

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7582867号
(P7582867)

(45)発行日 令和6年11月13日(2024.11.13)

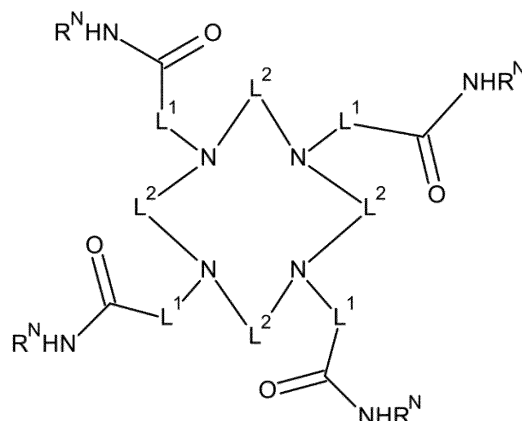
(24)登録日 令和6年11月5日(2024.11.5)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	47/61 (2017.01)	A 6 1 K	47/61
A 6 1 K	51/04 (2006.01)	A 6 1 K	51/04 1 0 0
A 6 1 K	31/555(2006.01)	A 6 1 K	31/555
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 D
		請求項の数 28 (全223頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2020-558420(P2020-558420)	(73)特許権者	520401619 オラノ メド エスアエス フランス国 9 2 4 0 0 クルブボア, プラス ジャン ミレ 1, トゥール アレバ
(86)(22)出願日	平成31年4月16日(2019.4.16)	(73)特許権者	514099673 エフ・ホフマンーラ・ロシュ・アクチュ ンゲゼルシャフト スイス国 シーエイチー 4 0 7 0 バーゼ ル グレンツァッハーシュトラーセ 1 2 4
(65)公表番号	特表2021-521245(P2021-521245 A)	(74)代理人	110002077 園田・小林弁理士法人
(43)公表日	令和3年8月26日(2021.8.26)	(72)発明者	トルグ, ジュリアン アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーラン ド, ゲイザースバーグ, グラナイト ブレイス 8, ユニット 2 6 5
(86)国際出願番号	PCT/IB2019/000521	最終頁に続く	
(87)国際公開番号	WO2019/202399		
(87)国際公開日	令和1年10月24日(2019.10.24)		
審査請求日	令和4年4月11日(2022.4.11)		
(31)優先権主張番号	62/658,468		
(32)優先日	平成30年4月16日(2018.4.16)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/658,471		
(32)優先日	平成30年4月16日(2018.4.16)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 キレート化された放射性核種に対する抗体および除去剤

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

P b－D O T A Mキレートに特異的な少なくとも1つの抗原結合部位および標的抗原に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位を含む多重特異性または二重特異性抗体を除去するための、D O T A MおよびD O T A Mの機能的バリエーションから選択されるキレート剤にコンジュゲートされたデキストランまたはアミノデキストランを含む除去剤であって、前記キレート剤が金属イオンと複合体化し、D O T A Mの前記機能的バリエーションが、以下の式：



10

[式中、

R^N は、H、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 ハロアルキル、 C_2-6 アルケニル、 C_2-6 アルキニル、 C_3-7 シクロアルキル、 C_3-7 シクロアルキル- C_1-4 アルキル、 C_2-7 ヘテロシクロアルキル、 C_2-7 ヘテロシクロアルキル- C_1-4 アルキル、フェニル、フェニル- C_1-4 アルキル、 C_1-7 ヘテロアリール、および C_1-7 ヘテロアリール- C_1-4 アルキルであり； C_1-6 アルキル、 C_1-6 ハロアルキル、 C_2-6 アルケニル、および C_2-6 アルキニルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^W 基でそれぞれ置換されていてもよく；前記 C_3-7 シクロアルキル、 C_3-7 シクロアルキル- C_1-4 アルキル、 C_2-7 ヘテロシクロアルキル、 C_2-7 ヘテロシクロアルキル- C_1-4 アルキル、フェニル、フェニル- C_1-4 アルキル、 C_1-7 ヘテロアリール、および C_1-7 ヘテロアリール- C_1-4 アルキルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^X 基でそれぞれ置換されていてもよく；

20

L^1 は、独立して C_1-6 アルキレン、 C_1-6 アルケニレン、または C_1-6 アルキニレンであり、それぞれ、1、2または3個の独立して選択される R^1 基で置換されていてもよく；

L^2 は、 C_2-4 直鎖アルキレンであり、独立して選択される R^1 基で置換されていてもよく； C_1-4 アルキルおよび／または C_1-4 ハロアルキルから独立して選択される1、2、3または4個の基で置換されていてもよく；

30

R^1 は、 $D^1-D^2-D^3$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、 C_1-6 アルコキシ、 C_1-6 ハロアルコキシ、 C_1-6 アルキルチオ、 C_1-6 アルキルスルフィニル、 C_1-6 アルキルスルホニル、アミノ、 C_1-6 アルキルアミノ、ジ- C_1-6 アルキルアミノ、 C_1-4 アルキルカルボニル、カルボキシ、 C_1-6 アルコキシカルボニル、 C_1-6 アルキルカルボニルアミノ、ジ- C_1-6 アルキルカルボニルアミノ、 C_1-6 アルコキシカルボニルアミノ、 C_1-6 アルコキシカルボニル- (C_1-6 アルキル) アミノ、カルバミル、 C_1-6 アルキルカルバミル、およびジ- C_1-6 アルキルカルバミルから独立して選択され；

D^1 はそれぞれ、 C_6-10 アリール- C_1-4 アルキル、 C_1-9 ヘテロアリール- C_1-4 アルキル、 C_3-10 シクロアルキル- C_1-4 アルキル、 C_2-9 ヘテロシクロアルキル- C_1-4 アルキル、 C_1-8 アルキレン、 C_1-8 アルケニレン、および C_1-8 アルキニレンから独立して選択され；前記 C_1-8 アルキレン、 C_1-8 アルケニレン、および C_1-8 アルキニレンは、1、2、3または4個の独立して選択される R^4 基で置換されていてもよく；前記 C_6-10 アリール- C_1-4 アルキル、 C_1-9 ヘテロアリール- C_1-4 アルキル、 C_3-10 シクロアルキル- C_1-4 アルキル、 C_2-9 ヘテロシクロアルキル- C_1-4 アルキルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^5 基でそれぞれ置換されていてもよく；

40

D^2 はそれぞれ、独立して存在しないか、または C_1-20 直鎖アルキレンであり、前記 C_1-20 直鎖アルキレンの1～6個の非隣接メチレン基は、独立して選択される- D^4 -

50

部分でそれぞれ置き換えられていてもよいが、但し、前記 C_{1-20} 直鎖アルキレン中の少なくとも 1 個のメチレン単位は、必要に応じて $-D^4-$ 部分で置き換えられていないことを条件とし；前記 C_{1-20} 直鎖アルキレンは、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、 C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} ハロアルキル、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} ハロアルコキシ、アミノ、 C_{1-4} アルキルアミノ、ジ- C_{1-4} アルキルアミノ、 C_{1-4} アルキルカルボニル、カルボキシ、 C_{1-4} アルコキシカルボニル、 C_{1-4} アルキルカルボニルアミノ、ジ- C_{1-4} アルキルカルボニルアミノ、 C_{1-4} アルコキシカルボニルアミノ、 C_{1-4} アルコキシカルボニル- (C_{1-4} アルキル) アミノ、カルバミル、 C_{1-4} アルキルカルバミル、およびジ- C_{1-4} アルキルカルバミルから独立して選択される 1 つまたは複数の基で置換されていてもよく；

D^3 はそれぞれ、H、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-14} シクロアルキル、 C_{3-14} シクロアルキル- C_{1-4} アルキル、 C_{2-14} ヘテロシクロアルキル、 C_{2-14} ヘテロシクロアルキル- C_{1-4} アルキル、 C_{6-14} アリール、 C_{6-14} アリール- C_{1-4} アルキル、 C_{1-13} ヘテロアリール、 C_{1-13} ヘテロアリール- C_{1-4} アルキルから独立して選択され；前記 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニルは、1、2、3、または 4 個の独立して選択される R^6 基でそれぞれ置換されていてもよく；前記 C_{3-14} シクロアルキル、 C_{3-14} シクロアルキル- C_{1-4} アルキル、 C_{2-14} ヘテロシクロアルキル、 C_{2-14} ヘテロシクロアルキル- C_{1-4} アルキル、 C_{6-14} アリール、 C_{6-14} アリール- C_{1-4} アルキル、 C_{1-13} ヘテロアリール、 C_{1-13} ヘテロアリール- C_{1-4} アルキルは、1、2、3 または 4 個の独立して選択される R^7 基でそれぞれ置換されていてもよく；

D^4 はそれぞれ、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR^aC(=O)-$ 、 $-NR^aC(=S)-$ 、 $-NR^bC(=O)NR^c-$ 、 $-NR^bC(=S)NR^c-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S(=O)NR^a-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR^a-$ 、 $-OC(=S)NR^a-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-NR^bS(=O)NR^c-$ 、および $NR^bS(=O)_2NR^0-$ から独立して選択され；

R^4 および R^6 はそれぞれ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} ハロアルコキシ、 C_{1-4} アルキルチオ、 C_{1-4} アルキルスルフィニル、 C_{1-4} アルキルスルホニル、アミノ、 C_{1-4} アルキルアミノ、ジ- C_{1-4} アルキルアミノ、 C_{1-4} アルキルカルボニル、カルボキシ、 C_{1-4} アルコキシカルボニル、 C_{1-4} アルキルカルボニルアミノ、ジ- C_{1-4} アルキルカルボニルアミノ、 C_{1-4} アルコキシカルボニルアミノ、 C_{1-4} アルコキシカルボニル- (C_{1-4} アルキル) アミノ、カルバミル、 C_{1-4} アルキルカルバミル、およびジ- C_{1-4} アルキルカルバミルから独立して選択され；

R^5 はそれぞれ、ハロゲン、シアノ、シアネート、イソチオシアネート、ニトロ、ヒドロキシル、 C_{1-4} アルキル、 C_{2-4} アルケニル、 C_{2-4} アルキニル、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} ハロアルコキシ、 C_{1-4} アルキルチオ、 C_{1-4} アルキルスルフィニル、 C_{1-4} アルキルスルホニル、アミノ、 C_{1-4} アルキルアミノ、ジ- C_{1-4} アルキルアミノ、 C_{1-4} アルキルカルボニル、カルボキシ、 C_{1-4} アルコキシカルボニル、 C_{1-4} アルキルカルボニルアミノ、ジ- C_{1-4} アルキルカルボニルアミノ、 C_{1-4} アルコキシカルボニルアミノ、 C_{1-4} アルコキシカルボニル- (C_{1-4} アルキル) アミノ、カルバミル、 C_{1-4} アルキルカルバミル、およびジ- C_{1-4} アルキルカルバミルから独立して選択され；

R^7 はそれぞれ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} シクロアルキル、 C_{3-7} シクロアルキル- C_{1-4} アルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル- C_{1-4} アルキル、フェニル、フェニル- C_{1-4} アルキル、 C_{1-7} ヘテロアリール、 C_{1-7} ヘテロアリール- C_{1-4} アルキル、 $-OR^0$ 、 $-SR^0$ 、 $-S(=O)R^P$ 、 $-S(=O)_2R^P$ 、 $-S(=O)NR^SR^t$ 、 $-C(=O)R^P$ 、 $-C(=O)OR^P$ 、 $-C(=O)$

10

20

30

40

50

NR^sR^t 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^p$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^s\text{R}^t$ 、 $-\text{NR}^s\text{R}^t$ 、 $-\text{NR}^q\text{C}(=\text{O})\text{R}^r$ 、 $-\text{NR}^q\text{C}(=\text{O})\text{OR}^r$ 、 $-\text{NR}^q\text{C}(=\text{O})\text{NR}^r$ 、 $-\text{NR}^q\text{S}(=\text{O})_2\text{R}^r$ 、および $-\text{NR}^p\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^s\text{R}^t$ から独立して選択され；前記 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R' 基でそれぞれ置換されていてもよく；前記 G_{3-7} シクロアルキル、 C_{3-7} シクロアルキル- C_{1-4} アルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル- C_{1-4} アルキル、フェニル、フェニル- C_{1-4} アルキル、 C_{1-7} ヘテロアリール、 C_{1-7} ヘテロアリール- C_{1-4} アルキルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R'' 基でそれぞれ置換されていてもよく；

R^a 、 R^b 、および R^c はそれぞれ、 H 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} シクロアルキル、 C_{3-7} シクロアルキル- C_{1-4} アルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル- C_{1-4} アルキル、フェニル、フェニル- C_{1-4} アルキル、 C_{1-7} ヘテロアリール、 C_{1-7} ヘテロアリール- C_{1-4} アルキルから独立して選択され；前記 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^w 基でそれぞれ置換されていてもよく；前記 C_{3-7} シクロアルキル、 C_{3-7} シクロアルキル- C_{1-4} アルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル- C_{1-4} アルキル、フェニル、フェニル- C_{1-4} アルキル、 C_{1-7} ヘテロアリール、 C_{1-7} ヘテロアリール- C_{1-4} アルキルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^x 基でそれぞれ置換されていてもよく；

R^o 、 R^p 、 R^q 、 R^r 、 R^s および R^t はそれぞれ、 H 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{3-7} シクロアルキル、 C_{3-7} シクロアルキル- C_{1-4} アルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル- C_{1-4} アルキル、フェニル、フェニル- C_{1-4} アルキル、 C_{1-7} ヘテロアリール、 C_{1-7} ヘテロアリール- C_{1-4} アルキルから独立して選択され；前記 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} ハロアルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^y 基でそれぞれ置換されていてもよく；前記 C_{3-7} シクロアルキル、 C_{3-7} シクロアルキル- C_{1-4} アルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル、 C_{2-7} ヘテロシクロアルキル- C_{1-4} アルキル、フェニル、フェニル- C_{1-4} アルキル、 C_{1-7} ヘテロアリール、 C_{1-7} ヘテロアリール- C_{1-4} アルキルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^z 基でそれぞれ置換されていてもよく；

