

(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2016-513098

(P2016-513098A)

(43) 公表日 平成28年5月12日 (2016.5.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7008 (2006.01)	A 6 1 K 31/7008	4 C O 7 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 C	4 C O 8 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	4 C O 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-557088 (P2015-557088)  
 (86) (22) 出願日 平成26年2月7日 (2014.2.7)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年6月5日 (2015.6.5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/015253  
 (87) 国際公開番号 W02014/124227  
 (87) 国際公開日 平成26年8月14日 (2014.8.14)  
 (31) 優先権主張番号 61/761,845  
 (32) 優先日 平成25年2月7日 (2013.2.7)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/810,002  
 (32) 優先日 平成25年4月9日 (2013.4.9)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504149971  
 イミューノメディクス、インコーポレイテッド  
 IMMUNOMEDICS, INC.  
 アメリカ合衆国ニュージャージー州、モリス、ブレインズ、アメリカン、ロード、300  
 (74) 代理人 100107456  
 弁理士 池田 成人  
 (74) 代理人 100162352  
 弁理士 酒巻 順一郎  
 (74) 代理人 100123995  
 弁理士 野田 雅一  
 (74) 代理人 100148596  
 弁理士 山口 和弘

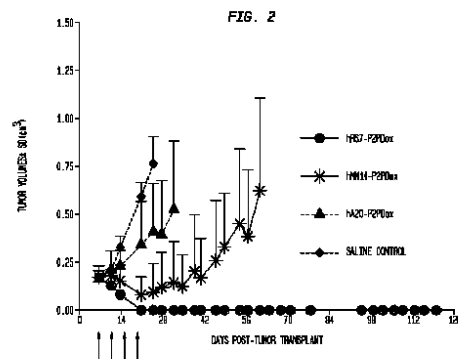
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の標的治療用抗体と抱合した極めて強力なプロドラッグ形態の2-ピロリノドキソルピシン (P2PDOX)

(57) 【要約】

抗体または抗体の抗原結合抗体フラグメント (ADC)、標的可能な構築ペプチド、または標的化した細胞、組織、もしくは病原体に P2PDOX を送達できる他の標的化分子と、2-ピロリノドキソルピシン (P2PDOX) のプロドラッグ結合の複合体の方法、組成物、および使用が開示される。標的細胞に送達されると、ADC またはペプチド複合体が内部移行され、非常に毒性の高い 2-ピロリノドキソルピシン (2-PDOX) が細胞内に放出される。P2PDOX-ペプチドまたは ADC 複合体は、癌、自己免疫疾患、または感染性疾患などの多様な疾患を処置するために使用される。

【選択図】 図 2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a) プロ - 2 - ピロリノドキシソルピシン ( P 2 P D o x ) と、  
 b) P 2 P D o x に付着した、抗体、抗原結合抗体フラグメント、標的化ペプチド、または非抗体細胞標的化構築物とを含む、複合体。

## 【請求項 2】

前記抗体、抗原結合抗体フラグメント、標的ペプチド、または非抗体細胞標的化構築物が、腫瘍関連抗原に結合する、請求項 1 に記載の複合体。

## 【請求項 3】

前記抗体、抗原結合抗体フラグメント、標的化ペプチド、または非抗体細胞標的化構築物が、炭酸脱水酵素 I X、C C C L 1 9、C C C L 2 1、C S A p、C D 1、C D 1 a、C D 2、C D 3、C D 4、C D 5、C D 8、C D 1 1 A、C D 1 4、C D 1 5、C D 1 6、C D 1 8、C D 1 9、I G F - 1 R、C D 2 0、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 3、C D 2 5、C D 2 9、C D 3 0、C D 3 2 b、C D 3 3、C D 3 7、C D 3 8、C D 4 0、C D 4 0 L、C D 4 5、C D 4 6、C D 4 7、C D 5 2、C D 5 4、C D 5 5、C D 5 9、C D 6 4、C D 6 6 a - e、C D 6 7、C D 7 0、C D 7 0 L、C D 7 4、C D 7 9 a、C D 8 0、C D 8 3、C D 9 5、C D 1 2 6、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D 1 4 7、C D 1 5 4、A F P、P S M A、C E A C A M 5、C E A C A M - 6、c - M E T、B 7、フィブロネクチンの E D - B、H 因子、F H L - 1、F l t - 3、葉酸受容体、G R O B、ヒストン H 2 B、ヒストン H 3、ヒストン H 4、H M G B - 1、低酸素誘導因子 ( H I F )、H M 1 . 2 4、インスリン様増殖因子 - 1 ( I L G F - 1 )、I F N - 、I F N - 、I L - 2、I L - 4 R、I L - 6 R、I L - 1 3 R、I L - 1 5 R、I L - 1 7 R、I L - 1 8 R、I L - 6、I L - 8、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 7、I L - 1 8、I L - 2 3、I L - 2 5、I P - 1 0、L I V - 1、M A G E、m C R P、M C P - 1、M I P - 1 A、M I P - 1 B、M I F、M U C 1、M U C 2、M U C 3、M U C 4、M U C 5、M U C 5 a、c、M U C 1 6、P A M 4 抗原、N C A - 9 5、N C A - 9 0、I a、H M 1 . 2 4、E G P - 1 ( T R O P - 2 )、E G P - 2、H L A - D R、テネイシン、L e ( y )、R A N T E S、T 1 0 1、T A C、T n 抗原、トムゼン - フリーデンライヒ抗原、腫瘍壊死抗原、T N F - 、T R A I L 受容体 ( R 1 および R 2 )、V E G F R、E G F R、P L G F、補体因子 C 3、C 3 a、C 3 b、C 5 a、C 5、ならびに他の癌遺伝子産物からなる群から選択される抗原と結合する、請求項 1 に記載の複合体。

## 【請求項 4】

前記非抗体標的化構築物が、アピマー、フィノマー、ファージディスプレイペプチド、アプタマー、アフィボディ、およびナノボディからなる群から選択される、請求項 1 に記載の複合体。

## 【請求項 5】

前記抗体が、h R 1 ( 抗 I G F - 1 R )、h P A M 4 ( 抗 M U C 5 a c )、h A 2 0 ( 抗 C D 2 0 )、G A 1 0 1 ( 抗 C D 2 0 )、h A 1 9 ( 抗 C D 1 9 )、h I M M U - 3 1 ( 抗 A F P )、h L L 1 ( 抗 C D 7 4 )、h L L 2 ( エブラツズマブ、抗 C D 2 2 )、h R F B 4 ( 抗 C D 2 2 )、h M u - 9 ( 抗 C S A p )、h L 2 4 3 ( 抗 H L A - D R )、h L 2 4 3 I g G 4 P ( 抗 H L A - D R )、h M N - 1 4 ( 抗 C E A C A M 5 )、h M N - 1 5 ( 抗 C E A C A M 6 )、h R S 7 ( 抗 E G P - 1 または抗 T R O P - 2 )、h M N - 3 ( 抗 C E A C A M 6 )、A b 1 2 4 ( 抗 C X C R 4 ) および A b 1 2 5 ( 抗 C X C R 4 ) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の複合体。

## 【請求項 6】

前記抗体フラグメントが、F ( a b ' ) <sub>2</sub>、F ( a b ) <sub>2</sub>、F a b、F a b'、および s c F v フラグメントからなる群から選択される、請求項 1 に記載の複合体。

## 【請求項 7】

10

20

30

40

50

前記抗体または抗体のフラグメントが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 からなる群から選択されるヒト定常領域を含む、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 8】

前記抗体が、非 G 1 m 1 ( n G 1 m 1 ) 抗体である、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 9】

前記抗体が、G 1 m 3 重鎖アロタイプを有する、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 10】

前記抗体が、n G 1 m 1 , 2 重鎖欠損のアロタイプを有する、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 11】

前記抗体が、K m 3 軽鎖アロタイプを有する、請求項 1 に記載の複合体。

10

【請求項 12】

前記抗体が、重鎖定常領域のアミノ酸残基 アルギニン - 2 1 4、グルタミン酸 - 3 5 6、メチオニン - 3 5 8、およびアラニン - 4 3 1 を含む、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 13】

前記抗体が、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体の抗原結合抗体フラグメント、二重特異性抗体、多選択性抗体、および抗体融合タンパク質から選択される、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 14】

前記ペプチドが、I M P 4 0 2、I M P 5 1 3、I M P 5 1 4、I M P 5 1 5、および I M P 5 1 6 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の複合体。

20

【請求項 15】

S M C C ヒドラジド、アミノキシ、フェニルヒドラジド、および 4 - ( ヒドラジノスルホニル ) 安息香酸からなる群から選択される架橋剤により、前記 P 2 P D o x が、前記抗体、抗体フラグメント、またはペプチドに付着する、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 16】

前記 P 2 P D o x が、マレイミド部を含み、システイン残基と前記マレイミドの反応により、前記抗体、抗体フラグメント、またはペプチドに付着する、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 17】

前記 P 2 P D o x が、前記抗体、または抗原結合抗体フラグメントと分子内架橋を形成する、請求項 1 に記載の複合体。

30

【請求項 18】

前記分子内架橋が、i n v i v o で前記複合体を安定化し、かつ循環中の遊離薬剤の放出を防止する、請求項 17 に記載の複合体。

【請求項 19】

請求項 1 に記載の複合体を含む医薬組成物。

【請求項 20】

癌を処置する方法であって、

( i ) プロ - 2 - ピロリノドキシソルピシン ( P 2 P D o x ) および ( i i ) 前記 P 2 P D o x に付着した抗体、抗原結合抗体フラグメント、標的化ペプチド、または非抗体細胞標的化構築物であって、前記抗体、抗原結合抗体フラグメント、標的化ペプチド、または非細胞標的化構築物が、腫瘍関連抗原 ( T A A ) と結合する、抗体、抗原結合抗体フラグメント、標的化ペプチド、または非抗体細胞標的化構築物を含む複合体を、癌に罹患した対象に投与することを含む、方法。

40

【請求項 21】

前記抗体、抗原結合抗体フラグメント、標的化ペプチド、または非抗体細胞標的化構築物が、炭酸脱水酵素 I X、C C C L 1 9、C C C L 2 1、C S A p、C D 1、C D 1 a、C D 2、C D 3、C D 4、C D 5、C D 8、C D 11 A、C D 1 4、C D 1 5、C D 1 6

50

、CD18、CD19、IGF-1R、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD47、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、AFP、PSMA、CEACAM5、CEACAM-6、c-MET、B7、フィブロネクチンのED-B、H因子、FHL-1、Flt-3、葉酸受容体、GROB、ヒストンH2B、ヒストンH3、ヒストンH4、HMGB-1、低酸素誘導因子(HIF)、HM1.24、インスリン様増殖因子-1(ILGF-1)、IFN-、IFN-、IFN-、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、IP-10、LIV-1、MAGE、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC5a,c、MUC16、PAM4抗原、NCA-95、NCA-90、Ia、HM1.24、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、HLA-DR、テネニン、Le(y)、RANTES、T101、TAC、Tn抗原、トムゼン-フリーデンライヒ抗原、腫瘍壊死抗原、TNF-、TRAIL受容体(R1およびR2)、VEGFR、EGFR、PLGF、補体因子、C3、C3a、C3b、C5a、C5、ならびに癌遺伝子産物からなる群から選択される抗原に結合する、請求項20に記載の方法。

10

20

【請求項22】

前記非抗体細胞標的化構築物が、アビマー、フィノマー、ファージディスプレイペプチド、アプタマー、アフイポディ、およびナノボディからなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

前記抗体が、hR1(抗IGF-1R)、hPAM4(抗MUC5ac)、hA20(抗CD20)、GA101(抗CD20)、hA19(抗CD19)、hIMMU-31(抗AFP)、hLL1(抗CD74)、hLL2(抗CD22)、hRFB4(抗CD22)、hMu-9(抗CSAp)、hL243(抗HLA-DR)、hL243 IgG4P(抗HLA-DR)、hMN-14(抗CEACAM5)、hMN-15(抗CEACAM6)、hRS7(抗EGP-1)、hMN-3(抗CEACAM6)、Ab124(抗CXCR4)およびAb125(抗CXCR4)からなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

30

【請求項24】

前記抗体フラグメントが、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab、Fab'およびscFvフラグメントからなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

【請求項25】

前記抗体または抗体フラグメントが、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群から選択されるヒト定常領域を含む、請求項20に記載の方法。

【請求項26】

前記抗体が、非G1m1(nG1m1)抗体である、請求項20に記載の方法。

40

【請求項27】

前記抗体が、G1m3重鎖アロタイプを有する、請求項20に記載の方法。

【請求項28】

前記抗体が、nG1m1,2重鎖欠損アロタイプを有する、請求項20に記載の方法。

【請求項29】

前記抗体が、Km3軽鎖アロタイプを有する、請求項20に記載の方法。

【請求項30】

前記抗体が、重鎖定常領域のアミノ酸残基 アルギニン-214、グルタミン酸-356、メチオニン-358、およびアラニン-431を含む、請求項20に記載の方法。

50

## 【請求項 3 1】

前記抗体が、モノクローナル抗体、モノクローナル抗体の抗原結合抗体フラグメント、二重特異性抗体、多選択性抗体、および抗体融合タンパク質からなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

## 【請求項 3 2】

前記ペプチドが、少なくとも 1 つのハプテン部を含む標的可能な構築物であり、前記方法が、前記ハプテンに対する少なくとも 1 つの結合部位および腫瘍関連抗原に対する少なくとも 1 つの結合部位を含む、二重特異性または多選択性抗体を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

## 【請求項 3 3】

前記ハプテンが I n - D T P A または H S G である、請求項 3 2 に記載の方法。

## 【請求項 3 4】

前記ペプチドを前記対象に投与する前に、前記二重特性または多選択性抗体を前記対象に投与する、請求項 3 2 に記載の方法。

## 【請求項 3 5】

前記ペプチドが、I M P 4 0 2、I M P 5 1 3、I M P 5 1 4、I M P 5 1 5、および I M P 5 1 6 からなる群から選択される、請求項 3 2 に記載の方法。

## 【請求項 3 6】

S M C C ヒドラジド、マレイミド含有ヒドロキシルアミン、マレイミド含有フェニルヒドラジン、および 4 - (ヒドラジノスルホニル)安息香酸からなる群から選択される架橋剤により、前記 P 2 P D o x が前記抗体、抗体フラグメント、またはペプチドに付着する、請求項 2 0 に記載の方法。

## 【請求項 3 7】

前記 P 2 P D o x がマレイミド部を含み、かつシステイン残基と前記マレイミドの反応により、前記抗体、抗体フラグメント、またはペプチドに付着する、請求項 2 0 に記載の方法。

## 【請求項 3 8】

前記個体に少なくとも 1 つの治療剤を投与することをさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

前記治療剤が、薬剤、プロドラッグ、毒素、酵素、チロシンキナーゼ阻害剤、スフィンゴシン阻害剤、免疫調製物質、サイトカイン、ホルモン、第 2 の抗体、第 2 の抗体フラグメント、免疫複合体、放射線核種、アンチセンスオリゴヌクレオチド、R N A i、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、および細胞傷害剤からなる群から選択される、請求項 3 8 に記載の方法。

## 【請求項 4 0】

前記薬剤が、5 - フルオロウラシル、アファチニブ、アプリジン ( a p l i d i n )、アザリピン、アナストロゾール、アントラサイクリン、アキシチニブ、A V L - 1 0 1、A V L - 2 9 1、ベンダムスチン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、ボスチニブ、プリオスタチン - 1、プスルファン、カリケアミシン ( c a l i c h e a m y c i n )、カンブトテシン、カルボプラチン、1 0 - ヒドロキシカンブトテシン、カルムスチン、セレブレックス、クロラムブシル、シスプラチン ( C D D P )、C o x - 2 阻害剤、イリノテカン ( C P T - 1 1 )、S N - 3 8、カルボプラチン、クラドリピン、カンプトセカン、クリゾチニブ、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダサチニブ、ジナシクリブ ( d i n a c i c l i b )、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、2 - ピロリノドキシソルピシン ( 2 P - D O X )、シアノ - モルフォリノキシソルピシン、ドキシソルピシングルクロニド、エピルピシングルクロニド、エルロチニブ、エストラムスチン、エピポドフィロトキシシン ( e p i d o p h y l l o t o x i n )、エルロチニブ、エンチノスタット、エストロゲン受容体結合剤、エトボシド ( V P 1 6、エトボシドグルクロニド、エトボシドホスフェート、エキセメスタン、フィンゴリモド、フロク

10

20

30

40

50

スウリジン (FUdR)、3', 5'-O-ジオレイル-FudR (FUdR-dO)、フルダリン、フルタミド、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、フラボピリドール、フォスタマチニブ (fostamatinib)、ガネテスピブ (ganetespib)、GDC-0834、GS-1101、ゲフィチニブ、ゲムシタピン、ヒドロキシ尿素、イブルチニブ、イダルビシン、イデラリシブ、イホスファミド、イマチニブ、L-アスパラギナーゼ、ラパチニブ、レノリダミド (lenolidamide)、ロイコボリン、LFM-A13、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、ミスラマイシン、マイトマイシン、ミトタン、ナベルピン、ネラチニブ、ニロチニブ、ニトロソウレア (nitrosourea)、オラパリブ (olaparib)、プリコマイシン (pl

10

【請求項 41】

前記毒素が、抗体または抗原結合抗体フラグメントに付着し、かつリシン、アブリン、毒素、サポリン、リボヌクラーゼ (RNase)、例えばオンコナーゼ、DNase I、ブドウ球菌性エンテロトキシン-A、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素、およびシュードモナス内毒素からなる群から選択される、請求項 39 に記載の方法。

20

【請求項 42】

前記放射線核種が、抗体または抗原結合抗体フラグメントに付着し、<sup>111</sup>In、<sup>111</sup>At、<sup>177</sup>Lu、<sup>211</sup>Bi、<sup>212</sup>Bi、<sup>213</sup>Bi、<sup>211</sup>At、<sup>62</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>90</sup>Y、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>133</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>47</sup>Sc、<sup>111</sup>Ag、<sup>67</sup>Ga、<sup>153</sup>Sm、<sup>161</sup>Tb、<sup>152</sup>Dy、<sup>166</sup>Dy、<sup>161</sup>Ho、<sup>166</sup>Ho、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>189</sup>Re、<sup>211</sup>Pb、<sup>212</sup>Pb、<sup>223</sup>Ra、<sup>225</sup>Ac、<sup>77</sup>As、<sup>89</sup>Sr、<sup>99</sup>Mo、<sup>105</sup>Rh、<sup>149</sup>Pm、<sup>169</sup>Er、<sup>194</sup>Ir、<sup>58</sup>Co、<sup>80m</sup>Br、<sup>99m</sup>Tc、<sup>103m</sup>Rh、<sup>109</sup>Pt、<sup>119</sup>Sb、<sup>189m</sup>Os、<sup>192</sup>Ir、<sup>219</sup>Rn、<sup>215</sup>Po、<sup>221</sup>Fr、<sup>255</sup>Fm、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>75</sup>Br、<sup>198</sup>Au、<sup>199</sup>Au、<sup>224</sup>Ac、<sup>77</sup>Br、<sup>113m</sup>In、<sup>95</sup>Ru、<sup>97</sup>Ru、<sup>103</sup>Ru、<sup>105</sup>Ru、<sup>107</sup>Hg、<sup>203</sup>Hg、<sup>121m</sup>Te、<sup>122m</sup>Te、<sup>125m</sup>Te、<sup>227</sup>Th、<sup>165</sup>Tm、<sup>167</sup>Tm、<sup>168</sup>Tm、<sup>197</sup>Pt、<sup>109</sup>Pd、<sup>142</sup>Pr、<sup>143</sup>Pr、<sup>161</sup>Tb、<sup>57</sup>Co、<sup>58</sup>Co、<sup>51</sup>Cr、<sup>59</sup>Fe、<sup>75</sup>Se、<sup>201</sup>Tl、<sup>76</sup>Br および <sup>169</sup>Yb からなる群から選択される、請求項 39 に記載の方法。

30

【請求項 43】

前記免疫調製物質が、サイトカイン、ケモカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血性因子、コロニー刺激因子 (CSF)、インターフェロン、エリスロポエチン、トロポポエチン、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン (IL)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) および「S1 因子」と呼ばれる幹細胞増殖因子からなる群から選択される、請求項 39 に記載の方法。

40

【請求項 44】

前記サイトカインが、ヒト増殖ホルモン、N-メチオニル ヒト増殖ホルモン、ウシ増殖ホルモン、副甲状腺ホルモン、チロキシン、インスリン、プロインスリン、レラキシン、プロレラキシン、卵胞刺激ホルモン (FSH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、黄体ホルモン (LH)、肝臓増殖因子、プロスタグランジン、線維芽細胞増殖因子、プロラク

50

チン、胎盤性ラクトゲン、OBタンパク質、腫瘍壊死因子 - 、腫瘍壊死因子 - 、ミューラー管抑制因子、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、インヒピン、アクチビン、血管内皮増殖因子、インテグリン、トロンボポエチン(TPO)、NGF - 、血小板増殖因子、TGF - 、TGF - 、インスリン様増殖因子 - I、インスリン様増殖因子 - II、エリスロポエチン(EPO)、骨誘導性因子、インターフェロン - 、インターフェロン - 、インターフェロン - 、マクロファージ - CSF(M-CSF)、IL - 1、IL - 1 - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12、IL - 13、IL - 14、IL - 15、IL - 16、IL - 17、IL - 18、IL - 21、IL - 25、LIF、FLT - 3、アンジオスタチン、トロンボスポンジン、エンドスタチン、腫瘍壊死因子およびリンホトキシンからなる群から選択される、請求項43に記載の方法。

10

【請求項45】

前記ケモカインが、RANTES、MCAF、MIP1 - 、MIP1 - およびIP - 10からなる群から選択される、請求項43に記載の方法。

【請求項46】

前記第2の抗体が、炭酸脱水酵素IX、CCCL19、CCCL21、CSAp、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、IGF - 1R、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD47、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a - e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CTLA - 4、AFP、PSMA、CEACAM5、CEACAM - 6、c - MET、B7、フィブロネクチンのED - B、H因子、FHL - 1、Flt - 3、葉酸受容体、GROB、ヒストンH2B、ヒストンH3、ヒストンH4、HMG B - 1、低酸素誘導因子(HIF)、HM1.24、インスリン様増殖因子 - 1(ILGF - 1)、IFN - 、IFN - 、IFN - 、IL - 2、IL - 4R、IL - 6R、IL - 13R、IL - 15R、IL - 17R、IL - 18R、IL - 6、IL - 8、IL - 12、IL - 15、IL - 17、IL - 18、IL - 23、IL - 25、IP - 10、LIV - 1、MAGE、mCRP、MCP - 1、MIP - 1A、MIP - 1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC5a、c、MUC16、PAM4抗原、PD - 1、PD - L1、NCA - 95、NCA - 90、Ia、HM1.24、EGP - 1(TROP - 2)、EGP - 2、HLA - DR、テネイシン、Le(y)、RANTES、T101、TAC、Tn抗原、トムゼン - フリーデンライヒ抗原、腫瘍壊死抗原、TNF - 、TRAIL受容体(R1およびR2)、VEGFR、EGFR、PLGF、補体因子、C3、C3a、C3b、C5a、C5、ならびに癌遺伝子産物からなる群から選択される抗原と結合する、請求項49に記載の方法。

20

30

【請求項47】

前記癌が固形腫瘍または造血性癌である、請求項20に記載の方法。

【請求項48】

前記癌が、B細胞リンパ腫、B細胞白血病、ホジキン病、T細胞白血病、T細胞リンパ腫、骨髄腫、結腸癌、胃癌、食道癌、甲状腺髄様癌、腎臓癌、乳癌、肺癌、膵臓癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、精巣癌、前立腺癌、肝臓癌、皮膚癌、骨癌、脳癌、直腸癌、および黒色腫からなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

40

【請求項49】

前記B細胞白血病またはB細胞リンパ腫が、B細胞リンパ腫の緩徐進行型形態、B細胞リンパ腫の侵襲性形態、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ球性白血病、ヘアリーセル白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、および多発性骨髄腫からなる群から選択される、請求項48に記載の方法。

50

## 【請求項 50】

前記 P2PDox が、前記抗体または抗原結合抗体フラグメントと分子内架橋を形成する、請求項 20 に記載の方法。

## 【請求項 51】

前記分子内架橋が、*in vivo* で前記複合体を安定化させ、循環中の遊離薬剤の放出を防止する、請求項 50 に記載の方法。

## 【請求項 52】

2 - ピロリノドキシソルピシンを標的細胞に送達する方法であって、請求項 1 に記載の複合体に前記標的細胞を曝露することを含み、前記複合体が、前記細胞により吸収され、2 - ピロリノドキシソルピシンが前記複合体から放出される、方法。

10

## 【請求項 53】

P2PDox 複合体を作製するためのプロセスであって、

a) プロ - 2 - ピロリノドキシソルピシン (P2PDox) を調製するステップと、

b) 前記 P2PDox を抗体、抗原結合抗体フラグメント、標的化ペプチド、または非抗体細胞標的化構築物に抱合するステップとを含む、工程。

## 【請求項 54】

前記非抗原細胞標的化構築物が、アビマー、フィノマー、ファージディスプレイペプチド、アプタマー、アフィボディ、およびナノボディからなる群から選択される、請求項 53 に記載のプロセス。

20

## 【請求項 55】

ドキシソルピシン上のアミン基の還元性アルキル化を含む前記 P2PDox の調製をフッ化溶媒中で実行することにより、有機溶媒中に親水性ドキシソルピシンを溶解し、軽度の還元剤ナトリウムトリアセトキシボロヒドリドを使用して還元性アルキル化を実施する、請求項 53 に記載のプロセス。

## 【請求項 56】

前記フッ化溶媒が、トリフルオロエタノールまたはヘキサフルオロイソプロパノールである、請求項 55 に記載のプロセス。

## 【請求項 57】

前記フッ化溶媒が、ヘキサフルオロイソプロパノールである、請求項 55 に記載のプロセス。

30

## 【請求項 58】

前記 P2PDox の調製が、過度のアルデヒド試薬、わずかにモル過剰の還元剤を使用すること、および前記フッ化溶媒中での共溶媒としてのジイソプロピルエチルアミンを使用することにより、短時間で高い収率の前記産物をもたらすことを含む、請求項 53 に記載のプロセス。

## 【請求項 59】

P2PDox が、抗体の抱合のためにマレイミド含有ヒドラゾンに対して二官能性の試薬である、SMCCヒドラジドにより活性化される、請求項 53 に記載のプロセス。

## 【請求項 60】

前記活性化した P2PDox を、抱合に精製することなく使用する、請求項 59 に記載のプロセス。

40

## 【請求項 61】

鎖間ジスルフィド還元型抗体のチオール基で酸性の切断可能なリンカーを使用して P2PDox を抗体に抱合することにより、生理学的条件下で安定な組成物を提供する、請求項 53 に記載のプロセス。

## 【請求項 62】

前記複合体が、pH 6.0 ~ 7.0 のグッドバッファー中で製剤化され、保存用に凍結乾燥される、請求項 61 に記載のプロセス。

## 【請求項 63】

50



前記グッドバッファーが、pH 6 ~ 7の範囲、好ましくはpH 6.5 ~ 7の範囲、および10 ~ 100 mM、好ましくは25 mMの緩衝液濃度の、2 - (N - モルフォリノ)エタンスルホン酸 (MES)、3 - (N - モルフォリノ)プロパンスルホン酸 (MOPS)、4 - (2 - ヒドロキシエチル)ピペラジン - 1 - エタンスルホン酸 (HEPES)、および1, 4 - ピペラジンジエタンスルホン酸 (PIPES) からなる群から選択される、請求項62に記載のプロセス。

【請求項64】

前記緩衝液が、pH 6.8のMOPS緩衝液である、請求項63に記載のプロセス。

【請求項65】

自己免疫疾患、免疫系調節不全、および感染性疾患からなる群から選択される疾患を処置する方法であって、(i)プロ-2-ピロリノドキソルピシン (P2PDox) と、(ii)前記P2PDoxに付着した抗体、抗原結合抗体フラグメント、標的化ペプチド、非抗体細胞標的化構築物とを含む複合体を、前記疾患に罹患した対象に投与することを含む、方法。

10

【請求項66】

前記自己免疫疾患が、急性特発性血小板減少性紫斑病、慢性突発性血小板減少性紫斑病、皮膚筋炎、シデナム舞蹈病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、真性糖尿病、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、連鎖球菌性感染後腎炎、結節性紅斑、高安動脈炎、アジソン病、関節リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、閉塞性血栓性血管炎 (thromboangiitis obliterans)、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本病、甲状腺中毒症、強皮症、慢性活動性肝炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発性軟骨炎、水疱性類天疱瘡、尋常性天疱瘡、ウェゲナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄癆、巨細胞性動脈炎/多発性筋痛、悪性貧血、急速進行性糸球体腎炎、乾癬および線維性肺胞炎からなる群から選択される、請求項65に記載の方法。

20

【請求項67】

前記感染性疾患が、HIVウイルス、マイコバクテリウム・ツベルクローシス、ストレプトコッカス・アガラクチア、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、レジオネラ (Legionella pneumophila)、化膿性連鎖球菌、大腸菌 (エシェリキア・コリ)、ナイセリア・ゴノレー、ナイセリア・メニンギティディス、肺炎球菌、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、ヒストプラズマ・カプスラーツム、インフルエンザ菌B (Hemophilis influenzae B)、梅毒トレポネーマ、ライム病スピロヘータ、シュードモナス・エルジノーサ、らい菌、ブルセラ・アボルタス、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスI、単純ヘルペスウイルスII、ヒト血清パルボ様ウイルス、呼吸器多核体ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、マウス白血病ウイルス、ムンプスウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、いぼウイルス、ブルータングウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、サルウイルス40、マウス乳腺腫瘍ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、ウエストナイルウイルス、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、ランゲルトリパノソーマ、クルーズトリパノソーマ、ローデシアトリパノソーマ (Trypanosoma rhodesiense)、ブルセイトリパノソーマ、マンソン住血吸虫、日本住血吸虫、ウシバベシア、鶏盲腸コクシジウム、回旋糸状虫、熱帯リーシュマニア、旋毛虫、タイレリア・パルバ、胞状条虫、ヒツジ条虫、無鉤条虫、単包条虫、Mesocostoides corti、マイコプラズマ・アルスリチジス、マイコプラズマ・ハイオリニス、M. orale、M. arginini、アコレプラズマ・レイドロウイ、M. salivariumおよびマイコプラズマ・ニューモニエからなる群から選択される病原体での感染症を含む、請求項65に記載の方法

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願

本願は、米国特許法119条(e)の下、2013年2月7日出願の米国仮特許出願番号第61/761,845号および2013年4月9日出願の同第61/810,002号の優先権を主張する。

## 【0002】

## 配列表

本願は、EFS-ウェブを介してASCII形式で提出された配列表を含み、同配列表は参照により本明細書に援用される。ASCIIのコピーは作成日が2014年2月3日、名称はIMM341WO1\_SL.txt、サイズは60,440バイトである。

## 【0003】

本発明は、2-ピロリノドキシソルピシンのプロドラッグ形態（本明細書ではP2PDoXと称する）の組成物、生成方法、および使用に関する。好ましい実施形態では、P2PDoXは、標的分子、好ましくは抗体または抗原結合抗体フラグメント、非抗体細胞標的化構築物、または標的化した細胞、組織、臓器、または病原体中に局在する二重特異性に*in vivo*で結合する標的可能な構築物と抱合する。*In vivo*では、標的化したP2PDoXは、毒性が極めて高い薬剤2-ピロリノドキシソルピシン（2PDoX）に変換され、これにより、標的化した細胞、組織、臓器、または病原体に強力な細胞毒性効果を有することとなる。抗体-薬剤複合体（ADC）製剤は、自己免疫疾患、免疫調節不全疾患、感染性疾患、癌（例えば、細胞腫、肉腫、黒色腫、神経膠腫、神経芽細胞腫、リンパ腫、白血病、急性および慢性リンパ球性および骨髄球性の白血病、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、T細胞リンパ腫もしくは白血病、多発性骨髄種、またはホジキンリンパ腫もしくは非ホジキンリンパ腫）などの様々な疾患の処置に使用される。

## 【背景技術】

## 【0004】

癌、感染症疾患、自己免疫疾患、免疫調節不全疾患、神経性疾患、循環器系疾患、および代謝系疾患などの多様な疾患状態の診断および/または治療に対し、モノクローナル抗体またはモノクローナル抗体のフラグメントの投与が提案されてきた（例えば、Nadler et al., 1980, Cancer Res 40:3147-54; Ritz and Schlossman, 1982, Blood 59:1-11; Waldmann, 2003, Nature Med 9:269-77; Ibbotson et al., 2003, Am J Cardiovasc Drugs 3:381-86; Dorner et al., 2009, Nat Rev Rheumatol 5:433-41; Pul et al., 2011, Expert Opin Biol Ther 11:343-57参照）。ヒトの免疫グロブリン混合物も使用されており、特に、肝炎の処置用の皮下注射、および多様な自己免疫疾患用の静脈内点滴注入に使用される（例えばPowell et al., 2006, Clin Transplant 20:524-25; Stiehm, 1997, Pediatr Infect Dis J 16:696-707; Zandman et al., Clin Rev Allergy Immunol [Epub ahead of print, July 6, 2011]; Kaveri et al., 2011, Clin Exp Immunol 164:2-5参照）。

## 【0005】

ネイキッド（非抱合型）抗体は、癌および他の疾患状態の治療の使用の実績があり、近年の手法では疾患の標的化治療に抗体薬物複合体（ADC）を使用している。このような

10

20

30

40

50

複合体は、抗体または抗体フラグメントの標的化の機能（および結果として起こる全身の毒性の減少）を有する抱合型薬剤の強力な細胞毒性効果を組み合わせる。カンプトテシン（例えばSN-38）（Govindan et al., 2013, Mol Cancer Ther 12:968-78; Sharkey et al., 2011, Mol Cancer Ther 10:1072-81; Moon et al., 2008, J Med Chem 51:6916-26）、モノメチルオーリスタチン（Francisco et al., 2003, Blood 102:1458-65; Law et al., 2004, Clin Cancer Res 10:7842-51）、カリチアマイシン（Hinman et al., 1993, Cancer Res 53:3336-42; Gillespie et al., 2000, Ann Oncol 11:735-41; Bross et al., 2001, Clin Cancer Res 7:1490-96）、およびマイタンシノイド（Erickson et al., 2006, Cancer Res 66:4426-33; Lewis Phillips et al., 2008, Cancer Res 68:9280-90; Haddley et al., 2013, Drugs Today 49:701-15）を含むADC用の様々な薬剤の複合体が開発されてきた。しかしながら、現時点ではこのような化合物の可能性は未だ満たされておらず、近年では、ヒト用としてFDAに認可された最初のADC（ゲムツズマブ、オゾガマイシン）は、患者の死亡の増加により市場から撤回され、従来の癌治療に利益を与えなかった（Hutter & Schlenk, 2011, Expert Opin Biol Ther 11:1369-80）。全身性毒性が低く、治療指数が改善したより有効なADCが必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

本発明は、プロ-2-ピロリノドキソルピシン（P2PDox）の複合体の組成物および生成方法ならびに使用に関する。好ましくは、P2PDoxは、抗体、抗原結合抗体フラグメント、または選択された標的細胞、組織、臓器、もしくは病原体にP2PDを送達できる標的可能な構築物もしくは他の標的化分子に抱合される。好ましくは、抗体または抗体のフラグメントは、少なくとも1のP2PDox、好ましくは1～約12のP2PDox、より好ましくは4以上のP2PDox、最も好ましくは約6～12のP2PDox部分に抗体または抗体フラグメントが結合する。P2PDoxを作製し、抗体、抗体フラグメント、ペプチドまたは他の分子にP2PDoxを抱合し、ADC免疫複合体を使用する方法を以下に詳細に記載する。好ましくは、本複合体は、pH6.0～7.0のグッドバッファー中で製剤化され、保存のため凍結乾燥される。好ましくは、グッドバッファーは、2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸（MES）、3-(N-モルフォリノ)プロパンスルホン酸（MOPS）、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エタンスルホン酸（HEPES）、および1,4-ピペラジンジエタンスルホン酸（PIPES）から選択され、このpHは、6～7、好ましくは6.5～7の範囲であり、10～100mM、好ましくは25mMの濃度である。

#### 【0007】

一実施形態では、P2PDoxは、酸分割可能な架橋剤を使用して、抗体または他の標的化分子と抱合する。好ましくは、P2PDoxは、鎖間ジスルフィド還元型抗体のチオール基に付着した酸分割可能な架橋剤を使用して抗体と抱合し、生理的条件下で非常に安定した組成物を提供する。

#### 【0008】

別の好ましい実施形態では、ドキソルピシン上のアミン基の還元性アルキル化を含む、P2PDoxの調製を、トリフルオロエタノールまたはヘキサフルオロイソプロパノールなどのフッ化溶媒中で実行し、それにより有機溶媒に親水性ドキソルピシンを溶解し、かつトリアセトキシボロヒドリドなどの穏やかな還元剤を使用して還元性アルキル化を実施

する。この手法は、分子中のシアン化物を組み込む可能性のある欠点を有するシアノ水素化ホウ素ナトリウムの使用を回避するものである。

【0009】

代替的な実施形態では、P2PDoxを作製するためのプロセスは、過剰なアルデヒド試薬、わずかにモル過剰である還元剤、およびフッ化溶媒の共溶媒としてのジイソプロピルエチルアミンを使用することを含む。この工程は、短時間で高い収率で生成物を収集する。

【0010】

さらなる実施形態では、P2PDoxは、わずかにモル過剰である市販のSMCC-ヒドラジド試薬（SMCCはサクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレートであり、SMCC-ヒドラジド試薬は、SMCCおよびヒドラジンの生成物である）と反応させることにより、抗体の抱合を受け入れ可能な、「活性形態」のMCC-P2PDoxヒドラゾン（MCCはマレイミドメチルシクロヘキサンカルボニル部である）に変換され、これにより反応生成物は、クロマトグラフィー精製を行うことを必要とせずに使用される。

【0011】

ナノボディなどの抗体または非抗体標的化構築物は、使用する際当業者に公知のいずれかの疾患関連抗原と結合し得る。疾患状態が癌である場合、例えば、腫瘍細胞により発現、または腫瘍細胞に関連して発現する多くの抗原が知られており、限定するものではないが、炭酸脱水酵素IX、 $\alpha$ -フェトプロテイン、 $\alpha$ -アクチン4、A3、A333抗体に特異的な抗原、ART-4、B7、Ba733、BAGE、Bre3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD47、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1、結腸特異的抗原、p(CSAp)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、葉酸受容体、G250抗原、GAGE、gp100、GROB、HLA-DR、HM1.24、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)およびそのサブユニット、HER2/neu、ヒストンH2B、ヒストンH3、ヒストンH4、HMGB-1、低酸素誘導因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、インスリン様増殖因子-1(IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、LIV1A(SLC39A6)、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、膵臓癌のムチン、胎盤増殖因子、p53、PLAGL2、前立腺酸性ホスファターゼ、PSA、PRAME、PSMA、PLGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、サバイピン、サバイピン-2B、TAC、TAG-72、テネシン、TRAIL受容体、TNF- $\alpha$ 、Tn抗原、Tomson-Friedenreich抗原、腫瘍壊死抗原、TROP-2、VEGFR、ED-Bフィブロネクチン、WT-1、17-1A-抗原、補体因子C3

10

20

30

40

50

、C3a、C3b、C5a、C5、血管新生マーカー、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、癌遺伝子マーカー、ならびに癌遺伝子産物が挙げられる（例えば、Sensiet al., Clin Cancer Res 2006, 12:5023-32; Parmiani et al., J Immunol 2007, 178:1975-79; Novellino et al. Cancer Immunol Immunother 2005, 54:187-207参照）。好ましくは、抗体は、CD74、CD20、CD22、HLA-DR、TROP-2、CEACAM5、CEACAM6、AFPまたはMUC5acと結合する。

