

明 細 書

発明の名称：抗体薬物複合体

技術分野

[0001] 本発明は、抗体薬物複合体、及びこれを含む抗がん用組成物に関する。

背景技術

[0002] 組織因子（Tissue factor、TF）は、多くのヒトがん細胞で発現しており、発現と悪性度との正の相関が臨床研究により実証されている。また、本発明者らによって、組織因子を標的とした抗体、及び抗組織因子抗体と細胞傷害剤とを含む抗体薬物複合体（ADC）が作製されている（特許文献1及び2、並びに非特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2015/115656号

特許文献2：国際公開第2019/087994号

特許文献3：特開第2018/188455号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Koga Y. ら、Int J Cancer、2015年9月15日、137巻、6号、1457～1466ページ

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、生体内において抗腫瘍効果を発揮する、抗組織因子抗体及び細胞傷害剤を含む抗体薬物複合体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、前記目的を達成すべく鋭意研究を重ね、抗組織因子抗体に、マレイミド－ポリエチレングリコール12－バリリン－シトルリン－p－アミノベンジルアルコールからなるリンカーを介し、細胞傷害剤であるモノメ

チルオーリスタチンE (MMAE) が結合しているADC (以下、「h u 1 0 8 4 - P E G 1 2 - M M A E」とも称する) を作製した。

[0007] さらに、抗組織因子抗体に、マレイミドカプロイルーバリニン-シトルリン-p-アミノベンジルアルコールからなるリンカーを介し、細胞傷害剤であるMMAEが結合しているADC (以下、「h u 1 0 8 4 - M M A E」とも称する) を作製した。

[0008] また、抗組織因子抗体に、マレイミドカプロイルーグリシン-グリシン-フェニルアラニン-グリシンからなるリンカーを介し、細胞傷害剤であるD x dが結合しているADC (以下、「h u 1 0 8 4 - D x d」とも称する) も作製した (リンカー及びD x dについては、特許文献3 参照のほど)。

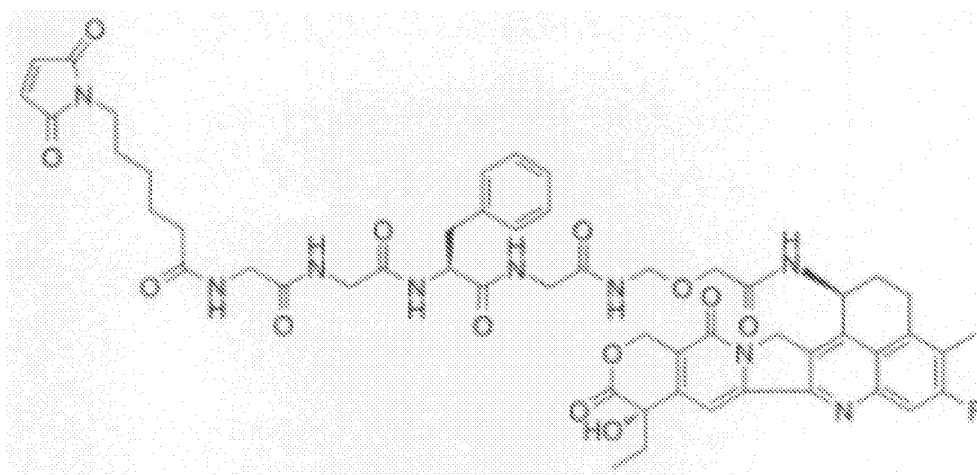
[0009] そして、これらADCについて、ヒト膵臓腺がん細胞株 (B x P C - 3、P S N - 1、H P A F - 1 1) に対する殺細胞効果を解析した結果、いずれのヒト膵臓腺がん細胞においても、h u 1 0 8 4 - P E G 1 2 - M M A E又はh u 1 0 8 4 - M M A Eの方が、h u 1 0 8 4 - D x dよりも、高い殺細胞効果を示した。特に、P S N - 1に対しては、h u 1 0 8 4 - D x dは全く殺細胞効果を示さなかった。

[0010] このように、ヒト膵臓がんに対しては、抗組織因子抗体及びMMAEを含むADCの方が有効であることが示唆された。しかしながら、ヒト膵臓がん組織を移植したヌードマウス (P D Xモデル) を用いて評価した結果、驚くべきことに、前記インビトロでの結果に反し、インビボにおいて、h u 1 0 8 4 - D x dは、ヒト由来の膵臓がん組織に対して顕著な腫瘍増殖抑制効果を示し、更には腫瘍退縮も認められることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は、抗組織因子抗体に、マレイミドカプロイルーグリシン-グリシン-フェニルアラニン-グリシンからなるリンカーを介し、D x dが結合しているADCに関し、より具体的には以下を提供する。

< 1 > 組織因子に結合する抗体と、下記式にて表されるリンカー及び薬物とが、結合した複合体

[0012] [化1]



[0013] <2> 前記組織因子に結合する抗体の、解離速度定数 k_d が 1×10^{-4} ($1/s$) 以上であり、かつ、結合速度定数 k_a が 1×10^4 ($1/Ms$) 以上である、<1>に記載の複合体。

<3> 前記組織因子に結合する抗体が、

配列番号：1～3に記載のアミノ酸配列、又は、配列番号：1～3に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列を、それぞれCDR 1～3として含む、重鎖可変領域と、

配列番号：5～7に記載のアミノ酸配列、又は、配列番号：5～7に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列を、それぞれCDR 1～3として含む、軽鎖可変領域と

を保持する、抗体である、<1>又は<2>に記載の複合体。

<4> 前記組織因子に結合する抗体が、

配列番号：4に記載のアミノ酸配列、配列番号：4に記載のアミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列を、含む重鎖可変

領域と、

配列番号：8に記載のアミノ酸配列、配列番号：8に記載のアミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は配列番号：8に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列を、含む軽鎖可変領域と、

を保持する、抗体である、＜1＞又は＜2＞に記載の複合体。

＜5＞ 前記リンカー及び薬物の1抗体あたりの平均結合数が3～8個である、＜1＞～＜4＞のうちのいずれか一項に記載の複合体。

＜6＞ ＜1＞～＜5＞のうちのいずれか一項に記載の複合体を含む、抗がん用組成物。

＜7＞ ＜1＞～＜5＞のうちのいずれか一項に記載の複合体を含む、抗腫瘍がん用組成物。

[0014] また、本発明は、抗がん用組成物（抗腫瘍がん用組成物等）の製造のための前記複合体の使用、抗がん用途のための前記複合体の使用、前記複合体の有効量を対象に投与する、がんの治療方法に関する。

[0015] なお、本発明において「組織因子（Tissue factor、TF）」とは、血液凝固因子の1つであり、F3、CD142、TF A、凝固第III因子（coagulation factor III）、トロンボプラスチン、組織トロンボプラスチンとも呼ばれるタンパク質である。組織因子は、膜貫通型の糖タンパク質であり、外因系血液凝固反応の開始因子として知られる。組織因子は、好ましくはヒト組織因子である。ヒト組織因子のアミノ酸配列は、例えば、NCBI Reference Sequence：NP_001984に示されるとおりである。しかしながら、遺伝子のDNA配列は、その変異等により、自然界において（すなわち、非人工的に）変異し、それにコードされるタンパク質のアミノ酸配列もそれに伴い改変される。したがって、本発明に係る「組織因子」は、前記典型的なアミノ酸配列からなるタンパク質に特定されることなく、このような天然の変異体も含まれる

。

[0016] 「結合速度定数」 (k_a) 及び「解離速度定数」 (k_d) は、2分子間の結合解離反応における速度定数である。各々、後述の実施例に示すように、例えば、表面プラズモン共鳴法 (SPR) による測定によって決定することができる。抗体と抗原間の結合の SPR 測定は周知であり、当業者であれば周知技術に基づいて抗体の結合速度定数 k_a 及び解離速度定数 k_d を求めることができる。SPR 測定では、アナライトを一定濃度でフローさせる相 (結合相) において結合速度定数を RU の変化量から求めることができ、その後ランニングバッファーをフローさせる相 (解離相) において解離定数を RU の変化量から求めることができる。測定は、single-cycle kinetics により行うことができる。また解析は、bivalent analysis により行うことができる。実測される SPR センサーグラムに対する近似曲線のカーブフィットは、kinetic titration 1:1 interaction model により行うことができる。カーブフィットの詳細は、Karlsson, R., Katsamba, P. S., Nordin, H., Pol, E. and Myszka, D. G. (2006). "Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors.", Anal. Biochem. 349 (1) : 136-47. を参照することができる。

