

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6831783号
(P6831783)

(45) 発行日 令和3年2月17日 (2021.2.17)

(24) 登録日 令和3年2月2日 (2021.2.2)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/30 (2006.01)

C O 7 K 16/30 Z N A

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 30 (全 131 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-525950 (P2017-525950)
 (86) (22) 出願日 平成27年11月13日 (2015.11.13)
 (65) 公表番号 特表2018-501781 (P2018-501781A)
 (43) 公表日 平成30年1月25日 (2018.1.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2015/058801
 (87) 国際公開番号 W02016/075670
 (87) 国際公開日 平成28年5月19日 (2016.5.19)
 審査請求日 平成30年11月13日 (2018.11.13)
 (31) 優先権主張番号 62/079,942
 (32) 優先日 平成26年11月14日 (2014.11.14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
 35
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体薬物コンジュゲート

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a. 配列番号 1 の V H C D R 1、配列番号 2 の V H C D R 2、および配列番号 3 の V H C D R 3 を含む重鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、重鎖可変領域、および配列番号 11 の V L C D R 1、配列番号 12 の V L C D R 2、および配列番号 13 の V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、軽鎖可変領域；
 を含む、P - カドヘリンを結合する抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 2】

a. 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、および配列番号 17 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)；
 を含む、P - カドヘリンを結合する抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 3】

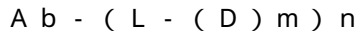
a. 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 19 のアミノ酸配列を含む軽鎖；
 を含む P - カドヘリンを結合する抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 4】

前記抗体が、ヒト抗体、ヒト化抗体、モノクローナル抗体または単鎖抗体 (s c F v) である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

【請求項 5】

式



(式中、

A b は、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片であり、

L は、リンカーであり、

D は、薬物部分であり、

m は、1 ~ 8 の整数であり、

n は、1 ~ 10 の整数である)

を含む抗体薬物コンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項 6】

前記 m が 1 である、請求項 5 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 7】

前記 n が、3 または 4 である、請求項 5 または 6 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 8】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 5 から 7 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 9】

前記リンカーが、切断性リンカー、非切断性リンカー、親水性リンカー、プロチャージリンカーおよびジカルボン酸に基づくリンカーからなる群から選択される、請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 10】

前記リンカーが、N - スクシンイミジル 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペンタノエート (S P P)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (S P D B)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) - 2 - スルホ - ブタノエート (スルホ - S P D B)、N - スクシンイミジルヨードアセテート (S I A)、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 (S I A B)、マレイミド P E G N H S、N - スクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (S M C C)、N - スルホスクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (スルホ - S M C C) および 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 17 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) - 5 , 8 , 11 , 14 - テトラオキソ - 4 , 7 , 10 , 13 - テトラアザヘプタデカン - 1 - オエート (C X 1 - 1) からなる群から選択される架橋試薬に由来する、請求項 9 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 11】

前記リンカーが、N - スクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (S M C C)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (S P D B)、および 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 17 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) - 5 , 8 , 11 , 14 - テトラオキソ - 4 , 7 , 10 , 13 - テトラアザヘプタデカン - 1 - オエート (C X 1 - 1) からなる群から選択される架橋試薬に由来する、請求項 10 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 12】

前記薬物部分が、V - A T P a s e 阻害剤、プロアポトーシス剤、B c l 2 阻害剤、M C L 1 阻害剤、H S P 9 0 阻害剤、I A P 阻害剤、m T o r 阻害剤、微小管安定化剤、微小管脱安定化剤、アウリスチン、ドラスタチン、メイタンシノイド、M e t A P (メチオニンアミノペプチダーゼ)、タンパク質 C R M 1 の核外輸送の阻害剤、D P P I V 阻害剤、プロテアソーム阻害剤、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害剤、タンパク質合成阻害剤、キナーゼ阻害剤、C D K 2 阻害剤、C D K 9 阻害剤、キネシン阻害剤、H D A C 阻害剤、D N A 損傷剤、D N A アルキル化剤、D N A インターカレーター、D

10

20

30

40

50

N A 副溝結合剤および D H F R 阻害剤からなる群から選択される、請求項 5 から 11 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 13】

前記薬物部分がメイタンシノイドである、請求項 12 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

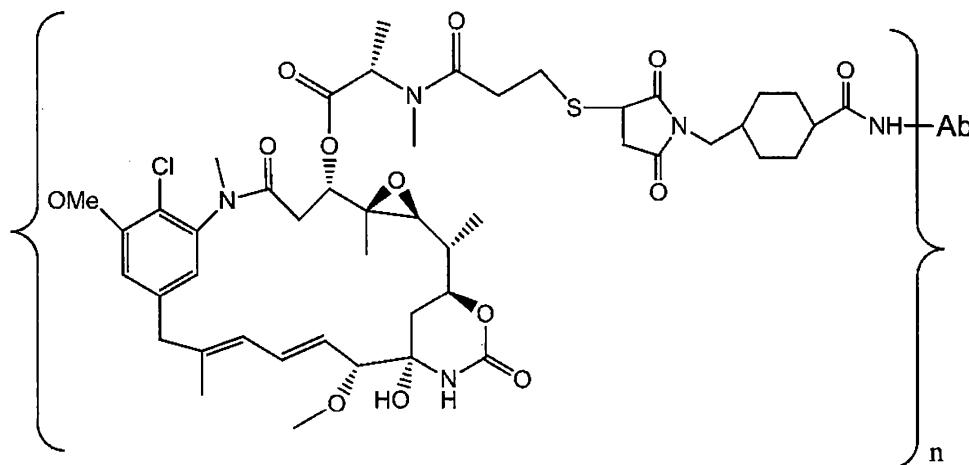
【請求項 14】

前記メイタンシノイドが、N(2')-デアセチル-N(2')-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン(DM1)またはN(2')-デアセチル-N2-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-メイタンシン(DM4)である、請求項 13 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 15】

下記式：

【化 1】



(式中、

A b は、配列番号 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 2 の重鎖 C D R 2、配列番号 3 の重鎖 C D R 3、および配列番号 11 の軽鎖 C D R 1、配列番号 12 の軽鎖 C D R 2、配列番号 13 の軽鎖 C D R 3 を含む抗体またはその抗原結合性断片であり、前記 C D R は、K a b a t 定義に従って規定され；および n は 1 ~ 10 である)

を有する、請求項 5 に記載の抗体薬物コンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩。

【請求項 16】

UV 分光光度計を使用して測定される、約 3 . 8 の平均 D A R を有する、請求項 5 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 17】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 18】

請求項 5 から 16 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 19】

凍結乾燥物として調製された、請求項 17 または 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記凍結乾燥物が、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または請求項 5 から 16 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート、ヒスチジン、スクロース、およびポリソルベート 20 を含む、請求項 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

10

20

30

40

50

約 10 mg / mL の請求項 15 に記載の抗体薬物コンジュゲート、20 mM ヒスチジン、240 mM スクロース、および 0.02 % ポリソルベート 20 を含む、請求項 20 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

それを必要とする患者におけるがんの処置における使用のための、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片、請求項 5 から 16 のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲートまたは請求項 17 から 21 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記がんが、副腎皮質癌、膀胱がん、骨がん、乳がん、中枢神経系非定型奇形腫様ノラ
ブドイド腫瘍、結腸がん、結腸直腸がん、胚芽腫、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、頭
頸部がん、肝細胞がん、カボジ肉腫、肝臓がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含
む肺がん、卵巣がん、直腸がん、横紋筋肉腫、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、頸
部扁平上皮がん、腹部がん、子宮がん、膣がん、および外陰部がんからなる群から選択さ
れる、請求項 22 に記載の抗体、その抗原結合性断片、抗体薬物コンジュゲートまたは医
薬組成物。

10

【請求項 24】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片をコードする核酸。

【請求項 25】

配列番号 8、18、10、および / または 20 のヌクレオチド配列を含む、請求項 24
に記載の核酸。

20

【請求項 26】

請求項 24 または 25 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 27】

請求項 26 に記載のベクターまたは請求項 24 または 25 に記載の核酸を含む宿主細胞
。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の宿主細胞を培養すること、および培養物から抗体を回収すること
を含む、抗体または抗原結合性断片を生成するための方法。

【請求項 29】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む診断剤。

30

【請求項 30】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、放射性標識、フルオロフォア、発色団、イメー
ジング剤、または金属イオンで標識されている、請求項 29 に記載の診断剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、A S C I I 方式で電子的に提出され、その全体が参照により本明細書に援用
される配列表を含有する。2015 年 11 月 12 日に作られた上記 A S C I I コピーは、
P A T 0 5 6 5 0 6 - W O - P C T _ S L . t x t という名称であり、サイズが 146 ,
966 バイトである。

40

【0002】

本発明は、一般に、抗 P - カドヘリン抗体、抗体断片、抗体薬物コンジュゲート、なら
びにがんの処置のためのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

P - カドヘリン

古典的なカドヘリンは、カルシウム依存性細胞間接触を媒介する接着型結合 (adherens
-type junctions) で発現される細胞接着分子のファミリーを表す。胎盤カドヘリン (P

50

- カドヘリン、カドヘリン 3、1 型または「CDH3」としても公知)は、正常組織では発現が制限されているが、皮膚、食道、肺および口腔の基底上皮細胞を含む幾つかの組織の未分化または分化下の細胞型で発現されることが知られている(例えば、Albergaria et al., Int. J. Dev. Biol. 55:811-822 (2011)を参照)。

【0004】

P - カドヘリンの構造は、3つの別個のドメイン：タンデムで5つのカドヘリン反復を含有する細胞外ドメイン(ECD)、膜貫通ドメイン、およびカテニン結合性ドメインを含有する細胞内テイルで構成される。ECDは、多重P - カドヘリン分子間のシスおよびトランス相互作用の両方を媒介する一方で、カテニン結合性ドメインは、P120カテニンなどのタンパク質、したがって細胞骨格エレメントにP - カドヘリンを連結される(例えば、Wu et al., PNAS 107:17592-7 (2010)を参照)。

10

【0005】

P - カドヘリンおよびがん

P - カドヘリン(「Pcad」、「PCad」、「P - Cad」、またはCDH3とも称される)はまた、とりわけ、乳がん、胃がん、子宮内膜がん、頭頸部がん、および結腸直腸がんを含む多数の悪性腫瘍において過剰発現されることが知られている。幾つかの乳腺腫瘍、子宮内膜腫瘍、卵巣腫瘍、結腸直腸腫瘍および膀胱腫瘍におけるP - カドヘリンの過剰発現はまた、P - カドヘリン発現レベルが低いか、または存在しない場合と比較して、より悪い予後と相関している。乳がんでは、P - カドヘリンは、高悪性度浸潤癌において高頻度で過剰発現され、基底様腫瘍の信頼性高いマーカーである(例えば、Paredes et al., Br. Can. Res. 9:214-226 (2007)、Sanders et al., Int. J. Can. 79:573-579 (1998)、Albergaria et al., Int. J. Dev. Biol. 55:811-822 (2011)、Sousa et al., Histol. Histopathol. 25:963-975 (2010)を参照)。

20

【0006】

乳がんおよび卵巣がんなどのある特定の細胞型では、P - カドヘリンは、腫瘍細胞運動性、侵襲性および転移を促進することが知られている(例えば、Cheung et al., Oncogene 30:2964-74 (2011)、Ribeiro et al., Oncogene 29 :392-402 (2010)を参照)。

【0007】

多数のがん関連プロセスは、P - カドヘリンmRNAおよびタンパク質の発現を促進することが知られている。発現の突然変異または損失のいずれかを介した腫瘍抑制因子BRCA1の不活性化は、乳がん細胞系および患者の検体の両方においてP - カドヘリン発現の増加と関連付けられている。転写因子C - EBP および抗エストロゲンICI182780(フルベストラント)は、他のプロセスを介したCDH3プロモーターの低メチル化のように、P - カドヘリン発現を調節不全にして、腫瘍細胞におけるそのアップレギュレーションを誘導することが知られている。胞巣状横紋筋肉腫では、キメラ発がん性転写因子PAX3 - FOXO A1およびPAX - FOXO A1(転座に起因する)は、P - カドヘリン発現を直接誘導して、腫瘍攻撃性の増加をもたらす(例えば、Albergaria et al., Int. J. Dev. Biol. 55:811-822 (2011)、Thuault et al., Oncogene 15:1474-86 (2012)、Ames et al., Clin. Can. Res. 11:4003-11 (2005)、Gorski et al., Br. Can. Res. Treat. 122:721-31 (2010)、Paredes et al., Clin. Can. Res. 11:5869-5877 (2005)、Albergaria et al., Human Mol. Gen. 19:2554-2566 (2010)を参照)。

30

40

【0008】

抗体薬物コンジュゲート

抗体薬物コンジュゲート(「ADC」)は、がんの処置における細胞毒性剤の局所送達のために使用されてきた(例えば、Lambert, Curr. Opinion In Pharmacology 5:543~549, 2005を参照されたい)。ADCにより、最小の毒性で最大の効能を達成することができる薬物部分の標的化された送達が可能になる。ADCが有望な臨床結果を示すにつれて、がん療法のための新しい治療剤を開発する必要性が増大する。さらに、公知のがん標的に対して治療上有効なADCを作製しようとする試みは、全てが首尾よくいっているとは限らない。ADCの治療上の有効性に

50

影響を及ぼし得る要因の例として、親和性、抗体のコンジュゲートする能力、リンカーの切断可能性または安定性、抗体 - 薬物コンジュゲートの安定性、抗体薬物コンジュゲートの凝集する傾向、および各抗体にコンジュゲートする薬物 / ペイロード分子の比 (「DAR」または「薬物抗体比」) が挙げられる。

【0009】

凝集および安定性の欠如は、臨床背景で抗体薬物コンジュゲートに対する有害反応の可能性を増加させて、有効性を低減させて、ならびにADCを作製するコストを増大させ得る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0010】

したがって、治療上有効なADC分子が必要とされる。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本出願は、ヒトP - カドヘリンタンパク質に結合する抗体、またはその抗原結合性断片を開示する。一実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号126の124、125、151、153、154、155、156、159、160、161、162、163、168、170、171、および172位にあるアミノ酸から選択される1つまたは複数の残基においてP - カドヘリンに結合する。別の実施形態では、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号126の124、125、151、153、154、155、156、159、160、161、162、163、168、170、171、および172位にあるアミノ酸においてヒトP - カドヘリンタンパク質に結合する。幾つかの実施形態では、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号126の124、151、153 ~ 156、および172位から選択される1つまたは複数のアミノ酸残基においてヒトP - カドヘリンに結合する重鎖可変領域を含む。さらなる実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号128の52、54、56、60、65、105、または107位から選択される1つまたは複数のアミノ酸残基を含むヒトP - カドヘリンタンパク質に対する重鎖結合性パラトープを含む。さらに別の実施形態では、抗体は、配列番号126の124、125、155、156、159 ~ 163、168、170、および171位から選択される1つまたは複数のアミノ酸残基においてヒトP - カドヘリンに結合する軽鎖可変領域を含む。さらなる実施形態では、ヒトP - カドヘリンタンパク質に対する軽鎖可変領域結合性パラトープは、配列番号129の1、2、27、28、30、68、92、93、または94位から選択される1つまたは複数のアミノ酸残基を含む。特定実施形態では、抗体、またはその抗原結合性断片は、上記で論述するような重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。

20

30

【0012】

他の実施形態では、本出願は、

- a) 配列番号1のVH CDR1、配列番号2のVH CDR2、および配列番号3のVH CDR3を含む重鎖可変領域であって、CDRが、Kabatt定義に従って規定される、重鎖可変領域、および配列番号11のVL CDR1、配列番号12のVL CDR2、および配列番号13のVL CDR3を含む軽鎖可変領域であって、CDRが、Kabatt定義に従って規定される、軽鎖可変領域；
- b) 配列番号21のVH CDR1、配列番号22のVH CDR2、および配列番号23のVH CDR3を含む重鎖可変領域であって、CDRが、Kabatt定義に従って規定される、重鎖可変領域；および配列番号31のVL CDR1、配列番号32のVL CDR2、および配列番号33のVL CDR3を含む軽鎖可変領域であって、CDRが、Kabatt定義に従って規定される、軽鎖可変領域；
- c) 配列番号41のVH CDR1、配列番号42のVH CDR2、および配列番号43のVH CDR3を含む重鎖可変領域であって、CDRが、Kabatt定義に従って規定される、重鎖可変領域、および配列番号51のVL CDR1、配列番号52のVL

40

50

C D R 2、および配列番号 5 3 の V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域であって、C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、軽鎖可変領域；

d) 配列番号 6 1 の V H C D R 1、配列番号 6 2 の V H C D R 2、および配列番号 6 3 の V H C D R 3 を含む重鎖可変領域であって、C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、重鎖可変領域、および配列番号 7 1 の V L C D R 1、配列番号 7 2 の V L C D R 2、および配列番号 7 3 の V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域であって、C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、軽鎖可変領域；

e) 配列番号 8 1 の V H C D R 1、配列番号 8 2 の V H C D R 2、および配列番号 8 3 の V H C D R 3 を含む重鎖可変領域であって、C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、重鎖可変領域、および配列番号 9 1 の V L C D R 1、配列番号 9 2 の V L C D R 2、および配列番号 9 3 の V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域であって、C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、軽鎖可変領域；または

f) 配列番号 1 0 1 の V H C D R 1、配列番号 1 0 2 の V H C D R 2、および配列番号 1 0 3 の V H C D R 3 を含む重鎖可変領域であって、C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、重鎖可変領域、および配列番号 1 1 1 の V L C D R 1、配列番号 1 1 2 の V L C D R 2、および配列番号 1 1 3 の V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域であって、C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、軽鎖可変領域

を含むヒト P - カドヘリンを結合する抗体、またはその抗原結合性断片を開示する。

【 0 0 1 3 】

本出願はまた、

a) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、および配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)；

b) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、および配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)；

c) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、および配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)；

d) 配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、および配列番号 7 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)；

e) 配列番号 8 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、および配列番号 9 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)；または

f) 配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、および配列番号 1 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む P - カドヘリンを結合する抗体、またはその抗原結合性断片を開示する。

【 0 0 1 4 】

他の実施形態では、本出願は、

a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

b) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

c) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

d) 配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

e) 配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 9 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖；または

f) 配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 1 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む P - カドヘリンを結合する抗体、またはその抗原結合性断片を開示する。

【 0 0 1 5 】

本出願はさらに、本明細書中に開示する抗体と同じヒト P - カドヘリンのエピトープに

10

20

30

40

50

結合するか、またはヒト P - カドヘリンへの結合について本明細書中に開示する抗体と競合する抗体、またはその抗原結合性断片を開示する。

【 0 0 1 6 】

幾つかの実施形態では、P - カドヘリン抗体、またはその抗原結合性断片は、ヒトまたはヒト化抗体である。他の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、モノクローナル抗体である。さらなる実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、単鎖抗体 (s c F v) である。

【 0 0 1 7 】

本出願はまた、式：

$$A b - (L - (D) _m) _n$$

10

(式中、A b は、本明細書中に開示するような P - カドヘリン抗体、またはその抗原結合性断片であり；L は、リンカーであり；D は、薬物部分であり；m は、1 ~ 8 の整数であり；n は、1 ~ 1 0 の整数である) を含む抗体薬物コンジュゲート (A D C)、またはその薬学的に許容される塩を開示する。幾つかの実施形態では、m は 1 である。他の実施形態では、n は、3 または 4 である。

【 0 0 1 8 】

幾つかの実施形態では、A D C の抗体、またはその抗原結合性断片は、

a) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V H 領域、および配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む V L 領域；または

b) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む V H 領域、および配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V L 領域を含む。

20

【 0 0 1 9 】

さらなる実施形態では、抗体薬物コンジュゲートの抗体、またはその抗原結合性断片は、

(a) 配列番号 1 の V H C D R 1、(b) 配列番号 2 の V H C D R 2、(c) 配列番号 3 の V H C D R 3 を含む V H 領域、および (d) 配列番号 1 1 の V L C D R 1、(e) 配列番号 1 2 の V L C D R 2、および (f) 配列番号 1 3 の V L C D R 3 を含む V L 領域を含み、C D R が、K a b a t 定義に従って規定されるか；または

(a) 配列番号 2 1 の V H C D R 1、(b) 配列番号 2 2 の V H C D R 2、(c) 配列番号 2 3 の V H C D R 3 を含む V H 領域、および (d) 配列番号 3 1 の V L C D R 1、(e) 配列番号 3 2 の V L C D R 2、および (f) 配列番号 3 3 の V L C D R 3 を含む V L 領域を含み、C D R が、K a b a t 定義に従って規定される。

30

【 0 0 2 0 】

他の実施形態では、抗体薬物コンジュゲートの抗体、またはその抗原結合性断片は、

a) 配列番号 9 の重鎖および配列番号 1 9 の軽鎖；または

b) 配列番号 2 9 の重鎖および配列番号 3 9 の軽鎖を含む。

【 0 0 2 1 】

さらなる実施形態では、抗体薬物コンジュゲートのリンカーは、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、親水性リンカー、プロチャージドリンカーおよびジカルボン酸ベースのリンカーからなる群から選択される。幾つかの実施形態では、リンカーは、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペントノエート (S P P)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (S P D B)、N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) 2 - スルホ - ブタノエート (スルホ - S P D B)、N - スクシンイミジルヨードアセテート (S I A)、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 (S I A B)、マレイミド P E G N H S、N - スクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (S M C C)、N - スルホスクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (スルホ - S M C

40

50

C) および 2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 17 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 1 - イル) - 5, 8, 11, 14 - テトラオキソ - 4, 7, 10, 13 - テトラアザヘプタデカン - 1 - オエート (CX1 - 1) からなる群から選択される架橋試薬に由来する。

【0022】

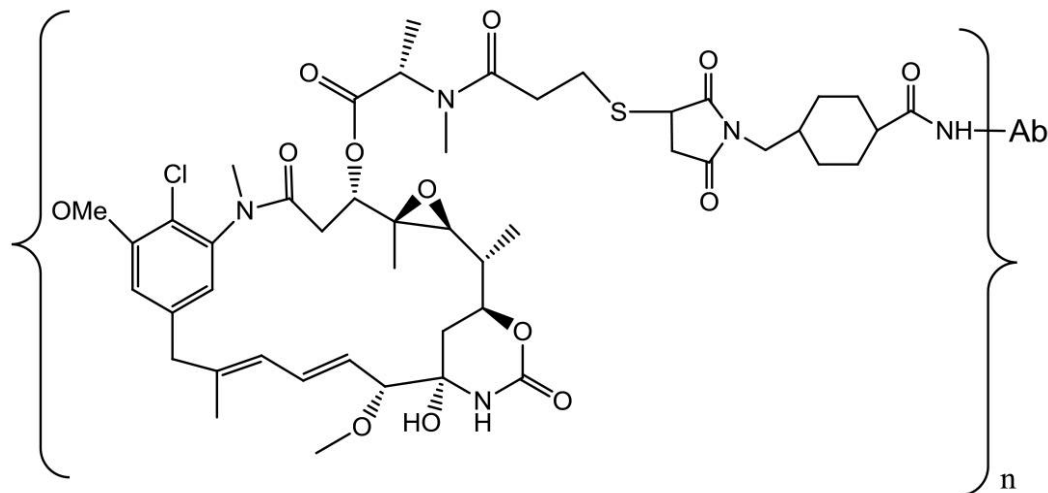
幾つかの実施形態では、抗体薬物コンジュゲートの薬物部分は、V - A T P a s e 阻害剤、プロアポトーシス剤、B c l 2 阻害剤、M C L 1 阻害剤、H S P 9 0 阻害剤、I A P 阻害剤、m T o r 阻害剤、微小管安定化剤、微小管脱安定化剤、アウリスタチン、ドラス タチン、メイタンシノイド、M e t A P (メチオニンアミノペプチダーゼ)、タンパク質 C R M 1 の核外輸送の阻害剤、D P P I V 阻害剤、プロテアソーム阻害剤、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害剤、タンパク質合成阻害剤、キナーゼ阻害剤、C D K 2 阻害剤、C D K 9 阻害剤、キネシン阻害剤、H D A C 阻害剤、DNA 損傷剤、DNA アルキル化剤、DNA インターカレーター、DNA 副溝結合剤および D H F R 阻害剤からなる群から選択される。さらなる実施形態では、細胞毒性剤は、メイタンシノイドである。特定実施形態では、メイタンシノイドは、N (2') - デアセチル - N (2') - (3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル) - マイタンシン (DM1) または N (2') - デアセチル - N 2 - (4 - メルカプト - 4 - メチル - 1 - オキソペンチル) - マイタンシン (DM4) である。

【0023】

特定実施形態では、抗体薬物コンジュゲートは、下記式：

【0024】

【化1】



(式中、A b は、配列番号 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 2 の重鎖 C D R 2、配列番号 3 の重鎖 C D R 3、および配列番号 11 の軽鎖 C D R 1、配列番号 12 の軽鎖 C D R 2、配列番号 13 の軽鎖 C D R 3 を含む抗体またはその抗原結合性断片であり；C D R が、K a b a t 定義に従って規定され；n は、1 ~ 10 である) またはその薬学的に許容される塩を有する。

【0025】

本出願はまた、本明細書中に開示するようなヒト P - カドヘリン抗体、もしくはその抗原結合性断片、またはこれらの抗体を含む抗体薬物コンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を開示する。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、凍結乾燥物として調製される。さらなる実施形態では、凍結乾燥物は、抗体、その抗原結合性断片、またはこれらの抗体の抗体薬物コンジュゲート、ヒスチジン、スクロース、およびポリソルベート 20 を含む。特定実施形態では、医薬組成物は、約 10 m g / m L の本明細

書中に開示する抗体薬物コンジュゲート、20 mM ヒスチジン、240 mM スクロース、および0.02% ポリソルベート20を含む。

【0026】

本発明はまた、それを必要とする患者においてがんを処置する方法であって、前記患者に、本明細書中に開示する抗体薬物コンジュゲートまたは医薬組成物を投与することを含む方法を開示する。幾つかの実施形態では、上記方法は、1つまたは複数のさらなる治療用化合物と組み合わせて、抗体薬物コンジュゲートまたは医薬組成物を患者に投与することを含む。

【0027】

他の実施形態では、本出願は、医薬としての使用のための、本明細書中に開示するようなP-カドヘリン抗体薬物コンジュゲートまたは医薬組成物を開示する。特定実施形態では、抗体薬物コンジュゲートまたは医薬組成物は、それを必要とする患者におけるがんの処置における使用のためである。

【0028】

同様に、それを必要とする患者においてがんを処置するための、またはがんの処置のための医薬の製造における、本明細書中で論述するようなP-カドヘリン抗体、もしくはその抗原結合性断片、または抗体薬物コンジュゲートの使用が本明細書中に開示される。

【0029】

幾つかの実施形態では、がんは、P-カドヘリンを発現する。さらなる実施形態では、がんは、副腎皮質癌、膀胱がん、骨がん、乳がん、中枢神経系非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、結腸がん、結腸直腸がん、胚芽腫、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、頭頸部がん、肝細胞がん、カポジ肉腫、肝臓がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、卵巣がん、直腸がん、横紋筋肉腫、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、頸部扁平上皮がん、腹部がん、子宮がん、膣がん、および外陰部がん、副腎皮質癌、膀胱がん、骨がん、乳がん、中枢神経系非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、結腸がん、結腸直腸がん、胚芽腫、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、頭頸部がん、肝細胞がん、カポジ肉腫、肝臓がん、小細胞肺がんおよび非小細胞肺がんを含む肺がん、卵巣がん、直腸がん、横紋筋肉腫、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、頸部扁平上皮がん、腹部がん、子宮がん、膣がん、および外陰部がんからなる群から選択される。特定実施形態では、がんは、膀胱がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、頭頸部がん、肺がん、および卵巣がんからなる群から選択される。

【0030】

本出願はまた、本明細書中に開示するようなP-カドヘリン抗体または抗原結合性断片をコードする核酸を開示する。特定実施形態では、核酸は、配列番号8、28、48、68、88、108、18、38、58、78、98、118、10、30、50、70、90、110、20、40、60、80、100、および120のヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、本出願は、本明細書に開示する核酸を含むベクター、ならびに本明細書中に開示するベクターまたは核酸を含む宿主細胞を企図する。さらに、P-カドヘリン抗体または抗原結合性断片を生成する方法であって、宿主細胞を培養することと、培養物から抗体を回収することとを含む方法が開示される。

【0031】

さらなる実施形態では、本出願は、抗P-カドヘリン抗体薬物コンジュゲートを生成する方法であって、

(a) SMC Cを薬物部分DM-1に化学的に連結させること、

(b) 上記リンカー-薬物を、請求項47に記載の細胞培養物から回収した抗体にコンジュゲートすること、および

(c) 抗体薬物コンジュゲートを精製すること

を含む、方法を開示する。別の実施形態では、抗P-カドヘリン抗体薬物コンジュゲートを生成する方法は、

(a) SMC Cを薬物部分DM-1に化学的に連結させること、

10

20

30

40

50

(b) 上記リンカー - 薬物を、本明細書中に開示するような抗体にコンジュゲートすること、および

(c) 抗体薬物コンジュゲートを精製すること

を含む。幾つかの実施形態では、これらの方法に従って作製される抗体薬物コンジュゲートは、約 3 . 8 の UV 分光光度計で測定される平均 D A R を有する。

【 0 0 3 2 】

他の実施形態では、本明細書中に開示する抗体、またはその抗原結合性断片は、診断剤として使用される。診断剤の幾つかの実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、放射性標識、フルオロフォア、発色団、イメージング剤、または金属イオンで標識される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 3 】

【図 1】図 1 は、ドメイン間接合部に位置する 3 つのカルシウム結合部位を有するヒト P - カドヘリンの細胞外ドメインの最初の 2 つのカドヘリン反復ドメインを示すヒト P - カドヘリン E C 1 _ E C 2 の結晶構造の全体図を表す。

【図 2】図 2 は、結晶の非対称ユニットを形成する 2 つのヒト P - カドヘリンタンパク質と複合体形成される 2 つの P - カドヘリン抗体 F a b の結晶構造の全体図を表す。挿入図は、2 つの P - カドヘリン分子の E C 1 ドメインを含む接触領域のクローズアップ図を表す。2 つの複合体間にほんの数個の結晶接触が存在する。

【図 3】図 3 は、P - カドヘリン抗体 N O V 1 6 9 N 3 1 Q の F a b の残基と接触するヒト P - カドヘリンエピトープ残基 (配列番号 1 3 3) を表すグラフである。ヒト P - カドヘリン E C 1 ドメインのアミノ酸配列は、水平軸上に列挙される。グラフの上部は、非水素原子間の 4 . 0 のカットオフ距離を使用したプログラム N C O N T により同定されるような、タンパク質抗原と抗体との間の直接的な分子間接触の数を示す。グラフの下部は、プログラム A R E A I M O L により算出されるような、抗体結合時の P - カドヘリン残基が招く溶媒接近可能表面積の低減を示す (2 で) 。 E C ドメインの - バレル構造は、鎖の番号付けに相当するラベルを伴う一連の矢印として図式的に示される。

【図 4】図 4 は、黒い棒状物質 (抗体図) で示される抗体 (4 . 0 カットオフ距離) と相互作用する全てのアミノ酸残基を伴うヒト P - カドヘリンの N - 末端カドヘリン反復 (E C 1) ドメイン (灰色の模式図) の結晶構造のクローズアップ図を表す。

【図 5】図 5 は、ヒト (配列番号 1 3 3) P - カドヘリン E C 1 ドメインおよびカニクイザル (「 c y n o 」 、カニクイザル (Macaca fascicularis)) (配列番号 1 3 4) P - カドヘリン E C 1 ドメインの配列アラインメントを表す。黒色太字のフォントのアミノ酸残基は、N O V 1 6 9 N 3 1 Q 抗体との直接的な分子間接触 (4 . 0 未満) に関与する。灰色太字のフォントで矢印とともに示されるアミノ酸残基は、さらに遠いが、抗体結合時にその溶媒接近可能表面の減少を受ける。両方のカテゴリーエピトープ残基が、カニクイザル P - カドヘリンで完全に保存されることに留意されたい。

【図 6】図 6 は、ヒトカドヘリンの E C 1 ドメインの多重配列アラインメントを表す (それぞれ、配列番号 1 3 5 ~ 1 4 3 、出現順で) 。 P - カドヘリンは、「カドヘリン - 3 」とも称されることに留意されたい。四角に囲った残基は、その溶媒接近可能表面の低減により決定されるように、抗原 - 抗体界面に位置する。ヒトカドヘリン 1 ~ 4 に見出される挿入は、太線で四角に囲われる。重要なエピトープ残基 G l u 1 5 5 は、他のヒトカドヘリンでは保存されない。

【図 7】図 7 は、P - カドヘリン媒介性細胞接着に対する P - カドヘリン抗体 N O V 1 6 9 N 3 1 Q の影響を示す顕微鏡写真を表す。細胞は、スフェロイド形成の誘導前に N O V 1 6 9 N 3 1 Q または非特異的ヒト I g G 1 抗体で前処理した。スフェロイド形状および密度は、1 3 2 時間のインキュベーション期間後に顕微鏡で評価した。

【図 8】図 8 は、P - カドヘリン陽性 (H C C 7 0 および H C C 1 9 5 4) および陰性 (H T 2 9) 細胞系における N O V 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1 の i n v i t r o での細胞毒性効力を示すグラフを表す。 (A) H C C 1 9 5 4 (P - カドヘリン +) 、 (B

10

20

30

40

50

）HCC70（P - カドヘリン + ）および（C）HT29（P - カドヘリン - ）細胞におけるNOV169N31Q - MCC - DM1の*in vitro*での用量応答。生存率は、遊離マイタンシン（L - DM1 - Me、黒丸）、アイソタイプ対照ADC（IgG1 - MCC - DM1、白四角）、NOV169N31Q - MCC - DM1の抗体構成成分（NOV169N31Q、白三角）およびNOV169N31Q - MCC - DM1（黒三角）による処置の5日後に測定した。

【図9】図9は、NOV169N31QおよびNOV169N31Q - MCC - DM1のADCC活性を示すグラフを表す。標的細胞を、固定数の新鮮なヒトNKエフェクター細胞（エフェクター対標的細胞比5：1）および増加量のNOV169N31Q（黒丸）、IgG1対照抗体（白丸）、NOV169N31Q - MCC - DM1（黒四角）またはIgG1 - SMCC - DM1（白四角）とともにインキュベートした。全ての試料を三重反復でランし、細胞生存率は、24時間後に評価した。

10

【図10】図10は、HCC70トリプルネガティブ乳がん皮下腫瘍異種移植片モデルにおけるNOV169N31Q - MCC - DM1 ADCの活性を示す一連のIHC画像を表す。画像は、単回用量のNOV169N31Q - MCC - DM1後の有糸分裂停止（p - ヒストンH3）を示す。

【図11】図11Aは、P - カドヘリンの発現を示すHCC70腫瘍組織上のP - カドヘリンに関するIHCの代表的な画像を表す。図11Bは、HCC70乳がん異種移植片モデルにおける各種P - カドヘリンADCの有効性を示すグラフを表す。

【図12】図12は、HCC70乳がん異種移植片モデルに対するNOV169N31Q - MCC - DM1の用量応答有効性を示すグラフを表す。

20

【図13 - 1】図13Aは、P - カドヘリンの発現を示すHCC1954腫瘍組織上のP - カドヘリンに関するIHCの代表的な画像を表す。図13Bは、HCC1954乳がん異種移植片モデルにおけるNOV169N31Q - MCC - DM1の有効性を示すグラフである。

【図13 - 2】図13Cは、HCC1954乳がん異種移植片モデルにおけるNOV169N31Q - MCC - DM1の有効性を示すグラフである。図13Dは、NOV169N31Q - MCC - DM1を使用した処置に応答したHCC1954乳がん異種移植片マウスの体重の変化を表すグラフである。

【図14】図14Aは、P - カドヘリンの発現を示すBICR6腫瘍組織上のP - カドヘリンに関するIHCの代表的な画像を表す。図14Bは、BICR6頭頸部がん異種移植片モデルにおけるNOV169N31Q - MCC - DM1の有効性を示すグラフを表す。

30

【図15】図15Aは、P - カドヘリンの発現を示すscaBER腫瘍組織上のP - カドヘリンに関するIHCの代表的な画像を表す。図15Bは、scaBER膀胱がん異種移植片モデルにおけるNOV169N31Q - MCC - DM1の有効性を示すグラフを表す。

【図16】図16は、HuPrimeED2267食道がん異種移植片モデルにおけるNOV169N31Q - MCC - DM1の有効性を示すグラフを表す。

【図17】図17は、HCC70乳がん異種移植片モデルにおける2つの異なるリンカー（MCC対CX1 - 1）を使用してDM1にコンジュゲートしている抗P - カドヘリンNEG0067の有効性を比較するグラフを表す。

40

【図18】図18は、HCC70乳がん異種移植片モデルにおけるSPDB - DM4リンカー - ペイロードを使用してコンジュゲートしている3つのマウスハイブリドーマ由来の抗P - カドヘリンADCの有効性を比較するグラフを表す。

【発明を実施するための形態】

【0034】

定義

別途記述しない限り、本明細書で使用される以下の用語および語句は、以下の意味を有することが意図される。

【0035】

50

用語「アルキル」とは、特定数の炭素原子を有する一価飽和炭化水素鎖を指す。例えば、 $C_1 \sim 6$ アルキルとは、1～6個の炭素原子を有するアルキル基を指す。アルキル基は、直鎖状または分枝状であってもよい。代表的な分枝状アルキル基は、1、2、または3個の分枝を有する。アルキル基の例としては、限定されるものではないが、メチル、エチル、プロピル（*n*-プロピルおよびイソプロピル）、ブチル（*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、および*t*-ブチル）、ペンチル（*n*-ペンチル、イソペンチル、およびネオペンチル）、ならびにヘキシルが挙げられる。

【0036】

本明細書で使用される用語「抗体」とは、非共有的に、可逆的に、および特異的様式で対応する抗原に結合することができる免疫グロブリンファミリーのポリペプチドを指す。例えば、天然のIgG抗体は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも2つの重鎖（H）と2つの軽鎖（L）とを含む四量体である。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書でVHと省略される）と、重鎖定常領域とから構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書でVLと省略される）と、軽鎖定常領域とから構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLから構成される。VHおよびVL領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる、より保存された領域が散在する、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域にさらに細分することができる。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4に配置される3つのCDRと、4つのFRから構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1成分（C1q）などの、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

【0037】

用語「抗体」は、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体など）を含む。抗体は、任意のアイソタイプ/クラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、またはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）のものであってもよい。

【0038】

「相補性決定ドメイン」または「相補性決定領域（「CDR」）」は、VLおよびVHの超可変領域を互換的に指す。CDRは、そのような標的タンパク質に対する特異性を担持する抗体鎖の標的タンパク質結合部位である。各ヒトVLまたはVH中には3つのCDR（CDR1～3、N末端から連続的に番号付けられる）が存在し、可変ドメインの約15～20%を占める。CDRは標的タンパク質のエピトープと構造的に相補的であり、かくして、結合特異性を直接担う。VLまたはVHの残りのストレッチ、いわゆるフレームワーク領域は、アミノ酸配列の変化をあまり示さない（Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000）。

【0039】

CDRとフレームワーク領域の位置を、当業界における様々な周知の定義、例えば、Kabatt、Chothia、国際Immunogeneticsデータベース（IMGT）（ワールドワイドウェブ上でwww.imgt.org/にて）およびAbM（例えば、Johnson et al., Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:877-883 (1989); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol., 273:927-748 (1997)を参照されたい）を使用して決定することができる。抗原結合部位の定義は、以下にも記載されている：Ruiz et al., Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000); およびLefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); およびMartin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin et al., Methods Enzymol., 203:121-153 (1991); およびRees et

10

20

30

40

50

al., In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。

【 0 0 4 0 】

軽鎖と重鎖は両方とも、構造的および機能的相同性の領域に分割される。用語「定常」および「可変」は機能的に使用される。これに関して、軽鎖 (V L) と重鎖 (V H) 部分の両方の可変ドメインポーションが抗原認識および特異性を決定付けることが理解される。逆に、軽鎖 (C L) および重鎖 (C H 1、C H 2 または C H 3) の定常ドメインは、分泌、経胎盤移動、F c 受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。慣例により、定常領域ドメインの番号付けは、それらが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端からより遠くなるにつれて増大する。N末端は可変領域であり、C末端は定常領域である；C H 3 および C L ドメインは、それぞれ、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端ドメインを実際に含む。

10

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用される用語「抗原結合性断片」とは、抗原のエピトープと特異的に相互作用する (例えば、結合、立体障害、安定化 / 脱安定化、空間分布により) 能力を保持する抗体の 1 または複数のポーションを指す。結合断片の例としては、限定されるものではないが、一本鎖 F v (s c F v)、ラクダ科抗体、ジスルフィド結合 F v (s d F v)、F a b 断片、F (a b') 断片、V L、V H、C L および C H 1 ドメインからなる一価断片；F (a b) 2 断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された 2 つの F a b 断片を含む二価断片；V H および C H 1 ドメインからなる F d 断片；抗体の単一アームの V L および V H ドメインからなる F v 断片；V H ドメインからなる d A b 断片 (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989)；ならびに単離された相補性決定領域 (C D R)、または抗体の他のエピトープ結合断片が挙げられる。

20

【 0 0 4 2 】

さらに、F v 断片の 2 つのドメイン、V L および V H は別々の遺伝子によりコードされるが、それらを、組換え方法を使用して、V L および V H 領域が対形成して一価分子 (一本鎖 F v (「s c F v」)) を形成する単一タンパク質鎖として作製することができる合成リンカーにより連結することができる；例えば、Bird et al., Science 242:423-426, 1988; および Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883, 1988 を参照されたい。そのような一本鎖抗体も、用語「抗原結合性断片」内に包含されることが意図される。これらの抗原結合性断片は、当業者には公知の従来の技術を使用して得られ、その断片はインタクト抗体と同じ様式で有用性についてスクリーニングされる。

30

【 0 0 4 3 】

抗原結合性断片を、単一ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、単一ドメイン抗体、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v - N A R および bis - s c F v (例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005 を参照されたい) 中に組込むこともできる。抗原結合性断片を、I I I 型フィブロネクチン (F n 3) などのポリペプチドに基づく足場中に移植することができる (フィブロネクチンポリペプチドモノボディを記載する米国特許第 6, 7 0 3, 1 9 9 号明細書を参照されたい)。

40

【 0 0 4 4 】

抗原結合性断片を、相補的軽鎖ポリペプチドと一緒に、抗原結合領域の対を形成する並列 F v セグメント対 (V H - C H 1 - V H - C H 1) を含む一本鎖分子に組込むことができる (Zapata et al., Protein Eng. 8:1057-1062, 1995; および米国特許第 5, 6 4 1, 8 7 0 号明細書)。

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、または同じ遺伝的起源に由来する抗体および抗原結合性断片などのポリペプチドを指す。この用語はまた、単一分子組成の抗体分子の調製物も含む。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合

50

特異性および親和性を示す。

【0046】

本明細書で使用される用語「ヒト抗体」は、フレームワーク領域とCDR領域の両方がヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体を含む。さらに、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域はまた、そのようなヒト配列、例えば、ヒト生殖系列配列、またはヒト生殖系列配列の変異型または例えば、Knappik et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000に記載のような、ヒトフレームワーク配列分析に由来するコンセンサスフレームワーク配列を含有する抗体に由来する。また、1つまたは複数のCDRが、親和性突然変異のために、または製造/ペイロードコンジュゲーション目的で突然変異されているヒト配列由来の抗体も含まれる。Hybridoma. 1997 Aug;16(4):381-9. Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS. Kilpatrick KE, Wring SA, Walker DH, Macklin MD, Payne JA, Su JL, Champion BR, Caterson B, McIntyre GD. Department of Molecular Sciences, Glaxo Wellcome, Research Triangle Park, NC 27709, USAを参照されたい。

10

【0047】

本発明のヒト抗体は、ヒト配列によりコードされないアミノ酸残基を含んでもよい（例えば、*in vitro*での無作為もしくは部位特異的突然変異誘発により、または*in vivo*での体細胞変異により、または安定性もしくは製造を促進するための保存的置換により導入される突然変異）。

【0048】

20

本明細書で使用される用語「認識する」とは、エピトープが直鎖状であろうと、立体構造的であろうと、そのエピトープを見つけて、それと相互作用する（例えば、結合する）抗体または抗原結合性断片を指す。用語「エピトープ」とは、本発明の抗体または抗原結合性断片が特異的に結合する抗原上の部位を指す。エピトープは、タンパク質の三次元折畳みにより並置される連続的アミノ酸または非連続的アミノ酸の両方から形成させることができる。連続的アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒への曝露の際に保持されるが、三次元折畳みにより形成されるエピトープは典型的には、変性溶媒による処理の際に失われる。エピトープは、典型的には、ユニークな空間的コンフォメーション中に少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のアミノ酸を含む。エピトープの空間的コンフォメーションを決定する方法は、当業界における技術、例えば、x線結晶学および2次元核磁気共鳴を含む（例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照されたい）。

30

【0049】

本明細書で使用される用語「親和性」とは、単一の抗原部位での抗体と抗原との相互作用の強度を指す。それぞれの抗原部位内で、抗体「アーム」の可変領域は、弱い非共有力を介して、いくつかの部位で抗原と相互作用する；相互作用が大きくなるほど、親和性が強くなる。

【0050】

用語「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す。しかしながら、1つの抗原に特異的に結合する単離された抗体は、他の抗原との交差反応性を有してもよい。さらに、単離された抗体は、他の細胞材料および/または化学物質を実質的に含まなくてもよい。

40

【0051】

用語「対応するヒト生殖系列配列」とは、ヒト生殖系列免疫グロブリン可変領域配列によりコードされる他の全ての既知の可変領域アミノ酸配列と比較して、参照可変領域アミノ酸配列またはサブ配列と最も高い決定されたアミノ酸配列同一性を有するヒト可変領域アミノ酸配列またはサブ配列をコードする核酸配列を指す。対応するヒト生殖系列配列はまた、他の全ての評価された可変領域アミノ酸配列と比較して、参照可変領域アミノ酸配列またはサブ配列と最も高いアミノ酸配列同一性を有するヒト可変領域アミノ酸配列また

50

はサブ配列を指してもよい。対応するヒト生殖系列配列は、フレームワーク領域のみ、相補性決定領域のみ、フレームワーク領域と相補性決定領域、可変セグメント（上記で定義されたもの）、または可変領域を含む配列もしくはサブ配列の他の組合せであってもよい。例えば、B L A S T、A L I G N、または当業界で公知の別のアラインメントアルゴリズムを使用して2つの配列を整列させる、本明細書に記載の方法を使用して、配列同一性を決定することができる。対応するヒト生殖系列核酸またはアミノ酸配列は、参照可変領域核酸またはアミノ酸配列との少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有してもよい。相当するヒト生殖系列配列は、例えば、公開されている国際ImMunoGeneTicsデータベース（IMG T）（ワールドワイドウェブ上でwww.imgt.org/にて）およびV - b a s e（ワールドワイドウェブ上でvbase.mrc-cpe.cam.ac.ukにて）によって決定することができる。

10

【0052】

抗原（例えば、タンパク質）と抗体、抗体断片、または抗体由来結合剤との間の相互作用を記述する文脈で使用される場合の語句「特異的に結合する」または「選択的に結合する」は、タンパク質および他の生物製剤の異種集団中の、例えば、生物試料、例えば、血液、血清、血漿または組織試料中の、抗原の存在を決定する結合反応を指す。かくして、ある特定の指定されたイムノアッセイ条件下では、特定の結合特異性を有する抗体または結合剤は、バックグラウンドの少なくとも2倍、特定の抗原に結合し、試料中に存在する他の抗原に有意な量で実質的に結合しない。一実施形態では、指定のイムノアッセイ条件下で、特定の結合特異性を有する抗体または結合剤は、バックグラウンドの少なくとも10倍、特定の抗原に結合し、試料中に存在する他の抗原に有意な量で実質的に結合しない。そのような条件下での抗体または結合剤への特異的結合は、特定のタンパク質に対するその特異性について抗体または薬剤を選択する必要がある。望ましい場合または適切な場合、この選択を、他の種（例えば、マウスもしくはラット）または他のサブタイプに由来する分子と交差反応する抗体を除去することにより達成することができる。あるいは、幾つかの実施形態では、ある特定の所望の分子と交差反応する抗体または抗体断片を選択する。

20

【0053】

様々なイムノアッセイ形式を使用して、特定のタンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択することができる。例えば、タンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択するためには、固相E L I S A イムノアッセイが日常的に使用される（例えば、特異的免疫反応性を決定するのに使用することができるイムノアッセイ形式および条件の説明については、Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998)を参照されたい）。典型的には、特異的または選択的結合反応は、バックグラウンドシグナルの少なくとも2倍、より典型的には、バックグラウンドの少なくとも10～100倍のシグナルをもたらす。

