

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5606916号
(P5606916)

(45) 発行日 平成26年10月15日 (2014. 10. 15)

(24) 登録日 平成26年9月5日 (2014. 9. 5)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/32 (2006. 01)

C O 7 K 16/32 Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 H

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 31/513 (2006. 01)

A 6 1 K 31/513

A 6 1 K 31/282 (2006. 01)

A 6 1 K 31/282

請求項の数 30 (全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-530101 (P2010-530101)
 (86) (22) 出願日 平成20年10月16日 (2008. 10. 16)
 (65) 公表番号 特表2011-504460 (P2011-504460A)
 (43) 公表日 平成23年2月10日 (2011. 2. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/080102
 (87) 国際公開番号 W02009/052249
 (87) 国際公開日 平成21年4月23日 (2009. 4. 23)
 審査請求日 平成23年8月24日 (2011. 8. 24)
 (31) 優先権主張番号 60/981, 411
 (32) 優先日 平成19年10月19日 (2007. 10. 19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
 ス サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 マオ, ウェイグアン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
 03, サン マテオ, デ アンザ ブ
 ールバード 1613

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 システイン操作抗 T E N B 2 抗体および抗体薬物結合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 個以上の遊離システインアミノ酸を含む、システイン操作抗 T E N B 2 抗体であって、
 以下：

【化 3 2】

MAVLGLLLCLVTFPSCVLSDVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSIT

SGYYWSWIRQPPGKGLEWMGFISYDGSNKYNPSLKNRITISRDTSKNQFSLK

LSSVTAADTAVYYCARGLRGDYSMDYWGGGTLTVTVSSCSTKGPSVFPLAP

SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK

TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS

PGK

配列番号3

10

を含む重鎖配列、および
以下

【化 3 3】

MDFQVQIFSLLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ

NVVTAWAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP

EDFATYYCQYSSYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV

CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKAD

YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 配列番号2

を含む軽鎖配列を含む、システイン操作抗 T E N B 2 抗体。

【請求項 2】

細菌または C H O 細胞において生成される、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体。

【請求項 3】

前記抗体は、オーリスタチン薬物部分に共有結合され、それによって、抗体薬物結合体化合物が形成される、請求項 1 または 2 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体。

【請求項 4】

システイン操作抗 T E N B 2 抗体 (A b)、およびオーリスタチン薬物部分 (D) を含む請求項 3 に記載の抗体薬物結合体化合物であって、ここで、該システイン操作抗 T E N B 2 抗体は、1 個以上の遊離システインアミノ酸を介してリンカー部分 (L) によって D に結合されており；該化合物は、式 I :

【化 3 4】



を有し、ここで p は、1、2、3、または 4 である、
抗体薬物結合体化合物。

【請求項 5】

20

30

40

50

システイン操作抗 T E N B 2 抗体 (A b)、およびオーリスタチン薬物部分 (D) を含む請求項 3 に記載の抗体薬物結合体化合物であって、ここで、該システイン操作抗 T E N B 2 抗体は、1 個以上の遊離システインアミノ酸を介してリンカー部分 (L) によって D に結合されており；該化合物は、式 I :

【化 3 4】



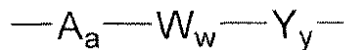
を有し、ここで p は、2 である、
抗体薬物結合体化合物。

10

【請求項 6】

L は、以下の式：

【化 3 5】



を有し、
ここで

A は、前記システイン操作抗体 (A b) のシステインチオールに共有結合される伸長因子ユニットであり；

a は、0 もしくは 1 であり；

20

各 W は、独立してアミノ酸ユニットであり；

w は、0 ~ 12 の範囲の整数であり；

Y は、前記薬物部分に共有結合されるスペーサーユニットであり；そして

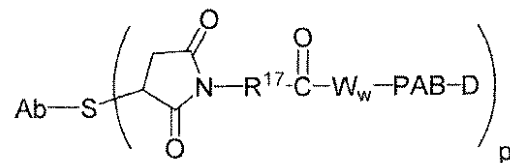
y は、0、1 もしくは 2 である、

請求項 4 または 5 に記載の抗体薬物結合体化合物。

【請求項 7】

以下の式を有する、請求項 6 に記載の抗体薬物結合体化合物：

【化 3 6】



30

ここで P A B は、パラアミノベンジルカルバモイルであり、 R^{17} は、 $(\text{CH}_2)_r$ 、 C_3-C_8 カルボシクリル、 $\text{O}-(\text{CH}_2)_r$ 、アリーレン、 $(\text{CH}_2)_r$ -アリーレン、-アリーレン- $(\text{CH}_2)_r$ -、 $(\text{CH}_2)_r-(\text{C}_3-\text{C}_8$ カルボシクリル)、 $(\text{C}_3-\text{C}_8$ カルボシクリル)- $(\text{CH}_2)_r$ 、 C_3-C_8 ヘテロシクリル、 $(\text{CH}_2)_r-(\text{C}_3-\text{C}_8$ ヘテロシクリル)、- $(\text{C}_3-\text{C}_8$ ヘテロシクリル)- $(\text{CH}_2)_r$ -、- $(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2)_r$ -、- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -、- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2$ -、- $(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -、- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2$ -、- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -、- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2$ -、および- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2)_r$ - から選択される二価ラジカルであり；ここで R^b は、H、 C_1-C_6 アルキル、フェニル、もしくはベンジルであり；そして r は、独立して、1 ~ 10 の範囲の整数である。

40

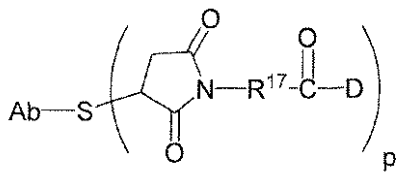
【請求項 8】

W_w は、バリン-シトルリンである、請求項 6 に記載の抗体薬物結合体化合物。

【請求項 9】

以下の式を有する、請求項 6 に記載の抗体薬物結合体化合物：

【化 3 7】



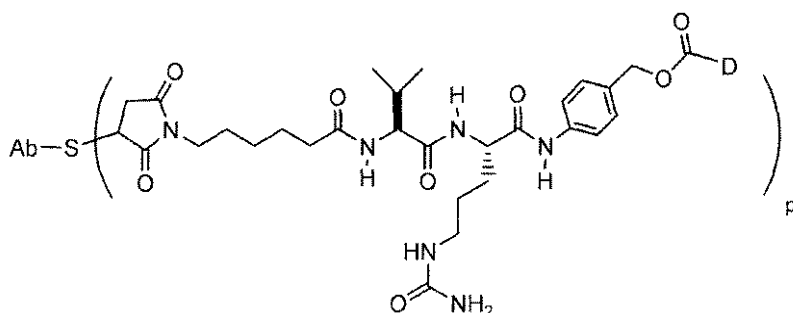
【請求項 1 0】

R¹⁷ は、(CH₂)₅ もしくは (CH₂)₂ である、請求項 7 または 9 のいずれかに記載の抗体薬物結合体化合物。

【請求項 1 1】

以下の式を有する、請求項 6 に記載の抗体薬物結合体化合物：

【化 3 8】



【請求項 1 2】

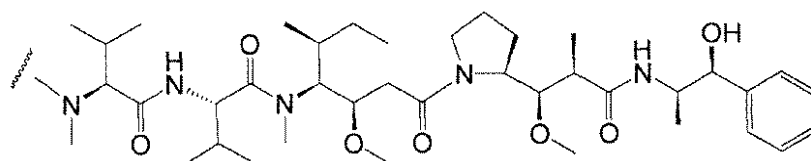
L は、SMCC もしくは BMPEO である、請求項 6 に記載の抗体薬物結合体化合物。

【請求項 1 3】

D は、

以下の構造：

【化 3 9】

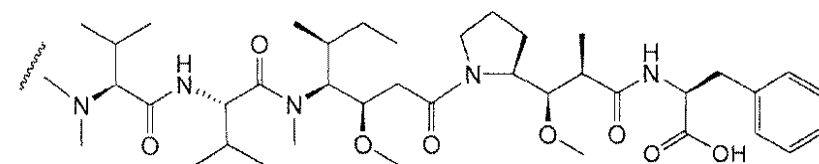


を有する MMAE であり、

ここで波線は、前記リンカー L への結合部位を示すか；または

以下の構造：

【化 4 0】



を有する MMAF であり、

ここで波線は、前記リンカー L への結合部位を示すか

のいずれかである、請求項 6 に記載の抗体薬物結合体化合物。

【請求項 1 4】

親抗 T E N B 2 抗体は、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、およびヒト化抗体から選択される、請求項 1 または 2 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体または請求項 3 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体薬物結合体化合物。

【請求項 1 5】

10

20

30

40

50

親抗 T E N B 2 抗体は、F a b フラグメントである、請求項 1 または 2 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体または請求項 3 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体薬物結合体化合物。

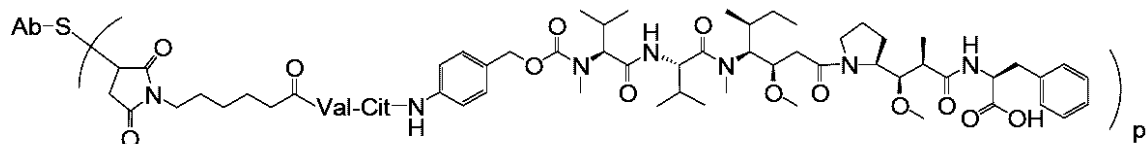
【請求項 1 6】

L は、M C - v a l - c i t - P A B もしくは M C 、S M C C 、S P P 、もしくは B M P E O である、請求項 4 に記載の抗体薬物結合体化合物。

【請求項 1 7】

以下の構造：

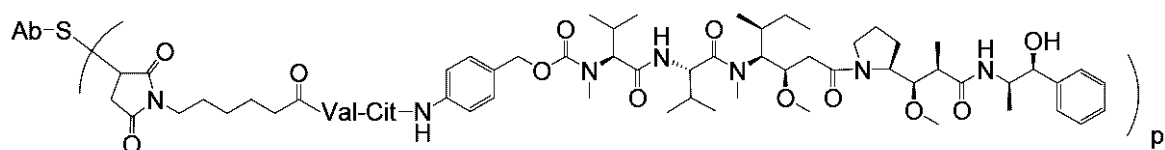
【化 4 1】



10

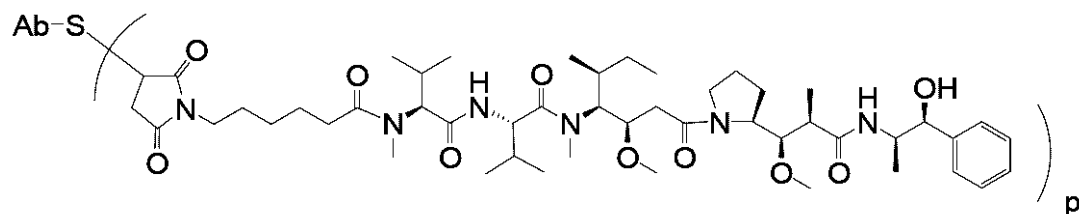
Ab-MC-vc-PAB-MMAF

【化 4 2】



20

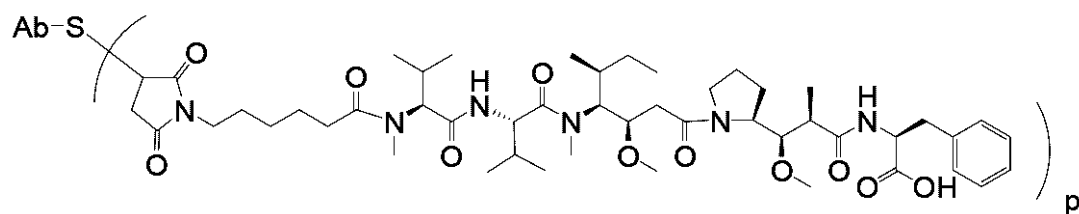
Ab-MC-vc-PAB-MMAE



30

Ab-MC-MMAE

および



40

Ab-MC-MMAF

から選択され、ここで V a l はバリンであり；C i t はシトルリンであり；p は、1、2

50

、 3、もしくは4であり；そしてA bは、請求項1に記載のシステイン操作抗T E N B 2抗体である、
抗体薬物結合体化合物。

【請求項18】

請求項1に記載のシステイン操作抗T E N B 2抗体または請求項3に記載の抗体薬物結合体化合物、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアもしくは賦形剤を含む、薬学的処方物。

【請求項19】

レトロゾール、オキサリプラチン、ドセタキセル、5 - F U、ラパチニブ、カペシタビン、ロイコボリン、エルロチニブ、ペルツズマブ、ペバシズマブ、およびゲムシタビンから
選択される化学療法剤の治療上有効な量をさらに含む、請求項18に記載の抗体薬物結合
体化合物を含む薬学的処方物。

10

【請求項20】

製造物品であって、

請求項18に記載の抗体薬物結合体化合物を含む薬学的処方物；

容器；および

前記化合物を使用して、T E N B 2ポリペプチドの過剰発現によって特徴づけられる癌
を処置することができることを示す、パッケージ挿入物もしくは表示、
を含み、ここで、該癌は、卵巣癌、前立腺癌、尿路の癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、もしくは
結腸癌から選択される、製造物品。

20

【請求項21】

T E N B 2タンパク質を含むと推測されるサンプル中のT E N B 2タンパク質の存在を決定
するための方法であって、該方法は、該サンプルを、請求項1に記載のシステイン操作
抗T E N B 2抗体に曝す工程、および該サンプル中の該T E N B 2タンパク質への該抗体
の結合を決定する工程を含み、ここで該タンパク質への該抗体の結合は、該サンプル中の
該タンパク質の存在を示し、該抗体は、蛍光色素、放射性同位体、ビオチン、もしくは金
属錯化配位子から選択される標識に共有結合されている、方法。

【請求項22】

前記サンプルは、前記T E N B 2タンパク質を発現すると推測される細胞を含み、ここで
該細胞は、前立腺癌細胞、卵巣癌細胞、乳癌細胞、肺癌細胞、もしくは膵臓癌細胞である
、請求項21に記載の方法。

30

【請求項23】

癌細胞を検出するためのインビトロアッセイであって、該アッセイは、

(a)細胞を、請求項3に記載の抗体薬物結合体化合物に曝す工程；および

(b)該細胞への該抗体薬物結合体化合物の結合の程度を決定する工程、
を包含し、ここで、該細胞は、前立腺腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、
結腸腫瘍細胞もしくは卵巣腫瘍細胞である、インビトロアッセイ。

【請求項24】

細胞増殖を阻害する方法であって、該方法は、細胞培養培地中の哺乳動物腫瘍細胞を、請
求項3に記載の抗体薬物結合体化合物で処理し、それによって、該腫瘍細胞の増殖を阻害
する工程、を包含し、ここで、該哺乳動物腫瘍細胞は、卵巣腫瘍細胞である、方法。

40

【請求項25】

癌を処置する方法において使用するための請求項18に記載の薬学的処方物であって、該
方法は、該薬学的処方物を患者に投与する工程を包含し、ここで該癌は、前立腺癌、尿路
の癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、結腸癌および卵巣癌からなる群より選択される、薬学的処方
物。

【請求項26】

前記方法は、前記抗体薬物結合体化合物と組み合わせて化学療法剤を前記患者に投与する
工程を包含し、ここで該化学療法剤は、レトロゾール、シスプラチン、カルボプラチン、
タキソール、パクリタキセル、オキサリプラチン、ドセタキセル、5 - F U、ロイコボリ

50

ン、エルロチニブ、ペルツズマブ、ベバシズマブ、ラパチニブ、およびゲムシタビンから選択される、請求項 25 に記載の薬学的処方物。

【請求項 27】

請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体 (A b) およびオーリスタチン薬物部分 (D) を含む、抗体薬物結合体化合物を作製するための方法であって、ここで該システイン操作抗体は、1 個以上の操作されたシステインアミノ酸を介してリンカー部分 (L) によって D に結合され；該化合物は、式 I :

【化 43】



10

を有し、ここで p は、1、2、3、もしくは 4 であり；
該方法は、

(a) 該システイン操作抗体の操作されたシステイン基と、リンカー試薬とを反応させて、抗体 - リンカー中間体 A b - L を形成する工程；および

(b) A b - L と、活性化された薬物部分 D とを反応させ；それによって、該抗体薬物結合体化合物が形成される、工程；

を包含するか、または

(c) 薬物部分の求核性基と、リンカー試薬とを反応させて、薬物 - リンカー中間体 D - L を形成する工程；および

(d) D - L と、該システイン操作抗体の操作されたシステイン基とを反応させ；それによって、該抗体薬物結合体化合物が形成される、工程、
を包含し、ここで該方法は、該システイン操作抗体をチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞において発現させる工程を包含する、方法。

20

【請求項 28】

請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体 (A b) およびオーリスタチン薬物部分 (D) を含む、抗体薬物結合体化合物を作製するための方法であって、ここで該システイン操作抗体は、1 個以上の操作されたシステインアミノ酸を介してリンカー部分 (L) によって D に結合され；該化合物は、式 I :

【化 43】



30

を有し、ここで p は、1、2、3、もしくは 4 であり；
該方法は、

(a) 該システイン操作抗体の操作されたシステイン基と、リンカー試薬とを反応させて、抗体 - リンカー中間体 A b - L を形成する工程；および

(b) A b - L と、活性化された薬物部分 D とを反応させ；それによって、該抗体薬物結合体化合物が形成される、工程；

を包含するか、または

(c) 薬物部分の求核性基と、リンカー試薬とを反応させて、薬物 - リンカー中間体 D - L を形成する工程；および

(d) D - L と、該システイン操作抗体の操作されたシステイン基とを反応させ；それによって、該抗体薬物結合体化合物が形成される、工程、
を包含する、方法。

40

【請求項 29】

前記発現されたシステイン操作抗体を、還元剤で処理する工程をさらに包含し、ここで該還元剤は T C E P および D T T から選択される、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記発現されたシステイン操作抗体を、前記還元剤で処理する工程の後に、酸化剤で処理する工程をさらに包含し、ここで該酸化剤は、硫酸銅、デヒドロアスコルビン酸、および

50

空気から選択される、請求項 29 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般に、反応性システイン残基で操作された抗体、およびより具体的には、治療的もしくは診断的適用を有する抗体に関する。上記システイン操作された抗体は、化学療法剤、毒素、アフィニティリガンド（例えば、ビオチン）、および検出標識（例えば、フルオロフォア）と結合体化され得る。本発明はまた、抗体および抗体薬物結合体化物を、哺乳動物細胞、もしくは関連する病的状態のインビトロ、インサイチュ、およびインビボ診断もしくは処置のために使用する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

抗体治療は、癌、免疫学的障害および血管新生障害を有する患者の標的化処置のために確立されてきた。正常な非癌細胞と比較して、ガン細胞の表面で特異的に発現される膜貫通ポリペプチドもしくはさもなくば腫瘍関連ポリペプチドは、抗体を用いた癌診断および癌治療のための細胞標的として同定されてきた。このような腫瘍関連細胞表面抗原ポリペプチド（すなわち、腫瘍関連抗原（TAA））の同定は、抗体ベースの治療を介した破壊のための癌細胞の特異的標的化を可能にする。

20

【0003】

細胞傷害性もしくは細胞増殖抑制性薬剤（すなわち、癌の処置において腫瘍細胞を死滅させるかもしくは阻害する薬物（非特許文献 1；非特許文献 2；非特許文献 3；非特許文献 4；非特許文献 5；米国特許第 4975278 号））の局所的送達のための抗体薬物結合体（ADC）（すなわち、免疫結合体）の使用は、上記薬物部分の、腫瘍への標的化された送達、および腫瘍での細胞内蓄積を可能にし、ここでこれら結合体化されていない薬物因子の全身の蓄積は、正常細胞に対して、および排除されるべき上記腫瘍細胞に対しても許容不能な毒性レベルを生じる（非特許文献 6；非特許文献 7）。上記治療指数（すなわち、ADC の最大の効力および最小の毒性）を改善しようとする努力は、ポリクローナル抗体（非特許文献 8）およびモノクローナル抗体（mAb）、ならびに薬物連結および薬物放出特性の選択性に焦点が当てられてきた（非特許文献 1）。抗体薬物結合体において使用される薬物部分としては、細菌タンパク質毒素（例えば、ジフテリア毒素）、植物タンパク質毒素（例えば、リシン）、低分子（例えば、オーリスタチン、ゲルダナマイシン（非特許文献 9；非特許文献 10；非特許文献 11）、マイタンシノイド（EP 1391213；非特許文献 12）、カリチアマイシン（非特許文献 13；非特許文献 14）、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート、およびビンデシン（非特許文献 8）が挙げられる。上記薬物部分は、細胞傷害性機構および細胞増殖抑制性機構（including チューブリン結合、DNA 結合、もしくはトポイソメラーゼ阻害）に影響を及ぼし得る。いくつかの細胞傷害性薬物は、大きな抗体もしくはタンパク質レセプターリガンドに結合体化される場合に、不活性もしくは活性が低い傾向がある。

30

40

【0004】

上記オーリスタチンペプチド、オーリスタチン E（AE）およびモノメチルオーリスタチン（MMAE）、ドラスタチンの合成アナログ（特許文献 1）は、薬物部分として以下に結合されてきた：（i）キメラモノクローナル抗体 cBR96（癌腫上のルイス Y に特異的）；（ii）血液悪性疾患の CD30 に特異的な cAC10（非特許文献 15；非特許文献 16；非特許文献 17；US 2004/0018194）；（iii）抗 CD20 抗体（例えば、CD20 発現癌および免疫障害の処置のためのリツキサン（非特許文献 2））；（iv）結腸直腸癌の処置のための抗 EphA2R 抗体 2H9（非特許文献 18）；（v）E-セレクチン抗体（非特許文献 19）；（vi）トラストズマブ（HERCEPTIN（登録商標）、US 2005/0238649）、ならびに（vi）抗 CD3

50

0 抗体（特許文献 3）。オーリスタチン E の改変体は、米国特許第 5 7 6 7 2 3 7 号および同第 6 1 2 4 4 3 1 号に開示されている。モノクローナル抗体に結合体化されたモノメチルオーリスタチン E は、非特許文献 2 0 に開示されている。オーリスタチンアナログ M M A E および M M A F は、種々の抗体に結合体化された（U S 2 0 0 5 / 0 2 3 8 6 4 9）。

【 0 0 0 5 】

薬物部分を抗体に結合（すなわち、共有結合を介した連結）する従来の手段は、一般に、分子の不均質な混合物をもたらし、ここで上記薬物部分は、上記抗体上の多くの部位で結合される。例えば、細胞傷害性薬物は、代表的には、上記抗体のしばしば多くのリジン残基を介して抗体に結合体化されてきており、このことは、不均質な抗体薬物結合体混合物を生成した。反応条件に依存して、上記不均質な混合物は、代表的には、0 ~ 約 8、もしくはそれ以上で、薬物部分に結合された抗体の分布を含む。さらに、薬物部分 対 抗体の特定の整数比を有する結合体の各亜群内に、上記薬物部分が上記抗体の種々の部位に結合された潜在的に不均質な混合物が存在する。分析方法および分取方法は、結合体化反応から生じる不均一な混合物内の上記抗体薬物結合体種分子を分離および特徴付けるためには不適切であり得る。抗体は、大きく、複雑かつ構造的に多様な生体分子であり、しばしば、多くの反応性官能基を有する。それらの、リンカー試薬および薬物 - リンカー中間体との反応性は、p H、濃度、塩濃度、および共溶媒のような要因に依存する。さらに、上記複数工程結合体化プロセスは、反応条件の制御、ならびに反応物および中間体の特徴付けが困難であることに起因して、再現性がない可能性があり得る。

【 0 0 0 6 】

システインチオールは、p H 7 付近では保護されかつ求核性の低い大部分のアミンとは異なり、中性 p H において反応性である。遊離チオール（R S H、スルフヒドリル）基は、比較的反応性であるので、システイン残基を有するタンパク質は、しばしば、ジスルフィド結合オリゴマーとしてそれらの酸化された形態で存在するか、または内部架橋されたジスルフィド基を有する。細胞外タンパク質は、一般に、遊離チオールを有さない（非特許文献 2 1）。抗体のシステインチオール基は、一般に、抗体のアミンもしくはヒドロキシル基よりも、求核性結合体化反応に対して反応性がより高い、すなわち、求核性がより高い。システイン残基は、遺伝子操作技術によってタンパク質の中に導入されて、リガンドに対する共有結合を形成したか、または新たな分子内ジスルフィド結合を形成した（非特許文献 2 2；非特許文献 2 3；非特許文献 2 4；非特許文献 2 5；非特許文献 2 6；非特許文献 2 7；米国特許第 6 2 4 8 5 6 4 号）。しかし、タンパク質の種々のアミノ酸残基をシステインアミノ酸残基へ変異させることによる、システインチオール基の操作は、潜在的に問題があり、特に、対形成していない残基（遊離 C y s）、もしくは比較的反応もしくは酸化しやすい残基の場合には、問題がある。上記タンパク質の濃縮溶液において、E . c o l i の周辺質、培養上清、または部分的もしくは完全に精製されたタンパク質においてであろうとそうでなかろうと、上記タンパク質の表面上の対形成していない C y s 残基は、対形成および酸化して、分子間ジスルフィドを形成し得、従って、タンパク質ダイマーもしくは丸チマーを形成し得る。ジスルフィドダイマー形成は、上記新たな C y s を、薬物、リガンド、もしくは他の標識への結合体化に対して非反応性にする。さらに、i f 上記タンパク質が、上記新たに操作された C y s と既存の C y s 残基との間で分子内ジスルフィド結合を産科的に形成する場合、両方の C y s チオール基は、活性部位関与および相互作用に利用できない。さらに、上記タンパク質は、間違った折りたたみもしくは四次構造の喪失によって、不活性もしくは非特異的にされ得る（非特許文献 2 8）。

【 0 0 0 7 】

システイン操作抗体は、F A B 抗体フラグメント（チオ F a b）と称され、全長の I g G モノクローナル（チオ M a b）抗体として発現された（U S 2 0 0 7 / 0 0 9 2 9 4 0（その内容は、本明細書に参考として援用される）。チオ F a b およびチオ M a b 抗体は、リンカーを介して、チオール反応性リンカー試薬および薬物 - リンカー試薬と、上記新たに導入されたシステインチオールにおいて結合体化して、抗体薬物結合体（チオ A D

10

20

30

40

50

C) を調製した。

【0008】

TENB2は、腫瘍関連抗原ポリペプチド(PR1としても公知)であり、上記TENB2タンパク質は、2個のフォリスタチン様ドメインおよび保存されたEGF様ドメインを含む。上記タンパク質をコードする遺伝子は、最初に、ヒト脳cDNAライブラリーから特徴付けられ(非特許文献29を参照のこと)、そして後に、ヒト胎児脳cDNAライブラリーから単離された(非特許文献30を参照のこと)。例えば、Online Mendelian Inheritance in Man, number 605734; UniGene Cluster Hs.22791; LocusLink 23671; および他のリンクされたサイトもまた参照のこと。TENB2は、PR1、トモレグリン(tomoregulin)、TR、過形成ポリープ症(hyperplastic polyposis)遺伝子1、HPP1、およびTMEFF2といわれてきた。その核酸配列は、ATCCアクセッション番号AF264150、AB004064、AB017269、およびAF179274によって同定され得る;そしてそのアミノ酸配列は、ATCCアクセッション番号AAF91397、BAA90820、BAA87897、およびAAD55776によって同定され得る。TENB2のUniGene Cluster識別番号は、hs.22791であり、LocusLink識別番号は、23671であり、OMIM識別番号は、605734である。

10

【0009】

上記遺伝子はまた、特定の癌状態に影響を与えた。非特許文献31は、結腸直腸ポリープにおける発現を報告した。非特許文献32は、前立腺癌についてのマーカーとして上記遺伝子を報告した。

20

【0010】

特定のヒト腫瘍におけるその過剰発現に起因して、上記TENB2ポリペプチドおよびそのポリペプチドをコードする上記核酸は、種々の哺乳動物組織サンプルの中で定量的および定性的比較の標的である。TENB2ポリペプチドの上記独特の発現プロファイル、およびそのポリペプチドをコードする上記核酸は、哺乳動物における癌性腫瘍の特定のタイプの診断および治療的処置のために利用され得る。

【0011】

最近、特定の抗TENB2抗体(抗TMEFF2抗体番号19を含む)が開示され、前立腺の増殖状態(例えば、良性前立腺肥大および前立腺癌を含む)を処置するためにインターナライズされかつ有用であることが示された(PCT/US03/07209; 米国特許出願第10/383447号(2003年3月7日); Vinayら, 「Antibodies Against Cancer Antigen TMEFF2 and Uses Thereof」(その内容は、本明細書に参考として援用される))。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】国際公開第02/088172号パンフレット

【特許文献2】国際公開第04/032828号パンフレット

40

【特許文献3】国際公開第03/043583号パンフレット

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5: 543 - 549

【非特許文献2】Wuら(2005) Nature Biotechnology 23(9): 1137 - 1146

【非特許文献3】Payne, G. (2003) Cancer Cell 3: 207 - 212

【非特許文献4】Syrigos and Epenetos (1999) Antica

50

ncer Research 19:605-614

【非特許文献5】Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172

【非特許文献6】Baldwin (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986): 603-05

【非特許文献7】Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera (編), pp. 475-506

10

【非特許文献8】Rowland (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87

【非特許文献9】Mandler (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581

【非特許文献10】Mandler (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028

【非特許文献11】Mandler (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791

【非特許文献12】Liu (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623

20

【非特許文献13】Lode (1998) Cancer Res. 58:2928

【非特許文献14】Hinman (1993) Cancer Res. 53:3336-3342

【非特許文献15】Klussman (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773

【非特許文献16】Doronina (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784

【非特許文献17】Francisco (2003) Blood 102(4):1458-1465

【非特許文献18】Mao (2004) Cancer Research 64(3):781-788

30

【非特許文献19】Bhaskar (2003) Cancer Res. 63:6387-6394

【非特許文献20】Senter, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623 (2004年3月28日に示された)

【非特許文献21】Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, 第55頁

40

【非特許文献22】Better (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650

【非特許文献23】Bernhard (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132

【非特許文献24】Greenwood (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255

【非特許文献25】Tu (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4862-4867

【非特許文献26】Kanno (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214

50

【非特許文献27】Chmuraら(2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484

【非特許文献28】Zhangら(2002) Anal. Biochem. 311:1-9

【非特許文献29】Uchidaら(1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602

【非特許文献30】Horieら(2000) Genomics 67:146-152

【非特許文献31】Youngら(2001) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98:265-270

【非特許文献32】Glynn-Jonesら(2001) Int. J. Cancer 94:178-184

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0014】

(要旨)

一局面において、本発明は、1個以上の遊離システインアミノ酸および配列番号8～23から選択される配列を含むシステイン操作抗TENB2抗体を包含する。上記システイン操作抗TENB2抗体は、TENB2ポリペプチドに結合し得る。腫瘍関連抗原(TAA)(例えば、TENB2ポリペプチド)は、当該分野で周知である方法および情報、およびPCT/US03/07209における例を使用して、システイン操作抗体を生成することにおいて使用するために調製され得る。上記システイン操作抗TENB2抗体は、親抗TENB2抗体1個以上のアミノ酸残基をシステインで置換する工程を包含するプロセスによって、調製され得る。

20

【0015】

上記システイン操作抗TENB2抗体の上記1個以上の遊離システインアミノ酸残基は、軽鎖もしくは重鎖に位置する。

【0016】

一局面において、本発明は、TENB2タンパク質を含むと推測されるサンプル中の上記タンパク質の存在を決定するための方法を包含し、上記方法は、上記サンプルをシステイン操作抗TENB2抗体に曝す工程、および上記サンプル中の上記TENB2タンパク質への上記抗体の結合を決定する工程を包含する。ここで上記タンパク質への上記抗体の結合は、上記サンプル中に上記タンパク質が存在することを示す。

30

【0017】

システイン操作抗TENB2抗体は、裸の抗体(薬物にも標識部分にも結合体化されていない)もしくは抗体薬物結合体(ADC)として使用され得る。上記システイン操作抗TENB2抗体は、オーリスタチン薬物部分に共有結合され得、それによって、抗体薬物結合体が形成される。上記抗体薬物結合体は、システイン操作抗TENB2抗体(Ab)、およびオーリスタチン薬物部分(D)を含み得、ここで上記システイン操作抗TENB2抗体は、1個以上の遊離システインアミノ酸を介して、リンカー部分(L)によって、Dへと結合され；上記化合物は、式Iを有し：

40

【0018】

【化1-1】



ここでpは、1、2、3、もしくは4である。オーリスタチン薬物部分は、MMAEおよびMMAFを包含する。

【0019】

本発明の一局面は、癌細胞を堅守するためのアッセイであり、上記方法は、(a)細胞を抗体薬物結合体化合物に曝す工程；および(b)上記細胞への上記抗体薬物結合体化合物の結合の程度を決定する工程を包含する。

50

【 0 0 2 0 】

本発明の一局面は、上記抗体薬物結合体、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアもしくは賦形剤を含む、薬学的処方物である。

【 0 0 2 1 】

本発明の一局面は、細胞増殖を阻害するための方法であり、上記方法は、細胞培養培地中の哺乳動物腫瘍細胞を、抗体薬物結合体化合物で処理する工程を包含し、それによって、上記腫瘍細胞の増殖は、阻害される。

【 0 0 2 2 】

本発明の一局面は、癌を処置するための方法であり、上記方法は、患者に上記薬学的処方物を投与する工程を包含する。上記患者は、化学療法剤を、上記抗体薬物結合体化合物と組み合わせて投与され得る。

10

【 0 0 2 3 】

本発明の一局面は、上記薬学的処方物、容器；および上記化合物が、TENB2ポリペプチドの過剰発現によって特徴付けられる癌を処置するために使用され得ることを示すパッケージ挿入物もしくは表示、を含む製造物品である。

【 0 0 2 4 】

本発明の一局面は、式Iの抗体薬物結合体化合物を作製するための方法であり、上記方法は、(a)上記システイン操作抗体の操作システイン基と、リンカー試薬とを反応させて、抗体-リンカー中間体Ab-Lを形成する工程；および(b)Ab-Lと、活性化された薬物部分Dとを反応させる工程を包含し、それによって、上記抗体薬物結合体が形成されるか；または(c)薬物部分の求核性基と、リンカー試薬とを反応させて、薬物-リンカー中間体D-Lを形成する工程；および(d)D-Lと、上記システイン操作抗体の操作システイン基とを反応させる工程を包含し、それによって上記抗体薬物結合体が形成される。

20

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(請求項1)

1個以上の遊離システインアミノ酸および配列番号8～23から選択される配列を含む、システイン操作抗TENB2抗体。

(請求項2)

前記システイン操作抗TENB2抗体は、TENB2ポリペプチドに結合する、請求項1に記載のシステイン操作抗TENB2抗体。

30

(請求項3)

親抗TENB2抗体の1個以上のアミノ酸残基を、システインで置換する工程を包含するプロセスによって調製される、請求項1に記載のシステイン操作抗TENB2抗体。

(請求項4)

前記1個以上の遊離システインアミノ酸残基は、軽鎖に位置する、請求項1に記載のシステイン操作抗TENB2抗体。

(請求項5)

以下から選択される1つ以上の配列を含む、請求項4に記載のシステイン操作抗TENB2抗体：

40

【表3】

Cys変異付近の配列	配列番号付け	Kabat 番号付け	配列番号
SLSASCGDRV	V15C	V15C	17
EIKRTCAAPSV	V110C	V110C	18
TVAAPCVFIFP	S114C	S114C	19
FIFPPCDEQLK	S121C	S121C	20
DEQLKCGTASV	S127C	S127C	21
VTEQDCKDSTY	S168C	S168C	22
GLSSPCTKSFN	V205C	V205C	23

50

(請求項 6)

前記 1 個以上の遊離システインアミノ酸残基は、重鎖に位置する、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体。

(請求項 7)

以下から選択される 1 つ以上の配列を含む、請求項 6 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体：

【表 4】

Cys変異付近の配列	配列番号付け	Kabat 番号付け	Eu番号付け	配列番号
DVQLCESGPG	Q5C	Q5C		8
LSLTCCVSGYS	A23C	A23C		9
LSSVTCADTAV	A88C	A84C		10
TLVTVCASATK	S119C	S112C		11
VTVSSCSTKGP	A121C	A114C	A118C	12
VSSASCKGPSV	T123C	T116C	T120C	13
WYVDGCEVHNA	V285C	V278C	V282C	14
KGFYPCDIAVE	S378C	S371C	S375C	15
PPVLDCDGSFF	S403C	S396C	S400C	16

10

(請求項 8)

以下を含む重鎖配列を含む、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体：

【化 3 2】

MAVLGLLLCVTFPSCVLSDVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYYWSWIRQPPG
KGLEWMGFISYDGSNKYNPSLKNRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGLRRGDYSMDYWG
QGTTLVTVSSCSTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

配列番号3

30

(請求項 9)

以下を含む軽鎖配列を含む、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体：

【化 3 3】

MDFQVQIFSLFLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVVTAVAWYQQK
GKAPKLLIYSASNRHTGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSYPFTFGGKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

配列番号2

40

(請求項 10)

前記親抗 T E N B 2 抗体は、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、およびヒト化抗体から選択される、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体。

(請求項 11)

抗体フラグメントである、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体。

(請求項 12)

50

前記抗体フラグメントは、F a b フラグメントである、請求項 1 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体。

(請求項 1 3)

キメラ抗体、ヒト抗体、もしくはヒト化抗体から選択される、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体。

(請求項 1 4)

細菌において生成される、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体。

(請求項 1 5)

C H O 細胞において生成される、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体。

(請求項 1 6)

T E N B 2 タンパク質を含むと推測されるサンプル中の T E N B 2 タンパク質の存在を決定するための方法であって、該方法は、該サンプルを、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体に曝す工程、および該サンプル中の該 T E N B 2 タンパク質への該抗体の結合を決定する工程を含み、ここで該タンパク質への該抗体の結合は、該サンプル中の該タンパク質の存在を示す、方法。

(請求項 1 7)

前記サンプルは、前記 T E N B 2 タンパク質を発現すると推測される細胞を含む、請求項 1 6 に記載の方法。

(請求項 1 8)

前記細胞は、前立腺癌細胞、卵巣癌細胞、乳癌細胞、肺癌細胞、もしくは膵臓癌細胞である、請求項 1 6 に記載の方法。

(請求項 1 9)

前記抗体は、蛍光色素、放射性同位体、ビオチン、もしくは金属錯化配位子から選択される標識に共有結合されている、請求項 1 6 に記載の方法。

(請求項 2 0)

