

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6436965号
(P6436965)

(45) 発行日 平成30年12月12日(2018.12.12)

(24) 登録日 平成30年11月22日(2018.11.22)

(51) Int.Cl.		F I			
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
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 53 (全 128 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-501809 (P2016-501809)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成26年3月13日 (2014. 3. 13)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2016-523810 (P2016-523810A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
(43) 公表日	平成28年8月12日 (2016. 8. 12)		サンフランシスコ ディーエヌエー
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/025285		ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W02014/159835	(74) 代理人	110002077
(87) 国際公開日	平成26年10月2日 (2014. 10. 2)		園田・小林特許業務法人
審査請求日	平成29年3月10日 (2017. 3. 10)	(72) 発明者	レオン, スティーヴン アール,
(31) 優先権主張番号	61/784, 877		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		80, サウス サンフランシスコ, デ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イーエヌエー ウェイ 1
(31) 優先権主張番号	61/785, 811	(72) 発明者	ボルソン, アンドリュー
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(33) 優先権主張国	米国 (US)		80, サウス サンフランシスコ, デ
			イーエヌエー ウェイ 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗B7-H4抗体及びイムノコンジュゲート

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

B7-H4に結合する単離抗体であって、

(a) (i) 配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii) 配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(iii) 配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(iv) 配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(v) 配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(vi) 配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-L3

を含む抗体。

【請求項2】

モノクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

ヒト化抗体又はキメラ抗体である、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項4】

B7-H4に結合する抗体断片である、請求項1から3の何れか一項に記載の抗体。

【請求項5】

B7-H4が、配列番号73のヒトB7-H4である、請求項1から4の何れか一項に記載の抗体。

【請求項6】

配列番号71の重鎖フレームワークFR3配列をさらに含む、請求項1から5の何れか

一項に記載の抗体。

【請求項 7】

配列番号 6 5 若しくは 6 6 の軽鎖フレームワーク F R 2 配列、及び / 又は配列番号 6 7 の軽鎖フレームワーク F R 3 配列をさらに含む、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

(a) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、又は

(b) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、又は

(c) (a) と同様の V H 配列及び (b) と同様の V L 配列、又は

(d) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、又は

(e) (a) と同様の V H 配列及び (d) と同様の V L 配列、又は

(f) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、又は

(g) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、又は

(h) (f) と同様の V H 配列及び (g) と同様の V L 配列、

を含む、請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

配列番号 5 6 の V H 配列、又は配列番号 2 8 の V H 配列を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

配列番号 5 5 の V L 配列、配列番号 2 7 の V L 配列、又は配列番号 5 7 の V L 配列を含む、請求項 8 又は 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

(a) 配列番号 5 6 の V H 配列及び配列番号 5 5 の V L 配列、又は (b) 配列番号 2 8 の V H 配列及び配列番号 2 7 の V L 配列、又は (c) 配列番号 5 6 の V H 配列及び配列番号 5 7 の V L 配列を含む、単離抗体。

【請求項 12】

I g G 1 抗体、I g G 2 a 抗体又は I g G 2 b 抗体である、請求項 1 から 11 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

請求項 1 から 12 の何れか一項に記載の抗体をコードする単離核酸。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項 15】

抗体が産生されるように請求項 14 に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体を産生する方法。

【請求項 16】

請求項 1 から 12 の何れか一項に記載の抗体及び細胞傷害剤を含むイムノコンジュゲート。

【請求項 17】

式 A b - (L - D) p を有し、式中、

(a) A b は抗体であり、

(b) L はリンカーであり、

(c) D はメイタンシノイド、オーリスタチン、カリケアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、及びネモルピシン誘導体から選択される薬物であり、

(d) p は 1 - 8 の範囲である、

10

20

30

40

50

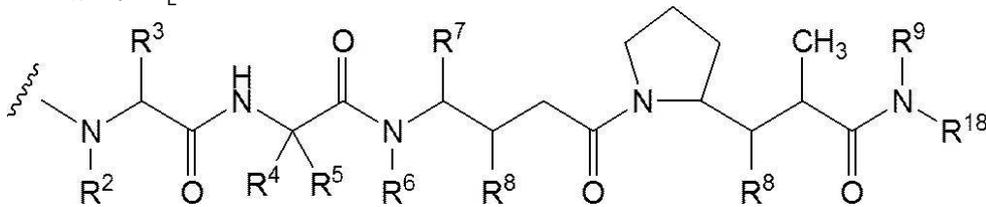
請求項 16 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 18】

細胞傷害剤がオーリスタチンである、請求項 16 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 19】

D が式 D_E



10

(式中、R² 及び R⁶ はそれぞれメチルであり、R³ 及び R⁴ はそれぞれイソプロピルであり、R⁵ は H であり、R⁷ は sec-ブチルであり、各 R⁸ は、CH₃、O-CH₃、OH 及び H から独立して選択され、R⁹ は H であり、R¹⁸ は -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-アリールである)

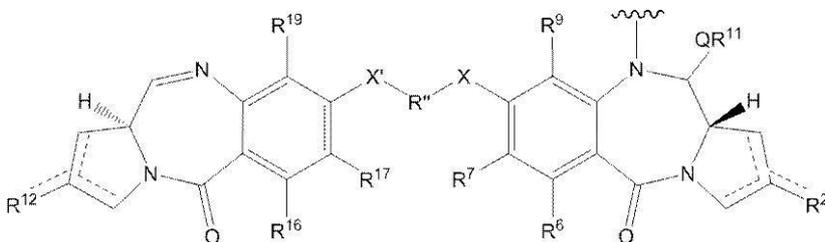
を有する、請求項 17 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 20】

薬物が MMAE である、請求項 18 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 21】

D が、式 A :



A ;

(式中、点線は、C1 及び C2 の間又は C2 及び C3 の間の二重結合の任意選択的な存在を示し、

R² は、H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R 及び COR から独立して選択され、任意選択的にハロ又はジハロからさらに選択され、R^D は、R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H 及びハロから独立して選択され、

R⁶ 及び R⁹ は、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn 及びハロから独立して選択され、

R⁷ は、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn 及びハロから独立して選択され、

Q は、O、S 及び NH から独立して選択され、

R¹¹ は、H 又は R の何れかであり、又は、Q が O の場合は、SO₃M であり、M は金属カチオンであり、

R 及び R' は、それぞれ独立して、置換されていてもよい C₁₋₈ アルキル、C₃₋₈ ヘテロシクリル及び C₅₋₂₀ アリール基から選択され、任意選択的に、NRR' 基に関して、R 及び R' は、それらが結合する窒素原子と共に、置換されていてもよい 4、5、6 又は 7 員複素環式環を形成し、

R¹²、R¹⁶、R¹⁹ 及び R¹⁷ は、それぞれ、R²、R⁶、R⁹ 及び R⁷ について定義した通りであり、

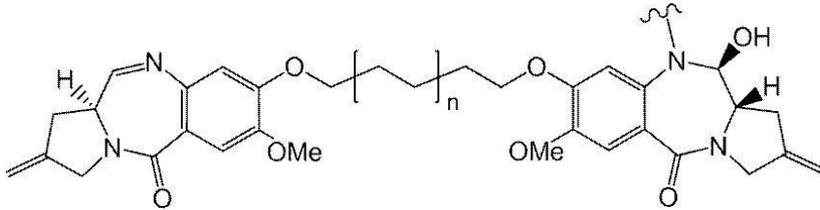
R'' は、C₃₋₁₂ アルキレン基であり、鎖は、1 つ又は複数のヘテロ原子及び / 又は置換されていてもよい芳香族環によって離断されてもよく、

50

X 及び X' は、O、S 及び N(H) から独立して選択される) のピロロベンゾジアゼピンである、請求項 17 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 22】

D が構造：



10

;

(式中、n は 0 又は 1 である)

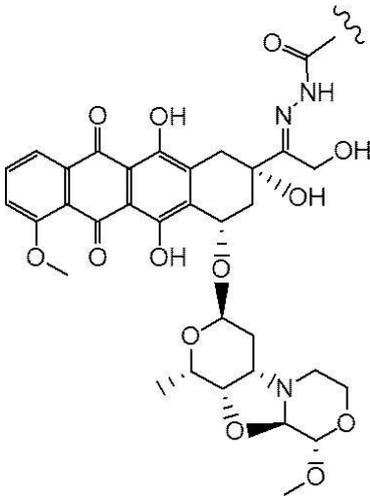
を有する、請求項 21 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 23】

細胞傷害剤がネモルピシン誘導体である、請求項 16 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 24】

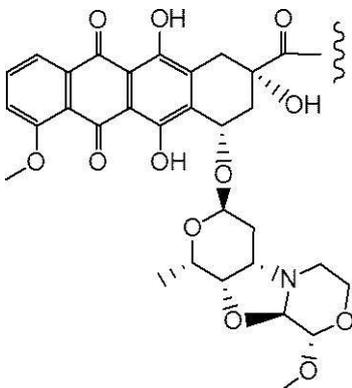
D が



20

30

; 及び



40

から選択される構造を有する、請求項 17 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 25】

リンカーがプロテアーゼによって切断可能である、請求項 17、19、21、22、及び 24 の何れか一項に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 26】

リンカーが val-cit ジペプチド又は Phe-homoLys ジペプチドを含む、請求項 25 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 27】

リンカーが酸不安定性である、請求項 17、19、21、22、及び 24 の何れか一項

50

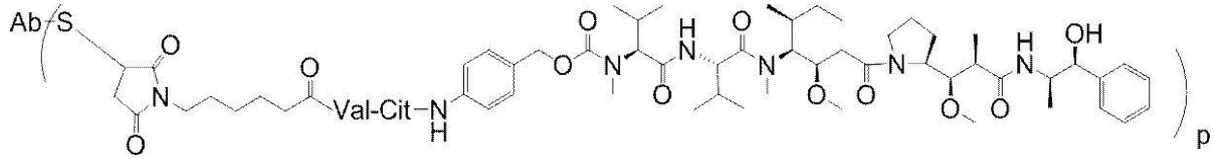
に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 28】

リンカーがヒドラゾンを含む、請求項 27 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 29】

式：

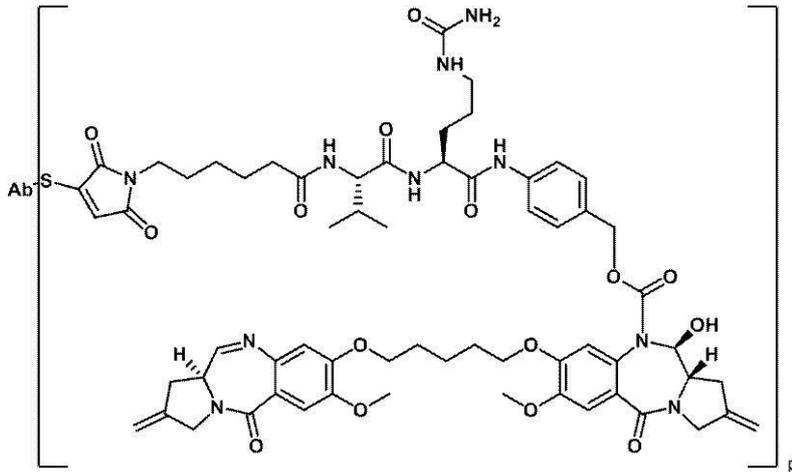


(式中、S は硫黄原子である)

を有する、請求項 17 に記載のイムノコンジュゲート。

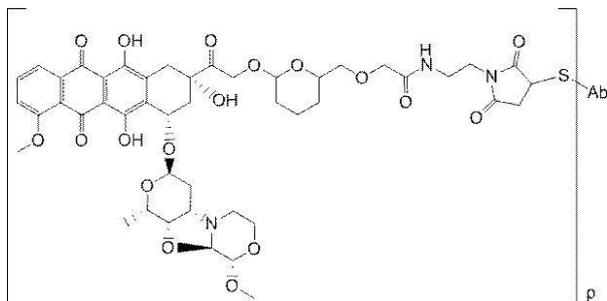
【請求項 30】

式：

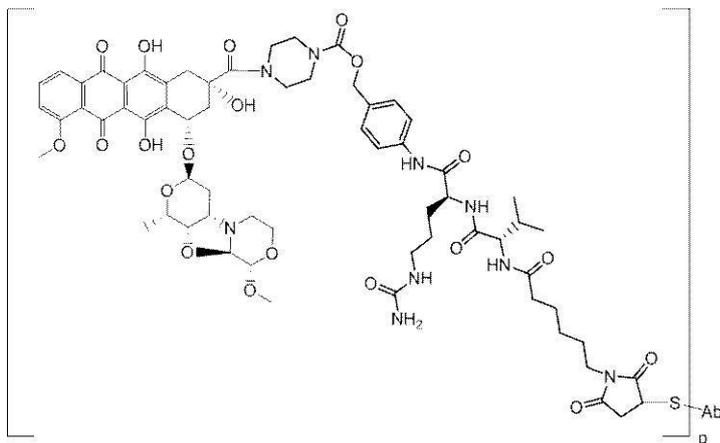


を有する、請求項 17 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 31】



;



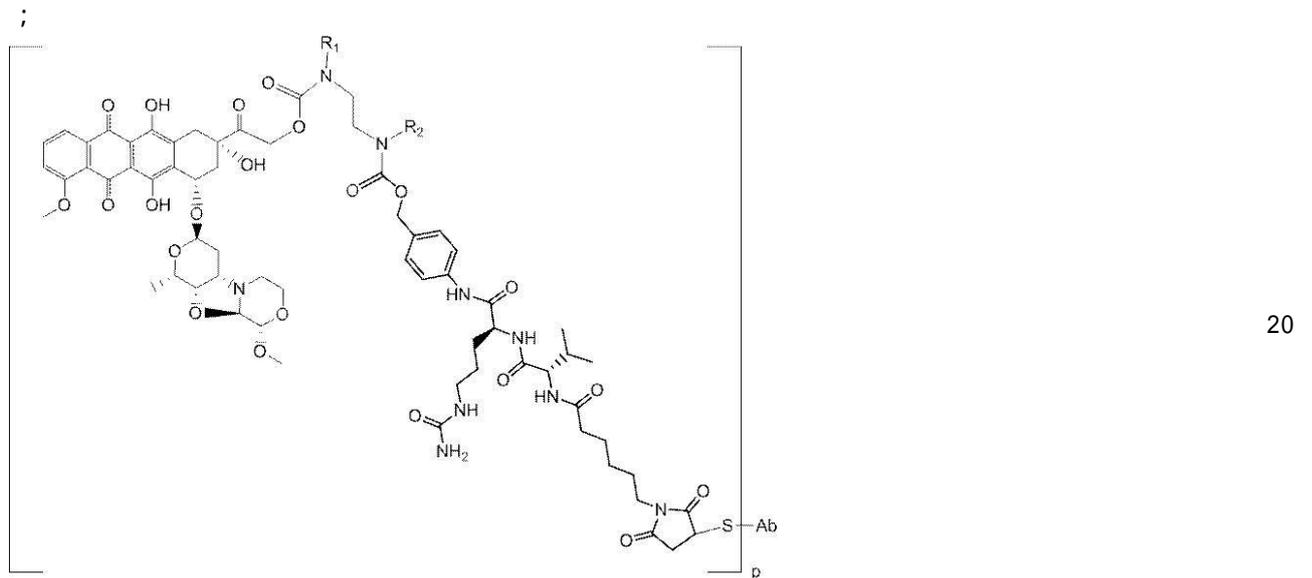
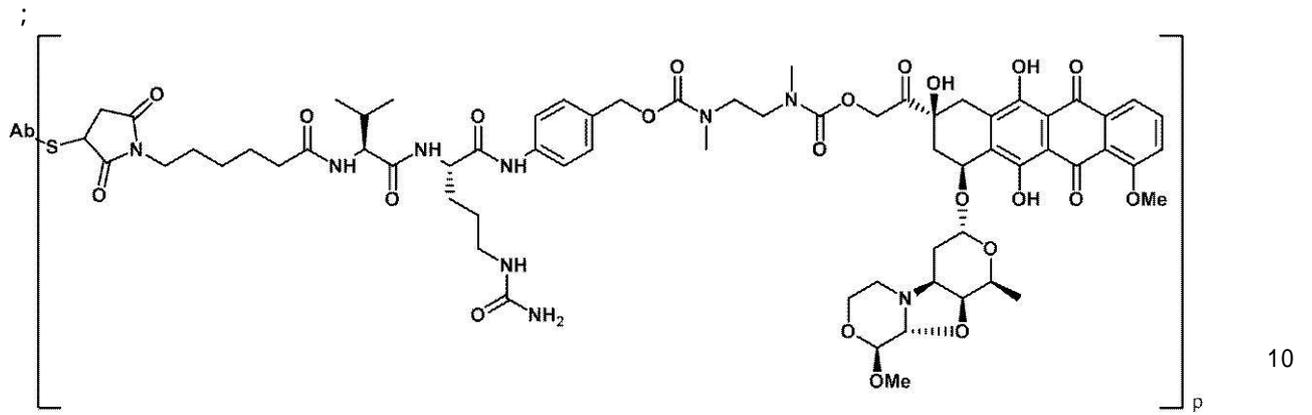
10

20

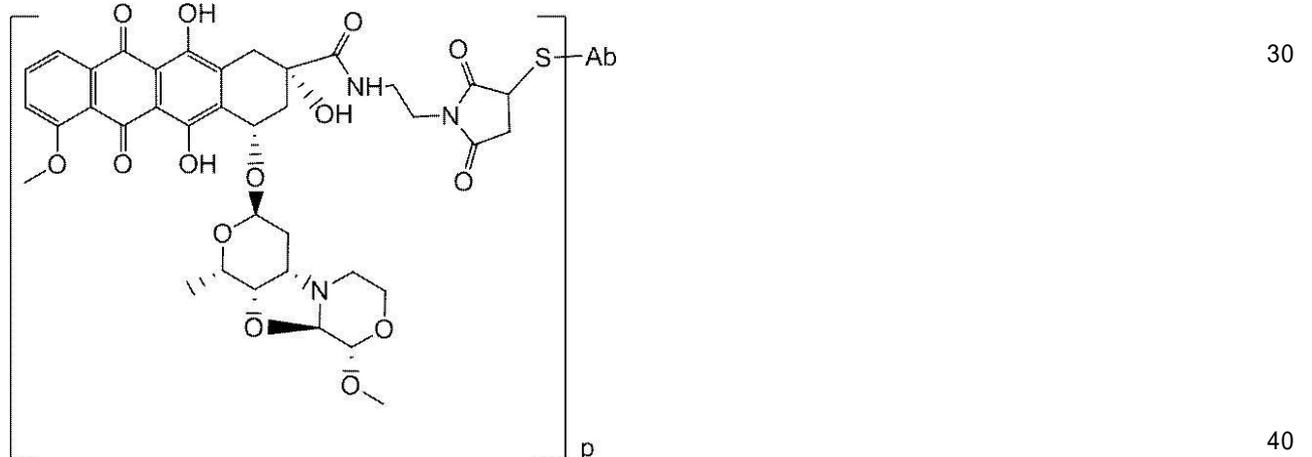
30

40

50



(式中、 R_1 及び R_2 は、独立して、H 及び $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される) ; 及び



から選択される式を有する、請求項 17 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 32】

p が 2 - 5 の範囲である、請求項 17、19、21、22、及び 24 から 31 の何れか一項に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 33】

請求項 11 に記載の抗体を含む、請求項 16 から 32 の何れか一項に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 34】

請求項 16 から 33 の何れか一項に記載のイムノコンジュゲート及び薬学的に許容される担体を含む薬学的製剤。

【請求項 3 5】

追加的な治療剤をさらに含む、請求項 3 4 に記載の薬学的製剤。

【請求項 3 6】

追加的な治療剤がアバスチン（登録商標）（ベバシズマブ）である、請求項 3 5 に記載の薬学的製剤。

【請求項 3 7】

請求項 1 6 から 3 3 の何れか一項に記載の有効量のイムノコンジュゲートを含む、B 7 - H 4 陽性のがんを有する個体を治療するための医薬。

【請求項 3 8】

B 7 - H 4 陽性のがんが、乳がん、卵巣がん、及び子宮内膜がんから選択される、請求項 3 7 に記載の医薬。 10

【請求項 3 9】

追加的な治療剤をさらに含む、請求項 3 8 に記載の医薬。

【請求項 4 0】

追加的な治療剤がアバスチン（登録商標）（ベバシズマブ）である、請求項 3 9 に記載の医薬。

【請求項 4 1】

細胞表面上の B 7 - H 4 へのイムノコンジュゲートの結合が可能な条件下で、請求項 1 6 から 3 3 の何れか一項に記載のイムノコンジュゲートに細胞を曝露し、それによって細胞の増殖を阻害することを含む、B 7 - H 4 陽性細胞の増殖を阻害するインビトロの方法。 20

【請求項 4 2】

細胞が、乳がん細胞、卵巣がん細胞又は子宮内膜がん細胞である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

標識にコンジュゲートされた、請求項 1 から 1 2 の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 4 4】

標識が陽電子放出体である、請求項 4 3 に記載の抗体。

【請求項 4 5】

陽電子放出体が ^{89}Zr である、請求項 4 4 に記載の抗体。 30

【請求項 4 6】

生体試料においてヒト B 7 - H 4 を検出する方法であって、天然に存在するヒト B 7 - H 4 への抗 B 7 - H 4 抗体の結合が可能な条件下で、請求項 1 から 1 2 の何れか一項に記載の抗 B 7 - H 4 抗体に生体試料を接触させること、及び生体試料において、抗 B 7 - H 4 抗体と天然に存在するヒト B 7 - H 4 の間で複合体が形成されているかどうかを検出することを含む方法。

【請求項 4 7】

抗 B 7 - H 4 抗体が請求項 1 1 と同様の抗体である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

生体試料が、乳がん試料、卵巣がん試料、又は子宮内膜がん試料である、請求項 4 6 又は 4 7 に記載の方法。 40

【請求項 4 9】

B 7 - H 4 陽性のがんを検出するための方法であって、請求項 1 から 1 2 の何れか一項に記載の抗 B 7 - H 4 抗体を含む標識抗 B 7 - H 4 抗体が投与された被検体において、標識抗 B 7 - H 4 抗体を検出することを含み、標識抗 B 7 - H 4 抗体の検出が被検体の B 7 - H 4 陽性のがんを示す方法。

【請求項 5 0】

標識抗 B 7 - H 4 抗体が、標識された請求項 1 1 と同様の抗体である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

標識抗 B 7 - H 4 抗体が陽電子放出体にコンジュゲートされた抗 B 7 - H 4 抗体を含む、請求項 4 9 又は 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

陽電子放出体が ^{89}Zr である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

B 7 - H 4 陽性のがんを検出するためのキットであって、請求項 1 から 1 2 の何れか一項に記載の抗 B 7 - H 4 抗体を含む標識抗 B 7 - H 4 抗体を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

関連出願とのクロスリファレンス

本出願は、それぞれがすべての目的のためにその全内容が本明細書に参照により援用される、2013年3月14日に提出された米国特許仮出願第61/784877号、2013年3月14日に提出された米国特許仮出願第61/785811号及び2013年9月5日に提出された米国特許仮出願第61/874175号の優先権の利益を主張する。

【0002】

本発明は、抗 B 7 - H 4 抗体及びイムノコンジュゲート並びにそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

20

B 7 - H 4 は、I 型膜貫通タンパク質であり、T 細胞受容体抗原性シグナルと連動して共シグナルを提供するタンパク質の B 7 スーパーファミリーの一員である。B 7 - H 4 は、T 細胞機能の負の制御因子であり、T 細胞の連結は、それらの増殖、サイトカイン分泌及び細胞傷害性を阻害する。マウスにおける B 7 - H 4 の排除は、免疫細胞恒常性に影響せず、自己免疫の兆候がない。Zhuら、Blood、113(8):1759-1767(2009); Suhら、Molecular and Cellular Biology、26(17):6403-6411(2006)。B 7 - H 4 についての受容体は知られておらず、同定されていない。

【0004】

ヒト B 7 - H 4 は、282 アミノ酸タンパク質（アミノ末端シグナル配列を含む）であり、そのうち ~ 227 アミノ酸は、アミノ末端シグナル配列の切断の後に細胞外空間にあると予測される。B 7 - H 4 は、Ig 様 V ドメイン、Ig 様 C ドメイン、膜貫通ドメイン及び短い細胞質尾部を含む。

30

【0005】

がんのような B 7 - H 4 付随状態を診断及び治療するために、B 7 - H 4 を標的にする薬剤に対する要求が当該技術分野で存在する。本発明は、その要求を満たし、他の利点も提供する。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、抗 B 7 - H 4 抗体及びイムノコンジュゲート並びにそれらの使用方法に関する。

40

【0007】

幾つかの実施態様では、B 7 - H 4 に結合する単離抗体が提供される。幾つかの実施態様では、抗体は、B 7 - H 4 に結合し、少なくとも1つの以下の特性：(a) B 7 - H 4 Ig - V 含有ドメイン（配列番号73のアミノ酸29 - 157）の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は B 7 - H 4 Ig - C 含有ドメイン（配列番号73のアミノ酸158 - 250）の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は B 7 - H 4 Ig - V 及び Ig - C ドメイン（配列番号73のアミノ酸29 - 250）の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号74（成熟ヒト B 7 - H 4）の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号73（前駆体ヒト B 7

50

- H 4) の全体若しくは一部分内のエピトープに結合する特性を有する。幾つかの実施態様では、抗体は、50 nM の親和性で B 7 - H 4 に結合する。幾つかの実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体である。幾つかの実施態様では、抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体である。幾つかの実施態様では、抗体は、I g G 1 抗体、I g G 2 a 抗体又は I g G 2 b 抗体である。幾つかの実施態様では、抗体は、B 7 - H 4 に結合する抗体断片である。幾つかの実施態様では、B 7 - H 4 は、配列番号 7 3 の配列を有するヒト B 7 - H 4 である。

【 0 0 0 8 】

幾つかの実施態様では、抗体は、(a) (i) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(i i) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び (i i i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、又は (b) (i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(i i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び (i i i) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、又は (c) (i) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(i i) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び (i i i) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、又は (d) (i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(i i) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び (i i i) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、又は (e) (i) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(i i) 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び (i i i) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、又は (f) (i) 配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び (i i i) 配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を含む。

【 0 0 0 9 】

幾つかの実施態様では、抗体は、(a) (i) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (c) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、又は (b) (i) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (c) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、又は (c) (i) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (c) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、又は (d) (i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (c) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、又は (e) (i) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (c) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、又は (f) (i) 配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (c) 配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。

【 0 0 1 0 】

幾つかの実施態様では、抗体は、配列番号 5 1、5 2 又は 5 3 の重鎖フレームワーク F R 3 配列をさらに含む。

【 0 0 1 1 】

幾つかの実施態様では、抗体は、(a) (i) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (b) (i) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (c) (i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (d) (i) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む H V R

10

20

30

40

50

- L 3、又は (e) (i) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (f) (i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 をさらに含む。

【 0 0 1 2 】

幾つかの実施態様では、抗体は、(a) (i) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (b) (i) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (c) (i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (d) (i) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (e) (i) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (f) (i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 をさらに含む。

【 0 0 1 3 】

幾つかの実施態様では、抗体は、配列番号 6 5 若しくは 6 6 の軽鎖フレームワーク F R 2 配列又は配列番号 4 7 の軽鎖フレームワーク F R 3 配列をさらに含む。

【 0 0 1 4 】

幾つかの実施態様では、単離抗体 (a) 配列番号 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、又は (b) 配列番号 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、又は (c) (a) と同様の V H 配列及び (b) と同様の V L 配列、又は (d) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、又は (e) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、又は (f) (d) と同様の V H 配列及び (e) と同様の V L 配列、又は (g) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、又は (h) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、又は (i) (g) と同様の V H 配列及び (h) と同様の V L 配列、又は (j) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、又は (k) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、又は (l) (j) と同様の V H 配列及び (k) と同様の V L 配列、又は (m) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、又は (n) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、又は (o) (m) と同様の V H 配列及び (n) と同様の V L 配列、又は (p) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、又は (q) (p) と同様の V H 配列及び (n) と同様の V L 配列、又は (r) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、又は (s) (r) と同様の V H 配列及び (n) と同様の V L 配列、又は (t) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、又は (u) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、又は (v) (t) と同様の V H 配列及び (v) と同様の V L 配列、又は (w) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、又は (x) (t) と同様の V H 配列及び (w) と同様の V L 配列。

【 0 0 1 5 】

幾つかの実施態様では、抗体は、配列番号 4 の V H 配列、配列番号 1 2 の V H 配列、配

10

20

30

40

50

列番号 20 の V H 配列、配列番号 4、28 の V H 配列、配列番号 36 の V H 配列、配列番号 37 の V H 配列、配列番号 38 の V H 配列又は配列番号 56 の V H 配列を含む。

【0016】

幾つかの実施態様では、抗体は、配列番号 3 の V L 配列、配列番号 11 の V L 配列、配列番号 19 の V L 配列、配列番号 27 の V L 配列、配列番号 35 の V L 配列、配列番号 55 の V L 配列又は配列番号 57 の V L 配列を含む。

【0017】

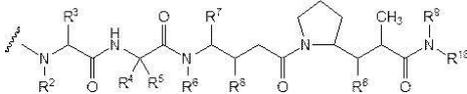
幾つかの実施態様では、単離抗体は、(a) 配列番号 4 の V H 配列及び配列番号 3 の V L 配列、又は (b) 配列番号 20 の V H 配列及び配列番号 19 の V L 配列、又は (c) 配列番号 28 の V H 配列及び配列番号 27 の V L 配列、又は (d) 配列番号 36 の V H 配列及び配列番号 35 の V L 配列、又は (e) 配列番号 37 の V H 配列及び配列番号 35 の V L 配列、又は (f) 配列番号 38 の V H 配列及び配列番号 35 の V L 配列、又は (g) 配列番号 56 の V H 配列及び配列番号 55 の V L 配列、又は (h) 配列番号 56 の V H 配列及び配列番号 57 の V L 配列を含む。

【0018】

幾つかの実施態様では、本明細書に記載の抗体をコードする単離核酸が提供される。幾つかの実施態様では、核酸を含む宿主細胞が提供される。幾つかの実施態様では、本明細書に記載の抗体を産生する方法が提供される。幾つかの実施態様では、方法は、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含む。

【0019】

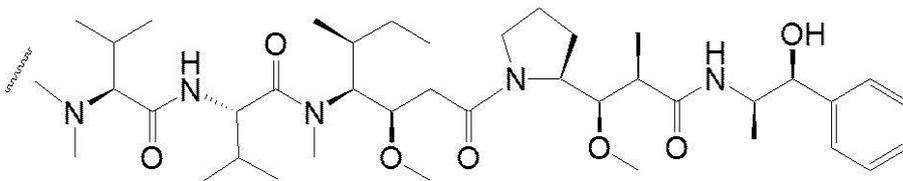
幾つかの実施態様では、イムノコンジュゲートが提供される。幾つかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、抗 B7-H4 抗体と細胞傷害剤とを含む。幾つかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、式 A b - (L - D) p を有し、式中、(a) A b は、本明細書に記載の抗体であり、(b) L は、リンカーであり、(c) D は、メイタンシノイド、オーリスタチン、カリケアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン及びネモルピシン誘導体から選択される薬物であり、(d) p は 1 - 8 の範囲である。幾つかの実施態様では、D は、オーリスタチンである。幾つかのそうした実施態様では、D は、式 D_E :



D_E

(式中、R² 及び R⁶ はそれぞれメチルであり、R³ 及び R⁴ はそれぞれイソプロピルであり、R⁵ は H であり、R⁷ は sec-ブチルであり、各 R⁸ は、CH₃、O-CH₃、OH 及び H から独立して選択され、R⁹ は H であり、R¹⁸ は -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-アリールである)

を有する。幾つかの実施態様では、D は、構造 :



を有する MMAE である。

【0020】

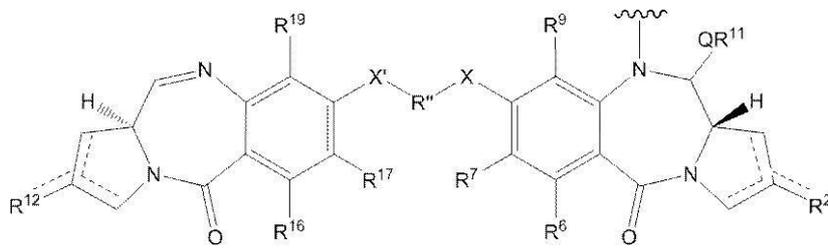
幾つかの実施態様では、D は、
式 A :

10

20

30

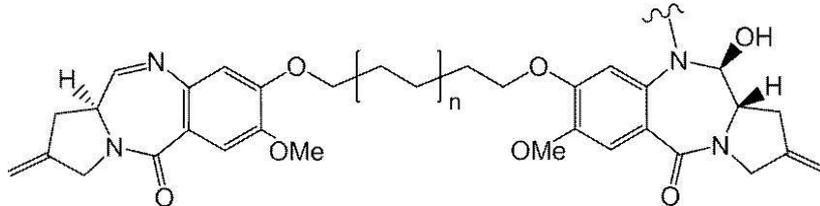
40



A;

のピロロベンゾジアゼピンである。

式中、点線は、C1とC2の間又はC2とC3の間の二重結合の任意選択的な存在を示し、R²は、H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R及びCORから独立して選択され、任意選択的にハロ又はジハロからさらに選択され、R^Dは、R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H及びハロから独立して選択され、R⁶及びR⁹は、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn及びハロから独立して選択され、R⁷は、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn及びハロから独立して選択され、Qは、O、S及びNHから独立して選択され、R¹¹は、H又はRの何れかであり、又は、QがOの場合は、SO₃Mであり、Mは金属カチオンであり、R及びR'は、置換されていてもよいC₁₋₈アルキル、C₁₋₁₂アルキル、C₃₋₈ヘテロシクリル、C₃₋₂₀ヘテロシクリル及びC₅₋₂₀アリール基からそれぞれ独立して選択され、及び任意選択的に、NRR'基に関して、R及びR'は、それらが結合する窒素原子と共に、置換されていてもよい4、5、6又は7員の複素環式環を形成し、R¹²、R¹⁶、R¹⁹及びR¹⁷は、それぞれ、R²、R⁶、R⁹及びR⁷について定義した通りであり、R''は、C₃₋₁₂アルキレン基であり、鎖は、1つ又は複数のヘテロ原子及び/又は置換されていてもよい芳香族環によって離断されてもよく、X及びX'は、O、S及びN(H)から独立して選択される。幾つかのそうした実施態様では、Dは、



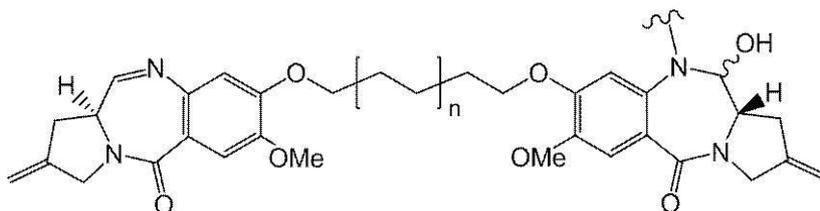
;

(式中、nは0又は1である)

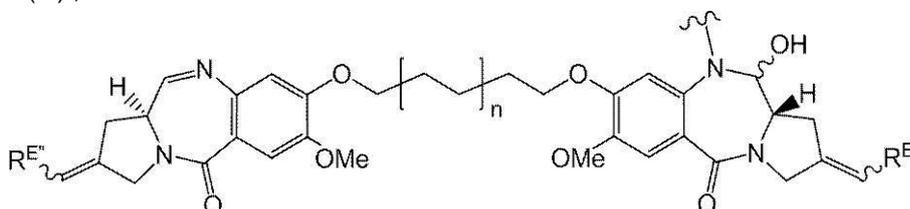
である。

【0021】

幾つかの実施態様では、Dは、



A(I);



10

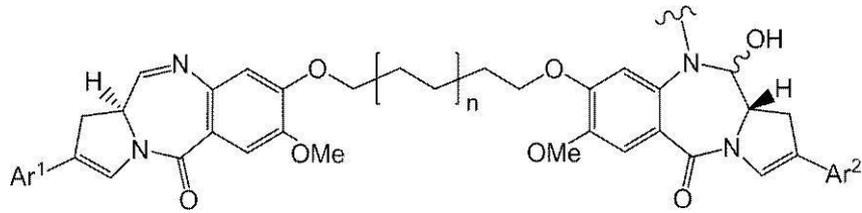
20

30

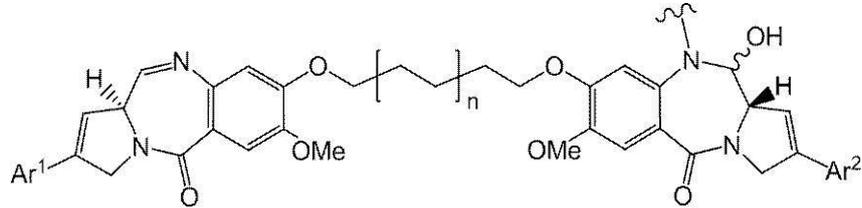
40

50

A(III);



A(IV); 及び



10

A(V);

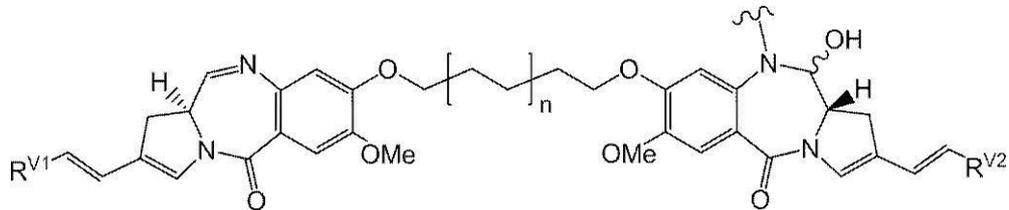
(式中、 R^E 及び $R^{E'}$ は、それぞれ、H又は R^D から独立して選択され、 R^D は、R、 CO_2R 、COR、CHO、 CO_2H 及びハロから独立して選択され、 Ar^1 及び Ar^2 は、それぞれ独立して置換されていてもよい C_{5-20} アリールであり、 n は、0又は1である)

から選択される構造を有するピロロベンゾジアゼピンである。

20

【0022】

幾つかの実施態様では、Dは、式B:



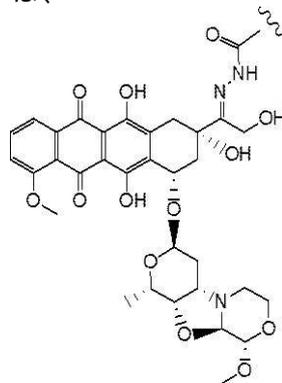
(式中、水平の波線は、リンカーへの共有結合部位を示し、 R^{V1} 及び R^{V2} は、H、メチル、エチル、フェニル、フルオロ置換フェニル及び C_{5-6} ヘテロシクリルから独立して選択され、 n は0又は1である)

30

のピロロベンゾジアゼピンである。

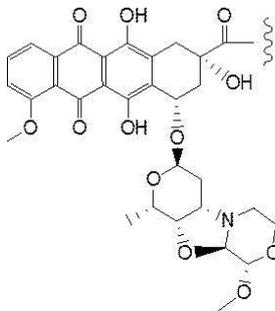
【0023】

幾つかの実施態様では、Dは、ネモルピシン誘導体である。幾つかの実施態様では、Dは、



40

; 及び



から選択される構造を有する。

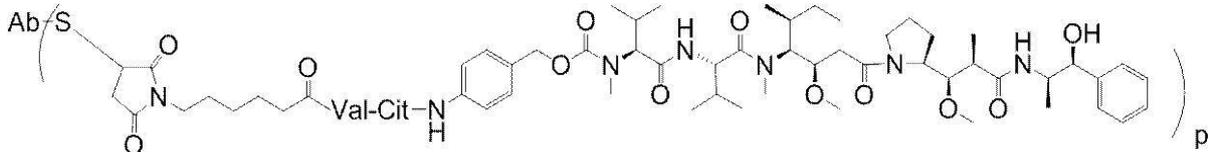
【0024】

10

幾つかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、プロテアーゼによって切断可能なリンカーを含む。幾つかの実施態様では、リンカーは、val-citジペプチド、Phe-Lysジペプチド又はPhe-ホモLysジペプチドを含む。幾つかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、酸不安定性のリンカーを含む。幾つかのそうした実施態様では、リンカーは、ヒドラゾンを含む。

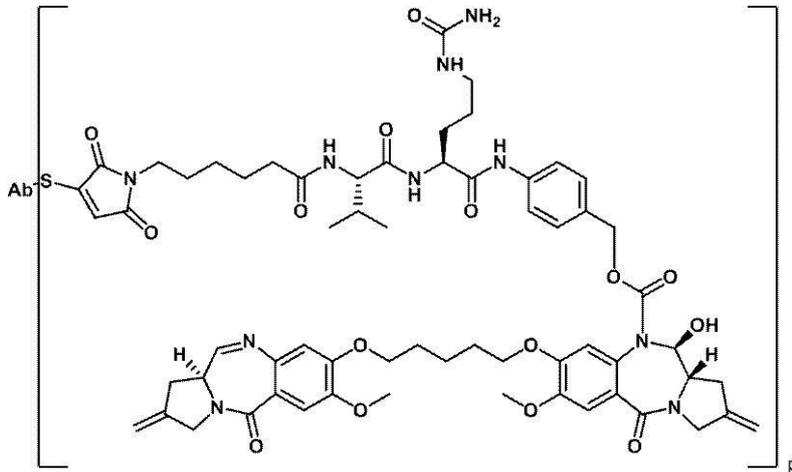
【0025】

幾つかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、以下から選択される式を有する。

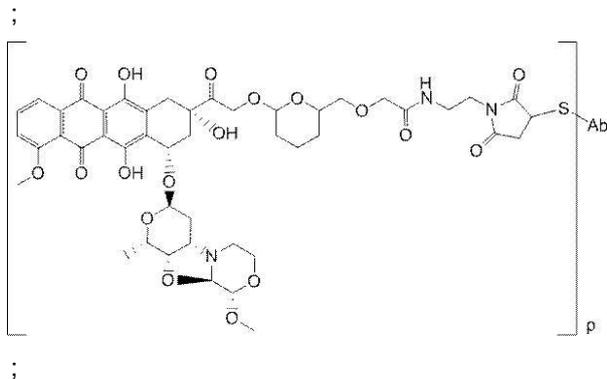


20

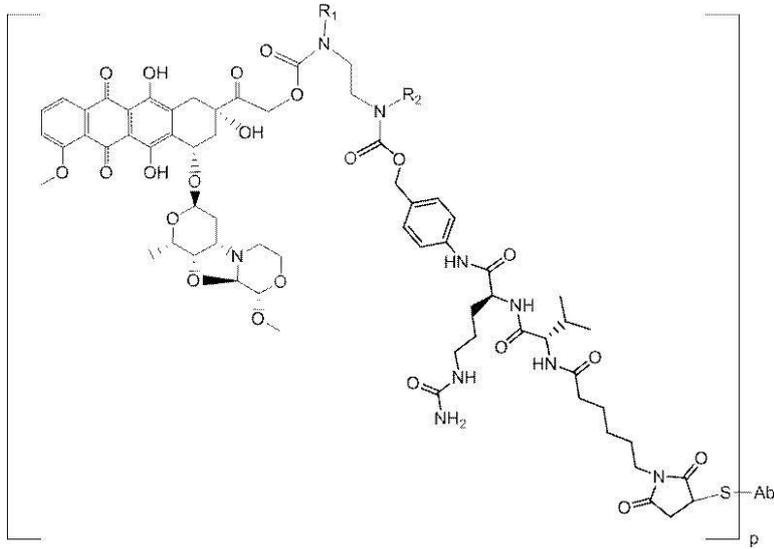
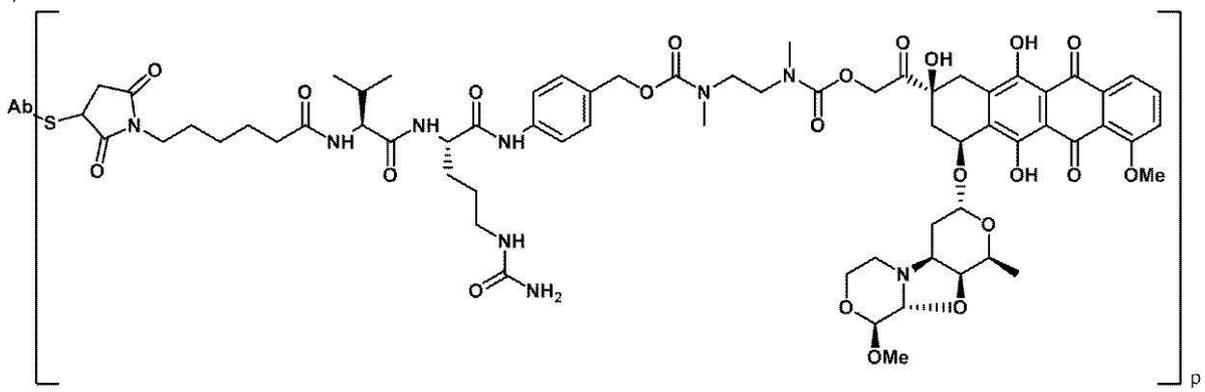
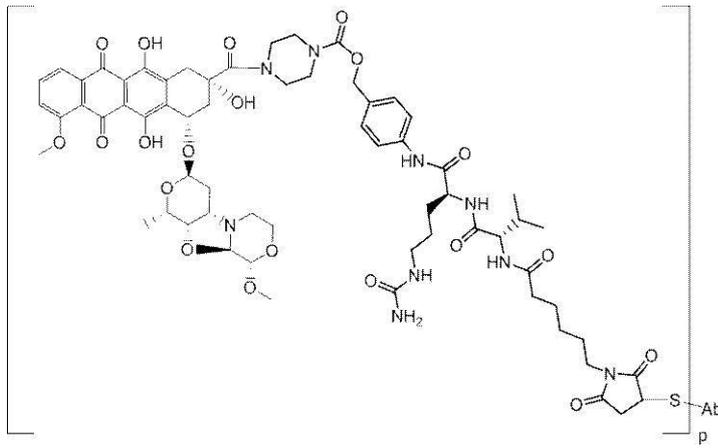
(式中、Sは硫黄原子である)



30



40



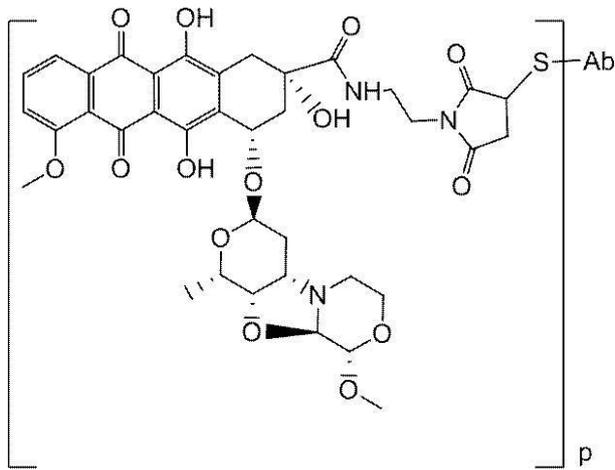
; 及び

10

20

30

40



【 0 0 2 6 】

幾つかの実施態様では、 p は2 - 5の範囲である。

【 0 0 2 7 】

幾つかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、(a) 配列番号 4 の V H 配列及び配列番号 3 の V L 配列、又は (b) 配列番号 2 0 の V H 配列及び配列番号 1 9 の V L 配列、又は (c) 配列番号 2 8 の V H 配列及び配列番号 2 7 の V L 配列、又は (d) 配列番号 3 6 の V H 配列及び配列番号 3 5 の V L 配列、又は (e) 配列番号 3 7 の V H 配列及び配列番号 3 5 の V L 配列、又は (f) 配列番号 3 8 の V H 配列及び配列番号 3 5 の V L 配列、又は (g) 配列番号 5 6 の V H 配列及び配列番号 5 5 の V L 配列、又は (h) 配列番号 5 6 の V H 配列及び配列番号 5 7 の V L 配列を含む抗体を含む。

【 0 0 2 8 】

幾つかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、(a) (i) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (i i i) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(b) (i) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (c) (i) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (i i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) (i) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (e) (i) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (i i i) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(f) (i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (g) (i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (i i i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(h) (i) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (i) (i) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (i i i) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(j) (i) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、又は (k) (i) 配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (i i i) 配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(l) (i) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (i i i) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む抗体を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

幾つかの実施態様では、薬学的製剤が提供される。幾つかのそうした実施態様では、薬学的製剤は、例えば本明細書に記載のように、B7-H4に結合する抗体を含むイムノコンジュゲートを含む。幾つかの実施態様では、薬学的製剤は、追加的な治療剤をさらに含む。幾つかの実施態様では、追加的な治療剤は、アバスチン（登録商標）（ペバシズマブ）である。

【 0 0 3 0 】

幾つかの実施態様では、B7-H4陽性のがんを有する個体を治療する方法が提供される。幾つかのそうした実施態様では、方法は、例えば本明細書に記載のように、B7-H4に結合する抗体を含むイムノコンジュゲートを含む薬学的製剤を投与することを含む。幾つかのそうした実施態様では、方法は、B7-H4の細胞外ドメインに結合する抗体を含むイムノコンジュゲートを含む薬学的製剤を投与することを含む。幾つかの実施態様では、B7-H4陽性のがんは、乳がん、卵巣がん及び子宮内膜がんから選択される。幾つかの実施態様では、方法は、追加的な治療剤を個体に投与することを含む。幾つかのそうした実施態様では、追加的な治療剤は、アバスチン（登録商標）（ペバシズマブ）である。

