

(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2010-536386

(P2010-536386A)

(43) 公表日 平成22年12月2日 (2010.12.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 7 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-522105 (P2010-522105)
 (86) (22) 出願日 平成20年8月25日 (2008.8.25)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年4月15日 (2010.4.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/074268
 (87) 国際公開番号 W02009/029601
 (87) 国際公開日 平成21年3月5日 (2009.3.5)
 (31) 優先権主張番号 60/957, 936
 (32) 優先日 平成19年8月24日 (2007.8.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 305023366
 リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
 オブ ミネソタ
 アメリカ合衆国, ミネソタ州 55114
 -8658, セント ポール, ウェストゲ
 ート ドライブ 1000, スイート 1
 60
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 受容体標的化試薬

(57) 【要約】

本開示により、とりわけ、例えば、受容体標的化試薬を細胞に結合させる方法、および限定されないが癌および炎症性障害などのさまざまな障害を処置するための方法に有用な受容体標的化試薬（例えば、免疫毒性受容体標的化試薬）を取り上げて記載する。また、被験体（例えば、癌もしくは炎症性障害を有する被験体）に対する適切な処置モダリティの選択および／または細胞増殖性障害などのさまざまな障害の処置に有用な方法、組成物およびキットを取り上げて記載する。

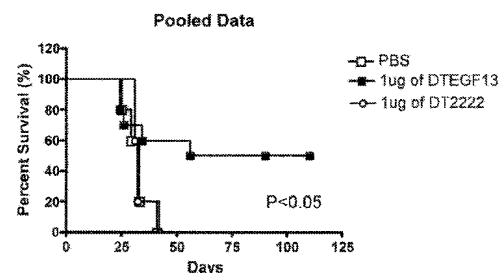


FIG. 22C

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 上皮成長因子受容体 (EGFR) 結合剤を含む第 1 の標的化ドメインと、(b) IL-13 受容体 (IL13R) 結合剤または IL-4 受容体 (IL4R) 結合剤を含む第 2 の標的化ドメインを含み、(a) が (b) に結合されている、受容体標的化試薬。

【請求項 2】

さらに毒性ドメインを含み、前記受容体標的化試薬が免疫毒性である、請求項 1 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 3】

前記毒性ドメインが小分子を含む、請求項 2 に記載の受容体標的化試薬。

10

【請求項 4】

前記毒性ドメインが放射線剤を含む、請求項 2 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 5】

前記毒性ドメインが毒性ポリペプチドを含む、請求項 2 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 6】

前記毒性ポリペプチドがジフテリア毒素またはその生物学的に活性な断片である、請求項 5 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 7】

前記毒性ポリペプチドが配列番号 9 または配列番号 10 を含む、請求項 5 に記載の受容体標的化試薬。

20

【請求項 8】

前記毒性ポリペプチドが、配列番号 9 または配列番号 10 からなる、請求項 5 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 9】

前記毒性ポリペプチドがシュードモナス体外毒素 A またはその生物学的に活性な断片を含む、請求項 5 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 10】

前記毒性ポリペプチドがシュードモナス体外毒素 A またはその生物学的に活性な断片からなる、請求項 5 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 11】

前記毒性ポリペプチドが配列番号 11 または配列番号 12 を含む、請求項 5 に記載の受容体標的化試薬。

30

【請求項 12】

前記毒性ポリペプチドが配列番号 11 を含み、ここで、

(i) 490 位のアルギニンがアラニンであり、513 位のアルギニンがアラニンであり、432 位のアルギニンがグリシンであり、467 位のアルギニンがアラニンであり、590 位のリジンがセリンである；

(ii) 490 位のアルギニンがアラニンであり、513 位のアルギニンがアラニンであり、467 位のアルギニンがグリシンであり、548 位のグルタミン酸がセリンであり、590 位のリジンがセリンであり、332 位のグルタミンがセリンであり、313 位のアルギニンがアラニンである；

40

(iii) 490 位のアルギニンがアラニンであり、513 位のアルギニンがアラニンであり、467 位のアルギニンがグリシンであり、548 位のグルタミン酸がセリンであり、590 位のリジンがセリンであり、432 位のグルタミンがグリシンであり、313 位のアルギニンがアラニンである；または

(iv) 490 位のアルギニンがアラニンであり、513 位のアルギニンがアラニンであり、467 位のアルギニンがグリシンであり、548 位のグルタミン酸がセリンであり、590 位のリジンがセリンであり、432 位のグルタミンがグリシンであり、332 位のグルタミンがセリンであり、313 位のアルギニンがアラニンである、請求項 11 に記載の受容体標的化試薬。

50

【請求項 13】

前記毒性ポリペプチドが、シュードモナス体外毒素（PE）、ブリオジン、ゲロニン、 α -サルシン、アスペルギリン、レストリクトシン、アンジオゲニン、サボリン、アブリン、原核生物のリボヌクレアーゼ、真核生物のリボヌクレアーゼ、リシン、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質（PAP）、アポトシス促進性ポリペプチド、リボソーム阻害性タンパク質、および前記のもののいずれかの生物学的に活性な断片からなる群より選択される、請求項 5 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 14】

前記アポトシス促進性ポリペプチドが、Bax、Fas、Bad、Bak、Bim、Bik、Bok、Hrk、FasL、TRAIL、TNF- α である、請求項 13 に記載の受容体標的化試薬。

10

【請求項 15】

前記毒性ポリペプチドが KDEL アミノ酸配列を含む、請求項 5 ～ 14 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 16】

前記第 2 の標的化ドメインが IL-13 受容体（IL13R）結合剤を含む、請求項 1 ～ 15 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 17】

前記 IL13R 結合剤が、IL13R に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項 1 ～ 16 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

20

【請求項 18】

前記 IL13R 結合剤が IL-13 ポリペプチドまたはその IL13 結合断片を含む、請求項 1 ～ 16 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 19】

前記第 2 の標的化ドメインが IL4R 結合剤を含む、請求項 1 ～ 15 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 20】

前記 IL4R 結合剤が、IL4R に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項 1 ～ 15 または 19 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 21】

前記 IL4R 結合剤が IL4 ポリペプチドまたはその IL4R 結合断片を含む、請求項 1 ～ 15、19 または 20 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

30

【請求項 22】

前記 EGFR 結合剤が EGFR に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項 1 ～ 21 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 23】

前記 EGFR 結合剤が上皮成長因子ポリペプチドまたはその EGFR 結合断片を含む、請求項 1 ～ 22 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 24】

前記 EGFR 結合剤が、ベータセルリンポリペプチド、トランスフォーミング増殖因子 α ポリペプチド、アンフィレギュリンポリペプチド、エピレギュリンポリペプチド、ヘパリン結合 EGFR ポリペプチド、または前記のもののいずれかの EGFR 結合断片を含む、請求項 1 ～ 22 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

40

【請求項 25】

前記抗体または抗原結合断片がモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項 17、20 または 22 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 26】

前記抗体または抗原結合断片が、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、F_{ab} 断片、F_{(ab')₂} 断片、F_{ab} 断片、F_v 断片、または s c F_v 断片である、請求項 17、20 または 22 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

50

【請求項 27】

(a) と (b) とが共有結合によって互いに結合されている、請求項 1 ～ 26 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 28】

(a) と (b) とが非共有結合によって互いに結合されている、請求項 1 ～ 26 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 29】

(a) と (b) とが、結合ペアの第 1 と第 2 の構成要素によって互いに結合されている、請求項 28 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 30】

前記結合ペアがストレプトアビジンとビオチンである、請求項 29 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 31】

(a)、(b)、または (a) と (b) とが前記毒性ドメインに非共有結合によって結合されている、請求項 2 ～ 30 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 32】

(a)、(b)、または (a) と (b) とが前記毒性ドメインに共有結合によって結合されている、請求項 2 ～ 30 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 33】

前記受容体標的化試薬が、(a) と (b) を含む融合タンパク質を含む、請求項 1 ～ 32 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 34】

前記受容体標的化試薬が、前記毒性ドメインおよび (a)、(b)、または (a) と (b) を含む融合タンパク質を含む、請求項 1 ～ 30、32 または 33 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 35】

さらに 1 つ以上のリンカー部分を含む、請求項 1 ～ 34 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 36】

前記 1 つ以上のリンカー部分の少なくとも 1 つがペプチドである、請求項 35 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 37】

前記 1 つ以上のリンカー部分が配列番号 13 または配列番号 14 を含む、請求項 35 または 36 に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 38】

配列番号 1 ～ 3 または 18 ～ 20 を含む、請求項 1 ～ 37 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 39】

さらに 1 つ以上の検出可能な標識を含む、請求項 1 ～ 38 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬。

【請求項 40】

請求項 1 ～ 39 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬および薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物。

【請求項 41】

請求項 33 ～ 40 に記載の受容体標的化試薬の融合タンパク質をコードする核酸。

【請求項 42】

配列番号 1 ～ 3 または 18 ～ 20 のいずれかを含む融合タンパク質をコードする、請求項 41 に記載の核酸。

【請求項 43】

配列番号 1 ～ 3 または 18 ～ 20 のいずれかからなる融合タンパク質をコードする、請

10

20

30

40

50

求項 4 1 または 4 2 に記載の核酸。

【請求項 4 4】

請求項 4 1 ～ 4 3 いずれか 1 項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 4 5】

請求項 4 1 ～ 4 3 いずれか 1 項に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 4 6】

請求項 4 5 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 4 7】

請求項 4 6 に記載の細胞を、融合タンパク質の発現に適した条件下で培養することを含む、融合タンパク質の作製方法。

【請求項 4 8】

さらに、前記タンパク質を前記細胞または該細胞を培養した培養培地から単離することを含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

細胞を、請求項 1 ～ 3 9 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬と接触させることを含む、受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのインビトロ方法。

【請求項 5 0】

さらに、前記細胞が E G F R、I L 1 3 R、または I L 4 R を発現しているかどうかを調べることを含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記細胞が E G F R を発現している、請求項 4 9 または 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記細胞が I L 1 3 R を発現している、請求項 4 9 ～ 5 1 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記細胞が I L 4 R を発現している、請求項 4 9 ～ 5 2 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記細胞が癌細胞である、請求項 4 9 ～ 5 3 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記癌細胞が、肺癌細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、腎臓癌細胞、胃癌細胞、肝臓癌細胞、骨癌細胞、血液の癌細胞、神経組織癌細胞、黒色腫細胞、甲状腺癌細胞、卵巣癌細胞、精巣癌細胞、前立腺癌細胞、頸部癌細胞、膣癌細胞、および膀胱癌細胞からなる群より選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記癌細胞が膠芽細胞腫細胞である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 4 9 ～ 5 6 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

被験体に、請求項 1 ～ 3 9 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬を送達することを含む、受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのインビボ方法。

【請求項 6 0】

前記被験体が哺乳動物である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記被験体がヒトである、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

さらに、前記被験体が癌を有するかどうかを調べることを含む、請求項 5 9 ～ 6 1 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記被験体が癌を有する、請求項 5 9 ～ 6 2 いずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 4】

前記癌が、肺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、腎臓癌、胃癌、肝臓癌、骨癌、血液の癌、神経組織の癌、黒色腫、甲状腺癌、卵巣癌、精巣癌、前立腺癌、頸部癌、腔癌、または膀胱癌である、請求項 6 2 または 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記癌が膠芽細胞腫である、請求項 6 2 ～ 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

さらに、癌の 1 つ以上の細胞が E G F R、I L 1 3 R、または I L 4 R を発現しているかどうかを調べることを含む、請求項 6 2 ～ 6 5 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7】

細胞を、請求項 2 ～ 3 9 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬と接触させることを含み、該細胞と該受容体標的化試薬との接触により該細胞が死滅する、細胞を死滅させるためのインビトロ方法。

【請求項 6 8】

癌を有する、癌を有することが疑われる、または癌が発生するリスクのある被験体に、請求項 2 ～ 3 9 いずれか 1 項に記載の受容体標的化試薬を送達することを含み、被験体の癌を処置するためのインビボ方法。

【請求項 6 9】

前記送達が、前記受容体標的化試薬を前記被験体に投与することを含み、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記送達が、医薬用の前記受容体標的化試薬を前記被験体に静脈内投与することを含み、請求項 6 8 または 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記受容体標的化試薬が前記被験体に体循環ポンプを用いて投与される、請求項 6 8 ～ 7 1 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 2】

被験体に請求項 2 ～ 3 9 いずれか 1 項に記載の免疫毒性受容体標的化試薬を送達する前に、

該被験体に、(a) 上皮成長因子受容体 (E G F R) 結合剤と、(b) I L - 1 3 受容体 (I L 1 3 R) 結合剤または I L - 4 受容体 (I L 4 R) 結合剤を含み、(a) が (b) に結合されている受容体標的化試薬であって、毒性ドメインを含まない受容体標的化試薬を送達することを含み、被験体において免疫毒性療法の毒性副作用を低下させるための方法。

【請求項 7 3】

癌を有する被験体に、(a) 上皮成長因子受容体 (E G F R) 結合剤と、(b) I L - 1 3 受容体 (I L 1 3 R) 結合剤または I L - 4 受容体 (I L 4 R) 結合剤を含み、(a) が (b) に結合されている受容体標的化試薬であって、毒性ドメインを含まない受容体標的化試薬を送達すること；および

該被験体に、請求項 2 ～ 3 9 いずれか 1 項に記載の免疫毒性受容体標的化試薬を送達することを含む、癌を処置するための方法。

【請求項 7 4】

哺乳動物の癌の 1 つ以上の癌細胞が I L 4 R、I L 1 3 R、または E G F R を発現しているかどうかを調べること；および

該 1 つ以上の癌細胞が I L 4 R、I L 1 3 R、または E G F R を発現している場合、該哺乳動物に対する治療用薬剤として請求項 2 ～ 3 9 いずれか 1 項に記載の受容体結合剤を選択することを含む、癌を有する哺乳動物に対する治療用薬剤を選択するための方法。

【請求項 7 5】

さらに、前記癌の１つ以上の癌細胞が I L 4 R、I L 1 3 R、または E G F R を発現していると判定された後、前記被験体に前記選択した受容体標的化試薬を送達することを含む、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

哺乳動物の癌の１つ以上の癌細胞が I L 4 R、I L 1 3 R、または E G F R を発現している場合、癌を有する哺乳動物に対する治療用薬剤として、請求項 2 ～ 3 9 いずれか１項に記載の受容体結合剤を選択すること

を含む、癌を有する哺乳動物に対する治療用薬剤を選択するための方法。

【請求項 7 7】

さらに、前記哺乳動物の１つ以上の癌細胞が I L 4 R、I L 1 3 R、または E G F R を発現しているかどうかを調べることを含む、請求項 7 6 に記載の方法。

10

【請求項 7 8】

請求項 1 ～ 3 9 いずれか１項に記載の受容体標的化試薬；および

該受容体標的化試薬を投与するための使用説明書

を備えるキット。

【請求項 7 9】

さらに、１種類以上の薬学的に許容され得る担体を備える、請求項 7 8 に記載のキット

。

【請求項 8 0】

さらに、薬学的に許容され得る希釈剤を備える、請求項 7 9 に記載のキット。

20

【請求項 8 1】

I L 4 R、I L 1 3 R、または E G F R の発現を検出するための１種類以上の試薬；および

I L 4 R、I L 1 3 R、または E G F R の発現が検出された場合、請求項 1 ～ 3 9 いずれか１項に記載の該受容体標的化試薬を投与するための使用説明書を備えるキット。

【請求項 8 2】

容器；および

該容器に内包された組成物

を備える、物品であって、

30

該組成物が哺乳動物の癌を処置するための活性剤を含み、該組成物内の該活性剤が請求項 2 ～ 3 9 いずれか１項に記載の免疫毒性受容体標的化試薬を含み、該容器が、該組成物が哺乳動物の癌の処置における使用のためのものであることを示すラベルを有する、物品。

【請求項 8 3】

前記ラベルが、さらに、前記哺乳動物の癌の１つ以上の癌細胞が I L 4 R、I L 1 3 R、または E G F R を発現している場合に前記組成物を該哺乳動物に投与することを示すものである、請求項 8 2 に記載の物品。

【請求項 8 4】

さらに、前記活性剤を前記哺乳動物に投与するための使用説明書を備える、請求項 8 2 または 8 3 に記載の物品。

40

【請求項 8 5】

前記組成物が、乾燥または凍結乾燥されている、請求項 8 2 ～ 8 4 いずれか１項に記載の物品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2007年8月24日に提出された、米国仮出願第60／957,936号（この全体の開示は、その全体が参考として本明細書に援用される）への優先権を主張

50

する。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

この出願に記載された研究は、National Institutes of HealthのNational Cancer InstituteからのU. S. Public Health Service助成金（助成金第RO1-CA36725号、第RO1-CA082154号および第RO1-CA108637号）による支援を受けた。したがって、米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本発明は、一般的に、病原細胞、例えば癌細胞の増殖の抑止（または死滅）に有用な免疫毒素の分野のものである。

【背景技術】

【0004】

背景

癌（例えば、前立腺癌または多形性膠芽腫などの膠芽細胞腫）は、西洋圏における主要死因であり、一般的に、細胞増殖に対する正常な抑制にもかかわらず過剰で無制御な細胞増殖を特徴とするものである。このような癌細胞は、他の細胞のために正常に確保された領域内に浸潤し、コロニーを形成（転移）し得る。癌治療の様式としては、化学療法、手術、放射線、およびこれらの処置の組合せが挙げられる。多くの抗癌剤が開発されているが、より有効な治療剤の必要性が依然として存在している。

【0005】

免疫毒素は、分子を対象の標的細胞（例えば、癌細胞または炎症性障害を媒介する免疫細胞）に指向させる標的化ドメインと、標的細胞の増殖を抑止（または標的細胞を死滅させる）毒性ドメインを含む分子である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

概要

本開示において、上皮成長因子受容体（EGFR）結合ドメインと、インターロイキン-13受容体（IL13R）結合ドメイン（またはインターロイキン-4受容体（IL4R）結合ドメイン）を含む二重特異性の免疫毒性受容体標的化試薬が、マウスの癌細胞の死滅および腫瘍負荷の低減において、その単一特異的な受容体標的化試薬対応物よりもずっと有効であったという驚くべき知見を詳述する。したがって、本明細書に記載の二重特異性受容体標的化試薬は、とりわけ、さまざまな増殖性障害、例えば癌および炎症性障害の処置方法に有用である。

【0007】

また、本開示により、被験体に投与された免疫毒性受容体標的化試薬の毒性が、免疫毒素の前に、該被験体に非免疫毒性受容体標的化試薬を投与することにより低減され得るという驚くべき知見について詳述する。したがって、免疫毒素療法の前に非免疫毒性受容体標的化試薬を投与する方法は、例えば、免疫毒性療法の1つ以上の副作用の数または重症度の低減に有用である。かかる方法は、医療従事者が、例えば、被験体の健常組織に実質的に影響を及ぼすことなく疾患（癌または炎症性障害など）が有効に処置される、被験体の治療レジメンを策定するために使用され得る。

【0008】

一態様において、本開示により、（a）上皮成長因子受容体（EGFR）結合剤を含む第1の標的化ドメインと、（b）IL-13受容体（IL13R）結合剤またはIL-4受容体（IL4R）結合剤を含む第2の標的化ドメインを含み、（a）が（b）に結合されている受容体標的化試薬を取り上げて記載する。

【0009】

別の態様において、本開示により、(a) 上皮成長因子受容体 (EGFR) 結合剤を含む第1の標的化ドメインと、(b) IL-4 受容体 (IL4R) 結合剤を含む第2の標的化ドメインを含み、該(a)が(b)に結合されている受容体標的化試薬を取り上げて記載する。

【0010】

別の態様において、本開示により、(a) 上皮成長因子受容体 (EGFR) 結合剤を含む第1の標的化ドメインと、(b) IL-13 受容体 (IL13R) 結合剤を含む第2の標的化ドメインを含み、該(a)が(b)に結合されている受容体標的化試薬を取り上げて記載する。

【0011】

本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬の一部の実施形態において、IL13R 結合剤は、IL13Rに結合する抗体もしくはその抗原結合断片またはIL-13 ポリペプチドもしくはそのIL13R 結合断片を含むもの、あるいは該抗体もしくは該断片または該ポリペプチドもしくは該断片からなるものであり得る。

【0012】

本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬の一部の実施形態において、IL4R 結合剤は、IL4Rに結合する抗体もしくはその抗原結合断片またはIL-4 ポリペプチドもしくはそのIL4R 結合断片を含むもの、あるいは該抗体もしくは該断片または該ポリペプチドもしくは該断片からなるものであり得る。

【0013】

本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬の一部の実施形態において、EGFR 結合剤は、(i) EGFRに結合する抗体またはその抗原結合断片；(ii) 上皮成長因子ポリペプチドもしくはそのEGFR 結合断片；(iii) ベータセルリンポリペプチドもしくはそのEGFR 結合断片；(iv) トランスフォーミング増殖因子 α ポリペプチドもしくはそのEGFR 結合断片；(v) アンフィレギュリンポリペプチドもしくはそのEGFR 結合断片；(vi) エピレギュリンポリペプチドもしくはそのEGFR 結合断片；または(vii) ヘパリン結合EGFポリペプチドもしくはそのEGFR 結合断片を含むもの、あるいは該(i)～(vii)のいずれかからなるものであり得る。抗体(例えば、EGFRまたはIL13Rに結合する抗体)または抗原結合断片は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、 F_{ab} 断片、 $F_{(ab)2}$ 断片、 F_{ab} 断片、 F_v 断片、または scF_v 断片であり得る。

【0014】

一部の実施形態において、(a)と(b)は、共有結合または非共有結合によって互いに結合され得る。一部の実施形態において、(a)と(b)は、結合ペアの第1と第2の構成要素によって互いに結合され得る。結合ペアは、ストレプトアビジン(またはアビジン)とビオチンであり得る。一部の実施形態において、受容体標的化試薬は、(a)と(b)を含む融合タンパク質を含むもの、または該融合タンパク質からなるものであり得る。

【0015】

一部の実施形態において、受容体標的化試薬は、さらに毒性ドメインを含むものであり得、この場合、該受容体標的化試薬は免疫毒性である。毒性ドメインは、小分子、放射線剤(radiological agent)および/または毒性ポリペプチドを含むもの、あるいは小分子、放射線剤および/または毒性ポリペプチドからなるものであり得る。毒性ポリペプチドは、ジフテリア毒素もしくはその生物学的に活性な断片からなるもの、または該毒素もしくは該断片を含むものであり得る。毒性ポリペプチドは、配列番号9または配列番号10からなるもの、あるいは該配列番号を含むものであり得る。毒性ポリペプチドは、シュードモナス体外毒素Aもしくはその生物学的に活性な断片からなるもの、または該毒素もしくは該断片を含むものであり得る。毒性ポリペプチドは、配列番号11または配列番号12を含むもの、あるいは該配列番号からなるものであり得る。毒性ポリペプチドは、例えば、シュードモナス体外毒素(PE)、ブリオジン(bryodin)、ゲロニン、 α -

10

20

30

40

50

サルシン、アスペルギリン、レストリクトシン (r e s t r i c t o c i n)、アンジオゲニン、サポリン、アブリン、原核生物のリボヌクレアーゼ、真核生物のリボヌクレアーゼ、リシン、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質 (P A P)、アポトーシス促進性ポリペプチド、リボソーム阻害性タンパク質、または前記のもののいずれかの生物学的に活性な断片であり得る。アポトーシス促進性ポリペプチドは、例えば、B a x、F a s、B a d、B a k、B i m、B i k、B o k、H r k、F a s L、T R A I L、または T N F - α であり得る。

【0016】

一部の実施形態において、受容体標的化試薬は、被験体において該ポリペプチドの免疫原性が低減または抑制されるように修飾された毒性ドメインを含むものであり得る。例えば、受容体標的化試薬は、配列番号 11 に示されたアミノ酸配列を有し、(i) 490 位のアルギニンがアラニンであり、513 位のアルギニンがアラニンであり、432 位のアルギニンがグリシンであり、467 位のアルギニンがアラニンであり、590 位のリジンがセリンである；(ii) 490 位のアルギニンがアラニンであり、513 位のアルギニンがアラニンであり、467 位のアルギニンがグリシンであり、548 位のグルタミン酸がセリンであり、590 位のリジンがセリンであり、332 位のグルタミンがセリンであり、313 位のアルギニンがアラニンである；(iii) 490 位のアルギニンがアラニンであり、513 位のアルギニンがアラニンであり、467 位のアルギニンがグリシンであり、548 位のグルタミン酸がセリンであり、590 位のリジンがセリンであり、432 位のグルタミンがグリシンであり、313 位のアルギニンがアラニンである；または (iv) 490 位のアルギニンがアラニンであり、513 位のアルギニンがアラニンであり、467 位のアルギニンがグリシンであり、548 位のグルタミン酸がセリンであり、590 位のリジンがセリンであり、432 位のグルタミンがグリシンであり、332 位のグルタミンがセリンであり、313 位のアルギニンがアラニンである毒性ポリペプチドを含むものであり得る。受容体標的化試薬は、配列番号 11 のアミノ酸配列および (i) ~ (iv) のいずれか 1 つに示した置換を有する毒性ポリペプチドの断片を含むものであってもよいことは理解されよう。例えば、受容体標的化試薬は、配列番号 11 のアミノ酸 276 ~ 633 のアミノ酸配列であって、(i) ~ (iv) のいずれかに示した置換を含む配列を有する毒性ポリペプチドを含むものであり得る。

【0017】

一部の実施形態において、(a)、(b)、または (a) と (b) は、毒性ドメインに非共有結合または共有結合によって結合され得る。受容体標的化試薬は、該毒性ドメインおよび (a)、(b)、または (a) と (b) を含む融合タンパク質を含むものであり得る。(a) および/または (b) は毒性ドメインに、本明細書に記載の任意の配置で結合され得る。

【0018】

一部の実施形態において、受容体標的化試薬は、さらに、1 つ以上のリンカー部分を含むものであり得る。該 1 つ以上のリンカー部分の少なくとも 1 つはペプチドリンカーであり得る。ペプチドリンカーは、例えば、配列番号 13 もしくは配列番号 14 または本明細書に記載の任意の他のリンカーペプチドを含むもの、あるいは該配列番号または該リンカーペプチドからなるものであり得る。

【0019】

一部の実施形態において、受容体標的化試薬は、配列番号 1 ~ 3 のいずれかを含むもの、または該配列番号からなるものであり得る。一部の実施形態において、受容体標的化試薬は、配列番号 18 ~ 20 のいずれか 1 つを含むもの、または該配列番号のいずれか 1 つからなるものであり得る。

【0020】

一部の実施形態において、受容体標的化試薬は、1 つ以上の検出可能な標識を含むものであり得る。

【0021】

一部の実施形態において、受容体標的化試薬は細胞に結合するものであり得る。該細胞は、例えば、ヒト細胞などの哺乳動物細胞であり得る。該細胞は、I L 1 3 Rおよび／またはE G F Rを発現している細胞であり得る。

【0022】

別の態様において、本開示により、上記の任意の受容体標的化試薬および薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物を取り上げて記載する。

【0023】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載の任意のポリペプチド（例えば、配列番号1～22のいずれか1つ）をコードする核酸を提供する。

【0024】

別の態様において、本開示は、上記の任意のポリペプチド受容体標的化試薬を含む融合タンパク質をコードする核酸を提供する。例えば、該核酸は、配列番号1～3のいずれか1つを含むか、または該配列番号のいずれか1つからなる融合タンパク質をコードするものであり得る。別の例において、該核酸は、配列番号18～20のいずれか1つを含むか、または該配列番号のいずれか1つからなる融合タンパク質をコードするものであり得る。

【0025】

また別の態様において、本開示により、(i) 上記の任意の核酸を含むベクター；(ii) 上記の任意の核酸を含む発現ベクター；および／または(iii) (ii)の発現ベクターを含む細胞を取り上げて記載する。

【0026】

別の態様において、本開示は、融合タンパク質の作製方法を提供する。該方法は、直前に記載の発現ベクターを含む細胞を、融合タンパク質の発現に適した条件下で培養する工程を含む。また、該方法は、該タンパク質を該細胞または該細胞を培養した培養培地から単離する工程も含むものであり得る。

【0027】

別の態様において、本開示により、上記の任意の核酸にコードされたポリペプチドを取り上げて記載する。

【0028】

また別の態様において、本開示により、細胞を上記の任意の受容体標的化試薬と接触させる工程を含む、受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのインビトロ方法を取り上げて記載する。また、該方法は、該細胞がE G F R、I L 1 3 R、またはI L 4 Rを発現しているかどうかを調べる工程も含むものであり得る。該細胞は、E G F RならびにI L 4 Rおよび／またはI L 1 3 Rを発現している細胞であり得る。

【0029】

また別の態様において、本開示により、細胞を上記の任意の受容体標的化試薬と接触させる工程を含む、受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのインビトロ方法を取り上げて記載する。また、該方法は、細胞がE G F RまたはI L 1 3 Rを発現しているかどうかを調べる工程も含むものであり得る。該細胞は、E G F Rおよび／またはI L 1 3 Rを発現している細胞であり得る。

【0030】

本明細書に記載の任意の方法の一部の実施形態において、該細胞は、癌細胞、例えば限定されないが、肺癌細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、腎臓癌細胞、胃癌細胞、肝臓癌細胞、骨癌細胞、血液の癌細胞、神経組織癌細胞、黒色腫細胞、甲状腺癌細胞、膠芽細胞腫細胞、卵巣癌細胞、精巣癌細胞、前立腺癌細胞、頸部癌細胞、膣癌細胞、および膀胱癌細胞などであり得る。該細胞は、T細胞またはB細胞などの免疫細胞であり得る。該細胞は、例えば、ヒト細胞などの哺乳動物細胞であり得る。

【0031】

また別の態様において、本開示により、受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのインビボ方法を取り上げて記載する。該方法は、被験体に上記の任意の受容体標的化試薬を

10

20

30

40

50

送達する工程を含む。また、該方法は、被験体が癌を有するかどうかを調べる工程も含むものであり得る。癌は、例えば、肺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、腎臓癌、胃癌、肝臓癌、骨癌、血液の癌、神経組織の癌、黒色腫、甲状腺癌、卵巣癌、精巣癌、前立腺癌、頸部癌、膠芽細胞腫、腔癌、または膀胱癌であり得る。また、該細胞はT細胞またはB細胞などの免疫細胞であり得る。被験体はヒトなどの哺乳動物であり得る。被験体は、炎症状態（例えば、本明細書に記載の任意のもの）を有する、該炎症状態を有することが疑われる、または該炎症状態が発生するリスクのある被験体であり得る。また、該方法は、被験体の癌の1つ以上の（one or more one or more）細胞がEGFR、IL4Rおよび／またはIL13Rを発現しているかどうかを調べる工程も含むものであり得る。該方法は、さらに、受容体標的化試薬が該細胞に結合したかどうか、または受容体標的化試薬が該細胞を死滅させた（もしくは該細胞の増殖を抑止した）かどうかを調べる工程を含むものであり得る。被験体が炎症状態を有する、炎症状態を有することが疑われる、または炎症状態が発生するリスクのある被験体である実施形態において、該方法は、炎症状態を処置する方法であり得る。

10

【0032】

別の態様において、本開示により、細胞の増殖を抑止するためのインビトロ方法を取り上げて記載する。該方法は、細胞を上記の任意の免疫毒性受容体標的化試薬と接触させる工程を含み、細胞と免疫毒性受容体標的化試薬との該接触により、該細胞の増殖が抑止される。一部の実施形態において、該免疫毒性受容体標的化試薬によって細胞が死滅され得、したがって、該方法は、細胞を死滅させるためのインビトロ方法であり得る。該細胞は、癌細胞（例えば、上記の任意のもの）であり得る。

20

【0033】

また別の態様において、本開示は、癌を有する、癌を有することが疑われる、または癌が発生するリスクのある被験体に、上記の任意の受容体標的化試薬を送達する工程を含む、被験体の癌を処置するためのインビボ方法を提供する。受容体標的化試薬は免疫毒性であり得る（すなわち、少なくとも1つの毒性ドメインを含む）。送達としては、例えば、静脈内および／または体循環ポンプ（systemic pump）の使用による該受容体標的化試薬の被験体への投与が挙げられ得る。

【0034】

別の態様において、本開示により、被験体において免疫毒性療法の1つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9つもしくは10またはそれ以上）の毒性副作用を低減させるための方法を取り上げて記載する。該方法は、被験体に免疫毒素（例えば、本明細書に記載の任意の免疫毒性受容体標的化試薬）を送達する前に、該被験体に、非免疫毒性の試薬（例えば、本明細書に記載の任意の非免疫毒性受容体標的化試薬）であって、毒性ドメインを含まない非免疫毒性の試薬を送達する工程を含む。

30

【0035】

一部の実施形態において、該非免疫毒性の試薬は、免疫毒素と同じ結合特異性を有するものであり得る。

【0036】

別の態様において、本開示は、被験体において免疫毒性療法の1つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはそれ以上）の毒性副作用を低減させるための方法を提供する。該方法は、被験体に上記の任意の免疫毒性受容体標的化試薬を送達する前に、該被験体に、（a）上皮成長因子受容体（EGFR）結合剤と、（b）IL-13受容体（IL13R）結合剤を含み、該（a）が（b）に結合されている受容体標的化試薬であって、毒性ドメインを含まない受容体標的化試薬を送達する工程を含む。

40

【0037】

別の態様において、本開示により、癌を処置するための方法を取り上げて記載する。該方法は、癌を有する被験体に、（a）上皮成長因子受容体（EGFR）結合剤と、（b）IL-13受容体（IL13R）結合剤またはIL-4受容体（IL4R）結合剤を含み、該（a）が（b）に結合されている受容体標的化試薬であって、毒性ドメインを含まな

50

い受容体標的化試薬を送達する工程；および該被験体に本明細書に記載の任意の免疫毒性受容体標的化試薬を送達する工程を含む。

【0038】

別の態様において、本開示により、癌を処置するための方法を取り上げて記載する。該方法は、癌を有する被験体に、（a）上皮成長因子受容体（EGFR）結合剤と、（b）IL-4受容体（IL4R）結合剤を含み、該（a）が（b）に結合されている受容体標的化試薬であって、毒性ドメインを含まない受容体標的化試薬を送達する工程；および該被験体に本明細書に記載の任意の免疫毒性受容体標的化試薬を送達する工程を含む。

【0039】

別の態様において、本開示により、癌を処置するための方法を取り上げて記載する。該方法は、癌を有する被験体に、（a）上皮成長因子受容体（EGFR）結合剤と、（b）IL-13受容体（IL13R）結合剤を含み、該（a）が（b）に結合されている受容体標的化試薬であって、毒性ドメインを含まない受容体標的化試薬を送達する工程；および該被験体に本明細書に記載の任意の免疫毒性受容体標的化試薬を送達する工程を含む。

【0040】

また別の態様において、本開示により、癌を有する哺乳動物に対する治療用薬剤を選択するための方法を取り上げて記載する。該方法は、哺乳動物の癌の1つ以上の癌細胞がIL13R、IL4R、またはEGFRを発現しているかどうか調べる工程；および該1つ以上の癌細胞がIL13R、IL4R、またはEGFRを発現している場合、該哺乳動物に対する治療用薬剤として上記の任意の受容体標的化試薬（例えば、上記の任意の免疫毒性受容体標的化試薬）を選択する工程を含む。一部の実施形態において、該方法は、該1つ以上の癌細胞がIL13R、IL4R、またはEGFRを発現していると判定された後、該被験体を選択した受容体標的化試薬を送達する工程も含むものであり得る。

【0041】

また別の態様において、本開示により、癌を有する哺乳動物に対する治療用薬剤を選択するための方法を取り上げて記載する。該方法は、哺乳動物の癌の1つ以上の癌細胞がIL4RまたはEGFRを発現しているかどうかを調べる工程；および該1つ以上の癌細胞がIL4RまたはEGFRを発現している場合、該哺乳動物に対する治療用薬剤として上記の任意の受容体標的化試薬（例えば、上記の任意の免疫毒性受容体標的化試薬）を選択する工程を含む。一部の実施形態において、該方法は、該1つ以上の癌細胞がIL4RまたはEGFRを発現していると判定された後、該被験体を選択した受容体標的化試薬を送達する工程も含むものであり得る。

【0042】

また別の態様において、本開示により、癌を有する哺乳動物に対する治療用薬剤を選択するための方法を取り上げて記載する。該方法は、哺乳動物の癌の1つ以上の癌細胞がIL13RまたはEGFRを発現しているかどうかを調べる工程；および該1つ以上の癌細胞がIL13RまたはEGFRを発現している場合、該哺乳動物に対する治療用薬剤として上記の任意の受容体標的化試薬（例えば、上記の任意の免疫毒性受容体標的化試薬）を選択する工程を含む。一部の実施形態において、該方法は、該1つ以上の癌細胞がIL13RまたはEGFRを発現していると判定された後、該被験体を選択した受容体標的化試薬を送達する工程も含むものであり得る。

【0043】

別の態様において、本開示により、哺乳動物の癌の1つ以上の癌細胞がIL13R、IL4R、またはEGFRを発現している場合、癌を有する哺乳動物に対する治療用薬剤として、上記の任意の免疫毒性受容体標的化試薬を選択する工程を含む、癌を有する哺乳動物に対する治療用薬剤を選択するための方法を取り上げて記載する。また、該方法は、哺乳動物の該1つ以上の癌細胞がIL13R、IL4R、またはEGFRを発現しているかどうかを調べる工程も含むものであり得る。

【0044】

別の態様において、本開示により、哺乳動物の癌の1つ以上の癌細胞がIL13Rまた

は E G F R を発現している場合、癌を有する哺乳動物に対する治療用薬剤として、上記の任意の免疫毒性受容体標的化試薬を選択する工程を含む、癌を有する哺乳動物に対する治療用薬剤を選択するための方法を取り上げて記載する。また、該方法は、哺乳動物の該 1 つ以上の癌細胞が I L 1 3 R または E G F R を発現しているかどうかを調べる工程も含むものであり得る。

【 0 0 4 5 】

上記の任意のインビボ方法の一部の実施形態において、被験体は、例えばヒトなどの哺乳動物であり得る。

【 0 0 4 6 】

一部の実施形態において、上記の任意のインビボ方法は、被験体が癌を有するかどうか、または癌が発生するリスクがあるかどうかを調べる工程を含むものであり得る。また、該方法は、被験体の癌の 1 つ以上の癌細胞が I L 1 3 R、I L 4 R および／または E G F R を発現しているかどうかを調べる工程も含むものであり得る。該インビボ方法は、(i) 受容体標的化試薬が細胞（例えば、E G F R、I L 4 R および／または I L 1 3 R を発現している細胞、例えば、癌細胞もしくは免疫細胞など）に結合したかどうかを調べる工程；および／または (i i) 受容体標的化試薬が細胞の増殖を抑止したかどうか、もしくは結合した細胞を死滅させたかどうかを調べる工程も含むものであり得る。

【 0 0 4 7 】

また別の態様において、本開示により、上記の任意の受容体標的化試薬；および該受容体標的化試薬を投与するための使用説明書を備えるキットを取り上げて記載する。また、キットは、1 種類以上の薬学的に許容され得る担体および／または薬学的に許容され得る希釈剤を含むものであってもよい。

【 0 0 4 8 】

別の態様において、本開示により、I L 1 3 R、I L 4 R、または E G F R の発現を検出するための 1 種類以上の試薬；および I L 1 3 R または E G F R の発現が検出された場合、被験体に本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬を投与するための使用説明書を備えるキットを取り上げて記載する。

【 0 0 4 9 】

別の態様において、本開示により、I L 4 R または E G F R の発現を検出するための 1 種類以上の試薬；および I L 4 R または E G F R の発現が検出された場合、被験体に本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬を投与するための使用説明書を備えるキットを取り上げて記載する。

【 0 0 5 0 】

別の態様において、本開示により、I L 1 3 R または E G F R の発現を検出するための 1 種類以上の試薬；および I L 1 3 R または E G F R の発現が検出された場合、被験体に本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬を投与するための使用説明書を備えるキットを取り上げて記載する。

【 0 0 5 1 】

別の態様において、本開示により、容器；および該容器に内包された組成物を備え、該組成物が哺乳動物の癌を処置するための活性剤を含み、該組成物内の活性剤が上記の任意の免疫毒性受容体標的化試薬を含み、該容器が、該組成物が哺乳動物の癌の処置における使用のためのものであることを示すラベルを有する物品を取り上げて記載する。該ラベルは、さらに、哺乳動物の癌の 1 つ以上の癌細胞が I L 1 3 R、I L 4 R、または E G F R を発現している場合に該組成物を該哺乳動物に投与することを示すものであり得る。物品は、該活性剤を該哺乳動物に投与するための使用説明書も含むものであり得る。該組成物は、液状形態、または乾燥状態もしくは凍結乾燥状態であり得る。