請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアもしくは賦形剤を含む、薬学的処方物。

(請求項 2 1)

前記抗体は、オーリスタチン薬物部分に共有結合され、それによって、抗体薬物結合体が形成される、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体。

(請求項 2 2)

システイン操作抗 T E N B 2 抗体 (A b)、およびオーリスタチン薬物部分 (D) を含み、ここで、該システイン操作抗 T E N B 2 抗体は、1 個以上の遊離システインアミノ酸を介してリンカー部分 (L) によって D に結合されており；該化合物は、式 I :

【化 3 4】



を有し、ここで p は、1、2、3、もしくは 4 である、請求項 2 1 に記載の抗体薬物結合体。

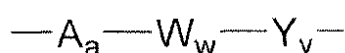
(請求項 2 3)

p は 2 である、請求項 2 2 に記載の抗体薬物結合体化合物。

(請求項 2 4)

L は、以下の式：

【化 3 5】



を有し、
ここで

10

20

30

40

50

Aは、前記システイン操作抗体（Ab）のシステインチオールに共有結合される伸長因子ユニットであり；

aは、0もしくは1であり；

各Wは、独立してアミノ酸ユニットであり；

wは、0～12の範囲の整数であり；

Yは、前記薬物部分に共有結合されるスペーサーユニットであり；そして

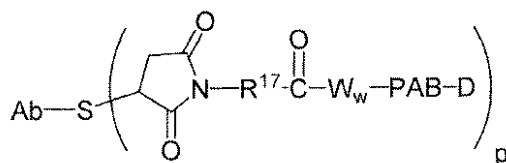
yは、0、1もしくは2である、

請求項22に記載の抗体薬物結合体化合物。

（請求項25）

以下の式を有する、請求項24に記載の抗体薬物結合体化合物：

【化36】



ここでPABは、パラアミノベンジルカルバモイルであり、 R^{17} は、 $(\text{CH}_2)_r$ 、 C_3 - C_8 カルボシクリル、 $\text{O}-(\text{CH}_2)_r$ 、アリーレン、 $(\text{CH}_2)_r$ -アリーレン、-アリーレン- $(\text{CH}_2)_r$ -、 $(\text{CH}_2)_r$ -(C_3 - C_8 カルボシクリル)、(C_3 - C_8 カルボシクリル)- $(\text{CH}_2)_r$ 、 C_3 - C_8 ヘテロシクリル、 $(\text{CH}_2)_r$ -(C_3 - C_8 ヘテロシクリル)、-(C_3 - C_8 ヘテロシクリル)- $(\text{CH}_2)_r$ -、- $(\text{CH}_2)_r$ $\text{C}(\text{O})\text{NR}^b$ $(\text{CH}_2)_r$ -、-($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_r$ -、-($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_r$ - CH_2 -、-($\text{CH}_2)_r$ $\text{C}(\text{O})\text{NR}^b$ $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -、-($\text{CH}_2)_r$ $\text{C}(\text{O})\text{NR}^b$ $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ - CH_2 -、-($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ $\text{C}(\text{O})\text{NR}^b$ $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -、-($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ $\text{C}(\text{O})\text{NR}^b$ $(\text{CH}_2)_r$ -から選択される二価ラジカルであり；ここで R^b は、H、 C_1 - C_6 アルキル、フェニル、もしくはベンジルであり；そしてrは、独立して、1～10の範囲の整数である。

（請求項26）

W_w は、バリン-シトルリンである、請求項24に記載の抗体薬物結合体化合物。

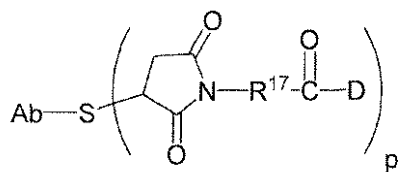
（請求項27）

R^{17} は、 $(\text{CH}_2)_5$ もしくは $(\text{CH}_2)_2$ である、請求項24に記載の抗体薬物結合体化合物。

（請求項28）

以下の式を有する、請求項24に記載の抗体薬物結合体化合物：

【化37】



（請求項29）

R^{17} は、 $(\text{CH}_2)_5$ もしくは $(\text{CH}_2)_2$ である、請求項28に記載の抗体薬物結合体化合物。

（請求項30）

以下の式を有する、請求項24に記載の抗体薬物結合体化合物：

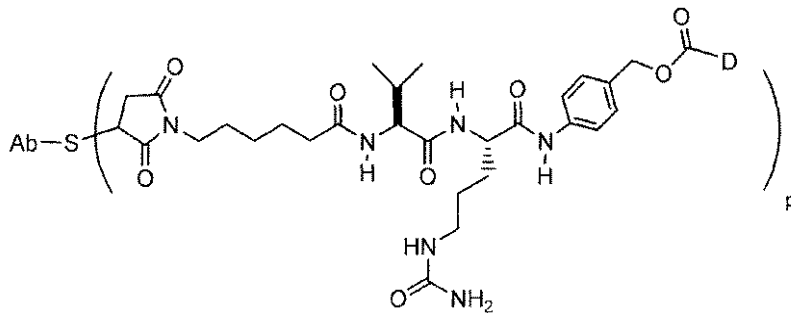
10

20

30

40

【化 3 8】



10

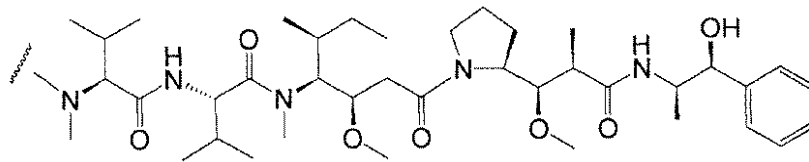
(請求項 3 1)

L は、SMCC もしくは BMPEO である、請求項 2 2 に記載の抗体薬物結合体化合物。

(請求項 3 2)

D は、MMAE であり、以下の構造：

【化 3 9】



20

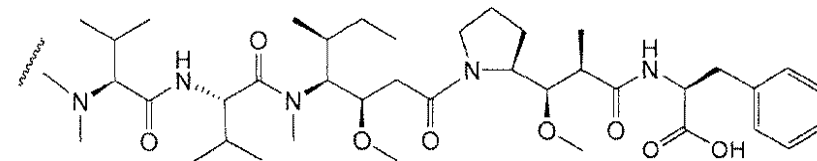
を有し、

ここで波線は、前記リンカー L への結合部位を示す、請求項 2 2 に記載の抗体薬物結合体化合物。

(請求項 3 3)

D は、MMAF であり、以下の構造：

【化 4 0】



30

を有し、

ここで波線は、前記リンカー L への結合部位を示す、請求項 2 2 に記載の抗体薬物結合体化合物。

(請求項 3 4)

親抗 T E N B 2 抗体は、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、およびヒト化抗体から選択される、請求項 2 1 に記載の抗体薬物結合体化合物。

40

(請求項 3 5)

親抗 T E N B 2 抗体は、抗体フラグメントである、請求項 2 1 に記載の抗体薬物結合体化合物。

(請求項 3 6)

前記抗体フラグメントは、F a b フラグメントである、請求項 3 5 に記載の抗体薬物結合体化合物。

(請求項 3 7)

前記オーリスタチンは、MMAE もしくは MMAF である、請求項 2 1 に記載の抗体薬物結合体。

(請求項 3 8)

50

L は、MC - v a l - c i t - P A B もしくは MC である、請求項 2 1 に記載の抗体薬物結合体。

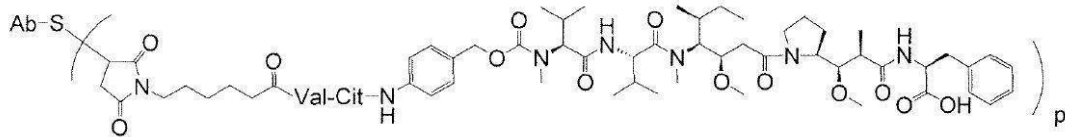
(請求項 3 9)

L は、S M C C 、 S P P 、 もしくは B M P E O である、請求項 2 1 に記載の抗体薬物結合体。

(請求項 4 0)

以下の構造：

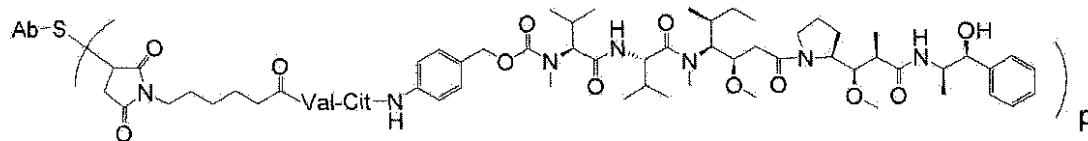
【化 4 1】



Ab-MC-vc-PAB-MMAF

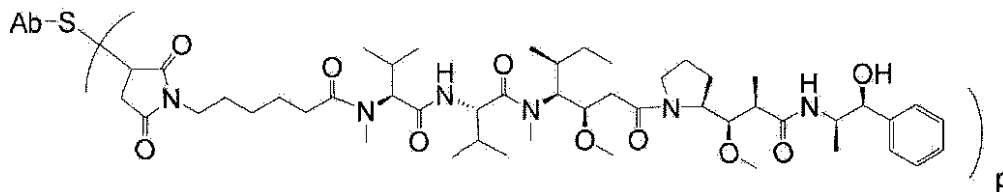
10

【化 4 2】



Ab-MC-vc-PAB-MMAE

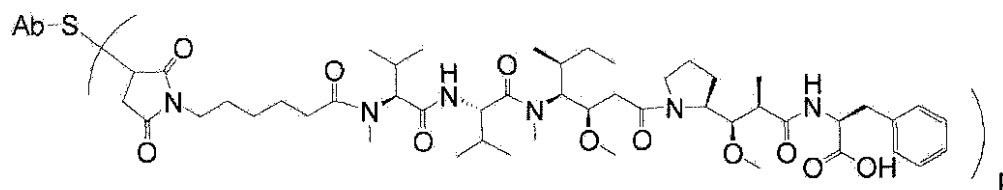
20



Ab-MC-MMAE

30

および



Ab-MC-MMAF

から選択され、ここで V a l はバリンであり；C i t はシトルリンであり；p は、1、2、3、もしくは4であり；そして A b は、請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体である、

抗体薬物結合体化合物。

(請求項 4 1)

A b は、配列番号 1 を含む、請求項 4 0 に記載の抗体薬物結合体。

(請求項 4 2)

A b は、配列番号 2 を含む、請求項 4 0 に記載の抗体薬物結合体。

(請求項 4 3)

A b は、配列番号 1 および配列番号 2 を含む、請求項 4 0 に記載の抗体薬物結合体。

(請求項 4 4)

40

50

癌細胞を検出するためのアッセイであって、該アッセイは、

(a) 細胞を、請求項 2 1 に記載の抗体薬物結合体化合物に曝す工程；および

(b) 該細胞への該抗体薬物結合体化合物の結合の程度を決定する工程、
を包含する、アッセイ。

(請求項 4 5)

前記細胞は、前立腺腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞
もしくは卵巣腫瘍細胞である、請求項 4 4 に記載のアッセイ。

(請求項 4 6)

細胞増殖を阻害するための方法であって、該方法は、細胞培養培地中の哺乳動物腫瘍細胞
を、請求項 2 1 に記載の抗体薬物結合体化合物で処理し、それによって、該腫瘍細胞の増
殖を阻害する工程、を包含する、方法。

10

(請求項 4 7)

前記哺乳動物腫瘍細胞は、卵巣腫瘍細胞である、請求項 4 6 に記載の方法。

(請求項 4 8)

請求項 2 1 に記載の抗体薬物結合体、および薬学的に受容可能な希釈剤、キャリアもしくは
賦形剤を含む、薬学的処方物。

(請求項 4 9)

レトロゾール、オキサリプラチン、ドセタキセル、5 - F U、ラパチニブ、カペシタビン
、ロイコボリン、エルロチニブ、ペルツズマブ、ペバシズマブ、およびゲムシタビンから
選択される化学療法剤の治療上有効な量をさらに含む、請求項 4 8 に記載の薬学的処方物
。

20

(請求項 5 0)

請求項 4 8 に記載の薬学的処方物を患者に投与する工程を包含する、癌を処置するための
方法。

(請求項 5 1)

前記癌は、前立腺癌、尿路の癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、結腸癌および卵巣癌からなる群よ
り選択される、請求項 5 0 に記載の方法。

(請求項 5 2)

前記患者は、前記抗体薬物結合体化合物と組み合わせて化学療法剤を投与され、ここで該
化学療法剤は、レトロゾール、シスプラチン、カルボプラチン、タキソール、パクリタキ
セル、オキサリプラチン、ドセタキセル、5 - F U、ロイコボリン、エルロチニブ、ペル
ツズマブ、ペバシズマブ、ラパチニブ、およびゲムシタビンから選択される、請求項 5 0
に記載の方法。

30

(請求項 5 3)

製造物品であって、

請求項 4 8 に記載の薬学的処方物；

容器；および

前記化合物を使用して、T E N B 2 ポリペプチドの過剰発現によって特徴づけられる癌
を処置することができることを示す、パッケージ挿入物もしくは表示、
を含む、製造物品。

40

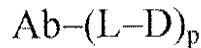
(請求項 5 4)

前記癌は、卵巣癌、前立腺癌、尿路の癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、もしくは結腸癌である、
請求項 5 3 に記載の製造物品。

(請求項 5 5)

請求項 1 に記載のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体 (A b) およびオーリスタチン薬物部
分 (D) を含む、抗体薬物結合体化合物を作製するための方法であって、ここで該システ
イン操作抗体は、1 個以上の操作されたシステインアミノ酸を介してリンカー部分 (L)
によって D に結合され；該化合物は、式 I：

【化 4 3】



I

を有し、ここで p は、1、2、3、もしくは4であり；

該方法は、

(a) 該システイン操作抗体の操作されたシステイン基と、リンカー試薬とを反応させて、抗体-リンカー中間体 $\text{Ab}-\text{L}$ を形成する工程；および

(b) $\text{Ab}-\text{L}$ と、活性化された薬物部分 D とを反応させ；それによって、該抗体薬物結合体が形成される、工程；

を包含するか、または

(c) 薬物部分の求核性基と、リンカー試薬とを反応させて、薬物-リンカー中間体 $\text{D}-\text{L}$ を形成する工程；および

(d) $\text{D}-\text{L}$ と、該システイン操作抗体の操作されたシステイン基とを反応させ；それによって、該抗体薬物結合体が形成される、工程、

を包含する、方法。

(請求項 5 6)

前記システイン操作抗体をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞において発現させる工程をさらに包含する、請求項 5 5 に記載の方法。

(請求項 5 7)

前記発現されたシステイン操作抗体を、還元剤で処理する工程をさらに包含する、請求項 5 6 に記載の方法。

(請求項 5 8)

前記還元剤は、TCEP および DTT から選択される、請求項 5 7 に記載の方法。

(請求項 5 9)

前記発現されたシステイン操作抗体を、前記還元剤で処理する工程の後に、酸化剤で処理する工程をさらに包含する、請求項 5 7 に記載の方法。

(請求項 6 0)

前記酸化剤は、硫酸銅、デヒドロアスコルビン酸、および空気から選択される、請求項 5 9 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図 1】図 1 は、ヒト化抗 T E N B 2 抗体 (h u T M E F F 2 # 1 9) の重鎖配列：配列番号 1、および軽鎖配列：配列番号 2 を示す。

【図 2】図 2 は、ヒト化システイン操作抗 T E N B 2 抗体 (A 1 2 1 C チオ h u T M E F F 2 # 1 9) の重鎖配列：配列番号 3、および軽鎖配列：配列番号 2 を示す。シグナル配列は、抗 T E N B 2 抗体の配列番号付け (sequential numbering) に含まれない。

【図 3】図 3 は、ヒト化トラスツズマブ軽鎖 (H u T M A b - L C、配列番号 4) および h u T M E F F 2 # 1 9 軽鎖 (配列番号 5) のアラインメントを示す。番号付けは、配列番号付けの慣例に従う。

【図 4】図 4 は、ヒト化トラスツズマブ重鎖 (H u T M A b - H C、配列番号 6)、および h u T M E F F 2 # 1 9 重鎖 (配列番号 7) のアラインメントを示す。番号付けは、配列番号付けの慣例に従う。

【図 5】図 5 は、システイン操作抗 T E N B 2 抗体薬物結合体 (A D C) の説明を示し、ここで薬物部分は、軽鎖 (L C - A D C)；重鎖 (H C - A D C)；および F c 領域 (F c - A D C) における操作システイン基に結合される。

【図 6】図 6 は、(i) システイン操作抗 T E N B 2 抗体 (チオ M a b) においてシステインジスルフィド付加物ならびに鎖間ジスルフィドおよび鎖内ジスルフィドを還元する工程；(i i) 部分的に酸化する工程 (すなわち、再酸化して、鎖間ジスルフィドおよび鎖

10

20

30

40

50

内ジスルフィドを再形成する工程) ; ならびに (i i i) 上記再酸化された抗体と、薬物 - リンカー中間体とを結合体化して、システイン操作抗 T E N B 2 抗体薬物結合体 (A D C) を形成する工程、を示す。

【図 7】図 7 は、癌および正常ヒト組織における T E N B 2 の発現を示す：オリゴヌクレオチドマイクロアレイ分析は、4841 個のヒト組織サンプルから抽出された R N A に対して行われた。プロット中の各ボックスは、上記示された組織のサンプルの T E N B 2 に対するシグナル強度 (100 に対してスケール化した平均差異) を提供する。緑色のボックスは、正常組織であり、赤色ボックスは腫瘍であり、青色ボックスは他の罹患した組織を示す。

【図 8】図 8 は、ヒト前立腺腫瘍における T E N B 2 発現を示す：上下のパネルは、それぞれ、ヒト前立腺外植片モデル (P C 3 T E N B 2 中程度安定 (m e d i u m s t a b l e) 細胞株) とベクターコントロール、および前立腺腫瘍に由来する。

10

【図 9】図 9 は、P C 3 T E N B 2 中程度細胞株および L u C a P 70 腫瘍に対する T E N B 2 モノクローナル抗体 (M a b) のインターナリゼーション (i n t e r n a l i z a t i o n) を示す。

【図 10】図 10 は、T E N B 2 中程度細胞とチオ抗 T E N B 2 A D C 処置もしくは従来の抗 T E N B 2 A D C 処置を用いた P C 3 に対する F A C S データを示す。

【図 11】図 11 は、従来の抗 T E N B 2 A D C およびチオ抗 T E N B 2 A D C を用いた P C 3 T E N B 2 中程度細胞に対する細胞死滅アッセイを示す。

【図 12】図 12 は、抗 T E N B 2 A D C およびチオ抗 T E N B 2 A D C (v c - M M A E もしくは M C - M M A F と結合体化) を使用する、P C 3 T E N B 2 中程度細胞に対する効力研究を示す。

20

【図 13】図 13 は、ヒト化抗 T E N B 2 A b (h u T M E F F 2 # 19) を使用する、種々の L u C a P 外植片腫瘍組織を用いたウェスタンブロットを示す。

【図 14】図 14 は、ヒト前立腺癌 L u C a P 70、77 および 96.1 を使用する、異種移植片実験を示す。

【図 15】図 15 は、チオ抗 T E N B 2 および従来の A D C を使用する、ラットの薬物動態評価を示す。

【図 16】図 16 は、抗 T E N B 2 - v c - M M A E 対 M C - M M A F を用いたラットでの安全性評価を示す。

30

【図 17】図 17 は、抗 T E N B 2 - v c - M M A E 対 抗 T E N B 2 - M C - M M A F を用いたカニクイザルに対する安全性評価を示す。

【図 18】図 18 は、チオ抗 T E N B 2 - v c - M M A E 対 抗 T E N B 2 - v c - M M A E を用いたラットに対する安全性評価を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

(例示的な実施形態の詳細な説明)

いまや本発明の特定の実施形態に対して詳細に言及がなされ、その実施例は、添付の構造および式において例示される。本発明は、列挙される実施形態とともに記載される一方で、上記実施形態が、本発明をそれらの実施形態に限定することを意図しないことが理解される。対照的に、本発明は、全ての代替物、改変物および等価物を網羅することが意図され、それらは、特許請求の範囲によって定義されるように、本発明の範囲内に含まれる。

40

【0027】

当業者は、本明細書に記載されるものと類似もしくは等価な多くの方法および材料を認識し、これらは、本発明の実施において使用され得る。本発明は、上記記載される方法および材料に決して限定されない。

【0028】

(定義)

別段定義されない限り、本明細書において使用される技術的および化学的用語は、本発

50

明が属する分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有し、以下と一致する：Singletonら(1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 第2版, J. Wiley & Sons, New York, NY; および Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 第5版, Garland Publishing, New York.

【0029】

本明細書において用語「抗体」とは、最も広い意味において使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ダイマー、マルチマー、マルチ特異性抗体(multisp
ecific antibody)(例えば、二重特異性抗体)、および抗体フラグメント
10 10 抗体、ダイマー、マルチマー、マルチ特異性抗体、および抗体フラグメントを具体的
に網羅する。(Millerら(2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861)。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラ、もしくは他の
種に由来するものであり得る。抗体は、特定の抗原を認識しかつこれに結合し得るタンパ
ク質である(Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik(2001) Immuno Biology, 第5版, Garland
Publishing, New York)。標的抗原は、一般に、複数の抗体の上の
CDRによって認識される多くの結合部位(エピトープともいわれる)を有する。異なる
エピトープに特異的に結合する各抗体は、異なる構造を有する。従って、1つの抗原は、
20 20 1つより多くの対応する抗体を有し得る。抗体は、全長免疫グロブリン分子もしくは全長
免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分(すなわち、目的の標的抗原を免疫特異的に
結合する抗原結合部位もしくはその一部)を含み、このような標的としては、癌細胞もし
くは自己免疫疾患と関連する自己免疫抗体を生成する細胞が挙げられるが、これらに限定
されない。本明細書で開示される免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子の任意のタイプ
(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、およびIgA)、クラス(例えば、IgG
1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)もしくはサブクラスのも
のであり得る。上記免疫グロブリンは、任意の種(例えば、ヒト、マウス、もしくはウサ
ギ)に由来し得る。上記異なるクラスの抗体の構造および特性については、例えば、Ba
sic and Clinical Immunology, 第8版, Daniel P
30 30 .Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 第
71頁および第6頁を参照のこと。

【0030】

「抗体フラグメント」とは、全長抗体の一部、一般に、上記抗原結合領域もしくはその
可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、
およびFvフラグメント；ダイアボディー；直線上抗体；ミニボディー(米国特許第56
41870号、実施例2；Zapataら(1995) Protein Eng. 8(1
0):1057-1062)；Olafsenら(2004) Protein Eng.
Design & Sel. 17(4):315-323)、Fab発現ライブラリーによ
って生成されるフラグメント、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、CDR(相補性決定
領域)、および癌細胞抗原、ウイルス抗原もしくは微生物抗原に免疫特異的に結合する上
記のうちのいずれかのエピトープ結合フラグメント、一本鎖抗体分子；抗体フラグメント
から形成されるマルチ特異性抗体が挙げられる。

【0031】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書において使用される場合、実質的に均質な
抗体の集団(すなわち、上記集団を構成する個々の抗体が、少量存在し得る考えられる天
然に存在する変異を除いて同一である)から得られる抗体をいう。モノクローナル抗体は
、高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対して指向されている。さらに、異なる決定
基(エピトープ)に対して指向される異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対
50 50

照的に、各モノクローナル抗体は、上記抗原上の単一の決定基に対して指向される。それらの特異性に加えて、上記モノクローナル抗体は、それらが他の抗体により汚染されずに合成され得るという点で有利である。修飾語「モノクローナル」とは、実質的に均質な抗体の集団から得られるとして上記抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による上記抗体の生成を要すると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるべき上記モノクローナル抗体は、Kohlerら(1975)Nature 256:495によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製され得るか、または組換えDNA法(例えば:米国特許第4816567号;同第5807715号を参照のこと)によって作製され得る。上記ハイブリドーマ法において、マウスもしくは他の適切な宿主動物(例えば、ハムスター)が、免疫のために使用されるタンパク質に特異的に結合する抗体を生成するかまたは生成し得るリンパ球を惹起するために、上記のように免疫される。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。免疫後に、リンパ球は単離され、次いで、適切な融合剤(例えば、ポリエチレングリコール)を使用して、骨髓腫細胞株と融合されて、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 Academic Press)。上記モノクローナル抗体はまた、Clacksonら(1991)Nature, 352:624-628; Marksら(1991)J. Mol. Biol., 222:581-597において記載される技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから単離され得る。

【0032】

上記抗体をコードするDNAは、キメラポリペプチドもしくは融合抗体ポリペプチドを、例えば、ヒト重鎖および軽鎖定常ドメイン(C_H および C_L)配列を、相同なマウス配列の代わりに使用すること(米国特許第4816567号;およびMorrissonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984))によってか、または上記免疫グロブリンコード配列と、非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てもしくは一部(異種ポリペプチド)と融合することによって、生成するために改変され得る。上記非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインの代わりに使用され得るか、またはこれらは、抗体の1つに抗原結合部位(antigen-combining site)の可変ドメインの代わりに使用されて、抗原に対して特異性を有する1つの抗原結合部位(antigen-combining site)および異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原結合部位(antigen-combining site)を含むキメラ二価抗体を作り出し得る。

【0033】

「ネイティブ抗体」とは、通常、約150,000ダルトンの異種テトラマー糖タンパク質であり、2つの同一の軽(L)鎖および2つの同一の重(H)鎖から構成される。各軽鎖は、1個の共有結合的ジスルフィド結合によって重鎖に連結される一方で、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの上記重鎖の中で変動する。各重鎖および軽鎖はまた、規則的に間隔を空けた鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一方の末端に可変ドメイン(V_H)を、続いて、多くの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端に可変ドメイン(V_L)を、その他方の末端に定常ドメインを有する。上記軽鎖の定常ドメインは、上記重鎖の第1の定常ドメインとアラインされ、上記軽鎖可変ドメインは、上記重鎖の可変ドメインとアラインされる。特定のアミノ酸残基は、上記軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に境界を形成すると考えられる。

【0034】

上記モノクローナル抗体は、本明細書において、具体的には、「キメラ」抗体を含み、ここで上記重鎖および/もしくは軽鎖の一部は、特定の種から得られるか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一であるか、またはこれに相同である一方で、上記鎖の残りは、望ましい生物学的活性を示す限りにおいて、別の種に由来するか、または別のクラスもしくはサブクラスに属する抗体、ならびにこのような抗体のフラグメントにおける対応する配列と同一であるか、またはこれに相同で

ある（米国特許第4816567号；およびMorrissonら（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855）。目的のキメラ抗体は、本明細書において、非ヒト霊長類（例えば、旧世界サル（Old World Monkey）、無尾猿（Ape）など）およびヒトの定常領域配列から得られる可変ドメイン抗原結合配列を含む「霊長類化」抗体を含む。

【0035】

非ヒト（例えば、齧歯類）抗体の「ヒト化」形態は、上記非ヒト抗体に由来する最小の配列を含むキメラ抗体である。大部分については、ヒト化抗体は、上記レシピエントの超可変領域の残基が、所望の抗体特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）（例えば、マウス、ラット、ウサギもしくは非ヒト霊長類）の超可変領域に由来する残基で置換される、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの場合において、上記ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、上記レシピエント抗体においても上記ドナー抗体においても見いだされない残基を含み得る。これら改変は、抗体性能をさらに精密にするために行われる。一般に、上記ヒト化抗体は、少なくとも1個の、および代表的には、2個の可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで上記超可変ループの全てもしくは実質的に全ては、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、そして上記FRの全てもしくは実質的に全ては、ヒト免疫グロブリン配列のものである。上記ヒト化抗体は、必要に応じて、免疫グロブリン定常領域（Fc）（代表的には、ヒト免疫グロブリンのもの）の少なくとも一部分を含む。上記Fcフラグメントは、ジスルフィドによって一緒に保持される両方のH鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、上記Fc領域中の配列によって決定され、上記領域はまた、特定の細胞タイプ上で見いだされるFcレセプター（FcR）によって認識される部分である（Jonesら（1986）Nature 321:522-525；Riechmannら（1988）Nature 332:323-329；Presta,（1992）Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596；Verhoevenら（1988）Science, 239:1534-1536；Simsら（1993）J. Immunol. 151:2296；Chothiaら（1987）J. Mol. Biol., 196:901）。他の方法は、軽鎖もしくは重鎖の特定の亜群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領域を使用する（Carterら（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285；Prestaら（1993）J. Immunol. 151:2623）。

【0036】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生成され、そして／または本明細書で開示されるヒト抗体を作製するための技術のうちのいずれかを使用して作製された抗体のものに対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に排除する。トラスジェニック動物（例えば、マウス）が利用可能であり、上記トランスジェニック動物は、免疫する際に、内因性免疫グロブリン生成の非存在下でヒト抗体の完全なレパートリーを生成することができる。例えば、キメラマウスおよび生殖系列変異マウスにおける上記抗体重鎖連結領域（J_H）遺伝子のホモ接合性欠失は、内因性抗体生成の完全な阻害を生じることが記載されてきた。上記ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの、このような生殖系列変異マウスへの移入は、抗原チャレンジの際にヒト抗体の生成を生じる（Jakobovitsら（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551；Jakobovitsら（1993）Nature, 362:255-258；Bruggemannら（1993）Year in Immunol. 7:33；米国特許第5545806号；同第5569825号；同第5591669号；同第5545807号；およびWO 97/17852）。

【0037】

「親和性成熟した（affinity matured）」抗体は、1個以上の変異を有しない抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性の改善を生じる1個以上のCDRに

10

20

30

40

50

おける1個以上を有する抗体である。好ましい親和性成熟した抗体は、上記標的抗原に対してnMもしくはさらにpMの親和性を有する。親和性成熟した抗体は、VHドメインおよびVLドメインシャフリング(Marksら(1992)Bio/Technology 10:779-783)、またはCDRおよび/もしくはフレームワーク残基のランダム変異誘発(Barbasら(1994)Proc Natl Acad Sci, USA 91:3809-3813; Schierら(1995)Gene 169:147-155; Yeltonら(1995)J. Immunol. 155:1994-2004; Jacksonら(1995)J. Immunol. 154(7):3310-9; およびHawkinsら(1992)J. Mol. Biol. 226:889-896)によって、親和性成熟を生じる。

10

【0038】

「インタクトな抗体」とは、本明細書において、VLドメインおよびVHドメイン、ならびに軽鎖定常ドメイン(CL)および重鎖定常ドメイン(CH1、CH2およびCH3)を含むものである。上記定常ドメインは、ネイティブ配列の定常ドメイン(例えば、ヒトのネイティブ配列の定常ドメイン)もしくはそのアミノ酸配列改変体であり得る。上記インタクトな抗体は、1個以上の「エフェクター機能」を有し得、このことは、抗体の上記Fc定常領域(ネイティブ配列のFc領域もしくはアミノ酸配列改変Fc領域)に帰することができる生物学的活性に言及する。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合; 補体依存性細胞傷害性; Fcレセプター結合; 抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC); ファゴサイトーシス; および細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプターおよびBCR)のダウンレギュレーションが挙げられる。

20

【0039】

用語「アミノ酸配列改変体」とは、ネイティブ配列のポリペプチドとある程度異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。通常は、アミノ酸配列改変体は、ネイティブ配列のポリペプチドの少なくとも1個のレセプター結合ドメインと、もしくはネイティブレセプターの少なくとも1個のリガンド結合ドメインと、少なくとも約70%の配列同一性を有し、そして好ましくは、上記改変体は、このようなレセプター結合ドメインもしくはリガンド結合ドメインと、配列が少なくとも約80%、より好ましくは、少なくとも約90%相同である。上記アミノ酸配列改変体は、上記ネイティブアミノ酸配列のアミノ酸配列内の特定の位置における置換、欠失、および/もしくは挿入を有する。アミノ酸は、従来の名称、1文字表記および3文字表記で指定される。

30

【0040】

「配列同一性」とは、上記配列をアラインし、必要であればギャップを導入して、最大%配列同一性を達成した後に同一であるアミノ酸配列改変体中の残基のパーセンテージとして定義される。上記アラインメントのための方法およびコンピュータープログラムは、当該分野で周知である。1つのこのようなコンピュータープログラムは、Genentech, Inc.の著作物である「Align 2」であり、これは、米国著作権局(Washington, DC 20559)に、1991年12月10日にユーザー説明書とともに提出され、そのコードは、PCT/US03/07209において見いだされる。

【0041】

40

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性」および「ADCC」とは、Fcレセプター(FcRs)を発現する非特異的細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、およびマクロファージ)が、標的細胞上の結合した抗体を認識し、その後、上記標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応をいう。ADCCを媒介するための主な細胞(NK細胞)は、FcRIIIのみを発現するのに対して、単球は、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch and Kinet, (1991)「Annu. Rev. Immunol.」9:457-92の第464頁、表3にまとめられる。目的の分子のADCC活性を評価するために、インビトロADCCアッセイ(例えば、米国特許第5500362号および同第5821337号に記載されているもの)を、行い得る。このアッセイのために有用なエフェ

50

クター細胞としては、末梢血単核球（P B M C）およびナチュラルキラー（N K）細胞が挙げられる。代わりに、もしくはさらに、上記目的の分子のA D C C活性は、インビボで（例えば、動物モデル（C l y n e s ら（1998）P r o c . N a t . A c a d . S c i .（U S A）95：652 - 656に開示されるもの）において）評価され得る。

【0042】

「ヒトエフェクター細胞」とは、1個以上の定常領域レセプター（F c R s）を発現しかつエフェクター機能を発揮する白血球である。好ましくは、上記細胞は、少なくともF c R I I I Iを発現しかつA D C Cエフェクター機能を発揮する。A D C Cを媒介するヒト白血球の年齢としては、末梢血単核球（P B M C）、ナチュラルキラー（N K）細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球が挙げられる；P B M CおよびN K細胞が好ましい。上記エフェクター細胞は、その天然供給源から（例えば、本明細書において記載されるように、血液もしくはP B M Cから）単離され得る。

10

【0043】

用語「F c レセプター」もしくは「F c R」とは、抗体の上記F c定常領域に結合するレセプターを意味する。好ましいF c Rは、ネイティブ配列のヒトF c Rである。さらに、好ましいF c Rは、I g G抗体（レセプター）を結合するものであり、F c R I、F c R I I、およびF c R I I Iサブクラスのレセプター（これらレセプターの対立遺伝子改変体および選択的スプライス形態を含む）を含む。F c R I I Iレセプターは、F c R I I I A（「活性化レセプター」）およびF c R I I I B（「阻害レセプター」）を含み、これらは、その細胞質ドメインにおいて主に異なる、類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプターF c R I I I Aは、その細胞質ドメインにおいて免疫レセプターチロシンベースの活性化モチーフ（I T A M）を含む。阻害レセプターF c R I I I Bは、免疫レセプターチロシンベースの阻害モチーフ（I T I M）をその細胞質ドメインに含む（総説M . i n D a e r o n ,（1997）「A n n u . R e v . I m m u n o l .」15：203 - 234を参照のこと）。F c Rは、R a v e t c h a n d K i n e t ,（1991）「A n n u . R e v . I m m u n o l .」, 9：457 - 92；C a p e l ら（1994）I m m u n o m e t h o d s 4：25 - 34；およびd e H a a s ら（1995）J . L a b . C l i n . M e d . 126：330 - 41において総説されている。他のF c R（将来同定されるものも含む）は、本明細書において、用語「F c R」によって包含される。上記用語はまた、新生児レセプター（n e o n a t a l r e c e p t o r）、F c R nを含み、これは、母親のI g Gを胎児に移すことを担う（G u y e r ら（1976）J . I m m u n o l . , 117：587およびK i m ら（1994）J . I m m u n o l . 24：249）。

20

30

【0044】

「補体依存性細胞傷害性」もしくは「C D C」とは、補体の存在下での標的細胞の融解をいう。古典的補体経路の活性化は、上記補体系の第1の成分（C 1 q）を、それらのコグネート抗原に結合される（適切なサブクラスの）抗体に結合させることによって開始される（G a z z a n o - S a n t o r o ら（1996）J . I m m u n o l . M e t h o d s 202：163）。

【0045】

40

用語「可変」とは、上記可変ドメインの特定の部分が、抗体の中でも配列において広範囲に異なり、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合および特異性において使用されるという事実をいう。しかし、その可変性は、上記抗体の可変ドメインを介して均一に分布しない。上記可変性は、軽鎖および重鎖両方の可変ドメインにおける超可変領域といわれる3つのセグメントにおいて、集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分が、フレームワーク領域（F R）といわれる。ネイティブの重鎖および軽鎖の可変ドメインは、各々4つのF Rを含み、主に、3つの超可変領域によって接続された - シート配置をとり、これは、ループ接続を形成し、ときおり、 - 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、上記F R近接して、上記他の鎖に由来する超可変領域と一緒に保持されており、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（K a b a t ら（1991）

50

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MDを参照のこと)。上記定常ドメインは、抗原への抗体の結合に直接は関与していないが、種々のエフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞傷害性（ADCC）における上記抗体の関与）を示す。

【0046】

用語「超可変領域」、「HVR」もしくは「HV」とは、本明細書において使用される場合、配列において超可変性であり、そして/または構造的に規定されたループに由来する抗体可変ドメインの領域をいう。一般に、抗体は、6個の超可変領域を含む；VH中に3個（H1、H2、H3）、およびVL中に3個（L1、L2、L3）。超可変領域の詳細図（delineation）の番号が使用されており、本明細書において包含される。上記Kabat相補性決定領域（CDR）は、配列可変性に基づき、最も一般に使用されている（Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）。Chothiaは、代わりに、構造ループの位置に言及している（Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)）。上記「接触」超可変領域は、利用可能な複雑な結晶構造の分析に基づく。これら超可変領域の各々からの残基は、以下に示される。別段示されなければ、タンパク質のアラインされた配列のKabatデータベースに従うKabat番号付けが、使用される（Wu and Kabat (1970) J. Exp. Med. 132: 211-250; Johnson and Wu (2000) Nuc. Acids Res. 28 (1): 214-218）。超可変領域の位置は、一般に、以下のとおりである：アミノ酸24～34（HVR-L1）、アミノ酸49～56（HVR-L2）、アミノ酸89～97（HVR-L3）、アミノ酸26～35A（HVR-H1）、アミノ酸49～65（HVR-H2）、およびアミノ酸93～102（HVR-H3）。超可変領域はまた、以下のような「伸長された（extended）超可変領域」を含み得る：VL中のアミノ酸24～36（L1）、およびアミノ酸46～56（L2）。上記可変ドメイン残基は、Kabatらに従って番号付けされる（これらの定義の各々については前出）。本明細書における目的で、「変化した（altered）超可変領域」とは、1個以上の（例えば、1～約16個の）アミノ酸置換をそこに含む超可変領域である。本明細書における目的で、「改変されていない超可変領域」とは、それが由来した非ヒト抗体と同じアミノ酸配列を有する超可変領域、すなわち、そこに1個以上のアミノ酸置換を欠いているものである。