10

【 0 0 3 1 】

幾つかの実施態様では、B7-H4陽性細胞の増殖を阻害する方法が提供される。幾つかの実施態様では、方法は、細胞表面上のB7-H4へのイムノコンジュゲートの結合が可能な条件下で、B7-H4に結合する抗体を含むイムノコンジュゲートに、細胞を曝露することを含む。幾つかの実施態様では、B7-H4に結合する抗体は、本明細書に記載の抗体である。幾つかの実施態様では、それによって、細胞の増殖が阻害される。幾つかの実施態様では、細胞は、乳がん細胞、卵巣がん細胞又は子宮内膜がん細胞である。

20

【 0 0 3 2 】

幾つかの実施態様では、B7-H4に結合する抗体は、標識にコンジュゲートされている。幾つかの実施態様では、B7-H4に結合する抗体は、本明細書に記載の抗体である。幾つかの実施態様では、標識は陽電子放出体である。幾つかの実施態様では、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。

【 0 0 3 3 】

幾つかの実施態様では、生体試料においてヒトB7-H4を検出する方法が提供される。幾つかの実施態様では、方法は、天然に存在するヒトB7-H4への抗B7-H4抗体の結合が可能な条件下で、生体試料を抗B7-H4抗体に接触させること、及び生体試料において、抗B7-H4抗体と天然に存在するヒトB7-H4との間で複合体が形成されているかどうかを検出することを含む。幾つかの実施態様では、抗B7-H4抗体は、本明細書に記載の抗体である。幾つかの実施態様では、生体試料は、乳がん試料、卵巣がん試料又は子宮内膜がん試料である。

30

【 0 0 3 4 】

幾つかの実施態様では、B7-H4陽性のがんを検出するための方法が提供される。幾つかのそうした実施態様では、方法は、(i) B7-H4陽性のがんを有する又は有することが疑われる被検体に標識された抗B7-H4抗体を投与すること、及び(ii) 被検体において標識された抗B7-H4抗体を検出することを含み、標識された抗B7-H4抗体の検出が、被検体のB7-H4陽性のがんを示す。幾つかの実施態様では、抗B7-H4抗体は、本明細書に記載の抗体である。幾つかのそうした実施態様では、標識された抗B7-H4抗体は、陽電子放出体にコンジュゲートされている抗B7-H4抗体を含む。幾つかの実施態様では、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 5 】

【図1】実施例Aに記載されている、様々な組織におけるヒトB7-H4遺伝子発現のレベルのグラフ図である。

【図2】実施例Bに記載されている、*in situ*ハイブリダイゼーションによる乳癌

50

試料における B 7 - H 4 の発現を示す図である。

【図 3 A - B】実施例 B に記載されている、(A) すべての乳がんサブタイプにおける B 7 - H 4 発現の広まり、(B) 乳がんサブタイプにおける B 7 - H 4 染色の 0、1 +、2 + 及び 3 + レベルの広まりを示す図である。

【図 3 C】実施例 B に記載されている、(C) 乳腺腫瘍における B 7 - H 4 の全体的な発現 (ウェスタン分析による) を示す図である。

【図 3 D】実施例 B に記載されている、(D) 原発性乳腺腫瘍における B 7 - H 4 の発現 (ウェスタン分析による) を示す図である。

【図 3 E】実施例 B に記載されている、(E) 卵巣腫瘍における B 7 - H 4 の発現を示す図である。

10

【図 4】(A) は、実施例に記載されている、開発したある種の抗 B 7 - H 4 モノクローナル抗体の特性を示す図である。(B) は、本明細書に記載の抗 B 7 - H 4 モノクローナル抗体のエピトープグループ化を示す図である。

【図 5】マウス抗体 1 D 1 1、3 2 D 6、9 B 9 及び 2 2 C 1 0 の軽鎖及び重鎖可変領域配列のアライメントを示す図である。

【図 6 - 1】マウス抗体 m u 1 D 1 1 及びそのヒト化変異体の軽鎖可変領域配列のアライメントを示す図である。

【図 6 - 2】マウス抗体 m u 1 D 1 1 及びそのヒト化変異体の軽鎖可変領域配列のアライメントを示す図である。

【図 7 - 1】マウス抗体 m u 1 D 1 1 及びそのヒト化変異体の重鎖可変領域配列のアライメントを示す図である。

20

【図 7 - 2】マウス抗体 m u 1 D 1 1 及びそのヒト化変異体の重鎖可変領域配列のアライメントを示す図である。

【図 8 - 1】マウス抗体 m u 2 2 C 1 0 及びそのヒト化変異体の軽鎖可変領域配列を示す図である。

【図 8 - 2】マウス抗体 m u 2 2 C 1 0 及びそのヒト化変異体の軽鎖可変領域配列を示す図である。

【図 9 - 1】マウス抗体 m u 2 2 C 1 0 及びそのヒト化変異体の重鎖可変領域配列を示す図である。

【図 9 - 2】マウス抗体 m u 2 2 C 1 0 及びそのヒト化変異体の重鎖可変領域配列を示す図である。

30

【図 1 0】ヒト、チンパンジー、カニクイザル、ラット、及びマウスからの B 7 - H 4 のアライメントを示す図である。

【図 1 1】抗 B 7 - H 4 抗体の種交差反応性を示す図である。

【図 1 2】キメラ抗体 c h 1 D 1 1 及び c h 2 2 C 1 0 並びに様々なヒト化変異体の親和性測定値を示す図である。

【図 1 3】S K - B R 3 細胞における抗 B 7 - H 4 9 B 9 抗体についての染色と E G F 染色とのオーバーラップにより示される、抗 B 7 - H 4 抗体の内部移行を示す図である。

【図 1 4】抗 B 7 - H 4 抗体が M X - 1 のリソソームに達することができることを示す図である。

40

【図 1 5】抗 B 7 - H 4 イムノコンジュゲートが M X - 1 乳がん異種移植における有効性を示すことを示す図である。

【図 1 6】抗 B 7 - H 4 イムノコンジュゲートが H B C X - 2 4 乳がん異種移植における有効性を示すことを示す図である。

【図 1 7】抗 B 7 - H 4 イムノコンジュゲートが M X - 1 乳がん異種移植における有効性を示すことを示す図である。

【図 1 8】抗 B 7 - H 4 イムノコンジュゲートが M X - 1 乳がん異種移植における有効性を示すことを示す図である。

【図 1 9】(A) F A C S 及び免疫組織化学による H C C - 1 5 6 9 x 2 乳がん異種移植での B 7 - H 4 の発現、並びに (B) 抗 B 7 - H 4 イムノコンジュゲートが H C C - 1 5

50

69 × 2 乳がん異種移植における有効性を示すことを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0036】

I. 定義

本明細書において、「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下で定義するように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン(VL)フレームワーク又は重鎖可変ドメイン(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、それらの同じアミノ酸配列を含んでいてもよいし、アミノ酸配列変化を含んでいてもよい。幾つかの実施態様では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。幾つかの実施態様では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

10

【0037】

「親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)の間の非共有相互作用を合計した力を指す。別途指示がない限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合ペアのメンバー(例えば抗体と抗原)の間の1:1の相互作用を反映する、固有の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数(Kd)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載のものを含めた、当該技術分野で知られている慣用法によって測定することができる。結合親和性の測定に関する具体的な例示的及び代表的な実施態様を以下に記載する。

20

【0038】

「親和性成熟」抗体は、変更を有さない親抗体と比較して、1つ又は複数の超可変領域(HVR)中に1つ又は複数の変更を有し、そうした変更が抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす、抗体を指す。

【0039】

用語「抗B7-H4抗体」及び「B7-H4に結合する抗体」は、抗体が、B7-H4のターゲティングにおいて、診断剤及び/又は治療剤として有用であるように、十分な親和性を有してB7-H4を結合することができる抗体を指す。一実施態様では、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)によって測定される無関係の非B7-H4タンパク質への抗B7-H4抗体の結合の程度は、B7-H4に対する抗体の結合の約10%未満である。ある種の実施態様では、B7-H4に結合する抗体は、1µM、100nM、10nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.1nM、0.01nM、又は0.001nM(例えば10⁻⁸M以下、例えば10⁻⁸Mから10⁻¹³M、例えば10⁻⁹Mから10⁻¹³M)の解離定数(Kd)を有する。ある種の実施態様では、抗B7-H4抗体は、様々な種のB7-H4の間で保存されている、B7-H4のエピトープに結合する。

30

【0040】

用語「抗体」は、本明細書で広義で使用され、これらに限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)及び抗体断片を含めた様々な抗体構造を、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、包含する。

40

【0041】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部を含み、インタクトな抗体が結合する抗原に結合する、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、これらに限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;ダイアボディ;直鎖状抗体;単鎖抗体分子(例えばscFv);及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。

【0042】

基準抗体として「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、その抗

50

原への基準抗体の結合を50%以上ブロックする抗体を指し、逆に、競合アッセイにおいて、基準抗体は、その抗原への抗体の結合を50%以上ブロックする。例示的な競合アッセイを本明細書で提供する。

【0043】

用語「がん」及び「癌性」は、典型的には無秩序な細胞成長/増殖で特徴づけられる、哺乳動物の生理的条件を指すか又は説明する。がんの例としては、これらに限定されないが、カルシノーマ、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫及び白血病が挙げられる。そうしたがんのより特定の例としては、扁平上皮がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜がん、肝細胞がん、胃腸がん、膵臓がん、神経膠腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、肝がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝臓癌、白血病及び他のリンパ増殖性障害、並びに様々なタイプの頭頸部がんが含まれる。

10

【0044】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部は特定の供給源又は種に由来するが、重鎖及び/又は軽鎖の残部は異なる供給源又は種に由来する抗体を指す。

【0045】

抗体の「クラス」は、抗体の重鎖が有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の5つの主要なクラス、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂にさらに分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに相当する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 κ 、 λ 、 μ 及び δ と呼ばれる。

20

【0046】

本明細書で使用する場合、用語「細胞傷害剤」は、細胞機能を阻害若しくは妨害する及び/又は細胞死若しくは細胞破壊を引き起こす物質を指す。細胞傷害剤としては、これらに限定されないが、放射性同位元素（例えば、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及びLuの放射性同位元素）；化学療法剤又は化学療法薬（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ピンカルカロイド（ピンクリスチン、ピンプラスチン、エトポシド）、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシン又は他の挿入剤）；成長阻害剤；酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素；抗生物質；毒素、例えば、細菌、真菌、植物又は動物起源の小分子毒素又は酵素的に活性な毒素（それらの断片及び/又は変異体を含む）；並びに以下に開示する様々な抗腫瘍性又は抗がん性の薬剤が挙げられる。

30

【0047】

「エフェクター機能」は、抗体アイソタイプによって異なる、抗体のFc領域に起因し得る生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）、食作用、細胞表面受容体（例えばB細胞受容体）の下方制御、並びにB細胞活性化が挙げられる。

40

【0048】

薬剤、例えば薬学的製剤の「有効量」は、所望の治療的又は予防的な結果を達成するのに必要な投薬量及び期間での有効な量を指す。

【0049】

用語「エピトープ」は、抗体が結合する、抗原分子上の特定の部位を指す。

【0050】

本明細書では、用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するのに使用される。この用語には、天然配列Fc領域及び変異Fc領域が含まれる。一実施態様では、ヒトIgG重鎖のFc領域は、Cys226又はPro230から重鎖のカルボキシル末端まで延びる。しかし、Fc領域のC末端リジン

50

(Lys 447)は、存在しても、存在しなくてもよい。本明細書で別途断りのない限り、Fc領域又は定常領域のアミノ酸残基の番号付けは、Kabataら、Sequence of Proteins of Immunological Interest、第5版Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD、1991に記載されているような、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。

【0051】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に、4つのFRドメイン、すなわちFR1、FR2、FR3及びFR4から成る。したがって、HVR配列及びFR配列は、一般に、VH (又はVL)中の次の配列、FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4に出現する。

10

【0052】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」は、本明細書では、互換的に使用されて、天然の抗体構造と実質的に類似している構造を有する、又は本明細書で定義したFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

【0053】

用語「グリコシル化された形態のB7-H4」は、炭水化物残基の付加により翻訳後修飾された天然に存在する形態のB7-H4を指す。

20

【0054】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養物」は、互換的に使用されて、外来性の核酸が導入された細胞(そうした細胞の後代を含む)を指す。宿主細胞には、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれ、これには、初代形質転換細胞、及び継代数とは関係なく、それに由来する後代が含まれる。後代は、核酸の含有量が親細胞と完全に同一でなくてもよく、変異を含んでいてもよい。元の形質転換細胞においてスクリーニング又は選択されたものと同じ機能又は生物活性を有する変異後代は、本明細書に含まれる。

【0055】

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生される、又はヒト抗体レパトリー若しくは他のヒト抗体をコードする配列を利用する非ヒトの供給源に由来する抗体のものに対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体の本定義は、非ヒトの抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

30

【0056】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVL又はVHのフレームワーク配列の選択において、最も一般的に存在するアミノ酸残基に相当するフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからである。一般に、配列のサブグループは、Kabataら、Sequence of Proteins of Immunological Interest、第5版、NIH Publication 91-3242、Bethesda MD(1991)、1-3巻と同様のサブグループである。一実施態様では、VLについては、サブグループは、上述のKabataらと同様のサブグループカッパIである。一実施態様では、VHについては、サブグループは、上述のKabataらと同様のサブグループIIIである。

40

【0057】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基及びヒトFR由来のアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。ある種の実施態様では、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、及び典型的には2つの可変ドメインのすべてを実質的に含み、すべて又は実質的にすべてのHVR(例えばCDR)は、非ヒト抗体のものに対応し、すべて又は実質的にすべてのFRは、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意選択的に、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでいてもよい。抗体、例えば非ヒト抗体の「ヒト化形態

50

」は、ヒト化された抗体を指す。

【0058】

本明細書で使用する場合、用語「超可変領域」又は「HVR」は、配列が超可変性である、及び/又は構造的に定められたループ(「超可変ループ」)を形成する、各抗体可変ドメイン領域を指す。一般に、天然の4鎖抗体は、6つのHVR、すなわちVH中の3つ(H1、H2、H3)及びVL中の3つ(L1、L2、L3)を含む。HVRは、一般に、超可変ループ由来及び/又は「相補性決定領域」(CDR)由来のアミノ酸残基を含み、後者は、配列変動性が最も高く、及び/又は抗原の認識に關与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3)で生じる(Chothia 及びLesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。例示的なCDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3)は、L1の24-34、L2の50-56、L3の89-97、H1の31-35B、H2の50-65及びH3の95-102のアミノ酸残基で生じる(Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。VH中のCDR1を除いては、CDRは、一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRは、抗原と接触する残基である、「特異性決定残基」又は「SDR」も含む。SDRは、短縮CDR又はa-CDRと呼ばれるCDR領域内に含まれる。例示的なa-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2及びa-CDR-H3)は、アミノ酸残基L1の31-34、L2の50-55、L3の89-96、H1の31-35B、H2の50-58及びH3の95-102で生じる(Almagro及びFransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008))を参照されたい)。別途指示がない限り、可変ドメインのHVR残基及び他の残基(例えばFR残基)は、本明細書では、上述のKabatらに従って番号付けする。

10

20

【0059】

「イムノコンジュゲート」は、これに限定されないが、細胞傷害剤を含めた、1つ又は複数の異種分子(複数可)にコンジュゲートされた抗体である。

【0060】

「個体」又は「被検体」は哺乳動物である。哺乳動物としては、これらに限定されないが、家畜(例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ)、霊長類(例えば、ヒト及びサルなどの非ヒト霊長類)、ウサギ及びげっ歯類(例えば、マウス及びラット)が挙げられる。ある種の実施態様では、個体又は被検体はヒトである。

30

【0061】

「単離抗体」は、その天然環境の構成成分から分離された抗体である。幾つかの実施態様では、抗体は、例えば電気泳動(例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動(IEF)、キャピラリー電気泳動)又はクロマトグラフィー(例えば、イオン交換又は逆相HPLC)によって測定した時に95%を越える又は99%の純度に精製される。抗体純度の評価方法の総説については、例えば、Flatmanら、J. Chromatogr. B 848:79-87(2007)を参照されたい。

40

【0062】

「単離核酸」は、その天然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離核酸としては、核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子が挙げられるが、核酸分子は、染色体外に、又はその天然の染色体上の位置とは異なる染色体上の位置にも存在する。

【0063】

「抗B7-H4抗体をコードする単離核酸」は、抗体の軽鎖及び重鎖(又はその断片)をコードする1種又は複数の核酸分子を指す。これには、単一のベクター又は別々のベクター中のそうした核酸分子(複数可)が含まれ、そうした核酸分子(複数可)は、宿主細胞の1か所又は複数の位置に存在する。

【0064】

50

本明細書で使用する場合、用語「B7-H4」は、細胞におけるB7-H4の前駆体タンパク質のプロセッシングによって生じる、任意の天然の成熟B7-H4を指す。この用語には、別途指示がない限り、霊長類（例えば、ヒト及びカニクイザル）などの哺乳動物並びにげっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含めた任意の脊椎動物供給源由来のB7-H4が含まれる。この用語には、天然に存在するB7-H4の変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体も含まれる。シグナル配列を有する（シグナル配列のアミノ酸1-28を有する）例示的ヒトB7-H4前駆体タンパク質のアミノ酸配列を、配列番号73に示す。例示的成熟ヒトB7-H4のアミノ酸配列を、配列番号74に示す。例示のカニクイザルB7-H4前駆体（シグナル配列のアミノ酸1-28を有する）の推定配列及び成熟配列を、それぞれ配列番号75及び76に示す。例示的ラットB7-H4前駆体（シグナル配列のアミノ酸1-28を有する）及び成熟配列のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号77及び78に示す。例示のマウスB7-H4前駆体（シグナル配列のアミノ酸1-28を有する）及び成熟配列のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号79及び80に示す。例示的チンパンジーB7-H4前駆体（シグナル配列のアミノ酸1-24を有する）及び成熟配列のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号81及び82に示す。

10

【0065】

用語「B7-H4陽性のがん」は、その表面でB7-H4を発現する細胞を含むがんを指す。幾つかの実施態様では、細胞表面でのB7-H4の発現は、例えば、免疫組織化学、FACSなどのような方法においてB7-H4に対する抗体を使用して決定する。あるいは、B7-H4 mRNA発現は、細胞表面でのB7-H4発現と相関すると考えられ、*in situ*ハイブリダイゼーション及びRT-PCR（定量的RT-PCRを含む）から選択される方法によって測定できる。

20

【0066】

用語「B7-H4陽性細胞」は、その表面にB7-H4を発現する細胞を指す。

【0067】

本明細書で使用する場合、用語「モノクローナル抗体」は、例えば天然に存在する変異を含む又はモノクローナル抗体調製物の産生の間に生じる、あり得る変異体抗体（そうした変異体は、一般に少量存在している）を除いては、実質的に均一な抗体の集団（すなわち、集団を構成する個々の抗体が同一である及び/又は同じエピトープに結合する）から得られる抗体を指す。様々な決定基（エピトープ）に対する様々な抗体を典型的には含むポリクローナル抗体調製物と対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原の単一決定基に対するものである。したがって、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られたという抗体の性質を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきでない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、これらに限定されないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン座の全体又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含めた種々の手法によって作製することができ、モノクローナル抗体を作製するためのそうした方法及び他の例示的方法是、本明細書に記載されている。

30

【0068】

「裸抗体」は、異種部分（例えば細胞傷害性部分）又は放射標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。裸抗体は、薬学的製剤に存在してもよい。

40

【0069】

「天然の抗体」は、多様な構造を有する、天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然のIgG抗体は、ジスルフィド結合した2つの同一の軽鎖及び2つの同一の重鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）、続いて3つの定常ドメイン（CH1、CH2及びCH3）を有する。同様にN末端からC末端に、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）、続いて定常軽鎖（CL）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常

50

ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()及びラムダ()と呼ばれる2つのタイプのうちの1つに帰属させることができる。

【0070】

用語「添付文書」は、治療用製品の商業的なパッケージに慣例上含まれ、そうした治療用製品の使用に関する、適応症、用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌及び/又は注意についての情報を含む、説明書を指すのに使用される。

【0071】

基準ポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、配列を整列させ、必要に応じて最大の配列同一性パーセントを得るためにギャップを導入した後の、いかなる保存的置換も配列同一性の一部としてみなさない、基準ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、当該技術分野の範囲内の様々な方法で、例えば、公的に利用可能なコンピュータソフトウェア、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNA STAR)ソフトウェアを使用して、達成することができる。当業者なら、比較する配列の完全長にわたる最大のアライメントを得るために必要とされる任意のアルゴリズムを含めて、配列を整列させるための適切なパラメーターを決定することができる。しかし、本明細書においては、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.によって作製され、ソースコードは、米国著作権庁、Washington D.C.、20559に使用者用書類と共に提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc.、South San Francisco、Californiaから公的に利用可能であり、又はソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、使用するために、デジタルUNIX V4.0Dを含めたUNIXオペレーティングシステムでコンパイルする必要がある。すべての配列比較パラメーターはALIGN-2プログラムによって設定され、変更しない。

【0072】

ALIGN-2をアミノ酸配列の比較に用いる場合は、所与のアミノ酸配列Bへの、所与のアミノ酸配列Bとの、又は所与のアミノ酸配列Bに対する所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性%(あるいはこれは、所与のアミノ酸配列Bへの、所与のアミノ酸配列Bとの、又は所与のアミノ酸配列Bに対する特定のアミノ酸配列同一性%を有する又は含む所与のアミノ酸配列Aと表現することができる)は、以下のように計算される：

分数 X/Y の100倍

式中、Xは、AとBのプログラムのアライメントにおいて、配列アライメントプログラムALIGN-2によって、同一一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bのアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さが、アミノ酸配列Bの長さに等しくない場合は、BへのAのアミノ酸配列同一性%は、AへのBのアミノ酸配列同一性%に等しくないであろうことが理解されよう。特に具体的に明記しない限り、本明細書で使用されるすべてのアミノ酸配列同一性%値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して、直前の段落に記載されているように得られる。

【0073】

用語「薬学的製剤」は、その中に含まれる活性成分の生物活性を有効にするような形態であって、製剤を投与することになる被検体にとって許容されない毒性を有する追加的な構成成分を含まない調製物を指す。

【0074】

「薬学的に許容される担体」は、被検体に非中毒性である、薬学的製剤中の活性成分以外の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、これらに限定はされないが、バッファー、賦形剤、安定化剤又は防腐剤が挙げられる。

【0075】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する場合、「治療」（及び「治療する」又は「治療すること」などのその文法的バリエーション）は、治療される個体の自然経過を変化させようとする臨床的介入を指し、予防のため又は臨床病理の過程において行うことができる。治療の望ましい作用としては、これらに限定されないが、疾患の出現又は再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接又は間接的な病理学的帰結の低減、転移の予防、疾患進行速度の低下、病態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善が挙げられる。幾つかの実施態様では、本発明の抗体は、疾患の発生を遅延させる又は疾患の進行を遅らせるために使用される。

【0076】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に参与する、抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖（それぞれVH及びVL）の可変ドメインは、一般に、各ドメインが、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）及び3つの超可変領域（HVR）を含む、類似した構造を有する（例えば、Kindtら、Kuby Immunology第6版、W.H.Freeman and Co.、p 91 (2007)を参照されたい）。単一のVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、抗原に結合する抗体由来のVH又はVLドメインを使用して、それぞれ相補的なVL又はVHドメインのライブラリーをスクリーニングし、特定の抗原を結合する抗体を単離することができる。例えば、Portolanoら、J. Immunol. 150: 880 - 887 (1993); Clarksonら、Nature 352: 624 - 628 (1991)を参照されたい。

【0077】

本明細書で使用する場合、用語「ベクター」は、それに結合した別の核酸を伝搬することができる核酸分子を指す。この用語には、自己複製核酸構造物としてのベクター及びそれが導入されている宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターが含まれる。ある種のベクターは、動作可能に連結された核酸の発現を指令することができる。そうしたベクターを、本明細書では、「発現ベクター」と称する。

【0078】

「アルキル」は、ノルマル、第2級、第3級又は環状の炭素原子を含むC₁ - C₁₈炭化水素である。例は、メチル（Me、-CH₃）、エチル（Et、-CH₂CH₃）、1-プロピル（n-Pr、n-プロピル、-CH₂CH₂CH₃）、2-プロピル（i-Pr、i-プロピル、-CH(CH₃)₂）、1-ブチル（n-Bu、n-ブチル、-CH₂CH₂CH₂CH₃）、2-メチル-1-プロピル（i-Bu、i-ブチル、-CH₂CH(CH₃)₂）、2-ブチル（s-Bu、s-ブチル、-CH(CH₃)CH₂CH₃）、2-メチル-2-プロピル（t-Bu、t-ブチル、-C(CH₃)₃）、1-ペンチル（n-ペンチル、-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃）、2-ペンチル（-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃）、3-ペンチル（-CH(CH₂CH₃)₂）、2-メチル-2-ブチル（-C(CH₃)₂CH₂CH₃）、3-メチル-2-ブチル（-CH(CH₃)CH(CH₃)₂）、3-メチル-1-ブチル（-CH₂CH₂CH(CH₃)₂）、2-メチル-1-ブチル（-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃）、1-ヘキシル（-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃）、2-ヘキシル（-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃）、3-ヘキシル（-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)）、2-メチル-2-ペンチル（-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃）、3-メチル-2-ペンチル（-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃）、4-メチル-2-ペンチル（-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂）、3-メチル-3-ペンチル（-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂）、2-メチル-3-ペンチル（-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂）、2,3-ジメチル-2-ブチル（-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂）、3,3-ジメチル-2-ブチル（-CH(CH₃)C(CH₃)₃）である。

【0079】

本明細書で使用する場合、用語「C₁ - C₈アルキル」は、1から8個の炭素原子を有する、直鎖又は分枝の、飽和又は不飽和の炭化水素を指す。代表的な「C₁ - C₈アルキル」基としては、これらに限定されないが、-メチル、-エチル、-n-プロピル、-n

- ブチル、- n - ペンチル、- n - ヘキシル、- n - ヘプチル、- n - オクチル、- n - ノニル及び- n - デシルが挙げられ、一方で、分枝 $C_1 - C_8$ アルキルとしては、これらに限定されないが、- イソプロピル、- sec - ブチル、- イソブチル、- tert - ブチル、- イソペンチル、2 - メチルブチルが挙げられ、不飽和 $C_1 - C_8$ アルキルとしては、これらに限定されないが、- ビニル、- アリル、- 1 - ブテニル、- 2 - ブテニル、- イソブチレニル、- 1 - ペンテニル、- 2 - ペンテニル、- 3 - メチル - 1 - ブテニル、- 2 - メチル - 2 - ブテニル、- 2, 3 - ジメチル - 2 - ブテニル、1 - ヘキシル、2 - ヘキシル、3 - ヘキシル、- アセチレニル、- プロピニル、- 1 - ブチニル、- 2 - ブチニル、- 1 - ペンチニル、- 2 - ペンチニル、- 3 - メチル - 1 - ブチニルが挙げられる。 $C_1 - C_8$ アルキル基は、未置換でもよいし、これらに限定されないが、- $C_1 - C_8$ アルキル、- O - ($C_1 - C_8$ アルキル)、- アリール、- C(O)R'、- OC(O)R'、- C(O)OR'、- C(O)NH₂、- C(O)NHR'、- C(O)N(R')₂ - NHC(O)R'、- SO₃R'、- S(O)₂R'、- S(O)R'、- OH、- ハロゲン、- N₃、- NH₂、- NH(R')、- N(R')₂及び- CN(式中、各R'は、H、- $C_1 - C_8$ アルキル及びアリールから独立して選択される)を含めた、1つ又は複数の基で置換されていてもよい。

10

【0080】

本明細書で使用する場合、用語「 $C_1 - C_{12}$ アルキル」は、1から12個の炭素原子を有する、直鎖又は分枝の、飽和又は不飽和の炭化水素を指す。 $C_1 - C_{12}$ アルキル基は、未置換でもよいし、これらに限定されないが、- $C_1 - C_8$ アルキル、- O - ($C_1 - C_8$ アルキル)、- アリール、- C(O)R'、- OC(O)R'、- C(O)OR'、- C(O)NH₂、- C(O)NHR'、- C(O)N(R')₂ - NHC(O)R'、- SO₃R'、- S(O)₂R'、- S(O)R'、- OH、- ハロゲン、- N₃、- NH₂、- NH(R')、- N(R')₂及び- CN(式中、各R'は、H、- $C_1 - C_8$ アルキル及びアリールから独立して選択される)を含めた、1つ又は複数の基で置換されていてもよい。

20

【0081】

本明細書で使用する場合、用語「 $C_1 - C_6$ アルキル」は、1から6個の炭素原子を有する、直鎖又は分枝の、飽和又は不飽和の炭化水素を指す。代表的な「 $C_1 - C_6$ アルキル」基としては、これらに限定されないが、- メチル、- エチル、- n - プロピル、- n - ブチル、- n - ペンチル及び- n - ヘキシルが挙げられ、一方で、分枝 $C_1 - C_6$ アルキルとしては、これらに限定されないが、- イソプロピル、- sec - ブチル、- イソブチル、- tert - ブチル、- イソペンチル及び2 - メチルブチルが挙げられ、不飽和 $C_1 - C_6$ アルキルとしては、これらに限定されないが、- ビニル、- アリル、- 1 - ブテニル、- 2 - ブテニル、及び- イソブチレニル、- 1 - ペンテニル、- 2 - ペンテニル、- 3 - メチル - 1 - ブテニル、- 2 - メチル - 2 - ブテニル、- 2, 3 - ジメチル - 2 - ブテニル、1 - ヘキシル、2 - ヘキシル、及び3 - ヘキシルが挙げられる。 $C_1 - C_6$ アルキル基は、 $C_1 - C_8$ アルキル基について上で述べるように、未置換でもよいし、1つ又は複数の基で置換されていてもよい。

30

【0082】

本明細書で使用する場合、用語「 $C_1 - C_4$ アルキル」は、1から4個の炭素原子を有する、直鎖又は分枝の、飽和又は不飽和の炭化水素を指す。代表的な「 $C_1 - C_4$ アルキル」基としては、これらに限定されないが、- メチル、- エチル、- n - プロピル、- n - ブチルが挙げられ、一方で、分枝 $C_1 - C_4$ アルキルとしては、これらに限定されないが、- イソプロピル、- sec - ブチル、- イソブチル、- tert - ブチルが挙げられ、不飽和 $C_1 - C_4$ アルキルとしては、これらに限定されないが、- ビニル、- アリル、- 1 - ブテニル、- 2 - ブテニル及び- イソブチレニルが挙げられる。 $C_1 - C_4$ アルキル基は、 $C_1 - C_8$ アルキル基について上で述べるように、未置換でもよいし、1つ又は複数の基で置換されていてもよい。

40

【0083】

50

「アルコキシ」は、酸素に単結合したアルキル基である。例示的アルコキシ基としては、これらに限定されないが、メトキシ(-OCH₃)及びエトキシ(-OCH₂CH₃)が挙げられる。「C₁-C₅アルコキシ」は、1から5個の炭素原子を有するアルコキシ基である。アルコキシ基は、アルキル基について上で述べたように、未置換でもよいし、1つ又は複数の基で置換されていてもよい。

【0084】

「アルケニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち炭素-炭素、sp²二重結合を有する、ノルマル、第2級、第3級又は環状の炭素原子を含む、C₂-C₁₈炭化水素である。例としては、これらに限定されないが、エチレン又はビニル(-CH=CH₂)、アリル(-CH₂CH=CH₂)、シクロペンテニル(-C₅H₇)及び5-ヘキセニル(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH=CH₂)が挙げられる。「C₂-C₈アルケニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち炭素-炭素、sp²二重結合を有する、2から8個のノルマル、第2級、第3級又は環状の炭素原子を含む、炭化水素である。

10

【0085】

「アルキニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち炭素-炭素、sp三重結合を有する、ノルマル、第2級、第3級又は環状の炭素原子を含む、C₂-C₁₈炭化水素である。例としては、これらに限定されないが、アセチレン(-C≡CH)及びプロパルギル(-CH₂C≡CH)が挙げられる。「C₂-C₈アルキニル」は、少なくとも1つの不飽和部位、すなわち炭素-炭素、sp三重結合を有する、2から8個のノルマル、第2級、第3級又は環状の炭素原子を含む、炭化水素である。

20

【0086】

「アルキレン」は、飽和した、分枝又は直鎖又は環状の、1-18個の炭素原子の炭化水素基であって、親アルカンの同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を除去することによって得られる一価のラジカル中心を2つ有する炭化水素基を指す。典型的なアルキレン基としては、これらに限定されないが、メチレン(-CH₂-)1,2-エチル(-CH₂CH₂-)、1,3-プロピル(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-ブチル(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)などが挙げられる。

【0087】

「C₁-C₁₀アルキレン」は、式-(CH₂)₁₋₁₀-の直鎖の飽和炭化水素基である。C₁-C₁₀アルキレンの例としては、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オシチレン(ocytylene)、ノニレン及びデカレンが挙げられる。

30

【0088】

「アルケニレン」は、不飽和の、分枝又は直鎖又は環状の、2-18個の炭素原子の炭化水素基であって、親アルケンの同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を除去することによって得られる一価のラジカル中心を2つ有する炭化水素基を指す。典型的なアルケニレン基としては、これに限定されないが、1,2-エチレン(-CH=CH-)が挙げられる。

【0089】

「アルキニレン」は、不飽和の、分枝又は直鎖又は環状の、2-18個の炭素原子の炭化水素基であって、親アルキンの同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を除去することによって得られる一価のラジカル中心を2つ有する炭化水素基を指す。典型的なアルキニレン基としては、これらに限定されないが、アセチレン(-C≡C-)、プロパルギル(-CH₂C≡C-)及び4-ペンチニル(-CH₂CH₂CH₂C≡C-)が挙げられる。

40

【0090】

「アリール」は、炭素環式芳香族基を指す。アリール基の例としては、これらに限定されないが、フェニル、ナフチル及びアントラセニルが挙げられる。炭素環式芳香族基又は複素環式芳香族基は、未置換でもよいし、これらに限定されないが、-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、

50

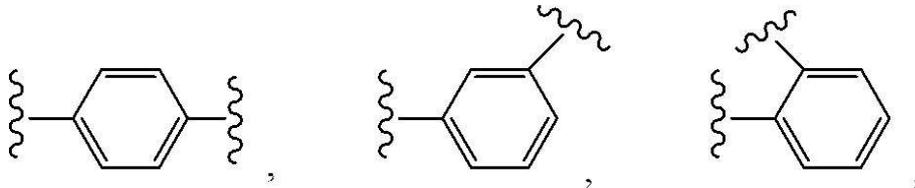
- C(O)OR'、- C(O)NH₂、- C(O)NHR'、- C(O)N(R')₂ - NHC(O)R'、- S(O)₂R'、- S(O)R'、- OH、- ハロゲン、- N₃、- NH₂、- NH(R')、- N(R')₂ 及び - CN (式中、各 R' は、H、- C₁ - C₈ アルキル及びアリールから独立して選択される) を含めた 1 つ又は複数の基で置換されていてもよい。

【0091】

「C₅ - C₂₀ アリール」は、炭素環式芳香族環中に 5 から 20 個の炭素原子を有するアリール基である。C₅ - C₂₀ アリール基の例としては、これらに限定されないが、フェニル、ナフチル及びアントラセニルが挙げられる。C₅ - C₂₀ アリール基は、アリール基について上で述べたように、置換されているも、未置換でもよい。「C₅ - C₁₄ アリール」は、炭素環式芳香族環中に 5 から 14 個の炭素原子を有するアリール基である。C₅ - C₁₄ アリール基の例としては、これらに限定されないが、フェニル、ナフチル及びアントラセニルが挙げられる。C₅ - C₁₄ アリール基は、アリール基について上で述べたように、置換されているも、未置換でもよい。

【0092】

「アリーレン」は、共有結合を 2 つ有するアリール基であり、以下の構造：



で示すように、オルソ、メタ又はパラ配置で存在することができ、

フェニル基は、未置換でもよいし、これらに限定されないが、- C₁ - C₈ アルキル、- O - (C₁ - C₈ アルキル)、- アリール、- C(O)R'、- OC(O)R'、- C(O)OR'、- C(O)NH₂、- C(O)NHR'、- C(O)N(R')₂ - NHC(O)R'、- S(O)₂R'、- S(O)R'、- OH、- ハロゲン、- N₃、- NH₂、- NH(R')、- N(R')₂ 及び - CN (式中、各 R' は、H、- C₁ - C₈ アルキル及びアリールから独立して選択される) を含めた 4 つまでの基で置換されていてもよい。

【0093】

「アリーラルキル」は、炭素原子、典型的には末端又は s p³ 炭素原子に結合した水素原子の 1 つがアリール基で置き換えられている、非環式のアルキル基を指す。典型的なアリーラルキル基としては、これらに限定されないが、ベンジル、2 - フェニルエタン - 1 - イル、2 - フェニルエテン - 1 - イル、ナフチルメチル、2 - ナフチルエタン - 1 - イル、2 - ナフチルエテン - 1 - イル、ナフトベンジル、2 - ナフトフェニルエタン - 1 - イルなどが挙げられる。アリーラルキル基は 6 から 20 個の炭素原子を含み、例えば、アリーラルキル基 (アルカニル、アルケニル又はアルキニル基を含む) のアルキル部分、は、1 から 6 個の炭素原子であり、アリール部分は 5 から 14 個の炭素原子である。

【0094】

「ヘテロアリーラルキル」は、炭素原子、典型的には末端又は s p³ 炭素原子に結合した水素原子の 1 つがヘテロアリール基で置き換えられている、非環式のアルキル基を指す。典型的なヘテロアリーラルキル基は、これらに限定されないが、2 - ベンズイミダゾリルメチル、2 - フリルエチルなどが挙げられる。ヘテロアリーラルキル基は、6 から 20 個の炭素原子を含み、例えば、ヘテロアリーラルキル基 (アルカニル、アルケニル又はアルキニル基を含む) のアルキル部分は 1 から 6 個の炭素原子であり、ヘテロアリール部分は、5 から 14 個の炭素原子、並びに N、O、P 及び S から選択される 1 から 3 個のヘテロ原子である。ヘテロアリーラルキル基のヘテロアリール部分は、3 から 7 環員 (2 から 6 個の炭素原子) を有する単環でもよいし、7 から 10 環員 (4 から 9 個の炭

10

20

30

40

50

素原子並びにN、O、P及びSから選択される1から3個のヘテロ原子)を有する二環でもよく、例えば、ピシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]又は[6,6]系でもよい。

【0095】

「置換されたアルキル」、「置換されたアリール」、及び「置換されたアリールアルキル」は、1つ又は複数の水素原子が、それぞれ独立して置換基で置き換えられた、アルキル、アリール及びアリールアルキルをそれぞれ意味する。典型的な置換基としては、これらに限定されないが、 $-X$ 、 $-R$ 、 $-O^-$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-S^-$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR_3$ 、 $=NR$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-N=C=O$ 、 $-NCS$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $NC(=O)R$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)NR_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_3H$ 、 $-S(=O)_2R$ 、 $-OS(=O)_2OR$ 、 $-S(=O)_2NR$ 、 $-S(=O)R$ 、 $-OP(=O)(OR)_2$ 、 $-P(=O)(OR)_2$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)X$ 、 $-C(=S)R$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-C(=S)OR$ 、 $-C(=O)SR$ 、 $-C(=S)SR$ 、 $-C(=O)NR_2$ 、 $-C(=S)NR_2$ 、 $-C(=NR)NR_2$ が挙げられ、式中、各Xは独立して、ハロゲン：F、Cl、Br又はIであり、各Rは独立して、 $-H$ 、 C_2-C_{18} アルキル、 C_6-C_{20} アリール、 C_3-C_{14} 複素環、保護基又はプロドラッグ部分である。上記のアルキレン、アルケニレン及びアルキニレン基も、同様に置換されていてもよい。

10

【0096】

「ヘテロアリール」及び「複素環」は、1つ又は複数の環原子がヘテロ原子、例えば、窒素、酸素及び硫黄である環系を指す。複素環基は、3から20個の炭素原子並びにN、O、P及びSから選択される1から3個のヘテロ原子を含む。複素環は、3から7環員(2から6個の炭素原子並びにN、O、P及びSから選択される1から3個のヘテロ原子)を有する単環でもよいし、7から10環員(4から9個の炭素原子並びにN、O、P及びSから選択される1から3個のヘテロ原子)を有する二環でもよく、例えば、ピシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]又は[6,6]系でもよい。

20

【0097】

例示的な複素環は、例えば、Paquette, Leo A., 「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W. A. Benjamin, New York, 1968)、特に1、3、4、6、7及び9章；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950年から現在まで)、特に13、14、16、19及び28巻；並びにJ. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566に記載されている。

30

【0098】

複素環の例としては、限定ではなく例として、ピリジル、ジヒドロピリジル(dihydropyridyl)、テトラヒドロピリジル(ピペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、硫黄酸化テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、bis-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、bis-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾシニル、トリアジニル、6H-1,2,5-チアアジアジニル、2H,6H-1,5,2-ジチアジアジニル、チエニル、チアントレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサントニル、フェノキサチニル(phenoxathinylyl)、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-インダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、

40

50

キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテリジニル、4 a H - カルバゾリル、カルバゾリル、 β -カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナンスロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシインドリル、ベンゾオキサゾリニル、及びイサチノイルが挙げられる。

【0099】

限定ではなく例として、炭素結合複素環は、ピリジンの2、3、4、5若しくは6位、ピリダジンの3、4、5若しくは6位、ピリミジンの2、4、5若しくは6位、ピラジンの2、3、5若しくは6位、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフエン、ピロール若しくはテトラヒドロピロールの2、3、4若しくは5位、オキサゾール、イミダゾール若しくはチアゾールの2、4、若しくは5位、イソオキサゾール、ピラゾール若しくはイソチアゾールの3、4、若しくは5位、アジリジンの2若しくは3位、アゼチジンの2、3若しくは4位、キノリンの2、3、4、5、6、7若しくは8位、又はイソキノリンの1、3、4、5、6、7若しくは8位で結合する。さらにより典型的には、炭素結合複素環としては、2 - ピリジル、3 - ピリジル、4 - ピリジル、5 - ピリジル、6 - ピリジル、3 - ピリダジニル、4 - ピリダジニル、5 - ピリダジニル、6 - ピリダジニル、2 - ピリミジニル、4 - ピリミジニル、5 - ピリミジニル、6 - ピリミジニル、2 - ピラジニル、3 - ピラジニル、5 - ピラジニル、6 - ピラジニル、2 - チアゾリル、4 - チアゾリル又は5 - チアゾリルが挙げられる。

【0100】

限定ではなく例として、窒素結合複素環は、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、2 - ピロリン、3 - ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2 - イミダゾリン、3 - イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2 - ピラゾリン、3 - ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、1 H - インダゾールの1位、イソインドール又はイソインドリンの2位、モルホリンの4位、及びカルバゾール又は β -カルボリンの9位で結合する。さらにより典型的には、窒素結合複素環としては、1 - アジリジル、1 - アゼテジル、1 - ピロリル、1 - イミダゾリル、1 - ピラゾリル及び1 - ピペリジニルが挙げられる。

【0101】

「 $C_3 - C_8$ 複素環」は、1から4個の環炭素原子が、O、S及びNから成る群からのヘテロ原子に独立して置き換えられている芳香族又は非芳香族の $C_3 - C_8$ 炭素環を指す。 $C_3 - C_8$ 複素環の代表的な例としては、これらに限定されないが、ベンゾフラニル、ベンゾチオフエン、インドリル、ベンゾピラゾリル、クマリニル、イソキノリニル、ピロリル、チオフエニル、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、ピリミジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル及びテトラゾリルが挙げられる。 $C_3 - C_8$ 複素環は、未置換でもよいし、これらに限定されないが、 $-C_1 - C_8$ アルキル、 $-O - (C_1 - C_8$ アルキル)、 $-アリアル$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2 - NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 及び $-CN$ (式中、各 R' は、 H 、 $-C_1 - C_8$ アルキル及びアリアルから独立して選択される)を含めた7個までの基で置換されていてもよい。

【0102】

「 $C_3 - C_8$ ヘテロシクロ」は、複素環基の水素原子の1つが結合で置き換えられている、上記で定義した $C_3 - C_8$ 複素環基を指す。 $C_3 - C_8$ ヘテロシクロは、未置換でもよいし、これらに限定されないが、 $-C_1 - C_8$ アルキル、 $-O - (C_1 - C_8$ アルキル)、 $-アリアル$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2 - NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2$

10

20

30

40

50

R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂及び-CN(式中、各R'は、H、-C₁-C₈アルキル及びアリアルから独立して選択される)を含めた6個までの基で置換されていてもよい。

【0103】

「C₃-C₂₀複素環」は、1から4個の環炭素原子がO、S及びNから成る群からのヘテロ原子で独立して置き換えられている、芳香族又は非芳香族のC₃-C₈炭素環を指す。C₃-C₂₀複素環は、未置換でもよいし、これらに限定されないが、-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-アリアル、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂-NHC(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂及び-CN(式中、各R'は、H、-C₁-C₈アルキル及びアリアルから独立して選択される)を含めた7個までの基で置換されていてもよい。

10

【0104】

「C₃-C₂₀ヘテロシクロ」は、複素環基の水素原子の1つが結合で置き換えられている、上記で定義したC₃-C₂₀複素環基を指す。

【0105】

「炭素環」は、単環として3から7個の炭素原子、又は二環として7から12個の炭素原子を有する、飽和環又は不飽和環を意味する。単環式炭素環は、3から6個の環原子、さらにより典型的には5又は6個の環原子を有する。二環式炭素環は、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]若しくは[6,6]系として配置された7から12個の環原子、又はビシクロ[5,6]若しくは[6,6]系として配置された9若しくは10個の環原子を有する。単環式炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペンタ-1-エニル、1-シクロペンタ-2-エニル、1-シクロペンタ-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキサ-1-エニル、1-シクロヘキサ-2-エニル、1-シクロヘキサ-3-エニル、シクロヘブチル及びシクロオクチルが挙げられる。

20

【0106】

「C₃-C₈炭素環」は、3、4、5、6、7又は8員の飽和又は不飽和の非芳香族炭素環である。代表的なC₃-C₈炭素環は、これらに限定されないが、-シクロプロピル、-シクロブチル、-シクロペンチル、-シクロペンタジエニル、-シクロヘキシル、-シクロヘキセニル、-1,3-シクロヘキサジエニル、-1,4-シクロヘキサジエニル、-シクロヘブチル、-1,3-シクロヘプタジエニル、-1,3,5-シクロヘプタトリエニル、-シクロオクチル及び-シクロオクタジエニルが挙げられる。C₃-C₈炭素環基は、未置換でもよいし、これらに限定されないが、-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-アリアル、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂-NHC(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-ハロゲン、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂及び-CN(式中、各R'は、H、-C₁-C₈アルキル及びアリアルから独立して選択される)を含めた1つ又は複数の基で置換されていてもよい。

30

40

【0107】

「C₃-C₈カルボシクロ」は、炭素環基の水素原子の1つが結合で置き換えられている、上記で定義したC₃-C₈炭素環基を指す。

【0108】

「リンカー」は、薬物部分に抗体を共有結合させる共有結合又は原子鎖を含む化学物質部分を指す。様々な実施態様では、リンカーは、2価の基、例えばアルキルジイル、アリアルジイル、ヘテロアリアルジイル、部分、例えば-(CR₂)_nO(CR₂)_n-、アルキルオキシ(例えばポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ)及びアルキルアミノ(例えばポリエチレンアミノ、Jeffamine(商標))の反復単位;並びに

50

コハク酸エステル、スクシニアミド、ジグリコールエステル、マロン酸エステル及びカプロアミドを含めた、二酸エステル及びアミドを含む。様々な実施態様では、リンカーは、バリン、フェニルアラニン、リジン及びホモリジンなどの1つ又は複数のアミノ酸残基を含むことができる。

【0109】

用語「キラル」は、鏡像パートナーの重ね合わせができない特性を有する分子を指し、一方で用語「アキラル」は、その鏡像パートナーに重ね合わせることができる分子を指す。

【0110】

用語「立体異性体」は、同一の化学構造を有するが、原子又は基の空間配置に関して異なる化合物を指す。

10

【0111】

「ジアステレオマー」は、2つ以上のキラリティー中心を有し、その分子が互いの鏡像でない立体異性体を指す。ジアステレオマーは、様々な物理的特性、例えば、融点、沸点、スペクトル特性及び反応性を有する。ジアステレオマー混合物は、電気泳動及びクロマトグラフィーなどの高分解能の分析法の下で分離することができる。

【0112】

「光学異性体」は、互いに重ね合わせることができない鏡像である、化合物の2つの立体異性体を指す。

【0113】

20

本明細書で使用する立体化学の定義及び慣例は、一般に、S. P. Parker 編、McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 並びに Eliel, E. 及び Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York に従う。多くの有機化合物は、光学的活性型で存在し、すなわちこれらは、平面偏光面を回転させる能力を有する。光学的活性化合物の記載では、接頭辞 D 及び L 又は R 及び S は、そのキラル中心（複数可）に関する分子の絶対配置を表示するのに使用される。接頭辞 d 及び l 又は (+) 及び (-) は、化合物による平面偏光の回転の徴候を示すのに用いられ、(-) 又は l は、化合物が左旋性であることを意味する。(+) 又は d が前に付けられた化合物は、右旋性である。所与の化学構造について、これらの立体異性体は、これらが互いの鏡像であることを除いては、同一である。特定の立体異性体は、光学異性体と称される場合もあり、そうした異性体の混合物は、光学異性混合物と呼ばれることが多い。光学異性体の 50 : 50 混合物は、ラセミ混合物又はラセミ体と称され、これは、化学反応又は化学過程において立体選択又は立体特異性がなかった場合に生じ得る。用語「ラセミ混合物」及び「ラセミ体」は、光学活性のない2つの光学異性体種の等モル混合物を指す。