R' 、 R^w および R^y はそれぞれ、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} ハロアルコキシ、アミノ、 C_{1-4} アルキルアミノ、およびジ- C_{1-4} アルキルアミノから独立して選択され；

R'' 、 R^x および R^z はそれぞれ、ヒドロキシル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、 C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} ハロアルキル、 C_{1-4} アルコキシ、 C_{1-4} ハロアルコキシ、アミノ、 C_{1-4} アルキルアミノ、およびジ- C_{1-4} アルキルアミノから独立して選択されるが；

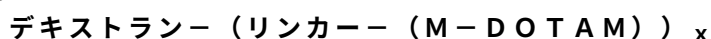
但し、置換されていてもよい部分のそれぞれの原子の価数を超えないことを条件とする]に従う化合物またはその薬学的に許容される塩である、除去剤。

【請求項2】

R^n がそれぞれ、 H 、 C_{1-6} アルキル、または C_{1-6} ハロアルキルであり； L^1 がそれぞれ C_{1-4} アルキレンであり； L^2 がそれぞれ C_2 アルキレンである、請求項1に記載の除去剤。

【請求項3】

キレート剤にコンジュゲートされたデキストランまたはアミノデキストランが、以下の式：



[式中、

デキストランは、デキストランまたはそのアミノデキストランであり；

リンカーは、連結部分であり；

M-DOTAMは、金属イオンが組み込まれたDOTAMまたはその前記機能的バリエーションであり；および

$x \geq 1$ である]

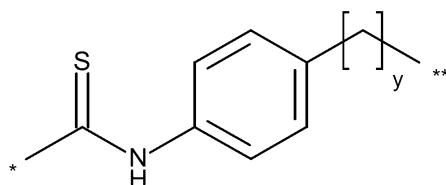
の化合物である、請求項1または2に記載の除去剤。

【請求項4】

x が、20以上、25以上、30以上、35以上、40以上、または50以上である、請求項3に記載の除去剤。

【請求項5】

連結部分が、以下の式：



[式中、 y は1～6であり、*はデキストランへの結合点を表し、**はDOTAMまたはその前記機能的バリエーションの環原子への結合点を表す]

の二価の基である、請求項3または4に記載の除去剤。

【請求項6】

アミノデキストランが、アミノ酸およびグルコース以外の糖類から選択される1つまたは複数の基で置換されている、請求項1から5のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項7】

デキストランまたはアミノデキストランのグルコース単位の数のパーセンテージとしてのDOTAM基の数が、少なくとも1%、少なくとも1.5%、少なくとも2%、少なくとも2.5%、少なくとも3%、少なくとも5%である、請求項1から6のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項8】

デキストランの平均分子量が、200～800kDaである、請求項1から7のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項9】

分子量カットオフ未満のデキストラン成分または除去剤が除去されており、分子量カットオフが50kDa以上、100kDa以上または200kDa以上である、請求項8に記載の除去剤。

【請求項10】

金属イオンが、安定な、または本質的に安定な、Pb、BiまたはCaイオンから選択される金属イオンである、請求項1から9のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項11】

DOTAMのデキストランへのコンジュゲーションの前および／または後に、DOTAMを金属イオンとキレート化することを含む、請求項1または2に記載の除去剤の製造方法。

【請求項12】

コンジュゲーションの前に、デキストランまたはアミノデキストランを、50kDa以上、100kDa以上または200kDa以上の分子量カットオフ／閾値より下の種を除去するための濾過工程にかける、および／または

コンジュゲートを濾過工程にかけて、50kDa以上、100kDa以上または200kDa以上の分子量カットオフ／閾値より下の種を除去することを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

i) 対象に、Pb-DOTAMキレートに特異的な少なくとも1つの抗原結合部位および標的抗原に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位を含む多重特異性または二重特異性抗体を投与することであって、投与後、抗体が標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化する、多重特異性または二重特異性抗体を投与すること；

ii) Pb-DOTAMキレートのための結合部位で抗体に結合することができ、細胞の表面に局在化されない抗体のクリアランスを増加させる、および／またはその抗原結合部位をブロックする、請求項1から10のいずれか一項に記載の除去剤を投与すること；

iii) その後、Pb放射性同位体とキレート化したDOTAMを含む複合体を投与することであって、前記複合体が、細胞の表面に局在化した抗体に結合する、複合体を投与すること

を含む、プレターゲティングされた放射線イメージングの方法における使用のための、請求項1から10のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項14】

前記方法が、

iv) キレート化された放射性核種が局在化した組織または臓器をイメージングすることをさらに含む、請求項13に記載の除去剤。

【請求項15】

i) 対象に、Pb-DOTAMキレートに特異的な少なくとも1つの抗原結合部位および標的抗原に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位を含む多重特異性または二重特異性抗体を投与することであって、投与後、抗体が標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化する、多重特異性または二重特異性抗体を投与すること；

ii) Pb-DOTAMキレートのための結合部位で抗体に結合することができ、細胞の表面に局在化されない抗体のクリアランスを増加させる、および／またはその抗原結合部位をブロックする、請求項1から10のいずれか一項に記載の除去剤を投与すること；

iii) その後、Pb放射性同位体とキレート化したDOTAMを含む複合体を投与することであって、前記複合体が、細胞の表面に局在化した抗体に結合する、複合体を投与すること

を含む、プレターゲティングされた放射線免疫療法の方法における使用のための、請求項1から10のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項16】

Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位が、

a) アミノ酸配列GFSLSTYSMS（配列番号1）を含む重鎖CDR1；

b) アミノ酸配列FIGSRGDTYYASWAKG（配列番号2）を含む重鎖CDR2；

c) アミノ酸配列ERDPYGGGAYPPHL（配列番号3）を含む重鎖CDR3；

d) アミノ酸配列QSSHVSVDNDLA（配列番号4）を含む軽鎖CDR1；

e) アミノ酸配列QASKLAS（配列番号5）を含む軽鎖CDR2；及び

f) アミノ酸配列LGGYDDSDTYG（配列番号6）を含む軽鎖CDR3

を含む、請求項13から15のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項17】

Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位が、ヒト、キメラまたはヒト化されたものである、請求項13から16のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項18】

i) Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位が、配列番号7および配列番号9からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、または配列番号7もしくは配列番号9に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーションを含む；かつ／または

ii) Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位が、配列番号8および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または配列番号

10

20

30

40

50

8もしくは配列番号10に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーションを含む、請求項16に記載の除去剤。

【請求項19】

i) Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位が、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む；または

ii) Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位が、配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む、

請求項16から18のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項20】

標的抗原が、腫瘍特異的な抗原である、請求項13から19のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項21】

腫瘍特異的な抗原が、CEA、HER2およびCD20からなる群から選択される、請求項20に記載の除去剤。

【請求項22】

多重特異性または二重特異性抗体が、Fc領域を含む、請求項13から21のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項23】

Fc領域が、エフェクター機能を低下させるように操作されている、請求項22に記載の除去剤。

【請求項24】

Fc領域が、残基234、235、238、265、269、270、297、327および／または329の1つまたは複数の置換によって、エフェクター機能を低下させるように操作されている、請求項23に記載の除去剤。

【請求項25】

多重特異性または二重特異性抗体が、

i) 第1の抗原のための抗原結合部位を含む完全長抗体、および

ii) 第2の抗原のための抗原結合部位と一緒に形成する、少なくとも第2の重鎖可変ドメインと第2の軽鎖可変ドメインを含み、第1または第2の抗原のいずれかがPb-DOTAMキレートであり、他方が標的抗原である、

請求項22から24のいずれか一項に記載の除去剤。

【請求項26】

多重特異性または二重特異性抗体が、第1の抗原のための抗原結合部位を含む完全長抗体を含み、重鎖の一方のNまたはC末端が、ポリペプチドリンカーを介して、第1のポリペプチドに連結されており、第1のポリペプチドが、第2のポリペプチドと会合して、第2の抗原のための結合部位を含むFabまたは交差Fabを形成する、請求項25に記載の除去剤。

【請求項27】

多重特異性または二重特異性抗体が、第1および第2のポリペプチドが一緒に形成する、第2の抗原のための抗原結合部位を形成するような

i) VLおよびCLドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VHドメインおよびCH1ドメインからなる第1のポリペプチド；または

ii) VHおよびCLドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VLドメインおよびCH1ドメインからなる第1のポリペプチド；または

iii) VLおよびCH1ドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VHドメインおよびCLドメインからなる第1のポリペプチドを含む、請求項26に記載の除去剤。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

多重特異性または二重特異性抗体が、第1の抗原のための抗原結合部位を含む完全長抗体を含み、重鎖の一方のC末端が、ポリペプチドリinkerを介して、VHおよびCLドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VLドメインおよびCH1ドメインからなる第1のポリペプチドに連結されている、請求項27に記載の除去剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、二重特異性抗体を含む、キレート化された放射性核種に特異的に結合する抗体に関する。本出願はさらに、放射線免疫イメージングおよび放射線免疫療法などの適用におけるそのような二重特異性抗体の使用に関する。本出願はさらに、そのような方法において有用な除去剤および組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

薬物をがん細胞に標的化するためのモノクローナル抗体が開発されてきた。毒性薬剤を、腫瘍関連抗原に結合する抗体にコンジュゲートすることによって、周囲の組織にあまり損傷を与えることなく、腫瘍をより特異的に殺傷することができる可能性がある。

【0003】

プレターゲティングされた放射線免疫療法 (PRIT) においては、一方では腫瘍関連抗原に対する親和性を有し、他方では放射標識化合物に対する親和性を有する抗体コンストラクトが使用される。第1の工程では、抗体が投与され、それが腫瘍内に局在化する。続いて、放射標識化合物が投与される。放射標識化合物は小さいため、腫瘍に迅速に送達することができ、また素早く除去される。これにより、腫瘍以外への放射線曝露が低減される (Goldenbergら、Theranostics 2012、2 (5)、523～540頁)。直接的な細胞殺傷効果の他に、PRITはまた、免疫原性細胞の細胞死の誘導因子およびがん免疫療法および内因性ワクチン接種手法のための潜在的な組合せパートナーとして作用することもできる。同様の手順を、イメージングのために使用することもできる。プレターゲティングは、二重特異性抗体、またはアビジン-ビオチンを使用するシステムを使用することができるが、後者は、アビジン/ストレプトアビジンが免疫原性であるという欠点を有する。

【0004】

PRITにおける使用のための放射性核種は、一般的には、目的の放射性核種が搭載されたキレートの形態にある。

【0005】

Suら (Nucl Med Biol 2005、32:741～747頁) は、mAb-ストレプトアビジンおよびDOTA-ビオチンを含む抗体プレターゲティングシステムを評価した。放射標識された ^{212}Pb -DOTA-ビオチンが安定ではなく、30%を超える遊離 ^{212}Bi (^{212}Pb の崩壊産物) が ^{212}Pb -DOTAから放出されることがわかった。

【0006】

WO2010/099536は、イットリウム、ルテニウムおよびガドリニウムのDOTA複合体に結合することができる二重特異性抗体を記載している。しかしながら、DOTAは、全ての放射性核種に安定に結合するわけではなく、遅い複合体形成速度を示し得る (YongおよびBrechtel、Dalton Trans. 2001年6月21日; 40 (23)、6068～6076頁)。放射性核種に安定に結合しないキレート剤は、腫瘍への放射線の送達を低減させ、一方、毒性は増大させてしまうリスクをもたらす。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、DOTAMおよび鉛 (Pb) を含む金属キレートに結合する抗体を提供する

。DOTAMは、安定な様式でPbをキレート化して、Pb [DOTAM] 複合体を形成することができる。

【0008】

本発明の抗体は、DOTAMおよびPbを含むキレートに結合し、Pbは安定な（非放射性）同位体または放射性同位体であってよい。鉛の放射性同位体は、放射線イメージングおよび放射線免疫療法などの適用において有用である。

【0009】

好ましくは、本発明の抗体は、pM～fM範囲の、Pb-DOTAMキレートに対する非常に高い親和性を有する。

【0010】

抗体はさらに、DOTAMによってキレート化されたビスマス（Bi）に結合する。²¹²Pbは、²¹²Biの親放射性核種であり、²¹²Biの*in vivo*での生成元として働くことができる。キレート化されたBiならびにキレート化されたPbに結合する抗体の能力は、Bi同位体がPb同位体からの崩壊産物として生成される放射線免疫療法などの適用におけるその有用性を増大させる。一部の実施形態では、抗体は、pM～fM範囲の非常に高い親和性で、Bi-DOTAMキレートと、Pb-DOTAMとの両方に結合することができる。

【0011】

さらに、本発明の抗体は、必要に応じて、または好ましくは、Cu-DOTAMキレートなどの他のキレート剤-金属錯体と比較して、Bi-DOTAMおよびPb-DOTAMに対して選択性である。

【0012】

一実施形態では、本発明は、Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位を含む抗体であって、前記抗原結合部位が、少なくとも1、2もしくは3つの重鎖CDR配列を含む重鎖を含み：

- a) 重鎖CDR1がアミノ酸配列GFSLSITYSMS（配列番号1）を含む；
 - b) 重鎖CDR2がアミノ酸配列FIGSRGDTYYASWAKG（配列番号2）を含む；
 - c) 重鎖CDR3がアミノ酸配列ERDPYGGGAYPPHL（配列番号3）を含む；
- ならびに／または抗原結合部位が、少なくとも1、2もしくは3つの軽鎖CDR配列を含む軽鎖を含み：
- d) 軽鎖CDR1がアミノ酸配列QSSHVSVDNDLA（配列番号4）を含む；
 - e) 軽鎖CDR2がアミノ酸配列QASKLAS（配列番号5）を含む；
 - f) 軽鎖CDR3がアミノ酸配列LGGYDDESDITYG（配列番号6）を含む、抗体を提供する。