30

【0054】

用語「平衡解離定数（ K_D 、 M ）」とは、解離速度定数（ k_d 、時間 $^{-1}$ ）を結合速度定数（ k_a 、時間 $^{-1}$ 、 M^{-1} ）で除算したものを指す。当業界における任意の公知の方法を使用して、平衡解離定数を測定することができる。本発明の抗体は一般に、約 10^{-7} または $10^{-8} M$ 未満、例えば、約 $10^{-9} M$ または $10^{-10} M$ 未満、幾つかの実施形態では、約 $10^{-11} M$ 、 $10^{-12} M$ または $10^{-13} M$ 未満の平衡解離定数を有する。

40

【0055】

用語「バイオアベイラビリティ」とは、患者に投与される所与の量の薬物の全身利用能（すなわち、血液/血漿レベル）を指す。バイオアベイラビリティは、投与される剤形から全身循環に達する薬物の時間（速度）と総量（程度）の両方の尺度を示す絶対項である。

【0056】

50

本明細書で使用される語句「から本質的になる」とは、方法または組成物中に含まれる活性薬剤の属または種、ならびに方法または組成物の意図される目的にとって不活性な任意の賦形剤を指す。幾つかの実施形態では、語句「から本質的になる」は、本発明の抗体薬物コンジュゲート以外の1または複数のさらなる活性剤の含有を明確に排除する。幾つかの実施形態では、語句「から本質的になる」は、本発明の抗体薬物コンジュゲート以外の1または複数のさらなる活性剤と、第2の同時投与される薬剤との含有を明確に排除する。

【0057】

用語「アミノ酸」とは、天然の、合成の、および非天然のアミノ酸、ならびに天然のアミノ酸と類似する様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸は、遺伝子コードによりコードされるもの、ならびに後に改変されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 α -カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体とは、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を有する化合物、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムに結合した α -炭素を指す。そのような類似体は改変されたR基（例えば、ノルロイシン）または改変ペプチド骨格を有するが、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を保持する。アミノ酸模倣体とは、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と類似する様式で機能する化合物を指す。

【0058】

用語「保存的に改変されたバリエーション」は、アミノ酸配列と核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変されたバリエーションとは、同一の、もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝子コードの縮重性のため、多数の機能的に同一の核酸が、任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUは全て、アミノ酸アラニンをコードする。かくして、アラニンがあるコドンによって特定される全ての位置で、そのコドンを、コードされるポリペプチドを変化させることなく記載される対応するコドンのいずれかに変化させてもよい。そのような核酸変化は「サイレント変異」であり、保存的に改変されたバリエーションの1種である。ポリペプチドをコードする全ての核酸配列はまた、核酸の全ての可能なサイレント変異を記述する。当業者であれば、核酸中のそれぞれのコドン（通常はメチオニンのための唯一のコドンであるAUGと、通常はトリプトファンのための唯一のコドンであるTGGを除く）を改変して、機能的に同一の分子を得ることができることを認識できる。従って、ポリペプチドをコードする核酸のそれぞれのサイレント変異は、それぞれ記載される配列中で暗黙的である。

【0059】

ポリペプチド配列について、「保存的に改変されたバリエーション」は、あるアミノ酸の、化学的に類似するアミノ酸との置換をもたらすポリペプチド配列に対する個々の置換、欠失または付加を含む。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的置換表は、当業界で周知である。そのような保存的に改変されたバリエーションは、本発明の多型バリエーション、種間相同体、および対立遺伝子だけでなく、それを排除しない。以下の8群は、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する：1) アラニン(A)、グリシン(G)；2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；4) アルギニン(R)、リシン(K)；5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；7) セリン(S)、トレオニン(T)；および8) システイン(C)、メチオニン(M)（例えば、Creighton, Proteins (1984)を参照されたい）。幾つかの実施形態では、用語「保存的配列改変」は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に有意に影響しないか、またはそれを変化させないアミノ酸改変を指すように使用される。

【0060】

本明細書で使用される用語「最適化された」とは、生成細胞または生物、一般には、真核細胞、例えば、酵母細胞、ピチア (Pichia) 細胞、真菌細胞、トリコデルマ (Trichoderma) 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) またはヒト細胞において好ましいコドンを使用してアミノ酸配列をコードするように変化させたヌクレオチド配列を指す。最適化されたヌクレオチド配列は、「親」配列としても知られる、出発ヌクレオチド配列により元々コードされるアミノ酸配列を完全に、またはできるだけ多く保持するように操作される。

【0061】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈における用語「同一であるパーセント」または「同一性パーセント」とは、2つ以上の配列またはサブ配列が同じである程度を指す。2つの配列は、それらが比較される領域にわたってアミノ酸またはヌクレオチドの同じ配列を有する場合、「同一」である。2つの配列が、以下の配列比較アルゴリズムの1つを使用して、もしくは手動によるアラインメントおよび視覚的検査により測定される比較ウィンドウ、または指定の領域にわたって最大の一致のために比較および整列された場合、同じであるアミノ酸残基またはヌクレオチドの特定のパーセンテージ (すなわち、特定の領域にわたって、または特定されない場合、配列全体にわたって60%の同一性、任意選択で、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の同一性) を有する場合、2つの配列は「実質的に同一」である。任意選択で、同一性は、長さ少なくとも約30ヌクレオチド (または10アミノ酸) である領域にわたって、またはより好ましくは、長さ100~500もしくは1000以上のヌクレオチド (または20、50、200以上のアミノ酸) である領域にわたって存在する。

【0062】

配列比較のために、典型的には、1つの配列は、試験配列が比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列と参照配列とをコンピュータに入力し、サブ配列座標を指定し、必要に応じて、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用するか、または代替パラメータを指定することができる。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、参照配列と比較した試験配列に関する配列同一性パーセントを算出する。

【0063】

本明細書で使用される場合、「比較ウィンドウ」は、2つの配列を最適に整列させた後に、配列を同じ数の連続する位置の参照配列と比較することができる、20~600、通常は約50~約200、より通常は約100~約150からなる群から選択される連続する位置数の任意の1つのセグメントに対する参照を含む。比較のための配列のアラインメントの方法は、当業界で周知である。比較のための配列の最適なアラインメントを、例えば、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482c (1970)の部分相同性アルゴリズムにより、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA) により、または手動によるアラインメントおよび視覚的検査 (例えば、Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, 2003を参照されたい) により行うことができる。

【0064】

配列同一性および配列類似性のパーセントを決定するのに好適であるアルゴリズムの2つの例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これらは、それぞれ、Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; およびAltschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990に記載されている。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationにより公共的に利用可能である。このアルゴリズムは、データ

ベース配列中の同じ長さのワードと整列させた場合に、いくつかの正の値の閾値スコア T と一致するか、またはそれを満足する、クエリー配列中の短いワード長 W を同定することにより高スコアリング配列対 (HSP) を最初に同定することを含む。 T は、近隣ワードスコア閾値と呼ばれる (Altschul et al., supra)。これらの初期近隣ワードヒットは、それらを含むより長い HSP を発見するための検索を開始するための種子として作用する。ワードヒットは、累積アラインメントスコアを増大させることができる限りそれぞれの配列に沿った両方の方向に伸長される。累積スコアを、ヌクレオチド配列については、パラメーター M (一致する残基の対に関するリワードスコア; 常に > 0) および N (不一致の残基のためのペナルティスコア; 常に < 0) を使用して算出する。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスを使用して、累積スコアを算出する。それぞれの方向におけるワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアがその最大達成値から量 X 減少する場合、停止される; 1 または複数の負のスコアの残基アラインメントの累積のため、累積スコアはゼロ以下になる; またはいずれかの配列の末端に到達する。BLAST アルゴリズムパラメーター W 、 T 、および X は、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTN プログラム (ヌクレオチド配列に関する) は、デフォルトとして、 11 のワード長 (W)、 10 の期待値 (E)、 $M = 5$ 、 $N = -4$ および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列については、BLASTP プログラムは、デフォルトとして、 3 のワード長、および 10 の期待値 (E)、および BLOSUM62 スコアリングマトリックス (Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 を参照されたい)、 50 のアラインメント (B)、 10 の期待値 (E)、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 、および両方の鎖の比較を使用する。

【0065】

BLAST アルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計分析を実施する (例えば、Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993 を参照されたい)。BLAST アルゴリズムにより提供される類似性の1つの尺度は、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然生じる確率の指示を提供する、最小合計確率 ($P(N)$) である。例えば、試験核酸と参照核酸との比較における最小合計確率が約 0.2 未満、より好ましくは、約 0.01 未満、および最も好ましくは、約 0.001 未満である場合、核酸は参照配列と類似すると考えられる。

【0066】

2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを、PAM120 ウェイト残テーブル (weight residue table)、 12 のギャップ長ペナルティおよび 4 のギャップペナルティを使用して、ALIGN プログラム (バージョン 2.0) に組み込まれた E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, 1988 のアルゴリズムを使用して決定することもできる。さらに、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを、BLOSUM62 マトリックスまたは PAM250 マトリックス、ならびに 16 、 14 、 12 、 10 、 8 、 6 、または 4 のギャップ重量および 1 、 2 、 3 、 4 、 5 または 6 の長さ重量を使用して、GCG ソフトウェアパッケージ中の GAPP プログラム (www.gcg.com で利用可能) に組み込まれた Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970 のアルゴリズムを使用して決定することができる。

【0067】

上記の配列同一性のパーセンテージ以外に、2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であることの別の指示は、以下に記載のように、第1の核酸によりコードされるポリペプチドが、第2の核酸によりコードされるポリペプチドに対して生じた抗体と免疫学的に交差反応することである。かくして、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、ポリペプチドは典型的には第2のポリペプチドと実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であることの別の指示は、以下に記載のように、2つの分子またはその相補体が、ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。2つの核酸配列が実質的に同一であることのさらに別の指示は、同じプライマーを使用してその配列を増幅することができることである。

【 0 0 6 8 】

用語「核酸」は、本明細書では、用語「ポリヌクレオチド」と互換的に使用され、一本鎖または二本鎖形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそのポリマーを指す。この用語は、合成である、天然である、および非天然である、参照核酸と類似する結合特性を有する、ならびに参照ヌクレオチドと類似する様式で代謝される、公知のヌクレオチド類似体または改変された骨格残基もしくは結合を含有する核酸を包含する。そのような類似体の例としては、限定されるものではないが、ホスホロチオエート (phosphorothioate)、ホスホルアミデート (phosphoroamidate)、メチルホスホン酸、キラル-メチルホスホン酸、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸 (PNA) が挙げられる。

10

【 0 0 6 9 】

別途指摘しない限り、特定の核酸配列は、保存的に改変されたそのバリエーション (例えば、縮重コドン置換) および相補配列、ならびに明示的に示される配列も暗示的に包含する。特に、以下に詳述されるように、1または複数の選択された (または全ての) コドンの第3の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより、縮重コドン置換を達成することができる (Batzer et al., (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al., (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; および Rossolini et al., (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98)。

【 0 0 7 0 】

核酸の文脈における用語「作動可能に連結された」とは、2つ以上のポリヌクレオチド (例えば、DNA) セグメント間の機能的関係を指す。典型的には、それは、転写される配列に対する転写調節配列の機能的関係を指す。例えば、プロモーターまたはエンハンサー配列が適切な宿主細胞または他の発現系においてコード配列の転写を刺激またはモジュレートする場合、それはコード配列に作動可能に連結されている。一般に、転写される配列に作動可能に連結されたプロモーター転写調節配列は、転写される配列に対して物理的に連続している、すなわち、それらは cis 作用性である。しかしながら、エンハンサーなどのいくつかの転写調節配列は、それらが転写を増強するコード配列に対して物理的に連続しているか、またはそれに近接して位置する必要はない。

20

【 0 0 7 1 】

用語「ポリペプチド」と「タンパク質」とは、アミノ酸残基のポリマーを指すように本明細書では互換的に使用される。この用語は、1または複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工化学模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーおよび非天然アミノ酸ポリマーに適用される。別途指摘しない限り、特定のポリペプチド配列は、保存的に改変されたそのバリエーションも暗示的に包含する。

30

【 0 0 7 2 】

本明細書で使用される用語「抗体薬物コンジュゲート」または「イムノコンジュゲート」は、抗体またはその抗原結合性断片と、化学療法剤、毒素、免疫治療剤、イメージングプローブなどの別の薬剤との連結を指す。連結は、共有結合、または静電力などを介する非共有相互作用であってもよい。当業界で公知の様々なリンカーを使用して、抗体薬物コンジュゲートを形成させることができる。さらに、抗体薬物コンジュゲートを、イムノコンジュゲートをコードするポリヌクレオチドから発現させることができる融合タンパク質の形態で提供することができる。本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」とは、別々のタンパク質 (ペプチドおよびポリペプチドを含む) を元々コードしていた2つ以上の遺伝子または遺伝子断片の連結により作出されるタンパク質を指す。融合遺伝子の翻訳は、元のタンパク質の各々に由来する機能特性を有する単一のタンパク質をもたらす。

40

【 0 0 7 3 】

用語「対象」は、ヒトおよび非ヒト動物を含む。非ヒト動物は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、および爬虫類を含む。注記しない限り、用語「患者」または「対象」は、互換的に本明細書に使用される。

50

【0074】

本明細書で使用される用語「細胞毒素」または「細胞毒性剤」は、細胞の成長および増殖にとって有害であり、細胞または悪性腫瘍を減少させる、阻害する、または破壊するように作用することができる任意の薬剤を指す。

【0075】

本明細書で使用される用語「抗がん剤」とは、限定されるものではないが、細胞毒性剤、化学療法剤、放射線療法および放射線療法剤、標的化抗がん剤、ならびに免疫治療剤などの、がんなどの細胞増殖障害を処置するために使用することができる任意の薬剤を指す。

【0076】

本明細書で使用される用語「薬物部分」または「ペイロード」とは、本発明の抗体または抗原結合性断片にコンジュゲートされ、任意の治療剤または診断剤、例えば、抗がん剤、抗炎症剤、抗感染剤（例えば、抗真菌剤、抗細菌剤、抗寄生虫剤、抗ウイルス剤）、または麻酔剤を含んでもよい化学部分を指す。例えば、薬物部分は、細胞毒のような抗がん剤であり得る。特定の実施形態では、薬物部分は、V - A T P a s e 阻害剤、H S P 9 0 阻害剤、I A P 阻害剤、m T o r 阻害剤、微小管安定化剤、微小管脱安定化剤、アウリスチン、ドラスタチン、メイタンシノイド、M e t A P（メチオニンアミノペプチダーゼ）、タンパク質 C R M 1 の核外輸送の阻害剤、D P P I V 阻害剤、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害剤、タンパク質合成阻害剤、キナーゼ阻害剤、C D K 2 阻害剤、C D K 9 阻害剤、プロテアソーム阻害剤、キネシン阻害剤、H D A C 阻害剤、D N A 損傷剤、D N A アルキル化剤、D N A インターカレーター、D N A 副溝結合剤および D H F R 阻害剤から選択される。これらの各々を、抗体と適合するリンカーに結合させるための方法および本発明の方法は、当業界で公知である。例えば、Singh et al., (2009) The therapeutic Antibodies: Methods and Protocols, vol. 525, 445-457を参照されたい。さらに、ペイロードは、生物物理学的プローブ、フルオロフォア、スピン標識、赤外線プローブ、親和性プローブ、キレート剤、分光プローブ、放射性プローブ、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、スピン標識、D N A、R N A、タンパク質、ペプチド、表面、抗体、抗体断片、ナノ粒子、量子ドット、リボソーム、P L G A 粒子、サッカリドまたはポリサッカリドであってもよい。

【0077】

用語「メイタンシノイド薬物部分」は、メイタンシノイド化合物の構造を有する抗体薬物コンジュゲートの下部構造を意味する。メイタンシノイドは、東アフリカの低木メイテナス・セラタ (Maytenus serrata) から初めて単離された（米国特許第 3, 896, 111 号明細書）。その後、ある特定の微生物も、メイタンシノールおよび C - 3 メイタンシノールエステルなどのメイタンシノイドを生成することが発見された（米国特許第 4, 151, 042 号明細書）。合成メイタンシノールおよびメイタンシノール類似体が報告されている。米国特許第 4, 137, 230 号明細書；第 4, 248, 870 号明細書；第 4, 256, 746 号明細書；第 4, 260, 608 号明細書；第 4, 265, 814 号明細書；第 4, 294, 757 号明細書；第 4, 307, 016 号明細書；第 4, 308, 268 号明細書；第 4, 308, 269 号明細書；第 4, 309, 428 号明細書；第 4, 313, 946 号明細書；第 4, 315, 929 号明細書；第 4, 317, 821 号明細書；第 4, 322, 348 号明細書；第 4, 331, 598 号明細書；第 4, 361, 650 号明細書；第 4, 364, 866 号明細書；第 4, 424, 219 号明細書；第 4, 450, 254 号明細書；第 4, 362, 663 号明細書；および第 4, 371, 533 号明細書、ならびに Kawai et al (1984) Chem. Pharm. Bull. 3441-3451（それぞれ参照により明示的に組み込まれる）を参照されたい。コンジュゲーションにとって有用な特定のメイタンシノイドの例としては、D M 1、D M 3 および D M 4 が挙げられる。

【0078】

「腫瘍」とは、悪性であっても、または良性であっても、新生物性細胞成長および増殖、ならびに全ての前がん性およびがん性細胞および組織を指す。

【 0 0 7 9 】

用語「抗腫瘍活性」は、腫瘍細胞の増殖、生存能力、または転移活性の速度の低下を意味する。例えば、抗腫瘍活性は、治療中に生じる異常細胞の成長速度の低下または腫瘍サイズの安定性もしくは低減、または治療法を用いない対照と比較した場合の治療法に起因したより長い生存により示され得る。そのような活性を、限定されるものではないが、異種移植片モデル、同種移植モデル、MMTVモデル、および抗腫瘍活性を調査するための当業界で公知の他のモデルなどの *in vitro* または *in vivo* 腫瘍モデルにおいて受け入れられるものを使用して評価することができる。

【 0 0 8 0 】

用語「悪性腫瘍」とは、非良性腫瘍またはがんを指す。本明細書で使用される用語「がん」は、脱調節された、または制御されない細胞成長を特徴とする悪性腫瘍を含む。例示的ながんとしては、がん腫、肉腫、白血病、およびリンパ腫が挙げられる。

【 0 0 8 1 】

用語「がん」は、原発性悪性腫瘍（例えば、細胞が元の腫瘍部位以外の対象の身体部位に移動していないもの）および二次悪性腫瘍（例えば、元の腫瘍部位とは異なる第2の部位への腫瘍細胞の移動である転移から生じるもの）を含む。

【 0 0 8 2 】

「P - カドヘリン」（P c a d、P C a d、またはC D H 3としても公知）という用語は、GenBank受託番号NP__001784、NP__001784.2（アミノ酸配列）、およびNM__001793.4、GenBank受託番号AA14462、NG__009096、およびNG__009096.1（ヌクレオチド配列）で公開されているP - カドヘリンの核酸およびアミノ酸配列を指す。ヒトP - カドヘリンドメイン1～5に関する配列情報は、細胞外であり、GenBank受託番号NM__001793.4およびNP__001784で公開されている。

【 0 0 8 3 】

「P - カドヘリン」はまた、その完全長にわたって、上記GenBank受託番号NP__001784、NP__001784.2のアミノ酸配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%配列同一性を有するタンパク質およびアミノ酸配列を指す。

【 0 0 8 4 】

構造的に、P - カドヘリン核酸配列は、その細胞外ドメインにわたって、GenBank受託番号NP__001793.4、GenBank受託番号AA14462、NG__009096、およびNG__009096.1の核酸配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%配列同一性を有する。

【 0 0 8 5 】

本明細書で使用される場合、任意の疾患または障害の用語「処置する」、「処置すること」または「処置」とは、一実施形態では、疾患または障害を改善すること（すなわち、疾患または少なくとも1つのその臨床症状の発生を減速させるか、または停止させるか、または軽減すること）を指す。別の実施形態では、「処置する」、「処置すること」または「処置」とは、患者によって認識できないものを含む少なくとも1つの物理的パラメータを軽減または改善することを指す。さらに別の実施形態では、「処置する」、「処置すること」または「処置」とは、疾患または障害を、物理的に（例えば、認識できる症状の安定化）、生理的に（例えば、物理的パラメータの安定化）、またはその両方で調節することを指す。さらに別の実施形態では、「処置する」、「処置すること」または「処置」とは、疾患または障害の開始または発生または進行を防止する、または遅延させることを指す。

【 0 0 8 6 】

用語「治療的に許容される量」または「治療有効用量」は、所望の結果（すなわち、腫瘍サイズの低下、腫瘍成長の阻害、転移の防止、ウイルス、細菌、真菌または寄生虫感染

10

20

30

40

50

の阻害または防止)を得るのに十分な量を互換的に指す。幾つかの実施形態では、治療的に許容される量は、望ましくない副作用を誘導しない、または引き起こさない。幾つかの実施形態では、治療上許容される量は、副作用(但し、患者の状態を考慮して、医療機関により許容されるもののみ)を誘導するか、またそれを引き起こす。治療的に許容される量を、最初は低用量を投与し、次いで、所望の効果が達成されるまでその用量を徐々に増加させることにより決定することができる。「予防有効用量」および「治療有効用量」の本発明の分子は、がんと関連する症状などの疾患症状の、それぞれ、開始を防止するか、またはその重症度の低下をもたらし得る。

【0087】

用語「同時投与する」とは、個体の血液中の2つの活性薬剤の存在を指す。同時投与される活性薬剤を、同時に、または連続的に送達することができる。

10

【0088】

本発明は、P-カドヘリンに結合する抗体、抗体断片(例えば、抗原結合性断片)、およびそれらの薬物コンジュゲート、すなわち抗体薬物コンジュゲートまたはADCを提供する。特に、本発明は、P-カドヘリンに結合し、そのような結合の際に内在化する抗体および抗体断片(例えば、抗原結合性断片)を提供する。本発明の抗体および抗体断片(例えば、抗原結合性断片)を、抗体薬物コンジュゲートを生成するために使用することができる。さらに、本発明は、望ましい薬物動態特性および他の望ましい属性を有し、したがって、P-カドヘリンを発現するがんを処置するのに使用され得る抗体薬物コンジュゲートを提供する。本発明はさらに、本発明の抗体薬物コンジュゲートを含む医薬組成物、

20

【0089】

抗体薬物コンジュゲート

本発明は、イムノコンジュゲートとも称される抗体薬物コンジュゲートを提供し、ここで、P-カドヘリンに特異的に結合する抗体、抗原結合性断片またはその機能的等価物は、薬物部分に連結される。一態様では、本発明の抗体、抗原結合性断片またはその機能的等価物は、リンカーによる共有結合を介して、抗がん剤である薬物部分に連結される。本発明の抗体薬物コンジュゲートは、有効用量の抗がん剤(例えば、細胞毒性剤)を、P-カドヘリンを発現する腫瘍組織に選択的に送達し、それによって、より高い選択性(およびより低い有効用量)を達成することができる。

30

【0090】

一態様では、本発明は、式(I)：

$$Ab - (L - (D)_m)_n$$

(式中、Abは、本明細書に記載のP-カドヘリン結合抗体を表し；

Lはリンカーであり；

Dは薬物部分であり；

mは1～8の整数であり；および

nは1～20の整数である)

のイムノコンジュゲートを提供する。一実施形態では、nは1～10、2～8、または2～5の整数である。特定の実施形態では、nは2、3または4である。幾つかの実施形態では、mは1である。他の実施形態では、mは2、3または4である。

40

【0091】

薬物と抗体の比率は特定のコンジュゲート分子については正確な値を有するが(例えば、式(I)中でmを掛けたn)、その値は、典型的には、コンジュゲーションステップと関連する、ある程度の不均等性のため、多くの分子を含有する試料を記述するために使用される場合には平均値であることが多いことを理解されたい。イムノコンジュゲートの試料に関する平均充填量を、本明細書では薬物と抗体の比率、または「DAR」と呼ぶ。幾つかの実施形態では、薬物がメイタンシノイドである場合、それは、「MAR」と称される。幾つかの実施形態では、DARは約2～約6であり、典型的には、約3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7.0、7.5、8.0である。幾つかの実施形態

50

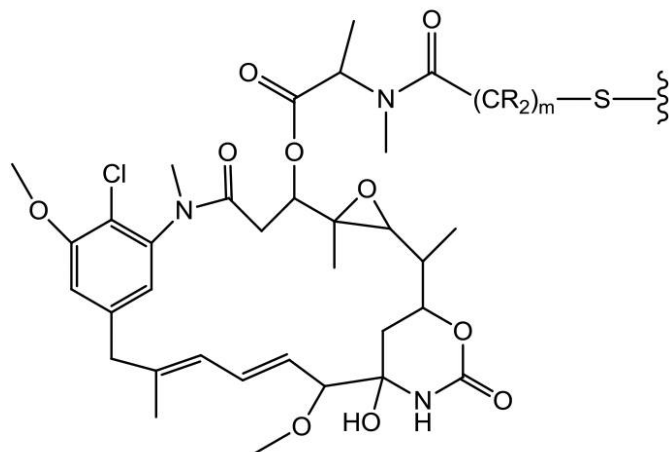
では、試料の少なくとも50重量%は、平均 $DAR \pm 2$ を有する化合物であり、好ましくは、試料の少なくとも50%は、平均 $DAR \pm 1$ を含有するコンジュゲートである。実施形態は、 DAR が約3.5、3.6、3.7、3.8または3.9であるイムノコンジュゲートを含む。幾つかの実施形態では、「約 n 」の DAR は、 DAR の測定値が n の20%以内にあることを意味する。

【0092】

本発明はまた、薬物部分に連結またはコンジュゲートされた、本明細書に開示される抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）およびその機能的等価物を含むイムノコンジュゲートに関する。一実施形態では、薬物部分Dは、構造：

【0093】

【化2】



（式中、波線は抗体薬物コンジュゲートのリンカーへのメイタンシノイドの硫黄原子の共有結合を示す）

を有するものなどの、メイタンシノイド薬物部分である。Rは、出現する毎に、独立にHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである。アミド基を硫黄原子に結合させるアルキレン鎖は、メタニル、エタニル、またはプロピルであってよい、すなわち、 m は1、2または3である（米国特許第633,410号明細書、米国特許第5,208,020号明細書、Chari et al. (1992) Cancer Res. 52; 127-131、Lui et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618-8623）。

【0094】

メイタンシノイド薬物部分の全ての立体異性体、すなわち、メイタンシノイドのキラル炭素でのRおよびS配置の任意の組合せが、本発明のイムノコンジュゲートについて企図される。一実施形態では、メイタンシノイド薬物部分は、以下の立体化学を有する。

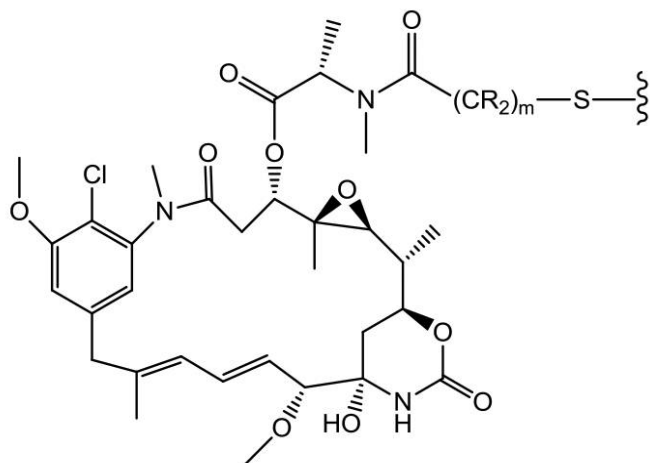
【0095】

10

20

30

【化 3】



10

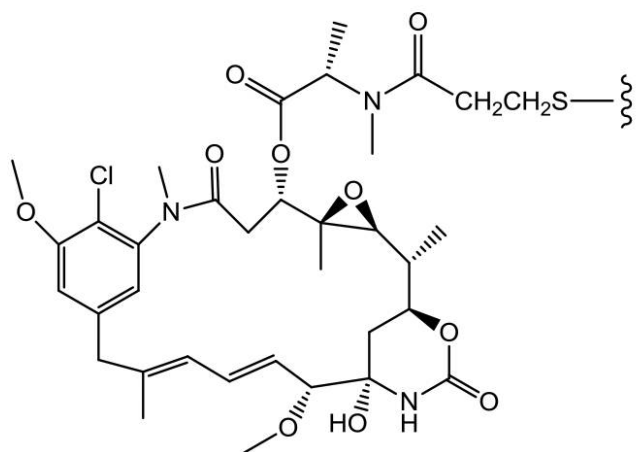
【 0 0 9 6 】

一実施形態では、メイタンシノイド薬物部分は、 $N^{2'}$ - デアセチル - $N^{2'}$ - (3 -メルカプト - 1 - オキソプロピル) - メイタンシン (DM 1 としても知られる) である。DM 1 は、以下の構造式により表される。

20

【 0 0 9 7 】

【化 4】



30

DM1

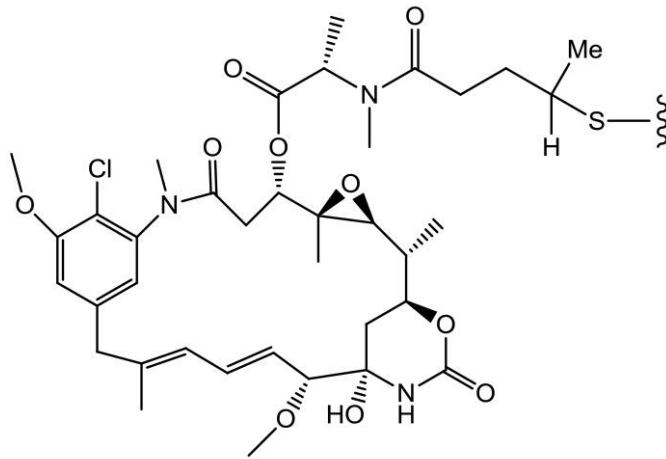
【 0 0 9 8 】

別の実施形態では、メイタンシノイド薬物部分は、 $N^{2'}$ - デアセチル - $N^{2'}$ - (4 -メルカプト - 1 - オキソペンチル) - メイタンシン (DM 3 としても知られる) である。DM 3 は、以下の構造式により表される。

40

【 0 0 9 9 】

【化5】



DM3

10

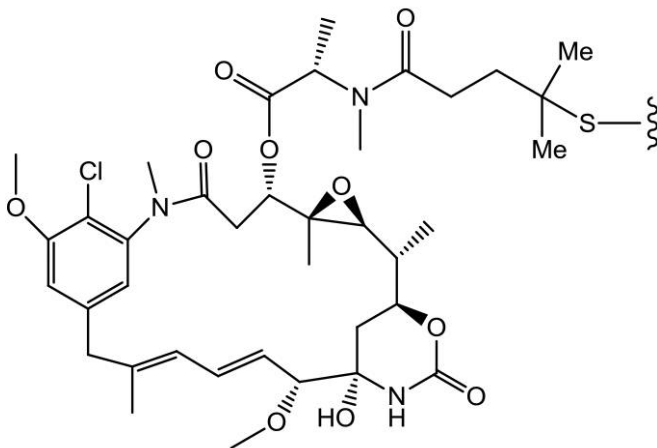
【0100】

別の実施形態では、メイタンシノイド薬物部分は、 $N^{2'}$ -デアセチル- $N^{2'}$ -(4-メチル-4-メルカプト-1-オキソペンチル)-メイタンシン(DM4としても知られる)である。DM4は、以下の構造式により表される。

20

【0101】

【化6】



DM4

30

【0102】

薬物部分Dは、リンカーLによって抗体Abに連結され得る。Lは、共有結合によって薬物部分を抗体に連結することが可能な任意の化学部分である。架橋試薬は、薬物部分および抗体を連結して、抗体薬物コンジュゲートを形成するのに使用され得る二官能性または多官能性試薬である。抗体薬物コンジュゲートは、薬物部分および抗体への結合を可能にする反応官能性を有する架橋試薬を使用して調製することができる。例えば、システイン、チオールまたはアミン、例えばN末端またはアミノ酸鎖側鎖(抗体のリシンのような)は、架橋試薬の官能基と結合を形成することができる。

40

【0103】

一実施形態では、Lは切断性リンカーである。別の実施形態では、Lは非切断性リンカーである。幾つかの実施形態では、Lは酸不安定リンカー、光不安定リンカー、ペプチダ

50

ーゼ切断性リンカー、エステラーゼ切断性リンカー、ジスルフィド結合切断性リンカー、親水性リンカー、プロチャージリンカー、またはジカルボン酸に基づくリンカーである。

【0104】

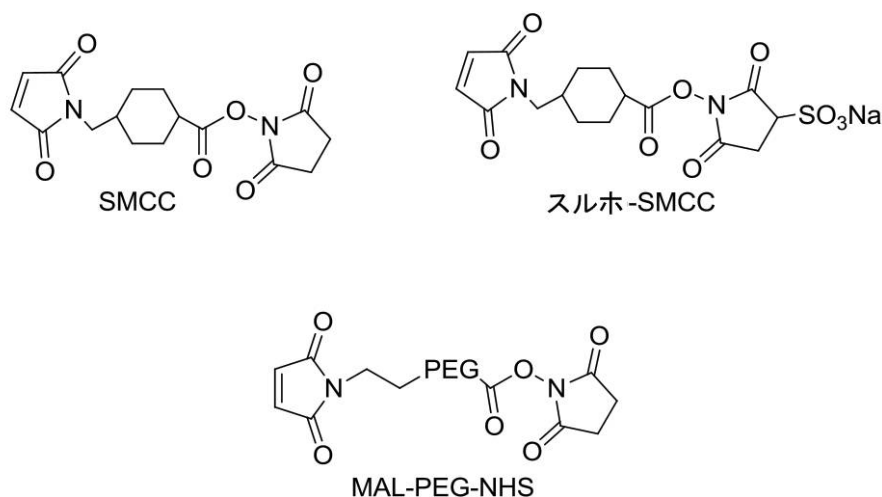
薬物部分、例えば、メイタンシノイドと、抗体との間で非切断性リンカーを形成する好適な架橋試薬は当業界で周知であり、硫黄原子（SMCCなど）を含む非切断性リンカーまたは硫黄原子を含まないものを形成することができる。薬物部分、例えば、メイタンシノイドと、抗体との間で非切断性リンカーを形成する好ましい架橋試薬は、マレイミドまたはハロアセチルに基づく部分を含む。本発明によれば、そのような非切断性リンカーは、マレイミドまたはハロアセチルに基づく部分に由来すると言われる。

【0105】

マレイミドに基づく部分を含む架橋試薬としては、限定されるものではないが、N - スクシンイミジル - 4 - (マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (SMCC)、スルホスクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - SMCC)、SMCCの「長鎖」類似体 (LC - SMCC)である N - スクシンイミジル - 4 - (マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシ - (6 - アミドカプロエート)、 - マレイミドウンデカン酸 N - スクシンイミジルエステル (KMUA)、 - マレイミド酪酸 N - スクシンイミジルエステル (GMB S)、 - マレイミドカプロン酸 N - スクシンイミジルエステル (EMCS)、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)、N - (- マレイミドアセトキシ) - スクシンイミドエステル (AMSA)、スクシンイミジル - 6 - (- マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート (SMPH)、N - スクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート (SMPB)、N - (- p - マレオミドフェニル)イソシアネート (PMIP)およびMAL - PEG - NHSなどのポリエチレングリコールスペースを含有するマレイミドに基づく架橋試薬が挙げられる。これらの架橋試薬は、マレイミドに基づく部分に由来する非切断性リンカーを形成する。マレイミドに基づく架橋試薬の代表的な構造は、以下に示される。

【0106】

【化7】



【0107】

別の実施形態では、リンカー L は、N - スクシンイミジル - 4 - (マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート (SMCC)、スルホスクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - SMCC) または MAL - PEG - NHS に由来する。

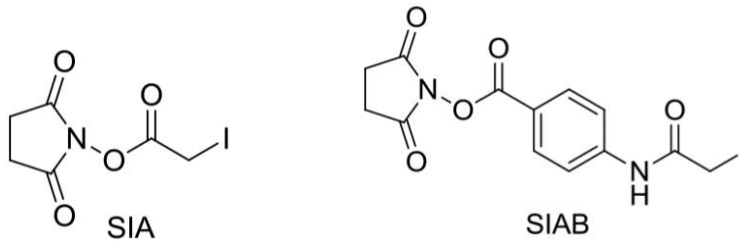
【0108】

ハロアセチルに基づく部分を含む架橋試薬としては、N - スクシンイミジルヨードアセ

テート (SIA)、N - スクシンイミジル (4 - ヨードアセチル) アミノベンゾエート (SIAB)、N - スクシンイミジルプロモアセテート (SBA) および N - スクシンイミジル 3 - (プロモアセトアミド) プロピオネート (SBAP) が挙げられる。これらの架橋試薬は、ハロアセチルに基づく部分に由来する非切断性リンカーを形成する。ハロアセチルに基づく架橋試薬の代表的な構造は、以下に示される。

【0109】

【化8】



または

【0110】

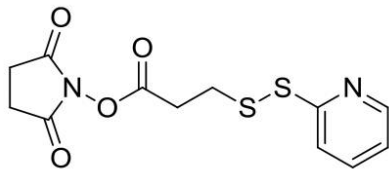
一実施形態では、リンカー L は、N - スクシンイミジルヨードアセテート (SIA) または N - スクシンイミジル (4 - ヨードアセチル) アミノベンゾエート (SIAB) に由来する。

【0111】

薬物部分、例えば、メイタンシノイドと、抗体との間で切断性リンカーを形成する好適な架橋試薬は、当業界で周知である。ジスルフィド含有リンカーは、生理的条件下で起こり得るジスルフィド交換を介して切断可能であるリンカーである。本発明によれば、そのような切断性リンカーは、ジスルフィドに基づく部分に由来すると言われる。好適なジスルフィド架橋試薬としては、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)、N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペタノエート (SPP)、N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (SPDB) および N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) 2 - スルホ - ブタノエート (スルホ - SPDB) が挙げられ、その構造は以下に示される。これらのジスルフィド架橋試薬は、ジスルフィドに基づく部分に由来する切断性リンカーを形成する。

【0112】

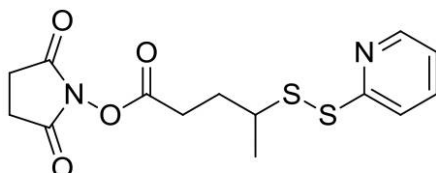
【化9】



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)、

【0113】

【化10】



10

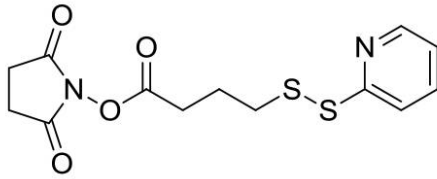
20

30

40

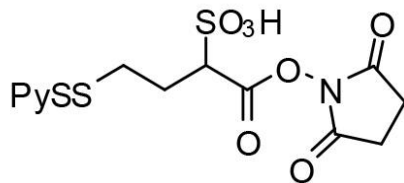
50

N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペンタノエート (S P P) 、
 【 0 1 1 4 】
 【 化 1 1 】



10

N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (S P D B) および
 【 0 1 1 5 】
 【 化 1 2 】



20

N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) 2 - スルホ - ブタノエート (スルホ - S P D B) 。
 【 0 1 1 6 】

一実施形態では、リンカー L は、N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (S P D B) に由来する。

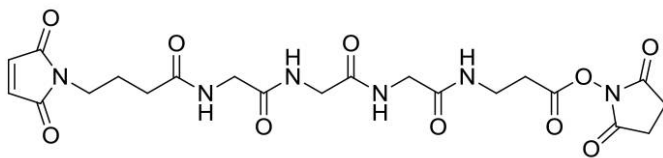
【 0 1 1 7 】

薬物部分、例えば、メイタンシノイドと、抗体との間で荷電リンカーを形成する好適な架橋試薬は、プロチャージ架橋試薬として知られる。一実施形態では、リンカー L は、プロチャージ架橋試薬 C X 1 - 1 に由来する。C X 1 - 1 の構造は、以下の通りである。

【 0 1 1 8 】

30

【 化 1 3 】



2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 1 7 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) - 5 , 8 , 1 1 , 1 4 - テトラオキソ - 4 , 7 , 1 0 , 1 3 - テトラアザヘプタデカン - 1 - オエート (C X 1 - 1) 。

【 0 1 1 9 】

40

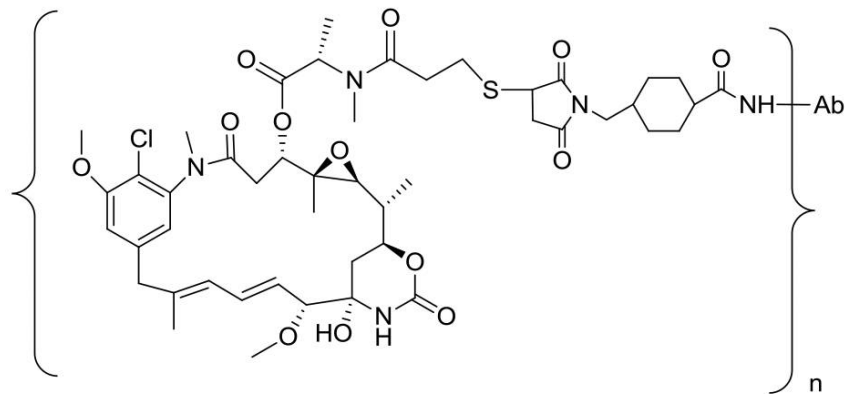
上記で表される架橋試薬はそれぞれ、架橋試薬の一方の末端に、抗体の第一級アミンと反応して、アミド結合を形成する N H S - エステル、および他方の末端に、メイタンシノイド薬物部分のスルフィドリルと反応して、チオエーテルまたはジスルフィド結合を形成するマレイミド基またはピリジニルジスルフィド基を含有する。

【 0 1 2 0 】

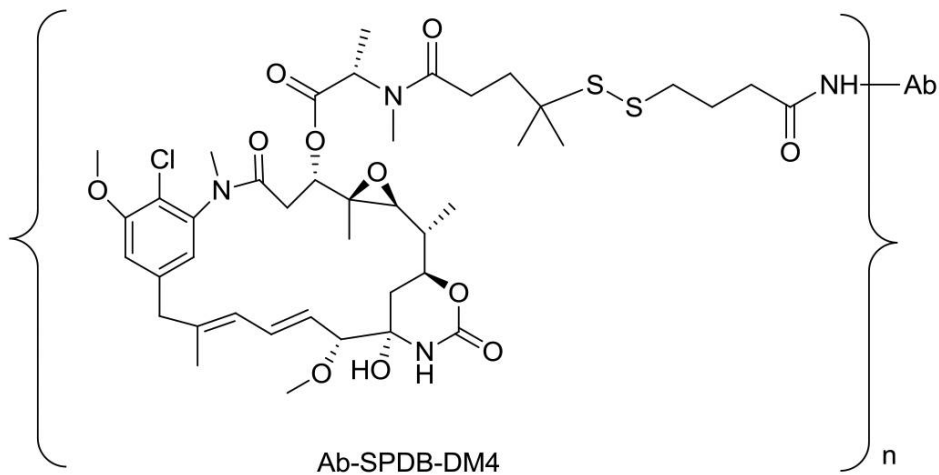
1 つの実施形態では、本発明のコンジュゲートは、下記構造式のいずれか 1 つにより表される。

【 0 1 2 1 】

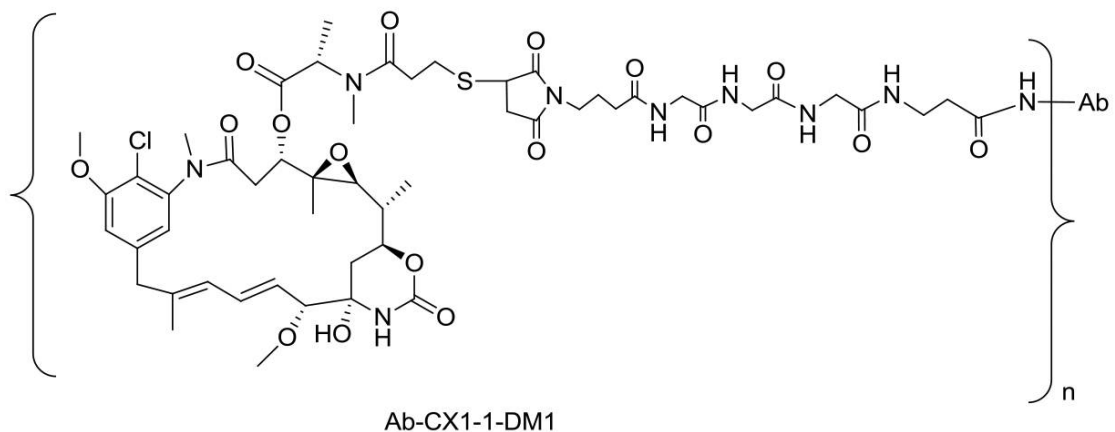
【化 1 4】



10



20



30

40

式中、

A b は P - カドヘリン に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片であり；

アミド結合と A b の第 1 級アミンとの形成を介して A b に結合した D - L 基の数を示す n は、1 ~ 20 の整数である。一実施形態において、n は 1 ~ 10、2 ~ 8 または 2 ~ 5 の整数である。特定の実施形態において、n は 3 または 4 である。

【 0 1 2 2】

一実施形態では、コンジュゲート中の薬物（例えば、DM1 または DM4）と抗体との

50

平均モル比（すなわち、メイタンシノイド抗体比（MAR）としても知られる、平均n値）は、約1～約10、約2～約8（例えば、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0または8.1）、約2.5～約7、約3～約5、約2.5～約4.5（例えば、約2.5、約2.6、約2.7、約2.8、約2.9、約3.0、約3.1、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9、約4.0、約4.1、約4.2、約4.3、約4.4、約4.5）、約3.0～約4.0、約3.2～約4.2、または約4.5～5.5（例えば、約4.5、約4.6、約4.7、約4.8、約4.9、約5.0、約5.1、約5.2、約5.3、約5.4または約5.5）である。

【0123】

本発明の態様では、本発明のコンジュゲートは、実質的に高い純度を有し、下記特色の1つまたは複数を有する：（a）約90%を上回る（例えば、約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%を上回るか、またはそれに等しい）、好ましくは約95%を上回るコンジュゲート種が単量体であること、（b）コンジュゲート調製物中のコンジュゲートされていないリンカーレベルが、約10%未満であること（例えば、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%または0%未満であるか、それに等しい）（総リンカーに対して）、（c）10%未満のコンジュゲート種が架橋されること（例えば、約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%または0%未満であるか、またはそれに等しい）、（d）コンジュゲート調製物における遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）レベルが、約2%未満であること（例えば、約1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%または0%未満であるか、またはそれに等しい）（総細胞障害性作用物質に対するmol/mol）、および/または（e）遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）のレベルにおける実質的な増加が、貯蔵時に起こらないこと（例えば、約1週、約2週、約3週、約1カ月、約2カ月、約3カ月、約4カ月、約5カ月、約6カ月、約1年、約2年、約3年、約4年または約5年後）。遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）のレベルにおける「実質的な増加」は、ある特定の貯蔵時間（例えば、約1週、約2週、約3週、約1カ月、約2カ月、約3カ月、約4カ月、約5カ月、約6カ月、約1年、約2年、約3年、約4年または約5年）後に、遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）のレベルの増加が、約0.1%、約0.2%、約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%、約1.0%、約1.1%、約1.2%、約1.3%、約1.4%、約1.5%、約1.6%、約1.7%、約1.8%、約1.9%、約2.0%、約2.2%、約2.5%、約2.7%、約3.0%、約3.2%、約3.5%、約3.7%、または約4.0%未満であることを意味する。

【0124】

本明細書で使用される用語「非コンジュゲート化リンカー」とは、抗体がリンカーを介して薬物（例えば、DM1またはDM4）に共有的にカップリングしていない、架橋試薬（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）に由来するリンカーと共有的に連結された抗体を指す（すなわち、「非コンジュゲート化リンカー」はAb-MCC、Ab-SPDB、またはAb-CX1-1で表すことができる）。

【0125】

1. 薬物部分

本発明は、P-カドヘリンに特異的に結合するイムノコンジュゲートを提供する。本発

10

20

30

40

50

明の抗体薬物コンジュゲートは、薬物部分、例えば、抗がん剤、自己免疫処置剤、抗炎症剤、抗真菌剤、抗細菌剤、抗寄生虫剤、抗ウイルス剤、または麻酔剤にコンジュゲートされた抗P-カドヘリン抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を含む。本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を、当業界で公知の任意の方法を使用して、いくつかの同一の、または異なる薬物部分にコンジュゲートすることができる。

