

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-524640
(P2019-524640A)

(43) 公表日 令和1年9月5日(2019.9.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4C076
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4C084
A61K 47/68 (2017.01)	A61K 47/68	4C085
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	4C086
A61K 38/05 (2006.01)	A61K 39/395 N	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-559715 (P2018-559715)
 (86) (22) 出願日 平成29年5月12日 (2017.5.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年11月30日 (2018.11.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/032357
 (87) 国際公開番号 W02017/197234
 (87) 国際公開日 平成29年11月16日 (2017.11.16)
 (31) 優先権主張番号 62/335,719
 (32) 優先日 平成28年5月13日 (2016.5.13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/447,218
 (32) 優先日 平成29年1月17日 (2017.1.17)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 518067179
 バイオアトラ、エルエルシー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
 121 サン ディエゴ トーレーナ
 ロード 11085 스위트 100
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 ショート ジェイ エム
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
 014 デル マー ピア エスペリア
 12985
 (72) 発明者 チャング フウェイ ウェン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
 069 サン マルコス シャドウ ヒル
 ズ ドライブ 1318
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗Ror2抗体、抗体断片、それらの免疫コンジュゲートおよびそれらの使用

(57) 【要約】

Ror2タンパク質に特異的に結合する重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を有するポリペプチドならびにRor2タンパク質に結合する重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含有する抗体および抗体断片。ポリペプチドまたはポリペプチドを含有する抗体および抗体断片を含む医薬組成物およびキットも提供される。

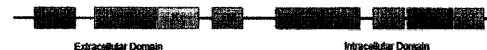


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

R o r 2 タンパク質に特異的に結合する単離ポリペプチドであって、3つの相補性決定領域を含む重鎖可変領域を含み、前記領域は、H 1、H 2、およびH 3配列を有し、

(a) 前記H 1配列は、G Y T X₁ T E X₂ X₃ X₄ H (配列番号1) またはG Y S I T T G X₂₉ Y W N (配列番号4) であり；

(b) 前記H 2配列は、X₅ X₆ X₇ X₈ N N G G T G Y N Q K F K G (配列番号2) またはY I T Y D G S X₃₀ N Y N P S L K N (配列番号5) であり；

(c) 前記H 3配列は、X₉ X₁₀ X₁₁ S X₁₂ Y X₁₃ Y X₁₄ X₁₅ S Y F X₁₆ X₁₇ X₁₈ (配列番号3) またはC S X₃₁ X₃₂ X₃₃ X₃₄ V X₃₅ X₃₆ X₃₇ L D X₃₈ (配列番号6) であり；

X₁は、FまたはEであり、

X₂は、YまたはDであり、

X₃は、TまたはCであり、

X₄は、MまたはDまたはEまたはYであり、

X₅は、GまたはSであり、

X₆は、IまたはEであり、

X₇は、NまたはCまたはLまたはVであり、

X₈は、TまたはDまたはEであり、

X₉は、AまたはMまたはTであり、

X₁₀は、RまたはHであり、

X₁₁は、GまたはEであり、

X₁₂は、LまたはFであり、

X₁₃は、SまたはGであり、

X₁₄は、GまたはDであり、

X₁₅は、NまたはEであり、

X₁₆は、DまたはLであり、

X₁₇は、YまたはCまたはTであり、

X₁₈は、WまたはLであり、

X₂₉は、YまたはEまたはRまたはTであり、

X₃₀は、KまたはNであり、

X₃₁は、RまたはGまたはHまたはWまたはYであり、

X₃₂は、FまたはCまたはNまたはQであり、

X₃₃は、EまたはSであり、

X₃₄は、GまたはEまたはFまたはHまたはMまたはQまたはSであり、

X₃₅は、WまたはAまたはIまたはPまたはQまたはTまたはVであり、

X₃₆は、YまたはGまたはNまたはQであり、

X₃₇は、GまたはSまたはTであり、

X₃₈は、YまたはIである、

単離ポリペプチド。

【請求項 2】

前記重鎖可変領域が、配列番号18～26の配列から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

3つの相補性決定領域L 1、L 2、およびL 3配列を含み、

(a) 前記L 1配列は、S A T S S X₁₉ X₂₀ X₂₁ M X₂₂ (配列番号7) またはR A S E S V D R Y G N S X₃₉ I H (配列番号10) であり；

(b) 前記L 2配列は、X₂₃ T S N L A S (配列番号8) またはX₄₀ T Y X₄₁ L E S (配列番号11) であり；

(c) 前記L 3配列は、Q X₂₄ X₂₅ S X₂₆ Y P F X₂₇ X₂₈ (配列番号9) またはQ Q X₄₂ N X₄₃ D P X₄₄ T X₄₅ (配列番号12) であり；

10

20

30

40

50

X_{19} は、V または E であり、
 X_{20} は、S または D であり、
 X_{21} は、Y または C または D であり、
 X_{22} は、H または G または L であり、
 X_{23} は、G または C または H または P であり、
 X_{24} は、Q または E であり、
 X_{25} は、R または H であり、
 X_{26} は、S または D または G または I または Q または V であり、
 X_{27} は、T または D であり、
 X_{28} は、F または D または E であり、
 X_{39} は、F または S または T であり、
 X_{40} は、R または C または D または E または W であり、
 X_{41} は、N または D であり、
 X_{42} は、T または I または P であり、
 X_{43} は、E または V であり、
 X_{44} は、W または T であり、
 X_{45} は、F または T である、

10

単離軽鎖可変領域との組合せの、請求項 1 または 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記軽鎖可変領域が、配列番号 13 ~ 17 および 27 から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 3 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 5】

前記 X_{29} が、Y である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記 X_{29} が、E である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

R or 2 タンパク質に特異的に結合する単離ポリペプチドであって、L1、L2、および L3 配列を有する 3 つの相補性決定領域を含む軽鎖可変領域を含み、

(a) 前記 L1 配列は、S A T S S X_{19} X_{20} X_{21} M X_{22} (配列番号 7) または R A S E S V D R Y G N S X_{39} I H (配列番号 10) であり；

30

(b) 前記 L2 配列は、 X_{23} T S N L A S (配列番号 8) または X_{40} T Y X_{41} L E S (配列番号 11) であり；

(c) 前記 L3 配列は、Q X_{24} X_{25} S X_{26} Y P F X_{27} X_{28} (配列番号 9) または Q Q X_{42} N X_{43} D P X_{44} T X_{45} (配列番号 12) であり；

X_{19} は、V または E であり、
 X_{20} は、S または D であり、
 X_{21} は、Y または C または D であり、
 X_{22} は、H または G または L であり、
 X_{23} は、G または C または H または P であり、
 X_{24} は、Q または E であり、
 X_{25} は、R または H であり、
 X_{26} は、S または D または G または I または Q または V であり、
 X_{27} は、T または D であり、
 X_{28} は、F または D または E であり、
 X_{39} は、F または S または T であり、
 X_{40} は、R または C または D または E または W であり、
 X_{41} は、N または D であり、
 X_{42} は、T または I または P であり、
 X_{43} は、E または V であり、
 X_{44} は、W または T であり、

40

50

X_{45} は、FまたはTである、
単離ポリペプチド。

【請求項 8】

前記軽鎖可変領域が、配列番号 13 ~ 17 および 27 から選択される DNA 配列によりコードされる、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

前記軽鎖可変領域が、配列番号 10 ~ 12 の配列をそれぞれ有する 3 つの相補性決定領域 L1、L2、および L3 を含む、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の単離重鎖可変領域ポリペプチドを含む抗 Ror2 抗体または抗体断片

10

【請求項 11】

3 つの相補性決定領域 L1、L2、および L3 配列を含み、

(a) 前記 L1 配列は、S A T S S X_{19} X_{20} X_{21} M X_{22} (配列番号 7) または R A S E S V D R Y G N S X_{39} I H (配列番号 10) であり；

(b) 前記 L2 配列は、 X_{23} T S N L A S (配列番号 8) または X_{40} T Y X_{41} L E S (配列番号 11) であり；

(c) 前記 L3 配列は、Q X_{24} X_{25} S X_{26} Y P F X_{27} X_{28} (配列番号 9) または Q Q X_{42} N X_{43} D P X_{44} T X_{45} (配列番号 12) であり；

X_{19} は、VまたはEであり、

20

X_{20} は、SまたはDであり、

X_{21} は、YまたはCまたはDであり、

X_{22} は、HまたはGまたはLであり、

X_{23} は、GまたはCまたはHまたはPであり、

X_{24} は、QまたはEであり、

X_{25} は、RまたはHであり、

X_{26} は、SまたはDまたはGまたはIまたはQまたはVであり、

X_{27} は、TまたはDであり、

X_{28} は、FまたはDまたはEであり、

X_{39} は、FまたはSまたはTであり、

30

X_{40} は、RまたはCまたはDまたはEまたはWであり、

X_{41} は、NまたはDであり、

X_{42} は、TまたはIまたはPであり、

X_{43} は、EまたはVであり、

X_{44} は、WまたはTであり、

X_{45} は、FまたはTである、

単離軽鎖可変領域をさらに含む、請求項 10 に記載の抗体または抗体断片。

【請求項 12】

腫瘍微小環境中の条件の値において、非腫瘍微小環境中で生じる同一条件の異なる値と比較して Ror2 タンパク質に対する高い結合親和性を有する、請求項 10 または 11 に記載の抗体または抗体断片。

40

【請求項 13】

前記条件が、pH である、請求項 12 に記載の抗体または抗体断片。

【請求項 14】

前記腫瘍微小環境中の pH が、5.8 ~ 6.8 の範囲であり、前記非腫瘍微小環境中の pH が、7.0 ~ 7.6 の範囲である、請求項 13 に記載の抗体または抗体断片。

【請求項 15】

少なくとも約 1.5 : 1、少なくとも約 2 : 1、少なくとも約 3 : 1、少なくとも約 4 : 1、少なくとも約 5 : 1、少なくとも約 6 : 1、少なくとも約 7 : 1、少なくとも約 8 : 1、少なくとも約 9 : 1、少なくとも約 10 : 1、少なくとも約 20 : 1、少なくとも

50

約 30 : 1、少なくとも約 50 : 1、少なくとも約 70 : 1、または少なくとも約 100 : 1 の、腫瘍微小環境中の条件の値における R o r 2 タンパク質に対する結合親和性と、非腫瘍微小環境中の同一条件の異なる値における R o r 2 タンパク質に対する結合親和性との比を有する、請求項 10 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体または抗体断片。

【請求項 16】

キメラ抗体、多重特異的抗体、またはヒト化抗体である、請求項 10 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体または抗体断片。

【請求項 17】

請求項 10 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体または抗体断片を含む免疫コンジュゲート。

10

【請求項 18】

化学療法剤、放射性原子、細胞増殖抑制剤および細胞毒性剤から選択される少なくとも 1 つの薬剤を含む、請求項 17 に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 19】

少なくとも 2 つの前記薬剤を含む、請求項 18 に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 20】

前記抗体または抗体断片および少なくとも 1 つの薬剤が、リンカー分子に共有結合している、請求項 18 または 19 に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 21】

前記少なくとも 1 つの薬剤が、メイタンシノイド、アウリスタチン、ドラスタチン、カリケマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、およびアントラサイクリンから選択される、請求項 18 ~ 20 のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

20

【請求項 22】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 10 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗体断片、または請求項 14 ~ 18 のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート；および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

【請求項 23】

等張化剤をさらに含む、請求項 22 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 24】

請求項 22 または 23 に記載の医薬組成物を、癌を有する患者に投与するステップを含む、癌を治療する方法。

【請求項 25】

診断または治療用キットであって、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 10 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗体断片、または請求項 17 ~ 21 のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート、または請求項 22 もしくは 23 に記載の医薬組成物ならびに前記抗体もしくは抗体断片、前記免疫コンジュゲートおよび/または前記医薬組成物を診断または治療に使用するための説明書を含むキット。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本開示は、抗 R o r 2 抗体、抗体断片ならびにそのような抗体および抗体断片の免疫コンジュゲートならびに診断および治療方法における抗体、抗体断片および免疫コンジュゲートの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

受容体チロシンキナーゼ (R T K) は、リガンド制御チロシンキナーゼ活性を介して一連の正常な細胞プロセスを調節する細胞表面受容体のファミリーである。過去 20 年間にわたり、R T K の機能不全は、癌の発生および進行において重要な役割を果たすことが示

50

されている。R TKは、目下、予後診断分子バイオマーカーとして、および癌治療薬の標的として認識されている。

【0003】

Ror2は、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体2とも呼ばれ、正常な骨および軟骨発生の間にWnt5A糖タンパク質とのその会合を介して非カノニカルWntシグナリングにより活性化される膜結合R TKである。Ror2は、その細胞外および細胞内ドメインを離隔する1つのみの膜貫通ドメインを有する(図1)。Ror2は、種々の器官および組織の正常な発生において重要な役割を果たすことが公知である。哺乳動物において、Ror2およびWnt5A欠損マウスは、発生形態の間に類似の異常を示し、収斂伸長運動および平面内細胞極性におけるそれらの欠陥を反映する。さらに、ヒトRor2 10
遺伝子の突然変異は、遺伝的骨格障害の優性短指症B型および劣性ロビノウ症候群の原因である。Ror2は、極性化細胞遊走を媒介し、Ror2の機能異常は遺伝性骨格障害および腫瘍侵入をもたらすことが見出されている(Minami et al., "Ror-family receptor tyrosine kinases in non-canonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases," Dev Dyn., vol. 239, pp. 1-15, 2010)。

【0004】

Ror2は、腫瘍促進効果を有することも報告されている。米国特許出願公開第2014/0322234号明細書は、種々の癌におけるRor2の発現および活性が正常組織と異なることを開示している。したがって、Ror2の機能不全が種々のヒト癌の病因における役割を果たすことが示唆される。米国特許出願公開第2014/0322234号 20
明細書は、Ror2に対する抗体を癌の診断および癌細胞成長の阻害において使用することができることも企図している。例えば、このような抗体は、細胞毒性剤が癌細胞を有効に殺傷し得るように、Ror2を発現する癌細胞についての高程度の細胞毒性を有する細胞毒性剤にコンジュゲートさせることができる。Ror2遺伝子は、癌におけるRor2発現パターンに従う癌の分類において使用することもできる。

【0005】

Ford et al. ("The dual role of the novel Wnt receptor tyrosine kinase, Ror2, in human carcinogenesis," International Journal of Cancer, vol. 133, pp. 779-787, 2013)は、癌発生におけるRor2の機序をさらに調査している。この参考文献は、Ror2が癌の発生および進行に 30
関与することを開示している。具体的には、Ror2は、多数の癌、例として、結腸癌、肝細胞癌、転移性黒色腫および腎細胞癌の癌発生において肝要な役割を果たすことが見出されている。例えば、Ror2は、骨肉腫、黒色腫、腎細胞癌、前立腺癌、頭頸部の扁平上皮癌および間質腫瘍において過剰発現される。したがって、Ror2は、Wntシグナリング経路の阻害による癌治療のための薬物標的である潜在性を有する。

【0006】

さらに、Debebe et al., ("Ror2 as a therapeutic target in cancer," Pharmacol. Ther., vol. 50, pp. 143-148, 2015)は、Ror2がカノニカルおよび非カノニカルシグナリング経路の両方を媒介することを開示している。Ror2は、骨肉腫および腎細胞癌において、ならびに黒色腫、結腸癌、頭頸部の扁平上皮癌、および乳癌において高度に発現される。これらの癌タイプの大多数において、Ror2発現は、より侵襲的な癌状態に関連する。したがって、この参考文献も、Ror2が癌治療のための潜在的な標的であることを示唆している。 40

【0007】

Ror2に対するモノクローナル抗体は市販されているが、癌治療法に好適な抗Ror 50

2抗体は報告されていない。本発明は、治療および診断的使用に、特に癌の診断および治療に好適な抗Ror2抗体または抗体断片を提供する。抗Ror2抗体または抗体断片の一部は、正常組織中に存在するRor2と比較して高い腫瘍中のRor2に対する結合親和性を有する。本発明のこれらの抗Ror2抗体または抗体断片は、当分野において公知のモノクローナル抗Ror2抗体と比較して少なくとも同等の効力および長い半減期を有するが、低減した副作用を有する。これは、これらの抗Ror2抗体または抗体断片のより高い投与量の使用を許容し得、したがって、対応する顕著な副作用を増加させずに、より有効な治療選択を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0008】

一態様において、本発明は、Ror2タンパク質に特異的に結合する単離重鎖可変領域ポリペプチドを提供する。ポリペプチドは、3つの相補性決定領域H1、H2、およびH3配列を含み、

H1配列は、GYTX₁TEX₂X₃X₄H（配列番号1）またはGYSTITGX₂₉YWN（配列番号4）であり；

H2配列は、X₅X₆X₇X₈NNGGTGYNQKFKG（配列番号2）またはYITYDGSX₃₀NYNPSLKN（配列番号5）であり；

H3配列は、X₉X₁₀X₁₁SX₁₂YX₁₃YX₁₄X₁₅SYFX₁₆X₁₇X₁₈（配列番号3）またはCSX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄VX₃₅X₃₆X₃₇LDX₃₈（配列番号6）であり；

20

X₁は、FまたはEであり、

X₂は、YまたはDであり、

X₃は、TまたはCであり、

X₄は、MまたはDまたはEまたはYであり、

X₅は、GまたはSであり、

X₆は、IまたはEであり、

X₇は、NまたはCまたはLまたはVであり、

X₈は、TまたはDまたはEであり、

X₉は、AまたはMまたはTであり、

X₁₀は、RまたはHであり、

30

X₁₁は、GまたはEであり、

X₁₂は、LまたはFであり、

X₁₃は、SまたはGであり、

X₁₄は、GまたはDであり、

X₁₅は、NまたはEであり、

X₁₆は、DまたはLであり、

X₁₇は、YまたはCまたはTであり、

X₁₈は、WまたはLであり、

X₂₉は、YまたはEまたはRまたはTであり、

X₃₀は、KまたはNであり、

40

X₃₁は、RまたはGまたはHまたはWまたはYであり、

X₃₂は、FまたはCまたはNまたはQであり、

X₃₃は、EまたはSであり、

X₃₄は、GまたはEまたはFまたはHまたはMまたはQまたはSであり、

X₃₅は、WまたはAまたはIまたはPまたはQまたはTまたはVであり、

X₃₆は、YまたはGまたはNまたはQであり、

X₃₇は、GまたはSまたはTであり、

X₃₈は、YまたはIである。

【0009】

別の態様において、この単離重鎖可変領域ポリペプチドは、3つの相補性決定領域L1

50

、L 2、およびL 3配列を含み、

L 1配列は、S A T S S X₁₉ X₂₀ X₂₁ M X₂₂ (配列番号7)またはR A S E S V D R Y G N S X₃₉ I H (配列番号10)であり；

L 2配列は、X₂₃ T S N L A S (配列番号8)またはX₄₀ T Y X₄₁ L E S (配列番号11)であり；

L 3配列は、Q X₂₄ X₂₅ S X₂₆ Y P F X₂₇ X₂₈ (配列番号9)またはQ Q X₄₂ N X₄₃ D P X₄₄ T X₄₅ (配列番号12)であり；

X₁₉は、VまたはEであり、

X₂₀は、SまたはDであり、

X₂₁は、YまたはCまたはDであり、

X₂₂は、HまたはGまたはLであり、

X₂₃は、GまたはCまたはHまたはPであり、

X₂₄は、QまたはEであり、

X₂₅は、RまたはHであり、

X₂₆は、SまたはDまたはGまたはIまたはQまたはVであり、

X₂₇は、TまたはDであり、

X₂₈は、FまたはDまたはEであり、

X₃₉は、FまたはSまたはTであり、

X₄₀は、RまたはCまたはDまたはEまたはWであり、

X₄₁は、NまたはDであり、

X₄₂は、TまたはIまたはPであり、

X₄₃は、EまたはVであり、

X₄₄は、WまたはTであり、

X₄₅は、FまたはTである、

単離軽鎖可変領域と組み合わせられている。

【0010】

さらに別の態様において、本発明は、本発明の単離重鎖可変領域ポリペプチドを含む抗R o r 2抗体または抗体断片を提供する。

【0011】

さらに別の態様において、本発明は、場合により、化学療法剤、放射性原子、細胞増殖抑制剤および細胞毒性剤から選択される薬剤にコンジュゲートしている本発明の抗体または抗体断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【0012】

さらに別の態様において、本発明は、本発明のポリペプチド、抗体もしくは抗体断片、または免疫コンジュゲートを薬学的に許容可能な担体と一緒に含む医薬組成物を提供する。

【0013】

さらに別の態様において、本発明は、本発明のポリペプチド、抗体もしくは抗体断片、または免疫コンジュゲートを含む診断または治療のためのキットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】ヒトR o r 2タンパク質の構造の模式図である。このタンパク質は、細胞外ドメイン中のI g様ドメイン(I g)、フリズドまたはシステインリッチ(C R D)ドメイン、およびクリングル(K r)ドメインを含有する。細胞外および細胞内ドメインは、膜貫通(T M)ドメインにより離隔されている。細胞内ドメインは、セリン/トレオニン(S T)リッチドメインによりフランキングされているチロシンキナーゼ(T K)ドメインおよびプロリンリッチドメイン(P R)を含有する。

【図2A】本発明の抗R o r 2抗体の例示的な重鎖可変領域の配列アラインメントを示す。

【図2B】本発明の抗R o r 2抗体の例示的な重鎖可変領域の配列アラインメントを示す

10

20

30

40

50

。

【図3A】本発明の抗Ror2抗体の例示的な軽鎖可変領域の配列アラインメントを示す

。

【図3B】本発明の抗Ror2抗体の例示的な軽鎖可変領域の配列アラインメントを示す

。

【図4】実施例1に記載のとおり、本発明の抗Ror2抗体が凝集しないことを示すサイズ排除クロマトグラフを示す。

【図5】実施例1に記載のとおり、Ror2への結合についての本発明の抗Ror2抗体のpH依存的結合プロファイルを示す。

【図6A】実施例1に記載のとおり、表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイにより計測された本発明の条件的に活性な抗体のオンおよびオフ速度を示す。

10

【図6B】実施例1に記載のとおり、表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイにより計測された本発明の条件的に活性な抗体のオンおよびオフ速度を示す。

【図7A】実施例2に記載のとおり、本発明のパクリタキセルコンジュゲート抗Ror2抗体によるゼノグラフトマウスの処理の腫瘍体積に対する効果を示す。

【図7B】実施例2に記載のとおり、本発明のパクリタキセルコンジュゲート抗Ror2抗体によるゼノグラフトマウスの処理の腫瘍体積に対する効果を示す。

【図7C】実施例2に記載のとおり、本発明のパクリタキセルコンジュゲート抗Ror2抗体によるゼノグラフトマウスの処理の腫瘍体積に対する効果を示す。

【図8】pH滴定により計測された例示的な条件的に活性な抗体BAP048のpH依存的結合親和性を示す。

20

【図9】ヒト、カニクイザル、およびマウスのRor2タンパク質に対する条件的に活性な抗体BAP048の結合親和性を示す。

【図10】ヒトRor2を発現するHEK293細胞に対するモノメチルアウリスタチンE(MMAE)にコンジュゲートしている条件的に活性な抗体BAP048の細胞殺傷を示す。

【図11A】LCLC103H細胞に対するMMAEにコンジュゲートしている条件的に活性な抗体BAP048の細胞殺傷を示す。

【図11B】LCLC103H細胞に対するMMAEにコンジュゲートしている条件的に活性な抗体BAP048の細胞殺傷を示す。

30

【図11C】LCLC103H細胞に対するMMAEにコンジュゲートしている条件的に活性な抗体BAP048の細胞殺傷を示す。

【図12A】HT1080細胞に対するMMAEにコンジュゲートしている条件的に活性な抗体BAP048の細胞殺傷を示す。

【図12B】HT1080細胞に対するMMAEにコンジュゲートしている条件的に活性な抗体BAP048の細胞殺傷を示す。

【図12C】HT1080細胞に対するMMAEにコンジュゲートしている条件的に活性な抗体BAP048の細胞殺傷を示す。

【図13】MMAEにコンジュゲートしている条件的に活性な抗体BAP048を使用してLCLC103Hにより誘導されたマウス腫瘍の処理を示す。

40

【図14】異なるリンカーを介してMMAEにコンジュゲートしている条件的に活性な抗体BAP048を使用する、LCLC103Hにより誘導されたマウス腫瘍の処理を示す

。

【図15A】MMAEにコンジュゲートしている条件的に活性な抗体BAP048を使用する、HT1080またはMDA-MB-436によりそれぞれ誘導されるマウス腫瘍の処理を示す。

【図15B】MMAEにコンジュゲートしている条件的に活性な抗体BAP048を使用する、HT1080またはMDA-MB-436によりそれぞれ誘導されるマウス腫瘍の処理を示す。

【発明を実施するための形態】

50

【 0 0 1 5 】

定義

本明細書において提供される実施例の理解を容易にするため、ある高頻度で使用される用語を本明細書において定義する。

【 0 0 1 6 】

計測される量との関連で、本明細書において使用される用語「約」は、計測を行い、計測の目的および使用される計測装置の精度に見合うあるレベルのケアを実行する当業者により予測されるその計測される量の通常の変動を指す。特に示されない限り、「約」は、提供される値の + / - 10 % の変動を指す。

【 0 0 1 7 】

本明細書において使用される用語「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）との間の非共有結合相互作用の総計の強度を指す。特に示されない限り、本明細書において使用される「結合親和性」は、結合ペア（例えば、抗体および抗原）のメンバー間の 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 についての親和性は、一般に、解離定数 (K d) により表すことができる。親和性は、当分野において公知の一般的方法、例として、本明細書に記載のものにより計測することができる。結合親和性を計測するための具体的な説明および例示的な実施形態を以下に記載する。

10

【 0 0 1 8 】

本明細書において使用される用語「親和性成熟」は、変更を保有しない親抗体と比較して 1 つ以上の超可変領域 (H V R) 中の 1 つ以上の変更を有する抗体を指し、そのような変更は、抗原についての抗体の親和性の改善をもたらす。

20

【 0 0 1 9 】

本明細書において使用される用語「アミノ酸」は、アミノ基 (- - N H ₂) およびカルボキシル基 (- - C O O H) を好ましくは遊離基として、あるいは縮合後にペプチド結合の一部として含有する任意の有機化合物を指す。「20個の天然にコードされるポリペプチド形成アルファ-アミノ酸」は当分野において理解され、アラニン (a l a または A) 、アルギニン (a r g または R) 、アスパラギン (a s n または N) 、アスパラギン酸 (a s p または D) 、システイン (c y s または C) 、グルタミン酸 (g l u または E) 、グルタミン (g i n または Q) 、グリシン (g l y または G) 、ヒスチジン (h i s または H) 、イソロイシン (i l e または I) 、ロイシン (l e u または L) 、リジン (l y s または K) 、メチオニン (m e t または M) 、フェニルアラニン (p h e または F) 、プロリン (p r o または P) 、セリン (s e r または S) 、スレオニン (t h r または T) 、トリプトファン (t i p または W) 、チロシン (t y r または Y) 、およびバリン (v a l または V) を指す。

30

【 0 0 2 0 】

本明細書において使用される用語「抗体」は、インタクト免疫グロブリン分子、ならびに抗原のエピトープに結合し得る免疫グロブリン分子の断片、例えば、F a b、F a b'、(F a b') ₂、F v、および S C A 断片を指す。これらの抗体断片は、それらが由来する抗体の抗原（例えば、ポリペプチド抗原）に選択的に結合するいくらかの能力を保持し、当分野において周知の方法を使用して作製することができる（例えば、H a r l o w a n d L a n e 前掲参照）、以下にさらに記載される。抗体は、分取量の抗原を免疫親和性クロマトグラフィーにより単離するために使用することができる。このような抗体または抗体断片の種々の他の使用は、疾患（例えば、新生物形成）を診断および/または病期分類するため、ならびに疾患、例えば、新生物形成、自己免疫疾患、A I D S、心血管疾患、感染症などを治療するための治療用途のためのものである。キメラヒト様ヒトまたは完全ヒト抗体は、ヒト患者への投与に特に有用である。

40

【 0 0 2 1 】

F a b 断片は、抗体分子の一価抗原結合断片からなり、酵素パパイニンによる完全抗体分子の消化により、インタクト軽鎖および重鎖の一部からなる断片を生じさせて産生するこ

50

とができる。

【0022】

抗体分子の Fab' 断片は、完全抗体分子をペプシンにより処理し、次いで還元してインタクト軽鎖および重鎖の一部からなる分子を生じさせることにより得ることができる。2つの Fab' 断片は、この様式で処理される抗体分子ごとに得られる。

【0023】

抗体の (Fab')₂ 断片は、完全抗体分子を酵素ペプシンにより後続の還元なしで処理することにより得ることができる。(Fab')₂ 断片は、2つのジスルフィド結合により一緒に保持される2つの Fab' 断片の二量体である。

【0024】

Fv断片は、2つの鎖として発現される軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された断片として定義される。

【0025】

本明細書において使用される用語「抗体断片」は、インタクト抗体が結合する抗原に結合するインタクト抗体の一部を含むインタクト抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；直鎖抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv）および抗体断片から形成される多重特異的抗体が挙げられる。

【0026】

本明細書において使用される用語「抗Ror2抗体」、「Ror2抗体」および「Ror2に結合する抗体」は、抗体がRor2の標的化における診断および/または治療剤として有用であるように十分な親和性でRor2に結合し得る抗体を指す。一実施形態において、非関連非Ror2タンパク質への抗Ror2抗体の結合の程度は、例えば、放射性免疫アッセイ(RIA)により計測してRor2への抗体の結合の約10%未満である。ある実施形態において、Ror2に結合する抗体は、1μM、100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、または0.001nM（例えば、10⁻⁸M以下、例えば、10⁻⁸M~10⁻¹³M、例えば、10⁻⁹M~10⁻¹³M）の解離定数(K_d)を有する。ある実施形態において、抗Ror2抗体は、異なる種からのRor2間で保存されるRor2のエピトープに結合する。

【0027】

本明細書において使用される用語「結合」は、抗体の可変領域またはFvと、抗原との相互作用を指し、その相互作用は抗原上の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存する。例えば、抗体可変領域またはFvは、タンパク質全般ではなく特異的タンパク質構造を認識し、それに結合する。本明細書において使用される「特異的に結合すること(specifically binding)」または「特異的に結合すること(binding specifically)」は、抗体可変領域またはFvが、特定の抗原に、他のタンパク質よりも高頻度で急速に長い持続時間および/または大きな親和性で結合し、または会合することを意味する。例えば、抗体可変領域またはFvは、その抗原に、他の抗原に結合するよりも大きな親和性、アビディティで、急速に、および/または長い持続時間、特異的に結合する。別の例では、抗体可変領域またはFvは、細胞表面タンパク質（抗原）に、それが関連タンパク質もしくは他の細胞表面タンパク質に、または多反応性天然抗体により（すなわち、ヒトにおいて天然に見出される種々の抗原に結合することが公知の天然存在抗体により）一般に認識される抗原に結合するよりもかなり大きな親和性で結合する。しかしながら、「特異的に結合する」は、必ずしも排他的結合または別の抗原の非検出結合を要求せず、これは、用語「選択的結合」を意味する。一例において、抗原に結合する抗体可変領域またはFv（または他の結合領域）の「特異的結合」は、抗体可変領域またはFvが、100nM以下、例えば、50nM以下、例えば、20nM以下、例えば、15nM以下、または10nM以下、または5nM以下、2nM以下、または1nM以下の平衡定数(K_D)で抗原に結合することを意味する。

【0028】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される用語「癌」および「癌性」は、典型的には、無秩序な細胞成長/増殖を特徴とする哺乳動物における生理学的病態を指し、または説明する。癌の例としては、限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられる。このような癌のより特定の例としては、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化管癌、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーマ、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝細胞腫、白血病および他のリンパ球増殖性疾患、ならびに種々のタイプの頭頸部癌が挙げられる。

【0029】

本明細書において使用される用語「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」は、ある程度の異常細胞増殖に関連する障害を指す。一実施形態において、細胞増殖性障害は、癌である。

【0030】

本明細書において使用される用語「化学療法剤」は、癌の治療において有用な化合物を指す。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド（CYTOXAN（登録商標））；スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、イムプロスルファンおよびピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドパ、カルボクオン、メツレドパ（meturedopa）、およびウレドパ（uredopa）；エチレンジアミンおよびメチルアメラミン（methy lamelamine）、例として、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロメラミン（trimethylomelamine）；アセトゲニン（特に、プラタシンおよびプラタシノン）；デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））；ベータ-ラバコン；ラバコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（例として、合成類似体トポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPOTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン（scopolactin）、および9-アミノカンプトテシン）；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体を含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体のKW-2189およびCB1-TM1を含む）；エレウテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンピキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチン（ranimnustine）；抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシガンマIIおよびカリケアマイシンオメガII（例えば、Nicolaou et al., Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994) 参照）；CDP323、経口アルファ-4インテグリン阻害剤；ジネマイシン、例として、ジネマイシンA；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウストラマイシン（authramycin）、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン（carabycin）、カミノマイシン（caminomycin）、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン（例として、ADRIAMYCIN（登録商標））、モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、ドキシソルピシンHC1リボソーム注射剤（DOXIL（登録商標））、リボソ-