【0047】

用語「Kabatにおけるような可変ドメイン残基番号付け」、「Kabatにおけるようなアミノ酸位置番号付け」、およびそのバリエーションは、Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)における、抗体の編集（compilation）の重鎖可変ドメインもしくは軽鎖可変ドメインに使用される番号付けシステムをいう。この番号付けシステムを使用して、実際の直線状アミノ酸配列は、上記可変ドメインのFRもしくはCDRの短縮化（shortening）、または上記FRもしくはCDRへの挿入に対応する、少数のもしくはさらなるアミノ酸を含み得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後ろの単一のアミノ酸挿入物（Kabatによれば、残基52a）および重鎖FR残基82の後ろの挿入された残基（例えば、Kabatによれば、残基82a、82b、および82cなど）を含み得る。残基の上記Kabat番号付けは、上記抗体の配列の、「標準的」Kabat番号付けされた配列との相同性の領域においてアラインメントによって、所定の抗体につ

いて決定され得る。

【0048】

「結合親和性」とは、一般に、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位と、その結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合的相互作用の総合計の強さをいう。別段示されなければ、本明細書において使用される場合、「結合親和性」とは、結合対（例えば、抗体および抗原）のメンバーとの間の1：1相互作用を反映する内因性の結合親和性をいう。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 ）によって表され得る。親和性は、本明細書に記載されるものを含む、当該分野で公知の一般的方法によって測定され得る。低親和性抗体は、一般に、ゆっくりと抗原に結合し、容易に解離する傾向があるのに対して、高親和性抗体は、一般に、より素早く抗原に結合し、より長く結合されたままである傾向がある。結合親和性を測定するための種々の方法は、当該分野で公知であり、そのうちのいずれかは、本発明の目的のために使用され得る。特定の例示的实施形態は、以下において記載される。

10

【0049】

「抗原」は、所定のポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン、または他の天然に存在するもしくは合成の化合物であり、これらに対して口蓋が選択的に結合し得る。

【0050】

「フレームワーク」もしくは「FR」の残基は、本明細書に定義されるように、超可変領域の残基以外のこれらの可変ドメイン残基である。「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVLもしくはVHフレームワーク配列の選択において、上記最も一般に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンVLもしくはVH配列の選択は、可変ドメイン配列の亜群からである。一般に、配列の亜群は、Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)におけるように、亜群である。一実施形態において、上記VLについては、上記亜群は、Kabatらにおけるように、亜群Iである。一実施形態において、上記VHについては、上記亜群は、Kabatらにおけるように、亜群IIである。「VH亜群IIコンセンサスフレームワーク」は、Kabatらの可変重鎖亜群II(variable heavy subgroup II)におけるアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含む。「VL亜群Iコンセンサスフレームワーク」は、Kabatらの可変軽鎖亜群I(variable light kappa subgroup I)におけるアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含む。

20

30

【0051】

「Fv」とは、完全な抗原認識かつ抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、密な非共有結合的会合において、1個の重鎖および1個の軽鎖の可変ドメインのダイマーからなる。各可変ドメインの3つの超可変領域は、上記VH-VLダイマーの表面上の抗原結合部位を規定するように相互作用することは、この形態において存在する。まとめると、上記6個の超可変領域は、上記抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、さらに単一の可変ドメイン（もしくは抗原に対して特異的なわずか3個の超可変領域を含むFvの半分）は、結合部位全体よりも低い親和性においてであるが、抗原を認識しかつ結合する能力を有する。

40

【0052】

上記Fabフラグメントはまた、上記軽鎖の定常ドメインおよび上記重鎖の最初の定常ドメイン(CH1)を含む。Fab'フラグメントは、上記抗体の本字領域に由来する1個以上のシステインを含む、上記重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端において数個の残基の添加によって、Fabフラグメントとは異なる。Fab'-SHは、Fab'についての本明細書中の名称であり、ここで上記定常ドメインの上記システイン残基は、少なくとも1個の遊離チオール基を有する。F(ab')₂抗体フラグメントは、本来は、間にヒンジシステインを有するFab'フラグメントの対として生成された。抗体フラグメン

50

トの他の化学的カップリングはまた、公知である。

【0053】

任意の脊椎動物種に由来する抗体の「軽鎖」は、2個の明らかに異なるタイプ（カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）といわれる）のうちの1つに、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、割り当てられ得る。

【0054】

「一本鎖Fv」もしくは「scFv」抗体フラグメントは、抗体の上記V_HドメインおよびV_Lドメインを含み、ここでこれらドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。好ましくは、上記Fvポリペプチドは、上記VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、このことは、上記scFvが、抗原結合のための望ましい構造を形成することを可能にする（Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 (1994)）。

【0055】

用語「ダイアボディー」とは、2個の抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントをいい、これらフラグメントは、同じポリペプチド鎖の中に可変軽鎖ドメイン（VL）に接続された可変重鎖ドメイン（VH）を含む（VH-VL）。上記同じ鎖上の2個のドメイン間での追啓製を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、上記ドメインは、別の鎖の相補性ドメインと対形成し、2個の抗原結合部位を作り出すようにされる（EP 404,097; WO 93/11161; Hollingerら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444 - 6448）。

【0056】

「遊離システインアミノ酸」とは、親抗体へと操作され、チオール官能基（-SH）を有し、分子内もしくは分子間ジスルフィドが共として対形成されていないか、またはさもないければその部分でないシステインアミノ酸残基をいう。

【0057】

用語「チオール反応性値」は、遊離システインアミノ酸の反応性の定量的特徴である。上記チオール反応性値は、チオール反応性試薬と反応し、最大値は1に変換されるシステイン操作抗体中の遊離システインアミノ酸のパーセンテージである。例えば、100%収率でチオール反応性試薬（例えば、ビオチン-マレイミド試薬）と反応して、ビオチン標識抗体を形成する、システイン操作抗体上の遊離システインアミノ酸は、1.0の反応性値を有する。80%収率でチオール反応性試薬と反応する同じもしくは異なる親抗体へと操作された別のシステインアミノ酸は、チオール反応性値0.8を有する。チオール反応性試薬と全く反応しない同じもしくは異なる親抗体へと操作された別のシステインアミノ酸は、チオール反応性値0を有する。特定のシステインのチオール反応性値の決定は、ELISAアッセイ、質量分析、液体クロマトグラフィー、オートラジオグラフィー、もしくは他の定量的分析試験によって行われ得る。上記システイン操作抗体の捕捉、ならびに上記システイン反応性の比較および定量を可能にするチオール反応性試薬としては、ビオチン-PEO-マレイミド（+）-ビオチニル-3-マレイミドプロピオンアミジル-3,6-ジオキサオクタジアミン（dioxaoctainediamine）（Odaら (2001) Nature Biotechnology 19:379 - 382, Pierce Biotechnology, Inc.）、ビオチン-BMCC、PEO-インドアセチルビオチン、ヨードアセチル-LC-ビオチン、およびビオチン-HPDP（Pierce Biotechnology, Inc.）、ならびにN-（3-マレイミジルプロピオニル）ビオチン（MPB, Molecular Probes, Eugene, OR）が挙げられる。ビオチン化、二官能性および多官能性リンカー試薬のための他の供給元としては、Molecular Probes, Eugene, ORおよびSigma, St. Louis, MOが挙げられる。

【0058】

10

20

30

40

50

「親抗体」とは、１個以上のアミノ酸残基が、１個以上のシステイン残基で置換されているアミノ酸配列を含む抗体である。上記親抗体は、ネイティブもしくは野生型の配列を含み得る。上記親抗体は、他のネイティブの、野生型、もしくは改変された形態の抗体と比較して、既存のアミノ酸配列改変（例えば、付加、欠失および／もしくは置換）を有し得る。親抗体は、目的の標的抗原（例えば、生物学的に重要なポリペプチド）に対して指向され得る。非ポリペプチド抗原（例えば、腫瘍関連糖脂質抗原；米国特許第 5 0 9 1 1 7 8 号を参照のこと）に対する抗体もまた、企図される。

【 0 0 5 9 】

「単離された抗体」とは、その天然の環境の成分から同定ならびに分離および／もしくは回収されたものである。その天然の環境の夾雑成分は、上記抗体の診断用途もしくは治療用途を妨害し、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性もしくは非タンパク質性溶質を含み得る物質である。好ましい実施形態において、上記抗体は、（１）Lowry 法によって決定される場合、抗体の重量の 95 重量％より高くにまで、および最も好ましくは、99 重量％にまで、（２）スピニングカップシークエネーター（spinning cup sequenator）の使用によって、N 末端アミノ酸配列もしくは内部アミノ酸配列のうちの少なくとも 15 残基を得るに十分な程度にまで、または（３）還元条件もしくは非還元条件下で、クーマシーブルーもしくは、好ましくは、銀染色を使用して、SDS-PAGE によって均一になる程度まで、精製される。単離された抗体は、組換え細胞内のインサイチュでの抗体を含む。なぜなら、上記抗体の天然の環境の少なくとも 1 個の成分は、存在しないからである。しかし、通常は、単離された抗体は、少なくとも 1 つの精製工程によって調製される。

【 0 0 6 0 】

分子標的もしくは目的の抗原（例えば、TENB2 もしくは CA125 抗原）を「結合する」抗体は、上記抗体が、その抗原を発現する細胞を標的とすることにおいて有用であるように、十分な親和性で上記抗原を結合することができるものである。上記抗体が、TENB2 を結合するものである場合、上記抗体は、通常、TENB2 を優先的に結合し、他のタンパク質と顕著に交叉反応しないものであり得る。このような実施形態において、上記抗体の、これら非 TENB2 タンパク質への結合（例えば、内因性レセプターに結合する細胞表面）の程度は、蛍光活性化セルソーティング（FACS）分析もしくは放射性免疫沈降（RIA）によって決定される場合に、10％未満である。

【 0 0 6 1 】

「処置する」もしくは「処置」もしくは「緩和」とは、治療的処置および予防的（prophylactic）手段もしくは予防的（preventative）手段の両方をいい、ここで上記目的は、上記標的とされる病的状態もしくは障害を予防するか、もしくは遅らせる（軽減する）ことである。処置が必要なヒトとしては、上記障害を既に有するヒト、および上記障害を有する傾向のあるヒト、もしくは上記障害が予防されるべきヒトが挙げられる。被験体もしくは哺乳動物は、本発明の方法に従って、抗 CA125/O772P 抗体（例えば、システイン操作抗 TENB2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体）の治療的用量を受けた後に、上記患者が、以下のうちの 1 個以上の観察可能なおよび／もしくは測定可能な低下、または以下のうちの 1 個以上の非存在を示す場合に、CA125/O772P ポリペプチドを発現する癌について首尾よく「処置」される：癌細胞数の低下もしくは癌細胞の非存在；腫瘍サイズの縮小；癌の、軟組織もしくは骨への拡がりを含む、末梢器官への癌細胞浸潤の阻害（すなわち、ある程度まで遅らせ、好ましくは停止する）；腫瘍転移の阻害（すなわち、ある程度まで遅らせ、好ましくは停止する）；腫瘍増殖のある程度までの阻害；ならびに／あるいは特定の癌と関連する症状のうちの 1 個以上のある程度までに軽減；罹患率および死亡率の低下、ならびにクオリティオブライフの問題の改善。上記システイン操作抗 TENB2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体が、増殖を予防し得、そして／または存在する癌細胞を死別させ得る程度にまで、上記抗体は、細胞増殖抑制性および／もしくは細胞傷害性であり得る。これら徴候もしくは症状の軽減はまた、上記患者によって感じられ得る。上記疾患における首尾よい処置および改善を評価

するための上記パラメーターは、医師が精通した慣用的手順によって容易に測定可能である。癌治療については、効力は、例えば、疾患進行までの時間（TTP）を評価すること、および/もしくは応答率（RR）を決定することによって、測定され得る。転移は、ステージ決定試験によって、そして骨への拡がりを決定するための骨のスカンならびにカルシウムレベルおよび他の酵素のための試験によって、決定され得る。CTスカンはまた、骨盤および上記領域におけるリンパ節への拡がりを探すために行われ得る。胸部X線および公知の方法による肝臓酵素レベルの測定は、それぞれ、肺および肝臓への転移を探すために使用される。上記疾患をモニターするための他の慣用的方法としては、経直腸的超音波検査（TRUS）および経直腸的針生検（TRNB）が挙げられる。

【0062】

用語「癌」および「癌性」とは、代表的には、調節されない細胞増殖によって特徴付けられる哺乳動物における生理学的状態を記載するために言及する。「腫瘍」は、1個以上の癌性細胞を含み、悪性が良性的に関わらず、全ての新生物細胞増殖（cell growth and proliferation）、および全ての前癌性および癌性の細胞および組織をいう。癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病もしくはリンパ系悪性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。このような癌のより具体的な例としては、扁平上皮癌（例えば、扁平上皮癌（epithelial squamous cell cancer））、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌（「NSCLC」）、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌が挙げられる）、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌（gastric or stomach cancer）（胃腸癌が挙げられる）、膵臓癌、神経膠芽細胞種、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌腫もしくは子宮癌種、唾液腺癌種、腎臓癌（kidney or renal cancer）、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌（hepatic carcinoma）、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭頸部癌が挙げられる。

【0063】

抗原性レセプターを「過剰発現する」癌は、同じ組織タイプの非癌性細胞と比較して、細胞表面において、上記レセプター（例えば、TENB2）の顕著により高いレベルを有する癌である。このような過剰発現は、遺伝子増幅によって、または増大した転写もしくは翻訳によって引き起こされ得る。レセプター過剰発現は、細胞の表面に存在するレセプタータンパク質の増大したレベルを（例えば、免疫組織科学アッセイ；IHCを介して）評価することによって、診断アッセイもしくは予後アッセイにおいて決定され得る。代わりに、もしくはさらに、例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH；WO98/45479を参照のこと）、サザンブロッティング、もしくはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術（例えば、リアルタイム定量的逆転写酵素PCR（qRT-PCR））を介して、細胞におけるレセプターコード核酸のレベルを測定し得る。

【0064】

「ヒトエフェクター細胞」とは、1個以上のFcRを発現しかつエフェクター機能を発揮する白血球、好ましくは、少なくともFcRIIIを発現しかつADCCエフェクター機能を発揮する細胞である。ADCCを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球が挙げられる；PBMCおよびNK細胞が好ましい。上記エフェクター細胞は、天然供給源から（例えば、血液から）単離され得る。

【0065】

用語「細胞増殖障害」および「増殖障害」とは、ある程度の異常な細胞増殖と関連する障害をいう。一実施形態において、上記細胞増殖障害は、癌である。

【0066】

用語「治療上有効な量」とは、薬物（例えば、システイン操作抗TENB2抗体薬物結合体もしくは化学療法剤）の、哺乳動物における疾患もしくは障害を処置するために有効な量をいう。癌の場合において、上記薬物の治療上有効な量は、癌細胞数を低下させ得；腫瘍サイズを縮小させ得；末梢器官への癌細胞増浸潤を阻害し得（すなわち、ある程度ま

10

20

30

40

50

で遅らせ得、好ましくは停止し得る)；腫瘍転移を阻害し得(すなわち、ある程度まで遅らせ得、好ましくは停止し得る)；腫瘍増殖をある程度まで阻害し得；ならびに/または上記がんと関連する症状のうちの1個以上をある程度まで軽減し得る。上記薬物は、増殖を予防し得および/もしくは癌細胞を死滅させ得る程度にまで、細胞増殖抑制性および/もしくは細胞傷害性であり得る。用語「細胞増殖抑制性」とは、細胞の機能を制限する(例えば、細胞増殖(cel l u l a r g r o w t h o r p r o l i f e r a t i o n o f c e l l)を制限する)効果をいう。癌治療については、効力は、例えば、疾患進行までの時間(TTP)を評価することおよび/もしくは応答率(RR)を決定することによって、測定され得る。

【0067】

「化学療法剤」とは、癌の処置において有用な化合物である。化学療法剤の例としては、以下が挙げられる：エルロチニブ(TARCEVA(登録商標), Genentech / OSI Pharm.)、ボルテゾミブ(VELCADE(登録商標), Millenium Pharm.)、フルベストラント(FASLODEX(登録商標), AstraZeneca)、ステント(SU11248, Pfizer)、レトロゾール(FEMARA(登録商標), Novartis)、イマチニブメシレート(GLEEVEC(登録商標), Novartis)、PTK787/ZK 222584(Novartis)、オキサリプラチン(Eloxatin(登録商標), Sanofi)、5-FU(5-フルオロウラシル)、ロイコボリン、ラパマイシン(シロリムス, RAPAMUNE(登録商標), Wyeth)、ラパチニブ(TYKERB(登録商標), GSK572016, GlaxoSmithKline)、ロナファルニブ(SCH 66336), ソラフェニブ(BAY43-9006, Bayer Labs.)、およびゲフィチニブ(IRESSA(登録商標), Astrazeneca)、AG1478、AG1571(SU 5271; Sugen)、アルキル化剤(例えば、チオテパおよび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、イムブスルファンおよびピボスルファン)；アジリジン(例えば、ベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、およびウレドパ)；エチレンイミンおよびメチルメラミン(methylamelamine)(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ルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロメラミンを含む)；アセトゲニン(特に、プラタシンおよびブタタシノン)；カンプトテシン(合成アナログトポテカンが挙げられる)；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成アナログが挙げられる)；クリプトフィシン(特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8)；ドラスタチン；デュオカルマイシン(合成アナログ、KW-2189およびCB1-TM1が挙げられる)；エリユテロビン；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコジクチン(sarcodictyin)；スポンジスタチン；ナイトロジェンマスタード(例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド(cholophosphamide)、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ヒドロクロリド、メルファラン、ノベムピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード)；ニトロソウレア(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、およびラニムスチン(ranimustine))；抗生物質(例えば、エネジイン抗生物質(例えば、カリチアマイシン、特に、カリチアマイシン 1Iおよびカリチアマイシン I1(Angew Chem Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186))；ジネマイシン(dynemicin)(ジネマイシンAが挙げられる)；ビスホスホネート(例えば、クロドロネート)；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連色素タンパク質エネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、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、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商

10

20

30

40

50

標) ドキソルピシン (モルホリノ - ドキソルピシン、シアノモルホリノ - ドキソルピシン、2 - ピロリノ - ドキソルピシンおよびデオキシドキソルピシンが挙げられる)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン (marcellomycin)、マイトマイシン (例えば、マイトマイシン C)、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 (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルピシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン; 代謝拮抗物質 (例えば、メトトレキサートおよび 5 - フルオロウラシル (5 - FU)); 葉酸アナログ (例えば、デノプテリン (denopterin)、メトトレキサート、プテロプテリン (pteropterin)、トリメトレキサート); プリンアナログ (例えば、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); ピリミジンアナログ (例えば、アンシタビン、アザシチジン、6 - 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、フロクスウリジン); アンドロゲン (例えば、カルステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン); 抗副腎剤 (anti-adrenal) (例えば、アミノグルテチミド、ミトータン、トリロスタン); 葉酸補充剤 (replenisher) (例えば、フロリン酸 (frolinic acid)); 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; ビサントレン; エダトラキサート (edatratexate); デフォファミン (defofamine); デメコルチン (demecolcine); ジアジクオン (diaziquone); エフロルニチン (elfornithine); 酢酸エリプチニウム (elliptinium acetate); 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 (lonidainine); マイタンシノイド (例えば、マイタンシンおよびアンサマイトシン (ansamitocin)); ミトグアゾン; ミトキサントロン; モピダンモール (mopidanmol); ニトラエリン (nitraerine); ペントスタチン; フェナメット (phenamet); ピラルピシン; ロソキサントロン; ポドフィリン酸 (podophyllinic acid); 2 - エチルヒドラジド; プロカルバジン; PSK (登録商標) ポリサッカリド複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR); ラゾキサン; リゾキシン; シゾフィラン; 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; トリコテシン (特に、T - 2 毒素、ベラクリン A (verracurin A)、ロリジン A およびアングイジン (anguidine)); ウレタン; ピンデシン; 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 (gacytosine); アラピノシド (「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 (TAXOL (登録商標), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)), AB RAXANETM Cremophor 非含有、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子処方物 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、および TAXOTERE (登録商標) ドセタキセル (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)); クロラムブシル; GEMZAR (登録商標) 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; 白金アナログ (例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン); ピンブラスチン; 白金; エトボシド (VP - 16); イホスファミド; ミトキサントロン; ピンクリスチン; NAVELBINE (登録商標) ビノレルビン; ノバントロン; テニボシド; エダトレキサート (edatrexate); ダウノマイシン; アミノプテリン; ゼローダ; イバンドロネート; CPT - 11; トポイソメラーゼインヒビター RFS 2000; ジフルオロメチルオルニチン (difluoromethylornithine) (DMFO); レチノイド (例えば、レチノイン酸); カペシタビン; ならびに上記の内のいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸もしくは誘導体。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

「化学療法剤」のこの定義においても含まれるのは、以下である：(i) 腫瘍に対するホルモン作用を調節もしくは阻害するように作用する抗ホルモン剤（例えば、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲンレセプターモジュレーター（SERM）（例えば、タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標）タモキシフェンを含む）、ラロキシフェン、ドロキシフェン、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（keoxifene）、LY117018、オナプリストン（onapristone）、およびFARESTON トレミフェンが挙げられる）；(ii) 副腎におけるエストロゲン生成を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼインヒビター（例えば、4（5）- イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE（登録商標）メゲステロールアセテート、AROMASIN（登録商標）エキセメスタン、ホルメスタン（formestane）、ファドロゾール、RIVISOR（登録商標）ボロゾール、FEMARA（登録商標）レトロゾール、ならびにARIMIDEX（登録商標）アナストロゾール）；(iii) 抗アンドロゲン（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、およびゴセレリン）；ならびにトロキサシタピン（1, 3 - ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）；(iv) アロマターゼインヒビター；(v) プロテインキナーゼインヒビター；(vi) 脂質キナーゼインヒビター；(vii) アンチセンスオリゴヌクレオチド（特に、異常な細胞増殖に關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 - 、RafおよびH - Ras））；(viii) リボザイム（例えば、VEGF発現インヒビター（例えば、ANGIOZYME（登録商標）リボザイム）およびHER2発現インヒビター）；(ix) ワクチン（例えば、遺伝子治療ワクチン（例えば、ALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、およびVAXID（登録商標）ワクチン））；PROLEUKIN（登録商標）rIL - 2；LURTOTECAN（登録商標）トポイソメラーゼ1インヒビター；ABARELIX（登録商標）rmRH；(x) 抗血管形成剤（例えば、ベバシズマブ（AVASTIN（登録商標）, Genentech））；ならびに(xi) 上記のうちのいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸もしくは誘導体。

【 0 0 6 9 】

用語「サイトカイン」とは、細胞内メディエーターとしてある細胞に対して作用する、別の細胞集団によって放出されるタンパク質についての包括的用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、および伝統的なポリペプチドホルモンである。以下が、サイトカインの中に含まれる：成長ホルモン（例えば、ヒト成長ホルモン、N - メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモン）；副甲状腺ホルモン；サイロキシン；インスリン；プロインスリン；リラキシン；プロリラキシン；糖タンパク質ホルモン（例えば、卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体形成ホルモン（LH））；肝細胞増殖因子（hepatic growth factor）；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子 - および腫瘍壊死因子 - ；ミューラー管阻害物質（mullerian - inhibiting substance）；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒピン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロポボエチン（TPO）；神経増殖因子（例えば、NGF - ）；血小板増殖因子；トランスホーミング増殖因子（TGF）（例えば、TGF - およびTGF - ）；インスリン様増殖因子 - Iおよび - II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子（osteoinductive factor）；インターフェロン（例えば、インターフェロン - 、 - 、および - ）；コロニー刺激因子（CSF）（例えば、マクロファージ - CSF（M - CSF）；顆粒球 - マクロファージ - CSF（GM - CSF）；および顆粒球 - CSF（G - CSF））；インターロイキン（IL）（例えば、IL - 1、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12）；腫瘍壊死因子（例えば、TNF - もしくはTNF - ）；ならびに他のポリペプチド因

子 (L I F および k i t リガンド (K L) が挙げられる) 。本明細書において使用される場合、用語サイトカインは、天然供給源もしくは組換え細胞培養物に由来するタンパク質、および上記ネイティブ配列のサイトカインの生物学的に活性な等価物を含む。

【 0 0 7 0 】

用語「標識」とは、抗体に共有結合され得かつ以下を行うように機能する任意の部分の意味する： (i) 検出可能なシグナルを提供する； (i i) 第 2 の標識と相互作用して、上記第 1 の標識もしくは第 2 の標識によって提供される検出可能なシグナルを改変する (例えば、F R E T (蛍光共鳴エネルギー移動)) ； (i i i) 抗原もしくはリガンドとの相互小夜を安定化させるか、またはその結合親和性を増大させる； (i v) 電荷、疎水性、形状、もしくは他の物理的パラメーターによって、移動度 (例えば、電気泳動的移動度) 、もしくは細胞透過性に影響を及ぼす、あるいは (v) 捕捉部分を提供して、リガンド親和性、抗体 / 抗原結合、もしくはイオン性錯化を調節する。

10

【 0 0 7 1 】

語句「薬学的に受容可能な塩」とは、本明細書において使用される場合、A D C の薬学的に受容可能な有機性もしくは無機性の塩をいう。例示的な塩としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩酸塩、プロミド、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシネート (g e n t i s i n a t e) 、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカレート、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p - トルエンスルホン酸塩、およびパモ酸塩 (すなわち、1 , 1 ' - メチレン - ビス - (2 - ヒドロキシ - 3 - ナフトエート)) 塩。薬学的に受容可能な塩は、別の分子 (例えば、アセテートイオン、スクシネートイオンもしくは他の対イオン) の包含を伴い得る。上記対イオンは、上記化合物上の電荷を安定化する任意の有機部分もしくは無機部分であり得る。さらに、薬学的に受容可能な塩は、その構造において 1 個より多い荷電した原子を有し得る。複数の荷電した原子が上記薬学的に受容可能な塩の一部である例は、複数の対イオンを有し得る。従って、薬学的に受容可能な塩は、1 個以上の荷電した原子および / もしくは 1 個以上の対イオンを有し得る。

20

【 0 0 7 2 】

「薬学的に受容可能な溶媒和物」とは、1 個以上の溶媒分子および A D C の会合をいう。薬学的に受容可能な溶媒和物を形成する溶媒の例としては、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、D M S O 、酢酸エチル、酢酸、およびエタノールアミンが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 7 3 】

「キャリア」とは、本明細書において使用される場合、使用される投与量および濃度でこれらに曝される細胞もしくは哺乳動物に対して非毒性である、薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、もしくは安定化剤を含む。しばしば、この生理学的に受容可能なキャリアは、水性の pH 緩衝化溶液である。生理学的に受容可能なキャリアの例としては、以下が挙げられる：緩衝物質 (例えば、ホスフェート、クエン酸塩、および他の有機酸) ；抗酸化物質 (アスコルビン酸が挙げられる) ；低分子量 (約 1 0 残基未満) のポリペプチド；タンパク質 (例えば、ひと血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン) ；親水性ポリマー (例えば、ポリビニルピロリドン) ；アミノ酸 (例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリジン) ；単糖類、二糖類、および他の炭水化物 (グルコース、マンノース、もしくはデキストリンが挙げられる) ；キレート化剤 (例えば、E D T A) ；糖アルコール (例えば、マンニトールもしくはソルビトール) ；塩形成対イオン (例えば、ナトリウム) ；ならびに / または非イオン性界面活性剤 (例えば、T W E E N (登録商標) 、ポリエチレングリコール (P E G) 、および P L U R O N I C S (登録商標)) 。

40

【 0 0 7 4 】

50

本明細書において使用される立体化学的定義および慣例は、一般に、S. P. Parker 編, McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; および Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York に従う。多くの有機化合物は、光学的に活性な形態で存在する。すなわち、それらは、平面偏光の面を回転する能力を有する。光学的に活性な化合物の記載にあたって、接頭辞 D および L、または R および S は、そのキラル中心の周りの分子の絶対配置を示すために使用される。接頭辞 d および l または (+) および (-) は、上記化合物による平面偏光の回転のしるしを示すために使用され、(-) もしくは l は、上記化合物が左旋性であることを意味する。(+) もしくは d の接頭辞がついた化合物は、右旋性である。所定の化学的構造について、これら立体異性体は、互いに鏡像であることを除いて、同一である。特定の立体異性体はまた、エナンチオマーといわれ得、そしてこのような異性体の混合物は、しばしば、エナンチオマー混合物といわれる。エナンチオマーの 50 : 50 混合物は、ラセミ混合物 (racemic mixture) もしくはラセミ化合物 (racemate) といわれ、これらは、化学反応もしくは化学プロセスにおいて、立体選択性もしくは立体特異性を何ら有さない場合に生じ得る。用語「ラセミ混合物」および「ラセミ化合物」とは、光学活性を欠いている、2 個のエナンチオマー種の等モル混合物をいう。

【0075】

以下の略語が本明細書において使用され、以下に示された定義を有する：BME は、メルカプトエタノールであり、Boc は、N-(t-ブトキシカルボニル)であり、cit は、シトルリン(2-アミノ-5-ウレイドペンタン酸)であり、dap は、ドラプロイン(dolaproine)であり、DCC は、1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミドであり、DCM は、ジクロロメタンであり、DEA は、ジエチルアミンであり、DEAD は、ジエチルアゾジカルボキシレートであり、DEPC は、ジエチルホスホリルシアニデートであり、DIAD は、ジイソプロピルアゾジカルボキシレートであり、DIEA は、N, N-ジイソプロピルエチルアミンであり、dil は、ドライソロイシン(dolaisoleucine)であり、DMA は、ジメチルアセトアミドであり、DMAp は、4-ジメチルアミノピリジンであり、DME は、エチレングリコールジメチルエーテル(もしくは1, 2-ジメトキシエタン)であり、DMF は、N, N-ジメチルホルムアミドであり、DMSO は、ジメチルスルホキシドであり、doe は、ドラフェニン(dolaphenine)であり、dov は、N, N-ジメチルバリンであり、DTNB は、5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)であり、DTPA は、ジエチレントリアミン五酢酸であり、DTT は、ジチオスレイトールであり、EDCI は、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリドであり、EEDQ は、2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1, 2-ジヒドロキノリンであり、ES-MS は、エレクトロスプレー質量分析法であり、EtOAc は、酢酸エチルであり、Fmoc は、N-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)であり、gly は、グリシンであり、HATU は、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートであり、HOBt は、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、HPLC は、高速液体クロマトグラフィーであり、ile は、イソロイシンであり、lys はリジンであり、MeCN (CH₃CN) はアセトニトリルであり、MeOH はメタノールであり、Mtr は、4-アニシルジフェニルメチル(もしくは4-メトキシトリチル)であり、nor は、(1S, 2R)-(+)-ノルエフェドリンであり、PAB は、p-アミノベンジルカルバモイルであり、PBS は、リン酸緩衝化生理食塩水(pH 7)であり、PEG は、ポリエチレングリコールであり、Ph はフェニルであり、Pnp は p-ニトロフェニルであり、MC は、6-マレイミドカプロリルであり、phe は L-フェニルアラニンであり、PyBroP は、is プロモトリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェートであり、SEC は、サイズ排除クロマ

トグラフィーであり、S u は、スクシンイミドであり、T F A は、トリフルオロ酢酸であり、T L C は、薄層クロマトグラフィーであり、U V は紫外線であり、v a l はバリンである。

【 0 0 7 6 】

(シス테인操作抗 T E N B 2 抗体)

本発明の化合物は、野生型もしくは親の抗 T E N B 2 抗体の任意の形態のうちの 1 個以上のアミノ酸がシス테인アミノ酸と置換されているシス테인操作抗 T E N B 2 抗体を含む。上記操作されたシス테인アミノ酸は、遊離シス테인アミノ酸であり、鎖内ジスルフィドユニットの一部でもなく、鎖間ジスルフィドユニットの一部でもない。抗 T E N B 2 抗体の任意の形態が、操作（すなわち、変異）され得る。例えば、親 F a b 抗体フラグメントは、シス테인操作 F a b（本明細書において「チオ F a b」といわれる）を形成するように操作され得る。同様に、親モノクローナル抗体は、「チオ M a b」を形成するように操作され得る。単一部位の変異が、単一の操作されたシス테인残基をチオ F a b において生じる一方で、単一部位の変異は、I g G 抗体のダイマー性質に起因して、2 個の操作されたシス테인残基をチオ M a b において生じることに注意すべきである。本発明のシス테인操作抗 T E N B 2 抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体もしくはキメラモノクローナル抗体、抗体の抗原結合フラグメント、融合ポリペプチドおよび細胞に会合した T E N B 2 ポリペプチドを優先的に結合するアナログを含む。

10

【 0 0 7 7 】

シス테인操作抗 T E N B 2 抗体は、それらの野生型、親抗 T E N B 2 抗体対応物の抗原結合能を保持する。従って、シス테인操作抗 T E N B 2 抗体は、T E N B 2 抗原に結合し得る。

20

【 0 0 7 8 】

シス테인操作抗 T E N B 2 抗体は、還元スルフヒドリル（チオール）基を有する 1 個以上の遊離シス테인アミノ酸を含み、ここで上記シス테인操作抗 T E N B 2 抗体は、T E N B 2 ポリペプチドに結合する。

【 0 0 7 9 】

一実施形態において、上記シス테인操作抗 T E N B 2 抗体は、親抗 T E N B 2 抗体の 1 個以上のアミノ酸残基をシス테인で置換する工程を包含するプロセスによって、調製される。

30

【 0 0 8 0 】

置換された（「操作された」）シス테인（C y s）残基を有する変異体は、上記新たに導入された、操作されたシスチンチオール基の反応性について評価され得る。上記チオール反応性値は、0 ~ 1 . 0 の範囲の相対的数値であり、任意のシス테인操作抗体について測定され得る。本発明のシス테인操作抗体のチオール反応性値は、0 . 6 ~ 1 . 0 ; 0 . 7 ~ 1 . 0 ; もしくは 0 . 8 ~ 1 . 0 の範囲内にあり得る。

【 0 0 8 1 】

一局面において、本発明は、単離されたシス테인操作抗 T E N B 2 抗体に関し、上記抗体は、以下をコードする D N A 分子の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む：（a）本明細書に記載されるように、全長アミノ酸配列を有するシス테인操作抗体、（b）本明細書で開示されるように、シグナルペプチドを欠いているシス테인操作抗体アミノ酸配列、（c）本明細書で開示されるように、シグナル配列ありもしくはなしの、膜貫通シス테인操作抗体タンパク質の細胞外ドメイン、（d）本明細書で開示される核酸配列のうちのいずれかによってコードされるアミノ酸配列、あるいは（e）本明細書で開示されるように、全長シス테인操作抗体アミノ酸配列の任意の他の具体的に定義されたフラグメント。

40

【 0 0 8 2 】

一局面において、本発明は、N 末端シグナル配列なしの、および / もしくは開始メチオニンなしの単離されたシス테인操作抗 T E N B 2 抗体を提供し、記載されるように、このようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる。上記抗体を

50

生成するためのプロセスはまた、本明細書に記載され、ここでそのプロセスは、上記適切なコード核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を、上記システイン操作抗体の発現を適切な条件下で培養する工程、および上記システイン操作抗体を細胞培養物から回収する工程を包含する。

【 0 0 8 3 】

本発明の別の局面は、膜貫通ドメイン欠失もしくは膜貫通ドメイン不活性化のいずれかである、単離されたシステイン操作抗 T E N B 2 抗体を提供する。上記抗体を生成するためのプロセスはまた、本明細書に記載され、ここでそれらの方法は、上記適切なコード核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を、上記システイン操作抗体の発現に適切な条件下で培養する工程、および上記システイン操作抗体を上記細胞培養物から回収する工程を包含する。

10

【 0 0 8 4 】

他の実施形態において、本発明は、異種（非 T E N B 2）ポリペプチドに融合された、本明細書に記載されるシステイン操作抗体のうちのいずれかを含む、単離された抗 T E N B 2 キメラシステイン操作抗体を提供する。このようなキメラ分子の例は、異種ポリペプチド（例えば、エピトープタグ配列もしくは免疫グロブリンの F c 領域）に融合された、本明細書に記載されるシステイン操作抗体のうちのいずれかを含む。

【 0 0 8 5 】

上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体は、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、もしくは抗 T E N B 2 ポリペプチド抗体の、そのそれぞれの抗原性エピトープへの結合を競合的に阻害する抗体であり得る。本発明の抗体は、必要に応じて、増殖阻害因子もしくは細胞傷害性薬剤（例えば、毒素（例えば、オーリスタチン、抗生物質、放射活性同位体、核溶解酵素などを含む））に結合体化され得る。本発明の抗体は、必要に応じて、C H O 細胞もしくは細菌細胞において生成され得、好ましくは、結合する細胞の増殖を阻害し得るか、または死滅を誘導し得る。診断目的については、本発明の抗体は、検出可能に標識され得るか、固体支持体に結合され得る、など。

20

【 0 0 8 6 】

本発明の他の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるシステイン操作抗 T E N B 2 抗体のいずれかをコードする D N A を含むベクターを提供する。任意のこのようなベクターを含む宿主細胞がまた、提供される。例えば、上記宿主細胞は、C H O 細胞、E . c o l i 細胞、もしくは酵母細胞であり得る。本明細書に記載されるポリペプチドのうちのいずれかを生成するためのプロセスがさらに提供され、宿主細胞を、望ましいポリペプチドの発現に適切な条件下で培養する工程、および上記望ましいポリペプチドを上記細胞培養物から回収する工程を包含する。

30

【 0 0 8 7 】

親抗 T E N B 2 抗体およびシステイン操作抗 T E N B 2 抗体は、T E N B 2 ポリペプチドもしくは P C T / U S 0 3 / 0 7 2 0 9 に記載される T E N B 2 ポリペプチド改変体に結合する。