[0017] 抗体の結合速度定数 k_a 及び解離速度定数 k_d はまた、例えば、GE Healthcare 社から市販される Biacore (登録商標) 等の SPR 装置を用い、その製造者マニュアルに従って求めることができる。より具体的には、SPR 測定装置にも k_a 及び k_d を求めるプログラムが搭載されており、SPR センサーグラムから k_a 及び k_d を算出することができる。例えば、Biacore (登録商標) 装置により得られた SPR センサーグラムを Biacore T200 Evaluation Software を用いて解析し、Fitting model として Bivalent

Analyte modelを採用することにより、Fitting curveを導出し、抗体又はADCのKinetics parameterとして k_a や k_d 、KDを算出することもできる。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、生体内において抗腫瘍効果を発揮する、抗組織因子抗体及び細胞傷害剤を含む抗体薬物複合体を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1A]ヒト膵臓腺がん細胞株（BxPC-3）に対する、抗体薬物複合体及び薬物単剤の殺細胞効果を解析した結果を示す、グラフである。図中、縦軸はヒト膵臓腺がん細胞株の生存率を示し、横軸は細胞株培養培地への薬物添加濃度（各薬物換算）を示す（グラフの縦軸及び横軸の表記については、以下の図1B～1Eにおいても同様である）。

[図1B]ヒト膵臓腺がん細胞株（PSN-1）に対する、抗体薬物複合体及び薬物単剤の殺細胞効果を解析した結果を示す、グラフである。

[図1C]ヒト膵臓腺がん細胞株（BxPC-3）に対する、抗体薬物複合体及び薬物単剤の殺細胞効果を解析した結果を示す、グラフである。図中、「anti-TF ADC MMAE」は、hu1084-MMAEを表し、「Control ADC MMAE」は、hu1084-MMAEにおけるhu1084のCDR領域のアミノ酸を改変し、ヒト組織因子を認識しなくなったものを表す。これらMMAEを含む抗体薬物複合体におけるリンカー及び薬物の1抗体あたりの平均結合数（DAR）は3～4である。「anti-TF ADC Dxd」はhu1084-Dxdを表し、「Control ADC Dxd」は、hu1084-Dxdにおけるhu1084のCDR領域のアミノ酸を改変し、ヒト組織因子を認識しなくなったものを表す。これらDxdを含む抗体薬物複合体におけるDARは7～8である（これら表記については、図1D及び1Eにおいても同様である）。

[図1D]ヒト膵臓腺がん細胞株（HPAF-II）に対する、抗体薬物複合体及び薬物単剤の殺細胞効果を解析した結果を示す、グラフである。

[図1E]ヒト膵臓腺がん細胞株（PSN-1）に対する、抗体薬物複合体及び薬物単剤の殺細胞効果を解析した結果を示す、グラフである。

[図2A]ヒト膵臓がん組織（ヒト膵臓腫瘍組織片 型番：PAN-02-JCK（実験動物中央研究所））を移植したヌードマウス（no, 2）において形成された腫瘍組織を、抗組織因子抗体を用いた免疫染色にて解析した結果を示す、顕微鏡写真である。図中のスケールバーは200 μ mを表す。

[図2B]ヒト膵臓がん組織（ヒト膵臓腫瘍組織片 型番：PAN-04-JCK（実験動物中央研究所））を移植したヌードマウス（no, 4）において形成された腫瘍組織を、抗組織因子抗体を用いた免疫染色にて解析した結果を示す、顕微鏡写真である。図中のスケールバーは200 μ mを表す。

[図2C]ヒト膵臓がん組織（ヒト膵臓腫瘍組織片 型番：PAN-08-JCK（実験動物中央研究所））を移植したヌードマウス（no, 8）において形成された腫瘍組織を、抗組織因子抗体を用いた免疫染色にて解析した結果を示す、顕微鏡写真である。図中のスケールバーは200 μ mを表す。

[図3A]前記ヌードマウス（no, 2）における、抗体薬物複合体の抗腫瘍効果を解析した結果を示す、グラフである。図中、縦軸は腫瘍サイズを示し、横軸は抗体薬物複合体投与を開始してからの日数を示す（グラフの縦軸及び横軸の表記については、以下の図3B～3Eにおいても同様である）。

[図3B]前記ヌードマウス（no, 4）における、抗体薬物複合体の抗腫瘍効果を解析した結果を示す、グラフである。図中、縦軸は腫瘍サイズを示し、横軸は抗体薬物複合体投与を開始してからの日数を示す。

[図3C]前記ヌードマウス（no, 8）における、抗体薬物複合体の抗腫瘍効果を解析した結果を示す、グラフである。図中、縦軸は腫瘍サイズを示し、横軸は抗体薬物複合体投与を開始してからの日数を示す。

[図3D]前記ヌードマウス（no, 8）における、抗体薬物複合体の抗腫瘍効果を解析した結果を示す、グラフである。図中、「anti-TF-MMAE」及び「anti-TF-Dxd」は各々、hu1084-MMAE（DAR：3）及びhu1084-Dxd（DAR：8）を表す。また、前記ヌ

ードマウス（no, 8）において形成された腫瘍組織を、抗組織因子抗体を用いた免疫染色にて解析した結果を併せて示す。当該顕微鏡写真中のスケールバーは200 μ mを表す。

[図3E]ヒト膵臓がん組織（ヒト膵臓腫瘍組織片 型番：PAN-14-JCK（実験動物中央研究所））を移植したヌードマウス（no, 14）における、抗体薬物複合体の抗腫瘍効果を解析した結果を示す、グラフである。また、前記ヌードマウス（no, 14）において形成された腫瘍組織を、抗組織因子抗体を用いた免疫染色にて解析した結果を併せて示す。当該顕微鏡写真中のスケールバーは200 μ mを表す。

発明を実施するための形態

[0020] <抗体薬物複合体>

後述の実施例に示すとおり、組織因子に結合する抗体と細胞傷害剤であるDxdとが、マレイミドカプロイルーグリシンーグリシンーフェニルアラニンーグリシンからなるリンカーを介して結合した複合体（抗体薬物複合体、ADC）は、生体内において、がんに対して顕著な腫瘍増殖抑制効果を示し、更には腫瘍退縮効果を示すことが明らかになった。したがって、本発明は、該抗体薬物複合体を提供する。

[0021] （組織因子に結合する抗体）

本発明における「抗体」は、免疫グロブリンのすべてのクラス（IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、IgY等）及びサブクラス（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2等）を含む。「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体が含まれ、また、抗体の機能的断片の形態も含む意である。「ポリクローナル抗体」は、異なるエпитープに対する異なる抗体を含む抗体調製物である。「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体（抗体断片を含む）を意味する。ポリクローナル抗体とは対照的に、モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を認識するものである。本発明の抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。本発明の抗体は、自然環境の成分から分離され、及び

／又は回収された（即ち、単離された）抗体である。

[0022] かかる抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することができ、また組換えDNA法によって作製することができる。

[0023] ハイブリドーマ法としては、代表的には、コーラー及びミルスタインの方法（Kohler & Milstein, Nature, 256:495 (1975)）が挙げられる。この方法における細胞融合工程に使用される抗体産生細胞は、抗原（組織因子、その部分ペプチド、それらにFcタンパク質等が融合してあるタンパク質、またはこれらを発現する細胞等）で免疫された動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、サル、ヤギ）の脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血白血球等である。免疫されていない動物から予め単離された上記の細胞又はリンパ球等に対して、抗原を培地中で作用させることによって得られた抗体産生細胞も使用することが可能である。ミエローマ細胞としては公知の種々の細胞株を使用することが可能である。抗体産生細胞及びミエローマ細胞は、それらが融合可能であれば、異なる動物種起源のものでもよいが、好ましくは、同一の動物種起源のものである。ハイブリドーマは、例えば、抗原で免疫されたマウスから得られた脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞との間の細胞融合により産生され、その後のスクリーニングにより、組織因子に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。組織因子に対するモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを培養することにより、また、ハイブリドーマを投与した哺乳動物の腹水から、取得することができる。

[0024] 組換えDNA法は、本発明の抗体をコードするDNAをハイブリドーマやB細胞等からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞（例えば、CHO細胞、HEK細胞等の哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞等）に導入し、本発明の抗体を組換え抗体として産生させる手法である（例えば、P. J. Delves, Antibody Production: Essential Techniques, 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean Mono

clonal Antibodies, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS、Vandamme A. M. et al., Eur. J. Biochem. 192:767-775 (1990))。本発明の抗体をコードするDNAの発現においては、重鎖又は軽鎖をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよく、重鎖及び軽鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよい（国際公開第94/11523号 参照）。本発明の抗体は、上記宿主細胞を培養し、宿主細胞内又は培養液から分離・精製し、実質的に純粋で均一な形態で取得することができる。抗体の分離・精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている方法を使用することができる。トランスジェニック動物作製技術を用いて、抗体遺伝子が組み込まれたトランスジェニック動物（ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ等）を作製すれば、そのトランスジェニック動物のミルクから、抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。