30

【0114】

「脱離基」は、別の官能基によって置換され得る官能基を指す。ある種の脱離基は当該技術分野でよく知られており、例としては、これらに限定されないが、ハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物）、メタンスルホニル（メシル）、p-トルエンスルホニル（トシル）、トリフルオロメチルスルホニル（トリフレート）及びトリフルオロメチルスルホネートが挙げられる。

40

【0115】

用語「保護基」は、化合物の他の官能基を反応させている間、特定の官能基性をブロック又は保護するのに一般に用いられる置換基を指す。例えば、「アミノ保護基」は、化合物のアミノ官能基性をブロック又は保護する、アミノ基に結合した置換基である。適切なアミノ保護基としては、これらに限定されないが、アセチル、トリフルオロアセチル、t-ブトキシカルボニル（BOC）、ベンジルオキシカルボニル（CBZ）及び9-フルオレニルメチレンオキシカルボニル（Fmoc）が挙げられる。保護基及びその使用の概説

50

については、T. W. Greene、Protective Groups in Organic Synthesis、John Wiley & Sons、New York、1991又はそれ以降の版を参照されたい。

【0116】

II. 組成物及び方法

一態様では、本発明は、B7-H4に結合する抗体及びそうした抗体を含むイムノコンジュゲートに部分的に基づく。本発明の抗体及びイムノコンジュゲートは、例えばB7-H4陽性がんの診断又は治療に有用である。

【0117】

A. 例示的な抗B7-H4抗体

幾つかの実施態様では、本発明は、B7-H4に結合する単離抗体を提供する。B7-H4は、例えば抗原提示細胞(APC)の表面で見出されるI型膜貫通タンパク質である。本明細書に証明するように、B7-H4は、乳癌標本の約80%及び調べた卵巣腫瘍試料の約60%で発現される。

【0118】

シグナル配列(アミノ酸1-28)を有する例示的な天然に存在するヒトB7-H4前駆体タンパク質配列を、配列番号73に示し、対応する成熟B7-H4タンパク質配列を、配列番号74(配列番号73のアミノ酸29-282に相当)に示す。

【0119】

ある種の実施態様では、抗B7-H4抗体は、少なくとも1つ又は複数の以下の特性：
 (a) B7-H4 Ig-V含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸29-157)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又はB7-H4 Ig-C含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸158-250)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又はB7-H4 Ig-V及びIg-Cドメイン(配列番号73のアミノ酸29-250)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号74(成熟ヒトB7-H4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号73(前駆体ヒトB7-H4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合する特性、並びに
 (b) 100 nM、50 nM、10 nM、又は9 nM、又は8 nM、又は7 nM、又は6 nM、又は5 nM、又は4 nM、又は3 nM、又は2 nM、又は1 nM、及び任意選択的に0.0001 nM、又は0.001 nM、又は0.01 nMの親和性でB7-H4に結合する特性
 を任意の組み合わせで有する。

【0120】

非限定的なそのような例示的抗体は、本明細書に記載の1D11、22C10、9B9、及び32D6、並びにそれらのヒト化変異体である。幾つかの実施態様では、B7-H4は、ヒトB7-H4である。幾つかの実施態様では、B7-H4は、ヒト、カニクイザル、マウス及びラットのB7-H4から選択される。

【0121】

幾つかの実施態様では、抗B7-H4抗体は、B7-H4 Ig-V含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸29-157)の全体又は一部内のエピトープに結合する。幾つかの実施態様では、抗B7-H4抗体は、B7-H4 Ig-C含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸158-250)の全体又は一部内のエピトープに結合する。幾つかの実施態様では、抗B7-H4抗体は、B7-H4 Ig-V及びIg-Cドメイン(配列番号73のアミノ酸29-250)の全体又は一部内のエピトープに結合する。幾つかの実施態様では、抗B7-H4抗体は、配列番号74(成熟ヒトB7-H4)の全体又は一部内のエピトープに結合する。幾つかの実施態様では、抗B7-H4抗体は、配列番号73(前駆体ヒトB7-H4)の全体又は一部内のエピトープに結合する。幾つかのそのような実施態様では、抗B7-H4抗体は、100 nM、50 nM、10 nM、又は9 nM、又は8 nM、又は7 nM、又は6 nM、又は5 nM、又は4 nM、又は3 nM、又は2 nM、又は1 nM、及び任意選択的に0.0001 nM、又は0

10

20

30

40

50

、0.01 nM、又は 0.01 nMの親和性でB7-H4に結合する。非限定的なそのような例示的抗体は、本明細書に記載の1D11、22C10、9B9及び32D6、並びにそれらのヒト化変異体を含む。幾つかの実施態様では、B7-H4は、ヒトB7-H4である。幾つかの実施態様では、B7-H4は、ヒトB7-H4又はカニクイザルB7-H4である。幾つかの実施態様では、B7-H4は、マウスB7-H4又はラットB7-H4である。

【0122】

アッセイ

抗B7-H4抗体が「B7-H4 Ig-V含有ドメイン（配列番号73のアミノ酸29-157）の全体又は一部内のエピトープに結合する」か、又は「B7-H4 Ig-C含有ドメイン（配列番号73のアミノ酸158-250）の全体又は一部内のエピトープに結合する」か、又は「B7-H4 Ig-V及びIg-Cドメイン（配列番号73のアミノ酸29-250）の全体又は一部内のエピトープに結合する」か、又は「配列番号74（成熟ヒトB7-H4）の全体又は一部内のエピトープに結合するか、又は「配列番号73（前駆体ヒトB7-H4）の全体又は一部内のエピトープに結合する」かどうかは、実施例Fにおいて本明細書に記載のように、FACSによりアッセイされる競合的結合により決定される。

10

【0123】

抗B7-H4抗体が「100 nM、50 nM、10 nM、又は9 nM、又は8 nM、又は7 nM、又は6 nM、又は5 nM、又は4 nM、又は3 nM、又は2 nM、又は1 nMの親和性で結合する」かどうかは、実施例Eにおいて本明細書に記載のように決定する。選択したヒト化変異体の解離定数は、放射性リガンド細胞結合アッセイを使用して決定した。簡単に述べると、~250 pM（標識されていない抗体競合物質と同じ）にて¹²⁵I-抗体トレーサーを、100,000のMX-1細胞又は293 B7-H4安定細胞株と、1000 nMから開始する標識されていない抗体の2倍希釈物の存在下でインキュベートした。抗体/細胞混合物を、DMEM（1% BSA、300 nMヒトIgG、0.1%アジド）中で25にて2時間インキュベートし、次いで、Milliporeマルチスクリーン濾過プレートを使用して回収及び濾過した。10分間、Perkin Elmer Wizard 1470自動ガンマカウンターを使用してDurapore膜フィルターをカウントした。抗体親和性定数（Kd）は、New Ligandソフトウェアを使用してスキャッチャード解析により決定した。

20

30

【0124】

抗体1D11及び他の実施態様

幾つかの実施態様では、本発明は、（a）配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-H2、（c）配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H3、（d）配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのHVRを含む抗B7-H4抗体を提供する。別の実施態様では、本発明は、（a）配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、（c）配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-H3、（d）配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのHVRを含む抗B7-H4抗体を提供する。

40

【0125】

一態様では、本発明は、（a）配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、配列番号7のアミノ酸

50

配列を含むHVR-H3を含む。別の実施態様では、抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H3及び配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる実施態様では、抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる実施態様では、抗体は、(a)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0126】

一態様では、本発明は、(a)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVH-HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。別の実施態様では、抗体は、配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる実施態様では、抗体は、配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる実施態様では、抗体は、(a)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0127】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVL-HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0128】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVL-HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、(a)配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0129】

別の態様では、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号7から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVH-HVR配列を含むVHドメイン、並びに(b)(i)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVL-HVR配列を含むVLドメインを含む。

【0130】

別の態様では、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号41から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVH-HVR配列を含むVHドメイン、並びに(b)(i)配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVL-HVR配

10

20

30

40

50

列を含むV Lドメインを含む。

【0131】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0132】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0133】

上記の実施態様の何れかでは、抗B7-H4抗体は、ヒト化されている。一実施態様では、抗B7-H4抗体は、上記の実施態様の何れかと同様のHVRを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えばヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。ある種の実施態様では、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒトV LカッパIコンセンサス(V L_{K I})フレームワーク及び/又はV HフレームワークV H₁である。ある種の実施態様では、ヒトアクセプターフレームワークは、以下の変異：軽鎖フレームワーク領域FR3中のY49H、V58I、T69R及び/又はF71Y変異；重鎖フレームワーク領域FR3中のV67A、I69L、R71A、T73K及び/又はT75S変異の何れか1つを含む、ヒトV LカッパIコンセンサス(V L_{K I})フレームワーク及び/又はV HフレームワークV H₁である。

【0134】

幾つかの実施態様では、抗B7-H4抗体は、上記の実施態様の何れかと同様のHVRを含み、配列番号51、52又は53の重鎖フレームワークFR3配列をさらに含む。幾つかのそうした実施態様では、重鎖可変ドメインフレームワークは、配列番号51、52又は53のFR3配列を有する改変されたヒトV H₁フレームワークである。

【0135】

別の態様では、抗B7-H4抗体は、配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(V H)配列を含む。ある種の実施態様では、配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するV H配列は、基準配列に対して、置換(例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、その配列を含む抗B7-H4抗体は、B7-H4に結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号4において、合計で1から10個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、配列番号4において、合計で1から5個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、HVRの外側の領域(すなわちFR内)で生じる。任意選択的に、抗B7-H4抗体は、配列の翻訳後修飾を含めた、配列番号4のV H配列を含む。特定の実施態様では、V Hは、(a)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVRを含む。

【0136】

別の態様では、抗B7-H4抗体は、配列番号36、37、38、99、100、101、102又は103のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(V H)配列を含む。ある種の実施態様では、配列番号36、37、

38、99、100、101、102又は103のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するVH配列は、基準配列に対して、置換(例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、その配列を含む抗B7-H4抗体は、B7-H4に結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号36、37、38、99、100、101、102又は103において、合計で1から10個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、配列番号36、37、38、99、100、101、102又は103において、合計で1から5個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、HVRの外側の領域(すなわちFR内)で生じる。任意選択的に、抗B7-H4抗体は、配列の翻訳後修飾を含めた、配列番号36、37、38、99、100、101、102又は103のVH配列を含む。特定の実施態様では、VHは、(a)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、1つ、2つ又は3つのHVRを含む。

10

【0137】

別の態様では、配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む、抗B7-H4抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するVL配列は、基準配列に対して、置換(例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、その配列を含む抗B7-H4抗体は、B7-H4に結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号3において、合計で1から10個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、配列番号3において、合計で1から5個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、HVRの外側の領域(すなわちFR内)で生じる。任意選択的に、抗B7-H4抗体は、配列の翻訳後修飾を含めた、配列番号3のVL配列を含む。特定の実施態様では、VLは、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、1つ、2つ又は3つのHVRを含む。

20

30

【0138】

別の態様では、配列番号35、93、94、95、96、97又は98のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む、抗B7-H4抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号35、93、94、95、96、97又は98のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するVL配列は、基準配列に対して、置換(例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、その配列を含む抗B7-H4抗体は、B7-H4に結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号35、93、94、95、96、97又は98において、合計で1から10個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、配列番号35、93、94、95、96、97又は98において、合計で1から5個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、HVRの外側の領域(すなわちFR内)で生じる。任意選択的に、抗B7-H4抗体は、配列の翻訳後修飾を含めた、配列番号35、93、94、95、96、97又は98のVL配列を含む。特定の実施態様では、VLは、(a)配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、1つ、2つ又は3つのHVRを含む。

40

50

【 0 1 3 9 】

別の態様では、上記の実施態様のうちの何れかと同様のV H、及び上記の実施態様のうちの何れかと同様のV Lを含む、抗B 7 - H 4抗体が提供される。

【 0 1 4 0 】

一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号4及び配列番号3のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号1 0 1及び配列番号9 3のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号1 0 1及び配列番号9 7のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号1 0 2及び配列番号9 8のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号1 0 3及び配列番号9 8のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号1 0 1及び配列番号9 6のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号1 0 1及び配列番号9 5のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号1 0 1及び配列番号9 4のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号1 0 0及び配列番号9 3のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号9 9及び配列番号9 3のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号3 6及び配列番号9 3のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号3 6及び配列番号3 5のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号3 7及び配列番号3 5のV H及びV L配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号3 8及び配列番号3 5のV H及びV L配列を含む。

【 0 1 4 1 】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で提供する抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。例えば、ある種の実施態様では、配列番号4のV H配列及び配列番号3のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号1 0 1のV H配列及び配列番号9 3のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号1 0 1のV H配列及び配列番号9 7のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号1 0 2のV H配列及び配列番号9 8のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号1 0 3のV H配列及び配列番号9 8のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号1 0 1のV H配列及び配列番号9 6のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号1 0 1のV H配列及び配列番号9 5のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号1 0 1のV H配列及び配列番号9 4のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号1 0 0のV H配列及び配列番号9 3のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号9 9のV H配列及び配列番号9 3のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号3 6のV H配列及び配列番号9 3のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号3 6のV H配列及び配列番号3 5のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号3 7のV H配列及び配列番号3 5のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号3 8のV H配列及び配列番号3 5のV L配列を含む抗B 7 - H 4抗体と同じエピトープ

10

20

30

40

50

プに結合する抗体が提供される。

【0142】

ある種の実施態様では、B7-H4に結合し、少なくとも1つの以下の特性：(a) B7-H4 Ig-V含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸29-157)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又はB7-H4 Ig-C含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸158-250)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又はB7-H4 Ig-V及びIg-Cドメイン(配列番号73のアミノ酸29-250)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号74(成熟ヒトB7-H4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号73(前駆体ヒトB7-H4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合する。幾つかの実施態様では、抗体は、少なくとも1つ又は複数の以下の特性を任意の組み合わせで有する。(a) B7-H4 Ig-V含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸29-157)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又はB7-H4 Ig-C含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸158-250)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又はB7-H4 Ig-V及びIg-Cドメイン(配列番号73のアミノ酸29-250)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号74(成熟ヒトB7-H4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号73(前駆体ヒトB7-H4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合する特性を有する、上記の実施態様の何れかに記載の抗体が提供される。

10

【0143】

本発明のさらなる態様では、上記の実施態様の何れかに記載の抗B7-H4抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体を含めた、モノクローナル抗体である。一実施態様では、抗B7-H4抗体は、抗体断片、例えばFv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ又はF(ab')₂断片である。別の実施態様では、抗体は、実質的に完全長抗体、例えば、IgG1抗体、又は本明細書で定義する他の抗体クラス若しくはアイソタイプである。

20

【0144】

さらなる態様では、上記の実施態様の何れかに記載の抗B7-H4抗体は、以下に記載されるような特色のうちの何れかを、単独で又は組み合わせて含むことができる。

【0145】

抗体22C10及び他の実施態様

一態様では、本発明は、(a)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのHVRを含む抗B7-H4抗体を提供する。

30

【0146】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのHVRを含む抗B7-H4抗体を提供する。

40

【0147】

一態様では、本発明は、(a)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのHVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。別の実施態様では、抗体は、配列番号31のア

50

ミノ酸配列を含むHVR-H3及び配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる実施態様では、抗体は、配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L3及び配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる実施態様では、抗体は、(a)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0148】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。別の実施態様では、抗体は、配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-H3及び配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる実施態様では、抗体は、配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-L3及び配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる実施態様では、抗体は、(a)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

10

【0149】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、(a)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

20

【0150】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、(a)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0151】

別の態様では、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、並びに(b)(i)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

40

【0152】

別の態様では、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、並びに(b)(i)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

50

【 0 1 5 3 】

別の態様では、本発明は、(a) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(f) 配列番号 3 4 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む抗体を提供する。

【 0 1 5 4 】

別の態様では、本発明は、(a) 配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(f) 配列番号 6 3 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む抗体を提供する。

【 0 1 5 5 】

上記の実施態様の何れかでは、抗 B 7 - H 4 抗体は、ヒト抗体である。

【 0 1 5 6 】

別の態様では、抗 B 7 - H 4 抗体は、配列番号 2 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(V H) 配列を含む。ある種の実施態様では、配列番号 2 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の同一性を有する V H 配列は、基準配列に対して、置換(例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、その配列を含む抗 B 7 - H 4 抗体は、B 7 - H 4 に結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号 2 8 において、合計で 1 から 1 0 個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、配列番号 2 8 において、合計で 1 から 5 個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、H V R の外側の領域(すなわち F R 内)で生じる。任意選択的に、抗 B 7 - H 4 抗体は、配列の翻訳後修飾を含めた、配列番号 2 8 の V H 配列を含む。特定の実施態様では、V H は、(a) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び(c) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される 1 つ、2 つ又は 3 つの H V R を含む。

【 0 1 5 7 】

別の態様では、配列番号 2 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(V L) を含む、抗 B 7 - H 4 抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号 2 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の同一性を有する V L 配列は、基準配列に対して、置換(例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、その配列を含む抗 B 7 - H 4 抗体は、B 7 - H 4 に結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号 2 7 において、合計で 1 から 5 個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、配列番号 2 7 において、合計で 1 から 1 0 個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、H V R の外側の領域(すなわち F R 内)で生じる。任意選択的に、抗 B 7 - H 4 抗体は、配列の翻訳後修飾を含めた、配列番号 2 7 の V L 配列を含む。特定の実施態様では、V L は、(a) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(c) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、1 つ、2 つ又は 3 つの H V R を含む。

【 0 1 5 8 】

別の態様では、配列番号 5 5、5 7、1 0 4、1 0 5 又は 1 0 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(V L) を含む、抗 B 7

10

20

30

40

50

- H4抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号55、57、104、105又は106のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するVL配列は、基準配列に対して、置換(例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、その配列を含む抗B7-H4抗体は、B7-H4に結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号55、57、104、105又は106において、合計で1から5個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、配列番号55、57、104、105又は106において、合計で1から10個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、HVRの外側の領域(すなわちFR内)で生じる。任意選択的に、抗B7-H4抗体は、配列の翻訳後修飾を含めた、配列番号55、57、104、105又は106のVL配列を含む。特定の
10
実施態様では、VLは、(a)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、1つ、2つ又は3つのHVRを含む。

【0159】

別の態様では、上記の実施態様のうちの何れかと同様のVH、及び上記の実施態様のうちの何れかと同様のVLを含む、抗B7-H4抗体が提供される。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号111及び配列番号104のVH及びVL配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号111及び配列番号55のVH及びVL配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の
20
翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号112及び配列番号55のVH及びVL配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号113及び配列番号55のVH及びVL配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号114及び配列番号55のVH及びVL配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号111及び配列番号105のVH及びVL配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号111及び配列番号106のVH及びVL配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号110及び配列番号55のVH及びVL配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号109及び配列番号55のVH及びVL配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の
30
翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号108及び配列番号55のVH及びVL配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号107及び配列番号55のVH及びVL配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号56及び配列番号55のVH及びVL配列を含む。別の実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号56及び配列番号57のVH及びVL配列を含む。

【0160】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で提供する抗B7-H4抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。例えば、ある種の実施態様では、配列番号28のVH配列及び配列番号27のVL配列を含む抗B7-H4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号111のVH配列及び配列番号104のVL配列を含む抗B7-H4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号111のVH配列及び配列番号55のVL配列を含む抗B7-H4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号112のVH配列及び配列番号55のVL配列を含む抗B7-H4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号113のVH配列及び配列番号55のVL配列を含む抗B7-H4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号114のVH配列及び配列番号55のVL配列を含む抗B7-H4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号111のVH配列及び配列番号105のVL配列を含む抗B7-H4抗体と
40
50

同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号 1 1 1 の V H 配列及び配列番号 1 0 6 の V L 配列を含む抗 B 7 - H 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号 1 1 0 の V H 配列及び配列番号 5 5 の V L 配列を含む抗 B 7 - H 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号 1 0 9 の V H 配列及び配列番号 5 5 の V L 配列を含む抗 B 7 - H 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号 1 0 8 の V H 配列及び配列番号 5 5 の V L 配列を含む抗 B 7 - H 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号 1 0 7 の V H 配列及び配列番号 5 5 の V L 配列を含む抗 B 7 - H 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号 5 6 の V H 配列及び配列番号 5 5 の V L 配列を含む抗 B 7 - H 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号 5 6 の V H 配列及び配列番号 5 7 の V L 配列を含む抗 B 7 - H 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

10

【 0 1 6 1 】

ある種の実施態様では、B 7 - H 4 に結合し、少なくとも 1 つの以下の特性を有する、上記の実施態様の何れかに記載の抗体が提供される。(a) B 7 - H 4 I g - V 含有ドメイン(配列番号 7 3 のアミノ酸 2 9 - 1 5 7)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は B 7 - H 4 I g - C 含有ドメイン(配列番号 7 3 のアミノ酸 1 5 8 - 2 5 0)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は B 7 - H 4 I g - V 及び I g - C ドメイン(配列番号 7 3 のアミノ酸 2 9 - 2 5 0)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号 7 4 (成熟ヒト B 7 - H 4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号 7 3 (前駆体ヒト B 7 - H 4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合する。幾つかの実施態様では、抗体は、少なくとも 1 つ又は複数の以下の特性:(a) B 7 - H 4 I g - V 含有ドメイン(配列番号 7 3 のアミノ酸 2 9 - 1 5 7)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は B 7 - H 4 I g - C 含有ドメイン(配列番号 7 3 のアミノ酸 1 5 8 - 2 5 0)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は B 7 - H 4 I g - V 及び I g - C ドメイン(配列番号 7 3 のアミノ酸 2 9 - 2 5 0)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号 7 4 (成熟ヒト B 7 - H 4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号 7 3 (前駆体ヒト B 7 - H 4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合する特性を任意の組み合わせで有する。

20

30

【 0 1 6 2 】

本発明のさらなる態様では、上記の実施態様の何れかに記載の抗 B 7 - H 4 抗体は、ヒト抗体を含めた、モノクローナル抗体である。一実施態様では、抗 B 7 - H 4 抗体は、抗体断片、例えば F v、F a b、F a b'、s c F v、ダイアポディ又は F (a b')₂断片である。別の実施態様では、抗体は、実質的に完全長抗体、例えば、I g G 2 a 抗体、又は本明細書で定義する他の抗体クラス若しくはアイソタイプである。

【 0 1 6 3 】

さらなる態様では、上記の実施態様の何れかに記載の抗 B 7 - H 4 抗体は、以下に記載されるような特色のうちの何れかを、単独で又は組み合わせて含むことができる。

40

【 0 1 6 4 】

抗体 3 2 D 6 及び他の実施態様

一態様では、本発明は、(a) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び(f) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ又は 6 つの H V R を含む抗 B 7 - H 4 抗体を提供する。

【 0 1 6 5 】

一態様では、本発明は、(a) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b

50

) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (c) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ又は 3 つすべての VH HVR 配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含む。別の実施態様では、抗体は、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 及び配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む。さらなる実施態様では、抗体は、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 及び配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 を含む。さらなる実施態様では、抗体は、(a) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 及び (c) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含む。

10

【0166】

別の態様では、本発明は、(a) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(b) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (c) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ又は 3 つすべての VL HVR 配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、(a) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(b) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (c) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む。

【0167】

別の態様では、本発明の抗体は、(a) (i) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(ii) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (iii) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ又は 3 つすべての VH HVR 配列を含む VH ドメイン、並びに (b) (i) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(ii) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (c) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ又は 3 つすべての VL HVR 配列を含む VL ドメインを含む。

20

【0168】

別の態様では、本発明は、(a) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、(c) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、(d) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(e) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (f) 配列番号 18 から選択されるアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む抗体を提供する。

30

【0169】

上記の実施態様の何れかでは、抗 B7 - H4 抗体は、ヒト抗体である。

【0170】

別の態様では、抗 B7 - H4 抗体は、配列番号 12 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン (VH) 配列を含む。ある種の実施態様では、配列番号 12 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有する VH 配列は、基準配列に対して、置換 (例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、その配列を含む抗 B7 - H4 抗体は、B7 - H4 に結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号 12 において、合計で 1 から 10 個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、配列番号 12 において、合計で 1 から 5 個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、HVR の外側の領域 (すなわち FR 内) で生じる。任意選択的に、抗 B7 - H4 抗体は、配列の翻訳後修飾を含めた、配列番号 12 の VH 配列を含む。特定の実施態様では、VH は、(a) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (c) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 から選択される 1 つ、2 つ又は 3 つの HVR を含む。

40

50

【 0 1 7 1 】

別の態様では、配列番号 11 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン (V L) を含む、抗 B 7 - H 4 抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号 11 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有する V L 配列は、基準配列に対して、置換 (例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、その配列を含む抗 B 7 - H 4 抗体は、B 7 - H 4 に結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号 11 において、合計で 1 から 5 個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、配列番号 11 において、合計で 1 から 10 個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、H V R の外側の領域 (すなわち F R 内) で生じる。任意選択的に、抗 B 7 - H 4 抗体は、配列の翻訳後修飾を含めた、配列番号 11 の V L 配列を含む。特定の実施態様では、V L は、(a) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (c) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、1 つ、2 つ又は 3 つの H V R を含む。

10

【 0 1 7 2 】

別の態様では、上記の実施態様のうちの何れかと同様の V H、及び上記の実施態様のうちの何れかと同様の V L を含む、抗 B 7 - H 4 抗体が提供される。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号 12 及び配列番号 11 の V H 及び V L 配列を含む。別の実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号 12 及び配列番号 11 の V H 及び V L 配列を含む。

20

【 0 1 7 3 】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で提供する抗 B 7 - H 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。例えば、ある種の実施態様では、配列番号 12 の V H 配列及び配列番号 11 の V L 配列を含む抗 B 7 - H 4 抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

【 0 1 7 4 】

ある種の実施態様では、B 7 - H 4 に結合し、少なくとも 1 つの以下の特性：(a) B 7 - H 4 I g - V 含有ドメイン (配列番号 73 のアミノ酸 29 - 157) の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は B 7 - H 4 I g - C 含有ドメイン (配列番号 73 のアミノ酸 158 - 250) の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は B 7 - H 4 I g - V 及び I g - C ドメイン (配列番号 73 のアミノ酸 29 - 250) の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号 74 (成熟ヒト B 7 - H 4) の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号 73 (前駆体ヒト B 7 - H 4) の全体若しくは一部分内のエピトープに結合する特性を有する、上記の実施態様の何れかに記載の抗体が提供される。幾つかの実施態様では、抗体は、少なくとも 1 つ又は複数の以下の特性：(a) B 7 - H 4 I g - V 含有ドメイン (配列番号 73 のアミノ酸 29 - 157) の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は B 7 - H 4 I g - C 含有ドメイン (配列番号 73 のアミノ酸 158 - 250) の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は B 7 - H 4 I g - V 及び I g - C ドメイン (配列番号 73 のアミノ酸 29 - 250) の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号 74 (成熟ヒト B 7 - H 4) の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号 73 (前駆体ヒト B 7 - H 4) の全体若しくは一部分内のエピトープに結合する特性を任意の組み合わせで有する。

30

40

【 0 1 7 5 】

本発明のさらなる態様では、上記の実施態様の何れかに記載の抗 B 7 - H 4 抗体は、ヒト抗体を含めた、モノクローナル抗体である。一実施態様では、抗 B 7 - H 4 抗体は、抗体断片、例えば F v、F a b、F a b'、s c F v、ダイアボディ又は F (a b')₂ 断片である。別の実施態様では、抗体は、実質的に完全長抗体、例えば、I g G 2 a 抗体、

50

又は本明細書で定義する他の抗体クラス若しくはアイソタイプである。

【0176】

さらなる態様では、上記の実施態様の何れかに記載の抗B7-H4抗体は、以下に記載されるような特色のうちの何れかを、単独で又は組み合わせる含むことができる。

【0177】

抗体9B9及び他の実施態様

一態様では、本発明は、(a)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのHVRを含む抗B7-H4抗体を提供する。

10

【0178】

一態様では、本発明は、(a)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。別の実施態様では、抗体は、配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-H3及び配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる実施態様では、抗体は、配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L3及び配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる実施態様では、抗体は、(a)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

20

【0179】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、(a)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0180】

別の態様では、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、並びに(b)(i)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つすべてのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

40

【0181】

別の態様では、本発明は、(a)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号26から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0182】

上記の実施態様の何れかでは、抗B7-H4抗体は、ヒト抗体である。

【0183】

別の態様では、抗B7-H4抗体は、配列番号20のアミノ酸配列に対して少なくとも

50

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。ある種の実施態様では、配列番号20のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するVH配列は、基準配列に対して、置換(例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、その配列を含む抗B7-H4抗体は、B7-H4に結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号20において、合計で1から10個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、配列番号20において、合計で1から5個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、HVRの外側の領域(すなわちFR内)で生じる。任意選択的に、抗B7-H4抗体は、配列の翻訳後修飾を含めた、配列番号20のVH配列を含む。特定の実施態様では、VHは、(a)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVRを含む。

10

【0184】

別の態様では、配列番号19のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む、抗B7-H4抗体が提供される。ある種の実施態様では、配列番号19のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するVL配列は、基準配列に対して、置換(例えば保存的置換)、挿入又は欠失を含むが、その配列を含む抗B7-H4抗体は、B7-H4に結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号19において、合計で1から5個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、配列番号19において、合計で1から10個のアミノ酸が、置換され、挿入され、及び/又は欠失する。ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、HVRの外側の領域(すなわちFR内)で生じる。任意選択的に、抗B7-H4抗体は、配列の翻訳後修飾を含めた、配列番号11のVL配列を含む。特定の実施態様では、VLは、(a)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、1つ、2つ又は3つのHVRを含む。

20

30

【0185】

別の態様では、上記の実施態様のうちの何れかと同様のVH、及び上記の実施態様のうちの何れかと同様のVLを含む、抗B7-H4抗体が提供される。一実施態様では、抗体は、配列の翻訳後修飾を含めて、それぞれ配列番号20及び配列番号19のVH及びVL配列を含む。

【0186】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で提供する抗B7-H4抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。例えば、ある種の実施態様では、配列番号20のVH配列及び配列番号19のVL配列を含む抗B7-H4抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

40

【0187】

ある種の実施態様では、B7-H4に結合し、少なくとも1つの以下の特性:(a)B7-H4 Ig-V含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸29-157)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又はB7-H4 Ig-C含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸158-250)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又はB7-H4 Ig-V及びIg-Cドメイン(配列番号73のアミノ酸29-250)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号74(成熟ヒトB7-H4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号73(前駆体ヒトB7-H4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合する特性を有する、上記の実施態様の何れかに記載の抗体が提供される。幾つかの実施態様では、抗体は、少なくと

50

も1つ又は複数の以下の特性：(a) B7-H4 Ig-V含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸29-157)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又はB7-H4 Ig-C含有ドメイン(配列番号73のアミノ酸158-250)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又はB7-H4 Ig-V及びIg-Cドメイン(配列番号73のアミノ酸29-250)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号74(成熟ヒトB7-H4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合するか、又は配列番号73(前駆体ヒトB7-H4)の全体若しくは一部分内のエピトープに結合する特性を任意の組み合わせで有する。

【0188】

本発明のさらなる態様では、上記の実施態様の何れかに記載の抗B7-H4抗体は、ヒト抗体を含めた、モノクローナル抗体である。一実施態様では、抗B7-H4抗体は、抗体断片、例えばFv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ又はF(ab')₂断片である。別の実施態様では、抗体は、実質的に完全長抗体、例えば、IgG2a抗体、又は本明細書で定義する他の抗体クラス若しくはアイソタイプである。

10

【0189】

さらなる態様では、上記の実施態様の何れかに記載の抗B7-H4抗体は、以下に記載されるような特色のうちの何れかを、単独で又は組み合わせて含むことができる。

【0190】

1. 抗体親和性

ある種の実施態様では、本明細書で提供する抗体は、1 μ M、100nM、50nM、10nM、5nM、1nM、0.1nM、0.01nM、又は0.001nMの解離定数(Kd)を有し、任意選択的に、10⁻¹³M(例えば10⁻⁸M以下、例えば10⁻⁸Mから10⁻¹³M、例えば、10⁻⁹Mから10⁻¹³M)である。

20

【0191】

一実施態様では、Kdは、以下のアッセイに記載されるように、目的のFab型抗体及びその抗原を用いて実施する放射標識抗原結合アッセイ(RIA)によって測定する。抗原に対するFabの溶液結合親和性は、滴定系列の非標識抗原の存在下で、最小濃度の(¹²⁵I)標識抗原を用いてFabを平衡化し、次いで、抗Fab抗体をコーティングしたプレートを用いて結合した抗原を捕獲することによって測定する(例えば、Chenら、J. Mol. Biol. 293: 865-881(1999)を参照されたい)。アッセイ条件を確立するために、MICRO TITER(登録商標)マルチウェルプレート(Thermo Scientific)を50mM炭酸ナトリウム(pH9.6)に入れた5 μ g/mlの捕獲抗Fab抗体(Cappel Labs)で一晩コーティングし、続いて、PBSに入れた2%(w/v)ウシ血清アルブミンを用いて、2から5時間、室温(約23 $^{\circ}$)でブロッキングする。非吸着プレート(Nunc #269620)において、100pM又は26pMの[¹²⁵I]-抗原を目的のFabの段階希釈物と混合する(例えば、Prestara、Cancer Res. 57: 4593-4599(1997)における抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一致している)。次いで、目的のFabを一晩インキュベートする。しかしインキュベーションは、確実に平衡状態に達するように、より長期間(例えば約65時間)続けてもよい。その後、この混合物を捕獲プレートに移して、室温で(例えば、1時間)インキュベートする。次いで溶液を除去し、0.1%ポリソルベート20(TWEEN-20(登録商標))のPBS溶液でプレートを8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 μ l/ウェルの閃光物質(MICROSCINT-20(商標)、Packard)を加え、TOPCOUNT(商標)ガンマカウンター(Packard)でプレートを10分間カウントする。最大結合の20%以下を与える各Fabの濃度を選んで、競合的結合アッセイで使用する。

30

40

【0192】

別の実施態様によれば、Kdは、~10反応単位(RU)で固定化された抗原CM5チップを用いるBIACORE(登録商標)-2000又はBIACORE(登録商標)-

50

3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を 25 で使用して、表面プラズモン共鳴アッセイによって測定する。簡単に述べると、供給業者の指示書に従って、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5、BIAcore, Inc.) を、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及び N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) で活性化する。抗原を、10 mM の酢酸ナトリウム、pH 4.8 を用いて、5 µg/ml (~0.2 µM) に希釈してから、5 µl/分の流速で注入して、約 10 反応単位 (RU) の結合タンパク質を得る。抗原の注入に続いて、1 M エタノールアミンを注入して、未反応基をブロックする。反応速度論的な測定のため、Fab の 2 倍段階希釈物 (0.78 nM から 500 nM) を、0.05% ポリソルベート 20 (TWEEN-20 (商標)) 界面活性剤を含む PBS (PBST) に、約 25 µl/分の流速で 25 で注入する。結合速度 (k_{on}) 及び解離速度 (k_{off}) を、単純な 1 対 1 ラングミュア結合モデル (BIAcore (登録商標) 評価ソフトウェア 3.2 版) を使用して、結合センサーグラムと解離センサーグラムを同時に適合することによって計算する。平衡解離定数 (K_d) を、比 k_{off}/k_{on} として計算する。例えば、Chen ら、*J. Mol. Biol.* 293: 865-881 (1999) を参照されたい。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによって、会合速度が $10^6 M^{-1} s^{-1}$ を超える場合は、流動停止を備えた分光光度計 (Aviv Instruments) 又は攪拌キュベットを備えた 8000-シリーズ SLM-AMINCO (商標) 分光光度計 (Thermo Spectronic) などの分光計で測定される、漸増濃度の抗原の存在下において、PBS、pH 7.2 に入れた 20 nM の抗抗原抗体 (Fab 型) の 25 での蛍光放出強度 (励起 = 295 nm; 発光 = 340 nm、16 nm 帯域通過) の増大又は低下を測定する蛍光消光技術を使用することによって、会合速度を決定することができる。

【0193】

2. 抗体断片

ある種の実施態様では、本明細書で提供する抗体は抗体断片である。抗体断片としては、これらに限定されないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv 及び scFv 断片並びに以下に記載する他の断片が挙げられる。特定の抗体断片の総説については、Hudson ら、*Nat. Med.* 9: 129-134 (2003) を参照されたい。scFv 断片の総説については、例えば、Pluckthun、*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*、113 巻、Rosenburg 及び Moore 編、(Springer-Verlag, New York)、269-315 頁 (1994) を参照されたい。国際公開第 93/16185 号; 並びに米国特許第 5571894 号及び第 5587458 号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、インビボでの半減期が増大した Fab 及び F(ab')₂ 断片の考察については、米国特許第 5869046 号を参照されたい。

【0194】

ダイアボディは、二価又は二重特異性であり得る、2 つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第 404097 号; 国際公開第 1993/01161 号; Hudson ら、*Nat. Med.* 9: 129-134 (2003); 及び Hollinger ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) を参照されたい。トリアボディ及びテトラボディも、Hudson ら、*Nat. Med.* 9: 129-134 (2003) に記載されている。

【0195】

シングルドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全体若しくは一部分、又は軽鎖可変ドメインの全体若しくは一部分を含む抗体断片である。ある種の実施態様では、シングルドメイン抗体は、ヒトシングルドメイン抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 例えば、米国特許第 6248516 B1 号を参照されたい) である。

【0196】

抗体断片は、これらに限定されないが、本明細書に記載のように、インタクトな抗体の

10

20

30

40

50

タンパク質消化並びに組換え宿主細胞（例えば大腸菌（*E. coli*）又はファージ）による産生を含めた様々な手法によって作製することができる。

【0197】

3. キメラ抗体及びヒト化抗体

ある種の実施態様では、本明細書で提供する抗体はキメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4816567号；及びMorrissonら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 - 6855 (1984)に記載されている。一例を挙げれば、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ又は非ヒト霊長類、例えばサルに由来する可変領域）及びヒト定常領域を含む。さらなる例を挙げれば、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体のものから変化した「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合性断片を含む。

10

【0198】

ある種の実施態様では、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減するためにヒト化されるが、非ヒト親抗体の特異性及び親和性を保持する。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えばCDR（又はその一部）が非ヒト抗体に由来し、FR（又はその一部）がヒト抗体配列に由来する、1つ又は複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、任意選択的に、ヒト定常領域の少なくとも一部も含む。幾つかの実施態様では、例えば、抗体特異性又は親和性を回復する又は改善するために、ヒト化抗体の幾つかのFR残基が、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換される。

20

【0199】

ヒト化抗体及びその作製方法は、例えば、Almagro及びFransson、*Front. Biosci.* 13: 1619 - 1633 (2008)に概説されており、さらに、例えば、Riechmannら、*Nature* 332: 323 - 329 (1988)；Queenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029 - 10033 (1989)；米国特許第5821337号、第7527791号、第6982321号及び第7087409号；Kashmiriら、*Methods* 36: 25 - 34 (2005)（SDR（a-CDR）グラフィングを記載）；Padlan、*Mol. Immunol.* 28: 489 - 498 (1991)（「リサーチフェシング」を記載）；Dall'Acquaら、*Methods* 36: 43 - 60 (2005)（「FRシャッフリング」を記載）；並びにOsbourneら、*Methods* 36: 61 - 68 (2005)及びKlimkaら、*Br. J. Cancer*, 83: 252 - 260 (2000)（FRシャッフリングに対する「誘導選択」手法を記載）に記載されている。

30

【0200】

ヒト化に使用することができるヒトフレームワーク領域としては、これらに限定されないが、「ベストフィット」法を使用して選択されるフレームワーク領域（例えば、Simsら、*J. Immunol.* 151: 2296 (1993)を参照されたい）、軽鎖又は重鎖可変領域の特定サブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carterら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992)；及びPrestaら、*J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)を参照されたい）、ヒト成熟（体細胞変異）フレームワーク領域又はヒト生殖細胞系フレームワーク領域（例えば、Almagro及びFransson、*Front. Biosci.* 13: 1619 - 1633 (2008)を参照されたい）、並びにFRライブラリーのスクリーニングから得られるフレームワーク領域（例えば、Bacarraら、*J. Biol. Chem.* 272: 10678 - 10684 (1997)；及びRosokら、*J. Biol. Chem.* 271: 22611 - 22618 (1996)を参照されたい）が挙げられる。

40

【0201】

4. ヒト抗体

50

ある種の実施態様では、本明細書で提供する抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で知られている様々な手法を使用して産生することができる。ヒト抗体は、一般的に、van Dijk及びvan de Winkel、Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74(2001)、並びにLonberg、Curr. Opin. Immunol. 20:450-459(2008)に記載されている。

【0202】

ヒト抗体は、抗原負荷に反応してインタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製することができる。そうした動物は、典型的にはヒト免疫グロブリン座の全体又は一部分を含み、ヒト免疫グロブリン座は、内因性の免疫グロブリン座に置き換わるか、又は染色体外に存在するか、若しくは動物の染色体にランダムに組み込まれる。そうしたトランスジェニックマウスでは、内因性の免疫グロブリン座は、一般に不活化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の総説については、Lonberg、Nat. Biotech. 23:1117-1125(2005)を参照されたい。例えば、XENOMOUSE(商標)技術を記載する米国特許第6075181号及び第6150584号；HUMAB(登録商標)技術を記載する米国特許第5770429号；K-M MOUSE(登録商標)技術を記載する米国特許第7041870号、並びにVELOCIMOUSE(登録商標)技術を記載する米国特許出願公開第2007/0061900号も参照されたい。そうした動物によって生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって、さらに改変することができる。

【0203】

ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づく方法によって作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体を産生するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株が記載されている(例えば、Kozbor J. Immunol.、133:3001(1984)；Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51-63頁(Marcel Dekker, Inc.、New York、1987)；及びBoernerら、J. Immunol.、147:86(1991)を参照されたい)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体も、Liら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、103:3557-3562(2006)に記載されている。さらなる方法としては、例えば、米国特許第7189826号(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載する)及びNi、Xiandai Mianyixue、26(4):265-268(2006)(ヒト-ヒトハイブリドーマを記載する)に記載されるものが挙げられる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)も、Vollmers及びBrandlein、Histology and Histopathology、20(3):927-937(2005)、並びにVollmers及びBrandlein、Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology、27(3):185-91(2005)に記載されている。

【0204】

ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択されたFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成することもできる。次いで、そうした可変ドメイン配列を、所望のヒト定常ドメインと組み合わせることができる。ヒト抗体を抗体ライブラリーから選択する技法を以下に記載する。

【0205】

5. ライブラリー由来抗体

本発明の抗体は、所望の活性(1又は複数)を有する抗体について、コンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリーを生成するための、及び所望の結合特性を有する抗体につい

10

20

30

40

50

てそうしたライブラリーをスクリーニングするための種々の方法が、当該技術分野で知られている。そうした方法は、例えば、Hoogenboomら、Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brienら編、Human Press、Totowa、NJ、2001)に概説されており、さらに、例えば、McCaffertyら、Nature 348:552-554; Clacksonら、Nature 352:624-628 (1991); Marksら、J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Marks及びBradbury、Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo編、Human Press、Totowa、NJ、2003); Sidhuら、J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Leeら、J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); 及びLeeら、J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)に記載されている。

【0206】

ある種のファージディスプレイ法では、Winterら、Ann. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994)に記載されているように、VH及びVL遺伝子のレパートリーをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により別々にクローニングし、ファージライブラリーにおいてランダムに組換え、次いでこれを、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは、典型的には、単鎖Fv(scFv)断片又はFab断片の何れかとして、抗体断片を提示する。免疫化された供給源由来のライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要無しで、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、Griffithsら、EMBO J. 12:725-734 (1993)によって記載されているように、ナイーブレパートリーを(例えばヒトから)クローニングし、いかなる免疫化もせずに、幅広い非自己及び自己抗原に対して抗体の単一供給源を提供することができる。最後に、Hoogenboom及びWinter、J. Mol. Biol. 227:381-388 (1992)によって記載されているように、再配列していないV-遺伝子セグメントを幹細胞からクローニングし、高度可変CDR3領域をコードし且つインビトロで再配列を達成するためのランダム配列を含むPCRプライマーを使用して、ナイーブライブラリーも合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリーを記載する特許公報としては、例えば、米国特許第5750373号、並びに米国特許公開第2005/0079574号、第2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936号及び第2009/0002360号が挙げられる。

【0207】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体又は抗体断片は、本明細書で、ヒト抗体又はヒト抗体断片とみなす。

【0208】

6. 多重特異性抗体

ある種の実施態様では、本明細書で提供する抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある種の実施態様では、結合特異性の1つはB7-H4に対してであり、他は、任意の他の抗原に対してである。ある種の実施態様では、結合特異性の1つはB7-H4に対してであり、他はCD3に対してである。例えば、米国特許第5821337号を参照されたい。ある種の実施態様では、二重特異性抗体は、B7-H4の2つの異なるエピトープに結合することができる。二重特異性抗体は、B7-H4を発現する細胞に細胞傷害剤を局在させるのに使用することもできる。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片として調製することができる。

【0209】

多重特異性抗体を作製するための技法としては、これらに限定されないが、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖ペアの組換え共発現 (Milstein及びCuello、Nature 305:537(1983)、国際公開第93/08829号、及びTraunckerら、EMBO J. 10:3655(1991)を参照されたい)、並びに「knob-in-hole」エンジニアリング (例えば、米国特許第5731168号を参照されたい) が挙げられる。多重特異性抗体は、抗体のFc-ヘテロ二量体分子を作製するための静電ステアリング作用を操作すること (国際公開第2009/089004A1号)、2つ以上の抗体又は断片を架橋結合すること (例えば、米国特許第4676980号、及びBrennanら、Science、229:81(1985)を参照されたい)、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生すること (例えば、Kostelnyら、J. Immunol.、148(5):1547-1553(1992)を参照されたい)、「ダイアボディ」技術を使用して二重特異性抗体断片を作製すること (例えば、Hollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444-6448(1993)を参照されたい)、及び単鎖Fv (sFv) ダイマーを使用すること (例えば、Gruberら、J. Immunol.、152:5368(1994)を参照されたい)、及び例えば、Tuttlら J. Immunol. 147:60(1991)に記載されているような三重特異性抗体を調製することによって、作製することもできる。

10

【0210】

「オクトパス抗体」を含めて、3つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作された抗体も本明細書に含まれる (例えば、米国特許出願公開第2006/0025576A1号を参照されたい)。

20

【0211】

本明細書の抗体又は断片には、B7-H4及び別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用Fab」又は「DAF」も含まれる (例えば米国特許出願公開第2008/0069820を参照されたい)。

【0212】

7. 抗体変異体

ある種の実施態様では、本明細書で提供する抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的な特性を改善することが望ましい場合もある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な修飾を導入すること、又はペプチド合成によって調製することができる。そうした修飾としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び/又はその残基への挿入、及び/又はその残基の置換が挙げられる。最終的なコンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有することを条件として、最終的なコンストラクトを得るために、欠失、挿入及び置換を任意に組み合わせることができる。

30

【0213】

a) 置換、挿入及び欠失変異体

ある種の実施態様では、1つ又は複数のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換突然変異誘発の目的の部位は、HVR及びFRを含む。保存的置換を、表1において「好ましい置換」の項目の下に示す。より実質的な変化を、表1において「例示的置換」の項目の下に提供し、アミノ酸側鎖クラスに関連して以下にさらに記載するように提供する。アミノ酸置換は、目的の抗体に導入することができ、その産物は、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の低下又はADCC又はCDCの改善についてスクリーニングされる。

40

表1

最初の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

アミノ酸は、共通の側鎖特性によってグループ化することができる。

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile、
- (2) 中性の親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、
- (3) 酸性：Asp、Glu、
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg、
- (5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro、
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe

【0214】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを必要とするであろう。

【0215】

置換変異体の1タイプは、親抗体（例えば、ヒト化の又はヒト抗体）の1つ又は複数の超可変領域残基を置換することを含む。一般に、さらなる研究のために選択された得られた変異体（複数可）は、親抗体と比較して、特定の生物学的な特性（例えば親和性の増大、免疫原性の低減）における改変（例えば改善）を有する、及び/又は実質的に保持された、親抗体の特定の生物学的な特性を有する。例示的置換変異体は親和性成熟抗体であり、これは、例えば、ファージディスプレイに基づく親和性成熟技法、例えば本明細書に記載のものを使用して、簡単に生成することができる。簡単に述べると、1つ又は複数のH

10

20

30

40

50

V R 残基を変異させ、変異体抗体をファージ上に提示し、特定の生物活性（例えば結合親和性）についてスクリーニングする。

【0216】

変更（例えば置換）は、例えば抗体親和性を改善するために、HVRにおいて行うことができる。そうした変更は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程の間に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury、Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)を参照されたい）、及び/又はSDR (a-CDR)において行うことができ、得られた変異体VH又はVLは、結合親和性について試験される。2次ライブラリーを構築し、それから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboomら、Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brienら編、Human Press, Totowa, NJ, (2001))に記載されている。親和性成熟の幾つかの実施態様では、種々の方法（例えば、エラープロードPCR、鎖シャフリリング又はオリゴヌクレオチド指定突然変異）のうちの何れかによって、成熟のために選ばれた可変遺伝子中に多様性を導入する。次いで2次ライブラリーを作出する。次いで、このライブラリーをスクリーニングして、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を同定する。多様性を導入するための別の方法は、幾つかのHVR残基（例えば、一度に4-6残基）をランダム化する、HVR指向性手法を含む。抗原結合に参与するHVR残基は、例えばアラニンスキャニング変異誘発又はモデル化を使用して、具体的に特定することができる。特にCDR-H3及びCDR-L3が標的にされることが多い。