【0126】

ある特定の実施形態では、本発明のイムノコンジュゲートの薬物部分は、V-ATPase阻害剤、プロアポトーシス剤、Bcl2阻害剤、MCL1阻害剤、HSP90阻害剤、IAP阻害剤、mTor阻害剤、微小管安定化剤、微小管脱安定化剤、アウリスタチン、ドラスタチン、メイタンシノイド、MetAP（メチオニンアミノペプチダーゼ）、タンパク質CRM1の核外輸送の阻害剤、DPPIV阻害剤、Eg5阻害剤、プロテアソーム阻害剤、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害剤、タンパク質合成阻害剤、キナーゼ阻害剤、CDK2阻害剤、CDK9阻害剤、キネシン阻害剤、HDAC阻害剤、DNA損傷剤、DNAアルキル化剤、DNAインターカレーター、DNA副溝結合剤およびDHFR阻害剤からなる群から選択される。

【0127】

一実施形態では、本発明のイムノコンジュゲートの薬物部分は、限定されるものではないが、DM1、DM3またはDM4などのメイタンシノイド薬物部分である。

【0128】

さらに、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を、所与の生物学的応答を改変する薬物部分にコンジュゲートすることができる。薬物部分は、古典的な化学療法剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を有するタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドであってもよい。そのようなタンパク質は、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、コレラ毒素、もしくはジフテリア毒素などの毒素、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子、サイトカイン、アポトーシス剤、抗血管新生剤などのタンパク質、または例えば、リンホカインなどの生物応答改変剤を含んでもよい。

【0129】

一実施形態では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物は、細胞毒素、薬物（例えば、免疫抑制剤）または放射性毒素などの薬物部分にコンジュゲートされる。細胞毒素の例としては、限定されるものではないが、タキサン（例えば、国際特許出願（PCT）WO01/38318およびPCT/US03/02675を参照されたい）、DNAアルキル化剤（例えば、CC-1065類似体）、アントラサイクリン、ツブリシン（tubulysin）類似体、デュオカルマイシン類似体、アウリスタチンE、アウリスタチンF、メイタンシノイド、ならびに反応性ポリエチレングリコール部分（例えば、Sasse et al., J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000)、Suzawa et al., Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000)、Ichimura et al., J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991)、Francisco et al., Blood (2003)（印刷出版物に先立って、電子出版物）、米国特許第5,475,092号明細書、第6,340,701号明細書、第6,372,738号明細書、および第6,436,931号明細書、米国特許出願公開第2001/0036923A1号明細書、係属中米国特許出願第10/024,290号明細書および第10/116,053号明細書、ならびに国際特許出願（PCT）WO01/49698を参照されたい）を含む細胞毒性剤、タキソン、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ピンブラスチン、 α -コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシンならびにその類似体または相同体が

挙げられる。また、治療剤としては、例えば、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラビン、5 - フルオロウラシルデカルバジン）、削摩剤（ablating agent）（例えば、メクロレタミン、チオテパクロラムブシル、メイファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびcis - ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）も挙げられる（例えば、Seattle Geneticsの米国特許出願公開第20090304721号明細書を参照されたい）。

10

【0130】

本発明の抗体、抗体断片（抗原結合性断片）または機能的等価物にコンジュゲートすることができる細胞毒素の他の例としては、デュオカルマイシン、カリケアマイシン、メイタンシンおよびアウリスタチン、ならびにその誘導体が挙げられる。

【0131】

治療剤を抗体にコンジュゲートするための様々な型の細胞毒素、リンカーおよび方法は、当業界で公知であり、例えば、Saito et al., (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan and Krei 20
tman, (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter and Springer, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264を参照されたい。

【0132】

本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を、放射性アイソトープにコンジュゲートして、放射性イムノコンジュゲートと呼ばれる、細胞毒性放射性薬剤を作成することもできる。診断的または治療的に使用するために抗体にコンジュゲートすることができる放射性アイソトープの例としては、限定されるものではないが、ヨウ素 - 131、インジウム - 111、イットリウム - 90、およびルテチウム - 177が挙げられる。放射性イムノコンジュゲートを調製するための方法は、当業界で確立されている。放射性イムノコンジュゲートの例は、Zevalin（商標）（DEC Pharma 30
ceuticals）およびBexxar（商標）（Corixa Pharmaceuticals）など、商業的に入手可能であり、同様の方法を使用して、本発明の抗体を使用して放射性イムノコンジュゲートを調製することができる。ある特定の実施形態では、大環状キレート剤は、リンカー分子を介して抗体に結合させることができる1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - N, N', N'', N''' - 四酢酸（DOTA）である。そのようなリンカー分子は、当業界で一般に公知であり、それぞれ全体が参照により組み込まれる、Denardo et al., (1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson et al., (1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; およびZimmerman et al., (1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50に記載されている。

30

【0133】

本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を、異種タンパク質またはポリペプチド（またはその断片、好ましくは、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90または少なくとも100アミノ酸のポリペプチド）にコンジュゲートして、融合タンパク質を作成することもできる。特に、本発明は、本明細書に記載の抗体断片（例えば、抗原結合性断片）（例えば、Fab断片、Fd断片、Fv断片、F(ab)2断片、VHドメイン、VH CDR、VLドメインまたはVL CDR）と、異種タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドとを含む融合タンパク質を提供する。

40

【0134】

50

さらなる融合タンパク質を、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エクソンシャッフリング、および/またはコドンシャッフリング(集合的に、「DNAシャッフリング」と呼ばれる)の技術により作成することができる。DNAシャッフリングを使用して、本発明の抗体またはその断片の活性(例えば、より高い親和性およびより低い解離速度を有する抗体またはその断片)を変化させることができる。一般に、米国特許第5,605,793号明細書、第5,811,238号明細書、第5,830,721号明細書、第5,834,252号明細書、および第5,837,458号明細書; Patten et al., (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson et al., (1999) J. Mol. Biol. 287:265-76; および Lorenzo and Blasco, (1998) Biotechniques 24(2):308-313(これらの特許および刊行物の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。抗体もしくはその断片、またはコードされた抗体もしくはその断片は、組換え前に変異性PCR、無作為ヌクレオチド挿入または他の方法により無作為突然変異誘発にかけることにより変化させることができる。抗原に特異的に結合する抗体またはその断片をコードするポリヌクレオチドを、1または複数の異種分子の、1または複数の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片などと組み換えることができる。

【0135】

さらに、本発明の抗体、抗体断片(例えば、抗原結合性断片)または機能的等価物を、ペプチドなどのマーカー配列にコンジュゲートして、精製を容易にすることができる。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、特に、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)に提供されるタグなどのヘキサ-ヒスチジンペプチド(配列番号130)であり、その多くが商業的に入手可能である。Gentz et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824に記載のように、例えば、ヘキサ-ヒスチジン(配列番号130)は、融合タンパク質の好都合の精製を提供する。精製にとって有用な他のペプチドタグとしては、限定されるものではないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエプトープに対応するヘマグルチニン(「HA」)タグ(Wilson et al., (1984) Cell 37:767)、および「FLAG」タグ(A. Einhauser et al., J. Biochem. Biophys. Methods 49: 455-465, 2001)が挙げられる。本発明によれば、抗体または抗原結合性断片を、腫瘍浸透ペプチドにコンジュゲートして、その効能を増強することもできる。

【0136】

他の実施形態では、本発明の抗体、抗体断片(例えば、抗原結合性断片)または機能的等価物は、診断剤または検出剤にコンジュゲートされる。そのようなイムノコンジュゲートは、特定の療法の効能の決定などの、臨床試験手順の一部として疾患または障害の開始、発生、進行および/または重症度をモニタリングまたは予後診断するのに有用であり得る。そのような診断および検出を、限定されるものではないが、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどの様々な酵素; 限定されるものではないが、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどの補欠分子族; 限定されるものではないが、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンなどの蛍光材料; 限定されるものではないが、ルミノールなどの発光材料; 限定されるものではないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンなどの生物発光材料; 限定されるものではないが、ヨウ素

(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、および ^{121}I)、炭素(^{14}C)、硫黄(^{35}S)、トリチウム(^3H)、インジウム(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、および ^{111}In)、テクネチウム(^{99}Tc)、タリウム(^{201}Ti)、ガリウム(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム(^{103}Pd)、モリブデン(^{99}Mo)、キセノン(^{133}Xe)、フッ素(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{64}Cu 、 ^{113}Sn 、および ^{117}Sn などの放射性材料；ならびに様々なポジトロン放出断層撮影を使用するポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンなどの、検出可能物質に抗体をカップリングさせることにより達成することができる。

10

【0137】

本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を、標的抗原のイムノアッセイまたは精製にとって特に有用である固相支持体に結合することもできる。そのような固相支持体としては、限定されるものではないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられる。

【0138】

2. リンカー

本明細書で使用される場合、「リンカー」は、薬物部分などの別の部分に、抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）または機能的等価物を連結することができる任意の化学部分である。リンカーは、化合物または抗体が活性を保持する条件下で、酸誘導性切断、光誘導性切断、ペプチダーゼ誘導性切断、エステラーゼ誘導性切断、およびジスルフィド結合切断などの切断の影響を受けやすいものであってもよい（切断性リンカー）。あるいは、リンカーは、切断に対して実質的に耐性であってもよい（例えば、安定性リンカーまたは非切断性リンカー）。いくつかの態様では、リンカーは、プロチャージリンカー、親水性リンカー、またはジカルボン酸に基づくリンカーである。

20

【0139】

一態様では、本発明で使用されるリンカーは、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(SPD P)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート(SPP)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート(SPDB)、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホ-ブタノエート(スルホ-SPDB)、N-スクシンイミジルヨードアセテート(SIA)、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)、マレイミドPEG-NHS、N-スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(SMCC)、N-スルホスクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(スルホ-SMCC)または2,5-ジオキソピロリジン-1-イル17-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-5,8,11,14-テトラオキソ-4,7,10,13-テトラアザヘプタデカン-1-オエート(CX1-1)などの架橋試薬に由来する。

30

40

【0140】

非切断性リンカーは、安定な、共有的な様式でメイタンシノイドなどの薬物を、抗体に連結することができ、切断性リンカーについて上記に列挙されたカテゴリーの下から外れない任意の化学部分である。かくして、非切断性リンカーは、酸誘導性切断、光誘導性切断、ペプチダーゼ誘導性切断、エステラーゼ誘導性切断およびジスルフィド結合切断に対して実質的に耐性である。さらに、非切断性とは、メイタンシノイドなどの薬物または抗体がその活性を喪失しない条件下で、酸、光不安定性切断剤、ペプチダーゼ、エステラーゼ、またはジスルフィド結合を切断する化学的もしくは生理的化合物により誘導される切断に耐える、リンカー中の、またはリンカーに隣接する化学的結合の能力を指す。

【0141】

50

酸不安定リンカーは、酸性 pH で切断可能なリンカーである。例えば、エンドソームおよびリソソームなどの特定の細胞内区画は、酸性 pH (pH 4 ~ 5) を有し、酸不安定リンカーを切断するのに好適な条件を提供する。

【0142】

光不安定リンカーは、光に接近可能である体表面で、および多くの体腔において有用であるリンカーである。さらに、赤外線は組織に浸透することができる。

【0143】

いくつかのリンカーは、ペプチダーゼ、すなわち、ペプチダーゼ切断性リンカーにより切断することができる。特定のペプチドのみが、細胞の内部または外部で容易に切断される。例えば、Trout et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) および Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989) を参照されたい。さらに、ペプチドは、

- アミノ酸と、化学的には、あるアミノ酸のカルボキシレート基と、第2のアミノ酸のアミノ基との間のアミド結合であるペプチド結合とから構成される。リシンのカルボキシレート基および - アミノ基との間の結合などの他のアミド結合は、ペプチド結合ではないと理解され、非切断性であると考えられる。

【0144】

いくつかのリンカーは、エステラーゼにより切断することができる、すなわち、エステラーゼ切断性リンカーである。再度、特定のエステルのみを、細胞の内部または外部に存在するエステラーゼにより切断することができる。エステルは、カルボン酸とアルコールとの縮合により形成される。単純エステルは、脂肪族アルコール、ならびに小環状および低分子芳香族アルコールなどの、単純アルコールを使用して生成されるエステルである。

【0145】

プロチャージリンカーは、抗体薬物コンジュゲートへの組み込み後にその電荷を保持する荷電した架橋試薬に由来する。プロチャージリンカーの例を、米国特許出願公開第2009/0274713号明細書に見出すことができる。

【0146】

3. ADC のコンジュゲーションおよび調製

本発明のコンジュゲートを、米国特許第7,811,572号明細書、第6,411,163号明細書、第7,368,565号明細書、および第8,163,888号明細書、ならびに米国特許出願公開第2011/0003969号明細書、第2011/0166319号明細書、第2012/0253021号明細書および第2012/0259100号明細書に記載のものなどの当業界で公知の任意の方法により調製することができる。これらの特許および特許出願公開の全教示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0147】

1 ステップ法

一実施形態では、本発明のコンジュゲートを、1ステップ法によって調製することができる。この方法は、実質的に水性の媒体中で抗体、薬物および架橋剤を混合すること、任意選択で、好適な pH で1または複数の共溶媒を含有させることを含む。一実施形態では、方法は、本発明の抗体を、薬物（例えば、DM1またはDM4）と接触させて、抗体と薬物とを含む第1の混合物を形成させるステップ、次いで、約4~約9のpHを有する溶液中で、抗体と薬物とを含む第1の混合物を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と接触させて、(i) コンジュゲート（例えば、Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4、またはAb-CX1-1-DM1）、(ii) 遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）、および(iii) 反応副生成物を含む混合物を提供するステップを含む。

【0148】

一実施形態では、1ステップ法は、約6以上（例えば、約6~約9、約6~約7、約7~約9、約7~約8.5、約7.5~約8.5、約7.5~約8.0、約8.0~約9.0、または約8.5~約9.0）のpHを有する溶液中で、抗体を、薬物（例えば、DM1またはDM4）、次いで、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、

スルホ - S P D B または C X 1 - 1) と接触させることを含む。例えば、本発明の方法は、約 6 . 0、約 6 . 1、約 6 . 2、約 6 . 3、約 6 . 4、約 6 . 5、約 6 . 6、約 6 . 7、約 6 . 8、約 6 . 9、約 7 . 0、約 7 . 1、約 7 . 2、約 7 . 3、約 7 . 4、約 7 . 5、約 7 . 6、約 7 . 7、約 7 . 8、約 7 . 9、約 8 . 0、約 8 . 1、約 8 . 2、約 8 . 3、約 8 . 4、約 8 . 5、約 8 . 6、約 8 . 7、約 8 . 8、約 8 . 9 または約 9 . 0 の p H を有する溶液中で、細胞結合剤を、薬物 (D M 1 または D M 4)、次いで、架橋剤 (例えば、S M C C、スルホ - S M C C、S P D B、スルホ - S P D B または C X 1 - 1) と接触させることを含む。特定の実施形態では、本発明の方法は、約 7 . 8 の p H (例えば、7 . 6 ~ 8 . 0 の p H または 7 . 7 ~ 7 . 9 の p H) を有する溶液中で、細胞結合剤を、薬物 (例えば、D M 1 または D M 4)、次いで、架橋剤 (例えば、S M C C、スルホ - S M C C、S P D B、スルホ - S P D B または C X 1 - 1) と接触させることを含む。

10

【 0 1 4 9 】

1 ステップ法 (すなわち、抗体を薬物 (例えば、D M 1 または D M 4)、次いで、架橋剤 (例えば、S M C C、スルホ - S M C C、S P D B、スルホ - S P D B または C X 1 - 1) と接触させること) を、当業界で公知の任意の好適な温度で実行することができる。例えば、1 ステップ法は、約 2 0 以下 (例えば、約 - 1 0 (例えば、細胞毒性剤および二官能性架橋試薬を溶解するために使用される有機溶媒の存在によって、溶液の凍結が防止されるという条件で) ~ 約 2 0、約 0 ~ 約 1 8、約 4 ~ 約 1 6)、または室温 (例えば、約 2 0 ~ 約 3 0 もしくは約 2 0 ~ 約 2 5)、または高温 (例えば、約 3 0 ~ 約 3 7) で行ってもよい。一実施形態では、1 ステップ法は、約 1 6 ~ 約 2 4 (例えば、約 1 6、約 1 7、約 1 8、約 1 9、約 2 0、約 2 1、約 2 2、約 2 3、約 2 4、または約 2 5) の温度で行う。別の実施形態では、1 ステップ法は、約 1 5 以下 (例えば、約 - 1 0 ~ 約 1 5、または約 0 ~ 約 1 5) の温度で実行される。例えば、方法は、例えば、架橋剤 (例えば、S M C C、スルホ - S M C C、スルホ - S P D B、S P D B、または C X 1 - 1) を溶解するために使用される有機溶媒 (複数可) の存在によって、溶液の凍結が防止されるという条件で、約 1 5、約 1 4、約 1 3、約 1 2、約 1 1、約 1 0、約 9、約 8、約 7、約 6、約 5、約 4、約 3、約 2、約 1、約 0、約 - 1、約 - 2、約 - 3、約 - 4、約 - 5、約 - 6、約 - 7、約 - 8、約 - 9、または約 - 1 0 の温度で、抗体を、薬物 (例えば、D M 1 または D M 4)、次いで、架橋剤 (例えば、S M C C、スルホ - S M C C、S P D B、スルホ - S P D B、または C X 1 - 1) と接触させることを含む。一実施形態では、方法は、約 - 1 0 ~ 約 1 5、約 0 ~ 約 1 5、約 0 ~ 約 1 0、約 0 ~ 約 5、約 5 ~ 約 1 5、約 1 0 ~ 約 1 5、または約 5 ~ 約 1 0 の温度で、抗体を、薬物 (例えば、D M 1 または D M 4)、次いで、架橋剤 (例えば、S M C C、スルホ - S M C C、S P D B、スルホ - S P D B または C X 1 - 1) と接触させることを含む。別の実施形態では、方法は、約 1 0 の温度 (例えば、8 ~ 1 2 の温度または 9 ~ 1 1 の温度) で、抗体を、薬物 (例えば、D M 1 または D M 4)、次いで、架橋剤 (例えば、S M C C、スルホ - S M C C、S P D B、スルホ - S P D B または C X 1 - 1) と接触させることを含む。

20

30

【 0 1 5 0 】

一実施形態では、上記の接触は、抗体を提供した後、該抗体を薬物 (例えば、D M 1 または D M 4) と接触させて、抗体と薬物 (例えば、D M 1 または D M 4) とを含む第 1 の混合物を形成させ、次いで、抗体と薬物 (例えば、D M 1 または D M 4) とを含む第 1 の混合物を、架橋剤 (例えば、S M C C、スルホ - S M C C、S P D B、スルホ - S P D B または C X 1 - 1) と接触させることにより行われる。例えば、一実施形態では、抗体を反応容器中に提供し、薬物 (例えば、D M 1 または D M 4) を反応容器に添加し (それによって、抗体を接触させる)、次いで、架橋剤 (例えば、S M C C、スルホ - S M C C、S P D B、スルホ - S P D B または C X 1 - 1) を、抗体と薬物 (例えば、D M 1 または D M 4) とを含む混合物に添加する (それによって、抗体と薬物とを含む混合物を接触させる)。一実施形態では、抗体を反応容器中に提供し、抗体を容器に提供する直後に、薬

40

50

物（例えば、DM 1 または DM 4）を反応容器に添加する。別の実施形態では、抗体を反応容器中に提供し、抗体を容器に提供した後の時間間隔後（例えば、細胞結合剤を空間に提供した後約 5 分、約 10 分、約 20 分、約 30 分、約 40 分、約 50 分、約 1 時間、約 1 日以上後）に、薬物（例えば、DM 1 または DM 4）を反応容器に添加する。薬物（例えば、DM 1 または DM 4）を、迅速に（すなわち、約 5 分、約 10 分などの短い時間間隔以内に）またはゆっくりと（ポンプを使用するなど）添加することができる。

【0151】

次いで、抗体を薬物（例えば、DM 1 もしくは DM 4）と接触させた直後に、または抗体を薬物（例えば、DM 1 もしくは DM 4）と接触させた後のいくらか後の時点で（例えば、約 5 分～約 8 時間以上）、抗体と薬物（例えば、DM 1 または DM 4）を含む混合物を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）と接触させることができる。例えば、一実施形態では、抗体を含む反応容器への薬物（例えば、DM 1 または DM 4）の添加の直後に、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）を、抗体と薬物（例えば、DM 1 または DM 4）とを含む混合物に添加する。あるいは、抗体を薬物（例えば、DM 1 または DM 4）と接触させた後、約 5 分、約 10 分、約 20 分、約 30 分、約 1 時間、約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間以上で、抗体と薬物（例えば、DM 1 または DM 4）とを含む混合物を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）と接触させることができる。

【0152】

抗体と薬物（例えば、DM 1 または DM 4）とを含む混合物を架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）と接触させた後、反応を約 1 時間、約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間、約 12 時間、約 13 時間、約 14 時間、約 15 時間、約 16 時間、約 17 時間、約 18 時間、約 19 時間、約 20 時間、約 21 時間、約 22 時間、約 23 時間、約 24 時間以上（例えば、約 30 時間、約 35 時間、約 40 時間、約 45 時間、または約 48 時間）進行させる。

【0153】

一実施形態では、1 ステップ法は、未反応の薬物（例えば、DM 1 もしくは DM 4）および/または未反応の架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB もしくは CX1-1）をクエンチするためのクエンチングステップをさらに含む。クエンチングステップは、典型的には、コンジュゲートの精製前に行われる。一実施形態では、混合物をクエンチング試薬と接触させることにより、混合物をクエンチする。本明細書で使用される場合、「クエンチング試薬」とは、遊離薬物（例えば、DM 1 もしくは DM 4）および/または架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）と反応する試薬を指す。一実施形態では、4-マレイミド酪酸、3-マレイミドプロピオン酸、N-エチルマレイミド、ヨードアセトアミド、またはヨードアセトアミドプロピオン酸などのマレイミドまたはハロアセトアミドクエンチング試薬を使用して、薬物（例えば、DM 1 または DM 4）中の任意の未反応の基（チオールなど）がクエンチされたことを確保することができる。クエンチングステップは、薬物（例えば、DM 1）の二量体化を防止するのに役立ち得る。二量体化した DM 1 は、除去するのが困難であり得る。極性の荷電したチオールクエンチング試薬（4-マレイミド酪酸または 3-マレイミドプロピオン酸など）を使用するクエンチングの際に、過剰の未反応の DM 1 は、精製ステップの間に共有的に連結したコンジュゲートから容易に分離することができる極性の荷電した水溶性付加物に変換される。非極性および中性チオールクエンチング試薬を使用するクエンチングを使用することもできる。一実施形態では、混合物を、未反応の架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDB または CX1-1）と反応するクエンチング試薬と接触させることにより、混合物をクエンチする。例えば、求核試薬を混合物に添加して、任意の未反応の SMCC をク

エンチすることができる。好ましくは、求核試薬は、リシン、タウリンおよびヒドロキシルアミンなどの、アミノ基含有求核試薬である。

【0154】

好ましい実施形態では、反応（すなわち、抗体を、薬物（例えば、DM1またはDM4）、次いで、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と接触させること）を、混合物をクエンチング試薬と接触させた後、完了まで進行させる。これに関して、抗体と薬物（例えば、DM1またはDM4）とを含む混合物を架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と接触させた後、クエンチング試薬を約1時間～約48時間（例えば、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間または約25時間～約48時間）混合物に添加する。

10

【0155】

あるいは、混合物のpHを約5.0（例えば、4.8、4.9、5.0、5.1または5.2）に低下させることにより、混合物をクエンチする。別の実施形態では、pHを6.0未満、5.5未満、5.0未満、4.8未満、4.6未満、4.4未満、4.2未満、4.0未満に低下させることにより、混合物をクエンチする。あるいは、pHを、約4.0（例えば、3.8、3.9、4.0、4.1または4.2）～約6.0（例えば、5.8、5.9、6.0、6.1または6.2）、約4.0～約5.0、約4.5（例えば、4.3、4.4、4.5、4.6または4.7）～約5.0に低下させる。一実施形態では、混合物のpHを4.8に低下させることにより、混合物をクエンチする。別の実施形態では、混合物のpHを5.5に低下させることにより、混合物をクエンチする。

20

【0156】

一実施形態では、1ステップ法は、不安定に結合したリンカーを抗体から遊離させるための保持ステップをさらに含む。保持ステップは、コンジュゲートの精製前（例えば、反応ステップの後、反応ステップとクエンチングステップの間、またはクエンチングステップの後）に混合物を保持することを含む。例えば、方法は、（a）抗体を薬物（例えば、DM1またはDM4）と接触させて、抗体と薬物（例えば、DM1またはDM4）とを含む混合物を形成させるステップ；次いで、約4～約9のpHを有する溶液中で、抗体と薬物（例えば、DM1またはDM4）とを含む混合物を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と接触させて、（i）コンジュゲート（例えば、Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4またはAb-CX1-1-DM1）、（ii）遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）、および（iii）反応副生成物を含む混合物を提供するステップ、（b）ステップ（a）で調製された混合物を保持して、不安定に結合したリンカーを細胞結合剤から遊離させるステップ、ならびに（c）混合物を精製して、精製されたコンジュゲートを提供するステップを含む。

30

【0157】

別の実施形態では、方法は、（a）抗体を薬物（例えば、DM1またはDM4）と接触させて、抗体と薬物（例えば、DM1またはDM4）とを含む混合物を形成させるステップ；次いで、約4～約9のpHを有する溶液中で、抗体と薬物（例えば、DM1またはDM4）とを含む混合物を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と接触させて、（i）コンジュゲート、（ii）遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）、および（iii）反応副生成物を含む混合物を提供するステップ、（b）ステップ（a）で調製された混合物をクエンチして、任意の未反応の薬物（例えば、DM1もしくはDM4）および/または未反応の架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）をクエンチするステップ、（c）ステップ（b）で調製された混合物を保持して、不安定に結合したリンカーを細胞結合剤から遊離させるステップ、ならびに（d）混合物を精製して、精製されたコンジュゲート（例えば、Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4または

40

50

A b - C X 1 - 1 - D M 1) を提供するステップを含む。

【 0 1 5 8 】

あるいは、保持ステップを、コンジュゲートの精製後に実施した後、さらなる精製ステップを行うことができる。

【 0 1 5 9 】

好ましい実施形態では、保持ステップの前に反応を完了まで進行させる。これに関して、保持ステップを、抗体と薬物（例えば、D M 1 または D M 4 ）とを含む混合物を架橋剤（例えば、S M C C、スルホ - S M C C、S P D B、スルホ - S P D B または C X 1 - 1）と接触させた後、約 1 時間 ~ 約 4 8 時間（例えば、約 1 時間、約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 1 0 時間、約 1 1 時間、約 1 2 時間、約 1 3 時間、約 1 4 時間、約 1 5 時間、約 1 6 時間、約 1 7 時間、約 1 8 時間、約 1 9 時間、約 2 0 時間、約 2 1 時間、約 2 2 時間、約 2 3 時間、約 2 4 時間または約 2 4 時間 ~ 約 4 8 時間）実施することができる。

10

【 0 1 6 0 】

保持ステップは、好適な期間（例えば、約 1 時間 ~ 約 1 週間、約 1 時間 ~ 約 2 4 時間、約 1 時間 ~ 約 8 時間、または約 1 時間 ~ 約 4 時間）にわたって好適な温度（例えば、約 0 ~ 約 3 7 ）で溶液を維持して、安定に結合したリンカーを抗体から実質的に遊離させないが、不安定に結合したリンカーを抗体から遊離させることを含む。一実施形態では、保持ステップは、約 2 0 以下（例えば、約 0 ~ 約 1 8 、約 4 ~ 約 1 6 ）、室温（例えば、約 2 0 ~ 約 3 0 もしくは約 2 0 ~ 約 2 5 ）、または高温（例えば、約 3 0 ~ 約 3 7 ）で溶液を維持することを含む。一実施形態では、保持ステップは、約 1 6 ~ 約 2 4 （例えば、約 1 5 、約 1 6 、約 1 7 、約 1 8 、約 1 9 、約 2 0 、約 2 1 、約 2 2 、約 2 3 、約 2 4 、または約 2 5 ）の温度で溶液を維持することを含む。別の実施形態では、保持ステップは、約 2 ~ 約 8 （例えば、約 0 、約 1 、約 2 、約 3 、約 4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、または約 1 0 ）の温度で溶液を維持することを含む。別の実施形態では、保持ステップは、約 3 7 （例えば、約 3 4 、約 3 5 、約 3 6 、約 3 7 、約 3 8 、約 3 9 、または約 4 0 ）の温度で溶液を維持することを含む。

20

【 0 1 6 1 】

保持ステップの持続期間は、保持ステップが行われる温度および p H に依存する。例えば、保持ステップの持続期間は、高温で保持ステップを行うことにより実質的に減少させることができ、その最大温度は細胞結合剤 - 細胞毒性剤コンジュゲートの安定性によって制限される。保持ステップは、約 1 時間 ~ 約 1 日（例えば、約 1 時間、約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 1 0 時間、約 1 2 時間、約 1 4 時間、約 1 6 時間、約 1 8 時間、約 2 0 時間、約 2 2 時間、または約 2 4 時間）、約 1 0 時間 ~ 約 2 4 時間、約 1 2 時間 ~ 約 2 4 時間、約 1 4 時間 ~ 約 2 4 時間、約 1 6 時間 ~ 約 2 4 時間、約 1 8 時間 ~ 約 2 4 時間、約 2 0 時間 ~ 約 2 4 時間、約 5 時間 ~ 約 1 週間、約 2 0 時間 ~ 約 1 週間、約 1 2 時間 ~ 約 1 週間（例えば、約 1 2 時間、約 1 6 時間、約 2 0 時間、約 2 4 時間、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、または約 7 日）または約 1 日 ~ 約 1 週間にわたって溶液を維持することを含んでもよい。

30

40

【 0 1 6 2 】

一実施形態では、保持ステップは、少なくとも約 1 2 時間から最大で 1 週間までの期間にわたって約 2 ~ 約 8 の温度で溶液を維持することを含む。別の実施形態では、保持ステップは、一晚（例えば、約 1 2 ~ 約 2 4 時間、好ましくは、約 2 0 時間）、約 2 ~ 約 8 の温度で溶液を維持することを含む。

【 0 1 6 3 】

保持ステップのための p H 値は、好ましくは、約 4 ~ 約 1 0 である。一実施形態では、保持ステップのための p H 値は、約 4 以上であるが、約 6 未満である（例えば、4 ~ 5 . 9 ）か、または約 5 以上であるが、約 6 未満である（例えば、5 ~ 5 . 9 ）。別の実施形態では、保持ステップのための p H 値は、約 6 ~ 約 1 0 の範囲（例えば、約 6 . 5 ~ 約 9

50

、約 6 ~ 約 8) である。例えば、保持ステップのための pH 値は、約 6、約 6.5、約 7、約 7.5、約 8、約 8.5、約 9、約 9.5、または約 10 であってもよい。

【0164】

特定の実施形態では、保持ステップは、約 12 時間 ~ 約 1 週間にわたって、約 6 ~ 7.5 の pH で 25 で混合物をインキュベートすること、約 5 時間 ~ 約 5 日間にわたって、約 4.5 ~ 5.9 の pH で 4 で混合物をインキュベートすること、または約 5 時間 ~ 約 1 日間にわたって、約 4.5 ~ 5.9 の pH で 25 で混合物をインキュベートすることを含んでもよい。

【0165】

1 ステップ法は、任意選択で、コンジュゲートの可溶性および回収を増加させるための反応ステップへのスクロースの添加を含んでもよい。望ましくは、約 0.1 % (w/v) ~ 約 20 % (w/v) (例えば、約 0.1 % (w/v)、1 % (w/v)、5 % (w/v)、10 % (w/v)、15 % (w/v)、または 20 % (w/v)) の濃度でスクロースを添加する。好ましくは、約 1 % (w/v) ~ 約 10 % (w/v) (例えば、約 0.5 % (w/v)、約 1 % (w/v)、約 1.5 % (w/v)、約 2 % (w/v)、約 3 % (w/v)、約 4 % (w/v)、約 5 % (w/v)、約 6 % (w/v)、約 7 % (w/v)、約 8 % (w/v)、約 9 % (w/v)、約 10 % (w/v)、または約 11 % (w/v)) の濃度でスクロースを添加する。さらに、反応ステップはまた、緩衝剤の添加をも含んでもよい。当業界で公知の任意の好適な緩衝剤を使用することができる。好適な緩衝剤としては、例えば、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、コハク酸緩衝液、およびリン酸緩衝液が挙げられる。一実施形態では、緩衝剤は、HEPPSO (N - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン - N' - (2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸))、POPSO (ピペラジン - 1, 4 - ビス - (2 - ヒドロキシ - プロパン - スルホン酸) 無水物)、HEPES (4 - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン - 1 - エタンスルホン酸)、HEPPS (EP PS) (4 - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン - 1 - プロパンスルホン酸)、TES (N - [トリス(ヒドロキシメチル)メチル] - 2 - アミノエタンスルホン酸)、およびその組合せからなる群から選択される。

【0166】

一実施形態では、1 ステップ法は、混合物を精製して、精製されたコンジュゲート (例えば、Ab - MCC - DM1、Ab - SPDB - DM4 または Ab - CX1 - 1 - DM1) を提供するステップをさらに含んでもよい。当業界で公知の任意の精製方法を使用して、本発明のコンジュゲートを精製することができる。一実施形態では、本発明のコンジュゲートは、接線流濾過 (TFF)、非吸着クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、吸着濾過、選択的沈降、または任意の他の好適な精製方法、ならびにその組合せを使用する。別の態様では、コンジュゲートを上記の精製方法にかける前に、1 または複数の PVDF 膜を通してコンジュゲートを最初に濾過する。あるいは、コンジュゲートを上記の精製方法にかけた後に、1 または複数の PVDF 膜を通してコンジュゲートを濾過する。例えば、一実施形態では、コンジュゲートを 1 または複数の PVDF 膜を通して濾過した後、接線流濾過を使用して精製する。あるいは、コンジュゲートを接線流濾過を使用して精製した後、1 または複数の PVDF 膜を通して濾過する。

【0167】

Pellicon 型システム (Millipore、Billerica、MA)、Sartocoon Cassette システム (Sartorius AG、Edgewood、NY)、および Centrasette 型システム (Pall Corp.、East Hills、NY) などの、任意の好適な TFF システムを精製のために使用することができる。

【0168】

任意の好適な吸着クロマトグラフィー樹脂を、精製のために使用することができる。好ましい吸着クロマトグラフィー樹脂としては、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性電荷誘導クロマトグラフィー (HCIC)、疎水性相互作用クロマトグラフィー

(HIC)、イオン交換クロマトグラフィー、混合様式イオン交換クロマトグラフィー、固定化金属親和性クロマトグラフィー(IMAC)、染料リガンドクロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、およびその組合せが挙げられる。好適なヒドロキシアパタイト樹脂の例としては、セラミックヒドロキシアパタイト(CHT Type IおよびType II、Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)、HA Ultrogelヒドロキシアパタイト(Pall Corp.、East Hills、NY)、およびセラミックフルオロアパタイト(CFT Type IおよびType II、Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)が挙げられる。好適なHCIC樹脂の例は、MEP Hypercel樹脂(Pall Corp.、East Hills、NY)である。好適なHIC樹脂の例としては、Butyl-Sephacrose、Hexyl-Sepaharose、Phenyl-Sephacrose、およびOctyl Sepharose樹脂(全てGE Healthcare、Piscataway、NJから)、ならびにMacro-prepメチルおよびMacro-Prep t-ブチル樹脂(Biorad Laboratories、Hercules、CA)が挙げられる。好適なイオン交換樹脂の例としては、SP-Sephacrose、CM-Sephacrose、およびQ-Sephacrose樹脂(全てGE Healthcare、Piscataway、NJから)、ならびにUnospheres樹脂(Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)が挙げられる。好適な混合様式イオン交換体の例としては、Bakerbond ABx樹脂(JT Baker、Phillipsburg、NJ)が挙げられる。好適なIMAC樹脂の例としては、Chelating Sepharose樹脂(GE Healthcare、Piscataway、NJ)およびProfinity IMAC樹脂(Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)が挙げられる。好適な染料リガンド樹脂の例としては、Blue Sepharose樹脂(GE Healthcare、Piscataway、NJ)およびAffi-gelブルー樹脂(Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA)が挙げられる。好適な親和性樹脂の例としては、Protein A Sepharose樹脂(例えば、MabSelect、GE Healthcare、Piscataway、NJ)および抗体が適切なレクチン結合部位を担持する、レクチン親和性樹脂、例えば、Lentil Lectin Sepharose樹脂(GE Healthcare、Piscataway、NJ)が挙げられる。好適な逆相樹脂の例としては、C4、C8、およびC18樹脂(Grace Vydac、Hesperia、CA)が挙げられる。

【0169】

任意の好適な非吸着クロマトグラフィー樹脂を、精製のために使用することができる。好適な非吸着クロマトグラフィー樹脂の例としては、限定されるものではないが、SEPHADEX(商標)G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL(商標)樹脂(例えば、S-200およびS-300)、SUPERDEX(商標)樹脂(例えば、SUPERDEX(商標)75およびSUPERDEX(商標)200)、BIO-GEL(登録商標)樹脂(例えば、P-6、P-10、P-30、P-60、およびP-100)、ならびに当業者には公知の他のものが挙げられる。

【0170】

2ステップ法および1ポット法

一実施形態では、本発明のコンジュゲートを、米国特許第7,811,572号明細書および米国特許出願公開第2006/0182750号明細書に記載のように調製することができる。この方法は、(a)本発明の抗体を、架橋剤(例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1)と接触させて、リンカー(すなわち、Ab-SMCC、Ab-SPDBまたはAb-CX1-1)を抗体に共有結合させることによって、リンカーが結合した抗体を含む第1の混合物を調製するステップ；(b)任意選択で、第1の混合物を精製方法にかけて、リンカーが結合した抗体の精製され

10

20

30

40

50

た第1の混合物を調製するステップ；(c)約4～約9のpHを有する溶液中で、リンカーが結合した抗体を薬物（例えば、DM1またはDM4）と反応させることにより、薬物（例えば、DM1またはDM4）を、第1の混合物中のリンカーが結合した抗体にコンジュゲートして、(i)コンジュゲート（例えば、Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4またはAb-CX1-1-DM1）、(ii)遊離薬物（例えば、DM1またはDM4）；および(iii)反応副生成物を含む第2の混合物を調製するステップ；ならびに(d)第2の混合物を精製方法にかけて、第2の混合物の他の成分からコンジュゲートを精製するステップを含む。あるいは、精製ステップ(b)を省略してもよい。本明細書に記載の任意の精製方法を、ステップ(b)および(d)のために使用することができる。一実施形態では、TFFをステップ(b)と(d)の両方のために使用する。別の実施形態では、TFFをステップ(b)のために使用し、吸着クロマトグラフィー（例えば、CHT）をステップ(d)のために使用する。

10

【0171】

1ステップ試薬およびin situ法

一実施形態では、米国特許第6,441,163号明細書および米国特許出願公開第2011/0003969号明細書および第2008/0145374号明細書に記載のように、予め形成された薬物-リンカー化合物（例えば、SMCC-DM1、スルホ-SMCC-DM1、SPDB-DM4またはCX1-1-DM1）を、本発明の抗体にコンジュゲートした後、精製ステップを行うことにより、本発明のコンジュゲートを調製することができる。本明細書に記載の任意の精製方法を使用することができる。薬物（例えば、DM1またはDM4）を、架橋剤（例えば、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、スルホ-SPDBまたはCX1-1）と反応させることにより、薬物-リンカー化合物を調製する。任意選択で、薬物-リンカー化合物（例えば、SMCC-DM1、スルホ-SMCC-DM1、SPDB-DM4またはCX1-1-DM1）を精製にかけた後、抗体にコンジュゲートする。

20

【0172】

抗P-カドヘリン抗体

本発明は、ヒトP-カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。本発明の抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）としては、実施例（以下のセクション6を参照）に記載するように単離されるヒトモノクローナル抗体またはそれらの断片が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0173】

ある特定の実施形態では、本発明は、P-カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）であって、配列番号7、27、47、67、87または107に記載のアミノ酸配列を有するVHドメインを含む、前記抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。ある特定の実施形態では、本発明はまた、P-カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）であって、以下の表1に列挙されるVH CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVH CDRを含む、前記抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）も提供する。特定の実施形態では、本発明は、P-カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）であって、以下の表1に列挙されるVH CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する1、2、3、4、5以上のVH CDRを含む（またはあるいは、からなる）前記抗体を提供する。

40

【0174】

本発明は、P-カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）であって、配列番号17、37、57、77、97または117のアミノ酸配列を有するVLドメインを含む前記抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。本発明はまた、P-カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）であって、以下の表1に列挙されるVL CDRのいずれか1つのアミノ酸配列を有するVL CDRを含む、前記抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断

50

片)も提供する。特に本発明は、P - カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片(例えば、抗原結合性断片)であって、以下の表1に列挙されるV L C D Rのいずれかのアミノ酸配列を有する1、2、3以上のV L C D Rを含む(またはあるいは、からなる)前記抗体または抗体断片(例えば、抗原結合性断片)を提供する。

【0175】

本発明の他の抗体または抗体断片(例えば、抗原結合性断片)は、変異しているが、表1に記載の配列に記載のC D R領域と、C D R領域において少なくとも60、70、80、90または95パーセントの同一性を有するアミノ酸を含む。幾つかの実施形態では、抗体は、表1に記載の配列に記載のC D R領域と比較した場合、1、2、3、4または5個以下のアミノ酸がC D R領域中で変異しているアミノ酸配列変異体を含む。

10

【0176】

本発明はまた、P - カドヘリンに特異的に結合する抗体のV H、V L、完全長重鎖および完全長軽鎖をコードする核酸配列を提供する。かかる核酸配列は、哺乳動物細胞における発現に関して最適化され得る。

【0177】

【表 1 - 1】

表 1.本発明の抗 P-カドヘリン抗体の例

NOV169N31Q		
配列番号	詳細	配列
配列番号 1	HCDR1 (Kabat)	SQSAAWN
配列番号 2	HCDR2 (Kabat)	RIYYRSKWYNDYALSVKS
配列番号 3	HCDR3 (Kabat)	GEGYGREGFAI
配列番号 4	HCDR1 (Chothia)	GDSVSSQSA
配列番号 5	HCDR2 (Chothia)	YYRSKWY
配列番号 6	HCDR3 (Chothia)	GEGYGREGFAI
配列番号 7	VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSQSAAWNWI RQSPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYALSVKSRITINPD TSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGEGYGREGFAI WGQGTLVTVSS
配列番号 8	DNA VH	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGCTGGTCAAGCC TAGTCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCTATTAGCGGCGATA GTGTGTCTAGTCAGTCAGCCGCTGGAAGTGGATTAGACAG TCACCCTCTAGGGGCTGGAGTGGCTGGGTAGAATCTACTA TAGGTCTAAGTGGTATAACGACTACGCCCTGAGCGTGAAGT CTAGGATCACTATTAACCCCGACACCTCTAAGAATCAGTTT AGCCTGCAGCTGAATAGCGTGACCCCGAGGACACCGCCGT CTACTACTGCGCTAGAGGCGAGGGCTACGGTAGAGAGGGCT TCGCTATCTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGC
配列番号 9	重鎖	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSQSAAWNWI RQSPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYALSVKSRITINPD TSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGEGYGREGFAI WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK

10

20

30

10

20

30

40

【表 1 - 3】

配列番号 18	DNA VL	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAG TGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAGA CTATCTCTAACACCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGT AAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCTAACCTGCA GTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCA CCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAGCCCGAGGAC TTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTACCTGAGCTGGTTCAC CTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAG
配列番号 19	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQTISNTLAWYQQKPG KAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQYLSWFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
配列番号 20:	DNA 軽鎖	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCTAG TGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCTCAGA CTATCTCTAACACCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGT AAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCTAACCTGCA GTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCA CCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAGCCCGAGGAC TTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTACCTGAGCTGGTTCAC CTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAGATTAAGCGTACGGTGG CCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAG CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAA CTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA ACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTACCCGAG CAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCT GACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC

10

20

NEG0012		
配列番号 21	HCDR1 (Kabat)	DHTIH
配列番号 22	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSINYNEKFKG
配列番号 23	HCDR3 (Kabat)	RNLFLPMEY
配列番号 24	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
配列番号 25	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
配列番号 26	HCDR3 (Chothia)	RNLFLPMEY
配列番号 27	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSGYTFTDHTIHWMRQMP GKGLEWMGYIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADKSSSTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARRNLFLPMEYWGQGLTVSS

30

40

【表 1 - 4】

配列番号 28	DNA VH	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAGCC CGGCGAGTCACTGAAGATTAGCTGTAAAGTCTCAGGCTACA CCTTCACCGATCACACTATTCACTGGATGAGACAGATGCCC GGTAAAGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCCTAGATC AGGCTCTATTAAGTATAACGAGAAGTTTAAGGGTCAGGTCA CAATTAGCGCCGATAAGTCTAGCTCTACCGCCTACCTGCAG TGGTCTAGCCTGAAGGCTAGTGACACCGCTATGTACTACTG CGCTAGACGTAACCTGTTCTGCCTATGGAATACTGGGGTC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGC	
配列番号 29	重鎖	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSGYTFDHTIHWMRQMP GKGLEWMGYIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADKSSSTAYLQ WSSLKASDTAMYICARRNLFLPMEYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
配列番号 30	DNA 重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAGCC CGGCGAGTCACTGAAGATTAGCTGTAAAGTCTCAGGCTACA CCTTCACCGATCACACTATTCACTGGATGAGACAGATGCCC GGTAAAGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCCTAGATC AGGCTCTATTAAGTATAACGAGAAGTTTAAGGGTCAGGTCA CAATTAGCGCCGATAAGTCTAGCTCTACCGCCTACCTGCAG TGGTCTAGCCTGAAGGCTAGTGACACCGCTATGTACTACTG CGCTAGACGTAACCTGTTCTGCCTATGGAATACTGGGGTC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGC CCAAGTGTGTTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTC CGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCCTGGTGAAGGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGCTCTG ACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAG CGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCA GCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTC CAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTA CAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCAAGGACTGGC TGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCC GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTG GTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCC CAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAG	20 30 40

【表 1 - 5】

		CTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
配列番号 31	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLSSGDQKNYLT
配列番号 32	LCDR2 (Kabat)	WASTRES
配列番号 33	LCDR3 (Kabat)	QNDYRYPLT
配列番号 34	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGDQKNY
配列番号 35	LCDR2 (Chothia)	WAS
配列番号 36	LCDR3 (Chothia)	DYRYPL
配列番号 37	VL	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLSSGDQKNYLTW YLQKPGQSPQLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCQNDYRYPLTFGQGTKLEIK
配列番号 38	DNA VL	GATATCGTGATGACTCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGAC CCCTGGCGAGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGATCTAGTCAGT CACTGCTGTCTAGCGGCGATCAGAAGAACTACCTGACCTGG TATCTGCAGAAGCCCGGTCAGTCACCTCAGCTGCTGATCTA CTGGGCCTCTACTAGAGAATCAGGCGTGCCCGATAGGTTTA GCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCT AGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTCTACTACTGTCAGAA CGACTATAGATACCCCCTGACCTTCGGTCAGGGCACTAAGC TGGAGATTAAG
配列番号 39	軽鎖	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLSSGDQKNYLTW YLQKPGQSPQLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCQNDYRYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

【 0 1 8 2 】

【表 1 - 6】

配列番号 40:	DNA 軽鎖	GATATCGTGATGACTCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGAC CCCTGGCGAGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGATCTAGTCAGT CACTGCTGTCTAGCGGCGATCAGAAGAACTACCTGACCTGG TATCTGCAGAAGCCCCGGTCAGTCACCTCAGCTGCTGATCTA CTGGGCCTCTACTAGAGAATCAGGCGTGCCCGATAGGTTTA GCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCT AGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTCTACTACTGTCAGAA CGACTATAGATACCCCCTGACCTTCGGTCAGGGCACTAAGC TGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATC TCCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAG CGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCA AGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT ACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
----------	--------	--