[0025] 本発明の抗体は、組織因子に結合すればよく、その由来、種類、形状等は特に限定されない。具体的には、非ヒト動物由来の抗体（例えば、ラット抗体、マウス抗体、ラクダ抗体）、ヒト由来の抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及びこれら抗体の機能的断片が含まれる。本発明の抗体を医薬としてヒトに投与する場合は、副作用低減の観点から、キメラ抗体又はヒト化抗体が望ましい。

[0026] 本発明において「キメラ抗体」とは、ある種の抗体の可変領域とそれとは異種の抗体の定常領域とを連結した抗体である。キメラ抗体は、例えば、上述のように作製されるモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（可変領域）を切り出して、ヒト骨髓由来の抗体定常部（定常領域）遺伝子と結合し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入して産生させることにより取得することができる（例えば、特開平8-280387号公報、米国特許第4816397号公報、米国特許第4816567号公報、米国特許第5807715号公報）。

[0027] キメラ抗体の定常領域には、通常、ヒト由来の抗体のものが使用される。例えば重鎖においては、 $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 2$ 、 $C\gamma 3$ 、 $C\gamma 4$ 、 $C\mu$ 、 $C\delta$ 、 $C\alpha 1$ 、 $C\alpha 2$ 、及び $C\epsilon$ を定常領域として利用することができる。また軽鎖においては $C\kappa$ や $C\lambda$ を定常領域として使用できる。これらの定常領域のアミノ酸配列、並びにそれをコードする塩基配列は公知である。また、抗体自体の安定性、又は抗体の産生の安定性を改善するために、ヒト由来の抗体定常領域中の1又は数個のアミノ酸を置換、欠失、付加及び／又は挿入をすることができる。

[0028] 本発明において「ヒト化抗体」とは、非ヒト（ラット等）由来の抗体の抗原結合部位（CDR）の遺伝子配列をヒト由来の抗体遺伝子に移植（CDRグラフトイング）した抗体であり、その作製方法は、オーバーラップエクステンションPCR等、公知である（例えば、欧州特許出願公開第239400号明細書、欧州特許出願公開第125023号明細書、国際公開第90／07861号、国際公開第96／02576号）。抗体の可変領域は、通常、4つのフレームワーク領域（FR）には含まれた3つのCDRで構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む一方、FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い相同性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるといわれている。また、CDRの機能の維持の観点から、非ヒト由来CDRのヒトFRへの移植においては、その非ヒト動物由来のFRと相同性の高いヒトFRが選択される。すなわち、CDR内のアミノ酸は、抗原を認識するばかりでなく、CDRの近傍にあるFRのアミノ酸と配位し、CDRのループ構造の維持にも関与しているため、移植すべきCDRに隣接しているFRのアミノ酸配列と相同性の高いアミノ酸配列からなるヒトFRを利用することが好ましい。

[0029] 非ヒト動物由来のFRと相同性の高い公知のヒトFRの検索を、例えば、インターネットで利用可能な抗体に特化した検索システム（<http://>

www.bioinf.org.uk/abysis/) を利用して行うことができる。このようにして得られたヒトFRの配列と一致するように、非ヒト由来の抗体のCDR以外の配列に変異を導入することができる。あるいは、検索によって得られたヒトFRのアミノ酸配列をコードする遺伝子(cDNA)が入手可能な場合は、その配列中に非ヒト由来CDRを導入してもよい。変異の導入等は核酸合成、部位特異的変異誘発等の当該分野で公知の技術を用いて行うことができる。

[0030] このようにして作製されたヒト化抗体の抗原への結合活性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト由来の抗体のFRが好適に選択できる。また必要に応じ、Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856等に記載の方法に沿って、ヒト化抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもでき、さらに当該アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への結合活性を測定して評価することによって、所望の性質を有する変異FR配列を選択することができる。

[0031] 本発明において抗体の「機能的断片」とは、抗原結合フラグメントとも称され、抗体の一部分(部分断片)であって、組織因子を特異的に認識するものを意味する。具体的には、Fab、Fab'、F(ab')₂、可変領域断片(Fv)、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv(scFv)、sc(Fv)₂、ダイアボディー、多特異性抗体、及びこれらの重合体等が挙げられる。

[0032] ここで「Fab」とは、1つの軽鎖及び重鎖の一部からなる免疫グロブリンの一価の抗原結合断片を意味する。抗体のパパイン消化によって、また、組換え方法によって得ることができる。「Fab'」は、抗体のヒンジ領域の1つ又はそれより多いシステインを含めて、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端でのわずかの残基の付加によって、Fabとは異なる。「F(ab')₂」とは、両方の軽鎖と両方の重鎖の部分からなる免疫グロブリンの二

価の抗原結合断片を意味する。

[0033] 「可変領域断片 (F_v)」は、完全な抗原認識及び結合部位を有する最少の抗体断片である。F_vは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。「一本鎖F_v (s c F_v)」は、抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、これらの領域は、単一のポリペプチド鎖に存在する。「s c (F_v)₂」は、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域をリンカー等で結合して一本鎖にしたものである。「ダイアボディー」とは、二つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片であり、この断片は、同一ポリペプチド鎖の中に軽鎖可変領域に結合した重鎖可変領域を含み、各領域は別の鎖の相補的領域とペアを形成している。「多特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。例えば、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現により調製することができる。

[0034] 本発明の抗体には、望ましい活性（抗原に対する結合活性等）を減少させることなく、そのアミノ酸配列が修飾された抗体が含まれる。このようなアミノ酸配列変異体は、例えば、後述のヒト化1084抗体の抗体鎖をコードするDNAへの変異導入によって、またはペプチド合成によって作製することができる。そのような修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の置換、欠失、付加及び／又は挿入を含む。抗体のアミノ酸配列が改変される部位は、改変される前の抗体と同等の活性を有する限り、抗体の重鎖又は軽鎖の定常領域であってもよく、また、可変領域（FR及びCDR）であってもよい。CDR以外のアミノ酸の改変は、抗原との結合活性への影響が相対的に少ないと考えられるが、現在では、CDRのアミノ酸を改変して、抗原への結合活性が高められた抗体をスクリーニングする手法が公知である（P N A S, 102:8466-8471 (2005)、P r o t e i n E n g i n e e r i n g, D e s i g n & S e l e c t i o n, 21:485-493 (2008)、国際公開第2002/051870号、J. B i o l . C h e m. , 280:24880-24887 (2005)、P r o t e

in Engineering, Design & Selection, 21 : 345-351 (2008)、MAbs. Mar-Apr; 6 (2) : 437-45 (2014))。また、現在では、統合計算化学システム等（例えば、Molecular Operating Environment、カナダCCG社製）を利用することにより、抗原への結合活性が高められた抗体をモデリングすることもできる（例えば、<http://www.rs-i.co.jp/kagaku/cs/ccg/products/application/protein.html> 参照）。さらに、Protein Eng Des Sel. 2010 Aug; 23 (8) : 643-51に記載の通り、抗原への結合活性において、重鎖可変領域のCDR1及び軽鎖可変領域のCDR3は関与していない例が知られている、また同様に、Molecular Immunology 44 : 1075-1084 (2007) には、大抵の抗体においては、軽鎖可変領域のCDR2は抗原への結合活性に関与していないということが報告されている。このように、抗体の抗原への結合活性においては、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域各々のCDR1～3の全てを要せずとも、同等の活性を発揮し得る。実際に、Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jul 18; 307 (1) : 198-205、J Mol Biol. 2004 Jul 9; 340 (3) : 525-42、J Mol Biol. 2003 Aug 29; 331 (5) : 1109-20においては、元の抗体の少なくとも1のCDRを保持することによって、抗原への結合活性が維持された例が報告されている。然るに、当業者であれば、FRのみならず、CDRのアミノ酸配列も、その抗体の抗原への結合活性を維持したまま、また向上させることを目的として改変し得る。

[0035] 本発明の抗体に関し、改変されるアミノ酸数は、好ましくは、10アミノ酸以内（例えば、9アミノ酸以内、8アミノ酸以内、7アミノ酸以内、6アミノ酸以内）、より好ましくは5アミノ酸以内（例えば、4アミノ酸以内）、さらに好ましくは3アミノ酸以内（例えば、2アミノ酸以内、1アミノ酸

）である。アミノ酸の改変は、好ましくは、保存的な置換である。「保存的な置換」とは、化学的に同様な側鎖を有する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、本発明の属する技術分野でよく知られている。例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸・グルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン・アルギニン・ヒスチジン）、中性アミノ酸においては、炭化水素鎖を持つアミノ酸（グリシン・アラニン・バリン・ロイシン・イソロイシン・プロリン）、ヒドロキシ基を持つアミノ酸（セリン・トレオニン）、硫黄を含むアミノ酸（システイン・メチオニン）、アミド基を持つアミノ酸（アスパラギン・グルタミン）、イミノ基を持つアミノ酸（プロリン）、芳香族基を持つアミノ酸（フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン）で分類することができる。