10

20

【0217】

ある種の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、そうした変更が、抗体が抗原に結合する能力を実質的に低減しない限り、1つ又は複数のHVR内に生じてもよい。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的変更（例えば、本明細書で提供する保存的置換）は、HVR内で行うことができる。そうした変更は、HVRの「ホットスポット」又はSDRの外側であってもよい。上記の変異体VH及びVL配列のある種の実施態様では、各HVRは、不変であるか、又は1つ、2つ若しくは3つ以下のアミノ酸置換を含むかの何れかである。

【0218】

突然変異誘発の標的にされ得る抗体の残基又は領域を同定するのに有用な方法は、Cunningham及びWells (1989) Science, 244:1081-1085によって記載されているように、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、標的残基の残基又は集団（例えば、arg、asp、his、lys及びgluなどの荷電残基）を同定し、中性の又は負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）で置き換えて、抗原との抗体の相互作用が影響を受けるかどうかを決定する。さらなる置換を、最初の置換に機能的感受性を示すアミノ酸の位置に導入することができる。あるいは、又はさらに、抗原抗体複合体の結晶構造を使用して、抗体と抗原の間の接触点を同定する。そうした接触残基及び隣接残基は、置換の候補として標的にされてもよいし、排除されてもよい。変異体をスクリーニングして、それらが所望の特性を含むかどうかを決定することができる。

30

40

【0219】

アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドまでの長さ及び/又はアミノ末端及び/又はカルボキシル末端融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体としては、抗体の血清半減期を増大させる（例えばADEPTについての）酵素又はポリペプチドに対する抗体のN末端又はC末端への融合が挙げられる。

【0220】

b) グリコシル化変異体

ある種の実施態様では、本明細書で提供する抗体は、抗体がグリコシル化される程度を

50

増大又は低下させるように変化させる。抗体に対するグリコシル化部位の付加又は欠失は、1つ又は複数のグリコシル化部位が作出される又は除去されるようにアミノ酸配列を変化させることによって、簡便に達成することができる。

【0221】

抗体がFc領域を含む場合は、それに結合する炭水化物を変化させることができる。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、一般に、Fc領域のCH2ドメインのAsn297へのN結合によって結合した、分岐した二分岐オリゴ糖を典型的には含む。例えば、Wrightら、TIBTECH15:26-32(1997)を参照されたい。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース及びシアル酸、並びに二分岐のオリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合したフコースを含み得る。幾つかの実施態様では、特定の改善した特性を有する抗体変異体を作成するために、本発明の抗体のオリゴ糖を修飾することができる。

10

【0222】

一実施態様では、Fc領域に(直接的又は間接的に)結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体変異体が提供される。例えば、そうした抗体のフコースの量は、1%から80%、1%から65%、5%から65%又は20%から40%であり得る。フコースの量は、例えば国際公開第2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析法によって測定されるような、Asn297に結合したすべての糖構造体(例えば複合、ハイブリッド及び高マンノース構造体)の合計に対して、Asn297における糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定する。Asn297は、Fc領域の約297位(Fc領域残基のEu番号付け)に位置するアスパラギン残基を指すが、抗体の軽微な配列バリエーションが原因で、Asn297は、297位の約±3アミノ酸上流又は下流、すなわち294位と300位の間に位置する可能性もある。そうしたフコシル化変異体は、改善したADCC機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号(Presta, L.);米国特許出願公開第2004/0093621号(協和発酵工業株式会社)を参照されたい。「脱フコシル化」又は「フコース欠損」抗体変異体に関する刊行物の例としては、米国特許出願公開第2003/0157108号;国際公開第2000/61739号;国際公開第2001/29246号;米国特許出願公開第2003/0115614号;米国特許出願公開第2002/0164328号;米国特許出願公開第2004/0093621号;米国特許出願公開第2004/0132140号;米国特許出願公開第2004/0110704号;米国特許出願公開第2004/0110282号;米国特許出願公開第2004/0109865号;国際公開第2003/085119号;国際公開第2003/084570号;国際公開第2005/035586号;国際公開第2005/035778号;国際公開第2005/053742号;国際公開第2002/031140号;Okazakiら、J. Mol. Biol. 336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnukiら、Biotech. Bioeng. 87:614(2004)が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生することができる細胞株の例としては、タンパク質のフコシル化を欠いたLecl3CHO細胞(Ripkaら Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545(1986);米国特許出願公開第2003/0157108A1号、Presta, L.;及び国際公開第2004/056312A1号、Adamsら、特に実施例11)、並びにロックアウト細胞株、例えば、-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8のロックアウトCHO細胞(例えば、Yamane-Ohnukiら、Biotech. Bioeng. 87:614(2004);Kanda, Y.ら、Biotechnol. Bioeng.、94(4):680-688(2006);及び国際公開第2003/085107号を参照されたい)が挙げられる。

20

30

40

【0223】

抗体変異体は、二分されたオリゴ糖をさらに備えており、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐のオリゴ糖がGlcNAcによって二分されている。そうした抗体変異体は、フコシル化が低減されている、及び/又はADCC機能が改善されている可能性がある

50

。そうした抗体変異体の例は、例えば、国際公開第2003/011878号(Jean-Mairetら)；米国特許第6602684号(Umanaら)；及び米国特許出願公開第2005/0123546(Umanaら)に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。そうした抗体変異体は、CDC機能が改善されている可能性がある。そうした抗体変異体は、例えば、国際公開第1997/30087号(Patelら)；国際公開第1998/58964号(Raju, S.)；及び国際公開第1999/22764号(Raju, S.)に記載されている。

【0224】

c) Fc領域変異体

ある種の実施態様では、1つ又は複数のアミノ酸修飾を、本明細書で提供する抗体のFc領域に導入することができ、それによって、Fc領域変異体を生成することができる。Fc領域変異体は、1つ又は複数のアミノ酸の位置に、アミノ酸修飾(例えば置換)を含むヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域)を含むことができる。

【0225】

ある種の実施態様では、本発明は、インビボでの抗体半減期が重要であるけれども、特定のエフェクター機能(補体及びADCCなど)は不要又は有害である適用にとって望ましい候補とする、すべてではないが、いくらかのエフェクター機能を有する抗体変異体を企図する。インビトロ及び/又はインビボ細胞傷害性アッセイを行って、CDC及び/又はADCC活性の低減/喪失を確認することができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイを行って、抗体がFcR結合を欠く(したがって、ADCC活性を欠く可能性がある)が、FcRn結合能力を保持するというのを確実にすることができる。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、Fc(RIIIのみを発現するが、一方、単球はFc(RI、Fc(RII及びFc(RIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch及びKinet、Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492(1991)の464頁の表3に概説されている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定例は、米国特許第5500362号(例えばHellstrom, I.ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059-7063(1986)を参照されたい)及びHellstrom, I.ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499-1502(1985)；第5821337号(Bruggermann, M.ら、J. Exp. Med. 166: 1351-1361(1987)を参照されたい)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いることもできる(例えば、ACTI(商標)フローサイトメトリー用の非放射性細胞傷害性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA)；及びCytotox96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照されたい)。そうしたアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。あるいは、又はさらに、目的の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、ClynesらProc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652-656(1998)に開示されているものなどの動物モデルで評価することができる。C1q結合アッセイを行って、抗体がC1qに結合することができず、それ故にCDC活性を欠くことを確認することもできる。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号のC1q及びC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行うことができる(例えば、Gazzano-Santorolaら、J. Immunol. Methods 202: 163(1996)；Cragg, M.S.ら、Blood 101: 1045-1052(2003)；並びにCragg, M.S.及びM.J. Glennie、Blood 103: 2738-2743(2004)を参照されたい)。当該技術分野で知られている方法を使用して、FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期の測定も行う

10

20

30

40

50

ことができる（例えば、Petkova, S. B.ら、Int'l. Immunol. 18(12): 1759-1769(2006)を参照されたい）。

【0226】

エフェクター機能が低減した抗体としては、Fc領域残基238、265、269、270、297、327及び329の1つ又は複数の置換を有する抗体（米国特許第6737056）が挙げられる。そうしたFc突然変異体としては、残基265及び297からアラニンへの置換を有する、いわゆる「DANA」Fc突然変異体（米国特許第7332581号）を含めて、アミノ酸の位置265、269、270、297及び327の2つ以上の置換を有するFc突然変異体が挙げられる。

【0227】

FcRへの結合が改善又は減弱された特定の抗体変異体が記載されている（例えば、米国特許第6737056号；国際公開第2004/056312号、及びShieldsら、J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照されたい）。

【0228】

ある種の実施態様では、抗体変異体は、ADCCを改善する1つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の位置298、333及び/又は334（残基のEU番号付け）での置換を有するFc領域を含む。

【0229】

幾つかの実施態様では、例えば、米国特許第6194551号、国際公開第99/51642号、及びIdusogieら、J. Immunol. 164: 4178-4184(2000)に記載されているように、変化した（すなわち、改善又は減弱した）C1q結合及び/又は補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらす変更が、Fc領域中で行われる。

【0230】

半減期が延び、母性IgGを胎児へ移行させるのに関与する（Guyerら、J. Immunol. 17:587 (1976)、及びKimら、J. Immunol. 24:249 (1994)）新生児Fc受容体（FcRn）への結合が改善された抗体が、米国特許出願公開第2005/0014934A1号（Hintonら）に記載されている。それらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する1つ又は複数の置換を有する、Fc領域含む。そうしたFc変異体としては、Fc領域の残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434の1つ又は複数での置換、例えば、Fc領域の残基434での置換（米国特許第7371826号）を有する変異体が挙げられる。

【0231】

Fc領域変異体の他の例に関する、Duncan & Winter、Nature 322: 738-40 (1988)；米国特許第5648260号；米国特許第5624821号；及び国際公開第94/29351号も参照されたい。

【0232】

d) システイン操作抗体変異体

ある種の実施態様では、抗体の1つ又は複数の残基がシステイン残基で置換されているシステイン操作抗体、例えば「チオMAb」を作出することが望ましい場合もある。特定の実施態様では、置換残基は、抗体のアクセス可能な部位に存在する。そのような残基をシステインで置換することにより、反応性のチオール基は、それによって、抗体のアクセス可能な部位に配置され、本明細書でさらに記載するように、薬物部分又はリンカー-薬物部分などの他の部分に抗体をコンジュゲートして、イムノコンジュゲートを作出するのに使用することができる。ある種の実施態様では、以下の残基の任意の1つ又は複数でシステインで置換することができる：軽鎖のV205（カバット番号付け）、重鎖のA118（EU番号付け）、及び重鎖Fc領域のS400（EU番号付け）。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第7521541号に記載されているように生成することができる。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 3 】

e) 抗体誘導体

ある種の実施態様では、本明細書で提供する抗体は、当該技術分野で知られており且つ容易に利用可能な付加的な非タンパク質性部分を含むように、さらに改変することができる。抗体の誘導体化に適した部分としては、これに限定されないが、水溶性ポリマーが挙げられる。水溶性ポリマーの非限定例としては、これらに限定されないが、ポリエチレングリコール (P E G)、エチレングリコール/プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ - 1 , 3 - ジオキソラン、ポリ - 1 , 3 , 6 - トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸 (ホモポリマー又はランダム共重合体の何れか)、及びデキストラン又はポリ (n - ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール (例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、並びにそれらの混合物が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造における利点を有し得る。ポリマーは、いかなる分子量のものでもよく、分枝でも非分枝でもよい。抗体に結合したポリマーの数は変動する可能性があり、1ポリマーより多くが結合する場合は、それらは、同じ分子でも異なる分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又はタイプは、これらに限定されないが、改善される抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が定められた条件下などで療法に使用されるかどうかなどを含めた考慮に基づいて決定することができる。

10

20

【 0 2 3 4 】

別の実施態様では、照射曝露によって選択的に加熱することができる抗体及び非タンパク質性部分のコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブ (Kamra, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605(2005)) である。照射はいかなる波長でもよく、これに限定はされないが、通常の細胞を害さないが、抗体 - 非タンパク質性部分の近位細胞が死滅する温度に非タンパク質性部分を加熱する波長が挙げられる。

【 0 2 3 5 】

B. 組換え法及び組成物

抗体は、例えば、米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号に記載されているような組換え法及び組成物を使用して産生することができる。一実施態様では、本明細書に記載の抗 B 7 - H 4 抗体をコードする単離核酸が提供される。そうした核酸は、抗体の V L を含むアミノ酸配列及び/又は抗体の V H を含むアミノ酸配列 (例えば、抗体の軽鎖及び/又は重鎖) をコードし得る。さらなる実施態様では、そうした核酸を含む 1 つ又は複数のベクター (例えば発現ベクター) が提供される。さらなる実施態様では、そうした核酸を含む宿主細胞が提供される。そうした実施態様の 1 つでは、宿主細胞は、以下のものを含む (例えば、以下のもので形質転換されている) : (1) 抗体の V L を含むアミノ酸配列及び抗体の V H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は (2) 抗体の V L を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第 1 のベクター、及び抗体の V H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第 2 のベクター。一実施態様では、宿主細胞は、真核性であり、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞又はリンパ系細胞 (例えば、Y 0、N S 0、S p 2 0 細胞) である。一実施態様では、抗 B 7 - H 4 抗体を作製する方法が提供され、この方法は、上記の抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に適した条件下で培養すること、及び任意選択的に、宿主細胞 (又は宿主細胞の培養培地) から抗体を回収することを含む。

30

40

【 0 2 3 6 】

抗 B 7 - H 4 抗体を組換え産生するために、例えば上記のように、抗体をコードする核酸を単離し、さらなるクローニング及び/又は宿主細胞での発現のために、1つ又は複数のベクターに挿入する。そうした核酸は、従来の手順を使用して (例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブ

50

を使用して)、容易に単離し、配列決定することができる。

【0237】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適切な宿主細胞としては、本明細書に記載の原核生物細胞又は真核生物細胞が挙げられる。例えば、抗体は、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要でない場合は、細菌で産生することができる。抗体断片及びポリペプチドの細菌での発現については、例えば、米国特許第5648237号、第5789199号及び第5840523号を参照されたい(大腸菌での抗体断片の発現を記載する、Charlton、Methods in Molecular Biology、248巻(B.K.C.Lo編、Humana Press、Totowa、NJ、2003)245-254頁も参照されたい)。発現させた後に、抗体を、可溶性画分の細菌細胞のペーストから単離することができ、さらに精製することができる。

10

【0238】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母などの真核微生物が、抗体をコードするベクターにとってクローニング又は発現の適切な宿主であり、これには、グリコシル化経路が「ヒト化され」、その結果、部分的に又は完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体を産生する真菌及び酵母株が含まれる。Gerngross、Nat. Biotech. 22: 1409-1414(2004)、及びLira、Nat. Biotech. 24: 210-215(2006)を参照されたい。

【0239】

グリコシル化抗体の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物体(無脊椎動物及び脊椎動物)にも由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と併せて使用することができる、特にヨトウガ(Spodoptera frugiperda)細胞のトランスフェクションのために使用することができる、多数のパキウイルス株が同定されている。

20

【0240】

植物細胞培養物も宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5959177号、第6040498号、第6420548号、第7125978号及び第6417429号(トランスジェニック植物で抗体を産生するためのPLANTIBODIES(商標)技術を記載する)を参照されたい。

【0241】

脊椎動物細胞も宿主として使用することができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳動物細胞株は、有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40(COS-7)によって形質転換されたサル腎臓CV1株、ヒト胎児性腎臓株(例えば、Grahamら、J. Gen. Virol. 36: 59(1977)に記載されているような293又は293細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)、マウスセルトリ細胞(例えば、Mather、Biol. Reprod. 23: 243-251(1980)に記載されているようなTM4細胞)、サル腎臓細胞(CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞(HELA)、イヌ腎臓細胞(MDCK)、バッファローラット肝細胞(BRL 3A)、ヒト肺細胞(W138)、ヒト肝細胞(Hep G2)、マウス乳房腫瘍(MMT060562)、例えば、Matherら、Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68(1982)に記載されているようなTRI細胞、MRC5細胞、及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、DHFR⁻CHO細胞(Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA77:4216(1980))を含めたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、及びY0、NS0及びSp2/0などの骨髓腫細胞株が挙げられる。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞株の総説として、例えば、Yazaki及びWu、Methods in Molecular Biology、248巻(B.K.C.Lo編、Humana Press、Totowa、NJ)、255-268頁(2003)を参照されたい。

30

40

【0242】

C. アッセイ

50

本明細書で提供する抗 B 7 - H 4 抗体は、当該技術分野で知られている様々なアッセイによって、その物理的 / 化学的特性及び / 若しくは生物活性を同定することができ、それらについてスクリーニングすることができ、又はそれらについて特徴を明らかにすることができる。

【 0 2 4 3 】

一態様では、例えば E L I S A、B I A C o r e (登録商標)、F A C S 又はウェスタンブロットなどの既知の方法によって、本発明の抗体をその抗原結合活性について試験する。

【 0 2 4 4 】

別の態様では、競合アッセイを使用して、B 7 - H 4 への結合について本明細書に記載の抗体のうちの何れかと競合する抗体を同定することができる。ある種の実施態様では、そうした競合抗体は、本明細書に記載の抗体が結合するのと同じエピトープ (例えば、直鎖状又は立体構造エピトープ) に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示の方法は、Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」、Methods in Molecular Biology 66 巻 (Humana Press, Totowa, NJ) に提供されている。

【 0 2 4 5 】

例示的競合アッセイでは、固定化された B 7 - H 4 を、B 7 - H 4 に結合する第 1 の標識抗体 (例えば、本明細書に記載の抗体のうちの何れか) と、B 7 - H 4 への結合について第 1 の抗体と競合するその能力について試験される第 2 の非標識抗体とを含む溶液中でインキュベートする。第 2 の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。コントロールとして、固定化された B 7 - H 4 を、第 1 の標識抗体を含むが、第 2 の非標識抗体を含まない溶液中でインキュベートする。第 1 の抗体が B 7 - H 4 に結合可能な条件下でインキュベーションした後、過剰な未結合抗体を除去し、固定化された B 7 - H 4 に結合した標識の量を測定する。固定化された B 7 - H 4 に結合した標識の量が、コントロール試料と比較して試験試料中で実質的に低減する場合は、B 7 - H 4 への結合について、第 2 の抗体が第 1 の抗体と競合していることを示す。Harlow 及び Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual 第 14 章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照されたい。

【 0 2 4 6 】

D . イムノコンジュゲート

本発明は、1 種又は複数の細胞傷害剤、例えば、化学療法剤又は化学療法薬、成長阻害剤、毒素 (例えば、細菌、真菌、植物若しくは動物起源のタンパク質毒素、酵素的に活性な毒素、又はそれらの断片) 又は放射性同位体 (すなわち放射性コンジュゲート) にコンジュゲートされた、本明細書における抗 B 7 - H 4 抗体を含むイムノコンジュゲートも提供する。

【 0 2 4 7 】

イムノコンジュゲートは、非コンジュゲート薬物の全身投与が、正常細胞に対して許容できないレベルの毒性をもたらし得る場合に、薬物部分を腫瘍へ標的送達することを可能にし、幾つかの実施態様では、その中での細胞内蓄積を可能にする (Polakis P. (2005) Current Opinion in Pharmacology 5:382-387)。

【 0 2 4 8 】

抗体 - 薬物コンジュゲート (ADC) は、抗原を発現する腫瘍細胞に強力な細胞毒性薬物をターゲティングすることによって、抗体及び細胞毒性薬物の両方の特性を兼ね備え (Teicher, B.A. (2009) Current Cancer Drug Targets 9:982-1004)、それによって、有効性を最大にし、オフターゲットな毒性を最小にすることにより治療指数を高める (Carter, P.J. 及び Senter P.D. (2008) The Cancer Jour. 14(3):154-169; Chari, R.V. (2008) Acc. Chem. Res. 41:98-107)、標的とされる化学療法分子である。

【 0 2 4 9 】

本発明のADC化合物としては、抗がん活性を有するものが挙げられる。幾つかの実施態様では、ADC化合物は、薬物部分にコンジュゲートされた、すなわち共有結合的に結合した抗体を含む。幾つかの実施態様では、抗体は、リンカーを介して共有結合的に薬物部分に結合している。本発明の抗体-薬物コンジュゲート(ADC)は、腫瘍組織に有効用量の薬物を選択的に送達し、これによって、治療指数(「治療濃度域」)を増大させながら、より大きな選択性、すなわちより低い有効用量を達成することができる。

【0250】

抗体-薬物コンジュゲート(ADC)の薬物部分(D)は、細胞傷害性又は細胞増殖抑制作用を有する任意の化合物、部分又は基を含むことができる。薬物部分は、これらに限定されないが、チューブリン結合、DNA結合又はインターカレーション、並びにRNAポリメラーゼ、タンパク質合成及び/又はトポイソメラーゼの阻害を含めた機序によって、その細胞傷害性及び細胞増殖抑制作用を与えることができる。例示的薬物部分は、これらに限定されないが、メイタンシノイド、ドラスタチン、オーリスタチン、カリケアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)、ネモルピシン及びその誘導体、PNU-159682、アントラサイクリン、デュオカルマイシン、ピンカアルカロイド、タキサン、トリコテセン、CC1065、カンプトテシン、エリナフィド、並びに細胞傷害性活性を有するそれらの立体異性体、同配体、アナログ及び誘導体が挙げられる。そうしたイムノコンジュゲートの非限定例を、以下でさらに詳細に論じる。

【0251】

1. 例示的抗体-薬物コンジュゲート

抗体-薬物コンジュゲート(ADC)化合物の例示の実施態様は、腫瘍細胞を標的とする抗体(Ab)、薬物部分(D)、及びAbをDに結合させるリンカー部分(L)を含む。幾つかの実施態様では、抗体は、リジン及び/又はシステインなどの1つ又は複数のアミノ酸残基を介してリンカー部分(L)に結合する。

【0252】

例示的ADCは、式I:



を有し、式中、pは1から約20である。幾つかの実施態様では、抗体にコンジュゲートすることができる薬物部分の数は、遊離システイン残基の数によって制限される。幾つかの実施態様では、遊離システイン残基を、本明細書に記載の方法によって抗体のアミノ酸配列に導入する。例示的な式IのADCとしては、これらに限定されないが、1、2、3又は4つの操作したシステインアミノ酸を有する抗体(Lyon, R.ら(2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138)が挙げられる。幾つかの実施態様では、1つ又は複数の遊離システイン残基は、操作しなくても抗体中に既に存在し、そのような場合は、現存する遊離システイン残基を使用して、抗体を薬物にコンジュゲートすることができる。幾つかの実施態様では、1つ又は複数の遊離システイン残基を生成するために、抗体のコンジュゲーションに先立って抗体を還元条件に曝露する。

【0253】

a) 例示的リンカー

「リンカー」(L)は、1つ又は複数の薬物部分(d)を抗体(Ab)に結合して、式Iの抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を形成するのに使用することができる、二官能性又は多官能性部分である。幾つかの実施態様では、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)は、薬物及び抗体に共有結合的に結合する反応官能基を有するリンカーを使用して調製することができる。例えば、幾つかの実施態様では、抗体(Ab)のシステインチオールは、リンカーの反応性官能基との結合、又はADCを作製するための薬物-リンカー中間体を形成することができる。

【0254】

一態様では、リンカーは、抗体中存在する遊離システインと反応して共有結合を形成することができる官能性を有する。非限定的な例示的なそうした反応官能基としては、マレイミド、ハロアセトアミド、-ハロアセチル、スクシンイミドエステルなどの活性化エ

10

20

30

40

50

ステル、4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアネート、及びイソチオシアネートが挙げられる。例えば、Kl us s m a n ら (2 0 0 4)、B i o c o n j u g a t e C h e m i s t r y 1 5 (4) : 7 6 5 - 7 7 3 の 7 6 6 頁のコンジュゲーション方法、及び本明細書の実施例を参照されたい。

【0255】

幾つかの実施態様では、リンカーは、抗体に存在する求電子基と反応することができる官能性を有する。例示的なそうした求電子基としては、これらに限定されないが、アルデヒド基及びケトンカルボニル基が挙げられる。幾つかの実施態様では、リンカーの反応官能基のヘテロ原子は、抗体の求電子基と反応することができ、抗体ユニットに対して共有結合を形成することができる。非限定的な例示的なそうした反応官能基としては、これらに限定されないが、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及びアリアルヒドラジドが挙げられる。

10

【0256】

リンカーは、1つ又は複数のリンカー構成成分を含むことができる。例示的リンカー構成成分としては、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」又は「vc」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、及び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(「MCC」)が挙げられる。様々なリンカー構成成分が当該技術分野で知られており、それらの幾つかを以下に記載する。

20

【0257】

リンカーは、薬物の放出を促進する「切断可能なリンカー」でもよい。非限定的な例示的な切断可能なリンカーとしては、(例えばヒドラゾンを含む)酸不安定性リンカー、プロテアーゼ感受性(例えばペプチダーゼ感受性)リンカー、感光性リンカー又はジスルフィド含有リンカー(Chariら, Cancer Research 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)が挙げられる。

【0258】

ある種の実施態様では、リンカーは、以下の式I I :

30

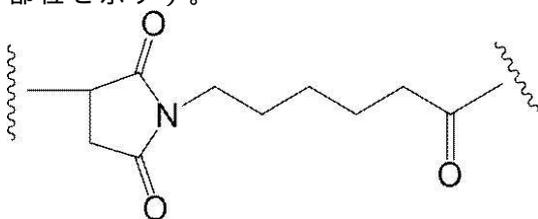


を有し、式中、Aは「ストレッチャーユニット」であり、aは0から1の整数である。Wは「アミノ酸ユニット」であり、wは0から12の整数である。Yは「スペーサーユニット」であり、yは0、1又は2である。Ab、D及びpは、式Iについて上記で定義されている。そうしたリンカーの例示的实施態様は、本明細書に参照により明確に援用される、米国特許第7498298号に記載されている。

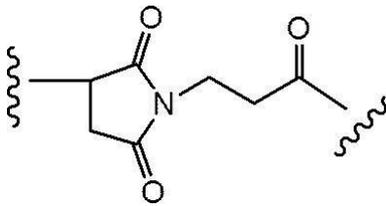
【0259】

幾つかの実施態様では、リンカー構成成分は、抗体を別のリンカー構成成分又は薬物部分に結合する「ストレッチャーユニット」を含む。非限定的な例示的ストレッチャーユニットを以下に示す(式中、波線は抗体、薬物又は追加的なリンカー構成成分への共有結合部位を示す)。

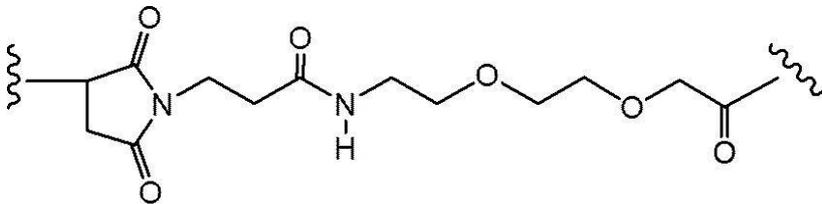
40



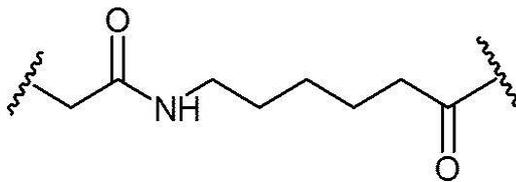
MC



MP



mPEG



【0260】

幾つかの実施態様では、リンカー構成成分は「アミノ酸ユニット」を含む。幾つかのそうした実施態様では、アミノ酸ユニットによって、プロテアーゼによるリンカーの切断が可能になり、それによって、リソソーム酵素などの細胞内プロテアーゼ曝露の際に、イムノコンジュゲートからの薬物放出が促進される (Doroninaら (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784)。例示的アミノ酸ユニットとしては、これらに限定されないが、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド及びペンタペプチドが挙げられる。例示的ジペプチドとしては、これらに限定されないが、バリン - シトルリン (v c 又は v a l - c i t)、アラニン - フェニルアラニン (a f 又は a l a - p h e)、フェニルアラニン - リジン (f k 又は p h e - l y s)、フェニルアラニン - ホモリジン (p h e - h o m o l y s)、及び N - メチル - バリン - シトルリン (M e - v a l - c i t) が挙げられる。例示的トリペプチドとしては、これらに限定されないが、グリシン - バリン - シトルリン (g l y - v a l - c i t) 及びグリシン - グリシン - グリシン (g l y - g l y - g l y) が挙げられる。アミノ酸ユニットは、天然に生じるアミノ酸残基及び/又はマイナーなアミノ酸及び/又は天然に存在しないアミノ酸アナログ、例えばシトルリンを含み得る。アミノ酸ユニットは、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシン B、C 及び D 又はプラスミンプロテアーゼによる酵素切断について、設計及び最適化することができる。

【0261】

幾つかの実施態様では、リンカー構成成分は、直接的に又はストレッチャーユニット及び/若しくはアミノ酸ユニットを介して抗体を薬物部分に結合する「スペーサー」ユニットを含む。スペーサーユニットは、「自壊性」でもよいし、「非自壊性」でもよい。「非自壊性」スペーサーユニットは、ADCの切断の際に、一部又はすべてのスペーサーユニットが薬物部分に結合したままのスペーサーユニットである。非自壊性スペーサーユニットの例としては、これらに限定されないが、グリシンスペーサーユニット及びグリシン - グリシンスペーサーユニットが挙げられる。幾つかの実施態様では、グリシン - グリシンスペーサーユニットを含むADCの腫瘍細胞関連プロテアーゼによる酵素切断によって、ADCの残部からグリシン - グリシン - 薬物部分が放出される。幾つかのそうした実施態様では、グリシン - グリシン - 薬物部分が、腫瘍細胞において加水分解ステップにかけられ、それにより、薬物部分からグリシン - グリシンスペーサーユニットが切断される。

【0262】

「自壊性」スペーサーユニットによって、薬物部分の放出が可能になる。ある種の実施

10

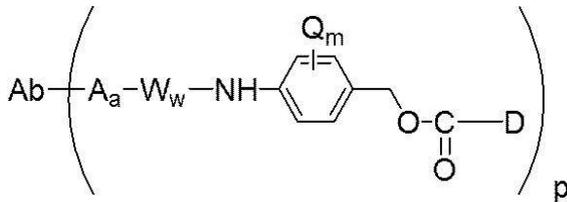
20

30

40

50

態様では、リンカーのスペーサーユニットは、p - アミノベンジルユニットを含む。幾つかのそうした実施態様では、p - アミノベンジルアルコールが、アミド結合を介してアミノ酸ユニットに結合し、カルバミン酸、メチルカルバミン酸又は炭酸塩が、ベンジルアルコールと薬物の間に作られる (Hamannら (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15: 1087-1103)。幾つかの実施態様では、スペーサーユニットは、p - アミノベンジロキシカルボニル (P A B) である。幾つかの実施態様では、自壊性リンカーを含む A D C は、構造：



10

を有し、式中、Qは - C₁ - C₈ アルキル、- O - (C₁ - C₈ アルキル)、- ハロゲン、- ニトロ又は - シアノであり、mは0から4に及ぶ整数であり、pは1から約20の範囲である。幾つかの実施態様では、pは1から10、1から7、1から5、又は1から4の範囲である。

【0263】

自壊性スペーサーの他の例としては、これらに限定されないが、P A B基、例えば、2 - アミノイミダゾール - 5 - メタノール誘導体 (米国特許第7375078号; Hayら (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) 及びオルソ - 又はパラ - アミノベンジルアセタールと電子的に類似している芳香族化合物が挙げられる。幾つかの実施態様では、置換及び未置換の4 - アミノ酪酸アミド (Rodriguesら (1995) Chemistry Biology 2:223)、適切に置換されたピシクロ [2.2.1] 及びピシクロ [2.2.2] 環系 (Stormら (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)、並びに2 - アミノフェニルプロピオン酸アミド (Amsberryら (1990) J. Org. Chem. 55:5867) などの、アミド結合加水分解の際に環化を受けるスペーサーを使用することができる。グリシン残基の - 炭素への薬物の結合は、A D Cにおいて有用であり得る自壊性スペーサーの別の例である (Kingsburyら (1984) J. Med. Chem. 27:1447)。

30

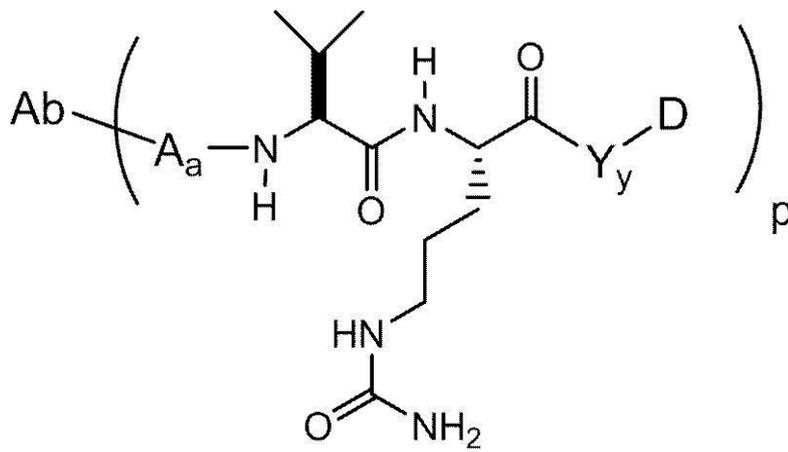
【0264】

幾つかの実施態様では、リンカーLは、分枝状の、多官能性リンカー部分を介して1つより多い薬物部分を抗体へ共有結合するための樹状型リンカー (Sunら (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sunら (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768) でもよい。樹状リンカーは、A D Cの力価に関係している、抗体に対する薬物のモル比、すなわち負荷を増加させることができる。したがって、抗体がたった1つの反応性システインチオール基のみを有する場合は、多数の薬物部分は、樹状リンカーを介して結合することができる。

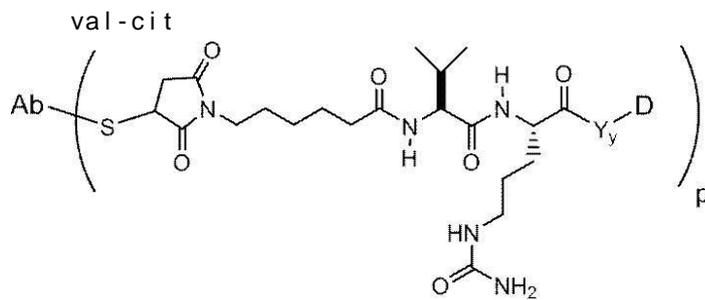
【0265】

式IのA D Cと関連して、非限定的な例示的リンカーを以下に示す。

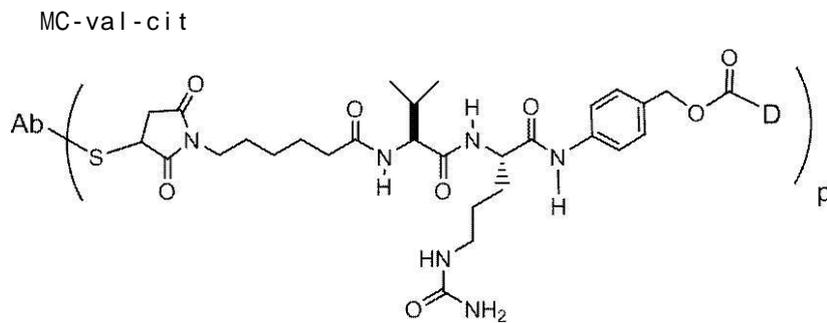
40



10



20

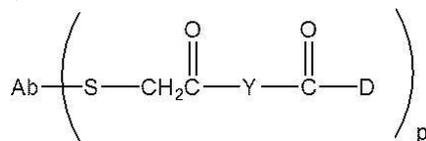
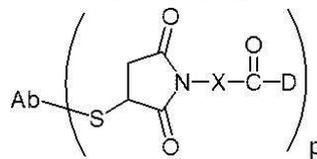


30

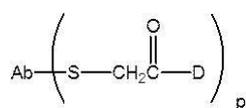
MC-val-cit-PAB

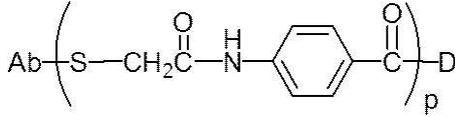
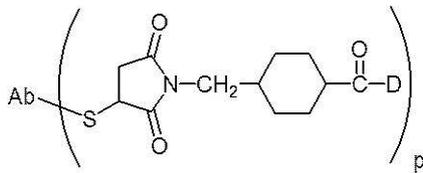
【 0 2 6 6 】

さらなる非限定的な例示的ADCは、以下の構造：

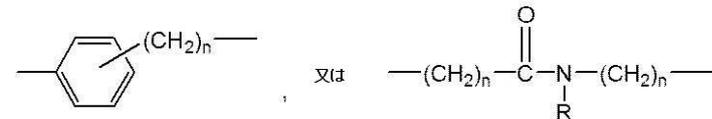
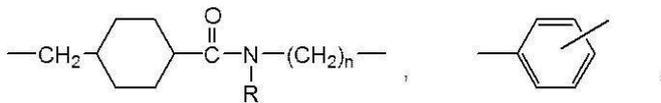
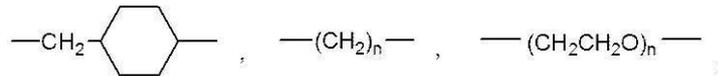


40



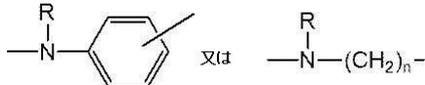


を含み、式中、Xは、



であり、

Yは、



であり、

各Rは独立して、H又はC₁ - C₆アルキルであり、nは1から12である。

【0267】

典型的には、ペプチド型リンカーは、2つ以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片の間にペプチド結合を形成することによって、調製することができる。そうしたペプチド結合は、例えば、液相合成法(例えば、E. Schroder及びK. Lubke(1965) "The Peptides", 1巻, pp 76-136, Academic Press)に従って調製することができる。

【0268】

幾つかの実施態様では、リンカーは、溶解度及び/又は反応性を調節する基で置換される。非限定例として、スルホネート(-SO₃⁻)又はアンモニウムなどの荷電置換基は、リンカー試薬の水溶性を高めることができ、ADCを調製するために用いられる合成経路に応じて、抗体及び/若しくは薬物部分とのリンカー試薬のカップリング反応を容易にするか、又はDとのAb-L(抗体-リンカー中間体)のカップリング反応若しくはAbとのD-L(薬物-リンカー中間体)のカップリング反応を容易にすることができる。幾つかの実施態様では、リンカーの一部が抗体に結合し、リンカーの一部が薬物に結合し、次いで、Ab-(リンカー部分)^aが薬物-(リンカー部分)^bに結合して、式IのADCを形成する。幾つかのそうした実施態様では、抗体は、1つより多い(リンカー部分)^a置換基を含み、その結果、1つより多い薬物が式IのADCの抗体に結合する。

【0269】

本発明の化合物は、これらに限定されないが、以下のリンカー試薬を用いて調製されるADCを特に意図する。ビス-マレイミド-トリオキシエチレングリコール(BMPEO)、N-(マレイミドプロピルオキシ)-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(

10

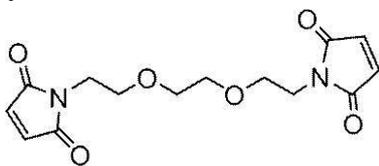
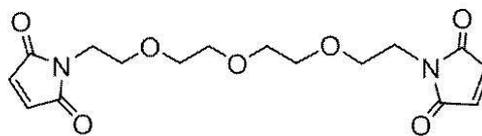
20

30

40

50

BMPS)、N-(-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミドエステル(EMCS)、N-[-マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステル(GMBS)、1,6-ヘキサン-ビス-ビニルスルホン(HBVS)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミドカプロエート)(LC-SMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキスクシンイミドエステル(MBS)、4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド(MPBH)、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)、スクシンイミジルヨードアセテート(SIA)、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-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-ピリジルチオ)ペンタノエート(SPP)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、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)、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)、イミノチオラン(IT)、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC及びスルホ-SMPB、並びにスクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート(SVSB)(ビス-マレイミド試薬:ジチオビスマレイミドエタン(DTME)、1,4-ビスマレイミドブタン(BMB)、1,4-ビスマレイミジル-2,3-ジヒドロキシブタン(BMDB)、ビスマレイミドヘキサン(BMH)、ビスマレイミドエタン(BMOE)、BM(PEG)₂(以下に示す)、及びBM(PEG)₃(以下に示す);イミドエステルの二官能性誘導体(アジブイミド酸ジメチルHClなど)、活性エステル(スベリン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(トルエン2,6-ジイソシアネートなど)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)を含む)。幾つかの実施態様では、ビス-マレイミド試薬によって、抗体のシステインのチオール基の、チオール含有薬物部分、リンカー又はリンカー-薬物中間体への結合が可能になる。チオール基と反応性の他の官能基としては、これらに限定されないが、ヨードアセトアミド、プロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネート及びイソチオシアネートが挙げられる。

BM(PEG)₂BM(PEG)₃

【0270】

特定の有用なリンカー試薬は、Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)、Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO)などの様々な商業的供給元から得ることができ、又は当該技術分野で記載されている手順、例えば、Tokira (2002) J. Org. Chem. 67: 1866-1872; Dubowchik (1997) Tetrahedron Letters, 38: 5257-60; Walker, M. A. (1995) J. Org. Chem. 60: 5352-5355; Frisch (1996) Bioconjugate Chem. 7: 180-186; 米国特許第6214345号; 国際公開第02/088172号; 米国特許出願公開第2003130189号; 米国特許出願公開第2003096743号; 国際公開第03/026577号; 国際公開第03/043583号; 及び国際公開第04/032828号に記載されている手順に従って合成することができる。

10

20

30

40

50

【0271】

炭素14標識した1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの、抗体へのコンジュゲーションについての例示的キレート剤である。例えば、国際公開第94/11026号を参照されたい。

【0272】

b) 例示的薬物部分

(1) メイタンシン及びメイタンシノイド

幾つかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、1つ又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートされた抗体を含む。メイタンシノイドはメイタンシンの誘導體であり、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。メイタンシンは、東アフリカの灌木であるメイテナス・セラタ(Maytenus serrata)から最初に単離された(米国特許第3896111号)。続いて、ある種の微生物も、メイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステル(米国特許第4151042号)などのメイタンシノイドを産生することが発見された。合成メイタンシノイドは、例えば、米国特許第4137230号;第4248870号;第4256746号;第4260608号;第4265814号;第4294757号;第4307016号;第4308268号;第4308269号;第4309428号;第4313946号;第4315929号;第4317821号;第4322348号;第4331598号;第4361650号;第4364866号;第4424219号;第4450254号;第4362663号;及び第4371533号に開示されている。

【0273】

メイタンシノイド薬物部分は、抗体-薬物コンジュゲートにおける魅力的な薬物部分である。これは、メイタンシノイド薬物部分が、(i)発酵又は発酵産物の化学修飾又は誘導體化によって調製するのに比較的利用しやすく、(ii)非ジスルフィドリンカーを介する抗体へのコンジュゲーションに適した官能基を用いる誘導體化を受けることができ、(iii)血漿中で安定であり、(iv)種々の腫瘍細胞株に対して有効であることが理由である。

【0274】

メイタンシノイド薬物部分としての使用に適した特定のメイタンシノイドは、当該技術分野で知られており、天然源から既知の方法に従って単離することができ、又は遺伝子工学的技法を使用して産生することができる(例えば、Yura(2002)PNAS99:7968-7973を参照されたい)。メイタンシノイドは、既知の方法に従って合成的に調製することもできる。

【0275】

例示的メイタンシノイド薬物部分としては、これらに限定されないが、C-19-デクロロ(米国特許第4256746号)(例えば、アンサマイトシンP2の水素化アルミニウムリチウム還元によって調製される);C-20-ヒドロキシ(又はC-20-デメチル)+/-C-19-デクロロ(米国特許第4361650号及び第4307016号)(例えば、ストレプトマイセス(Streptomyces)若しくは放射菌(Actinomyces)を使用する脱メチル化又はLAHを使用する脱塩素によって調製される);及びC-20-デメトキシ、C-20-アシルオキシ(-OCOR)、+/-デクロロ(米国特許第4294757号)(例えば、塩化アシルを使用するアシル化によって調製される)などの修飾された芳香族環を有するもの、並びに芳香族環の他の位置での修飾を有するものが挙げられる。

【0276】

例示的メイタンシノイド薬物部分としては、C-9-SH(米国特許第4424219号)(例えば、メイタンシノールとH₂S又はP₂S₅との反応によって調製される);C-14-アルコキシメチル(デメトキシ/CH₂OR)(米国特許第4331598号);C-14-ヒドロキシメチル又はアシルオキシメチル(CH₂OH又はCH₂OAc)(米国特許第4450254号)(例えば、ノカルジア(Nocardia)から調製

10

20

30

40

50

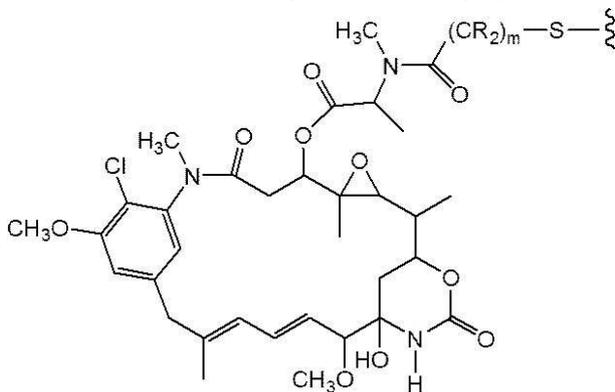
される) ; C - 15 - ヒドロキシノアシルオキシ (米国特許第 4 3 6 4 8 6 6 号) (例えば、ストレプトマイセスによるメイタンシノールの変換によって調製される) ; C - 15 - メトキシ (米国特許第 4 3 1 3 9 4 6 号及び第 4 3 1 5 9 2 9 号) (例えば、トレウィア・ヌドロフロラ (Trewia nudiflora) から単離される) ; C - 18 - N - デメチル (米国特許第 4 3 6 2 6 6 3 号及び第 4 3 2 2 3 4 8 号) (例えば、ストレプトマイセスによるメイタンシノールの脱メチル化によって調製される) ; 及び 4 , 5 - デオキシ (米国特許第 4 3 7 1 5 3 3 号) (例えば、メイタンシノールの三塩化チタン / LAH 還元によって調製される) などの修飾を有するものも挙げられる。

【 0 2 7 7 】

メイタンシノイド化合物の多くの位置が結合位置として有用である。例えば、エステル結合は、従来のカップリング技法を使用して、ヒドロキシル基との反応によって形成することができる。幾つかの実施態様では、反応は、ヒドロキシル基を有する C - 3 位、ヒドロキシメチルで修飾された C - 1 4 位、ヒドロキシル基で修飾された C - 1 5 位、及びヒドロキシル基を有する C - 2 0 位で起こり得る。幾つかの実施態様では、結合は、メイタンシノール又はメイタンシノールアナログの C - 3 位で形成される。

【 0 2 7 8 】

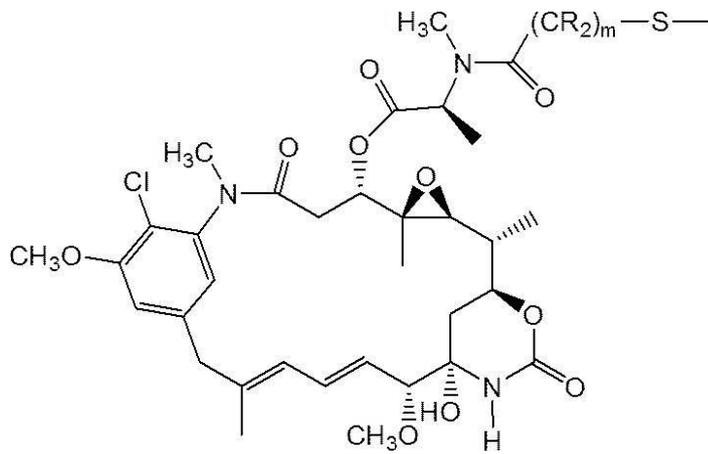
メイタンシノイド薬物部分には、構造 :



を有するものが含まれ、式中、波線はメイタンシノイド薬物部分の硫黄原子の、ADCのリンカーへの共有結合を示す。各 R は独立して、H 又は C₁ - C₆ アルキルでもよい。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、エタニル又はプロピルでもよく、すなわち、m は、1、2 又は 3 でもよい (米国特許第 6 3 3 4 1 0 号 ; 米国特許第 5 2 0 8 0 2 0 号 ; Chari ら (1992) Cancer Res. 52:127-131; Liu ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8618-8623)。

【 0 2 7 9 】

メイタンシノイド薬物部分のすべての立体異性体、すなわち、キラル炭素での R 及び S 配置の任意の組み合わせ (その全内容が参照により援用される、米国特許第 7 2 7 6 4 9 7 号 ; 米国特許第 6 9 1 3 7 4 8 号 ; 米国特許第 6 4 4 1 1 6 3 号 ; 米国特許第 6 3 3 4 1 0 (RE 3 9 1 5 1) 号 ; 米国特許第 5 2 0 8 0 2 0 号 ; Widdison ら (2006) J. Med. Chem. 49:4392-4408) が本発明の ADC について企図される。幾つかの実施態様では、メイタンシノイド薬物部分は、以下の立体化学 :