10

20

30

40

50

ムドキシソルピシンTLC D-99 (MYOCET (登録商標))、peg化リボソーム
ドキシソルピシン (CAELYX (登録商標))、およびデオキシドキシソルピシン)、エビ
ルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えば、
マイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシ
ン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン (que lamycin)
、ロドルピシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、
ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシン; 代謝拮抗物質、例えば、メ
トトレキサート、ゲムシタピン (GEMZAR (登録商標))、テガフル (UFTORA
L (登録商標))、カペシタピン (XELODA (登録商標))、エポチロン、および5
-フルオロウラシル (5-FU); 葉酸類似体、例えば、デノプテリン、メトトレキサート
、プテロプテリン、トリメトレキサート; プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-
メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン; ピリミジン類似体、例えば、アンシタ
ピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン
、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン; アンドロゲン、例えば、カルス
テロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタノール、テスト
ラクトン; 抗副腎剤、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン; 葉酸補給
剤、例えば、フロリン酸 (frolinic acid); アセグラトン; アルドホスフ
ァミドグリコシド; アミノレプリン酸; エニルウラシル; アムサクリン; ベストラブシル
; ビサントレン; エダトラキサート; デフォファミン; デメコルシン; ジアジクオン; エ
ルフォルミチン (elformithine); 酢酸エリブチニウム; エポチロン; エト
グルシド; 硝酸ガリウム; ヒドロキシウレア; レンチナン; ロニダイニン; メイタンシノ
イド、例えば、メイタンシンおよびアンサミトシン; ミトグアゾン; ミトキサントロン;
モピダンモール; ニトラエリン; ペントスタチン; フェナメット; ピラルピシン; ロソキ
サントロン; 2-エチルヒドラジド; プロカルバジン; PSK (登録商標) 多糖複合体 (JHS
Natural Products, Eugene, Oreg.); ラゾキサン
; リゾキシン; シゾフィラン; スピロゲルマニウム; テヌアゾン酸; トリアジクオン; 2
, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン (特に、T-2毒素、ペラ
クリンA、ロリジンAおよびアングイジン); ウレタン; ビンデシン (ELDISINE
(登録商標)、FILDESIN (登録商標)); ダカルバジン; マンノムスチン; ミト
プロニトール; ミトラクトール; ピボプロマン; ガシトシン; アラビノシド (「Ara-
C」); チオテパ; タキソイド、例えば、パクリタキセル (TAXOL (登録商標))、
パクリタキセルのアルブミンエンジニアリングナノ粒子配合物 (ABRAXANE (商標
))、およびドセタキセル (TAXOTERE (登録商標)); クロランブシル (chl
oranbucil); 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキサート; 白金
類似体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン (例えば、ELOXATIN (登録商
標))、およびカルボプラチン; チュープリン重合の微小管形成を妨害するピンカ、例と
して、ピンプラスチン (VELBAN (登録商標))、ピンクリスチン (ONCOVIN
(登録商標))、ビンデシン (ELDISINE (登録商標)、FILDESIN (登録
商標))、およびビノレルピン (NAVELBINE (登録商標)); エトポシド (VP
-16); イホスファミド; ミトキサントロン; ロイコポリン; ノバントロン; エダトレ
キサート; ダウノマイシン; アミノプテリン; イバンドロネート; トポイソメラーゼ阻害
剤RFS2000; ジフルオロメチルオルニチン (DMF (登録商標)); レチノイド、
例えば、レチノイン酸、例として、ベキサロテン (TARGRETIN (登録商標));
; ビスホスホネート、例えば、クロドロネート (例えば、BONEFOS (登録商標) また
はOSTAC (登録商標))、エチドロネート (DIDROCAL (登録商標))、N
E-58095、ゾレドロネート/ゾレドロネート (ZOMETA (登録商標))、アレ
ンドロネート (FOSAMAX (登録商標))、パミドロネート (AREDIA (登録商標
))、チルドロネート (SKELID (登録商標))、またはリセドロネート (ACTO
NELL (登録商標)); トロキサシタピン (1, 3-ジオキソランヌクレオシドシトシン
類似体); アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関するシグナリ

10

20

30

40

50

ング経路における遺伝子、例えば、PKC - アルファ、Raf、H - Ras、および上皮成長因子受容体 (EGF - R) などの発現を阻害するもの；ワクチン、例えば、THERATOPE (登録商標) ワクチンおよび遺伝子療法ワクチン、例えば、ALLOVECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワクチン、およびVAXID (登録商標) ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害剤 (例えば、LURTOTECAN (登録商標))；rmRH (例えば、ABARELIX (登録商標))；BAY439006 (ソラフェニブ；Bayer)；SU - 11248 (スニチニブ、SUTENT (登録商標)、Pfizer)；ペリフォシン、COX - 2 阻害剤 (例えば、セレコキシブまたはエトリコキシブ)、プロテオソーム阻害剤 (例えば、PS341)；ボルテゾミブ (VELCADE (登録商標))；CCI - 779；チピファルニブ (R11577)；オラフェニブ、ABT510；Bcl - 2 阻害剤、例えば、オブリメルセンナトリウム (GENASENSE (登録商標))；ピキサントロン；EGFR 阻害剤 (以下の定義参照)；チロシンキナーゼ阻害剤 (以下の定義参照)；セリン - トレオニンキナーゼ阻害剤、例えば、ラパマイシン (シロリムス、RAPAMUNE (登録商標))；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、例えば、ロナファルニブ (SCH6636、SARASAR (商標))；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体；ならびに上記の2つ以上の組合せ、例えば、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、およびプレドニゾロンの併用療法の省略形であるCHOP；および5 - FUおよびロイコポリンと組み合わせたオキサリプラチン (ELOXATIN (商標)) を用いる治療レジメンの省略形であるFOLFOXなどが挙げられる。

10

20

【0031】

本明細書において定義される化学療法剤としては、癌の成長を促進し得るホルモンの効果を調節し、低減させ、遮断し、または阻害するように作用する「抗ホルモン剤」または「内分泌治療薬」が挙げられる。これらは、ホルモンそれ自体であり得、例として、限定されるものではないが、混合アゴニスト/アンタゴニストプロファイルを有する抗エストロゲン剤、例として、タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標))、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン (FARESTON (登録商標))、イドキシフェン、ドロキシフェン、ラロキシフェン (EVISTA (登録商標))、トリオキシフェン、ケオキシフェン、および選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM)、例えば、SERM3；アゴニスト特性を有さない純抗エストロゲン剤、例えば、フルベストラント (FASLODEX (登録商標))、およびEM800 (このような薬剤は、エストロゲン受容体 (ER) 二量体化を遮断し、DNA 結合を阻害し、ER ターンオーバーを増加させ、および/またはER レベルを抑制し得る)；アロマターゼ阻害剤、例として、ステロイドアロマターゼ阻害剤、例えば、ホルメスタンおよびエキセメスタン (AROMASIN (登録商標))、および非ステロイドアロマターゼ阻害剤、例えば、アナストラゾール (anastrozole) (ARIMIDEX (登録商標))、レトロゾール (FEMARA (登録商標)) およびアミノグルテチミド、および他のアロマターゼ阻害剤、例として、ポロゾール (RIVISOR (登録商標))、酢酸メゲストロール (MEGASE (登録商標))、ファドロゾール、および4 (5) - イミダゾール；黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、例として、ロイプロリド (LUPRON (登録商標)) およびELIGARD (登録商標))、ゴセレリン、プセレリン、およびトリプテレリン；性ステロイド、例として、プロゲステロン、例えば、酢酸メゲストロールおよび酢酸メドロキシプロゲステロン、エストロゲン、例えば、ジエチルstilbestrol およびプレマリン、およびアンドロゲン/レチノイド、例えば、フルオキシメステロン、全てのトランスレチノイン酸およびフェンレチニド；オナプリストン；抗プロゲステロン剤；エストロゲン受容体下方調節剤 (ERD)；抗エストロゲン剤、例えば、フルタミド、ニルタミドおよびピカルタミド；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体；ならびに上記の2つ以上の組合せが挙げられる。

30

40

【0032】

本明細書において使用される用語「キメラ」抗体は、重鎖および/または軽鎖の一部が

50

特定の資源または種に由来する一方、重鎖および/または軽鎖の残部が異なる資源または種に由来する抗体を指す。

【0033】

本明細書において使用される用語、抗体の「クラス」は、その重鎖により保有される定常ドメインまたは定常領域のタイプを指す。5つの主要な抗体のクラス：I g A、I g D、I g E、I g G、およびI g Mが存在し、これらのいくつかはサブクラス（アイソタイプ）、例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、およびI g A₂にさらに分類することができる。異なる免疫グロブリンのクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、
、
、
、
、およびμと呼ばれる。

【0034】

本明細書において使用される用語「条件的に活性な抗体」は、腫瘍微小環境中の条件下で、非腫瘍微小環境中の条件下と比較して活性である抗体を指す。腫瘍微小環境中の条件としては、非腫瘍微小環境中の条件と比較して低いpH、高い濃度の乳酸塩および/またはピルビン酸塩、低酸素、低い濃度のグルコース、ならびにわずかに高い温度を挙げることができる。例えば、条件的に活性な抗体は、正常な体温において実質的に不活性であるが、腫瘍微小環境中のより高い温度において活性である。さらに別の態様において、条件的に活性な抗体は、正常な含酸素血液中では低活性であるが、腫瘍中に存在する低含酸素環境下では活性である。さらに別の態様において、条件的に活性な抗体は、正常な生理学的pH 7.2 ~ 7.8において低活性であるが、腫瘍微小環境中に存在する酸性pH 5.8 ~ 7.0、または6.0 ~ 6.8下でより活性である。当業者に公知の腫瘍微小環境中の他の条件が存在し、それらを抗Ror2抗体がRor2に対する異なる結合親和性を有する本発明における条件として使用することもできる。

【0035】

本明細書において使用される用語「構成的」は、例えば、Ror2活性に適用される場合、リガンドの存在にも他の活性化分子の存在にも依存的でない受容体キナーゼの連続的なシグナリング活性を指す。受容体キナーゼの性質に応じて、活性の全ては構成的であり得、または受容体の活性は、他の分子（例えば、リガンド）の結合によりさらに活性化され得る。受容体キナーゼの活性化をもたらす細胞イベントは、当業者の間で周知である。例えば、活性化としては、より高次の受容体複合体へのオリゴマー化、例えば、二量体化、三量体化などを挙げることができる。複合体は、単一種のタンパク質、すなわち、ホモ複合体を含み得る。あるいは、複合体は、少なくとも2つの異なるタンパク質種、すなわち、ヘテロ複合体を含み得る。複合体形成は、例えば、細胞の表面上の受容体の正常または突然変異形態の過剰発現により引き起こされ得る。複合体形成は、受容体中の1つ以上の特異的突然変異によっても引き起こされ得る。

【0036】

本明細書において使用される用語「細胞増殖抑制剤」は、インビトロまたはインビボのいずれかにおける細胞の成長を停止させる化合物または組成物を指す。したがって、細胞増殖抑制剤は、S期における細胞の割合を顕著に低減させるものであり得る。細胞増殖抑制剤のさらなる例としては、G0/G1停止またはM期停止を誘導することにより細胞周期進行を遮断する薬剤が挙げられる。ヒト化抗Her2抗体トラスツズマブ（HERCEPTIN（登録商標））は、G0/G1停止を誘導する細胞増殖抑制剤の一例である。古典的M期遮断剤としては、ピンカ（ピンクリスチンおよびピンブラスチン）、タキサン、およびトポイソメラーゼII阻害剤、例えば、ドキシソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、およびブレオマイシンが挙げられる。G1を停止させるある薬剤、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、およびara-CはS期停止にも波及する。さらなる情報は、Mendelsohn and IsraeI, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1、表題“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”、Murakami

10

20

30

40

50

et al. (W. B. Saunders, Philadelphia, 1995)、例えば、13頁に見出すことができる。タキサン（パクリタキセルおよびドセタキセル）は、両方ともイチイ由来する抗癌薬である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhône-Poulenc Rorer）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）の半合成類似体である。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管の集合を促進し、脱重合を妨害することにより微小管を安定させ、細胞の有糸分裂の阻害をもたらす。

【0037】

本明細書において使用される用語「細胞毒性剤」は、細胞機能を阻害もしくは妨害し、および/または細胞死もしくは破壊を引き起こす、物質を指す。細胞毒性剤としては、限定されるものではないが、放射性同位体（例えば、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²、およびLuの放射性同位体）；化学療法剤または化学療法薬（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）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他のインターカレート剤）；成長阻害剤；酵素およびその断片、例えば、核酸分解酵素；抗生物質；毒素、例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素活性毒素（それらの断片および/またはバリエーションを含む）；ならびに以下に開示される種々の抗腫瘍または抗癌剤が挙げられる。

10

20

【0038】

本明細書において使用される用語「ダイアボディ」は、断片が同一ポリペプチド鎖中の軽鎖可変ドメイン（V_L）に連結している重鎖可変ドメイン（V_H）（V_H-V_L）を含む2つの抗原結合部位を有する小分子抗体断片を指す。同一鎖上の2つのドメイン間の対合を許容し得ないほど短鎖のリンカーを使用することにより、ドメインを別の鎖の相補的ドメインと強制的に対合させ、それが2つの抗原結合部位を作出する。

【0039】

本明細書において使用される用語「検出可能に標識する」は、物理的または化学的手段による直接または間接的のいずれかの検出または計測が試料中のCTCの存在を示す任意の物質を指す。有用な検出可能標識の代表的な例としては、限定されるものではないが、以下のもの：光吸収、蛍光、反射、光散乱、燐光、または発光特性に基づき直接または間接的に検出可能な分子またはイオン；放射性により検出可能な分子またはイオン；核磁気共鳴または常磁性により検出可能な分子またはイオンが挙げられる。光吸収または蛍光に基づき間接的に検出可能な分子の群には、例えば、非光吸収から光吸収分子への、または非蛍光から蛍光分子への適切な基質の変換を引き起こす種々の酵素が含まれる。

30

【0040】

本明細書において使用される用語「診断」は、疾患または障害に対する対象の感受性の測定、対象が疾患または障害を現在罹患しているか否かに関する決定、疾患または障害を罹患している対象の予後診断（例えば、前転移または転移癌性状態、癌の病期、または治療法に対する癌の応答性の同定）、および治療方針（例えば、治療法の効果または効力に関する情報を提供するための対象病態のモニタリング）を指す。一部の実施形態において、本発明の診断方法は、早期癌の検出において特に有用である。

40

【0041】

本明細書において使用される用語「診断剤」は、直接または間接的に検出することができる、診断目的のために使用される分子を指す。診断剤は、対象または試料に投与することができる。診断剤は、それ自体で提供することができ、またはビヒクル、例えば、条件的に活性な抗体にコンジュゲートさせることができる。

【0042】

本明細書において使用される用語「エフェクター機能」は、抗体のFc領域に起因し、抗体アイソタイプにより変動する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例として

50

は、C1q結合および補体依存性細胞毒性(CDC)；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)、食作用、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方調節；ならびにB細胞活性化が挙げられる。

【0043】

本明細書において使用される用語、薬剤、例えば、医薬配合物の「有効量」は、投与量において、および必要な期間にわたり、所望の治療または予防結果を達成するために有効な量を指す。

【0044】

本明細書において使用される用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語は、天然配列Fc領域およびパリアントFc領域を含む。一実施形態において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から、またはPro230から重鎖のカルボキシル末端へと伸長する。しかしながら、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は、存在していてもしていなくてもよい。本明細書において特に規定されない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991に記載のとおりEUIンデックスとも呼ばれるEU番号付け系に従う。

10

【0045】

本明細書において使用される用語「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域(HVRまたは重鎖中のH1~3および軽鎖中のL1~3)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：FR1、FR2、FR3、およびFR4からなる。したがって、HVRおよびFR配列は、一般に、V_H(またはV_L)中の以下の配列：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4に出現する。

20

【0046】

用語「全長抗体」、「インタクト抗体」、または「完全抗体」は、抗原結合可変領域(V_HまたはV_L)ならびに軽鎖定常ドメイン(CL)および重鎖定常ドメインCH1、CH2およびCH3を含む抗体を指す。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)またはそのアミノ酸配列パリアントであり得る。重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、全長抗体は、異なる「クラス」に割り当てることができる。全長抗体の5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMが存在し、それらのいくつかは、「サブクラス」(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2にさらに分類することができる。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニットおよび三次元立体配置は周知である。

30

【0047】

本明細書において使用される用語「宿主細胞」、「宿主細胞系」、および「宿主細胞培養物」は互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含む。宿主細胞としては、「形質転換体」および「形質転換細胞」が挙げられ、それらとしては一次形質転換細胞および継代数に関係なくそれに由来する子孫が挙げられる。子孫は、核酸含有量が親細胞と完全に同一でなくてよく、突然変異を含有し得る。元の形質転換細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じの機能または生物学的活性を有する突然変異体子孫が、本明細書に含まれる。

40

【0048】

本明細書において使用される用語「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞により産生される抗体、またはヒト抗体のレパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト資源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を保有する抗体である。

50

ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

【0049】

本明細書において使用される用語「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V_LまたはV_Hフレームワーク配列の選択において、最も一般に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンV_LまたはV_H配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからのものである。一般に、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3におけるようなサブグループである。一実施形態において、V_Lについてのサブグループは、Kabat et al.、前掲におけるようなサブグループカップIである。一実施形態において、V_Hについてのサブグループは、Kabat et al.、前掲におけるようなサブグループIIIである。

10

【0050】

本明細書において使用される用語「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基およびヒトFRからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。ある実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、そのドメイン中ではHVR（例えば、CDR）の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、FRの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、場合により、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み得る。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

20

【0051】

本明細書において使用される用語「超可変領域」または「HVR」は、配列が超可变的であり、および/または構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの領域のそれぞれを指す。一般に、天然四鎖抗体は、6つのHVR；V_H中の3つ（H1、H2、H3）、およびV_L中の3つ（L1、L2、L3）を含む。HVRは一般に、超可変ループからの、および/または「相補性決定領域」（CDR）からのアミノ酸残基を含み、後者は配列変動性が最も高く、および/または抗原認識に關与する。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）、および96~101（H3）において生じる（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., vol. 196, pp. 901-917 1987）。例示的なCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3）は、L1のアミノ酸残基24~34、L2の50~56、L3の89~97、H1の31~35B、H2の50~65、およびH3の95~102において生じる（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1991）。V_H中のCDR1を除き、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」、または「SDR」も含む。SDRは、短縮型CDR、またはa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含有される。例示的なa-CDR（a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、およびa-CDR-H3）は、L1のアミノ酸残基31~34、L2の50~55、L3の89~96、H1の31~35B、H2の50~58、およびH3の95~102において生じる（Almagro and Fransson, Front. Biosci., vol. 13, pp. 1619-1633, 2008参照）。特に示されない限り、可変ドメイン中のHVR残基および他の残基（例えば、FR残基）は、本明細書においてKabat et al.、前掲に従って番号付けされる。

30

40

【0052】

50

本明細書において使用される用語「免疫コンジュゲート」は、(1つ以上の)異種分子、例として、限定されるものではないが、細胞毒性剤にコンジュゲートしている抗体である。

【0053】

本明細書において使用される用語「個体」または「対象」は、哺乳動物を指す。哺乳動物としては、限定されるものではないが、家畜動物(例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ)、霊長類(例えば、ヒトおよび非ヒト霊長類、例えば、サル)、ウサギ、およびげっ歯類(例えば、マウスおよびラット)が挙げられる。ある実施形態において、個体または対象は、ヒトである。

【0054】

本明細書において使用される用語「細胞成長または増殖を阻害する」は、細胞成長または増殖を、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%だけ減少させることを意味し、細胞死の誘導も含む。

【0055】

本明細書において使用される用語「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。一部の実施形態において、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)またはクロマトグラフィー(例えば、イオン交換または逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC))により測定して95%または99%超の純度まで精製される。抗体純度の評価方法の概説については、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B, vol. 848, pp. 79-87, 2007参照。

【0056】

本明細書において使用される用語「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。単離核酸は、通常核酸分子を含有する細胞中に含有される核酸分子を含むが、その核酸分子は、染色体外に、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0057】

本明細書において使用される用語「抗Ror2抗体をコードする単離核酸」は、抗体重鎖および軽鎖(またはそれらの断片)をコードする1つ以上の核酸分子を指し、単一のベクターまたは別個のベクター中のそのような核酸分子、および宿主細胞中の1つ以上の位置に存在するそのような核酸分子を含む。

【0058】

本明細書において使用される用語「リガンド非依存的」は、例えば、受容体シグナリング活性に適用される場合、リガンドの存在に依存的でないシグナリング活性を指す。リガンド非依存的キナーゼ活性を有する受容体は、必ずしも、キナーゼ活性の追加の活性化を産生するためのその受容体へのリガンドの結合を除外しない。

【0059】

本明細書において使用される用語「転移」は、癌細胞が原発腫瘍から分散し、リンパおよび/または血管中に浸透し、血流を介して循環し、体内の他箇所の正常組織中の遠位病巣中で成長する(転移)ことを支持する全てのRor2関与プロセスを指す。特に、これは、転移の基盤をなし、Ror2の非触媒または触媒活性、好ましくは、例としてRor2リン酸化および/またはRor2媒介シグナル伝達により刺激または媒介される腫瘍細胞の細胞イベント、例えば、増殖、遊走、足場非依存性、アポトーシスの回避、または血管新生因子の分泌を指す。

【0060】

本明細書において使用される用語「微小環境」は、組織の他の領域または身体の領域と恒常的または一時的な物理的または化学的差異を有する組織または身体の任意の一部または領域を意味する。腫瘍について、本明細書において使用される用語「腫瘍微小環境」は、腫瘍内の非細胞区域および腫瘍組織のすぐ外側の区域であるが、癌細胞自体の細胞内コ

10

20

30

40

50

ンパートメントに関連しない、腫瘍が存在する環境を指す。腫瘍および腫瘍微小環境は密接に関連しており、常に相互作用する。腫瘍はその微小環境を変化させ得、微小環境は、いかに腫瘍が成長し、拡散するかに影響を及ぼし得る。典型的には、腫瘍微小環境は、5.8~7.0の範囲、より一般には、6.0~6.8の範囲、6.2~6.8の範囲の低pHを有する。他方で、正常な生理学的pHは、7.2~7.8の範囲である。腫瘍微小環境は、血漿と比較して低濃度のグルコースおよび他の栄養素を有するが、高濃度の乳酸を有することも公知である。さらに、腫瘍微小環境は、正常の生理学的温度よりも0.3~1 高い温度を有し得る。腫瘍微小環境は、参照により全体として本明細書に組み込まれるGillies et al., "MRI of the Tumor Microenvironment," Journal of Magnetic Resonance Imaging, vol. 16, pp. 430-450, 2002に考察されている。用語「非腫瘍微小環境」は、腫瘍以外の部位における微小環境を指す。

10

【0061】

本明細書において使用される用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団をなす個々の抗体が同一であり、および/または同一のエピトープに結合するが、例えば、天然存在の突然変異を含有し、またはモノクローナル抗体調製物の産生中に生じる可能性のあるバリエーション抗体を除き、このようなバリエーションは一般に少量で存在する。異なる決定基(エピトープ)に対して指向される異なる抗体を典型的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物のそれぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。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の集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を要求するものとして解釈すべきではない。例えば、本発明に従って使用することができるモノクローナル抗体は、種々の技術、例として、限定されるものではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法により作製することができ、モノクローナル抗体を作製するこのような方法および他の例示的な方法は本明細書に記載されている。

20

【0062】

本明細書において使用される用語「裸抗体」は、異種部分(例えば、細胞毒性部分)にも放射性標識にもコンジュゲートしていない抗体を指す。裸抗体は、医薬配合物中に存在し得る。

30

【0063】

本明細書において使用される用語「天然抗体」は、変動する構造を有する天然存在の免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合している2本の同一軽鎖および2本の同一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末端にかけ、それぞれの重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(V_H)と、それに続く3つの定常ドメイン(CH1、CH2、およびCH3)を有する。同様に、N末端からC末端にかけ、それぞれの軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(V_L)と、それに続く定常軽鎖(C_L)ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づきカッパ(κ)およびラムダ(λ)と呼ばれる2つのタイプの一方に割り当てることができる。

40

【0064】

本明細書において使用される用語「添付文書」は、治療用製品の商品包装に通例含まれる説明書を指すために使用され、適応症、使用法、投与量、投与、併用療法、禁忌および/またはそのような治療用製品の使用に関する注意事項についての情報を含む。

【0065】

本明細書において使用される用語、参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列をアラインし、最大のパーセント配列同一性を達成するために必要であれば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

50

て考慮しない、参照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割合として定義される。パーセントアミノ酸配列同一性決定の目的のためのアラインメントは、当分野の技能の範囲内である種々の手法で、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またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアを使用して達成することができる。当業者は、配列をアラインするための適切なパラメータ、例として、比較される配列の全長にわたり最大のアラインメントを達成するのに必要な任意のアルゴリズムを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のため、%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を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.により著作され、ソースコードは、U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559に利用者向け文書とともに申請されており、米国著作権登録番号TXU510087のもと登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Calif.から公的に利用可能であり、また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、UNIXオペレーティングシステム、例として、デジタルUNIX(登録商標)V4.0D上での使用のためにコンパイルすべきである。全ての配列比較パラメータはALIGN-2プログラムにより設定され、変動しない。

10

【0066】

アミノ酸配列比較にALIGN-2を用いる状況において、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bへの、所与のアミノ酸配列Bとの、または所与のアミノ酸配列Bに対する%アミノ酸配列同一性(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、または所与のアミノ酸配列Bに対する、ある%アミノ酸配列同一性を有し、または含む所与のアミノ酸配列Aと代替表現することもできる)は、以下のとおり算出される

20

:

分数(X/Y)の100倍

(式中、Xは、配列アラインメントプログラムALIGN-2によりAおよびBのそのプログラムのアラインメントにおいて同一マッチとしてスコアリングされたアミノ酸残基数であり、Yは、B中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の長さとは等しくない場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性と等しくないことが認識される。特に具体的に記述されない限り、本明細書において使用される全ての%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のとおり得られる。

30

【0067】

本明細書において使用される用語「医薬配合物」は、その中に含有される活性成分の生物学的活性の有効性を許容するような形態であり、配合物が投与される対象に許容不可能な毒性を示す追加の構成成分を含有しない製剤を指す。

【0068】

本明細書において使用される用語「薬学的に許容可能な担体」は、対象に非毒性である、活性成分以外の医薬配合物中の成分を指す。薬学的に許容可能な担体としては、限定されるものではないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、または保存剤が挙げられる。

40

【0069】

本明細書において使用される用語「精製」および「単離」は、示される分子が同一タイプの他の生物巨大分子の実質的不存在下で存在する本発明による抗体、またはヌクレオチド配列を指す。本明細書において使用される用語「精製」は、好ましくは、少なくとも75重量%、より好ましくは、少なくとも85重量%、いっそうより好ましくは、少なくとも95重量%、最も好ましくは、少なくとも98重量%の同一タイプの生物巨大分子が存在することを意味する。特定のポリペプチドをコードする「単離」核酸分子は、ポリペプチドをコードしない他の核酸分子を実質的に有さず、核酸分子を指し;しかしながら、分子は、組成物の基本的特徴に悪影響を及ぼさない一部の追加の塩基または部分を含み得る

50

。

【0070】

本明細書において使用される用語「組換え抗体」は、抗体をコードする核酸を含む組換え宿主細胞により発現される抗体（例えば、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体またはそれらの抗原結合性断片）を指す。組換え抗体を産生するための「宿主細胞」の例としては：（１）哺乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、COS、骨髄腫細胞（例として、Y0およびNS0細胞）、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、HeLaおよびVero細胞；（２）昆虫細胞、例えばsf9、sf21およびTn5；（３）植物細胞、例えば、タバコ属（Nicotiana）に属する植物（例えば、タバコ（Nicotiana tabacum））；（４）酵母細胞、例えば、サッカロミセス属（Saccharomyces）（例えば、出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae））またはアスペルギルス属（Aspergillus）（例えば、クロコウジカビ（Aspergillus niger））に属するもの；（５）細菌細胞、例えば、大腸菌（Escherichia coli）細胞または枯草菌（Bacillus subtilis）細胞などが挙げられる。

10

【0071】

本明細書において使用される用語「Ror2」は、Genbankアクセッション番号AAI30523に示される、インビトロタンパク質活性を有する予測943アミノ酸タンパク質である受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体2を指す。多くの系統限定受容体チロシンキナーゼは、公知の受容体と相同の「オーファン」として最初に同定され、続いて初めてそれが使用されてそれらの未知の成長因子が同定された。DeChiara et al. (2000)は、図1に示されるRor2によりコードされる1つのそのようなオーファンを同定した。

20

【0072】

用語「治療有効量」の本発明の抗体は、任意の医学的治療に適用可能な妥当な利益/リスク比において前記癌を治療するために十分な量の抗体を意味する。しかしながら、本発明の抗体および組成物の総1日使用量は、正当な医学的判断の範囲内で担当医により決定されることが理解される。任意の特定の患者についての具体的な治療有効用量レベルは、種々の因子、例として、治療される障害および障害の重症度；用いられる具体的な抗体の活性；用いられる具体的な組成物、患者の年齢、体重、全身健康状態、性別および食事；用いられる具体的な抗体の投与の時間、投与経路、および排泄速度；治療の持続時間；用いられる具体的な抗体との組合せまたはそれと同時に使用される薬物；ならびに医学分野において周知の同様の因子に依存する。例えば、所望の治療効果を達成するために要求されるよりも低いレベルにおいて化合物の用量を開始すること、および所望の効果が達成されるまで投与量を徐々に増加させることは当分野の技能の範囲内で周知である。

30

【0073】

本明細書において使用される用語「単鎖Fv」（「scFv」）は、通常、ペプチドコードリンカーにより結合しているV_HおよびV_Lコード遺伝子を含む遺伝子融合物から発現される共有結合しているV_H：V_Lヘテロ二量体である。「dsFv」は、ジスルフィド結合により安定化されるV_H：V_Lヘテロ二量体である。二価および多価抗体断片は、一価scFvの会合により自然に形成し得、またはペプチドリンカーにより一価scFvをカップリングさせることにより生成することができる（例えば、二価sc(Fv)₂）。

40

【0074】

本明細書において使用される用語「治療」、「治療する」または「治療すること」などは、治療される個体の自然経過を変更する試行の臨床的介入を指し、予防のため、または臨床的病変の経過において実施することができる。治療の望ましい効果としては、限定されるものではないが、疾患の発症または再発の予防、症状の緩和、疾患の直接的または間接的な任意の病理学的帰結の縮小、転移の予防、疾患進行速度の減少、疾患状態の改善または軽減、および寛解または予後の改善が挙げられる。一部の実施形態において、本発明の抗体は、疾患の発生を遅延させ、または疾患の進行を減速させるために使用される。

50

【0075】

本明細書において使用される用語「腫瘍」は、悪性であるか良性であるかに関わらない、全ての新生物性の細胞成長および増殖、ならびに全ての前癌性および癌性の細胞および組織を指す。用語「癌」、「癌性」、「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」および「腫瘍」は、本明細書において相互に排他的に言及されるわけではない。

【0076】

本明細書において使用される用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に関与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、 V_H および V_L ）は一般に、それぞれのドメインが4つの保存されたフレームワーク領域（FR）および3つの超可変領域（HVR）を含む類似の構造を有する（例えば、Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007) 参照）。単一の V_H または V_L 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、特定の抗原に結合する抗体または抗体断片は、その抗原に結合する抗体からの V_H または V_L ドメインを使用して単離してそれぞれ相補的な V_L または V_H ドメインのライブラリーをスクリーニングすることができる。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.*, vol. 150, pp. 880 - 887, 1993; Clarkson et al., *Nature*, vol. 352, pp. 624 - 628, 1991 参照。

10

【0077】

本明細書において使用される用語「ベクター」は、結合している別の核酸を伝播し得る核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、および導入された宿主細胞のゲノム中に取り込まれるベクターを含む。あるベクターは、それらが作動可能に結合している核酸の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。

20

【0078】

詳細な説明

例示を目的として、種々の例示的实施形態を参照して本発明の原理を説明する。本発明のある実施形態が本明細書において具体的に説明されるが、当業者は、同一原理が他の系および方法において同様に適用可能であり、用いることができることを容易に認識する。本発明の開示される実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、示される任意の特定の実施形態の詳細にその適用が限定されないことを理解すべきである。さらに、本明細書において使用される用語は説明を目的とするものであり、限定を目的とするものではない。さらに、ある方法は本明細書においてある順序で提示されるステップを参照して記載されるが、多くの場合、当業者が理解し得るとおり、これらのステップは任意の順序で実施することができる；したがって、新規方法は、本明細書に開示の特定のステップの順に限定されるものではない。

