させ、分析を上記パートAで説明したようにELISAによって実施した。下記の表10は、試験した各抗体のEC₅₀を報告する。

10

20

30

40

50

【表 10】

表10. 酸化ストレス下でのh u 5 T 4への抗体の結合

mAb	条件	EC ₅₀ (nM)
mAb A 4	PBS時間0	0. 1 8 2
mAb A 4	PBS時間2 4時間	0. 2 0 0
mAb A 4	PBS時間4 8時間	0. 1 8 9
mAb A 4	PBS+H ₂ O ₂ 時間0	0. 2 2 5
mAb A 4	PBS+H ₂ O ₂ 時間2 4時間	0. 3 9 3
mAb A 4	PBS+H ₂ O ₂ 時間4 8時間	0. 3 8 6
mAb A 1 5	PBS時間0	0. 2 2 9
mAb A 1 5	PBS時間2 4時間	0. 2 1 2
mAb A 1 5	PBS時間4 8時間	0. 2 0 3
mAb A 1 5	PBS+H ₂ O ₂ 時間0	0. 1 9 1
mAb A 1 5	PBS+H ₂ O ₂ 時間2 4時間	0. 1 9 0
mAb A 1 5	PBS+H ₂ O ₂ 時間4 8時間	0. 1 8 9
mAb A 1 7	PBS時間0	0. 1 9 8
mAb A 1 7	PBS時間2 4時間	0. 1 8 6
mAb A 1 7	PBS時間4 8時間	0. 1 8 5
mAb A 1 7	PBS+H ₂ O ₂ 時間0	0. 1 8 8
mAb A 1 7	PBS+H ₂ O ₂ 時間2 4時間	0. 1 8 3
mAb A 1 7	PBS+H ₂ O ₂ 時間4 8時間	0. 2 0 7

10

20

30

40

50

【0250】

実施例8. カニクイザル、ラット、及びマウス5 T 4に対する抗体の交差反応性（E L I S A及びO C T E T）

選択された抗体を、E L I S A及びO c t e tを使用して、非ヒト5 T 4-Tに結合するそれらの能力に関して試験した。ヒト5 T 4抗原の代わりに、組み換えカニクイザル5 T 4-Fc（R&D Systems（Minneapolis, MN, USA）、カタログ番号2280-TG-100またはLSBio（Seattle, WA, USA）、カタログ番号LS-G137131のいずれかから供給）、組換えマウス5 T 4-Fc（R&D Systems、カタログ番号5049-TG-100）、6His-SUMO、N末端タグを有する組換えラットTPBG/5 T 4（LSBioカタログ番号G56592）、His、N末端タグ（LSBio、カタログ番号G12168）抗原を有する組み換えマウスTPBG/5 T 4に置き換えて、実施例7に記載のE L I S Aプロトコルを使用した。O c t e t分析では、プロテインAバイオチップを抗体でコーティングし、PBSで洗浄し、次いで、上記で特定したように、抗原と反応させた。試験したすべての抗体は、ヒト、カニクイザル、及びラット5 T 4に結合した。マウス5 T 4に対する有意な結合交差反応性は観察されなかった。

【0251】

実施例9. 5 T 4トランスフェクトCHO及びHEK293細胞に対する抗体の細胞結合

選択された抗体を、ヒト、カニクイザル、ラット、またはマウス5 T 4を発現するようにトランスフェクトしたHEK293及びCHO細胞に結合する能力について試験した。非トランスフェクト細胞を対照として利用し、非特異的結合を観察した。mAb A 4、mAb A 1 5、及びmAb A 1 7は、ヒト及びカニクイザル5 T 4を発現するようにトランスフェクトされたHEK293及びCHO細胞に反応性であったが、ラットまたはマウス5 T 4を発現するようにトランスフェクトされた細胞には反応しなかった。