【 0 0 8 8 】

T E N B 2 ポリペプチド改変体は、以下のとおりである T E N B 2 と少なくとも約 8 0 % アミノ酸配列同一性を有する T E N B 2 ポリペプチドである：（ i ）全長ネイティブ配列；（ i i ）シグナル配列を欠いているポリペプチド配列；（ i i i ）シグナル配列ありもしくはなしの細胞外ドメイン；または（ i v ）全長 T E N B 2 ポリペプチド配列の任意の他のフラグメント。このような T E N B 2 ポリペプチド改変体は、例えば、全長ネイティブアミノ酸配列の N 末端もしくは C 末端において 1 個以上のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失されたポリペプチドを含む。通常は、T E N B 2 ポリペプチド改変体は、全長ネイティブ配列の T E N B 2 ポリペプチド配列、シグナルペプチドを欠いている T E N B 2 ポリペプチド配列、シグナルペプチドありもしくはなしの T E N B 2 ポリペプチドの細胞外ドメイン、または全長 T E N B 2 ポリペプチド配列の任意の他の具体的に規定されたフラグメントに対して、少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも

40

50

約 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性を有する。通常は、TENB2ポリペプチド改変体は、長さが少なくとも約10アミノ酸、あるいは長さが少なくとも約20アミノ酸、30アミノ酸、40アミノ酸、50アミノ酸、60アミノ酸、70アミノ酸、80アミノ酸、90アミノ酸、100アミノ酸、110アミノ酸、120アミノ酸、130アミノ酸、140アミノ酸、150アミノ酸、160アミノ酸、170アミノ酸、180アミノ酸、190アミノ酸、200アミノ酸、210アミノ酸、220アミノ酸、230アミノ酸、240アミノ酸、250アミノ酸、260アミノ酸、270アミノ酸、280アミノ酸、290アミノ酸、300アミノ酸、310アミノ酸、320アミノ酸、330アミノ酸、340アミノ酸、350アミノ酸、360アミノ酸、370アミノ酸、380アミノ酸、390アミノ酸、400アミノ酸、410アミノ酸、420アミノ酸、430アミノ酸、440アミノ酸、450アミノ酸、460アミノ酸、470アミノ酸、480アミノ酸、490アミノ酸、500アミノ酸、510アミノ酸、520アミノ酸、530アミノ酸、540アミノ酸、550アミノ酸、560アミノ酸、570アミノ酸、580アミノ酸、590アミノ酸、600アミノ酸以上である。必要に応じて、TENB2改変ポリペプチドは、上記ネイティブTENB2ポリペプチド配列と比較して、わずか1個の保存的アミノ酸置換、あるいは上記ネイティブTENB2ポリペプチド配列と比較して、わずか2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、もしくは10個の保存的アミノ酸置換を有する。

【0089】

TENB2ポリペプチドは、以下における組換え発現によって調製され得る：(i) pBR322ベクターを有する*E. coli*；(ii) 哺乳動物細胞（例えば、ヒトHEK293細胞（ATCC CCL 1573）、COS（シミアン線維芽細胞、SV-40）細胞、pRK5ベクターを含むチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）；(iii) 酵母（例えば、酵母株AB110）；または(iv) バキュロウイルス感染昆虫細胞（PCT/US03/07209）。ネイティブもしくは組換えTENB2ポリペプチドは、タンパク質精製の分野の種々の標準的技術によって精製され得る。例えば、プロTENB2ポリペプチド、成熟TENB2ポリペプチド、もしくはプレTENB2ポリペプチドは、目的のTENB2ポリペプチドに対して特異的な抗体を使用して、イムノアフィニティークロマトグラフィーによって精製される。一般に、イムノアフィニティークラムは、上記抗TENB2ポリペプチド抗体を、活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合的にカップリングすることによって構築される。TENB2ポリペプチドは、異種ポリペプチド（これは、シグナル配列もしくは上記成熟タンパク質もしくはポリペプチドのN末端において特定の切断部位を有する他のポリペプチドであり得る）との融合タンパク質として組換え精製され得る。あるいは、TENB2ポリペプチドは、シグナル配列、および上記TENB2融合ポリペプチドの精製を可能にする異種ポリペプチド配列との融合ポリペプチドとして生成され得る；このようなポリペプチドの例は、ポリヒスチジン（His₆（配列番号24））もしくはHis₈（配列番号25））、ヒトIgG Fc、FLAGエピトープ（KDYKDDDDK（配列番号26））、およびgDエピトープ（KYALADASLKMA DP NR FRGKDL PVL（配列番号27））である。上記シグナル配列は、上記ベクターの成分であり得るか、または上記ベクターに挿入される上記抗TENB2抗体コードDNAもしくはTENB2ポリペプチドコードDNAの一部であり得る。上記シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、もしくは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であり得る。酵母分泌のために、上記シグナル配列は、例えば、酵母インペルターゼリーダー、因子リーダー（*Saccharomyces*および*Kluyveromyces*の因子リーダー（米国特許第5010182号）を含む）、または酸性ホスファターゼリーダー、*C. albicans* グルコアミラーゼリーダー（EP 0362179）、もしくはWO 90/13646に記載されるシグナルであり得る。哺乳動物細胞発現において、哺乳動物のシグナル配列は、上記タンパク質の分泌を指向するために使用され得る（

例えば、同種もしくは関連する種に分泌ポリペプチド由来のシグナル配列、ならびにウイルス分泌リーダー)。

【0090】

TENB2発現細胞は、細胞表面上でもしくは分泌形態において、内因性のもしくはトランスフェクトされたTENB2ポリペプチド抗原を発現する。TENB2発現癌は、細胞表面上に存在するTENB2ポリペプチドを有するか、またはTENB2抗原性ポリペプチドを生成しかつ分泌する細胞を含む。TENB2発現癌は、必要に応じて、抗TENB2抗体、その抗体薬物結合体が、上記TENB2ポリペプチドに結合し得、そして上記癌に関して治療的効果を発揮し得るように、その癌の表面上で十分なレベルのTENB2ポリペプチドを生成する。TENB2ポリペプチドを過剰発現する癌は、同じ組織体包の非癌性細胞と比較して、その細胞表面において顕著に高いレベルのTENB2ポリペプチドを有するか、または生成および分泌するものである。このような過剰発現は、遺伝子増幅によって、または増大した転写もしくは翻訳によって引き起こされ得る。TENB2ポリペプチド過剰発現は、細胞の表面に存在する増大したレベルのTENB2タンパク質を評価することによって臨床的設定において決定され得るか、または上記細胞によって(例えば、上記TENB2ポリペプチドをコードする単離された核酸から組換えDNA技術を使用して調製され得る単離されたTENB2ポリペプチドに対して調製される抗TENB2抗体を使用して、免疫組織化学的アッセイ; FACS分析などを介して)分泌され得る。代わりに、もしくはさらに、細胞におけるTENB2ポリペプチドコード核酸もしくはmRNAのレベルを、例えば、TENB2コード核酸もしくはその相補体に対応する核酸ベースのプロブを使用して、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH); (WO 98/45479)、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、もしくはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術(例えば、リアルタイム定量的逆転写酵素PCR(qRT-PCR))を介して、測定し得る。また、生物学的流体(例えば、血清)中の自由な(shed)抗原を、例えば、抗体ベースのアッセイ(米国特許第4933294号; WO 91/05264; 米国特許第5401638号; Siasら(1990) J. Immunol. Methods 132:73-80)を使用して測定することによって、TENB2ポリペプチド過剰発現を検出し得る。種々の他のインビボアッセイが、企図され得る。あるいは、上記患者の身体内の細胞は、必要に応じて、検出可能な標識(例えば、放射活性同位体)で標識されている抗体に曝され得、上記患者における細胞への上記抗体の結合は、例えば、放射活性について外部スキャンすることによって、または上記抗体に以前に曝された患者から採取した生検を分析することによって、評価され得る。

【0091】

親抗TENB2抗体およびシステイン操作抗TENB2抗体は、本明細書に記載されるように、TENB2ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合し得る。TENB2結合オリゴペプチドは、周知の技術を使用して、過度な実験無くして同定され得る。この点に関して、ポリペプチド標的に特異的に結合し得るオリゴペプチドについてのオリゴペプチドライブラリーをスクリーニングするための技術は、当該分野で周知であることが注意される(米国特許第5556762号; 同第5750373号; 同第4708871号; 同第4833092号; 同第5223409号; 同第5403484号; 同第5571689号; 同第5663143号; WO 84/03506; WO 84/03564; Geysenら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998-4002; Geysenら(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:178-182; Geysenら, in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149(1986); Geysenら, J. Immunol. Meth., 102:259-274(1987); Schoofsら, J. Immunol., 140:611-616(1988), Cwirlla, S.E.ら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B.ら(1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.ら(1991) Nature, 352:624; Marks, J.D.

ら(1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A. S. ら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, および Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668)。

【0092】

上記親抗 T E N B 2 抗体および本発明のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体、および異種結合体抗体を含む。ヒト化抗 T E N B 2 抗体の種々の形態が企図される。例えば、上記ヒト化抗体は、抗体フラグメント(例えば、F a b)であり得る。あるいは、上記ヒト化抗体は、インタクトな抗体(例えば、インタクトな I g G 1 抗体)であり得る。

10

【0093】

二重特異性抗 T E N B 2 抗体は、少なくとも2個の異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗 T E N B 2 抗体は、本明細書に記載されるように、T E N B 2 タンパク質の2個の異なるエピトープに結合し得る。他のこのような抗体は、T E N B 2 結合部位と、別のタンパク質に対する結合部位とを併せもっている。あるいは、抗 T E N B 2 アームは、白血球上のトリガー分子(triggering molecule)(例えば、T細胞レセプター分子(例えば、C D 3)、もしくは I g G についての F c レセプター(F c R)(例えば、F c R I (C D 6 4)、F c R I I (C D 3 2)および F c R I I I (C D 1 6))に結合するアームと合わせられて、細胞防御機構を上記 T E N B 2 発現細胞へ集中させかつ局在させ得る。二重特異性抗体はまた、T E N B 2 を発現する再紡に細胞傷害性薬剤を局在させるために使用され得る。これら抗体は、T E N B 2 結合アームおよび上記細胞傷害性薬剤(例えば、サボリン、抗インターフェロン- γ 、ピンカ・アルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサートもしくは放射活性同位体ハプテン)を結合するアームを有する。二重特異性抗体は、全長抗体もしくは抗体フラグメント(例えば、F (a b')₂ 二重特異性抗体)として調製され得る。全長二重特異性抗体の伝統的な生成は、2個の免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで上記2個の鎖は、異なる特異性を有する(Millstein ら(1983) Nature 305:537-539)。

20

【0094】

異種結合体抗 T E N B 2 抗体はまた、本発明の範囲内である。異種結合体抗体は、2個の共有結合された抗体から構成される。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を、望ましくない細胞に標的化すること(米国特許第4676980号)、およびHIV感染の処置のために(WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089)が提唱された。上記抗体が、合成タンパク質化学(架橋剤を要するものを含む)において公知の方法を使用して、インビトロで調製され得ることが企図される。

30

【0095】

本発明の抗 T E N B 2 抗体は、3個以上の抗原結合部位を有する多価抗体(例えば、四価抗体)であり得、これらは、上記抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現によって、容易に生成され得る。上記多価抗体は、ダイマー化ドメインおよび3個以上の抗原結合部位を含み得る。上記好ましいダイマー化ドメインは、F c 領域もしくはヒンジ領域を含む(またはこれらからなる)。この状況において、上記抗体は、F c 領域、および上記 F c 領域に対してアミノ末端側に3個以上の抗原結合部位を含む。上記好ましい多価抗体は、本明細書において、3~約8個、しかし好ましくは4個の抗原結合部位を含む(もしくはこれらからなる)。上記多価抗体は、少なくとも1個のポリペプチド鎖(および好ましくは、2個のポリペプチド鎖)を含み、ここで上記ポリペプチド鎖は、2個以上の可変ドメインを含む。例えば、上記ポリペプチド鎖は、V D 1 - (X 1)_n - V D 2 - (X 2)_n - F c を含み得、ここで V D 1 は、第1の可変ドメインであり、V D 2 は、第2の可変ドメインであり、F c は、F c 領域の1個のポリペプチド鎖であり、X 1 および X 2 は、アミノ酸もしくはポリペプチドを表し、n は、0 もしくは1 である。例えば、上記ポリペプチド鎖は、以下を含み得る：V H - C H 1 - 可撓性リンカー - V H - C H 1 -

40

50

Fc領域鎖；もしくはVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖。上記多価抗体は、本明細書において、好ましくは、少なくとも2個（および好ましくは4個）の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに含む。上記多価抗体は、本明細書において、例えば、約2～約8個の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含み得る。本明細書において企図された上記軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、必要に応じて、CLドメインをさらに含む。

【0096】

抗TENB2抗体のエフェクター機能は、1個以上のアミノ酸置換をFc領域中に導入することによって改変され得る。このような改変は、抗TENB2抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)および/もしくは補体依存性細胞傷害性(CDC)を増強し得る。そのように生成された上記ホモダイマー性抗体は、改善されたインターナリゼーション能力および/もしくは増大した補体媒介性細胞死滅ならびに抗体依存性細胞性細胞傷害性(ADCC)を有し得る。Caronら(1992)J. Exp. Med. 176: 1191-1195およびShopes, B. J. (1992) Immunol. 148: 2918-2922を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモダイマー性抗TENB2抗体はまた、Wolfら(1993) Cancer Research 53: 2560-2565に記載されるように、ヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、抗体は操作され得、二重Fc領域を有し、それによって、増大した補体溶解能力およびADCC能力を有し得る(Stevensonら(1989) Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230)。

【0097】

抗TENB2抗体の血清半減期は、救出レセプター結合エピトープ(salvage receptor binding epitope)(例えば、抗体フラグメント(米国特許第5739277号))を組み込むことによって、調節され得る。本明細書において使用される場合、用語「救出レセプター結合エピトープ」とは、IgG分子(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4)のインビボ血清半減期の増大を担うIgG分子のFc領域のエピトープをいう。

【0098】

TENB2エピトープに結合するモノクローナル抗体(TMEFF2#19を含む)は、標準的競合結合分析およびエピトープマッピング(PCT/US03/07209)によって決定される。

【0099】

免疫組織化学的分析を、TMEFF2#19モノクローナル抗体を使用して行った(PCT/US03/07209; Sambrookら Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989; Ausubelら, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons, 1997)。モノクローナル抗体TMEFF2#19は、241個のヒト前立腺癌標本のうちの176個において、弱～強の結合を示した。

【0100】

モノクローナル抗体TMEFF2#19は、細胞の中にインターナライズされ、上記抗体は、素早く細胞表面上のTENB2ポリペプチドに結合する。

【0101】

(抗TENB2抗体の改変)

本明細書に記載される抗TENB2抗体における改変およびバリエーションは、例えば、保存的および非保存的変異について当該分野で公知の技術およびガイドラインのうちのいずれかを使用して、作製され得る(例えば、米国特許第5364934号におけるもの)。バリエーションは、上記ネイティブ配列の抗TENB2抗体と比較して、そのアミノ酸配列において変化を生じる、上記抗体もしくはポリペプチドをコードする1個以上のコ

ドンの置換、欠失もしくは挿入であり得る。必要に応じて、上記バリエーションは、上記抗TENB2抗体のドメインのうちの1個以上において、少なくとも1個のアミノ酸を任意の他のアミノ酸で置換することによる。上記バリエーションは、当該分野で公知の方法（例えば、オリゴヌクレオチド媒介性（部位指向性）変異誘発、アラニンスキャニング、およびPCR変異誘発）を使用して、作製され得る。部位指向性変異誘発（Carterら（1986）Nucleic Acids Res., 13:4331; Zollerら（1987）Nucleic Acids Res., 10:6487）、カセット変異誘発（Wellsら（1985）Gene, 34:315）、制限選択変異誘発（restriction selection mutagenesis）（Wellsら（1986）Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A, 317:415）もしくは他の公知の技術が、上記抗TENB2抗体改変体DNAを生成するために、クローニングされたDNAに対して行われ得る。アミノ酸変化は、上記抗TENB2抗体の翻訳後プロセスを変化させ得る（例えば、グリコシル化部位の数もしくは位置を変化させるか、または膜固定特性（membrane anchoring characteristic）を変化させる）。他の改変は、グルタミン残基およびアスパラギン残基の、それぞれ、その対応するグルタミン残基およびアスパルチル残基への脱アミド、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリン残基もしくはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化（T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, (1983) W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79 - 86）、N末端アミンのアセチル化、および任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。抗TENB2抗体は、適切なヌクレオチド変化を上記コードDNAに導入し、そして/または化学合成によって、調製され得る。

【0102】

抗TENB2抗体フラグメントは、例えば、全長抗TENB2抗体と比較した場合に、N末端もしくはC末端において短縮され得るか、または内部残基を欠き得る。特定のフラグメントは、上記抗TENB2抗体の望ましい生物学的活性に必須でないアミノ酸残基を欠いている。抗TENB2抗体フラグメントは、多くの従来技術のうちのいずれかによって調製され得る。望ましいペプチドフラグメントは、化学的に合成され得る。大腿のアプローチは、抗体フラグメントを、酵素消化によって（例えば、上記タンパク質を、特定の

アミノ酸残基によって規定される部位でタンパク質を切断することが既知の酵素で処理することによって、もしくは上記DNAを、適切な制限酵素で消化し、望ましいフラグメントを単離することによって）生成する工程を包含する。なお別の適切な技術は、望ましい抗体もしくはフラグメントをコードするDNAフラグメントを、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、単離および増幅することを包含する。上記DNAフラグメントの望ましい末端を規定するオリゴヌクレオチドは、上記PCRにおいて5'プライマーおよび3'プライマーにおいて使用される。好ましくは、抗TENB2抗体配列は、少なくとも1個の生物学的および/もしくは免疫学的活性を、本明細書で開示されるネイティブ抗TENB2抗体と共有する。

【0103】

置換改変体の特定の好ましいタイプは、ヒト化抗体もしくはヒト抗体の1個以上の超可変領域残基を置換することを要する。一般に、さらなる開発のために選択された、上記得られた改変体は、これが生成される上記抗体と比較して改善された生物学的特性を有する。このような置換改変体を生成するための都合のよい方法は、ファージディスプレイを使用する親和性成熟を包含する。簡潔には、いくつかの超可変領域部（例えば、6～7個の部位）は、各部位における全ての考えられるアミノ酸置換を生成するために変異させられる。このように生成された上記抗体改変体は、各粒子内でパッケージされたM13の遺伝子III生成物への融合物として、繊維状ファージ粒子から一価の様式でディスプレイされる。上記ファージディスプレイされた改変体は、次いで、本明細書で開示されるように、それらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。改変の

ための候補超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング変異誘発は、抗原結合に顕著に寄与する超可変領域残基を同定するために行われ得る。代わりに、もしくはさらに、上記抗原 - 抗体複合体の結晶構造を分析して、上記抗体とヒト T E N B 2 ポリペプチドとの間の接触点を同定することは有益であり得る。このような接触残基および隣り合う残基は、本明細書で詳述されている技術によれば、置換の候補である。一旦このような改変体が生成されると、改変体のパネルは、本明細書に記載されるようにスクリーニングに供され、1 種以上の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体が、さらなる開発のために選択され得る。

【0104】

本発明の範囲内に含まれる上記抗 T E N B 2 抗体の共有結合的改変の別のタイプは、上記抗体もしくはポリペプチドのネイティブのグリコシル化パターンを、ネイティブ配列の抗 T E N B 2 抗体において見いだされる 1 個以上の炭水化物部分を欠失させることによって（基礎にあるグリコシル化部位を除去することか、または化学的手段および / もしくは好訴的手段によりグリコシル化を欠失させるかのいずれかによって）変化させること、ならびに / あるいは上記ネイティブ配列の抗 T E N B 2 抗体に存在しない 1 個以上のグリコシル化部位を付加することを包含する。さらに、上記改変は、上記ネイティブタンパク質のグリコシル化における定性的変化を含み、存在する種々の炭水化物部分の性質および特性において変化を伴う。抗体および他のポリペプチドのグリコシル化は、代表的には、N 結合型もしくは O 結合型のいずれかである。N 結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合をいう。トリペプチド配列であるアスパラギン - X - セリンおよびアスパラギン - X - スレオニン（ここで X は、プロリンを除く、任意のアミノ酸である）は、上記アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチドにおけるこれらトリペプチド配列のうちのいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を作り出す。O 結合型グリコシル化とは、糖である N - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、もしくはキシロースのうちの 1 つの、ヒドロキシアミノ酸（最も一般的には、セリンもしくはスレオニン）への結合をいうが、5 - ヒドロキシプロリンもしくは 5 - ヒドロキシリジンもまた、使用され得る。上記抗 T E N B 2 抗体へのグリコシル化部位の付加は、上記アミノ酸配列を、上記トリペプチド配列（N 結合型グリコシル化部位についての）のうちの 1 個以上を含むように改変することによって、都合よく達成される。上記改変はまた、上記抗 T E N B 2 抗体の配列（O 結合型グリコシル化部位について）へ 1 個以上のセリンもしくはスレオニン残基を付加、もしくはこれらの残基で置換することによって、行われ得る。上記抗 T E N B 2 抗体のアミノ酸配列は、必要に応じて、DNA レベルでの変化を介して、特に、コドンが生成され、望ましいアミノ酸へ翻訳するように、所定の塩基において、上記抗 T E N B 2 抗体をコードする DNA を変異させることによって、改変され得る。

【0105】

上記抗 T E N B 2 抗体上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、グリコシドを上記ポリペプチドへ化学的にもしくは酵素的にカップリングさせることによる。このような方法は、例えば、WO 87 / 05330（1987 年 9 月 11 日公開）において、および Applin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259 - 306（1981）において、当該分野で記載されている。

【0106】

上記抗 T E N B 2 抗体に存在する炭水化物部分の除去は、化学的にもしくは酵素的に、またはグリコシル化の標的として働くアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換（mutational substitution）によって、達成され得る。化学的脱グリコシル化技術は、当該分野で公知であり、例えば、Hakimuddinら, Arch. Biochem. Biophys., 259: 52（1987）および Edgeら, Anal. Biochem., 118: 131（1981）によって記載されている。炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraら（1987）Meth. Enzymol., 138: 350 に記載されるように、種々のエンドグリコシダーゼもしくはエキソグリ

コシダーゼを使用することによって、達成され得る。

【0107】

抗TENB2抗体の別のタイプの共有結合的改変は、上記抗体もしくはポリペプチドを、米国特許第4640835号；同第4496689号；同第4301144号；同第4670417号；同第4791192号もしくは同第4179337号に記載される様式において、種々の非タンパク質性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、もしくはポリオキシアルキレン）のうちの1つに連結することを包含する。上記抗体もしくはポリペプチドはまた、コロイド性薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）、もしくはマクロエマルジョン中に、例えば、コアセルベーション技術によつてもしくは界面重合によって調製されるマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）の中に捕捉され得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Oslo, A. 編（1980）で開示される。

10

【0108】

本発明の抗TENB2抗体はまた、別の異種ポリペプチドもしくはアミノ酸配列に融合された抗TENB2抗体を含むキメラ分子を形成する方法において、改変され得る。一実施形態において、このようなキメラ分子は、上記抗TENB2抗体と、抗タグ抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドとの融合物を含む。上記エピトープタグは、一般に、上記抗TENB2抗体のアミノ末端もしくはカルボキシ末端に位置する。上記抗TENB2抗体のこのようなエピトープタグ化形態の存在は、上記タグポリペプチドに対する抗体を使用して、検出され得る。また、上記エピトープタグを提供すると、上記抗TENB2抗体が、抗タグ抗体もしくは上記エピトープタグに結合する別のタイプのアフィニティマトリクスを使用するアフィニティ精製によって、容易に精製されることが可能になる。種々のタグポリペプチドおよびそれらそれぞれの抗体は、当該分野で周知である。例としては、ポリ-ヒスチジン（ポリ-his）もしくはポリ-ヒスチジン-グリシン（ポリ-his-gly）タグ；インフルエンザ（flu）HAタグポリペプチドおよびその抗体12CA5（Fieldら（1988）Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165）；c-mycタグおよびこれに対する8F9抗体、3C7抗体、6E10抗体、G4抗体、B7抗体および9E10抗体（Evanら（1985）Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616）；ならびにHerpes Simplexウイルス糖タンパク質D（gD）タグおよびその抗体（Paborskyら（1990）Protein Engineering, 3(6):547-553）が挙げられる。他のタグポリペプチドとしては、Flag-ペプチド（Hoppら（1988）BioTechnology 6:1204-1210）；KT3エピトープペプチド（Martinら（1992）Science, 255:192-194）；-チューブリンエピトープペプチド（Skinnerら（1991）J. Biol. Chem., 266:15163-15166）；およびT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ（Lutz-Freyermuthら（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397）が挙げられる。

20

30

40

【0109】

代替の実施形態において、上記キメラ分子は、上記抗TENB2抗体と、免疫グロブリンもしくは免疫グロブリンの特定の領域との融合物を含み得る。上記キメラ分子（「イムノアドヘシン」ともいわれる）の二価形態については、このような融合物は、IgG分子のFc領域に対してであり得る。上記Ig融合物は、好ましくは、Ig分子内の少なくとも1個の可変領域の代わりに、抗TENB2抗体の可溶性（膜貫通ドメイン欠失もしくは不活性化）形態を使うことを含む。特に好ましい実施形態において、上記免疫グロブリン融合物は、IgG1分子のヒンジ、CH2およびCH3、またはヒンジ、CH1、CH2

50

およびCH3領域を含む(米国特許第5428130号)。

【0110】

(抗TENB2抗体の調製)

本発明のシステイン操作抗TENB2抗体および親抗TENB2抗体のアミノ酸配列改変体をコードするDNAは、種々の方法によって調製され、これら方法としては、始めに調製した上記ポリペプチドをコードするDNAの、天然供給源からの単離(天然に存在するアミノ酸配列改変体の場合)、部位指向性(もしくはオリゴヌクレオチド媒介性)変異誘発(Carter(1985)ら *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443; Ho(1989) *Gene (Amst.)* 77:51-59; Kunkel(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488; Liu(1998) *J. Biol. Chem.* 273:20252-20260)、PCR変異誘発(Higuchi, (1990) in *PCR Protocols*, p. 177-183, Academic Press; Ito(1991) *Gene* 102:67-70; Bernhard(1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132; およびVallette(1989) *Nuc. Acids Res.* 17:723-733)、ならびにカセット変異誘発(Wells(1985) *Gene* 34:315-323)が挙げられるが、これらに限定されない。変異誘発プロトコル、キット、および試薬は、市販されている(例えば、QuikChange(登録商標) Multi Site-Direct Mutagenesis Kit(Stratagene, La Jolla, CA))。単一の変異はまた、二本鎖プラスミドDNAをテンプレートとして使用して、by PCRベースの変異誘発によって、オリゴヌクレオチド指向性変異誘発によって生成される(Sambrook and Russell, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版; Zoller(1983) *Methods Enzymol.* 100:468-500; Zoller, M. J. and Smith, M. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500)。組換え抗体の改変体は、制限フラグメント操作によって、もしくは合成オリゴヌクレオチドとの重複伸長PCR(overlap extension PCR)によって構築され得る。変異誘発プライマーは、システインコドン置換をコードする。標準的な変異誘発技術は、このような変異システイン操作抗体をコードするDNAを生成するために使用され得る(Sambrookら *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; およびAusubelら *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993)。

【0111】

ファージディスプレイ技術(McCafferty(1990) *Nature* 348:552-553)は、免疫していないドナーに由来する免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、抗TENB2ヒト抗体ヒト抗体および抗体フラグメントをインビトロで生成するために使用され得る。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、繊維状バクテリオファージ(例えば、M13もしくはfd)のメジャーコートタンパク質遺伝子もしくはマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかの中にインフレームでクローニングされ、そして上記ファージ粒子の表面に機能的抗体フラグメントとしてディスプレイされる。上記繊維状粒子は、上記ファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、上記抗体の機能的特性に基づく選択はまた、それら特性を示す上記抗体をコードする遺伝子の選択を生じる。従って、上記ファージは、B細胞の特性のいくつかを模倣する(Johnson(1993) *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571; Clackson(1991) *Nature*, 352:624-628; Marks(1991) *J. Mol. Biol.* 22

10

20

30

40

50

2 : 5 8 1 - 5 9 7 ; G r i f f i t h ら (1 9 9 3) E M B O J . 1 2 : 7 2 5 - 7 3 4 ; 米 国 特 許 第 5 5 6 5 3 3 2 号 ; 同 第 5 5 7 3 9 0 5 号 ; 同 第 5 5 6 7 6 1 0 号 ; 同 第 5 2 2 9 2 7 5 号) 。

【 0 1 1 2 】

抗 T E N B 2 抗体は、公知のオリゴペプチド合成方法論を使用して化学的に合成され得るか、または組み換え技術を使用して調製および精製され得る。上記適切なアミノ酸配列、もしくはその一部は、固相技術を使用して、直接ペプチド合成によって生成され得る (S t e w a r t ら , S o l i d - P h a s e P e p t i d e S y n t h e s i s , (1 9 6 9) W . H . F r e e m a n C o . , S a n F r a n c i s c o , C A ; M e r r i f i e l d , (1 9 6 3) J . A m . C h e m . S o c . , 8 5 : 2 1 4 9 - 2 1 5 4) 。インビトロタンパク質合成は、手動の技術を使用して、もしくは自動化によって行われ得る。自動化固相合成は、例えば、t - B O C 保護もしくはFmoc保護されたアミノ酸を使用し、および製造業者の説明書を使用するA p p l i e d B i o s y s t e m s P e p t i d e S y n t h e s i z e r (F o s t e r C i t y , C A) を利用して、達成され得る。上記抗 T E N B 2 抗体もしくは T E N B 2 ポリペプチドの種々の部分は、化学的に別個に合成され得、そして所望の抗 T E N B 2 抗体もしくは T E N B 2 ポリペプチドを生成するために化学的もしくは酵素的方法を使用して、合わせられ得る。

【 0 1 1 3 】

種々の技術は、抗体フラグメントの生成のために開発されてきた。伝統的には、これらフラグメントを、インタクトな抗体のタンパク質分解的消化を介して誘導したか (M o r i m o t o ら (1 9 9 2) J o u r n a l o f B i o c h e m i c a l a n d B i o p h y s i c a l M e t h o d s 2 4 : 1 0 7 - 1 1 7 ; および B r e n n a n ら (1 9 8 5) S c i e n c e , 2 2 9 : 8 1) 、または組換え宿主細胞によって直接生成した。F a b 、 F v および S c F v 抗 T E N B 2 抗体フラグメントは、全て、E . c o l i においては発現されかつ E . c o l i から分泌され得、従って、これらフラグメントの大量の容易な生成を可能にする。抗体フラグメントは、本明細書で議論される抗体ファージライブラリーから単離され得る。あるいは、F a b ' - S H フラグメントは、E . c o l i から直接回収され、化学的に連結されて、F (a b ') 2 フラグメントを形成するか (C a r t e r ら (1 9 9 2) B i o / T e c h n o l o g y 1 0 : 1 6 3 - 1 6 7) 、または組換え宿主細胞培養物から直接単離される。上記抗 T E N B 2 抗体は、(s c F v) 一本鎖 F v フラグメントであり得る (W O 9 3 / 1 6 1 8 5 ; 米 国 特 許 第 5 5 7 1 8 9 4 号 ; 同 第 5 5 8 7 4 5 8 号) 。上記抗 T E N B 2 抗体フラグメントはまた、「直線状抗体」であり得る (米 国 特 許 第 5 6 4 1 8 7 0 号) 。このような直線状抗体フラグメントは、単一特異性もしくは二重特異性であり得る。

【 0 1 1 4 】

以下の記載は、主に、抗 T E N B 2 抗体コード核酸を含むベクターで形質転換もしくはトランスフェクトした細胞を培養することによる、抗 T E N B 2 抗体の生成に関する。抗 T E N B 2 抗体をコードする D N A は、上記抗 T E N B 2 抗体 m R N A を有し、検出可能なレベルでこれを発現すると考えられている組織から調製された c D N A ライブラリーから得られ得る。従って、ヒト抗 T E N B 2 抗体もしくは T E N B 2 ポリペプチドの D N A は、ヒト組織から調製された c D N A ライブラリーから都合よく得られ得る。上記抗 T E N B 2 抗体コード遺伝子はまた、ゲノムライブラリーからもしくは公知の合成手順技術 (例えば、自動化核酸合成) によって、得られ得る。

【 0 1 1 5 】

ライブラリーは、目的の遺伝子もしくはこれによってコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ (例えば、少なくとも約 2 0 ~ 8 0 塩基のオリゴヌクレオチド) でスクリーニングされ得る。上記 c D N A もしくはゲノムライブラリーを上記選択されたプローブでスクリーニングすることは、標準的な手順 (例えば、S a m b r o o k ら , M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l (N e w Y o r k : C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P

ress, 1989に記載された)を使用して行われ得る。抗TENB2抗体もしくはTENB2ポリペプチドをコードする遺伝子を単離するための代替手段は、PCR方法論(Sambrookら, 前出; Dieffenbachら, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)である。

【0116】

宿主細胞は、抗TENB2抗体もしくはTENB2ポリペプチドの生成について本明細書で記載される発現ベクターもしくはクローニングベクターでトランスフェクトもしくは形質転換され、プロモーターを誘導するか、形質転換体を選択するか、もしくは望ましい配列をコードする遺伝子を増幅するために適切な場合に改変される、従来の栄養培地中で培養される。上記培養条件(例えば、培地、温度、pHなど)は、過度の実験なくして、当業者によって選択され得る。一般に、細胞培養の生産性を最大化するための原理、プロトコル、および実的な技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, 編.(IRL Press, 1991)およびSambrookら(前出)において見いだされ得る。

10

【0117】

上記ベクター中のDNAをクローニングもしくは発現するための適切な宿主細胞としては、本明細書において、原核生物細胞、酵母細胞、もしくは高等真核生物細胞が挙げられる。適切な原核生物細胞としては、ユーバクテリア(例えば、グラム陰性生物もしくはグラム陽性生物(例えば、Enterobacteriaceae(例えば、E. coli)))が挙げられるが、これらに限定されない。種々のE. coli株が、公に利用可能である(例えば、E. coli K12株 MM294(ATCC 31,446); E. coli X1776(ATCC 31,537); E. coli株 W3110(ATCC 27,325)およびK5 772(ATCC 53,635)。他の適切な原核生物宿主細胞としては、Enterobacteriaceae(例えば、Escherichia(例えば、E. coli)、Enterobacter、Erwinia、Klebsiella、Proteus、Salmonella(例えば、Salmonella typhimurium)、Serratia(例えば、Serratia marcescans)、およびShigella、ならびにBacilli(例えば、B. subtilisおよびB. licheniformis)(例えば、B. licheniformisは、1989年4月12日に公開されたDD 266,710の41頁に開示される)、Pseudomonas(例えば、P. aeruginosa、およびStreptomycesが挙げられる。これら例は、限定ではなく、例示である。株W3110は、組換えDNA生成物発酵のための例示的な宿主株である。好ましくは、上記宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、上記宿主に対して内因性のタンパク質をコードする遺伝子において遺伝的変異をもたらすために改変され得、このような宿主の例としては、E. coli W3110株 1A2(これは、完全遺伝子型tonAを有する); E. coli W3110株 9E4(これは、完全遺伝子型tonA ptr3を有する); E. coli W3110株 27C7(ATCC 55,244)(これは、完全遺伝子型tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT kan^rを有する); E. coli W3110株 37D6(これは、完全遺伝子型tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^rを有する); E. coli W3110株 40B4(これは、非カナマイシン耐性degP欠失変異を有する株37D6である); および変異ペリプラズムプロテアーゼを有するE. coli株(米国特許第4946783号)が挙げられる。あるいは、インビトロのクローニング法(例えば、PCRもしくは他の核酸ポリメラーゼ反応)が適している。

20

30

40

【0118】

50

全長抗体、抗体フラグメント、および抗体融合タンパク質は、細菌中で、特に、グリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされない場合に、例えば、上記治療的抗体が細胞傷害性薬剤（例えば、毒素）に結合体化される場合、生成され得、そしてその免疫結合体自体は、腫瘍細胞破壊において有効性を示し得る。全長抗体は、循環中でより長い半減期を有する。E. coliにおける生成は、例えば、翻訳開始領域（TIR）ならびに発現および分泌を最適化するためのシグナル配列を有する細菌における抗体フラグメントおよびポリペプチドの発現を使用して、より迅速にかつよりコスト効率的であり得る（米国特許第5,648,237号；同第5789199号；同第5840523号）。発現後に、上記抗体は、可溶性画分において、E. coli細胞ペーストから単離され、そのアイソタイプに依存して、例えば、プロテインAもしくはプロテインGのカラムを通して生成され得る。最終的精製は、例えば、CHO細胞において発現された抗体を精製するためのプロセスに類似して、行われ得る。

【0119】

原核生物に加えて、真核生物微生物（例えば、糸状菌もしくは酵母）は、抗TENB2抗体コードベクターもしくはTENB2ポリペプチドコードベクターのための適切なクローニング宿主もしくは発現宿主である。Saccharomyces cerevisiaeは、一般に使用される下等真核生物宿主微生物である。他のものとしては、以下が挙げられる：Schizosaccharomyces pombe（Beach and Nurse, (1981) Nature, 290:140; EP 139,383）；Kluyveromyces宿主（米国特許第4943529号；Fleerら（1991）Bio/Technology, 9:968-975）（例えば、K. lactis（MW98-8C、CBS683、CBS4574；Louvencourtら（1983）J. Bacteriol., 154(2):737-742）、K. fragilis（ATCC 12,424）、K. bulgaricus（ATCC 16,045）、K. wickerhamii（ATCC 24,178）、K. waltii（ATCC 56,500）、K. drosophilum（ATCC 36,906；Vanden Bergら（1990）Bio/Technology, 8:135）、K. thermotolerans、およびK. marxianus）；yarrowia（EP 402226）；Pichia pastoris（EP 183070；Srekrishnaら（1988）J. Basic Microbiol., 28:265-278）；Candida；Trichoderma reesia（EP 244234）；Neurospora crassa（Caseら（1979）Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263）；Schwanniomycetes（例えば、Schwanniomycetes occidentalis（EP 394538））；および糸状菌（例えば、Neurospora、Penicillium、Tolypocladium（WO 91/00357）、およびAspergillus宿主（例えば、A. nidulans（Ballanceら（1983）Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289；Tilburnら（1983）Gene, 26:205-221；Yeltonら（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474）およびA. niger（Kelly and Hynes, (1985) EMBO J., 4:475-479））。メタノール資化性（Methylotrophic）酵母は、本明細書において適切であり、これらとしては、Hansenula、Candida、Kloeckera、Pichia、Saccharomyces、Torulopsis、およびRhodotorulaからなる属より選択されるメタノール上で増殖できる酵母が挙げられるが、これらに限定されない。