30

【0079】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明示しない限り、複数形の参照物を含むことに留意しなければならない。さらに、用語「a」（または「an」）、「1つ以上」および「少なくとも1つ」は、本明細書において互換的に使用することができる。用語「~を含む（comprising）」、「~を含む（including）」、「~を有する」および「~から構築される」も、互換的に使用することができる。

40

【0080】

特に示されない限り、本明細書および特許請求の範囲において使用される、成分の量、特性、例えば分子量、パーセント、比、反応条件などを表す全ての数字は、全ての場合において、用語「約」により、その用語「約」の有無にかかわらず修飾されるものとして理解すべきである。したがって、逆の指示がない限り、本明細書および特許請求の範囲に記載の数値パラメータは近似値であり、その近似値は、本開示により得ることができる求め

50

られる所望の特性に応じて変動し得る。少なくとも、および特許請求の範囲に対する均等論の適用を制限する企図としてではなく、それぞれの数値パラメータは、報告された有効数字に照らし、通常の下捨五入法を適用することにより少なくとも解釈すべきである。本開示の広い範囲を記載する数値範囲およびパラメータは近似値であるが、具体例において記載されている数値は、可能な限り正確に報告される。しかしながら、いずれの数値も、それぞれの試験測定値において見出される標準偏差から必然的に生じる、ある誤差を本質的に含有する。

【0081】

本明細書に開示のそれぞれの構成成分、化合物、置換基、またはパラメータは、単独で、または本明細書に開示のそれぞれのおよび他のあらゆる構成成分、化合物、置換基、もしくはパラメータの1つ以上との組合せでの使用について開示されているとして解釈すべきであることを理解すべきである。

10

【0082】

本明細書に開示のそれぞれの構成成分、化合物、置換基、またはパラメータについてのそれぞれの量/値または量/値の範囲は、本明細書に開示の他のあらゆる構成成分、化合物、置換基、またはパラメータについて開示されているそれぞれの量/値、または量/値の範囲との組合せでも開示されているとして解釈すべきであること、および、したがって本明細書に開示の2つ以上の構成成分、化合物、置換基、またはパラメータの量/値、または量/値の範囲の任意の組合せも、本詳細な説明の目的のために互いの組合せでも開示されていることも理解すべきである。

20

【0083】

本明細書に開示のそれぞれの範囲のそれぞれの下限值は、同一の構成成分、化合物、置換基、またはパラメータについて本明細書に開示のそれぞれの範囲のそれぞれの上限值との組合せで開示されているものとして解釈すべきであることがさらに理解される。したがって、2つの範囲の開示は、それぞれの範囲のそれぞれの下限値を、それぞれの範囲のそれぞれの上限值と組み合わせることにより導かれる4つの範囲の開示として解釈すべきである。3つの範囲の開示は、それぞれの範囲のそれぞれの下限値を、それぞれの範囲のそれぞれの上限值と組み合わせることにより導かれる9つの範囲の開示などとして解釈すべきである。さらに、本明細書または実施例に開示の構成成分、化合物、置換基、またはパラメータの具体的な量/値は、範囲の下限值または上限値のいずれかの開示として解釈すべきであり、したがって、本出願の他箇所に開示の同一の構成成分、化合物、置換基、またはパラメータについての範囲の他の任意の下限值もしくは上限値または具体的な量/値と組み合わせるその構成成分、化合物、置換基、またはパラメータの範囲を形成し得る。

30

【0084】

A. 抗Ror2抗体

一態様において、本発明は、ヒトRor2タンパク質に特異的に結合する単離重鎖可変領域ポリペプチドを提供する。重鎖可変領域ポリペプチドは、3つの相補性決定領域H1、H2、およびH3配列を含み、

H1配列は、G Y T X₁ T E X₂ X₃ X₄ H (配列番号1) または G Y S I T T G X₂₉ Y W N (配列番号4) であり；

40

H2配列は、X₅ X₆ X₇ X₈ N N G G T G Y N Q K F K G (配列番号2) または Y I T Y D G S X₃₀ N Y N P S L K N (配列番号5) であり；

H3配列は、X₉ X₁₀ X₁₁ S X₁₂ Y X₁₃ Y X₁₄ X₁₅ S Y F X₁₆ X₁₇ X₁₈ (配列番号3) または C S X₃₁ X₃₂ X₃₃ X₃₄ V X₃₅ X₃₆ X₃₇ L D X₃₈ (配列番号6) であり；

X₁は、FまたはEであり、

X₂は、YまたはDであり、

X₃は、TまたはCであり、

X₄は、MまたはDまたはEまたはYであり、

X₅は、GまたはSであり、

50

X_6 は、 I または E であり、
 X_7 は、 N または C または L または V であり、
 X_8 は、 T または D または E であり、
 X_9 は、 A または M または T であり、
 X_{10} は、 R または H であり、
 X_{11} は、 G または E であり、
 X_{12} は、 L または F であり、
 X_{13} は、 S または G であり、
 X_{14} は、 G または D であり、
 X_{15} は、 N または E であり、 10
 X_{16} は、 D または L であり、
 X_{17} は、 Y または C または T であり、
 X_{18} は、 W または L であり、
 X_{29} は、 Y または E または R または T であり、
 X_{30} は、 K または N であり、
 X_{31} は、 R または G または H または W または Y であり、
 X_{32} は、 F または C または N または Q であり、
 X_{33} は、 E または S であり、
 X_{34} は、 G または E または F または H または M または Q または S であり、
 X_{35} は、 W または A または I または P または Q または T または V であり、 20
 X_{36} は、 Y または G または N または Q であり、
 X_{37} は、 G または S または T であり、
 X_{38} は、 Y または I である。

【 0 0 8 5 】

重鎖可変領域のアラインメントを図 2 A ~ 2 B に示す。

【 0 0 8 6 】

別の態様において、本発明は、ヒト R o r 2 タンパク質に特異的に結合する単離軽鎖可変領域ポリペプチドを提供する。軽鎖可変領域ポリペプチドは、3つの相補性決定領域 L 1、L 2、および L 3 配列を含み、

L 1 配列は、S A T S S X_{19} X_{20} X_{21} M X_{22} (配列番号 7) または R A S E S V D R Y G N S X_{39} I H (配列番号 10) であり、 30

L 2 配列は、 X_{23} T S N L A S (配列番号 8) または X_{40} T Y X_{41} L E S (配列番号 11) であり；

L 3 配列は、Q X_{24} X_{25} S X_{26} Y P F X_{27} X_{28} (配列番号 9) または Q Q X_{42} N X_{43} D P X_{44} T X_{45} (配列番号 12) であり；

X_{19} は、V または E であり、
 X_{20} は、S または D であり、
 X_{21} は、Y または C または D であり、
 X_{22} は、H または G または L であり、
 X_{23} は、G または C または H または P であり、 40
 X_{24} は、Q または E であり、
 X_{25} は、R または H であり、
 X_{26} は、S または D または G または I または Q または V であり、
 X_{27} は、T または D であり、
 X_{28} は、F または D または E であり、
 X_{39} は、F または S または T であり、
 X_{40} は、R または C または D または E または W であり、
 X_{41} は、N または D であり、
 X_{42} は、T または I または P であり、
 X_{43} は、E または V であり、 50

X₄₄ は、W または T であり、
X₄₅ は、F または T である。

【0087】

軽鎖可変領域のアラインメントを図3A～3Bに示す。

【0088】

本発明は、米国特許第8,709,755号明細書に開示の方法を介して親抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域からこれらの単離重鎖可変領域および単離軽鎖可変領域をそれぞれ同定した。条件的に活性な抗体を生成する方法は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0089】

親抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域中のそれぞれの位置を1つずつランダム化する包括的位置進化(Comprehensive Positional Evolution)(CPE)を使用して親抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするDNAを進化させて突然変異抗体ライブラリーを生成した。ライブラリー中のそれぞれの突然変異重鎖/軽鎖は、親抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域と比較して1つのみの単一点突然変異を有する(図2A～2Bおよび3A～3B)。ライブラリー中の突然変異体を、ELISAによりpH7.4と比べたpH6.0におけるヒトRor2に対する選択的結合親和性についてスクリーニングした。pH7.4よりもpH6.0において活性である突然変異重鎖/軽鎖可変領域を、重鎖および軽鎖可変領域のそれぞれにおいて示される単一点突然変異を有する条件的に活性な抗体の重鎖/軽鎖可変領域として選択した(表1および2、図2A～2Bおよび3A～3B)。

【0090】

【表1】

表1.条件的に活性な抗Ror2抗体軽鎖可変領域

クローン	親和性ELISA突然変異体		
	pH 6.0	pH 7.4	比, pH 6.0/7.4
LC-V029E	0.406	0.129	3.15
LC-S030D	0.733	0.252	2.91
LC-Y031C	1.341	0.700	1.92
LC-Y031D	0.911	0.405	2.25
LC-H033G	1.103	0.536	2.06
LC-H033L	0.690	0.332	2.08
LC-G049C	0.468	0.133	3.52
LC-G049H	1.873	0.118	15.87
LC-G049P	0.660	0.268	2.46
LC-Q089E	0.438	0.251	1.74
LC-R090H	0.560	0.256	2.19
LC-S092D	1.127	1.122	1.00
LC-S092V	1.226	1.182	1.04
LC-T096D	0.755	0.474	1.59
LC-F097D	0.190	0.107	1.77
LC-F097E	0.489	0.215	2.28

【0091】

【表 2】

表 2.条件的に活性な抗 Ror2 抗体重鎖可変領域

クローン	親和性ELISA突然変異体		
	pH 6.0	pH 7.4	比, pH 6.0/7.4
HC-F029E	1.342	0.742	1.81
HC-Y032D	1.470	0.510	2.88
HC-T033C	0.626	0.232	2.70
HC-M034D	1.244	0.211	5.90
HC-M034E	1.165	0.185	6.30
HC-M034Y	0.903	0.391	2.31
HC-G050S	0.828	0.318	2.60
HC-I051E	1.039	0.100	10.39
HC-N052C	0.995	0.431	2.31
HC-N052L	0.911	0.433	2.10
HC-N052V	0.870	0.340	2.56
HC-T053D	1.108	0.222	4.99
HC-T053E	0.540	0.157	3.44
HC-A097I	1.892	1.730	1.892
HC-A097M	1.977	1.701	1.977
HC-A097S	1.666	1.692	1.666
HC-A097T	1.834	1.692	1.666
HC-R098H	0.928	0.353	2.63
HC-R098Q	0.799	0.276	2.89
HC-G099E	0.616	0.421	1.46
HC-L101F	1.461	1.412	1.461
HC-S103G	0.794	0.655	1.21
HC-G105D	0.509	0.379	1.34
HC-N106E	0.224	0.115	1.95
HC-D110L	1.675	1.403	1.675
HC-Y111C	1.079	0.793	1.36
HC-Y111T	1.862	1.403	1.675
HC-W112L	1.746	1.704	1.746

10

20

30

【0092】

別の態様において、本発明は、図 2 A ~ 2 B に表される重鎖可変領域および図 3 A ~ 3 B に提示される軽鎖可変領域を含む。重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 18 ~ 26 である。軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 13 ~ 17 および 27 である。これらの重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、ヒト Ror2 に特異的に結合し得る。これらの重鎖可変領域および軽鎖可変領域の 1 つを含む抗体または抗体断片は、腫瘍微小環境中の pH において非腫瘍微小環境中の pH よりも高い Ror2 に対する結合親和性を有することが見出された。例えば、抗体および抗体断片は、pH 6.0 において pH 7.4 よりも高い Ror2 に対する結合親和性を有する。

40

【0093】

抗 Ror2 抗体または抗体断片は、正常組織中での Ror2 に対するそれらの結合親和性と比較して高い腫瘍中での Ror2 に対する結合親和性を有する。これらの抗 Ror2 抗体または抗体断片は、当分野において公知のモノクローナル抗 Ror2 抗体と比較して

50

長い半減期および低減した副作用、ならびに同等の効力を有する。これらの特徴は、患者に送達すべきこれらの抗 R o r 2 抗体または抗体断片のより高い投与量の使用を許容し、したがって、より有効な治療選択である。

【 0 0 9 4 】

本発明は、図 2 A ~ 2 B、3 A ~ 3 B に提示され、配列番号 1 3 ~ 2 4 を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むが、本発明はまた、ヒト R o r 2 に特異的に結合し得るそれらのバリエーションを提供する。これらのバリエーションを誘導するため、重鎖可変領域の相補性決定領域 (C D R) (H 1 ~ H 3) および軽鎖可変領域の相補性決定領域 (L 1 ~ L 3) はインタクトのままであるべきである。しかしながら、相補性決定領域の外側の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、本出願に考察される置換、挿入および欠失の原理に従って突然変異させることができる。

10

【 0 0 9 5 】

これらのバリエーションの誘導において、本明細書に記載の方法がガイドとなる。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のバリエーションは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列中に適切な改変を導入することにより、またはペプチド合成により調製することができる。このような改変としては、例えば、重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列からの欠失、および/またはそれらの配列中への挿入、および/またはそれらの配列内の残基の置換が挙げられる。欠失、挿入、および置換の任意の組合せを作製して本発明の抗体または抗体断片に到達し得るが、ただし、それらは所望の特徴、例えば、ヒト R o r 2 への抗原結合および/または条件的活性を保有するものとする。

20

【 0 0 9 6 】

置換、挿入、および欠失バリエーション

ある実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体または抗体断片バリエーションが提供される。置換突然変異誘発のための目的部位としては、C D R およびフレームワーク領域 (F R) が挙げられる。保存的置換を「保存的置換」という見出しで表 3 に示す。より実質的な変化を、「例示的な置換」という見出しで表 3 に提供し、アミノ酸側鎖のクラスに関してさらに以下に記載する。アミノ酸置換を目的の抗体または抗体断片に導入することができ、その生成物を、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、または免疫原性の減少についてスクリーニングすることができる。

30

【 0 0 9 7 】

【表 3】

表 3 : アミノ酸置換

元の残基	例示的な置換	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

【0098】

アミノ酸は、共通の側鎖特性に従ってグループ分けすることができる：

- (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) 鎖配向に影響を与える残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0099】

非保存的置換は、これらのクラスのうち1つのメンバーを別のクラスのものに交換することを伴う。

【0100】

1つのタイプの置換バリエーションは、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基の置換を含む。一般に、さらなる試験のために選択されて得られるバリエーションは、親抗体に対してある生物学的特性の改変（例えば、改善）（例えば、親

10

20

30

40

50

和性の増加、免疫原性の減少)を有し、および/または親抗体のある生物学的特性を実質的に保持する。例示的な置換バリエーションは親和性成熟抗体であり、例えば、ファージディスプレイベースの親和性成熟技術、例えば、本明細書に記載のものを使用して簡便に生成することができる。簡潔に述べると、1つ以上のCDR残基を突然変異させ、バリエーション抗体をファージ上でディスプレイさせ、特定の生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングする。

【0101】

変更(例えば、置換)は、例えば、抗体親和性を改善するためにCDR中で作製することができる。このような変更は、CDRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセスの間に高頻度で突然変異を受けるコドンによりコードされる残基(例えば、Chowdhury, *Methods Mol. Biol.*, vol. 207, pp. 179-196, 2008参照)、および/またはSDR(a-CDR)中で作製することができ、得られるバリエーションV_HまたはV_Lを結合親和性について試験する。二次ライブラリーの構築および二次ライブラリーからの再選択による親和性成熟は、例えば、Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology*, vol. 178, pp. 1-37, 2001)に記載されている。親和性成熟の一部の実施形態において、種々の方法(例えば、エラープロードPCR、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指向変異誘発)のいずれかにより、成熟について選択された可変遺伝子中に多様性を導入する。次いで、二次ライブラリーを作出する。次いで、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バリエーションを同定する。多様性を導入する別の方法はCDR指向アプローチを含み、そのアプローチでは、いくつかのCDR残基(例えば、1回に4~6残基)をランダム化する。例えば、アラニンスクランニング突然変異誘発またはモデリングを使用して抗原結合に關与するCDR残基を具体的に同定することができる。特にCDR-H3およびCDR-L3を標的化することが多い。

【0102】

ある実施形態において、置換、挿入、または欠失は、このような変更が抗原に結合する抗体または抗体断片の能力を実質的に低減させない限り、1つ以上のHVR内で生じてよい。例えば、結合親和性を実質的に低減させない保存的変更(例えば、本明細書で提供されるような保存的置換)をCDR中で作製することができる。このような変更は、CDRの「ホットスポット」またはSDRの外側であってよい。上記提供されるバリエーションV_HおよびV_L配列のある実施形態において、それぞれのCDRは不変であり、または1つ、2つ、もしくは3つ以下のアミノ酸置換を含有する。

【0103】

突然変異誘発のために標的化することができる抗体の残基または領域を同定する有用な方法は、Cunningham and Wells, *Science*, vol. 244, pp. 1081-1085, 1989により記載されるとおり「アラニンスクランニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法において、標的残基の残基または群(例えば、荷電残基、例えば、arg、asp、his、lys、およびglu)を同定し、中性または負荷電アミノ酸(例えば、アラニンまたはポリアラニン)により置き換えて抗体または抗体断片と抗原との相互作用が影響されるか否かを決定する。さらなる置換を、最初の置換に対して機能的感受性を実証するアミノ酸位置において導入することができる。あるいは、またはさらに、抗体または抗体断片と抗原との間の接触点を同定するための抗原-抗体複合体の結晶構造。このような接触残基および隣接残基を置換の候補として標的化し、または排除することができる。バリエーションをスクリーニングしてそれらが所望の特性を含有するか否かを決定することができる。

【0104】

アミノ酸配列挿入としては、1残基~100以上の残基を含有するポリペプチドの長さの範囲であるアミノおよび/またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を

10

20

30

40

50

有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入バリエーションとしては、抗体のNまたはC末端と酵素との融合（例えば、ADEPTのための）または抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドとの融合が挙げられる。

【0105】

本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列改変が企図される。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。非ヒト動物に由来する抗体のV_HおよびV_L中のCDRのみをヒト抗体のV_HおよびV_LのFR中に簡易にグラフト化することによりヒト化抗体を産生する場合、抗体結合活性は、非ヒト動物に由来する元の抗体のものと比較して低減することが公知である。非ヒト抗体のV_HおよびV_Lのいくつかのアミノ酸残基は、CDR中だけでなく、FR中のものも抗体結合活性に直接または間接的に関連することが考慮される。したがって、ヒト抗体のV_HおよびV_LのFRに由来する異なるアミノ酸残基によるこれらのアミノ酸残基の置換は、結合活性を低減させる。この問題を解消するため、ヒトCDRがグラフト化される抗体において、ヒト抗体のV_HおよびV_LのFRのアミノ酸配列のうち、抗体への結合に直接関連し、またはCDRのアミノ酸残基と相互作用し、または抗体の三次元構造を維持し、抗原への結合に直接関連するアミノ酸残基を同定することを試行しなければならない。低減した抗原結合活性は、同定されたアミノ酸を非ヒト動物に由来する元の抗体のアミノ酸残基により置き換えることにより増加させることができる。

10

【0106】

改変および変化は、本発明の抗体の構造中で、およびそれらをコードするDNA配列中で作製することができ、所望の特徴を有する抗体をコードする機能的分子を依然として得る。

20

【0107】

アミノ酸配列中の変化の作製において、アミノ酸のハイドロパシー指数を考慮することができる。タンパク質に対する相互作用的な生物学的機能の付与におけるハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、一般に当分野において理解されている。アミノ酸の相対的ハイドロパシー特徴が得られるタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそれがタンパク質と他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を定めることが受け入れられる。それぞれのアミノ酸には、それらの疎水性および電荷の特徴に基づきハイドロパシー指数が割り当てられており、それらは、イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；トレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)；およびアルギニン(-4.5)である。

30

【0108】

本発明のさらなる目的は、本発明の抗体の機能保存的バリエーションも包含する。

【0109】

「機能保存的バリエーション」は、タンパク質または酵素中の所与のアミノ酸残基が、ポリペプチドの全体的な立体構造および機能を変更せずに変化したもの、例として、限定されるものではないが、類似の特性（例えば、極性、水素結合ポテンシャル、酸性、塩基性、疎水性、芳香族など）を有するアミノ酸によるアミノ酸の置き換えである。保存されることが示されるアミノ酸以外のアミノ酸は、タンパク質中で異なり得、その結果、類似機能の任意の2つのタンパク質間のパーセントタンパク質またはアミノ酸配列類似性が変動し得、例えば、アラインメントスキームに従って、例えば、類似性がMEGALIGNアルゴリズムに基づくCluster法により決定して70~99%であり得る。「機能保存的バリエーション」は、BLASTまたはFASTAアルゴリズムにより決定して少なくとも60%、好ましくは、少なくとも75%、より好ましくは、少なくとも85%、さらに好ましくは、少なくとも90%、いっそうより好ましくは、少なくとも95%のアミノ酸同

40

50

一性を有し、比較される天然または親タンパク質と同一または実質的に類似の特性または機能を有するポリペプチドも含む。

【0110】

2つのアミノ酸配列は、より短い配列の全長と比べて80%超、好ましくは、85%超、好ましくは、90%超のアミノ酸が同一であり、または約90%超、好ましくは、95%超が類似（機能的に同一）である場合、「実質的に相同」または「実質的に類似」である。好ましくは、類似または相同配列は、例えば、GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wis.) パイルアッププログラム、または配列比較アルゴリズム、例えば、BLAST、FASTAなどのいずれかを使用するアラインメントにより同定される。

10

【0111】

例えば、あるアミノ酸は、活性の認識可能な損失なしでタンパク質構造中で他のアミノ酸により置換することができる。タンパク質の相互作用キャパシティおよび性質がタンパク質の生物学的機能活性を定めるため、あるアミノ酸置換をタンパク質配列中で、および無論、そのDNAコード配列中で作製することができる一方、それにもかかわらず、同様の特性を有するタンパク質を得る。したがって、本発明の抗体もしくは抗体断片の配列、または前記抗体もしくは抗体断片をコードする対応するDNA配列中で種々の変化を、それらの生物学的活性の認識可能な損失なしで作製することができることが企図される。

20

【0112】

あるアミノ酸は、類似のハイドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸により置換することができ、類似の生物学的活性を有するタンパク質を依然としてもたらず、すなわち、生物学的機能等価タンパク質を依然として得ることが当分野において公知である。

【0113】

上記概略のとおり、したがって、アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。種々の上記の特徴を考慮する例示的な置換は当業者に周知であり、それとしては、アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにパリン、ロイシンおよびイソロイシンが挙げられる。

30

【0114】

グリコシル化バリエーション

ある実施形態において、本明細書において提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるように変更される。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作出または除去されるようにアミノ酸配列を変更することにより簡便に達成することができる。

【0115】

抗体がFc領域を含む場合、それに付着している炭水化物を変更することができる。哺乳動物細胞により産生される天然抗体は、典型的には、一般にFc領域のCH2ドメインのAsn297へのN結合により付着している分岐した二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wright et al. TIBTECH, vol. 15, pp. 26-32, 1997参照。オリゴ糖としては、種々の炭水化物、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、およびシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「幹」におけるGlcNAcに付着しているフコースを挙げることができる。一部の実施形態において、本発明の抗体中のオリゴ糖の改変は、ある改善された特性を有する抗体バリエーションを作出するために作製することができる。

40

【0116】

一実施形態において、Fc領域に（直接的または間接的に）付着しているフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体バリエーションが提供される。例えば、このような抗体中のフコース量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%または20%~40%であり得る

50

。フコース量は、例えば、国際公開第2008/077546号パンフレットに記載のとおりMALDI-TOF質量分析法により計測してAsn297に付着している全ての糖構造（例えば、複合体、ハイブリッドおよび高マンノース構造）の合計と比較してAsn297における糖鎖内のフコースの平均量を算出することにより決定される。Asn297は、Fc領域中の297位あたり（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し；しかしながら、Asn297は、抗体中の軽微な配列変動に起因して297位の約±3アミノ酸上流または下流、すなわち、294位～300位の間にも位置し得る。このようなフコシル化バリエーションは、改善されたADCC機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号明細書（Presta, L.）；米国特許出願公開第2004/0093621号明細書（Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd）参照。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体バリエーションに関連する刊行物の例としては、米国特許出願公開第2003/0157108号明細書；国際公開第2000/61739号パンフレット；国際公開第2001/29246号パンフレット；米国特許出願公開第2003/0115614号明細書；米国特許出願公開第2002/0164328号明細書；米国特許出願公開第2004/0093621号明細書；米国特許出願公開第2004/0132140号明細書；米国特許出願公開第2004/0110704号明細書；米国特許出願公開第2004/0110282号明細書；米国特許出願公開第2004/0109865号明細書；国際公開第2003/085119号パンフレット；国際公開第2003/084570号パンフレット；国際公開第2005/035586号パンフレット；国際公開第2005/035778号パンフレット；国際公開第2005/053742号パンフレット；国際公開第2002/031140号パンフレット；Okazaki et al. J. Mol. Biol., vol. 336, pp. 1239-1249, 2004；Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng., vol. 87, pp. 614-622, 2004が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生し得る細胞系の例としては、タンパク質フコシル化を欠損するLec13CHO細胞（Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys., vol. 249, pp. 533-545, 1986；米国特許出願第2003/0157108A号明細書；および国際公開第2004/056312A1号パンフレット、特に実施例11）、ならびにノックアウト細胞系、例えば、アルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8ノックアウトCHO細胞（例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng., vol. 87, pp. 614-622, 2004；Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., vol. 94, pp. 680-688, 2006；および国際公開第2003/085107号パンフレット参照）が挙げられる。

【0117】

例えば、抗体のFc領域に付着している二分岐オリゴ糖がGlcNAcにより二分されている二分オリゴ糖を有する抗体バリエーションがさらに提供される。このような抗体バリエーションは、低減したフコシル化および/または改善されたADCC機能を有し得る。このような抗体バリエーションの例は、例えば、国際公開第2003/011878号パンフレット；米国特許第6,602,684号明細書；および米国特許出願公開第2005/0123546号明細書に記載されている。Fc領域に付着しているオリゴ糖中の少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体バリエーションも提供される。このような抗体バリエーションは、改善したCDC機能を有し得る。このような抗体バリエーションは、例えば、国際公開第1997/30087号パンフレット；国際公開第1998/58964号パンフレット；および国際公開第1999/22764号パンフレットに記載されている。

【0118】

Fc領域バリエーション

ある実施形態において、1つ以上のアミノ酸改変を本明細書において提供される抗体のFc領域中に導入し、それによりFc領域バリエーションを生成することができる。Fc領域バリエーションは、1つ以上のアミノ酸位置におけるアミノ酸改変（例えば、置換）を含むヒ

トFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4Fc領域）を含み得る。

【0119】

ある実施形態において、本発明は、全てではないが、一部のエフェクター機能を保有する抗体バリエーションを企図し、これらは、インビボにおける抗体の半減期が重要である一方で、あるエフェクター機能（例えば、ADCC）が不要または有害である用途に関して望ましい候補となる。インビトロおよび/またはインビボの細胞毒性アッセイを実施してCDCおよび/またはADCC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイを実施して抗体がFcR結合を欠く（したがって、ADCC活性を欠く可能性が高い）が、FcRn結合能を保持することを確保することができる。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞はFcRIIのみを発現する一方、単球はFcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 9, pp. 457 - 492, 1991の464頁の表5にまとめられている。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的な例は、米国特許第5,500,362号明細書（例えば、Hellstrom et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, vol. 83, pp. 7059 - 7063, 1986も参照）およびHellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, vol. 82, pp. 1499 - 1502, 1985; 米国特許第5,821,337号明細書（Bruggemann et al., *J. Exp. Med.*, vol. 166, pp. 1351 - 1361, 1987も参照）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ができる（例えば、フローサイトメトリーのためのACTI（商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Cell Technology, Inc. Mountain View, Calif.; およびCytotox 96（登録商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Promega, Madison, Wis.）参照。このような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）およびナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。あるいは、またはさらに、目的の分子のADCC活性を、例えば、動物モデル、例えば、Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, vol. 95, pp. 652 - 656, 1998に開示のものにおいてインビボで評価することができる。C1q結合アッセイを実施して、抗体がC1qに結合し得ず、したがって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号パンフレットおよび国際公開第2005/100402号パンフレットにおけるC1qおよびC3c結合ELISA参照。補体活性化を評価するため、CDCアッセイを実施することができる（例えば、Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, vol. 202, pp. 163 - 171, 1996; Cragg, M. S. et al., *Blood*, vol. 101, pp. 1045 - 1052, 2003; およびCragg, M. S., and M. J. Glennie, *Blood*, vol. 103, pp. 2738 - 2743, 2004参照）。FcRn結合およびインビボクリアランス/半減期の決定も、当分野において公知の方法を使用して実施することができる（例えば、Petkova, S. B. et al., *Int'l. Immunol.*, vol. 18, pp. 1759 - 1769, 2006参照）。

【0120】

減少したエフェクター機能を有する抗体としては、Fc領域残基238、265、269、270、297、327および329の1つ以上の置換を有するもの（米国特許第6,737,056号明細書）が挙げられる。このようなFc突然変異体としては、アミノ酸265、269、270、297および327位の2つ以上における置換を有するFc突然変異体、例として、残基265および297の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7,332,581号明細書）が挙げられる。

【0121】

10

20

30

40

50

FcRに対する改善または縮小した結合を有するある抗体バリエーションが記載されている（例えば、米国特許第6,737,056号明細書、国際公開第2004/056312号パンフレット、および Shields et al., J. Biol. Chem., vol. 9, pp. 6591-6604, 2001 参照）。

【0122】

ある実施形態において、抗体バリエーションは、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298、333、および/または334位（残基のEU番号付け）における置換を有するFc領域を含む。

【0123】

一部の実施形態において、変更された（すなわち、改善され、または縮小した）C1q結合および/または補体依存性細胞毒性（CDC）をもたらす変更、例えば、米国特許第6,194,551号明細書、国際公開第99/51642号パンフレット、および Idusogie et al. J. Immunol., vol. 164, pp. 4178-4184, 2000 に記載のものが、Fc領域中で作製される。

【0124】

増加した半減期を有し、胎児への母体IgGの移動を担う（Guyer et al., J. Immunol., vol. 117, pp. 587-593, 1976 および Kim et al., J. Immunol., vol. 24, p. 249, 1994）新生児Fc受容体（FcRn）への改善された結合を有する抗体が、米国特許出願公開第2005/0014934号明細書に記載されている。それらの抗体は、その中にFc領域のFcRnへの結合を改善する1つ以上の置換を有するFc領域を含む。このようなFcバリエーションとしては、Fc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424または434の1つ以上における置換、例えば、Fc領域残基434の置換（米国特許第7,371,826号明細書）を有するものが挙げられる。Fc領域バリエーションの他の例に関しては、Duncan & Winter, Nature, vol. 322, pp. 738-740, 1988；米国特許第5,648,260号明細書；米国特許第5,624,821号明細書；および国際公開第94/29351号パンフレットも参照。

【0125】

システインエンジニアリング抗体バリエーション

ある実施形態において、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基により置換されているシステインエンジニアリング抗体、例えば、「thioMAb」を作出することが望ましい場合がある。特定の実施形態において、置換残基は抗体のアクセス可能な部位に生じる。それらの残基をシステインにより置換することにより、反応性チオール基は、それにより抗体のアクセス可能な部位に位置され、それを使用して抗体を他の部分、例えば、薬物部分またはリンカー-薬物部分とコンジュゲートさせて本明細書においてさらに記載されるとおり免疫コンジュゲートを作成することができる。ある実施形態において、以下の残基のいずれか1つ以上をシステインにより置換することができる：軽鎖のV205（Kabab番号付け）、重鎖のA118（EU番号付け）；および重鎖Fc領域の5400（EU番号付け）。システインエンジニアリング抗体は、例えば、米国特許第7,521,541号明細書に記載のとおり生成することができる。

【0126】

抗体誘導体

ある実施形態において、本明細書において提供される抗体または抗体断片は、当分野において公知の容易に利用可能な追加の非タンパク質部分を含有するようにさらに改変することができる。抗体または抗体断片の誘導体化に好適な部分としては、限定されるものではないが、水溶性ポリマーが挙げられる。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニ

10

20

30

40

50

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 / 無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）、およびデキストランまたはポリ（*n* - ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド / エチレンオキシドコポリマー、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、なら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に起因して製造上の利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量のものであり得、分岐でも非分岐でもよい。抗体または抗体断片に付着しているポリマーの数は変動し得、2つ以上のポリマーが付着している場合、それらは同一または異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数および / またはタイプは、検討事項、例として、限定されるものではないが、改善すべき抗体または抗体断片の特定の特性または機能、その誘導体が規定の条件下で治療法において使用されるか否かなどに基づき決定することができる。