* * * * *

【0252】

本願を通して、さまざまな刊行物、特許、特許出願及びその他文献が参照されている。これらの刊行物、特許、特許出願ならびにその他文献の開示は、本発明が関連する分野の状態をより詳細に述べる目的を含むすべての目的のために、それらの全体が本願への参照により本明細書に組み込まれる。本発明は、上記で提供された実施例を参照しながら説明されてきたが、本発明の趣旨から逸脱することなく、さまざまな修正を行うことができることを理解されるべきである。本発明の多くの変型は、本明細書を考慮すれば当業者に明らかとなるであろう。

【図面】

【図1A】

VHドメイン
Kabat 1 10 22 31--35 40 50--a-----60---65
AbM 1 10 22 26-----35 40 50--a-----58 65
Chothia 1 10 22 26-----32 40 a-55 65
Contact 1 10 22 30-----35 40 47-----a-----58 65
IMGT 1 23 27-----38 41 56-----65 74
mAbA4 EVLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS GFTFSRYIIH WYQAPGKGLEWVA FIPSGSYTYIADSVKG
mAbA15 EVLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS GFTFSRYIIH WYQAPGKGLEWVA YITSGSYTYIADSVKG
mAbA17 EVLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS GFTFSRYIIH WYQAPGKGLEWVA AIFPYSGSTLYADSVKG

Kabat 70 80 abc 90 95-----102 110
AbM 70 80 abc 90 95-----102 110
Chothia 70 80 abc 90 96-----101 110
Contact 70 80 abc 90 93-----101 110
IMGT 75 89 105-----117
mAbA4 RFTISADTSKNTAYILQMNSLRRAEDTAVYYCAR EYISMGVL----DY WQQTGLTVTVSS (配列番号25)
mAbA15 RFTISADTSKNTAYILQMNSLRRAEDTAVYYCAR YDRSTRYSGL---DY WQQTGLTVTVSS (配列番号44)
mAbA17 RFTISADTSKNTAYILQMNSLRRAEDTAVYYCAR SPGRSLPSGL--DY WQQTGLTVTVSS (配列番号62)

【図1B】

VLドメイン
Kabat 1 10 20 24-27-----34 40 50-----56
AbM 1 10 20 24-----30--34 40 50-----56
Chothia 1 10 20 26-----32 40 50--
Contact 1 10 20 30-----36 40 46-----55
IMGT 1 23 27-----38 41 56-65 69
mAbA4 DIQMTQSPFSSLSASVGRVTITC RASQSVSSAVA WYQKPGKAPKLLIY SASSLIYS
mAbA15 DIQMTQSPFSSLSASVGRVTITC RASQSVSSAVA WYQKPGKAPKLLIY SASSLIYS
mAbA17 DIQMTQSPFSSLSASVGRVTITC RASQSVSSAVA WYQKPGKAPKLLIY SASSLIYS

Kabat 60 70 80 89-----97
AbM 60 70 80 89-----97
Chothia 60 70 80 91-----96
Contact 60 70 80 89-----96
IMGT 70 89 105-----117
mAbA4 GVPSPRSGRSRGTDFTLTITSSLPQPEDFATYYC QQAYEPTV FQGTGKVEIK (配列番号26)
mAbA15 GVPSPRSGRSRGTDFTLTITSSLPQPEDFATYYC QQAYATPTV FQGTGKVEIK (配列番号45)
mAbA17 GVPSPRSGRSRGTDFTLTITSSLPQPEDFATYYC QQGDGSPYV FQGTGKVEIK (配列番号63)

【配列表】

2025518493000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/66819

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. C07K 16/30, C07K 16/28 (2023.01) ADD. C07K 14/705, A61P 35/00 (2023.01) CPC - INV. A61K 39/00118, C07K 16/2827 ADD. C07K 14/705, C07K 2317/622, A61K 2039/505 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2020/0407461 A1 (CELLECTIS) 31 December 2020 (31.12.2020) Abstract	1-3, (8-9)/(1-3)
A	WO 2020/237320 A1 (THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH) 3 December 2020 (03.12.2020) Claim 1; P9-29; P9-43	1-3, (8-9)/(1-3)
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 August 2023		Date of mailing of the international search report NOV 08 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/66819