#### 【0012】

利用し得る例示的な抗体は、限定するものではないが、hR1（抗-IGF-1R、米国特許仮出願番号第12/722,645号、3/12/10出願）、hPAM4（抗-MUC5ac、米国特許第7,282,567号）、hA20（抗-CD20、米国特許第7,251,164号）、hA19（抗-CD19、米国特許第7,109,304号）、hIMMU-31（抗-AFP、米国特許第7,300,655号）、hLL1（抗-CD74、米国特許第7,312,318号）、hLL2（抗-CD22、米国特許第7,074,403号）、hMu-9（抗-CSAp、米国特許第7,387,773号）、hL243（抗-HLA-DR、米国特許第7,612,180号）、hMN-14（抗-CEACAM5、米国特許第6,676,924号）、hMN-15（抗-CEACAM6、米国特許第7,541,440号）、hRS7（抗-EGP-1、米国特許第7,238,785号）、hMN-3（抗-CEACAM6、米国特許第7,541,440号）、Ab124およびAb125（抗-CXCR4、米国特許第7,138,496号）が挙げられ、それぞれ引用した特許または出願公開公報の実施例部分は本明細書中参照により援用される。より好ましくは、抗体は、hA20（ベルツズマブ）、hLL2（エブラツズマブ）、hLL1（ミラツズマブ）、hL243（IMMU-114）、IMMU-H2B、IMMU-H3またはIMMU-H4である。

#### 【0013】

使用される代替的な抗体は、限定するものではないが、アブシキシマブ（抗-糖タンパク質IIb/IIIa）、アレムツズマブ（抗-CD52）、ベバシズマブ（抗-VEGF）、セツキシマブ（抗-EGFR）、ゲムツズマブ（抗-CD33）、イブリツモマブチウキセタン（抗-CD20）、パニツムマブ（抗-EGFR）、リツキシマブ（抗-CD20）、トシツモマブ（抗-CD20）、トラスツズマブ（抗-ErbB2）、アバゴボマブ（abagovomab）（抗-CA-125）、アデカツムマブ（adecatumumab）（抗-EpCAM）、アトリズマブ（atlizumab）（抗-IL-6受容体）、ベンラリズマブ（benralizumab）（抗-CD125）、CC49（抗-TAG-72）、AB-PG1-XG1-026（抗-PSMA、米国特許出願第11/983,372号、ATCC PTA-4405およびPTA-4406として帰着）、D2/B（抗-PSMA、国際特許出願公開番号第2009/130575号）、トシリズマブ（抗-IL-6受容体）、バシリキシマブ（抗-CD25）、ダクリズマブ（抗-CD25）、エファリズマブ（抗-CD11a）、GA101（抗-CD20; Glycart Roche）、ム口モナブ-CD3（抗-CD3受容体）、ナタリズマブ（抗-4インテグリン）、オマリズマブ（抗-IgE）；CDP571などの抗-TNF-抗体（Ofei et al., 2011, Diabetes 45:881-85）、MTNFAI、M2TNFAI、M3TNFAI、M3TNFABI、M302B、M303（Thermo Scientific、イリノイ州ロックフォード）、インフリキシマブ（Centocor、ペンシルバニア州マルバーン）、セルトリズマブペゴル（UCB、ベルギーブリュッセル）、抗-CD40L（UCB、ベルギーブリュッセル）、アダリムマブ（Abbott、イリノイ州アボットパーク）、ベリンスタ（Belysta）（Human Genome Sciences）；Alz50などのアルツハイマー病の治療用の抗体（Ksiezak-Reding et al., 1987, J Biol Chem 263:7943-47）、ガンテネルマブ（gantel

10

20

30

40

50

nerumab)、ソラネズマブ(solanezumab)およびインフリキシマブ; 抗-フィブリン抗体様59D8、T2G1s、MH1; P4/D10などの抗-HIV抗体(米国特許仮出願番号第11/745,692号)、Ab75、Ab76、Ab77(Paulik et al., 1999, Biochem Pharmacol 58: 1781-90); ならびにCR6261(抗-インフルエンザ)、エクシビビルマブ(Exbivirumab)(抗B型肝炎)、フェルビズマブ(felvizumab)(抗-呼吸器多核体ウイルス)、フォラビルマブ(foravirumab)(抗-狂犬病ウイルス)、モタビズマブ(motavizumab)(抗-呼吸器多核体ウイルス)、パリビズマブ(palivizumab)(抗-呼吸器多核体ウイルス)、パノバクマブ(panobacumab)(抗-シュドモナス)、ラフィビルマブ(rafvirumab)(抗-狂犬病ウイルス)、レガビルマブ(regavirumab)(抗-サイトメガロウイルス)、セビルマブ(sevirumab)(抗-サイトメガロウイルス)、tivirumab(抗B型肝炎)、およびウルトキサズマブ(urtoxazumab)(抗-E.coli)などの病原体に対する抗体が挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【0014】

使用される抗体または抗原結合抗体フラグメントは、キメラであっても、ヒト化されても、またはヒト由来であってもよい。キメラ抗体はヒト抗体定常領域を有し、したがってマウス抗体と同様に強力なヒト抗マウス抗体(HAMA)応答を誘発しないため、キメラ抗体の使用はマウス親抗体に対して好ましい。ヒト化抗体の使用はHAMA応答を誘導する可能性をさらに低減するために、さらにより好ましい。マウスのフレームワークおよび定常領域配列を対応するヒトの抗体フレームワークおよび定常領域配列に置き換えることによるマウス抗体をヒト化する技術は当業者に公知であり、多くのマウス抗癌抗体に使用されている。また、抗体のヒト化は、1つ以上のヒトのフレームワークのアミノ酸残基を、マウス親フレームワーク領域の配列から対応する残基と置換することを含んでもよい。以下で論述するように、ヒト抗体の作製技術も公知である。

#### 【0015】

治療剤は、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、scFv、Fvなどの抗体フラグメントまたはF(ab')<sub>2</sub>、Fab、scFvの軽鎖および重鎖の一部または全てを利用する融合タンパク質を含んでもよい。また本抗体は、多価であってもよく、または多価かつ多選択性であってもよい。本抗体は、ヒトのIgG1、IgG2a、IgG3、またはIgG4のヒト定常領域を含んでもよい。

#### 【0016】

より好ましい実施形態では、抗体のアロタイプは、以下により詳細に論述されるように、投与した抗体に対する宿主の免疫原性応答を最小限にするために選択されてもよい。好ましいアロタイプは、G1m3、G1m3,1、G1m3,2、またはG1m3,1,2などの非-G1m1アロタイプ(nG1m1)である。非G1m1アロタイプは抗体の免疫反応性の低下にとって好ましい。驚くべきことに、濃縮したnG1m1抗体を繰り返し皮下投与することにより、皮下投与の免疫原性が増大したにも関わらず、顕著な免疫応答の誘導が見いだされなかった。

#### 【0017】

様々な実施形態は、限定するものではないが、非ホジキンリンパ腫、B細胞の急性および慢性のリンパ性白血病、パーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、ヘアリーセル白血病、急性および慢性の骨髄性白血病、T細胞型のリンパ腫および白血病、多発性骨髄腫、神経膠腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、細胞腫、黒色腫、肉腫、神経膠腫、ならびに皮膚癌を含む疾患を処置するための対象となる方法および組成物の使用に關し得る。細胞腫は、口腔、甲状腺、消化管、肺管、肺、乳房、卵巣、前立腺、子宮、子宮内膜、子宮頸部、膀胱、膵臓、骨、脳、結合組織、肝臓、胆嚢、腎臓、皮膚、中枢神経系、内分泌性臓器および精巣の細胞腫を含んでもよい。

#### 【0018】

さらに、対象となる方法および組成物を使用して、自己免疫疾患、例えば、急性免疫血

小板減少症、慢性免疫血小板減少症、皮膚筋炎、シデナム舞蹈病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、尋常性天疱瘡、真性糖尿病（例えば、若年性糖尿病）、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、連鎖球菌性感染後腎炎、結節性紅斑、高安動脈炎、アジソン病、関節リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、閉塞性血栓性血管炎（*thromboangitis obliterans*）、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本病、甲状腺中毒症、強皮症、慢性活動性肝炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発性軟骨炎、尋常性天疱瘡、ウェゲナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄癆、巨細胞性動脈炎/多発性筋痛、悪性貧血、急速進行性糸球体腎炎、乾癬、または線維性肺胞炎を処置してもよい。他の実施形態では、対象となる方法および組成物を使用して、異種移植片対宿主病または臓器移植の拒絶などの免疫調節不全疾患を処置してもよい。

10

## 【0019】

特定の実施形態では、疾患治療は、本発明の一部として、1つ以上の他の治療剤との併用治療により高められてもよい。本発明に使用される既知の治療剤として、免疫調節物質（サイトカイン、リンホカイン、ケモカインおよび増殖因子、およびそれらの阻害剤など）、スフィンゴシン阻害剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、オリゴヌクレオチド（*siRNA*または*RNAi*など）、光活動性治療剤、抗血管新生剤、ならびにアポトーシス促進剤が挙げられる。細胞傷害性薬剤または放射性核種などの、従来より使用されるさらなる他の治療剤を、P2PDox-抗体複合体投与の前、投与と同時に、または投与の後に投与してもよい。

20

## 【0020】

免疫複合体の好ましい最適用量は、70kgの成人で0.3mg/kg~5mg/kgの用量を含んでもよく好ましくは、1週間に1度、隔週以下の頻度、例えば3週間ごとに行ってもよい。最適な服用スケジュールは、2週連続した治療の後1週間、2週間、3週間、もしくは4週間の休薬、または隔週ごとの治療および休薬、または1週間の治療の後2週間、3週間、もしくは4週間の休薬、または3週間の治療の後の1週間、2週間、3週間、もしくは4週間の休薬、または4週間の治療の後の1週間、2週間、3週間、もしくは4週間の休薬、または5週間の治療の後の1週間、2週間、3週間、4週間、もしくは5週間の休薬、または2週間ごとの投与、3週間ごともしくは1ヶ月毎の投与の周期を含んでもよい。処置は、任意の数の周期を延長してもよく、好ましくは、少なくとも2周期、少なくとも4周期、少なくとも6周期、少なくとも8周期、少なくとも10周期、少なくとも12周期、少なくとも14周期、または少なくとも16周期延長してもよい。用量は、最大5mg/kgであってもよい。使用される例示的な用量は、0.3mg/kg、0.5mg/kg、0.7mg/kg、1.0mg/kg、1.2mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、3.0mg/kg、3.5mg/kg、4.0mg/kg、4.5mg/kg、および5.0mg/kgを含んでもよい。好ましい用量は、毎週の投与での0.6mg/kgであり、かつより短い頻度での服用での1.2mg/kgである。当業者は、年齢、一般的な健康状態、特異的な臓器の機能または重量、および特異的な臓器系（例えば骨髄）に関する従来の治療の効果などの様々な要因が、免疫複合体の最適な用量を選択する際に考慮され得るものであり、投与の用量および/または頻度が、治療工程の最中に増大または減少してもよいことを認識するものである。用量は、必要な場合には反復されてもよく、この際、わずか3~8回の用量の後、腫瘍が縮小した証拠が観察された。70kgまたは1.7月齢未満の小児患者の用量は、通常の小児科の慣習にしたがって調節される。

30

40

## 【0021】

本発明の好ましい実施形態を示すために以下の図面を提供する。しかしながら、特許を請求する対象は、本図面に開示される例示的な実施形態によって限定されない。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0022】

50

- 【図1A】ドキシソルピシンの構造。「Me」はメチル基である。
- 【図1B】2-ピロリノドキシソルピシン(2-PDox)の構造。「Me」はメチル基である。
- 【図1C】2-ピロリノドキシソルピシンのプロドラッグ形態(P2PDox)の構造。「Me」はメチル基であり、「Ac」はアセチル基である。
- 【図1D】抗体結合のためのP2PDoxのマレイミド活性化形態の構造。「Me」はメチル基であり、「Ac」はアセチル基である。
- 【図2】Capan-1ヒトの膵臓腺癌の異種移植片を有するヌードマウス(n=5)における、週2回×2週間、2.25mg/kgのタンパク質用量(0.064mg/kgの薬物用量)のMAb-P2PDox複合体を使用する、皮下ヒト腫瘍異種移植片を有するヌードマウスの治療。 10
- 【図3A】NCI-N87のヒト胃癌異種移植片を有するヌードマウス(n=7)における、週2回×2週間、2.25mg/kgのタンパク質用量(0.064mg/kgの薬物用量)のMAb-P2PDox複合体を使用する、皮下ヒト腫瘍異種移植片を有するヌードマウスの治療。
- 【図3B】MDA-MB-468のヒト乳癌異種移植片を有するヌードマウス(n=7)における、週2回×2週間、2.25mg/kgのタンパク質用量(0.064mg/kgの薬物用量)のMAb-P2PDox複合体を使用する、皮下ヒト腫瘍異種移植片を有するヌードマウスの治療。
- 【図3C】BxPC3のヒト膵癌異種移植片を有するヌードマウス(n=7)における、週2回×2週間、2.25mg/kgのタンパク質用量(0.064mg/kgの薬物用量)のMAb-P2PDox複合体を使用する、皮下ヒト腫瘍異種移植片を有するヌードマウスの治療。 20
- 【図4A】複数回の注射を用いたhLL1-P2PDox複合体のMTD試験。マウスにhLL1-P2PDox(q4d×4)を用量当たり25μgで静脈内投与した。
- 【図4B】複数回の注射を用いたhLL1-P2PDox複合体のMTD試験。マウスにhLL1-P2PDox(q4d×4)を用量当たり50μgで静脈内投与した。
- 【図4C】複数回の注射を用いたhLL1-P2PDox複合体のMTD試験。マウスにhLL1-P2PDox(q4d×4)を用量当たり100μgで静脈内投与した。
- 【図4D】複数回の注射を用いたhLL1-P2PDox複合体のMTD試験。マウスにhLL1-P2PDox(q4d×4)を用量当たり150μgで静脈内投与した。 30
- 【図5A】ヒドラジドリンカーを使用して調製した、P2PDoxの活性形態。
- 【図5B】アミノキシリンカーを使用して調製した、P2PDoxの活性形態。
- 【図5C】フェニルヒドラジンリンカーを使用して調製した、P2PDoxの活性形態。
- 【図5D】4-(ヒドラジノスルホニル)安息香酸リンカーを使用して調製した、P2PDoxの活性形態。
- 【図6A】P2PDox ADCの細胞内での開裂。ヒドラジドはP2PDox ADCを誘導体化した。
- 【図6B】P2PDox ADCの細胞内での開裂。エステラーゼ活性または塩基性pHは、不安定な中間複合体を生成する。 40
- 【図6C】P2PDox ADCの細胞内での開裂。自然開環は、2-Pdiox複合体が生成される。
- 【図6D】P2PDox ADCの細胞内での開裂。リソソームの酸性分割により、遊離型の2-PDox複合体が生成される。
- 【図7】ペプチド複合体型P2PDox、IMP513の構造。
- 【図8】IMP402の構造。
- 【図9】IMP514の構造。
- 【図10】IMP515の構造。
- 【図11】IMP516の構造。
- 【図12】ヒンダードジスルフィド系を含む、新規架橋剤の合成用のスキーム。 50



【図13A】NCI-N87のヒト胃癌異種移植片を有するヌードマウスにおけるP2PDox複合体の*in vivo*での効果。マウスに生理食塩水を対照として投与した。

【図13B】NCI-N87のヒト胃癌異種移植片を有するヌードマウスにおけるP2PDox複合体の*in vivo*での効果。矢印で示すように45 $\mu$ gのhA20-P2PDoxをマウスに投与した。

【図13C】NCI-N87のヒト胃癌異種移植片を有するヌードマウスにおけるP2PDox複合体の*in vivo*での効果。矢印で示すように45 $\mu$ gのhMN-15-P2PDoxをマウスに投与した。

【図13D】NCI-N87のヒト胃癌異種移植片を有するヌードマウスにおけるP2PDox複合体の*in vivo*での効果。矢印で示すように45 $\mu$ gのhRS7-P2PDoxをマウスに投与した。

10

【図13E】NCI-N87のヒト胃癌異種移植片を有するヌードマウスにおけるP2PDox複合体の*in vivo*での効果。矢印で示すように45 $\mu$ gのhLL1-P2PDoxをマウスに投与した。

【図13F】NCI-N87のヒト胃癌異種移植片を有するヌードマウスにおけるP2PDox複合体の*in vivo*での効果。矢印で示すように45 $\mu$ gのhMN-14-P2PDoxをマウスに投与した。

【図14】NCI-N87のヒト胃癌異種移植片を有するヌードマウスにおける、生存に関するhRS7-P2PDoxの服用スケジュールの効果。

【図15】ヒトの胃癌異種移植片の増殖に関するhRS7-P2PDoxの異なる単一用量の効果。

20

【図16】ヒト胃癌異種移植片を有するマウスの生存に関するhRS7-P2PDoxの異なる単一用量の効果。

【図17】様々なhRS7-ADCs vs hRS7 IgGのADCC。

【図18】ペプチド複合体を作製する際に使用する、P2PDox用の可溶化剤を作製する代替的なスキーム。

【図19A】NCI-N87ヒト胃癌をマウスに注入した服用スケジュール試験。マウスに対照となる生理食塩水を投与した。

【図19B】NCI-N87ヒト胃癌をマウスに注入した服用スケジュール試験。マウスに45 $\mu$ gのhRS7-P2PDoxを1日4回 $\times$ 4投与した。

30

【図19C】NCI-N87ヒト胃癌をマウスに注入した服用スケジュール試験。マウスに90 $\mu$ gのhRS7-P2PDoxを1週間に1回 $\times$ 2投与した。

【図19D】NCI-N87ヒト胃癌をマウスに注入した服用スケジュール試験。マウスに180 $\mu$ gのhRS7-P2PDoxを単一用量で投与した。

【図19E】NCI-N87ヒト胃癌をマウスに注入した服用スケジュール試験。マウスに、45 $\mu$ gのhA20-P2PDoxを1日4回 $\times$ 4投与した。

【図19F】NCI-N87ヒト胃癌をマウスに注入した服用スケジュール試験。マウスに90 $\mu$ gのhA20-P2PDoxを1週間に1回 $\times$ 2投与した。

【図19G】NCI-N87ヒト胃癌をマウスに注入した服用スケジュール試験。マウスに、180 $\mu$ gのhA20-P2PDoxを単一用量で投与した。

40

【発明を実施するための形態】

【0023】

定義

以下の定義は、本明細書の開示の理解を促すために提供される。用語は、特段の規定のない限り、標準的かつ通常の意味にしたがって使用される。

【0024】

本明細書に使用されるように、用語「a」、「an」、および「the」は、単数形のみを意味することが文脈から明らかではない限り、単数形または複数形のいずれかを指し得る。

【0025】

50

「抗体」は、完全長（すなわち、天然に存在するか、または正常な免疫グロブリン遺伝子フラグメント組み換え工程により形成される）免疫グロブリン分子（例えばIgG抗体）または抗体フラグメントなどの免疫グロブリン分子の免疫学的に活性（抗原結合）な部分と称する。

【0026】

「抗体フラグメント」は、IgG4の半分子を含む、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、scFv、単ドメイン抗体（DABまたはVHH）などの抗体の一部である（van der Neut Kolfshoten et al., 2007, Science 317: 1554 - 1557）。構造に関わらず抗体フラグメントは、未処置の抗体により認識される同一の抗原と結合する。例えば、抗-CD74抗体フラグメントは、CD74のエピトープと結合する。また、用語「抗体フラグメント」は、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」フラグメントなどの可変領域からなる単離フラグメント、軽鎖および重い可変領域が、ペプチドリンカー（「scFvタンパク質」）により結合する組み換え単鎖ポリペプチド分子、および高頻度可変性の領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識領域を含む。

10

【0027】

「キメラ抗体」は、1つの種に由来する抗体、好ましくは齧歯類の抗体由来の相補性決定領域（CDR）を含む可変ドメインを含む組み換えタンパク質であり、この抗体分子の定常ドメインは、ヒト抗体の抗体に由来する。獣医学に適用する際には、キメラ抗体の定常ドメインは、ネコまたはイヌなどの他の種の抗体に由来してもよい。

20

【0028】

「ヒト化抗体」は、ある抗体、例えば齧歯類などの1種の抗体由来のCDRが、齧歯類の抗体の重鎖および軽鎖の可変鎖から、ヒトのフレームワーク領域（FR）配列を含むヒトの重鎖および軽鎖の可変ドメイン内に形質転換される組み換えタンパク質である。抗体分子の定常ドメインは、ヒトの抗体に由来する。

【0029】

「ヒト」抗体は、抗原性の変化に応答する特異的なヒト抗体を産生するために遺伝的に改変したトランスジェニックマウスから得た抗体である。この技術では、ヒトの重鎖および軽鎖の遺伝子座の配列は、内在性の重鎖および軽鎖の遺伝子座の標的化された破損を含む胚性幹細胞株由来のマウス系統に導入される。トランスジェニックマウスは、ヒト抗原に特異的なヒト抗体を合成でき、このマウスを使用して、抗体-分泌ハイブリドーマを産生できる。トランスジェニックマウス由来のヒト抗体を取得する方法は、Green et al., Nature Genet. 7: 13 (1994), Lonberg et al., Nature 368: 856 (1994)、およびTaylor et al., Int. Immun. 6: 579 (1994)に記載される。また、遺伝的または染色体上の形質転換法、およびファージディスプレイ技術により完全なヒト抗体を構築でき、この技術全ては当業者に公知である（例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552 - 553 (1990) for the production of human antibodies and fragments thereof in vitro, from immunoglobulin variable domain gene repertoires from unimmunized donors）参照。この技術では、抗体の可変ドメイン遺伝子は、主要なまたは希少な繊維状バクテリオファージのコートタンパク質遺伝子へとインフレームでクローン化され、ファージ粒子の表面上の機能的な抗体フラグメントとして表される。繊維状の粒子はファージゲノムの単鎖のDNAコピーを含むため、抗体の機能的特性に基づく選択はまた、これら特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をもたらす。この方法では、ファージは、B細胞の特性の一部を模倣する。ファージディスプレイを多様な形式で実施でき、この報告として、例えばJohnson and Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3: 556 4 - 571 (1993)を参照されたい。またヒト抗体を、in vitroでの活性化

30

40

50

B細胞により作製してもよい（米国特許第5,567,610号および第5,229,275号参照）。

【0030】

「治療剤」は、ある疾患の処置に有益な原子、分子、または化合物である。治療剤の例として、限定するものではないが、抗体、抗体フラグメント、薬剤、サイトカインまたはケモカイン阻害剤、ナノボディ、アポトーシス促進剤、チロシンキナーゼ阻害剤、毒素、酵素、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節物質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、RNAi、キレート剤、ホウ素化合物、光活動性剤、色素、および放射性同位体が挙げられる。

【0031】

「診断薬」は、ある疾患の診断に有益な原子、分子、または化合物である。有益な診断薬として、限定するものではないが、放射性同位体、色素、造影剤、蛍光化合物または分子、および増強剤（例えば常磁性イオン）が挙げられる。好ましくは、診断薬は、放射線同位体、増強剤、および蛍光化合物からなる群から選択される。

【0032】

「免疫複合体」は、原子、分子、またはより高次の構造（例えばリポソームを備える）、治療剤、または診断薬と抗体の複合体である。「ネイキッド抗体」は、他の薬剤と全く抱合しない抗体である。

【0033】

本明細書に使用されるように、用語「抗体融合タンパク質」は、抗体または抗体フラグメントが、同一または異なる抗体もしくは抗体フラグメント、またはDDDペプチドもしくはADペプチドなどの別のタンパク質またはペプチドと結合する組み換え産生型抗原結合分子である。融合分子は、単一の抗体成分、異なる抗体成分の多価または多選択性の組み合わせ、または同一の抗体成分の複数のコピーを含んでもよい。融合タンパク質は、抗体または抗体フラグメント、および治療剤をさらに含んでもよい。このような融合タンパク質に適切な治療剤の例として、免疫調節物質および毒素が挙げられる。1つの好ましい毒素は、リボヌクレアーゼ（RNase）、好ましくは組み換えRNaseである。

【0034】

「多選択性抗体」は、例えば、2つの異なる抗原、同一の抗原上の2つの異なるエピトープ、またはハプテンおよび/または抗原もしくはエピトープなどの異なる構造である少なくとも2つの標的で同時に結合できる抗体である。「多価抗体」は、同一または異なる構造である少なくとも2つの標的に同時に結合できる抗体である。結合価は、抗体が単一の抗原またはエピトープとどのくらい多くの結合アームまたは結合部位を有しているか、すなわち、1価、2価、3価、または多価であるかを示す。抗体の多価性は、抗原に結合する際に複数の相互作用を行うことができる利点があり、したがって、抗原に結合する活性が増大することを意味する。具体的には、どのくらい多くの抗原またはエピトープと抗体が結合できるか、すなわち、単一特異性、二重特異性、三重特異性、多選択性であるかどうかを示す。これらの定義を使用して、天然の抗体、例えばIgGは、2つの結合アームを有するため二価であるが、1つのエピトープと結合するため単一特異性である。多選択性であり多価の抗体は、異なる特異性を有する1つ超の結合部位を有する構築物である。

【0035】

「二重特性抗体」は、異なる構造である2つの標的に同時に結合できる抗体である。二重特異性抗体（bsAb）および二重特異性抗体フラグメント（bsFab）は、例えば、B細胞、T細胞、骨髄細胞、血漿細胞、およびマスト細胞の抗原もしくはエピトープに特異的に結合する少なくとも1つのアーム、ならびに、治療剤または診断薬を備える標的可能な複合体と特異的に結合する少なくとも1つのアームを有していてもよい。様々な二重特異性抗体を、分子改変を使用して産生できる。

【0036】

「ナノボディ」（単一ドメイン抗体）は、単一の単量体可変抗体ドメインからなる抗体

10

20

30

40

50

フラグメントである。抗体のように、ナノボディは、特異的な抗原と選択的に結合できる。ナノボディは、概して12～15kDaの分子量であり、実質的に抗体よりも小さい。

【0037】

プロ-2-ピロリノドキシソルピシン(P2PDox)

癌治療に対する抗体薬物複合体(ADC)の手法は、特にホジキンリンパ腫およびHER2+転移性乳癌用の生成物としてFDAが近年認可した(Deng et al., 2013, Clin Cancer Res 19:22-7; Peddi & Hurvitz, 2013, Future Oncol 9:319-26)ことから、現在非常に興味深い話題となっている(Chari, 2008, Acc Chem Res 41:98-107)。毒性が極めて高い薬剤系ADCを用いることにより、患者への合計用量、治療剤の費用は少なくなった。しかしながら、ADCの設計は、具体的な応答を達成するよう最適化されるべきである。

10

【0038】

超毒性薬剤を選択する際に考慮される実際の態様:(i)cGMPグレードにおける薬剤の商業的入手性と、(ii)分割可能なリンカーおよびMAb-複合基を組み込む、薬剤の活性形態の容易な調製と、(iii)材料を扱う際の安全性の考慮とが存在する。本出願人は、2-ピロリノドキシソルピシンを本発明のADCと決定した。この薬剤は、1996年Schallyのグループにより記載され、後にSchallyらは前臨床探索のために、多くの受容体標的化ペプチドと抱合するために使用した(Nagy et al., 1996a, Proc Natl Acad Sci U S A 93:7269-73; Nagy et al., 1996b, Proc Natl Acad Sci U S A 93:2464-9; Nagy et al., 1997, Proc Natl Acad Sci U S A 94:652-6; Nagy et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A 95:1794-9)。これはドキシソルピシンの誘導体であり、5員環に組み込まれたダウノサミンの窒素を有し、極めて強力なアルキル化剤となり、ドキシソルピシンの500～1000倍の細胞毒性を有する。この薬剤の超毒性は、安全性のため、アイソレーター内で特別に扱う必要がある。

20

【0039】

2-ピロリノドキシソルピシンのプロドラッグ形態が別のグループにより調査され、このグループは、N-(4,4-ジアセトキシブチル)ドキシソルピシンと称したドキシソルピシンの誘導体を開示した(Farquhar et al., 1998, J Med Chem 41:965-72; 米国特許第5,196,522号;第6,433,150号)。この誘導体は、in vivoで2-ピロリノドキシソルピシンに変換可能である。この誘導体は、4,4-ジアセトキシブチルアルデヒド(diacetyoxybutyraldehyde)でのドキシソルピシンの還元性のアルキル化により調製した。しかしながら、このプロドラッグは、ジスルフィド還元型抗体のチオールで、分割可能なリンカーとして、ヒドラゾンなどの酸に不安定な基を使用して抗体または他の標的化分子に付着しなかった。

30

【0040】

以下の実施例に開示した試験は、ADCにおける薬剤としてのプロ-2-ピロリノドキシソルピシン(P2PDox)を使用する。この物質には、(i)プロドラッグのみを扱うことにより、安全性の不安を軽減することと、(ii)原材料のドキシソルピシン(Dox)はcGMPグレードの量で入手可能であることと、(iii)Doxを活性型P2PDox(P2PDox)に変換する化学は、数回の合成ステップのみを含むことと、のいくつかの利点がある。図1A～1Dは、Dox、2-PDox、P2PDox(P2PDox)、および活性型P2PDoxの構造を示す。IgGと結合しているため、本出願人は、酸に不安定なヒドラゾンおよびマレイミド基を誘導する手法によりP2PDoxをSMCC-ヒドラジドで活性化させた。マレイミド基は穏やかに還元した抗体のチオールの抱合に用いられる。

40

50

## 【0041】

超毒性薬剤としての2-ピロリノドキシソルピシン、特にMAbsと複合体でのプロドラッグ形態の選択することにより、原材料のドキシソルピシンがcGMPグレードで容易に入手可能であるため、急速に免疫複合体を開発できる。P2PDox上のケトン、単一ステップにおいて酸に不安定なヒドラゾンおよび抗体結合マレイミド基を組み込むためのハンドルを提供する。2-PDoxの場合のドキシソルピシンのアミノ基の誘導体化は、先行文献(Farquhar et al., 1998, 41: 965-72; Guillemard & Uri, 2004, Oncogene 23: 3613-21)に基づきドキシソルピシンに関連した複数の薬剤耐性を克服するものである。この設計は、in vivoで作製される活性2-ピロリノドキシソルピシン構造に影響を与えることなく、目的物質を放射性標識し、かつ/または投与された用量をさらに調節するため、必要な場合には、リンカーまたはN-アルキル部に親水基を添加する場合を提供する。

10

## 【0042】

他者により現在試験されているADCの大部分は、チューブリンに作用し毒性の極めて高いマイタシンノイドおよびオーリスタチンを組み込み、これにより、細胞周期段階に特異的となる。逸話風に、トラスツズマブ-DM1を除き、これらADCは、固体の癌における相対的に限定された臨床的な治療指数を示すとされる。2-PDoxなどのDNA-アルキル化剤は、細胞周期の段階に非特異的である。提案されたADCは、異なる細胞殺傷機構、EpCAM MAbsなどの他の多くよりも癌に特異性を示す抗体のインターナライジング、および結合の化学性により作用する薬剤成分に基づき、毒性の極めて高い他のADCから逸脱した利点を提供し、改善した治療指数を提供する。以下に示すように、膵臓癌、乳癌、および胃癌の浸潤性異種移植片モデルにおいて日付を付けて行った前臨床試験は、hRS7-P2PDox複合体が低度かつ安全な用量で非常に活性であり、完全な退行が導かれることを示す。また、このような腫瘍を標的化し、かつP2PDと抱合した様々な抗体で処置したヒトの血液腫瘍および固形腫瘍を有するマウスでの試験は、希発用量でさえも、主に好中球減少により用量が限定される毒性を用いて、非常に良好な腫瘍制御(対照群と比較して、増殖の遅延または後退)を示す。この用量は、通常、5%未満の死亡率をもたらす最少毒物致死量(MTD)より低く調整することにより制御される。

20

## 【0043】

## モノクローナル抗体の調製

本明細書に記載される組成物、製剤、および方法はモノクローナル抗体を含んでよい。抗原に特異的な齧歯類のモノクローナル抗体は、当業者に公知の方法により得られてよい(例えば、Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975)、およびColigan et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, pages 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991)参照)。マウスの免疫グロブリンの可変ドメインをクローニングする一般的な技術は例えば、Orlandi et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 3833 (1989)の公開により開示されている。

30

40

## 【0044】

## キメラ抗体

キメラ抗体は、齧歯類の抗体などの、1種の動物由来のCDRを含む可変ドメインを含む組み換えタンパク質であり、抗体分子の残り、すなわち定常ドメインは、ヒトの抗体に由来する。キメラ抗体を構築する技術は当業者に公知である。例として、LeungらのHybridoma 13: 469 (1994)、は、LL2モノクローナル抗体、抗-CD22抗体のV<sub>k</sub>ドメインおよびV<sub>H</sub>ドメインをコードするDNA配列を、それぞれヒトおよびIgG<sub>1</sub>の定常領域ドメインと組み合わせることによりどのようにLL2キメラが産生されるかを開示する。この公開はまた、LL2の軽鎖および重鎖の可変領域の核酸配列であるV<sub>k</sub>およびV<sub>H</sub>をそれぞれ提供する。

50

## 【0045】

## ヒト化抗体

キメラ抗体の可変ドメイン中のマウスFRの配列を1つ以上の異なるヒトFRと置き換えることによりキメラモノクローナル抗体をヒト化することができる。マウスのCDRは、マウスの免疫グロブリンの重鎖および軽鎖から対応するヒト抗体の可変ドメインへと導入される。特にマウスのCDRは、マウスの免疫グロブリンの重鎖および軽鎖から、対応するヒトの抗体の可変ドメインへと導入される。単にマウスのCDRをヒトのFRに導入することは、多くの場合、抗体親和性が低下するか、またはさらには消失するため、マウスの抗体の元の親和性を回復させるために、さらなる改変が必要となる場合がある。このことは、そのエピトープに対して良好な結合親和性を有する抗体を得るため、マウスの対応物とFR領域中の1つ以上のいくつかのヒト残基の一部を置き換えることにより達成される(例えば、Tempest et al., *Biotechnology* 9:266(1991) and Verhoeyen et al., *Science* 239:1534(1988)参照)。ヒト化抗体を産生する技術は、例えば、Jones et al., *Nature* 321:522(1986), Riechmann et al., *Nature* 332:323(1988), Verhoeyen et al., *Science* 239:1534(1988), Carter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285(1992), Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437(1992)、および Singer et al., *J. Immun.* 150:2844(1993)により開示される。

10

20

## 【0046】

## ヒト抗体

完全ヒト抗体は、ヒトではないトランスジェニック動物から取得できる(例えば、Mendez et al., *Nature Genetics*, 15:146-156, 1997; 米国特許第5,633,425号参照)。コンビナトリアル手法またはヒト免疫グロブリンの遺伝子座で形質転換されたトランスジェニック動物のいずれかを使用する完全ヒト抗体を産生する方法が当業者に公知である(例えば、Mancini et al., 2004, *New Microbiol.* 27:315-28; Conrad and Scheller, 2005, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:117-26; Brekke and Loiset, 2003, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:544-50に記載されており、各文献は参照により本明細書に援用される)。このような完全ヒト抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体よりも副作用が少なく、本質的に内在性ヒト抗体として*in vivo*で機能すると予測される。特定の実施形態では、請求される方法および手順は、このような技術により産生されるヒト抗体を利用してもよい。

30

## 【0047】

1つの代替案として、ファージディスプレイ技術を使用して、ヒト抗体を作製してもよい(例えば、Dantas-Barbosa et al., 2005, *Genet. Mol. Res.* 4:126-40は、本明細書中に参照として組み込まれる)。ヒト抗体は、正常なヒトまたは、癌などの特定の疾患状態を示すヒトから作製されてもよい(Dantas-Barbosa et al., 2005)。疾患のある個体由来のヒト抗体を構築する利点は、循環する抗体のレパートリーが、疾患関連抗原に対する抗体と偏向し得る点である。

40

## 【0048】

この方法の1つの非限定的な例として、Dantas-Barbosaら(2005)は、骨肉腫の患者からヒトのFab抗体フラグメントのファージディスプレイライブラリを構築した。一般的に、総RNAは、循環する血液のリンパ球(I d)から取得した。組み換えFabは、 $\mu$ 、 $\kappa$ 、および重鎖抗体のレパートリーからクローン化され、ファージディスプレイライブラリ(I d)に挿入される。RNAはcDNAに変換され、重鎖およ

50

び軽鎖の免疫グロブリンに対して特異的なプライマーを使用してFab cDNAライブラリを作製するために使用された(Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-97)。ライブラリ構築物は、Andris-Widhopfら(2000, In: Phage Display Laboratory Manual, Barbas et al. (eds), 1st edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 9.1 to 9.22, この文献は参照として本明細書に援用される)にしたがって実行した。最終的なFabフラグメントを制限エンドヌクレアーゼで消化し、ファージディスプレイライブラリを作製するためにバクテリオファージゲノム内に挿入した。標準的なファージディスプレイ方法によりこのようなライブラリをスクリーニングしてもよい。当業者は、この技術が単なる例示であり、ファージディスプレイによるヒト抗体または抗体フラグメントを作製かつスクリーニングするいずれかの既知の方法が利用され得ることを理解するものである。

10

#### 【0049】

別の代替案では、ヒト抗体を産生するよう遺伝的に改変されたトランスジェニック動物を使用して、上述した標準的な免疫プロトコルを使用することにより、いずれかの本質的に免疫原性である標的に対する抗体を作製してもよい。トランスジェニックマウスからヒト抗体を取得する方法は、Green et al., Nature Genet. 7: 13 (1994), Lonberg et al., Nature 368: 856 (1994)、およびTaylor et al., Int. Immun. 6: 579 (1994)に記載される。このようなシステムの非限定的な例は、Abgenix(カリフォルニア州フリーモント)からのXenoMouse(登録商標)(例えば、Green et al., 1999, J. Immunol. Methods 231: 11-23, この文献は参照により援用される)である。XenoMouse(登録商標)および同様の動物では、マウス抗体遺伝子は不活性化されており、機能的なヒト抗体遺伝子により置き換えられており、残りのマウスの免疫系は未処置のままである。

20

#### 【0050】

XenoMouse(登録商標)を、アクセサリ遺伝子および制御配列に沿って、可変領域配列の大部分を含むヒトIgHおよびIg 遺伝子座の一部を含んだ生殖系列-構成型YAC(酵母人工染色体)を用いて形質転換した。ヒト可変領域のレパトリーを使用して、B細胞を産生する抗体を作製してもよく、これを既知の技術によりハイブリドーマ内で処置してもよい。標的抗原で免疫化したXenoMouse(登録商標)は、正常な免疫応答によりヒト抗体を産生し、これにより、上述の標準的な技術により収集かつ/または産生される。様々なXenoMouse(登録商標)株が入手可能であり、それぞれ異なる分類の抗体を産生できる。遺伝子導入により産生したヒト抗体は、正常なヒト抗体の薬物動態学的特性を残したまま治療上の可能性を有することが示されている(Green et al., 1999)。当業者は、請求した組成物および方法は、XenoMouse(登録商標)系にの使用に限定されるものではないが、ヒト抗体を産生するために遺伝的に改変したいずれかのトランスジェニック動物を利用してもよい。

30

#### 【0051】

抗体のクローニングおよび産生

キメラ抗体またはヒト化抗体の産生などの様々な技術は、抗体のクローニングおよび構築の手法を含んでもよい。対象となる抗体の抗原結合 $V_k$ (可変軽鎖)および $V_H$ (可変重鎖)配列は、RT-PCR、5'-RACEおよびcDNAライブラリスクリーニングなどの様々な分子クローニング手法により得られてよい。マウスの抗体を発現する細胞由来の抗体のV遺伝子は、PCRの増幅によりクローン化でき、配列決定できる。これら遺伝子の確実性を確認するために、クローン化した $V_L$ および $V_H$ 遺伝子は、Orlandiら(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 3833 (1989))により記載されるように、キメラAbとして細胞培養液中で発現できる。次いで、V遺伝子配列に基づき、Leungら(Mol. Immunol., 32: 1413 (1

