

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6067754号  
(P6067754)

(45) 発行日 平成29年1月25日(2017.1.25)

(24) 登録日 平成29年1月6日(2017.1.6)

(51) Int.Cl.	F I				
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K	19/00	Z	N	A
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K	16/28			
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C07K	16/46			
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K	39/395		N	
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61P	35/00			

請求項の数 17 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-558681 (P2014-558681)	(73) 特許権者	514213888
(86) (22) 出願日	平成25年2月22日 (2013.2.22)		アルテオジェン インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2015-513541 (P2015-513541A)		A l t e o g e n I n c .
(43) 公表日	平成27年5月14日 (2015.5.14)		大韓民国, 305-811, テジョン, ユ
(86) 国際出願番号	PCT/KR2013/001417		ソン-グ, ユソン-デロ, 1662, #3
(87) 国際公開番号	W02013/125891	(74) 代理人	100090251
(87) 国際公開日	平成25年8月29日 (2013.8.29)		弁理士 森田 憲一
審査請求日	平成26年10月16日 (2014.10.16)	(74) 代理人	100139594
(31) 優先権主張番号	10-2012-0019221		弁理士 山口 健次郎
(32) 優先日	平成24年2月24日 (2012.2.24)	(74) 代理人	100185915
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		弁理士 長山 弘典
前置審査		(74) 代理人	100194973
			弁理士 尾崎 祐朗

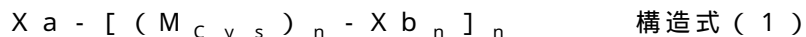
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シス테인残基を含むモチーフが結合した修飾抗体、前記修飾抗体を含む修飾抗体-薬物複合体及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

修飾抗体に薬物が結合された修飾抗体-薬物複合体であって、  
前記修飾抗体は、親抗体の末端に下記の構造式(1)：



{前記構造式(1)で、 $( M_{c y s} )_n$ は、シス테인残基を含む金属イオン結合モチーフを意味して、 $X a$ は、シス테인を除いたアミノ酸残基0個~20個で構成されたペプチドを意味して、 $X b_n$ は、A、G、及びSから成る群から選択されるアミノ酸残基0個~20個で構成されたペプチドを意味して、 $n$ は1~20の整数であり；

$( M_{c y s} )_1 \sim ( M_{c y s} )_n$ は、独立して、同じであり又は異なり、そして $X b_1 \sim X b_n$ は、独立して、同じであり又は異なり；そして

シス테인残基を含む前記金属イオン結合モチーフは、ジンクフィンガータンパク質の $C_2H_2$ グループ( $C y s_2 H i s_2 c l a s s : C y s - X_{2-4} - C y s - X_{1-2} - H i s - X_{3-5} - H i s$ ( $X$ は $C y s$ 以外のアミノ酸残基である))を含むジンクフィンガーモチーフ、膜タンパク質ATP分解酵素のSer-Pro-Cysモチーフ、又はCGH若しくはHGC含有モチーフである}

で表されるシス테인残基を含むモチーフが結合したことを特徴としており、そして前記親抗体に結合された構造式(1)で表される金属イオン結合モチーフ内のシス테인残基のチオール基を介して薬物が結合されることを特徴とする前記修飾抗体-薬物複合体

## 【請求項 2】

前記の構造式(1)で表されるシステイン残基を含む金属イオン結合モチーフが親抗体の重鎖末端に結合したことを特徴とする請求項1に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

## 【請求項 3】

前記の構造式(1)で表されるシステイン残基を含む金属イオン結合モチーフが親抗体の重鎖C - 末端に結合したことを特徴とする請求項2に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

## 【請求項 4】

前記ジंकフィンガータンパク質のC<sub>2</sub>H<sub>2</sub>グループは、

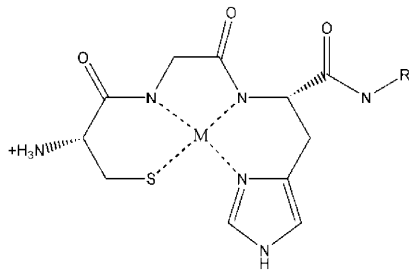
Y R C K Y C D R S F S D S S N L Q R H V R N I H (配列番号5)、  
 F K C P V C G K A F R H S S S L V R H Q R T H (配列番号7)、 10  
 Y E C D H C G K A F S I G S N L N V H R R I H (配列番号9)、  
 Y K C H Q C G K A F I Q S F N L R R H E R T H (配列番号12)、  
 F Q C N Q C G A S F T Q K G N L N R H I K L H (配列番号13)、  
 Y T C S Y C G K S F T Q S N T L K Q H T R I H (配列番号14)、  
 Y K C G Q C G K F Y S Q V S H L T R H Q K I H (配列番号16)、  
 Y V C R E C G R G F R Q H S H L V R H K R T H (配列番号19)、  
 Y E C D H C G K S F S Q S S H L N V H K R T H (配列番号21)、  
 Y M C S E C G R G F S Q K S N L T I H Q R T H (配列番号22)、  
 Y K C E E C G K A F T Q S S N L T K H K K I H (配列番号23)、  
 F E C K D C G K A F I Q K S N L I R H Q R T H (配列番号24)、 20  
 Y V C R E C R R G F S Q K S N L I R H Q R T H (配列番号25)、  
 Y E C E K C G K A F N Q S S N L T R H K K S H (配列番号26)、  
 Y E C V Q C G K S Y S Q S S N L F R H Q R R H (配列番号27)、  
 Y E C V Q C G K G F T Q S S N L I T H Q R V H (配列番号28)、  
 Y E C N T C R K T F S Q K S N L I V H Q R T H (配列番号29)、  
 Y V C S K C G K A F T Q S S N L T V H Q K I H (配列番号30)、  
 Y K C D E C G K N F T Q S S N L I V H K R I H (配列番号31)、  
 Y E C D V C G K T F T Q K S N L G V H Q R T H (配列番号32)、  
 Y K C P D C G K S F S Q S S S L I R H Q R T H (配列番号33)、  
 Y E C Q D C G R A F N Q N S S L G R H K R T H (配列番号34)、 30  
 Y E C N E C G K F F S Q S S S L I R H R R S H (配列番号35)、  
 Y K C E E C G K A F N Q S S T L T R H K I V H (配列番号36)、  
 Y E C N E C G K A F A Q N S T L R V H Q R I H (配列番号37)、  
 Y E C H D C G K S F R Q S T H L T R H R R I H (配列番号39)、  
 H K C L E C G K C F S Q N T H L T R H Q R T H (配列番号40)、  
 Y V C D V E G C T W K F A R S D E L N R H K K R H (配列番号41)、  
 Y H C D W D G C G W K F A R S D E L T R H Y R K H (配列番号42)、  
 Y R C S W E G C E W R F A R S D E L T R H F R K H (配列番号43)、  
 F S C S W K G C E R R F A R S D E L S R H R R T H (配列番号44)、  
 F A C S W Q D C N K K F A R S D E L A R H Y R T H (配列番号45)、 40  
 Y H C N W D G C G W K F A R S D E L T R H Y R K H (配列番号46)、  
 F L C Q Y C A Q R F G R K D H L T R H M K H S H (配列番号47)、  
 F Q C K T C Q R K F S R S D H L K T H T R T H (配列番号49)、  
 F A C E V C G V R F T R N D K L K I H M R K H (配列番号50)、  
 Y V C D V E G C T W K F A R S D K L N R H K K R H (配列番号51)、  
 Y K C M E C G K A F N R R S H L T R H Q R I H (配列番号52)、  
 Y I C R K C G R G F S R K S N L I R H Q R T H (配列番号53)、  
 Y E C K E C G K A F S S G S N F T R H Q R I H (配列番号54)、  
 F H C G Y C E K S F S V K D Y L T K H I R T H (配列番号55)、  
 Y E C D H C G K A F S V S S N L N V H R R I H (配列番号56)、 50

Y T C K Q C G K A F S V S S S L R R H E T T H (配列番号 57)、  
 Y E C N Y C G K T F S V S S T L I R H Q R I H (配列番号 58)、  
 Y R C E E C G K A F R W P S N L T R H K R I H (配列番号 59)、  
 F A C D I C G R K F A R S D E R K R H T K I H (配列番号 60)、  
 C P V E S C D R R F S R S D E L T R H I R I H (配列番号 61)、及び  
 C D I C G R K F A R S D E R K R H T K I H (配列番号 62)

から選択されるいずれか一つであり、

前記 C G H モチーフは、下記の式 (1) の構造を持つことを特徴とする請求項 1 に記載の修飾抗体 - 薬物複合体：

【化 1】



(前記式 (1) で、M は金属イオンを意味して、R はシステインを除いたアミノ酸残基を意味する)。

【請求項 5】

前記親抗体は、モノクローナル抗体、二重特異的抗体、キメラ抗体、ヒト抗体及びヒト化抗体から一つまたは二以上選択することを特徴とする請求項 1 に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

【請求項 6】

前記親抗体は、I g A、I g D、I g E、I g G 及び I g M から選択される一つ以上であることを特徴とする請求項 1 に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

【請求項 7】

前記親抗体は、癌特異抗原、細胞表面受容体タンパク質、細胞表面タンパク質、膜横断タンパク質、信号伝達タンパク質、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発達または分化に関連した分子、リンホカイン、サイトカイン、細胞周期調節に関連した分子、血管形成に関連した分子、及び血管新生に関連した分子に対する結合能と特異性を持つことを特徴とする請求項 1 に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

【請求項 8】

前記親抗体は、

(1) B M P R I B (骨形態形成タンパク質受容体 - I B 型)；

(2) E 1 6 (L A T 1、S L C 7 A 5)；

(3) S T E A P 1 (前立腺の 6 回の膜横断上皮抗原)；

(4) 0 7 7 2 P (C A 1 2 5、M U C 1 6)；

(5) M P F (M P F、M S L N、S M R、巨核球強化因子、メソテリン)；

(6) N a p i 3 b (N A P I - 3 B、N P T I I b、S L C 3 4 A 2、溶質キャリアーファミリー 3 4 (リン酸ナトリウム)、メンバー 2、第 II 型ナトリウム - 依存性ポスフェート輸送体 3 b)；

(7) S e m a 5 b (F L J 1 0 3 7 2、K I A A 1 4 4 5、M m . 4 2 0 1 5、S E M A 5 B、S E M A G、セマフォリン 5 b H l o g、セマドメイン、七つのトロンボスポンジン反復体 (第 1 型及び類似第 1 型)、膜横断ドメイン (T M) 及び短い細胞質ドメイン、(セマフォリン) 5 B)；

(8) P S C A h 1 g (2 7 0 0 0 5 0 C 1 2 R i k、C 5 3 0 0 0 8 O 1 6 R i k、R I K E N c D N A 2 7 0 0 0 5 0 C 1 2、R I K E N c D N A 2 7 0 0 0 5 0 C 1 2 遺伝子)；

10

20

30

40

50

- (9) ETBR (エンドセリンB型受容体) ;
- (10) MSG783 (RNF124、仮想タンパク質FLJ20315) ;
- (11) STEAP2 (HGNC\_8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前立腺癌関連遺伝子1、前立腺癌関連タンパク質1、前立腺の6回の膜横断上皮抗原2、6回の膜横断前立腺タンパク質) ;
- (12) TrpM4 (BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、一時的受容体電位陽イオンチャネル、M亜族、メンバー4) ;
- (13) CRIPTO (CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、奇形癌腫由来成長因子) ;
- (14) CD21 (CR2 (補体受容体2) または、C3DR (C3d / エプスタイン・パール・ウイルス受容体) またはHs.73792) ; 10
- (15) CD79b (CD79B、CD79、IGb (免疫グロブリン - 関連)、B29) ;
- (16) FcRH2 (IFGP4、IRTA4、SPAP1A (SH2ドメイン含有ホスファターゼ固定タンパク質1a)、SPAP1B、SPAP1C) ;
- (17) HER2 ;
- (18) EGFR、HER3及びHER4から選択されたErbB ;
- (19) NCA ;
- (20) MDP ;
- (21) IL20R ; 20
- (22) プレピカン ;
- (23) EphB2R ;
- (24) ASLG659 ;
- (25) PSCA ;
- (26) GEDA ;
- (27) BAFF-R (B細胞活性化因子受容体、BlyS受容体3、BR3) ;
- (28) CD22 (B-細胞受容体CD22-Bイソ形) ;
- (29) CD79a (Ig (CD79B) と共有的に相互作用してIgM分子と表面で複合体を形成するB細胞特異的タンパク質であるCD79A、CD79、免疫グロブリン - 関連はB細胞分化に關与する信号を伝達する) ; 30
- (30) CXCR5 (CXCL13ケモカインにより活性化したGタンパク質カップリングされた受容体であるパーキットリンパ腫受容体1は、リンパ球移動及び体液性防御に作用してHIV-2感染に参加して、AIDS、リンパ腫、骨髄腫及び白血病の発病と関連があると見なされる) ;
- (31) HLA-DOB (ペプチドに結合してCD4+ Tリンパ球に提示する、MHCクラスII分子 (Ia抗原) のサブユニット) ;
- (32) P2X5 (細胞外ATPによってゲートされるイオンチャネルである、プリン性受容体P2Xリガンド-ゲートイオンチャネル5は、シナプス伝達及び神経発生に關与でき、これの欠乏は特発性排尿筋不安定の病態生理に寄与される) ;
- (33) CD72 (B-細胞分化抗原CD72、Lyb-2) ; 40
- (34) LY64 (ロイシン豊富反復体 (LRR) 族の第I型膜タンパク質である、リンパ球抗原64 (RP105) は、B細胞活性化及び細胞自滅を調節して、これの機能喪失は全身性紅斑性ループス患者の疾病活性増加と関連がある) ;
- (35) FcRH1 (C2型Ig-類似及びITAMドメインを含有する免疫グロブリンとFcドメインに対する推定的受容体であるFc受容体様タンパク質1は、Bリンパ球分化に關与できる) ;
- (36) IRTA2 (B細胞発生及びリンパ腫発生に作用できる推定的免疫受容体である免疫グロブリン巨大族受容体転座関連2、転座による前記遺伝子脱調節は、いくつかのB細胞悪性腫瘍で起きる) ; 及び
- (37) TENB2 (成長因子のEGF / ヘレグリン族及びポリリスタチンと関連がある 50

推定的膜横断プロテオグリカン) ;

( 3 8 ) M A G E - C 1 / C T 7 ( 精 巢 癌 過 発 現 タ ン パ ク 質 ) ;

( 3 9 ) a n d r o g e n r e c e p t o r 、 P T E N 、 h u m a n k a l l i k r e i n - r e l a t e d p e p t i d a s e 3 ( 前 立 腺 癌 で 過 発 現 す る タ ン パ ク 質 ) ;

( 4 0 ) C D 2 0 ;

( 4 1 ) C D 3 0 ;

( 4 2 ) C D 3 3 ;

( 4 3 ) C D 5 2 ;

( 4 4 ) E p C a m ;

( 4 5 ) C E A ;

( 4 6 ) g p A 3 3 ;

( 4 7 ) M u c i n s ;

( 4 8 ) T A G - 7 2 ;

( 4 9 ) C a r b o n i c a n h y d r a s e I X ;

( 5 0 ) P S M A ;

( 5 1 ) f o l a t e b i n d i n g p r o t e i n ;

( 5 2 ) g a n g l i o s i d e s ( G D 2 、 G D 3 、 G M 2 ) ;

( 5 3 ) 糖 水 和 物 L e w i s - Y ;

( 5 4 ) V E G F ;

( 5 5 ) V E G F R ;

( 5 6 ) a V b 3 ;

( 5 7 ) a 5 b 1 ;

( 5 8 ) E R B 3 ;

( 5 9 ) c - M E T ;

( 6 0 ) E p h A 3 ;

( 6 1 ) T R A I L - R 1 、 T R A I L - R 2 ;

( 6 2 ) R A N K L ;

( 6 3 ) F A P ; 及 び

( 6 4 ) T e n a s c i n

から選択された一つ以上のタンパク質に対する結合能を持つことを特徴とする請求項7に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

