

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-509259

(P2012-509259A)

(43) 公表日 平成24年4月19日 (2012.4.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 2 4
C07K 14/76 (2006.01)	C O 7 K 14/76 Z N A	4 C O 7 6
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 4
A61K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 5
A61P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 96 頁) 最終頁に続く		

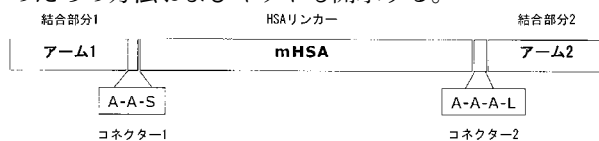
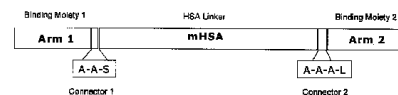
(21) 出願番号	特願2011-536365 (P2011-536365)	(71) 出願人	508044829
(86) (22) 出願日	平成21年10月14日 (2009.10.14)		メリマック ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成23年7月8日 (2011.7.8)		インコーポレーティッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/060721		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ
(87) 国際公開番号	W02010/059315		ンブリッジ ワン ケンドル スクエア
(87) 国際公開日	平成22年5月27日 (2010.5.27)		スイート ビー7201
(31) 優先権主張番号	PCT/US2009/040259	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成21年4月10日 (2009.4.10)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/115,797		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成20年11月18日 (2008.11.18)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヒト血清アルブミンリンカーおよびそのコンジュゲート

(57) 【要約】

ヒト血清アルブミン (HSA) リンカー、ならびに、結合剤、診断剤、および治療剤を結合させたHSAリンカーを開示する。また、該HSAリンカーと第一および第二の単鎖Fv分子 (scFv) であるアミノ末端およびカルボキシ末端の結合部分とが共有結合した、コンジュゲートも開示する。例示的なコンジュゲートは、例えば、治療用途等のために腫瘍細胞の増殖を低下させるのに有用である。HSAリンカーコンジュゲートの診断用途および治療用途のための方法およびキットも開示する。

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む、HSAリンカーコンジュゲート：

- (i) SEQ ID NO: 6～15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列を含む、ヒト血清アルブミン (HSA) リンカー；ならびに
- (ii) 抗体、単鎖Fv分子、二重特異性単鎖Fv ((scFv')₂) 分子、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボディ (triabody)、ホルモン、Fab断片、F(ab')₂分子、タンデムscFv (taFv) 断片、レセプター、リガンド、アプタマー、およびこれらの生物学的に活性な断片からなる群より選択される第一および第二の結合部分であって、該第一の結合部分が、該HSAリンカーのアミノ末端に結合し、かつ該第二の結合部分が、該HSAリンカーのカルボキシ末端に結合している、第一および第二の結合部分。

【請求項 2】

前記HSAリンカーが、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載のHSAリンカーコンジュゲート。

【請求項 3】

前記第一の結合部分がErbB3に特異的に結合し、かつ前記第二の結合部分がErbB2に特異的に結合する、請求項1記載のHSAリンカーコンジュゲート。

【請求項 4】

SEQ ID NO: 16であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-1。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 17であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-2。

【請求項 6】

SEQ ID NO: 18であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-3。

【請求項 7】

SEQ ID NO: 19であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-4。

【請求項 8】

SEQ ID NO: 20であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-5。

【請求項 9】

SEQ ID NO: 21であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-6。

【請求項 10】

SEQ ID NO: 22であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-7。

【請求項 11】

SEQ ID NO: 23であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-8。

【請求項 12】

SEQ ID NO: 24であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-9。

【請求項 13】

SEQ ID NO: 25であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-10。

【請求項 14】

薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合された、請求項1～13のいずれか一項記載のHSAリンカーコンジュゲート。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

請求項1~13のいずれか一項記載のHSAリンカーコンジュゲートの有効量を哺乳動物に投与する工程を含む、疾患または障害を有する患者を治療するための方法。

【請求項 16】

シクロホスファミド、カンプトテシン、ホモカンプトテシン、コルヒチン、コンブレスタチン (combrestatin)、コンブレスタチン、リゾキシシン、ドリスタチン (dolistatin)、アンサマイトシンp3、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリチアマイシン (caleac himicin)、メトトレキサート、5-フルオロウラシル (5-FU)、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン、ラロキシフェン、レトロゾール、エピルビシン、ベバシズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、およびこれらの誘導体からなる群より選択される1つまたは複数の治療剤と組み合わせた、請求項1~13のいずれか一項記載のHSAリンカーコンジュゲートを含む、組成物。

10

【請求項 17】

前記治療剤がトラスツズマブである、請求項16記載の組成物。

【請求項 18】

前記HSAリンカーコンジュゲートが、SEQ ID NO: 16であるアミノ酸配列を有するまたは含むHSAリンカーコンジュゲートB2B3-1である、請求項16記載の組成物。

【請求項 19】

前記治療剤がトラスツズマブであり、かつ前記HSAリンカーコンジュゲートが、SEQ ID NO: 16であるアミノ酸配列を有するまたは含むHSAリンカーコンジュゲートB2B3-1である、請求項16記載の組成物。

20

【請求項 20】

ヒト乳房腫瘍細胞を用いたヒト異種移植モデルのヌードマウスにおいて第一の用量の治療剤および第二の用量のHSAリンカーコンジュゲートにより試験した場合に、同一モデルにおいて第一の用量の治療剤のみまたは第二の用量のHSAリンカーコンジュゲートのみに提供されるよりも大きな効果が該組み合わせによって提供される、請求項19記載の組成物。

【請求項 21】

少なくとも3 mg/kgのB2B3-1および少なくとも0.1 mg/kgのトラスツズマブを提供するように対象に投与することが可能な剤形である、請求項20記載の組成物。

30

【請求項 22】

3 mg/kgのB2B3-1および0.1 mg/kgのトラスツズマブを提供するように対象に投与されるのに適合化された剤形である、請求項21記載の組成物。

【請求項 23】

10 mg/kgのB2B3-1および1 mg/kgのトラスツズマブを提供するように対象に投与されるのに適合化された剤形である、請求項21記載の組成物。

【請求項 24】

3 mg/kgのB2B3-1および0.1 mg/kgのトラスツズマブを提供するように対象に投与された場合に、対応する対象の3 mg/kgのB2B3-1のみまたは0.1 mg/kgのトラスツズマブのみによる処理よりも効果的である、請求項22記載の組成物。

40

【請求項 25】

10 mg/kgのB2B3-1および1 mg/kgのトラスツズマブを提供するように対象に投与された場合に、対応する対象の10 mg/kgのみまたは1 mg/kgのトラスツズマブのみによる処理よりも効果的である、請求項23記載の組成物。

【請求項 26】

3 mg/kgのB2B3-1および0.1 mg/kgのトラスツズマブをそれぞれに提供するように複数の対象に投与された場合に、20日後に該対象の10%超において腫瘍の退縮を誘導する、請求項22記載の組成物。

【請求項 27】

10 mg/kgのB2B3-1および1 mg/kgのトラスツズマブをそれぞれに提供するように複数の

50

対象に投与された場合に、20日後に該対象の少なくとも50%において腫瘍の退縮を誘導する、請求項23記載の組成物。

【請求項28】

前記治療剤がラパチニブである、請求項16記載の組成物。

【請求項29】

前記治療剤がタキサンである、請求項16記載の組成物。

【請求項30】

タキサンがパクリタキセルまたはドセタキセルである、請求項29記載の組成物。

【請求項31】

前記治療剤がレトロゾールである、請求項16記載の組成物。

10

【請求項32】

前記第一の結合部分が約16 nMの K_d でErbB3に結合し、かつ前記第二の結合部分が約0.3 nMの K_d でErbB2に結合する、請求項3記載のHSAリンカーコンジュゲート。

【請求項33】

対象を治療する方法であって、該対象が腫瘍の治療を必要としており、該治療が、請求項1～14および32のいずれか一項記載のHSAリンカーコンジュゲートの有効量を該対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項34】

対象を治療する方法であって、該対象が腫瘍の治療を必要としており、該治療が、請求項16～30のいずれか一項記載の組成物の有効量を該対象に投与する工程を含む、方法。

20

【請求項35】

腫瘍の治療のための医薬の調製における、請求項1～14および32のいずれか一項記載のHSAリンカーコンジュゲートの使用。

【請求項36】

腫瘍の治療のための医薬の調製における、請求項16～30のいずれか一項記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

30

ヒト血清アルブミン（HSA）リンカーコンジュゲート、ならびにその結合用、診断用、および治療用のコンジュゲートを提供する。一態様では、HSAリンカーは、2つのアミノ酸置換を包含する。別の態様は、第一および第二の単鎖Fv分子（scFv）であるアミノ末端およびカルボキシ末端の結合部分にHSAリンカーが共有結合している、コンジュゲートである。例示的なコンジュゲートは、例えば治療用途等のために腫瘍細胞の増殖を低下させるのに有用である。診断用および治療用のHSAリンカーコンジュゲートの製造および投与のための方法を、さらに提供する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

40

抗体様結合部分（無傷の抗体、抗体断片、およびscFv内のものを含む）は、治療用途のためにしばしば使用される。一般に抗体断片およびscFvは無傷の抗体よりも短い血清半減期を呈し、一部の治療用途においては、そのような断片およびscFvの機能を保有する治療剤に関してインビボ半減期の延長が望ましいことがあり得る。

【0003】

ヒト血清アルブミン（HSA）は、約66,500kDのタンパク質であって、少なくとも17個のジスルフィド架橋を含む585アミノ酸から構成される。アルブミンファミリーの多くのメンバーと同様に、ヒト血清アルブミンはヒトの生理機能において重要な役割を果たし、実質的にあらゆるヒトの組織および身体分泌物に存在する。HSAは、長鎖脂肪酸を含む広範なリガンドを結合させて循環系全体に輸送する能力を有し、これらはさもなくば循環血漿

50

中で不溶性である。

【0004】

血清アルブミンは、ビタミンD結合タンパク質としても公知である、 α -フェトプロテインおよびヒト群に特異的な成分を含むタンパク質ファミリーに属する。血清アルブミンは循環系の主要な可溶性タンパク質であって、多くの生命維持に必要な生理学的プロセスに寄与している。血清アルブミンは一般に、乾燥重量あたり約50%の全血成分を含む。アルブミンおよびその関連する血液タンパク質はまた、種々の化学的に異なる分子、例えば脂肪酸、アミノ酸、ステロイド、カルシウム、金属、例えば銅および亜鉛、ならびに種々の薬剤を含む、人体における多くの内因性および外因性のリガンドの、輸送、分布、および代謝において重要な役割も果たしている。アルブミンファミリーの分子は一般に、肝臓、腸、腎臓、および脳などの器官-循環の境界を横断する、多くのこれらのリガンドの輸送を促進すると考えられている。アルブミンはこのように、広範な循環機能および代謝機能に参与している。

10

【発明の概要】

【0005】

第一の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 6~15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列を含むヒト血清アルブミン (HSA) リンカーと、抗体、単鎖Fv分子、二重特異性単鎖Fv ((scFv')₂) 分子、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボディ (triabody)、ホルモン、Fab断片、F(ab')₂分子、タンデムscFv (taFv) 断片、レセプター (例えば細胞表面レセプター)、リガンド、アプタマー、およびこれらの生物学的に活性な断片からなる群より選択される、第一および第二の結合部分とを含むHSAリンカーコンジュゲートを提供し、ここで、該第一の結合部分は該HSAリンカーのアミノ末端に結合し、該第二の結合部分は該HSAリンカーのカルボキシ末端に結合している。一態様では、該第一の結合部分はErbB3に特異的に結合し、該第二の結合部分はErbB2に特異的に結合している。他の態様では、HSAリンカーはSEQ ID NO: 1、9、10、14、または15に示されるアミノ酸配列を含む。

20

【0006】

第二の局面では、3つ以上の結合部分 (例えば、4、5、6、7、8、9、10個以上) を上記剤に含めることができ；これら追加の結合部分は、例えば第一または第二の結合部分と一列になって (例えば、2、3、4もしくは5個以上が一列になって) 該剤に付加されうる。

【0007】

第三の局面では本発明は、SEQ ID NO: 1に示される配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列と、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列の34位のセリン残基と、503位のグルタミン残基とを含む、HSAリンカーを提供する。一態様では、該アミノ酸配列はSEQ ID NO: 1に示される配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する。別の態様では、該HSAリンカーはSEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列を含む。さらに別の態様では、該HSAリンカーはSEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列を有する。

30

【0008】

第四の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1に示される配列に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するHSAリンカーと、少なくとも第一の結合部分とを含む、HSAリンカーコンジュゲートを提供する。一態様では、該HSAリンカーコンジュゲートは、第一の結合部分をHSAリンカーに結合させる、第一のペプチドコネクターを含む。

40

【0009】

第五の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 11~15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列またはこれらの配列のいずれか一つの断片もしくは変異体を有するHSAリンカーと、少なくとも第一の結合部分とを含む、HSAリンカーコンジュゲートを特徴とする。

【0010】

本発明の第四または第五の局面どちらかの特定の態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、第一の結合部分をHSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に結合させる、第一のペプチドコネクター (例えば、AAS、AAQ、またはAAAL (SEQ ID NO: 5)) をさらに含む。ある態様では、第一のコネクターは、第一の結合部分をHSAリンカーに共有結合さ

50

せる。

【0011】

本発明の第四または第五の局面どちらかの特定の態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、少なくとも第二の結合部分をさらに含む。ある態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、第二の結合部分をHSAリンカーに結合させる第二のペプチドコネクター（例えば、AAS、AAQ、またはAAAL（SEQ ID NO: 5））をさらに含む。他の態様では、第二のコネクターは、第二の結合部分をHSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に結合させる。さらなる態様では、第二のコネクターは、第二の結合部分をHSAリンカーに共有結合させる。他の態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、第一または第二の結合部分と一列になって含まれている3つ以上の結合部分をさらに含み；該3つ以上の結合部分は、該3つ以上の結合部分を該第一または第二の結合部分に結合させかつ互いに結合させるコネクター配列をさらに含むことができる。

10

【0012】

本発明の第四または第五の局面どちらかの特定の態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、第一の結合部分をHSAリンカーのアミノ末端に共有結合させる第一のペプチドコネクターと、第二の結合部分をHSAリンカーのカルボキシ末端に共有結合させる第二のペプチドコネクターとを含む。一態様では、第一のコネクターはアミノ酸配列AASまたはAAQを有し、第二のコネクターはSEQ ID NO: 5に示されるアミノ酸配列を有する。

【0013】

本発明の第四または第五どちらかの局面の特定の態様では、第一または第二の結合部分（または第三以降の結合部分）は、抗体、単鎖Fv分子、二重特異性単鎖Fv（(scFv')₂）分子、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボディ、ホルモン、Fab断片、F(ab')₂分子、タンデムscFv（taFv）断片、レセプター（例えば、細胞表面レセプター）、リガンド、アプタマー、またはこれらの生物学的に活性な断片である。他の態様では、本明細書で提供されるHSAリンカーコンジュゲートは、これらの別々のタイプの結合部分の組み合わせを含む。一態様では、少なくとも第一または第二の結合部分はヒト単鎖Fv分子またはヒト化単鎖Fv分子である。

20

【0014】

本発明の第一、第二、第三、第四、または第五の局面のいずれか一つの態様では、上記第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数、インスリン様成長因子1レセプター（IGF1R）、IGF2R、インスリン様成長因子（IGF）、間葉上皮移行因子レセプター（c-met；肝細胞成長因子レセプター（HGFR）としても公知）、肝細胞成長因子（HGF）、上皮細胞成長因子レセプター（EGFR）、上皮細胞成長因子（EGF）、ヘレグリン、線維芽細胞成長因子レセプター（FGFR）、血小板由来成長因子レセプター（PDGFR）、血小板由来成長因子（PDGF）、血管内皮成長因子レセプター（VEGFR）、血管内皮成長因子（VEGF）、腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）、腫瘍壊死因子α（TNF-α）、TNF-β、葉酸レセプター（FOLR）、葉酸、トランスフェリンレセプター（TfR）、メソセリン、Fcレセプター、c-kitレセプター、c-kit、インテグリン（例えば、α4インテグリンまたはβ-1インテグリン）、P-セレクチン、スフィンゴシン-1-リン酸レセプター-1（S1PR）、ヒアルロン酸レセプター、白血球機能抗原-1（LFA-1）、CD4、CD11、CD18、CD20、CD25、CD27、CD52、CD70、CD80、CD85、CD95（Fasレセプター）、CD106（血管細胞付着分子1（VCAM1））、CD166（活性化白血球細胞接着分子（ALCAM））、CD178（Fasリガンド）、CD253（TNF関連アポトーシス誘導性リガンド（TRAIL））、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、CCR5、CXCL12（間質細胞由来因子1（SDF-1））、インターロイキン1（IL-1）、CTLA-4、MART-1、gp100、MAGE-1、エフリン（Eph）レセプター、粘膜アドレシン細胞付着分子1（MAdCAM-1）、癌胎児性抗原（CEA）、Lewis^Y、MUC-1、上皮細胞接着分子（EpCAM）、癌抗原125（CA125）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、TAG-72抗原、およびこれらの断片からなる群より選択されるタンパク質であるかまたはそれらのタンパク質に特異的に結合する。さらなる態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数、赤芽球白血病ウイルス癌遺伝子ホモロ

30

40

50

グ (ErbB) レセプター (例えば、ErbB1レセプター ; ErbB2レセプター ; ErbB3レセプター ; およびErbB4レセプター) であるか、またはこれに特異的に結合する。別の態様では、第一または第二の結合部分 (または、存在する場合には第三以降の結合部分) の1つまたは複数、 α -フェトプロテイン (AFP) もしくはインターフェロン、またはこれらの生物学的に活性な断片であるか、またはこれに特異的に結合する。さらなる態様では、第一または第二の結合部分 (または、存在する場合には第三以降の結合部分) の1つまたは複数、ナタリズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、ダクリズマブ、エファリズマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブ、トラスツズマブ、アバタセプト、エタネルセプト、ベルツズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、またはアナキンラである。

10

【0015】

本発明の第一、第二、第三、第四、または第五の局面のうちのいずれか一つでは、HSAリンカーコンジュゲートは診断剤、治療剤またはその両方に結合している。一態様では、診断剤は検出可能標識、例えば、放射性標識、蛍光標識、または重金属標識である。別の態様では、治療剤は細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、または免疫調節剤である。細胞毒性剤としてはアルキル化剤、抗生物質、抗腫瘍剤、抗増殖剤、代謝拮抗剤、チューブリンインヒビター、トポイソメラーゼIもしくはIIのインヒビター、ホルモンのアゴニストもしくはアンタゴニスト、免疫調節剤、DNAマイナーグループバインダー、および放射性剤、または、腫瘍細胞に結合して該細胞を殺傷できるかもしくは腫瘍細胞増殖を阻害できる任意の剤が挙げられる。抗腫瘍剤としてはシクロホスファミド、カンプトテシン、ホモカンプトテシン、コルヒチン、コンプレスタチン (combrestatin)、コンプレスタチン、リゾキシシン、ドリスタチン (dolistatin)、アンサマイトシンp3、メイタンシノイド、アウリスチン、カリチアマイシン (caleachimicin)、メトトレキサート、5-フルオロウラシル (5-FU)、ドキシソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン、ラロキシフェン、レトロゾール、エピルビシン、ベバシズマブ、ベルツズマブ、トラスツズマブ、およびこれらの誘導体が挙げられる。

20

【0016】

本発明の第一、第二、第三、第四、または第五の局面のうちのいずれか一つでは、HSAリンカーコンジュゲートは薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合される。一態様では、該剤は6時間~7日間のインビボ半減期を呈する。別の態様では、該剤は、8時間超のインビボ半減期を呈する。

30

【0017】

第六の局面では、本発明は、本明細書に記載のHSAリンカーコンジュゲートのいずれか一つを投与することによって疾患または障害を有する哺乳動物を治療するための方法の特徴とする。一態様では、該疾患または障害は、細胞表面レセプターを通じた細胞シグナル伝達に関連する。別の態様では、該哺乳動物はヒトである。さらなる態様では、該疾患または障害は増殖性疾患または自己免疫疾患である。増殖性疾患としては、黒色腫、明細胞肉腫、頭頸部癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、卵巣癌、子宮内膜癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、前立腺癌、唾液腺癌、肺癌、肝臓癌、皮膚癌、および脳癌などの癌が挙げられる。自己免疫疾患としては、多発性硬化症、乾癬、重症筋無力症、ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデス、および関節リウマチが挙げられる。一態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、1つまたは複数の治療剤と、例えば抗腫瘍剤と組み合わせて投与される。

40

【0018】

第七の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1、3、もしくは6~15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO: 1、3、もしくは6~15のいずれか一つに示される配列に対して少なくとも90%、95%、97%、もしくは100%の配列同一性を有する配列を有するHSAリンカーのアミノ末端に少なくとも第一の結合部分を、およびカルボキシ末端に第二の結合部分を結合させることによって、HSAリンカーコンジュゲートを作製するための方法の特徴とする。一態様では、第一または第二の結合部分はHSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に共有結合している。他の態様では、第三以降の結合部分 (例え

50

ば、第四、第五、第六、第七、第八、第九、または第十の結合部分)は、第一または第二の結合部分と一列になって、HSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に共有結合する。別の態様では、第一または第二の結合部分(または、存在する場合には第三以降の結合部分)の1つまたは複数は、抗体、単鎖Fv分子、二重特異性単鎖Fv((scFv')₂)分子、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボディ、ホルモン、Fab断片、F(ab')₂分子、タンデムscFv(taFv)断片、レセプター(例えば、細胞表面レセプター)、リガンド、またはアプタマーである。別の態様では、第一または第二の結合部分(または、存在する場合には第三以降の結合部分)はヒト単鎖Fv分子またはヒト化単鎖Fv分子である。さらに別の態様では、この第一または第二の結合部分(または、存在する場合には第三以降の結合部分)の1つまたは複数は、インスリン様成長因子1レセプター(IGF1R)、IGF2R、インスリン様成長因子(IGF)、間葉上皮移行因子レセプター(c-met; 肝細胞成長因子レセプター(HGFR)としても公知)、肝細胞成長因子(HGF)、上皮細胞成長因子レセプター(EGFR)、上皮細胞成長因子(EGF)、ヘレグリン、線維芽細胞成長因子レセプター(FGFR)、血小板由来成長因子レセプター(PDGFR)、血小板由来成長因子(PDGF)、血管内皮成長因子レセプター(VEGFR)、血管内皮成長因子(VEGF)、腫瘍壊死因子レセプター(TNFR)、腫瘍壊死因子α(TNF-α)、TNF-β、葉酸レセプター(FOLR)、葉酸、トランスフェリンレセプター(TfR)、メソセリン、Fcレセプター、c-kitレセプター、c-kit、インテグリン(例えば、α4インテグリンまたはβ-1インテグリン)、P-セレクチン、スフィンゴシン-1-リン酸レセプター-1(S1PR)、ヒアルロン酸レセプター、白血球機能抗原-1(LFA-1)、CD4、CD11、CD18、CD20、CD25、CD27、CD52、CD70、CD80、CD85、CD95(Fasレセプター)、CD106(血管細胞付着分子1(VCAM1)、CD166(活性化白血球細胞接着分子(ALCAM))、CD178(Fasリガンド)、CD253(TNF関連アポトーシス誘導性リガンド(TRAIL))、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、CCR5、CXCL12(間質細胞由来因子1(SDF-1))、インターロイキン1(IL-1)、CTLA-4、MART-1、gp100、MAGE-1、エフリン、(Eph)レセプター、粘膜アドレシン細胞付着分子1(MAdCAM-1)、癌胎児性抗原(CEA)、Lewis^Y、MUC-1、上皮細胞接着分子(EpCAM)、癌抗原125(CA125)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、TAG-72抗原、およびこれらの断片であるかまたはこれに特異的に結合する。さらなる態様では、第一または第二の結合部分(または、存在する場合には第三以降の結合部分)の1つまたは複数は、赤芽球白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ(ErbB)レセプター(例えば、ErbB1レセプター; ErbB2レセプター; ErbB3レセプター; およびErbB4レセプター)であるかまたはこれに特異的に結合する。別の態様では、第一または第二の結合部分(または、存在する場合には第三以降の結合部分)の1つまたは複数は、α-フェトプロテイン(AFP)もしくはインターフェロン、またはこれらの生物学的に活性な断片であるか、またはこれに特異的に結合する。さらなる態様では、第一または第二の結合部分(または、存在する場合には第三以降の結合部分)の1つまたは複数は、ナタリズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、ダクリズマブ、エファリズマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブ、トラスツズマブ、アバタセプト、エタネルセプト、ベルツズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、またはアナキンラである。別の態様では、該剤は診断剤または治療剤に結合している。一態様では、診断剤は検出可能標識、例えば、放射性タグ、生物発光タグ、蛍光タグ、重金属タグ、またはエピトープタグである。別の態様では、治療剤は細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、または免疫調節剤である。細胞毒性剤としては、アルキル化剤、抗生物質、抗腫瘍剤、抗増殖剤、代謝拮抗剤、チューブリンインヒビター、トポイソメラーゼIおよびIIのインヒビター、ホルモンのアゴニストもしくはアンタゴニスト、免疫調節剤、DNAマイナーグруппバインダー、および放射性剤、または、腫瘍細胞に結合して該細胞を殺傷できるかもしくは腫瘍細胞増殖を阻害できる、任意の剤が挙げられる。抗腫瘍剤としてはシクロホスファミド、カンプトテシン、ホモカンプトテシン、コルヒチン、コンプレスタチン、コンプレスタチン、リゾキシシン、ドリスタチン、アンサマイトシンp3、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリチアマイシン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル(5-FU)、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン、ラロキシフェン、レトロ

ゾール、エピルピシン、ベバシズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、およびこれらの誘導体が挙げられる。さらなる態様では、該剤は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合される。

【0019】

第八の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1、3、および6~15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列中の1つまたは複数の表面露出アミノ酸残基を、診断剤または治療剤の結合を可能にする化学修飾が可能な置換アミノ酸で置換することによって、HSAリンカーを作製するための方法の特徴とする。一態様では、置換アミノ酸はシステインであり、表面露出アミノ酸残基はセリンまたはトレオニンである。別の態様では、化学修飾によって、置換アミノ酸と診断剤または治療剤との間の共有結合が生じる。さらなる態様では、表面露出アミノ酸残基は、496位のトレオニン、58位のセリン、76位のトレオニン、79位のトレオニン、83位のトレオニン、125位のトレオニン、236位のトレオニン、270位のセリン、273位のセリン、304位のセリン、435位のセリン、478位のトレオニン、506位のトレオニン、または508位のトレオニンである。

10

【0020】

第九の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1、3、および6~15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列内の残基の1つまたは複数をアスパラギン、セリン、またはトレオニンで置換して、それによりHSA剤内部にグリコシル化部位を組み込むことによって、HSAリンカーを作製するための方法の特徴とする。

【0021】

第十の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1、3、および6~15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列内の残基アスパラギン、セリン、またはトレオニンのうちの1つまたは複数を、アスパラギン、セリン、またはトレオニン以外の任意のアミノ酸で置換し、それによりHSA剤からグリコシル化部位を取り除くことによって、HSAリンカーを作製するための方法の特徴とする。

20

【0022】

第十一の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 16~25に示されるアミノ酸配列の一つに対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、HSAリンカーを特徴とする。一態様では、該HSAリンカーはSEQ ID NO: 16~25に示されるアミノ酸配列のうちの一つに対して少なくとも95%の配列同一性を有する。別の態様では、該HSAリンカーはSEQ ID NO: 16~25に示されるアミノ酸配列のうち一つを含む。さらに別の態様では、該HSAリンカーはSEQ ID NO: 16~25に示されるアミノ酸配列のうち一つを有する。

30

【0023】

さらなる態様では、該HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、診断剤または治療剤に結合している。診断剤としては、検出可能標識、例えば放射性標識、生物発光標識、蛍光標識、もしくは重金属標識、またはエピトープタグが挙げられる。検出可能標識として役立ち得る蛍光分子としては、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、高感度GFP (eGFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP)、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、赤色蛍光タンパク質 (RFP) およびdsRedが挙げられる。一態様では、生物発光分子はルシフェラーゼである。別の態様では、エピトープタグはc-myc、赤血球凝集素、またはヒスチジンタグである。さらなる態様では、治療剤は、シトクロムc、カスパーゼ1~10、グランザイムAまたはB、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、TNF- β 、Fas、Fasリガンド、Fas関連死ドメイン様IL-1 β 変換酵素 (FLICE)、TRAIL/APO2L、TWEAK/APO3L、Bax、Bid、Bik、Bad、Bak、RICK、血管アポトーシス誘導性タンパク質1および2 (VAP1およびVAP2)、ピエリシン、アポトーシス誘導性タンパク質 (AIP)、IL-1 α プロピース (propiece) ポリペプチド、アポプチン、アポプチン関連タンパク質1 (AAP-1)、エンドスタチン、アンギオスタチン、およびこれらの生物学的に活性な断片などの、細胞毒性ポリペプチドである。HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、1つまたは複数の治療剤、例えば、シクロホスファミド、カンプトテシン、ホモカンプトテシン、コルヒチン、コンプレスタチン、コンプレスタチン、リゾキシシン、ドリスタチン、アンサマイトシンp3、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリ

40

50

チアマイシン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル (5-FU)、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン、ラロキシフェン、レトロゾール、エピルビシン、ベバシズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、およびこれらの誘導体と組み合わせる（例えば、薬学的組成物中で結合させるまたは混合する）ことができる。

【0024】

本明細書に記載の任意の局面のある態様では、第一および第二の結合部分（および、存在する場合には第三以降の結合部分のうちの1つまたは複数）が、同じ標的分子に特異的に結合する。任意の局面の別の態様では、第一および第二の結合部分（および、存在する場合には第三以降の結合部分のうちの1つまたは複数）が、異なる標的分子に特異的に結合する。任意の局面のさらなる態様では、第一および第二の結合部分（および、存在する場合には第三以降の結合部分のうちの1つまたは複数）が、同じ標的分子上の異なるエピトープに特異的に結合する。

10

【0025】

第十二の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列のアミノ酸残基25～44および494～513の1つまたは複数を含む、HSAリンカーを特徴とする。一態様では、該HSAリンカーは、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基25～70および450～513を含む。別の態様では、該HSAリンカーは、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基15～100および400～520を含む。さらなる態様では、該HSAリンカーは、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基10～200および300～575を含む。別の態様では、該HSAリンカーは、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基5～250および275～580を含む。

20

【0026】

本発明の第十二の局面では、該HSAリンカーは、HSAリンカーコンジュゲートを形成するために、少なくとも第一の結合部分に結合している。一態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、HSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に第一の結合部分を結合させる第一のペプチドコネクターを少なくとも含む。別の態様では、該第一のペプチドコネクターは、第一の結合部分をHSAリンカーに共有結合させる。さらなる態様では、該HSAリンカーは、第二の結合部分を含む。一態様では、該HSAリンカーは、第二の結合部分を該HSAリンカーに結合させる第二のペプチドコネクターを含む。他の態様では、第二のコネクターは、第二の結合部分をHSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に結合させる。さらなる態様では、第二のコネクターは、第二の結合部分をHSAリンカーに共有結合させる。他の態様では、該HSAリンカーは、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、または第十の結合部分を含む。他の態様では、これら追加の結合部分は、第一または第二の結合部分の一方または両方と一列になって存在する。さらに他の態様では、ペプチドコネクター（例えば、AAS、AAQ、またはAAAL (SEQ ID NO: 5)）によって、これらの追加の結合部分の1つまたは複数は、互いから、第一もしくは第二の結合部分から、またはHSAリンカーから隔てられる。

30

【0027】

本発明の第十二の局面では、該HSAリンカーは、該ポリペプチドリリンカーのアミノ末端に第一の結合部分を共有結合させる第一のペプチドコネクターと、該HSAリンカーのカルボキシ末端に第二の結合部分を共有結合させる第二のペプチドコネクターとを含む。一態様では、第一のコネクターはアミノ酸配列AASまたはAAQを有し、第二のコネクターはSEQ ID NO: 5に示されるアミノ酸配列を有する。

40

【0028】

本発明の第十二の局面では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、抗体、単鎖Fv分子、二重特異性単鎖Fv ((scFv')₂) 分子、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボディ、ホルモン、Fab断片、F(ab')₂分子、タンデムscFv (taFv) 断片、レセプター（例えば、細胞表面レセプター）、リガンド、アプタマー、またはこれらの生物学的に活性な断片である。一態様では、第一または第

50

二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）のうちの1つまたは複数
は、ヒト単鎖Fv分子またはヒト化単鎖Fv分子である。

【0029】

本発明の第十二の局面では、この第一および第二の結合部分（または存在する場合には
第三以降の結合部分）のうちの1つまたは複数が、インスリン様成長因子1レセプター（IG
F1R）、IGF2R、インスリン様成長因子（IGF）、間葉上皮移行因子レセプター（c-met；肝
細胞成長因子レセプター（HGFR）としても公知）、肝細胞成長因子（HGF）、上皮細胞成
長因子レセプター（EGFR）、上皮細胞成長因子（EGF）、ヘレグリン、線維芽細胞成長因
子レセプター（FGFR）、血小板由来成長因子レセプター（PDGFR）、血小板由来成長因子
（PDGF）、血管内皮成長因子レセプター（VEGFR）、血管内皮成長因子（VEGF）、腫瘍壊
死因子レセプター（TNFR）、腫瘍壊死因子 α （TNF- α ）、TNF- β 、葉酸レセプター（FOLR
）、葉酸、トランスフェリンレセプター（TfR）、メソセリン、Fcレセプター、c-kitレセ
プター、c-kit、インテグリン（例えば、 α 4インテグリンまたは β -1インテグリン）、P-
セレクチン、スフィンゴシン-1-リン酸レセプター-1（S1PR）、ヒアルロン酸レセプター
、白血球機能抗原-1（LFA-1）、CD4、CD11、CD18、CD20、CD25、CD27、CD52、CD70、CD80
、CD85、CD95（Fasレセプター）、CD106（血管細胞付着分子1（VCAM1）、CD166（活性化
白血球細胞接着分子（ALCAM））、CD178（Fasリガンド）、CD253（TNF関連アポトーシス
誘導性リガンド（TRAIL））、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、CCR5、CXCL12（間質細胞由来
因子1（SDF-1））、インターロイキン1（IL-1）、CTLA-4、MART-1、gp100、MAGE-1、エフ
リン（Eph）レセプター、粘膜アドレシ細胞付着分子1（MadCAM-1）、癌胎児性抗原（CE
A）、Lewis^y、MUC-1、上皮細胞接着分子（EpCAM）、癌抗原125（CA125）、前立腺特異的
膜抗原（PSMA）、TAG-72抗原、およびこれらの断片からなる群より選択されるタンパク質
であるかまたはこれに特異的に結合する。さらなる態様では第一または第二の結合部分
は、赤芽球白血球ウイルス癌遺伝子ホモログ（ErbB）レセプター（例えば、ErbB1レセプ
ター；ErbB2レセプター；ErbB3レセプター；およびErbB4レセプター）であるかまたはこれ
に特異的に結合する。別の態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場
合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、 α -フェトプロテイン（AFP）もしくはイ
ンターフェロン、またはこれらの生物学的に活性な断片であるか、またはこれに特異的に
結合する。さらなる態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第
三以降の結合部分）の1つまたは複数は、ナタリズマブ、インフリキシマブ、アダリムマ
ブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、ダクリズマブ、エファリズマブ、ゴ
リムマブ、セルトリズマブ、トラスツズマブ、アバタセプト、エタネルセプト、ペルツ
ズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、またはアナキンラである。

【0030】

本発明の第十二の局面では、該HSAリンカーは、診断剤、治療剤、またはその両方に結
合している。一態様では、診断剤は検出可能標識、例えば、放射性標識、蛍光標識、また
は重金属標識である。別の態様では、治療剤は細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、または免疫
調節剤である。細胞毒性剤としてはアルキル化剤、抗生物質、抗腫瘍剤、抗増殖剤、代謝
拮抗剤、チューブリンインヒビター、トポイソメラーゼIもしくはIIのインヒビター、ホ
ルモンのアゴニストもしくはアンタゴニスト、免疫調節剤、DNAマイナーグループバイン
ダー、および放射性剤、または、腫瘍細胞に結合して該細胞を殺傷できるかもしくは腫瘍
細胞増殖を阻害できる任意の剤が挙げられる。抗腫瘍剤としてはシクロホスファミド、カ
ンプトテシン、ホモキャンプトテシン、コルヒチン、コンプレスタチン、コンプレスタチン
、リゾキシシン、ドリスタチン、アンサマイトシンp3、メイタンシノイド、アウリスタチン
、カリチアマイシン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル（5-FU）、ドキソルビシン
、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン、ラ
ロキシフェン、レトロゾール、エピルビシン、ベバシズマブ、ペルツズマブ、トラスツズ
マブ、およびこれらの誘導体が挙げられる。一態様では、結合したHSAリンカーは、薬学
的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合される。別の態様では、該HSAリンカ
ーは、6時間～7日間のインビボ半減期を呈する。さらなる態様では、該HSAリンカーは8時

間超のインビボ半減期を呈する。

【0031】

本発明の第十三の局面は、本発明の前述の局面（一～十二）のいずれかの剤であって、該HSAリンカーが別のポリペプチドリinkerで置き換えられた剤を特徴とする。例えば、ポリペプチドリinker配列は、哺乳動物、非ヒト血清アルブミンポリペプチド配列、例えば、ウシ、マウス、ネコ、およびイヌの血清アルブミン（BSA）ポリペプチド配列などであってもよい。他の態様では、このポリペプチドリinker配列は、5～1,000アミノ酸長、例えば、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、もしくは900アミノ酸長、またはこの範囲内の任意の数のアミノ酸である。他の態様では、ポリペプチドリinker配列は、単一のアミノ酸（例えば、これらに限定されるわけ
10
ではないが、グリシン、アラニン、セリン、グルタミン、ロイシン、およびバリンが挙げられる）またはアミノ酸の組み合わせを含む。

【0032】

別の態様では、HSAリンカーは、 α -フェトプロテイン（AFP）ポリペプチド、例えば哺乳動物AFPポリペプチド、例えばヒト、マウス、ウシ、またはイヌのAFPポリペプチドによって置き換えられる。ある態様では、AFPリンカーは、全長ヒトAFPポリペプチド配列（アミノ酸1～609；SEQ ID NO: 58）、シグナル配列のアミノ酸1～18を欠いている成熟ヒトAFPポリペプチド配列（SEQ ID NO: 58のアミノ酸19～609）、またはこれらの断片に相当する。他の態様では、AFPポリペプチドリinkerは、SEQ ID NO: 58の少なくとも5～8個の連続アミノ酸、好ましくは少なくとも10、20、または50個の連続アミノ酸、より好ましくは
20
少なくとも100個の連続のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも200、300、400個、もしくはそれ以上の連続アミノ酸を含むか、あるいは、これらの長さのうちの1つまたは複数を有するSEQ ID NO: 58の連続ポリペプチド配列に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、少なくとも95%、97%、99%、またはそれ以上の配列同一性）を有する。例えば、SEQ ID NO: 58のアミノ酸446～479

(LSEDKLLACGEGAADIHGLCIRHEMTPVNPVG; SEQ ID NO: 59)

に相当する34merのヒトAFPペプチドに対して90%の配列同一性を有するAFPポリペプチドリinker配列は、SEQ ID NO: 58の446～479セグメントから改変されたアミノ酸を最大3個含む。生物学的に活性なヒトAFP断片における配列変更のこのような例の一つは、米
30
国特許第5,707,963号（参照により本明細書に組み入れられる）で見出され、これは例えば、2つのアミノ酸残基（SEQ ID NO: 59のアミノ酸9および22）に柔軟性（flexibility）を有するヒトAFPの34アミノ酸断片（SEQ ID NO: 59）を開示している。AFPポリペプチドリinker配列のその他の例としては、例えば、SEQ ID NO: 58のアミノ酸19～198（ヒトAFPドメインI）、SEQ ID NO: 58のアミノ酸217～408（ヒトAFPドメインII）、SEQ ID NO: 58のアミノ酸409～609（ヒトAFPドメインIII）、SEQ ID NO: 58のアミノ酸19～408（ヒトAFPドメインI+II）、SEQ ID NO: 58のアミノ酸217～609（ヒトAFPドメインII+III）、およびSEQ ID NO: 58のアミノ酸285～609（ヒトAFP断片I）が挙げられる。別の態様では、ヒトAFPポリペプチドリinker配列は、SEQ ID NO: 58のアミノ酸489～496を含む8アミノ酸の配列（すなわち、EMTPVNP）である。

【0033】

本発明の第十四の局面は、HSAリンカー、HSAリンカーコンジュゲート、または上述の第一、第二、第三、第四、第五、第十一、第十二、および第十三の局面に記載される任意の他の剤のいずれかを包含する、キットを特徴とする。キットは、実施者（例えば、医師、看護師、または患者）がそれに含まれる組成物および剤を投与することを可能にするための説明書をさらに備える。一態様では、キットは、剤の有効量を含む、例えば、本明細書記載のHSAリンカーコンジュゲートまたは、例えば、1つもしくは複数の結合部分（例えば、抗体または抗体断片（例えば、scFv））、診断剤（例えば、放射性核種またはキレート剤）、および/もしくは治療剤（例えば、細胞毒性剤または免疫調節剤）を含む、HSAリンカーの有効量を含む、単一用量または複数回用量の薬学的組成物の複数のパッケージを備える。任意で、薬学的組成物を投与するために必要な説明書またはデバイスをキットに含
40
50

めてもよい。例えばキットは、HSAリンカーコンジュゲートもしくはHSAリンカー、またはそれに結合した任意の結合剤、診断剤および/もしくは治療剤の有効量を含む、1つまたは複数の充填済み注射器を提供し得る。さらにキットは、疾患または病状（例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管系疾患）に罹患している患者が、例えばHSAリンカーコンジュゲートもしくはHSAリンカーまたはそれに結合した任意の結合剤、診断剤、および/もしくは治療剤を含む薬学的組成物を用いるための説明書または投与スケジュールなどの、追加の構成要素を備えてもよい。