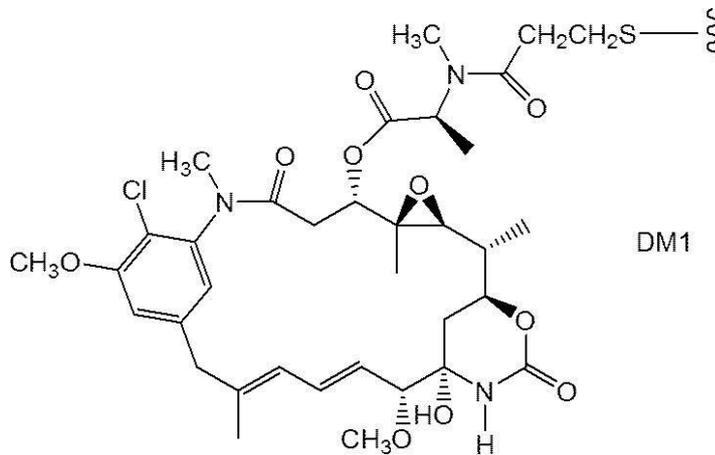


10

を有する。

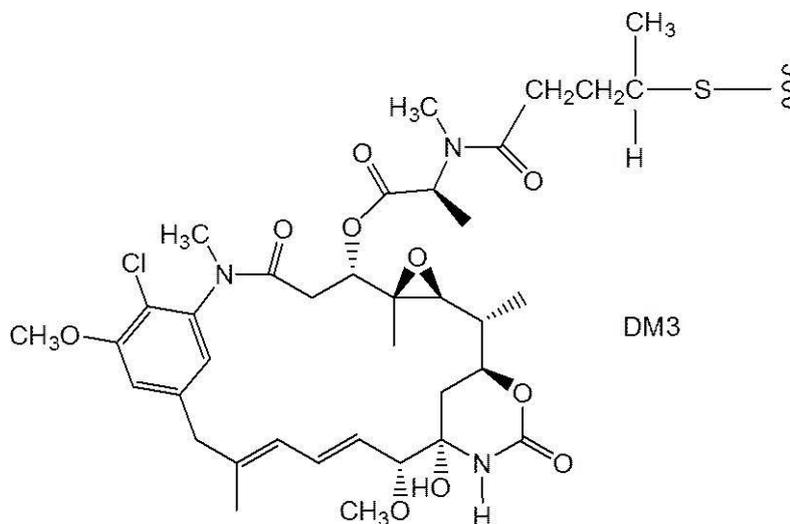
【 0 2 8 0 】

メイトンシノイド薬物部分の例示的实施態様としては、これらに限定されないが、構造：



20

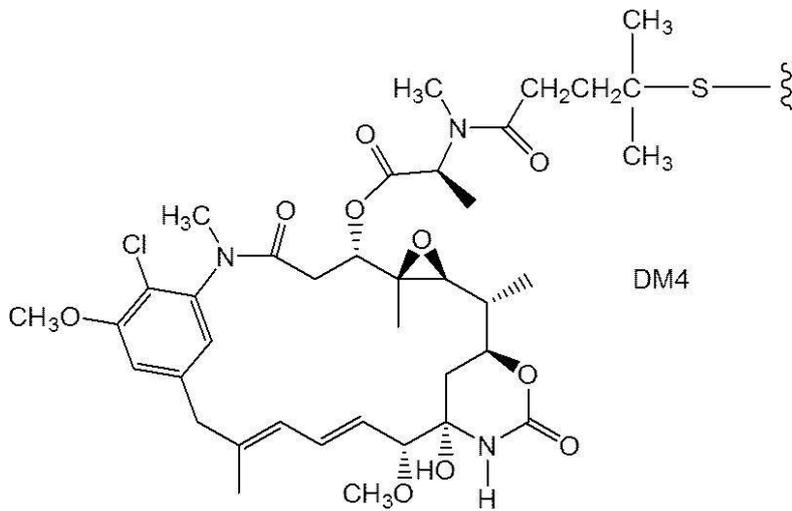
DM1



30

DM3

40



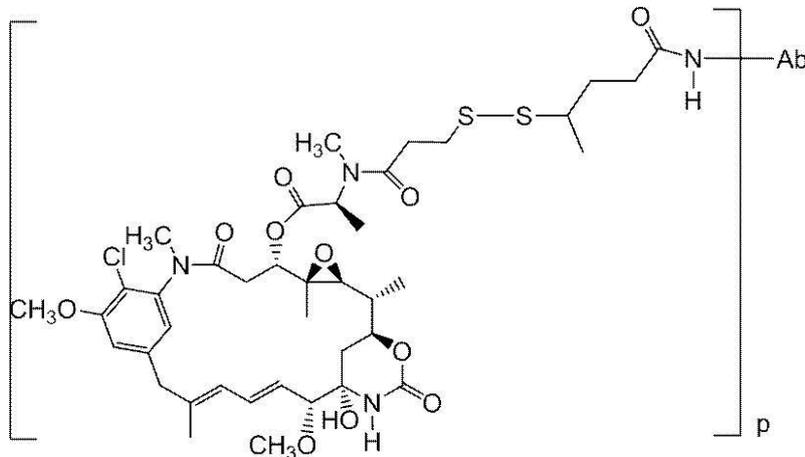
10

を有する、DM1、DM3及びDM4が挙げられ、式中、波線は抗体-薬物コンジュゲートのリンカー(L)への薬物の硫黄原子の共有結合を示す。

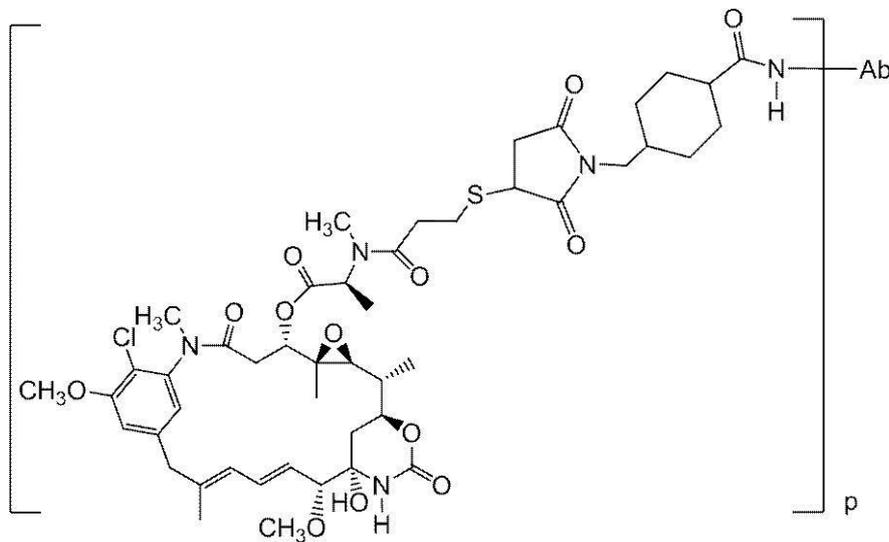
【0281】

他の例示的メイトンシノイド抗体-薬物コンジュゲートは、以下の構造及び略称を有する(式中、Abは抗体であり、pは1から約20である。幾つかの実施態様では、pは1から10、pは1から7、pは1から5、又はpは1から4である)。

20



30



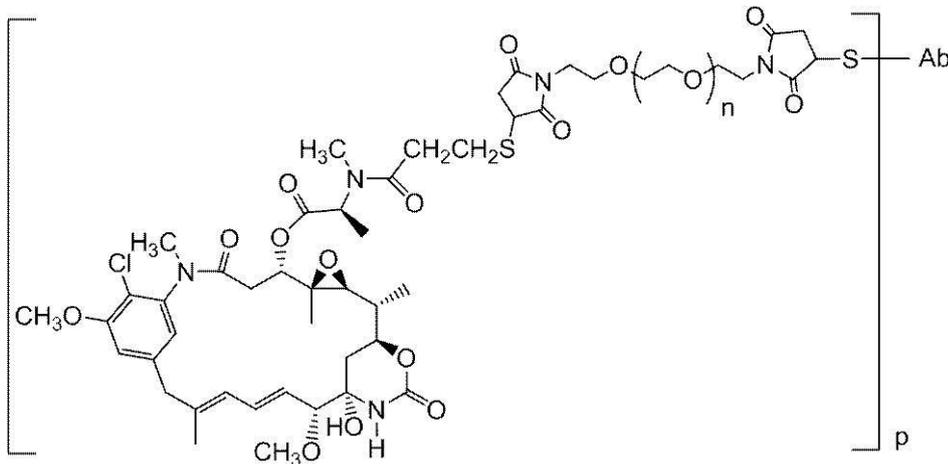
40

【0282】

DM1が、BMPEOリンカーを介して抗体のチオール基へ結合する場合の例示的抗体

50

- 薬物コンジュゲートは、構造及び略称：



10

を有し、式中、A bは抗体であり、nは0、1又は2であり、pは1から約20である。幾つかの実施態様では、pは1から10、pは1から7、pは1から5、又はpは1から4である。

【0283】

メイタンシノイドを含むイムノコンジュゲート、その作製方法及びその治療的使用は、例えば、米国特許第5208020号及び第5416064号、米国特許出願公開第2005/0276812A1号、並びに欧州特許第0425235B1号に開示されており、その開示は、本明細書に参照により明確に援用される。Liuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996); 及びCharira、Cancer Research 52: 127-131 (1992)も参照されたい。

20

【0284】

幾つかの実施態様では、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合することによって、抗体又はメイタンシノイド分子の何れかの生物活性を顕著に減弱させることなく調製することができる。例えば、米国特許第5208020号を参照されたい(その開示は、本明細書に参照により明確に援用される)。幾つかの実施態様では、抗体分子あたり平均3-4個のメイタンシノイド分子がコンジュゲートされたADCは、抗体の機能又は溶解度に負の影響を及ぼすことなく、標的細胞の細胞傷害性の増強において有効性を示した。場合によっては、1分子の毒素/抗体でさえ、裸抗体の使用において細胞傷害性を増強することが期待される。

30

【0285】

抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するための例示的連結基としては、例えば、本明細書に記載のもの、及びその開示が本明細書に参照により明確に援用される、米国特許第5208020号; 欧州特許第0425235B1号; Charira Cancer Research 52: 127-131 (1992); 米国特許出願公開第2005/0276812A1号; 及び米国特許出願公開第2005/016993A1号に開示されているものが挙げられる。

40

【0286】

(2) オーリスタチン及びドラスタチン

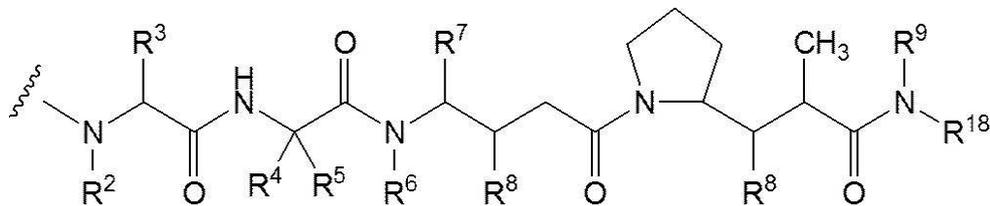
薬物部分としては、ドラスタチン、オーリスタチン、並びにそれらのアナログ及び誘導体(米国特許第5635483号; 米国特許第5780588号; 米国特許第5767237号; 米国特許第6124431号)が挙げられる。オーリスタチンは、海生軟体動物の化合物のドラスタチン-10の誘導体である。いかなる特定の理論にも束縛されることを意図するものではないが、ドラスタチン及びオーリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解並びに核及び細胞の分裂に干渉すること(Woykeら(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)、並びに抗がん性(米国特許第5663149号)及び

50

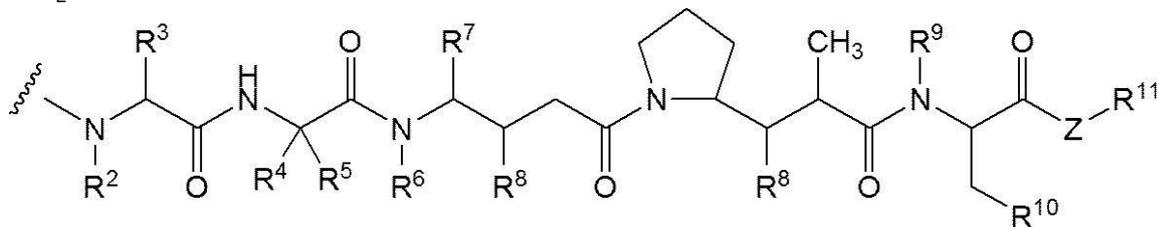
抗真菌活性 (Pettitら(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965) を有することが示されている。ドラスタチン/オーリスタチン薬物部分は、ペプチド性薬物部分のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端を介して、抗体に結合することができる(国際公開第02/088172号; Doroninaら(2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Franciscoら(2003) Blood 102(4):1458-1465)。

【0287】

例示的なオーリスタチンの実施態様としては、N末端に連結したモノメチルオーリスタチン薬物部分D_E及びD_Fが挙げられ、これらは、その開示が、参照によりその全内容が明確に援用される、米国特許第7498298号及び米国特許第7659241号に開示されている。



D_E



D_F

式中、D_E及びD_Fの波線は抗体又は抗体-リンカー構成成分への共有結合部位を示し、独立して各位置で、

R²は、H及びC₁-C₈アルキルから選択され、

R³は、H、C₁-C₈アルキル、C₃-C₈炭素環、アリール、C₁-C₈アルキル-アリール、C₁-C₈アルキル-(C₃-C₈炭素環)、C₃-C₈複素環及びC₁-C₈アルキル-(C₃-C₈複素環)から選択され、

R⁴は、H、C₁-C₈アルキル、C₃-C₈炭素環、アリール、C₁-C₈アルキル-アリール、C₁-C₈アルキル-(C₃-C₈炭素環)、C₃-C₈複素環及びC₁-C₈アルキル-(C₃-C₈複素環)から選択され、

R⁵は、H及びメチルから選択され、

又はR⁴及びR⁵は、共同で炭素環を形成し、式-(CR^aR^b)_n-を有し(式中、R^a及びR^bは、H、C₁-C₈アルキル及びC₃-C₈炭素環から独立して選択され、nは2、3、4、5及び6から選択される)、

R⁶は、H及びC₁-C₈アルキルから選択され、

R⁷は、H、C₁-C₈アルキル、C₃-C₈炭素環、アリール、C₁-C₈アルキル-アリール、C₁-C₈アルキル-(C₃-C₈炭素環)、C₃-C₈複素環及びC₁-C₈アルキル-(C₃-C₈複素環)から選択され、

各R⁸は、H、OH、C₁-C₈アルキル、C₃-C₈炭素環及びO-(C₁-C₈アルキル)から独立して選択され、

R⁹は、H及びC₁-C₈アルキルから選択され、

R¹⁰は、アリール又はC₃-C₈複素環から選択され、

Zは、O、S、NH又はNR¹²であり(式中、R¹²はC₁-C₈アルキルである)

R¹¹は、H、C₁-C₂₀アルキル、アリール、C₃-C₈複素環、-(R¹³O)_m-R¹⁴、又は-(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂から選択され、

mは、1-1000に及ぶ整数であり、

10

20

30

40

50

R^{13} は、 $C_2 - C_8$ アルキルであり、
 R^{14} は、H 又は $C_1 - C_8$ アルキルであり、
 R^{15} の各出現は、独立に、H、COOH、 $-(CH_2)_n - N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n - SO_3H$ 又は $-(CH_2)_n - SO_3 - C_1 - C_8$ アルキルであり、
 R^{16} の各出現は、独立に、H、 $C_1 - C_8$ アルキル又は $-(CH_2)_n - COOH$ であり、
 R^{18} は $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2$ - アリール、 $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2 - (C_3 - C_8$ 複素環)、及び $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2 - (C_3 - C_8$ 炭素環) から選択され、

n は、0 から 6 に及ぶ整数である。

10

【0288】

一実施態様では、 R^3 、 R^4 及び R^7 は、独立して、イソプロピル又は *sec*-ブチルであり、 R^5 は、-H 又はメチルである。例示的实施態様では、 R^3 及び R^4 はそれぞれイソプロピルであり、 R^5 は -H であり、 R^7 は *sec*-ブチルである。

【0289】

さらに別の実施態様では、 R^2 及び R^6 はそれぞれメチルであり、 R^9 は -H である。

【0290】

なお別の実施態様では、 R^8 の各出現は $-OCH_3$ である。

【0291】

例示的实施態様では、 R^3 及び R^4 はそれぞれイソプロピルであり、 R^2 及び R^6 はそれぞれメチルであり、 R^5 は -H であり、 R^7 は *sec*-ブチルであり、 R^8 の各出現は $-OCH_3$ であり、 R^9 - H である。

20

【0292】

一実施態様では、Z は、-O- 又は -NH- である。

【0293】

一実施態様では、 R^{10} はアリールである。

【0294】

例示的实施態様では、 R^{10} は -フェニルである。

【0295】

例示的实施態様では、Z が -O- である場合は、 R^{11} は、-H、メチル又は *t*-ブチルである。

30

【0296】

一実施態様では、Z が -NH である場合は、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ であり、式中、 R^{15} は $-(CH_2)_n - N(R^{16})_2$ であり、 R^{16} は、 $-C_1 - C_8$ アルキル又は $-(CH_2)_n - COOH$ である。

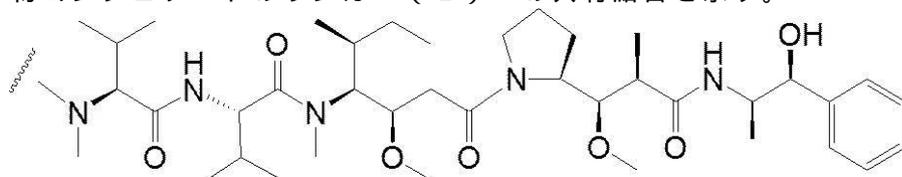
【0297】

別の実施態様では、Z が -NH である場合は、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ であり、式中、 R^{15} は $-(CH_2)_n - SO_3H$ である。

【0298】

式 D_E の例示的なオーリスタチンの実施態様は MMAE であり、式中、波線は抗体 - 薬物コンジュゲートのリンカー (L) への共有結合を示す。

40

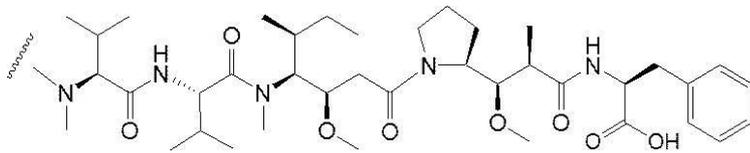


MMAE

【0299】

式 D_F の例示的なオーリスタチンの実施態様は MMAF であり、式中、波線は抗体 - 薬物コンジュゲートのリンカー (L) への共有結合を示す。

50



MMAF

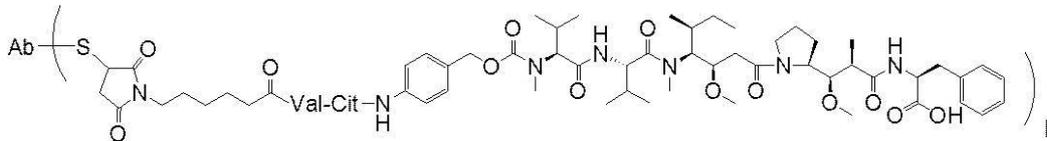
【0300】

他の例示の実施態様としては、ペントペプチドオーリスタチン薬物部分のC末端にフェニルアラニンカルボキシ修飾を有するモノメチルバリン化合物（国際公開第2007/008848号）、及びペントペプチドオーリスタチン薬物部分のC末端にフェニルアラニン側鎖修飾を有するモノメチルバリン化合物（国際公開第2007/008603号）が

10

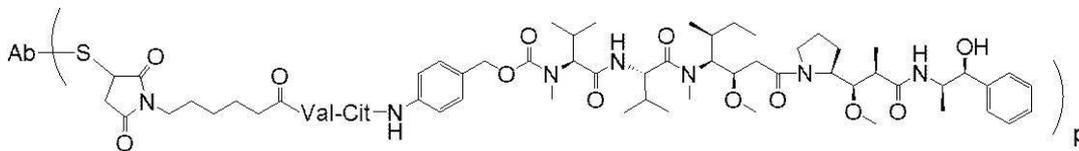
【0301】

MMAE又はMMAF及び様々なリンカー構成成分を含む式IのADCの非限定的な例示の実施態様は、以下の構造及び略称を有する（式中、「Ab」は抗体であり、pは1から約8であり、「Val-Cit」はバリン-シトルリンジペプチドであり、「S」は硫黄原子である）。

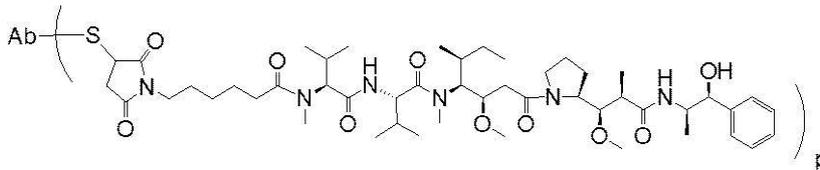


20

Ab-MC-vc-PAB-MMAF

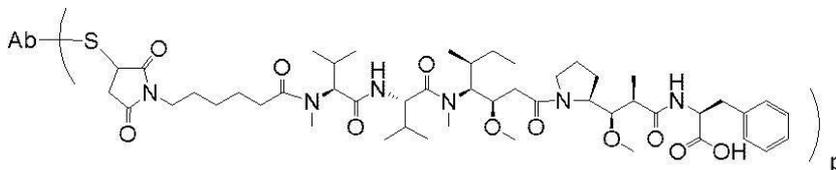


Ab-MC-vc-PAB-MMAE



30

Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

【0302】

MMAF及び様々なリンカー構成成分を含む式IのADCの非限定的な例示の実施態様は、Ab-MC-PAB-MMAF及びAb-PAB-MMAFをさらに含む。タンパク分解で切断不可能なリンカーによって抗体に結合したMMAFを含むイムノコンジュゲートは、タンパク分解で切断可能なリンカーによって抗体に結合したMMAFを含むイムノコンジュゲートと匹敵する活性を有することが示されている（Doroninaら（2006）Bioconjugate Chem. 17:114-124）。幾つかのそうした実施態様では、薬物放出は、細胞における抗体の分解によってもたらさせると考えられている。

40

【0303】

典型的には、ペプチド-ベースの薬物部分は、2つ以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片の間にペプチド結合を形成することによって調製することができる。そうしたペプチド結合は、例えば、液相合成法に従って調製することができる（例えば、E. Schro

50

der及びK. Lubke、「The Peptides」、1巻、76-136頁、1965、Academic Pressを参照されたい)。幾つかの実施態様では、オーリスタチン/ドラスタチン薬物部分は、米国特許第7498298号；米国特許第5635483号；米国特許第5780588号；Pettitら(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465；Pettitら(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G. R.ら、Synthesis, 1996, 719-725；Pettitら(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863；並びにDoronina(2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784の方法に従って調製することができる。

10

【0304】

幾つかの実施態様では、MMAEなどの式D_E及びMMAFなどのD_Fのオーリスタチン/ドラスタチン薬物部分、及び薬物-リンカー中間体、並びにそれらの誘導体、例えばMC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF及びMC-vc-PAB-MMAEは、米国特許第7498298号；Doroninら(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124；及びDoroninら(2003) Nat. Biotech. 21:778-784に記載されている方法を使用して調製することができ、次いで、目的の抗体にコンジュゲートすることができる。

【0305】

(3) カリケアマイシン

幾つかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、1つ又は複数のカリケアマイシン分子にコンジュゲートされた抗体を含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリー及びそのアナログは、ピコモル濃度以下で二本鎖DNAの破断を引き起こすことができる(Hinmanら, (1993) Cancer Research 53:3336-3342; Lodeら, (1998) Cancer Research 58:2925-2928)。カリケアマイシンは、細胞内作用部位を有するが、場合によっては、形質膜を容易に通過しない。したがって、抗体媒介性内部移行を介するこうした薬剤の細胞内取込は、幾つかの実施態様では、その細胞傷害性作用を大きく増強し得る。カリケアマイシン薬物部分を有する抗体-薬物コンジュゲートの調製に関する非限定的な例示的方法は、例えば、米国特許第5712374号；米国特許第5714586号；米国特許第5739116号；及び米国特許第5767285号に記載されている。

20

30

【0306】

(4) ピロロベンゾジアゼピン

幾つかの実施態様では、ADCは、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)を含む。幾つかの実施態様では、PDBダイマーは、特異的なDNA配列を認識し、それに結合する。天然物のアントラマイシンであるPBDは、1965年に最初に報告された(LeimGruberら, (1965) J. Am. Chem. Soc., 87:5793-5795; LeimGruberら, (1965) J. Am. Chem. Soc., 87:5791-5793)。それ以来、ダイマーの三環式PBDスキャフォールド(米国特許第6884799号；米国特許第7049311号；米国特許第7067511号；米国特許第7265105号；米国特許第7511032号；米国特許第7528126号；米国特許第7557099号)を含めて、天然に存在するもの及びアナログの両方の幾つかのPBDが報告されている(Thurstonら, (1994) Chem. Rev. 1994, 433-465)。いかなる特定の理論にも束縛されることを意図するものではないが、ダイマー構造は、B型DNAの副溝を伴う等螺旋性に適切な3次元形状を与え、結合部位でのびったりとした嵌合をもたらすと考えられている(Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley及びNeedham-VanDevanter, (1986) Acc. Chem. Res., 19:230-237)。C2アリアル置換基を有するダイマーのPBD化合物は、細胞傷害剤として有用であることが示されている(Hartleyら(2010) Cancer Res. 70(17):6849-6858; Antonow (2010) J. Med. Chem. 53(7):2927-2941; Howardら(2009) Bioorganic and Med. Chem. Letters 19(22):6463-6466)。

40

【0307】

50

幾つかの実施態様では、PBD化合物は、インビボで除去可能な窒素保護基を用いてN10位において保護することによって、プロドラッグとして用いることができる（国際公開第00/12507号；国際公開第2005/023814号）。

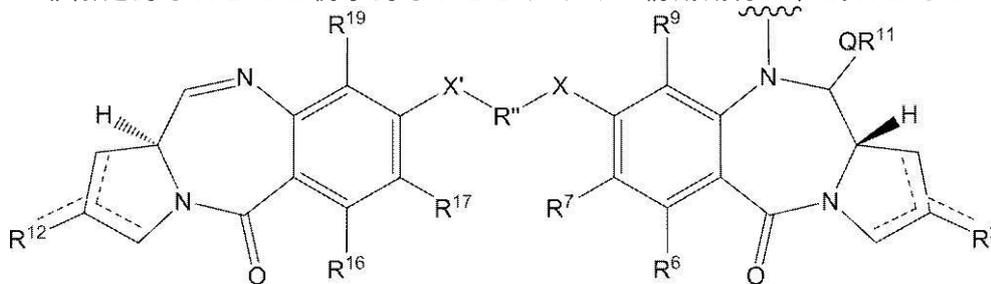
【0308】

PBDダイマーが抗体にコンジュゲートされており、得られたADCは、抗がん特性を有することが示された（米国特許出願公開第2010/0203007号）。非限定的な例示的なPBDダイマーの結合部位としては、5員のピロロ環、PBDユニット間のテザー、及びN10-C11イミン基が挙げられる（国際公開第2009/016516号；米国特許出願公開第2009/304710号；米国特許出願公開第2010/047257号；米国特許出願公開第2009/036431号；米国特許出願公開第2011/0256157号；国際公開第2011/130598号）。

10

【0309】

非限定的なADCの例示的なPBDダイマー構成成分は、式Aのもの：



20

A

並びにその塩及び溶媒和物であり、式中、

波線は、リンカーへの共有結合部位を示し、

点線は、C1及びC2の間又はC2及びC3の間の二重結合の任意選択的な存在を示し、

R²は、H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R及びCORから独立して選択され、任意選択的に八口又はジ八口からさらに選択され、R^Dは、R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H及び八口から独立して選択され、

30

R⁶及びR⁹は、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR[']、NO₂、Me₃Sn及び八口から独立して選択され、

R⁷は、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR[']、NO₂、Me₃Sn及び八口から独立して選択され、

Qは、O、S及びNHから独立して選択され、

R¹¹は、H若しくはRの何れかであり、又は、QがOの場合は、SO₃Mであり、Mは金属カチオンであり、

R及びR[']は、それぞれ独立して、置換されていてもよいC₁₋₈アルキル、C₁₋₁₂アルキル、C₃₋₈ヘテロシクリル、C₃₋₂₀複素環、及びC₅₋₂₀アリール基から選択され、任意選択的に、NRR[']基に関して、R及びR[']は、それらが結合する窒素原子と共に、置換されていてもよい4、5、6又は7員複素環式環を形成し、

40

R¹²、R¹⁶、R¹⁹及びR¹⁷は、それぞれ、R²、R⁶、R⁹及びR⁷について定義した通りであり、

R^{''}は、C₃₋₁₂アルキレン基であり、その鎖は、1つ又は複数のヘテロ原子、例えばO、S、N(H)、NMe及び/又は環が置換されていてもよい芳香族環、例えばベンゼン又はピリジンによって離断されてもよく、

X及びX[']は、O、S及びN(H)から独立して選択される。

【0310】

幾つかの実施態様では、R及びR[']は、それぞれ独立して、置換されていてもよいC₁₋₁₂アルキル、C₃₋₂₀複素環、及びC₅₋₂₀アリール基から選択され、任意選択

50

的に、 NRR' 基に関して、 R 及び R' は、それらが結合する窒素原子と共に、置換されていてもよい 4、5、6 又は 7 員複素環式環を形成する。

【0311】

幾つかの実施態様では、 R^9 及び R^{19} は H である。

【0312】

幾つかの実施態様では、 R^6 及び R^{16} は H である。

【0313】

幾つかの実施態様では、 R^7 及び R^{17} は両方とも OR^{7A} であり、 R^{7A} は、置換されていてもよい C_{1-4} アルキルである。幾つかの実施態様では、 R^{7A} は Me である。幾つかの実施態様では、 R^{7A} は、 Ch_2Ph (式中、 Ph はフェニル基である) である。

10

【0314】

幾つかの実施態様では、 X は O である。

【0315】

幾つかの実施態様では、 R^{11} は H である。

【0316】

幾つかの実施態様では、各単量体ユニットの $\text{C}2$ と $\text{C}3$ の間に二重結合が存在する。

【0317】

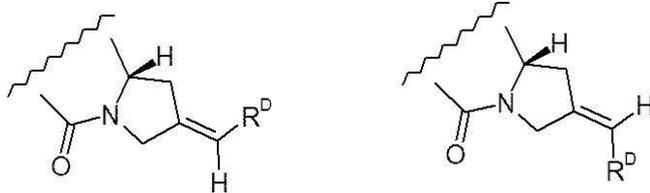
幾つかの実施態様では、 R^2 及び R^{12} は、 H 及び R から独立して選択される。幾つかの実施態様では、 R^2 及び R^{12} は、独立して R である。幾つかの実施態様では、 R^2 及び R^{12} は独立して、置換されていてもよい C_{5-20} アリール又は C_{5-7} アリール又は C_{8-10} アリールである。幾つかの実施態様では、 R^2 及び R^{12} は独立して、置換されていてもよいフェニル、チエニル、ナフチル、ピリジル、キノリニル又はイソキノリニルである。幾つかの実施態様では、 R^2 及び R^{12} は、 $=\text{O}$ 、 $=\text{CH}_2$ 、 $=\text{CH}-\text{R}^D$ 及び $=\text{C}(\text{R}^D)_2$ から独立して選択される。幾つかの実施態様では、 R^2 及び R^{12} は、それぞれ $=\text{CH}_2$ である。幾つかの実施態様では、 R^2 及び R^{12} は、それぞれ H である。幾つかの実施態様では、 R^2 及び R^{12} は、それぞれ $=\text{O}$ である。幾つかの実施態様では、 R^2 及び R^{12} は、それぞれ $=\text{CF}_2$ である。幾つかの実施態様では、 R^2 及び / 又は R^{12} は、独立して $=\text{C}(\text{R}^D)_2$ である。幾つかの実施態様では、 R^2 及び / 又は R^{12} は、独立して $=\text{CH}-\text{R}^D$ である。

20

30

【0318】

幾つかの実施態様では、 R^2 及び / 又は R^{12} が $=\text{CH}-\text{R}^D$ の場合は、それぞれの基は、独立して、以下に示す配置の何れかを有し得る。



(I)

(II)

40

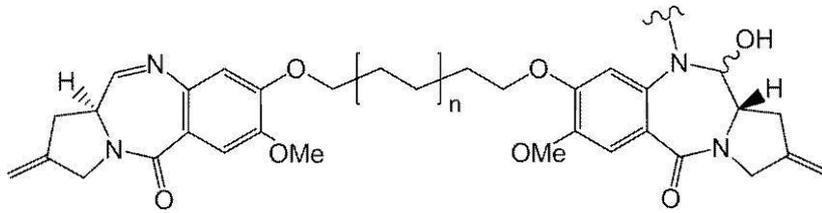
幾つかの実施態様では、 $\text{a} = \text{CH}-\text{R}^D$ は配置 (I) 中に存在する。

【0319】

幾つかの実施態様では、 R'' は C_3 アルキレン基又は C_5 アルキレン基である。

【0320】

幾つかの実施態様では、ADCの例示的なPBDダイマー構成成分は式A(I)：



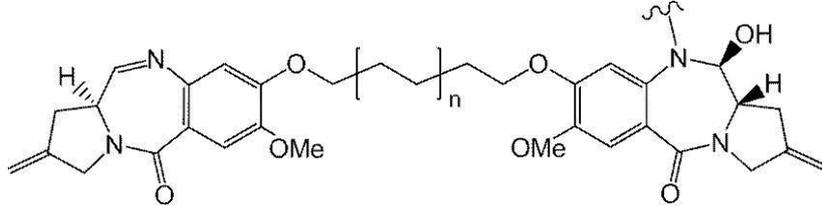
A(I);

(式中、 n は0又は1である)

の構造を有する。

【0321】

幾つかの実施態様では、ADCの例示的なPBDダイマー構成成分は、式A(II)：



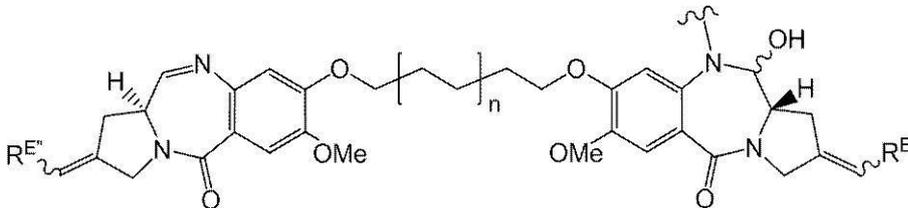
A(II);

(式中、 n は0又は1である)

の構造を有する。

【0322】

幾つかの実施態様では、ADCの例示的なPBDダイマー構成成分は、式A(III)：



A(III);

(式中、 $R^{E'}$ 及び $R^{E''}$ は、それぞれ独立してH又は R^D から選択され、 R^D は上記で定義されており、

n は0又は1である)

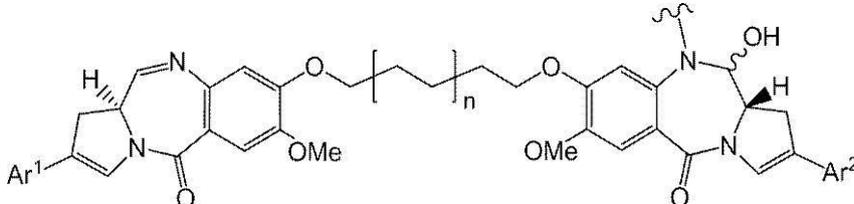
の構造を有する。

【0323】

幾つかの実施態様では、 n は0である。幾つかの実施態様では、 n は1である。幾つかの実施態様では、 $R^{E'}$ 及び/又は $R^{E''}$ はHである。幾つかの実施態様では、 $R^{E'}$ 及び $R^{E''}$ はHである。幾つかの実施態様では、 $R^{E'}$ 及び/又は $R^{E''}$ は R^D であり、 R^D は、置換されていてもよい C_{1-12} アルキルである。幾つかの実施態様では、 $R^{E'}$ 及び/又は $R^{E''}$ は R^D であり、 R^D はメチルである。

【0324】

幾つかの実施態様では、ADCの例示的なPBDダイマー構成成分は、式A(IV)：



A(IV);

(式中、 Ar^1 及び Ar^2 は、それぞれ独立して、置換されていてもよい C_{5-20} ア

10

20

30

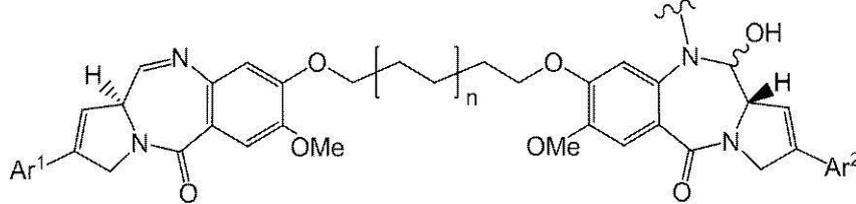
40

50

ルールであり、 Ar^1 及び Ar^2 は、同じでも異なっていてもよく、
 n は 0 又は 1 である)
 の構造を有する。

【0325】

幾つかの実施態様では、ADC の例示的な PBD ダイマー構成成分は、式 A (V) :



10

A(V);

(式中、 Ar^1 及び Ar^2 は、それぞれ独立して、置換されていてもよい C_{5-20} ア
 リールであり、 Ar^1 及び Ar^2 は、同じでも異なっていてもよく、
 n は 0 又は 1 である)
 の構造を有する。

【0326】

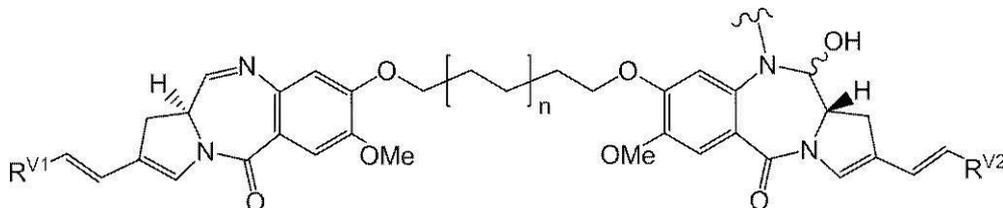
幾つかの実施態様では、 Ar^1 及び Ar^2 は、それぞれ独立して、置換されていてもよ
 いフェニル、フラニル、チオフェニル及びピリジルから選択される。幾つかの実施態様で
 は、 Ar^1 及び Ar^2 は、それぞれ独立して、置換されていてもよいフェニルである。幾
 つかの実施態様では、 Ar^1 及び Ar^2 は、それぞれ独立して、置換されていてもよいチ
 エン - 2 - イル又はチエン - 3 - イルである。幾つかの実施態様では、 Ar^1 及び Ar^2
 は、それぞれ独立して、置換されていてもよいキノリニル又はイソキノリニルである。キノ
 リニル又はイソキノリニル基は、任意の利用可能な環位置を介して PBD コアに結合す
 ることができる。例えば、キノリニルは、キノリン - 2 - イル、キノリン - 3 - イル、キノ
 リン - 4 イル、キノリン - 5 - イル、キノリン - 6 - イル、キノリン - 7 - イル及びキノ
 リン - 8 - イルでもよい。幾つかの実施態様では、キノリニルは、キノリン - 3 - イル
 及びキノリン - 6 - イルから選択される。イソキノリニルは、イソキノリン - 1 - イル、
 イソキノリン - 3 - イル、イソキノリン - 4 イル、イソキノリン - 5 - イル、イソキノリ
 ン - 6 - イル、イソキノリン - 7 - イル及びイソキノリン - 8 - イルでもよい。幾つかの
 実施態様では、イソキノリニルは、イソキノリン - 3 - イル及びイソキノリン - 6 - イル
 から選択される。

20

30

【0327】

さらなる非限定的な ADC の例示的な PBD ダイマー構成成分は、式 B のもの :



40

B

並びにその塩及び溶媒和物であり、式中、

波線は、リンカーへの共有結合部位を示し、

OH に繋がれた波線は、S 又は R 配置を示し、

R^{V1} 及び R^{V2} は、H、メチル、エチル及びフェニル (フェニルは、特に 4 位のフル
 オロで任意選択的に置換されていてもよい) 及び C_{5-6} ヘテロシクリルから独立して選
 択され、(式中、 R^{V1} 及び R^{V2} は、同じでも異なっていてもよく、)

n は 0 又は 1 である。

【0328】

幾つかの実施態様では、 R^{V1} 及び R^{V2} は、H、フェニル及び 4 - フルオロフェニル

50

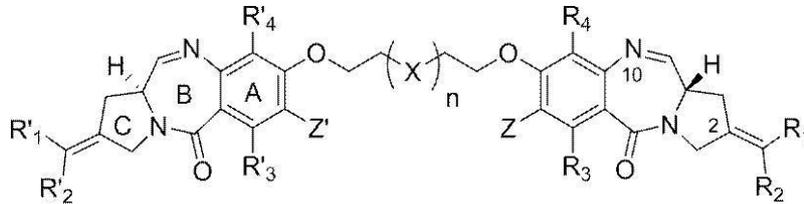
から独立して選択される。

【0329】

幾つかの実施態様では、リンカーは、B環のN10イミン、C環のC-2エンド/エキソ位又はA環に結合するテザユニットを含めたPBDダイマー薬物部分の様々な部位のうちの一つで結合することができる(以下の構造C(I)及びC(II)を参照されたい)。

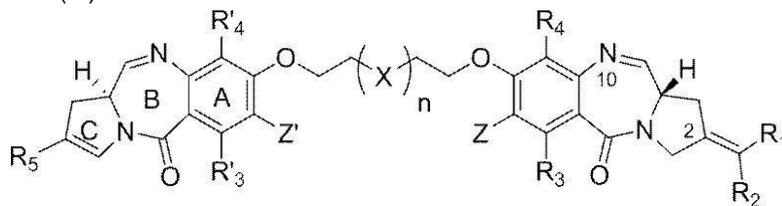
【0330】

非限定的なADCの例示的なPBDダイマー構成成分は、式C(I)及びC(II)：



10

C(I)



20

C(II)

を含む。

【0331】

式C(I)及びC(II)をそれらのN10-C11イミン形態において示す。例示的PBD薬物部分は、以下の表：

 イミン	 カルビノールアミン	 保護されたカルビノールアミン
---------	---------------	--------------------

30

で示すように、カルビノールアミン及び保護されたカルビノールアミン形態もさらに含む。

式中、

Xは、CH₂ (n = 1から5)、N又はOであり、

Z及びZ'は、OR及びNR₂から独立して選択され、Rは、1から5個の炭素原子を含む一級、二級又は三級アルキル鎖であり、

R₁、R'₁、R₂及びR'₂は、それぞれ独立して、H、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈アルケニル、C₂-C₈アルキニル、C₅-₂₀アリール(置換されたアリールを含む)、C₅-₂₀ヘテロアリール基、-NH₂、-NHMe、-OH及び-SHから選択され、幾つかの実施態様では、アルキル、アルケニル及びアルキニル鎖は、5炭素原子まで含み、

40

R₃及びR'₃は、H、OR、NHR及びNR₂から独立して選択され、Rは、1から5個の炭素原子を含む一級、二級又は三級アルキル鎖であり、

R₄及びR'₄は、H、Me及びOMeから独立して選択され、

R₅は、C₁-C₈アルキル、C₂-C₈アルケニル、C₂-C₈アルキニル、C₅-₂₀アリール(ハロ、ニトロ、シアノ、アルコキシ、アルキル、ヘテロシクリルによって置換されたアリールを含む)、及びC₅-₂₀ヘテロアリール基から選択され、幾つかの実施態様では、アルキル、アルケニル及びアルキニル鎖は、5炭素原子まで含み、

R₁₁は、H、C₁-C₈アルキル又は保護基(例えば、アセチル、トリフルオロアセ

50

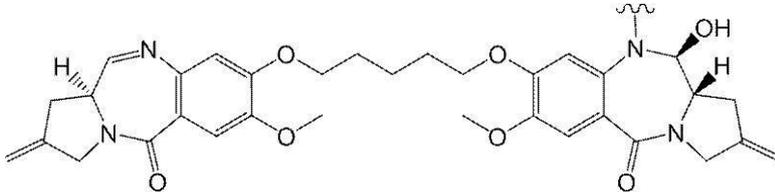
チル、*t*-ブトキシカルボニル (BOC)、ベンジルオキシカルボニル (CBZ)、9-フルオレニルメチレンオキシカルボニル (Fmoc)、又は、パリン-シトルリン-PABなどの自壊ユニットを含む部分)であり、

R_{12} は、H、 $C_1 - C_8$ アルキル又は保護基であり、

R_1 、 R'_1 、 R_2 、 R'_2 、 R_5 又は R_{12} のうちの1つの水素、又はA環の間の-OCH₂CH₂(X)_nCH₂CH₂O-スパーサーの水素は、ADCのリンカーに繋がれた結合で置き換えられている。

【0332】

ADCの例示的PDBダイマー部としては、これらに限定されないが、

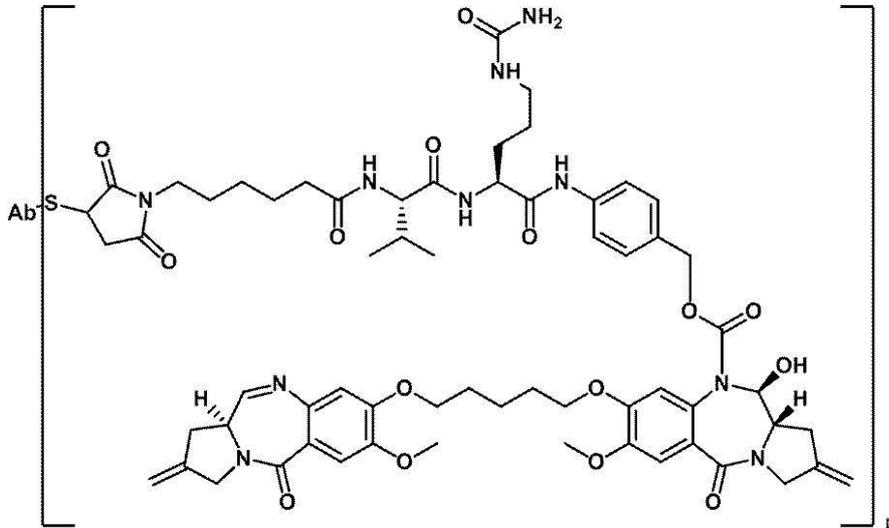


PBDダイマー；

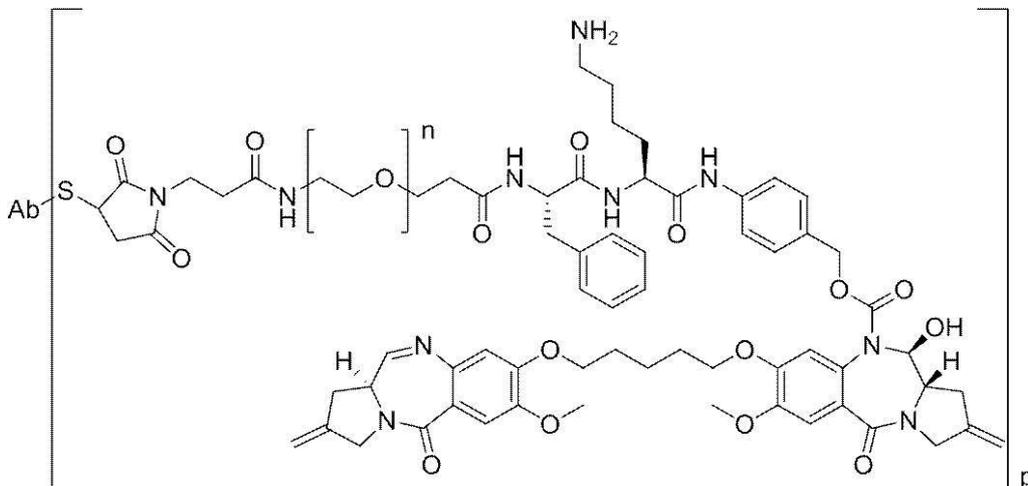
が挙げられる (波線は、リンカーへの共有結合部位を示す)。

【0333】

PBDダイマーを含むADCの非限定的な例示的实施態様は、以下の構造を有する。



PBDダイマー - val - cit - PAB - Ab；



PBDダイマー - Phe - Lys - PAB - Ab、式中、

n は0から12である。幾つかの実施態様では、 n は2から10である。幾つかの実施態様では、 n は4から8である。幾つかの実施態様では、 n は4、5、6、7及び8から選択される。

10

20

30

40

50

【0334】

PBDダイマー - val - cit - PAB - Ab及びPBDダイマー - Phe - Lys - PAB - Abのリンカーはプロテアーゼ切断可能であるが、PBDダイマー - マレイミド - アセタールのリンカーは酸不安定性である。

【0335】

PBDダイマー及びPBDダイマーを含むADCは、当該技術分野で知られている方法に従って、調製することができる。例えば、国際公開第2009/016516号；米国特許出願公開第2009/304710号；米国特許出願公開第2010/047257号；米国特許出願公開第2009/036431号；米国特許出願公開第2011/0256157号；国際公開第2011/130598号を参照されたい。

10

【0336】

(5) アントラサイクリン

幾つかの実施態様では、ADCはアントラサイクリンを含む。アントラサイクリンは、細胞傷害性活性を示す抗生物質化合物である。いかなる特定の理論にも束縛されることを意図するものではないが、研究によって、アントラサイクリンは、幾つかの異なる機序によって細胞を死滅させる働きをすることが示され、この機序には、1)細胞のDNAへ薬物分子がインターカレーションし、それによってDNA依存性核酸合成が阻害されること、2)薬物によりフリーラジカルが産生され、次いで、それが細胞の高分子と反応して、細胞に損傷を引き起こすこと、及び/又は3)細胞膜との薬物分子の相互作用が含まれる(例えば、C. Petersonら、「Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia」 in Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy ; N. R. Bachur「Free Radical Damage」 id. 97 - 102頁を参照されたい)。その細胞傷害性潜在能力のために、アントラサイクリンは、多数のがん、例えば、白血病、乳癌、肺癌、卵巣腺癌及び肉腫の治療に使用されてきた(例えば、P. H. Wiernik, in Anthracycline: Current Status And New Developments, 11頁を参照されたい)。