10

20

30

40

50

【0127】

別の実施形態において、放射線への曝露により選択的に加熱することができる抗体または抗体断片および非タンパク質部分のコンジュゲートが提供される。一実施形態において、非タンパク質部分は、カーボンナノチューブである（Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 102, pp. 11600 - 11605, 2005）。放射線は任意の波長のものであり得、それとしては、限定されるものではないが、通常の細胞を害することはないが、抗体 - 非タンパク質部分の近位の細胞が殺滅される温度まで非タンパク質部分を加熱する波長が挙げられる。

【0128】

別の態様において、本発明は、単離重鎖可変領域ポリペプチドまたは単離軽鎖可変領域ポリペプチドを含む抗 Ror2 抗体または抗体断片を提供する。単離重鎖可変領域ポリペプチドは、配列番号 1 ~ 6 を有する H1、H2、および H3 領域を含む。単離軽鎖可変領域ポリペプチドは、配列番号 7 ~ 12 を有する L1、L2、および L3 領域を含む。

【0129】

本発明の抗 Ror2 抗体または抗体断片は、腫瘍微小環境中の条件下で、非腫瘍微小環境中の条件下よりも高い Ror2 に対する結合親和性を有する。一実施形態において、腫瘍微小環境中の条件および非腫瘍微小環境中の条件は、両方の pH である。したがって、本発明の抗 Ror2 抗体または抗体断片は、約 5. ~ 約 6.8 の pH において Ror2 に選択的に結合し得るが、正常な生理学的環境に見出される 7.2 ~ 7.8 の pH においてはより低い Ror2 に対する結合親和性を有する。実施例 1 に示されるとおり、抗 Ror2 抗体または抗体断片は、pH 6.0 において pH 7.4 よりも高い Ror2 に対する結合親和性を有する。

【0130】

ある実施形態において、本発明の抗 Ror2 抗体または抗体断片は、約 1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、または 0.001 nM（例えば、 10^{-8} M 以下、または 10^{-8} M ~ 10^{-13} M、または 10^{-9} M ~ 10^{-13} M）の腫瘍微小環境中の条件下の Ror2 についての解離定数（Kd）を有する。一実施形態において、腫瘍微小環境中の条件の値における Ror2 についての抗体または抗体断片の Kd と、非腫瘍微小環境中の同一条件の異なる値における Kd との比は、少なくとも約 1.5 : 1、少なくとも約 2 : 1、少なくとも約 3 : 1、少なくとも約 4 : 1、少なくとも約 5 : 1、少なくとも約 6 : 1、少なくとも約 7 : 1、少なくとも約 8 : 1、少なくとも約 9 : 1、少なくとも約 10 : 1、少なくとも約 20 : 1、少なくとも約 30 : 1、少なくとも約 50 : 1、少なくとも約 70 : 1、または少なくとも約 100 : 1 である。

【0131】

一実施形態において、Kd は、以下のアッセイを使用する目的抗体の Fab 型およびその抗原を用いて実施される放射性標識抗原結合アッセイ（RIA）によって計測される。抗原についての Fab の溶液結合親和性は、非標識抗原の滴定系列の存在下で最小濃度の

(¹²⁵I) 標識抗原により Fab を平衡化し、次いで、抗 Fab 抗体コーティングプレートにより結合した抗原を捕捉することにより計測される (例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999) 参照)。アッセイ条件を確立するため、MICRO TITER (登録商標) マルチウェルプレート (Thermo Scientific) を、50 mM の炭酸ナトリウム (pH 9.6) 中で 5 µg/ml の捕捉抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) により一晩コーティングし、続いて PBS 中の 2% (w/v) のウシ血清アルブミンにより室温 (約 23 °C) において 2 ~ 5 時間ブロッキングする。非吸着プレート (Nunc 番号 269620) 中で、100 pM または 26 pM の [¹²⁵I] 抗原を、目的の Fab の段階希釈物 (例えば、Prestet et al., Cancer Res. 57: 4593 - 4599 (1997) における抗 VEGF 抗体の Fab - 12 の評価と一致する) と混合する。次いで、目的の Fab を一晩インキュベートし; しかしながら、インキュベーションは、平衡への到達を確保するためにより長い時間 (例えば、約 65 時間) 継続し得る。その後、混合物を、室温におけるインキュベーション (例えば、1 時間) のために捕捉プレートに移す。次いで溶液を除去し、プレートを PBS 中 0.1% のポリソルベート 20 (TWEEN - 20 (登録商標)) により 8 回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 µl / ウェルのシンチラント (MICRO SCINT - 20 (商標)、Packard) を添加し、プレートを TOP COUNT (商標) ガンマカウンター (Packard) 上で 10 分間計数する。最大結合の 20% 以下を与えるそれぞれの Fab の濃度を、競合結合アッセイにおける使用のために選択する。

【0132】

別の実施形態によれば、K_d は、BIACORE (登録商標) - 2000 または BIA CORE (登録商標) - 3000 (BIACORE, Inc., Piscataway, N. J.) を使用する表面プラズモン共鳴アッセイを使用して、25 °C において固定化抗原 CM5 チップを用いて、約 10 応答単位 (RU) において計測する。簡潔に述べると、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.) を供給業者の説明書に従って 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) および N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) により活性化させる。抗原を 10 mM の酢酸ナトリウム (pH 4.8) により 5 µg/ml (約 0.2 µM) まで希釈してから、約 10 の応答単位 (RU) の結合タンパク質を達成するように 5 µl / 分の流速において注入する。抗原の注入後、1 M のエタノールアミンを注入して未反応基をブロッキングする。カイネティクス計測のため、Fab の 2 倍段階希釈物 (0.78 nM ~ 500 nM) を 25 °C において、約 25 µl / 分の流速において 0.05% ポリソルベート 20 (TWEEN - 20 (商標)) 界面活性剤を有する PBS (PBST) 中に注入する。会合速度 (k_{on}) および解離速度 (k_{off}) を、単純 1 対 1 ラングミュア結合モデル (BIACORE (登録商標) 評価ソフトウェアバージョン 3.2) を使用して、会合および解離センサーグラムを同時にフィッティングすることにより算出する。平衡解離定数 (K_d) を、k_{off} / k_{on} 比として算出する。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999) 参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによるオン速度が 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ を超過する場合、オン速度は、分光計、例えば、ストップフロー方式の分光光度計 (Aviv Instruments) または攪拌キュベットを有する 8000 シリーズ SLM - AMINCO (商標) 分光光度計 (Thermo Spectronic) において計測する場合、PBS (pH 7.2) 中、20 nM の抗抗原抗体 (Fab 形態) の蛍光発光強度 (励起 = 295 nm、発光 = 340 nm、16 nm のバンドパス) の増加または減少を増加濃度の抗原の存在下で 25 °C において計測する蛍光消光技術を使用することにより測定することができる。

【0133】

本発明の抗 Ror2 抗体は、キメラ、ヒト化またはヒト抗体であり得る。一実施形態において、抗 Ror2 抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、Fab' - SH、sc Fv、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディまたは F(ab')₂ 断片および抗体

断片から形成される多重特異的抗体を用いる。別の実施形態において、抗体は、本明細書において定義される全長抗体、例えば、インタクトIgG抗体または他の抗体クラスまたはアイソタイプである。ある抗体断片の概説については、Hudson et al. Nat. Med., vol. 9, pp. 129 - 134, 2003参照。scFv断片の概説については、例えば、Pluckthuen, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269 - 315 (1994)参照；国際公開第93/16185号パンフレット；および米国特許第5,571,894号明細書および同第5,587,458号明細書も参照。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、増加したインビボ半減期を有するFabおよびF(ab')₂断片の考察については、米国特許第5,869,046号明細書参照。

10

【0134】

本発明のダイアボディは、二価または二重特異的であり得る。例えば、ダイアボディの例については、欧州特許第404,097号明細書；国際公開第1993/01161号パンフレット；Hudson et al., Nat. Med. 9: 129 - 134 (2003)；およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, pp. 6444 - 6448, 1993参照。トリアボディおよびテトラボディの例も、Hudson et al., Nat. Med., vol. 9, pp. 129 - 134, 2003に記載されている。

20

【0135】

一部の実施形態において、本発明は、抗体の重鎖可変ドメインの全部もしくは一部または軽鎖可変ドメインの全部もしくは一部を含む単一ドメイン抗体断片を含む。ある実施形態において、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, Mass.; 例えば、米国特許第6,248,516B1号明細書参照)。

【0136】

抗体断片は、種々の技術、例として、限定されるものではないが、本明細書に記載のとおりインタクト抗体のタンパク質分解消化および組換え宿主細胞(例えば、大腸菌(E. coli)またはファージ)による産生により作製することができる。

30

【0137】

一部の実施形態において、本発明の抗Ror2抗体は、キメラ抗体であり得る。あるキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号明細書；およびMorrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81, pp. 6851 - 6855, 1984)に記載されている。一例において、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、または非ヒト霊長類、例えば、サルに由来する可変領域)およびヒト定常領域を含む。さらなる例において、キメラ抗体は、抗体のクラスまたはサブクラスが親抗体のクラスまたはサブクラスに対して変化している「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、それらの抗原結合断片を含む。

40

【0138】

ある実施形態において、本発明のキメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、このような非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性および親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減させるようにヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、CDR(またはその一部)が非ヒト抗体に由来し、FR(またはその一部)がヒト抗体配列に由来する1つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、場合によりヒト定常領域の少なくとも一部も含み得る。一部の実施形態において、ヒト化抗体中の一部のFR残基は、例えば、抗体の特異性または親和性を回復させ、または改善するために非ヒト抗体(例えば、CDR残基が由来する抗体)からの対応する残基により置換される。

【0139】

50

ヒト化抗体およびその作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, *Front. Biosci.*, vol. 13, pp. 1619 - 1633, 2008 に概説されており、さらに例えば、Riechmann et al., *Nature*, vol. 332, pp. 323 - 329, 1988; Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, vol. 86, pp. 10029 - 10033, 1989; 米国特許第5,821,337号明細書、同第7,527,791号明細書、同第6,982,321号明細書、および同第7,087,409号明細書、Kashmiri et al., *Methods*, vol. 36, pp. 25 - 34, 2005 (SDR (a-CDR) グラフト化について記載); Padlan, *Mol. Immunol.*, vol. 28, pp. 489 - 498, 1991 (「リサーチフェイスング」について記載); Dall'Acqua et al., *Methods*, vol. 36, pp. 43 - 60, 2005 (「FRシャフリング」について記載); ならびに Osbourn et al., *Methods*, vol. 36, pp. 61 - 68, 2005 および Klimka et al., *Br. J. Cancer*, vol. 83, pp. 252 - 260, 2000 (FRシャフリングに対する「誘導選択」アプローチについて記載) に記載されている。

10

【0140】

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、限定されるものではないが、「ベストフィット」法 (例えば、Sims et al., *J. Immunol.*, vol. 151, p. 2296, 1993 参照) を使用して選択されるフレームワーク領域; 軽鎖または重鎖可変領域の特定のサブグループにおける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 et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 89, p. 4285, 1992; および Presta et al., *J. Immunol.*, vol. 151, p. 2623, 1993 参照)、ヒト成熟 (体細胞変異) フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系列フレームワーク領域 (例えば、Almagro and Fransson, *Front. Biosci.*, vol. 13, pp. 1619 - 1633, 2008 参照); ならびに FRライブラリーのスクリーニングに由来するフレームワーク領域 (例えば、Baca et al., *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 10678 - 10684, 1997 および Rosok et al., *J. Biol. Chem.*, vol. 271, pp. 22611 - 22618, 1996 参照) が挙げられる。

20

30

【0141】

一部の実施形態において、本発明の抗 Ror2 抗体は、多重特異的抗体、例えば、二重特異的抗体である。多重特異的抗体は、少なくとも2つの異なる部位についての結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある実施形態において、結合特異性のあるものは Ror2 についてのものであり、他方は別の抗原についてのものである。ある実施形態において、二重特異的抗体は、Ror2 の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異的抗体は、Ror2 を発現する細胞に対して細胞毒性剤を局在化させるために使用することもできる。二重特異的抗体は、全長抗体または抗体断片として調製することができる。

【0142】

多重特異的抗体を作製する技術としては、限定されるものではないが、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 and Cuello, *Nature*, vol. 305, pp. 537 - 540, 1983)、国際公開第93/08829号パンフレット、および Traunecker et al., *EMBO J.* vol. 10, pp. 3655 - 3659, 1991 参照)、ならびに「ノブインホール (knob-in-hole)」エンジニアリング (例えば、米国特許第5,731,168号明細書参照) が挙げられる。多重特異的抗体は、抗体Fcヘテロ二量体分子を作製するために静電ステアリング (electrostatic steering) 効果をエンジニアリングすること (国際公開第2009/089004A1号パンフレット); 2つ以上の抗体または断片を架橋すること (例えば、米国特許第4,

40

50

676, 980号明細書、および Brennan et al., Science, vol. 229, pp. 81-83, 1985参照); 二重特異的抗体を産生するためにロイシンジッパーを使用すること(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., vol. 148, pp. 1547-1553, 1992参照); 二重特異的抗体断片を作製するために「ダイアボディ」技術を使用すること(例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, pp. 6444-6448, 1993参照); ならびに単鎖Fv(scFv)二量体を使用すること(例えば、Gruber et al., J. Immunol., vol. 152, pp. 5368-5374, 1994参照); ならびに例えば、Tutt et al., J. Immunol., vol. 147, pp. 60-69, 1991に記載のとおり三重特異的抗体を調製することにより作製することもできる。

10

【0143】

3つ以上の機能的抗原結合部位を有するエンジニアリング抗体、例として「オクトパス抗体」も本明細書に含まれる(例えば、米国特許出願公開第2006/0025576A1号明細書参照)。

【0144】

抗体または抗体断片としては、Ror2およ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」または「DAF」も挙げられる(Ror1などは例えば、米国特許出願公開第2008/0069820号明細書参照)。

【0145】

本発明の抗Ror2抗体または抗体断片は、米国特許出願公開第2016/0017040号明細書に詳述されている組換え法および組成物を使用して産生することができる。

20

【0146】

本発明の抗Ror2抗体または抗体断片の物理的/化学的特性および/または生物学的活性は、当分野において公知の種々のアッセイにより試験および計測することができる。これらのアッセイの一部は、米国特許第8,853,369号明細書に記載されている。

【0147】

B. 免疫コンジュゲート

別の態様において、本発明はまた、1つ以上の細胞毒性剤、例えば、化学療法剤または化学療法薬、成長阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源のタンパク質毒素、酵素活性毒素、またはそれらの断片)、または放射性同位体にコンジュゲートしている抗Ror2抗体または抗体断片を含む免疫コンジュゲートを提供する。

30

【0148】

一実施形態において、免疫コンジュゲートは、抗体または抗体断片が1つ以上の薬物にコンジュゲートしている抗体-薬物コンジュゲート(ADC)であり、その薬物としては、限定されるものではないが、メイタンシノイド(米国特許第5,208,020号明細書、同第5,416,064号明細書および欧州特許第0425235B1号明細書参照); アウリスタチン、例えば、モノメチルアウリスタチン薬物部分DEおよびDF(MMAEおよびMMAF)(米国特許第5,635,483号明細書および同第5,780,588号明細書、および同第7,498,298号明細書参照); ドラスタチン; カリケアマイシンまたはその誘導体(米国特許第5,712,374号明細書、同第5,714,586号明細書、同第5,739,116号明細書、同第5,767,285号明細書、同第5,770,701号明細書、同第5,770,710号明細書、同第5,773,001号明細書、および同第5,877,296号明細書参照; Hinman et al., Cancer Res., vol. 53, pp. 3336-3342, 1993; および Lode et al., Cancer Res., vol. 58, pp. 2925-2928, 1998); アントラサイクリン、例えば、ダウノマイシンまたはドキソルピシン(Kratz et al., Current Med. Chem., vol. 13, pp. 477-523, 2006; Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters, vol. 16, pp. 358-362

40

50

, 2006; Torgov et al., *Bioconj. Chem.*, vol. 16, pp. 717 - 721, 2005; Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 97, pp. 829 - 834, 2000; Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, vol. 12, vol. 1529 - 1532, 2002; King et al., *J. Med. Chem.*, vol. 45, pp. 4336 - 4343, 2002; ならびに米国特許第6,630,579号明細書参照); メトトレキサート; ビンデシン; タキサン、例えば、デセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、およびオルタタキセル; トリコテセン; およびCC1065が挙げられる。

【0149】

別の実施形態において、免疫コンジュゲートは、酵素活性毒素またはその断片、例として、限定されるものではないが、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*)からのもの)、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチン(*dianthin*)タンパク質、ヨウシュアヤマゴボウ(*Phytolaca americana*)タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ツルレイシ(*Momordica charantia*)阻害剤、またはクルシン、クロチン、サボンソウ(*Saponaaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンにコンジュゲートしている本明細書に記載の抗体または抗体断片を含む。

【0150】

別の実施形態において、免疫コンジュゲートは、放射性コンジュゲートを形成するために放射性原子にコンジュゲートしている本明細書に記載の抗体または抗体断片を含む。放射性コンジュゲートの産生には種々の放射性同位体が利用可能である。例としては、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} およびLuの放射性同位体が挙げられる。放射性コンジュゲートを検出に使用する場合、それは、シンチグラフィ試験のための放射性原子、例えば、 Tc^{99m} もしくは I^{123} 、または核磁気共鳴(NMR)イメージング(磁気共鳴イメージング、*mri*としても公知)用のスピン標識、例えば、ヨウ素-123、さらにヨウ素-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、もしくは鉄を含み得る。

【0151】

抗体/抗体断片および細胞毒性剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、ジメチルアジブイミデートHCL)、活性エステル(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート)、およびビス活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., *Science*, vol. 238, pp. 1098 - , 1987に記載のとおり調製することができる。炭素-14により標識された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ペンタ酢酸(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のための例示的なキレート剤である。国際公開第94/11026号パンフレット参照。リンカーは、細胞中で細胞毒性薬の放出を容易にする「開裂可能リンカー」であり得る。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、

10

20

30

40

50

ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー (Chari et al., Cancer Res., vol. 52, pp. 127 - 131, 1992; 米国特許第 5, 208, 020 号明細書) を使用することができる。

【0152】

本明細書における免疫コンジュゲートは、限定されるものではないが、架橋試薬、例として、限定されるものではないが、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、およびスルホ-SMPB、ならびに (例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill., U.S.A から) 市販されているSVSB (スクシニミジル- (4-ビニルスルホン) ベンゾエート) を用いて調製されるコンジュゲートを明示的に企図する。

10

【0153】

ADCの例示的な実施形態は、腫瘍細胞を標的化する抗体または抗体断片 (Ab)、薬物部分 (D)、および Ab を D に付着させるリンカー部分 (L) を含む。一部の実施形態において、抗体は、1つ以上のアミノ酸残基、例えば、リジンおよび/またはシステインを介してリンカー部分 (L) に付着している。

【0154】

例示的なADCは、式 I: $Ab - (L - D)_p I$ (式中、p は、1 ~ 約 20 である) を有する。一部の実施形態において、抗体にコンジュゲートされ得る薬物部分の数は、遊離システイン残基の数により限定される。一部の実施形態において、遊離システイン残基は、本明細書に記載の方法により抗体アミノ酸配列中に導入される。式 I の例示的なADCとしては、限定されるものではないが、1、2、3、または4つのエンジニアリングされたシステインアミノ酸を有する抗体が挙げられる (Lyon et al., Methods in Enzym., vol. 502, pp. 123 - 138, 2012)。一部の実施形態において、1つ以上の遊離システイン残基が、エンジニアリングを使用することなく抗体中で既に存在し、その場合、既存の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させることができる。一部の実施形態において、抗体は、1つ以上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前に還元条件に曝露される。

20

30

【0155】

a) 例示的なリンカー

「リンカー」(L) は、1つ以上の部分、例えば、薬物部分 (D) を抗体または抗体断片 (Ab) に結合して免疫コンジュゲート、例えば、式 I のADCを形成するために使用することができる二官能性または多官能性部分である。一部の実施形態において、ADCは、薬物および抗体に共有結合するための反応性官能基を有するリンカーを使用して調製することができる。例えば、一部の実施形態において、抗体または抗体断片 (Ab) のシステインチオールは、リンカーの反応性官能基または薬物-リンカー中間体との結合を形成してADCを作製し得る。

【0156】

一態様において、リンカーは、抗体上に存在する遊離システインと反応して共有結合を形成し得る官能基を有する。このような反応性官能基の非限定的な例としては、マレイミド、ハロアセトアミド、 α -ハロアセチル、活性化エステル、例えば、スクシニミドエステル、4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアネート、およびイソチオシアネートが挙げられる。例えば、Klussman, et al., Bioconjugate Chemistry, vol. 15, pp. 765 - 773, 2004 の 766 頁におけるコンジュゲーション法参照。

40

【0157】

一部の実施形態において、リンカーは、抗体上に存在する求電子基と反応し得る官能基

50

を有する。例示的なそのような求電子基としては、限定されるものではないが、アルデヒドおよびケトンカルボニル基が挙げられる。一部の実施形態において、リンカーの反応性官能基のヘテロ原子が、抗体上の求電子基と反応し、抗体単位への共有結合を形成し得る。非限定的な例示的なこのような反応性官能基としては、限定されるものではないが、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、およびアリアルヒドラジドが挙げられる。

【0158】

リンカーは、1つ以上のリンカー構成成分を含み得る。例示的な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」または「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」)、および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。種々のリンカー構成成分が当分野において公知であり、それらの一部が以下に記載される。

10

【0159】

リンカーは、薬物の放出を容易にする「開裂可能なリンカー」であり得る。開裂可能なリンカーの非限定的な例としては、酸不安定性リンカー(例えば、ヒドラゾンを含む)、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、光不安定性リンカー、またはジスルフィド含有リンカー(Chari et al., Cancer Research, vol. 52, pp. 127-131, 1992; 米国特許第5,208,020号明細書)が挙げられる。

20

【0160】

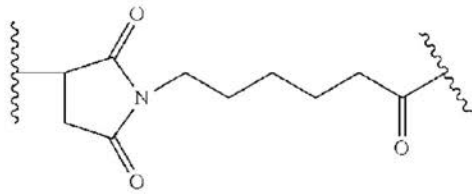
ある実施形態において、リンカーは、以下の式II: $-A_a - W_w - Y_y -$ (式中、Aは、「ストレッチャー単位」であり、aは、0~1の整数であり; Wは、「アミノ酸単位」であり、wは、0~12の整数であり; Yは「スペーサー単位」であり、yは、0、1、または2である)を有する。式IIのリンカーを含むADCは、式I(A): $A_b - (A_a - W_w - Y_y - D)_p$ (式中、Ab、D、およびpは、式Iについて上記定義のとおりである)を有する。このようなリンカーの例示的な実施形態は、米国特許第7,498,298号に記載されている。

30

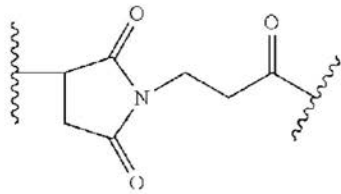
【0161】

一部の実施形態において、リンカー構成成分は、抗体を別のリンカー構成成分にまたは薬物部分に結合させる「ストレッチャー単位」(A)を含む。非限定的な例示的なストレッチャー単位が以下に示される(式中、波線は、抗体、薬物、または追加のリンカー構成成分への共有結合の部位を示す)。

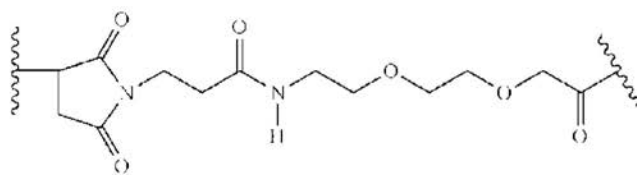
【化 1】



MC



MP



mPEG

10

20

【0162】

一部の実施形態において、リンカー構成成分は、「アミノ酸単位」(W)を含む。一部のそのような実施形態において、アミノ酸単位は、プロテアーゼによるリンカーの開裂を可能にし、それにより細胞内プロテアーゼ、例えば、リソソーム酵素への曝露時に免疫コンジュゲートからの薬物の放出を容易にする (Doronina et al., Nat. Biotechnol., vol. 21, pp. 778 - 784, 2003)。例示的なアミノ酸単位としては、限定されるものではないが、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、およびペンタペプチドが挙げられる。例示的なジペプチドとしては、限定されるものではないが、バリン-シトルリン (vc または val - cit)、アラニン-フェニルアラニン (af または ala - phe)、フェニルアラニン-リジン (fk または phe - lys) ; フェニルアラニン-ホモリジン (phe - homolys) ; および N-メチル-バリン-シトルリン (Me - val - cit) が挙げられる。例示的なトリペプチドとしては、限定されるものではないが、グリシン-バリン-シトルリン (gly - val - cit) およびグリシン-グリシン-グリシン (gly - gly - gly) が挙げられる。アミノ酸単位は、天然に生じるアミノ酸残基および/または微量アミノ酸および/または非天然存在アミノ酸類似体、例えば、シトルリンを含み得る。アミノ酸単位は、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、および D、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的開裂のために設計および最適化することができる。

30

【0163】

典型的には、ペプチドタイプリンカーは、2つ以上のアミノ酸および/またはペプチド断片間のペプチド結合を形成することにより調製することができる。このようなペプチド結合は、例えば、脂質相合成法 (例えば、E. Schroder and K. Luebeck (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76 - 136, Academic Press) に従って調製することができる。

40

【0164】

一部の実施形態において、リンカー構成成分は、抗体を薬物部分に直接、またはストレッチャー単位および/もしくはアミノ酸単位を介して結合する「スペーサー」単位 (Y) を含む。スペーサー単位は、「自己犠牲型 (self-immolative)」または「非自己犠牲型」であり得る。「非自己犠牲型」スペーサー単位は、ADCの開裂時にス

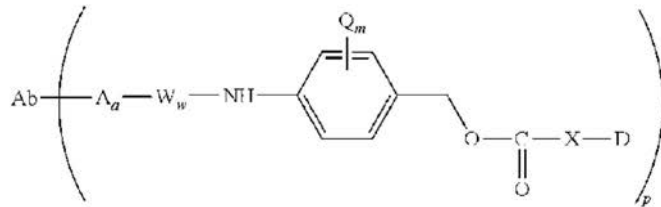
50

ペーサー単位の一部または全部が薬物部分に結合しているままのものである。非自己犠牲型スペーサー単位の例としては、限定されるものではないが、グリシンスペーサー単位およびグリシン-グリシンスペーサー単位が挙げられる。一部の実施形態において、腫瘍細胞関連プロテアーゼによるグリシン-グリシンスペーサー単位を含有するADCの酵素的開裂が、ADCの残部からのグリシン-グリシン-薬物部分の放出をもたらす。一部のそのような実施形態において、グリシン-グリシン-薬物部分は、腫瘍細胞中で加水分解ステップに供され、したがってグリシン-グリシンスペーサー単位を薬物部分から開裂する。

【0165】

「自己犠牲型」スペーサー単位は、薬物部分の放出を可能にする。ある実施形態において、リンカーのスペーサー単位は、p-アミノベンジル単位を含む。一部のそのような実施形態において、p-アミノベンジルアルコールは、アミド結合を介してアミノ酸単位に付着しており、カルバメート、メチルカルバメート、またはカルボネートが、ベンジルアルコールと薬物との間に作製される (Hamann et al. Expert Opin. Ther. Patents, vol. 15, pp. 1087-1103, 2005)。一部の実施形態において、スペーサー単位は、p-アミノベンジルオキシカルボニル (PAB) を含む。一部の実施形態において、自己犠牲型リンカーを含むADCは、構造：

10

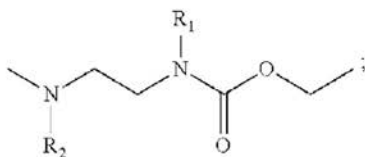
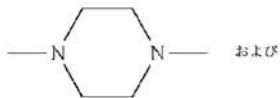


20

(式中、Qは、-C₁~C₈アルキル、-O-(C₁~C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、または-シアノであり、mは、0~4範囲の整数であり；Xは、1つ以上の追加のスペーサー単位であり得、または不存在であり得；pは、1~約20の範囲である)を有する。一部の実施形態において、pは、1~10、1~7、1~5、または1~4の範囲である。非限定的な例示的なXスペーサー単位としては、

30

【化3】



(式中、R₁およびR₂は、HおよびC₁~C₆アルキルから独立して選択される)が挙げられる。一部の実施形態において、R₁およびR₂は、それぞれ-CH₃である。

40

【0166】

自己犠牲型スペーサーの他の例としては、限定されるものではないが、PAB基と電子的に類似する芳香族化合物、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7,375,078号明細書; Hay et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., vol. 9, p. 2237-, 1999) およびオルト-またはパラ-アミノベンジルアセタールが挙げられる。一部の実施形態において、アミド結合加水分解時に環化を受けるスペーサー、例えば、置換および非置換4-アミノ酪酸アミド (Rodrigues et al., Chemistry Biology, vol. 2, pp. 223-, 1995)、適切に置換されているピシクロ[2.2.1]および

50

ビスクロ[2.2.2]環系 (Storm et al., J. Amer. Chem. Soc., vol. 94, p. 5815 - , 1972) ならびに 2-アミノフェニルプロピオン酸アミド (Amsberry et al., J. Org. Chem., vol. 55, p. 5867, 1990) を使用することができる。グリシン残基の α -炭素への薬物の結合は、ADCにおいて有用であり得る自己犠牲型スペーサーの別の例である (Kingsbury et al., J. Med. Chem., vol. 27, p. 1447, 1984)。

【0167】

一部の実施形態において、リンカーLは、分岐する多官能性リンカー部分を介して2つ以上の薬物部分が抗体に共有結合するための樹状型リンカーであり得る (Sun et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 12, pp. 2213 - 2215, 2002; Sun et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 11, pp. 1761 - 1768, 2003)。樹状リンカーは、ADCの効力に関連する薬物と抗体とのモル比、すなわち、負荷を増加させ得る。したがって、抗体が1つのみの反応性ステインチオール基を担持する場合、複数の薬物部分が、樹状リンカーを介して付着され得る。