【0034】

定義

「抗体」という用語は、本明細書において互換的に用いる場合、抗体または免疫グロブリンの全体および、任意の抗原結合断片またはその鎖を包含する。抗体とは、本明細書において用いる場合、哺乳動物（例えば、ヒトまたはマウス）のものでもよく、ヒト化されても、キメラであっても、組み換えられていても、合成的に作製されても、または天然から単離されてもよい。ヒトを含むほとんどの哺乳動物では、抗体全体とは、ジスルフィド結合によって接続された少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を有する。各々の重鎖は、重鎖可変領域（本明細書において V_H と省略される）および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、3つのドメインである C_{H1} 、 C_{H2} 、および C_{H3} 、ならびに C_{H1} と C_{H2} との間のヒンジ領域からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書において V_L と省略される）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、一つのドメインである C_L からなる。 V_H および V_L 領域はさらに、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域と、より保存された、散在するフレームワーク領域（FR）と呼ばれる領域に細分することができる。 V_H および V_L は各々、3つのCDRと4つのFRから構成され、これらは、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で、整列されている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）、および古典的な補体系の第一成分（C1q）などを含む宿主の組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。本発明の抗体には、全ての公知の形態の抗体および抗体様特性を有するその他のタンパク質骨格が挙げられる。例えば抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、または抗体様特性を有するタンパク質骨格、例えばフィブロネクチンまたはアンキリンリピートであってもよい。抗体はまた、Fab、Fab'2、scFv、SMIP、ダイアボディ、ナノボディ、アプタマー、またはドメイン抗体であってもよい。抗体は、以下のアイソタイプの一つを有してもよい：IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4）、IgM、IgA（例えば、IgA1、IgA2、およびIgAsec）、IgD、またはIgE。本明細書において規定される結合部分として、HSAリンカーと組み合わせて使用可能な抗体には、これらに限定されるわけではないが、ナタリズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、リツキシマブ、アレムツマブ、ベバシズマブ、ダクリズマブ、エファリズマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブ、トラストズマブ、アバタセプト、エタネルセプト、ペルツマブ、セツキシマブ、およびパニツマブが含まれる。

【0035】

「抗体断片」という用語は、本明細書において用いる場合、抗原（例えば、ErbB2）に特異的に結合する能力を保持している抗体の1つまたは複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって発揮することが可能である。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例としては、これらに限定されるわけではないが、以下が挙げられる：(i) Fab断片、 V_L 、 V_H 、 C_L および C_{H1} ドメインからなる一価断片；(ii) $F(ab')_2$ 断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合した2つのFab断片を含む二価断片；(iii) V_H および C_{H1} ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単独のアームの V_L および V_H ドメインからなるFv断片；(v) V_H および V_L ドメインを含むdAb；(vi) V_H ドメインからなるdAb断片（Wardら、Nature 341:544~546（1989））；(vii) V_H または V_L ドメインからなるdAb；(viii) 単離された相補性決定領域（CDR）；ならびに（ix）任意で合成リンカーによって接続され得る、2つ以上の単離されたCDRの組み合わせ。さらに、Fv断片

の2つのドメインである V_L および V_H は別々の遺伝子によってコードされているが、組換え法を用いて、これらを、 V_L および V_H 領域が対になって一価の分子を形成する単一のタンパク質鎖（単鎖Fv（scFv）として公知；例えば、Birdら、Science 242:423～426（1988）；ならびに、Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879～5883（1988）を参照のこと）として作製することが可能である合成リンカーによって、接続することができる。これらの抗体断片は当業者に公知の従来技術を用いて得られ、かつ該断片は、無傷の抗体と同じ様式で有用性についてスクリーニングされる。抗体断片は、組み換えDNA技術によって、または無傷の免疫グロブリンの酵素切断もしくは化学切断によって作製することができる。

【0036】

「自己免疫疾患」とは、自己のエピトープまたは抗原に対して免疫系応答が生じる疾患を意味する。自己免疫疾患の例としては、これらに限定されるわけではないが、円形脱毛症、強直性脊髄炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー皮膚炎、慢性疲労免疫機能障害症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発神経神経障害、チャージ・スト劳斯症候群、癰痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状狼瘡、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛-線維筋炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、甲状腺機能低下症、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病、若年性関節炎、扁平苔癬、ループス、メニエール病、混合結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多内分泌腺症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフーマン症候群、全身性エリテマトーデス（SLE）、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎（例えば、散弾状脈絡網膜炎およびサルコイドブドウ膜炎）、脈管炎、白斑、ウェゲネル肉芽腫症および重症筋無力症が挙げられる。

【0037】

「結合部分」とは標的のエピトープ、抗原、リガンド、またはレセプターに特異的に結合する任意の分子を意味する。結合部分としては、これらに限定されるわけではないが、抗体（例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組み換え抗体、ヒト化抗体、およびキメラ抗体）、抗体断片（例えば、Fab断片、Fab'2、scFv抗体、SMIP、ドメイン抗体、ダイアボディ、ミニボディ、scFv-Fc、アフイボディ、ナノボディ、およびドメイン抗体）、レセプター、リガンド、アプタマー、および、公知の結合パートナーを有するその他の分子が挙げられる。

【0038】

「生物学的に活性である」とは、核酸、ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質などの生物学的分子を含む分子が、それ自体または他の分子に対して物理的または化学的な活性を発揮することを意味する。例えば、「生物学的に活性な」分子は、例えば、酵素的活性、タンパク質結合活性（例えば、抗体相互作用）、あるいは細胞毒性活性を有してもよく、「生物学的に活性」である。

【0039】

「キメラ抗体」という用語は、第一の種に由来する可変領域と、第二の種に由来する定常領域とを有する、免疫グロブリンまたは抗体を指す。キメラ抗体は、例えば、別々の種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから（例えば、マウスおよびヒトから）、遺伝子操作によって構築され得る。

【0040】

「コネクター」または「ペプチドコネクター」とは、HSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端の一方もしくは両方に共有結合しているか、またはHSAリンカーの1つもしくは複数の残基（例えば、アミノ末端残基とカルボキシ末端残基の間の残基）に共有結合

10

20

30

40

50

している、2～20残基長のアミノ酸配列を意味する。好ましい態様では、HSAリンカーのアミノ末端に結合したペプチドコネクターはアミノ酸配列AASまたはAAQを有し、カルボキシ末端に結合したコネクターはアミノ酸配列AAAL (SEQ ID NO: 5) を有する。

【0041】

「有効量」または「～に有効な量」または「治療上有効量」という用語は、剤（例えば、コネクター配列有りまたは無しで1つもしくは複数の結合部分または診断剤または治療剤と結合させたHSAリンカー）が、所望の結果、例えば、癌細胞の殺傷、腫瘍細胞増殖の低減、疾患組織もしくは器官における炎症の低減、または組織、器官、もしくは生物体（例えば、ヒト）における特定の細胞集団の標識をもたらすのに十分な量を意味する。

【0042】

「ヒト抗体」という用語は、本明細書において用いる場合、例えばKabatら、(Sequences of proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242(1991)) によって記載される、フレームワーク領域とCDR領域の両方がヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来するような可変領域を有する抗体、またはその断片を含むことが意図される。さらに、抗体が定常領域を含む場合、該定常領域もヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列由来である。ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基（例えば、インビトロにおける無作為もしくは部位特異的な突然変異誘発またはインビボにおける体細胞変異によって導入された変異）を含んでもよい。しかしながら、「ヒト抗体」という用語は、本明細書において用いる場合、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列がヒトのフレームワーク配列に移植された抗体（すなわち、ヒト化抗体または抗体断片）を含むことは意図していない。

【0043】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリンまたはヒト抗体に実質的に由来する可変フレームワーク領域を含む可変領域を有する少なくとも一つの免疫グロブリンドメインと、非ヒト免疫グロブリンまたは非ヒト抗体に実質的に由来する相補性決定領域（例えば、少なくとも一つのCDR）とを含む、任意の抗体または抗体断片を指す。

【0044】

本明細書において用いる場合、「炎症性シグナル伝達インヒビター」または「ISI」とは、炎症促進性サイトカイン（例えば、TNF- α 、TNF- β 、またはIL-1）とそのレセプター（例えばそれぞれ、TNFレセプター1もしくは2、またはIL-1レセプター）との間の結合を低下させる剤；炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子（例えば、CD20、CD25、CTLA-4、CD80/CD86、またはCD28）と活性化分子との結合を低下させる剤；あるいは、炎症促進性サイトカインとそのレセプターとの結合の後に、または炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子と活性化分子との結合の後に活性化される細胞内シグナル伝達分子の下流の活性化またはその活性を低下させる剤（例えば、p38 MAPKシグナル伝達経路におけるシグナル伝達分子の活性化またはその活性を低下させる剤）である。ISIによって媒介される該低下とは、炎症促進性サイトカインとそのレセプターとの間の結合の低下、炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子と活性化分子との結合の低下、あるいは、炎症促進性サイトカインとそのレセプターとの結合の後に起こるか、または炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子と活性化分子との結合の後に起こる、細胞内シグナル伝達の低下である。好ましくは、ISIによって媒介されるそのような低下は、少なくとも約10%、好ましくは少なくとも20%、30%、40%、または50%、より好ましくは少なくとも60%、70%、80%、または90%（最大100%）の低下である。ISIは、レセプターへの結合のために自由に使用可能な炎症促進性サイトカイン（例えば、TNF- α 、TNF- β 、またはIL-1）の量を減らすことによって作用し得る。例えばISIは、可溶性の炎症促進性サイトカインレセプタータンパク質（例えば、可溶性のTNFレセプター融合タンパク質、例えば、エタネルセプト (ENBRELEXTM (登録商標)) またはレネルセプト）であってもよく、または、可溶性で炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子（例えば、可溶性CTLA-4 (アバタセプト)）であってもよく、または、炎症促進性サイトカインもしくは炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子に対する抗体（例えば、抗

TNF抗体、例えば、アダリムマブ、セルトリズマブ、インフリキシマブ、もしくはゴリムマブ；抗CD20抗体、例えば、リツキシマブ；またはTRU-015 (Trubion Pharmaceuticals))であってもよい。さらにISIは、内因性の野性型炎症促進性サイトカインまたは炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子がそのレセプター（例えば、TNFレセプター1もしくは2、IL-1レセプター-例えばアナキンラ、またはCD11a-例えばエファリズマブ (RAPTIVA (登録商標)、Genentech)) に結合する能力を妨害することによって作用し得る。ドミナントネガティブなTNF- α 変異体の例は、XENP345 (TNF変異体A145R/I97Tのペグ化型) およびXproTM1595、ならびに、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第20030166559号および同第20050265962号に開示された、さらなる変異体である。ドミナントネガティブなIL-1変異体の例はアナキンラ (KINERET (登録商標)) であり、これは、細胞内のシグナル伝達経路を活性化することなくIL-1レセプターに結合するIL-1の可溶型である。本発明で使用可能な炎症性シグナル伝達インヒビターはまた、炎症促進性サイトカインまたは炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子（例えば、DE 096) の下流のシグナル伝達経路を阻害または低減する低分子でもある。この種のISIの例としてはp38 MAPキナーゼのインヒビター、例えば、5-アミノ-2-カルボニルチオペン (thiopene) 誘導体 (本明細書に組み入れられる、WO 04/089929に記載) ; ARRY-797; BIRB 796 BS、(1-5-tert-ブチル-2-p-トリル-2H-ピラゾール-3-イル)-3-[4-2 (モルホリン-4-イル-エトキシ)-ナフタレン-1-イル]-尿素) ; CHR-3620; CNI-1493; FR-167653 (藤沢薬品、日本、大阪) ; ISIS 101757 (Isis Pharmaceuticals) ; ML3404; NPC31145; PD169316; PHZ1112; RJW67657、(4-(4-(4-フルオロフェニル)-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル)-3-ブチン-1-オール; SC10-469; SB202190; SB203580、(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジニル) 1H-イミダゾール) ; SB239063、トランス-1-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)-4-(4-フルオロフェニル-メトキシピリジミジン-4-イル) イミダゾール; SB242235; SD-282; SKF-86002; TAK 715; VX702; およびVX745が挙げられる。さらに、ISIは、炎症促進性サイトカイン（例えば、TNF- α およびTNF- β) がその膜結合型から可溶性型へとプロセッシングされることを妨げ得る。TACEのインヒビターはこのクラスのISIである。TACEのインヒビターの例としては、BB-1101、BB-3103、BMS-561392、ブチニルオキシフェニル β -スルホンピペリジンヒドロキシマート (hydroxamate)、CH4474、DPC333、DPH-067517、GM6001、GW3333、Ro 32-7315、TAPI-1、TAPI-2、およびTMI 005が挙げられる。ISIの追加の例としては、疾患特異的な免疫調節活性について操作された、大腸菌 (E. coli) の熱ショックタンパク質由来の短いペプチドが挙げられる (例えば、dnaJPI) 。

【0045】

「インテグリンアンタゴニスト」とは、インテグリン分子、例えばインテグリン分子の $\alpha 4$ サブユニットの生物学的活性を低減または阻害する (例えば、インテグリンアンタゴニスト非存在下の生物学的活性に対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、またはそれ以上の低減または阻害)、任意の剤を意味する。該剤は、 $\alpha 4$ インテグリンサブユニット (NCBIアクセッション番号P13612; Takadaら、EMBO J. 8:1361~1368(1989)) の活性または発現を阻害することによって、直接的または間接的に $\alpha 4$ インテグリンサブユニットに作用してもよく、 $\alpha 4$ サブユニットを含む無傷のインテグリンが結合する標的に作用してもよい。例えば、血管細胞接着分子-1 (VCAM-1) に結合することによって $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンとVCAM-1との結合を妨げる抗体またはブロックペプチドは、本発明の目的に関してインテグリンアンタゴニストとみなされる。本発明での使用に適した非限定的な例示的インテグリンアンタゴニストとしては、タンパク質、ブロックペプチド、抗体、例えばナタリズマブ (TYSABRI (登録商標))、および低分子インヒビターを挙げることができる。 $\alpha 4$ インテグリンアンタゴニストの例としては、これらに限定されるわけではないが、ナタリズマブ (Elan/Biogen Idec; 例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,840,299号; 同第6,033,665号; 同第6,602,503号; 同第5,168,062号; 同第5,385,839号; および同第5,730,978号を参照されたい)、oMEPUPA-V (Biogen; 参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,495,525

号)、アレファセプト、CDP-323 (Celltech) ; フィラテグラスト (SB-68399; GlaxoSmithKline) ; TR-9109 (Pfizer) ; ISIS-107248 (Antisense Therapeutics) ; R-1295 (Roche) ; およびTBC-4746 (Schering-Plough) が挙げられる。 α 4インテグリンアンタゴニストのさらなる非限定的な例としては、以下に記載の低分子が挙げられる：米国特許第5,821,231号；同第5,869,448号；同第5,936,065号；同第6,265,572号；同第6,288,267号；同第6,365,619号；同第6,423,728号；同第6,426,348号；同第6,458,844号；同第6,479,666号；同第6,482,849号；同第6,596,752号；同第6,667,331号；同第6,668,527号；同第6,685,617号；同第6,903,128号；および同第7,015,216号（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる）；米国特許出願公開第2002/0049236号；同第2003/0004196号；同第2003/0018016号；同第2003/0078249号；同第2003/0083267号；同第2003/0100585号；同第2004/0039040号；同第2004/0053907号；同第2004/0087574号；同第2004/0102496号；同第2004/0132809号；同第2004/0229858号；同第2006/0014966号；同第2006/0030553号；同第2006/0166866号；同第2006/0166961号；同第2006/0241132号；同第2007/0054909号；および同第2007/0232601号（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる）；欧州特許EP 0842943；EP 0842944；EP 0842945；EP 0903353；およびEP 0918059；ならびに国際公開公報WO 95/15973；WO 96/06108；WO 96/40781；WO 98/04247；WO 98/04913；WO 98/42656；WO 98/53814；WO 98/53817；WO 98/53818；WO 98/54207；WO 98/58902；WO 99/06390；WO 99/06431；WO 99/06432；WO 99/06433；WO 99/06434；WO 99/06435；WO 99/06436；WO 99/06437；WO 99/10312；WO 99/10313；WO 99/20272；WO 99/23063；WO 99/24398；WO 99/25685；WO 99/26615；WO 99/26921；WO 99/26922；WO 99/26923；WO 99/35163；WO 99/36393；WO 99/37605；WO 99/37618；WO 99/43642；WO 01/42215；およびWO 02/28830；これら全てが参照により本明細書に組み入れられる。 α 4インテグリンアンタゴニストのさらなる例としては、以下に記載のフェニルアラニン誘導体が挙げられる：米国特許第6,197,794号；同第6,229,011号；同第6,329,372号；同第6,388,084号；同第6,348,463号；同第6,362,204号；同第6,380,387号；同第6,445,550号；同第6,806,365号；同第6,835,738号；同第6,855,706号；同第6,872,719号；同第6,878,718号；同第6,911,451号；同第6,916,933号；同第7,105,520号；同第7,153,963号；同第7,160,874号；同第7,193,108号；同第7,250,516号；および同第7,291,645号（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる）。 α 4インテグリンアンタゴニストであるさらなるアミノ酸誘導体としては、以下に記載のものが挙げられる：例えば、米国特許出願公開第2004/0229859号および同第2006/0211630号（参照により本明細書に組み入れられる）；ならびに国際公開公報WO 01/36376；WO 01/47868；およびWO 01/70670；これら全てが参照により本明細書に組み入れられる。 α 4インテグリンアンタゴニストのその他の例としては、以下に記載のペプチド、およびペプチドと半ペプチド (semi-peptide) の化合物が挙げられる：例えば、国際公開公報WO 94/15958；WO 95/15973；WO 96/00581；WO 96/06108；WO 96/22966 (Leu-Asp-Valトリペプチド；Biogen, Inc.) ；WO 97/02289；WO 97/03094；およびWO 97/49731。 α 4インテグリンアンタゴニストのさらなる例としては、以下に記載のペグ化分子が挙げられる：米国特許出願公開第2007/066533号（参照により本明細書に組み入れられる）。 α 4インテグリンアンタゴニストである抗体の例としては、以下に記載のものが挙げられる：例えば、国際公開公報WO 93/13798；WO 93/15764；WO 94/16094；およびWO 95/19790。さらなる α 4インテグリンアンタゴニストの例は、本明細書に記載される。

【0046】

「インターフェロン」とは、哺乳動物（例えばヒト）のインターフェロン- α 、- β 、- γ 、もしくは- τ のポリペプチド、またはこれらの生物学的に活性な断片、例えば、IFN- α （例えばIFN- α -1a；参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願第20070274950号を参照されたい）、IFN- α -1b、IFN- α -2a（参照により本明細書に組み入れられる国際公開公報WO 07/044083を参照されたい）、およびIFN- α -2b）、IFN- β （例えば参照により組み入れられる米国特許第7,238,344号；参照により組み入れられる米国特許第6,962,978に記載のIFN-b-1a (AVONEX (登録商標) およびREBIF (登録商標))、およびIFN- β -1b（その全文が参照により組み入れられる、米国特許第4,588,585号；同第4,959,314号；同

第4,737,462号；および同第4,450,103号に記載のBETASERON（登録商標））、IFN-g、ならびにIFN-t（参照により組み入れられる米国特許第5,738,845号および米国特許出願公開第20040247565号および同第20070243163号に記載）を意味する。

【0047】

「HSAリンカーコンジュゲート」とは、1つまたは複数の結合部分、ペプチドコネクター、診断剤、または治療剤と組み合わせられた（好ましくは共有結合した）、ヒト血清アルブミン（HSA）リンカーを意味する。

【0048】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書において使用する場合、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、該集団を含む個々の抗体は、僅かな量で存在し得る潜在的な天然の変異を除いて、同一である。モノクローナル抗体は極めて特異的であって、単一の抗原部位に対して指向している。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して指向した様々な抗体を典型的には含む従来の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対して指向している。モノクローナル抗体は、任意の当技術分野で認められている技術、および本明細書に記載される技術、例えば、Kohlerら、Nature, 256:495（1975）に記載されるハイブリドーマ法、トランスジェニック動物（例えば、Lonbergら、Nature 368（6474）:856～859（1994））、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号）を用いて、または、例えばClacksonら、Nature, 352:624～628（1991）およびMarksら、J. Mol. Biol, 222:581～597（1991）に記載の技術を用いるファージ、酵母、もしくは合成骨格（scaffold）抗体ライブラリーを用いて、調製することができる。

【0049】

「薬学的に許容される担体」とは、治療される哺乳動物に生理学的に許容される一方で一緒に投与される化合物の治療特性を保持する、担体を意味する。薬学的に許容される担体の一例は生理食塩水である。その他の生理学的に許容される担体およびそれらの配合は当業者に公知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences,（第18版）, ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載される。

【0050】

「増殖性疾患」または「癌」とは、異常なまたは無秩序な細胞増殖を特徴とする任意の病態を意味する。増殖性疾患の例としては例えば、固形腫瘍、例えば、肉腫（例えば、明細胞肉腫）、癌腫（例えば、腎細胞癌）、およびリンパ腫；乳癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、中咽頭癌、下咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢癌、胆管癌、小腸癌、泌尿器系（腎臓、膀胱および尿管の上皮を含む）の癌、女性生殖器系（子宮頸、子宮、卵巣、絨毛癌および妊娠性栄養膜）の癌、男性生殖器系（前立腺、精嚢および精巣を含む）の癌、内分泌腺（甲状腺、副腎および下垂体を含む）の癌、皮膚（血管腫、黒色腫、骨または軟部組織由来の肉腫およびカポジ肉腫を含む）の癌；脳および髄膜（星状細胞腫、神経膠腫、神経膠芽細胞腫、網膜芽腫、神経腫、神経芽腫、神経鞘腫および神経芽腫を含む）の癌、神経の癌、眼の癌、造血系の癌（緑色白血病、プラズマ細胞腫、および真皮T細胞リンパ腫/白血病を含む）、ならびに免疫系の癌（リンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫および非ホジキン病リンパ腫を含む）が挙げられる。非固形腫瘍増殖性疾患の例は白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）である。

【0051】

「組み換え抗体」という用語は、組み換え手段によって調製、発現、作製または単離された抗体、例えば以下を指す：（a）免疫グロブリン遺伝子（例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子）について遺伝子導入されたか染色体導入された動物（例えば、マウス）から、またはそこから調製されたハイブリドーマから、単離された抗体、（b）抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された該抗体、（c）ファージ、酵母、または合成骨格ディスプレイを用いる組み換えコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒト抗体配列を含む）から単離された抗体、ならびに（d）免疫グロブリン遺伝子配列（例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子）を他のDNA配列へと

スプライシングする工程を伴う任意の他の手段によって調製、発現、作製、または単離された、抗体。

【0052】

「特異的に結合する」とは、結合部分（例えば、本明細書に記載の抗体、抗体断片、レセプター、リガンド、または剤の低分子部分）と、標的分子を欠く非標的細胞または組織ではなく、標的分子（例えば、分泌された標的分子、例えばサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、レセプター、またはリガンド）との、または標的分子（例えば、細胞表面抗原、例えばレセプターまたはリガンド）を保有する細胞もしくは組織との、優先的な結合を意味する。結合部分と非標的分子（単独でまたは細胞もしくは組織と共に存在する）との間で、ある程度 of 非特異的な相互作用が起こり得ることが認識される。それにもかかわらず、特異的結合は、標的分子の特異的認識を通じて媒介されるとして区別され得る。特異的結合は、例えば標的分子（例えば、抗原）を保有する細胞と結合部分（例えば、抗体）との間に、例えば標的分子を欠いている細胞と結合部分との間よりも強力な結合をもたらす。特異的結合は典型的に、例えば、標的分子またはマーカーを欠いている細胞または組織と比較して、該標的分子またはマーカーを保有している細胞または組織に結合した結合部分の量（単位時間あたり）を、2倍超、好ましくは5倍超、より好ましくは10倍超、最も好ましくは100倍超に増大させる。結合部分は、例えば、 10^{-6} M未満、より好ましくは 10^{-7} M未満、 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満、 10^{-10} M未満、 10^{-11} M未満、または 10^{-12} M未満、最も好ましくは 10^{-13} M未満、 10^{-14} M未満、または 10^{-15} M未満の解離定数で、標的分子またはマーカーに結合する。そのような条件下でのタンパク質への特異的結合には、該特定のタンパク質に対する特異性について選択された結合部分が必要である。種々のアッセイ形式が、特定の標的分子に特異的に結合できる結合部分（例えば、抗体）を選択するのに適している。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質との特異的免疫反応性を有するモノクローナル抗体を選択するのに常用される。特異的免疫反応性を決定するために使用できるイムノアッセイの形式および条件の記載については、Harlow & Lane、Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Publications、New York(1988)を参照のこと。

【0053】

（参照配列に対してポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列を比較する文脈において）「配列同一性」とは、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列が、該参照配列と同一であるか、または、二つの配列を最適に整列させた場合に該参照配列内の対応する位置において同一であるヌクレオチド残基もしくはアミノ酸残基を所与のパーセンテージで有することを意味する。

【0054】

「表面露出アミノ酸残基」または「表面露出した」とは、折り畳まれかつ立体配置的に正しい三次構造であるHSAポリペプチドの外面上に存在する、アミノ酸残基を意味する。このような残基は、診断剤または治療剤の部位特異的結合を可能にするように、例えば、化学反応性を有する他のアミノ酸（例えば、システイン）で置換することができる。さらに、表面露出アミノ酸残基は、グリコシル化を（例えば、セリン、トレオニン、もしくはアスパラギン残基、またはグリコシル化モチーフの追加によって）可能にするかまたは（例えば、セリン、トレオニン、もしくはアスパラギン残基、またはグリコシル化モチーフの除去によって）妨害するように、置換することができる。表面露出アミノ酸残基としては、これらに限定されるわけではないが、496位のトレオニン、58位のセリン、76位のトレオニン、79位のトレオニン、83位のトレオニン、125位のトレオニン、236位のトレオニン、270位のセリン、273位のセリン、304位のセリン、435位のセリン、478位のトレオニン、506位のトレオニン、および508位のトレオニンが挙げられる（アミノ酸の番号付けは、例えば、SEQ ID NO: 1に示されるHSAリンカーの配列を基準とする）。他の表面露出残基は、HSA結晶構造を用いて当業者によって同定され得る（Sugioら、「Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution」Protein Eng. 12:439~446 (1999)）。

【0055】

「対象」とは、ヒト患者または、ヒト腫瘍細胞を有するヌードマウス異種移植モデルを指す。

【0056】

「標的分子」または「標的細胞」とは、結合部分（例えば、抗体）または1つもしくは複数の結合部分を含むHSAコンジュゲート（例えば、1つまたは複数の抗体または抗体断片に結合したHSAリンカー）が特異的に結合できる分子（例えば、タンパク質、エピトープ、抗原、レセプター、またはリガンド）または細胞を意味する。好ましい標的分子は標的細胞の外側に露出している（例えば、細胞表面タンパク質または分泌タンパク質）が、標的分子は代替的にもしくはさらに、標的細胞の内側に存在してもよい。

【0057】

好ましくは、「治療」により、対象における、ヒトの疾患もしくは障害（例えば、自己免疫疾患または増殖性疾患）の進行もしくは重症度が、または、ヒトの該疾患または障害の1つまたは複数の症状の進行、重症度、もしくは頻度が、低減（例えば、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%までも）する。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】例示的なHSAリンカーコンジュゲートの模式図を示す図である。アミノ末端結合部分とHSAリンカーとの間のコネクターは、アラニン-アラニン-セリンの配列を有する。HSAリンカーとカルボキシ末端結合部分との間のコネクターはアラニン-アラニン-アラニン-ロイシンの配列（SEQ ID NO: 5）を有する。

【図2】B2B3変異体がZR75-1乳癌細胞においてHRG誘導性pErbB3を阻害することを示すグラフである。

【図3A】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-2（A5-HSA-B1D2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ErbB3の阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図3B】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-1（H3-HSA-B1D2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ErbB3の阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図3C】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-10（H3-HSA-F5B6H2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ErbB3の阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図3D】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-8（F4-HSA-F5B6H2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ErbB3の阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図4A】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-2（A5-HSA-B1D2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化AKTの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図4B】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-1（H3-HSA-B1D2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化AKTの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図4C】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-10（H3-HSA-F5B6H2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化AKTの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図4D】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-8（F4-HSA-F5B6H2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化AKTの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図5A】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-2（A5-HSA-B1D2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ERKの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

10

20

30

40

50

【図 5 B】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-1 (H3-HSA-B1D2) における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ERKの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図 5 C】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-10 (H3-HSA-F5B6H2) における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ERKの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図 5 D】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-8 (F4-HSA-F5B6H2) における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ERKの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図 6】B2B3-1変異体によるBT474乳癌細胞の処理がG1停止およびS期の細胞数の減少をもたらすことを示すグラフである。

【図 7】BT-474-M3細胞と1 μ M B2B3-1のプレインキュベーションによってHRGの結合が実質的に遮断されることを示すフローサイトメトリーヒストグラムである。

【図 8】図8A～図8Dは、B2B3-1がB-T474-M3細胞株およびZR75-30細胞株におけるErbB3およびAKTのリン酸化を阻害することを示すグラフである。乳癌細胞株BT-474-M3 (図8Aおよび図8C) およびZR75-30 (図8Bおよび図8D) を、24時間にわたりB2B3-1の用量滴定によって前処理し、次いで10分間にわたり5nMのHRG 1 β EGFドメインで刺激した。その後、ErbB3およびAKTのリン酸化状態をELISAアッセイを用いて調べた。

【図 9】BT474乳癌細胞におけるシグナル伝達タンパク質に対する漸増濃度のB2B3-1による処理の有効性を示す、ウェスタンブロットの写真である。「p-」は、チロシンリン酸化型のシグナル伝達タンパク質を示す。 β チューブリン (本文脈においてシグナル伝達タンパク質ではない) は、ローディング対照を規定する。 β チューブリン (本文脈においてシグナル伝達タンパク質ではない) は、ローディング対照を規定する。

【図 10】B2B3-1処理したBT474乳癌細胞の免疫沈降を示すウェスタンブロットの写真である。 β チューブリンは、免疫沈降反応に入力された細胞タンパク質のレベルに関する対照を規定する。

【図 11】図11A～図11Cは、BT-474細胞株のB2B3-1処理により、G1停止およびS期における細胞数の減少をもたらされること (図11A)、および、処理なしの細胞と比較してBT-474細胞およびSKBr3細胞の両方においてコロニー形成が阻害されること (図11B) を示すグラフである。さらに、B2B3-1は細胞インピーダンスアッセイにおいてBT-474-M3細胞の増殖を阻害する (図11C)。

【図 12】B2B3-1がZR75-1細胞においてErbB3リン酸化を刺激しないことを示すグラフである。

【図 13】図13A～図13Bは、B2B3-1がErbB3 (図13A) およびErbB2 (図13B) に特異的に結合することを示すグラフである。

【図 14】MALME-3細胞に対するB2B3-1の高親和力の (avidity) 結合が、ErbB2のみの結合変異体であるSK0-3、およびErbB3のみの結合変異体であるSK0-2と比較して、見かけの結合親和性における有意な増大をもたらすことを示す、グラフである。

【図 15】図15A～図15Cは、マウス、カニクイザル (*Cynomolgus monkey*)、およびヒトの血清におけるB2B3-1の安定性を示すグラフである。100nMのB2B3-1を、マウス (図15A)、カニクイザル (図15B)、またはヒト (図15C) の血清中で120時間、37°Cでインキュベーションした。試料を0、24、48、72、96、および120時間目に取り出し、B2B3-1がErbB2およびErbB3の両方に結合する能力をELISAによって測定した (RLU=相対的発光量)。

【図 16】BT-474-M3乳癌異種移植モデルにおけるB2B3-1の用量応答を示すグラフである。腫瘍応答に対するB2B3-1用量の関連性を、示した用量においてBT-474-M3乳房腫瘍株で評価した。HSAは、90mg/kgのB2B3-1用量と等モル用量である52.5mg/kgで与えた。

【図 17】図17A～図17Eは、B2B3-1がErbB2依存的様式で、複数の異種移植モデルにおいて有効であることを示すグラフである。Calu-3 (ヒト肺腺癌; 図17A)、SKOV-3 (ヒト卵巣腺癌; 図17B)、NCI-N87 (ヒト胃癌; 図17C)、ACHN (ヒト腎臓腺癌; 図17D)、およびMDA-MB-361 (ヒト乳房腺癌; 図17E) の異種移植モデルが示される。マウスを、30mg/kgの

10

20

30

40

50

B2B3-1で3日毎に、またはB2B3-1と等モル用量のHSA対照で処理した。

【図 1 8 A】ErbB2の過剰発現によって、B2B3-1不応答のADRR乳癌異種移植モデルが応答モデルに変換されることを示すグラフである。レトロウイルス発現系を用いて、野性型ADRR異種移植片においてErbB2を過剰発現させた。

【図 1 8 B】ErbB2の過剰発現によって、B2B3-1不応答のADRR乳癌異種移植モデルが応答モデルに変換されることを示すグラフである。レトロウイルス発現系を用いて、ADRR-E2異種移植片においてErbB2を過剰発現させた。

【図 1 9 A】B2B3-1活性が、インビトロにおいてErbB2発現レベルと正に相関していることを示すグラフである。

【図 1 9 B】B2B3-1活性が、インビボにおいてErbB2発現レベルと正に相関していることを示すグラフである。

10

【図 2 0】図20A～図20Bは、B2B3-1処理によって腫瘍細胞の周期が改変されることを示している。図20Aは、6時間にわたるBT474-M3乳房腫瘍細胞のB2B3-1処理によって細胞周期インヒビターp27^{kip1}の核への移行がもたらされることを示す、蛍光顕微鏡写真を含む。Hoechst染色を用いて核を同定した。図20BはB2B3-1で72時間処理したBT-474-M3細胞のウェスタンブロットであり、これにより、細胞周期調節因子Cyclin D1のレベルの低下がもたらされた。この実験では、細胞骨格タンパク質であるビンクリンをタンパク質ローディング対照としてプローブした。

【図 2 1】図21A～図21Bは、BT474乳房腫瘍異種移植片のB2B3-1処理によってp27^{kip1}の核への移行がもたらされることを示す、顕微鏡写真である。BT474乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図21A）または等モル用量のHSA（図21B）で、3日毎に計4回処理し、p27^{kip1}について染色した。

20

【図 2 2】図22A～図22Bは、B2B3-1処理によってBT474-M3乳癌異種移植片における増殖マーカーKi67の減少がもたらされることを示す、蛍光顕微鏡写真である。BT474-M3乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図22A）または等モル用量のHSA（図22B）で、3日毎に計4回処理した。

【図 2 3】図23A～図23Bは、B2B3-1処理によって、BT474-M3乳癌異種移植腫瘍における血管密度の減少（CD31染色の低下により判定される）がもたらされることを示す、蛍光顕微鏡写真である。BT474-M3乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図23A）または等モル用量のHSA（図23B）で、3日毎に計4回処理した。

30

【図 2 4】図24A～図24Bは、B2B3-1がインビボにおいてErbB3のリン酸化を阻害することを示すグラフである。B2B3-1（M1～M5）または対照HSA（H1～H2）で処理した個別のBT-474-M3異種移植腫瘍に由来する溶解物をSDS-PAGEに供し、ウェスタンブロット分析を用いてpErbB3およびβチューブリンについてプローブした（図24A）。βチューブリンシグナル平均値に対するpErbB3シグナル平均値の正規化によって、B2B3-1処理された腫瘍はHSA腫瘍よりも有意に少ないpErbB3を含んでいたことが実証された（図24B）。

【図 2 5 A】BT-474-M3 shPTENおよびBT-474-M3 shControlの異種移植におけるB2B3-1のインビボ活性を示すグラフである。培養したBT-474-M3腫瘍細胞を対照ベクター（図25A）で、または、PTEN活性をノックアウトするshPTENを発現するレトロウイルスベクター（図25B）でトランスフェクトする。このようにPTEN活性をノックアウトするように操作されたBT-474-M3乳癌細胞をマウスの右側腹部に注射し、対照ベクターでトランスフェクトした細胞を同じマウスの左側腹部に注射した。マウスを、30mg/kgのB2B3-1で3日毎に、または10mg/kgのハーセプチンで毎週処理し、対照としてHSAをB2B3-1と等モル用量で注射した。B2B3-1およびハーセプチンは、対照のBT-474-M3乳癌細胞によって形成された腫瘍の大きさの低下を促進した。

40

【図 2 5 B】BT-474-M3 shPTENおよびBT-474-M3 shControlの異種移植におけるB2B3-1のインビボ活性を示すグラフである。培養したBT-474-M3腫瘍細胞を対照ベクター（図25A）で、または、PTEN活性をノックアウトするshPTENを発現するレトロウイルスベクター（図25B）でトランスフェクトする。このようにPTEN活性をノックアウトするように操作されたBT-474-M3乳癌細胞をマウスの右側腹部に注射し、対照ベクターでトランスフェクトし

50

た細胞を同じマウスの左側腹部に注射した。マウスを、30mg/kgのB2B3-1で3日毎に、または10mg/kgのハーセプチンで毎週処理し、対照としてHSAをB2B3-1と等モル用量で注射した。B2B3-1のみ（かつハーセプチンなし）は、PTENの発現を欠くBT-474-M3乳癌細胞によって形成された腫瘍の大きさの低下を促進させた。

【図26A】B2B3-1が、PTEN活性が低下しているBT-474-M3異種移植片におけるAKTのリン酸化を阻害することを示す。処理（q3d×11）の完了後に腫瘍を溶解させて、ウェスタンブロット分析によってPTEN、pErbB3、およびpAKTの発現レベルについて試験した。

【図26B】B2B3-1が、PTEN活性が低下しているBT-474-M3異種移植片におけるAKTのリン酸化を阻害することを示す。総AKTおよび総タンパク質に対して正規化したpAKTのバンド強度に対する濃度測定によって、B2B3-1はこのタンパク質のリン酸化を阻害でき、ハーセプチンはしなかったことが実証される。

【図27】図27A～図27Dは、nu/nuマウスにおけるボーラス用量5mg/kg（図27A）、15mg/kg（図27B）、30mg/kg（図27C）、および45mg/kg（図27D）のB2B3-1の単一用量薬物動態特性を示すグラフである。B2B3-1血清濃度の測定値は、HSAアッセイまたはErbB2/ErbB3アッセイにおいて同程度であり、このことは、B2B3-1の抗原結合活性が循環中で保持されていることを示している。

【図28】ヌードマウスにおけるボーラス用量5、15、30、および45mg/kgのB2B3-1の用量-曝露の関係を示すグラフである。用量の増大は、B2B3-1に対する全体的曝露の直線的な増大をもたらす。

【図29】4mg/kg（n=2）、20mg/kg（n=2）、および200mg/kg（336時間の時点までn=4、384時間、552時間および672時間の時点についてn=2）を3日毎に4回投与したカニクイザルで測定した、B2B3-1血清濃度を示すグラフである。

【図30】B2B3-1発現プラスミドpMP10k4H3-mHSA-B1D2の説明図である。

【図31】ネオマイシン耐性プラスミドpSV2-neoの説明図である。

【図32】ハイグロマイシン耐性プラスミドpTK-Hygの説明図である。

【図33】q7dで投与したB2B3-1がq3d投与と同等の有効性を示すことを実証するデータを示す。

【図34】B2B3-1およびトラスツズマブが異なるErbB3阻害機序を呈することを実証するウェスタンブロットのデータを示す。

【図35A】ヒト乳房腫瘍のモデルとなる様々なヒト乳癌細胞株のスフェロイドにおいてB2B3-1とトラスツズマブの組み合わせ治療を調べた、実施例43で詳述する実験の結果を示す。BT-474-M3細胞を用いて得たデータを示す。単独または組み合わせたB2B3-1のモル濃度をX軸に示す。単独または組み合わせたトラスツズマブのモル濃度は、示されたB2B3-1の各濃度の1/3である。

【図35B】ヒト乳房腫瘍のモデルとなる様々なヒト乳癌細胞株のスフェロイドにおいてB2B3-1とトラスツズマブの組み合わせ治療を調べた、実施例43で詳述する実験の結果を示す。SKBR3細胞を用いて得たデータを示す。単独または組み合わせたB2B3-1のモル濃度をX軸に示す。単独または組み合わせたトラスツズマブのモル濃度は、示されたB2B3-1の各濃度の1/3である。

【図35C】ヒト乳房腫瘍のモデルとなる様々なヒト乳癌細胞株のスフェロイドにおいてB2B3-1とトラスツズマブの組み合わせ治療を調べた、実施例43で詳述する実験の結果を示す。MDA-MB-361細胞を用いて得たデータを示す。単独または組み合わせたB2B3-1のモル濃度をX軸に示す。単独または組み合わせたトラスツズマブのモル濃度は、示されたB2B3-1の各濃度の1/3である。

【図36】実施例44で詳述する、インビボにおける腫瘍異種移植実験の結果を示す。X軸の「日数」とは、腫瘍移植後日数を示す。各データ点のエラーバーは、少なくとも2つの独立した異種移植片に対する応答を表す。

【図37】使用した腫瘍細胞が米国国立癌研究所より入手され得るN-87胃腫瘍細胞であることを除き、本質的には実施例44で説明するような、異種移植モデルから得られたデータを示す。

10

20

30

40

50

【図 3 8】図36に提示したデータのサブセットを示す。

【発明を実施するための形態】

【0059】

詳細な説明

本発明は、ヒト血清アルブミン（HSA）リンカー、ならびに、HSAリンカーと1つまたは複数のさらなる部分、例えば結合部分とを含むHSAリンカーコンジュゲート（例えば、結合剤、診断剤、または治療剤）を提供する。そのようなHSAリンカーコンジュゲートは、例えば6時間～7日間という延長されたインビボ半減期などの望ましい特性を有し、かつ、哺乳動物（例えばヒト）にインビボで投与されても、体液性または細胞媒介性の有意な免疫応答を誘導しない。一局面では、本発明は、2つの所定のアミノ酸置換（すなわち、SEQ ID NO: 1に示される「C34S」および「N503Q」の置換）を有する変異HSAリンカーを提供する。別の局面では、本発明は、インビボでの哺乳動物（例えば、ヒト）における診断用途もしくは治療用途のための、または哺乳動物の細胞、組織、もしくは器官と関連したインビトロでの使用のための、1つまたは複数の結合部分（例えば、抗体、抗体断片、レセプター/リガンド、または低分子）に結合したHSAリンカーを提供する。さらなる局面において、哺乳動物における（または哺乳動物の細胞、組織、または器官と関連した）診断用途または治療用途のために、HSAリンカーを1つまたは複数の免疫調節剤、細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤、検出可能標識、または放射性剤と連結してもよい。HSAリンカーを含むHSAリンカーコンジュゲートは任意で、1つまたは複数の薬学的に許容される担体または賦形剤と組み合わせられてもよく、かつ、静脈内に、筋肉内に、経口的に、吸入によって、非経口的に、腹腔内に、動脈内に、経皮的に、舌下に、経鼻的に、座剤の使用を通じて、経頬的に、リポソームで、脂肪に（adiposally）、眼球に（ophthalmically）、眼内に、皮下に、髄腔内に、局部的に、または局所的に投与されるように製剤化されてもよい。HSAリンカーコンジュゲートは、1つまたは複数の生物学的活性剤（例えば、生物学的または化学的な剤、例えば化学療法剤および抗腫瘍剤）と組み合わせたり同時投与することができるが、必ずしもその必要はない。さらなる局面において本発明は、結合部分（例えば、抗体、抗体断片、レセプター、またはリガンド）、免疫調節剤、細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤、検出可能標識、または放射性剤をHSAリンカーに結合させて、診断または治療の用途に使用できるHSAリンカーコンジュゲートを調製するための、説明書を備えたキットを提供する。