40

50

995))により記載されるようにヒト化抗体を設計し、かつ構築できる。

【0052】

一般的な分子クローニング技術によりマウスの抗体を産生する任意の既知のハイブリドーマ株または遺伝子導入した細胞株からcDNAを調製できる(Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory manual, 2nd Ed (1989))。抗体のV<sub>k</sub>配列は、プライマーVK1BACKおよびVK1FOR(Orlandi et al., 1989)またはLeungら(BioTechniques, 15: 286 (1993))により記載される伸長したプライマーセットを使用して増幅させてもよい。V<sub>H</sub>配列は、プライマー対VH1BACK/VH1FOR(Orlandi et al., 1989)またはLeungら(Hybridoma, 13: 469 (1994))により記載されるマウスIgGの定常領域にアニーリングするプライマーを使用して増幅できる。ヒト化V遺伝子を、Leungら(Mol. Immunol., 32: 1413 (1995))により記載されるように、長いオリゴヌクレオチドのテンプレートの合成およびPCRの増幅の組み合わせにより構築できる。

10

【0053】

V<sub>k</sub>のPCR産物を、Igプロモーター、単一ペプチド配列、および簡便な制限部位を含む、pBR327系のステージングベクターVKpBRなどのステージングベクター内にサブクローニングできる。プロモーターおよびシグナルペプチド配列と共にV<sub>k</sub>およびV<sub>H</sub>配列を含む発現カセットを、VKpBRおよびVHpBSから切除でき、pKhおよびpG1gなどの、それぞれ適切な発現ベクター内に連結できる(Leung et al., Hybridoma, 13: 469 (1994))。この発現ベクターは、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体の産生のためにモニタリングされる適切な細胞および懸濁液内に同時に導入できる。あるいは、Gilliesら(J. Immunol. Methods 125: 191 (1989))により記載されるように、V<sub>k</sub>およびV<sub>H</sub>発現カセットを切除し、かつpdHL2などの単一の発現ベクター内にサブクローニングできる。このことは、Losman et al., Cancer, 80: 2660 (1997))にも示されている。

20

【0054】

代替的な実施形態では、発現ベクターは、無血清媒体中の遺伝子導入、増殖、および発現に予め適合した宿主細胞中に遺伝子導入してもよい。使用し得る例示的な細胞株は、Sp/EEE、Sp/ESFおよびSp/ESF-X細胞株を含む(例えば、米国特許第7,531,327号;第7,537,930号、および7,608,425号を参照。これらのそれぞれの実施例部分は本明細書に援用される)。これらの例示的な細胞株は、変異型Bcl-EEE遺伝子でトランスフェクトしたSp2/0骨髓種の細胞株に基づき、遺伝子導入した遺伝子配列を増幅するためにメトトレキサートに曝露し、タンパク質発現用に無血清細胞株に予め適合されている。

30

【0055】

抗体のアロタイプ

治療抗体の免疫原性は、融合反応のリスクの増大および治療応答の持続期間の減少に関連する(Baert et al., 2003, N Engl J Med 348: 602-08)。治療抗体が宿主での免疫応答を誘導する度合いは、抗体のアロタイプによって部分的に判定され得る(Stickler et al., 2011, Genes and Immunity 12: 213-21)。抗体のアロタイプは、抗体の定常領域配列での特異的な位置のアミノ酸配列変異体に関連する。重鎖型定常領域を含むIgG抗体のアロタイプは、Gmアロタイプと称する(1976, J Immunol 117: 1056-59)。

40

【0056】

一般的なIgG1ヒト抗体では、最も普及しているアロタイプはG1m1である(Stickler et al., 2011, Genes and Immunity 12

50



: 213 - 21)。しかしながら、G1m3アロタイプも、コーカサス人種で頻繁に生じる。G1m1抗体は、G1m3患者などの、非-G1m1 (nG1m1) レシピエントに投与する際に、免疫応答を誘導するよう意図するアロタイプの配列を含むことが報告されている (Stickler et al., 2011)。非-G1m1アロタイプ抗体は、G1m1患者に投与する際には免疫原性ではない (Stickler et al., 2011)。

【0057】

ヒトG1m1アロタイプは、重鎖IgG1のCH3配列において、カバト位置356にアミノ酸のアスパラギン酸、カバト位置358にロイシンを含む。nG1m1アロタイプは、カバト位置356にアミノ酸のグルタミン酸、カバト位置358にメチオニンを含む。G1m1およびnG1m1のアロタイプは、カバト位置357にグルタミン酸残基を含み、アロタイプは、DELおよびEEMアロタイプと称する場合もある。G1m1およびnG1m1アロタイプ抗体の重鎖定常領域配列の非限定的な例は、以下の例示的な抗体リツキシマブ (配列番号85) およびベルツズマブ (配列番号86) に示される。

リツキシマブ重鎖可変領域配列 (配列番号85)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S  
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T  
Y I C N V N H K P S N T K V D K K A E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G  
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W  
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K  
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E  
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V  
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T  
Q K S L S L S P G K

ベルツズマブ重鎖可変領域 (配列番号86)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S  
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T  
Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G  
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W  
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K  
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E  
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V  
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T  
Q K S L S L S P G K

【0058】

Jefferys および Lefranc (2009, mAbs 1:1-7) は、IgGアロタイプの配列変異体の特徴およびそれらの免疫原性に関する効果を調査した。彼らから、G1m3アロタイプは、G1m17アロタイプ中のカバト214のリシン残基と比較し、カバト位置214のアルギニン残基により特徴付けられることが報告された。nG1m1, 2のアロタイプは、カバト位置356のグルタミン酸、カバト位置358のメチオニン、およびカバト位置431のアラニンにより特徴付けられた。G1m1, 2のアロタイプは、カバト位置356のアスパラギン酸、カバト位置358のロイシン、およびカバト位置431のグリシンにより特徴づけられた。重鎖定常領域配列変異体に加え、Jefferys および Lefranc (2009) は、カバト位置153のバリン、カバト位置191のロイシンにより特徴付けられるKm1アロタイプ、カバト位置153のアラニンおよびカバト位置191のロイシンにより特徴付けられるKm1, 2アロタイプ、ならびにカバト位置153のアラニンおよびカバト位置191のバリンにより特徴付けられるKm3アロタイプを備える、軽鎖定常領域中のアロタイプ変異体を報告した。

【0059】

治療抗体に関して、ベルツズマブおよびリツキシマブは、それぞれ、幅多様な血液系腫

瘍および/または自己免疫疾患の治療に使用する、CD20に対するヒト化IgG1抗体およびキメラIgG1抗体である。表1は、リツキシマブ対ベルツズマブのアロタイプ配列を比較する。表1に示されるように、リツキシマブ(G1m17, 1)は、リツキシマブのリシン対ベルツズマブのアルギニンのカバト位置214の追加的な配列変異(重鎖CH1)を備える、DELアロタイプIgG1である。ベルツズマブは、リツキシマブよりも対象中の免疫原性が低く(例えばMorchhauser et al., 2009, J Clin Oncol 27:3346-53; Goldenberg et al., 2009, Blood 113:1062-70; Robak & Robak, 2011, BioDrugs 25:13-25参照)、ヒト化抗体およびキメラ抗体間の差異に起因する作用が報告されている。しかしながら、おそらく、EEMおよびDELのアロタイプ間のアロタイプの差異は、ベルツズマブの免疫原性が低いことも考慮される。

10

## 【表1】

表1: リツキシマブ対ベルツズマブのアロタイプ

	完全なアロタイプ	重鎖 位置および関連するアロタイプ					
		214 (アロタイプ)		356/358アロタイプ		431 (アロタイプ)	
リツキシマブ	G1m17, 1	K	17	D/L	1	A	-
ベルツズマブ	G1m3	R	3	E/M	-	A	-

20

## 【0060】

nG1m1遺伝子型の個体における治療抗体の免疫原性を低減させるために、カバト214のアルギニンにより特徴付けられるG1m3アロタイプ、ならびにカバト位置356のグルタミン酸、カバト位置358のメチオニン、およびカバト位置431のアラニンにより特徴付けられるnG1m1, 2欠損-アロタイプに対応させるために抗体のアロタイプを選択することが望ましい。驚くべきことに、長期間にわたるG1m3抗体の反復皮下投与は、有意な免疫応答をもたらさなかった。代替的な実施形態では、G1m3アロタイプに共通するヒトIgG3重鎖は、カバト位置214にアルギニン、カバト位置356にグルタミン酸、カバト位置359にメチオニン、およびカバト431にアラニンを有する。免疫原性は、これらの位置の残基に少なくとも部分的に関連することがわかっているため、治療抗体様のヒトIgG4重鎖定常領域の使用も好ましい実施形態である。IgG4抗体とG1m3 IgG1抗体との組み合わせも、治療のための投与に使用してもよい。

30

## 【0061】

## 既知の抗体

様々な実施形態では、特許を請求する方法および組成物は、当業者に公知の様々な抗体のいずれかを利用してよい。使用する抗体は、多くの既知の供給源から商業的に入手してもよい。例えば、ハイブリドーマ株をスクリーニングした様々な抗体は、American Type Culture Collection (ATCC, バージニア州マナサス)から入手可能である。限定するものではないが、腫瘍関連抗原を含む多様な疾患標的に対する多くの抗体は、ATCCに蓄積されており、かつ/または公開されている可変領域配列を有し、請求される方法および組成物において使用するために入手可能である。例えば、米国特許第7,312,318号;第7,282,567号;第7,151,164号;第7,074,403号;第7,060,802号;第7,056,509号;第7,049,060号;第7,045,132号;第7,041,803号;第7,041,802号;第7,041,293号;第7,038,018号;第7,037,498号;第7,012,133号;第7,001,598号;第6,998,468号;

40

50

第 6 , 9 9 4 , 9 7 6 号 ; 第 6 , 9 9 4 , 8 5 2 号 ; 第 6 , 9 8 9 , 2 4 1 号 ; 第 6 , 9  
 7 4 , 8 6 3 号 ; 第 6 , 9 6 5 , 0 1 8 号 ; 第 6 , 9 6 4 , 8 5 4 号 ; 第 6 , 9 6 2 , 9  
 8 1 号 ; 第 6 , 9 6 2 , 8 1 3 号 ; 第 6 , 9 5 6 , 1 0 7 号 ; 第 6 , 9 5 1 , 9 2 4 号 ;  
 第 6 , 9 4 9 , 2 4 4 号 ; 第 6 , 9 4 6 , 1 2 9 号 ; 第 6 , 9 4 3 , 0 2 0 号 ; 第 6 , 9  
 3 9 , 5 4 7 号 ; 第 6 , 9 2 1 , 6 4 5 号 ; 第 6 , 9 2 1 , 6 4 5 号 ; 第 6 , 9 2 1 , 5  
 3 3 号 ; 第 6 , 9 1 9 , 4 3 3 号 ; 第 6 , 9 1 9 , 0 7 8 号 ; 第 6 , 9 1 6 , 4 7 5 号 ;  
 第 6 , 9 0 5 , 6 8 1 号 ; 第 6 , 8 9 9 , 8 7 9 号 ; 第 6 , 8 9 3 , 6 2 5 号 ; 第 6 , 8  
 8 7 , 4 6 8 号 ; 第 6 , 8 8 7 , 4 6 6 号 ; 第 6 , 8 8 4 , 5 9 4 号 ; 第 6 , 8 8 1 , 4  
 0 5 号 ; 第 6 , 8 7 8 , 8 1 2 号 ; 第 6 , 8 7 5 , 5 8 0 号 ; 第 6 , 8 7 2 , 5 6 8 号 ;  
 第 6 , 8 6 7 , 0 0 6 号 ; 第 6 , 8 6 4 , 0 6 2 号 ; 第 6 , 8 6 1 , 5 1 1 号 ; 第 6 , 8  
 6 1 , 2 2 7 号 ; 第 6 , 8 6 1 , 2 2 6 号 ; 第 6 , 8 3 8 , 2 8 2 号 ; 第 6 , 8 3 5 , 5  
 4 9 号 ; 第 6 , 8 3 5 , 3 7 0 号 ; 第 6 , 8 2 4 , 7 8 0 号 ; 第 6 , 8 2 4 , 7 7 8 号 ;  
 第 6 , 8 1 2 , 2 0 6 号 ; 第 6 , 7 9 3 , 9 2 4 号 ; 第 6 , 7 8 3 , 7 5 8 号 ; 第 6 , 7  
 7 0 , 4 5 0 号 ; 第 6 , 7 6 7 , 7 1 1 号 ; 第 6 , 7 6 4 , 6 8 8 号 ; 第 6 , 7 6 4 , 6  
 8 1 号 ; 第 6 , 7 6 4 , 6 7 9 号 ; 第 6 , 7 4 3 , 8 9 8 号 ; 第 6 , 7 3 3 , 9 8 1 号 ;  
 第 6 , 7 3 0 , 3 0 7 号 ; 第 6 , 7 2 0 , 1 5 5 号 ; 第 6 , 7 1 6 , 9 6 6 号 ; 第 6 , 7  
 0 9 , 6 5 3 号 ; 第 6 , 6 9 3 , 1 7 6 号 ; 第 6 , 6 9 2 , 9 0 8 号 ; 第 6 , 6 8 9 , 6  
 0 7 号 ; 第 6 , 6 8 9 , 3 6 2 号 ; 第 6 , 6 8 9 , 3 5 5 号 ; 第 6 , 6 8 2 , 7 3 7 号 ;  
 第 6 , 6 8 2 , 7 3 6 号 ; 第 6 , 6 8 2 , 7 3 4 号 ; 第 6 , 6 7 3 , 3 4 4 号 ; 第 6 , 6  
 5 3 , 1 0 4 号 ; 第 6 , 6 5 2 , 8 5 2 号 ; 第 6 , 6 3 5 , 4 8 2 号 ; 第 6 , 6 3 0 , 1  
 4 4 号 ; 第 6 , 6 1 0 , 8 3 3 号 ; 第 6 , 6 1 0 , 2 9 4 号 ; 第 6 , 6 0 5 , 4 4 1 号 ;  
 第 6 , 6 0 5 , 2 7 9 号 ; 第 6 , 5 9 6 , 8 5 2 号 ; 第 6 , 5 9 2 , 8 6 8 号 ; 第 6 , 5  
 7 6 , 7 4 5 号 ; 第 6 , 5 7 2 ; 8 5 6 号 ; 第 6 , 5 6 6 , 0 7 6 号 ; 第 6 , 5 6 2 , 6  
 1 8 号 ; 第 6 , 5 4 5 , 1 3 0 号 ; 第 6 , 5 4 4 , 7 4 9 号 ; 第 6 , 5 3 4 , 0 5 8 号 ;  
 第 6 , 5 2 8 , 6 2 5 号 ; 第 6 , 5 2 8 , 2 6 9 号 ; 第 6 , 5 2 1 , 2 2 7 号 ; 第 6 , 5  
 1 8 , 4 0 4 号 ; 第 6 , 5 1 1 , 6 6 5 号 ; 第 6 , 4 9 1 , 9 1 5 号 ; 第 6 , 4 8 8 , 9  
 3 0 号 ; 第 6 , 4 8 2 , 5 9 8 号 ; 第 6 , 4 8 2 , 4 0 8 号 ; 第 6 , 4 7 9 , 2 4 7 号 ;  
 第 6 , 4 6 8 , 5 3 1 号 ; 第 6 , 4 6 8 , 5 2 9 号 ; 第 6 , 4 6 5 , 1 7 3 号 ; 第 6 , 4  
 6 1 , 8 2 3 号 ; 第 6 , 4 5 8 , 3 5 6 号 ; 第 6 , 4 5 5 , 0 4 4 号 ; 第 6 , 4 5 5 , 0  
 4 0 号 ; 第 6 , 4 5 1 , 3 1 0 号 ; 第 6 , 4 4 4 , 2 0 6 号 ; 第 6 , 4 4 1 , 1 4 3 号 ;  
 第 6 , 4 3 2 , 4 0 4 号 ; 第 6 , 4 3 2 , 4 0 2 号 ; 第 6 , 4 1 9 , 9 2 8 号 ; 第 6 , 4  
 1 3 , 7 2 6 号 ; 第 6 , 4 0 6 , 6 9 4 号 ; 第 6 , 4 0 3 , 7 7 0 号 ; 第 6 , 4 0 3 , 0  
 9 1 号 ; 第 6 , 3 9 5 , 2 7 6 号 ; 第 6 , 3 9 5 , 2 7 4 号 ; 第 6 , 3 8 7 , 3 5 0 号 ;  
 第 6 , 3 8 3 , 7 5 9 号 ; 第 6 , 3 8 3 , 4 8 4 号 ; 第 6 , 3 7 6 , 6 5 4 号 ; 第 6 , 3  
 7 2 , 2 1 5 号 ; 第 6 , 3 5 9 , 1 2 6 号 ; 第 6 , 3 5 5 , 4 8 1 号 ; 第 6 , 3 5 5 , 4  
 4 4 号 ; 第 6 , 3 5 5 , 2 4 5 号 ; 第 6 , 3 5 5 , 2 4 4 号 ; 第 6 , 3 4 6 , 2 4 6 号 ;  
 第 6 , 3 4 4 , 1 9 8 号 ; 第 6 , 3 4 0 , 5 7 1 号 ; 第 6 , 3 4 0 , 4 5 9 号 ; 第 6 , 3  
 3 1 , 1 7 5 号 ; 第 6 , 3 0 6 , 3 9 3 号 ; 第 6 , 2 5 4 , 8 6 8 号 ; 第 6 , 1 8 7 , 2  
 8 7 号 ; 第 6 , 1 8 3 , 7 4 4 号 ; 第 6 , 1 2 9 , 9 1 4 号 ; 第 6 , 1 2 0 , 7 6 7 号 ;  
 第 6 , 0 9 6 , 2 8 9 号 ; 第 6 , 0 7 7 , 4 9 9 号 ; 第 5 , 9 2 2 , 3 0 2 号 ; 第 5 , 8  
 7 4 , 5 4 0 号 ; 第 5 , 8 1 4 , 4 4 0 号 ; 第 5 , 7 9 8 , 2 2 9 号 ; 第 5 , 7 8 9 , 5  
 5 4 号 ; 第 5 , 7 7 6 , 4 5 6 号 ; 第 5 , 7 3 6 , 1 1 9 号 ; 第 5 , 7 1 6 , 5 9 5 号 ;  
 第 5 , 6 7 7 , 1 3 6 号 ; 第 5 , 5 8 7 , 4 5 9 号 ; 第 5 , 4 4 3 , 9 5 3 号 ; 第 5 , 5  
 2 5 , 3 3 8 号を参照されたい。これら文献の実施例部分は参照により本明細書に援用さ  
 れる。これらは単なる例示であり、幅多様な他の抗体およびそれらのハイブリドーマが当  
 業者に公知である。ほとんどの疾患関連抗原のいずれかに対する抗体の配列または抗体 -  
 分泌ハイブリドーマは、対象である選択した疾患関連標的に対する抗体を、A T C C、N  
 C B I、および/または U S P T O で単純に検索することにより入手し得ることを当業者  
 は理解している。クローン化した抗体の抗原結合ドメインは、当業者に公知である標準的  
 な技術を使用して増幅し、切断し、発現ベクターに連結し、適合した宿主細胞に遺伝子導

10

20

30

40

50

入されてもよく、かつ、タンパク質産生のために使用されてもよい（例えば、米国特許第7,531,327号；第7,537,930号；第7,608,425号および第7,785,880号を参照。これら文献の実施例部分は参照により本明細書に援用される）。

#### 【0062】

請求される方法および組成物の範囲内の癌治療に使用し得る特定の抗体として、限定するものではないが、LL1（抗CD74）、LL2またはRFB4（抗CD22）、ベルツズマブ（hA20、抗CD20）、リツキシマブ（rituxumab）（抗CD20）、オビヌツズマブ（GA101、抗CD20）、ランプロリズマブ（抗PD-1受容体）、ニボルマブ（抗PD-1受容体）、イピリムマブ（抗CTLA-4）、RS7（抗上皮糖タンパク質-1（EGP-1、TROP-2としても知られる））、PAM4またはKC4（両方とも抗ムチン）、MN-14（抗癌胎児性抗原（CEA、CD66eもしくはCEACAM5としても知られる））、MN-15またはMN-3（抗CEACAM6）、Mu-9（抗結腸特異抗原-p）、Immu 31（抗-フェトプロテイン）、R1（抗IGF-1R）、A19（抗CD19）、TAG-72（例えばCC49）、Tn、J591またはHuJ591（抗PSMA（前立腺特異的膜抗原））、AB-PG1-XG1-026（抗PSMA二量体）、D2/B（抗PSMA）、G250（抗炭酸脱水酵素IX MA b）、L243（抗HLA-DR）アレムツズマブ（抗CD52）、ペバシズマブ（抗VEGF）、セツキシマブ（抗EGFR）、ゲムツズマブ（抗CD33）、イブリツモマブチウキセタン（抗CD20）；パニツムマブ（抗EGFR）；トシツモマブ（抗CD20）；PAM4（アカテトラキセタン（akacclivatuzumab）、抗ムチン）およびトラスツズマブ（抗ErbB2）が挙げられる。このような抗体は当業者に公知である（例えば、米国特許第5,686,072号；第5,874,540号；第6,107,090号；第6,183,744号；第6,306,393号；第6,653,104号；第6,730,300号；第6,899,864号；第6,926,893号；第6,962,702号；第7,074,403号；第7,230,084号；第7,238,785号；第7,238,786号；第7,256,004号；第7,282,567号；第7,300,655号；第7,312,318号；第7,585,491号；第7,612,180号；第7,642,239号および米国特許出願公開公報第20050271671号；第20060193865号；第20060210475号；第20070087001号を参照。これらの各実施例部分は本明細書に援用される）。使用される特定の既知の抗体は、hPAM4（米国特許第7,282,567号）、hA20（米国特許第7,251,164号）、hA19（米国特許第7,109,304号）、hIMMU-31（米国特許第7,300,655号）、hLL1（米国特許第7,312,318号）、hLL2（米国特許第7,074,403号）、hMu-9（米国特許第7,387,773号）、hL243（米国特許第7,612,180号）、hMN-14（米国特許第6,676,924号）、hMN-15（米国特許第7,541,440号）、hR1（米国特許出願公開公報第12/772,645号）、hRS7（米国特許第7,238,785号）、hMN-3（米国特許第7,541,440号）、AB-PG1-XG1-026（米国特許出願公開公報第11/983,372号、ATCC PTA-4405およびPTA-4406として表される）、およびD2/B（国際特許公開公報第2009/130575号）を含み、これらの引用した特許または公開公報のテキストは図面および実施例部に関して参照により本明細書に援用される。

#### 【0063】

記載した複合体を使用して標的化し得る他の有益な抗原として、炭酸脱水酵素IX、B7、CCCL19、CCCL21、CSAp、HER-2/neu、BrE3、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20（例えば、C2B8、hA20、1F5 MA bs）、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b

10

20

30

40

50

、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD47、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CEACAM5、CEACAM6、CTLA-4、  
 -フェトプロテイン(AFP)、VEGF(例えば、AVASTIN(登録商標)、  
 フィブロネクチン スプライシング変異体)、ED-B フィブロネクチン(例えば、L19)、EGP-1(TROP-2)、EGP-2(例えば、17-1A)、EGF受容体(ErbB1)(例えば、ERBITUX(登録商標))、ErbB2、ErbB3、  
 H因子、FHL-1、Flt-3、葉酸受容体、Ga733、GRO-、HMGB-1、  
 低酸素誘導因子(HIF)、HM1.24、HER-2/neu、ヒストンH2B、  
 ヒストンH3、ヒストンH4、インスリン様増殖因子(ILGF)、IFN-、IFN-、  
 IFN-、IL-2R、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、IP-10、IGF-1R、Ia、  
 HM1.24、ガングリオシド、HCG、L243に結合するHLA-DR抗原、CD66抗原、  
 すなわちCD66a-dまたはそれらの組み合わせ、MAGE、mCRP、MCP-1、  
 MIP-1A、MIP-1B、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)、MUC1、MUC2、  
 MUC3、MUC4、MUC5ac、胎盤増殖因子(PLGF)、PSA(前立腺特異抗原)、  
 PSMA、PAM4抗原、PD-1受容体、PD-L1、NCA-95、NCA-90、A3、  
 A33、Ep-CAM、KS-1、Le(y)、メソセリン、S100、  
 テネイシン、TAC、Tn抗原、Thomas-Friedenreich抗原、  
 腫瘍壊死抗原、腫瘍血管新生抗原、TNF-、TRAIL受容体(R1およびR2)、  
 TROP-2、VEGFR、RANTES、T101、ならびに癌幹細胞抗原、  
 補体因子、C3、C3a、C3b、C5a、C5、ならびに癌遺伝子産物が挙げられる。

10

20

#### 【0064】

適切な抗原の総合的な解析(クラスター分類またはCD)は、造血性悪性細胞を標的とし、これはフローサイトメトリーにより示され、薬剤抱合型免疫治療用の適切な抗体を選択するガイドとなり得る(Craig and Foon, Blood prepubl  
 ished online January 15, 2008; DOL 10.1182  
 /blood-2007-11-120535)。

30

#### 【0065】

CD66抗原は、癌胎児性抗原(CEA)遺伝子ファミリーメンバーである、BCG、CGM6、NCA、CGM1、およびCEAによりそれぞれコードされるを備える同様の構造である、5つの異なる糖タンパク質CD66a-eからなる。これらのCD66抗原(例えばCEACAM6)は、顆粒球、消化管の正常な上皮細胞、および多様な組織の腫瘍細胞において主に発現する。癌の適切な標的として、NY-ESO-1などの精巣癌抗原(Theurillat et al., Int. J. Cancer 2007; 120(11):2411-7)、骨髄性白血病およびB細胞疾患のCD79a(Kozlov et al., Cancer Genet. Cytogenet. 2005; 163(1):62-7)、ならびに非ホジキンリンパ腫のCD79b(Poison et al., Blood 110(2):616-623)が含まれる。上述の多くの抗原は、2002年11月15日に出願の「Use of Multi-specific, Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics」との表題の米国仮特許出願第60/426,379号に開示される。癌幹細胞は、治療抵抗性前駆体悪性細胞の集合からもたらされ(Hill and Perris, J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99:1435-40)、前立腺癌(Maitland et al., Ernst Schering Found. Sympos. Proc. 2006; 5:155-79)、非小細胞性肺癌(Donnenberg et al., J. Control Rel

40

50

ease 2007; 122(3): 385-91)、および神経膠芽腫(Beier et al., Cancer Res. 2007; 67(9): 4010-5)におけるCD133、ならびに結腸直腸癌(Dalerba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(24): 10158-63)、膵臓癌(Liet al., Cancer Res. 2007; 67(3): 1030-7)、および頭頸部扁平上皮癌(Prince et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(3): 973-8)におけるCD44など、特定の種類の癌において標的化できる抗原を有する。乳癌の治療に有益な別の標的は、Taylorら(Biochem. J. 2003; 375: 51-9)により記載されるLIV-抗原である。

10

## 【0066】

多発性骨髄腫治療では、適切な標的化抗体は、例えば、CD38およびCD138(Stevenson, Mol Med 2006; 12(11-12): 345-346; Tassone et al., Blood 2004; 104(12): 3688-96)、CD74(Stein et al., ibid.)、CS1(Tai et al., Blood 2008; 112(4): 1329-37、およびCD40(Tai et al., 2005; Cancer Res. 65(13): 5898-5906)に対して記載されている。

## 【0067】

マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は、生来の適合性の免疫およびアポトーシスの重要な調節因子である。CD74は、MIFの内在性受容体である(Leng et al., 2003, J Exp Med 197: 1467-76)。MIF媒介型細胞内経路上の拮抗性抗CD74抗体の治療上の効果は、膀胱、前立腺、乳房、胚、結腸の癌、および慢性リンパ球性白血病(例えば、Meyer-Siegler et al., 2004, BMC Cancer 12: 34; Shachar & Haran, 2011, Leuk Lymphoma 52: 1446-54)、関節リウマチおよび全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患(Morand & Leech, 2005, Front Biosci 10: 12-22; Shachar & Haran, 2011, Leuk Lymphoma 52: 1446-54)、腎臓異種移植片拒絶などの腎疾患(Lan, 2008, Nephron Exp Nephrol. 109: e79-83)、ならびに多くの炎症性疾患(Meyer-Siegler et al., 2009, Mediators Inflamm epub March 22, 2009; Takahashi et al., 2009, Respir Res 10: 33)などの幅広い範囲の疾患状態の処置に使用されてもよい。ミラツズマブ(hLL1)は、MIF媒介疾患の治療のために治療に使用する例示的な抗CD74抗体である。

20

30

## 【0068】

抗TNF抗体は当業者に公知であり、自己免疫疾患、免疫機能不全(例えば異種移植片対宿主病、臓器移植の拒絶)などの免疫疾患または糖尿病を処置するために使用されてもよい。TNF- $\alpha$ に対する既知の抗体は、ヒト抗体CDP571(Ofei et al., 2011, Diabetes 45: 881-85); マウス抗体MTNFAI、M2TNFAI、M3TNFAI、M3TNFABI、M302B、およびM303(Thermo Scientific、イリノイ州ロックフォード); インフリキシマブ(Centocor、ペンシルバニア州マルバーン); セルトリズマブペゴル(UCB、ベルギーブリュッセル); およびアダリムマブ(Abbott、イリノイ州アボットパーク)が挙げられる。これらおよび他の多くの既知の抗-TNF抗体を、請求される方法および組成物に使用してもよい。免疫調節不全疾患または自己免疫疾患の治療のために使用される他の抗体としては、限定するものではないが、ベルツズマブ、エブラツズマブ、ミラツズマブ、またはhL243などの抗B細胞抗体; トシリズマブ(抗IL-6受容体); パシリキシマブ(抗CD25); ダクリズマブ(抗CD25); エファリズマブ(抗CD11a); ム口モナブ-CD3(抗CD3受容体); 抗CD40L(UCB、ベルギ

40

50

ーブリュッセル) ; ナタリズマブ ( 抗 4 インテグリン ) およびオマリズマブ ( 抗 I g E ) が挙げられる。

【 0 0 6 9 】

チェックポイント阻害剤抗体は癌治療に使用されている。免疫チェックポイントは、末梢組織の損傷を最小限にするために、自己寛容を維持し、かつ免疫系の応答の度合いを調製する役割を担う免疫系の阻害性経路と称する。しかしながら、腫瘍細胞も、腫瘍組織に対する免疫応答の効果を減少させるために、免疫系のチェックポイントを活性化できる。細胞障害性Tリンパ球抗原4 ( C T L A 4 、 C D 1 5 2 としても知られる ) 、プログラム化細胞死タンパク質1 ( P D 1 、 C D 2 7 9 としても知られる ) 、およびプログラム化細胞死1リガンド1 ( P D - L 1 、 C D 2 7 4 としても知られる ) に対する例示的なチェックポイント阻害剤の抗体は、疾患のある細胞、組織、または病原体に対する免疫応答の有効性を高めるために、1つ以上の他の薬剤と併用して使用してもよい。例示的な抗 - P D 1 抗体として、ランプロリズマブ ( M K - 3 4 7 5 , M E R C K ) 、ニボルマブ ( B M S - 9 3 6 5 5 8 、 B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B B ) 、 A M P - 2 2 4 ( M E R C K ) 、および p i d i l i z u m a b ( C T - 0 1 1 、 C U R E T E C H L T D ) が挙げられる。抗 P D 1 抗体は、例えば A B C A M ( 登録商標 ) ( A B 1 3 7 1 3 2 ) 、 B I O L E G E N D ( 登録商標 ) ( E H 1 2 . 2 H 7 、 R M P 1 - 1 4 ) および A F F Y M E T R I X E B I O S C I E N C E ( J 1 0 5 、 J 1 1 6 、 M I H 4 ) から、商業的に入手可能である。例示的な抗 - P D 1 抗体は、 M D X - 1 1 0 5 ( M E D A R E X ) 、 M E D I 4 7 3 6 ( M E D I M M U N E ) M P D L 3 2 8 0 A ( G E N E N T E C H ) 、 および B M S - 9 3 6 5 5 9 ( B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B B ) を含む。抗 P D 1 抗体も、例えば、 A F F Y M E T R I X E B I O S C I E N C E ( M I H 1 ) から商業的に入手可能である。例示的な抗 C T L A 4 抗体は、イピリムマブ ( B r i s t o l - M y e r s S q u i b b ) およびトレメリムマブ ( P F I Z E R ) を含む。抗 - P D 1 抗体は、例えば、 A B C A M ( 登録商標 ) ( A B 1 3 4 0 9 0 ) 、 S I N O B I O L O G I C A L I N C ( 1 1 1 5 9 - H 0 3 H 、 1 1 1 5 9 - H 0 8 H ) 、 および T H E R M O S C I E N T I F I C P I E R C E ( P A 5 - 2 9 5 7 2 、 P A 5 - 2 3 9 6 7 、 P A 5 - 2 6 4 6 5 、 M A 1 - 1 2 2 0 5 、 M A 1 - 3 5 9 1 4 ) から商業的に入手可能である。イピリムマブは、最近悪性黒色腫の処置に対して F D A に認可を受けた ( W a d a e t a l . , 2 0 1 3 , J T r a n s l M e d 1 1 : 8 9 ) 。

10

20

30

【 0 0 7 0 】

1 型および 2 型の糖尿病を、 C D 2 2 ( エブラツズマブおよび h R F B 4 ) 、 C D 7 4 ( ミラツズマブ ) 、 C D 1 9 ( h A 1 9 ) 、 C D 2 0 ( ベルツズマブ ) または H L A - D R ( h L 2 4 3 ) などの B 細胞抗原に対する既知の抗体を使用して処置してもよい ( 例えば、 W i n e r e t a l . , 2 0 1 1 , N a t u r e M e d 1 7 : 6 1 0 - 1 8 参照 ) 。抗 C D 3 抗体も、1 型糖尿病の治療に提案されている ( C e r n e a e t a l . , 2 0 1 0 , D i a b e t e s M e t a b R e v 2 6 : 6 0 2 - 0 5 ) 。

【 0 0 7 1 】

別の好ましい実施形態では、細胞表面上で急速に内部移行し、次いで再度発現し、細胞表面上で処理され提示される抗体を使用することにより、細胞による循環複合体の連続的な取り込みおよび付着を可能にする。最も好ましい抗体 / 抗原の対の例は、 L L 1 、抗 C D 7 4 M a b ( インパリアント鎖、クラス I I 特異的シャペロン、 I i ) 、 ( 例えば、米国特許第 6 , 6 5 3 , 1 0 4 号 ; 第 7 , 3 1 2 , 3 1 8 号参照。各実施例部は参照により本明細書に援用される ) 。 C D 7 4 抗原は、 B 細胞リンパ腫 ( 多発性骨髄腫を含む ) および白血病、特定の T 細胞リンパ腫、黒色腫、結腸、肺、および腎臓癌、神経膠芽腫、ならびに特定の他の癌上で高く発現する ( O n g e t a l . , I m m u n o l o g y 9 8 : 2 9 6 - 3 0 2 ( 1 9 9 9 ) ) 。癌における C D 7 4 の抗体の概説は、 S t e i n e t a l . , C l i n C a n c e r R e s . 2 0 0 7 S e p 1 5 ; 1 3 ( 1 8 P t 2 ) : 5 5 5 6 s - 5 5 6 3 s に含まれており、この文献は本明細書に参照として援用される。

40

50

## 【0072】

抗CD74抗体で好ましく処置される疾患は、限定するものではないが、非ホジキンリンパ腫、ホジキン疾患、黒色腫、肺、腎臓、結腸の癌、多形態の神経膠芽腫 (glioblastoma multiforme)、組織球腫、骨髄性白血病、および多発性骨髄腫を含む。標的細胞の表面上での短期間のCD74抗原の連続した発現の後の、抗原の内部移行、および抗原の再発現は、標的化LL1抗体を、この抗体を運搬する化学治療剤部位に加えて内部移行されるように標的化できる。このことにより、LL1化学治療剤複合体の治療のための高濃度を、このような細胞に集めることが可能となる。内部移行したLL1-化学治療剤複合体は、リソソームおよびエンドソームを介して循環され、化学治療部は、標的細胞内で、活性形態で放出される。

10

## 【0073】

別の好ましい実施形態では、病原体に対する抗体が知られているため、治療用複合体は病原体に対して使用できる。例えば、細菌、リケッチア、マイコプラズマ、原虫、真菌、およびウイルスなどの病原体により引き起こされるウイルス、細菌、真菌、および寄生虫を含む、感染性病変により産生されるか、または関連するマーカーと特異的に結合する抗体および抗体フラグメント、ならびにこのような微生物に関連する産物は、特に、Hansenらの米国特許第3,927,193号およびGoldenbergの米国特許第4,331,647号、第4,348,376号、第4,361,544号、第4,468,457号、第4,444,744号、第4,818,709号、および第4,624,846号に開示されており、これら文献および上記で引用したReichert and Dewitzの実施例部は参照により本明細書に援用される。感染症生物に対する抗体および他の標的を列挙した概説は、Casadevall, Clin Immunol 1999; 93(1): 5-15に記載されており、これは参照により本明細書に援用される。

20

## 【0074】

好ましい実施形態では、病原体は、米国特許第6,440,416号に開示されるように、HIVウイルス、マイコバクテリウム・ツベルクローシス、ストレプトコッカス・アガラクチア、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、レジオネラ (Legionella pneumophilia)、化膿性連鎖球菌、大腸菌 (エシェリキア・コリ)、ナイセリア・ゴノレー、ナイセリア・メニンギティディス、肺炎球菌、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、ヒストプラズマ・カプスラーツム、インフルエンザ菌B (Hemophilis influenzae B)、梅毒トレポネーマ、ライム病スピロヘータ、シュドモナス・エルジノーサ、らい菌、ブルセラ・アボルタス、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスI、単純ヘルペスウイルスII、ヒト血清パルボ様ウイルス、呼吸器多核体ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、マウス白血病ウイルス、ムンプスウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、いぼウイルス、ブルータングウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、サルウイルス40、マウス乳腺腫瘍ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、ウエストナイルウイルス、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、ランゲルトリパノソーマ、クルーズトリパノソーマ、ローデシアトリパノソーマ (Trypanosoma rhodesiense)、ブルセイトリパノソーマ、マンソン住血吸虫、日本住血吸虫、ウシバベシア、鶏盲腸コクシジウム、回旋糸状虫、熱帯リーシュマニア、旋毛虫、タイレリア・バルバ、胞状条虫、ヒツジ条虫、無鉤条虫、単包条虫、Mesocostoides corti、マイコプラズマ・アルスリチジス、マイコプラズマ・ハイオリニス、M. orale、M. arginini、アコレプラズマ・レイドロウイ、M. salivarium、およびマイコプラズマ・ニューモニエからなる群から選択され、この文献の実施例部は参照により本明細書に援用される。

30

40

## 【0075】

50



より好ましい実施形態では、抗gp120および抗HIV抗体などの他の物質を含む本発明の薬剤複合体は、エイズ患者のHIVに対する治療として使用でき、マイコバクテリウム・ツベルクローシスに対する抗体の薬剤複合体は、薬剤屈折性(drug-refractive)結核の治療に適している。抗gp120MAb(抗HIVMAb)およびPseudomonas exotoxinなどの毒素の融合タンパク質は、抗ウイルス性特性に関して試験されている(Van Oigen et al., J Drug Target, 5:75-91, 1998)。おそらくは不十分な効力または許容できない宿主の毒性のため、エイズ患者のHIV感染を処置する試みは失敗した。本発明のCPT薬剤複合体は、このようなタンパク質毒素の毒性副作用を欠いている利点を有し、したがって、エイズ患者のHIV感染を処置する際に有利に使用できる。これらの薬剤複合体を単独に使用してもよく、または単独で使用する場合にこのような患者に有効である他の抗生物質または治療剤と併用してもよい。候補となる抗HIV抗体は、Johanssonら(AIDS, 2006 Oct 3; 20(15):1911-5)により記載されるP4/D10抗エンペロープ抗体、およびPolymun(Vienna, Austria)により記載かつ販売されており、また米国特許第5,831,034号および第5,911,989号およびVcelar et al., AIDS 2007; 21(16):2161-2170 and Joos et al., Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50(5):1773-9に記載される抗HIV抗体を含み、これら文献の全ては参照により本明細書に援用される。耐性に打ち勝つために、HIV用の好ましい標的化剤は、これら抗体の様々な組み合わせである。