【0013】

一部の実施形態では、抗原結合部位は、上で定義された軽鎖と、重鎖との両方を含む。

【0014】

別の実施形態では、本発明は、Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位を含む抗体であって、前記抗原結合部位が、少なくとも：

- a) アミノ酸配列FIGSRGDTYYASWAKG（配列番号2）を含む重鎖CDR2、または配列番号2中に1、2、もしくは3個までの置換を有し、これらの置換がPhe50、Asp56、および/Tyr58を含まず、必要に応じて、Gly52および／もしくはArg54も含まない、そのバリエーション；
- b) アミノ酸配列ERDPYGGGAYPPHL（配列番号3）を含む重鎖CDR3、または配列番号3中に1、2、もしくは3個までの置換を有し、これらの置換がGlu95、Arg96、Asp97、Pro98を含まず、必要に応じて、Ala100C、Tyr100D、および／もしくはPro100Eも含まない、ならびに／または必要に応じて、Tyr99も含まない、そのバリエーション；
- c) アミノ酸配列QSSHVSVDNDLA（配列番号4）を含む軽鎖CDR1、ま

10

20

30

40

50

たは配列番号4中に1、2、もしくは3個までの置換を有し、これらの置換がTyr28およびAsp32を含まない、そのバリエーション；

d) アミノ酸配列LGGYDDSDTYG（配列番号6）を含む軽鎖CDR3、または配列番号6中に1、2、もしくは3個までの置換を有し、これらの置換がGly91、Tyr92、Asp93、Thr95cおよびTyr96を含まない、そのバリエーションを含む、抗体を提供する。

【0015】

残基の番号付けは、カバットによるものである。

【0016】

一部の実施形態では、抗体はさらに、必要に応じて：

i) アミノ酸配列GFSLSTYSMS（配列番号1）を含む重鎖CDR1または配列番号1中に1、2、もしくは3個までの置換を有するそのバリエーション；

ii) アミノ酸配列QASKLAS（配列番号5）を含む軽鎖CDR2または配列番号5中に少なくとも1、2、もしくは3個の置換を有し、必要に応じて、Gln50を含まない、そのバリエーション

である重鎖CDR1と軽鎖CDR2とを含む。

【0017】

上記のCDRを含む配列のバリエーションに関する本発明の任意の実施形態では、タンパク質は、上記の1つまたは複数の残基はインバリエーションであってもよい。

【0018】

一部の実施形態では、本発明による抗体は、本明細書に開示される抗体が結合するものと、キレート化された放射性核種の同じエピトープ、または重複するエピトープに結合する。

【0019】

一部の実施形態では、抗体は、Fab PRIT-0213またはPRIT-0214が結合するエピトープと同じエピトープ、または重複するエピトープに結合する。例えば、抗体は、

i) 配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを有する抗体；または

ii) 配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを有する抗体
と同じエピトープ、または重複するエピトープに結合してもよい。

【0020】

一実施形態では、抗原結合部位は、

a) アミノ酸配列GFSLSTYSMS（配列番号1）を含む重鎖CDR1；

b) アミノ酸配列FIGSRGDTYYASWAKG（配列番号2）を含む重鎖CDR2；

c) アミノ酸配列ERDPYGGGAYPPHL（配列番号3）を含む重鎖CDR3；

d) アミノ酸配列QSSHSHSVYSDNDLA（配列番号4）を含む軽鎖CDR1；

e) アミノ酸配列QASKLAS（配列番号5）を含む軽鎖CDR2；

f) アミノ酸配列LGGYDDSDTYG（配列番号6）を含む軽鎖CDR3
から選択される少なくとも1、2、3、4、5、または6つのCDRを含む。

【0021】

必要に応じて、上記の態様のいずれかにおける抗体は、ヒト、キメラまたはヒト化されたものである。

【0022】

必要に応じて、抗原結合部位は、配列番号7および配列番号9からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、または配列番号7もしくは配列番号9に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーションを含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0023】

必要に応じて、抗原結合部位は、配列番号8および配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または配列番号8もしくは配列番号10に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーションを含んでもよい。

【0024】

必要に応じて、Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位は、配列番号7もしくは配列番号9からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、または上で定義されたそのバリエーションと、配列番号8もしくは配列番号10からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または上で定義されたそのバリエーションとを含んでもよい。例えば、Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位は、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインまたはそのバリエーションと、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインまたはそのバリエーションとを含んでもよい。別の実施形態では、それは、配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインまたはそのバリエーションと、配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインまたはそのバリエーションとを含んでもよい。

10

【0025】

抗体は、全抗体および抗体断片を含む、任意の形式にあってもよい。抗体は、単一特異性であってもよい。この形態では、抗体は、例えば、放射標識部分を上手く分離するための、例えば、選別および精製スキームにおいて有用である。

20

【0026】

一部の態様では、Pb-DOTAMキレートに特異的に結合する抗体は、標的剤を生産するために細胞結合剤／ターゲティング部分にカップリングされている。そのような薬剤は、例えば、プレターゲティングされた放射線免疫療法またはプレターゲティングされた放射線免疫イメージングにとって有用である。

【0027】

カップリングは、好ましくは、融合ポリペプチドまたはタンパク質としての発現によるものであってもよい。融合は、直接的であっても、またはリンカーを介するものであってもよい。融合ポリペプチドまたはタンパク質を、組換え的に生産し、コンジュゲーション化学反応の必要性を回避することができる。

30

【0028】

一部の実施形態では、ターゲティング部分（標的のための抗原結合部位を含む）は、抗体またはその断片である。すなわち、一部の実施形態では、上記の抗体は、以下でさらに考察されるように、多重特異性（例えば、二重特異性）抗体の形態にあってもよい。

【0029】

別の態様では、本発明はさらに、Pb-DOTAMキレートを標的細胞に標的化するのに好適な多重特異性抗体／抗体複合体に関する。

【0030】

したがって、別の態様では、本発明は、Pb-DOTAMキレートと、標的抗原、例えば、標的細胞の表面上に発現される抗原との両方に特異的に結合する二重特異性または多重特異性抗体に関する。二重特異性抗体は、DOTAM-キレート化鉛に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位と、標的抗原のための少なくとも1つの抗原結合部位とを含む。

40

【0031】

一部の実施形態では、Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位は、上記の実施形態のいずれかによるものであってもよい。

【0032】

標的抗原は、本明細書でさらに考察されるような任意の抗原、例えば、任意の腫瘍特異的抗原であってもよい。一部の実施形態では、それは、原核生物またはウイルスなどの病原体によって発現されるタンパク質またはポリペプチドであってもよい。

【0033】

50

一部の実施形態では、腫瘍関連抗原は、C E A（がん胎児性抗原）であってもよい。すなわち、一部の実施形態では、二重特異性抗体は、P b - D O T A Mキレートに特異的な少なくとも1つの抗原結合部位と、C E Aに特異的な少なくとも1つの抗原結合部位とを含んでもよい。C E Aは、比較的ゆっくりと内在化され、かくして、高いパーセンテージの二重特異性抗体が、放射性核種への結合のために、初期処理後に細胞の表面上で利用可能なままであるため、本発明の文脈において有利である。他の低内在化標的／腫瘍関連抗原も好ましく、本明細書に記載される。本発明において有用であり得る腫瘍関連抗原の他の例としては、C D 2 0またはH E R 2が挙げられる。

【0034】

一部の実施形態では、標的抗原がC E Aである場合、C E Aに特異的な抗原結合部位は、
d) 重鎖C D R 1が、配列番号11のアミノ酸配列を含む；
e) 重鎖C D R 2が、配列番号12のアミノ酸配列を含む；
f) 重鎖C D R 3が、配列番号13のアミノ酸配列を含む、
少なくとも1、2、もしくは3つの重鎖C D Rを含んでもよく；
および／またはC E Aに特異的な抗原結合部位は、
a) 軽鎖C D R 1が、配列番号14のアミノ酸配列を含む；
b) 軽鎖C D R 2が、配列番号15のアミノ酸配列を含む；
c) 軽鎖C D R 3が、配列番号16のアミノ酸配列を含む、
少なくとも1、2、もしくは3つの軽鎖C D Rを含んでもよい。

【0035】

一部の実施形態では、C E Aのための抗原結合部位は、
a) 配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖C D R 1；
b) 配列番号12のアミノ酸配列を含む重鎖C D R 2；
c) 配列番号13のアミノ酸配列を含む重鎖C D R 3；
d) 配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖C D R 1；
e) 配列番号15のアミノ酸配列を含む軽鎖C D R 2；
f) 配列番号16のアミノ酸配列を含む軽鎖C D R 3
から選択される少なくとも1、2、3、4、5、または6つ（すなわち、全部）のC D Rを含んでもよい。

【0036】

一部の実施形態では、C E Aのための抗原結合部位は、配列番号17のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、または配列番号17に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーションを含んでもよい。

【0037】

必要に応じて、抗原結合部位は、配列番号18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または配列番号18に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーションを含んでもよい。

【0038】

必要に応じて、C E Aに特異的な抗原結合部位は、配列番号17のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインまたはそのバリエーションと、配列番号18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインまたはそのバリエーションとを含んでもよい。

【0039】

本明細書にさらに記載されるものを含む、二重特異性抗体または多重特異性抗体のための様々な可能な形式が当業界で公知である。本発明の抗体は、これらの形式のいずれかを採用してもよい。例えば、一部の実施形態では、二重特異性抗体は、二価、三価または四価であってもよい。

【0040】

本発明の抗体は、F c領域を含むことが好ましい場合がある。F c領域の存在は、放射

10

20

30

40

50

線免疫療法および放射線イメージングの文脈において利益を有し、例えば、より小さい断片に関して観察され得るものよりも、タンパク質の循環半減期を延長させる、および／または高い腫瘍取込みをもたらす。

【0041】

一部の実施形態では、Fc領域が存在する場合、Fc領域はエフェクター機能を低下させるように操作されていることが好ましい場合がある。これは、Fc領域残基234、235、238、265、269、270、297、327および／または329のうちの1つまたは複数、例えば、234、235および／または329のうちの1つまたは複数の置換を含んでもよい。一部の実施形態では、Fc領域を、Pro329からGlyへの置換、Leu234からAlaへの置換および／またはLeu235からAlaへの置換(EUインデックスによる番号付け)を含むように操作することができる。

10

【0042】

Fcドメインを含む多重特異性抗体の様々な形式が公知である。

【0043】

一実施形態では、二重特異性または多重特異性抗体は、i) Fcドメイン、ii) Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位を含む少なくとも1つのFab、交差Fab、Fv、scFab、もしくはscFv断片または単ドメイン抗体(VHH)およびiii) 標的抗原に特異的な抗原結合部位を含む少なくとも1つのFab、交差Fab、Fv、scFab、もしくはscFv断片または単ドメイン抗体(VHH)を含んでもよい。

20

【0044】

一部の実施形態では、二重特異性または多重特異性抗体は、標的抗原(例えば、腫瘍関連抗原)について多価、例えば、二価であることが好ましい可能性がある。これは、アビディティを増大させる利点を有する。

【0045】

一部の実施形態では、二重特異性または多重特異性抗体は、Pb-DOTAMについて一価である。これは、除去剤が使用される場合の高分子量複合体形成のリスクを低減する(以下のさらなる考察を参照されたい)。

【0046】

かくして、一部の実施形態では、抗体は、三価であってもよい：すなわち、標的抗原について二価およびPb-DOTAMについて一価であってもよい。

30

【0047】

1つの例示的な形式では、二重特異性または多重特異性抗体は、第1および第2の抗体重鎖と、第1および第2の抗体軽鎖とを含む完全長抗体(例えば、IgG)であって、第1の重鎖と第1の軽鎖とが集合して、第1の抗原のための抗原結合部位を形成し、第2の重鎖と第2の軽鎖とが集合して、第2の抗原のための抗原結合部位を形成する、完全長抗体を含んでもよい。必要に応じて、さらなる抗原結合部分を、例えば、ポリペプチドリinkerを介して、第1および／または第2の重鎖のNまたはC末端に融合して、一方または両方の抗原に関する価数を増加させることができる。例えば、第1の抗原のためのさらなる抗原結合部分を、重鎖分子の一方または両方のN末端に融合することができる。

40

【0048】

別の例示的な形式では、二重特異性または多重特異性抗体は、第1の抗原のための抗原結合部位(例えば、第1の抗原について二価であってもよい)を含む完全長抗体(例えば、IgG)を含んでもよく、第2の抗原に特異的な少なくとも1つの抗原結合部分をさらに含む。様々な実施形態では、抗原結合部分は、Fab断片、クロスオーバーFab分子、scFab、Fv分子、scFv、もしくは単ドメイン抗体(VHH)であってもよく、または第2の完全長抗体の部分であってもよい。例えば、抗体は、第1の抗原のための抗原結合部位を含む完全長抗体を含んでもよく、一緒になって第2の抗原のための抗原結合部位を形成する、少なくとも第2の重鎖可変ドメインと、第2の軽鎖可変ドメインとをさらに含む。第1または第2の抗原のいずれかはPb-DOTAMキレートであり、他

50

方の抗原は標的抗原である。

【0049】

本明細書の形式の一部の実施形態では、第2の抗原はPb-DOTAMキレートであり、第1の抗原は標的、例えば、腫瘍関連抗原（一部の実施形態では、CEA、CD20またはERBB2）である。