【請求項9】

前記親抗体は、トラスツズマブ、リツキシマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、イピリムマブ、アレムツズマブ、オフアツムマブ、ゲムツズマブ、プレツキシマブ、<sup>90</sup>Y - イブリツモマブ、<sup>131</sup>I - トシツモマブ、c B R 9 6、c A C 1 0、抗 - C D 2 0 抗体、抗 - E p h B 2 抗体、抗 - I L - 8、E - セレクチン抗体、抗 - M U C 1 6 抗体、抗 - C D 3 0 抗体、抗 - C D 3 3 抗体及び抗 - C D 5 2 抗体から選択される一つ以上であることを特徴とする請求項7に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

【請求項10】

前記親抗体に結合された構造式(1)で表される金属イオン結合モチーフ内のシステイン残基と薬物は、リンカーを介して連結されることを特徴とする請求項1に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

【請求項11】

前記リンカーは、ハロアセチル官能基を含むアルキルハライド誘導体、マレイミド基を含む誘導体、アジリジン誘導体、アクリロイル誘導体、またはフルオロベンゼンなどを含むアリールハライド誘導体から一つまたは二以上選択されることを特徴とする請求項10に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

【請求項12】

前記誘導体は、アルキル化反応基、アリール化反応基、マレイミド基、アジリジン基、アクリロイル基、または、ピリジルジスルフィド及びチオニトロ安息香酸を含む二硫化相

10

20

30

40

50

互交換反応基を含み、前記反応基は、モチーフ内システイン残基のチオール基と反応して共有結合することを特徴とする請求項 1 1 に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

【請求項 1 3】

前記薬物は、マイクロチュブリン抑制剤、有糸分裂抑制剤、トポイソメラーゼ抑制剤、DNA インターカレーターとして機能できる化学療法剤、抗癌剤、酵素的に機能できるタンパク質毒素、特定癌遺伝子の発現を抑制させることができるマイクロRNA (miRNA)、siRNA、shRNA、及び放射線同位元素から選択される一つ以上であることを特徴とする請求項 1 に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

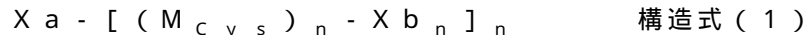
【請求項 1 4】

前記薬物は、メイタンシノイド、オーリスタチン、アミノプテリン、アクチノマイシン、プレオマイシン、タリソマイシン、カンプトテシン、N<sup>8</sup>-アセチルスペルミジン、1-(2クロロエチル)-1,2-ジメチルスルホニルヒドラジド、タクソル、エスベラマイシン、エトポシド、6-メルカプトプリン、トラスタチン、トリコテセン、CC1065 (細胞毒性化合物)、カリケアマイシン及び他のエンジイン抗生剤、タキサン、アントラサイクリン、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンデシン、ピンンカアルカロイド (ピンクリスチン、ピンブラスチン、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A、マイトマイシンC、クルラムブシル、ダウノルピシン、ダウノマイシン及びその立体異性体、同配体、同族体または誘導體、テュオカルマイシン及びその立体異性体、同配体、同族体または誘導體、核酸分解酵素、抗生剤、細菌や動植物由来の毒素、シスプラチン、CPT-11、ドキシソルピシン、パクリタキセル及びドセタキセルから選択される一つ以上であることを特徴とする請求項 1 に記載の修飾抗体 - 薬物複合体。

【請求項 1 5】

(a) 下記の構造式 (1) で表されるモチーフが結合した親抗体をリンカー試薬と反応して抗体 - リンカー中間体を形成させる工程と、

(b) 前記抗体 - リンカー中間体を活性化薬物の部分と反応させて修飾抗体 - 薬物複合体を形成させる工程と、を含む修飾抗体 - 薬物複合体の製造方法、ここで、前記親抗体に結合された構造式 (1) で表される金属イオン結合モチーフ内のシステイン残基のチオール基を介して薬物が結合されるものとする：



{ 前記構造式 (1) で、(M<sub>c y s</sub>)<sub>n</sub> は、システイン残基を含む金属イオン結合モチーフを意味して、X a は、システインを除いたアミノ酸残基 0 個 ~ 20 個で構成されたペプチドを意味して、X b<sub>n</sub> は、A、G、及び S から成る群から選択されるアミノ酸残基 0 個 ~ 20 個で構成されたペプチドを意味して、n は 1 ~ 20 の整数であり；

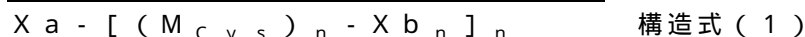
(M<sub>c y s</sub>)<sub>1</sub> ~ (M<sub>c y s</sub>)<sub>n</sub> は、独立して、同じであり又は異なり、そして X b<sub>1</sub> ~ X b<sub>n</sub> は、独立して、同じであり又は異なり；そして

システイン残基を含む前記金属イオン結合モチーフは、ジンクフィンガータンパク質の C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> グループ (C y s<sub>2</sub> H i s<sub>2</sub> c l a s s : C y s - X<sub>2-4</sub> - C y s - X<sub>12</sub> - H i s - X<sub>3-5</sub> - H i s (X は C y s 以外のアミノ酸残基である)) を含むジンクフィンガーモチーフ、膜タンパク質 ATP 分解酵素の S e r - P r o - C y s モチーフ、又は C G H 若しくは H G C 含有モチーフである}。

【請求項 1 6】

(a) 薬物の部分の親核基を第 2 リンカー試薬と反応させて薬物 - リンカー中間体を形成させる工程と、

(b) 前記薬物 - リンカー中間体を下記の構造式 (1) で表されるモチーフと結合した親抗体と反応させる工程と、を含む修飾抗体 - 薬物複合体の製造方法、ここで、前記親抗体に結合された構造式 (1) で表される金属イオン結合モチーフ内のシステイン残基のチオール基を介して薬物が結合されるものとする：



{ 前記構造式 (1) で、(M<sub>c y s</sub>)<sub>n</sub> は、システイン残基を含む金属イオン結合モチーフを意味して、X a は、システインを除いたアミノ酸残基 0 個 ~ 20 個で構成されたペプ

10

20

30

40

50

チドを意味して、 $Xb_n$  は、A、G、及びSから成る群から選択されるアミノ酸残基0個～20個で構成されたペプチドを意味して、 $n$  は1～20の整数であり；

$(M_{cys})_1 \sim (M_{cys})_n$  は、独立して、同じであり又は異なり、そして $Xb_1 \sim Xb_n$  は、独立して、同じであり又は異なり；そして

システイン残基を含む前記金属イオン結合モチーフは、ジンクフィンガータンパク質の $C_2H_2$ グループ( $Cys_2His_2class : Cys - X_{2-4} - Cys - X_{1-2} - His - X_{3-5} - His$  ( $X$ はCys以外のアミノ酸残基である))を含むジンクフィンガーモチーフ、膜タンパク質ATP分解酵素のSer-Pro-Cysモチーフ、又はCGH若しくはHGC含有モチーフである}。

【請求項17】

請求項1～14のいずれか一項に記載の修飾抗体-薬物複合体を含む治療用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、システイン(cysteine: Cys)残基を含むモチーフ(motif)が親抗体、好ましくは親抗体の末端、より好ましくは重鎖または軽鎖末端、最も好ましくは重鎖または軽鎖C-末端に結合した修飾抗体、かかる抗体と診断用または治療用薬物が結合した修飾抗体-薬物複合体(mADC、modified antibody-drug conjugate)及び前記修飾抗体または修飾抗体-薬物複合体の製造方法に関する。

【0002】

本発明に係る修飾抗体-薬物複合体は、複合体に含まれた親抗体の抗原に対する高い特異性によりターゲット細胞に薬物を正確に伝達できて、治療効果が高められ、さらに、高い効果にもかかわらず、毒性により使用が制限的な薬物、特に抗癌剤などの活用度を向上することができる。

また、本発明は、前記修飾抗体-薬物複合体を含む疾病、特に癌の治療用組成物及びこれを利用した治療方法に関する。

【0003】

本発明に係る修飾抗体は、一つ以上のシステイン残基を含むモチーフが親抗体に結合することによって、薬物結合に利用されうるシステインを多数含むことができるため、多量の薬物を結合することができるだけでなく、結合された多量の薬物がターゲット細胞、または組織に効果的に伝達されうる。また、親抗体に結合するシステイン残基個数の調節が容易であるため、修飾抗体-薬物複合体(mADC)に含まれる薬物の個数、すなわち薬物の量を目的の水準に容易に調節することができる。

【0004】

また、本発明に係る修飾抗体-薬物複合体は、抗原に対する高い特異性により、ターゲット細胞に薬物を正確に伝達できて、治療効果が高められ、高い効果にもかかわらず、毒性により使用が制限的な薬物、特に抗癌剤などの活用度を向上することができる。

【背景技術】

【0005】

特定疾患において特異的に発現する標的(target)、すなわち抗原に特異的に結合する抗体を利用した治療剤は、バイオ医薬物のうち現在最も活発に研究が進められている。特に、癌細胞表面に特異的に発現する腫瘍-関連抗原を糾明して、これに対し結合して細胞の成長を抑制したり死滅を誘導する抗体、すなわち抗癌抗体を利用した腫瘍診断及び治療方法は現在広く用いられており、今後の展望も非常に明るい技術分野である。

【0006】

しかしながら、このような抗癌抗体は、標的特異性は非常に高いが、癌細胞の死滅効果は、既存の細胞毒性薬物(抗癌剤)、すなわち抗癌薬物に比べて低い場合があって、細胞毒性薬物及びその他細胞増殖抑制薬物などとの併用投与療法(combination therapy)で用いられる場合が多い。

【0007】

10

20

30

40

50

前記のような併用投与療法において、細胞毒性薬物などの治療効能向上及び毒性低下のために毒性が高い細胞毒性薬物が標的抗体に結合した修飾抗体 - 薬物複合体 (mADC) に対する研究も活発に進められているが、修飾抗体 - 薬物複合体を利用する場合、薬物の前身毒性は軽減されて、標的が過量発現した細胞、特に癌細胞にだけ集中的に細胞毒性を誘発することがあり、治療効果を向上できるものと認識されている。

#### 【0008】

実際、ゼバリン (ZEVALINTM、[Witzig et al., J. Clin. Oncol, 2002, 20(15):3262-3269])、マイロターゲット (MYLOTARGETM、[Drugs of the Future, 2000, 25(7):686]) 等の抗体と細胞毒性薬物、または放射線同位元素が結合した抗体 - 薬物複合体は非ホジキンリンパ腫と急性骨髄性白血病治療用として成功的に開発され、カンツズマブメルタンシン (Immunogen, Inc. [Xie et al., J. of Pharm. and Exp. Ther. 2004, 308(3):1073-1082])、トラスツズマブメルタンシン (Roche [Isakoff et al., J. Clin. Oncol. 2011, 29(4):351-4]) 等猛毒性メルタンシンを抗体に結合させたり、ドラスタチン誘導体であるオーリスタチンペプチド、オーリスタチンE (AE)、モノメチルオーリスタチン (MMAE)、あるいはMMAFなどの細胞毒性薬物をcBR96 (癌腫上のルイスY (Lewis Y) に特異的なターゲット) 抗体、血液学的悪性腫瘍上のCD30に特異的なcAC10、CD20 - 発現癌及び免疫障害の治療のための抗-CD20抗体、例えばリツキサンの、直腸結腸癌の治療のための抗-EpH2R抗体、2H9及び抗-IL-8、E-セレクトインは抗体などに結合させるなど、多くの試みが活発に進められている ([Klussman, et al., Bioconjugate Chemistry, 2004, 15(4):765-773]; [Doronina et al., Nature Biotechnology, 2003, 21(7):778-784]; [Francisco et al., Blood, 2003, 102(4): 1458-1465]) US 2004/0018194 A1) WO 04/032828 A3; [Mao et al., Cancer Research, 2004, 64(3):781-788]; [Bhaskar et al., Cancer Res, 2003, 63:6387-6394]) 。

#### 【0009】

また、ダウノマイシン、ドキソルピシン、メトトレキサート及びビンデシンを利用した抗体 - 薬物複合体開発も試みられ、抗体 - 薬物複合体に含まれてもよい薬物として、細菌性毒素、例えばジフテリア毒素、植物毒素、例えば、リジン、小分子毒素、例えば、ゲルダナマイシン ([Mandler et al., J. of the Nat. Cancer Inst, 2000, 92(19):1573-1581]; [Mandler et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters, 2000, 10:1025-1028]; [Mandler et al., Bioconjugate Chem, 2002, 13:786-791])、マイタンシノイド [EP 1391213 A1]; [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93:8618-8623])、及びカリケアミシン ([Lode et al., Cancer Res, 1998, 58:2928]; [Hinman et al., Cancer Res, 1993, 53:3336-3342]) 等が使用可能であることが知られている。これらの細胞毒性薬物は、主にチューブリン結合、DNA結合、またはトポイソメラーゼ抑制などの機序によって細胞毒性及び細胞増殖抑制効果を持つ。

#### 【0010】

前記のような抗体 - 薬物複合体を製造するために、通常用いられる薬物と抗体の共有結合を誘導する工程を利用する場合、薬物が抗体の多数部位に結合した異質性混合物で生成されることになる。例えば、細胞毒性薬物は、しばしば抗体の多数のリジン残基を介して抗体に結合して異質性抗体 - 薬物複合体混合物が生成されやすく、反応条件により異質性混合物は0個～約8個以上の異なる薬物結合分布、すなわち単位抗体当たり結合した薬物の個数が異なる結果を示すことになる。

#### 【0011】

また、薬物対抗体の特定整数比を持つ複合体の各下位群内に、薬物が抗体上の種々の部位に付着される潜在的異質性混合物が存在する。このような多様な異質性混合物を均質に製造して、一々分画する方法は、医薬物を大量生産するための工程で用いられるには適切ではない ([Hamblett et al., Clin. Cancer Res, 2003, 10, 7063-7070]、[Wang et al., Protein Sci. 2005, 14, 2436-2446]) 。

#### 【0012】

10

20

30

40

50



抗体に薬物を結合させるさらに他の方法としては、抗体にすでに存在するシステイン間のジスルフィド (disulfide) 結合を還元剤を利用して分離させた後、遊離チオール (thiol) 基に薬物を結合させる方法があるが、この方法も抗体固有特性が失われる可能性があり、異質性混合物が過量生成されるとの短所がある。具体的に、免疫グロブリンMは、ジスルフィド - 結合ペンタマーの例であり、一方免疫グロブリンGは、サブユニットを共に結合させる内部ジスルフィドブリッジ (bridge) を持つタンパク質の例であり、前記のようなタンパク質で、ジチオスレイトール (DTT)、または、セレンオールのような試薬を利用したジチオール結合の還元 ([Singh et al., Anal. Biochem. 2002, 304:147-156]) は、反応性遊離チオールを生成させるが、このような接近法は、抗体3次構造及び抗原結合特異性を損傷させることがある ([Jagath et al., Nature Biotechnology, 2008, 26(8):925-32])。 10

#### 【0013】

以上で説明したような既存の抗体 - 薬物結合方法の代表的な短所は、薬物の抗体結合部位及び結合個数を精度よく調節しにくいものである。このような短所を克服するために、抗体の機能を損傷させない範囲内で位置選択的に遊離チオール基を付加 (特定アミノ酸をシステインに置換) するために、各アミノ酸が、システインで置換された時現れるチオール基の反応性を予測して、適切な反応性を持つと予想される位置のアミノ酸をシステインに置き換えて、これから最適システイン - 置換抗体をスクリーニングする方法も開発された (大韓民国公開特許公報第2007-0054682号、「ThioFab技術」)。 20  
このような方法で製造されたトラスツズマブ - メルタンシンの抗体 - 薬物複合体を利用した転移性乳癌を治療するための臨床試験が進められている ([Burris III et al., J. Clin. Oncol., 2011, 29(4):398-405])。前記ThioFab技術は、新しいシステインを抗体内部に導入することによって、親抗体が持つジスルフィド結合の損傷を極力抑制できる長所を持つが、親抗体内部のアミノ酸の一部をシステインに置き換えるため、親抗体の構造と機能に対する変形をもたらすことがあるとの恐れが依然として残っている。