10

NEG0013		
配列番号 41	HCDR1 (Kabat)	DHTIH
配列番号 42	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSINYNEKFKG
配列番号 43	HCDR3 (Kabat)	RNLFLPMEY
配列番号 44	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
配列番号 45	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
配列番号 46	HCDR3 (Chothia)	RNLFLPMEY
配列番号 47	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSGYTFTDHTIHWMRQMP GKGLEWMGYIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADKSSSTAYLQ WSSLKASDTAMYICARRNLFLPMEYWGQGTLVTVSS
配列番号 48	DNA VH	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAGCC CGGCGAGTCACTGAAGATTAGCTGTAAAGTCTCAGGCTACA CCTTCACCGATCACACTATTCAGTGGATGAGACAGATGCCC GGTAAAGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCCTAGATC AGGCTCTATTAAGTATAACGAGAAGTTTAAAGGGTCAGGTCA CAATTAGCGCCGATAAGTCTAGCTCTACCGCCTACCTGCAG TGGTCTAGCCTGAAGGCTAGTGACACCGCTATGTACTACTG CGCTAGACGTAACCTGTTCTGCCTATGGAATACTGGGGTC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGC

20

30

40

【表 1 - 7】

配列番号 49	重鎖	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSGYTFTDHTIHWMRQMP GKGLEWMGYIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADKSSSTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARRNLFLPMEYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
配列番号 50	DNA 重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAGCC CGGCGAGTCACTGAAGATTAGCTGTAAAGTCTCAGGCTACA CCTTCACCGATCACACTATTCACTGGATGAGACAGATGCCC GGTAAAGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCTAGATC AGGCTCTATTAACATAACGAGAAGTTTAAGGGTCAGGTCA CAATTAGCGCCGATAAGTCTAGCTCTACCGCCTACCTGCAG TGGTCTAGCCTGAAGGCTAGTGACACCGCTATGTACTACTG CGCTAGACGTAACCTGTTCCCTGCCTATGGAATACTGGGGTC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGC CCAAGTGTGTTTTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTC CGGCGGAAGTGTCTGCCCTGGGTTGCCCTGGTGAAGGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGCTCTG ACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCGTGCTGCAGAGCAG CGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCA GCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTC CAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTA CAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGC TGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCC GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTG GTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCC CAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG	20 30 40
配列番号 51	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLSGNQKNYLT	
配列番号 52	LCDR2 (Kabat)	WASTRES	

【表 1 - 8】

配列番号 53	LCDR3 (Kabat)	QNDYSYPLT	
配列番号 54	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGNQKNY	
配列番号 55	LCDR2 (Chothia)	WAS	
配列番号 56	LCDR3 (Chothia)	DYSYPL	
配列番号 57	VL	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSSGNQKNYLTW YLQKPGQSPQLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK	10
配列番号 58	DNA VL	GATATCGTGATGACTCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGAC CCCTGGCGAGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGATCTAGTCAGT CACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGAACTACCTGACCTGG TATCTGCAGAAGCCCGGTCACTCACCTCAGCTGCTGATCTA CTGGGCCTCTACTAGAGAATCAGGCGTGCCCGATAGGTTTA GCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCTGAAGATCTCT AGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTCTACTACTGTCAGAA CGACTATAGCTACCCCCCTGACCTTCGGTCAGGGCACTAAGC TGGAGATTAAG	20
配列番号 59	軽鎖	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSSGNQKNYLTW YLQKPGQSPQLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	
配列番号 60:	DNA 軽鎖	GATATCGTGATGACTCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGAC CCCTGGCGAGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGATCTAGTCAGT CACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGAACTACCTGACCTGG TATCTGCAGAAGCCCGGTCACTCACCTCAGCTGCTGATCTA CTGGGCCTCTACTAGAGAATCAGGCGTGCCCGATAGGTTTA GCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCTGAAGATCTCT AGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTCTACTACTGTCAGAA CGACTATAGCTACCCCCCTGACCTTCGGTCAGGGCACTAAGC TGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCGAGCGTGTTCATC TTCCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAG CGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCA AGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT ACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC	30
			40

NEG0016		
配列番号 61	HCDR1 (Kabat)	DHTLH
配列番号 62	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSTKYNNFRG

【表 1 - 9】

配列番号 63	HCDR3 (Kabat)	RLLFLPLDY	
配列番号 64	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH	
配列番号 65	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS	
配列番号 66	HCDR3 (Chothia)	RLLFLPLDY	
配列番号 67	VH	QIQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKVSGYTFTDHTLHWMRQAP GQGLEWMGYIYPRSGSTKYNNFRGRVTITADTSSSTAYME LSSLRSEDVAVYYCARRLLFLPLDYWGQGLTVTVSS	10
配列番号 68	DNA VH	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACC CGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGCTACA CCTTCACCGATCACACCCTGCACTGGATGAGACAGGCCCA GGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCTAGATC AGGCTCTACTAAGTATAACGAGAACTTTAGGGGTAGAGTGA CTATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACCGCCTATATGGAA CTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGCTCTACTACTG CGCTAGACGGCTGCTGTTCCCTGCCCCTGGACTACTGGGGTC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGC	20
配列番号 69	重鎖	QIQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKVSGYTFTDHTLHWMRQAP GQGLEWMGYIYPRSGSTKYNNFRGRVTITADTSSSTAYME LSSLRSEDVAVYYCARRLLFLPLDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVSVLTIVLHQLDNLNGKEYCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
配列番号 70	DNA 重鎖	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACC CGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGCTACA CCTTCACCGATCACACCCTGCACTGGATGAGACAGGCCCA GGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCTAGATC AGGCTCTACTAAGTATAACGAGAACTTTAGGGGTAGAGTGA CTATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACCGCCTATATGGAA CTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGCTCTACTACTG CGCTAGACGGCTGCTGTTCCCTGCCCCTGGACTACTGGGGTC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGC CCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTC CGGCGGAAGTGTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGCTCTG ACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAG CGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAAGTGCCTCCA GCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTC CAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCC	40

【表 1 - 10】

		AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTA CAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGC TGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCC GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTG GTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCCC CAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG	10
配列番号 71	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLSSGNQKSYLT	
配列番号 72	LCDR2 (Kabat)	WASTRES	
配列番号 73	LCDR3 (Kabat)	QNDYSYPFT	20
配列番号 74	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGNQKSY	
配列番号 75	LCDR2 (Chothia)	WAS	
配列番号 76	LCDR3 (Chothia)	DYSYPF	
配列番号 77	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLSSGNQKSYLTW YQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQGTKLEIK	
配列番号 78	DNA VL	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGTCAGT CACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGTCCTACCTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCTAGACTGCTGATCTA CTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCCGCTAGGTTTA GCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCT AGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGTCAGAA CGACTATAGCTACCCCTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGC TGGAGATTAAG	30
配列番号 79	軽鎖	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLSSGNQKSYLTW YQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	40

【表 1 - 1 1】

配列番号 80:	DNA 軽鎖	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGTCAGT CACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGTCCTACCTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCTAGACTGCTGATCTA CTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCCGCTAGGTTTA GCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCT AGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGTCAGAA CGACTATAGCTACCCCTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGC TGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATC TTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAG CGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCA AGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT ACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
----------	--------	--

10

NEG0064		
配列番号 81	HCDR1 (Kabat)	DHTLH
配列番号 82	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSTKYNENFRG
配列番号 83	HCDR3 (Kabat)	RLLFLPLDY
配列番号 84	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
配列番号 85	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
配列番号 86	HCDR3 (Chothia)	RLLFLPLDY
配列番号 87	VH	QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKVSGYTFTDHTLHWMRQAP GQGLEWMGYIYPRSGSTKYNENFRGRVTITADTSSSTAYME LSSLRSEDYAVYYCVRRLFLPLDYWGQGLTVTVSS
配列番号 88	DNA VH	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACC CGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGCTACA CCTTCACCGATCACACCCTGCACTGGATGAGACAGGCCCA GGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCTAGATC AGGCTCTACTAAGTATAACGAGAACTTTAGGGGTAGAGTGA CTATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACCGCCTATATGGAA CTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCTACTACTG CGTCAGACGGCTGCTGTTCTGCCCTGGACTACTGGGGTC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGC

20

30

40

【表 1 - 1 2】

配列番号 89	重鎖	QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKVSGYTFTDHTLHWMRQAP GQGLEWMGYIYPRSGSTKYNNFRGRVTITADTSSSTAYME LSSLRSEDTAVYYCVRRLFLPLDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
配列番号 90	DNA 重鎖	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACC CGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGCTACA CCTTCACCGATCACACCCTGCACTGGATGAGACAGGCCCA GGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCTAGATC AGGCTCTACTAAGTATAACGAGAACTTTAGGGGTAGAGTGA CTATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACCGCCTATATGGAA CTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCTACTACTG CGTCAGACGGCTGCTGTTCCCTGCCCTGGACTACTGGGGTC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGC CCAAGTGTGTTTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTC CGGCGGAAGTGTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGCTCTG ACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAG CGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCTCCA GCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTC CAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTA CAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGC TGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCC GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTG GTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCC CAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG	20 30 40
配列番号 91	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLSSGNQKSYLT	
配列番号 92	LCDR2 (Kabat)	WASTRES	

【表 1 - 13】

配列番号 93	LCDR3 (Kabat)	QNDYSYPFT	
配列番号 94	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGNQKSY	
配列番号 95	LCDR2 (Chothia)	WAS	
配列番号 96	LCDR3 (Chothia)	DYSYPF	
配列番号 97	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLLSSGNQKSYLTW YQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQGTKLEIK	10
配列番号 98	DNA VL	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGTCAGT CACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGTCCTACCTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCTAGACTGCTGATCTA CTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCGCTAGGTTTA GCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCT AGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGTCAGAA CGACTATAGCTACCCCTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGC TGGAGATTAAG	20
配列番号 99	軽鎖	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLLSSGNQKSYLTW YQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	30
配列番号 100	DNA 軽鎖	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGTCAGT CACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGTCCTACCTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCTAGACTGCTGATCTA CTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCGCTAGGTTTA GCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCT AGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGTCAGAA CGACTATAGCTACCCCTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGC TGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATC TCCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAG CGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCA AGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT ACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC	40

NEG0067		
配列番号 101	HCDR1 (Kabat)	DHTLH
配列番号 102	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSTKYNNFKG

【表 1 - 1 4】

配列番号 103	HCDR3 (Kabat)	RLLFLPLDY	
配列番号 104	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH	
配列番号 105	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS	
配列番号 106	HCDR3 (Chothia)	RLLFLPLDY	
配列番号 107	VH	QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSVCKVSGYTFTDHTLHWMRQAP GQGLEWMGYIYPRSGSTKYNNENFKGRVTITADTSSSTAYME LSSLRSEDVAVYYCVRLLFLPLDYWGQGLTVTVSS	10
配列番号 108	DNA VH	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACC CGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGCTACA CCTTCACCGATCACACCCTGCACTGGATGAGACAGGCCCA GGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCTAGATC AGGCTCTACTAAGTATAACGAGAACTTTAAGGGTAGAGTGA CTATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACCGCCTATATGGAA CTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCTACTACTG CGTCAGACGGCTGCTGTTCCCTGCCCCTGGACTACTGGGGTC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGC	20
配列番号 109	重鎖	QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSVCKVSGYTFTDHTLHWMRQAP GQGLEWMGYIYPRSGSTKYNNENFKGRVTITADTSSSTAYME LSSLRSEDVAVYYCVRLLFLPLDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVSVLTIVLHQLDNLNGKEYCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
配列番号 110	DNA 重鎖	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACC CGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGCTACA CCTTCACCGATCACACCCTGCACTGGATGAGACAGGCCCA GGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCTAGATC AGGCTCTACTAAGTATAACGAGAACTTTAAGGGTAGAGTGA CTATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACCGCCTATATGGAA CTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCTACTACTG CGTCAGACGGCTGCTGTTCCCTGCCCCTGGACTACTGGGGTC AGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGC CCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTC CGGCGGAAGTGTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCCTGGAAGTCTGGGGCTCTG ACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAG CGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCA GCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTC CAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCCTGTCCCCCCC	40

【表 1 - 1 5】

		AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGG TGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTA CAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGC TGAACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCC CTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCC GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTG GTGAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCC CAGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG	10
配列番号 111	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLSSGNQKSYLT	
配列番号 112	LCDR2 (Kabat)	WASTRES	
配列番号 113	LCDR3 (Kabat)	QNDYSYPFT	20
配列番号 114	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGNQKSY	
配列番号 115	LCDR2 (Chothia)	WAS	
配列番号 116	LCDR3 (Chothia)	DYSYPF	
配列番号 117	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLSSGNQKSYLTW YQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQGTKLEIK	
配列番号 118	DNA VL	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGTCAGT CACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGTCCTACCTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCTAGACTGCTGATCTA CTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCCGCTAGGTTTA GCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCT AGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGTCAGAA CGACTATAGCTACCCCTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGC TGGAGATTAAG	30
配列番号 119	軽鎖	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLSSGNQKSYLTW YQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSPVTKSFNRGEC	40

【表 1 - 16】

配列番号 120	DNA 軽鎖	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGTCAGT CACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAAGTCCTACCTGACCTGG TATCAGCAGAAGCCCGGTGAGGCCCCCTAGACTGCTGATCTA CTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCCGCTAGGTTTA GCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACCCTGACTATCTCT AGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGTCAGAA CGACTATAGCTACCCCTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGC TGGAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATC TCCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAG CGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCA AGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT ACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
----------	--------	---

10

【0193】

本発明の他の抗体としては、アミノ酸またはアミノ酸をコードする核酸が変異しているが、表 1 に記載の配列に対する少なくとも 60、70、80、90 または 95 パーセントの同一性を有するものが挙げられる。幾つかの実施形態では、表 1 に記載する配列で表される可変領域と比較した場合、1、2、3、4 または 5 個のアミノ酸が可変領域中で突然変異しているが、表 1 に列挙する抗体と実質的に同じ治療活性を保持する。

20

【0194】

これらの抗体はそれぞれ P - カドヘリンに結合することができるため、VH、VL、完全長軽鎖、および完全長重鎖配列（アミノ酸配列およびアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列）を「混合および一致」させて、本発明の他の P - カドヘリン結合抗体を作することができる。そのような「混合および一致」した P - カドヘリン結合抗体を、当業界で公知の結合アッセイ（例えば、ELISA、および実施例のセクションに記載の他のアッセイ）を使用して試験することができる。これらの鎖を混合および一致させる場合、特定の VH / VL 対に由来する VH 配列を、構造的に類似する VH 配列と置き換えるべきである。同様に、特定の完全長重鎖 / 完全長軽鎖対に由来する完全長重鎖配列を、構造的に類似する完全長重鎖配列と置き換えるべきである。同様に、特定の VH / VL 対に由来する VL 配列を、構造的に類似する VL 配列と置き換えるべきである。同様に、特定の完全長重鎖 / 完全長軽鎖対に由来する完全長軽鎖配列を、構造的に類似する完全長軽鎖配列と置き換えるべきである。従って、一態様では、本発明は、抗体が P - カドヘリンに特異的に結合する、配列番号 7、27、47、67、87 および 107 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および配列番号 17、37、57、77、97 および 117 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合領域を提供する。

30

40

【0195】

別の態様では、本発明は、(i) 配列番号 9、29、49、69、89 および 109 からなる群から選択される哺乳動物細胞中での発現のために最適化されたアミノ酸配列を含む完全長重鎖；および配列番号 19、39、59、79、99 および 119 からなる群から選択される哺乳動物発現系の細胞中での発現のために最適化されたアミノ酸配列を含む完全長軽鎖を有する単離されたモノクローナル抗体；または (ii) その抗原結合ポーションを含む機能的タンパク質を提供する。

【0196】

別の態様では、本発明は、表 1 に記載の重鎖および軽鎖 CDR1、CDR2 および CD

50

R 3、またはその組合せを含む P - カドヘリン結合抗体を提供する。抗体の V H C D R 1 のアミノ酸配列を、配列番号 1、2 1、4 1、6 1、8 1 および 1 0 1 に示す。抗体の V H C D R 2 のアミノ酸配列を、配列番号 2、2 2、4 2、6 2、8 2 および 1 0 2 に示す。抗体の V H C D R 3 のアミノ酸配列を、配列番号 3、2 3、4 3、6 3、8 3 および 1 0 3 に示す。抗体の V L C D R 1 のアミノ酸配列を、配列番号 1 1、3 1、5 1、7 1、9 1 および 1 1 1 に示す。抗体の V L C D R 2 のアミノ酸配列を、配列番号 1 2、3 2、5 2、7 2、9 2 および 1 1 2 に示す。抗体の V L C D R 3 のアミノ酸配列を、配列番号 1 3、3 3、5 3、7 3、9 3 および 1 1 3 に示す。

【 0 1 9 7 】

これらの抗体がそれぞれ P - カドヘリンに結合することができ、抗原結合特異性が主に C D R 1、2 および 3 領域によって提供されることを考慮して、V H C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列と、V L C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列とを、「混合および一致」させることができる（すなわち、異なる抗体に由来する C D R を混合および一致させることができる）。そのような「混合および一致」した P - カドヘリン結合抗体を、当業界で公知の結合アッセイおよび実施例に記載のアッセイ（例えば、E L I S A）を使用して試験することができる。V H C D R 配列を混合および一致させる場合、特定の V H 配列に由来する C D R 1、C D R 2 および / または C D R 3 配列を、構造的に類似する C D R 配列（複数可）と置き換えるべきである。同様に、V L C D R 配列を混合および一致させる場合、特定の V L 配列に由来する C D R 1、C D R 2 および / または C D R 3 配列を、構造的に類似する C D R 配列（複数可）と置き換えるべきである。新規 V H および V L 配列を、1 または複数の V H および / または V L C D R 領域配列を、本開示のモノクローナル抗体について本明細書に示される C D R 配列に由来する構造的に類似する配列と置換することにより、新しい V H および V L 配列を作出することができることが当業者には容易に明らかである。

【 0 1 9 8 】

従って、本発明は、抗体が P - カドヘリンに特異的に結合する、配列番号 1、2 1、4 1、6 1、8 1 および 1 0 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1；配列番号 2、2 2、4 2、6 2、8 2 および 1 0 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2；配列番号 3、2 3、4 3、6 3、8 3 および 1 0 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3；配列番号 1 1、3 1、5 1、7 1、9 1 および 1 1 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1；配列番号 1 2、3 2、5 2、7 2、9 2 および 1 1 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2；ならびに配列番号 1 3、3 3、5 3、7 3、9 3 および 1 1 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合領域を提供する。

【 0 1 9 9 】

特定の実施形態では、P - カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 2 の重鎖 C D R 2、配列番号 3 の重鎖 C D R 3、配列番号 1 1 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 2 の軽鎖 C D R 2、および配列番号 1 3 の軽鎖 C D R 3 を含む。

【 0 2 0 0 】

別の特定の実施形態では、P - カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 2 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 2 2 の重鎖 C D R 2、配列番号 2 3 の重鎖 C D R 3、配列番号 3 1 の軽鎖 C D R 1、配列番号 3 2 の軽鎖 C D R 2、および配列番号 3 3 の軽鎖 C D R 3 を含む。

【 0 2 0 1 】

さらに別の特定の実施形態では、P - カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 4 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 4 2 の重鎖 C D R 2、配列番号 4 3 の重鎖 C D R 3、配列番号 5 1 の軽鎖 C D R 1、配列番号 5 2 の軽鎖 C D R 2、および配列番号 5 3 の軽鎖 C D R 3 を含む。

【 0 2 0 2 】

さらなる実施形態では、P - カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 6 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 6 2 の重鎖 C D R 2、配列番号 6 3 の重鎖 C D R 3、配列番号 7 1 の軽鎖 C D R 1、配列番号 7 2 の軽鎖 C D R 2、および配列番号 7 3 の軽鎖 C D R 3 を含む。

【 0 2 0 3 】

別の特定の実施形態では、P - カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 8 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 8 2 の重鎖 C D R 2、配列番号 8 3 の重鎖 C D R 3、配列番号 9 1 の軽鎖 C D R 1、配列番号 9 2 の軽鎖 C D R 2、および配列番号 9 3 の軽鎖 C D R 3 を含む。

10

【 0 2 0 4 】

さらに特定の実施形態では、P - カドヘリンに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、配列番号 1 0 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 1 0 2 の重鎖 C D R 2、配列番号 1 0 3 の重鎖 C D R 3、配列番号 1 1 1 の軽鎖 C D R 1、配列番号 1 1 2 の軽鎖 C D R 2、および配列番号 1 1 3 の軽鎖 C D R 3 を含む。

【 0 2 0 5 】

ある実施形態では、P - カドヘリンに特異的に結合する抗体は、表 1 に記載される抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）である。

【 0 2 0 6 】

1 . エピトープおよび同エピトープに結合する抗体の同定

20

一実施形態では、本発明は、配列番号 1 2 6 の 1 2 4、1 2 5、1 5 1、1 5 3、1 5 4、1 5 5、1 5 6、1 5 9、1 6 0、1 6 1、1 6 2、1 6 3、1 6 8、1 7 0、1 7 1、および 1 7 2 位にあるアミノ酸から選択される 1 つまたは複数の残基を含むヒト P - カドヘリン上のエピトープに特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。幾つかの実施形態では、本発明は、配列番号 1 2 6 の 1 2 4、1 5 1、1 5 3 ~ 1 5 6、および 1 7 2 位から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸残基においてヒト P - カドヘリンに結合する重鎖を含む抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。他の実施形態では、本発明は、配列番号 1 2 6 の 1 2 4、1 2 5、1 5 5、1 5 6、1 5 9 ~ 1 6 3、1 6 8、1 7 0、および 1 7 1 位から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸残基においてヒト P - カドヘリンに結合する軽鎖を含む抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。幾つかの実施形態では、抗体または抗体断片は、配列番号 1 2 8 の 5 2、5 4、5 6、6 0、6 5、1 0 5、または 1 0 7 位から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸残基を含むヒト P - カドヘリンタンパク質に対する重鎖結合性パラトープを含む。他の実施形態では、抗体または抗体断片は、配列番号 1 2 9 の 1、2、2 7、2 8、3 0、6 8、9 2、9 3、または 9 4 位から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸残基を含むヒト P - カドヘリンタンパク質に対する軽鎖結合性パラトープを含む。

30

【 0 2 0 7 】

本発明はまた、表 1 に記載する抗 P - カドヘリン抗体と同じエピトープに特異的に結合するか、または表 1 に記載する抗体と交差競合する抗体および抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を提供する。したがって、さらなる抗体および抗体断片（例えば、抗原結合性断片）は、例えば B I A C O R E を介した P - カドヘリン結合アッセイまたは結合を測定するための当業者に公知のアッセイで、本発明の他の抗体と交差競合する（cross-compete）（例えば、統計学的に有意な様式で、その結合を競合的に阻害する）その能力に基づいて同定され得る。P - カドヘリン（例えば、ヒト P - カドヘリン）への本発明の抗体および抗体断片（例えば、抗原結合性断片）の結合を阻害する試験抗体の能力は、試験抗体が P - カドヘリンへの結合について抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）と競合することができることを示す；そのような抗体は、非限定的理論によれば、それが競合する抗体または抗体断片（例えば、抗原結合性断片）と、P - カドヘリンタンパク質上の同じか、または関連する（例えば、構造的に類似するか、または空間的に近い、または重

40

50

なっている) エピトープに結合することができる。特定の実施形態では、表 1 に記載する抗体または抗体断片 (例えば、抗原結合性断片) と同じ P - カドヘリン上のエピトープに結合する抗体は、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体である。そのようなヒトまたはヒト化モノクローナル抗体を、本明細書に記載のように調製および単離することができる。

【0208】

2. Fc 領域のフレームワークのさらなる変化

本発明のイムノコンジュゲートは、例えば、抗体の特性を改善するための、VH および / または VL 内のフレームワーク残基に対する改変をさらに含む改変された抗体またはその抗原結合性断片を含んでもよい。幾つかの実施形態では、フレームワーク改変を行って、抗体の免疫原性を低下させる。例えば、1つの手法は、1または複数のフレームワーク残基を、対応する生殖系列配列に「復帰変異」させることである。より特には、体細胞変異を受けた抗体は、抗体が誘導される生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有してもよい。抗体フレームワーク配列を、抗体が誘導される生殖系列配列と比較することにより、そのような残基を同定することができる。フレームワーク領域配列をその生殖系列構成に戻すために、例えば、部位特異的突然変異誘発により、体細胞変異を生殖系列配列に「復帰変異」させることができる。そのような「復帰変異」した抗体もまた、本発明により包含されることが意図される。

【0209】

別の型のフレームワーク改変は、フレームワーク領域内、またはさらには、1もしくは複数のCDR領域内の1または複数の残基を変異させて、T細胞エピトープを除去することによって、抗体の潜在的な免疫原性を低下させることを含む。この手法はまた、「脱免疫化」とも呼ばれ、Carr et al. による米国特許出願公開第20030153043号明細書にさらに詳細に記載されている。

【0210】

フレームワークまたはCDR領域内で作製される改変に加えて、またはその代わりに、Fc領域内に改変を含む、典型的には、血清半減期、補体固定化、Fc受容体結合、および / または抗原依存的細胞性細胞毒性などの、抗体の1または複数の機能的特性を変化させるように、本発明の抗体を操作することができる。さらに、本発明の抗体を化学的に改変する (例えば、1もしくは複数の化学的部分を抗体に結合することができる) か、または改変してそのグリコシル化を変化させ、再度、抗体の1または複数の機能的特性を変化させることができる。これらの実施形態はそれぞれ、以下にさらに詳細に記載される。

【0211】

一実施形態では、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が変化する、例えば、増加するか、または減少するように、CH1のヒンジ領域を改変する。この手法は、Bodmer et al. による米国特許第5,677,425号明細書にさらに記載されている。CH1のヒンジ領域中のシステイン残基の数を変化させて、例えば、軽鎖および重鎖の集合を容易にするか、または抗体の安定性を増加もしくは減少させる。

【0212】

別の実施形態では、抗体のFcヒンジ領域を変異させて、抗体の生物学的半減期を減少させる。より特には、抗体が天然のFc - ヒンジドメインSpA結合と比較して弱いスタフィロコッカス (Staphylococcy) タンパク質A (SpA) 結合を有するように、1または複数のアミノ酸変異をFc - ヒンジ断片のCH2 - CH3ドメイン境界領域中に導入する。この手法は、Ward et al. による米国特許第6,165,745号明細書にさらに詳細に記載されている。

【0213】

さらに他の実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸残基を、異なるアミノ酸残基と置き換えて、抗体のエフェクター機能を変化させることにより、Fc領域を変化させる。例えば、抗体がエフェクターリガンドに対する変化した親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力を保持するように、1または複数のアミノ酸を、異なるアミノ酸残基と置き換えることができる。親和性を変化させるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または

補体の C 1 成分であってもよい。この手法は、例えば、両方とも Winter et al. による米国特許第 5, 6 2 4, 8 2 1 号明細書および第 5, 6 4 8, 2 6 0 号明細書に記載されている。

【 0 2 1 4 】

別の実施形態では、抗体が変化した C 1 q 結合および/または低下した、もしくは無効化される補体依存的細胞毒性 (C D C) を有するように、アミノ酸残基から選択される 1 または複数のアミノ酸を、異なるアミノ酸残基と置き換えることができる。

【 0 2 1 5 】

別の実施形態では、1 または複数のアミノ酸残基を変化させることによって、補体を固定する抗体の能力を変化させる。この手法は、例えば、Bodmer et al. による P C T 公開第 W O 9 4 / 2 9 3 5 1 号パンフレットに記載されている。特定の実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片の 1 または複数のアミノ酸を、1 または複数のアロタイプアミノ酸残基により、図 4 に示すように I g G 1 サブクラスおよびカッパアイソタイプに置き換える。アロタイプアミノ酸残基としては、限定されるものではないが、I g G 1、I g G 2 および I g G 3 サブクラスの重鎖の定常領域、ならびに Jefferis et al., MAb s. 1:332-338 (2009) により記載されたようなカッパアイソタイプの軽鎖の定常領域も挙げられる。

【 0 2 1 6 】

さらに別の実施形態では、F c 領域を改変して、抗体依存的細胞性細胞毒性 (A D C C) を媒介する抗体の能力を増加させる、および/または 1 もしくは複数のアミノ酸を改変することにより F c 受容体に対する抗体の親和性を増加させる。この手法は、例えば、Presta による P C T 公開第 W O 0 0 / 4 2 0 7 2 号パンフレットに記載されている。さらに、F c R I、F c R I I、F c R I I I および F c R n に対するヒト I g G 1 上の結合部位がマッピングされており、結合が改善されたバリエーションが記載されている (Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001 を参照されたい)。

【 0 2 1 7 】

さらに別の実施形態では、抗体のグリコシル化を改変する。例えば、無グリコシル化抗体を作製することができる (すなわち、抗体はグリコシル化を欠く)。グリコシル化を変化させて、例えば、「抗原」に対する抗体の親和性を増加させることができる。そのような炭水化物改変を、例えば、抗体配列内の 1 または複数のグリコシル化部位を変化させることにより達成することができる。例えば、1 または複数の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除去をもたらす 1 または複数のアミノ酸置換を作製することによって、その部位でのグリコシル化を除去することができる。そのような無グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させることができる。そのような手法は、例えば、Co et al. による米国特許第 5, 7 1 4, 3 5 0 号明細書および第 6, 3 5 0, 8 6 1 号明細書に記載されている。

【 0 2 1 8 】

さらに、またはあるいは、フコシル残基の量が減少した低フコシル化抗体またはバイセクテイング G 1 c N a c 構造が増加した抗体などの、変化した型のグリコシル化を有する抗体を作製することができる。そのような変化したグリコシル化パターンは、抗体の A D C C 能力を増加させることが証明されている。そのような炭水化物改変を、例えば、グリコシル化機構が変化した宿主細胞中で抗体を発現させることにより達成することができる。グリコシル化機構が変化した細胞は当業界で記載されており、本発明の組換え抗体を発現させることによって、グリコシル化が変化した抗体を生成する宿主細胞として使用することができる。例えば、Hang et al. による E P 1, 1 7 6, 1 9 5 は、フコシルトランスフェラーゼをコードする F U T 8 遺伝子が機能的に破壊された細胞系を記載し、そのような細胞系中で発現された抗体は低グリコシル化を示す。Presta による P C T 公開第 W O 0 3 / 0 3 5 8 3 5 号パンフレットは、フコスを A s n (2 9 7) に連結された炭水化物に結合させる能力が低下し、その宿主細胞中で発現される抗体の低フコシル化をももたらす、バリエーション C H O 細胞系、L e c 1 3 細胞を記載している (Shields et al., (200

10

20

30

40

50

2) J. Biol. Chem. 277:26733-26740も参照されたい)。Umama et al.によるPCT公開第WO99/54342号パンフレットは、操作された細胞系中で発現される抗体が、抗体のADCC活性の増加をもたらすバイセクティングGlcNAc構造の増加を示すように、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、ベータ(1,4)-NアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するように操作された細胞系を記載している(Umana et al., Nat. Biotech. 17:176-180, 1999も参照されたい)。

【0219】

別の実施形態では、抗体をその生物学的半減期を増加させるように改変する。様々な手法が可能である。例えば、Wardの米国特許第6,277,375号明細書に記載のような、1または複数の以下の変異を導入することができる：T252L、T254S、T256F。あるいは、生物学的半減期を増加させるために、Presta et al.による米国特許第5,869,046号明細書および第6,121,022号明細書に記載のように、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから取られたサルベージ受容体結合エピートープを含有するように、抗体をCH1またはCL領域内で変化させることができる。

【0220】

3. P-カドヘリン抗体の生成

限定されるものではないが、組換え発現、化学的合成、および抗体四量体の酵素的消化などの、当業界で公知の任意の手段によって抗P-カドヘリン抗体およびその抗体断片（例えば、抗原結合性断片）を生成することができるが、完全長モノクローナル抗体を、例えば、ハイブリドーマまたは組換え生成によって取得することができる。組換え発現は、当業界で公知の任意の適切な宿主細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞などに由来するものであってよい。

【0221】

本発明は、本明細書に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド、例えば、本明細書に記載のような重鎖もしくは軽鎖可変領域または相補性決定領域を含むセグメントをコードするポリヌクレオチドをさらに提供する。幾つかの実施形態では、重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号8、28、48、68、88および108からなる群から選択されるポリヌクレオチドとの少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の核酸配列同一性を有する。幾つかの実施形態では、軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号18、38、58、78、98および118からなる群から選択されるポリヌクレオチドとの少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の核酸配列同一性を有する。

【0222】

幾つかの実施形態では、重鎖をコードするポリヌクレオチドは、配列番号10、30、50、70、90または110のポリヌクレオチドとの少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の核酸配列同一性を有する。幾つかの実施形態では、軽鎖をコードするポリヌクレオチドは、配列番号20、40、60、80、100または120のポリヌクレオチドとの少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の核酸配列同一性を有する。

【0223】

本発明のポリヌクレオチドは、抗P-カドヘリン抗体の可変領域配列のみをコードしてもよい。それらはまた、抗体の可変領域と定常領域との両方をコードしてもよい。いくつかのポリヌクレオチド配列は、例示的マウス抗P-カドヘリン抗体の1つの重鎖と軽鎖の両方の可変領域を含むポリペプチドをコードする。いくつかの他のポリヌクレオチドは、マウス抗体の1つの重鎖と軽鎖の可変領域とそれぞれ実質的に同一である2つのポリペプチドセグメントをコードする。

【 0 2 2 4 】

ポリヌクレオチド配列を、抗 P - カドヘリン抗体またはその結合断片をコードする存在する配列（例えば、以下の実施例に記載の配列）の *de novo* 固相 DNA 合成によるか、または PCR 突然変異誘発により生成することができる。Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90, 1979 のホスホトリエステル法 ; Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979 のホスホジエステル法 ; Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981 のジエチルホスホロアミダイト法 ; および米国特許第 4, 458, 066 号明細書の固相支持体法などの、当業界で公知の方法により、核酸の直接化学合成を達成することができる。PCR によるポリヌクレオチド配列への変異の導入を、例えば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; および Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991 に記載のように実施することができる。

10

【 0 2 2 5 】

また、上記の抗 P - カドヘリン抗体を生成するための発現ベクターおよび宿主細胞も、本発明において提供される。様々な発現ベクターを使用して、抗 P - カドヘリン抗体鎖または結合断片をコードするポリヌクレオチドを発現させることができる。ウイルスに基づく発現ベクターと非ウイルス発現ベクターの両方を使用して、哺乳動物宿主細胞中で抗体を生成することができる。非ウイルスベクターおよび系としては、典型的には、タンパク質または RNA を発現させるための発現カセットを含む、プラスミド、エピソードベクター、およびヒト人工染色体（例えば、Harrington et al., Nat Genet 15:345, 1997 を参照されたい）が挙げられる。例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）細胞中での抗 P - カドヘリンポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現にとって有用な非ウイルスベクターとしては、pThioHis A、B および C、pcDNA (商標) 3.1 / His、pEBVHis A、B および C (Invitrogen, San Diego, CA)、MPSV ベクター、ならびに他のタンパク質を発現させるための当業界で公知のいくつかの他のベクターが挙げられる。有用なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスに基づくベクター、SV40 に基づくベクター、パピローマウイルス、HBPEプスタイン・バーウイルス、ワクシニアウイルスベクターおよびセムリキ森林熱ウイルス (SFV) が挙げられる。Brent et al., supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; および Rosenfeld et al., Cell 68:143, 1992 を参照されたい。

20

30

【 0 2 2 6 】

発現ベクターの選択は、ベクターを発現させる意図される宿主細胞に依存する。典型的には、発現ベクターは、抗 P - カドヘリン抗体鎖または断片をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されるプロモーターおよび他の調節配列（例えば、エンハンサー）を含有する。幾つかの実施形態では、誘導性プロモーターを使用して、誘導条件下以外では挿入された配列の発現を防止する。誘導性プロモーターとしては、例えば、アラビノース、lacZ、メタロチオネインプロモーターまたは熱ショックプロモーターが挙げられる。形質転換された生物の培養物を、発現生成物が宿主細胞によってより良好に許容されるコード配列について集団を偏らせることなく、非誘導条件下で拡張することができる。プロモーターに加えて、他の調節エレメントも、抗 P - カドヘリン抗体鎖または断片の効率的発現にとって必要とされるか、または望まれる。これらのエレメントは、典型的には、ATG 開始コドンおよび隣接するリボソーム結合部位または他の配列を含む。さらに、発現の効率を、使用において細胞系にとって適切なエンハンサーの含有により増強することができる（例えば、Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; および Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987 を参照されたい）。例えば、SV40 エンハンサーまたは CMV エンハンサーを使用して、哺乳動物宿主細胞中での発現を増加させることができる。

40

50

【0227】

発現ベクターはまた、挿入される抗 P - カドヘリン抗体配列によりコードされるポリペプチドとの融合タンパク質を形成するための分泌シグナル配列位置も提供することができる。より頻繁には、挿入される抗 P - カドヘリン抗体配列を、ベクター中に含有させる前にシグナル配列に連結する。抗 P - カドヘリン抗体軽鎖および重鎖可変ドメインをコードする配列を受容するために使用されるベクターは、その定常領域または部分もコードすることがある。そのようなベクターにより、定常領域との融合タンパク質としての可変領域の発現が可能になり、それにより、インタクト抗体またはその断片の生成がもたらされる。典型的には、そのような定常領域はヒトである。

【0228】

抗 P - カドヘリン抗体鎖を担持および発現させるための宿主細胞は、原核または真核であってもよい。大腸菌 (*E. coli*) は、本発明のポリヌクレオチドをクローニングし、発現させるのに有用な 1 つの原核宿主である。使用にとって好適な他の微生物宿主としては、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) などの桿菌、ならびにサルモネラ (*Salmonella*)、セラチア (*Serratia*)、および様々なシュードモナス (*Pseudomonas*) 種などの他の腸内細菌科が挙げられる。これらの原核宿主においては、当業者であれば、典型的には宿主細胞と適合する発現制御配列 (例えば、複製起点) を含有する発現ベクターを作製することもできる。さらに、ラクトースプロモーター系、トリプトファン (*trp*) プロモーター系、ベータ - ラクタマーゼプロモーター系、またはラムダファージに由来するプロモーター系などの、任意数の様々な周知のプロモーターが存在する。プロモーターは、典型的には、任意選択でオペレーター配列と共に発現を制御し、転写および翻訳を開始および完了させるためのリボソーム結合部位配列などを有する。酵母などの他の微生物を使用して、本発明の抗 P - カドヘリンポリペプチドを発現させることもできる。バキュロウイルスベクターと組み合わせた昆虫細胞を使用することもできる。

【0229】

いくつかの好ましい実施形態では、哺乳動物宿主細胞を使用して、本発明の抗 P - カドヘリンポリペプチドを発現および生成させる。例えば、それらは、内因性免疫グロブリン遺伝子を発現するハイブリドーマ細胞系 (例えば、実施例に記載のミエローマハイブリドーマクローン) または外因性発現ベクターを担持する哺乳動物細胞系 (例えば、以下に例示される SP2/O ミエローマ細胞) であってもよい。これらのものは、任意の正常な死滅する、または正常もしくは異常な不死の動物もしくはヒト細胞を含む。例えば、CHO 細胞系、様々な COS 細胞系、HeLa 細胞、ミエローマ細胞系、形質転換された B 細胞およびハイブリドーマなどの、インタクト免疫グロブリンを分泌することができるいくつかの好適な宿主細胞系が開発されている。ポリペプチドを発現させるための哺乳動物組織細胞培養の使用は、例えば、Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987 で一般的に考察されている。哺乳動物宿主細胞のための発現ベクターは、複製起点、プロモーター、およびエンハンサーなどの発現制御配列 (例えば、Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49-68, 1986 を参照されたい)、ならびにリボソーム結合部位、RNA スプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列などの必要なプロセッシング情報部位を含んでもよい。これらの発現ベクターは通常、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターを含有する。好適なプロモーターは、構成的である、細胞型特異的である、段階特異的である、および/またはモジュレート可能もしくは調節可能であってもよい。有用なプロモーターとしては、限定されるものではないが、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性 MMTV プロモーター、SV40 プロモーター、MRP pol III プロモーター、構成的 MP SV プロモーター、テトラサイクリン誘導性 CMV プロモーター (ヒト極初期 CMV プロモーターなど)、構成的 CMV プロモーター、および当業界で公知のプロモーター - エンハンサーの組合せが挙げられる。

【0230】

対象のポリヌクレオチド配列を含有する発現ベクターを導入するための方法は、細胞宿

10

20

30

40

50

主の型に応じて変化する。例えば、原核細胞のためには塩化カルシウムトランスフェクションが一般的に使用されるが、他の細胞宿主のためにはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションを使用してもよい（一般的には、Sambrook et al., supraを参照されたい）。他の方法としては、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム処理、リポソーム媒介性形質転換、インジェクションおよびマイクロインジェクション、弾道法、ピロソーム、イムノリポソーム、ポリカチオン：核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、人工ビリオン、ヘルペスウイルス構造タンパク質VP22との融合（Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997）、DNAの薬剤増強性取込み、およびex vivoでの形質導入が挙げられる。組換えタンパク質の長期的な、高収率の生成のためには、安定な発現が望ましいことが多い。例えば、抗P-カドヘリン抗体鎖または結合断片を安定に発現する細胞系を、ウイルスの複製起点または内因性発現エレメントと、選択マーカー遺伝子とを含有する本発明の発現ベクターを使用して調製することができる。ベクターの導入後、細胞を富化培地中で1～2日間成長させた後、選択培地に切替えることができる。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与することであり、その存在により、選択培地中で導入された配列を上手く発現する細胞の成長が可能となる。耐性の安定にトランスフェクトされた細胞を、細胞型にとって適切な組織培養技術を使用して増殖させることができる。

10

【0231】

治療的および診断的使用

本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、および抗体薬物コンジュゲートは、限定されるものではないが、固形がんなどのがんの処置などの様々な適用において有用である。ある特定の実施形態では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、および抗体薬物コンジュゲートは、腫瘍成長の阻害、分化の誘導、腫瘍体積の減少、および/または腫瘍の発がん性の低下にとって有用である。使用法は、in vitro、ex vivo、またはin vivoでの方法であってもよい。

20

【0232】

一態様では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、および抗体薬物コンジュゲートは、生物試料中のP-カドヘリンの存在を検出するのに有用である。本明細書で使用される用語「検出すること」は、定量的または定性的検出を包含する。ある特定の実施形態では、生物試料は細胞または組織を含む。ある特定の実施形態では、そのような組織は、他の組織と比較してより高いレベルでP-カドヘリンを発現する正常および/またはがん性組織を含む。

30

【0233】

一態様では、本発明は、生物試料中のP-カドヘリンの存在を検出する方法を提供する。ある特定の実施形態では、この方法は、抗体の抗原への結合を可能にする条件下で、生物試料を抗P-カドヘリン抗体と接触させること、および抗体と抗原との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む。

【0234】

1つの態様では、本発明は、P-カドヘリンの増加された発現に関連付けられる障害を診断する方法を提供する。ある特定の実施形態では、この方法は、試験細胞を抗P-カドヘリン抗体と接触させること；抗P-カドヘリン抗体のP-カドヘリン抗原への結合を検出することにより試験細胞上でのP-カドヘリンの発現レベルを決定すること（定量的または定性的に）；および試験細胞中でのP-カドヘリンの発現レベルを、対照細胞（例えば、試験細胞と同じ組織起源の正常細胞またはそのような正常細胞と同等のレベルでP-カドヘリンを発現する細胞）中でのP-カドヘリンの発現レベルと比較することを含み、対照細胞と比較して、試験細胞上でのP-カドヘリンの発現レベルが高い場合、P-カドヘリンの発現の増加と関連する障害の存在を示す。ある特定の実施形態では、試験細胞は、P-カドヘリンの発現の増加と関連する障害を有することが疑われる個体から得られる。ある特定の実施形態では、障害は、がんまたは腫瘍などの細胞増殖性障害である。ある特定の実施形態では、上記方法は、試験細胞においてP-カドヘリン遺伝子のコピー数を

40

50

測定することを含む。ある特定の実施形態では、上記方法は、PAX-FOXOトランスロケーション突然変異を検出することを含む。遺伝子のコピー数および/またはトランスロケーション突然変異は、当技術分野で公知の標準的な方法、例えばPCR、RT-PCR等を使用して検出することができる。

【0235】

ある特定の実施形態では、上記のものなどの診断または検出の方法は、細胞表面上で、または表面上にP-カドヘリンを発現する細胞から得られる膜調製物中で発現されるP-カドヘリンへの抗P-カドヘリン抗体の結合を検出することを含む。細胞表面上に発現されるP-カドヘリンへの抗P-カドヘリン抗体の結合を検出するための例示的アッセイは、「FACS」アッセイである。

10

【0236】

ある特定の他の方法を使用して、P-カドヘリンへの抗P-カドヘリン抗体の結合を検出することができる。そのような方法としては、限定されるものではないが、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ、および免疫組織化学（IHC）などの、当業界で周知である抗原結合アッセイが挙げられる。

【0237】

ある特定の実施形態では、抗P-カドヘリン抗体を標識する。標識としては、限定されるものではないが、直接検出される標識または部分（蛍光、発色、高電子密度、化学発光、および放射性標識など）、ならびに例えば、酵素反応または分子相互作用を介して間接的に検出される、酵素またはリガンドなどの部分が挙げられる。

20

【0238】

ある特定の実施形態では、抗P-カドヘリン抗体を、不溶性マトリックス上に固定する。固定は、溶液中で遊離したままである任意のP-カドヘリタンパク質から抗P-カドヘリン抗体を分離することを必要とする。これは、水に不溶性のマトリックスもしくは表面への吸着（Bennich et al, 米国特許第3,720,760号明細書）により、もしくは共有カップリング（例えば、グルタルアルデヒド架橋を使用する）により、アッセイ手順の前に抗P-カドヘリン抗体を不溶化することによって、または例えば、免疫沈降により、抗P-カドヘリン抗体とP-カドヘリタンパク質との複合体の形成後に抗cKIT抗体を不溶化することによって、都合良く達成される。

30

【0239】

診断または検出の上記実施形態のいずれかを、抗P-カドヘリン抗体の代わりに、またはそれに加えて、本発明のイムノコンジュゲートを使用して実行することができる。

【0240】

一実施形態では、本発明は、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを患者に投与することを含む、疾患を処置、または防止する方法を提供する。本発明はまた、患者において疾患を処置または防止するための、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートの使用を提供する。幾つかの実施形態では、本発明は、患者における疾患の処置または防止における使用のための、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを提供する。さらなる実施形態では、本発明は、患者における疾患の処置または防止のための医薬の製造における、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートの使用を提供する。

40

【0241】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、および抗体薬物コンジュゲートで処置される疾患は、がんである。ある特定の実施形態では、がんは、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、および抗体薬物コンジュゲートが結合するP-カドヘリン発現細胞を特徴とする。ある特定の実施形態では、がんは、健常な患者に対して、P-カドヘリンの発現の増加を特徴とする。幾つかの実施形態

50

では、P - カドヘリンの発現は、P - カドヘリンRNAの増加により測定され得る。他の実施形態では、がんは、P - カドヘリンのDNAコピー数の増加を特徴とする。p - カドヘリン発現のレベルを測定または決定する他の方法は、当業者に公知である。処置および/または防止され得る疾患の例として、副腎皮質癌、膀胱がん、骨がん、乳がん、中枢神経系非定型奇形腫様ノブドイド腫瘍、結腸がん、結腸直腸がん、胚芽腫、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、頭頸部がん、肝細胞がん、カボジ肉腫、肝臓がん、小細胞肺癌および非小細胞肺癌を含む肺癌、卵巣がん、直腸がん、横紋筋肉腫、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、頸部扁平上皮がん、腹部がん、子宮がん、膣がん、および外陰部がんが挙げられるが、それらに限定されない。

【0242】

10

本発明は、治療有効量の本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを投与することを含む、がんを処置する方法を提供する。ある特定の実施形態では、がんは固形がんである。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、がんは、耐性がんおよび/または再発したがんである。ある特定の態様では、例えば、耐性がんは、EGFR阻害剤、Her2阻害剤、Her3阻害剤、IGFR阻害剤およびMet阻害剤を含むがこれらに限定されないチロシンキナーゼ阻害剤に耐性である。ある特定の実施形態では、がんは、Her2耐性がんである。

【0243】

ある特定の実施形態では、本発明は、対象に、治療有効量の本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを投与することを含む、腫瘍成長を阻害する方法を提供する。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、対象は、腫瘍を有するか、または腫瘍が除去されている。ある特定の実施形態では、腫瘍は、EGFR阻害剤、Her2阻害剤、Her3阻害剤、IGFR阻害剤およびMet阻害剤を含むがこれらに限定されない他のチロシンキナーゼ阻害剤に耐性である。