【0050】

別の例示的な形式では、二重特異性または多重特異性抗体は、第1の抗原のための抗原結合部位（例えば、第1の抗原について二価であってもよい）を含む完全長抗体であって、重鎖の一方のNまたはC末端が、ポリペプチドリinkerを介して、第1のポリペプチドに連結されており、第1のポリペプチドが第2のポリペプチドと会合して、第2の抗原のための結合部位を含むFabまたは交差Fabを形成する、完全長抗体を含んでもよい。例えば、この形式は、第1および第2のポリペプチドが一緒になって、第2の抗原のための抗原結合部位を形成するような、

i) VLおよびCLドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VHドメインおよびCH1ドメインからなる第1のポリペプチド；または

ii) VHおよびCLドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VLドメインおよびCH1ドメインからなる第1のポリペプチド；または

iii) VLおよびCH1ドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VHドメインおよびCLドメインからなる第1のポリペプチド

を含んでもよい。

【0051】

一部の実施形態では、融合は、完全長抗体の重鎖の一方のN末端にあってもよい。

【0052】

別の特定の実施形態では、抗体は、

a) 第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長抗体；

b)

i) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)；または

ii) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)および抗体重鎖定常ドメイン(CH1)；または

iii) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)および抗体軽鎖定常ドメイン(CL)

からなるポリペプチドであって、

VHドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の一方のC末端に融合されているポリペプチド；

c)

i) 抗体軽鎖可変ドメイン(VL)；または

ii) 抗体軽鎖可変ドメイン(VL)および抗体軽鎖定常ドメイン(CL)；または

iii) 抗体軽鎖可変ドメイン(VL)および抗体重鎖定常ドメイン(CH1)

からなるポリペプチドであって、

VLドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の他方のC末端に融合されているポリペプチド

を含み；

(b)の下の子ペプチドの抗体重鎖可変ドメインおよび(c)の下の子ペプチドの抗体軽鎖可変ドメインが、一緒になって第2の抗原への抗原結合部位を形成する、二重特異性抗体であってもよい。

【0053】

この形式では、第1または第2の抗原のいずれかは、Pb-DOTAMキレートであってもよい。その他方は、標的抗原、例えば、腫瘍関連抗原であろう。

【0054】

一部の実施形態では、第2の抗原はPb-DOTAMキレートであり、第1の抗原は標的、例えば、腫瘍関連抗原（一部の実施形態では、CEA、CD20またはERBB2）

【 0 0 5 5 】

【 0 0 5 6 】

10

【 0 0 5 7 】

20

【 0 0 5 8 】

i) a) の下の完全長抗体の第1の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸は、リジン(K)、アルギニン(R)もしくはヒスチジン(H) (カバットによる番号付け) によって独立して(1つの好ましい実施形態では、リジン(K)もしくはアルギニン(R)によって独立して)置換され、a) の下の第1の重鎖の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸もしくは213位のアミノ酸は、グルタミン酸(E)もしくはアスパラギン酸(D) (カバットのEUインデックスによる番号付け) によって独立して置換される; または

i i) b) の下の第2の軽鎖の定常ドメインCLにおいて、124位のアミノ酸は、リジン(K)、アルギニン(R)もしくはヒスチジン(H) (カバットによる番号付け) によって独立して(1つの好ましい実施形態では、リジン(K)もしくはアルギニン(R)によって独立して)置換され、b) の下の第2の重鎖の定常ドメインCH1において、147位のアミノ酸もしくは213位のアミノ酸は、グルタミン酸(E)もしくはアスパラギン酸(D) (カバットのE.U.インデックスによる番号付け) によって独立して置換される。

30

【 0 0 5 9 】

a) C E A に特異的に結合し、2 つの抗体重鎖および 2 つの抗体軽鎖からなる完全長抗体であって、

重鎖が配列番号 22 もしくは 23 のアミノ酸 1 ~ 450（両端の値を含み、連続する番号付けに基づく）の重鎖に対する（すなわち、リンカーの前の配列の部分に対する）少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 もしくは 100% の同一性を有し；

40

軽鎖が配列番号 21 の軽鎖に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 もしくは 100 % の同一性を有する、完全長抗体；ならびに／または

b)

i) 配列番号7の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する抗体重鎖可変ドメイン(VH)；もしくは

i i) 配列番号 7 の重鎖可変ドメインに対する少なくとも 90、91、92、93、9

50

4、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン（VH）および抗体重鎖定常ドメイン（CH1）；もしくは

i i i) 配列番号7の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン（VH）および抗体軽鎖定常ドメイン

からなるポリペプチドであって、

VHドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の一方のC末端に融合されているポリペプチド；ならびに／または

c)

i) 配列番号8の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する抗体軽鎖可変ドメイン（VL）；もしくは

i i) 配列番号8の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン（VL）および抗体軽鎖定常ドメイン（CL）；もしくは

i i i) 配列番号8の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン（VL）および抗体重鎖定常ドメイン（CH1）

からなるポリペプチドであって、

VLドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の他方のC末端に融合されているポリペプチドを含んでもよく；

(b) の下のペプチドの抗体重鎖可変ドメインおよび (c) の下のペプチドの抗体軽鎖可変ドメインは、一緒になって Pb-DOTAM キレートへの抗原結合部位を形成する。

【0060】

一例では、完全長抗体の重鎖の一方は、EUインデックスの番号付けによる、いわゆる「ノブ突然変異」（T366Wおよび必要に応じて、S354CまたはY349Cのうちの1つ、好ましくは、S354C）を含み、他方は、いわゆる「ホール突然変異」（T366S、L368AおよびY407V、必要に応じて、Y349CまたはS354C、好ましくは、Y349C）を含む（例えば、Carter, Pら、Immunotechnology, 2 (1996) 73を参照されたい）。

【0061】

一部の実施形態では、(a) の下の2つの抗体重鎖は、i) 配列番号23のアミノ酸1～450（両端の値を含み、連続する番号付けに基づく）の重鎖（すなわち、リンカーの前の配列の部分に対する）に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有し、349位にC、366位にS、368位にAおよび407位にV（EU番号付け）を有する、第1の抗体重鎖；ならびに i i) 配列番号22のアミノ酸1～450（両端の値を含み、連続する番号付けに基づく）の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有し、354位にCおよび366位にW（EU番号付け）を有する、第2の抗体重鎖を含む。

【0062】

本明細書に記載される「固定」残基は、CH3中の「ノブ・イントゥー・ホール」突然変異であるか、または他方の重鎖のCH3上の対応する残基と対形成して、所望の分子の形成を好む、ジスルフィド架橋形成残基などの他の残基である。他方の重鎖上に存在してもよい可能な残基は、表2の配列（例えば、配列19および20または22および23）に由来するものであってもよい。例えば、一実施形態では、第1の抗体重鎖が349位にCを有する場合、第2の抗体重鎖は、354位にCを有する。

【0063】

必要に応じて、リンカーは、上記の通りである。

【0064】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、上記の三価構造を有してもよく、
a) C E Aに特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長抗体であって、

重鎖が配列番号19もしくは20のアミノ酸1～450（両端の値を含み、連続する番号付けに基づく：すなわち、リンカーの前の配列）の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有し；

軽鎖が配列番号21の軽鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する、完全長抗体；

b)

i) 配列番号9の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する抗体重鎖可変ドメイン(VH)；もしくは

ii) 配列番号9の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン(VH)および抗体重鎖定常ドメイン(CH1)；もしくは

iii) 配列番号9の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン(VH)および抗体軽鎖定常ドメイン

からなるポリペプチドであって、

VHドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の一方のC末端に融合されているポリペプチド；

c)

i) 配列番号10の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する抗体軽鎖可変ドメイン(VL)；もしくは

ii) 配列番号10の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン(VL)および抗体軽鎖定常ドメイン(CL)；もしくは

iii) 配列番号10の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン(VL)および抗体重鎖定常ドメイン(CH1)

からなるポリペプチドであって、

VLドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の他方のC末端に融合されているポリペプチド

を含んでもよく；

(b)の下の子ペプチドの抗体重鎖可変ドメインおよび(c)の下の子ペプチドの抗体軽鎖可変ドメインは、一緒になってPb-DOTAMキレートへの抗原結合部位を形成する。

【0065】

上記のように、上記実施形態のいずれかにおいて、完全長抗体の重鎖の一方は、EUIンデックスの番号付けによる、いわゆる「ノブ突然変異」(T366Wおよび必要に応じて、S354CまたはY349Cのうちの1つ、好ましくは、S354C)を含み、他方は、いわゆる「ホール突然変異」(T366S、L368AおよびY407V、必要に応じて、Y349CまたはS354C、好ましくは、Y349C)を含む(例えば、Carter, Pら、Immunotechnol. 2 (1996) 73を参照されたい)。

【0066】

一実施形態では、(a)の下の子2つの抗体重鎖は、i) 配列番号22のアミノ酸1～450の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有し、354位にCおよび366位にW(EU番号付け)を有する、第1の抗体重鎖；ならびにii) 配列番号23のアミノ酸1～450の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99も

10

20

30

40

50

しくは100%の同一性を有し、349位にC、366位にS、368位にAおよび407位にV（EU番号付け）を有する、第2の抗体重鎖を含んでもよい。

【0067】

必要に応じて、リンカーは、上記の通りである。

【0068】

別の実施形態では、二重特異性抗体は、

i) 配列番号22の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する第1の重鎖、

ii) 配列番号23の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有する第2の重鎖、

iii) 配列番号21の軽鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有する2つの抗体軽鎖を含む。

【0069】

さらに別の実施形態では、二重特異性抗体は、

i) 配列番号22のアミノ酸配列を有する第1の重鎖；

ii) 配列番号23のアミノ酸配列を有する第2の重鎖；および

iii) 配列番号21のアミノ酸配列を有する2つの抗体軽鎖を含む、P R I T - 0 2 1 3と本明細書で呼ばれる分子である。

【0070】

別の実施形態では、二重特異性抗体は、

i) 配列番号19の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する第1の重鎖、

ii) 配列番号20の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有する第2の重鎖、

iii) 配列番号21の軽鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有する2つの抗体軽鎖を含む。

【0071】

さらに別の実施形態では、二重特異性抗体は、

i) 配列番号19のアミノ酸配列を有する第1の重鎖；

ii) 配列番号20のアミノ酸配列を有する第2の重鎖；および

iii) 配列番号21のアミノ酸配列を有する2つの抗体軽鎖を含む、P R I T - 0 2 1 4と本明細書で呼ばれる分子である。

【0072】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、上記の三価構造を有してもよく、

a) E R B B 2に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長抗体であって、

重鎖が配列番号36もしくは37のアミノ酸1～449（両端の値を含み、連続する番号付けに基づく）の重鎖に対する（すなわち、リンカーの前の配列の部分に対する）少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有し；

軽鎖が配列番号38の軽鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する、完全長抗体；ならびに／または

b)

i) 配列番号7もしくは配列番号9（一部の実施形態では、好ましくは、配列番号7）の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する抗体重鎖可変ドメイン（VH）；もしくは

10

20

30

40

50

i i) 配列番号7もしくは配列番号9 (一部の実施形態では、好ましくは、配列番号7) の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン (VH) および抗体重鎖定常ドメイン (CH1) ; もしくは

i i i) 配列番号7もしくは配列番号9 (一部の実施形態では、好ましくは、配列番号7) の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン (VH) および抗体軽鎖定常ドメイン (CL)

からなるポリペプチドであって、

VHドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の一方のC末端に融合されているポリペプチド ; ならびに / または

c)

i) 配列番号8もしくは配列番号10 (一部の実施形態では、好ましくは、配列番号8) の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する抗体軽鎖可変ドメイン (VL) ; もしくは

i i) 配列番号8もしくは配列番号10 (一部の実施形態では、好ましくは、配列番号8) の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン (VL) および抗体軽鎖定常ドメイン (CL) ; もしくは

i i i) 配列番号8もしくは配列番号10 (一部の実施形態では、好ましくは、配列番号8) の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン (VL) および抗体重鎖定常ドメイン (CH1)

からなるポリペプチドであって、

VLドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の他方のC末端に融合されているポリペプチドを含んでもよく ;

(b) の下のペプチドの抗体重鎖可変ドメインおよび (c) の下のペプチドの抗体軽鎖可変ドメインは、一緒になって Pb-DOTAMキレートへの抗原結合部位を形成する。

【0073】

一例では、完全長抗体の重鎖の一方は、EUインデックスの番号付けによる、いわゆる「ノブ突然変異」(T366Wおよび必要に応じて、S354CまたはY349Cのうちの1つ、好ましくは、S354C) を含み、他方は、いわゆる「ホール突然変異」(T366S、L368AおよびY407V、必要に応じて、S354CまたはY349C、好ましくは、Y349C) を含む (例えば、Carter, Pら、Immunotechnol. 2 (1996) 73を参照されたい)。

【0074】

一部の実施形態では、(a) の下の2つの抗体重鎖は、i) 配列番号37のアミノ酸1~449 (両端の値を含み、連続する番号付けに基づく) の重鎖 (すなわち、リンカーの前の配列の部分に対する) に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有し、349位にC、366位にS、368位にAおよび407位にV (EU番号付け) を有する、第1の抗体重鎖 ; ならびに i i) 配列番号36のアミノ酸1~449 (両端の値を含み、連続する番号付けに基づく) の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有し、354位にCおよび366位にW (EU番号付け) を有する、第2の抗体重鎖を含む。

【0075】

必要に応じて、リンカーは、上記の通りである。

【0076】

別の実施形態では、二重特異性抗体は、

10

20

30

40

50

- i) 配列番号36の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する第1の重鎖、
- ii) 配列番号37の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有する第2の重鎖、
- iii) 配列番号38の軽鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有する2つの抗体軽鎖を含む。