#### 【0014】

したがって、親抗体の構造及び機能などの特性が維持されながら、結合される薬物の個数及び結合位置などを正確に調節できる新しい抗体 - 薬物複合体及びその製造方法に対する開発が切に求められている。

#### 【発明の概要】

 30

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0015】

前記のような問題を解決するために、本発明では一つ以上のシステイン残基を含む「モチーフ」が親抗体に結合して、多数の薬物結合部位を持つ新しい形態の抗体 (以下「修飾抗体」という) を提供し、さらに、前記修飾抗体に薬物が結合された修飾抗体 - 薬物複合体を提供する。

#### 【0016】

本発明で提供される修飾抗体は、親抗体の特性は維持されながら、非常に多様な薬物が効率的に結合することができるため、高い標的特異性と薬物効果を期待できる新しい形態の抗体である。 40

本発明の修飾抗体は、一つ以上のシステイン残基を含むモチーフを含み、システイン残基に薬物を結合させて薬物を標的組織に効果的に伝達できるだけでなく、薬物と結合できるシステイン残基個数の正確な調節が可能で、修飾抗体 - 薬物複合体に含まれる薬物の個数、すなわち量を調節できるという長所を有しているので、既存抗体 - 薬物複合体の短所を改善した優秀な薬物伝達体として用いることができ、究極的に癌などの疾病治療のために効率的に用いられる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0017】

【図1】トラスツズマブシステイン追加修飾抗体発現ベクターの切断地図を示す図面。

【図2】精製後、HR-Cysの形態をウェスタンブロット (western-blot) で確認した 50

結果を示す図面。(トラスツズマブ(右側の二つのレーン)とシステインが追加されたトラスツズマブ変異体(HR-Cys、左側の二つのレーン))。

【図3】HR-Cys-ドキシソルピシン複合体の結合の有無をUV-VIS吸光度(A)及び非還元SDS-PAGE(B)で確認した結果を示す図面。

【図4】Her-M2(Cys)抗体変異体と蛍光染料であるAlexa Fluor(商標)488の複合体であるHer-M2(Cys)-Alexa488を製造した後、(A)SDS-PAGE gelでの電気泳動結果(B)重鎖と軽鎖にそれぞれ結合したAlexa488染料の相対的な蛍光強さを分析した結果を示す図面。

【図5】HER2発現BT-474細胞で細胞増殖度分析(anti-proliferation MTS assay)を介してHR-Cys-DOXの細胞成長抑制効果をハーセプチン、ハーセプチンとドキシソルピシン(doxorubicin)1:2混合物、そしてドキシソルピシンと比較して確認した結果を示す図面。

10

【図6】HER2発現SK-BR3細胞での細胞増殖度分析(anti-proliferation assay)を介してハーセプチン-MMAE抗体-薬物複合体であるHER-M(Cys)-MMAEの細胞成長抑制効果をハーセプチンと比較して確認した結果を示す図面。

【図7】HER2発現SK-BR-3細胞でHR-Cys2-MMAEの細胞死滅効果を確認するために、処理濃度別カスパーゼ(caspase)活性化現象をハーセプチンと比較して観察した結果を示す図面。

【図8】HER2発現SK-BR3細胞での細胞死滅がハーセプチン抗体変異体に接合されたMMAEによるアポトーシス(apoptosis)効果を確認するために、処理濃度別カスパーゼ活性化現象をハーセプチンと比較して観察した結果を示す図面。

20

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明をより詳細に説明する。

本発明では、一つ以上のシステイン残基を含むモチーフが親抗体と結合して、多数の薬物結合部位を持つ新しい形態の修飾抗体及びこれを利用した修飾抗体-薬物複合体を提供する。このような修飾抗体は、親抗体の特性は維持しながら、非常に多様な薬物が多数結合することができて、効率的な新しい修飾抗体-薬物複合体として用いられる。

【0019】

本発明での「親抗体」とは、システイン残基を含むモチーフが結合しなかった通常の「抗体」を意味するもので、特定抗原に対する結合能と特異性を持つものならば制限することなく使用が可能で、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体として、マウス抗体などの動物由来抗体、キメラ(chimeric)抗体、ヒト化抗体、形質転換マウスやディスプレイ(display)技術などを利用して開発されたヒト抗体などが全て使用可能である。また、二重特異的抗体(bispecific antibody)等の変形された抗体や、抗体の断片なども全部使用可能であることは本発明が属する技術分野において通常の知識を有する者(以下「当業者」という)には自明である。

30

【0020】

本発明での「抗体の断片」とは、少なくとも抗原に対する結合機能を保有している断片を意味して、単鎖抗体、ダイアボディー、トリアボディー、テトラボディー、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fd、scFv、ドメイン抗体、ミニボディー、スキップ(single chain antibody、scAb)、抗体不変領域の誘導体、タンパク質スキャフォールド(protein scaffolds)に基づいた人工抗体などを含む。

40

【0021】

また、本発明に係る親抗体は、免疫グロブリン分子のすべての類型(例: IgG、IgE、IgM、IgD、及びIgA)及びこれの下位部類(例: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2)であってもよく、いかなる種(species)から由来したものでも使用可能である。

【0022】

本発明での親抗体は、腫瘍-関連抗原(TAA)等の癌特異抗原、細胞表面受容体タン

50

パク質、受容体以外の他の細胞表面タンパク質及び分子、膜横断タンパク質、信号伝達タンパク質、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発達、または分化と関連した分子（例えば、組織発達または分化に機能的に寄与すると知られているか推定される分子）、リンホカイン、サイトカイン、細胞周期調節に関連した分子、血管形成に関連した分子、及び血管新生に関連した分子（例えば、血管新生に機能的に寄与すると知られているか推定される分子）に対する結合能と特異性を持つ。

【0023】

具体的に本発明での親抗体が結合できる抗原としては、

(1) BMPRI B (骨形態形成タンパク質受容体 - I B 型、ジーンバンク承認番号 NM\_\_001203) ;

10

(2) E16 (LAT1、SLC7A5、ジーンバンク承認番号 NM\_\_003486) ;

(3) STEAP1 (前立腺の6回の膜横断上皮抗原、ジーンバンク承認番号 NM\_\_012449) ;

(4) O772P (CA125、MUC16、ジーンバンク承認番号 AF361486) ;

;

(5) MPF (MPF、MSLN、SMR、巨核球強化因子、メソテリン、ジーンバンク承認番号 NM\_\_005823) ;

(6) Napi3b (NAPI-3B、NPTIIB、SLC34A2、溶質キャリアーファミリー34 (リン酸ナトリウム)、メンバー2、第II型ナトリウム - 依存性ポスフェート輸送体3b、ジーンバンク承認番号 NM\_\_006424) ;

20

(7) Sema5b (FLJ10372、KIAA1445、Mm、42015、SEMA5B、SEMAG、セマフォリン5b Hlog、セマドメイン、七つのトロンボスポンジン反復体 (第1型及び類似第1型)、膜横断ドメイン (TM) 及び短い細胞質ドメイン、(セマフォリン) 5B、ジーンバンク承認番号 AB040878) ;

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik、C530008O16Rik、RIKEN cDNA 2700050C12、RIKEN cDNA 2700050C12 遺伝子、ジーンバンク承認番号 AY358628) ;

(9) ETBR (エンドセリンB型受容体、ジーンバンク承認番号 AY275463) ;

(10) MSG783 (RNF124、仮想タンパク質 FL、J20315、ジーンバンク承認番号 NM\_\_017763) ;

30

(11) STEAP2 (HGNC\_\_8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前立腺癌関連遺伝子1、前立腺癌関連タンパク質1、前立腺の6回の膜横断上皮抗原2、6回の膜横断前立腺タンパク質、ジーンバンク承認番号 AF455138) ;

(12) TrpM4 (BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、一時的受容体電位陽イオンチャネル (transient receptor potential cation channel)、M亜族 (subfamily M)、メンバー4、ジーンバンク承認番号 NM\_\_017636) ;

(13) CRIPTO (CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、奇形癌腫 - 由来成長因子 (teratocarcinoma-derived growth factor)、ジーンバンク承認番号 NP\_\_003203 または NM\_\_003212) ;

40

(14) CD21 (CR2 (補体受容体2) または、C3DR (C3d / エプスタイン・パール・ウイルス受容体) または Hs.73792 ジーンバンク承認番号 M26004) ;

;

(15) CD79b (CD79B、CD79、IGb (免疫グロブリン - 関連)、B29、ジーンバンク承認番号 NM\_\_000626) ;

(16) FcRH2 (IFGP4、IRTA4、SPAP1A (SH2ドメイン含有ホスファターゼ固定タンパク質1a)、SPAP1B、SPAP1C、ジーンバンク承認番号 NM\_\_030764) ;

(17) HER2 (ジーンバンク承認番号 M11730) ;

(18) NCA (ジーンバンク承認番号 M18728) ;

50

- ( 1 9 ) M D P ( ジーンバンク承認番号 B C 0 1 7 0 2 3 ) ;
- ( 2 0 ) I L 2 0 R ( ジーンバンク承認番号 A F 1 8 4 9 7 1 ) ;
- ( 2 1 ) プレピカン ( ジーンバンク承認番号 A F 2 2 9 0 5 3 ) ;
- ( 2 2 ) E p h B 2 R ( ジーンバンク承認番号 N M \_ 0 0 4 4 4 2 ) ;
- ( 2 3 ) A S L G 6 5 9 ( ジーンバンク承認番号 A X 0 9 2 3 2 8 ) ;
- ( 2 4 ) P S C A ( ジーンバンク承認番号 A J 2 9 7 4 3 6 ) ;
- ( 2 5 ) G E D A ( ジーンバンク承認番号 A Y 2 6 0 7 6 3 ) ;
- ( 2 6 ) B A F F - R ( B 細胞活性化因子受容体、 B L y S 受容体 3、 B R 3、 N P \_ 4 4 3 1 7 7 . 1 ) ;
- ( 2 7 ) C D 2 2 ( B - 細胞受容体 C D 2 2 - B イソ形、 N P - 0 0 1 7 6 2 . 1 ) ; 10
- ( 2 8 ) C D 7 9 a ( I g ( C D 7 9 B ) と共有的に相互作用して I g M 分子と表面で複合体を形成する B 細胞特異的タンパク質である C D 7 9 A、 C D 7 9 、免疫グロブリン - 関連 ( immunoglobulin-associated alpha ) は B 細胞分化に關与する信号を伝達する、ジーンバンク承認番号 N P \_ 0 0 1 7 7 4 . 1 ) ;
- ( 2 9 ) C X C R 5 ( C X C L 1 3 ケモカインにより活性化した G タンパク質カップリングされた受容体であるパーキットリンパ腫受容体 1 は、リンパ球移動及び体液性防御に作用して H I V - 2 感染に参加して、 A I D S、リンパ腫、骨髄腫及び白血病の発病と關連があると見なされる、ジーンバンク承認番号 N P \_ 0 0 1 7 0 7 . 1 ) ;
- ( 3 0 ) H L A - D O B ( ペプチドに結合して C D 4 + T リンパ球に提示する、 M H C クラス II 分子 ( I a 抗原 ) の サブユニット、ジーンバンク承認番号 N P \_ 0 0 2 1 1 1 . 1 ) ; 20
- ( 3 1 ) P 2 X 5 ( 細胞外 A T P によってゲートされるイオンチャネルである、プリン性受容体 P 2 X リガンド - ゲートイオンチャネル 5 は、シナプス伝達及び神経発生に關与でき、これの欠乏は特異性排尿筋不安定の病態生理に寄与される、ジーンバンク承認番号 N P \_ 0 0 2 5 5 2 . 2 ) ;
- ( 3 2 ) C D 7 2 ( B - 細胞分化抗原 C D 7 2、 L y b - 2、ジーンバンク承認番号 N P \_ 0 0 1 7 7 3 . 1 ) ;
- ( 3 3 ) L Y 6 4 ( ロイシン豊富反復体 ( L R R ) 族の第 I 型膜タンパク質である、リンパ球抗原 6 4 ( R P 1 0 5 ) は、 B 細胞活性化及び細胞自滅を調節して、これの機能喪失は前身性紅斑性ループス患者の疾病活性増加と關連がある、ジーンバンク承認番号 N P \_ 0 0 5 5 7 3 . 1 ) ; 30
- ( 3 4 ) F c R H 1 ( C 2 型 I g - 類似及び I T A M ドメインを含有する免疫グロブリンと F c ドメインに対する推定的受容体である F c 受容体様タンパク質 1 は、 B リンパ球分化に關与できる、ジーンバンク承認番号 N P \_ 4 4 3 1 7 0 . 1 )
- ( 3 5 ) I R T A 2 ( B 細胞発生及びリンパ腫発生に作用できる推定的免疫受容体である免疫グロブリン巨大族受容体転座關連 2 ( Immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 2 )、転座による前記遺伝子脱調節は、いくつかの B 細胞悪性腫瘍で起きる、ジーンバンク承認番号 N P \_ 1 1 2 5 7 1 . 1 ) ; 及び
- ( 3 6 ) T E N B 2 ( 成長因子の E G F / ヘレグリン族及びポルリスタチンと關連がある推定的膜横断プロテオグリカン、ジーンバンク承認番号 A F 1 7 9 2 7 4 ) ; 40
- 等があるが、これに対し限定されることなく、治療用、または診断用で使用可能ないずれの抗原が含まれる。

#### 【 0 0 2 4 】

好ましい例として、本発明に係る親抗体は、 E G F R、 H E R 2、 H E R 3 及び H E R 4 から選択された E r b B 受容体及びその他癌抗原に対する結合能及び特異性を持って、特に好ましくは、本発明に係る親抗体は、トラスツズマブ ( trastuzumab、商品名：ハーセプチン )、リツキシマブ ( rituximab、商品名：リツキサン )、ベバシズマブ ( bevacizumab、商品名：アバスタチン )、セツキシマブ ( cetuximab、商品名：アービタックス )、 c B R 9 6、 c A C 1 0、抗 - C D 2 0 抗体、抗 - E p h B 2 抗体、抗 - I L - 8、 E - セレクチン ( selectin ) 抗体、抗 - M U C 1 6 抗体及び抗 - C D 3 0 抗体から選択される 50

一つ以上のものを含むが、これに限定されない。

【0025】

HER2は、乳癌細胞の増殖と生存に関係する重要な信号伝達体系の一つである上皮細胞成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGF R) ファミリーを意味する。EGF Rファミリーのチロシンリン酸化酵素受容体 (receptor tyrosine kinases) は、erb1、erb2/HER2、erb3、erb4の四つからなり、細胞増殖と生存の他にも細胞の付着、移動及び分化を調節するのに関与すると知られている。

【0026】

四つのerbファミリーのうちerb2/HER2と結合するリガンドはないが、乳癌で最も強力な癌遺伝子 (oncogene) として知られている。HER2が正常な水準である場合には、正常な乳腺組織の成長と発達に関与するが、非正常的にHER2が過発現するか増幅されると、正常細胞調節が崩壊されて、乳腺組織では攻撃的癌細胞が形成されることになる。すなわち、HER2が異なるEGF Rファミリーとオリゴマー化 (oligomerization) されて活性化すると、多くの下部分子 (downstream molecules) をリン酸化して、順に種々の信号伝達系 (signaling cascades) を活性化させるが、細胞増殖に関与するSOS-Ras-Raf-MEK-MAPK経路と細胞死滅を抑制するPI-3K/Akt経路が癌増殖に関与する代表的な機序である。

【0027】

前臨床と臨床実験結果、HER2過発現は、癌発生段階の初期から現れる重要な現象であり、これは癌の成長と進行に重要な役割を果たしている。HER2過発現は、浸潤性乳癌の約20~30%で現れており、過発現は悪性度がより高い攻撃的癌で、乳癌の不良な予後とも関係があると知られている。

【0028】

前記HER2受容体またはEGF受容体からなる群から選択された成長因子受容体に特異的に結合する親抗体に一つ以上のシステインを含むモチーフを結合させて、これにさらに通常の抗癌薬物を結合させた本発明に係る修飾抗体-薬物複合体を患者の腫瘍細胞成長を抑制させるのに有効な量で患者に投与することによって、前記成長因子受容体を過発現する腫瘍細胞の成長を抑制すると同時に死滅を誘導して優れた癌治療効果を上げることができる。