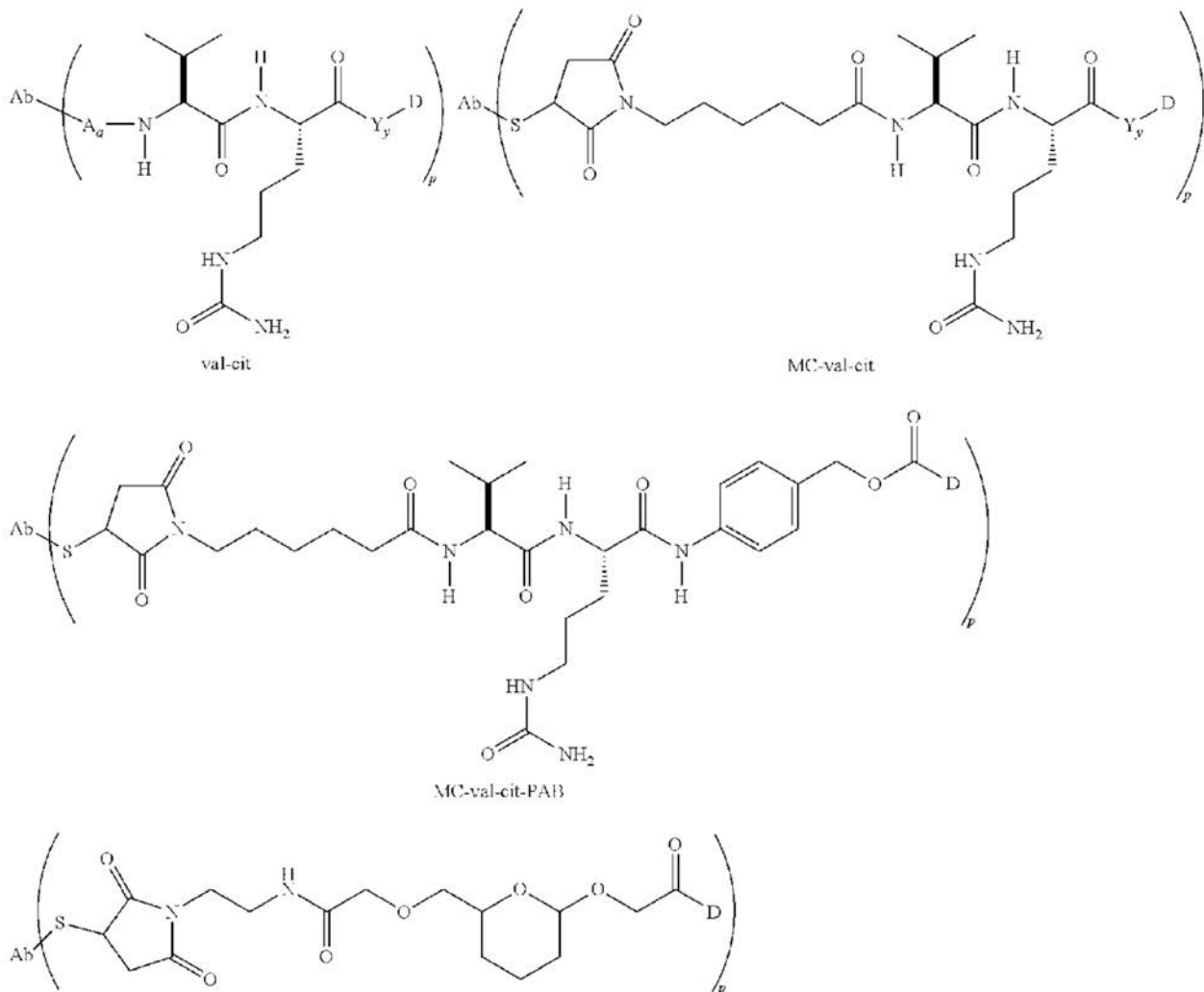
10

【0168】

非限定的な例示的リンカーは、式IのADCの関連において以下に示される：

【化4】

20



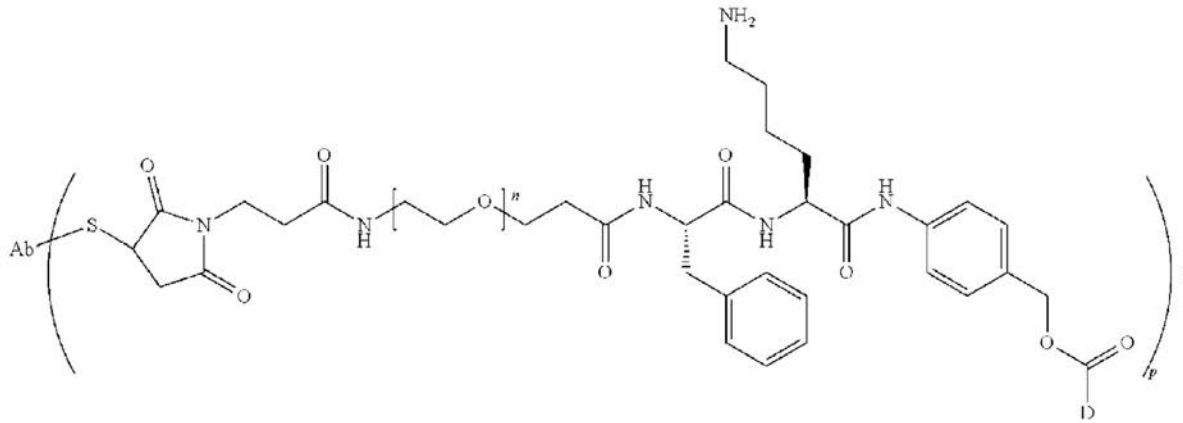
30

40

(式中、R₁およびR₂は、HおよびC₁~C₆アルキルから独立して選択される)。一部の実施形態において、R₁およびR₂は、それぞれ-CH₃である。

50

【化5】



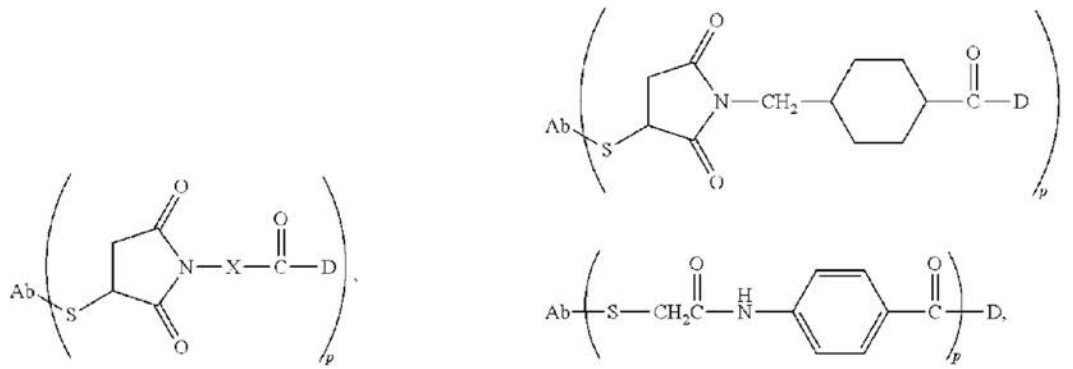
Phe-Lys-PAB-Ab

(式中、nは、0～12である)。一部の実施形態において、nは、2～10である。一部の実施形態において、nは、4～8である。

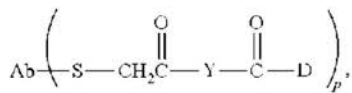
【0169】

さらなる非限定的な例示的なADCとしては、構造：

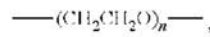
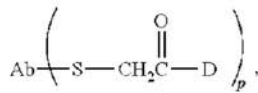
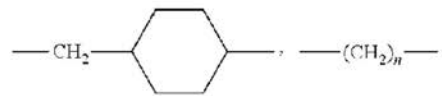
【化6】



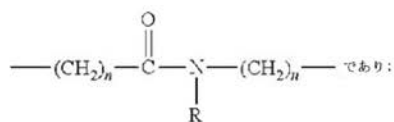
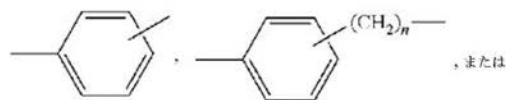
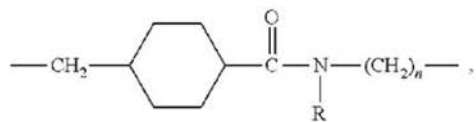
10



(式中、Xは、

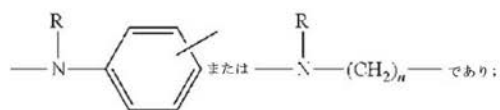


20



30

Yは、



それぞれの R は、独立して H または $C_1 \sim C_6$ アルキルであり； n は、1 ~ 12 である）が挙げられる。

40

【0170】

一部の実施形態において、リンカーは、溶解度および/または反応性をモジュレートする基により置換されている。非限定的な例として、荷電置換基、例えば、スルホネート ($-SO_3^-$) またはアンモニウムは、リンカー試薬の水溶性を増加させ、リンカー試薬と抗体および/もしくは薬物部分とのカップリング反応を容易にし得、または ADC を調製するために用いられる合成経路に応じて、Ab-L (抗体-リンカー中間体) と D とのカップリング反応、もしくは D-L (薬物-リンカー中間体) と Ab とのカップリング反応を容易にし得る。一部の実施形態において、リンカーの一部を抗体にカップリングし、リンカーの一部を薬物にカップリングし、次いで Ab-(リンカー部分)^a を薬物-(リンカー部分)^b にカップリングして式 I の ADC を形成する。

50

【0171】

本発明の化合物は、限定されるものではないが、以下のリンカー試薬を用いて調製されるADCを明示的に企図する：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(BMPSE)、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-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド(MPBH)、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-[(ベータ-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、およびスルホ-SMPB、なら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)、ならびに例として、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(以下に示される)、およびBM(PEG)₃(以下に示される)；イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、ジメチルアジブイミデートHCL)、活性エステル(例えば、ジスクシンイミジルスベレート)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート)、およびビス活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)。一部の実施形態において、ビス-マレイミド試薬は、チオール含有薬物部分、リンカー、またはリンカー-薬物中間体への抗体中のシステインのチオール基の付着を可能にする。チオール基と反応性である他の官能基としては、限定されるものではないが、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、およびイソチオシアネートが挙げられる。

10

20

30

【0172】

ある有用なリンカー試薬は、種々の商業的供給源、例えば、Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, Ill.), Molecular Biosciences Inc. (Boulder, Colo.) から入手し、または当分野において、例えば、Tokiet al., J. Org. Chem., vol. 67, pp. 1866-1872, 2002; Dubowchik, et al., Tetrahedron Letters, vol. 38, pp. 5257-60, 1997; Walker, J. Org. Chem., vol. 60, pp. 5352-5355, 1995; Frisch et al., Bioconjugate Chem., vol. 7, pp. 180-186, 1995; 米国特許第6,214,345号明細書; 国際公開第02/088172号パンフレット; 米国特許出願公開第2003130189号明細書; 米国特許出願公開第2003096743号明細書; 国際公開第03/026577号パンフレット; 国際公開第03/043583号パンフレット; および国際公開第04/032828号パンフレットに記載される手順に従って合成することができる

40

【0173】

50

炭素 - 14 標識 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ペンタ酢酸 (MX-DTPA) は、抗体への放射性ヌクレオチドのコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である。例えば、国際公開第 94/11026 号パンフレット参照。

【0174】

b) 例示的な薬物部分

1) メイタンシンおよびメイタンシノイド

一部の実施態様において、免疫コンジュゲートは、1つ以上のメイタンシノイド分子にコンジュゲートしている抗体を含む。メイタンシノイドはメイタンシンの誘導体であり、チューブリン重合を阻害することにより作用する有糸分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカ低木のメイテナス・セラタ (*Maytenus serrata*) から単離された (米国特許第 3896111 号明細書)。続いて、ある微生物もメイタンシノイド、例えば、メイタンシノールおよび C-3 メイタンシノールエステルを生成することが発見された (米国特許第 4151042 号明細書)。合成メイタンシノールおよびその誘導体および類似体は、例えば、米国特許第 4,137,230 号明細書; 同第 4,248,870 号明細書; 同第 4,256,746 号明細書; 同第 4,260,608 号明細書; 同第 4,265,814 号明細書; 同第 4,294,757 号明細書; 同第 4,307,016 号明細書; 同第 4,308,268 号明細書; 同第 4,308,269 号明細書; 同第 4,309,428 号明細書; 同第 4,313,946 号明細書; 同第 4,315,929 号明細書; 同第 4,317,821 号明細書; 同第 4,322,348 号明細書; 同第 4,331,598 号明細書; 同第 4,361,650 号明細書; 同第 4,364,866 号明細書; 同第 4,424,219 号明細書; 同第 4,450,254 号明細書; 同第 4,362,663 号明細書; および同第 4,371,533 号明細書に開示されている。

10

20

【0175】

メイタンシノイド薬物部分は、(i) 発酵もしくは化学修飾、または発酵産物の誘導体化により調製することが比較的利用しやすく、(ii) 抗体への非ジスルフィドリンカーを介するコンジュゲーションに好適な官能基による誘導体化に従い、(iii) 血漿中で安定であり、(iv) 種々の腫瘍細胞系に対して有効であるため、抗体-薬物コンジュゲートの有力な薬物部分である。

30

【0176】

メイタンシノイド薬物部分としての使用に好適なあるメイタンシノイドは当分野において公知であり、公知の方法に従って天然の供給源から単離することができ、または遺伝子操作技術を使用して産生することができる (例えば、Yuet al., PNAS, vol. 99, pp. 7968-7973, 2002 参照)。また、メイタンシノイドは、公知の方法に従って合成により調製することもできる。

【0177】

例示的なメイタンシノイド薬物部分としては、限定されるものではないが、修飾芳香環を有するもの、例えば、C-19-デクロロ (米国特許第 4,256,746 号明細書) (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り調製される); C-20-ヒドロキシ (または C-20-デメチル) + / - C-19-デクロロ (米国特許第 4,361,650 号明細書および同第 4,307,016 号明細書) (例えば、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) もしくはアクチノミセス属 (*Actinomyces*) を使用する脱メチル化または LAH を使用する脱塩素により調製される); および C-20-デメトキシ、C-20-アシロキシ (-OCOR)、+ / - デクロロ (米国特許第 4,294,757 号明細書) (例えば、アシル塩化物を使用するアシル化により調製される)、ならびに芳香環の他の位置における修飾を有するものが含まれる。

40

【0178】

例示的なメイタンシノイド薬物部分としては、修飾を有するもの、例えば、C-9-S

50

H (米国特許第 4, 424, 219 号明細書) (例えば、メイトンシノールと H_2S または P_2S_5 との反応により調製される); C-14-アルコキシメチル (デメトキシ/ CH_2OR) (米国特許第 4, 331, 598 号明細書); C-14-ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル (CH_2OH または CH_2OAc) (米国特許第 4, 450, 254 号明細書) (例えば、ノカルディア属 (*Nocardia*) から調製); C-15-ヒドロキシ/アシルオキシ (米国特許第 4, 364, 866 号明細書) (例えば、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) によるメイトンシノールの変換により調製される); C-15-メトキシ (米国特許第 4, 313, 946 号明細書および同第 4, 315, 929 号明細書) (例えば、トレウィア・ヌドルフロラ (*Trewia nudiflora*) から単離される); C-18-N-デメチル (例えば、米国特許第 4, 362, 663 号明細書および同第 4, 322, 348 号明細書) (ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) によるメイトンシノールの脱メチル化により調製される); および 4, 5-デオキシ (米国特許第 4, 371, 533 号明細書) (例えば、メイトンシノールの三塩化チタン/ $LAlH$ 還元により調製される) も挙げられる。

10

【0179】

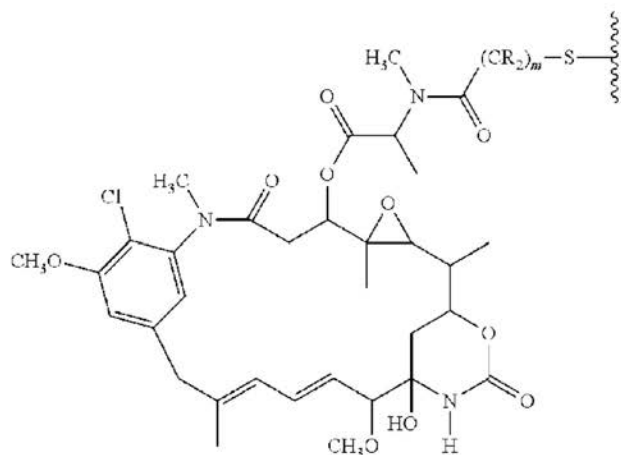
メイトンシノイド化合物上の多くの位置が結合位置として有用である。例えば、慣用のカップリング技術を使用してヒドロキシル基との反応によりエステル結合を形成することができる。一部の実施形態において、反応は、ヒドロキシル基を有する C-3 位、ヒドロキシメチルにより修飾されている C-14 位、ヒドロキシル基により修飾されている C-15 位、およびヒドロキシル基を有する C-20 位において生じ得る。一部の実施形態において、結合は、メイトンシノールまたはメイトンシノール類似体の C-3 位において形成される。

20

【0180】

メイトンシノイド薬物部分としては、以下の構造：

【化7】



30

(式中、波線は、ADCのリンカーへのメイトンシノイド薬物部分の硫黄原子の共有結合を示す)を有するものが挙げられる。それぞれのRは、独立してHまたは $C_1 - C_6$ アルキルであり得る。アミド基を硫黄原子に付着しているアルキレン鎖は、メタニル、エタニル、またはプロピルであり得、すなわち、mは、1、2または3である (米国特許第 633, 410 号明細書; 米国特許第 5, 208, 020 号明細書; Chari et al., *Cancer Res.*, vol. 52, pp. 127-131, 1992; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 93, pp. 8618-8623, 1996)。

40

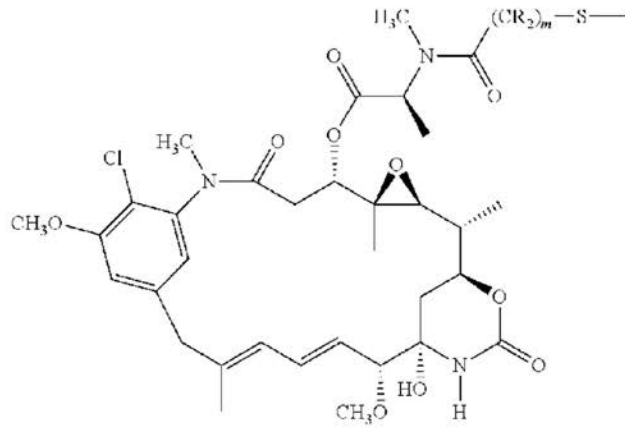
【0181】

メイトンシノイド薬物部分の全ての立体異性体、すなわちキラル炭素におけるRおよびS立体配置の任意の組合せが、本発明のADCについて企図される (米国特許第 7, 276, 497 号明細書; 米国特許第 6, 913, 748 号明細書; 米国特許第 6, 441,

50

163号明細書；米国特許第633,410号明細書(RE39151)；米国特許第5,208,020号明細書；Widdison et al(2006) J. Med. Chem. 49:4392-4408)。一部の実施態様において、メイタンシノイド薬物部分は、以下の立体化学を有する：

【化8】



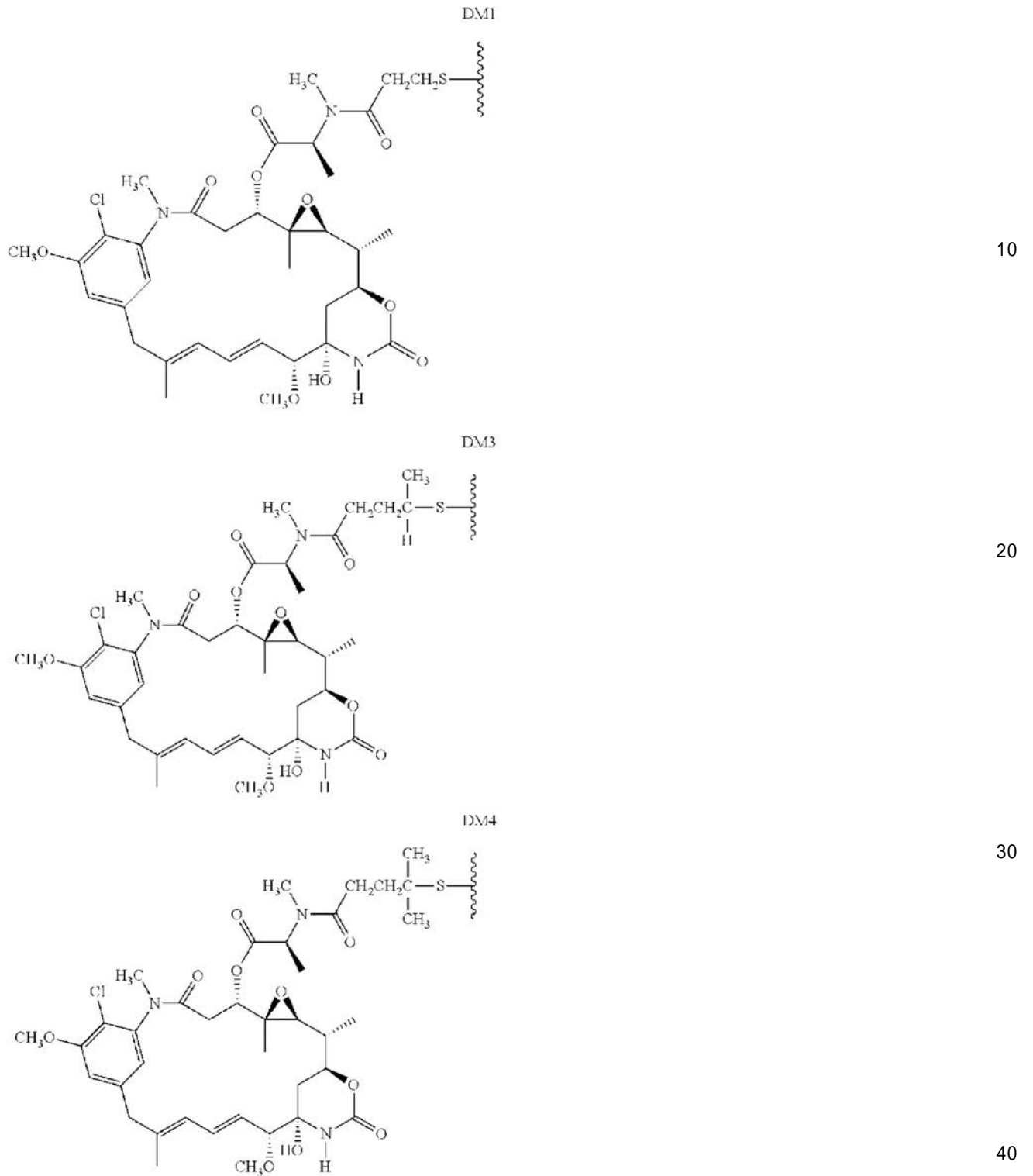
10

【0182】

メイタンシノイド薬物部分の例示的な実施態様としては、限定されるものではないが、構造：

20

【化 9】

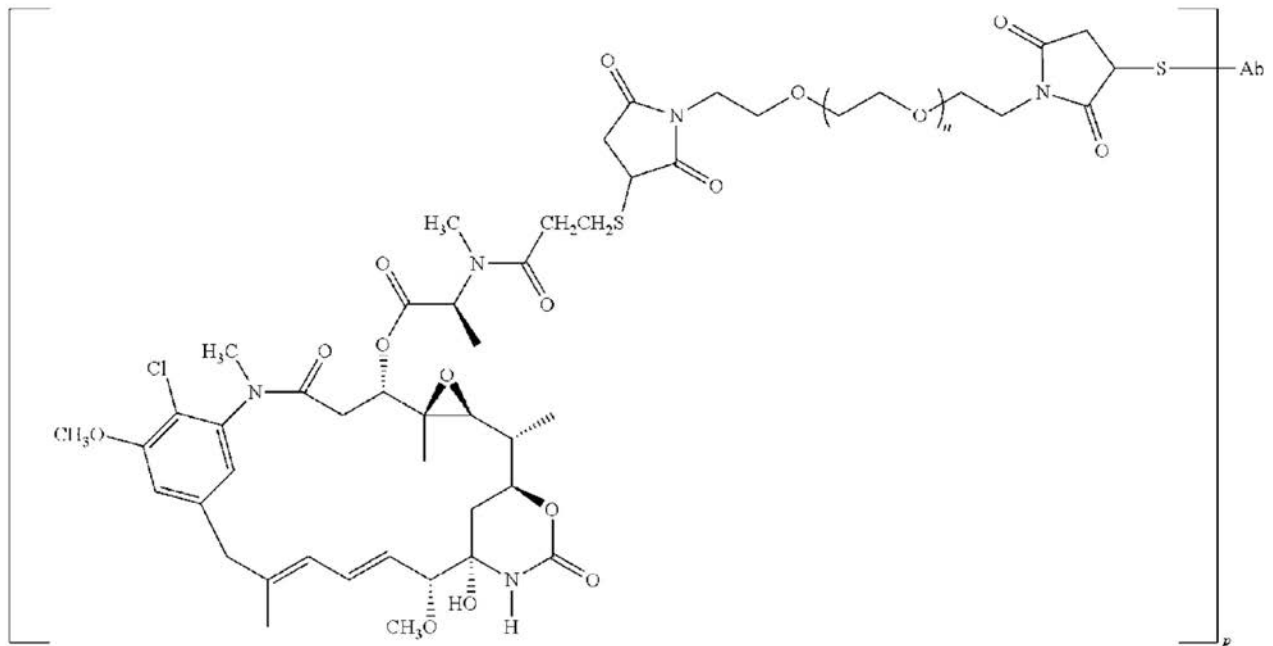


(式中、波線は、抗体 - 薬物コンジュゲートのリンカー (L) への薬物の硫黄原子の共有結合を示す) を有する DM1 ; DM3 および DM4 が挙げられる。

【0183】

DM1 が抗体のチオール基に BMPEO リンカーを介して結合している例示的な抗体 - 薬物コンジュゲートは、構造および略記号 :

【化 10】



10

(式中、Abは、抗体であり；nは、0、1、または2であり；pは、1～約20である)を有する。一部の実施形態において、pは、1～10であり、pは、1～7であり、pは、1～5であり、またはpは、1～4である。

20

【0184】

メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート、その作製方法およびその治療的使用は、例えば、米国特許第5,208,020号明細書および同第5,416,064号明細書；米国特許出願公開第2005/0276812A1号明細書；および欧州特許第0425235B1号明細書に開示されている。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, pp. 8618-8623, 1996；およびChari et al., Cancer Research, vol. 52, p. 127-131, 1992も参照。

30

【0185】

一部の実施形態において、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体の生物学的活性もメイタンシノイド分子の生物学的活性も実質的に縮小させずに、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製することができる。例えば、米国特許第5,208,020号明細書参照。一部の実施形態において、抗体分子当たりコンジュゲートしている平均3～4つのメイタンシノイド分子を有するADCは、抗体の機能にも溶解度にも悪影響を及ぼさずに標的細胞の細胞毒性の向上において効力を示している。一部の例において、毒素/抗体の1つの分子であっても、裸抗体の使用と比べて細胞毒性を向上させることが予測される。

40

【0186】

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な結合基としては、例えば、本明細書に記載のものならびに米国特許第5,208,020号明細書；欧州特許第0425235B1号明細書；Chari et al., Cancer Research, vol. 52, pp. 127-131, 1992；米国特許出願公開第2005/0276812A1号明細書；および米国特許出願公開第2005/016993A1号明細書に開示のものが挙げられる。

【0187】

(2) アウリスタチンおよびドラスタチン

薬物部分としては、ドラスタチン、アウリスタチン、ならびにそれらの類似体および誘導体が挙げられる(米国特許第5,635,483号明細書；米国特許第5,780,5

50

88号明細書；米国特許第5,767,237号明細書；米国特許第6,124,431号明細書）。アウリスタチンは、海産軟体動物化合物ドラスタチン-10の誘導体である。任意の特定の理論により拘束されるものではないが、ドラスタチンおよびアウリスタチンは、微小管ダイナミクス、GTP加水分解、ならびに核および細胞分裂（Woyke et al., *Antimicrob. Agents and Chemother.*, vol. 45, pp. 3580-3584, 2001）を妨げ、抗癌性（米国特許第5,663,149号明細書）および抗真菌活性（Pettit et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, pp. 2961-2965, 1998）を有することが示されている。ドラスタチン/アウリスタチン薬物部分は、ペプチド性薬物部分のN（アミノ）末端またはC（カルボキシル）末端を介して抗体に付着させることができる（国際公開第02/088172号パンフレット；Doroina et al., *Nature Biotechnology*, vol. 21, pp. 778-784, 2003；Francisco et al., *Blood*, vol. 102, pp. 1458-1465, 2003）。

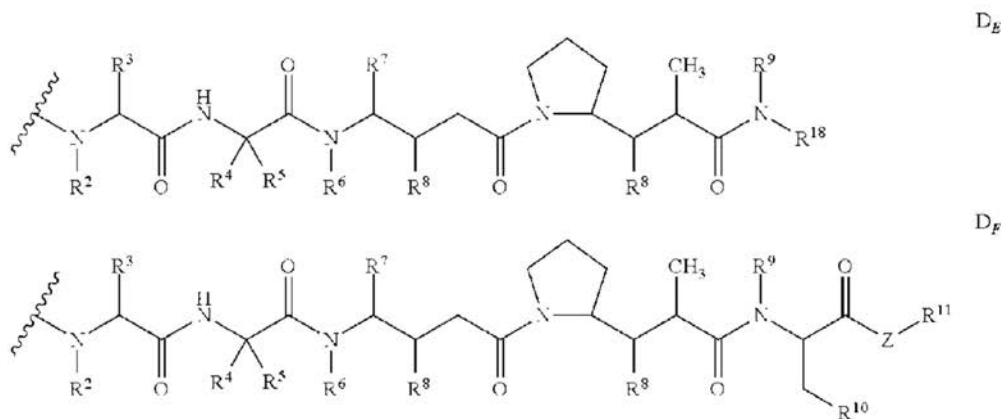
10

【0188】

例示的なアウリスタチンの実施態様としては、米国特許第7,498,298号明細書および米国特許第7,659,241号明細書に開示のN末端結合モノメチルアウリスタチン薬物部分D_EおよびD_Fが挙げられる：

【化11】

20



30

（式中、D_EおよびD_Fの波線は、抗体または抗体-リンカー構成成分への共有結合部位を示し、独立してそれぞれの位置において、

R²は、Hおよび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複素環および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複素環およびC₁~C₈アルキル-(C₃~C₈複素環)から選択され；

40

R⁵は、Hおよびメチルから選択され；

またはR⁴およびR⁵は共同で炭素環式環を形成し、式-(CR^aR^b)_n-（式中、R^aおよびR^bは、H、C₁~C₈アルキルおよびC₃~C₈炭素環式化合物から独立して選択され、nは、2、3、4、5および6から選択される）を有し；

R⁶は、Hおよび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複素環およびC₁~C₈アルキル-(C₃~C₈複素環)から選択され；

それぞれのR⁸は、H、OH、C₁~C₈アルキル、C₃~C₈炭素環およびO-(C₁~C₈アルキル)から独立して選択され；

50

R^9 は、Hおよび $C_1 \sim C_8$ アルキルから選択され；
 R^{10} は、アリールまたは $C_3 \sim C_8$ 複素環から選択され；
 Z は、O、S、NH、または NR^{12} であり、 R^{12} は、 $C_1 \sim C_8$ アルキルであり；
 R^{11} は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、アリール、 $C_3 \sim C_8$ 複素環、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 、または $(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ から選択され；
 m は、1～1000の範囲の整数であり；
 R^{13} は、 $C_2 \sim C_8$ アルキルであり；
 R^{14} は、Hまたは $C_1 \sim C_8$ アルキルであり；
 e のそれぞれの存在は、独立してH、 $COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、または $(CH_2)_n-SO_3-C_1 \sim C_8$ アルキルであり；
 e のそれぞれの存在は、独立してH、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、または $(CH_2)_n-COOH$ であり；
 R^{18} は、 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -アリール、 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ ($C_3 \sim C_8$ 複素環)、および $C(R^8)_2-C(R^8)_2$ ($C_3 \sim C_8$ 炭素環)から選択され；
 n は0～6の範囲の整数である)。

10

【0189】

一実施態様において、 R^3 、 R^4 および R^7 は、独立してイソプロピルまたはsec-ブチルであり、 R^5 は、-Hまたはメチルである。例示的な実施態様において、 R^3 および 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。

20

【0190】

さらに他の実施態様において、 R^2 および R^6 は、それぞれメチルであり、 R^9 は-Hである。

【0191】

さらに他の実施態様において、 R^8 のそれぞれの存在は、 $-OCH_3$ である。

【0192】

例示的な実施態様において、 R^3 および R^4 は、それぞれイソプロピルであり、 R^2 および 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 のそれぞれの存在は、 $-OCH_3$ であり、 R^9 は、-Hである。

30

【0193】

一実施態様において、 Z は、-O-またはNH-である。

【0194】

一実施態様において、 R^{10} は、アリールである。

【0195】

例示的な実施態様において、 R^{10} は、-フェニルである。

【0196】

例示的な実施態様において、 Z が-O-である場合、 R^{11} は、-H、メチルまたはt-ブチルである。

【0197】

一実施態様において、 Z が-NHである場合、 R^{11} は、 $-CH(R^{15})_2$ であり、 R^{15} は、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ であり、 R^{16} は、 $-C_1 \sim C_8$ アルキルまたは $(CH_2)_n-COOH$ である。

40

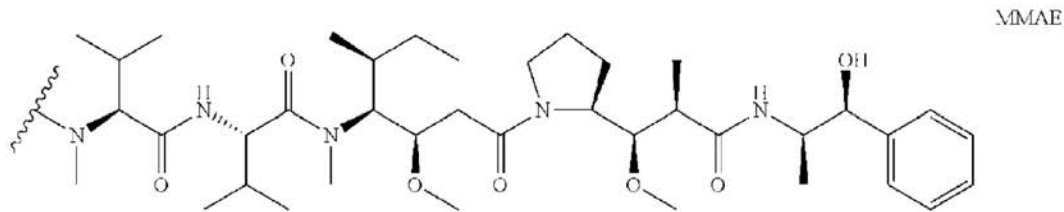
【0198】

別の実施態様において、 Z が-NHである場合、 R^{11} は、 $-CH(R^{15})_2$ であり、 R^{15} は、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ である。

【0199】

式 D_E の例示的なアウ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：

【化 1 2】

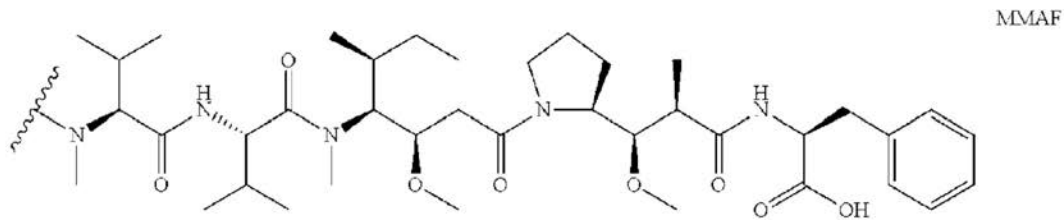


【 0 2 0 0】

式 D_E の例示的なアウ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：

10

【化 1 3】



【 0 2 0 1】

他の例示的な実施態様としては、ペントペプチドアウリスタチン薬物部分の C 末端における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 号パンフレット) およびペントペプチドアウリスタチン薬物部分の C 末端における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 号パンフレット) が挙げられる。