20

【0337】

非限定的な例示的アントラサイクリンとしては、ドキシソルピシン、エピルピシン、イダルピシン、ダウノマイシン、ネモルピシン、及びそれらの誘導体が挙げられる。ダウノルピシン及びドキシソルピシンのイムノコンジュゲート及びプロドラッグが調製され、研究された(Kratzら(2006) Current Med. Chem. 13:477-523; Jeffreyら(2006) Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362; Torgovら(2005) Bioconj. Chem. 16:717-721; Nagyら(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834; Dubowchikら(2002) Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532; Kingら(2002) J. Med. Chem. 45:4336-4343; 欧州特許第0328147号; 米国特許第6630579号)。抗体 - 薬物コンジュゲートのBR96 - ドキシソルピシンは、腫瘍関連抗原のLewis - Yと特異的に反応し、第I相及び第II相試験で評価された(Salehら(2000) J. Clin. Oncology 18:2282-2292; Ajaniら(2000) Cancer Jour. 6:78-81; Tolcherら(1999) J. Clin. Oncology 17:478-484)。

30

40

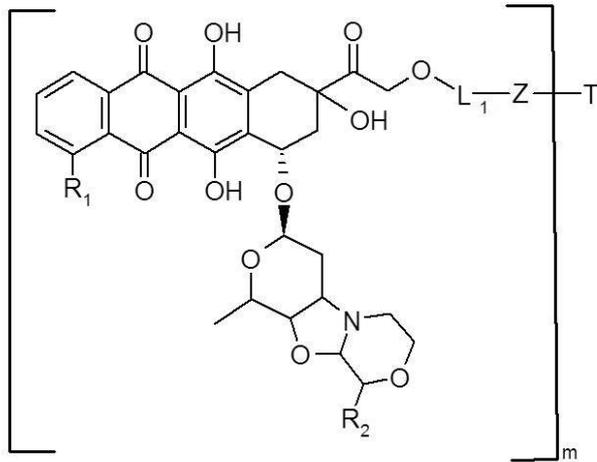
【0338】

PNU - 159682は、ネモルピシンの強力な代謝物(又は誘導体)である(Quintieriら(2005) Clinical Cancer Research 11(4):1608-1617)。ネモルピシンは、ドキシソルピシンのグリコシドアミノに2 - メトキシモルホリノ基を有する、ドキシソルピシンの半合成的アナログであり、臨床評価下にあり(Grandiら(1990) Cancer Treat. Rev. 17:133; Ripamontiら(1992) Brit. J. Cancer 65:703;)、臨床評価には、肝細胞癌の第II / III相試験(Sunら(2003) Proceedings of the American Society for Clinical Oncology 22, Abs1448; Quintieri (2003) Proceedings of the American Association of Cancer Research, 44:第1版, Abs 4649; Pacciariniら(2006) Jour. Clin. Oncology 24:14116)が含まれる。

50

【0339】

ネモルピシン又はネモルピシン誘導体を含む非限定的な例示的ADCを、式Iaに示す。



(Ia)

10

式中、 R_1 は、水素原子、ヒドロキシ又はメトキシ基であり、 R_2 は、 $C_1 - C_5$ アルコキシ基又は薬学的に許容されるそれらの塩であり、

L_1 及び Z は共に、本明細書に記載のリンカー (L) であり、

T は本明細書に記載の抗体 (Ab) であり、

m は、1 から約 20 である。幾つかの実施態様では、m は、1 から 10、1 から 7、1 から 5、又は 1 から 4 である。

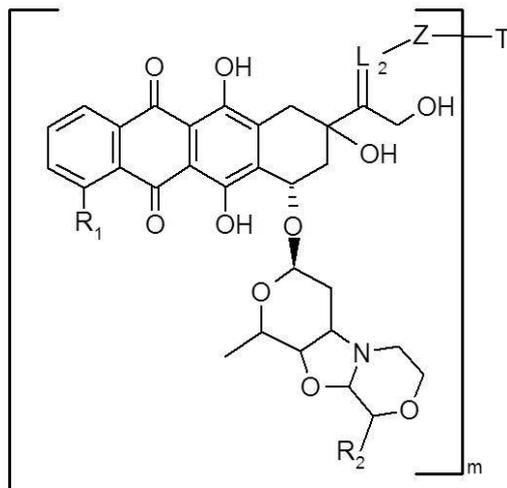
20

【0340】

幾つかの実施態様では、 R_1 及び R_2 は両方ともメトキシ (-OMe) である。

【0341】

ネモルピシン又はネモルピシン誘導体を含むさらなる非限定的な例示的ADCを、式Ibに示す。



(Ib)

30

式中、 R_1 は水素原子、ヒドロキシ又はメトキシ基であり、 R_2 は、 $C_1 - C_5$ アルコキシ基又は薬学的に許容されるそれらの塩であり、

L_2 及び Z は共に、本明細書に記載のリンカー (L) であり、

T は本明細書に記載の抗体 (Ab) であり、

m は、1 から約 20 である。幾つかの実施態様では、m は、1 から 10、1 から 7、1 から 5、又は 1 から 4 である。

40

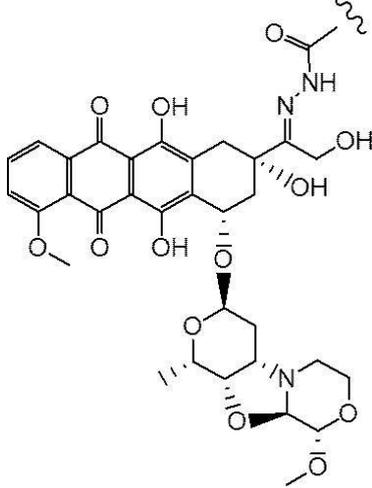
【0342】

幾つかの実施態様では、 R_1 及び R_2 は両方ともメトキシ (-OMe) である。

【0343】

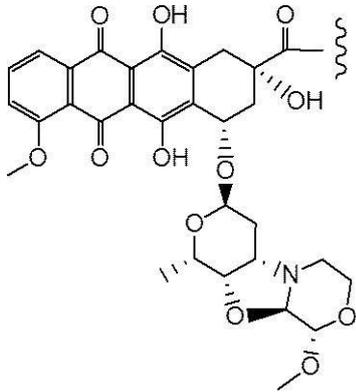
50

幾つかの実施態様では、ネモルピシン含有ADCのネモルピシン構成成分はPNU - 159682である。幾つかのそうした実施態様では、ADCの薬物部は、以下の構造のうちの1つを有してもよい。



10

; 又は



20

;

式中、波線は、リンカー（L）への結合を示す。

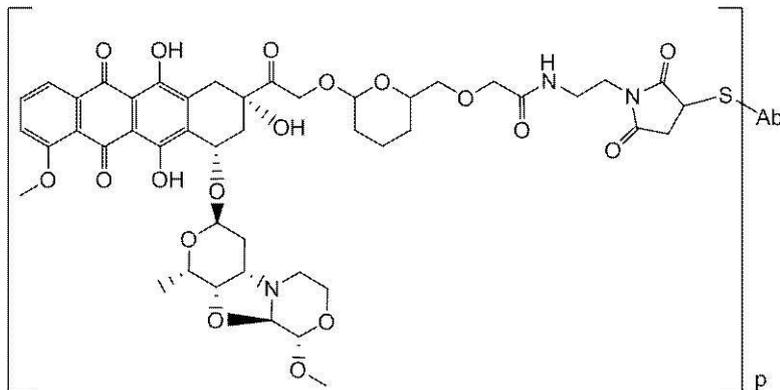
30

【0344】

アントラサイクリンは、PNU - 159682を含めて、幾つかの結合部位及び本明細書に記載のリンカーを含めた種々のリンカー（米国特許出願公開第2011/0076287号；国際公開第2009/099741号；米国特許出願公開第2010/0034837号；国際公開第2010/009124号）を介して、抗体にコンジュゲートすることができる。

【0345】

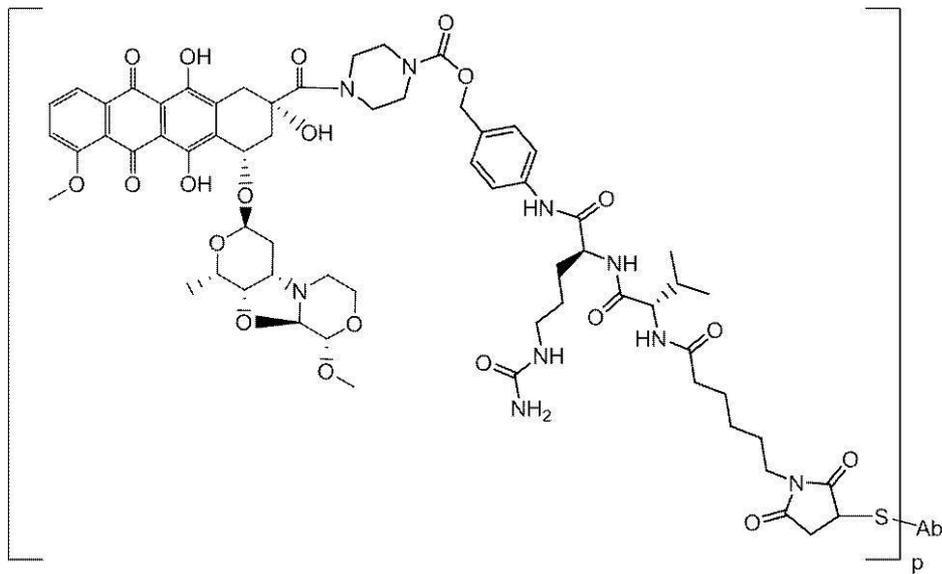
ネモルピシン及びリンカーを含む例示的ADCとしては、これらに限定されないが、



40

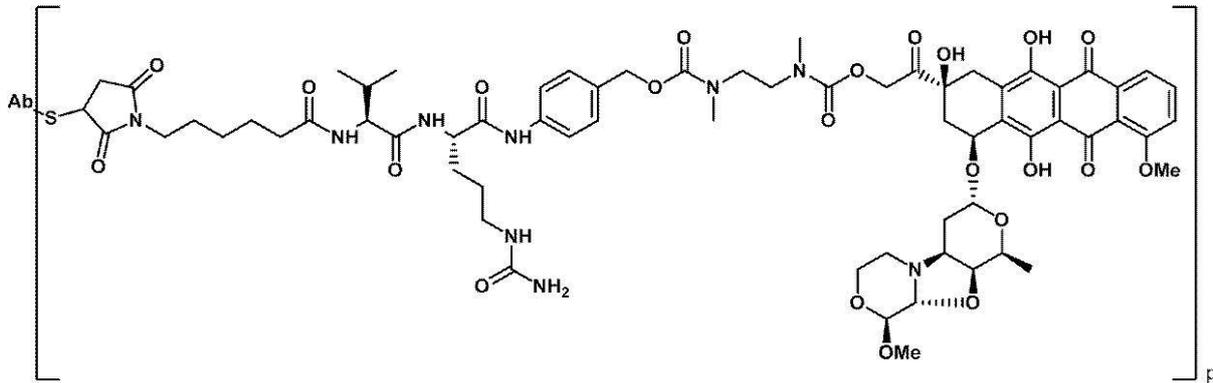
PNU - 159682 マレイミドアセタール - Ab ;

50



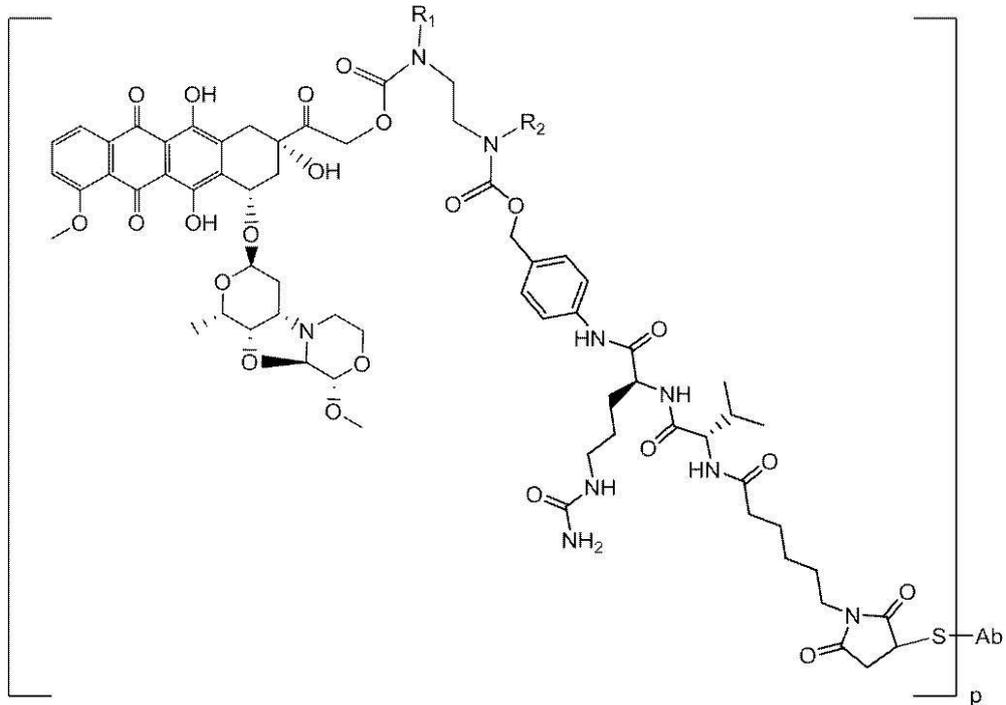
10

PNU - 159682 - val - cit - PAB - Ab ;



20

PNU - 159682 - val - cit - PAB - スペーサー - Ab ;

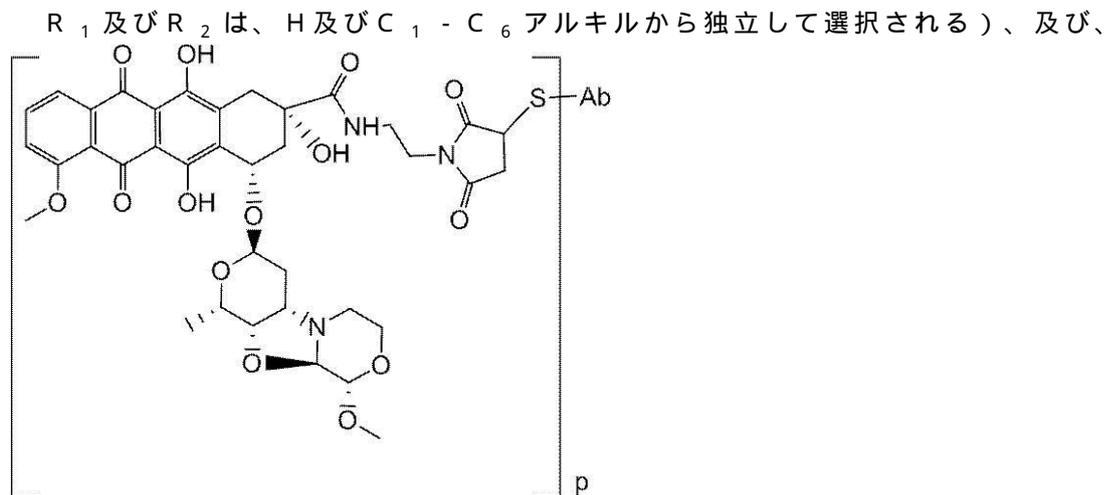


30

40

PNU - 159682 - val - cit - PAB - スペーサー (R ¹ R ²) - Ab (式中、

50



10

PNU-159682-マレイミド-Ab
が挙げられる。

【0346】

PNU-159682マレイミドアセタール-Abのリンカーは酸不安定性であるが、PNU-159682-val-cit-PAB-Ab、PNU-159682-val-cit-PAB-スパーサー-Ab、及びPNU-159682-val-cit-PAB-スパーサー(R¹R²)-Abのリンカーは、プロテアーゼ切断可能である。

20

【0347】

(6) 他の薬物部分

薬物部分としては、ゲルダナマイシン(Mandlerら(2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandlerら(2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandlerら(2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、並びに酵素的に活性な毒素及びその断片も挙げられ、これらに限定されないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖(緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来)、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(*Phytolacca americana*)タンパク質(PAPI、PAPII及びPAP-S)、ニガウリ(*Momordica charantia*)阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ(*Saponaaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテセンが含まれる。例えば、国際公開第93/21232号を参照されたい。

30

【0348】

薬物部分としては、核酸分解活性を有する化合物(例えば、RNA分解酵素又はDNAエンドヌクレアーゼ)も挙げられる。

【0349】

ある種の実施態様では、イムノコンジュゲートは高放射性原子を含むことができる。種々の放射性同位体が、放射性コンジュゲート抗体を産生するのに利用可能である。例としては、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及びLuの放射性同位体が挙げられる。幾つかの実施態様では、検出にイムノコンジュゲートが使用される場合、イムノコンジュゲートは、シンチグラフィ研究用に放射性原子、例えばTc⁹⁹若しくはI¹²³を含むことができ、又は核磁気共鳴(NMR)画像化(磁気共鳴画像化、MRIとしても知られる)用にスピン標識、例えばジルコニウム-89、ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン若しくは鉄を含むことができる。ジルコニウム-89は、例えば、PET画像化用に、様

40

50

々な金属キレート剤と錯体形成していてもよく、抗体にコンジュゲートされていてもよい（国際公開第2011/056983号）。

【0350】

放射性標識又は他の標識を、既知の方法でイムノコンジュゲートに組み込むことができる。例えばペプチドは、例えば、1つ又は複数の水素の代わりに1つ又は複数のフッ素-19原子を含む適切なアミノ酸前駆体を使用して、生合成又は化学合成することができる。幾つかの実施態様では、 Tc^{99} 、 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及び In^{111} などの標識は、抗体のシステイン残基を介して結合することができる。幾つかの実施態様では、イットリウム-90は、抗体のリジン残基を介して結合することができる。幾つかの実施態様では、IODOGEN法（Frakerら（1978）*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57）を使用して、ヨウ素-123を組み込むことができる。「*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*」（Chatal、CRC Press 1989）は、特定の他の方法を記載している。

【0351】

ある種の実施態様では、イムノコンジュゲートは、プロドラッグ活性化酵素にコンジュゲートされた抗体を含むことができる。幾つかのそうした実施態様では、プロドラッグ活性化酵素は、プロドラッグ（例えばペプチジル化学療法剤、国際公開第81/01145号を参照されたい）を、活性薬物、例えば抗がん剤に変換する。幾つかの実施態様では、そうしたイムノコンジュゲートは、抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ療法（「ADEPT」）において有用である。抗体にコンジュゲートすることができる酵素としては、これらに限定されないが、リン酸塩含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用であるアルカリホスファターゼ；硫酸塩含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用であるアリールスルファターゼ；無毒性の5-フルオロシトシンを、抗がん薬、5-フルオロウラシルに変換するのに有用であるシトシンデアミナーゼ；ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用であるプロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、スプチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン（カテプシンB及びLなど）；D-アミノ酸置換基を含むプロドラッグを変換するのに有用であるD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用である、
- ガラクトシダーゼ及びノイラミニダーゼなどの炭水化物切断酵素；
- ラクタムで誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するのに有用である
- ラクタマーゼ；並びにそのアミン窒素においてフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基でそれぞれ誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するのに有用であるペニシリンVアミダーゼ及びペニシリンGアミダーゼなどのペニシリンアミダーゼが挙げられる。幾つかの実施態様では、酵素は、当該技術分野でよく知られている組換えDNA技法によって、共有結合的に抗体に結合することができる。例えば、Neubergerら、*Nature* 312: 604-608（1984）を参照されたい。

【0352】

c) 薬物負荷

薬物負荷は、p、すなわち式Iの分子における抗体あたりの薬物部分の平均数によって表される。薬物負荷は、抗体あたり1から20の薬物部分（D）に及び得る。式IのADCは、1から20の範囲の薬物部分とコンジュゲートされた抗体の集合を含む。コンジュゲーション反応由来のADC調製物における抗体あたりの薬物部分の平均数は、質量分光、ELISAアッセイ及びHPLCなどの従来手段で特徴を明らかにすることができる。pに関するADCの定量的分布を、決定することもできる。場合によっては、pが他の薬物負荷を有するADC由来の特定の値である場合の均一なADCの分離、精製及び特徴づけは、逆相HPLC又は電気泳動などの手段によって達成することができる。

【0353】

幾つかの抗体-薬物コンジュゲートについては、pは、抗体の結合部位の数によって制限され得る。例えば、結合がシステインチオールである場合は、上記の特定の例示的实施態様にあるように、抗体は、1つのみ又は幾つかのシステインチオール基を有してもよい

10

20

30

40

50

し、リンカーが結合することができる、1つのみ又は幾つかの十分に反応性のチオール基を有してもよい。ある種の実施態様では、高薬物負荷、例えば $p > 5$ は、特定の抗体 - 薬物コンジュゲートの凝集、不溶性、毒性又は細胞透過性の喪失を引き起こす可能性がある。ある種の実施態様では、ADCに対する平均薬物負荷は、1から約8、約2から約6、又は約3から約5の範囲である。実際、特定のADCについて、抗体あたりの薬物部分の最適な比は、8未満、及び約2から約5であり得ることが示された（米国特許第7498298号）。

【0354】

ある種の実施態様では、理論上の最大数より少ない薬物部分が、コンジュゲーション反応の間に抗体にコンジュゲートする。以下で論じるように、抗体は、例えば、薬物 - リンカー中間体又はリンカー試薬に反応しないリジン残基を含むことができる。一般に、抗体は、薬物部分に結合し得る、遊離及び反応性システインチオール基を多く含まず、実際、抗体のほとんどのシステインチオール残基は、ジスルフィド架橋として存在する。ある種の実施態様では、ジチオスレイトール（DTT）又はトリカルボニルエチルホスフィン（TCEP）などの還元剤で、部分的又は全還元条件下で抗体を還元して、反応性システインチオール基を生成することができる。ある種の実施態様では、抗体を変性条件にかけて、リジン又はシステインなどの反応性求核基を明らかにする。

【0355】

ADCの負荷（薬物 / 抗体比率）は、様々な方法で、例えば、(i) 抗体と比較して薬物 - リンカー中間体又はリンカー試薬の過剰モルの制限、(ii) コンジュゲーションの反応時間又は温度の制限、及び(iii) システインチオール修飾のための部分的又は制限的還元条件によって調節することができる。

【0356】

1つより多い求核基が薬物 - リンカー中間体又はリンカー試薬と反応する場合は、得られた産物は、抗体に結合した1つ又は複数の薬物部分が分布したADC化合物の混合物であることを理解されたい。抗体あたりの薬物の平均数は、抗体に対して特異的且つ薬物に対して特異的な二重ELISA抗体アッセイによって、混合物から計算することができる。個々のADC分子を、質量分光によって混合物中で同定することができ、HPLC、例えば疎水性相互作用クロマトグラフィーによって分離することができる（例えば、McDonaghら（2006）Prot. Engr. Design & Selection 19（7）：299 - 307；Hamblettら（2004）Clin. Cancer Res. 10：7063 - 7070；Hamblett, K. J. ら「Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody - drug conjugate」、要旨番号624、American Association for Cancer Research、2004 Annual Meeting、March 27 - 31、2004、Proceedings of the AACR、45巻、March 2004；Alley, S. C. ら「Controlling the location of drug attachment in antibody - drug conjugates」、要旨番号627、American Association for Cancer Research、2004 Annual Meeting、March 27 - 31、2004、Proceedings of the AACR、45巻、March 2004を参照されたい）。ある種の実施態様では、単一の負荷値を有する均一なADCを、電気泳動又はクロマトグラフィーによって、コンジュゲーション混合物から単離することができる。

【0357】

d) イムノコンジュゲート調製の特定の方法

式IのADCは、当業者に知られている有機化学の反応、条件及び試薬を用いる幾つかの経路によって調製することができ、これは、(1) 抗体の求核基を二価のリンカー試薬と反応させて、共有結合を介してAb - Lを形成し、続いて、薬物部分Dと反応させるこ

10

20

30

40

50

と、及び(2)薬物部分の求核基を二価のリンカー試薬と反応させて、共有結合を介してD-Lを形成し、続いて、抗体の求核基と反応させることを含む。後者の経路を介して式IのADCを調製するための例示的方法は、米国特許第7498298号に記載されており、これは、本明細書に参照により明確に援用される。

【0358】

抗体の求核基としては、これらに限定されないが、(i)N末端アミン基、(ii)側鎖アミン基、例えばリジン、(iii)側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv)抗体がグリコシル化される場所である糖ヒドロキシル又はアミノ基が挙げられる。アミン、チオール及びヒドロキシル基は、求核性であり、(i)活性エステル、例えばNHSエステル、HOBtエステル、ハロギ酸エステル及び酸ハロゲン化物、(ii)アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド、並びに(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基を含めた、リンカー部分及びリンカー試薬の求電子基と共有結合を形成するように反応することができる。特定の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体を完全に又は部分的に還元するように、DTT(ジチオスレイトール)又はトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)などの還元剤で処理することによって、リンカー試薬とのコンジュゲーションのために抗体を反応性にすることができる。したがって、理論的に、各システイン架橋は、2つの反応性チオール求核剤を形成する。リジン残基の修飾を介して、例えば、リジン残基を2-イミノチオラン(トラウト試薬)と反応させることによって、追加的な求核基を抗体に導入することができ、これによって、アミンをチオールに変換することができる。1つ、2つ、3つ、4つ又はそれ以上のシステイン残基を導入することによって(例えば、1つ又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含む変異体抗体を調製することによって)、反応性チオール基を抗体に導入することもできる。

【0359】

本発明の抗体-薬物コンジュゲートは、例えばアルデヒド又はケトンカルボニル基などの抗体の求電子基とリンカー試薬又は薬物の求核基との間の反応によって産生することもできる。リンカー試薬における有用な求核基としては、これらに限定されないが、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート及びアリールヒドラジドが挙げられる。一実施態様では、抗体を、リンカー試薬又は薬物の求核性置換基と反応することができる求電子性部分を導入するように修飾する。別の実施態様では、グリコシル化抗体の糖を、例えば過ヨウ素酸塩酸化試薬を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬物部分のアミン基と反応し得るアルデヒド又はケトン基を形成することができる。得られたイミンシッフ塩基は、安定な結合を形成することができ、又は例えばホウ化水素試薬によって還元されて、安定なアミン結合を形成することができる。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はメタ過ヨウ素酸ナトリウムの何れかとのグリコシル化抗体の炭水化物部の反応は、薬物の適切な基と反応することができるカルボニル(アルデヒド及びケトン)基を抗体中にもたらし得る(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。別の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含む抗体は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応することができ、最初のアミノ酸の代わりにアルデヒドを産生することができる(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; 米国特許第5362852号)。そうしたアルデヒドは、薬物部分又はリンカー求核剤と反応することができる。

【0360】

薬物部分の例示的求核基としては、これらに限定されないが、(i)活性エステル、例えばNHSエステル、HOBtエステル、ハロギ酸エステル及び酸ハロゲン化物、(ii)アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド、(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基を含めたリンカー部分及びリンカー試薬の求電子基と共有結合を形成するように反応することができる、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及びアリールヒドラジド基が挙げられる。

【0361】

A D Cを調製するのに使用することができる非限定的な例示的架橋試薬は、「例示的リンカー」と表題をつけたセクションにおいて本明細書に記載する。タンパク質性部分及び化学物質部分を含めた2つの部分を結合するためのそうした架橋試薬を使用する方法は、当該技術分野で知られている。幾つかの実施態様では、抗体及び細胞傷害剤を含む融合タンパク質を、例えば、組換え技法又はペプチド合成によって作製することができる。組換えDNA分子は、互いに隣接した又コンジュゲートの所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって分離した、コンジュゲートの抗体及び細胞傷害性部をコードする領域を含むことができる。

【0362】

さらに別の実施態様では、抗体を、腫瘍のプレターゲティングに利用するための「受容体」(ストレプトアビジンなど)にコンジュゲートすることができ、ここでは、抗体-受容体コンジュゲートを患者に投与し、続いて、除去剤を使用して循環から未結合のコンジュゲートを除去し、次いで、細胞傷害剤(例えば、薬物又は放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートされた「リガンド」(例えば、アビジン)を投与する。

【0363】

E. 診断及び検出のための方法及び組成物

ある種の実施態様では、本明細書で提供する抗B7-H4抗体のうちの何れかは、生体試料におけるB7-H4の存在を検出するのに有用である。本明細書で使用する場合、用語「検出」は、定量的又は定性的検出を包含する。「生体試料」は、例えば、細胞又は組織(例えば、癌性又は癌性の可能性がある、乳房、子宮内膜、又は卵巣の組織を含めた生検材料)を含む。

【0364】

一実施態様では、診断又は検出の方法で使用するための抗B7-H4抗体が提供される。さらなる態様では、生体試料におけるB7-H4の存在を検出する方法が提供される。ある種の実施態様では、方法は、抗B7-H4抗体がB7-H4に結合可能な条件下で、本明細書に記載のように、抗B7-H4抗体に生体試料を接触させること、及び生体試料において抗B7-H4抗体及びB7-H4の間で複合体が形成されているかどうかを検出することを含む。そうした方法は、インビトロの方法でもよいし、インビボの方法でもよい。一実施態様では、例えば、B7-H4が患者を選択するためのバイオマーカーである場合、抗B7-H4抗体は、抗B7-H4抗体を用いる療法に好適な被検体を選択するのに使用される。さらなる実施態様では、生体試料は、細胞又は組織(例えば、癌性又は癌性の可能性がある、乳房、子宮内膜、又は卵巣の組織を含めた生検材料)である。

【0365】

さらなる実施態様では、抗B7-H4抗体は、例えば、がんの診断、予測若しくは病期分類、適切な療法経過の決定、又は療法に対するがんの応答のモニタリングの目的で、例えばインビボ画像化によって、被検体のB7-H4陽性のがんを検出するために、インビボで使用される。インビボ検出のための当該技術分野で知られている一方法は、例えば、van Dongenら、*The Oncologist* 12:1379-1389(2007)、及びVerelら、*J. Nucl. Med.* 44:1271-1281(2003)に記載されているような、免疫陽電子放出断層撮影法(免疫PET)である。そうした実施態様では、被検体のB7-H4陽性のがんを検出するための方法が提供され、この方法は、B7-H4陽性のがんを有する又は有することが疑われる被検体に標識抗B7-H4抗体を投与すること、及び被検体において標識抗B7-H4抗体を検出することを含み、標識抗B7-H4抗体の検出が、被検体のB7-H4陽性のがんを示す。ある種のそうした実施態様では、標識抗B7-H4抗体は、陽電子放出体、例えば ^{68}Ga 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 及び ^{124}I にコンジュゲートされた抗B7-H4抗体を含む。特定の実施態様では、陽電子放出体は ^{89}Zr である。

【0366】

さらなる実施態様では、診断又は検出の方法は、基質に固定化された第1の抗B7-H

10

20

30

40

50

4 抗体を、B 7 - H 4 の存在について試験される生体試料と接触させること、第 2 の抗 B 7 - H 4 抗体に基質を曝露すること、及び生体試料において第 1 の抗 B 7 - H 4 抗体と B 7 - H 4 の間の複合体に第 2 の抗 B 7 - H 4 が結合しているかどうかを検出することを含む。基質は、任意の支持媒体、例えば、ガラス、金属、セラミック、ポリマービーズ、スライド、チップ及び他の基質でもよい。ある種の実施態様では、生体試料は、細胞又は組織（例えば、癌性又は癌性の可能性がある、乳房、子宮内膜又は卵巣の組織を含めた生検材料）を含む。ある種の実施態様では、第 1 又は第 2 の抗 B 7 - H 4 抗体は、本明細書に記載の抗体のうちの何れかである。

【 0 3 6 7 】

上記実施態様の何れかに従って診断又は検出することができる例示的障害としては、B 7 - H 4 陽性のがん、例えば B 7 - H 4 陽性の乳がん、B 7 - H 4 陽性の卵巣がん、及び B 7 - H 4 陽性の子宮内膜がんが挙げられる。幾つかの実施態様では、B 7 - H 4 陽性のがんは、抗 B 7 - H 4 免疫組織化学 (I H C) 又は *in situ* ハイブリダイゼーション (I S H) の「0」より大きいスコアが与えられるがんであり、このスコアは、実施例 B において本明細書に記載する条件下で、非常に弱い又は > 9 0 % の腫瘍細胞で染色無しに相当する。別の実施態様では、B 7 - H 4 陽性のがんは、実施例 B において本明細書で記載する条件下で定められるように、B 7 - H 4 を 1 +、2 + 又は 3 + のレベルで発現する。幾つかの実施態様では、B 7 - H 4 陽性のがんは、B 7 - H 4 の mRNA を検出する逆転写 PCR (R T - P C R) アッセイにより B 7 - H 4 を発現するがんである。幾つかの実施態様では、R T - P C R は、定量的 R T - P C R である。

【 0 3 6 8 】

ある種の実施態様では、標識抗 B 7 - H 4 抗体が提供される。標識には、これらに限定されないが、(蛍光、発色団、高電子密度、化学発光、及び放射性標識などの) 直接的に検出される標識又は部分、並びに例えば、酵素反応又は分子の相互作用を介して間接的に検出される、酵素又はリガンドなどの部分が挙げられる。例示的標識としては、これらに限定されないが、放射性同位体の ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 3H 及び ^{131}I 、希土類キレート又はフルオレセインなどのフルオロフォア及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ (米国特許第 4 7 3 7 4 5 6 号)、ルシフェリン、2, 3 - ジヒドロフタラジンジオン類、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、複素環式オキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、色素前駆体を酸化するために過酸化水素を用いる酵素、例えば H R P、ラクトペルオキシダーゼ又はミクロペルオキシダーゼとの結合、ピオチン / アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定なフリーラジカルなどが挙げられる。別の実施態様では、標識は陽電子放出体である。陽電子放出体としては、これらに限定されないが ^{68}Ga 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 及び ^{124}I が挙げられる。特定の実施態様では、陽電子放出体は ^{89}Zr である。

【 0 3 6 9 】

F . 薬学的製剤

本明細書に記載の抗 B 7 - H 4 抗体又はイムノコンジュゲートの薬学的製剤は、所望の純度を有するそうした抗体又はイムノコンジュゲートを 1 つ又は複数の任意選択的な薬学的に許容される担体 (Remington ' s Pharmaceutical Sciences 第 16 版, Osol, A. 編 (1980)) と混合することによって、凍結乾燥製剤又は水性液剤の形で調製される。薬学的に許容される担体は、一般に、用いる投薬量及び濃度においてレシピエントに対して非中毒性であり、これらに限定されないが、リン酸、クエン酸及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含めた抗酸化剤；防腐剤 (例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル若しくはベンジルアルコール；メチル若しくはプロピルパ

ラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン若しくはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース若しくはデキストリンを含めた、単糖類、二糖類及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；シヨ糖、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば亜鉛-タンパク質錯体）；並びにノ又はポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性の界面活性剤が挙げられる。本明細書において例示的な薬学的に許容される担体としては、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（SHASEGP）などの間質薬物分散剤、例えば、rHuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質をさらに含む。特定の例示的SHASEGP及び使用方法は、rHuPH20を含めて、米国特許公開第2005/0260186号及び第2006/0104968号に記載されている。一態様では、SHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1つ又は複数の追加的なグルコサミノグリカナーゼと組み合わせる。

10

【0370】

例示的な凍結乾燥抗体製剤又は凍結乾燥イムノコンジュゲート製剤は、米国特許第6267958号に記載されている。水性抗体製剤又は水性イムノコンジュゲート製剤には、米国特許第6171586号及び国際公開第2006/044908号に記載されているものが含まれ、後者の製剤は、ヒスチジン-酢酸バッファーを含む。

20

【0371】

本明細書の製剤は、治療される特定の適応症に必要な場合、1種より多い活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含むこともできる。例えば場合によっては、例えば、B7-H4陽性のがん、例えばB7-H4陽性の乳がん、B7-H4陽性の卵巣がん又はB7-H4陽性の子宮内膜がんなどの治療のために、アバスチン（登録商標）（ベバシズマブ）をさらに提供することが望ましい場合もある。

【0372】

活性成分は、コロイド薬物配送システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロソフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンにおいて、例えばコアセルベーション技法又は界面重合によって調製されるマイクロカプセル、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-（メタクリル酸メチル）マイクロカプセルに封入することができる。そうした技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences第16版、Osol, A編（1980）に開示されている。

30

【0373】

持続性放出調製物を調製することができる。持続性放出調製物の適切な例としては、マトリックスが成形品の形、例えばフィルム又はマイクロカプセルである、抗体又はイムノコンジュゲートを含む固形疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられる。

【0374】

インビボ投与に使用される製剤は、一般に無菌である。無菌状態は、例えば、滅菌濾過膜を通ず濾過によって容易に達成することができる。

40

【0375】

G. 治療方法及び組成物

本明細書で提供する抗B7-H4抗体又はイムノコンジュゲートのうちの何れかを、方法、例えば治療方法において使用することができる。

【0376】

一態様では、本明細書で提供する抗B7-H4抗体又はイムノコンジュゲートは、B7-H4陽性細胞の増殖を阻害する方法であって、細胞表面上のB7-H4への抗B7-H4抗体又はイムノコンジュゲートの結合が可能な条件下で、細胞を抗B7-H4抗体又は

50

イムノコンジュゲートに曝露し、それによって、細胞の増殖を阻害することを含む方法において、使用される。ある種の実施態様では、方法は、インビトロ又はインビボの方法である。さらなる実施態様では、細胞は、乳房細胞、卵巣細胞又は子宮内膜細胞である。

【0377】

インビトロでの細胞増殖の阻害は、Promega (Madison, WI) から市販品として入手できる、CellTiter-Glo (商標) 発光細胞生存率アッセイを使用してアッセイすることができる。このアッセイは、代謝的に活性な細胞の指標である存在するATPの定量化に基づいて、培養物中の生細胞の数を測定する。Crouchら(1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88、米国特許第6602677号を参照されたい。アッセイは、自動ハイスループットスクリーニング(HTS)に適合しやすくする96又は384ウェル型式で行うことができる。Creerら(1995) AntiCancer Drugs 6: 398-404を参照されたい。アッセイ手順は、単一試薬(CellTiter-Glo (登録商標) 試薬)を培養細胞に直接的に加えることを含む。これによって、細胞が溶解し、ルシフェラーゼ反応によって産生される発光シグナルが発生する。発光シグナルは、存在するATPの量に比例し、これは、培養物中に存在する生細胞の数に正比例する。データは、ルミノメーター又はCCDカメラ画像化装置によって記録することができる。発光産生量は、相対的光単位(RLU)として表される。

10

【0378】

別の態様では、医薬として使用するための抗B7-H4抗体又はイムノコンジュゲートが提供される。さらなる態様では、治療法で使用するための抗B7-H4抗体又はイムノコンジュゲートが提供される。ある種の実施態様では、B7-H4陽性のがんの治療において使用するための抗B7-H4抗体又はイムノコンジュゲートが提供される。ある種の実施態様では、本発明は、有効量の抗B7-H4抗体又はイムノコンジュゲートを個体に投与することを含む、B7-H4陽性のがんを有する個体を治療する方法において使用するための、抗B7-H4抗体又はイムノコンジュゲートを提供する。そうした実施態様の1つでは、方法は、例えば以下に記載するような、有効量の少なくとも1つの追加的な治療剤を個体に投与することをさらに含む。

20

【0379】

さらなる態様では、本発明は、医薬の製造又は調製における抗B7-H4抗体又はイムノコンジュゲートの使用を提供する。一実施態様では、医薬は、B7-H4陽性のがんを治療するためのものである。さらなる実施態様では、医薬は、B7-H4陽性のがんを有する個体に有効量の医薬を投与することを含む、B7-H4陽性のがんを治療する方法において使用するためのものである。そうした実施態様の1つでは、方法は、例えば以下に記載するような、有効量の少なくとも1つの追加的な治療剤を個体に投与することをさらに含む。

30

【0380】

さらなる態様では、本発明は、B7-H4陽性のがんの治療方法を提供する。一実施態様では、方法は、そうしたB7-H4陽性のがんを有する個体に、有効量の抗B7-H4抗体又はイムノコンジュゲートを投与することを含む。そうした実施態様の1つでは、方法は、以下に記載するような、有効量の少なくとも1つの追加的な治療剤を個体に投与することをさらに含む。

40

【0381】

上記実施態様の何れかに記載のB7-H4陽性のがんは、例えば、B7-H4陽性の乳がん、B7-H4陽性の卵巣がん、又はB7-H4陽性の子宮内膜がんでもよい。幾つかの実施態様では、B7-H4陽性のがんは、抗B7-H4免疫組織化学(IHC)又はinsituハイブリダイゼーション(ISH)の「0」より大きいスコアが与えられるがんであり、このスコアは、本明細書の実施例Bに記載する条件下で、非常に弱い又は>90%の腫瘍細胞で染色無しに相当する。別の実施態様では、B7-H4陽性のがんは、本明細書の実施例Bに記載する条件下で定められるように、1+、2+又は3+のレベル

50

で B 7 - H 4 を発現する。幾つかの実施態様では、B 7 - H 4 陽性のがんは、B 7 - H 4 の mRNA を検出する逆転写 PCR (RT - PCR) アッセイにより B 7 - H 4 を発現するがんである。幾つかの実施態様では、RT - PCR は、定量的 RT - PCR である。

【 0 3 8 2 】

上記実施態様の何れかに記載の「個体」はヒトでもよい。

【 0 3 8 3 】

さらなる態様では、本発明は、例えば、上記の何れかの治療方法において使用するための、本明細書で提供する抗 B 7 - H 4 抗体又はイムノコンジュゲートのうちの何れかを含む薬学的製剤を提供する。一実施態様では、薬学的製剤は、本明細書で提供する抗 B 7 - H 4 抗体又はイムノコンジュゲートのうちの何れか、及び薬学的に許容される担体を含む。別の実施態様では、薬学的製剤は、本明細書で提供する抗 B 7 - H 4 抗体又はイムノコンジュゲートのうちの何れか、及び例えば以下に記載するような少なくとも 1 つの追加的な治療剤を含む。

【 0 3 8 4 】

本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、療法において単独又は他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、少なくとも 1 つの追加的な治療剤と共投与することができる。ある種の実施態様では、例えば、B 7 - H 4 陽性のがん、例えば、B 7 - H 4 陽性の乳がん用の追加的な治療剤はアバスタチン (登録商標) (ベバシズマブ) である。ある種の実施態様では、追加的な治療剤は、カドサイラ (登録商標) (トラスツズマブエムタンシン) である。

【 0 3 8 5 】

上記のそうした併用療法は、併用投与 (2 つ以上の治療剤が同じ又は別々の製剤に含まれる)、及び分離投与 (本発明の抗体又はイムノコンジュゲートの投与が、追加的な治療剤及び / 又はアジュバントの投与より前に、その投与と同時に、及び / 又はその投与に続いて生じ得る) を包含する。本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、照射療法と組み合わせて使用することもできる。

【 0 3 8 6 】

本発明の抗体又はイムノコンジュゲート (及び任意の追加的な治療剤) は、任意の適切な手段によって投与することができ、その手段には、非経口、肺内及び鼻腔内が含まれ、並びに局所治療が望まれる場合、病変内の投与が含まれる。非経口注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内又は皮下投与が挙げられる。投与が短期であるか長期であるかどうかにある程度応じて、任意の適切な経路、例えば静脈内又は皮下注射などの注射によって投薬することができる。これらに限定されないが、様々な時間点にわたる単回又は複数回投与、ポールス投与及びパルス注入を含めた様々な投薬計画が、本明細書で企図される。

【 0 3 8 7 】

本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、医学行動規範と一致した様式で、製剤化され、用量決定され、投与されることになる。これに関連して考慮する要因としては、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与計画、及び医師に知られている他の要因が挙げられる。抗体又はイムノコンジュゲートは、必要ではないが、任意選択的に、問題になっている障害を予防又は治療するのに現在使用されている 1 つ又は複数の薬剤と製剤化される。そうした他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体又はイムノコンジュゲートの量、障害又は治療のタイプ、及び上で論じた他の要因によって決まる。これらは、一般に、本明細書に記載されるのと同じ投薬量及び投与経路で、又は本明細書に記載の投薬量の約 1 から 99 % で、又は経験的 / 臨床的に適切であると決定された任意の投薬量及び任意の経路で使用される。

【 0 3 8 8 】

疾患の予防又は治療のために、(単独又は 1 つ又は複数の他の追加的な治療剤と組み合わせて使用する場合の) 本発明の抗体又はイムノコンジュゲートの適切な投薬量は、治療

10

20

30

40

50

される疾患のタイプ、抗体又はイムノコンジュゲートのタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体又はイムノコンジュゲートが予防又は治療目的で投与されるか、以前の療法、患者の病歴及び抗体又はイムノコンジュゲートに対する応答、並びに主治医の裁量によって決まる。抗体又はイムノコンジュゲートは、単回、又は一連の治療に適切に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ から $15 \text{mg} / \text{kg}$ (例えば $0.1 \text{mg} / \text{kg} - 10 \text{mg} / \text{kg}$) の抗体又はイムノコンジュゲートが、例えば、1回又は複数回の分離投与によるか、連続的注入によるかに関わらず、患者に投与するための最初の候補投薬量であり得る。1つの典型的な1日投薬量は、上述の要因に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ から $100 \text{mg} / \text{kg}$ 以上の範囲に及び得る。数日以上にわたる反復投与については、状態に応じて、治療は、一般に、疾患症状の所望の抑制が起こるまで持続されることになる。抗体又はイムノコンジュゲートの1つの例示的投薬量は、約 $0.05 \text{mg} / \text{kg}$ から約 $10 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲であろう。したがって、約 $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $4.0 \text{mg} / \text{kg}$ 又は $10 \text{mg} / \text{kg}$ (又はそれらの任意の組み合わせ) の1つ又は複数の用量が、患者に投与される得る。そうした用量は、断続的に、例えば毎週又は3週毎に投与することができる(例えばその結果、患者は、約2から約20、又は例えば約6用量の抗体が与えられる)。最初の高負荷用量に続いて、1つ又は複数の低用量を投与することができる。しかし、他の薬物投与方法も有用であり得る。この療法の進捗は、従来の技法及びアッセイによって容易にモニタリングされる。

10

【0389】

上記の製剤又は治療方法の何れかが、本発明のイムノコンジュゲートと抗B7-H4抗体の両方を使用して実施され得ることが理解されよう。

20

【0390】

H. 製造品

本発明の別の態様では、上記の障害の治療、予防及び/又は診断に有用な材料を含む製造品が提供される。製造品は、容器、及び容器上の若しくは容器に付随するラベル又は添付文書を含む。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、注射器、IV溶液バッグなどが挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの種々の材料から形成される。容器は、単独で、又は別の組成物と組み合わせて、障害を治療、予防及び/若しくは診断するのに有効な組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルでもよい)。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートである。ラベル又は添付文書は、組成物が、選択された状態を治療するのに使用されることを示す。さらに、製造品は、(a)本発明の抗体又はイムノコンジュゲートを含む組成物が中に含まれる第1の容器、及び(b)さらなる細胞傷害性剤又は治療剤を含む組成物が中に含まれる第2の容器を含むことができる。本発明の本実施態様における製造品は、組成物が特定の状態を治療するのに使用ができることを示す添付文書をさらに含むことができる。あるいは、又はさらに、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば静菌性の注射用水(BWFI)、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液又はデキストロース溶液を含む第2(又は第3)の容器をさらに含むことができる。他のバッファー、希釈剤、濾過器、針及び注射器を含めた、商業的及び使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含んでい

30

40

【実施例】

【0391】

以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。上記の概説を考えると、様々な他の実施態様が実施され得ることが理解されよう。

【0392】

A. ヒトB7-H4遺伝子の発現

ヒトB7-H4遺伝子発現を、遺伝子発現情報を含む所有権のあるデータベース(GeneExpress(登録商標)、Gene Logic Inc.、Gaithersburg, MD)を使用して解析した。GeneExpress(登録商標)データベー

50

スの図による解析を、マイクロアレイプロファイルビューアを使用して行った。図1は、様々な組織におけるヒトB7-H4遺伝子発現の図示である。y軸上の尺度は、ハイブリダイゼーションシグナル強度に基づく遺伝子発現量を示す。点は、それぞれの列挙する組織の名称から延びる直線の左及び右の両方に出現する。直線の左に出現する点は、正常組織における遺伝子発現を表し、直線の右に出現する点は、腫瘍及び疾患組織における遺伝子発現を表す。図1は、ある種の腫瘍又は疾患組織において、それらの正常の対応物に対してB7-H4遺伝子発現が増加していることを示す。特に、B7-H4は、乳腺腫瘍、子宮内膜腫瘍及び卵巣腫瘍において実質的に過剰発現している。B7-H4の最高の正常mRNAレベルは、乳房、腎臓、膵臓及び卵巣において観察される。ヒトB7-H4タンパク質発現は、正常組織においてかなりより低く、~30の試験した組織(PBMC、骨髄、扁桃腺及び脾臓を含む)で発現がないか、又は正常乳房、卵巣、腎臓、膵臓及び胎盤組織において発現のレベルが低く、これは、genelogicデータ(データは示さず)と一貫する。

10

【0393】

B. 乳腺及び卵巣癌腫におけるヒトB7-H4の広まり

乳癌におけるB7-H4の発現を評価するために、185の原発性乳腺癌腫を複数の供給元から得た。組織マイクロアレイ(TMA)は、Bubendorf Lら、J Pathol. 2001年9月; 195(1): 72-9に記載されるようにして2重コアを使用して組み立て、一致する症例からの正常乳房試料を含めた。