20

【0244】

ある特定の実施形態では、腫瘍は、抗P - カドヘリン抗体が結合するP - カドヘリンを発現する。ある特定の実施形態では、腫瘍は、ヒトP - カドヘリンを過剰発現する。ある特定の実施形態では、腫瘍は、P - カドヘリン遺伝子のコピー数の増加を有する。

【0245】

30

本発明はまた、治療有効量の上記抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを投与することを含む、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートによる処置に関して患者を選択する方法を提供する。ある特定の態様では、上記方法は、チロシンキナーゼ阻害剤耐性がんを有する患者を選択することを含む。ある特定の態様では、チロシンキナーゼ阻害剤耐性がんが、EGFR阻害剤、Her2阻害剤、Her3阻害剤、IGFR阻害剤および/またはMet阻害剤に耐性であると企画される。ある特定の態様では、耐性がんは、Her2耐性がんであると企画される。より具体的には、Her2耐性がんは、トラスツズマブまたはトラスツズマブエムタンシンに応答しないと企画される。ある特定の態様では、がんは、新生耐性がんであると企画され、さらに他の態様では、がんは、再発したがん、例えばHer2再発がんであると企画される。本発明のある特定の態様では、上記方法は、新生耐性または再発したがんを有する患者を選択すること、およびP - カドヘリンの発現に関して測定することを含む。ある特定の態様では、再発したがんまたは腫瘍が、初期ではP - カドヘリン発現性がんまたは腫瘍ではなかったが、チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、トラスツズマブまたはトラスツズマブエムタンシン）による処置後に、チロシンキナーゼ耐性の、もしくは再発したがんまたは腫瘍であるP - カドヘリン陽性がんとなることが企画される。

40

【0246】

疾患の処置のために、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートの適切な用量は、処置しようとする疾患の種類、疾患の重症度およ

50

び経過、疾患の応答性、以前の療法、患者の病歴などの様々な因子に依存する。抗体または薬剤を1回で、または数日から数カ月継続する一連の処置にわたって、または治癒が行われるか、もしくは疾患状態の縮小（例えば、腫瘍サイズの減少）が達成されるまで投与することができる。最適な投薬スケジュールは、患者の体内での薬物蓄積の測定値から算出することができ、個々の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートの相対的効力に応じて変化する。処置する医師であれば、体液または組織中での測定された滞留時間および薬物濃度に基づいて、投与のための反復速度を推定することができる。

【0247】

組合せ療法

ある特定の例では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを、他の抗がん剤、抗アレルギー剤、抗嘔吐剤（または制吐剤）、疼痛緩和剤、細胞保護剤、およびその組合せなどの他の治療剤と組み合わせる。

【0248】

一実施形態では、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートを、抗がん特性を有する第2の化合物との組合せ療法として組合せ医薬製剤、または用量レジメン中で組み合わせる。組合せ医薬製剤または用量レジメンの第2の化合物は、それらが互いに有害に作用しないような、抗体または組合せのイムノコンジュゲートに対する相補的活性を有してもよい。例えば、本発明の抗体、抗体断片（例えば、抗原結合性断片）、または抗体薬物コンジュゲートは、化学療法剤、チロシンキナーゼ阻害剤、P - カドヘリン下流シグナル伝達経路阻害剤、IAP阻害剤、Bcl2阻害剤、Mcl1阻害剤、および他のP - カドヘリン阻害剤と組み合わせ投与され得るが、これらに限定されない。

【0249】

本明細書で使用される用語「組合せ医薬」とは、1つの単位剤形中の固定的組合せ、または2つ以上の治療剤を同時に独立に、もしくは特に、組合せパートナーが協調的な、例えば、相乗効果を示すことができる時間間隔内で別々に投与することができる非固定的組合せもしくは組み合わせ投与のための部分のキットを指す。

【0250】

用語「組合せ療法」とは、本開示に記載の治療状態または障害を処置するための2つ以上の治療剤の投与を指す。そのような投与は、固定比の活性成分を有する単一のカプセルなどの、実質的に同時的な様式でのこれらの治療剤の同時投与を包含する。あるいは、そのような投与は、それぞれの活性成分について、複数の、または別々の容器（例えば、カプセル、粉末、および液体）中での同時投与を包含する。粉末および/または液体を、投与前に所望の用量に再構成または希釈することができる。さらに、そのような投与はまた、ほぼ同時に、または異なる時間に、連続的様式でのそれぞれの種類の治療剤の使用も包含する。いずれかの場合、処置レジメンは、本明細書に記載の状態または障害の処置において組合せ薬物の有益な効果を提供する。

【0251】

組合せ療法は、「相乗作用」を提供し、「相乗的」であることがわかっていてもよい、すなわち、活性成分を一緒に使用した場合に達成される効果は、化合物を別々に使用することから得られる効果の合計よりも大きい。活性成分が（1）組み合わせた単位用量製剤中で同時製剤化および投与されるか、もしくは同時に送達される；（2）別々の製剤として交互に、もしくは同時に送達される；または（3）いくつかの他のレジメンによるものである場合、相乗効果を達成することができる。交互療法において送達される場合、化合物が例えば、別々の注射筒中の異なる注射液により連続的に投与または送達される場合、相乗効果を達成することができる。一般に、交互療法中では、有効用量の各活性成分は連続的に、すなわち、順次投与されるが、組合せ療法においては、有効用量の2つ以上の活性成分は一緒に投与される。

【0252】

組合せ療法における使用のために考えられる一般的な化学療法剤としては、アナストロゾール（Arimidex（登録商標））、ピカルタミド（Casodex（登録商標））、硫酸ブレオマイシン（Blenoxane（登録商標））、ブスルファン（Myleran（登録商標））、ブスルファン注射液（Busulfex（登録商標））、カペシタピン（Xeloda（登録商標））、N4 - ペントキシカルボニル - 5 - デオキシ - 5 - フルオロシチジン、カルボプラチン（Paraplatin（登録商標））、カルムスチン（BiCNU（登録商標））、クロラムブシル（Leukeran（登録商標））、シスプラチン（Platinol（登録商標））、クラドリビン（Leustatin（登録商標））、シクロホスファミド（Cytosan（登録商標））またはNeosar（登録商標））、シタラビン、シトシンアラビノシド（Cytosar - U（登録商標））、シタラビンリポソーム注射液（DepoCyt（登録商標））、ダカルバジン（DTIC - Dome（登録商標））、ダクチノマイシン（Actinomycin D、Cosmegam）、塩酸ダウノルビシン（Cerubidine（登録商標））、クエン酸ダウノルビシンリポソーム注射液（DaunoXome（登録商標））、デキサメタゾン、ドセタキセル（Taxotere（登録商標））、塩酸ドキソルビシン（Adriamycin（登録商標））、Rubex（登録商標）、エトポシド（Vepesid（登録商標））、リン酸フルダラビン（Fludara（登録商標））、5 - フルオロウラシル（Aldrucil（登録商標））、Efudex（登録商標）、フルタミド（Eulexin（登録商標））、テザシチビン、ゲムシタピン（ジフルオロデオキシシチジン）、ヒドロキシウレア（Hydrea（登録商標））、イダルビシン（Idamycin（登録商標））、イフォスファミド（IFEX（登録商標））、イリノテカン（Campthosar（登録商標））、L - アスパラギナーゼ（ELSPAR（登録商標））、ロイコボリンカルシウム、メルファラン（Alkeran（登録商標））、6 - メルカプトプリン（Purinethol（登録商標））、メトトレキサート（Folex（登録商標））、ミトキサントロン（Novantrone（登録商標））、マイロターグ、パクリタキセル（Taxol（登録商標））、フェニックス（イットリウム90 / MX - DT PA）、ペントスタチン、カルムスチンインプラントを含むポリフェプロサン20（Gliadel（登録商標））、クエン酸タモキシフェン（Nolvadex（登録商標））、テニポシド（Vumon（登録商標））、6 - チオグアニン、チオテパ、チラパザミン（Tirazone（登録商標））、注射用塩酸トポテカン（Hycamtin（登録商標））、ビンブラスチン（Velban（登録商標））、ピンクリスチン（Oncovin（登録商標））、およびビノレルビン（Navelbine（登録商標））が挙げられる。

【0253】

一態様では、本発明は、限定されるものではないが、EGFR阻害剤、Her2阻害剤、Her3阻害剤、IGFR阻害剤、およびMet阻害剤などの1または複数のチロシンキナーゼ阻害剤と組み合わせた本発明の抗体薬物コンジュゲートを、それを必要とする対象に投与することにより、がんを処置する方法を提供する。

【0254】

例えば、チロシンキナーゼ阻害剤としては、限定されるものではないが、塩酸エルロチニブ（Tarceva（登録商標））；リニファニブ（Genentechから入手可能なABT869としても知られる、N - [4 - (3 - アミノ - 1H - インダゾール - 4 - イル)フェニル] - N' - (2 - フルオロ - 5 - メチルフェニル)ウレア）；リンゴ酸スニチニブ（Sutent（登録商標））；ボスチニブ（SKI - 606としても知られ、米国特許第6,780,996号明細書に記載された、4 - [(2,4 - ジクロロ - 5 - メトキシフェニル)アミノ] - 6 - メトキシ - 7 - 「3 - (4 - メチルピペラジン - 1 - イル)プロボキシ」キノリン - 3 - カルボニトリル）；ダサチニブ（Sprycel（登録商標））；パゾパニブ（Votrient（登録商標））；ソラフェニブ（Nexavar（登録商標））；ザクチマ（ZD6474）；およびイマチニブまたはメシル酸イマチニブ（Gleevec（登録商標））およびGleevec（登録商標））が挙げられる。

【0255】

上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害剤としては、限定されるものではないが、塩酸エルロチニブ (Tarceva (登録商標))、ゲフィチニブ (Iressa (登録商標))；N - [4 - [(3 - クロロ - 4 - フルオロフェニル) アミノ] - 7 - [[(3 ' ' S ' ') - テトラヒドロ - 3 - フラニル] オキシ] - 6 - キナゾリニル] - 4 (ジメチルアミノ) - 2 - ブテナミド、Tovok (登録商標))；バンデタニブ (Caprelsa (登録商標))；ラパチニブ (Tykerb (登録商標))；(3 R , 4 R) - 4 - アミノ - 1 - ((4 - ((3 - メトキシフェニル) アミノ) ピロロ [2 , 1 - f] [1 , 2 , 4] トリアジン - 5 - イル) メチル) ピペリジン - 3 - オール (BMS 6 9 0 5 1 4)；カネルチニブ二塩酸塩 (CI - 1 0 3 3)；6 - [4 - [(4 - エチル - 1 - ピペラジニル) メチル] フェニル] - N - [(1 R) - 1 - フェニルエチル] - 7 H - ピロロ [2 , 3 - d] ピリミジン - 4 - アミン (AEE 7 8 8 、 CAS 4 9 7 8 3 9 - 6 2 - 0)；ムブリチニブ (TAK 1 6 5)；ペリチニブ (EKB 5 6 9)；アフアチニブ (BIBW 2 9 9 2)；ネラチニブ (HKI - 2 7 2)；N - [4 - [[1 - [(3 - フルオロフェニル) メチル] - 1 H - インダゾール - 5 - イル] アミノ] - 5 - メチルピロロ [2 , 1 - f] [1 , 2 , 4] トリアジン - 6 - イル] - カルバミン酸、(3 S) - 3 - モルホリニルメチルエステル (BMS 5 9 9 6 2 6)；N - (3 , 4 - ジクロロ - 2 - フルオロフェニル) - 6 - メトキシ - 7 - [[(3 a , 5 , 6 a) - オクタヒドロ - 2 - メチルシクロペンタ [c] ピロール - 5 - イル] メトキシ] - 4 - キナゾリナミン (XL 6 4 7 、 CAS 7 8 1 6 1 3 - 2 3 - 8)；および 4 - [4 - [[(1 R) - 1 - フェニルエチル] アミノ] - 7 H - ピロロ [2 , 3 - d] ピリミジン - 6 - yl] - フェノール (PKI 1 6 6 、 CAS 1 8 7 7 2 4 - 6 1 - 4) が挙げられる。

10

20

【 0 2 5 6 】

EGFR 抗体としては、限定されるものではないが、セツキシマブ (Erbix (登録商標))；パニツムマブ (Vectibix (登録商標))；マツズマブ (EMD - 7 2 0 0 0)；トラスツズマブ (Herceptin (登録商標))；ニモツズマブ (hR3)；ザルツムマブ；TheraCIM h - R3；MDX 0 4 4 7 (CAS 3 3 9 1 5 1 - 9 6 - 1)；および ch 8 0 6 (mAb - 8 0 6 、 CAS 9 4 6 4 1 4 - 0 9 - 1) が挙げられる。

【 0 2 5 7 】

ヒト上皮成長因子受容体 2 (Her 2 受容体) (Neu 、 ErbB - 2 、 CD 3 4 0 、 または p 1 8 5 としても知られる) 阻害剤としては、限定されるものではないが、トラスツズマブ (Herceptin (登録商標))；ペルツズマブ (Omni targ (登録商標))；トラスツズマブエムタンシン (Kadcyla (登録商標))；ネラチニブ (HKI - 2 7 2 、 (2 E) - N - [4 - [[3 - クロロ - 4 - [(ピリジン - 2 - イル) メトキシ] フェニル] アミノ] - 3 - シアノ - 7 - エトキシキノリン - 6 - イル] - 4 - (ジメチルアミノ) ブタ - 2 - エンアミド、PCT 公開第 WO 0 5 / 0 2 8 4 4 3 号パンフレットに記載)；ラパチニブまたはラパチニブジトシレート (ditosylate) (Tykerb (登録商標))；(3 R , 4 R) - 4 - アミノ - 1 - ((4 - ((3 - メトキシフェニル) アミノ) ピロロ [2 , 1 - f] [1 , 2 , 4] トリアジン - 5 - イル) メチル) ピペリジン - 3 - オール (BMS 6 9 0 5 1 4)；(2 E) - N - [4 - [(3 - クロロ - 4 - フルオロフェニル) アミノ] - 7 - [[(3 S) - テトラヒドロ - 3 - フラニル] オキシ] - 6 - キナゾリニル] - 4 - (ジメチルアミノ) - 2 - ブテナミド (BIBW - 2 9 9 2 、 CAS 8 5 0 1 4 0 - 7 2 - 6)；N - [4 - [[1 - [(3 - フルオロフェニル) メチル] - 1 H - インダゾール - 5 - イル] アミノ] - 5 - メチルピロロ [2 , 1 - f] [1 , 2 , 4] トリアジン - 6 - イル] - カルバミン酸、(3 S) - 3 - モルホリニルメチルエステル (BMS 5 9 9 6 2 6 、 CAS 7 1 4 9 7 1 - 0 9 - 0 2)；カネルチニブ二塩酸塩 (PD 1 8 3 8 0 5 または CI - 1 0 3 3)；および N - (3 , 4 - ジクロロ - 2 - フルオロフェニル) - 6 - メトキシ - 7 - [[(3 a , 5 , 6 a) - オクタヒドロ - 2 - メチルシクロペンタ [c] ピロール - 5 - イル] メトキシ] - 4 - キナゾリナミン (XL 6 4 7 、 CAS 7 8 1 6 1 3 - 2 3 - 8) が挙げられる。

30

40

50

【0258】

Her3阻害剤としては、限定されるものではないが、LJM716、MM-121、AMG-888、RG7116、REGN-1400、AV-203、MP-RM-1、MM-111、およびMEHD-7945Aが挙げられる。

【0259】

MET阻害剤としては、限定されるものではないが、カボザンチニブ(XL184、CAS849217-68-1)；フォレチニブ(GSK1363089、以前はXL880、CAS849217-64-7)；チバンチニブ(ARQ197、CAS1000873-98-2)；1-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-N-(5-(7-メトキシキノリン-4-イルオキシ)ピリジン-2-イル)-5-メチル-3-オキソ-2-フェニル-2,3-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-カルボキサミド(AMG458)；クリゾチニブ(Xalkori(登録商標)、PF-02341066)；(3Z)-5-(2,3-ジヒドロ-1H-インドール-1-イルスルホニル)-3-({3,5-ジメチル-4-[(4-メチルピペラジン-1-イル)カルボニル]-1H-ピロール-2-イル}メチレン)-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン(SU11271)；(3Z)-N-(3-クロロフェニル)-3-({3,5-ジメチル-4-[(4-メチルピペラジン-1-yl)カルボニル]-1H-ピロール-2-イル}メチレン)-N-メチル-2-オキソインドリン-5-スルホンアミド(SU11274)；(3Z)-N-(3-クロロフェニル)-3-{{[3,5-ジメチル-4-(3-モルホリン-4-イルプロピル)-1H-ピロール-2-イル]メチレン}-N-メチル-2-オキソインドリン-5-スルホンアミド(SU11606)；6-[ジフルオロ[6-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1,2,4-トリアゾロ[4,3-b]ピリダジン-3-イル]メチル]-キノリン(JNJ38877605、CAS943540-75-8)；2-[4-[1-(キノリン-6-イルメチル)-1H-[1,2,3]トリアゾロ[4,5-b]ピラジン-6-イル]-1H-ピラゾール-1-イル]エタノール(PF04217903、CAS956905-27-4)；N-((2R)-1,4-ジオキサソ-2-イルメチル)-N-メチル-N'-[3-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-5-オキソ-5H-ベンゾ[4,5]シクロヘプタ[1,2-b]ピリジン-7-イル]スルファミド(MK2461、CAS917879-39-1)；6-[6-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1,2,4-トリアゾロ[4,3-b]ピリダジン-3-イル]チオ]-キノリン(SGX523、CAS1022150-57-7)；および(3Z)-5-[[2,6-ジクロロフェニル]メチル]スルホニル]-3-[[3,5-ジメチル-4-[(2R)-2-(1-ピロリジニルメチル)-1-ピロリジニル]カルボニル]-1H-ピロール-2-イル]メチレン]-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-オン(PHA665752、CAS477575-56-7)が挙げられる。

【0260】

IGF1R阻害剤としては、限定されるものではないが、BMS-754807、XL-228、OSI-906、GSK0904529A、A-928605、AXL1717、KW-2450、MK0646、AMG479、IMCA12、MED1-573、およびBI836845が挙げられる。概説については、例えば、Yee, JNCI, 104; 975 (2012)を参照されたい。

【0261】

別の態様では、本発明は、限定されるものではないが、MEK阻害剤、Braf阻害剤、PI3K/Akt阻害剤、SHP2阻害剤、およびまたmTorなどの、1または複数のP-カドヘリン下流シグナリング経路阻害剤と組み合わせた本発明の抗体薬物コンジュゲートを、それを必要とする対象に投与することにより、がんを処置する方法を提供する。

【0262】

例えば、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MEK)阻害剤としては、限定され

10

20

30

40

50

るものではないが、X L - 5 1 8 (A C C C o r p . から入手可能な、G D C - 0 9 7 3、C a s N o . 1 0 2 9 8 7 2 - 2 9 - 4 としても知られる) ; 2 - [(2 - クロロ - 4 - ヨードフェニル) アミノ] - N - (シクロプロピルメトキシ) - 3 , 4 - ジフルオロ - ベンザミド (C I - 1 0 4 0 または P D 1 8 4 3 5 2 としても知られ、P C T 公開第 W O 2 0 0 0 0 3 5 4 3 6 号パンフレットに記載されている) ; N - [(2 R) - 2 , 3 - ジヒドロキシプロポキシ] - 3 , 4 - ジフルオロ - 2 - [(2 - フルオロ - 4 - ヨードフェニル) アミノ] - ベンザミド (P D 0 3 2 5 9 0 1 としても知られ、P C T 公開第 W O 2 0 0 2 0 0 6 2 1 3 号パンフレットに記載されている) ; 2 , 3 - ビス [アミノ [(2 - アミノフェニル) チオ] メチレン] - ブタンジニトリル (U 0 1 2 6 としても知られ、米国特許第 2 , 7 7 9 , 7 8 0 号明細書に記載されている) ; N - [3 , 4 - ジフルオロ - 2 - [(2 - フルオロ - 4 - ヨードフェニル) アミノ] - 6 - メトキシフェニル] - 1 - [(2 R) - 2 , 3 - ジヒドロキシプロピル] - シクロプロパンスルホンアミド (R D E A 1 1 9 または B A Y 8 6 9 7 6 6 としても知られ、P C T 公開第 W O 2 0 0 7 0 1 4 0 1 1 号パンフレットに記載されている) ; (3 S , 4 R , 5 Z , 8 S , 9 S , 1 1 E) - 1 4 - (エチルアミノ) - 8 , 9 , 1 6 - トリヒドロキシ - 3 , 4 - ジメチル - 3 , 4 , 9 , 1 9 - テトラヒドロ - 1 H - 2 - ベンゾオキサシクロテトラデシン - 1 , 7 (8 H) - ジオン] (E 6 2 0 1 としても知られ、P C T 公開第 W O 2 0 0 3 0 7 6 4 2 4 号パンフレットに記載されている) ; 2' - アミノ - 3' - メトキシフラボン (B i a f f i n G m b H & C o . , K G , G e r m a n y から入手可能な P D 9 8 0 5 9 としても知られる) ; ベムラフェニブ (P L X - 4 0 3 2、C A S 9 1 8 5 0 4 - 6 5 - 1) ; (R) - 3 - (2 , 3 - ジヒドロキシプロピル) - 6 - フルオロ - 5 - (2 - フルオロ - 4 - ヨードフェニルアミノ) - 8 - メチルピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 4 , 7 (3 H , 8 H) - ジオン (T A K - 7 3 3、C A S 1 0 3 5 5 5 5 - 6 3 - 5) ; ピマセルチブ (A S - 7 0 3 0 2 6、C A S 1 2 0 4 5 3 1 - 2 6 - 9) ; およびトラメチニブジメチルスルホキシド (G S K - 1 1 2 0 2 1 2、C A S 1 2 0 4 5 3 1 - 2 5 - 8 0) が挙げられる。

【 0 2 6 3 】

ホスホイノシチド 3 - キナーゼ (P I 3 K) 阻害剤としては、限定されるものではないが、4 - [2 - (1 H - インダゾール - 4 - イル) - 6 - [[4 - (メチルスルホニル) ピペラジン - 1 - イル] メチル] チエノ [3 , 2 - d] ピリミジン - 4 - イル] モルホリン (G D C 0 9 4 1 としても知られ、P C T 公開第 W O 0 9 / 0 3 6 0 8 2 号パンフレットおよび第 W O 0 9 / 0 5 5 7 3 0 号パンフレットに記載されている) ; 2 - メチル - 2 - [4 - [3 - メチル - 2 - オキソ - 8 - (キノリン - 3 - イル) - 2 , 3 - ジヒドロイミダゾ [4 , 5 - c] キノリン - 1 - イル] フェニル] プロピオニトリル (B E Z 2 3 5 または N V P - B E Z 2 3 5 としても知られ、P C T 公開第 W O 0 6 / 1 2 2 8 0 6 号パンフレットに記載されている) ; 4 - (トリフルオロメチル) - 5 - (2 , 6 - ジモルホリノピリミジン - 4 - イル) ピリジン - 2 - アミン (B K M 1 2 0 または N V P - B K M 1 2 0 としても知られ、P C T 公開第 W O 2 0 0 7 / 0 8 4 7 8 6 号パンフレットに記載されている) ; トザセルチブ (V X 6 8 0 または M K - 0 4 5 7、C A S 6 3 9 0 8 9 - 5 4 - 6) ; (5 Z) - 5 - [[4 - (4 - ピリジニル) - 6 - キノリニル] メチレン] - 2 , 4 - チアゾリジンジオン (G S K 1 0 5 9 6 1 5、C A S 9 5 8 8 5 2 - 0 1 - 2) ; (1 E , 4 S , 4 a R , 5 R , 6 a S , 9 a R) - 5 - (アセチルオキシ) - 1 - [(ジ - 2 - プロペニルアミノ) メチレン] - 4 , 4 a , 5 , 6 , 6 a , 8 , 9 , 9 a - オクタヒドロ - 1 1 - ヒドロキシ - 4 - (メトキシメチル) - 4 a , 6 a - ジメチル - シクロペンタ [5 , 6] ナフト [1 , 2 - c] ピラン - 2 , 7 , 1 0 (1 H) - トリオン (P X 8 6 6 , C A S 5 0 2 6 3 2 - 6 6 - 8) ; および 8 - フェニル - 2 - (モルホリン - 4 - イル) - クロメン - 4 - オン (L Y 2 9 4 0 0 2、C A S 1 5 4 4 4 7 - 3 6 - 6) が挙げられる。

【 0 2 6 4 】

m T o r としては、限定されるものではないが、テムシロリムス (T o r i s e l (登

10

20

30

40

50

録商標)) ; リダホロリムス (以前はデフェロリムス、(1 R , 2 R , 4 S) - 4 - [(2 R) - 2 [(1 R , 9 S , 1 2 S , 1 5 R , 1 6 E , 1 8 R , 1 9 R , 2 1 R , 2 3 S , 2 4 E , 2 6 E , 2 8 Z , 3 0 S , 3 2 S , 3 5 R) - 1 , 1 8 - ジヒドロキシ - 1 9 , 3 0 - ジメトキシ - 1 5 , 1 7 , 2 1 , 2 3 , 2 9 , 3 5 - ヘキサメチル - 2 , 3 , 1 0 , 1 4 , 2 0 - ペンタオキソ - 1 1 , 3 6 - ジオキサ - 4 - アザトリシクロ [3 0 . 3 . 1 . 0 ⁴ . ⁹] ヘキサトリアコンタ - 1 6 , 2 4 , 2 6 , 2 8 - テトラエン - 1 2 - イル] プロピル] - 2 - メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネートとして知られ、A P 2 3 5 7 3 および M K 8 6 6 9 としても知られ、P C T 公開第 W O 0 3 / 0 6 4 3 8 3 号パンフレットに記載されている) ; エベロリムス (A f i n i t o r (登録商標) または R A D 0 0 1) ; ラパマイシン (A Y 2 2 9 8 9 、 S i r o l i m u s (登録商標)) ; シマピモッド (C A S 1 6 4 3 0 1 - 5 1 - 3) ; (5 - { 2 , 4 - ビス [(3 S) - 3 - メチルモルホリン - 4 - イル] ピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 7 - イル } - 2 - メトキシフェニル) メタノール (A Z D 8 0 5 5) ; 2 - アミノ - 8 - [t r a n s - 4 - (2 - ヒドロキシエトキシ) シクロヘキシル] - 6 - (6 - メトキシ - 3 - ピリジニル) - 4 - メチル - ピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 7 (8 H) - オン (P F 0 4 6 9 1 5 0 2 、 C A S 1 0 1 3 1 0 1 - 3 6 - 4) ; および N ² - [1 , 4 - ジオキソ - 4 - [[4 - (4 - オキソ - 8 - フェニル - 4 H - 1 - ベンゾピラン - 2 - イル) モルホリウム - 4 - イル] メトキシ] ブチル] - L - アルギニルグリシル - L - アスパルチル L - セリン - (配列番号 1 3 1) 、内塩 (S F 1 1 2 6 、 C A S 9 3 6 4 8 7 - 6 7 - 1) が挙げられる。

【 0 2 6 5 】

さらに別の態様において、本発明は、限定されるものではないが、I A P 阻害剤、B c 1 2 阻害剤、M C 1 1 阻害剤、T r a i l 剤、C h k 阻害剤などの1または複数のプロアポトーシス剤と組み合わせた本発明の抗体薬物コンジュゲートを、それを必要とする対象に投与することによりがんを処置する方法を提供する。

【 0 2 6 6 】

例えば、I A P 阻害剤としては、限定されるものではないが、L C L 1 6 1 、G D C - 0 9 1 7 、A E G - 3 5 1 5 6 、A T 4 0 6 、および T L 3 2 7 1 1 が挙げられる。I A P 阻害剤の他の例としては、限定されるものではないが、国際公開第 0 4 / 0 0 5 2 8 4 号パンフレット、国際公開第 0 4 / 0 0 7 5 2 9 号パンフレット、国際公開第 0 5 / 0 9 7 7 9 1 号パンフレット、国際公開第 0 5 / 0 6 9 8 9 4 号パンフレット、国際公開第 0 5 / 0 6 9 8 8 8 号パンフレット、国際公開第 0 5 / 0 9 4 8 1 8 号パンフレット、米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 1 4 7 0 0 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 2 5 3 4 7 号明細書、国際公開第 0 6 / 0 6 9 0 6 3 号パンフレット、国際公開第 0 6 / 0 1 0 1 1 8 号パンフレット、国際公開第 0 6 / 0 1 7 2 9 5 号パンフレット、および国際公開第 0 8 / 1 3 4 6 7 9 号パンフレット (これらは全て参照により本明細書に組み込まれる) に開示されたものが挙げられる。

【 0 2 6 7 】

B C L - 2 阻害剤としては、限定されるものではないが、4 - [4 - [[2 - (4 - クロロフェニル) - 5 , 5 - ジメチル - 1 - シクロヘキセン - 1 - イル] メチル] - 1 - ピペラジニル] - N - [[4 - [[(1 R) - 3 - (4 - モルホリニル) - 1 - [(フェニルチオ) メチル] プロピル] アミノ] - 3 - [(トリフルオロメチル) スルホニル] フェニル] スルホニル] ベンザミド (A B T - 2 6 3 としても知られ、P C T 公開第 W O 0 9 / 1 5 5 3 8 6 号パンフレットに記載されている) ; テトロカルシン A ; アンチマイシン ; ゴシポール ((-) B L - 1 9 3) ; オバトクラックス ; エチル - 2 - アミノ - 6 - シクロペンチル - 4 - (1 - シアノ - 2 - エトキシ - 2 - オキソエチル) - 4 H クロモン - 3 - カルボキシレート (H A 1 4 - 1) ; オブリメルセン (G 3 1 3 9 、 G e n a s e n s e (登録商標)) ; B a k B H 3 ペプチド ; (-) - ゴシポール酢酸 (A T - 1 0 1) ; 4 - [4 - [(4 ' - クロロ [1 , 1 ' - ビフェニル] - 2 - イル) メチル] - 1 - ピペラジニル] - N - [[4 - [[(1 R) - 3 - (ジメチルアミノ) - 1 - [(フェニ

10

20

30

40

50

ルチオ)メチル]プロピル]アミノ]-3-ニトロフェニル]スルホニル]-ベンザミド (ABT-737、CAS 852808-04-9); およびナピトクラックス (ABT-263、CAS 923564-51-6) が挙げられる。

【0268】

DR4 (TRAILR1) および DR5 (TRAILR2) などのプロアポトーシス受容体アゴニスト (PARA) としては、限定されるものではないが、デュラネルミン (AMG-951、RhApo2L/TRAIL); マパツムマブ (HRS-ETR1、CAS 658052-09-6); レキサツムマブ (HGS-ETR2、CAS 845816-02-6); アポマブ (Apomab (登録商標)); コナツムマブ (AMG655、CAS 896731-82-1); およびチガツズマブ (CS1008、CAS 946415-34-5、Daiichi Sankyo から入手可能) が挙げられる。チェックポイントキナーゼ (CHK) 阻害剤としては、限定されるものではないが、7-ヒドロキシスタウロスポリン (UCN-01); 6-プロモ-3-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-5-(3R)-3-ピペリジニル-ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-7-アミン (SCH900776、CAS 891494-63-6); 5-(3-フルオロフェニル)-3-ウレイドチオフエン-2-カルボン酸N-[(S)-ピペリジン-3-イル]アミド (AZD7762、CAS 860352-01-8); 4-[(3S)-1-アザピシクロ[2.2.2]オクタ-3-イル)アミノ]-3-(1H-ベンズイミダゾール-2-イル)-6-クロロキノリン-2(1H)-オン (CHIR124、CAS 405168-58-3); 7-アミノダクチノマイシン (7-AAD)、イソグラヌラチミド、デブプロモヒメニアルジシン; N-[5-プロモ-4-メチル-2-[(2S)-2-モルホリニルメトキシ]-フェニル]-N'-(5-メチル-2-ピラジニル)ウレア (LY2603618、CAS 911222-45-2); スルホラファン (CAS 4478-93-7、4-メチルスルフィニルブチルイソチオシアネート); 9, 10, 11, 12-テトラヒドロ-9, 12-エポキシ-1H-ジインドロ[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]ピロロ[3,4-i][1,6]ベンゾジアゾシン-1,3(2H)-ジオン (SB-218078、CAS 135897-06-2); および TAT-S216A (YGRKKRRQRRRLYRSPAMPENL (配列番号 132)), および CBP501 ((d-Bpa)sws(d-Phe-F5)(d-Cha)rrrqrr) が挙げられる。

【0269】

さらなる実施形態では、本発明は、それを必要とする対象に、1つまたは複数の免疫調節薬 (例えば、共刺激分子の活性化因子または免疫チェックポイント分子の阻害剤のうちの1つまたは複数) と組み合わせて、本発明の抗体薬物コンジュゲートを投与することにより、がんを処置する方法を提供する。

【0270】

ある特定の実施形態では、免疫調節薬は、共刺激分子の活性化因子である。一実施形態では、共刺激分子のアゴニストは、OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3 または CD83 リガンドのアゴニスト (例えば、アゴニスト抗体もしくはその抗原結合性断片、または可溶性融合物) から選択される。

【0271】

ある特定の実施形態では、免疫調節薬は、免疫チェックポイント分子の阻害剤である。一実施形態では、免疫調節薬は、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4 および/または TIGIT ベータの阻害剤である。一実施形態では、免疫チェックポイント分子の阻害剤は、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3 もしくは CTLA4、またはそれらの任意の組合せを阻害する。「阻害」または「阻害剤」という用語は、所与

10

20

30

40

50

の分子、例えば免疫チェックポイント阻害剤のある特定のパラメーター、例えば活性の低減を含む。例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%またはそれ以上の活性、例えばPD-1またはPD-L1活性の阻害は、この用語に含まれる。したがって、阻害は、100%である必要はない。

【0272】

阻害分子の阻害は、DNA、RNAまたはタンパク質レベルで実施され得る。幾つかの実施形態では、阻害核酸（例えば、dsRNA、siRNAまたはshRNA）を使用して、阻害分子の発現を阻害することができる。他の実施形態では、阻害シグナルを有する阻害剤は、ポリペプチド、例えば可溶性リガンド（例えば、PD-1-IgまたはCTLA-4-Ig）、または阻害分子に結合する抗体もしくはその抗原結合性断片、例えば、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4および/またはTGFRベータ、またはそれらの組合せに結合する抗体またはその断片（本明細書中では「抗体分子」とも称される）である。

【0273】

一実施形態では、抗体分子は、完全抗体またはその断片（例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、または単鎖Fv断片（scFv））である。さらに他の実施形態では、抗体分子は、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、およびIgEの重鎖定常領域から選択される重鎖定常領域（Fc）、特に、例えばIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4の重鎖定常領域から選択される重鎖定常領域（Fc）、さらに特に、IgG1またはIgG4（例えば、ヒトIgG1またはヒトIgG4）の重鎖定常領域を有する。一実施形態では、重鎖定常領域は、ヒトIgG1またはヒトIgG4である。一実施形態では、定常領域は、変更されて、例えば突然変異されて、抗体分子の特性を改変する（例えば、Fc受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基の数、エフェクター細胞機能、もしくは補体機能のうちの1つまたは複数を増加または減少させる）。

【0274】

ある特定の実施形態では、抗体分子は、二重特異性または多重特異性抗体分子の形態で存在する。一実施形態では、二重特異性抗体分子は、PD-1またはPD-L1に対する第1の結合特異性および第2の結合特異性、例えばTIM-3、LAG-3、またはPD-L2に対する第2の結合特異性を有する。一実施形態では、二重特異性抗体分子は、PD-1またはPD-L1およびTIM-3に結合する。別の実施形態では、二重特異性抗体分子は、PD-1またはPD-L1およびLAG-3に結合する。別の実施形態では、二重特異性抗体分子は、PD-1およびPD-L1に結合する。さらに別の実施形態では、二重特異性抗体分子は、PD-1およびPD-L2に結合する。別の実施形態では、二重特異性抗体分子は、TIM-3およびLAG-3に結合する。上述の分子の任意の組合せは、PD-1またはPD-L1に対する第1の結合特異性、ならびにTIM-3、LAG-3、またはPD-L2のうちの2つまたはそれ以上に対する第2および第3の結合特異性を含む多重特異性抗体分子、例えば三重特異性抗体で成され得る。

【0275】

ある特定の実施形態では、免疫調節薬は、PD-1、例えばヒトPD-1の阻害剤である。別の実施形態では、免疫調節薬は、PD-L1、例えばヒトPD-L1の阻害剤である。一実施形態では、PD-1またはPD-L1の阻害剤は、PD-1またはPD-L1に対する抗体分子である。PD-1またはPD-L1阻害剤は、単独で、または他の免疫調節薬と組み合わせて、例えばLAG-3、TIM-3またはCTLA4の阻害剤と組み合わせて投与することができる。例示的な実施形態では、PD-1またはPD-L1の阻害剤、例えば抗PD-1またはPD-L1抗体分子は、LAG-3阻害剤、例えば抗LAG-3抗体分子と組み合わせて投与される。別の実施形態では、PD-1またはPD-L1の阻害剤、例えば抗PD-1またはPD-L1抗体分子は、TIM-3阻害剤、例えば抗TIM-3抗体分子と組み合わせて投与される。さらに他の実施形態では、PD-1ま

たはPD-L1の阻害剤、例えば抗PD-1抗体分子は、LAG-3阻害剤、例えば抗LAG-3抗体分子、およびTIM-3阻害剤、例えば抗TIM-3抗体分子と組み合わせて投与される。PD-1阻害剤との免疫調節薬の他の組合せ（例えば、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4および/またはTGFR）もまた、本発明内である。当該技術分野で公知の、または本明細書中に開示する抗体分子はいずれも、チェックポイント分子の阻害剤の上述の組合せで使用するすることができる。

【0276】

一実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブ、ペムブロリズマブまたはピディリズマブから選択される抗PD-1抗体である。幾つかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブである。ニボルマブに関する代替名称として、MDX-1106、MDX-1106-04、ONO-4538、またはBMS-936558が挙げられる。幾つかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブ（CAS登録番号：946414-94-4）である。ニボルマブは、PD1を特異的にブロックする完全ヒトIgG4モノクローナル抗体である。ニボルマブ（クローン5C4）およびPD-1に特異的に結合する他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第8,008,449号明細書およびPCT国際公開第2006/121168号パンフレットに開示されている。

【0277】

他の実施形態では、抗PD-1抗体は、ペムブロリズマブである。ペムブロリズマブ（商品名KEYTRUDA、以前はランブロリズマブ、Merck 3745、MK-3475またはSCH-900475としても公知）は、PD1に結合するヒト化IgG4モノクローナル抗体である。ペムブロリズマブは、例えばHamid, O. et al. (2013) New England Journal of Medicine 369 (2): 134-44、PCT国際公開第2009/114335号パンフレット、および米国特許第8,354,509号明細書に開示されている。

【0278】

幾つかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ピディリズマブである。ピディリズマブ（CT-011、Cure Tech）は、PD-1に結合するヒト化IgG1kモノクローナル抗体である。ピディリズマブおよび他のヒト化抗PD-1モノクローナル抗体は、PCT国際公開第2009/101611号パンフレットに開示されている。他の抗PD1抗体は、米国特許第8,609,089号明細書、米国特許出願公開第2010028330号明細書、および/または米国特許出願公開第20120114649号明細書に開示されている。他の抗PD1抗体として、AMP 514（Amplimmune）が挙げられる。

【0279】

幾つかの実施形態では、PD-1阻害剤は、イムノアドヘシン（例えば、定常領域（例えば、免疫グロブリン配列のFc領域）に融合されたPD-L1もしくはPD-L2の細胞外またはPD-1結合性部分を含むイムノアドヘシン）である。幾つかの実施形態では、PD-1阻害剤は、AMP-224である。

【0280】

幾つかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、抗PD-L1抗体である。幾つかの実施形態では、抗PD-L1阻害剤は、例えば国際公開第2013/0179174号パンフレットに開示され、本明細書中に開示する配列（またはそれに対して実質的に同一または類似の配列、例えば、指定配列に対して少なくとも85%、90%、95%またはそれ以上同一の配列）を有するYW243.55.S70、MPDL3280A、MED1-4736、またはMDX-1105MSB-0010718C（A09-246-2とも称される）から選択される。

【0281】

一実施形態では、PD-L1阻害剤は、MDX-1105である。BMS-936559としても公知であるMDX-1105は、PCT国際公開第2007/005874号パンフレットに記載される抗PD-L1抗体である。

【0282】

一実施形態では、PD-L1阻害剤は、YW243.55.S70である。YW243.55.S70抗体は、PCT国際出願第2010/077634号パンフレットに記載される抗PD-L1（それぞれ、配列番号20および21に示される重鎖および軽鎖可変領域配列）である。

【0283】

一実施形態では、PD-L1阻害剤は、MDPL3280A（Genentech/Roche）である。MDPL3280Aは、PD-L1に結合するヒトFc最適化IgG1モノクローナル抗体である。MDPL3280AおよびPD-L1に対する他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第7,943,743号明細書および米国特許出願公開第20120039906号明細書に開示されている。

10

【0284】

他の実施形態では、PD-L2阻害剤は、AMP-224である。AMP-224は、PD1とB7-H1との間の相互作用をブロックするPD-L2 Fc融合可溶性受容体（B7-DCIg、Amplimmune、例えばPCT国際公開第2010/027827号パンフレットおよび国際公開第2011/066342号パンフレットに開示されている）である。

【0285】

一実施形態では、LAG-3阻害剤は、抗LAG-3抗体分子である。一実施形態では、LAG-3阻害剤は、BMS-986016である。

20

【0286】

医薬組成物

イムノコンジュゲートを含む医薬組成物または滅菌組成物を調製するために、本発明のイムノコンジュゲートを、薬学的に許容される担体または賦形剤と混合する。組成物は、がん（膀胱がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、バレット食道がん、胃がん、頭頸部がん、肺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、肝臓がん、膵がん、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、骨肉腫、扁平上皮癌、末梢神経鞘腫瘍、シュワン腫、神経膠芽細胞腫、軟部組織の明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎がん、黒色腫、前立腺がん、良性全室線肥大症（BPH）、女性化乳房（gynecomastia）、および横紋筋肉腫を含むが、それらに限定されない）がんを処置または防止するのに適している1つまたは複数の他の治療剤をさらに含有することができる。

30

【0287】

治療剤および診断剤の製剤を、例えば、凍結乾燥粉末、スラリー、水性溶液、ローション、または懸濁液の形態で生理的に許容される担体、賦形剤、または安定化剤と混合することにより調製することができる（例えば、Hardman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000; Avis, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, et al. (eds.) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner and Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000を参照されたい）。

40

【0288】

一実施形態では、本発明の抗体薬物コンジュゲートの臨床サービス形態（CSF）は、ADC、ヒスチジン、スクロースおよびポリソルベート20を含有するバイアル中の凍結乾燥物である。凍結乾燥物を注射用水で再構成させることができ、その溶液はADC、ヒスチジン、スクロース、およびポリソルベート20、pH約5.0を含む。1つの特定実施形態では、凍結乾燥物は、pH5.3で、10mg/mlのADC、20mMヒスチジン、240mMスクロース、および0.02%ポリソルベート20を含む。

50

【0289】

治療剤のための投与レジメンの選択は、実体の血清または組織代謝回転率、症状のレベル、実体の免疫原性および生物学的マトリックス中の標的細胞の接近可能性などのいくつかの因子に依存する。ある特定の実施形態において、投与レジメンは、許容される副作用レベルと一致する患者に送達される治療剤の量を最大化する。従って、送達される生物製剤の量は、特定の实体および処置される状態の重症度に一部依存する。適切な用量の抗体、サイトカイン、および小分子を選択する際の指針が利用可能である（例えば、Wawrzynczak, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.), Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991; Bach (ed.), Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993; Baert et al., New Engl. J. Med. 348:601-608, 2003; Milgrom et al., New Engl. J. Med. 341:1966-1973, 1999; Slamon et al., New Engl. J. Med. 344:783-792, 2001; Beniaminovitz et al., New Engl. J. Med. 342:613-619, 2000; Ghosh et al., New Engl. J. Med. 348:24-32, 2003; Lipsky et al., New Engl. J. Med. 343:1594-1602, 2000を参照されたい）。

10

【0290】

適切な用量の決定は、例えば、処置に影響するか、または処置に影響すると予測されることが当業界で公知の、または疑われるパラメーターまたは因子を使用して、医師によって行われる。一般に、用量は最適用量よりもいくらか低い量から開始し、その後、任意の負の副作用と比較して所望の、または最適な効果が達成されるまで少しずつ増加させる。重要な診断尺度は、例えば、生成される炎症性サイトカインの炎症またはレベルの症状のものを含む。

20

【0291】

本発明の医薬組成物中の活性成分の急性用量レベルを、患者にとって毒性とならないように、特定の患者、組成物、および投与様式に対する所望の治療応答を達成するのに有効である活性成分の量を得るために変化させることができる。選択される用量レベルは、使用される本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与の時間、使用される特定の化合物の排出速度、処置の持続期間、使用される特定の組成物と共に使用される他の薬物、化合物および/または材料、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、一般的健康および以前の病歴、ならびに医学界で公知の同様の因子を含む様々な薬物動態因子に依存する。

30

【0292】

本発明の抗体またはそれらの断片を含む組成物は、連続注入により、または例えば1日、1週または1週につき1～7回、隔週に1回、3週ごとに1回、4週ごとに1回、5週ごとに1回、6週ごとに1回、7週ごとに1回、または8週ごとに1回の間隔での投与により供給され得る。用量を、静脈内、皮下、局所、経口、経鼻、直腸、筋肉内、大脳内で、または吸入により提供することができる。特定の用量プロトコールは、有意な望ましくない副作用を回避する最大用量または用量頻度を含むものである。

【0293】

本発明のイムノコンジュゲートに関して、患者に投与される用量は、0.0001 mg/kg ~ 100 mg/kg 患者体重であってもよい。用量は、0.0001 mg/kg ~ 30 mg/kg、0.0001 mg/kg ~ 20 mg/kg、0.0001 mg/kg ~ 10 mg/kg、0.0001 mg/kg ~ 5 mg/kg、0.0001 ~ 2 mg/kg、0.0001 ~ 1 mg/kg、0.0001 mg/kg ~ 0.75 mg/kg、0.0001 mg/kg ~ 0.5 mg/kg、0.0001 mg/kg ~ 0.25 mg/kg、0.0001 ~ 0.15 mg/kg、0.0001 ~ 0.10 mg/kg、0.0001 ~ 0.5 mg/kg、0.01 ~ 0.25 mg/kg または 0.01 ~ 0.10 mg/kg 患者体重であってもよい。本発明の抗体またはその断片の用量を、キログラム患者体重 (kg) に、mg/kg で投与される用量を掛けたものを使用して算出することができる。

40

【0294】

50

本発明のイムノコンジュゲートの用量を反復し、投与を一日未満、少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、15日、30日、45日、2カ月、75日、3カ月、4カ月、5カ月または少なくとも6カ月空けてもよい。幾つかの実施形態では、本発明のイムノコンジュゲートは、週に2回、週に1回、2週毎に1回、3週毎に1回、4週毎に1回、またはより低頻度で投与され得る。特定の実施形態においては、本発明のイムノコンジュゲートの用量を、2週間毎に反復する。

【0295】

特定の患者のための有効量は、処置される状態、患者の全体的な健康、投与の方法、経路および用量ならびに副作用の重症度などの因子に応じて変化してもよい（例えば、Maynard et al., A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK, 2001を参照されたい）。

【0296】

投与経路は、例えば、局所もしくは皮膚適用、皮下、静脈内、腹腔内、大脳内、筋肉内、眼内、動脈内、脳脊髄内、病変内投与による注射もしくは輸注、または持続放出系もしくは埋込み体によるものであってもよい（例えば、Sidman et al., Biopolymers 22:547-556, 1983; Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981; Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034, 1980; 米国特許第6,350,466号明細書および第6,316,024号明細書を参照されたい）。必要に応じて、組成物はまた、可溶化剤または注射部位での疼痛を軽減するためのリドカインなどの局所麻酔剤、またはその両方を含んでもよい。さらに、例えば、吸入器または噴霧器、およびエアゾール化剤を含む製剤の使用により、肺投与を使用することもできる。例えば、米国特許第6,019,968号明細書、第5,985,320号明細書、第5,985,309号明細書、第5,934,272号明細書、第5,874,064号明細書、第5,855,913号明細書、第5,290,540号明細書、および第4,880,078号明細書；ならびにPCT公開第WO92/19244号パンフレット、第WO97/32572号パンフレット、第WO97/44013号パンフレット、第WO98/31346号パンフレット、および第WO99/66903号パンフレット（それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0297】