【0077】

さらに別の実施形態では、二重特異性抗体は、

- i) 配列番号36のアミノ酸配列を有する第1の重鎖；
- ii) 配列番号37のアミノ酸配列を有する第2の重鎖；および
- iii) 配列番号38のアミノ酸配列を有する2つの抗体軽鎖を含む、P1AD9827と本明細書で呼ばれる分子である。

【0078】

別の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、上記の三価構造を有してもよく、

- a) CD20に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長抗体であって、

重鎖が配列番号47もしくは48のアミノ酸1～448（両端の値を含み、連続する番号付けに基づく）の重鎖に対する（すなわち、リンカーの前の配列の部分に対する）少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有し；

軽鎖が配列番号49の軽鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する、完全長抗体；ならびに／または

b)

- i) 配列番号7もしくは配列番号9（一部の実施形態では、好ましくは、配列番号7）の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する抗体重鎖可変ドメイン（VH）；もしくは

- ii) 配列番号7もしくは配列番号9（一部の実施形態では、好ましくは、配列番号7）の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン（VH）および抗体重鎖定常ドメイン（CH1）、

- iii) 配列番号7もしくは配列番号9（一部の実施形態では、好ましくは、配列番号7）の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン（VH）および抗体軽鎖定常ドメイン（CL）

からなるポリペプチドであって、

VHドメインのN末端が、ペプチドリナーを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の一方のC末端に融合されているポリペプチド；ならびに／または

c)

- i) 配列番号8もしくは配列番号10（一部の実施形態では、好ましくは、配列番号8）の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する抗体軽鎖可変ドメイン（VL）；もしくは

- ii) 配列番号8もしくは配列番号10（一部の実施形態では、好ましくは、配列番号8）の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン（VL）および抗体軽鎖定常ドメイン；

- iii) 配列番号8もしくは配列番号10（一部の実施形態では、好ましくは、配列番号

10

20

30

40

50

号8)の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン(VL)および抗体重鎖定常ドメインからなるポリペプチドであって、VLドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の他方のC末端に融合されているポリペプチドを含んでもよく;

(b)の下の子ペプチドの抗体重鎖可変ドメインおよび(c)の下の子ペプチドの抗体軽鎖可変ドメインは、一緒になってPb-DOTAMキレートへの抗原結合部位を形成する。

【0079】

一例では、完全長抗体の重鎖の一方は、EUインデックスの番号付けによる、いわゆる「ノブ突然変異」(T366Wおよび必要に応じて、S354CまたはY349Cのうちの1つ、好ましくは、S354C)を含み、他方は、いわゆる「ホール突然変異」(T366S、L368AおよびY407V、必要に応じて、Y349CまたはS354C、好ましくは、Y349C)を含む(例えば、Carter, Pら、Immunotechnology, 2(1996)73を参照されたい)。

【0080】

一部の実施形態では、(a)の下の子2つの抗体重鎖は、i)配列番号48のアミノ酸1~448(両端の値を含み、連続する番号付けに基づく)の重鎖(すなわち、リンカーの前の配列の部分)に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有し、349位にC、366位にS、368位にAおよび407位にV(EU番号付け)を有する、第1の抗体重鎖;ならびにii)配列番号47のアミノ酸1~448(両端の値を含み、連続する番号付けに基づく)の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有し、354位にCおよび366位にW(EU番号付け)を有する、第2の抗体重鎖を含む。

【0081】

必要に応じて、リンカーは、上記の通りである。

【0082】

別の実施形態では、二重特異性抗体は、

i)配列番号47の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する第1の重鎖、

ii)配列番号48の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有する第2の重鎖、

iii)配列番号49の軽鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の同一性を有する2つの抗体軽鎖を含む。

【0083】

さらに別の実施形態では、二重特異性抗体は、

i)配列番号47のアミノ酸配列を有する第1の重鎖;

ii)配列番号48のアミノ酸配列を有する第2の重鎖;および

iii)配列番号49のアミノ酸配列を有する2つの抗体軽鎖を含む、P1AD9826と本明細書で呼ばれる分子である。

【0084】

さらなる態様では、本発明は、本明細書に記載の抗体のいずれかをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットに関する。さらなる実施形態では、本発明は、前記ポリヌクレオチドまたは複数のポリヌクレオチドを含むベクターまたは発現ベクターのセット、必要に応じて、発現ベクターに関する。さらなる目的では、本発明は、本発明のベクターを含む原核または真核宿主細胞に関する。さらに、抗体が産生されるように宿主細胞を培養することを含む、抗体を生産する方法が提供される。

10

20

30

40

50

【0085】

本明細書に記載される二重特異性または多重特異性抗体は、プレターゲティングされた放射線免疫療法およびプレターゲティングされた放射線免疫イメージングなどの、治療および診断適用を含む様々な適用において有用であってよい。

【0086】

かくして、さらなる態様では、本発明は、プレターゲティングされた放射線イメージングにおける使用のための本明細書に記載の任意の二重特異性または多重特異性抗体に関する。そのような実施形態では、キレート化されたPbは、好ましくは、 ^{203}Pb である。

【0087】

イメージングのために放射性同位体を組織または臓器に標的化する方法は、

i) 対象に、本明細書に記載の多重特異性または二重特異性抗体であって、標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化する、前記抗体を投与すること；および

ii) 続いて、DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種であって、標的細胞の表面に局在化された抗体に結合する、DOTAMまたはその前記機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種を個体に投与することを含んでもよい。

【0088】

必要に応じて、工程(i)と(ii)の間に、Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位に結合する除去剤を投与する。除去剤は、Pb-DOTAMのための抗原結合部位をブロックし、循環している抗体がキレート化されたPb放射性核種に結合するのを防止する。あるいは、またはさらに、除去剤は、体内からの抗体のクリアランスの速度を増大させることができる。「除去剤」は、あるいは「ブロッキング剤」と呼んでもよい：これらの用語は、以下の考察において互いに置換することができる。

【0089】

除去剤は、金属イオンと、DOTAMまたはその機能的バリエーションとの複合体であって、Pb-DOTAMのための抗原結合部位によって認識される前記複合体を含んでもよい。好ましくは、金属イオンは、安定な同位体または本質的に安定な同位体である。「安定な同位体」とは、放射性崩壊を受けない同位体を意味する。「本質的に安定な同位体」とは、非常に長い半減期で放射性崩壊を受け、それを使用にとって安全にする同位体を意味する。好ましくは、金属イオンは、Pb、CaおよびBiのイオンから選択される。例えば、除去剤は、DOTAMもしくはその機能的バリエーションと複合体化したPb、DOTAMもしくはその機能的バリエーションと複合体化したCa、またはDOTAMもしくはその機能的バリエーションと複合体化した ^{209}Bi (1.9×10^{19} 年の半減期を有する本質的に安定な同位体)の安定な同位体を含んでもよい。Pbは、安定な(非放射性)同位体 ^{204}Pb 、 ^{206}Pb 、 ^{207}Pb および ^{208}Pb の混合物である、天然に存在する鉛であってもよい。

【0090】

DOTAMまたはその機能的バリエーションは、除去部分にコンジュゲートされる。この部分は、例えば、そのサイズおよび／または高い流体力学半径のため、腫瘍への取込みが低い除去剤を提供する。好適な除去部分は、以下でさらに考察される。一部の実施形態では、除去剤は、デキストランまたはその誘導体にコンジュゲートされたDOTAMまたはその機能的バリエーションを含んでもよい。

【0091】

イメージング方法の別の実施形態では、多重特異性または二重特異性抗体を、投与の時点でキレート化されたPb放射性核種に結合させることができる。

【0092】

必要に応じて、任意の実施形態では、前記方法は、

iii) DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種が局在化された組織または臓器をイメージングすることを含んでもよい。

【0093】

一部の実施形態では、標的抗原は、腫瘍特異的抗原であってよく、イメージングは、腫瘍または複数の腫瘍をイメージングする方法であってもよい。

【0094】

さらなる態様では、本発明は、プレターゲティングされた放射線免疫療法の方法における使用のための本明細書に記載の抗体に関する。そのような実施形態では、キレート化されたPbは、好ましくは、 ^{212}Pb である。

【0095】

療法のために放射性同位体を組織または臓器に標的化する方法は、

i) 対象に、本明細書に記載の多重特異性または二重特異性抗体であって、標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化する、前記抗体を投与すること；および

ii) 続いて、DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種であって、細胞の表面に局在化された抗体に結合する、DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種を投与することを含んでもよい。

【0096】

必要に応じて、工程(i)と(ii)の間に、除去剤を上記のように投与する。

【0097】

一部の実施形態では、標的抗原は、腫瘍関連抗原であり、方法は、がんを処置する方法である。他の実施形態では、標的抗原は、感染と関連する抗原、例えば、原核生物またはウイルス感染細胞によって発現されるタンパク質であってもよい。

【0098】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体を、併用療法の一部として投与することができる。例えば、それらを、1つまたは複数の放射線増感剤および／または化学療法剤と組み合わせて投与してもよい：放射線増感剤または化学療法剤と、抗体とを、同時に、またはいずれかの順序で連続的に投与してもよい。

【0099】

本明細書に記載の放射線イメージングおよび放射線免疫療法の方法を、必要に応じて、例えば、抗体および ^{203}Pb -DOTAMと ^{212}Pb -DOTAMの両方を、例えば、混合物として投与することによって、組み合わせることができる。

【0100】

本発明はさらに、本発明の抗体と、薬学的に許容される添加物とを含む医薬組成物にも関する。

【0101】

さらなる実施形態では、本発明は、本発明の抗体と、

i) 薬学的に許容される添加物；

ii) DOTAMもしくはその機能的バリエーションによってキレート化されたPb放射性核種；

iii) 本明細書に記載の除去剤；

iv) 1つもしくは複数のさらなる化学療法剤；および／または

v) 1つもしくは複数の放射線増感剤

のうちの1、2、3、4つもしくは全部を含むキットに関する。

【0102】

本発明のさらなる態様では、本発明者らは、新規除去剤を開発してきた。そのような除去剤を、本明細書に記載のような診断、イメージングまたは治療の方法のいずれかに使用することができる。

【0103】

一態様では、本発明は、DOTAMおよびDOTAMの機能的バリエーションから選択されるキレート剤にコンジュゲートされたデキストランまたはその誘導体を含む除去剤であって、前記キレート剤がPb、Zn、CaまたはBiと複合体を形成する除去剤に関する。

除去剤は、典型的には、Pb、Zn、CaまたはBiイオンなどの、キレート化された金属イオンを含む。

【0104】

除去剤は、DOTAMまたはDOTAMの機能的バリエーションにカップリングされたアミノデキストランを含んでもよい。例えば、除去剤は、イソチオシアネートカップリングを用いてアミノデキストランにカップリングされたDOTAM（例えば、アミノデキストランをp-SCN-Bn-TCMCと反応させることによって得られる化合物）を含んでもよい。

【0105】

除去剤の使用に伴う1つの潜在的な困難は、それらが腫瘍に進入し、放射性リガンドのその後の結合に負に影響し得る可能性である。

【0106】

本発明者らはさらに、i) 高い平均分子量を有する、およびii) ある特定のサイズより下の断片が除去されるように分子量カットオフにかけられた、デキストランベースの除去剤を使用する場合、腫瘍への低い除去剤浸透と共に、血液からの良好なクリアランスを達成することができることを見出した。

【0107】

かくして、好ましい除去剤は、i) 除去剤中のデキストランまたはその誘導体の平均分子量が、200~800 kDa、必要に応じて、300、350、400または450 kDaより高く、必要に応じて、700、650、600または550 kDa未満であり、必要に応じて、約500 kDaであるもの、およびii) 特定の分子量カットオフ未満のデキストラン、デキストラン誘導体または除去剤が除去され、分子量カットオフが50 kDa以上、100 kDa以上または200 kDa以上であり、必要に応じて、50 kDa~250 kDaまたは50 kDa~200 kDa、必要に応じて、100 kDa~200 kDaの範囲にあり、必要に応じて、約100 kDa、150 kDaまたは200 kDaであるものであってもよい。

【0108】

さらなる態様では、本発明は、除去剤を調製する方法、および放射線免疫療法または放射線免疫イメージングの方法における除去剤の使用に関する。

【0109】

本発明のこれらの態様および他の態様は、以下でさらに考察される。

【図面の簡単な説明】

【0110】

【図1】図1は、可能な二重特異性抗体形式の模式図を示す。この形式は、1種の標的（A）に対する2個の抗原結合部位、および第2の標的（B）に対する1個の抗原結合部位を含む（2:1形式）。

【図2】図2は、Pb-DOTAMと複合体形成したPRIT-0213の構造を示す。

【図3】図3は、カバット（Kabat）に従って番号付けした、Pb-DOTAMと複合体形成したPRIT-0213の相互作用部位に関する表示を示す。

【図4】図4は、放射標識されたDOTAMの注射24時間後の²¹²Pbの分布を示す（%ID/g ± SD, n=3）。PRIT-0206、-0207、-0208および-0165は、T84.66を標的とし、一方、PRIT-0186、-0187および-0156は、CH1A1Aを標的とする。PRIT-0175は、非CEA結合コントロールである。

【図5】図5は、放射標識されたDOTAMと予め結合させたPRIT抗体の注射96時間後のカウント毎分（CPM）として表現される、²⁰³Pbの分布を示す（CPM ± SD, n=3）。PRIT-0205、-0206、-0207、-0208および-0209は、完全にヒト化されたコンストラクトであり、一方、PRIT-0165および-0175は、それぞれポジティブおよびネガティブコントロールである。

【図6】図6は、放射標識されたDOTAMと予め結合させたPRIT抗体の注射後の様

10

20

30

40

50

々な時点における、 $CPM \pm SD$ ($n = 3$) として表現される、 $B \times P C 3$ 腫瘍および血液における $^{203}Pb-DO TAM-bsAb$ の蓄積／クリアランスを示す。 $PRIT-0206$ は、 $PRIT-0165$ の完全にヒト化型である； $PRIT-0175$ は、非 CEA 結合コントロールである。