20

【 0 2 0 2】

MMAF および種々のリンカー構成成分を含む式 I の ADC の非限定的な例示的な実施態様としては、Ab-MC-PAB-MMAF および Ab-PAB-MMAF も挙げられる。タンパク質分解により開裂可能でないリンカーにより抗体に付着している MMAF を含む免疫コンジュゲートは、タンパク質分解により開裂可能なリンカーにより抗体に付着している MMAF を含む免疫コンジュゲートと同等の活性を保有することが示されている (Doronina et al., *Bioconjugate Chem.*, vol. 17, pp. 114 - 124, 2006 参照)。一部のこのような実施形態において、薬物放出は細胞中の抗体分解に影響されると考えられる。

30

【 0 2 0 3】

典型的には、ペプチドベースの薬物部分は、2 つ以上のアミノ酸および/またはペプチド断片間でペプチド結合を形成することにより調製することができる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成法に従って調製することができる (例えば、E. Schroeder and K. Luebke, "The Peptides", volume 1, pp. 76 - 136, 1965, Academic Press 参照)。アウリスタチン/ドラスタチン薬物部分は、一部の実施形態において、米国特許第 7,498,298 号明細書; 米国特許第 5,635,483 号明細書; 米国特許第 5,780,588 号明細書; Pettit et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, pp. 5463 - 5465, 1998; Pettit et al., *Anti-Cancer Drug Design*, vol. 13, pp. 243 - 277, 1998; Pettit et al., *Synthesis*, vol. 6, pp. 719 - 725, 1996; Pettit et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* vol. 15, pp. 859 - 863, 1996; および Doronina, *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 778 - 784, 2003 の方法に従って調製することができる。

40

50

【0204】

一部の実施形態において、式D_Eのアウリスタチン/ドラスタチン薬物部分、例えば、MMAE、およびD_E、例えば、MMAF、ならびにそれらの薬物-リンカー中間体および誘導体、例えば、MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF、およびMC-vc-PAB-MMAEは、米国特許第7,498,298号明細書；Doronina et al., Bioconjugate Chem., vol. 17, pp. 114-124, 2006；およびDoronina et al., Nat. Biotech., vol. 21, pp. 778-784, 2003に記載の方法を使用して調製し、次いで目的の抗体にコンジュゲートさせることができる。

【0205】

(3) カリケアマイシン

一部の実施形態において、免疫コンジュゲートは、1つ以上のカリケアマイシン分子にコンジュゲートしている抗体または抗体断片を含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリー、およびそれらの類似体は、サブピコモル濃度において二本鎖DNA分解を産生し得る(Hinman et al., Cancer Research, vol. 53, pp. 3336-3342, 1993；Lode et al., Cancer Research, vol. 58, pp. 2925-2928, 1998)。カリケアマイシンは、細胞内作用部位を有するが、ある例において、細胞膜を容易に通過しない。したがって、抗体媒介内在化を介するこれらの薬剤の細胞取り込みは、一部の実施形態において、それらの細胞毒性効果を大きく向上させ得る。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を調製する非限定的な例示的方法は、例えば、米国特許第5,712,374号明細書；米国特許第5,714,586号明細書；米国特許第5,739,116号明細書；および米国特許第5,767,285号明細書に記載されている。

【0206】

(4) ピロロベンゾジアゼピン

一部の実施形態において、ADCは、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)を含む。一部の実施形態において、PDB二量体は特異的DNA配列を認識し、それに結合する。天然産物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 et al., J. Am. Chem. Soc., vol. 87, pp. 5793-5795, 1965；Leimgruber et al., J. Am. Chem. Soc., vol. 87, pp. 5791-5793, 1965)。それ以降、天然存在および類似体の両方の多数のPBDが報告されており(Thurston et al., Chem. Rev. vol. 1994, pp. 433-465, 1994)、それらとしては、三環式PBD足場の二量体(米国特許第6,884,799号明細書；米国特許第7,049,311号明細書；米国特許第7,067,511号明細書；米国特許第7,265,105号明細書；米国特許第7,511,032号明細書；米国特許第7,528,126号明細書；米国特許第7,557,099号明細書)が挙げられる。いかなる特定の理論にも拘束されるものではないが、二量体構造が、B型DNAの副溝との等螺旋性(isohelicity)に適切な三次元形状を付与し、結合部位における滑合をもたらすと考えられる(Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975)；Hurley and Needham-Vandevanter, Acc. Chem. Res., vol. 19, pp. 230-237, 1986)。C2アリアル置換基を担持する二量体PBD化合物は、細胞毒性剤として有用であることが示されている(Hartley et al. Cancer Res., vol. 70, pp. 6849-6858, 2010；Antonow, J. Med. Chem. vol. 53, pp. 2927-2941, 2010；Howard et al., Bioorganic and Med. Chem. Letters, vol. 19, pp. 6463-6466, 2009)。

【0207】

PBD二量体は抗体にコンジュゲートされており、得られるADCは、抗癌特性を有す

10

20

30

40

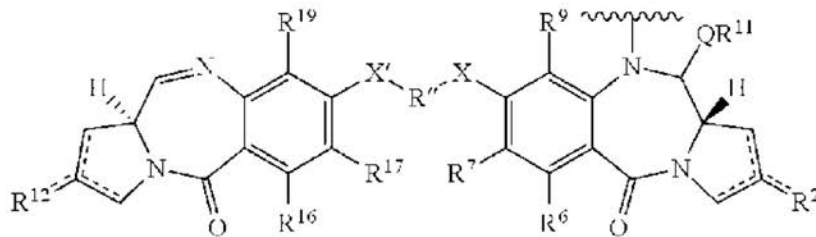
50

ることが示されている。非限定的な例示的なPBD二量体上の結合部位としては、5員ピロ口環、PBD単位の間テザー、およびN10-C11イミン基が挙げられる（国際公開第2009/016516号パンフレット；米国特許出願公開第2009/304710号明細書；米国特許出願公開第2010/047257号明細書；米国特許出願公開第2009/036431号明細書；米国特許出願公開第2011/0256157号明細書；国際公開第2011/130598号パンフレット）。

【0208】

非限定的な例示的ADCのPBD二量体構成成分は：

【化14】



のもの、ならびにその塩および溶媒和物（式中、

波線は、リンカーへの共有結合部位を示し；

点線は、C1とC2との間またはC2とC3との間の二重結合の任意選択の存在を示し；

R²は、H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂RおよびCORから独立して選択され、場合により、ハ口またはジハ口からさらに選択され、R^Dは、R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H、およびハ口から独立して選択され；

R⁶およびR⁹は、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Snおよびハ口から独立して選択され；

R⁷は、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Snおよびハ口から独立して選択され；

Qは、O、S、およびNHから独立して選択され、

R¹¹は、HもしくはRのいずれかであり、またはQがOである場合、SO₃Mであり、Mは、金属陽イオンであり；

RおよびR'は、場合により置換されている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、およびC₅~₂₀アリール基からそれぞれ独立して選択され、場合により、基NRR'との関連で、RおよびR'は、それらが付着している窒素原子と一緒に、場合により置換されている4、5、6、または7員複素環式環を形成し；

R¹²、R¹⁶、R¹⁹、およびR¹⁷は、それぞれR²、R⁶、R⁹、およびR⁷について定義されるとおりであり、

R''は、C₃~₁₂アルキレン基であり、その鎖は、1つ以上のヘテロ原子、例えば、O、S、N(H)、NMe、および/または芳香環、例えば、ベンゼンまたはピリジンにより中断されていてよく、それらの環は、場合により置換されており；

XおよびX'は、O、S、およびN(H)から独立して選択される)である。

【0209】

一部の実施形態において、RおよびR'は、場合により置換されているC₁~₁₂アルキル、C₃~₂₀複素環、およびC₅~₂₀アリール基からそれぞれ独立して選択され、場合により、基NRR'との関連で、RおよびR'は、それらが付着している窒素原子と一緒に、場合により置換されている4、5、6、または7員複素環式環を形成する。一部の実施形態において、R⁹およびR¹⁹は、Hである。一部の実施形態において、R⁶およびR¹⁶は、Hである。

【0210】

一部の実施形態において、R⁷およびR¹⁷は両方とも、OR^{7A}であり、R^{7A}は、場合に

10

20

30

40

50

より置換されている $C_1 \sim 4$ アルキルである。一部の実施形態において、 R^{7A} は、Me である。一部の実施形態において、 R^{7A} は、 CH_2Ph であり、Ph は、フェニル基である。一部の実施形態において、X は、O である。一部の実施形態において、 R^{11} は、H である。一部の実施形態において、それぞれの単量体単位中の C2 と C3 との間に二重結合が存在する。

【0211】

一部の実施形態において、 R^2 および R^{12} は、H および R から独立して選択される。一部の実施形態において、 R^2 および R^{12} は、独立して R である。一部の実施形態において、 R^2 および R^{12} は、独立して、場合により置換されている $C_5 \sim 20$ アリールまたは $C_5 \sim 7$ アリールまたは $C_8 \sim 10$ アリールである。一部の実施形態において、 R^2 および R^{12} は、独立して、場合により置換されているフェニル、チエニル、ナフチル、ピリジル、キノリニル、またはイソキノリニルである。一部の実施形態において、 R^2 および R^{12} は、 $=O$ 、 $=CH-R^D$ 、および $=C(R^D)_2$ から独立して選択される。一部の実施形態において、 R^2 および R^{12} は、それぞれ $=CH_2$ である。一部の実施形態において、 R^2 および R^{12} は、それぞれ H である。一部の実施形態において、 R^2 および R^{12} は、それぞれ $=O$ である。一部の実施形態において、 R^2 および R^{12} は、それぞれ $=CF_2$ である。一部の実施形態において、 R^2 および / または R^{12} は、独立して $=C(R^D)_2$ である。一部の実施形態において、 R^2 および / または R^{12} は、独立して $=CH-R^D$ である。

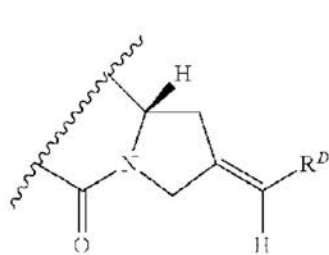
10

【0212】

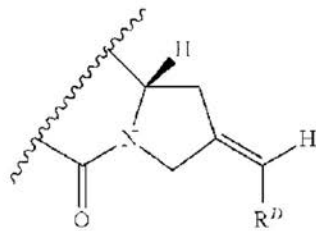
一部の実施形態において、 R^2 および / または R^{12} が $=CH-R^D$ である場合、それぞれの基は、独立して、以下に示される立体配置のいずれかを有し得る：

20

【化15】



(II)



30

一部の実施形態において、 $=CH-R^D$ は、立体配置 (I) である。一部の実施形態において、 R^D は、 C_3 アルキレン基または C_5 アルキレン基である。

40

【0213】

PBD二量体 - val - cit - PAB - Ab および PBD二量体 - Phe - Lys - PAB - Ab のリンカーは、プロテアーゼ開裂可能である一方、PBD二量体 - マレイミド - アセタールのリンカーは、酸不安定性である。

【0214】

PBD二量体およびPBD二量体を含むADCは、当分野において公知の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号パンフレット；米国特許出願公開第2009/304710号明細書；米国特許出願公開第2010/047257号明細書；米国特許出願公開第2009/036431号明細書；米国特許出願公開第2011/0256157号明細書；国際公開第2011/130598号パンフレット参照。

50

【0215】

5) アントラサイクリン

一部の実施形態において、ADCは、アントラサイクリンを含み得る。アントラサイクリンは、細胞毒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よっても拘束されるものではないが、研究は、アントラサイクリンが多数の異なる機序、例として、1) 細胞のDNA中への薬物分子のインターカレーションと、それによるDNA依存的核酸合成の阻害；2) 次に細胞巨大分子と反応して細胞への損傷を引き起こすフリーラジカルの薬物による産生、および/または3) 薬物分子と細胞膜との相互作用により細胞を殺傷するように機能し得ることを示している(例えば、C. Peterson et al., "Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia" in Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy; N.R. Bachur, "Free Radical Damage" id. at pp. 97-102 参照)。アントラサイクリンは、その細胞毒性潜在性のため、多数の癌、例として、白血病、乳癌、肺癌、卵巣腺癌、および肉腫の治療において使用されている(例えば、P.H. Wiernik, in Anthracycline: Current Status And New Developments p 11 参照)。

10

【0216】

非限定的な例示的なアントラサイクリンとしては、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ダウノマイシン、ネモルビシン、およびそれらの誘導体が挙げられる。ダウノルビシンおよびドキソルビシンの免疫コンジュゲートおよびプロドラッグが調製され、研究されている(Kratz et al., Current Med. Chem., vol. 13, pp. 477-523, 2006; Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters, vol. 16, pp. 358-362, 1996; Torgov et al., Bioconj. Chem., vol. 16, pp. 717-721, 2005; Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 97, pp. 829-834, 2000; Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters, vol. 12, pp. 1529-1532, 2002; King et al., J. Med. Chem., vol. 45, pp. 4336-4343, 2002; 欧州特許第0328147号明細書; 米国特許第6,630,579号明細書)。抗体-薬物コンジュゲートBR96-ドキソルビシンは、腫瘍関連抗原ルイス-Yと特異的に反応し、第I相および第II相試験において評価されている(Saleh et al., J. Clin. Oncology, vol. 18, pp. 2282-2292, 2000; Ajani et al., Cancer Jour., vol. 6, pp. 78-81, 2000; Tolcher et al., J. Clin. Oncology, vol. 17, pp. 478-484, 1999)。

20

30

【0217】

PNU-159682は、ネモルビシンの強力な代謝産物(または誘導体)である(Quintieri et al., Clinical Cancer Research, vol. 11, pp. 1608-1617, 2005)。ネモルビシンは、ドキソルビシンのグリコシドアミノ上の2-メトキシモルホリノ基を有するドキソルビシンの半合成類似体であり、臨床評価中であり(Grandi et al. Cancer Treat. Rev. vol. 17, pp. 133-138, 1990; Ripamonti et al. Brit. J. Cancer, vol. 65, pp. 703-707, 1992)、例としては、第II相/第III相試験が挙げられる(Sun et al., Proceedings of the American Society for Clinical Oncology, vol. 22, Abs 1448, 2003; Quintieri, Proceedings of the American Assoc

40

50

iation of Cancer Research, vol. 44: 1st Ed, Abs 4649, 2003; Pacciarini et al., Jour. Clin. Oncology, vol. 24, p. 14116, 2006)。

【0218】

アントラサイクリン、例として、PNU-159682は、いくつかの結合部位、および種々のリンカー（米国特許出願公開第2011/0076287号明細書；国際公開第2009/099741号パンフレット；米国特許出願公開第2010/0034837号明細書；国際公開第2010/009124号パンフレット）、例として、本明細書に記載のリンカーを介して抗体にコンジュゲートさせることができる。

【0219】

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一方、PNU-159682-val-cit-PAB-Ab、PNU-159682-val-cit-PAB-スペーサー-Ab、およびPNU-159682-val-cit-PAB-スペーサー(R^1R^2)-Abのリンカーは、プロテアーゼ開裂可能である。

【0220】

(6) 他の薬物部分

薬物部分としては、ゲルダナマイシン(Mandler et al., J. Nat. Cancer Inst., vol. 92, pp. 1573-1581, 2000; Mandler et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters, vol. 10, pp. 1025-1028, 2000; Mandler et al., Bioconjugate Chem., vol. 13, pp. 786-791, 2002); ならびに酵素活性毒素およびその断片、例として、限定されるものではないが、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)からのもの)、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-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、および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、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンも挙げられる。例えば、国際公開第93/21232号パンフレット参照。

【0221】

薬物部分としては、核酸分解活性を有する化合物(例えば、リボヌクレアーゼまたはDNAエンドヌクレアーゼ)も挙げられる。

【0222】

ある実施形態において、免疫コンジュゲートは、高放射性の原子を含み得る。種々の放射性同位体が放射性コンジュゲート抗体の産生に利用可能である。例としては、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、およびLuの放射性同位体が挙げられる。一部の実施形態において、免疫コンジュゲートを検出に使用する場合、それは、シンチグラフィ試験のための放射性原子、例えば、 Tc^{99} もしくは I^{123} 、または核磁気共鳴(NMR)イメージング(磁気共鳴イメージング(MRI))としても公知)用のスピン標識、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、マンガンまたは鉄を含み得る。例えば、PETイメージングのためにジルコニウム-89を種々の金属キレート剤に錯化させ、抗体にコンジュゲートさせることができる(国際公開第2011/056983号パンフレット)。

【0223】

放射標識または他の標識は、公知の手法で免疫コンジュゲートに取り込むことができる。例えば、ペプチドは、例えば、1つ以上のフッ素-19原子を1つ以上の水素の代わりに含む好適なアミノ酸前駆体を使用して生合成または化学合成することができる。一部の

10

20

30

40

50

実施形態において、標識、例えば、Tc⁹⁹、I¹²³、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、およびIn¹¹¹を、抗体中のシステイン残基を介して付着させることができる。一部の実施形態において、イットリウム-90は、抗体のリジン残基を介して付着させることができる。一部の実施形態において、IODOGEN法(Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 80, pp. 49-57, 1978)を使用してヨウ素-123を取り込むことができる。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”(Chatal, CRC Press 1989)は、ある他の方法を記載している。

【0224】

ある実施形態において、免疫コンジュゲートは、プロドラッグ活性化酵素にコンジュゲートしている抗体を含み得る。一部のこのような実施形態において、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号パンフレット参照)を活性薬物、例えば、抗癌薬に変換する。このような免疫コンジュゲートは、一部の実施形態において、抗体依存的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させることができる酵素としては、限定されるものではないが、ホスフェート含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なアルカリホスファターゼ;スルフェート含有プロドラッグを遊離薬物に変換するために有用なアリアルスルファターゼ;非毒性5-フルオロシトシンを抗癌薬5-フルオロウラシルに変換するために有用な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ために有用なプロテアーゼ、例えば、セラチアプロテアーゼ、テルモシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、およびカテプシン(例えば、カテプシンBおよびL);D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを変換するために有用な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ために有用な炭水化物開裂酵素、例えば、 α -ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ; β -ラクタムにより誘導体化されている薬物を遊離薬物に変換するために有用な β -ラクタマーゼ;ならびにアミン窒素においてフェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基によりそれぞれ誘導体化されている薬物を遊離薬物に変換するために有用なペニシリンアミダーゼ、例えば、ペニシリンVアミダーゼおよびペニシリンGアミダーゼが挙げられる。一部の実施形態において、酵素は、当分野において周知の組換えDNA技術により抗体に共有結合させることができる。例えば、Neuberger et al., Nature, vol. 312, pp. 604-608, 1984参照。

【0225】

c) 薬物負荷

薬物負荷は、式Iの分子における抗体当たりの薬物部分の平均数pにより表される。薬物負荷は、抗体当たり1~20個の薬物部分(D)の範囲であり得る。式IのADCは、1~20個の範囲の薬物部分とコンジュゲートしている抗体の集団を含む。コンジュゲーション反応からのADC調製において使用される抗体当たりの薬物部分の平均数は、慣用の手段、例えば、質量分析、ELISAアッセイ、およびHPLCにより特徴付けることができる。また、pの単位でのADCの定量分布を測定することもできる。一部の例において、pがある値である同種ADCを、他の薬物負荷を有するADCから分離し、精製し、特徴付けることは、逆相HPLCまたは電気泳動のような手段により達成することができる。

【0226】

一部の抗体-薬物コンジュゲートについて、pは、抗体上の付着部位の数により限定され得る。例えば、上記のある例示的な実施形態のように付着がシステインチオールである場合、抗体は、1つのみもしくは数個のシステインチオール基を有し得、または1つのみもしくは数個の反応性が十分なチオール基を有し得、それらによりリンカーを付着させることができる。ある実施形態において、薬物負荷がより高くなると、例えば、 $p > 5$ になると、ある抗体-薬物コンジュゲートの凝集、不溶性、毒性、または細胞透過性の損失を引き起こし得る。ある実施形態において、ADCについての平均薬物負荷は、1~約8;

約 2 ~ 約 6 ; または約 3 ~ 約 5 の範囲である。実際、ある ADC について、抗体当たりの薬物部分の最適な比は、8 未満であり得、約 2 ~ 約 5 であり得ることが示されている (米国特許第 7, 498, 298 号明細書)。

【0227】

ある実施形態において、理論上の最大数よりも少ない薬物部分を、コンジュゲーション反応の間に抗体にコンジュゲートさせる。抗体は、以下に考察されるとおり、例えば、薬物-リンカー中間体ともリンカー試薬とも反応しないリジン残基を含有し得る。一般に、抗体は、薬物部分に結合され得る多くの遊離および反応性システインチオール基を含有せず；実際、抗体中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。ある実施形態において、抗体は、還元剤、例えば、ジチオトレイトール (DTT) またはトリカルボニルエチルホスフィン (TCEP) により部分または完全還元条件下で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。ある実施形態において、抗体を変性条件に供して反応性求核基、例えば、リジンまたはシステインを明らかにする。

10

【0228】

ADC の負荷 (薬物 / 抗体比) は、様々な手法で、例えば、(i) 抗体に対してモル過剰の薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬の限定、(ii) コンジュゲーション反応時間または温度の限定、および (iii) システインチオール修飾のための部分または限定的還元条件により制御することができる。

【0229】

2 つ以上の求核基が薬物-リンカー中間体またはリンカー試薬と反応する場合、得られる生成物は、抗体に付着している 1 つ以上の薬物部分の分布を有する ADC の混合物であることが理解される。抗体当たりの薬物の平均数は、抗体に特異的であり、薬物に特異的である二重 ELISA 抗体アッセイにより混合物から算出することができる。個々の ADC は、質量分析法により混合物中で同定し、HPLC、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィーにより分離することができる (例えば、McDonagh et al., Prot. Engr. Design & Selection, vol. 19, pp. 299-307, 2006; Hamblett et al., Clin. Cancer Res., vol. 10, pp. 7063-7070, 2004 参照)。ある実施形態において、単一の負荷値を有する同種 ADC を、電気泳動またはクロマトグラフィーによりコンジュゲーション混合物から単離することができる。

20

30

【0230】

d) 免疫コンジュゲートを調製するある方法

式 I の ADC である免疫コンジュゲートは、当業者に公知の有機化学反応、条件、および試薬を用いるいくつかの経路、例として、(1) 抗体の求核基を二価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、次いで薬物部分 D と反応させることと；ならびに (2) 薬物部分の求核基を二価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、次いで抗体の求核基と反応させることにより調製することができる。後者の経路を介して式 I の ADC を調製する例示的な方法は、米国特許第 7, 498, 298 号明細書に記載されている。

40

【0231】

抗体上の求核基としては、限定されるものではないが、(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、および (iv) 抗体がグリコシル化される糖ヒドロキシルまたはアミノ基が挙げられる。アミン、チオール、およびヒドロキシル基は求核性であり、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基、例として、(i) 活性エステル、例えば、NHS エステル、HOBT エステル、ハロホルメート、および酸ハロゲン化物；(ii) アルキルおよびベンジルハロゲン化物、例えば、ハロアセトアミド；ならびに (iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基と反応して共有結合を形成し得る。ある抗体は、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。抗体は、抗体が完全にまたは部分

50

的に還元されるように、還元剤、例えば、DTT（ジチオトレイトール）またはトリカルボニルエチルホスフィン（TCEP）による処理によりリンカー試薬とのコンジュゲーションに対して反応性とすることができる。したがって、それぞれのシステイン架橋は、理論上、2つの反応性チオール求核剤を形成する。追加の求核基は、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（Traut試薬）と反応させてアミンをチオールに変換させることにより抗体中に導入することができる。反応性チオール基も、1、2、3、4つ以上のシステイン残基を導入することにより（例えば、1つ以上の非天然システインアミノ酸残基を含むバリエーション抗体を調製することにより）抗体中に導入することができる。

【0232】

本発明の抗体-薬物コンジュゲートは、抗体または抗体断片上の求電子基、例えば、アルデヒドまたはケトンカルボニル基と、リンカー試薬または薬物上の求核基との間の反応によっても産生することができる。リンカー試薬上の有用な求核基としては、限定されるものではないが、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、およびアリアルヒドラジドが挙げられる。一実施形態において、抗体は、リンカー試薬または薬物上の求核置換基と反応し得る求電子部分を導入するように修飾される。別の実施形態において、グリコシル化抗体の糖を、例えば、過ヨウ素酸塩酸化試薬により酸化してリンカー試薬または薬物部分のアミン基と反応し得るアルデヒド基またはケトン基を形成することができる。得られるイミンシッフ塩基群は、安定した結合を形成し得、または例えば、ホウ化水素試薬により還元して安定したアミン結合を形成することができる。一実施形態において、グリコシル化抗体の炭水化物部分と、ガラクトースオキシダーゼまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとの反応は、薬物上の適切な基と反応し得る抗体中のカルボニル（アルデヒドおよびケトン）基を生じさせ得る（Hermanson, *Bioconjugate Techniques*）。別の実施形態において、N末端セリンまたはトレオニン残基を含有する抗体はメタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応し、第1のアミノ酸の代わりにアルデヒドを産生し得る（Geoghagan & Stroh, *Bioconjugate Chem.*, vol. 3, pp. 138-146, 1992; 米国特許第5,362,852号明細書）。このようなアルデヒドは、薬物部分またはリンカー求核剤と反応させることができる。

【0233】

薬物部分上の例示的な求核基としては、限定されるものではないが、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基、例として、(i) 活性エステル、例えば、NHSエステル、HOBTエステル、ハロホルメート、および酸ハロゲン化物；(ii) アルキルおよ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、およびマレイミド基と反応して共有結合を形成し得るアミン、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、およびアリアルヒドラジド基が挙げられる。

【0234】

ADCを調製するために使用することができる非限定的な例示的な架橋試薬は、本明細書において「例示的なリンカー」と題されるセクションに記載される。このような架橋試薬を使用して2つの部分、例として、タンパク質性部分および化学部分を結合させる方法は、当分野において公知である。一部の実施形態において、抗体および細胞毒性剤を含む融合タンパク質は、例えば、組換え技術またはペプチド合成により作製することができる。組換えDNA分子は、互いに隣接しており、または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隔離されている、コンジュゲートの抗体および細胞毒性部分をコードする領域を含み得る。

【0235】

さらに別の実施形態において、抗体または抗体断片は、腫瘍のプレターゲットングにおいて利用するために「受容体」（例えば、ストレプトアビジン）にコンジュゲートさせることができ、その腫瘍のプレターゲットングにおいては、抗体/抗体断片-受容体コンジ

10

20

30

40

50

ュゲートを患者に投与し、次いでクリアリング剤を使用して血液循環からの非結合コンジュゲートを除去し、次いで細胞毒性剤（例えば、薬物または放射性ヌクレオチド）にコンジュゲートしている「リガンド」（例えば、アビジン）を投与する。

【0236】

C. 診断および検出のための方法および組成物

ある実施形態において、本明細書において提供される抗Ror2抗体または抗体断片のいずれも、生物学的試料中のRor2の存在の検出に使用することができる。本明細書において使用される用語「検出すること」は、定量または定性的検出を包含する。ある実施形態において、生物学的試料は、細胞または組織、例えば、乳房、膵臓、食道、肺および/または脳細胞または組織を含む。

10

【0237】

本発明のさらなる態様は、Ror2発現レベルが体内の少なくとも1つの場所において正常な生理学的レベルから増加または減少する癌または別の疾患を診断および/またはモニタリングするための本発明の抗Ror2抗体または抗体断片に関する。

【0238】

好ましい実施形態において、本発明の抗体または抗体断片は、検出可能な分子または物質、例えば、上記の蛍光分子、放射性分子または当分野において公知の任意の他の標識により標識することができる。例えば、本発明の抗体または抗体断片は、放射性分子により標識することができる。例えば、好適な放射性分子としては、限定されるものではないが、シンチグラフィ試験に使用される放射性原子、例えば、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{111}In 、 ^{186}Re 、および ^{188}Re が挙げられる。本発明の抗体または抗体断片は、核磁気共鳴（NMR）イメージング用のスピン標識、例えば、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、マンガンまたは鉄により標識することもできる。抗体の投与後、患者内の放射性標識抗体の分布を検出する。任意の好適な公知の方法を使用することができる。一部の非限定的な例としては、コンピュータ断層撮影（CT）、ポジトロン放出断層撮影（PET）、磁気共鳴イメージング（MRI）、蛍光、化学発光および超音波診断が挙げられる。

20

【0239】

本発明の抗体または抗体断片は、Ror2過剰発現に関連する癌および疾患の診断および病期分類に有用であり得る。Ror2過剰発現に関連する癌としては、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、膵臓癌、グリア細胞腫瘍、例えば、膠芽細胞腫および神経線維腫症、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーマ、乳癌、結腸癌、黒色腫、結腸直腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎臓癌（kidney cancer）、腎臓癌（renal cancer）、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝細胞腫、肉腫、血液癌（白血病）、星状細胞腫、および種々のタイプの頭頸部癌または他のRor2発現または過剰発現の過剰増殖性疾患を挙げることができる。

30

【0240】

本発明の抗体または抗体断片は、Ror2発現が増加または減少する癌以外の疾患の診断に有用であり得る。（可溶性または細胞Ror2形態の両方をそのような診断に使用することができる。典型的には、このような診断法は、患者から得られる生物学的試料の使用を含む。本明細書において使用される用語「生物学的試料」は、診断またはモニタリングアッセイにおいて使用することができる対象から得られる種々の試料タイプを包含する。生物学的試料としては、限定されるものではないが、生物起源の血液ならびに他の液体試料、固体組織試料、例えば、生検標本または組織培養物またはそれに由来する細胞、およびその子孫が挙げられる。例えば、生物学的試料としては、Ror2過剰発現に関連する癌、および好ましい実施形態において、神経膠腫、胃癌、肺癌、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、腎臓癌、肝臓癌および子宮内膜癌を有すると疑われる個体から回収される組織試料から得られる細胞が挙げられる。生物学的試料は、臨床試料、培養物中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、生物学的体液、および組織試料を包含する。

40

【0241】

50

特定の実施形態において、本発明は、本発明の抗体を使用して対象からの細胞上の R o r 2 を検出することにより対象における R o r 2 過剰発現に関連する癌を診断する方法である。特に、前記方法は、

(a) 対象の生物学的試料を、本発明による抗体または抗体断片と、抗体または抗体断片が R o r 2 を発現する生物学的試料の細胞との複合体を形成するのに好適な条件下で接触させるステップ；ならびに

(b) 前記複合体を検出および / または定量するステップ (前記複合体の検出は、 R o r 2 過剰発現に関連する癌を示す)

を含み得る。

【 0 2 4 2 】

癌の進行をモニタリングするため、方法による方法を異なる時点において繰り返して試料への抗体結合が増加または減少するか否かを決定することができ、それから、癌が進行、退縮または安定しているか否かを決定することができる。

【 0 2 4 3 】

特定の実施形態において、本発明は、 R o r 2 の発現もしくは過剰発現または R o r 2 の可溶性形態の減少もしくは増加に関連する疾患を診断する方法である。このような疾患の例としては、ヒト免疫障害、血栓疾患 (血栓症およびアテローム血栓症)、および心血管疾患を挙げることができる。

【 0 2 4 4 】

一実施形態において、診断または検出の方法において使用される抗 R o r 2 抗体または抗体断片が提供される。さらなる態様において、生物学的試料中の R o r 2 の存在を検出する方法が提供される。さらなる態様において、生物学的試料中の R o r 2 の量を定量する方法が提供される。ある実施形態において、本方法は、生物学的試料を、本明細書に記載の抗 R o r 2 抗体または抗体断片と、 R o r 2 への抗 R o r 2 抗体または抗体断片の結合を許容する条件下で接触させること、および抗 R o r 2 抗体または抗体断片と R o r 2 との間で複合体が形成されるか否かを検出することを含む。このような方法は、インビトロまたはインビボで実施することができる。一実施形態において、抗 R o r 2 抗体または抗体断片は、治療法に資格の対象を選択するために使用される。一部の実施形態において、治療法は、対象への抗 R o r 2 抗体または抗体断片の投与を含む。

【 0 2 4 5 】

ある実施形態において、標識抗 R o r 2 抗体または抗体断片が提供される。標識としては、限定されるものではないが、直接検出される標識または部分 (例えば、蛍光標識、発色団、高電子密度、化学発光、および放射性標識)、および間接的に、例えば、酵素反応または分子相互作用を介して検出される酵素またはリガンドのような部分が挙げられる。例示的な標識としては、限定されるものではないが、放射性同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、および¹³¹I、フルオロフォア、例えば希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、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および細菌ルシフェラーゼ (米国特許第 4 , 7 3 7 , 4 5 6 号明細書)、ルシフェリン、2 , 3 - ジヒドロフタラジンジオン、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (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

【 0 2 4 6 】

D . 医薬配合物

抗 R o r 2 抗体または抗体断片は、細胞殺傷活性を有する。この細胞殺傷活性は、複数の異なる細胞系のタイプに及ぶ。さらに、これらの抗原または抗体断片は、細胞毒性剤に