【0029】

また、前記説明した通り本発明での親抗体はトラスツズマブが好ましいが、トラスツズマブはC-末端リジン (Lys) が殆ど除去された形態で製造されるが、本発明に係る修飾抗体-薬物複合体は、一つ以上のシステイン (Cys) を含むモチーフと結合されるトラスツズマブのC-末端部位にリジン (Lys) が存在する形態とリジンが存在しない形態のいずれの形態に適用可能である。

【0030】

本発明で提供されるアミノ酸の種々の配列内に存在するアミノ酸は、それらの公示された3-文字または、1-文字略語によって表示される。多様な核酸切片内に存在するヌクレオチドは当該分野で日常的に用いられる標準単一-文字命名法で命名される。

【0031】

本発明でのシステイン残基を含むモチーフは、1個~100個、好ましくは1個~50個、さらに好ましくは1個~30個、最も好ましくは1個~10個のアミノ酸残基を持って、一つ以上のシステイン残基を含む。特に、本発明に係るシステイン残基を含むモチーフは、1個~20個のシステイン残基を含むことが好ましく、好ましくは1個~10個のシステイン残基を、特に好ましくは1個~5個のシステイン残基を含む。

【0032】

前記システイン残基を含むモチーフは、特定の作用能 (functionality) や2次あるいは3次構造を持たない単純なペプチドモチーフであってもよく、特定の作用能や2次あるいは3次構造を持つペプチドモチーフであることが好ましい。前記特定の作用能は、システイン残基の化学的接合性能を維持-保護できる特性が好ましいが、これに制限されない

10

20

30

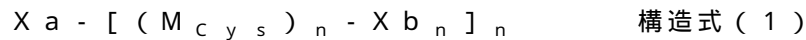
40

50

。特に、システイン残基を含むモチーフは、特定リガンド (ligand) との結合や、あるいはペプチドモチーフ自らの2次または3次構造的特性によって、システイン残基の酸化を防止したり、酸化を遅くすることによって、システイン残基の作用能をより効果的に維持させることができる。

#### 【0033】

本発明に係るシステイン残基を含むモチーフは、下記の構造式(1)のような構造を持つ：

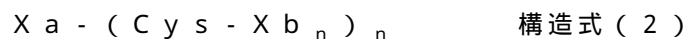


前記構造式(1)で、 $(M_{C y s})_n$ は、単なるシステイン残基、または、システイン残基を含んで特定の作用能や2次あるいは3次構造を持つペプチドモチーフを意味して、 $X a$ 及び $X b_n$ は、互いに独立的にシステインを除いたアミノ酸残基0個~20個で構成されたペプチドを意味して、 $n$ は1~20の整数である。

前記構造式(1)での各 $(M_{C y s})_n$ 、すなわち $(M_{C y s})_1$ 、 $(M_{C y s})_2$ ・ $\dots$ ・ $(M_{C y s})_n$ は、互いに同じでも異なっても良い。また、各 $X b_n$ 、すなわち $X b_1$ 、 $X b_2$ ・ $\dots$ ・ $X b_n$ も互いに同じでも異なっても良い。

#### 【0034】

また、前記構造式(1)で、 $(M_{C y s})_n$ が単なるシステイン残基の場合、本発明に係るシステイン残基を含むモチーフは、下記の構造式(2)のような構造を持つ。



構造式(2)での $X a$ 、 $X b_n$ 及び $n$ は、前記構造式(1)での定義と同様である。

#### 【0035】

また、前記構造式(1)で、 $(M_{C y s})_n$ がシステイン残基を含んで特定の作用能や2次あるいは3次構造を持つペプチドモチーフの場合、好ましくは $(M_{C y s})_n$ はシステイン残基を含む金属イオン結合モチーフであってもよい。システイン残基を含む金属イオン結合モチーフは、金属イオンとの結合を介してシステイン残基の酸化を阻害することによってシステイン基のアルキル化反応性を効果的に維持させられることが知られている (Van Horn et al. (2003) J. Biol. Inorg. Chem. 8:601-610)。

#### 【0036】

本発明で用いることができるシステイン残基を含む金属イオン結合モチーフでは、生体内で金属イオンの濃度を調節するのに用いられる金属イオンキレーター (chelator) タンパク質 (Zhang et al. (2012) Biochem. Genet. 50(7-8):585-599)、金属イオンを細胞外部や細胞内特定位置に伝達する役割を果たすシャペロン (chaperones) (Ansbacher and Shurki, J. Phys. Chem. B (2012) 116(15):4425-4432; Allen et al. (2012) Biochemistry 51(7):1439-48; Click et al. (2012) H. Comput. Chem. 33(11):1142-51)、金属イオンの濃度に応じて転写 (transcription) を調節する転写調節タンパク質 (transcriptional regulators) (Gunther et al. (2012) Biochim. Biophys. Acta. 1823(2):476-83; Sitthisak et al. (2012) FEMS Microbiol. Lett. 327(2):126-133)、タンパク質-タンパク質反応 (protein-protein interaction) やタンパク質-DNA反応に関与する多くのタンパク質に広範囲に存在するジンクフィンガー (Zinc Finger) モチーフ (MacPherson et al. (2006) Microbiol. Mol. Bio. Rev. 70(3):583-604; Schaeffer et al. (2012) Nucleic Acids Res. 40(18):9298-9307) 及び多様な種類の酵素 (Zielazinski et al. (2012) Biochemistry 51(40):7891-7900; Zhou et al. (2012) FEBS J. 279(2):285-298; Cochran et al. (2011) Nat. Struct. Mol. Biol. 19(1):122-127) 由来のものなどがあるが、これに限定されるのではない。前記金属イオン結合モチーフは、システイン残基を金属イオン結合モチーフの必要不可欠な結合グループとして用いており、かかる金属イオン結合モチーフが本発明に係る修飾抗体-薬物複合体の製造に利用されることができる。

#### 【0037】

本発明に係る金属イオン結合モチーフの具体的な例として、ジンクフィンガータンパク質の $C_2H_2$ グループ ( $C y s_2 H i s_2$  クラス:  $C y s - X_{2-4} - C y s - X_{1-2} -$

10

20

30

40

50

His - X<sub>3-5</sub> - His)、C<sub>4</sub>グループ(C4クラス: Cys - X<sub>2</sub> - Cys - X<sub>n</sub> - Cys - X<sub>2</sub> - Cys - X<sub>m</sub> - Cys - X<sub>2</sub> - Cys - X<sub>n</sub> - Cys - X<sub>2</sub> - Cys)、C<sub>6</sub>グループ(C6クラス: Cys - X<sub>2</sub> - Cys - X<sub>6</sub> - Cys - X<sub>5-12</sub> - Cys - X<sub>2</sub> - Cys - X<sub>6-8</sub> - Cys)、転写調節タンパク質や金属シャペロンタンパク質、金属イオン運搬タンパク質(metal ion transporter)、スーパーオキシドディスムターゼ(superoxide dismutase)等で多く発見されるCys - X - X - CysやCys - X - CysモチーフなどCys - X<sub>m</sub> - Cysモチーフ、Met - X - Cys - X - X - Cysモチーフ、C - Q - C - Q - C - A - Cモチーフ、膜タンパク質ATP分解酵素のSer - Pro - Cysモチーフなどが好ましいが、これに限定されるのではない。前記金属イオン結合モチーフ構造で、XはCys以外のアミノ酸残基、mは1~10、好ましくは1~5の整数を意味して、X<sub>m</sub>またはX<sub>m-q</sub>は、m、または、m~q個のCys以外のアミノ酸残基を意味する。

10

## 【0038】

より具体的に本発明で用いられるジンクフィンガータンパク質の金属イオン結合モチーフは、

YKCKQCGKAFGCP SNLRRHGRTH (配列番号1)、  
 YQCNICGGKCFSCNSNLHRHQ RTH (配列番号2)、  
 YSCGICGKSFSDSSAKRRHCILH (配列番号3)、  
 YTCSDCGKAFRDKSC LNRHR RTH (配列番号4)、  
 YRCKYCDRSFSDSSNLQRHV RN I H (配列番号5)、  
 YKCKE C G K A F N H S S N F N K H H R I H (配列番号6)、  
 FKCPVCGKAFRHSSSLVRHQ RTH (配列番号7)、  
 YRCKYCCDRSF S I S S N L Q R H V R N I H (配列番号8)、  
 YEC D H C G K A F S I G S N L N V H R R I H (配列番号9)、  
 YGCHLCCKAFSKSSNLRRHEM I H (配列番号10)、  
 YKCKE C G Q A F R Q R A H L I R H H K L H (配列番号11)、  
 YKCHQCGKAFIQSFNLRRHER TH (配列番号12)、  
 FQCNQCGASFTQKGNLNRHI KLH (配列番号13)、  
 YTC SY C G K S F T Q S N T L K Q H T R I H (配列番号14)、  
 YACHLCGKAFTQSSHR RHEK TH (配列番号15)、  
 YKCGQCGKFYSQVSHLTRHQKI H (配列番号16)、  
 YACHLCGKAFTQCSHLRRHEK TH (配列番号17)、  
 YACHLCAKAFIQCSHLRRHEK TH (配列番号18)、  
 YVCRECGRGFRQHSHLVRHKR TH (配列番号19)、  
 YKCEECEGKAFTQSSHLTTHK I I H (配列番号20)、  
 YEC D H C G K S F S Q S S H L N V H K R T H (配列番号21)、  
 YMCSECGRGFSQKSNLTIHQ RTH (配列番号22)、  
 YKCEECEGKAFTQSSNLTKHKKI H (配列番号23)、  
 FECKDCGKAFTQKSNLIRHQ RTH (配列番号24)、  
 YVCRECRRGFSQKSNLIRHQ RTH (配列番号25)、  
 YECEKCGKAFNQSSNLTRHKKSH (配列番号26)、  
 YECVQCGKSYSSQSSNLFRHQ RRH (配列番号27)、  
 YECVQCGKGFTQSSNLITHQ RVH (配列番号28)、  
 YECNTCRKTF S Q K S N L I V H Q R T H (配列番号29)、  
 YVCSKCGKAFTQSSNLTVHQKI H (配列番号30)、  
 YKCDCECGKNFTQSSNLIVHKRI H (配列番号31)、  
 YEC D V C G K T F T Q K S N L G V H Q R T H (配列番号32)、  
 YKCPDCGKSF S Q S S S L I R H Q R T H (配列番号33)、  
 YECQDCGRAFNQNSSLGRHKR TH (配列番号34)、  
 YECNECGKFFS Q S S S L I R H R R S H (配列番号35)、

20

30

40

50

YKCEECGKAFNQSSSTLTRHKIVH (配列番号36)、  
 YECNECGKAFANSTLRVHQRIH (配列番号37)、  
 YEVHDCGKSFQRSTHTLTQHRRIH (配列番号38)、  
 YECHDCGKSFQRSTHLTRHRRIH (配列番号39)、  
 HKCLEECGKCF SQNTHLTRHQ RTH (配列番号40)、  
 YVCDVEGCTWK FAR SDELNRHKKRH (配列番号41)、  
 YHCDWDGCGWK FAR SDELTRHYRKH (配列番号42)、  
 YRCSWEGCEWR FAR SDELTRHFRKH (配列番号43)、  
 FSCSWKGCERR FAR SDELSRHR RTH (配列番号44)、  
 FACS WQDCNKK FAR SDELARHYRTH (配列番号45)、  
 YHCNWDGCGWK FAR SDELTRHYRKH (配列番号46)、  
 FLCQYCAQRFRGRKDHLTRHMKHSH (配列番号47)、  
 CRCNECGKSF SR RDHLVRHQ RTH (配列番号48)、  
 FQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRTH (配列番号49)、  
 FACEVCGVRFTRNDK LKIHM RKH (配列番号50)、  
 YVCDVEGCTWK FAR SDKLN RHKKRH (配列番号51)、  
 YKCMCECGKAFNR RSHLTRHQRIH (配列番号52)、  
 YICRKCGRGFSRKS N LIRHQ RTH (配列番号53)、  
 YECKECGKAFSSGSNFTRHQRIH (配列番号54)、  
 FHCGYCEKSF SVKDY LTKHIRTH (配列番号55)、  
 YECDHCGKAFSVSSNLNVHRRIH (配列番号56)、  
 YTCKQC GKAFSVSSSLRRHETTH (配列番号57)、  
 YECNYCGKTF SVSSTLIRHQRIH (配列番号58)、  
 YRCEECGKAFRWPSNLTRHKRIH (配列番号59)、  
 FACDICGRKFARSDERKRHTKIH (配列番号60)、  
 CPVESC DRRF SR SDELTRHIRIH (配列番号61)、  
 CDICGRKFARSDERKRHTKIH (配列番号62)

10

20

などが挙げられるが、これに制限されるのではなく、

<http://www.zincfingers.org>、<http://www.genenames.org/genefamilies/ZF>、<http://www.scripps.edu/mb/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php>、<https://zifdb.msi.umn.edu:8444/ZiFDB/>、または Macpherson et al. (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70(3), 583-604等に報告されたジンクフィンガータンパク質の金属イオン結合モチーフのうち本発明の技術的特性と符合するのであれば、いずれも制限されることなく使用可能である。

30

#### 【0039】

また、本発明で用いられる転写調節タンパク質や金属シャペロンタンパク質などの金属イオン結合モチーフは、

Ca dCタンパク質：

CEIFCYDEEKVNRIQGD LQTVDISGVSQILKAIADENRAK  
ITYALCQDEELCV C (配列番号63)

Az tRタンパク質：

CDTHLVHLDNVRSSQAQILPTDKAQQMAEIFGV LADTNRI  
RLLSALASSELCVC (配列番号64)

40

Zi aRタンパク質：

CDQPLVHLEQVRQVQPEVMSLDQAQQMAEFFSALADPSRL  
RLMSALARQELCV C (配列番号65)

Bx mRタンパク質：

CDRAHLVDCSR VGD IQTQVLNTAKAQRMAEFFSLLGDANR  
LRVVS V LAKQELCV C (配列番号66)

Ar sRタンパク質：LSDETRLGIVLLREMGELCVCDLCM (配列番号67)

50



C C T L A T G P L S S D E S E H Y A D L F K V L G D P V R L R I L S Q L A A G G  
C (配列番号68)

Y R A A M P V V R A L V A Y L T E N C C H G T R D C (配列番号69)

C m t Rタンパク質:

C L R G C G L V V A T Y E G R Q V R Y A L A D S H L A R A L G E L V Q V V L A V  
D T D Q P C (配列番号70)

C L R D C G L V V T V P D G R R S R Y E L A D E R L G H A L D D L R A A V V A V  
D A D R T C P D A D E L E C C (配列番号71)

などが挙げられるが、これに限定されるのではない。

【0040】

バクテリアの信号伝達に關与する膜タンパク質で発見される亜鉛 (Zn) 結合タンパク質は、一つのシステインと三つのヒスチジン残基で構成される固有な金属イオン結合モチーフを持つが (Draper et al., J. Bacteriol. 2011, 193(17), 4338-4345)、これは H X X W F Y L X<sub>2 1-2 8</sub> C X L F M V I G X W F L V I X<sub>1 8-2 7</sub> H X X H (Xは任意のアミノ酸であり、X<sub>m-q</sub>はm~q個のCys以外のアミノ酸残基を意味する。)の構造を持って、現在まで報告された150種以上の亜鉛結合タンパク質も本発明での金属イオン結合モチーフとして使用可能である。

【0041】

金属イオン運搬タンパク質には陽イオン拡散誘導タンパク質グループ (cation diffusion facilitators)、Zrt、Irk-様タンパク質 (Zrt, Irk-like protein)、陽イオン交換タンパク質 (cation exchangers)、銅運搬タンパク質 (copper transporters)、重金属P-型ATP分解酵素 (heavy metal P-type ATPase)、ATP-結合カセット (ATP-binding cassette) 運搬タンパク質などが知られているが (Hanikenne et al. Plant Physiology 2005, 137, 428-446; Hall and Williams, J. Experimental Botany, 2003, 54(393) 2601-2613)、本発明では次のようなM-X-C-X-X-Cモチーフが好ましく用いられるが、これに制限されるのではない。