[0036] また、改変後のアミノ酸配列が、後述のヒト化1084抗体の抗体鎖に対して、アミノ酸配列レベルで80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる抗体鎖を有する抗体も、改変される前の抗体と同等の活性を有する限り、本発明の抗体に含まれる。かかる相同性としては、少なくとも80%であればよいが、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上（例えば、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）である。また、配列の相同性は、BLASTP（アミノ酸レベル）のプログラム（Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410, 1990）を利用して決定することができる。該プログラムは、Karlin及びAltschulによるアルゴリズムBLAST（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877, 1993）に基づいている。BLASTPによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。また、Gapped BLASTプログラムを用いて、アミノ酸配列を解析する場合は、Altschulら（Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1

997)に記載されているように行うことができる。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。また、「同等の活性を有する」とは、抗原への結合活性が、対象抗体（代表的には、ヒト化1084抗体）と同等（例えば、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上）であることを意味する。

[0037] また、本発明の抗体の改変は、例えば、グリコシル化部位の数又は位置を変化させる等の抗体の翻訳後プロセスの改変であってもよい。これにより、例えば、抗体のADCC活性を向上させることができる。抗体のグリコシル化とは、典型的には、N-結合又はO-結合である。抗体のグリコシル化は、抗体を発現するために用いる宿主細胞に大きく依存する。グリコシル化パターンの改変は、糖生産に関わる特定の酵素の導入又は欠失等の公知の方法で行うことができる（特開2008-113663号公報、米国特許第5047335号、米国特許第5510261号、米国特許第5278299号、国際公開第99/54342号）。さらに、本発明においては、抗体の安定性を増加させる等の目的で脱アミド化されるアミノ酸若しくは脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより脱アミド化を抑制してもよい。また、グルタミン酸を他のアミノ酸へ置換して、抗体の安定性を増加させることもできる。本発明は、こうして安定化された抗体をも提供するものである。

[0038] また、本発明の抗体は、インターナリゼーション能を有していてもよい（特許文献1 参照のほど）。「インターナリゼーション」とは、抗体が細胞表面の抗原と免疫複合体を形成後、細胞内に取り込まれる現象を意味する。抗体がインターナリゼーション能を有するか否かは、例えば、標識物質を結合した抗体を表面に組織因子を発現する細胞と接触させ、該標識物質が細胞内に移行するか否かを確認する方法、細胞毒性を有する物質を結合した抗体を表面に組織因子を発現する細胞と接触させた際に、細胞死又は細胞の増殖阻害が誘導されるか否かを確認する方法等によって判断することができる。

[0039] 本発明の抗体はまた、A D C C活性及びC D C活性から選択される少なくとも1の細胞障害活性を有していてもよい。「A D C C活性（抗体依存性細胞障害活性）」とは、標的細胞の細胞表面抗原に抗体が結合した際、その抗体のF c領域にエフェクター細胞（NK細胞、単球等の免疫細胞）がさらに結合することにより、当該細胞が活性化され、それに伴い、因子を放出して標的細胞を殺傷する活性を意味する。他方、「C D C活性（補体依存性細胞障害活性）」とは、抗体が標的細胞に結合すると補体系が活性化し、その結果、標的細胞を溶解する活性を意味する。

[0040] 一旦、組織因子に結合した後に速やかに解離することにより、A D Cとした際に固形腫瘍内部への浸透能が高く、また抗腫瘍効果が高い傾向にあるという観点から（特許文献2 参照のほど）、本発明にかかる抗体の、解離速度定数 k_d は 1×10^{-4} (1/s) 以上であることが好ましく、 2×10^{-4} (1/s) 以上であることがより好ましく、 3×10^{-4} (1/s) 以上であることがさらに好ましく、 4×10^{-4} (1/s) 以上であることがより好ましく、 5×10^{-4} (1/s) 以上であることがさらに好ましく、 6×10^{-4} (1/s) 以上であることがより好ましく、 7×10^{-4} (1/s) 以上であることがさらに好ましく、 8×10^{-4} (1/s) 以上であることがより好ましく、 9×10^{-4} (1/s) 以上であることがさらに好ましく、 1.0×10^{-4} (1/s) 以上であることがより好ましく、 1.5×10^{-4} (1/s) 以上であることがさらに好ましい。また同観点から、結合速度定数 k_a が 1×10^4 (1/Ms) 以上であることが好ましく、 2×10^4 (1/Ms) 以上であることがより好ましく、 3×10^4 (1/Ms) 以上であることがさらに好ましく、 4×10^4 (1/Ms) 以上であることがより好ましく、 5×10^4 (1/Ms) 以上であることがさらに好ましく、 6×10^4 (1/Ms) 以上であることがより好ましい。さらに、 k_d 及び k_a の組み合わせとしては各々、 1×10^{-4} (1/s) 以上及び 1×10^4 (1/Ms) 以上であることが好ましく、 3×10^{-4} (1/s) 以上及び 2×10^4 (1/Ms) 以上であることがより好ましく、 1.0×10^{-4} (1/s) 以上及び 3×10^4 (1/Ms)

）以上であることがさらに好ましく、 1.5×10^{-4} （1/s）以上及び 6×10^4 （1/Ms）以上であることがより好ましい。なお、 k_d 及び k_a の上限は免疫して得られる抗体のそれらの範囲であり得る。また、 K_D 値は、1～100 nMであることが好ましく、10～50 nMであることがより好ましく、20～40 nMであることがさらに好ましい。

[0041] かかる本発明の抗体としては、特許文献2に記載のラット由来ハイブリドーマ クローンNo. 1084から産生されるモノクローナル抗体（ラット1084抗体）が挙げられる。また後述の実施例に示すとおり、当該ラット由来の抗体をヒト化した抗体（ヒト化1084抗体）が、本発明の抗体のより好適な例として挙げられ、より具体的な例として以下が挙げられる。

[0042] 配列番号：1～3に記載のアミノ酸配列、又は、配列番号：1～3に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列を、それぞれCDR 1～3として含む、重鎖可変領域と、

配列番号：5～7に記載のアミノ酸配列、又は、配列番号：5～7に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列を、それぞれCDR 1～3として含む、軽鎖可変領域と

を保持する、組織因子に結合する抗体。

[0043] 配列番号：4に記載のアミノ酸配列、配列番号：4に記載のアミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列を、含む重鎖可変領域と、

配列番号：8に記載のアミノ酸配列、配列番号：8に記載のアミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は配列番号：8に記載のアミノ酸配列の少なくともいずれかにおいて、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されたアミノ酸配列を、含む軽鎖可変

領域と、

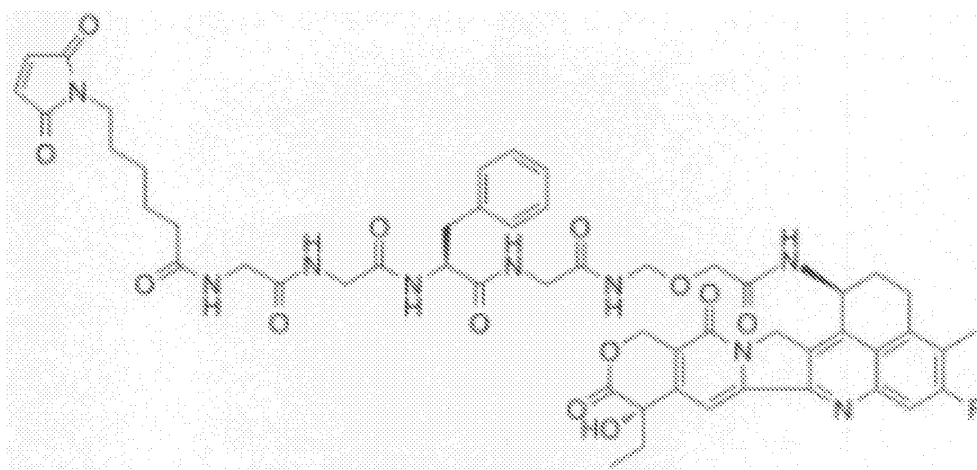
を保持する、組織因子に結合する抗体。

[0044] なお、相同性やアミノ酸の改変数については上述のとおりであり、組織因子への結合活性等を指標としながら、当業者であれば適宜調整し得る。また改変される部位としても上述のとおり当業者であれば適宜選択し得るが、好ましくは、ラット 1084 抗体の CDRs とヒト化 1084 抗体におけるそれらとアミノ酸が異なっている部位が挙げられ、より具体的には、重鎖可変領域 CDR2 の N 末側から 11～13、15 及び 16 位、軽鎖可変領域 CDR1 の N 末側から 4 位、並びに軽鎖可変領域 CDR2 の N 末側から 4 位から選択される、少なくとも 1 の部位（例えば、1、2、3、4、5、6 又は 7 の部位）が挙げられる。また、これら部位におけるアミノ酸は、任意のアミノ酸（所謂、Xaa）であってもよい。