10

20

#### 【0076】

自己免疫疾患または免疫系調節不全(例えば異種移植片対宿主病、臓器移植の拒絶)を処置するために使用される抗体は当業者に公知であり、開示される方法および組成物を使用してP2PDoxにと抱合してもよい。自己免疫疾患/免疫機能不全疾患を処置するために使用される抗体は、限定するものではないが、BCL-1、BCL-2、BCL-6、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD41a、CD43、CD45、CD55、TNF-、インターフェロン、IL-6、およびHLA-DRを含む、例示的な抗原と結合してもよい。これら抗原および上述した他の標的抗原と結合する抗体を使用して、自己免疫疾患または免疫機能不全を処置してもよい。免疫複合体で処置し得る自己免疫疾患は、急性特発性血小板減少性紫斑病、慢性特発性血小板減少性紫斑病、皮膚筋炎、シデナム舞踏病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、真性糖尿病、ヘノッホ・シェンライン紫斑病、連鎖球菌性感染後腎炎、結節性紅斑、高安動脈炎、ANCA関連血管炎(ANCA-associated vasculitide)、アジソン病、関節リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、閉塞性血栓性血管炎(thromboangitis obliterans)、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本病、甲状腺中毒症、強皮症、慢性活動性肝炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発性軟骨炎、水疱性類天疱瘡、尋常性天疱瘡、ウェゲナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄癆、巨細胞性動脈炎/多発性筋痛、悪性貧血、急速進行性糸球体腎炎、乾癬または線維性肺胞炎を含んでもよい。

30

40

#### 【0077】

上述の抗体および疾患関連抗原に対する他の既知の抗体は、特許を請求する方法および組成物を実施する際に、P2PDox-複合体として使用してもよい。

#### 【0078】

##### 抗体フラグメント

特異的なエピトープを認識する抗体フラグメントを、既知の技術を使用して作製できる。抗体フラグメントは、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、scFvなどの抗体の

50

抗原結合部である。他の抗体フラグメントとして、限定するものではないが、抗体分子および Fab' フラグメントのペプシン消化により産生できる F(ab')<sub>2</sub> フラグメントを含み、F(ab')<sub>2</sub> フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより作製できる。あるいは、Fab' 発現ライブラリを構築して、望ましい特異性を有するモノクローナル Fab' フラグメントの迅速および簡易な同定を可能にできる (Huse et al., 1989, Science, 246: 1274 - 1281)。

【0079】

単一鎖 Fv 分子 (scFv) は、VL ドメインおよび VH ドメインを含む。VL および VL ドメインは、標的結合部位を形成するために関連付けられる。これら 2 つのドメインは、ペプチドリンカー (L) とさらに共役結合する。scFv 分子を作製し、適切なペプチドリンカーを設計する方法は、米国特許第 4,704,692 号および米国特許第 4,946,778 号、R. Raag and M. Whitlow, "Single Chain Fvs." FASEB Vol 9: 73 - 80 (1995) and R. E. Bird and B. W. Walker, "Single Chain Antibody Variable Regions," TIBTECH, Vol 9: 132 - 137 (1991) に開示されている。

10

【0080】

抗体フラグメントは、例えば、Goldenberg の米国特許第 4,036,945 号および第 4,331,647 号に開示されるように、既知の方法により調製できる。これら文献は参照により本明細書に含まれる。また、Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89: 230 (1960); Porter, Biochem. J. 73: 119 (1959), Edelman et al., in METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1, page 422 (Academic Press 1967)、および Coligan at pages 2.8.1 - 2.8.10 and 2.10. - 2.10.4 をも参照されたい。

20

【0081】

単一の相補性決定領域 (CDR) は、抗体が結合し、可変領域の残りよりも可変であるエピトープに構造的に相補性である抗体の可変領域のセグメントである。したがって、CDR は、高頻度可変領域と称する場合もある。可変領域は、3 つの CDR を含む。CDR ペプチドは、対象となる抗体の CDR をコードする遺伝子を構築することにより取得できる。このような遺伝子は、例えば、抗体産生細胞の RNA から可変領域を合成するポリメラーゼ鎖反応を使用することにより調製される (例えば、Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), pages 166 - 179 (Cambridge University Press 1995); and Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al., (eds.), pages 137 - 185 (Wiley-Liss, Inc. 1995) 参照)。

30

40

【0082】

抗体フラグメントの別の形態は、単一ドメイン抗体 (dAb) であり、場合によっては、単一鎖抗体と称する。単一ドメイン抗体を産生する技術は当業者に公知である (例えば、Cossins et al., Protein Expression and Purification, 2007, 51: 253 - 59; Shuntao et al., Molec Immunol 2006, 43: 1912 - 19; Tanha et

50

al., J. Biol. Chem. 2001, 276: 24774 - 780 参照)。

【0083】

特定の実施形態では、抗体のFc部などの抗体の配列は、血清の半減期などの、複合体の生理学的特徴を最適化するために変動してもよい。タンパク質のアミノ酸配列を置換する方法は、部位特異的変異誘発など、当業者に公知である(例えば Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed, 1989)。好ましい実施形態では、変異体は、Fc配列中の1つ以上のグリコシル化部位の添加または除去を含んでもよい(例えば、米国特許第6,254,868号参照。この実施例部は本明細書に援用される)。他の好ましい実施形態では、Fc配列における特異的なアミノ酸の置換が行われてもよい(例えば、Hornick et al., 2000, J Nucl Med 41: 355 - 62; Hinton et al., 2006, J Immunol 176: 346 - 56; Petkova et al. 2006, Int Immunol 18: 1759 - 69; 米国特許第7,217,797号; Hwang and Foote, 2005, Methods 36: 3 - 10; Clark, 2000, Immunol Today 21: 397 - 402; J Immunol 1976 117: 1056 - 60; Ellison et al., 1982, Nucl Acids Res 13: 4071 - 79; Stickler et al., 2011, Genes and Immunity 12: 213 - 21)。

10

【0084】

二重特異性抗体および多選択性抗体

二重特異性抗体は、多くの生物医学での使用に有益である。例えば、腫瘍細胞表面抗原およびT細胞表面受容体に対する結合部位を有する二重特異性抗体は、T細胞により特異的な腫瘍細胞の溶解を行うことができる。神経膠腫をおよびT細胞上のCD3エピトープを認識する二重特異性抗体をヒトの患者の脳腫瘍を処置する際に使用することが成功している(Nitta, et al. Lancet. 1990; 355: 368 - 371)。好ましい二重抗体は、抗CD3 X 抗CD19抗体である。代替的な実施形態では、抗CD3抗体または抗CD抗体のフラグメントを、抗CD3 X 抗CD20、抗CD3 X 抗CD22、抗CD3 X 抗HLA-DRまたは抗CD3 X 抗CD74などの、別のB細胞関連抗原に対する抗体またはフラグメントに付着させてもよい。特定の実施形態では、本明細書に開示される治療剤の抱合のための技術および組成物は、標的部としての二重特異性または多選択性の抗体と共に使用してもよい。

20

30

【0085】

二重特異性または多選択性の抗体を産生する多くの方法が、米国特許第7,405,320号に開示されるように知られている。この文献の実施例部は参照により援用される。二重特異性抗体は、2つの異なるハイブリドーマの融合を含む、クアドローマにより産生できる、これらそれぞれは異なる抗原部位を認識するモノクローナル抗体を産生する(Milstein and Cuello, Nature, 1983; 305: 537 - 540)。

【0086】

二重特異性抗体を産生する別の方法は、2つの異なるモノクローナル抗体を化学的に繋留するヘテロ二機能性の架橋剤を使用する(Staerz, et al. Nature, 1985; 314: 628 - 631; Perez, et al. Nature, 1985; 316: 354 - 356)。また、二重特異性抗体は、それぞれ半分の分子に対して2つのモノクローナル親抗体のそれぞれを還元することにより産生し、これを混合して、再び酸化させた後ハイブリッド構造を得ることが可能である(Staerz and Bevan. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83: 1453 - 1457)。別の代替案は、適切なリンカーを使用して、2つまたは3つの別々に生成したFab'フラグメントを化学的に架橋することを含む。(たとえば欧州特許出願第0453082号参照)。

40

50

## 【0087】

他の方法として、レトロウイルス由来のシャトルベクターを介してそれぞれの選択可能なマーカーをそれぞれ親ハイブリドーマに遺伝子導入することによるハイブリッドハイブリドーマであって、その後融合するハイブリドーマ (De Monte, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87: 2941-2945)、または異なる抗体の重鎖および軽鎖を含む発現プラスミドでのハイブリドーマ細胞の遺伝子導入の効率を改善することが含まれる

## 【0088】

同族の $V_H$ および $V_L$ ドメインは、適切な組成および長さ(通常、12超のアミノ酸残基からなる)のペプチドリンカーと結合して、結合活性を備える単鎖Fc(Fc)を形成できる。Fcを製造する方法は、米国特許第4,946,778号および米国特許第5,132,405号に開示されており、これらの各実施例部は参照により本明細書に援用される。12未満のアミノ酸残基の長さのペプチドリンカーの還元は、同一の鎖上の $V_H$ ドメインおよび $V_L$ ドメインの対形成を防止し、他の鎖上で相補的ドメインを備える $V_H$ ドメインおよび $V_L$ ドメインの対形成を強要することにより、官能性多量体の形成をもたらす。3~12のアミノ酸残基のリンカーと結合する $V_H$ ドメインおよび $V_L$ ドメインのポリペプチド鎖は、二量体(二重特異性抗体と称される)を優性的に形成する。0~2のアミノ酸残基を用いて、三量体(三重特異性抗体と称される)および四量体(四重特異性抗体と称される)が好ましいが、オリゴマー化の精確なパターンは、リンカーの長さに加え、Vドメイン( $V_H$ -リンカー- $V_L$ または $V_L$ -リンカー- $V_H$ )の配向と同様、組成に依存することが明らかである。

## 【0089】

多選択性または二重特異性抗体を産生するこれらの技術は、低収率、精製の必要性、低い安定性、または技術開発に多くの労働力が必要との観点から、様々な困難があるとされる。さらに最近、DNL(「dock and lock」)として知られる技術を利用して、実質的に任意の望ましい抗体、抗体フラグメント、および他のエフェクター分子の組み合わせが産生されている(例えば、米国特許第7,521,056号、第7,527,787号、第7,534,866号、第7,550,143号、第7,666,400号、第7,858,070号、第7,871,622号、第7,906,121号、第7,906,118号、第8,163,291号、第7,901,680号、第7,981,398号、第8,003,111号、および第8,034,352号参照。これらの各実施例部は参照により本明細書に援用される)。この技術は、アンカードメイン(AD)、ならびにDDD(dimerization and docking domain)と称する、相補性タンパク質結合ドメインを利用し、これらは、互いに結合し、二量体、三量体、四量体、および五量体の範囲の複合構造のアセンブリを可能にする。これらは、過度に精製することなく高い収率で安定した複合体を形成する。DNA技法は、単一特異性、二重特異性、または多選択性の抗体のアセンブリを可能にする。二重特異性抗体または多選択性抗体を作製する当業者に公知の技術のいずれかは、本明細書で請求される方法を実施する際に利用されてもよい。

## 【0090】

多様な実施形態では、本明細書に開示される複合体は、複合体型多選択性抗体の一部であってもよい。このような抗体は、異なる特異性を有する2つ以上の異なる抗原結合部位を含んでよい。多選択性複合体は、同一の抗原の異なるエピトープと結合してもよく、またあるいは、2つの異なる抗原と結合してもよい。

## 【0091】

DOCK-AND-LOCK(商標)DNL(商標)

好ましい実施形態では、二価または多価の抗体は、DOCK-AND-LOCK(商標)(DNL(商標)複合体として形成される(例えば、米国特許第7,521,056号、第7,527,787号、第7,534,866号、第7,550,143号、第7,666,400号、第7,858,070号、第7,871,622号、第7,906,

10

20

30

40

50

121号、第7,906,118号、第8,163,291号、第7,901,680号、第7,981,398号、第8,003,111号、および第8,034,352号参照。これらの各実施例部は参照により本明細書に援用される)。一般的に、この技術は、cAMP依存型タンパク質キナーゼ(PKA)の制御型(R)サブユニットのDDD(dimerization and docking domain)および様々なAKAPタンパク質のいずれかに由来するアノードメイン(AD)の間で起こる特異的な高親和性の結合相互作用の利点が見られる(Baillie et al., FEBS Letters. 2005; 579: 3264. Wong and Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 959)。DDDおよびADペプチドは、任意のタンパク質、ペプチド、または他の分子に付着してもよい。DDD配列は、同時に、AD配列を二量体化し、かつAD配列に結合するため、この技術により、DDDまたはAD配列に付着し得る任意の選択した分子間の複合体形成を可能にする。

10

20

30

40

50

#### 【0092】

標準的なDNL(商標)複合体は1つのAD結合型分子に付着した2つのDDD結合型分子を有するトリマーを含むが、複合体構造の変異体は、2量体、3量体、4量体、5量体、および他の多量体の形成を可能にする。一部の実施形態では、DNL(商標)複合体は、同一の抗原決定基または2つ以上の異なる抗原に結合する2つ以上の抗体、抗体フラグメント、または融合タンパク質を含んでもよい。また、DNL(商標)複合体は、タンパク質、ペプチド、免疫調製物質、サイトカイン、インターロイキン、インターフェロン、結合タンパク質、ペプチドリガンド、キャリアタンパク質、毒素、オンコナーゼ(onconase)などのリボヌクレアーゼ、siRNAなどの阻害性オリゴヌクレオチド、抗原または異種抗原、PEGなどのポリマー、酵素、治療剤、ホルモン、細胞傷害剤、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、または他のいずれかの分子もしくは凝集体などの1つ以上の他のエフェクターを含んでもよい。

#### 【0093】

PKAは、Rサブユニットに第2のメッセンジャーcAMPを結合することにより引き金となる最も試験されているシグナル伝達経路の1つにおいて中心的な役割を果たしており、1968年にウサギの骨格筋から最初に単離された(Walsh et al., J. Biol. Chem. 1968; 243: 3763)。ホロ酵素の構造は、Rサブユニットの不活性形態中に保持される2つの触媒サブユニットからなる(Taylor, J. Biol. Chem. 1989; 264: 8443)。PKAのイソ酵素は、2種類のRサブユニットで見いだされており(RIおよびRII)それぞれがアイソフォームおよびBアイソフォームを有する(Scott, Pharmacol. Ther. 1991; 50: 123)。したがって、PKA制御サブユニットの4つのアイソフォームは、RI、RI、RII およびRII である。Rサブユニットは、安定した二量体としてのみ単離されており、二量体化ドメインは、RII の第1の44のアミノ末端残基からなることが示されている(Newlon et al., Nat. Struct. Biol. 1999; 6: 222)。以下に論述するように、他の制御サブユニットのアミノ酸配列の類似する部分は、二量体化およびドッキングに関与しており、それぞれは、制御サブユニットのN末端の近くに位置している。cAMPをRサブユニットに結合することは、幅広いスペクトラムのセリン/スレオニンキナーゼ活性に対する活性触媒サブユニットの放出をもたらし、これにより、AKPとのドッキングを介するPKAの区別を通して選択された基質に向けて配向される(Scott et al., J. Biol. Chem. 1990; 265: 21561)。

#### 【0094】

第1のAKAPである、微小管関連タンパク質2は1984年に特徴付けられてから(Lohmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81: 6723)、原形成質膜、アクチン細胞骨格、核、ミトコンドリア、および小胞体を含む、様々な細胞小器官に局在する50超のAKAPが、酵母からヒトにわたる多様な種の構造内で同定されてきた(Wong and Scott, Nat. Rev.

Mol. Cell Biol. 2004; 5: 959). The AD of AKAPs for PKA is an amphipathic helix of 14-18 residues (Carr et al., J. Biol. Chem. 1991; 266: 14188). ADのアミノ酸配列は、個々のAKAPにわたって高く変動し、この際、RII二量体の結合親和性は、2~90nMの範囲である(Alto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100: 4445)。AKAPは、二量体のRサブユニットにのみ結合する。ヒトのRIIでは、ADは、23のアミノ末端残基により形成される疎水性表面に結合する(Colledge and Scott, Trends Cell Biol. 1999; 6: 216)。したがって、ヒトRIIの二量体化ドメインおよびAKAP結合ドメインは、同一のN末端の44アミノ酸配列内に配置されており(Newlon et al., Nat. Struct. Biol. 1999; 6: 222; Newlon et al., EMBO J. 2001; 20: 1651)、これを本明細書中でDDDと称する。

#### 【0095】

本出願人は、ヒトPKA制御サブユニットのDDD、および任意の2つの実体をドッキングする優れた1対のリンカー分子としてのAKAPのADを利用するプラットフォーム技術を開発した。この2つの実体は非共有結合複合体内でAおよびBを指し、ジスルフィド結合の形成を促進する目的の位置で、DDDおよびADD内へのシステイン残基の導入を介してDNL(商標)複合体にさらにロックされる場合がある。この手法の一般的な方法は以下の通りである。実体Aは、Aの前駆体にDDD配列を結合することにより構築され、以下でaと表される第1の成分をもたらす。DDD配列は二量体の自発的生成に影響するため、Aは、a<sub>2</sub>を含む。実体Bは、Bの前駆体にAD配列を結合することにより構築され、以下でbと表される第2の成分をもたらす。a<sub>2</sub>に含まれるDDDの二量体モチーフは、bに含まれるAD配列に結合するドッキング部位を作製することにより、a<sub>2</sub>およびbのすでにある会合を促進してa<sub>2</sub>bを含む二量体または三量体の複合体を形成する。この結合事象は、ジスルフィド架橋を介して2つの実体を共役結合的に結合するその後の反応と不可逆的なものであり、最初の結合相互作用は、DDDおよびAD上に配置した反応性チオール基を近接させて部位特異的に結合するため、効率的な局所濃度の原則に基づきこの事象は非常に効率よく行われる(Chmura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98: 8480)。リンカー、アダプター分子、および前駆体の多様な組み合わせを使用して、幅広い範囲の異なる化学量論のDNL(商標)構築物を生成かつ使用してもよい(例えば、米国特許第7,550,143号;第7,521,056号;第7,534,866号;第7,527,787号および第7,666,400号参照)。

#### 【0096】

2つの前駆体の官能基から離れた状態でDDDおよびADを付着させることにより、このような部位特異的連結が、2つの前駆体の元々の活性を保存することも予測される。この手法は、自然にあるモジュラー式であり、ペプチド、タンパク質、抗体、抗体フラグメント、および幅広い範囲の活性を備える他のエフェクター分子を含む、幅広い範囲の部位特異的かつ共役結合性基質に使用できる。以下の実施例に記載されるADおよびDDD抱合型エフェクターを構築する融合タンパク質を利用することにより、実質的に、任意のタンパク質またはペプチドを、DNL(商標)構築物に組み込んでよい。しかしながら、本技術は限定されるものではなく、他の抱合方法を利用してもよい。

#### 【0097】

核酸合成、ハイブリダイゼーション、および/または増幅を含む、融合タンパク質を作製して、対象となる融合タンパク質をコードする合成二本鎖核酸を産生する様々な方法が知られている。標準的な分子生物学の技術により、このような二本鎖核酸を融合タンパク質産生のため発現ベクター内に挿入してもよい(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed, 1989参照)。このような好ましい実施形態では、ADおよび/または

DDD部は、エフェクタータンパク質またはペプチドのN末端またはC末端のいずれかに付着されてもよい。しかしながら、当業者は、エフェクター部位に対するADまたはDDD部の付着部位が、エフェクター部位および生理学的活性に関与するエフェクター部位の一部の化学的性質に応じて変動し得ることを理解するものである。多様なエフェクター部位の部位特異的な付着は、二価架橋試薬および/または他の化学結合技術の使用など、当業者に公知の技術を使用して実施してもよい。

【0098】

多様な実施形態では、以下に詳細に記載されているように、例えば、抗体の重鎖のC末端にDDDまたはAD部位を付着させることにより、抗体または抗体フラグメントをDNL(商標)複合体に組み込んでもよい。より好ましい実施形態では、DDDまたはAD部位、より好ましくは、AD部位は、抗体の軽鎖のC末端に付着させてもよい(例えば、2013年5月24日に出願した米国特許仮出願番号第13/901,737号参照。この実施例部は参照により本明細書に援用される)。

10

【0099】

ADおよびDDD部位の構造 - 機能の関係

異なる種類のDNL(商標)構築物では、異なるADまたはDDDの配列を利用してもよい。例示的なDDDおよびADの配列を以下に提供する。

DDD1

SHIQIPPGLT ELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(配列番号:1)

20

DDD2

CGHIQIPPGLT ELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA(配列番号:2)

AD1

QIEYLAKQIVDNAIQQA(配列番号:3)

AD2

CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC(配列番号:4)

【0100】

当業者は、DDD1およびDDD2は、タンパク質キナーゼAのヒトRIIアイソフォームのDDD配列に基づくことを理解するものである。しかしながら、代替的な実施形態では、DDD3、DDD3CおよびAD3に以下に例示されるように、DDDおよびAD部位はタンパク質キナーゼAのヒトRI形態のDDD配列および対応するAKAP配列に基づいてもよい。

30

DDD3

SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK(配列番号:5)

DDD3C

MSCGGS LRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK(配列番号:6)

AD3

CGFEELAWKIAKMIWSDVFQQGC(配列番号:7)

40

【0101】

他の代替的な実施形態では、ADおよび/またはDDD部位の他の配列変異体を、DNL(商標)複合体の構築に利用してもよい。例えば、PKARI、RII、RI、およびRIIのDDD部位に対応するヒトPKA DDD配列の4つの変異体のみが存在する。RIIのDDD配列は、上記に開示されたDDD1およびDDD2に基づく。4つのヒトPLA DDD配列を以下に示す。DDD配列は、残基1~44のRII、1~44のRII、12~61のRI、および13~66のRIを表す(DDD1の配列は、ヒトPKARI DDD部位からわずかに改変されていることに留意されたい)。

50

P K A R I  
S L R E C E L Y V Q K H N I Q A L L K D V S I V Q L C T A R P E R P M A F L R E  
Y F E K L E K E E A K ( 配列番号 : 8 )

P K A R I  
S L K G C E L Y V Q L H G I Q Q V L K D C I V H L C I S K P E R P M K F L R E H  
F E K L E K E E N R Q I L A ( 配列番号 : 9 )

P K A R I I  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V G Q Q P P D L V D F A V E Y F T R L R E  
A R R Q ( 配列番号 : 10 )

P K A R I I  
S I E I P A G L T E L L Q G F T V E V L R H Q P A D L L E F A L Q H F T R L Q Q  
E N E R ( 配列番号 : 11 )

10

#### 【0102】

A D および D D D ドメインの構造 - 機能の関係性は、調査の対象である ( 例えば、B u r n s - H a m u r o e t a l . , 2 0 0 5 , P r o t e i n S c i 1 4 : 2 9 8 2 - 9 2 ; C a r r e t a l . , 2 0 0 1 , J B i o l C h e m 2 7 6 : 1 7 3 3 2 - 3 8 ; A l t o e t a l . , 2 0 0 3 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A 1 0 0 : 4 4 4 5 - 5 0 ; H u n d s r u c k e r e t a l . , 2 0 0 6 , B i o c h e m J 3 9 6 : 2 9 7 - 3 0 6 ; S t o k k a e t a l . , 2 0 0 6 , B i o c h e m J 4 0 0 : 4 9 3 - 9 9 ; G o l d e t a l . , 2 0 0 6 , M o l C e l l 2 4 : 3 8 3 - 9 5 ; K i n d e r m a n e t a l . , 2 0 0 6 , M o l C e l l 2 4 : 3 9 7 - 4 0 8 参照。これら文献のテキスト全体は、参照により本明細書に援用される ) 。

20

#### 【0103】

例えば、K i n d e r m a n ら ( 2 0 0 6 , M o l C e l l 2 4 : 3 9 7 - 4 0 8 ) は、A D - D D D 結合相互作用の結晶構造を試験し、ヒト D D D 配列は、以下の配列番号 1 の下線部が引かれている、二量体形態または A K A P 結合のいずれかに重要である保存された多くのアミノ酸残基を含むと結論付けた ( K i n d e r m a n e t a l . , 2 0 0 6 の図 1 を参照。この文献は参照により本明細書に援用される ) 。当業者は、D D D 配列の配列変異体を設計する際に、保存されたアミノ酸置換が、二量体化および A K A P 結合にあまり重要ではない残基で行われる間は、下線が引かれた残基の変化を回避することが望ましいことを理解するものである。

30

#### 【化 1】

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA

( 配列番号 : 1 )

#### 【0104】

以下に詳細に論述されるように、保存されたアミノ酸の置換は、12 の共通する L アミノ酸のそれぞれにより特徴付けられている。したがって、K i n d e r m a n ( 2 0 0 6 ) のデータおよび保存されたアミノ酸の置換に基づき、配列番号 1 に基づく潜在的に代替的な D D D 配列を表 2 に示す。表 2 を考案する際、非常に保存されたアミノ酸置換のみが考慮された。例えば、変化した残基は、同一に変化した残基のみで置換され、小さな側鎖を備える残基は、同様の寸法の残基で置換され、ヒドロキシル側鎖は、他のヒドロキシルのみと置換されるなどがある。アミノ酸の二次構造上のプロリン固有の作用のため、他の残基はプロリンに置換されない。このような潜在的に代替的な D D D 部の配列の限定した数を、以下の配列番号 1 2 ~ 配列番号 3 1 に示す。当業者は、D D D 部に属する限定されない数の代替的な種 ( 配列 ) は、例えば、市販のペプチドシンセサイザーまたは公知の部位特異的変異誘発技術を使用した標準的な技術により構築できる。また、A D 部位結合上のアミノ酸置換の作用は、例えば、A l t o ら ( 2 0 0 3 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A 1 0 0 : 4 4 4 5 - 5 0 ) により記載されるように標準的な結合ア

40

50



ッセイにより容易に判定されてもよい。

【表 2】

表 2. DDD 1 における保存されたアミノ酸配列の置換 (配列番号 1)。配列番号 87 として開示されたコンセンサス配列

<b>S</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>Q</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	
T	K		N				A		S	D			N	A		S		D			K	
R																						

<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>Y</b>	<b>F</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>A</b>
N	N			E			D		L		D			S	K		K	D	L	K	L
									I										I		I
									V										V		V

10

THIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 12)

SKIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 13)

SRIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 14)

20

SHINIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 15)

SHIQIPPALTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 16)

SHIQIPPGLSELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 17)

SHIQIPPGLTDLLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 18)

SHIQIPPGLTELLNGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 19)

30

SHIQIPPGLTELLQAYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 20)

SHIQIPPGLTELLQGYSVLEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 21)

SHIQIPPGLTELLQGYTVLDVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 22)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLKQQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 23)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRNQPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 24)

40

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQNPPDLVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 25)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPELVEFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 26)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVDFAVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 27)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFLVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 28)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFIVEYFTRLRE  
E A R A (配列番号: 29)

50

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFVVEYFTRLREARA (配列番号: 30)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVDYFTRLREARA (配列番号: 31)

【0105】

Altoら(2003, Proc Natl Acad Sci USA 100: 4445-50)は、0.4nMのDDDの結合定数で、AKAP-IS (配列番号: 3) と呼ばれるRII選択的AD配列を設計するため、多様なAKAPタンパク質のAD配列を生物情報学的に解析した。AKAP-IS配列は、PKAに結合するAKAPのペプチドアンタゴニストとして設計した。置換がDDDへの結合を減少させるAKAP-IS配列中の残基は、以下の配列番号3で下線が引かれている。当業者は、AD配列の配列変異体を設計する際に、保存されたアミノ酸の置換が、DDD結合にあまり重要ではない残基で作製されながら、下線が引かれた残基のいずれかの変化を避けることが望ましいことを理解するものである。図3は、上記の表2のDDD1 (配列番号: 1) に示される置換と同様に、AKAP-IS (AD1、配列番号: 3) の配列中の潜在的に保存されたアミノ酸置換を示す。

10

【0106】

このような限定された数の潜在的に代替的なAD部位配列を、以下の配列番号32~配列番号49に示す。繰り返すが、潜在的なAD部位配列に属する非常に多くの配列(種)は、Altoら(2003)のデータに基づき当業者により作製、試験かつ、使用できる。Alto(2003)の図2は、実際の結合実験に基づき、DDD部位に結合活性を保持しながら、作製し得るさらに多くの潜在的なアミノ酸置換を示す。

20

【化2】

AKAP-IS

QIEYLAKQIVDNAIQQA

(配列番号: 3)

【表3】

表3. AD1において保存されたアミノ酸置換(配列番号3)。配列番号88として開示されるコンセンサス配列

30

Q	I	E	Y	L	<u>A</u>	K	Q	<u>I</u>	<u>V</u>	D	N	<u>A</u>	<u>I</u>	Q	Q	A
N	L V	D	F T S	I V		R	N			E	Q			N	N	L I V

NIEYLAKQIVDNAIQQA (配列番号: 32)

QLEYLAKQIVDNAIQQA (配列番号: 33)

QVEYLAKQIVDNAIQQA (配列番号: 34)

QIDYLAKQIVDNAIQQA (配列番号: 35)

QIEFLAKQIVDNAIQQA (配列番号: 36)

QIETLAKQIVDNAIQQA (配列番号: 37)

QIESLAKQIVDNAIQQA (配列番号: 38)

QIEYIAKQIVDNAIQQA (配列番号: 39)

QIEYVAKQIVDNAIQQA (配列番号: 40)

QIEYLARQIVDNAIQQA (配列番号: 41)

QIEYLAKNIVDNAIQQA (配列番号: 42)

QIEYLAKQIVENAIQQA (配列番号: 43)

QIEYLAKQIVDQAIQQA (配列番号: 44)

40

50

Q I E Y L A K Q I V D N A I N Q A ( 配列番号 : 4 5 )  
 Q I E Y L A K Q I V D N A I Q N A ( 配列番号 : 4 6 )  
 Q I E Y L A K Q I V D N A I Q Q L ( 配列番号 : 4 7 )  
 Q I E Y L A K Q I V D N A I Q Q I ( 配列番号 : 4 8 )  
 Q I E Y L A K Q I V D N A I Q Q V ( 配列番号 : 4 9 )  
 【 0 1 0 7 】

Goldら(2006, Mol Cell 24:383-95)は、結晶学およびペプチドスクリーニングを利用して、RIアイソフォームと比較してPKAのRIIアイソフォームに対して5桁の大きさの非常に大きな選択性を示すSuperAKAP-IS配列(配列番号50)を開発した。下線が引かれた残基は、RIIのDDD部位との結合を増大させる、AKAP-IS配列に対するアミノ酸置換の位置を示す。この配列では、N末端のQ残基は、残基の数が4と番号が付けられ、C末端のA残基は、残基数20である。置換がRIIの親和性に影響を与え得る残基は、残基8、11、15、16、18、19、および20(Gold et al., 2006)であった。特定の代替な実施形態では、SuperAKAP-IS配列は、DNL(商標)構築物を調製するために、AKAP-IS AD部配列に置換されてもよい。AKAP-IS AD配列に置換され得る他の代替的な配列を、配列番号51~53に示す。AKAP-IS配列に対する置換に下線が引かれている。配列番号4に示されるAD2配列を用いて、AD部はまた、追加的なN末端残基のシステインおよびグリシン、ならびにC末端残基のグリシンおよびシステインを含んでもよいことが予測される。

10

20

【化3】

SuperAKAP-IS

QIEYVAKQIVDYAIHQA (配列番号50)

代替的なAKAP 配列

QIEYKAKQIVDHAIHQA (配列番号51)

QIEYHAKQIVDHAIHQA (配列番号52)

QIEYVAKQIVDHAIHQA (配列番号53)

30

【0108】

Goldらの図2は、以下に示す様々なAKAPタンパク質由来の追加的なDDD結合配列を開示した。

RII - 特異的 AKAPs

AKAP - KL

PLEYQAGLLVQNAIQQA I (配列番号: 54)

AKAP79

LLIETASSLVKNAIQLSI (配列番号: 55)

AKAP - Lbc

LIEEAASRIVDAVIEQVK (配列番号: 56)

40

RI - 特異的 AKAPs

AKAPce

ALYQFADRFSELVISEAL (配列番号: 57)

RIAD

LEQVANQLADQIIKEAT (配列番号: 58)

PV38

FEE LAWKIAKMIWSDVF (配列番号: 59)

Dual - 特異的 AKAPs

AKAP7

ELVRLSKRLVENAVLKAV (配列番号: 60)

50

M A P 2 D

T A E E V S A R I V Q V V T A E A V ( 配列番号 : 6 1 )

D A K A P 1

Q I K Q A A F Q L I S Q V I L E A T ( 配列番号 : 6 2 )

D A K A P 2

L A W K I A K M I V S D V M Q Q ( 配列番号 : 6 3 )

【 0 1 0 9 】

Stokkara (2006, Biochem J 400:493-99) はまた、配列番号 64 ~ 66 に示される。PKA に結合する AKAP のペプチド競合物質をも開発した。ペプチドアンタゴニストは、Ht31 (配列番号: 64)、RIAD (配列番号: 65)、および PV-38 (配列番号: 66) として設計した。Ht-31 ペプチドは、PKA の RII アイソフォームに高い親和性を示し、RIAD はおよび PV-38 は RII に高い親和性をしめした。

10

H t 3 1

D L I E E A A S R I V D A V I E Q V K A A G A Y ( 配列番号 : 6 4 )

R I A D

L E Q Y A N Q L A D Q I I K E A T E ( 配列番号 : 6 5 )

P V - 3 8

F E E L A W K I A K M I W S D V F Q Q C ( 配列番号 : 6 6 )

【 0 1 1 0 】

Hundsrucker (2006, Biochem J 396:297-306) は、PKA の RII 形態の DDD に対して 0.4 nM の低い結合定数を有する、PKA に対する AKAP 結合に対する他のペプチド競合物質をさらに開発した。様々な AKAP アンタゴニストペプチドの配列を、Hundsrucker の表 1 に提供し、以下の表 4 に再度作製した。AKAPIS は、合成 RII サブユニット結合ペプチドを表す。他の全てのペプチドは、指定した AKAP の RII 結合ドメインに由来する。

20

## 【表 4】

表 4 : AKAP ペプチド配列

ペプチド配列		
AKAPIS	QIEYLAKQIVDNAIQQA (配列番号: 3)	
AKAPIS-P	QIEYLAKQIPDNAIQQA (配列番号: 67)	
Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG (配列番号: 68)	
Ht31-P	KGADLIEEAASRIPDAPIEQVKAAG (配列番号: 69)	
AKAP7 $\delta$ -wt-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY (配列番号: 70)	
AKAP7 $\delta$ -L304T-pep	PEDAELVRTSKRLVENAVLKA VQQY (配列番号: 71)	10
AKAP7 $\delta$ -L308D-pep	PEDAELVRLSKRDVENAVLKA VQQY (配列番号: 72)	
AKAP7 $\delta$ -P-pep	PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY (配列番号: 73)	
AKAP7 $\delta$ -PP-pep	PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY (配列番号: 74)	
AKAP7 $\delta$ -L314E-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVEKA VQQY (配列番号: 75)	
AKAP1-pep	EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA (配列番号: 76)	20
AKAP2-pep	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ (配列番号: 77)	
AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL (配列番号: 78)	
AKAP9-pep	LEKQYQEQLLEEVAKVIVSMSIAFA (配列番号: 79)	
AKAP10-pep	NTDEAQEELAWKIAKMIVSDIMQQA (配列番号: 80)	
AKAP11-pep	VNLDDKAVLAEKIVAEAIKKAEREL (配列番 号: 81)	30
AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNI IQTAVDQF (配列番 号: 82)	
AKAP14-pep	TQDKNYEDEL TQVALALVEDVINYA (配列番 号: 83)	
Rab32-pep	ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH (配列番 号: 84)	

## 【0111】

異なる AKAP タンパク質の AD ドメインにおいて非常に保存された残基は、AKAP IS 配列 (配列番号 3) を参照して下線を引くことにより以下に示される。残基は、C 40  
末端のアラニン残基に加えて、Altoら (2003) により観察されるものと同一である (Hundsruckerら (2006) の図 4 を参照。この文献は参照により本明細書に援用される)。RII DDD 配列に特に高い親和性を有するペプチドアンタゴニストの配列は、AKAP-IS、AKAP7-wt-pep、AKAP7-L304T-pep および AKAP7-L308D-pep の配列であった。

【化4】

AKAP-IS

QIEYLAKQIVDNAIQQA

(配列番号：3)

【0112】

Carrら(2001, J Biol Chem 276:17332-38)は、ヒトおよび非ヒトタンパク質と異なるAKAP結合DDD配列間の配列の相同性の度合いを試験し、かつ、異なるDDD部において最も高く保存されると明らかになったDDD配列中の残基を同定した。これらはを配列番号1のヒトPKARII DDD配列を参照して下線を引くことにより以下に示す。特に保存される残基をイタリック体によりさらに示す。この残基は、AKAPタンパク質への結合に重要である、Kindermanら(2006)により示唆される配列と重複するが、同一の配列ではない。当業者は、DDDの配列変異体を設計する際に、保存されたアミノ酸の置換が、下線が引かれておらず、イタリック体でもない残基を考慮しながら、最も保存された残基(イタリック体)の変化を避けることが最も好ましく、同様に、保存した残基(下線)の変化を避けることが好ましい。

10

【化5】

20

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA

(配列番号：1)

【0113】

Carrら(2001)のデータに基づき、改変された一連のDDD1(配列番号1)配列の保存されたアミノ酸置換を表5に示す。この還元された一連の置換された配列を用いてさえ、過度の実験を行うことなく当業者により、産生、試験、かつ使用され得る多くの代替的なDDD部位の配列が存在する可能性がある。当業者は、表2および表3で上記に開示したこのような代替的なDDDアミノ酸配列を容易に導くことができる。

30

【表5】

表5：DDD1における保存されたアミノ酸配列の置換(配列番号1)。配列番号89として開示されるコンセンサス配列

S	<u>H</u>	<u>I</u>	Q	<u>I</u>	<u>P</u>	P	<u>G</u>	<u>L</u>	T	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	Q	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	V	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>R</u>
T			N						S								I				
																	L				
																	A				

Q	<u>Q</u>	<u>P</u>	P	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	V	E	<u>Y</u>	<u>F</u>	T	R	<u>L</u>	R	<u>E</u>	A	<u>R</u>	A
N										I	D			S	K		K		L		L
										L									I		I
										A									V		V

40

【0114】

当業者は、DDDまたはADアミノ酸配列におけるこれらのアミノ酸置換および他のアミノ酸置換を使用して、この分野の標準であり、単なる通常の実験である技術を使用して、ADまたはDDD部位の属内の代替的な配列(種)を産生してもよい。

【0115】

50

### アミノ酸の置換

代替的な実施形態では、本開示の方法および組成物は、1つ以上の置換したアミノ酸残基を備えるタンパク質またはペプチドの産生および使用を含んでもよい。例えば、DNL（商標）を作製するために使用されるDDDおよび/またはAD配列は、上述のように改変されてもよい。