【0120】

グリコシル化された抗TENB2抗体もしくはTENB2ポリペプチドの発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物から得られ得る。無脊椎動物細胞の例としては、昆虫細胞（例えば、Drosophila S2およびSpodoptera Sf9）、ならびに

10

20

30

40

50

植物細胞（例えば、綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマトおよびタバコの細胞培養物）が挙げられる。多くのバキュロウイルス株および改変体、ならびに *Spodoptera frugiperda*（イモムシ）、*Aedes aegypti*（蚊）、*Aedes albopictus*（蚊）、*Drosophila melanogaster*（ショウジョウバエ）、および *Bombyx mori* のような宿主に由来する、対応する許容可能な昆虫宿主細胞が、同定された。トランスフェクションのための種々のウイルス株は、公に入手可能であり、例えば、*Autographa californica* NPV の L-1 改変体および *Bombyx mori* NPV の Bm-5 株、ならびにこのようなういるすは、本発明に従って、特に、*Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションのための、本明細書に記載されるウイルスとして使用され得る。

10

【0121】

有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 株（COS-7、ATCC CRL 1651）；ヒト胚性腎臓細胞株（293細胞、もしくは懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた293細胞、Grahamら（1977）J. Gen. Virol. 36:59）；胎仔ハムスター腎臓細胞（BHK, ATCC CCL 10）；チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 / - DHFR（CHO, Urlaubら（1980）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216）；マウスセルトリ細胞（TM4, Mather（1980）Biol. Reprod. 23:243-251）；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76, ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA, ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK, ATCC CCL 34）；水牛ラット肝細胞（BRL 3A, ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL 75）；ヒト肝細胞（Hep G2, HB 8065）；マウス乳腺腫瘍（MMT 060562, ATCC CCL 51）；TRI細胞（Matherら（1982）Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68）；MRC 5細胞；FS4細胞；およびヒト肝癌株（Hep G2）である。

20

【0122】

宿主細胞は、抗TENB2抗体生成のための上記発現ベクターもしくはクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導するか、形質転換体を選択するか、もしくは上記望ましい配列をコードする遺伝子を増幅するために適切な場合に改変される、従来の栄養培地中で培養される。上記抗TENB2抗体もしくはTENB2ポリペプチドをコードする核酸（例えば、cDNAもしくはゲノムDNA）は、クローニング（上記DNAの増幅）もしくは発現のための複製可能なベクターに挿入され得る。上記ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、もしくはファージの形態において存在し得る。上記適切な核酸配列は、種々の手順によって上記ベクターに挿入され得る。

30

【0123】

インビトロもしくはインビボでの腫瘍細胞の増殖阻害は、当該分野で公知の種々の方法（例えば、未処置腫瘍細胞と比較して、TENB2発現腫瘍細胞の細胞増殖をインビトロもしくはインビボで約25～100%、もしくは約30～100%、もしくは約50～100%もしくは70～100%、一実施形態において、約0.5～30μg/mlの抗体濃度で阻害すること）において決定され得る。インビトロでの抗TENB2抗体の増殖阻害性効果は、当該分野で公知の方法によって、例えば、内因的にもしくは上記TENB2遺伝子でのトランスフェクション後のいずれかにおいて、TENB2ポリペプチドを発現する細胞を使用して、評価され得る。例えば、適切な腫瘍細胞株およびTENB2トランスフェクト細胞は、数日間（例えば、2～7日間）にわたって、種々の濃度の抗TENB2モノクローナル抗体で処理され得、クリスタルバイオレットもしくはMTTで染色され得るか、またはいくつかの他の比色アッセイによって分析され得る。低下したシグナルは、増殖阻害を示す。増殖を測定するための別の方法は、³H-チミジン取り込みを、抗TENB2抗体の存在下もしくは非存在下で処理した細胞によって比較することによる。処

40

50

理後、上記細胞は回収され、上記DNAへ組み込まれる放射活性の量は、シンチレーションカウンターにおいて定量される。増殖の阻害は、放射活性の低下によって示される。細胞死を誘導する抗TENB2抗体について選択するために、例えば、ヨウ化プロピジウム(PI)、トリパンプルもしくは7AAD取り込みによって示されるように、膜完全性の喪失は、コントロールに比較して評価され得る。適切なポジティブコントロールは、選択された細胞株を、その細胞株の増殖を阻害することが既知の増殖阻害性抗体で処理することを包含する。増殖阻害は、細胞培養物において約0.5~30 μ g/mlもしくは約0.5nM~200nMの抗体濃度で測定され得、ここで上記増殖阻害は、上記腫瘍細胞を上記抗体に曝した1~10日間後に、決定される。上記抗体は、約1 μ g/kg~約100mg/kg 体重の上記抗TENB2抗体の投与が、上記抗体の最初の投与から約5日間~3ヶ月以内に、好ましくは、約5~30日間以内に、腫瘍サイズの縮小もしくは腫瘍細胞増殖の低下を生じる場合、インビボで増殖阻害性である。

10

【0124】

(システイン操作抗TENB2抗体の調製)

本発明の設計、選択、および調製方法は、求電子性官能基と反応性であるシステイン操作抗TENB2抗体を可能にする。これら方法は、指定され、設計された、選択的部位において薬物分子との抗体結合体化合物(例えば、抗体薬物結合体(ADC)化合物をさらに可能にする。抗体表面上の反応性システイン残基は、薬物部分を、チオール反応性基(例えば、マレイミドもしくはハロアセチル)を介して特異的に結合体化することを可能にする。Cys残基の上記チオール官能基のマレイミド基に対する求核性の反応性は、タンパク質中の任意の他のアミノ酸官能基(例えば、リジン残基のアミノ基もしくはN末端アミノ基)と比較して、約1000倍高い。ヨードアセチル試薬およびマレイミド試薬における特定の官能基は、アミン基と反応し得るが、より高いpH(>9.0)およびより長い反応時間が必要とされる(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。タンパク質中の遊離チオールの量は、標準的なエルマンズアッセイ(Ellman's assay)によって概算され得る。免疫グロブリンMは、ジスルフィド架橋したペントマーの例である一方で、免疫グロブリンGは、サブユニットと一緒に結合する内部ジスルフィド架橋を有するタンパク質の例である。このようなタンパク質において、試薬(例えば、ジチオスレイトール(DTT)もしくはセレンオール(selenol)(Singhら(2002)Anal.Biochem.304:147-156))でのジスルフィド結合の還元は、上記反応性遊離チオールを生成するために必要とされる。このアプローチは、抗体三次元構造および抗原結合特異性の喪失を生じ得る。

20

30

【0125】

PHASELECTOR(Phage ELISA for Selection of Reactive Thiols)アッセイは、ELISAファージフォーマットにおける抗体-Fabs中の反応性システイン基の検出を可能にし、それによって、システイン操作抗体の設計を補助する(US 2007/0092940)。上記システイン操作抗体似結合する抗原は、表面に十分にコーティングされ、続いて、システイン操作Fabをディスプレイするファージ粒子とともにインキュベートされ、HRP標識2次抗体が添加され、吸光度が検出される。上記ファージ上にディスプレイされた変位タンパク質は、迅速で、強力かつハイスループットの様式でスクリーニングされ得る。システイン操作抗体のライブラリーが生成され得、同じアプローチを使用して結合選択に供されて、抗体もしくは他のタンパク質のタンパク質-ファージライブラリーから遊離Cys組み込みの適切に反応性の部位を同定し得る。この技術は、ファージ上にディスプレイされたシステイン変異タンパク質と、アフィニティー試薬もしくはチオール反応性でもあるレポーター基とを反応させることを包含する。

40

【0126】

上記PHASELECTORアッセイは、抗体中の反応性チオール基のスクリーニング

50

を可能にする。この方法によるA121C改変体の同定は、例示である。Fab分子全体は、反応性チオール基を有するより多くのチオFab改変体を同定するために効率的に検索され得る。パラメーター、部分的表面接近性(fractional surface accessibility)を使用して、ポリペプチド中のアミノ酸残基への溶媒の接近性を同定および定量した。上記表面接近性は、溶媒分子(例えば、水)が接触し得る表面積(\AA^2)として表され得る。上記水の占有空間は、1.4 半径の球として概算される。ソフトウェアは、フリーで入手できるかまたは、タンパク質の各アミノ酸の表面接近性を、既知のX線結晶学由来の座標を用いて計算するある議リズムを使用する、結晶学プログラムのCCP4 Suiteとして許可制である(Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825、もしくはインターネット: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)(「The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography」(1994) Acta Cryst. D 50: 760-763)。表面接近性計算を行う2つの例示的ソフトウェアモジュールは、B. Lee and F. M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55: 379-400のアルゴリズムに基づく、「AREAIMOL」および「SURFACE」である。AREAIMOLは、タンパク質の上記溶媒接近表面を、プローブ球体(probe sphere)(溶媒分子を表す)の中心の位置として規定する。なぜなら、上記プローブ球体は、上記タンパク質のファンデルワールス表面を転がるからである。AREAIMOLは、calculates 上記溶媒接近表面積を、各原子の周りの拡張範囲(extended sphere)上の表面点を(原子およびプローブ半径の合計に等しい原子中心からの距離において)生成し、隣り合う原子と関連する等価な球内にあるものを排除することによって、計算する。AREAIMOLは、PDB座標ファイルにおいて原子の上記溶媒接近面積を見だし、残基ごとの、鎖ごとの、および分子全体に対する接近面積をまとめる。個々の原子についての接近面積(もしくは面積差)は、偽PDB出力ファイル(pseudo-PDB output file)に書き出され得る。AREAIMOLは、各元素に対する単一半径を想定し、異なる元素の制限された数を認識するのみである。

【0127】

AREAIMOLおよびSURFACEは、絶対的接近性、すなわち、平方オングストローム(\AA^2)の数を報告する。部分的表面接近性は、ポリペプチド内のアミノ酸に対して関連する標準的な状態を参照することによって計算される。上記参照状態は、トリペプチドGly-X-Glyであり、ここでXは、目的のアミノ酸であり、上記参照状態は、「拡張」配置、すなわち、 β -鎖における配置のようであるはずである。上記拡張配置は、Xの接近性を最大にする。計算された接近可能面積は、Gly-X-Glyトリペプチド参照状態における接近可能面積によって除算され、その商を報告し、これは、部分的接近性である。％接近性は、100を乗算した部分的接近性である。表面接近性を計算するための別の例示的アルゴリズムは、上記ポリペプチドのX線座標に基づく水の球体へのアミノ酸残基の部分的接近性を計算するプログラムxsae(Broger, C., F. Hoffmann-Laroche, Basel)のSOLVモジュールに基づく。抗体中のすべてのアミノ酸についての上記部分的表面接近性は、利用可能な結晶構造情報を使用して計算され得る(Eigenbroten (1993) J. Mol. Biol. 229: 969-995)。

【0128】

上記システイン操作抗体をコードするDNAは、容易に単離され、従来の手順を使用して(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)配列決定される。上記ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの供給源として働く。一旦単離されると、上記DNAは、発現ベクターの中に配置され得、次いで、上記発現ベクターは、宿主細胞(例えば、E. co

10

20

30

40

50

1 i 細胞、シミアン C O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、もしくは他の哺乳動物宿主細胞 (例えば、骨髓腫細胞 (米国特許第 5 8 0 7 7 1 5 号 ; U S 2 0 0 5 / 0 0 4 8 5 7 2 ; U S 2 0 0 4 / 0 2 2 9 3 1 0) (これは、上記組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得るために、他の方法では、上記抗体タンパク質を生成しない)) にトランスフェクトされる。

【 0 1 2 9 】

設計および選択の後に、操作され高度に反応性の不對 C y s 残基を有するシステイン操作抗体 (例えば、チオ F a b) は、如何によって生成され得る : (i) 細菌 (例えば、E . c o l i 系 (S k e r r a ら (1 9 9 3) C u r r . O p i n i o n i n I m m u n o l . 5 : 2 5 6 - 2 6 2 ; P l u c k t h u n (1 9 9 2) I m m u n o l . R e v s . 1 3 0 : 1 5 1 - 1 8 8)) もしくは哺乳動物細胞培養系 (W O 0 1 / 0 0 2 4 5) (例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (C H O)) における発現 ; ならびに (i i) 一般的なタンパク質精製技術を使用する精製 (L o w m a n ら (1 9 9 1) J . B i o l . C h e m . 2 6 6 (1 7) : 1 0 9 8 2 - 1 0 9 8 8) 。

【 0 1 3 0 】

上記操作された C y s チオール基は、求核性リンカー試薬、薬物 - リンカー中間体と反応して、システイン操作抗体薬物結合体および他の表紙個システイン操作抗体を形成する。システイン操作抗体の、および親抗体に存在する C y s 残基 (これらは、対形成し、鎖間および鎖内のジスルフィド結合を形成する) は、いかなる反応性チオール基をも有さず (還元剤で処理されなければ)、そして求核性リンカー試薬とも薬物 - リンカー中間体とも反応しない。上記新たに操作された C y s 残基は、対形成しないままであり得、求核性リンカー試薬もしくは薬物 - リンカー中間体 (例えば、薬物 - マレイミド) と反応 (すなわち、結合体化) し得る。例示的薬物 - リンカー中間体としては、以下が挙げられる : M C - M M A E 、 M C - M M A F 、 M C - v c - P A B - M M A E 、 および M C - v c - P A B - M M A F 。上記重鎖および軽鎖の操作された C y s 残基の構造的位置は、配列番号付けシステムに従って番号付けされる。この配列番号付けシステムは、N末端で始まって、K a b a t 番号付けシステム (K a b a t ら , (1 9 9 1) S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 第 5 版 . P u b l i c H e a l t h S e r v i c e , N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a , M D) に相互に関係し、a、b、c によって示される挿入によって K a b a t 番号付けスキーム (下の行) とは異なる。上記 K a b a t 番号付けシステムを使用すると、実際の直線状アミノ酸配列は、上記可変ドメインの F R もしくは C D R の短縮もしくは上記 F R もしくは C D R への挿入に対応するいくつかのもしくはさらなるアミノ酸を含み得る。上記システイン操作された重鎖改変部位は、上記配列番号付けおよび K a b a t 番号付けスキームによって同定される。

【 0 1 3 1 】

一実施形態において、上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体は、以下を包含するプロセスによって調製される :

(a) 親抗 T E N B 2 抗体の 1 個以上のアミノ酸残基を、システインで置換する工程 ; および

(b) 上記システイン操作抗体とチオール反応性試薬とを反応させることによって、上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体のチオール反応性を決定する工程。

【 0 1 3 2 】

上記システイン操作抗体は、上記親抗体よりも上記チオール反応性試薬との反応性が高い。

【 0 1 3 3 】

上記遊離システインアミノ酸残基は、上記重鎖もしくは軽鎖に位置し得るか、または定常ドメインもしくは可変ドメインに位置し得る。抗体フラグメント (例えば、F a b) はまた、1 個以上のシステインアミノ酸で操作され得、上記抗体フラグメントのアミノ酸を置換して、システイン操作抗体フラグメントを形成し得る。

【0134】

本発明の別の実施形態は、システイン操作抗 T E N B 2 抗体を調製（作製）するための方法を提供し、上記方法は、

（a）上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体を精製するために、1 個以上のシステインアミノ酸を、親抗 T E N B 2 抗体に導入する工程；および

（b）上記システイン操作抗体のチオール、チオール反応性試薬とのチオール反応性を決定する工程；

を包含し、ここで上記システイン操作抗体は、親抗体よりも、上記チオール反応性試薬との反応性が高い。

【0135】

10

システイン操作抗体を調製するための方法の工程（a）は、

（i）上記システイン操作抗体をコードする核酸配列を変異誘発する工程；

（ii）上記システイン操作抗体を発現する工程；および

（iii）上記システイン操作抗体を単離および精製する工程、

を含み得る。

【0136】

システイン操作抗体を調製するための方法の工程（b）は、ファージもしくはファージミドから選択されるウイルス粒子上で上記システイン操作抗体を発現する工程を包含し得る。

【0137】

20

システイン操作抗体を調製するための方法の工程（b）はまた、

（i）上記システイン操作抗体とチオール反応性アフィニティー試薬とを反応させて、アフィニティー標識されたシステイン操作抗体を生成する工程；および

（ii）上記アフィニティー標識されたシステイン操作抗体の、捕捉媒体への結合を測定する工程、

を含み得る。

【0138】

本発明の別の実施形態は、チオール反応性について、非常に反応性の不對システインアミノ酸でシステイン操作抗体をスクリーニングするための方法であり、上記方法は、

（a）システイン操作抗体を生成するために、1 個以上のシステインアミノ酸を、親抗体に導入する工程；

（b）上記システイン操作抗体と、チオール反応性アフィニティー試薬とを反応させて、アフィニティー標識されたシステイン操作抗体を生成する工程；および

（c）上記アフィニティー標識されたシステイン操作抗体の、捕捉媒体への結合を測定する工程；および

（d）上記システイン操作抗体の、上記チオール反応性試薬とのチオール反応性を決定する工程、

を包含する。

【0139】

40

システイン操作抗体をスクリーニングするための方法の工程（a）は、

（i）上記システイン操作抗体をコードする核酸配列を変異誘発する工程；

（ii）上記システイン操作抗体を発現する工程；および

（iii）上記システイン操作抗体を単離および精製する工程

を包含し得る。

【0140】

システイン操作抗体をスクリーニングするための方法の工程（b）は、ファージもしくはファージミド粒子から選択されるウイルス粒子上で上記システイン操作抗体を発現する工程を包含し得る。

【0141】

システイン操作抗体をスクリーニングするための方法の工程（b）はまた、

50

(i) 上記システイン操作抗体と、チオール反応性アフィニティー試薬とを反応させて、アフィニティー標識されたシステイン操作抗体を生成する工程；および

(i i) 上記アフィニティー標識されたシステイン操作抗体の、捕捉媒体への結合を測定する工程、
を包含し得る。

【 0 1 4 2 】

(T M E F F 2 # 1 9 I g G 改変体のシステイン操作)

システインを、重鎖 1 2 1 (シグナル配列を除く配列番号付け) 部位において、全長のヒト化親モノクローナル抗 T E N B 2 T M E F F 2 # 1 9 抗体へと、本明細書に記載される上記システイン操作方法によって導入して、重鎖配列：配列番号 1、および軽鎖配列：配列番号 2 (図 1) を有する A 1 2 1 C チオ h u 抗 T E N B 2 T M E F F 2 # 1 9 ヒト化改変体を得た。これらシステイン操作されたモノクローナル抗体を、1 m M システインを含む培地中での一時的な発酵によって、C H O (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞において発現させた。

【 0 1 4 3 】

一実施形態によれば、ヒト化 T M E F F 2 # 1 9 システイン操作抗 T E N B 2 抗体は、遊離システインアミノ酸とともに、以下の可変領域重鎖配列のうちの 1 個以上を含む (表 1)。

【 0 1 4 4 】

【 表 1 】

表1: hu TMEFF2#19 システイン操作抗TENB2抗体改変体についての重鎖の配列番号付け、Kabat番号付けおよびEu番号付けの比較

Cys変異付近の配列	配列番号付け	Kabat 番号付け	Eu番号付け	配列番号
DVQLCESGPG	Q5C	Q5C		8
LSLTCCVSGYS	A23C	A23C		9
LSSVTCADTAV	A88C	A84C		10
TLVTVCASATK	S119C	S112C		11
VTVSSCSTKGP	A121C	A114C	A118C	12
VSSASCKGPSV	T123C	T116C	T120C	13
WYVDGCEVHNA	V285C	V278C	V282C	14
KGFYPCDIAVE	S378C	S371C	S375C	15
PPVLDCDGSFF	S403C	S396C	S400C	16

一実施形態によれば、ヒト化 T M E F F 2 # 1 9 システイン操作抗 T E N B 2 抗体は、遊離システインアミノ酸とともに、以下の可変領域軽鎖配列のうちの 1 個以上を含む (表 2)。

【 0 1 4 5 】

【 表 2 】

表2: hu TMEFF2#19 システイン操作抗TENB2抗体改変体についての軽鎖の配列番号付けおよびKabat番号付けの比較

Cys変異付近の配列	配列番号付け	Kabat 番号付け	配列番号
SLSASCGDRVT	V15C	V15C	17
EIKRTCAAPSV	V110C	V110C	18
TVAAPCVFIFP	S114C	S114C	19
FIFPPCDEQLK	S121C	S121C	20
DEQLKCGTASV	S127C	S127C	21
VTEQDCKDSTY	S168C	S168C	22
GLSSPCTKSFN	V205C	V205C	23

(標識されたシステイン操作抗 T E N B 2 抗体)

システイン操作抗 T E N B 2 抗体は、チオール反応性試薬と部位特異的にかつ効率的にカップリングされ得る。上記チオール反応性試薬は、多官能性リンカー試薬、捕捉（すなわち、アフィニティー）標識試薬（例えば、ビオチン - リンカー試薬）、検出標識（例えば、フルオロフォア試薬）、固相固定化試薬（例えば、S E P H A R O S ETM、ポリスチレンもしくはガラス）、もしくは薬物 - リンカー中間体であり得る。チオール反応性試薬の一例は、N - エチルマレイミド（N E M）である。例示的实施形態において、チオ F a b とビオチン - リンカー試薬との反応は、ビオチン化チオ F a b を提供し、それによって、上記操作されたシステイン残基の存在および反応性が検出および測定され得る。チオ F a b と多官能性リンカー試薬との反応は、薬物部分試薬もしくは他の標識とさらに反応させられ得る官能化リンカーを有するチオ F a b を提供する。チオ F a b と薬物 - リンカー中間体との反応は、チオ F a b 薬物結合体を提供する。

10

【 0 1 4 6 】

本明細書に記載される例示的方法は、一般に、抗体の同定および生成に適用され得、より一般には、本明細書に記載される設計およびスクリーニング工程の適用を介して他のタンパク質に適用され得る。

【 0 1 4 7 】

このようなアプローチは、他のチオール反応性試薬の結合体に適用され、上記試薬において、上記反応性基は、例えば、マレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、もしくは他のチオール反応性結合パートナー（conjugation partner）である（Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3: 2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1: 2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40 - 55, 643 - 671)。上記チオール反応性試薬は、may be a 薬物部分、フルオロフォア（例えば、フルオレセインもしくはローダミンのような蛍光色素）、画像化もしくは放射線療法剤のためのキレート化剤、ペプチジルもしくは非ペプチジル標識または検出タグ、あるいはクリアランス改変薬剤（例えば、ポリエチレングリコールの種々のアイソマー、第3の成分に結合するペプチド、または別の炭水化物もしくは親油性薬剤）

20

30

(システイン操作抗 T E N B 2 抗体の使用)

システイン操作抗 T E N B 2 抗体、およびその結合体は、治療的薬剤および/もしくは診断的薬剤としての用途を見いだし得る。本発明は、T E N B 2 関連障害と関連する1個以上の症状を予防、管理、処置もしくは緩和するための方法をさらに提供する。特に、本発明は、細胞増殖症外（例えば、癌（例えば、卵巣癌、子宮頸癌、子宮癌、膵臓がん、肺癌および乳癌））と関連する1個以上の症状を予防、管理、処置もしくは緩和するための方法を提供する。本発明は、T E N B 2 関連障害もしくはこのような障害を発症させる素因を診断するための方法、ならびに細胞関連 T E N B 2 ポリペプチドを優先的に結合する抗体、および抗体の抗原結合フラグメントを同定するための方法をさらに提供する。

40

【 0 1 4 8 】

本発明の別の実施形態は、T E N B 2 関連障害に応答性である状態の処置において有用な医薬の調製のための、システイン操作抗 T E N B 2 抗体の使用に関する。

【 0 1 4 9 】

(システイン操作抗 T E N B 2 抗体薬物結合体)

本発明の別の局面は、システイン操作抗 T E N B 2 抗体（A b）、およびオーリスタチン薬物部分（D）を含む抗体薬物結合体化合物であり、ここで上記システイン操作抗体は

50

、１個以上の遊離システインアミノ酸を介して、リンカー部分（Ｌ）によってＤへと結合される；上記化合物は、式Ⅰ：

【０１５０】

【化１－２】



を有し、ここで p は、１、２、３、もしくは４であり；そしてここで上記システイン操作抗体は、親抗ＴＥＮＢ２抗体のうちの１個以上のアミノ酸残基を、１個以上の遊離システインアミノ酸で置換する工程を包含するプロセスによって調製される得る。

【０１５１】

図５は、オーリスタチン薬物部分が以下の中の操作されたシステイン基に結合される、システイン操作抗ＴＥＮＢ２抗体薬物結合体（ＡＤＣ）の実施形態を示す：軽鎖（ＬＣ－ＡＤＣ）；重鎖（ＨＣ－ＡＤＣ）；およびＦｃ領域（Ｆｃ－ＡＤＣ）。

【０１５２】

システイン操作抗ＴＥＮＢ２抗体薬物結合体の潜在的利点としては、改善された安全性（より大きな治療指数）、改善されたＰＫパラメーターが挙げられ、抗体鎖間ジスルフィド結合が保持され、このことは、上記結合体を安定化させ得、その活性な結合配置を保持し得、薬物結合体の部位が規定され、そして薬物－リンカー試薬へのシステイン操作抗体の結合体化から、システイン操作抗体薬物結合体を調製すると、より均質な生成物が生じる。

【０１５３】

（薬物部分）

式Ⅰの上記抗体薬物結合体（ＡＤＣ）のオーリスタチン薬物部分は、ドラスタチン、オーリスタチン（米国特許第５６３５４８３号；同第５７８０５８８号；同第５７６７２３７号；同第６１２４４３１号）、アナログおよびそれらの誘導体を含む。ドラスタチンおよびオーリスタチンは、微小管の動力学、ＧＴＰ加水分解、ならびに核分裂および細胞分裂を妨害し（Woykeら（２００１）Antimicrob. Agents and Chemother. 45（１２）：３５８０－３５８４）、そして抗癌活性（米国特許第５６６３１４９号）および抗真菌活性（Pettitら（１９９８）Antimicrob. Agents Chemother. 42：２９６１－２９６５）を有することが示された。種々の形態のドラスタチンもしくはオーリスタチン薬物部分が、上記ペプチド性薬物部分のＮ（アミノ）末端もしくはＣ（カルボキシル）末端を介して抗体に共有結合され得る（WO 02/088172；Doroninaら（２００３）Nature Biotechnology 21（７）：７７８－７８４；Franciscoら（２００３）Blood 102（４）：１４５８－１４６５）。

【０１５４】

例示的オーリスタチンの実施形態は、WO 2005/081711；Senterら，Proceedings of the American Association for Cancer Research，Volume 45，Abstract Number 623（２００４年３月２８日に発表）（これら各々の開示は、その全体が本明細書に参考として援用される）で開示される、上記Ｎ末端結合モノメチルオーリスタチン薬物部分ＤＥおよびＤＦを含む。例示的オーリスタチン薬物部分は、ＭＭＡＥ、およびＭＭＡＦを含む。

【０１５５】

式Ⅰの上記抗体薬物結合体（ＡＤＣ）の上記オーリスタチン薬物部分（Ｄ）は、モノメチルオーリスタチン薬物部分ＭＭＡＥおよびＭＭＡＦを含む。上記ＭＭＡＥもしくはＭＭＡＦ薬物部分のＮ末端は、上記抗体の操作されたシステインへのリンカーを介して共有結合される；

【０１５６】

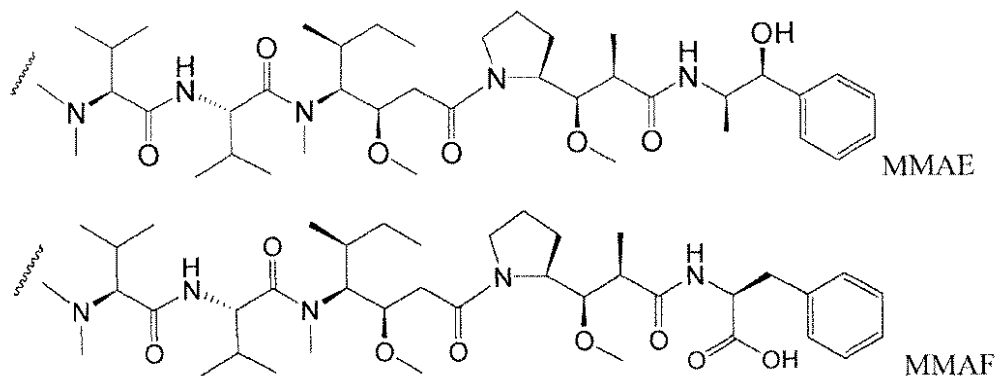
10

20

30

40

【化 2】



10

他の例示的オーリスタチン薬物部分は、ペントペプチドオーリスタチン薬物部分のC末端においてフェニルアラニンカルボキシ改変を有するモノメチルパリン化合物(WO 2007/008848)およびペントペプチドオーリスタチン薬物部分のC末端においてフェニルアラニン側鎖改変を有するモノメチルパリン化合物(WO 2007/008603)を含む。

【0157】

代表的には、ペプチドベースの薬物部分は、2個以上のアミノ酸および/もしくはペプチドフラグメントの間にペプチド結合を形成することによって、調製され得る。このようなペプチド結合は、例えば、タンパク質化学の分野において周知の液相合成方法(E. S. Schruder and K. Lubke, 「The Peptides」, volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照のこと)に従って、調製され得る。

20

【0158】

(リンカー)

「リンカー」、「リンカーユニット」、もしくは「連結」とは、薬物部分に抗体を共有結合する、共有結合もしくは原子の鎖を含む化学部分を意味する。種々の実施形態において、リンカーは、Lとして特定される。「リンカー」(L)は、1個以上の薬物部分(D)および抗体ユニット(Ab)を連結して、式Iの抗体薬物結合体(ADC)を形成するために使用され得る二官能性もしくは多官能性の部分である。抗体薬物結合体(ADC)は、上記薬物および抗体へ結合するための反応性官能基を有するリンカーを使用して、都合よく調製され得る。システイン操作抗体(Ab)のシステインチオールは、リンカー試薬、薬物部分もしくは薬物-リンカー中間体の求核性官能基との結合を形成し得る。

30

【0159】

一局面において、リンカーは、抗体に存在する求核性システインに対して反応性である求核性基を有する反応性部位を有する。上記抗体のシステインチオールは、リンカー上の求核性基と反応性であり、かつリンカーに対して共有結合を形成する。有用な求核性基としては、マレイミドおよびハロアセトアミド基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0160】

リンカーとしては、二価ラジカル(例えば、アルキルジイル、アリーレン、ヘテロアリーレン、以下のような部分(例えば、 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ 、アルキルオキシの反復ユニット(例えば、ポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ)およびアルキルアミノ(例えば、ポリエチレンアミノ、JeffamineTM));ならびに二酸エステルおよびアミド(スクシネート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネート、およびカプロアミド(caproamide)が挙げられる)が挙げられる。

40

【0161】

システイン操作抗体は、Klussmanら(2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773の第766頁および実施例3のプロトコルに従えば、リンカー試薬もしくは薬物-リンカー中間体と、求核性官能基(例えば

50

、マレイミドもしくは - ハロカルボニル) と反応する。

【0162】

上記リンカーは、1個以上のリンカー成分から構成され得る。例示的なリンカー成分は、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」もしくは「vc」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」もしくは「af」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「SMCC」)、N-スクシンイミジル(4-ヨード-アセチル)アミノベンゾエート(「SIAB」)、エチレンオキシ-CH₂CH₂O-(1個以上の反復ユニット(「EO」もしくは「PEO」として)が挙げられる。さらなるリンカー成分は、当該分野で公知であり、いくらかは、本明細書において記載される。

10

【0163】

一実施形態において、ADCのリンカーLは、以下の式：

【0164】

【化3】



を有し、ここで

20

-A-は、上記抗体(Ab)のシステインチオールに共有結合された伸長因子ユニットであり；

aは、0もしくは1であり；

各-W-は、独立して、アミノ酸ユニットであり；

wは、独立して、0～12の範囲に及ぶ整数であり；

-Y-は、上記薬物部分に共有結合されるスペーサーユニットであり；そして

yは、0、1もしくは2である。

【0165】

(伸長因子ユニット)

上記伸長因子ユニット(-A-)は、存在する場合、抗体ユニットをアミノ酸ユニット(-W-)に連結し得る。この点に関して、抗体(Ab)は、伸長因子ユニットの求核性官能基との結合を形成し得る遊離システインチオールを有する。式Iの結合体における例示的伸長因子ユニットは、式IIおよび式IIIによって示され、ここでAb-、-W-、-Y-、-D、wおよびyは、上記で定義されるとおりであり、R¹⁻⁷は、以下から選択される二価ラジカルである：(CH₂)_r、C₃-C₈カルボシクリル、O-(CH₂)_r、アリーレン、(CH₂)_r-アリーレン、-アリーレン-(CH₂)_r-、(CH₂)_r-(C₃-C₈カルボシクリル)、(C₃-C₈カルボシクリル)-(CH₂)_r、C₃-C₈ヘテロシクリル、(CH₂)_r-(C₃-C₈ヘテロシクリル)、-(C₃-C₈ヘテロシクリル)-(CH₂)_r-、-(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-、-(CH₂CH₂O)_r-、-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-、-(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-、-(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-、-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-、-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-、および-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-；ここでR^bは、H、C₁-C₆アルキル、フェニル、もしくはベンジルであり；そしてrは、独立して、1～10の範囲に及ぶ整数である。

30

40

【0166】

アリーレンは、芳香族環系から2個の水素原子を除去することによって得られる、6～20個の炭素原子の二価の芳香族炭化水素ラジカルを含む。代表的なアリーレン基としては、ベンゼン、置換されたベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニルなどが挙げ

50

られるが、これらに限定されない。

【0167】

ヘテロシクリル基は、1個以上の環原子がヘテロ原子（例えば、窒素、酸素および硫黄）である環系を含む。上記複素環ラジカルは、1～20個の炭素原子および1～3個のヘテロ原子（N、O、P、およびSから選択される）を含む。複素環は、3～7個の環員（2～6個の炭素原子および1～3個のヘテロ原子（N、O、P、およびSから選択される））を有する単環もしくは7～10個の環員（4～9個の炭素原子および1～3個のヘテロ原子（N、O、P、およびSから選択される））を有する二環（例えば、ピシクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、もしくは[6, 6]系）であり得る。複素環は、Paquette, Leo A.; 「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W. A. Benjamin, New York, 1968)（特に、第1章、3章、4章、6章、7章、および9章）; 「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950～最新版まで)（特に、第13巻、14巻、16巻、19巻、および28巻）; およびJ. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566に記載されている。

【0168】

複素環の例としては、例えば、ピリジル、ジヒドロキシピリジル、テトラヒドロピリジル（ピペリジル）、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、イオウ酸化型テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリジニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾシニル、トリアジニル、6H-1, 2, 5-チアジニル、2H, 6H-1, 5, 2-ジチアジニル、チエニル、チアントレニル（thianthrenyl）、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル（chromenyl）、キサンテニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-インダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シノリニル、プテリジニル（pteridiny l）、4Ah-カルバゾリル、カルバゾリル、-カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾイニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾイソキサゾリル、オキシインドリル、ベンゾオキサゾリニル、およびイサチノイル（isatinoy l）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0169】

カルボシクリル基としては、単環としての3～7個の炭素原子を有する飽和もしくは不飽和の環、もしくは二環としての7～12個の炭素原子を含む。単環式炭素環は、3～6個の環原子、さらにより代表的には、5もしくは6個の環原子を有する。二環式炭素環は、例えば、ピシクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6]もしくは[6, 6]系として配置された7～12個の環原子、またはピシクロ[5, 6]もしくは[6, 6]系として配置される9もしくは10個の環原子を有する。単環式炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペンタ-1-エニル、1-シクロペンタ-2-エニル、1-シクロペンタ-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキサ-1-エニル、1-シクロヘキサ-2-エニル、1-シクロヘキサ-3-エニル、シクロヘ

10

20

30

40

50

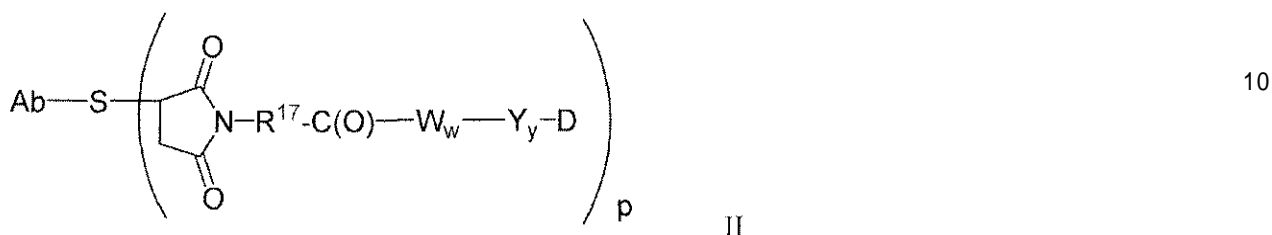
プチル、およびシクロオクチルが挙げられる。

【0170】

さらに明示的に示されないとしても、操作されたシステイン残基の数に依存して、1～4個の薬物部分が、抗体に連結される（ $p = 1 \sim 4$ ）ことが、式IのADC（例えば、I I - V）

【0171】

【化4】



の例示的实施形態の全てから理解されるべきである。

【0172】

例示的式I Iの伸長因子ユニットは、マレイミド - カプロイル（MC）：

【0173】

【化5】



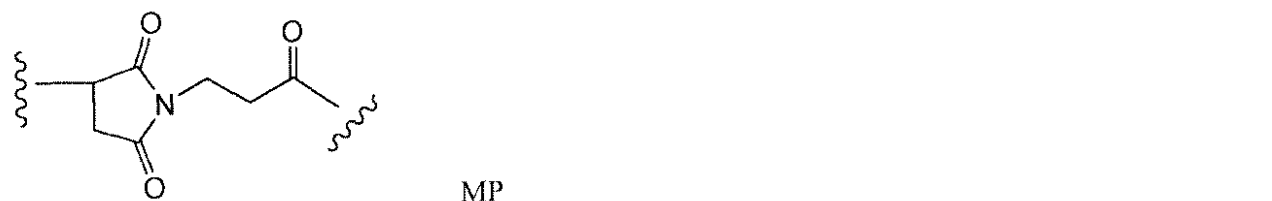
から得られ、ここで R^{17} は、 $-(CH_2)_5-$ である。

【0174】

式I Iの例示的伸長因子ユニットは、マレイミド - プロパノイル（MP）：

【0175】

【化6】



から得られ、ここで R^{17} は、 $-(CH_2)_2-$ である。

【0176】

式I Iの別の例示的伸長因子ユニット（ここで R^{17} は、 $-(CH_2CH_2O)_r - CH_2 -$ であり、 r は2である）は以下である：

【0177】

【化7】



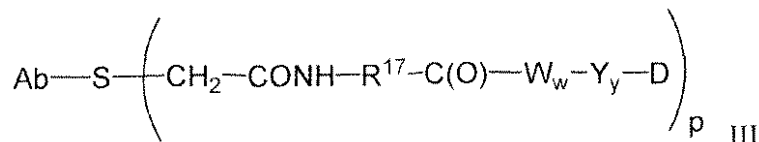
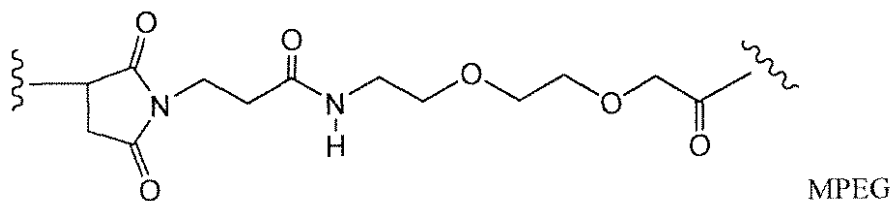
式I Iの別の例示的伸長因子ユニット（ここで R^{17} は、 $-(CH_2)_r C(O)NR_b (CH_2CH_2O)_r - CH_2 -$ であり、ここで R_b はHであり、各 r は2である）は