【 0 0 5 2 】

別の態様において、本開示により、容器；および該容器に内包された組成物を備え、該組成物が哺乳動物の癌を処置するための活性剤を含み、該組成物内の活性剤が上記の任意の免疫毒性受容体標的化試薬を含み、該容器が、該組成物が哺乳動物の癌の処置における

10

20

30

40

50

使用のためのものであることを示すラベルを有する物品を取り上げて記載する。該ラベルは、さらに、哺乳動物の癌の1つ以上の癌細胞が I L 4 R または E G F R を発現している場合に該組成物を該哺乳動物に投与することを示すものであり得る。物品は、該活性剤を該哺乳動物に投与するための使用説明書も含むものであり得る。該組成物は、液状形態、または乾燥状態もしくは凍結乾燥状態であり得る。

【0053】

別の態様において、本開示により、容器；および該容器に内包された組成物を備え、該組成物が哺乳動物の癌を処置するための活性剤を含み、該組成物内の活性剤が上記の任意の免疫毒性受容体標的化試薬を含み、該容器が、該組成物が哺乳動物の癌の処置における使用のためのものであることを示すラベルを有する物品を取り上げて記載する。該ラベルは、さらに、哺乳動物の癌の1つ以上の癌細胞が I L 1 3 R または E G F R を発現している場合に該組成物を該哺乳動物に投与することを示すものであり得る。物品は、該活性剤を該哺乳動物に投与するための使用説明書も含むものであり得る。該組成物は、液状形態、または乾燥状態もしくは凍結乾燥状態であり得る。

【0054】

本明細書で用いる場合、2つ以上の原子間または分子単位間の相互作用との関連における「結合された」または「～に結合された」は、2つ以上の原子または分子単位（例えば、2つ以上のドメイン（標的化ドメインもしくは毒性ドメインなど））の互いの任意の共有結合または非共有結合をいう。共有結合の化学的性質（1対以上の価電子を共有する2つの原子）は当該技術分野で知られており、例えば、ジスルフィド結合またはペプチド結合が挙げられる。非共有結合は、対の価電子の共有を伴わない原子間または分子間の化学結合である。例えば、非共有結合による相互作用としては、例えば、疎水性相互作用、水素結合相互作用、イオン結合、ファンデルワールス結合、または双極子間相互作用が挙げられる。かかる非共有結合による相互作用の例としては、抗体-抗原複合体形成または結合ペア相互作用（結合ペアの第1と第2の構成要素の相互作用（ストレプトアビジンとビオチン間の相互作用など））が挙げられる。用語「(a)が(b)に結合されている」は、(a)と(b)とが標的化ドメインである場合、(a)が(b)に、(i)上記の化学結合のいずれか1つ；(i i)リンカー（結合ペアを含む）；または(i i i)毒性ドメインによって結合されていることを意味する。用語「(a)が(b)に直接結合されている」は、(a)が(b)に、(i i i)ではなく(i)または(i i)のいずれかによって結合されていることを意味する。

【0055】

「ポリペプチド」および「タンパク質」は互換的に使用し、長さまたは翻訳後修飾に関係なく、任意のペプチド結合アミノ酸鎖を意味する。

【0056】

本明細書に記載の受容体標的化試薬の種々の成分（例えば、ドメイン）、例えば、E G F R 結合ドメイン、I L 1 3 R 結合ドメイン、I L 4 R 結合ドメイン、または毒性ポリペプチドを含む毒性ドメイン）はいずれも、該ポリペプチドの完全長野生型形態からなるもの、または該野生型形態を含むものであってもよい。ポリペプチドの成熟形態と未成熟形態が存在する場合、本発明の受容体標的化剤に使用されるものは、好ましくは成熟形態である。例えば、E G F R 結合ドメインは、完全長上皮成長因子（例えば、ヒト上皮成長因子（アミノ酸配列配列番号6を有する上皮成長因子など））からなるもの、または該因子であり得る。

【0057】

また、本開示は、(i)生物学的活性バリエーション、および(i i)本明細書に記載の完全長野生型ポリペプチドの生物学的に活性な断片またはその生物学的活性バリエーション（例えば、受容体標的化試薬の種々のポリペプチドドメイン）を提供する。完全長の好ましくは成熟野生型タンパク質または該タンパク質の断片の生物学的活性バリエーションは、付加、欠失または置換を含むものであり得る。置換を有するタンパク質は、一般的に、50個以下（例えば、1個以下、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、2

5、30、35、40、または50個)の同類アミノ酸置換を有する。同類置換は、あるアミノ酸の、類似した特性を有する別のアミノ酸での置換である。同類置換としては、以下：バリン、アラニンおよびグリシン；ロイシン、バリンおよびイソロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギンおよびグルタミン；セリン、システインおよびトレオニン；リジンおよびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロシンの群内での置換が挙げられる。非極性疎水性アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが挙げられる。極性天然アミノ酸としては、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが挙げられる。正の電荷を有する(塩基性)アミノ酸としては、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが挙げられる。負の電荷を有する(酸性)アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。上記の極性塩基性または酸性群の一構成要素の、同じ群の別の構成要素による任意の置換が同類置換とみなされ得る。反対に、非同類置換は、あるアミノ酸の、異なる特性を有する別のアミノ酸での置換である。

10

【0058】

欠失バリエーションは、(2つ以上のアミノ酸の)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸セグメントまたは非連続単一アミノ酸が欠けたものであり得る。

【0059】

付加体(付加バリエーション)としては、(a)少なくとも5個のアミノ酸を含む完全長野生型ポリペプチドまたはその断片；および(b)内部または末端(CもしくはN)に無関連または非相同アミノ酸配列を含む融合タンパク質が挙げられる。かかる融合タンパク質との関連において、用語「非相同アミノ酸配列」は(a)以外のアミノ酸配列をいう。したがって、本明細書に記載のペプチドと非相同アミノ酸配列を含む融合タンパク質は、配列において、天然に存在するタンパク質の全部または一部に対応しない。非相同配列は、例えば、組換えタンパク質の精製に使用される配列(例えば、FLAG、ポリヒスチジン(例えば、ヘキサヒスチジン)、血球凝集素(hemagglutinin)(HA)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、またはマルトース結合タンパク質(MBP))であり得る。また、非相同配列は、診断用または検出可能なマーカーとして有用なタンパク質、例えば、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)であり得る。一部の実施形態において、該融合タンパク質は、別のタンパク質由来のシグナル配列(例えば、KDEL(配列番号15)配列または本明細書に記載の任意の他の配列を含むものである。一部の実施形態において、該融合タンパク質は、例えば、免疫応答の誘導(例えば、抗体生成のため；下記参照)に有用な担体(例えば、KLH)を含むものであり得る。一部の実施形態において、該融合タンパク質は外因性メチオニンアミノ酸残基を含むものであり得る。一部の実施形態において、該融合タンパク質は1つ以上のリンカー部分(下記参照)を含むものであり得る。非相同配列は種々の長さのものであり得、場合によっては、非相同配列を結合させる完全長標的タンパク質よりも長い配列であり得る。

20

30

【0060】

「断片」は、本明細書で用いる場合、未成熟タンパク質の完全長より短いポリペプチドセグメントをいう。タンパク質の断片は、末端(カルボキシもしくはアミノ末端)および/または内部の欠失を有するものであり得る。一般的に、タンパク質の断片は、少なくとも4(例えば、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも15、少なくとも18、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、または少なくとも100またはそれより長い)アミノ酸長である。

40

【0061】

本明細書に記載の任意の標的化ポリペプチドまたは毒性ポリペプチドの生物学的に活性

50

な断片または生物学的活性バリエーションは、本明細書において、完全長野生型ポリペプチドの活性の少なくとも25%（例えば、少なくとも：30%；40%；50%；60%；70%；75%；80%；85%；90%；95%；97%；98%；99%；99.5%、または100%またはさらに大きい）活性を有するものである。標的化ポリペプチドの場合、当該活性は、標的化ポリペプチドが対象の標的（例えば、EGFR受容体、IL13R、またはIL4R）に結合する能力である。毒性ポリペプチドの場合、当該活性は、細胞の増殖を抑止する（または細胞を死滅させる）能力である。

【0062】

意図される用途に応じて、該ポリペプチド、その生物学的に活性な断片または生物学的活性バリエーションは、任意の種、例えば、線虫、昆虫、植物、鳥類、魚類、爬虫類、または哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、アレチネズミ、イヌ、ネコ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、クジラ、サル、もしくはヒト）などのものであり得る。一部の実施形態において、生物学的に活性な断片または生物学的活性バリエーションは、該タンパク質の免疫原性の抗原断片を含むものである。免疫原性断片は、当該完全長野生型タンパク質が対象の動物において免疫応答（例えば、抗体応答または細胞性免疫応答）を刺激する能力の少なくとも25%（例えば、少なくとも：30%；40%；50%；60%；70%；75%；80%；85%；90%；95%；97%；98%；99%；99.5%、または100%またはそれより大きい）能力を有するものである。タンパク質の抗原断片は、当該完全長野生型タンパク質が該タンパク質に特異的な抗体または該タンパク質に特異的なT細胞によって認識される能力の少なくとも25%（例えば、少なくとも：30%；40%；50%；60%；70%；75%；80%；85%；90%；95%；97%；98%；99%；99.5%、または100%またはそれより大きい）能力を有するものである。

【0063】

特に記載のない限り、本明細書で用いるすべての科学技術用語は、本発明が関連する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。好ましい方法および材料は以下に記載するが、本明細書に記載のものと類似または均等な方法および材料を本発明の実施および試験において使用することができる。本明細書に挙げたすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。材料、方法および実施例は、例示にすぎず、限定を意図しない。

【0064】

本発明の他の特徴および利点、例えば、癌細胞の増殖を抑止する（または癌細胞を死滅させる）ための方法は、以下の説明、図面および特許請求の範囲から明らかとなろう。

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1】図1Aは、DTEGF13構築物を示す模式図である。二重特異性の単鎖免疫毒素DTEGF13をコードする遺伝子断片を、オーバーラップ伸長PCRを用いて作製した。この構築物は（5'から3'に）、切断型ジフテリア毒素分子（DT₃₉₀）をコードする核酸、7アミノ酸（EASPPGE）（配列番号14）リンカー（L）、ヒト上皮成長因子（EGF）、ヒト筋肉アルドラーゼ（hma）のフレキシブル20アミノ酸セグメント、およびインターロイキン-13（IL-13）からなるものであった。NcoI/XhoI制限部位を使用し、DTEGF13をコードする核酸配列pET21d細菌発現ベクター内にクローニングした。図1Bは、EGF4KDEL構築物を示す模式図である。二重特異性の単鎖免疫毒素EGF4KDELをコードする遺伝子断片を、オーバーラップ伸長PCRを用いて作製した。この構築物は（5'から3'に）、切断型ヒト上皮成長因子（EGF）をコードする核酸、ヒト筋肉アルドラーゼ（hma）のフレキシブル20アミノ酸セグメント、ヒトインターロイキン-4（IL-4）、シュードモナス体外毒素（PE）Aの生物学的に活性な断片（配列番号12）、およびKDEL（配列番号15）アミノ酸配列からなるものであった。NcoI/XhoI制限部位を使用し、EGF4KDELをコードする核酸配列をpET21d細菌発現ベクター内にクローニングした。

【図2】図2Aは、EGFR⁺/IL13R⁺ PC-3細胞におけるDTEGF13の特異的細胞毒性を示す折れ線グラフである（増殖アッセイにより測定）。DTEGF13、DTIL13、またはDTEGFを、PC-3前立腺癌細胞とともに72時間培養した。グラフ上のデータ点は3連の試料の平均±SDを表す。IC₅₀（または阻害濃度50%）は、免疫毒素の非存在下での細胞増殖の割合の50%を抑止する免疫毒素の濃度である。X軸は、各免疫毒素の濃度を表す（単位：ナノモル（nM））。Y軸は、対照（未処理）細胞（対照応答に対する%）と比べたときの細胞増殖%を表す。図2Bは、EGFR⁻/IL13R⁻ Daudi細胞におけるDTEGF13の特異的細胞毒性を示す折れ線グラフである（増殖アッセイにより測定）。DTEGF13、DTIL13、またはDTEGFを、Daudi細胞とともに72時間培養した。グラフ上のデータ点は、3連の試料の平均±SD（標準偏差）を表す。X軸は、各免疫毒素の濃度（単位：nM）を表す。Y軸は、対照（未処理）細胞（対照応答に対する%）と比べたときの細胞増殖%を表す。

10

【図3】図3は、EGFR⁺/IL13R⁺ U87細胞におけるDTEGF13の特異的細胞毒性を示す折れ線グラフである（増殖アッセイにより測定）。DTEGF13、DTIL13、またはDTEGFを、U87細胞とともに72時間培養した。グラフ上のデータ点は3連の試料の平均±SDを表す。X軸は、各免疫毒素の濃度（単位：nM）を表す。Y軸は、対照（未処理）細胞（対照応答に対する%）と比べたときの細胞増殖%を表す。

【図4】図4は、抗EGF抗体と抗IL13抗体がDTEGF13によるPC-3細胞増殖の抑止をブロックする能力を示す棒グラフである（増殖アッセイにより測定）。DTEGF13（0.1nM）をPC-3細胞とともに、抗EGF抗体、抗IL13抗体または対照抗体（Ly5.2）の存在下または非存在下で72時間培養した。X軸は、各実験での試験を表す。Y軸は、対照（未処理）細胞（対照応答に対する%）と比べたときの細胞増殖%を表す。

20

【図5】図5は、EGFR⁺/IL13R⁺ DU-145細胞におけるDTEGF13の特異的細胞毒性を示す折れ線グラフである（増殖アッセイにより測定）。DTEGF13、DTIL13、またはDTEGFを、DU-145細胞とともに72時間培養した。グラフ上のデータ点は3連の試料の平均±SDを表す。X軸は、各免疫毒素の濃度（単位：nM）を表す。Y軸は、対照（未処理）細胞（対照応答に対する%）と比べたときの細胞増殖%を表す。

30

【図6】図6は、EGFR⁺/IL13R⁺ U118細胞におけるDTEGF13の特異的細胞毒性を示す折れ線グラフである（増殖アッセイにより測定）。DTEGF13、DTIL13、DTEGF、またはBic3（対照）を、U118細胞とともに72時間培養した。グラフ上のデータ点は3連の試料の平均±SDを表す。X軸は、各免疫毒素の濃度（単位：nM）を表す。Y軸は、対照（未処理）細胞（対照応答に対する%）と比べたときの細胞増殖%を表す。

【図7】図7は、EGFR⁺/IL13R⁺ HT-29細胞におけるDTEGF13の特異的細胞毒性を示す折れ線グラフである（増殖アッセイにより測定）。DTEGF13、DTIL13、DTEGF、またはDT222（陰性対照）を、HT-29細胞とともに72時間培養した。グラフ上のデータ点は3連の試料の平均±SDを表す。X軸は、各免疫毒素の濃度（単位：nM）を表す。Y軸は、対照（未処理）細胞（対照応答に対する%）と比べたときの細胞増殖%を表す。

40

【図8】図8は、EGFR⁺/IL13R⁺ Calu-3細胞におけるDTEGF13の特異的細胞毒性を示す折れ線グラフである（増殖アッセイにより測定）。DTEGF13、DTIL13、DTEGF、またはDT222（対照）を、Calu-3細胞とともに72時間培養した。グラフ上のデータ点は3連の試料の平均±SDを表す。X軸は、各免疫毒素の濃度（単位：nM）を表す。Y軸は、対照（未処理）細胞（対照応答に対する%）と比べたときの細胞増殖%を表す。

【図9】図9は、DTEGFとDTIL13の単一特異性免疫毒素の混合物と比べたとき

50

の二重特異性 D T E G F 1 3 免疫毒素の細胞毒性を示す折れ線グラフである。この混合物は、1 nM 溶液が 0.5 nM D T E G F と 0.5 nM D T I L 1 3 であるものである。D T E G F 1 3、D T I L 1 3、D T E G F、または D T E G F と D T I L 1 3 を、H T - 2 9 細胞とともに 72 時間培養した。グラフ上のデータ点は 3 連の試料の平均 ± S D を表す。X 軸は、各免疫毒素の濃度（単位：nM）を表す。Y 軸は、対照（未処理）細胞（対照応答に対する %）と比べたときの細胞増殖 % を表す。

【図 1 0】図 1 0 は、D T E G F と D T I L 1 3 の単一特異性免疫毒素の混合物と比べたときの二重特異性 D T E G F 1 3 免疫毒素の細胞毒性を示す折れ線グラフである。D T E G F 1 3、D T I L 1 3、D T E G F、または D T E G F と D T I L 1 3 を、U 8 7 細胞とともに 72 時間培養した。グラフ上のデータ点は 3 連の試料の平均 ± S D を表す。X 軸は、各免疫毒素の濃度（単位：nM）を表す。Y 軸は、対照（未処理）細胞（対照応答に対する %）と比べたときの細胞増殖 % を表す。

10

【図 1 1】図 1 1 は、P C - 3 細胞による D T E G F 1 3 の結合およびインターナリゼーションを示す折れ線グラフである。P C - 3 細胞を ¹²⁵I 標識 D T E G F 1 3 とともに種々の時間（X 軸）インキュベートした。データを、各画分における初期結合タンパク質に対するパーセンテージとして示す（Y 軸）。各データ点は、試料平均 ± S D を表す。

【図 1 2】図 1 2 A は、P C - 3 前立腺腫瘍マウスモデルを用いた、腫瘍増殖に対する D T E G F 1 3 処置の効果を示す折れ線グラフである。P C - 3 側腹部腫瘍を有するヌードマウスを、D T E G F 1 3、D T I L 1 3、または D T E G F で腫瘍内（i. t.）処置した（n = 4 ~ 5 / 処置群）。マウスの平均腫瘍体積を各処置群において示す。横座標の下部の矢印は注射の日を示す。図 1 2 B は、P C - 3 前立腺腫瘍マウスモデルを用いた、体重減少に対する D T E G F 1 3 処置の効果を示す折れ線グラフである。P C - 3 側腹部腫瘍を有するヌードマウスを、D T E G F 1 3、D T I L 1 3、または D T E G F で i. t. 処置した（n = 4 ~ 5 / 処置群）。マウスの平均体重を各処置群において示す。横座標の下部の矢印は注射の日を示す。

20

【図 1 3】図 1 3 は、P C - 3 前立腺腫瘍マウスモデルを用いた、腫瘍増殖に対する D T E G F 1 3 処置の効果を示す折れ線グラフである。P C - 3 側腹部腫瘍を有するヌードマウスに、D T E G F 1 3 または D T 2 2 2 の 5 回の 2.5 μg の i. t. 注射を行なった（n = 4 ~ 5 / 処置群）。横座標の下部の矢印は注射の日を示す。個々の腫瘍の増殖を時間に対してプロットしている。

30

【図 1 4】図 1 4 は、D T E G F 1 3 で処置された P C - 3 側腹部腫瘍の退縮を示す一連の写真である。触知可能な P C - 3 側腹部腫瘍を有する 2 匹の雌ヌードマウスを、各々、D T E G F 1 3 の i. t. 注射で処置した。腫瘍体積に対する経時的な進歩的効果が写真に示されている。マウス 1 には第 0 日から第 28 日の間に合計 9 回注射し、一方、マウス 2 には第 0 日から第 10 日の間に 5 回注射した（1 日おき；q. o. d.）。

【図 1 5 A】図 1 5 A は、U 8 7 腫瘍マウスモデルを用いた、腫瘍増殖に対する D T E G F 1 3 処置の効果を示す折れ線グラフである。U 8 7 側腹部腫瘍を有するヌードマウスを、D T E G F 1 3、D T I L 1 3、または D T E G F で i. t. 処置した（n = 5 / 処置群）。マウスの平均腫瘍体積を各処置群において示す。横座標の下部の線は注射の日を示す。

40

【図 1 5 B】図 1 5 B は、U 8 7 腫瘍マウスモデルを用いた、腫瘍増殖に対する D T E G F 1 3 処置の長期効果を示す折れ線グラフである。U 8 7 側腹部腫瘍を有するヌードマウスを、D T E G F 1 3、D T I L 1 3、または D T E G F で i. t. 処置した。横座標の下部の線は注射の日を示す。個々の腫瘍の増殖を時間に対してプロットしている。

【図 1 5 C】図 1 5 C は、U 8 7 腫瘍マウスモデルを用いた、体重減少に対する D T E G F 1 3 処置の効果を示す折れ線グラフである。U 8 7 側腹部腫瘍を有するヌードマウスを、D T E G F 1 3 または D T 2 2 2 で i. t. 処置した（n = 4 ~ 5 / 処置群）。マウスの平均体重を各処置群において示す。横座標の下部の線は注射の日を示す。

【図 1 6】図 1 6 は、M I A P a C a - 2 培養細胞に対する D T E G F 1 3 と E G F 1 3 K D E L の細胞傷害効果を示す折れ線グラフである。D T E G F 1 3 または E G F 1 3 K

50

DELを、MIA PaCa-2細胞とともに72時間培養した。グラフ上のデータ点は3連の試料の平均±SDを表す。X軸は、各免疫毒素の濃度（単位：nM）を表す。Y軸は、対照（未処理）細胞と比べたときの細胞増殖%を表す。

【図17A】図17Aおよび17Bは、MIA PaCa-2側腹部腫瘍に対するDTEGF13のi. t. 注射の効果を示す1対の折れ線グラフである（実験1）。MIA PaCa-2側腹部腫瘍は、 1×10^7 個のMIA PaCa-2細胞を雄ヌードマウスの左側腹部内に注射することにより確立させた。触知可能な腫瘍が確立されたら（ほぼ第22日）、マウスを2つの群：図17A：処置なし；または17B：DTEGF13処置に分けた。DTEGF13処置群のマウスには、i. t. 注射で2.5 μ gのDTEGF13を与えた。横座標の下部の線は注射の日を示す。

10

【図17B】図17Aおよび17Bは、MIA PaCa-2側腹部腫瘍に対するDTEGF13のi. t. 注射の効果を示す1対の折れ線グラフである（実験1）。MIA PaCa-2側腹部腫瘍は、 1×10^7 個のMIA PaCa-2細胞を雄ヌードマウスの左側腹部内に注射することにより確立させた。触知可能な腫瘍が確立されたら（ほぼ第22日）、マウスを2つの群：図17A：処置なし；または17B：DTEGF13処置に分けた。DTEGF13処置群のマウスには、i. t. 注射で2.5 μ gのDTEGF13を与えた。横座標の下部の線は注射の日を示す。

【図17C】図17C、17D、および17Eは、実験2における、MIA PaCa-2側腹部腫瘍に対するDTEGF13のi. t. 注射の効果を示す一連の折れ線グラフである。腫瘍細胞の注射前に、雄ヌードマウスに、x線照射装置を用いて300Rad（放射線吸収線量）を照射した。次いで、 1×10^7 個のMIA PaCa-2細胞（DMEM：マトリゲルの1：1混合物中）を注射することにより側腹部腫瘍を確立させた。腫瘍がほぼ50mm³に達したら、マウスを群分けし、2.5 μ gのDTEGF13、DTIL13、DTEGFまたはPBSのi. t. 注射で処置した。この4つの注射は、各グラフの下部の線による表示のとおりq. o. d.で行なった。図17Cは、各処置群の動物の平均腫瘍体積を示す。図17Dは、DTEGF13で処置された個々の腫瘍の増殖を示す。図17Eは、DTEGF13処置群の個々のマウス（マウス1～マウス5）の動物の体重を示す。

20

【図17D】図17C、17D、および17Eは、実験2における、MIA PaCa-2側腹部腫瘍に対するDTEGF13のi. t. 注射の効果を示す一連の折れ線グラフである。腫瘍細胞の注射前に、雄ヌードマウスに、x線照射装置を用いて300Rad（放射線吸収線量）を照射した。次いで、 1×10^7 個のMIA PaCa-2細胞（DMEM：マトリゲルの1：1混合物中）を注射することにより側腹部腫瘍を確立させた。腫瘍がほぼ50mm³に達したら、マウスを群分けし、2.5 μ gのDTEGF13、DTIL13、DTEGFまたはPBSのi. t. 注射で処置した。この4つの注射は、各グラフの下部の線による表示のとおりq. o. d.で行なった。図17Cは、各処置群の動物の平均腫瘍体積を示す。図17Dは、DTEGF13で処置された個々の腫瘍の増殖を示す。図17Eは、DTEGF13処置群の個々のマウス（マウス1～マウス5）の動物の体重を示す。

30

【図17E】図17C、17D、および17Eは、実験2における、MIA PaCa-2側腹部腫瘍に対するDTEGF13のi. t. 注射の効果を示す一連の折れ線グラフである。腫瘍細胞の注射前に、雄ヌードマウスに、x線照射装置を用いて300Rad（放射線吸収線量）を照射した。次いで、 1×10^7 個のMIA PaCa-2細胞（DMEM：マトリゲルの1：1混合物中）を注射することにより側腹部腫瘍を確立させた。腫瘍がほぼ50mm³に達したら、マウスを群分けし、2.5 μ gのDTEGF13、DTIL13、DTEGFまたはPBSのi. t. 注射で処置した。この4つの注射は、各グラフの下部の線による表示のとおりq. o. d.で行なった。図17Cは、各処置群の動物の平均腫瘍体積を示す。図17Dは、DTEGF13で処置された個々の腫瘍の増殖を示す。図17Eは、DTEGF13処置群の個々のマウス（マウス1～マウス5）の動物の体重を示す。

40

50

【図18】図18Aおよび18Bは、MIA PaCa-2側腹部腫瘍に対するDTG F13のi. t. 投与の効果を示す1対の折れ線グラフである（実験3）。図18A：脾臓癌の異種移植片モデルを、雄ヌードマウス（事前の照射なし）に 1×10^7 個のMIA PaCa-2細胞（DMEM：マトリゲルの1：1混合物中）を注射することにより確立した。平均腫瘍体積がほぼ 75 mm^3 になった第15日に、マウスを無作為に3群に分けた（ $n=6$ /群）。被処置動物には、 $2.5 \mu\text{g}$ のDTG F13、DT2222いずれかをi. t. 注射するか、または処置なしとした。合計6回の注射を、各グラフの下部の線による表示のとおり2週間にわたって行なった。図18Bは、DTG F13試薬を投与された試験中（図18Aに示すデータ）の各動物の体重を示す。

【図19】図19Aは、致死量のDTG F13が投与されたマウスの生存に対するEG F13予備投与の保護効果を示す Kaplan-Meier プロットである。正常C57BL/6マウス（ $n=6$ /群）に $100 \mu\text{g}$ のEG F13タンパク質または対照の予備投与を行なった直後に、致死量（ $5 \mu\text{g}$ i. p.）のDTG F13を投与した。対照マウスにはEG F13タンパク質を投与しなかった。Y軸は生存%を表し、X軸は致死量投与後の日数を表す。図19Bは、致死量のDTG F13が投与されたマウスの体重減少に対するEG F13予備投与の保護効果を示す折れ線グラフである。正常C57BL/6マウス（ $n=6$ /群）に $100 \mu\text{g}$ のEG F13タンパク質または対照の予備投与を行なった直後に、致死量（ $5 \mu\text{g}$ i. p.）のDTG F13を投与した。対照マウスにはEG F13タンパク質を投与しなかった。Y軸は、各マウスの平均体重（単位：グラム（g））を表し、X軸は致死量投与後の日数を表す。

【図20】図20は、致死量のDTG F13が投与されたマウスの生存に対するEG F13予備投与の保護効果を示す Kaplan-Meier プロットである。正常C57BL/6マウス（ $n=6$ /群）に、 $100 \mu\text{g}$ のEG F13タンパク質または対照（2219）の予備投与を5分間または30分間のいずれかで行なった後、致死量（ $5 \mu\text{g}$ i. p.）のDTG F13を投与した。Y軸は生存%を表し、X軸は致死量投与後の日数を表す。

【図21】図21Aは、MIA PaCa-2細胞腫瘍マウスモデルを用いた、腫瘍増殖に対するDTG F13処置の効果を示す折れ線グラフである。MIA PaCa-2側腹部腫瘍を有するヌードマウスは、 $2.5 \mu\text{g}$ のDTG F13を体循環ポンプによって投与するか、または処置なしとした。マウスの平均腫瘍体積を各処置群において示す。個々の腫瘍の増殖を時間に対してプロットしている。図21Bは、MIA PaCa-2細胞腫瘍マウスモデルを用いた、体重減少に対するDTG F13処置の効果を示す折れ線グラフである。MIA PaCa-2側腹部腫瘍を有するヌードマウスは、 $2.5 \mu\text{g}$ のDTG F13を体循環ポンプによって投与するか、または処置なしとした。マウスの平均体重を各処置群において示す。

【図22A】図22A～22Cは、ラット頭蓋内膠芽細胞腫モデルを用いた、ヒト腫瘍に対するDTG F13処置の効果を示す一連の生存プロットである。ラットには、頭蓋内注射によってU87ヒト膠芽細胞腫細胞を投与した。次いで、DTG F13（計 $1 \mu\text{g}$ ）またはPBSプラセボ（図22A）またはDT2222対照免疫毒素（図22B）を、マイクロインフュージョンポンプによって、U87腫瘍を有する胸腺欠損ヌードラットの群（ $N=5$ ）に投与した。図22Aは、DTG F13またはPBSプラセボで処置されたラットの推定生存率プロットである。図22Bは、DTG F13またはDT2222で処置されたラットの推定生存率プロットである。図22Cは、図22Aと22Bのデータを合わせた（ $n=10$ /群）データの推定生存率プロットである。統計学的検定として、ログランク検定とカイ二乗検定を使用した。

【図22B】図22A～22Cは、ラット頭蓋内膠芽細胞腫モデルを用いた、ヒト腫瘍に対するDTG F13処置の効果を示す一連の生存プロットである。ラットには、頭蓋内注射によってU87ヒト膠芽細胞腫細胞を投与した。次いで、DTG F13（計 $1 \mu\text{g}$ ）またはPBSプラセボ（図22A）またはDT2222対照免疫毒素（図22B）を、マイクロインフュージョンポンプによって、U87腫瘍を有する胸腺欠損ヌードラットの群（ $N=5$ ）に投与した。図22Aは、DTG F13またはPBSプラセボで処置され

10

20

30

40

50

たラットの推定生存率プロットである。図 2 2 B は、D T E G F 1 3 または D T 2 2 2 2 で処置されたラットの推定生存率プロットである。図 2 C は、図 2 2 A と 2 2 B のデータを合わせた (n = 10 / 群) データの推定生存率プロットである。統計学的検定として、ログランク検定とカイ二乗検定を使用した。

【図 2 2 C】図 2 2 A ~ 2 2 C は、ラット頭蓋内膠芽細胞腫モデルを用いた、ヒト腫瘍に対する D T E G F 1 3 処置の効果を示す一連の生存プロットである。ラットには、頭蓋内注射によって U 8 7 ヒト膠芽細胞腫細胞を投与した。次いで、D T E G F 1 3 (計 1 μ g) または P B S プラセボ (図 2 2 A) または D T 2 2 2 2 対照免疫毒素 (図 2 2 B) を、マイクロインフュージョンポンプによって、U 8 7 腫瘍を有する胸腺欠損ヌードラットの群 (N = 5) に投与した。図 2 2 A は、D T E G F 1 3 または P B S プラセボで処置されたラットの推定生存率プロットである。図 2 2 B は、D T E G F 1 3 または D T 2 2 2 2 で処置されたラットの推定生存率プロットである。図 2 C は、図 2 2 A と 2 2 B のデータを合わせた (n = 10 / 群) データの推定生存率プロットである。統計学的検定として、ログランク検定とカイ二乗検定を使用した。

【図 2 3】図 2 3 は、ラットに頭蓋内投与された D T E G F 1 3 タンパク質の最大耐用量を示すカプラン・マイヤープロットである。種々の濃度の D T E G F 1 3 (単位: マイクログラム) をラットに第 0 日と第 7 日に投与し、生存率 (Y 軸) を経時的 (日; X 軸) に記録した。

【図 2 4】図 2 4 A および 2 4 B は、処置ラットの肝臓 (血中尿素窒素 (B U N) レベルによる; 図 2 4 A) または腎臓 (血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T) レベルによる; 図 2 4 B) における D T E G F 1 3 処置の毒性に関する試験を示す 1 対の棒グラフである。ラットを 1 μ g の D T E G F 1 3 または対照としての P B S で処置し、A L T および B U N のレベルをラットから採取した血清から測定した。処置を X 軸に示し、各試験の測定単位 (任意単位 / L、図 2 4 A および m g / L、図 2 4 B) を Y 軸に示す。

【図 2 5 A】図 2 5 A ~ C は、E G F R と I L 1 3 R の両方を発現している M D A - M B - 2 3 1 ヒト乳癌細胞、および E G F R も I L 4 R も発現していない H P B - M L T ヒト細胞腫瘍細胞に対する E G F 4 K D E L のインビトロ細胞毒性を示す一連の折れ線グラフである。図 2 5 A : M D A - M B - 2 3 1 細胞を種々の濃度の E G F 4 K D E L または単一特異性免疫毒素 I L 4 K D E L もしくは E G F K D E L で処理し、細胞を死滅させる能力を、トリチウム標識チミジン取込みアッセイ (上記) を用いて測定した。使用した免疫毒素の濃度を X 軸に示し、非処置対照と比べたときのバイアビリティのパーセントを Y 軸に示す (対照応答に対する %)。図 2 5 B : M D A - M B - 2 3 1 細胞を種々の濃度の E G F 4 K D E L、単一特異性免疫毒素 I L 4 K D E L と E G F K D E L の組合せ、ならびに 3 種類の対照免疫毒素タンパク質 B i c 3、2 2 1 9 E A、および D T 2 2 1 9 A R L で処理した。免疫毒素による細胞死滅能力を、トリチウム標識チミジン取込みアッセイ (上記) を用いて測定した。使用した免疫毒素の濃度を X 軸に示し、非処置対照と比べたときの細胞内の放射能のパーセントを Y 軸に示す (対照応答に対する %)。図 2 5 C : H P B - M L T 細胞を種々の濃度の E G F 4 K D E L または陽性対照としての B i c 3 で処理した。免疫毒素による細胞死滅能力を、トリチウム標識チミジン取込みアッセイ (上記) を用いて測定した。使用した免疫毒素の濃度を X 軸に示し、非処置対照と比べたときのバイアビリティのパーセントを Y 軸に示す (対照応答に対する %)。

【図 2 5 B】図 2 5 A ~ C は、E G F R と I L 1 3 R の両方を発現している M D A - M B - 2 3 1 ヒト乳癌細胞、および E G F R も I L 4 R も発現していない H P B - M L T ヒト細胞腫瘍細胞に対する E G F 4 K D E L のインビトロ細胞毒性を示す一連の折れ線グラフである。図 2 5 A : M D A - M B - 2 3 1 細胞を種々の濃度の E G F 4 K D E L または単一特異性免疫毒素 I L 4 K D E L もしくは E G F K D E L で処理し、細胞を死滅させる能力を、トリチウム標識チミジン取込みアッセイ (上記) を用いて測定した。使用した免疫毒素の濃度を X 軸に示し、非処置対照と比べたときのバイアビリティのパーセントを Y 軸に示す (対照応答に対する %)。図 2 5 B : M D A - M B - 2 3 1 細胞を種々の濃度の E G F 4 K D E L、単一特異性免疫毒素 I L 4 K D E L と E G F K D E L の組合せ、なら

10

20

30

40

50

びに3種類の対照免疫毒素タンパク質B i c 3、2 2 1 9 E A、およびD T 2 2 1 9 A R Lで処理した。免疫毒素による細胞死滅能力を、トリチウム標識チミジン取込みアッセイ（上記）を用いて測定した。使用した免疫毒素の濃度をX軸に示し、非処置対照と比べたときの細胞内の放射能のパーセントをY軸に示す（対照応答に対する％）。図2 5 C：H P B－M L T細胞を種々の濃度のE G F 4 K D E Lまたは陽性対照としてのB i c 3で処理した。免疫毒素による細胞死滅能力を、トリチウム標識チミジン取込みアッセイ（上記）を用いて測定した。使用した免疫毒素の濃度をX軸に示し、非処置対照と比べたときのバイアビリティのパーセントをY軸に示す（対照応答に対する％）。

【図2 5 C】図2 5 A～Cは、E G F RとI L 1 3 Rの両方を発現しているM D A－M B－2 3 1 ヒト乳癌細胞、およびE G F RもI L 4 Rも発現していないH P B－M L TヒトT細胞腫瘍細胞に対するE G F 4 K D E Lのインビトロ細胞毒性を示す一連の折れ線グラフである。図2 5 A：M D A－M B－2 3 1細胞を種々の濃度のE G F 4 K D E Lまたは単一特異性免疫毒素I L 4 K D E LもしくはE G F K D E Lで処理し、細胞を死滅させる能力を、トリチウム標識チミジン取込みアッセイ（上記）を用いて測定した。使用した免疫毒素の濃度をX軸に示し、非処置対照と比べたときのバイアビリティのパーセントをY軸に示す（対照応答に対する％）。図2 5 B：M D A－M B－2 3 1細胞を種々の濃度のE G F 4 K D E L、単一特異性免疫毒素I L 4 K D E LとE G F K D E Lの組合せ、ならびに3種類の対照免疫毒素タンパク質B i c 3、2 2 1 9 E A、およびD T 2 2 1 9 A R Lで処理した。免疫毒素による細胞死滅能力を、トリチウム標識チミジン取込みアッセイ（上記）を用いて測定した。使用した免疫毒素の濃度をX軸に示し、非処置対照と比べたときの細胞内の放射能のパーセントをY軸に示す（対照応答に対する％）。図2 5 C：H P B－M L T細胞を種々の濃度のE G F 4 K D E Lまたは陽性対照としてのB i c 3で処理した。免疫毒素による細胞死滅能力を、トリチウム標識チミジン取込みアッセイ（上記）を用いて測定した。使用した免疫毒素の濃度をX軸に示し、非処置対照と比べたときのバイアビリティのパーセントをY軸に示す（対照応答に対する％）。

【図2 6】図2 6は、抗E G F抗体と抗I L 4抗体がE G F 4 K D E LによるM D A－M B－2 3 1細胞増殖の抑止をブロックする能力を示す棒グラフである（増殖アッセイにより測定）。E G F 4 K D E L（0. 1 nM）を細胞とともに7 2時間、抗E G F抗体、抗I L 1 3抗体または対照抗体（L y 5. 2）の存在下または非存在下で培養した。X軸は、各実験での試験を表す。Y軸は、対照（未処理）細胞と比べたときのバイアビリティ％を表す。

【図2 7】図2 7は、M D A－M B－2 3 1 ヒト乳癌細胞に対するD T E G F 4の細胞毒性を示す折れ線グラフである。M D A－M B－2 3 1細胞を種々の濃度のD T E G F 1 3、D T E G F 4、またはE G F 4 K D E Lで処理し、細胞を死滅させる能力を、トリチウム標識チミジン取込みアッセイ（上記）を用いて測定した。使用した免疫毒素の濃度をX軸に示し、非処置対照と比べたときの細胞内の放射能のパーセントをY軸に示す。

【図2 8】図2 8は、ヌードマウスまたはマウスの腫瘍含有器官の生物発光画像の一連の写真である。ホタルルシフェラーゼタンパク質を発現するM D A－M B－2 3 1－l u c細胞をマウスの脾臓に注射し、注射後第6 1日にマウスを致死させ、器官を取り出した。各パネルは、生物発光画像形成を伴う、または伴わない器官（名称によって特定）を示す。画像はすべて3 0秒間の曝露時間を表し、すべての関心領域（R O I）を単位：光子／秒／c m 2／s rで表示する。生物発光画像の下方に示された数値は、各器官について測定された光子／秒／c m 2／s rを表す。画像は、X e n o g e n I V I S（商標）画像形成システム（U n i v e r s i t y o f M i n n e s o t a）を用いて取得し、L i v i n g I m a g e 2. 5により解析した。

【図2 9 A】図2 9 Aおよび2 9 Bは、処置なし（図2 9 A、左パネル）、4マイクログラム（4 u g）のE G F 4 K D E L（「E G F 4 c p I L 4 k d e l」）で処置、または陰性対照としてのB i c 3で処置（図2 9 B）（週4日間で各々9週間）のいずれかであるM D A－M B－2 3 1－l u c細胞を有するマウスの蛍光画像の一連の写真である。マウスの画像形成は図2 8に示したようにして行なった。写真の十字部分は試験動物の死

10

20

30

40

50

亡を示す。細胞の注射後の日数を写真の各列の上部に示す（図29A）。EGF4KDELでの処置に応答しなかった腫瘍を有するマウスを、図29Aのパネルの右側に「M6」で示す。