【0060】

ヒト血清アルブミン（HSA）リンカー

HSAリンカーは、SEQ ID NO: 3に示される野生型HSAアミノ酸配列を含みうる。あるいは、HSAリンカーは、改変配列または変異配列を含んでもよい。1つの変異HSAリンカーは、SEQ ID NO: 3に示される野生型HSAアミノ酸配列を基準として34位および503位に2つのアミノ酸変異を含む。34位のシステイン残基（すなわち、C34）はシステイン以外の任意のアミノ酸残基（例えば、セリン、トレオニン、またはアラニン）に変異してもよい。同様に、503位のアスパラギン残基（すなわち、N503）はアスパラギン以外の任意のアミノ酸残基（例えば、グルタミン、セリン、ヒスチジン、またはアラニン）に変異してもよい。一態様では、HSAリンカーは、それぞれSEQ ID NO: 1およびSEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を有する。この変異HSAリンカーは、2つのアミノ酸置換（すなわち、アミノ酸残基34のシステインの代わりにセリン（「C34S」）、およびアミノ酸残基503のアスパラギンの代わりにグルタミン（「N503Q」））を含む。1つまたは複数の結合部分（例えば、抗体、抗体断片（例えば、単鎖抗体）、または他の標的化剤もしくは生物学的に活性な剤（例えば、レセプターおよびリガンド））に結合させた場合、HSAリンカーは、これらのコンジュゲートに対して、および、同じく結合させた追加の診断剤もしくは治療剤（例えば、免疫調節剤、細胞毒性剤、もしくは細胞増殖抑制剤、検出可能標識、または放射性剤）に対して、該HSAリンカーの非存在下におけるこれらの剤の薬理学的特性と比べて有益な、いくつかの薬理学的特性を付与する。哺乳動物（例えば、ヒト）への投与の場合、これらの恩典には、免疫原性の低下（例えば、リンカー-抗体

コンジュゲートの宿主抗体中和反応の低減)、(例えば、質量分析による)HSAリンカーコンジュゲートの検出の増大、および薬理学的半減期の延長(例えば、6時間超、8時間超、12時間超、24時間超、36時間超、2日超、3日超、4日超、5日超、6日超、または7日超の半減期)が含まれる。具体的には、アミノ酸残基34のシステインをセリンで置換することにより、HSAリンカーの酸化およびタンパク質不均一性が低減する。野性型HSAにおいて、アミノ酸残基503のアスパラギンは脱アミノ反応に感受性であり、これは薬理学的半減期の低下をもたらす可能性が高い。アミノ酸残基503のアスパラギンをグルタミンで置換することにより、HSAリンカーの薬理学的半減期の延長と、それに対応して、哺乳動物(例えば、ヒト)またはその細胞、組織、または器官に投与された場合のHSAリンカーを含むコンジュゲート剤の薬理学的半減期の延長をもたらすことができる。

10

【0061】

他の態様では、変異HSAリンカーは、HSAのドメインI (SEQ ID NO: 53; SEQ ID NO: 1の残基1~197)、HSAのドメインIII (SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 1の残基381~585)、HSAのドメインIおよびIIIの組み合わせ、またはHSAのドメインIまたはIIIとHSAのドメインII (SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 1の残基189~385)との組み合わせを含む。例えば、HSAリンカーはドメインIとII、IとIII、またはIIとIIIを含むことができる。さらに、ドメインI (SEQ ID NO: 53)の34位のシステイン残基(すなわち、C34)を、システイン以外の任意のアミノ酸残基(例えば、セリン、トレオニン、またはアラニン)に変異させてもよい。同様に、ドメインIII (SEQ ID NO: 55)の503位のアスパラギン残基(すなわち、N503)を、アスパラギン以外の任意のアミノ酸残基(例えば、グルタミン、セリン、ヒスチジン、またはアラニン)に変異させてもよい。これらのHSAリンカーは、各々が下記で詳述されている、1つまたは複数のペプチドコネクター、結合部分、および治療剤または診断剤を含む、HSAリンカーコンジュゲートに組み込むことができる。

20

【0062】

ペプチドコネクター

HSAリンカーに対する、本明細書において定義される結合部分の結合を容易にするために、短い(例えば、2~20アミノ酸長の)ペプチドコネクターを、HSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に結合させることができる(例えば、共有結合(例えば、ペプチド結合)、イオン結合、または疎水性結合させるか、または高親和性のタンパク質-タンパク質結合相互作用を介する(例えば、ビオチンとアビジン))。これらのコネクターは、本明細書に記載の任意の結合部分が結合可能である、柔軟なテザーを提供する。ペプチドコネクターは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上のアミノ酸長であってもよい。一態様では、コネクターは、例えばグリシン、アラニン、セリン、グルタミン、ロイシン、またはバリン残基の配列である。本明細書において具体的に列挙されてはいないが、コネクターは、グリシン、アラニン、セリン、グルタミン、ロイシン、もしくはバリン残基のみであってもよく、または最大約20アミノ酸長までのこれらの残基の任意の組み合わせであってもよい。好ましい態様では、HSAリンカーのアミノ末端に結合したコネクターはアミノ酸配列AASまたはAAQを有し、カルボキシ末端に結合したコネクターはアミノ酸配列「AAAL」(SEQ ID NO: 5)を有する。コネクターは、HSAリンカー内のアミノ酸残基に対して、HSAリンカーのアミノ末端もしくはカルボキシ末端と共有結合してもよいし、または存在する場合には1つまたは複数の結合部分の間に含まれてもよい。

30

40

【0063】

HSAリンカーの作製

1つまたは複数の上述のペプチドコネクター、1つまたは複数の後述の結合部分、ポリペプチドベースの検出可能標識、および他のポリペプチドベースの治療剤を含むまたは含まない、HSAリンカーは、組み換えにより作製することができる。例えば、HSAリンカー(および1つまたは複数の任意のエレメント)をコードするヌクレオチド配列は、細菌(例えば、大腸菌)、昆虫、酵母、もしくは哺乳動物の細胞(例えば、CHO細胞)、または、哺乳動物の組織、器官、もしくは生物体(例えば、トランスジェニックのげっ歯類、有蹄類

50

(例えば、ヤギ)または非ヒト霊長類)において、(例えば、プラスミド内で、ウイルスベクター内で、または遺伝子導入により)発現させてもよい。宿主の細胞、組織、または器官でHSAリンカーを発現させた後、当業者は、標準的なタンパク質精製法(例えば、FPLCまたはアフィニティークロマトグラフィー)を用いて該HSAリンカーを単離および精製し得る。2つの結合部分と組み合わせたHSAリンカーの産生のための組み換え発現系を図1に図示する。

【0064】

あるいは、1つまたは複数の上述の任意のエレメントを含むまたは含まないHSAリンカーを、合成により作製することができる。例えば、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、固相アプローチのようなペプチド合成の分野において一般に確立されている技術によって、調製することができる。固相合成は、ポリスチレンのような不溶性の支持体またはマトリックスに連結させた、伸長するペプチド鎖へのアミノ酸残基の段階的な付加を伴う。ペプチドのC末端残基をまず、*t*-ブチルオキシカルボニル基(tBoc)またはフルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基などのN保護剤で保護されたアミノ基をもつ市販の支持体に固定する。アミノ保護基を、適切な脱保護剤、例えば、tBOCについてはTFA、FMOCについてはピペリジンで除去し、次のアミノ酸残基(N保護型)を、ジシクロカルボジイミド(DCC)などのカップリング剤によって付加する。ペプチド結合が形成されたら、該試薬を支持体から洗浄によって除く。最後の残基の付加後、トリフルオロ酢酸(TFA)またはフッ化水素(HF)などの適切な試薬を用いて剤を支持体から切断する。望ましい場合、1つまたは複数の上述の任意のエレメントを含むまたは含まないHSAリンカーを1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のセグメントで作製することができ、次にこれらを連結してHSAリンカー構築物全体を形成することができる。

【0065】

結合部分

HSAリンカーコンジュゲートはまた、標的の細胞、組織、または器官へのHSAリンカーコンジュゲートの選択的かつ特異的な結合を可能にする、1つまたは複数の結合部分、例えば、抗体、抗体断片(本明細書記載のとおり、例えば、単鎖Fv(scFv))、またはレセプター/リガンド(すなわち、タンパク質または糖タンパク質のリガンドまたはレセプター)を含んでもよい。結合部分を、(例えば、共有結合(例えば、ペプチド結合)、イオン結合、もしくは疎水性結合を介して、または高親和性のタンパク質-タンパク質の結合相互作用を介して(例えば、ビオチンとアビジン))HSAリンカーに結合させることができる。

【0066】

1つまたは複数の結合部分をHSAリンカーに結合させることができる。一態様では、2つ以上の同一の結合部分(すなわち、同じ構造および結合親和性を有する部分)の1つまたは複数(例えば、一列になって)それぞれをHSAリンカーのアミノ末端およびカルボキシ末端に結合させ、それによって該HSAリンカーは、その標的抗原に対する該結合部分の結合活性の向上を提供する。あるいは、2つ以上の異なる結合部分(例えば、2つ以上の異なる標的分子に対して結合親和性を有するscFv、または同じ標的分子上の2つ以上の異なるエピトープに対して結合親和性を有するscFvなどの、抗体)をHSAリンカー(例えば、二重特異性HSAリンカーコンジュゲート)に結合させて、複数の標的抗原またはエピトープをHSAリンカーコンジュゲートによって結合させることができる。別の態様では、例えば、リンカーコンジュゲートに2つ以上の異なる結合特異性または生物学的な作動/拮抗(agonistic/antagonistic)特性をもたらすために、異なる種の結合部分をHSAリンカーに結合させることもできる。二重特異性HSAリンカーコンジュゲートの調製において使用するための結合部分対の有用な組み合わせは、例えば、参照により本明細書に組み入れられる国際公開公報WO 2006/091209およびWO 2005/117973に開示されている。他の態様では、3つ以上の結合部分(例えば、同じまたは異なる結合部分)をHSAリンカーに結合させて、HSAリンカーコンジュゲートを形成させることができる。

【0067】

本発明は、少なくとも第一および第二の結合部分を有するHSAリンカーコンジュゲート
を特徴とし、その各々がHSAリンカーのアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれかに
結合可能であるか、または、該末端のいずれかもしくは両方に存在する、本明細書におい
て規定されるようなペプチドコネクターに結合可能である。図1は例示的な変異HSAリンカー
を図示し、ここで2つの結合部分（「アーム1」および「アーム2」）は、アミノ末端ペ
プチドコネクターAASおよびカルボキシ末端ペプチドコネクターAAAL（SEQ ID NO: 5）に
よって該変異HSAリンカーに結合している。また結合部分（例えば、抗体またはscFv）を
、例えば共有結合でまたはイオン結合によって、例えばビオチン-アビジン相互作用を用
いて、他の遺伝子座（例えば、HSAリンカーの内部アミノ酸残基）に結合させることがで
きる。アミン（例えば、リジン残基）およびスルフヒドリル（例えば、システイン残基）
のアミノ酸側鎖のビオチン化は当技術分野において公知であり、結合部分をHSAリンカー
に結合させるために用いることができる。

10

【0068】

HSAリンカーコンジュゲートに含まれ得る結合部分としては、抗体、抗体断片、レセプ
ター、およびリガンドが挙げられる。HSAリンカーに結合させた結合部分は組み換え（例
えば、ヒト、マウス、キメラ、またはヒト化）型でも、合成型でも、天然型でもよい。代
表的な結合部分としては、例えば、完全抗体、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボ
ディ、二重特異性抗体、抗体断片、Fab断片、F(ab')₂分子、単鎖Fv（scFv）分子、二重特異
性単鎖Fv（(scFv')₂）分子、タンデムscFv断片、抗体融合タンパク質、ホルモン、レセ
プター、リガンド、およびアプタマー、ならびにこれらの生物学的に活性な断片が挙げら
れる。

20

【0069】

抗体

抗体には、IgG、IgA、IgM、IgD、およびIgEアイソタイプが含まれる。抗体またはその
抗体断片は、本明細書において用いる場合、標的細胞の外側上にまたは内部に存在する標
的タンパク質、糖タンパク質、またはエピトープに結合する、1つまたは複数の相補性決
定領域（CDR）または結合ペプチドを含む。

【0070】

本明細書に記載される多くの抗体またはその断片は、結合特異性もエフェクター機能も
失うことなく、かつ、容認できない結合親和性低下（例えば、約 10^{-7} M未満）も伴うこと
なく、可変領域および定常領域の両方で、不可欠ではないアミノ酸の置換、付加、または
欠失を受けることができる。通常、そのような改変を組み込んだ抗体または抗体断片は、
それが由来する参照の抗体または抗体断片に対して実質的な配列同一性を呈する。場合
によっては、自身が由来する参照の抗体または抗体断片と比較して同じ特異性と増大した親
和性とを有する変異抗体または変異抗体断片が選択される場合がある。ファージディス
プレイ技術によって、このような抗体を選択するための強力な技術が提供される。例えば、
Dowerら、WO 91/17271 McCaffertyら、WO 92/01047；およびHuse、WO 92/06204（参照に
より本明細書に組み入れられる）を参照のこと。

30

【0071】

またHSAリンカーを、標的抗原に対して特異性を有して結合する能力を保持している抗
体の1つまたは複数の断片に結合させることができる。抗体断片としては、個別の可変重
鎖、可変軽鎖、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、およびscFvが挙げられる。断片は、無傷の免
疫グロブリンの酵素的または化学的な分離によって作製することができる。例えば、F(ab
')₂断片は、HarlowおよびLane、Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
Pubs., N. Y. (1988)に記載の方法のような標準的な方法を用いた、pH3.0~3.5でペプシ
ンを用いるタンパク質分解性消化によって、IgG分子から得ることができる。Fab断片は、
限定的な還元によってF(ab')₂断片から、または、還元剤の存在下でのパパインを用いた
消化によって抗体全体から得てもよい。断片はまた、組み換えDNA技術によって作製する
こともできる。選択した断片をコードする核酸のセグメントを、制限酵素を用いた全長コ
ード配列の消化によって、または新規合成によって、作製する。断片は、ファージ被覆（

40

50

phage-coat) 融合タンパク質の形態で発現されることが多い。この発現様式は、抗体の親和性強化 (sharpening) のために有利である。

【0072】

ヒト化抗体

またヒト化抗体をHSAリンカーと組み合わせて使用してもよく、ここで、該抗体CDRの1つまたは複数是非ヒト抗体配列由来であり、該CDRの1つまたは複数 (ただし好ましくは全て) は、抗原 (例えば、タンパク質、糖タンパク質、または他の適切なエピトープ) に特異的に結合する。

【0073】

ヒト化抗体は、ヒト抗体 (アクセプター抗体と称する) に実質的に由来する定常フレームワーク領域、ならびに、場合によっては、ヒト抗体に由来する可変領域の大部分を含む。該CDRの1つまたは複数 (全てまたはその一部、ならびに、CDRの1つまたは複数の周囲の目立たないアミノ酸) は、マウス抗体などの非ヒト抗体から提供される。該抗体の定常領域は存在してもしなくてもよい。

【0074】

1つまたは複数のマウスCDRを置換によりヒト可変ドメインフレームワークに入れることは、該CDRが由来するマウス可変フレームワークと同じまたは類似している高次構造を該ヒト可変領域ドメインフレームワークがとる場合にその正確な空間的配向の保持をもたらす可能性が最も高い。これは、該CDRが由来する該マウス可変フレームワークドメインと高度な配列同一性および構造同一性を呈するフレームワーク配列を有するヒト抗体由来の該ヒト可変ドメインを得ることによって、達成される。重鎖および軽鎖の可変フレームワーク領域は、同じまたは異なるヒト抗体配列に由来することができる。ヒト抗体配列は、天然ヒト抗体の配列であっても、いくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であっても、またはヒト生殖系列可変ドメイン配列であってもよい。例えば、Kettleboroughら、Protein Engineering 4:773(1991) ; Kolbingerら、Protein Engineering 6:971(1993)を参照のこと。

【0075】

適切なヒト抗体配列は、マウス可変領域のアミノ酸配列と公知のヒト抗体の配列とのアラインメントによって特定される。比較は、重鎖および軽鎖について別々に行うが、その原理はどちらについても同様である。

【0076】

キメラ抗体およびヒト化抗体ならびに抗体断片を調製する方法は、米国特許第4,816,567号、同第5,530,101号、同第5,622,701号、同第5,800,815号、同第5,874,540号、同第5,914,110号、同第5,928,904号、同第6,210,670号、同第6,677,436号、および同第7,067,313号ならびに米国特許出願第2002/0031508号、同第2004/0265311号、および同第2005/0226876号に記載されている。抗体またはその抗体断片の調製は、例えば米国特許第6,331,415号、同第6,818,216号、および同第7,067,313号にさらに記載されている。

【0077】

レセプターおよびリガンド

特定のHSAリンカーコンジュゲート内部では、タンパク質または糖タンパク質のレセプターまたはリガンドがHSAリンカーと結合している。レセプターまたはリガンドと結合したHSAリンカーを用いて、例えば、分泌タンパク質、細胞 (例えば、癌細胞)、組織、または器官を特異的に標的してもよい。さらにHSAリンカー-レセプターまたは-リガンドコンジュゲートと、同起源の標的レセプターまたはリガンドとの特異的結合によって、細胞内または細胞間のシグナル伝達経路における生物学的な作動/拮抗活性を生じさせることができる。本明細書に記載の他の結合部分と同様に、レセプターおよびリガンドまたはこれらの断片を、HSAリンカーのアミノ末端および/もしくはカルボキシ末端に、HSAリンカーに連結したペプチドコネクターに、またはHSAリンカー内のアミノ酸残基に、結合させることができる。

【0078】

HSAリンカーに結合され得る例示的なレセプターおよびリガンドとしては、これらに限定されるわけではないが、インスリン様成長因子1レセプター (IGF1R)、IGF2R、インスリン様成長因子 (IGF)、間葉上皮移行因子レセプター (c-met; 肝細胞成長因子レセプター (HGFR) としても公知)、肝細胞成長因子 (HGF)、上皮細胞成長因子レセプター (EGFR)、上皮細胞成長因子 (EGF)、ヘレグリン、線維芽細胞成長因子レセプター (FGFR)、血小板由来成長因子レセプター (PDGFR)、血小板由来成長因子 (PDGF)、血管内皮成長因子レセプター (VEGFR)、血管内皮成長因子 (VEGF)、腫瘍壊死因子レセプター (TNFR)、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、TNF- β 、葉酸レセプター (FOLR)、葉酸、トランスフェリンレセプター (TfR)、メソセリン、Fcレセプター、c-kitレセプター、c-kit、 α 4インテグリン、P-セレクトリン、スフィンゴシン-1-リン酸レセプター-1 (S1PR)、ヒアルロン酸レセプター、白血球機能抗原-1 (LFA-1)、CD4、CD11、CD18、CD20、CD25、CD27、CD52、CD70、CD80、CD85、CD95 (Fasレセプター)、CD106 (血管細胞付着分子1 (VCAM1))、CD166 (活性化白血球細胞接着分子 (ALCAM))、CD178 (Fasリガンド)、CD253 (TNF関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL))、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、CCR5、CXCL12 (間質細胞由来因子1 (SDF-1))、インターロイキン1 (IL-1)、CTLA-4、レセプター α および β 、MART-1、gp100、MAGE-1、エフリン (Eph) レセプター、粘膜アドレシン細胞付着分子1 (MAdCAM-1)、癌胎児性抗原 (CEA)、Lewis^Y、MUC-1、上皮細胞接着分子 (EpCAM)、癌抗原125 (CA125)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、TAG-72抗原、およびその生物学的に活性な断片が挙げられる。

10

【0079】

20

上述の任意の方法を用いて、レセプターおよびリガンドを発現させることができ、単離することができる、またはHSAリンカーに結合させることができる。

【0080】

診断剤

HSAリンカー、またはそれに結合した任意の結合部分 (例えば、抗体、抗体断片、レセプター、またはリガンド) を、キレート剤または検出可能標識に連結して、診断剤をすることができる。また、本明細書に記載のような検出可能標識と、1つまたは複数の本明細書に記載の治療剤または結合部分とを含む、HSAリンカーコンジュゲートも意図される。

【0081】

HSAリンカー (またはHSAリンカーコンジュゲート) のトレオニン残基の遊離アミノ基と、キレーターの適切な官能基、例えばカルボキシル基または活性化エステルとを反応させることによって、HSAリンカー (またはHSAリンカーコンジュゲート) とキレーター成分を連結することができる。例えばそのような連結は、キレーターであるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (錯体化学の分野では一般的である) を、エチレン鎖上のカルボキシル置換基によって官能基化される際に組み込むことによって、達成され得る。この種のEDTA誘導体の合成はAryaら (Bioconjugate Chemistry 2:323(1991)) において報告されており、剤のペプチド部分のアミノ基と反応させるためのエチレン鎖上のカルボキシル置換基が遊離している一方で、4つの配位するカルボキシル基の各々をt-ブチル基で遮断することが記載されている。

30

【0082】

HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、ペプチド性である、すなわち固相ペプチド合成に適合性である、金属キレーター成分を組み込んでもよい。この場合、該キレーターは、上記のEDTAと同じ様式で連結されてもよく、あるいは、より好都合には、該キレーターおよびHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、該HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートのC末端残基から開始して該キレーターのN末端残基で終結するように全体として合成される。

40

【0083】

HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、該HSAリンカーをキレーターに連結させるようにはたらく一方で、該HSAリンカーの生物学的特性、該HSAリンカーコンジュゲートの結合部分の標的化機能、または該キレーターの金属結合機能にとって有害な影響を

50

有さない、連結基成分をさらに組み込んでもよい。適切な連結基としては、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートに対する、およびキレーターに対する連結のための反応性基によって官能基化された、アミノ酸鎖およびアルキル鎖が挙げられる。HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを固相技術によって全体として合成できるようにキレーターがペプチド性である場合、好ましい連結基はアミノ酸鎖である。アルキル鎖連結基は、HSAリンカーのペプチド部分のトレオニン残基のアミノ基と、アルキル鎖上の第一の官能基、例えばカルボキシル基または活性化エステルとの反応によって、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートに組み込まれ得る。続いて、該キレーターを該アルキル鎖に付加して、該アルキル鎖上の第二の官能基と該キレーター上の適切な基とを反応させることによって、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートの形成を完了する。アルキル鎖上の第二の官能基は、変異HSAリンカーのトレオニン残基に対して反応性ではないがキレーター上の官能基に対して反応性を有する置換基から選択される。例えば、キレーターがカルボキシル基または活性化エステルなどの官能基を組み込んでいる場合、アルキル鎖連結基の第二の官能基は、アミノ基であってもよい。HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートの形成には、望ましくない産物の形成を回避するために存在する官能基の保護および脱保護を要する場合があることを認識されたい。保護および脱保護は保護基、試薬、および有機合成分野で一般的なプロトコルを用いて達成される。特に上記の固相ペプチド合成で使用される保護および脱保護の技術を用いてもよい。

10

【0084】

アルキル鎖に対する代替的な化学連結基はポリエチレングリコール (PEG) であり、これは、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートへの組み込みについて上記されたアルキル鎖と同じ様式で官能基化される。代替的に、連結基をまずキレーターに連結し、次いでHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートに連結してもよいことを、認識されたい。

20

【0085】

一局面では、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを、錯体を形成することができる診断上有用な金属に連結する。適切な金属としては、例えば、種々の形態のテクネチウムおよびレニウム（例えば、 $^{99m}\text{TcO}_3^+$ 、 $^{99m}\text{TcO}_2^+$ 、 ReO_3^+ 、および ReO_2^+ ）などの放射性核種が挙げられる。HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートへの金属の組み込みは、錯体化学分野で一般的な種々の方法によって達成できる。金属がテクネチウム-99mである場合、以下の一般的手順を用いて、テクネチウム錯体を形成してもよい。エタノールなどのアルコール水溶液中にHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを溶解することによって、HSAリンカー-キレーターコンジュゲート溶液を最初に形成する。次いで、該溶液を脱気して酸素を除いた後、適切な試薬を用いて、例えば水酸化ナトリウムを用いてチオール保護基を取り除き、次いで、有機酸、例えば酢酸 (pH6.0~6.5) で中和する。標識工程では、モリブデン発生源から得た化学量論的に過剰な過テクネチウム酸ナトリウムを、テクネチウムを還元するのに十分な量の還元剤、例えば塩化第一スズとともに該コンジュゲート溶液に添加して、加熱する。標識されたHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを、混入物である $^{99m}\text{TcO}_4^-$ およびコロイド状 $^{99m}\text{TcO}_2$ から、例えばC-18Sep Pakカートリッジを用いるクロマトグラフィーによって分離させてもよい。

30

40

【0086】

別の方法では、HSAリンカーの標識はトランスキレート化 (transchelation) 反応によって達成できる。テクネチウム供給源とは、選択されたキレーターとのリガンド交換を容易にする不安定性リガンドと複合体化されたテクネチウムの溶液である。トランスキレート化に適したリガンドとしては、酒石酸塩、クエン酸塩、およびヘプタグルコン酸塩が挙げられる。この場合、好ましい還元試薬は亜ジチオン酸ナトリウムである。HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを上記の技術を用いて標識してもよいし、あるいは、キレーター自体を標識した後にHSAリンカーに連結して、HSAリンカー-キレーターコンジュゲートを形成させてもよい（「前標識 (prelabeled) リガンド」方法と呼ばれるプロセス）ことを認識されたい。

50

【0087】

HSAリンカーまたはそれに結合させた任意の剤を標識するための別のアプローチは、金属キレート化の際に切断される連結を通じて、固相支持体上でHSAリンカー-キレーターコンジュゲートを固定する工程を伴う。これは、錯化原子の一つによってキレーターが支持体の官能基に連結されると、達成される。好ましくは、マレイミドのような硫黄保護基で官能基化された支持体に、錯化硫黄原子を連結する。

【0088】

診断上有用な金属で標識されている場合、HSAリンカー-キレーターコンジュゲートを含む剤を用いて、癌（例えば、肺癌、乳癌、結腸癌、および前立腺癌）、加齢関連疾患（例えば、心血管系疾患、脳血管疾患、またはアルツハイマー病）、タバコ関連疾患（例えば、肺気腫、大動脈瘤、食道癌、または頭頸部扁平上皮癌）を発症するリスクのある組織を、診断画像化分野で確立された手順によって検出することができる。テクネチウム-99mなどの放射性核種金属で標識されたHSAリンカーを組み込んでいる剤を、等張食塩水などの薬学的に許容される溶液中での静脈注射によって、または本明細書に記載の他の方法によって、哺乳動物（例えば、ヒト）に投与してもよい。急速に除去されるHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを組み込んでいる剤は、それほど急速には除去されないHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを組み込んでいる剤よりも高用量で投与され得るという観点から、標識された剤の、投与に適した量は、選択されるHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートの分布プロファイルに依存する。組織を画像化するために許容可能な単位用量は、体重70kgの個体に対して約5~40mCiの範囲である。標識されたHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを組み込んでいる剤のインビボでの分布および局在化は、投与後の適切な時点で、非標的組織でのクリアランス速度に対する標的部位での蓄積速度に応じて典型的には30分後~180分後および最大約5日後まで、本明細書に記載の標準的技術によって追跡することができる。

【0089】

また、診断上または治療上の使用を容易にするために、HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を修飾または標識することもできる。検出可能標識、例えば、放射性分子、蛍光分子、重金属分子、または他の分子を該剤のいずれに結合させてもよい。剤の一重、二重、または多重の標識が有利である場合がある。例えば、例えば⁹⁰Yをキレート基を介してアミン含有側鎖または反応性基にさらに連結することと組み合わせた、放射性ヨウ素化による1つまたは複数の残基の二重標識によって、組み合わせ標識が可能になるであろう。これは、広範に分散した小さな新生細胞塊の特定などの、専門的な診断要件に有用であり得る。

【0090】

また、HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、例えばペプチド成分のチロシン残基のハロゲン化によって修飾することもできる。ハロゲンとしては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、およびアスタチンが挙げられる。例えばハロゲンが、例えば¹⁸F、⁷⁵Br、⁷⁷Br、¹²²I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹²⁹I、¹³¹I、または²¹¹Atなどの放射性同位体である場合に、このようなハロゲン化剤は検出可能に標識され得る。ハロゲン化剤は、各剤の分子内の少なくとも一つのアミノ酸に、および好ましくはD-Tyr残基に共有結合したハロゲンを含む。他の適切な検出可能修飾としては、剤またはアナログ、特にリジンを含むリンカーを有する剤またはアナログの、リジン残基に対する他の化合物（例えば、フルオレセインなどの蛍光色素）の結合が挙げられる。

【0091】

HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を放射性標識するための放射性同位体としては、剤またはそのアナログのペプチド成分の残基に対して共有結合され得る任意の放射性同位体が挙げられる。また放射性同位体を、β線もしくはγ線のいずれかを放射する放射性同位体から選択することもでき、あるいは代替的に、任意の剤を、例えば、HSAリンカーまたはそれに結合された任意のペプチド剤のリジン残基に共有結合できるキレート基を含むように、修飾することもできる。次いでキレート基を、任意の

種々の放射性同位体、例えば、ガリウム、インジウム、テクネチウム、イッテルビウム、レニウム、またはタリウム（例えば、 ^{125}I 、 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{169}Yb 、 ^{186}Re ）を含むように修飾することができる。

【0092】

HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、放射性同位体の付加によって修飾することができる。好ましい放射性同位体は、用いられるHSAコンジュゲートの生物学的半減期に相当するかまたはそれより長い放射性半減期を有している、放射性同位体である。より好ましくは、該放射性同位体は、ハロゲン原子の放射性同位体（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、およびアスタチンの放射性同位体）であり、さらにより好ましくは ^{75}Br 、 ^{77}Br 、 ^{76}Br 、 ^{122}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{129}I 、 ^{131}I 、または ^{211}At である。

10

【0093】

HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を組み込んでいる剤を、放射性金属に連結して、X線画像解析または放射線療法で用いることができる。同じく好ましい放射性同位体としては、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{51}Cr 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 、 ^{168}Yb 、 ^{140}La 、 ^{90}Y 、 ^{88}Y 、 ^{153}Sm 、 ^{156}Ho 、 ^{165}Dy 、 ^{64}Cu 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{203}Pb 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、および ^{214}Bi が挙げられる。金属の選択は、所望の治療用途または診断用途に基づいて決定される。

【0094】

診断剤または治療剤を作製するために、HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、金属成分に連結することができる。検出可能標識は、重元素または希土類イオン由来の金属イオン、例えば Gd^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{3+} 、または Cr^{2+} であり得る。常磁性または超常磁性の金属が結合されたHSAリンカーを組み込んでいる剤が、MRI画像化用途における診断剤として有用である。常磁性金属としては、これらに限定されるわけではないが、クロム（III）、マンガン（II）、鉄（II）、鉄（III）、コバルト（II）、ニッケル（II）、銅（II）、プラセオジウム（III）、ネオジウム（III）、サマリウム（III）、ガドリニウム（III）、テルビウム（III）、ジスプロシウム（III）、ホルミウム（III）、エルビウム（III）、およびイッテルビウム（III）が挙げられる。

20

【0095】

検出可能標識または他の分子を、HSAリンカーまたはそれに結合された剤に間接的に連結するために、キレート基を用いてもよい。キレート基は、剤と放射性標識、例えば、安定な二官能性キレーターとを連結させることもでき、または、1つもしくは複数の末端もしくは内部のアミノ酸反応性基に連結されることもできる。HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、イソチオシアネート β -Alaを介して、または、エドマン分解を妨げる適切な非 α -アミノ酸リンカーを介して連結させることができる。当技術分野で公知のキレーターの例としては、例えば、イミノカルボン（ininocarboxylic）およびポリアミノポリカルボン反応性基、イミノカルボン（ininocarboxylic）およびポリアミノポリカルボン反応性基、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、および1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（DOTA）が挙げられる。

30

【0096】

HSAリンカーを組み換え発現させた場合、検出可能ペプチド標識または診断剤に結合させることができる。HSAリンカーとともに検出可能標識として使用可能なペプチドおよびタンパク質としては、これらに限定されるわけではないが、蛍光タンパク質、生物発光タンパク質、およびエピトープタグが挙げられ、その各々が以下で詳述される。また、これらの検出可能標識の1つまたは複数、同じく治療剤、細胞毒性剤、または細胞増殖抑制剤も含む、HSAリンカーコンジュゲートに組み込むことができる。

40

【0097】

蛍光タンパク質または蛍光色素、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP；SEQ ID NO: 47）、高感度GFP（eGFP）、黄色蛍光タンパク質（SEQ ID NO: 48；YFP）、シアン蛍光性タンパク質（SEQ ID NO: 49；CFP）、および赤色蛍光性タンパク質（SEQ ID NO: 50；RFPまた

50

はDsRed)を、HSAリンカーに結合される検出可能標識として使用することができる。蛍光タンパク質は、該蛍光タンパク質のヌクレオチド配列をコードする発現ベクターを細胞(例えば、リンパ球などの血液細胞)にトランスフェクションまたは形質導入した後に、該細胞中で組み換え発現させることができる。蛍光タンパク質を刺激周波数の光に曝露すると、該蛍光タンパク質は、顕微鏡下の肉眼でまたは光学画像化デバイスで観察できる低、中、または高強度の光を放射する。剤における診断用配列として用いるのに適した例示的な蛍光タンパク質は、例えば、その各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第7,417,131号および同第7,413,874号に記載されている。

【0098】

生物発光タンパク質もまた、HSAリンカーに組み込まれる検出可能標識として使用可能である。生物発光タンパク質、例えば、ルシフェラーゼ(例えば、ホタル(SEQ ID NO: 51)、ウミシイタケ(Renilla)(SEQ ID NO: 52)、およびキノコ(Omphalotus)のルシフェラーゼ)およびエクオリンは、基質(例えば、ルシフェリンおよびセレンテラジン)との化学反応の一部として発光する。一態様では、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするベクターにより、本明細書に記載のものなどの標準的な方法に従って形質導入またはトランスフェクトされている細胞(例えば、リンパ球などの血液細胞)のインビボ、インビトロ、またはエクスビボにおける検出が提供される。診断用配列としての使用に適した例示的な生物発光タンパク質およびそれらの使用に関する方法は、例えば、その各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,292,658号、同第5,670,356号、同第6,171,809号、および同第7,183,092に記載される。

【0099】

エピトープタグは短いアミノ酸配列、例えば、5~20アミノ酸残基長であり、これを、一旦細胞中で発現されるか、細胞から分泌されるか、または標的細胞に結合されたら検出を容易にするための検出可能標識として、HSAリンカーコンジュゲートに組み込むことができる。診断用配列としてエピトープタグを組み込んでいる剤は、該エピトープタグに特異的な抗体、抗体断片、または他の結合分子とのその相互作用のおかげで、検出可能である。エピトープタグをコードするヌクレオチド配列は、天然遺伝子の適切な部分をクローニングすることによって、または該エピトープタグをコードするポリヌクレオチドを合成することによって、作製される。エピトープタグに結合する抗体、抗体断片、または他の結合分子は、検出可能標識(例えば、蛍光色素、放射性標識、重金属、または酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)を直接組み込んでもよいし、または、このような標識を組み込んでいる二次抗体、抗体断片、もしくは他の結合分子の標的としてそれ自体が機能してもよい。診断用配列として使用することができる例示的なエピトープタグとしては、c-myc(SEQ ID NO: 33)、赤血球凝集素(HA; SEQ ID NO: 34)、およびヒスチジンタグ(His₆; SEQ ID NO: 35)が挙げられる。さらに、蛍光タンパク質(例えば、GFP)および生物発光タンパク質も、エピトープタグとして、抗体、抗体断片として機能でき、かつ、これらのタンパク質の検出用に他の結合分子が市販されている。

【0100】

診断用配列(例えば、蛍光タンパク質、生物発光タンパク質、またはエピトープタグ)を組み込んでいるHSAリンカーコンジュゲート、またはそれを発現しているかそれに結合した任意の細胞のインビボ、インビトロ、またはエクスビボでの検出、画像化、または追跡は、顕微鏡、フローサイトメーター、ルミノメーター、または他の最先端の光学画像化デバイス、例えば、IVIS(登録商標)Imaging System(Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA)を用いて達成することができる。

【0101】

HSAリンカーに連結される治療剤または細胞毒性剤

HSAリンカー、またはそれに結合した任意の分子もしくは部分を任意の公知の細胞毒性部分または治療部分に連結して、疾患(例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管系の疾患)または疾患の1つまたは複数の症状を治療、阻害、軽減、または緩和するために投与可能な剤(HSAリンカーコンジュゲート)を形成させることができる。例としては、これ

らに限定されるわけではないが、抗腫瘍剤、例えば：アシビシン；アクリルピシン；塩酸
 アコダゾール；アクロニン；アドゼレシン；アドリアマイシン；アルデスロイキン；アル
 トレタミン；アンボマイシン（ambomycin）；酢酸アメタントロン；アミノグルテチミド
 ；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アスペルリ
 ン（asperlin）；アザシチジン；アゼテパ（azetepa）；アゾトマイシン（azotomycin）
 ；パチマスタット；ベンゾデパ；ビカルタミド；塩酸ビスアントレン；ビスナフィドジメシ
 レート（bisnafide dimesylate）；ビゼレシン；硫酸ブレオマイシン；ブレキナルナトリ
 ウム；プロピリミン；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カンプトテシン
 ；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルムスチン；塩酸カルピシン；カルゼ
 レシン；セデフィンゴール；クロラムブシル；シロレマイシン；シスプラチン；クラドリ
 ピン；コンプレテストアチンa-4；クリスナトールメシレート；シクロホスファミド；シタ
 ラビン；ダカルバジン；ダカ（n- [2-（ジメチル-アミノ）エチル] アクリジン-4-カルボ
 キサミド）；ダクチノマイシン；塩酸ダウノルピシン；ダウノマイシン；デシタビン；デ
 キソルマプラチン；デザグアニン；デザグアニンメシレート；ジアジクオン（diaziquone）
 ；ドセタキセル；ドラサチン；ドキソルピシン；塩酸ドキソルピシン；ドロロキシフェ
 ン；クエン酸ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン；エ
 ダトレキサート；塩酸エフロールニチン；エリブチシン；エルサミトルシン；エンロプラ
 チン；エンプロマート；エピプロピジン；塩酸エピルピシン；エルプロゾール；塩酸エソ
 ルピシン；エストラムスチン；リン酸エストラムスチンナトリウム；エタニダゾール；ヨ
 ード化ケシ油エチルエステルi131；エトポシド；リン酸エトポシド；エトプリン；塩酸フ
 ァドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フロクスウリジン；リン酸フルダラビン
 ；フルオロウラシル；5-fdump；フルオロシタビン；ホスキドン；ホストリエシンナトリ
 ウム；ゲムシタビン；塩酸ゲムシタビン；金au198；ホモカンプトテシン；ヒドロキシ尿
 素；塩酸イダルピシン；イホスファミド；イルモホシン；インターフェロン α -2a；イン
 ターフェロン α -2b；インターフェロン α -n1；インターフェロン α -n3；インターフェロ
 ン β -ia；インターフェロン γ -ib；イブプロプラチン；塩酸イリノテカン；ランレオチド酢
 酸；レトロゾール；酢酸リユープロリド；塩酸リアロゾール；ロメトレキソールナトリウ
 ム；ロムスチン；塩酸ロソキサントロン；マソプロコール；メイタンシン；塩酸メクロレ
 タミン；酢酸メゲストロール；メレンゲストロール酢酸；メルファラン；メノガリル；メ
 ルカプトプリン；メトトレキサート；メトトレキサートナトリウム；メトプリン；メツレ
 デパ；ミチンドミド；ミトカルシン（mitocarcin）；ミトクロミン；ミトジリン（mitogi
 llin）；ミトマルシン（mitomalcin）；マイトマイシン；ミトスペル（mitosper）；ミト
 タン；塩酸ミトキサントロン；ミコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オル
 マプラチン；オキシスラン；パクリタキセル；ペガスパルガーゼ；ペリオマイシン（peli
 omycin）；ペンタムスチン；硫酸ペプロイシン；ペルホスファミド；ピボプロマン；ピボ
 スルファン；塩酸ピロキサントロン；プリカマイシン；プロメスタン；ポルフィマーナト
 リウム；ポルフィロマイシン；プレドニムスチン；塩酸プロカルバジン；ピューロマイシ
 ン；塩酸ピューロマイシン；ピラゾフリン；リゾキシシン；リゾキシシンd；リボプリン；ロ
 グレチミド；サフィンゴール；塩酸サフィンゴール；セムスチン；シムトラゼン；スパル
 ホサートナトリウム；スパルソマイシン；塩酸スピログエルマニウム；スピロムスチン；ス
 ピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプトゾシン；塩化ストロンチウムsr89；スロ
 フェヌル；タリソマイシン；タキサン；タキソイド；テコガラン（tecogalan）ナトリウ
 ム；テガフル；塩酸テロキサントロン；テモボルフィン；テニボシド；テロキシロン；
 テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテパ；チミタック（thymitaq）；チ
 アゾフリン；チラバザミン；トムデックス；top53；塩酸トボテカン；クエン酸トレミフ
 ェン；酢酸トレストロン；リン酸トリシリピン；トリメトレキサート；グルクロン酸トリ
 メトレキサート；トリプトレリン；塩酸ツプロゾール；ウラシルマスタード；ウレデパ；
 バブレオチド；ベルテボルフィン；ビンブラスチン；硫酸ビンブラスチン；ピンクリスチ
 ン；硫酸ピンクリスチン；ビンデシン；硫酸ビンデシン；硫酸ビネピジン；硫酸ビングリ
 シナート；硫酸ビンロイロシン；酒石酸ビノレルピン；硫酸ビンロシジン（vinrosidine