【0042】

E. coli ZntA: V S G M D C A A C A R K V E N A V R Q L A G V N Q V Q V L  
F A (配列番号72)

Tn501 MerP: V P G M T C S A C P I T V K K A I S E V E G V S K V D V T  
F E (配列番号73)

Tn501 MerA: I T G M T C D S C A A H V K E A L E K V P G V Q S A L V S  
Y (配列番号74)

S. aureus CadA: V Q G F T C A N C A G K F E K N V K K I P G V Q D A K  
V N F G (配列番号75)

Human Menkes: V E G M T C N S C V W T I E Q Q I G K V N G E H H I K  
V S L E (配列番号76)

Yeast Atx1: V V M T C S G C S G A V N K V L T K L E P D V S K I D I S  
(配列番号77)

Rat Wilsons: G M T C A S C V A N I E R N L R R E E G I Y S V (配列番号78)

Hum Wilsons: Y E G M T C Q S C V S S I E G K Y R K L Q G V V R Y K V  
S L (配列番号79)

Rice Cu ATPase: G M S C Q G C A G A V R R V L T K M E G V E T F D I  
D M E (配列番号80)

H. pylori Cu ATPase: V P S I T C S H C V D K I E K F V G E I E G  
V S F I D A N V E (配列番号81)

Ran1: V T G M T C A A C S N S V E A A L M N V N G V D V G G M T C G G C S A  
S V K K L L E S Q P C V A S A S V (配列番号82)

Cpx89: V S G M V C A A C S T A V E N A L L S C S G V (配列番号83)

10

20

30

40

50

P a a 1 : D V G G M T C G G C S A S V K K I L E S Q P ( 配列番号 8 4 )

C p x 1 1 8 4 : D V G G M K C G G C V E H V K K I L E E Q F G V T S A S ( 配列番号 8 5 )

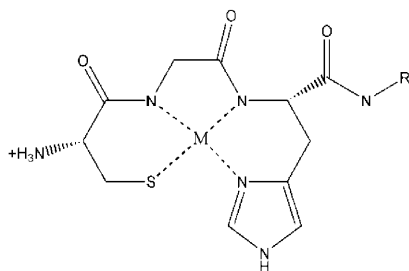
【 0 0 4 3 】

また、前記のような生体内で発見される天然 (wild type) 金属イオン結合モチーフを基に人為的にデザインされた種々の金属イオン結合モチーフも本発明に係る修飾抗体 - 薬物複合体の製造に用いられ、このような例としては、ジンクフィンガータンパク質の金属イオン結合ペプチドモチーフのうちシステイン残基を含まない G G H モチーフを基にする C G H モチーフ (Van Horn et al. (2003) J. Biol. Inorg. Chem. 8:601-610)、あるいはペプチドモチーフ内に存在する多数のシステイン残基中一つ以上のシステインをスレオニン (threonine) やセリン (serine)、ヒスチジン (Histidine) 等他のアミノ酸残基に置き換えた (Jancso et al. (2011) Metallomics 3(12):1331-1339) 金属イオン結合モチーフなどが挙げられるが、これに限定されるのではない。前記 C G H モチーフは、下記の式 (1) の構造を持って、特に C 末端と N 末端にアラニンが位置する A C G H A 構造を持つことが好ましい。

10

【 0 0 4 4 】

【 化 1 】



… (1)

20

前記式 (1) で、M は金属イオンを意味して、R はシステインを除いたアミノ酸残基、特にアラニンが好ましい。

【 0 0 4 5 】

本発明に係る C G H モチーフは、N - 末端と C - 末端の位置が変わっても依然として金属イオン結合特性を持つので、本発明での C G H モチーフには N - 末端と C - 末端の位置が変わった H G C モチーフも含まれることは、当業者には自明である。

30

ジンクフィンガーモチーフを基にして人為的に合成された金属イオン結合モチーフでは P Y K C P E C G K S F S Q K S A L V K H Q R T H T H で最も必須の役割を果たすシステイン残基やヒスチジン残基中システインをメチル基が置換されたメチル - システイン基 (Me - Cys) に置換されたり、またはヒスチジン残基をシステインに置換された (Rohm and Berg, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 13083-13087 参照) 下記のような金属結合ペプチドモチーフが用いられる。

【 0 0 4 6 】

P Y K C P E C G K S F S Q K S A L V K H Q R T H T C ( 配列番号 8 6 )、

P Y K C P E C G K S F S Q K S A L V K H Q R T H T M ( 配列番号 8 7 )、

P Y K C P E C G K S F S Q K S A L V K H Q R T H T ( Me - C ) ( 配列番号 8 8 )、

P Y K ( Me - C ) P E C G K S F S Q K S A L V K H Q R T H T H ( 配列番号 8 9 )、

P Y K C P E ( Me - C ) G K S F S Q K S A L V K H Q R T H T H ( 配列番号 9 0 )、

P Y K C P E ( Me - C ) G K S F S Q K S A L V K H Q R ( 配列番号 9 1 )

40

前記金属結合ペプチドモチーフで、Me - C はメチル基が置換されたシステイン残基を意味する。

その他にも、現在まで報告された多くの金属イオン結合タンパク質モチーフを基にする人為的合成ペプチドも使用可能である。タンパク質の 2 次及び 3 次構造に基づいた金属イオン結合モチーフは、beta - sheet、混在された alpha / beta モチーフ、そして最も多く発見される alpha - ヘリックス構造などが挙げられるが、alpha

50

a - ヘリックス構造には単一鎖だけでなく、二重鎖、三重鎖、四中鎖  $\alpha$  - ヘリックス構造を持つペプチドがある。

【0047】

これらの多重鎖の  $\alpha$  - ヘリックスは、例えば TRI ファミリーの場合には L K A L E E K シーケンスのペプチドが四つ連続する  $G(L K A L E E K)_4 G$  の構造を持つ。このような TRI ファミリーで特定アミノ酸をシステインに置き換えた人為的に合成された金属イオン結合ペプチドモチーフが報告され (Peakcock et al. 2009. Dalton Trans. 7(13). 2271-2280)、下記のような構造を持つこれらの人為的に合成されたペプチドモチーフが用いられるが、これに限定されるのではない。

G L K A L E E K C K A L E E K L K A L E E K L K A L E E K G (配列番号 92)

10

G L K A L E E K L K A L E E K L K A C E E K L K A L E E K G (配列番号 93)

G L K A L E E K C K A L E E K L K A C E E K L K A L E E K G (配列番号 94)

G L K A L E E K L K A L E E K C K A L E E K L K A L E E K G (配列番号 95)

G L K A L E E K L K A L E E K L K A L E E K C K A L E E K G (配列番号 96)

G L K A L E E K L K A L E E K L K A L E E K L K A A E E K C K A L E E K G (配列番号 97)

G L K A L E E K L K A L E E K C K A L E E K L K A A E E K C K A L E E K G (配列番号 98)

E L Y A L E K E L G A L E K E L A C L E K E L G A L E K E L Y A L E K (配列番号 99)

20

K L Y A L K E K L G A L K E K L A C L K E K L G A L K E K L Y A L K E (配列番号 100)

E L Y A L E K E L G A L E K E L A C L K E K L G A L K E K L Y A L K E (配列番号 101)

K L Y A L K E K L G A L K E K L A C L E K E L G A L E K E L Y A L E K (配列番号 102)

この他にも環状構造を持つ

C y c l o [ K 1 , 1 2 ] ( Q C G V C G K C I A C K )

のような金属イオン結合ペプチドモチーフ (Nivorozhkin et al. 2000. Inorg. Chem. 39 (11) 2306-2313) 等数多くの金属イオン結合ペプチドも用いられる。

30

本発明に係る修飾抗体に用いられるシステインを含む金属イオン結合モチーフをまとめると、下の表 1 のとおりになる。

【0048】

【表 1】

本発明で用いられるシステインを含む金属イオンモチーフ構造

		モチーフ構造	
天然タンパク質由来金属イオンモチーフ	ジंकフィンガー	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> グループ	Cys-X <sub>2-4</sub> -Cys-X <sub>12</sub> -His-X <sub>3-5</sub> -His
		C <sub>4</sub> グループ	Cys-X <sub>2</sub> -Cys-X <sub>n</sub> -Cys-X <sub>2</sub> -Cys-X <sub>n</sub> -Cys-X <sub>2</sub> -Cys-X <sub>n</sub> -Cys-X <sub>2</sub> -Cys
		C <sub>6</sub> グループ	Cys-X <sub>2</sub> -Cys-X <sub>6</sub> -Cys-X <sub>5-12</sub> -Cys-X <sub>2</sub> -Cys-X <sub>6-8</sub> -Cys
	転写調節タンパク質、 金属イオンシャペロン		Cys-X <sub>n</sub> -Cys
	膜タンパク質		HXXWFYLYX <sub>21-28</sub> CXLFMVIGXWFLVIX <sub>18-27</sub> HXXH (x は任意のアミノ酸)
金属イオン運搬タンパク質		M-X-C-X-X-C	
人工合成金属イオンモチーフ	ジंकフィンガー由来モチーフ		PYKCPECGKSFSGKSALVKHQRTHTH 修飾ペプチド
			ACGHA
	多重鎖α- ヘリックス	TRIファミリー	(LKALEEK) <sub>n</sub> (n=1~5)の修飾ペプチド
		その他	Cyclo(K 1, 12)-QCGVCGKCIACK ELYALEKELGALEKELACLEKELGALEKELYALEK

10

20

## 【0049】

このようなシステイン残基を含むモチーフは、親抗体の特異性を維持しながら、ターゲット薬物が結合可能な形態ならば、親抗体の軽鎖または重鎖のN-末端やC-末端のうち選択された一つ以上の部位に制限さらず結合することができるが、好ましくは重鎖または軽鎖C-末端に連結されて、特に重鎖のC-末端、すなわち親抗体不変領域(constant region)末端部位、抗体断片が用いられる場合は、その断片の重鎖C-末端に結合することが好ましい。

30

しかし、親抗体の特異性が維持される限り、本発明に係るシステイン残基を含むモチーフ、特にシステイン残基を含むモチーフが金属イオン結合モチーフのようにシステイン残基を含み、特定の作用能や2次あるいは3次構造を持つペプチドモチーフである場合には、親抗体の重鎖と軽鎖末端以外の他の位置、すなわち抗体の内部のどこにも連結されてもよく、長い鎖のペプチドリンカーを介して導入されることもできる。可変領域を除いた親抗体の重鎖や軽鎖のアミノ酸をシステインやリジンに置き換えた修飾抗体に長い鎖の炭化水素リンカーを介して導入された抗体-薬物複合体の場合、親抗体の構造的特性と抗体の特異性を維持させることができるのは、良く知られている。したがって、このような位置に長い鎖のペプチドリンカーで連結されたシステイン残基を含む金属イオン結合ペプチドモチーフは、親抗体の特異性を維持させながら同一性(homogeneity)が高い抗体-薬物複合体を提供することができる。

40

## 【0050】

本発明に係る修飾抗体において、親抗体とシステイン残基を含むモチーフは、アミノ結合を介した融合(fusion)形態で直接結合されることができ、親抗体の末端官能基とシス

50

テイン残基を持つモチーフの末端官能基を化学的に結合する形態で結合することもでき、第1リンカーによって媒介された(linker-mediated)形態の結合も可能である。

親抗体に結合されたシステイン残基を含むモチーフ内のシステイン残基とシステイン残基のチオール基(-SH)を介して直接結合されることができ、システインと薬物を連結する第2リンカーが挿入された形態で結合されることもできる。

#### 【0051】

前記システイン残基を含むモチーフ内のシステイン残基と薬物を連結する第2リンカーの結合は、アルキル化、二硫化相互交換方法及びトランスチオエステル化反応法が利用されることができる。前記第2リンカーは、ハロアセチル官能基を含むアルキルハライド誘導体、マレイミド基を含む誘導体、アジリジン誘導体、アクリルロイル誘導体、またはフルオロベンゼンなどを含むアリールハライド誘導体から一つまたは二以上選択されることを特徴とするが、これに限定されない。前記誘導体は、アルキル化反応基、アリール化反応基、マレイミド基、アジリジン基、アクリロイル基、または、ピリジルジスルフィド及びチオニトロ安息香酸などを含む二硫化相互交換反応基などによってモチーフ内システイン残基のチオール基と結合することが特徴である(Bioconjugate techniques, 2nd edition, pp 182-192, Gerg T. Hermanson, ELSVIER)。

10

#### 【0052】

例えば、チオール-リンカー結合のために通常用いられるマレイミド基の場合、システイン残基のチオールがマレイミド基に対して持つ親核反応性がタンパク質中に存在する他のアミノ酸官能基、例えば、リシン残基のアミノ基またはN-末端アミノ基に比べて約1,000倍も高いので、システインに特異的に結合させるのに活用されている。したがって、第2リンカーであるマレイミド、またはヨードアセトアミドを特徴とする修飾抗体-薬物複合体は、システインがチオエテル結合で薬物と結合されることがわかる。通常第2リンカーは、抗体上に存在する親核性システインに反応する親電子性基を持つ反応性部位を持つ。

20

#### 【0053】

本発明での修飾抗体と結合される薬物は、疾病の治療効果がある薬物ならいずれも制限なしに使用可能で、特に腫瘍細胞の増殖抑制効果がある癌治療用薬物が好ましい。

具体的に、本発明の修飾抗体-薬物複合体に用いられることができる薬物は、細胞毒性または細胞増殖抑制効果を持つ任意の化合物、部分または基を含み、

30

(i) マイクロチューブリン抑制剤、有糸分裂抑制剤、トポイソメラーゼ抑制剤、またはDNAインターカレーターとして機能できる化学療法剤；

(ii) 酵素的に機能できるタンパク質毒素；

(iii) 特定癌遺伝子の発現を抑制させることができるマイクロRNA(miRNA)、siRNA、shRNA；及び

(iv) 放射線同位元素などが含まれる。

#### 【0054】

このような薬物には、メイタンシノイド、オーリスタチン、トラスタチン、トリコテセン、CC1065(細胞毒性化合物)、カリケマイシン及び他のエンジイン抗生剤、タキサン、アントラサイクリン、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンデシン、ピンカアルカロイド(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、クルラムブシル、ダウノルピシン、ダウノマイシン及びその立体異性体、同配体、同族体または誘導体、その他挿入剤である酵素及びその断片、例えば、核酸分解酵素、抗生剤、及び毒素(細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的活性毒素または小分子毒素)及びシスプラチン、CPT-11、ドキシソルピシン、パクリタキセル及びドセタキセルなどの各種抗腫瘍または抗癌剤などが含まれるか、これらに限定されない。

40

#### 【0055】

また、本発明で薬物部分上の親核基は、第2リンカーの部分及び第2リンカー試薬上の親電子性基と共有結合を形成するために反応できるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒ

50

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、及びアリアルヒドラジド基から選択された一つ以上のものを含み、これらに限定されない。

本発明の前記第2リンカーの部分を通じて抗体と結合できる薬物の数は、前記記載された通り親抗体に結合したモチーフに含まれたシステイン残基の数が増加するほど増加することができる。

【0056】

前記の通り本発明に係る修飾抗体は、一つ以上のシステイン残基を含むモチーフが親抗体、好ましくは親抗体C-末端に結合することによって、薬物結合に利用できるシステインを多数含むことができるようになる。したがって、本発明に係る修飾抗体には多量の薬物が結合することができるだけでなく、結合した多量の薬物がターゲット細胞または組織に効果的に伝達されることのできる。

10

【0057】

また、親抗体に結合するシステイン残基の個数の調節が容易であるため、修飾抗体-薬物複合体(mADC)に含まれる薬物の個数、すなわち薬物の量を目的の水準に容易に調節することができる。このような特徴は、既存修飾抗体-薬物複合体の短所を改善したもので、本発明に係る新しい修飾抗体-薬物複合体は優秀な薬物伝達体として用いられ、窮極的に癌などの疾病治療のために効率的に用いることができる。