[0045] （リンカー及び薬物）

本発明の ADC においては、上述の抗体と、下記式にて表されるリンカー及び薬物とが、結合している（CAS 番号：1599440-13-7）。

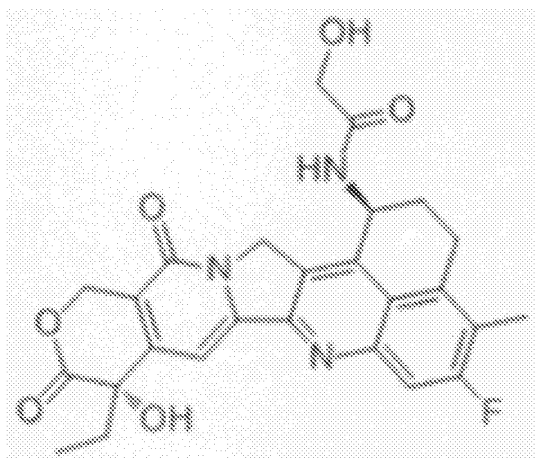
[0046] [化2]



[0047] 本発明にかかるリンカーは、上記のとおり、マレイミドカプロイル（MC、maleimidocaproyl）－グリシン（Gly）－グリシン（Gly）－フェニルアラニン（Phe）－グリシン（Gly）からなる。ま

た薬物は、下記式にて表される抗腫瘍性の化合物（D x d、C A S 番号：1599440-33-1）である。

[0048] [化3]



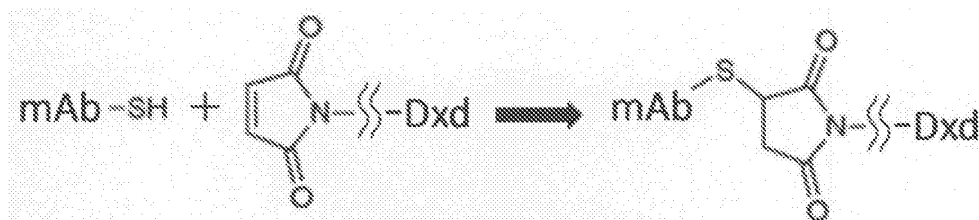
[0049] なお、D x d は、カンプトテシン構造を有するので、酸性水性媒体中（例えば、p H 3 程度）ではラクトン環が形成された構造（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えば、p H 1 0 程度）ではラクトン環が開環した構造（開環体）に平衡が偏ることが知られている。このような閉環構造及び開環構造に対応するエキサテカン残基を導入したADCであっても同等の抗腫瘍効果が期待され、いずれのものも本発明の範囲に包含されることを理解されたし。

[0050] かかるリンカー及び薬物は、当業者であれば、公知の方法を用い、適宜合成し得る。また、市販品（例えば、MedChemExpress社、製品番号：HY-13631E、商品名：デルクステカン（Deruxtecán））として購入することにより、入手することができる。

[0051] 本発明にかかる抗組織因子抗体と、上述のリンカー及び薬物との「結合」とは、下記式に示すとおり、該抗体におけるチオール基（S H 基、スルフヒドリル基）と、リンカー末端のマレイミド基との反応によって形成されるチオエーテル基を介した結合を意味する。なお、下記式において「m A b」は、本発明にかかる抗組織因子抗体を表し、「D x d」は本発明にかかる薬物

を表す。

[0052] [化4]



[0053] 本発明のADCにおいて、抗体1分子あたりの薬物結合数は、その有効性、安全性を考慮し、その数が一定の数となるよう、反応させる原料・試薬の使用量等の反応条件を規定して実施される。しかしながら、低分子化合物の化学反応とは異なり、異なる数の薬物が結合した混合物として得られるのが通常である。抗体1分子への薬物の結合数は平均値、すなわち、平均薬物結合数として特定され、表記される。したがって、本願明細書においても特に断りのない限り、薬物の結合数は平均値を意味する。

[0054] 抗体1分子あたりの薬物結合数は、後述の実施例に示すとおり、用いる還元剤の種類及びその濃度、抗体に対するリンカー及び薬物の濃度（モル過剰率等）、並びに結合反応における温度又は時間を調整することにより、コントロール可能である。「還元剤」としては、抗体中のジスルフィド結合を還元的に開裂させて上記チオール基を介した結合を生じさせ得るものであれば特に制限はないが、例えば、ジチオスレイトール（DTT、DL-DTT）、2-メルカプトエチルアミン、メルカプトエタノール、TCEPが挙げられる。

[0055] 本発明において、1抗体あたりの薬物平均結合数は、好ましくは3～8個であり、より好ましくは4～8個であり、さらに好ましくは5～8個であり、より好ましくは6～8個であり、さらに好ましくは7～8個であり、特に好ましくは8個である。なお、抗体1分子あたりの薬物結合数は、後述の実施例に示すように、DTNB等のチオール基を比色定量する試薬を用い、当業者であれば求めることができる。

[0056] また、本発明のADCは、大気中に放置したり、又は再結晶することによ

り、水分を吸収し、吸着水がついたり、水和物になる場合があり、そのような水を含む化合物及び塩も、本発明に含まれる。

[0057] 本発明のADCを構成する原子の1以上に、原子同位体の非天然割合も含有し得る。原子同位体としては、例えば、 ^2H 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{14}C が挙げられる。また、本発明のADCは、バイオイメージング技術等において検出するために、標識物質が結合されていてもよい。標識物質は、用いる検出方法等の種類に合せて適宜選択されるが、例えば、放射性標識物質、蛍光性標識物質、常磁性標識物質、超常磁性標識物質、酵素標識物質が挙げられる。また、このような標識物質とADCとの結合は直接的なものであってもよく、間接的なものであってもよい。間接的な結合としては、標識物質を結合させた二次抗体、標識物質を結合させたポリマー（プロテインA、プロテインB等）を介した結合が挙げられる。

[0058] より具体的には、ADCを標識する放射性同位元素として、陽電子放出核種を利用することができる。例えば、 ^{64}Cu 、 ^{18}F 、 ^{55}Co 、 ^{66}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 及び ^{124}I のような陽電子放出核種で抗体を標識することができる。これらの陽電子放出核種によるADCの標識には、公知の方法（Nuc l Med Biol. 1999 ; 26 (8) : 943-50.、J Nuc l Med. 2013 ; 54 (11) : 1869-75. 等）を利用することができる。また、陽電子放出核種で標識されたADCが対象に投与された後に、PET（ポジトロン断層撮影装置）により、その放射性核種から放射される放射線を体外から計測し、コンピュータトモグラフィーの手法で画像に変換される。このようにして、対象に投与したADCの腫瘍組織への浸透等を追跡することができる。

[0059] <抗がん用組成物>

後述の実施例に示すとおり、本発明のADCは、生体内において、顕著な腫瘍増殖抑制効果を示し、更には腫瘍退縮効果も奏し得る。したがって、本発明は、本発明のADCを含む、がんを治療するための組成物（抗がん用組成物）を提供する。

- [0060] 本発明の対象となる「がん」としては、例えば、固形腫瘍が挙げられ、より具体的には、膵臓がん、リンパ腫、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、膀胱がん、乳がん、食道がん、胃がん、大腸がん、子宮がん、卵巣がん、皮膚がん、甲状腺がん、胸腺がん、腎臓がん、精巣がん、陰茎がん、肝臓がん、胆道がん、脳腫瘍、骨軟部腫瘍、後腹膜腫瘍、血管・リンパ管肉腫が挙げられる。また、このようながんは原発性のものであってもよく、転移性のものであってもよい。
- [0061] 本発明の組成物は、ADCの他、薬理学上許容される他の成分を含むことができる。このような他の成分としては、例えば、担体、乳化剤、湿潤剤、pH緩衝化剤、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、等張化剤、懸濁剤、可溶化剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤が挙げられる。より具体的に、薬理学上許容される他の成分としては、注射剤等の液状製剤の場合には、水溶液（生理食塩水、注射用水、リン酸塩緩衝液、葡萄糖水溶液、グリセロール水溶液等）、水酸化アルミニウム等を例として挙げることができる。また、凍結乾燥した製剤の場合、糖（マンニトール、ラクトース、サッカロース等）、アルブミン等を例として挙げることができるが、これらに限定されるものではない。さらに、本発明の組成物は、上記成分が投与前に混合され得るような、キットの態様であってもよい。また、注射剤として用いる場合には、シリンジに導入された形態であり得る。
- [0062] 本発明の組成物は、有効成分として、本発明のADCのみを含むものであってもよいし、該ADC及び少なくとも一つの他の癌治療剤を含むものであってもよい。本発明のADCは、他の癌治療剤と共に投与することもでき、これによって抗癌効果を増強させることができる。このような目的で使用される他の抗癌剤は、本発明のADCと同時に、別々に、あるいは連続して対象に投与されてもよいし、それぞれの投与間隔を変えて投与してもよい。このような癌治療剤として、例えば、免疫チェックポイント阻害薬（抗PD-1抗体等）、ゲムシタビン、S-1、エルロチニブ、5-FU、ロイコボリン、イリノテカン（CPT-11）、オキサリプラチン、アブラキサン、カ

ルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、ソラフェニブ、ビンブラスチン、LH-RHアナログ（リュープロレリン、ゴセレリン等）、エストラムスチン・フォスフェイト、エストロジェン拮抗薬（タモキシフェン、ラロキシフェン等）、アロマターゼ阻害剤（アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン等）、国際公開第WO2003/038043号に記載の薬剤を挙げることができるが、抗腫瘍活性を有する薬剤であれば限定されることはない。

[0063] <がんの治療方法>

本発明はまた、本発明のADC又は該ADCを含む組成物の有効量を対象に投与する、がんを治療する方法を提供する。

[0064] 当該方法において投与されるADC及び組成物については、上述のとおりである。それらが投与される「対象」としては、その治療を必要としているものであれば特に制限はなく、上述のがんを罹患しているものであってもよく、その罹患のおそれがあるもの、またがんを再発するおそれがあるものであってもよい。また対象は、ヒトであってもよく、非ヒト哺乳動物であってもよい。非ヒト哺乳動物としては特に制限はなく、家畜、ペット、実験用動物が挙げられ、より具体的には、サル、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌが挙げられる。

[0065] 本発明において「治療」とは、完治、治癒、寛解、症状又は状態の改善、進行（悪化）速度の低下を意味する。また、「有効量」とは、その治療に有効な薬剤の量を意味する。

[0066] 本発明のADC又は組成物の投与方法は、投与対象の年齢、体重、性別、健康状態等により異なるが、非経口投与（例えば、静脈内投与、動脈内投与、皮内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、局所投与）、経口投与のいずれかの投与経路で投与することができる。好ましい投与方法は、非経口投与であり、より好ましくは静脈内投与である。投与は、例えば、注入又はボーラス注射によるものであり得る。

[0067] 本発明のADC又は組成物の投与量は、対象の年齢、体重、性別、健康状態、症状の進行の程度及び投与する組成物の成分により変動しうるが、一般的に静脈内投与の場合、含有する薬物量換算にて、成人には体重1kg当たり1日0.001～1000mg、好ましくは0.01～100mgである。投与回数としては、例えば、1回、又は1日～1年間に1回の間隔（例えば、1週毎、10～30日毎、1月毎、3～6月毎、半年毎、1年毎）で複数回投与してもよい。

実施例

[0068] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0069] [抗組織因子抗体の調製]

本実施例においては、特許文献2に記載のラット由来ハイブリドーマクローンNo. 1084から産生されるモノクローナル抗体（ラット1084抗体）をヒト化し、それを抗組織因子抗体として用いた。

[0070] 具体的には、先ず、ラット1084抗体の各CDR領域の配列を、Kabataの定義で決定した。決定したラット1084抗体の各配列は以下のとおりである。

重鎖可変領域 CDR1～3のアミノ酸配列…配列番号：9～11

重鎖可変領域のアミノ酸配列…配列番号：12

軽鎖可変領域 CDR1～3のアミノ酸配列…配列番号：13～15

軽鎖可変領域のアミノ酸配列…配列番号：16。

[0071] 次に、Human Monoclonal Antibody (Springer Protocols) のChapter 7 (123-138) の記載の方法に沿って、ラット1084抗体のフレームワーク領域等をヒト由来のそれらに置換した。ヒト化した1084抗体の各アミノ酸配列は以下のとおりである。

重鎖可変領域 CDR1～3のアミノ酸配列…配列番号：1～3

重鎖可変領域のアミノ酸配列…配列番号：4

軽鎖可変領域 CDR 1～3 のアミノ酸配列…配列番号：5～7

軽鎖可変領域のアミノ酸配列…配列番号：8。

[0072] なお、ヒト化1084抗体とラット1084抗体とは、一部のCDR領域の配列が異なっている。これは、当該部分は分子表面に露出していないため、抗原認識部位ではなく、ヒト化したフレームワーク領域と相互作用することで構造安定化に寄与するため、ラットの配列ではなくヒトの配列を採用したことによる。

[0073] また、前記可変領域以外の配列（定常領域）は、リツキシマブ（抗ヒトCD20ヒト・マウスキメラ抗体からなるモノクローナル抗体、CAS登録番号：174722-31-7、DrugBank：DB00073）のものを用いた。リツキシマブ由来の配列を備えた、ヒト化1084抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、配列番号：17及び18に各々示す。

[0074] そして、ヒト化1084抗体をコードするベクターを常法にて作製し、CHO細胞（製品名；ExpiCHO expression system（thermofisher社製））を用い、当該抗体を一過性で発現させ、精製した。

[0075] [抗体薬物複合体（ADC）の調製]

前記にて作製したヒト化1084抗体を用い、下記表1に示す4種類のADCを、以下に示す方法にて調製した。

[0076]

[表1]

抗体	リンカー	細胞傷害剤	1抗体あたりの 平均結合数 (BAR)
hu1084-Dxd3	MC-Gly-Gly-Phe-Gly	Dxd	3
hu1084-Dxd8	MC-Gly-Gly-Phe-Gly	Dxd	8
hu1084-PEG12-MMAE3	Mal-PEG12-Val-Cit-PABA	MMAE	3
hu1084-PEG12-MMAE8	Mal-PEG12-Val-Cit-PABA	MMAE	8
hu1084-MMAE3	Mal-Val-Cit-PABA	MMAE	3
hu1084-MMAE8	Mal-Val-Cit-PABA	MMAE	8

[0077] (hu1084-Dxd3の調製)

先ず、還元処理時に用いるバッファの作製を行った。バッファAとして、5 mM EDTA (pH 8.0) を含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) を調製した。またバッファBとして、100 mM リン酸二水素ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、5 mM EDTA (pH 8.0) を調製した。

[0078] 次に、抗体を含むDPBS溶液に、0.5 M EDTA (pH 8.0) を添加し、最終EDTA濃度が5 mMになるように調整した。そして、最終抗体濃度が1 mg/mLになる液量を全反応液量として、その内の1/6量のバッファBと、抗体溶液を混合して、最後にバッファAで最終抗体濃度を1 mg/mLになるよう調整した。

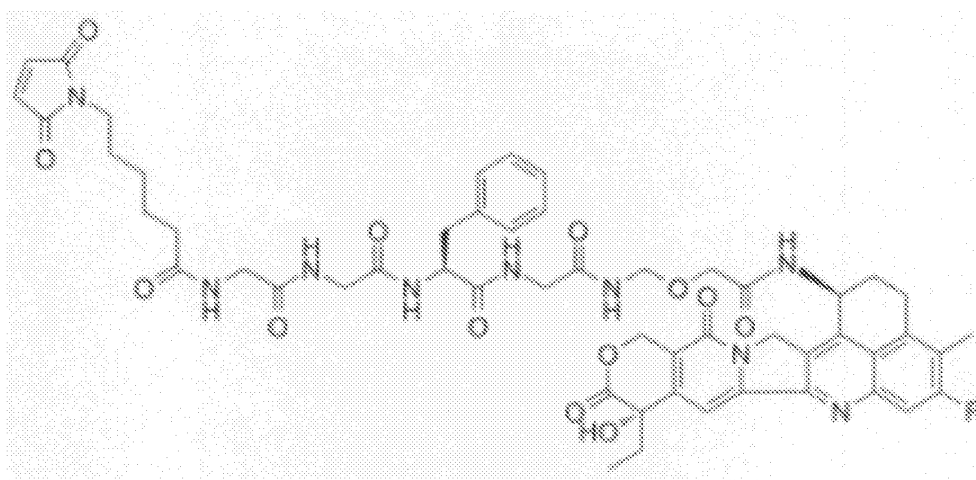
[0079] この還元反応用混合液を37℃で15分間、恒温槽を用いてプレインキュベーションした。その後、混合液全体の1/100量の還元剤(2-メルカプトエチルアミン-HCl溶液、Sigma-aldrich社製、終濃度20 mM)を添加して、37℃で30分間恒温槽を用いてインキュベーションした。