#### 【0116】

当業者は、一般的に、アミノ酸の置換は、概して、あるアミノ酸と同様の特性の別のアミノ酸との置換（すなわち、保存されるアミノ酸置換）を含むことを理解するものである。多様なアミノ酸の特性ならびにタンパク質の構造および機能に関するアミノ酸置換の効果は大規模な試験の対象とされており、当業者に公知である。

10

#### 【0117】

例えば、アミノ酸の疎水性親水性指標が考慮されてもよい（Kyte & Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157: 105-132）。アミノ酸の疎水性親水性試料の相対的な特徴は、結果として得られるタンパク質の二次構造に起因し、言い換えると、他の分子とのタンパク質の相互作用を規定する。各アミノ酸は、その疎水性かつ荷電性の特徴に基づき疎水性親水性指標を割り当て（Kyte & Doolittle, 1982）、こ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）；スレオニン（-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。保存される置換を作製する際、疎水性親水性指数が±2以内、より好ましくは±1以内、さらにより好ましくは±0.5以内のアミノ酸を使用する。

20

#### 【0118】

また、アミノ酸の置換は、アミノ酸残基の親水性を考慮してもよい（例えば、米国特許第4,554,101号）。親水性の値は、アミノ酸残基：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0）；グルタミン酸（+3.0）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；スレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；トリプトファン（-3.4）に割り当てられている。同様の親水性を備えるアミノ酸との置換が好ましい。

30

#### 【0119】

他に、アミノ酸側鎖の寸法が考慮される。グリシンまたはセリンなどの小さな側鎖を備えるアミノ酸を、例えばトリプトファンまたはチロシンなどのかさばる側鎖を備えるアミノ酸と置換することは概して好ましくない。タンパク質の二次構造上の多様なアミノ酸残基の効果も考慮される。実験による試験を通して、らせん、シート、または逆行ターンの二次構造を取るためのタンパク質ドメインの傾向に関する異なるアミノ酸残基の効果が判定されており、当業者に公知である（例えば、Chou & Fasman, 1974, Biochemistry, 13: 222-245; 1978, Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276; 1979, Biophys. J., 26: 367-384参照）。

40

#### 【0120】

このような考慮および大規模な実験上の試験に基づき、保存されるアミノ酸の置換の表が構築されており、当業者に公知の、例えば、アルギニンおよびロイシン、グルタミン酸およびアスパラギン酸、セリンおよびスレオニン、グルタミンおよびアスパラギン、ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシンが挙げられる。あるいは、Ala(A)Leu

50

、 ile、 val; Arg (R) gln、 asn、 lys; Asn (N) his、 asp、 lys、 arg、 gln; Asp (D) asn、 glu; Cys (C) ala、 ser; Gln (Q) glu、 asn; Glu (E) gln、 asp; Gly (G) ala; His (H) asn、 gln、 lys、 arg; Ile (I) val、 met、 ala、 phe、 leu; Leu (L) val、 met、 ala、 phe、 ile; Lys (K) gln、 asn、 arg; Met (M) phe、 ile、 leu; Phe (F) leu、 val、 ile、 ala、 tyr; Pro (P) ala; Ser (S)、 thr; Thr (T) ser; Trp (W) phe、 tyr; Tyr (Y) trp、 phe、 thr、 ser; Val (V) ile、 leu、 met、 phe、 alaが挙げられる。

## 【0121】

他のアミノ酸の置換に対する考慮として、残基がタンパク質の内部または曝露した溶媒のいずれかに配置されているかどうかを挙げられる。残基の内部では、保存される置換は、 AspおよびAsn; SerおよびThr; SerおよびAla; ThrおよびAla; AlaおよびGly; IleおよびVal; ValおよびLeu; LeuおよびIle; LeuおよびMet; PheおよびTyr; TyrおよびTrpを含む(例えば、rockefeller.eduのPROWLウェブサイトを参照)。溶媒に曝露した残基では、保存される置換は、 AspおよびAsn; AspおよびGlu; GluおよびGln; GluおよびAla; GlyおよびAsn; AlaおよびPro; AlaおよびGly; AlaおよびSer; AlaおよびLys; SerおよびThr; LysおよびArg; ValおよびLeu; LeuおよびIle; IleおよびVal; PheおよびTyr (Id.)を含む。PAM250スコアリングマトリックス、Dayhoffマトリックス、Granthamマトリックス、McLachlanマトリックス、Doolittleマトリックス、Henikoffマトリックス、Miyataマトリックス、Fitchマトリックス、Jonesマトリックス、Raoマトリックス、LevinマトリックスおよびRislerマトリックス(Idem.)などの多様なマトリックスが、アミノ酸置換の選択を支援するために構築されている。

## 【0122】

アミノ酸置換を決定するために、正荷の残基(例えばHis、Arg、Lys)、および負荷の残基(例えばAsp、Glu)の間のイオン結合(塩橋)、または近くのシステイン残基間でのジスルフィド結合の形成などの、分子間結合または分子内結合の度合いを考慮してもよい。

## 【0123】

コードしたタンパク質配列の他のいずれかのアミノ酸と任意のアミノ酸を置換する方法は公知であり、例えば、部位特異的変異誘発の技術またはアミノ酸の置換をコードし、かつ発現ベクター構築物へとスプライシングを行うオリゴヌクレオチドの合成およびアセンブリにより行われ、この方法は当業者にとって通常の実験の事項である。

## 【0124】

アビマー(Avimer)

特定の実施形態では、本明細書に記載される結合部は、1つ以上のアビマー配列を含んでもよい。アビマーは、多様な標的分子に対する親和性および特異性において、抗体といくらも類似する分類の結合タンパク質である。アビマーは、in vitroでのエキソニックシャッフリングおよびファージディスプレイによりヒト細胞外受容体から開発された(Silverman et al., 2005, Nat. Biotechnol. 23: 1493-94; Silverman et al., 2006, Nat. Biotechnol. 24: 220)。結果として得られるマルチドメインタンパク質は、複数の独立した結合ドメインを含んでもよく、これらは、単一のエピトープ結合タンパク質(Id)と比較して親和性(場合によってはサブナノモル濃度の親和性)および特異性が改善される。様々な実施形態では、アビマーは、例えば、請求される方法および組成物に使用されるDDDおよび/またはAD配列に付着されてもよい。アビマーの構築および使用方法に関するさらなる詳細は、例えば、米国特許出願公開公報第20040175756号、

10

20

30

40

50



第20050048512号、20050053973号、第20050089932号および第20050221384号に開示されており、各文献の実施例部は参照により援用される。アビマーは、本明細書に開示される方法および組成物を使用して、P2PDoxと結合してもよい。

#### 【0125】

##### ファージディスプレイ

請求される組成物および/または方法の特定の実施形態は、多様な標的分子の結合ペプチドおよび/またはペプチド模倣物に関し得る。結合ペプチドは、限定するものではないが、ファージディスプレイ技術を含む当業者に公知のいずれかの技術により同定されてもよい。ファージディスプレイの様々な方法およびペプチドの多様な集合を産生する技術は当業者に公知である。例えば、米国特許第5,223,409号;第5,622,699号および第6,068,829号は、ファージライブラリを調製する方法を開示する。ファージディスプレイライブラリ技術は、小さなペプチドがその表面上で発現できるようにバクテリオファージを遺伝的に操作することを含む(Smith and Scott, 1985, Science 228:1315-1317; Smith and Scott, 1993, Meth. Enzymol. 21:228-257)。ペプチドに加えて、単一鎖抗体などの大きなタンパク質ドメインも、ファージ粒子の表面上に表されてもよい(Arap et al., 1998, Science 279:377-380)。

10

#### 【0126】

所定の臓器、組織、細胞腫、または標的分子に選択的な標的化アミノ酸は、パニングにより単離されてもよい(Pasqualini and Ruoslahti, 1996, Nature 380:364-366; Pasqualini, 1999, The Quart. J. Nucl. Med. 43:159-162)。簡潔に述べると、推定上の標的化ペプチドを含むファージのライブラリを、未処置の臓器、または単離した臓器、組織、細胞腫、もしくは標的分子に投与し、結合ファージを含む試料を収集する。標的と結合するファージは、標的の臓器、組織、細胞腫、または標的分子から溶出されてもよく、次いで、宿主細菌の中でこのファージを増殖させることにより増幅される。

20

#### 【0127】

特定の実施形態では、ファージは、数回のラウンドのパニングの間に宿主細菌の中で増殖させてもよい。ファージにより溶解されるよりも、細菌は、特定の挿入断片を示すファージの複数のコピーを分泌し得る。望ましい場合、増幅したファージは、標的の臓器、組織、細胞腫、または標的分子に再び曝露され、かつ、さらなる数ラウンドのパニングのために収集されてもよい。選択的または特異的な結合剤の集合が得られるまで複数回のラウンドのパニングを実施してもよい。ペプチドのアミノ酸配列は、ファージゲノムに挿入した標的化ペプチドに対応するDNAをシーケンシングすることにより判定されてもよい。次いで、同定した標的化ペプチドは、標準的なタンパク質化学技術により合成ペプチドとして産生されてもよい(Arap et al., 1998, Smith et al., 1985)。

30

#### 【0128】

一部の実施形態では、サブトラクションプロトコルを使用して、バックグラウンドのファージ結合をさらに低減させてもよい。サブトラクションの目的は、対象となる標的以外の標的と結合するファージをライブラリから除去することである。代替的な実施形態では、ファージライブラリは、対照の細胞、組織、または臓器に対してプレスクリーニングされてもよい。例えば腫瘍結合ペプチドは、対照となる正常な細胞株に対するライブラリのプレスクリーニングの後に同定されてもよい。サブトラクションの後に、目的の分子、細胞、組織、または臓器に対してライブラリをスクリーニングしてもよい。サブトラクションプロトコルの他の方法は、例えば、米国特許第5,840,841号、第5,705,610号、第5,670,312号、および第5,492,807号に開示されるように知られており、特許を請求する方法を実施する際に使用してもよい。ファージディスプレ

40

50

イは、本明細書に開示される方法および組成物を使用して P 2 P D o x と結合してもよい。

【 0 1 2 9 】

アプタマー

特定の実施形態では、使用され得る標的部位はアプタマーであってもよい。アプタマーの結合性の特徴を構築および判定する方法は当業者に公知である。このような技術は、米国特許第 5, 582, 981号、5, 595, 877号および第 5, 637, 459号に記載されており、各実施例部は本明細書に参照として援用される。対象となる特定の標的と結合するアプタマーの調製およびスクリーニング方法は、例えば、米国特許第 5, 475, 096号および米国特許第 5, 270, 163号において公知であり、各実施例部は参照により本明細書に援用される。

10

【 0 1 3 0 】

アプタマーは、合成、組み換え、および精製方法を含むいずれかの既知の方法により調製されてもよく、単独または同一の標的に特異的な他のリガンドと併用して使用してもよい。一般的に、最小で約 3 つのヌクレオチド、好ましくは少なくとも 5 つのヌクレオチドが、特異的な結合に影響を与えるために必要である。10 より短いアプタマーの配列は、10、20、30、または 40 のヌクレオチドが好ましい場合があるにも関わらず、融合可能である。

【 0 1 3 1 】

アプタマーを、従来の DNA または RNA 分子として、単離、配列決定、かつ/または増幅もしくは合成してもよい。あるいは、対象となるアプタマーは、改変オリゴマーを含んでもよい。アプタマーに通常存在するヒドロキシル基のいずれかは、ホスホン酸エステル基、リン酸基により置換されてもよく、標準的な保護基により保護されてもよく、または他のヌクレオチドとのさらなる結合を調製するよう活性化されてもよく、または固体の担体と結合してもよい。1 つ以上のホスホジエステル結合は、P(O)S、P(O)NR<sub>2</sub>、P(O)R、P(O)OR'、CO、または CNR<sub>2</sub> により置換された P(O)O などであって、式中、R は H またはアルキル (1 - 20C) であり、R' は、アルキル (1 - 20C) であるような代替的な連結基により置換されてもよく、さらにこの基は、O または S を介して隣接したヌクレオチドに付着してもよい。オリゴマーの全ての連結基が同一である必要はない。アプタマーは、本明細書に開示される方法および組成物を使用して、P 2 P D o x と結合してもよい。

20

30

【 0 1 3 2 】

アフィボディ ( a f f i b o d y ) およびフィノマー ( F y n o m e r )

特定の代替的な実施形態は、抗体の代わりにアフィボディを使用してもよい。アフィボディは、A f f i b o d y A B (スウェーデンソルナ) から商業的に入手可能である。アフィボディは、抗体の模倣物として機能する小さなタンパク質であり、標的分子と結合する際に使用される。アフィボディは、らせんタンパク質スキャホールド上でのコンビナトリアル改変により開発された (Nord et al., 1995, Protein Eng 8: 601 - 8; Nord et al., 1997, Nat Biotech nol 15: 772 - 77)。アフィボディの設計は、タンパク質 A の Ig G 結合ドメインを含む 3 つのヘリックスの束状構造に基づく (Nord et al., 1995; 1997)。幅広い範囲の結合親和性を有するアフィボディは、細菌のタンパク質 A の Fc 結合活性に関与する 13 のアミノ酸のランダム化により産生され得る (Nord et al., 1995; 1997)。ランダム化の後、PCR により増幅したライブラリが、変異タンパク質のファージディスプレイによりスクリーニングするためファージミドベクター内にクローン化された。ファージディスプレイライブラリを、標準的なファージディスプレイスクリーニング技術を使用して、任意の既知の抗原に対してスクリーニングして、標的抗原に対する 1 つ以上のアフィボディを同定してもよい (例えば、Pasqualini and Ruoslahti, 1996, Nature 380: 364 - 366; Pasqualini, 1999, Quart. J. Nucl. Med. 43: 1

40

50

59 - 162)

【0133】

HER2/neuに特異的な<sup>177</sup>Luを標識したアフィボディは、*in vivo*でHER2-発現異種移植片を標的化することが論述されている(Tolmachev et al., 2007, Cancer Res 67:2773-82)。低分子量の放射標識した化合物の蓄積による腎毒性にまず問題があったにも関わらず、アルブミンへの可逆的結合は、腎蓄積を低減し、標識したアフィボディ(I d)での放射線核種系の治療を可能にした。

【0134】

*In vivo*での腫瘍のイメージング用の放射標識したアフィボディを使用する実現可能性が最近論述されている(Tolmachev et al., 2011, Bioconjugate Chem 22:894-902)。マレイミド誘導型NOTAは、抗HER2アフィボディと結合し、<sup>111</sup>In(I d)で放射性標識された。HER2-発現DU145異種移植片を有するマウスに投与した後、カメライメージングを行い、この異種移植片(I d)の可視化を可能にした。

10

【0135】

また、フィノマーは、抗体と同様の親和性および特異性を用いて標的抗原と結合できる。フィノマーは、結合分子のアセンブリのスクヤホールドとしてヒトFynSH3ドメインに基づく。FynSH3ドメインは、高い収率で細菌において産生できる完全にヒト由来の63のアミノ酸のタンパク質である。フィノマーは、2つ以上の異なる抗原標的との親和性を備える多選択性の結合タンパク質を収集するために、共に連結されてもよい。フィノマーは、COVAGEN AG(スイスチューリッヒ)から商業的に入手可能である。

20

【0136】

アフィボディまたはフィノマーは、特許請求される方法および組成物の実施の際に、P2PDoxと付着してもよく、標的分子として使用してもよいことを当業者は理解している。

【0137】

ナノボディ

ナノボディは、約12~15kDaの大きさ(約110の長さのアミノ酸)の単ドメイン抗体である。ナノボディは、フルサイズの抗体のように、標的抗原と選択的に結合でき、抗原と同様の親和性を有する。しかしながら、小さな寸法のため、ナノボディは、固形腫瘍により良好に浸透する場合がある。この小さな寸法は、ナノボディの安定性にも寄与しており、これにより、フルサイズの抗体のよりもpHおよび温度に対する耐性がかなり高くなる(Van Der Linden et al., 1999, Biochim Biophys Act 1431:37-46)。当初、単一のドメイン抗体は、ラクダ類(ラクダ、アルパカ、ラマ)が、軽鎖を用いることなく完全に機能的な抗体を有するとの発見の後に発見された(例えば、Hamsen et al., 2007, Appl Microbiol Biotechnol 77:13-22)。重鎖抗体は、単一の可変ドメイン(V<sub>H</sub>H)および2つの定常ドメイン(C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3)からなる。抗体のように、ナノボディは多選択性および/または二重特異性の構築物として開発かつ使用されてもよい。IL-6R、vWF、TNF、RSV、RANKL、IL-17A&FおよびIgE(例えば、ABLYNX(登録商標)、ベルギーヘント)などの様々な標的抗原に標的化されたナノボディのヒト化形態が商業的に開発されており、癌、炎症、感染性疾患、アルツハイマー病、急性冠症候群および他の障害に臨床的に使用される可能性がある(例えばSaerens et al., 2008, Curr Opin Pharmacol 8:600-8; Muyldermans, 2013, Ann Rev Biochem 82:775-97; Ibanez et al., 2011, J Infect Dis 203:1063-72)。

30

40

【0138】

50

ナノボディの血漿内半減期は、腎経路により主に排出されることから、フルサイズの抗体よりも短い。またナノボディはFc領域が欠損しているため、補体依存性細胞傷害を示さない。

#### 【0139】

ナノボディは、標的抗原を備えるラクダ、ラマ、アルパカ、またはサメの免疫化、次いで、mRNAを単離し、ライブラリにクローニング、かつ、抗原結合用のスクリーニングを行うことにより産生されてもよい。ナノボディの配列は、標準的な技術によりヒト化されてもよい(例えば、Jones et al., 1986, Nature 321: 522, Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323, Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534, Carter et al., 1992, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 4285, Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech. 12: 437, Singer et al., 1993, J. Immun. 150: 2844)。ヒト化は、ラクダ化FR配列およびヒトFR配列の間での高い相同性のため、比較的矛盾がない。

10

#### 【0140】

様々な実施形態では、対象のP2PDox複合体は、細胞、組織、臓器、または病原体へ抱合型薬剤の標的化送達するためのナノボディを含んでもよい。ナノボディの使用は、米国特許第7,807,162号;第7,939,277号;第8,188,223号;第8,217,140号;第8,372,398号;第8,557,965号;第8,623,361号、および第8,629,244号に開示されており、各実施例部は参照により本明細書に援用される。

20

#### 【0141】

##### 前標的化

二重特異性または多選択性の抗体は、前標的化技術に利用されてもよい。前標的化は、骨髄などの正常な組織に望ましくない毒性に寄与することから、当初は、直接標的化した抗体の遅い血液クリアランスを解決するために開発された。前標的化を用いて、放射線核種または他の治療剤を、血液から数分以内に除かれた小さな送達分子(標的可能な構築物)

に付着させる。前標的化二重特異性または多選択性の抗体は、標的抗原と同様に標的可能な構築物に対する結合部位を有しており、まず投与され、遊離抗体が循環から除かれ、次いで標的可能な構築物が投与される。

30

#### 【0142】

前標的化方法は、例えば、Goodwinらの米国特許第4,863,713号;Goodwin et al., J. Nucl. Med. 29:226, 1988;Hnatowich et al., J. Nucl. Med. 28:1294, 1987;Oehr et al., J. Nucl. Med. 29:728, 1988;Klibanov et al., J. Nucl. Med. 29:1951, 1988;Sinitzyn et al., J. Nucl. Med. 30:66, 1989;Kalofonos et al., J. Nucl. Med. 31:1791, 1990;Schechter et al., Int. J. Cancer 48:167, 1991;Paganelli et al., Cancer Res. 51:5960, 1991;Paganelli et al., Nucl. Med. Commun. 12:211, 1991;米国特許第5,256,395号;Stickney et al., Cancer Res. 51:6650, 1991;Yuan et al., Cancer Res. 51:3119, 1991;米国特許第6,077,499号;第7,011,812号;第7,300,644号;第7,074,405号;第6,962,702号;第7,387,772号;第7,052,872号;第7,138,103号;第6,090,381号;第6,472,511号;第6,962,702号;および6,962,702号に開示されており、それぞれが参照により本明細書に援用される。

40

50

## 【0143】

対象の疾患または障害を処置または診断する前標的化方法は、(1)二重特異性抗体または抗体フラグメントを対象に投与することと、(2)任意に、除去組成物を対象に投与することと、この組成物により循環から抗体が除去されることと、(3)P2PDoxなどの1つ以上のキレート化または化学的に結合した治療剤または診断薬を含む標的可能な構築物を対象に投与することにより提供されてもよい。

## 【0144】

## 標的可能な構築物

特定の実施形態では、前標的化に使用するための1つ以上の治療剤または診断薬で標識した標的可能な構築ペプチドは、標的可能な構築ペプチドの1つ以上の結合部位、および疾患または病態に関連する標的抗原の1つ以上の結合部位を有する二重特異性抗体に結合するために選択されてもよい。二重特異性抗体は、前標的化技術に使用されてもよく、この場合抗体は対象にまず投与される。標的抗原に結合する二重特異性抗体および結合していない抗体を循環から除去するために十分な時間が必要とされてもよい。次いで、標識したペプチドなどの、標的可能な構築物が対象に投与されてもよく、二重特異性抗体に結合されてもよく、疾患のある細胞または組織で局在してもよい。

10

## 【0145】

このような標的可能な構築物は多様な構造とすることができ、標的可能な構築物に高い親和性で結合する抗体またはフラグメントの利用可能性だけでなく、前処理化方法および二重特異性抗体(bisAb)または多選択性抗体の中で使用される際のin vivoでの迅速なクリアランスに関して選択できる。疎水性薬剤は、強力な免疫応答を誘導する際に最もふさわしく、親水性薬剤は、迅速なin vivoでのクリアランスで好ましい。したがって、疎水性クリアランスおよび親水性クリアランスの間の均衡が確立される。このことは、多くの有機部位の本来の疎水性を相殺するため、親水性キレート剤を使用することにより部分的に達成されてもよい。同様に、標的可能な構築物のサブユニットは、例えばペプチドなど、溶液の反対の特性のうちいずれを有するかどうか、どのアミノ酸を含むかどうか、一部が疎水性であるか、一部が親水性であるかが選択されてもよい。

20

## 【0146】

2つのアミノ酸残基、好ましくは2~10の残基として数個のアミノ酸を有するペプチドを、キレート剤などの、他の部位に使用してもよく、かつ他の部位と結合してもよい。リンカーは、低分子量の複合体であり、好ましくは、50,000ダルトン未満、好ましくは、20,000ダルトン未満、10,000ダルトン未満、または5,000ダルトン未満の分子量を有するものである。さらに通常は、標的可能な構築ペプチドは、例えば二重特異性抗体に結合するための4つ以上の残基および1つ以上のハプテンを有する。例示的なハプテンは、In-DTPA(インジウム-ジエチレントリアミペンタアセテート酸)またはHSG(ヒスタミンスクシニルグリシン)を含んでもよい。また、標的可能な構築物は、DOTA(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン1,4,7,10-テトラ酢酸)、NOTA(1,4,7-トリアザシクロノナン-1,4,7-トリ酢酸)、TETA(p-プロモアセトアミド-ベンジル-テトラエチルアミンテトラ酢酸)、NETA([2-(4,7-ビスカルボキシメチル[1,4,7]トリアザシクロノナン-1-イル-エチル]-2-カルボニルメチル-アミノ]酢酸)、または他の既知のキレート部位などの、1つ以上のキレート部位を含んでもよい。キレート部位を使用して、例えば、治療用および/または診断用の放射線核種、常磁性イオン、または造影剤と結合してもよい。

30

40

## 【0147】

また、標的可能な構築物は、例えば、in vivoでのペプチドの安定性を増大させるため、骨格構造中に、例えばD-アミノ酸などの、非天然のアミノ酸を含んでもよい。代替的な実施形態では、非天然のアミノ酸またはペプチドから構築されるような他の骨格構造を使用してもよい。

## 【0148】

50

標的可能な構築物として使用されるペプチドは、固体相の担体および反復的な直交性の脱保護およびカップリングの標準的な技術を使用して自動化したペプチドシンセサイザー上で簡便に合成される。ペプチド中の遊離アミノ基は、後にキレート部または他の薬剤との結合に使用され、Boc基などの標準的な保護基で有利な状態で阻害される。この時N末端残基は、血清の安定性を増大させるためにアセチル化されていてもよい。このような保護基は、当業者に公知であり、Greene and Wuts *Protective Groups in Organic Synthesis*, 1999 (John Wiley and Sons, N.Y.を参照されたい)。ペプチドが、二重特異性抗体システム内で後に使用するために調製される際、*in vivo*でのカルボキシペプチダーゼ活性を阻害するために、これらペプチドは、対応するC末端アミドから有利に切断される。

10

#### 【0149】

二重特異性抗体を備えるパーセンテージを使用する場合、抗体は、標的組織により産生されるか、または標的組織と関連する抗原の第1の結合部位、および標的可能な構築物上のハプテンの第2の結合部位を含む。例示的なハプテンは、限定するものではないが、HSGおよびIn-DTPAを含む。HSGハプテンにより産生される抗体が知られており（例えば679抗体）、適切な二重特異性抗体に容易に組み込むことができる（例えば、米国特許第6,962,702号；第7,138,103号および第7,300,644号参照。これらの実施例に関しては、参照により本明細書に援用される）。しかしながら、他のハプテンおよびハプテンに結合する抗体は当業者に公知であり、In-DTPAおよび734抗体などとして使用されてもよい（例えば、米国特許第7,534,431号。この文献の実施例部は参照により本明細書に援用される）。

20

#### 【0150】

##### 免疫複合体の調製

好ましい実施形態では、P2PDoxまたは別の治療剤もしくは診断薬は、免疫複合体を形成するため抗体または抗体フラグメントに共役的に付着してもよい。一部の実施形態では、診断薬および/または治療剤は、キャリアー部を介して抗体または抗体フラグメントに付着してもよい。キャリアー部は、例えば、還元型SH基および/または炭水化物側鎖に付着してもよい。キャリアー部は、ジスルフィド結合形成を介して、還元型抗体のヒンジ領域で付着できる。あるいは、このような薬剤は、N-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)などのヘテロ二機能性架橋剤を使用して付着できる(Yu et al., *Int. J. Cancer* 56: 244 (1994))。このような抱合の一般的な技術が当業者に公知である。例えば、Wong, *CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING* (CRC Press 1991); Upešlacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS*, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION*, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)を参照されたい。あるいは、キャリアー部は、抗体のFc領域の炭水化物部分を介して抱合できる。

30

40

#### 【0151】

抗体の炭水化物部分を介して抗体に官能基を抱合する方法は当業者に公知である。例えば、Shih et al., *Int. J. Cancer* 41: 832 (1988); Shih et al., *Int. J. Cancer* 46: 1101 (1990)

50

; and Shih et al、および米国特許第5,057,313号を参照されたい。これらの実施例部は参照により本明細書に援用される。一般的な方法は、少なくとも1つの遊離アミンの機能を有するキャリアポリマーと酸化した炭化水素部分を有する抗体を反応させることを含む。この反応は、Schiff塩基(イミン)結合を生じさせ、二次的なアミンへと還元することにより安定化させて最終的な複合体を形成できる。

#### 【0152】

Fc領域は、免疫複合体の抗体成分が抗体フラグメントである場合には存在しない。しかしながら、完全長の抗体または抗体フラグメントの軽鎖可変領域の中に炭化水素部分を導入することが可能である。例えば、Leung et al., J. Immunol. 154: 5919 (1995) および米国特許第5,443,953および第6,254,868号を参照されたい。これら実施例部は参照により本明細書に援用される。改変した炭化水素部分を使用して、治療剤または診断薬を付着させる。

10

#### 【0153】

標的化分子にキャリア部分を付着させる代替的な方法は、クリックケミストリー反応の使用を含む。このクリックケミストリー手法は、本来、分子形式で共に小さなサブユニットを結合することにより複合基質を迅速に作製する方法と考えられていた(例えば、Kolb et al., 2004, Angew Chem Int Ed 40: 3004-31; Evans, 2007, Aust J Chem 60: 384-95参照)。ヒュスゲン1,3-二極性環化付加銅触媒反応など、様々な形態のクリックケミストリー反応が当業者に公知であり(Tornoe et al., 2002, J Organ 20 ic Chem 67: 3057-64)、多くの場合「クリック反応」と称する。他の代替案として、ディールス・アルダー求核性置換反応などの環化付加反応(特に、エポキシおよびアジリド化合物のような小さな鎖化合物に対する反応)、尿素化合物のカルボニル化学形成、およびチオール-エン反応におけるアルキンなどの炭素-炭素二重結合を含む反応を含む。

20

#### 【0154】

アジドアルキレンヒュスゲン環化付加反応は、第1の分子に付着した末端アルキル基の反応を触媒する還元剤の存在する中で銅触媒を使用する。アジド部を含む第2の分子の存在する中で、アジドは活性化したアルキンと反応して、1,4-ジスルフィド1,2,3-トリアゾールを形成する。銅で触媒する反応が室温で起こり、この反応は、反応産物の精製を多くの場合必要としない点で十分に特異的である(Rostovstev et al., 2002, Angew Chem Int Ed 41: 2596; Tornoe et al., 2002, J Org Chem 67: 3057.)。アジドおよびアルキン官能基は、多くは、水性媒体中の生体分子に対して不活性であり、複合溶液中でこの反応が起こることが可能である。形成されたトリアゾールは化学的に安定であり、酵素的切断を行わず、クリックケミストリー生成物を生物学系で非常に安定させる。銅触媒は生細胞に毒性があるが、銅に基づくクリックケミストリー反応は、in vitro での免疫複合体形成に使用されてもよい。

30

#### 【0155】

銅を使用しないクリック反応が、生体分子の共役的改変用に提案されている(例えば、Agard et al., 2004, J Am Chem Soc 126: 15046-47参照)。銅を使用しない反応は、銅触媒の代わりに環ひずみを使用して、[3+2]アジド-アルキン環化付加反応(Id)を促進する。例えば、シクロオクチンは、内部アルキン結合を含む8つの炭素の環構造である。閉環構造は、アセチレンの実質的な結合角を誘導し、これにより、アジド基と高く反応してトリアゾールを形成する。したがって、シクロオクチン誘導体は、銅を使用しないクリック反応に使用されてもよい(Id)。

40

#### 【0156】

別の種類の銅を使用しないクリック反応が、Ningら(2010, Angew Chem Int Ed 49: 3065-68)により報告されており、ひずみ促進型アル

50

キン - ニトロ環化付加を含む。本来のシクロオクチン反応の低い比率を示すため、電子求引基は、3重結合に隣接して付着する ( I d )。このような置換したシクロオクチンの例は、ジフルオロ化シクロオクチン、4 - ジベンゾシクロオクチノール、およびアザシクロオクチン ( I d ) を含む。代替的な銅を使用しない反応は N - アルキル化イソオキサゾリンを得るためのひずみ促進型アルキン - ニトロ環化付加を含む。この反応は、例外的に迅速な反応動態を有することが報告されており、ペプチドおよびタンパク質の部位特異的改変 ( I d ) のワンポットの3つのステップのプロトコルに使用された。ニトロンを、N - メチルヒドロキシアミンを用いた適切なアルデヒドの凝縮ならびにアセトニトリルおよび水 ( I d ) の混合物中で行われる環化付加により調製した。これらおよび他の既知のクリックケミストリー反応を使用して、*in vitro* で抗体にキャリアー部を付着させてもよい。

10

## 【 0 1 5 7 】

A g a r d ら ( 2 0 0 4 , J A m C h e m S o c 1 2 6 : 1 5 0 4 6 - 4 7 ) は、過酢酸の N - アジドアセチルマンノサミン ( N - a z i d o a c e t y l m a n n o s a m i n e ) の存在下で CHO 細胞に発現した組み換え糖タンパク質は、糖タンパク質の炭化水素中の対応する N - アジドアセチルシアル酸の生物学的組み込みをもたらすことが論述した。アジド - 誘導型糖タンパク質は、ビオチニル化シクロオクチンと特異的に反応し、ビオチニル化糖タンパク質を形成し、アジド部を持たない対照糖タンパク質は標識されないままだった。L a u g h l i n ら ( 2 0 0 8 , S c i e n c e 3 2 0 : 6 6 4 - 6 6 7 ) は、プレアセチル化 N - アジドアセチルガラクトサミンでインキュベートしたゼブラフィッシュの胚において、細胞表面のグリカン代謝的に標識する同様の技術を使用した。ジフルオロ化シクロオクチン ( D I F O ) 試薬とアジド - 誘導体化グリカンを反応させて *in vivo* でグリカンを可視化させた。

20

## 【 0 1 5 8 】

また、ディールス・アルダー反応は、*in vivo* で分子を標的化する際に使用されている。R o s s i n ら ( 2 0 1 0 , A n g e w C h e m I n t E d 4 9 : 3 3 7 5 - 7 8 ) は、トランス - シクロオクテン ( T C O ) 反応部位を運搬する腫瘍に局在した抗 T A G 7 2 ( C C 4 9 ) 抗体および  $^{111}I$  n を標識したテトラジン D O T A 誘導体の間で、*in vivo* で 5 2 % の収率が報告された。T C O で標識した C C 4 9 抗体を、結腸癌異種移植片を有するマウスに投与し、1日後に  $^{111}I$  n 標識したテトラジンプローブを注入した。腫瘍局在化抗体と放射標識したプローブとの反応は、放射標識プローブの注入から3時間後の生存マウスの S P E C T イメージングにより例示されるように、腫瘍の顕著な反応性局在を引き起こし、腫瘍体マウスの比率は 1 3 : 1 であった ( I d )。この結果から、T C O およびテトラジン標識した分子の *in vivo* での化学反応が確認された。

30

## 【 0 1 5 9 】

標識部位の生物学的組み込みを使用する抗体標識技術は米国特許第 6 , 9 5 3 , 6 7 5 号にさらに開示される ( この実施例部は参照により本明細書に援用される )。このような「ランドスケープ」抗体をグリコシル化部位上の反応性ケトン部位を有しするよう調製した。本方法は、糖類または糖類前駆体のケトン誘導体を含む培養媒体中で C H 1 または V<sub>K</sub> ドメインにおける 1 つ以上の N - グリコシル化部位を備えた抗体をコードする発現ベクターで形質転換された細胞を発現させることを含んだ。ケトン - 誘導体化糖類または前駆体は、N - レプリノイルマンノサミンおよび N - レプリノイルフコースを含んだ。その後、ランドスケープ抗体を、ヒドラジド、ヒドラジン、ヒドロキシルアミノまたはチオセミカルバジド基などのケトン反応部を含む薬剤と反応させて標識化標的分子を形成した。ランドスケープ抗体に付着する例示的な薬剤は、D T P A のようなキレート剤、ドキシソルピシン - デキストランなどの大きな薬剤分子、およびアシル - ヒドラジド含有ペプチドが挙げられる。ランドスケープ技術は、ケトン部を含む抗体の産生に限定されるものではなく、ニトロ、アジド、またはシクロオクチンなどのクリックケミストリー反応基を抗体または他の生物分子に導入するために使用してもよい。

40

50



## 【0160】

クリックケミストリー反応の改変は、*in vivo*または*in vitro*での使用に適している。反応標的分子は、化学結合または生物学的組み込みのいずれかにより形成されてもよい。抗体または抗体フラグメントなどの標的化分子は、アジド部、置換シクロオクチンまたはアルキン基、またはニトロ部で活性化されてもよい。標的化分子がアジド基またはニトロ基を含む場合、対応する標的可能な構築物は置換シクロオクチンまたはアルキン基を含み、また逆でも成立する。このように活性化した分子は、上述のように生存細胞における代謝組み込みにより作製されてもよい。

## 【0161】

あるいは、生物分子へのこのような部位の化学的抱合方法は当業者によく知られており、このうちいずれかの既知の方法が使用されてもよい。免疫複合体形成の一般的な方法は、例えば、米国特許第4,699,784号；第4,824,659号；第5,525,338号；第5,677,427号；第5,697,902号；第5,716,595号；第6,071,490号；第6,187,284号；第6,306,393号；第6,548,275号；第6,653,104号；第6,962,702号；第7,033,572号；第7,147,856号；および第7,259,240号に開示されており、各実施例部は参照により本明細書に援用される。

10

## 【0162】

## 治療剤および診断薬

特定の実施形態では、免疫複合体または他のP2PDox複合体は、1つ以上の治療剤および/または診断薬と併用して使用してもよい。治療剤は、放射線核種、免疫調製物質、抗血管新生剤、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、ホルモン、薬剤、プロドラッグ、酵素、オリゴヌクレオチド、アポトーシス促進剤、干渉RNA (*interference RNA*)、光活動性治療剤、チロシンキナーゼ阻害剤、スフィンゴシン阻害剤、化学治療剤または毒素であり得る細胞傷害剤、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されてもよい。使用される薬剤は、抗有糸分裂剤、抗キナーゼ剤、アルキル化剤、代謝抵抗性剤、抗生剤、アルカロイド剤、抗血管形成剤、アポトーシス促進剤、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される薬物動態的な特性を有していてもよい。

20

## 【0163】

例示的な薬剤は、限定するものではないが、5-フルオロウラシル、アフアチニブ、アブリジン (*aplidin*)、アザリピン、アナストロゾール、アントラサイクリン、アキシチニブ、AVL-101、AVL-291、ベンダムスチン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、ボスチニブ、プリオスタチン-1、ブスルファン、カリケアミシン (*calicheamycin*)、カンプトテシン、カルボプラチン、10-ヒドロキシカンプトテシン、カルムスチン、セレブレックス、クロラムブシル、シスプラチン (*CDDP*)、Cox-2阻害剤、イリノテカン (*CPT-11*)、SN-38、カルボプラチン、クラドリピン、カンプトセカン、クリゾチニブ、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダサチニブ、ジナシクリブ (*dinaciclib*)、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、2-ピロリノドキシソルピシン (*2P-DOX*)、シアノ-モルフォリノドキシソルピシン、ドキシソルピシングルクロニド、エピルピシングルクロニド、エルロチニブ、エストラムスチン、エピポドフィロトキシシン (*epidophyllotoxin*)、エルロチニブ、エンチノスタット、エストロゲン受容体結合剤、エトボシド (*VP16*)、エトボシドグルクロニド、エトボシドホスフェート、エキセメスタン、フィンゴリモド、フロクスウリジン (*FUdR*)、3',5'-O-ジオレイル-FudR (*FUdR-dO*)、フルダラビン、フルタミド、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、フラボピリドール、フォスタマチニブ (*fostatinib*)、ガネテスピブ (*ganetespib*)、GDC-0834、GS-1101、ゲフィチニブ、ゲムシタピン、ヒドロキシ尿素、イブルチニブ、イダルピシン、イデラリシブ、イホスファミド、イマチニブ、L-アスパラギナーゼ、ラパチニブ、レノリダミド (*lenolidamide*)、ロイコボリン、LFM-A13、ロムスチン、メ

30

40

50

クロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、ミスラマイシン、マイトマイシン、ミトタン、ナベルピン、ネラチニブ、ニロチニブ、ニトロソウレア (nitrosurea)、オラパリブ (olaparib)、プリコマイシン (plicomycin)、プロカルバジン、パクリタキセル、PCI-32765、ペントスタチン、PSI-341、ラロキシフェン、セムスチン、ソラフェニブ、ストレプトゾシン、SU11248、スニチニブ、タモキシフェン、テマゾロミド (temazolomide) (DTICの水性形態)、トランス白金 (transplatinum)、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、テニボシド、トポテカン、ウラシルマスタード、パタラニブ、ピノレルピン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンカルカロイド、およびZD1839を含んでもよい。このような薬剤は、本明細書に記載される複合体の一部であってもよく、本複合体の前、同時、または後のいずれかで、記載される複合体と併用して投与してもよい。あるいは、1つ以上の治療ネイキッド抗体は当業者に公知であり、記載される複合体と併用して使用してもよい。例示的な治療ネイキッド抗体は上述されている。

10

## 【0164】

毒素は、例えば、オンコナーゼDNase I、Staphylococcal、エンテロトキシンA、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素、およびシュードモナス内毒素を含んでもよい。