また、本発明では親抗体及び一つ以上のシステインが含まれたモチーフと結合した修飾抗体を製造する方法を提供する。

20

【0058】

前記親抗体は、親抗体の重鎖または軽鎖不変ドメインをコードするヌクレオチド配列が含まれた適合した発現ベクターを製造して、組換えられた前記発現ベクターを用いて原核または真核細胞を形質転換して抗体タンパク質を発現させて、以後分離及び通常製薬的に許容可能な純度への精製過程を含んで製造されることができ。

【0059】

本発明に係る適合した発現ベクターは、プロモーター、開始コドン、終止コドン、ポリアダニル化シグナル及びエンハンサーのような発現調節因子の他にも膜標的化または分泌のためのシグナル配列を含むことができる。一般的に用いられるプロモーターで、原核細胞にはlac、tac、T3及びT7プロモーターがあるが、これに制限されない。真核細胞には猿ウイルス40(SV40)、マウス乳房腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、例えばHIVの長い末端反復部(LTR)プロモーター、モロニーウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、エプスタインバールウイルス(EBV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターだけでなく、 $\alpha$ -アクチンプロモーター、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、ヒトメタロチオネイン由来のプロモーターがあるが、これに制限されない。

30

【0060】

前記発現ベクターは、ベクターを含有する宿主細胞を選択するための選択性マーカを含んでもよい。選択マーカは、ベクターで形質転換された細胞を選別するためのものであって、薬物耐性、栄養要求性、細胞毒性剤に対する耐性、または表面タンパク質の発現のような選択可能表現型を付与するマーカが用いられる。選択剤(selective agent)が処理された環境で選別マーカを発現する細胞だけ生存するので、形質転換された細胞が選別可能である。また、ベクターは複製可能な発現ベクターである場合、複製が開始される特定核酸配列である複製原点(replication origin)を含んでもよい。

40

【0061】

外来遺伝子を挿入するための組換え発現ベクターとしては、プラスミド、ウイルス、コズミドなど多様な形態のベクターを用いることができる。組換えベクターの種類は、原核細胞及び真核細胞の各種宿主細胞で所望の遺伝子を発現して、所望のタンパク質を生産する機能をする限り、特に限定されないが、強力な活性を示すプロモーターと強い発現力を保有しながら自然状態と類似の形態の外來タンパク質を大量生産できるベクターが好まし

50

い。

【0062】

本発明に係る親抗体、または一つ以上のシステインが含まれたモチーフが融合した修飾抗体を発現させるために、種々の発現宿主/ベクター組合せが利用されることができる。真核宿主に適合した発現ベクターとしては、これらに限定されないが、SV40、牛乳頭腫ウイルス、アデノウイルス、アデノ-関連ウイルス (adeno-associated virus)、サイトメガロウイルス及びレトロウイルスから由来した発現調節配列が含まれる。細菌宿主に使用できる発現ベクターには、pET、pRSET、pBluescript、pGEX2T、pUC、colE1、pCR1、pBR322、pMB9及びこれらの誘導体のように、大腸菌 (*Escherichia coli*) で得られる細菌性プラスミド、RP4のようにより広い宿主範囲を持つプラスミド、gt10とgt11、NM989のような非常に多様なファージラムダ (phage lambda) 誘導体に例示されることができるファージDNA、及びM13とフィラメント性一本鎖DNAファージのようなその他のDNAファージが含まれる。酵母細胞に有用な発現ベクターは2µmプラスミド及びその誘導体である。昆虫細胞に有用なベクターはpVL941である。

10

【0063】

他の様態として、本発明は、前記組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。前記組換えベクターは、宿主細胞に挿入されて形質転換体を形成する。前記ベクターの適合宿主細胞は、大腸菌、バチルスサブティリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces* sp.)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.)、プロテウスミラビリス (*Proteus mirabilis*) またはスタピロコッカス属 (*Staphylococcus* sp.) のような原核細胞であってもよい。また、アスペルギルス属 (*Aspergillus* sp.) のような真菌、ピキアパストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロマイセスセレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、簡単にシゾサッカロマイセス属 (*Schizosaccharomyces* sp.) 及びニューロスポラクラッサ (*Neurospora crassa*) のような酵母、その他の下等真核細胞、及び昆虫からの細胞のような高等真核生物の細胞のような真核細胞であってもよい。また、植物、哺乳動物から由来することができる。好ましくは、宿主細胞はPER.C6細胞、猿腎臓細胞7 (COS7: monkey kidney cells) 細胞 (特にシミアン (simian) COS細胞)、NSO細胞、SP2/0、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO: chinese hamster ovary) 細胞、W138、子ハムスター腎臓 (BHK: baby hamster kidney) 細胞、MDCK、骨髓腫細胞株、HuT78細胞及びHEK293細胞、抗体タンパク質を別に生成はしない他の哺乳動物宿主細胞などが利用可能であるが、これに限定されない。

20

30

【0064】

特に本発明に係る宿主細胞は、最大限に発現効率を高めるために大腸菌、シミアンCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、または、抗体タンパク質を別に生成はしない他の哺乳動物宿主細胞から選択された一つ以上が好ましく、特にチャイニーズハムスター卵巣細胞であるCHO-K1を宿主細胞として用いることが好ましい。

【0065】

本発明で宿主細胞への「形質転換」は、核酸を有機体、細胞、組織、または器官に導入するいずれの方法も含まれて、当分野で公示された通り宿主細胞により適合した標準技術を選択して行うことができる。このような方法には電気ショック遺伝子伝達法 (electroporation)、原形質融合、リン酸カルシウム ( $\text{CaPO}_4$ ) 沈殿、塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ ) 沈殿、シリコンカーバイド繊維を利用した攪拌、アグロバクテリアが媒介された形質転換、PEG、デキストリンスルフィド、リポフェクタミン及び乾燥/抑制媒介された形質転換方法などが含まれるが、これに制限されない。

40

【0066】

前記発現した抗体タンパク質、すなわち抗体は、宿主細胞から、培養液の上澄液または溶解後細胞から回収されて、通常のタンパク質精製技術を利用して、本発明の一つ以上のシステインが含まれたモチーフが結合した修飾抗体が製造されることができる。

【0067】

50

前記抗体の精製方法は、例えば、タンパク質 A セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析または親和性クロマトグラフィーのような従来の免疫グロブリン精製手順で培養培地適切に分離することができる。

システインが含まれたモチーフが結合した親抗体は、親抗体の重鎖または軽鎖不変ドメインをコードするヌクレオチド配列にシステインが含まれたモチーフをコードするヌクレオチド配列を連結して、融合された形態で発現できるように組み換えられた発現ベクターを製造して、これを原核または真核細胞で発現させて、前記親抗体の製造方法と類似の方法で生産、精製することができる。

【 0 0 6 8 】

また、親抗体と一つ以上のシステイン残基を含むモチーフをそれぞれ発現させて、親抗体の末端官能基とシステイン残基を持つモチーフの末端官能基を化学的に結合させたり、第 1 リンカー媒介された形態で結合させて抗体を製造できて、前記本発明の親抗体に一つ以上のシステインが含まれたモチーフが結合した修飾抗体と薬物を結合して修飾抗体 - 薬物複合体 ( m A D C ) を製造することができる。

【 0 0 6 9 】

具体的には、親抗体に結合した一つ以上のシステインが含まれたモチーフを持つ修飾抗体 - 薬物複合体は：

( a ) 一つ以上のシステインが含まれたモチーフが結合した親抗体をリンカー試薬と反応して共有結合を介して抗体 - 第 2 リンカー中間体を形成させた後、この抗体 - 第 2 リンカー中間体を活性化薬物の部分と反応させる方法；または

( b ) 薬物の部分の親核基を第 2 リンカー試薬と反応させて共有結合を介して薬物 - 第 2 リンカー中間体を形成させた後、この薬物 - 第 2 リンカー中間体を一つ以上のシステインが含まれたモチーフと結合した親抗体のシステイン基と反応させる方法を介しても製造可能である。

【 0 0 7 0 】

さらに他の形態として、本発明は、修飾抗体 - 薬物複合体を有効性分として含む治療用組成物を提供する。

前記組成物で修飾抗体 - 薬物複合体の薬物は、細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤、化学療法剤、免疫抑制剤、抗炎症剤などが用いられるが、これに限定されるのではなく、癌治療において腫瘍細胞を死滅または抑制する薬物の局所的伝達のための抗体複合体の使用によって薬物の部分が腫瘍内に抗体 - 抗原で標的化された伝達及び細胞内での蓄積を可能にする。この時、このような非結合薬物製剤の投与は除去しようとする腫瘍細胞だけでなく正常細胞にも許容できない水準の毒性を誘発したりもする。しかし、本発明では、修飾抗体 - 薬物複合体に含まれた抗体の抗原に対する高い特異性により、ターゲット細胞に薬物を正確に伝達できて、治療効果を高めることができ、また高い効果にもかかわらず、毒性により使用が制限的な薬物、特に抗癌剤などの活用度を向上することができる。これにより、最小の毒性を伴った最高の効能が追求される抗体 - 薬物複合体が製造、精製されて提供される。

【 0 0 7 1 】

また、本発明では修飾抗体 - 薬物複合体を有効性分として、癌、自己免疫、炎症性または感染性疾病または疾患がある前記標的細胞に接触して、標的細胞の増殖を抑制する方法を提供する。

本発明での治療可能な癌は、肝臓癌、胃癌、乳癌、結腸癌、骨癌、すい臓癌、頭部または、頸部癌、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、食道癌、小腸癌、肛門付近癌、卵管癌腫、子宮内膜癌腫、子宮頸部癌腫、質癌腫、陰門癌腫、ホジキン病 ( Hodgkin ' s disease )、前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌、輸尿管癌、腎臓細胞癌腫、腎臓骨盤癌腫、及び中枢神経系腫瘍から選択される一つ以上のもので、これに限定されない。具体的な例として、試験管内の H E R 2 - 増幅された乳癌細胞である B T - 4 7 4 で修飾抗体 - 薬物複合体を接触させて、細胞増殖抑制を誘導することができる。そのため、本発明での修飾抗体 - 薬物複合体を有効性分とする抑制方法は、前記疾病に関連した細胞を死滅させたり増殖速度を減少させて抑

10

20

30

40

50



制させる効果を有することが明らかである。

【0072】

以下、本発明を具体的な実施例によってより詳細に説明する。しかし、本発明は下記実施例によって限定されるのではなく、本発明のアイデアと範囲内で様々な変形、または修正されうことは、当業者には自明である。

本発明で使われる技術用語及び科学用語において、他の定義がない限り、本発明が属する技術分野で通常知識を有する者が一般的に理解する意味を持つ。また、従来と同じ技術的構成及び作用に対する繰り返される説明は省略することにする。

【0073】

1. 分析方法

1.1: UV-VIS分光分析

本発明では、抗癌剤であるドキシソルピシン(6-maleimidocaproyl)hydrazonideにリンカーを付着した薬物(DOX-EMCH)を利用して抗体-薬物複合体を製造した。DOX-EMCHは人体に注射時血液内アルブミンに存在するシステインのチオール基と結合して、アルブミン-薬物複合体を形成する薬物[Willner et al., Bioconjugate Chem. 1993 (4):521-7]であって、本発明の説明に容易に適用されることができる。

【0074】

タンパク質と薬物の結合反応以後、タンパク質を精製して薬物がまだタンパク質に結合しているかを確認するために、通常適用する方法は、タンパク質と薬物のUV-VIS吸光度最大値を活用する方法である。タンパク質は、通常280nm波長のUV域で最大吸光度を示し、本発明に用いられるドキシソルピシンは、495nm波長の可視光線域で最大吸光度を持つ。タンパク質とドキシソルピシン共に固有の吸光係数を持つので、280nmと495nmでの吸光度を測定して、吸光係数を適用すると、タンパク質分子当たり結合した薬物の当量を測定した[US patent 7,528,234 B2]。

【0075】

1.2: 試験管内の細胞増殖抑制能の分析

修飾抗体-薬物複合体(mADC)の細胞毒性または細胞増殖抑制性活性は、受容体タンパク質を持つ哺乳動物細胞、例えばSK-BR-3細胞あるいはBT-474細胞を細胞培養培地で修飾抗体-薬物複合体(mADC)に露出させて、細胞を約6時間~約5日間培養して、細胞生存率を測定することによって確認した。

【0076】

1.3: 試験管内Caspase 3/7活性測定

ハーセプチンは、直接的に癌細胞死滅を起こすことなく、ADCC(antibody dependent cellular cytotoxicity)を介して、Her2陽性細胞死滅を起こす。それに対して、薬物治療方法は、直接的に癌細胞死滅を誘導(apoptotic cell death)するので、caspase活性を測定すると、修飾抗体-薬物複合体(mADC)の細胞毒性がカスパーゼ媒介アポトーシス(caspase mediated apoptosis)であるか確認することができる(Bayascas, et al. (2002), Cell Death and Differentiation. 9: 1078-1089; Preaudat, et al (2002), Journal of Biomolecular Screening. 7: 267-274; Phillips, et al. (2008), Cancer Research 68(22): 9280-9290)。

【0077】

本発明では、修飾抗体-薬物複合体(mADC)によるアポトーシス機序を確認するために、カスパーゼ3と7(Caspase 3/7)の活性を測定した。一般に、修飾抗体-薬物複合体(mADC)によるアポトーシスは、受容体タンパク質を持つ哺乳動物細胞、例えばSK-BR-3細胞あるいはBT-474細胞を培地で修飾抗体-薬物複合体(mADC)に露出させて、細胞を約2日間培養して、カスパーゼ活性を測定することによって確認される。

【実施例】

【0078】

10

20

30

40

50

## 2. 実施例

### 実施例 1：発現ベクター pAV4 の製造

本発明に必要な発現ベクタークローニングは、親ベクターである pSGHV0 (Gen Bank Accession No. AF285183) を利用して、産業界で抗体製作に使用可能なように目的に合わせて改良させて開発した pAV4 ベクターを利用した。親ベクターは、大腸菌のようなバクテリアを利用して人体由来タンパク質を発現させる場合、細胞内に過量発現するが、活性を持つ物質で得られにくいタンパク質の場合に動物細胞を利用して細胞外に生理活性を持つ目的のタンパク質を高濃度で発現させて、容易に精製する目的で製作された研究用ベクターである。しかし、産業界で生産用として用いるには多くの制限があるので、このベクターの最も大きい長所である発現量が高いことを生産に利用するために、産業界で使用可能なように改良したものである。また、抗体の場合、重鎖 (heavy chain) と軽鎖 (light chain) の二つのタンパク質を同時に発現させなければならないので、このような目的に合ったベクターを開発した。

【0079】

### 実施例 2：トラスツズマブ及びトラスツズマブ - システイン追加修飾抗体のベクター製造

トラスツズマブ (HHL002) ベクターを製造するために、トラスツズマブの重鎖と軽鎖の cDNA を CHO 細胞で発現が最大化されるようにコドン最適化された配列でそれぞれ合成した。この遺伝子を pAV4 ベクターの XhoI/NotI と ApaI/SmaI にそれぞれクローニングしてトラスツズマブベクター (pHHL002) を製造した。

【0080】

#### 2.1：トラスツズマブ修飾抗体 HR - Cys と HR - Cys - Gly - Cys 製造

トラスツズマブの C - 末端にコードされたリジン除去してシステイン残基一つだけが追加されたトラスツズマブシステイン修飾抗体 (HR - Cys、HHL002C) と Cys - Gly - Cys (CGC) で構成されたペプチドが追加された別の修飾抗体 (HR - Cys - Gly - Cys、HHL002C2) を製造するために、製造したトラスツズマブベクター (pHHL002) を鋳型にして二つの正方向プライマーと逆方向プライマーを利用して、PCR を行った。具体的には、トラスツズマブを鋳型にして二つのプライマーである XhoHH 正方向プライマー (5' - GGG GGG CTC GAG ACC ATG GGT TGG AGC TGT - 3') と HHNot 逆方向プライマー (5' - GCG GCC GGC CGC TCA ACA ACC CGG AGA CAG - 3')、または HHNot 逆方向プライマー 2 (5' - GCG GCC GGC CGC TCA ACA GCC ACA ACC CGG AGA CAG - 3') を利用して PCR で増幅した。前記増幅されたヌクレオチドを末端に存在する二つの制限酵素である XhoI と NotI で切断して、XhoI/NotI 切断部を持っている発現ベクター pHHL002 と接合してトラスツズマブシステイン修飾抗体ベクター (pHHL002C、pHHL002C2) を製造した。ベクター模式図は図 1 のとおりである。本実施例で製造されたシステイン追加修飾抗体は、C - 末端リジンが除去されて、システインまたはシステイン、グリシン、システインが追加されたトラスツズマブのシステイン追加抗体である。