【図 7】図 7 は、 $MKN 45$ 腫瘍を有するマウスにおける ^{212}Pb 標識された除去剤の注射 2 時間後の、選択された組織における放射能分布を示す ($\%ID/g \pm SD$ 、 $n = 3$)。

【図 8】図 8 は、 $MKN 45$ 腫瘍を有するマウスにおける ^{212}Pb 標識された除去剤の注射 24 時間後の、選択された組織および尿における放射能分布を示す ($\%ID/g \pm SD$ 、 $n = 3$)。

【図 9】図 9 は、 $MKN 45$ 腫瘍を有するマウスにおける ^{212}Pb 標識された除去剤の注射 24 時間後の、選択された組織および尿における臓器別の (organ-wise) 放射能分布を示す ($\%ID \pm SD$ 、 $n = 3$)。

【図 10】図 10 は、腫瘍がないマウスにおける ^{203}Pb 標識された除去剤の注射 1 週間後の、選択された組織における放射能分布を示す ($\%ID/g \pm SD$ 、 $n = 3$)。

【図 11】図 11 は、腫瘍がないマウスにおける ^{203}Pb 標識された除去剤の注射 1 週間後の、選択された組織における臓器別の放射能分布を示す ($\%ID \pm SD$ 、 $n = 3$)。

【図 12】図 12 は、 $^{212}Pb-DO TAM$ の注射 4 時間後の、血液における放射能含有量を示す ($\%ID/g \pm SD$ 、 $n = 3$)。縞模様のバーは、全候補試薬を比較した、 CA なしコントロール (除去剤なし) を表す。アスタリスクは、低 (*) から高 (***) へと、統計的有意性のレベルをマークする。

【図 13】図 13 は、 $^{212}Pb-DO TAM$ の注射 24 時間後の、血液における平均放射能含有量を示す ($\%ID/g \pm SD$ 、 $n = 3$)。縞模様のバーは、全候補試薬を比較した、 CA なしコントロール (除去剤なし) を表す。

【図 14】図 14 は、 $^{212}Pb-DO TAM$ の注射 24 時間後の、血液および腫瘍における放射能含有量を示す ($\%ID/g \pm SD$ 、 $n = 3$)。

【図 15】図 15 は、30 もしくは $100 \mu g$ の二重特異性抗体および $10 \sim 100 \mu g$ の除去剤と 100 もしくは $30 kDa$ 濾過カットオフ、または除去剤完全不含 (PBS) を使用した、放射標識された $DO TAM$ の注射 24 時間後の、 ^{212}Pb の分布を示す ($\%ID/g \pm SD$ 、 $n = 3$)。

【図 16】図 16 は、漸増量の除去剤 ($0 \sim 100 \mu g$) による、血液および腫瘍における ^{212}Pb の放射能 (activity) 濃度における効果を示す。腫瘍は、 $100 \mu g$ の $PRIT-0165$ を使用してプレターゲットイングし、続いて 4 日後に、 $100 kDa$ カットオフで $De x 500$ ダイアフィльтраーションした、または PBS を使用してこれを行った。除去剤の 2 時間後に $^{212}Pb-DO TAM$ を投与した。記号は、放射能注射 24 時間後の $\%ID/g$ を表し、線は、腫瘍データの線形回帰を表す。

【図 17】図 17 は、 $^{212}Pb-DO TAM$ の注射 24 時間後の、選択された組織における放射能分布を示す ($\%ID/g \pm SD$ 、 $n = 3$)。暗灰色および黒色のバーは、候補試薬を比較した、 CA なしポジティブコントロール (除去剤なし) を表す。

【図 18】図 18 は、 $^{212}Pb-DO TAM$ の注射 24 時間後の、血液および腫瘍における ^{212}Pb 含有量 ($\%ID/g \pm SD$ 、 $n = 3$)、ならびに対応する腫瘍対血液比を示す。暗灰色および黒色のバーは、候補試薬を比較した、 CA なしポジティブコントロール (除去剤なし) を表す。

【図 19】図 19 は、除去剤 (CA) 量 ($PJR D 08-46$) および $TCMC$ 飽和の関数として、 $^{212}Pb-DO TAM$ の注射 24 時間後の腫瘍対血液比を示す (9 対、20 対、39 対または 84 対 1)。破線は、それぞれのデータの線形回帰 ($R^2 = 0.82$) および非線形曲線適合 ($R^2 = 0.74$) を表す。

【図 20】図 20 は、放射標識された $DO TAM$ の注射 24 時間後の、 ^{212}Pb の分布を示す ($\%ID/g \pm SD$ 、 $n = 3$)。白色および灰色の背景を有するバーは、それぞれ $T 84.66$ および $CH 1 A 1 A$ のターゲットイングを表す；黒色のバーは、非 CEA 結合コントロールを表す。

10

20

30

40

50

【図21】図21は、B x P C 3モデルにおける処置サイクル1および2に関する、 ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、選択された組織における放射能分布を示す($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SEM}$, $n = 3$)。

【図22】図22は、B x P C 3モデルにおけるCEA-PRIT後の群A~G ($n = 8$)における平均体重を示す。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM投与を示す。

【図23】図23は、初期体重のパーセンテージとして表現される、B x P C 3モデルにおけるCEA-PRIT後の群A~G ($n = 8$)における平均体重変化を示す。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM投与を示す。

【図24】図24は、B x P C 3モデルにおける群A~Gに関する腫瘍増殖平均と標準誤差を示す($n = 8$)。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM投与を示す。

【図25】図25は、B x P C 3モデルにおける群A~Gに関する個々の腫瘍増殖曲線を示す。垂直な点線は、 ^{212}Pb -DOTAMの投与を示す。

【図26】図26は、B x P C 3モデルにおける群A~Gにおける生存を示す Kaplan-Meier 曲線を示す($n = 8$)。垂直な点線は、 ^{212}Pb -DOTAMの投与を示す。

【図27】図27は、LS174Tモデルにおける処置サイクル1および2に関する、 ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、選択された組織における放射能分布を示す($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$, $n = 3$)。

【図28】図28は、LS174TモデルにおけるCEA-PRIT後の群A~G ($n = 8$)における平均体重を示す。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM投与を示す。

【図29】図29は、初期体重のパーセンテージとして表現される、LS174TモデルにおけるCEA-PRIT後の群A~G ($n = 8$)における平均体重変化を示す。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM投与を示す。

【図30】図30は、LS174Tモデルにおける群A~Gに関する腫瘍増殖平均と標準誤差を示す($n = 8$)。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM投与を示す。

【図31】図31は、LS174Tモデルにおける群A~Gに関する個々の腫瘍増殖曲線を示す。垂直な点線は、 ^{212}Pb -DOTAMの投与を示す。

【図32】図32は、LS174Tモデルにおける群A~Gにおける生存を示す Kaplan-Meier 曲線を示す($n = 8$)。垂直な点線は、 ^{212}Pb -DOTAMの投与を示す。

【図33】図33は、 ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、選択された組織における放射能分布を示す($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$, $n = 3$)。灰色のバーは、様々な量のDex 500-(50%)除去剤(CA)の注射後の組織蓄積を表す；黒色のバーは、CAなしコントロール(除去剤なし)を表す。

【図34】図34は、 ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、血液および腫瘍における ^{212}Pb 含有量、ならびに対応する腫瘍対血液比を示す($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$, $n = 3$)。灰色のバーは、様々な量のDex 500-(50%)除去剤(CA)の注射後の組織蓄積を表す；黒色のバーは、CAなしコントロール(除去剤なし)を表す。

【図35】図35は、 ^{212}Pb -DOTAMの注射4時間後の、血液における放射能含有量を示す($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$, $n = 3$)。

【図36】図36は、MKN-45細胞への1種の抗体(PRIT-0165)の結合を示し、これを、二次検出(右パネル、Alexa 488)またはDOTAM FITC(左パネル、FITC-A)のいずれかを使用して検出する。

【図37】図37は、例示的な標的抗原としてCEAを使用して、二重特異性抗体の可能な形式を示す。他の標的抗原を使用することもできる。

【図38】図38は、Her2結合能を実証するための、KPL-4細胞へのP1AD8

10

20

30

40

50

927の結合を示す：ヒトIgG特異的二次抗体を使用した抗体の検出。

【図39】図39は、DOTAM結合能を実証するための、KPL-4細胞へのP1AD8927の結合を示す：Pb-DOTAM-FITCを使用した、アイソタイプ補正された検出。

【図40】図40は、CD20結合能を実証するための、Raji細胞へのP1AD8926の結合を示す：ヒトIgG特異的二次抗体を使用した抗体の検出。

【図41】図41は、DOTAM結合能を実証するための、Raji細胞へのP1AD8926の結合を示す：Pb-DOTAM-FITCを使用した、アイソタイプ補正された検出。

【図42】図42は、SCIDマウスにおけるs.c. BxPC3腫瘍のCEA-PRITを評価する、プロトコル103の試験概要を示す（h=時間、d=日、w=週）。

【図43】図43：パネルAは、%ID/g±SD（n=3）として表現される、両方の処置サイクル後の収集された組織における ^{212}Pb の平均蓄積を示す。パネルBは、安楽死時の対応する腫瘍体積（mm³）と共に、マウス毎の ^{212}Pb の個々の腫瘍取込みを示す。

【図44】図44は、BxPC3モデルにおける群A～Gに関する平均腫瘍増殖曲線と標準誤差を示す（n=10）。n<5で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM投与（30または10μCi）を示す。

【図45】図45は、BxPC3モデルにおける群A～Gに関する個々の腫瘍増殖曲線を示す（n=10）。垂直な点線は、 ^{212}Pb -DOTAMの投与（30または10μCi）を示す。

【図46】図46は、BxPC3モデルにおける群A～Gにおける生存を示すカプラン・マイヤー曲線を示す（n=10）。垂直な点線は、 ^{212}Pb -DOTAMの投与（30または10μCi）を示す。

【図47】図47は、BxPC3モデルにおけるCEA-PRIT後の群A～Gにおける平均体重減少を示す（n=10）。n<5で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM投与を示す。

【図48】図48は、s.c. BxPC3腫瘍を有するSCIDマウスにおける ^{203}Pb -BsAb（20μCi、100μg）の分布を示す。マウスに、20μCiの予め結合した ^{203}Pb -DOTAM-CEA-DOTAMまたは ^{203}Pb -DOTAM-DIG-DOTAM（ネガティブコントロール）を注射し、続いて注射後1、4、7または10日目に臓器採集して、収集された組織における蓄積された放射能を評価した（%ID/g±SD、n=5）。

【図49】図49は、20μCi/100μgの予め結合した ^{203}Pb -DOTAM-CEA-DOTAMまたは ^{203}Pb -DOTAM-DIG-DOTAM（ネガティブコントロール）の注射1～10日後のs.c. BxPC3腫瘍における ^{203}Pb -BsAbの蓄積を示す（%ID/g±SD、n=5）。

【図50】図50は、s.c. BxPC3腫瘍を有するSCIDマウスにおける ^{212}Pb の分布を示す。放射能注射の5分～48時間後に、マウスに、 ^{212}Pb -DOTAM投与前にCEA-DOTAM BsAbおよびCAを注射した（%ID/g±SD、n=5）。*経時的な、すなわち、以前の値を含む各時点における、尿および糞便における累積的 ^{212}Pb 含有量。尿における推定%ID/gは、5匹のマウスからプールされた尿/洗浄液（50mL）の1/5（10mL）に基づいた。

【図51】図51は、s.c. BxPC3腫瘍を保有するSCIDマウスにおける、CEA-DOTAM BsAb、Pb-DOTAM-デキストラン-500 CA、および5種の異なる金属（Zn、Gd、Cu、CaまたはPb）のいずれかによりクエンチされた ^{212}Pb -DOTAMを使用したPRIT後の ^{212}Pb のin vivo分布を評価する、プロトコル131の試験概要を示す（d=日、h=時間）。

【図52】図52は、CEA-DOTAM-プレターゲティングされた ^{212}Pb -DOT

10

20

30

40

50

AMの注射2時間後の腫瘍を有するSCIDマウスにおける ^{212}Pb の分布を示す($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$ 、 $n = 4$)。

【図53】図53は、異なる金属でクエンチされた ^{212}Pb -DOTAMの注射2時間後の腫瘍を有するSCIDマウスの選択された正常組織における ^{212}Pb の分布を示す($\% \text{ID} / \text{g}$)。

【図54】図54は、CD20-DOTAM BsAbまたはネガティブコントロールDIG-DOTAMによってプレターゲティングされた ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、腫瘍を有するSCIDマウスにおける ^{212}Pb の分布を示す($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$ 、 $n = 3$)。

【図55】図55は、HER2-DOTAM BsAbまたはネガティブコントロールDIG-DOTAMによってプレターゲティングされた ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、腫瘍を有するSCIDマウスにおける ^{212}Pb の分布を示す($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$ 、 $n = 3$)。

【図56】図56は、s.c. HP AF-II腫瘍を保有するSCIDマウスにおける、様々なBsAbコンストラクトを使用したCEA-PRIT後の ^{212}Pb -DOTAMの体内分布を評価する、プロトコル154の試験概要を示す($h = \text{時間}$ 、 $d = \text{日}$)。

【図57】図57は、ネガティブコントロールDIG-DOTAM、標準CEA-DOTAM BsAbまたは代替BsAbコンストラクトの1種のいずれかによってプレターゲティングされた ^{212}Pb -DOTAMの注射6時間後の腫瘍を有するSCIDマウスにおける ^{212}Pb の分布を示す($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$ 、 $n = 3$)。