[0080] 反応終了後、速やかに氷上にサンプルを移し、VIVASPIN TURBO 15 (Sartorius社製、Göttingen, Germany)を用いて、バッファAにバッファ置換を行い、還元剤の除去を行った。バッファ置換は、元の反応液を100万倍以上希釈できるまで繰り返した。

[0081] 続いて、抗体溶液の最終濃度が0.5 mg/mLになる液量を全反応液量として、その内の1/6量のバッファBと、還元された抗体を含む抗体溶液、フリーになったチオール基から計算される必要量の3倍のモル量のリンカーDxd (MedChemExpress社、製品番号: HY-13631E、商品名: デルクステカン)を混合して、バッファAにより抗体の最終濃度が0.5 mg/mLになるように調整した。混合液を転倒混和により、穏やかに攪拌した後に、4℃で18時間静置した。

[0082] なお、リンカーDxdは、下記式で表される化合物である。

[0083] [化5]



[0084] 最後に、再度V I V A S P I N T U R B O 15を用いて、D P B Sにバッファー置換を行った。このバッファー置換の過程においても、元の反応液を100万倍以上希釈できるまで繰り返した。

[0085] このようにして調製したADCは、無菌条件下においてP V D Fメンブレン0.22 μmフィルターユニットを用い、フィルター処理した後に、滅菌済みのD P B Sにて、抗体濃度が2 mg/mLになるよう調整して分注し、使用時まで−80℃に凍結保存した。凍結はこの1回のみとし、凍結融解後は速やかに各実験に用いた。

[0086] (h u 1 0 8 4 − D x d 8の作製)

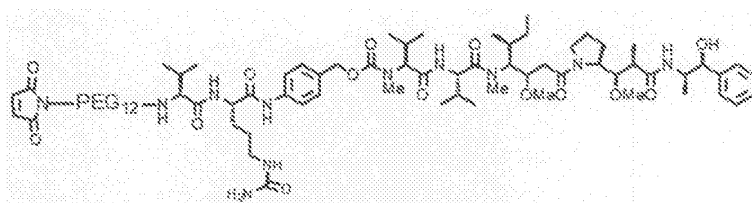
還元反応用混合液のプレインキュベーションの温度を26℃とし、該混合液に添加した還元剤をD L − D T T溶液(S i g m a − a l d r i c h社製、終濃度35 mM)とし、該添加後のインキュベーションの温度を26℃とした以外は、前記(h u 1 0 8 4 − D x d 3の調製)に記載の方法と同様にして、ADCを調製した。

[0087] [h u 1 0 8 4 − P E G 1 2 − M M A E 3の作製]

リンカーD x dの代わりに下記リンカーP E G 1 2 − M M A E (M a l − P E G 1 2 − v c − P A B C − M M A E。国立研究開発法人理化学研究所眞鍋史乃博士からの提供)を用いた以外は、前記(h u 1 0 8 4 − D x d 3

の調製)に記載の方法と同様にして、ADCを調製した。なお、リンカーPEG12-MMAEは、下記式で表される化合物である。

[0088] [化6]



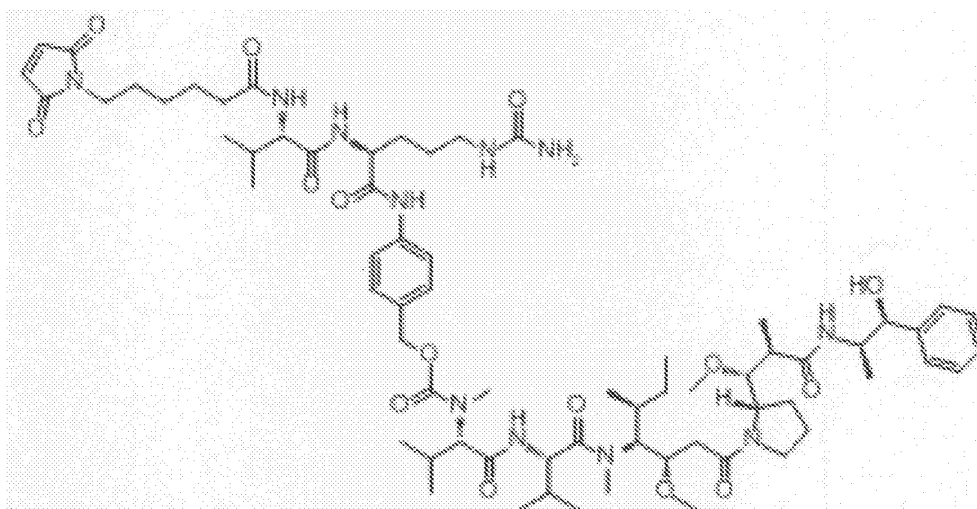
[0089] [h u 1 0 8 4 - P E G 1 2 - M M A E 8 の作製]

リンカーD x dの代わりに前記リンカーPEG12-MMAEを用いた以外は、前記(h u 1 0 8 4 - D x d 8 の作製)に記載の方法と同様にして、ADCを調製した。

[0090] [h u 1 0 8 4 - M M A E 3 の作製]

リンカーD x dの代わりに下記リンカーMMAE (M a l - v c - P A B C - M M A E。商品名: v c M M A E、メーカー: M e d C h e m E x p r e s s、型番: H Y - 1 5 5 7 5)を用いた以外は、前記(h u 1 0 8 4 - D x d 3 の調製)に記載の方法と同様にして、ADCを調製した。なお、リンカーMMAEは、下記式で表される化合物である。

[0091] [化7]



[0092] [h u 1 0 8 4 - M M A E 8 の作製]

リンカーD×dの代わりに前記リンカーMMAEを用いた以外は、前記（hu1084-D×d8の作製）に記載の方法と同様にして、ADCを調製した。

[0093] なお、これらADCにおけるリンカー及び薬物の1抗体あたりの平均結合数（DAR）は、チオール基を比色定量する試薬DTNB（5, 5'-dithiobis（2-nitrobenzoic acid））を用いて行なった。すなわち、当該試薬を、還元剤による抗体の還元後とリンカー化合物の付加後とに各々添加した。そして、吸光度（ $\lambda_{max}=412\text{ nm}$ ）を測定することにより、フリーのチオール基を定量した。そして、前記還元後と付加後とにおけるフリーのチオール基数に基づき、DARを算出した。

[0094] [殺細胞効果]

上記にて調製したADCについて、インビトロにてヒト膵臓腺がん細胞に対する殺細胞効果を、以下の方法にて評価した。

[0095] 培養液には、10% ウシ胎仔血清及びペニシリンーストレプトマイシン-アンピシリン B（×100）懸濁液を添加したRPMI-1640を用いた。ヒト膵臓腺がん BxPC-3、PSN-1及びHPAF-IIをそれぞれ5000細胞/mL、2000細胞/mL及び5000細胞/mLになるよう調整し、100 μL /wellで96ウェルプレートに播種し、CO₂インキュベーター内（37℃）で一晩静置した。

[0096] 各ADC、D×d単剤及びMMAE単剤を終濃度（MMAE及びD×d換算）が0.1、0.3、1、3、10、30、100 nM等となるように培養液で調整し、各ヒト膵臓腺がんを播種した96ウェルプレートに100 μL /wellで添加後、CO₂インキュベーター内（37℃）で6日間静置した。その後、薬剤を含んだ培養液をアスピレーターにより除去して、Cell Counting Kit-8（同仁化学社製）により生細胞数の測定を付属のプロトコールに従って行った。試薬の反応時間は3時間とし、吸光度の測定はSpectraMax Paradigm（Molecular Devices社製）によって行った。殺細胞効果の結果を図1A～1

Eに示す。

[0097] 図1Aに示した結果より、BxPC-3に対するMMAE、hu1084-PEG12-MMAE3、hu1084-PEG12-MMAE8、Dxd、hu1084-Dxd3、及びhu1084-Dxd8のIC50値はそれぞれ、 0.62 ± 0.04 nM、 0.05 ± 0.00 nM、 0.05 ± 0.00 nM、 2.58 ± 0.26 nM、 0.27 ± 0.02 nM、及び 0.20 ± 0.01 nMであった。

[0098] 図1Bに示した結果より、PSN-1に対するMMAE、hu1084-PEG12-MMAE3、hu1084-PEG12-MMAE8、Dxd、hu1084-Dxd3、及びhu1084-Dxd8のIC50値はそれぞれ、 0.73 ± 0.04 nM、 6.29 ± 1.04 nM、 0.35 ± 0.12 nM、 7.92 ± 0.84 nM、N.D.、及びN.D.であった。

[0099] また、図1C～1Fに示した結果より、ヒト膵臓腺がん細胞の細胞株3種類において、フリーのMMAEはフリーのDxdよりIC50値は30～50倍低かった。すなわち、これらヒト膵臓腺がん細胞株に対する殺細胞効果は、MMAEの方が著明に高かった。また、これら薬剤を含むそれぞれのADCにおいても、MMAEのほうが数倍殺細胞効果が高かった。