10

20

30

40

50

コンジュゲートされると腫瘍サイズを低減させ得、低減した毒性を示し得る。本出願の実施例 2 参照。したがって、抗 R o r 2 抗体、その断片または免疫コンジュゲートは、R o r 2 発現に関連する増殖性疾患の治療に有用であり得る。抗体、断片または免疫コンジュゲートは、単独で、または任意の好適な薬剤または他の慣用の治療との組合せで使用することができる。

【0247】

抗 R o r 2 抗体または抗体断片は、R o r 2 発現、過剰発現または活性化に関連する疾患を治療するために使用することができる。R o r 2 発現についての要求以外の、治療することができる癌のタイプまたは組織に対する特定の限定は存在しない。例としては、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、膵臓癌、グリア細胞腫瘍、例えば、膠芽細胞腫および神経線維腫症、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーマ、乳癌、結腸癌、黒色腫、結腸直腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎臓癌、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝細胞腫、肉腫、血液癌（白血病）、星状細胞腫、および種々のタイプの頭頸部癌が挙げられる。より好ましい癌は、膠芽細胞腫、胃癌、肺癌、膵臓癌、乳癌、前立腺癌、腎臓癌、肝臓癌および子宮内膜癌である。

10

【0248】

抗 R o r 2 抗体または抗体断片は自然免疫応答の強力な活性化因子であり、したがって、ヒト免疫障害、例えば、敗血症の治療において使用することができる。本発明の抗 R o r 2 抗体または抗体断片は、免疫化、例えば、ワクチンのためのアジュバントとして、ならびに例えば、細菌、ウイルスおよび寄生虫に対する抗感染剤として使用することもできる。

20

【0249】

抗 R o r 2 抗体または抗体断片は、血栓疾患、例えば、静脈および動脈血栓症ならびにアテローム血栓症から保護し、それを予防し、または治療するために使用することができる。抗 R o r 2 抗体または抗体断片は、心血管疾患から保護し、それを予防し、または治療するため、ならびにウイルス、例えば、ラッサおよびエボラウイルスの侵入を予防し、または阻害するため、ならびにウイルス感染を治療するために使用することもできる。

【0250】

本明細書に記載の治療方法の実施形態のそれぞれにおいて、抗 R o r 2 抗体、抗体断片または抗 R o r 2 抗体または抗体断片免疫コンジュゲートは、治療が求められる疾患または障害の管理に関連する慣用の方法と一致する様式で送達することができる。本明細書の開示によれば、有効量の抗体、抗体断片または免疫コンジュゲートを、そのような治療が必要とされる対象に、疾患または障害を予防または治療するために十分な期間および条件下で投与する。したがって、本発明の一態様は、R o r 2 の発現に関連する疾患の治療が必要とされる対象に治療有効量の本発明の抗体、抗体断片または免疫コンジュゲートを投与することを含む、A x 1 の発現に関連する疾患を治療する方法に関する。

30

【0251】

投与のため、抗 R o r 2 抗体、抗体断片または免疫コンジュゲートを、医薬組成物として配合することができる。抗 R o r 2 抗体、抗体断片または免疫コンジュゲートを含む医薬組成物は、医薬組成物を調製する公知の方法に従って配合することができる。このような方法において、治療分子は、典型的には、薬学的に許容可能な担体を含有する混合物、溶液または組成物と組み合わせる。

40

【0252】

薬学的に許容可能な担体は、レシipient患者により寛容され得る材料である。無菌リン酸緩衝生理食塩水は、薬学的に許容可能な担体の一例である。他の好適な薬学的に許容可能な担体は、当業者に周知である（例えば、Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed., 1995) 参照）。配合物は、1つ以上の賦形剤、保存剤、安定剤、緩衝剤、バイアル表面上のタンパク質損失を防止するためのアルブミンなどをさらに含み得る。

50

【0253】

医薬組成物の形態、投与経路、投与量およびレジメンは、通常、治療すべき病態、疾病の重症度、患者の年齢、体重および性別などに依存する。これらの検討事項は、当業者が考慮して好適な医薬組成物を配合することができる。本発明の医薬組成物は、局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下または眼内投与用などに配合することができる。

【0254】

好ましくは、医薬組成物は、注射され得る配合物のために薬学的に許容可能なビヒクルを含有する。これらは、特定の等張無菌生理食塩水溶液（リン酸ナトリウムもしくは二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウムもしくはマグネシウムなどまたはそのような塩の混合物）、または例えば、無菌水もしくは生理食塩水の添加時に注射液の構成を可能とする乾燥、特に凍結乾燥組成物中で存在し得る。

10

【0255】

一部の実施形態において、「安定剤」として公知であることもある等張化剤は、組成物中の液体の等張性を調整または維持するために存在する。大型荷電生体分子、例えば、タンパク質および抗体とともに使用される場合、それらは、アミノ酸側鎖の荷電基と相互作用し、それにより分子間および分子内相互作用の潜在性を減少させ得るため「安定剤」と称されることが多い。等張化剤は、医薬組成物の0.1重量%～25重量%、好ましくは1～5%の任意の量で存在し得る。好ましい等張化剤としては、多価糖アルコール、好ましくは三価またはより高級の糖アルコール、例えば、グリセリン、エリトリール、アラビトール、キシリトール、ソルビトールおよびマンニトールが挙げられる。

20

【0256】

追加の賦形剤としては、以下の1つ以上として機能し得る薬剤が挙げられる：(1)増量剤、(2)溶解度向上剤、(3)安定剤および(4)および変性または容器壁への接着を防止する薬剤。このような賦形剤としては、多価糖アルコール（上記列挙）；アミノ酸、例えば、アラニン、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、リジン、オルニチン、ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸、トレオニンなど；有機糖または糖アルコール、例えば、スクロース、ラクトース、ラクチトール、トレハロース、スタキオース、マンノース、ソルボース、キシロース、リボース、リビトール、ミオイニシトース (myoinisitolose)、ミオイニシトール (myoinisitol)、ガラクトース、ガラクトール、グリセロール、シクリトール（例えばイノシトール）、ポリエチレングリコール；硫黄含有還元剤、例えば、尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロールおよびチオ硫酸ナトリウム；低分子量タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチンまたは他の免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；単糖（例えば、キシロース、マンノース、フルクトース、グルコース）；二糖（例えば、ラクトース、マルトース、スクロース）；三糖（例えば、ラフィノース）；ならびに多糖（例えば、デキストリンまたはデキストラン）を挙げることができる。

30

【0257】

非イオン性界面活性剤または洗浄剤（「湿潤剤」としても公知）は、治療剤を溶解させるのに役立ち、および攪拌誘導性凝集から治療タンパク質を保護するために用いることができ、さらにそれにより、活性治療タンパク質または抗体の変性を引き起こさずに剪断表面応力への配合物の曝露を可能とする。非イオン性界面活性剤は、約0.05mg/ml～約1.0mg/ml、好ましくは、約0.07mg/ml～約0.2mg/mlの濃度範囲で存在し得る。

40

【0258】

好適な非イオン性界面活性剤としては、ポリソルベート（20、40、60、65、80など）、ポリオキサマー（184、188など）、PLURONIC（登録商標）ポリオール、TRITON（登録商標）、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル（TWEEN（登録商標）-20、TWEEN（登録商標）-80など）、ラウロマクロゴール

50

400、ポリオキシル40ステアレート、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10、50および60、モノステアリン酸グリセロール、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースが挙げられる。使用することができる陰イオン性洗剤としては、ラウリル硫酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウムおよびスルホン酸ジオクチルナトリウムが挙げられる。陽イオン性洗剤としては、塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトニウムが挙げられる。

【0259】

投与に使用される用量は、種々のパラメータに応じて、特に、使用される投与方式、関連病変、または代替的に所望の治療期間に応じて適合させることができる。医薬組成物を調製するため、有効量の抗体または抗体断片を、薬学的に許容可能な担体または水性媒体中で溶解または分散させることができる。

10

【0260】

注射使用に好適な剤形としては、無菌水溶液または分散液；ゴマ油、ピーナッツ油または水性プロピレングリコールを含む配合物；および無菌注射液または分散液の即時調製のための無菌粉末が挙げられる。全ての場合において、剤形は無菌でなければならず、容易な注射針通過性が存在する程度に流動性でなければならない。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、微生物、例えば、細菌および真菌の汚染作用から保存しなければならない。

【0261】

遊離塩基または薬理的に許容可能な塩としての活性化化合物の溶液は、界面活性剤と好適に混合された水中で調製することができる。分散液も、グリセロール、液状ポリエチレングリコール、およびその混合物中で、ならびに油中で調製することができる。通常の保存および使用の条件下で、これらの製剤は微生物の成長を防止するための保存剤を含有する。

20

【0262】

抗Ror2抗体または抗体断片は、中性または塩形態の組成物に配合することができる。薬学的に許容可能な塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基を用いて形成される）が挙げられ、それは無機酸、例えば、塩酸もしくはリン酸、または例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸を用いて形成される。遊離カルボキシル基を用いて形成される塩も、無機塩基、例えば、水酸化カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは鉄、および例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基から誘導することができる。

30

【0263】

担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒体であってもよい。適切な流動性は、例えば、コーティング、例えば、レシチンの使用により、分散液の場合には要求される粒径の維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによりもたすことができる。多くの場合、等張化剤、例えば糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射組成物の吸収延長は、その組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを使用することによりもたすことができる。

40

【0264】

無菌注射液は、要求量の活性化化合物を適切な溶媒中に、必要であれば上記に列挙された他の成分の1つ以上とともに取り込み、次いで滅菌濾過することにより調製される。一般に、分散液は、種々の滅菌された活性成分を、基礎分散媒体および上記に列挙されるものから要求される他の成分を含有する無菌ビヒクル中に取り込むことにより調製される。無菌注射液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製法は、活性成分と任意の追加の所望の成分の粉末を予め滅菌濾過されたその溶液から生じさせる真空乾燥および凍結乾燥技

50

術である。

【0265】

直接注射のためのより濃縮され、または高度に濃縮された溶液の調製も企図され、溶媒としてのジメチルスルホキシド(DMSO)の使用は極めて急速な浸透をもたらし、高濃度の活性薬剤を小さな腫瘍区域に送達することが想定される。

【0266】

配合時、液剤は投与配合物と適合性の様式で、治療有効であるような量で投与される。配合物は、種々の投与剤形で、例えば、上記のタイプの注射液で容易に投与されるが、薬物放出カプセルなどを用いることもできる。

【0267】

水溶液中での非経口投与のため、例えば、液剤は、必要であれば好適に緩衝化すべきであり、液体希釈剤は、まず、十分な生理食塩水またはグルコースにより等張とすべきである。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与に特に好適である。これに関連して、用いることができる無菌水性媒体は、本開示に照らして当業者に公知である。例えば、1投与量を1mlの等張NaCl溶液中で溶解させることができ、1000mlの皮下点滴療法用液体に添加し、または提案される注入部位に注射することができる(例えば、“Remington’s Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580参照)。投与量のいくらかの変動が、治療される対象の病態に応じて必然的に生じる。投与責任者は、いずれのイベントにおいても、個々の対象に適切な用量を決定する。

10

20

【0268】

抗体または抗体断片は、治療混合物内に1用量あたり0.0001~10.0ミリグラム、または約0.001~5ミリグラム、または約0.001~1ミリグラム、または約0.001~0.1ミリグラム、または約0.1~1.0またはさらには約10ミリグラムを送達するように配合することができる。複数回用量を選択される時間間隔において投与することもできる。

【0269】

非経口投与、例えば、静脈内または筋肉内注射用に配合された化合物に加えて、他の薬学的に許容可能な形態としては、例えば、錠剤または経口投与用の他の固形剤；徐放性カプセル剤；および現在使用されている任意の他の形態が挙げられる。

30

【0270】

ある実施態様において、リポソームおよび/またはナノ粒子の使用が、宿主細胞中への抗体または抗体断片の導入のために企図される。リポソームおよび/またはナノ粒子の形成および使用は、当業者に公知である。

【0271】

ナノカプセル剤は、一般に、安定した再現性のある手法で化合物を捕捉し得る。細胞内へのポリマーの過剰負荷に起因する副作用を回避するため、このような超微細粒子(サイズは約0.1 μ m)が、インピボで分解し得るポリマーを使用して一般に設計される。これらの要件を満たす生分解性ポリアルキル-シアノアクリレートナノ粒子が本発明における使用のために企図され、このような粒子は容易に作製することができる。

40

【0272】

リポソームは、水性媒体中で分散するリン脂質から形成され、多重膜同心円状二層小胞(多層膜ベシクル(MLV)とも称される)を自発的に形成する。MLVは、一般に25nm~4 μ mの直径を有する。MLVの超音波処理は、コア中で水溶液を含有する200~500の範囲の直径を有する小さな一枚膜ベシクル(SUV)の形成をもたらす。リポソームの物理的特徴は、pH、イオン強度および二価陽イオンの存在に依存する。

【0273】

本明細書に記載の抗Ror2抗体または抗体断片を含有する医薬配合物は、所望の純度の程度を有するそのような抗体または抗体断片を1つ以上の任意選択の薬学的に許容可能

50

な担体 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) と混合することにより、凍結乾燥配合物または水溶液の形態で調製される。薬学的に許容可能な担体は、一般に、用いられる投与量および濃度においてレシipientに対して非毒性であり、それとしては、限定されるものではないが、緩衝液、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸；酸化防止剤、例として、アスコルビン酸およびメチオニン；保存剤（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、ブチルもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルもしくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン；単糖、二糖、および他の炭水化物、例として、グルコース、マンノース、もしくはデキストリン；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに/または非イオン性界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) が挙げられる。

10

【0274】

本明細書における例示的な薬学的に許容可能な担体としては、介在性薬物分散剤、例えば、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (SHASEGP)、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、rHuPH20 (HYLENEX (登録商標)、Baxter International, Inc.) がさらに挙げられる。ある例示的なSHASEGPおよび使用方法、例として、rHuPH20は、米国特許出願公開第2005/0260186号明細書および同第2006/0104968号明細書に記載されている。一態様において、SHASEGPは、1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼ、例えば、コンドロイチナーゼと組み合わせられる。

20

【0275】

例示的な凍結乾燥抗体配合物は、米国特許第6,267,958号明細書に記載されている。水性抗体配合物としては、米国特許第6,171,586号明細書および国際公開第2006/044908号パンフレットに記載のものが挙げられ、後者の配合物はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

30

【0276】

本明細書における配合物は、治療される特定の適応症に対する必要に応じて、2つ以上の活性成分も含有し得る。好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有する成分を単一配合物中で組み合わせることができる。例えば、EGFRアンタゴニスト（例えば、エルロチニブ）、抗アンドロゲン剤（例えば、抗VEGF抗体であり得るVEGFアンタゴニスト）または化学療法剤（例えば、タキソイドまたは白金剤）を、本発明の抗Ror2抗体、抗体断片または免疫コンジュゲートに加えて提供することが望ましい場合がある。このような活性成分は、意図される目的のために有効である量の組合せで好適に存在する。

40

【0277】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術により、または界面重合により調製されるマイクロカプセル中にカプセル封入することができる。例えば、それぞれ、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子およびナノカプセル）中またはマクロエマルション中の、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセルを用いることができる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示される。

50

【0278】

徐放性製剤を調製することができる。徐放性製剤の好適な例としては、抗体または抗体断片を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、そのマトリックスは、成形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態であり得る。

【0279】

インビボ投与に使用すべき配合物は、一般に無菌性である。無菌状態は、例えば、滅菌濾過膜に通す濾過により容易に達成することができる。

【0280】

E. 治療方法および組成物

本明細書において提供される抗 R o r 2 抗体または抗体断片のいずれも、治療方法において使用することができる。一態様において、医薬品として使用される抗 R o r 2 抗体または抗体断片が提供される。さらなる態様において、癌（例えば、乳癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、脳腫瘍、膵臓、脳、腎臓、卵巣、胃、白血病、子宮内膜、結腸、前立腺、甲状腺、肝臓の癌、骨肉腫、および/または黒色腫）の治療において使用される抗 R o r 2 抗体または抗体断片が提供される。ある実施形態において、治療の方法において使用される抗 R o r 2 抗体または抗体断片が提供される。ある実施形態において、本発明は、個体に有効量の抗 R o r 2 抗体または抗体断片を投与することを含む、癌を有する個体を治療する方法において使用される抗 R o r 2 抗体または抗体断片を提供する。ある実施形態において、本発明は、個体に有効量の抗 R o r 2 抗体または抗体断片を投与することを含む、免疫障害（例えば、自己免疫障害）、心血管障害（例えば、アテローム性動脈硬化症、高血圧、血栓症）、感染性疾患（例えば、エボラウイルス、マールブルグウイルス）または糖尿病を有する個体を治療する方法において使用される抗 R o r 2 抗体または抗体断片を提供する。1つのそのような実施形態において、本方法は、個体に有効量の少なくとも1つの追加の治療剤、例えば、下記のことを投与することをさらに含む。さらなる実施形態において、本発明は、血管新生の阻害、細胞増殖の阻害、免疫機能の阻害、炎症性サイトカイン分泌（例えば、腫瘍関連マクロファージからのもの）の阻害、腫瘍血管系（例えば、腫瘍内血管系または腫瘍関連血管系）の阻害、および/または腫瘍間質機能の阻害において使用される抗 R o r 2 抗体または抗体断片を提供する。

10

20

【0281】

ある実施形態において、本発明は、個体に有効の抗 R o r 2 抗体または抗体断片を投与して血管新生を阻害し、細胞増殖を阻害し、免疫機能を阻害し、炎症性サイトカイン分泌（例えば、腫瘍関連マクロファージからのもの）を阻害し、腫瘍血管系発生（例えば、腫瘍内血管系または腫瘍関連血管系）を阻害し、および/または腫瘍間質機能を阻害することを含む、個体において血管新生を阻害し、細胞増殖を阻害し、免疫機能を阻害し、炎症性サイトカイン分泌（例えば、腫瘍関連マクロファージからのもの）を阻害し、腫瘍血管系（例えば、腫瘍内血管系または腫瘍関連血管系）を阻害し、および/または腫瘍間質機能を阻害する方法において使用される抗 R o r 2 抗体または抗体断片を提供する。上記実施形態のいずれかによる「個体」は、好ましくは、ヒトである。

30

【0282】

さらなる態様において、本発明は、医薬品の製造または調製における抗 R o r 2 抗体または抗体断片の使用を提供する。一実施形態において、医薬品は、癌（一部の実施形態において、乳癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、脳腫瘍、膵臓、脳、腎臓、卵巣、胃、白血病、子宮内膜、結腸、前立腺、甲状腺、肝臓の癌、骨肉腫、および/または黒色腫）の治療用である。さらなる実施形態において、医薬品は、癌を有する個体に有効量の医薬品を投与することを含む、癌を治療する方法において使用される。さらなる実施形態において、医薬品は、個体に有効量の抗 R o r 2 抗体または抗体断片を投与することを含む、免疫障害（例えば、自己免疫障害）、心血管障害（例えば、アテローム動脈硬化症、高血圧、血栓症）、感染性疾患（例えば、エボラウイルス、マールブルグウイルス）または糖尿病を治療する方法において使用される。1つのそのような実施形態において、本方法は、個体に有効量の少なくとも1つの追加の治療剤、例えば、下記のことを投与することをさらに含む

40

50

。さらなる実施形態において、医薬品は、血管新生の阻害、細胞増殖の阻害、免疫機能の阻害、炎症性サイトカイン分泌（例えば、腫瘍関連マクロファージからのもの）の阻害、腫瘍血管系（例えば、腫瘍内血管系または腫瘍関連血管系）の阻害、および/または腫瘍間質機能の阻害用である。さらなる実施形態において、医薬品は、個体に有効量の医薬品を投与して血管新生を阻害し、細胞増殖を阻害し、免疫機能を促進し、炎症性サイトカイン分泌（例えば、腫瘍関連マクロファージからのもの）を誘導し、腫瘍血管系発生（例えば、腫瘍内血管系または腫瘍関連血管系）を阻害し、および/または腫瘍間質機能を阻害することを含む、個体において血管新生を阻害し、細胞増殖を阻害し、免疫機能を阻害し、炎症性サイトカイン分泌（例えば、腫瘍関連マクロファージからのもの）を阻害し、腫瘍血管系（例えば、腫瘍内血管系または腫瘍関連血管系）を阻害し、および/または腫瘍間質機能を阻害する方法において使用される。上記実施形態のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

10

【0283】

さらなる態様において、本発明は、癌を治療する方法を提供する。一実施形態において、本方法は、そのような癌を有する個体に有効量の抗Ror2抗体または抗体断片を投与することを含む。1つのそのような実施形態において、本方法は、個体に有効量の下記の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。上記実施形態のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

【0284】

さらなる態様において、本発明は、免疫障害（例えば、自己免疫障害）、心血管障害（例えば、アテローム性動脈硬化症、高血圧、血栓症）、感染性疾患（例えば、エボラウイルス、マールブルグウイルス）または糖尿病を治療する方法を提供する。1つのそのような実施形態において、本方法は、個体に有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。上記実施形態のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

20

【0285】

さらなる態様において、本発明は、個体において血管新生を阻害し、細胞増殖を阻害し、免疫機能を阻害し、炎症性サイトカイン分泌（例えば、腫瘍関連マクロファージからのもの）を阻害し、腫瘍血管系（例えば、腫瘍内血管系または腫瘍関連血管系）を阻害し、および/または腫瘍間質機能を阻害する方法を提供する。一実施形態において、本方法は、個体に有効量の抗Ror2抗体または抗体断片を投与して血管新生を阻害し、細胞増殖を阻害し、免疫機能を促進し、炎症性サイトカイン分泌（例えば、腫瘍関連マクロファージからのもの）を誘導し、腫瘍血管系発生（例えば、腫瘍内血管系または腫瘍関連血管系）を阻害し、および/または腫瘍間質機能を阻害することを含む。一実施形態において、「個体」は、ヒトである。

30

【0286】

さらなる態様において、本発明は、例えば、上記治療方法のいずれかにおいて使用される、本明細書において提供される抗Ror2抗体または抗体断片のいずれかを含む医薬配合物を提供する。一実施形態において、医薬配合物は、本明細書において提供される抗Ror2抗体または抗体断片のいずれかおよび薬学的に許容可能な担体を含む。別の実施形態において、医薬配合物は、本明細書において提供される抗Ror2抗体または抗体断片のいずれかおよび少なくとも1つの追加の治療剤、例えば、下記のものを含む。

40

【0287】

それぞれのおよび全ての上記治療において、本発明の抗体または抗体断片は、単独で、免疫コンジュゲートとして、または他の薬剤との組合せで治療法において使用することができる。例えば、本発明の抗体は、少なくとも1つの追加の治療剤と同時投与することができる。ある実施形態において、追加の治療剤は、抗血管新生剤である。ある実施形態において、追加の治療剤は、VEGFアンタゴニスト（一部の実施形態において、抗VEGF抗体、例えば、ベパシズマブ）である。ある実施形態において、追加の治療剤は、EGFRアンタゴニスト（一部の実施形態において、エルロチニブ）である。ある実施形態に

50

において、追加の治療剤は、化学療法剤および/または細胞増殖抑制剤である。ある実施形態において、追加の治療剤は、タキソイド（例えば、パクリタキセル）および/または白金剤（例えば、カルボ白金（carboplatinum））である。ある実施形態において、追加の治療剤は、患者の免疫または免疫系を向上させる薬剤である。

【0288】

上記のこのような併用療法は、併用投与（同一または別個の配合物中に2つ以上の治療剤が含まれる）、および別個の投与を包含し、別個の投与の場合、抗体または抗体断片の投与は、追加の治療剤および/またはアジュバントの投与前、投与と同時に、および/または投与後に行うことができる。抗体または抗体断片は、放射線療法との組合せで使用することもできる。

10

【0289】

抗体または抗体断片は、良好な医療行為と一致する様式で、配合し、投薬し、投与することができる。これに関連する検討事項の因子としては、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床病態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジューリング、および医師に公知の他の因子が挙げられる。抗体または抗体断片は、必ずしもそうである必要はないが、場合により、当該の障害を予防または治療するために現在使用されている1つ以上の薬剤とともに配合される。このような他の薬剤の有効量は、配合物中の抗体または抗体断片の量、障害または治療のタイプ、および上記で考察される他の因子に依存する。これらは一般に、本明細書に記載のものと同一の投与量および投与経路で、もしくは本明細書に記載の投与量の約1~99%で使用され、または実験的/臨床的に適切と判断される任意の投与量で、および任意の経路により使用される。

20

【0290】

疾患の予防または治療について、抗体または抗体断片の適切な投与量（単独で、または1つ以上の他の追加の治療剤との組合せで使用される場合）は、治療すべき疾患のタイプ、抗体または抗体断片のタイプ、疾患の重症度および経過、抗体または抗体断片が予防または治療目的で投与されるか否か、前治療、患者の病歴および抗体または抗体断片に対する応答、ならびに主治医の裁量に依存する。抗体または抗体断片は好適に、1回で、または一連の治療にわたり患者に投与される。疾患のタイプおよび重症度に応じて、例えば、1回以上の別個の投与によるものであるか、連続注入によるものであるかにかかわらず、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $40\text{mg}/\text{kg}$ の抗体または抗体断片が、患者への投与のための初回候補投与量であり得る。1つの典型的な1日投与量は、上記因子に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であり得る。数日間以上にわたる反復投与については、病態に応じて、治療は一般に疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続される。このような用量は、断続的に、例えば、毎週または3週間毎（例えば、患者が約2~約20回、または例えば、約6回の用量の抗体または抗体断片を受容するように）投与することができる。より高い初回負荷用量、次いで1回以上のより低い用量を投与することができる。しかしながら、他の投与量レジメンが有用であり得る。この治療法の進行は、慣用の技術およびアッセイにより容易にモニタリングされる。

30

【0291】

上記配合物または治療方法のいずれも、抗Ror2抗体の代わりに、またはそれに加えて本発明の抗体断片または免疫コンジュゲートを使用して実施することができることが理解される。

40

【0292】

腫瘍を撲滅するための宿主の免疫機能の向上は、関心が増加している主題である。慣用の方法としては、(i) APC増強、例えば、(a) 外来MHCアロ抗原をコードするDNAの腫瘍中への注射、または(b) 腫瘍の免疫抗原認識の確率を増加させる遺伝子（例えば、免疫刺激サイトカイン、GM-CSF、共刺激分子B7.1、B7.2）による生検採取腫瘍細胞の形質移入、(iii) 養子細胞免疫療法、または活性化腫瘍特異的T細胞による治療が挙げられる。養子細胞免疫療法は、腫瘍浸潤宿主Tリンパ球を単離し、例えば、IL-2または腫瘍またはその両方による刺激を介してインビトロでその集団を拡

50

大することを含む。さらに、機能不全の単離T細胞を、本発明の抗PD-L1抗体のインビトロ適用により活性化することもできる。次いで、こうして活性化されたT細胞を宿主に再投与することができる。これらの方法の1つ以上を、本発明の抗体、抗体断片または免疫コンジュゲートの投与との組合せで使用することができる。

【0293】

癌のための慣習的な治療法としては、以下のもの：(i)放射線療法(例えば、ラジオセラピー、X線療法、放射線照射)または癌細胞を殺傷し、腫瘍を縮小させるためのイオン化放射線の使用が挙げられる。放射線療法は、外部ビームラジオセラピー(EBRT)を介して外部から、または小線源療法を介して内部から施与することができ；(ii)一般に急速に分裂する細胞に影響を及ぼす化学療法、または細胞毒性薬の適用；(iii)癌細胞の調節不全タンパク質に特異的に影響を及ぼす標的療法、または薬剤(例えば、チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブ、ゲフィニチブ；モノクローナル抗体、光線力学的療法)；(iv)免疫療法、または宿主免疫応答の向上(例えば、ワクチン)；(v)ホルモン療法、またはホルモンの遮断(例えば、腫瘍がホルモン感受性である場合)、(vi)血管新生阻害剤、または血管形成および成長の遮断、ならびに(vii)苦痛緩和ケア、または疼痛、悪心、嘔吐、下痢および出血を低減させるためのケアの質の改善に指向される治療が挙げられる。鎮痛剤、例えば、モルヒネおよびオキシコドン、制吐剤、例えば、オンダンセトロンおよびアプレピタントは、より侵襲的な治療レジメンを可能とし得る。

【0294】

癌の治療において、癌免疫の治療のための既に記載されている慣用の治療のいずれも、抗Ror2抗体または抗体断片の投与前、投与後または投与と同時に実施することができる。さらに、抗Ror2抗体または抗体断片は、慣用の癌治療、例えば、腫瘍結合抗体(例えば、モノクローナル抗体、毒素コンジュゲートモノクローナル抗体)および/または化学療法剤の投与前、投与後または投与と同時に投与することができる。

【0295】

F. 製品およびキット

本発明の別の態様において、抗Ror2抗体または抗体断片および上記障害の治療、予防および/または診断に有用な他の材料を含有する製品が提供される。製品は、容器および容器上または容器に伴うラベルまたは添付文書を含む。好適な容器としては、例えば、瓶、バイアル、注射器、IV溶液バッグなどが挙げられる。容器は、種々の材料、例えばガラスまたはプラスチックから形成することができる。容器は、組成物それ自体、または病態の治療、予防、および/もしくは診断に有効な別の組成物との組合せである組成物を保持し、無菌アクセスポートを有し得る(例えば、容器は、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針により貫通可能な栓を有するバイアルであり得る)。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本発明の抗体または抗体断片である。ラベルまたは添付文書は、組成物が選択される病態の治療に使用されることを示す。さらに、製品は、(a)抗体または抗体断片を含む組成物の中に含有する第1の容器；および(b)さらなる細胞毒性剤または他の治療剤を含む組成物の中に含有する第2の容器を含み得る。本発明のこの実施形態における製品は、組成物を特定の病態を治療するために使用することができることを示す添付文書をさらに含み得る。あるいは、またはさらに、製品は、薬学的に許容可能な緩衝液、例えば、注射用の静菌水(BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液およびデキストロス溶液を含む第2(または第3)の容器をさらに含み得る。これは、商業的および使用者の見地から望ましい他の材料、例として、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針および注射器をさらに含み得る。

【0296】

上記製品のいずれも、抗Ror2抗体または抗体断片に代えて、またはそれに加えて本発明の免疫コンジュゲートを含み得ることが理解される。

【0297】

最後に、本発明はまた、少なくとも1つの本発明の抗体または抗体断片を含むキットを提供する。本発明のポリペプチド、抗体もしくは抗体断片、または抗体薬物コンジュゲ

トを含有するキットは、Ror2発現（増加または減少）の検出において、または治療もしくは診断アッセイにおいて使用される。本発明のキットは、固体担体、例えば、組織培養プレートまたはビーズ（例えば、sepharoseビーズ）にカップリングしている抗体を含有し得る。例えば、ELISAまたはウェスタンブロットにおける、インビトロでのRor2の検出および定量のための抗体を含有するキットを提供することができる。検出に有用なこのような抗体は、標識、例えば、蛍光または放射標識とともに提供することができる。

【0298】

キットは、その使用に関する説明書をさらに含有する。一部の実施形態において、説明書は、U.S. Food and Drug Administrationによりインビトロ診断キットに要求される説明書を含む。一部の実施形態において、キットは、試料中の脳脊髄液の存在または不存在を、前記試料中のRor2の存在または不存在に基づき診断するための説明書をさらに含む。一部の実施形態において、キットは、1つ以上の抗体または抗体断片を含む。他の実施形態において、キットは、1つ以上の酵素、酵素阻害剤または酵素活性化剤をさらに含む。さらに他の実施形態において、キットは、1つ以上のクロマトグラフィー化合物をさらに含む。さらに他の実施形態において、キットは、分光光度アッセイ用の試料を調製するために使用される1つ以上の化合物をさらに含む。さらなる実施形態において、キットは、指示薬の強度、色スペクトル、または他の物理的属性に従ってRor2の存在または不存在を解釈するための比較参照材料をさらに含む。

10

【0299】

以下の実施例は、限定されるものではないが、本開示の軟ゼラチンカプセル剤の説明のためのものである。当分野において通常見出され、当業者に明らかである種々の条件およびパラメータの他の好適な改変および適合が本開示の範囲内である。

20

【実施例】

【0300】

実施例1：Ror2に対する条件的に活性な生物学的（CAB）抗体

本実施例においてヒトRor2に対する抗体を産生した。Ror2に対するヒト化抗体を野生型抗体として使用してRor2に対するCAB抗体を生成した。野生型抗体（重鎖および軽鎖可変領域）をコードするDNAを進化させて突然変異抗体重鎖および軽鎖可変領域ライブラリーを生成した。ライブラリー中の突然変異重鎖および軽鎖可変領域を、ELISAによりpH7.4と比べたpH6.0におけるヒトRor2に対する選択的結合親和性についてスクリーニングした（図2A～2Bおよび3A～3B）。同時に、突然変異抗体の発現レベルも、後続の製造プロセスにおけるより高い収量を提供するための最適化した。スクリーニングは、スクリーニングについて偽陽性を引き起こし得る血清中のヒト抗体が存在するため、FLAGタグを使用して血清中で行った。生成された条件的に活性な抗体は、pH7.4におけるRor2に対する結合親和性よりも高いpH6.0におけるRor2に対する結合親和性を有することが見出された（表1および2）。