## 【0165】

免疫調製物質は、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血細胞因子、コロニー刺激因子 (CSF)、インターフェロン (IFN)、エリスロポエチン、トロンボポエチンおよびそれらの組み合わせから選択されてもよい。特に有益なものは、腫瘍壊死因子 (TNF) などのリンホトキシン、インターロイキン (IL) などの造血性因子、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) などのコロニー刺激因子、インターフェロン、または などのインターフェロン、および「S1因子」と呼ばれる幹細胞増殖因子である。サイトカインに誘導されるものは、ヒト増殖ホルモン、N-メチオニル ヒト増殖ホルモン、およびウシ増殖ホルモンなどの増殖ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；卵胞刺激ホルモン (FSH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、および黄体ホルモン (LH) などの糖タンパク質ホルモン；肝臓増殖因子；

プロスタグランジン、線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン、OBタンパク質；腫瘍壊死因子 - および - ；ミューラー管抑制因子；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン (TPO)；NGF - などの神経増殖因子；血小板増殖因子；TGF - および TGF - などの形質転換増殖因子 (TGFs)；インスリン様増殖因子 - I および - II；エリスロポエチン (EPO)；骨誘導性因子；インターフェロン、および などのインターフェロン；マクロファージ-CSF (M-CSF) などのコロニー刺激因子 (CSFs)；IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23、IL-25 などの、インターロイキン (ILs)、LIF、キット-リガンドまたは FLT-3、アンジオスタチン、トロンボスポンジン、エンドスタチン、腫瘍壊死因子およびLTから選択されてもよい。

20

30

40

## 【0166】

使用されるケモカインとして、RANTES、MCAF、MIP1 -、MIP1 -、およびIP-10を含む。

## 【0167】

<sup>11</sup>In、<sup>177</sup>Lu、<sup>212</sup>Bi、<sup>213</sup>Bi、<sup>211</sup>At、<sup>62</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>90</sup>Y、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>47</sup>Sc、<sup>111</sup>Ag、<sup>67</sup>Ga、<sup>142</sup>Pr、<sup>153</sup>Sm、<sup>161</sup>Tb、<sup>166</sup>Dy、<sup>166</sup>Ho、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、

50

$^{189}\text{Re}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{77}\text{As}$ 、 $^8$   
 $^9\text{Sr}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{169}\text{Er}$ 、 $^{1$   
 $^9\text{Ir}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{227}\text{Th}$ 、および $^{211}\text{Pb}$ 。好ましくは、治療  
 用放射線核種は、オージェエミッタ (Auger emitter) で20~6,000  
 keVの範囲、好ましくは60~200keVの範囲の崩壊エネルギー、ベータエミッタ  
 で100~2,500keVの崩壊エネルギー、アルファエミッタで4,000~6,0  
 00keVの範囲の崩壊エネルギーを有する。有益な粒子放射核種の最大崩壊エネルギ  
 ーは、好ましくは、20~5,000keV、より好ましくは100~4,000keV  
 、および最も好ましくは500~2,500keVである。また、実質的にオージェ放射  
 電子を放射する粒子で崩壊する放射線核種、例えば、Co-58、Ga-67、Br-8  
 0m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I  
 -125、Ho-161、Os-189m、およびIr-192が好ましい。有益な粒  
 子放射核種の崩壊エネルギーは、好ましくは、1,000keV未満、より好ましくは1  
 00keV未満、最も好ましくは70keV未満である。また、粒子の発生により実質  
 的に崩壊する放射線核種が好ましい。このような放射線核種は、限定するものではないが  
 、Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-2  
 15、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213、Th  
 -227、およびFm-255を含む。有益な粒子を放射する放射線核種の崩壊エネルギ  
 ーは、好ましくは、2,000~10,000keV、より好ましくは、3,000k  
 eV~8,000keV、および最も好ましくは、4,000keV~7,000keV  
 である。さらに使用される可能性のある放射線同位体は、 $^1\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{75}\text{B}$   
 $^r$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{224}\text{Ac}$ 、 $^{126}\text{I}$ 、 $^{133}\text{I}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 $^{95}\text{Ru}$   
 $^9\text{Ru}$ 、 $^{103}\text{Ru}$ 、 $^{105}\text{Ru}$ 、 $^{107}\text{Hg}$ 、 $^{203}\text{Hg}$ 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122}$   
 $^{\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{165}\text{Tm}$ 、 $^{167}\text{Tm}$ 、 $^{168}\text{Tm}$ 、 $^{197}\text{Pt}$ 、 $^{109}\text{Pd}$   
 $^9\text{Pd}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{57}\text{C}$   
 $^o$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{1$   
 $^{69}\text{Yb}$ などを含む。

#### 【0168】

治療剤は、光活動性の薬剤または色素を含んでもよい。蛍光色素などの蛍光性組成物、  
 および可視光に感応性のある他の色素体またはポルフィリンなどの色素は、適切な光を病  
 変に導くことにより病変を検出し、処置するために使用されている。治療では、これは、  
 光放射、光線治療、または光線力学的治療と呼ばれる。Jori et al. (eds  
 .), PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OT  
 HER DISEASES (Libreria Progetto 1985); van  
 den Bergh, Chem. Britain (1986), 22:430を参照され  
 たい。さらに、モノクローナル抗体は、光線治療を達成させる光活性型色素と結合させ  
 ている。Mew et al., J. Immunol. (1983), 130:1473  
 ; idem., Cancer Res. (1985), 45:4380; Oserof  
 f et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986), 83  
 :8744; idem., Photochem. Photobiol. (1987), 4  
 6:83; Hasan et al., Prog. Clin. Biol. Res. (19  
 89), 288:471; Tatsuta et al., Lasers Surg. M  
 ed. (1989), 9:422; Pelegrin et al., Cancer (1  
 991), 67:2529を参照されたい。

#### 【0169】

副腎皮質ステロイドホルモンは、他の化学治療剤の効果を増大させることができ、結果  
 として、これらは併用治療に頻繁に使用されている。プレドニゾンおよびデキサメタゾン  
 は、副腎皮質ステロイドホルモンの例である。

#### 【0170】

特定の実施形態では、アンジオスタチン、バキュロスタチン (baculostati 50

n)、カンスタチン(canstatin)、マスピン、抗胎盤増殖因子(PLGF)ペプチドおよび抗体、抗血管増殖因子抗体(抗-VEGFおよび抗-PLGFなど)、抗Flk-1抗体、抗Flt-1抗体およびペプチド、抗Kras抗体、抗cMET抗体、抗MIF(マクロファージ遊走阻止因子)抗体、ラミニンペプチド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン-12、IP-10、Gro-、トロンボスポンジン、2-メトキシエストラジオール、プロリフェリン関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、CM101、マリマスタット、ペントサンポリ硫酸、アンジオポエチン-2、インターフェロン、ハービマイシンA、PNU145156E、16Kプロラクチンフラグメント、リノミド、サリドマイド、ペントキシフィリン、ゲニステイン、TNP-470、エンドスタチン、パクリタキセル、アキューチン(accurtin)、アンジオスタチン、シドホビル、ピンクリスチン、プレオマイシン、AGM-1470、血小板因子4またはミノサイクリンなどの抗血管新生剤を使用してもよい。

10

## 【0171】

治療剤は、siRNAなどのオリゴヌクレオチドを含んでもよい。当業者は、いずれかのsiRNAまたは干渉RNAの種が、標的組織に送達されるために抗体または抗体フラグメントに付着してもよいことを理解している。多様な標的に対する多くのsiRNA種は当業者に公知であり、このような任意の既知のsiRNAが特許請求される方法および組成物に使用されてもよい。

20

## 【0172】

使用される可能性のある既知のsiRNA種は、IKK-(米国特許第7,022,828号);VEGF、Flt-1およびFlk-1/KDR(米国特許第7,148,342号);Bcl2およびEGFR(米国特許第7,541,453号);CDC20(米国特許第7,550,572号);トランスデュシン()-様3(米国特許第7,576,196号);KRAS(米国特許第7,576,197号);炭酸脱水酵素I(米国特許第7,579,457号);補体成分3(米国特許第7,582,746号);インターロイキン-1受容体関連キナーゼ4(IRAK4)(米国特許第7,592,443号);サバイピン(米国特許第7,608,7070号);スーパーオキシドジスムターゼ1(米国特許第7,632,938号);MET癌原遺伝子(米国特許第7,632,939号);アミロイド前駆体タンパク質(APP)(米国特許第7,635,771号);IGF-1R(米国特許第7,638,621号);ICAM1(米国特許第7,642,349号);補体因子B(米国特許第7,696,344号);p53(第7,781,575号)、ならびにアポリポタンパク質B(第7,795,421号)に特異的な種を含み、参照される各特許の実施例部は参照により本明細書に援用される。

30

## 【0173】

追加的なsiRNA種は、Sigma-Aldrich(ミズーリ州セントルイス)、Invitrogen(カリフォルニア州カールスバッド)、Santa Cruz Biotechnology(カリフォルニア州サンタクルーズ)、Ambion(テキサス州オースティン)、Dharmacon(Thermo Scientific、コロラド州ラファイエット)、Promega(ウィスコンシン州マディソン)、Mirus Bio(ウィスコンシン州マディソン)およびQiagen(カリフォルニア州バレンシア)などの既知の商業的供給源、および多くの他の商業的供給源から入手可能である。他のsiRNA種の公共に入手可能な供給源は、Stockholm Bioinformatics CentreのsiRNAdbデータベース、MIT/ICBP siRNAデータベース、Broad InstituteのRNAi ConsortiumのshRNAライブラリ、およびNCBIのプロープデータベースを含む。例えば、NCBIプロープデータベースには、30,852のsiRNA種が存在する。当業者は、対象となるいずれかの遺伝子で、siRNA種がすでに設計されているか、または公共的に入手可能なソフトウェアツールを使用して容易に設計され得ることを理解するものであ

40

50

る。このような s i R N A 種のいずれかは、対象の D N A 複合体を使用して送達されてもよい。

【0174】

診断薬は、好ましくは、放射線核種、放射線造影剤、常磁性イオン、金属、蛍光標識、化学発光標識、超音波造影剤、および光活動性剤からなる群から選択される。このような診断薬は公知であり、このような既知の診断薬を使用してもよい。診断薬の非限定的な例として、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{110}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{120}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{154}\text{-}^{158}\text{Gd}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{51}\text{Mn}$ 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{75}\text{Br}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 $^{83}\text{Sr}$ 、または他の、ベータ、もしくは陽電子放射体などの放射線核種を含んでもよい。

10

【0175】

使用される常磁性イオンは、クロム ( I I I )、マンガン ( I I )、鉄 ( I I I )、鉄 ( I I )、コバルト ( I I )、ニッケル ( I I )、銅 ( I I )、ネオジウム ( I I I )、サマリウム ( I I I )、イッテルビウム ( I I I )、ガドリニウム ( I I I )、バナジウム ( I I )、テルビウム ( I I I )、ジスプロシウム ( I I I )、ホルミウム ( I I I ) またはエルビウム ( I I I ) を含んでもよい。金属造影剤は、ランタン ( I I I )、金 ( I I I )、鉛 ( I I )、またはビスマス ( I I I ) を含んでもよい。

20

【0176】

超音波造影剤は、気体充填リポソームなどのリポソームを含んでもよい。放射線不透性診断薬は、化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物、およびタリウム化合物から選択されてもよい。幅広い範囲の蛍光標識は当業者に公知であり、限定するものではないが、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン ( p h y c o e r y t h e r i n )、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルアルデヒド ( p h t h a l d e h y d e )、およびフルオレサミンを含む。使用される化学蛍光標識は、ルミノール、イソルミノール、芳香アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、またはシュウ酸エステルを含んでもよい。

【0177】

製剤および投与

30

複合体の投与に適切な経路は、限定するものではないが、経口、非経口、直腸、経粘膜的、腸管内投与、髄内、くも膜下腔内、直接的な心室内、静脈内、硝子体内、腔内、腹腔内、または腫瘍内への注射を含む。好ましい投与経路は、非経口性、より好ましくは静脈内への投与である。あるいは、全身性の方法よりも局所的な方法で化合物を投与してもよく、例えば、固形腫瘍または血液学的腫瘍に直接化合物を注射することを介した投与であってもよい。

【0178】

免疫複合体は、薬学的に有益な組成物を調製する既知の方法により製剤化し、これにより免疫的な複合体を薬学的に適切な賦形剤と混合して併用できる。無菌性のリン酸干渉食塩水は、薬学的に適切な賦形剤の一例である。他の適切な賦形剤は当業者に公知である。例えば、Ansel et R M A C E U T I C A L D O S A G E F O R M S A N D D R U G D E L I V E R Y S Y S T E M S , 5 t h E d i t i o n ( L e a & F e b i g e r 1 9 9 0 )、および G e n n a r o ( e d . ) , R E M I N G T O N ' S P H A R M A C E U T I C A L S C I E N C E S , 1 8 t h E d i t i o n ( M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y 1 9 9 0 ) およびこれらの改訂版を参照されたい。

40

【0179】

好ましい実施形態では、免疫複合体は、N - ( 2 - アセトアミド ) - 2 - アミノエタンスルホン酸 ( A C E S ) ; N - ( 2 - アセトアミド ) イミノ二酢酸 ( A D A ) ; N , N - ビス ( 2 - ヒドロキシエチル ) - 2 - アミノエタンスルホン酸 ( B E S ) ; 4 - ( 2 - ヒ

50

ドロキシエチル)ピペラジン - 1 - エタンスルホン酸 (HEPES); 2 - (N - モルフォリノ)エタンスルホン酸 (MES); 3 - (N - モルフォリノ)プロパンスルホン酸 (MOPS); 3 - (N - モルホリニル) - 2 - ヒドロキシプロパンスルホン酸 (MOPSO); およびピペラジン - N, N' - ビス(2 - エタンスルホン酸) [Pipes] となる群から選択される緩衝液を使用したグッドバッファー (pH 6 ~ 7) 中で製剤化される。より好ましい緩衝液は、20 ~ 100 mM の範囲の濃度、より好ましくは約 25 mM の濃度の MES または MOPS である。最も好ましい緩衝液は、pH 6.5、25 mM の MES である。本製剤は、賦形剤の添加の結果、22.25 mM に改変された最終緩衝液濃度での、25 mM のトレハロースおよび賦形剤としての 0.01% v/v のポリソルベート 80 をさらに含んでよい。好ましい保存方法は、複合体の凍結乾燥製剤のように保存され、-20 ~ 2 の温度範囲で保存し、最も好ましくは、2 ~ 8 で保存される。

10

## 【0180】

免疫複合体は、例えば、ボラス注入、遅効性の注入、または連続性の注入を介する静脈内投与用に製剤化される。好ましくは、本発明の抗体は、約 4 時間未満、より好ましくは約 3 時間未満の期間にわたり注入される。例えば、第 1 に 25 ~ 50 mg を 30 分以内、好ましくは 15 分以内に注入し、残りを次の 2 ~ 3 時間にわたり注入できる。注入用の製剤は、例えば、添加保存剤と共に、アンプルまたは複数回用量のコンテナ中の単位剤形内で存在できる。本組成物は、油性または水性ビヒクルにおける懸濁剤、溶液またはエマルジョンとしてこのような形態をとることができ、懸濁剤、安定化剤、および/または分散剤などの製剤を含むことができる。あるいは、活性成分は、使用前に、例えば無菌性のパイロジェンフリー水などの適切なビヒクルと共に構成するための粉体の形態とすることができる。

20

## 【0181】

追加的な薬学的方法を使用して、治療用複合体の作用の持続期間を制御してもよい。徐放の調製は、免疫複合体を複合または吸収するポリマーを使用して調製できる。例えば、生体適合性ポリマーは、ポリ(エチレン - コ - ビニルアセテート)のマトリックスならびにステアリン酸二量体およびセバシン酸のポリ無水物コポリマーのマトリックスを含む (Sherwood et al., Bio/Technology 10: 1446 (1992))。このようなマトリックスからの免疫複合体の放出率は、免疫複合体の分子量、マトリックス内の免疫複合体の量、および分散した粒子の寸法に依存する。Saltzman et al., Biophys. J. 55: 163 (1989); Sherwood et al., supra。他の個体剤形は、Ansel et al. RMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990)、および Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990)、ならびにこれらの改訂版に記載される。

30

## 【0182】

一般的に、ヒトに投与される免疫複合体の用量は、患者の年齢、体重、身長、性別、一般的な健康状態、および以前の医学的経歴などの因子に応じて変動する。単一静脈内注射として 0.3 mg/kg ~ 5 mg/kg の範囲の免疫複合体の用量をレシピエントに提供することが望ましいが、状況に応じて上記より高いまたは低い用量で投与してもよい。70 kg の患者に 0.3 ~ 5 mg/kg の用量とは、例えば、1.7 m の患者に 21 ~ 350 mg、または 12 ~ 206 mg/m<sup>2</sup> である。用量は、例えば、2 ~ 10 週間の間週 1 回、8 週間の間週 1 回、4 週間の間週 1 回のように、必要に応じて反復されてもよい。また、維持治療に必要な際には、数か月間隔週ごと、またはそれより多い月の間、1 ヶ月に 1 度もしくは年に 4 回など、頻度を減らして行ってもよい。好ましい用量は、限定するものではないが、0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、0.7 mg/kg、1.0 mg/kg、1.2 mg/kg、1.5 mg/kg、2.0 mg/kg、2.5 mg/kg、3.0 mg/kg、3.5 mg/kg、4.0 mg/kg、4.5 mg/kg、および 5.

40

50

0 mg / kg を含んでもよい。より好ましい用量は、0.6 mg / kg の毎週の投与、およびそれより低い頻度での1.2 mg / kg の投与である。0.3 ~ 5 mg / kg の範囲の量を使用してもよい。好ましくは、この用量を1週間に1度、複数回投与する。4週間の、より好ましくは8週間、より好ましくは16週間以上の最小用量スケジュールを、主に血液学的動性に関連する毒性副作用および副作用からの回復に応じた用量頻度で使用してもよい。投与スケジュールは、(i) 毎週、(ii) 隔週、(iii) 1週間の治療の後、2、3、または4週間の休薬、(iv) 2週間の治療の後、1週間、2週間、3週間、または4週間の休薬、(v) 3週間の治療の後、1週間、2週間、3週間、4週間、または5週間の休薬、(vi) 4週間の治療の後、1週間、2週間、3週間、4週間、または5週間の休薬、および(viii) 毎月からなる群からな選択される周期で、1週間に1回または2回の投与を含んでもよい。この周期は、2回、4回、6回、8回、10回、または12回以上反復されてもよい。

10

20

30

40

50

#### 【0183】

あるいは、免疫複合体は、2または3週間ごとに1用量を投与してもよく、少なくとも合計3つの用量で反復されてもよい。または、4~6週間、1週間に2回投与してもよい。この用量は、隔週に一度投与してもよく、またはそれよりも低い頻度で投与してもよく、これにより、患者はいずれかの薬剤関連毒性から回復できる。あるいは、用量スケジュールを2~3か月間、2または3週間ごとと、少なくしてもよい。用量スケジュールは、任意に他の間隔で反復でき、用量およびスケジュールを適切に調節することにより、多様な非経口経路を介して用量を得てもよい。

#### 【0184】

好ましい実施形態では、免疫複合体は、癌の治療に使用される。例示的な癌は、限定するものではないが、細胞腫、リンパ腫、神経膠芽腫、黒色腫、肉腫および白血病、リンパ系腫瘍を含む。このような癌のより特定した例は以下に記載されており、扁平上皮癌(例えば扁平上皮癌(epithelial squamous cell cancer))、ユーイング肉腫、ウィルムス腫瘍、星状細胞腫、小細胞肺癌、非小細胞性肺癌、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌を含む肺癌、胃腸癌を含む胃癌(gastricまたはstomach)、膵臓癌、多形神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、肝細胞癌、神経内分泌腫瘍、甲状腺髄様癌、甲状腺分化癌、乳癌、卵巣癌、結腸癌、直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌(kidneyまたはrenal)、前立腺癌、外陰癌、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭頸部癌を含む。用語「癌」は、原発性悪性細胞または組織(例えば、これらの細胞は元となる悪性部位または腫瘍以外の対象の部位に移動しない)、二次悪性細胞または腫瘍(例えば、転移から生じ、元の腫瘍の部位と異なる二次的な部位への悪性細胞または腫瘍細胞が移動する)を含む。

#### 【0185】

癌または悪性腫瘍の他の例は、限定するものではないが、急性小児性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、成人性(原発性)肝細胞癌、成人性(原発性)肝臓癌、成人性急性リンパ球性白血病、成人性急性骨髄性白血病、成人性ホジキンリンパ腫、成人性リンパ球性白血病、成人性非ホジキンリンパ腫、成人性原発性肝臓癌、成人軟組織肉腫、エイズ関連リンパ腫、エイズ関連悪性腫瘍、肛門癌、星状細胞腫、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、乳癌、腎盂および尿管の癌、中枢神経系(原発性)リンパ腫、中枢神経系リンパ腫、小脳星状細胞腫、小脳星状細胞腫、子宮頸癌、小児性(原発性)肝細胞癌、小児性(原発性)肝臓癌、小児性急性リンパ性白血病、小児性急性骨髄性白血病、小児性脳幹神経膠腫、小児性小脳星状細胞腫、小児性小脳星状細胞腫、小児性頭蓋外胚細胞腫瘍、小児性ホジキン疾患、小児性ホジキンリンパ腫、小児性視床下部および視覚路の神経膠腫、小児性リンパ性白血病、小児性髄芽腫、小児性非ホジキンリンパ腫、小児性松果体およびテント上の原始神経外胚葉性腫瘍、小児性原発性肝臓癌、小児性横紋筋肉腫、小児性軟組織肉腫、小児性視覚路および視床下部の神経膠腫、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸癌、皮膚性T細

胞リンパ腫、内分泌性ランゲルハルス島細胞腫、子宮内膜癌、上衣腫、上皮癌、食道癌、ユーイング肉腫および関連する腫瘍、外分泌性膵臓癌、頭蓋外肺細胞腫瘍、性腺外生殖細胞腫瘍、肝臓外胆管癌、眼癌、女性の乳癌、ゴーシェ病、胆嚢癌、胃癌、胃腸系カルチノイド腫瘍、胃腸腫瘍、生殖細胞腫瘍、妊娠性絨毛腫瘍、ヘアリーセル白血病、頭頸部癌、肝細胞癌、ホジキンリンパ腫、高ガンマグロブリン血漿、下咽頭癌、腸癌、眼球内黒色腫、膵島細胞癌、膵島細胞癌 (Islet Cell Pancreatic Cancer)、カボジ肉腫、腎臓癌、喉頭癌、唇および口腔癌、肝臓癌、肺癌、リンパ増殖性疾患、マクログロブリン血漿、男性の乳癌、悪性中皮腫、悪性胸腺腫、髄芽腫、黒色腫、中皮腫、原発不明転移性扁平上皮性頸部癌、原発転移性扁平上皮性頸部癌、転移性扁平上皮性頸部癌、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫/形質細胞腫瘍、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病 (myelogenous leukemia)、骨髄性白血病 (myeloid leukemia)、骨髄増殖性疾患、鼻腔および副鼻腔癌、上咽頭癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、非黒色腫皮膚癌、非小細胞性肺癌、原発不明転移性扁平上皮性頸部癌 (Occult Primary Metastatic Squamous Neck Cancer)、中咽頭癌、骨性/悪性繊維肉腫、骨肉腫/悪性線維性組織球腫、骨の骨肉腫/悪性線維性組織球腫、卵巣上皮癌、卵巣生殖細胞腫瘍、卵巣低悪性潜在腫瘍、膵臓癌、異常タンパク血症、真性多血症、甲状腺癌、副甲状腺癌、陰茎癌、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性肝臓癌、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎盂および尿管の癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、サルコイドーシス肉腫、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟組織肉腫、扁平上皮頸部癌、胃癌、テント上原始神経外胚葉性腫瘍および松果体腫瘍、T細胞リンパ腫、精巣癌、胸腺腫、甲状腺癌、腎盂および尿管の移行性細胞癌、移行性の腎盂および尿管の癌、絨毛性腫瘍、尿管および腎盂の細胞癌、尿道癌、子宮癌、子宮肉腫、陰癌、視覚路および視床下部の神経膠腫、外陰癌、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍、ならびに上述の臓器系に置かれる新生物以外の他のいずれかの過剰増殖疾患を含む。

10

20

## 【0186】

本明細書に記載されかつ請求される方法および組成物を使用して、悪性条件または前悪性条件を処置し、限定するものではないが、上述に記載の障害を含む、新生物状態または悪性状態への進行を防止してもよい。このような使用は、新生物または癌への進行、特に、過形成、異形成、また最も具体的には異形成症 (dysplasia) からなる非新生物細胞増殖が起こる新生物または癌への進行することが知られているか、または疑いのある条件に必要とされている (このような異常増殖条件の概説として、Robbins and Angel, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-79 (1976) を参照とされたい)。

30

## 【0187】

異形成症は、しばしば癌の前兆であり、主に上皮で見いだされる。異形成症は、個々の細胞の均一性および細胞の構造学的配向の消失を含む、非新生物細胞増殖の最も乱雑な形態である。異形成症は、慢性的な刺激または炎症が存在する場所で起こることを特徴とする。治療できる異形成障害は、限定するものではないが、無汗性外胚葉形成異常症、前後形成異常、窒息性胸郭形成異常、心房異形成症、気管支肺異形成症、脳異形成症、子宮頸部異形成、軟骨外胚葉異形成、鎖骨頭蓋異形成症、先天性外胚葉異形成症、頭蓋骨幹形成異常 (cranio-carpotarsal dysplasia)、頭尾軸骨幹端異形成症 (cranio-metaphyseal dysplasia)、象牙質異形成症、骨幹異形成症、外胚葉異形成症、エナメル質異形成症、脳眼異形成症、半肢骨端線異形成症、多発性骨端形成異常、点状骨端形成異常、上皮性異形成症、顔面指趾生殖器異形成症、下顎の家族性線維性異形成、家族性白色癩性異形成症、線維筋異形成症、骨の線維性骨異形成症、顎骨セメント質異形成症 (florid osseous dysplasia)、先天性腎-網膜異形成症、発汗性外胚葉異形成症、発汗低下性外胚葉異形成症、リンパ性減少性胸腺異形成症、乳房異形成症、下顎顔面異形成症、骨幹端異形成症、モンデ

40

50



イーニ奇形、単骨性線維性骨異形成症、粘膜上皮異形成症、多発性骨端異形成症、眼耳脊椎異形成症、眼歯指異形成症、眼脊椎異形成症、歯牙異形成症、眼下顎形成異常、根尖部セメント質異形成症、多骨性線維性骨異形成症、偽軟骨発育不全脊椎骨端形成異常、網膜異形成症、中隔視神経異形成症、脊椎骨異形成症、ならびに心室橈骨異形成症を含む。

【0188】

治療できる追加的な前新生物障害は、限定するものではないが、良性異常増殖性障害 (benign dysproliferative disorders) (例えば、良性腫瘍、線維嚢胞性病態、組織の肥大、腸ポリープまたはアデノーマ、および食道異形成)、白板症、角化症、ポーエン病、農夫皮膚、太陽性口唇炎、ならびに日光角化症を含む。

10

【0189】

好ましい実施形態では、本発明の方法を使用して、癌、特に上記に列挙した癌の増殖、進行、および/または転移を阻害する。

【0190】

追加的な過剰増殖性疾患、および/または病態は、限定するものではないが、白血病 (急性白血病、例えば急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病 (骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、および赤白血病) を含む)、および慢性白血病 (例えば慢性骨髄球性 (顆粒球性) 白血病、および慢性リンパ球性白血病)、真性多血症、リンパ腫 (例えばホジキン疾患および非ホジキン疾患)、多発性骨髄症、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖疾患、ならびに、限定する物ではないが、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫 (lymphangioperithelioma)、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸細胞腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平細胞腫、基底細胞腫、腺癌、汗腺細胞腫、皮脂腺細胞腫、乳頭細胞腫、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞腫、肝細胞腫、胆管細胞腫、絨毛癌、精上皮腫、胚性癌腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺細胞腫、小細胞肺細胞腫、膀胱細胞腫、上皮細胞腫、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫 (emangioblastoma)、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫などの肉腫および細胞腫を含む固形腫瘍を含む。

20

30

【0191】

免疫複合体で処置し得る自己免疫疾患は、急性かつ慢性免疫血小板減少、皮膚筋炎、シデナム舞踏病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、真性糖尿病、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、連鎖球菌性感染後腎炎、結節性紅斑、高安動脈炎、ANCA関連血管炎 (ANCA-associated vasculitide)、アジソン病、関節リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、閉塞性血栓性血管炎 (thromboangiitis obliterans)、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本病、甲状腺中毒症、強皮症、慢性活動性肝炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発性軟骨炎、水疱性類天疱瘡、尋常性天疱瘡、ウェゲナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄癆、巨細胞性動脈炎/多発性筋痛、悪性貧血、急速進行性糸球体腎炎、乾癬、または線維性肺炎を含む。

40

【0192】

好ましい実施形態では、hRS7 Mabなどの抗EGP-1 (抗TROP-2) 抗体を含む治療複合体を使用して、食道、膵臓、肺、胃、結腸および直腸、膀胱、乳房、卵巣、子宮、腎臓、および前立腺の細胞腫などの細胞腫を、米国特許第7,238,785号、第7,517,964号、および第8,084,583号に開示されるように治療でき、これら文献の実施例部は参照により本明細書に援用される。hRS7抗体は、軽鎖相補性決定領域 (CDR) 配列CDR1 (KASQDVSIAVA、配列番号: 90); CD

50

R 2 ( S A S Y R Y T、配列番号： 9 1 ) ; および C D R 3 ( Q Q H Y I T P L T、配列番号： 9 2 ) ならびに重鎖 C D R 配列 C D R 1 ( N Y G M N、配列番号： 9 3 ) ; C D R 2 ( W I N T Y T G E P T Y T D D F K G、配列番号： 9 4 ) および C D R 3 ( G G F G S S Y W Y F D V、配列番号： 9 5 ) を含むヒト化抗体である。

【 0 1 9 3 】

別の好ましい実施形態では、抗 C E A C A M 5 抗体 ( 例えば h M N - 1 4、ラベツズマブ ( l a b r e t u z u m a b ) ) および / または抗 C E A C A M 6 抗体 ( 例えば h M N - 3 または h M N 0 1 5 ) を含む治療複合体を使用して、米国特許第 7 , 5 4 1 , 4 4 0 号 ; 第 7 , 9 5 1 , 3 6 9 号 ; 第 5 , 8 7 4 , 5 4 0 号 ; 第 6 , 6 7 6 , 9 2 4 号 および 第 8 , 2 6 7 , 8 6 5 号 に開示されるように、 C E A C A M 5 および / または C E A C A M 6 を発現する様々な癌のいずれかを処置してもよく、これら文献の各実施例部は参照により本明細書に援用され得る。抗 C E A C A M 5、抗 C E A C A M 6、またはこの 2 つの組み合わせを使用して処置し得る固形腫瘍は、限定するものではないが、乳癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、甲状腺髄様癌、卵巣癌、結腸癌、直腸癌、膀胱癌、口癌、および胃癌を含む。胃腸癌、呼吸器癌、尿生殖器癌、および乳癌を含むほとんどの細胞腫は C E A C A M 5 を発現し、対象の免疫複合体を用いて処置されてもよい。h M N - 1 4 抗体は、軽鎖可変領域 C D R 配列 C D R 1 ( K A S Q D V G T S V A ; 配列番号： 9 6 )、C D R 2 ( W T S T R H T ; 配列番号： 9 7 )、および C D R 3 ( Q Q Y S L Y R S ; 配列番号： 9 8 )、ならびに重鎖可変領域 C D R 配列 C D R 1 ( T Y W M S ; 配列番号： 9 9 )、C D R 2 ( E I H P D S S T I N Y A P S L K D ; 配列番号： 1 0 0 ) および C D R 3 ( L Y F G F P W F A Y ; 配列番号： 1 0 1 ) を含むヒト化抗体である。h M N - 3 抗体は、軽鎖可変領域 C D R 配列 C D R 1 ( R S S Q S I V H S N G N T Y L E、配列番号： 1 0 2 )、C D R 2 ( K V S N R F S、配列番号： 1 0 3 ) および C D R 3 ( F Q G S H V P P T、配列番号： 1 0 4 ) ならびに重鎖 C D R 配列 C D R 1 ( N Y G M N、配列番号： 1 0 5 )、C D R 2 ( W I N T Y T G E P T Y A D D F K G、配列番号： 1 0 6 ) および C D R 3 ( K G W M D F N S S L D Y、配列番号： 1 0 7 ) を含むヒト化抗体である。h M N - 1 5 抗体は、軽鎖可変領域 C D R 配列 S A S S R V S Y I H ( 配列番号： 1 0 8 ) ; G T S T L A S ( 配列番号： 1 0 9 ) ; および Q Q W S Y N P P T ( 配列番号： 1 1 0 ) ; ならびに重鎖可変領域 C D R 配列 D Y Y M S ( 配列番号： 1 1 1 ) ; F I A N K A N G H T T D Y S P S V K G ( 配列番号： 1 1 2 ) ; および D M G I R W N F D V ( 配列番号： 1 1 3 ) を含むヒト化抗体である。

【 0 1 9 4 】

別の好ましい実施形態では、抗 C D 7 4 抗体 ( 例えば、米国特許第 7 , 0 7 4 , 4 0 3 号 ; 第 7 , 3 1 2 , 3 1 8 号 ; 第 7 , 7 7 2 , 3 7 3 号 ; 第 7 , 9 1 9 , 0 8 7 号 および 第 7 , 9 3 1 , 9 0 3 号 に開示される h L L 1、ミラツズマブ。これら文献の実施例部は参照により本明細書に援用される ) を含む治療複合体を使用して、限定するものではないが、腎臓癌、肺癌、腸癌、胃癌、乳癌、前立腺癌、または卵巣癌、ならびに、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫、およびホジキン腫などのいくつかの血液系癌を含む、C D 7 4 を発現する様々な癌のいずれかを処置してもよい。h L L 1 抗体は、軽鎖 C D R 配列 C D R 1 ( R S S Q S L V H R N G N T Y L H ; 配列番号： 1 1 4 )、C D R 2 ( T V S N R F S ; 配列番号： 1 1 5 )、および C D R 3 ( S Q S S H V P P T ; 配列番号： 1 1 6 )、ならびに重鎖可変領域 C D R 配列 C D R 1 ( N Y G V N ; 配列番号： 1 1 7 )、C D R 2 ( W I N P N T G E P T F D D D F K G ; 配列番号： 1 1 8 )、および C D R 3 ( S R G K N E A W F A Y ; 配列番号： 1 1 9 ) を含むヒト化抗体である。

【 0 1 9 5 】

別の好ましい実施形態では、抗 C D 2 2 抗体 ( 例えば、米国特許第 5 , 7 8 9 , 5 5 4 号 ; 第 6 , 1 8 3 , 7 4 4 号 ; 第 6 , 1 8 7 , 2 8 7 号 ; 第 6 , 3 0 6 , 3 9 3 号 ; 第 7 , 0 7 4 , 4 0 3 号 および 第 7 , 6 4 1 , 9 0 1 号 に開示される h L L 2、エブラツズマブ。( 各実施例部は参照により本明細書に援用される )、またはキメラ化またはヒト化の

10

20

30

40

50

RFB4抗体)を含む治療複合体を使用して、限定するものではないが、B細胞リンパ腫の緩徐進行型形態、B細胞リンパ腫の侵襲性形態、慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、またはびまん性B細胞リンパ腫を含む、CD22を発現する様々な癌のいずれかを処置してもよい。hLL2抗体は、軽鎖CDR配列CDR1(KSSQSVLYSANHKYL A、配列番号:120)、CDR2(WASTRES、配列番号:121)、およびCDR3(HQYLSSTWF、配列番号:122)、ならびに重鎖CDR配列CDR1(SYWLH、配列番号:123)、CDR2(YINPRNDYTEYNQNFKD、配列番号:124)、およびCDR3(RDITTFY、配列番号:125)を含むヒト化抗体である。

10

## 【0196】

好ましい実施形態では、hMu-9 Mabなどの抗CSAp抗体を含む治療複合体を使用して、米国特許第6,962,702号;第7,387,772号;第7,414,121号;第7,553,953号;第7,641,891号および第7,670,804号に開示されるように、膵臓癌および卵巣癌と同様に結腸癌を処置できる。これら文献の各実施例部は参照により本明細書に援用される。さらに、hPAM4 Mabを含む治療複合体を使用して、米国特許第7,238,786号および第7,282,567号に開示されるように、膵臓癌または他の個体腫瘍を処置できる。これら文献の各実施例部は参照により本明細書に援用される。hMu-9抗体は、軽鎖CDR配列CDR1(RSSQSI VHSNGNTYLE、配列番号:126)、CDR2(KVSNRFS、配列番号:127)およびCDR3(FQGS RVPYT、配列番号:128)、ならびに重鎖可変CDR配列CDR1(EYVIT、配列番号:129)、CDR2(EIYPGS GSTSYNEKFK、配列番号:130)およびCDR3(EDL、配列番号:131)を含むヒト化抗体である。

20

## 【0197】

別の好ましい実施形態では、hPAM4 Mabなどの抗MUC5ac抗体を含む治療複合体を使用して、米国特許第7,238,786号;第7,282,567号;第8,491,896号および第8,574,854号に開示されるように、膵臓癌、胃癌、結腸癌、または肺癌などの癌を処置できる。これら文献の実施例は本明細書に援用される。hPAM4抗体は、軽鎖可変領域CDR配列CDR1(SASSSVSSSYLY、配列番号:132);CDR2(STSNLAS、配列番号:133);およびCDR3(HQWNRYPYT、配列番号:134);ならびに重鎖CDR配列CDR1(SYVLH、配列番号:135);CDR2(YINPYNDGTQYNEKFKG、配列番号:136)およびCDR3(GFGGSYGFAY、配列番号:137)を含むヒト化抗体である。

30

## 【0198】

別の好ましい実施形態では、IMMU-31などの抗AFP-MAbを含む治療複合体を使用して、米国特許第7,300,655号に開示されるように、ヒト化抗体、キメラ抗体、およびヒト抗体の形態を使用して、肝細胞癌、生殖細胞腫瘍、および他のAFP産生腫瘍を処置できる。この文献の実施例は参照により本明細書に援用される。IMMU-31抗体は、重鎖CDR配列CDR1(SYVIH、配列番号:138)、CDR2(YIHPYNGGTKYNEKFKG、配列番号:139)およびCDR3(SGGGDPFAY、配列番号:140)、ならびに軽鎖CDR1(KASQDINKYIG、配列番号:141)、CDR2(YTSA LLP、配列番号:142)およびCDR3(LQYDDLWT、配列番号:143)を含む、ヒト化抗体である。

40

## 【0199】

別の好ましい実施形態では、hL243などの抗HLA-DR Mabを含む治療複合体を使用して、米国特許第7,612,180号に開示されるように、リンパ腫、白血病、皮膚癌、食道癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、子宮内膜癌、子宮頸部癌、精巣癌、腎臓癌、黒色腫、またはHLA-DR産生腫瘍を処置でき

50

る。この文献の実施例部は参照により本明細書に援用される。hL243抗体は、重鎖CDR配列CDR1(NYGMN、配列番号：144)、CDR2(WINTYTREPTYADDFKG、配列番号：145)、およびCDR3(DITAVVPTGFDY、配列番号：146)ならびに軽鎖CDR配列CDR1(RASENIYSNLA、配列番号：147)、CDR2(AASNLAAD、配列番号：148)、およびCDR3(QHFWTTPWA、配列番号：149)を含むヒト化抗体である。