【0081】

#### 2.2：トラスツズマブ修飾抗体 HR - M2 (Cys) 製造

金属イオン結合モチーフ (CGH) を二つ持つトラスツズマブ修飾抗体である HR - M2 (Cys) (HR - ACHGAACGHA、HHL002M2) を製造するためにトラスツズマブベクター (pHHL002) を鋳型にして XhoHH 正方向プライマー (5' - GGG GGG CTC GAG ACC ATG GGT TGG AGC TGT - 3') と M2 逆方向プライマー (5' - CCCC GC GGC CGC CTA GGC ATG GCC ACA AGC AGC ATG GCC ACA GGC GCC GGG AGA CAG AGA - 3') を利用して PCR で増幅した。前記増幅されたヌクレオチドを末端に存在する二つの制限酵素である XhoI と NotI で切断して、XhoI/NotI 切断部を有している発現ベクター pHHL002 と接合してトラスツズマブシステイン修飾抗体ベクター (pHHL002M2) を製造した。

## 【 0 0 8 2 】

2.3: トラストズマブ修飾抗体HR-M(Cys)製造

金属イオン結合モチーフ(CGH)を一つだけ持つトラストズマブ修飾抗体であるHR-M(Cys)(HR-GGGACGHA、HHL002M)を製造するために、前記製造したトラストズマブ修飾抗体HR-M2(Cys)を鋳型にして、正方向プライマー(5'-GGT GGA GGT GCT TGT GGC CAT TAA GC)と逆方向プライマー(3'-GCC GGG AGA CAG AGA CAG TG)を用いて、site-directed mutagenesis(エンジノミックスEzChange Site-directed mutagenesis kit、Ez004S)方法でPCRを利用して、二つの金属イオン結合モチーフのうちC-末端のモチーフを除去して、親抗体との間にグリシンリンカーを添加した。元の鋳型であるHR-M2(Cys)は制限酵素であるDpnIで切り出した後、PCRを介して作られた5-M(Cys)は、リガーゼ(ligase)を利用して、二本鎖DNAに再び連結してトラストズマブ修飾抗体ベクター(pHHL002M)を製造した。

10

## 【 0 0 8 3 】

2.4: トラストズマブ修飾抗体HR-M2L(Cys)製造

金属イオン結合モチーフ(CGH)が三つのアミノ酸リンカーに連結されたトラストズマブ修飾抗体であるHR-M2L(Cys)(HR-ACGHAGGGACGHA、HHL002M2L)を製造するために前記製造したトラストズマブ修飾抗体HR-M2(Cys)を鋳型にして、正方向プライマー(5'-GGT GGA GGT GCT TGT GGC CAT GCC TAA GCG)と逆方向プライマー(3'-AGC ATG GCC ACA GGC GCC)を使ってsite-directed mutagenesis(エンジノミックスEzChange Site-directed mutagenesis kit、Ez004S)方法でPCRを利用して、二つの金属イオン結合モチーフの間にグリシンリンカーを添加した。元の鋳型であるHR-M2(Cys)は制限酵素であるDpnIで切り出した後、PCRを介して作られた5-M2L(Cys)は、リガーゼを利用して、二本鎖DNAに再び連結してトラストズマブ修飾抗体ベクター(pHHL002M2L)を製造した。

20

## 【 0 0 8 4 】

2.5: トラストズマブ修飾抗体HR-Z(Cys)製造

金属イオン結合特性を持つクラスI(Class I)ジンクフィンガーモチーフを持つHR-Z(Cys)(HR-CDICGRKFARSDERKRHTKIHLRQK、HHL002Z)を製造するために、トラストズマブベクター(pHHL002)を鋳型にして、XhoI正方向プライマー(5'-GGG GGG CTC GAG ACC ATG GGT TGG AGC TGT - 3'、配列番号1)とZ逆方向プライマー(5'-GCA TGC GGC CGC CTT ACT TCT GCC GCA GGT GGA TCT TGG TAT GCC TTT TTC GCT CGT CGG ATC TAG CA A ATT TGC GTC CAC AAA TAT CGC ATT TGC CGG GAG ACA GAG A - 3')を利用してPCRで増幅した。前記増幅されたヌクレオチドを末端に存在する二つの制限酵素であるXhoIとNotIで切断して、XhoI/NotI切断部を有する発現ベクターpHHL002と接合してトラストズマブシステイン修飾抗体ベクター(pHHL002Z)を製造した。

30

40

## 【 0 0 8 5 】

実施例3: トラストズマブ及びトラストズマブ-システイン追加修飾抗体の発現及び精製

チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1)を利用して実施例1及び2で製造したトラストズマブ(HHL002)及びこれのシステイン修飾抗体(HHL002C、HHL002C2、HHL002M、HHL002M2、HHL002M2L、HHL002Z)のタンパク質発現を確認した。CHO-K1は10%FBS(Fetal Bovine Serum)と抗生剤を含んだDMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media)に37℃、5%CO<sub>2</sub>、培養器で培養した。トラストズマブ及びこれの修飾抗体発現ベクターを導入する一日

50

前、100mmシャーレに細胞を $5 \times 10^6$  / mL濃度で播種して培養した後、FBSと抗生剤がない800 $\mu$ LのDMEMと10 $\mu$ gのトラスツマブまたはシステイン修飾抗体発現ベクターを混合して、常温で1分維持した後、20 $\mu$ gのPEI (Polyethylenimine, linear, Polysciences Inc (Cat. no: 23966, MW ~ 25,000))と混合して10~15分程度常温で放置した。この時、一日前に培養した細胞をPBSで洗浄して新しい培養液6mLのDMEMを添加した。10~15分常温に放置したトラスツマブまたはシステイン修飾抗体の発現ベクターをこのシャーレに添加した。次の日PBS洗浄してFBSが内IMDM (Cat. No 12200-028, Gibco, Iscove's Modified Dulbecco's Medium)培地を添加してタンパク質発現を確認した。

10

## 【0086】

このように発現したトラスツマブ及びこれのシステイン修飾抗体は、下記のように精製した。具体的には、細胞培養液で分泌されたトラスツマブ及びこれのシステイン修飾抗体を精製するために、培養液を遠心分離して細胞を除去した後、上澄液だけを取り、この上澄液を平衡緩衝溶液で平衡化されたHiTrap Protein A HP (GE Healthcare、米国)コラムに注入して、平衡緩衝溶液で十分に洗浄した後、Glycine緩衝溶液(100mM Glycine、pH2.8)でpHを変化させてタンパク質を湧出させた。前記溶液をリン酸塩緩衝溶液で透析した後、Vivaspin 20 (Sartorius、米国)を使って濃縮し、最終的に高純度に精製されたタンパク質を得た。

20

## 【0087】

実施例4：修飾抗体と薬物の複合体製造4.1：トラスツマブを基にする修飾抗体と薬物(ドキシソルピシン)の複合体製造

通常タンパク質のシステインが内部ジスルフィド結合をなしていなければ、タンパク質同士ジスルフィドをなして二量体をなすが、図2で示すように、本発明で製造されたHR-CysはSDS-PAGEとウエスタンブロット(western blot)で確認したところ、完全な抗体の形態で存在した。また、遊離チオール基を持つシステインは、細胞内成分であるグルタチオンやアミノ酸で存在するシステインとジスルフィド結合状態で存在されるので、薬物-第2リンカーとの結合時、ジスルフィド結合を解体するためにDTT (dithiothreitol)やTCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine)で代表される還元剤処理段階を必要とするが、常温で攪拌する処理だけで十分結合反応が起きることもある。

30

## 【0088】

本実験に用いられた第2リンカーと結合した薬物は、DOXO-EMCHと知らされたドキシソルピシンの(6-maleimidocaproyl)hydrazine誘導体であり、DOXO-EMCHのようにマレイミド基を持つ化合物をタンパク質のチオール基に結合させる方法は前述した文献に記載されている [Klussman, et al. (2004), Biocjugate Chemistry 15(4):765-773, page 766; Emmanuel et al. (2010) Chemistry & Biology 2010 (17):213-227]。

## 【0089】

本発明では、精製されたHR-CysとDOXO-EMCHを1:10のモル比で混合して、常温で4時間攪拌した後、塩除去コラムで残留DOXO-EMCHを除去して、限外ろ過法で3回洗浄することによってHR-Cys-ドキシソルピシン結合体(HR-Cys-DOX)を製造することができて、製造された物質の結合の可否は、UV-VIS吸光度測定で、図3で示すように確認した。タンパク質と薬物の固有吸光係数を利用して計算した結果、HR-Cys分子当たり約2分子のDOXO-EMCHが結合されたことが分かった。

40

## 【0090】

4.2：トラスツマブを基にした修飾抗体と薬物(MMAE)の複合体製造

本発明では、ドキシソルピシンより細胞毒性がはるかに高いと知られているMMAEとHR-Cys-GLY-Cysを接合させてハーセプチン-MMAE結合体(HR-Cys

50

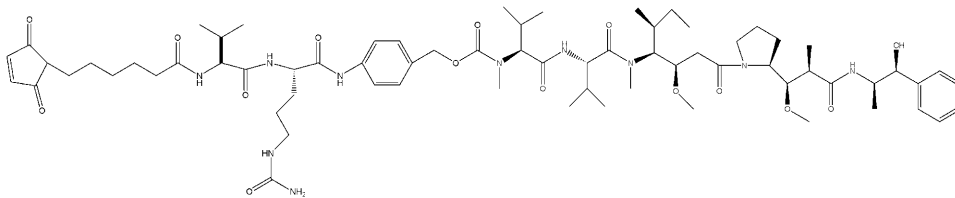
2 - MMA E) を製造した。MMA E と知られているオーリスタチン (Auristatin) の接合の可能性誘導体である単一メチルオーリスタチン E (monomethyl Auristatin E、[式 (2)] 参照) であって、細胞内でタンパク質分解酵素 (protease) によって分解されるバリン - シトルリン (valine-citrulline) と自らの分解スペーサーグループであるパラアニリン安息香酸 (para-aniline benzoic acid: PABA) を介して、チオール基に選択的に結合するマレイミド基に連結される構造を持つ。これを通称して MC (maleimido caproic acid) - VC (valine-citrulline) - PAB - MMA E とし、これに対する合成方法はすでに知られていると同様である (米国特許第 6 2 1 4 3 4 5 号 ; 米国特許第 7 7 4 5 3 9 4 号)。オーリスタチンは、細胞内毒性が強い物質であり、細胞増殖抑制試験での IC50 値が 200 ~ 300 pM と知られている。

10

【0091】

【化2】

メチルオーリスタチンE



... (2)

【0092】

本発明では、精製されたトラスツズマブ変異体を抗体変異体1当量当たり還元剤である TCEP を 2 ~ 10 当量加えて、4 度で 30 分間反応させてチオール基を還元させた後、MC - vc - PAB - MMA E を 2 ~ 10 当量添加して、常温で 2 ~ 4 時間位反応させる。反応は過量のシステインを加えて終結させて、過量の MC - vc - PAB - MMA E と TCEP は、遠心分離ろ過フィルターとリン酸塩緩衝溶液での透析を介して除去して、最終精製されたトラスツズマブ変異体 - MC - vc - PAB - MMA E を製造した。

20

【0093】

製造したトラスツズマブ変異体 - MC - vc - PAB - MMA E の選択的結合特異性を確認するために、製造された HR - M2 (Cys) - MC - vc - PAB - MMA E のペプチドマッピング (peptide mapping) を行った ((株) プロテインワークス、大田 (テジョン))。ペプチドマッピングの結果、MC - vc - PAB - MMA E は、重鎖の C - 末端に導入された薬物結合部位であるペプチドのシステイン残基に結合していることを確認した。重鎖や軽鎖の鎖内 (intrachain) あるいは鎖間 (interchain) ジスルフィド結合から由来したシステインでの薬物の結合は見られなかった。これから本発明でデザインした重鎖の C - 末端に選択的に結合して、抗体 - 薬物複合体の同質性を画期的に高めることができる抗体変異体の合成が有効であることを確認することができた。

30

【0094】

4.3: マレイミド基を含む蛍光染料 Alexa Fluor (商標) r488 を利用したトラスツズマブ変異抗体の選択的接合特性確認

トラスツズマブの重鎖 C - 末端部位に導入されたシステイン残基に選択的に薬物が接合されるのか確認するために、チオール基に選択的に結合するマレイミド基が置換された蛍光染料である Alexa Fluor (商標) r488 をそれぞれのトラスツズマブ変異抗体と反応させた。通常タンパク質のシステインが内部ジスルフィド結合をなしていなければタンパク質同士ジスルフィドをなして二量体をなすが、図 2 で示すように、本発明で製造された HR - Cys は SDS - PAGE とウエスタンブロットで確認したところ、完全な抗体の形態で存在した。また、遊離チオール基を持つシステインは、細胞内成分であるグルタチオンやアミノ酸で存在するシステインとジスルフィド結合状態で存在されるので、薬物 - 第 2 リンカーとの結合時、ジスルフィド結合を解除するために DTT や TCEP で代表される還元剤処理段階を必要とするが、常温で攪拌する処理だけで十分結合反応が起きることもある。2 ~ 4 当量の還元剤は、重鎖の C - 末端に導入されたシステイン

40

50

残基だけでなく、重鎖と軽鎖それぞれの鎖内のジスルフィド結合と重鎖と軽鎖を連結する鎖間ジスルフィド結合も還元させることができる。したがって、還元剤によって還元されたシステイン基には、どこにでも蛍光染料が結合される可能性がある。鎖間または鎖内のジスルフィドに結合される薬物体は、抗体-薬物複合体の同一性を低下させて、また結合した比較的大きさが大きい薬物体は、抗体タンパク質自らの構造的安定性と抗原特異性を阻害する可能性が大きいので、究極的バイオ薬物製造においてその効用性が非常に低下することがある。

#### 【0095】

トラスツズマブ変異抗体1当量に2~4当量のTCEPを加えた後、4で30分程還元させる。この過程を通して、ジスルフィド結合を介して二量体として存在する修飾抗体やタンパク質発現過程で酸化剤と結合している形態で存在できるシステインのチオール官能基がマレイミド基と結合できる還元された形態で還元される。還元反応後、マレイミド基と反応性があるDTTなどの還元剤は、遠心分離ろ過フィルター等を介して除去されるが、TCEPの場合には除去しなくてもマレイミド基とチオール基の結合反応に関与しない。TCEPによって還元されたトラスツズマブ変異抗体に1当量当たり2~10当量のAlexa Fluor(商標)r488を加えた後、常温で2~4時間ほど振りながら反応させる。反応は過量のシステインを加えて終結させて、反応しないで残った過量の染料と還元剤などは遠心分離ろ過フィルターで除去した後、リン酸塩緩衝溶液で透析を介して最終のトラスツズマブ変異抗体-Alexa488染料複合体を得た。

#### 【0096】

前記のように得たトラスツズマブ変異抗体-Alexa488染料複合体をSDS-PAGE gelで電気泳動を介して分離した後、重鎖と軽鎖にそれぞれ結合した染料の量を蛍光イメージ分析器(Fluorescence Image Analyzer, Typhoon 9410, Amersham Bioscience Ltd.)で分析した。蛍光イメージ分析は、HR-CysとHR-Cys-Gly-Cys抗体変異体の場合、軽鎖に比べて重鎖に染料が相対的によく結合することが見られた。金属イオン結合モチーフを持つHR-M(Cys)、HR-M2(Cys)、HR-M2L(Cys)、HR-Z(Cys)の場合でも軽鎖に比べて多くの染料が結合することが見られた。図4で示すように、HR-M2(Cys)抗体変異体の場合、軽鎖に比べて重鎖に結合した蛍光染料の相対的蛍光強さは、概略6倍程度で観察された。このような相対的な蛍光強さの違いは、軽鎖に比べて重鎖に結合する染料の量のはるかに多いことを示し、したがって重鎖に対するマレイミド基の選択性がより大きいことを示す。