30

【0301】

CAB抗体は、図4に実証されるとおり緩衝液中で凝集を示さなかった。CAB抗体をサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。図4に示されるとおり、1つのピークのみが検出され、抗体がほとんど凝集せず、または全く凝集しないことを実証した。図5は、選択された突然変異抗体（scFv）の一部が、pH7.4におけるRor2に対する結合親和性よりも高いpH6.0におけるRor2に対する結合親和性を実証したことを示す。さらに、図5は、室温から60℃への温度上昇が抗体の選択性を有意に変更しなかったことも示す。

40

【0302】

条件的に活性な抗体は全て、以下の表4に示されるとおり高い発現レベルを示し、列「クローン」は抗体を示し、発現レベルをmg/mlで第2の列に示す。

【0303】

これらの抗体のクローンをサービス提供者に予測発現レベルを表す要求される発現レ

50

ベル（「オーダー量」）で送付した。しかしながら、これらの抗体のいくつかの実際の発現レベル（「送達量」）は極めて高く、予測発現レベルを超過した。少なくとも3つのクローンは、予測発現レベルを超過する発現レベルを有した（BAP048.7.067-HC-FLAG、BAP048.7-C02D09-FLAG、およびBAP048.7-A03F01-FLAG）。

【0304】

【表4】

表4. 高い発現レベルを有する抗体

クローン	[mg/mL]	推定収量	実収量
BAP048.1-06-07	4.9	100	137
BAP048.7-06-07	3.7	100	94
BAP048.7-C02D09	3.8	30	57
BAP048.7-A03F01	4.4	30	65
BAP048.7-A03C05	4.2	30	36

10

【0305】

表面プラズモン表面（SPR）も使用して条件的に活性な抗体をアッセイしてRor2への結合についてのオンおよびオフ速度を計測した。SPRアッセイを使用してタンパク質結合についてのオンおよびオフ速度を計測することができる。条件的に活性な抗体のインビボのオンおよびオフ速度（動物およびヒトにおけるもの）は、重要な特徴である。

20

【0306】

条件的に活性な抗体がpH6.0における良好な結合親和性を有し、pH7.4における結合親和性をほとんど有さず、または全く有さないことが観察された（図6A～6B）。SPRアッセイは、それらの同一の条件的に活性な抗体がpH7.4と比較してpH6.0において高度に選択的であることを示した（図6A～6B）。

【0307】

実施例2：モデル毒素にコンジュゲートしている抗Ror2抗体

30

本発明の抗Ror2抗体を、モデル毒素（例えば、パクリタキセル）にコンジュゲートさせて条件的に活性な抗体-薬物コンジュゲート（Ror2-CAB-ADC）を産生した。

【0308】

マウスにおいて腫瘍をMDA-MB-436腫瘍細胞の注射により誘導してゼノグラフトマウスを産生した。次いで、Ror2-CAB-ADCをゼノグラフトマウス中に0.3または1mg/kgの用量において2週間、週1回注射した。本試験において使用される対照は、ピヒクルとしてのPBS緩衝液および毒素単独（パクリタキセル）を含んだ。試験は、Ror2-CAB-ADCが、対照と比較して腫瘍のサイズの有意に大きな低減を提供することを示した（図7A～7C）。0.3mg/kg投与量群についての結果を図7Bに提示し、1mg/kg投与量群についての結果を図7Cに提示する。この試験は、毒素にコンジュゲートしている抗Ror2抗体が腫瘍サイズの低減において有効であることを示した。

40

【0309】

実施例3. 条件的に活性な抗体BAP048のpH依存的結合親和性

本発明により同定された条件的に活性な抗体の1つ、BAP048（または図面の一部に示されるBAP048.7）の結合親和性を、pH滴定により試験した。野生型抗体を対照として使用した。図8に示されるとおり、条件的に活性な抗体BAP048は、pH6.5よりも低いpHにおいてより活性であるが、pH7.0においては低活性である。野生型抗体は、その結合親和性についてpH依存性を示さない。

50

【0310】

実施例4．条件的に活性な抗体BAP048の異種間結合親和性

条件的に活性な抗体BAP048を、ヒトRor2の条件的結合親和性について選択した。ELISAを使用してこの条件的に活性な抗体を3つの標的：ヒトRor2(hROR2)、カニクイザルRor2(cynoROR2)、およびマウスRor2(mROR2)に対するその結合親和性について試験した(図9)。条件的に活性な抗体BAP048は、ヒトおよびカニクイザルRor2に対するほぼ同一の結合親和性を示したが、マウスRor2に対する有意に低い結合親和性を示した。3つの標的についての条件的に活性な抗体BAP048のEC50は、ヒトRor2について201.4ng/ml、カニクイザルRor2について327.1ng/ml、およびマウスRor2について7653ng/mlであると算出された。

10

【0311】

実施例5．条件的に活性な抗体BAP048-MMAEコンジュゲートによる細胞殺傷

条件的に活性な抗体BAP048を化学療法薬モノメチルアウリスタチンE(MMAE)にコンジュゲートさせて抗体薬物コンジュゲート(ADC)を産生した。ADCを、ヒトRor2を細胞表面上で発現するHEK293細胞に対して試験した。この試験に使用される陰性対照は、親和性一致抗体であるが、ヒトRor2に特異的でないものである。陰性対照もMMAEにコンジュゲートさせた。

【0312】

BAP048ADCを2つのpH:6.0および7下で試験した。陰性対照により処理された細胞に対する、処理後に生存したままの細胞の割合を図10に提示する。BAP048ADCが100ng/ml未満の濃度においてpH6.0において細胞殺傷活性を呈する一方、pH7.4においてBAP048ADCは約1000ng/mlにおいて細胞殺傷を示すことが観察され、有効濃度の差は約10倍であった。

20

【0313】

BAP048ADCの細胞殺傷活性を、LCLC103H細胞およびHT1080細胞に対しても試験した。ヒト肺癌細胞系であるLCLC103H細胞について、BAP048ADCの細胞殺傷活性を、pH6.0、6.2、および6.4において試験した(図11A~11C)。BAP048ADCの細胞殺傷活性の差は3つの試験pH値間で有意に異なるものではなく、IC50は、1.819ng/ml(pH6.0)、1.232ng/ml(pH6.2)、および3.318ng/ml(pH6.5)であった。

30

【0314】

線維肉腫細胞系であるHT1080細胞についても、BAP048ADCの細胞殺傷活性を、pH6.0、6.2、および6.4において試験した(図12A~12C)。BAP048ADCの細胞殺傷活性の差は3つの試験pH値間で有意に異なるものではなく、IC50は、2.897ng/ml(pH6.0)、3.138ng/ml(pH6.2)、および2.601ng/ml(pH6.5)であった。

【0315】

実施例6．条件的に活性な抗体BAP048-MMAEコンジュゲートによるマウスにおける腫瘍の処理

肺癌細胞LCLC103Hをマウス中に注射してマウスゼノグラフト(マウス中の腫瘍)を生成した。条件的に活性な抗体BAP048をMMAEにリンカーチオ架橋を介してコンジュゲートさせ、2つの濃度1mg/kgおよび6mg/kgにおけるマウスへの注射のためのADCを生成した。陰性対照は、ADCを有さない緩衝液(ビヒクル)であった。一方の用量群を、1mg/kg用量において3回の投与について週1回注射し、他方の用量群を6mg/kg用量において4回の投与について4日毎に注射した。

40

【0316】

試験の間、腫瘍の体積を計測した。6mg/kg用量群においては、腫瘍サイズが、BAP048-MMAEADCにより30日目までに有意に縮小することが観察された。1mg/kg用量群においては、腫瘍成長が、ビヒクル対照と比較してBAP048-M

50

M A E A D Cにより減速した(図13)。

【0317】

実施例7. 条件的に活性な抗体B A P 0 4 8 - M M A Eコンジュゲートにおけるリンカーの効果

条件的に活性な抗体B A P 0 4 8 M M A Eコンジュゲーションのリンカーの効果を、2つの異なるリンカー: m c - v c - P A Bおよびm c - P E G 8 - v cを使用して試験した(図14)。同一の陰性対照(ビヒクル)を使用した。これら2つのB A P 0 4 8 - M M A Eコンジュゲートを、1 m g / m lの単回用量においてマウスゼノグラフト中に注射した。試験の間、腫瘍のサイズを計測した。両方のB A P 0 4 8 - M M A Eコンジュゲートが陰性対照と比較して腫瘍の成長を有意に減速させたが、2つのB A P 0 4 8 - M M A Eコンジュゲート間の差は有意でないことが観察された(図14)。したがって、B A P 0 4 8 - M M A Eコンジュゲートに対するリンカーの影響は有意でないと考えられる。

10

【0318】

実施例8. 条件的に活性な抗体B A P 0 4 8によるマウス中の腫瘍の処理

本実施例は実施例6と類似するが、マウス中の腫瘍を誘導するために使用される細胞は異なった。本実施例において使用される2つの細胞系は、H T 1 0 8 0細胞(線維肉腫細胞系)およびM D A - M B - 4 3 6細胞(乳癌細胞系)である。

【0319】

H T 1 0 8 0により誘導されたマウスゼノグラフトについて、条件的に活性な抗体B A P 0 4 8を、m c - v c - P A BのリンカーによりM M A Eにコンジュゲートさせた。3つの用量群を使用した: 4回の投与について4日毎の6 m g / k g、3回の投与について週1回の10 m g / k g、および4回の投与について4日毎の10 m g / k g(図15A)。2つの対照を使用した: 一方は抗体もM M A Eも有さないビヒクルであり、他方はM M A EにコンジュゲートしていないB A P 0 4 8抗体である。

20

【0320】

腫瘍は、2つの対照群により着実に成長することが観察された。腫瘍体積の増加は、条件的に活性な抗体B A P 0 4 8 - M M A Eコンジュゲートにより有意に減速した。腫瘍成長の阻害は用量依存的であり、最大用量群、4回の投与の4日毎の10 m g / k gにより、腫瘍成長の最大低減を示した(図15A)。

【0321】

M D A - M B - 4 3 6により誘導されたマウスゼノグラフトについて、条件的に活性な抗体B A P 0 4 8を同様にm c - v c - P A BによりM M A Eにコンジュゲートさせた。1つのみの用量群が存在した: 4回の投与について4日毎の6 m g / k g、対照としてビヒクル(抗体もM M A Eもなし)(図15B)。腫瘍は対照群により着実に成長することが観察された。腫瘍体積の増加は、条件的に活性な抗体B A P 0 4 8 - M M A Eコンジュゲートにより有意に低減した(図15B)。

30

【0322】

しかしながら、本発明の多数の特徴および利点を、本発明の構造および機能の詳細と一緒に上記の詳細な説明において記載してきたが、本開示は、説明のためのものにすぎず、変更を詳細に、特に本発明の原理内でパーツの形状、サイズおよび配置の事項において、添付の特許請求の範囲が表現される用語の広義の一般的意味により示される完全な程度に作製することができることを理解すべきである。

40

【0323】

本明細書に挙げられる全ての文献は、参照により全体として、あるいはそれらが特に依存する開示を提供するために本明細書に組み込まれる。本出願人は、任意の開示実施形態を公的に提供する意図はなく、任意の開示の改変または変更が特許請求の範囲の範囲内に文字通り収まり得ない程度で、それらは、均等論のもと、その一部とみなされる。

【 図 6 B 】

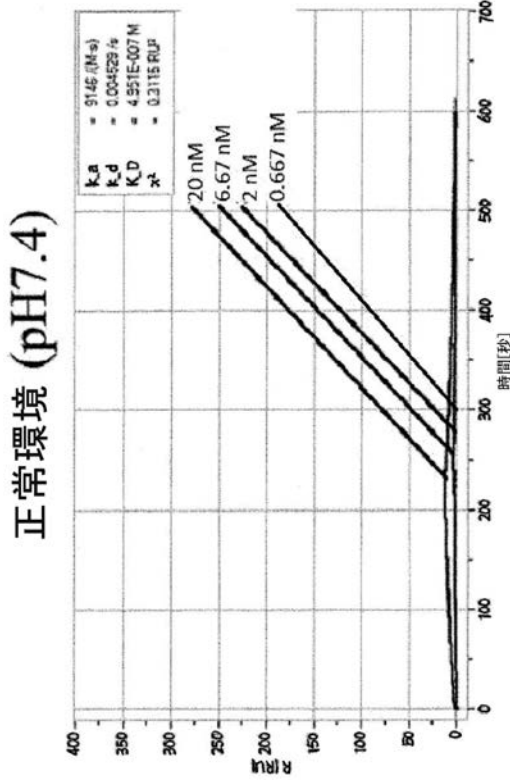


図6B

【 図 7 A 】

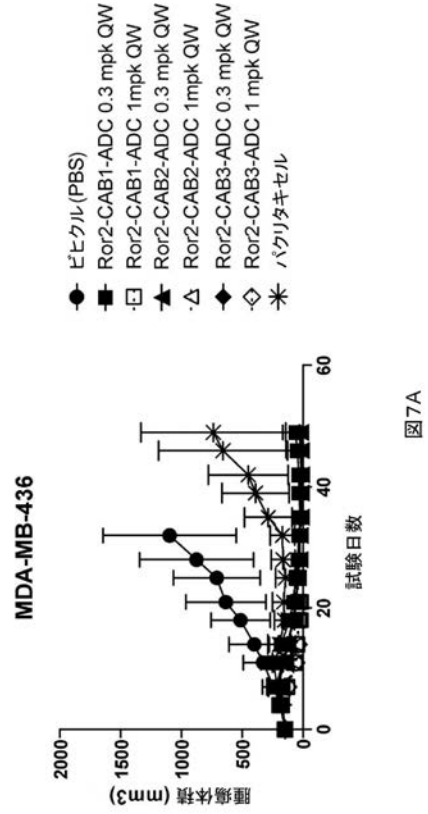


図7A

【 図 7 B 】

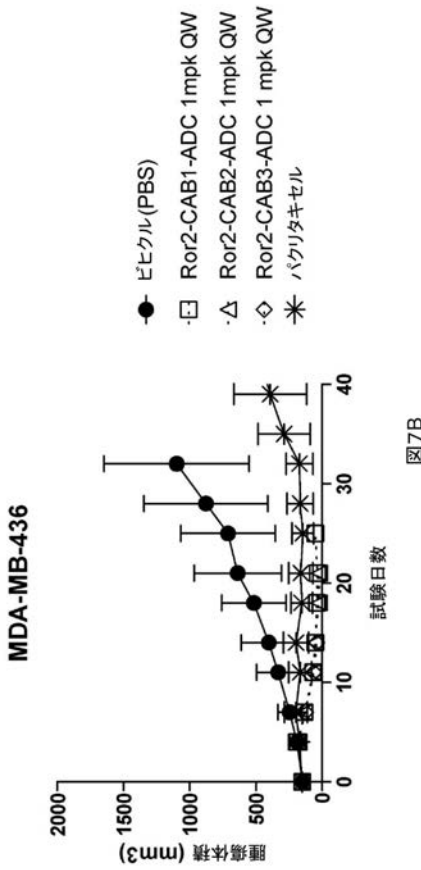


図7B

【 図 7 C 】

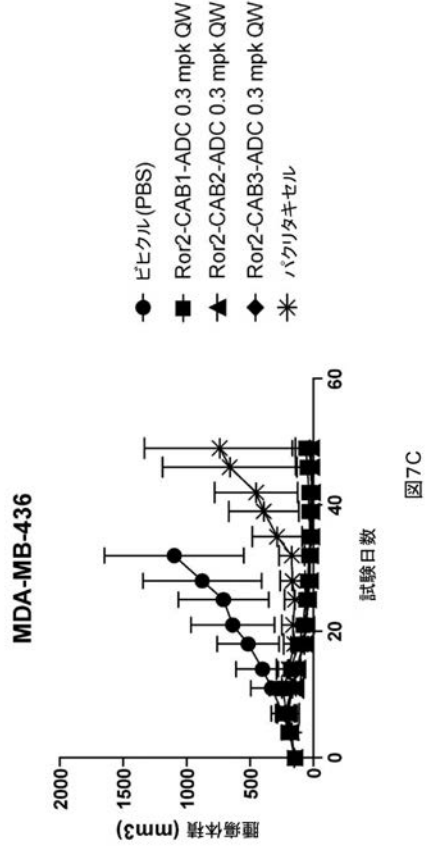
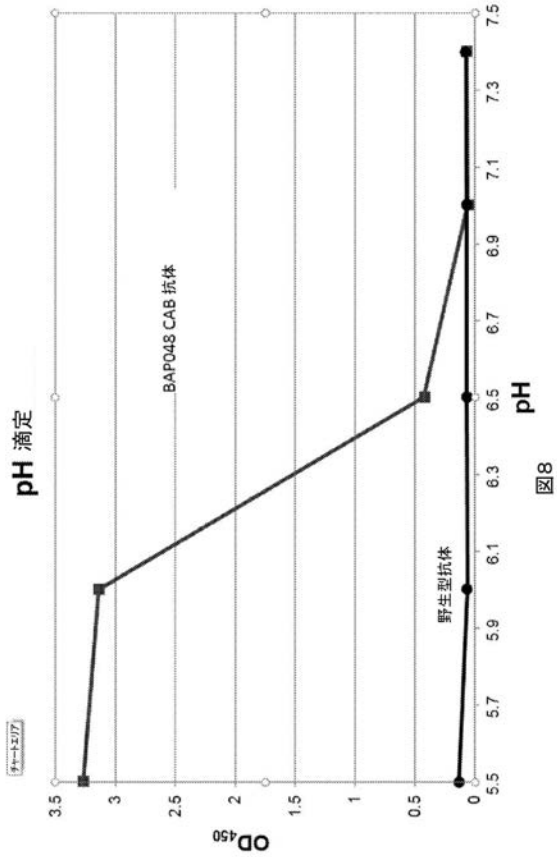
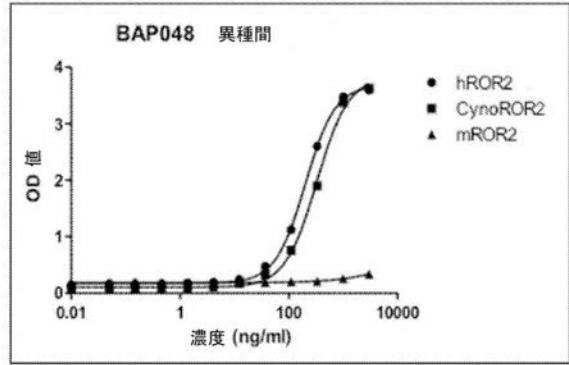


図7C

【 図 8 】



【 図 9 】



抗原	hROR2	CynoROR2	mROR2
EC50 (ng/ml)	201.4	327.1	7653

図9

【 図 1 0 】

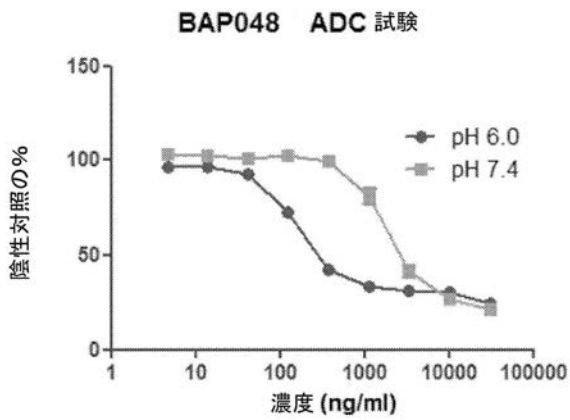
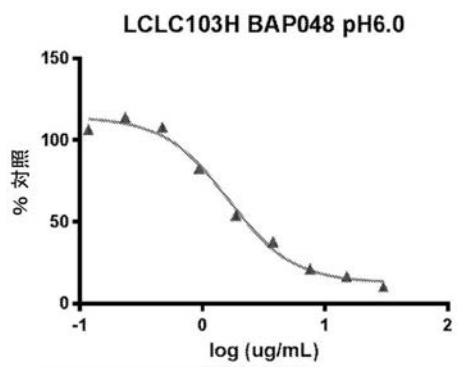


図10

【 図 1 1 A 】



	810D-PAB-MMAE
IC50	1.619

図11A

【 图 1 1 B 】

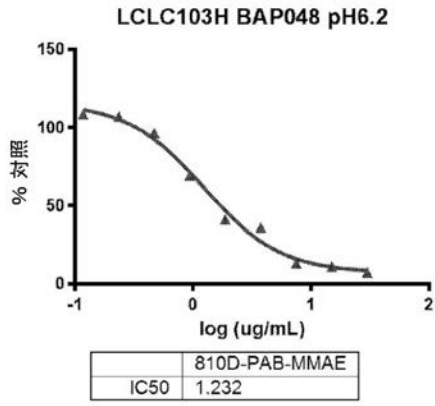


图11B

【 图 1 1 C 】

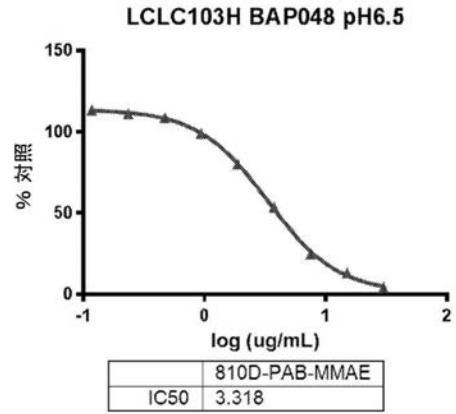


图11C

【 图 1 2 A 】

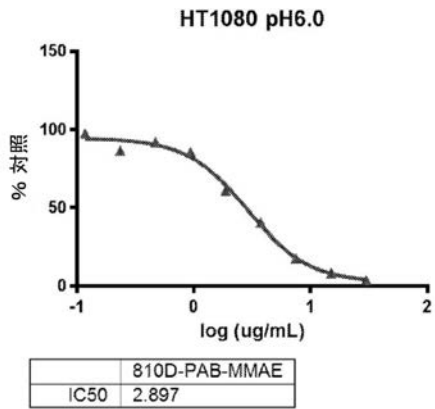


图12A

【 图 1 2 B 】

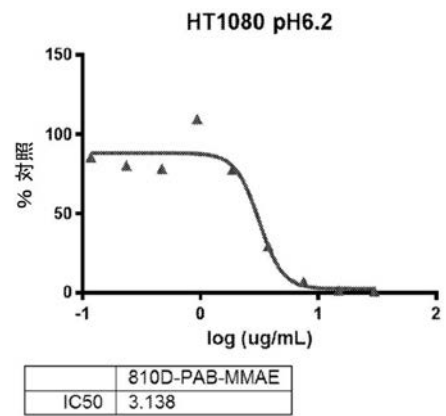


图12B

【 図 1 2 C 】

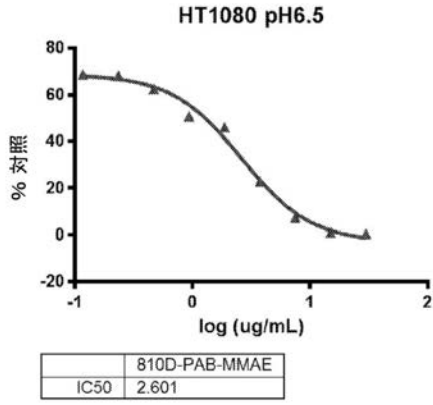


図12C

【 図 1 3 】

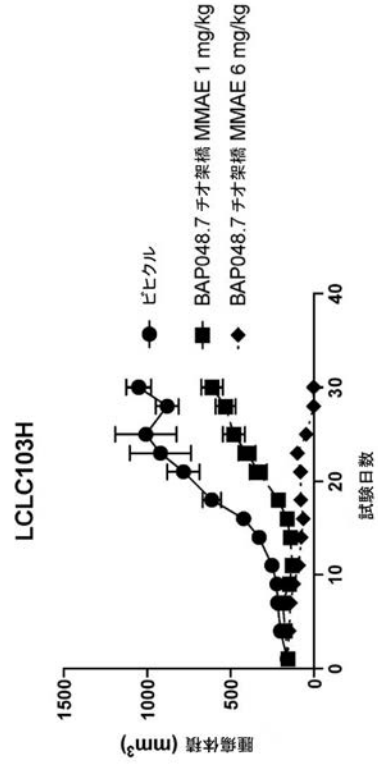


図13

【 図 1 4 】

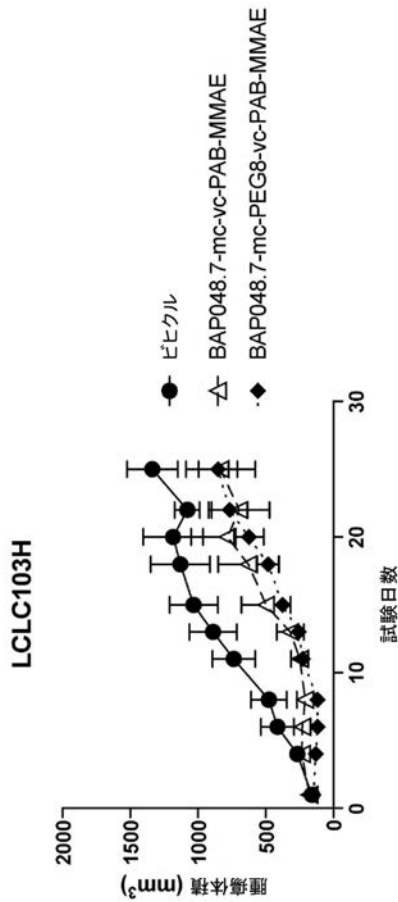


図14

【 図 1 5 A 】

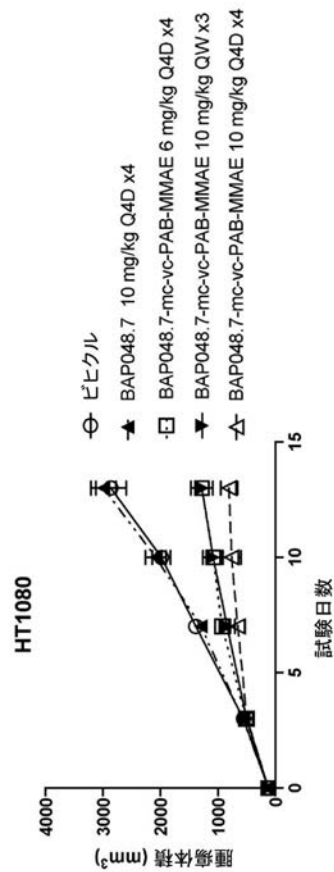


図15A

【 図 1 5 B 】

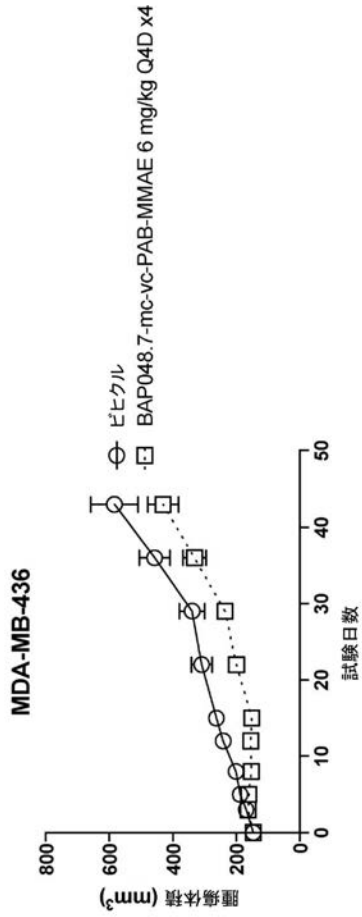


図15B

【 配 列 表 】

[2019524640000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2017/032357
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i, A61K 47/50(2017.01)i, G01N 33/574(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 35/00; C12Q 1/68; G01N 33/574; A61P 19/08; A61K 47/50		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: Ror2 antibody, tumor environment, pH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014-0322234 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 30 October 2014 See abstract; paragraphs [0053]-[0059]; claim 1.	1-4, 7-14
A	US 2010-0255004 A1 (DEPINHO et al.) 07 October 2010 See the whole document.	1-4, 7-14
A	US 2009-0047287 A1 (BILLIARD et al.) 19 February 2009 See the whole document.	1-4, 7-14
A	EDRIS et al., 'ROR2 is a novel prognostic biomarker and a potential therapeutic target in leiomyosarcoma and gastrointestinal stromal tumour' The Journal of Pathology, Vol.227, pages 223-233 (2012) See the whole document.	1-4, 7-14
A	HENRY et al., 'Targeting the ROR1 and ROR2 receptors in epithelial ovarian cancer inhibits cell migration and invasion' Oncotarget, Vol.6, No.37, pages 40310-40326 (2015) See the whole document.	1-4, 7-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 10 July 2017 (10.07.2017)		Date of mailing of the international search report 11 July 2017 (11.07.2017)
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer CHO, Ki Yum Telephone No. +82-42-481-5655

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2017/032357

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 18-19,23
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 18-19 and 23 refer to one of unsearchable claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. Claims Nos.: 5-6,15-17,20-22,24-25
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2017/032357

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2014-0322234 A1	30/10/2014	EP 2800975 A1 WO 2013-103637 A1 WO 2013-103637 A9	12/11/2014 11/07/2013 19/09/2013
US 2010-0255004 A1	07/10/2010	CA 2683804 A1 EP 2137535 A1 EP 2137535 B1 WO 2008-127707 A1	23/10/2008 30/12/2009 03/06/2015 23/10/2008
US 2009-0047287 A1	19/02/2009	AU 2007-217779 A1 CA 2638803 A1 CN 101384619 A EP 1984395 A2 JP 2009-527485 A KR 10-2008-0095269 A WO 2007-098198 A2 WO 2007-098198 A3	30/08/2007 30/08/2007 11/03/2009 29/10/2008 30/07/2009 28/10/2008 30/08/2007 13/03/2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/537 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 31/5517 (2006.01)	A 6 1 K 38/05	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/537	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	A 6 1 K 31/5517	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/531	A
	C 1 2 N 15/13	
	C 1 2 N 15/13	Z N A
	C 1 2 N 15/62	Z

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

(72)発明者 フレイ ガーハード

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 9 サン ディエゴ ピア シーマ ベラ 1 3 7
6 8

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC27 CC41 EE41 EE59 FF02 FF14
4C084 AA02 AA03 BA08 BA14 BA23 BA32 BA44 CA59 NA05 NA13
ZB261
4C085 AA13 AA14 AA16 AA25 AA26 AA27 BB41 BB43 BB50 CC02
CC23 CC32 DD62 EE01
4C086 AA01 AA02 CB11 CB22 EA08 EA10 MA01 MA04 NA05 NA13
ZB26
4H045 AA11 AA30 BA10 BA51 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	抗Ror2抗体，抗体片段，它们的免疫缀合物及其用途		
公开(公告)号	JP2019524640A	公开(公告)日	2017-11-16
申请号	JP2018559715	申请日	2017-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	生物蛋白有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物ATRA，LLC		
[标]发明人	シヨートジェイエム チャングフウェイウエン フレイガーハード		
发明人	シヨート ジェイ エム チャング フウェイ ウエン フレイ ガーハード		
IPC分类号	C07K16/28 C07K16/46 A61K47/68 A61K39/395 A61K38/05 A61K31/537 A61K31/704 A61K31/5517 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/531 C12N15/13 C12N15/62		
CPC分类号	A61K47/6803 A61K47/6849 C07K16/2803 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/574 A61K2039/505 C07K2317/31 C07K2317/565 G01N2333/70503 A61K38/07 A61K47/6811 A61P35/00		
FI分类号	C07K16/28 C07K16/46 A61K47/68 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.C A61K39/395.L A61K38/05 A61K31/537 A61K31/704 A61K31/5517 A61P35/00 G01N33/53.D G01N33/531.A C12N15 /13 C12N15/13.ZNA C12N15/62.Z		
F-TERM分类号	4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF02 4C076/FF14 4C084 /AA02 4C084/AA03 4C084/BA08 4C084/BA14 4C084/BA23 4C084/BA32 4C084/BA44 4C084/CA59 4C084/NA05 4C084/NA13 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA25 4C085 /AA26 4C085/AA27 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB11 4C086/CB22 4C086/EA08 4C086 /EA10 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/NA13 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA51 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	62/335719 2016-05-13 US 62/447218 2017-01-17 US		
其他公开文献	JP2019524640A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

具有与Ror2蛋白特异性结合的重链可变区和/或轻链可变区的多肽，以及含有与Ror2蛋白结合的重链可变区和/或轻链可变区的抗体和抗体片段。还提供了药物组合物和试剂盒，其包括含有多肽或多肽的抗体或抗体片段。

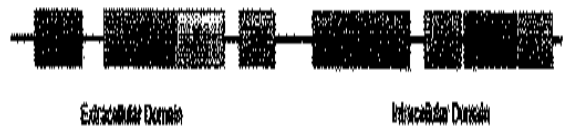


FIG. 1