50

、以下のとおりである：

【 0 1 7 8 】

【 化 8 】

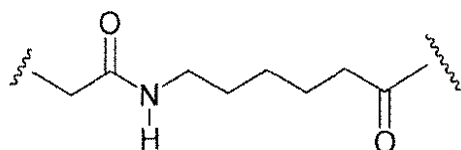


10

式 I I I の例示的伸長因子ユニット（ここで R^{17} は $-(\text{CH}_2)_5-$ である）は、以下のとおりである：

【 0 1 7 9 】

【 化 9 】

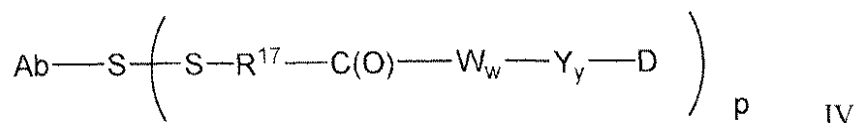


20

別の実施形態において、上記伸長因子ユニットは、上記抗体の上記操作されたシステイン硫黄原子と、上記伸長因子ユニットの硫黄原子との間のジスルフィド結合を介して、上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体に連結される。この実施形態の代表的伸長因子ユニットは、式 I V によって示され、ここで R^{17} 、 $\text{Ab}-$ 、 $-\text{W}-$ 、 $-\text{Y}-$ 、 $-\text{D}$ 、 w および y は、上記で定義されるとおりである：

【 0 1 8 0 】

【 化 1 0 】



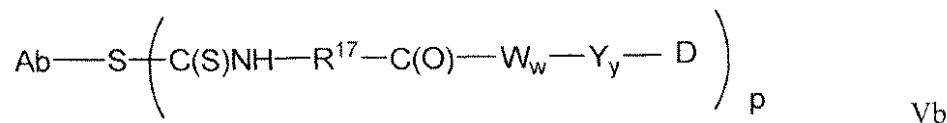
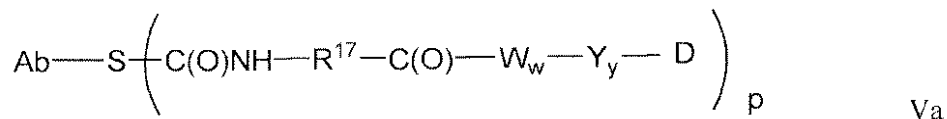
30

さらに別の実施形態において、上記伸長因子 (S t r e t c h e r) の反応性基は、抗体の遊離システインチオールと形成を形成し得るチオール反応性官能基を含む。チオール反応官能基の例としては、マレイミド、 α -ハロアセチル、活性化エステル（例えば、スクシンイミドエステル、4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル）、無水物、酸クロリド、スルホニルクロリド、イソシアネートおよびイソチオシアネートが挙げられるが、これらに限定されない。この実施形態の代表的な伸長因子ユニットは、式 V a および V b によって示され、ここで $-\text{R}^{17}$ 、 $-\text{Ab}-$ 、 $-\text{W}-$ 、 $-\text{Y}-$ 、 $-\text{D}$ 、 w および y は、上記で定義されるとおりである；

40

【 0 1 8 1 】

【化 1 1】



別の実施形態において、上記リンカーは、1個より多くの薬物部分を、分枝状の多官能性リンカー部分を介して抗体に共有結合するための樹状タイプのリンカーであり得る (Sunら (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sunら (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990)、樹状リンカーは、薬物対抗体のモル比 (すなわち、負荷 (loading)) を増大させ得、この比は、上記ADCの有効性に関する。従って、システイン操作抗体がわずか1個の反応性システインチオール基を有する場合、多くの薬物部分は、樹状リンカーを介して結合され得る。

【0182】

(アミノ酸ユニット)

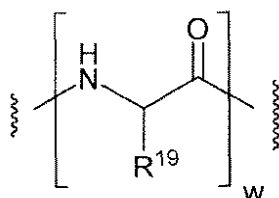
上記リンカーは、アミノ酸残基を含み得る。上記アミノ酸ユニット (-W_w-) は、存在する場合、上記抗体 (Ab) を、本発明の上記システイン操作抗体-薬物結合体 (ADC) の上記薬物部分 (D) に連結する。

【0183】

-W_w- は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチドもしくはドデカペプチドユニットである。上記アミノ酸ユニットを含むアミノ酸残基は、天然に存在するもの、およびマイナーアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸アナログ (例えば、シトルリン) を含む。各 -W- ユニットの、独立して、大括弧中の如何に示される式を有し、w は、0 ~ 12 の範囲に及ぶ整数である：

【0184】

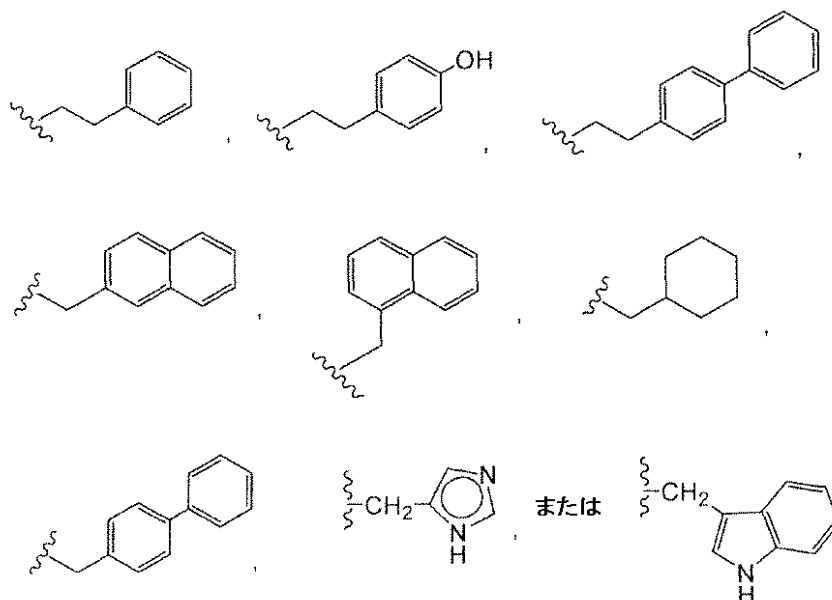
【化 1 2】



ここで R¹⁹ は、水素、メチル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、ベンジル、p-ヒドロキシベンジル、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂SCCH₃、-CH₂CONH₂、-CH₂COOH、-CH₂CH₂CONH₂、-CH₂CH₂COOH、-(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₃NH₂、-(CH₂)₃NHCOCH₃、-(CH₂)₃NHCHO、-(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₄NH₂、-(CH₂)₄NHCOCH₃、-(CH₂)₄NHCHO、-(CH₂)₃NHCONH₂、-(CH₂)₄NHCONH₂、-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、フェニル、シクロヘキシル、

【0185】

【化 13】



10

である。R₁₉ が水素以外である場合、R¹⁹ が結合される炭素原子は、キラルである。R¹⁹ が結合される各炭素原子は、独立して、(S) 配置もしくは(R) 配置において存在するか、またはラセミ混合物で存在する。アミノ酸ユニットは、従って、鏡像異性的に純粋であってもよいし、ラセミ体であってもよいし、ジアステレオマ - であってもよい。

20

【0186】

例示的な -W_w- アミノ酸ユニットとしては、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドもしくはペンタペプチドが挙げられる。例示的なジペプチドとしては、以下が挙げられる：バリン - シトルリン (v c もしくは v a l - c i t)、アラニン - フェニルアラニン (a f もしくは a l a - p h e)。例示的なトリペプチドとしては、以下が挙げられる：グリシン - バリン - シトルリン (g l y - v a l - c i t) およびグリシン - グリシン - グリシン (g l y - g l y - g l y)。アミノ酸リンカー成分を含むアミノ酸残基は、天然に存在するもの、ならびにマイナーアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸アナログ (例えば、シトルリン) が挙げられる。

30

【0187】

上記アミノ酸ユニットは、1 種以上の酵素 (腫瘍関連プロテアーゼが挙げられる) によって酵素的に切断されて、上記薬物部分 (-D) を遊離し得、上記酵素は、一実施形態において、放出する際にインビボでプロトン化されて、薬物 (D) を提供する。アミノ酸リンカー成分が設計され得、特定の酵素 (例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシン B、C および D、またはプラスミンプロテアーゼ) によって酵素的切断のためのそれらの選択性において最適化され得る。

【0188】

(スペーサーユニット)

40

上記スペーサーユニット (-Y_y-) は、存在する (y = 1 もしくは 2) 場合、アミノ酸ユニットが存在する (w = 1 ~ 12) 場合に、アミノ酸ユニット (-W_w-) を上記薬物部分 (D) に連結する。あるいは、上記スペーサーユニットは、上記アミノ酸ユニットが存在しない場合に、上記伸長因子ユニットを上記薬物部分に連結する。上記スペーサーユニットはまた、上記アミノ酸ユニットおよび伸長因子ユニットの両方が存在しない (w、y = 0) 場合、上記薬物部分を上記抗体ユニットに連結する。スペーサーユニットは、2 個の一般的タイプのものである：自壊型 (self-immolative) および非自壊型 (non self-immolative)。非自壊型スペーサーユニットは、上記スペーサーユニットの一部もしくは全てが、アミノ酸ユニットを、上記抗体薬物結合体もしくは上記薬物部分 - リンカーから切断した後 (特に、酵素的に) に、上記薬物部分

50

に結合したままであるものである。グリシン - グリシンSpacerユニットもしくはグリシンSpacerユニットを含むADCが、腫瘍細胞関連プロテアーゼを介して酵素的切断を受ける場合、癌細胞関連プロテアーゼもしくはリンパ球関連プロテアーゼ、グリシン - グリシン - 薬物部分もしくはグリシン - 薬物部分が、 $A_b - A_a - W_w -$ から切断される。一実施形態において、独立した加水分解反応は、上記標的細胞内で起こり、上記グリシン - 薬物部分結合を切断し、上記薬物を遊離させる。

【0189】

別の実施形態において、 $-Y_y-$ は、フェニレン部分が Q_m で置換された（ここで Q は、 $-C_1 - C_8$ アルキル、 $-O - (C_1 - C_8$ アルキル)、 $-$ ハロゲン、 $-$ ニトロもしくは $-$ シアノであり；そして m は、 $0 \sim 4$ の範囲に及ぶ整数である） p - アミノベンジルカルバモイル（PAB）ユニットである。

10

【0190】

非自壊型Spacerユニット（ $-Y-$ ）の例示的实施形態は、以下のとおりである： $-Gly - Gly -$ ； $-Gly -$ ； $-Ala - Phe -$ ； $-Val - Cit -$ 。

【0191】

一実施形態において、上記Spacerユニットが存在しない（ $y = 0$ ）薬物部分 - リンカーもしくはADC、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物が提供される。

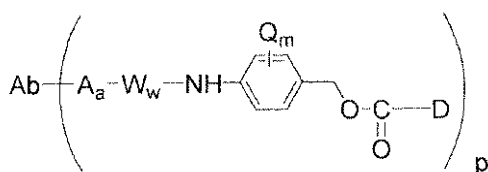
【0192】

あるいは、自壊型Spacerユニットを含むADCは、 $-D$ を放出し得る。一実施形態において、 $-Y-$ は、上記PAB基のアミノ窒素原子を介して $-W_w-$ に連結されるPAB基であり、カーボネート、カルバメートもしくはエーテル基を介して $-D$ に接続され、ここで上記ADCは、以下の例示的な構造を有する：

20

【0193】

【化14】



ここで Q は、 $-C_1 - C_8$ アルキル、 $-O - (C_1 - C_8$ アルキル)、 $-$ ハロゲン、 $-$ ニトロもしくは $-$ シアノであり； m は、 $0 \sim 4$ の範囲に及ぶ整数であり； p は、 $1 \sim 4$ の範囲に及ぶ。

30

【0194】

自壊型Spacerの他の例としては、PAB基（例えば、2 - アミノイミダゾール - 5 - メタノール誘導体）に電子的に類似の芳香族化合物（Hayら（1999）Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 2237）、複素環式PABアナログ（US 2005/0256030）、 $-$ グルクロニド（WO 2007/011968）、およびオルト - もしくはパラ - アミノベンジルアセタールが挙げられるが、これらに限定されない。Spacerが使用され、上記Spacerは、アミド結合加水分解（例えば、置換されたおよび置換されていない4 - アミノ酪酸アミド（Rodriguesら（1995）Chemistry Biology 2: 223）、適切に置換されたビスクロ[2.2.1]およびビスクロ[2.2.2]環系（Stormら（1972）J. Amer. Chem. Soc. 94: 5815）ならびに2 - アミノフェニルプロピオン酸アミド（Amsberryら（1990）J. Org. Chem. 55: 5867）の際に環化を受ける。グリシンで置換されるアミン含有薬物の排除（Kingsburyら（1984）J. Med. Chem. 27: 1447）はまた、ADCにおいて有用な自壊型Spacerの例である。

40

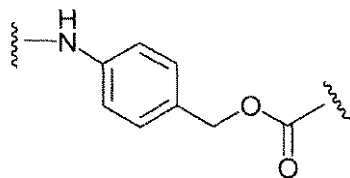
【0195】

例示的Spacerユニット（ $-Y_y-$ ）は、式X ~ XIIによって表される：

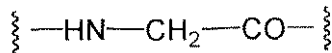
【0196】

50

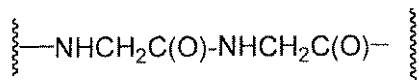
【化 15】



X



XI



XII

10

(樹状リンカー)

別の実施形態において、リンカー L は、1 個より多くの薬物部分を、分枝状の多官能性リンカー部分を介して抗体に共有結合するための樹状タイプリンカーであり得る (Sun ら (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun ら (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹状リンカーは、薬物 対 抗体のモル比 (すなわち、負荷) を増大させ得、上記比は、上記 ADC の有効性に関連する。従って、システイン操作抗体が、わずか 1 個の反応性システインチオール基を有する場合、多くの薬物部分が、樹状リンカーを介して結合され得る。分枝状の樹状リンカーの例示的实施形態としては、2, 6 - ビス (ヒドロキシメチル) - p - クレゾールおよび 2, 4, 6 - トリス (ヒドロキシメチル) - フェノールデンドリマーユニット (WO 2004/01993; Szalai ら (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689; Shamis ら (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731; Amir ら (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499) が挙げられる。

20

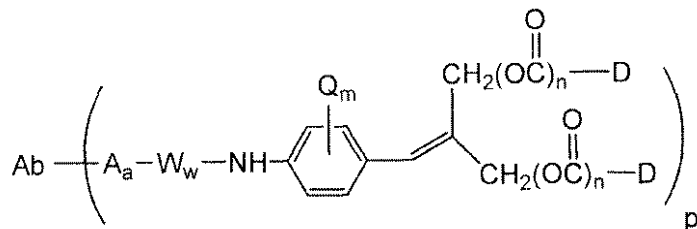
【0197】

一実施形態において、上記スペーサーユニットは、分枝状のビス (ヒドロキシメチル) スチレン (BHMS) であり、これは、2 - (4 - アミノベンジリデン) プロパン - 1, 3 - ジオールデンドリマーユニット (WO 2004/043493; de Groot ら (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494) を含む以下の構造を有する複数の薬物を組み込みかつ放出するために使用され得る：

30

【0198】

【化 16】



40

ここで Q は、-C₁-C₈ アルキル、-O-(C₁-C₈ アルキル)、-ハロゲン、-ニトロもしくは -シアノであり；m は、0 ~ 4 の範囲に及ぶ整数であり；n は 0 もしくは 1 であり；そして p は、1 ~ 4 の範囲に及ぶ。

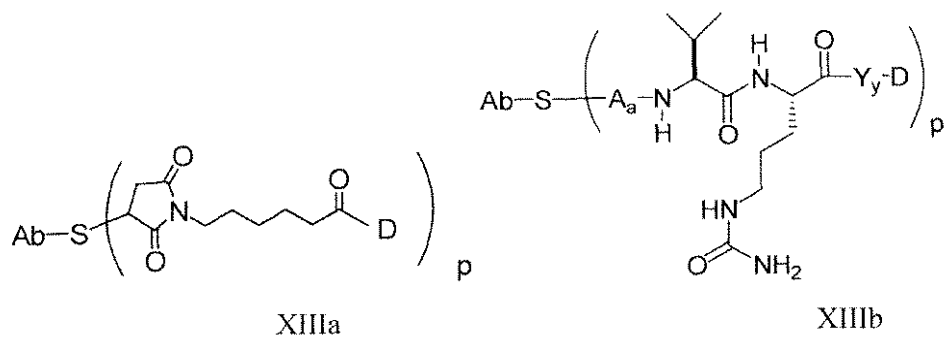
【0199】

式 I の抗体薬物結合体化合物の例示的实施形態としては、以下が挙げられる：XIIIIa (MC)、XIIIIb (val-cit)、XIIIIc (MC-val-cit)、および XIIII d (MC-val-cit-PAB)：

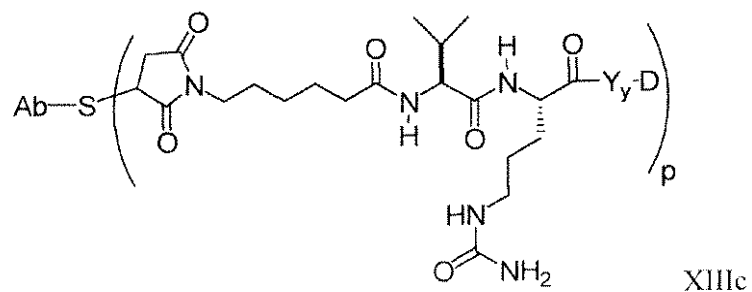
【0200】

50

【化 1 7】



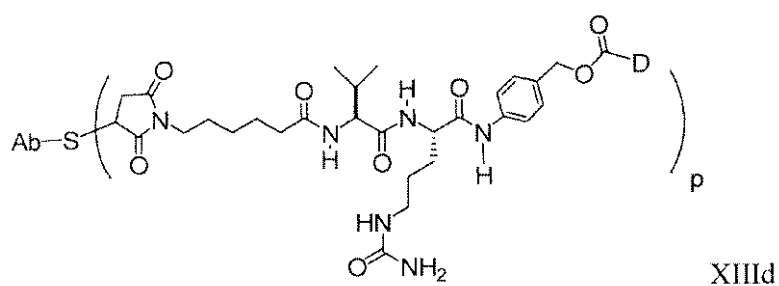
10



【 0 2 0 1】

20

【化 1 8】

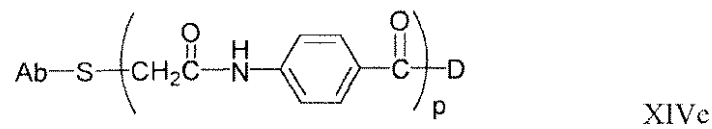
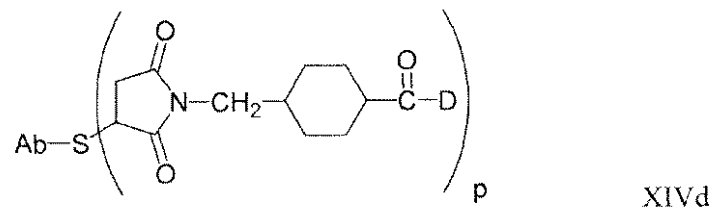
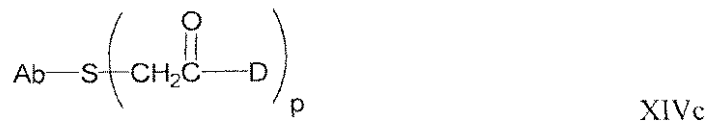
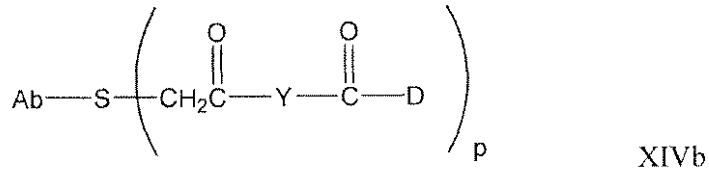
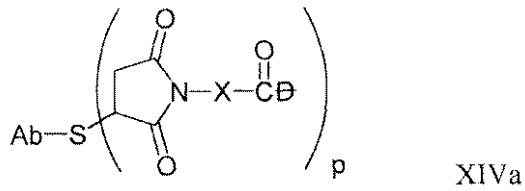


式 I a の抗体薬物結合体化合物の他の例示的实施形態は、X I V a ~ e を含み：

30

【 0 2 0 2】

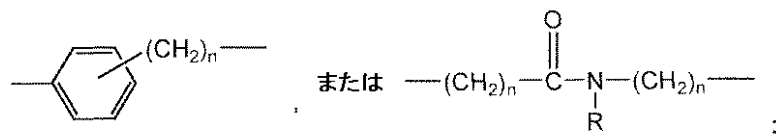
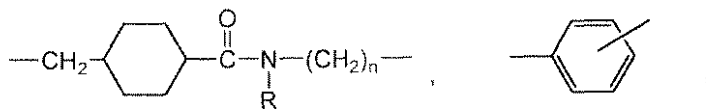
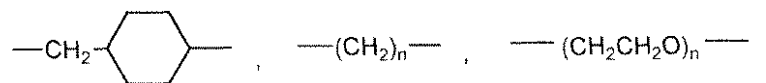
【化 19】



ここで X は :

【 0 2 0 3 】

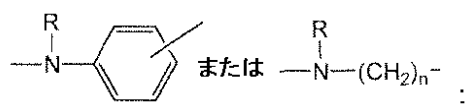
【化 20】



Y は、以下 :

【 0 2 0 4 】

【化 21】



であり、ここで R は、独立して、H もしくは C₁ - C₆ アルキルであり ; n は 1 ~ 12 である。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 5 】

別の実施形態において、リンカーは、抗体上に存在する求核性基に対して反応性である求核性基を有する反応性官能基を有する。抗体上の有用な求核性基としては、アルデヒドおよびケトンカルボニル基が挙げられるが、これらに限定されない。リンカーの求核性基の上記ヘテロ原子は、抗体上の求核性基と反応し得、そして抗体ユニットに対して共有結合を形成し得る。リンカー上の有用な求核性基としては、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドが挙げられるが、これらに限定されない。抗体上の上記求核性基は、リンカーへの結合のための都合のよい部位を提供する。

【 0 2 0 6 】

代表的には、ペプチドタイプリンカーは、2個以上のアミノ酸および/もしくはペプチドフラグメントの間にペプチド結合を形成することによって、調製され得る。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド合成の分野において周知である液相合成法 (E. S. Schroder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press) に従って、調製され得る。リンカー中間体は、スペーサー、伸長因子、およびアミノ酸ユニットを含む任意の組み合わせもしくは一連の反応で組み立てられ得る。上記スペーサー、伸長因子、およびアミノ酸ユニットは、求電子性、求核性、もしくは性質が遊離ラジカルである反応性官能基を使用し得る。反応性官能基としては、カルボキシル、ヒドロキシル、パラ-ニトロフェニルカーボネート、イソチオシアネート、および脱離基 (例えば、O-メシル、O-トシル、-Cl、-Br、-I) ; もしくはマレイミドが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 2 0 7 】

別の実施形態において、上記リンカーは、溶解度もしくは反応性を調節した基で置換され得る。例えば、荷電した置換基 (例えば、スルホネート (-SO₃-) もしくはアンモニウム) は、上記ADCを調製するために使用される合成経路に依存して、上記試薬の水溶性を増大させ得るか、上記リンカー試薬と、上記抗体もしくは上記薬物部分とのカップリング反応を促進し得るか、またはAb-L (抗体-リンカー中間体) とDとの、もしくはD-L (薬物-リンカー中間体) とAbとのカップリング反応を促進し得る。

【 0 2 0 8 】

(リンカー試薬)

上記抗体およびオーリスチチンの結合体化は、種々の二官能性リンカー試薬 (例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP)、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)、イミノチオラン (IT)、イミドエステル (例えば、ジメチルアジピミデートHCl) の二官能性誘導体、活性エステル (例えば、ジスクシンイミジルスベレート)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物 (例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート)、およびビス活性フッ素化合物 (例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)) を使用して作製され得る。

【 0 2 0 9 】

上記抗体薬物結合体はまた、以下のリンカー試薬: BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC、and sulfo-SMPB、およびSVSB (スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゼン)、および以下を含むビス-マレイミド試薬: DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、BM(PEO)₃、およびBM(PEO)₄ (これらは、Pierce Biotechnology, Inc., P.O. Box 117, Rockford,

10

20

30

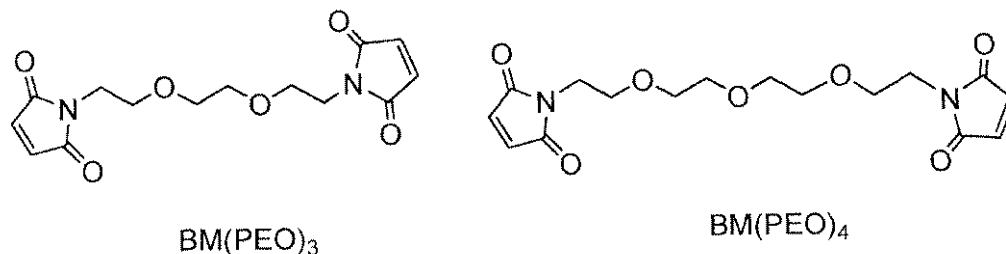
40

50

IL 61105, USA. 市販されている)で調製され得る。ビス-マレイミド試薬は、逐次的もしくは同時に起こる様式において、システイン操作抗体のチオール基を、チオール含有薬物部分、標識、もしくはリンカー中間体に結合することを可能にする。マレイミドの他の官能基(これは、システイン操作抗体、薬物部分、標識、もしくはリンカー中間体のチオール基と反応する)としては、ヨードアセトアミド、ブロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジジスルフィド、イソシアネート、およびイソチオシアネートが挙げられる。

【0210】

【化22】



10

有用なリンカー試薬はまた、他の市販の供給源(例えば、Molecular Bio sciences Inc. (Boulder, CO))を介して得られ得るか、または Tokiura (2002) J. Org. Chem. 67: 1866-1872; Walker, M. A. (1995) J. Org. Chem. 60: 5352-5355; Frisch (1996) Bioconjugate Chem. 7: 180-186; 米国特許第6214345号; WO 02/088172; US 2003130189; US 2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; および WO 04/032828に記載される手順に従って合成され得る。

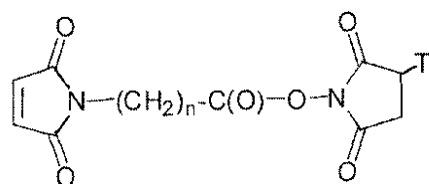
20

【0211】

式(IIIIa)の伸長因子は、以下のリンカー試薬と、上記アミノ酸ユニットのN末端とを反応させることによって、リンカーに導入され得る:

【0212】

【化23】

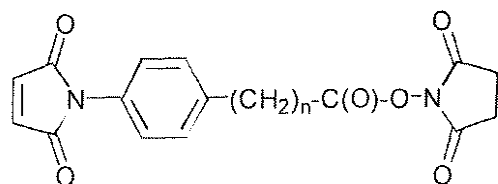


30

(ここでnは、1~10の範囲に及ぶ整数であり、Tは、-Hもしくは-SO₃Naである);

【0213】

【化24】

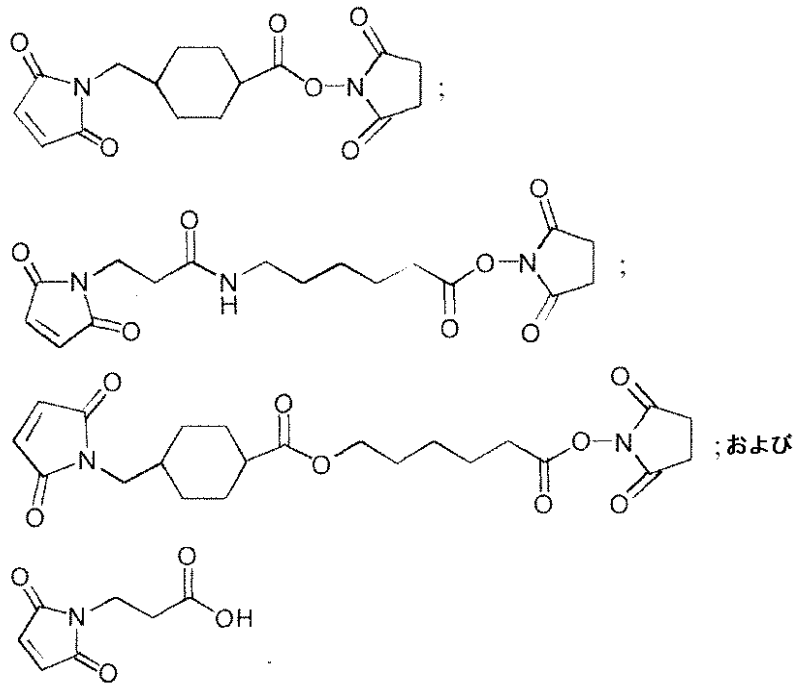


40

(ここでnは、0~3の範囲に及ぶ整数である);

【0214】

【化25】



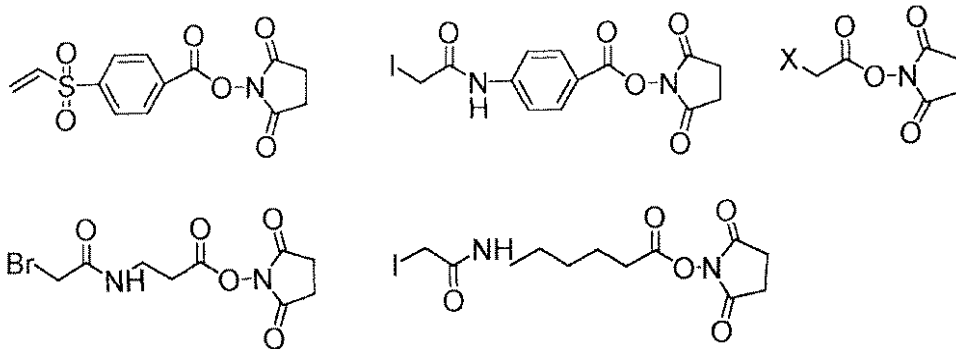
10

伸長因子ユニットは、以下の二官能性試薬と、上記アミノ酸ユニットのN末端とを反応させることによって、リンカーに導入され得る：

20

【0215】

【化26】



30

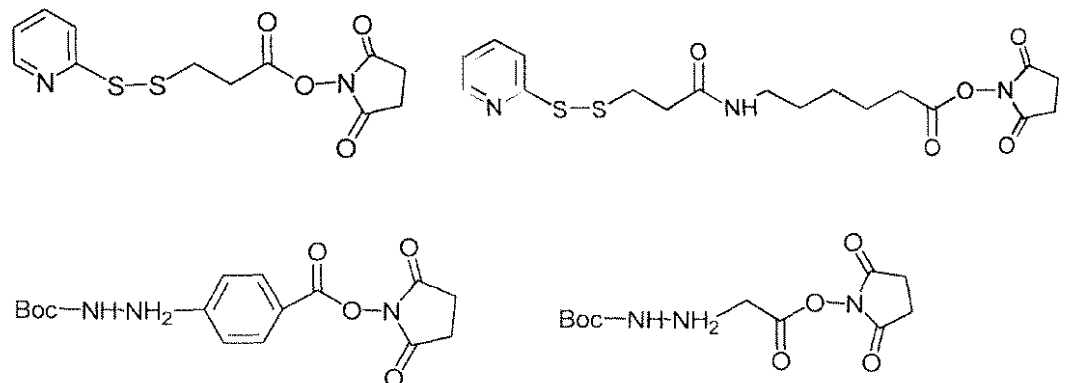
(ここでXは、BrもしくはIである)。

【0216】

式の伸長因子ユニットはまた、以下の二官能性試薬と、アミノ酸ユニットのN末端とを反応させることによって、リンカーに導入され得る：

【0217】

【化27】



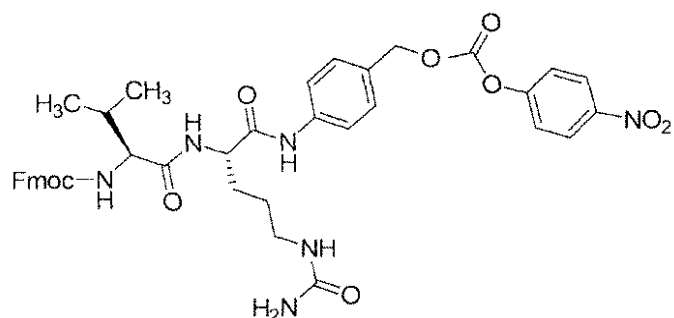
40

50

マレイミド伸長因子およびパラアミノベンジルカルバモイル (P A B) 自壊型スパーサーを有する例示的なバリン - シトルリン (v a l - c i t もしくは v c) ジペプチドリンカー試薬は、以下の構造を有する：

【 0 2 1 8 】

【化 2 8】

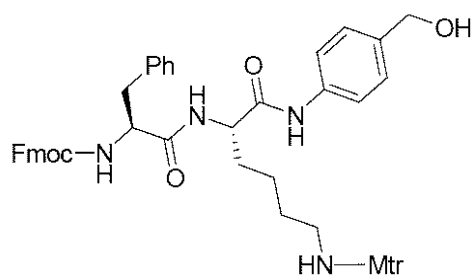


10

マレイミド伸長因子ユニットおよびPAB自壊型スパーサーユニットを有する例示的なp h e - l y s (M t r、モノ - 4 - メトキシトリチル)ジペプチドリinker試薬は、D u b o w c h i k ら (1 9 9 7) T e t r a h e d r o n L e t t e r s , 3 8 : 5 2 5 7 - 6 0 に従って調製され得、以下の構造を有する：

【 0 2 1 9 】

【化 2 9】



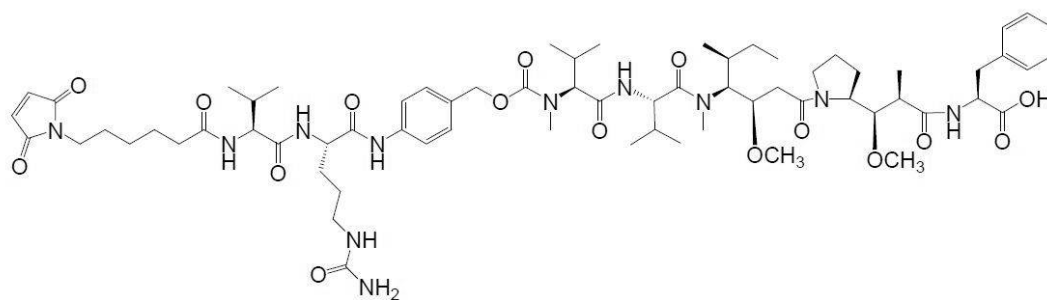
20

例示的な薬物 - リンカー中間体は、以下を含む：

【 0 2 2 0 】

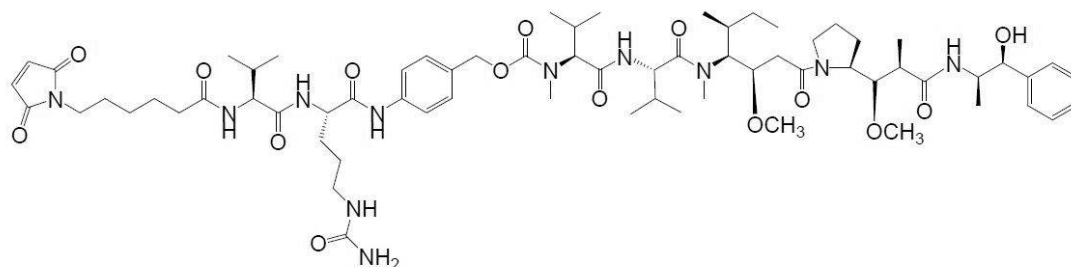
30

【化 3 0】



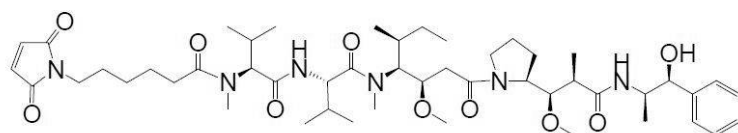
MC-val-cit-PAB-MMAF

10

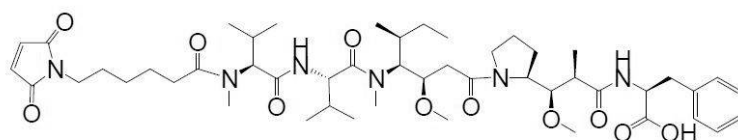


MC-val-cit-PAB-MMAE

20



MC-MMAE



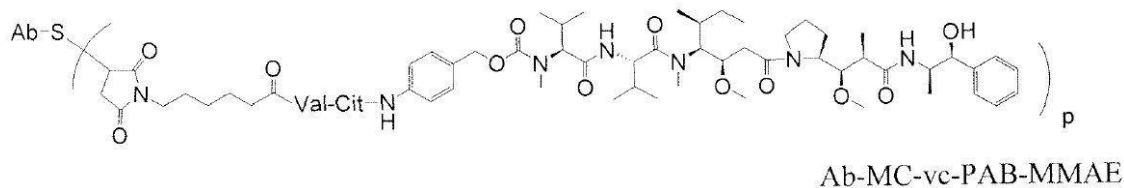
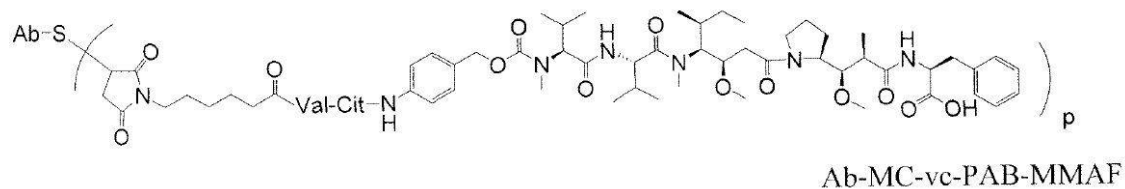
MC-MMAF