【0394】

B7-H4発現は、ヒトB7-H4に対するA57.1抗体(diaDexus、South San Francisco)を用いる免疫組織化学により決定した。CAB7-H4ハイブリダイゼーション強度は、強度(銀粒子)及び染色の広さを考慮して、以下のスキームに従って、訓練された病理学者によりスコア化した。

20

0(陰性): 腫瘍細胞の>90%においてハイブリダイゼーションが非常に弱い又は全くない

1+(軽度): 優勢なハイブリダイゼーションパターンが弱い

2+(中度): 優勢なハイブリダイゼーションパターンが新生物細胞の大多数(>50%)において中度に強い

3+(強度): 優勢なハイブリダイゼーションパターンが新生物細胞の大多数(>50%)において強い

30

【0395】

同じA57.1抗体を使用して、正常乳房組織におけるハイブリダイゼーションの特異性のコントロールとした。

【0396】

図2は、0、1+、2+及び3+のレベルの染色を有する例示的乳癌切片を示す。画像における銀粒子の沈着は、抗体のハイブリダイゼーション及びB7-H4タンパク質の発現を示す。~68%(126/185)の分析した乳癌切片はB7-H4陽性であり、1+、2+又は3+のレベルでの染色を示し、32%(59/185)は1+の染色、22%(41/185)は2+の染色及び15%(26/185)は3+の染色をそれぞれ示した。さらに、およそ~70%のB7-H4陽性の乳腺癌腫は、TMAコアに基づいて80%を超える腫瘍細胞染色を示した。

40

【0397】

B7-H4発現の意義及び異なる乳がんサブタイプにおける広まりを評価するために、乳がん試料を集め、ヒト上皮増殖因子受容体2(Her2)、ホルモン受容体(HR)及び原発腫瘍のトリプルネガティブ(TN)状態に基づいて3つのサブタイプに類別した。B7-H4を発現する腫瘍のパーセンテージを、上記のようにして行い、スコア化した。

【0398】

図3Aに示すように、B7-H4発現は、すべての乳がんサブタイプに広まっており、すべてのサブタイプの~65%が陽性であった(スコア1-3)。特に、~60%のHe

50

r 2 + 及び HR + 乳がんサブタイプは B 7 - H 4 も発現し、~ 8 0 % の TN 乳がんは B 7 - H 4 陽性であった。図 3 B は、免疫組織化学により測定される、乳がんサブタイプにおける B 7 - H 4 染色の 0、1 +、2 + 及び 3 + のレベルの広まりを示す。~ 2 0 % の Her 2 + 及び HR + 乳がんサブタイプ並びに ~ 2 5 % の TN 乳がんサブタイプは、B 7 - H 4 について 1 + のレベルの染色を示した。~ 2 8 % の Her 2 + 及び TN 乳がんサブタイプ並びに ~ 1 8 % の HR + 乳がんサブタイプは、B 7 - H 4 について 2 + のレベルの染色を示した。~ 1 5 %、~ 2 0 % 及び ~ 2 5 % の Her 2 +、HR + 及び TN 乳がんサブタイプはそれぞれ、B 7 - H 4 について 3 + のレベルの染色を示した。

【 0 3 9 9 】

ウェスタンブロット解析も、図 3 C に示すように、乳腺腫瘍における B 7 - H 4 の全体的な発現が ~ 7 0 % であり、これらの乳腺腫瘍の ~ 4 0 % において実質的に発現が高いことを示唆した。MX - 1 腫瘍モデルを内因性のポジティブコントロールとして、B 7 - H 4 について陰性の腫瘍細胞株である BT 5 4 9 を内因性のネガティブコントロールとして用い、1 0 個の異なる乳腺腫瘍試料を、4 つの正常乳房組織（腫瘍に隣接する正常組織として定義される正常）と比較して、B 7 - H 4 タンパク質発現について評価した。2 9 3 野生型細胞及びヒト B 7 - H 4 でトランスフェクトされた 2 9 3 細胞もコントロールとして含めた。B - アクチンレベルを使用して、ローディングの不整合を標準化した。

10

【 0 4 0 0 】

B 7 - H 4 は、A 5 7 . 1 抗体を使用してウェスタンブロット解析により検出される、8 2 % の原発性乳腺腫瘍（X e n t e c h パネル）で発現される。図 3 D に示すように、B 7 - H 4 は、2 3 / 2 8 の試験した原発性乳腺腫瘍において ~ 6 2 K d のバンドとして出現する。

20

【 0 4 0 1 】

ウェスタンブロット解析は、図 3 E に示すように、卵巣腫瘍における B 7 - H 4 の全体的な発現が ~ 8 0 % であり、これらの卵巣腫瘍の ~ 6 0 % において発現が実質的に高いことも示唆していた。

【 0 4 0 2 】

C . マウスモノクローナル抗体生成

ヒト B 7 - H 4 に対するモノクローナル抗体は、以下の手順を使用して生成した。組み換えヒト B 7 - H 4 を過剰発現する 2 9 3 細胞又はヒト B 7 - H 4 の DNA 発現コンストラクトの何れかで、2 つの別々の群の Bal b / C マウス（Charles River Laboratories、Hollister、CA）を過免疫化し、マウスの骨髄腫発現系で発現させた C 末端 F c を有するマウス B 7 - H 4 細胞外ドメイン（ECD、アミノ酸 2 9 - 2 5 8）で、第 3 の群のマウス B 7 - H 4 KO BL / 6 N マウスを免疫化した。

30

【 0 4 0 3 】

Bal b / c マウス（Charles River Laboratories International, Inc.、Hollister、CA、USA）に、PBS 中のヒト B 7 - H 4 を過剰発現する 2 9 3 細胞（腹腔内で 5 百万 / 投与）又は乳酸リンゲル液中の hu B 7 - H 4 プラスミド DNA（尾静脈から）の何れかを注射した後に、組み換えヒト B 7 - H 4 ECD（腹腔内で 4 μ g / 投与）を使用してタンパク質追加免疫を行った。マウス B 7 - H 4 KO BL / 6 N マウスに、上記のようにして（後足蹠から）、代謝性スクワレン（4 % v / v）、Tween 8 0（0 . 2 % v / v）、トレハロース 6 , 6 - ジミコレート（0 . 0 5 % w / v）及びモノホスホリルリピド A（0 . 0 5 % w / v ; Sigma Aldrich、USA）を含むアジュバント中の組み換えマウス B 7 - H 4 ECD を注射した。血清力価は、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）及び FACS により、6 - 9 回の注射の後に評価した。B 7 - H 4 陽性マウスの血清から収集した脾臓 B 細胞を、マウス骨髄腫細胞（X 6 3 . Ag 8 . 6 5 3、アメリカンタイプカルチャーコレクション、Manassas、VA、USA）と、電気融合（Hybridoma、Harvard Apparatus, Inc.、Holliston、

40

50

MA、USA)により融合した。10 - 14日後に、ハイブリドーマ上清を、ELISAにより抗体分泌についてスクリーニングした。すべての陽性クローンを、次いで、増殖させ、huB7 - H4及びmuB7 - H4との結合についてELISA及びFACSにより再スクリーニングした。組み換えヒトB7 - H4、組み換えカニクイザルB7 - H4及び組み換えマウスB7 - H4を発現する安定細胞株を用いる蛍光性活性化セルソーティング(FACS)により強く反応する、4つのハイブリドーマクローンが同定された: 1D11(マウスB7 - H4免疫化mB7 - H4 KOマウスから同定)、2.32D6(ヒトB7 - H4を使用してDNA免疫化されたマウスから同定)並びに9B9及び3.22.C10(組み換えヒトB7 - H4を過剰発現する293細胞を使用する細胞性免疫化から同定)。

10

【0404】

図4Aは、生成したある種のモノクローナル抗体を、ある種の特徴(このうちのいくつかは以下にさらに詳細に記載する)と共に示す。

【0405】

D. マウスモノクローナル抗体のクローニング及びキメラ化

モノクローナル抗体1D11、32D6、9B9及び22C10を、以下のようにクローニングして、キメラ化した。

【0406】

トータルRNAを、マウスの1D11、32D6、9B9及び22C10を産生するハイブリドーマ細胞から、標準的な方法を使用して抽出した。可変軽鎖(VL)及び可変重鎖(VH)ドメインを、重鎖及び軽鎖に対する縮重プライマーを用いるRT-PCRを使用して増幅した。フォワードプライマーは、VL及びVH領域のN末端アミノ酸配列に特異的であった。それぞれLC及びHCリバースプライマーは、種間で高度に保存された定常軽鎖(CL)及び定常重鎖ドメイン1(CH1)中の領域にアニールするように設計した。挿入断片のポリヌクレオチド配列は、常套的配列決定法を使用して決定した。1D11 VL及びVHアミノ酸配列を、配列番号3及び4に示す。1D11重鎖超可変領域(HVR)H1、H2及びH3を、それぞれ配列番号5、6及び7に示す。1D11軽鎖超可変領域(HVR)L1、L2及びL3を、それぞれ配列番号8、9及び10に示す。32D6 VL及びVHアミノ酸配列を、配列番号11及び12に示す。32D6重鎖超可変領域(HVR)H1、H2及びH3を、それぞれ配列番号13、14及び15に示す。32D6軽鎖超可変領域(HVR)L1、L2及びL3を、それぞれ配列番号16、17及び18に示す。9B9 VL及びVHアミノ酸配列を、配列番号19及び20に示す。9B9重鎖超可変領域(HVR)H1、H2及びH3を、それぞれ配列番号21、22及び23に示す。9B9軽鎖超可変領域(HVR)L1、L2及びL3を、それぞれ配列番号24、25及び26に示す。22C10 VL及びVHアミノ酸配列を、配列番号27及び28に示す。22C10重鎖超可変領域(HVR)H1、H2及びH3を、それぞれ配列番号29、30及び31に示す。22C10軽鎖超可変領域(HVR)L1、L2及びL3を、それぞれ配列番号32、33及び34に示す。抗体1D11、32D6、9B9及び22C10の軽鎖及び重鎖可変領域のアライメントを、図5に示す。

20

30

【0407】

各抗体は、マウス重鎖可変領域をヒトIgG1重鎖定常領域にクローニングし、ヒトラムダ軽鎖定常領域にクローニングした9B9以外は軽鎖可変領域をヒトカッパ軽鎖定常領域にクローニングすることによりキメラ化した。

40

【0408】

E. 1D11及び22C10のヒト化

モノクローナル抗体1D11及び22C10を、以下に記載するようにしてヒト化した。残基番号は、Kabataら、Sequences of proteins of immunological interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD(1991)に従う。

50

【0409】

アクセプターヒトコンセンサスフレームワークへの超可変領域の直接グラフト

1D11及び22C10のヒト化の間に構築した変異体を、IgGの形態で評価した。マウスの1D11及び22C10からのVL及びVHドメインを、ヒトVLカップI (VL_{K_I})及びヒトVHサブグループI (VH_I)コンセンサス配列に整列させた。

【0410】

マウスの1D11 (mu1D11)抗体からの超可変領域を、VL_{K_I}及びVH_Iアクセプターフレームワークに操作して、ヒト化1D11.v1 (h1D11.v1)、1D11.v2 (h1D11.v2)、1D11.v3 (h1D11.v3)、1D11.v4 (h1D11.v4)、1D11.v1.1 (h1D11.v1.1)、1D11.v1.2 (h1D11.v1.2)、1D11.v1.3 (h1D11.v1.3)、1D11.v1.4 (h1D11.v1.4)、1D11.v1.5 (h1D11.v1.5)、1D11.v1.6 (h1D11.v1.6)、1D11.v1.7 (h1D11.v1.7)、1D11.v1.8 (h1D11.v1.8)及び1D11.v1.9 (h1D11.v1.9)を生成した。具体的に、mu1D11 VLドメインから、位置24-34 (L1)、50-56 (L2)及び89-97 (L3)をVL_{K_I}にグラフトした。mu1D11 VHドメインから、位置26-35 (H1)、50-65 (H2)及び95-102 (H3)をVH_Iにグラフトした。

【0411】

さらに、ある種の残基は、CDR構造を調整して抗原の適合を微調整し得る「バーニア」領域として作用するフレームワーク残基の一部であることが見出された。例えばFootte及びWinter、J. Mol. Biol. 224: 487-499 (1992) (図5及び6)を参照されたい。これらのCDRの定義は、それらの配列超可変性 (Wu, T. T.及びKabat, E. A. (1970))、それらの構造上の位置 (Chothia, C.及びLesk, A. M. (1987))及び抗原-抗体接触におけるそれらの関わり (MacCallumらJ. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))により定義される位置を含む。例えば、VH及びVL中の以下の位置は、マウス配列から以下のヒト化1D11変異体において保持した。

【0412】

h1D11.v1 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69及び71、VLのフレームワークIIにおける位置49、並びにVLのフレームワークIIIにおける位置69及び71

【0413】

h1D11.v2 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69及び71、VLのフレームワークIIにおける位置49、並びにVLのフレームワークIIIにおける位置71

【0414】

h1D11.v3 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69、71及び73、VLのフレームワークIIにおける位置49、並びにVLのフレームワークIIIにおける位置58、69及び71

【0415】

h1D11.v4 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69、71、73及び75、VLのフレームワークIIにおける位置49、並びにVLのフレームワークIIIにおける位置58、69及び71

【0416】

h1D11.v1.1 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69及び71、VLのフレームワークIIIにおける位置69及び71

【0417】

h1D11.v1.2 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69及び71、VLのフレームワークIIにおける位置49、並びにVLのフレームワークIIIにおける位置71

【0418】

h1D11.v1.3 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69及び71、VLのフレームワークIIにおける位置49、並びにVLのフレームワークIIIにおける位置69

【0419】

h1D11.v1.4 - - VHのフレームワークIIIにおける位置69及び71、VLのフレームワークIIにおける位置49、並びにVLのフレームワークIIIにおける位置69及び71

【0420】

h1D11.v1.5 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67及び71、VLのフレームワークIIにおける位置49、並びにVLのフレームワークIIIにおける位置69及び71

10

【0421】

h1D11.v1.6 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67及び69、VLのフレームワークIIにおける位置49、並びにVLのフレームワークIIIにおける位置69及び71

【0422】

h1D11.v1.7 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67及び69、VLのフレームワークIIIにおける位置69及び71

【0423】

h1D11.v1.8 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、VLのフレームワークIIIにおける位置69及び71

20

【0424】

h1D11.v1.9 - VHにおいて変更なし、VLのフレームワークIIIにおける位置69及び71

【0425】

1D11の様々なヒト化変異体についての軽鎖可変領域配列及び重鎖可変領域配列を、それぞれ図6及び7に示す。

【0426】

4つすべてのh1D11変異体(h1D11.v1-4)のうち、h1D11.v1は、ヒトB7-H4を発現する293細胞でのFACSによるマウス1D11との比較により、最も近い親和性を保持することが示された。その結果、追加的なh1D11.v1変異体を、上記のようにして、重鎖及び軽鎖の両方の可変領域の異なるバーニア位置を改変することにより生成した。

30

【0427】

マウスの22C10(mu22C10)抗体からの超可変領域を、VL_{KI}及びVH_Iアクセプターフレームワークに操作して、様々なヒト化22C10を生成した。具体的に、mu22C10 VLドメインから、位置24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)をVL_{KI}にグラフトした。mu22C10 VHドメインから、位置26-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3)をVH_Iにグラフトした。

40

【0428】

例えば、VH及びVL中の以下の位置は、マウス配列から以下のヒト化22C10変異体において保持した。

【0429】

h22C10.v1 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69、71及び93、VLのフレームワークIIにおける位置46及び47、並びにVLのフレームワークIIIにおける位置71

【0430】

h22C10.v2 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69、71及

50

び93、VLのフレームワークIIにおける位置46及び47

【0431】

h22C10.v3 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69、71、73及び93、VLのフレームワークIIにおける位置46及び47

【0432】

h22C10.v4 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69、71、76及び93、VLのフレームワークIIにおける位置46及び47

【0433】

h22C10.v5 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69、71、75、76及び93、VLのフレームワークIIにおける位置46及び47

10

【0434】

h22C10.v2.1 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69、71及び93、VLのフレームワークIIにおける位置47

【0435】

h22C10.v2.2 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69、71及び93、VLのフレームワークIIにおける位置46

【0436】

h22C10.v2.3 - - VHのフレームワークIIIにおける位置69、71及び93、VLのフレームワークIIにおける位置46及び47

【0437】

20

h22C10.v2.4 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、71及び93、VLのフレームワークIIにおける位置46及び47

【0438】

h22C10.v2.5 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69及び93、VLのフレームワークIIにおける位置46及び47

【0439】

h22C10.v2.6 - - VHのフレームワークIIIにおける位置67、69及び71、VLのフレームワークIIにおける位置46及び47

【0440】

h22C10.v2.7 - VHにおける変更なし、VLのフレームワークIIにおける位置46及び47

30

【0441】

h22C10.v2.8 - VHにおける変更なし、VLのフレームワークIIにおける位置46

【0442】

22C10の様々なヒト化変異体についての軽鎖可変領域配列及び重鎖可変領域配列を、それぞれ図8及び9に示す。

【0443】

1D11及び22C10のヒト化変異体は、Kunkel突然変異誘発により、各超可変領域について別々のオリゴヌクレオチドを使用して生成した。正しいクローンは、DNA配列決定により同定した。

40

【0444】

変異体の評価

スクリーニングする目的のために、IgG変異体を、まず293細胞において産生した。VL及びVHをコードするベクターを293細胞にトランスフェクトした。プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって、細胞培養培地からIgGを精製した。

【0445】

小規模調製物を、まず、FACS及びスキッチャード解析によりスクリーニングして、組み換え及び内因性のB7-H4に対する種特異性及び親和性(Kd)を決定した。異なる濃度(0-10µg/ml)のヒト化変異体を、組み換えヒト、カニクイザル又はマ

50

ウスB7-H4を過剰発現する293細胞及び内因性のヒトB7-H4を発現する腫瘍細胞株であるMX-1と40分間4 でインキュベートした後に洗浄し、DyLight-650とコンジュゲートされた2次ヤギ抗ヒトIgG抗体で20分間4 で染色することにより、初期EC₅₀及び種特異性を決定した。蛍光性シグナルは、BD FACSCaliburを使用して取得し、EC₅₀の値は、Graph PadプログラムPrism4を使用して決定した。

【0446】

1. 種交差反応性

モノクローナル抗体がヒト以外の種からのB7-H4と交差反応するかを決定するために、モノクローナル抗体を試験した。図10は、ヒト(配列番号73)、チンパンジー(配列番号81)、カニクイザル(配列番号75)、ラット(配列番号77)及びマウス(配列番号79)B7-H4間のアライメントを示す。5つすべての種の間で同一の残基を、赤色の箱の中にグループ化することにより示す。異なる残基は、赤色の点で示す。B7-H4オルソログは、非常に高い配列同一性を有する(ヒトB7-H4 100%、チンパンジーB7-H4 96.09%、カニクイザルB7-H4 98.6%、ラットB7-H4 86.87%、及びマウスB7-H4 87.63%)。特に、ラットB7-H4は、マウスB7-H4と97.17%同一である。B7-H4オルソログも非常に高い配列類似性を有する(ヒトB7-H4 100%、チンパンジーB7-H4 97.42%、カニクイザルB7-H4 98.8%、ラットB7-H4 89.3%、及びマウスB7-H4 90.12%)。

【0447】

それぞれの種のB7-H4との結合は、B7-H4(ヒト、チンパンジー、カニクイザル、ラット又はマウスB7-H4)で安定してトランスフェクトされ、DyLight-650コンジュゲートヤギ抗ヒト抗体で染色する293細胞のFACS解析により決定した。トランスフェクトされていない293細胞は、B7-H4を通常発現しない。

【0448】

図11に示すように、代表的なFACSスクリーニングデータは、hu1D11v1.7-9及びhu22C10v2.7-8が組み換えヒト、カニクイザル及びマウスB7-H4と、親のキメラ抗体の範囲内のEC₅₀で結合することを示す。

【0449】

1. 抗体親和性

標準的な手順(Holmesら、Science 256:1205-1210 (1992))に従ってスキッチャード解析を実施して、ch1D11、ch9B9、ch22C10及びch32D6抗体の相対的結合親和性を決定した。

【0450】

間接的Iodogen法を使用して抗B7-H4抗体を[¹²⁵I]標識した。[¹²⁵I]標識された抗B7-H4抗体は、NAP-5カラム(GE Healthcare)を使用するゲル濾過によって遊離¹²⁵I-Naから精製し、精製ヨウ素化抗B7-H4抗体は、8-10µCi/µgの比活性範囲を有していた。固定濃度の[¹²⁵I]標識された抗体及び漸減濃度の系列希釈した標識されていない抗体を含む50µLの競合アッセイ混合物を96ウェルプレートに配置した。ヒト、カニクイザル、ラット若しくはマウスB7-H4を安定して発現する293細胞又はMX-1腫瘍細胞を、成長培地中で37にて5%CO₂中で培養した。細胞を、Sigma細胞解離溶液を使用してフラスコから離し、1%ウシ血清アルブミン(BSA)、300mMヒトIgG及び0.1%アジ化ナトリウムを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)から成る結合バッファーで洗浄した。洗浄した細胞を、0.2mLの結合バッファー中の密度が100,000細胞で、96ウェルプレートに加えた。各ウェル中の[¹²⁵I]標識された抗体の最終濃度は、~250pMであった。競合アッセイ中の標識されていない抗体の最終濃度は、1000nMから、10個の2倍段階希釈により、0nMバッファーのみのアッセイまでの範囲に及んだ。競合アッセイは、3重で行った。競合アッセイを2時間室温でインキュベ

10

20

30

40

50

トした。2時間のインキュベーションの後に、競合アッセイをMilliporeマルチスクリーンフィルタープレート(Billerica, MA)に移し、結合バッファーで4回洗浄して、結合した $[I^{125}]$ 標識された抗体から遊離抗体を分離した。Wallac Wizard 1470ガンマカウンター(PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc., Wellesley, MA)でフィルターをカウントした。結合データは、抗体の結合親和性を決定するのにMunson及びRobard(Munson及びRobard 1980)の適合アルゴリズムを使用するNewLigandソフトウェア(Genentech)を使用して評価した。

【0451】

図4Aに示すように、ヒトB7-H4、カニクイザルB7-H4、マウスB7-H4及びラットB7-H4に結合するch1D11は、それぞれ6.1 nM、4.1 nM、9.4 nM及び4.1 nMの親和性で、安定してトランスフェクトされた293細胞で発現された。ヒトB7-H4、カニクイザルB7-H4、マウスB7-H4及びラットB7-H4に結合するch22C10は、それぞれ6.6 nM、4.6 nM、18.3 nM及び5.7 nMの親和性で、安定してトランスフェクトされた293細胞で発現された。ヒトB7-H4、カニクイザルB7-H4、マウスB7-H4及びラットB7-H4に結合するch9B9は、それぞれ6.6 nM、5.2 nM、13.7 nM及び4.7 nMの親和性で、安定してトランスフェクトされた293細胞で発現された。ヒトB7-H4及びカニクイザルB7-H4に結合するch32D6は、それぞれ4.8 nM及び3.1 nMの親和性で、安定してトランスフェクトされた293細胞で発現された。

【0452】

様々なヒト化抗B7-H4抗体の親和性も、上記のスク্যাッチャード解析を使用して評価した。ヒトB7-H4を安定して発現するMX-1腫瘍細胞を、成長培地中で37にて5%CO₂中で培養した。図12に示すように、hu1D11.v1.7、hu1D11.v1.8及びhu1D11.v1.9は、(親の1D11抗体の7.8 nMと比較して)それぞれ8.3 nM、8.7 nM及び7.8 nMの親和性でヒトB7-H4に結合した。Hu22C10.v2.7及びhu22C10.v2.8は、(親の22C10抗体の4.9 nMと比較して)それぞれ6.3 nM及び10 nMの親和性でヒトB7-H4に結合した。

【0453】

F.モノクローナル抗体エピトープグループ化

モノクローナル抗体のエピトープグループ化を決定するために、FACS解析を実施して、他の抗体が基準抗体を置き換えるかどうかを評価した。

【0454】

エピトープグループ化は、細胞ベースの競合結合FACSアッセイを使用して決定した。組み換えヒトB7-H4を発現する293細胞を、標識されていない抗体(0、0.05、0.5、5、50 µg/ml)の存在下でDyLight-488標識されたトレーサー抗体(0.3-1 µg/ml)とインキュベートした。トレーサーが標識されていない抗体で置き換えられる場合、競合が生じ、抗体がB7-H4の同じ又は同様の領域に結合することを示す。このことは、同じ抗体をトレーサー及び競合抗体として用いる場合に生じる。異なる標識されていない抗体によりトレーサーが置き換えられない場合、標識されていない抗体は、B7-H4中の異なる領域に結合している。

【0455】

B7-H4抗体がB7-H4のIg-V又はIg-Cドメインの何れかに結合するかどうかを決定するために、標準的な分子クローニング方法を使用して、B7-H4(IgV; スペーサーS151-V157を含むG28-F150)と無関係の(Ig-C)(コンストラクト-88)又は無関係の(Ig-V)-B7-H4(Ig-C; TM/CD D237-K282を含むD158-G236)(コンストラクト-88B)膜タンパク質の何れかを含有キメラIgドメイン分子を操作した。N末端又は細胞質タグを付加して、これらのコンストラクトでトランスフェクトされた293細胞がタンパク質を細胞膜上

で発現することを確認した(データは示さず)。簡単に述べると、293細胞は、polyfectを使用してコンストラクト88及び88Bで一過性にトランスフェクトされた。48時間後に、Dylight-488又は-650で標識された10 μ g/mlのch9B9、ch1D11、ch22C10又はch32D6で30-40分間4で細胞を染色し、洗浄し、BD FACS caliberで解析した。

【0456】

さらに、操作した可溶性B7-H4(Ig-V、G28-V157)-Fc融合タンパク質を使用して独立して結果を確認した。3-300倍の濃度にて色素で標識されたトレーサー抗体とインキュベートした場合、トレーサーの結合は、FACSにより決定されるように、293-huB7-H4細胞に対して阻害された。

10

【0457】

B7-H4(Ig-V)ドメインは、単一N-結合グリコシル化部位(N112-S114)を含み、グリコシル化がB7-H4への抗体の結合に影響するかどうかを決定するために、標準的な部位特異突然変異誘発を使用してS114をアラニンで置換して、完全長ヒトB7-H4膜コンストラクトにおけるグリコシル化を妨げた。変異S114AヒトB7-H4コンストラクトを、polyfectを使用して293細胞にトランスフェクトし、48時間後に、抗体結合についてFACSにより293-huB7-H4安定細胞株と共に解析した。

【0458】

図4Aは、これらの結果を、「エピトープグループ」との表題の欄にまとめる。図4に示すように、抗体1D11及び9B9は共に、「A」の下にグループ化されるエピトープに結合するが、抗体22.C10は、「B」の下にグループ化されるエピトープに結合し、抗体32D6は、「C」の下にグループ化されるエピトープに結合する。

20

【0459】

3つのモノクローナル抗体が、B7-H4 Ig-Vドメインと確実に結合し、ch22C10が、Ig-V/Ig-Cを共に含むエピトープに結合する可能性があり、そのような結合がグリコシル化非依存性であった(4つすべての抗体はアイソタイプコントロールより100倍多く結合した)ことがさらに確認された。ch1D11及びch22C10についての代表的なデータを図4Bに示す。用いたch1D11のバージョンは、1D11 mAb軽鎖がC43Gにて置換を含む、ch1D11のわずかに改変したバージョンであった。B7-H4 Ig-Cドメインに対する結合は、何れのモノクローナル抗体によっても検出されなかった。

30

【0460】

G. 抗B7-H4抗体の内部移行

ADC標的のある所望の属性は、抗体を細胞の分解性区画内に内部移行する能力である。抗B7-H4抗体が結合により内部移行されるかどうかを決定するために、SKBR3腺癌細胞を細胞培養処理4ウェルチャンバースライド(Nalge Nunc International)に播種し、Dylight594コンジュゲート抗B7-H4 9B9 mAb(10 μ g/mL)又は膜染色コントロールとしての抗EGF-Alexa 488(3 μ g/mL)の何れかと共に2時間4でインキュベートした。内部移行のために、両方を加え、2時間4でインキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、リソソームプロテアーゼ阻害剤ペプスタチン(5 μ g/mL)/ロイペプチン(10 μ g/mL)の存在下で16時間の追跡に供した。すべての処置グループは、3%パラホルムアルデヒド(Poly Sciences, Inc.)中で20分間室温で固定し、50mM塩化アンモニウム及びPBSで洗浄し、その後DAPIで核染色することにより追跡した。Leica SP5共焦点顕微鏡(Leica Microsystems)を画像解析のために用いた。

40

【0461】

図13に示すように、9B9及びEGF(リソソームマーカーとして用いた)染色のかなりのオーバーラップが細胞内で見られた。これらの結果から、抗B7-H4 ADCが

50

、効果的に内部移行され、分解を受け、がん細胞を死滅させる薬物を放出することが予測される。

【0462】

抗B7-H4抗体がリソソームに到達することを証明するために、色素コンジュゲートで標識されたch1D11及びch22C10抗B7-H4抗体を、MX-1カルシノーマ細胞とインキュベートし、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を使用して、抗体の細胞内の位置を追跡した。FRETは、2つの発色団、この場合はドナー及びアクセプター色素の間のエネルギー移動の機構である。簡単に述べると、ch1D11又はch22C10の何れかを、カテプシン切断部位を含むペプチドスペーサーにより一緒にされた2つの色素FAM及びTAMRAにコンジュゲートされた。未切断状態では、緑色色素(ドナー)が赤色色素(アクセプター)と近接しているのでクエンチされ、このため、膜及び細胞質の染色は赤色に見える。抗体コンジュゲートがリソソームに入ると、リソソーム酵素であるカテプシンがペプチドスペーサーを切断し、アクセプターからのドナーの距離が増え、よって、赤色色素へのエネルギー移動を妨げ、緑色色素が見えるようになる。このことを達成するために、2µg/mlの抗体-コンジュゲートと細胞を氷上で30分間インキュベートした。細胞を直ちに画像化して、タイムラプス撮影技術で10時間にわたって37℃でLeica SP5共焦点顕微鏡を使用して膜染色(TO)を示した。図14に示すように、ch1D11及びch22C10は共にリソソームに局在され、インタクト(赤色)及び切断された(緑色)コンジュゲートの合成画像は、リソソーム中で両方のコンジュゲートが共局在する黄色の領域を示す。

【0463】

H. 抗B7-H4抗体薬物コンジュゲートの生成

大規模な抗体産生のために、抗体をCHO細胞で産生する。VL及びVHをコードするベクターをCHO細胞にトランスフェクトし、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって、細胞培養培地からIgGを精製した。

【0464】

抗B7-H4抗体-薬物コンジュゲート(ADC)は、1D11、22C10及び9B9を、本明細書に示す薬物-リンカー部分MC-vc-PAB-MMAEにコンジュゲートすることによって産生した。便宜上、薬物-リンカー部分MC-vc-PAB-MMAEは、これらの実施例及び図で「vcMMAE」又は「VCE」と呼ぶこともある。コンジュゲーションに先立って、国際公開第2004/010957A2号に記載されている方法に従った標準的な方法を使用して、TECPで抗体を部分的に還元した。部分的に還元した抗体を、例えば、Doroninaら(2003)Nat. Biotechnol. 21:778-784及び米国特許出願公開第2005/0238649A1号に記載された方法に従った標準的な方法を使用して、薬物-リンカー部分にコンジュゲートした。簡単に述べると、抗体の還元システイン残基へ薬物-リンカー部分がコンジュゲートできるように、部分的に還元した抗体を薬物-リンカー部分と組み合わせた。コンジュゲーション反応をクエンチし、ADCを精製した。各ADCに関する薬物負荷(抗体あたりの薬物部分の平均数)を決定し、抗B7-H4抗体について3.5-3.9(オーリスタチン)及び1.6-1.9(ネモルピシン)の間であった。

【0465】

あるいは、本明細書に示す、アセタールリンカーを有する薬物-リンカー部分PNU-159682マレイミド(PNU-159682マレイミドアセタールリンカー)に1D11をコンジュゲートすることにより、抗B7-H4抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を生成した。

【0466】

I. MX-1ヒト乳がん細胞株異種移植における抗B7-H4抗体薬物コンジュゲートの有効性

MX-1ヒト乳がん異種移植モデルを使用して、抗B7-H4 ADCの有効性を調べた。MX-1細胞株は、トリプルネガティブ(TN、ER(-)/PR(-)/Her2

10

20

30

40

50

(-)) 乳管癌細胞株である。B7-H4は、MX-1細胞で高発現され、IHC、FACS、IF及び共焦点顕微鏡観察及びウエスタンブロットで確認された。MX-1腫瘍断片(1mm³) (9B9を使用してFACSによりB7-H4陽性)を、グループあたり10匹のマウスの側背に皮下移植し、移植片が接種後100-150mm³に到達したときに、マウスに3mg/kg若しくは10mg/kgのヒト抗gD 5B6-vcMMAEコントロール抗体-薬物コンジュゲート、3mg/kg若しくは10mg/kgのch9B9-vcMMAE抗体-薬物コンジュゲート、ch22C10-vcMMAE抗体-薬物コンジュゲート、ch1D11-vcMMAE抗体-薬物コンジュゲート、又は10mg/kgのch9B9裸抗体、又はピヒクル(PBS)単独を単回静脈内注射した。抗体の存在は、注射後1、7及び14日にPK出血により確認した。

10

【0467】

図15に示すように、実質的な腫瘍増殖阻害が、試験した両方の濃度で3つすべての抗B7-H4抗体-薬物コンジュゲートを使用して達成された。

【0468】

J. HBCX-24乳がん細胞株異種移植における抗B7-H4抗体薬物コンジュゲートの有効性

HBCX-24乳がん異種移植モデルを使用して、抗B7-H4 ADCの有効性を調べた。HBCX-24細胞株は、トリプルネガティブ(TN、ER(-)/PR(-)/Her2(-))乳癌細胞株である。B7-H4は、HBCX-24乳がん細胞で高発現され、IHC、FACS、IF及び共焦点顕微鏡観察及びウエスタンブロットで確認された。免疫組織化学により測定される、HBCX-24乳がん細胞において1+及び2+のレベルのB7-H4染色の広まりがあった。HBCX-24腫瘍断片(20mm³)を、グループあたり5-10匹のマウスの側背に皮下移植し、移植片が接種後75-200mm³に到達したときに、マウスに6mg/kg若しくは10mg/kgのヒト抗gD 5B6-vcMMAEコントロール抗体-薬物コンジュゲート、3mg/kg、6mg/kg若しくは10mg/kgのch9B9-vcMMAE抗体-薬物コンジュゲート、又は10mg/kgのch9B9裸抗体、又はピヒクル(PBS)単独を単回静脈内注射した。抗体の存在は、注射後1、7及び14日にPK出血により確認した。

20

【0469】

図16に示すように、実質的な腫瘍増殖阻害が、試験したすべての濃度でch9B9抗B7-H4抗体-薬物コンジュゲートを使用して達成された。

30

【0470】

K. MX-1乳がん細胞異種移植における抗B7-H4抗体薬物コンジュゲートの有効性

MX-1乳がん異種移植モデルを使用して、アセタールリンカーを有する薬物-リンカー部分PNU-159682マレイミドに1D11をコンジュゲートすることにより生成した抗B7-H4 ADCの有効性を調べた。MX-1腫瘍断片(1mm³)を、グループあたり10匹のマウスの側背に皮下移植し、移植片が接種後100-150mm³に到達したときに、マウスに0.1mg/kg、0.5mg/kg若しくは2.5mg/kgのヒト抗gD 5B6-vcMMAEコントロール抗体-薬物コンジュゲート、又はアセタールリンカーを有する0.1mg/kg、0.5mg/kg若しくは2.5mg/kgのch1D11-PNU-159682マレイミド、又はピヒクル(PBS)単独を単回静脈内注射した。抗体の存在は、注射後1、7及び14日にPK出血により確認した。

40

【0471】

図17に示すように、2.5mg/kg用量のch1D11 ADCは、腫瘍増殖を遅らせるが、より低い用量の0.1mg/kg及び0.5mg/kgは、腫瘍増殖に対して認識できる作用を示さなかったことがわかった。

【0472】

L. MX-1乳がん細胞異種移植における抗B7-H4抗体薬物コンジュゲートの有効性

実施例Kに記載するようなMX-1異種移植モデルを使用して、hu22C10v2.7の抗B7-H4 ADCの有効性を調べた。マウスを10匹のグループに分け、12m

50

g / k g の h u 2 2 C 1 0 v 2 . 7 裸抗体、0 . 5 m g / k g、1 . 5 m g / k g、3 m g / k g、6 m g / k g、9 m g / k g、1 2 m g / k g の h u 2 2 C 1 0 v 2 . 7 - v c - P A B - M M A E、6 若しくは 1 2 m g / k g のヒト抗 g D - 5 B 6 - v c - P A B - M M A E、又はビヒクル (P B S) 単独の単回静脈内用量を投与した。抗体の存在は、P K 出血により確認した。腫瘍増殖阻害 (T G I) は、ビヒクルに対して各処置群についての 1 日あたりの適合した腫瘍体積 - 時間曲線下面積 (A U C) のパーセントとして、以下の式を使用して計算した：

$$\% T G I = 1 0 0 \cdot (1 - A U C_{\text{処置}} / \text{日}、A U C_{\text{ビヒクル}} / \text{日})$$

【 0 4 7 3 】

1 0 0 % の T G I 値は、腫瘍停滞を示し、> 1 % であるが < 1 0 0 % の T G I は、腫瘍増殖遅延を示し、> 1 0 0 % の T G I は、腫瘍後退を示す。

10

【 0 4 7 4 】

図 1 8 に示すように、h u 2 2 C 1 0 v 2 . 7 - v c - P A B - M M A E は、6、9 及び 1 2 m g / k g 用量についてそれぞれ 9 1 %、1 0 6 % 及び 1 0 8 % の顕著な腫瘍増殖阻害を示し、9 m g / k g 用量では 3 8 % 部分寛解 (P R) 及び 6 2 % 完全寛解 (C R) を示した。ビヒクル又はコントロール A D C では応答は観察されなかった。

【 0 4 7 5 】

M . H C C - 1 5 6 9 x 2 乳がん細胞異種移植における抗 B 7 - H 4 抗体薬物コンジュゲートの有効性

H C C - 1 5 6 9 x 2 (H e r 2 ⁺ / E R ⁻) 乳がん細胞異種移植モデルを使用して、h u 2 2 C 1 0 v 2 . 7 の抗 B 7 - H 4 A D C の有効性を調べた。B 7 - H 4 は、H C C - 1 5 6 9 x 2 異種移植で高発現され、I H C 及び F A C S で確認された (図 1 9 A) 。H C C - 1 5 6 9 x 2 細胞 (マトリゲル中 5 x 1 0 ⁶) を S C I D ベージュマウスの乳腺脂肪体に接種し、腫瘍体積が 2 5 0 - 3 7 5 m m ³ に達するまでモニタリングした。マウスを 1 0 匹のグループに分け、5 m g / k g の c h 2 2 C 1 0 - v c - P A B - M M A E、又は 3 m g / k g 若しくは 5 m g / k g の h u 2 2 C 1 0 v 2 . 7 - v c - P A B - M M A E、又は 5 m g / k g のヒト抗 g D - 5 B 6 - v c - P A B - M M A E、又はビヒクル (P B S) 単独の単回静脈内用量を投与した。抗体の存在は、P K 出血により確認した。

20

【 0 4 7 6 】

図 1 9 B に示すように、c h 2 2 C 1 0 - v c - P A B - M M A E 及び h u 2 2 C 1 0 v 2 . 7 - v c - P A B - M M A E は、5 m g / k g の用量でそれぞれ 1 0 7 % 及び 1 0 5 % の腫瘍増殖阻害 (T G I) を示した。キメラ又はヒト化 2 2 C 1 0 抗体薬物コンジュゲートの間で有効性の顕著な差はなかった。より低い 3 m g / k g の用量の h u 2 2 C 1 0 v 2 . 7 - v c - P A B - M M A E は、ビヒクル又はコントロール A D C の何れかと比較して 9 4 % の腫瘍増殖阻害 (T G I) を示した。

30

【 0 4 7 7 】

理解を明瞭にする目的で、前述の発明を、例示及び例としてある程度詳細に記載したが、説明及び例は、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきでない。本明細書で引用されるすべての特許及び科学文献の開示は、その全内容が本明細書に参照により明確に援用される。

40

配列の表

配列番号	説明	配列
1	hu _k _i	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SYLAWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSYYPFTFGQ GTKVEIKR
2	huVH _i	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYIIHWVRQA PGQGLEWIGW INPGSGNTNY AQKFQGRVTI TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARFD YWQQGLTVTV SS
3	mu1D11 軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKASQGFN KYVAWYQHQP GQCPRLLIHY TSTLQPGIPA RFGSGSGRD YSFSISNLEP EDSATYFCLQ YGNLLYAFGG GTKLEIKR
4	mu1D11 重鎖可変領域	QVQLQQSGAE LVRPGTSVKM SCKASGYTFT SYWIGWAKQR PGHGFIEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGKATL TADKSSSTAY MQFSSLTSED SAIYYCARLD GSSYRGAMDS WQQGTSITVS S
5	mu1D11 HVR H1	GYTFTSYIIH
6	mu1D11 HVR H2	DIYPGGGYTN YNEKFKG
7	mu1D11 HVR H3	LDGSSYRGAM DS
8	mu1D11 HVR L1	KASQGFNKYV A
9	mu1D11 HVR L2	YTSTLQP
10	mu1D11 HVR L3	LQYGNLLYA
11	mu32D6 軽鎖可変領域	DIVMTQSPSS LVTAGEKVT MSCRSSQSLF DSGSQRNYLT WFHQKGRPP KLLIYWASTR ESGVPDRFTG SSGTDFTLT ISSVQTEDLA VFYFCQNDYSF PFTFGSGTKL EEK
12	mu32D6 重鎖可変領域	EVQLQQSGPD LVKPGASVKI SCKASGYSFT GYIIHWMKQS HGKSLEWIGR VNPNGDPIY NQKFRGKAIL TVDQSSNTAY MELRSLTSEA SAVYYCARVL FYYGSPFAYW GQGLTVTVSA
13	mu32D6 HVR H1	GYSFTGYIIH
14	mu32D6 HVR H2	RVNPNGDPIYNQKFRG
15	mu32D6 HVR H3	VLFYYGSPFAY
16	mu32D6 HVR L1	RSSQSLFDGSGQRNYLT
17	mu32D6 HVR L2	WASTRES
18	mu32D6 HVR L3	QNDYSFPFT
19	mu9B9 軽鎖可変領域	QAVVTQESAL TTSPGDTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQE KPDHLFTGLI GGTNNRVPV PARFSGSLIG DKAALTITGA QTEDEAMYFC ALWYNNHWVF GGGTKLE
20	mu9B9 重鎖可変領域	QVQLQQSGAE LMKPGASVKM SCKATGYTFS SYWIEWVKQR PGHGLEWIGE ILPGTSITTY NAKFKVKATF TADTSSNTAY MQLSSLTSED SAVYFCARYY FGSSSFYFDY WQQGTSITVS S
21	mu9B9 HVR H1	GYTFSSYWIE
22	mu9B9 HVR H2	EILPGTSITTYNAKFKV
23	mu9B9 HVR H3	ARYYFGSSSFYFDY
24	mu9B9 HVR L1	RSSTGAVTTSNYAN
25	mu9B9 HVR L2	GTNNRVP
26	mu9B9 HVR L3	ALWYNNHWV
27	mu22C10 軽鎖可変領域	QIVLTQSPTI MSASPGEKVT LTCSATSSIS YMHYQQKPG TSPKGWIYDT SKLAHGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCHQR RSYFPFTFGSG TKLEIK
28	mu22C10 重鎖可変領域	QVQLQQPGAE LVKPGTSVKL SCKASGYTFT NFWIHWVIQR PGQGLEWIGE IDPSDYSYNY NQKFKGKATL TVDKSSNTAY MQLSSLTSED SAVYYCSREI TTVDYWQQGT TLTVSS
29	mu22C10 HVR H1	GYTFTNFWIH
30	mu22C10 HVR H2	EIDPSDYSYNYNQKFKG
31	mu22C10 HVR H3	EITTVDY
32	mu22C10 HVR L1	SATSSISYMH
33	mu22C10 HVR L2	DTSKLAH
34	mu22C10 HVR L3	HQRRSYPFT

10

20

30

40

35	hu1D11.v1.7 輕鎖可變領域; hu1D11.v1.8 輕鎖可變領域; hu1D11.v1.9 輕鎖可變領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQGFN KYVAWYQQKP GKAPKLLIYY TSTLQPGVPS RFGSGSGRD YTLTISSLQP EDFATYYCLQ YGNLLYAFGQ GTKVEIKR	
36	hu1D11.v1.6 重鎖可變領域; hu1D11.v1.7 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIGWVRQA PGQGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGRATL TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARLD GSSYRGAMDS WGQGTLVTVS S	
37	hu1D11.v1.8 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIGWVRQA PGQGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGRATI TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARLD GSSYRGAMDS WGQGTLVTVS S	10
38	hu1D11.v1.9 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIGWVRQA PGQGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGRVTI TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARLD GSSYRGAMDS WGQGTLVTVS S	
39	hu1D11.v1 HVR H1 hu1D11.v2 HVR H1 hu1D11.v3 HVR H1 hu1D11.v4 HVR H1 hu1D11.v1.1 HVR H1 hu1D11.v1.2 HVR H1 hu1D11.v1.3 HVR H1 hu1D11.v1.4 HVR H1 hu1D11.v1.5 HVR H1 hu1D11.v1.6 HVR H1 hu1D11.v1.7 HVR H1 hu1D11.v1.8 HVR H1 hu1D11.v1.9 HVR H1	GYTFTSYWIG	20
40	hu1D11.v1 HVR H2 hu1D11.v2 HVR H2 hu1D11.v3 HVR H2 hu1D11.v4 HVR H2 hu1D11.v1.1 HVR H2 hu1D11.v1.2 HVR H2 hu1D11.v1.3 HVR H2 hu1D11.v1.4 HVR H2 hu1D11.v1.5 HVR H1 hu1D11.v1.6 HVR H2 hu1D11.v1.7 HVR H2 hu1D11.v1.8 HVR H2 hu1D11.v1.9 HVR H2	DIYPGGGYTNYNEKFKG	30
41	hu1D11.v1 HVR H3 hu1D11.v2 HVR H3 hu1D11.v3 HVR H3 hu1D11.v4 HVR H3 hu1D11.v1.1 HVR H3 hu1D11.v1.2 HVR H3 hu1D11.v1.3 HVR H3 hu1D11.v1.4 HVR H3 hu1D11.v1.5 HVR H3 hu1D11.v1.6 HVR H3 hu1D11.v1.7 HVR H3 hu1D11.v1.8 HVR H3 hu1D11.v1.9 HVR H3	LDGSSYRGAMDS	40

42	hu1D11.v1 HVR L1 hu1D11.v2 HVR L1 hu1D11.v3 HVR L1 hu1D11.v4 HVR L1 hu1D11.v1.1 HVR L1 hu1D11.v1.2 HVR L1 hu1D11.v1.3 HVR L1 hu1D11.v1.4 HVR L1 hu1D11.v1.5 HVR L1 hu1D11.v1.6 HVR L1 hu1D11.v1.7 HVR L1 hu1D11.v1.8 HVR L1 hu1D11.v1.9 HVR L1	KASQGFNKYVA	10
43	hu1D11.v1 HVR L2 hu1D11.v2 HVR L2 hu1D11.v3 HVR L2 hu1D11.v4 HVR L2 hu1D11.v1.1 HVR L2 hu1D11.v1.2 HVR L2 hu1D11.v1.3 HVR L2 hu1D11.v1.4 HVR L2 hu1D11.v1.5 HVR L2 hu1D11.v1.6 HVR L2 hu1D11.v1.7 HVR L2 hu1D11.v1.8 HVR L2 hu1D11.v1.9 HVR L2	YTSTLQP	20
44	hu1D11.v1 HVR L3 hu1D11.v2 HVR L3 hu1D11.v3 HVR L3 hu1D11.v4 HVR L3 hu1D11.v1.1 HVR L3 hu1D11.v1.2 HVR L3 hu1D11.v1.3 HVR L3 hu1D11.v1.4 HVR L3 hu1D11.v1.5 HVR L3 hu1D11.v1.6 HVR L3 hu1D11.v1.7 HVR L3 hu1D11.v1.8 HVR L3 hu1D11.v1.9 HVR L3	LQYGNLLYA	30
45	hu1D11.v1 軽鎖(LC)フレ ームワーク 1(FR1) hu1D11.v2 LC FR1 hu1D11.v3 LC FR1 hu1D11.v4 LC FR1 hu1D11.v1.1 LC FR1 hu1D11.v1.2 LC FR1 hu1D11.v1.3 LC FR1 hu1D11.v1.4 LC FR1 hu1D11.v1.5 LC FR1 hu1D11.v1.6 LC FR1 hu1D11.v1.7 LC FR1 hu1D11.v1.8 LC FR1 hu1D11.v1.9 LC FR1	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC	40
46	hu1D11.v1.1 LC FR2 hu1D11.v1.7 LC FR2 hu1D11.v1.8 LC FR2 hu1D11.v1.9 LC FR2	WYQQKPGKAP KLLIY	