【図58】図58は、ネガティブコントロールDIG-DOTAM、標準CEA-DOTAM BsAbまたは代替BsAbコンストラクトの1種のいずれかによってプレターゲティングされた ^{212}Pb -DOTAMの注射6時間後の ^{212}Pb の血液含有量および腫瘍蓄積を示す($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$ 、 $n = 3$)。

【図59】図59は、プロトコル162の実験スケジュールを示す。s.c. WSU-DLCL2腫瘍を保有するSCIDマウスにおいて、CD20-DOTAM BsAb、Ca-DOTAM-デキストラン-500 CAおよび ^{212}Pb -DOTAMを使用してCD20-PRITを実行した；s.c. WSU-DLCL2腫瘍を保有するSCIDマウスにおいて、 ^{212}Pb -DOTAMと予め結合させたCD20-DOTAM BsAb (^{212}Pb -DOTAM-CD20-DOTAM)を使用して1段階RITを実行した。

【図60】図60は、CD20-DOTAM-プレターゲティングされた ^{212}Pb -DOTAMまたは予め結合させた ^{212}Pb -DOTAM-CD20-DOTAMの注射24時間後の、腫瘍を有するSCIDマウスにおける ^{212}Pb の分布を示す。臓器および組織における放射能含有量は、平均 $\% \text{ID} / \text{g}$ および標準偏差(SD； $n = 3$)として表現される。

【図61】図61は、 $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$ ($n = 10$)で表現される、群A～Gに関する平均WSU-DLCL2 s.c. 腫瘍増殖を示す。

【図62】図62は、初期体重 $\pm \text{SEM}$ の%として表現される、様々な処置後のマウス体重の平均変化を示す。点線は、処置スキームに応じた ^{212}Pb または抗体注射を示す。

【発明を実施するための形態】

【0111】

定義

本明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義される、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変ドメイン(VL)フレームワークまたは重鎖可変ドメイン(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、それと同じアミノ酸配列を含んでもよい、またはそれはアミノ酸配列変化を含有してもよい。一部の実施形態では、アミノ酸変化の数は、10個以下、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、または2個以下である。一部

10

20

30

40

50

の実施形態では、V Lアクセプターヒトフレームワークは、V Lヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【0112】

「親和性」とは、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位と、その結合パートナー（例えば、抗原）との非共有相互作用の合計の強度を指す。別途指示がない限り、本明細書で使用される「結合親和性」とは、結合ペア（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数（ K_d ）によって表すことができる。親和性を、本明細書に記載のものを含む、当業界で公知の一般的方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための特異的な実証的および例示的实施形態は、以下に記載される。

10

【0113】

「親和性成熟」抗体とは、1つまたは複数の変更を有しない親抗体と比較して、1つまたは複数の超可変領域（HVR）中にそのような変更を有する抗体を指し、そのような変更は、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす。

【0114】

用語「抗Pb-DOTAM抗体」、「Pb-DOTAMに結合する抗体」、「Pb-DOTAMキレートに結合する抗体」、および同等の用語は、抗体が、Pb-DOTAM標識部分を分離するための選別および／もしくは精製スキームにおいて有用であるような、ならびに／または例えば、Pb-DOTAMを細胞に標的化するために、抗体が、Pb-DOTAMを、抗体の部位に局在化させることができるような、十分な親和性でPb-DOTAMキレートに結合することができる抗体を指す。用語「抗標的抗体」および「標的に結合する抗体」は、抗体が、例えば、細胞の表面上に発現される場合、抗体の標的への局在化を含む治療および／または診断適用において有用であるような十分な親和性で標的に結合することができる抗体を指す。一実施形態では、抗体の、関連しない部分および／または関連しない標的タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）によって測定される場合、抗体のPb-DOTAMまたは標的への結合の約10%未満である。ある特定の実施形態では、抗体は、 $\leq 1 \mu M$ 、 $\leq 100 nM$ 、 $\leq 10 nM$ 、 $\leq 1 nM$ 、 $\leq 0.1 nM$ 、 $\leq 0.01 nM$ 、または $\leq 0.001 nM$ （例えば、 $10^{-8} M$ 以下、例えば、 $10^{-8} M \sim 10^{-13} M$ 、例えば、 $10^{-9} M \sim 10^{-13} M$ ）の、Pb-DOTAMおよび／または標的に対する解離定数（ K_d ）を有する。

20

30

【0115】

本明細書における用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、限定されるものではないが、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を含む様々な抗体構造を包含する。

【0116】

「抗体断片」とは、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)₂ダイアボディ；直鎖状抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv）；および抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。

40

【0117】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、参照抗体のその抗原への結合を50%以上ブロックする抗体、逆に、競合アッセイにおいて抗体のその抗原への結合を50%以上ブロックする参照抗体を指してもよい。例示的な競合アッセイは、本明細書に提供される。

【0118】

用語「キメラ」抗体とは、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の供給源または種に由来するが、重鎖および／または軽鎖の残りの部分が、異なる供給源または種に由来する抗体を指す。

【0119】

50

抗体の「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域の型を指す。抗体の5つの主要なクラス：Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、およびIg Mがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、Ig G₁、Ig G₂、Ig G₃、Ig G₄、Ig A₁、およびIg A₂にさらに分類することができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γ、およびμと呼ばれる。

【0120】

本明細書で使用される場合、用語「細胞傷害性剤」とは、細胞機能を阻害する、もしくは防止する、および／または細胞死もしくは破壊を引き起こす物質を指す。細胞傷害性剤としては、限定されるものではないが、放射性同位体（例えば、²²⁵Ac、²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹²Bi、²¹³Bi、³²P、²¹²PbおよびLuの放射性同位体）；化学療法剤または薬（例えば、メトレキセート、アドリマイシン、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他の挿入剤）；増殖阻害剤；拡散分解酵素などの酵素およびその断片；抗生物質；低分子毒素または細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素活性毒素（その断片および／またはバリエーションを含む）などの毒素；ならびに以下に開示される様々な抗腫瘍剤または抗がん剤が挙げられる。

【0121】

「エフェクター機能」とは、抗体アイソタイプと共に変化する、抗体のFc領域に起因する生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合および補体依存性細胞傷害（CDC）；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方調節；ならびにB細胞活性化が挙げられる。

【0122】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療または予防結果を達成するのに必要な用量で、および期間にわたって有効な量を指す。

【0123】

本明細書における用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語は、天然配列のFc領域およびFc領域バリエーションを含む。一実施形態では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys₂₂₆、またはPro₂₃₀から、重鎖のカルボキシル末端に向かって伸びる。しかしながら、Fc領域のC末端リジン（Lys₄₄₇）は、存在しても、存在しなくてもよい。本明細書で別途特定されない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、EU番号付けシステムによるものであり、Kabatra、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD、1991に記載されたように、EUインデックスとも呼ばれる。

【0124】

「フレームワーク」または「FR」とは、超可変領域（HVR）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的には、4つのFRドメイン：FR₁、FR₂、FR₃、およびFR₄からなる。したがって、HVRおよびFR配列は一般に、VH（またはVL）中に以下の配列：FR₁-H₁（L₁）-FR₂-H₂（L₂）-FR₃-H₃（L₃）-FR₄に現れる。

【0125】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」および「全抗体」は、本明細書では互換的に使用され、天然抗体構造と実質的に類似する構造を有する、または本明細書に定義されるFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指す。完全長抗体は、例えば、IgGであってもよい。

【0126】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」および「宿主細胞培養物」は、互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含む。宿主細胞は、初代形質転換細胞および継代回数に関係なく、それに由来する子孫を含む「形質転換体」および「形質転換細胞」を含む。子孫は、核酸含有量において親細胞と完全に同一でなくてもよく、突然変異を含有してもよい。元々形質転換された細胞中でスクリーニングまたは選択されたのと同じ機能または生物活性を有する変異体子孫も、本明細書に含まれる。

【0127】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生される、またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト起源に由来する抗体のものに対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、具体的には非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

10

【0128】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、選択されたヒト免疫グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列中に最も一般的に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的には、選択されたヒト免疫グロブリンVLまたはVH配列は、可変ドメイン配列のサブグループに由来する。一般的には、配列のサブグループは、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、NIH Publication 91-3242、Bethesda MD (1991)、第1-3巻に記載されたようなサブグループである。一実施形態では、VLについて、サブグループは、Kabatら、上掲に記載のようなサブグループカッパイである。一実施形態では、VHについて、サブグループは、Kabatら、上掲に記載のようなサブグループIIIである。

20

【0129】

「ヒト化」抗体とは、非ヒトHVRに由来するアミノ酸残基と、ヒトFRに由来するアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。ある特定の実施形態では、ヒト化抗体は、HVR（例えば、CDR）の全部または実質的に全部が非ヒト抗体のものに対応し、FRの全部または実質的に全部がヒト抗体のものに対応する、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含むであろう。ヒト化抗体は、必要に応じて、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。「ヒト化型」の抗体、例えば、非ヒト抗体とは、ヒト化を受けた抗体を指す。

30

【0130】

本明細書で使用される場合、用語「超可変領域」または「HVR」とは、配列において超可変性である（「相補性決定領域」または「CDR」）、および／または構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成する、および／または抗原接触残基（「抗原接触」）を含有する、抗体可変ドメインのそれぞれの領域を指す。一般に、抗体は、3個はVH中に（H1、H2、H3）、3個はVL中に（L1、L2、L3）、6個のHVRを含む。例示的なHVRは、

(a) アミノ酸残基26～32（L1）、50～52（L2）、91～96（L3）、26～32（H1）、53～55（H2）、および96～101（H3）に存在する超可変ループ（ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol. 196:901～917頁（1987））；

40

(b) アミノ酸残基24～34（L1）、50～56（L2）、89～97（L3）、31～35b（H1）、50～65（H2）、および95～102（H3）に存在するCDR（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda MD（1991））；

(c) アミノ酸残基27c～36（L1）、46～55（L2）、89～96（L3）、30～35b（H1）、47～58（H2）、および93～101（H3）に存在する

50

抗原接触 (MacCallumら、J. Mol. Biol. 262: 732~745頁 (1996)) ; ならびに

(d) HVRアミノ酸残基46~56 (L2)、47~56 (L2)、48~56 (L2)、49~56 (L2)、26~35 (H1)、26~35b (H1)、49~65 (H2)、93~102 (H3)、および94~102 (H3)

を含む、(a)、(b)、および/または(c)の組合せを含む。

【0131】

上記の代わりに、本明細書に記載のCDR-H1の配列は、Kabatt26からKabatt35まで伸びてもよい。

【0132】

一実施形態では、HVRまたはCDR残基は、表2または本明細書の他の箇所で同定されるものを含む。

【0133】

別途指示がない限り、HVR/CDR残基および可変ドメイン中の他の残基(例えば、FR残基)は、本明細書では、Kabattら、上掲によって番号付けられる。

【0134】

「イムノコンジュゲート」は、限定されるものではないが、細胞傷害性剤を含む、1つまたは複数の異種分子にコンジュゲートされた抗体である。

【0135】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、限定されるものではないが、家畜(例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ)、霊長類(例えば、ヒトおよびサルなどの非ヒト霊長類)、ウサギ、および齧歯類(例えば、マウスおよびラット)が挙げられる。ある特定の実施形態では、個体または対象は、ヒトである。

【0136】

本明細書に記載の分子は、「単離されて」いてもよい。「単離された」抗体は、その天然の環境の成分から分離されたものである。一部の実施形態では、抗体は、例えば、電気泳動(例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動(IEF)、キャピラリー電気泳動)またはクロマトグラフィー(例えば、イオン交換または逆相HPLC)によって決定された場合、95%または99%の純度よりも高く精製される。抗体純度の評価のための方法の概説については、例えば、Flatmanら、J. Chromatogr. B 848: 79~87頁(2007)を参照されたい。

【0137】

用語「核酸分子」または「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドのポリマーを含む任意の化合物および/または物質を含む。それぞれのヌクレオチドは、塩基、具体的には、プリンまたはピリミジン塩基(すなわち、シトシン(C)、グアニン(G)、アデニン(A)、チミン(T)またはウラシル(U))、糖(すなわち、デオキシリボースまたはリボース)、およびリン酸基から構成される。核酸分子は、核酸分子の一次構造(直鎖状構造)を表す、塩基の配列によって記載されることが多い。塩基の配列は、典型的には、5'から3'に向かって表される。本明細書では、核酸分子という用語は、例えば、相補的DNA(cDNA)およびゲノムDNA、リボ核酸(RNA)、特に、メッセンジャーRNA(mRNA)、DNAまたはRNAの合成型、ならびにこれらの分子の2つ以上を含む混合ポリマーを含むデオキシリボ核酸(DNA)を包含する。核酸分子は、直鎖状または環状であってもよい。さらに、核酸分子という用語は、センス鎖とアンチセンス鎖の両方、ならびに一本鎖型と二本鎖型の両方を含む。さらに、本明細書に記載される核酸分子は、天然または非天然ヌクレオチドを含有してもよい。非天然ヌクレオチドの例としては、誘導体化された糖もしくはリン酸骨格結合または化学修飾残基を有する修飾ヌクレオチド塩基が挙げられる。核酸分子はまた、例えば、宿主または患者における、in vitroおよび/またはin vivoでの本発明の抗体の直接的発現のためのベクターとして好適であるDNAおよびRNA分子も包含する。そのようなDNA(例えば、cDNA)またはRNA(例えば、mRNA)ベクターは、非修飾または修飾されていてもよい。例えば

10

20

30

40

50

、mRNAを化学修飾して、RNAベクターの安定性および／またはコードされた分子の発現を増強し、mRNAを対象に注射して、*in vivo*で抗体を生成させることができる（例えば、Stadlerら、Nature Medicine 2017、2017年6月12日にオンライン公開、doi:10.1038/nm.4356またはEP2101823B1を参照されたい）。