本発明の組成物を、1または複数の当業界で公知の様々な方法を使用して、1または複数の投与経路により投与することもできる。当業者であれば理解できるように、投与の経路および/または様式は、所望の結果に応じて変化する。本発明のイムノコンジュゲートのために選択される投与経路としては、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または例えば、注射もしくは輸注による他の非経口投与経路が挙げられる。非経口投与は、通常は注射による、腸内投与および局所投与以外の投与様式であってよく、限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および輸注が挙げられる。あるいは、本発明の組成物を、局所、表皮または粘膜投与経路などの非経口経路により、例えば、鼻内的、経口的、経膈的、直腸的、舌下的または局所的に投与することができる。一実施形態において、本発明のイムノコンジュゲートは、輸注により投与される。別の実施形態において、本発明のイムノコンジュゲートは皮下投与される。

【0298】

本発明のイムノコンジュゲートを制御放出系または持続放出系において投与する場合、ポンプを使用して制御放出または持続放出を達成することができる（Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:20, 1987; Buchwald et al., Surgery 88:507, 1980; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574, 1989を参照されたい）。ポリマー材料を使用して、本発明の療法の制御放出または持続放出を達成することができる（例えば、

Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1983を参照されたい; また、Levy et al., Science 228:190, 1985; During et al., Ann. Neurol. 25:351, 1989; Howard et al., J. Neurosurg. 71:105, 1989; 米国特許第5,679,377号明細書; 米国特許第5,916,597号明細書; 米国特許第5,912,015号明細書; 米国特許第5,989,463号明細書; 米国特許第5,128,326号明細書; PCT公開第WO99/15154号パンフレット; およびPCT公開第WO99/20253号パンフレットも参照されたい)。持続放出製剤において使用されるポリマーの例としては、限定されるものではないが、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-ビニルアセテート)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)、およびポリオルトエステルが挙げられる。一実施形態において、持続放出製剤において使用されるポリマーは、不活性であり、浸出性不純物を含まず、保存時に安定であり、無菌であり、および生分解性である。制御放出系または持続放出系を、予防または治療標的の近くに置き、かくして、全身用量のほんの一部のみを要することができる(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138, 1984を参照されたい)。

【0299】

制御放出系は、Langer, Science 249:1527-1533, 1990による概説で考察されている。当業者には公知の任意の技術を使用して、本発明の1または複数のイムノコンジュゲートを含む持続放出製剤を生成することができる。例えば、米国特許第4,526,938号明細書、PCT公開第WO91/05548号パンフレット、PCT公開第WO96/20698号パンフレット、Ning et al., Radiotherapy & Oncology 39:179-189, 1996; Song et al., PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, 1995; Cleek et al., Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 1997; およびLam et al., Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, 1997(それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

【0300】

本発明のイムノコンジュゲートを局所投与する場合、それらを軟膏、クリーム、経皮パッチ、ローション、ゲル、スプレー、エアゾール、溶液、乳濁液の形態、または当業者には周知の他の形態で製剤化することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)を参照されたい。非スプレー可能局所剤形については、局所適用と適合する担体または1もしくは複数の賦形剤を含み、いくつかの場合、水よりも高い動的粘度を有する粘性から半固体または固体の形態が典型的に使用される。好適な製剤としては、限定されるものではないが、必要に応じて、滅菌されるか、または例えば、浸透圧などの様々な特性に影響を及ぼすための補助剤(例えば、保存剤、安定化剤、湿潤剤、緩衝液、もしくは塩)と混合される、溶液剤、懸濁液剤、乳濁液剤、クリーム剤、軟膏剤、散剤、リミネント剤、蠟膏剤などが挙げられる。他の好適な局所剤形としては、いくつかの場合、固体または液体の不活性担体と組み合わせた活性成分が、加圧された揮発性物質(例えば、フレオンなどの気体噴射剤)との混合物中、またはスクイズボトル中に充填される、スプレー可能なエアゾール調製物が挙げられる。必要に応じて、モイスチャライザーまたは保湿剤を医薬組成物および剤形に添加することもできる。そのような追加の成分の例は、当業界で周知である。

【0301】

イムノコンジュゲートを含む組成物を鼻内投与する場合、それをエアゾール形態、スブ

10

20

30

40

50

レー、ミストまたは液滴の形態で製剤化することができる。特に、本発明による使用のための予防剤または治療剤を、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の好適な気体）の使用と共に、加圧パックまたは噴霧器からのエアゾールスプレー提示物の形態で都合良く送達することができる。加圧エアゾールの場合、一定量を送達するためのバルブを提供することにより、用量単位を決定することができる。化合物と、ラクトースまたはデンプンなどの好適な粉末基剤との粉末混合物を含有する、吸入器または散布器における使用のためのカプセルおよびカートリッジ（例えば、ゼラチンから構成される）を製剤化することができる。

【0302】

10

第2の治療剤、例えば、サイトカイン、ステロイド、化学療法剤、抗生物質、または放射線療法との同時投与または処置のための方法は、当業界で公知である（例えば、Hardman et al., (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.を参照されたい）。治療剤の有効量は、症状を少なくとも10%；少なくとも20%；少なくとも約30%；少なくとも40%、または少なくとも50%減少させることができる。

【0303】

20

本発明のイムノコンジュゲートと共に投与することができるさらなる療法（例えば、予防剤または治療剤）を、本発明のイムノコンジュゲートから5分未満空けて、30分未満空けて、1時間空けて、約1時間空けて、約1～約2時間空けて、約2時間～約3時間空けて、約3時間～約4時間空けて、約4時間～約5時間空けて、約5時間～約6時間空けて、約6時間～約7時間空けて、約7時間～約8時間空けて、約8時間～約9時間空けて、約9時間～約10時間空けて、約10時間～約11時間空けて、約11時間～約12時間空けて、約12時間～約18時間空けて、18時間～24時間空けて、24時間～36時間空けて、36時間～48時間空けて、48時間～52時間空けて、52時間～60時間空けて、60時間～72時間空けて、72時間～84時間空けて、84時間～96時間空けて、または96時間～120時間空けて投与することができる。2つ以上の療法を、1回の同じ患者訪問のうちに投与してもよい。

30

【0304】

ある特定の実施形態では、本発明のイムノコンジュゲートを、*in vivo*での適切な分布を確保するように製剤化することができる。例えば、血液脳関門(BBB)は多くの高親水性化合物を排除する。本発明の治療化合物がBBBを通過することを確保するために（必要に応じて）、それらを、例えば、リポソーム中で製剤化することができる。リポソームを製造する方法については、例えば、米国特許第4,522,811号明細書；第5,374,548号明細書；および第5,399,331号明細書を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または臓器中に選択的に輸送される1または複数の部分を含み、かくして、標的化薬物送達を増強してもよい（例えば、Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照されたい）。標的化部分の例としては、葉酸またはビオチン（例えば、Low et al.の米国特許第5,416,016号明細書を参照されたい）；マンノシド（Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）；抗体（Bloeman et al., (1995) FEBS Lett. 357:140; Owais et al., (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）；界面活性プロテインA受容体（Briscoe et al., (1995) Am. J. Physiol. 1233:134）；p120（Schreier et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:9090）が挙げられ、K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273も参照されたい。

40

【0305】

本発明は、単独で、または他の療法と組み合わせた本発明のイムノコンジュゲートを含

50

む医薬組成物を、それを必要とする対象に投与するためのプロトコールを提供する。本発明の併用療法の治療法（例えば、予防剤または治療剤）は、対象へ同時にまたは順次投与され得る。本発明の組合せ療法の療法（例えば、予防剤または治療剤）を、周期的に投与することもできる。周期的療法は、療法（例えば、薬剤）の１つに対する耐性の発生を軽減するため、療法（例えば、薬剤）の１つの副作用を回避もしくは軽減する、および／または療法の効能を改善するための、一定期間、第１の療法（例えば、第１の予防剤または治療剤）の投与、次いで、一定期間、第２の療法（例えば、第２の予防剤または治療剤）の投与、およびこの連続的投与の反復、すなわち、周期を含む。

【０３０６】

本発明の組合せ療法の療法（例えば、予防剤または治療剤）を、対象に同時に投与することができる。

10

【０３０７】

用語「同時に」は、正確に同時の療法（例えば、予防剤または治療剤）の投与に限定されないが、むしろ、本発明の抗体またはその断片を含む医薬組成物が対象に連続して、および本発明の抗体薬物コンジュゲートが他の療法（複数可）と一緒に作用して、それらを別途投与した場合よりも増大した利益を提供し得るような時間間隔で投与されることを意味する。例えば、それぞれの療法を同時に、または異なる時点で任意の順序で連続的に投与することができる；しかしながら、同時に投与しない場合、それらを十分に近い時間で投与して、所望の治療または予防効果を提供すべきである。それぞれの療法を、任意の適切な形態で、および任意の好適な経路により、別々に対象に投与することができる。様々な実施形態において、療法（例えば、予防剤または治療剤）を、５分未満空けて、１５分未満空けて、３０分未満空けて、１時間未満空けて、約１時間空けて、約１～約２時間空けて、約２時間～約３時間空けて、約３時間～約４時間空けて、約４時間～約５時間空けて、約５時間～約６時間空けて、約６時間～約７時間空けて、約７時間～約８時間空けて、約８時間～約９時間空けて、約９時間～約１０時間空けて、約１０時間～約１１時間空けて、約１１時間～約１２時間空けて、２４時間空けて、４８時間空けて、７２時間空けて、または１週間空けて対象に投与する。他の実施形態において、２以上の療法（例えば、予防剤または治療剤）を、同じ患者訪問のうちに投与する。

20

【０３０８】

併用療法の予防剤または治療剤は、同じ医薬組成物中で対象に投与することができる。あるいは、併用療法の予防剤または治療剤は、別々の医薬組成物中で対象に同時に投与することができる。予防剤または治療剤は、同じか、または異なる投与経路により対象に投与されてもよい。組合せ療法の予防剤または治療剤を、同じ医薬組成物中で対象に投与することができる。あるいは、組合せ療法の予防剤または治療剤を、別々の医薬組成物中、対象に同時に投与することができる。予防剤または治療剤を、同じか、または異なる投与経路により対象に投与してもよい。

30

【実施例１】

【０３０９】

抗体の生成

ヒト、カニクイザル、マウスおよびラット P - カドヘリンタンパク質に関する発現構築物の生成

40

ヒト、マウスおよびラット P - カドヘリン細胞外ドメイン（ECD）は、GenBank または UniProt データベース由来のアミノ酸配列に基づいて遺伝子合成した（以下の表 2 を参照）。カニクイザル P - カドヘリン ECD cDNA 鋳型は、各種カニクイザル組織から単離した mRNA を使用して生成したアミノ酸配列情報に基づいて遺伝子合成した。合成された DNA 断片は全て、精製を可能にするために、C - 末端ヘキサ - ヒスチジンタグ（配列番号 130）を有する適切な発現ベクターへクローニングした。

【０３１０】

【表 2 - 1】

表 2:P-カドヘリンに関するアミノ酸配列情報

名称	詳細	受託番号または配列	配列番号
ヒト P-カドヘリン(CDH3) D1-5	ヒト CDH3, 残基 108-652-TAG	NM_001793.4, NP_001784	121
ラット P-カドヘリン(CDH3) D1-5	ラット CDH3, 残基 100-647-TAG	NM_053938.1, NP_446390	122
マウス P-カドヘリン(CDH3) D1-5	マウス CDH3 アイソフォーム a, 残基 100-647-TAG	NM_001037809.5, NP_001032898	123
カニクイザル P-カドヘリン変異体 1 (CDH3) D1-5	カニクイザル CDH3 変異体 1, 残基 108-654-TAG	MKFLVNVALVFMVVYISYIYADHQ TSLYKKAGFEGDRDWDVAPISVP ENGKGPFQRLNQLKSNKDRDTKI FYSITGPGADSPPEGVFVEKETG WLLLNKPLDREEIAKYELFGHAVS ENGASVEDPMNISIIIVTDQNDHKP KFTQDTFRGSVLEGVLPGTSVMQV TATDEDDAIHTYNGVVAYSISHSQE PKDPHDLMTIHRSTGTISVISSG LDREKVPEYTLTIQATDMDGDGST TTAVAVVEILDANDNAPVFDPOKY ESHVPENAVGHEVQRLTVTDLDAP NSPAWRATYLVGGDDGDHFTIAT HPESNQGILTTRKGLDFEAKNQHT LYVEVTNEAPFVLKLPTSTATIVV HVEDVNEAPVFVPPSKVVEVQEGI PTGEAVCVYAKDPDKENQKISYR ILRDPAGWLAMPDPSGQVTVAGTL DREDERFVRNNIYEVMLAVDNGS PPTTGTGTLTLLTIDVNDHGPVPE PREITICNQSPESQVLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWMAEVNE KDDTVVLSLKKFLKQDTYDVHLSL SDHGNKEQLTVIRATVCDCHGHVE KCPDPWKGGGAHHHHHHGA	124

10

20

30

【 0 3 1 1 】

【表 2 - 2】

カニクイザル P-カドヘリン変異体 2 (CDH3) D1-5	カニクイザル CDH3 変異体 2, 残基 108-654-TAG	MKFLVNVALVFMVVYISYIYADHQ TSLYKKAGFEGDRTDWVAPISVP ENGKGFPFQRLNQLKSNKDRDTKI FYSITGPGADSPPEGVFAVEKETG WLLLNKPLDREEIAKYELFGHAVS ENGASVEDPMNISIIIVTDQNDHKP KFTQDTRFGSVLEGVLPGTSMQV TATDEDDAIHTYNGVVAYSISQ PKDPHDLMTIHRSTGTISVISSG LDREKVP EYTLTIQATDMDGDGST TTAVAVVEILDANDNAPVFDPPQKY ESHVPENAVGHEVQRLTVTDLDAP NSPAWRATYLVGGDDGDHFTIAT HPESNQGILTTRKGLDFEAKNQHT LYVEVTNEAPFVLKLPTSTATIVV HVEDVNEAPVFVPPSKVVEVQEGI PTGEAVCVYTAKDPDKENQKISYR ILRDPAGWLAMDPSGQVTVAGTL DREDERFVRNNIYEVMLAVDNGS PPTTGTGTTTTLIDVNDHGPVPE PREITICNQSPESQVLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWMAEVNE KDDTVVLSLKKFLKQGTVDVHLSL SDHGNKEQLTVIRATVCDCHGHVE KCPDPWKGGGAHHHHHHHGA	125
			10
			20

【0312】

P - カドヘリンバキュロウイルス生成

組換え P - カドヘリン E C D タンパク質を発現するバキュロウイルスは、製造業者のプロトコールに従って、同時トランスフェクション / ブラーク精製方法 (O' Reilly et. al., 1992) または B a c - T o - B a c 発現系法 (I n v i t r o g e n) のいずれかにより生成された。トランスフェクトした昆虫細胞から生成されたウイルスを、標準的な低 M O I 感染法を使用して増幅させた。

30

【0313】

組換え P - カドヘリンタンパク質の発現

無血清培地中で成長中の T h 5 細胞の懸濁培養物 (所有権、インハウスメイドレシビ) を、 1.5×10^6 個の細胞 / m l の密度で播種して、 $10 \text{ pfu} / \text{ml}$ の M O I または容量 3 % のいずれかで、組換え P - カドヘリンバキュロウイルスで同調的に感染させた。P - カドヘリンバキュロウイルス培養調製物を、2 L のガラス製 E r l e n m y r フラスコまたは W a v e バイオリアクター (G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e s) のいずれか中で増殖させた。2 L のフラスコ中に発現させた P - カドヘリン調製物を無血清培地中で、27 で 120 rpm にて振とうした。W a v e バイオリアクター中で発現させた調製物を 28 で 7.5° の角度で 25 rpm にて振とうした。フラスコまたは W a v e バイオリアクターのいずれかから収集した上清を、 1800 rpm で 10 分間、4 で培養物を遠心分離することによって、感染の 2 日後に収集した。続いて、上清を $0.2 \mu \text{M}$ のフィルターユニットで濾過した。1 L を上回る発現に関しては、K v i c k S t a r t 限外濾過フラットシートカセットとともに A K T A クロスフロー系 (G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e s) を使用して、細胞培養物上清を 2 ~ 10 倍に濃縮した。濃縮材料を $0.2 \mu \text{M}$ のフィルターユニットで濾過した。

40

【0314】

ヒト、カニクイザル、マウスおよびラット p C A D E C D タンパク質の精製

50

pCAD細胞外ドメインタンパク質でタグ付けされた組換えヘキサ - ヒスチジン (配列番号130) (例えば、ヒトpCAD - 6xHis (配列番号130として開示される「6xHis」)、カニクイザル1 pCAD - 6xHis (配列番号130として開示される「6xHis」)、カニクイザル2 pCAD - 6xHis (配列番号130として開示される「6xHis」)、マウスpCAD - 6xHis (配列番号130として開示される「6xHis」)、ラットpCAD - 6xHis (配列番号130として開示される「6xHis」))を細胞培養物上清から精製した。清澄化された上清を、25mMピストリスプロパン、0.3M NaCl、1mM CaCl₂、pH6.2で平衡化させたニッケルセファロース樹脂 (GE Healthcare Life Sciences) カラム上で固定化金属親和性クロマトグラフィー (IMAC) に通過させた。上清を5~8mL/分の流速でIMACカラムに適用させた。25mMピストリスプロパン、0.3M NaCl、1mM CaCl₂、pH6.2によるベースライン洗浄後に、5倍カラム容量に関して洗浄緩衝液 (20mMトリス、0.3M NaCl、1mM CaCl₂、pH7.5) に切替えた。プールしたタンパク質は、必要であれば、Amicon Ultraの15mLの遠心濃縮器を使用して、10kDまたは30kDの公称分子量カットオフで濃縮した。次に、プールタンパク質は、20mMトリス、0.3M NaCl、1mM CaCl₂、pH7.5中で予め平衡化させたSuperdex 200 26/60カラム (GE Healthcare Life Sciences) を利用したゲル濾過により精製した。関係分画をプールして、SDS-PAGEで分析した。Bradfordタンパク質アッセイ (Thermal Fisher) によりタンパク質濃度を決定した。

10

20

【0315】

マウスの免疫化およびハイブリドーマの生成

精製されたヒトP - カドヘリンECDを、フロイント完全アジュバントで1:1に希釈した後、Bcl - 2トランスジェニックマウス (C57BL/6 - Tgn (bcl - 2) 22wehi株) を免疫した。Repetitive Immunization at Multiple Sites (RIMMS) (McIntyre GD. Hybridoma 1997) をコールする手順を使用して、マウスを免疫した。簡潔に述べると、マウスに、末梢リンパ節 (PLN) に近い8つの特定部位で、抗原1~3µgを注射した。この手順を、12日間にわたって8回反復した。12日目に、試験血液を収集し、血清抗体価をELISAにより分析した。プールしたPLNを、15日目に高力価マウスから除去した。リンパ球を収集するために、PLNをプレーンDMEMで2回洗浄した後、0.22ミクロンのスクリーン (Falcon #352350) を通す濾過により分離させた。得られたリンパ球を、さらに2回洗浄した後、Cytofusion培地 (BTXpress Cytofusion (登録商標) 電気穿孔培地cat#47001) 中で融合した。F0ミエローマ細胞を、リンパ球対F0細胞1の比でリンパ球と混合した。細胞混合物を遠心分離した後、Cytofusion培地7mL中に懸濁させて、続いて9mLの電気融合チャンバー (Harvard Apparatus Coaxial Chamber 9ML Part #470020) に添加した。Cyto Pulse Sciences, IncのCEEF - 50B Hybrimmune/Hybridoma系を使用して、製造業者の指示書に従って、電気融合を実施した。融合細胞をチャンバー中で5分回収させて、HATを伴わない融合培地 (DMEM + 20% FBS、Pen/Strep/Glu、1xNEAA、0.5xHFCs) 中で1/10に希釈して、1時間、37℃に置いた。4xHAT培地 (DMEM + 20% FBS、Pen/Strep/Glu、1xNEAA、4xHAT、0.5xHFCs) を添加して、1x溶液を作製して、密度を 1.67×10^4 個の細胞/mLに調整した。次いで、細胞を、60µL/ウェルで384ウェルプレート中に平板培養した。

30

40

【0316】

P - カドヘリンに対する抗体を分泌するハイブリドーマのスクリーニング

融合の10日後に、ハイブリドーマプレートを、P - カドヘリン特異的抗体の存在につ

50

いてスクリーニングした。E L I S Aスクリーンのため、M a x i s o r p 384ウェルプレート (N u n c # 4 6 4 7 1 8) を、ヒトP - カドヘリン (P B S 中で15 ng / ウェルに希釈) 50 μ L でコーティングし、4 で一晩インキュベートした。残存タンパク質を吸引し、ウェルをP B S 中の1% B S A で遮断した。室温で30分のインキュベーション後に、ウェルをP B S + 0.05% ツイーン (P B S T) で4回洗浄した。ハイブリドーマ上清15 μ L をE L I S A プレートに移した。P L N 除去の時点で取ったマウス血清15 μ L を、P B S 中で1:1000に希釈し、陽性対照として添加した。二次抗体 (ヤギ抗マウス I g G - H R P (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h # 115 - 035 - 071)、P B S 中で1:5000に希釈) 50 μ L を、E L I S A プレート上の全ウェルに添加した。室温で1時間のインキュベーション後、プレートにP B S T で8回洗浄した。T M B (K P L # 50 - 76 - 05) 25 μ L を添加して、室温で30分のインキュベーション後、プレートを605 nm の吸光度で読み取った。陽性ウェルからの細胞を、H T 培地 (D M E M + 20% F B S、P e n / S t r e p / G l u、1 \times N E A A、1 \times H T、0.5 \times H F C S) 中で24ウェルプレートで増殖させた。

【0317】

抗体の精製

抗体を含有する上清を、プロテインG (U p s t a t e # 16 - 266 (ビルリカ、M A)) を使用して精製した。上清を充填する前に、樹脂を10倍カラム容量のP B S で平衡化させた。試料の結合後、カラムを10倍カラム容量のP B S で洗浄し、抗体を5倍カラム容量の0.1 M グリシン、p H 2.0 で溶出させた。カラム分画を、1/10倍容量のトリスH C l、p H 9.0 ですぐに中和した。分画のO D 280を測定して、陽性分画をプールし、P B S、p H 7.2 に対して一晩透析した。

【0318】

抗P - カドヘリン抗体のヒト化および親和性成熟

ハイブリドーマ由来の抗P - カドヘリン抗体のV H およびV L 配列を、下記の通りにヒト化および親和性成熟させた。

【0319】

ヒト化配列の作成

ホモ・サピエンス (homo sapiens) のためのコドン最適化を含む、ヒト化V L およびV H ドメインをコードするD N A 配列を、G e n e A r t (L i f e T e c h n o l o g i e s I n c.、レーゲンスブルク、ドイツ) に注文した。V L およびV H ドメインをコードする配列を、哺乳動物細胞における分泌に適した発現ベクター中にG e n e A r t 由来ベクターからの切断および貼付によりサブクローニングした。重鎖および軽鎖を個々の発現ベクター中にクローニングして、同時トランスフェクションを可能にした。発現ベクターの要素としては、プロモーター (サイトメガロウイルス (C M V) エンハンサー - プロモーター)、分泌を容易にするためのシグナル配列、ポリアデニル化シグナルおよび転写ターミネーター (ウシ成長ホルモン (B G H) 遺伝子)、エピソーム複製および原核生物中での複製を可能にする要素 (例えば、S V 40 起源およびC o l E 1 または当該技術分野で公知の他のもの) ならびに選択を可能にするための要素 (アンプシリン耐性遺伝子およびゼオシンマーカー) が挙げられる。

【0320】

ヒト化抗体の発現および精製

S V 40 ラージT 抗原を構成的に発現するヒト胚腎細胞 (H E K 293 - T A T C C 11268) は、ヒト化および/または最適化されたI g G タンパク質の一過性発現のための好ましい宿主細胞系のうちの1つである。トランスフェクションを、トランスフェクション試薬としてP E I (ポリエチレンジアミン、MW 25,000 線状、P o l y s c i e n c e s、U S A、C a t 番号23966) を使用して実施する。細胞培養等級の水900 ml にP E I 1 g を室温 (R T) で注意深く溶解することによりP E I ストック溶液を調製する。P E I の溶解を容易にするために、溶液を、H C l の添加によりp H 3 ~ 5 へ酸性化した後、N a O H を用いて最終p H 7.05 となるように中和した。最終的に

、容量を1 Lに調整し、溶液を0.22 µmフィルターを通して濾過し、アリコートし、さらなる使用まで-80 で凍結した。一度解凍したら、アリコートを-20 で3回まで再凍結してもよいが、-20 では長期間保管すべきではない。

【0321】

HEK293T細胞を、細胞のトランスフェクションおよび増殖のための無血清培養培地、および生成/供給培地としてのExCell VPRO無血清培養培地(SAFC Biosciences、USA、Cat番号24561C)を使用して培養する。一過的トランスフェクションのために調製された細胞を懸濁培養で培養する。小規模(<5 L)トランスフェクションのためには、細胞を、5%CO₂で加湿されたインキュベーター中、オービタルシェーカー(100~120 rpm)上のCorning振とうフラスコ(Corning、チュークスベリ、MA)中で成長させる(種フラスコ)。種培養物中の細胞を、指数増殖期($5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 個/mLの細胞密度)に維持すべきであり、トランスフェクションのためには90%を超える生存率を示すべきである。この範囲の外側の細胞密度は、希釈後に遅滞期またはトランスフェクション効率の低下をもたらす。小規模(<5 L)のトランスフェクションのために、細胞のアリコートを種培養物から取り、Novartis無血清培養培地を使用して最終容量の36%中、 1.4×10^6 の細胞/mLに調整する。最終培養容量の7%中にDNAを1 mg/L(最終容量)に希釈した後穏やかに混合することにより、DNA溶液(溶液1:1 Lのトランスフェクションのために0.5 mgの重鎖および0.5 mgの軽鎖発現プラスミド)を調製する。細菌汚染を防止するために、この溶液を0.22 µmフィルター(例えば、Millipore Stericup)を使用して濾過する。次いで、3 mg/L(最終容量)のPEI溶液も、最終培養容量の7%中に希釈し、穏やかに混合した(溶液2)。両溶液を、室温(RT)で5~10分間インキュベートする。その後、溶液2を、穏やかに混合しながら溶液1に添加し、室温でさらに5~15分間インキュベートする。次いで、トランスフェクション混合物を細胞に添加し、細胞の培養を4~6時間継続する。最終的に、残りの50%の全生成容量を、ExCell(登録商標)VPRO無血清培養培地の添加により達成する。細胞培養を、トランスフェクション後8日間継続する。培養物を4 で20分間、4500 rpmでの遠心分離により収集する(Heraeus(登録商標)、Multifuge 3 S-R、Thermo Scientific、ロックフォード、IL)。回収された細胞上清を、stericupフィルター(0.22 µm)を通して滅菌濾過し、さらなるプロセッシングまで4 で保管する。

【0322】

新鮮に消毒された(0.25 M NaOH)HiTrap ProtA MabSelect(登録商標)SuRe、5 mlカラムを使用して、冷却キャビネット中、4 で「AKTA 100 explorer Air」クロマトグラフィーシステム上で精製を実施した。カラムは、5 CVのPBS(Gibco、Life Technologies、カールズバッド、CA)で平衡化した後、滅菌濾過された上清(2 L)を4.0 ml/分で充填した。カラムを8 CVのPBSで洗浄して、未結合の試料を溶出させて、5 CVのPBSで再度洗浄した。抗体を、5 CVの50 mMクエン酸、70 mM NaCl pH 3.2で溶出させた。溶出液を3 ml分画で収集して、分画をプールし、1 Mトリス HCl pH 10でpH 7に調整した。プールをプールし、滅菌濾過(Millipore Steriflip、0.22 µm)し、OD_{280 nm}を、Spectrophotometer ND-1000(NanoDrop)中で測定し、タンパク質濃度を配列データに基づいて算出した。溶出液を、凝集(SEC-MALS)および純度(SDS-PAGE、LALおよびMS)について試験した。2回目の精製ステップのために、必要に応じて、1回目の精製からのプールを、新鮮に消毒された(0.5 M NaOH)SPX(Hi Load 16/60 Superdex 200グレード120 mL(GE-Healthcare))中に充填した。カラムをPBSで平衡化させて、1 ml/分でPBS緩衝液を使用してランを行い、溶出液を1.2 ml分画中に収集し、1回目の精製ステップについて記載されたように分析した。

10

20

30

40

50

【0323】

Morphosys HuCAL PLATINUM (登録商標) ファージライブラリーパンニング由来の抗体

ヒトP-カドヘリンを認識する抗体の選択のために、多重パンニング戦略を利用した。ヒトP-カドヘリントタンパク質に対する治療用抗体は、抗体バリエーションタンパク質の供給源として、商業的に入手可能なファージディスプレイライブラリー、Morphosys HuCAL PLATINUM (登録商標) ライブラリーを使用して、P-カドヘリンに結合するクローンの選択により作成した。このファージミドリライブラリーは、HuCAL (登録商標) コンセプト (Knappik et al., 2000, J Mol Biol 296: 57-86) に基づくものであり、ファージ表面上にFabを展示するためにCys Display (商標) 技術を使用する (国際公開第01/05950号パンフレット)。

10

【0324】

抗P-カドヘリン抗体の単離に関して、固相、液相、および細胞ベースのパンニング戦略を用いた。

【0325】

組換えP-カドヘリン上での固相パンニング

抗原選択プロセスに先立って、コーティングチェックELISAを実施して、抗原に関して最適コーティング濃度を決定した。Hisタグを有する組換えP-カドヘリントタンパク質は、受動的吸着により、Maxisorp (商標) プレート (Nunc) 上にコーティングすることにより、固相パンニングアプローチで使用された。96ウェルMaxisorp (商標) プレート (Nunc) の適切な数 (サブライブラリープールの数に応じる) のウェルを、4 で一晩、125 nMの抗原でコーティングした。コーティングされたウェルを、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) / 5 % 粉乳 / 5 % BSA (ウシ血清アルブミン) / 0.1 % Tween 20 / 1 mM CaCl₂ で遮断した。各パンニングに関して、HuCAL PLATINUM (登録商標) ファージ-抗体約50 µLを、室温 (RT) で2時間溶液中で遮断した。ブロッキング手順後、予めブロックしたファージミックスを、抗原でコーティングしてブロックしたウェルそれぞれに添加して、マイクロタイタープレート (MTP) 振とう機上で室温で2時間 (h) インキュベートした。その後、非特異的な結合ファージを、いくつかの洗浄ステップによりPBSで洗い流した。特異的に結合されるファージの溶出に関して、25 mMのDTT (ジチオスレイトール) を室温で10分 (min) 間添加した。DTT溶出液を、E. コリ (E. coli) (大腸菌 (Escherichia coli)) TG-F⁺ 細胞の感染に使用した。感染後、細菌をLB (溶源性ブロス) / Cam (クロラムフェニコール) 寒天プレート上で平板培養して、30 で一晩インキュベートした。コロニーをプレートからこすり落として、ファージレスキュー、選択クローンのポリクローナル増幅およびファージ生産に使用した。精製ファージを用いて、次のパンニングラウンドを開始した。

20

30

【0326】

2回目および3回目のラウンドの固相パンニングを、よりストリンジェントな洗浄条件以外は1回目のラウンドのプロトコルに従って実施した。

【0327】

選択Fab断片のサブクローニングおよび微量発現 (Microexpression)

可溶性Fabの迅速な発現を促進するために、選択したHuCAL PLATINUM (登録商標) ファージのFabコード挿入物を、pMORPH (登録商標) 30 ディスプレイベクターから、pMORPH (登録商標) x11 発現ベクターpMORPH (登録商標) x11_FHへサブクローニングした。

40

【0328】

初期スクリーニングおよび特性評価のために、個々のFabを発現する大腸菌 (E. coli) クローンの一晩の培養物を、0.5 mg/mLのリゾチーム、0.8 mM EDTA および4 U/µlのベンゾナーゼを使用して溶解した。Fab含有大腸菌 (E. coli) 溶解物を、ELISAおよびFACSスクリーニングのために使用した。

50

【0329】

E L I S Aスクリーニング

E L I S Aスクリーニングを使用して、単一F a bクローンを、標的抗原への結合に関してパニングアウトプットから同定した。F a bは、F a b含有粗製E . コリ (E . coli) 溶解産物を使用して試験した。

【0330】

調製された大腸菌 (E . coli) 溶解物におけるF a b発現の検証のために、M a x i s o r p (商標) (N u n c) 384ウェルプレート、P B S中で1 : 1000に希釈したF d断片特異的ヒツジ抗ヒトI g Gでコーティングした。P B S中の5 %スキムミルク粉末でプレートを遮断した後、F a b含有大腸菌 (E . coli) 溶解物を添加した。F a bの結合を、A t t o p h o s 蛍光基質 (R o c h e、C a t # 11681982001) を使用してアルカリホスファターゼにコンジュゲートされたF (a b)₂ 特異的ヤギ抗ヒトI g G (1 : 5000希釈) により検出した。535 nmでの蛍光放出を、430 nmで励起して記録した。

10

【0331】

P - カドヘリン抗原結合性F a b断片の同定のために、M a x i s o r p (商標) (N u n c) 384ウェルプレート、P B S中で受動的吸着により25 nMのヒトP - カドヘリン抗原でコーティングした。P B S中の5 %スキムミルク粉末でプレートを遮断した後、F a b含有大腸菌 (E . coli) 溶解物を添加した。F a bの結合を、A t t o p h o s 蛍光基質 (R o c h e、カタログ# 11681982001) を使用して、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされたF (a b)₂ 特異的ヤギ抗ヒトI g G (1 : 5000に希釈) により検出した。535 nmでの蛍光放出を、430 nmでの励起とともに記録した。

20

【0332】

F A C Sスクリーニング (蛍光標識細胞分取)

F A C Sスクリーニングでは、細胞表面発現抗原に対する単一F a bクローン結合は、パニングアウトプットから同定される。F a bは、F a b含有粗製E . コリ (E . coli) 溶解産物を使用して、細胞結合に関して試験される。

【0333】

細胞懸濁液50 μlを、新鮮な96ウェルプレートへ移して (1 × 10⁵ 個の細胞 / ウェルをもたらす)、F a b含有細菌抽出物50 μlと混合した。

30

【0334】

次に、細胞 - 抗体懸濁液を氷上で1時間振とう機上でインキュベートした。インキュベーション後、細胞を遠沈させて、氷冷F A C S緩衝液で2回洗浄した。各洗浄ステップ後、細胞を遠心分離して、慎重に再懸濁させた。

【0335】

二次検出抗体 (P Eとコンジュゲートされたヤギ抗ヒトI g G、D i a n o v a) を添加して、試料を氷上でインキュベートして、次に、F a bインキュベーションに従って洗浄した。蛍光強度は、F A C S A r r a y (商標) 機器で決定した。

【0336】

H u C A L (登録商標) F a b断片の発現および精製

F a b断片の発現は、E . コリ (E . coli) T G 1 F - 細胞で実施した。培養物を30で18時間振とうさせた。細胞を収集して、崩壊させた。H i s₆でタグ付けしたF a b断片 (配列番号130として開示される「H i s₆」) をI M A Cおよびゲル濾過によって単離して、タンパク質濃度を、280 nmでのUV分光光度法により決定した。

40

【0337】

F a b調製物のアイデンティティおよび純度は、質量分析 (M S) により自然状態で決定された。

【0338】

交差反応分析

50

精製したFabは、ヒト、カニクイザル、ラットおよびマウスP-カドヘリンECDタンパク質への結合に関して、ELISAで試験した。この目的で、Maxisorp(商標)(Nunc)384ウェルプレート、10 µg/mLの濃度で、PBS中4晩、抗原でコーティングした。Fabの結合を、Attophos蛍光基質(Roche、カタログ#11681982001)を使用して、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされたFab₂特異的ヤギ抗ヒトIgG(1:5000に希釈)により検出した。535 nmでの蛍光放出を、430 nmで励起して記録した。

【0339】

IgGへの変換およびIgG発現

HEK細胞内の完全長IgGを発現するために、重鎖(VH)および軽鎖(VL)の可変ドメイン断片を、ヒトIgG1に関して、Fab発現ベクターから適切なpMorph(登録商標)―hIgベクターへサブクローニングした。細胞培養物上清を、トランスフェクションの10日後に収集した。滅菌濾過後、溶液を、液体ハンドリングステーションを使用してプロテインAアフィニティークロマトグラフィーに付した。緩衝液交換は、1×ダルベッコPBS(pH7.2、Invitrogen)へ実施され、試料は滅菌濾過された(孔サイズ0.2 µm)。タンパク質濃度をUV分光光度法により280 nmで決定して、IgGの純度は、SDS-PAGEで、変性還元性条件下で分析した。

【0340】

バイオアッセイ

上述するパニングプロセス後に得られる抗P-カドヘリン抗体を、以下で例示されるアッセイで評価した：

【0341】

HCC細胞1954細胞内部移行アッセイ

抗P-カドヘリン抗体の、標的媒介性細胞内部移行を受ける能力を決定するために、顕微鏡ベースの内部移行アッセイを、P-カドヘリン発現HCC1954腫瘍細胞系を使用して確立させた。

【0342】

細胞を完全成長培地(RPMI-1640+10%FCS)中に再懸濁して、平底顕微鏡96ウェルアッセイプレート(ViewPlate(登録商標)-96 FTC、Perkin Elmer、#6005225)へ、100 µl中で5×10³個の細胞/ウェルの細胞密度で播種して、37 °Cおよび5%CO₂で2日間インキュベートした。

【0343】

2日後、HuCAL(登録商標)抗体(IgG)をPBS中で所望の濃度へ希釈した。抗体溶液100 µlを播種細胞へ添加して、2時間インキュベートした。その後、細胞をPBSで2回洗浄して、1×CellFIX試薬(CellFIX(商標)、BD Biosciences、#340181)で固定して、再びPBSで2回洗浄して、0.1%トリトンX-100で透過性にした。続いて、細胞を1×Odyssey緩衝液(Li-cor、No.927-40000)で1時間ブロックした。吸引後、Hoechst(ビスベンズイミドH33342三酸化物、#B2261、Sigma)およびAlexa Fluor(登録商標)488ヤギ抗ヒトIgG(Invitrogen、#A-11013)で、細胞を1時間染色した。染色後、細胞をPBSで3回洗浄して、Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader(Thermo Fischer Scientific)を使用して分析した。半最大内部局在化濃度(IC₅₀値)を評価するために、4倍希釈ステップで、10 nM~2.4 pMの範囲を網羅するIgG滴定を実施した。

【0344】

翻訳後修飾(PTM)部位の除去

上述する内部移行アッセイで同定され、かつP-カドヘリン発現腫瘍細胞HCC1954へ効率的に内部局在化することがわかっている抗体の1つであるNOV169が、HCDR1において単一N31S PTM部位を含有することを見出した。脱アミノ化を防止

するために、この部位を、単一点K u n k e l突然変異誘発によりN 3 1 Q部位へ変換して、抗体NOV 1 6 9 N 3 1 Qをもたらした。親NOV 1 6 9と比較したNOV 1 6 9 N 3 1 Qによる組換えヒトP - カドヘリンへの等価性結合強度は、f o r t e B I O K D決定によって確認された。

【 0 3 4 5 】

抗体の概要

表1は、M o r p h o s y s H u C A L P L A T I N U M (登録商標)ファージライブラリーから単離される抗P - カドヘリン抗体およびマウスハイブリドーマに由来するヒト化抗P - カドヘリン抗体に関する関連性ある配列情報について記載する。

【実施例2】

【 0 3 4 6 】

ヒトP - カドヘリンE C 1 __ E C 2およびNOV 1 6 9 N 3 1 Q F a bとのその複合体のX線結晶学的構造

ヒトP - カドヘリンの三次元構造は、これまで未知であった。ヒトP - カドヘリンE C D (細胞外ドメイン)断片(最初の2つのN - 末端カドヘリン反復ドメイン、またはE C 1 __ E C 2、アミノ酸108 ~ 324、配列番号2、表1)ならびにNOV 1 6 9 N 3 1 QのF a b断片(表1)とのその複合体の結晶構造を決定した。以下に詳述するように、ヒトP - カドヘリンE C 1 __ E C 2を発現させて、リフォールディングして、精製して、結晶化させた。さらに、精製ヒトP - カドヘリンE C 1 __ E C 2を、NOV 1 6 9 N 3 1 Q F a bと混合して、複合体を形成させて、それと同様に、続いて精製および結晶化した。次に、タンパク質結晶学を用いて、遊離状態でのヒトP - カドヘリンE C 1 __ E C 2およびエピトープを規定するためにNOV 1 6 9 N 3 1 Q F a bに結合したヒトP - カドヘリンE C 1 __ E C 2に関する原子分解能データを作成した。

【 0 3 4 7 】

結晶学用のヒトP - カドヘリンE C 1 __ E C 2およびNOV 1 6 9 N 3 1 Q F a bのタンパク質生成

結晶学用に生成したヒトP - カドヘリンE C 1 __ E C 2およびNOV 1 6 9 N 3 1 Q F a bのアミノ酸配列を表3に示す。ヒトP - カドヘリンE C 1 __ E C 2の構築物は、組換え発現ベクター由来のN末端残基(小文字で示される、配列番号127)と一緒に、ヒトP - カドヘリン(UniProt識別子P 2 2 2 2 3、配列番号126)の残基108 ~ 324(下線を付した)を含んでいた。NOV 1 6 9 N 3 1 Q F a bに関しては、重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を、C末端識別/精製タグ(小文字で示される、それぞれ配列番号128および配列番号129)と一緒に示す。

【 0 3 4 8 】

10

20

30

【表 3】

表 3.結晶構造決定に使用したタンパク質

構築物	1 文字コードのアミノ酸配列	配列番号
ヒト P-カドヘリン (P22223)	MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREAEVTL EAGGAEQ EPGQALGKVFMGCPGQEPALFSTDNDFFTNRGETVQERRSLKER NPLKIFPSKRILRRHKRDWVAPI SVPENGKGPFQRLNQLKSNK DRDTKIFYSITGPGADSPPEGVF AVEKETGWLLLLNKPLDREEIAK YELFGHAVSENGASVEDPMNISIIIVTDQNDHKPKFTQDTFRGSVL EGVLPGTSVMQVTATDEDDAIYTYNGVVAYSIIHSQEPKDPHDLMF TIHRSTGTISVISSGLDREKVPEYTLTIQATMDGDGSTTTAVAV VEILDANDNAPMFPDQKYEAHV PENAVGHEVQRLTVTDLDAPNSP AWRATYILIMGGDDGDHFTITTHPESNQGILTTRKGLDFEAKNQHT LYVEVTNEAPFVLKLPSTATIVVHVEDVNEAPVFVPPSKVVEVQ EGIPTGEPVCVYTAEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMDPSGQV TAVGTL DREDEQFVRNNIYEVMLAMDNGSPPTTGTGTLTLLTID VNDHGPVPEPRQITICNQSPVRQVLNITDKDLSPHTSFQAQLTD DSDIYWTAEVNEEGD TVVLSLKKFLKQDTYDVHLSLSDHGNEQL TVIRATVCDCHGHVETCPGPWKGGFIPVLGAVLALLFLLLVL LVRKKRKIKEPLLLPEDDTRDNVFFYYGEEGGGEEDQDYDITQLHR GLEARPEVVL RNDVAPTIIPTMYRPRPANPDEIGNFIIENLKAA NTDPTAPPYDTLLVFDYEGSGSDAASLSSLTSSASDQDQDYDYL EWGSRFKKLADMYGGGEDD	126
ヒト P-カドヘリン EC1_EC2	gpDWVAPI SVPENGKGPFQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITGPGA DSPPEGVF AVEKETGWLLLLNKPLDREEIAKYELFGHAVSENGASV EDPMNISIIIVTDQNDHKPKFTQDTFRGSVLEGVLPGTSVMQVTAT DEDDAIYTYNGVVAYSIIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISVISSG LDREKVPEYTLTIQATMDGDGSTTTAVAVVEILDANDN	127
NOV169N31Q Fab 重鎖	QVQLQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSQSAAWNWI RQSPSR GLEWLGRIYYRSKYNDYALSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVT PEDTAVYYCARGEGYREGFAIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSEFdykdddkgaphhhhhh	128
NOV169N31Q Fab 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQTISNTLAWYQQKPGKAPK LLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YLSWFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEA	129

【 0 3 4 9 】

N - 末端ヘキサヒスチジンタグ (配列番号 130)、続いて Pre Sc i s s i o n 切断部位を有するヒト P - カドヘリン EC1 _ EC2 を、pET28ベクターを有する大腸菌 (E. coli) BL21 (DE3) Star (Invitrogen) において、クローニングして、発現させた。18 での IPTG を用いた一晩の誘導後に、細胞 (67 g) を収集して、50 mM トリス pH 8.0、500 mM NaCl、10% グリセロール、2 mM TCEP、および EDTA フリー c o m p l e t e プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) 14 タブレットの 700 ml 中でフレンチプレスを用いて溶解させた。遠心分離 (SS34 ローターを用いて、18,000 rpm で 35 分) 後に、上清を滅菌濾過して (0.45 μm)、緩衝液 A (50 mM トリス pH 8.0、500 mM NaCl、10% グリセロール) で予め平衡化した Crude FF 金属キレート化クロマトグラフィーカラム (5 ml、GE Healthcare) 上に充填した。カラムは、まず平衡化緩衝液で、次に 25 mL イミダゾールを含む緩衝液 A で洗浄して、続いて 25 mM ~ 500 mM イミダゾール勾配を用いて溶出させた。次に、溶出タンパク質 (36 mg) は、50 mM トリス pH 8.0 に対する一晩の透析中に、Pre Sc i s s i o n プロテア

10

20

30

40

50

ーゼ (1 mg/mg 当たり 10 μ g) を使用して切断した。濾過 (0.22 μ m) 後に、試料を、50 mM トリス pH 8.0 で予め平衡化した Mono Q 陰イオン交換クロマトグラフィーカラム (GE Healthcare) 上に充填して、0.0 M ~ 1.0 M NaCl 勾配を用いて溶出させた。P-カドヘリン EC1__EC2 (25.6 mg) を含有する主要ピークを収集して、SDS-PAGE および HPLC で分析した。続いて分画プールを、以前と同様に、50 mM トリス pH 8.0、500 mM NaCl、10% グリセロールで予め平衡化した Crude FF 金属キレート化クロマトグラフィーカラム (5 ml、GE Healthcare) 上に再充填した。P-カドヘリン EC1__EC2 タンパク質は、フロースルー中で回収されて、HPLC および LC-MS によって分析した。LC-MS 分析により、予測分子量 (23,837 Da) が示された。

10

【0350】

NOV169N31Q Fab を、大腸菌 (E. coli) において 1 リットル規模で発現させた。まず、Fab 断片をコードするプラスミドを、化学的にコンピテントな TG1F 大腸菌 (E. coli) 細胞へ形質転換した。37 °C での LB / 寒天 / 1% グルコース / 34 μ g/ml のクロラムフェニコールプレート上での細菌の一晩の成長後、1つのコロニーを使用して、6 ml のプレ培養物 (2 x YT / 1.0% グルコース / 34 μ g/ml のクロラムフェニコール) を接種した。220 rpm で振とうしながら、培養物を 30 °C で一晩インキュベートした。翌日、プレ培養物を、発現培養物 (2 x YT / 1.0% グルコース / 34 μ g/ml のクロラムフェニコール) 1 リットルに移した。OD_{600nm} 0.6 ~ 0.8 に達するまで、220 rpm で振とうしながら、発現培養物を 30 °C でインキュベートした。発現は、IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように添加することにより誘導させた。発現は、25 °C および 220 rpm で一晩行った。翌日、細胞をペレット化して、-80 °C で凍結させた。

20

【0351】

Fab 断片を、AEKTA 発現系 (ソフトウェア、Unicom__v5.11) で自動プロトコールを使用して 2 ステップで精製した。まず、細菌ペレットを、溶解緩衝液 (200 mM リン酸 Na pH 7.4、0.5 M NaCl、0.1% リゾチーム、2 mM MgCl₂、10 U/ml のベンゾナーゼ、complete EDTA フリープロテアーゼ阻害剤 1 タブレット / 50 ml) 40 ml 中に懸濁させて、振とう下、室温で 1 時間インキュベートした。細胞片は、16,000 g で 30 分間の遠心分離によって除去した。Fab を含有する上清を、0.2 μ M シリンジフィルター (Pall、#PN4525) に通して、ランニング緩衝液 (20 mM リン酸 Na、0.5 M NaCl、10 mM イミダゾール、pH 7.4) で予め平衡化した系上に充填した。第 1 の精製ステップは、1 ml の HiTrap HP カラム (GE Healthcare) にわたって実施した。カラムをランニング緩衝液で洗浄して、His₆ タグ付け Fab 断片 (配列番号 130 として開示される「His₆」) を、溶出緩衝液 (20 mM リン酸 Na、0.5 M NaCl、250 mM イミダゾール、pH 7.4) で溶出させた。ピーク分画は、ゲル濾過カラム (HiLoad 16/60 Superdex 75、GE Healthcare) 上に自動的に適用させた。精製 Fab 断片を PBS 中で溶出させた。Fab 断片の濃度は、UV_{280nm} 測定により、およびアミノ酸配列から推定される消衰係数を使用して、Lambert-Beer 方程式を適用することにより決定した。