47	hu1D11.v1 LC FR3 hu1D11.v1.4 LC FR3 hu1D11.v1.5 LC FR3 hu1D11.v1.6 LC FR3 hu1D11.v1.7 LC FR3 hu1D11.v1.8 LC FR3 hu1D11.v1.9 LC FR3	GVPSRFSGSG SGRDYTLTIS SLQPEDFATY YC	
48	hu1D11.v1 LC FR4 hu1D11.v2 LC FR4 hu1D11.v3 LC FR4 hu1D11.v4 LC FR4 hu1D11.v1.1 LC FR4 hu1D11.v1.2 LC FR4 hu1D11.v1.3 LC FR4 hu1D11.v1.4 LC FR4 hu1D11.v1.5 LC FR4 hu1D11.v1.6 LC FR4 hu1D11.v1.7 LC FR4 hu1D11.v1.8 LC FR4 hu1D11.v1.9 LC FR4	FGQGTKVEIK R	10
49	hu1D11.v1 重鎖(HC)フレームワーク 1(FR1) hu1D11.v2 HC FR1 hu1D11.v3 HC FR1 hu1D11.v4 HC FR1 hu1D11.v1.1 HC FR1 hu1D11.v1.2 HC FR1 hu1D11.v1.3 HC FR1 hu1D11.v1.4 HC FR1 hu1D11.v1.5 HC FR1 hu1D11.v1.6 HC FR1 hu1D11.v1.7 HC FR1 hu1D11.v1.8 HC FR1 hu1D11.v1.9 HC FR1	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS	20
50	hu1D11.v1 HC FR2 hu1D11.v2 HC FR2 hu1D11.v3 HC FR2 hu1D11.v4 HC FR2 hu1D11.v1.1 HC FR2 hu1D11.v1.2 HC FR2 hu1D11.v1.3 HC FR2 hu1D11.v1.4 HC FR2 hu1D11.v1.5 HC FR2 hu1D11.v1.6 HC FR2 hu1D11.v1.7 HC FR2 hu1D11.v1.8 HC FR2 hu1D11.v1.9 HC FR2	WVRQAPGQGL EWIG	30
51	hu1D11.v1.6 HC FR3 hu1D11.v1.7 HC FR3	RATLTRDTST STAYLELSSL RSEDVAVYYC AR	
52	hu1D11.v1.8 HC FR3	RATITRDTST STAYLELSSL RSEDVAVYYC AR	
53	hu1D11.v1.9 HC FR3	RVTITRDTST STAYLELSSL RSEDVAVYYC AR	
54	hu1D11.v1 HC FR4 hu1D11.v2 HC FR4 hu1D11.v3 HC FR4 hu1D11.v4 HC FR4 hu1D11.v1.1 HC FR4 hu1D11.v1.2 HC FR4	WGQGTLVTVS S	40

	hu1D11.v1.3 HC FR4 hu1D11.v1.4 HC FR4 hu1D11.v1.5 HC FR4 hu1D11.v1.6 HC FR4 hu1D11.v1.7 HC FR4 hu1D11.v1.8 HC FR4 hu1D11.v1.9 HC FR4		
55	hu22C10.v2 輕鎖可變領域 hu22C10.v3 輕鎖可變領域 hu22C10.v4 輕鎖可變領域 hu22C10.v5 輕鎖可變領域 hu22C10.v2.3 輕鎖可變領域 hu22C10.v2.4 輕鎖可變領域 hu22C10.v2.5 輕鎖可變領域 hu22C10.v2.6 輕鎖可變領域 hu22C10.v2.7 輕鎖可變領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSATSSIS YMHWYQQKPG KAPKGWIYDT SKLAHGVPSR FSGSGSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCHQR RSYPTFTGQG TKVEIK	10
56	hu22C10.v2.7 重鎖可變領域; hu22C10.v2.8 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NFWIHWRQA PGQGLEWIGE IDPSDSTNY NQKFKGRVTI TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCAREI TTVDYWGQGT LVTVSS	20
57	hu22C10.v2.8 輕鎖可變領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSATSSIS YMHWYQQKPG KAPKGLIYDT SKLAHGVPSR FSGSGSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCHQR RSYPTFTGQG TKVEIK	
58	hu22C10.v1 HVR H1 hu22C10.v2 HVR H1 hu22C10.v3 HVR H1 hu22C10.v4 HVR H1 hu22C10.v5 HVR H1 hu22C10.v2.1 HVR H1 hu22C10.v2.2 HVR H1 hu22C10.v2.3 HVR H1 hu22C10.v2.4 HVR H1 hu22C10.v2.5 HVR H1 hu22C10.v2.6 HVR H1 hu22C10.v2.7 HVR H1 hu22C10.v2.8 HVR H1	GYTFTNFWIH	30
59	hu22C10.v1 HVR H2 hu22C10.v2 HVR H2 hu22C10.v3 HVR H2 hu22C10.v4 HVR H2 hu22C10.v5 HVR H2 hu22C10.v2.1 HVR H2 hu22C10.v2.2 HVR H2 hu22C10.v2.3 HVR H2 hu22C10.v2.4 HVR H2 hu22C10.v2.5 HVR H2 hu22C10.v2.6 HVR H2 hu22C10.v2.7 HVR H2 hu22C10.v2.8 HVR H2	EIDPSDSTNYNQKFKG	40
60	hu22C10.v1 HVR H3 hu22C10.v2 HVR H3	EITTVDY	

	hu22C10.v3 HVR H3 hu22C10.v4 HVR H3 hu22C10.v5 HVR H3 hu22C10.v2.1 HVR H3 hu22C10.v2.2 HVR H3 hu22C10.v2.3 HVR H3 hu22C10.v2.4 HVR H3 hu22C10.v2.5 HVR H3 hu22C10.v2.6 HVR H3 hu22C10.v2.7 HVR H3 hu22C10.v2.8 HVR H3		
61	hu22C10.v1 HVR L1 hu22C10.v2 HVR L1 hu22C10.v3 HVR L1 hu22C10.v4 HVR L1 hu22C10.v5 HVR L1 hu22C10.v2.1 HVR L1 hu22C10.v2.2 HVR L1 hu22C10.v2.3 HVR L1 hu22C10.v2.4 HVR L1 hu22C10.v2.5 HVR L1 hu22C10.v2.6 HVR L1 hu22C10.v2.7 HVR L1 hu22C10.v2.8 HVR L1	SATSSISYMH	10
62	hu22C10.v1 HVR L2 hu22C10.v2 HVR L2 hu22C10.v3 HVR L2 hu22C10.v4 HVR L2 hu22C10.v5 HVR L2 hu22C10.v2.1 HVR L2 hu22C10.v2.2 HVR L2 hu22C10.v2.3 HVR L2 hu22C10.v2.4 HVR L2 hu22C10.v2.5 HVR L2 hu22C10.v2.6 HVR L2 hu22C10.v2.7 HVR L2 hu22C10.v2.8 HVR L2	DTSKLAH	20
63	hu22C10.v1 HVR L3 hu22C10.v2 HVR L3 hu22C10.v3 HVR L3 hu22C10.v4 HVR L3 hu22C10.v5 HVR L3 hu22C10.v2.1 HVR L3 hu22C10.v2.2 HVR L3 hu22C10.v2.3 HVR L3 hu22C10.v2.4 HVR L3 hu22C10.v2.5 HVR L3 hu22C10.v2.6 HVR L3 hu22C10.v2.7 HVR L3 hu22C10.v2.8 HVR L3	HQRRSYPFT	30
64	hu22C10.v1 LC FR1 hu22C10.v2 LC FR1 hu22C10.v3 LC FR1 hu22C10.v4 LC FR1 hu22C10.v5 LC FR1 hu22C10.v2.1 LC FR1 hu22C10.v2.2 LC FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	40

	hu22C10.v2.3 LC FR1 hu22C10.v2.4 LC FR1 hu22C10.v2.5 LC FR1 hu22C10.v2.6 LC FR1 hu22C10.v2.7 LC FR1 hu22C10.v2.8 LC FR1		
65	hu22C10.v1 LC FR2 hu22C10.v2 LC FR2 hu22C10.v3 LC FR2 hu22C10.v4 LC FR2 hu22C10.v5 LC FR2 hu22C10.v2.3 LC FR2 hu22C10.v2.4 LC FR2 hu22C10.v2.5 LC FR2 hu22C10.v2.6 LC FR2 hu22C10.v2.7 LC FR2	WYQQKPGKAPKGIY	10
66	hu22C10.v2.8 LC FR2	WYQQKPGKAPKGIY	
67	hu22C10.v2 LC FR3 hu22C10.v3 LC FR3 hu22C10.v4 LC FR3 hu22C10.v5 LC FR3 hu22C10.v2.1 LC FR3 hu22C10.v2.2 LC FR3 hu22C10.v2.3 LC FR3 hu22C10.v2.4 LC FR3 hu22C10.v2.5 LC FR3 hu22C10.v2.6 LC FR3 hu22C10.v2.7 LC FR3 hu22C10.v2.8 LC FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC	20
68	hu22C10.v1 LC FR4 hu22C10.v2 LC FR4 hu22C10.v3 LC FR4 hu22C10.v4 LC FR4 hu22C10.v5 LC FR4 hu22C10.v2.1 LC FR4 hu22C10.v2.2 LC FR4 hu22C10.v2.3 LC FR4 hu22C10.v2.4 LC FR4 hu22C10.v2.5 LC FR4 hu22C10.v2.6 LC FR4 hu22C10.v2.7 LC FR4 hu22C10.v2.8 LC FR4	FGQGTKVEIKR	30
69	hu22C10.v1 HC FR1 hu22C10.v2 HC FR1 hu22C10.v3 HC FR1 hu22C10.v4 HC FR1 hu22C10.v5 HC FR1 hu22C10.v2.1 HC FR1 hu22C10.v2.2 HC FR1 hu22C10.v2.3 HC FR1 hu22C10.v2.4 HC FR1 hu22C10.v2.5 HC FR1 hu22C10.v2.6 HC FR1 hu22C10.v2.7 HC FR1 hu22C10.v2.8 HC FR1	EVQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKAS	40
70	hu22C10.v1 HC FR2 hu22C10.v2 HC FR2	WVRQAPGQGLEWIG	

	hu22C10.v3 HC FR2 hu22C10.v4 HC FR2 hu22C10.v5 HC FR2 hu22C10.v2.1 HC FR2 hu22C10.v2.2 HC FR2 hu22C10.v2.3 HC FR2 hu22C10.v2.4 HC FR2 hu22C10.v2.5 HC FR2 hu22C10.v2.6 HC FR2 hu22C10.v2.7 HC FR2 hu22C10.v2.8 HC FR2		
71	hu22C10.v2.7 HC FR3 hu22C10.v2.8 HC FR3	RVTI TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCAR	10
72	hu22C10.v1 HC FR4 hu22C10.v2 HC FR4 hu22C10.v3 HC FR4 hu22C10.v4 HC FR4 hu22C10.v5 HC FR4 hu22C10.v2.1 HC FR4 hu22C10.v2.2 HC FR4 hu22C10.v2.3 HC FR4 hu22C10.v2.4 HC FR4 hu22C10.v2.5 HC FR4 hu22C10.v2.6 HC FR4 hu22C10.v2.7 HC FR4 hu22C10.v2.8 HC FR4	WGQGT LVTVSS	20
73	ヒト B7_H4 前駆体、シグナル配列=アミノ酸 1-28	MASLGQILFW SIISIILLA GAIALIIGFG ISGRHSITVT TVASAGNIGE DGILSCTFEP DIKLSDIVIQ WLKEGVLGLV HEFKEGKDEL SEQDEMFRGR TAVFADQVIV GNASLRKKNV QLTDAGTYKC YIITSKGKGN ANLEYKTGAF SMPEVNVDYN ASSETLRCEA PRWFPQPTVV WASQVDQGAN FSEVSNTSFE LNSENVTMKV VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV TESEIKRRSH LQLLNSKASL CVSSFFAISW ALLPLSPYLM LK	
74	ヒト B7-H4 成熟、シグナル配列無し、アミノ酸 29-282	FGISGRHSIT VTTVASAGNI GEDGILSCTF EPDIKLSDIV IQWLKEGVLG LVHEFKEGKD ELSEQDEMFR GRTAVFADQV IVGNASLRK NVQLTDAGTY KCYIITSKGK GNANLEYKTG AFSMPEVNVD YNASSETLRC EAPRWFQPT VVWASQVDQG ANFSEVSNTS FELNSENVTM KVVSVLYNVT INNTYSCMIE NDIAKATGDI KVTESEIKRR SHLQLLNSKA SLCVSSFFAI SWALLPLSPY LMLK	30
75	カニクイザル B7-H4 前駆体、シグナル配列=アミノ酸 1-28	MASLGQILFW SIISIFILA GAIALIIGFG ISGRHSITVT TVASAGNIGE DGILSCTFEP DIKLSDIVIQ WLKEGVIGLV HEFKEGKDEL SEQDEMFRGR TAVFADQVIV GNASLRKKNV QLTDAGTYKC YIITSKGKGN ANLEYKTGAF SMPEVNVDYN ASSETLRCEA PRWFPQPTVV WASQVDQGAN FSEVSNTSFE LNSENVTMKV VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV TESEIKRRSH LQLLNSKASL CVSSFLAISW ALLPLAPYLM LK	
76	カニクイザル B7-H4 成熟、シグナル配列無し、アミノ酸 29-282	FGISGRHSIT VTTVASAGNI GEDGILSCTF EPDIKLSDIV IQWLKEGVIQ LVHEFKEGKD ELSEQDEMFR GRTAVFADQV IVGNASLRK NVQLTDAGTY KCYIITSKGK GNANLEYKTG AFSMPEVNVD YNASSETLRC EAPRWFQPT VVWASQVDQG ANFSEVSNTS FELNSENVTM KVVSVLYNVT INNTYSCMIE NDIAKATGDI KVTESEIKRR SHLQLLNSKA SLCVSSFLAI SWALLPLAPY LMLK	40
77	ラット B7-H4 前駆体、シグナル配列=アミノ酸 1-28	MASLGQIIFW SIINVIIILA GAIVLIIGFG ISGKHFITVT TFTSAGNIGE DGTLSCTFEP DIKLNIGVIQ WLKEGKGLV HEFKEGKDDL SQQHEMFRGR TAVFADQVVV GNASLRKKNV	

		QLTDAGTYTC YIHTSKGKGN ANLEYKTGAF SMPEINVDYN ASSESLRCEA PRWFPQPTVA WASQVDQGAN FSEVSNTSFE LNSENVTMKV VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV TDSEVKRRSQ LELLNSGPSP CVSSVSAAGW ALLSLSCCLM LR	
78	ラット B7-H4 成熟、シグナル配列無し、アミノ酸 29-282	FGISGKHFIT VTTFTSAGNI GEDGTLSCF EPDIKLNIV IQWLKEGKIG LVHEFKEGKD DLSQQHEMFR GRTAVFADQV VVGNASLRLK NVQLTDAGTY TCYIHTSKGK GNANLEYKTG AFSMPEINVD YNASSESLRC EAPRWFPQPT VAWASQVDQG ANFSEVSNTS FELNSENVTM KVVSVLYNVT INNTYSCMIE NDIAKATGDI KVTDSEVKRR SQLELLNSGP SPCVSSVSA GWALLSLSCC LMLR	10
79	マウス B7-H4 前駆体、シグナル配列=アミノ酸 1-28	MASLGQIIFW SIINIILLA GAIALIIGFG ISGKHFITVT TFTSAGNIGE DGTLSCTFEP DIKLNIVIQ WLKEGKGLV HEFKEGKDDL SQQHEMFRGR TAVFADQVVV GNASLRLKNV QLTDAGTYTC YIRTSKGKGN ANLEYKTGAF SMPEINVDYN ASSESLRCEA PRWFPQPTVA WASQVDQGAN FSEVSNTSFE LNSENVTMKV VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV TDSEVKRRSQ LQLLNSGPSP CVFSSAFAAG WALLSLSCCL MLR	
80	マウス B7-H4 成熟、シグナル配列無し、アミノ酸 29-283	FGISGKHFIT VTTFTSAGNI GEDGTLSCF EPDIKLNIV IQWLKEGKIG LVHEFKEGKD DLSQQHEMFR GRTAVFADQV VVGNASLRLK NVQLTDAGTY TCYIRTSKGK GNANLEYKTG AFSMPEINVD YNASSESLRC EAPRWFPQPT VAWASQVDQG ANFSEVSNTS FELNSENVTM KVVSVLYNVT INNTYSCMIE NDIAKATGDI KVTDSEVKRR SQLQLLNSGP SPCVSSAFA AGWALLSLSC CLMLR	20
81	チンパンジー B7-H4 前駆体、シグナル配列=アミノ酸 1-24	MKPLTSRIIS IIIILAGAIR LIIGFGISGR HSITVTTVAS AGNIGEDGIL SCTFEPDIKL SDIVIQLKE GVLGLVHEFK EGKDELSEQD EMFRGRTAVF ADQVIVGNAS LRLKNVQLTD AGTYKCYIIT SKGKGNANLE YKTGAFSMPE VNVYNASSE TLRCEAPRWF PQPTVVWASQ IDQGANFSEV SNTSFELNSE NVTMKVSVL YNATINNTYS CMIENDIAKA TGDIVTESE IKRRSHLQLL NSKASLCVSS FFAISWALLP LSPYMLK	
82	チンパンジー B7-H4 成熟、シグナル配列無し、アミノ酸 25-278	FGISGRHSIT VTTVASAGNI GEDGILSCF EPDIKLSIV IQWLKEGVLG LVHEFKEGKD ELSEQDEMFR GRTAVFADQV IVGNASLRLK NVQLTDAGTY KCYIITSKGK GNANLEYKTG AFSMPEVNDV YNASSETLRC EAPRWFPQPT VVWASQIDQG ANFSEVSNTS FELNSENVTM KVVSVLYNAT INNTYSCMIE NDIAKATGDI KVTSEIKRR SHLQLLNSKA SLCVSSFFAI SWALLPLSPY LMLK	30
83	hu1D11.v1 LC FR2 hu1D11.v2 LC FR2 hu1D11.v3 LC FR2 hu1D11.v4 LC FR2 hu1D11.v1.2 LC FR2 hu1D11.v1.3 LC FR2 hu1D11.v1.4 LC FR2 hu1D11.v1.5 LC FR2 hu1D11.v1.6 LC FR2	WYQQKPGKAP KLLIH	40
84	hu1D11.v2 LC FR3	GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YC	
85	hu1D11.v3 LC FR3 hu1D11.v4 LC FR3	GIPSRFSGSG SGRDYTLTIS SLQPEDFATY YC	
86	hu1D11.v1.2 LC FR3	GVPSRFSGSG SGTDYTLTIS SLQPEDFATY YC	
87	hu1D11.v1.3 LC FR3	GVPSRFSGSG SGRDYTLTIS SLQPEDFATY YC	
88	hu1D11.v1 HC FR3 hu1D11.v2 HC FR3	RATLTADTST STAYLELSSL RSEDVAVVYC AR	

	hu1D11.v.1.1 HC FR3 hu1D11.v.1.2 HC FR3 hu1D11.v.1.3 HC FR3		
89	hu1D11.v3 HC FR3	RATLTADKST STAYLELSSL RSED TAVYYC AR	
90	hu1D11.v4 HC FR3	RATLTADKSS STAYLELSSL RSED TAVYYC AR	
91	hu1D11.v1.4 HC FR3	RVTLTADTST STAYLELSSL RSED TAVYYC AR	
92	hu1D11.v1.5 HC FR3	RATITADTST STAYLELSSL RSED TAVYYC AR	
93	hu1D11.v1 輕鎖可變領域; hu1D11.v1.4 輕鎖可變領域; hu1D11.v1.5 輕鎖可變領域; hu1D11.v1.6 輕鎖可變領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQGFN KYVAWYQQKP GKAPKLLIHY TSTLQPGVPS RFSGSGSGRD YLTISSLQP EDFATYYCLQ YGNLLYAFGQ GTKVEIKR	10
94	hu1D11.v1.3 輕鎖可變領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQGFN KYVAWYQQKP GKAPKLLIHY TSTLQPGVPS RFSGSGSGRD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YGNLLYAFGQ GTKVEIKR	
95	hu1D11.v1.2 輕鎖可變領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQGFN KYVAWYQQKP GKAPKLLIHY TSTLQPGVPS RFSGSGSGTD YLTISSLQP EDFATYYCLQ YGNLLYAFGQ GTKVEIKR	
96	hu1D11.v1.1 輕鎖可變領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQGFN KYVAWYQQKP GKAPKLLIYY TSTLQPGVPS RFSGSGSGRD YLTISSLQP EDFATYYCLQ YGNLLYAFGQ GTKVEIKR	20
97	hu1D11.v2 輕鎖可變領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQGFN KYVAWYQQKP GKAPKLLIHY TSTLQPGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YGNLLYAFGQ GTKVEIKR	
98	hu1D11.v3 輕鎖可變領域; hu1D11.v4 輕鎖可變領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQGFN KYVAWYQQKP GKAPKLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YLTISSLQP EDFATYYCLQ YGNLLYAFGQ GTKVEIKR	
99	hu1D11.v1.5 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIGWVRQA PGQGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGRATI TADTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARLD GSSYRGAMDS WGQGTLVTVS S	
100	hu1D11.v1.4 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIGWVRQA PGQGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGRVTL TADTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARLD GSSYRGAMDS WGQGTLVTVS S	30
101	hu1D11.v1 重鎖可變領域; hu1D11.v2 重鎖可變領域; hu1D11.v1.1 重鎖可變領域; hu1D11.v1.2 重鎖可變領域; hu1D11.v1.3 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIGWVRQA PGQGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGRATL TADTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARLD GSSYRGAMDS WGQGTLVTVS S	
102	hu1D11.v3 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIGWVRQA PGQGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGRATL TADKSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARLD GSSYRGAMDS WGQGTLVTVS S	40
103	hu1D11.v4 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWIGWVRQA PGQGLEWIGD IYPGGGYTNY NEKFKGRATL TADKSSSTAY LELSSLRSED TAVYYCARLD GSSYRGAMDS WGQGTLVTVS S	
104	hu22C10.v1 輕鎖可變領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSATSSIS YMHWYQQKPG KAPKGWIYDT SKLAHGVPSPR FSGSGSGTDY TLTISSLQPE DFATYYCHQR RSYPTFGGQ TKVEIK	
105	hu22C10.v2.1 輕鎖可變	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSATSSIS YMHWYQQKPG	

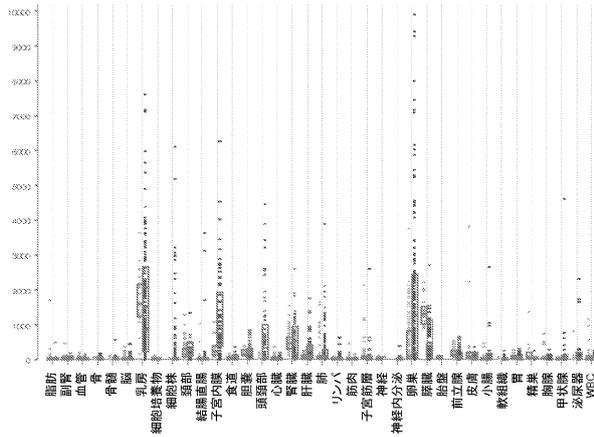
	領域	KAPKLWIYDT SKLAHGVPSR FSGSGSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCHQR RSYPFTEGQG TKVEIK
106	hu22C10.v2.2 輕鎖可變 領域; hu22C10.v2.8 輕 鎖可變領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCATSSIS YMHYQQKPG KAPKGLIYDT SKLAHGVPSR FSGSGSGTDF TLTISSLQPE DFATYYCHQR RSYPFTEGQG TKVEIK
107	hu22C10.v2.6 重鎖可變 領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NFWIHWRQA PGQGLEWIGE IDPSDSTNY NQKFKGRATL TVDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCAREI TTVDYWGQGT LVTVSS
108	hu22C10.v2.5 重鎖可變 領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NFWIHWRQA PGQGLEWIGE IDPSDSTNY NQKFKGRATL TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCSREI TTVDYWGQGT LVTVSS
109	hu22C10.v2.4 重鎖可變 領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NFWIHWRQA PGQGLEWIGE IDPSDSTNY NQKFKGRATI TVDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCSREI TTVDYWGQGT LVTVSS
110	hu22C10.v2.3 重鎖可變 領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NFWIHWRQA PGQGLEWIGE IDPSDSTNY NQKFKGRVTL TVDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCSREI TTVDYWGQGT LVTVSS
111	hu22C10.v1 重鎖可變領 域; hu22C10.v2 重鎖可變領 域 hu22C10.v2.1 重鎖 可變領域; hu22C10.v2.2 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NFWIHWRQA PGQGLEWIGE IDPSDSTNY NQKFKGRATL TVDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCSREI TTVDYWGQGT LVTVSS
112	hu22C10.v3 重鎖可變領 域;	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NFWIHWRQA PGQGLEWIGE IDPSDSTNY NQKFKGRATL TVDKSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCSREI TTVDYWGQGT LVTVSS
113	hu22C10.v4 重鎖可變領 域;	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NFWIHWRQA PGQGLEWIGE IDPSDSTNY NQKFKGRATL TVDKSTNTAY LELSSLRSED TAVYYCSREI TTVDYWGQGT LVTVSS
114	hu22C10.v5 重鎖可變領 域;	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NFWIHWRQA PGQGLEWIGE IDPSDSTNY NQKFKGRATL TVDKSSNTAY LELSSLRSED TAVYYCSREI TTVDYWGQGT LVTVSS
115	hu22C10.v2.1 LC FR2	WYQQKPGKAPKLWIY
116	hu22C10.v2.2 LC FR2	WYQQKPGKAPKGLIY
117	hu22C10.v1 LC FR3	GVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYC
118	hu22C10.v2.6 HC FR3	RATL TVDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCAR
119	hu22C10.v2.5 HC FR3	RATL TRDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCSR
120	hu22C10.v2.4 HC FR3	RATI TVDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCSR
121	hu22C10.v2.3 HC FR3	RVTL TVDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCSR
122	hu22C10.v1 HC FR3 hu22C10.v2 HC FR3 hu22C10.v2.1 HC FR3 hu22C10.v2.2 HC FR3	RATL TVDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCSR
123	hu22C10.v3 HC FR3	RATL TVDKSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCSR
124	hu22C10.v4 HC FR3	RATL TVDKSTNTAY LELSSLRSED TAVYYCSR
125	hu22C10.v5 HC FR3	RATL TVDKSSNTAY LELSSLRSED TAVYYCSR

10

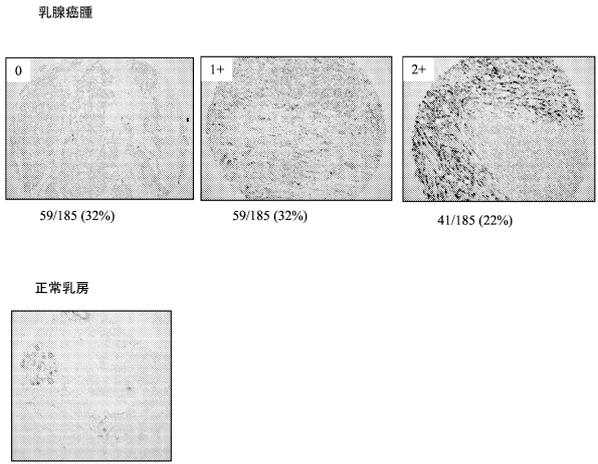
20

30

【図1】

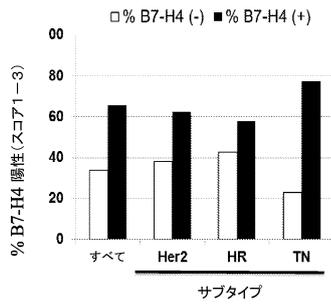


【図2】

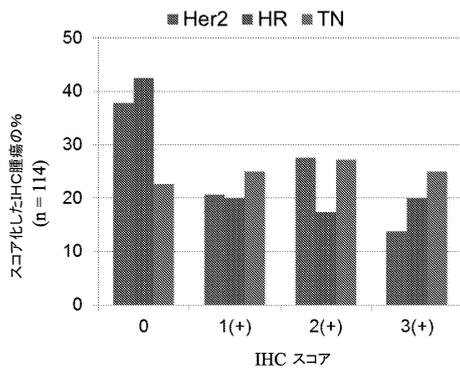


【図3 A - B】

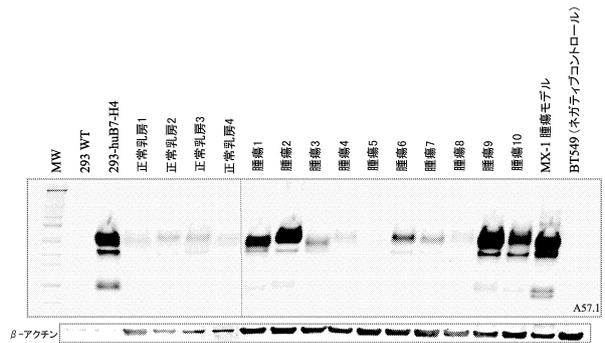
(A)



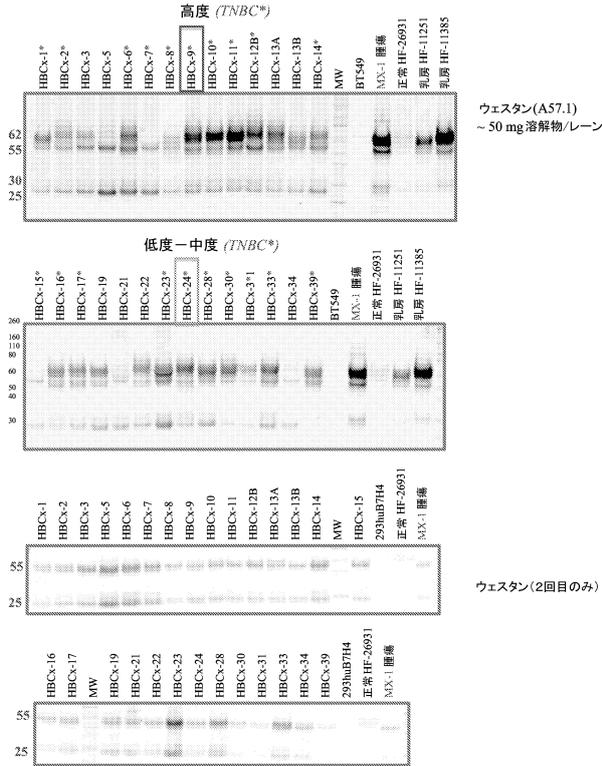
(B)



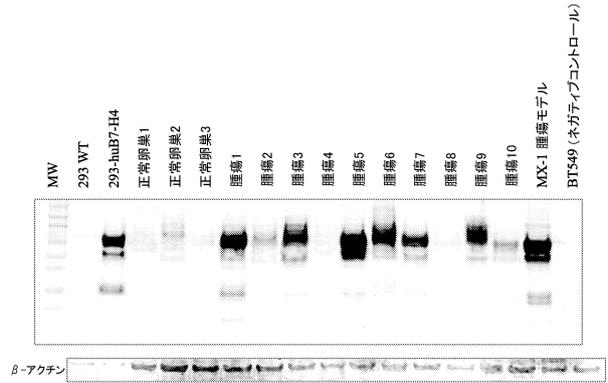
【図3 C】



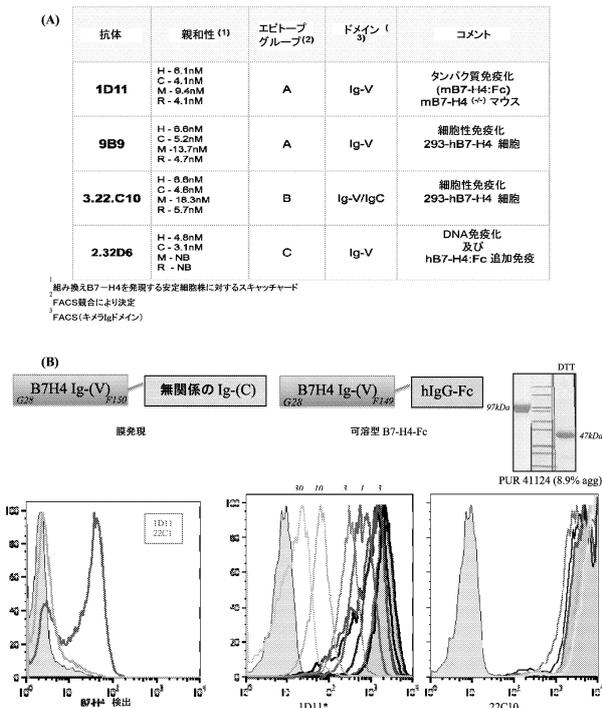
【図3D】



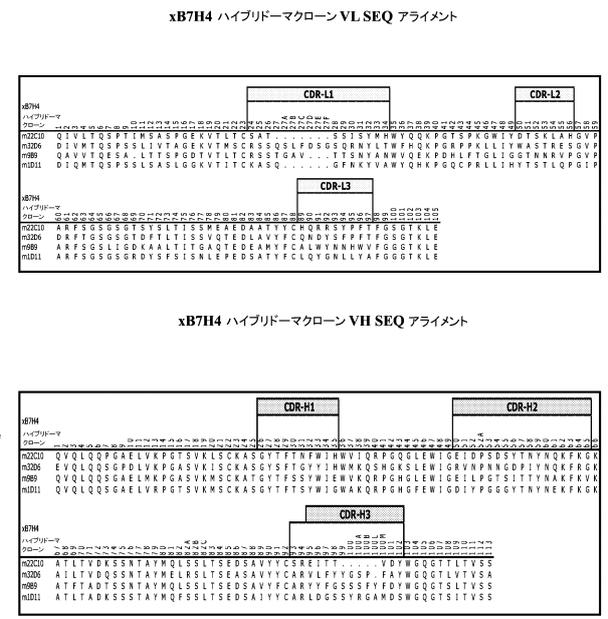
【図3E】



【図4】



【図5】



【図6-1】

xB7H4 m1D11及びh1D11. v1-4とHuK1との
軽鎖可変ドメイン配列アライメント

Sequence alignment table for Figure 6-1 showing amino acid sequences for huK1, m1D11, h1D11.v1-4, and Kabat# across various domains (CDR1, CDR2, CDR3).

m1D11及びh1D11. v1-4をコンセンサストVLカプ1と比較することによる、
強調したフレームワークの差

【図6-2】

xB7H4 m1D11及びh1D11. v1. 1-1. 9とHuK1との
軽鎖可変ドメイン配列アライメント

Sequence alignment table for Figure 6-2 showing amino acid sequences for huK1, m1D11, h1D11.v1.1-9, and Kabat# across various domains (CDR1, CDR2, CDR3).

m1D11及びh1D11. v1. 1-1. 9をコンセンサストVLカプ1と比較することによる、
強調したフレームワークの差

【図7-1】

xB7H4 m1D11及びh1D11. v1-4とHuVH1との
重鎖可変ドメイン配列アライメント

Sequence alignment table for Figure 7-1 showing amino acid sequences for HuVH1, m1D11, h1D11.v1-4, and Kabat# across various domains (CDR1, CDR2, CDR3).

m1D11及びh1D11. v1-4をコンセンサストVHサブグループ1と比較することによる、
強調したフレームワークの差

【図7-2】

xB7H4 m1D11及びh1D11. v1. 1-1. 9とHuVH1との
重鎖可変ドメイン配列アライメント

Sequence alignment table for Figure 7-2 showing amino acid sequences for HuVH1, m1D11, h1D11.v1.1-9, and Kabat# across various domains (CDR1, CDR2, CDR3).

m1D11及びh1D11. v1. 1-1. 9をコンセンサストVHサブグループ1と比較することによる、
強調したフレームワークの差

【図 8 - 1】

xB7H4 m22C10及びh22C10. v1-5とHuK1との
軽鎖可変ドメイン配列アライメント

Sequence alignment table for Figure 8-1 showing amino acid sequences for hHuK1, m22C10, h22C10v1, h22C10v2, h22C10v3, h22C10v4, h22C10v5, and h22C10v6. The alignment is divided into Contact-CDR1, Contact-CDR2, and Contact-CDR3 regions.

【図 8 - 2】

xB7H4 m22C10及びh22C10. v2. 1-2. 8とHuK1との
軽鎖可変ドメイン配列アライメント

Sequence alignment table for Figure 8-2 showing amino acid sequences for hHuK1, m22C10, h22C10v2, h22C10v1, h22C10v3, h22C10v4, h22C10v5, and h22C10v6. The alignment is divided into Contact-CDR1, Contact-CDR2, and Contact-CDR3 regions.

m22C10及びh22C10. v1-5をコンセンサストVLカッパ1と比較することによる、
強調したフレームワークの差

Sequence alignment table comparing m22C10 and h22C10 v1-5 variants against the consensus VL kappa 1 sequence. Differences are highlighted in red.

m22C10及びh22C10. v2. 1-2. 8をコンセンサストVLカッパ1と比較することによる、
強調したフレームワークの差

Sequence alignment table comparing m22C10 and h22C10 v2.1-2.8 variants against the consensus VL kappa 1 sequence. Differences are highlighted in red.

【図 9 - 1】

xB7H4 m22C10及びh22C10. v1-5とHuVH1との
重鎖可変ドメイン配列アライメント

Sequence alignment table for Figure 9-1 showing amino acid sequences for hHuVH1, m22C10, h22C10v1, h22C10v2, h22C10v3, h22C10v4, h22C10v5, and h22C10v6. The alignment is divided into Contact-CDR1, Contact-CDR2, and Contact-CDR3 regions.

m22C10及びh22C10. v1-5をコンセンサストVHサブグループ1と比較することによる、
強調したフレームワークの差

Sequence alignment table comparing m22C10 and h22C10 v1-5 variants against the consensus VH subgroup 1 sequence. Differences are highlighted in red.

【図 9 - 2】

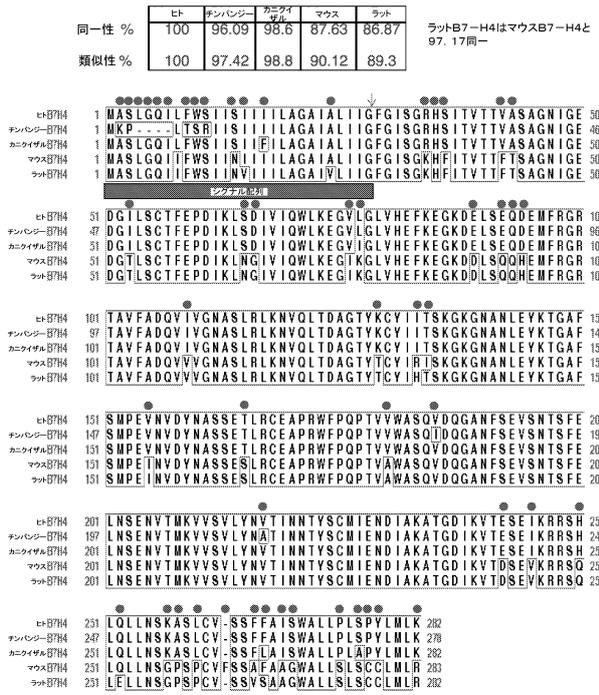
xB7H4 m22C10及びh22C10. v2. 1-2. 8とHuVH1との
重鎖可変ドメイン配列アライメント

Sequence alignment table for Figure 9-2 showing amino acid sequences for hHuVH1, m22C10, h22C10v2, h22C10v1, h22C10v3, h22C10v4, h22C10v5, and h22C10v6. The alignment is divided into Contact-CDR1, Contact-CDR2, and Contact-CDR3 regions.

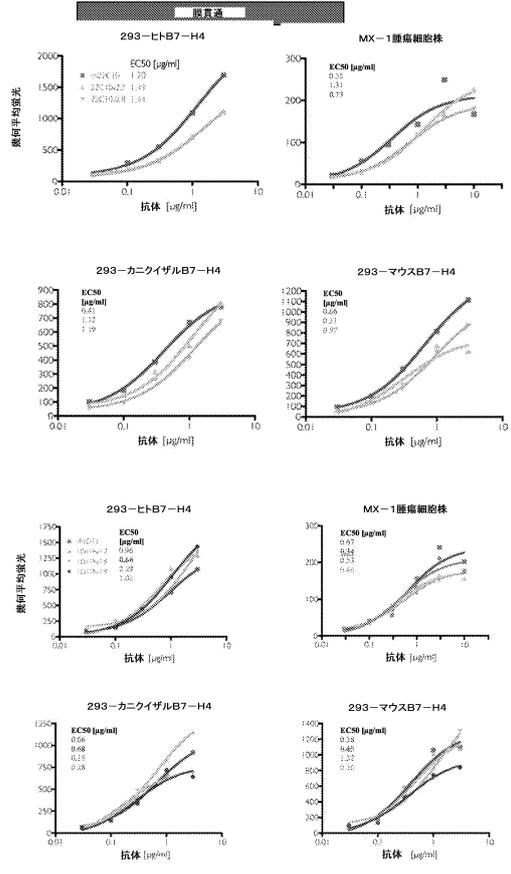
m22C10及びh22C10. v2. 1-2. 8をコンセンサストVHサブグループ1と比較することによる、
強調したフレームワークの差

Sequence alignment table comparing m22C10 and h22C10 v2.1-2.8 variants against the consensus VH subgroup 1 sequence. Differences are highlighted in red.

【 図 1 0 】



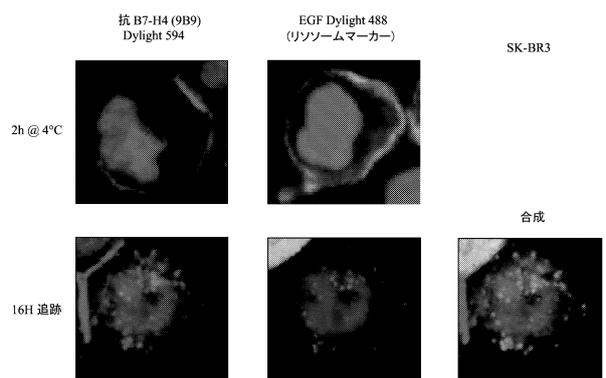
【 図 1 1 】



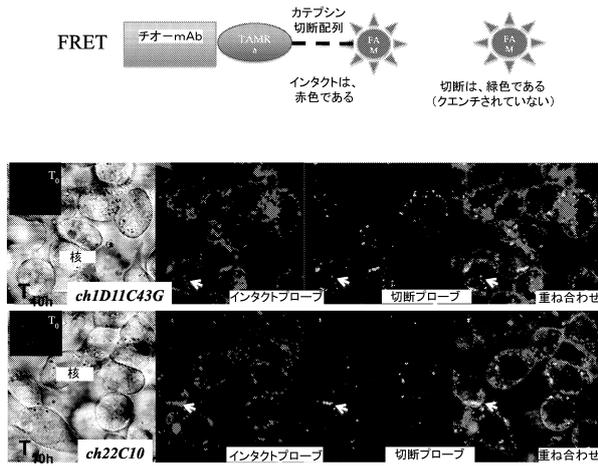
【 図 1 2 】

抗体	親和性 (MX-1)	親抗体の親和性 (MX-1)	親mAbに 対する 倍数	エピトープ	マウスフレームワーク残基
1D11hv1.7	8.3 nM	7.8 nM	0.94	A	LC-R69, Y71 HC-A67, L69
1D11hv1.8	8.7 nM	7.8 nM	0.89	A	LC-R69, Y71 HC-A67
1D11hv1.9	7.8 nM	7.8 nM	1	A	LC-R69, Y71 HC-無し
22C10hv2.7	6.3 nM	4.9nM	0.78	C	LC-G46, W47 HC-無し
22C10hv2.8	10 nM	4.9nM	.49	C	LC-G46 HC-無し

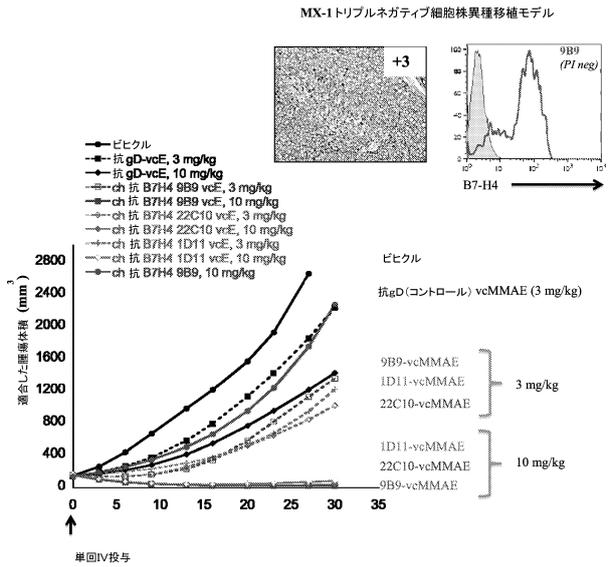
【 図 1 3 】



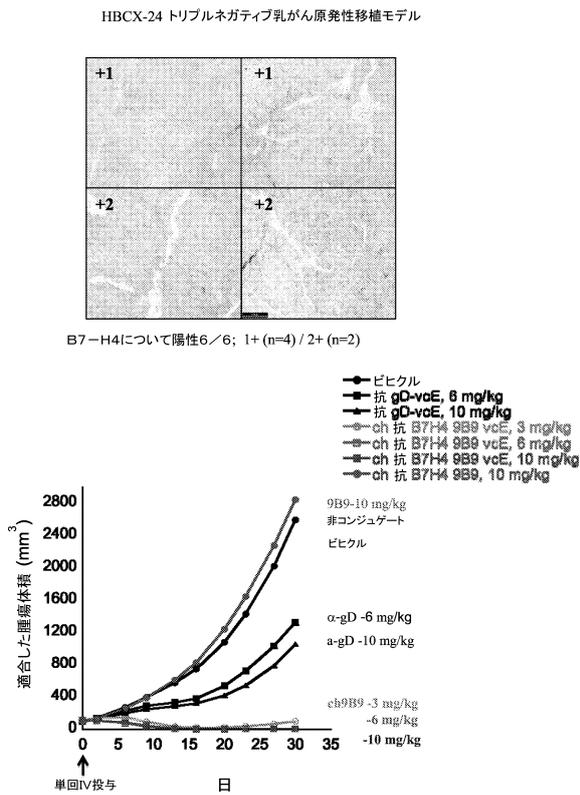
【 図 1 4 】



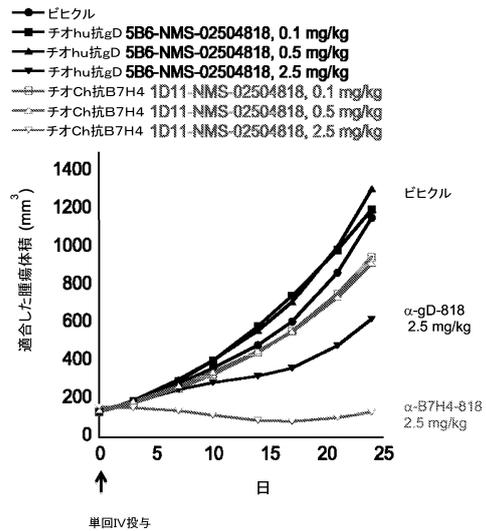
【 図 1 5 】



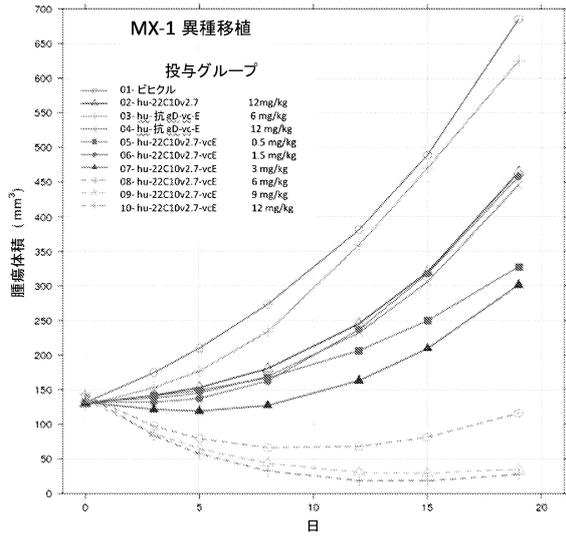
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

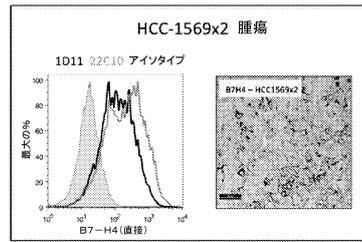


【図18】

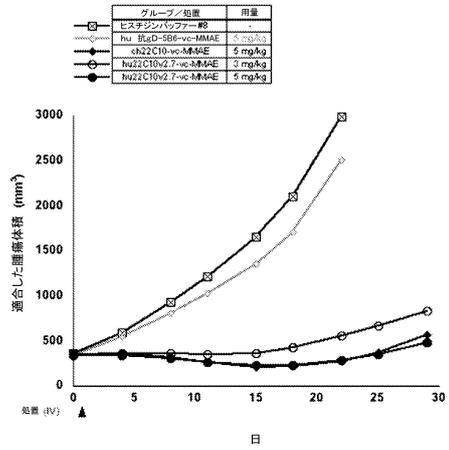


【図19】

A



B



【配列表】

0006436965000001.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	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	47/50	(2017.01)	A 6 1 K	47/50	
A 6 1 K	31/537	(2006.01)	A 6 1 K	31/537	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	38/00	
A 6 1 K	31/706	(2006.01)	A 6 1 K	31/706	
A 6 1 K	31/7036	(2006.01)	A 6 1 K	31/7036	
A 6 1 K	31/5513	(2006.01)	A 6 1 K	31/5513	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	51/10	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	51/10	1 0 0
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
			G 0 1 N	33/577	B

(31)優先権主張番号 61/874,175

(32)優先日 平成25年9月5日(2013.9.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ポラキス, ポール

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1

(72)発明者 ウー, ヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1

(72)発明者 リャン, ウェイ - チーン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1

(72)発明者 ファイアスタイン, ロン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1

審査官 布川 莉奈

(56)参考文献 特表2011-505372(JP,A)

国際公開第2013/025779(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

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