30

本発明の例示的な抗体薬物結合体化合物は、以下を含む：

【 0 2 2 1】

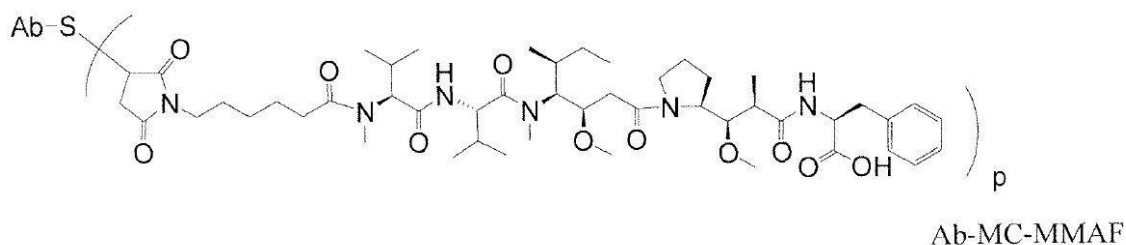
【化 3 1】



10



20



ここでValはバリンであり；Citはシトルリンであり；pは、1、2、3、もしくは4であり；そしてAbは、システイン操作抗TENB2抗体である。

30

【0222】

(システイン操作抗TENB2抗体 - 薬物結合体の調製)

式IのADCは、当業者に公知の有機化学反応、条件、および試薬を使用して、以下を含むいくつかの経路によって調製され得る：(1)抗体 - リンカー中間体Ab-Lを、共有結合を介して形成し、続いて、活性化薬物部分Dと反応させるための、システイン操作抗体のシステイン基と、リンカー試薬との反応；および(2)薬物 - リンカー中間体D-Lを、共有結合を介して形成し、続いて、システイン操作抗体のシステイン基と反応させるための、薬物部分の求核性基と、リンカー試薬との反応。結合方法(1)および(2)は、種々のシステイン操作抗体、薬物部分、およびリンカーとともに使用して、式Iの抗体薬物結合体を調製し得る。

40

【0223】

抗体システインチオール基は、求核性でありかつリンカー試薬および薬物 - リンカー中間体上の求核性基で共有結合を形成するように反応し得、上記求核性基としては、以下が挙げられる：(i)活性エステル(例えば、NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、および酸ハライド)；(ii)アルキルハライドおよびベンジルハライド(例えば、ハロアセトアミド)；(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基；ならびに(iv)スルフィド交換を介するジスルフィド(ピリジルジスルフィドが挙げられる)。薬物部分上の求核性基としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオ

50

セミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジド基。これらは、リンカー部分およびリンカー試薬上の求核性基と共有結合を形成するために反応し得る。

【0224】

システイン操作抗体は、還元剤（例えば、DTT（クリーランド試薬、ジチオスレイトール）もしくはTCEP（トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィンヒドロクロリド；Getzら（1999）Anal. Biochem. Vol. 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA）での処理、続いて、再度酸化して、鎖間および鎖内ジスルフィド結合を再形成することによって、リンカー試薬との結合体

10

化に対して反応性にされ得る（実施例2）。例えば、CHO細胞において発現された全長システイン操作モノクローナル抗体（チオMab）は、TCEPの約50倍過剰で、37で3時間にわたって還元されて、上記新たに導入されたシステイン残基と、上記培養培地中に存在するシステインとの間で形成し得るシステイン付加物におけるジスルフィド結合を還元する。上記還元されたチオMabは希釈され、10mM 酢酸ナトリウム、pH 5中のHiTrap Sカラムに載せられ、0.3M 塩化ナトリウム含有PBSで溶出される。ジスルフィド結合を、上記親Mabに存在するシステイン残基の間で、希（200nM）硫酸銅（CuSO₄）水溶液を用いて室温において一晩で再確立した。あるいは、デヒドロアスコルビン酸（DHAA）は、上記システイン付加物の還元的切断を後に、上記システイン操作抗体の鎖内ジスルフィド基を再確立するための有効な酸化体である。他の酸化体（すなわち、酸化剤）、および当該分野で公知の酸化条件は、使用され得る。周囲の空気による酸化もまた、有効である。この温和な、部分的再酸化工程は、高い信頼性で効率的に鎖内ジスルフィドを形成し、上記新たに導入されたシステイン残基のチオール基を保存する。抗体（新たに導入されたシステイン残基と比較して約1.5倍過剰）と比較して、薬物-リンカー中間体（例えば、MC-vc-PAB-MMAE）のほぼ3倍過剰がを、添加し、混合し、そして室温において約1時間放置して、結合体化を行い、上記TMEFF2#19抗TENB2抗体-薬物結合体を形成した。上記結合体混合物をゲル濾過し、HiTrap Sカラムに載せて、溶出して、過剰の薬物-リンカー中間体および他の不純物を除去した。

20

【0225】

図6は、結合体化のために細胞培養物から発現されたシステイン操作抗体を調製するための一般的プロセスを示す。上記細胞培養培地がシステインを含む場合、ジスルフィド付加物が、上記新たに導入されたシステインアミノ酸と、培地由来のシステインとの間に形成し得る。これらシステイン付加物（図6の例示的チオMab（左）において丸で示される）は、結合体化に対して反応性のシステイン操作抗体を生成するためには、還元されなければならない。システイン付加物は、（おそらく、種々の鎖間ジスルフィド結合と一緒に）、還元的に切断されて、還元剤（例えば、TCEP）により上記抗体の還元形態を与える。対形成したシステイン残基間の鎖間ジスルフィド結合は、硫酸銅、DHAA、もしくは周囲酸素への曝露により、部分的酸化条件下で再形成される。上記新たに導入され、操作されかつ対形成していないシステイン残基は、本発明の抗体結合体を形成するために、リンカー試薬もしくは薬物-リンカー中間体との反応に利用可能なままである。哺乳動物細胞株において発現された上記チオMabは、-S-S-結合形成を介して操作されたCysに対して、外部に結合体化されたCys付加物を生じる。従って、上記精製チオMabは、実施例2に記載されるように、還元および再酸化手順で処理して、反応性チオMabを生成する。これらチオMabは、細胞傷害性薬剤、フルオロフォア、および他の標識を含むマレイミドとの結合体化するために使用される。

30

40

【0226】

システイン操作抗体薬物結合体反応の分析は、鎖間もしくは鎖内ジスルフィド結合の還元、続いて、チオール反応性薬物リンカー中間体との結合体化（標準的ADC）によって調製される抗体薬物結合体に対して、不均一性を低下させた。

【0227】

50

(スクリーニング方法)

本発明のさらに別の実施形態は、上記 T E N B 2 ポリペプチドを含むと推測されるサンプル中において、T E N B 2 ポリペプチドの存在を決定するための方法に関し、ここで上記方法は、上記サンプルを、上記 T E N B 2 ポリペプチドに結合するシステイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体に曝す工程、および上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体の、上記サンプル中に上記 T E N B 2 ポリペプチドへの結合を決定する工程を包含し、ここでこのような結合の存在は、上記サンプル中の上記 T E N B 2 ポリペプチドの存在を示す。必要に応じて、上記サンプルは、上記 T E N B 2 ポリペプチドを発現すると推測される細胞（これは、癌細胞であり得る）を含み得る。上記方法において使用される上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体は、必要に応じて、検出可能に標識され得るか、固体支持体に結合され得るなどであり得る。

10

【0228】

本発明の別の実施形態は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断するための方法に関し、ここで上記方法は、(a) 上記哺乳動物から得られる組織細胞を含む試験サンプルと、T E N B 2 ポリペプチドに結合するシステイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体とを接触させる工程、および (b) 上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体と、上記試験サンプル中の T E N B 2 ポリペプチドとの間の複合体の形成を検出する工程を包含し、ここで上記複合体の形成は、哺乳動物における腫瘍の存在を示す。必要に応じて、上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体は、検出可能に標識されるか、固体支持体に結合されるなど、および/または組織細胞の上記試験サンプルは、癌性腫瘍を有すると推測される固体から得られる。

20

【0229】

(インビトロ細胞増殖アッセイ)

本発明の一実施形態は、T E N B 2 ポリペプチドを発現する再紡の増殖を阻害するための方法に関し、ここで上記方法は、上記細胞と、システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体とを接触させて、上記 T E N B 2 ポリペプチドが、上記 T E N B 2 を発現する再紡の増殖の阻害を引き起こす工程を包含する。上記細胞は癌細胞であり得、上記システイン操作抗体もしくはその抗体薬物結合体の、上記 T E N B 2 ポリペプチドへの結合は、上記 T E N B 2 ポリペプチドを発現する再紡の死滅を引き起こす。

30

【0230】

一般に、抗体薬物結合体 (A D C) の上記細胞傷害性活性もしくは細胞増殖抑制性活性は、以下によって測定される：T E N B 2 ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞を、細胞培養培地中の A D C に曝すこと；上記細胞を、約 6 時間～約 5 日間の期間にわたって培養すること；および細胞生存性を測定すること。細胞増殖アッセイに有用な哺乳動物細胞としては、以下が挙げられる：(1) T E N B 2 ポリペプチド発現 L u C a P 7 7 腫瘍異種移植片；(2) 上記 T E N B 2 ポリペプチドの一部を細胞表面に安定に発現するように操作された P C 3 由来細胞株 (P C 3 / T E N B 2)；および (3) T E N B 2 ポリペプチドを発現しない P C 3 細胞株 (P C 3 / n e o)。細胞ベースのインビトロアッセイは、本発明の A D C の生存性 (増殖)、細胞傷害性、およびアポトーシスの誘導 (カスパーゼ活性化) を測定するために使用される。

40

【0231】

(薬物動態 - 血清クリアランスおよび安定性)

上記抗 T E N B 2 抗体 - 薬物結合体のインビボでの配置を、S p r a g u e - D a w l e y ラットに 1 回の静脈内ボラス投与の後に、抗体のおよび薬物結合体の血清濃度を測定することによって、分析した。少なくとも 1 個の細胞傷害性薬物を有する抗体薬物結合体の濃度は、捕捉のための抗 M M A E を、ならびに検出のためのビオチン化 T E N B 2 細胞外ドメイン (E C D) およびストレプトアビジン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) を使用した E L I S A で測定した。血清中の合計の T M E F F 2 # 1 9 およびチオ T M E F F 2 # 1 9 濃度を、捕捉のための T E N B 2 E C D を、および 2 次抗体として抗

50

ヒト - F c H R P を使用した E L I S A で測定した。このアッセイは、任意の抗 T E N B 2 抗体（結合体化 M M A E ありおよびなしの両方）を測定した。上記アッセイは、1 : 1 0 0 の最低希釈で、1 6 . 4 n g / m L の定量の下限を有する。各動物からの上記血清濃度 - 時間データは、I V ボーラス投入を用いた 2 区画モデル、一次排除、およびマクロ速度定数 (m a c r o - r a t e c o n s t a n t) を使用して分析した (M o d e l 8 , W i n N o n l i n P r o v . 5 . 0 . 1 , P h a r s i g h t C o r p o r a t i o n , M o u n t a i n V i e w , C A) 。適合の全体的な良好さは、推定された概算値、推定についての標準誤差、ならびに一次パラメーターおよび二次パラメーターに対する変動係数のパーセンテージ、ならびに観察された濃度 - 時間データと推定された濃度 - 時間データとの間の残りのプロットの検査に基づいた。個々の一次 P K パラメーターは、それぞれ、相および相と関連するゼロ時切片 (A および B) 、ならびにミクロ速度定数 (m i c r o - r a t e c o n s t a n t) を含んでいた (および得。以下のモデリング選択肢を使用した：初期概算値を、W i n N o n l i n を使用して決定した；濃度を、推定平方濃度の逆数

【数 1】

$$(1/\hat{y}^2)$$

によって秤量した；N e l d e r - M e a d 最小化アルゴリズムを使用した。以下の P K パラメーターを報告した：

【数 2】

AUC_{0INF}

、C L、C_{m a x}、M R T、t_{1 / 2 , a}、t_{1 / 2 , b}、V₁ および V_{s s}。

【0 2 3 2】

ラットにおける 2 8 日の薬物動態分析の結果を、図 1 5 に示す、ラットに、5 m g / k g 体重 チオ T M E F F 2 # 1 9 - V C - M M A E もしくは 5 m g / k g T M E F F 2 # 1 9 - V C - M M A E を投与した。ラット由来の血清を、投与後 5 分、1 時間、6 時間、2 4 時間、および 2 日、3 日、4 日、8 日、1 1 日、1 5 日、2 1 日、および 2 8 日で集めた。動態の用量直線性を、0 . 5 ~ 5 m g / k g 用量の間の c h T M E F F 2 # 1 9 - V C - M M A E に対して観察したので、上記 5 m g / k g 用量データを、チオ T M E F F 2 # 1 9 - V C - M M A E との比較のために、5 m g / k g の推定データを反映するように算術的に変換した。

【0 2 3 3】

(齧歯類毒性)

システイン操作抗 T E N B 2 抗体 - 薬物結合体の毒性を、急性毒性ラットおよびカニクイザルモデルにおいて評価した。A D C の毒性を、雌性 S p r a g u e - D a w l e y ラットおよびカニクイザルの、上記 A D C での処置、およびその後の検査および種々の器官の効果の分析によって調査した。肉眼的観察 (体重) 、臨床的病理パラメーター (血清化学および血液学) および組織病理学に基づいて、A D C の上記毒性が、観察され得、特徴付けられ得、そして測定され得る。等しい用量レベルにおいて、標的依存性効果が見られないことが見いだされた。標的非依存性毒性を、動物腫瘍モデルにおいて有効用量を超える用量において観察された。

【0 2 3 4】

(処置方法)

本発明の別の実施形態は、T E N B 2 ポリペプチドを発現する再紡を含む癌性腫瘍を有する哺乳動物を治療的に処置するための方法に関し、ここで上記方法は、上記哺乳動物に、上記 T E N B 2 ポリペプチドに結合するシステイン操作抗体、もしくはその抗体薬物結合体の治療上有効な量を投与し、それによって、上記腫瘍の治療的処置を生じる工程を包含する。

【0 2 3 5】

本発明の別の実施形態は、T E N B 2 ポリペプチドの活性の変化した、好ましくは増大

10

20

30

40

50

した発現もしくは活性と関連する細胞増殖障害を、処置もしくは予防するための方法に関し、上記方法は、このような処置が必要な被験体に、有効量のシステイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体を投与する工程を包含する。例示的な細胞増殖障害は癌である。上記細胞増殖障害の有効な処置もしくは予防は T E N B 2 ポリペプチドを発現する細胞の直接的死滅もしくは増殖阻害の結果、T E N B 2 ポリペプチドの細胞増殖強化活性を、上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体と拮抗させることによってまたはであり得る。

【 0 2 3 6 】

本発明のさらに別の実施形態は、システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体を、T E N B 2 ポリペプチドを発現する細胞に結合するための方法に関し、ここで上記方法は、T E N B 2 ポリペプチドを発現する細胞と、上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体とを、上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体の、上記 T E N B 2 ポリペプチドへの結合に適した条件下で接触させる工程、ならびにそれらの間の結合を可能にする工程を包含する。好ましい実施形態において、上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体は、上記システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体の、位置および / もしくは上記細胞への結合の量を定性的および / もしくは定量的に決定するために有用である分子もしくは化合物で標識される。

10

【 0 2 3 7 】

本発明の他の実施形態は、(i) 癌もしくは腫瘍の治療的処置もしくは診断的検出、または (i i) 細胞増殖障害の治療的処置もしくは予防に有用な医薬の調製における、システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体の使用に関する。

20

【 0 2 3 8 】

本発明の別の実施形態は、癌細胞の増殖を阻害するための方法に関し、ここで上記癌細胞の増殖は、少なくとも一部、T E N B 2 ポリペプチドの増殖強化効果に依存し、ここで上記方法は、T E N B 2 ポリペプチドと、システイン操作抗 T E N B 2 抗体、もしくはその抗体薬物結合体とを接触させ、それによって、上記 T E N B 2 ポリペプチドの増殖強化活性を拮抗させ、続いて、上記癌細胞の増殖を阻害する工程を包含し、それによって、上記癌細胞の増殖が阻害される。

【 0 2 3 9 】

30

本発明の別の実施形態は、哺乳動物における腫瘍を治療的に処置するための方法に関し、ここで上記腫瘍の増殖は、少なくとも一部、T E N B 2 ポリペプチドの増殖強化効果に依存し、ここで上記方法は、上記哺乳動物に、治療上有効な量の、上記 T E N B 2 ポリペプチドに結合する抗 T E N B 2 システイン操作抗体、もしくはその抗体薬物結合体を投与する工程を包含し、それによって、上記 T E N B 2 ポリペプチドの増殖強化活性を拮抗し、上記腫瘍の有効な治療的処置を生じる。

【 0 2 4 0 】

上記抗体、抗体フラグメント、およびその結合体は、細胞外液へと放出される形質膜 T E N B 2 タンパク質の細胞外エピトープを認識する。本発明は、上記抗体、抗体フラグメントおよび結合体を使用して、悪性疾患（例えば、乳癌および卵巣癌）の検出、モニタリングおよび処置のための方法をさらに提供する。

40

【 0 2 4 1 】

本発明の抗体薬物結合体 (A D C) は、種々の疾患もしくは障害を処置するために使用され得る（例えば、T E N B 2 腫瘍抗原の過剰発現によって特徴付けられ得る）。例示的な状態もしくは過剰増殖障害としては、良性腫瘍もしくは悪性腫瘍（前立腺癌を含む）が挙げられる。

【 0 2 4 2 】

上記動物モデルおよび細胞ベースのアッセイにおいて同定される上記 A D C 化合物は、腫瘍保有高等霊長類およびヒトの臨床試験においてさらに試験され得る。上記臨床試験は、A D C の効力を、既知の治療レジメン（例えば、公知の化学療法剤および / もしくは細

50

胞傷害性薬剤を伴う照射および／もしくは化学療法）と組み合わせて評価するように設計され得る。

【0243】

一般に、処置されるべき上記疾患もしくは障害は、癌のような過剰増殖障害である。本明細書において処置されるべき癌の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病もしくはリンパ系悪性疾患。このような癌のより具体的な例としては、扁平上皮癌（例えば、扁平上皮癌（epithelial squamous cell cancer））、肺癌（including 小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌（squamous carcinoma of the lung））、腹膜の癌、肝細胞がん、胃癌（gastric or stomach cancer）（胃腸癌を含む）、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌もしくは子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌（kidney or renal cancer）、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭頸部癌が挙げられる。

10

【0244】

疾患の予防もしくは処置のために、適切な用量のADCは、処置されるべき疾患のタイプ（上記のような）、上記疾患の重篤度および経過、上記分子が予防目的で投与されるのか、治療目的で投与されるのか、以前の治療、上記患者の臨床的履歴および上記抗体に対する応答、ならびに主治医の判断に依存する。上記分子は、上記患者に一度に、もしくは一連の処置にわたって、適切に投与される。上記疾患のタイプおよび重篤度に依存して、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1\sim20\text{mg}/\text{kg}$ ）の分子が、例えば、1回以上の別個の投与によろうが、または連続注入によろうが、上記患者への投与のための最初の候補投与量である。代表的な一日用量は、前述の要因に依存して、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲に及び得る。患者に投与されるべきADCの例示的な用量は、約 $0.1\sim10\text{mg}/\text{kg}$ 患者体重の範囲内である。

20

【0245】

数日もしくはそれ以上にわたる反復投与については、状態に依存して、上記処置は、疾患の症状の望ましい抑制が起こるまで持続される。例示的な投与レジメンは、約 $4\text{mg}/\text{kg}$ の初期負荷用量、続いて、約 $2\text{mg}/\text{kg}$ の抗TENN2抗体の1週間に1回の維持用量を投与する工程を包含する。他の投与レジメンも、有用であり得る。この治療の目的は、従来の技術およびアッセイ（超音波画像化を含む）によって容易にモニターされる。

30

【0246】

（抗体薬物結合体の投与）

本発明の抗体薬物結合体（ADC）は、処置されるべき状態に適した任意の経路によって投与され得る。上記ADCは、代表的には、非経口的に（すなわち、注入、皮下、腹腔内、筋肉内、静脈内、皮内、鞘内および硬膜外）投与される。

【0247】

（薬学的処方物）

本発明の治療的抗体薬物結合体（ADC）の薬学的処方物は、代表的には、非経口投与（すなわち、薬学的に受容可能な非経口的ビヒクルとともに、単位投与量、滅菌注射用形態において、ボーラス注射、静脈内注射、腫瘍内注射）のために調製される。望ましい程度の純度を有する抗体薬物結合体（ADC）は、凍結乾燥処方物もしくは水性溶液の形態において、必要に応じて、薬学的に受容可能な希釈剤、キャリア、賦形剤、もしくは安定化剤と混合される（Remington's Pharmaceutical Sciences（1980）第16版，Osol，A．編）。

40

【0248】

受容可能な希釈剤、キャリア、賦形剤、および安定化剤は、使用される投与量および濃度において、レシipientに対して非毒性であり、緩衝化剤（例えば、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸）；抗酸化剤（アスコルビン酸およびメチオニンを含む）；保存

50

剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド）；ヘキサメトニウムクロリド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン（例えば、メチルパラベンもしくはプロピルパラベン）；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン）；単糖類、二糖類および他の炭水化物（グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む）；キレート化剤（例えば、EDTA）；糖（例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および/または非イオン性界面活性剤（例えば、TWEENTM、PLURONICSTMもしくはポリエチレングリコール（PEG））が挙げられる。

10

【0249】

上記活性な薬学的成分はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、もしくは界面重合化によって調製されるマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセル、およびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）中に、コロイド性薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）中に、またはマクロエマルジョン中に、捕捉され得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版, Osol, A. 編(1980)で開示されている。

20

【0250】

徐放性調製物は、が調製され得る。徐放性調製物の適切な例は、上記ADCを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクス（このマトリクスは、成形物品（例えば、フィルム、もしくはマイクロカプセル）の形態で存在する）を含む。徐放性マトリクスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、もしくはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸とD-エチル-L-グルタミン酸塩とのコポリマー、非分解性エチレン-ビニルアセテート、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（例えば、LUPRON DEPOSITTM（乳酸-グリコール酸コポリマーおよびロイプロリドアセテートから構成される注射用マイクロスフェア）、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

30

【0251】

上記処方物は、前述の投与経路に適したものを含む。上記処方物は、便利なことには、単位投与形態で存在し得、製薬の分野で周知の方法のうちのいずれかによって調製され得る。技術および処方物は、一般に、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA)に見いだされる。このような方法は、上記活性成分と1種以上の補助成分を構成する上記キャリアとを会合させる工程を包含する。一般に、上記処方物は、上記活性成分と、液体キャリアもしくは微細に分割した固体キャリアもしくはその両方とを、均質にかつ完全に会合させ、必要であれば、製品に成形することによって、調製される。

40

【0252】

本発明の水性懸濁物は、水性懸濁物の製造に適した賦形剤と混合した状態で、上記活性物質を含む。このような賦形剤としては、懸濁剤（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クロスカルメロース、ポピドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム、およびアカシアガム、ならびに分散剤もしくは湿潤剤（例えば、天然に存在するホスファチド（例えば、レシチン））、アルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンステアレー）、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物

50

(例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール)、エチレンオキシドと、脂肪酸およびヘキシトール無水物から得た部分エステルとの縮合生成物(例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート)が挙げられる。上記水性懸濁物はまた、1種以上の保存剤(例えば、エチルもしくはn-プロピル p-ヒドロキシ-ベンゾエート)、1種以上の着色剤、1種以上の矯味矯臭剤および1種以上の甘味剤(例えば、スクロースもしくはサッカリン)を含み得る。

【0253】

A D Cの薬学的組成物は、滅菌注射用調製物(例えば、滅菌注射用水性懸濁物もしくは油性懸濁物)の形態で存在し得る。この懸濁物は、上記で言及した適切な分散剤もしくは湿潤剤および懸濁剤を使用して、公知の技術に従って処方され得る。上記滅菌注射用調製物はまた、非毒性の非経口的に受容可能な希釈剤もしくは溶媒中の滅菌注射用溶液もしくは懸濁物(例えば、1,3-ブタン-ジオール中の溶液)であり得るか、もしくは凍結乾燥粉末として調製され得る。使用され得る受容可能なビヒクルおよび溶媒の中には、水、リンゲル溶液および等張性塩化ナトリウム溶液がある。さらに、滅菌不揮発性油は、溶媒もしくは懸濁媒体として従来どおりに使用され得る。この目的のために、任意の低刺激性の不揮発性油が使用され、それらとしては、合成モノグリセリドもしくはジグリセリドが挙げられる。さらに、脂肪酸(例えば、オレイン酸)は、注射用物の調製において、同様に使用され得る。

【0254】

上記キャリア物質とあわされて、単一の投与形態を生成する活性成分の量は、処置される宿主および特定の投与様式に依存して変動する。例えば、静脈内投与について意図された水性溶液は、約30 mL/時間の速度での適切な容積の注入が生じるように、溶液1 mLあたり約3~500 μgの活性成分を含み得る。

【0255】

非経口投与に適した処方物は、水性および非水性の滅菌注射溶液(これら溶液は、抗酸化剤、緩衝化剤、静菌剤、および上記処方物を、意図されたレシビエントの血液と等張にする溶質を含み得る)；ならびに水性および非水性の滅菌懸濁物(これら懸濁物は、懸濁剤および濃化剤を含み得る)を含む。

【0256】

タンパク質治療剤の経口投与は、兆における加水分解もしくは変性に起因して嫌われているが、経口投与に適したA D Cの処方物は、別個の単位(例えば、カプセル剤、カシェもしくは錠剤(各々は、上記A D Cの所定の量を含む))として調製され得る。

【0257】

上記処方物は、単位用量もしくは複数用量の容器(例えば、密封されたアンプルおよびバイアル)中にパッケージされ得、そして使用直前に注射用の滅菌液体キャリア(例えば、水)の添加のみを要する凍結乾燥状態において貯蔵され得る。即席の注射溶液および懸濁物は、以前に記載された種類の滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製される。好ましい単位投与処方物は、上記のように、上記活性成分の1日用量もしくは単位1日分割用量(unit daily sub-dose)、もしくはその適切な小部分を含むものである。

【0258】

本発明の組成物はまた、イムノリポソームとして処方され得る。「リポソーム」は、薬物を哺乳動物に送達するのに有用な、種々のタイプの脂質、リン脂質および/もしくは界面活性剤から構成される小さな小胞である。上記リポソームの成分は、生物学的膜の脂質配置に類似した二層形態において一般に配置される。上記抗体を含むリポソームは、当該分野で公知の方法(例えば、Epsteinら(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwangら(1980)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; 米国特許第4485045号; 同第4544545号; 同第5013556号; WO 97/38731に記載される)によって調製される。リポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化

10

20

30

40

50

ホスファチジルエタノールアミン (P E G - P E) を含む脂質組成物との逆相エバポレーション法によって生成され得る。リポソームは、規定の孔サイズのフィルタを通して押し出されて、所望の直径を有するリポソームを生じ得る。本発明の組成物の F a b ' フラグメントは、ジスルフィド交換反応を介して、リポソームに結合体化され得る (M a r t i n ら (1 9 8 2) J . B i o l . C h e m . 2 5 7 : 2 8 6 - 2 8 8) 。化学療法剤は、必要に応じて、上記リポソーム内に含まれる (G a b i z o n ら (1 9 8 9) J . N a t i o n a l C a n c e r I n s t . 8 1 (1 9) : 1 4 8 4) 。

【 0 2 5 9 】

(併用療法)

本発明の抗体薬物結合体 (A D C) は、薬学的組み合わせ処方物において、もしくは抗癌特性を有する第 2 の化合物との併用療法としての投与レジメンにおいて、組み合わせられ得る。上記薬学的組み合わせ処方物もしくは投与レジメンの第 2 の化合物は、好ましくは、上記組み合わせが互いに有害に影響しないように、上記組み合わせの A D C に対して補完的な活性を有する。

【 0 2 6 0 】

上記第 2 の化合物は、化学療法剤、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、増殖阻害性薬剤、抗ホルモン剤、および/もしくは心臓保護剤 (c a r d i o p r o t e c t a n t) であり得る。このような分子は、意図された目的に有効である量で、適切に、組み合わせにおいて存在する。本発明の A D C を含む薬学的組成物はまた、治療上有効な量の化学療法剤 (例えば、チューブリン形成インヒビター、トポイソメラーゼインヒビター、DNA インターカレーター、もしくは DNA 結合剤) を有し得る。

【 0 2 6 1 】

他の治療的レジメンは、本発明に従って同定された抗癌剤の投与と併用され得る。上記併用療法は、同時もしくは逐次的レジメンとして投与され得る。逐次的に投与される場合、上記併用は、2 回以上の投与において投与され得る。上記組み合わせた投与は、別個の処方物もしくは単一の薬学的処方物を使用する同時投与、およびいずれかの順番での連続投与を含み、ここで好ましくは、両方 (もしくは全ての) 活性薬剤は、それらの生物学的活性を同時に発揮する一定期間存在する。

【 0 2 6 2 】

一実施形態において、A D C での処置は、システイン操作抗 T E N B 2 抗体もしくはその抗体薬物結合体、および 1 種以上の化学療法剤、治療的生物製剤、もしくは増殖阻害薬剤の組み合わせた投与 (異なる化学療法剤のカクテルの同時投与を含む) を含む。化学療法剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない : タキサン (例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル) ; 白金含有化合物 (例えば、カルボプラチン) ; E G F R インヒビター (例えば、エルロチニブ、およびゲフィチニブ) ; チロシンキナーゼインヒビター (例えば、イマチニブ) ; およびアントラサイクリン抗生物質 (例えば、ドキソルビシンもしくはドキシル) 。システイン操作抗 T E N B 2 抗体もしくはその抗体薬物結合体と併用されるべき治療的生物製剤としては、ベバシズマブ (A v a s t i n (登録商標)) もしくはペルツズマブ (O m n i t a r g ^{T M} , G e n e n t e c h I n c) が挙げられる。このような化学療法剤のための調製および投与スケジュールは、製造業者の説明書に従って、もしくは当業者によって経験的に決定されるように、使用され得る。このような化学療法の準備および投与スケジュールはまた、「 C h e m o t h e r a p y S e r v i c e 」, (1 9 9 2) 編, M . C . P e r r y , W i l l i a m s & W i l k i n s , B a l t i m o r e , M d に記載されている。

【 0 2 6 3 】

上記 A D C は、抗ホルモン化合物 ; 例えば、抗エストロゲン化合物 (例えば、タモキシフェン) ; 抗プロゲステロン (例えば、オナプリストン (E P 6 1 6 8 1 2)) ; もしくは抗アンドロゲン (例えば、フルタミド) と、このような分子について既知の投与量で、併用され得る。上記処置されるべき癌がホルモン非依存性癌である場合、上記患者は、抗ホルモン療法を以前に受けたことがあり得、そして癌がホルモン非依存性になった後に

、上記ADC（および必要に応じて、本明細書に記載される他の薬剤）が、上記患者に投与され得る。心臓保護剤（上記治療に関連した心筋機能不全を予防もしくは軽減するために）もしくは1種以上のサイトカインを、上記患者に同時投与することはまた、有益であり得る。上記治療レジメンに加えて、上記患者は、癌細胞の外科的除去および/もしくは放射線療法に供され得る。

【0264】

上記の同時投与される薬剤のうちのいずれかについての適切な投与は、現在使用されているものであるか、または上記新たに同定された薬剤および他の化学療法剤もしくは処置の併用作用（相乗効果）に起因して、低下させられ得る。

【0265】

上記併用療法は、「相乗効果」を提供し得、「相乗的」である、すなわち、上記活性化化合物と一緒に使用する場合に達成される効果が、上記化合物を別個で使用するところから生じる効果の合計よりも大きいと判明し得る。相乗の効果は、上記活性成分が以下である場合に達成され得る：（1）同時に処方され、投与されるか、または組み合わせられた単位用量処方物において同時に送達される；（2）別個の処方物として交互にもしくは並行して送達される；あるいは（3）いくつかの他のレジメンによって。交互治療において送達される場合、相乗効果は、上記化合物が、逐次的に（例えば、別個のシリンジ中の異なる注射物によって）投与もしくは送達される場合に達成され得る。一般に、交互治療の間に、有効用量の各活性成分は、逐次的、すなわち、連続してに投与されるのに対して、併用療法では、有効用量の2種以上の活性成分が、一緒に投与される。

【0266】

（抗体薬物結合体の代謝産物）

このような生成物が新規でありかつ先行技術に対して自明でない程度にまで、本明細書に記載されるADC化合物のインビボ代謝生成物はまた、本発明の範囲内に入る。このような生成物は、例えば、上記投与される化合物の酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化、酵素的切断などから生じ得る。従って、本発明は、本発明の化合物と、哺乳動物とを、その代謝生成物を生じるに十分な期間にわたって接触させる工程を包含するプロセスによって生成される、新規かつ非自明の化合物を包含する。

【0267】

代謝生成物は、代表的には、放射性標識した（例えば、 ^{14}C もしくは ^3H ）ADCを調製し、それを、検出可能な用量において（例えば、約0.5 mg/kgより高い）動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、サルもしくはヒト）に投与し、allowing代謝が起こるのに十分な時間（代表的には、約30秒～30時間）を与え、尿、血液もしくは他の生物学的サンプルからその変換生成物を単離することによって、同定される。これら生成物は容易に単離される。なぜなら、それらは、標識されている（他は、上記代謝生成物中に残っているエピトープに結合し得る抗体の使用によって単離される）からである。上記代謝生成物構造は、従来の様式において（例えば、MS、LC/MSもしくはNMR分析によって）決定される。一般に、代謝生成物の分析は、当業者に周知の従来の薬物代謝研究と同じ方法で行われる。その変換生成物は、それらがインビボで他の方法で見いだされない限りにおいて、本発明のADC化合物の治療的投与のための診断アッセイにおいて有用である。

【0268】

（製造物品）

本発明の別の実施形態において、上記の障害の処置のために有用な物質を含む製造物品、もしくは「キット」が、提供される。上記製造物品は、容器および上記容器上のもしくは上記容器と関連づけられたラベルもしくはパッケージ挿入物を含む。上記パッケージ挿入物は、治療生成物の市販のパッケージ中に習慣的に含まれ、かつこのような治療生成物の使用に関する適応症、使用、投与量、投与、禁忌および/もしくは警告についての情報を含む説明書に言及し得る。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、ブリストアパックなどが挙げられる。上記容器は、種々の物質（例えば、ガラスもしくは

はプラスチック)から形成され得る。

【0269】

一実施形態において、上記製造物品は、容器、および上記容器内に含まれるシステイン操作抗T E N B 2抗体、もしくはその抗体薬物結合体の処方物を含む。上記物品は、必要に応じて、腫瘍の上記治療的処置もしくは診断的検出のための組成物の使用に言及する、上記容器に貼付したラベル、もしくは上記容器と一緒に含まれるパッケージ挿入物をさらに含み得る。上記処方物を保持する上記容器は、貯蔵および治療剤の送達に有効であり、滅菌アクセスポートを有し得る(例えば、上記容器は、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグもしくはバイアルであり得る)。上記ラベルもしくはパッケージ挿入物は、上記処方物が、選択した状態(例えば、癌)を処置するために使用されることを示す。代わりに、またはさらに、上記製造物品は、薬学的に受容可能な緩衝化剤(例えば、注射用制菌水(B W F I)、リン酸緩衝化生理食塩水、リンゲル溶液およびデキストロース溶液)を含む第2の(もしくは第3の)容器をさらに含む。上記製造物品は、商業的およびユーザーの寒天から望ましい他の物質(他の緩衝化剤、希釈剤、フィルタ、針、およびシリンジを含む)をさらに含み得る。

10

【0270】

以下の例は、例示目的でのみ提供され、本発明の範囲をいかようにも制限することを意図しない。

【0271】

本明細書において引用される全ての特許および参考文献は、その全体が本明細書に参考として援用される。

20

【実施例】

【0272】

実施例において言及される市販の試薬は、別段示されない限り、製造業者の説明書に従って使用した。以下の実施例において、および本明細書全体を通じて、A T C Cアクセッション番号によって同定される細胞の供給源は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(M a n a s s a s , V A)である。

【0273】

(実施例1:抗T M E F F 2 # 1 9抗体の調製)

ヒト化T M E F F 2 # 1 9抗体は、P C T / U S 0 3 / 0 7 2 0 9に従って調製した。図1は、重鎖アミノ酸配列(配列番号1)および軽鎖アミノ酸配列(配列番号2)を示す。

30

【0274】

(実施例2:還元および再酸化による結合体化のためのシステイン操作抗T E N B 2抗体の調製)

C H O細胞において発現された全長のシステイン操作抗T E N B 2モノクローナル抗体(チオM a b)は、細胞培養条件に起因して、上記操作されたシステインに関するシステイン付加物(シスチン)を有する。上記操作されたシステインの反応性チオール基を遊離するために、上記チオM a bを、約p H 8 . 0において、5 0 0 m M ホウ酸ナトリウムおよび5 0 0 m M 塩化ナトリウムに溶解し、1 m M T C E P (トリス(2 - カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロリド; G e t z r a (1 9 9 9) A n a l . B i o c h e m . V o l 2 7 3 : 7 3 - 8 0 ; S o l t e c V e n t u r e s , B e v e r l y , M A)の約5 0 ~ 1 0 0倍過剰で3 7 °Cにおいて約1 ~ 2時間にわたって還元する。上記還元したチオM a b(図6)を希釈し、1 0 m M 酢酸ナトリウム(p H 5)中でH i T r a p Sカラム上に載せ、0 . 3 M 塩化ナトリウム含有P B Sで溶出する。上記溶出した還元したチオM a bは、2 m M デヒドロアスコルビン酸(d h A A)でp H 7において3時間にわたって、または室温において一晚2 m M 硫酸銅水溶液(C u S O ₄)で処理した。周囲空気酸化はまた、有効であり得る。上記緩衝化剤を、S e p h a d e x G 2 5樹脂に対する溶出によって交換し、1 m M D T P A含有P B Sで溶出した。上記チオール/A b値を、上記還元した抗体濃度を、上記溶液の、2 8 0 n mの吸光度から決