【図29B】図29Aおよび29Bは、処置なし（図29A、左パネル）、4マイクログラム（4ug）のEGF4KDEL（「EGF4cpIL4kdel」）で処置、または陰性対照としてのBic3で処置（図29B）（週4日間で各々9週間）のいずれかであるMDA-MB-231-luc細胞を有するマウスの蛍光画像の一連の写真である。マウスの画像形成は図28に示したようにして行なった。写真の十字部分は試験動物の死亡を示す。細胞の注射後の日数を写真の各列の上部に示す（図29A）。EGF4KDELでの処置に応答しなかった腫瘍を有するマウスを、図29Aのパネルの右側に「M6」で示す。

10

【図29C】図29Cは、EGF4KDELで処置した4匹のマウスにおけるMDA-MB-231-luc腫瘍の増殖を示す折れ線グラフである。X軸は、腫瘍細胞注射後の日数を示し、Y軸は、腫瘍増殖の程度（各マウスの腫瘍から生じた生物発光（単位：光子／秒／cm²／sr）により測定）を示す。

【図29D】図29Dは、マウスにおけるEGF4KDEL処置（図29Aおよび29B）の毒性を示す折れ線グラフである。マウスの体重（単位：グラム）をY軸に示し、細胞の注射後の日数をX軸に示す。EGF4KDELでの処置（図29A）に応答しなかったマウスのデータを示し、グラフにおいて「11」で特定する。

【図30】図30は、SW1990ヒト膵臓癌細胞に対する二重特異性免疫毒素EGF13PEタンパク質および一連の変異型タンパク質の細胞毒性を示す折れ線グラフである。SW1990細胞を、種々の濃度（X軸（単位：nM））の野生型（親）EGF13PE、またはEGF13PE 5 Mut、EGF13PE 7 Mut（7a、逆白三角）、EGF13PE 7 Mut（7b、白菱形）、またはEGF13PE 8 Mutで処理した。すべての変異型を表1に示す。Y軸は、免疫毒素で処理しなかった細胞と比べたときの生存%を表す（対照応答に対する%）。

20

【図31】図31Aおよび31Bは、マウスでのヒト膵臓腫瘍に対するDTEGF13の有効性に対する非毒性の二重特異性免疫毒素での予備処置の効果を示す1対の折れ線グラフである。ルシフェラーゼタンパク質を発現するMiaPaCa-2-lucヒト膵臓癌細胞を、ヌードマウスの脾臓に注射し、マウスを処置なし（図31A）または7.5μgのDTEGF13で処置（図31B）のいずれかとした。DTEGF13で処置されたマウスには、DTEGF13処置のほぼ30分前に、200μgのEGF13（毒性ドメイン含まない）を投与した。X軸は、腫瘍細胞注射後の日数を示し、Y軸は、腫瘍増殖の程度（各マウスの腫瘍から生じた生物発光（単位：光子／秒／cm²／sr）により測定）を示す。

30

【図32】図32は、図31AとBに示した処置のマウスにおける毒性を示す折れ線グラフである。マウスの体重（単位：グラム）をY軸に示し、細胞の注射後の日数をX軸に示す。「PDD」は、上記のEGF13とDTEGF13の両方での処置を示す。

【発明を実施するための形態】

【0066】

40

詳細説明

本開示により、とりわけ、さまざまなインビトロ、インビボ、エキソビボ方法に有用な受容体標的化試薬（例えば、免疫毒性受容体標的化試薬）を取り上げて記載する。例えば、受容体標的化試薬は、受容体標的化試薬を細胞に結合させる方法に有用である。付随の実施例に詳述するように、免疫毒性形態の本明細書に記載の受容体標的化試薬により、培養癌細胞の増殖が抑止され得、完全体の動物モデルでは、非免疫毒性形態の該受容体標的化試薬により、免疫毒性療法と関連する毒性副作用が低減された。したがって、本明細書に記載の受容体標的化試薬は、さまざまな増殖性障害、例えば限定されないが、癌および炎症性障害などの処置に有用である。

【0067】

50

また、本明細書において、被験体（例えば、癌もしくは炎症性障害を有する被験体）に対する適切な処置モダリティの選択および／またはさまざまな増殖性障害の処置に有用な方法、組成物およびキットを提供する。

【0068】

受容体標的化試薬

本開示により、（a）上皮成長因子受容体（EGFR）結合剤を含む第1の標的化ドメインと、（b）IL-13受容体（IL13R）結合剤またはIL-4受容体（IL4R）結合剤を含む第2の標的化ドメインを含み、該（a）が（b）に結合されている受容体標的化試薬を取り上げて記載する。

【0069】

EGFR結合剤は、EGFR（例えば、EGFR/HER1/ErbbB1、HER2/ErbbB2/neu、HER3、またはHER4）に選択的に結合する任意の薬剤であり得る。例えば、EGFR結合剤は、EGFRに特異的な抗体の全部またはそのEGFR結合断片を含むものであり得る。EGFR結合剤は、EGFRの天然リガンドの全部もしくは一部（EGFR結合断片）からなるもの、または該全部もしくは一部を含むものである。例えば、EGFR結合剤は、HER1の天然リガンド、例えば限定されないが、上皮成長因子ポリペプチド、ベータセルリンポリペプチド、トランスフォーミング増殖因子αポリペプチド、アンフィレギュリンポリペプチド、エピレギュリンポリペプチド、ヘパリン結合EGFポリペプチド、もしくは前記のもののいずれかのEGFR結合断片などからなるもの、または前記のものもしくは該断片を含むものであり得る。完全長成熟（シグナルペプチドを欠く）ヒトEGFポリペプチドの例示的なアミノ酸配列は、以下のとおりである：

NSDSECP LSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG Y IGER
RCQYRD LKWWELR（配列番号6）。

【0070】

本明細書に記載の方法に適したEGFRのさらなる天然リガンドとしては、限定されないが：ニューレグリン（ヘレグリン、neu分化因子、またはグリア細胞増殖因子としても知られている；例えば、ヘレグリンα、ヘレグリンβ）およびニューレグリン-2sが挙げられる。

【0071】

一部の実施形態において、EGFR結合剤は、EGFRに結合する小分子、例えば、EGFRのEGF結合部位に結合する小分子であり得る。

【0072】

受容体標的化試薬は、EGFR結合剤を含む第1の標的化ドメインと、IL13R結合剤を含む第2の標的化ドメインを含むものであり得る。IL13R結合剤は、IL13R（例えば、ヒトIL13Rなどの哺乳動物IL13R）に選択的に結合する任意の薬剤であり得る。例えば、IL13R結合剤は、IL13Rもしくはその抗原結合断片に結合する抗体からなるもの、または該抗体もしくは該断片を含むものであり得る。IL13R結合剤は、例えば、IL13Rの天然リガンドの全部または一部（IL13R結合断片）であり得る。また、例えば、IL13R結合剤は、IL-13ポリペプチドもしくはそのIL13結合断片からなるもの、または該ペプチドもしくは該断片を含むものであり得る。完全長成熟（シグナルペプチドを欠く）ヒトIL-13ポリペプチドの例示的なアミノ酸配列は、以下のとおりである：

【0073】

【化1】

GPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIE

KTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKKLFREGRFN（配列

番号7）。

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、I L 1 3 R 結合剤は、I L 1 3 R に結合する小分子、例えば、I L 1 3 R の I L - 1 3 結合部位に結合する小分子であり得る。

【0074】

受容体標的化試薬は、E G F R 結合剤を含む第1の標的化ドメインと、I L 4 R 結合剤を含む第2の標的化ドメインを含むものであり得る。I L 4 R 結合剤は、I L 4 R （例えば、ヒト I L 4 R などの哺乳動物 I L 4 R）に選択的に結合する任意の薬剤であり得る。例えば、I L 4 R 結合剤は、I L 4 R に結合する抗体もしくはその抗原結合断片からなるもの、または該抗体もしくは該断片を含むものであり得る。I L 4 R 結合剤は、例えば、I L 4 R の天然リガンドの全部または一部（I L 4 R 結合断片）であり得る。また、例えば、I L 4 R 結合剤は、I L - 4 ポリペプチドもしくはその I L 4 結合断片からなるもの、または該ポリペプチドもしくは該断片を含むものであり得る。完全長ヒト I L - 4 ポリペプチドの例示的なアミノ酸配列は以下のとおりである：

【0075】

【化2】

MGLTSQLLPPLFFLLACAGNFVHGHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASK
NTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAG
LNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS (配列番号17).

一部の実施形態において、I L 4 R 結合剤は、I L 4 R に結合する小分子、例えば、I L 4 R の I L 4 結合部位に結合する小分子であり得る。

【0076】

上記の E G F R -、I L 1 3 R -、または I L 4 R - 特異的抗体（またはその抗原結合断片）は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、または E G F R 特異的抗体の F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、F a b ' 断片、F v 断片、もしくは s c F v 断片であり得る。かかる抗体の作製方法は後述する（「抗体の作製方法」参照）。

【0077】

一部の実施形態において、受容体標的化試薬は免疫毒性であり得る。すなわち、本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬は、さらに、1つ以上（例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、15以上、または20以上）の毒性ドメインを含むものであり得る。

【0078】

毒性ドメインは、例えば、小分子からなるもの、または小分子を含むものであり得る。毒性ドメインに適した小分子としては、例えば化学療法剤、例えば限定されないが、シスプラチン、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、アドリアマイシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン (b i s u l f a n)、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン、マイトマイシン、エトポシド、ベランピル (v e r a m p i l)、ポドフィロトキシン、タモキシフェン、タキソール、トランスプラチン (t r a n s p l a t i n u m)、5-フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキサートなど、または上記のもののいずれかの類縁化合物が挙げられる。受容体標的化試薬が1つより多くの小分子を含む場合、その種々の小分子は、同じであるか、異なっているか、または上記の両方の混合型であり得る。

【0079】

毒性ドメインは、少なくとも1つ（例えば、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、または少なくとも20）の放射性核種からなるもの、または該放射性核種を含むものであり得る。少なくとも1つの放射性核種は、例えば、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、²¹²Pb、²¹²Bi、²¹³Bi、

10

20

30

40

50

^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{211}At 、 ^{32}P 、 ^{177}Lu 、 ^{47}Sc 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{153}Sm 、または ^{199}Au であり得る。

【0080】

一部の実施形態において、放射性核種原子は、大きな分子の一部分（例えば、メター [^{125}I] ヨードフェニル-N-ヒドロキシスクシンイミド ([^{125}I] mIPNHs)（これは、遊離アミノ基によって結合して該当タンパク質のメターヨードフェニル (mIP) 誘導体を形成する) の ^{125}I （例えば、Rogersら (1997) J. Nucl. Med. 38:1221-1229を参照のこと）、またはキレート的一部分（例えば、放射性金属原子、例えば、ヒドロキサム酸、DOTA、もしくはDTPAなどにキレート結合された $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{188}Re 、 ^{186}Re 、 ^{90}Y 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{177}Lu 、 ^{47}Sc 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{153}Sm 、 ^{199}Au など）であり得 (can be can be)、該大きな分子またはキレート自体が受容体標的化試薬の一部分である。受容体標的化試薬が1つより多くの放射性核種原子を含む場合、その種々の放射性核種原子は、すべて同じ放射性核種（例えば、1つより多くの ^{90}Y ）、すべて異なる放射性核種、または上記の両方の混合型のいずれかであり得る。放射性核種は、 α -、 β -、もしくは γ -放射線またはこれらの型の照射の2種類以上の組合せを放出するものであり得る。

【0081】

付随の実施例に記載のように、毒性ドメインは、毒性ポリペプチドを含むもの、または毒性ポリペプチドからなるものであり得る。例えば、毒性ポリペプチドは、ジフテリア毒素またはその生物学的に活性な断片（毒性断片）もしくはバリエーション（毒性バリエーション）であり得る。

【0082】

完全長ジフテリア毒素（これは、アミノ末端リーダー配列：MLVRGYVVSRKLFASILIGALLGIGAPPSAHA（配列番号8）を含む）の例示的なアミノ酸配列は、以下のとおりである：

【0083】

【化3】

MLVRGYVVSRKLFASILIGALLGIGAPPSAHAGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGY
VDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVT
YPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGS
SSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCI
NLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSE
LKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGA
VHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYS
PGHKTQPFLLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLD
VNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSEKIHS
NEISSDSIGVLGYQKTVDHVKVNSKLSLFFEIKS (配列番号9).

ジフテリア毒素の生物学的活性バリエーション（これは、配列番号9のアミノ酸33～421（すなわち、配列番号9のN末端リーダー配列がない）と、1位に外因性メチオニンを含む）の例示的なアミノ酸配列は、以下のとおりである：

【0084】

【化 4】

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDDDWKGFYST
 DNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPL
 MEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRG
 QDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSE
 SPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVID
 SETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELV
 DIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF (配列番号10).

10

このアミノ酸配列は、本明細書において D T 3 9 0 と称する。

【 0 0 8 5 】

一部の実施形態において、毒性ポリペプチドは、シュードモナス体外毒素 A もしくはその生物学的に活性な断片からなるもの、または該体外毒素 A もしくは該断片を含むものであり得る。

【 0 0 8 6 】

完全長シュードモナス体外毒素 A の例示的なアミノ酸配列は、以下のとおりである：

【 0 0 8 7 】

【化 5】

20

MHLIPHWIPLVASLGLLAGGSSASAAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDP
 ADTNGQGVLLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITS DGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQA
 RGSWSLNLWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFV
 RAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQTQPRREKRWSEWASGKVLCLLDPLDGVYNYLA
 QQRCLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGLAALTAHQACHLPL
 ETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGE
 AIREQPEQARLALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGANADVSLTCPVAAGECAGPADS
 GDALLERNYPTGAFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERGYVFGYHGT
 LEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRV
 YVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAE
 RTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (配列

30

番号11).

シュードモナス体外毒素 A の生物学的活性バリエント（これは、（配列番号 1 1）のアミノ酸 2 7 6 ～ 6 3 3 を含む）の例示的なアミノ酸配列は、以下のとおりである：

【 0 0 8 8 】

【化 6】

40

PEGGLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQV
 DQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGANAD
 VVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQ
 AHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYA
 QDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAI
 TGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQ
 GKPPKDEL (配列番号12).

50

シュードモナス体外毒素の生物学的活性バリエーションの他の例示的なアミノ酸配列としては、(i) 490位のアルギニンがアラニンであり、513位のアルギニンがアラニンであり、432位のアルギニンがグリシンであり、467位のアルギニンがアラニンであり、590位のリジンがセリンである；(ii) 490位のアルギニンがアラニンであり、513位のアルギニンがアラニンであり、467位のアルギニンがグリシンであり、548位のグルタミン酸がセリンであり、590位のリジンがセリンであり、332位のグルタミンがセリンであり、313位のアルギニンがアラニンである；(iii) 490位のアルギニンがアラニンであり、513位のアルギニンがアラニンであり、467位のアルギニンがグリシンであり、548位のグルタミン酸がセリンであり、590位のリジンがセリンであり、432位のグルタミンがグリシンであり、313位のアルギニンがアラニンである；および(iv) 490位のアルギニンがアラニンであり、513位のアルギニンがアラニンであり、467位のアルギニンがグリシンであり、548位のグルタミン酸がセリンであり、590位のリジンがセリンであり、432位のグルタミンがグリシンであり、332位のグルタミンがセリンであり、313位のアルギニンがアラニンである配列番号11のアミノ酸配列が挙げられる。

10

【0089】

毒性ポリペプチドは、シュードモナス体外毒素(PE)、プリオジン、ゲロニン、 α -サルシン、アスペルギリン、レストリクトシン、アンジオゲニン、サポリン、アブリン、原核生物のリボヌクレアーゼ、真核生物のリボヌクレアーゼ、リシン、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質(PAP)、アポトーシス促進性ポリペプチド、リボソーム阻害性タンパク質、もしくは前記のもののいずれかの生物学的に活性な断片からなるもの、または前記のものもしくは該断片を含むものであり得る。好適なアポトーシス促進性ポリペプチドとしては、限定されないが、Bax、Bad、Bak、Bim、Bik、Bok、Hrk、FasL、TRAIL、またはTNF- α が挙げられる。

20

【0090】

一部の実施形態において、毒性ドメインは、例えば、1つ以上(例えば、1、2、3、4、5、6、7または8つ、またはそれ以上)の毒素(例えば、毒性の小分子、放射性核種、または毒性ポリペプチドもしくはその生物学的に活性な断片)(例えば、本明細書に記載の任意のもの)を含むものであり得る。また、1つより多く(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9つ、または10またはそれ以上)の毒素または1つ以上(例えば、1、2、3、4、5、6、7または8つまたはそれ以上)の毒素の生物学的に活性な断片が毒性ドメイン内に含まれ得る。毒性ドメインは、多コピーまたは多数の反復配列の1つ以上の毒素(例えば、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、または10コピー以上の毒素)を含むものであり得る。反復配列が含まれる場合、該配列は、互いに直接隣接していてもよく、1つ以上の標的化断片によって分離されていてもよく、リンカーペプチド(下記参照)によって分離されていてもよく、別の異なる毒素によって分離されていてもよい。

30

【0091】

本明細書に記載の受容体標的化試薬の成分(ドメイン、例えば、第1と第2の標的化ドメインおよび毒性ドメイン)は、互いに共有結合または非共有結合によって結合され得る。例えば、受容体標的化試薬の成分は、結合ペアの第1と第2の構成要素によって一緒に結合され得る。すなわち、第1の標的化ドメインは、結合ペアの第1の構成要素に結合され得、第2の標的化ドメインは、該結合ペアの第2の構成要素に結合され得る。結合ペアは、例えば、アビジン(またはストレプトアビジン)とビオチン(またはビオシチン)であり得る。

40

【0092】

本明細書に記載の受容体標的化試薬の成分は、任意の数多くの配置またはコンホメーションで分子複合体内に一緒に結合され得る。例えば、第1の標的化ドメイン(a)、第2の標的化ドメイン(b)、および毒性ドメイン(c)は、

(a)が、(c)に結合された(b)に結合される；

50

(c) が、(b) に結合された (a) に結合される；
(a) が、(b) に結合された (c) に結合される；
(c) が、(a) に結合された (b) に結合される；
(b) が、(c) に結合された (a) に結合される；
(b) が、(a) に結合された (c) に結合される；または
(a) が (b) に結合され、(b) が (c) に結合され、(c) が (a) に結合される
ように一緒に結合され得る。

【0093】

該ドメインは、本明細書に記載の任意の相互作用によって一緒に結合され得る。受容体標的化試薬のいずれのドメインも、共有結合と非共有結合の混合型によって一緒に結合され得ることは理解されよう。例えば、第1と第2の標的化ドメインは、結合ペアの第1と (a n) 第2の構成要素によって一緒に結合され得、毒性ドメインは、第1または第2の標的化ドメイン（または両方）に共有結合によって結合され得る。

【0094】

受容体標的化試薬のドメインの2つ以上（または全部）が、共有結合により融合タンパク質として一緒に結合されていてもよい。例えば、第1と第2の標的化ドメイン、第1もしくは第2の標的化ドメインと毒性ドメイン、または第1と第2の標的化ドメインと毒性ドメインが、共有結合により単一の融合タンパク質として一緒に結合され得る。

【0095】

本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬は、受容体標的化試薬のドメイン（例えば、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン、または毒性ドメイン）の1つ以上（または全部）を一緒に連結する1つ以上（例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、または7つ以上）のリンカー部分を含むものであり得る。かかるリンカー部分は、例えば、受容体標的化試薬の2つ以上のドメイン間の立体障害の最小化（例えば、第1と第2の標的化ドメイン間の立体障害の最小化）に有用、または毒性ドメイン（存在する場合）によって1つ以上の標的化ドメインが標的細胞に結合する能力が妨害されるのを抑制するのに有用であり得る。リンカー部分としては、例えば、結合ペアの第1と第2の構成要素またはペプチドリナーが挙げられ得る。リンカーペプチドは、1アミノ酸長であってもよいが、より長いものであり得る。例えば、リンカーペプチドは、少なくとも2（例えば、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、または少なくとも55またはそれ以上）のアミノ酸長であり得る。リンカーペプチドは、任意のアミノ酸を含むものであり得る。

【0096】

一部の実施形態において、ペプチドリナーは、ヒト筋肉アルドラーゼ (hma) タンパク質の一部（例えば、PSGQAAGAAASESLFVSNHAY（配列番号13））からなるもの、または該一部を含むものであり得る。一部の実施形態において、1つ以上のペプチドリナーは、EASGGPE（配列番号14）を含むもの、あるいは該配列からなるものであり得る。一部の実施形態において、1つ以上のペプチドリナーは、(i) アミノ酸配列GSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号4）を有する凝集低減リンカー (ARL) および／または (ii) モノもしくはポリ-GGGGS配列（例えば、GGGGSGGGGS（配列番号5））を含むもの、あるいは前記 (i) および／または (ii) からなるものであり得る。受容体標的化試薬が融合タンパク質である実施形態において、該1つ以上のリンカー部分は、該融合タンパク質のドメインの2つ以上を連結するものであり得る。例示的なリンカー部分およびその受容体標的化試薬の2つ以上のドメインの連結における役割は、付随の実施例に記載している。

【0097】

例示的な受容体標的化試薬は、付随の実施例に記載しており、以下のものが挙げられる：例えば、ジフテリア毒素の生物学的活性バリエーション（配列番号10）、リンカー（配列番号14）、上皮成長因子（配列番号6）、リンカー（配列番号13）、およびIL13（配列番号7）を含み、以下のアミノ酸配列：

【0098】

【化7】

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQPKSGTQGNYYDDDWKGFYST
DNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPL
MEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSV EYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRG
QDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSE
SPNKTVSEEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVID
SETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELV
DIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFEASGGPENSSDSECPLSHDGYCL
HDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELRPSGQAGAAASESLFVSNHA
YGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAI
EKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKCLFREGRFN (配列
番号1);

10

20

を有するDTEGF13受容体標的化試薬；

上皮成長因子（配列番号6）、リンカー（配列番号13）、およびIL13（配列番号7）を含み、以下のアミノ酸配列：

【0099】

【化8】

NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELRPSGQ
AGAAASESLFVSNHAYGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMY
CAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLK
CLFREGRFN (配列番号2);

30

を有するEGF13受容体標的化試薬；

上皮成長因子（配列番号6）、リンカー（配列番号13）、IL13（配列番号7）、リンカー（配列番号14）、シュードモナス毒素Aの生物学的に活性な断片（配列番号12）、およびKDEL（配列番号15）を含み、以下のアミノ酸配列：

【0100】

【化 9】

MENS DSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELRPS
GQAGAAASESLFVSNHAYGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAG
MYCAALES LINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLL
HLKKLFREGRFNEASGGPEPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYP
VQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAESE
RFVRQGTGNDEAGAANADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGG
DVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRLQLEERGYVVFVGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDL
AIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPE
AAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDL
PSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPKDEL. (配列番号 3);

10

を有する E G F 1 3 K D E L 受容体標的化試薬；

ジフテリア毒素の生物学的に活性な断片（配列番号 10）、リンカー（配列番号 14）、
上皮成長因子（配列番号 6）、リンカー（配列番号 13）、および I L 4（配列番号 1
7）を含み、以下のアミノ酸配列：

【0 1 0 1】

20

【化 10】

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGN YDDDWKGFYST
DNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPL
MEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSV EYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRG
QDAMYEYMAQACAGNRVRRSVGSSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSE
SPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVID
SETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELV
DIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF EASGGPENSDSECPLSHDGYCL
HDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELRPSGQAGAAASESLFVSNHA
YMGLTSQLLPPLFFLLACAGNFVHGHKCDITLQEIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAAS
KNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLA
GLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS (配列番号 18);

30

を有する D T E G F 4 受容体標的化試薬；

上皮成長因子の生物学的に活性な断片（配列番号 6）、リンカー（配列番号 13）、I
L 4（配列番号 17）、リンカー（配列番号 14）、シュードモナス毒素 A の生物学的に
活性な断片（配列番号 12）、および K D E L（配列番号 15）を含み、以下のアミノ酸
配列：

40

【0 1 0 2】

【化 1 1】

MNSDSECLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELRPSG
QAGAAASESLFVSNHAYMGLTSQLLPPLFFLLACAGNFVHGHKCDITLQEIIKTLNSLTE
QKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQ
LIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSSEASGGPEPE
GGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVD
QVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGANADV
VSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQA
HRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQ
DQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAIT
GPEEEGGRLETILGWPLAERTTVVIPS IPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQP
GKPPKDEL (配列番号19);

10

を有する E G F 4 K D E L 受容体標的化試薬；ならびに

上皮成長因子（配列番号6）、リンカー（配列番号13）、および I L 4（配列番号17）を含み、以下のアミノ酸配列：

【0103】

20

【化 1 2】

NSDSECLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELRPSGQ
AGAAASESLFVSNHAYMGLTSQLLPPLFFLLACAGNFVHGHKCDITLQEIIKTLNSLTEQ
KTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQL
IRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS (配列
番号20).

を有する E G F 4 受容体標的化試薬。

【0104】

30

上記の各例示的な受容体標的化試薬のリンカー領域に下線を付している。

【0105】

また、本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬は、1つ以上（例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、または10以上）の検出可能な標識を含むものであり得る。例えば、受容体標的化試薬は、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、もしくはアセチルコリンエステラーゼ）、蛍光物質（例えば、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、アロフィコシアニン（APC）、もしくはフィコエリトリン）、発光物質（例えば、ユーロビウム、テルビウム）、生物発光物質（例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、もしくはイクオリン）、または放射性核種（例えば、本明細書に記載の任意の放射性核種）を含むものであり得る。

40

【0106】

本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬は、1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10以上）のさらなる「標的化」ドメインおよび／または1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10以上）のさらなる毒性ドメインを含むものであり得ることは理解されよう。受容体標的化試薬は、1つ以上の第1の標的化ドメイン、1つ以上の第2の標的化ドメインおよび／または1つ以上の毒性ドメインを含むものであり得る。例えば、本明細書に記載の受容体標的化試薬は、2つ以上の E G F R 結合ドメインおよび／または2つ以上の I L 1 3 R—もしくは I L 4 R 結合ド

50

メインを含むものであり得る。

【0107】

受容体標的化試薬の種々のドメイン（例えば、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン、または毒性ドメイン）は、互いに対して任意の向きに配列され得る。例えば、毒性ドメインは、1つ以上（または全部）標的化ドメインに対してN末端側またはC末端側であり得る。別の例において、毒性ドメインは2つの標的化ドメイン間に存在し得る。同様に、標的化ドメインは、互いに隣接していてもよく、例えば毒性ドメインおよび／またはリンカー部分（上記参照）によって分離されていてもよい。

【0108】

一部の実施形態において、本明細書に記載の任意のポリペプチド（例えば、毒性ポリペプチド）は、被験体において該ポリペプチドの免疫原性が低減または抑制されるような様式で修飾され得る。本明細書で用いる場合、「低減された免疫原性」を有するように修飾されたポリペプチドは、所与の被験体、被験体コホートにおいて、対応する非修飾ポリペプチドよりも低い免疫応答を惹起するものである。本実施例において例示するように、ポリペプチドをコードする核酸は、標準的な分子生物学的手法（Sambrookら、上掲）によって、コードされたポリペプチドが被験体において該ポリペプチドの免疫原性が低減されるのに有効な1つ以上の置換を含むように修飾され得る。例えば、配列番号11を有するシュードモナス（*Pseudomonas*）体外毒素（PE）Aポリペプチドは、限定されないが：（i）490位のアルギニンがアラニンであり、513位のアルギニンがアラニンであり、432位のアルギニンがグリシンであり、467位のアルギニンがアラニンであり、590位のリジンがセリンである；（ii）490位のアルギニンがアラニンであり、513位のアルギニンがアラニンであり、467位のアルギニンがグリシンであり、548位のグルタミン酸がセリンであり、590位のリジンがセリンであり、332位のグルタミンがセリンであり、313位のアルギニンがアラニンである；（iii）490位のアルギニンがアラニンであり、513位のアルギニンがアラニンであり、467位のアルギニンがグリシンであり、548位のグルタミン酸がセリンであり、590位のリジンがセリンであり、432位のグルタミンがグリシンであり、313位のアルギニンがアラニンである；または（iv）490位のアルギニンがアラニンであり、513位のアルギニンがアラニンであり、467位のアルギニンがグリシンであり、548位のグルタミン酸がセリンであり、590位のリジンがセリンであり、432位のグルタミンがグリシンであり、332位のグルタミンがセリンであり、313位のアルギニンがアラニンであるなどの1つ以上の置換（例えば、同類または非同類置換）を含み得る。

【0109】

修飾ポリペプチドは、少なくとも2つ（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、32、35、または40またはそれ以上）のアミノ酸置換を含むものであり得る。修飾ポリペプチドは、20未満（例えば、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1つ）のアミノ酸置換を含むものであり得る。修飾ポリペプチドは、少なくとも2つであるが20未満のアミノ酸置換を含むものであり得ることは理解されよう。

【0110】

ポリペプチドの免疫原性を調べるための好適なインビトロおよびインビボ方法は当該技術分野で知られており、本実施例に記載している。インビトロ方法としては、例えば、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、修飾型または非修飾型）を有する哺乳動物被験体から採取したリンパ系細胞（例えば、TおよびBリンパ球）の培養が挙げられる。リンパ系細胞は、該ポリペプチド、該ポリペプチドが由来するタンパク質または該ポリペプチドが微生物に由来する場合は該ポリペプチドを天然に産生する該微生物に事前に曝露させた被験体由来のものであり得る。あるいはまた、リンパ系細胞のドナーは、これらの存在体のいずれかに曝露されたものである必要はない。該細胞の培養物を、該ポリペプチドのいずれかで必要なだけ多く「再刺激」してもよい。また、該細胞の培養物を種々の時点でモ

ニターし、いつ免疫反応性（例えば、抗体生成またはC D 4 + ヘルパーT細胞活性）が生じたかを確認してもよい。かかる実験では、第1の組の細胞が修飾ポリペプチドと接触され得、同一の第2の組の細胞が対応する非修飾ポリペプチドと接触され得る。非修飾ポリペプチドによってもたらされる免疫応答と比べたときの修飾ポリペプチドによってもたらされる免疫応答の低減は、修飾ポリペプチドが低減された免疫原性を有するという表示である。

【0111】

インビボ方法では、該ポリペプチド自体が被験体に投与され得る。該ポリペプチドは被験体に、経口、経皮、直腸内、膈内、鼻腔内、胃内、気管内、もしくは肺内投与され得るか、または静脈内、皮下、筋肉内、もしくは腹腔内注射（もしくは注入）され得る。該ポリペプチドは、適切なリンパ系組織（例えば、脾臓、リンパ節、または粘膜関連リンパ系組織（MALT））に直接送達され得る。ヒト被験体が使用される試験では、該ポリペプチドは皮下投与され得、「ホイール状の発赤（wheel and flare）」の発生または重症度は、該被験体に対する該ポリペプチドの免疫原性の表示であり得る。一部の実施形態において、修飾ポリペプチドおよび非修飾ポリペプチドは同じ被験体に、例えば皮膚試験を用いて投与され得る。かかるアッセイでは、試験抗原に特異的な抗体と予備活性化C D 4 + T細胞の両方が試験される。12時間以内の陽性応答は抗体応答を示し、一方、48～96時間の間で最適な応答は、該当する抗原に事前に曝露されたC D 4 + T細胞の存在を示す。例えば、ヒト被験体には修飾型組成物と非修飾型組成物が、身体

10

20

の同じ領域内の異なる位置に、例えば、被験体の背中または腹部の異なる位置に皮下投与され得る。動物実験などの一部の実施形態では、1匹の動物または動物（例えば、マウス）の群に修飾ポリペプチドが投与され得、同一の動物または動物の群に対応する非修飾ポリペプチドが投与され得る。インビトロ実験の場合と同様、非修飾ポリペプチドによってもたらされる免疫応答と比べたときの修飾ポリペプチドによってもたらされる免疫応答の低減は、修飾ポリペプチドが低減された免疫原性を有するという表示である。

【0112】

免疫応答レベルの測定方法は当該技術分野で知られており、本詳細説明に示し、本実施例に例示している。例えば、抗体生成の測定方法は、標題「抗体の作製方法」のセクションに記載している。

【0113】

核酸および受容体標的化試薬の作製方法

また、本明細書に記載のポリペプチド受容体標的化試薬（例えば、完全長ポリペプチド受容体標的化試薬またはそのポリペプチドドメイン）をコードする核酸、および該核酸を含むベクターを取り上げて記載する。該核酸およびベクターは、例えば、ポリペプチド受容体標的化試薬を宿主細胞（例えば、細菌、酵母、または哺乳動物の細胞）内で発現させるため使用され得る。また、該核酸およびベクターは、例えば、後述する処置のエクソビポ方法において使用され得る。

【0114】

単一の核酸は、受容体標的化試薬全体、例えば、受容体標的化試薬融合タンパク質をコードするものであり得る。受容体標的化試薬は、場合によっては、2つ以上（例えば、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、または10以上）の異なる核酸にコードされたものであり得る。例えば、受容体標的化試薬の各ドメインが別々の核酸にコードされていてもよい。

40

【0115】

一部の実施形態において、該核酸は、該核酸にコードされたポリペプチド受容体標的化試薬の発現を指令するプロモーターおよび／またはエンハンサーエレメントに作動可能に連結されたものであり得る。所与のポリペプチド受容体標的化試薬のコード配列は、核酸配列（例えば、ゲノムDNA配列もしくはcDNA配列）を含む単一の発現ベクター内に含めてもよく、2つ以上のベクターに含めてもよい。例えば、3つの異なるドメイン（例えば、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン、および毒性ドメイン）を含むポリ

50

ペプチド受容体標的化試薬は、3つの異なるベクターに存在する異なる核酸にコードされていてもよく、この場合、各ベクターは、例えば1つのドメインのコード配列を含む。後者の場合、それぞれのベクター内にコードされたドメインは、これらが翻訳後に細胞内で会合し、該細胞内で共有（例えば、ジスルフィド）結合または非共有結合性（例えば、疎水性もしくはイオン性）相互作用のいずれかによって構成されるように設計され得る。あるいはまた、個々の各ドメインをまず単離し、次いで、別の工程と一緒に結合（例えば、化学的または酵素的に一緒に結合）してもよい。

【0116】

エンハンサーは、時間、位置およびレベルに関して発現特異性をもたらす。プロモーターとは異なり、エンハンサーは、プロモーターが存在しているという条件で、転写開始部位から種々の距離で存在させた場合に機能を果たし得る。また、エンハンサーを転写開始部位の下流に存在させてもよい。コード配列をプロモーターの制御下にある状態にするには、ペプチドまたはポリペプチドの翻訳リーディングフレームの翻訳開始部位を、プロモーターの1～約50ヌクレオチド下流（3'）に配置することが必要である。対象のプロモーターとしては、限定されないが、サイトメガロウイルスhCMV前初期遺伝子、SV40アデノウイルスの初期もしくは後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージAの主要オペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3ホスホグリセレートキナーゼのプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター、ならびに酵母α接合因子のプロモーター、アデノウイルスE1bミニマルプロモーター、またはチミジンキナーゼミニマルプロモーターが挙げられる。

【0117】

単一の融合タンパク質がコードされている場合、標的化ドメインをコードする核酸配列は、毒性ドメインをコードする核酸の5'側に存在していてもよく、その逆でもよい。2つのコード配列は互いにインフレームであり、互いに直接隣接していてもよく、リンカーペプチドをコードするリンカー領域によって分離されていてもよく、リンカーペプチドは、例えば、標的細胞の表面への第1または第2の標的化ドメインの結合毒性ドメインによる立体障害を抑制する機能を果たし得る。

【0118】

一部の実施形態において、該核酸または該核酸を含むベクターは、シグナルペプチドをコードするリーダー配列を含むものであり得る。リーダー配列は、例えば、受容体標的化試薬または受容体標的化試薬全体の融合タンパク質の1つ以上のドメインをコードする配列の5'末端に存在させ得る。シグナルペプチドは、成熟ポリペプチド（例えば、成熟形態の第1もしくは第2の標的化ドメインまたは受容体標的化試薬をコードする融合タンパク質）のN末端のすぐ後であり得るが、リーダー配列が該融合タンパク質をコードする核酸配列とインフレームであることを条件として、該末端から1アミノ酸以上（例えば、2、3、4、6、8、10、15または20個分）離れていてもよい。シグナルペプチドは、一般的には分泌前に融合タンパク質から切断され、翻訳中に融合タンパク質を標的化細胞の小胞体（ER）の内腔内に指向し、次いで、融合タンパク質が分泌小胞によって標的化細胞の環境内に分泌される。このように、標的化細胞は、標的化細胞の細胞質ゾル内の毒素とタンパク質合成機構との相互作用がERおよび分泌小胞の膜二重層によって抑制されるため、バイアブルなまま維持される。有用なリーダーペプチドは、該当する標的化ドメイン（IL-4、EGF、もしくはIL13もしくはIL16ポリペプチド）の天然リーダーペプチドまたは該天然リーダーの機能性断片であり得る。あるいはまた、該リーダーは、別のポリペプチドに由来するものであり得る。例えば、シグナルペプチドは、アミノ酸配列MAISGVPLGFFIIAVLMSAQESWA（配列番号16）を有するものであり得る。また、ペプチド配列KDEL（配列番号15）は、ERの保持シグナルとして作用することが示されている。一部の実施形態において、シグナルポリペプチドは、ポリペプチドをコードする核酸の3'末端（すなわち、核酸にコードされたタンパク質のカルボキシ末端）に存在させ得る。例えば、KDEL（配列番号15）配列は、受容体標的化試薬（付随の実施例に記載のEGF13KDEL試薬など）をコードする核酸

の3'末端に存在させ得る。他のシグナル配列は、米国特許第5,827,516号(その開示は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)に詳細に記載されている。

【0119】

一部の実施形態において、ポリペプチド受容体標的化試薬(例えば、融合タンパク質受容体標的化試薬)または任意のポリペプチド標的化ドメイン、ポリペプチド毒性ドメイン(もしくはその毒性ポリペプチド)をコードする核酸の5'末端に、非天然ATG「開始配列」が含まれていてもよい。これは、例えば、完全長ポリペプチドの生物学的に活性な断片またはバリエーションをコードする核酸に付加され得るATG配列であり、該タンパク質が適正に転写および翻訳されるのが確実になる。リーダー配列は一般的にATG開始配列を含むが、含んでいない実施形態では、ATG配列が、リーダー配列をコードする核酸の5'末端に付加され得る。当然、これにより、ポリペプチド受容体標的化試薬の対応する配列において非天然メチオニン残基アミノ酸がもたらされる。

10

【0120】

核酸および発現ベクターの構築のための好適な方法は当業者に充分わかり、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第2版 第1巻、2巻および3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989年11月(その開示は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されている。

【0121】

組換え核酸は細胞内にさまざまな方法を用いて導入され得るが、該方法は、少なくとも一部において、核酸が導入される細胞の型に依存し得る。例えば、細菌細胞は、エレクトロポレーションまたはヒートショックなどの方法を用いて形質転換させ得る。酵母細胞をトランスフェクトするための方法としては、例えば、スフェロプラスト手法または塩化リチウムによる全細胞酵母形質転換方法(例えば、米国特許第4,929,555号;Hinnenら(1978)Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75:1929;Itoら(1983)J. Bacteriol. 153:163;米国特許第4,879,231号;およびSreekrishnaら(1987)Gene 59:115(各々の開示は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照のこと)が挙げられる。動物細胞のトランスフェクションは、例えば、リン酸カルシウム、エレクトロポレーション、ヒートショック、リボソーム、またはトランスフェクション試薬(FUGENE(登録商標)もしくはLIPOFECTAMINE(登録商標)など)を用いること、または裸の核酸ベクターを細胞と溶液中で接触させること(例えば、Sambrookら(上掲)を参照のこと)による細胞内へのベクターの導入を特色とするものであり得る。

20

30

【0122】

本明細書に記載の受容体標的化試薬小規模または大規模作製に使用され得る発現系としては、限定されないが、本発明の核酸分子を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した微生物(細菌(例えば、大腸菌およびB. subtilis)など);本発明の核酸分子を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母(例えば、サッカロミセス属およびピキア);本発明の核酸分子を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染させた昆虫細胞系;融合タンパク質ヌクレオチド配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)およびタバコモザイクウイルス(TMV))に感染させた、あるいは該ヌクレオチド配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換した植物細胞系;または哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)あるいは哺乳動物ウイルス由来のプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター、CMVプロモーター、SV40プロモーター、もしくはワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を含む組換え発現構築物を保有させた哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、VERO、HeLa、MDCK、WI38、およびNIH 3T3細胞)が挙げられる。ま

40

50

た、哺乳動物から採取した、プラスミドベクターでトランスフェクトした、またはウイルスベクター（例えば、ウイルスベクター（特に、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、弱毒化ワクシニアウイルス、カナリアポックスウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなど；下記のエキソビボ法も参照のこと）に感染させた一次細胞または二次細胞も宿主細胞として有用である。

【0123】

本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬の発現後、受容体標的化試薬は、培養細胞から、または細胞を培養した培地から標準的な手法（Sambrookら（上掲）参照）を用いて単離され得る。タンパク質の単離方法は当該技術分野で知られており、例えば、液体クロマトグラフィー（例えば、HPLC）、アフィニティークロマトグラフィー（例えば、金属キレート化もしくはイムノアフィニティークロマトグラフィー）、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、沈降、または分別可溶化が挙げられる。

10

【0124】

小分子の受容体標的化試薬（またはそのドメイン）、例えば、200未満（例えば、175未満、150未満、125未満、100未満、90未満、80未満、70未満、または60未満）のアミノ酸を有する受容体標的化試薬またはドメインは、標準的な化学反応手段によって化学合成され得る。

【0125】

一部の実施形態において、単離された受容体標的化試薬は、凍結、凍結乾燥または固定化させて適切な条件下で保存され得、これにより、該タンパク質が活性（例えば、免疫毒性活性または細胞に対する結合能力）を保持することが可能になる。

20

【0126】

1つ以上のドメインまたは薬剤（例えば、標的化ドメインまたは毒性薬剤）が独立して作製されたものである場合、各ドメインまたは薬剤を共有結合または非共有結合によって、当該技術分野で知られた方法を用いて一緒に連結させ得る。例えば、一方のドメイン（または薬剤）上の末端または内部のシステイン残基が、別のドメインまたは薬剤上の末端または内部のシステイン残基とのジスルフィド結合の形成に利用され得る。

【0127】

また、ドメインまたは薬剤を、いくつかの既知の任意の化学的架橋体を用いて架橋させてもよい。かかる化学的架橋体の例は、2つのアミノ酸残基を、「ヒンダード」ジスルフィド結合を含む連結によって連結させるものである。このような連結において、架橋単位内のジスルフィド結合は、例えば、還元型グルタチオンまたは酵素ジスルフィドレダクターゼの作用による還元から保護される（ジスルフィド結合のいずれかの側の立体障害基によって）。適当な化学的架橋体の一例である4-スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル- α -(2-ピリジルジチオ)トルエン(SMPT)は、一方のドメイン（または薬剤）上の末端リジンと他方の末端システインを用いて、2つのドメイン（または薬剤）間にかかる連結を形成する。ヘテロ二官能性試薬は、各ドメイン（例えば、各ドメインポリペプチド）または薬剤（例えば、毒性の小分子もしくは放射性核種）上の異なるカップリング部分によって架橋を行なう。したがって、一方のドメインまたは薬剤上のカップリング部分はシステイン残基であり得、他方のものはリジン残基であり得る。このように、得られる二量体は、ホモ二量体またはホモ二量体とヘテロ二量体の混合物のいずれかではなくヘテロ二量体であろう。他の有用な架橋体としては、限定されないが、2つのアミノ基を連結する化学基（例えば、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド）、2つのスルフヒドリル基を連結する化学基（例えば、1,4-ビス-マレイミドブタン）アミノ基とスルフヒドリル基を連結する化学基（例えば、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）、アミノ基とカルボキシル基を連結する化学基（例えば、4-[p-アジドサリチルアミド]ブチルアミン）、およびアミノ基とアルギニンの側鎖内に存在するグアニジウム(guanadium)基を連結する化学基（例えば、p-アジドフェニル glyoxal monohydrate）が挙げられ

30

40

50

る。

【0128】

このような架橋方法は、任意の該ドメインまたは薬剤に対して天然の残基（「カップリング部分」）を伴うものであり得るが、ポリペプチド鎖内に組み込まれた非天然（「非相同」）配列（例えば、リンカー配列）を架橋させるためにも使用され得る。必ずしもそうではないが、かかる配列は、一般的に、アミノ酸（例えば、システイン、リジン、アルギニン、または任意のN末端アミノ酸）で構成されている。非アミノ酸部分としては、限定されないが、例えば、ビシナールジオールが使用された糖質（例えば、糖タンパク質上）が挙げられる（Chamowら（1992）J. Biol. Chem. 267, 15916-15922）。例えば、架橋剤4-（4-N-マレイミドフェニル）酪酸ヒドラジド（MPBH）は、あるドメイン（または薬剤）上の糖質残基と別のドメイン（または薬剤）上のスルフヒドリル基を架橋させるために使用され得る。これらは、例えば、ドメイン（もしくは薬剤）またはドメインもしくは薬剤の一部分の化学的合成の際に付加され得る。あるいはまた、当該技術分野で知られた標準的な組換え核酸手法によって付加してもよい。

10

【0129】

非相同カップリング部分は、得られる受容体標的化試薬の活性が阻害されないことを条件として、融合タンパク質のドメインまたは薬剤内の任意の位置に存在させ得る。したがって、該連結は、標的化ドメインの構造の破壊をもたらし、該ドメインが特異性を有する細胞表面分子に対して実質的に結合できなくなるようなものであってはならない。さらに、該連結は、毒性ドメイン（または薬剤）の構造の破壊をもたらし、該ドメインが実質的にそれぞれの標的細胞の増殖を抑止（または該細胞を死滅させることが）できなくなるようなものであってはならない。当業者にわかる（および付随の実施例に詳述した）標準的な結合アッセイおよび毒性アッセイを使用し、ドメイン上の異なる残基が関与する連結が使用された候補受容体標的化試薬は、対象の標的細胞に結合して増殖を抑止する（または該細胞を死滅させる）能力について試験され得る。分子モデル設計手法を使用し、ドメイン間連結を形成し得る部分の挿入に適切であり得る標的化ドメインまたは毒性ドメイン（または薬剤）上の領域を予測することが高頻度で可能になる。したがって、例えば、標的化ドメインの外側表面上に存在しているが標的分子に対する結合に関与していないようであると予測される領域は、標的化ドメイン内の挿入に適切な部分として有用な領域であり得る。同様に、毒性ドメイン（または薬剤）の外側表面に存在しているが、毒性活性に関与していないようであると予測される領域は、毒性ドメイン内の挿入に適切な部分として有用な領域であり得る。

20

30

【0130】

カップリング部分は、好ましくは、該ドメインの末端（CまたはN）に存在させる。該部分は、上記のように、各ドメイン（または薬剤）上のシステイン残基、または一方のシステインと他方のリジンであり得る。該部分が2つのシステイン残基である場合、架橋は、例えば、ドメイン（または薬剤）を酸化条件に曝露することにより行なわれ得る。

【0131】

場合によっては、架橋をドメインまたは薬剤に挿入された非天然部分のみに制限するため、例えば、該ドメインまたは薬剤内の1つ以上の天然システイン残基を排除するのが望ましいこともあり得る。場合によっては扱いにくいシステインは、例えば、アラニンまたはチロシン残基で置き換えられ得る。これは、例えば、標準的な組換え手法によって行なわれ得る。当然、このような置き換えは、得られる受容体標的化試薬の活性を阻害するものでないのがよい。

40

【0132】

2つより多くのドメイン（または2種類より多くの薬剤）を接続させる場合、該ドメイン（または薬剤）の少なくとも1つは、1つより多くの架橋部分を有するものであり得る。かかる多量体は、各ドメインまたは薬剤が次のものに、鎖内の末端の2つのドメイン（または薬剤）はドメイン間（または薬剤間）結合に関与する残基を1つだけ有するが、各

50

「内部」ドメイン（または薬剤）はドメイン間結合に関与する部分を2つ有するように連接されるように「逐次」構築され得る。あるいはまた、1つのドメインを多数の（例えば、2、3、4、または5つの）他のドメインまたは薬剤に連結させてもよい。

【0133】

受容体標的化試薬のさらなる処理

本明細書に記載の任意のポリペプチド受容体標的化試薬の発現または合成後、該試薬をさらに処理してもよい。例えば、さらなる処理は、受容体標的化試薬に対する1つ以上のドメインの化学的もしくは酵素的付加、または受容体標的化ドメイン内の既存のドメインに対する修飾、または両方を含むものであり得る。該受容体標的化分子のさらなる処理は、非相同アミノ酸配列（ポリマー、担体、またはその他の任意の上記の非相同配列）の付加（共有結合または非共有結合）を含むものであってもよい。該処理は、例えば、受容体標的化試薬に対する放射性核種の付加を含むものであり得る。放射性核種は、毒性のもの（上記）または一般的に非毒性のものまたは低毒性のもの（インビボ診断に使用されている放射性核種など）であり得る。診断用の型の放射性核種の例としては、限定されないが、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{123}I 、 ^{131}I 、 ^{211}At 、 ^{177}Lu 、 ^{47}Sc 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{153}Sm 、 ^{199}Au 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{124}I 、 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{198}Au 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{13}N 、 $^{34\text{m}}\text{Cl}$ 、 ^{38}Cl 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{76}As 、 ^{72}Se 、 ^{73}Se 、または ^{75}Se が挙げられる。放射性核種原子（またはこれらを含む大分子／キレート；上記参照）を受容体標的化試薬に結合させる方法は当該技術分野で知られており、受容体標的化試薬を放射性核種とともに、該受容体標的化試薬に対する放射性核種原子または放射性核種原子含有分子もしくはキレートの結合を助長する条件（例えば、pH、塩濃度および／または温度）下でインキュベートすることを伴うものであり得る（例えば、米国特許第6,001,329号（その開示は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。

【0134】

また、さらなる処理は、受容体標的化試薬の酵素的または化学的処理を伴うものであり得る。例えば、酵素的処理は、改変された標的分子を、例えば1種類以上のプロテアーゼ、ホスファターゼ、またはキナーゼと、該受容体標的化試薬の修飾が誘導されるのに十分な時間接触させることを伴うものであり得る。酵素的処理は、受容体標的化試薬をグリコシル化し得る、または該試薬のグリコシル化を変更し得る1種類以上の酵素（例えば、オリゴサッカリルトランスフェラーゼまたはマンノシダーゼ）と該受容体標的化試薬を接触させることを伴うものであり得る。

【0135】

受容体標的化試薬を含む医薬組成物

本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬が医薬組成物に組み込まれ得る。かかる組成物は、典型的には、受容体標的化試薬と薬学的に許容され得る担体を含む。本明細書で用いる場合、文言「薬学的に許容され得る担体」は、医薬の投与に適合性の溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤ならびに吸収遅延剤などを包含する。受容体標的化試薬は、シロップ剤、エリキシル剤、懸濁剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、ロゼンジ剤、トローチ剤、水性液剤、クリーム剤、軟膏、ローション剤、ゲル剤、乳剤などの形態の医薬組成物として製剤化され得る。また、補助活性化化合物（例えば、1種類以上の化学療法剤）が該組成物に組み込まれることがあり得る。

【0136】

医薬組成物は、一般的に、その意図される投与経路と適合性となるように製剤化される。投与経路の例としては、経口、経直腸、および非経口、例えば、静脈内、筋肉内、皮内、皮下、吸入、経皮、または経粘膜が挙げられる。非経口適用に使用される液剤または懸濁剤には、以下の成分：滅菌希釈剤（注射用水、生理食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒など）；抗菌剤（ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなど）；抗酸化剤（アスコルビン酸または重亜硫

酸ナトリウムなど) ; キレート剤 (エチレンジアミン四酢酸など) ; 緩衝剤 (酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩など) および張度調整剤 (塩化ナトリウムまたはデキストロースなど) が含まれ得る。pHは、酸または塩基 (塩酸または水酸化ナトリウムなど) で調整され得る。該組成物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは反復用量バイアル内に封入され得る。

【0137】

注射用用途に適した医薬組成物としては、滅菌水性液剤 (水溶性の場合) または分散剤および滅菌注射用液剤または分散剤の即時調合調製のための滅菌粉末剤が挙げられる。静脈内投与では、好適な担体として、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL (商標) (BASF, パーシッパニー, N. J.) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) が挙げられる。すべての場合において、該組成物は滅菌されたものでなければならず、易注射針通過性 (syringeability) が存在する程度に流動性であるのがよい。該組成物は、製造および保存の条件下で安定であるのがよく、細菌および真菌などの微生物の汚染に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど)、ならびにその適当な混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散剤の場合は必要とされる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物による汚染の抑制は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによってなされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖類、多価アルコール (マンニトール、ソルビトールなど)、塩化ナトリウムを該組成物中に含めることが望ましい。注射用組成物の持続性吸収は、該組成物中に、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによりもたらされ得る。

【0138】

滅菌された注射用液剤は、受容体標的化試薬を必要量で適切な溶媒中に、必要に応じて上記の成分の1種類または組合せとともに組み込んだ後、濾過滅菌することにより調製され得る。一般的に、分散剤は、受容体標的化試薬を、基礎分散媒体と上記のものからの必要な他の成分とを含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことにより調製される。滅菌注射用液剤の調製用の滅菌粉末剤の場合、調製方法は真空乾燥および凍結乾燥を含み、これにより、事前に滅菌濾過した液剤から、活性成分+任意のさらなる所望の成分の粉末剤が得られる。

【0139】

経口用組成物には、一般的に、不活性希釈剤または可食担体が含まれる。治療的経口投与の目的のため、受容体標的化試薬は、賦形剤とともに組み込まれ得、錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤 (例えば、ゼラチンカプセル剤) の形態で使用され得る。また、経口用組成物は、マウスウォッシュとしての使用のための流動性担体を用いて調製され得る。医薬適合性のある結合剤および/または補助物質を、該組成物の一部として含めてもよい。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などには、任意の以下の成分、または類似した性質の化合物: 結合剤 (微晶質セルロース、トラガカントゴムもしくはゼラチンなど); 賦形剤 (デンプンもしくはラクトースなど)、崩壊剤 (アルギン酸、プリモジェルもしくはコーンスターチなど); 滑沢剤 (ステアリン酸マグネシウムもしくはSterotesなど); 流動促進剤 (コロイド状二酸化ケイ素など); 甘味剤 (スクロースもしくはサッカリンなど); またはフレーバー剤 (ペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジフレーバーなど) が含有され得る。

【0140】

粉末剤および錠剤には、1%~95% (w/w) の受容体標的化試薬が含まれ得る。一部の特定の実施形態において、受容体標的化試薬は5%~70% (w/w) の範囲である。好適な担体は、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、デンプン、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、

カルボキシメチルセルロースナトリウム、低融点ワックス、ココアバターなどである。用語「調製物」は、カプセル剤を提供する担体としてカプセル化材料を有する受容体標的化試薬の製剤を包含するものとし、カプセル剤では、受容体標的化試薬（他の担体ありまたはなし）が担体に囲まれ、したがって担体と合体している。同様に、カシェ剤およびロゼンジ剤も包含される。錠剤、粉末剤、カプセル剤、丸剤、カシェ剤、およびロゼンジ剤は、経口投与に適した固形投薬形態として使用され得る。

【0141】

経口使用に適した水性液剤は、活性成分を水に溶解させ、所望により適当な着色剤、フレーバー、安定剤および増粘剤を添加することにより調製され得る。経口使用に適した水性懸濁剤は、微粉化した活性成分を水中に、粘性物質（天然または合成ガム、樹脂、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなど）および他のよく知られた懸濁化剤とともに分散させることにより作製され得る。

10

【0142】

吸入による投与では、該化合物は、適当な噴霧推進剤（例えば、二酸化炭素などのガス）が内包された加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからのエロゾルスプレー剤の形態で送達される。

【0143】

経表面投与に適した受容体標的化試薬は、例えば、クリーム剤、スプレー剤、フォーム剤、ゲル剤、軟膏、膏薬、または速乾性擦式製剤（dry rub）として製剤化され得る。速乾性擦式製剤は、投与部位で再水和され得る。また、受容体標的化試薬は、経表面投与のための包帯、ガーゼまたはパッチ剤内に直接注入する（例えば、浸漬させて乾燥させる）ために製剤化され得る。また、受容体標的化試薬は、経表面投与のための包帯、ガーゼまたはパッチ剤内で半液状、ゲル状、または完全な液状状態に製剤化され得る（例えば、米国特許第4,307,717号（その内容は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。

20

【0144】

また、全身投与は経粘膜または経皮手段によるものであり得る。経粘膜または経皮投与では、バリア層に浸透させるのに適切な浸透剤が製剤中に使用される。かかる浸透剤は、当該技術分野で一般的に知られており、例えば、経粘膜投与のためには、デタージェント、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻腔内スプレー剤または坐剤によって使用によってなされ得る。経皮投与には、受容体標的化試薬は、当該技術分野で一般的に知られている軟膏、膏薬、ゲル剤、またはクリーム剤に製剤化される。

30

【0145】

また、受容体標的化試薬は、坐剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドなどの慣用的な坐剤基剤を使用）または経直腸送達用の持続性注腸剤の形態に調製され得る。

【0146】

一実施形態において、受容体標的化試薬は、該受容体標的化試薬を体内からの急速な排出から保護する担体を用いて調製される（制御放出製剤、例えば、埋入物およびマイクロカプセル封入送達系など）。生分解性で生体適合性のポリマー、例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などが使用され得る。かかる製剤の調製方法は当業者には自明である。また、これらの物質は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceutical, Inc. から市販されている。リボソーム懸濁剤（例えば、ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を有する感染細胞に標的化されるリボソーム）もまた、薬学的に許容され得る担体として使用され得る。これは、当業者にはわかる方法、例えば、米国特許第4,522,811号に記載の方法に従って調製することができる。

40

【0147】

経口用または非経口用組成物を、容易な投与および均一な投薬量のために単位投薬形態に製剤化することは特に好都合である。単位投薬形態は、本明細書で用いる場合、処置対象の被験体に対する単回投薬量に適応させた物理的に独立した単位であって、各単位が、

50

所望の治療効果がもたらされるように計算された所定量の受容体標的化試薬を、必要な医薬用担体とともに含むものをいう。また、投薬単位に使用のための使用説明書が添付されているともよい。

【0148】

本明細書に記載の任意の医薬組成物は、容器、パック、またはディスペンサー内に、以降のセクションに記載する投与の使用説明書とともに内包され得る。

【0149】

抗体の作製方法

本明細書に記載のEGFR（例えば、HER1、HER2、HER3、or HER4）、IL13RまたはIL4Rに特異的な抗体の作製方法は、当該技術分野で知られている。例えば、1つ以上の遺伝子にコードされたタンパク質に特異的な抗体または抗体断片の作製方法は、例えば動物を用いた免疫処置による、またはファージディスプレイなどのインビトロ方法による作製であり得る。抗体または抗体断片の作製には、標的タンパク質の全部または一部（例えば、EGFR、IL13RまたはIL4Rの全部または一部）を含むポリペプチドが使用され得る。

【0150】

該ペプチドは、これで適当な被験体（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物）を免疫処置することにより抗体を調製するために使用され得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、化学合成されたペプチドまたは組換えにより発現させたペプチドを含むものであり得る。該調製物は、さらに、アジュバント（フロイント完全もしくは不完全アジュバントなど）、または類似した免疫賦活薬を含んでいてもよい。適当な被験体を免疫原性ペプチド調製物で免疫処置すると、ポリクローナル抗ペプチド抗体応答が誘導される。

【0151】

抗体という用語は、本明細書で用いる場合、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分（すなわち、該ペプチドに特異的に結合する抗原結合部位を含む分子）をいう。本明細書に記載のペプチドに特異的に結合する抗体は、該ペプチドに結合するが、試料中の他の分子には実質的に結合しない抗体である。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、F(ab)およびF(ab')₂断片が挙げられる。

【0152】

該抗ペプチド抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体調製物であり得る。モノクローナル抗体という用語は、本明細書で用いる場合、該ペプチドと免疫反応を行い得る抗原結合部位を1種のみ含む抗体分子集団をいう。したがって、モノクローナル抗体組成物は、典型的には、免疫反応する特定のペプチドに対して単一の結合親和性を示す。

【0153】

ポリクローナル抗ペプチド抗体は、上記のように適当な被験体をペプチド免疫原で免疫処置することにより調製され得る。免疫処置された被験体における抗ペプチド抗体の力価は、標準的な手法、例えば、固定化ペプチドを使用する酵素免疫測定法(ELISA)などによって経時的にモニターされ得る。所望により、該ペプチドに対する抗体分子を哺乳動物（例えば、血液）から単離し、プロテインAクロマトグラフィーなどの手法によってさらに精製し、IgG画分を得てもよい。免疫処置後、適切な時点で、例えば抗ペプチド抗体の力価が最大になったとき、抗体産生細胞を被験体から採取し、標準的な手法、例えば、ハイブリドーマ手法（最初にKohlerおよびMilstein（1975）Nature 256:495-497によって報告）、ヒトB細胞ハイブリドーマ手法（Kozborら（1983）Immunol. Today 4:72）、またはEBV-ハイブリドーマ手法（Coleら（1985）、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）により、モノクローナル抗体の調製に使用することができる。リンパ

球と不死化細胞株の融合に使用されている多くのよく知られた任意のプロトコルが、抗ペプチドモノクローナル抗体の作製の目的に適用され得る（例えば、Current Protocols in Immunology（上掲）；Galfrèら（1977）Nature 266：55052；R. H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York（1980）；and Lerner（1981）Yale J. Biol. Med., 54：387-402を参照のこと）。

【0154】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマの調製の択一例として、本明細書に記載のペプチドを用いて組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングし、該ペプチドに結合する免疫グロブリンライブラリー構成要素を単離することにより、モノクローナル抗ペプチド抗体が同定および単離され得る。

【0155】

抗ペプチド抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降などの手法によって該ペプチドを単離するために使用され得る。さらに、抗ペプチド抗体は、本明細書に記載のスクリーニングアッセイにおいて該ペプチドを検出するために使用され得る。抗体を、任意選択で、検出可能な標識（例えば、本明細書に記載の任意のもの）または結合ペアの第1もしくは第2の構成要素（例えば、スト렙トアビジン／ビオチンもしくはアビジン／ビオチン）（この第2の構成要素を検出可能な標識にコンジュゲートさせてもよい）にカップリングさせてもよい。

【0156】

また、EGFR、IL13RまたはIL4Rに対する非ヒト抗体を非ヒト宿主（例えば、齧歯類）において産生させ、次いで、例えば、米国特許第6,602,503号、EP 239 400、米国特許第5,693,761号、および米国特許第6,407,213号に記載のようにしてヒト化してもよい。

【0157】

EP 239 400（Winterら）には、ある種のCDRを別の種由来のものと置換すること（所与の可変領域内で）により抗体を改変することが記載されている。CDR置換抗体は、含有されている非ヒト成分がかなり少ないため、真のキメラ抗体と比べてヒトにおいて免疫応答が惹起されにくいものであり得る。Riechmannら, 1988, Nature 332, 323-327；Verhoeyenら, 1988, Science 239, 1534-1536参照。典型的には、マウス抗体のCDRは、所望の置換型抗体をコードする配列が得られる組換え核酸手法を使用することにより、ヒト抗体の対応する領域内で置換される。所望のアイソタイプ（例えば、CHの γ IおよびCLの κ ）のヒト定常領域遺伝子セグメントを付加し、ヒト化重鎖および軽鎖遺伝子を哺乳動物細胞において共発現させると、可溶性のヒト化抗体が産生され得る。

【0158】

WO 90/07861には、元のマウス抗体のV領域フレームワークとの最適なタンパク質配列相同性に関するコンピュータ解析によってヒトVフレームワーク領域を選び出すこと、およびマウスV領域の3次構造をモデル設計し、マウスCDRと相互作用する可能性のあるフレームワークアミノ酸残基を可視化することを含む方法が記載されている。このようなマウスアミノ酸残基を、次いで、相同なヒトフレームワーク上に重ね合わせる。米国特許第5,693,762号；同第5,693,761号；同第5,585,089号；および同第5,530,101号もまた参照のこと。Tempestら, 1991, Biotechnology 9, 266-271では、マウス残基の原子団の導入なしのCDRグラフィングで、標準として、それぞれNEWMおよびREIの重鎖および軽鎖に由来するV領域フレームワークが使用されている。NEWMおよびREI系ヒト化抗体を構築するためにTempestらのアプローチを使用する利点は、NEWMとRE

I の可変領域の 3 次元構造が x 線結晶構造解析からわかり、したがって、C D R と V 領域フレームワーク残基間の特異的相互作用がモデル設計され得ることである。

【0159】

非ヒト抗体は、例えば、コンセンサスヒトアミノ酸残基を、ヒト免疫グロブリン配列内の特定の位置に、例えば、以下の位置：（軽鎖の可変ドメインのフレームワーク内の）4 L、35 L、36 L、38 L、43 L、44 L、58 L、46 L、62 L、63 L、64 L、65 L、66 L、67 L、68 L、69 L、70 L、71 L、73 L、85 L、87 L、98 L および／または（重鎖の可変ドメインのフレームワーク内の）2 H、4 H、24 H、36 H、37 H、39 H、43 H、45 H、49 H、58 H、60 H、67 H、68 H、69 H、70 H、73 H、74 H、75 H、78 H、91 H、92 H、93 H および／または 103 H（Kabat による番号付け）の 1 つ以上（例えば、少なくとも 5、10、12 または全部）に挿入する置換を含むように修飾され得る。例えば、米国特許第 6,407,213（その開示は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）号を参照のこと。

10

【0160】

E G F R、I L 13 R または I L 4 R に結合する完全ヒトモノクローナル抗体は、例えば、Boerner ら、1991, J. Immunol., 147, 86-95 に記載のインビトロ初回刺激ヒト脾細胞を用いて作製され得る。これは、Persson ら、1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88:2432-2436 または Huang および Stollár, 1991, J. Immunol. 方法 141, 227-236 に記載のレパートリークローニングによって調製され得る；米国特許第 5,798,230 号も参照のこと（各々の開示は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）。また、非免疫処置されていないヒトの大型ファージディスプレイライブラリーの使用により、標準的なファージ手法を用いてヒト用治療剤として開発され得る高親和性抗体が単離され得る（例えば、Vaughan ら、1996；Hoogenboom ら（1998）Immunotechnology 4:1-20；および Hoogenboom ら（2000）Immunol Today 2:371-8；US 2003-0232333 を参照のこと）。

20

【0161】

本明細書で用いる場合、「免疫グロブリン可変ドメイン配列」は、免疫グロブリン可変ドメインの構造が形成され得るアミノ酸配列をいう。例えば、該配列は、天然に存在する可変ドメインのアミノ酸配列の全部または一部を含むものであり得る。例えば、該配列は、1 つ、2 つまたはそれ以上の N-または C 末端のアミノ酸、内部アミノ酸がなくてもよく、1 つ以上の挿入またはさらなる末端のアミノ酸を含んでいてもよく、他の改変を含んでいてもよい。一実施形態において、免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むポリペプチドは、別の免疫グロブリン可変ドメイン配列と結合させ、標的結合構造（すなわち「抗原結合部位」）、例えば、E G F R、I L 13 R または I L 4 R と相互作用する構造が形成されるようにし得る。

30

【0162】

抗体の V H または V L 鎖に、さらに、重鎖または軽鎖の定常領域の全部または一部を含め、それにより、それぞれ免疫グロブリンの重鎖または軽鎖が形成されるようにしてもよい。一実施形態において、抗体は、2 つの免疫グロブリン重鎖と 2 つの免疫グロブリン軽鎖の四量体である。免疫グロブリンの軽鎖と重鎖は、ジスルフィド結合によって連結させ得る。重鎖定常領域は、典型的には、3 つの定常ドメイン C H 1、C H 2 および C H 3 を含む。軽鎖定常領域は、典型的には C L ドメインを含む。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、典型的には、宿主組織または因子（例えば、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第 1 成分（C 1 q））に対する抗体の結合を媒介する。

40

【0163】

抗体の 1 つ以上の領域がヒト由来、有効なヒト由来、またはヒト化のものであり得る。

50

例えば、可変領域の1つ以上がヒト由来または有効なヒト由来であり得る。例えば、C D Rの1つ以上、例えば、重鎖(H C) C D R 1、H C C D R 2、H C C D R 3、軽鎖(L C) C D R 1、L C C D R 2、およびL C C D R 3がヒト由来であり得る。各軽鎖C D Rがヒト由来であってもよい。H C C D R 3がヒト由来であってもよい。フレームワーク領域(F R)の1つ以上、例えば、H CまたはL CのF R 1、F R 2、F R 3、およびF R 4がヒト由来であってもよい。一部の実施形態において、すべてのフレームワーク領域がヒト由来、例えば、ヒト体細胞(例えば、免疫グロブリン産生造血細胞または非造血細胞)由来である。一実施形態において、ヒト由来配列は、例えば、生殖細胞系の核酸にコードされた生殖細胞系の配列である。定常領域の1つ以上が、ヒト由来、有効なヒト由来、またはヒト化のものであり得る。別の実施形態において、フレームワーク領域(例えば、F R 1、F R 2およびF R 3の集合、またはF R 1、F R 2、F R 3およびF R 4の集合)または抗体全体の少なくとも70、75、80、85、90、92、95、または98%がヒト由来、有効なヒト由来、またはヒト化のものであり得る。例えば、F R 1、F R 2およびF R 3の集合が、ヒト由来生殖細胞系のセグメントにコードされたヒト由来配列と少なくとも70、75、80、85、90、92、95、98、または99%同一であり得る。

【0164】

「有効なヒト由来」免疫グロブリン可変領域は、該免疫グロブリン可変領域によって正常なヒトにおいて免疫原性応答が惹起されないような充分な数のヒトフレームワークアミノ酸位置を含む免疫グロブリン可変領域である。「有効なヒト由来」抗体は、該抗体によって正常なヒトにおいて免疫原性応答が惹起されないような充分な数のヒトアミノ酸位置を含む抗体である。

【0165】

「ヒト化」免疫グロブリン可変領域は、ヒトにおいて修飾形態によって惹起される免疫応答が非修飾形態よりも低くなるように修飾された、例えば、該免疫グロブリン可変領域によって正常なヒトにおいて免疫原性応答が惹起されないような充分な数のヒトフレームワークアミノ酸位置を含むように修飾された免疫グロブリン可変領域である。「ヒト化」免疫グロブリンの説明は、例えば、米国特許第6,407,213号および米国特許第5,693,762号(各々の開示は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる)に示されている。場合によっては、ヒト化免疫グロブリンの1つ以上のフレームワークアミノ酸位置に非ヒトアミノ酸を含めてもよい。

【0166】

抗体の全部が免疫グロブリン遺伝子またはそのセグメントにコードされていてもよく、その一部がコードされていてもよい。例示的なヒト免疫グロブリン遺伝子としては、 κ 、 λ 、 α (I g A 1およびI g A 2)、 γ (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)、 δ 、 ϵ および μ 定常領域遺伝子、または無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。完全長免疫グロブリン「軽鎖」(約25 k D aまたは214アミノ酸)は、NH2末端の可変領域遺伝子(約110アミノ酸)と、COOH末端の κ または λ 定常領域遺伝子にコードされている。完全長免疫グロブリン「重鎖」(約50 k D aまたは446アミノ酸)は、同様に、可変領域遺伝子(約116アミノ酸)と上記の他方の定常領域遺伝子の1つ、例えば、 γ (約330アミノ酸をコード)にコードされている。

【0167】

完全長抗体の用語「抗原結合断片」は、対象の標的(すなわち、E G F R、I L 1 3 RまたはI L 4 R)に特異的に結合する能力を保持している完全長抗体の1つ以上の断片をいう。完全長抗体の「抗原結合断片」という用語に包含される結合断片の例としては、(i) F a b断片(V L、V H、C LおよびC H 1ドメインからなる一価の断片)；(i i) F (a b') 2断片(ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結された2つのF a b断片を含む二価断片)；(i i i) F d断片(V HおよびC H 1ドメインからなる)；(i v) F v断片(抗体の単一のアームのV LおよびV Hドメインからなる)；(v) d A b断片(W a r dら、(1989) N a t u r e 341:544-546)(V Hドメ

インからなる) ; ならびに (v i) 機能性を保持している単離された相補性決定領域 (C D R) が挙げられる。さらに、F v 断片の2つのドメインV LとV Hは別々の遺伝子にコードされているが、組換え方法を使用し、V L領域とV H領域のペアが単鎖F v (s c F_v) として知られる一価分子を形成している単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーにより、これらを接続させてもよい。例えば、Birdら (1988) Science 242: 423-426 ; およびHustonら (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (各々の開示は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる) を参照のこと。

【0168】

受容体標的化試薬を細胞に結合させるための方法

本開示は、受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのさまざまなインビトロ、インビボ、エキソビボ方法を提供する。受容体標的化試薬が免疫毒性である (すなわち、受容体標的化試薬が1つ以上の毒性ドメインを含む) 場合、該方法は、細胞 (例えば、癌細胞または炎症性障害を媒介する免疫細胞) の増殖を抑止する (または細胞を死滅させる) ために使用され得る。受容体標的化試薬が検出可能に標識された実施形態では、かかる試薬は、E G F R、I L 1 3 RまたはI L 4 Rの1種類以上を発現している細胞 (例えば、癌細胞または炎症性障害を媒介する免疫細胞) の存在を検出するために有用であり得る。したがって、該インビボまたはエキソビボ方法は、とりわけ、癌または炎症性障害の処置および/または診断に有用であり、該病状としては、本明細書に記載の任意の癌または炎症性障害 (例えば、自己免疫疾患) が挙げられる。

【0169】

また、一部の実施形態において、受容体標的化試薬を細胞に結合させるための方法は、例えば、受容体標的化試薬を細胞に接触させるための方法、細胞を死滅させるための方法、細胞の増殖を抑止するための方法、または細胞の有無を検出するための方法であり得る。

【0170】

受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのインビトロ方法

本明細書において、受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのインビトロ方法を提供する。該方法は、例えば、培養癌細胞の増殖の抑止 (もしくは該細胞の死滅) における免疫毒性受容体標的化試薬の有効性を評価する試験において、または特定の受容体 (例えば、E G F R、I L 1 3 RもしくはI L 4 R) を発現している1つ以上の細胞を同定するための診断用アッセイにおいて有用である。例えば、検出可能に標識された受容体標的化試薬を、被験体から採取した細胞試料に接触させ、該細胞試料の1つ以上の細胞がE G F R、I L 1 3 RまたはI L 4 Rを発現しているかどうかを調べることができる。また、該方法は、類似した活性 (例えば、類似した細胞結合能力または受容体標的化試薬が免疫毒性である場合は、類似した免疫毒性特性) を有する化合物を同定するためのアッセイにおいて「陽性対照」としての機能を果たすことがあり得る。

【0171】

受容体標的化試薬を細胞に結合させるインビトロ方法は、細胞を本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬と接触させる工程を含む。細胞を本明細書に記載の受容体標的化試薬と接触させるための方法は、付随の実施例に詳述している。例えば、接着細胞が固相支持体マトリックス (例えば、プラスチック組織培養プレート、またはマルチウェル (96もしくは386ウェル) 組織培養プレート) 上に平板培養され、適切な培地 (例えば、D M E MまたはR P M I 培地) 中で培養され得る。固相支持体上への細胞の播種後、該細胞を培養している培地に受容体標的化試薬が添加され (種々の濃度で)、該細胞とともに、該細胞に対する受容体標的化試薬の結合が起こるのを可能にする条件下で、(種々の時間量で) インキュベートされ得る。

【0172】

また、該方法は、任意選択で、該細胞がE G F R、I L 1 3 RまたはI L 4 Rを発現しているかどうかを調べる工程を含むものであり得る。発現は、E G F R、I L 1 3 Rまた

は I L 4 R の m R N A またはタンパク質の発現であり得る。タンパク質または m R N A の発現を検出するための好適な方法は当業者に充分わかり、例えば、S a m b r o o k ら（上掲）に記載されている。このような方法は、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（S D S － P A G E）／標的タンパク質に特異的な抗体を使用するウェスタンブロッティング手法（上記の「抗体の作製方法」参照）、または R T － P C R もしくは m R N A 発現の検出のためのノザンブロッティング手法を含むものであり得る。

【0173】

また、該方法は、任意選択で、受容体標的化試薬を該細胞と接触させた後、受容体標的化試薬が該細胞に結合したかどうかを調べる工程を含むものであり得る。例えば、受容体標的化試薬は上記のように検出可能に標識され得、該細胞を検出可能に標識された受容体標的化試薬と接触させた後、該細胞に対する該試薬の結合が、該検出可能な標識の存在を検出することによって検出され得る。あるいはまた、該細胞を検出可能に標識されていない受容体標的化試薬と接触させた後、該細胞に対する受容体標的化試薬の結合を、受容体標的化試薬と、検出可能に標識され、受容体標的化試薬に特異的に結合する抗体とを接触させることによって検出してもよい。

【0174】

検出可能な標識の検出および／または定量方法は、標識の性質に依存し、当該技術分野で知られている。検出可能な標識の検出に有用な検出器の例としては、限定されないが、x 線フィルム、放射能測定装置、シンチレーションカウンタ、分光測光器、比色計、蛍光光度計、ルミノメーター、およびデンシトメーターが挙げられる。

【0175】

また、受容体標的化試薬が該細胞に結合したかどうかを調べるための好適な方法も付随の実施例に詳述している。

【0176】

細胞は、E G F R（例えば、H E R 1、H E R 2、H E R 3 もしくは H E R 4）、I L 1 3 R または I L 4 R の 1 種類以上を発現しているものであり得る。該細胞には、原核生物細胞（例えば、細菌細胞）と真核生物細胞の両方が含まれる。真核生物細胞としては、例えば、真菌（例えば、酵母）、昆虫、植物、魚類、爬虫類、および哺乳動物の細胞（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ、ウシ、クジラ、サル、またはヒト）が挙げられ得る。細胞は、正常、形質転換型、または悪性であり得、任意の組織学的型のもの、例えば限定されないが、上皮細胞、線維芽細胞、リンパ系細胞、マクロファージ／単球、顆粒球、ケラチノサイト、または筋肉細胞であり得る。癌細胞としては、限定されないが、肺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、腎臓癌、胃癌、肝臓癌、骨癌、血液の癌、神経組織の癌（例えば、膠芽細胞腫）、黒色腫、甲状腺癌、卵巣癌、精巣癌、前立腺癌、頸部癌、腔癌、または膀胱癌などの癌に由来する細胞が挙げられ得る。好適な細胞株としては、付随の実施例に記載のもの、例えば、膠芽細胞腫または前立腺癌細胞株が挙げられる。

【0177】

インビトロ方法が、細胞を、免疫毒性受容体標的化試薬（本明細書に記載の任意のものなど）と接触させることを含む実施形態では、該方法はまた、癌細胞または炎症性障害を媒介する免疫細胞などの細胞の増殖を抑止（または該細胞を死滅させる）方法であり得る。該方法は、任意選択で、免疫毒性受容体標的化試薬が該細胞を死滅させた（または該細胞の増殖を抑止した）かどうかを調べる工程を含むものであり得る。一般的に、細胞は、例えば、壊死（細胞膨潤および破碎）またはプログラムされた細胞死（アポトーシス）によって死滅し得る。細胞が死滅しているかどうかを調べるための方法は当該技術分野で知られており、付随の実施例に記載している。例えば、免疫毒性受容体標的化試薬との接触後に残留している細胞集団内のバイアブル細胞数が、試薬と接触させなかった対照細胞集団内のバイアブル細胞の数と比較される。

【0178】

細胞（または細胞集団）のバイアビリティを測定するための方法の一例はトリパンブルー排除解析である。例えば、組織培養皿のウェルの細胞が該プレートでトリプシン処理され、洗浄され、色素（例えば、トリパンブルー）で染色され、顕微鏡または機械的細胞計数器（例えば、Beckman-Coulter Z1^{（商標）} Series COUNTER COUNTER（登録商標）Cell and Particle Counter）を用いて計数され得る。トリパンブルーなどの色素は、死細胞または死にかけている細胞によってのみ取り込まれるため、この方法により、集団内においてバイアブル細胞とバイアブルでない細胞との識別（すなわち、青色または白色の細胞）が可能になる。

【0179】

細胞（または細胞集団）のバイアビリティを測定するための方法の別の例は代謝アッセイ、例えば、MTT代謝アッセイ（例えば、Invitrogen（USA）社のMTT代謝アッセイ）である。MTTジフェニルテトラゾリウムブロミドは、ミトコンドリア呼吸鎖に属し、バイアブル細胞内でのみ活性なコハク酸デヒドロゲナーゼ系によって切断されてホルマザン結晶になるテトラゾリウム塩（黄色っぽい色）である。ミトコンドリアコハク酸デヒドロゲナーゼは、電子結合試薬の存在下でMTT結晶を紫色のホルマザンに還元する。細胞を化合物で処理した後、該細胞をMTT試薬に曝露すると、よりバイアブルな細胞がウェル内に存在し、より多くのホルマザン色素が生成される。ホルマザン色素の程度は、例えば、分光測光器を用いて測定され得る。他の一般に使用されている細胞死増大の検出方法としては、細胞集団におけるDNA合成のモニタリング（すなわち、細胞集団におけるDNA合成量の低減）が挙げられる。また、例えば、免疫毒性受容体標的化試薬の存在下または非存在下で増殖させた細胞を、細胞分裂すると該細胞のDNA内に組み込まれ得るヌクレオチド類縁化合物で処理する。かかるヌクレオチド類縁化合物の例としては、例えば、BrdUまたは³H-チミジンが挙げられる。各場合において、細胞（所与の阻害剤の存在下および非存在下で培養）内に組み込まれた標識の量が定量され、標識取込み量は、細胞集団内の残留バイアブル細胞の量に正比例する。これに関連して、細胞バイアビリティ（例えば、癌細胞バイアビリティ）は、免疫毒性受容体標的化試薬の非存在下での細胞バイアビリティと比べて、少なくとも10%（例えば、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%またはそれ以上）低減され得る。

【0180】

上記の方法は、受容体標的化試薬が標的細胞の増殖を抑止したかどうかを調べるためにも使用され得ることは理解されよう。

【0181】

免疫毒性受容体標的化試薬とともに培養した細胞とそうでない細胞との間のアポトーシスの程度の比較は、一群のインジケーター、例えば、DNA断片化、カスパーゼ活性、ミトコンドリアの膜電位の低下、反応性酸素種（ROS）の生成の増大、細胞内酸性化、クロマチン凝縮、細胞表面のホスファチジルセリンレベル、または細胞透過性の増大を測定することにより行なわれ得る。

【0182】

DNA断片化は、例えば、TUNELアッセイ（末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼdUTPニック末端標識）によって測定され得る。市販のアッセイ形態、例えば、APO-BrdUTM TUNELアッセイキット（Invitrogen）、APO-DIRECTTMキット（BD-Biosciences-Pharmingen）およびApoAlertTM DNA断片化アッセイキット（Clontech）が広く利用可能である。

【0183】

カスパーゼ活性は、所与のカスパーゼ（例えば、カスパーゼ3またはカスパーゼ9）に

特異的な蛍光発生物質、色原体物質、および発光物質によって測定され得る。さまざまなカスパーゼ（カスパーゼ3、カスパーゼ7、カスパーゼ8、およびカスパーゼ9など）に対して市販のキットが利用可能である（BD-PharmingenまたはInvitrogen参照）。

【0184】

ミトコンドリアの膜電位低下は、完全性と機能性に基づいてミトコンドリアの種々の区画内に選択的に蓄積する蛍光色素により測定され得る。かかる色素の非限定的な一例は、Mitotracker Red（Invitrogen）である。

【0185】

反応性酸素種の生成は、H2DCFDAなどの蛍光色素を用いてモニターされ得る。

10

【0186】

クロマチン凝縮は、Hoechst 33342またはヨウ化プロピジウムなどの色素を用いて測定され得る。

【0187】

ホスファチジルセリン（PS）レベルは細胞表面において測定され得る。例えば、PSに対して高親和性を有するアネキシンVが、細胞表面上のPSに対するプローブとして使用され得る。数多くの市販のアッセイキットがかかる測定に適している（BD-Biosciences Pharmingen参照）。

【0188】

受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのインビボ方法

20

また、受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのインビボ方法を取り上げて記載する。該方法は、被験体に本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬を送達する工程を含む。被験体は、任意の哺乳動物、例えば、ヒト（例えば、ヒト患者）または非ヒト霊長類（例えば、チンパンジー、ヒヒ、またはサル）、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、アレチネズミ、ハムスター、ウマ、家畜系（例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、もしくはヤギ）、イヌ、ネコ、またはクジラであり得る。被験体は、癌もしくは炎症性障害を有する、癌もしくは炎症性障害を有することが疑われる、または癌もしくは炎症性障害が発生するリスクのある被験体であり得る。

【0189】

受容体標的化試薬が免疫毒性の（すなわち、受容体標的化試薬が1つ以上の毒性ドメインを含む）場合、受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのインビボ方法は、癌細胞の増殖を抑止する（または癌細胞を死滅させる）方法であり得る。

30

【0190】

一般的に、被験体に送達される受容体標的化試薬は、薬学的に許容され得る担体（例えば、生理食塩水）中に懸濁させ、経口、経直腸、非経口で投与、例えば、静脈内、皮下、筋肉内、髄腔内、腹腔内、直腸内、腔内、鼻腔内、胃内、気管内、または肺内（上記）注射される。また、受容体標的化試薬は、細胞または組織（例えば、腫瘍細胞）に直接送達され得る。受容体標的化試薬が免疫毒性である場合、該方法は、腫瘍細胞もしくは炎症性障害を媒介する免疫細胞を死滅させるため、または例えば、外科的腫瘍切除後の腫瘍床内の任意の残留腫瘍細胞を死滅させるために使用され得る。

40

【0191】

必要とされる投薬量は、投与経路の選択；製剤の性質；患者の疾病の性質；被験体の体格、体重、表面積、年齢、および性別；投与されている他の薬物；ならびに担当医師の判断に依存する。好適な投薬量は、0.0001mg/kg～100mg/kgの範囲である。必要とされる投薬量には、受容体標的化試薬の多様性および種々の投与経路の効率の差異に鑑みると、広範な変動性が予測される。例えば、経口投与には、静脈内注射による投与よりも高い投薬量が必要とされ得る。このような投薬量レベルの変動性は、最適化（当該技術分野で充分理解されている）のための標準的で経験的な常套手段を用いて調整され得る。

【0192】

50

投与は、単回または反復（例えば、2回、3回、4回、6回、8回、10回、20回、50回、100回またはそれ以上）であり得る。適当な送達媒体（例えば、ポリマー微粒子または埋入可能なデバイス）内への受容体標的化試薬のカプセル封入により、送達、特に経口送達の効率が増大し得る。

【0193】

あるいはまた、受容体標的化試薬をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドは、哺乳動物の適切な細胞に送達され得る。コード配列の発現は、被験体の体内の任意の細胞に指向され得る。しかしながら、発現は、好ましくは標的細胞自体に、場合によっては、バリアビリティの低減が所望される細胞近傍に指向される。これは、例えば、当該技術分野で知られた生分解性ポリマー微粒子またはマイクロカプセル剤送達デバイスの使用によって行われ得る。核酸の取込みを行なうための別の様式は、標準的な方法によって作製されるリボソームの使用である。ベクターは、このような送達媒体内に単独で組み込んでもよく、組織特異的または腫瘍特異的抗体と一緒に組み込んでもよい。あるいはまた、静電気力または共有結合力によってポリ-L-リジンに結合されたプラスミドまたは他のベクターで構成された分子コンジュゲートを作製してもよい。ポリ-L-リジンは、標的細胞上の受容体に結合し得るリガンドに結合する（Cristianoら（1995），J. Mol. Med. 73:479（その開示は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる））。あるいはまた、組織特異的標的化が、当該技術分野で知られた組織特異的転写調節エレメント（TRE）の使用によって行なわれ得る。筋肉内、皮内または皮下部位への「裸のDNA」（すなわち、送達媒体なし）の送達は、インビボ発現を行なうための別の手段である。

【0194】

ポリヌクレオチドは、薬学的に許容され得る担体にて投与され得る。薬学的に許容され得る担体は、ヒトへの投与に適した生物学的に適合性のビヒクルであり、例えば、生理食塩水またはリボソームである。治療有効量は、処置被験体において医学的に望ましい結果（例えば、癌細胞の増殖の低減）がもたらされ得る該ポリヌクレオチドの量である。医療分野でよく知られているように、任意の一患者に対する投薬量は、多くの要素、例えば、患者の体格、体表面積、年齢、投与される具体的な化合物、性別、投与の期間および経路、一般健康状態、ならびに併用投与されている他の薬物に依存する。投薬量は種々であるが、ポリヌクレオチド投与の好ましい投薬量は、ほぼ 10^6 ～ほぼ 10^{12} コピーの該ポリヌクレオチド分子である。この用量は、必要に応じて反復して投与され得る。スケジュールおよび共投与は、本明細書に記載の任意のものであり得る。（例えば、「処置方法」を参照）。

【0195】

一部の実施形態において、該インビボ方法は、被験体が癌または炎症性障害を有するかどうかを調べる工程を含むものであり得る。被験体が癌または炎症性障害を有する（または有すると判定された）場合、該方法は、被験体の癌の1つ以上の細胞または被験体の炎症状態を媒介する1つ以上の免疫細胞がEGFR、IL13RまたはIL4Rを発現しているかどうかを調べる工程を含むものであり得る。EGFR、IL13RまたはIL4Rの発現を調べるための方法は、上記に記載している。

【0196】

免疫毒性受容体標的化試薬またはその医薬組成物は、一部の実施形態において、被験体に、例えば、免疫毒性療法と関連する1つ以上の副作用の数または重症度を低減するために、被験体に非免疫毒性受容体標的化試薬を投与した後に投与され得る（下記参照）。

【0197】

また、任意の受容体標的化試薬は、場合によっては、1つ以上のさらなる治療剤または治療用薬剤（化学療法剤など）とともに共投与され得る。共投与のための方法、ならびに本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬とともに共投与され得る例示的なさらなる治療法および治療用薬剤は、以下に詳述する。

【0198】

被験体に送達される受容体標的化試薬が検出可能に標識されている場合、該インビボ方法は、細胞、例えば、EGFR、IL13RまたはIL4Rを発現している細胞の存在を検出するために使用され得る。すなわち、検出可能に標識された任意の本明細書に記載の受容体標的化試薬は、例えば、手術をガイドするため、または疾患を検出するためのプローブとして使用され得る。例えば、癌細胞（例えば、原発腫瘍または微視的転移）を含むことが疑われる領域が、該細胞に結合し得る（EGFR、IL13RまたはIL4Rによって）受容体標的化試薬に曝露され得る。したがって、受容体標的化試薬が結合する癌細胞はすべて、非癌細胞から分化したものであり、癌の処置（例えば、癌の外科的除去または標的化化学療法）を補助するものであり得る。別の例において、本明細書に記載の受容体標的化試薬によって検出可能に標識された細胞は、非標識細胞から単離され得る。例えば、特定の型または集団の細胞（例えば、B細胞もしくはT細胞集団（例えば、炎症性障害を媒介するB細胞もしくはT細胞集団）または幹細胞集団）が検出され、検出可能に標識されていない細胞から単離され得る。また、検出可能に標識された細胞をインビボで可視化し、例えば、その位置を調べてもよい。受容体標的化試薬を検出するインビボ方法は、もちろん、検出可能な標識の性質に依存し、例えば、生物発光画像法、マイクロ陽電子断層撮影法／単光子放射型コンピュータ断層撮影法、磁気共鳴画像法、および生体顕微鏡検査（例えば、Dustin（2003）Arthritis Res. Ther. 5: 165-171（その開示は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）が挙げられ得る。

10

【0199】

20

適当なインビボ方法（例えば、本明細書に記載の受容体標的化試薬を用いる処置方法）のさらなる説明は、「処置方法」を見るとよい。

【0200】

受容体標的化試薬を細胞に結合させるためのエキソビボ法

エキソビボストラテジーは、処置対象の被験体（または別の被験体）から採取した細胞を、例えば、標的細胞に結合し得る、または標的細胞を死滅させ得る受容体標的化試薬（例えば、免疫毒性受容体標的化試薬）をコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトまたは形質導入することを伴うものであり得る。トランスフェクトまたは形質導入した細胞を、次いで、被験体に投与する。細胞は、広範な型の任意のもの、例えば限定されないが、造血細胞（例えば、骨髄細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、T細胞、もしくはB細胞）、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、または筋肉細胞であり得る。かかる細胞は、被験体内で生存している限り、受容体標的化試薬の供給源としての機能を果たす。あるいはまた、腫瘍細胞または炎症細胞（例えば、免疫細胞）（好ましくは、被験体から採取したもの（自己）であるが、場合によっては該被験体以外の同じ種の被験体から採取したもの（同種異系））は、受容体標的化試薬をコードするベクターによってトランスフェクトまたは形質転換させ得る。次いで、腫瘍細胞（好ましくは、増殖能を消去する薬剤（例えば、イオン化照射）で処理したものを）、被験体に導入すると、該細胞は受容体標的化試薬を分泌する。

30

【0201】

該エキソビボ方法は、細胞を被験体から採取する工程、該細胞を培養する工程、該細胞を発現ベクターで形質導入する工程、および該細胞を受容体標的化試薬の発現に適した条件下に維持する工程を含む。このような方法は、分子生物学の分野で知られている。形質導入工程は、エキソビボ遺伝子療法に使用されている任意の標準的な手段、例えば、リン酸カルシウム、リポフェクション、エレクトロポレーション、ウイルス感染、および微粒子銃遺伝子導入（上記も参照）によって行なわれる。あるいはまた、リボソームまたはポリマー微粒子が使用され得る。成功裡に形質導入された細胞は、例えば、コード配列または薬物耐性遺伝子の発現に関して選択され得る。次いで、細胞は、致死線量が照射され（所望により）、同じまたは別の被験体に注射または移植され得る。

40

【0202】

一部の実施形態において、該エキソビボ方法は、細胞混合物から、ある細胞集団を一掃

50

するために使用され得る。例えば、癌（例えば、本明細書に記載した任意の癌）を有する被験体から採取した細胞混合物（例えば、骨髄または任意の他の幹細胞集団）から、その中の任意の癌細胞が一掃され得る。細胞混合物は、本明細書に記載の免疫毒性受容体標的化試薬と接触させると、混合物中の癌細胞が死滅され得る。癌細胞の死滅後、細胞混合物は、例えば被験体を化学療法剤で処置した後、該被験体に戻され得る。

【0203】

免疫毒性療法のための被験体のプレコンディショニング方法

また、免疫毒性療法のための被験体のプレコンディショニングのためのインビボおよびエキソビボ方法を取り上げて記載する。付随の実施例に示すように、哺乳動物に免疫毒素を投与する前に、該哺乳動物に非免疫毒性受容体標的化試薬を投与することにより、免疫毒素と関連する毒性副作用が有意に低減された。したがって、本明細書に記載の方法は、免疫毒性療法と関連する1つ以上（例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、または8つ以上）の副作用の数および／または重症度の低減に有用である。

【0204】

本明細書で用いる場合、「免疫毒素」は、薬剤を対象の標的細胞（例えば、癌細胞または炎症性障害を媒介する免疫細胞）に指向する少なくとも1つの標的化ドメインと、標的細胞の増殖を抑止する（または該細胞を死滅させる）少なくとも1つの毒性ドメインとを含む任意の免疫毒性薬剤をいう。免疫毒素としては、本明細書に記載の免疫毒性受容体標的化試薬が挙げられ得る。

【0205】

本明細書で用いる場合、「非免疫毒性受容体標的化試薬」は、毒性ドメイン（例えば、本明細書に記載の任意の毒性ドメイン）を含まない受容体標的化試薬である。したがって、本明細書で用いる場合、非免疫毒性受容体標的化試薬は、薬剤を対象の標的細胞（例えば、癌細胞または炎症性障害を媒介する免疫細胞）に指向する1つ以上の標的化ドメインを含むが毒性ドメインを含まない受容体標的化剤である。このような受容体標的化剤は、本明細書において、本質的に1つ以上のかかる標的化ドメインからなると記載している場合がある。例えば、非免疫毒性受容体標的化試薬は、本質的に：（a）上皮成長因子受容体（EGFR）結合剤と、（b）IL-13受容体（IL13R）結合剤またはIL-4受容体（IL4R）結合剤からなり、該（a）が（b）に結合されているものであり得る。しかしながら、本質的に1つ以上の標的化ドメインからなる受容体標的化試薬には毒性ドメイン以外の成分、例えば限定されないが、リンカー、検出可能な標識、または翻訳後修飾（例えば、リン酸化もしくはグリコシル化など）（上記参照）などが含まれていてもよいことは理解されよう。

【0206】

免疫毒性療法と関連する副作用は、例えば、免疫毒素（受容体標的化試薬の毒性ドメイン）の性質、その処置を受ける被験体の一般健康状態、免疫毒素の投薬量および／または免疫毒素が被験体に投与される期間に応じて種々である。副作用としては、例えば、筋肉への影響（例えば、眼瞼下垂、舌の麻痺、もしくは嚥下困難）、呼吸困難、体重減少、肝毒性、低アルブミン血症、毛細管漏出症候群、筋肉痛、または前記のもののいずれかの1つ以上の組合せが挙げられ得る。場合によっては、免疫毒性療法により、被験体において極端な毒性（ほとんど致命的な毒性）がもたらされることがあり得る。

【0207】

免疫毒性療法のための被験体のプレコンディショニングのためのインビボ方法

免疫毒性療法（免疫毒性療法と関連する1つ以上の副作用を低減するための方法）のための被験体のプレコンディショニングのためのインビボ方法は、被験体に免疫毒素を送達する前に、該被験体に、免疫毒素と同じ標的に結合するが毒性ドメインを含まない（すなわち、免疫毒性でない）非免疫毒性試薬を送達する工程を含む。

【0208】

免疫毒素（例えば、免疫毒性受容体標的化試薬）は、任意のさまざまな標的被検物質に

特異的に結合するものであり得る。例えば、免疫毒素は、任意の数の細胞表面分子（受容体（例えば、EGFR、インターロイキン受容体（例えば、インターロイキン1～30のいずれか1つに対する受容体（IL13RもしくはIL4R））など）、接着分子（例えば、インテグリン、アドヘシン、コヒーシン、もしくはカドヘリン）、または細胞特異的マーカー（例えば、免疫障害もしくは種々の癌を媒介するB細胞もしくはT細胞に対する細胞特異的マーカー））に結合するものであり得る。免疫毒素は、単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性もしくは三重特異性）の免疫毒素であり得る。例えば、免疫毒素は、上皮成長因子受容体（EGFR）結合剤、IL-13受容体（IL13R）結合剤、またはIL-4受容体（IL4R）結合剤を含むものであり得る。免疫毒素は、例えば、（a）上皮成長因子受容体（EGFR）結合剤を含む第1の標的化ドメイン；および（b）IL-13受容体（IL13R）結合剤またはIL-4受容体（IL4R）結合剤を含む第2の標的化ドメインを含むものであり得る。

【0209】

免疫毒素は、本明細書に記載の任意の毒性ドメインの1つ以上を含むものであり得る。例えば、免疫毒素は、上記の放射性核種、毒性の小分子、毒性ポリペプチド（例えば、ジフテリア毒素またはシュードモナス毒素A）の1つ以上を含むものであり得る。

【0210】

免疫毒性療法のための被験体のプレコンディショニング方法における使用のためのさらなる免疫毒素は、例えば、米国特許公開公報第20020048550号および米国特許第7,101,542号（各々の開示は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0211】

一般的に、免疫毒素と非免疫毒性試薬は、標的と結合価に関して同じ特異性を有する。例えば、免疫毒素が単一特異性である（例えば、EGFR結合ドメインを含む）場合、非免疫毒性試薬もまた単一特異性（例えば、EGFR結合ドメインを含むもの）であり得る。免疫毒素が多重特異性（例えば、二重特異性）である場合、非免疫毒性試薬もまた多重特異性であり得る。すなわち、多重特異性免疫毒素が標的Aと標的Bに結合するものである場合、非免疫毒性試薬も標的Aと標的Bに結合するものであり得る。しかしながら、非免疫毒性試薬は単一特異性であってもよい。例えば、多重特異性免疫毒素が標的Aと標的Bに結合するものである場合、非免疫毒性試薬は標的Aまたは標的Bに結合するものであり得る。

【0212】

免疫毒素が多重特異性であり、非免疫毒性試薬が単一特異性である実施形態では、1種類より多くの単一特異性の非免疫毒性試薬が免疫毒素の前に投与され得る。例えば、標的Aに特異的な単一特異性の非免疫毒性試薬と標的Bに特異的な単一特異性の非免疫毒性試薬の混合物が被験体に、標的Aと標的Bに特異的な多重特異性免疫毒素を投与する前に投与され得る。

【0213】

免疫毒素と非免疫毒性試薬は、毒性ドメインの存在のみが異なるものであり得るが、それ以外の点では同一であり得る。例えば、免疫毒素は、EGFR結合ドメインとジフテリア毒素からなるものであり得、非免疫毒性試薬はEGFR結合ドメインからなるものであり得る。

【0214】

一部の実施形態において、非免疫毒性試薬は被験体に、免疫毒素を該被験体に投与する前の24時間未満（例えば、22時間未満、20時間未満、16時間未満、15時間未満、12時間未満、11時間未満、10時間未満、9時間未満、8時間未満、6時間未満、5時間未満、3時間未満、2時間未満、90分未満、60分未満、55分未満、50分未満、45分未満、40分未満、35分未満、30分未満、25分未満、20分未満、15分未満、10分未満、9分未満、8分未満、7分未満、6分未満、5分未満、4分未満、3分未満、2分間、または1分未満）の時点に投与され得る。

【0215】

一部の実施形態において、非免疫毒性試薬は被験体に、対応する免疫毒素と同じ時点で（同時に）投与され得る。

【0216】

一部の実施形態において、非免疫毒性試薬は被験体に、単回用量として投与され得る。
一部の実施形態において、非免疫毒性試薬は被験体に、多数回の（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または25回またはそれ以上の）個別用量で投与され得る。

【0217】

一部の実施形態において、免疫毒性療法のための被験体のプレコンディショニングのインビボ方法は、被験体に本明細書に記載の任意の免疫毒性受容体標的化試薬を送達する前に、該被験体に、対応する（例えば、特異性と結合価において）本明細書に記載の非免疫毒性受容体標的化試薬を送達することを含む。例えば、免疫毒性受容体標的化試薬は、（a）上皮成長因子受容体（EGFR）結合剤；（b）IL-13受容体（IL13R）結合剤またはIL-4受容体（IL4R）結合剤、および毒性ドメインを含み；該（a）が（b）に結合されているものであり得、非免疫毒性受容体標的化試薬は、（a）上皮成長因子受容体（EGFR）結合剤と、（b）IL-13受容体（IL13R）結合剤またはIL-4受容体（IL4R）結合剤を含み、該（a）が（b）に結合されており、毒性ドメインを含まないものであり得る。

10

【0218】

また、プレコンディショニングのための任意のインビボ方法は、例えば、被験体が癌もしくは炎症性障害を有するかどうかを調べる工程、または被験体が癌もしくは炎症性障害を有する（または有すると判定された）場合、被験体の癌の1つ以上の細胞もしくは炎症性障害を媒介する1つ以上の免疫細胞が、免疫毒素もしくは非免疫毒性試薬によって標的化される被検物質を発現しているかどうかを調べる工程も含むものであり得る。例えば、免疫毒素（および／または非免疫毒性試薬）がEGFR結合ドメインとIL13R結合ドメインを含むものである場合、EGFRおよび／またはIL13Rの発現（例えば、mRNAまたはタンパク質の発現）が上記のようにして測定され得る。

20

【0219】

あるいはまた、該プレコンディショニングのためのインビボ方法は、1種類以上の標的化被検物質が、被験体の癌の1つ以上の細胞または炎症性障害を媒介する1つ以上の免疫細胞上に存在しているかどうかを調べる工程を含むものであり得る。例えば、1種類以上の特異的受容体（例えば、EGFR、IL13RまたはIL4R）の存在が決定され得ると、次いで、適切な免疫毒素および対応する非免疫毒性試薬（1種または複数種）が選択および／または被験体に投与され得る。

30

【0220】

該インビボ方法は、免疫毒性療法の1つ以上の副作用の数または重症度が低減されたかどうかを調べる工程も含むものであり得る。かかる副作用は、上記に記載しており、該副作用の数または重症度の評価方法は医療分野で知られている。

【0221】

上記のように、免疫毒性療法（すなわち、免疫毒性療法の1つ以上の副作用の低減）のための被験体のプレコンディショニングは、処置対象の被験体（または別の被験体）から採取した細胞を、受容体標的化試薬（例えば、毒性ドメインを含まない受容体標的化試薬）をコードし、例えば、免疫毒性療法のための被験体のプレコンディショニングがなされ得るポリヌクレオチドでトランスフェクトまたは形質導入するエキソビボ手法を伴うことがあり得る。

40

【0222】

免疫毒性療法のための被験体のプレコンディショニングのための適当なインビボ方法（例えば、投薬、併用療法など）のさらなる説明は、「処置方法」を見るとよい。

【0223】

50

受容体標的化試薬を含む治療剤により治療可能な疾患

本明細書に記載の受容体標的化試薬（例えば、免疫毒性受容体標的化試薬）は、さまざまな増殖性障害および／または炎症性障害を処置するために使用され得る。増殖性障害としては、例えば、癌、特定の免疫障害（炎症性障害、または疣など）が挙げられる。1種類以上の受容体標的化試薬の投与によって処置（または場合によっては予防）され得る具体的な障害の一例を、以下のセクションに概説する。

【0224】

癌

癌は、制御不能な細胞分裂と、浸潤による隣接組織内への直接増殖または転移による遠隔部位への移植（癌細胞が血流もしくはリンパ系によって輸送される場合）のいずれかによるその播種能とを特徴とする疾患または障害の一類型である。癌はあらゆる年齢の人が罹患し得るが、そのリスクは、年齢とともに増大する傾向にある。癌の型としては、例えば、肺癌、乳癌、結腸癌、膵臓癌、腎臓癌、胃癌、肝臓癌、骨癌、血液の癌、神経組織の癌（例えば、多形性膠芽腫などの膠芽細胞腫）、黒色腫、甲状腺癌、卵巣癌、精巣癌、前立腺癌、頸部癌、腔癌、または膀胱癌が挙げられ得る。

【0225】

本明細書で用いる場合、「癌が発生するリスクのある」被験体は、癌の発生に対する素因、すなわち、癌の発生に対する遺伝的素因（腫瘍抑制遺伝子における変異（例えば、BRCA1、p53、RB、もしくはAPCにおける変異）など）を有する被験体、または癌が生じ得る条件に曝露されたことがある被験体である。したがって、変異原性または発癌性レベルの特定の化合物（例えば、アクロレインなどの煙草の煙に含まれる発癌性化合物、ヒ素、ベンゼン、ベンズアントラセン、ベンゾピレン、ポロニウム-210（ラドン）、ウレタン、または塩化ビニル）に曝露された場合も、被験体は「癌が発生するリスクのある」被験体であり得る。さらに、被験体は、例えば、大量の紫外光もしくはX-照射に曝露された場合、または腫瘍発生性／関連ウイルス（パピローマウイルス、エプスタイン・バーウイルス、B型肝炎ウイルス、もしくはヒトT細胞白血病-リンパ腫ウイルスなど）に曝露された（例えば、感染した）場合、「癌が発生するリスクのある」被験体であり得る。上記のことから、「癌が発生するリスクのある」被験体は、対象の種内のすべての被験体ではないことは明白である。

【0226】

被験体「癌を有することが疑われる」は、癌の1つ以上の症状を有する被験体であり得る。癌の症状は当業者には充分わかり、限定されないが、胸のしこり、乳頭の変化、乳房嚢胞、乳房痛、体重減少、虚弱、過大な疲労、摂食障害、食欲減退、慢性咳嗽、息切れ、の悪化、喀血、血尿、血便、吐き気、嘔吐、肝臓転移、肺転移、骨転移、腹部膨満、鼓脹、腹腔内液貯留、腔出血、便秘、腹部膨隆、結腸の穿孔、急性腹膜炎（感染、発熱、疼痛）、痛み、吐血、多汗、発熱、高血圧、貧血、下痢、黄疸、眩暈、寒気、筋痙攣、結腸転移、肺転移、膀胱転移、肝臓転移、骨転移、腎臓転移、および膵臓転移、嚥下困難などが挙げられる。

【0227】

本明細書に記載の1種類以上の受容体標的化試薬の投与に加え、癌は、化学療法剤、イオン化放射線、免疫療法剤、または温熱療法剤（hyperthermotherapy）によっても処置され得る。化学療法剤としては、限定されないが、シスプラチン、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、アドリアマイシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン、マイトマイシン、エトポシド、ベランピル、ポドフィロトキシン、タモキシフェン、タキソール、トランスプラチン、5-フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、およびメトトレキサートが挙げられる。上記のように、これらの任意の非受容体標的化試薬治療剤が、本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬とともに共投与（併用療法レジメンにて投与）され得る（以下の「処置方法」参照）。

【0228】

炎症性障害

「炎症性障害」は、本明細書で用いる場合、1種類以上の物質（例えば、被験体に天然に存在しない物質）が、白血球（例えば、B細胞、T細胞、マクロファージ、単球、または樹状細胞）の作用によって、病理的応答（例えば、病理的免疫応答）を不適切に誘発する過程をいう。したがって、炎症応答に関与するかかる免疫細胞は「炎症細胞」と称される。不適切に誘発された炎症応答は、異物（例えば、抗原、ウイルス、細菌、真菌）が被験体内または被験体上に存在していない場合のものであり得る。不適切に誘発された応答は、炎症細胞によって自己成分（例えば、自己抗原）が標的化される場合のもの（例えば、多発性硬化症などの自己免疫障害）であり得る。また、不適切に誘発された応答は、大きさまたは持続期間が不適切な応答（例えば、アナフィラキシー）であり得る。したがって、不適切に標的化された応答は、微生物感染（例えば、ウイルス、細菌、または真菌）の存在によるものであり得る。炎症性障害の型（例えば、自己免疫疾患）としては、限定されないが、変形性関節症、関節リウマチ（RA）、脊椎関節症、POEMS症候群、クローン病、対宿主性移植片病、多中心性キャスルマン病、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症（MS）、筋ジストロフィー（MD）、インスリン依存性糖尿病（IDDM）、皮膚筋炎、多発性筋炎、炎症性の神経障害（ギラン・バレー症候群など）、血管炎、例えば、ヴェーゲナー肉芽腫症、結節性多発性動脈炎、リウマチ性多発性筋痛、側頭動脈炎、シェーグレン症候群、ベーチェット病、チャグ-ストラウス症候群、または高安症候群が挙げられる。また、炎症性障害には、特定の型のアレルギー、例えば、鼻炎、副鼻腔炎、じんま疹（urticaria/hives）、血管浮腫、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー（例えば、ナッツアレルギー）、薬物アレルギー（例えば、ペニシリン）、昆虫アレルギー（例えば、蜂刺傷に対するアレルギー）、または肥満細胞症などが包含される。また、炎症性障害には、潰瘍性大腸炎および喘息が包含されることがあり得る。

10

20

【0229】

「炎症性障害が発生するリスクのある」被験体は、1つ以上の炎症性障害の家族歴（例えば、1つ以上の炎症性障害に対する遺伝的素因）を有する被験体、または1回以上の炎症誘導性条件に曝露されたことがある被験体をいう。例えば、被験体は、ウイルスまたは細菌のスーパー抗原（限定されないが、ブドウ球菌エンテロトキシン（SE）、化膿性連鎖球菌体外毒素（SPE）、黄色ブドウ球菌毒性ショック症候群毒素（TSST-1）、連鎖球菌マイトジェン体外毒素（SME）および連鎖球菌スーパー抗原（SSA）など）に曝露されたことがある被験体であり得る。上記のことから、「炎症性障害が発生するリスクのある」被験体は、対象の種内のすべての被験体ではないことは明白である。

30

【0230】

「炎症性障害を有することが疑われる」被験体は、炎症性障害の1つ以上の症状を示す被験体である。炎症性障害の症状は当該技術分野でよく知られており、限定されないが、発赤、腫脹（例えば、関節腫脹）、熱をもった（warm to the touch）関節、関節痛、硬直、関節機能の低下、発熱、寒気、疲労、活力低下、頭痛、食欲減退、筋肉硬直、不眠、掻痒、鼻詰まり、くしゃみ、咳、1つ以上の神経性の症状（眩暈、発作または疼痛）が挙げられる。

40

【0231】

1種類以上の本明細書に記載の改変された受容体標的化試薬の投与に加え、炎症性障害は、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）、疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）、生体応答修飾薬、またはコルチコステロイド薬によっても処置され得る。生体応答修飾薬としては、例えば、抗TNF剤（例えば、TNFに特異的な可溶性のTNF受容体または抗体（アダリムマブ、インフリキシマブ、またはエタネルセプトなど））が挙げられる。上記のように、これらの任意の非受容体標的化試薬治療剤が、本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬とともに共投与（併用療法レジメンにて投与）され得る（以下の「処置方法」参照）。

50

【0232】

被験体に適切な治療モダリティを選択するための方法

また、本明細書において、被験体（例えば、ヒト（癌または炎症性障害を有するヒトなど））に適切な治療モダリティを選択するための方法であって、例えば、医療専門家が、癌または炎症性障害などの障害を有する被験体を有効かつ適切に処置するのに有用な方法を提供する。

【0233】

該方法は、被験体の癌の1つ以上の癌細胞、または被験体の炎症性障害を媒介している1つ以上の免疫細胞がIL13RおよびIL4RまたはEGFRを発現している場合、癌または炎症性障害を有する被験体に対する治療用薬剤として、本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬（例えば、本明細書に記載の任意の免疫毒性受容体標的化試薬）を選択する工程を含むものであり得る。また、該方法は、被験体の癌の1つ以上の癌細胞、または被験体の炎症性障害を媒介している1つ以上の免疫細胞がIL13R、EGFRまたはIL4Rを発現しているかどうかを調べる工程も含むものであり得る。細胞がIL13R、IL4R、またはEGFR受容体を発現しているかどうかを調べる方法は、上記に記載している。

【0234】

医療従事者が被験体に対して免疫毒性受容体標的化試薬を含む治療剤を選択する一部の場合において、医療従事者は、非免疫毒性受容体標的化試薬を含む治療剤を選択してもよい。例えば、医療専門家は、非免疫毒性受容体標的化試薬を含む第1の治療剤と、免疫毒性受容体標的化試薬を含む第2の治療剤を選択することがあり得る。医療専門家によっては、2種類の異なる治療剤（例えば、免疫毒性受容体標的化試薬を含む治療剤と、非免疫毒性受容体標的化試薬を含む治療剤）が被験体に対して選択されることがあり得ることは理解されよう。例えば、第1の医療専門家によると、被験体に対して免疫毒性受容体標的化試薬を含む第1の治療剤が選択され得、第2の医療専門家によると、被験体に対して非免疫毒性受容体標的化試薬を含む治療剤が選択され得る。

【0235】

本明細書に記載の方法によると、任意の医療従事者（例えば、医師または看護師）が、EGFR、IL13RまたはIL4Rを発現している1つ以上の癌細胞（または炎症性障害を媒介する免疫細胞）を有すると同定された被験体に対し、適切な治療モダリティを選択することができる。被験体に対する治療剤の選択は、例えば、（i）薬の処方箋を書くこと；（ii）被験体に薬を与えること（だが、必ずしも投与することではない）（例えば、患者が診察室に居るときに、患者に処方薬のサンプルを手渡すこと）；（iii）患者に対する提案もしくは推奨治療モダリティ（例えば、本明細書に記載の免疫毒性受容体標的化試薬）の連絡（口頭、書面（処方箋以外）、または電子的手段（eメール、安全なサイトへの書込み））；または（iv）被験体に対する適当な治療モダリティの特定および例えば患者記録による他の医療関係者に対する情報普及であり得る。後者の（iv）は、例えば、1種類より多くの治療用薬剤が医療従事者によって患者に投与される場合に有用であり得る。電子的手段の連絡は、例えば、コンピュータまたは他の電子媒体（DVD、CD、もしくはフロッピー（登録商標）ディスクなど）に格納されたもの、あるいは書面（例えば、印刷）形態であり得ることは理解されよう。

【0236】

被験体に対して適切な治療モダリティが選択された後、医療従事者（例えば、医師または看護師）により、該適切な治療モダリティ（例えば、本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬）が該被験体に投与され得る。哺乳動物への受容体標的化試薬（例えば、免疫毒性受容体標的化試薬）の投与方法を、以下および付随の実施例に記載する。

【0237】

処置方法

本明細書に記載の受容体標的化試薬またはその医薬組成物の投与は、全身または局所であり得る。上記のように、医薬組成物は、非経口および／または非経口投与に適するよう

に製剤化され得る。具体的な投与モダリティとしては、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮、髄腔内、経口、経直腸、口腔内、経表面、経鼻、眼内、関節内、動脈内、クモ膜下、気管支内、リンパ経由、経膈、および子宮内投与が挙げられる。

【0238】

投与は、医薬組成物のボーラスの定期的な注射によるものであってもよく、外部（例えば、IVバッグ）または内部（例えば、生体腐食性埋入物、バイオ人工器官、もしくは受容体標的化試薬産生細胞のコロニーの移植）の貯蔵部からの静脈内または腹腔内投与による中断なしのまたは連続的なものであってもよい。例えば、米国特許第4,407,957号、同第5,798,113号、および同第5,800,828号（各々は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。医薬組成物の投与は、適当な送達手段、例えば、ポンプ（例えば、Annals of Pharmacotherapy, 27:912 (1993); Cancer, 41:1270 (1993); Cancer Research, 44:1698 (1984)（引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照）；マイクロカプセル封入（例えば、米国特許第4,352,883号；同第4,353,888号；および同第5,084,350号（引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照）；連続放出ポリマー埋入物（例えば、Sabel, 米国特許第4,883,666号（引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照）；マイクロカプセル封入（例えば、米国特許第5,284,761号、同第5,158,881号、同第4,976,859号および同第4,968,733号およびPCT特許出願公開公報WO92/19195、WO95/05452（各々の開示は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる））；皮下、静脈内、動脈内、筋肉内いずれか、もしくは他の適当な部位への注射；またはカプセル剤、液剤、錠剤、丸剤、もしくは持続性放出製剤での経口投与などを用いて行なわれ得る。

【0239】

医薬組成物の治療有効量は、それを必要とする被験体に、当業者によって確認可能な投薬量レジメンで投与され得る。例えば、該組成物は被験体に、例えば、 $0.001\mu\text{g}/\text{kg}\sim 10,000\mu\text{g}/\text{kg}$ 被験体体重/投与の投薬量で全身投与され得る。別の例では、投薬量は $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 100\mu\text{g}/\text{kg}$ 被験体体重/投与である。別の例では、投薬量は $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 30\mu\text{g}/\text{kg}$ 被験体体重/投与、例えば、 $3\mu\text{g}/\text{kg}\sim 10\mu\text{g}/\text{kg}$ 被験体体重/投与である。

【0240】

治療有効性を最適化するため、受容体標的化試薬（例えば、免疫毒性受容体標的化試薬）は、最初は種々の投与レジメンで投与され得る。単位用量およびレジメンは、例えば、哺乳動物の種、その免疫状態、哺乳動物の体重などの要素に依存する。典型的には、組織中の受容体標的化試薬のレベルは、例えば、所与の処置レジメンの有効性を調べるために、臨床試験手順の一部として、適切なスクリーニングアッセイを用いてモニターされ得る。

【0241】

受容体標的化試薬の投与頻度は、医療従事者（例えば、医師または看護師）の技能と臨床判断の範囲である。典型的には、投与レジメン（regime）は、最適な投与パラメータが確立され得る臨床試験によって確立される。しかしながら、医療従事者によっては、被験体の年齢、健康、体重、性別および医学的状态に応じて、かかる投与レジメンが変更されることがあり得る。投与頻度は、処置が予防用であるか治療用であるかによって異なり得る。

【0242】

かかる受容体標的化試薬（例えば、免疫毒性受容体標的化試薬）またはその医薬組成物の毒性と治療有効性は、既知の製薬手順によって、例えば細胞培養物または実験動物において測定され得る。このような手順は、例えば、LD₅₀（集団の50%に対して致死性の用量）およびED₅₀（集団の50%において治療上有効な用量）を調べるために使用され得る。毒性効果と治療効果の用量比は治療指数であり、これは、LD₅₀/ED₅₀

比で表示され得る。高い治療指数を示す医薬組成物が好ましい。毒性の副作用を示す医薬組成物を使用してもよいが、正常細胞（例えば、非標的細胞）に対する損傷の可能性を最小限にし、それにより副作用が低減されるように、かかる化合物を罹患組織部位に標的化させる送達系の設計には注意すべきである。

【0243】

細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータは、適切な被験体（例えば、ヒト患者）における使用のための投薬量の範囲を設定するために使用され得る。かかる医薬組成物の投薬量は、一般的に毒性がほとんどまたは全くない ED_{50} を含む循環濃度範囲内である。投薬量は、使用される投薬形態および使用される投与経路に応じてこの範囲内で異なり得る。本明細書に記載のようにして（例えば、被験体の増殖性障害の処置のために）使用される医薬組成物では、治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから概算され得る。該用量は、動物モデルにおいて、細胞培養物において決定された IC_{50} （すなわち、症状の最大の半数の抑制が達成される医薬組成物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲が得られるように設定され得る。かかる情報は、ヒトにおける有用な用量を、より厳密に決定するために使用され得る。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。細胞培養物における受容体標的化試薬の IC_{50} の決定方法は、付随の実施例に詳述している。

【0244】

本明細書において定義する場合、受容体標的化試薬の「治療有効量」は、処置被験体において、医療上望ましい結果（例えば、増殖性障害の1つ以上の症状の改善、癌細胞もしくは炎症性障害を媒介する免疫細胞の増殖の低減、または免疫毒性療法と関連する1つ以上の副作用の低減）がもたらされ得る該試薬の量である。受容体標的化試薬の治療有効量（すなわち、有効投薬量）としては、ミリグラム、マイクログラム、ナノグラム、またはピコグラム試薬量／キログラム被験体または試料重量（例えば、約1ナノグラム／キログラム～約500マイクログラム／キログラム、約1マイクログラム／キログラム～約500ミリグラム／キログラム、約100マイクログラム／キログラム～約5ミリグラム／キログラム、もしくは約1マイクログラム／キログラム～約50マイクログラム／キログラム）が挙げられる。

【0245】

被験体は、本明細書に記載の任意の被験体、例えば、ヒトなどの哺乳動物であり得る。

【0246】

本明細書に記載の受容体標的化試薬またはその医薬組成物は被験体に、別の処置剤、例えば、増殖性障害（例えば、癌または炎症性障害）の処置剤との併用療法として投与してもよい。例えば、併用療法は、増殖性障害を有する、または増殖性障害が発生するリスクのある（または増殖性障害を有することが疑われる）被験体に、治療有益性をもたらす該1種類以上のさらなる薬剤を、被験体に（例えば、ヒト患者）に投与することを含むものであり得る。したがって、受容体標的化試薬または医薬組成物と該1種類以上のさらなる薬剤は、同じ時点で投与され得る。あるいはまた、受容体標的化試薬を、第1の時点で投与し、該1種類以上のさらなる薬剤を第2の時点で投与してもよい。該1種類以上のさらなる薬剤を第1の時点で投与し、受容体標的化試薬を第2の時点で投与してもよい。受容体標的化試薬は、以前または現在投与中の治療剤を置換または増強するものであり得る。例えば、受容体標的化試薬での被験体の処置の際、該1種類以上のさらなる薬剤により、中止または低減、例えば、より低いレベルでの投与となり得る。また、以前の治療剤の投与を維持してもよい。場合によっては、以前の治療剤は、受容体標的化試薬のレベル（例えば、投薬量またはスケジュール）が、治療効果がもたらされるのに十分なレベルに達するまで維持され得る。これらの2種類の治療剤は、併用して投与され得る。

【0247】

以前の治療剤が特に毒性である場合では、受容体標的化試薬の投与は、以前の治療剤の量を、同じまたは改善された治療有益性がもたらされるのに充分であるが毒性レベルは同じでないレベルに補正および／または削減するために使用され得ることは認識されよう。

もちろん、医療従事者は、被験体に免疫毒性受容体標的化試薬を投与する前に、該被験体に非免疫毒性受容体標的化試薬を投与してもよい。

【0248】

場合によっては、被験体に本発明の受容体標的化試薬または医薬組成物を投与する場合、最初の治療を中止する。被験体は、第1の予備選択結果、例えば、増殖性障害の1つ以上の症状（例えば、本明細書に記載の任意のもの）（例えば、上記参照）の改善についてモニターされ得る。場合によっては、第1の予備選択結果が観察された場合、受容体標的化試薬での処置は軽減または中止される。次いで、被験体は、受容体標的化試薬での処置中止後の第2の予備選択結果、例えば、増殖性障害の症状の悪化についてモニターされ得る。第2の予備選択結果が観察された場合、被験体に対する受容体標的化試薬の投与が再開もしくは増強され得、あるいは最初の治療剤の投与が再開されるか、または、被験体に受容体標的化試薬と最初の治療剤の両方が投与されるか、または受容体標的化試薬の量と最初の治療レジメンが増強される。

10

【0249】

また、受容体標的化試薬は、疾患（例えば、増殖性障害）の1つ以上の症状に対する処置剤とともに投与してもよい。例えば、受容体標的化試薬は、例えば鎮痛剤とともに共投与され得る（例えば、同じ時点で、または上記の任意の併用レジメンによって）。

【0250】

このセクションに記載の処置方法により、上記のインビボ方法（適用可能な場合）が増強されることは理解されよう。

20

【0251】

キットおよび物品

また、本明細書において、1種類以上の本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬と、任意選択で、該1種類以上の受容体標的化試薬を被験体（例えば、ヒトまたは本明細書に記載の任意の被験体）に投与するための使用説明書が内包されたキットを提供する。被験体は、癌もしくは炎症性障害を有する、または癌もしくは炎症性障害を有することが疑われる被験体であり得る。また、キットは、任意選択で、1種類以上の薬学的に許容され得る担体または希釈剤も含むものであり得る。

【0252】

また、EGFR、IL4Rおよび／またはIL13Rの発現を検出するのに有用なキットを取り上げて記載する。キットは、IL13R、IL4R、またはEGFRの発現を検出するための1種類以上の試薬；およびIL13R、IL4R、またはEGFRの発現が検出された場合、本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬（例えば、本明細書に記載の免疫毒性受容体標的化試薬）を投与するための使用説明書を内包するものであり得る。

30

【0253】

キットは、任意選択で、例えば、EGFR、IL4RまたはIL13RのmRNAまたはタンパク質を含むことがわかっている対照試料（陽性対照）、含まないことがわかっている対照試料（陰性対照）を含んでいてもよい。一部の実施形態において、キットは、試料（例えば、細胞試料）を処理するための1種類以上の試薬を含むものであり得る。例えば、キットは、試料からmRNAまたはタンパク質を単離するための試薬、および／または単離したmRNAを増幅させるための試薬（例えば、逆転写酵素、逆転写もしくはPCR増幅のためのプライマー、またはdNTP）、および／またはタンパク質発現（例えば、EGFR、IL13RもしくはIL4Rに特異的な1種類以上の抗体）を検出するための試薬を含むものであり得る。

40

【0254】

また、本開示は、容器、および該容器に内包された組成物を内包する物品を提供する。該組成物は、哺乳動物の癌（または炎症性障害）を処置するための活性剤である。該組成物中の活性剤は、本明細書に記載の任意の免疫毒性受容体標的化試薬を含むもの、あるいは該試薬からなるものであり得、容器は、該組成物が哺乳動物の癌（または炎症性障害）の処置における使用のためのものであることを示すラベルを有していてもよい。該ラベル

50

は、さらに、哺乳動物の癌の1つ以上の癌細胞（または1つ以上の炎症性障害を媒介する免疫細胞）がIL13R、IL4R、またはEGFRを発現している場合、該組成物が該哺乳動物に投与されることを示すものであり得る。また、物品には、該組成物（例えば、再水和型組成物）を哺乳動物に投与するための使用説明書が内包されていてもよい。

【0255】

一部の実施形態において、該組成物は、乾燥状態または凍結乾燥状態であり得る。該組成物は、再水和またはさらなる製剤化の必要なく投与の準備ができたものであり得る。

【0256】

以下の実施例は本発明の例示を意図するものであり、限定を意図するものではない。

【実施例】

【0257】

実施例

実施例1. 材料および方法

DTEGF13の構築。二重特異性単鎖免疫毒素（BIT）DTEGF13をコードするハイブリッド遺伝子の合成およびアセンブリは、DNAシャッフリングおよびDNAクローニング手法を用いて行なった。完全にアセンブリされた融合構築物は（5'末端から3'末端に）、NcoI制限酵素部位、ATG転写開始コドン、ジフテリア毒素（DT）分子の最初の389アミノ酸をコードするヌクレオチド配列（本明細書においてDT₃₉₀と称する）、7アミノ酸EASGGPE（配列番号14）リンカーをコードするヌクレオチド配列、ヒト上皮成長因子（EGF）をコードするヌクレオチド配列、ヒト筋肉アルドラーゼ（hma）の20アミノ酸セグメント（PSGQAAGAAASESLFVSNHAY（配列番号13））をコードするヌクレオチド配列、インターロイキン13（IL13）をコードするヌクレオチド配列、およびXhoI制限部位からなるものであった。得られた1,755塩基対（bp）のNcoI/XhoIフランキング断片遺伝子を、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）誘導性T7プロモーターの制御下、pET21d発現ベクター内でクローニングした（図1）。DNA配列決定解析（Biomedical Genomics Center, ミネソタ大学）を使用し、クローニングされた遺伝子のヌクレオチド配列が正しく、インフレームであることを確認した。DT₃₉₀とヒトEGF（DTEGF）またはDT₃₉₀とヒトIL13（DTIL13）の単一特異性免疫毒素（MIT）-融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を、同じ手法を用いて構築した。

【0258】

DT₃₉₀断片を含むさらなる二重特異性融合タンパク質を、特異性対照として作製した。DT2222対照は、ヒト抗CD22抗体に特異的な2つの反復sFv分子をDT₃₉₀に接続することにより構築した。

【0259】

DT2219EAの構築。標準的な分子生物学的手法を使用し、DT2219の変異型DT2219EAを構築した。DT2219EA構築物には、NcoI制限部位、続いて下流ATG開始コドンを含む核酸配列、DTの最初の389アミノ酸（DT₃₉₀）、ヒト筋肉アルドラーゼ（hma）の20アミノ酸セグメントによって連結された抗CD22（sFv）と抗CD19のV_H領域とV_L領域をコードする核酸配列、およびXhoI適合性制限部位を含めた。3つのアミノ酸Thr-His-Trp（THW）を、抗CD22-sFvのV_HのCDR3領域の100位、100A位および100B位のSer-Ser-Tyr（SSY）の代わりに使用するとCD22に対する親和性が増強されたため、これらの同じアミノ酸を、pDT2219hmaEA（すなわち親和性増強型（Enhanced Affinity））と称するアセンブリングプラスミドにおいて変異させた。

【0260】

DT2219ARLの構築。DT2219ARLをコードするハイブリッド遺伝子を、アセンブリPCRを用いて構築した。DT2219ARLとDT2219EAの主な2つ

10

20

30

40

50

の違いは、1) V_H 鎖と V_L 鎖の向きが逆。DT2219ARLでは、 V_L を V_H の前にしたこと (proceed) ; ならびに2) 各sFvのVL遺伝子およびVH遺伝子を、ARLリンカー (GSTSGSGKPGSGEGSTKG; 配列番号21) をコードする断片によって連結させ、この2つのsFv遺伝子を、 G_4S リンカーをコードする断片によって連結させたことであった。その最終配置において、DT2219ARL Nc o 1 / X h o 1 遺伝子断片は、開始コドン、続いてDT390である最初の389アミノ酸、続いて7アミノ酸リンカーEASPEEA (配列番号22)、続いて抗CD22 sFv、続いてCD19 sFvをコードした。この最終標的遺伝子を、標準的な分子生物学的手法を使用し、pET21dベクター発現ベクター内にクローニングし、細菌内で発現させた。

10

【0261】

封入体の単離。上記の融合タンパク質をコードする発現プラスミドで、大腸菌株BL21 (DE3) (Novagen, Madison, WI) である細菌を形質転換した。一夜培養後、細菌を2リットル容フラスコ内で、50mg/mlカルベニシリンを含有する800mlのルリアブイヨン (LB) 中、振とうしながら37℃で培養した。8mlの100mMイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (Fisher Biotech, Fair Lawn, NJ) を添加することにより、培養培地がOD₆₀₀ 0.65に達すると、融合タンパク質の発現が誘導された。誘導開始から2時間後、細菌を遠心分離によって回収した。細菌細胞ペレットをバッファー溶液 (50mM Tris、50mM NaCl、および5mM EDTA pH8.0) 中に再懸濁させ、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジナイズした後、細菌ホモジネートを遠心分離に供し、得られたペレットを、0.3%デオキシコール酸ナトリウム (DOC)、5% Triton X-100、10%グリセリン、50mmol/L Tris、50mmol/L NaCl、5mmol/L EDTA (pH8.0) を含有するバッファー中に再懸濁させて洗浄した。

20

【0262】

リフォールディングおよび精製。封入体を20:1 (mg湿潤重量:mL) で、可溶性バッファー (7M塩酸グアニジン、50mM Tris、50mM NaCl、5mM EDTAおよび50mM DTT、pH8.0) 中に溶解させた。37℃で1時間のインキュベーション後、混合物を遠心分離に供し、ペレットを廃棄した。上清みをリフォールディングバッファー (50mM Tris-HCl、50mM NaCl、0.8mM L-アルギニン、20%グリセリン、5mM EDTAおよび1mM GSSG、pH8.0) で20倍に希釈し、4℃で2日間インキュベートした。塩酸グアニジンを溶液から透析 (20mM Tris-HCl (pH9.0) に対して10倍透析) によって除去した。高速タンパク質用液体クロマトグラフィー-イオン交換クロマトグラフィー (Q Sepharose Fast Flow (商標), Sigma, St. Louis, MO) を使用し、0.2~0.5M NaCl含有20mM Tris-HCl (pH9.0) の連続塩勾配にて4カラム容量で、リフォールディングされたタンパク質を精製した。

30

【0263】

細胞培養。ヒト前立腺癌細胞株DU-145およびPC-3、ヒト結腸直腸癌細胞株HT-29、ヒトバーキットリンパ腫細胞株Daudi、およびCalu-3 (ヒト肺腺癌) を、American Type Culture Collection (ATCC, Rockville MD) から入手した。ヒト膠芽細胞腫細胞株U-87およびU-118は、多形性膠芽腫 (GBM) を有する患者由来のものとし、また、ATCCからも入手した。U87細胞とU118細胞はDMEM中で培養したが、その他の細胞株は、10%ウシ胎仔血清、2mmol/L L-グルタミン、100単位/mL ペニシリン、および100 μ g/mL ストレプトマイシンを補給したRPMI-1640培地 (Cambrex, East Rutherford NJ) 中に維持した。癌腫細胞はすべて単層として培養したが、Daudi細胞は、培養フラスコを用いて浮遊培養した。細胞培養物を、37℃の5%CO₂含有加湿雰囲気内でインキュベートした。接着細胞が80~

40

50

90%コンフルエントになったとき、トリプシン-EDTAを使用し（培養皿から細胞を剥離するため）、継代培養した。トリパンブルー排除による測定で>95%のバイアビリティを有する細胞のみ、本明細書に記載の実験（下記参照）に使用した。

【0264】

細胞増殖を測定するためのバイオアッセイ。DU-145、U118、U87-MG、HT-29、Daudi細胞、および以下に記載する他の細胞株に対するDTG F13の効果を調べるため、³H-チミジン取込みを測定する増殖アッセイを使用した。細胞を96ウェル平底プレート内に播種し（10⁴細胞/ウェル）、一晚37℃（5%CO₂）でインキュベートし、細胞を接着させた。種々の濃度の免疫毒素をウェルに3連で添加した。処理した細胞を37℃および5%CO₂で72時間インキュベートした。最後の8時間のインキュベーションでは、[メチル-³H]-チミジン（GE Healthcare, UK）を各ウェルに添加した（1μCi/ウェル）。インキュベーション後、プレートを凍結して細胞を剥離させ、次いで、剥離した細胞をガラス繊維フィルター上に回収し、洗浄し、乾燥させ、標準的なシンチレーション法を用いて計数した。未処理ウェル内のバックグラウンドシンチレーション計数は73, 820±8, 499計数/分（cpm）～104, 372±11, 359cpmの範囲であった。PC-3細胞は³H-チミジンの取込みができなかったため、これらの細胞に対するDTG F13の効果を、³H-ロイシン取込みによって示されるタンパク質合成を測定することにより解析した。³H-ロイシン取込み測定するアッセイは³H-チミジンアッセイと、ロイシン無含有培地中で行なった点、および標識ロイシンとのインキュベーションを8時間ではなく24時間持続させた点のみが異なっていた。これらの各増殖アッセイのデータは、対照計数に対するパーセンテージとして報告した。

【0265】

いくつかの場合において、細胞増殖の阻害を、トリパンブルー排除実験手法によっても調べた。簡単には、免疫毒素（上記）または対照で処理した細胞、未処理細胞を回収し、洗浄し、トリパンブルーで染色し、計数した。免疫毒素を含む培養ウェルで得られた細胞数は、免疫毒素を含まないウェルで得られた細胞数と比べて少なかった。また、対照細胞における細胞死の量と比べると、免疫毒素で処理した細胞では、細胞死の量の増大（すなわち、トリパンブルー陽性細胞数の増加）が観察された。このような結果により、細胞の免疫毒素処理によって細胞の死滅がもたらされることが示された。

【0266】

また、DTG F13の特異性を試験するため、ブロック試験も実施した。簡単には、抗EGFまたは抗IL13（R&D Systems, Minneapolis MN）抗体を、50μg/mlの最終濃度で0.1nM DTG F13含有培地に添加した。得られた混合物を、PC-3またはU87細胞の入ったウェルに添加した。PC-3細胞増殖を、³H-ロイシン取込みによって測定した。マウス白血球特異的抗体Ly 5.2を陰性対照として含めた。

【0267】

放射性標識ITの結合およびインターナリゼーション。DTG F13の結合およびインターナリゼーション効率を測定するため、該タンパク質のアリコート¹¹¹Inで標識した。簡単には、MX-DTPA 1B4Mキレート剤を2.5:1のモル比で該タンパク質に、5mM重炭酸ナトリウム、15mM塩化ナトリウム、および0.5mM EDTA（pH9.2）からなるコンジュゲーションバッファーを用いてコンジュゲートさせた。ほぼ250μgの1B4M-キレート化DTG F13を20μCiの¹¹¹Inで標識し、標識効率は>90%であった。次いで、PC-3細胞（3×10⁵/チューブ）を100μlのRPMI中に懸濁させ、4℃で30分間置いた。次いで、この氷冷RPMI中の100μlの600nM ¹¹¹In標識DTG F13を各チューブに添加し、次いで、インターナリゼーションを抑制するために細胞を4℃で30分間インキュベートした。冷PBSで2回洗浄後、細胞を再懸濁させ、37℃で指定のインキュベーション時間培養した。2つの細胞試料を初期結合タンパク質の計算のために確保した。インキュ

ベーション時間後、細胞をペレット化し、培地を各チューブから吸引した。細胞を500 μ lのPBSで2回洗浄した。各チューブの洗浄液のインキュベーション培地とPBSをすべてプールし、未結合画分として確保した。次いで、PC-3細胞をRPMI (pH 3.0)で2回洗浄し、結合タンパク質を放出させ、培地を結合画分として確保した。また、細胞ペレットも確保し、結合放射能を、インターナリゼーションされたタンパク質として計数した。すべてのチューブ内に存在する放射能を、 Γ カウンター (Perkin-Elmer, Wellesley MA)を用いて計数した。各画分中に存在する初期結合活性のパーセンテージを、各試料について計算した。

【0268】

PC-3側腹部腫瘍に対するDTEGF13のインビボ有効性試験。雄nu/nuマウスを、National Cancer Institute, Frederick Cancer Research and Development Center, Animal Production Area (Frederick, MD)から購入し、Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Careの認可を受けた特定の無菌施設に、Department of Research Animal Resources, ミネソタ大学の管理の下に収容した。動物研究プロトコルは、ミネソタ大学のInstitutional Animal Care and Use Committeeに承認されたものであった。動物はすべてマイクロアイソレーターケージ内に収容し、混入ウイルスによる感染の可能性を最小限にした。

【0269】

側腹部腫瘍試験では、マウスの左側腹部に、 4×10^6 (実験1) または 6×10^6 (実験2) 個のPC-3細胞 (100 μ lのRPMI/マトリゲルの1:1混合物中に懸濁) を注射した。触知可能な腫瘍が形成されたら (第18日)、マウスを群分けし、DTEGF13の反復注射により処置した。ITはすべて、29ゲージ針を有する3/10cc容シリンジを用いて腫瘍内 (i. t.) 注射によって投与した。処置群にはすべて、100 μ l容量の滅菌PBSにて投与した。デジタル式カリパスを用いて腫瘍サイズを測定し、長さ、幅および高さの積として体積を求めた。

【0270】

PC-3側腹部腫瘍に対するDTEGF13のインビボ有効性試験。側腹部腫瘍試験では、雌nu/nuマウスに 6×10^6 個のU87細胞を注射し、腫瘍がほぼ200 mm³のサイズに達したら (約第14日)、マウスを群分けし、DTEGF13、DTEGF、DTIL13、またはDT2222のいずれかで処置した。免疫毒素はすべて、100 μ l容量の滅菌PBSにてi. t. 注射によって投与し、スケジュール (下記参照) どおりに行なった。デジタル式カリパスを用いて腫瘍サイズを測定し、長さ、幅および高さの積として体積を求めた (上記)。動物体重を測定することにより、処置関連毒性をモニターした。

【0271】

化学発光U87側腹部腫瘍に対するDTEGF13の効果。また、U87異種移植片に対するDTEGF13のi. t. 投与の効果を、生物発光画像法を用いて測定した。ホタルシフェラーゼ遺伝子を安定的に発現するU87/Luc細胞は、John Ohlfest博士 (ミネソタ大学) のご好意によりご提供頂いた。U87/Luc細胞は、増殖特性とDTEGF13に対する感受性が親U87細胞と同一であった。異種移植片の初期処理のため、雌ヌードマウスの側腹部に、 6×10^6 個のU87/Luc細胞 (100 μ lのPBS中) を注射した。腫瘍がほぼ75 mm³の体積に達したら (第12日)、2.5 μ gのDTEGF13のi. t. 投与での処置を開始した。マウスはDTEGF13で、第12、14、16、21、24、26、31および33日に処置した。処置したマウスの画像を、第12日 (処置前)、第17および34日に取得し、ルシフェラーゼ活性のレベルをモニターした。画像は、Xenogen Ivis画像法システムを用いて取得し、Living Image 2.5ソフトウェア (Xenogen Corpora

tion, Hopkinton, MA) により解析した。画像形成前、マウスを、 $200\mu\text{l}$ の $8\text{mg}/\text{ml}$ ケタミン、 $1\text{mg}/\text{ml}$ アゼプロマジン、および $0.1\text{mg}/\text{ml}$ ブトルファノールのカクテルの腹腔内投与によって麻酔した。画像形成の10分前、すべてのマウスに、 $100\mu\text{l}$ の $30\text{mg}/\text{ml}$ D-ルシフェリン水溶液 (Gold Biotechnology, St. Louis MO) を与えた。画像はすべて10秒間の曝露時間を表し、すべての関心領域 (ROI) を単位：光子/秒で表示する。

【0272】

MIA PaCa-2 細胞側腹部腫瘍モデル、実験1。 1×10^7 個の MIA PaCa-2 細胞 (DMEM 中) をヌードマウス ($n=20$) の左側腹部に注射することにより側腹部腫瘍を初期処理した。第22日、触知可能な腫瘍を有するマウスを DTG F13 処置群または処置なし群に無作為に分けた。処置マウスには、 $2.5\mu\text{g}$ の DTG F13 ($100\mu\text{l}$ の PBS 中) を i. t. 注射で投与した。合計10回の注射を、グラフ (図17B) に表示の頻度で行なった。

【0273】

MIA PaCa-2 細胞側腹部腫瘍モデル、実験2。細胞注射の1日前、雄ヌードマウスに、X線照射装置を用いて 300rad を照射した。 1×10^7 個の MIA PaCa-2 細胞 (DMEM とマトリゲル (BD Biosciences, San Jose CA) の 1:1 混合物中) を注射することにより、側腹部腫瘍を確立させた。腫瘍がほぼ 50mm^3 に達したら (第18日)、マウスを群分けし ($n=5$ / 群)、処置を開始した。 $2.5\mu\text{g}$ の DTG F13、DTG F、または DTIL13 の4回の腫瘍内注射を1日おき (q. o. d.) に行なった。対照群のマウスには $100\mu\text{l}$ の PBS の腫瘍内注射を行なった。

【0274】

MIA PaCa-2 細胞側腹部腫瘍モデル、実験3。実験3の側腹部腫瘍試験では、ヌードマウスに 1×10^7 個の MIA PaCa-2 細胞 (DMEM とマトリゲルの 1:1 混合物中) を注射した。側腹部腫瘍がほぼ 75mm^3 に達した第15日、マウスを処置群 ($n=6$ / 群) に分けた。処置マウスには、 $2.5\mu\text{g}$ の DTG F13 または B 細胞標的化免疫毒素 DT2222 のいずれかの腫瘍内注射を合計6回行なった。注射は週3回、2週間行なった。

【0275】

統計解析。連続データの群別比較を、スチューデントの t 検定により行なった。生命表のコンパイルおよびログランク検定による統計学的解析のためのコンピュータプログラムを使用し、生存データを解析した。確率 (p) 値 < 0.05 を有意とみなした。

【0276】

実施例2。DTG F13 の構築および精製

NcoI/XhoI 消化後、二重特異性 IT DTG F13 をコードする DNA 断片を、イソプロピル- β -D-チオオガラクトピラノシド (IPTG) 誘導性 T7 プロモーターの制御下、pET21d 発現ベクター内でクローニングした (図1)。また、単一特異性 IT 遺伝子 (DTG F および DTIL13) を含む構築物も合成した。DNA 配列決定解析 (これは、University of Minnesota Microchemical Facilities (ミネソタ大学, Minneapolis, MN) で行なわれた) により、構築物配列が正しいことが確認された。精製 (上記) 後、DTG F は、予測分子量 63.6kDa を有すると測定された。SDS-PAGE によって解析すると、IT はすべて $> 95\%$ 純粋であった。

【0277】

実施例3。DTG F13 が前立腺および膠芽細胞腫細胞を死滅させる能力の測定

DTG F13 が上皮成長因子受容体 (EGFR) - およびインターロイキン13 受容体 (IL13R) - 発現癌腫細胞を死滅させる能力を調べるため、EGFR⁺ および IL13R⁺ 前立腺癌細胞株 PC-3 を DTG F13 で処理し、PC-3 細胞増殖の阻害を細胞増殖アッセイによって測定した。単一特異性 DTIL13 は PC-3 細胞を死滅させ

ることができ、 IC_{50} は 0.038 nM であった（図2A）。単一特異性免疫毒素DT EGFは、PC-3細胞の死滅において有効性がずっと低く、 100 nM において、増殖の阻害はわずか20%であった。しかしながら、二重特異性細胞毒（CT）DT EGF13は、 0.042 pM の IC_{50} を示し、これはDT IL13と比べて905倍高い活性、およびDT EGFと比べて少なくとも710倍高い活性を示す。DT EGF13および単一特異性ITは、EGF13RおよびIL13R陰性細胞株Dauidiに対して最小限細胞増殖阻害を示した（図2B）。

【0278】

また、DT EGF13をEGFR+およびIL13R+膠芽細胞腫細胞株U87 MGに対して試験した。図3に示す通り、単一特異性DT EGFはU87細胞を死滅させることができ、 IC_{50} が 1.2 nM であった。単一特異性DT IL13はあまり有効ではなく、 IC_{50} は 10 nM であった。しかしながら、DT EGF13は 0.015 nM の IC_{50} を示し、これは、DT EGFと比べて80倍高い活性、およびDT IL13と比べて665倍高い活性を示す。DT EGF13は、EGF13R-IL13R-Bリンパ腫細胞株DauidiおよびT細胞白血病細胞株のジャーカットおよびCEMに対して最小限の活性を示した。

【0279】

また、DT₃₉₀のないEGF13タンパク質も、95%より高い純度で合成した（上記参照）。PC-3細胞またはU87細胞に添加した $1,000\text{ nM}$ ものEGF13タンパク質は阻害性ではなく、これは、EGF13部分それ自体は抗癌活性をもたないことを示す。

【0280】

実施例4．抗EGFおよび抗IL13抗体またはEGF13がDT EGF13誘導性死滅をブロックする能力の測定

EGFとIL13がともにPC-3細胞のDT EGF13誘導性死滅に重要であることを確認するため、ブロック実験を行なった。 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ の抗EGFまたは抗IL13抗体を、DT EGF13によるPC-3細胞の死滅をブロックする能力について試験した（図4）。 0.1 nM のDT EGF13に添加すると、両抗体は、抗増殖効果の約70～80%をブロックすることができたが、いずれの抗体も単独で添加すると、DT EGF13誘導性のPC-3死滅は完全にブロックされず、これは、おそらく、単一特異性ブロック剤が一方のリガンドしかブロックできず、他方はブロックされないためである。両抗体によるブロックにより100%ブロックがもたらされた。対照的に、対照抗マウスLy5.2抗体の添加にはブロック効果はなかった。U87 MG細胞を用いると同様の結果が得られた（図2C）。

【0281】

総合すると、これらのデータにより、両方のリガンド（EGFおよびIL13）がDT EGF13分子の活性に重要であることが示された。

【0282】

非免疫毒性形態のDT EGF13受容体標的化試薬が、MiaPaCa-2ヒト膵臓癌細胞のDT EGF13誘導性死滅をインビトロで低減させることができるかどうかを調べるため、ブロック実験を行なった。細胞を種々の濃度のDT EGF13と、 1 nM 、 10 nM 、 100 nM 、もしくは 1000 nM のEGF13の存在下で、または対照としてEGF13なしで接触させた。実験結果により、EGF13（非免疫毒性受容体標的化試薬）はMiaPaCa-2細胞のDT EGF13誘導性死滅の低減に有効であることが示された。

【0283】

実施例5．DT EGF13が前立腺細胞株DU-145および膠芽細胞腫細胞株U118を死滅させる能力の測定

DT EGF13を第2の前立腺癌細胞株DU-145に対して試験した。単一特異性DT IL13は、DU-145細胞に対して低い死滅活性を示し、 100 nM より高いIC

10

20

30

40

50

IC_{50} を有した(図5)。 IC_{50} が0.018 nMである単一特異性免疫毒素DTEGFは、DTIL13よりも有効であった。しかしながら、DTEGFは、100 nMであってもDU-145応答を完全に阻害することができなかった。対照的に、DTEGF13(IC_{50} は0.0021 nM)は、0.1 nMでDU-145応答を完全に阻害した。陰性対照ITであるDT2222は阻害性がかなり低かった。DTEGF13と単一特異性ITでは、LNCaP由来C4-2前立腺癌細胞株と同様の所見が観察された。

【0284】

DTEGF13を、第2の膠芽細胞腫細胞株U118に対して試験した。図6は、U118細胞に対して、単一特異性DTIL13が2 nMの IC_{50} を示したことを示す。単一特異性DTEGFは3 nMの IC_{50} を示した。対照的に、DTEGF13は、U118細胞に対して0.02 nMの IC_{50} を示し、少なくとも100倍高かった。陰性対照ITであるBic3は阻害性が低く、>300 nMの IC_{50} を示した。

【0285】

同様の結果が、PANC-1(DTEGF13 IC_{50} は0.035 nM)、SW-1990(DTEGF13 IC_{50} は0.00013 nM)、およびASPC-1(DTEGF13 IC_{50} は0.052 nM)ヒト膵臓癌細胞株を用いた実験で得られた。

【0286】

総合すると、これらの細胞株データにより、BITが単鎖分子上のEGFリガンドおよびIL13リガンドに結合すると、いずれかの単一特異性ITと比べ、いくつかの異なる前立腺癌細胞株に対する免疫毒性効力が増大することが示された。

【0287】

実施例6. HT-29ヒト結腸直腸癌細胞およびCalu-3ヒト肺腺癌腫細胞に対するDTEGF13の選択的細胞傷害性

HT-29ヒト結腸直腸癌細胞に対するDTEGF13の細胞傷害的有効性を調べるため、細胞をDTEGF13、DTEGF、またはDTIL13で処理し、その増殖に対する免疫毒素の効果を測定した(上記)。DTEGF13は、HT-29ヒト結腸直腸癌細胞株に対して高度に活性であった(図7)。DU-145の場合と同様、DTIL13はDTEGF13よりも有効性が低く、95 nMの IC_{50} を有した。DTEGF13は有効性が高く、 IC_{50} は0.088 nMであった。DTEGF13はいずれかの単一特異性ITよりも活性が高く、 IC_{50} は0.0012 nMであった。この実験では、陰性対照DT2222は、HT-29細胞増殖に対して効果はなかった。

【0288】

また、Calu-3細胞でも、DTEGF13は、DTEGFまたはDTIL13よりも有効であり、0.0018 nMの IC_{50} を示した(図8)。DTEGFは0.09 nMの IC_{50} を示し、DTIL13は3.1 nMの IC_{50} を示した(陰性対照の効果は最小限であった)。

【0289】

総合すると、これらの結果は、DTEGF13が、他の形態の癌腫に対しても、その単量体対応物より有効であることを示す。

【0290】

実施例7. DTEGF13の高活性は単一分子上のEGFおよびIL13リガンドの存在によるものである

DTEGF13の高活性がその2つの異なるリガンドの存在によるものであるのかどうかを調べるため、増殖アッセイを行ない、DTEGF13で処理したHT-29細胞を、単量体のDTEGFとDTIL13の混合物(または個々の各単量体形態)で処理したHT-29細胞と比較した。この単一特異性免疫毒素の混合物は、単鎖DTEGF13上の結合分子の数に相当する結合分子数1:1で含むものであった。DTEGFとDTIL13の混合物は、HT-29細胞に対して、DTEGF単独と同じ細胞毒性(cytotoxic)効果を示した(図9)。対照的に、DTEGF13分子は0.0015 nMの IC_{50} を有し、これは、DTEGFとDTIL13の混合物の IC_{50} よりも307倍強力で

あった。

【0291】

また、U87細胞を用いて同様の実験を行なった。この場合に行なった増殖アッセイでは、DTG F13で処理したU87細胞を、単量体のDTG FとDTIL13の混合物（または個々の各単量体形態）で処理したU87細胞と比較した。この単一特異性免疫毒素の混合物も、単鎖DTG F13上の結合分子の数に相当する結合分子数を1:1で含むものであった。DTG FとDTIL13の混合物は、U87細胞に対してDTG F単独と同じ細胞傷害効果を示した（図10）。対照的に、DTG F13分子は、0.007 nMのIC₅₀を有し、これは、DTG FとDTIL13の混合物のIC₅₀よりも1000倍超強力であった。

10

【0292】

MIPaCa-2ヒト膵臓癌細胞およびH2981-T3ヒト肺癌細胞を用いた実験でも同様の結果が得られた。

【0293】

これらのデータは、DTG F13で観察された高活性は、大部分が、DTG F13中の該2つの異なるリガンドの存在によるものであることを示す。

【0294】

実施例8. DTG F13の結合およびインターナリゼーション

DTG F13の結合およびインターナリゼーションを調べるため、DTG F13を¹²⁵I放射線標識で標識し、PC-3細胞またはU87 MG細胞とともに、0～2時間の種々の時間量インキュベートした。インキュベーション後、各タンパク質の結合画分を優先的に放出させ、細胞に結合されたすべての残留放射能を、DTG F13がインターナリゼーションされた結果とみなした。1時間の間にPC-3細胞に対して結合およびインターナリゼーションされた標識DTG F13の画分の量を図11に示す（同様の結果がU87 MG細胞についても得られた）。DTG F13の結合は、免疫毒素が細胞によってインターナリゼーションされるにつれて減少した。同様の結果が、単量体の免疫毒素分子DTG FとDTIL13でも観察された。

20

【0295】

実施例9. 腫瘍内ヌードマウス側腹部腫瘍モデルにおけるDTG F13

PC-3側腹部腫瘍モデル。DTG F13が腫瘍増殖をインビボで抑止する能力を試験するため、2つの別々の実験において、PC-3細胞をヌードマウスの左側腹部内に注射した。腫瘍が確立されて触知可能になったら、マウスをDTG F13の反復i. t. 注射で処置した。ヒトEGFおよびIL13（DTG F13）は、それぞれ、マウスEGFRおよびIL13Rに結合するため、DTG F13をマウスモデルにおいて試験した。図12Aは、マウス群（n=4～5/群）に対して、第1、3、5、8、10、12、23、25日にDTG F13、DTG F、DTIL13のいずれかのi. t. 注射（2.5 μg/注射）を行なうか、または未処置とした第1の実験の平均腫瘍体積データを示す。DTG F13の反復注射は、未処置対照と比べ、第25日に注射を中止するまで腫瘍増殖の抑制に有意に有効であった。第29日、DTG F13処置マウスにおいて、4匹のうち2匹のマウスで腫瘍が再発生しており4匹のうち2匹のマウスでは検出不能であった。DTG FおよびDTIL13で処置した腫瘍は未処置対照腫瘍と類似した速度で増殖しており、したがって、有意な阻害効果はなかった。

30

40

【0296】

体重減少は、細胞毒（CT）および免疫毒素（IT）試験において毒性の表示として高頻度で使用されている。図12Bは、反復投与後、実験終了時のDTG F13処置に起因する体重減少が処置前の体重の10%を超えていないことを示す。したがって、このDTG F13の投薬量は許容量であった。

【0297】

第2の実験では、確立されたPC-3腫瘍を、第1日～第10日の間で1日おき（q. o. d.）に（計5回の注射）、DTG F13または陰性対照DT2222のi. t.