#### 【0097】

##### 実施例5：金属イオン結合モチーフの金属イオン結合力測定

前記の通り、金属イオン結合モチーフであるCGHを持つペプチドは、金属イオンに結合してシステイン残基の酸化を抑制したり遅くして、システインの過酸化によるスルホン化反応を防止する。システイン残基の酸化は、二つの反応経路を解して進められる。一つは、チオール-チオール結合を介したジスルフィド結合が生じることがあって、他の一つは空气中で過量の酸素と反応して酸化されて中間生成物でスルフェン酸(sulfenic acid: R-S-OH)が生成されることもある。この場合、チオール-ジスルフィド形成反応は可逆反応で、還元剤を介して再びチオール単体に還元されることができるが、酸素が結合したスルフェン酸の形成は、非可逆的反応である。ジスルフィドとスルフェン酸は過量の酸素に長期間露出する場合、全てが非可逆的反応を介してスルホン酸(R-SO<sub>3</sub>H)に酸化される。このようなスルフェン酸やスルホン酸は、共にマレイミドに対する反応性がないので、スルフェン酸やスルホン酸での酸化は、抗体変異体のマレイミドに対する反応性を弱化させて、したがって抗体-薬物複合体の接収率と同質性に大きい影響を及ぼしかねない。

#### 【0098】

先に述べたように、生体内で多く発見される金属イオン結合モチーフであるGGHから由来した合成モチーフであるCGHが含まれたペプチドは、金属イオンとの結合を介して

システインのスルホン化反応を抑制すると報告された (Van Horn et al. (2003) J. Biol. Inorg. Chem. 8: 601-610)。金属イオン結合ペプチドモチーフを含む抗体タンパク質は、発現過程を介して細胞外に発現した後、細胞培養液に存在する微量の金属イオンとの結合を介してシステインのスルホン化反応を効果的に抑制することができる。このような金属イオン結合ペプチドモチーフを含む抗体変形体の金属イオン結合特性を測定するために、良く知られている金属イオンキレータである Fura-2 (Invitrogen、F-1200) を利用して金属イオン結合の強さを測定した。これを介して、HR-M2 (Cys) は、亜鉛金属イオンとの分解定数 ( $K_d$ ) が約 20 nM と非常に強い結合をすることを測定した。また、これらの金属イオンを含む抗体変異体が、金属イオンとの結合を介してシステイン残基を保護するかを確認するために、金属イオンを添加した時のアルキル化反応速度を測定した。亜鉛金属イオンとは非常に強い結合をして、金属イオンがない時と比較して 24 時間までもシステインのアルキル化反応を抑制していることを観察した。ニッケル金属イオンの場合は、亜鉛金属イオンに比べて CGH モチーフに対する結合が大きくないので、亜鉛金属イオンに比べてはシステインのアルキル化を抑制する効果が大きくなかった。しかし、金属イオンがない場合と比較して、ニッケル金属イオンがある場合、システインのアルキル化速度が低下することが確認された。亜鉛金属イオンと結合した HR-M2 (Cys) に強い金属イオンキレータである EDTA を添加して亜鉛金属イオンを除去した場合、システインのアルキル化は金属イオンがない場合と同様にアルキル化反応が早く起きることを観察した。

【 0 0 9 9 】

#### 実施例 6：試験管内細胞増殖抑制能試験

##### 6.1：ドキシソルピシンと修飾抗体複合体の細胞増殖抑制能

BT-474 細胞を 10% FBS が添加された DMEM / F12 培地に希釈して  $1 \times 10^4$  個 / ウェルになるように調整した後、100  $\mu$ L 細胞培養物を 96-ウェルプレートの各ウェルに播種した。播種後、ウェルプレートを 5% 二酸化炭素及び 37 と設定された培養器で 24 時間培養して細胞をプレートに付着させた。ハーセプチン、ハーセプチンとドキシソルピシンの 1 : 2 混合物、前記実施例で製造された HR-Cys-DOX、そしてドキシソルピシンを培地に希釈した後、100  $\mu$ L / ウェルで終濃度 1000 nM、100 nM、10 nM、1 nM 及び 0.1 nM になるように添加し、それと共に対照群ウェルには培地のみ (薬物なし) 添加した。5 日間培養後に、20  $\mu$ L / ウェルで Cell Titer 96 - Aqueous One Solution 試薬 [MTS - 基礎検定; 生き

ている細胞のデヒドロゲナーゼ (dehydrogenase) により MTS が紫色ホルマザン (formazan) を形成して、生成された紫色ホルマザンの量によって増殖測定] を添加した後、37 と設定された培養器で 2 時間培養した。10% SDS 溶液を 20  $\mu$ L / ウェル添加して反応を終了させた後、十分混合して細胞溶菌を誘導した。細胞溶菌を吸光分析器で測定し、細胞生存率 (viability) (%) として図 5 にグラフでしめした。その結果、低濃度で処理した時は、HR-Cys-DOX の細胞成長抑制効果は、ハーセプチン、そしてハーセプチンとドキシソルピシンの 1 : 2 混合物の効果と類似して示され、高濃度ではドキシソルピシンと類似する細胞毒性を示した。この結果から、HR-Cys-DOX は、ハーセプチン固有の機能を維持すると同時に第 2 リンカーと連結されて、ハーセプチンに結合して

【 0 1 0 0 】

##### 6.2：MMAE と修飾抗体複合体の細胞増殖抑制能

SK-BR3 細胞を 10% FBS が添加された DMEM / F12 培地に希釈して  $1 \times 10^4$  個 / ウェル (well) になるように調整した後、100  $\mu$ L 細胞培養物を 96-ウェルプレートの各ウェルに加えた。以後ウェルプレートを 5% 二酸化炭素及び 37 と設定された培養器で 24 時間培養して細胞をプレートに付着させた。ハーセプチンと前記例で製造したハーセプチン変異抗体-MC-vc-PAB-MMAE 複合体を培地に希釈した後、最終濃度 66.7 nM、33.3 nM、6.7 nM、3.3 nM、0.67 nM、0.33 nM、0.067 nM、及び 0.0067 nM となるように添加し、それと共に対照

群ウェルには培地のみ（薬物なし）添加した。5日間培養後、20 $\mu$ L/ウェルでCell Titer 96 - Aqueous One Solution 試薬 [MTS - 基礎検定；生きている細胞のデヒドロゲナーゼによりMTSが紫色ホルマザンを形成して、生成された紫色ホルマザンの量によって増殖測定]を添加した後、37 $^{\circ}$ Cと設定された培養器で2時間培養した。細胞溶菌を吸光分析器でO.D.490nmで測定して細胞生存率（%）を測定した。HR - Cys - MC - vc - PAB - MMAE、HR - Cys - Gly - Cys - MC - vc - PAB - MMAE、HR - M2 (Cys) - MC - vc - PAB - MMAE、HR - M (Cys) - MC - vc - PAB - MMAE、HR - M2L (Cys) - MC - vc - PAB - MMAE、HR - Z (Cys) - MC - vc - PAB - MMAE 共に親抗体であるハーセプチンに比べて優秀な細胞増殖抑制能を見せた。図6に示したように、HR - M2 (Cys) - MC - vc - PAB - MMAEは親抗体であるハーセプチンに比べてIC50値は5倍以上（ハーセプチンは細胞生存率が50%以下に低下しなかった）、細胞生存率最大値と最小値の中間値を取った）減少して、高濃度での細胞毒性は、抗体 - 薬物複合体が約85%が減少するのに比べて親抗体であるハーセプチンは、約40%だけ減少することが示された。これから抗体 - 薬物複合体が親抗体に比べて非常に優秀な細胞毒性とIC50値を示すことが分かった。

10

#### 【0101】

#### 実施例7：試験管内Caspase 3/7活性測定試験

SK - BR - 3細胞を10% FBSが添加されたRPMI 1640培地に希釈して1 $\times$ 10<sup>4</sup>個/ウェルになるように調整した後、100 $\mu$ L細胞培養物を96 - ウェルプレートの各ウェルに加えた。以後ウェルプレートを5%二酸化炭素及び37 $^{\circ}$ Cと設定された培養器で24時間培養して細胞をプレートに付着させた。ハーセプチンと前記実施例で製造された抗体変異体 - 薬物複合体を培地に希釈した後、終濃度66.7nM、33.3nM、6.7nM、3.3nM、0.67nM、0.33nM、0.067nM及び0.0067nMになるように添加し、それと共に対照群ウェルには培地のみ（薬物なし）添加した。48時間培養後、100 $\mu$ L/ウェルでCaspase - Glo 3/7 試薬 [Caspase - Glo 3/7 検定；カスパーゼパスウェイ (Caspase pathway) を介してアポトーシスが進行される細胞で形成されたカスパーゼ3、7の活性によってカスパーゼ気質が分解されて、発光する程度を測定]を添加した後、室温で30分間培養した。発光をルミノメーター (luminometer) で測定した。

20

30

#### 【0102】

その結果、図7に示された通り親抗体であるハーセプチンを処理した細胞ではカスパーゼ活性がほとんど現れないが、HR - Cys 2 - MMAE 処理細胞は、濃度が増加するほどカスパーゼ3と7の活性が高く現れることが示された。この結果から、HR - Cys 2 - MMAE は、ハーセプチンとは異なって、細胞内に輸送されたHR - Cys 2 - MMAE から遊離したMMAE薬物がカスパーゼパスウェイを介してアポトーシスを起こすことを確認することができた。

#### 【0103】

また、図8に示された通り親抗体であるハーセプチンを処理した細胞ではカスパーゼ活性がほとんど現れなかったが、HR - M2 (Cys) - MC - vc - PAB - MMAE 処理細胞は濃度が増加するほどカスパーゼ3と7の活性が高く現れることが示された。この結果から、HR - M2 (Cys) - MC - vc - PAB - MMAE は、ハーセプチンとは異なって細胞内に輸送されたHR - M2 (Cys) - MC - vc - PAB - MMAE から遊離したMMAE薬物がカスパーゼパスウェイを介してアポトーシスを起こすことを確認することができた。

40

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0104】

本発明に係る修飾抗体及びこれを含む修飾抗体 - 薬物複合体は、抗原に対する高い特異性によりターゲット細胞に薬物を正確に伝達できて、治療効果が高められ、高い効果にもかかわらず毒性により使用が制限的な薬物、特に抗癌剤などの活用度を向上することがで

50

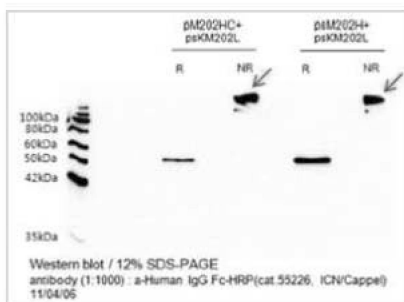


なる。

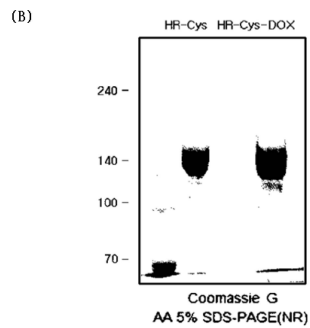
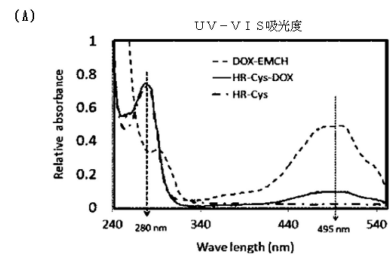
【 図 1 】



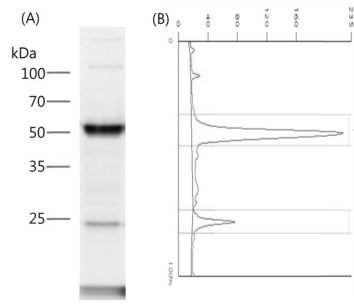
【 図 2 】



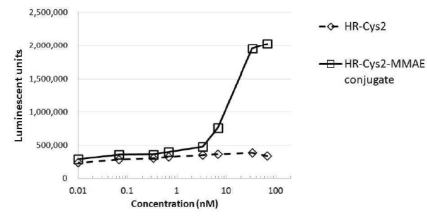
【 図 3 】



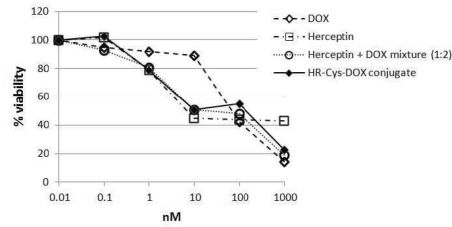
【 図 4 】



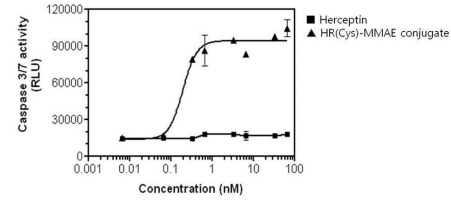
【 図 7 】



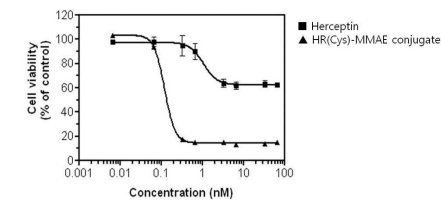
【 図 5 】



【 図 8 】



【 図 6 】



【 配列表 】

0006067754000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	31/519 (2006.01)	A 6 1 K	31/519	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	31/4745 (2006.01)	A 6 1 K	31/4745	
A 6 1 K	31/132 (2006.01)	A 6 1 K	31/132	
A 6 1 K	31/175 (2006.01)	A 6 1 K	31/175	
A 6 1 K	31/7048 (2006.01)	A 6 1 K	31/7048	
A 6 1 K	31/52 (2006.01)	A 6 1 K	31/52	
A 6 1 K	31/7034 (2006.01)	A 6 1 K	31/7034	
A 6 1 K	31/122 (2006.01)	A 6 1 K	31/122	
A 6 1 K	31/704 (2006.01)	A 6 1 K	31/704	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

- (72)発明者 パク スンジェ  
大韓民国, 3 0 5 - 7 5 9 , テジョン, ユソン - グ, ハギ - ドン, ソンリム マウル アパートメント, 6 0 4 - 1 0 0 2
- (72)発明者 チョン ヘシン  
大韓民国, 3 0 5 - 7 5 9 , テジョン, ユソン - グ, ハギ - ドン, ソンリム マウル アパートメント, 6 0 4 - 1 0 0 2
- (72)発明者 クォン ソヌン  
大韓民国, 1 3 8 - 7 8 8 , ソウル, ソンパ - グ, オリユン - ドン, オリンピック ソンスチョン アpartment, 3 1 2 - 1 3 0 1
- (72)発明者 イ ソンベ  
大韓民国, 3 0 5 - 7 6 2 , テジョン, ユソン - グ, チョンミン - ドン, エクスポ アpartment, 5 1 0 - 4 0 3
- (72)発明者 ユ ソンア  
大韓民国, 3 0 5 - 7 9 5 , テジョン, ユソン - グ, ヨンサン - ドン, 7 2 5 , プルジオ ハイム アpartment, 2 0 4 - 7 0 2
- (72)発明者 キム ヨンモ  
大韓民国, 5 8 0 - 7 5 1 , チョルラブク - ト, チョンウブ - シ, サン - ドン, ヒョンデ 1 - チャ アpartment, 1 0 5 - 1 0 0 4

審査官 田中 晴絵

- (56)参考文献 特表2008-516896(JP,A)  
特表2010-526821(JP,A)  
特表2011-504460(JP,A)  
国際公開第2008/140538(WO,A1)  
国際公開第96/000087(WO,A1)  
国際公開第2011/156328(WO,A1)  
Protein Engineering, Design & Selection, 2008年, Vol.21, No.8, p.495-505

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C A p l u s / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )