

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4874090号
(P4874090)

(45) 発行日 平成24年2月8日 (2012.2.8)

(24) 登録日 平成23年12月2日 (2011.12.2)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/42 (2006.01)

A 6 1 K 47/42

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

T

A 6 1 K 51/00 (2006.01)

A 6 1 K 49/02

A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 20 (全 66 頁)

(21) 出願番号 特願2006-503216 (P2006-503216)
 (86) (22) 出願日 平成16年2月2日 (2004.2.2)
 (65) 公表番号 特表2006-518737 (P2006-518737A)
 (43) 公表日 平成18年8月17日 (2006.8.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/002768
 (87) 国際公開番号 W02004/074434
 (87) 国際公開日 平成16年9月2日 (2004.9.2)
 審査請求日 平成19年1月17日 (2007.1.17)
 (31) 優先権主張番号 60/444,357
 (32) 優先日 平成15年1月31日 (2003.1.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504149971
 イミューノメディクス、インコーポレイテッド
 IMMUNOMEDICS, INC.
 アメリカ合衆国ニュージャージー州、モリス、ブレインズ、アメリカン、ロード、300
 (74) 代理人 100075812
 弁理士 吉武 賢次
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100094640
 弁理士 紺野 昭男
 (74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療薬および診断薬を投与するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌の治療または診断用医薬組成物であって、

(i) 癌胎児性抗原 (CEA)、結腸特異的抗原 - p (CSAp)、CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD22、CD40、CD40L、CD74、B7、HLA-DR、EGFR、HER2/neu、TAG-72、EGP-1、HCG、HCG-、PSMA、PSA、VEGF、およびMAGEからなる群から選択される、腫瘍関連マーカーと結合する標的結合部分と、

HSG (ヒスタミンスクシニルグリシン)、DTPA (ジエチレントリアミン五酢酸)、またはTscg-Cys (チオセミ-カルバゾニルグリオキシシルシステイン) を含む第1のハブテンに結合する、少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分とを含んでなる、二重特異性抗体；

(ii) Ac-Lys (DTPA) - Tyr-Lys (DTPA) - Lys (Tscg-Cys) - NH₂、またはDTPA-Gln-Ala-Lys (HSG) - D-Tyr-Lys (HSG) - NH₂ (IMP272) を含んでなるターゲッティング可能構築物であって、治療部分または診断部分とを含んでなる、ターゲッティング可能構築物；および

(iii) HSG、DTPA、またはTscg-Cysを含む第2のハブテンに結合する、1以上の第二の抗体またはその抗原結合フラグメントを含んでなる、クリアリング剤であって、第1および第2のハブテンが、互いにと直交しており、かつ、標的部位におい

10

20

てターゲッティング可能構築物の保持を高める、クリアリング剤を含んでなる、医薬組成物。

【請求項 2】

腫瘍関連マーカーが、CEA、CD74、HLA-DR、CD20、CD22、またはEGP-1である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

標的結合部分が、ヒト化、キメラ、ヒト、またはネズミの抗CEA MN-14、抗CD74 LL1、抗CD20 A20、抗CD22 LL2、または抗EGP-1 RS7抗体、またはその抗原結合フラグメントである、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

癌の治療または診断用医薬組成物であって、

(i) 癌胎児性抗原(CEA)、結腸特異的抗原-p(CSAP)、CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD22、CD40、CD40L、CD74、B7、HLA-DR、EGFR、HER2/neu、TAG-72、EGP-1、HCG、HCG-、PSMA、PSA、VEGF、およびMAGEからなる群から選択される、腫瘍関連マーカーと結合する標的結合部分と、

HSG(ヒスタミンスクシニルグリシン)を含む第1のハプテンに結合する、少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分とを含んでなる、二重特異性抗体；

(ii) DTPA-Gln-Ala-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂(IMP272)を含んでなるターゲッティング可能構築物であって、治療部分または診断部分とを含んでなる、ターゲッティング可能構築物；および

(iii) In-DTPAを含む第2のハプテンに結合する、1以上の第二の抗体の抗原結合フラグメントを含んでなる、クリアリング剤であって、第1および第2のハプテンが、互いに直交しており、かつ、標的部位においてターゲッティング可能構築物の保持を高める、クリアリング剤を含んでなる、医薬組成物。

【請求項 5】

第1のハプテンHSGに結合する結合部分が、679抗体であり、かつ、In-DTPAを含む第2のハプテンに結合する第二の抗体が、734抗体である、請求項4に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

クリアリング剤とターゲッティング可能構築物との結合が、ターゲッティング可能構築物と二重特異性抗体との結合を安定化させ、二重特異性抗体と結合していないターゲッティング可能構築物のクリアランスを促進する、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

二重特異性抗体とターゲッティング可能構築物が同時に投与され、クリアリング剤がその同時投与の後、またはその同時投与と同時に投与される、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

二重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントおよび第二の抗体およびその抗原結合フラグメントが、ヒト化抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ネズミ抗体およびその抗原結合フラグメントから選択される、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

第二の抗体が、IgG抗体である、請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

クリアリング剤のIgG抗体が、循環からクリアリングを高める、C_H2欠損を有するIgG抗体である、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

第二の抗体またはその抗原結合フラグメントが、葉酸、メトトレキサート、HIV-1

10

20

30

40

50

t a t、トランスポーター、モデル両親媒性ペプチド(M A P)、ペネトラチン、ソマトスタチン、L H R H、ボンベシン、C C K B、サブスタンス P、および V I P からなる群より選択されるインターナリゼーション部分と結合する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 2】

インターナリゼーション部分が、葉酸である、請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

標的結合部分が、抗 C E A 抗体、またはその抗原結合フラグメントである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

抗 C E A 抗体またはその抗原結合フラグメントが、h M N 1 4 抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

腫瘍関連マーカーが C E A であり、
二重特異性抗体が C E A およびハプテン H S G と結合する h M N 1 4 - h 6 7 9 であり、かつ

クリアリング剤が、I n D T P A に対して 2 つの結合アームを有している、高度ガラクトシル化 m 7 3 4 I g G である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

癌の治療または診断用医薬組成物であって、

(i) C E A およびハプテン H S G と結合する、h A 2 0 F a b - 6 7 9 s c F v を含んでなる、二重特異性抗体；

(ii) I n - D T P A - G l n - A l a - L y s (H S G) - D - T y r - L y s (H S G) - N H ₂ を含んでなるターゲッティング可能構築物であって、治療部分または診断部分とを含んでなる、ターゲッティング可能構築物；および

(iii) I n - D T P A および C D 7 4 に結合する、(c 7 3 4 s c F v) ₂ h L L 1 I g G を含んでなる、クリアリング剤であって、標的部位においてターゲッティング可能構築物の保持を高める、クリアリング剤を含んでなる、医薬組成物。

【請求項 1 7】

腫瘍関連マーカーが C D 7 4 であり、標的結合部分が、C D 7 4 と結合する、ヒト化、キメラ、またはネズミ L L 1 抗体またはその抗原結合 L L 1 抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

腫瘍関連マーカーが C D 2 0 であり、標的結合部分が、C D 2 0 と結合する、ヒト化、キメラ、またはネズミ A 2 0 抗体またはその抗原結合 A 2 0 抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

腫瘍関連マーカーが C D 2 2 であり、標的結合部分が、C D 2 2 と結合する、ヒト化、キメラ、またはネズミ L L 2 抗体またはその抗原結合 L L 2 抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

腫瘍関連マーカーが E P G - 1 であり、標的結合部分が、E P G - 1 と結合する、ヒト化、キメラ、またはネズミ R S 7 抗体またはその抗原結合 R S 7 抗体フラグメントである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0 0 0 1】

本発明は、治療薬および診断薬の in v i v o 投与の分野に関し、このような薬剤を特定の細胞種にターゲッティングする方法および組成物を含む。

10

20

30

40

50

本明細書中に示す情報および引用されている参照文献は単に読者の理解を助けるためのものであり、このような情報または引用されている参照文献はいずれも本発明の先行技術を構成することを認めたものではない。

【0002】

標的部位の検出は検出薬剤のシグナル/バックグラウンド比が高ければ有利である。治療は、標的部位における治療薬の絶対付着が極力高く、ならびに取り込みおよび結合が合理的に長期間であれば有利である。ターゲッティング率と標的部位に送達される薬剤の量は、優先的に局在させるためにターゲッティング部分と結合させた診断薬または治療薬を含むターゲッティングベクターを用いて向上させることができる。

【0003】

ターゲッティングベクターの例としては、抗体または抗体フラグメント、細胞または組織特異的ペプチド、ならびにホルモンおよびその他の受容体結合分子などのターゲッティング部分と診断薬または治療薬との複合体が挙げられる。例えば、罹患細胞および正常細胞に関連する種々の決定基、ならびに病原微生物に関連する決定基の対する抗体が広範な病状または病変の検出および処置に用いられてきた。これらの方法では、例えばHansen et al.の米国特許第3,927,193号およびGoldenbergの米国特許第4,331,647号、同第4,348,376号、同第4,361,544号、同第4,468,457号、同第4,444,744号、同第4,460,459号、同第4,460,561号、同第4,624,846号および同第4,818,709号（これらの開示内容は総て、引用することにより本明細書の一部とする）に記載されているように、ターゲッティング抗体が適当な検出薬または治療薬に直接結合されている。

【0004】

直接ターゲッティング法、すなわち、診断薬または治療薬（「有効薬剤」）がターゲッティング部分に直接結合される方法で出くわす一つの問題は実際に標的部位に結合する複合体は比較的少なく、複合体の大部分は循環中に留まり、ターゲッティングされた複合体の機能を様々な形で損ねる。例えば放射免疫シンチグラフィ複合体または磁気共鳴イメージング複合体などの診断複合体の場合では、循環中に留まっている、ターゲッティングされなかった複合体がバックグラウンドを引き上げ、解像度を低下させる。抗体などの長期循環ターゲッティング部分と結合させた有毒治療薬（例えば放射性同位元素、薬物、または毒素など）を含む治療薬の場合では、骨髄毒性または全身性副作用といった、許容できない毒性を宿主にもたらすこともある。

【0005】

検出薬または治療薬の標的：バックグラウンド比を高めるためにプレターゲッティング法が開発されている。プレターゲッティングおよびビオチン/アビジンアプローチの例は、例えば、Goodwin et al., 米国特許第4,863,713号；Goldenberg, 米国特許第5,525,338号；Goodwin et al., J. Nucl. Med. 29:226, 1988；Hnatowich et al., J. Nucl. Med. 28:1294, 1987；Oehr et al., J. Nucl. Med. 29:728, 1988；Klibanov et al., J. Nucl. Med. 29:1951, 1988；Sinitzyn et al., J. Nucl. Med. 30:66, 1989；Kalofoinos et al., J. Nucl. Med. 31:1791, 1990；Schechter et al., Int. J. Cancer 48:167, 1991；Paganelli et al., Cancer Res. 51:5960, 1991；Paganelli et al., Nucl. Med. Commun. 12:211, 1991；Sharkey et al., Bioconjugate Chem 8:595-604, 1997；Stickney et al., Cancer Res. 51:6650, 1991；およびYuan et al., Cancer Res. 51:3119, 1991（これらの開示内容は総て、引用することにより本明細書の一部とする）に記載されている。

【0006】

プレターゲッティング法では、一次ターゲッティング種（診断薬または治療薬と結合されていない）を投与する。この一次ターゲッティング種は、標的部位と結合するターゲッティング部分と、ターゲッティング可能構築物上の結合部位との結合に利用可能な結合部分を含む。一次ターゲッティング種の十分な付着が達成されたところで、ターゲッティング可能構築物を投与する。このターゲッティング可能構築物は、一次ターゲッティング種

の利用可能な結合部位を認識する結合部位と診断薬または治療薬を含む。

【0007】

プレターゲッティングでは、直接ターゲッティング法の使用を超える、ある利点が得られる。例えば、治療、例えば放射免疫治療のため標的部位へ放射性核種をin vivo送達するためのプレターゲッティングアプローチを用いれば、放射性免疫複合体が長期循環することにより起こる骨髄毒性が軽減される。これは放射性同位元素が、長期循環種であることが多い一次ターゲッティング分子と直接結合されているのではなく、迅速にクリアリングされる低分子量キレートとして送達されるためである。

【0008】

いくつかのプレターゲッティング法に見られる特徴の一つは、重患中の一次ターゲッティング種（標的部位に結合していない一次ターゲッティング種）が、ターゲッティング可能複合体と、標的部位に結合している（一次ターゲッティング種上の結合部分を介して）ターゲッティング種との結合を妨害するということである。いくつかの方法では、このように一次ターゲッティング種と結合し、その種の循環からのクリアリングを助けるクリアリング剤を用いることにより、循環中の一次ターゲッティング種のレベルを引き下げる。一例として、Goodwin, et al., 米国特許第4,863,713号に記載されている。しかしながら、循環中の一次ターゲッティング種のレベルを引き下げれば結合平衡がシフトして結合している一次ターゲッティング種が標的から解離してしまい、それにより検出種または治療種が標的部位に存在する時間が短くなる。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、生物活性種と構築物を生体標的に送達するために有利な方法を提供する。このように、一実施形態では、本発明は、標的部位における治療薬または診断薬（またはその他の活性種）の結合を、標的部位における活性種の保持を高める薬剤を用いて増強するという、改良されたターゲッティング法に関する。

【0010】

もう一つの実施形態では、本発明は、活性種または複合体のインターナリゼーションが、標的細胞においてインターナリゼーション薬剤を用いない場合よりも高い程度で、かつ/または迅速にインターナライズされる部分の結合または複合体の形成によって促進されるという、改良されたターゲッティング法に関する。

【0011】

さらなる実施形態では、本発明は、治療薬または診断薬のターゲッティング送達のための方法であって、少なくとも一つの標的結合部分と少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分を含む一次ターゲッティング剤；少なくとも一つの一次ターゲッティング剤結合部分とクリアリング剤結合部分、および通常は治療部分または診断部分を含むターゲッティング可能構築物；および少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分を含み、標的部位においてターゲッティング可能構築物の保持を高めるクリアリング剤を哺乳類に投与することによる方法に関する。

【0012】

もう一つの実施形態では、本発明は、治療部分または診断部分の細胞のインターナリゼーションを高める方法であって、標的結合部分を含む一次ターゲッティング剤；およびインターナリゼーション部分を含む個別のインターナリゼーション薬剤を哺乳類に投与し、一次ターゲッティング剤がインターナリゼーション薬剤と複合体を形成し、それによりインターナリゼーションを促進することによる（この複合体も治療薬または診断薬を含む）方法を提供する。

【0013】

同様に、もう一つの態様では、本発明は、in vivo可視化系においてコントラストを高める方法であって、標的結合部分と少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分を含む一次ターゲッティング剤；一次ターゲッティング剤結合部分とクリアリング剤結合部分と可視化部分とを含むターゲッティング可能構築物；および少なくとも一つのター

10

20

30

40

50

ゲッティング可能構築物結合部分を含むクリアリング剤を哺乳類に投与し、それにより、標的と結合したターゲッティング可能構築物に対する循環中のターゲッティング可能構築物の比率を引き下げ、かつ/または循環標的のクリアランス速度を高めることによる方法を提供する。

【0014】

また、本明細書に記載されるようなクリアリング剤を提供することで、循環中の治療薬または診断薬を有する哺乳類にクリアリング剤を投与することにより循環中の治療薬または診断薬をクリアリングする方法も提供され、ここで、このクリアリング剤は、治療薬または診断薬を含む循環中の分子または複合体上の少なくとも一つの部分と特異的に結合し、その分子または複合体のクリアランスを促進する。

10

【0015】

関連の態様において、本発明は、本方法で有用な構築物に関する。よって、本発明は、治療部分または診断部分の送達に適合した三重特異性ターゲッティング可能構築物に関する。この構築物は、個別の一次ターゲッティング剤との結合に好適な少なくとも一つの第一の結合部分；クリアリング剤との結合に好適な第二の結合部分；およびインターナリゼーション薬剤との結合に好適な第三の結合部分を含む。

【0016】

さらに、本発明は、哺乳類において循環からターゲッティング可能構築物をクリアリングするのに好適なクリアリング剤を提供する。このクリアリング剤は、ターゲッティング可能構築物との結合に好適な結合部分；およびインターナリゼーション部分を含む。

20

【0017】

もう一つの関連態様では、本発明は、インターナライズ薬剤と結合されている、少なくとも一つの一次ターゲッティング剤結合部分とインターナライズ薬剤結合部分を含むターゲッティング可能構築物を含んでなる、分子複合体を提供する。

【0018】

さらにもう一つの関連態様は、クリアリング剤と結合されている、少なくとも一つ、好ましくは二つの一次ターゲッティング剤結合部分、クリアリング剤結合部分、および治療部分または診断部分を含む分子複合体を含んでなる、ターゲッティング可能構築物に関する。

【0019】

さらなる実施形態は、複数の一次ターゲッティング剤結合部分を含む多価ターゲッティング可能構築物と結合されている、標的結合部分と複数のターゲッティング可能構築物結合部分を含む多価一次ターゲッティング剤；クリアリング剤結合部分、および治療部分または診断部分を含む分子複合体である。

30

【0020】

さらなる分子複合体は、少なくとも一つの一次ターゲッティング剤結合部分とクリアリング剤結合部分と治療薬または診断薬結合部分とを含むターゲッティング可能構築物と結合され、かつ、ターゲッティング可能構築物結合部分またはクリアリング剤結合部分とインターナライズ部分を含むインターナライズ薬剤と結合されている、標的結合部分と少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分を含む一次ターゲッティング剤を含む。

40

【0021】

さらにもう一つの複合体は、一次ターゲッティング剤結合部分とインターナライズ部分を含むインターナリゼーション薬剤と結合されている、標的結合部分と治療部分または診断部分を含む一次ターゲッティング剤を含む。

【0022】

ある実施形態では、治療薬または診断薬を標的細胞へターゲッティングするための開示されている方法で用いるための、本発明の成分を含むキットが提供される。

【0023】

さらなる実施形態では、被験体（典型的には患者）、好ましくはヒトにおいて疾病また

50

は症状を処置および／または診断する方法が提供される。この方法は本明細書で記載されるターゲッティング送達法において被験体に少なくとも一つの治療部分または診断部分を投与することを含む。

【0024】

さらにもう一つの態様では、本発明は、固相媒体上、例えば樹脂上での合成によりDTPA結合ペプチドを製造するための有利な方法を提供する。

さらなる態様および実施形態は以下の図面の説明および詳細な説明から明らかとなる。

【発明の具体的説明】

【0025】

特に断りのない限り、名詞の単数表現は複数の場合も含むことを意味する。

【0026】

I. 定義

以下の説明において、多数の専門用語が使用されており、以下、本発明の理解を容易にするために定義を示す。特に断りのない限り、用いられている技術用語および科学用語は総て当業者が通常に理解しているものと同じ意味を有する。さらに、本明細書に引用されている総ての参照文献の内容は引用することによりそのまま本明細書の一部とされる。

【0027】

本明細書において、「一次ターゲッティング剤」(primary targeting agent)とは、選択された標的と結合する少なくとも一つの結合部分と、ターゲッティング可能構築物と結合する少なくとも一つの(好ましくは二つの)結合部分を含む少なくとも一つの二重特異性構築物をさす。本明細書において「二重特異性抗体」(bispecific antibody)は二つの異なる部分、例えば標的組織とターゲッティング可能構築物と結合し得る抗体である。二重特異性抗体は構造の異なる二つの標的と同時に結合することができる。二重特異性抗体(bisAb)および二重特異性抗体フラグメント(bisFab)は、例えば腫瘍、組織、B細胞、T細胞、骨髄、血漿、およびマスト細胞抗原またはエピトープと特異的に結合する少なくとも一つのアームと、ターゲッティング可能構築物と特異的に結合する少なくとも一つの他のアームを有する。分子工学技術を用いて種々の二重特異性融合タンパク質を作製できる。一つの形態においては、二重特異性融合タンパク質は一価であり、例えば一つの抗原に対する一つの結合部位を有するscFvと第二の抗原に対する単一結合部位を有するFabフラグメントからなる。もう一つの形態においては、二重特異性融合タンパク質は二価であり、例えば一つの抗原に対する一つの結合部位を有するIgGと第二の抗原に対する二つの結合部位を有する二つのscFvからなる。また別の形態においては、本発明では、二量体抗体であるダイアボディーが有用である。ダイアボディーは重鎖可変ドメイン(VH)からなり、ペプチドリンカーにより軽鎖可変ドメイン(VL)と連結されている。単鎖(sc)Fvフラグメントとは異なり、各抗原結合部位は二つの異なるポリペプチドに由来する1つのVHと1つのVLドメインの組により形成される。ダイアボディーは二つの抗原結合部位を有し、二重特異性であってもよく、本発明において一次ターゲッティング剤として有用である。

【0028】

また、一次ターゲッティング剤は構造の異なる少なくとも二つの標的、例えば二つの異なる抗原、同じ抗原上の二つの異なるエピトープと同時に結合することができる抗体である多重特異性抗体、またはハプテンおよび／または抗原もしくはエピトープであってもよい。例えば一つの特異性はB細胞、T細胞、骨髄、血漿、およびマスト細胞抗原またはエピトープに対するものである。もう一つの特異性はB細胞上のCD20、CD19、CD21、CD23、CD46、CD80、HLA-DR、CD74、およびCD22など、同じ細胞種上の異なる抗原に対するものであり得る。多価抗体は構造の同じまたは異なる少なくとも二つの標的と同時に結合することができる抗体である。多重特異性多価抗体は、特異性の異なる1を超える結合部位を有する構築物である。例えば、ダイアボディーは、ある抗原を含む1つの結合部位および別の抗原を含む別の結合部位と反応することができ

10

20

30

40

50

る。

【 0 0 2 9 】

さらに、一次ターゲッティング剤は、二以上の同じもしくは異なる単鎖抗体、または特異性が同じもしくは異なる抗体フラグメントセグメントが連結されている組換えにより作出された抗原結合分子である抗体または抗体融合タンパク質であってもよい。融合タンパク質の価数は、その融合タンパク質が単一の抗原またはエピトープに対して有している結合アームまたは結合部位の数を示し、すなわち、一価、二価、三価または多価などである。抗体融合タンパク質が多価であるということは、抗原に対する結合において複数の相互作用を利用できることを意味し、従って、その抗原に対する結合力が高まる。特異性は、抗体融合タンパク質が結合できる抗原またはエピトープの数を示し、すなわち、一重特異性、二重特異性、三重特異性、多重特異性などである。これらの定義により、例えば I g G のような天然の抗体は、結合アームを二本持つために二価であるといえるが、この抗体は一つのエピトープにしか結合しないので一重特異性である。一重特異性多価融合タンパク質は、1つのエピトープに対して一を超える結合部位を有するが、一つのエピトープとしか結合せず、例えば、ダイアボディーは同じ抗原と反応性のある二つの結合部位を有する。この融合タンパク質は、単一の抗体成分、異なる抗体成分の多価もしくは多重特異性の組合せ、または同じ抗体成分の複数のコピーを含んでもよい。この融合タンパク質はさらに抗体または抗体フラグメントおよび治療薬を含んでもよい。このような融合タンパク質に好適な治療薬の例としては、免疫調節剤（「抗体 - 免疫調節剤融合タンパク質」）および毒素（「抗体 - 毒素融合タンパク質」）が挙げられる。

【 0 0 3 0 】

一次ターゲッティング剤はその標的結合部分を介して種々の抗原または標的と特異的に結合する。しかし、特に好適な抗原としては、癌胎児性抗原、テネイシン、上皮細胞増殖因子受容体、血小板由来増殖因子受容体、繊維芽細胞増殖因子受容体、血管内皮細胞増殖因子受容体、ガングリオシド、HER / 2 neu 受容体、およびそれらの混合物が挙げられる。より具体的には、抗原は結腸特異的抗原 - p (C S A p)、CD 6 6 e としても知られている癌胎児性抗原 (C E A)、CD 4、CD 5、CD 8、CD 1 4、CD 1 5、CD 1 9、CD 2 0、CD 2 1、CD 2 2、CD 2 3、CD 2 5、CD 3 0、CD 3 3、CD 3 7、CD 3 8、CD 4 0、CD 4 0 L、CD 4 5、CD 4 6、CD 5 2、CD 6 6 a - d、CD 7 4、CD 7 5、CD 8 0、CD 1 2 6、B 7、HLA - DR、I a、I i、HM 1 . 2 4、MUC 1、MUC 2、MUC 3、MUC 4、NCA、EGFR、HER 2 / neu、PAM - 4、TAG - 7 2、EGP - 1、EGP - 2、AFP、HCG、HCG - 、PLAP、PAP、ヒストン、A 3、KS - 1、Le (y)、S 1 0 0、PSMA、PSA、テネイシン、葉酸受容体、VEGF、PLGF、ILGF - 1 (インスリン様増殖因子 - 1)、壊死抗原、IL - 2、IL - 6、T 1 0 1、MAGE、従属栄養ホルモン、癌遺伝子産物、サイトケラチン、およびそれらの組合せが挙げられる。

【 0 0 3 1 】

「ターゲッティング可能構築物」(tagetable construct)は、それぞれ一次ターゲッティング剤の結合部分およびクリアリング剤の結合部分により認識される少なくとも二つの直交結合部分を含む、または有する分子スキャフォールドを含む。本明細書において「分子スキャフォールド」(または単に「スキャフォールド」)とは、エピトープおよび他の結合部分がそのスキャフォールドおよび/または他の部分に対して種々の位置に、かつ/または種々の配向で結合することができる任意の化学構造である。限定されるものではないが、分子スキャフォールドの例としては、オリゴペプチドおよびオリゴヌクレオチドなどの高分子が挙げられる。Skerra, Engineered protein scaffolds for molecular recognition. J Mol Recognit 13(4):167-187, 2000; Erratum in: J Mol Recognit 14(2):141, 2001参照。

【 0 0 3 2 】

本明細書において「クリアリング剤」(clearing agent)とは、結合していないターゲッティング可能構築物の循環からのクリアランス促進し、かつ/またはターゲッティング可

能構築物を一次ターゲッティング剤にロックする構築物である。クリアリング剤はそのクリアリング剤と同じ処理手順で用いるターゲッティング可能構築物により認識される標的細胞の集団へのクリアリング剤の接近を制限する大きさ、電荷、構成またはそれらの組合せなどの物理的特性を有するのが好ましい。この促進作用は、標的部位と結合する、一次ターゲッティング剤の決定基に特異的な抗イディオタイプモノクローナル抗体などの抗イディオタイプクリアリング剤の投与によりさらに向上させることができる。ガラクトシル化されたクリアリング剤は肝臓により迅速にクリアリングされることから、ガラクトシル化されたクリアリング剤を用いることでクリアランス作用はさらに増強することができる。同様に、クリアリング剤はクリアランスを促進する突然変異を有する抗体など、迅速にクリアリングする抗体を含むこともできる。クリアリング剤はIgGであってもよく、より好ましくは、補体結合すれば患者から迅速にクリアリングされるIgG1であってもよい。本発明に関しては、クリアリング剤はまた、個々の標的結合ターゲッティング可能構築物を架橋する構成となっている。

10

【0033】

本明細書において「病原体」とは、限定されるものではないが、真菌、ウイルス（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、ヒト血清パルボ様ウイルス、シミアンウイルス40、呼吸器合胞体ウイルス、マウス乳癌ウイルス、水痘-带状疱疹ウイルス、 Dengue熱ウイルス、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、ネズミ白血病ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、疣贅ウイルスおよびブルータンクウイルス）、寄生虫および細菌（例えば、ストレプトコッカス・アガラクティー（*Streptococcus agalactiae*）、レジオネラ・ニューモフィラ（*Legionella pneumophila*）、化膿連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）、大腸菌（*Escherichia coli*）、淋菌（*Neisseria gonorrhoeae*）、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）、肺炎球菌（*Pneumococcus*）、B型インフルエンザ（*Hemophilis influenzae B*）、梅毒トレポネーマ（*Treponema pallidum*）、ライム病スピロヘータ、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、らい菌（*mycobacterium leprae*）、ウシ流産菌（*Brucella abortus*）、ヒト結核菌（*mycobacterium tuberculosis*）および破傷風菌毒素）が挙げられる。米国特許第5,332,567号参照。さらなる病原体は詳細な説明に挙げられている。

20

30

【0034】

本明細書において「抗体」とは、全長（すなわち、天然に存在するまたは通常の免疫グロブリン遺伝子フラグメント組換えプロセスにより形成される）免疫グロブリン分子（例えばIgG抗体）、または抗体フラグメントのような、免疫グロブリン分子の免疫学的に有効な（すなわち、特異的に結合する）部分をいう。

【0035】

「抗体フラグメント」とは、 $F(a b')_2$ 、 $F(a b)_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F v$ 、 $s c F v$ などのような抗体の部分を用いる。構造に関係なく、抗体フラグメントは完全な抗体により認識される同じ抗原と結合する。例えば、抗CEAモノクローナル抗体フラグメントは、CEAのエピトープと結合する。

40

【0036】

「抗体フラグメント」とはまた、特定の抗原に結合して複合体を形成することにより抗体のようにふるまういずれの合成または遺伝子操作タンパク質も含む。例えば、抗体フラグメントとしては、可変領域からなる単離されたフラグメント、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「 $F v$ 」フラグメント、軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリンカー（「 $s c F v$ タンパク質」）により接続されている組換え単鎖ポリペプチド分子、および超過変領域を模倣したアミノ酸残基からなる最小認識ユニットが挙げられる。

【0037】

「 $s c F v$ 」とは、抗体の軽鎖可変領域と重鎖可変領域がペプチドリンカーによって連

50

結されている組換え単鎖ポリペプチド分子を意味するのに用いられる。単鎖抗体 (s c F v) は一般にエフェクター機能に関与する抗体の F c 領域の部分を含まず、従って裸の抗体であるが、所望によりこのような領域に既知の s c F v 分子を付加する方法も知られている。Helfrich et al., A rapid and versatile method for harnessing scFv antibody fragments with various biological functions. J Immunol Methods 237:131-145 (2000)およびde Haard et al., Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. Advanced Drug Delivery Reviews 31:5-31 (1998)参照。

【 0 0 3 8 】

「I g G」とは、抗原に対して生成され、抗原と特異的に結合することができる抗体タンパク質を意味するのに用いる。

【 0 0 3 9 】

本明細書において迅速にクリアリングする突然変異抗体に関して、「親抗体」とは、親抗体の I g G 成分の F c ヒンジフラグメントが C_H2 - C_H3 ドメイン境界領域に 1 以上のアミノ酸突然変異を含まないこと以外は総ての点で突然変異抗体と同じ抗体を意味するのに用いられる。本明細書において「F c ヒンジ」とは、I g G の C_L、C_H1、ヒンジ、C_H2 および C_H3 領域を含む。

【 0 0 4 0 】

「キメラ抗体」は、齧歯類抗体に由来する可変ドメインと相補性決定領域を含むが、抗体分子の残りの部分はヒト抗体に由来する組換えタンパク質である。

【 0 0 4 1 】

「ヒト化抗体」とは、抗体を投与しようとする動物、通常ヒトにおいて抗体または抗体フラグメントの抗原性を軽減するために、アミノ酸配列、グリコシル化パターンなどに関してよりヒトに似ているように遺伝子操作および/またはin vitro処理により改変された抗体をさす。Gussow & Seemann, Humanization of monoclonal antibodies. Methods Enz. 203:99-121 (1991)、およびVaswani & Hamilton, Humanized antibodies as potential therapeutic drugs. Ann Allergy Asthma Immunol 81:105-119 (1998)参照。多くの場合、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体のネズミ相補性決定領域がネズミ免疫グロブリンの重鎖および軽鎖可変ドメインからヒト可変ドメインへと移されている組換えタンパク質である。あるいは、完全ヒト抗体はトランスジェニック非ヒト動物から得ることもできる。例えば、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる、Mendez et al., Nature Genetics, 15:146-156 (1997); 米国特許第 5, 6 3 3, 4 2 5 号参照。一次ターゲティング剤およびクリアリング剤は上記のようなネズミ、キメラ、ヒト化、ヒト抗体またはそれらの組合せからなり得る。

【 0 0 4 2 】

本明細書において結合部分に関して「直交」(orthogonal)とは、示された二以上の結合部分が互いに直交していて、同じ相補的結合対のメンバーとは有意なレベルでは結合しないということ、すなわち、それらは異なる分子上の異なるエピトープを認識するということを意味する。

【 0 0 4 3 】

「ハプテン」は免疫原性担体分子とまず結合しないことには免疫応答を惹起できない小分子である。ハプテンはそれ自体免疫応答を惹起できないが、免疫原応答中に生じた抗体が特異的に結合してハプテン - 担体複合体となる。

【 0 0 4 4 】

本明細書において「治療薬」とは、治療に有用な複合体を作出するために例えば R N A ーゼまた毒素とともに、抗体部分などの一次ターゲティング部分と結合させた、またはターゲティング可能構築物と結合させた、または一次ターゲティング剤と融合させた分子または原子である。限定されるものではないが、治療薬の例としては、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、プロドラッグを薬物へと活性化させる酵素、酵素 - 阻害剤、ヌクレアーゼ、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、免疫調節剤、例えばサイトカイン、すなわちインターロイキン (インターロイキン - 2 など)、リンホカイン、インターフェロンお

10

20

30

40

50

よび腫瘍壊死因子、オリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは干渉RNA、すなわち小さな干渉RNA（siRNA））、キレート剤、ホウ素化合物、光活性薬または色素、放射性同位元素または放射性核種が挙げられる。LL1scv734IGは本願の図9で示したような結合分子でもあるロック抗体の一例である。

【0045】

付加的に投与される好適な薬物、プロドラッグ、および/または毒素としては、アブリジン、アザリピン、アナストロゾール、アザシチジン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、プリオスタチン-1、プスルファン、カンプトテシン、10-ヒドロキシカンプトテシン、ルムスチン、セレブレックス、クロラムブシル、シスプラチン、イリノテカン（CPT11）、SN-38、カルボプラチン、クラドリピン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノマイシングルクロニド、ダウノルピシン、デキサメタゾン、ジエチルスチルベストロール、ドキソルピシンおよびその類似体、ドキソルピシングルクロニド、エピルピシングルクロニド、エチニルエストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エトポシドグルクロニド、リン酸エトポシド、フロクスウリジン（FUDR）、3',5'-O-ジオレオイル-FUDR（FUDR-dO）、フルダラビン、フルタミド、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、ゲムシタビン、カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イフォスファミド、L-アスパラギナーゼ、ロイコボリン、ロムスチン、メクロレタミン、酢酸メドロプロゲステロン、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトタン、酪酸フェニル、プレドニゾン、プロカルバジン、パクリタキセル、ペントスタチン、セムスタチンストレプトゾシン、タモキシフェン、タキサン類、タキソール、プロピオン酸テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、テニポシド、トポテカン、ウラシルマスタード、ビンブラスチン、ビノレルピン、ピンクリスチン、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ（オンコナーゼ）、rapLR1、DNアーゼI、ブドウ球菌内毒素-A、ブタクサ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素、シュードモナス内毒素、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、スルホン酸アルキル、ニトロソ尿素、トリアゼン、葉酸類似体、アントラサイクリン、COX-2阻害剤、ピリミジン類似体、プリン類似体、抗生物質、エピポドフィロトキシン、プラチナ錯体、ピンカルカロイド、置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、アンタゴニスト、エンドスタチンまたはそれらの組合せが挙げられる。

【0046】

好適な放射性核種としては、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 ^{94}Tc 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{154}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、またはそれらの混合物が挙げられる。

【0047】

一次治療薬とともに投与できる好適な酵素としては、カルボキシルエステラーゼ、グルクロニダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、 α -ラクタマーゼ、ホスファターゼ、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、およびそれらの混合物が挙げられる。

【0048】

好適な光活性薬および色素としては、ベンゾボルフィリン-酸環A（BPD-MA）、スズエチオプルプリン（SnET2）、スルホン化アルミニウムフタロシアニン（AISPC）およびルテチウムテキサフィリン（Lutex）のような光増感剤など、光線力学

療法用の薬剤が挙げられる。

【0049】

本明細書において「診断薬」とは、診断に有用な、抗体部などの一次ターゲッティング部分に結合された、またはターゲッティング可能構築物に結合されて複合体を形成する分子または原子である。限定されるものではないが、診断薬の例としては、光活性薬または色素、放射性核種、放射線不透過性物質、造影剤、蛍光化合物、磁気共鳴イメージング(MRI)用の増強剤(例えば、常磁性イオン)およびそれらの組合せが挙げられる。好適な増強剤としては、Mn、FeおよびGdがある。米国特許第6,331,175号はMRI技術およびMRI増強剤に結合された抗体の作製を記載し、その全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる。超音波イメージングには一以上の増強剤が有用であり得る。

10

【0050】

診断薬が25~4000keVの粒子をおよび/または陽電子を放射する、診断用として好適な放射性核種としては、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{45}Ti 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{188}Re 、またはそれらの混合物が挙げられる。さらに、診断薬が60~700keVの粒子および/または陽電子を放射する、診断用として好適な放射性核種としては、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{90}Y 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、またはそれらの混合物が挙げられる。放射性同位元素はポジトロン放射断層撮影(PET)を行うのに用いる。

20

【0051】

治療薬および/または診断薬は一次治療薬と直接会合させることができる(例えば、それとの共有または非共有結合)。好ましくは診断薬は、放射性同位元素、磁気共鳴イメージング用の増強剤、および蛍光化合物からなる群から選択される。抗体成分に放射性金属または常磁性イオンを付加するためには、イオンと結合するための複数のキレート基を結合させるための長いテールを有する試薬と反応させる必要がある場合がある。このようなテールはポリリジン、多糖類、または、例えばエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビス-チオセミカルバゾン、ポリオキシム、およびこの目的で有用なことが知られている同様の基などのキレート基が結合し得るペンダント基を有する他の誘導体化された、または誘導体化可能な鎖といった高分子であり得る。

30

【0052】

本明細書において「組織」とは、当業者がその意味するところを理解しているような組織を意味するのに用いる。本願で構想されているように、組織とはまた、身体組織または体液(例えば、血球)の個々の細胞、細胞群、または細胞培養物を意味するためにも用いられる。さらに、この組織は被験体内のものであっても、生検のものであっても、被験体から取り出されたものであってもよい。組織はまた、身体器官の全体または任意の一部であってよい。さらに、組織は、その組織が切除と本発明の方法の間に保存工程がなく、取り出されたばかりであるという意味で「新鮮」であるといえる。また、組織は、本発明の方法の適用前に、限定されるものではないが、冷凍、急速冷凍、パラフィン包埋、および組織固定をはじめとする標準的な組織標本技術により保存されていたものであってもよい。組織の例としては、限定されるものではないが、卵巣、胸腺、副甲状腺、および脾臓由来の組織が挙げられる。

40

【0053】

本明細書において「標的組織」または「標的」とは、例えば器官系、器官、組織、細胞オルガネラ、受容体、表面抗原、血餅、梗塞部、アテローム斑、トランスメンブランタン

50

パク質または分泌ポリペプチドなど、ターゲッティング可能構築物"が優先的に送達される任意の生体物である。「送達される」とは、標的組織と接触させること、標的組織と結合すること、および/または標的組織によりインターナライズされることを含む。例えば、本発明の治療の態様では、標的組織は多くの場合、感染、炎症、悪性、機能不全または変位または異所性の組織である（例えば、感染細胞、癌細胞、子宮内膜症など）。

【0054】

本明細書において「エピトープ」（a . k . a . 免疫原認識部分）は認識部分または分子が特異的に結合する任意の分子または部分を含む。認識部位および分子の例としては、限定されるものではないが、抗体、抗体誘導体、抗体の抗原結合領域および最小認識単位、ならびに受容体特異的リガンドが挙げられる。

10

【0055】

本明細書において、「被験体」とは、いずれの動物（すなわち、脊椎動物および無脊椎動物）もさし、限定されるものではないが、ヒトおよびその他の霊長類、齧歯類（例えば、マウス、ラット、およびモルモット）、ウサギ類（例えば、ウサギ）、ウシ属（例えば、畜牛）、ヒツジ類（例えば、ヒツジ）、ヤギ類（例えば、ヤギ）、ブタ類（例えば、ブタ）、ウマ類（例えば、ウマ）、イヌ類（例えば、イヌ）、ネコ類（例えば、ネコ）、家禽類（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、その他キジ類の鳥類など）、ならびに限定されるものではないが、有蹄類（例えば、シカ）、クマ、魚類、ウサギ類、齧歯類、鳥類などをはじめとする野生化または野生動物をさす。この用語は特定の年齢または性に限定されるものではない。よって、この用語には、雄性であれ雌性であれ、生体および新生被験体、ならびに胎児が含まれる。

20

【0056】

II. 本発明の一般法、薬剤、構築物、複合体およびキット

本発明は、診断薬または治療薬などの活性種を標的部位へ送達する方法に関する。一般に、これらの方法は一次ターゲッティング剤を所望の標的へターゲッティングすることを含む。一次ターゲッティング剤と結合し、活性種を運ぶターゲッティング可能構築物を投与する。結合したターゲッティング可能構築物をその場所にロックし、結合していないターゲッティング可能構築物を迅速にクリアリングするクリアリング剤も投与する。結合したターゲッティング可能構築物を標的結合部位に「ロックする」ということは、一般に二以上の結合したターゲッティング可能構築物を架橋することにより、一次ターゲッティング剤に対するターゲッティング可能構築物の結合平衡が結合状態へシフトすることから生じる。このように、ターゲッティング可能構築物が循環している際に循環から活性種を除去することで、そうでない場合に起こってしまう標的部位からのターゲッティング可能構築物の解離が起りにくくなる。

30

【0057】

よって、一般にクリアリング剤は二重の機能を有する。「ロック」の機能については、クリアリング剤は一般に、二以上の隣接する構築物を架橋することによりターゲッティング可能構築物をその場所に「ロックする」。同時に、ターゲッティング可能構築物と一次ターゲッティング剤の間の結合は通常、安定性が高くなるように、典型的には各ターゲッティング可能構築物について二以上の結合部分を利用するように選択する。クリアリング機能については、全身の組織（ターゲッティングされていない）の活性種暴露が少なくなるよう望ましいクリアランス時間となるようにクリアリング剤を選択することができる。例えば、クリアランス速度を高める突然変異を有するIgG分子、または修飾してガラクトシル化抗体とした抗体など、迅速に除去されるクリアリング剤が選択される場合が多い。このように、クリアリング剤は全身組織の活性種暴露を軽減すると同時に、標的部位における、活性種を含有するターゲッティング可能構築物の解離を軽減する。その結果、この方法は標的における活性種の濃度を高くし、かつ/または標的部位におけるターゲッティング可能構築物の結合を安定化させることにより暴露時間を長くする。

40

【0058】

さらなる実施形態では、本発明は、プレターゲッティングの使用により、哺乳類におい

50

てin vivoで特手の部位に治療薬または診断薬をターゲッティングすることに関し、非局在活性種は迅速にクリアリングされる。このようにすれば、一次ターゲッティング種（局在化剤とも呼ばれる）は、局在化剤が循環からクリアリングされないで平衡状態に留まる。その代わり、活性種を含む結合していないターゲッティング可能複合体はクリアリングされ、それにより非標的部位の活性種暴露が軽減される。ターゲッティング可能複合体は、ターゲッティング可能構築物と結合してその除去を促すクリアリング剤を用いてクリアリングされる。クリアリング剤は、それがターゲッティング可能構築物を局在化剤に固定する「ロック」種としても機能するように構築することが極めて好ましい。このようにすれば、ターゲッティング可能構築物のクリアリングは標的部位において結合した局在化剤から実質量のターゲッティング可能構築物は解離しない。

10

【0059】

さらなる実施形態では、本発明は、治療薬または診断薬のターゲッティング送達のための方法であって、哺乳類に、少なくとも一つの標的結合部分と少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分を含む一次ターゲッティング剤；少なくとも一つの一次ターゲッティング剤結合部分とクリアリング剤結合部分と、通常には治療部分または診断部分とを含むターゲッティング可能構築物；および少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分を含み、標的部位においてターゲッティング可能構築物の保持を高めるクリアリング剤を投与することによる方法に関する。これらの成分はクリアリング剤がターゲッティング可能構築物と結合し（かつ、一次ターゲッティング剤と結合することもできる）、ターゲッティング可能構築物が一次ターゲッティング剤単独と結合する場合、または標的結合部位においてターゲッティング可能構築物を安定化させるものではないクリアリング剤を用いた場合に比べて、結合部位におけるターゲッティング可能構築物の結合を安定化させるように構成する。ほとんどの場合、このような安定化は結合部位において二つ、またはそれ以上であってよいターゲッティング可能構築物を架橋することにより達成される。

20

【0060】

一次ターゲッティング剤のある実施形態では、標的結合部分は抗体であり；一次ターゲッティング剤は複数、例えば2、3または4つの標的結合部分を含み；ターゲッティング可能構築物結合部分は抗体またはその抗原結合フラグメントであり；ターゲッティング可能構築物結合部分はハプテンであり；ターゲッティング可能構築物結合部分は特異的結合対のメンバーであり；一次ターゲッティング剤は複数の、例えば二つのターゲッティング可能構築物結合部分を含み；一次ターゲッティング剤は癌細胞をターゲッティングし；一次ターゲッティング剤は組織をターゲッティングし；一次ターゲッティング剤は病原体をターゲッティングし；標的結合抗体および/またはターゲッティング可能構築物結合抗体はIgG抗体（抗体フラグメントであってもよい）である。

30

【0061】

ターゲッティング可能構築物の実施形態では、一次ターゲッティング剤結合部分は直交ハプテンなどのクリアリング剤結合部分と直交しており；ターゲッティング可能構築物は二つの一次ターゲッティング剤結合部分を含み；ターゲッティング可能構築物は二つの一次ターゲッティング剤結合部分と一つのクリアリング剤結合部分を含み；ターゲッティング可能構築物は治療薬を含み；ターゲッティング可能構築物は診断薬を含み；一次ターゲッティング剤結合部分は抗体またはハプテンであり；クリアリング剤結合部分は抗体またはハプテンであり；一次ターゲッティング剤結合部分およびクリアリング剤結合部分は双方とも抗体またはハプテンであり；一次ターゲッティング剤結合部分およびクリアリング剤結合部分は個々の特異的結合対のメンバーである。

40

【0062】

クリアリング剤の特定の実施形態では、クリアリング剤は少なくとも二つのターゲッティング可能構築物結合部分を含み；ターゲッティング可能構築物結合部分は抗体またはその抗原結合フラグメントであり；ターゲッティング可能構築物結合部分はハプテンであり；ターゲッティング可能構築物結合部分は特異的結合対のメンバーであり；クリアリング

50

剤のターゲッティング可能構築物結合抗体はIgG抗体（フラグメントであってもよい）を含み；IgG抗体は抗体および結合したクリアリング剤が修飾を伴わない親抗体よりも迅速に循環からクリアリングされる修飾され；IgG修飾は一以上のアミノ酸変異および/または欠損を含んでもよく；IgG欠損はC_H2ドメイン欠損を含み；クリアリング剤の抗体はガラクトースを結合させて含み；クリアリング剤は複数の、例えば2または3のターゲッティング可能構築物と結合し；結合した一次ターゲッティング剤をターゲッティングするために結合させたターゲッティング可能構築物に対するクリアリング剤の結合は標的部位におけるターゲッティング可能構築物の結合を安定化させ（ターゲッティング可能構築物が結合を維持する時間が長くなる）；標的部位に結合していないターゲッティング可能構築物に対するクリアリング剤の結合はターゲッティング可能構築物の循環からのクリアランス速度を高める。

10

【0063】

本方法のある実施形態では、一次ターゲッティング剤はターゲッティング可能構築物結合抗体構築物と標的結合抗体構築物を含み；ターゲッティング可能構築物は、ターゲッティング可能構築物結合抗体構築物と結合する少なくとも2コピーのハプテンと、クリアリング剤抗体構築物と結合する一つのハプテンを含み；かつ、クリアリング剤は、少なくとも二つのターゲッティング可能構築物と結合するターゲッティング可能構築物結合抗体構築物を含む。

【0064】

いくつかの例では、クリアリング剤がターゲッティング可能構築物を迅速にクリアリングする必要はなく、従って、本質的にロック機能だけで十分である。これは、特にターゲッティング可能構築物がそれ自体迅速にクリアリングする場合に適用できる。このような系では、ターゲッティング可能構築物は一次ターゲッティング剤と結合し、結合していないターゲッティング可能構築物が循環からクリアリングするにつれ標的部位において「ロックされる」。よって、本発明はまた、迅速にクリアリングしない架橋クリアリング剤の使用も含む。

20

【0065】

本発明の多くの適用は細胞表面への局在化またはターゲッティングを含む。しかし、本発明の一般法はまた、細胞における活性種のインターナリゼーションを含むものに拡張することができる。これらの実施形態において、その方法は、細胞に、会合した複合体をインターナライズさせるインターナリゼーション部分を組み込む構築物を用いる。このようなインターナリゼーション部分は種々の構築物と会合させることができ、例えば、クリアリング剤の一部としたり、あるいはターゲッティング可能構築物またはクリアリング剤と結合する個別のインターナリゼーション薬剤の一部としたりすることができる。これに関して、本発明は、複合体、例えば治療薬または診断薬を含む複合体を標的細胞内にインターナライズするアプローチに関する。このアプローチは、局在化剤を標的ヘターゲッティングまたはプレターゲッティングすること、および会合した複合体の細胞インターナリゼーションを続伸するインターナリゼーション薬剤を付加することを含む。このようにすれば、局在化剤を用いずにインターナリゼーション薬剤を使用することによって生じる非特異的インターナリゼーションの代わりに、標的インターナリゼーションが起こる。このアプローチは本明細書に記載のプレターゲッティング法と組み合わせても使用できるし、他のターゲッティング法でも使用できる。局在化剤は例えば基本的ターゲッティング法の成分の一つであってもよいし、あるいはそれらの成分の一以上と結合する個別の薬剤であってもよい。

30

40

【0066】

特に本発明は、治療薬または診断薬の細胞インターナリゼーションを促進する方法であって、哺乳類に、標的結合部分を含む一次ターゲッティング剤；およびインターナリゼーション部分を含む個別のインターナリゼーション薬剤を投与することにより、一次ターゲッティング剤がインターナリゼーション薬剤と複合体を形成し、それによりインターナリゼーションを促進し；また、この複合体がまた治療部分または診断部分も含む方法を提供

50

する。治療部分または診断部分は一次ターゲッティング剤の一部であってもよい。

【0067】

好ましい実施形態では、インターナリゼーション部分はターゲッティング可能構築物またはクリアリング剤と結合するか、またはその一部である。よって、ある実施形態では、その方法はまた、哺乳類に、一次ターゲッティング剤結合部分とクリアリング剤結合部分を含むターゲッティング可能構築物、およびターゲッティング可能構築物結合部分とインターナリゼーション部分を含むクリアリング剤を投与することを含む。あるいは、クリアリング剤はインターナリゼーション薬剤結合部分を含むことができ、クリアリング剤結合部分を含むインターナリゼーション薬剤も投与される。同様に、ある実施形態では、その方法は、哺乳類に、一次ターゲッティング剤結合部分とインターナリゼーション薬剤結合部分とクリアリング剤結合部分とを含むターゲッティング可能構築物；ターゲッティング可能構築物結合部分を含むクリアリング剤；およびターゲッティング可能構築物結合部分とインターナリゼーション部分を含むインターナリゼーション薬剤を投与することを含む。個別のインターナリゼーション薬剤の使用は、その結合部位においてのみ、またはその結合部位において優先的にインターナリゼーション部分とターゲッティング可能構築物を会合させることで有利なものとなり得る。

【0068】

インターナリゼーション部分を含む本発明の態様に関して、インターナリゼーションは種々の方法で達成することができる。特定の実施形態では、インターナリゼーション部分は葉酸受容体などの再循環受容体と結合する。葉酸受容体との結合のためには、インターナリゼーション部分は例えば葉酸基もしくはメトトレキサート、または葉酸受容体と結合する葉酸類似体を含めばよい。他の実施形態では、インターナリゼーション部分は非受容体媒介インターナリゼーションを促進するペプチド、例えばHIV-1 tatタンパク質、トランスポーター、MAP（モデル両親媒性ペプチド）、アンテナペディアペプチド（ペネトラチンとしても知られる）、およびそれらが結合した部分をインターナライズすることが知られているタンパク質またはペプチドを含む。Nagahara et al., Nature Medicine, 4(12):1449 1998は、融合タンパク質におけるtatの使用を開示している。細胞に浸透する他のペプチドも先行技術で知られており、Thoren et al., FEBS Letters 482: 265-268 (2000); Mazel et al., Anti-Cancer Drugs 12:107-116 (2001); Hallbrink et al., Biochim. et Biophys. Acta 1515:101-109 (2001); Thoren et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 307:100-107 (2003)で開示されている。その方法では上記のような構築物が使用でき、かつ/または上記のようなインターナリゼーション薬剤またはインターナリゼーション部分を含む。

【0069】

診断部分または治療部分を含む本発明の態様では、このような診断部分または治療部分は多くの異なるタイプのものであり得る。例えば、治療部分は光活性薬、放射性同位元素、非放射性金属キレート、薬物、プロドラッグを活性化させるための酵素、プロドラッグ、および/または毒素であってもよいし、それらを含んでもよい。同様に、診断部分は例えば造影剤、光散乱金属コロイド粒子、放射性同位元素および/または放射線イメージング金属キレートであってもよいし、それらを含んでもよい。

【0070】

この細胞インターナリゼーション促進法では、クリアリング剤のターゲッティング可能構築物結合部分は抗体またはその抗原結合抗体フラグメントを含み、より詳しくは、この抗体またはそのフラグメントはIgG抗体またはそのフラグメントである。より詳しくは、この抗体または抗体フラグメントは循環からのクリアランスを促進するC_H2欠損を有する抗体である。この抗体または抗体フラグメントはまた、クリアランスを促進するためにガラクトースで修飾することもできる。

【0071】

さらに、インターナリゼーション促進法では、複数のターゲッティング可能構築物と結合するクリアリング剤を用いる。さらに、ターゲッティング可能構築物に対してのクリア

リング剤は結合部位におけるターゲッティング可能構築物と一次ターゲッティング剤との結合を安定化させ、結合部位において一次ターゲッティング剤と結合していないターゲッティング可能構築物のクリアランスを促進する。クリアリング剤のターゲッティング可能構築物結合部分は抗体または抗体フラグメント、特にIgG抗体または抗体フラグメントを含む。この抗体または抗体フラグメントは、循環からのクリアランスを促進するC_H2欠損を有するIgG抗体、あるいはガラクトースで修飾されている抗体または抗体フラグメントである。

【0072】

さらに、本発明は、in vivo可視化系においてコントラストを増強する方法であって、哺乳類に、標的結合部分と少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分を含む一次ターゲッティング剤；一次ターゲッティング剤結合部分とクリアリング剤結合部分と可視化部分とを含むターゲッティング可能構築物；および少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分を含むクリアリング剤を投与し、それにより、標的に結合したターゲッティング可能構築物に対する循環中のターゲッティング可能構築物の比率を引き下げ、かつ/または循環中の標的のクリアランス速度を高める方法を開示する。クリアリング剤はさらにインターナリゼーション部分を含む。ターゲッティング可能構築物はさらにインターナリゼーション薬剤結合部分を含み、この方法はさらに、ターゲッティング可能構築物結合部分とインターナリゼーション部分を含むインターナリゼーション薬剤を哺乳類に投与することを含む。一実施形態では、クリアリング剤のターゲッティング可能構築物結合部分は抗体または抗体フラグメントであり、好ましくはIgG抗体または抗体フラグメントである。IgG抗体は循環からのクリアランスを促進するC_H2欠損を有するか、またはガラクトースで修飾されている。このクリアリング剤は複数のターゲッティング可能構築物と結合し得る。さらに、このクリアリング剤とターゲッティング可能構築物との結合は結合部位におけるターゲッティング可能構築物と一次ターゲッティング剤との結合を安定化させ、かつ、結合部位において一次ターゲッティング剤と結合していないターゲッティング可能構築物のクリアランスを促進する。

【0073】

本発明はまた、循環中の治療薬または診断薬をクリアリングする方法であって、循環中の治療薬または診断薬を有する哺乳類にクリアリング剤を投与し、そのクリアリング剤が治療薬または診断薬を含む循環分子または複合体上の少なくとも一つの部分と特異的に結合し、その分子または複合体のクリアランスを促進することによる方法を包含する。その方法は本明細書に記載のようなターゲッティング可能構築物および/またはクリアリング剤を含む。

【0074】

特定の実施形態では、治療薬または診断薬は、少なくとも二つの直交ハプテン、好ましくは、少なくとも2コピーの直交ハプテンを含むターゲッティング可能構築物の一部であり；ターゲッティング可能構築物はペプチド、好ましくは、スキャフォールドまたはリンカーとしてのものを含み；治療薬は放射性同位元素、薬物、毒素、プロドラッグを活性化させる酵素、非放射性金属キレート、または免疫刺激薬である。この方法では、クリアリング剤は、循環中の分子または複合体と特異的に結合する抗体または抗体フラグメントを含む。このクリアリング剤は少なくとも二つの循環分子または複合体と結合し、それにより、その分子または複合体を架橋する。クリアリング剤は上記のように、IgGもしくはフラグメント、または循環からのクリアランスを促進するC_H2欠損を有する、またはガラクトースで修飾されているIgG抗体である。クリアリング剤はまた、複数のターゲッティング可能構築物と結合することもできる。さらに、クリアリング剤とターゲッティング可能構築物との結合は、結合部位におけるターゲッティング可能構築物と一次ターゲッティング剤との結合を安定化させ、かつ、結合部位において一次ターゲッティング剤と結合していないターゲッティング可能構築物のクリアランスを促進する。

【0075】

以下にさらに詳細に記載されるように、本発明において用いるための構築物は多くの異

10

20

30

40

50

なる方法で構成することができる。例えば、特定の結合対（例えば、抗体／ハプテン対）については、一般にその結合対の個々のメンバーを、所望に応じて関連の構築物上に局在させることができる。よって、抗体／ハプテン結合対を用いる場合、抗体は1つの構築物上にあり、同種のハプテンが、第一の構築物が結合する構築物上にあるか、または抗体とハプテンは二つの構築物上で逆転していてもよい。このような代替構築物は以下の記載から明らかとなる。いくつかの構成例が図1～5および7～9で概略的に示されている。

【0076】

本明細書には、本発明で適用できる情報を示す参照文献がいくつか引用されている。例えば、引用されている参照文献には、本発明で有用な、または本発明で有用となるように適合可能な一次ターゲッティング剤、ターゲッティング可能構築物、およびクリアリング剤についての記載が含まれる。特に有用な例として、"Use of Bi-Specific Antibodies for Pre-Targeting Diagnosis and Therapy"と題されたGoldenberg et alの米国特許出願第10/150,654号には、（限定されるものではないが）二重特異性抗体構築物、ターゲッティング可能構築物、クリアリング剤、標的、治療部分および診断部分、結合方法、試験方法および使用方法についての適用可能な記載が含まれており、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる。

【0077】

特に、本発明は、本方法で有用な構築物に関する。よって、本発明は治療部分または診断部分の送達に適した三重特異性ターゲッティング可能構築物に関する。この構築物は、個別の一次ターゲッティング剤との結合に好適な少なくとも一つの第一の結合部分；クリアリング剤との結合に好適な第二の結合部分；およびインターナリゼーション薬剤との結合に好適な第三の結合部分を含む。この構築物は好ましくはまた、診断部分または治療部分も含む。治療部分は放射性同位元素、非放射性金属キレート、薬物、プロドラッグ、毒素またはプロドラッグを活性化させる酵素または本明細書で開示されているその他の治療部分である。診断部分は光活性薬、造影剤、光散乱金属コロイド粒子、放射性同位元素または放射線イメージング金属キレートまたは本明細書で開示されている診断部分である。この構築物は好ましくは哺乳類細胞と結合し、より好ましくは、この構築物は哺乳類に投与し、哺乳類の内部に局在される。

【0078】

好ましい実施形態では、第一、第二、および第三の結合部分の少なくとも一つがハプテンであり；これら結合部分のいずれか二つがハプテンであり；これらの結合部分の三つ総てがハプテンであり；これらの結合部分は好ましくは直交している。この構築物のさらなる特徴は、ターゲッティング可能構築物に関して本明細書で記載されている通りである。

【0079】

ある実施形態では、構築物は哺乳類細胞と結合し、このような細胞は哺乳類、例えばヒトであり得る。

本明細書で開示されているように、本発明は、哺乳類においてターゲッティング可能構築物を循環からクリアリングするのに好適なクリアリング剤を提供する。このクリアリング剤はターゲッティング可能構築物との結合に好適な結合部分、ある実施形態では、少なくとも二つの結合部分とインターナリゼーション部分とを含む。クリアリング剤および／またはインターナリゼーション部分の種々の実施形態は本明細書に記載の通りである。インターナリゼーション部分には上記のように、再循環中の細胞表面受容体または非受容体媒介インターナリゼーションペプチドが結合可能である。さらに、クリアリング剤は上記のように、抗体、そのフラグメント、 $C_{H}2$ 欠損抗体またはガラクトシル化抗体であってよい。

【0080】

もう一つの関連の態様では、本発明は、インターナライズ薬剤と結合されている、少なくとも一つの一次ターゲッティング剤結合部分とインターナライズ薬剤結合部分を含むターゲッティング可能構築物を含む分子複合体を提供する。このターゲッティング可能構築物はさらにクリアリング剤結合部分を含んでもよい。複合体のインターナライズ薬剤はタ

ーゲッティング可能構築物結合部分とインターナリゼーション部分をさらに含んでもよい。ターゲット可能構築物は本明細書に記載されているような治療部分または診断部分をさらに含んでもよい。クリアリング剤および/またはインターナリゼーション部分の種々の実施形態は本明細書で他の態様に関して記載されている通りである。

【0081】

さらにもう一つの態様は、クリアリング剤と結合されている、少なくとも一つ、好ましくは二つの一次ターゲット結合部分とクリアリング剤結合部分と本明細書に記載されているような治療部分または診断部分を含むターゲット可能構築物を含む分子複合体に関する。好ましい実施形態では、この一次ターゲット結合部分とクリアリング剤結合部分は直交ハブテンと、クリアリング剤により架橋された少なくとも二つのターゲット可能構築物を含み、この複合体は一次ターゲット剤も含む。

10

【0082】

別の分子複合体としては、複数の一次ターゲット結合部分を含む多価ターゲット可能構築物と結合されている、標的結合部分と複数の、好ましくは二つのターゲット可能構築物結合部分とを含む多価一次ターゲット剤；クリアリング剤結合部分、および本明細書に記載されているような治療部分または診断部分を含む。このターゲット可能構築物結合部分は抗体結合ドメインであってもよい。一次ターゲット剤結合部分はクリアリング剤結合部分と直交している。

【0083】

さらなる分子複合体は、少なくとも一つの一次ターゲット結合部分とクリアリング剤結合部分と、本明細書に記載されているような治療薬または診断薬結合部分とを含むターゲット可能構築物と結合され、かつ、ターゲット可能構築物結合部分またはクリアリング剤結合部分とインターナライズ部分を含むインターナライズ薬剤と結合されている、標的結合部分と少なくとも一つのターゲット可能構築物結合部分を含む一次ターゲット剤を含む。

20

【0084】

さらにもう一つの複合体は、一次ターゲット結合部分とインターナライズ部分を含むインターナリゼーション薬剤と結合されている、標的結合部分と、本明細書に記載されているような治療部分または診断部分を含む一次ターゲット剤を含む。

【0085】

複合体のある実施形態では、この複合体は哺乳類細胞と結合し；この複合体は哺乳類においてそのような細胞と結合でき、この複合体は結合部位において結合する。

30

標的細胞に治療薬または診断薬をターゲットするための構築物、キットおよび方法に関して、本発明はまた、被験体（一般に患者）、好ましくはヒト被験者において疾病または症状を処置および/または診断する方法も提供する。その方法は、本明細書に記載されているようなターゲット送達法において被験体に少なくとも一つの治療部分または診断部分を投与することを含む。この方法によって処置可能なこのような疾病および症状は本明細書の以下で開示される。

【0086】

ある実施形態では、治療部分または診断部分は、例えば迅速にインターナライズする受容体との架橋またはインターナライズペプチドによってインターナリゼーションを促進する様式でターゲットされる。一般に、治療部分または診断部分は標的に結合した複合体の一部としてインターナライズされる。特定の実施形態では、治療部分または診断部分は本明細書に挙げられている活性種を含む。また、ある実施形態では、治療部分または診断部分は併用療法の一部として投与する。

40

【0087】

特定の実施形態では、本明細書で示されているようなマーカー、生物または組織をターゲットする。同様に、特定の実施形態では、本方法を用い、本明細書で示されているような疾病または症状を処置または診断（イメージングを含み得る）。

【0088】

50

さらにもう一つの態様では、本発明は、固相媒体上、例えば樹脂上での合成により、DTPA結合ペプチドを製造する有利な方法を提供する。この合成は本明細書の実施例でIMP 272の製造に関する説明により例示される。

【0089】

さらなる態様は上記のような構築物を組み込んだキットに関する。このようなキットの一つは治療薬または診断薬の投与のためのキットである。このキットは、標的結合部分と少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分を含む一次ターゲッティング剤；少なくとも一つの一次ターゲッティング剤結合部分と本明細書に記載されているような治療部分または診断部分とクリアリング剤結合部分とを含むターゲッティング可能構築物；およびターゲッティング可能構築物結合部分を含むクリアリング剤を含む。この一次ターゲッティング剤、ターゲッティング可能構築物およびクリアリング剤は上記のように構成することができる。

10

【0090】

このようなもう一つのキットとしては、標的結合部分と少なくとも一つのインターナリゼーション薬剤結合部分を含む一次ターゲッティング剤；およびインターナリゼーション部分を含む複合体のインターナリゼーションを促進するインターナリゼーション部分と一次ターゲッティング剤結合部分を含むインターナリゼーション薬剤を含む。

【0091】

好ましくは、哺乳類、例えばヒトにおけるin vivo使用のための調節剤により改善される。

20

当業者により認識されているように、抗体/ハプテンまたはその他の抗体/エピトープ結合対に加えて、いくつかの異なる特定の結合対が利用できる。これらには、例えば、金属キレート対、リガンド/受容体結合対（天然、類似体、または合成リガンド）、ビオチン/アビジンまたはストレプトアビジン、および炭水化物/レクチンが含まれる。

【0092】

同様に、葉酸受容体と葉酸またはメトトレキサートの代わりにいくつかのインターナリゼーション機構が利用できる。例えば、ステロイドホルモンなどのホルモンまたはホルモン類似体/ホルモン受容体対；特異的ペプチド/ペプチド受容体；および非受容体媒介ペプチドインターナリゼーションがある。

【0093】

30

III. 二重特異性一次ターゲッティング種

本ターゲッティング法では、選択された標的、一般に細胞標的に結合させるために一次ターゲッティング剤が用いられる。多くの場合、ある組織の細胞であるか、または特定の特徴を有する細胞である。ほとんどの場合、一次ターゲッティング剤は二重特異性薬剤であるのが望ましい。よって、一次ターゲッティング剤は一般に、標的結合部分と少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分の双方を含む二重特異性薬剤であり、ここでターゲッティング可能構築物は一般に標的に向けることを意図する部分、例えば治療部分または診断部分を有する。

【0094】

二重特異性一次ターゲッティング剤、特に抗体に基づく薬剤がいくつかの適用のための記載されている。このような記載としては、例えば、1999年6月22日出願の“Use of bi-specific antibodies for pre-targeting diagnosis and therapy”と題された出願第09/337,756号；1999年8月23日出願の“Use of bi-specific antibodies for pre-targeting diagnosis and therapy”と題された出願第09/382,186号；2001年4月3日出願の“Production and use of novel agents for use with bi-specific antibodies”と題された出願番号第09/823,746号；2001年3月1日出願の“Bi-specific antibody point mutations for enhancing rate of clearance”と題された米国仮特許出願60/361,037号；および“Use of bi-specific antibodies for pre-targeting diagnosis and therapy”と題されたHansen et alの公開PCT出願WO 99/66951が挙げられ、これらは総て引用することによりその全

40

50

10

20

20

30

30

40

40

50

50

きる。このような多重結合は多重結合部分が結合するように適当な距離および柔軟性で連結する。

【 0 0 9 9 】

このように、例えばターゲッティング可能構築物に対して反応性のある完全抗体または s c F v 成分などの部分を含む二重特異性抗体構築物により、種々の治療適用および診断適用が各適用に関して新たな b s A b を惹起することなく行えるようになる。

【 0 1 0 0 】

二重特異性一次ターゲッティング剤の一例として、M N 1 4 - m 6 7 9 と呼ばれるものがある。H M N 1 4 h はヒト化抗 C E A である。m 6 7 9 部分はネズミ抗 H S G である。この構築物は 2 0 0 1 年 4 月 3 日出願の米国特許出願第 0 9 / 8 2 3 , 7 4 6 号、および Sharkey, McBride, Karacay, Chang, Griffiths, Hansen, and Goldenberg の A Universal Pre-Targeting System for Cancer Detection and Therapy Using Bispecific Antibody . Cancer Research 63:354-363 (2003) . に詳細に記載されている。この薬剤は、H S G 部分が薬剤の m 6 7 9 部分と結合するように H S G 部分を含むターゲッティング可能構築物とともに使用可能である。そして、ターゲッティング可能構築物上のクリアリング剤結合部分は I n - D T P A などの直交ハプテンであってよく、クリアリング剤は抗 I n - D T P A 結合部分を含む。h M N 1 4 - h 6 7 9 三価二重特異性融合タンパク質の例は、2 0 0 3 年 4 月 2 2 出願の米国仮特許出願第 6 0 / 4 6 4 , 5 3 2 号に記載されており、引用することにより本明細書の一部とされる。この種の一次ターゲッティング剤の例は図 1 ~ 5 に概略的に示されている。同様の一次ターゲッティング剤が図 7 ~ 9 に模式的に示されている。

【 0 1 0 1 】

使用できるもう一つの構築物として、h M N 1 4 - 7 3 4 s c F v と呼ばれるものがあり (h M N 1 4 - m 7 3 4 ならびに h M N 1 4 を 7 3 4 抗体に由来する抗体フラグメントと連結させた他の薬剤も使用できる)、その製造法および構造は公開 P C T 出願 W O 9 9 / 6 6 9 5 1 に記載されている。上記のように h M N 1 4 はヒト化抗 C E A 抗体であり、7 3 4 s c F v は抗 I n - D T P A (D T P A と複合化されたインジウム) である。この薬剤は I n - D T P A 部分を含むターゲッティング可能構築物とともに使用できる。このターゲッティング可能構築物上のクリアリング剤結合部分は H S G などの直交ハプテンであってよく、クリアリング剤は抗 H S G 結合部分を含む。

【 0 1 0 2 】

IV . ターゲッティング可能構築物

上記のように、ターゲッティング可能構築物は活性種を運ぶか、または活性種を「付加」されている。本明細書に記載の一般的なターゲッティング送達法では、ターゲッティング可能構築物は一次ターゲッティング剤と結合して活性種を局在させ、クリアリング剤と結合して個々の標的結合ターゲッティング可能構築物を架橋するとともに結合していない構築物をクリアリングする。

【 0 1 0 3 】

ターゲッティング可能構築物は、一次ターゲッティング剤およびクリアリング剤双方との結合を与える限り、いずれの構成で構築してもよい。一般に、ターゲッティング可能構築物はペプチドスキャフォールドを基にしたものであるが、炭水化物などの他の化学物を用いることもできる。また、この構築物は一次ターゲッティング剤およびクリアリング剤との結合も与え、ターゲッティング可能構築物は少なくとも二つの直交結合部分も含む。通常、これらの結合部分は、抗体またはハプテンのいずれかのような特異的結合対のメンバーである。好ましくは、この構築物は少なくとも二つの直交ハプテンを含み、その一方が一次ターゲッティング剤と結合し、もう一方がクリアリング剤と結合する。このようなハプテンとしては、限定されるものではないが、キレート剤または金属キレート錯体が挙げられる。限定されるものではないが例を挙げると、このキレート剤は硬酸陽イオンに対しては硬塩基キレート剤でえあってよく、軟酸陽イオンに対しては、少なくとも一つのキレート剤が軟塩基キレート剤であり ; あるいはカルボン酸基とアミン基を含む硬塩基キレ

ート剤であってよい。硬塩基キレート剤の例としては、限定されるものではないが、DTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）、NOTA（1, 4, 7 - トリアザ - シクロノナン - N, N', N'' - 三酢酸）、DOTA（1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロテトラデカン - N, N', N'', N''' - 四酢酸）、およびTETA（テトラアザシクロテトラデカン - N, N', N'', N''' - 四酢酸）が挙げられる。

【0104】

好ましくは、ターゲッティング可能構築物は少なくとも二つのハプテンなど、一次ターゲッティング剤と結合するように選択された少なくとも二つの結合部分を含む。これらの多重結合部分は同じであっても異なっているもよい。構築物を単純にするため、これらは同じものであれば好ましい。

【0105】

ターゲッティング可能構築物はまた、クリアリング剤と結合するように選択された少なくとも一つの結合部分も含む。好ましい実施形態では、このようなクリアリング剤結合部分が一つある。本方法では、ターゲッティング可能構築物を標的部位において「ロック」するために個々のターゲッティング可能構築物分子を架橋するのが望ましい。従って、このターゲッティング可能構築物は、対応するクリアリング剤が持っているターゲッティング可能構築物結合部分よりも少ないクリアリング剤結合部分を持っていなければならない。例えば、クリアリング剤がターゲッティング可能構築物と結合する二つの部分を含むとすれば、そのターゲッティング可能構築物のクリアリング剤と結合する部分は一つだけで、クリアリング剤上のもう一つの結語部分は別のターゲッティング可能構築物との結合に利用できるように残しておかなければならない。

【0106】

ターゲッティング可能構築物は罹患組織を処置または診断するのに有用な種々の薬剤と結合させてもよい。結合薬剤の例としては、限定されるものではないが、キレート剤、金属キレート錯体、放射性核種、薬物、毒素（例えば、リシン、アブリン、ブドウ球菌内毒素 - A、ブタクサ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒、シュードモナス外毒素、シュードモナス内毒素）および他のエフェクター分子、例えば、サイトカイン、リンホカイン、オリゴヌクレオチド、ケモカイン、免疫調節剤、酵素、放射線増感剤、アスパラギナーゼ、RNAアーゼ、DNAアーゼ、受容体ターゲッティング剤が挙げられる。さらに、プロドラッグの活性化またはプロドラッグの標的特異的毒性の増強に有用な酵素をターゲッティング可能構築物に結合させることもできる。結合可能な特定の部分のいくつかの例は本明細書に記載されている。

【0107】

1. ペプチド / ハプテン構築物

上記で示されているように、ターゲッティング可能構築物は種々の構造で構築することができる。しかしながら、抗体結合に関与するようにデザインする構築物に関しては、十分強い結合をもたすだけでなく、迅速なin vivoクリアランスという点でも選択するのが好ましい。多くの実施形態では、ペプチドに基づく構造を、一般に抗体結合を与えるためハプテンと組み合わせ用いる。クリアリング剤と結合させるため直交結合部分を組み込むことにより本発明に適合可能なターゲッティング可能構築物の例は、1999年6月22日出願の米国特許出願第09/337,756号および2001年4月3日出願の米国特許出願第09/823,746号に記載されており、これらの全開内容は引用することにより本明細書の一部とされる。本発明での使用に適合可能なさらなるターゲッティング可能構築物はプレターゲッティング法に関する背景技術で引用されているさらなる参考文献に記載されている。通常、本発明では、ターゲッティング可能構築物は少なくとも一つ、好ましくは複数の一次ターゲッティング剤結合部分と、少なくとも一つのクリアリング剤結合部分を含んでいて、この一次ターゲッティング剤結合部分とクリアリング剤結合部分が直交していなければならない。当然のことであるが、個々の結合機能を提供する部分は、特定の系での使用のために選択される特定の一次ターゲッティング剤およびクリアリング剤によって異なる。

【 0 1 0 8 】

ターゲッティング可能構築物は通常、抗体との結合のために少なくとも二つの直交ハプテンを含み、ターゲッティング可能構築物の一部に対して直接免疫応答を惹起するのが好ましい場合もある。一般に、強い免疫応答の惹起という点では疎水性薬剤が最良であり、一方、迅速な *in vivo* クリアランスに関しては親水性薬剤が好ましいことから、疎水性と親水性のバランスを確立しなければならない。これは、一つには、親水性キレート剤を用いて多くの有機部分の固有の疎水性を相殺することにより達成することができる。また、ターゲッティング可能構築物のサブユニットを、反対の溶液特性を有するよう選択してもよく、例えばいくらかが疎水性でいくらかが親水性のアミノ酸を含むペプチドがある。ペプチドの代わりに炭水化物、好ましくは 2 ~ 6 個の糖ユニットの鎖の炭水化物鎖を用いてもよい。また、デキストランなどの高分子炭水化物も使用できる。

10

【 0 1 0 9 】

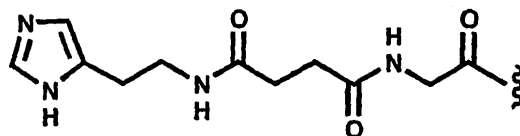
2 個といった少ないアミノ酸残基しか持たないペプチド、好ましくは、キレート剤などの他の部分とも結合させるならば、2 ~ 10 残基を用いればよい。このリンカーは、好ましくは分子量 50,000 ダルトン未満、有利には約 20,000 ダルトン、10,000 ダルトンまたは 5,000 ダルトン未満（キレート剤中の金属イオンを含む）の低分子量複合体である。例えば、既知のペプチド DTPA-Tyr-Lys(DTPA)-OH（ここで、DTPA はジエチレントリアミン五酢酸である）は分子のインジウム-DTPA 部分に対する抗体を作製するために使用されている。しかし、非インジウム含有分子および適当なスクリーニング工程の使用により、チロシル-リジンジペプチドに対する新しい Ab が作製できる。

20

【 0 1 1 0 】

より通常には、このペプチドは、In-DTPA および HSG などの結合ハプテン部分を有し、ここで、HSG は式

【 化 1 】



30

のヒスタミンスクシニルグリシル基である。

【 0 1 1 1 】

免疫原として用いるペプチドは、固相支持体と標準的な反復直交脱保護およびカップリング技術を用い、自動ペプチド合成装置で便宜に合成することができる。後にキレート複合体の形成に用いられるペプチド中の遊離アミノ酸は、アセチル基などの標準的な保護基で遮断するのが好ましい。このような保護基は当業者に公知である。Greene and Wuts *Protective Groups in Organic Synthesis*, 1999 (John Wiley and Sons, N.Y.) 参照。これらのペプチドは、本発明での使用のために作製する場合、*in vivo* カルボキシペプチダーゼ活性を阻害するために、樹脂から切り離して対応する C 末端アミドを作製する。

40

【 0 1 1 2 】

2. キレート部分

リンカー部分上にキレート部分が存在することでいくつかの異なる官能性が得られる。親水性キレート部分は迅速な *in vivo* クリアランスを確保する助けとなる。親水性の他、キレート剤はそれらの金属結合特性に関しても選択される。このような金属キレートの組合せは治療または診断用金属同位元素の組み込み可能とするだけでなく、少なくともいくつかの場合では、強く結合する抗体が開発可能なハプテン部分が得られる。

【 0 1 1 3 】

有用な金属-キレートの組合せの例としては、放射イメージングおよび RAIT 用の ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 ^{100}Y 、 ^{101}Y 、 ^{102}Y 、 ^{103}Y 、 ^{104}Y 、 ^{105}Y 、 ^{106}Y 、 ^{107}Y 、 ^{108}Y 、 ^{109}Y 、 ^{110}Y 、 ^{111}Y 、 ^{112}Y 、 ^{113}Y 、 ^{114}Y 、 ^{115}Y 、 ^{116}Y 、 ^{117}Y 、 ^{118}Y 、 ^{119}Y 、 ^{120}Y 、 ^{121}Y 、 ^{122}Y 、 ^{123}Y 、 ^{124}Y 、 ^{125}Y 、 ^{126}Y 、 ^{127}Y 、 ^{128}Y 、 ^{129}Y 、 ^{130}Y 、 ^{131}Y 、 ^{132}Y 、 ^{133}Y 、 ^{134}Y 、 ^{135}Y 、 ^{136}Y 、 ^{137}Y 、 ^{138}Y 、 ^{139}Y 、 ^{140}Y 、 ^{141}Y 、 ^{142}Y 、 ^{143}Y 、 ^{144}Y 、 ^{145}Y 、 ^{146}Y 、 ^{147}Y 、 ^{148}Y 、 ^{149}Y 、 ^{150}Y 、 ^{151}Y 、 ^{152}Y 、 ^{153}Y 、 ^{154}Y 、 ^{155}Y 、 ^{156}Y 、 ^{157}Y 、 ^{158}Y 、 ^{159}Y 、 ^{160}Y 、 ^{161}Y 、 ^{162}Y 、 ^{163}Y 、 ^{164}Y 、 ^{165}Y 、 ^{166}Y 、 ^{167}Y 、 ^{168}Y 、 ^{169}Y 、 ^{170}Y 、 ^{171}Y 、 ^{172}Y 、 ^{173}Y 、 ^{174}Y 、 ^{175}Y 、 ^{176}Y 、 ^{177}Y 、 ^{178}Y 、 ^{179}Y 、 ^{180}Y 、 ^{181}Y 、 ^{182}Y 、 ^{183}Y 、 ^{184}Y 、 ^{185}Y 、 ^{186}Y 、 ^{187}Y 、 ^{188}Y 、 ^{189}Y 、 ^{190}Y 、 ^{191}Y 、 ^{192}Y 、 ^{193}Y 、 ^{194}Y 、 ^{195}Y 、 ^{196}Y 、 ^{197}Y 、 ^{198}Y 、 ^{199}Y 、 ^{200}Y 、 ^{201}Y 、 ^{202}Y 、 ^{203}Y 、 ^{204}Y 、 ^{205}Y 、 ^{206}Y 、 ^{207}Y 、 ^{208}Y 、 ^{209}Y 、 ^{210}Y 、 ^{211}Y 、 ^{212}Y 、 ^{213}Y 、 ^{214}Y 、 ^{215}Y 、 ^{216}Y 、 ^{217}Y 、 ^{218}Y 、 ^{219}Y 、 ^{220}Y 、 ^{221}Y 、 ^{222}Y 、 ^{223}Y 、 ^{224}Y 、 ^{225}Y 、 ^{226}Y 、 ^{227}Y 、 ^{228}Y 、 ^{229}Y 、 ^{230}Y 、 ^{231}Y 、 ^{232}Y 、 ^{233}Y 、 ^{234}Y 、 ^{235}Y 、 ^{236}Y 、 ^{237}Y 、 ^{238}Y 、 ^{239}Y 、 ^{240}Y 、 ^{241}Y 、 ^{242}Y 、 ^{243}Y 、 ^{244}Y 、 ^{245}Y 、 ^{246}Y 、 ^{247}Y 、 ^{248}Y 、 ^{249}Y 、 ^{250}Y 、 ^{251}Y 、 ^{252}Y 、 ^{253}Y 、 ^{254}Y 、 ^{255}Y 、 ^{256}Y 、 ^{257}Y 、 ^{258}Y 、 ^{259}Y 、 ^{260}Y 、 ^{261}Y 、 ^{262}Y 、 ^{263}Y 、 ^{264}Y 、 ^{265}Y 、 ^{266}Y 、 ^{267}Y 、 ^{268}Y 、 ^{269}Y 、 ^{270}Y 、 ^{271}Y 、 ^{272}Y 、 ^{273}Y 、 ^{274}Y 、 ^{275}Y 、 ^{276}Y 、 ^{277}Y 、 ^{278}Y 、 ^{279}Y 、 ^{280}Y 、 ^{281}Y 、 ^{282}Y 、 ^{283}Y 、 ^{284}Y 、 ^{285}Y 、 ^{286}Y 、 ^{287}Y 、 ^{288}Y 、 ^{289}Y 、 ^{290}Y 、 ^{291}Y 、 ^{292}Y 、 ^{293}Y 、 ^{294}Y 、 ^{295}Y 、 ^{296}Y 、 ^{297}Y 、 ^{298}Y 、 ^{299}Y 、 ^{300}Y 、 ^{301}Y 、 ^{302}Y 、 ^{303}Y 、 ^{304}Y 、 ^{305}Y 、 ^{306}Y 、 ^{307}Y 、 ^{308}Y 、 ^{309}Y 、 ^{310}Y 、 ^{311}Y 、 ^{312}Y 、 ^{313}Y 、 ^{314}Y 、 ^{315}Y 、 ^{316}Y 、 ^{317}Y 、 ^{318}Y 、 ^{319}Y 、 ^{320}Y 、 ^{321}Y 、 ^{322}Y 、 ^{323}Y 、 ^{324}Y 、 ^{325}Y 、 ^{326}Y 、 ^{327}Y 、 ^{328}Y 、 ^{329}Y 、 ^{330}Y 、 ^{331}Y 、 ^{332}Y 、 ^{333}Y 、 ^{334}Y 、 ^{335}Y 、 ^{336}Y 、 ^{337}Y 、 ^{338}Y 、 ^{339}Y 、 ^{340}Y 、 ^{341}Y 、 ^{342}Y 、 ^{343}Y 、 ^{344}Y 、 ^{345}Y 、 ^{346}Y 、 ^{347}Y 、 ^{348}Y 、 ^{349}Y 、 ^{350}Y 、 ^{351}Y 、 ^{352}Y 、 ^{353}Y 、 ^{354}Y 、 ^{355}Y 、 ^{356}Y 、 ^{357}Y 、 ^{358}Y 、 ^{359}Y 、 ^{360}Y 、 ^{361}Y 、 ^{362}Y 、 ^{363}Y 、 ^{364}Y 、 ^{365}Y 、 ^{366}Y 、 ^{367}Y 、 ^{368}Y 、 ^{369}Y 、 ^{370}Y 、 ^{371}Y 、 ^{372}Y 、 ^{373}Y 、 ^{374}Y 、 ^{375}Y 、 ^{376}Y 、 ^{377}Y 、 ^{378}Y 、 ^{379}Y 、 ^{380}Y 、 ^{381}Y 、 ^{382}Y 、 ^{383}Y 、 ^{384}Y 、 ^{385}Y 、 ^{386}Y 、 ^{387}Y 、 ^{388}Y 、 ^{389}Y 、 ^{390}Y 、 ^{391}Y 、 ^{392}Y 、 ^{393}Y 、 ^{394}Y 、 ^{395}Y 、 ^{396}Y 、 ^{397}Y 、 ^{398}Y 、 ^{399}Y 、 ^{400}Y 、 ^{401}Y 、 ^{402}Y 、 ^{403}Y 、 ^{404}Y 、 ^{405}Y 、 ^{406}Y 、 ^{407}Y 、 ^{408}Y 、 ^{409}Y 、 ^{410}Y 、 ^{411}Y 、 ^{412}Y 、 ^{413}Y 、 ^{414}Y 、 ^{415}Y 、 ^{416}Y 、 ^{417}Y 、 ^{418}Y 、 ^{419}Y 、 ^{420}Y 、 ^{421}Y 、 ^{422}Y 、 ^{423}Y 、 ^{424}Y 、 ^{425}Y 、 ^{426}Y 、 ^{427}Y 、 ^{428}Y 、 ^{429}Y 、 ^{430}Y 、 ^{431}Y 、 ^{432}Y 、 ^{433}Y 、 ^{434}Y 、 ^{435}Y 、 ^{436}Y 、 ^{437}Y 、 ^{438}Y 、 ^{439}Y 、 ^{440}Y 、 ^{441}Y 、 ^{442}Y 、 ^{443}Y 、 ^{444}Y 、 ^{445}Y 、 ^{446}Y 、 ^{447}Y 、 ^{448}Y 、 ^{449}Y 、 ^{450}Y 、 ^{451}Y 、 ^{452}Y 、 ^{453}Y 、 ^{454}Y 、 ^{455}Y 、 ^{456}Y 、 ^{457}Y 、 ^{458}Y 、 ^{459}Y 、 ^{460}Y 、 ^{461}Y 、 ^{462}Y 、 ^{463}Y 、 ^{464}Y 、 ^{465}Y 、 ^{466}Y 、 ^{467}Y 、 ^{468}Y 、 ^{469}Y 、 ^{470}Y 、 ^{471}Y 、 ^{472}Y 、 ^{473}Y 、 ^{474}Y 、 ^{475}Y 、 ^{476}Y 、 ^{477}Y 、 ^{478}Y 、 ^{479}Y 、 ^{480}Y 、 ^{481}Y 、 ^{482}Y 、 ^{483}Y 、 ^{484}Y 、 ^{485}Y 、 ^{486}Y 、 ^{487}Y 、 ^{488}Y 、 ^{489}Y 、 ^{490}Y 、 ^{491}Y 、 ^{492}Y 、 ^{493}Y 、 ^{494}Y 、 ^{495}Y 、 ^{496}Y 、 ^{497}Y 、 ^{498}Y 、 ^{499}Y 、 ^{500}Y 、 ^{501}Y 、 ^{502}Y 、 ^{503}Y 、 ^{504}Y 、 ^{505}Y 、 ^{506}Y 、 ^{507}Y 、 ^{508}Y 、 ^{509}Y 、 ^{510}Y 、 ^{511}Y 、 ^{512}Y 、 ^{513}Y 、 ^{514}Y 、 ^{515}Y 、 ^{516}Y 、 ^{517}Y 、 ^{518}Y 、 ^{519}Y 、 ^{520}Y 、 ^{521}Y 、 ^{522}Y 、 ^{523}Y 、 ^{524}Y 、 ^{525}Y 、 ^{526}Y 、 ^{527}Y 、 ^{528}Y 、 ^{529}Y 、 ^{530}Y 、 ^{531}Y 、 ^{532}Y 、 ^{533}Y 、 ^{534}Y 、 ^{535}Y 、 ^{536}Y 、 ^{537}Y 、 ^{538}Y 、 ^{539}Y 、 ^{540}Y 、 ^{541}Y 、 ^{542}Y 、 ^{543}Y 、 ^{544}Y 、 ^{545}Y 、 ^{546}Y 、 ^{547}Y 、 ^{548}Y 、 ^{549}Y 、 ^{550}Y 、 ^{551}Y 、 ^{552}Y 、 ^{553}Y 、 ^{554}Y 、 ^{555}Y 、 ^{556}Y 、 ^{557}Y 、 ^{558}Y 、 ^{559}Y 、 ^{560}Y 、 ^{561}Y 、 ^{562}Y 、 ^{563}Y 、 ^{564}Y 、 ^{565}Y 、 ^{566}Y 、 ^{567}Y 、 ^{568}Y 、 ^{569}Y 、 ^{570}Y 、 ^{571}Y 、 ^{572}Y 、 ^{573}Y 、 ^{574}Y 、 ^{575}Y 、 ^{576}Y 、 ^{577}Y 、 ^{578}Y 、 ^{579}Y 、 ^{580}Y 、 ^{581}Y 、 ^{582}Y 、 ^{583}Y 、 ^{584}Y 、 ^{585}Y 、 ^{586}Y 、 ^{587}Y 、 ^{588}Y 、 ^{589}Y 、 ^{590}Y 、 ^{591}Y 、 ^{592}Y 、 ^{593}Y 、 ^{594}Y 、 ^{595}Y 、 ^{596}Y 、 ^{597}Y 、 ^{598}Y 、 ^{599}Y 、 ^{600}Y 、 ^{601}Y 、 ^{602}Y 、 ^{603}Y 、 ^{604}Y 、 ^{605}Y 、 ^{606}Y 、 ^{607}Y 、 ^{608}Y 、 ^{609}Y 、 ^{610}Y 、 ^{611}Y 、 ^{612}Y 、 ^{613}Y 、 ^{614}Y 、 ^{615}Y 、 ^{616}Y 、 ^{617}Y 、 ^{618}Y 、 ^{619}Y 、 ^{620}Y 、 ^{621}Y 、 ^{622}Y 、 ^{623}Y 、 ^{624}Y 、 ^{625}Y 、 ^{626}Y 、 ^{627}Y 、 ^{628}Y 、 ^{629}Y 、 ^{630}Y 、 ^{631}Y 、 ^{632}Y 、 ^{633}Y 、 ^{634}Y 、 ^{635}Y 、 ^{636}Y 、 ^{637}Y 、 ^{638}Y 、 ^{639}Y 、 ^{640}Y 、 ^{641}Y 、 ^{642}Y 、 ^{643}Y 、 ^{644}Y 、 ^{645}Y 、 ^{646}Y 、 ^{647}Y 、 ^{648}Y 、 ^{649}Y 、 ^{650}Y 、 ^{651}Y 、 ^{652}Y 、 ^{653}Y 、 ^{654}Y 、 ^{655}Y 、 ^{656}Y 、 ^{657}Y 、 ^{658}Y 、 ^{659}Y 、 ^{660}Y 、 ^{661}Y 、 ^{662}Y 、 ^{663}Y 、 ^{664}Y 、 ^{665}Y 、 ^{666}Y 、 ^{667}Y 、 ^{668}Y 、 ^{669}Y 、 ^{670}Y 、 ^{671}Y 、 ^{672}Y 、 ^{673}Y 、 ^{674}Y 、 ^{675}Y 、 ^{676}Y 、 ^{677}Y 、 ^{678}Y 、 ^{679}Y 、 ^{680}Y 、 ^{681}Y 、 ^{682}Y 、 ^{683}Y 、 ^{684}Y 、 ^{685}Y 、 ^{686}Y 、 ^{687}Y 、 ^{688}Y 、 ^{689}Y 、 ^{690}Y 、 ^{691}Y 、 ^{692}Y 、 ^{693}Y 、 ^{694}Y 、 ^{695}Y 、 ^{696}Y 、 ^{697}Y 、 ^{698}Y 、 ^{699}Y 、 ^{700}Y 、 ^{701}Y 、 ^{702}Y 、 ^{703}Y 、 ^{704}Y 、 ^{705}Y 、 ^{706}Y 、 ^{707}Y 、 ^{708}Y 、 ^{709}Y 、 ^{710}Y 、 ^{711}Y 、 ^{712}Y 、 ^{713}Y 、 ^{714}Y 、 ^{715}Y 、 ^{716}Y 、 ^{717}Y 、 ^{718}Y 、 ^{719}Y 、 ^{720}Y 、 ^{721}Y 、 ^{722}Y 、 ^{723}Y 、 ^{724}Y 、 ^{725}Y 、 ^{726}Y 、 ^{727}Y 、 ^{728}Y 、 ^{729}Y 、 ^{730}Y 、 ^{731}Y 、 ^{732}Y 、 ^{733}Y 、 ^{734}Y 、 ^{735}Y 、 ^{736}Y 、 ^{737}Y 、 ^{738}Y 、 ^{739}Y 、 ^{740}Y 、 ^{741}Y 、 ^{742}Y 、 ^{743}Y 、 ^{744}Y 、 ^{745}Y 、 ^{746}Y 、 ^{747}Y 、 ^{748}Y 、 ^{749}Y 、 ^{750}Y 、 ^{751}Y 、 ^{752}Y 、 ^{753}Y 、 ^{754}Y 、 ^{755}Y 、 ^{756}Y 、 ^{757}Y 、 ^{758}Y 、 ^{759}Y 、 ^{760}Y 、 ^{761}Y 、 ^{762}Y 、 ^{763}Y 、 ^{764}Y 、 ^{765}Y 、 ^{766}Y 、 ^{767}Y 、 ^{768}Y 、 ^{769}Y 、 ^{770}Y 、 ^{771}Y 、 ^{772}Y 、 ^{773}Y 、 ^{774}Y 、 ^{775}Y 、 ^{776}Y 、 ^{777}Y 、 ^{778}Y 、 ^{779}Y 、 ^{780}Y 、 ^{781}Y 、 ^{782}Y 、 ^{783}Y 、 ^{784}Y 、 ^{785}Y 、 ^{786}Y 、 ^{787}Y 、 ^{788}Y 、 ^{789}Y 、 ^{790}Y 、 ^{791}Y 、 ^{792}Y 、 ^{793}Y 、 ^{794}Y 、 ^{795}Y 、 ^{796}Y 、 ^{797}Y 、 ^{798}Y 、 ^{799}Y 、 ^{800}Y 、 ^{801}Y 、 ^{802}Y 、 ^{803}Y 、 8

^{61}Tb 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、および ^{225}Ac 併用する2-ベンジル-DTPAおよびそのモノメチルおよびシクロヘキシル類似体が挙げられる。同じキレート剤が、Mn、FeおよびGdなどの非放射性金属と錯化されれば、本発明の突然変異bsAbとともに用いる場合にはMRI用に使用できる。NOTA(1,4,7-トリアザ-シクロノナン-N,N',N''-三酢酸)、DOTA、およびTETA(p-ブromoアセタミド-ベンジル-テトラエチルアミン四酢酸)などの大環キレート剤は種々の金属および放射性金属、最も詳しくはそれぞれGa、YおよびCuの放射性核種と併用されるものである。

【0114】

そのリガンドがカルボン酸基またはアミン基などの硬質の塩基性キレート官能基を含むDTPAおよびDOTA型のキレート剤は硬酸陽イオン、特に第IIa族および第IIb族金属陽イオンをキレートするのに最も有効である。このような金属-キレート錯体は、環のサイズを目的の金属にあわせて調整することにより極めて安定にすることができる。大環状ポリエーテルのような他のリング型キレート剤は、RAITのための ^{223}Ra のような、安定に結合する核種を対照とするものである。ポルフィリンキレート剤は多くの放射性金属と併用することができ、また、bsAb指定免疫光療法用の特定の非放射性金属錯体としても有用である。一を超える種類のキレート剤を複数の金属イオン、例えば、非放射性イオン、診断用放射性核種および/または治療用放射性核種と結合させるために担体と結合させ得る。特に有用な治療用放射性核種としては、限定されるものではないが、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{90}Y 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{223}Ra および ^{225}Ac が挙げられる。特に有用な診断用放射性核種としては、限定されるものではないが、 ^{18}F 、 ^{45}Ti 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ および ^{175}Lu が挙げられる。

【0115】

米国特許第5,753,206号に開示されているもの、特にチオセミ-カルバゾニルグリオキシルシステイン(Tscg-Cys)およびチオセミカルバジニル-アセチルシステイン(Tsca-Cys)キレート剤などのキレート剤は、軟塩基リガンド、特に硫黄またはリン含有リガンドと強固に結合されるTc、Re、Biおよびその他の遷移金属、ランタニドおよびアクチニドの軟酸陽イオンと結合するために有利に用いられる。それは、一を超える種類のキレート剤とペプチドを結合するのに有用であり、例えば、In(III)陽イオンのためのものなどのDTPAまたは同様のキレート剤、およびTc陽イオンのためのチオール含有キレート剤、例えば、Tscg-Cysがある。ジ-DTPAハプテンに対する抗体は既知であり(Barbetの米国特許第5,256,395号)、標的抗体と容易に結合してbsAbが形成されるので、放射性同位元素をターゲッティングするためのプレターゲッティングプロトコールにおいて放射性同位元素と結合させるための非放射性ジDTPAキレート剤およびその他のキレート剤とともにペプチドハプテンを使用することができる。このようなペプチドの一例としては、Ac-Lys(DTPA)-Tyr-Lys(DTPA)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂がある。このペプチドはIn(III)とともに予め負荷した後、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 陽イオンで標識し、このIn(III)イオンはDTPAにより優先的にキレート化され、このTc陽イオンはチオール含有Tscg-Cysと優先的に結合する。このDTPA基をNOTA、DOTA、TETAなどの他の硬酸キレート剤に置き換えることもでき、それらに特異的なMabが、抗ジ-DTPA Mabを作製するのに用いられるものと同様の技術を用いて生産され得る。

【0116】

二つの異なる硬酸または軟酸キレート剤を、陽イオンの大きさの違い、キレート環の幾

10

20

30

40

50

何学および陽イオンの好ましい錯イオン構造により、二つの異なる硬酸または軟酸陽イオンに優先的に結合する、例えばキレート環の大きさの異なるリンカーへ組み込むことができる。これにより二種類の異なる金属が（その一方または双方が放射性であるか、またはMRI増強のために有用である）、プレターゲティングされた一次ターゲティング剤により結果として捕捉されるリンカーへと組み込み可能となる。

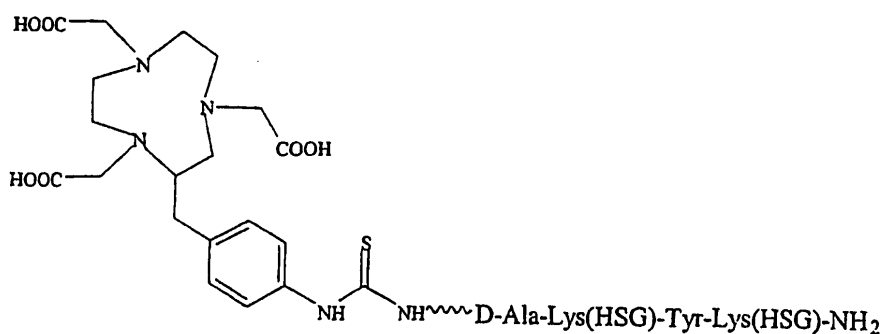
【0117】

キレート剤NOTA、DOTAおよびTscgは以下の構造：

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂；
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂；
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂；
- (d)

10

【化2】

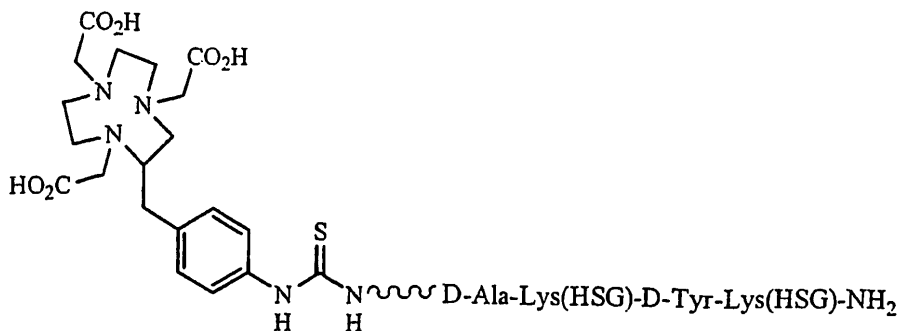


20

および

- (e)

【化3】



30

で例示されるようなキレート剤 - ペプチド複合体モチーフ例に組み込まれている。

【0118】

上記のキレート剤 - ペプチド複合体 (d) および (e) は ⁶⁸Ga と結合することが示されており、よって、陽電子放射断層撮影法 (PET) の適用において有用であり得る。

キレート剤は標準的な化学法を用いてリンカー部分と結合される。要するに、ペプチド Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ の合成は、ペプチド合成装置にて、まず、Alloc-Lys(Fmoc)-OH を Rink アミド樹脂に結合させることにより行った。本明細書で用いる保護基の略号「Alloc」および「Fmoc」はアリルオキシカルボニルおよびフルオレニルメチルオキシカルボニル基をさす。次に、この Fmoc-Cys(Trt)-OH および Tscg を、標準的な Fmoc 自動合成プロトコルを用い、リジンの側鎖に付加して次のペプチド：Alloc-Lys(Tscg-Cys(Trt))-rink 樹脂を形成した。その後、この Alloc 基を除去した。このペプチド合成を合成装置で続け、次のペプチド：(Lys(Alloc)-D-Tyr(But)-Lys(Alloc)-Lys(Tscg-Cys(Trt))-)-rink 樹脂を製造した。N 末端のアシル化の後、側鎖 Alloc 保護

40

50

基を除去した。次に、得られたペプチドを活性化した N - トリチル - H S G - O H で、カイザー試験を用いて樹脂がアミンに関し陰性の結果を示すまで処理した。Karacay et al. Bioconjugate Chem. 11:842-854(2000)参照。Ac - Lys (H S G) D - Tyr - Lys (H S G) - Lys (T s c g - C y s -) - N H ₂ の合成、ならびに D O T A - P h e - Lys (H S G) - D - Tyr - Lys (H S G) - N H ₂、および D O T A - P h e - Lys (H S G) - Tyr - Lys (H S G) - N H ₂ の合成は以下にさらに詳細に記載されている。

【 0 1 1 9 】

3 . 金属キレート剤の作製のための一般法

キレート剤 - ペプチド複合体は固体として長期間保存することができる。それらは金属結合反応に関して単位用量で計量することができ、固体、水溶液もしくは半水溶液、凍結溶液または凍結乾燥調製物のいずれかとして単位用量で保存することができる。それらは公知の手順によってラベルすることができる。典型的には、硬酸陽イオンは通常の塩の溶液として導入され、硬酸キレート剤およびおそらくは軟酸キレート剤により取り込まれる。しかし、その後、軟酸陽イオンを加えれば、軟酸キレート剤によりその結合に至り、そこにキレート化されている可能性のある硬酸陽イオンが解離する。例えば、過剰量の非放射性 ¹¹¹InCl₃ の存在下でさえ、^{99m}Tc (V) グルコヘプトネートまたは Tc 陽イオンによる標識化が in situ 生成し、塩化スタンナンおよび Na ^{99m}TcO₄ が軟酸キレート剤に定量的に先行する。¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹³Bi および二価または三価陽イオンの Mn、Co、Ni、Pb、Cu、Cd、Au、Fe、Ag (一価)、Zn および Hg などの他の軟酸陽イオン、特に ⁶⁴Cu および ⁶⁷Cu など (そのいくつかは放射免疫診断法または放射免疫療法に有用である) は、類似の方法によりペプチドキレート剤の組合せに付加することができる。Re 陽イオンもまた、過レニウム酸塩およびスズイオンから in situ 生成可能であるか、または予め還元されたグルコヘプトン酸レニウムまたはその他のトランスキレート剤が使用できる。過レニウム酸塩の還元は、Tc の還元に必要なものよりも多くのスズイオンを必要とする (典型的には最終濃度約 200 μg / mL) ので、より高いレベルのスズイオンがジスルフィド環化ペプチドに存在するものなどの感受性のあるジスルフィド結合を還元しないように十分注意しなければならない。レニウムによる放射性標識の際にも、Tc - ^{99m}Tc とともに使用されるものと同様の手順が用いられる。T s c g - C y s - リガンドの Re O 金属錯体の調製のための好ましい方法は、このペプチドを Re OCl₃ (P (Ph ₃) ₂) と反応させることによるものであるが、Re O (エチレンジアミン) ₂ などの他の還元種を使用することもできる。

【 0 1 2 0 】

本発明のためのターゲッティング可能構築物の例は、ペプチドスキャフォールドまたはリンカーが構築された二つの H S G 部分と一つの D T P A 部分を含むように構築した (図 1 ~ 4 に概略的に示されている)。この構築物は I M P 2 7 2 と呼ばれ、その製造および構造については以下の実施例に記載されている。この構築物では、クリアリング剤との結合のために一つの D T P A 部分が用いられ、一次ターゲッティング剤との結合のために二つの H S G 部分が用いられる。この目的で、D T P A 部分をインジウムでキレート化すると、抗 In - D T P A 抗体との結合が可能となる。ターゲッティング可能構築物のもう一つの例が図 7 ~ 9 に示されている。この場合、ターゲッティング可能構築物はただ一つの一次ターゲッティング剤抗 H S G 部分と結合するようにただ一つの H S G 部分を含む。

【 0 1 2 1 】

V . クリアリング剤

本方法では、クリアリング剤は、個々のターゲッティング可能構築物を架橋し、さらに結合していないターゲッティング可能構築物の循環からのクリアランスを助けることにより、標的部位において標的結合ターゲッティング可能構築物を「ロック」することで二重の機能を提供する。これに関して、「結合していない」とは、構築物が循環中の一次ターゲッティング剤またはその他の循環成分と結合していることがあっても、標的部位において結合していないことを示す。ロック機能を提供するためには、クリアリング剤は、同じ種

であっても異なる種であってもよいが、二以上の個別のターゲッティング可能構築物と結合するのが極めて好ましい。ほとんどの場合、ただ一種のターゲッティング可能構築物結合部分を有するようにデザインされるが、あるいは複数種のターゲッティング可能構築物結合部分も使用できる。

【0122】

結合していない複合体の迅速なクリアランスの寄与するため、クリアリング剤は迅速にクリアリングされる一以上の部分を含むのが好ましい。天然 IgG 抗体が比較的迅速にクリアリングされるが、クリアランス速度はある種の修飾抗体を用いることにより、または補体結合し得る IgG1 を用いることにより促進することができ、このようにして迅速なクリアランスに寄与できる。

10

【0123】

クリアランス速度を高めることが知られている修飾の一種として、ガラクトースの付加（ガラクトシル化）がある。所望のクリアランス特性を得るためにガラクトシル化レベルを選択することができる。例えば、Karacay et al., 1997, Bioconjug Chem 8(4):585-594 参照。ガラクトースは肝臓のアシアロ糖タンパク質受容体と結合し、それにより会合した薬剤または複合体が肝細胞により迅速に認識される。ガラクトシル化薬剤の使用の結果、注射後数分以内、通常、実質的に肝臓を一回通っただけでほぼ完全に肝細胞により認識され隔離される。示されているように、薬剤の糖残基修飾の程度は血液のクリアランス速度を決定する。所望のクリアランス速度を達成するための薬剤一分子当たりの糖残基の数は、当技術分野で周知の通常の方法により、特定のクリアリング剤各々について経験的に決定することができる。グリコシル化の程度は、糖の付加により修飾されたリシン残基のパーセンテージとして表すのが便宜である。抗イディオタイプ抗体クリアリング剤については、リシン残基の約 22% を修飾しても、局在していない一次ターゲッティング複合体の有意に加速されたクリアランスは得られないが、リシン残基の約 48% を修飾するとクリアランスが著しく加速され、リシン残基の約 76% 以上を修飾すると、肝臓を一回通るだけで循環から実質上完全なクリアランスが得られる。これは一般に抗体フラグメントについても同じであるが、そのパーセンテージはある程度多様である。一回の通過で実質的に完全なクリアランスを達成するためのグリコシル化のレベルは容易に判定される。

20

【0124】

クリアランスを促進する別の種の修飾としては、IgG 成分の Fc ヒンジ部分におけるある種の突然変異（通常、置換または欠失）があり、すなわち、C_H2 - C_H3 ドメイン境界領域に一以上のアミノ酸突然変異を含む。言い換えれば、この突然変異抗体の IgG 成分の Fc ヒンジ部分を親抗体の IgG 成分の Fc ヒンジ部分と比べた場合、それらの領域が一以上のアミノ酸で異なっている。突然変異は例えば、置換されたアミノ酸同じ構造または化学特性を有する「保存的」変異（例えば、ロイシンとイソロイシンの置換）を包含する。突然変異はまた、例えば「非保存的」変異（例えば、グリシンとトリプトファンの置換）も包含する。C_H2 - C_H3 ドメイン境界領域のいずれのアミノ酸が突然変異していてもよい。好ましアミノ酸突然変異はイソロイシン 253 からアラニン（I253A）である。C_H2 領域の欠損もこのようなクリアランスの促進をもたらし得る。

30

【0125】

クリアリング剤の例は図 2 ~ 5 に概略的に示されている。図 3 に示されている薬剤はクリアランス速度を高めるためにガラクトースで修飾され、図 4 に示されている薬剤は葉酸受容体を介したインターナリゼーションを促進するために葉酸基で修飾されている。もう一つのクリアリング剤例が図 9 に概略的に示されている。このクリアリング剤は迅速にインターナライズする B 細胞腫瘍抗原（CD74）と結合する抗体（hLL1）を含む。複合化したクリアリング薬と CD74 が結合すると、複合体のインターナリゼーション、ひいてはターゲッティング可能構築物上の活性種のインターナリゼーションが高まる。

40

【0126】

VI. 同時投与および投与前に形成される複合体

多くの場合、一次ターゲッティング剤を投与し、ターゲッティング可能構築物の投与前

50

に標的と結合させるプレターゲットティングを用いるのが好ましい。しかし、別法として、その系の二以上の成分を本質的に同時に投与することもできるし、投与前に混合することもできる。例えば、一次ターゲットティング剤とターゲットティング可能構築物を本質的に同時に投与して標的と結合させた後、クリアリング剤を投与することができる。同様に、一次ターゲットティング剤、ターゲットティング可能構築物およびクリアリング剤を同時に投与し、標的上で構成させることもできる。

【0127】

さらに、一次ターゲットティング剤とターゲットティング可能構築物は投与前に混合して複合体を形成させることもできる。このような複合体は一次ターゲットティング剤の投与と同様に投与し、標的と結合させる。その後、クリアリング剤を常法で用い、結合した複合体を標的部位にロックし、かつ、結合していない複合体を循環からクリアリングすることができる。同様に、クリアリング剤をこの混合物に添加して、三成分総てを複合体として投与することもできる。三成分総ての混合は、特にクリアリング剤が迅速にクリアリングするものではないが、主としてその「ロック」機能のために用いる場合に適用できる。

【0128】

VII. ロック・アンド・チェイスターゲットティング法

上記で触れたように、本明細書に記載の構築物は有利なターゲットティング法を提供する。これら種々の構築物はいくつかの異なる様式で 사용할ことができる。ターゲットティング法では、一次ターゲットティング剤が、会合した複合体の薬剤およびその他の成分を標的部位に局在させる最初の、すなわち一次ターゲットティング種となる。従って、通常、一次ターゲットティング剤を被験体に投与し、分散させ、標的に結合させる、プレターゲットティング法が用いられる。一次ターゲットティング種が標的上に十分付着したところで、ターゲットティング可能構築物を投与する。ターゲットティング可能構築物は、一次ターゲットティング剤の利用可能な結合部位を認識する少なくとも一つの結合部位と診断薬または治療薬を含む。ターゲットティング可能構築物の例は本明細書に記載されている。これら試薬の用量およびタイミングは当業者ならば容易に導き出すことができ、用いる試薬の具体的な性質によって異なる。通常、プレターゲットティング法はクリアリング剤の使用を伴っても伴わなくてもよいが、本発明のほとんどの適用の場合、循環中のターゲットティング可能構築物の濃度が低くなっても、標的部位において、一次ターゲットティング剤との複合体におけるターゲットティング可能構築物の会合を安定化するための「ロック」薬剤としても機能するクリアリング剤を用いる。

【0129】

ターゲットティングに加え、本構築物は標的細胞による複合体のインターナリゼーションも促進するように構成することができる。インターナリゼーションは、インターナライズする複合体に一以上のインターナリゼーション部分を付着させることにより達成される。このようなインターナリゼーション薬剤の使用は以下に記載されている。

【0130】

以下、本方法における使用のために行える種々のデザインをいくつか示すが、これらの場合、抗体とハプテンの組合せを用いる。上記で示した用に、抗体および/またはハプテンの代わりに、またはそれに加えて他の結合対を使用することもできる。

【0131】

1. 一次ターゲットティング剤：b s A b (二つの標的結合 A b 部分と二つのターゲットティング可能構築物ハプテン結合 A b 部分)；

ターゲットティング可能構築物：二つの直交ハプテン (一次ターゲットティング剤上のハプテン結合抗体により認識 2 コピーのされるハプテンと、クリアリング剤上のハプテン結合抗体により認識されるその他のもの) と治療部分または診断部分を有するペプチド骨格；

クリアリング剤：ターゲットティング可能構築物上の 1 コピーのハプテンを認識する二価 A b。

【0132】

2. 一次ターゲットティング剤：b s A b (一つの標的結合 A b 部分と一つのターゲット

10

20

30

40

50

イング可能構築物ハプテン結合 A b 部分) ;

ターゲッティング可能構築物：二つの直交ハプテン（一次ターゲッティング剤上のハプテン結合抗体により認識 2 コピーのされるハプテンと、クリアリング剤上のハプテン結合抗体により認識されるその他のもの）と治療部分または診断部分を有するペプチド骨格；

クリアリング剤：ターゲッティング可能構築物上の 1 コピーのハプテンを認識する二価 A b。

【 0 1 3 3 】

3 . 一次ターゲッティング剤： A b とハプテンの双方（二つの標的結合 A b 部分とターゲッティング可能構築物上の A b により認識される 2 コピーのハプテン）を含む二重特異性薬剤；

ターゲッティング可能構築物：一次ターゲッティング剤上のハプテンを認識する二価 A b と、クリアリング剤上の A b により認識されるハプテン（ 1 コピー）と治療部分または診断部分を有するペプチド骨格；

クリアリング剤：ターゲッティング可能構築物上のハプテンを認識する二価 A b。

【 0 1 3 4 】

4 . 一次ターゲッティング剤： A b （二つの標的結合部分を有する）と、ターゲッティング可能構築物上の A b により認識される 2 コピーのハプテンの双方を含む二重特異性薬剤；

ターゲッティング可能構築物：一次ターゲッティング剤上のハプテンを認識する二価 A b と、クリアリング剤上の A b により認識される 2 コピーのハプテンと、治療部分または診断部分を有するペプチド骨格；

クリアリング剤：ターゲッティング可能構築物上のハプテンを認識する A b 部分。

【 0 1 3 5 】

5 . 一次ターゲッティング剤： b s A b （二つの標的結合 A b 部分と二つのターゲッティング可能構築物ハプテン結合 A b 部分）；

ターゲッティング可能構築物：二つの直交ハプテン（一次ターゲッティング剤上のハプテン結合抗体により認識 2 コピーのされるハプテンと、クリアリング剤上のハプテン結合抗体により認識されるその他のもの）と治療部分または診断部分を有するペプチド骨格；

クリアリング剤：ターゲッティング可能構築物上の 1 コピーのハプテンを認識する二価 A b とインターナリゼーション部分。

【 0 1 3 6 】

6 . 一次ターゲッティング剤： b s A b （二つの標的結合 A b 部分と二つのターゲッティング可能構築物ハプテン結合 A b 部分）；

ターゲッティング可能構築物：二つの直交ハプテン（一次ターゲッティング剤上のハプテン結合抗体により認識 2 コピーのされるハプテンと、クリアリング剤上のハプテン結合抗体により認識されるその他のもの）と治療部分または診断部分を有するペプチド骨格；

クリアリング剤：ターゲッティング可能構築物上の 1 コピーのハプテンを認識する二価 A b とインターナリゼーション薬剤結合部分（ A b ）。

インターナリゼーション薬剤：クリアリング剤上のハプテン結合 A b 部分により認識されるハプテン（ターゲッティング可能構築物上の両ハプテンと直交）。

【 0 1 3 7 】

7 . 一次ターゲッティング剤： b s A b （一つの標的結合 A b 部分と一つのターゲッティング可能構築物ハプテン結合 A b 部分）；

ターゲッティング可能構築物：二つの直交ハプテン（一次ターゲッティング剤上のハプテン結合抗体により認識される 1 コピーのハプテンと、クリアリング剤上のハプテン結合抗体により認識される 1 コピーのハプテン）と治療部分または診断部分を有するペプチド骨格；

クリアリング剤：ターゲッティング可能構築物上の 1 コピーのハプテンを認識する二価 A b。

【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

50

抗体およびハプテンを用いる構成のいくつかの例を図面で概略的に示している。一次ターゲティング剤、ターゲティング可能構築物、およびクリアリング剤の結合については図1～5に示されている。

【0139】

さらに、構成例の一連の結合を示す一連の概略図は図6～9で示されている。図6は細胞表面に提示される複数のCD20抗原を有するB細胞を示している。CD20は、図7

に示されているように、一次ターゲティング剤の標的抗原として働く。図7は一次ターゲティング剤が注射されたことを示し、一次ターゲティング剤と、図6に示されているようなCD20抗原との結合を示している。示されているように、一次ターゲティング剤は、ターゲティング可能構築物との結合のための抗HSG Ab部分と連結された抗CD20 Ab部分(hA20Fab')を有する。一次ターゲティング剤が標的部位と結合した後、図8に示されるようにターゲティング可能構築物が注射される。示されているように、ターゲティング可能構築物は局在した一次ターゲティング剤と、HSGハプテンを介して結合する。各ターゲティング可能構築物は二つのHSG部分を含んでいるので、二つの局在一次ターゲティング剤、活性種(^{131}I)およびクリアリング剤との結合のための一つのDTPA部分を架橋することができる。ターゲティング可能構築物の結合の後に、図9で示されるようにクリアリング剤を注射する。クリアリング剤は二つの抗In-DTPA Ab部分を有する二価クリアリング剤であるので、二つのターゲティング可能構築物と結合し、これを架橋することができる。ターゲティング可能構築物はそれ自体二つの一次ターゲティング剤と結合するので、その結果、四つの標的抗原と結合した架橋複合体が形成され、これによりターゲティング可能構築物が標的に「ロック」される。さらに、図9のクリアリング剤は、迅速にインターナライズする表面抗原である異なる細胞表面抗原CD74と結合するAb部分(hLL1)を含む。このように、CD74との結合は活性種(この場合、 ^{131}I)を含む会合複合体のインターナライゼーションを促進することができる。

【0140】

上記の組合せは単に例示であり、例えば、上記の組合せ例のAb/ハプテン対のいくつか、または総てを置換した他の結合対を用い、他の構成を構築することもできる。

【0141】

VI. ターゲティング法の適用

本発明により提供される高解像度ターゲティングは、治療および診断(可視化を含む)の双方に多数の異なるタイプの適用で利用することができる。このような適用では、本構築物および方法を用いて標的部位に、ある部分を送達し、それにより処置および/または診断もしくは、例えば正常組織または細胞分布のイメージングを提供することができる。いくつかの異なるタイプの適用が下記、および引用することにより本明細書の一部とされる特許および特

【0142】

限定されるものではないが、本組成物および方法は心血管病変(梗塞、血餅、血栓、アテローム斑)、その他の病変(例えば、アミロイドーシスおよびアルツハイマー病におけるアミロイド)、癌(例えば、白血病、リンパ腫、肉腫、黒色腫、癌腫、神経膠腫、皮膚癌)、感染症(例えば、細菌、リケッチア、真菌、寄生虫、およびウイルス病原体)、炎症(例えば、慢性関節リウマチ、全身性天疱瘡、多発性硬化症などの自己免疫疾患)、変位または異所性の正常組織および細胞(例えば、子宮内膜、胸腺、脾臓、副甲状腺)、正常組織の消耗(例えば、骨髄、脾臓)の治療および/または診断もしくはイメージングに使用できる。

【0143】

1. 検出およびイメージング

よって、例えば、体腔において腫瘍は適当な波長の光を当て、その後、回収する種々の構造を直接的または間接的に可視化する手段により検出することができる。非イオン化放射線を当てて、これらの構造から再捕捉できる限り、いずれの身体部位の病変も可視化す

ることができる。例えば、高解像度の非侵襲性イメージング技術であるPETをヒト疾病の可視化用の本薬剤と併用することができる。PETでは、陽電子消滅崩壊時に生じる511keVの光子が検出される。

【0144】

本発明は通常、25~600keVの粒子および/または陽電子を放出する診断薬を用いることができる。このような薬剤の例としては、限定されるものではないが、 ^{18}F 、 ^{45}Ti 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ および ^{175}Lu が挙げられる。このようなシグナル発生薬剤は本化合物、一般にターゲッティング可能構築物の一つと結合させれば、ターゲッティングおよびその後のイメージングまたは検出が可能となる。

10

【0145】

手術用/内視鏡的短針による検出はまた、例えば放射性標識ターゲッティング可能構築物(例えば、I-125で標識されたペプチドに基づく構築物)を用いて行うこともできる。このような方法は例えば、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる、米国特許第5,716,595号および同第6,096,289号および米国特許出願公報第2002/146369号に記載されている。

【0146】

治療上および診断上有用な免疫複合体は光活性薬または色素をターゲッティング可能構築物に結合させることにより得ることができる。病変部に好適な光を当てることで病変部を検出および処置するには、蛍光およびその他の色素原、または色素(可視光に感受性のあるポルフィリンなど)が用いられてきた。療法では、光照射、光療法、または光線力学療法(PDT)(Jori et al. (eds.), Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases (Libreria Progetto 1985); van den Bergh, Chem. Britain 22:430 (1986))。さらに、モノクローナル抗体が光線療法を行うための光活性化色素と結合されている。Mew et al., J. Immunol. 130:1473 (1983);同著者, Cancer Res. 45:4380 (1985); Oseroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8744 (1986);同著者, Photochem. Photobiol. 46:83(1987); Hasan et al., Prog. Clin. Biol. Res. 288:471 (1989); Tatsuta et al., Lasers Surg. Med. 9:422 (1989); Pelegriin et al., Cancer 67:2529 (1991)。

20

【0147】

光線力学療法(PDT)法は米国特許第6,096,289号、同第4,331,647号、同第4,818,709号、同第4,348,376号;同第4,361,544号;同第4,444,744号;同第5,851,527号にも開示されており、これらは総て引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる。これらの方法では、光増感剤、例えばジヘマトポルフィリンエーテルなどのヘマトポルフィリン誘導体を被験体に投与する。抗腫瘍活性は、例えば630nmの光を用いることで誘導する。皮膚は太陽光により光増感しにくい場合、より長い波長で有用なものをはじめ、その他の光増感剤を用いることもできる。このような光増感剤の例としては、限定されるものではないが、ベンゾポルフィリン-酸環A(BPD-MA)、スズエチオプルブリン(SnET2)、スルホン化アルミニウムフタロシアニン(AISPc)およびルテチウムテキサフィリン(Lutex)が挙げられる。

30

40

【0148】

さらに、PDTでは、診断薬(例えば、本明細書に記載のようなターゲッティング可能構築物)は例えば全身注射することができ、内視鏡とともにレーザー誘導蛍光を用いて、光活性化薬剤を付着させた癌の部位を検出することができる。例えば、これは初期肺腫瘍の蛍光気管支鏡暴露に適用されている。Doiron et al. Chest 76:32 (1979)。もう一つの例では、本構築物は単一光子放射において使用できる。例えば、一次ターゲッティング剤を投与した後に被験体にTc-99m標識診断薬を投与し、その後、クリアリング剤を投与する。次に、被験体を、単一光子放射型コンピューター断層画像を作製するガンマカメラで走査し、病変部または腫瘍部位を確定する。

50

【 0 1 4 9 】

上記で示されているように、本組成物および方法は癌細胞検出の他、診断またはイメージングに関する多くの内容で適用することができる。例えば、アテローム性動脈硬化部のイメージングの検出のための抗体ターゲティングの使用は、Goldenbergの米国特許第5,525,338号の実施例8に記載されている。イメージングはガンマカメラでの走査により行われた。抗体ターゲティングを用いた癌のイメージングおよび癌治療もこの特許に記載されている。

【 0 1 5 0 】

イメージング（および治療）に使用できる抗体標的の一例として、アルツハイマー病特異的 t a u タンパク質エピトープがある (Vechterova et al., 2003, Neuroreport 14(1): 87-91, "DC11: a novel monoclonal antibody revealing Alzheimer's disease-specific tau epitope"). 同定されたモノクローナル抗体 (m A b D C 1 1) は免疫組織化学において、A D 患者に由来する脳の神経原繊維病変と結合し、健康な脳組織との反応性はなかった。ウエスタンブロットでは、m A b D C 1 1 は天然の健常な t a u もその全長組換え対応物も認識しなかった。よって、m A b D C 1 1 (または同様の特異性を有する別の抗体) は A D 脳に存在する病的 t a u のコンホメーションに対して特異性を有する有用な標的結合部分を提供する。

10

【 0 1 5 1 】

2. 治療適用

本構築物、薬剤、および方法は治療適用に極めて有利である。一般に、本構築物が治療に治療に用いられる標的および疾病または症状はまた、治療部分の代わりに、または治療部分に加えて診断部分を適宜選択することで診断（例えば、イメージング）用にも使用できる。

20

【 0 1 5 2 】

a. 酵素およびプロドラッグ

ある種の適用では、ターゲティング可能構築物を、標的部位においてプロドラッグを活性化し得る酵素と結合させ、身体の解毒経路を制御するか、または治療応答に作用する酵素反応を行わせることによって通常の治療薬の効力を向上させることができる。例えば、好適な酵素を標的部位へプレターゲティングした後、標的部位で作用することが知られている細胞傷害薬を注射する。この薬物は哺乳類の通常解毒プロセスにより解毒されるものであってもよい。例えば、この薬物は肝臓でより毒性が低い可能性があるグルクロニドへと変換され得る。次に、このこの解毒された中間体は、標的部位においてプレターゲティングされた酵素により、そのより有毒な形へと再変換され得る。あるいは、投与したプロドラッグをプレターゲティングされた酵素により有効薬剤へと変換することもできる。プレターゲティングされた酵素は、解毒された薬物を再循環させることで治療効果を向上させる。このアプローチはいずれの酵素 - 薬物対との併用にも適合させることができる。

30

【 0 1 5 3 】

抗癌治療に有用なある種の細胞傷害薬は相対的に血清に不溶である。非結合型で極めて有毒なものもあり、それらの毒性はプロドラッグへの変換により著しく軽減される。溶解度の乏しい薬物の、より溶解度の高い複合体、例えばグルクロニド、親水性酸のエステルまたは親水性アミンのアミドへの変換により、血清の水相における溶解度、および静脈、動脈または毛細血管細胞壁を通して腫瘍が浸かっている細胞間液に達する能力を向上させる。プロドラッグの開裂は標的部位において溶解度の低い薬物を定着させる。このようなプロドラッグから薬物への変換の多くの例が、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる、Hansenの米国特許第5,851,527号に記載されている。

40

【 0 1 5 4 】

肝臓における、芳香族または脂肪族アルコール、チオール、フェノールおよびアミンなどのある種の有毒物質の、グルクロニドへの変換は、それらを解毒し、尿中へ排泄しやすくする身体の方法である。このような物質へと変換可能な抗腫瘍薬の一種として、アント

50

ラサイクリングリコシドであり、ヒト α - D - グルクロニダーゼの基質であることが示されているドキシソルピシンの 4 - エピマーであるエピルピシン (アドリアマイシン) がある。例えば、Arcamone Cancer Res. 45:5995 (1985) 参照。もっと極性基の少ない他の類似体は、親油性が大きく、このようなアプローチにより有望であることが示されている。芳香族または脂肪族アルコール、チオールまたはアミン基を有するその他の薬物または毒素はこのような複合体形成の候補である。これらの薬物、またはその他のプロドラッグ形は本発明の部位特異的増強法の好適な候補である。

【 0 1 5 5 】

別の例として、プロドラッグ CPT - 11 (イリノテカン) は *in vivo* においてカルボキシルエステラーゼにより活性代謝物 SN - 38 へと変換される。よって、本発明の一つの適用は腫瘍およびハプテンにターゲッティングされる bsAb (例えば、ジ - DTPA) を用いた後に、ジ - DTPA - カルボキシルエステラーゼ複合体を注射することである。好適な腫瘍/バックグラウンド局在比に達したところで、CPT - 11 を与えると、腫瘍に局在したカルボキシルエステラーゼが腫瘍において CPT - 11 を SN - 38 に変換する働きをする。その溶解度が乏しいため、活性 SN - 38 は腫瘍の近傍に留まり、結局、ターゲッティングされた抗原に関して陰性の、隣接する腫瘍細胞で作用を発揮する。これは本方法のさらなる利点である。修飾された形のカルボキシルエステラーゼはすでに記載されており、本発明の範囲内にある。例えば、Potter et al., Cancer Res. 58:2646-2651 (1998) おおび Potter et al., Cancer Res. 58:3627-3632 (1998) 参照。

【 0 1 5 6 】

さらなる例として、エトポシドは、広く用いられ、そのグルクロニドの形成により主要な程度まで解毒される癌の薬物であり、本発明の範囲内にある。例えば、Hande et al. Cancer Res. 48:1829-1834 (1988) 参照。グルクロニド複合体は細胞傷害薬から製造することができ、mAb - グルクロニダーゼ複合体でプレターゲッティングした腫瘍の治療薬として注射することができる。例えば、Wang et al., Cancer Res. 52:4484-4491 (1992) 参照。従って、このような複合体も本明細書に記載のターゲッティング法と併用できる。同様に、ダウノマイシンおよびドキシソルピシンの誘導体を基にしてデザインしたプロドラッグも、カルボキシルエステラーゼおよびグルクロニダーゼとの併用に関する記載されている。例えば、Bakina et al., J. Med. Chem. 40:4013-4018 (1997) 参照。本発明内で使用できるプロドラッグ/酵素対の他の例としては、限定されるものではないが、フェノールマスタードのヒドロキシ誘導体のグルクロニドプロドラッグと α - グルクロニダーゼ；フェノールマスタードまたは CPT - 11 とカルボキシペプチダーゼ；メトトレキサート置換 α - アミノ酸とカルボキシペプチダーゼ A；6 - メルカプトプリンおよびドキシソルピシンなどの薬物のペニシリンまたはセファロスリン複合体と α - ラクタマーゼ；リン酸エトポシドとアルカリ性ホスファターゼが挙げられる。

【 0 1 5 7 】

b. ホウ素中性子補足療法 (BNCT)

本発明はまた、ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) プロトコルに関して適用することもできる。BNCT は、腫瘍に局在する ^{10}B 原子の中性子照射によって電離放射線を腫瘍細胞へ送達するよう設計された二元システムである。BNCT は、安定した同位元素である同位体的に豊富な ^{10}B (自然界には 19.8% 存在度で存在) が熱中性子とともに照射されて α 粒子および ^7Li 原子核を生じる際に起こる核反応に基づく。これらの粒子の飛程は約 1 細胞径であり、結果として線形の高エネルギー転移を生じる。この核反応で生じる飛程の短い 1.7 MeV の α 粒子がほんのわずかなれば、細胞核を標的とし、それを破壊するのに十分である。BNCT で癌治療を成功させるには高濃度の ^{10}B を腫瘍部位に局在させつつ、非標的器官は基本的にホウ素を含まないままにしておく方法が必要である。BNCT のためのプレターゲッティング bsAb を用いて被験体内で腫瘍を治療する組成物および方法は特許出願第 09/205,243 号 (引用することによりその全開示内が本明細書の一部とされる) に記載され、本発明の目的のために容易に修正できる。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 8 】

c . 手術中、血管内、および内視鏡的腫瘍および病変検出、生検および療法

検出およびイメージングに関して上記で示されているように、さらなる適用では、本発明を、引用することによりその全開示内が本明細書の一部とされる米国特許第 5 , 7 1 6 , 5 9 5 号および同第 6 , 0 9 6 , 2 8 9 号、ならびに米国特許出願公報第 2 0 0 2 / 0 1 4 6 3 6 9 号に記載されているような手術中、血管内、および内視鏡的腫瘍および病変検出、生検および療法においても使用できる。

【 0 1 5 9 】

d . 疾病およびその他の症状の処置への適用

上記で示されているように、本構築物および方法は、関連の組織がターゲッティング可能な種々の疾病および症状に適用できる。本発明を用いて処置できる疾病および症状のいくつかを以下に簡単に記載する。

【 0 1 6 0 】

1 . 癌の処置

癌の処置に有用な技術および薬剤の例の記載により上記で示されているように、本発明は癌の処置に極めて有用である。一般に、本発明は抗癌薬剤または癌細胞に対する抗癌処置の成分をターゲッティングすることができる。このターゲッティングは好ましくは細胞表面癌マーカーを用いて行う。多くの場合、このマーカーは正常細胞におけるよりも癌細胞で高い（例えば数倍またはそれ以上）レベルで存在するタンパク質またはペプチドである。このようなマーカーは多くの場合、特定の種の癌、または関連の癌のセットに特異的である。いくつかのマーカー例が本明細書に示されているが、当業者ならば、他のマーカーも知られており、さらにその他のものも同定されるであろうことが分かるであろう。このようなさらなるマーカーも本発明で標的として使用できる。

【 0 1 6 1 】

2 . 自己免疫疾患

もう一つの適用例として、本組成物は自己免疫疾患に関して使用できる。例えば、C D 2 2、C D 2 0、C D 1 9、C D 7 4 または H L A - D R 抗原などの B 細胞抗原をターゲッティングするターゲッティング剤が使用できる。自己免疫疾患の処置のためのターゲッティングの使用例は、“Immunotherapy of Autoimmune Disorders Using Antibodies Which Target B-Cells”と題された Goldenberg and Hansen の国際出願 P C T / U S 0 0 / 0 1 5 7 8 0、国際公開公報 W O 0 0 / 7 4 7 1 8 A 1 に記載されている。本明細書に記載するように、このような処置としては一を超える B 細胞抗原と結合する抗体の使用および多様式処置法における B 細胞ターゲッティングと他の処置法の組合せを含み得る。処置できる自己免疫疾患の例としては、限定されるものではないが、免疫媒介性血小板減少症（急性特発性血小板減少性紫斑病または慢性特発性血小板減少性紫斑病など）、皮膚筋炎、シドナム舞踏病、重症筋無力症、全身性紅斑性狼瘡、狼瘡腎炎、リウマチ熱、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、真性糖尿病、ヘノッホ - シェンライン紫斑病、溶連菌感染後腎炎、結節性紅斑、高安動脈炎、アジソン病、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、多形性紅斑、I g A 腎症、結節性多発性動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、パージャール病、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、甲状腺中毒症、硬皮症、慢性活動性肝炎、多発性筋炎 / 皮膚筋炎、多発性軟骨炎、尋常性天疱瘡、ウェゲナー肉芽腫、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄ろう、巨細胞性動脈炎 / 多発性筋痛、悪性貧血、急速進行性糸球体腎炎および繊維性肺肺炎などの第 I I 種自己免疫疾患が挙げられる。

【 0 1 6 2 】

3 . 感染症

病原菌または日和見菌、真菌、リケッチア、原虫、およびウイルスなどの感染性病原体も使用可能な標的となる。このような標的は感染性病原体の細胞上に存在する場合もあるし、感染した宿主細胞の表面に存在する場合もある（例えば、細胞の感染がその細胞表面に特徴的なマーカーを残す場合）。本明細書には特定の感染性病原体がいくつか挙げられ

10

20

30

40

50

ており、ここでは繰り返さない。

【0163】

4. 正常細胞のターゲッティング

多くの場合、本方法は例えば癌細胞、感染細胞、感染性病原体、生化学的にバランスを欠いた、または生化学的機能に欠陥のある細胞などの病態標的をターゲッティングするために適用される。しかし、次の場合、正常細胞をターゲッティングするのが有益であり、例えば・・・。

【0164】

5. 併用療法

本発明を用いて単一の治療部分を送達する方法の他、これらの組成物および方法は少なくとも一つの付加的治疗部分を同時に送達するよう、かつ/または別の治療法とともに構成することができる。例えば、癌のターゲッティング免疫療法を用いた複数薬物療法の適用が、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる、“Targeted Combination Immunotherapy of Cancer”と題されたGriffiths et alの米国特許第6,077,499号に記載されている。本発明では、同じ結合部分において、異なる治療部分を用いて構築したターゲッティング可能構築物を用いることにより、あるいは、異なる治療部分を含むターゲッティング可能構築物を用いることにより、このような二薬剤（または複数薬剤、例えば、二、三、四薬剤）法を実施することができる。このような異なる治療部分は例えば二つの異なる薬物、二つの異なる毒素、二つの異なる放射性核種、放射性核種と薬物、放射性核種と毒素、薬物と毒素を含むことができる。あるいは、個々のターゲッティング可能構築物、通常には一次ターゲッティング剤上の個別の結合部分と結合する個別のターゲッティング可能構築物を使用することができる。このような併用療法はまた、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる、“Targeted Combination Immunotherapy of Cancer and Infectious Diseases”と題されたGriffiths, et alの国際出願PCT/US01/41048、国際公開公報WO01/97855A2に記載されている。

【0165】

e. in vitro適用

本構築物および方法は治療およびイメージング目的だけでなく、in vitro研究を行う助けとしても使用できる。例えば、二重特異性一次ターゲッティング剤をin vitroで用いてターゲッティング可能構築物が一以上のbsAbまたはその他の二重特異性一次ターゲッティング剤と安定な複合体を形成できるかどうかを確認することができる。このようなアッセイは、このような安定な複合体を形成するターゲッティング可能構築物を同定する上で当業者の助けとなる。そして、これにより当業者は、治療および/または造影剤として優れたものである可能性のあるターゲッティング可能構築物を同定することができる。

【0166】

このようなアッセイは対象ターゲッティング可能構築物と少なくとも2モル当量の突然変異bsAbを組み合わせることによって行うのが有利である。インキュベーション後、混合物をサイズ排除HPLCにより分析して、その構築物がbsAbと結合したかどうかを判定する。あるいは、種々のbsAb溶液を標準的な96穴プレートに入れる標準的なコンビナトリアル法を用いてアッセイを行う。各穴にターゲッティング可能構築物の溶液を加える。インキュベーションおよび分析の後に、構築物がどのbsAbと最もよく結合したかが容易に判定できる。

【0167】

このようなアッセイでは、ターゲッティング可能構築物に二重特異性薬剤を加える順序は重要ではなく、すなわち、二重特異性薬剤を構築物へ加えてもよいし、その逆でもよい。同様に、突然変異bsAbも構築物も溶液である必要はなく、すなわち、それらは溶液で加えても、そのまま加えてもよく、どちらでも便宜なことに代わりはない。最後に、結合が「確率されている限り、結合の分析方法も重要でない。よって、サイズ排除HPLCとともに、またはその代わりに、限定されるものではないが、FABMS、高磁界NM

R またはその他の適当な方法を含む標準的な分析法を用いて結合を分析すればよい。当業者ならば多くの好適な検出方法を知っている。

【0168】

VII. 標的抗原およびエピトープ

標的エピトープは被験体の標的組織、サンプルまたは細胞培養物の内部に含まれているか、それらにより提示されているか、かつ/またはそれらから放出される。サンプルは身体組織または液性組織であっても、被験体内にあっても、被験体から生検採取されたものであっても、取り出されたものであっても、身体組織の全体または任意の一部であってもよい。さらに、組織は、その組織が切除と本発明の方法の間に保存工程がなく、取り出されたばかりであるという意味で「サンプル」であるといえる。また、組織は、本発明の方法の適用前に、限定されるものではないが、冷凍、急速冷凍、パラフィン包埋、および組織固定をはじめとする標準的な組織標本技術により保存されていたものであってもよい。

10

【0169】

「提示されている」とは、膜タンパク質の一部が細胞、組織および/または器官の表面に存在し、従って、細胞、組織または器官の外部環境と接触しているということを意味する。標的エピトープは、限定されるものではないが、癌、その他の増殖性疾患および病原性感染、ならびにその他の疾病および症状をはじめとする疾病に関連するものであってよい。

【0170】

A. 過増殖性疾患に関連する抗原およびエピトープ

20

本発明に用いられる二重特異性一次ターゲティング剤（例えば、抗体）は過増殖性疾患と関連した種々の細胞表面または細胞内抗原に特異的となるようにデザインすることができる。正常な組織の恒常性は細胞増殖速度と細胞死速度の間の複雑なバランスによって成り立つ。細胞増殖速度が高まるか、または細胞死速度が低下するかのいずれかによってこのバランスが乱れた結果、異常な細胞増殖が起こり、これが癌およびその他の過増殖性疾患の発症における主要な事象であると考えられる。よって、「過増殖性疾患」は、細胞の細胞分裂速度が異常に大きく、かつ/または壊死および/またはアポトーシスの速度が異常に低いというものである。限定されるものではないが、例としては、腫瘍発生；腫瘍進行；白血病、固形腫瘍および転移症などの癌；乾癬；良性前立腺肥大、皮膚の良性過形成および血管腫などの良性過増殖性疾患；乾癬および慢性関節リウマチなどの慢性炎症性増殖性疾患；糖尿病性網膜症および黄斑変性などの増殖性眼疾患；ならびに再狭窄およびアテローム性動脈硬化症などの増殖性心血管疾患が挙げられる。再狭窄は血管形成術またはその他の動脈損傷後に平滑筋細胞が血管腔内に再成長することを特徴とするが、血管形成術の長期成功という点で頻繁に繰り返される問題であり、動脈再構築、またはアテローム切除術、ステント移植、およびレーザー血管形成術の後にも起こるものである。

30

【0171】

これらの抗原は、細胞質であれ核であれ、種々のオルガネラまたは細胞下成分（細胞表面受容体または細胞内受容体を含む）であれ、例えば腫瘍により生産される物質であっても、腫瘍部位に、または腫瘍細胞表面に、または腫瘍細胞内に蓄積する物質であってもよい。このような細胞関連マーカーとしては、限定されるものではないが、Herberman, Immunodiagnosis of Cancer, in Fleisher ed., The Clinical Biochemistry of Cancer, page 347 (American Association of Clinical Chemists, 1979) および米国特許第 4, 150, 149 号、同第 4, 361, 544 号、および同第 4, 444, 744 号に開示されているものがある。

40

【0172】

腫瘍関連マーカーは、Herberman, 前掲が、癌胎児性抗原、胎盤抗原、癌または腫瘍ウイルス関連抗原、組織関連抗原、器官関連抗原、異所性のホルモンおよび正常抗原またはその変異体をはじめとするいくつかのカテゴリーに分類している。場合により、例えば、米国特許第 4, 361, 644 号および同第 4, 444, 744 号（引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする）に記載されているような、非腫瘍物質との交差

50

反応性が著しく軽減された抗体の産生を刺激するヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（HCG）のサブユニットまたは癌胎児性抗原（CEA）の領域など、腫瘍特異性のより高い抗体を惹起するために腫瘍関連マーカーのサブユニットを用いるのが有利である。

【0173】

限定されるものではないが、好適な腫瘍関連マーカーまたは受容体の例としては、B細胞複合体構造（例えば、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD74、CD80）、造血系およびある種の固形腫瘍で発現するその他の受容体（例えば、CD74、HLA-DR）、および多様な癌で発現する腫瘍関連マーカー（例えば、癌胎児性抗原、CSAp、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、Tag-72、EGP-1、EGP-2、A33抗体に特異的な抗原、PSA、PSMA、EGFR、HER2/neu、PAM-4、AFP、HCGおよびそのサブユニット、黒色腫瘍関連抗原（例えば、S100）、神経膠腫関連抗原、卵巣癌関連抗原など）、ならびに腫瘍の血管構造により発現する標的分子（腫瘍脈管形成マーカー、通常は血管内皮により産生される）、例えばVEGFおよびテネイシン（例えば、後者は脳腫瘍におけるもの）、また、p53などの癌遺伝子関連マーカーが挙げられる。本明細書に開示されているような抗原に対する抗体例の他にも、これらの抗原に対する抗体は当技術分野で公知である（例えば、Kim S., Song S., Kim Y., Park S. Expression and Characterization of a Recombinant Fab Fragment Derived from an Anti-Human alpha-Fetoprotein Monoclonal Antibody. *Mol. Cells* 11:158-163, 2001; および Haisma HJ, Sernee MF, Hooijberg E, Brakenhoff RH, Meulen-Muileman I, Pinedo HM; Boven E. Construction and characterization of a fusion protein of single-chain anti-CD40 antibody and human b-glucuronidase for antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Blood* 92:184-190, 1998参照）。

【0174】

対象となる別のマーカーとして、トランスメンブランアクチベーターおよびCAML-インターアクター（TACI）がある。Yu et al. *Nat. Immunol.* 1:252-256 (2000)参照。要するに、TACIはB細胞悪性腫瘍（例えば、リンパ腫）のマーカーである。さらに、TACIおよびB細胞成熟抗原（BCMA）には腫瘍壊死因子ホモログ増殖誘導リガンド（APRIL）が結合することが知られている。APRILは一次B細胞およびT細胞のin vivo増殖を刺激し、in vivoにおけるB細胞の蓄積により脾臓重量を増す。APRILはまた、受容体結合に関してTALL-1（BlySまたはBAFFとも呼ばれる）と競合する。可能性BCMAおよびTACIはAPRILの結合を特異的に妨げ、APRILにより刺激される一次B細胞の増殖を遮断する。BCMA-Fcはまた、マウスにおいてキーホールリンペットヘモシアニンおよびニューモバックスに対する抗体の産生を阻害するが、このことはBCMAおよび/またはTACIを介するAPRILおよび/またはTALL-Iのシグナル伝達が体液性免疫の形成に必要であることを示唆している。このように、APRIL-TALL-IおよびBCMA-TACIはB細胞およびT細胞の刺激に関与する二リガンド-二受容体経路を形成する。

【0175】

腫瘍特異的抗原（TSA）、腫瘍関連分化抗原（TADA）ならびに癌およびその他の過増殖性疾患と関連するその他の抗原としてはまた、限定されるものではないが、ヒト癌関連タンパク質であるC1IAC (Osther, 米国特許第4,132,769号); 卵巣の嚢胞腺癌関連の抗原であるCA125抗原 (Hanisch et al., *Carbohydr. Res.* 178:29-47, 1988; O'Brien, 米国特許第4,921,790号); 多くの腺癌に存在するCEA (癌胎児性抗原) (Horig et al., *Strategies for cancer therapy using carcinoembryonic antigen vaccines*, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>: 1,2000); Toth et al (米国特許第4,914,021号) が記載しているCOR (癌腫またはオロソムコイド関連抗原); ヒト乳癌由来DF3抗原 (Kufe, 米国特許第4,963,484号および同第5,053,489号); 脾臓癌抗原であるDU-PAN-2 (Lan et al., *Cancer Res.* 45:305-310, 1985); ヒト癌腫抗原であるHCA (Coddington et al., 米国特許第5,693,763号); 乳癌抗原であるHer2 (Fendly

et al., The Extracellular Domain of HER2/neu Is a Potential Immunogen for Active Specific Immunotherapy of Breast Cancer, Journal of Biological Responses 9:449-455, 1990); 乳癌糖タンパク質である M S A (Tjandra et al., Br. J. Surg. 75:811-817, 1988); 癌腫抗原である M F G M (Ishida et al., Tumor Biol. 10:12-22, 1989); 前立腺特異的抗原である P S A (Nadji et al., Prostatic-specific-antigen, Cancer 48:1229-1232, 1981); S T E A P (前立腺の 6 つのトランスメンブラン上皮抗原) タンパク質 (A far et al., 米国特許第 6, 3 2 9, 5 0 3 号); 乳癌糖タンパク質である T A G - 7 2 (Kjeldsen et al., Cancer Res. 48: 2214-2220, 1988); 肺癌抗原である Y H 2 0 6 (Hino da et al., Cancer J. 42:653-658, 1988); ヒト黒色腫の p 9 7 抗原 (Estin et al., Rec ombinant Vaccinia Virus Vaccine Against the Human Melanoma Antigen p97 for Use i n Immunotherapy, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 85:1052-1056, 1988); および Pfreundsc huh が米国特許第 6, 0 2 5, 1 9 1 号で記載している黒色腫特異的抗原が挙げられる。

【 0 1 7 6 】

B. 病原体関連抗原

本発明は癌およびその他の増殖性疾患に関連するエピトープへのターゲッティングに特に有利であるが、このようなエピトープに限定されるものではない。例えば、本発明はウイルス、細菌、および真菌などの病原体の存在に関するエピトープをターゲッティングするためにも使用できる。例えば Polin, 1984, Eur. J. Clin. Microbiol. 4(5):387-398 にまとめられているように、感染性病原体に対して多様なモノクローナル抗体が開発されている。感染性病原体に対する特定の抗体は米国特許第 3, 9 2 7, 1 9 3 号; 同第 4, 3 3 1, 6 4 7 号; 同第 4, 3 4 8, 3 7 6 号; 同第 4, 3 6 1, 5 4 4 号; 同第 4, 8 1 8, 7 0 9 号および同第 4, 6 2 4, 8 4 6 号に記載されている。このような抗体またはこれらの標的に対する他の好適な抗体は本発明において使用可能である。さらに、いくつかの病原体例を以下に示す。

【 0 1 7 7 】

1. ウイルス

ターゲッティング可能なウイルスの例としては、限定されるものではないが、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、I 型単純ヘルペス (H S V - I)、II 型単純ヘルペス (H S V - II)、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、狂犬病ウイルス、エボラウイルス、ロタウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、乳頭腫ウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス (C M V)、エチノウイルス、アルボウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、I 型ヒト免疫不全ウイルス I (H I V - I) および II 型ヒト免疫不全ウイルス (H I V - II)、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、ヒト血清パルボ様ウイルス、シミアンウイルス 4 0 (S V 4 0)、呼吸器合胞体ウイルス (R S V)、マウス乳癌ウイルス (M M T V)、水痘 - 帯状疱疹ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス、エプスタイン - バーウイルス、ネズミ白血病ウイルス、水疱性口内炎ウイルス (V S V)、天然痘 (痘瘡ウイルス)、シンドビスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、牛痘ウイルス、疣贅ウイルスおよびブルータングウイルスが挙げられる。

【 0 1 7 8 】

2. 細胞内病原体

同様に、限定されるものではないが、細胞内偏性病原体の例としては、クラミジア種、リケッチア種、細胞内原虫 (限定されるものではないが、リーシュマニア、コクジディオ (Kokzidioa) およびトリパノソーマ種を含み、限定されるものではないが、細胞内スピロヘータを含み、限定されるものではないが、ラム病の病原体であるボレリア・ブルグドルフェリ (Borrelia Burgdorferi) を含む)、ならびに肝臓および赤血球の胞子虫偏性細胞内寄生虫であるプラスモジウム種 (限定されるものではないが、マラリア病原体である熱帯熱マラリア原虫 (P. falciparum)、睡眠病を引き起こす住血鞭毛虫ブルーストリパノソーマ

マ(*Trypanosoma brucei*)、シャーガス病の原因であるクルーズトリパノソーマ(*Trypanosoma cruzi*)を含む)が挙げられる。このような病原体の免疫学に関する総説は、Blackman M J. Proteases involved in erythrocyte invasion by the malaria parasite: function and potential as chemotherapeutic targets. *Curr Drug Targets*. 2000 Jul;1(1):59-83; Kosma P. Chlamydial lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Oct 8; 145 5 (2-3): 387-402; Casadevall A. Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Trends Microbiol*. 1998 Mar;6(3):102-7; Hoffman SL, Franke ED. Inducing protective immune responses against the sporozoite and liver stages of *Plasmodium*. *Immunol Lett*. 1994 Jul; 41(2-3):89-94; Keusch GT. Immune responses in parasitic diseases. Part A: general concepts. *Rev Infect Dis*. 1982 Jul-Aug; 4(4): 7 51-5; および Colli W, Alves MJM. Relevant glycoproteins on the surface of *Trypanosoma cruzi*. を参照。

【 0 1 7 9 】

3 . 細菌

同様に、細菌病原体としては、限定されるものではないが、黄色ブドウ球菌(*Streptococcus aureus*)、ストレプトコッカス・アガラクティー(*Streptococcus agalactiae*)、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、肺炎球菌(*Pneumococcus*)種、B型インフルエンザ(*Hemophilis influenzae B*)、ペスト菌(*Yersinia pestis*)、マイコバクテリア(*Mycobacteria*)種(限定されるものではないが、例としてはらい菌(*Mycobacteria leprae*)およびヒト結核菌(*Mycobacteria tuberculosis*)、梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、野兔病菌(*Francisella tularensis*)、ブルセラ(*Brucella*)種(ウシ流産菌(*Brucella abortus*)を含む)、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)(炭疽孢子を含む)、ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)(ボツリヌス毒素を含む)および破傷風菌(*Clostridium tetani*)(破傷風菌毒素を含む)が挙げられる。米国特許第 5 , 3 3 2 , 5 6 7 号参照。

【 0 1 8 0 】

4 . 病原性真菌

ターゲティングできる真菌病原体としては、限定されるものではないが、カンジダ(*Candida*)種、アスペルギルス(*Aspergillus*)種、ケカビ(*Mucor*)種、クモノスカビ(*Rhizopus*)種、フザリウム(*Fusarium*)種、ペニシリウム・マルネフェイ(*Penicillium marneffeii*)および小孢子菌(*Microsporum*)毛癬白癬菌(*Trichophyton mentagrophytes*)、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム(*Histoplasma capsulatum*)、プラストミセス・デルマティティディス(*Blastomyces dermatitidis*)、およびコクシジオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)が挙げられる。また、他のこのような真菌病原体も使用できる。

【 0 1 8 1 】

C . 他の標的

上記に挙げた標的に限定されるものではない。他疾病、症状、感染性病原体、組織などを識別する抗原またはエピトープも既知であり、さらに多くが同定されと考えられる。一例として、上記で示されているアルツハイマー病特異的 t a u タンパク質エピトープがある(Vechterova et al., 2003, *Neuroreport* 14(1):87-91, “DC11: a novel monoclonal antibody revealing Alzheimer's disease-specific tau epitope”)

【 0 1 8 2 】

VIII . 活性種

本発明では、標的部位にターゲティングすることにより、種々の異なる種を対象とすることができる。ほとんどの場合、標的へ送達される種は診断種または治療種である。これらには例えば、可視化薬剤、造影剤、治療用放射活性同位元素、薬物および毒素が挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの例が、ターゲティング可能構

築物との結合または複合体形成に関して本明細書に記載されている。また、このような活性種はさらなるターゲッティング法で用いるために他の送達成分と組み合わせることもできる。例えば、活性種は、一次ターゲッティング剤と結合する個別のインターナリゼーション薬剤を用いる方法で用いるために、一次ターゲッティング剤（標的に直接結合する種）と組み合わせることができる。

【 0 1 8 3 】

IX. インターナリゼーション部分

本ターゲッティング法および構築物は、標的複合体またはその一部のインターナリゼーションを促進する技術と組み合わせて使用することもできる。これらの方法では、ターゲッティング可能構築物がインターナリゼーション部分と特異的に会合する。このようなインターナリゼーション部分一次ターゲッティング剤またはクリアリング剤上の部分として組み込むこともできるし、あるいは、一次ターゲッティング剤、ターゲッティング可能構築物またはクリアリング剤と特異的に会合する個別のインターナリゼーション薬剤として提供することもできる。インターナリゼーション部分は、活性種の非標的インターナリゼーションを少なくするために、ターゲッティングの前に活性種から分離することが極めて好ましい。

【 0 1 8 4 】

インターナリゼーションを促進する種々の異なる種が知られており、使用できる。例として、葉酸受容体を介したインターナリゼーションを用いる葉酸（葉酸基）またはメトトレキサート；ステロイドホルモンとそれらの個々の受容体；受容体によって認識されるペプチド、例えば、ソマトスタチン、LHRHポンペシン/CCKB、サブスタンスP、VIPが挙げられる。さらに、ターゲッティング可能構築物と迅速にインターナライズする膜タンパク質とを架橋する二重特異性抗体を用いてインターナリゼーションを促進することもできる。例えば、ターゲッティング可能構築物をリンパ腫細胞上のCD20に向け、次に、二重特異性抗体を用いてCD74と架橋することができる。架橋二重特異性抗体の構築に用いるのに好適な抗CD74抗体としては、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる米国特許第6,458,933号に記載されているLL1がある。あるいは、二重特異性抗体を用い、いずれもB細胞リンパ腫に存在する、迅速にインターナライズするB細胞特異的分子として知られているCD22またはCD19とターゲッティング可能構築物とを架橋することもできる。この目的に好適な抗CD22抗体としては、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる米国特許第5,789,554号に記載されているLL2がある。もう一つの例として、ターゲッティング可能構築物を癌腫細胞上のCD66e (CEA) に向け、次に、二重特異性抗体を用いてEGP-1と架橋することもできる。架橋二重特異性抗体の構築に用いるのに好適抗EGP-1抗体としては、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる、RS7 Antibodiesと題された2002年3月1日出願の、Govindan et alの米国仮出願第60/360229号に記載されているRS7がある。EGP-2 (Anticancer Res 1998 Sept-Oct; 18(5B): 3669-75)は、CD66e陽性癌腫細胞に存在する、もう一つの迅速にインターナライズする腫瘍関連抗原であり、これもEGP-1のインターナリゼーション作用に関して上記したように使用できる。

【 0 1 8 5 】

同様に、非受容体媒介機構によってインターナライズされる特定のウイルスまたはウイルス様ペプチドも使用できる。細胞透過ペプチドの例としては、限定されるものではないが、ペントラチン、トランスポータン、TatおよびMAPが挙げられる。例えば、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる、Hallbrink et al., 2001, Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides, BBiochimica et Biophysica Acta 1515:1001-1009; Gallouzi & Steitz, 2001, Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides, Science 294:1895-1901参照。

【 0 1 8 6 】

X. インターナライズ分子複合体に関する方法

10

20

30

40

50

インターナリゼーション部分（例えば、上記の通り）を用いて標的活性種のインターナリゼーションを補助することもできる。特に活性種が有毒薬剤である場合には、インターナリゼーション部によって媒介される非標的インターナリゼーションのレベルを最小限とすることが極めて好ましい。従って、インターナリゼーション部分は、このような非特異的インターナリゼーションを回避するために活性種から独立したものでなければならない。すなわち、インターナリゼーション部分は活性種ではなく別の種の一部でなければならない。例えば、一次ターゲッティング剤、ターゲッティング可能構築物、およびクリアリング剤を用い、活性種がターゲッティング可能構築物の一部である場合、インターナリゼーション部分はクリアリング剤か、またはあまり望ましくはないが一次ターゲッティング剤と結合されることもできるし、あるいは、標的部位において複合体を結合させた後に投与し、一次ターゲッティング剤、ターゲッティング可能構築物またはクリアリング剤と特異的に結合する別種として提供することもできる。インターナリゼーション部分から活性種を物理的かつ／または一時的に分離することにより、活性種の非特異的インターナリゼーションは最小限となる。

10

【0187】

もう一つの例では、このようなインターナリゼーション薬剤は、本ターゲッティング法、ロック法およびクリアリング法を用いなくとも使用できる。例えば、毒素または治療用放射性核種などの活性種を一次ターゲッティング剤上に結合または複合化させる。この薬剤を投与して、標的部位に付着させる。その後、インターナリゼーション薬剤を投与するのであるが、このインターナリゼーション薬剤は一次ターゲッティング剤と特異的に結合して複合体を形成し、この複合体のインターナリゼーションを促進する結合部分を含んでいる。このようにすれば、インターナリゼーション薬剤と会合した循環中の活性種の量が最小となり、これにより活性種の非特異的インターナリゼーションも最小となる。

20

【0188】

また別の例では、一次ターゲッティング剤と迅速にインターナライズする細胞表面受容体とを架橋することにより、上記で示したように、特定のインターナリゼーション薬剤を使わなくてもインターナリゼーションが達成できる。この方法は特に、標的が正常細胞にも存在するが、特定の標的細胞、例えば癌細胞にはるかに高いレベルで存在するという場合に適用できる。これらの場合、標的細胞に結合したものに比べて、正常細胞に結合したターゲッティング剤は相対的に少ない。従って、迅速にインターナライズする表面分子との架橋およびその結果としてのインターナリゼーションは正常細胞よりも標的細胞で起こる頻度が高くなる。このように、正常細胞における活性種のインターナリゼーションは標的細胞よりもはるかに低いレベルでしか起こらない。

30

【0189】

XI. キット

本発明の方法の実施を容易にするには、キット、例えば患者において罹患組織を処置または診断するのに好適な成分を含んだキットを提供するのが有利である。このようなキットは、本明細書に記載の少なくとも一つの構築物、例えば一次ターゲッティング剤、ターゲッティング可能構築物、クリアリング剤、インターナリゼーション薬剤、およびこのような成分の各組合せを含み得る。ターゲッティング可能構築物を含む場合、その構築物が診断部分または治療部分を含むか、またはそのような成分と結合する構成であれば極めて好ましい。

40

【0190】

さらに、投与成分を含有する組成物が消化管を介した送達用として処方されていない場合（限定されるものではないが、舌下送達を含む）治療薬を他のいくつかの経路を介して送達し得る装置を含めてもよい。経口送達などの適用のための装置の一種としては、治療薬を必要とする動物の身体へ組成物を注射するために用いるシリンジがある。また、吸入装置を用いてもよい。

【0191】

また、各々がそのキットの一以上の試薬、または複数のコンパートメントを有する容器

50

を含む、個々の容器を含むのが有利であり得る。好ましい実施形態では、再構成に好適な組成物の滅菌凍結乾燥製剤を含んだバイアルである。また、キットは一次ターゲッティング剤、ターゲッティング可能構築物、クリアリング剤、および／またはインターナリゼーション薬剤などの他の試薬の再構成および／または希釈に好適な一以上のバッファーを含むこともできる。使用可能な他の容器としては、限定されるものではないが、ポーチ、トレイ、ボックス、チューブなどが挙げられる。キット成分は容器内に無菌で封入および維持が可能である。

【0192】

含め得る別の構成要素としては、その用途にキットを用いる人に対する使用説明書がある。これらの使用説明は一以上のキット成分、キットパッケージおよび／またはキットパッケージ添付書類に示すことができる。このような使用説明には、限定されるものではないが、キットおよびその試薬の用途、凍結乾燥試薬またはその他の調製試薬の再構成、および／または投与後の患者の監視に関する説明が含まれる。

10

【0193】

好ましい実施形態では、これらのキットは、例えば米国食品医薬品局など、診断薬および／または治療薬の規制を負う適正な国立または地方の規制当局により使用、例えばヒトでの使用を認可されたものである。

【0194】

本キットの例としては、以下のものが挙げられる。

【0195】

20

標的結合部分と少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分を含む一次ターゲッティング剤；少なくとも一つの一次ターゲッティング剤結合部分と治療部分または診断部分とクリアリング剤結合部分とを含むターゲッティング可能構築物；およびターゲッティング可能構築物結合部分を含むクリアリング剤を含む治療薬または診断薬の投与のためのキット。

【0196】

もう一つの例としては、少なくとも一つの標的結合部分と少なくとも一つのインターナリゼーション薬剤結合部分を有する一次ターゲッティング剤；ならびにインターナリゼーション部分を有する複合体のインターナリゼーションを促進するインターナリゼーション部分と一次ターゲッティング剤結合部分とを有するインターナリゼーション薬剤を含むキットがある。このキットはまたターゲッティング可能構築物および／またはクリアリング剤を含むことができ、この場合には、一次ターゲッティング剤は少なくとも一つのターゲッティング可能構築物結合部分も含む。

30

【0197】

上記のような一次ターゲッティング剤、ターゲッティング可能構築物、クリアリング剤、および／またはインターナリゼーション薬剤の選択肢を含むその他多数の本発明のキットが提供される。例えば、特定のキットは、本明細書に記載の特定の標的に向けられている一次ターゲッティング剤、記載のような活性種および／またはハプテンを含むターゲッティング可能構築物、記載のような二価クリアリング剤、および／またはインターナリゼーション薬剤または部分を含む。

40

【0198】

XII. 投与

本構築物は種々の投与法を用いて正常組織および器官を処置および／またはイメージングする上で用いることができる。限定されるものではないが、投与は静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜腔内、髄腔内、局部カテーテルからの灌流によるもの、および直接病変内注射によるものであり得る。投与法の例としては、米国特許第6,126,916号；同第6,077,499号；同第6,010,680号；同第5,776,095号；同第5,776,094号；同第5,776,093号；同第5,772,981号；同第5,753,206号；同第5,746,996号；同第5,697,902号；同第5,328,679号；同第5,128,119号；同第5,101,827号；

50

および同第4, 735, 210号に記載されている。さらなる方法が1999年6月22日出願の米国特許出願第09/337, 756号および2001年4月3日出願の米国特許出願第09/823, 746号に記載されている。これらの参考文献は総て、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする。これらの文書の記載の他、以下に医薬組成物の製造および使用に関する有用な情報を示す。

【0199】

一般に、哺乳類に投与するためには、本構築物を医薬組成物として調剤する。「医薬組成物」とは送達物を含む組成物をさし、その担体は医薬上許容される担体であり、「獣医学用組成物」の場合は、この担体が獣医学上許容される担体である。「医薬上許容される担体」または「獣医学上許容される担体」とは、生物学上、またはその他の点で望ましくない媒体または材料も含み、すなわち、この担体は望ましくない生体作用を生じたり、あるいはその複合体またはそのいずれかの成分またはその生物と有害な相互作用を起こしたりせずに本発明の組成物または化合物とともに生物に投与することができる。医薬上許容される試薬の例は、Pharmaceutical Dosage Forms & Drug Delivery Systems, 7th Edition, Ansel et al., editors, Lippincott Williams & Wilkins, 1999 同様、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされるThe United States Pharmacopeia, The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD 1990に記載されている。

【0200】

送達する分子（例えば、一次ターゲッティング剤、ターゲッティング可能構築物、クリアリング剤、または複合体）は、患者に望ましい作用をもたらすに十分な量で医薬組成物に含める。本発明の医薬組成物はさらに希釈剤および賦形剤などの他の化学成分を含んでもよい。「希釈剤」は、溶媒中で薬物の溶解を助ける溶媒、好ましくは水性溶媒で希釈された化学化合物であり、これはまた生物的に活性な形態の薬物、またはその一以上の成分を安定化させる働きもし得る。当技術分野では、緩衝溶液に溶解させた塩が希釈剤として用いられる。例えば、好ましい希釈剤は異なる一以上の塩を含有する緩衝溶液である。好ましい緩衝溶液は、それがヒトの血中の塩条件を模倣することからリン酸緩衝生理食塩水（特に医薬投与のために意図された組成物と組み合わせたもの）。バッファ塩は低濃度で溶液のpHを制御することができるので、緩衝希釈剤が生物活性ペプチドの生物活性を改質することは少ない。

【0201】

「賦形剤」は、好適な特性、例えば好適なコンシステンシーを付与するため、または薬物を形成するために組成物に加え得る多少とも不活性な物質である。好適な賦形剤および担体としては、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールなどの糖類、セルロース製剤、例えばトウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、寒天、ベクチン、キサントガム、グアーガム、ローカストビーンガム、ヒアルロン酸、カゼインジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、ポリアクリレート、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/またはポリビニルピロリドン（PVP）などの増量剤が挙げられる。所望により、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムのようなその塩といった崩壊剤も含めることができる。他の好適な賦形剤および担体としては、ヒドロゲル、ゲル化ヒドロコロイド、およびキトサンが挙げられる。キトサンマイクロスフェアおよびマイクロカプセルは担体として使用できる。WO 98/52547 参照（化合物を胃ヘターゲッティングするためのマイクロスフェア製剤について記載し、これらの製剤は、一以上の有効成分を含む内部コア（所望によりゲル化ヒドロコロイドを含む）、有効成分の放出速度を制御するための水不溶性ポリマー（例えば、エチルセルロース）を含む膜、および生体接着性陽イオンポリマー、例えば陽イオン多糖、陽イオンタンパク質、および/または合成陽イオンポリマーを含む外層を含む）；米国特許第4, 895, 724号参照。一般に、キトサンは例えばグルタルアルデヒド、グリオキサール、エピクロロヒドリン、およびスクシンアルデヒドなどの好適な薬剤用いて架橋される。担

体としてキトサンを用いる組成物は、丸剤、錠剤、微粒子、およびマイクロスフェア（有効成分の徐放性を提供するものを含む）をはじめとする種々の投与形に調剤することができる。その他の好適な生体接着性陽イオンポリマーとしては、酸性ゼラチン、ポリガラクトサミン、ポリアミノ酸（ポリリジン、ポリヒスチジン、ポリオルニチンなど）、ポリ第四級化合物、プロラミン、ポリイミン、ジエチルアミノエチルデキストラン（DEAE）、DEAE-イミン、DEAE-メタクリレート、DEAE-アクリルアミド、DEAE-デキストラン、DEAE-セルロース、ポリ-p-アミノスチレン、ポリオキセタン、コポリメタクリレート、ポリアミドアミン、陽イオンデンプン、ポリチオジエチルアミノメチルエチレンおよびポリビニルピリジンが挙げられる。

【0202】

本発明のターゲッティング可能構築物、他の薬剤、および複合体はいずれの好適な様式で調剤してもよい。ターゲッティング可能構築物および複合体は担体中に均一（均質）または不十分（非均質）に分散させ得る。好適な処方物としては、乾燥および液体小胞物が挙げられる。乾燥処方物としてはフリーズドライ（凍結乾燥）粉末を含み、これは肺、または洞へのエアゾール送達に、または長期間保存の後、投与前に好適な希釈剤で再構成するのに特によく適している。他の好ましい乾燥処方物としては、本発明の医薬組成物が経口投与に好適な錠剤または丸剤の形に圧縮されたもの、または持続放出处方物へと混成されたものが挙げられる。医薬組成物が経口投与を意図したものであるが、ターゲッティング可能構築物または複合体を腸上皮へ送達する場合、処方物を腸溶コーティングに封入し、処方物を保護し、中に含まれているターゲッティング可能構築物および複合体の早期放出を防ぐことが好ましい。当業者ならば分かるように、本発明の医薬組成物はいずれの好適な投与形とすることもできる。丸剤および錠剤はこのようないくつかの投与形である。医薬組成物はまた、例えば、圧縮、浸漬、パンコーティング、噴霧乾燥などにより、いずれの好適なカプセルまたはその他のコーティング材料中にも封入することができる。好適なカプセルとしては、ゼラチンおよびデンプン製のものが挙げられる。次に、このようなカプセルを所望により一以上のさらなる材料、例えば腸溶コーティングでコーティングすることもできる。液体処方物としては、水性処方物、ゲルおよびエマルションが挙げられる。

【0203】

いくつかの好ましい実施形態は、生体接着性、好ましくは粘膜接着性のコーティングを含む組成物に関する。「生体接着性コーティング」とは、そのコーティングがない場合よりも薬物を生体表面または生体物質によりよく接着させるコーティングである。「粘膜接着性コーティング」とは、ある物質、例えば本発明の組成物をコーティングがない場合よりも粘膜によりよく接着させる好ましい生体接着性コーティングである。例えば、微粉砕粒子（例えば平均径約5、10、25、50または100 μm の粒子）は粘膜接着性を伴うコーティングが可能である。次に、このコーティング粒子を、生物体に投与するのに好適な投与形へと構築することができる。好ましくは、また、ターゲッティングされる細胞表面輸送部分が発現する場所にもよるが、次に、この投与形を、目的の場所に到達するまでその処方物を保護するための別のコーティングを施せば、この生体接着剤は、本発明の組成物または化合物が標的細胞表面輸送部分と相互作用している間、処方物の保持が可能となる。

【0204】

本発明の医薬組成物は、生物、好ましくは動物、好ましくは哺乳類、鳥類、魚類、昆虫、またはクモ類へのモノクローナル抗体の投与を容易にする。好ましい哺乳類としては、ウシ類、イヌ類、ウマ類、ネコ類、ヒツジ類およびブタ類の動物、ならびに非ヒト霊長類が挙げられる。ヒトが特に好ましい。当技術分野には、限定されるものではないが、経口、直腸（例えば、浣腸または坐剤）、エアゾール（例えば鼻腔または肺送達用）、非経口、および局所的投与をはじめ、化合物を投与または送達する多数の技術がある。好ましくは、意図する作用を達成するのに十分な量の本発明の組成物または化合物を送達する。組成物または化合物の送達量は、達成する作用、その組成物を送達する生物の種類、投与経

10

20

30

40

50

路、投与計画、および生物の年齢、健康状態および性をはじめとする多くの因子によって異なる。所定の処方物に含まれる本発明の組成物または化合物の特定の用量はそれ自体、当業者の判断に任せられる。

【0205】

当業者はならば、特定の所望の生体成果（治療作用または予防作用を含み得る）を達成するための薬剤として本発明の医薬組成物を投与する場合、本発明の組成物または化合物を好適な医薬担体と組み合わせる必要がある場合があることが分かるであろう。医薬担体の選択および治療薬または予防薬としての組成物または化合物の調製は意図する使用および投与様式によって異なる。治療薬の好適な処方物および投与様式としては、限定されるものではないが、経口、肺、鼻腔、口内、眼、皮膚、直腸または経送達が挙げられる。

10

【0206】

用いる送達様式に応じ、本発明で使用する構築物は種々の医薬上許容される形態で送達することができる。例えば、構築物は、丸剤、カプセル剤、錠剤、坐剤、エアゾール、滴剤、注射剤、またはスプレー剤として配合された固体、溶液、エマルション、分散液、ミセル、リポソームなどの形態で送達することができる。丸剤、錠剤、坐剤、エアゾール、散剤、滴剤およびスプレー剤は複雑な多層構造を有してもよく、広範な大きさであり得る。エアゾール、散剤、滴剤およびスプレー剤は小型（1ミクロン）から大型（200ミクロン）の範囲であってよい。

【0207】

本発明の医薬組成物は固体、凍結乾燥粉末、溶液、エマルション、分散液、ミセル、リポソームなどの形態で使用でき、この場合、得られる組成物は有効成分として本発明の以上のターゲッティング可能構築物または複合体を、経腸または非経口適用に好適な有機または無機担体または賦形剤と混合して含む。有効成分は例えば通常の無毒の、錠剤、ペレット、カプセル剤、坐剤、溶液、エマルション、懸濁液、および使用に好適な他いずれかの形態用の、医薬上許容される担体と混成してもよい。使用可能な担体としては、固体、半固体または液体型の、例えば、グルコース、ラクトース、マンノース、アラビアガム、ゼラチン、マンニトール、デンプンペースト、三ケイ酸マグネシウム、タルク、コーンスターチ、ケラチン、コロイドシリカ、ジャガイモデンプン、尿素、中鎖トリグリセリド、デキストラン、およびその他製剤の製造における使用に好適な担体が挙げられる。さらに、助剤、安定剤、増粘剤、着色剤および香料を用いてもよい。安定化乾燥剤の例としてはトリウロースが挙げられ、0.1%以上の濃度が好ましい（例えば、米国特許第5,314,695号参照）。

20

30

【0208】

個々の必要は様々であるが、医薬組成物の有効量に関する至適範囲の決定は当業者の範囲内である。ヒトの用量は動物試験から推定することができる(Katocs et al., Chapter 27 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990)。一般に、有効量の医薬組成物を提供するのに必要な用量は、当業者ならば調節が可能であり、レシピエントの年齢、健康状態、物理条件、体重、疾病または疾患の種類および程度、処置頻度、併用療法の特性（行う場合）、ならびに目的の作用の性質および範囲によって異なる。例えば、Nies et al., Chapter 3 In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al., eds., McGraw-Hill, New York, N.Y., 1996)参照。

40

【0209】

治療組成物の投与は処置する病態の重篤度および応答性によって異なり、処置過程は数日～数ヶ月、あるいは治癒が達成されるまで、または病態の軽減が達成されるまで続く。最適な投与計画は患者の身体の薬物蓄積量の測定から算出することができる。「患者」とは、動物（例えば、ネコ、イヌおよびウマ）ならびにヒトを含むものとする。当業者ならば、最適な用量、投与方法および反復割合を容易に判断することができる。至適用量は個々の治療薬の相対的効力によって大きく異なり、通常、in vitroおよびin vivo動物モデルで有効であることが分かったEC₅₀に基づいて評価することができる。

50

【0210】

一般に、種々の動物に対する治療作用の効力は広く異なり、用量は通常ラットに比べてヒトでは20倍、30倍または40倍小さい(単位体重当たり)こともあるので、用量(ターゲッティング可能構築物または複合体の投与量)の範囲は広い。一般に、用量は0.01 μ g~100g/体重kg、好ましくは0.01 μ g~10g/体重kg、0.01 μ g~1000mg/体重kg、0.01 μ g~100mg/体重kg、0.01 μ g~1mg/体重kg、0.01 μ g~100 μ g/体重kg、0.01 μ g~10 μ g/体重kg、0.01 μ g~1 μ g/体重kg、0.01 μ g~10 μ g/体重kg、0.01 μ g~1 μ g/体重kg、0.01 μ g~0.1 μ g/体重kg、および上記用量範囲の境界に基づく範囲に及ぶ。従って、例えば、上記の用量は100~10g/体重kg、10g~1000mg/体重kg、1000mg~100mgなどの範囲内の用量を包含する。

10

【0211】

投与は1日に1回以上、毎週、毎月、または毎年、あるいは2~20年おきに1回行うことができる。当業者ならば、測定された滞留時間、および体液または組織中のターゲッティング可能構築物または複合体の濃度に基づき、投与の反復割合を容易に評価することができる。処置が成功した後は、患者に病態の再発を防ぐ管理療法を施すのが望ましく、その場合には治療薬を、1日1回以上~20年ごとに1回、0.01 μ g~100g/体重kgの範囲の管理用量で投与する。

【0212】

20

具体的な用量は患者のおよその体重または表面積に従って算出する。適当な用量を決定する上での他の因子としては、処置または予防される疾病または疾患、疾病の重篤度、投与経路、ならびに患者の年齢、性および医学的条件が挙げられる。当業者ならば、特に本明細書に開示されている用量に関する情報およびアッセイを鑑みて、処置用に適当な量を決定するのに必要な計算のさらなる精緻化を通常行える。用量はまた、使用量を決定するための既知のアッセイを適当な用量応答データと併用して決定することができる。

【0213】

個々の患者の用量は疾病の進行を関ししつつ調節することができる。有効濃度を達成する、または維持するのに用量を調節する必要があるかどうかを知るためには、患者においてターゲッティング可能構築物または複合体の血中レベルを測定することができる。どのターゲッティング可能構築物および/または複合体、およびその用量が、ある固体に効果的である可能性が最も高いかを判定するには、ファーマコゲノミクスを用いてもよい(Schmitz et al., Clinica Chimica Acta 308:43-53, 2001; Steimer et al., Clinica Chimica Acta 308:33-41, 2001)。

30

【0214】

XIII. 抗体惹起の方法

目的のエピトープに対する抗体は、周知のAb作製方法により作出する。例えば、免疫適格動物に、フロイントの完全アジュバント中、(ペプチド)_n-KLH(ここで、KLHはキーホールリンペット・ヘモシアニンであり、n=1~30である)などの免疫原の注射、次いで、フロイントの不完全アジュバントに懸濁させた同じ免疫原の2回の連続注射を行い、追加抗原の静脈投与を行った後、3日後に脾細胞を採取する。次に、採取した脾細胞をSp2/O-Ag14骨髓腫細胞と融合させ、得られたクローンの培養上清を、直接結合ELISAを用い、抗ペプチド反応性に関して分析する。生じたAbの詳細な特異性はもとの免疫原のペプチド断片を用いて分析することができる。これらの断片は自動ペプチド合成装置を用いて容易に作製できる。Ab産生に関しては、融合した細胞系統の選択ができるよう。酵素欠損ハイブリドーマを単離する。また、この技術を用いて、例えば、In(III)-DTPAキレートなどのリンカーを含む一以上のキレートに対して抗体を惹起することができる。In(III)-ジ-DTPAに対するモノクローナルマウス抗体は公知である(Barbet '395前掲)。

40

【0215】

50

本発明でターゲティングに用いる抗体は、マーカー物質としての種々の細胞表面または細胞内腫瘍関連抗原のいずれかに特異的である。これらのマーカーは腫瘍によって産生される物質であってもよいし、あるいは、腫瘍部位、腫瘍細胞表面または腫瘍細胞内（細胞質であれ、核であれ、種々のオルガネラであれ、または細胞下の構造であれ）に蓄積する物質であってもよい。このような腫瘍関連マーカーとしては、Herberman, "Immunodiagnosis of Cancer", in Fleisher ed., "The Clinical Biochemistry of Cancer", page 347 (American Association of Clinical Chemists, 1979)および米国特許第4,150,149号、同第4,361,544号、および同第4,444,744号に開示されているものが挙げられる。

【0216】

10

腫瘍関連マーカーは、Herbermanが、癌胎児性抗原、胎盤抗原、癌または腫瘍ウイルス関連抗原、組織関連抗原、器官関連抗原、異所性のホルモンおよび正常抗原またはその変異体をはじめとするいくつかのカテゴリーに分類している。場合により、例えば、米国特許第4,361,644号および同第4,444,744号に記載されているような、非腫瘍物質との交差反応性が著しく軽減された抗体の産生を刺激するヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（HCG）のサブユニットまたは癌胎児性抗原（CEA）の領域など、腫瘍特異性のより高い抗体を惹起するために腫瘍関連マーカーのサブユニットを用いるのが有利である。

【0217】

対象となる別のマーカーとして、トランスメンブランアクチベーターおよびCAML-インターアクター（TACI）がある。Yu et al. Nat. Immunol. 1:252-256 (2000)参照。要するに、TACIはB細胞悪性腫瘍（例えば、リンパ腫）のマーカーである。さらに、TACIおよびB細胞成熟抗原（BCMA）には腫瘍壊死因子ホモログ増殖誘導リガンド（APRIL）が結合することが知られている。APRILは一次B細胞およびT細胞のin vivo増殖を刺激し、in vivoにおけるB細胞の蓄積により脾臓重量を増す。APRILはまた、受容体結合に関してTALL-1（BlySまたはBAFFとも呼ばれる）と競合する。可能性BCMAおよびTACIはAPRILの結合を特異的に妨げ、APRILにより刺激される一次B細胞の増殖を遮断する。BCMA-Fcはまた、マウスにおいてキーホールリンペットヘモシアニンおよびニューモバックスに対する抗体の産生を阻害するが、このことはBCMAおよび/またはTACIを介するAPRILおよび/またはTALL-Iのシグナル伝達が体液性免疫の形成に必要であることを示唆している。このように、APRIL-TALL-IおよびBCMA-TACIはB細胞およびT細胞の刺激に関与する二リガンド-二受容体経路を形成する。

20

30

【0218】

免疫原に対する最初の抗体惹起の後、その抗体の配列を決定し、次いで組換え技術により生産することができる。ネズミ抗体および抗体フラグメントのヒト化およびキメラ化は当業者に周知である。例えば、ヒト化モノクローナル抗体は、マウス免疫グロブリンの重鎖および軽鎖可変鎖由来のマウス相補性決定領域をヒト可変ドメインに移し、次いでフレームワーク領域中のヒト残基をマウスの対応物で置換することにより作製する。ヒト化モノクローナル抗体由来の抗体成分を使用することによってマウス定常領域の免疫原性に伴う潜在的な問題が防げる。マウス免疫グロブリン可変ドメインのクローニングのための一般的な技術は、例えば、引用することによりその全開示内容が本明細書の一部とされる、Orlandi et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:3833 (1989)に記載されている。ヒト化Mabの生産技術は、例えば、各々引用することにより本明細書の一部とされる、Jones et al., Nature 321:522 (1986), Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988), Carter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285 (1992), Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437 (1992)、およびSinger et al., J. Immun. 150:2844 (1993)により記載されている。

40

【0219】

あるいは、完全ヒト抗体はトランスジェニック非ヒト動物から得ることもできる。例え

50

ば、Mendez et al., Nature Genetics, 15:146-156 (1997); 米国特許第 5, 633, 425 号参照。例えば、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するトランスジェニックマウスから回収することができる。このマウス体液性免疫系は、内在する免疫グロブリン遺伝子を不活化し、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することによりヒト化する。ヒト免疫グロブリン遺伝子座は極めて複雑で、多数の離散セグメントを含み、それはヒトゲノムのほぼ 0.2% を占める。トランスジェニックマウスが十分な抗体レパートリーを産生できることを保証するには、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子座の大きな部分をマウスゲノムに導入しなければならない。これは、生殖系構造においてヒト重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座のいずれかを含む酵母人工染色体 (YAC) の形成に始まる段階的なプロセスで達成される。それぞれの挿入配列はほぼ 1 Mb のサイズなので、YAC 構築体は免疫グロブリン遺伝子座の重複フラグメントの相長的組換えを必要とする。一つは重鎖遺伝子座、もう一つは軽鎖遺伝子座を含む二つの YAC を、YAC 含有酵母スフェロプラストとマウス胚幹細胞の融合を通じてマウスに個々に導入する。次いで、胚幹細胞クローンをマウス胚盤胞にマイクロインジェクションする。得られたキメラ雄動物を、生殖細胞系を通じて YAC を伝達する能力に関してスクリーニングし、マウス抗体産生を欠損しているマウスと交配させる。一種はヒト重鎖遺伝子座を含み、もう一種はヒト軽鎖遺伝子座を含む二種のトランスジェニック系統を繁殖させ、免疫感作に応答してヒト抗体を産生する作出する。

【0220】

また、再配列されていないヒト免疫グロブリン遺伝子も、マイクロ細胞媒介染色体導入 (microcell-mediated chromosome transfer) (MMCT) により、マウス胚幹細胞へ導入することができる。例えば、Tomizuka et al., Nature Genetics, 16: 133(1997) 参照。この方法論では、ヒト染色体を含むマイクロ細胞をマウス胚幹細胞と融合させる。導入された染色体は安定的に保持され、成体キメラは適切な組織特異的発現を示す。

【0221】

別法として、本発明の抗体または抗体フラグメントは、コンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーから単離されたヒト抗体フラグメントに由来するものであってもよい。例えば、引用することにより本明細書の一部とされる、Barbas et al., METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 2: 119 (1991)、および Winter et al., Ann. Rev. Immunol. 12: 433 (1994) 参照。B 細胞の不活化によるモノクローナル抗体の作製に伴う問題の多くは、ファージディスプレイを用い、大腸菌 (E. coli) を操作し、そこで抗体フラグメントを発現させることによって克服することができる。高親和性モノクローナル抗体の回収を保証するためには、コンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーは大きなレパートリーを含んでいなければならない。典型的な戦略では、逆転写酵素を用いて cDNA を合成するために、免疫化したマウスのリンパ球または脾細胞から得られた mRNA を用いる。重鎖および軽鎖の遺伝子をそれぞれ PCR により増幅し、ファージクローニングベクターに連結する。重鎖遺伝子を含むものと軽鎖遺伝子を含むものの二つの異なるライブラリーが生じる。各ライブラリーからファージ DNA を単離し、重鎖配列と軽鎖配列をともに連結し、パッケージングしてコンビナトリアルライブラリーを形成する。各ファージは重鎖と軽鎖の cDNA の無作為なペアを含み、大腸菌の感染時に感染細胞内でこれらの抗体鎖の発現を命令する。目的の抗原を認識する抗体を同定するには、ファージライブラリーをプレートイングし、プラークに存在する抗体分子をフィルターに移す。これらのフィルターを放射性標識した抗原とともにインキュベートした後、洗浄して過剰な非結合リガンドを除去する。オートラジオグラム上の放射性スポットを、その抗原と結合する抗体を含むプラークとして同定する。ヒト免疫グロブリンファージライブラリーを作製するのに有用なクローニングおよび発現ベクターは、例えば STRATAGENE Cloning Systems (La Jolla, CA) から入手できる。

【0222】

同じ方法論を用いて高親和性 scFv を得ることもできる。例えば、Vaughn et al., Nat. Biotechnol., 14:309-314 (1996) 参照。高親和性 scFv を得るには、総て既知の V

10

20

30

40

50

V_H 、 V_L および V 遺伝子ファミリーに対応する PCR プライマーを用いて、非免疫ヒトドナーから V 遺伝子を単離することにより、レパートリーの大きな $s c F v$ ライブラリーを構築することができる。増幅後、 V_H と V_L のプールを合わせて一つのプールとする。これらのフラグメントをファージミドベクターに連結する。次に、 $s c F v$ リンカー ($G l y_4, S e r$)₃ をファージミドの V_L フラグメントの上流に連結する。この V_H および リンカー - V_L フラグメントを増幅し、 J_H 領域で構築する。得られた V_H - リンカー - V_L フラグメントをファージミドベクターに連結する。このファージミドライブラリーは、上記のようなフィルターを用いて、または免疫チューブ (Nunc; Maxisorp) を用いてパンニングすることができる。感作ウサギのリンパ球または脾細胞に由来するコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーを構築し、*P. pastoris* (P. pastoris) において $s c F v$ 構築物を発現させることによっても同様の結果を達成することができる。例えば、Ridder et al., *Biotechnology*, 13: 255-260 (1995) 参照。さらに、適当な $s c F v$ を単離した後、*C D R 3* 突然変異誘発およびチェーンシャッフリングなどの親和性成熟プロセスにより、結合親和性がより高く、解離速度がより遅い抗体フラグメントを得ることができる。例えば、Jackson et al., *Br. J. Cancer*, 78: 181-188 (1998); Osbourn et al., *Immunotechnology*, 2: 181-196 (1996) 参照。

10

【0223】

キメラ抗体は齧歯類抗体に由来する可変ドメインと相補性決定領域を含み、その抗体部分の残りの部分はヒト抗体に由来する組換えタンパク質である。ヒト化抗体は、モノクローナル抗体のネズミ相補性決定領域がネズミ免疫グロブリンの重鎖および軽鎖鎖からヒト可変ドメインに移されている組換えタンパク質である。

20

【0224】

二重特異性抗体および抗体フラグメントを生産するには、様々な組換え法を使用できる。例えば、二重特異性抗体および抗体フラグメントはトランスジェニック家畜の乳汁中で生産することができる。例えば、Colman, A., *Biochem. Soc. Symp.*, 63: 141-147, 1998; 米国特許第 5, 827, 690 号参照。それぞれ対となる免疫グロブリン重鎖および軽鎖をコードする DNA セグメントを含む二つの DNA 構築物を作製する。これらのフラグメントを、哺乳類上皮細胞で優先的に発現するプロモーター配列を含む発現ベクターにクローニングする。例としては、限定されるものではないが、ウサギ、ウシおよびヒツジのカゼイン遺伝子、ウシ - ラクトグロブリン遺伝子、ヒツジ - ラクトグロブリン遺伝子、およびマウスホエー酸タンパク質遺伝子由来のプロモーターが挙げられる。好ましくは、挿入されたフラグメントの 3' 側に哺乳類特異的遺伝子由来の同族ゲノム配列が隣接する。これによりポリアデニル化部位および転写安定化配列が提供される。この発現カセットを受精した哺乳類の卵子の前核に同時注入し、次いでレシピエント雌の子宮に着床させて妊娠させる。出産後、サザン分析により両導入遺伝子の存在に関してその後代をスクリーニングする。抗体が存在するためには、重鎖および軽鎖双方の遺伝子が同時に同じ細胞で発現されなければならない。トランスジェニック雌からの乳汁を当技術分野で公知の標準的な免疫学的方法を用いて該抗体または抗体フラグメントの存在と機能に関して分析する。この抗体は当技術分野で公知の標準的方法により、乳汁から精製することができる。

30

【0225】

キメラ $A b$ はマウス軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインをコードする $c D N A$ フラグメントとヒト抗体由来の C ドメインをコードするフラグメントを連結することにより構築される。 C ドメインは抗原結合に寄与しないので、このキメラ抗体は元のマウス $A b$ と同じ抗原特異性を保持するが、配列はヒト抗体に近い、キメラ $A b$ はまだいくらかのマウス配列を含むが、なお免疫源性を残している。ヒト化 $A b$ は抗原認識に必要なマウスアミノ酸のみを含む。この産物は、マウス相補性決定領域に由来するアミノ酸をヒト抗体フレームワークへ構築することにより構築される。

40

【実施例】

【0226】

実施例 1: *I M P 2 7 2* の合成、抗体結合および血清安定性

50

以下に記載するように、典型的なペプチドIMP272（以下に示す）を合成し、それを ^{111}In で標識した。

DTPA - Gl n - Ala - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH_2
(IMP272、 MH^+ : 1512)

【0227】

合成

上記ペプチドを、Fmoc法によるSieber アミド樹脂（0.424 g, 0.53 mmol/g）での固相ペプチド合成により合成した。以下のアミノ酸（一回のカップリングにつき6当量）を示した順に添加した；Fmoc - Lys (Alloc) - OH、Fmoc - D - Tyr (OBu) - OH、Fmoc - Lys (Alloc) - OH、Fmoc - Ala - OH、そして、Fmoc - Gl n (Trt) - OH。各アミノ酸を2時間のカップリングによってダブルカップリングした（第1に、活性化剤として、ジイソプロピルカルボジイミドを使用し、次ぎに、ヘキサフルオロリン酸O - ベンゾトリアゾール - N, N, N', N' - テトラメチル - ウロニウム (HBTU) を使用してカップリングを行った）。

【0228】

グルタミンから末端Fmoc基を外し、N末端アミノ基を0.866 g 無水クロロ酢酸、0.042 g DMAP、1.76 mL DIEAおよび5 mL NMPと反応させて、樹脂上にDTPAを構築した。この反応物を21時間混合した。樹脂をNMPおよびIPAで洗浄した。ジエチレントリアミン、1.0 mLを4.0 mL NMPと混合し、この溶液をクロロアセチル樹脂に添加した。この反応物を21時間混合した。樹脂をNMP / IPAで洗浄した。プロモ酢酸t - ブチル、1.50 mLを2.0 mL DIEAおよび3.0 mL NMPと混合した。この溶液を樹脂に添加し、21時間混合した。その後、常法によりPd触媒を用いてAlloc側鎖を外し、トリチル - HSG - OHをリシン側鎖とダブルカップリングした。TFAを用いて樹脂からペプチドを切り出し、それをエーテルで沈殿させ、HPLCにより精製し、所望のペプチドを得た。

【0229】

IMP272製剤キット

15 μg のIMP272を含有する製剤キットをこの試験に使用した。このキットは以下の手順により作製した：ヒドロキシプロピル - シクロデキストリン、10.053 g、0.426 g のクエン酸および0.0015 g のIMP272を85 mLのDI水に溶かした。この溶液のpHを1 M NaOHを添加してpH 4.30に調整した。溶液をDI水で100 mLに希釈した。溶液を1 mLアリコートずつMillex GV (0.22 μm) フィルターで濾過し、3 mL凍結乾燥バイアルに入れた。これらのバイアルをドライアイス上に置き、溶液を冷凍し、その後、凍結乾燥した。凍結乾燥サイクルが完了したら、バイアルを真空密閉し、凍結乾燥機から取り出した。

【0230】

標識化

$^{111}\text{InCl}_3$ (30.4 μL) を500 μL のDI H_2O に添加した。この溶液を調製したIMP272のバイアルに添加し、室温にて約20分間静置した。次いで、さらに600 μL の未標識In酢酸バッファ（ 1.0×10^{-4} M InCl_3 , 0.5 M NaOAc, pH 6.5）を同じバイアルに添加し、さらに45分間静置した。全量はIMP272 1.220×10^{-8} モルを含有する1130 μL であり、濃度 8.777×10^{-6} Mを得た。標識化完了後、ヒトおよびヌードマウス新鮮血清における24時間にわたる安定性についてペプチドを試験した。さらに、ペプチドをヒト化抗体；m679 \times hMN14およびm734 \times hMN14との結合についても試験した。サイズ排除および逆相クロマトグラムでは、ペプチド標識が十分に表れ、ペプチドがhMN - 14 \times 679およびhMN - 14 \times m734と個々にまたは同時に結合することが示されている。

【0231】

10

20

30

40

50

^{111}In IMP 272, 60 μL を540 μL ヒト新鮮血清に添加した。これを攪拌し、37 の一定温度下に置いた。この混合物に対するペプチド濃度は $8.777 \times 10^{-7} \text{ M}$ とした。ヒト血清中でインキュベートしたペプチドは、ヒト血清中、37 にて1時間インキュベーションした後は無傷であったが、37 にて24時間後にはHSGとの結合の一部が失われていた。サイズ排除HPLCでは、24時間時点で2つのHSGの一方との結合の約50%が損なわれたことが示されている。

【0232】

^{111}In IMP 272 44 μL を400 μL ヌードマウス新鮮血清に添加した。これを攪拌し、37 の一定温度下に置いた。この混合物に対するペプチド濃度は $8.698 \times 10^{-7} \text{ M}$ とした。サイズ排除HPLCおよび逆相HPLCクロマトグラムでは、ペプチドがマウス血清中、37 にて24時間安定していることが示されている。

【0233】

結論

ペプチドIMP 272は ^{111}In で適切に標識された。さらに、標識化後、ペプチドを2つのm679 \times hMN 14抗体と1つのm734 \times hMN 14抗体と個々にしっかりと結合させた。両抗体と結合した場合には、保持時間の移動とピークのブロード化が見られる。37 でのインキュベーション下でマウス血清と結合した場合には、ペプチドは安定していた。37 にてヒト血清と結合した場合には、ペプチドは一部代謝される。HSGの一方が抗体とのその結合能力を喪失している。

【0234】

実施例2： クリアリング剤を使用したターゲッティング可能構築物のクリアリング（チェイス）

特定の構築物に関しては、IMP 272 ペプチドについて本明細書に記載するように、ロック・アンド・チェイス法のクリアリング（チェイス）成分を試験することができる。ペプチド、IMP 272 DTPA-Gln-Ala-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-NH₂ MH⁺ 1512を、ロック・アンド・チェイス二重特異性抗体薬物ターゲッティング用に作製した。ペプチドは2つのHSG基を有し、通常のプレターゲッティング様式で腫瘍表面の抗体と結合する。ペプチドはDTPAも有しており、それによって（インジウムで満たされている場合）、m734抗体と結合する。IgGはDTPAに対して2つの結合アームを有しているため、腫瘍表面と結合されている2つのペプチドと結合することができる。腫瘍表面での特別な架橋が、ペプチドが腫瘍部位に留まる時間を延長する。m734 IgG抗体によるIn-DTPA架橋は、ロック・アンド・チェイス抗体系におけるロックを提供する。抗体がガラクトースで修飾されている場合には、非ガラクトシル化抗体よりも迅速に血流からクリアリングされる。抗体のガラクトース量がクリアランス速度に影響を及ぼしている。高値（30～40 gal/ab）であれば、抗体は迅速にクリアリングされ、より中程度の値（10～20 gal/ab）であれば、抗体はより中程度の速度でクリアリングされる。この試験は60匹のGW-39担癌ヌードマウスを使用して実施することが好ましいため、試験に十分な担癌マウスが利用できるように65匹のマウスに腫瘍を移植するべきである。

【0235】

研究のプレターゲッティングアームの各マウスに15 μg のI-125標識したhMN-14 \times m679を含有する溶液100 μL を注射する（5 μCi /マウス）。抗体はペプチドを注射する24時間前に注射する。

【0236】

一般に、ペプチドは、15 μg のペプチドを含有する凍結乾燥キットとして調剤する。ペプチドをIn-111で標識した後、過剰の未標識インジウムを添加し、ペプチド上の全てのDTPAを飽和させる。

【0237】

ペプチドの放射性標識

キットを3 mLバイアルで凍結乾燥し、1 mL水（滅菌水が許容される）で再構成する

。0.5 mL アリコートを取り出し、これを3.0 mCi In-111と混合する。In-111キット溶液を室温にて10分間インキュベートする。1アリコート、117 μ Lを取り出し、これを117 μ Lの未標識インジウム含有(1×10^{-4} M In) 酢酸バッファー(0.5 M NaOAc、pH 6.54)と混合した後、室温にてさらに10分間インキュベートする。次いで、その溶液を滅菌バイアル内にて6.80 mL 生理食塩水で希釈する。標識ペプチドは飽和NaCl中でのITLCにより解析することができる。遊離In-111はITLCストリップの上部20%にある。

【0238】

動物試験

群I (hMN-14 x m679でプレターゲッティング、24時間にIMP272、さらに、25時間にm734 IgG Hlgal)

10

15匹のGW-39担癌ヌードマウスに15 μ g (5 μ Ci, 1.5×10^{-10} mol)のhMN-14 x m679溶液100 μ Lを注射する。24時間後に、 1.5×10^{-11} mol (10 μ Ci)のIMP272溶液100 μ Lを注射する。二重特異性抗体の注射から25時間後に、12 μ g (8×10^{-11} mol)の高度ガラクトシル化m734 IgG 100 μ Lを注射する。ペプチドの注射から3時間、24時間および48時間後、1時点につき動物5匹を屠殺する。以下の器官および組織を採取し、計数する：腫瘍、血液、筋肉、肝臓、肺、腎臓、脾臓、大腸、小腸、胃、尿および尾。

【0239】

群II (hMN-14 x m679でプレターゲッティング、24時間に既混合IMP272、m734 IgG Hlgal)

20

15匹のGW-39担癌ヌードマウスに15 μ g (5 μ Ci, 1.5×10^{-10} mol)のhMN-14 x m679溶液100 μ Lを注射する。24時間後に、12 μ g (8×10^{-11} mol)のm734 IgG (高度ガラクトシル化)を混合した、 1.5×10^{-11} mol (10 μ Ci) IMP272溶液100 μ Lを注射する。ペプチドの注射から3時間、24時間および48時間後、1時点につき動物5匹を屠殺する。以下の器官および組織を採取し、計数する：腫瘍、血液、筋肉、肝臓、肺、腎臓、脾臓、大腸、小腸、胃、尿および尾。

【0240】

群III (hMN-14 x m679でプレターゲッティング、24時間にIMP272、さらに、25時間にm734 IgG Modgal)

30

15匹のGW-39担癌ヌードマウスに15 μ g (5 μ Ci, 1.5×10^{-10} mol)のhMN-14 x m679溶液100 μ Lを注射する。24時間後に、 1.5×10^{-11} mol (10 μ Ci)のIMP272溶液100 μ Lを注射する。二重特異性抗体の注射から25時間後に、12 μ g (8×10^{-11} mol)のm734 IgG (中度ガラクトシル化) 100 μ Lを注射する。ペプチドの注射から3時間、24時間および48時間後、1時点につき動物5匹を屠殺する。以下の器官および組織を採取し、計数する：腫瘍、血液、筋肉、肝臓、肺、腎臓、脾臓、大腸、小腸、胃、尿および尾。

【0241】

群IV (hMN-14 x m679でプレターゲッティング、24時間に既混合IMP272、m734 IgG Modgal)

40

15匹のGW-39担癌ヌードマウスに15 μ g (5 μ Ci, 1.5×10^{-10} mol)のhMN-14 x m679溶液100 μ Lを注射する。24時間後に、12 μ g (8×10^{-11} mol)のm734 IgG (中度ガラクトシル化)を混合した、 1.5×10^{-11} mol (10 μ Ci)のIMP272溶液100 μ Lを注射する。ペプチドの注射から3時間、24時間および48時間後、1時点につき動物5匹を屠殺する。以下の器官および組織を採取し、計数する：腫瘍、血液、筋肉、肝臓、肺、腎臓、脾臓、大腸、小腸、胃、尿および尾。

【0242】

実施例3： ロック・アンド・チェイスのロック成分についての試験

50

上記実施例に記載したチェイス成分の試験と同様に、ロック・アンド・チェイス法のロック面も試験することができる。例えば、ペプチド、IMP 272 DTPA-Gln-Ala-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ MH⁺ 1512を、ロック・アンド・チェイス二重特異性抗体薬物ターゲティング用に作製した。上記のように、ペプチドは2つのHSG基を有し、通常のプレターゲティング様式で腫瘍表面の二重特異性抗体と結合する。ペプチドはDTPAも有しており、それによって(インジウムで満たされている場合)、m734抗体と結合する。IgGはDTPAに対して2つの結合アームを有しているため、腫瘍表面と結合されている2つのペプチドと結合することができる。腫瘍表面での特別な架橋が、ペプチドが腫瘍部位に留まる時間を延長する。m734 IgG抗体によるIn-DTPA架橋は、ロック・アンド・チェイス抗体系におけるロックを提供する。この試験では50匹のGW-39担癌ヌードマウスを使用するため、試験に十分な担癌マウスが利用できるように55匹のマウスに腫瘍を移植するべきである。

10

【0243】

本研究のプレターゲティングアームの各マウスに15 µgのI-125標識したhMN-14xm679を含有する溶液100 µLを注射する(5 µCi/マウス)。抗体はペプチドを注射する24時間前に注射する。

【0244】

ペプチドは、15 µgのペプチドを含有する凍結乾燥キットとして調剤しておいた。ペプチドをIn-111で標識した後、過剰の未標識インジウムを添加し、ペプチド上の全てのDTPAを飽和させる。

20

【0245】

ペプチドの放射性標識

キットを3 mLバイアルで凍結乾燥し、1 mL水(滅菌水がよい)で再構成する。0.5 mLアリコートを取り出し、これを3.0 mCi In-111と混合する。In-111キット溶液を室温にて10分間インキュベートする。1アリコート、100 µLを取り出し、これを100 µLの未標識インジウム含有酢酸バッファー(1 × 10⁻⁴ M InCl₃, 0.5 M NaOAc, pH 6.5)と混合した後、室温にてさらに10分間インキュベートする。次いで、その溶液を滅菌バイアル内にて5.80 mL生理食塩水で希釈する。標識ペプチドは飽和NaCl中でのITLCにより解析する。遊離In-111はITLCストリップの上部20%にある。

30

【0246】

動物試験

群I(hMN-14xm679でプレターゲティング、24時間にIMP 272、さらに、25時間にm734 IgG)

15匹のGW-39担癌ヌードマウスに15 µg(5 µCi, 1.5 × 10⁻¹⁰ mol)の溶液100 µLを注射する。24時間後に、1.5 × 10⁻¹¹ mol(10 µCi)IMP 272の溶液100 µLを注射する。二重特異性抗体の注射から26時間後に、12 µg(8 × 10⁻¹¹ mol)のm734 IgG 100 µLを注射する。ペプチドの注射から3時間、24時間および48時間後、1時点につき動物5匹を屠殺する。以下の器官および組織を採取し、計数する：腫瘍、血液、筋肉、肝臓、肺、腎臓、脾臓、大腸、小腸、胃、尿および尾。

40

【0247】

群II(hMN-14xm679でプレターゲティング、24時間にIMP 272)

15匹のGW-39担癌ヌードマウスに15 µg(5 µCi, 1.5 × 10⁻¹⁰ mol)の溶液100 µLを注射する。24時間後に、1.5 × 10⁻¹¹ mol(10 µCi)IMP 272溶液100 µLを注射する。ペプチドの注射から3時間、24時間および48時間後、1時点につき動物5匹を屠殺する。以下の器官および組織を採取し、計数する：腫瘍、血液、筋肉、肝臓、肺、腎臓、脾臓、大腸、小腸、胃、尿および尾。

【0248】

50

群III (IMP 272 単独)

20匹のGW-39 担癌ヌードマウスに100 μ L 中 1.5×10^{-11} mol (10 μ Ci) のIMP 272 の溶液100 μ L を注射する。ペプチドの注射から30分、1時間、3時間および24時間後、1時点につき動物5匹を屠殺する。以下の器官および組織を採取し、計数する：腫瘍、血液、筋肉、肝臓、肺、腎臓、脾臓、大腸、小腸、胃、尿および尾。

【0249】

以下の試験を実施して、抗In-DTPA F(ab')₂ 抗体(734)のその後の注入により、プレターゲティングする、IMP-272として知られる特定化学物質(DCS)のヒト結腸腫瘍(GW-39)上での保持を高める能力を調べる。この概念は「ロック・アンド・チェイス」として知られている。これらのデータを用いて半減期を算出し、腫瘍ならびにその他の種々の組織におけるDCSの線量測定を734 F(ab')₂を投与していない動物と比較する。

10

【0250】

実施例4： ロック・アンド・チェイス用ロック成分についてのさらなる試験

プレターゲティングする、IMP-272として知られる特定化学物質(DCS)の腫瘍での半減期を調べるため、以下の試験を、GW-39ヒト結腸直腸癌異種移植片を有するヌードマウスにおいて実施する。動物には以下のように3種類の注射を施す：抗CEA BS1.5HPダイアボディー(hMN-14x679)の最初の注射に続いて、24時間後にIMP-272、その後、3時間後に抗In-DTPA F(ab')₂ 抗体, 734の注射を受ける。BS1.5HPは¹²⁵Iで標識し、IMP-272は¹¹¹Inで標識する。このダイアボディーの合成および使用については、Clin. Cancer. Res. 9: 3886s-3896s (2003)、ならびに2003年12月23日に出願し、2003年12月24日に米国出願第10/746,245号に指定され、PCT/US03/41131としても出願された、2002年12月24日出願の米国仮特許出願第60/436,359号(これらは総て、引用することによりその全開示内容を本明細書の一部とする)に開示されている。知られている標準的な分子生物学手法を利用して、BS1.5HPを調製した。

20

【0251】

腫瘍表面でのペプチドの最大架橋について試験するために注射する734 F(ab')₂のタンパク質全用量を10 μ g ~ 100 μ gの範囲とする。4群のマウスに、10 μ Ci ¹²⁵I-BS1.5HP (27 μ g, 5.0×10^{-10} モル)、続いて、24時間後に二重特異性：IMP-272比10:1の25 μ Ci ¹¹¹In-IMP-272 (5.0×10^{-11} モル)を投与する。腫瘍をターゲティングし、血液からクリアリングされるように、IMP-272は、734 F(ab')₂を投与する3時間前に投与する。群間では投与する734 F(ab')₂の量だけを変える。

30

【0252】

群I：生理食塩水だけの対照 [20匹のマウス；生理食塩水の注射から3、24、48および72時間後に犠牲5匹/時点]

群II：734 F(ab')₂ タンパク質全用量10 μ g [20匹のマウス、734の注射から3、24、48および72時間後に犠牲5匹/時点]

40

群III：734 F(ab')₂ 20 μ g [20匹のマウス、734の注射から3、24、48および72時間後に犠牲5匹/時点]

群IV：734 F(ab')₂ 100 μ g [20匹のマウス、734の注射から3、24、48および72時間後に犠牲5匹/時点]

【0253】

材料および方法：

試験および対照用試薬

用量調製および解析：Edmund Rossi, Ph. D.が規定するBS1.5HP [ロット番号011303, 150 mMスクロース中1 mg/mL, 10 mM リン酸塩, pH 6.0

50

〕およびWilliam McBride, Ph. D.が凍結乾燥キットとして調製した〔ロット番号BM 11-154〕、以下の化学式を有するDCS IMP-272:

IMP-272: $[^1\ ^1\ ^1\text{In}] \text{DTPA-Gln-Ala-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH}_2$ (MW = 1512)
【0254】

DTPA = ジエチレントリアミン - ペンタ酢酸、 $[^1\ ^1\ ^1\text{In}] \text{DTPA}$ は抗体734により認識される。HSG = ヒスタミン - スクシニル - グリシン基、HSGはBS1.5HPの679部分により認識される。

抗体734 F(ab')₂〔ロット番号052201〕は、734 IgGをペプシン消化し、続いて、プロテインA、そしてイオン交換クロマトグラフィー精製を行うこと
10

【0255】

放射性標識: NEN Life Science Products(Boston, MA)から入手したヨウ化ナトリウム-125(Na^{125}I)とIsoTex(Friendsville, TX)から入手した塩化インジウム-111($^{111}\text{InCl}_3$)をこれらの試験に使用する。過剰のチロシンの添加によりクエンチするBS1.5HPの放射性ヨウ素化については、クロロミン-T法を利用する。

【0256】

精製はPD 10カラムでのサイズ排除によって行う。

IMP-272 (1×10^{-8} mol ペプチド/キット)を無金属条件下で ^{111}In で標識する。要するに、キットを1 mL 滅菌水で再構成する。0.6 mL アリコートのIMP-272を $^{111}\text{InCl}_3$ (3 mCi)と混合する。この後、室温にて15分間インキュベーションを行う。2.4 mL アリコートの未標識 In(OAc)_3 (1.0×10^{-4} M In , pH 4.5 バッファー)を取り出し、これを In-111 標識ペプチド溶液と混合し、室温にてさらに15分間インキュベートする。次いで、この溶液を滅菌バイアル内にて生理食塩水で12 mLに希釈する。標識DCSは飽和 NaCl 中でのITLCにより解析する。結合していない ^{111}In はITLCストリップの上部20%に移動する。
20

【0257】

放射性同位元素標識されたBS1.5HPについては、CEAとの混合前と混合後にサイズ排除HPLCカラムで解析する。IMP-272については、非標識BS1.5HPとの混合前と混合後に同様に解析する。以下に、使用するマウスに関する情報を記載する。
30

【0258】

系統、性別、年齢、体重、起源: この試験に使用するマウスはTaconic(Germantown, NY)から入手した約20グラムの雌無胸腺nu/nuマウスである。これらのマウスを使用するのは、GW-39はヌードマウスにおいて皮下腫瘍として増殖し、腫瘍増殖の追跡が容易であり、その結果、試験開始時間をより適切に決めることができるからである(腫瘍容積 $\sim 0.2 \text{ cm}^3$)。統計的に検出するには1時点につきマウス5匹が必要である。全ての動物を製造供給元からウイルスフリーとして購入した。動物を1週間検疫した。動物をThoren ケージユニットで飼育し、CMMI承認の手順に従って取り扱う。開始時腫瘍容積をカリパス測定により三次元測定し、長さ \times 幅 \times 奥行きで算出する。マウスが1群内の時点間および群自体の間で同じくらいの大きさ(平均 \pm SD)の腫瘍を有するように、それらを1時点につき動物およそ5匹の群に分ける。この試験には、約 0.2 cm^3 ($0.2 \sim 0.5 \text{ cm}^3$)の腫瘍を有するマウスを使用する。
40

【0259】

細胞種および起源: ヒト結腸直腸腫瘍、GW-39は、マウスにおいて、腫瘍の連続継代としてのみ維持する。腫瘍を0.9%生理食塩水で細かく刻み、その後、40メッシュワイヤースクリーンを通して調製した10%(w/v)腫瘍懸濁液0.3 mLを皮下注射することにより、約 1 cm^3 の腫瘍を連続増殖させる。この腫瘍に関するこれまでの経験から、腫瘍が適当な大きさに達するまでには約17日かかることが分かっている。
50

試験開始時の腫瘍の大きさは約 0.2 cm^3 である。

【0260】

動物に外側尾静脈より $10 \mu\text{Ci}$ の ^{125}I -BS1.5HPダイアボディー ($27 \mu\text{g}$; 5.0×10^{-10} モル) を静脈注射する。この腫瘍モデル系においてのこの試薬に関するこれまでの経験 (注射から24時間後には血液中に1% ID/g 未満しか存在しないということが分かっている) に基づいて試験を行う。この時点で、 $25 \mu\text{Ci}$ の ^{111}In -IMP-272 (76 ng ; 5.0×10^{-11} モル) をマウスに静脈投与する。3時間後、マウス5匹の検死を行う。残るマウス群には、生理食塩水 (対照群) または 734 F(ab')_2 のいずれかを注射する。734群のタンパク質全用量を $10 \sim 100 \mu\text{g}$ の範囲とする (標識734 + 「未標識」734)。注射量は $0.05 \text{ mL} \sim 0.2 \text{ mL}$ とし、臨床用途で推奨されている同期間内で、調製し、注射する (すなわち、6時間以内)。

【0261】

以下の動物群を試験する: IMP-272注射から3時間後、群Iに振り分けられた5匹のマウスの検死を行い、これを734投与前のIMP-272腫瘍取り込みについての参照の原点とする。

【0262】

【表1】

85匹のGW-39ヒト結腸癌細胞皮下接種無胸腺ヌードマウス					
群	(N)	注入試薬	BS:DCS 比	用量	スケジュール
I	25	BS1.5HP IMP-272 生理食塩水 (対照)	(10:1)	$27 \mu\text{g}$ (5.0×10^{-10} モル) 76 ng (5.0×10^{-11} モル) $100 \mu\text{L}$ 生理食塩水	0時間 BS1.5HP から24時間後 IMP-272 から3時間後
II	20	BS1.5HP IMP-272 734 F(ab')_2	(10:1)	$27 \mu\text{g}$ (5.0×10^{-10} モル) 76 ng (5.0×10^{-11} モル) $10 \mu\text{g}$ (1.0×10^{-10} モル)	0時間 BS1.5HP から24時間後 IMP-272 から3時間後
III	20	BS1.5HP IMP-272 734 F(ab')_2	(10:1)	$27 \mu\text{g}$ (5.0×10^{-10} モル) 76 ng (5.0×10^{-11} モル) $20 \mu\text{g}$ (2.0×10^{-10} モル)	0時間 BS1.5HP から24時間後 IMP-272 から3時間後
IV	20	BS1.5HP IMP-272 734 F(ab')_2	(10:1)	$27 \mu\text{g}$ (5.0×10^{-10} モル) 76 ng (5.0×10^{-11} モル) $100 \mu\text{g}$ (1.0×10^{-9} モル)	0時間 BS1.5HP から24時間後 IMP-272 から3時間後

【0263】

各群から、1時点 (3、24、48および72時間) につきマウス5匹の検死を行う。群Iは特別なマウス5匹からなり、腫瘍をターゲティングするIMP-272の量および 734 F(ab')_2 が投与されるときその血中量を決定するのに有用な0時間時点 (IMP-272注射から3時間後) を有する唯一の群である。これを全4群の参照の原点とする。これらのマウスは生理食塩水しか与えず、734を全く与えないことから、この群が、734により表面上に「ロックされ」ないときのIMP-272の腫瘍および正常組織からの喪失を追跡するための対照群ともなる。

【0264】

臨床応用に似た注入経路で、マウスに試薬を静脈投与する。放射性同位元素標識製品の放射能の量は、この試験に使用する時点 (注射から3時間~96時間後) ならびに ^{111}In の半減期 (68時間) および ^{125}I (60日) に基づいて選択した。二重特異性モノクローナル抗体対IMP-272比10:1 (5.0×10^{-10} : 5.0×10^{-11} モル) を示すことが、Clin. Cancer Res. Vo. 9, 3886s-3896s、前掲に記載されており、その比によって、DCSによるGW-39腫瘍の特異性の高いターゲティング (3時

間にて $\sim 20\% \text{ ID/g}$) がもたらされる。

【0265】

腫瘍上に結合したペプチドの最大架橋を達成するための 734 F(ab')_2 量の選択が重要であり、このような用量は、 734 F(ab')_2 の単一二価分子が2つのペプチドと確実に結合されるように、飽和量より少ない量にした。タンパク質用量がこの系において十分に影響を及ぼしているかについて最善の判定を行うために、試験する3用量を $10 \mu\text{g}$ 、 $20 \mu\text{g}$ および $100 \mu\text{g}$ とする。これらの用量は、IMP-272 から3時間後に、腫瘍1グラム当たり 1×10^{-11} モルに相当する $\sim 20\% \text{ ID/g}$ が存在するという前提に基づいて選択した。 734 で見ると、注射から3時間後の腫瘍に 734 F(ab')_2 約 $5\% \text{ ID/g}$ が存在することになるだろう。 734 F(ab')_2 の分子量は $100,000$ ダルトンであり、そのため、 $10 \mu\text{g}$ が 1×10^{-10} モルに相当する。 $5\% \text{ ID/g}$ では、これが腫瘍1グラム当たり 5×10^{-12} モルに相当し、腫瘍に存在するであろうIMP-272量の $1/2$ となる。これらの用量は、最大架橋を可能にするように選択した。さらに、他の2群に漸増量の 734 F(ab')_2 を与え、IMP-272に対して腫瘍中過剰にした：

【0266】

注射スケジュールおよび予測

注入 5×10^{-11} モル IMP-272 @ 3時間 $\sim 20\% \text{ ID/g}$ 腫瘍 = 1×10^{-11} モル

注入 1×10^{-10} モル 734 F(ab')_2 ($10 \mu\text{g}$) @ 3時間 $\sim 5\% \text{ ID/g}$ = 5×10^{-12} モル

$$734 \text{ F(ab')}_2 : \text{IMP-272} = 0.5$$

注入 2×10^{-10} モル 734 F(ab')_2 ($20 \mu\text{g}$) @ 3時間 $\sim 5\% \text{ ID/g}$ = 1×10^{-11} モル

$$734 \text{ F(ab')}_2 : \text{IMP-272} = 1.0$$

注入 1×10^{-9} モル 734 F(ab')_2 ($100 \mu\text{g}$) @ 3時間 $\sim 5\% \text{ ID/g}$ = 5×10^{-11} モル

$$734 \text{ F(ab')}_2 : \text{IMP-272} = 10.0$$

【0267】

動物を、腫瘍の大きさの評価、麻痺および病理評価、ならびに血液化学、WBC、組織学などの毒性評価、さらに、追加定期試験、試験期間中の所見など、定期的に観察する。

指定の検視時には、動物5匹に麻酔をかけ、心臓穿刺により採血した後、頸椎脱臼させる。器官を取り出し、その重量を測定し、容器に入れる。以下の組織を解析に用いた：腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓、肺、血液、胃、小腸、大腸、骨（大腿骨）、洗浄骨（大腿骨）および筋肉。組織を ^{111}In および ^{125}I について目盛り付き カウンターにより計数する。 ^{111}In から交差曲線を作成し、 ^{125}I チャネルに交差しているカウント数を補正する。組織の各セットを、注入から残っている標識製品と「未標識」製品の混合物から作製されるカウンティング標準品とともに計数する。これらの標準品を使用し、2種の放射性同位元素標識試薬について、任意の時点で、注入した全放射能を算出する。一般に、これを行うためには、注入物質の $1:100$ 希釈溶液の調製が必要であり、 0.1 mL を計数する。 $> 2 \times 10^6 \text{ cpm}$ を有する組織は、後に、組織の放射能を正確に測定するのに十分なくらい放射能が減衰したときに再計数する。

【0268】

試験は、腫瘍が一定の大きさに達したとき、瀕死の状態、後肢麻痺、所定の時点、他などの判定基準に基づいて終了する。上記のように、上記の時点で、マウスを屠殺する。

【0269】

統計分析：異なる用量の 734 F(ab')_2 または対照の生理食塩水を注射したマウスの組織間の比較では、スチューデント t 検定を用いる（F検定および異常値を特定するグラブスの棄却Z検定により等分散性を確認した後にこの検定を実施する）。血液または腫瘍の $\% \text{ ID/g}$ に基づき、異常値として動物を除く。（i）血液値が非常に低い場合

、注入の有効性が低くなり、腫瘍を含む全ての組織における標識の取り込み量が少なくなることから、そして(ii)腫瘍が正確に切除されていない、すなわち、腫瘍に過剰量の正常組織が存在している場合、または腫瘍が壊死している場合、%ID/gの判定は不正確なものとなることから、これら2組織を選択した。この「ロック・アンド・チェイス」概念によって、 734 Fab' _2 を受けたマウス群と受けなかったマウス群(対照)間に統計的有意性が達成される場合でも、この概念をさらに追求するには、実際上の理由で、50%を超える線量測定 of 増加が必要であろう。

【0270】

実施例5： 典型的な一次ターゲッティング剤の調製および構造

以上で示したように、数多くの異なる構造の一次ターゲッティング剤を構築することが可能であり、それらは本発明において有用である。多くの場合、薬剤は二重特異性抗体設計(b s A B)である、すなわち、2つの異なるエピトープに対し特異的な抗体結合ドメインを含有している。以下の実施例をはじめとする、数多くの異なる二重特異性抗体一次ターゲッティング剤が構築されており、それらが有効なターゲッティングを提供することが示されている。

【0271】

h M N 1 4 - m 6 7 9 の調製

典型的なh M N 1 4 - m 6 7 9 一次ターゲッティング剤(b s A B)の構築については、2001年4月3日出願の米国特許出願第09/823,746号、およびSharkey, M cBride, Karacay, Chang, Griffiths, Hansen, and Goldenberg, A Universal Pre-Targeting System for Cancer Detection and Therapy Using Biospecific Antibody. Cancer Research 63: 354-363 (2003)に記載されている。また、b s A B 一次ターゲッティング剤の活性種を有するターゲッティング可能構築物との併用(所望により、クリアリング剤も併用してもよい)についてもこれらの参考文献に記載されている。

【0272】

h M N 1 4 - 7 3 4 の調製

二重特異性抗体h M N - 1 4 x 7 3 4 を、等量の、ヒト化抗C E A 抗体(h M N - 1 4)のF a b' フラグメントとo - フェニレン - ビスマレイミドにより活性化したネズミ抗インジウム - D T P A 抗体(7 3 4)のF a b' フラグメントとをカップリングし、続いて、C a - D T P A カラム(特異的に結合していないh M N - 1 4 を除去する)とSupred ex-200カラム(100 - k D 産物を得る)で精製を行って、調製した。二重特異性複合体のC E A に対する免疫活性は、サイズ排除H P L C で、過剰のC E A の存在下では、C E A と結合した結果として、保持時間の短い側へと移動する放射性ヨウ化サンプルの画分を測定することにより評価した。免疫活性は一般に85%以上であった。二重特異性複合体の放射性同位元素標識ペプチドと結合する能力は、サイズ排除H P L C で、二重特異性複合体添加後の、放射性同位元素標識ペプチドの保持時間の短い側への移動に注目することによって同様に示された。

【0273】

実施例6： 典型的なクリアリング剤の調製および構造

典型的なクリアリング剤としては、抗D T P A I g G 抗体(m 7 3 4 I g G)が挙げられる。m 7 3 4 I g G を、Karacay et. al. Bioconjugate Chem., 1997, 8, 585-594の方法によりガラクトシル化する。C T T G (0.23g, $5.7 \times 10^{-5} \text{ mol}$)を6.2mLの無水メタノールに溶かす。ナトリウムメトキシド、メタノール中0.5M($115 \mu\text{L}$, $5.75 \times 10^{-5} \text{ mol}$)をアルゴン下で上記溶液に添加し、室温にて18時間攪拌する。イミダートはすぐに使用するか、または4 で保存する。m 7 3 4 I g G のリシン残基をガラクトシル化するために、異なるイミダート:m 7 3 4 I g G モル比に相当するイミダートをアルゴン流により蒸発させる。抗体、m 7 3 4 I g G を各々に添加し、最終タンパク質濃度をpH 8.1の0.1Mリン酸ナトリウムを添加して8.4mg/mLに調整し、最終pHを三塩基性リン酸ナトリウム飽和溶液により8.5~8.6に調整する。反応混合物を室温にて2時間攪拌し、修飾されたm 7 3 4 I g

Gを、pH 7.3の0.1Mリン酸ナトリウム中にSephadex G-50~80が充填されている、連続する2セットの遠心スピナラムで精製する。ガラクトシル化m734 IgGサンプルをMALDI-MSにより分析し、存在するガラクトース残基の正確な数を決定する。

【0274】

実施例7： 典型的なロック・アンド・チェイスターゲッティング送達

二重特異性抗体、hMN-14xm679(100μL PBS中15μg/1マウス当たり)をGW-39担癌ヌードマウスに注射する。抗体が24時間クリアリングされ、In-111標識IMP272(100μL中10μCi/マウス、上記のように標識)をペプチドの注射から15分後(群A)および30分後(群B)にガラクトシル化m734 IgG(100μL PBS中25~30μg/1マウス当たり)。3時間、24時間、48時間および72時間の時点で、動物(各群、1時点につき5匹)を屠殺する。群AおよびBにおけるターゲッティングを、ペプチドの注射後に無関係のガラクトシル化抗体Ag8を受けた対照(群C)と比較する。

10

【0275】

実施例8： インターナリゼーションによる典型的なターゲッティング送達

迅速にインターナライズする表面抗原との架橋によるインターナリゼーションでのB細胞リンパ腫の治療法

広範囲の結節転移が認められるB細胞リンパ腫を有する患者に、米国出願第09/337,756号および同第60/360,229号に記載のように調製した、標的用量の二重特異性hA20Fab-679scFvを含有する、発熱物質を含まない滅菌溶液を静脈注入する。24時間後、患者に、次いで、治療用量のDTPA-Gln-Ala-Lys(HSG)-D-[I-131Tyr]-Lys(HSG)-NH₂を含有する、発熱物質を含まない滅菌PBS溶液を静脈注入する。24時間後、患者に、さらに、二重特異性hLL1IgG[734scFv]の、発熱物質を含まない滅菌PBS溶液50mgを静脈注入する。血液からのI-131の迅速なクリアランスが観察され、その後の放射免疫検出により、結節に転移したリンパ腫にI-131が集中局在することおよび長時間保持されることが示される。次の数ヶ月間にわたるCATスキャンでは、結節に転移したリンパ腫の大きさが大幅に縮小されることが示される。図6~9にて、この投与についての概略を示す。

20

30

【0276】

葉酸受容体を利用するインターナリゼーションによるターゲッティング送達

葉酸m734 IgGの合成

m734 IgGなどのタンパク質は、Reddy et. Al. Blood, 1999, 93, 3940-3948の方法により、葉酸を用いて誘導体化することが可能である。葉酸(10mg)を無水DMSOに溶かし、25mg 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドとともに、攪拌下、室温にて30分間インキュベートする。次いで、1アリコート(溶液の1/3)の溶液をpH 7.4のPBS中m734 IgG(~10mg/mL)100mgに添加する。攪拌しながら、室温にて2時間インキュベーションした後、反応混合物をPBSで平衡化したPD-10脱塩カラムに通し、過剰の遊離葉酸から複合タンパク質を分離する。

40

抗体複合体をMALDI-MSにより分析し、1抗体当たりの葉酸残基の正確な数を決定する。

【0277】

葉酸受容体インターナリゼーションによるin-vivoターゲッティング送達についての試験

二重特異性抗体、hMN-14xm679(100μL PBS中15μg/1マウス当たり)をGW-39担癌ヌードマウスに注射する。抗体が24時間クリアリングされた後、In-111標識IMP272(100μL中10μCi/マウス、上記のように標識)を注射する。ペプチドの注射から30分後(群A)に葉酸で修飾したm734 IgG

50

G (1 0 0 μ L P B S 中 2 5 ~ 3 0 μ g / 1 マウス当たり) 。 3 時間、 2 4 時間、 4 8 時間および 7 2 時間の時点に、動物 (各群、 1 時点につき 5 匹) を屠殺する。群 A におけるターゲティングを、ペプチドの注射後に非修飾 m 7 3 4 I g G を受けた対照 (群 B) と無関係の葉酸修飾抗体 A g 8 を受けた対照 (群 C) と比較する。

【 0 2 7 8 】

葉酸受容体インターナリゼーションによる in-vitro ターゲティング送達についての試験

L o V o または T T 細胞などの C E A 発現細胞を、 h M N - 1 4 x m 6 7 9 および ¹ ¹ I n / I n D T P A - G l n - A l a - L y s (H S G) - D - T y r - L y s (H S G) - N H ₂ (I M P 2 7 2) [2 抗体対 1 ペプチドモル比] とともに 1 時間インキュベートする。その後、細胞を新鮮な血清で洗浄し、葉酸修飾抗体ならびに対照抗体 (非修飾 m 7 3 4 I g G および葉酸修飾 A g 8) とともに 4 時間インキュベートする (独立したウェルにて各抗体のインキュベーションを行う) 。さらに、細胞を新鮮な血清で洗浄し、ペプチドのインターナリゼーションをインキュベーションから 3 0 分、 1 時間、 2 時間、 4 時間、 8 時間、 2 4 時間、 4 8 時間および 7 2 時間後に評価する。

10

【 0 2 7 9 】

本明細書において引用する全ての特許およびその他の参考文献は、本発明が関連する当業者の技術レベルを示し、それらは、各参考文献が個別にその全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる場合と同じ程度で、表および図面を含むそれらの全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる。

20

【 0 2 8 0 】

当業者ならば、本発明が、記載した目的および利点、ならびにその中において固有のものを得るのによく適合していることが容易に分かるであろう。本明細書において好ましい実施形態で示すような、本明細書に記載の方法、変数および組成物は典型的なものであり、本発明の範囲を限定するものではない。当業者ならば、本発明に包含されるその変形およびその他の使用にも考えが及ぶであろう。

【 0 2 8 1 】

当業者ならば、本明細書に開示する本発明に対し、本発明の範囲および精神を逸脱することなく、種々の置換および修飾をなし得ることが容易に理解できるであろう。例えば、種々の異なる結合対、ならびに種々の異なる治療薬および診断薬を利用してもよい。よって、こういったさらなる実施形態は本発明の範囲内である。

30

【 0 2 8 2 】

本明細書において例示的に記載した本発明は、本明細書にて具体的に開示されていない要素、制限はなく、適切に実践され得る。よって、例えば、本明細書におけるいずれの場合においても、「含む」、「本質的にからなる」、「からなる」はいずれも、それ以外の 2 語と置き換えることができる。使用してきた用語および表現は、説明するために使用するものであり、制限するためのものではない。示し、記載した特徴またはその一部の等価物を除外するこのような用語および表現の使用において、種々の修飾が本発明の範囲内で可能であるとする意図はない。よって、当然のことながら、好ましい実施形態によって本発明を具体的に開示してきたが、当業者ならば、本明細書において開示する概念の任意の特徴、修飾および変形を使用でき、さらに、このような修飾および変形は本発明の範囲内であると見なされる。

40

【 0 2 8 3 】

さらに、本発明の特徴または態様が Markush グループまたはその他の別団体の観点で記載されている場合には、それに関して、Markush グループまたはその他のグループの各メンバーもしくはメンバーのサブグループに関しても本発明が記載されていることが当業者には分かるであろう。

【 0 2 8 4 】

また、それと反対の指示がない限り、種々の数値が実施形態で示されている場合には、範囲の指標として 2 つの異なる値を用いることによって、さらなる実施形態を説明してい

50

る。このような範囲もまた本発明の範囲内である。

よって、さらなる実施形態は本発明の範囲内である。例えば、本発明は、以下の番号を付けた実施形態によりさらに例示される。

【図面の簡単な説明】

【 0 2 8 5 】

【図 1】腫瘍細胞上の C E A と結合する h M N 1 4 A b 部分と、ターゲッティング可能構築物上のハプテン H S G と結合する 6 7 9 A b 部分を有する一次ターゲッティング剤によるプレターゲッティングを示す概略図である。ターゲッティング可能構築物は、直交ハプテン H S G (2 コピー) と D T P A (1 コピー) を有し、このターゲッティング可能構築物は二つの標的結合一次ターゲッティング剤と結合し、D T P A 部分はクリアリング剤との結合のためにフリーとなっている。

10

【図 2】二つの標的結合複合体と、二つのターゲッティング可能構築物の各々にある I n D T P A ハプテンと結合する 7 3 4 I g G A b を有するクリアリング剤とを架橋し、それにより標的部位においてターゲッティング可能構築物の保持を高めるといふ、図 1 のプレターゲッティングを示す概略図である。示されているように、このようにターゲッティング可能構築物とクリアリング剤を組み合わせることで、4 つの標的部位を架橋する複合体となる。

【図 3】循環中のクリアリング剤およびそれが結合しているターゲッティング可能構築物のクリアランス速度を高めるように、クリアリング剤がガラクトース部分で修飾されていること以外は、図 2 と同じプレターゲッティングおよびロックを示す概略図である。

20

【図 4】葉酸部分が葉酸受容体と結合し、会合した複合体のインターナリゼーションを促進するように、クリアリング剤が葉酸で修飾されていること以外は、図 2 と同じプレターゲッティングおよびロックを示す概略図である。

【図 5】ターゲッティング可能構築物の別の構成を示す概略図である。図 2 とは対照的に、ターゲッティング可能構築物は H S G ハプテンは一つだけであるので、一次ターゲッティング剤としか結合しない。図 2 同様、クリアリング剤は、標的部位におけるターゲッティング可能構築物の保持を高めるように二つの標的結合ターゲッティング可能構築物を架橋している。この構成では、複合体は二つの標的部位を架橋する。

【図 6】細胞表面マーカーをプレターゲッティングするための一次ターゲッティング剤；一次ターゲッティング剤と結合し、このように結合した二つの一次ターゲッティング剤を架橋するターゲッティング可能構築物；およびターゲッティング可能構築物と結合し、二つの結合したターゲッティング可能構築物を架橋し、それにより 4 つの細胞表面マーカーとの結合を含む標的結合複合体を形成するクリアリング剤の使用を示す一連の概略図である。図 6 はその表面に C D 2 0 を有する B 細胞を示す。

30

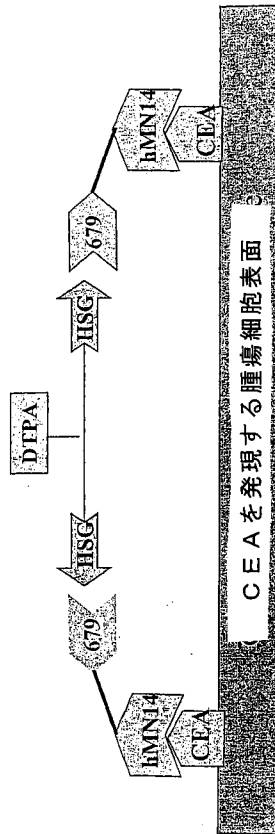
【図 7】図 7 は一次ターゲッティング剤の、図 6 で示される細胞表面マーカーへの結合を示す。

【図 8】図 8 は図 7 で局在させた一次ターゲッティング剤と結合したターゲッティング可能構築物を示し、各ターゲッティング可能構築物は局在した二つの一次ターゲッティング剤を架橋している。

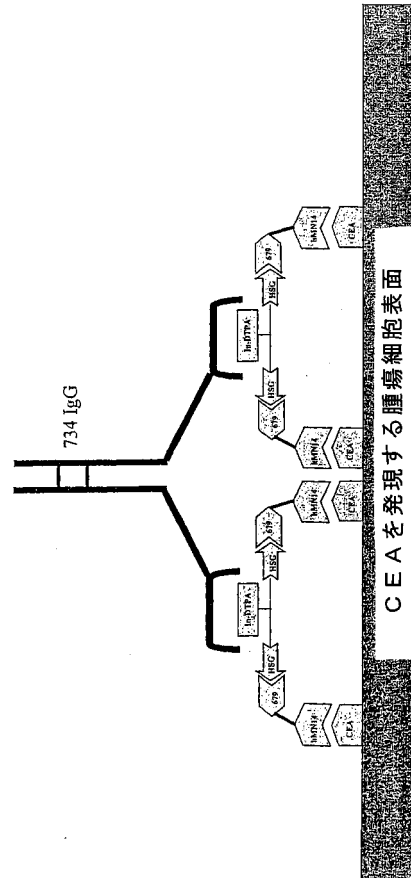
【図 9】図 9 は二価のクリアリング剤が、局在しているターゲッティング可能構築物と結合し、二つのターゲッティング可能構築物を架橋し、それにより 4 つの標的との結合を含む複合体を形成していることを示す。

40

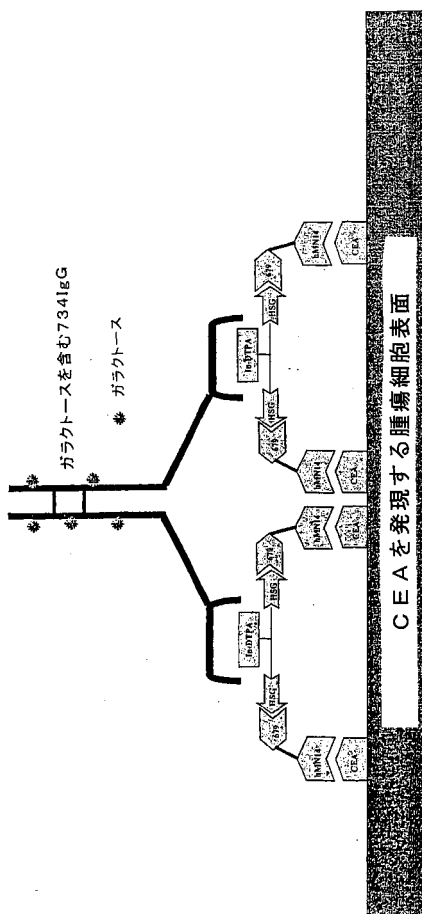
【図 1】



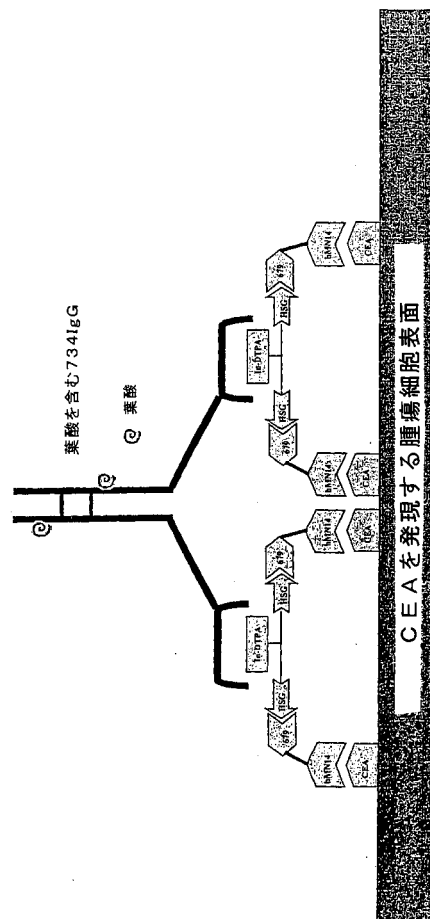
【図 2】



【図 3】

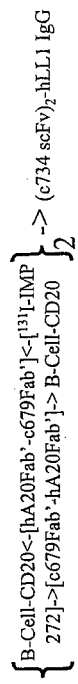


【図 4】

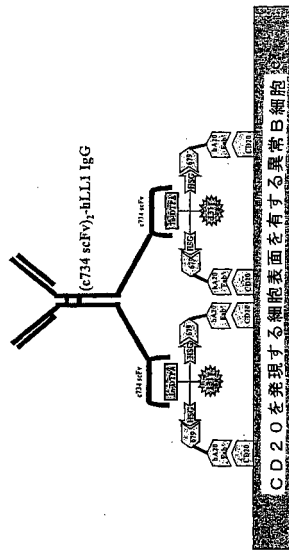


【図 9】

工程3 (c734 scFv)₂-hLL1 IgG を注射すると、



が形成される。



フロントページの続き

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(72)発明者 ウィリアム、マックブライド

アメリカ合衆国ニュージャージー州、ブーントン、グローバー、ストリート、116

(72)発明者 ハンス、ジェイ・ハンセン

アメリカ合衆国ミシシッピ州、ピカユネ、アングラー、ドライブ、6014

(72)発明者 チェン ヒン、ケン、チャン

アメリカ合衆国ペンシルバニア州、ダウニントン、フレンチ、サークル、349

(72)発明者 デイビッド、エム・ゴールドンバーグ

アメリカ合衆国ニュージャージー州、メンダム、キャロライス、ファーム、ロード、1

審査官 遠藤 広介

(56)参考文献 特表2002-518460(JP,A)

特表2002-526457(JP,A)

特表平09-506106(JP,A)

SHARKEY R M, CANCER RESEARCH, 米国, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2003
年 1月15日, V63 N2, P354-363

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 47/48

A61K 39/395

A61K 47/42

A61K 51/00

BIOSIS(STN)

CAPLUS(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)