10

20

30

40

50

) ; 硫酸ビンゾリジン ; ボロゾール ; ゼニプラチン ; ジノスタチン ; 塩酸ゾルピシン ; 2-クロロデオキシアデノシン ; 2'-デオキシホルマイシン ; 9-アミノカンプトテシン ; ラルチトレキセド ; N-プロパルギル-5,8-ジデアザ葉酸 ; 2-クロロ-2'-アラビノ-フルオロ-2'-デオキシアデノシン ; 2-クロロ-2'-デオキシアデノシン ; アニソマイシン ; トリコスタチンA ; hPRL-G129R ; CEP-751 ; リノミド (linomide) ; 硫黄マスタード ; ナイトロジェンマスタード (メクロレタミン) ; シクロホスファミド ; メルファラン ; クロラムブシル ; イホスファミド ; ブスルファン ; N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU) ; N,N'-ビス (2-クロロエチル) -N-ニトロソ尿素 (BCNU) ; N- (2-クロロエチル) -N'-シクロヘキシル-N-ニトロソ尿素 (CCNU) ; N- (2-クロロエチル) -N'- (トランス-4-メチルシクロヘキシル-N-ニトロソ尿素 (MeCCNU) ; N- (2-クロロエチル) -N'- (ジエチル) エチルホスホン酸-N-ニトロソ尿素 (フォテムスチン) ; ストレプトゾトシン ; ジアカルバジン (DTIC) ; ミトゾロミド ; テモゾロミド ; チオテバ ; マイトマイシンC ; AZQ ; アドゼレシン ; シスプラチン ; カルボプラチン ; オルマプラチン ; オキサリプラチン ; C1-973 ; DWA2114R ; JM216 ; JM335 ; ビス (白金) ; トムデックス ; アザシチジン ; シタラビン ; ゲムシタビン ; 6-メルカプトプリン ; 6-チオグアニン ; ヒポキサンチン ; テニボシド9-アミノカンプトテシン ; トポテカン ; CPT-11 ; ドキソルピシン ; ダウノマイシン ; エピルピシン ; ダルビシン ; ミトキサントロン ; ロソキサントロン ; ダクチノマイシン (アクチノマイシンD) ; アムサクリン ; ピラゾロアクリジン ; オールトランスレチノール ; 14-ヒドロキシ-レトロ-レチノール ; オールトランスレチノイン酸 ; N- (4-ヒドロキシフェニル) レチナミド ; 13-シス-レチノイン酸 ; 3-メチルTTNEB ; 9-シス-レチノイン酸 ; フルダラビン (2-F-アラ-AMP) ; または2-クロロデオキシアデノシン (2-Cda) が挙げられる。

【0102】

他の治療用化合物としては、これらに限定されるわけではないが、20-ピ-1,25ジヒドロキシビタミンD3 ; 5-エチニルウラシル ; アビラテロン ; アクラルピシン ; アシルフルベン ; アデシペノール ; アドゼレシン ; アルデスロイキン ; ALL-TKアンタゴニスト ; アルトレタミン ; アンバムスチン ; アミドックス ; アミホスチン ; アミノレブリン酸 ; アムルピシン ; アムサクリン ; アナグレリド ; アナストロゾール ; アンドログラホリド ; 脈管形成インヒビター ; アンタゴニストD ; アンタゴニストG ; アンタレリックス ; 抗背側化形態形成タンパク-1 (anti-dorsalizing morphogenetic protein-1) ; 抗アンドロゲン、前立腺癌 ; 抗エストロゲン ; 抗新生物薬 ; アンチセンスオリゴヌクレオチド ; アフィジコリングリシネート ; アポトーシス遺伝子モジュレーター ; アポトーシス調節因子 ; アブリン酸 ; アラ-CDP-DL-PTBA ; アルギニンデアミナーゼ ; アシュラクリン ; アタメスタン ; アトリムスチン ; アクシナスタチン1 ; アクシナスタチン2 ; アクシナスタチン3 ; アザセトロン ; アザトキシ ; アザチロシン ; バッカチンIII誘導体 ; パラノール ; パチマスタット ; BCR/ABLアンタゴニスト ; ベンゾクロリン ; ベンゾイルスタウロスポリン ; β ラクタム誘導体 ; β -アレチン ; ベタクラマイシンB ; ベツリン酸 ; bFGFインヒビター ; ビカルタミド ; ビサントレン ; ビサジリジニルスベルミン ; ビスナフィド ; ビストラテンA ; ビゼレシン ; ブレフレート ; プレオマイシンA2 ; プレオマイシンB2 ; プロピリミン ; ブドチタン ; ブチオニンスルホキシイミン ; カルシポトリオール ; カルホスチンC ; カンプトテシン誘導体 (例えば、10-ヒドロキシ-カンプトテシン) ; カナリボクスIL-2 ; カペシタビン ; カルボキサミド-アミノ-トリアゾール ; カルボキサミドトリアゾール ; CaRest M3 ; CARN 700 ; 軟骨由来インヒビター ; カルゼレシン ; カゼインキナーゼインヒビター (ICOS) ; カスタノスベルミン ; セクロピンB ; セトロレリックス ; クロリン (chlorins) ; クロロキノキサリンスルホンアミド ; シカプロスト ; シス-ポルフィリン ; クラドリピン ; クロミフェンアナログ ; クロトリマゾール ; コリスマイシンA ; コリスマイシンB ; コンブレタスタチンA4 ; コンブレタスタチンアナログ ; コナゲニン ; クラムベスシジン816 (crambescidin 816) ; クリスナトール ; クリプトフィシン8 ; クリプトフィシンA誘導体 ; クラシンA ; シクロペンタントラキノン ; シクロプラタム ; シペマイシン ; シタラビンオクホスファート ; 細胞溶解因子 ; サイトスタチン ; ダクリキシマブ ; デシタビン ; デヒドロジデムニンB ; 2'-デオキシコホルマイシン (DCF) ; デスロレリン ; デキシホスファミド ; デキシラゾキサ

ン；デキシベラパミル；ジアジクオン；ジデムニンB；ジドックス；ジエチルノルスペル
 ミン；ジヒドロ-5-アザシチジン；ジヒドロタキソール,9-；ジオキサマイシン；ジフェニ
 ルスピロムスチン；ジスコデルモリド；ドコサノール；ドラセトロン；ドキシフルリジン
 ；ドロロキシフェン；ドロナビノール；デュオカルマイシンSA；エブセレン；エコムスチ
 ン；エデルホシン；エドレコロマブ；エフロルニチン；エレメン；エミテフル；エピル
 ビシン；エポチロン（A、R=H；B、R=Me）；エピチロン；エプリステリド；エストラム
 スチンアナログ；エストロゲンアンタゴニスト；エストロゲンアンタゴニスト；エタニダ
 ゴール；エトポシド；エトポシド4'-ホスフェート（エトポホス（etopofos））；エキセ
 メスタン；ファドロソール；ファザラビン；フェンレチニド；フィルグラスチム；フィナ
 ステリド；フラボピリドール；フレゼラスチン；フルアステロン；フルダラビン；塩酸フ
 ルオロダウノルニシン；ホルフェニメックス；ホルメスタン；ホストリエシン；フォテム
 スチン；ガドリニウムテキサフィリン；硝酸ガリウム；ガロシタビン；ガニレリックス；
 ゼラチナーゼインヒビター；ゲムシタビン；グルタチオンインヒビター；ヘプスルファム
 ；ヘレグリン；ヘキサメチレンビスアセトアミド；ホモハリントニン（HHT）；ヒペリシ
 ン；イバンドロン酸；イダルビシン；イドキシフェン；イドラマノトン；イルモホシン；
 イロマスタット；イミダゾアクリドン；イミキモド；免疫刺激ペプチド；インスリン様成
 長因子-1レセプターインヒビター；インターフェロンアゴニスト；インターフェロン；イ
 ンターロイキン；イオベングアン；ヨードドキシソルビシン；イボメアノール,4-；イリノ
 テカン；イロプラクト；イルソグラジン；イソベンガゾール；イソホモハリコンドリノB
 ；イタセトロン；ジャスプラキノリド；カハラリドF；三酢酸ラメラリン-N；ラノレオチ
 ド；レイナマイシン；レノグラスチム；硫酸レンチナン；レプトールスタチン；レトロゾ
 ール；白血病抑制因子；白血球αインターフェロン；ロイプロリド+エストロゲン+プロ
 ゲステロン；ロイプロレリン；レバミソール；リアロゾール；線状ポリアミンアナログ；
 親油性二糖類ペプチド；親油性白金化合物；リソクリナミド7；ロバプラチン；ロムブリ
 シン；ロメトレキソール；ロニダミン；ロソキサントロン；ロバスタチン；ロキシソルビシ
 ン；ルートテカン（lurtotecan）；ルテチウムテキサフィリン；リゾフィリン；溶菌ペプ
 チド；メイタンシン；マンノスタチンA；マリマスタット；マソプロコール；マスピン；
 マトリリシンインヒビター；マトリックスメタロプロテアーゼインヒビター；メノガリル
 ；メルバロン；メテレリン；メチオニナーゼ；メトクロプラミド；MIFインヒビター；イ
 フェプリストン；ミルテホシン；ミリモスチム；ミスマッチ二本鎖RNA；ミトラシン；ミ
 トグアゾン；ミトラクトール；マイトマイシンアナログ；ミトナフィド；ミトトキシ線
 維芽細胞成長因子サポリン；ミトキサントロン；モファロテン；モルグラモスチム；モノ
 クローナル抗体；ヒト絨毛性ゴナドトロピン；モノホスホリルリビドA+ミオバクテリア
 細胞壁sk；モピダモール；多剤耐性遺伝子インヒビター；多発性腫瘍抑制因子-1ベースの
 療法；マスタード抗癌剤；ミカベルオキシドB；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ミリア
 ポロン；N-アセチルジナリン；N-置換ベンズアミド；ナファレリン；ナグレスチップ；ナ
 ロキソン+ペンタゾシン；ナパビン；ナフテルピン；ナルトグラスチム；ネダプラチン；
 ネモルビシン；ネリドロロン酸；中性エンドペプチダーゼ；ニルタミド；ニサマイシン；酸
 化窒素モジュレーター；ニトロキシド抗酸化物質；ニトルリン；06-ベンジルグアニン；
 オクトレオチド；オキセノン；オリゴヌクレオチド；オナプリストン；オندانセトロン
 ；オندانセトロン；オラシン；経口サイトカイン誘導物質；オルマプラチン；オサテロ
 ン；オキサリプラチン；オキサウノマイシン；パクリタキセルアナログ；パクリタキセル
 誘導体；パラウアミン（palauamine）；パルミトイルリゾキシシン；パミドロロン酸；パナキ
 シトリオール；パノミフェン；パラバクチン；パゼルリブチン；ペガスパルガーセ；ペル
 デシン；ペントサン多硫酸ナトリウム；ペントスタチン；ペントロゾール；ペルフルプロ
 ン；ペルホスファミド；ペリリルアルコール；フェナジノマイシン；フェニルアセテート
 ；ホスファターゼインヒビター；ピシバニル；塩酸ピロカルピン；ピラルビシン；ピリト
 レキシム；プラセチンA；プラセチンB；プラスミノゲン・アクチベータ・インヒビター
 ；白金錯体；白金化合物；白金-トリアミン複合体；ポドフィロトキシシン；ポルフィマー
 ナトリウム；ポルフィロマイシン；プロピルビス-アクリドン；プロスタグランジンJ2；

10

20

30

40

50

プロテアソームインヒビター；プロテインAベースの免疫調節物質；プロテインキナーゼC
 インヒビター；プロテインキナーゼCインヒビター、微小藻類 (microalgal) ；プロテ
 インチロシンホスファターゼインヒビター；プリンスクレオシドホスホリラーゼインヒビ
 ター；プルプリン；ピラゾロアクリジン；ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレン
 コンジュゲート；rafアンタゴニスト；ラルチトレキセド (raltitrexed) ；ラモステロン
 ；rasファルネシルプロテイントランスフェラーゼインヒビター；rasインヒビター；ras-
 GAPインヒビター；ジメチル化レテルリブチン；エチドロネ酸レニウムRe 186；リゾキシ
 ン；リボザイム；RIIレチナミド；ログレチミド；ロヒツカイン (rohitukine) ；ロムル
 チド；ロキニメックス；ルビジノンB1；ルボキシル；サフィンゴール；サントピン；SarC
 NU；サルコフィトールA；サルグラモスチム；Sdi 1模倣物；セムスチン；老化誘導インヒ
 ビター1 (senescence derived inhibitor 1) ；センスオリゴヌクレオチド；シグナル伝
 達インヒビター；シグナル伝達モジュレーター；単鎖抗原結合タンパク質；シゾフィラン
 ；ソブゾキサニ；ナトリウムボロカプテート；フェニル酢酸ナトリウム；ソルベロール；
 ソマトメジン結合蛋白；ソネルミン；スパルホス酸 (sparfosic acid) ；スピカマイシン
 D；スピロムスチン；スプレノペンチン；スポンジスタチン1；スクアラミン；幹細胞イン
 ヒビター；幹細胞分裂インヒビター；スチピアミド、ストロメリシンインヒビター；スル
 フィノシン；過活性血管作用性小腸ペプチドアンタゴニスト；スラジスタ；スラミン；ス
 ワインソニン；合成グリコサミノグリカン；タリムスチン；タモキシフェンメチオダイド
 ；タウロムスチン；タザロテン；テコガランナトリウム；テガフル；テルルラピリリウ
 ム；テロメラーゼインヒビター；テモボルフィン；テモゾロミド；テニボシド；テトラク
 ロロデカオキシド；テトラゾミン；サリブラスチン；サリドマイド；チオコラリン；トロ
 ンボポエチン；トロンボポエチン模倣物；チマルファシン；サイモポイエチンレセプター
 アゴニスト；サイモトリナン；甲状腺刺激ホルモン；スズ・エチル・エチオプルプリン；
 チラパザミン；チタノセンジクロライド；トボテカン；トブセンチン；トレミフェン；全
 能性幹細胞因子；翻訳インヒビター；トレチノイン；トリアセチルウリジン；トリシリビ
 ン；トリメトレキセート；トリプトレリン；トロピセトロン；ツロステリド；チロシンキ
 ナーゼインヒビター；チルホスチン；UBCインヒビター；ウベニメックス；尿生殖洞由来
 成長阻害因子；ウロキナーゼレセプターアンタゴニスト；バプレオチド；バリオリンB；
 ベクター系、赤血球遺伝子療法；ベラレゾール；ベラミン；ベルジン；ベルテボルフィン
 ；ビノレルビン；ビンキサルチン；ビタキシン；ボロゾール；ザノテロン；ゼニプラチン
 ；ジラスコルブおよびジノスタチンスタマラマーが挙げられる。

【0103】

HSAリンカーコンジュゲートはまた、部位特異的に結合した分子および部分を含むこと
 もできる。部位特異的結合によって、例えば抗チューブリン剤、DNAマイナーグループバ
 インダー、DNA複製インヒビター、アルキル化剤、アントラサイクリン、抗生物質、葉酸
 代謝拮抗剤、代謝拮抗剤、化学療法増感剤または放射線増感剤、デュオカルマイシン、エ
 トポシド、フッ化ピリミジン、イオノフォア、レキシトロプシン、ニトロソ尿素、プラチ
 ノール、プリン代謝拮抗剤、ピューロマイシン、ステロイド、タキサン、トポイソメラー
 ゼインヒビター、およびピンカアルカロイド、または本明細書に記載の任意の他の分子も
 しくは部分を含む、細胞毒性剤、免疫調節剤、または細胞増殖抑制剤のHSAリンカー中の
 特定残基に対する、制御された化学量論的付着が可能になる。

【0104】

治療剤をタンパク質、特に抗体に結合させるための技術は周知である（例えば、Arnon
 et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy,
 " in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld et al., eds., Alan R. L
 iss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in Control
 led Drug Delivery (Robinson et al., eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Th
 orpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in
 Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera et al.
 , eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Us

e of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy,” in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin et al., eds., Academic Press, 1985); Thorpe et al., Immunol. Rev. 62:119-58 (1982); および Doronina et al., “Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy,” Nature Biotech. 21:(7)778-784 (2003))。同じく、例えば国際公開公報WO 89/12624も参照されたい。

【0105】

HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、溶解性ペプチドに連結することもできる。そのような溶解性ペプチドは細胞死を誘導し、これらに限定されるわけではないが、ストレプトトリシン0；イソギンチャク (stolichactis) 毒素；ファロリシン；ブドウ球菌 (staphylococcus) のα毒素；ホロスリンA；ジギトニン；メリチン；リゾレシチン；カルジオトキシシン；およびヒモムシ (cerebratulus) のA毒素 (Kemら、J. Biol. Chem. 253 (16) :5752~5757, 1978) を含む。HSAリンカー、またはそれに結合した任意の分子もしくは部分 (例えば、抗体または抗体断片のコンジュゲート) を、任意の天然ペプチドリシンの配列相同性または化学的特徴の一部と共通している合成ペプチドに連結してもよい；このような特徴としては、これらに限定されるわけではないが、直線性、正電荷、両親媒性、および疎水性環境におけるαヘリックス構造の形成が挙げられる (Leuschnerら、Biology of Reproduction 73:860-865, 2005)。また、HSAリンカー、またはそれに結合した任意の分子もしくは部分を、補体媒介性細胞溶解を誘発する剤、例えば免疫グロブリンFcサブユニットなどに連結することもできる。また、HSAリンカー、またはそれに結合した任意の分子もしくは部分を、酵素のホスホリパーゼファミリーの任意のメンバー (ホスホリパーゼA、ホスホリパーゼB、ホスホリパーゼC、またはホスホリパーゼDを含む) に、またはその触媒活性サブユニットに連結することもできる。

【0106】

また、HSAリンカー、またはそれに結合した任意の分子もしくは部分を、検出用途または治療用途のために用いられ得る剤を形成するように放射性剤に連結することもできる。用いられ得る放射性剤としては、これらに限定されるわけではないが、フィブリノーゲン¹²⁵I；フルデオキシグルコース¹⁸F；フルオロドーパ¹⁸F；インスリン¹²⁵I；インスリン¹³¹I；ロベングアン¹²³I；ヨージパミドナトリウム¹³¹I；ヨードアンチピリン¹³¹I；ヨードコレステロール¹³¹I；ヨード馬尿酸ナトリウム¹²³I；ヨード馬尿酸ナトリウム¹²⁵I；ヨード馬尿酸ナトリウム¹³¹I；ヨードピラセト¹²⁵I；ヨードピラセト¹³¹I；ロフェタミン塩酸塩¹²³I；イオメシン¹²⁵I；イオメシン¹³¹I；ヨータラム酸ナトリウム¹²⁵I；ヨータラム酸ナトリウム¹³¹I；チロシン¹³¹I；リオチロニン¹²⁵I；リオチロニン¹³¹I；メリソプロールアセテート¹⁹⁷Hg；メリソプロールアセテート²⁰³Hg；メリソプロール¹⁹⁷Hg；セレノメチオニン⁷⁵Se；テクネチウム^{99m}Tc三硫化アンチモンコロイド；テクネチウム^{99m}Tcピシセート；テクネチウム^{99m}Tcジソフェニン；テクネチウム^{99m}Tcエチドロネート；テクネチウム^{99m}Tcイクサメタジウム；テクネチウム^{99m}Tcフリフォスミン；テクネチウム^{99m}Tcグルセプテート；テクネチウム^{99m}Tcリドフェニン；テクネチウム^{99m}Tcメプロフェニン；テクネチウム^{99m}Tcメドロネート；テクネチウム^{99m}Tcメドロネート二ナトリウム；テクネチウム^{99m}Tcメルチアチド；テクネチウム^{99m}Tcオキシドロネート；テクネチウム^{99m}Tcペンテテート；テクネチウム^{99m}Tcペンテテートカルシウム三ナトリウム；テクネチウム^{99m}Tcセスタミビ；テクネチウム^{99m}Tcシボロキシム；テクネチウム^{99m}Tcスクシマー；テクネチウム^{99m}Tcイオウコロイド；テクネチウム^{99m}Tcテボロキシム；テクネチウム^{99m}Tcテトロフォスミン；テクネチウム^{99m}Tcチアチド；チロキシシン¹²⁵I；チロキシシン¹³¹I；トルポビドン¹³¹I；トリオレイン¹²⁵I；またはトリオレイン¹³¹Iが挙げられる。

【0107】

さらに、放射性同位体を、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートに対して部位特異的に結合させることができる。利用可能な反応性基を用いて、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、^{99m}Tc、¹¹¹In、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁷⁷Lu、⁹⁰Y、⁷⁷As、⁷²As、⁸⁶Y、⁸⁹Zr、²¹¹At、²¹²Bi、²¹³Bi、または²²⁵Acを含む放射性同位体の標識のために部位特異的二官能

10

20

30

40

50

性キレート剤を結合させてもよい。

【0108】

HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートに組み込まれるかまたは連結される治療剤または細胞毒性剤はさらに、例えば、抗癌補助的増強剤を含んでもよく、これには、これらに限定されるわけではないが以下が挙げられる：三環系抗うつ薬（例えば、イミプラミン、デシプラミン、アミトリプチリン、クロミプラミン、トリミプラミン、ドキシペリン、ノルトリプチリン、プロトリプチリン、アモキサピンおよびマプロチリン）；非環系抗うつ剤（例えば、セルトラリン、トラゾドンおよびシタロプラム）； Ca^{2+} アンタゴニスト（例えば、ベラパミル、ニフェジピン、ニトレンジピンおよびカルベリン）、カルモジュリンインヒビター（例えば、プレニルアミン、トリフルオロペラジン、およびクロミプラミン）；アンホテリシンB；トリパラノールアナログ（例えば、タモキシフェン）；抗不整脈薬（例えば、キニジン）；抗高血圧薬（例えば、レセルピン）；チオール枯渇剤（例えば、ブチオニンおよびスルホキシミン）ならびに多剤耐性低減剤、例えばクレマホル（Cremaphor）EL。

【0109】

また、HSAリンカーまたはそれに結合した任意の分子もしくは部分を含む剤を、1つまたは複数のサイトカイン（例えば、顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン- α 、および腫瘍壊死因子- α ）と連結することができ、または一緒に投与することができる。また、HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、代謝拮抗剤に連結することもできる。代謝拮抗剤としては以下の化合物およびこれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されるわけではない：アザチオプリン、クラドリビン、シタラビン、ダカルバジン、リン酸フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビンクロルハイドレート（gencitabine chlorhydrate）、メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトブロニトール、ミトタン、プログアニルクロルハイドレート、ピリメタミン、ラルチトレキセド、トリメトトレキセートグルクロネート、ウレタン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンクリスチンなど。より好ましくは、HSAリンカーまたはコンジュゲートを、葉酸タイプの代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート、プログアニルクロルハイドレート、ピリメタニン、トリメトプリン、またはトリメトトレキセートグルクロネートを含む、ある種の薬剤、またはこれらの化合物の誘導体と連結することができる。

【0110】

また、HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、アクリルビシンクロルハイドレート、ダウノルビシンクロルハイドレート、ドキシルビシンクロルハイドレート、エピルビシンクロルハイドレート、イダルビシンクロルハイドレート、ピラルビシン、またはゾルビシンクロルハイドレートを非限定的に含む、アントラサイクリンファミリーメンバーの腫瘍剤；カンプトテシン、またはその誘導体もしくは関連化合物、例えば、10,11メチレンジオキシカンプトテシン；あるいは、種々の構造的に関連する化合物を含むメイタンシノイドファミリーメンバーの化合物、例えば、アンサミトシンP3、メイタンシン、2'-N-デメチルメイタンブチン、およびメイタンビシクリノールに連結することもできる。

【0111】

HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、公知の化学的方法を用いて細胞毒性剤もしくは治療剤に直接的に連結することもでき、または間接的な結合を介して細胞毒性剤もしくは治療剤に間接的に連結することもできる。例えば、HSAリンカーを、細胞毒性剤または治療剤と結合しているキレート基に結合させることができる。キレート基としては、これらに限定されるわけではないが、イニノカルボキシ（ininocarboxylic）反応性基およびポリアミノポリカルボキシ反応性基である、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、および1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（DOTA）が挙げられる。一般的な方法に関しては、例えば、Liu et al., Bioconjugate Chem. 12(4):653, 2001; Cheng et al., WO 89/12631; Kieffer et al., WO 93/12112; Albert et al., U.S.P.N. 5,753,627; およびWO 91/01144（それぞれが本明細書において参照に

より組み入れられる)を参照されたい。

【0112】

例えばHSAリンカー、(本明細書で定義した介在性ペプチドコネクターを伴うまたは伴わない)1つまたは複数の結合部分、および治療剤または細胞毒性剤を含む、HSAリンカーコンジュゲートを、該結合部分(例えば抗体、抗体断片、またはレセプター/リガンド)によって、細胞または組織に対して特異的に標的とすることができ、それによって、該結合部分が指向される該標的細胞または組織の選択的な破壊が可能になる。例えば、HSAリンカーコンジュゲートが肺、乳房、前立腺、および結腸の癌細胞に特異的に結合する結合部分を含む場合、これらの器官に由来する癌を予防、安定化、その進行を阻害、または治療するために、該HSAリンカーコンジュゲートを用いてこれらの器官における該癌細胞を標的としかつ破壊することができる。また、例えば自己免疫疾患の場合には、(例えば、自己反応性T細胞上に存在する腫瘍壊死因子レセプター2(TNFR2)に結合させかつ拮抗させることによって)自己反応性T細胞を標的とすることによって、脈管構造、脳、肝臓、腎臓、心臓、肺、前立腺、結腸、上咽頭、中咽頭、喉頭、気管支、および皮膚に関連する、加齢関連疾患もしくは状態、タバコ関連疾患もしくは状態、または自己免疫疾患もしくは状態を、予防、安定化、その進行を阻害、または治療するために、例えば、HSAリンカーコンジュゲートを用いて、これらの器官の細胞を標的としかつ破壊することができる。

10

【0113】

HSAリンカーを組み換え的に発現させる場合、細胞毒性ポリペプチドに結合させることができる。細胞毒性ポリペプチドは、標的細胞(例えば、癌細胞)と接触させると、該細胞に対して細胞毒性効果または細胞増殖抑制効果を発揮する。例えば、細胞毒性ポリペプチドは、HSAリンカーと連結された場合、標的細胞の結合の際に標的細胞中で、細胞死をもたらすイベント、例えばアポトーシス、壊死、または老化を誘発できる。あるいは、HSAリンカーと結合させた細胞毒性ポリペプチドは、正常な生物学的細胞活性、例えば、分裂、代謝、および増殖、または異常な生物学的細胞活性、例えば、転移を妨害または阻害できる。

20

【0114】

例えば、カスパーゼ3に結合させたHSAリンカーは、標的細胞(例えば、癌細胞)に結合して、エンドサイトーシスを受けると考えられる。標的細胞によって一旦内部移行されれば、HSAリンカーコンジュゲートのカスパーゼ部分がアポトーシス促進性のカスパーゼカスケードを開始することができ、最終的には該標的細胞のアポトーシスが起こる。

30

【0115】

好ましい態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、癌細胞を殺傷できる細胞毒性ポリペプチドを含む。別の態様では、細胞毒性ポリペプチドは、癌細胞の増殖または転移を阻害する。また、HSAリンカーに結合した細胞毒性ポリペプチドを用いて、固形腫瘍を還流する血管を形成する内皮細胞などの、癌増殖に関連するか、必須であるか、または有益である細胞を殺傷することまたはその増殖を阻害することもできる。

【0116】

一態様では、HSAリンカーコンジュゲートには、標的細胞(例えば、癌細胞)に対する細胞毒性効果または細胞増殖抑制効果の特異性、強度、または持続期間を調節する(例えば、延長させる)ように2つ以上の細胞毒性ポリペプチドを含めることができる。

40

【0117】

別の態様では、HSAリンカーを、活性化可能型の細胞毒性ポリペプチド(例えば、酵素または薬物による切断の際に活性化が可能である、生物学的に不活性なプロ薬剤)に結合させる。この態様では、該細胞毒性ポリペプチドを切断できる酵素または薬物に対して該細胞毒性ポリペプチドプロ薬剤を(例えば、インビボにおいて)曝露することにより、該細胞毒性ポリペプチドを生物学的に活性(例えば、細胞毒性または細胞増殖抑制性)にする。HSAリンカーとの使用のために生物学的活性型へと変換することが可能な生物学的に不活性な細胞毒性ポリペプチドの一例は、プロカスパーゼ(例えば、プロカスパーゼ8または3)である。例えば、HSAリンカーのプロカスパーゼ8ドメインは、標的細胞(例えば

50

、癌細胞)による内部移行の際にTRAILまたはFasLによって切断できる。一旦切断されれば、生物学的に活性なカスパーゼ8は、標的細胞のアポトーシスを促進することができる。

【0118】

一態様では、HSAリンカーに結合した細胞毒性ポリペプチドは、細胞毒性または細胞増殖抑制性を有することが公知である、全長のペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質、またはこれらの生物学的に活性な断片(例えば、「死ドメイン」)を含むことができる。細胞毒性または細胞増殖抑制性を有するペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を(例えば、アミノ酸を置換、変異、短縮、または付加することによって)改変して、本明細書記載の剤への細胞毒性配列の組み込みを容易にすることができる。望ましい改変として、例えば、タンパク質の発現、寿命、細胞分泌、および標的細胞毒性を促進するアミノ酸配列への変更が挙げられる。

【0119】

本発明はまた、任意で結合部分およびペプチドコネクターを含むHSAリンカーとの融合タンパク質として細胞毒性ポリペプチドをコードする核酸分子も提供する。ベクター(例えば、発現ベクター)をトランスフェクトまたは形質導入した細胞中でのHSAリンカーの発現の際に、細胞毒性ポリペプチド、HSAリンカー、および結合部分が(存在するならば)、操作可能に連結される(例えば、融合されるか、隣接して結合されるか、または一緒につながれる)ように、核酸分子を該ベクター内に組み込むことができる。本発明の細胞毒性ポリペプチドとして用いられ得るペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質の例としては、これらに限定されるわけではないが、アポトーシス誘導性タンパク質、例えば、シトクロムc (SEQ ID NO: 39); カスパーゼ(例えば、カスパーゼ3 (SEQ ID NO: 36) およびカスパーゼ8 (SEQ ID NO: 37)); プロカスパーゼ、グランザイム(例えば、グランザイムAおよびB (SEQ ID NO: 38)); 腫瘍壊死因子(TNF)およびTNFレセプターファミリーのメンバー、例としては、TNF- α (TNF α ; SEQ ID NO: 40)、TNF- β 、Fas (SEQ ID NO: 41) およびFasリガンド; Fas-関連死ドメイン様IL-1 β 変換酵素 (FLICE); TRAIL/APO2L (SEQ ID NO: 45) およびTWEAK/APO3L (例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2005/0187177号を参照のこと); Bcl-2ファミリーのアポトーシス促進性メンバー、例としては、Bax (SEQ ID NO: 46)、Bid、Bik、Bad (SEQ ID NO: 42)、Bak、およびRICK (例えば、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第2004/0224389号を参照のこと); 血管アポトーシス誘導性タンパク質1および2 (VAP1 およびVAP2; Masudaら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 278:197~204 (2000)); ピエリシン (pierisin) (SEQ ID NO: 44; Watanabeら、Biochemistry 96:10608~10613 (1999)); アポトーシス誘導性タンパク質 (SEQ ID NO: 43; AIP; Murawakaら、Nature 8: 298~307 (2001)); IL-1 α プロピースポリペプチド(例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,191,269号を参照のこと); アポプチンおよびアポプチン関連タンパク質、例えば、AAP-1 (例えば、参照により本明細書に組み入れられる欧州特許出願公開第EP 1083224号を参照のこと); 抗血管形成因子、例えば、エンドスタチンおよびアンギオスタチン; ならびに他のアポトーシス誘導性タンパク質、例としては、各々が参照により本明細書に組み入れられる以下の国際特許出願公開公報番号および米国特許出願公開: 米国特許出願公開第2003/0054994号、同第2003/0086919号、同第2007/0031423号、WO 2004/078112、WO 2007/012430、およびWO 2006/0125001 (デルタ1およびジャグド (jagged) 1の細胞内ドメイン) に記載されるものが挙げられる。

【0120】

野性型HSAリンカーコンジュゲート

本発明はまた、結合剤、診断剤、または治療剤の形成における、天然の野性型HSAリンカーを包含し、そのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列をそれぞれSEQ ID NO: 3および4に示す。SEQ ID NO: 3に列挙されるアミノ酸配列を有するHSAリンカーを利用する全ての態様では、1つまたは複数の上記のペプチドコネクターを、該HSAリンカーのアミノ末端および/もしくはカルボキシ末端に共有結合させるか、または該HSAリンカー配列内のアミノ

酸残基に共有結合させて、1つまたは複数の結合部分の結合を容易にする。

【0121】

短縮

本発明はさらに、1つまたは複数のペプチドコネクターまたは結合部分と組み合わせてもよい、短縮した野性型HSAポリペプチドを用いて形成される、HSAリンカーコンジュゲートを提供する。野性型の全長HSAアミノ酸配列（すなわち、SEQ ID NO: 3）のアミノ酸のうち1個、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個、50個、100個、200個、またはそれ以上を欠いている野性型HSAポリペプチドを、本明細書において記載されるような任意の結合部分または診断剤または治療剤のいずれかに結合させることができる。短縮は、HSAリンカーの一端または両端で行うことができ、または内部残基の欠失を含むことができる。2つ以上のアミノ酸残基の短縮は一行に並んでいる（すなわち、連続的である）必要はない。野性型HSAリンカーの例としては、1つまたは複数のペプチドコネクターまたは結合部分、1つまたは複数のドメインI（SEQ ID NO: 56；SEQ ID NO: 3の残基1～197）、ドメインII（SEQ ID NO: 54；SEQ ID NO: 3の残基189～385）、もしくはドメインIII（SEQ ID NO: 57；SEQ ID NO: 3の残基381～585）、またはこれらの組み合わせを有するものも、例えば、ドメインIとII、IとIII、およびIIとIIIを組み合わせて有するものが挙げられる。

10

【0122】

コンジュゲート（例えば、二重特異性のHSA-薬物、または放射性同位体含有剤）の血清クリアランス速度は、上記のような短縮型の野性型HSAリンカーを含むコンジュゲートを試験することによって最適化することができる。

20

【0123】

追加的なHSAリンカー修飾

HSAリンカーを、該HSAリンカーのアミノ酸残基の部位特異的修飾によって修飾してもよいが、必須ではない。正確に折り畳まれた三次構造のHSAは、該タンパク質の外面上に特定のアミノ酸残基を提示している。化学的反応性を有するアミノ酸残基（例えば、システイン）を、表面露出したこれらの残基に対して置換することができ、これによって診断剤または治療剤の部位特異的結合が可能になる。

【0124】

代替的または追加的に、任意でHSAリンカー配列からのアスパラギン残基、セリン残基、またはトレオニン残基の追加または除去によってHSAリンカーを修飾して、これらのアミノ酸残基のグリコシル化を改変してもよい。本明細書で述べるように、HSAリンカーに追加されたグリコシル化部位は、表面露出していることが好ましい。HSAリンカーに導入されたグリコシル部分または他の糖質部分を、診断剤、治療剤、または細胞毒性剤に直接結合させることができる。

30

【0125】

システイン（チオール）結合

HSAリンカーの表面露出アミノ酸残基は、診断剤、治療剤、または細胞毒性剤の化学結合を可能にするためにシステイン残基で置換されてもよい。（その天然の三次構造に折り畳まれている場合に）HSAリンカーの表面上に露出したシステイン残基は、マレイミドまたはハロアセチルなどのチオール反応性基に対する診断剤、治療剤、または細胞毒性剤の特異的結合を可能にする。マレイミド基に対するシステイン残基のチオール官能基の求核反応性は、リジン残基のアミノ基またはN末端アミノ基などのタンパク質内の他の全てのアミノ酸官能基と比較して約1000倍高い。ヨードアセチル試薬およびマレイミド試薬におけるチオール特異的な官能性はアミン基と反応し得るが、より高いpH（>9.0）およびより長い反応時間が必要である（Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London）。タンパク質中の遊離チオールの量は、標準的なエルマンアッセイを用いて推定され得る。反応性の遊離チオールを生成するために、ジチオスレイトール（DTT）またはセレノールなどの試薬によるジスルフィド結合の還元（Singhら、Anal. Biochem. 304:147～156（2002））が必要である場合もある。

40

【0126】

50

システイン置換のための部位は、HSAリンカーの表面接触性の解析によって特定され得る（例えば、置換に適したセリン残基およびトレオニン残基の特定は下記の実施例1に記載される）。該表面接触性は、溶媒分子、例えば、水が接触し得る表面積（例えば、平方オングストローム）として表現できる。水の占有領域は半径1.4オングストロームの球に近似される。タンパク質の各のアミノ酸の表面接触性を算出するためのソフトウェアは自由に入手可能であるかまたは使用許可され得る。例えば、結晶学プログラムCCP4 Suiteは、公知のx線結晶学由来の座標を用いてタンパク質の各々のアミノ酸の表面接触性を算出するためのアルゴリズムを使用する（「The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography」Acta. Cryst. D50:760-763 (1994); www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html）。また溶媒接触性は、スイスバイオインフォマティクス研究所（Swiss Institute of Bioinformatics）からダウンロードしたフリーソフトウェアDeep View Swiss PDB Viewerを用いて評価してもよい。表面露出部位でのシステインの置換によって、診断剤または治療剤に連結したチオール反応性基に対する反応性システインの結合が可能になる。

【0127】

グリコシル化

さらに、血清クリアランス速度の改変は、HSAリンカー内部にグリコシル化部位を設計することによって達成できる。特定の態様では、HSAリンカーはグリコシル化されている。ポリペプチドのグリコシル化は、典型的にはN結合型かO結合型のどちらかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への糖質部分の結合を指す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン（ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸を表す）は、アスパラギン側鎖に対する糖質部分の酵素的結合に対する認識配列である。従って、ポリペプチド内にこれらのトリペプチド配列のどちらかが存在することによって、可能性のあるグリコシル化部位が作製される。O結合型グリコシル化とは、糖であるN-アセチルガラクトサミン（acetylgalactosamine）、ガラクトース、またはキシロースのうち一つの、ヒドロキシアミノ酸に対する、最も一般的にはセリンまたはトレオニンに対する結合を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンを用いてもよい。

【0128】

（N結合型グリコシル化部位について）HSAリンカーに対するグリコシル化部位の付加または欠失は、上記したトリペプチド配列の1つまたは複数を作製されるようにアミノ酸配列を改変することによって、好都合に達成される。（O結合型グリコシル化部位について）元のHSAリンカーの配列に対する1つまたは複数のセリン残基またはトレオニン残基の付加、欠失、または置換によって改変を行ってもよい。また、HSA上で得られた糖質構造を、上述の細胞毒性剤、免疫調節剤、または細胞増殖抑制剤の部位特異的結合に用いることができる。

【0129】

他の治療剤と組み合わせたHSAリンカーコンジュゲート

本明細書に記載のHSAリンカーコンジュゲートを、本明細書に記載の治療剤、細胞毒性剤、または細胞増殖抑制剤の1つまたは複数と共に投与してもよい。例えば、乳癌に罹患している患者に、ErbB2およびErbB3 scFv（例えば、B2B3-1）を含むHSAリンカーを投与することができ、これは、乳癌の治療のための一般的な化学療法レジメンである、例えばドキソルビシン、シクロホスファミド、およびパクリタキセルと同時投与することができる。この点に関して使用のために好ましい治療剤は、トラスツズマブである。この組み合わせに関するデータは、後述の実施例42～44に示される。癌治療に有用である追加の生物学および化学的な剤は、本明細書に、例えば付表2に示される。

【0130】

放射線療法または外科手術と組み合わせたHSAリンカーコンジュゲート

放射線療法または外科手術の前に、それと同時に、またはその後に、HSAリンカーコンジュゲートを投与してもよい。例えば、増殖性障害（例えば、乳癌）に罹患している患者に、HSAリンカーコンジュゲートを単独で、または、癌性組織の部位における標的放射線

療法または外科的処置（例えば、乳腺腫瘍摘出術または乳房切除術）と同時に本明細書に記載のその他の治療剤、細胞毒性剤、もしくは細胞毒性剤と組み合わせて、投与することができる。HSAリンカーコンジュゲートとの組み合わせに適した放射線療法としては、近接照射療法および標的術中放射線療法（TARGIT）が挙げられる。

【0131】

薬学的組成物

本明細書で提供される薬学的組成物は、1つまたは複数の結合部分（例えば、抗体または抗体断片）、診断剤（例えば、放射性核種またはキレート剤）、または治療剤（例えば、細胞毒性剤または免疫調節剤）を含むHSAリンカーコンジュゲートの、治療上有効量または診断上有効量を包含する。活性成分であるHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合部分、診断剤、または治療剤と共に調製される）は、種々の薬物送達系における使用のために製剤化することができる。1つまたは複数の生理学的に許容可能な賦形剤または担体を、適切な製剤化のために組成物に含めることができる。本発明での使用に適した製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版（1985）に見出される。薬物送達のための方法の概説については、Langer Science 249:1527~1533（1990）を参照のこと。

【0132】

該薬学的組成物は、予防的および/または治療的な処置のための、例えば経皮手段による、非経口の、経鼻の、局所的な、経口の、または局所的な投与を目的としている。通常は、該薬学的組成物は、非経口的に（例えば、静脈内、筋肉内、または皮下の注射によって）、または経口摂取によって、または局所塗布によって、投与される。従って非経口投与のための組成物は、許容可能な担体に、好ましくは水性の担体に、例えば水、緩衝水、生理食塩水、PBSなどに溶解するかまたは懸濁された、1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤が結合されたまたは結合されていない、HSAリンカーを含み得る。組成物は、適切な生理学的条件に必要な、薬学的に許容される補助物質、例えばpH調節剤およびpH緩衝剤、等張化剤、湿潤剤および界面活性剤などを含んでもよい。本発明はまた、経口送達のための組成物も提供し、これには、錠剤およびカプセルなどの製剤化のための、結合剤または充填剤などの不活性成分が含まれる。さらに本発明は局所投与のための組成物を提供し、これには、クリームおよび軟膏の製剤化のための、溶媒または乳化剤などの不活性成分が含まれる。

【0133】

これらの組成物は従来の滅菌技術によって滅菌されてもよいし、滅菌ろ過されてもよい。得られた水溶液は、そのまま使用するために包装されてもよく、または凍結乾燥されてもよく、該凍結乾燥調製物は、滅菌済の水性担体と投与前に混合される。調製物のpHは、典型的には3~11であり、より好ましくは5~9、または6~8であり、最も好ましくは7~8、例えば7~7.5である。得られた固体形態の組成物は複数の単回投与単位で包装され得、そのそれぞれが、例えば、錠剤またはカプセルの密封包装1つの中の、一定量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を含む。また、固体形態の組成物を、局部適用可能なクリームまたは軟膏用に設計された絞り出し可能なチューブなどの、量を可変にするための容器内に、包装することもできる。

【0134】

有効量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を含む組成物を、予防的および/または治療的な処置のために哺乳動物（例えば、ヒト）に投与することができる。予防的用途において、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を含む組成物は、疾患もしくは病態（例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管系疾患）に感受性であるか、またはさもなくば該疾患もしくは病態を発症するリスクを有する患者に投与される。そのような量は、「予防上有効な用量」と定義される。この使用において、正確な量はやはり患者の健康状態に依存するが、一般的には、1用量あたり

約0.5mg～約400mgの（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）HSAリンカーコンジュゲート（例えば、1用量あたり10mg、50mg、100mg、200mg、300mg、または400mg、またはそれ以上）、および、1用量あたり約0.1μg～約300mgの1つまたは複数の免疫調節剤（例えば、1用量あたり10μg、30μg、50μg、0.1mg、10mg、50mg、100mg、または200mg）の範囲にわたる。1用量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、患者に対して予防的に、1時間あたり、1日あたり、1週間あたり、1ヶ月あたり、または1年あたり1回以上（例えば、1時間あたり、1日あたり、1週間あたり、1ヶ月あたり、または1年あたり2、4、5、6、7、8、9、10、11、または12回）投与することができる。より一般的には、1週間あたり1用量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）が投与される。 10

【0135】

治療用途において、1用量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/、または治療剤とともに調製された）は、疾患または病態（例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管系疾患）に既に罹患している哺乳動物（例えば、ヒト）に、治療に十分な量で、または該疾患もしくは病態およびその合併症の症状の1つもしくは複数の少なくとも部分的に停止もしくは軽減するのに十分な量で、投与される。この目的を達成するのに十分な量は、「治療上有効な用量」と定義される。この使用に有効な量は、疾患または病態の重症度および患者の全身状態に依存し得るが、一般的には、1用量あたり約0.5mg～約400mgの（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）HSAリンカーコンジュゲート（例えば、1用量あたり10mg、50mg、100mg、200mg、300mg、または400mg、またはそれ以上）の範囲にわたる。1用量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、患者に対して治療的に、1時間あたり、1日あたり、1週間あたり、1ヶ月あたり、または1年あたり1回以上（例えば、1時間あたり、1日あたり、1週間あたり、1ヶ月あたり、または1年あたり2、4、5、6、7、8、9、10、11、または12回）投与することができる。より一般的には、1週間あたり1用量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）が投与される。 20

【0136】

いくつかの態様において、患者に、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、1用量あたり約0.5mg～約400mgの範囲で、1週間あたり1回以上（例えば、1週間あたり2、3、4、5、6、または7回、またはそれ以上）、好ましくは、1用量あたり約5mg～約300mgで1週間あたり1回以上、さらにより好ましくは、1用量あたり約5mg～約200mgで1週間あたり1回以上、投与してもよい。また患者に、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を約50mg～約800mgの範囲で隔週に1回、または、HSAリンカー、またはこれに結合された任意の結合剤、診断剤、および/もしくは治療剤を約50mg～約1,200mgの範囲で月1回、投与してもよい。 30

【0137】

他の態様において、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、患者に対して、約0.5mg/週～約2,000 mg/週、約1.0mg/週～約1,000 mg/週、約5mg/週～約500 mg/週、約10mg/週～約100mg/週、約20mg/週～約80mg/週、約100mg/週～約300mg/週、または約100mg/週～約200mg/週の通常の用量範囲で投与してもよい。別の局面では、70 kgの患者へ投与するための本明細書で提供するHSAリンカーコンジュゲートの用量は、例えば約1μg～約5000 mg、約2μg～約4500 mg、約3μg～約4000 mg、約4μg～約3,500 mg、約5μg～約3000 mg、約6μg～約2500 mg、約7μg～約2000 mg、約μg～約1900 mg、約9μg～約1,800 mg、約10μg～約1,700 mg、約15μg～約1,600 mg、約20μg～約1,575 mg、約30μg～約1,550 mg、約40μg～約1,500 mg、約50μg～約1,475 mg、約100μg～約1,450 mg、約200μg～約1,425 mg、約300μg～約1,000 mg、約400μg～約975 mg、約500μg～約650 mg、約0.5 mg～約625 mg、約1 mg～約6 40 50

00 mg、約1.25 mg～約575 mg、約1.5 mg～約550 mg、約2.0 mg～約525 mg、約2.5 mg～約500 mg、約3.0 mg～約475 mg、約3.5 mg～約450 mg、約4.0 mg～約425 mg、約4.5 mg～約400 mg、約5 mg～約375 mg、約10 mg～約350 mg、約20 mg～約325 mg、約30 mg～約300 mg、約40 mg～約275 mg、約50 mg～約250 mg、約100 mg～約225 mg、約90 mg～約200 mg、約80 mg～約175 mg、約70 mg～約150 mg、または約60 mg～約125 mgの範囲であり得る。最適な治療応答を提供するように投与レジメンを調整してもよい。別の局面では、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、隔日で約0.5mg～隔日で約500 mg、好ましくは、隔日で約5mg～隔日で約75mg、より好ましくは、隔日で約10mg～隔日で約50mg、さらにより好ましくは、隔日で20 mg～隔日で約40mgの範囲で、投与してもよい。HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）はまた、約0.5mg×3回/週～約100mg×3回/週、好ましくは、約5mg×3回/週～約75mg×3回/週、より好ましくは、約10mg×3回/週～約50mg×3回/週、さらにより好ましくは、約20mg×3回/週～約40mg×3回/週の範囲で、投与されてもよい。

10

【0138】

本発明における方法の非限定的な態様では、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）は、哺乳動物（例えば、ヒト）に対して、継続的に1、2、3、または4時間；1日に1、2、3、または4回；隔日で、または3日、4日、5日、もしくは6日毎に；1週間に1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回；隔週で；1ヵ月に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30回；隔月で；6ヵ月毎に1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回；1年に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20回；あるいは1年に2回、投与される。HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、治療レジメンの間に異なる頻度で投与してもよい。追加の態様では、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、同じ頻度で患者に投与してもよく、または異なる頻度で患者に投与してもよい。

20

【0139】

所望の治療効果を達成するために必要な、1つまたは複数の診断剤もしくは治療剤およびHSAリンカーまたはそこに結合された任意の剤の量は、選択した具体的な診断剤または治療剤、投与方式、およびレシピエントの臨床状態などの、いくつかの要素に依存する。当業者であれば、1つまたは複数の診断剤または治療剤およびHSAリンカー、またはそこに結合された任意の剤の、所望の結果を達成するのに適した投薬量を決定することができるであろう。

30

【0140】

有効量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を含む組成物の単回または複数回の投与は、処理を行っている医師によって選択された用量レベルおよびパターンで実施可能である。用量および投与スケジュールは、哺乳動物（例えば、ヒト）における疾患または病態の重症度に基づいて決定および調節することができ、これは、臨床医が一般に実施する方法または本明細書に記載の方法により治療経過全体にわたってモニターされ得る。

40

【0141】

HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、哺乳動物対象、例えばヒトに、直接、または当技術分野で公知の任意の薬学的に許容される担体もしくは塩と組み合わせて、投与することができる。薬学的に許容される塩としては、製薬業界で一般に用いられる非毒性の酸付加塩または金属錯体を挙げることができる。酸付加塩の例としては、酢酸、乳酸、パモ酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、パルミチン酸、スベリン酸、サリチル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、またはトリフルオロ酢

50

酸などの有機酸；タンニン酸、またはカルボキシメチルセルロースなどの重合酸（polymeric acid）；および、塩酸、臭化水素酸、硫酸、またはリン酸などの無機酸が挙げられる。金属錯体としては亜鉛および鉄などが挙げられる。薬学的に許容される担体の一例は生理食塩水である。その他の生理学的に許容される担体およびそれらの配合は当業者に公知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載される。

【0142】

診断用途および治療用途

HSAリンカーコンジュゲートは、例えば、増殖性疾患（例えば、黒色腫、明細胞肉腫、および腎臓癌などの癌）、および自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、およびブドウ膜炎）の診断または治療を含む、ヒトにおける診断用途および治療用途に用いることができる。ヒトの増殖性疾患および自己免疫疾患についての以下の記載は、診断用途および治療用途においてHSAリンカーコンジュゲートをどのように適用できるのかについての全体的な理解を当業者に与えるためのものであり、本発明の範囲を限定する意図はない。

【0143】

増殖性疾患（癌）

HSAリンカーコンジュゲートは、これらに限定されるわけではないが、乳癌、黒色腫、明細胞肉腫、腎臓癌（例えば、腎細胞癌）、前立腺癌、肺癌、胃癌、および卵巣癌などの増殖性疾患を、診断、治療、予防、または除去するために使用できる。増殖性疾患を有することが疑われるまたはそれに罹患している患者における診断用途または治療用途のためにHSAリンカーと結合させる結合部分は、増殖性疾患に関連する標的分子（例えば、チロシンキナーゼレセプターなどの細胞表面レセプター）を特異的に結合させるか、アゴナイズするか、活性化するか、拮抗するか、または阻害する能力に基づいて、選択され得る。例えば、インスリン様成長因子レセプター（IGFR、例えば、IGF1RおよびIGF2R）、線維芽細胞成長因子レセプター（FGFR）、血小板由来成長因子レセプター（PDGFR）、血管内皮成長因子レセプター（VEGFR）、腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）、上皮細胞成長因子レセプター（EGFR、例えば、ErbB2（HER2/neu））、Fcレセプター、c-kitレセプター、または間葉上皮移行因子レセプター（c-met；肝細胞成長因子レセプター（HGFR）としても公知）を標的とする結合部分をHSAリンカーに結合させて、増殖性疾患を診断または治療することができる。HSAリンカーコンジュゲートによる癌細胞の特異的結合は、結合された癌細胞の検出（例えば、本明細書で定義したような検出可能標識に結合させたHSAリンカー）または破壊（例えば、細胞毒性剤に結合させたHSAリンカー）を可能にし得る。乳癌および腎臓癌の治療に関するHSAリンカーコンジュゲートの具体的な用途を、下記に記載する。

【0144】

乳癌

一般的な形態の乳癌としては、浸潤性の乳管癌つまり乳管の悪性癌、および浸潤性の小葉癌つまり乳腺小葉の悪性癌が挙げられる。ある種の乳癌細胞は、高レベルの上皮細胞成長因子レセプター、特にErbB2（すなわち、HER2/neu）を発現することが公知である。EGFRの異常なシグナル伝達または無秩序な活性化は、乳癌を含む多くの癌の発達および進行に関連づけられている。機能不全EGFR経路を介して媒介される無制限細胞増殖は、上皮由来の多種多様な固形腫瘍で見出され、データによって、腫瘍のEGFR発現、過剰発現、および調節不全と、疾患の進行、転移の表現型、化学療法に対する耐性、および全体的な予後不良とが関連付けられている。

【0145】

EGFRに特異的な1つまたは複数の結合部分（例えば、抗ErbB2；トラスツズマブ）に結合させたHSAリンカーを、本明細書に記載のように、診断剤（例えば、検出可能標識）、または細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、もしくは治療剤とともに用いて、乳癌を診断または治療することができる。あるいは、本明細書においてさらに記載される、ErbB2およびErbB3

に特異的な結合部分、例えば「B2B3-1」を含む二重特異性HSAリンカーコンジュゲートを用いて、癌、例えば、乳癌、腎臓癌、卵巣癌、および肺癌を診断または治療することができる。

【0146】

上記のとおり、乳癌を治療するために用いられるHSAリンカーコンジュゲートは、放射線療法または外科的処置の前に（例えば、ネオアジュバント化学療法）、同時に、または後に（例えば、アジュバント化学療法）、投与することができる。また、HSAリンカーコンジュゲートを、乳癌の治療に有用な他の化合物（例えば、生物学的治療剤または化学的治療剤などの抗腫瘍剤）と同時に投与することもできる。例えば、有糸分裂阻害剤（例えば、タキサン）、トポイソメラーゼインヒビター、アルキル化剤（例えば白金ベースの剤を含む）、選択的エストロゲンモジュレーター（SERM）、アロマターゼインヒビター、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生物質（例えば、アントラサイクリン抗生物質）、抗VEGF剤、抗ErbB2（HER2/neu）剤、および抗ErbB3剤を含む、表1に列挙される抗腫瘍剤が、乳癌の治療に特に有用であることが公知である。臨床医は、乳癌の治療のために有益であると考えられるかまたはそれが公知である、付表2に列挙されるものを含む任意の化合物と組み合わせて、HSAリンカーコンジュゲートを投与することができる。

10

【0147】

（表1）HSAリンカーコンジュゲートと組み合わせた乳癌の治療のための例示的な抗腫瘍剤

治療薬の分類	例示的な剤 (一般名/商品名)	例示的な用量
有糸分裂阻害剤	パクリタキセル (TAXOL (登録商標) ; ABRAXANE (登録商標))	175 mg/m ²
	ドセタキセル (TAXOTERE (登録商標))	60-100 mg/m ²
トポイソメラーゼインヒビター	カンプトテシン	
	塩酸トポテカン (HYCAMTIN (登録商標))	
	エトポシド (EPOSIN (登録商標))	
アルキル化剤	シクロホスファミド (CYTOXAN (登録商標))	600 mg/m ²
白金ベースの剤	シスプラチン	20-100 mg/m ²
	カルボプラチン (PARAPLATIN (登録商標))	300 mg/m ²
	ネダプラチン (AQUPLA (登録商標))	
	オキサリプラチン (ELOXATIN (登録商標))	65-85 mg/m ²
	サトラプラチン (SPERA (登録商標))	
	四硝酸トリプラチン	
選択的エストロゲン モジュレーター (SERM)	タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標))	20-40 mg/日
	ラロキシフェン (EVISTA (登録商標))	60 mg/日
	トレミフェン (FARESTON (登録商標))	
代謝拮抗剤	メトトレキサート	40 mg/m ²
	フルオロウラシル (5-FU)	500 mg/m ²
	ラルチトレキセド	
抗腫瘍抗生物質	ドキソルビシン (ADRIAMYCIN (登録商標))	40-75 mg/m ²
	エピルビシン (ELLENC (登録商標))	60-120 mg/m ²
アロマターゼインヒビター	アミノグルテチミド (CYTADREN (登録商標))	250-2000 mg/日
	アナストロゾール (ARIMIDEX (登録商標))	1 mg/日
	レトロゾール (FEMARA (登録商標))	2.5 mg/日
	ボロゾール	
	エキセメスタン (AROMASIN (登録商標))	25-50 mg/日
	テストラクトン	
	ファドロゾール (AFEMA (登録商標))	
抗VEGF剤	ベバシズマブ (AVASTIN (登録商標))	10 mg/kg
抗ErbB2 (HER2/neu) 剤	トラスツズマブ (HERCEPTIN (登録商標))	2-8 mg/kg
	ペルツズマブ (OMNITARG (登録商標))	
抗ErbB3 (HER3) 剤	U3-1287 (AMG 888)	

【 0 1 4 8 】

腎臓癌

腎臓癌、例えば腎細胞癌は、従来の放射線療法および化学療法に対して特に耐性である。そういう訳で、HSAリンカーと結合させた生物学的治療剤の適用は、これらの癌に罹患

10

20

30

40

50

している患者にとっての魅力的な選択肢に相当する。例えば、腎癌を治療するために、I型インターフェロンまたはインターロイキン2レセプターをアゴナイズする結合部分と結合させたHSAリンカーを用いることができる。固形腫瘍として、腫瘍血管新生を標的および阻害する結合部分（例えば、ベバシズマブなどの抗血管内皮成長因子（VEGF）抗体）も、治療効果のために用いることができる。

【0149】

自己免疫疾患

HSAリンカーコンジュゲートを用いて、例えばヒト患者における自己免疫疾患および自己免疫障害、例えば、多発性硬化症（MS）、インスリン依存性糖尿病（IDDM）、関節リウマチ（RA）、ブドウ膜炎、シェーグレン症候群、グレーブス病、乾癬、および重症筋無力症などを、診断、治療、予防、または安定化することができる。自己免疫疾患および自己免疫障害は、免疫系の自己反応性要素（例えば、T細胞、B細胞、および自己反応性抗体）によって生じる。そういう訳で、自己反応性の免疫細胞および抗体を阻害、遮断、拮抗、または枯渇させる結合部分（例えば、抗リンパ球または抗胸腺細胞グロブリン；モノクローナル抗体であるバシリキシマブ、ダクリズマブ、またはムロモナブ-CD3）を、治療用途のためにHSAリンカーと結合させることができる。本明細書で定義された、炎症性シグナル伝達インヒビター（ISI）として機能する結合部分を、自己免疫の治療のためにHSAリンカーに結合させることができる。さらに、インテグリン機能を阻害またはこれに拮抗する結合部分（例えば、本明細書で定義されたインテグリンアンタゴニスト）は、疾患の進行を回復または停止できる。

【0150】

他の態様では、該結合部分は、可溶性TNFレセプター、例えばエタネルセプトまたはレネルセプト；炎症促進性サイトカインまたは炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子に対して指向した抗体、例えばアダリムマブ、セルトリズマブ、インフリキシマブ、ゴリムマブ、およびリツキシマブ；ドミナントネガティブな炎症促進性サイトカイン変異体、例えばXENP345、XPROTM1595、アナキンラ、ならびに、米国特許出願公開第20030166559号および同第20050265962号に開示された変異体；炎症促進性サイトカインまたは炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子の下流のシグナル伝達経路のインヒビター、例えば、DE 096、5-アミノ-2-カルボニルチオペン誘導体（WO2004089929に記載）、ARRY-797、BIRB 796 BS、(1-5-tert-ブチル-2-p-トリル-2H-ピラゾール-3-イル)-3-[4-2(モルホリン-4-イル-エトキシ)-ナフタレン-1-イル]-尿素、CHR-3620、CNI-1493、FR-167653（Fujisawa Pharmaceutical, Osaka, Japan）、ISIS 101757（Isis Pharmaceuticals）、ML3404、NPC31145、PD169316、PHZ1112、RJW67657、4-(4-(4-フルオロフェニル)-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル)-3-ブチン-1-オール、SCIO-469、SB202190、SB203580、(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジニル)-1H-イミダゾール)、SB239063、トランス-1-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)-4-(4-フルオロフェニル-メトキシピリジミジン-4-イル)イミダゾール、SB242235、SD-282、SKF-86002、TAK 715、VX702、およびVX745；あるいは、TNF- α 変換酵素（TACE）のインヒビター、例えばBB-1101、BB-3103、BMS-561392、ブチニルオキシフェニル β -スルホンピペリジンヒドロキシマート、CH4474、DPC333、DPH-067517、GM6001、GW3333、Ro 32-7315、TAPI-1、TAPI-2、およびTMI 005）；あるいは、抗イディオタイプ剤、例えばモノクローナル抗体、LJP 394（abetimus, RIQUENT（登録商標）、La Jolla Pharmaceuticals）である。

【0151】

他の態様では、該結合部分は、本明細書に記載のインターフェロンである。HSAリンカーに結合可能な結合部分としては、例えば、インターフェロン- β （REBIF（登録商標）（IFN- β -1a）、AVONEX（登録商標）（IFN- β -1a）、およびBETASERON（登録商標）（IFN- β -1b））、インターフェロン-t（TAUFERONTM）、インターフェロン- α （例えば、ROFERON-N-A（登録商標）（IFN- α -2a）、INTRON-A（登録商標）（IFN- α -2b）、REBETRON（登録商標）（IFN- α -2b）、ALFERON-N（登録商標）（IFN- α -n3）、PEG-INTRON（登録商標）（モノメトキシポリエチレングリコールと共有結合したIFN- α -2b）、INFERGEN（登録商

標) (IFN- α -2bに対して88%の相同性を有する、非天然1型インターフェロン)、またはPEGASYS(登録商標)(ペグ化IFN- α -1a))、ならびにACTIMMUNE(登録商標)(IFN-g-1b)が挙げられる。

【0152】

本発明はさらに、自己免疫を治療するための、これらの炎症促進性分子またはその特異的レセプターに拮抗する結合部分を有するHSAリンカーコンジュゲートを提供する。MSおよびRAの診断および治療に関するHSAリンカーコンジュゲートの具体的な適用は、下記に記載されている。

【0153】

多発性硬化症

多発性硬化症(MS)は、中枢神経系(CNS)の神経の不可逆的な変性を特徴とする神経学的疾患である。根源的な原因は不明であるが、MSにおける神経変性は、脱髄すなわち、通常は外層を裏打ちして神経を絶縁するタンパク質であるミエリンの剥離の直接的結果である。T細胞は、MSの発症に重要な役割を果たしている。正常な白質でない、炎症を起こしたMS病変は、ヒトHLA-DR2などのMHCクラスII関連分子によって提示される自己抗原に反応する、浸潤性CD4⁺T細胞を有し得る。浸潤性CD4T細胞(T_H1細胞)は、炎症促進性サイトカインIL-2、IFN- γ 、およびTNF- α を産生し、これが、マクロファージなどの抗原提示細胞(APC)を活性化して、さらなる炎症促進性サイトカイン(例えば、IL-1 β 、IL-6、IL-8、およびIL-12)を産生させる。IL-12はさらにIFN- γ 合成を誘導する。その結果、神経鞘の進行性脱髄が起こり、これがヒト疾患につながる。

【0154】

MSの診断を補助するためにHSAリンカーコンジュゲートを用いることができる。診断用HSAリンカーコンジュゲート(例えば、二重特異性HSAリンカーコンジュゲート)は、1つまたは複数の免疫細胞活性化マーカー(例えば、CD69、CD28、HLA-DR、およびCD45)を特異的に標的する結合部分を含む。他の因子または細胞に対する1つまたは複数のこれらの炎症促進性または免疫細胞活性化メディエーターの不均衡は、診断剤(例えば、放射性同位体または蛍光色素)と結合されたHSAリンカーコンジュゲートを用いることによって測定され得る。

【0155】

MSに罹患しているかもしくはその発症リスクを有する人を治療するため、または該疾患の症状を予防、寛解、もしくは治癒するために、HSAリンカーコンジュゲートを用いることができる。例えば、 α 4インテグリン(例えば、ナタリズマブ)、CD52(例えば、アレムツズマブ)、CD80、P-セレクトリン、スフィンゴシン-1-リン酸レセプター-1(S1PR1)、ヒアルロン酸レセプター、白血球機能抗原-1(LFA-1)、CD11(例えば、エファリズマブ)、CD18、CD20(例えば、リツキシマブ)、CD85、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、またはCCR5を特異的に標的しかつ拮抗する結合部分は、MSに罹患している患者での治療用途のためにHSAリンカーに結合させた場合に、有用であり得る。同様に、I型インターフェロン(例えば、インターフェロン α およびインターフェロン β)を中和するかまたはI型インターフェロンレセプター(例えば、IFN α R1)に拮抗する結合部分もまた、治療用途のためにHSAリンカーに結合させることができる。

【0156】

関節リウマチ

関節リウマチ(RA)は、免疫系による関節の攻撃が起こっている慢性的な炎症性自己免疫障害である。これは、日常生活に支障を来し(disabling)かつ疼痛性の炎症状態であり、疼痛および関節破壊によって運動機能の実質的な喪失をもたらし得る。RAは全身性の疾患であって、皮膚、血管、心臓、肺、および筋肉を含む身体全体にわたって関節外組織に影響を与える場合が多い。

【0157】

RAに罹患している患者ではしばしば、HLA-DR4/DR1クラスターの細胞性発現が増大している。これらの細胞表面分子の一つまたは両方に特異的なHSAリンカーコンジュゲートは

、RAの診断に有用である。

【0158】

RAに罹患しているかもしくはその発症リスクを有する人を治療するため、または該疾患の症状を予防、寛解、もしくは治癒するために、HSAリンカーコンジュゲートを用いることができる。例えば、本明細書で定義された結合部分は、TNF- α （例えば、エタネルセプト、インフリキシマブ、およびアダリムマブ）、IL-1（例えば、アナキンラ）、またはCTLA-4（例えば、アバタセプト）を特異的に標的しかつこれに拮抗する。RAを治療または予防するために、B細胞を特異的に標的しかつ枯渇させる結合部分（例えば、リツキシマブなどの抗CD20抗体）もまた、本明細書に記載のHSAリンカーに結合させることができる。

【0159】

ブドウ膜炎

ブドウ膜炎とは、具体的には眼球の中間層の炎症を指すが、眼球の内部に關与する任意の炎症性プロセスを指す場合もある。ブドウ膜炎は、自己免疫性原因によっても特発性原因によってもよい。

【0160】

自己免疫性ブドウ膜炎に罹患しているかもしくはその発症リスクを有する人を治療するため、または該疾患の症状を予防、寛解、もしくは治癒するために、HSAリンカーコンジュゲートを用いることができる。自己免疫性または特発性のブドウ膜炎に関連する炎症を低減または消失させるために、例えば、 α -フェトプロテイン（例えば、ヒトAFP；NCBIアクセッション番号NM_001134）またはその生物学的活性断片を、HSAリンカーに結合させることができる。

【0161】

キット

本発明はさらに、HSAリンカーならびに1つまたは複数の結合部分（例えば、抗体または抗体断片）、診断剤（例えば、放射性核種またはキレート剤）、および治療剤（例えば、細胞毒性剤または免疫調節剤）と共に、必要に応じて、これらを該HSAリンカーに結合させるために使用可能である試薬を含む、薬学的組成物と、薬学的に許容される担体とを、疾患または病態（例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管疾患）を治療するための治療上有効量で含む、キットを提供する。キットは、それに含まれる組成物を実施者（例えば、医師、看護師、または患者）が投与することを可能にするための説明書を含む。

【0162】

好ましくは、キットは、有効量のHSAリンカーまたは、任意のその結合コンジュゲート（例えば、抗体または抗体断片（例えば、scFv））、診断用コンジュゲート（例えば、放射性核種またはキレート剤）、および/もしくは治療用コンジュゲート（例えば、細胞毒性剤または免疫調節剤）を含む、単一用量の薬学的組成物の複数パッケージを含む。任意で、薬学的組成物を投与するのに必要な説明書またはデバイスをキットに含めてもよい。例えばキットは、有効量のHSAリンカー、またはそれに結合した任意の結合剤、診断剤、および/もしくは治療剤を含む、1つまたは複数の充填済み注射器を提供し得る。さらに、疾患または病態（例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管疾患）に罹患している患者がHSAリンカーまたはそれに結合させた任意の結合剤、診断剤、および/もしくは治療剤を含む薬学的組成物を用いるための、説明書または投与スケジュールなどの追加の構成要素を、キットに含めてもよい。

【0163】

本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、本発明の組成物、方法、およびキットにおいて種々の修飾および変更がなされ得ることは、当業者には明白であろう。従って、添付の特許請求の範囲およびその等価物内の範囲に入るという条件で、本発明の修飾および変更は本発明に包含されることが意図される。

【実施例】

【0164】

以下の実施例は、限定目的ではなく、単なる例示の目的で提供されるものである。当業

10

20

30

40

50

者は、本質的に同じまたは類似した結果を得るために種々の重要でないパラメーターを変更または改変できることを容易に認識するであろう。

【0165】

実施例1：細胞毒性薬または細胞増殖抑制薬の部位特異的結合のためのHSAリンカー中の残基を同定する方法

HSAに対する薬物の特異的結合のための部位を特定するために、結晶構造を調査して、表面に露出したセリン残基およびトレオニン残基を同定する。これらの特定の表面露出したアミノ酸をその後システインに変異させることができ、これによって、マレイミドのようなチオール特異的結合を用いた、置換されたシステインへの薬物の結合が可能になる。薬物結合の前には、温和な還元が必要であり得る。結合させる薬物の数は、HSAに導入される、表面露出したシステイン残基の数によって、制御される。どちらも大部分の構造がシステインと同一であるので、セリンおよびトレオニンは変異のための最も適切な残基として選択されるが、他の表面露出した残基を変異させてシステインとしてもよく、細胞増殖抑制薬または細胞毒性薬に対して成功裏に結合しうる。

【0166】

HSAの結晶構造は、RSCB Protein Data Bankに寄託されている (1bm0 - Sugio et al., "Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution," Protein Eng. 12:439-446 (1999))。この構造は、スイスバイオインフォマティクス研究所からダウンロードしたDeep View Swiss PDB Viewerを用いて解析された。50%、40%、および30%表面露出したセリンおよびトレオニンの残基を、システインへの変異に最も適しているとした (表2)。標準的な分子生物学的手順を用いて変異を導入することができる。導入されたシステインへのチオール反応薬またはキレート剤の結合は、標準的なタンパク質化学技術を用いて試験することができる。

【0167】

(表2)

%表面露出	残基
50	T496
40	S58
30	T76, T79, T83, T125, T236, S270, S273, S304, S435, T478, T500, T508

【0168】

実施例2：アスパラギン連結グリコシル化部位の導入のためのHSAリンカー中の残基を同定する方法

HSA中のアスパラギン連結グリコシル化部位の導入のための領域を特定するために、結晶構造を調査して、表面露出した (>30%) アスパラギン、セリン、およびトレオニンの残基が変異に適しているとする。コンセンサス配列であるアスパラギン-x-セリン/トレオニン (ここで、xはプロリンではない) が存在する場合、グリコシル化はアスパラギン残基で起こる。表2は、アスパラギン連結グリコシル化の導入のためのHSA中の可能な変異部位を列挙している。

【0169】

(表3)

10

20

30

40

残基	提案される変異
Gln32	Asn
Val46	Ser/Thr
Asp56	Asn
Asp63	Ser/Thr*
Glu231	Asn
Asp237	Asn
Gln268	Asn
Asp269	Ser/Thr
Glu285	Asn
Ala320	Ser/Thr*
Asp340	Asn
Glu354	Asn
Gln437	Asn
Glu425	Asn
Glu465	Asn
Asp494	Asn*

* これらの変異がHSA内で起こることは滅多に無いことも、報告されている (Carlson et al., "Alloalbuminemia in Sweden: Structural study and phenotypic distribution of nine albumin variants," Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:8225- 8229 (1992); Madison et al., "Genetic variants of human serum albumin in Italy: point mutants and a carboxyl-terminal variant," Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:6476-6480 (1994); Hutchinson et al., "The N-terminal sequence of albumin Redhill, a variant of human serum albumin," FEBS Lett. 193:211-212 (1985); Brennan et al., "Albumin Redhill (-1 Arg, 320 Ala-Thr): a glycoprotein variant of human serum albumin whose precursor has an aberrant signal peptidase cleavage site," Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:26-30 (1990); Minchiotti et al., "Structural characterization of four genetic variants of human serum albumin associated with alloalbuminemia in Italy," Eur. J. Biochem. 247:476-482 (1997); Peach et al., "Structural characterization of a glycoprotein variant of human serum albumin: albumin Casebrook (494 Asp-Asn)," Biochim. Biophys. Acta 1097:49-54 (1991))。

【 0 1 7 0 】

実施例3

B2B3-1は、ヒト抗ErbB2 scFv抗体であるB1D2 (SEQ ID NO: 27)、および、ヒト抗ErbB3 scFvであるH3 (SEQ ID NO: 26)を含む、二重特異性scFv抗体融合分子である。2つのscFvは、修飾されたヒト血清アルブミン (HSA) リンカーによって連結されている。抗ErbB3 scFvであるH3は、短いコネクターポリペプチドを組み込んでいるHSAリンカーのアミノ末端に組み換えによって融合されており、抗ErbB2 scFvであるB1D2は、さらなる短いコネクターポリペプチドを組み込んでいる該修飾HSAリンカーのカルボキシ末端に組み換えによって融合されている。各々のコネクターポリペプチドは、プロテアーゼ耐性の特性に基づいて選択される。該修飾HSAリンカーは2つのアミノ酸置換を含む。天然HSAの34位のシステイン残基を、この部位での酸化に起因する潜在的なタンパク質の不均一性を低下させるために、セリンに変異させる。薬理学的半減期を低下させ得る脱アミドに対して天然HSAでは感受性であり得る、天然HSAのアミノ酸503のアスパラギン残基を、グルタミンに変異させる。その抗ErbB2 scFv結合部分の高い親和性 (10.0nM~0.01nMの範囲のkD、より好ましくは約0.3nMのkDを有する) のために、B2B3-1は、ErbB2を過剰発現している腫瘍に選択的に結合すると考えられている。続いて50~1nMの範囲、より好ましくは約16nMのkDを有する抗ErbB3 scFvによりErbB3が結合することによって、ErbB3のHRG誘導性リン酸化が阻害される。修飾HSAリンカーは、該二重特異性分子の循環半減期を延長させる。B2B3-1は分子量119.6kDaを有し、好ましくはグリコシル化されていない。

【0171】

B2B3-1は、ナノモル未満の力価でErbB3のリガンド誘導性リン酸化を阻害し；この活性は少なくとも部分的に、その二量体化パートナーであるErbB2の大量発現によるものと考えられ、このことによって、両方のレセプターを発現している癌細胞の特異的標的化が容易になる。

【0172】

実施例4

図2に示されるとおり、B2B3-1変異体は、ZR75-1乳癌細胞においてHRG誘導性のpErbB3を阻害する。ZR75-1乳癌細胞を、ある用量範囲のB2B3-1変異体で24時間処理した後、HRG刺激を行う。ELISAによって細胞溶解物中でpErbB3レベルを測定し、パーセント阻害と共にIC₅₀値を算出する。繰り返し実験を表すエラーバーと共にIC₅₀平均値（Y軸）を示す。対応するバーの上にパーセント阻害値を示す。

【0173】

ELISAアッセイ

特記しない限り、全ErbB3およびリン酸化ErbB3のELISAのためのELISA試薬は、R&D Systemsより購入したDUOSETキットである。96ウェルのNUNC MAXISORBプレートを抗体50 μ lで被覆し、室温で一晩インキュベーションする。翌朝、カルシウムおよびマグネシウムを含まないDulbeccoリン酸緩衝生理食塩水（PBS）にTween界面活性剤を含めたもの（PBST）（0.05% Tween-20）を用いるBIOTEKプレートウォッシャー内で1000 μ l/ウェルでプレートを3回洗浄する。続いて、2% BSAを含むPBSを用いて、室温で約1時間プレートをブロッキングする。PBSTを用いるBIOTEKプレートウォッシャー内で1000 μ l/ウェルでプレートを3回洗浄する。細胞は、37°Cおよび5%二酸化炭素で増殖させ、冷PBSで洗浄した後、150mM NaCl、5mMピロリン酸ナトリウム、10 μ M bpV(phen)、50 μ M フェニルアルシン、1mM オルトバナジン酸ナトリウム、およびプロテアーゼインヒビターカクテル（Sigma、P2714）を添加した哺乳動物タンパク質抽出（MPER）溶解緩衝液（Pierce, 78505）を用いて回収する。さらなる処理に関しては、50%溶解緩衝液および1% BSAで希釈した50 μ Lの細胞溶解物および標準を2つ組で使用する。試料を4°Cで2時間、プレートシェーカー上でインキュベーションし、上述のように洗浄する。約50 μ lの検出抗体を2% BSAで希釈し、PBSTを添加し、室温で約1~2時間インキュベーションする。リン酸化ErbB3については検出抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）に直接結合させるが、全ErbB3についてはビオチン化マウス抗ヒトErbB3二次検出抗体を使用する。プレートを上述のように洗浄する。全ErbB3については約50 μ lのストレプトアビジン-HRPを添加して30分間インキュベーションし、プレートを上述のように洗浄する。約50 μ lのSUPERSIGNAL ELISA Pico（Thermo Scientific）基質を添加し、FUSIONプレートリーダーを用いてプレートを読み取る。2つ組の試料は平均され、存在する場合、エラーバーは2つの複製物の間の標準偏差を表す。

【0174】

実施例5

B2B3-1変異体A5-HSA-B1D2（図3~5のパネルA）、H3-HSA-B1D2（図3~5のパネルB）、H3-HSA-F5B6H2（図3~5のパネルC）、およびF4-HSA-F5B6H2（図3~5のパネルD）による24時間の前処理の後に、リン酸化ErbB3（図3A~D）、AKT（図4A~D）、およびERK（図5A~D）の阻害を測定する。BT474乳癌細胞を、ある用量範囲のB2B3-1変異体で24時間処理した後、HRG刺激を行う。ELISAによって細胞溶解物中でpErbB3、pAKT、およびpERKのレベルを測定し、パーセント阻害と共にIC₅₀値を算出する。これらの結果は、10⁻⁸モルおよびそれ以上の濃度においてAKT、ERK、およびErbB3のHRG誘導性リン酸化を50%超阻害するHSAリンカーコンジュゲートは、試験したものの中でB1B2-1のみであることを実証するものである。

【0175】

実施例6

図6に示すとおり、B2B3-1変異体によるBT474乳房腫瘍細胞の処理は、G1細胞周期停止、およびS期の細胞群の減少を引き起こす。BT474細胞を、1 μ MのB2B3-1変異体および対照を用いて72時間処理する。処理の終了後、細胞をトリプシン処理して、ヨウ化プロピジウム

を含む低張液中に穏やかに再懸濁し、単一の細胞をフローサイトメトリーによって解析する。G1期およびS期の細胞周期分布は、細胞周期分析のために設計された曲線あてはめアルゴリズム (FlowJoソフトウェア細胞周期プラットフォーム) を用いて測定する。

【0176】

実施例7

B2B3-1 (SEQ ID NO: 16) は、その二量体化パートナーであるErbB2の大量発現を利用してErbB3活性化を阻害し、腫瘍細胞を標的する。高親和性抗ErbB2 scFv抗体であるB1D2は、ErbB2を過剰発現している腫瘍細胞をB2B3-1が標的とするのを容易にする。修飾HSAリンカーによってB1D2を低親和性の抗ErbB3 scFv抗体であるH3に接続し、これが、ErbB3のリガンドであるHRGの結合を遮断する。B2B3-1によって媒介される、ErbB3リン酸化および下流のAKTシグナル伝達の阻害は、この遮断によるものと考えられる。ErbB2結合性scFvであるB1D2は、作動作用も拮抗作用も有さない親scFvのC6.5に由来する。従ってB1D2は、単なる標的剤として機能する可能性が高い。ErbB3結合性scFvの比較的低い結合親和性により、ErbB3を発現しているがErbB2はほとんどまたは全く発現していない正常な非癌性組織とB2B3-1との強い結合が妨害されと考えられ、それによって非特異的な毒性の可能性が低下する。ErbB2とErbB3の両方を発現している腫瘍細胞では、両方のレセプターに結合する二重特異性B2B3-1の結合活性の影響が存在し、これによって、ErbB3 scFvの親和性の低さが克服され、ErbB3レセプター複合体とのHRG相互作用の強力な阻害が可能になる。

【0177】

ErbB3に対するHRG結合をB2B3-1が阻害する能力は、フローサイトメトリー (FACS) を用いて調べる。ヒト乳癌細胞株 (ErbB2を過剰発現するBT-474の変異体) の細胞を、 $1\mu\text{M}$ のB2B3-1で前処理した後、 10nM のビオチン化HRG 1β EGFドメインとともにインキュベーションする。徹底的に洗浄した後、ストレプトアビジン-AlexaFluor 647コンジュゲートを用いて結合を評価する。全てのインキュベーションを 4°C で行う。図7は、ErbB3に対するHRGの結合をB2B3-1が遮断できることを示し、濃度 $1\mu\text{M}$ で100%遮断が提供されるようである。

【0178】

実施例8

ErbB3に対するHRGの結合を遮断できるB2B3-1の能力を実証した後、ErbB3を発現しかつErbB2を過剰発現している2つの細胞株におけるインビトロErbB3シグナル伝達に対するB2B3-1の効果を調査する。ヒト乳癌細胞株BT-474-M3 (例えばDrummond et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:3392; Park et al. (2002) Clin. Cancer Res. 8:1172; Kirpotin et al. (2006) Cancer Res. 66:6732に記載) およびZR7530 (US NIH Lawrence Berkeley National Laboratory breast cancer cell collectionより入手可能) を、一晚にわたり血清飢餓処理し、24時間にわたりB2B3-1の用量滴定で前処理した後、10分間にわたり 5 nM のHRG 1β EGFドメインで刺激する。その後、ほぼ上述したとおりにELISAアッセイを用いてErbB3およびAKTのリン酸化状態を調べる。その結果、両細胞株において、用量依存的様式で、かつ強力な IC_{50} で、ErbB3およびAKT両方のリン酸化のHRG誘導性活性化をB2B3-1が阻害することが示される (図8A~D)。

【0179】

実施例9

図9は、BT474乳癌細胞におけるシグナル伝達タンパク質に対するB2B3-1処理の効果を示す。細胞を、ある用量範囲のB2B3-1を用いて24時間処理した後、ヘレグリン刺激を行う。pErbB2、pErbB3、pErk、およびpAKTのレベル、ならびにこれらの対応する総タンパク質レベルを、細胞溶解物についてウェスタンブロット分析によって測定する。少なくともpErbB2およびpErbB3のレベルはB2B3-1処理によって用量依存的様式で低下することが、結果により示される。

【0180】

実施例10

図10は、B2B3-1処理したBT474乳癌細胞の免疫沈降-ウェスタンブロット分析を示す。細

10

20

30

40

50

胞を、ある用量範囲のB2B3-1を用いて24時間処理した後、ヘレグリン刺激を行う。ErbB2に会合した複合体を、抗ErbB2抗体を用いて細胞溶解物から単離した後、ウェスタンブロット分析によってpErbB2およびpErbB3、ならびに対応する総タンパク質のレベルを検出する。抗ErbB2抗体によって実質的により多くのErbB3およびリン酸化ErbB3が沈降するように、B2B3-1がErbB2をErbB3に架橋させていることが、結果により示される。

【0181】

実施例11

B2B3-1の抗腫瘍活性を、いくつかのアッセイを用いてインビトロで調べる。第一のアッセイでは、G1期のBT-474細胞またはSKBR3細胞の蓄積に対するB2B3-1の影響、ならびに随伴するS期の細胞周期の減少を調べる。簡潔に言うと、細胞を1 μ MのB2B3-1またはPBSビヒクルを用いて72時間処理する。処理の終了後、細胞をトリプシン処理して、ヨウ化プロピジウムを含む低張液中に穏やかに再懸濁し、単一の細胞をフローサイトメトリーによって解析する。G1期およびS期の細胞周期分布は、細胞周期分析のために設計された曲線あてはめアルゴリズム (FlowJoソフトウェア細胞周期プラットフォーム, Tree Star, Inc.) を用いて測定する。B2B3-1は、S期の細胞の割合をわずかに低下させ、G1期の細胞群を増大させることが見出された (図11A)。第二の実験では、B2B3-1による処理の後に形成された細胞コロニーの数を調べる。乳癌細胞BT-474およびSKBR3を1 μ MのB2B3-1の存在下でプレーティングし、培地のみにプレーティングした細胞と比較する。培地のみまたは処理を含む培地は、3日毎に補充する。14日後、コロニー数を計数して、処理なしの細胞と比較する。図11Bは、B2B3-1で細胞を処理した場合に形成されるコロニーの数が対照細胞と比較して40~45%低下することを示している。最後に、B2B3-1が細胞増殖を阻害する能力を、Real-Time Cell Electronic Sensing System(RT-CES; ACEA Biosciences)を用いる細胞インピーダンスアッセイで評価する。BT-474細胞を、マイクロエレクトロニクスセンサーアレイを組み込んだプレート上に播種して、B2B3-1または培地のみの用量滴定で72時間処理する。細胞-電極インピーダンス応答の発生を表すデータを72時間にわたり1時間毎に収集し、IC₅₀値を処理から68時間後に算出する。図11Cは、B2B3-1がBT-474細胞のインピーダンスを33nMのIC₅₀で阻害できたことを示す。

【0182】

実施例12

本発明者らはまた、B2B3-1が、ErbB2レセプターとErbB3レセプターに同時に結合して架橋できるその能力に基づいて、アゴニスト活性を呈するか否かも検討した。血清飢餓処理したZR75-1乳癌細胞を1 μ MのB2B3-1またはPBSビヒクルとともに24時間インキュベーションする。また細胞を、B2B3-1またはPBSビヒクルで24時間処理した後、5nMのHRG 1 β EGFドメインを用いて10分間刺激する。細胞を溶解し、ほぼ上述したとおりのELISAによって、溶解物のpErbB3含量を評価する。図12は、B2B3-1のみで処理した細胞が、処理なしの細胞のレベルと同等レベルのリン酸化ErbB3を含んでいたことを示し、これにより、B2B3-1はErbB3リン酸化を促進するアゴニストとしては作用しないことが示される。

【0183】

実施例13

ErbB2およびErbB3に対して特異的に結合でき、関連するErbBファミリーメンバーであるEGFRおよびErbB4には結合できないB2B3-1の能力を、ELISAによって調べる。プレートを、ErbB2またはErbB3いずれかの組み換え細胞外ドメインで被覆する。プレートをブロッキングして、競合するEGFR、ErbB2、ErbB3、またはErbB4の組み換え細胞外ドメインの連続希釈物の存在下で、半最大結合濃度のB2B3-1を用いてインキュベーションする。ErbB2被覆プレートに対するB2B3-1結合を遮断したのは可溶性ErbB2細胞外ドメインだけであったことが、結果により示される (図13A)。同様に、ErbB3被覆プレートに対するB2B3-1結合を遮断したのは、可溶性ErbB3細胞外ドメインだけであった (図13B)。これらの結果は、ErbB2に対する、抗ErbB2アームであるB1D2の特異性、およびErbB3に対する、抗ErbB3アームであるH3の特異性を実証するものと考えられる。ErbB3被覆プレート上でB2B3-1と共に可溶性ErbB2細胞外ドメインをインキュベーションした場合に観察されたシグナルの増大は

、該プレート上でのErbB2-ErbB3-B2B3-1複合体の形成によるものと考えられる。

【0184】

実施例14

B2B3-1の単特異性変異体を用いて、ErbB2およびErbB3の両方を発現している腫瘍細胞に結合できるB2B3-1の能力を調査した。SK0-2 (SEQ ID NO: 67) およびSK0-3 (SEQ ID NO: 68) は、それぞれErbB2またはErbB3と相互作用できる能力を欠いた、B2B3-1の変異体である。

【0185】

鋳型ベクターの対向する鎖にそれぞれ相補的なオリゴヌクレオチドプライマー対を用いるQUICKCHANGE部位特異的突然変異誘発キット (STRATAGENE) を用いて、SK0-2およびSK0-3を構築する。これらは温度サイクルの間に伸長し、互い違いのニックを含む変異プラスミドを生じる。温度サイクルに続いて、親DNA鋳型を消化するために用いられるDpn Iで生成物を処理する。所望の変異を含む、ニックの入ったベクターDNAを次に、XL1-BLUE supercompetent cells (STRATAGENE) 内に形質転換し、プラスミドDNAを増殖させる。

【0186】

SK0-2を作製するために、抗ErbB2 scFvであるB1D2のVH CDR3ループ内の5ヌクレオチドを変異させて、以下のアミノ酸置換を生じる：H95A、W100hA、およびE100jA。これらの位置における変異は、B1D2親scFvであるC6.5のErbB2に対する結合をロックアウトすることが実証されている (Schier et al, 1996 JMB)。段階的な様式で、B2B3-1プラスミドpMP9043 (SEQ ID NO: 60) に変異を導入する。まず、プライマー

5'-GTA CTT TTG TGC CCG GGC CGA TGT GGG CTA CTG C -3' (SEQ ID NO:61)

および

5'-GCA GTA GCC CAC ATC GGC CCG GGC ACA AAA GTA C -3' (SEQ ID NO:62)

と、以下の温度サイクルを用いて、変異c295gおよびa296cを作成する：95℃1分間の後、95℃1分間、55℃1分間、および65℃17.2分間を30サイクル。プラスミドDNAのDNA配列決定によって、変異を確認する。t334g、g335c、およびa341cに変異を導入するために、c295gおよびa296cに配列確認済みの変異を有するプラスミドに対して、プライマー

5'-GAC ATG TGC CAA GGC CCC CGC GTG GCT GGG AGT G -3' (SEQ ID NO:63)

および

5'-CAC TCC CAG CCA CGC GGG GGC CTT GGC ACA TGT C -3' (SEQ ID NO:64)

と以下の温度サイクルを用いて、2回目の部位特異的突然変異誘発を実施する：95℃30秒間ならびに、95℃30秒間、55℃1分間、および68℃17.2分間を18サイクル。得られるプラスミドDNAのDNA配列決定によって、変異を確認する。

【0187】

SK0-3を作製するために、変異B1D2 scFvを元のB2B3-1プラスミド内にサブクローニングして抗ErbB3 scFvであるH3を除く。SK0-2にアニーリングするプライマーである

5'ACAGTGGCGGCCCGCCACCATGGGCTGGTCTCTGATCCTGCTGTTCCCTGGTGG

CCGTGGCCACGCGTGTGCTGTCCCAGGTGCAGCTCGTCCAGAGCGGCGC (SEQ

ID NO:65)

および

5'GGAGGCGGCGCCCGAGGACTGTCAGCTTGGTGCCACCGCCG (SEQ ID NO:66)

を用いて、変異B1D2 scFvをSK0-2から単離し、Kas I/ Not I制限消化B2B3-1プラスミドへのサブクローニングのためにKas I制限部位およびNot I制限部位を導入する。PCRは以下の通り実施する：変異B1D2の増幅のため、94℃1分間の後、94℃30秒間、58℃1分間、72℃1分間を30サイクル、その後72℃5分間を1サイクル。クローニングの成功は、DNA配列決定によりモニタリングする。SK0-2およびSK0-3プラスミドは、振とうフラスコまたは10L WAVEバッグ中のCHO-K1細胞より安定に発現され、Blue SEPHAROSEおよび陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて調整培地から精製される。

【0188】

10

20

30

40

50

ほぼ同数のErbB2レセプターおよびErbB3レセプターを発現するMALME-3M黒色腫細胞を、飽和濃度のAlexafluor-647結合ヤギ抗HSA抗体の存在下で、B2B3-1、SK0-2、またはSK0-3の連続希釈物とともにインキュベーションする。細胞結合をフローサイトメトリーによって評価し、見かけの結合親和性を各分子について決定する。対照細胞は、二次抗体のみとインキュベーションする。SK0-2については測定可能な細胞結合が観察されず、これは、H3に媒介されるErbB3に対する低親和性の結合しか保持しておらず、ErbB2結合活性が欠如している。SK0-3は、機能性かつ高親和性のErbB2結合B1D2 scFvを保持するが、ErbB3に結合する能力は欠如しており、6.7 nMの K_D を有していた。B2B3-1は0.2 nMの K_D で細胞に結合した。このことは、該分子の二重特異性設計に媒介される結合の増大を示している（図14）。

10

【0189】

実施例15

100nMのB2B3-1を、ヒト、カニクイザル、またはマウスの血清中で120時間にわたり37℃でインキュベーションすることによって、生理学的条件下でのB2B3-1の安定性を評価する。試料を0、24、48、72、96、および120時間目に取り出して、B2B3-1がErbB2およびErbB3の両方に結合する能力をELISAによって測定する。このELISAは、組み換えErbB2細胞外ドメインで96ウェルプレートを一晩被覆する工程、引き続くブロッキング工程、およびその後のB2B3-1の連続希釈物とのインキュベーションを伴う。次いで、プレートをFc-ErbB3細胞外ドメイン融合タンパク質と共に、続いてヤギ抗ヒトFc-HRPコンジュゲートと共に、インキュベーションする。スーパーシグナル化学発光基質の添加によって、プレートを現像する。図15A～Cは、B2B3-1が、3つの種全てに由来する血清において生理学的条件下で安定であり続け、測定した全ての時点でErbB2およびErbB3の両方に結合できる同等の能力を維持していることを示している。

20

【0190】

実施例16：BT-474-M3ヒト乳癌インビボ異種移植モデルにおけるB2B3-1の用量応答

ヒトBT-474-M3異種移植片を保有しているヌードマウスを用いて、インビボでのB2B3-1の効果を評価する。1群あたり10匹のマウスを、0.3、1、3、10、30、または90mg/kgのB2B3-1で12回、3日毎に処理する。対照群には、90mg/kgのB2B3-1用量と等モル用量のPBSビヒクルまたはHSAを投与する。全ての用量を腹腔内（i.p.）投与する。腫瘍の大きさを週2回測定して、相当する腫瘍容積を算出する。B2B3-1処理は、対照群と比較してBT-474-M3腫瘍の大きさを有意に低下させることが、結果により示される（図16）。最低用量のB2B3-1（0.1mg/kg）で処理されたマウス以外のB2B3-1処理群の各々で、完全退縮が観察された。

30

【0191】

実施例17

図17A～図17Eで示されるとおり、B2B3-1は複数の異種移植モデルにおいて、腫瘍の大きさをErbB2依存的様式で低下させる。B2B3-1は、ErbB2をレセプター $>1 \times 10^5$ 個/細胞で発現しているCalu-3（図17A）、SKOV-3（図17B）、NCI-N87（図17C）、およびMDA-MB-361（図17E）の異種移植モデルでは有効であったが、 4.5×10^4 個/細胞のErbB2レセプターを発現するACHN（図17D）異種移植モデルではそれほど作用しなかった。マウスは、30mg/kgのB2B3-1で3日毎に処理した。

40

【0192】

実施例18

ErbB2の過剰発現によって、B2B3-1不応答のADDr乳癌異種移植モデルがB2B3-1に対する応答モデルに変換される（図18Aおよび18B）。ErbB2は、レトロウイルス発現系を用いてADDr乳癌細胞で過剰発現する。高レベルのErbB2を発現しているトランスフェクト細胞（ADDr-E2）をFACSを用いて選択し、続いてヌードマウス中に皮下注射して、異種移植腫瘍を樹立する。マウスは、30mg/kgのB2B3-1で3日毎に処理する。野性型ADDr異種移植片（図18A）ではB2B3-1に対する応答は観察されなかったが、ADDr-E2異種移植片（図18B）はB2B3-1に応答した。

【0193】

50

実施例19

図19A～Bに示すように、B2B3-1活性は、インビトロ（図19A）およびインビボ（図19B）においてErbB2発現レベルと正に相関する。B2B3-1によるErbB3リン酸化の阻害を、ErbB2発現レベルがレセプター 5×10^4 個/細胞～レセプター 2.4×10^6 個/細胞の範囲である9種類の腫瘍細胞株において、ELISAアッセイを用いて判定する。B2B3-1がErbB3リン酸化を基底レベル（%pErbB3阻害）まで阻害する能力の程度は、ErbB2発現レベルと正に相関していることが見出された。同様に、低～高レベルのErbB2を発現している10種類の異種移植モデルにおいてB2B3-1活性を評価する。異種移植片応答は同じく、ErbB2発現レベルと正に相関していた。

【0194】

10

実施例20

BT474-M3乳房腫瘍細胞のB2B3-1処理によって、核に対するp27^{kip1}の転位が生じる（図20A）。BT474-M3細胞を1 μ MのB2B3-1で6時間処理する。p27^{kip1}の細胞内位置を、免疫蛍光技術を用いて評価する。B2B3-1で処理した細胞において、p27^{kip1}は核へと転位し、これは細胞増殖の阻害をもたらすことが示されている。p27^{kip1}は処理なしの細胞の細胞質内に残存した。

【0195】

細胞周期に対するB2B3-1の効果をさらに調査するため、B2B3-1で72時間処理したBT-474-M3細胞を、ウェスタンブロット分析を用いて細胞周期調節因子サイクリンD1についてプローブする（図20B）。この実験におけるタンパク質ローディング対照として、細胞骨格タンパク質であるビンクリンを用いる。B2B3-1処理によって、処理なしの細胞と比較してサイクリンD1のレベルの低下が生じた。

【0196】

20

実施例21

図21A～Bに示すように、BT474-M3乳房腫瘍異種移植片のB2B3-1処理によって核へのp27^{kip1}の転位が起こる。BT474乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図21A）、または等モル用量のHSA（図21B）で3日毎に計4回処理する。HSA対照腫瘍と比較して、B2B3-1処理した腫瘍においてp27^{kip1}に関する核染色の増大が観察され、このことはインビボにおけるB2B3-1の抗増殖効果を示した。

【0197】

30

実施例22

B2B3-1処理によって、BT474乳癌異種移植腫瘍における増殖マーカーKi67の減少がもたらされる。BT474-M3乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図22A）または等モル用量のHSA（図22B）で3日毎に計4回処理する。その後のKi67に対する腫瘍切片の染色により、HSA処理腫瘍と比較して、B2B3-1処理腫瘍に関する発現パターンの低下が実証された。

【0198】

実施例23

CD31発現に関するアッセイによって判定されるように（図23A～図23B）、B2B3-1処理は、BT474-M3乳癌異種移植腫瘍において血管密度の低下をもたらす。BT474乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図23A）または等モル用量のHSA（図23B）で、3日毎に計4回処理する。腫瘍を、血管マーカーCD31の存在について染色する。B2B3-1で処理した腫瘍は、HSAで処理した対照腫瘍と比較して、血管密度の顕著な低下を示す。

【0199】

40

実施例24：B2B3-1は、インビボにおけるErbB3のリン酸化を阻害する

BT-474-M3異種移植腫瘍を30mg/kgのB2B3-1または17.5 mg/kgのHSAで、3日毎に計4回処理して、最後の投与から24時間後に腫瘍を回収する。腫瘍を溶解し、SDS-PAGE、続いてウェスタン分析に供して、B2B3-1の標的であるErbB3のリン酸化の相対レベルを評価する。等量のタンパク質を各レーンにロードし、 β チューブリンについてプローブすることによって総タンパク質レベルを制御する。リン酸化ErbB3に特異的な抗体を用いるウェスタン

50

プロット分析によって、B2B3-1処理腫瘍が含むpErbB3は、HSA処理腫瘍よりも少ないことが示される（図24A）。ウエスタンプロット分析の濃度測定と、その後の、 β チューブリン積分バンド強度平均値に対するpErbB3積分バンド強度平均値の正規化によって、B2B3-1処理腫瘍が含むpErbB3は対照のHSA処理腫瘍よりも有意に少ないことが、実証された（図24B）。これらのデータによって、B2B3-1はインビボにおいてその標的ErbB3のリン酸化を阻害することが確認された。

【0200】

実施例25：PTEN活性が減少したBT-474-M3異種移植片におけるB2B3-1のインビボ活性

BT-474-M3乳癌細胞において腫瘍サプレッサー遺伝子であるホスファターゼ・テンシンホモログ（PTEN）の活性をノックアウトするために、shRNA技術を適用する。簡潔に言うと、レトロウイルストランスフェクションによって、shPTENまたはshControl RNAでBT-474-M3培養細胞をトランスフェクトする。PTENが減少したトランスフェクト細胞を、FACSを用いて選択し、続いてヌードマウスの右側腹部に皮下注射して異種移植腫瘍を樹立する。対照ベクターでトランスフェクトした細胞を、同じマウスの左側腹部に注射する。30mg/kgのB2B3-1で3日毎に、または10mg/kgのトラスツズマブで毎週、マウスを処理する。B2B3-1と等モル用量のHSAを対照として注射する。全て、腹腔内（i.p.）注射とする。

【0201】

B2B3-1およびトラスツズマブは、対照のBT-474-M3乳癌細胞によって形成された腫瘍の大きさの低下を促進させた（図25A）一方、B2B3-1のみ（かつトラスツズマブなし）は、PTENの発現を欠くBT-474-M3ヒト乳癌細胞によって形成された腫瘍の大きさの低下を促進させた（図25B）。

【0202】

実施例26：B2B3-1は、PTEN活性が減少しているBT-474-M3乳癌細胞におけるErbB3シグナル伝達を阻害する

腫瘍異種移植片でシグナル伝達するErbB3のリン酸化をB2B3-1が阻害する能力を、上述のPTEN欠損BT-474-M3モデルを用いて調査する。操作された細胞株または対照細胞株の異種移植腫瘍を、30mg/kgのB2B3-1、17.5mg/kgのHSAで3日毎に、または10mg/kgのトラスツズマブで毎週処理して、腫瘍を最終回の24時間後に回収する。腫瘍を溶解し、SDS-PAGEに続いてウエスタン分析に供し、B2B3-1の標的であるErbB3、AKTのリン酸化の相対レベル、および総PTENレベルを評価する。等量のタンパク質を各レーンにロードし、PCNAについてプローブすることによって総タンパク質レベルを制御する。リン酸化ErbB3特異的な抗体を用いるウエスタンプロット分析によって、B2B3-1処理腫瘍が含むpAKTは、HSA処理腫瘍やハーセプチン処理腫瘍よりも少ないことが示される（図26A）。ウエスタンプロット分析の濃度測定と、その後の、PCNA積分バンド強度平均値に対するpAKT積分バンド強度平均値の正規化によって、B2B3-1処理腫瘍が含むpAKTは、対照のHSA処理腫瘍およびハーセプチン処理腫瘍よりも有意に少ないことが実証された（図26B）。

【0203】

実施例27

B2B3-1の薬物動態学的パラメーターをnu/nuマウスで調べる。動物を無作為にグループ分けし、単一用量5、15、30、または45mg/kgのB2B3-1を静脈内（IV）投与する（それぞれ、図27A～図27D）。投与前、ならびに投与から0.5、4、8、24、48、72、および120時間後に、採血する。各時点について3匹のマウスを用いる。B2B3-1の血清レベルを、2つのELISA方法を用いて測定する。第一の方法は、ErbB2およびErbB3の両方に対するB2B3-1の機能的な結合を要するが、第二の方法は、血清中のB2B3-1のHSA成分しか測定しない。HSAのELISAは、ポリクローナル抗HSA捕捉抗体およびHRP結合ポリクローナル抗HSA検出抗体を利用する。HSA法に対してErbB2/ErbB3結合法を用いて測定したB2B3-1血清濃度が低下していることは、機能性B2B3-1の損失を示しうる。図27A～Dは、いずれのELISA法を用いて評価した場合にもB2B3-1の薬物動態特性が同等であることを示しており、これは、B2B3-1がマウスの循環中で安定であることを示している。

【0204】

実施例28

B2B3-1血清濃度は、2コンパートメントの双指数関数モデルを用いてあてはめられ、二相性の配置を示す。5、15、30、または45mg/kg用量に対して、終末半減期はそれぞれ17、16、23、および18時間と算出され、これを表4に示す。B2B3-1用量の増加によって、曝露の直線的な増大がもたらされた（図28）。

【0205】

（表4）マウスおよびカニクイザルにおけるB2B3-1の薬物動態特性

用量 (mg/kg)	種	N	T _{1/2} β (hr)	AUC (hr·μg/ml)	クリアランス (ml/hr/kg)
5	マウス（単回投与）	3	16.9	1.58E+03	3.19
15	マウス（単回投与）	3	16.2	6.10E+03	2.47
30	マウス（単回投与）	3	22.6	1.18E+04	2.54
45	マウス（単回投与）	3	17.5	1.84E+04	2.46
4	カニクイザル （初回投与）	2	39.1	3.44E+03	1.17
4	カニクイザル （4回目の投与）	2	44.9	7.20E+03	0.60
20	カニクイザル （初回投与）	2	33.1	2.29E+04	0.88
20	カニクイザル （4回目の投与）	2	122.5	8.20E+04	0.25
200	カニクイザル （初回投与）	4	68.8	3.18E+05	0.64
200	カニクイザル （4回目の投与）	2	69.7	5.72E+05	0.35
200	カニクイザル （4回目の投与）*	2	66.6	5.99E+05	0.34

* 回復した動物

【0206】

実施例29

薬物動態分析のための血液試料は、雌性カニクイザルにおける用量範囲決定用の毒性試験からも得る。この試験では、動物に4、20、または200mg/kgのB2B3-1を3日毎に4回、注入投与する。サンプリングは、投与前濃度およびピーク/トラフ濃度を得るために、各投与日（試験1日目、4日目、7日目、および10日目）における投与の前および5分後に、ならびに、1日目の初回注入から1、2、4、8、24、および48時間後と、10日目の最終注入から1、2、4、8、24、48、72、および120時間後とに行った。200mg/kgを投与した動物の回復に関しては、最終注入から168、336、および456時間後にも血清試料を採取する。

【0207】

カニクイザルの血清試料は、上述のErbb2/Erbb3 ELISA法を用いて分析する。各用量に対する経時的な血清濃度は図29に示す。1日目および10日目の投与後の血清中B2B3-1の平均濃度-時間のプロファイルは、一般に時間とともにC_{max}から下落する濃度と質的に類似していたことが、この分析によって示される。推定の半減期平均値は、1日目に38.3～67.2時間の範囲であり、10日目に45.0～121.0時間の範囲であった（表4）。

【0208】

10

20

30

40

50

実施例30

B2B3-1二重特異性scFv抗体融合タンパク質をコードするプラスミドは、固有のヒト抗ErbB3 scFv（「H3」と命名される）、ヒト抗ErbB2 scFv（「B1D2」と命名される）、および改変されたヒト血清アルブミン（HSA）リンカーの遺伝子配列を組み合わせて作製される。抗ErbB3 scFvであるH3は、接続用ペプチド（Ala-Ala-Ser）を介してHSAリンカーのアミノ末端に組み換え的に連結され、抗ErbB2 scFvであるB1D2は接続用ペプチド（Ala-Ala-Ala-Leu；SEQ ID NO: 5）を介してHSAリンカーのカルボキシ末端に遺伝子的に連結される。ペプチドコネクターは、哺乳動物の発現ベクター構築の際に制限部位を導入することによって形成され、単鎖抗体断片およびHSAリンカーと一緒に哺乳動物で発現するのに適したコドン使用頻度で合成される。

10

【0209】

B1D2 scFvは、非免疫ファージディスプレイライブラリーから選択されたErbB2結合scFv C6.5の突然変異誘発によって作成した、コンビナトリアルファージディスプレイライブラリーから選択される。H3 scFvは、元はSheetsらにより作製された非免疫ファージディスプレイライブラリーから選択される。B1D2およびH3の単鎖抗体断片をコードする遺伝子配列を、CHO細胞コドン選択について最適化し、B2B3-1をコードするプラスミドのその後の構築のために合成する。

【0210】

修飾HSAリンカーは2つのアミノ酸置換を含む。34位のシステイン残基を、この部位での酸化に起因する潜在的なタンパク質不均一性を低下させるために、セリンに変異させる。アミノ酸503のアスパラギン残基を、野性型HSAにおいては脱アミノ反応に対して感受性でありかつ薬理学的半減期の低下を生じ得る、グルタミンに変異させる。

20

【0211】

修飾HSAリンカーをコードする遺伝子配列を、B2B3-1をコードするプラスミドを続いて構築するために哺乳動物での発現に適したコドン使用頻度で合成する。

【0212】

実施例31

標準的な分子生物学的技術を用いてB2B3-1コード配列をpMP10kベースのベクター中にクローニングし、図30に示されるプラスミドpMP10k4H3-mHSA-B1D2を作製する。この構築物は大部分が、一般に用いられる遺伝子エレメントを使用している。B2B3-1発現は、ヒトGA PDプロモーターによって駆動される。このベクターは、マトリックス付着領域またはMARエレメントと呼ばれる遺伝子エレメントを利用している。MAR遺伝子レエレメントは、クロマチンの動的な機構を制御し、隣接する遺伝子を周囲のクロマチンの影響から遮断することによって、遺伝子のコピー数依存性、位置独立性、発現を増大させる。MARエレメントは、組み換えタンパク質の産生に関して所望のレベルの発現を呈しているクローンの単離確率を向上させ、かつ産生の安定性を増大させることが示されている。B2B3-1構築物で用いられるMARエレメントは非コードヒトMARエレメントである。B2B3-1プラスミドに加えて、ネオマイシン抗生物質耐性プラスミド（図31）およびハイグロマイシン耐性プラスミド（図32）も、安定な形質転換体を選択するために用いられる。

30

【0213】

40

実施例32：初回の遺伝子トランスフェクション

チャイニーズハムスター卵巣CHO-K1細胞は、ATCC（ATCC # CCL-61）から購入する。CHO-K1細胞株は、T. T. Puckが作製した、親CHO細胞株の血清依存的かつプロリン依存的な接着性サブクローンである。B2B3-1トランスフェクションに用いるCHO-K1細胞は、トランスフェクションの前に無血清培地での懸濁増殖について予め適合させる。B2B3-1細胞株を発生させるために、反復トランスフェクション手順を用いる。トランスフェクションの24時間前に、CHO-K1細胞を、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、および0.016mMのチミジンを補充したSFM4CHO（無血清）培地（HyClone, Logan, UT）中で、細胞 1.0×10^6 個/mLまで事前継代（sub passage）する。トランスフェクション当日、細胞をOptiMEM培地（Invitrogen Corp, Carlsbad, CA）中に再懸濁し、細胞40,000個を24ウェル

50

プレートの各ウェル中に入れる。最初のトランスフェクションでは、B2B3-1発現プラスミド (pMP10k4H3-mHSA-B1D2) およびネオマイシン耐性プラスミド (図30; pSV2-neo (Selexis, Inc., Marlborough, MA) を、プラスミドモル比75:1 (B2B3-1:ネオマイシン耐性) で一緒に混合する。該プラスミド混合物を次に、陽イオン性脂質トランスフェクション試薬 (Lipofectamine LTX, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) と混合し、30分間にわたり脂質/DNA複合体を形成させる。その後、該DNA/脂質複合体をCHO-K1細胞に添加して、24ウェルプレートを37℃、5%CO₂のインキュベーター内に入れる。

【0214】

実施例33: 高産生株の選択およびスクリーニング

各トランスフェクションウェルの内容物をPBSで洗浄し、トリプシン処理して、2つの96ウェルプレートに分配する。用いる増殖培地は、10%FBS (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) および500mg/Lのジェネティシン (G418; Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) を含むDMEM/F12 (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) からなる。96ウェルプレート中の培地を、4日目に、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、0.016mMのチミジン、および500mg/Lのジェネティシンを補充したSFM4CHO培地に交換する。選択培地中でさらに2週間培養した後、生存細胞は明確なコロニーを形成している。該クローンを、定量用スポットプロット技術を用いて評価する。産生性最大のコロニーをトリプシン処理して、24ウェルプレートの単一ウェルに広げる。

【0215】

B2B3-1高産生性コロニーをスクリーニングするために、7日間の生産性分析を用いる。広げた後に、24ウェルプレート中の細胞を、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、および0.016mMのチミジンを補充したSFM4CHO培地中で7日間にわたり増殖させる。使用した培地中のB2B3-1濃度を測定する。24ウェル規模で最高のクローンを125mLのバッフル付き振とうフラスコ中に広げる。振とうフラスコにおける、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、および0.016mMのチミジンを補充したSFM4CHO培地中での7日間の試験を用いて、細胞プールを増殖およびB2B3-1産生についてスクリーニングする。

【0216】

実施例34: 2回目の遺伝子トランスフェクション

初回のトランスフェクション (前記) から決定された産生性最大の細胞プールを、産生を増大させるために2回目のトランスフェクションに供する。トランスフェクションの24時間前、細胞プールを、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、および0.016mMのチミジンを補充したSFM4CHO (無血清) 培地中で細胞 1.0×10^6 個/mLまで事前継代する。トランスフェクション当日、細胞をOptiMEM培地 (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) 中に再懸濁し、細胞40,000個を24ウェルプレートの各ウェル中に再度入れる。最初のトランスフェクションでは、B2B3-1およびハイグロマイシン耐性プラスミド (図32; pTK-Hyg (Clontech, Mountain View, CA)) を50:1 (B2B3-1:ハイグロマイシン耐性) というプラスミドモル比で一緒に混合する。該プラスミド混合物を次に、陽イオン性脂質トランスフェクション試薬 (Lipofectamine LTX, Invitrogen Corp) と混合し、30分間にわたり脂質/DNA複合体を形成させる。その後、該DNA/脂質複合体を前記細胞プールに添加して、24ウェルプレートを37℃、5%CO₂のインキュベーター内に配置する。

【0217】

実施例35: 2回目のトランスフェクションからの高産生株の選択およびスクリーニング

各トランスフェクションウェルの内容物をPBSで洗浄し、トリプシン処理して、2つの96ウェルプレートに分配する。用いる増殖培地は、10%のFBSおよび400mg/LのハイグロマイシンB (Invitrogen Corp) を補充したDMEM/F12からなる。96ウェルプレート中の培地を、4日目に、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、0.016mMのチミジン、および400 mg/LのハイグロマイシンBを補充したHyclone SFM4CHO培地に交換する。さらに2週間の選択の後、生存細胞は明確なコロニーを形成している。該クローンを、定量用スポットプロット技術を用いて評価する。産生性最大のコロニーをトリプシン処理して、24

ウェルプレートの単一ウェルに広げる。

【0218】

B2B3-1高産生性コロニーをスクリーニングするために、7日間の生産性分析を用いる。

【0219】

広げた後に、細胞を7日間にわたり増殖させ、使用した培地中のB2B3-1濃度を測定する。

【0220】

24ウェルプレートからの最高クローンを、125mLのバッフル付き振とうフラスコ内の、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、および0.016mMのチミジンを補充したHyclone SFM4CHO培地中に広げる。振とうフラスコにおける7日間の試験を用いて、増殖およびB2B3-1産生性について細胞プールをスクリーニングする。使用した培地を、Protein AresinおよびHPLC装置を用いて定量する。

10

【0221】

実施例36：限界希釈クローニング

前記産生分析によって特定される、増殖性が最高でB2B3-1産生性が最大であるコロニーを、125mLの振とうフラスコから移して、5つの96ウェルプレート中に、細胞1個/ウェルとなるよう算出した細胞濃度でプレーティングする。96ウェルプレートを37℃かつ5%CO₂のインキュベーター内に配置する。ウェルを週2回試験して、コロニーの形成を追跡する。単一細胞から生じるコロニーを、該コロニーの対称形状に基づいて特定する。そのようなコロニーを含むウェルを、24ウェルでの7日間の評価、および125mL振とうフラスコでの7日間の評価による、さらなるスクリーニングのために選び出す。

20

【0222】

2回目の限界希釈クローニングは、1回目と同様の様式で行う。クローンの選択を確認するために、さらに100mLの流加培養による評価を行う。播種前バンク (pre-seed bank) を凍結保存する。

【0223】

実施例37：B2B3-1の製剤化

B2B3-1は、患者の耐容度に応じて、60分間または90分間にわたる点滴静注によって週1回投与される。B2B3-1は、患者（例えば、ヒト）への投与用に、20mMのL-ヒスチジン塩酸塩、150mMの塩化ナトリウム、pH6.5の滅菌溶液中に25mg/mLの濃度で処方される。

30

【0224】

実施例38：乳癌の治療

患者の癌が、ErbB2 (HER2/neu) を含む上皮細胞成長因子レセプターを高レベルで発現していると考えられる場合、ErbB2結合部分と結合したHSAリンカー、例えばB2B3-1、B2B3-2、v-3、B2B3-4、B2B3-5、B2B3-6、B2B3-7、B2B3-8、B2B3-9、またはB3B3-10（後述の表6を参照のこと）による治療が適応であり得る。癌生検の遺伝型スクリーニングまたは組織学的スクリーニングによって患者腫瘍におけるErbB2高発現が明らかになる場合も該当する。

【0225】

乳癌と診断された患者に、患者の耐容度に応じて例えば60分間または90分間にわたる点滴静注を介して、B2B3 HSAリンカーコンジュゲート（例えばB2B3-1、SEQ ID NO: 16）を30mg/kg以下の用量で週1回または週2回投与する。B2B3 HSAリンカーコンジュゲートは、該患者への投与用に20mM L-ヒスチジン塩酸塩、150mMの塩化ナトリウム、pH6.5の滅菌溶液中に25mg/mLの濃度で処方される。B2B3 HSAリンカーコンジュゲートの投与を監督する臨床医は、一般的な処方および投与の慣例に従って患者の適切な治療経過を判定する。

40

【0226】

臨床医は、B2B3 HSAリンカーコンジュゲートと共に1つまたは複数の療法をさらに同時に施してもよい。例えばドキソルビシン、シクロホスファミド、およびパクリタキセルを含む乳癌治療用の一般的な化学療法レジメンなどの1つまたは複数の治療薬または化合物を、B2B3 HSAリンカーコンジュゲートと組み合わせて投与してもよい。あるいは、臨床医

50

は、B2B3 HSAリンカーコンジュゲートを、乳癌患者を治療するための外科的療法または放射線療法と組み合わせて投与することができる。

【0227】

実施例39：卵巣癌の治療

患者の癌がErbB2 (HER2/neu) を含む上皮細胞成長因子レセプターを高レベルで発現していると考えられる場合、ErbB2結合部分と結合させたHSAリンカー、例えばB2B3-1、B2B3-2、v-3、B2B3-4、B2B3-5、B2B3-6、B2B3-7、B2B3-8、B2B3-9、またはB3B3-10（後述の表6を参照のこと）による治療が適応であり得る。癌生検の遺伝型スクリーニングまたは組織学的スクリーニングによって患者腫瘍におけるErbB2高発現が明らかになる場合も該当する。

【0228】

B2B3 HSAリンカーコンジュゲート（例えばB2B3-1、SEQ ID NO: 16）を、卵巣癌と診断された患者に、単独で、または前述の実施例で本質的に述べた通りの1つもしくは複数のその他の療法と組み合わせて、投与する。

【0229】

実施例40：さらなるHSAリンカーコンジュゲート

HSAリンカーコンジュゲートは、後述の表5で列挙する1つまたは複数のエレメント（グループA～E）を用いて構築される。特に、後述の表5でグループCとして示されるHSAリンカーコンジュゲートは、表5に示されるグループAおよびEから選択される1つまたは複数の結合部分を組み込んでいる。さらに、HSAリンカーコンジュゲートはまた、表5のグループBおよびDから選択される1つまたは複数のペプチドコネクターを、HSAリンカーのアミノ末端およびカルボキシ末端の各々に含んでもよい。ペプチドコネクターは、コネクター配列の長さを増大または減少させるために、繰り返されてもよいし短縮されてもよい。

【0230】

実施例41：インビボにおいてq7dで投与したB2B3-1は、q3dで投与したB2B3-1と同等の効果を示す

q7d（7日毎に1回）投与レジメンを使用したB2B3-1の効果を、ヒト乳癌細胞株BT-474-M3の異種移植腫瘍を有する、Charles River Labsより入手した5～6週齢の雌性無胸腺ヌードマウス（nu/nu）において測定する（図33）。PBS中のヒトBT-474-M3細胞 20×10^6 個を注射する24時間前に、マウスの反対側腹部にエストロゲン放出インプラントを皮下移植する（0.72 mgペレット、60日、遅延放出、Innovative Research of America, Sarasota, FL）。腫瘍増殖（腫瘍容積約400 mm³）が確認されたら投与を開始し、試験全体にわたって30 mg/kgを3日毎に1回（q3d）、あるいは、22 mg/kg、66 mg/kg、132 mg/kg、または198 mg/kgを7日毎に1回、1群あたり10匹のマウスに腹腔内注射によりB2B3-1を投与する。デジタル式キャリパーを用いて、1週間に2回、腫瘍を計測する。腫瘍容積は下記式を用いて算出する： $\pi/6 \times (W^2 \times L)$ 、式中、Wは短径であり、Lは長径である。異種移植腫瘍に対して、66 mg/kgのq7d投与によって与えられるB2B3-1の曝露は、30 mg/kgのq3d投与と類似していることが、薬物動態の算出によって示唆される。PBSビヒクルを陰性対照として用いる。B2B3-1の効果は、B2B3-1の30 mg/kg、q3d投与および高い順に3種類の用量のq7d投与について同等であった。このことは、B2B3-1に関するq7d投与スケジュールが本モデルに適していることを示す。

【0231】

実施例42：B2B3-1およびトラスツズマブは異なるErbB3阻害機序を有する

B2B3-1がヘレグリン誘導性ErbB3活性を阻害する能力を、ウエスタンブロット解析を用いて試験する。血清飢餓させたBT-474-M3細胞の単層を100 nM B2B3-1またはトラスツズマブで24時間処理した後、5 nM HRG 1 β EGFで10分間刺激する。細胞は、10nMおよび100 nMのB2B3-1または10nMおよび100 nMのトラスツズマブでも処理し、刺激せずに放置する。溶解物を、ErbB3、pErbB3、AKT、およびpAKTに対する免疫ブロット解析に供する。B2B3-1処理はリガンド依存的様式でpErbB3およびpAKTの阻害をもたらすことがウエスタンブロット解析（図34）によって実証されたが、一方、トラスツズマブによるpErbB3およびpAKTの阻

10

20

30

40

50

害はリガンド非存在下でしか認められなかった。

【0232】

実施例43：B2B3-1はインビトロにおいてトラスツズマブと共に投与された場合に相加効果を有する

4種類の異なる乳癌細胞株を用いて、B2B3-1、トラスツズマブ、および両薬物の組み合わせが癌細胞スフェロイドの増殖に与える効果を調べた。ヒト乳癌細胞BT-474-M3、SKBR3 (ATCC)、またはMDA-MB-361 (ATCC) 2,000個を低接着性の丸底96ウェルプレート (Corning (登録商標) 96 Well Clear Round Bottom Ultra Low Attachment Microplate - Product #7007) に播種し、翌日、スフェロイドを計測して、ある用量範囲のB2B3-1、トラスツズマブ、または、トラスツズマブに対してB2B3-1が3倍モル過剰である両者の組み合わせで処理した。増殖の12日後、スフェロイドの表面積を計測し、処理なしの細胞と比較した。図35A~Cで認められるように、ある濃度範囲にわたるB2B3-1とトラスツズマブの組み合わせは、最低濃度を除く全ての薬物濃度で試験した全細胞株において、単一の剤を上回るスフェロイド増殖阻害をもたらした。またこれらの結果は、ErbB2 (HER2) への結合に関してB2B3-1がトラスツズマブとは競合しないことも示す。

10

【0233】

実施例44：B2B3-1はインビボにおいてトラスツズマブと共に投与された場合に相加効果を有する

トラスツズマブと同時投与された場合のB2B3-1のインビボにおける効果を、Charles River Labsより入手した5~6週齢の雌性無胸腺ヌードマウス (nu/nu) において、BT-474-M3 異種移植モデルを用いて調べる。PBS中のヒトBT-474-M3細胞 20×10^6 個を注射する24時間前に、マウスの反対側腹部にエストロゲン放出インプラントを皮下移植する (0.72 mgペレット、60日、遅延放出、Innovative Research of America, Sarasota, FL)。腫瘍増殖 (腫瘍容積約400 mm³) が確認されたら投与を開始する。デジタル式キャリパーを用いて、1週間に2回、腫瘍を計測する。腫瘍容積は下記式を用いて算出する： $\pi/6 \times (W^2 \times L)$ 、式中、Wは短径であり、Lは長径である。1群あたり10匹のマウスに、B2B3-1を3 mg/kgまたは10 mg/kgでq3d投与するか、トラスツズマブを1 mg/kgまたは0.1 mg/kgでq7d投与するか、あるいは両薬物の組み合わせを、試験全体にわたって腹腔内注射により投与する。B2B3-1とトラスツズマブの組み合わせ (10 mg/kg B2B3-1 + 1 mg/kgトラスツズマブ、10 mg/kg B2B3-1 + 0.1 mg/kgトラスツズマブ、3 mg/kg B2B3-1 + 1 mg/kgトラスツズマブ、3 mg/kg B2B3-1 + 0.1 mg/kgトラスツズマブ) は全て、対応する単一の剤と同様に投与する。

20

30

【0234】

図36に示すように、全組み合わせに関して、単一の剤よりも実質的に大きな効果が認められ、かつ、10 mg/kg B2B3-1と両用量のトラスツズマブ、および3 mg/kg B2B3-1と1 mg/kgトラスツズマブを投与した組み合わせ群に関しては、少なくとも早くも20日目以降には有意な効果が観察された。10 mg/kg B2B3-1 + 1 mg/kgトラスツズマブの組み合わせ群においてマウス10匹中5匹で腫瘍の完全な退縮が生じたが、これに対し、組み合わせと同用量で単一の剤を投与された群では10匹中0匹であった。3 mg/kg B2B3-1 + 1 mg/kgトラスツズマブの組み合わせ群においてはマウス10匹中7匹で腫瘍の完全な退縮が生じたが、これに対し、組み合わせと同用量で単一の剤を投与された群では10匹中0匹であった。これらの結果は、ErbB2 (HER2) への結合に関してB2B3-1がトラスツズマブとは競合しないことを示す。またこれらの結果は、少なくとも3 mg/kgのB2B3-1と少なくとも0.1 mg/kgのトラスツズマブの組み合わせによる処理が、3 mg/kgもしくは10 mg/kgのB2B3-1単独または0.1 mg/kgもしくは1 mg/kgのトラスツズマブ単独による処理より有効であることも、実証している。特に、少なくとも3 mg/kgのB2B3-1と1 mg/kgのトラスツズマブの組み合わせは、ヒト乳房腫瘍細胞異種移植片を有するヌードマウスの少なくとも約50%において本質的に完全な腫瘍退縮を誘導するが、同じ濃度のB2B3-1またはトラスツズマブのどちらか単独では、同マウスの10%においてさえも完全な退縮をもたらさない。

40

【0235】

50

上述のHSAリンカー、ペプチドコネクター、および結合部分の特定の態様もさらに提供される。後述の表6は、HSAリンカーのアミノ末端およびカルボキシ末端に種々のErbB2特異的結合部分またはErbB3特異的結合部分ならびにペプチドコネクターを有する、10個のHSAリンカーコンジュゲートを列挙する。

【0236】

当業者は、本明細書に記載された具体的な態様についての多くの等価物を認識し、かつ、ルーチンの実験法のみを使用して確認および実行することができるであろう。そのような等価物は、添付の特許請求の範囲に含まれることが意図される。従属する請求項に開示された態様の任意の組み合わせは、当該開示の範囲内に含まれることが意図される。

【0237】

本明細書において言及される、米国および外国の特許および係属中の特許出願ならびに刊行物の各々および全ての開示は、その全文が参照により本明細書に組み入れられる。

【0238】

(表6)

HSAリンカー コンジュゲート	アミノ末端 結合部分	N末端 コネクター	HSA	C末端 コネクター	カルボキシ末端 結合部分
B2B3-1 (SEQ ID NO:16)	H3 (SEQ ID NO:26)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	B1D2 (SEQ ID NO:27)
B2B3-2 (SEQ ID NO:17)	A5 (SEQ ID NO:28)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	B1D2 (SEQ ID NO:27)
B2B3-3 (SEQ ID NO:18)	A5 (SEQ ID NO:28)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	F5B6H2 (SEQ ID NO:32)
B2B3-4 (SEQ ID NO:19)	A5 (SEQ ID NO:28)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	ML3.9 (SEQ ID NO:29)
B2B3-5 (SEQ ID NO:20)	B12 (SEQ ID NO:30)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	B1D2 (SEQ ID NO:27)
B2B3-6 (SEQ ID NO:21)	B12 (SEQ ID NO:30)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	F5B6H2 (SEQ ID NO:32)
B2B3-7 (SEQ ID NO:22)	F4 (SEQ ID NO:31)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	B1D2 (SEQ ID NO:27)
B2B3-8 (SEQ ID NO:23)	F4 (SEQ ID NO:31)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	F5B6H2 (SEQ ID NO:32)
B2B3-9 (SEQ ID NO:24)	H3 (SEQ ID NO:26)	AAS	HSA (SEQ ID NO:3)	AAAL (SEQ ID NO:5)	B1D2 (SEQ ID NO:27)
B2B3-10 (SEQ ID NO:25)	H3 (SEQ ID NO:26)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	F5B6H2 (SEQ ID NO:32)

【0239】

付表A

配列、配列アノテーション、および配列アラインメント

SEQ ID NO:60

pMP9043

gtgccgacgatagagcagacctcgctaaatatactgcgagaatcaggattccattagctctaagctgaaagaatgttgcgagaagccc
ctcctggaaaagagtcattgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgccagcagatctgccatcactcgtcgccgactttgtggaat
ccaaagatgtctgcaagaattacgcagaggctaaagacgtgttcctggggatgtttctgtatgagtacgcccggtcaccgccattat
agcgtcgtgctcctgctccgactggcacaagacctacgaaacaactctggagaaatgttgcgctgccgcagaccctcatgaatgttatgc
taaggtgttcgatgagtttaagccactcgtcgaagagccccagaacctgattaaacagaattgcgaactgttcgagcagctcgggtgaat
acaagtttcagaacgccctgctcgtgctgtataccaaaaaggtccctcaggtgtctacaccaactctggaggaggtcagtaggaatctg
ggcaaaagtgggatcaaagtgttgcacaacccccgaggcaaaagagaatgccttgtgtgaagattacctctccgctgctgaaccagc
tctgctgtcgtcatgaaaagaccccgagtcagcgatcggtgacaaaatgttgcaccgaatctctggtcaatcgccgacctgtttcagt
gccctcgaagtggacgaaacttatgtgcctaaggagtttcaggctgaacattcacctttcacgccgatatctgcactctgtccgagaaa
gaaaggcagattaagaacagacagcactgttcgagctcgtgaagcalaaaccaaaggctaccaaggagcagctgaaagccgtca
tggacgatttcgacgttttggtaaaagtgttgcacaagccgacgataaggagactgtttcgcagaagaggggaaaaagctcgtggc
tgccagccaggcagctcgtggctcgtggccgagctctgcaggtgcagctcgtccagagcgccgctgaggtgaagaagccagggcgag
tccctgaagatcctctgaagggtccggctacagcttccactcctactggatcgttgggtgaggcagatgccagaaaagggactgg
agtacatgggctgtatccctggcgactccgacaccaagtactccccatcctccagggccaggtgaccatcagcgtggacaagtc
cgtgtctaccgctacctgcaatggctccctgaagccttctgactctgccgtgtacttttggccggcacgatgtgggtactgcacc
gaccggacatgtgcaagtggcccgagtggtcgtgggagtggtgggacagggaaactggtgacagtgaagttcgtggcgtggcggt
cttccggcggtggtctgttggcgggcggtatcagagcgtgctgacacagccacctagcgtgtccgctgccccgtggcagaaggtg
acaatcagctgctccggcagctcttccaacatcggaacaactacgtgtcttgggtatcagcagctgcccggaacagctccaaaactgct
gatctatgaccacaccaatcgccctgccggcgtgccagatcggttctctggctctaagagcgccacctccgccagcctggctatctct
ggcttcagatctgaggtgaggtgactactattgtgcctcctgggactacacctgtctggctgggtgttccggcggtggcacaagct
gacagtcctgggatgatgactcagcttagagggcccggttaaacccgctgacagcctcactgtgccttctagtgtccagccaatctgt
tgttggccccctccccgtgccttcttgcacctggaaggtgccactccactgtccttcttaataaaatgaggaaattgcacgcattgtct
gagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggg
gatcggtgggctctatggcttctgagggcgaagaaccagctggggctctaggggtatccccacgcgccctgtagcggcgcat
agcgcgggcggtgtggtgttacgcgcagcgtgaccgtacacttgcagcgccctagcgcccgctccttctcgttcttcttcttctt
ctcgccacgttcgccggcttccccgtcaagctctaaatcggggggtccctttaggggtccgatttagtgccttacggcacctcgaccccaa
aaaacttgattagggtgatggttcacgtacctaagaagttcctatccgaagttcctattctctagaagtataggaacttcttggccaaaa
agcctgaactcaccgcgacgtctgtcagagaagtttctgatcgaaaagttcgacagcgtctccgacctgatgcagctctcggaggcgga
agaatcctgctcttcagcttcgatgtaggagggcggtgatatgtcctgcgggtaaatagctgcgccgatggtttctacaaagatcgttat
gtttatcgccactttgcatcgccgcgctcccgaattccggaagtgttgacattggggaaatcagcgagagcctgacctattgcatctcc
cgccgtgcacagggtgtcaggttgaagacctgcctgaaaccgaactgcccgtgttctgcagccggtcgcgaggccatggatgc
gatcgctgcggccgatcttagccagacgagcgggtcggccattcgaccgcaaggaaatcggtcaatacactacatggcgtgatttc
atatcgcgattgtgatccccatgtgtatcactggcaactgtgatggacgacaccgtcagtgctcgcgcgaggtctcgtatga
gctgatgcttggggcgaggactgccccgaagtccggcacctcgtgcacgcggatttcggctccaacaatgtcctgacggacaatgg
ccgcataacagcgggtcaltgactggagcgagggcatgttcggggattcccaatacagaggtcgccaacatcttcttggaggccgtgg
ttggcttgtatggagcagcagacgcctacttcgagcggaggcatccggagcttcaggaatcgccgcgggtcggcggtatgtctc
cgcatggcttgcacaaactctatcagagcttgggtgacggcaatttcgatgatgcagcttggcgaggggtcgatgcgacgcaatcgt
ccgatccggagccgggactgtcggggctacacaaatcgccgcagaagcgccgctctggaccgatggctgtgtagaagtactc
ggcgatagtggaaccgacgccccagcactcgtccgagggcaaaaggaatagcacgtactacgagatttcgattccaccgcccgttc
tatgaaaggttgggcttcggaatcgtttccgggacgccggctggatgatctccagcgcggggatctcatgctggagttcttgc
ccccactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttactgcattctagt
gtggttgcacaaactcacaatgtatcttatcatgtctgtataccgtcgacctctagctagacttggcgtaatacaggtcatagctgttct
gtgtgaaattgtatccgtcacaattccacacaacatacagccggaagcataaagtgtaaagcctgggtgcctaataagtgagct
actcacattaattgcgttgcgctcactgcccgttccagtcgggaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcgg
ggagagggcggttgcgtattgggcgtcttccgctcctcgtcactgactcgtcgcgtcggtcgttcggctgcggcgagcggtatca

10

20

30

40

gtcactcaaaggcggtataacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaagg
ccaggaaccgtaaaaggccgcgttgctggcggttttccataggtccgccccctgacgagcaccacaaaaatcgacgtcgaagtc
gaggtggcgaaaccgacaggactataaagataccaggcggtttccccctggaagtcctctgtgcgtctctgttccgacctgccc
cttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcggtggcggtttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgt
tcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgcgccttatccggtaactatcgtctgagtccaacccgg
taagacacgacttatcgccactggcagcagccactggttaacaggattagcagagcgaggatgtaggcggtgctacagagttcttgaa
gtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtag
ctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttgttgcagcagcagattaccgcgcagaaaaaaaggatctcaag
aagatcctttgaltclllclacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggaatttggtcatgagattatcaaaaggatc
ttcacctagatccttttaattaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgctlaacag
tgaggcacctatctcagcgatctgtctatttctgtcaccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggttac
catctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagg
gcccagcgcagaagtggctctgcaactttatccgctccatccagcttattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttccagtt
aatagtttgcgaacgttgttgcattgtacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgttggatlggttcattcagctccggttcccaacg
atcaaggcgagttacatgacccccatgttgcgtaaaagcggttagctccttcggtcctccgacgtgtgcagaagtaagttggccgc
agtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctctactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaacc
aagtcattctgagaatagtgtatggcgacccgagttgctcttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttt
aaaagtgtctcatcttgaaaacgttctcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgtatgaaccactcgt
gcaccaactgatcttcagcatcttttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaat
aaggcgacacggaaatgtgaatactcatactcttcttttcaatattatgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggatcata
tttgaatgtatttagaaaaataacaaatagggggtccgcgcacattccccgaaaagtccacctgacgtcgacggatcgggagatct
cccgatccccatggtgcaactctcagtacaatctgctctgatgccgalagtaagccagttatctgctccctgctgtgtgttgagggtcgc
tgagtagtgccgcgagcaaaatfaagctacaacaaggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggttaggcgtttg
cgtgcttcgcatgtacggccagatatacgcgttgacattgatttgaactagttatfaatagtaataattacggggcatttagttcala
gcccataatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaata
atgacglatgttccatagtaaacgcaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaaactgccacttgccagtac
atcaagtgtatcatatgcaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccgcctggcattatgccaglacatgacctat
gggactttctacttggcagttacatctacgtatlagtcagctatfaccatgggtatgcggttttggcagttacatcaatggcggtgatalag
cgttttgactcacggggalllccaagctccacccccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaaacacgggactttccaaaat
gtcgtaaacactccgccattgacgcaaatggcggttagcggtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactag
agaacccactgcttactggcttatcgaataatacgaactactataggagaccgaagcttctagaattcgtctgtcgcaggggccagc
tgttgggggtgagtactccctctcaaaagcgggcagctctcgcgtaagattgtcagtttccaaaacgaggaggatttgaattcacct
ggccccgggtgatgcctttgaggggtggccgcgtccatctggtcagaaaagacaatcttttgttgcagcttgagggttgaggcaggttg
agatctggccatacacttgagtacaatgacatccacttgcctttctctccacaggtgtccactcccaggtccaactgcagatccagc
acagtgccggccgccaccatgggctggtctctgacccgtctgttccgttggtggccgtggccacgcgtgtgtctccaggtgcagctgc
aggagcttgccggcgactggtgaagcctggcggtccctgcggctgtctgcgcgcctccggcttcaccttctctctactggat
gtcctgggtgcggcagggccctggcaaggcctggagtgggtggccaacataaccgggacggctccgctcctactacgtggact
ccgtgaaggggccggttcacatctcccgggacgacgccaagaactccctgtacctgcagatgaactccctgcgggcccaggacacc
gccgtgtactactgcgccagggaccggggcggtgggclacttgcaccltgggggagggggcaccctggtgacctgtctctccgtag
tactggcgggcgaggatctggcgaggaggagcgggggcggtggatcccagtcgccctgaccagcctgctccgtgtccgg
ctccccggccagtcacatcagctgcacggcacctctccgacgtggcggttacaacttctgtcttggtatcagcagcac
ccgggcaaggccctaaagctgatgatctacgactgtccgaccggccttccggcgtgtccgacaggttccgggtcccaagtcgggc
aacaccgcctccctgatcatcagcggcctgcaggcagacgacaggcgactactactgtctctctacggctcctcctccaccac
gtgatctttggcgggcggaacaaagtgaccgtgtggcgccgctccgacgctcacaagagcgaaagtggcacataggttcaaaaga
tctgggcgaagagaactttaaggccctcgtctgatcgttttcacagttacctccagcagctcctttgaagatcacgtgaaactggt
caatgaggtgaccgaatttgcgaagacatgcgtggctgatgagagtgcagaaaactgtgacaaactactgcatactctctttggagata
agctgtgcaccgtgccacactcagagagacttatggggaaatggctgactgttgcgaaaacaggagcctgaacgggaatgagtgtt
ctccagcacaaggatgacaacccaaatctgccccgctcgtgcgacctgaggtcgatgtgatgtgcaccgctttcatgacaacgaa
gagacattcctgaagaaatcctgtatgaaatgtcgttaggcacccatactttatgccccgagctcctgttctttgcaagagataca
aagctgccttactgaatgttgcaggcagctgataaggccgcatgtctctgcclaaactggacgagctccgggatgaaggtaaggc

10

20

30

40

ttccagcgccaaacagcgctgaagtgcgttctctccagaagtttggcgagcgagcattcaaagcctgggctgtggcccgctcagt
cagagggttccaaaggcagaatttgcgtgaggtctcaaaactggtgaccgacctcacaaaggtccatactgagtgtgccacggagatct
gctggaat

SEQ ID NO:67

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGDS
DTKYSPSFQGGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARADVGYCTDRTCAKAP
AWLGVWGGQGLTVTVSSGGGGSSGGGSSGGGSSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGS
SSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSED
EADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLGAASDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVL
IAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLR
ETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKK
YLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSA
KQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDL
LECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADI.PSLAAD
FVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAA
DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTP
TLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTCKC
TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH
KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQ
VQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGDS
TKYSPSFQGGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHADVGYCTDRTCAKWP
EWLGVWGGQGLTVTVSSGGGGSSGGGSSGGGSSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGS
SNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDE
ADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLG

10

20

SEQ ID NO:68

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANINRDG
SASYVDSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGVGYFDLWGR
GTLTVTVSSASTGGGGSSGGGSSGGGSSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGY
NFVSWYQQHPGKAPKLMYDVS DRPSGVSDRFSGSKSGNTASLIISGLQADDEADYY
CSSYGSSTHVIFGGGTKVTVLGAASDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVIAFAQYL
QQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEM
ADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIA
RRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEC
ADRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK
DVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHE
CYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVE
VSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTCKCCTESL
VNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKA
TKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLV
QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGDS
DTKYSPSFQGGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARADVGYCTDRTCAKAP
AWLGVWGGQGLTVTVSSGGGGSSGGGSSGGGSSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGS
SSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDE
ADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLG

30

40

B2B3-1 (H3-mHSA-B1D2)

1 QVQLQESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMSWVRQA** PGKGLEWVAN
 51 **INRDGSASY** **VDSVKGR**FTI SRDDAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARD**R**
 101 **GVGYFDLWGR** GTLVTVSSAS TGGGSGGGG SGGGGSQSAL TQPASVSGSP
 151 GQSITISCT**G** **TSSDVGGYNF** **VS**WYQQHPGK APKLMY**DVS** **DRPSGV**SDRF
 201 SGSKSGNTAS LIISGLQADD EADYYC**SSYG** **SSSTHVI**FGG GTKVTVLG**AA**
 251 SDAHKSEVAH RFKDLGEENF KALVLIAFAQ YLQQSPFEDH VKLVNEVTEF
 301 AKTCVADESA ENCDKSLHTL FGDKLCTVAT LRETYGEMAD CCAKQEPERN
 351 ECFLQHKDDN PNLPRLVPRPE VDMCTAFHD NEETFLKKYL YEIARRHPYF
 401 YAPELLFFAK RYKAAFTECC QAADKAACLL PKLDELDEG KASSAKQRLK
 451 CASLQKFGER AFKAWAVARL SQRFPKAEFA EVSKLVTDLT KVHTECCHGD
 501 LLECADDRAD LAKYICENQD SISKSLKECC EKPLLEKSHC IAEVENDEMP
 551 ADLPSLAADF VESKDVCKNY AEAKDVFLGM FLYEYARRHP DYSVVLLRL
 601 AKTYETTLEK CCAAADPHEC YAKVFDEFKP LVEEPQNLIK QNCELFEQLG
 651 EYKFQNALLV RYTKKVPQVS TPTLVEVSRN LGKVGSKCK HPEAKRMPCA
 701 EDYLSVVLNQ LCVLHEKTPV SDRVTKCCTE SLVNRPCFS ALEVDETYVP
 751 KEFQAETFTF HADICTLSEK ERQIKQTAL VELVKHKPKA TKEQLKAVMD
 801 DFAAFVEKCC KADDKETCFA EEGKKLVAAS QAALGL**AAAL** QVQLVQSGAE
 851 VKKPGESLKI SCKGSGYSFT **SYWIAWVRQM** PGKGLEYMGL **IYPGDS**DTKY
 901 **SPSFQGQVTI** SVDKSVSTAY LQWSSLKPSD SAVYFCAR**HD** **VG**YCTDRT**CA**
 951 **KWPEWLG**VWG QGTLVTVSSG GGGSSGGGSG GGGGSQSVLTQ PPSVSAAPGQ
 1001 KVTISCSGSS **SNIGNNYVSW** YQQLPGTAPK LLIY**DHTNRP** AGVPDRFSGS
 1051 KSGTSASLAI SGFRSEDEAD YYCASWDYTL **SGWV**FGGGTK LTVLG

10

20

30

CDRループを、H3（下線部1～248、CDRをイタリック太字体で示す）およびB1D2（下線部841～1095、CDRをイタリック太字体で示す）内でハイライトしている。修飾HSAに対するコネクターを破線で示す。

B2B3およびmHSAを含む様々なHSAリンカーコンジュゲートに対する配列アラインメント

	1	45	
A5-mHSA-ML3.9	(1)	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFNTYDMNWVRQAPGKGL	
A5-mHSA-B1D2	(1)	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFNTYDMNWVRQAPGKGL	
A5-mHSA-F5B6H2	(1)	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFNTYDMNWVRQAPGKGL	
B12-mHSA-B1D2	(1)	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL	
B12-mHSA-F5B6H2	(1)	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL	
F4-mHSA-B1D2	(1)	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL	
F4-mHSA-F5B6H2	(1)	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL	
H3-mHSA-B1D2	(1)	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGL	
H3-mHSA-F5B6H2	(1)	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGL	
	46	90	10
A5-mHSA-ML3.9	(46)	EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED	
A5-mHSA-B1D2	(46)	EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED	
A5-mHSA-F5B6H2	(46)	EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED	
B12-mHSA-B1D2	(46)	EWVSGISWNSSGSIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPED	
B12-mHSA-F5B6H2	(46)	EWVSGISWNSSGSIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPED	
F4-mHSA-B1D2	(46)	EWVSTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED	
F4-mHSA-F5B6H2	(46)	EWVSTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED	
H3-mHSA-B1D2	(46)	EWVANINRDGSASYVDSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAED	
H3-mHSA-F5B6H2	(46)	EWVANINRDGSASYVDSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAED	
	91	135	20
A5-mHSA-ML3.9	(91)	TAVYYCARDG---VATTPFDYWGQGLTVTVS---SGGGSGGGGS	
A5-mHSA-B1D2	(91)	TAVYYCARDG---VATTPFDYWGQGLTVTVS---SGGGSGGGGS	
A5-mHSA-F5B6H2	(91)	TAVYYCARDG---VATTPFDYWGQGLTVTVS---SGGGSGGGGS	
B12-mHSA-B1D2	(91)	TAVYYCARDLGAKQWLEGFDYWGQGLTVTVSSASTGGGSGGGGS	
B12-mHSA-F5B6H2	(91)	TAVYYCARDLGAKQWLEGFDYWGQGLTVTVSSASTGGGSGGGGS	
F4-mHSA-B1D2	(91)	TAVYYCAKGYSSSWSEVASGYWGQGLTVTVSSASTGGGSGGGGS	
F4-mHSA-F5B6H2	(91)	TAVYYCAKGYSSSWSEVASGYWGQGLTVTVSSASTGGGSGGGGS	
H3-mHSA-B1D2	(91)	TAVYYCARDR---GVGYFDLWGRGTLTVTVSSASTGGGSGGGGS	
H3-mHSA-F5B6H2	(91)	TAVYYCARDR---GVGYFDLWGRGTLTVTVSSASTGGGSGGGGS	
	136	180	30
A5-mHSA-ML3.9	(130)	GGGGSQSVLTQPPS-VSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQ	
A5-mHSA-B1D2	(130)	GGGGSQSVLTQPPS-VSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQ	
A5-mHSA-F5B6H2	(130)	GGGGSQSVLTQPPS-VSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQ	
B12-mHSA-B1D2	(136)	GGGGSSEYELTQDPA-VSVALCQTVRITCQGDSLRS---YYASWYQ	
B12-mHSA-F5B6H2	(136)	GGGGSSEYELTQDPA-VSVALCQTVRITCQGDSLRS---YYASWYQ	
F4-mHSA-B1D2	(136)	GGGSAIVMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIR---NDLGWYQ	
F4-mHSA-F5B6H2	(136)	GGGSAIVMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIR---NDLGWYQ	
H3-mHSA-B1D2	(132)	GGGGSQSALTQPAS-VSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNFVSWYQ	
H3-mHSA-F5B6H2	(132)	GGGGSQSALTQPAS-VSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNFVSWYQ	
	181	225	40
A5-mHSA-ML3.9	(174)	QLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED	
A5-mHSA-B1D2	(174)	QLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED	
A5-mHSA-F5B6H2	(174)	QLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED	
B12-mHSA-B1D2	(177)	QKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNSASLTITGAQAED	
B12-mHSA-F5B6H2	(177)	QKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNSASLTITGAQAED	
F4-mHSA-B1D2	(178)	QKAGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSSLQPD	
F4-mHSA-F5B6H2	(178)	QKAGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSSLQPD	
H3-mHSA-B1D2	(176)	QHPGKAPKLLIYDVSDRPSGVSDRFSGSKSGNTASLIISGLQADD	
H3-mHSA-F5B6H2	(176)	QHPGKAPKLLIYDVSDRPSGVSDRFSGSKSGNTASLIISGLQADD	
	226	270	
A5-mHSA-ML3.9	(219)	EADYYCQSYDSS-LSALFGGGTKLTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD	
A5-mHSA-B1D2	(219)	EADYYCQSYDSS-LSALFGGGTKLTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD	
A5-mHSA-F5B6H2	(219)	EADYYCQSYDSS-LSALFGGGTKLTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD	

B12-mHSA-B1D2	(222)	EADYYCNSRDSSGNHWVFGGGKVTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD
B12-mHSA-F5B6H2	(222)	EADYYCNSRDSSGNHWVFGGGKVTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD
F4-mHSA-B1D2	(223)	FATYFCQQAHSF--PPTFGGGTKVEIKRGAASDAHKSEVAHRFKD
F4-mHSA-F5B6H2	(223)	FATYFCQQAHSF--PPTFGGGTKVEIKRGAASDAHKSEVAHRFKD
H3-mHSA-B1D2	(221)	EADYYCSSYGSSSTHVIFGGGKVTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD
H3-mHSA-F5B6H2	(221)	EADYYCSSYGSSSTHVIFGGGKVTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD

	271	315
A5-mHSA-ML3.9	(262)	LGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADES
A5-mHSA-B1D2	(262)	LGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADES
A5-mHSA-F5B6H2	(262)	LGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADES
B12-mHSA-B1D2	(266)	LGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADES
B12-mHSA-F5B6H2	(266)	LGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADES
F4-mHSA-B1D2	(266)	LGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADES
F4-mHSA-F5B6H2	(266)	LGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADES
H3-mHSA-B1D2	(265)	LGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADES
H3-mHSA-F5B6H2	(265)	LGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADES

10

	316	360
A5-mHSA-ML3.9	(307)	AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF
A5-mHSA-B1D2	(307)	AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF
A5-mHSA-F5B6H2	(307)	AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF
B12-mHSA-B1D2	(311)	AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF
B12-mHSA-F5B6H2	(311)	AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF
F4-mHSA-B1D2	(311)	AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF
F4-mHSA-F5B6H2	(311)	AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF
H3-mHSA-B1D2	(310)	AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF
H3-mHSA-F5B6H2	(310)	AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF

20

	361	405
A5-mHSA-ML3.9	(352)	QHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPY
A5-mHSA-B1D2	(352)	QHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPY
A5-mHSA-F5B6H2	(352)	QHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPY
B12-mHSA-B1D2	(356)	QHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPY
B12-mHSA-F5B6H2	(356)	QHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPY
F4-mHSA-B1D2	(356)	QHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPY
F4-mHSA-F5B6H2	(356)	QHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPY
H3-mHSA-B1D2	(355)	QHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPY
H3-mHSA-F5B6H2	(355)	QHKDDNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPY

30

	406	450
A5-mHSA-ML3.9	(397)	FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASS
A5-mHSA-B1D2	(397)	FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASS
A5-mHSA-F5B6H2	(397)	FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASS
B12-mHSA-B1D2	(401)	FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASS
B12-mHSA-F5B6H2	(401)	FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASS
F4-mHSA-B1D2	(401)	FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASS
F4-mHSA-F5B6H2	(401)	FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASS
H3-mHSA-B1D2	(400)	FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASS
H3-mHSA-F5B6H2	(400)	FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASS

	451	495
A5-mHSA-ML3.9	(442)	AKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
A5-mHSA-B1D2	(442)	AKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
A5-mHSA-F5B6H2	(442)	AKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
B12-mHSA-B1D2	(446)	AKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
B12-mHSA-F5B6H2	(446)	AKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
F4-mHSA-B1D2	(446)	AKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
F4-mHSA-F5B6H2	(446)	AKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
H3-mHSA-B1D2	(445)	AKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
H3-mHSA-F5B6H2	(445)	AKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL

40

	496	540	
A5-mHSA-ML3.9	(487) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL		
A5-mHSA-B1D2	(487) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL		
A5-mHSA-F5B6H2	(487) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL		
B12-mHSA-B1D2	(491) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL		
B12-mHSA-F5B6H2	(491) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL		
F4-mHSA-B1D2	(491) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL		
F4-mHSA-F5B6H2	(491) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL		
H3-mHSA-B1D2	(490) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL		
H3-mHSA-F5B6H2	(490) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL		
	541	585	
A5-mHSA-ML3.9	(532) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG		10
A5-mHSA-B1D2	(532) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG		
A5-mHSA-F5B6H2	(532) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG		
B12-mHSA-B1D2	(536) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG		
B12-mHSA-F5B6H2	(536) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG		
F4-mHSA-B1D2	(536) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG		
F4-mHSA-F5B6H2	(536) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG		
H3-mHSA-B1D2	(535) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG		
H3-mHSA-F5B6H2	(535) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG		
	586	630	
A5-mHSA-ML3.9	(577) MFLYHEYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV		
A5-mHSA-B1D2	(577) MFLYHEYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV		
A5-mHSA-F5B6H2	(577) MFLYHEYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV		20
B12-mHSA-B1D2	(581) MFLYHEYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV		
B12-mHSA-F5B6H2	(581) MFLYHEYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV		
F4-mHSA-B1D2	(581) MFLYHEYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV		
F4-mHSA-F5B6H2	(581) MFLYHEYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV		
H3-mHSA-B1D2	(580) MFLYHEYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV		
H3-mHSA-F5B6H2	(580) MFLYHEYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV		
	631	675	
A5-mHSA-ML3.9	(622) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQV		
A5-mHSA-B1D2	(622) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQV		
A5-mHSA-F5B6H2	(622) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQV		
B12-mHSA-B1D2	(626) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQV		
B12-mHSA-F5B6H2	(626) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQV		30
F4-mHSA-B1D2	(626) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQV		
F4-mHSA-F5B6H2	(626) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQV		
H3-mHSA-B1D2	(625) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQV		
H3-mHSA-F5B6H2	(625) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQV		
	676	720	
A5-mHSA-ML3.9	(667) STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL		
A5-mHSA-B1D2	(667) STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL		
A5-mHSA-F5B6H2	(667) STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL		
B12-mHSA-B1D2	(671) STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL		
B12-mHSA-F5B6H2	(671) STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL		
F4-mHSA-B1D2	(671) STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL		
F4-mHSA-F5B6H2	(671) STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL		
H3-mHSA-B1D2	(670) STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL		40
H3-mHSA-F5B6H2	(670) STPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL		
	721	765	
A5-mHSA-ML3.9	(712) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT		
A5-mHSA-B1D2	(712) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT		
A5-mHSA-F5B6H2	(712) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT		
B12-mHSA-B1D2	(716) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT		

B12-mHSA-F5B6H2	(716)	HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
F4-mHSA-B1D2	(716)	HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
F4-mHSA-F5B6H2	(716)	HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
H3-mHSA-B1D2	(715)	HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
H3-mHSA-F5B6H2	(715)	HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT

766

810

A5-mHSA-ML3.9	(757)	FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
A5-mHSA-B1D2	(757)	FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
A5-mHSA-F5B6H2	(757)	FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
B12-mHSA-B1D2	(761)	FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
B12-mHSA-F5B6H2	(761)	FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
F4-mHSA-B1D2	(761)	FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
F4-mHSA-F5B6H2	(761)	FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
H3-mHSA-B1D2	(760)	FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
H3-mHSA-F5B6H2	(760)	FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA

10

811

855

A5-mHSA-ML3.9	(802)	FVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVQSGA
A5-mHSA-B1D2	(802)	FVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVQSGA
A5-mHSA-F5B6H2	(802)	FVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVESGG
B12-mHSA-B1D2	(806)	FVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVQSGA
B12-mHSA-F5B6H2	(806)	FVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVESGG
F4-mHSA-B1D2	(806)	FVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVQSGA
F4-mHSA-F5B6H2	(806)	FVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVESGG
H3-mHSA-B1D2	(805)	FVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVQSGA
H3-mHSA-F5B6H2	(805)	FVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVESGG

20

856

900

A5-mHSA-ML3.9	(847)	EVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPG
A5-mHSA-B1D2	(847)	EVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPG
A5-mHSA-F5B6H2	(847)	GLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGR
B12-mHSA-B1D2	(851)	EVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPG
B12-mHSA-F5B6H2	(851)	GLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGR
F4-mHSA-B1D2	(851)	EVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPG
F4-mHSA-F5B6H2	(851)	GLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGR
H3-mHSA-B1D2	(850)	EVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPG
H3-mHSA-F5B6H2	(850)	GLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGR

30

901

945

A5-mHSA-ML3.9	(892)	DSDTKYSPSFQGGQVTISVDKSVSTAYLQWSSSLKPSDSAVYFCARH
A5-mHSA-B1D2	(892)	DSDTKYSPSFQGGQVTISVDKSVSTAYLQWSSSLKPSDSAVYFCARH
A5-mHSA-F5B6H2	(892)	GDNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKM
B12-mHSA-B1D2	(896)	DSDTKYSPSFQGGQVTISVDKSVSTAYLQWSSSLKPSDSAVYFCARH
B12-mHSA-F5B6H2	(896)	GDNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKM
F4-mHSA-B1D2	(896)	DSDTKYSPSFQGGQVTISVDKSVSTAYLQWSSSLKPSDSAVYFCARH
F4-mHSA-F5B6H2	(896)	GDNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKM
H3-mHSA-B1D2	(895)	DSDTKYSPSFQGGQVTISVDKSVSTAYLQWSSSLKPSDSAVYFCARH
H3-mHSA-F5B6H2	(895)	GDNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKM

946

990

A5-mHSA-ML3.9	(937)	DVG YC S S S N C A K W P E Y F Q H W G Q G T L V T V S S G G G S S G G G S G G G G S
A5-mHSA-B1D2	(937)	DVG YC T D R T C A K W P E W L G V W G Q G T L V T V S S G G G S S G G G S G G G G S
A5-mHSA-F5B6H2	(937)	T S N A V G ----- F D Y W G Q G T L V T V S S G G G S S G G G S G G G G S
B12-mHSA-B1D2	(941)	DVG YC T D R T C A K W P E W L G V W G Q G T L V T V S S C G G G S S G G G S G G G G S
B12-mHSA-F5B6H2	(941)	T S N A V G ----- F D Y W G Q G T L V T V S S G G G S S G G G S G G G G S
F4-mHSA-B1D2	(941)	DVG YC T D R T C A K W P E W L G V W G Q G T L V T V S S G G G S S G G G S G G G G S
F4-mHSA-F5B6H2	(941)	T S ----- N A V G F D Y W G Q G T L V T V S S G G G S S G G G S G G G G S
H3-mHSA-B1D2	(940)	DVG YC T D R T C A K W P E W L G V W G Q G T L V T V S S G G G S S G G G S G G G G S
H3-mHSA-F5B6H2	(940)	T S N A V G ----- F D Y W G Q G T L V T V S S G G G S S G G G S G G G G S

40

	991	1035	
A5-mHSA-ML3.9	(982) QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY-VSWYQQLPGTA		
A5-mHSA-B1D2	(982) QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY-VSWYQQLPGTA		
A5-mHSA-F5B6H2	(972) QSVLTQPPSVSGAPGQKVTISCTGRHSNIGLGYGVHWYQQLPGTA		
B12-mHSA-B1D2	(986) QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY-VSWYQQLPGTA		
B12-mHSA-F5B6H2	(976) QSVLTQPPSVSGAPGQKVTISCTGRHSNIGLGYGVHWYQQLPGTA		
F4-mHSA-B1D2	(986) QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY-VSWYQQLPGTA		
F4-mHSA-F5B6H2	(976) QSVLTQPPSVSGAPGQKVTISCTGRHSNIGLGYGVHWYQQLPGTA		
H3-mHSA-B1D2	(985) QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY-VSWYQQLPGTA		
H3-mHSA-F5B6H2	(975) QSVLTQPPSVSGAPGQKVTISCTGRHSNIGLGYGVHWYQQLPGTA		
	1036	1080	
A5-mHSA-ML3.9	(1026) PKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC		10
A5-mHSA-B1D2	(1026) PKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC		
A5-mHSA-F5B6H2	(1017) PKLLIYGNTNRPAGVPDRFSGFKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC		
B12-mHSA-B1D2	(1030) PKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC		
B12-mHSA-F5B6H2	(1021) PKLLIYGNTNRPAGVPDRFSGFKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC		
F4-mHSA-B1D2	(1030) PKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC		
F4-mHSA-F5B6H2	(1021) PKLLIYGNTNRPAGVPDRFSGFKSCTSASLAITGLQAEDEADYYC		
H3-mHSA-B1D2	(1029) PKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC		
H3-mHSA-F5B6H2	(1020) PKLLIYGNTNRPAGVPDRFSGFKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC		
	1081	1104	
A5-mHSA-ML3.9	(1071) ASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLG--		
A5-mHSA-B1D2	(1071) ASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLG--		
A5-mHSA-F5B6H2	(1062) QSYDRRTPCWVFGGGTKLTVLG--		20
B12-mHSA-B1D2	(1075) ASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLG--		

【 0 2 4 0 】

付表2
抗癌剤

<u>B2B3-1と併用するための抗癌剤</u>	<u>商品名</u>	<u>製造元/所有元</u>
<u>抗IGF1R抗体</u> AMG 479 (完全ヒト化mAb) IMCA12 (完全ヒト化mAb) NSC-742460 19D12 (完全ヒト化mAb) CP751-871 (完全ヒト化mAb) H7C10 (ヒト化mAb) alphaIR3 (マウス) scFV/FC (マウス/ヒトのキメラ) EM/164 (マウス) MK-0646, F50035		Amgen ImClone Dyax Pfizer Pierre Fabre Medicament, Merck
<u>IGF1Rを標的とする低分子</u> NVP-AEW541 BMS-536,924 (1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-1H-ピリジン-2-オン) BMS-554,417 シクロリガン (Cycloligan) TAE226 PQ401		Novartis Bristol-Myers Squibb Bristol-Myers Squibb
<u>抗EGFRモノクローナル抗体</u> INCB7839 ベバシズマブ セツキシマブ mAb 806 マツズマブ (EMD72000) ニモツズマブ (TheraCIM) パニツムマブ	Avastin(登録商標) Erbitux(登録商標) Vectibix(登録商標)	Incyte Genentech IMCLONE Amgen
<u>抗ErbB3治療薬</u> U3-1287 / AMG888 MM-121		U3 Pharma/Amgen Merrimack Pharmaceuticals
<u>抗ErbB2治療薬</u> トラツズマブ HKI-272 -ネラチニブ KOS-953 -タネスピマイシン	Herceptin(登録商標)	Genentech Wyeth Kosan Biosciences
<u>Her/ErbB二量体化インヒビター</u> 2C4, R1273 -ペルツズマブ	, Omnitarg(登録商標)	Genentech, Roche

10

20

30

40

<u>EGFRを標的とする低分子</u> CI-1033 (PD 183805) EKB-569 ゲフィチニブ ラパチニブ (GW572016) ラパチニブジトシレート エルロチニブHC1(OSI-774) PD158780 PKI-166 チロホスチンAG1478 (4-(3-クロロアニリン)-6,7-ジメトキシキナゾリン)	IRESSA(商標) Tykerb(登録商標) Tarceva(登録商標)	Pzifer, Inc. AstraZeneca GlaxoSmithKline SmithKline Beecham OSI Pharms Novartis
<u>抗cmet抗体療法</u> AVEO (AV299) AMG102 5D5 (OA-5D5)		AVEO Amgen Genentech
<u>cmetを標的とする低分子</u> PHA665752 ARQ-650RP ARQ 197		ArQule ArQule
<u>アルキル化剤</u> BCNU→1,3-ビス(2-クロロエチル)-ニトロソ尿素 ベンダムスチン プスルファン カルボプラチン カルボコン カルムスチン CCNU→1, -(2-クロロエチル)-3-シクロヘキシル-1-ニトロソ尿素 (メチルCCNU) クロラムブシル クロルメチン シスプラチン (Cisplatinum, CDDP) シクロホスファミド ダカルバジン (DTIC) フォテムスチン ヘキサメチルメラミン (アルトレタミン、HMM) イホスファミド ロムスチン マンノスルファン メルファラン	Myleran Paraplatin Leukeran(登録商標) Platinol Cytosan Neosar Hexalen(登録商標) Mitoxana(登録商標) Alkeran(登録商標)	GlaxoSmithKline Bristol-Myers Squibb Smithkline Beecham Bristol-Myers Bristol-Myers Squibb Teva Parenteral MGI Pharma, Inc. ASTA Medica GlaxoSmithKline

10

20

30

40

ネダプラチン		
ニムスチン		
オキサリプラチン	Eloxatin(登録商標)	Sanofi-Aventis US
プレドニムスチン		
プロカルバジン HCL	Matulane	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
リボヌクレオチドリダクターゼ インヒビター (RNR)		
ラニムスチン		
サトラプラチン		
セムスチン		
ストレプトゾシン		
デモゾロミド		
トレオスルファン		
トリアジコン		
トリエチレンメラミン		
チオデパ		Bedford, Abraxis, Teva
四硝酸トリプラチン		
トロホスファミド		
ウラムスチン		
<u>代謝拮抗剤</u>		
5-アザシチジン		
フルオロウラシル (5-FU) /カペシタビン		
6-メルカプトプリン (メルカプトプリン、6-MP)		
6-チオグアニン (6-TG)	Purinethol(登録商標)	Teva
シトシンアラビノシド (シタラビン、Ara-C)	Thioguanine(登録商標)	GlaxoSmithKline
アザチオプリン	Azasan(登録商標)	AAIPHARMA LLC
カペシタビン	XELODA(登録商標)	HLR (Roche)
クラドリピン (2-CdA, 2- クロロデオキシアデノシン)	Leustatin(登録商標)	Ortho Biotech
5-トリフルオロメチル-2'-デオキシウリジン		
リン酸フルダラビン	Fludara(登録商標)	Bayer Health Care
フロクスウリジン (5-フルオロ-2)	FUDR(登録商標)	Hospira, Inc.
メトトレキサートナトリウム	Trexall	Barr
ペメトレキセド	Alimta(登録商標)	Lilly
ペントスタチン	Nipent(登録商標)	Hospira, Inc.
ラルチトレキセド	Tomudex(登録商標)	AstraZeneca
デガフル		
<u>アロマトース (aromatase) インヒビター</u>		
ケトコナゾール		
<u>グルココルチコイド</u>		

10

20

30

40

デキサメタゾン	Decadron(登録商標)Dexasone,	Wyeth, Inc.
プレドニゾロン	Diodex, Hexadrol, Maxidex	
プレドニゾン	Deltasone, Orasone, Liquid Pred, Sterapred(登録商標)	
<u>免疫療法薬</u>		
α インターフェロン		
血管形成インヒビター	Avastin(登録商標)	Genentech
IL-12→インターロイキン12		
IL-2→インターロイキン2 (アルデスロイキン)	Proleukin(登録商標)	Chiron
<u>キナーゼインヒビター</u>		
AMG 386		Amgen
アキシチニブ((AG-013736)		Pfizer, Inc
ボスチニブ(SKI-606)		Wyeth
ブリバニブアラリナート(BMS-582664)		BMS
セディラニブ(AZD2171)	Recentin	AstraZeneca
ダサチニブ(BMS-354825)	Sprycel(登録商標)	Bristol-Myers Squibb
メシル酸イマチニブ	Gleevec	Novartis
レスタウルチニブ(CEP-701)		Cephalon
モテサニブニリン酸 (AMG-706)		Amgen/Takeda
ニロチニブ塩酸塩一水和物	Tasigna(登録商標)	Novartis
パゾパニブHCL (GW786034)	Armala	GSK
セマキサニブ(SU5416)		Pharmacia,
トシル酸ソラフェニブ	Nexavar(登録商標)	Bayer
リンゴ酸スニチニブ	Sutent(登録商標)	Pfizer, Inc.
バンデタニブ(AZD647)	Zactima	AstraZeneca
バタラニブ; PTK-787		Novartis; Bayer Schering Pharma
XL184, NSC718781		Exelixis, GSK
<u>微小管標的化剤</u>		
コルヒチン		
ドセタキセル	Taxotere(登録商標)	Sanofi-Aventis US
イクサベピロン	IXEMPRA(商標)	Bristol-Myers Squibb
ラロタキセル		Sanofi-aventis
オルタタキセル		Spectrum Pharmaceuticals
ナノ粒子パクリタキセル(ABI-007)	Abraxane(登録商標)	Abraxis BioScience, Inc.
パクリタキセル	Taxol(登録商標)	Bristol-Myers Squibb
テセタキセル		Genta
硫酸ビンブラスチン	Velban(登録商標)	Lilly
ビンクリスチン	Oncovin(登録商標)	Lilly
硫酸ビンデシン	Eldisine(登録商標)	Lilly
ビンフルニン		Pierre Fabre
酒石酸ビノレルビン	Navelbine(登録商標)	Pierre Fabre

10

20

30

40

<u>mTORインヒビター</u>		
デフォロリムス(AP23573, MK 8669)		ARIAD Pharmaceuticals, Inc
エベロリムス(RAD001, RAD001C)	Certican(登録商標), Afinitor	Novartis
シロリムス (ラパマイシン)	Rapamune(登録商標)	Wyeth Pharama
テムシロリムス(CCI-779)	Torisel(登録商標)	Wyeth Pharama
<u>タンパク質合成インヒビター</u>		
L-アスパラギナーゼ	Elspar(登録商標)	Merck & Co.
<u>ソマトスタチンアナログ</u>		
酢酸オクトレオチド	Sandostatin(登録商標)	Novartis
<u>トポイソメラーゼインヒビター</u>		
アクチノマイシンD		
カンプトテシン(CPT)		
ベロテカン		
クエン酸ダウノルビシン	Daunoxome(登録商標)	Gilead
塩酸ドキソルビシン	Doxil(登録商標)	Alza
	Vepesid(登録商標)	Bristol-Myers Squibb
エトポシド	Etopophos	Hospira, Bedford, Teva Parenteral, Etc.
イリノテカンHCL (CPT-11)	Camptosar(登録商標)	Pharmacia & Upjohn
ミトキサントロンHCL	Novantrone	EMD Serono
ルビテカン		
テニポシド(VM-26)	Vumon(登録商標)	Bristol-Myers Squibb
トポテカンHCL	Hycamtin(登録商標)	GlaxoSmithKline

10

20

<u>化学療法剤</u>		
アドリアマイシン、5-フルオロウラシル、 サイトキシン、プレオマイシン、 マイトマイシンC、ダウノマイシン、 カルミノマイシン、アミノプテリン、 ダクチノマイシン、マイトマイシン、 エスベラミシン、クロファラビン、 メルカプトプリン、ペントスタチン、 チオグアニン、シタラビン、デシタビン、 フロクスウリジン、ゲムシタビン (Gemzar)、エノシタビン、サバシタビン		
<u>ホルモン療法</u>		
アバレリックス	Plenaxis (商標)	Amgen
酢酸アピラテロン	CB7630	BTG plc
アフィモキシフェン	TamoGel	Ascend Therapeutics, Inc.
アナストラゾール	Arimidex(登録商標)	AstraZeneca
アロマターゼインヒビター	Atamestane plus toremifene	Intarcia Therapeutics, Inc.
	Arzoxifene	Eli Lilly & Co.
アセントール (Asentar) ; DN-101		Novartis; Oregon Health & Science Univ.
ビカルタミド	Casodex(登録商標)	AstraZeneca
ブセレリン	Suprefact(登録商標)	Sanofi Aventis
セトロレリックス	Cetrotide(登録商標)	EMD Serono
エキセメスタン	Aromasin(登録商標)	Pfizer
エキセメスタン	Xtane	Natco Pharma, Ltd.
ファドロゾール(CGS 16949A)		
フルタミド	Eulexin(登録商標)	Schering
フルタミド	Prostacur	Laboratorios Almirall, S.A.
フルベストラント	Faslodex(登録商標)	AstraZeneca
酢酸ゴセレリン	Zoladex(登録商標)	AstraZeneca
レトロゾール	Femara(登録商標)	Novartis
レトロゾール(CGS20267)	Femara	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.
レトロゾール	Estrochek	Jagsonpal Pharmaceuticals, Ltd.
レトロゾール	Letrozole	Indchemie Health Specialities
酢酸ロイプロリド	Eligard(登録商標)	Sanofi Aventis
酢酸ロイプロリド	Leopril	VHB Life Sciences, Inc.
酢酸ロイプロリド	Lupron(登録商標)/Lupron Depot	TAP Pharma
酢酸ロイプロリド	Viador	Bayer AG
酢酸メゲストロール	Megace(登録商標)	Bristol-Myers Squibb
酢酸メゲストロール	Estradiol Valerate (Delestrogen)	Jagsonpal Pharmaceuticals, Ltd.
酢酸メドロキシprogステロン	Veraplex	Combiphar
MT206		Medisyn Technologies, Inc.
ナファレリン		
デカン酸ナンドロロン	Zestabolin	Mankind Pharma, Ltd.

10

20

30

40

ニルタミド	Nilandron(登録商標)	Aventis Pharmaceuticals
ラロキシフェンHCL	Evista(登録商標)	Lilly
タモキシフェン	Taxifen	Yung Shin Pharmaceutical
タモキシフェン	Tomifen	Aikem Laboratories, Ltd.
クエン酸タモキシフェン	Nolvadex	AstraZeneca
クエン酸タモキシフェン	Soltamox	EUSA Pharma, Inc.
クエン酸タモキシフェン	Tamoxifen citrate SOPHARMA	Sopharma JSCo.
クエン酸トレミフェン	Fareston(登録商標)	GTX, Inc.
トリプトレリンパモエート	Trelstar(登録商標)	Watson Labs
トリプトレリンパモエート	Trelstar Depot	Paladin Labs, Inc.
<u>プロテインキナーゼB (PKB) インヒビター</u>		
AKTインヒビター ASTEX		Astex Therapeutics
AKTインヒビター NERVIANO		Nerviano Medical Sciences
AKTキナーゼインヒビター TELIK		Telik, Inc.
AKT DECIPHERA		Deciphera Pharmaceuticals, LLC
ペリホシン(KRX0401, D-21266)		Keryx Biopharmaceuticals, Inc., AEterna Zentaris, Inc.
ペリホシン+ドセタキセル		Keryx Biopharmaceuticals, Inc., AEterna Zentaris, Inc.
ペリホシン+ゲムシタビン		AEterna Zentaris, Inc.
ペリホシン+パクリタキセル		Keryx Biopharmaceuticals, Inc., AEterna Zentaris, Inc.
プロテインキナーゼBインヒビター DEVELOGEN		DeveloGen AG
PX316		Oncothyreon, Inc.
RX0183		Rexahn Pharmaceuticals, Inc.
RX0201		Rexahn Pharmaceuticals, Inc.
VQD002		VioQuest Pharmaceuticals, Inc.
XL418		Exelixis, Inc.
ZEN027		AEterna Zentaris, Inc.
<u>ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) インヒビター</u>		
BEZ235		Novartis AG
BGT226		Novartis AG
CAL101		Calistoga Pharmaceuticals, Inc.
CHR4432		Chroma Therapeutics, Ltd.
Erk/PI3Kインヒビター ETERNA		AEterna Zentaris, Inc.
GDC0941		Genentech Inc./Piramed Limited/Roche Holdings, Ltd.
エンザスタウリン HCL (LY317615)	Enzastaurin	Eli Lilly
LY294002/ワートマニン		
PI3Kインヒビター SEMAFORE		Semafore Pharmaceuticals
PX866		Oncothyreon, Inc.

10

20

30

40

SF1126		Semafore Pharmaceuticals
VMD-8000		VM Discovery, Inc.
XL147		Exelixis, Inc.
XL147 + XL647		Exelixis, Inc.
XL765		Exelixis, Inc.
PI-103		Roche/Piramed
サイクリン依存性キナーゼインヒビター		
CYC200, r-ロスコピチン	Seliciclib	Cyclacel Pharma
NSC-649890, L86-8275, HMR-1275	Alvocidib	NCI
TLr9, CD289		
IMオキシシン		Merck KGaA
HYB2055		Idera
IMO-2055		Isis Pharma
1018 ISS		Dynavax Technologies/UCSF
PF-3512676		Pfizer
酵素インヒビター		
ロナファルニブ (SCH66336)	Sarasar	SuperGen, U Arizona
抗TRAIL		
AMG-655		Aeterna Zentaris, Keryx Biopharma
Apo2L/TRAIL, AMG951		Genentech, Amgen
Apomab (完全ヒト化mAb)		Genentech

10

20

<u>B2B3-1と併用するための抗癌剤</u>	<u>標的</u>	<u>製造元/所有元</u>
その他		
Imprime PGG		Biothera
CHR-2797	アミノペプチダーゼ M1	Chroma Therapeutics
E7820, NSC 719239	インテグリン $\alpha 2$	Eisai
INCB007839	ADAM 17, TACE	Incyte
CNF2024, BIIB021	Hsp90	Biogen Idec
MP470, HPK-56	Kit/Met/Ret	Shering-Plough
SNDX-275/MS-275	HDAC	Syndax
ザーネストラ、ティピファニブ, R115777	Ras	Janssen Pharma
ボロシキシマブ; Eos 200-4, M200	$\alpha 581$ インテグリン	Biogen Idec; Eli Lilly/UCSF/PDL BioPharma
アプリコキシブ (Apricoxib) (TP2001)	COX-2インヒビター	Daiichi Sankyo; Tragara Pharma

30

【 0 2 4 1 】

他の態様

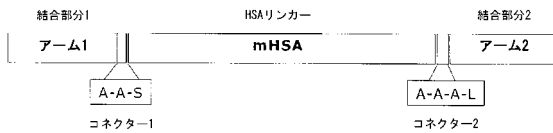
40

本発明をその特定の態様を参酌して記載してきたが、さらなる改変が可能であること、および、概して本発明の原理に従い、かつ本発明が属する技術分野内で公知のまたは慣例の実施に近くかつ本明細書で上述される本質的な特徴に適用され得るような本発明の開示からの逸脱を含む、本発明の任意の改変、用途、または適応を、本出願が包含することを意図していることが理解されるであろう。

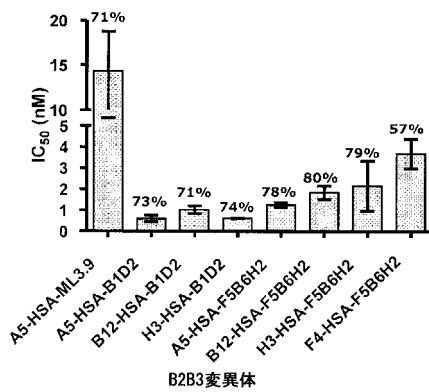
【 0 2 4 2 】

本明細書で言及される全ての特許および特許出願は、個々の独立した特許または特許出願がその全体が参照により組み入れられると具体的かつ個別に示されたのと同じ程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

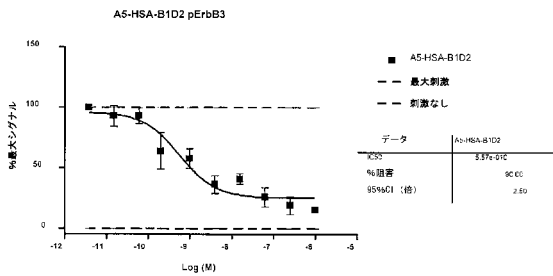
【図 1】



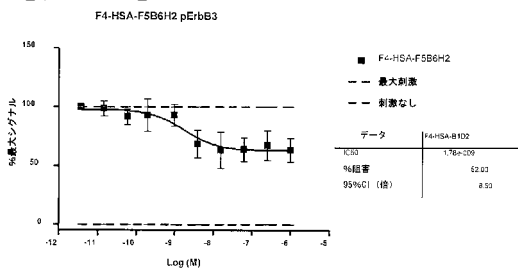
【図 2】



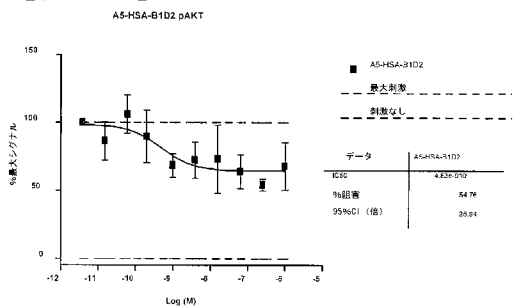
【図 3 A】



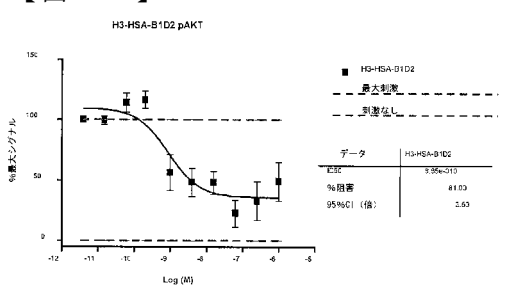
【図 3 D】



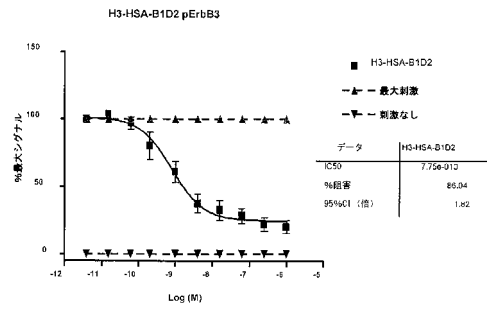
【図 4 A】



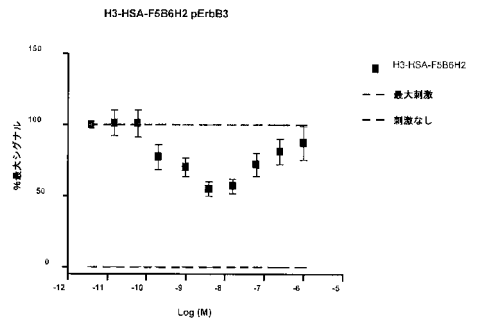
【図 4 B】



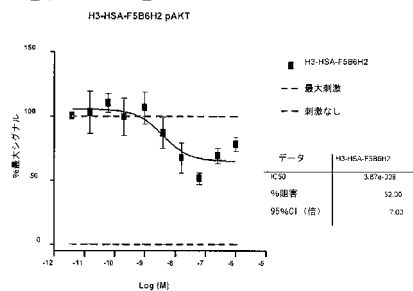
【図 3 B】



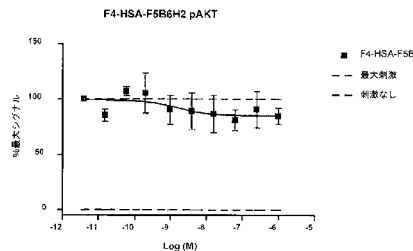
【図 3 C】



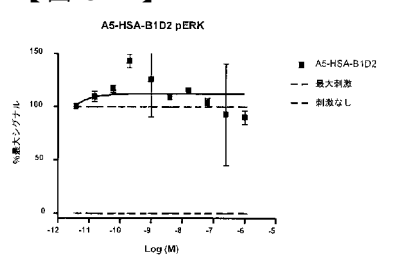
【図 4 C】



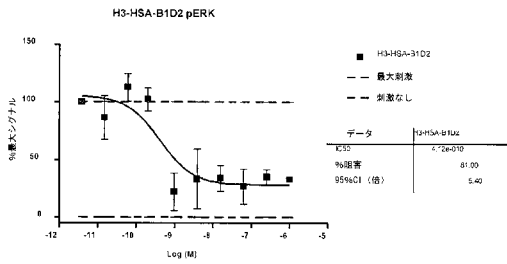
【図 4 D】



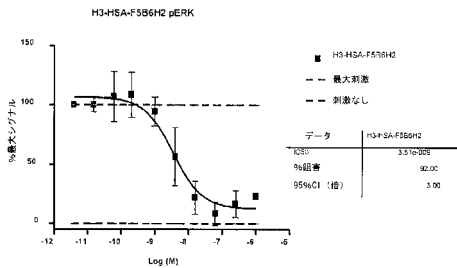
【図 5 A】



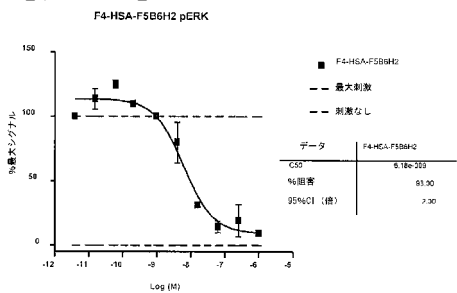
【図 5 B】



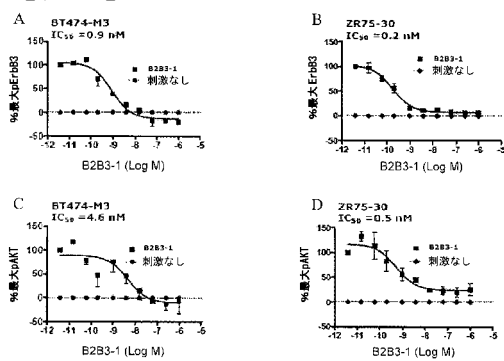
【図 5 C】



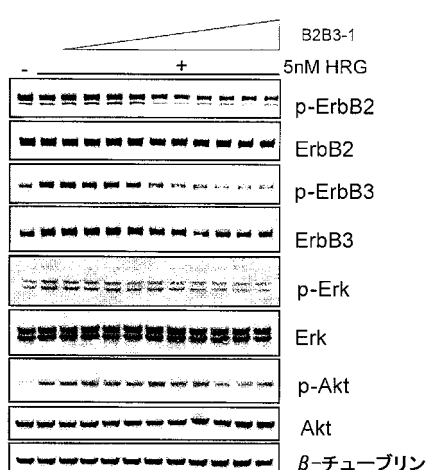
【図 5 D】



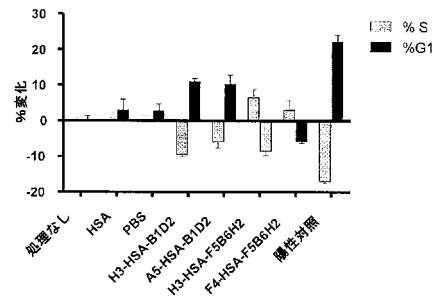
【図 8】



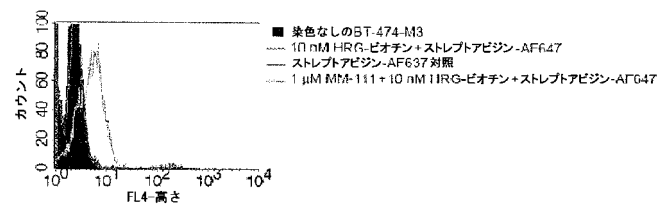
【図 9】



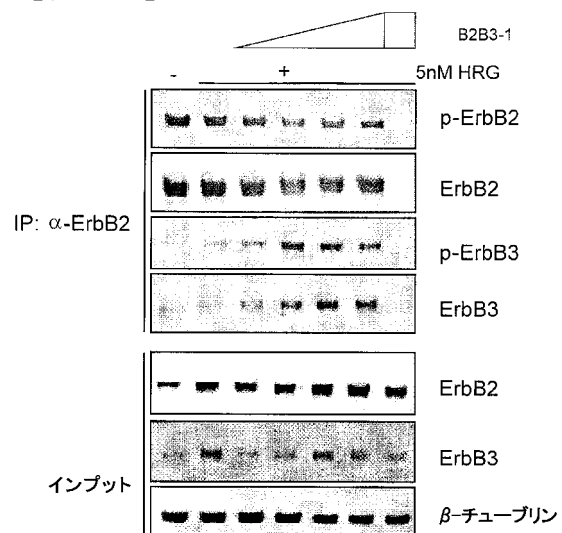
【図 6】



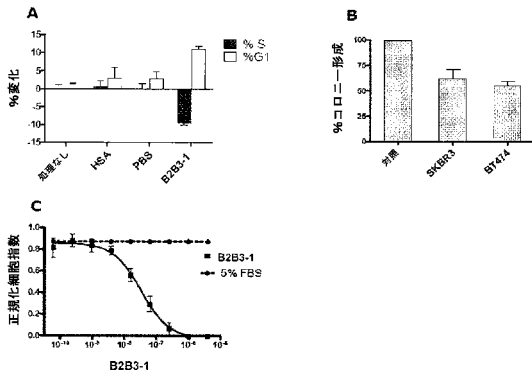
【図 7】



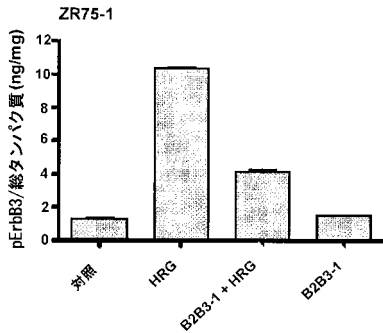
【図 10】



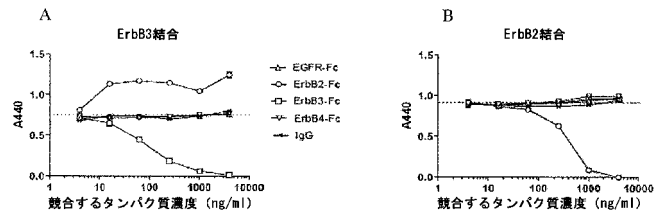
【図 1 1】



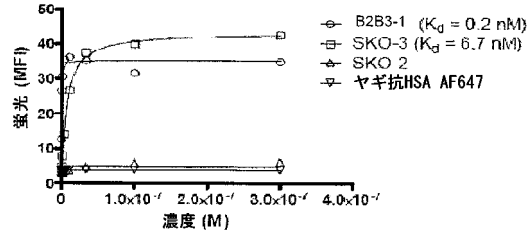
【図 1 2】



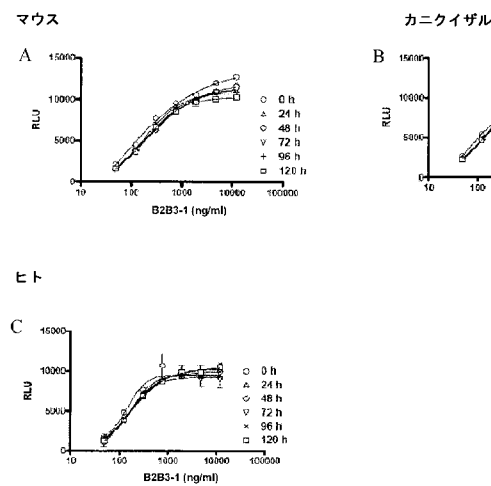
【図 1 3】



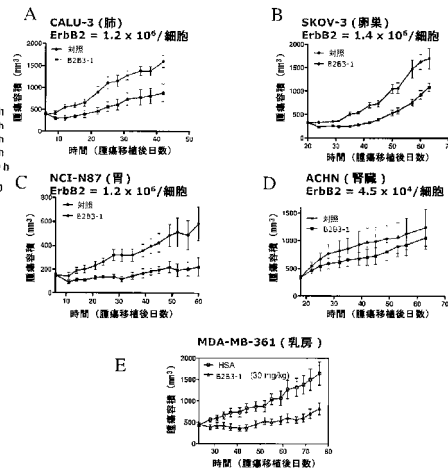
【図 1 4】



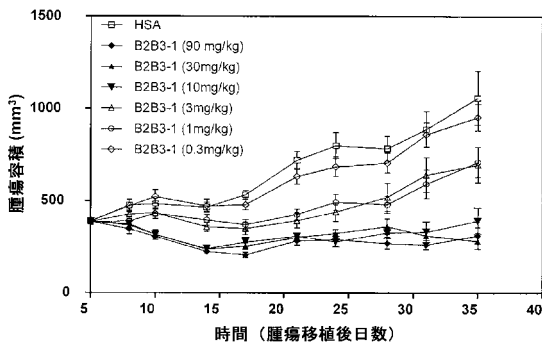
【図 1 5】



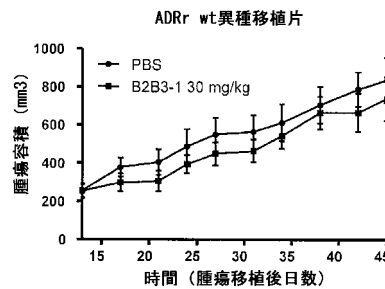
【図 1 7】



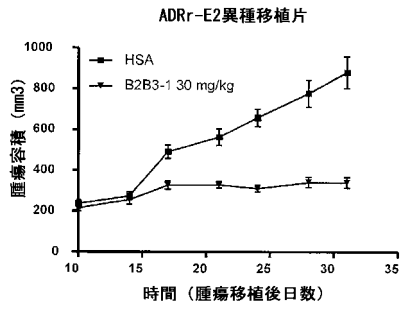
【図 1 6】



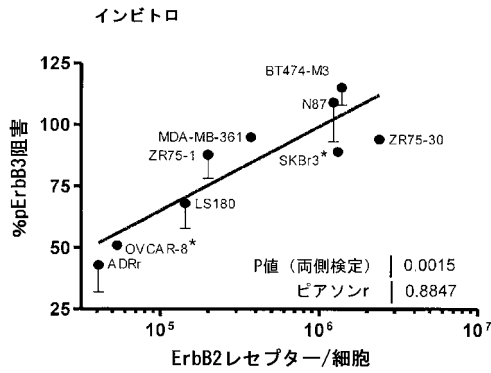
【図 1 8 A】



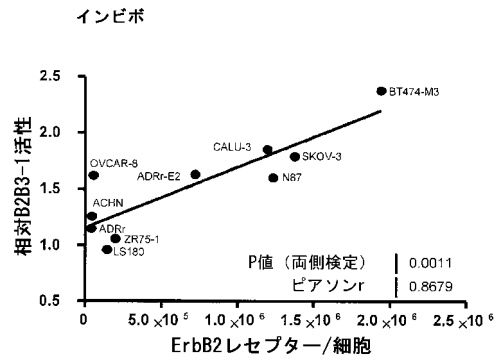
【図 18 B】



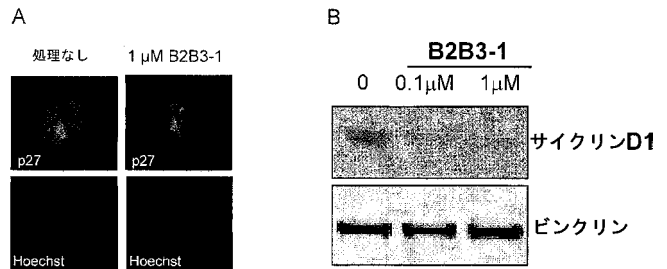
【図 19 A】



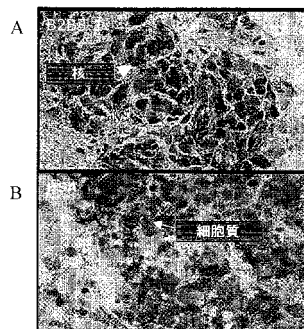
【図 19 B】



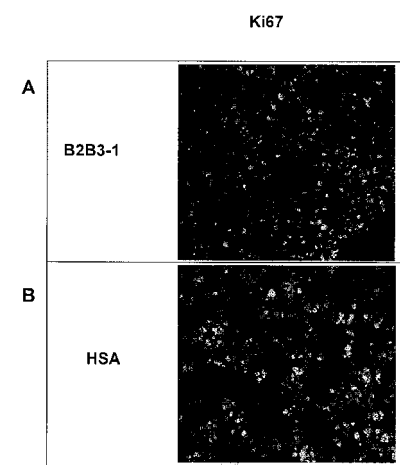
【図 20】



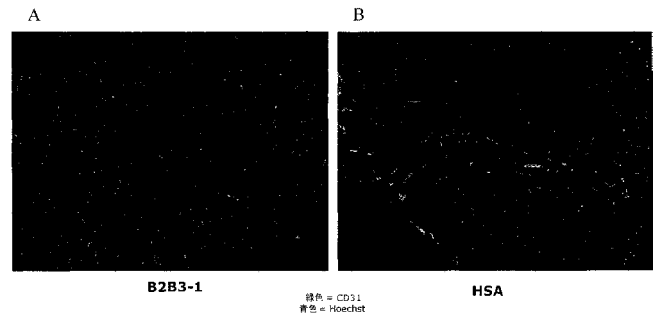
【図 21】



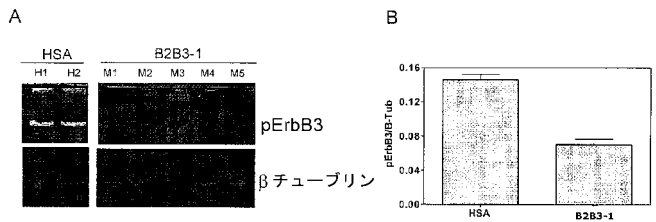
【図 22】



【図 23】

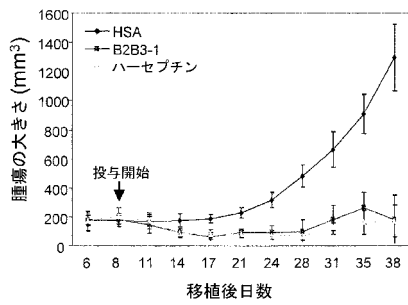


【図 24】



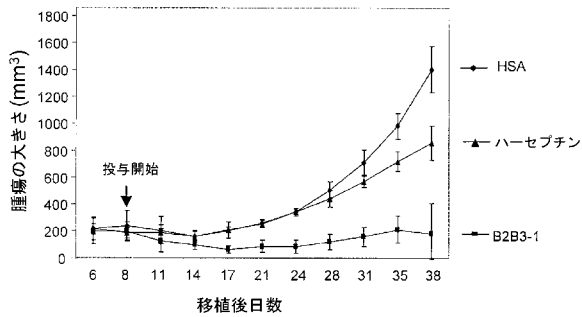
【図 25 A】

BT-474-M3 対照

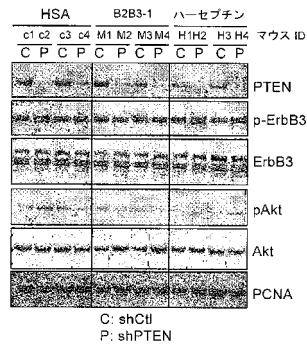


【図 25 B】

BT-474-M3 PTENノックダウン

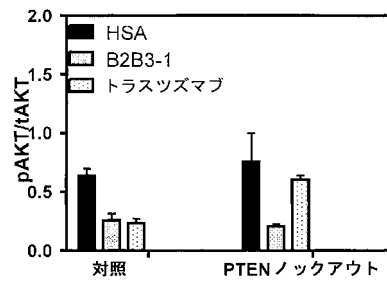


【図 26 A】

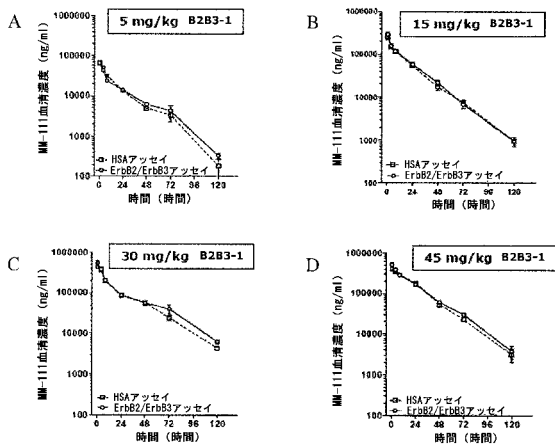


【図 26 B】

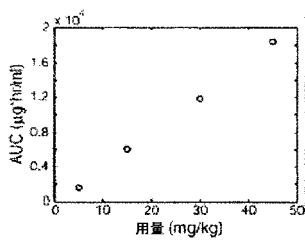
BT-474-M3



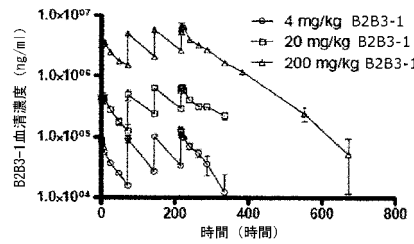
【図 27】



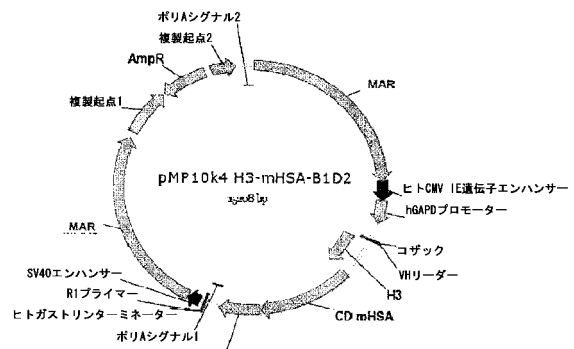
【図 28】



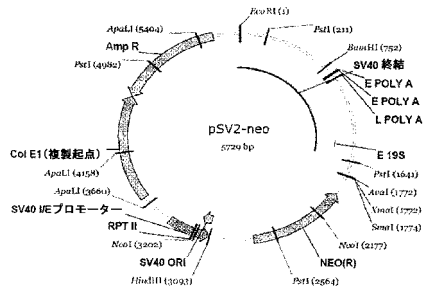
【図 29】



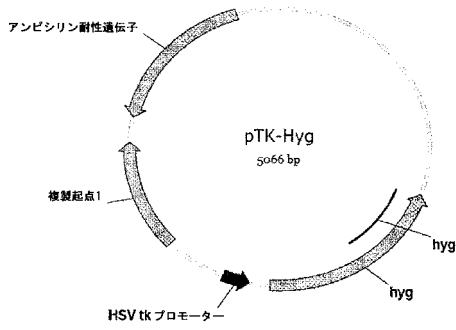
【図 30】



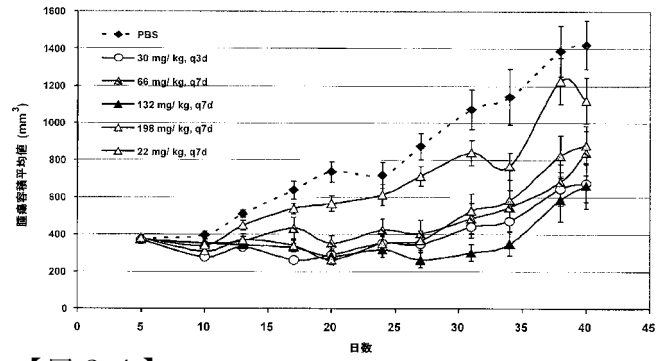
【図 3 1】



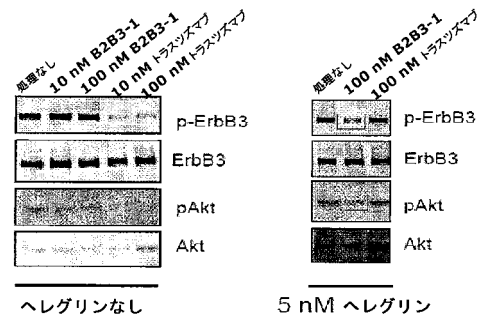
【図 3 2】



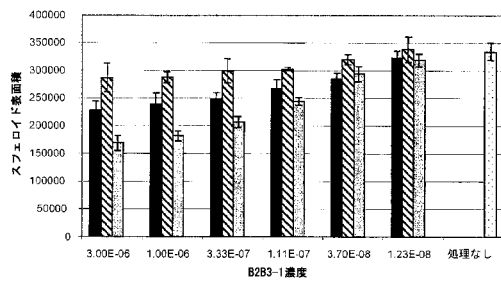
【図 3 3】



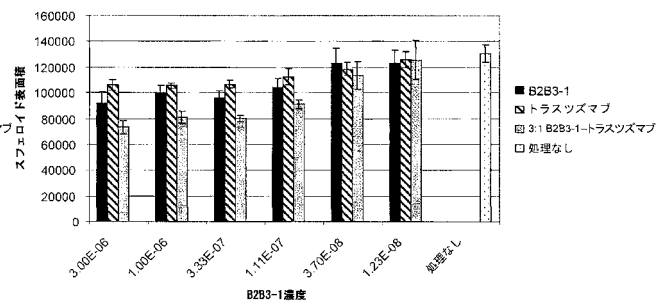
【図 3 4】



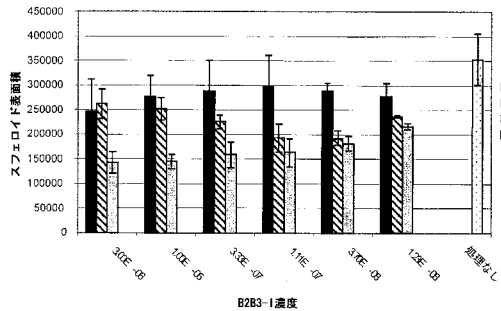
【図 3 5 A】



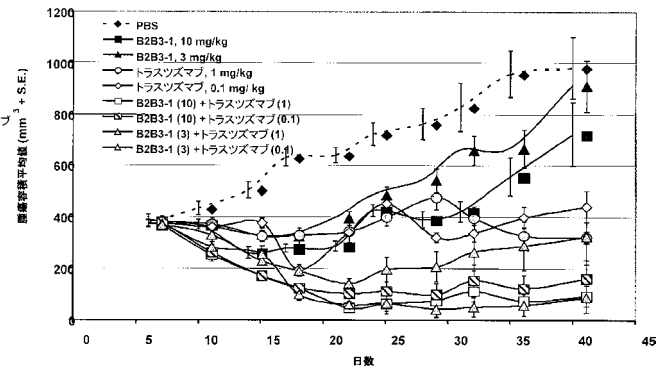
【図 3 5 C】



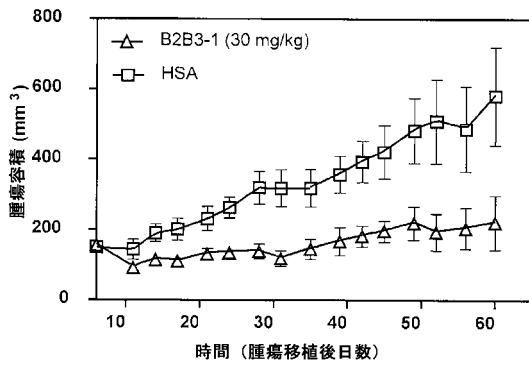
【図 3 5 B】



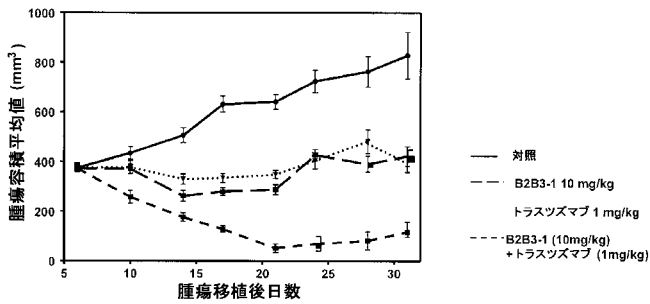
【図 3 6】



【図 3 7】



【図 3 8】



【配列表】

[2012509259000001.app](#)

【手続補正書】

【提出日】平成23年7月26日(2011.7.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

[2012509259000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/60721

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/76; A61K 38/38 (2010.01) USPC - 530/362; 514/2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C07K 14/76; A61K 38/38 (2010.01) USPC - 530/362; 514/2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST - DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=YES; OP=ADJ; Google Scholar Search terms: HSA, human serum albumin, albumin, linker, conjugate, construct, fusion, HER2, NEU, NGL, CD340, HER-2, ErbB-2, herstatin, TKR1, erbB2, letrozole, trastuzumab, lapatinib, taxane, paclitaxel, docetaxel, HER3, HER-3, ErbB-3, ErbB3, LCCS2, lethal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/0186664 A1 (ROSEN et al.) 25 August 2005 (25.08.2005) para [0006]-[0009]; [0047]-[0049]; [0066]-[0068]; [0113]-[0117]; [0126]-[0131]; [0228]; [0305]; [0306]; [0604]-[0612]; [0618];	1, 2, 14-16, 29, 30
Y	Tables 1 and 2; SEQ ID NOs: 262; 269; 1038.	3, 17, 28, 31, 32
A		4, 18-27
Y	US 2008/0124334 A1 (AKITA et al.) 29 May 2008 (29.05.2008) para [0021]; [0026]; [0049]; [0050]; [0066]; [0219]-[0221].	3, 32
Y	US 2008/0166358 A1 (TUNG) 10 July 2008 (10.07.2008) para [0004]; [0089]; [0090].	17, 28, 31
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 April 2010 (06.04.2010)		Date of mailing of the international search report 13 APR 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/60721

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 33-36
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Group 1: claims 1-4 and 14-32, directed to a human serum albumin conjugate comprising any one of SEQ ID NOs: 6-15, wherein a first binding moiety is bonded to the amino terminus of the albumin, and a second binding moiety is bonded to the carboxy terminus of the albumin; limited to wherein the albumin linker comprises SEQ ID NO: 6 or 1, further wherein the first binding moiety binds to ErbB3, and the second moiety binds to ErbB2, wherein the linker conjugate comprises SEQ ID NO: 16.

- Please see extra sheet for continuation -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-4 and 14-32, limited to SEQ ID NOs: 1, 6, and 16

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/60721

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

Group 2: claims 5 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 17.
Group 3: claims 6 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 18.
Group 4: claims 7 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 19.
Group 5: claims 8 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 20.
Group 6: claims 9 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 21.
Group 7: claims 10 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 22.
Group 8: claims 11 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 23.
Group 9: claims 12 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 24.
Group 10: claims 13-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 25.

The inventions listed as Groups 1 - 10 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the claims of Groups 1-10 is a human serum albumin linker conjugate, wherein each Group is directed to a conjugate comprising a particular sequence. The Groups may share the further common technical element of being conjugates that comprise binding moieties that bind to both ErbB2 and ErbB3.

The only common technical element shared by the above groups is that they are related to albumin fusion proteins comprising binding moieties that bind to ErbB2 and ErbB3. This common technical element does not improve upon the prior art of US 2007/0086942 A1 to Chang et al. (see para [0016], [0017]). The claims of Group 1 share a further common technical element of comprising a particular albumin linker sequence. This common technical element does not improve upon the prior art of US 2005/0186684 A1 to Rosen et al. (see para [0097], [0099], [0162], [0172], [0305], and SEQ ID NO: 262 in comparison to Applicants' SEQ ID NO: 12). Therefore, the inventions of Groups 1 - 10 lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

(Applicants may elect for additional albumin sequences to be searched in Group 1 by specifying the SEQ ID NO: and paying an additional invention search fee for each sequence. Where the sequence comprises at least a portion of the sequence of another Group stated above, the additional Group will not be searched unless the Applicant can further demonstrate that the sequence associated with the Group can be formed using the sequences of the binding moieties of Group 1 (e.g. SEQ ID NO's: 26 and 27), or the sequences of the binding moieties of another Group for which an additional invention search payment has been made).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 31/4196 (2006.01)	A 6 1 K 31/4196	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

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

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 マクドナー シャーロット
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウィンチェスター サージェント ロード 1 1

(72)発明者 フェルダウス マイケル
アメリカ合衆国 ニューハンプシャー州 グランサム ピー. オー. ボックス 1 8 8 8

(72)発明者 フハロブ アレクサンドラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ サクラメント ストリート 4 7 アパートメント 3

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA20 DA02 EA04 GA11
4C076 CC03 CC27 EE41 EE59
4C084 AA02 AA07 BA44 CA18 DA37 NA14 ZB07 ZB071 ZB072 ZB26
ZB261 ZB262 ZC75 ZC751 ZC752
4C085 AA14 BB15 CC23
4C086 AA01 AA02 BA02 BC46 BC60 GA02 GA07 MA02 MA06 NA05
NA13 ZB07 ZB26 ZC75
4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA70 DA75 EA20 FA74