#### 【0200】

別の好ましい実施形態では、ベルツズマブ(hA20)、1F5、オビヌツズマブ(GA101)、またはリツキシマブなどの抗-CD20MAbを含む治療複合体を使用して、米国特許第7,435,803号または第8,287,864号に開示されるように、リンパ腫、白血病、免疫性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、Evans症候群、関節炎、動脈炎、尋常性天疱瘡、移植腎拒絶、移植心拒絶、関節リウマチ、パーキットリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、びまん性B細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ球性白血病、I型真性糖尿病、GVHD、多発性硬化症または多発性骨髄腫を処置できる。これら文献の実施例部は参照により本明細書に援用される。hA20(ベルツズマブ)抗体は、軽鎖CDR配列CDRL1(RASSSVSYIH、配列番号：150)、CDRL2(ATSNLAS、配列番号：151)およびCDRL3(QQWTSNPP T、配列番号：152)、ならびに重鎖CDR配列CDRH1(SYNMH、配列番号：153)、CDRH2(AIYPGNGDTSYNQKFKG、配列番号：154)およびCDRH3(STYYGGDWYFDV、配列番号：155)を含むヒト化抗体である。

#### 【0201】

別の好ましい実施形態では、hA19などの抗CD-19MAbを含む治療複合体を使用して、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、または急性リンパ性白血病などの、B細胞関連リンパ腫および白血病を処置できる。処置し得る他の疾患状態は、米国特許第7,109,304号、第7,462,352号、第7,902,338号、第8,147,831号および第8,337,840号に開示されるように、急性もしくは慢性免疫血小板減少症、皮膚筋炎、シデナム舞踏病、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、真性糖尿病、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、連鎖球菌性感染後腎炎、紅斑結節炎(erythema nodosum)、高安動脈炎、アジソン病、関節リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、IgA腎症、結節性多発動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、閉塞性血栓性血管炎(thromboangitis obliterans)、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本病、甲状腺中毒症、強皮症、慢性活動性肝炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、多発性軟骨炎、尋常性天疱瘡、ウェゲナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄癆、巨細胞性動脈炎/多発性筋痛、悪性貧血、急速進行性糸球体腎炎、乾癬、および線維性肺胞炎を含んでもよく、これら文献の各実施例部は参照により本明細書に援用される。hA19抗体は、軽鎖CDR配列CDR1KASQSVDYDGD SYLN(配列番号：156)；CDR2DASNLV S(配列番号：157)；およびCDR3QQSTEDPWT(配列番号：158)、ならびに重鎖CDR配列CDR1SYWMN(配列番号：159)；CDR2QIWPGDGD TN YNGKFKG(配列番号：160)およびCDR3RETTTVGRYY YAMDY(配列番号：161)を含むヒト化抗体である。

#### 【0202】

##### キット

様々な実施形態は患者の疾患組織の処置に適した成分を含むキットに関してもよい。例示的なキットは、本明細書に記載される少なくとも1つの抱合型抗体または他の標的化部を含んでもよい。投与用の成分を含む組成物が経口送達などによる、代替的なカナルを介した送達用に製剤化されていない場合、いくつかの他の経路を介してキット成分を送達で

10

20

30

40

50

きる装置が含まれ得る。非経口送達などの使用のための装置の一種は、対象の体内に組成物を注入するために使用するシリンジである。また吸引装置を使用してもよい。

【0203】

キットの成分は、2つ以上のコンテナ内に共に詰められていてもよく、または別々に詰められていてもよい。一部の実施形態では、コンテナは、再構成に適した組成物の無菌凍結乾燥製剤を含むバイアルであってもよい。また、キットは、他の試薬の再構成および/または希釈に適した1つ以上の緩衝液を含んでもよい。使用し得る他のコンテナは、限定するものではないが、ポーチ、トレイ、ボックス、チューブなどを含んでもよい。キットの組成は、コンテナ内に無菌的に詰められ、維持されてもよい。含まれてよい別の構成要素としては、キットの使用者が使用するための説明書が挙げられる。

10

【0204】

実施例

実施例1. プロ-2-ピロリノドキシソルピシン (P2PDox) の生成および使用

合成 - 抗体、または他のタンパク質、またはスルフヒドリル含有ペプチドに対する抱合に適したP2PDoxのマレイミド誘導体と同様に、P2PDoxの合成経路中の中間物質の構造を図1A~Dに示す。例示的なP2PDoxを生成するスキームを以下のスキーム1に示す。本出願人は、40%未満に収率で1g超の4,4-ジアセトキシブチルアルデヒド (diacetyoxybutyraldehyde) を生成する1gスケール反応を実施した。シアン化物で生成物を汚染する可能性のあるシアノ水素化ホウ素ナトリウムを回避するため、還元剤を還元性アルキル化においてナトリウムトリアセトキシボロヒドリドに変更した。探索スケールに関しては、P2PDoxへの80%超のドキシソルピシンの転化が記録された。このことは、1g超のP2PDox (スキーム1) を作製するために2gスケールまで増大された。4,4-ジアセトキシブチルアルデヒドを、報告されている方法を修正して調製した (Nagy et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A 95:1794-9)。この方法では、有害なオゾン分解方法を避ける必要がある。無水酢酸および塩化インジウム触媒で商業的に入手可能な4-ペンテン-1-オールジアセトキシ化の後に、4,4-ジアセトキシブチルアルデヒドを備えた塩化ルテニウムおよび過ヨウ素酸ナトリウムの組み合わせ (Yang & Zhang, 2001, 66:4814-8) によるオレフィンの酸化切断を行った。以下のステップが含まれた。(i) 無水酢酸 (7.45 mL) および塩化インジウム (0.56 g) を含むジクロロメタン (20 mL) の混合物に5.05 gの4-ペンテン-1-オールを添加した。10~30分後、反応混合物を、25%の水性酢酸ナトリウム (20 mL) で処理し、有機層を鹼水で洗浄し、乾燥させた。溶媒を除去して、15.3 gの液体生成物を得て、次のステップに進んだ。(ii) 3.5 mMの塩化ルテニウム原液を含む水 (69.4 mL) を、おけるステップ(i)の生成物を含むジクロロメタンを含む6:1のアセトニトリル:水 (350 mL) 溶液に添加した。過ヨウ素酸ナトリウム (29.7 g) を部分的に添加した。完全に反応させた後、TLC解析により判断されるように、反応混合物を、30 mLの飽和チオ硫酸ナトリウムで処理し、セライトパッドを介して濾過し、アセトニトリルを蒸発させた。残りの水層を酢酸エチルで抽出し、25%の酢酸ナトリウム、水、および鹼水で洗浄し、乾燥させた。粗製物質を、溶出用のエチルアセテート-ヘキサン混合物を使用して、シリカゲル上のクロマトグラフィーにより精製した。純粋な生成物を、次のステップのドキシソルピシンの還元性アルキル化に使用した。(iii) 1.5グラムのドキシソルピシン塩酸塩を、1, 1, 1, 3, 3, 3, -ヘキサフルオロイソプロパノール (195 mL) およびジイソプロピルエチルアミン (2.7 mL) に反応させ、ステップ(ii)からのアルデヒド3.4 g (7倍のモル過剰)、および0.66 gのナトリウムトリアセトキシボロヒドリドと反応させた。この反応を10分で完了させ、この生成物を、溶出用のメチレンクロリド-イソプロパノールを使用したシリカゲル上で精製し、0.96 gの純粋な生成物をもたらした。エレクトロスプレー質量スペクトルは、生成物の構造と一致するm/z 716.2570 (M+H) の質量を示した。またこの構造は、プロトンおよびC-13 NMRスペクトルにより確認された。(i

20

30

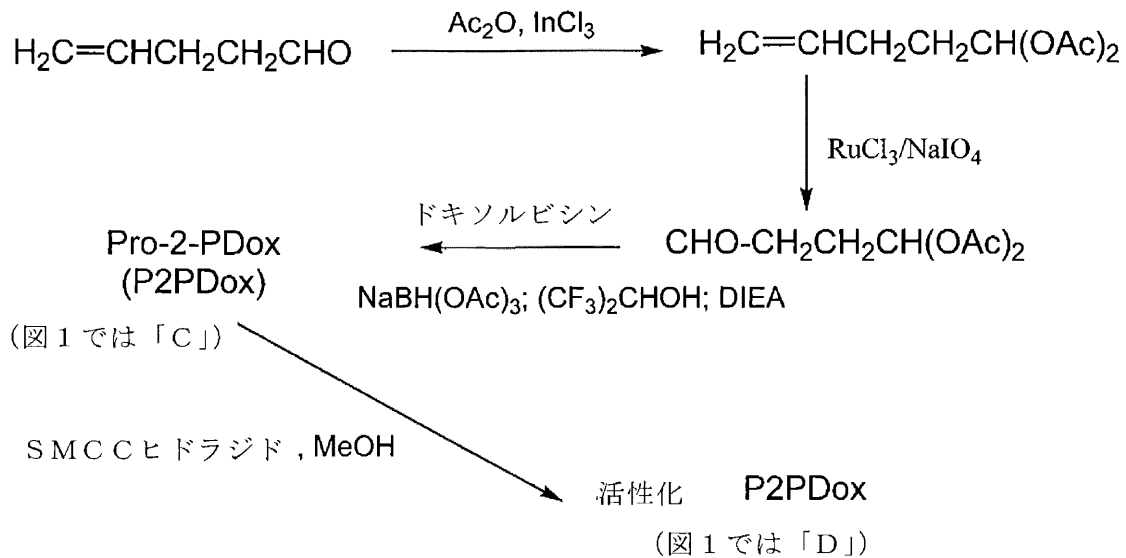
40

50

v) ステップ (iii) 由来の P2PDox を、以下のように SMCC ヒドラジドを使用して MCC ヒドラゾンに変換した。75 ml の無水メタノールに P2PDox を 0.6 g 溶解させ、0.34 g の SMCC ヒドラジドで処置し、使用した P2PDox の分光測定量に基づき 1.8 倍超となるまで計算した。転化率は、計算した質量 949.3713 (M+H) の (m/z) と矛盾することなく、949.3734 (M+H) の m/z で生成物のピークを示した。非誘導体化開始物質は抱合せず、抱合精製過程の間に除去されるため、溶媒を除去した後の物質を抱合などに使用した。

【化 6】

スキーム 1



10

20

【0205】

小規模の抱合調製 - 抱合調製の後、PBS 中において TCEP で IgG の鎖間のジスルフィドを穏やかに還元する一般的な方法が行われ、その後、10 倍超の活性化 P2PDox に結合した。この複合体は、pH 6.8、25 mM の 3-(N-モルフォリノ)プロパンスルホン酸 (MOP S) 中で平衡した SEPHADEX (登録商標) 上の遠心した分子ふるいクロマトグラフィー (SEC) 上で精製し、その後疎水性カラムを通過させた。この生成物を、トレハロースおよびポリソルベート 80 で製剤化し、凍結乾燥した。4~7 薬剤 / IgG の範囲の置換で抱合した生成物を、サイズ排除 HPLC による単一ピークとして溶出し、概して、1% 未満の逆相 HPLC による非抱合型遊離薬剤を含んだ。

30

【0206】

スケールアップ複合調製 ヒト化抗 TROP-2 抗体、hRS7 の複合体を、5 g ~ 10 g のスケールで、抗体の TCEP 還元により調製し、共溶媒 (5% v/v) としての DM SO で、1.2 倍超の活性化した P2PDox を使用して *in situ* で抱合した。生成物を、pH 6.8、25 mM の MOP S 緩衝液を使用したタンジェント流濾過により、精製用の 20-血液透析濾過を用いて精製した。この生成物を、25 mM のトレハロースおよび 0.01% の TWEEN (登録商標) 80 で製剤化し、20 mg または 100 mg のロットを一定分量分取し、凍結乾燥した。

40

【表 6】

## 反応性複合体

	複合体	ロット	% タン パク質 回収	P 2 P D o x /IgG	HPLC	
					Aggr.	遊離薬 剤
1	hIMMU-31-P2P Dox	II22-13 8	75.0%	7.39	1.9%	0.26%
2	hA20-P2PDox	II22-13 5	85.7%	6.79	<2%	<0.1%
3	hLL1-P2PDox	II22-14 5	88.6%	7.10	2.8%	0.2%
4	hRS7-P2PDox	II22-14 2	80.1%	7.17	1.8%	0.12%
5	hMN15-P2PDox	II22-18 0	74.9%	6.87	1.1%	0.46%
6	hMN-14-P2PDo x	II22-18 3	80.2%	6.78	2.1%	0.53%

10

20

## 【0207】

また、複合体は、同様のタンパク質収率および精度（図示せず）を有する、hPAM4 - P2PDox、hLL2 - P2PDox、およびRFB4 - P2PDoxに対して調製された。

30

## 【0208】

実施例 2 : *in vitro*での前臨床試験

*In vitro*での細胞結合試験

抗体結合の保持を、抱合していない抗体との抱合の結合性を比較する細胞結合アッセイによって確認した（Charl, 2008, Acc Chem Res 41:98-107）。複合体の効力は、適切な標的細胞を使用して、4日間のMTSアッセイで試験した。hRS7 - P2PDoxは、同一の細胞株において0.02~0.07 nMの効力を示した遊離薬剤を用いて、ヒトの胃腸癌（NCI-N87）、膵臓癌（Capan-1）、および乳癌の細胞株において0.35~1.09 nMのIC<sub>50</sub>値を示した。

40

## 【0209】

血清安定性

プロトタイプのP2PDox複合体、hRS7 - P2PDoxの血清安定性を、37、0.2 mg/mlの濃度でヒト血清をインキュベートすることにより判定した。このインキュベートを、遊離薬剤によるピークおよび複合体またはより大きな分子量腫によるピーク間の良好な保持時間の分離が存在するブチル疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）のカラムを使用したHPLCにより解析した。この解析は、複合体から遊離薬剤が放出されないことを示し、これにより、複合体の高い血清安定性が示唆される。同一の実験を、hRS7ドキシソルピシン複合体で繰り返す際、hRS7 - P2PDoxとしての同一の切断可能なリンカーを含み、遊離薬剤は、96時間の半減期で放出され、遊離薬剤

50

のピークが明確に形成されることが独立して検証され、すなわち、ドキソルビシンのピークはH I C H P L C 上に見られた。

#### 【0210】

驚くべきことに、P2PDox複合体は、抗体のペプチド鎖と架橋しているため、抗体にきつく保持されていることが判定された。この架橋は、薬剤が、抗体が代謝された後に細胞内にのみ放出されるように、薬剤と抗体との付着を安定化させる。この架橋は、循環中の遊離薬剤の放出からもたらされる毒性、例えば心毒性を最小限にすることを支援する。薬剤は*in vivo*であるペプチドと他のタンパク質または複数のペプチドを架橋させるため、以前の2-PDoxペプチドの使用はうまくいかなかった。本発明の複合体では、P2PDoxは、プロドラッグ形態の間鎖間ジスルフィドチオール基に付着されている。プロドラッグの保護は、注入の直後に、*in vivo*で迅速に除去され、結果として、複合体の2-PDox部は抗体のペプチド鎖と架橋し、抗体分子内の分子内架橋を形成する。このことは、ADCを安定化し、循環における他の分子に対する架橋を防止する。

10

#### 【0211】

実施例3：*in vivo*での前臨床試験

##### 概要

腫瘍の寸法を、 $(L \times W^2) / 2$ として計算された腫瘍体積での長さ(L)および幅(W)のノギス測定により判定した。1週間に2回腫瘍を測定し、マウスの体重を測定した。マウスの腫瘍が $1 \text{ cm}^3$ 超であり、マウスの開始時の体重の15%が消失しているか、またはマウスがひん死の状態である場合、マウスを安楽死させた。腫瘍増殖データの統計解析は、曲線(AUC)および生存時間の下の面積に基づく。個々の腫瘍増殖のプロファイルは、線形直線モデリングを介して得られた。f検定を使用して、増殖曲線の統計解析の前にグループ間の変動一様性を判定した。両側のt検定を使用して、全ての様々な処理グループおよび非特異的な対照の間の統計学的優位性を評価した。生理食塩水の対照解析では、片側のt検定を使用して優位性を評価した。生存試験は、カプランマイヤープロット(ログランク解析)を使用し、Prism GraphPad Software(v4.03)ソフトウェアパッケージ(Advanced Graphics Software, Inc.; カリフォルニア州エンシニータス)を使用して、解析した。前臨床実験をすべての用量を、抗体の量で表現した。薬剤の観点から、20gのマウスで $100 \mu\text{g}$ の抗体( $5 \text{ mg/kg}$ )は、3~6薬剤/IgGでADCを使用する際、 $1.4 \mu\text{g} \sim 2.8 \mu\text{g}$ ( $0.14 \sim 0.17 \text{ mg/kg}$ )のP2PDox当量用量を運搬する。

20

30

#### 【0212】

本複合体の $300 \mu\text{g}$ 以上( $10 \mu\text{g}$ 未満のP2PDox)の単一静脈内注射での用量は致死性であったが、2週間での4つの $45 \mu\text{g}$ の用量は、全ての動物に耐性があった。この用量レジメンを使用して、本出願人は、2つのヒト腫瘍異種移植片モデル、Capan-1(膵臓癌)およびNCI-N87(胃癌)におけるhRS7-P2PDoxの治療効果を試験した。治療を、ヌードマウスにおける腫瘍の移植から7日後に開始した。確立しているように、7日齢のCapan-1モデルは、グループのうち100%で確立した腫瘍が迅速に消失し、再増殖のエビデンスも見られなかった(図2)。この結果は、反復実験でも再び作製された(図示せず)。同様の結果が、確立したNCI-N87モデルで作製された(図3)。ここで、第70日後に投与される第2の工程の治療は安全に耐容性があり、残りの腫瘍をさらに消失させた(図3)。hRS7-SN-38複合体をインターナライズすること、Trop-2を標的化することは、抗CEACAM5抗体を不十分にインターナライズする複合体、hMN-14よりも良好な治療の応答を与えた(図2、図3)。非標的化抗CD20 ADC、hA20-P2PDox hは有効ではなく、選択的な治療効果を示した(図2、図3)。乳癌異種移植片(MDA-MB-468)および第2の膵臓癌異種移植片からのデータ(それぞれ、図3Aおよび図3B)は、複合体の特異的かつ重要な抗腫瘍効果の同一の傾向を反復するものである。

40

#### 【0213】

50



6.8または3.7薬剤/IgGの置換を有するHRS7-P2PDoxのPKおよび毒性

8つもの超毒性薬剤/MAbを輸送する抗体薬物複合体は、非改変型MAbよりも早く清浄にし、非標的毒性を増大させることが知られており、4以下の薬剤置換を使用する現在の傾向をもたらす結果が得られている(Hamblett et al., 2004, Clin Cancer Res 10:7063-70)。複合体は、平均6:1未満および3:1未満の薬剤/MAb置換率(MSR)で調製し、評価した。正常なマウスのグループ(n=5)に、6.8~3.7の薬剤置換を有する非改変型hRS7またはHRS7-P2PDoxの単一用量を静脈内で投与し、血清試料を、注射を行ってから30分後、4時間後、24時間後、72時間後、および168時間後に回収した。これらを、抗体濃度に関してELISAにより解析した。多様な時間での血清濃度中の優位な差異は存在せず、このことは、これら物質が同様に除去されたことを示唆した。PKパラメータ(Cmax、AUCなど)も同様であった。同時に複合体薬剤を投与した際、薬剤置換が多いまたは少ない複合体は、ヌードマウスで同様の耐性を有した

10

20

30

40

50

【0214】

最小有効量(MED)での治療効果

抗TROP-2抗体複合体、hRS7-P2PDoxを、9mg/kg、6.75mg/kg、4.5mg/kg、2.25mg/kg、または1mg/kgのタンパク質用量を単一ボラス投与することにより、NCI-N87ヒト胃癌の異種移植片を有するヌードマウスにおいて評価した。平均腫瘍体積(mTV)が0.256cm<sup>3</sup>である時治療を開始した。21日目に、生理食塩水の対照グループ(非処置グループ)のmTVは0.801±0.181cm<sup>3</sup>であり、9、6.75、4.5、または2.25mg/kgの用量で処置したマウスの腫瘍体積よりも顕著に大きく、これらのmTVは0.211±0.042cm<sup>3</sup>、0.239±0.0054cm<sup>3</sup>、0.264±0.087cm<sup>3</sup>、および0.567±0.179cm<sup>3</sup>であった(P<0.00047、片側t検定)。これらから、最小有効量は、2.25mg/kgと判断され、9mg/kgがmTDを表した。

【0215】

実施例4.抗体P2PDoxのMTD

マウスにおいて、プロトタイプの抗体、hLL1の2-PDoxおよびP2PDox複合体を比較するMTD試験は、P2PDox複合体がより強力であることを示した(図示せず)。単一の静脈内注射のMTD試験は、100~300μgであった。合計4回の注射を4日間行うのスケジュール(q4dx4)で、複数の注射でのMTDを、注射あたり25~150μgの用量のタンパク質を使用すると判定した。これらの用量で、100~600μgの累積用量を動物に対して得た。以下の表6は多様なグループをまとめたものである。

【表7】

表6 抗体-P2PDoxのMTDの用量およびスケジュール

12匹のメスの胸腺欠損ヌードマウス			
グループ	N	処置	合計量
1	3	25 μg i.v. q4dx4	100 μg
2	3	50 μg i.v. q4dx4	200 μg
3	3	100 μg i.v. q4dx4	400 μg
4	3	150 μg i.v. q4dx4	600 μg

【0216】

体重減少を示すグラフを図4A～4Dに示す。25 $\mu$ gのP2PDox-ADCで処置したマウスのみが、毒性の兆候を継続して示さなかった。このことは、単一注射として投与される際、用量耐容性がある100 $\mu$ gの累積用量であることを示す(図示せず)。したがって、マウスのP2PDox-ADCの複数回の注射用のMTDは、この実験から25 $\mu$ g(q4d $\times$ 4)となる。この実験のデータおよび反復した慎重な解析により、2週間1日4回に投与する、部分投与用のMTDが45 $\mu$ gの複合体のタンパク質用量(45 $\mu$ g、q4d $\times$ 4のスケジュール)であることが確認された。

#### 【0217】

##### 実施例5. ADC複合体のP2PDoxの代替的な構造

抗体、抗体フラグメント、標的可能な構築物、または他の標的化分子に対するP2PDoxの複合体に使用する代替的な架橋剤を図5A～Dに示す。図5Aは、SMCCヒドラジド架橋剤であり、P2PDoxを含むアシルヒドラゾン形成する架橋剤を示す。図5Bはアミノキシ架橋剤であり、P2PDoxを含むオキシム形成する架橋剤を示す。図5Cは、P2PDoxを含むフェニルヒドラゾン形成する架橋剤を示す。SMCCヒドラジド、アミノキシ、およびフェニルヒドラゾンの架橋剤を使用して、マレイミド誘導体P2PDoxを生成する。この物質はいずれかの遊離スルフヒドリル基に付着できる。図5Dは、4-(ヒドラジノスルホニル)安息香酸架橋剤を示す。このリンカーは、異なる内在性の切断比率を有する。アシルヒドラゾンは相対的に迅速に切断され、オキシムおよびフェニルヒドラゾン誘導体はより安定である(Mueller et al., 1990, Bioconj Chem 1:325-30)。

10

20

#### 【0218】

SMCCヒドラジドおよびアミノキシ架橋剤は、P2PDoxのC-13のケトン基と結合し、多くの抗体の複合体が調製された。In vitroのデータでは、アシルヒドラゾン誘導型複合体は良好な活性を示し、オキシム誘導体ADCの活性は弱かったことが示されている。SMCCヒドラジド、アミノキシ、フェニルヒドラジド、および4-(ヒドラジノスルホニル)安息香酸架橋剤を備える誘導体も調製され、ペプチド標的化部位に付着した。

#### 【0219】

##### 実施例6. ADCからの2-PDoxの細胞内切断

P2PDox ADC複合体からの2-PDoxの細胞内切断の提案されるスキームを図6A～Dに示す。P2PDox ADCのアセタート基(図6A)を、血清における化学的または酵素的工程により除去して、不安定な中間体を作製し(図6B)、水を除去することにより自然に発生する環化を行い、2-PDoxの細胞傷害性の高い複合体を作製した(図6C)。インターナリゼーションおよびリソソームへの細胞内輸送の後に、複合体のヒドラゾン部を、リソソーム内部の酸性条件により指定される部位で切断して、遊離2-PDoxを作製する(図6D)。

30

#### 【0220】

##### 実施例7. ペプチド抱合型P2PDox

特定の実施形態では、標的化ペプチド(例えば、標的可能な構築物)を利用して標的組織にP2PDoxを送達してもよい。例示的なペプチド抱合型P2PDoxはIMP513であり、図7に示す。複合体をペプチドに抱合するために使用されるドキソルピシン-アリアルヒドラゾンリンカーが米国特許第7,405,320号に開示されている(この文献の実施例部は参照により本明細書に援用される)。最初のP2PDox生成物は、実質量のケトン部のシアノヒドリン付加物を含み、0.1%NH<sub>4</sub>OAc中にプロドラッグを溶解させ、溶液を凍結乾燥することにより除去した。シアノヒドリン基の除去の後、この反応を定量化した。SMCCヒドラジン誘導体P2PDoxを、ペプチドIMP402にも付着した(図8)。さらなるP2PDoxのペプチド複合体を、図9(IMP514)、図10(IMP515)、および図11(IMP516)に示されるように作製した。IMP514は、アシルヒドラゾン-結合ペプチドであり、IMP515は、オキシム-結合ペプチドであり、IMP516は、ピリンヒドラゾン(pyriminehydra

40

50

zone) - 結合ペプチドである。ペプチド抱合型 P2PDox を、疾患関連抗原（例えば腫瘍関連抗原）およびペプチドに含まれるハプテンに対する結合部位を含む二重特異性抗体を使用して標的組織に送達してもよい。

#### 【0221】

##### 実施例 8 . 架橋剤の設計

A DC 形成に使用される新規架橋剤は、ヒンダードジスルフィドシステムに關与する（図 12）。リンカーは、（A）マレイミド酸誘導体、（B）ペニシラミン、（C）4 - メルカプトタン酸、および（D）p - アミノベンジルアルコール（PABOH）から構築される。薬剤は、PABOH 端に付着し、抗体はマレイミド（または他の関連する複合部位）に付着する。薬剤の「R」部は、薬剤の構造自体の一部であってもよく、（薬剤が SN - 38 である場合）「O」を表し、（薬剤がドキシソルピシン、Pro2PDox、または他のアミン含有薬剤である場合）アミノ基を表し、または、COOH が薬剤の構造の一部である、ヒドラジドの形態で COOH に付着した NH<sub>2</sub>NH 残基であってもよい。

10

#### 【0222】

ペニシラミン上の「COOH」基は、適切な可溶化基を添加するハンドルを提供する。あるいは、ペニシラミンの「COOH」は、タンパク質複合体（活性エステルまたはマレイミドへの誘導体化）に使用でき、アミン基はそのまま残されるか、またはさらに誘導体化される。

#### 【0223】

ヒンダードジスルフィドはリンカー全体の安定性を保証しながら、細胞内の高濃度のチオール（例えばシステイン、還元 GSH）が、チオール交換によりジスルフィドを切断する。このことは、容易に起こる PABOH、CO<sub>2</sub>、および薬剤を遊離する 1, 6 - 断片化を伴って、5 員ラクトン（5 員環の幾何学が好ましい）への分子内環化により「ドミノ切断」を準備する。したがって、リンカーは、血液中の ADC 安全性を促進し、これにより細胞内の薬剤放出を促進する。

20

#### 【0224】

##### 実施例 9 . P2PDox 複合体を備えるさらなる試験

NCI - N87 の胃の細胞腫の細胞に抗体部の結合に有意差がないことが、非抱合型 hRS7 および抗体あたり 6 分子の P2PDox に抱合した P2PDox - hRS7 の間で観察された（図示せず）。標的抗原に結合する抗体上の抱合の効果がないことが、P2PDox - hMN - 15（抗 - CEACAM6）、P2PDox - hLL2（抗 - CD22）および P2PDox - hMN - 24（抗 - CEACAM5）複合体で確認された。抗体への P2PDox の抱合は、抗体 - 抗原結合活性に影響を与えないことが結論付けられた。

30

#### 【0225】

標的細胞への P2PDox - mAb 複合体の細胞傷害性を試験した。hRS7 - P2PDox および hMN - 15 - P2PDox は、MDA - MB - 468、AGS、NCI - N87、および Capan - 1 固形腫瘍細胞株に細胞傷害性があった（図示せず）。hMN - 14 - P2PDox は、Capan - 1、BxPC - 3、および AsPC - 1 ヒト膵臓腫瘍株、ならびに AGS、NCI - N87、および LS147T のヒト胃および結腸腫瘍株に細胞傷害性があった（図示せず）。hLL2 - P2PDox は、Daudi、Raji、Ramos および JVM - 3 造血性腫瘍細胞株に細胞傷害性があった（図示せず）。複合体の IC<sub>50</sub> 値は、ナノモル濃度範囲内であった（図示せず）。

40

#### 【0226】

さらなる *in vivo* の有効性試験を、NCI - N87 ヒト胃癌異種移植片を移植したヌードマウスで実施した（図 13A ~ F）。4 x 45 μg の hRS7 - P2PDox の 1 回の処置周期で、すべての腫瘍が縮小した（図 13D）。第 2 の処置周期を、第 1 の周期から 2 カ月後に開始し、hRS7 - P2PDox で処置した動物のうち 1 匹以外すべてで完全に腫瘍が縮小した。hA20、hLL1 および hMN - 14 複合体は、腫瘍の進行に関してほとんど影響がなかった（図 13A、13B、13E、および 13F）。P2

50

P D o x - h M N - 1 5 の投与は、胃癌の遅行型の退行をもたらしたが、h R S 7 複合体よりも有効ではなかった。

【0227】

抗腫瘍効果に関して用量スケジュールを変動する効果を試験した(図14、19A~G)。実験を、すべてのグループの平均腫瘍体積は $0.383\text{ cm}^3$ である、腫瘍を移植してから9日後に開始し、93日目に終了した(治療を開始してから84日後)。この試験では、 $180\text{ }\mu\text{g}$ の単一用量、(週ごとを2回の) $90\text{ }\mu\text{g}$ の用量、および $q4d \times 4$ の $45\text{ }\mu\text{g}$ の用量のすべてが、有意に生存を高めた(図14、図19B~D)。生理食塩水の対照では、9匹のマウスうち0匹が生存した(図19A)。h R S 7 - P 2 P D o x の $q4d \times 4$ の $45\text{ }\mu\text{g}$ を受けたマウスで、94日目で9匹のうち8匹のマウスが生存した(図19B)。週に1回 $\times$ 2のh R S 7 - P 2 P D o xを受けたマウスでは、94日目で9匹のうち9匹が生存した(図19C)。単一用量 $180\text{ }\mu\text{g}$ のh R S 7 - P 2 P D o xを受けたマウスでは、94日目で9匹のうち7~8匹のマウスが生存した(図19D)。

10

【0228】

同一の用量スケジュールでは、対照のh A 2 0 複合体は、生存に関して効果がなかった(図14、図19E~F)。毒性試験は、R S 7 - P 2 P D o x の3つの用量スケジュールが、同様の低いレベルの毒性を与えた(図示せず)。

【0229】

また、h R S 7 - P 2 P D o x 複合体は、C a p a n - 1 膵臓癌に有効であり(図示せず)、h R S 7 - S N - 3 8 複合体よりも腫瘍増殖の阻害に有効であった(図示せず)。また、P A M 4 - P 2 P D o x 複合体は、h P A M 4 - S N - 3 8 複合体よりもC a p a n - 1 のヒト膵臓癌の増殖の阻害に有効であった。C a p a n - 1 腫瘍の注射から63日後(接種してから1日後に治療を開始)に、生理食塩水の対照では10匹のマウスのうち0匹が生存し、1週間に2回 $\times$ 2週間 $45\text{ }\mu\text{g}$ のh P A M 4 - P 2 P D o x での処置では、10匹のマウスのうち10匹が生存し、1週間に2回 $\times$ 2週間、 $45\text{ }\mu\text{g}$ のh A 2 0 - P 2 P D o x での処置では、10匹のマウスのうち2匹が生存し、1週間に2回 $\times$ 4週間、 $250\text{ }\mu\text{g}$ のP A M 4 - S N - 3 8 での処置では、10匹のマウスのうち0匹のマウスが生存し、1週間に2回 $\times$ 4週間、 $250\text{ }\mu\text{g}$ のh 2 0 - S N - 3 8 での処置では、10匹のマウスのうち0匹のマウスが生存した。

20

【0230】

h R S 7 - P 2 P D o x は、P x P C - 3 の膵臓癌の増殖の阻害の際にh R S 7 - S N - 3 8 よりも実質的に有効であり(図示せず)、M D A - M B - 4 6 8 乳癌の増殖の阻害の際にh R S 7 - S N - 3 8 よりも有効であった(図示せず)。

30

【0231】

N C I - N 8 7 の胃細胞腫の異種移植片の増殖に関するh R S 7 - P 2 P D o x の異なる単一用量の効果を図15に示す。単一用量を使用して、腫瘍増殖の最大有効性を、 $90\text{ }\mu\text{g}$ 以上と観察した(図15)。 $45\text{ }\mu\text{g}$ の単一用量は、生理食塩水と比較して有意な延命効果を見る必要のある最小値であった(図16)。

【0232】

様々なh R S 7 - A D C 複合体のA D C C 活性を、h R S 7 I g G と比較して決定した(図17)。P B M C を、ニュージャージーの血液センターから購入した血液から精製した。T r o p - 2 陽性ヒト膵臓腺癌株(B x P C - 3)を、100:1の比率となるようエフェクターと共に標的細胞株として使用した。h R S 7 I g G により媒介されたA D C C は、h R S 7 - プロ - 2 - P D o x 、h R S 7 - C L 2 A - S N - 3 8 と比較され、還元され、h R S 7 - N E M をキャップした。すべてを $33.3\text{ nM}$ で使用した。

40

【0233】

結果を図17に示す。総合的な活性は低いが有意なものであった。h R S 7 - プロ - 2 - P D o x と顕著に異なるものではないh R S 7 I g G に特異的な8.5%の溶解が存在した。両方が、h L L 2 対照ならびにh R S 7 - N E M およびh R S 7 - S N - 3 8 よりも顕著に良好であった( $p < 0.02$ 、両側t検定)。h R S 7 - N E M およびh R S

50

7 - S N - 3 8 間に差は認められなかった。

【 0 2 3 4 】

実施例 1 0 . P 2 P D o x エブラツズマブ A D C での非ホジキンリンパ腫 ( N H L ) の処置

P 2 P D o x エブラツズマブ A D C を、上記の実施例 1 および実施例 3 のように調製する。未治療または再発型の N H L を有する 1 7 名の患者に、2 週間ごとに、7 0、1 0 0、または 1 5 0 m g の P 2 P D o x エブラツズマブの 4 用量を静脈内注射した。逆作用、B 細胞の血液レベル、血清のエブラツズマブレベル、およびヒト抗エブラツズマブ ( H A H A ) 力価を含む他の評価と共に、C T スキャンにより応答を評価した。

【 0 2 3 5 】

時折のみ、軽度～中程度の一過性拒絶反応が見られたが、他の安全性の問題は、最大グレード 3 の好中球減少症 ( しかし、グレード 1 に低減するまでの妨害治療の後は可逆的である ) を除く安全性の問題は観察されなかった。一過性の B 細胞の欠失 ( 最大 2 5 % ) は、P 2 P D o x エブラツズマブのすべての用量レベルで観察された。客観的な応答率 ( 部分的な応答プラス完全寛解プラス確認されていない完全寛解 ) は、完全寛解で 4 7 % ( 8 / 1 7 ) / 確認されていない完全寛解の 2 4 % ( 4 / 1 7 ) であった。8 つの客観的な応答のうち 4 つは 3 0 週以上連続した。客観的な応答は、P 2 P D o x エブラツズマブのすべての用量レベルで観察された。ヒトの抗エブラツズマブ抗体 ( H A H A ) で評価したすべての血清試料は陰性である。

【 0 2 3 6 】

実施例 1 1 . P 2 P D o x ベルツズマブ A D C での慢性リンパ球性白血病 ( C L L ) の処置

未治療または再発型の C L L の患者に、7 0 m g、1 0 0 m g、または 1 5 0 m g の P 2 P D o x ベルツズマブの 4 用量を、2 週間ごとに静脈内注射した。時折のみ、軽度～中程度の一過性の拒絶反応が見られ、好中球減少症以外の他の安全性の問題は観察されなかった。これは、従来 of 慣習により、改善するまで治療を妨害し、または G - C S K 白血球の刺激因子を投与することにより制御できる。迅速な B 細胞および C L L の消失が、P 2 P D o x ベルツズマブのすべての用量レベルで観察されたが、少なくとも 4 週間の間最も高い 2 つの用量ではより著しかった。客観的な応答が P 2 P D o x ベルツズマブのすべての用量で観察されたが。最も高い用量で 3 0 % ( 大部分では部分的な応答 ) などの特に高い応答があった。ヒト抗ベルツズマブ抗体 ( H A H A ) を評価したすべての血清試料は陰性である。

【 0 2 3 7 】

実施例 1 2 . P 2 P D o x - h R S 7 A D C でのトリプルネガティブ乳癌の処置

P 2 P D o x - h R S 7 A D C を上記の実施例 1 および実施例 3 のように調製する。少なくとも 2 つの標準的な治療が奏功しなかったトリプルネガティブ乳癌患者に、3 週間ごとに 7 0 m g の P 2 P D o x - h R S 7 を、3 周期、静脈内注射する。2 周期の治療後、平均 3 5 % の腫瘍体積が低下を伴う、この用量レベルの P 2 P D o x - h R S 7 の客観的な応答が観察される。ヒトの抗 h R S 抗体 ( H A H A ) で評価したすべての血清試料は陰性である。

【 0 2 3 8 】

実施例 1 3 . P 2 P D o x - h M N - 1 5 A D C での転移性結腸癌の処置

右肺に 5 c m の転移、および 1 3 0 n g / m l の血液 C E A 値の上昇と同様に、左右の肝臓葉に転移性結腸癌 ( 3 ~ 5 c m の直径 ) を有する 5 2 歳の患者を、I g G あたり 4 つの薬剤で P 2 P D o x と抱合した 1 5 0 m g 用量の h M N - 1 5 抗 T R O P - 2 で処置し、4 用量で、隔週遅効静脈内注射により投与する。処置から 8 週間の C T 評価の後、3 つの標的病変の合計の平均直径が 2 5 % 減少したことが測定され、それにより、R E C I S T 1 . 1 の判断基準により良好な安定した疾患応答を構築した。同時により、患者の血液の C E A 力価は、3 0 n g / m l まで低下した。反復工程の治療は、患者の好中球減少症が標準化するように続けられる。

10

20

30

40

50

## 【0239】

N a b - タキソール ( アブラキサン ( 登録商標 ) ) プラスゲムシタピンの後に F O L F I R I N O X を用いる従来治療の後に再発した、脾臓の転移性管状腺癌の62歳の男性に、4つの工程で、隔週120mgの用量で P A M 4 - P 2 P D o x A D C を投与し、3週間後に、別の工程の2回の注射を2週間静脈内投与した。患者は治療により、いくらかの吐き気および一過性の下痢を示し、第1の工程の後、グレード3の好中球減少症を示したが、第2の工程の治療の前に回復した。治療を開始してから8週間で作製したCT測定により、前処置したベースラインの測定と比較して、肝臓における3つの標的病変が合計18%縮小し、これにより、R E C I S T 1 . 1 の判断基準により安定した疾患を構成した。同様に、患者の C A 1 9 - 9 血液力価が、12,400のベースライン値から55%減少した。また、6週間後の患者の食欲および2kgの体重増加を含む、脱力感、疲労、および異常な不快感などの患者の一般的な症状も、かなり改善された。