30

40

【0352】

ヒト P-カドヘリン EC1__EC2 の結晶化および構造決定

ヒト P-カドヘリン EC1__EC2 を、10 mM トリス-HCl pH 7.4、25 mM NaCl に対して透析して、15 mg/ml へ濃縮して、20 °C で結晶化に関してスクリーニングした。

【0353】

結晶は、シットティングドロップ蒸気拡散により、96 ウェル SD2 プレート中で成長させた。詳細には、タンパク質 0.2 μ l を、リザーバ溶液 0.2 μ l と混合して、ドロップを、20 °C で同じリザーバ溶液 80 μ l に対して平衡化させた。X線回折分析に適した

50

結晶は、0.085 MのHEPES pH 7.5、3.655 M NaCl、15%グリセロールで作製されるリザーバ溶液を用いて得られた。

【0354】

データ収集のために、ヒトP-カドヘリンEC1__EC2結晶の1つを、低温ループに載せて、液体窒素中で直接瞬間冷却した。Pilatusピクセル検出器および0.99999の波長のX線を用いて、Swiss Light Source (Paul Scherrer Institute、スイス)のビームラインX10SA (PX-II)で、回折データを収集した。結晶から検出器への距離200 mmで、それぞれ0.25 degの振動の総計で720枚の画像を記録した。データを加工処理して、APRV-INDEXで実行されるように(Kroemer, Dreyer, Wendt (2004) Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr. 60:1679-1682)、XDSを使用して1.40の解像度で縮尺した(Kabsch (1993) J. Appl. Crystallogr. 26:795-800)。結晶は、セル寸法 $a = 120.89$ 、 $b = 76.52$ 、 $c = 46.21$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 107.79^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ を有する空間群C2で存在した。ヒトP-カドヘリンEC1__EC2構造は、プログラムPhaser (McCoy et al., (2007) J. Appl. Cryst. 40:658-674)およびPDBエントリ1L3W (アフリカツメガエル(X. Laevis)C-カドヘリン、3.08、55%配列同一性)を使用して分子置換により分析した。最終的なモデルは、COOTで構築し(Emsley et al., (2010) Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr. 66:486-501)、それぞれ結合長および結合角に関して0.010および1.13°のrmsdで、それぞれ19.8%および21.3%の R_{work} および R_{free} 値へ、Bruster (Global Phasing, LTD)を用いて改善させた。

【0355】

ヒトP-カドヘリンEC1__EC2構造

ヒトP-カドヘリンEC1__EC2 (アミノ酸残基108~322)の結晶構造を図1に示す。両方のカドヘリンドメインは、明確に規定された電子密度を有し、予想される全体的なフォールドを示した。3つのカルシウムイオンは、ドメイン界面で観察された。

【0356】

カドヘリンのECDドメインは、細胞間接着を制御する接着結合の細胞外構築物において役割を果たすと提唱されている。接合部アッセンブリーは、カドヘリンクラスターの外部ドメイン間のトランスおよびシス同型相互作用の両方を含む(Boggon et al., (2002) Science 296:1308-1313、Harrison et al., (2011) Structure 19:244-256)。トランス同型相互作用は、逆の配向性で2つのカドヘリン分子のEC1ドメイン間にN末端Trp交換(「鎖交換二量体」)を含む(2つの異なるセルで提示)。対照的に、シス同型相互作用は、同じ配向性で、ある分子のN末端細胞外カドヘリン(EC1)ドメインおよび別の分子の第2の(EC2)ドメインを含む。トランス相互作用は、シス相互作用よりもはるかに強力であると考えられる。トランス相互作用が、細胞間接着の分子基盤を形成する一方で、シス相互作用は、分子クラスター形成を介して細胞接着を促進すると考えられる。

【0357】

ヒトP-カドヘリンEC1__EC2断片の結晶構造により、Trp交換を介したトランス同型相互作用に関与するN末端セグメントは、結晶中ではかかる相互作用には加担せず、それ自体のドメインに結合されることが示された。さらに、結晶充填の分析により、対称性関連P-カドヘリンEC1__EC2分子の1つが、他のカドヘリンに関してすでに報告されているものに非常に類似したシス同型相互作用を行っていることが明らかとなり、結晶化は、この場合、シス同型相互作用により駆動されることを示した。

【0358】

NOV169N31Q Fab複合体の結晶化および構造決定

ヒトP-カドヘリンEC1__EC2とNOV169N31Q Fabとの複合体は、1.5:1.0のモル比(HPLCにより測定される濃度)で、精製ヒトP-カドヘリンE

C1__EC2およびNOV169N31Q Fabを混合することと、EDTAフリー cOmpleteプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) の2タブレットともに10 mM トリス-HCl pH7.5、150 mM NaClで平衡化したSuperdex 200 (GE Healthcare) サイズ排除クロマトグラフィー上で複合体を精製することにより調製した。ピーク分画をSDS-PAGEおよびLCMSで分析した。ヒトP-カドヘリンEC1__EC2/NOV169N31Q Fab複合体を含有する分画を、約12 mg/mlに濃縮して、最終濃度5 mMになるようにCaCl₂を添加して、試料を20 での結晶化に関してスクリーニングした。

【0359】

結晶は、シッティングドロップ蒸気拡散により、96ウェルSD2プレート中で成長させた。詳細には、タンパク質0.2 μlを、リザーバ溶液0.2 μlと混合して、ドロップを、20 で同じリザーバ溶液80 μlに対して平衡化させた。X線回折分析に適した結晶は、0.2 M 酢酸カルシウム、10% (w/v) PEG 8,000、0.1 M MES pH6.5で作製されるリザーバ溶液を用いて得られた。

【0360】

データ収集の前に、ヒトP-カドヘリンEC1__EC2/NOV169N31Q Fab結晶の1つを、20% PEG 8,000、30%グリセロールを有するリザーバ溶液の1:1ミックスに手短に移して、液体窒素中で直接瞬間冷却した。

【0361】

Pilatusピクセル検出器および0.99999 の波長のX線を用いて、Swiss Light Source (Paul Scherrer Institute、スイス)のビームラインX10SA (PX-II)で、回折データを収集した。結晶から検出器への距離340 mmで、それぞれ0.25 degの振動の総計で720枚の画像を記録した。データを加工処理して、APRV-INDEXで実行されるように (Kroemer, Dreyer, Wendt (2004) Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr. 60:1679-1682)、XDSを使用して2.10 の解像度で縮尺した (Kabsch (1993) J. Appl. Crystallogr. 26:795-800)。結晶は、セル寸法 $a = 172.69$ 、 $b = 77.79$ 、 $c = 133.41$ 、アルファ = 90°、ベータ = 90.0°、ガンマ = 90°を有する空間群 $P2_12_12$ で存在した。ヒトP-カドヘリンEC1__EC2/NOV169N31Q Fab複合体構造は、Phaser (McCoy et al., (2007) J. Appl. Cryst. 40:658-674) を使用した分子置換により分析した。最終的なモデルがCOOTで構築され (Emsley et al., (2010) Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr. 66:486-501)、それぞれ結合長および結合角に関して0.010 および1.18°のrmsdで、それぞれ19.2%および22.1%のR_{work}およびR_{free}値へ、Bruster (Global Phasing、LTD)を用いて改良した。NOV169N31Q Fabにおける任意の原子の4.0 内に原子を含有するヒトP-カドヘリンEC1__EC2の残基は、CCP4プログラム一式 (Collaborative Computing Project, Number 4 (1994) Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr. 50:760-763) のプログラムNcontにより同定され、表4および表5に列挙した。NOV169N31Q抗体の結合時に溶媒に接近しにくくなるヒトP-カドヘリンEC1__EC2の残基は、CCP4プログラム一式のプログラムAREAIMOLにより同定した。

【0362】

NOV169N31Qに関するP-カドヘリンEC1__EC2エピトープ

P-カドヘリンEC1__EC2/NOV169N31Q Fab複体の結晶構造を使用して、NOV169N31Qに関するP-カドヘリンEC1__EC2エピトープを同定した。X線分析により、NOV169N31Qが、ヒトP-カドヘリンのEC1ドメイン (N末端カドヘリン反復ドメイン) に結合することが示される (図2)。結晶の非対称性ユニットにおいてNOV169N31Q Fab-ヒトP-カドヘリンEC1__EC2複体の2つのコピーが存在する (非対称性ユニットは、結晶学的対称性オペレーターを適用することにより、結晶全体を再生するのに必要とされる構造情報全てを含有する)。コ

10

20

30

40

50

ピーはともに、結晶充填に起因した小さな変動を除いて、NOV169N31Q Fab と接触しているほぼ同一残基を共有する。

【0363】

NOV169N31Q Fab によるヒトP-カドヘリンEC1_EC2上の相互作用表面は、P-カドヘリンのEC1ドメイン内に完全に含まれ、残基123～残基127、および残基151～残基177を含む2つの不連続（すなわち、非隣接）配列により形成される（図3）。それらの中でも、残基124および残基124、ならびに残基151～残基172は、表4および表5に詳述するように、また図3に示すように、4.0よりも短い直接的な分子間接触（非水素原子間）に寄与している。これらの残基は、NOV169N31Q Fab により認識される三次元表面を形成する（図4）。

10

【0364】

【表4】

表4.ヒトP-カドヘリンEC1_EC2とNOV169N31Q Fab 重鎖(H)との間の相互作用。P-カドヘリン残基は、P22223に基づいて番号付けられる(配列番号126)。Fab 重鎖残基は、それらの直鎖状アミノ酸配列に基づいて番号付けられる(配列番号128)。示されるP-カドヘリン残基は、NOV169N31Q Fab における原子の4.0Å内に少なくとも1つの原子を有する。

ヒト P-カドヘリン残基(配列番号 126)		NOV169N31Q Fab 残基(配列番号 128)		
アミノ酸	番号	アミノ酸	番号	鎖
Phe	124	Leu	65	H
Asp	151	Tyr	105	H
Pro	153	Tyr	54	H
		Arg	56	H
		Tyr	60	H
		Tyr	105	H
Pro	154	Tyr	54	H
Glu	155	Arg	52	H
		Tyr	54	H
		Tyr	105	H
		Arg	107	H
Gly	156	Arg	107	H
Pro	172	Leu	65	H

20

30

【0365】

【表 5】

表 5. ヒト P-カドヘリン EC1_EC2 と NOV169N31Q Fab 軽鎖(L) との間の相互作用。P-カドヘリン残基は、P22223 に基づいて番号付けられる(配列番号 126)。Fab 軽鎖残基は、それらの直鎖状アミノ酸配列に基づいて番号付けられる(配列番号 129)。示される P-カドヘリン残基は、NOV169N31Q Fab における原子の 4.0 Å 内に少なくとも 1 つの原子を有する。

ヒト P-カドヘリン残基(配列番号 126)		NOV169N31Q Fab 残基(配列番号 129)		
残基	番号	残基	番号	鎖
Phe	124	Asp	1	L
Pro	125	Ile	2	L
		Gln	27	L
		Ser	93	L
Glu	155	Trp	94	L
Gly	156	Trp	94	L
Ala	159	Leu	92	L
Val	160	Leu	92	L
Glu	161	Gln	27	L
		Thr	28	L
Lys	162	Ser	30	L
Glu	163	Gly	68	L
Leu	168	Leu	92	L
Asn	170	Ser	93	L
		Trp	94	L
Lys	171	Trp	94	L

【0366】

ヒト P-カドヘリンの他の細胞外カドヘリン反復ドメインとは対照的に、EC1 ドメインは、任意の公知の N 連結または O 連結されるグリコシル化部位を保有しない。したがって、P-カドヘリンへの NOV169N31Q 結合は、グリコシル化と無関係である。同様に、ヒト P-カドヘリン EC1 ドメインのアミノ酸配列が、カニクイザル (*Macaca fascicularis*) P-カドヘリンにおいて完全に保存されることも注目に値する(図 5)。したがって、NOV169N31Q により認識される P-カドヘリンエピトープは、毒物学的研究で使用するこのサル種で完全に保存される。

【0367】

ヒト P-カドヘリン EC1_EC2 の Glu155 は、NOV169N31Q Fab と最も接触しているエピトープ残基である(図 3 を参照)。興味深いことに、Glu155 は、全てのヒトカドヘリンの多重配列アラインメントにより示されるように、ヒトカドヘリン 1~4 のみで見出される非保存挿入内に位置する(図 6)。Glu155 自体が、ヒトカドヘリン 1、2 および 4 で保存されないため、NOV169N31Q は、ヒトカドヘリン-3 (別名、ヒト P-カドヘリン) に対して高い選択性を示すと予想される。

【0368】

上述するように、カドヘリンは、細胞間接着の分子メカニズムにおいて重要な役割を果たし、それは、カドヘリンクラスターの外部ドメイン間の強力なトランス同型相互作用および弱いシス同型相互作用の両方を含む (Boggon et al., (2002) *Science* 296:1308-1313, Harrison et al., (2011) *Structure* 19:244-256)。ヒト P-カドヘリン EC1_EC2 / NOV169N31Q Fab 複合体の結晶構造に基づいて、NOV169N31Q に関する結合エピトープは、シス同型相互作用に関与する EC1 ドメインの表面領域と

部分的に重複するが、トランス（細胞間）同型相互作用に關与するN末端領域とは重複しないようである。その結果として、NOV169N31Qは、カドヘリン結合について強力なトランス相互作用とは競合せず、したがって、その結合性エピトープにより容易に接近する可能性が高い。さらに、この抗体の、その標的抗原への結合は、トランス同型相互作用が保存されるため、細胞間接着を完全に崩壊させるとは予想されない。

【実施例3】

【0369】

P - カドヘリン抗体薬物コンジュゲートの生成および特性評価

1ステップ法によるDM1コンジュゲートの調製

P - カドヘリンに対する抗体を、コンジュゲーション反応を開始する前に接線流濾過（TFF # 1）により反応緩衝液（15 mMリン酸カリウム、2 mM EDTA、pH 7.6）中で透析濾過した。続いて、抗体（5.0 mg/mL）をDM1（抗体量に対して5.6倍モル過剰）、次いで、SMCC（抗体量に対して4.7倍過剰）と混合した。反応を、2 mM EDTAおよび10% DMAを含有する15 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.6）中、20 で約16時間行った。1 M酢酸を添加してpHを5.50に調整することにより反応をクエンチした。pH調整後、反応混合物を多層（0.45 / 0.22 μm）PVDFフィルターを通して濾過し、精製し、接線流濾過（TFF # 2）を使用して8.22%スクロースを含有する20 mMヒスチジン緩衝液（pH 5.6）中で透析濾過した。接線流濾過のための装置パラメーターを、以下の表6に列挙する。

【0370】

【表6】

表6. 接線流濾過に関する装置パラメータ

TFF パラメータ	TFF#1 設定点	TFF#2 設定点
バルク濃度(Cb - g/L)	20	20
TMP (psi)	12-18	12-18
供給流速(LMH)	324	324
膜負荷(g/m2)	110 - 150	110 - 150
透析容量	10	14
透析濾過バッファー	15 mM リン酸カリウム, 2 mM EDTA, pH 7.6	20 mM ヒスチジン, 8.22% スクロース, pH 5.6
温度(°C)	RT (20 - 25)	RT (20 - 25)

【0371】

上記の方法から得られたコンジュゲートを、細胞毒性剤ローディング（メイタンシノイドと抗体の比、MAR）についてはUV分光法；コンジュゲート単量体の決定についてはSEC - HPLC；および遊離メイタンシノイドパーセンテージについては逆相HPLCまたは疎水性保護相（Hisep） - HPLCにより分析した。データは表7に示す。

【0372】

【表7】

表7.ワンステップ法を使用して調製されたP-カドヘリンADCの特性

試料	MAR	単量体 (%)	総遊離メイタンシノイド (%)
NOV169N31Q-MCC-DM1	3.7	99.1	0.6

【0373】

*i n s i t u*法によるDM1コンジュゲートの調製

本発明のコンジュゲートはまた、下記手順に従って、*i n s i t u*法により調製することができる。P-カドヘリン抗体は、スルホサクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸(スルホ-SMCC)リンカーを使用してDM1にコンジュゲートされた。DM1およびスルホ-SMCCヘテロ二官能性リンカーのストック溶液を、DMA中で調製した。スルホ-SMCCとDM1チオールとを一緒に混合して、40%v/vの水性50mMコハク酸緩衝液、2mMEDTA、pH5.0を含有するDMA中で、DM1とリンカーとの比1.3:1モル当量およびDM1の最終濃度1.95mMで、25で10分間反応させた。次いで、抗体を反応のアリコートと反応させて、50mMEPPS、pH8.0および10%DMA(v/v)中、2.5mg/mLのAbの最終コンジュゲーション条件下で、約6.5:1のSMCCとAbとのモル当量比を得た。25で約18時間後、コンジュゲーション反応混合物を、10mMコハク酸塩、250mMグリシン、0.5%スクロース、0.01%Tween20、pH5.5で平衡化させたSEPHADEX(商標)G25カラムを使用して精製した。

【0374】

【表8】

表8.DM1コンジュゲート化抗体の特性

クローン名称	リンカー過剰	MAR	単量体(%)	収率(%)	遊離薬物(%)
NOV169N31Q	7.0	3.15	99.0	76	<2
NEG0012	6.8	4.07	97.8	56	<2
NEG0013	5.5	3.29	94.6	70	<2
NEG0016	6.8	3.44	97.3	70	<2
NEG0064	5.3	3.91	98.0	76	<2
NEG0067	5.1	3.63	97.8	79	<2

【0375】

SPDBリンカーを使用するADCの調製

P-カドヘリン抗体(8mg/mL)を、50mMリン酸カリウム、50mLNaCl、2mMEDTA、および5%DMAを含有する60mMEPPS緩衝液(pH8.5)中、25で120分間、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート(SPDB、4.0~4.1倍モル過剰)を用いて修飾した。次いで、精製されていない修飾Abを、50mMリン酸カリウム、50mMNaCl、2mMEDTA、および5%DMAを含有する60mMEPPS緩衝液(pH8.5)中、4mg/mLの最終修飾抗体濃度で、25で18時間、DM4(未結合のリンカーに対して1.5倍モル過剰)にコンジュゲートした。コンジュゲーション反応混合物を、10mMコハク酸塩、250mMグリシン、0.5%スクロース、0.01%Tween20、pH5.5で平衡化および溶出させるSEPHADEX(商標)G25カラムを使用して精製した。

【0376】

【表 9】

表 9. DM4 コンジュゲート化抗体の特性

クローン名称	リンカー 一過剰	MAR	単量体 (%)	収率 (%)	遊離薬物 (%)
2P10	4.0	3.18	95.6	93	<0.5%
1G12	4.1	3.60	96.8	95	<0.5%
3D21	4.0	3.42	97.0	96	<0.5%

10

【 0 3 7 7 】

C X 1 - 1 リンカーを使用する A D C の調製

抗体 N E G 0 0 6 7 (5 . 0 m g / m L) を、 D M 1 (抗体量に対して 7 . 4 倍モル過剰)、次いで、C X 1 - 1 (抗体量に対して 5 . 7 倍過剰) と混合した。反応を、2 m M E D T A および 5 % D M A を含有する 5 0 m M E P P S [4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンプロパンスルホン酸] 緩衝液 (p H 8 . 0) 中、2 5 で約 1 6 時間行った。次いで、反応混合物を、1 0 m M コハク酸塩、2 5 0 m M グリシン、0 . 5 % スクロース、0 . 0 1 % T w e e n 2 0、p H 5 . 5 中で平衡化および溶出させる S E P H A D E X (商標) G 2 5 カラムを使用して精製した。

20

【 0 3 7 8 】

【表 1 0】

表 10. CX1-1/DM1 とコンジュゲートされた NEG0067 の特性

クローン名称	リンカー 一過剰	MAR	単量体 (%)	収率 (%)	遊離薬物 (%)
NEG0067	5.7	3.47	99.4	79	0.7

30

【実施例 4】

【 0 3 7 9 】

P - カドヘリンに対する P - カドヘリン抗体および A D C の親和性

P - カドヘリンおよびその種オルソログに対する各種抗体および抗体薬物コンジュゲート (A b - M C C - D M 1 方式で) の親和性を、C M 5 センサーチップを使用する B i a c o r e (登録商標) T 1 0 0 装置 (G E H e a l t h c a r e、ピッツバーグ、P A) または B i a c o r e (登録商標) 2 0 0 0 装置 (G E H e a l t h c a r e、ピッツバーグ、P A) を使用して、S P R 技術を使用して決定した。

40

【 0 3 8 0 】

簡潔に述べると、2 % O d y s s e y (登録商標) ブロッキング緩衝液 (L i - C o r B i o s c i e n c e s、リンカーン、N E) を補充した H B S - P ⁺ (0 . 0 1 M H E P E S、p H 7 . 4、0 . 1 5 M N a C l、0 . 0 5 % 界面活性剤 P 2 0) を、B i a c o r e (登録商標) T 1 0 0 装置での実験全てに関するランニング緩衝液として使用した。2 % O d y s s e y (登録商標) ブロッキング緩衝液を補充した H B S - P (0

50

． 0 1 M H E P E S、p H 7 . 4、0 . 1 5 M N a C l、0 . 0 0 5 %界面活性剤 P 2 0) を、B i a c o r e (登 録 商 標) 2 0 0 0 装 置 で の 全 て の 実 験 に 関 し て ラ ン ニ ン グ 緩 衝 液 と し て 使 用 し た。固 定 化 レ ベ ル お よ び 分 析 物 相 互 作 用 は、応 答 単 位 (R U) に よ り 測 定 し た。パ イ ロ ッ ト 実 験 を 実 施 し て、プ ロ テ イ ン A (G E H e a l t h c a r e、ピ ッ ツ バ ー グ、P A) の 固 定 化 お よ び 試 験 抗 体 の 捕 捉 の 実 現 可 能 性 を 試 験 な ら び に 確 認 し た。

【 0 3 8 1 】

動 態 測 定 に 関 し て、抗 体 が、固 定 化 プ ロ テ イ ン A を 介 し て セ ン サ ー チ ッ プ 表 面 に 捕 捉 さ れ た 実 験 を 実 施 し て、P - カ ド ヘ リ ン タ ン パ ク 質 の、遊 離 溶 液 中 で 結 合 す る 能 力 を 決 定 し た。簡 潔 に 述 べ る と、2 3 0 0 ~ 3 3 0 0 R U に 達 す る よ う に、p H 4 . 5 で 2 8 μ g / m l の プ ロ テ イ ン A を、2 つ の フ ロ ー セ ル 状 に 流 速 1 0 μ l / 分 で ア ミ ン カ ッ プ リ ン グ に よ っ て C M 5 セ ン サ ー チ ッ プ 上 に 固 定 化 し た。次 に、0 . 0 1 ~ 0 . 2 5 μ g / m l の 試 験 抗 体 を、5 μ l / 分 で 3 分 間 注 入 し た。抗 体 の 捕 捉 レ ベ ル は 概 し て、4 0 0 R U 未 満 に 維 持 さ れ た。続 い て、6 . 2 5 ~ 1 0 0 n M の P - カ ド ヘ リ ン E C D を、2 倍 系 列 で 希 釈 し て、流 速 4 0 μ l / 分 で 2 ~ 4 分 間、参 照 お よ び 試 験 フ ロ ー セ ル の 両 方 に わ た っ て 注 入 し た。試 験 E C D の 表 1 1 を 以 下 に 列 挙 す る。結 合 の 解 離 を 5 分 間 行 っ た。各 注 入 サ イ ク ル 後 に、チ ッ プ 表 面 を、1 0 0 μ l / 分 で 4 5 秒 間、P B S / 6 M グ ア ニ ジ ン H C l、p H 7 . 4 で 再 生 さ せ た。実 験 は 全 て、2 5 で 実 施 し て、応 答 デ ー タ は、B i o c o r e T 1 0 0 方 程 式 ソ フ ト ウ ェ ア バ ー ジ ョ ン 2 . 0 . 3 (G E H e a l t h c a r e) を 使 用 し て、全 体 的 に 簡 素 な 1 : 1 相 互 作 用 モ デ ル で フ ィ ッ テ ィ ン グ さ せ て、B i o c o r e (登 録 商 標) T 1 0 0 装 置 で 速 度 (k_a)、オ フ 速 度 (k_d) お よ び 親 和 性 (K_D) の 推 定 値 を 得 た。B i o c o r e (登 録 商 標) 2 0 0 0 装 置 で 実 行 し た 実 験 は、S c r u b b e r 2 (登 録 商 標) ソ フ ト ウ ェ ア バ ー ジ ョ ン 2 . 0 b (B i o L o g i c S o f t w a r e) を 使 用 し て、全 体 的 に 簡 素 な 1 : 1 相 互 作 用 モ デ ル で フ ィ ッ テ ィ ン グ さ せ て、速 度 (k_a)、オ フ 速 度 (k_d) お よ び 親 和 性 (K_D) の 推 定 値 を 得 た。

【 0 3 8 2 】

【 表 1 1 】

表 11. 親和性アッセイで使用された P-カドヘリン ECD アイソタイプおよび供給源

ECD アイソタイプ	タグ	供給源
ヒト	C 末端 6x His (配列番号 130)	NVS
カニクイザル_1	C 末端 6x His (配列番号 130)	NVS
カニクイザル_2	C 末端 6x His (配列番号 130)	NVS
マウス	C 末端 6x His (配列番号 130)	NVS
ラット	C 末端 6x His (配列番号 130)	NVS

【 0 3 8 3 】

表 1 2 は、表 1 に 開 示 す る 各 種 P - カ ド ヘ リ ン 抗 体 の ド メ イ ン 結 合 お よ び 親 和 性 を 列 挙

する。表に示すように、抗体NOV169N31Q、NEG0012、NEG0013、NEG0016、NEG0064、およびNEG0067は全て、ナノモルレベルでヒトP-カドヘリンと反応し、カニクイザルP-カドヘリンECDに対して試験したものに関して類似の親和性を有する。抗体は全て、NOV169N31Qを除いて、ラットと交差反応した。

【0384】

【表12】

表 12. ヒト P-カドヘリンおよび種オルソログに対して得られた抗 P-カドヘリン抗体ならびに ADC の親和性推定値

抗体 ID		親和性推定値(K _D)			
		ヒト P-cad (nM)	カニクイ ザル_1 P-cad (nM)	カニクイ ザル_2 P-cad (nM)	ラット P-cad (nM)
NOV169N31Q	ネイキッド	33.3	36.8	44.5	結合なし
	ADC	27	27.5	47.1	ND
NEG0012	ネイキッド	44.8	30.2	23	44.5
	ADC	31.3	39	37.1	ND
NEG0013	ネイキッド	37.3	21.1	17.2	37
	ADC	36	ND	ND	ND
NEG0016	ネイキッド	60	26.9	33.6	60.1
	ADC	54	ND	ND	ND
NEG0064	ネイキッド	3.66	3.46	2.9	8.99
	ADC	4.4	6	6.4	13.3
NEG0067	ネイキッド	3.21	3.27	3.53	10.3
	ADC	6	ND	ND	ND

ND=測定せず

【実施例 5】

【0385】

生化学アッセイにおける NOV169N31Q - MCC - DM1 / NOV169N31Q 選択性

NOV169N31Q - MCC - DM1 のオフターゲット交差反応性の可能性を検査するために、NOV169N31Q を、相当する ECD : E - カドヘリン (CDH1) または N - カドヘリン (CDH2) において最高度のアミノ酸配列同一性を有する 2 つの密接に関連した古典的なカドヘリンファミリーの成員への結合に関して評価した。

【0386】

P - カドヘリン対 E - カドヘリンおよび N - カドヘリンに対する結合の特異性を評価するために、Maxisorp 384 ウェルプレート を、4 で一晩、組換えヒト E - カ

10

20

30

40

50

ドヘリンまたはN - カドヘリンECDとともに置いて、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 方式を使用して、Fab断片をアッセイした。洗浄後、プレートを、1 x PBST中の5 % スキムミルクで2時間、ブロックした。Fab含有大腸菌 (E. coli) 溶解物を添加して、室温 (RT) で1時間結合させた。結合Fab断片を検出するために、プレートを5 x TBSTで洗浄して、AP - 抗ヒトIgG F(ab')₂を1 / 2500希釈で添加した。室温で1時間後、プレートを5 x TBSTで洗浄して、製造業者の仕様書に従って、Attophos基質を添加した。基質を添加した5分後に、プレートをELISA読み取り機で読み取った。

【0387】

ELISA方法論を利用して、ヒトE - カドヘリンまたはN - カドヘリンへの有意な結合は、抗P - カドヘリン抗体候補NOV169N31Qに関して検出されなかった。

【実施例6】

【0388】

生化学アッセイにおけるNOV169N31Q - MCC - DM1 / NOV169N31Q選択性

NOV169N31Q - MCC - DM1のオフターゲット交差反応性の可能性を検査するために、NOV169N31Qを、相当するECD: E - カドヘリン (CDH1) またはN - カドヘリン (CDH2) において最高度のアミノ酸配列同一性を有する2つの密接に関連した古典的なカドヘリンファミリーの成員への結合に関して評価した。

【0389】

P - カドヘリン対E - カドヘリンおよびN - カドヘリンに対する結合の特異性を評価するために、Maxisorp 384ウェルプレートを、4で一晩、組換えヒトE - カドヘリンまたはN - カドヘリンECDとともに置いて、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 方式を使用して、Fab断片をアッセイした。洗浄後、プレートを、1 x PBST中の5 % スキムミルクで2時間、ブロックした。Fab含有大腸菌 (E. coli) 溶解物を添加して、室温 (RT) で1時間結合させた。結合Fab断片を検出するために、プレートを5 x TBSTで洗浄して、AP - 抗ヒトIgG F(ab')₂を1 / 2500希釈で添加した。室温で1時間後、プレートを5 x TBSTで洗浄して、製造業者の仕様書に従って、Attophos基質を添加した。基質を添加した5分後に、プレートをELISA読み取り機で読み取った。

【0390】

ELISA方法論を利用して、ヒトE - カドヘリンまたはN - カドヘリンへの有意な結合は、抗P - カドヘリン抗体候補NOV169N31Qに関して検出されなかった。

【実施例7】

【0391】

P - カドヘリン機能に対するNOV169N31Qの影響の評価

抗P - カドヘリン抗体NOV169N31Q (抗体薬物コンジュゲートNOV169N31Q - MCC - DM1の構成成分) の、細胞アッセイにおいてP - カドヘリンに対して機能的効果を発揮する能力を評価するために、研究を実施した。P - カドヘリンは、がん細胞の細胞表面上に発現される同型細胞接着分子であり、したがって、P - カドヘリン陽性HCT116細胞およびP - カドヘリン陰性HT - 29細胞を使用したスフェロイド完全性アッセイを用いて、抗体の潜在的なアンタゴニスト特性を評価した。このアッセイの読出しは、明視野顕微鏡法および細胞DNAの7 - AAD蛍光検出により決定される場合の、スフェロイドの形状および堅固さである。

【0392】

HCT116細胞 (P - カドヘリン陽性) またはHT29細胞 (P - カドヘリン陰性) を、96ウェル丸底超低結合プレート (Corning Cat. #7007) において1ウェル当たり6,000個の細胞の密度で、ヒトIgG1アイソタイプ対照Ab (10 μg / mL) もしくはNOV169N31Q (10 μg / mL) を伴って、または伴わずに播種した。細胞を、37、5 % CO₂でオービタルシェーカー (60 rpm) に置い

10

20

30

40

50

た。細胞を平板培養して、細胞DNAを標識した116時間後に、7 - アミノアクチノマイシンD (7 - AAD、BD Pharmingen、Cat. # 559925) を添加した。細胞を平板培養した132間後に、Texas Redフィルターを使用したGEIN Cell Analyzer 2000で、7 - AAD画像処理を行った。各ウェルの7 ~ 9枚の「z」画像スタックを撮り、IN Cell Developer Toolbox 1.8プログラムを使用して、画像スタックを折り畳んだ (collapsed) 。

【0393】

図7では、NOV169N31Qは、明視野顕微鏡法および7 - AAD (DNAベースの) 画像処理により決定されるスフェロイド密度分析から明らかであるように、P - カドヘリン発現HCT116細胞ではP - カドヘリン媒介性細胞接着に対して、小さいが、識別可能な効果を示したが、P - カドヘリン陰性HT29細胞では示さなかった。対照的に、非特異的な対照ヒトIgG1抗体は、多細胞スフェロイドの完全性に対して影響しなかった。したがって、NOV169N31Qは、*in vitro*で、および/または*in vivo*で、P - カドヘリン機能の部分的アゴニストであり得る。

【実施例8】

【0394】

細胞増殖および生存のNOV169N31Q - MCC - DM1阻害

NOV169N31Q - MCC - DM1の、細胞増殖および生存を阻害する能力を、Cell Titer Glo (登録商標) 増殖アッセイを使用して評価した。

【0395】

細胞系は、組織培養インキュベーター中で、5% CO₂、37 °Cでその成長に最適である培地中で培養した。増殖アッセイのための播種に先立って、最適な成長密度を保証するためにアッセイの少なくとも2日前に、細胞を分割した。播種の日、0.25%トリプシンを使用して、細胞を組織培養フラスコから取り出した。細胞生存率および細胞密度は、細胞カウンター (Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer、Beckman Coulter) を使用して決定した。85%よりも高い生存率を有する細胞を、黒壁付き透明底96ウェルプレート (Corning cat # 3904) において、標準成長培地50 μL中でウェル1つ当たり2,500個の細胞の密度で播種した。ウェル容量に対する蒸発の影響を最低限に抑えるために、プレートの縁を取るウェルに、PBSを充填した。プレートを組織培養インキュベーター中で、37 °Cで一晩インキュベートした。翌日、遊離マイタンシン (L - DM1 - Me)、NOV169N31Q - MCC - DM1および非ターゲットイングADC対照 (IgG1 - SMCC - DM1) を標準成長培地中で2倍で調製した。次に、調製薬物処理を細胞に加えて、0 ~ 100 nMの範囲の最終濃度および1ウェル当たり100 μLの最終容量をもたらした。各薬物濃度を三重反復で試験した。プレートを組織培養インキュベーター中で、37 °Cで一晩または5日間インキュベートし、その後、細胞を溶解させて、かつ総アデノシン三リン酸 (ATP) 含有量を測定する試薬であるCell Titer Glo (登録商標) (Promega、cat # G7573) 100 μLの添加によって、細胞生存率を評価した。プレートを、オービタルシェーカーで、細胞溶解を誘導するのに3分間の適正な混合を提供する速度で、暗所で室温でインキュベートした。発光カウンター (Wallac 1450 MicroBeta TriLux、Perkin Elmer) を使用した読取りに先立って、プレートを室温で10分間インキュベートして、蛍光シグナルを安定化させた。未処理細胞の蛍光カウントを、播種後にその日に (0日目の読み取り)、および薬物曝露の5日後に (5日目の読み取り) 取った。アッセイ仕様として、未処理細胞の5日目の読み取りを、0日目の読み取りと比較した。インキュベーション期間中の少なくとも1回の細胞倍加を伴うアッセイは、妥当であるとみなした。薬物処理の効果を評価するために、未処理細胞を含有するウェル由来の発光カウント (生存率100%) を使用して、処理試料を正規化した。Graph Pad Prism 6ソフトウェアを使用して、IC₅₀値を算出した。各細胞系を少なくとも3回評価して、代表的なIC₅₀値を示す

10

20

30

40

50

。

【 0 3 9 6 】

NOV169N31Q-MCC-DM1は、標的平均3.8個の分子の各抗体に結合しているDM1を有する（薬物対抗体比、またはDAR3.8）。3つの代表的な細胞系の要領応答曲線を示す（図8）。細胞成長または生存の50%を阻害するのに必要とされる処理の濃度（IC₅₀）を算出して、試験した細胞系の代表的なIC₅₀値を、表13に概要した。

【 0 3 9 7 】

コンジュゲートしていない抗体NOV169N31Qは、細胞毒性であるとも、また増殖性であるとも実証されなかったのに対して、NOV169N31Q-MCC-DM1は、P-カドヘリン発現細胞系において増殖および生存を強力に阻害した。どちらの分子も、P-カドヘリン陰性細胞系HT29において活性ではなかった（図8）。対照的に、NOV169N31Q-MCC-DM1は、2つの乳がん細胞系HCC1954およびHCC70の成長を強力に阻害した。表13は、細胞系のパネルにおけるNOV169N31Q-MCC-DM1の活性を概要する。アイソタイプ適合非ターゲティング対照ADC（IgG1-MCC-DM1）と比較して、NOV169N31Q-MCC-DM1は多くの場合、細胞1つ当たり50,000個を上回る細胞表面コピーを発現する細胞系に対して細胞傷害活性を示した。これらの研究により、NOV169N31Q-MCC-DM1の細胞毒性効果が、ADCの内部移行したマイタンシン構成成分に起因すること、およびNOV169N31Q-MCC-DM1が、P-カドヘリンを過剰発現する細胞を特異的に標的とすることが示される。

【 0 3 9 8 】

【表13】

表 13: ヒトがん細胞株のパネルにおけるP-カドヘリン発現およびNOV169N31Q-MCC-

DM1 活性。細胞株のパネルにおける遊離マイタンシン(L-DM1-ME)およびアイソタイプ対照ADC(IgG1-MCC-DM1)と比較したNOV169N31Q-MCC-DM1のIC₅₀(nM)値。

NOV169N31Q-MCC-DM1に関する最大細胞死滅値が報告される。ここで報告する値は、多重反復の代表である個々のアッセイからの値である。

細胞株	起源	抗原密度 (×1000)	IC50 (nM)			最大細胞死滅 (%)
			NOV169N31Q -MCC-DM1	L-DM1-Me	IgG1- MCC-DM1	NOV169N31 Q-MCC-DM1
scaBER	膀胱	63	4.06	0.07	27.77	89
HCC1954	胸部	80	2.28	0.17	26.68	88
HCC38	胸部	95	5.29	0.09	35.10	81
HCC70	胸部	86	3.23	0.23	92.58	69
HCC1806	胸部	68	11.45	0.07	10.54	84
BICR6	頭頸 部	70	9.62	0.16	25.34	71
A431	皮膚	81	21.76	0.06	27.28	83
HT29	結腸	0.2	62.94	0.06	64.32	89

【実施例 9】

【0399】

NOV169N31QおよびNOV169N31Q-MCC-DM1誘導性ADCC活性の*in vitro*での評価

増殖に対するその影響に加えて、NOV169N31QおよびNOV169N31Q-MCC-DM1はまた、抗体依存性細胞毒性(ADCC)を媒介するその能力に関しても評価した。

【0400】

エフェクター細胞は、All Cells, LLCから入手されるそのままの(untouched)ヒトナチュラルキラー(NK)細胞(カタログ#PB012: Fresh/Untouched Normal PB CD56+ NK細胞)であった。標的細胞は、Novartis Cell Services(NCS)を介してAmerican Type Culture Collectionから入手した(P-カドヘリン陽性HCC1954、P-カドヘリン陰性HT-29)。トリプシンフリー細胞解離緩衝液(Gibcoからの「Cell Dissociation Buffer」、Cat.#13151-014)を使用して、HCC1954およびHT-29標的細胞を組織培養容器から取り出して、PBSで2~3回洗浄して、培養培地中に再懸濁させた。細胞を、手動でまたは自動細胞カウンターを使用して計数した。90%を上回る生存率の細胞を、培養培地中に 1×10^5 個の細胞/mLで懸濁させた。ヒトNK細胞を洗浄して、標的細胞系と同じ様式で計数した。次に、エフェクター細胞を、細胞培養培地中に $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の細胞/mLで懸濁させた。

【0401】

処理は、NOV169N31Q抗体、適合アイソタイプ対照抗体(IgG1対照)、ならびに抗体薬物コンジュゲートNOV169N31Q-MCC-DM1およびIgG1-SMCC-DM1を含んでいた。培地50 μ L中の標的細胞5000個を、96ウェルプレート平底プレート(Corning #3603)において播種した。次に、試験および対照抗体を、培地25 μ L中で4 \times 最終濃度(最終濃度範囲50~0.0001 μ g/mL、処理なしの対照に加えて)で、37 $^{\circ}$ Cで20分間添加した。続いて、エフェクター細胞を、培地25 μ L中でエフェクター対標的細胞比(E:T)5:1(例えば、5:1の比に関して、ウェル1つ当たり25000個のエフェクター細胞)で添加した。処理および対照(標的細胞のみ、エフェクター細胞のみ、細胞なし)を三重反復でランした。次に、プレートを遠心機で500 RPMで(制動なしで)回転させて、プレートの底部で細胞を濃縮した。続いて、プレートを、正常な細胞培養条件(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)下で24時間インキュベートした。

【0402】

インキュベーション期間後、培地をプレートから除去して、ウェルをPBSで2~3回洗浄して、非接着エフェクター細胞を除去した。Cell Titer Glo(Pro-mega Cat#G7570)100 μ Lを各ウェルに添加して、プレートを光から守り、オービタルシェーカー上に2分間置いた。次に、発光カウンター(Wallac TriLux MicroBeta 1450)で、プレートを読み取った。発光カウンターにより検出されるシグナルは、ウェル中に残存するATPの量または細胞の数に正比例する。ベースラインとして対照ウェルを使用して、各処理に関する生存細胞数を、未処理対照のパーセントとして決定することができる。

【0403】

NOV169N31Q-MCC-DM1およびNOV169N31Qはともに、用量依存性様式で*in vitro*で、ヒトナチュラルキラー(NK)細胞の存在下でP-カドヘリン過剰発現細胞に対してADCC活性を媒介する能力を実証した(図9)。抗体およびADCの両方のための適合アイソタイプ対照が、有意な細胞死滅を示さなかったため、この活性は、P-カドヘリン特異的であることがわかった。NOV169N31QもNO

NOV 169N31Q - MCC - DM1も、P - カドヘリン陰性細胞系 HT - 29 に対して ADC のいかなる誘導も示さず、同様に抗体および抗体薬物コンジュゲートの特定の効果を示している。したがって、腫瘍細胞への細胞毒性ペイロードの送達に加えて、ADC は、*in vivo* で腫瘍細胞を死滅させるための NOV 169N31Q - MCC - DM1 作用の別の潜在的なメカニズムを表す。

【実施例 10】

【0404】

抗 P - カドヘリン ADC による *in vivo* でのオンターゲット薬物動態マーカーモジュレート

P - カドヘリン ADC である NOV 169N31Q - MCC - DM1 の、*in vivo* で G2/M 停止の薬物動態マーカー [ホスホ - ヒストン H3 (pHH3) による細胞の蓄積] をモジュレートする能力を評価するために研究を行った。目標は、NOV 169N31Q - MCC - DM1、アイソタイプ対照 ADC またはビヒクル単独で処置したマウス由来の腫瘍において G2/M 細胞周期停止の度合いおよび持続期間を評価することであった。

10

【0405】

免疫組織化学により評価されるように、pHH3 陽性核の蓄積を測定するために、ヒトヒストン H3 (pHH3) のリン酸化 Ser 10 周囲の残基に相当する合成ホスホペプチドで動物を免疫化することにより生成されるウサギポリクローナル抗体は、Cell Signaling Technology (ダンバース、MA、Cat # 9701) から入手した。簡潔に述べると、IHC プロトコルは、熱、および Ventana Cell Conditioning # 1 抗原回復 (antigen retrieval) 試薬に対する標準的な曝露を含んでいた。一次抗体を 1 : 50 に希釈して、室温で 60 分間インキュベートした。続いて、Jackson ImmunoResearch Laboratories ヤギ抗ラビット抗体ビオチン化二次抗体 (Cat # 111 - 065 - 144、ウエストグロープ、PA) とのインキュベーションを 32 分間実施した。

20

【0406】

皮下腫瘍異種移植片モデルにおいて HCC 70トリプルネガティブ乳がんモデルにおける抗 P - カドヘリン ADC 誘導性 PD マーカー変化を評価するために、雌 SCID ベージュマウスに、ハンクス平衡塩溶液中に 50 % Matrigel (商標) (BD Biosciences) を含有する懸濁液中で、 1.0×10^6 個の細胞を皮下移植した。

30

【0407】

懸濁液中に細胞を含有する総注射容量は 200 μ l であった。腫瘍がいったん、平均しておよそ 130 mm³ (n = 3 匹 / 群) になったら、マウスを無作為に割り当てて、単回静脈内 (IV) 用量の NOV 169N31Q - MCC - DM1 (10 mg / kg)、非特異的な IgG1 - MCC - DM1 アイソタイプ対照 (10 mg / kg) または空のビヒクル対照 (20 mM ヒスチジン、8.22 % スクロース、0.02 % PS - 20、pH 5.6) のいずれかを付与した。投与の 21 日後までの時点で、腫瘍を収集した。PD 応答の尺度として、ホスホ - ヒストン H3 (pHH3) レベルの定性的評価を、以下に記載する免疫組織化学染色により行った。

40

【0408】

図 10 では、メイタンシノイドペイロードの予測メカニズムと一致して、幾つかのベースラインホスホ - ヒストン H3 免疫染色をビヒクル処置腫瘍で検出した一方で、これらのレベルは、NOV 169N31Q - MCC - DM1 処置後に、特に投与の 2 ~ 7 日後に上昇した。これらのデータにより、NOV 169N31Q - MCC - DM1 が、メイタンシノイドペイロードの作用機序と一致して、腫瘍異種移植片において頑強な細胞 PD 応答を誘発することが可能であることが実証される。

【実施例 11】

【0409】

マウスにおける HCC 70トリプルネガティブ乳がん (TNBC) モデルに対する抗 P

50

- カドヘリンADCの*in vivo*有効性 (ADC有効性スクリーニング)

乳がんでは、P - カドヘリンは、高頻度で高度に発現され、それは、各細胞の表面上におよそ66,000個の受容体を伴うHCC70細胞系で例示された。HCC70腫瘍上でのP - カドヘリン免疫染色の代表的な写真は、この異種移植片モデルにおける染色パターンを可視化するために示される (図11A)。IHCは、Ventana Discovery XT自動染色機を使用して実施した。ホルマリン固定したパラフィン包埋腫瘍の切片を脱パラフィンして、Ventana Cell Conditioning #1 (CCIS) 抗原回復試薬で処置して、次に、一次抗体 [BD Transduction Labからのマウスモノクローナル抗ヒトP - cad抗体 (Cat # 610228、ロット09934)] 中で、10 µg / mlの濃度で、室温で60分間インキュベートした。この後、1:250の作業濃度で使用するビオチン化ヤギ抗マウス (Jackson Laboratories、cat # 115 - 066 - 072、ロット# 63620) とインキュベーションを行った。検出は、DAB Mapキット (Ventana Medical、cat # 760 - 124) を使用して行った。非特異的なマウスIgG抗体 (Vector Laboratories Cat # I - 2000、ロット# V0610) を対照として使用して、P - カドヘリン抗体を用いた場合に観察される染色が特異的であることを保証した。

【0410】

腫瘍が、およそ215 mm³ に達したら、マウスを、腫瘍体積に従って処置群へ無作為化して (n = 8匹 / 群)、ビヒクルまたは7 mg / kgのADCの単回IV投与を施した。7 mg / kg用量レベルは、それが、このモデルにおけるADC候補間での差を識別する機会 (window) を提供するように選択された。用量は、個々のマウスの体重に調整された。IV用量容量は8 ml / kgであった。

【0411】

NEG0012 - MCC - DM1およびNOV169N31Q - MCC - DM1処置群における平均腫瘍体積は、42日目にアイソタイプ適合huIgG1 - MCC - DM1対照群と有意に異なっていた (一元配置ANOVA、Dunn法、p = 0.05)。ADC候補で処置した他の群は、対照と比較して、統計学的に異なる腫瘍体積を示さなかった (図11B)。これにより、リードADC候補として、NEG0012 - MCC - DM1およびNOV169N31Q - MCC - DM1が選出された。有意な体重損失は、いずれの群でも観察されなかった。