50

注射で処理した（図13）。腫瘍体積を個々の処置マウスについて示す。DT2222で処理した腫瘍は、処置にかかわらず、継続してサイズが徐々に増大した。対照的に、DEGF13での処理では、5匹中5匹のマウスで腫瘍増殖が抑止され、処理を第10日に停止したことにもかかわらず、第57日においても腫瘍増殖の停止が維持された。DT2222処置マウスとDEGF13処置マウスの腫瘍体積の差は有意であった（ $p < 0.0001$ ）。DEGF13処置マウスでは有意な体重減少はなかった。

【0298】

独立した試験において、反復DEGF13処置を受けた2匹のマウスの腫瘍の写真撮影を、処置後、種々の時点で行なった（図14）。動物には、その腫瘍（約 0.2 cm^3 であった）内に10日間にわたって5回の注射を行なった。マウス1の腫瘍の方が退縮が遅く、早くも第2日にわずかな潰瘍形成の徴候が示された。これは、第28日までに元の腫瘍サイズの約80%に縮小した。第47日までに完全に検出不能となった。マウス2の腫瘍の縮小の方が速かった。腫瘍サイズは第10日までに100%低減された。この腫瘍は20日後に再発した。

【0299】

U87側腹部腫瘍モデル。DEGF13が腫瘍増殖をインビボで抑止する能力をさらに試験するため、U87細胞をヌードマウスの側腹部に注射した。腫瘍が体積約 0.2 cm^3 に達したら、マウスを上記のようなDEGF13の反復i.t.注射で処置した。図15Aは、マウス群（ $n = 5$ /群）に対して、第14、17、20、24、27、31、34および38日に、DEGF13、DEGF、DTIL13またはDT2222のいずれかの注射（ $2.5\text{ }\mu\text{g}$ /注射）を行なった第1の実験の平均腫瘍体積データを示す。DEGF13の反復注射は、DT2222陰性対照と比べ、腫瘍増殖の抑制に有意に有効であった（第27日と第31日で $p < 0.04$ ）。DEGFとDTIL13で処理した腫瘍は、DT2222処理対照腫瘍と類似した速度で増殖し、したがって、有意な阻害効果はなかった。

【0300】

図15Bでは、個々のマウスデータをDEGF13群に対してプロットしている。第38日以降、5つのうち2つの腫瘍が再発し、処置中に増殖した。5つのうち3つの腫瘍は、実験を終了した第62日まで、継続してさらなるDEGF13処置に応答した。

【0301】

DEGF13処置と関連する体重減少は、これらの試験有意な問題ではなく、DEGF13処置投薬量は許容量であった（図15C）。

【0302】

第2の実験では、DEGF13を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を安定的に発現するU87細胞に対して試験した。細胞（U87/luc）は、インビトロでのDEGF13と類似した応答を示した。この細胞を胸腺欠損ヌードマウスの側腹部内に注射した。腫瘍が確立されて触知可能になったら（第12日）、ルシフェラーゼ活性に関する4匹の各マウスの画像を取得した。処置は第12日に開始し、マウスは、第12、14、16、21、24、26、31、および第33日に処置した。3つの応答パターンがみとめられた。パターン1では、マウス1において腫瘍が完全に退縮し、それぞれ、第17日と第34日に3つの画像を取得した。マウス4では、腫瘍増殖が遅かったが腫瘍は退縮しなかった。マウス5では、腫瘍は第17日までに退縮したが、その後、第34日に再度出現した。

【0303】

総合すると、2つの異なる腫瘍モデルを用いたこれらの試験では、DEGF13のヒトEGFおよびIL13がマウスEGFおよびIL13と交差反応性であるモデルにおいて、DEGF13が高度に有効な抗腫瘍剤であることが示された。また、この所見により、該薬剤が前立腺癌および膠芽細胞腫に対する作用において高度に活性であること、ならびに同じ分子上でのEGF部分とIL13部分の両方の位置が、その卓越した抗腫瘍効果に寄与していることが示された。

【0304】

実施例 10. M I A P a C a - 2 膵臓腺癌腫瘍細胞に対する D T E G F 1 3 と E G F 1 3 K D E L の効果

他の毒素部分が E G F 1 3 免疫毒素の D T₃₉₀ として有効に作用し得るかどうかを調べるため、D T₃₉₀ 部分の核酸配列を E G F 1 3 コード配列から除き、シュードモナス体外毒素 A K D E L 配列をコードする核酸配列を E G F 1 3 部分の 3' 末端に、標準的な分子生物学的手法を用いて付加した。M i a P a C a - 2 膵臓腺癌腫瘍細胞を、種々の濃度の D T E G F 1 3 または E G F K D E L のいずれかで 72 時間処理した。72 時間後、³H-チミジン取込みによって細胞増殖を測定し、これを、対照細胞に対するパーセンテージとして報告する (図 16)。E G F 1 3 K D E L 免疫毒素は、0.0000014 nM の I C₅₀ 値を示したのに対し、D T E G F 1 3 は I C₅₀ 値が 0.0022 nM であった。これらのデータは、さらなる毒性ドメインが免疫毒性 E G F 1 3 組成物においてに有効であることを示す。

10

【0305】

実施例 11. M I A P a C a - 2 腫瘍内ヌードマウス側腹部腫瘍モデルにおける D T E G F 1 3

D T E G F 1 3 が膵臓腫瘍増殖をインビボで抑止する能力を試験するため、ヒト M I A P a C a - 2 細胞をヌードマウスの側腹部に異種移植した。腫瘍が確立されて触知可能になったら、マウスを上記の D T E G F 1 3 の反復 i. t. 注射で処置した。図 17 (図 17A および 17B) に示す実験 1 では、D M E M 中に懸濁させた 1×10^7 個の腫瘍細胞を、全身照射 (T B I) に供しなかったマウスの側腹部内に注射した。この方法では、腫瘍確立の割合が不十分であった (注射動物の < 40%)。腫瘍が発生した動物のうち 3 匹には、3 週間の期間で 10 回の D T E G F 1 3 注射という集中的な過程を行なった。この実験では、対照腫瘍増殖は、ほとんどの動物において所望されたよりも遅かった (図 17A)。しかしながら、D T E G F 1 3 処置は、試験期間を通して腫瘍増殖のブロックにおいて有効であった (図 17B)。

20

【0306】

実験 2 では、動物を、 1×10^7 個の M I A P a C a - 2 細胞の注射の 1 日前に、300 R a d (放射線吸収線量) の T B I に曝露した。より良好な腫瘍増殖を促進するため、細胞を、D M E M とマトリゲルの 1:1 混合物にて注射した。T B I とマトリゲルの組合せにより、腫瘍生着率が > 95% に増大した。第 18 日、腫瘍生着後、実験マウスに、2.5 μ g の D T E G F 1 3、D T E G F、または D T I L 1 3 いずれかの 4 回の i. t. 注射を q. o. d. で行ない、一方、対照マウスには、P B S の i. t. 注射を同じスケジュールで行なった。図 17C は、最高度の抗腫瘍有効性が D T E G F 1 3 投与で得られたことを示し、図 17D は、D T E G F 1 3 処置群内の個々の動物の腫瘍体積を示す。各動物は、顕著な腫瘍体積の縮小を示し、腫瘍の 1 つは完全に退縮した。しかしながら、処置関連毒性は、この実験で動物に施した全身照射によって増強された (図 17E)。これまでは充分許容されていた処置レジメンに従ったにもかかわらず、体重減少と死亡例 (3 匹/5 匹の動物) が生じた。

30

【0307】

実験 3 では、非照射マウスの左側腹部に、 1×10^7 個の M I A P a C a - 2 細胞 (D M E M とマトリゲルの 1:1 混合物 100 μ l に懸濁) を皮下注射した。この方法により、T B I に関連する望ましくない副作用が導入されることなく、100% の腫瘍確立が助長された。図 18A は、未処置である (the were untreated) か、または陰性対照 D T 2 2 2 2 で処置したマウス群で観察された腫瘍進行と比べたときの、D T E G F 1 3 の有意な抗腫瘍効果を示す。マウスにおける腫瘍増殖は D T E G F 1 3 処置によって抑止されたが、D T E G F 1 3 処置の中止後、一部において再発が生じた。2.5 μ g の D T E G F 1 3 の 6 回の i. t. 注射の過程は許容され、動物の体重で示される有意な毒性はなかった (図 18B)。

40

【0308】

総合すると、これらの試験は、D T E G F 1 3 のヒト E G F および I L - 1 3 がマウス

50

E G F RおよびI L-13 Rと交差反応性であるモデルにおいて、D T E G F 13が高度に有効な抗腫瘍剤であること、該試薬がヒト膵臓癌に対して高度に有効であること、ならびに同じ分子内に存在するE G F部分とI L-13部分の両方がその卓越した抗腫瘍効果に寄与していることを示す。

【0309】

実施例12. E G F 13の予備投与によりマウスは致死量のD T E G F 13から保護される

D T 390毒性ドメインのないE G F 13ポリペプチドの投与により、マウスが致死量のD T E G F 13から保護され得るかどうかを調べるため、正常マウスにE G F 13（または対照生理食塩水溶液）を腹腔内（i. p.）にて予備投与し、次いで、致死量のD T E G F 13（5 μ g）をi. p.投与した。各動物の体重と生存を13日間にわたってモニターした（図19）。致死量のD T E G F 13の前にE G F 13予備投与を受けなかった対照マウスの80%が体重減少を示し、第3日までに死亡した（図19A）。対照的に、E G F 13の予備投与を受けたマウスはいずれも実質的な体重減少を示さず、これらのマウスはすべて、試験の第13日まで生存していた（図19B）。これらの結果は、E G F 13の予備投与によりマウスがD T E G F 13の致死性負荷刺激から保護されることを示す。

【0310】

E G F 13の予備投与のタイミングが、致死量のD T E G F 13からのマウスの保護効果に重要であるかどうかを調べるため、正常マウスに、E G F 13（または対照タンパク質「2219」）の予備投与を、D T E G F 13の投与の5分前または30分前のいずれかで行なった。「2219」タンパク質は、C D 19タンパク質に特異的なs F v免疫グロブリン断片に結合されたC D 22タンパク質に特異的なs F v免疫グロブリン断片からなるものであった。このタンパク質はE G F受容体またはI L 13受容体を認識することができず、したがって、これらの試験の対照として供した。予備投与により、タイミングに関係なく、動物はすべて保護された。非反応性2219タンパク質が投与された、または予備投与なしの対照マウスはほぼすべてが第5日までに死亡した。対照的に、D T E G F 13投与の5分前または30分前に予備投与を受けたマウスはすべて、試験の第11日まで生存した（図20）。これらの結果は、予備投与のタイミングは、致死量のD T E G F 13からの保護効果に実質的に影響しないことを示す。

【0311】

実施例13. 体循環ポンプを用いたマウスへのD T E G F 13の送達

マウスにおける腫瘍増殖に対する体循環ポンプによるD T E G F 13免疫毒素の送達の有効性を調べるため、 10^7 個のM I A P a c a-2細胞（細胞混合物：マトリゲルが1：1）を、雄ヌードマウスの側腹部に投与した。腫瘍注射後の第11日に、A l z e t 1007D浸透圧ポンプを右肩甲骨（左側腹部腫瘍と反対側）付近に埋入し、マウスに50 μ gのD T E G F 13（またはビヒクル対照）を送達するのに使用した。マウスにおける腫瘍増殖をデジタル式カリバスで測定した。図21Aに示されるように、D T E G F 13の体循環ポンプ送達により、処置なしと比べると、処置マウスにおいて平均腫瘍体積が低減された。処置動物において、体循環ポンプ送達されたD T E G F 13による体重減少はなかった（図21B）。

【0312】

実施例14. ラットU87（膠芽細胞腫）腫瘍モデルにおけるD T E G F 13の有効性

D T E G F 13が膠芽細胞腫増殖をインビボで抑止する能力を試験するため、ヒトU87-l u c細胞（ルシフェラーゼタンパク質をコードする核酸を安定的に発現するU87膠芽細胞腫細胞）を胸腺欠損ヌードラットに頭蓋内注射した。D T E G F 13（計1 μ g）は、腫瘍注射後の第8日と第15日に、U87-l u c腫瘍を有するラット群（N=5）にマイクロインフュージョンポンプによって頭蓋内注射した。プラセボ（リン酸緩衝生理食塩水；P B S）を受けた5匹の対照ラット群（これらはすべて第42日までに死亡した）と比べると、5匹の処置ラットのうち3匹が完全な腫瘍退縮を示した（図22Aおよ

び 2 2 C)。また、D T E G F 1 3 注射後、最小限の体重減少が検出され、これは、該化合物がラットにおいて充分許容されることを示す。D T E G F 1 3 化合物のヒト E G F および I L 1 3 はマウス E G F R および I L 1 3 R に結合し、これは、ラットモデルにおける D T E G F 1 3 のオンターゲット効果を示す。

【0313】

第2の実験では、ヒト U 8 7 - l u c 細胞（ルシフェラーゼタンパク質をコードする核酸を安定的に発現する U 8 7 膠芽細胞腫細胞）を胸腺欠損ヌードラットに頭蓋内注射した。D T E G F 1 3（計 1 μ g）は、腫瘍注射後の第8日と第15日に、U 8 7 - l u c 腫瘍を有するラット群（N=5）にマイクロインフュージョンポンプによって頭蓋内注射した。この場合、D T E G F 1 3 で処置した5匹のラットのうち2匹は完全な腫瘍退縮を示した。最初は退縮を示したが後に再発したラットが1匹いた。D T 2 2 2 2（上記）対照免疫毒素を受けた5匹の対照ラットのうち4匹は、第42日までに死亡した（図 2 2 B および 2 2 C）。

10

【0314】

これらの結果により、D T E G F 1 3 は、ヒト膠芽細胞腫増殖をインビボで抑止することができ、場合によっては、その完全な退縮をもたらし得ることが示された。

【0315】

実施例 1 5．D T E G F 1 3 の最大耐用量の決定および毒性の評価

ラットにおける D T E G F 1 3 の最大耐用量（MTD）を調べるため、正常ラット（n = 3 / 群）に種々の濃度（0.5、1、2、4 および 8 μ g）の D T E G F 1 3 または対照としての P B S を、第0日と第7日に頭蓋内注射した。動物の物理的外観および行動変化を毎日モニターした。生存曲線を図 2 3 に示す。この実験の結果により、ラットにおける D T E G F 1 3 頭蓋内注射の MTD は 1 μ g / 注射であることが示された。

20

【0316】

D T E G F 1 3 化合物がラットモデルにおいて、なんらかの肝臓毒性または腎臓毒性を示すかどうかを調べるため、正常ラット（n = 5 / 群）に 1 μ g の D T E G F 1 3 または対照としての P B S を、第0日と第7日に頭蓋内注射した。例えば、R u s t a m z a d e h ら（2006）I n t . J . C a n c e r 1 2 0 : 4 1 1 - 4 1 9 に記載のようにして、正常ラット（N = 5 / 群）において、D T E G F 1 3 処置に起因する任意の肝臓損傷を、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）レベルを測定することによりモニターし、腎臓損傷を、血中尿素窒素（BUN）レベルを測定することによりモニターした。最後の注射の後、第21日と第14日に各ラットから血液を採取し（顔面静脈）、解析した。ALT（図 2 4 A）または BUN（図 2 4 B）レベルにおいて、対照群と比べたとき、P B S と D T E G F 1 3 処置群間に有意差は観察されず、これは、この用量が腫瘍の処置に有効であっただけでなく、重要な器官系に毒性をもたらさなかったことを示す。

30

【0317】

ヒト被験体における本明細書に記載の任意の受容体標的化試薬の使用のための有効性および／または安全性パラメータの確立において、他の前臨床試験動物（例えば、マウス、ウサギ、モルモット、ブタ、イヌ、ネコ、または非ヒト霊長類）において、および他の投与経路（例えば、全身投与）で、同様の解析が行なわれ得ることは理解されよう。

40

【0318】

実施例 1 6．E G F 4 K D E L が M D A - M B - 2 3 1 ヒト乳癌細胞を死滅させる能力の測定

E G F および I L - 4 を含む二重特異性免疫毒素もまた、腫瘍細胞毒性の増強を示すかどうかを調べるため、E G F、I L - 4、およびシュードモナス体外毒素の生物学的に活性な断片／K D E L 配列（構築物命名法において「K D E L」と称されている）を含む融合タンパク質（E G F 4 K D E L）をコードする核酸（上記の手法を使用；E G F K D E L 分子のアミノ酸配列を配列番号 1 9 に示す）を構築した。E G F 4 K D E L 免疫毒素を、M D A - M B - 2 3 1 ヒト乳癌細胞の死滅における有効性について試験した。該細胞を種々の濃度の E G F 4 K D E L、I L 4 K D E L、および E G F 4 K D E L で処理し、細

50

胞の増殖に対する免疫毒素の効果を測定した（上記のとおり；図25A参照）。EGF4KDELは、乳癌細胞の死滅において高度に有効であり、 1×10^{-7} 未満のIC₅₀を有したのに対し、単一特異性IL4KDEL試薬ではIC₅₀が0.0009および単一特異性EGF4KDEL試薬ではIC₅₀が0.0001であった。同様の結果が、いくつかの他のヒト乳癌細胞株、例えば、MCF-7細胞（IC₅₀は0.004nM）、SKBR3細胞（IC₅₀は0.03nM）、およびBT474細胞（IC₅₀は0.002nM）などでも得られた。また、U87細胞、U118細胞、MiaPaCa-2細胞、PC-3細胞、SW1990細胞、およびHT29細胞でも同様の結果が得られ、これは、DTEGF13免疫毒素などのEGF4KDEL免疫毒素が、広範なヒト癌細胞（例えば、乳癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、および結腸癌の細胞、ならびに膠芽細胞腫細胞）において広く有効であることを示す。

10

【0319】

EGF4KDEL免疫毒素の活性の特異性を調べるため、MDA-MB-231ヒト乳癌細胞を種々の濃度のEGF4KDEL、IL4KDEL、およびEGF4KDEL、またはBic3、2219EA、およびDT2219ARL対照で処理し、該細胞の増殖に対する免疫毒素の効果を測定した。Bic3、DT2219ARL、および2219EA二重特異性免疫毒素はこの乳癌細胞に結合しない。一方、EGF4KDELは、この場合も、乳癌細胞の死滅において高度に有効であり、0.0000011のIC₅₀を有したが、Bic3、DT2219ARL、および2219EAが有したMDA-MB-231細胞に対する死滅効果は最小限であった（図25B）。

20

【0320】

別の実験において、EGF4RまたはIL4Rを発現しないヒトT細胞株であるHPB-MLT細胞をEGF4KDELおよびBic3で処置し、該細胞の増殖に対する効果を測定した。HPBMLT細胞増殖は、Bic3陽性対照試薬によって有意にもたらされたが、EGF4KDELによる阻害は最小限に留まった（図25C）。これらの結果は、EGF4KDEL試薬が、EGF4RおよびIL4Rを発現する細胞の死滅において有効で特異的であることを示唆する。

【0321】

実施例17. 抗EGFおよび抗IL4抗体がEGF4KDEL誘導性死滅をブロックする能力の測定

30

EGFおよびIL4がともに、MDQ-MB-231細胞のEGF4KDEL誘導性死滅に重要であることを確認するため、ブロック実験を行なった。50μg/mlの抗EGFまたは抗IL4抗体を、EGF4KDELによる細胞の死滅をブロックする能力について試験した（図26）。EGF4KDEL（0.1nM）を細胞とともに、抗EGF抗体、抗IL13抗体または対照抗体（Ly5.2）の存在下または非存在下で、72時間培養した。いずれかの抗体をEGF4KDELに添加すると、両抗体は、抗増殖効果の約70～85%をブロックすることができた。対照的に、対照抗マウスLy5.2抗体の添加はブロック効果がなかった。

【0322】

総合すると、これらのデータにより、両方のリガンド（EGFおよびIL4）がEGF4KDEL分子の活性に重要であることが示された。

40

【0323】

実施例18. MDA-MB-231癌細胞増殖に対するDTEGF4の効果

毒性領域としてジフテリア（Diphtheria）毒素を含むEGF4構築物もまた、MDA-MB-231細胞を死滅させることができるかどうかを調べるため、ジフテリア毒素（DT）分子の最初の389アミノ酸をコードする核酸、7アミノ酸EASGGPE（配列番号14）リンカーをコードするヌクレオチド配列、ヒト上皮成長因子（EGF）をコードするヌクレオチド配列、ヒト筋肉アルドラーゼ（hma）の20アミノ酸セグメント（PSGQAGAAASESLFVSNHAY（配列番号13）をコードするヌクレオチド配列、インターロイキン4（IL4）をコードするヌクレオチド配列を構築した。

50

MDA-MB-231細胞を、種々の濃度のEGF4KDEL、DTG4、およびDTG13免疫毒素で処理し、該細胞の増殖に対する該毒素の効果を測定した。EGF4KDEL、DTG4、DTG13は、各々、乳癌細胞の死滅において高度に有効であり、それぞれ、0.002nM、0.1nM、および0.02nMのIC₅₀を有した(図27)。

【0324】

これらのデータにより、少なくとも2種類の異なる毒素を含む二重特異性EGF4分子が腫瘍細胞の死滅に有効であることが示された。

【0325】

実施例19. MDA-MB-231腫瘍内ヌードマウス腫瘍モデルにおけるEGF4KDEL

EGF4KDELが乳腺腫瘍増殖をインビボで抑止する能力を試験するため、MDA-MB-231ヒト乳癌細胞をヌードマウスの脾臓内に異種移植した。MDA-MB-231細胞は、ホタルルシフェラーゼタンパク質をコードする外因性核酸を含み、これを安定的に発現するものであった(MDA-MB-231-luc細胞)。1×10⁶個のMDA-MB-231-luc細胞をマウスに、脾臓内(IS)注射によって投与した。第61日、器官を取り出し、蛍光分光法によって画像を取得し、発生中の腫瘍の位置を調べた(図28)。このデータは、脾臓内注射により、MDA-MB-231-luc細胞が肝臓および他の器官に転移し、そこで安定的にゆっくり増殖するモデルがもたらされることを示す。

【0326】

別の実験において、1×10⁶個のMDA-MB-231-luc細胞をマウス(N=4)に、IS注射によって投与した。また、マウスに4μgのEGF4KDEL、またはBicタンパク質(上記)もi.p.によって、各週4日間で9週間投与した。腫瘍発生の阻害がEGF4KDELで処置したマウス4匹のうち3匹(75%)において観察され、そのうち2匹のマウスでは、第68日において腫瘍の形跡が示されなかった(図29AおよびC)。陰性対照Bic3を受けたマウスの腫瘍は治療に応答しなかった(図29B)。治療応答群マウスにおいて有意な体重減少はみられなかったが、治療に応答しなかったマウスでは体重の変化がみられた(図29C)。

【0327】

別の実験において、1×10⁶個のMDA-MB-231-luc細胞をマウスにIS注射によって投与した。また、マウスに、4μgのEGF4KDEL、または2219ARLKDEL対照タンパク質(上記)もi.p.によって、各週4日間で9週間投与した。腫瘍増殖の抑止がEGF4KDELで処置したマウスにおいて観察されたが、陰性対照2219ARLKDEL毒素を受けたマウスの腫瘍は治療に応答しなかった。

【0328】

総合すると、これらの試験は、EGF4KDELのヒトEGFおよびIL-4がマウスEGFRおよびIL4Rと交差反応性であるモデルにおいて、EGF4KDELが高度に有効な抗腫瘍剤であることを示す。該試薬はヒト乳癌に対して高度に有効であること、および同じ分子内に存在するEGF部分とIL4部分がその卓越した抗腫瘍効果に寄与していることを示す。

【0329】

実施例20. 変異による毒素の免疫原性の低減

二重特異性免疫毒素の毒素成分の免疫原性が低減される効果において、EGF13融合タンパク質が、一連のアミノ酸置換を有するシュードモナス体外毒素(PE)タンパク質(配列番号11)のC末端融合部を含む一連のEGF13変異型を構築した。各タンパク質は、表1に概略を示す一連の置換を含むものとした。

【0330】

【表 1】

表1. EGF13PE変異型に対する免疫応答の発生

薬剤	置換	生成された抗PE抗体 $\mu\text{g/mL}$
PE親	なし	1,072
EGF13PE 5変異型	R490A, R513A, R432G, R467A, K590S	18.6および226
EGF13PE 7a変異型	R490A, R513A, R467A, E548S, K590S, Q332S, R313A	試験せず
EGF13PE 7b変異型	R490A, R513A, R467A, E548S, K590S, R432G, R313A	試験せず
EGF13PE 8変異型	R490A, R513A, R467A, E548S, K590S, R432G, Q332S, R313A	試験せず

7つの顕著な免疫優性エピトープがPE毒素内に見出された（例えば、Ondaら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008年8月4日（出版前に電子公開）を参照）。種々のタンパク質を抗腫瘍活性について、上記のチミジン取込み増殖アッセイを用いてインビトロで試験した。4種類のPE変異型を作製し、すべての免疫原性のエピトープ（1～7）に置換を有する「7」変異バリエーションと、さらなる置換アミノ酸を有する「8」変異バリエーションを含めた。「5」変異バリエーションは、エピトープ1～5のみに置換を含むものとした。変異型タンパク質を発現させ、単離し、95%より高い純度まで精製した。次いで、これを、EGFRおよびIL13R発現SW1990腫瘍細胞を死滅させる能力について試験した。8変異構築物は、2log低い活性を有し、これは、該毒素の立体配置の改変を示す。2つの7変異構築物（これらは、各7エピトープ領域に変異を有する）および5変異構築物で示されたインビトロで腫瘍細胞を死滅させる能力の低下は最小限であった（図30A）。

【0331】

5変異EGF13PEタンパク質を、IgG抗体反応性についてサンドイッチELISAアッセイにて試験した。このアッセイは、高度に精製されたPE毒素の使用に基づくものであり、該毒素をまずプレートに接着させ（EGF13PE毒素のタンパク質と同じアミノ酸配列）、続いて、試験血清と、マウスIgGに特異的であり、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HP）にコンジュゲートさせた二次抗体とを添加する。PE毒素に対するマウス血清中の抗体の結合を、比色定量アッセイを用いて測定する。親PE毒素を使用し、標準曲線によって $r^2 = 0.9552$ が求められた。同PEタンパク質の週4回注射を行い、次いで、最後の注射の4日後に採血した8匹の正常BALB/cマウスのプール由来の第1の試験血清試料が、その血清中において高レベル（1,072 $\mu\text{g/mL}$ ）の抗PE抗体を示した（表1）。2匹のBALB/cマウスをEGF13 5 mutタンパク質（表1）で同じように免疫処置し、次いで、個々に試験した。これらの2匹のマウスは、それぞれ、血清中に18.6および226.4 $\mu\text{g/mL}$ の抗PE抗体を有すると測定され、非変異型形態のPEからの約80%および98%の低減であった。これらのデータにより、7つの免疫優性エピトープのうち5つにおいてEGF13PEを変異させ

ると、毎週反復注射に対する抗体応答を生じる能力が有効に低減されることが示された。
EGF13PE 7 mutタンパク質でも同様の結果が得られることが予測される。

【0332】

実施例21. インビボ腫瘍モデルにおける予備投与の効果

上記の試験（実施例12）により、毒素を含む二重特異性分子を投与する前に、動物に非毒性二重特異性分子を予備投与することは、正常マウスにおいて、該二重特異性免疫毒素分子と関連する毒性の低減に有効であることが示された。インビボ腫瘍モデルにおいて予備投与（またはプロフェクティシャス（*profectitious*）薬物送達またはPDD）の有効性を試験するため、MiaPaCa-2同所性膵臓癌モデルを使用した。MiaPaCa-2細胞は、ホタルルシフェラーゼタンパク質をコードする外因性核酸を含み、これを安定的に発現させるものであった（MiaPaCa-2-luc細胞）。 1×10^6 個のMiaPaCa-2-luc-luc細胞を、マウスの膵臓に注射によって投与した。また、マウスに、 $7.5 \mu\text{g}$ のDTEGF13または $200 \mu\text{g}$ のEGF13と $7.5 \mu\text{g}$ のDTEGF13もi.p.注射によって投与した。EGF13とDTEGF13の両方を受けた動物において、EGF13の注射は、DTEGF13タンパク質の注射の約30分前に行なった。動物には、3回の注射をQODで5週間行なった。処置を受けなかった動物は進行性の膵臓癌を示したが（図31A）、非免疫毒性のEGF13の予備投与を受けた動物は、腫瘍負荷の劇的な低減を示した（図31B）。また、PDDは、動物の体重によって測定した場合でも、毒性の低減に有効であった。各DTEGF13の注射はMTDの15倍を超え、動物は合計15回の注射を受けた。このことにもかかわらず、上記のPDD群（マウス8～14）の動物の平均体重は減少せず（図32）、これは、このレジメンの毒性が最小限であることを示す。

【0333】

他の実施形態

本発明を、その詳細説明に関して説明したが、前述の説明は例示を意図するものであって、本発明の範囲を限定するものではない。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によって規定される。他の態様、利点および変形例は、以下の特許請求の範囲に含まれる。