[0100] 以上のとおり、いずれのヒト膵臓腺がん細胞においても、MMAEリンカー（リンカーPEG12-MMAE又はリンカーMMAE）及び抗組織因子抗体からなる複合体の方が、リンカーDxd及び抗組織因子抗体からなる複合体よりも、高い殺細胞効果を示した、特に、PSN-1に対しては、hu1084-Dxd3及びhu1084-Dxd8では、IC50を得るに至らなかった（共にN.D.）。

[0101] [抗腫瘍効果]

（患者腫瘍組織移植（PDX）モデルの作製）

次に、各ADCについて、インビボにてヒト膵臓がん細胞に対する抗腫瘍効果を、以下の方法にて評価した。

[0102] 全ての実験において1週間馴化させた5週齢ヌードマウス（BALB/c

n u / n u、メス、日本チャールス・リバー)を用いた。3～5 mm角のヒト膵臓腫瘍組織片(型番: P A N - 0 2 - J C K、P A N - 0 4 - J C K、P A N - 0 8 - J C K、P A N - 1 4 - J C K(実験動物中央研究所))を、各々ヌードマウスの皮下に移植し、形成した腫瘍をP a s s a g e 1 (P 1)とした。なお、各ヒト膵臓腫瘍組織は、由来(各膵臓腫瘍を罹患するヒト)が異なる。P 1腫瘍を細断し、3～5 mm角にトリミングしてマウス皮下に移植してP 2腫瘍を得た。この操作を繰り返して、腫瘍の継代を行った。抗腫瘍効果の検討にはP 4～P 6を用いる事とした。

[0103] (免疫組織化学染色)

過麻酔によりマウスを安楽死させた後に、迅速に腫瘍組織を摘出し、O C Tコンパウンドに包埋し、- 8 0℃で凍結保存した。クリオスタットを用いて6 μ mの腫瘍組織を薄切し、スライドガラスに張り付け、3 0分間風乾した。4 %パラホルムアルデヒド(P F A) - D P B S溶液により1 5分間室温で固定処理を行い、D P B Sで洗浄後、3 %過酸化水素水-メタノール溶液に3 0分間室温で処理し、内在性ペルオキシダーゼの不活化を行った。その後、D P B Sで洗浄し、5 %スキムミルク- D P B S溶液により1 時間室温でブロッキングを行った。同様にD P B Sで洗浄し、ヤギ由来抗組織因子ポリクローナル抗体(R & D s y s t e m s 社)を5 %スキムミルク溶液で1 / 5 0 0希釈を行い、1 時間室温で反応させた。D P B Sで洗浄後、H R P標識抗ヤギポリクローナル抗体(M B L 社製)を5 %スキムミルク溶液で1 / 5 0 0希釈を行い、1 時間室温で反応させた。D P B Sで洗浄後、ジアミノベンジジン(D A B)を3 分間室温で反応させ、再度D P B Sで洗浄し、ヘマトキシリン溶液による核染色を1 0分間室温で行った。流水で1 0分間色出しを行い、エタノール及びキシレンによる脱水、透徹を行った。最後にマウントクイックを用いて、カバーガラスをかぶせて組織の封入を行った。観察はバーチャルスライドシステム(オリンパス社製)を用いて行った。染色の結果を図2 A～2 C、図3 D及び3 Eに示す。

[0104] 図2 A～2 Cに示すとおり、膵臓がんP D Xモデル3例(n o, 2、4及

び8)において、組織因子の発現が確認された。どちらのモデルも、一部組織因子陰性のがん細胞集団も見られ、組織因子発現に関しては不均一な腫瘍であった。また、図3Eに示すとおり、no, 14においても、前記3例同様に、組織因子発現に関しては不均一な腫瘍であった。特に、膵臓がんPDXモデル no, 8及びno, 14の方が、no, 2及び4と比較して、組織因子の発現レベルが低く、またその発現においてより不均一な腫瘍であり、組織因子を発現していないがんが全体の50%あるいはそれ以上存在していた。

[0105] (PDXモデルを用いた治療実験)

PDXモデルの平均腫瘍サイズが200~300mm³になった時点でランダムにマウスの群分けを行い、各投与群において尾静脈投与により治療実験を開始した。各ADCを10mg/kgで週1回、計3回投与し、腫瘍サイズと体重の測定を週1回行った。腫瘍サイズは、電動ノギスを用い皮下腫瘍の長径と短径を測定し、「腫瘍の長径×短径×短径×1/2」により算出した。腫瘍サイズが2000mm³を超えた時点、あるいは腫瘍部に潰瘍等が観察された時点を入道的エンドポイントとして、イソフルランの過麻酔によるマウスの安楽死を行った。N数は3~4とした。また、陰性対照群として、ADCの代わりにDPBSを投与したマウスも調製した。

[0106] 図3A~Cに示すとおり、いずれのPDXモデルにおいても、上述のインビトロでの結果に反して、リンカーDxd及び抗組織因子抗体からなる複合体を投与した場合、腫瘍退縮又は腫瘍増殖抑制効果が認められた。

[0107] 一方、MMAEリンカー（リンカーPEG12-MMAE又はリンカーMMAE）及び抗組織因子抗体からなる複合体を投与した場合には、図3Cにおいて示すとおり、ヒト膵臓腫瘍組織片 PAN-08-JCKを移植したPDXモデルno. 8にhu1084-PEG12-MMAE8を投与した際に、腫瘍増殖抑制効果が認められた。また、図3Fにおいて示すとおり、ヒト膵臓腫瘍組織片 PAN-14-JCKを移植したPDXモデルno. 14にhu1084-MMAE3を投与した際に、腫瘍増殖抑制効果が認め

られた。しかしながら、その効果の程度は、リンカーD×d及び抗組織因子抗体からなる複合体を投与した場合に比べ、劣るものであった。

[0108] このように、抗組織因子抗体及びリンカーD×dからなるADCは、インビボにおいてがんに対して高い腫瘍退縮又は腫瘍増殖抑制効果を奏せることが明らかになった。特に驚くべきことに、一部組織因子陰性のがん細胞集団も見られ、組織因子発現に関しては不均一な腫瘍であったとしても、前記ADCは、高い腫瘍増殖抑制効果等を示した。

[0109] かかる効果を奏せる理由は必ずしも定かではないが、本発明者らは以下のように推察する。すなわち、D×dは疎水性が高く、組織因子陽性のがん細胞にADCとして攻撃した後も、細胞外にフリーな状態で放出され、隣接する組織因子陰性がん細胞の細胞膜を通過する。そして、容易に細胞内へと侵入し、当該がん細胞も殺すことができる（バイスタンダー効果）と推察する。体内において形成される固形がんの殆どは、組織因子の発現においてヘテロながん組織であることから、抗組織因子抗体及びリンカーD×dからなるADCの有効性が強く示唆される。

[0110] なお、図には示さないが、リンカーMMAEを用いた場合には、図3A～3Cに示すリンカーPEG12-MMAE及びリンカーD×dとは異なり、DARが3の方が8の時よりも腫瘍増殖抑制効果が高かった。また、全ての治療実験において、ADC投与群の顕著な体重減少は観察されなかった。

[0111] [表面プラズモン共鳴解析]

ヒト化1084抗体の解離定数及び結合定数を、表面プラズモン共鳴（SPR、製品名：BiaCore T200（GE healthcare社製））にて解析した。

[0112] 具体的には先ず、1mg/mLのリコンビナントヒト組織因子抗原を、10mM 酢酸ナトリウム液（pH5.0）に添加して、最終濃度が20μg/mLなるように調整した。次いで、contact timeを120秒に設定し、CM5センサーチップ（GE healthcare社製）に前記抗原を、アミンカップリング法により固相化した。一方、ヒト化1084

抗体を、HBS-N溶液（GE healthcare社製）にて溶液置換し、抗体濃度が320nM、160nM、80nM、40nM及び20nMとなるように調整した。そして、これら希釈抗体を用いて、single-cycle kineticsにより、抗体のbinding kineticsを測定した。なお、抗体のcontact timeと解離測定時間はそれぞれ120秒と600秒に設定した。センサーグラムの解析は1：1 bindingにより行った。得られた結果を表2に示す。

[0113] [表2]

	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$
hu1084 mAb	6.573×10^4	1.788×10^{-3}	2.719×10^{-8}

産業上の利用可能性

[0114] 以上説明したように、本発明によれば、生体内において抗腫瘍効果を発揮する、抗組織因子抗体及び細胞傷害剤を含む抗体薬物複合体を提供することが可能となる。したがって、本発明は、抗がん剤の開発、及びがんの治療等において有用である。