【実施例12】

【0412】

マウスにおけるHCC70トリプルネガティブ乳がん (TNBC) モデルに対するNOV169N31Q - MCC - DM1の用量依存性*in vivo*有効性

各細胞の表面上におよそ66,000個の受容体を伴うHCC70細胞系は、*in vitro*でNOV169N31Q - MCC - DM1に対して感受性があることが示された。HCC70モデルにおいてNOV169N31Q - MCC - DM1による標的抗腫瘍活性を実証するために、2.5、5、10および15 mg / kgまたは10 mg / kgのNOV169N31Q - MCC - DM1または非特異的なアイソタイプ対照IgG1 - MCC - DM1の単回IV処置を投与した。HCC70腫瘍は、各マウスの右脇腹への10 × 10⁶ 個の細胞の皮下注射により雌SCIDマウスにおいて樹立させた。腫瘍が、およそ143 mm³ に達したら、マウスを、腫瘍体積に従って処置群へ無作為化した (n = 9)。試験作用物質は全て、示した用量レベルおよびスケジュールで投与され、用量は、個々のマウスの体重に調整された。IV用量容量は5 ml / kgであった。

【0413】

NOV169N31Q - MCC - DM1処置は、T / C %値48% (2.5 mg / kg)、1% (5 mg / kg) で、用量に比例した抗腫瘍有効性をもたらした一方で、10および15 mg / kgの用量は、それぞれ平均退縮64%および61%をもたらした。最大有効性は、10 mg / kgで達成された。試験した5、10および15 mg / kg群

10

20

30

40

50

は、ビヒクル処置とは統計学的に異なっていた ($P < 0.05$ 、順位に基づくANOVA/Dunn法、59日目)。10および15 mg/kgの用量レベルは、研究を終結させた場合、処置の86日後まで持続するマウスにおける持続的腫瘍退縮を誘発した。

【0414】

試験作用物質は全て、研究で許容され、マウスP-カドヘリンを結合しないADCに関して予測されるように、毒性の明白な臨床症状は、処置群のいずれにおいても観察されなかった。全ての群において、マウスP-カドヘリンを結合しないADCに関して予測されるように、体重増加が、無作為化での平均体重と比較して観察され、ビヒクル処置マウスの体重増加に類似していた (図12および表14)。

【0415】

10

【表14】

表14:59日目のHCC70乳がん異種移植片モデルにおけるNOV169N31Q-MCC-DM1用量応答有効性。腫瘍体積および体重に対する処置の効果を、平均値±SEMとして提示する。実験は、処置の59日目に評価した。*ビヒクルに対して $p < 0.001$ (Kruskal-Wallisの順位に基づく一元配置ANOVA/Dunn法)。 $\Delta T / \Delta C \% = 100 \Delta T / \Delta C$ (式中、 ΔT =研究の21日目の薬物処置群の平均腫瘍体積-投与の初日の薬物処置群の平均腫瘍体積、 ΔC =研究の21日目の対照群の平均腫瘍体積-投与の初日の対照群の平均腫瘍体積)。退縮 $\% = (1 - T_{\text{最終}} / T_{\text{初日}}) \times 100$ 。

化合物	用量、スケジュール	腫瘍応答		宿主応答	
		$\Delta T / \Delta C$ (%)	退縮 (%)	Δ 体重 (%)	残存 (生存/総計)
ビヒクル	なし, 単回用量	100	-	11.1 ± 1.6	9/9
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, 単回用量	119	-	10.9 ± 1.7	9/9
NOV169N31Q-MCC-DM1	2.5 mg/kg, 単回用量	48	-	10.2 ± 2.5	9/9
NOV169N31Q-MCC-DM1	5 mg/kg, 単回用量	1*	-	12.0 ± 2.4	8/9
NOV169N31Q-MCC-DM1	10 mg/kg, 単回用量	-	-64*	9.9 ± 2.3	9/9
NOV169N31Q-MCC-DM1	15 mg/kg, 単回用量	-	-61*	8.8 ± 1.9	9/9

20

30

【実施例13】

【0416】

40

マウスにおけるHCC1954乳がんモデルに対するNOV169N31Q-MCC-DM1のin vivo有効性

さらなる乳がんモデルにおける有効性を実証するために、NOV169N31Q-MCC-DM1活性を、SCIDベージュマウスにおけるHCC1954基底様 (Her2+) 乳がん異種移植片モデルにおいて評価した。HCC1954モデルは、in vitroでのP-カドヘリン発現 (84,000個の受容体/細胞) およびNOV169N31Q-MCC-DM1に対する感受性に基づいて選択した。これまでに記載するように、免疫組織化学を実施して、HCC70腫瘍における腫瘍P-カドヘリンタンパク質レベルを確認した (図13A)。

【0417】

50

腫瘍が、およそ 150 mm^3 に達したら、マウスを、腫瘍体積に従って処置群へ無作為化して ($n = 9$ 匹/群)、ビヒクルまたは 10 mg/kg の IgG1-MCC-DM1 もしくは NOV169N31Q-MCC-DM1 のいずれかの単回 IV 投与を施した。用量は、個々のマウスの体重に調整された。IV 用量容量は 5 ml/kg であった。

【0418】

NOV169N31Q-MCC-DM1 処置は、HCC1954 腫瘍の 56% の退縮をもたらし、それは、55 日目まで持続的であった (ビヒクルまたは IgG1-MCC-DM1 に対して、 $p < 0.05$ 、Kruskal-Wallis の順位に基づく一元配置 ANOVA/Dunn 法)。IgG1-MCC-DM1 の有効性は、 $T/C\% 75\%$ であり、ビヒクルとは有意に異ならなかった ($p > 0.05$)。試験作用物質は全て、研究で許容され、毒性の明白な臨床症状は、処置群のいずれにおいても観察されなかった (図 13B および表 15A)。

【0419】

【表 15】

表 15A:31 日目の HCC1954 乳がん異種移植片モデルにおける NOV169N31Q-MCC-DM1 有効性。腫瘍体積および体重に対する処置の効果を、平均値 \pm SEM として提示する。実験は、処置の 31 日目に評価した。*ビヒクルに対して $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis の順位に基づく一元配置 ANOVA/Dunn 法)。

試験薬剤	用量、スケジュール	腫瘍応答			宿主応答	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	退縮 (%)	Δ 腫瘍体積 (mm^3)	Δ 体重 (%)	残存 (生存/総計)
ビヒクル	なし, 単回用量	100	-	289 ± 49	4.1 ± 1.6	9/9
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg , 単回用量	75	-	218 ± 36	4.3 ± 1.5	9/9
NOV169N31Q-MCC-DM1	10 mg/kg , 単回用量	-	-55.8*	-82 ± 10	4.8 ± 1.7	9/9

【0420】

別の例では、NOV169N31Q-MCC-DM1 活性を、SCID マウスにおける HCC1954 基底様 (Her2+) 乳がん異種移植片モデルにおいて評価した。HCC1954 モデルは、*in vitro* での P-カドヘリン発現 (84,000 個の受容体/細胞) および NOV169N31Q-MCC-DM1 に対する感受性に基づいて選択した。腫瘍が、およそ 190 mm^3 に達したら、マウスを、腫瘍体積に従って処置群へ無作為化して ($n = 5$ 匹/群)、ビヒクル、 15 mg/kg の NOV169N31Q または 15 mg/kg の NOV169N31Q-MCC-DM1 の 2 回 (0 日目および 7 日目に投与) IV 投与を施した。用量は、個々のマウスの体重に調整された。IV 用量容量は 10 ml/kg であった。NOV169N31Q-MCC-DM1 処置は、HCC1954 腫瘍の 100% の退縮をもたらし、それは、56 日目の終わりまで持続的であった (ビヒクルに対して、 $p < 0.05$ 、Kruskal-Wallis の順位に基づく一元配置 ANOVA/Dunn 法、図 13C)。NOV169N31Q の有効性は、 $T/C\% 121.4\%$ であり、ビヒクルとは有意に異ならなかった ($p > 0.05$)。試験作用物質

は全て、研究で許容され、毒性の明白な臨床症状は、処置群のいずれにおいても観察されなかった（図 1 3 D および表 1 5 B ）。

【 0 4 2 1 】

【表 1 6 】

表15B:56日目のHCC1954乳がん異種移植片モデルにおけるNOV169N31Q-MCC-DM1有効性。腫瘍体積および体重に対する処置の効果を、平均値±SEMとして提示する。実験は、処置の56日目に評価した。*ビヒクルに対して $p<0.05$ (Kruskal-Wallisの順位に基づく一元配置ANOVA/Dunn法)。

試験薬剤	用量、スケジュール	腫瘍応答			宿主応答	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	退縮(%)	Δ 腫瘍体積 (mm ³)	Δ 体重 (%)	残存 (生存/総計)
ビヒクル	なし, 0日目および7日目	100	-	925 ± 147	8.4 ± 1.0	5/5
NOV169N31Q	15 mg/kg, 0日目および7日目	121.4	-	1123 ± 134	9.9 ± 1.7	5/5
NOV169N31Q-MCC-DM1	15 mg/kg, 0日目および7日目	-20.8	-100*	-192 ± 9	9.0 ± 0.7	5/5

【実施例 1 4 】

【 0 4 2 2 】

マウスにおけるB I C R 6頭頸部（下咽頭扁平上皮癌）がんモデルに対するNOV 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1のin vivo有効性

NOV 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1の有効性評価を、in vitroでの70,000個の受容体/細胞のP-カドヘリン発現およびNOV 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1に対する感受性に基づくB I C R 6細胞系で行った。これまでに記載するように、免疫組織化学を実施して、B I C R 6腫瘍における腫瘍P-カドヘリンレベルを確認して、ここで腫瘍細胞の82%が、P-カドヘリンに関して少なくとも2+を染色する（図 1 4 A ）。

【 0 4 2 3 】

B I C R 6腫瘍は、各マウスの右脇腹への 5×10^6 個の腫瘍細胞の皮下生着により雌SCIDベージュマウスにおいて樹立させた。腫瘍が、およそ130 mm³に達したら、マウスを、腫瘍体積に従って処置群へ無作為化して（n = 10匹/群）、ビヒクルまたは10 mg / k gのq 7 dスケジュール（q 2 d x 2）にわたって投与されるI g G 1 - M C C - D M 1もしくはNOV 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1のいずれかのIV投与を施した。用量は、個々のマウスの体重に調整された。IV用量容量は5 ml / k gであった。

【 0 4 2 4 】

NOV 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1処置は、最大37%の腫瘍退縮をもたらした（研究の26日目）。全体として、静止の腫瘍応答は、投与の42日後まで、NOV 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1で持続的であった（T / C 1%、 $p < 0.05$ 、Kruskal-Wallisの順位に基づく一元配置ANOVA / Turkey検定）。試験

作用物質は全て、研究で許容され、毒性の明白な臨床症状は、処置群のいずれにおいても観察されなかった（図 1 4 B および表 1 6 ）。

【 0 4 2 5 】

【表 1 7 】

表 16:42 日目の下咽頭(頭頸部)異種移植片モデルの BICR6 ヒト扁平上皮細胞癌における NOV169N31Q-MCC-DM1 有効性。腫瘍体積および体重に対する処置の効果を、平均値±SEM として提示する。実験は、処置の 42 日目に評価した。*ビヒクルに対して $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis の順位に基づく一元配置 ANOVA/Tukey 検定)。

試験薬剤	用量、スケジュール	腫瘍応答			宿主応答	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	退縮(%)	Δ 腫瘍体積 (mm ³)	Δ 体重(%)	残存 (生存/総計)
ビヒクル	なし, Q2W x 2	100	-	386 ± 90	7.6 ± 1.4	10/10
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, Q2W x 2	136	-	526 ± 96	8.9 ± 1.1	10/10
NOV169N31Q-MCC-DM1	10 mg/kg, Q2W x 2	1*	-	5 ± 20	7.4 ± 2.3	10/10

【実施例 1 5 】

【 0 4 2 6 】

マウスにおける s c a B E R 膀胱がんモデルに対する NOV 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1 の i n v i v o 有効性

NOV 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1 の抗腫瘍活性を、i n v i t r o での 6 3 , 0 0 0 個の受容体 / 細胞の P - カドヘリン発現および NOV 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1 に対する感受性に基づいて選択される s c a B E R 膀胱がん異種移植片モデルで評価した。免疫組織化学を実施して、s c a B E R 腫瘍における腫瘍 P - カドヘリンレベルを確認して、腫瘍細胞のおよそ 5 2 % が、少なくとも 2 + を染色することを示した（図 1 5 A ）。

【 0 4 2 7 】

s c a B E R 腫瘍は、各マウスの右脇腹への腫瘍断片の皮下生着により雌 S C I D ベージュマウスにおいて樹立させた。腫瘍が、およそ 1 3 0 mm³ に達したら、マウスを、腫瘍体積に従って処置群へ無作為化して (n = 1 0 匹 / 群)、ビヒクルまたは 1 0 m g / k g の 2 週空けて 2 度 (Q 2 W x 2) 投与される I g G 1 - M C C - D M 1 もしくは NOV 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1 のいずれかの I V 投与を施した。用量は、個々のマウスの体重に調整された。I V 用量容量は 5 m l / k g であった。

【 0 4 2 8 】

NOV 1 6 9 N 3 1 Q - M C C - D M 1 処置は、T / C 1 8 % をもたらした (ビヒクルまたは I g G 1 - M C C - D M 1 に対して、 $p < 0 . 0 5$ 、ANOVA / T u r k e y 検定、3 5 日目)。I g G 1 - M C C - D M 1 の有効性は、T / C 8 6 % であり、ビヒクルとは有意に異ならなかった ($p > 0 . 0 5$)。試験作用物質は全て、研究で許容され、毒性の明白な臨床症状は、処置群のいずれにおいても観察されなかった（図 1 5 B および表 1 7 ）。

【 0 4 2 9 】

【表 18】

表 17:42 日目の scaBER ヒト膀胱扁平上皮癌異種移植片モデルにおける NOV169N31Q-MCC-DM1 有効性。腫瘍体積および体重に対する処置の効果を、平均値±SEM として提示する。実験は、処置の 42 日目に評価した。*ビヒクルに対して $p<0.001$ (Kruskal-Wallis の順位に基づく一元配置 ANOVA/Turkey 検定)。

試験薬剤	用量、スケジュール	腫瘍応答			宿主応答	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	退縮(%)	Δ 腫瘍体積 (mm^3)	Δ 体重 (%)	残存 (生存/総計)
ビヒクル	なし, Q2W x 2	100	-	279 ± 67	5.6 ± 1.9	10/10
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, Q2W x 2	86	-	239 ± 56	4.9 ± 1.8	10/10
NOV169N31Q-MCC-DM1	10 mg/kg, Q2W x 2	18*	-	50 ± 15	2.1 ± 1.5	10/10

【実施例 16】

【0430】

マウスにおける HuPrime (登録商標) ES2267 食道がんモデルに対する NOV169N31Q-MCC-DM1 の *in vivo* 有効性

NOV169N31Q-MCC-DM1 の抗腫瘍活性を、P-カドヘリン発現 ES2267 食道がん異種移植片モデルで評価した。雌 BALB/cヌードマウスに、各マウスの右脇腹において腫瘍断片を皮下移植した。腫瘍が、およそ 154 mm^3 に達したら、マウスを、腫瘍体積に従って処置群へ無作為化した ($n = 5$)。10 mg/kg で投与される NOV169N31Q-MCC-DM1 またはヒト化非特異的アイソタイプ対照 3207-MCC-DM1 を、無作為化の 0 日後および 13 日後に投与した。用量は、個々のマウスの体重に調整された。IV 用量容量は 10 ml/kg であった。

【0431】

10 mg/kg での NOV169N31Q-MCC-DM1 による処置は、21 日目に平均退縮 58% を有するビヒクルと比較した場合に、抗腫瘍有効性をもたらした。さらに、10 mg/kg での非特異的アイソタイプ対照 IgG1-MCC-DM1 による処置後に、有意な抗腫瘍有効性は観察されなかった。研究の 21 日目に、および最終日 (53 日目) に、試験した NOV169N31Q-MCC-DM1 は、ビヒクルおよびアイソタイプ対照 IgG1-MCC-DM1 処置群と統計的に異なっていた ($P < 0.05$ 、ANOVA/Holm-Sidak 法、21 日目)。試験作用物質は全て、十分許容され、体重損失は、マウス P-カドヘリンを結合しない ADC に関して予想されるように、処置群のいずれにおいても観察されなかった (図 16 および表 18)。

【0432】

【表 19】

表 18:21 日目の HuPrime(登録商標)ES2267 食道がん異種移植片モデルにおける

NOV169N31Q-MCC-DM1 有効性(投与後の最大腫瘍退縮)。腫瘍体積および体重に対する

処置の効果を、平均値±SEM として提示する。実験は、NOV169N31Q-MCC-DM1 腫瘍が、

処置後にそれらの最大退縮に達した、処置の 21 日目に評価した。*ビヒクルに対して

p=0.014(順位に基づく一元配置 ANOVA/Holm-Sidak 法)。

化合物	用量、経路、スケジュール	腫瘍応答			宿主応答
		腫瘍サイズ (mm ³ +/- SEM)	ΔT/ ΔC (%)	退縮(%)	残存 (生存/総計)
ビヒクル	0 mg/kg, IV, 0 日目および 13 日目	361 ± 48	100	--	5/5
NOV169N31Q- MCC-DM1	10 mg/kg, IV, 0 日目お よび 13 日目	66 ± 24	43	58*	5/5
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, IV, 0 日目お よび 13 日目	267 ± 54	55	--	5/5

10

20

【実施例 17】

【0433】

HCC70 乳がん異種移植片モデルにおける 2 つのリンカー (MCC および CX1-1) を使用して DM1 にコンジュゲートしている NEG0067 の有効性比較

HCC70 乳がん異種移植片モデルを使用して、MCC 対 CX1-1 リンカーを使用して DM1 にコンジュゲートしている抗 P-カドヘリン抗体 NEG0067 の抗腫瘍有効性を比較した。腫瘍が、およそ 215 mm³ に達したら、マウスを、腫瘍体積に従って処置群へ無作為化して (n = 8 匹 / 群)、ビヒクルまたは 7 mg / kg の ADC の単回 IV 投与を施した。用量は、個々のマウスの体重に調整された。IV 用量容量は 8 ml / kg であった。

30

【0434】

NEG0067 - CX1-1 - DM1 群における平均腫瘍体積は、対照 IgG1 - CX1-1 - DM1 群と有意に異なった (一元配置 ANOVA、Dunn 法、p = 0.05) のに対して、NEG0067 - MCC - DM1 は、IgG1 - MCC - DM1 と統計学的に異ならなかった。しかしながら、HuIgG1 - MCC - DM1 処置群と比較して、IgG1 - CX1-1 - DM1 において活性の増加の傾向が見られた。

【実施例 18】

【0435】

HCC70 乳がん異種移植片モデルにおける SPDB - DM4 リンカーペイロード (切断可能なリンカー) を使用してコンジュゲートしているマウスハイブリドーマ由来の抗 P-カドヘリン ADC の有効性評価

HCC70 乳がん異種移植片モデルを使用して、SPDB - DM4 リンカーペイロードを使用した 3 つのマウスハイブリドーマ由来の ADC の抗腫瘍有効性を比較した。腫瘍が、およそ 150 mm³ に達したら、マウスを、腫瘍体積に従って処置群へ無作為化して (n = 10 匹 / 群)、ビヒクルまたは 5 mg / kg の ADC の単回 IV 投与を施した。用量は、個々のマウスの体重に調整された。

40

【0436】

2P10 - SPDB - DM4 処置群における幾つかの腫瘍再成長を伴って、単回 5 mg

50

/m l 用量の3つのSPDB - DM4 連結ADC全てが、持続的な腫瘍退縮を有意に誘導した (p = 0.05)。1G12 - SPDB - DM4 または 3D21 - SPDB - DM4 で処置した群では、腫瘍は完全に退縮したままであった (図18)。

【実施例19】

【0437】

ADC 製剤

ADCであるNOV169N31Q - MCC - DM1の臨床サービス形態(CSF)は、NOV169N31Q - MCC - DM1 50mgを含有するバイアル中の凍結乾燥物である。注射用の水5mLによる凍結乾燥物の再構成後に、pH5.3の10mg/mLのNOV169N31Q - MCC - DM1、20mM L - ヒスチジン / L - ヒスチジン塩酸塩一水和物、240mMスクロースおよび0.02%ポリソルベート20を含有する溶液が得られる。

10

【0438】

その後の静脈内投与のために、得られた溶液を、通常、担体溶液中にさらに希釈して、輸注用のすぐに使えるADC溶液にする。

【0439】

CSFについては、10mg/mLのADC濃度を選択した。等張性製剤を作出し、不定形の凍結乾燥ケーキ構造を維持し、タンパク質安定化を得るために、240mMのスクロース濃度を選択した。

【0440】

20

最も安定な製剤を選択するための重要な安定性指示分析方法は、特に、凝集レベルを決定するためのサイズ排除クロマトグラフィー、肉眼では見ることができない粒子状物質の試験、遊離毒素の決定および効力試験を包含していた。予備スクリーニング研究により、0.02%の濃度のポリソルベート20が機械的ストレスに対する十分な安定を提供することが示された。実時間および加速安定性条件(25 および40)での液体および凍結乾燥安定性研究により、5.0 ~ 5.5のpH値のヒスチジンベースの製剤が、全体的に最良の貯蔵安定性を提供することが実証された。とりわけ、この範囲では、遊離毒素の凝集と放出との間の試験される製剤全てのバランスを満たすことができた。25 および40 での2カ月安定性研究により、非常に低レベルの凝集および分解産物が示された。

【0441】

30

本明細書に記載の実施例および実施形態は例示目的に過ぎず、それに照らして様々な改変または変更が当業者に対して示唆され、本出願および添付の特許請求の範囲の精神および範囲の中に含まれることが理解される。

また、本発明は以下を提供する。

[1]

配列番号126の124、125、151、153、154、155、156、159、160、161、162、163、168、170、171、および172位にあるアミノ酸から選択される1つまたは複数の残基においてヒトP - カドヘリンタンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片。

[2]

40

配列番号126の124、125、151、153、154、155、156、159、160、161、162、163、168、170、171、および172位にあるアミノ酸においてヒトP - カドヘリンタンパク質に結合する、[1]に記載の抗体。

[3]

配列番号126の124、151、153 ~ 156、および172位から選択される1つまたは複数のアミノ酸残基においてヒトP - カドヘリンに結合する重鎖可変領域を含む、[1]に記載の抗体。

[4]

ヒトP - カドヘリンタンパク質に対する前記重鎖可変領域結合性パラトープが、配列番号128の52、54、56、60、65、105、または107位から選択される1つ

50

または複数のアミノ酸残基を含む、[3]に記載の抗体。

[5]

配列番号 1 2 6 の 1 2 4、1 2 5、1 5 5、1 5 6、1 5 9 ~ 1 6 3、1 6 8、1 7 0、および 1 7 1 位から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸残基においてヒト P - カドヘリンに結合する軽鎖可変領域を含む、[1]に記載の抗体。

[6]

ヒト P - カドヘリントタンパク質に対する前記軽鎖可変領域結合性パラトープが、配列番号 1 2 9 の 1、2、2 7、2 8、3 0、6 8、9 2、9 3、または 9 4 位から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸残基を含む、[5]に記載の抗体。

[7]

[3]に記載の重鎖領域および [5]に記載の軽鎖可変領域を含む抗体またはその抗原結合性断片。

[8]

a . 配列番号 1 の V H C D R 1、配列番号 2 の V H C D R 2、および配列番号 3 の V H C D R 3 を含む重鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、重鎖可変領域、および配列番号 1 1 の V L C D R 1、配列番号 1 2 の V L C D R 2、および配列番号 1 3 の V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、軽鎖可変領域；

b . 配列番号 2 1 の V H C D R 1、配列番号 2 2 の V H C D R 2、および配列番号 2 3 の V H C D R 3 を含む重鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、重鎖可変領域、および配列番号 3 1 の V L C D R 1、配列番号 3 2 の V L C D R 2、および配列番号 3 3 の V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、軽鎖可変領域；

c . 配列番号 4 1 の V H C D R 1、配列番号 4 2 の V H C D R 2、および配列番号 4 3 の V H C D R 3 を含む重鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、重鎖可変領域、および配列番号 5 1 の V L C D R 1、配列番号 5 2 の V L C D R 2、および配列番号 5 3 の V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、軽鎖可変領域；

d . 配列番号 6 1 の V H C D R 1、配列番号 6 2 の V H C D R 2、および配列番号 6 3 の V H C D R 3 を含む重鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、重鎖可変領域、および配列番号 7 1 の V L C D R 1、配列番号 7 2 の V L C D R 2、および配列番号 7 3 の V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、軽鎖可変領域；

e . 配列番号 8 1 の V H C D R 1、配列番号 8 2 の V H C D R 2、および配列番号 8 3 の V H C D R 3 を含む重鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、重鎖可変領域、および配列番号 9 1 の V L C D R 1、配列番号 9 2 の V L C D R 2、および配列番号 9 3 の V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、軽鎖可変領域；または

f . 配列番号 1 0 1 の V H C D R 1、配列番号 1 0 2 の V H C D R 2、および配列番号 1 0 3 の V H C D R 3 を含む重鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される重鎖可変領域、および配列番号 1 1 1 の V L C D R 1、配列番号 1 1 2 の V L C D R 2、および配列番号 1 1 3 の V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域であって、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、軽鎖可変領域を含む、P - カドヘリンを結合する抗体またはその抗原結合性断片。

[9]

a . 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、および配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)；

b . 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、および配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)；

c . 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、および配列番号 5 7 の

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V L）；

d．配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V H）、および配列番号 7 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V L）；

e．配列番号 8 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V H）、および配列番号 9 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V L）；または

f．配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V H）、および配列番号 1 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V L）

を含む、P - カドヘリンを結合する抗体またはその抗原結合性断片。

[1 0]

a．配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

b．配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

c．配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

d．配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 7 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

e．配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 9 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖；

f．配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号 1 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む P - カドヘリンを結合する抗体またはその抗原結合性断片。

[1 1]

[8] から [1 0] のいずれか一項に記載の抗体と同じヒト P - カドヘリンのエピトープに結合するか、またはヒト P - カドヘリンへの結合に対し [8] から [1 0] のいずれか一項に記載の抗体と競合する抗体。

[1 2]

式

$$A b - (L - (D) _m) _n$$

（式中、

A b は、[1] から [1 1] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片であり、

L は、リンカーであり、

D は、薬物部分であり、

m は、1 ～ 8 の整数であり、

n は、1 ～ 1 0 の整数である）

を含む抗体薬物コンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩。

[1 3]

前記 m が 1 である、[1 2] に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[1 4]

前記 n が、3 または 4 である、[1 1] または [1 2] に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[1 5]

前記抗体または抗原結合性領域が、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V H 領域および配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む V L 領域を含む、[1 2] から [1 4] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[1 6]

前記抗体または抗原結合性領域が、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む V H 領域および配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V L 領域を含む、[1 2] から [1 4] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

10

20

30

40

50

[1 7]

前記抗体またはその抗原結合性断片が、(a) 配列番号 1 の V H C D R 1、(b) 配列番号 2 の V H C D R 2、(c) 配列番号 3 の V H C D R 3 を含む V H 領域、および (d) 配列番号 1 1 の V L C D R 1、(e) 配列番号 1 2 の V L C D R 2、および (f) 配列番号 1 3 の V L C D R 3 を含む V L 領域を含み、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、[1 2] から [1 4] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[1 8]

前記抗体またはその抗原結合性断片が、(a) 配列番号 2 1 の V H C D R 1、(b) 配列番号 2 2 の V H C D R 2、(c) 配列番号 2 3 の V H C D R 3 を含む V H 領域、および (d) 配列番号 3 1 の V L C D R 1、(e) 配列番号 3 2 の V L C D R 2、および (f) 配列番号 3 3 の V L C D R 3 を含む V L 領域を含み、前記 C D R が、K a b a t 定義に従って規定される、[1 2] から [1 4] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

10

[1 9]

前記抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 9 の重鎖および配列番号 1 9 の軽鎖を含む、[1 2] から [1 4] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[2 0]

前記抗体が、配列番号 2 9 の重鎖および配列番号 3 9 の軽鎖を含む、[1 2] から [1 4] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

20

[2 1]

前記抗体が、モノクローナル抗体である、[1 2] から [2 0] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[2 2]

前記リンカーが、切断性リンカー、非切断性リンカー、親水性リンカー、プロチャージリンカーおよびジカルボン酸に基づくリンカーからなる群から選択される、[1 2] から [2 1] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[2 3]

前記リンカーが、N - スクシンイミジル 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ペンタノエート (S P P)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (S P D B)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) - 2 - スルホ - ブタノエート (スルホ - S P D B)、N - スクシンイミジルヨードアセテート (S I A)、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 (S I A B)、マレイミド P E G N H S、N - スクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (S M C C)、N - スルホスクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (スルホ - S M C C) および 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 1 7 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) - 5 , 8 , 1 1 , 1 4 - テトラオキソ - 4 , 7 , 1 0 , 1 3 - テトラアザヘプタデカン - 1 - オエート (C X 1 - 1) からなる群から選択される架橋試薬に由来する、[2 2] に記載の抗体薬物コンジュゲート。

30

40

[2 4]

前記リンカーが、N - スクシンイミジル 4 - (マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボキシレート (S M C C)、N - スクシンイミジル 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノエート (S P D B)、および 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 1 7 - (2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) - 5 , 8 , 1 1 , 1 4 - テトラオキソ - 4 , 7 , 1 0 , 1 3 - テトラアザヘプタデカン - 1 - オエート (C X 1 - 1) からなる群から選択される架橋試薬に由来する、[2 3] に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[2 5]

前記薬物部分が、V - A T P a s e 阻害剤、プロアポトーシス剤、B c l 2 阻害剤、M

50

CL1阻害剤、HSP90阻害剤、IAP阻害剤、mTor阻害剤、微小管安定化剤、微小管脱安定化剤、アウリスタチン、ドラスタチン、メイタンシノイド、MetAP（メチオニンアミノペプチダーゼ）、タンパク質CRM1の核外輸送の阻害剤、DPPIV阻害剤、プロテアソーム阻害剤、ミトコンドリアにおけるホスホリル転移反応の阻害剤、タンパク質合成阻害剤、キナーゼ阻害剤、CDK2阻害剤、CDK9阻害剤、キネシン阻害剤、HDAC阻害剤、DNA損傷剤、DNAアルキル化剤、DNAインターカレーター、DNA副溝結合剤およびDHFR阻害剤からなる群から選択される、[12]から[24]のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[26]

前記細胞毒性剤がメイタンシノイドである、[25]に記載の抗体薬物コンジュゲート

10

[27]

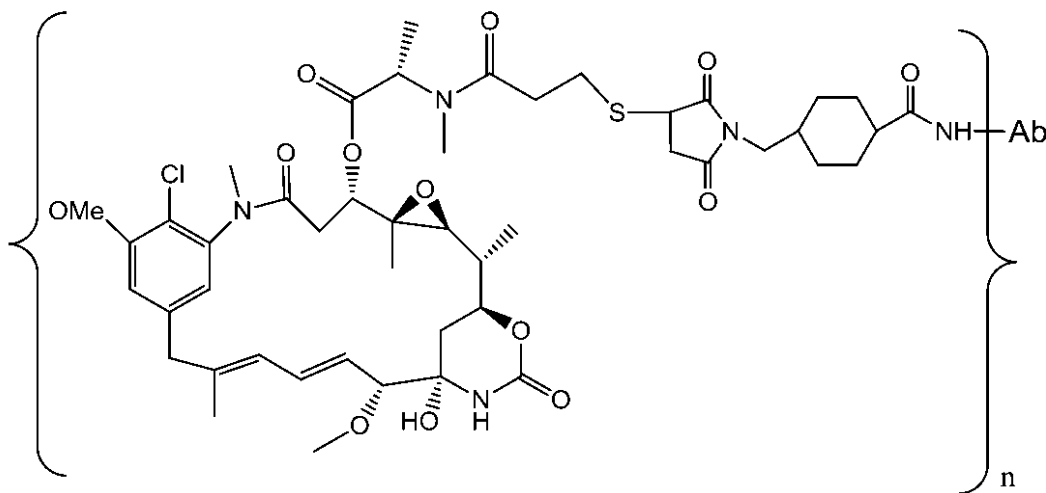
前記メイタンシノイドが、N(2')-デアセチル-N(2')-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン(DM1)またはN(2')-デアセチル-N2-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-メイタンシン(DM4)である、[26]に記載の抗体薬物コンジュゲート。

[28]

下記式：

【化15】

20



30

(式中、

Abは、配列番号1の重鎖CDR1、配列番号2の重鎖CDR2、配列番号3の重鎖CDR3、および配列番号11の軽鎖CDR1、配列番号12の軽鎖CDR2、配列番号13の軽鎖CDR3を含む抗体またはその抗原結合性断片であり、前記CDRは、Kabatt定義に従って規定され；およびnは1～10である)

40

を有する、[12]に記載の抗体薬物コンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩。

[29]

[1]から[11]のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

[30]

[12]から[28]のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲートおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

[31]

凍結乾燥物として調製された、[29]または[30]に記載の医薬組成物。

[32]

50

前記凍結乾燥物が、[1] から [1 1] のいずれか一項に記載の抗体または [1 2] から [2 8] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート、ヒスチジン、スクロース、およびポリソルベート 20 を含む、[3 1] に記載の医薬組成物。

[3 3]

約 10 mg / mL の [2 8] に記載の抗体薬物コンジュゲート、20 mM ヒスチジン、240 mM スクロース、および 0.02 % ポリソルベート 20 を含む、[3 2] に記載の医薬組成物。

[3 4]

それを必要とする患者におけるがんを処置する方法であって、[1 2] から [2 8] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲート、または [2 9] から [3 3] のいずれか一項に記載の医薬組成物を、前記患者に投与することを含む、方法。

10

[3 5]

前記抗体薬物コンジュゲートまたは医薬組成物が、1つまたは複数のさらなる治療用化合物と組み合わせて、前記患者に投与される、[3 4] に記載の方法。

[3 6]

医薬としての使用のための、[1 2] から [2 8] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲートまたは [2 9] から [3 3] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[3 7]

それを必要とする患者におけるがんの処置における使用のための、[1 2] から [2 8] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲートまたは [2 9] から [3 3] のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

[3 8]

それを必要とする患者においてがんを処置するための、[1] から [1 1] のいずれか一項に記載の抗体、[1 2] から [2 8] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲートまたは [2 9] から [3 3] のいずれか一項に記載の医薬組成物の使用。

[3 9]

がんの処置のための医薬の製造における、[1] から [1 1] のいずれか一項に記載の抗体または [1 2] から [2 8] のいずれか一項に記載の抗体薬物コンジュゲートの使用。

[4 0]

前記がんが、P - カドヘリンを発現する、[3 4] または [3 5] に記載の方法、[3 6] または [3 7] に記載の抗体薬物コンジュゲートまたは [3 8] または [3 9] に記載の使用。

30

[4 1]

前記がんが、副腎皮質癌、膀胱がん、骨がん、乳がん、中枢神経系非定型奇形腫様 / ラブドイド腫瘍、結腸がん、結腸直腸がん、胚芽腫、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、頭頸部がん、肝細胞がん、カボジ肉腫、肝臓がん、小細胞肺癌および非小細胞肺癌を含む肺がん、卵巣がん、直腸がん、横紋筋肉腫、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、頸部扁平上皮がん、腹部がん、子宮がん、膣がん、および外陰部がん、副腎皮質癌、膀胱がん、骨がん、乳がん、中枢神経系非定型奇形腫様 / ラブドイド腫瘍、結腸がん、結腸直腸がん、胚芽腫、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、頭頸部がん、肝細胞がん、カボジ肉腫、肝臓がん、小細胞肺癌および非小細胞肺癌を含む肺がん、卵巣がん、直腸がん、横紋筋肉腫、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、頸部扁平上皮がん、腹部がん、子宮がん、膣がん、および外陰部がんからなる群から選択される、[4 0] に記載の方法、抗体薬物コンジュゲートまたは使用。

40

[4 2]

前記がんが、膀胱がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、頭頸部がん、肺がん、および卵巣がんからなる群から選択される、[3 8] に記載の方法、抗体薬物コンジュゲートまたは使用。

[4 3]

前記抗体が、ヒトまたはヒト化抗体である、[1] から [1 1] のいずれか一項に記載

50

の抗体または抗原結合性断片。

[4 4]

前記抗体が、モノクローナル抗体である、[1] から [1 1] および [4 3] のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

[4 5]

単鎖抗体 (s c F v) である、[1] から [1 1] 、[4 3] または [4 4] のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片。

[4 6]

[1] から [1 1] 、[4 3] 、[4 4] または [4 5] のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片をコードする核酸。

[4 7]

配列番号 8、28、48、68、88、108、18、38、58、78、98、118、10、30、50、70、90、110、20、40、60、80、100、および 120 のヌクレオチド配列を含む、[4 6] に記載の核酸。

[4 8]

[4 6] または [4 7] に記載の核酸を含むベクター。

[4 9]

[4 8] に記載のベクターまたは [4 6] または [4 7] に記載の核酸を含む宿主細胞。

[5 0]

[4 9] に記載の宿主細胞を培養すること、および培養物から抗体を回収することを含む、抗体または抗原結合性断片を生成するための方法。

[5 1]

(a) S M C C を薬物部分 D M - 1 に化学的に連結すること；

(b) リンカー - 薬物を、[4 7] に記載の細胞培養物から回収された抗体にコンジュゲートすること；および

(c) 抗体薬物コンジュゲートを精製すること

を含む、抗 P - カドヘリン抗体薬物コンジュゲートを生成するための方法。

[5 2]

抗 P - カドヘリン抗体薬物コンジュゲートを生成する方法であって、

(a) S M C C を薬物部分 D M - 1 に化学的に連結させることと

(b) リンカー - 薬物を、[1] から [1 1] 、[4 3] または [4 4] のいずれか一項に記載の抗体にコンジュゲートすること、および

(c) 抗体薬物コンジュゲートを精製すること

を含む、方法。

[5 3]

UV 分光光度計を使用して測定される、約 3 . 8 の平均 D A R を有する、[5 1] または [5 2] に従って作製された抗体薬物コンジュゲート。

[5 4]

[1] から [1 1] 、[4 3] 、[4 4] または [4 5] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む診断剤。

[5 5]

前記抗体またはその抗原結合性断片が、放射性標識、フルオロフォア、発色団、イメージング剤、または金属イオンで標識されている、[5 4] に記載の診断剤。

10

20

30

40

【図 8】

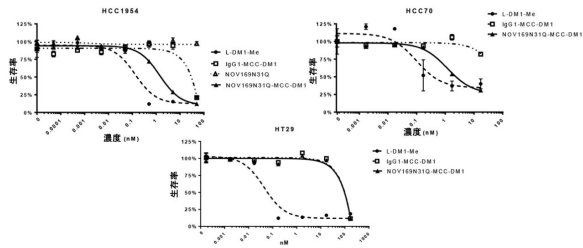


図 8

【図 9】

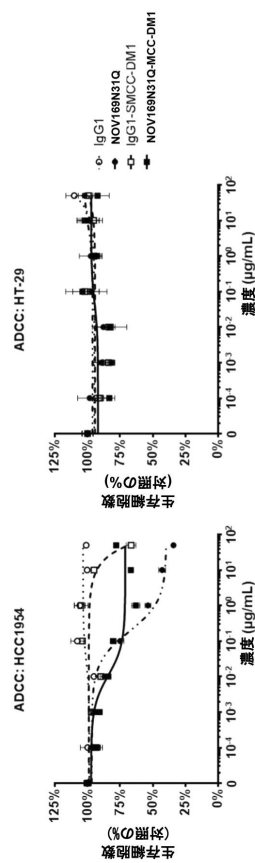


図 9

【図 10】

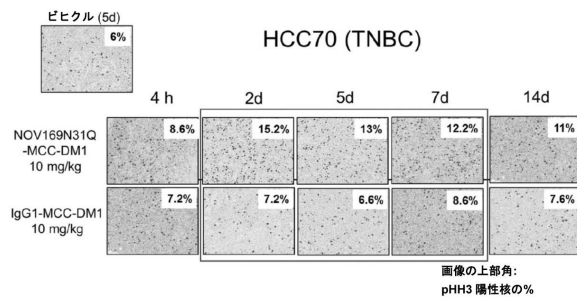


図 10

【図 11】

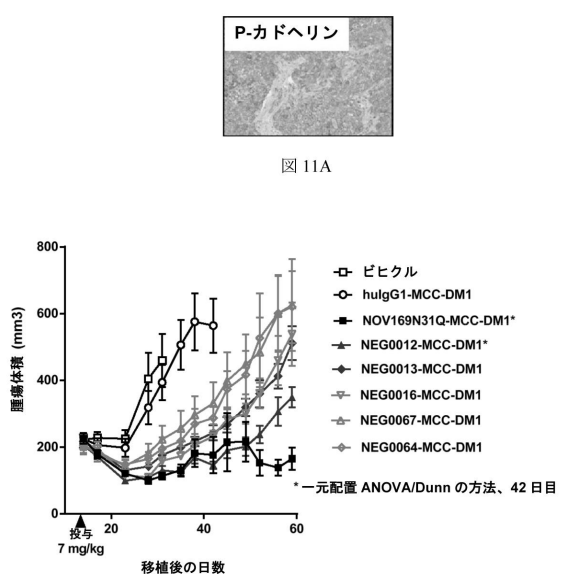


図 11B

【図 1 2】

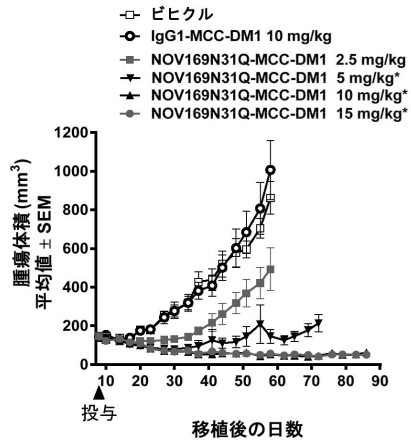


図 12

【図 1 3 - 1】

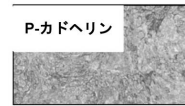


図 13A

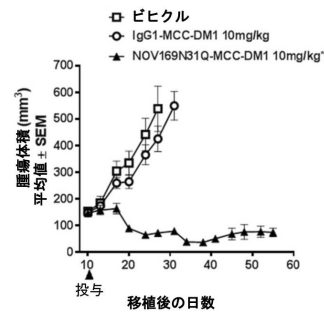


図 13B

【図 1 3 - 2】

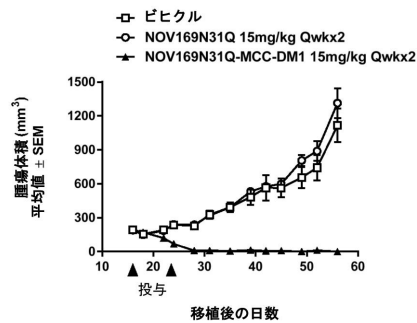


図 13C

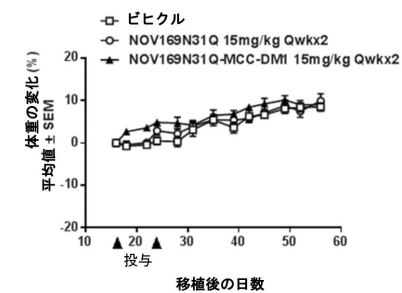


図 13D

【図 1 4】

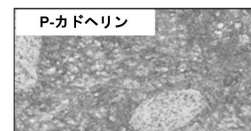


図 14A

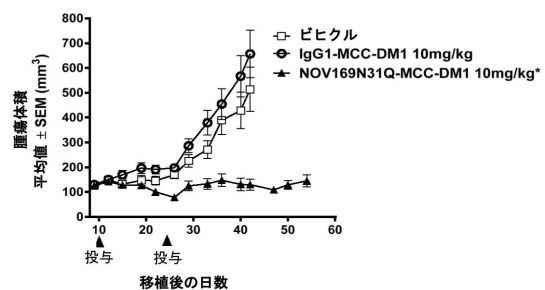


図 14B

【図 15】

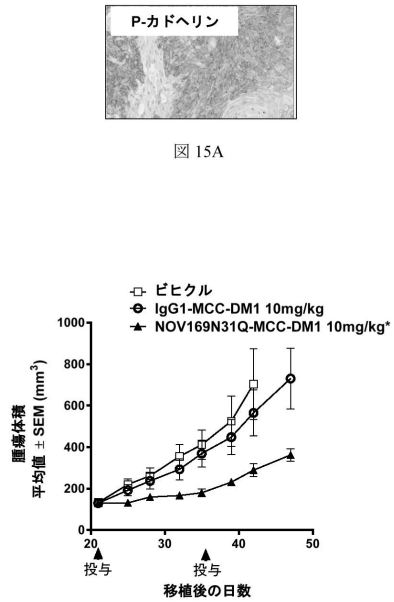


図 15B

【図 16】

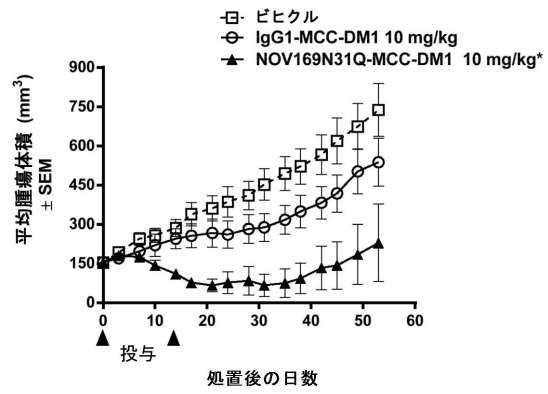


図 16

【図 17】

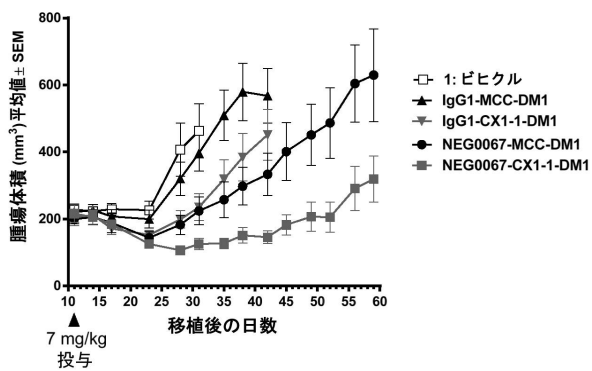


図 17

【図 18】

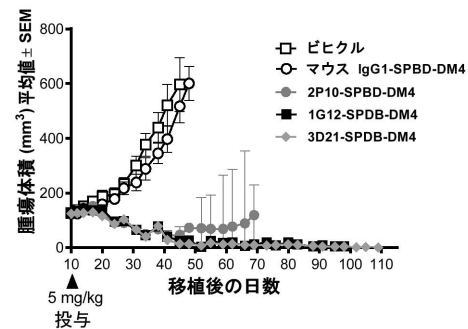


図 18

【配列表】

0006831783000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K 47/68
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 D

- (72)発明者 アブラムス, ティンヤ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレーテッド内
- (72)発明者 コーエン, スティーブン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス ドライブ 1 0 6 7 5, ディービーイー ゲノミクス インスティテューツ オブ ザ ノバルティス リサーチ ファウンデーション, ノバルティス インスティテューツ フォー ファンクショナル ゲノミクス, インコーポレーテッド内
- (72)発明者 ダミアノ, ジェイソン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 8, エメリーヴィレ, ホートン ストリート 4 5 6 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレーテッド内
- (72)発明者 ドゥル, クレメンス
スイス国 ツェーハー - 4 0 0 2 バーゼル, ポストファッハ, ノバルティス ファーマ アーゲー内
- (72)発明者 フーバー, トーマス
スイス国 ツェーハー - 4 0 0 2 バーゼル, ポストファッハ, ノバルティス ファーマ アーゲー内
- (72)発明者 メネゼス, ダニエル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 8, エメリーヴィレ, ホートン ストリート 4 5 6 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレーテッド内
- (72)発明者 ミラー, キャシー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 8, エメリーヴィレ, ホートン ストリート 4 5 6 0, ノバルティス ヴァクシーンズ アンド ダイアグノスティックス, インコーポレーテッド内
- (72)発明者 レンダール, キャサリン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 6 0 8, エメリーヴィレ, ホートン ストリート 4 5 6 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコーポレーテッド内
- (72)発明者 ロンドー, ジェーン - マイケル レニー
スイス国 ツェーハー - 4 0 0 2 バーゼル, ポストファッハ, ノバルティス ファーマ アーゲー内

審査官 西垣 歩美

- (56)参考文献 国際公開第2 0 1 2 / 0 5 7 3 2 8 (WO, A 1)
国際公開第2 0 1 3 / 1 5 0 6 2 3 (WO, A 1)

国際公開第2014/126198(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00 - 16/46

C07K 19/00

C12N 15/00 - 15/90

A61K 38/00 - 38/58

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / R E S I S T R Y (S T N)