40

50

定することによって、および上記チオール濃度を、DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) との反応および 412 nm の吸光度の決定によって、チェックする。

【0275】

(実施例3: シス테인操作抗TENB2抗体および薬物-リンカー中間体の結合体化)

実施例2の還元および再酸化の手順の後に、上記シス테인操作抗TENB2抗体は、PBS (リン酸緩衝化生理食塩水) 緩衝液中に溶解し、氷上で冷却する。オーリスタチン薬物リンカー中間体 (例えば、MC-MMAE (マレイミドカプロイル-モノメチルオーリスタチンE)、MC-MMAF、MC-val-cit-PAB-MMAE、もしくはMC-val-cit-PAB-MMAF) の抗体あたりの操作されたシス테인に対し 10
て約1.5モル当量と、チオール反応性官能基 (例えば、マレイミド) はを、DMSOに溶解し、アセトニトリルおよび水中に希釈し、PBS中に、上記冷却し、還元し、再酸化した抗体に添加する。約1時間後に、過剰のマレイミドを添加して、上記反応をクエンチし、任意の反応していない抗体チオール基をキャップする。上記反応混合物を、遠心分離による限外濾過によって濃縮し、上記シス테인操作抗TENB2抗体薬物結合体を、PBS中にG25樹脂を通じた溶出によって精製および脱塩し、滅菌条件下で0.2 μm フィルタを介して濾過し、貯蔵のために凍結する。

【0276】

上記の手順によって、以下のシス테인操作抗TENB2抗体薬物結合体を調製した:
A114C (Kabat) チオ hu TMEFF2 #19 および MC-MMAF の結合 20
体化によるチオ hu TMEFF2 #19 - MC-MMAF; および
A114C (Kabat) チオ hu TMEFF2 #19 および MC-val-cit-PAB-MMAE の結合体化によるチオ hu TMEFF2 #19 - MC-val-cit-PAB-MMAE。

【0277】

(実施例4: IHC、インターナリゼーション研究、FACS、細胞死滅アッセイ、ウェスタンブロット、異種移植片研究、薬物動態研究および安全性評価のための材料および方法)

抗体および組換えタンパク質: ヒト化抗tenb2 Mab PR1を、PDLから得た。チオMab抗tenB2 PR1 (HC-A121C; 配列番号付け) およびten 30
B2ECD Flagタンパク質を、上記で議論されるように生成した。

【0278】

細胞株およびヒト腫瘍異種移植片: PC3は、ヒト前立腺癌細胞株(ATCC)である。PC3TenB2中間安定細胞株(Medium stable cell line)を、Genentech、ヒト前立腺外移植片モデルによって生成し、LuCap70、77および96.1を、University of Washingtonから得た。

【0279】

RNAおよびタンパク質発現: RNA発現分析、免疫学的手順(IHC, Western)、抗体結合(FACS)およびインターナリゼーションは、以前に発表された方法に従った(Cancer research 64, 781-788 (2004))。 40

【0280】

従来のもしくはチオMab抗TenB2-バリリン-シトルリン(vc)-モノメチルオーリスタチンE(MMAE)およびMC-MMAFアームの薬物結合体(ADC)の調製: 従来の、チオ-mabおよびコントロールmabと、vc-MMAE、MC-MMAF ADCとの結合体化を、上記のように行った。

【0281】

インビトロ細胞死滅およびインビボ研究: 上記再紡死滅アッセイを、Cancer research 64, 781-788 (2004) に記載されるものと同様に行った。各前立腺外移植片モデル腫瘍細胞株を、去勢した(アンドロゲン非依存性モデル, LuC 50

a p 7 0) もしくは去勢していない (アンドロゲン依存性モデル, L u C A P 7 7 および L u C A P 9 6 . 1)、C h a r l e s R i v e r l a b . からの雄性 S C I D - ベージュマウスにおける連続移植によって維持した。腫瘍を、上記研究の期間にわたって 1 週間に 1 回 ~ 2 回、測定した。

【 0 2 8 2 】

安全性評価のためのラットおよびカニクイザルモデル：抗 t e n b 2 M a b は、ヒト、サルおよびラット t e n b 2 標的 (F S I ドメイン) を特異的に認識した。

【 0 2 8 3 】

薬物動態研究：標準的プロトコルおよびアッセイ方法を使用した。

【 0 2 8 4 】

上記データは、ヒト T e n B 2 (T M E F F 2) が、一般に、前立腺および C N S における発現に制限され、癌性前立腺において顕著に上昇したレベルを有することが実証する。抗 T E N B 2 抗体はまた、迅速にインターナライズされることが示された。これら抗体は、M M A E および M M A F に結合体化された場合、種々の再紡死滅アッセイにおいて、インビトロおよびインビボで前立腺腫様細胞を死滅させることを示した。さらに、有効な用量の T E N B 2 - A D C は、齧歯類および霊長類における毒性効果を誘発するのに必要とされる用量より顕著に低かった。

【 0 2 8 5 】

前述の記載は、当業者が本発明を実施できるように具体的であるとみなされる。本発明は、寄託された構築物によって、範囲が限定されるべきではない。なぜなら、上記寄託された実施形態は、本発明の特定の範囲の単純な例示として意図され、機能的に等価な任意の構築物は、本発明の範囲内であるからである。本明細書における物質の寄託は、本明細書に含まれる記載が、本発明の任意の局面 (その最良の実施形態を含む) の実施を実施するに不適切であるという容認を構成しないし、特許請求の範囲を、それが表す具体的例示に限定するとは解釈されない。実際に、本発明の種々の改変は、示され、本明細書において記載されるものに加えて、前述の記載から当業者に明らかになり、添付の特許請求の範囲内に入る。

10

20

【 図 3 】

Hu4D5Light PRI-IC	1	<u>D</u> I <u>O</u> I <u>K</u> O <u>T</u> S <u>P</u> S <u>S</u> L <u>S</u> A <u>S</u> <u>U</u> G <u>D</u> R <u>V</u> T <u>I</u> T <u>T</u> C <u>R</u> A <u>S</u> <u>Q</u> D <u>N</u> I <u>T</u> A <u>V</u> A <u>W</u> Y <u>Q</u> O <u>K</u> P <u>G</u> K <u>A</u> P <u>K</u> L <u>L</u> I <u>Y</u> S	50
	1	<u>D</u> I <u>O</u> I <u>T</u> Q <u>S</u> P <u>S</u> S <u>L</u> S <u>A</u> S <u>U</u> G <u>D</u> R <u>V</u> T <u>I</u> T <u>T</u> C <u>R</u> A <u>S</u> <u>Q</u> <u>N</u> V <u>T</u> A <u>V</u> A <u>W</u> Y <u>Q</u> O <u>K</u> P <u>G</u> K <u>A</u> P <u>K</u> L <u>L</u> I <u>Y</u> S	50
Hu4D5Light PRI-IC	51	<u>A</u> S <u>P</u> L <u>S</u> G <u>V</u> S <u>R</u> F <u>S</u> G <u>R</u> <u>S</u> G <u>T</u> D <u>F</u> T <u>L</u> I <u>S</u> S <u>L</u> Q <u>E</u> D <u>E</u> D <u>F</u> A <u>T</u> Y <u>Y</u> C <u>Q</u> H <u>Y</u> T <u>T</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>T</u> Q	100
	51	<u>A</u> S <u>N</u> R <u>H</u> I <u>G</u> <u>V</u> P <u>S</u> R <u>F</u> S <u>G</u> S <u>G</u> <u>S</u> G <u>T</u> D <u>F</u> T <u>L</u> I <u>S</u> S <u>L</u> Q <u>E</u> D <u>E</u> D <u>F</u> A <u>T</u> Y <u>Y</u> C <u>Q</u> Y <u>S</u> S <u>Y</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>T</u> Q	100
Hu4D5Light PRI-IC	101	<u>G</u> T <u>K</u> <u>V</u> E <u>I</u> K <u>R</u> <u>I</u> V <u>A</u> A <u>S</u> <u>V</u> F <u>I</u> F <u>P</u> <u>H</u> S <u>D</u> E <u>Q</u> L <u>K</u> S <u>G</u> T <u>A</u> S <u>V</u> C <u>L</u> N <u>N</u> F <u>P</u> R <u>E</u> A <u>K</u> <u>V</u> Q <u>W</u> <u>K</u> <u>V</u>	150
	101	<u>G</u> T <u>K</u> <u>V</u> E <u>I</u> K <u>R</u> <u>I</u> V <u>A</u> A <u>S</u> <u>V</u> F <u>I</u> F <u>P</u> <u>H</u> S <u>D</u> E <u>Q</u> L <u>K</u> S <u>G</u> T <u>A</u> S <u>V</u> C <u>L</u> N <u>N</u> F <u>P</u> R <u>E</u> A <u>K</u> <u>V</u> Q <u>W</u> <u>K</u> <u>V</u>	150
Hu4D5Light PRI-IC	151	<u>D</u> N <u>A</u> L <u>Q</u> S <u>G</u> N <u>S</u> Q <u>E</u> S <u>V</u> T <u>Q</u> <u>D</u> <u>S</u> K <u>D</u> S <u>T</u> <u>S</u> L <u>S</u> T <u>L</u> T <u>L</u> S <u>K</u> A <u>D</u> Y <u>E</u> K <u>H</u> K <u>V</u> Y <u>A</u> C <u>B</u> V <u>T</u> H <u>Q</u>	200
	151	<u>D</u> N <u>A</u> L <u>Q</u> S <u>G</u> N <u>S</u> Q <u>E</u> S <u>V</u> T <u>Q</u> <u>D</u> <u>S</u> K <u>D</u> S <u>T</u> <u>S</u> L <u>S</u> T <u>L</u> T <u>L</u> S <u>K</u> A <u>D</u> Y <u>E</u> K <u>H</u> K <u>V</u> Y <u>A</u> C <u>B</u> V <u>T</u> H <u>Q</u>	200
Hu4D5Light PRI-IC	201	<u>L</u> S <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u> T <u>K</u> S <u>F</u> N <u>R</u> G <u>E</u> C	214
	201	<u>L</u> S <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u> T <u>K</u> S <u>F</u> N <u>R</u> G <u>E</u> C	214
Hu4D5Heavy PRI-IC	205		205

番号付けは、配列番号付けに従うPR1 (抗TENB2) 重鎖を示す。

Figure 3

【 図 4 】

Hu4D5Heavy PRI-IC	1	<u>E</u> V <u>Q</u> <u>V</u> E <u>S</u> G <u>G</u> L <u>V</u> Q <u>P</u> G <u>S</u> I <u>R</u> D <u>S</u> <u>C</u> A <u>S</u> G <u>E</u> N <u>I</u> K <u>D</u> T <u>V</u> I	49
	1	<u>D</u> V <u>Q</u> <u>L</u> Q <u>E</u> S <u>G</u> P <u>G</u> L <u>V</u> K <u>P</u> S <u>E</u> T <u>L</u> S <u>T</u> C <u>A</u> V <u>S</u> G <u>V</u> S <u>I</u> R <u>Q</u> <u>P</u> E <u>G</u> K <u>G</u> L <u>E</u> W <u>M</u> G	50
Hu4D5Heavy PRI-IC	50	<u>R</u> I <u>P</u> T <u>N</u> G <u>Y</u> T <u>R</u> A <u>D</u> S <u>V</u> <u>G</u> R <u>P</u> F <u>I</u> S <u>A</u> D <u>T</u> S <u>K</u> N <u>T</u> A <u>Y</u> <u>Q</u> M <u>N</u> S <u>L</u> R <u>A</u> E <u>D</u> T <u>A</u> V <u>Y</u> Y <u>C</u> S <u>R</u> W	98
	51	<u>P</u> I <u>L</u> - <u>S</u> <u>Y</u> D <u>G</u> S <u>N</u> K <u>V</u> N <u>P</u> S <u>I</u> <u>K</u> <u>N</u> B <u>I</u> L <u>S</u> R <u>D</u> I <u>S</u> K <u>N</u> Q <u>F</u> S <u>I</u> K <u>L</u> S <u>V</u> T <u>A</u> I <u>T</u> A <u>V</u> Y <u>C</u> A <u>B</u> G	98
Hu4D5Heavy PRI-IC	100	<u>G</u> D <u>P</u> <u>I</u> A <u>N</u> F <u>Y</u> W <u>G</u> Q <u>G</u> T <u>V</u> T <u>V</u> S <u>G</u> N <u>S</u> <u>K</u> G <u>P</u> S <u>V</u> P <u>L</u> A <u>P</u> S <u>K</u> S <u>T</u> S <u>G</u> T <u>A</u> I <u>G</u> C <u>L</u> V	149
	100	<u>L</u> R <u>P</u> <u>I</u> S <u>M</u> D <u>I</u> W <u>G</u> Q <u>G</u> T <u>V</u> T <u>V</u> S <u>G</u> N <u>S</u> <u>K</u> G <u>P</u> S <u>V</u> P <u>L</u> A <u>P</u> S <u>K</u> S <u>T</u> S <u>G</u> T <u>A</u> I <u>G</u> C <u>L</u> V	149
Hu4D5Heavy PRI-IC	150	<u>K</u> D <u>F</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> T <u>V</u> S <u>W</u> N <u>S</u> G <u>A</u> L <u>T</u> S <u>G</u> V <u>H</u> T <u>F</u> A <u>V</u> L <u>Q</u> S <u>G</u> L <u>S</u> L <u>S</u> S <u>V</u> T <u>P</u> S <u>S</u> L <u>G</u> T	199
	150	<u>K</u> D <u>F</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>V</u> T <u>V</u> S <u>W</u> N <u>S</u> G <u>A</u> L <u>T</u> S <u>G</u> V <u>H</u> T <u>F</u> A <u>V</u> L <u>Q</u> S <u>G</u> L <u>S</u> L <u>S</u> S <u>V</u> T <u>P</u> S <u>S</u> L <u>G</u> T	199
Hu4D5Heavy PRI-IC	200	<u>T</u> Y <u>I</u> C <u>N</u> V <u>N</u> H <u>K</u> P <u>S</u> N <u>T</u> K <u>V</u> D <u>K</u> K <u>V</u> E <u>P</u> K <u>S</u> C <u>D</u> K <u>T</u> H <u>T</u> C <u>P</u> C <u>P</u> A <u>P</u> E <u>L</u> L <u>G</u> O <u>P</u> S <u>V</u> F <u>P</u> P <u>K</u>	249
	200	<u>T</u> Y <u>I</u> C <u>N</u> V <u>N</u> H <u>K</u> P <u>S</u> N <u>T</u> K <u>V</u> D <u>K</u> K <u>V</u> E <u>P</u> K <u>S</u> C <u>D</u> K <u>T</u> H <u>T</u> C <u>P</u> C <u>P</u> A <u>P</u> E <u>L</u> L <u>G</u> O <u>P</u> S <u>V</u> F <u>P</u> P <u>K</u>	249
Hu4D5Heavy PRI-IC	250	<u>P</u> K <u>D</u> T <u>I</u> M <u>I</u> S <u>R</u> T <u>P</u> E <u>V</u> T <u>C</u> V <u>V</u> D <u>V</u> S <u>H</u> E <u>D</u> P <u>E</u> V <u>K</u> F <u>N</u> W <u>V</u> D <u>G</u> <u>V</u> E <u>V</u> H <u>N</u> A <u>K</u> T <u>K</u> P <u>R</u> E <u>Q</u> Y	299
	250	<u>P</u> K <u>D</u> T <u>I</u> M <u>I</u> S <u>R</u> T <u>P</u> E <u>V</u> T <u>C</u> V <u>V</u> D <u>V</u> S <u>H</u> E <u>D</u> P <u>E</u> V <u>K</u> F <u>N</u> W <u>V</u> D <u>G</u> <u>V</u> E <u>V</u> H <u>N</u> A <u>K</u> T <u>K</u> P <u>R</u> E <u>Q</u> Y	299
Hu4D5Heavy PRI-IC	300	<u>N</u> S <u>T</u> Y <u>R</u> V <u>S</u> V <u>L</u> T <u>V</u> L <u>H</u> Q <u>D</u> W <u>L</u> N <u>G</u> E <u>Y</u> K <u>C</u> K <u>V</u> S <u>N</u> K <u>A</u> L <u>P</u> A <u>P</u> I <u>E</u> K <u>T</u> I <u>S</u> K <u>A</u> K <u>G</u> Q <u>P</u> R <u>E</u> P	349
	300	<u>N</u> S <u>T</u> Y <u>R</u> V <u>S</u> V <u>L</u> T <u>V</u> L <u>H</u> Q <u>D</u> W <u>L</u> N <u>G</u> E <u>Y</u> K <u>C</u> K <u>V</u> S <u>N</u> K <u>A</u> L <u>P</u> A <u>P</u> I <u>E</u> K <u>T</u> I <u>S</u> K <u>A</u> K <u>G</u> Q <u>P</u> R <u>E</u> P	349
Hu4D5Heavy PRI-IC	350	<u>Q</u> V <u>Y</u> T <u>T</u> P <u>P</u> S <u>R</u> I <u>B</u> E <u>M</u> T <u>K</u> N <u>Q</u> V <u>S</u> L <u>T</u> C <u>V</u> K <u>G</u> F <u>Y</u> <u>P</u> S <u>D</u> I <u>A</u> V <u>E</u> W <u>E</u> S <u>N</u> G <u>Q</u> P <u>E</u> N <u>N</u> Y <u>K</u> T <u>T</u> P	399
	350	<u>Q</u> V <u>Y</u> T <u>T</u> P <u>P</u> S <u>R</u> I <u>B</u> E <u>M</u> T <u>K</u> N <u>Q</u> V <u>S</u> L <u>T</u> C <u>V</u> K <u>G</u> F <u>Y</u> <u>P</u> S <u>D</u> I <u>A</u> V <u>E</u> W <u>E</u> S <u>N</u> G <u>Q</u> P <u>E</u> N <u>N</u> Y <u>K</u> T <u>T</u> P	399
Hu4D5Heavy PRI-IC	400	<u>V</u> L <u>D</u> S <u>G</u> S <u>F</u> F <u>Y</u> S <u>K</u> L <u>T</u> V <u>D</u> K <u>S</u> R <u>W</u> Q <u>Q</u> G <u>N</u> V <u>F</u> S <u>C</u> S <u>V</u> M <u>H</u> E <u>A</u> L <u>H</u> N <u>H</u> Y <u>T</u> Q <u>K</u> S <u>L</u> S <u>P</u> G	449
	400	<u>V</u> L <u>D</u> S <u>G</u> S <u>F</u> F <u>Y</u> S <u>K</u> L <u>T</u> V <u>D</u> K <u>S</u> R <u>W</u> Q <u>Q</u> G <u>N</u> V <u>F</u> S <u>C</u> S <u>V</u> M <u>H</u> E <u>A</u> L <u>H</u> N <u>H</u> Y <u>T</u> Q <u>K</u> S <u>L</u> S <u>P</u> G	449
Hu4D5Heavy PRI-IC	450	<u>K</u>	450
	450	<u>K</u>	450

番号付けは、配列番号付けに従うPR1 (抗TENB2) 重鎖を示す。

Figure 4

【 図 1 】

ヒト-TIMEFF2#19 (Pr-1) 抗TENB2 Ab重鎖アミノ酸配列 (シグナル配列には下線を付す)	MAVLGLLLCLLVTPFSCVLSDVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYYWSWIRQPPGKGLKMWGFIS	1
	YDGNKYNPSLKNRITIRSDTSKNQFSILKLSVTRAADTAAYYCARGLRGGDYMDYWGQGTLLTVYSSASTKG	
	PSVPFLAPSSKISGGTAAAGCLVXDYFPEPVTYWNNSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVYSSSLG	
	TQTICNVNHPKSNTKVKVEPKSCDXTHTCCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV	
	SHEDPEKYNWYDGVVHNNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISK	
	AKGQRPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVLVGKFPSPSDIAVWESNGQPENNYKTPPPVLDSGSGFLYSKL	
	TVDSRWQQGNVFCSWHEALHNHYTQKSLSLSPGK	配列番号1
ヒト-TIMEFF2#19 (Pr-1) 抗TENB2 Ab軽鎖アミノ酸配列 (シグナル配列には下線を付す)	MDFOVQLFSEFLILISASVIMSRGDIQWTCSPSSLSASVGDVRVITTCASQNVVTAVAWYQQKPKAKPLLIYSASNRHT	
	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDRQLKSGTASVVC	
	LIINFPYREAKVQWKVDNALQSNQSQESVTEQDSKDSYISLSTLTLSKADYEKHKYACVETHQGSLSPVTKSFNRNG	
		配列番号2

Figure 1

【 図 2 】

A121C チオヒム TIMEFF2#19 (Pr-1) 重鎖アミノ酸配列 (シグナル配列には下線を付す)	MAVLGLLLCLLVTPFSCVLSDVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYYWSWIRQPPGKGLKMWGFI	
	SYDGNKYNPSLKNRITIRSDTSKNQFSILKLSVTRAADTAAYYCARGLRGGDYMDYWGQGTLLTVYSSCST	
	KGPSVPFLAPSSKISGGTAAAGCLVXDYFPEPVTYWNNSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVYSS	
	SLGTQTYICNVNHPKSNTKVKVEPKSCDXTHTCCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV	
	VVDVSHEDPEKYNWYDGVVHNNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE	
	KTLSKAKGQRPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVLVGKFPSPSDIAVWESNGQPENNYKTPPPVLDSGSGF	
	FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHALHNHYTQKSLSLSPGK	配列番号3
A121C チオヒム TIMEFF2#19 (Pr-1) 軽鎖アミノ酸配列 (シグナル配列には下線を付す)	MDFOVQLFSEFLILISASVIMSRGDIQWTCSPSSLSASVGDVRVITTCASQNVVTAVAWYQQKPKAKPLLIYSASNRH	
	TGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDRQLKSGTASV	
	VCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSNQSQESVTEQDSKDSYISLSTLTLSKADYEKHKYACVETHQGSLSPVTKSF	
		配列番号2

チオ抗TENB2重鎖アミノ酸配列(シグナル配列には下線を付す)。
システムイン置換は、重鎖におけるA1a121残基である。

Figure 2

【 図 5 】

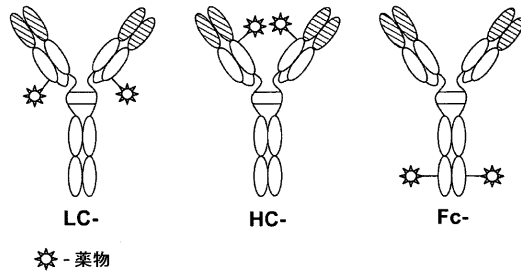


Figure 5

【 図 6 】

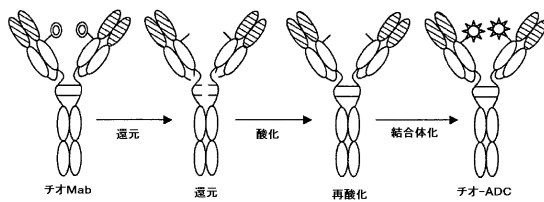


Figure 6

【圖 7】

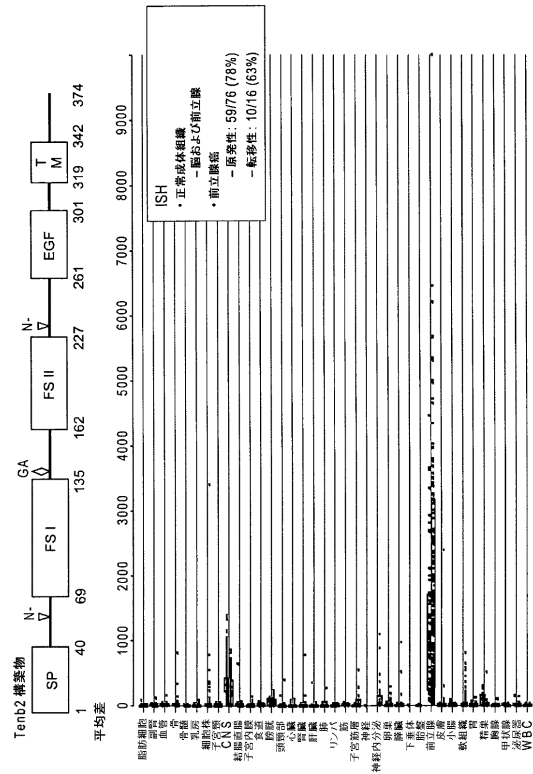
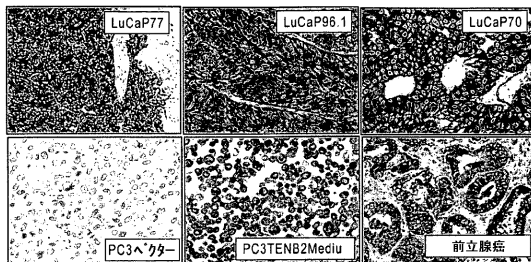


Figure 7

【 図 8 】

抗TENB2でのTENB2のISH



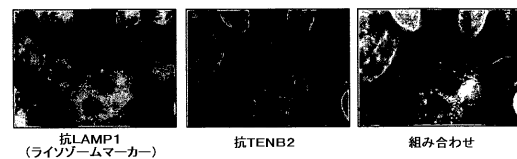
免疫組織化学: ヒト前立腺腫瘍におけるTENB2発現
 上下のパネルは、上下のパネルは、それぞれ、ヒト前立腺外植片モデル (PC3TENB2中程度安定 (medium stable) 細胞株) とベクターコントロール、および前立腺腫瘍に由来する

Figure 8

【圖 9】

PC3TENB2中程度細胞株およびLuCaP 70腫瘍に対するTENB2モノクローナル抗体(Mab)のインターナリゼーション

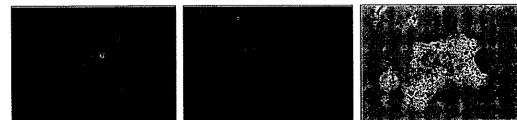
37℃において2時間での、PC3TENB2中程度細胞株に対する抗TENB2



抗TENB2

組み合わせ

37℃のインキュベーションにおいて2時間および18時間での、LuCaP 70腫瘍に対する抗TENB2



抗TENB2 Abは、LuCaP 70腫瘍より速くPC3TENB2中程度細胞株においてインターナライズした。

抗TENB2 Abは、18時間においてLuCaP 70細胞に対して60%より高くインターナライズした。

Figure 9

【図 10】

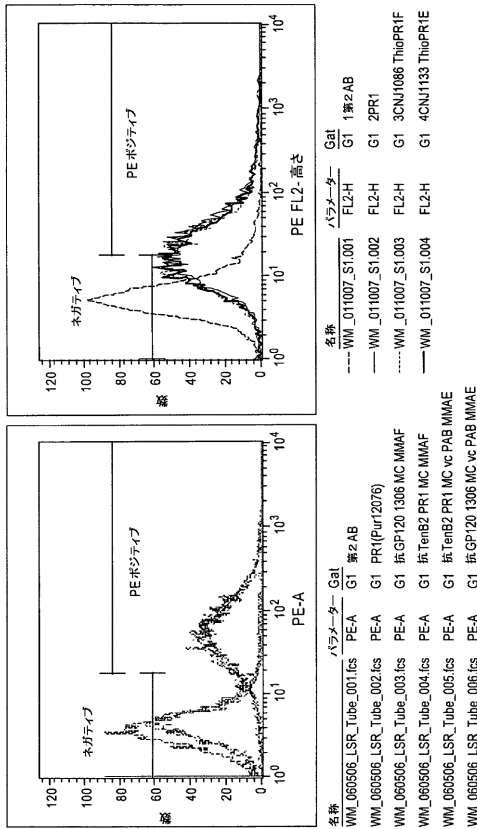


Figure 10

【図 11】

従来の抗TENB2 ADCおよびチオ抗TENB2 ADCを用いたPC3 TENB2中程度細胞に対する細胞死滅アッセイ

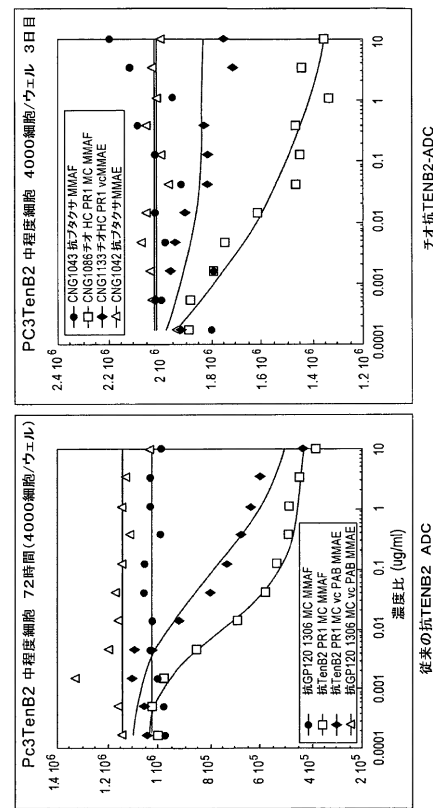


Figure 11

PC3 TENB2中程度細胞 4000細胞/ウェル 3日目 チオ抗TENB2 ADC
TENB2発現PC3細胞を、従来のもしくはチオ抗TENB2ADCによって死滅さ
せた。TENB2を発現する上記PC3細胞株を、清浄度の従来の
チオ抗TENB2ADCおよびコンロントADCで処理した。細胞生存性を、3日後
に測定した。

【図 12】

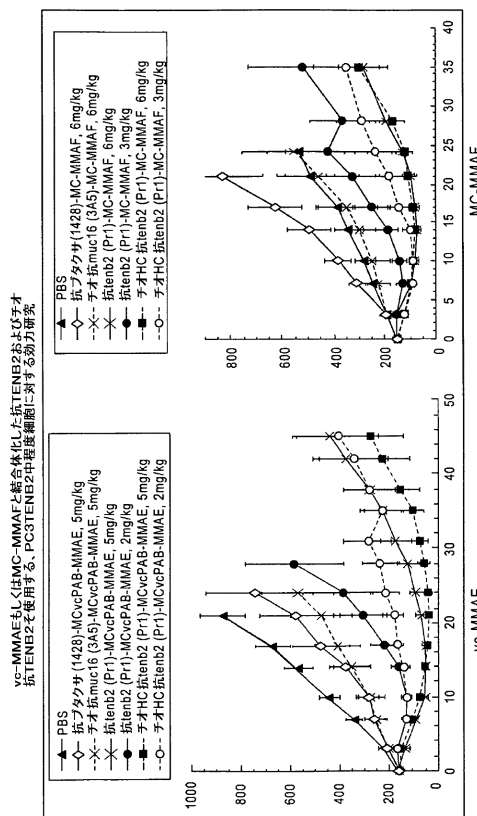
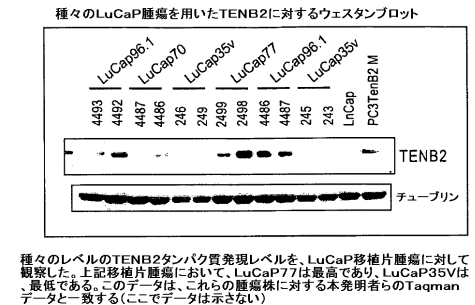


Figure 12

チオ抗TENB2 ADCの効力は、従来の方法により
生成されたADCに等しいか、よりすぐれている。

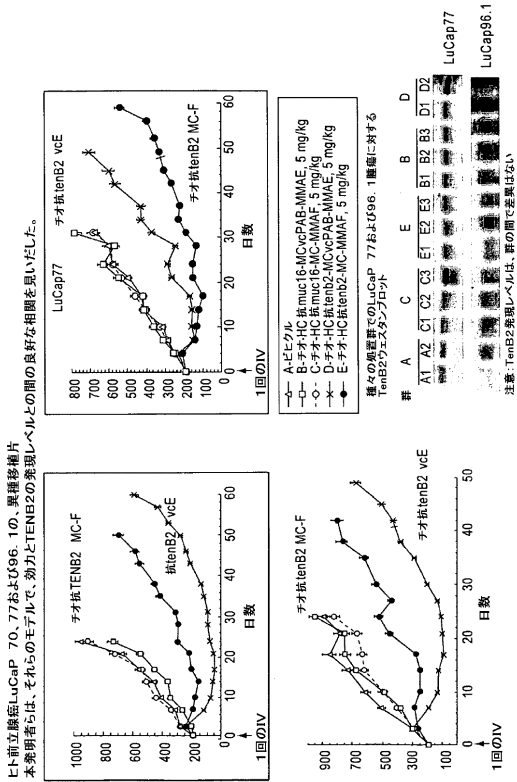
【図 13】



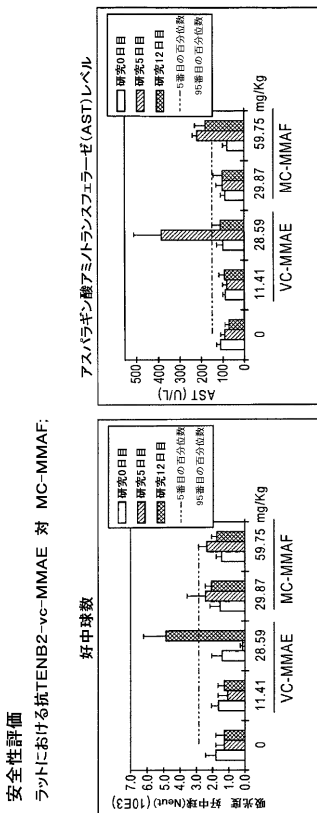
種々のレベルのTENB2タンパク質発現レベルを、LuCap移植片腫瘍に対して
観察した。上記移植片腫瘍において、LuCap77は最高であり、LuCap35vは
最低である。このデータは、これらの腫瘍株に対する本発明者のTagman
データと一致する(ここでデータは示さない)

Figure 13

【 図 1 4 】



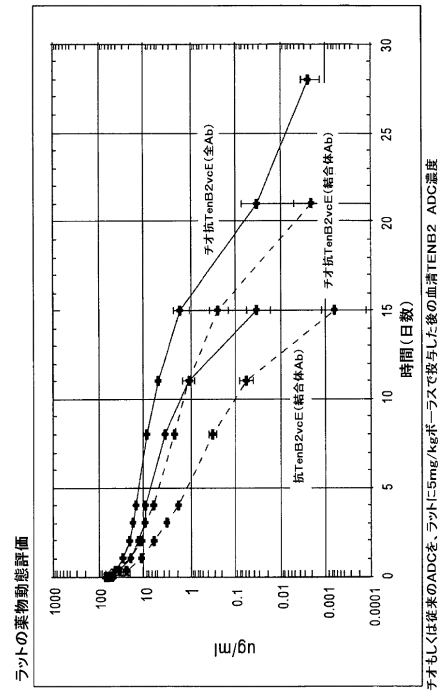
【 図 1 6 】



抗TENB2 ADCを用いたラットおよびマウス(ともに結合種)での毒物学研究を行ったところ、正常組織において標的関連毒性はなく、認識される有効量よりも実質的に高い用量において非標的依存性毒性があることが明らかになった。

Figure 16

【 図 1 5 】

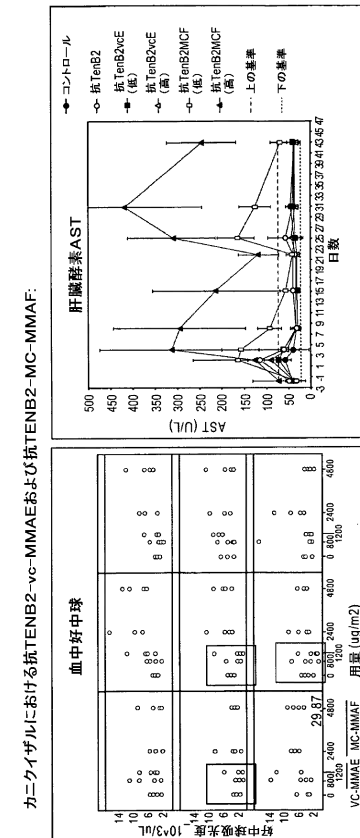


チオ抗TENB2 ADCは、従来の抗TEN2 ADCより血清中により安定である。

抗TENB2vcE = 抗TENB2-vc-MMAE
チオ抗TENB2vcE = チオ抗TENB2-vc-MMAE

Figure 15

【 図 1 7 】



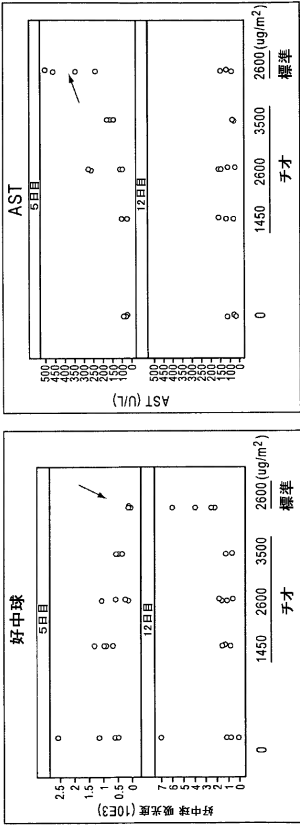
群: 1 ピヒクル、2 裸のPR1、3 および4 PR1vcE(800, 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)
5 および6 PR1MC F(2400, 4800 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)。注意: 800 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (8.7 mg/kgに等しい)

抗TENB2 ADCを用いたラットおよびマウスの毒性学研究を行ったところ、正常組織において標的関連毒性はなく、認識される有効用量よりも実質的に高い用量において非標的依存性毒性があることが明らかにされた。

Figure 17

【図 18】

ラットにおける抗TENB2-vc-MMAEと比較した、チオ抗TENB2-vc-MMAE



チオ抗TENB2-vc-MMAE: 好中球数およびASTレベルにおける改善

Figure 18

【配列表】

0005606916000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 33/24	(2006.01)	A 6 1 K 33/24	
G 0 1 N 33/574	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
		G 0 1 N 33/574	D
		C 1 2 N 15/00	A

(72)発明者 ジュナトゥラ, ヤガス レディー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 5, フレモント, タペロ ストリート 3 4 3 9
 1

(72)発明者 ポラキス, ポール
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 4 1, ミル パレー, コルテ マデーラ アベニュー
 - 2 6 0

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 国際公開第2006/034488(WO, A1)
 特表2006-502092(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 U n i P r o t / G e n e S e q
 P u b M e d