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
	1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.I(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/66819

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 10-30
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—Please see continuation in first extra sheet —

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, (8-9) (in part), limited to mAb A4, SEQ ID NOs:25, 26

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/66819

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+; Claims 1-9, directed to an antibody or fragment thereof that binds to 5T4. The antibody will be searched to the extent that the antibody encompasses mAb A4 comprising (i) a VH region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:25 comprising a VH CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, a VH CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, a VH CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3; and a VL region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:26 comprising a VL CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4, a VL CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5, and a VL CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6 (note, these are the first claimed sequences for the inventive antibody). The first named invention was determined based on the first claimed sequences (Claims 1-2) for the inventive antibody embodiment. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-3, (8-9) (in part) encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the antibody encompasses mAb A4 comprising (i) a VH region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:25 comprising a VH CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, a VH CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, a VH CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3; and a VL region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:26 comprising a VL CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4, a VL CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5, and a VL CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6. Additional antibody sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected antibody sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an antibody mAb A15 comprising a VH region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:44 comprising a VH CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:27, a VH CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:28, a VH CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:29; and a VL region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:45 comprising a VL CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4, a VL CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5, and a VL CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:30 (claims 1, 4-5, (8-9) (in part)).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique amino acid sequence. Each amino acid sequence comprises a unique peptide, and is considered a distinct technical feature.

Common technical features

No technical features are shared between the antibody amino acid sequences in each of Group I+ inventions and, accordingly, these inventions lack unity a priori.

Additionally, even if Group I+ inventions were considered to share the technical features of including:

an antibody or fragment thereof that binds to 5T4, wherein the antibody or fragment thereof comprises (i) a VH CDR1, a VH CDR2, and a VH CDR3 and a VL CDR1, a VL CDR2, and a VL CDR3; these shared technical features are previously disclosed by US 2020/0407481 A1 to Collectis (hereinafter 'Collectis').

Collectis teaches an antibody or fragment thereof that binds to 5T4, wherein the antibody or fragment thereof comprises (i) a VH CDR1, a VH CDR2, and a VH CDR3 and a VL CDR1, a VL CDR2, and a VL CDR3 (Abstract - The present invention relates to Chimeric Antigen Receptors (CAR) that are recombinant chimeric proteins able to redirect immune cell specificity and reactivity toward selected membrane antigens, and more particularly in which extracellular ligand binding is a scFV derived from a 5T4 monoclonal antibody, conferring specific immunity against 5T4 positive cells.; para [0019] - 'FIGS. 3 to 6: schematic representation of the v1 to v6 T cell CARs accordingly to FIG. 2 with the VH and VL chains from A1, A2, A3 and H8 antibodies.; TABLE 2 - 'Sequence of the VH and VL chains of different scFVs and their respective CDRs).

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of Item 4 above: claims 10-30 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
			C 1 2 N	15/12	

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

(72)発明者 ハマー, ボニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 0 2, アラメダ, ハーバー ベイ パークウェイ 1 8 5 1, エグゼリクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ヒガキ, ジェフリー エヌ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 0 2, アラメダ, ハーバー ベイ パークウェイ 1 8 5 1, エグゼリクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 カンタク, シーマ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 0 2, アラメダ, ハーバー ベイ パークウェイ 1 8 5 1, エグゼリクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 カプラン, チャールズ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 0 2, アラメダ, ハーバー ベイ パークウェイ 1 8 5 1, エグゼリクス, インコーポレイテッド 気付

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC27 EE41 EE59

4C084 AA19 MA02 NA05 ZB261 ZB262 ZC751 ZC752

4C085 AA14 BB11 BB41 BB43 DD62 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 FA74