10

## 【0240】

実施例14 . エブラツズマブ - P 2 P D o x での全身性エリテマトーデス ( S L E ) の治療

活動が中程度の S L E ( 合計 B r i t i s h I s l e s L u p u s A s s e s s m e n t G r o u p ( B I L A G ) スコア6~12 ) 患者の非盲検単一試験を行った。3つの注射を隔週ごとに、10、20、40、および60mgの ( 3 . 5 の複合体の薬剤 / 抗体比率での複合した ) エブラツズマブ - P 2 P D o x 用量で患者に投与し、4カ月後に反復した。評価は、安全性、S L E 活性 ( B I L A G ) 、 B 細胞および T 細胞の血液レベル、およびヒト抗エブラツズマブ抗体 ( H A H A ) 力価を含む。

20

## 【0241】

合計の B I L A G スコアは、すべての患者で少なくとも50%減少し、92%が少なくとも18週間減少が連続した。ほぼすべての患者 ( 93% ) が、6、10、および18週間目で、少なくとも1つの B I L A G B または C 細胞のレベルの疾患活性の改善を経験した。さらに、ベースラインでの複数の B I L A G B の関与のある3名の患者は、18週間までにすべての B レベルの疾患活性が回復した。エブラツズマブ - P 2 P D o x は良好に耐容性があり、免疫原または T 細胞、免疫グロブリン、もしくは自己抗体レベルにおける有意な変化に関しては証明されなかった。B細胞レベルは18週目で平均35%減少し、処置後6週間減少を保持した。

30

## 【0242】

実施例15 . P 4 / D 1 0 - P 2 P D o x でのヒト免疫不全ウイルス感染症の処置

H I V - 1 に対する免疫複合体の効果を示すために、H I V ( P 4 / D 1 0 ) エンベロープ抗原に対してマウスのモノクローナル抗体 ( M a b ) を上記の実施例1および実施例3のように P 2 P D o x と抱合し、感染した細胞に対して、i n v i t r o および i n v i v o で試験した。P 4 / D 1 0 - P 2 P D o x を、腹腔内から H I V - 1 / M u L V ( マウス白血病ウイルス ) 感染型同一遺伝子細胞を除去することにより、非感染細胞およびマウスモデル内の H I V - 1 感染細胞を除去する際の効力に関して i n v i t r o で試験した。

40

## 【0243】

ジャーカット T 細胞を、 $100 \times T C I D_{50}$  と  $5 \sim 10 \times 10^6$  細胞を混合し、1時間 37 でインキュベートすることにより H I V - 1 <sub>I I I B</sub> に感染させた。細胞を媒体で洗浄し、37 でインキュベートした。3日ごとに、媒体を変え、p 2 4 産生に関して上清を確認した。ほぼ100%の細胞を感染させた際、異なる比率の H I V - 1 <sub>I I I B</sub> 感染型細胞を、非感染型細胞と混合した。細胞を、段階希釈した抗体または  $100 \sim 0.00001 \mu g / m l$  の血清を処置した。37 で数日間培養した後、H I V - 1 p 2 4 阻害を測定した。

## 【0244】

M u L V を遺伝的に組み込んだゲノムを有するヒト T 細胞株、C E M - 1 B を、H I V 1 <sub>I I I B</sub> に感染させ、H I V ゲノムおよび M u L C エンベロープを有する偽ウイルスの

50

産生が引き起こされた ( Adang et al. , PNAS USA 1999 , 96 : 12749 - 753 ; Hinkula et al. , Cells Tissues Organs 2004 , 177 : 169 - 184 ) 。これらのウイルスの上清を使用して HLA - A201 を遺伝子組み換えした C57B1 / 6 x DBA F1 K<sup>b</sup> / <sup>d</sup> マウスから脾細胞を感染させた。アイソジェニックマウスを、HIV - 1<sub>I I I B</sub> / MuLV 感染脾細胞を腹腔内投与で検証し、直後に、腹腔内投与にて複合型抗体または遊離抗体を得た。検証してから 10 日後に、マウスを屠殺し、腹膜細胞を収集した。腹膜細胞をペレット状にし、24 ウェルプレートで増殖させた  $1 \times 10^6$  HIV 感受性 ジャーカット T 細胞またはヒト P B M C を添加した。これらの二次的培養物から、上清を除去し、新鮮な媒体を 3 ~ 4 日ごとに添加した。上清で回収した感染性 HIV の量を、p24 ELISA により 3 週間測定した。

10

**【0245】**

3% の HIV 1<sub>I I I B</sub> 感染 ジャーカット 細胞を、97% の非感染型細胞と混合し、P4 / D10 - P2 P D o x は、遊離 P4 D10 または P2 P D o x 複合型対照抗体よりも、HIV - 1 感染の細胞内伝搬の非常に強い阻害を  $0.005 \mu\text{g} / \text{ml}$  の濃度で媒介する。同様の結果が、感染した細胞および非感染型細胞の他の全ての濃度で見られた。これら細胞培養物から非感染型 ジャーカット 細胞への上清の移動後に p24 産生が検出されなかったため、感染したウイルスは、P4 / D10 - P2 P D o x で処置した培養物で発見されなかった。

20

**【0246】**

P4 / D10 - P2 P D o x の効力を *in vivo* で試験するために、マウスに、複合体と共に、同系移植 HIV / MuLV 感染細胞を腹腔内に投与した。腹膜細胞を 10 日後に回収し、感染型 HIV が全ての対照に表われた。P4 / D10 - P2 P D o x は、HIV - 1 感染型原発性リンパ球での検証に対して完全にマウスを保護した。感染性 HIV は、 $5 \mu\text{g}$  の P4 / D10 - P2 P D o x での検証および処置後腹膜細胞から回収された。 $100 \mu\text{g}$  の非複合型 P4 / D10 抗体で処置したマウスは、p24 産生に陽性である。P2 P D o x 抱合型対照抗体 ( h L L 1 または h R S 7 ) は、 $100 \sim 200 \mu\text{g}$  の用量で何等かの保護を提供する。

**【0247】**

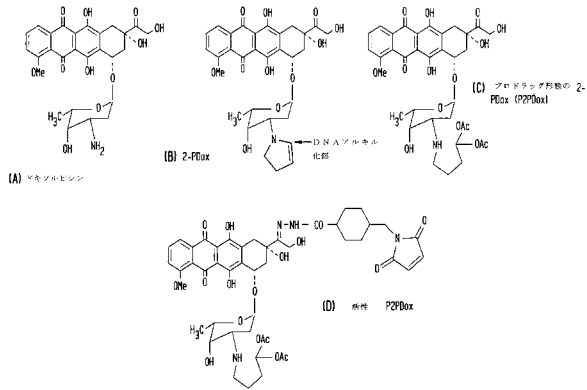
本明細書に引用されるすべての特許および他の引用文献は、本発明に関連する当業者のレベルを表しており、これらの引用文献は、表および図面を含め、それぞれの引用文献が個々に組み込まれたのと同じ程度で本明細書に援用される。

30

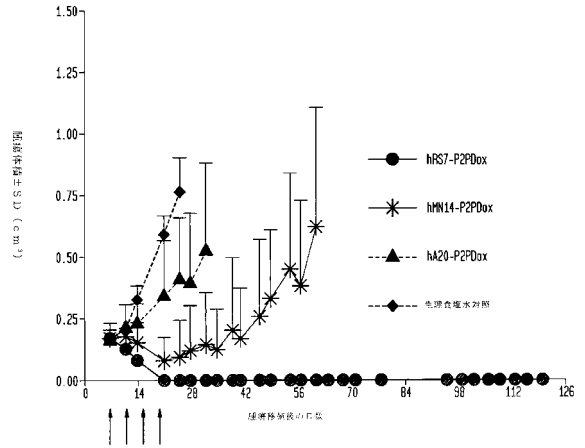
**【0248】**

本発明が本明細書固有の記載と同様に、上述の結果および利点を得るよう良好に適合していることを当業者は容易に理解するものである。好ましい実施形態と本明細書に表されるような本明細書に記載される方法、差異、および組成物は例示的なものであり、本発明の範囲を限定するものではない。これらの変更および他の用途は、当業者により行われるものであり、本発明に含まれるものである。

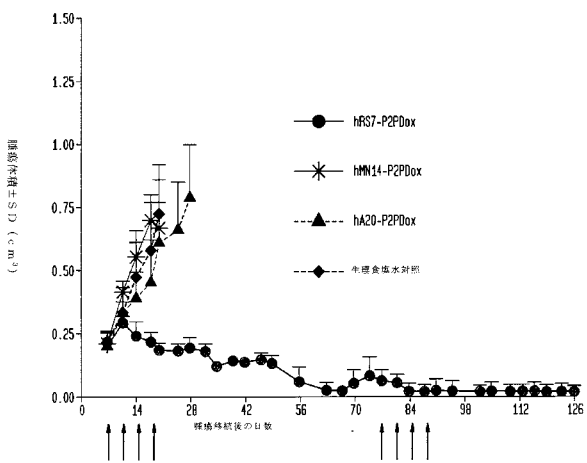
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 A 】



【 図 3 B 】

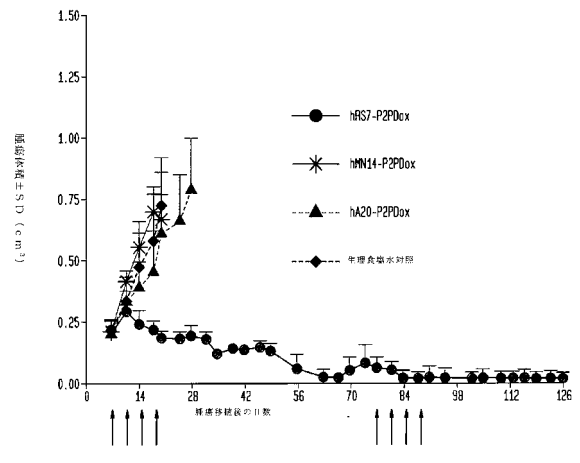
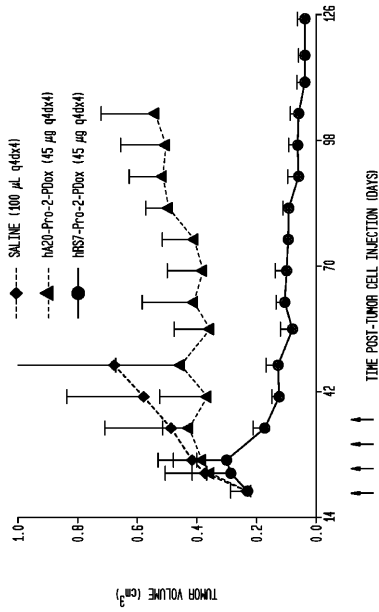
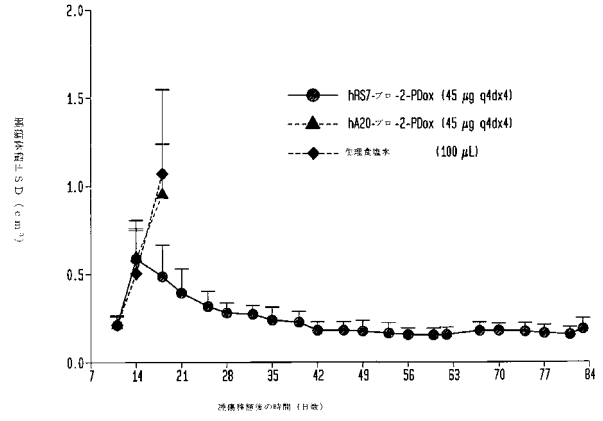




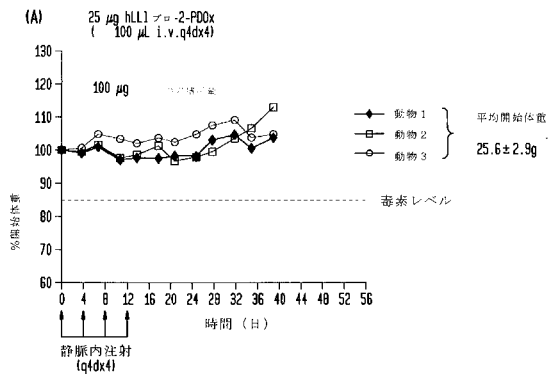
FIG. 3B



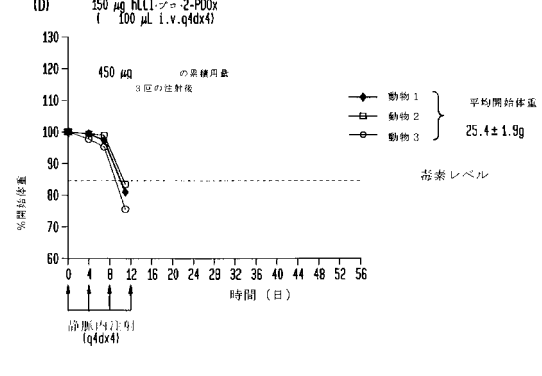
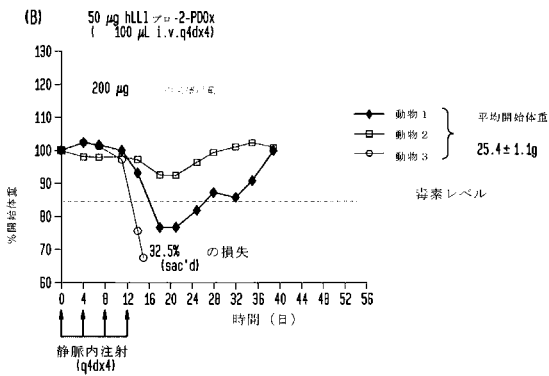
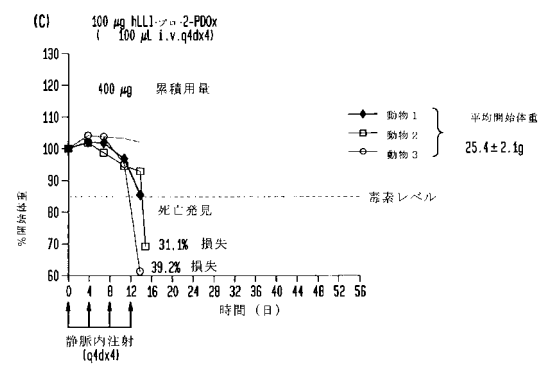
【 図 3 C 】



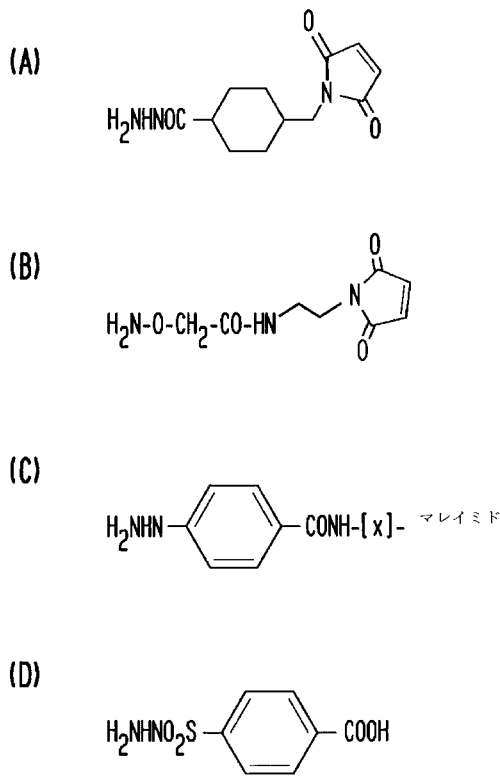
【 図 4 - 1 】



【 図 4 - 2 】

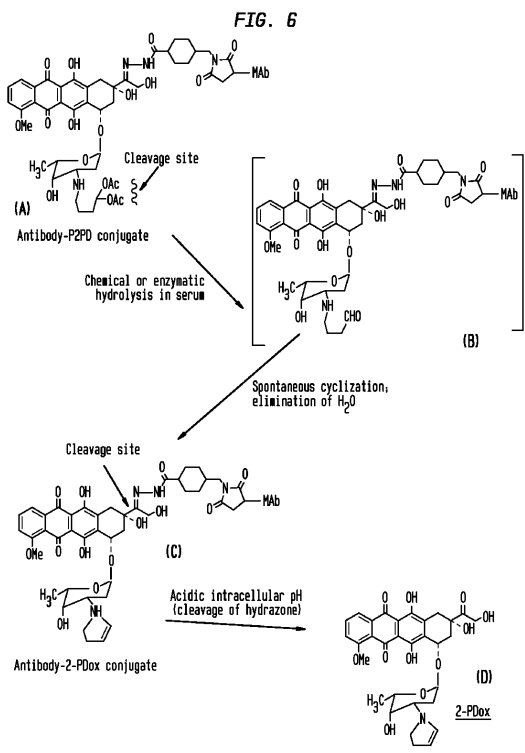
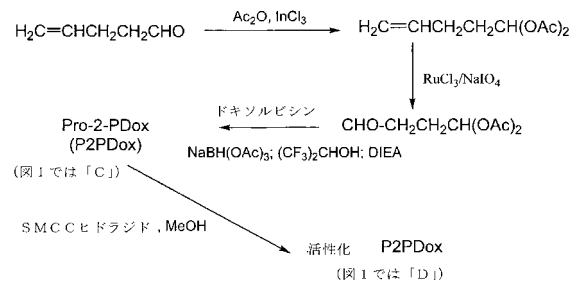


【 図 5 】

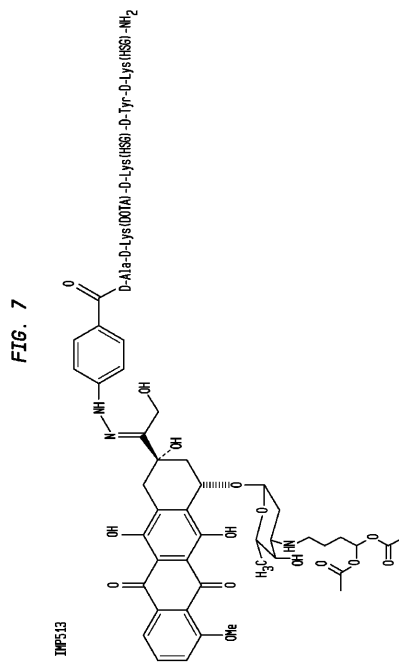


【 図 6 】

スキーム 1

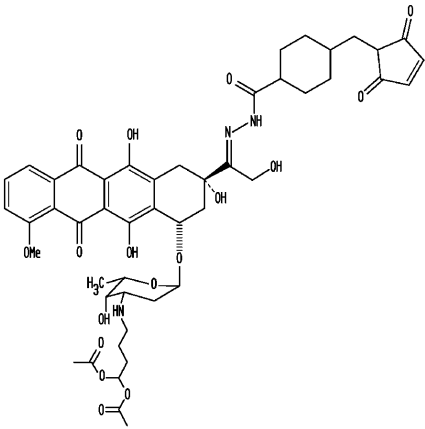


【 図 7 】



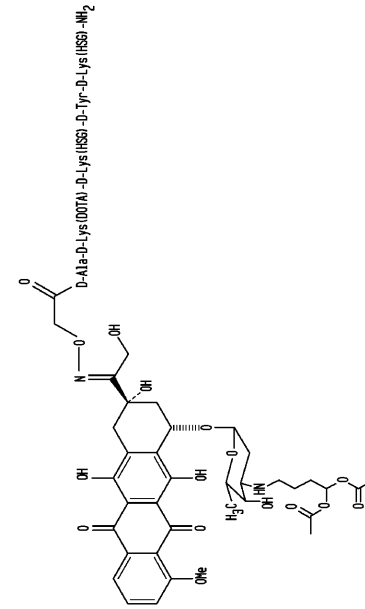
【 図 8 】

FIG. 8



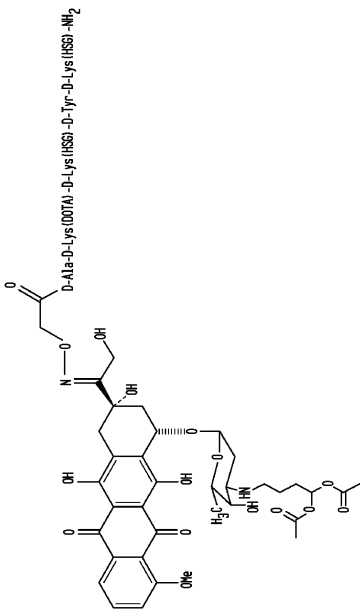
【 図 9 】

FIG. 9



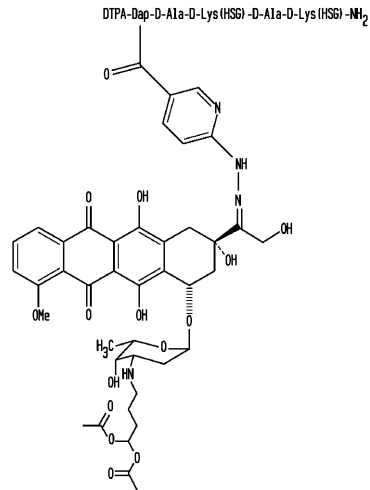
【 図 10 】

FIG. 10

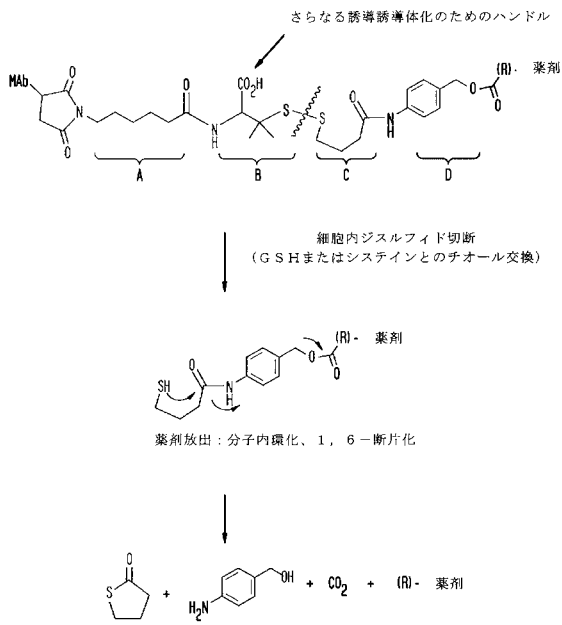


【 図 11 】

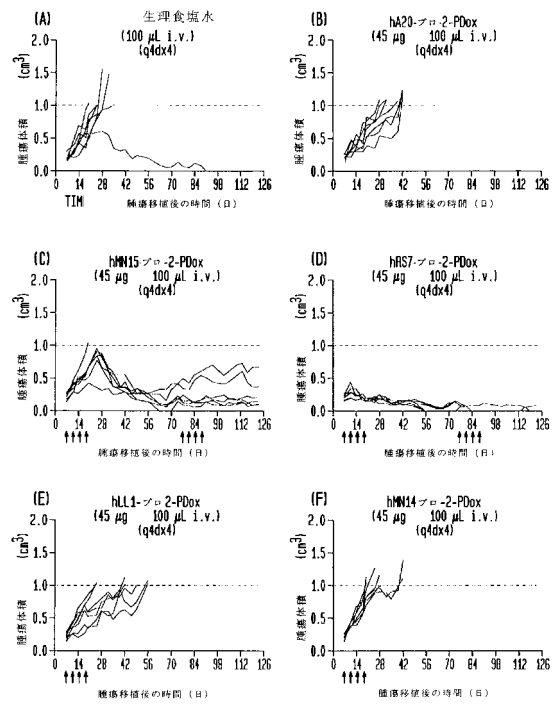
FIG. 11



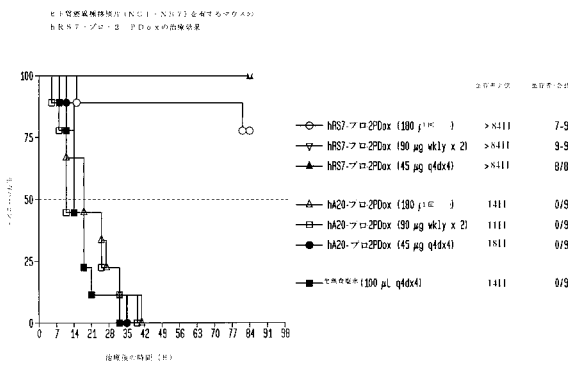
【図 1 2】



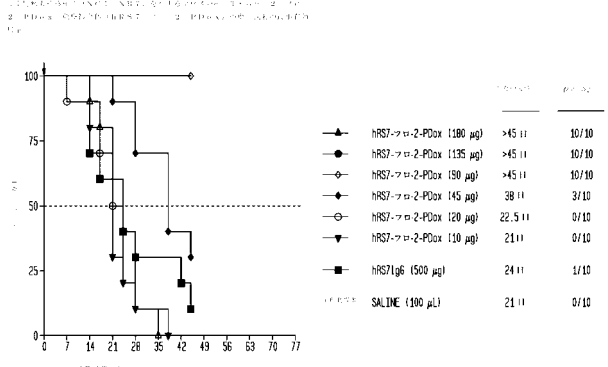
【図 1 3】



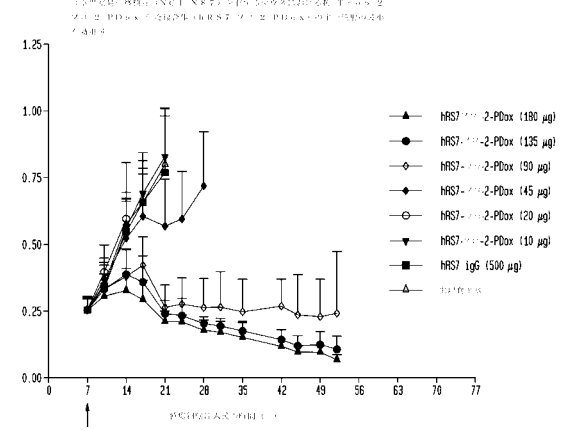
【図 1 4】



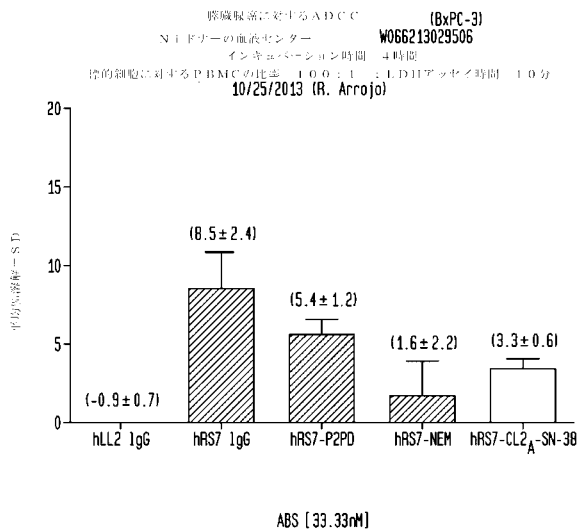
【図 1 6】



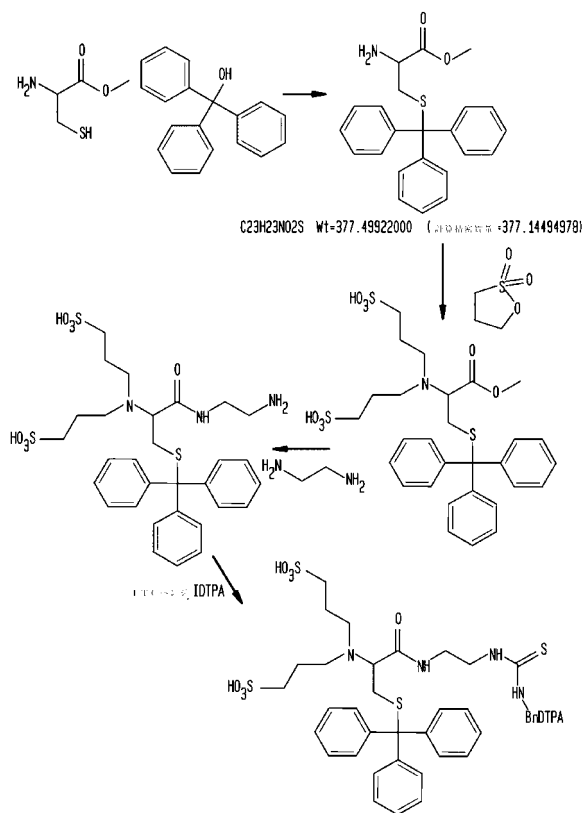
【図 1 5】



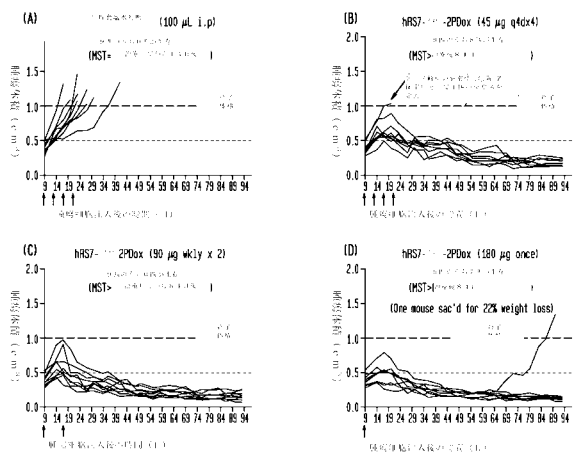
【 図 17 】



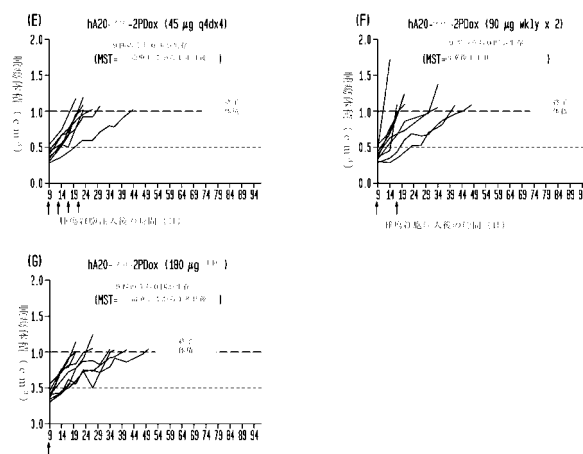
【 図 18 】



【 図 19 - 1 】



【 図 19 - 2 】



【配列表】

2016513098000001.xml

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/015253
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/395 (2014.01) USPC - 424/181.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/00, 39/395; C07K 16/00 (2014.01) USPC - 424/130.1, 133.1, 178.1, 181.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 39/00, 39/395, 39/3951 (2014.02) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google, PubMed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/034995 A2 (BARBAS et al) 01 May 2003 (01.05.2003) entire document	1, 2, 7, 13, 17-20, 25, 31, 47, 48, 50-53, 61, 65
—		
Y		3, 9, 11, 15, 21, 27, 29, 36, 49, 54-60, 62-64, 66, 67
Y	US 2009/0068095 A1 (MARASCO et al) 12 March 2009 (12.03.2009) entire document	3, 21
Y	US 2012/0321553 A1 (ZENG et al) 20 December 2012 (20.12.2012) entire document	9, 11, 27, 29, 49, 54, 66, 67
Y	US 2005/0271671 A1 (GRIFFITHS) 08 December 2005 (08.12.2005) entire document	15, 36, 59, 60
Y	NAGY et al. "High yield conversion of doxorubicin to 2-pyrrolinodoxorubicin, an analog 500-1000 times more potent: Structure-activity relationship of daunosamine-modified derivatives of doxorubicin," PNAS, Vol. 93, Pgs. 2464-2469, March 1996. entire document	55-58
Y	CN101503732 A (HONGWU) 12 August 2009 (12.08.2009) entire document	62-64
Y	US 2011/0190291 A1 (RENSLO et al) 04 August 2011 (04.08.2011) entire document	55-57
Y	US 2009/0326178 A1 (OKAMOTO et al) 31 December 2009 (31.12.2009) entire document	56, 57
Y	US 2012/0121613 A1 (TANG et al) 17 May 2012 (17.05.2012) entire document	64
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 06 June 2014		Date of mailing of the international search report <b>23 JUN 2014</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/015253

**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.:  
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:
  
3.  Claims Nos.:  
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:

See Extra Sheet(s)

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 additional fees, this Authority did not invite payment of 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.:  
1-3, 7, 9, 11, 13, 15, 17-21, 25, 27, 29, 31, 36, and 47-67 to the extent that they read on pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox) and an anti-carbonic anhydrase IX antibody of G1m3 heavy chain allotype

**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

International application No.

PCT/US2014/015253

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+ claims 1-67 are drawn to a conjugate comprising: a) pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox); and b) an antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide, or non-antibody cell-targeting construct attached to the P2PDox; a method of treating disease comprising the same, and a process for making a P2PDox conjugate.

The first invention of Group I+ is restricted to a) a conjugate comprising: a) pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox); and b) an antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide, or non-antibody cell-targeting construct attached to the P2PDox; and a method of treating disease comprising the same; wherein said conjugate is selected to be (a) pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox) and b) an antibody, wherein the antibody is selected to bind to a tumor-associated antigen, wherein the tumor-associated antigen is selected to be carbonic anhydrase IX, wherein the antibody comprises human constant regions selected to be IgG1, where in the antibody is selected to be of G1m3 heavy chain allotype. It is believed that claims 1-3, 7, 9, 11, 13, 15, 17-21, 25, 27, 29, 31, 36, and 47-67 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on the above selected conjugate.

Applicant is invited to elect additional antibodies, antigen-binding antibody fragments, targeting peptides, or non-antibody cell-targeting portions attached to the P2PDox for each construct and method to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a) a conjugate comprising: a) pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox); and b) an antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide, or non-antibody cell-targeting construct attached to the P2PDox; and a method of treating disease comprising the same; wherein said conjugate is selected to be (a) pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox) and b) an antibody, wherein the antibody is selected to bind to a tumor-associated antigen, wherein the tumor-associated antigen is selected to be CCCL19, wherein the antibody comprises human constant regions selected to be IgG1, where in the antibody is selected to be of G1m3 heavy chain allotype. Additional conjugates will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element, requiring the selection of alternatives for the antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide, or non-antibody cell-targeting construct attached to the P2PDox "wherein the antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide, or non-antibody cell-targeting construct binds to an antigen selected from the group consisting of carbonic anhydrase IX, CCCL19, CCCL21, CSAP, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CDS, CD6, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, IGF-1R, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD45, CD46, CD47, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, AFP, PSMA, CEACAM5, CEACAM-6, c-MET, B7, ED-B of fibronectin, Factor H, FHL-1, Flt-3, folate receptor, GROB, histone H2B, histone H3, histone H4, HMGB-1, hypoxia inducible factor (HIF), HM1.24, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-2, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-25, IP-10, LN-1, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC5a,c, MUC16, PAM4 antigen, NCA-95, NCA-90, Ia, HM1.24, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, HLA-DR, tenascin, Le(y), RANTES, T101, TAC, Tn antigen, ThomsonFriedenreich antigens, tumor necrosis antigens, TNF- $\alpha$ , TRAIL receptor (R1 and R2), VEGFR, EGFR, P1GF, complement factors C3, C3a, C3b, C5a, C5, and an oncogene product".

The Groups I+ share the technical features of a conjugate comprising: a) pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox); and b) an antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide, or non-antibody cell-targeting construct attached to the P2PDox; a method of treating cancer, comprising administering to a subject with cancer a conjugate comprising (i) pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox); and (ii) an antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide, or non-antibody cell-targeting construct attached to the P2PDox, wherein the antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide or non-antibody cell-targeting construct binds to a tumor-associated antigen (TAA); and a method of treating a disease selected from the group consisting of autoimmune disease, immune system dysfunction and infectious disease comprising administering to a subject with the disease a conjugate comprising (i) pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox); and (ii) an antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide or non-antibody cell-targeting construct attached to the P2PDox; and a process for making a P2PDox conjugate. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/015253

Specifically, WO 2003/034995 A2 to Barbas et al. discloses a conjugate (targeting compounds comprising at least one integrin targeting component covalently linked via a linker to at least one functional component, Para. [0003]) comprising: a) pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox) (the functional component is propyrrolinodoxorubicin, Para. [0075]); and b) an antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide, or non-antibody cell-targeting construct attached to the P2PDox (the targeting moiety is an integrin antagonist and the functional component is propyrrolinodoxorubicin (R=peptides) and the two are linked by a pH sensitive labile linker, Para. [0075]; targeting integrin expressing cells, Para. [0002]); a method of treating cancer (methods of treating or preventing a disease or condition that involves integrin in an individual ...the disease or condition involves a defect in angiogenesis, Para. [0010]), comprising administering to a subject with cancer a conjugate comprising (i) pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox); and (ii) an antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide, or non-antibody cell-targeting construct attached to the P2PDox, wherein the antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide or non-antibody cell-targeting construct binds to a tumor-associated antigen (TAA) (methods includes administering to the individual a therapeutically effective amount of an integrin targeting compound of the invention that includes a functional component that is a therapeutic agent, Para. [0010]; the targeting moiety is an integrin antagonist and the functional component is propyrrolinodoxorubicin (R=peptides) and the two are linked by a pH sensitive labile linker, Para. [0075]; targeting Integrin expressing cells, Para. [0002]; the targeting component specifically binds to the integrin target typically through a ligand/receptor relationship ... preferably the integrin target is on the surface of the target cell or tissue, Para. [0026]; target molecules expressed on the surface of tumor endothelial cells are readily accessible to targeting molecules, Para. [0001]); a process for making a P2PDox conjugate; and a method of treating a disease selected from the group consisting of autoimmune disease, immune system dysfunction and infectious disease (methods of treating or preventing a disease or condition that involves integrin in an individual, Para. [0010]; the treatment or prevention of other diseases including ... autoimmune diseases, Para. [0083]) comprising administering to a subject with the disease a conjugate comprising (i) pro-2-pyrrolinodoxorubicin (P2PDox); and (ii) an antibody, antigen-binding antibody fragment, targeting peptide or non-antibody cell-targeting construct attached to the P2PDox (methods includes administering to the individual a therapeutically effective amount of an integrin targeting compound of the invention that includes a functional component that is a therapeutic agent, Para. [0010]; the targeting moiety is an integrin antagonist and the functional component is propyrrolinodoxorubicin (R=peptides) and the two are linked by a pH sensitive labile linker, Para. [0075]; targeting integrin expressing cells, Para. [0002]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

## 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 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), 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, R S, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, UA, UG, US

- (72) 発明者 ゴヴィンダン, セレンガラム, プイ.  
アメリカ合衆国, ニュージャージー州 0 7 9 5 0, モリス ブレインズ, 3 0 0 アメリカン  
ロード
- (72) 発明者 マクブライド, ウィリアム ジェー.  
アメリカ合衆国, ニュージャージー州 0 7 9 5 0, モリス ブレインズ, 3 0 0 アメリカン  
ロード
- (72) 発明者 サティアナラヤン, ナリーニ  
アメリカ合衆国, ニュージャージー州 0 7 9 5 0, モリス ブレインズ, 3 0 0 アメリカン  
ロード
- (72) 発明者 マツザ - フェレイラ, クリスティーヌ  
アメリカ合衆国, ニュージャージー州 0 7 9 5 0, モリス ブレインズ, 3 0 0 アメリカン  
ロード
- (72) 発明者 ゴールデンバーグ, デイビッド エム.  
アメリカ合衆国, ニュージャージー州 0 7 9 5 0, モリス ブレインズ, 3 0 0 アメリカン  
ロード

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA53 CA04 CA07 DA02 EA04 FA02 GA11 HA03

4C076	AA95	CC27	CC41	EE41	EE59						
4C084	AA19	NA05	NA13	ZB261	ZB262						
4C085	AA13	AA14	AA21	AA25	AA26	AA33	AA34	AA35	BB36	BB41	
	BB43	CC22	CC23								
4C086	AA01	AA02	BA08	MA01	MA04	NA13	NA15	ZA02	ZA22	ZA36	
	ZA51	ZA55	ZA59	ZA75	ZA81	ZA89	ZA94	ZB07	ZB08	ZB15	
	ZB26	ZB32	ZB33	ZB35	ZB37	ZB38	ZC35	ZC55			
4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	CA40	DA76	EA28	FA74		