【図 1 A】

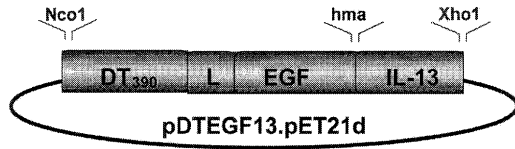


FIG. 1A

【図 1 B】

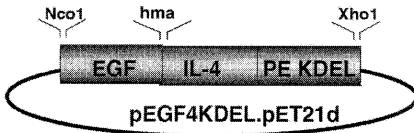


FIG. 1B

【図 3】

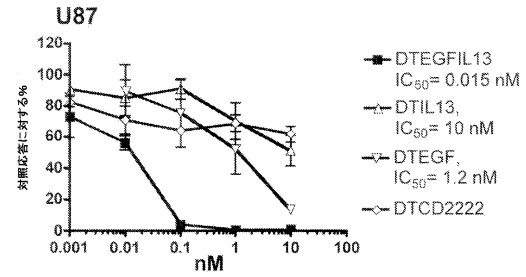


FIG. 3

【図 1 1】

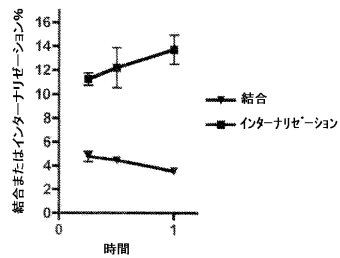


FIG. 11

【図 1 2】

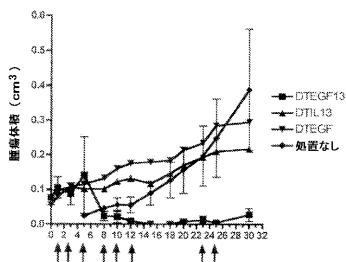


FIG. 12A

【図 1 3】

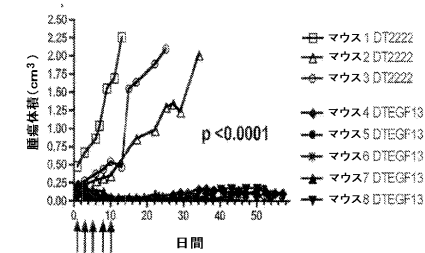


FIG. 13

【図 1 5 A】

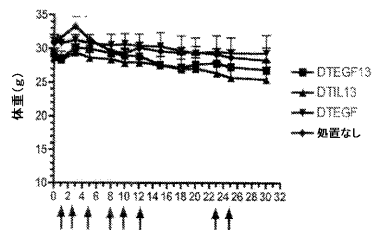


FIG. 12B

【図 1 5 A】

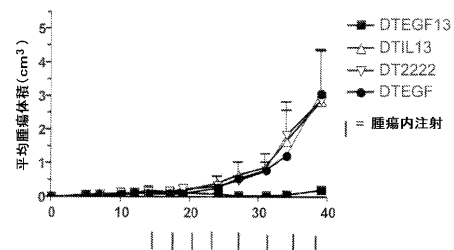


FIG. 15A

【図 15 B】

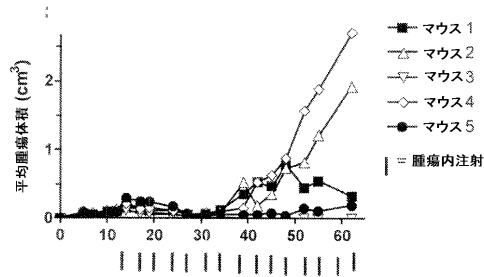


FIG. 15B

【図 16】

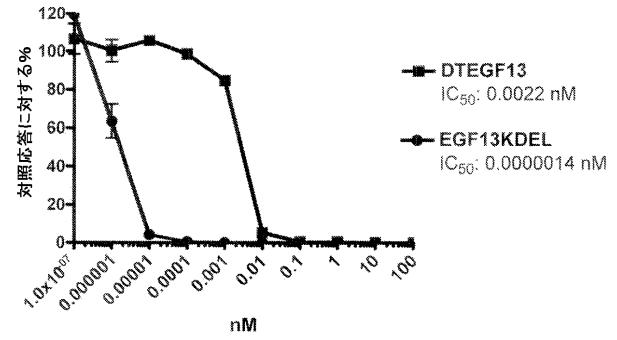


FIG. 16

【図 15 C】

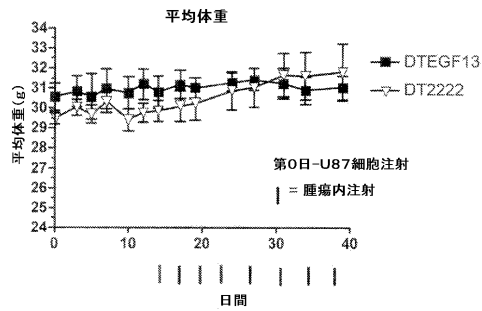


FIG. 15C

【図 17 A】

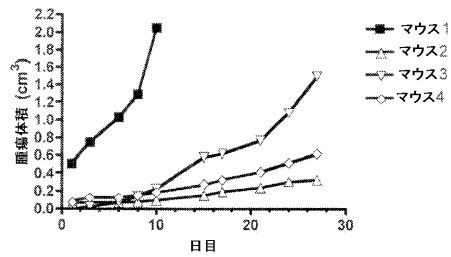


FIG. 17A

【図 17 B】

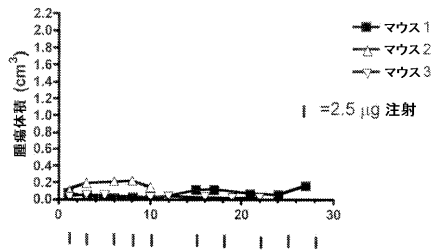


FIG. 17B

【図 17 D】

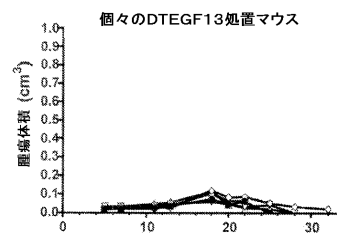


FIG. 17D

【図 17 C】

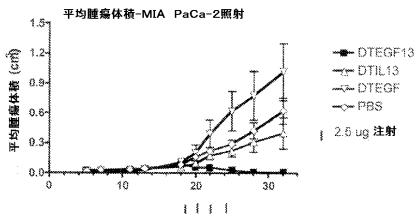


FIG. 17C

【図 17 E】

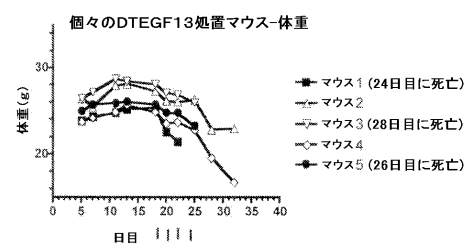


FIG. 17E

【図 18】

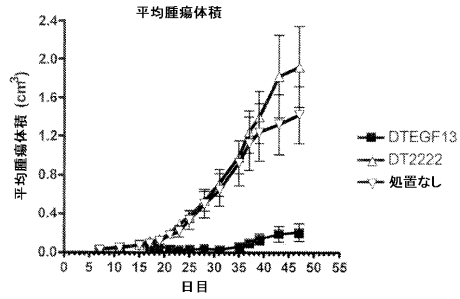


FIG. 18A

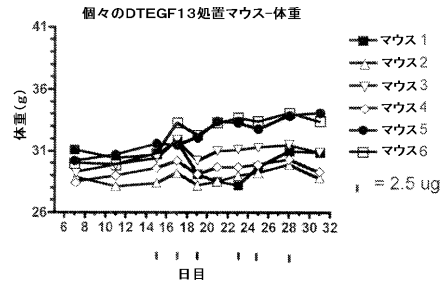


FIG. 18B

【図 19】

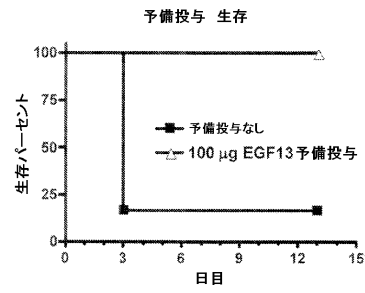


FIG. 19A

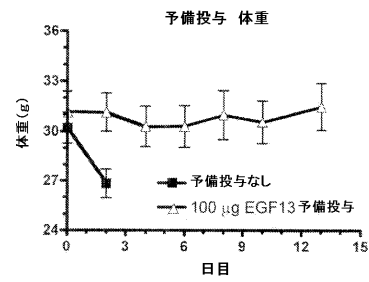


FIG. 19B

【図 20】

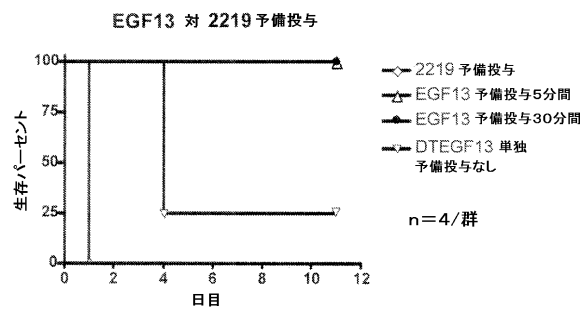


FIG. 20

【図 21】

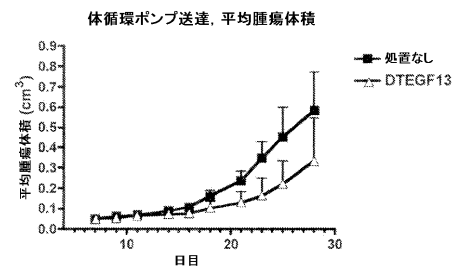


FIG. 21A

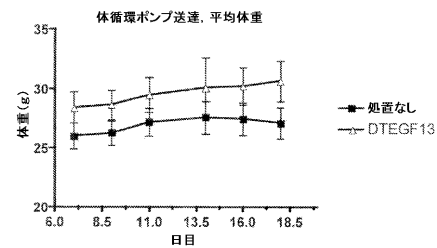


FIG. 21B

【図 2 2 A】

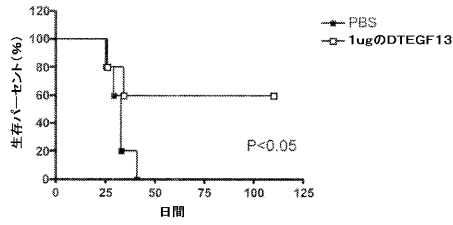


FIG. 22A

【図 2 2 C】

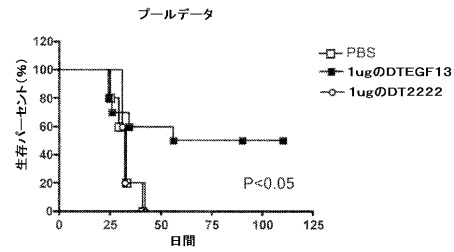


FIG. 22C

【図 2 2 B】

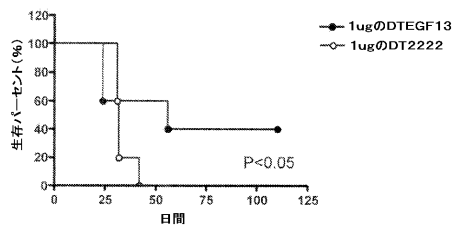


FIG. 22B

【図 2 3】

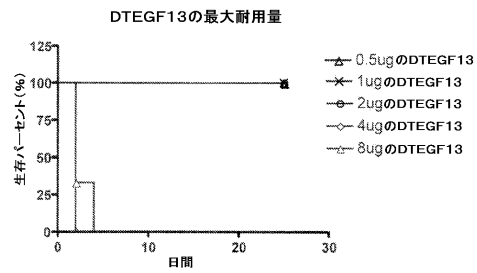


FIG. 23

【図 2 4】

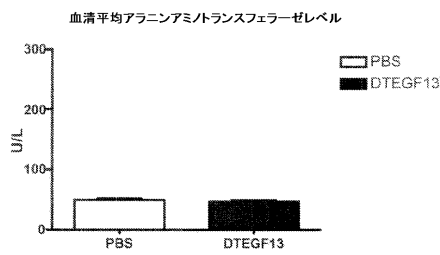


FIG. 24A

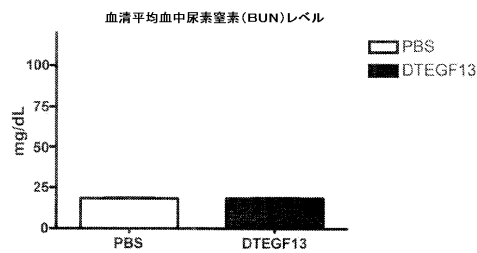


FIG. 24B

【図 2】

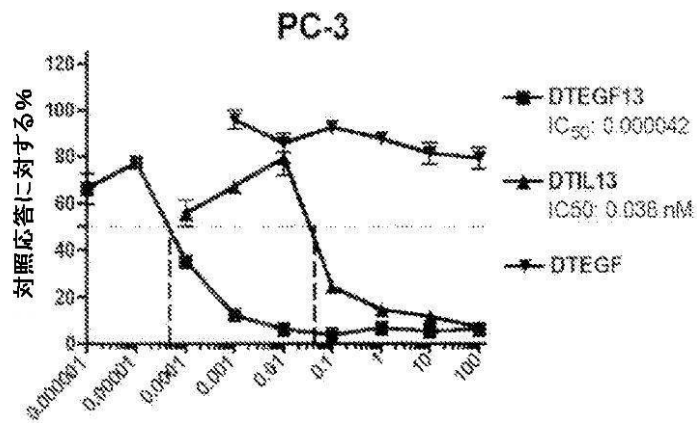


FIG. 2A

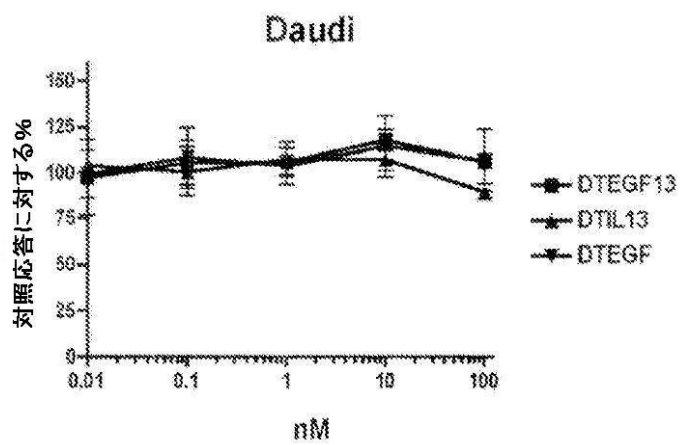


FIG. 2B

【図 4】

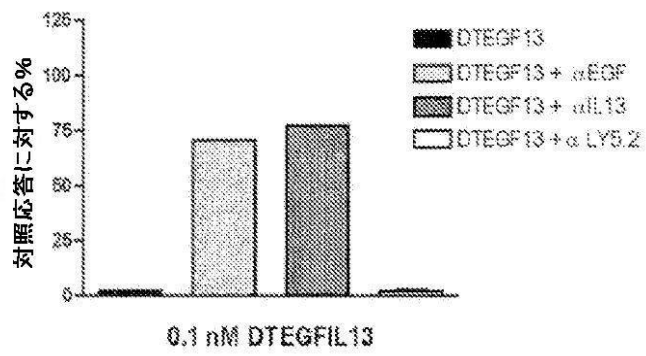


FIG. 4

【図 5】

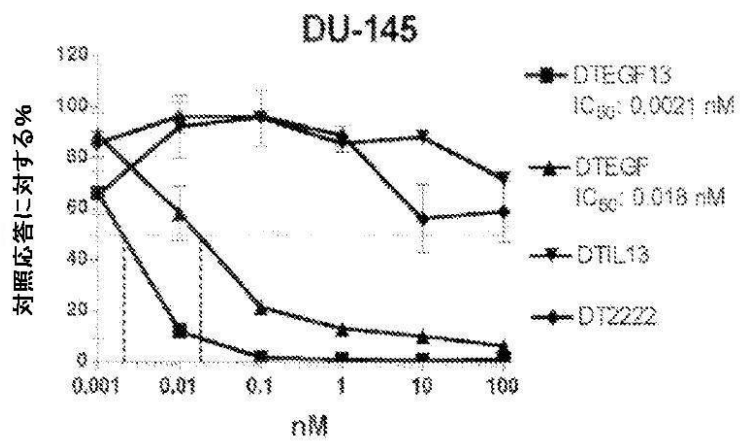


FIG. 5

【図 6】

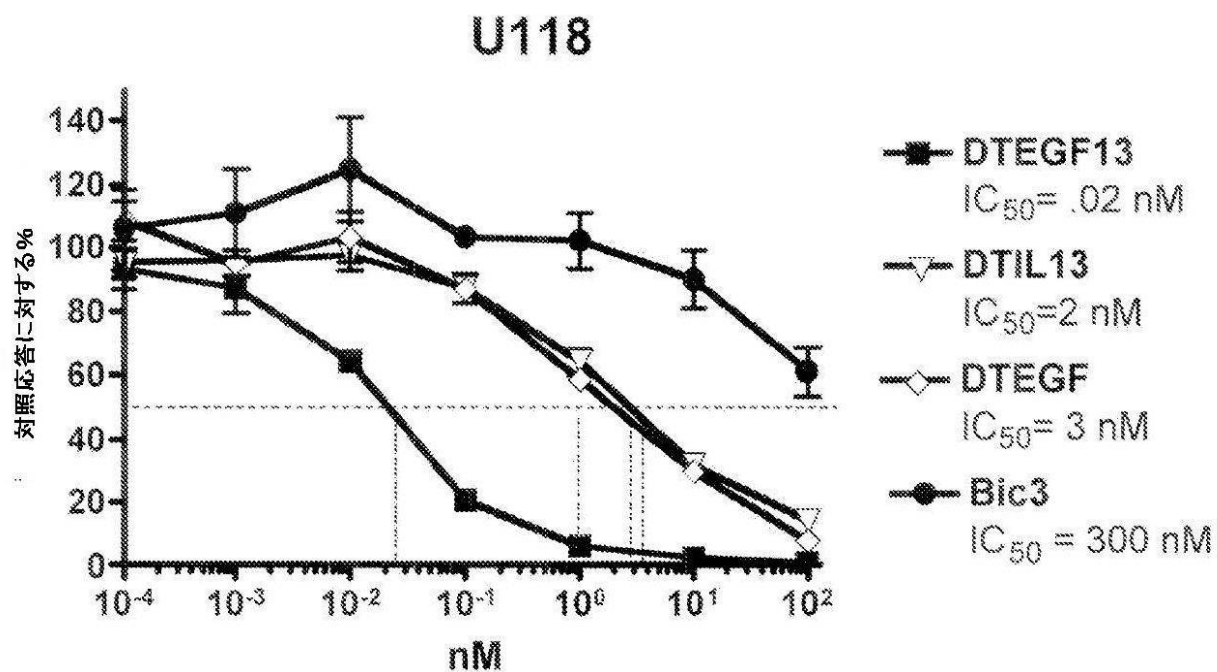


FIG. 6

【図 7】

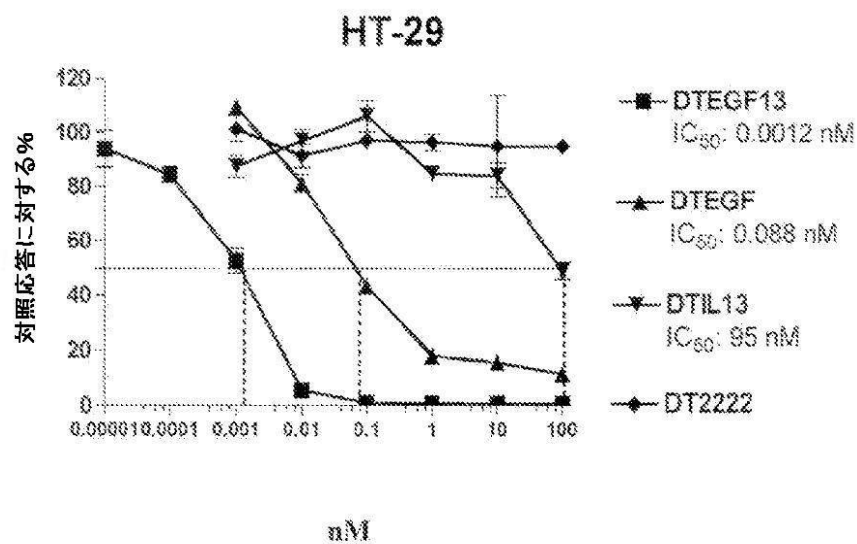


FIG. 7

【図 8】

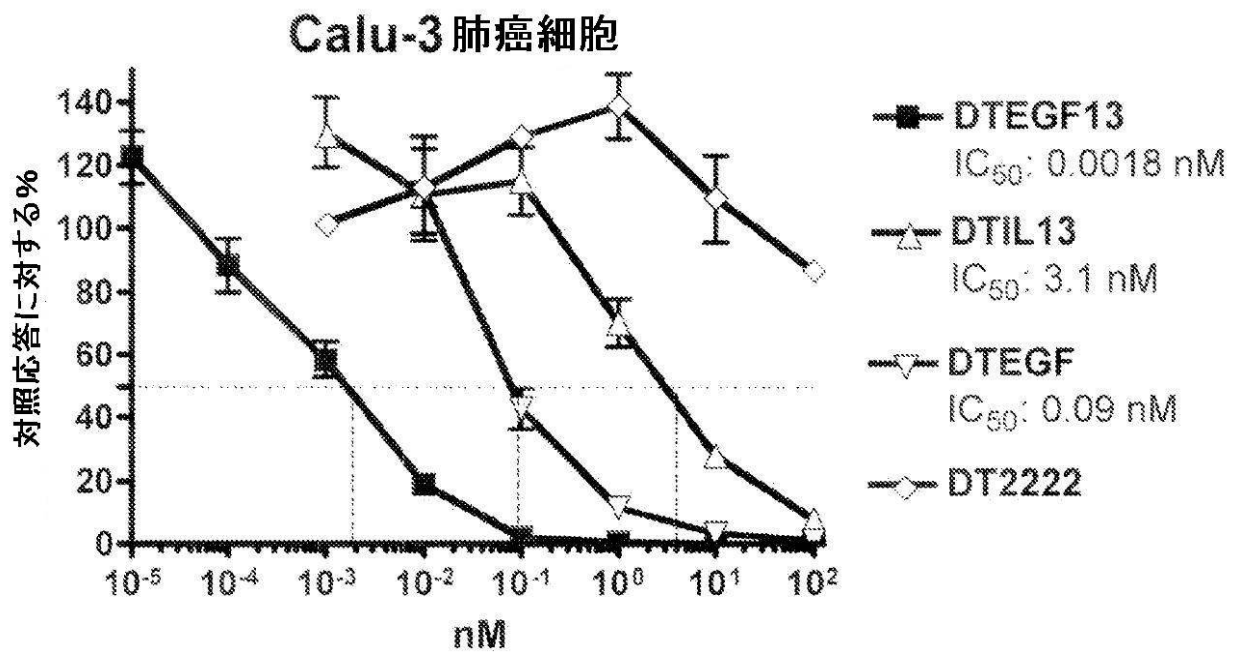


FIG. 8

【図 9】

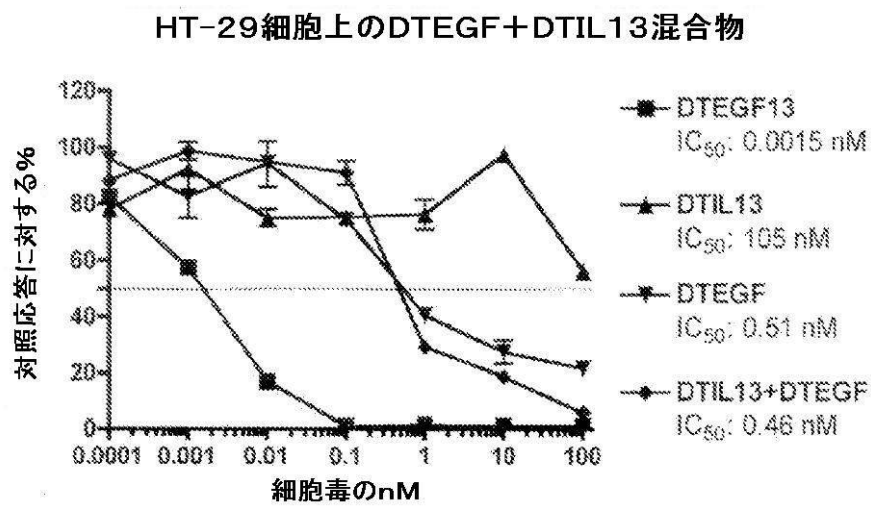


FIG. 9

【図 10】

併用処置U87

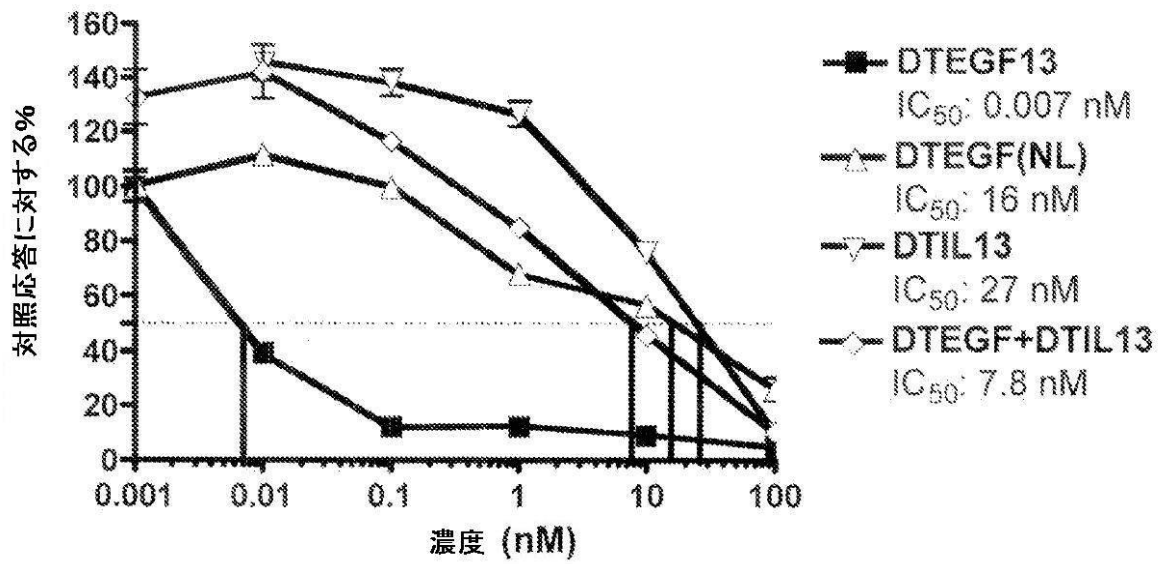


FIG. 10

【図 14】

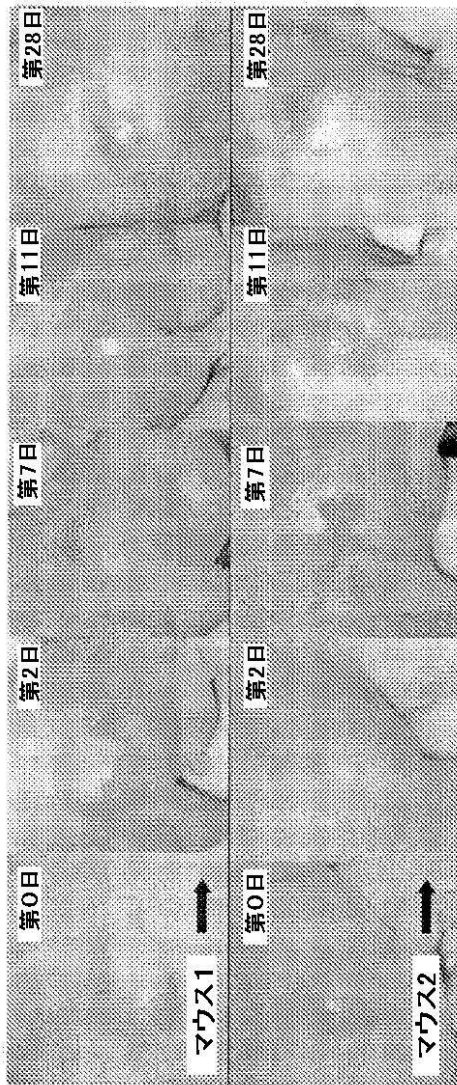


FIG. 14

【図 25 A】

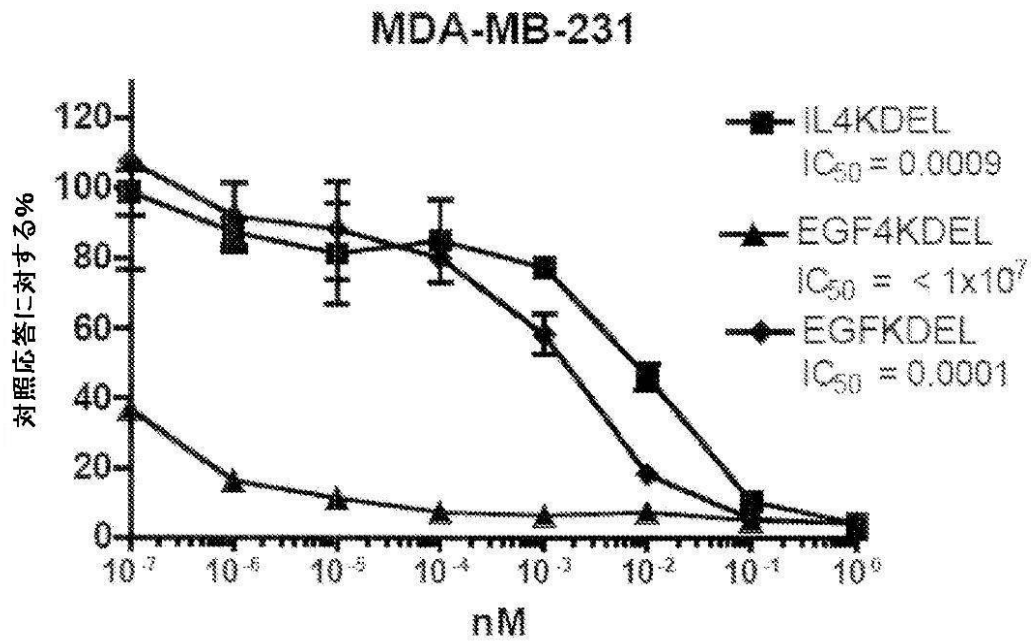


FIG. 25A

【図 25 B】

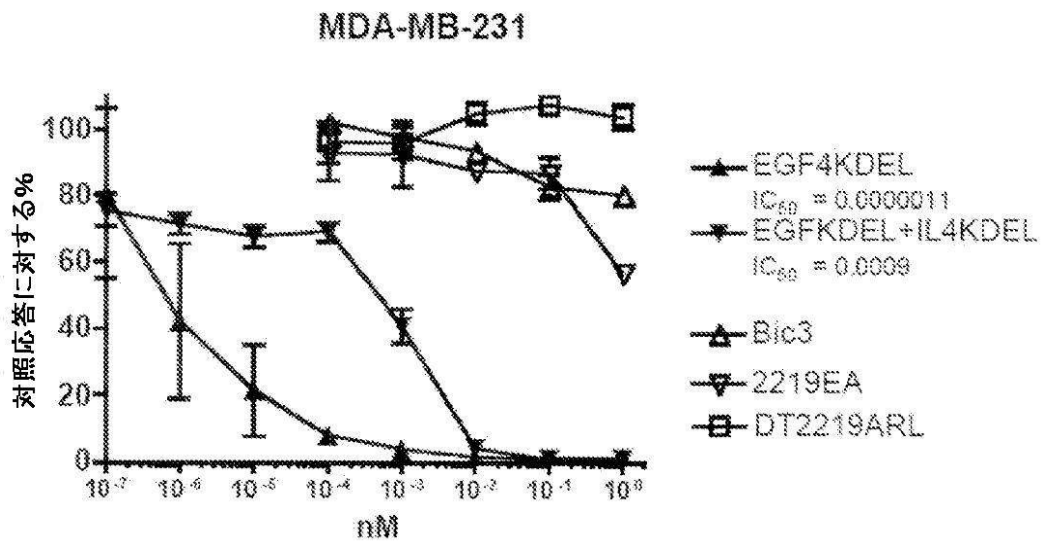


FIG. 25B

【図 25 C】

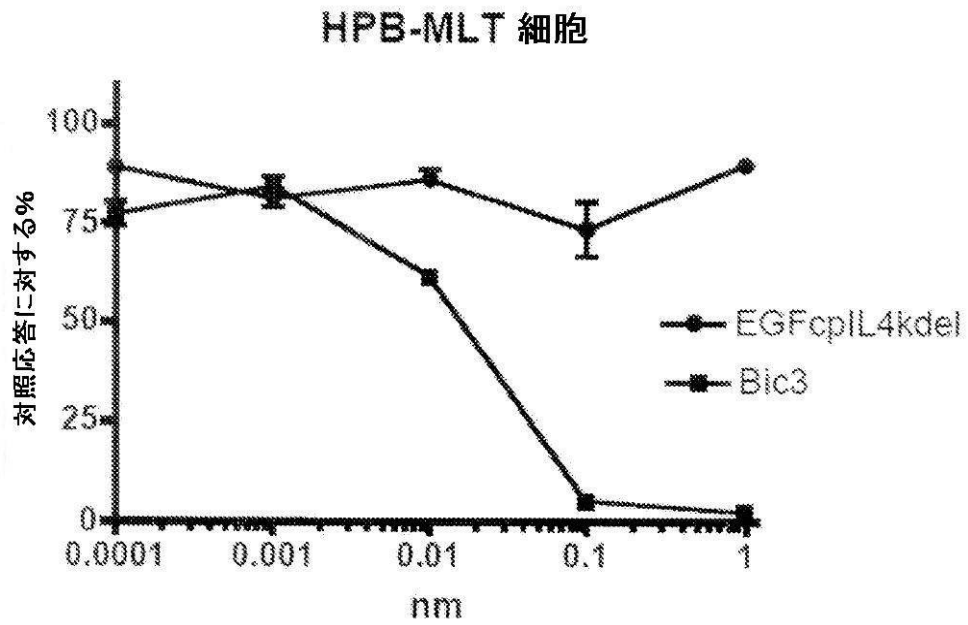


FIG. 25C

【図 26】

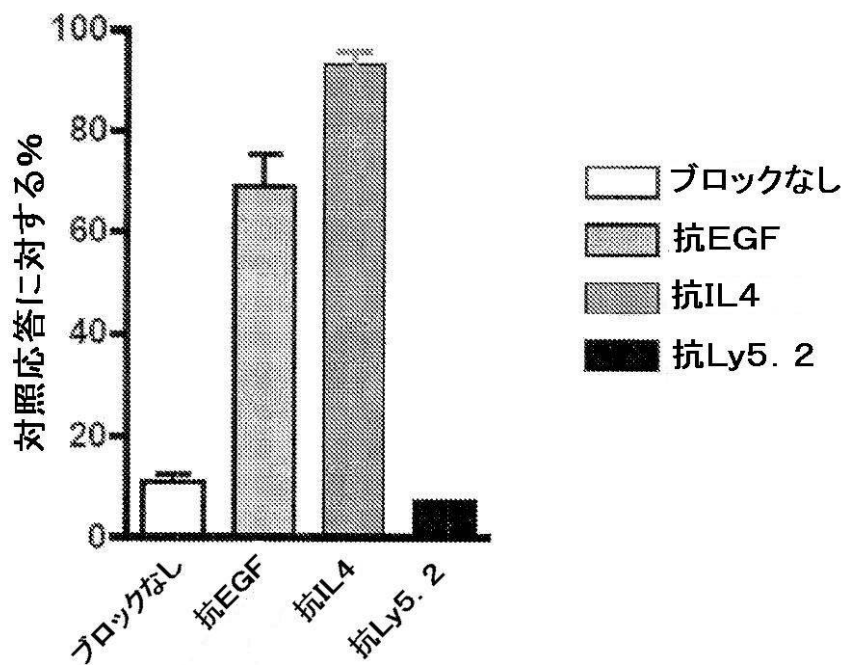


FIG. 26

【図 27】

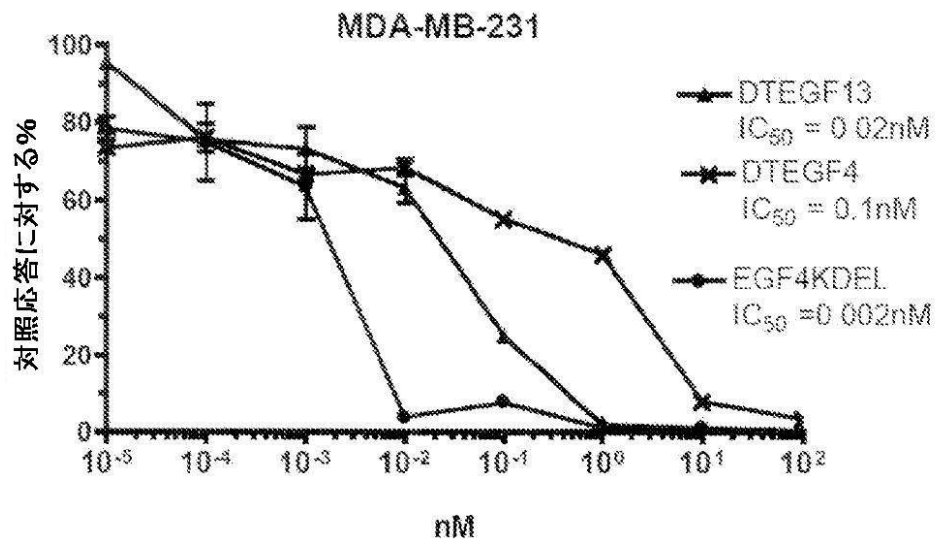


FIG. 27

【図 28】

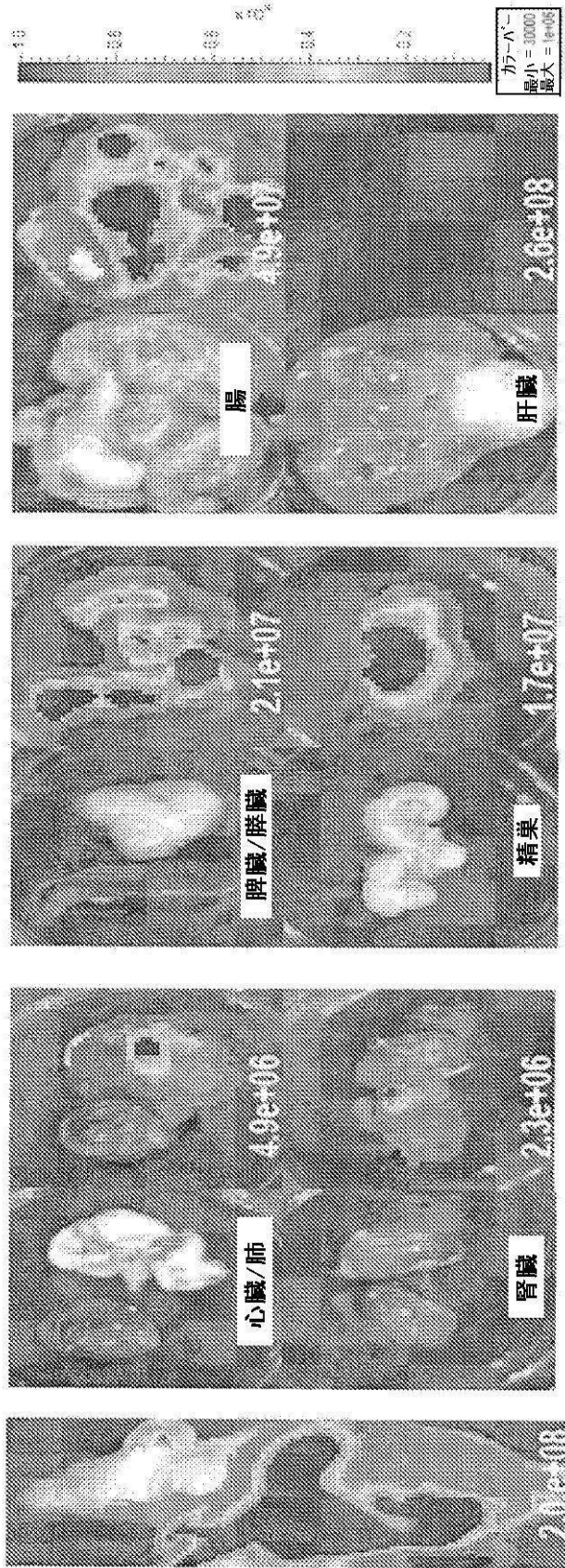


FIG. 28

【図 29 A】

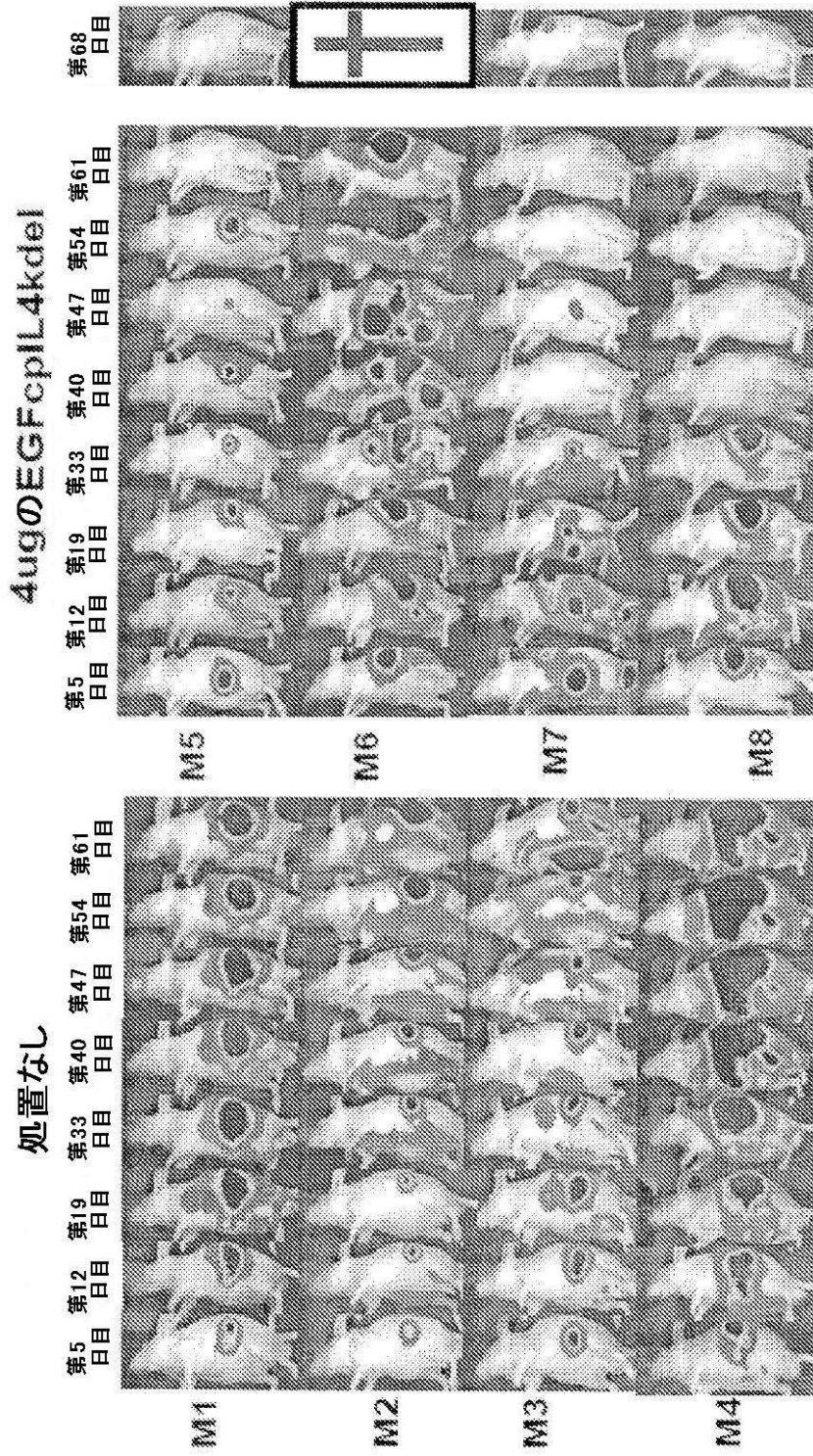
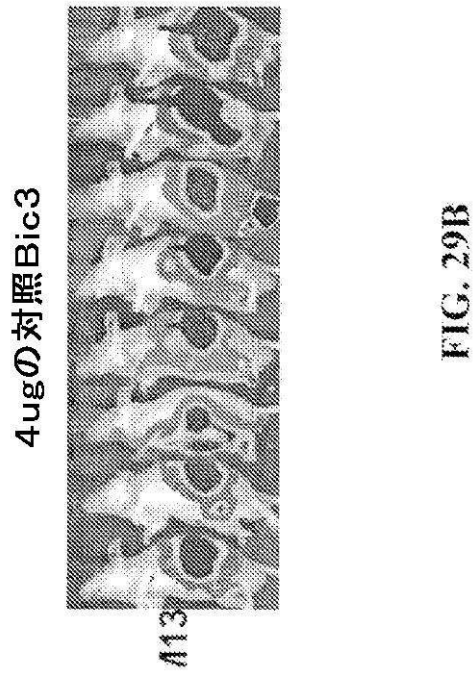
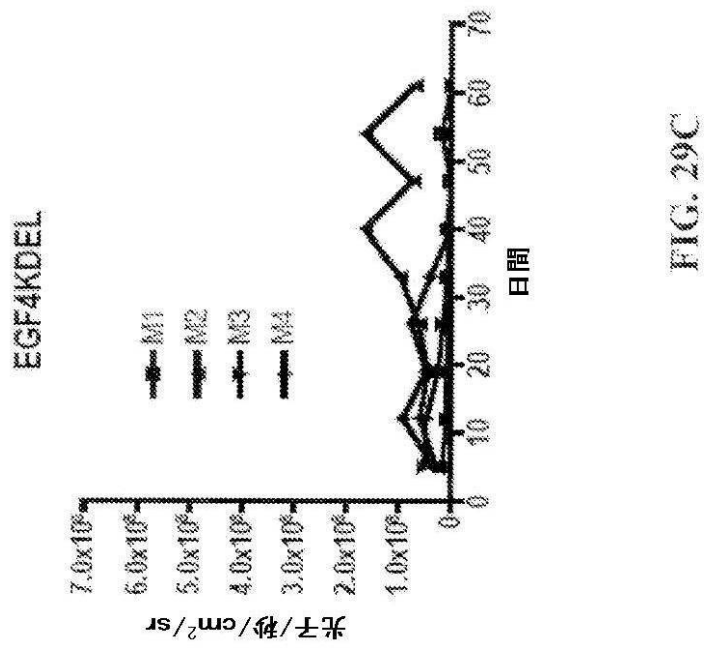


FIG. 29A

【図 29 B】



【図 29 C】



【図 29 D】

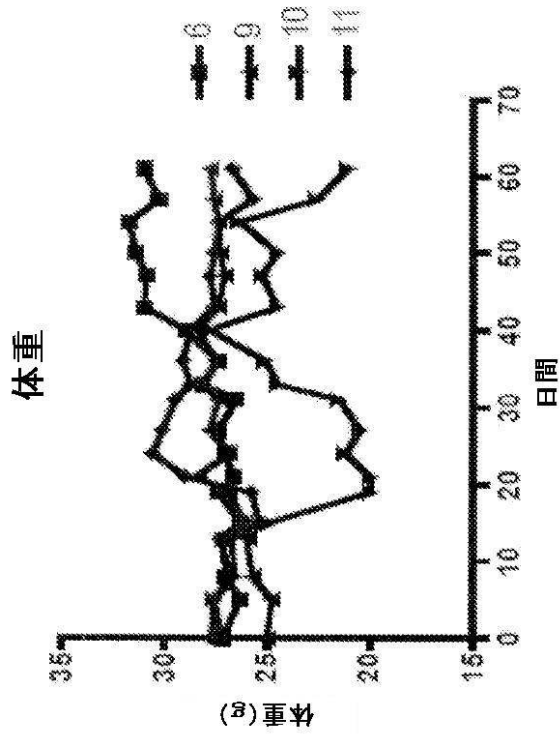


FIG. 29D

【図 30】

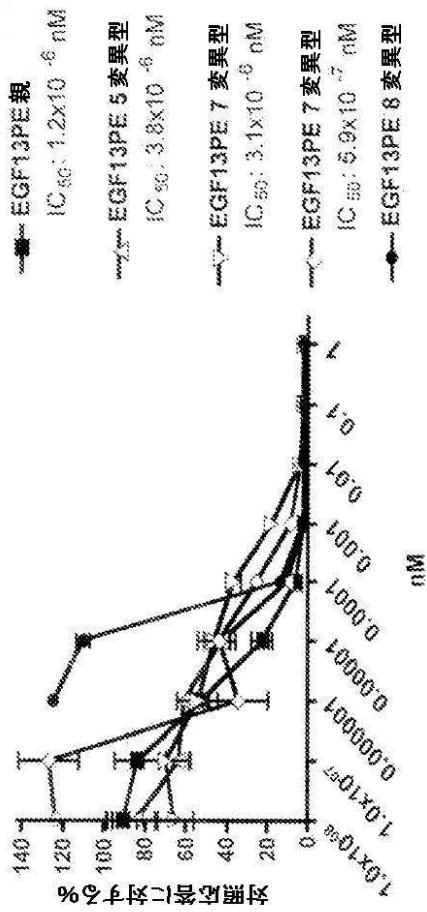


FIG. 30

【図 3 1】

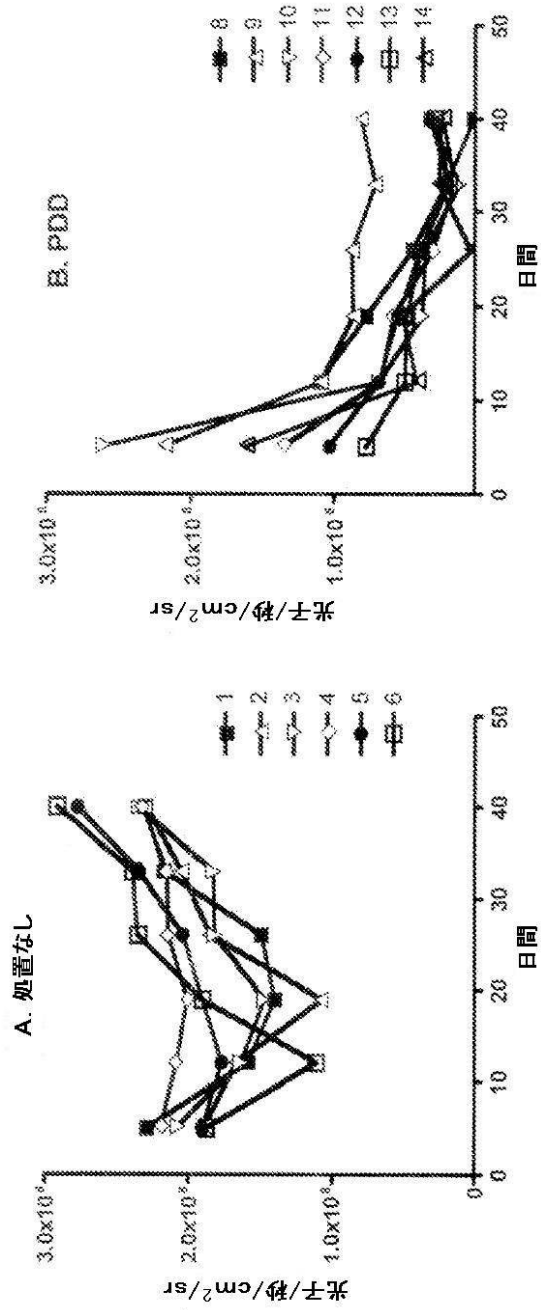


FIG. 31B

FIG. 31A

【図 3 2】

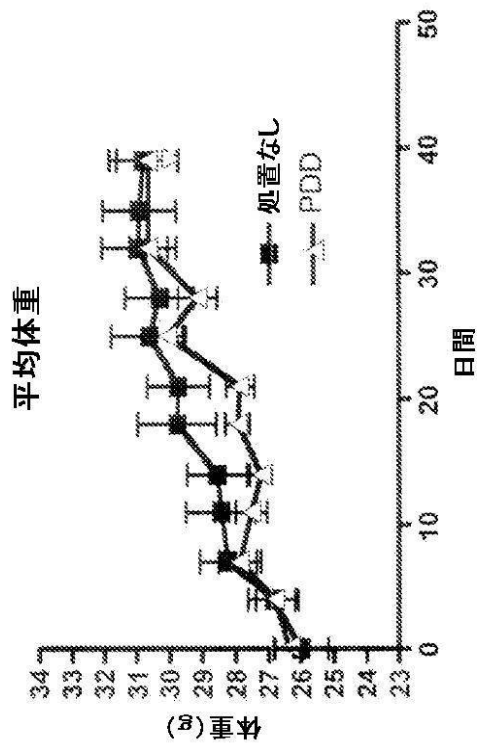


FIG. 32

【配列表】

2010536386000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2008/074268
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C07K 14/705(2006.01); C07K 19/00(2006.01); C12N 15/62(2006.01); A61K 38/17(2006.01); A61P 35/00(2006.01);</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/705; C07K 16/30; C12Q 1/70		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models (Chinese Patents and application for patent)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal), google, google scholar, NCBO database & Keywords: EGFR , IL13 , cancer. Diphtheria toxin, targeting		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU, T. et al. Bioconjugate Chem, 2003, Vol. 14. pages 1107-1114. See abstract and Results.	1-15
X	TYNER, J. et al. The Journal of Clinical Investigation, February 2006, Vol. 15, pages 309-321.	1
A	See abstract.	2-15
A	US 2005-0142539 A1 (WILLIAM HERMAN) 30 June 2005 See abstract and page 3-5.	1-15
PX	STISH, B. et al. Cancer Therapy: Preclinical, 01 November 2007, Vol. 13, No. 21, pages 6486-6493. (-) 01 November 2007 See the whole document.	1-15
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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 16 FEBRUARY 2010 (16.02.2010)		Date of mailing of the international search report 16 FEBRUARY 2010 (16.02.2010)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Sohn, Younghee Telephone No. 82-42-481-5975 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2008/074268

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.: 59-66,68-77
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 59-66,68-77 pertain to method for treatment of the human by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☒ Claims Nos.: 29,30,36,42,46-48,50,55,56,58,60,61,69,75,77,79,80,83
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 29,30,36,42,46-48,50,55,56,58,60,61,69,75,77,79,80,83 are too unclear to make meaningful search. Claims 29,30,36,42,46-48,50,55,56,58,60,61,69,75,77,79,80,83 are dependent claims of multiple dependent claims, which are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4.
3. ☒ Claims Nos.: 16-28,31-35,37-41,43-45,49,51-54,57,59,62-68,70-74,76,78,81,82,84,85
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2008/074268

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005-0142539 A1	30.06.2005	AU 2002-240751 A8	24.09.2002
		AU 2003-201559 A1	24.07.2003
		AU 2003-201559 A8	24.07.2003
		CA 2479116-A1	19.09.2002
		CA 2513287-A1	17.07.2003
		EP 1455820 A2	15.09.2004
		EP 1497331 A2	19.01.2005
		EP 2075256 A2	01.07.2009
		US 2005-0069549 A1	31.03.2005
		US 2005-0118164 A1	02.06.2005
		US 2009-0104195 A1	23.04.2009
		WO 02-072141 A2	19.09.2002
		WO 03-057732 A2	17.07.2003
		WO 03-057732 A3	17.07.2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1		4 C 0 8 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C		4 C 0 8 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02			4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00			
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K 9/19			
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z		
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z		
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08			

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 バレラ, ダニエル エー.

アメリカ合衆国 ミネソタ 5 5 4 2 5, セント ルイス パーク, ダブリュー. フランク
リン アベニュー 8 1 1 6

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB01 DA14 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA12 BA38 BA41 BA63 BA80 CA01 CA11 GA11 HA01
HA12 HA15
4B064 AG27 AG30 AG31 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C076 AA29 CC27
4C084 AA02 BA44 CA04 DA27 DA33 MA44 NA14 ZB261 ZB262
4C085 AA13 BA07 CC07 CC22
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 BA72 CA40 DA50 DA76 DA83
DA86 EA22 EA28 EA50 EA51 EA54 FA74