【0138】

「単離された」核酸とは、その天然の環境の成分から分離されている核酸分子を指す。単離された核酸は、通常は核酸分子を含有する細胞中に含有される核酸分子を含むが、核酸分子は染色体外、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0139】

「抗体をコードする単離された核酸」とは、単一のベクターまたは別々のベクター中のそのような核酸分子を含む、抗体重鎖および軽鎖（またはその断片）をコードする1つまたは複数の核酸分子を指し、そのような核酸分子は、宿主細胞中の1つまたは複数の位置に存在する。

【0140】

本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、例えば、天然に存在する突然変異を含有する、またはモノクローナル抗体調製物の生産中に生じる、あり得る抗体バリエーションであって、一般的には、少量で存在するそのようなバリエーションを除いて、その集団を含む個々の抗体は同一である、および／または同じエピトープに結合する。典型的には、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物のそれぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。かくして、修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の生産を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体を、限定されるものではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含む、様々な技術によって作製することができ、そのような方法およびモノクローナル抗体を作製するための他の例示的な方法は、本明細書に記載される。

【0141】

「ネイキッド抗体」とは、異種部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。ネイキッド抗体は、薬学的製剤中に存在してもよい。

【0142】

「天然抗体」とは、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合する2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖とから構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に向かって、それぞれの重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）、次いで、3つの定常ドメイン（CH1、CH2、およびCH3）を有する。同様に、N末端からC末端に向かって、それぞれの重鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）、次いで、定常軽鎖（CL）ドメインを有する。抗体の軽鎖を、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる2つの型の1つに割り当てることができる。

【0143】

用語「添付文書」は、適応症、使用、用量、投与、併用療法、禁忌および／または治療薬の使用に関する警告に関する情報を含有する、そのような治療薬の市販のパッケージに習慣的に含まれる説明書を指すために使用される。

【0144】

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、配列を整列させ、必要に応じて、ギャップを導入して、最大の配列同一性パーセントを達成した後、配列同一性の部分としていかなる保存的置換も考慮せずに、参照ポリペプチド配列中の

10

20

30

40

50

アミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントを、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公共的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用する、当業界における技術の範囲内にある様々な方法で達成することができる。当業者であれば、比較される配列の完全長にわたって最大のアラインメントを達成するのに必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列を整列させるための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. によって著されたものであり、そのソースコードは、U. S. Copyright Office, Washington D. C.、20559にユーザー文書と共にファイリングされており、米国著作権局登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc.、South San Francisco, Californiaから公共的に入手可能であるか、またはソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変化しない。

10

【0145】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較のために用いられる状況では、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bとの、それと比べたの、またはそれに対するアミノ酸配列同一性%（あるいは、所与のアミノ酸配列Bとの、それと比べたの、またはそれに対するある特定のアミノ酸配列同一性%を有する、または含む所与のアミノ酸配列Aと表現することもできる）は、以下のように算出される：

20

画分 X/Y の100倍

〔式中、Xは、AとBとの配列アラインメントプログラムALIGN-2のアラインメントにおける、そのプログラムによる同一の一致としてスコア化されるアミノ酸残基の数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である〕。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、AのBに対するアミノ酸配列同一性%は、BのAに対するアミノ酸配列同一性%と等しくないことが理解されるであろう。別途具体的に記述されない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性%の値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して直前の段落に記載されたように得られる。

30

【0146】

用語「薬学的製剤」とは、そこに含まれる活性成分の生物活性が有効であることを可能にするような形態にあり、製剤が投与される対象にとって許容できないほどに毒性であるさらなる成分を含有しない調製物を指す。

【0147】

「薬学的に許容される担体」とは、対象にとって非毒性的である、活性成分以外の、薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、限定されるものではないが、バッファー、添加物、安定剤、または防腐剤が挙げられる。

40

【0148】

本明細書で使用される場合、「治療」（および「治療する」または「治療すること」などのその文法的変形）は、治療される個体の自然の経過を変化させる試みにおける臨床的介入を指し、予防のため、または臨床病理の過程の間に実施することができる。治療の望ましい効果としては、限定されるものではないが、疾患の出現または再発の防止、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、転移の防止、疾患進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、および寛解または予後の改善が挙げられる。一部の実施形態では、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるか、または疾患の進行を減速させるために使用される。

【0149】

50

用語「可変領域」または「可変ドメイン」とは、抗体の抗原への結合に関与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、VHおよびVL）は、一般に、類似する構造を有し、それぞれのドメインは、4個の保存されたフレームワーク領域（FR）および3個の超可変領域（HVR）を含む（例えば、Kindtら、Kuby Immunology、第6版、W. H. Freeman and Co.、91頁（2007）を参照されたい）。単一のVHまたはVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分なものであってよい。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、その抗原に結合する抗体に由来するVHまたはVLドメインを使用して単離して、それぞれ、相補的なVLまたはVHドメインのライブラリーをスクリーニングすることができる。例えば、Portolanoら、J. Immunol. 150:880~887頁（1993）；Clarksonら、Nature 352:624~628頁（1991）を参照されたい。

10

【0150】

本明細書で使用される場合、用語「ベクター」とは、それが連結される別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製する核酸構造としてのベクターならびにそれが導入された宿主細胞のゲノム中に組み込まれるベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが作動可能に連結された核酸の発現を指令することができる。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。

【0151】

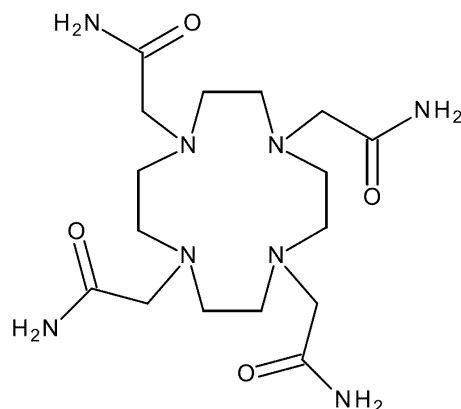
本明細書で使用される場合、用語「Pb」または「鉛」は、そのイオン、例えば、Pb（II）を含む。かくして、知識のある読者であれば、例えば、鉛、Pb、 ^{212}Pb または ^{203}Pb という用語が、その元素のイオン形態、特に、Pb（II）を包含することが意図されることを理解できる。本発明の様々な態様では、Pbは、放射性同位体（例えば、放射線免疫療法もしくは放射線免疫イメージングの方法において使用する場合）であってよい、または安定な、非放射性同位体（例えば、除去剤の文脈において好ましい場合があるように）であってよい。

20

【0152】

「DOTAM」は、化学名：1, 4, 7, 10-テトラキス（カルバモイルメチル）-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカンを有し、以下の式：

30



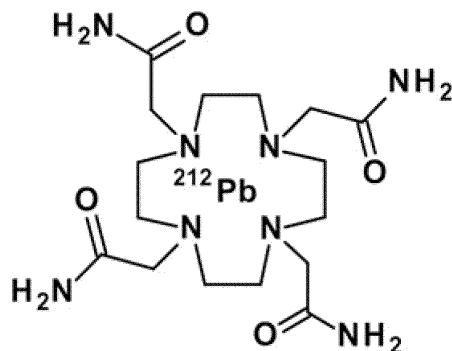
40

の化合物である。

【0153】

^{212}Pb -DOTAMは、以下の構造：

50



10

を有する。

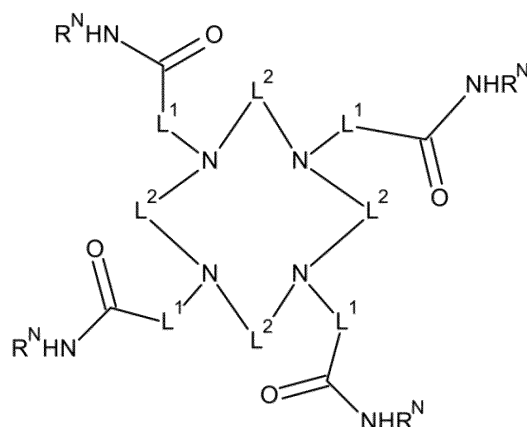
【0154】

本発明は、ある特定の態様および実施形態では、金属イオンを含むDOTAMの機能的バリエーションまたは誘導体も使用する。DOTAMの好適なバリエーション／誘導体は、DOTAMの構造とはある特定の限られた程度で異なり、機能する能力を保持する（すなわち、本明細書に記載の1つまたは複数の目的のために使用される十分な活性を保持する）。そのような態様および実施形態では、DOTAMおよびDOTAMの機能的バリエーション／誘導体は、WO 2010/099536に開示された活性バリエーションの1つであってもよい。

20

【0155】

好適な機能的バリエーション／誘導体は、以下の式：



30

の化合物、またはその薬学的に許容される塩

[式中、

R^N は、H、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_1 \sim 6$ ハロアルキル、 $C_2 \sim 6$ アルケニル、 $C_2 \sim 6$ アルキニル、 $C_3 \sim 7$ シクロアルキル、 $C_3 \sim 7$ シクロアルキル- $C_1 \sim 4$ アルキル、 $C_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル、 $C_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル- $C_1 \sim 4$ アルキル、フェニル、フェニル- $C_1 \sim 4$ -アルキル、 $C_1 \sim 7$ ヘテロアリール、および $C_1 \sim 7$ ヘテロアリール- $C_1 \sim 4$ -アルキルであり； $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_1 \sim 6$ ハロアルキル、 $C_2 \sim 6$ アルケニル、および $C_2 \sim 6$ アルキニルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^W 基でそれぞれ置換されていてもよく；前記 $C_3 \sim 7$ シクロアルキル、 $C_3 \sim 7$ シクロアルキル- $C_1 \sim 4$ アルキル、 $C_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル、 $C_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル- $C_1 \sim 4$ アルキル、フェニル、フェニル- $C_1 \sim 4$ -アルキル、 $C_1 \sim 7$ ヘテロアリール、および $C_1 \sim 7$ ヘテロアリール- $C_1 \sim 4$ -アルキルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^X 基でそれぞれ置換されていてもよく；

40

L^1 は、独立して $C_1 \sim 6$ アルキレン、 $C_1 \sim 6$ アルケニレン、または $C_1 \sim 6$ アルキニ

50

レンであり、それぞれ、1、2または3個の独立して選択される R^1 基で置換されていてもよく；

L^2 は、 $C_{2\sim4}$ 直鎖アルキレンであり、独立して選択される R^1 基で置換されていてもよく； $C_{1\sim4}$ アルキルおよび／または $C_{1\sim4}$ ハロアルキルから独立して選択される1、2、3または4個の基で置換されていてもよく；

R^1 は、 $D^1-D^2-D^3$ 、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、 $C_{1\sim6}$ アルコキシ、 $C_{1\sim6}$ ハロアルコキシ、 $C_{1\sim6}$ アルキルチオ、 $C_{1\sim6}$ アルキルスルフィニル、 $C_{1\sim6}$ アルキルスルホニル、アミノ、 $C_{1\sim6}$ アルキルアミノ、ジ- $C_{1\sim6}$ アルキルアミノ、 $C_{1\sim4}$ アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1\sim6}$ アルコキシカルボニル、 $C_{1\sim6}$ アルキルカルボニルアミノ、ジ- $C_{1\sim6}$ アルキルカルボニルアミノ、 $C_{1\sim6}$ アルコキシカルボニルアミノ、 $C_{1\sim6}$ アルコキシカルボニル- ($C_{1\sim6}$ アルキル)アミノ、カルバミル、 $C_{1\sim6}$ アルキルカルバミル、およびジ- $C_{1\sim6}$ アルキルカルバミルから独立して選択され、

D^1 はそれぞれ、 $C_{6\sim10}$ アリール- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{1\sim9}$ ヘテロアリール- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{3\sim10}$ シクロアルキル- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{2\sim9}$ ヘテロシクロアルキル- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{1\sim8}$ アルキレン、 $C_{1\sim8}$ アルケニレン、および $C_{1\sim8}$ アルキニレンから独立して選択され；前記 $C_{1\sim8}$ アルキレン、 $C_{1\sim8}$ アルケニレン、および $C_{1\sim8}$ アルキニレンは、1、2、3または4個の独立して選択される R^4 基で置換されていてもよく；前記 $C_{6\sim10}$ アリール- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{1\sim9}$ ヘテロアリール- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{3\sim10}$ シクロアルキル- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{2\sim9}$ ヘテロシクロアルキル- $C_{1\sim4}$ アルキルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^5 基でそれぞれ置換されていてもよく；

D^2 はそれぞれ、独立して存在しないか、または $C_{1\sim20}$ 直鎖アルキレンであり、前記 $C_{1\sim20}$ 直鎖アルキレンの1～6個の非隣接メチレン基は、独立して選択される- D^4 -部分でそれぞれ置き換えられていてもよいが、但し、前記 $C_{1\sim20}$ 直鎖アルキレン中の少なくとも1個のメチレン単位は、必要に応じて- D^4 -部分で置き換えられていないことを条件とし；前記 $C_{1\sim20}$ 直鎖アルキレンは、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、 $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{1\sim4}$ ハロアルキル、 $C_{1\sim4}$ アルコキシ、 $C_{1\sim4}$ ハロアルコキシ、アミノ、 $C_{1\sim4}$ アルキルアミノ、ジ- $C_{1\sim4}$ アルキルアミノ、 $C_{1\sim4}$ アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1\sim4}$ アルコキシカルボニル、 $C_{1\sim4}$ アルキルカルボニルアミノ、ジ- $C_{1\sim4}$ アルキルカルボニルアミノ、 $C_{1\sim4}$ アルコキシカルボニルアミノ、 $C_{1\sim4}$ アルコキシカルボニル- ($C_{1\sim4}$ アルキル)アミノ、カルバミル、 $C_{1\sim4}$ アルキルカルバミル、およびジ- $C_{1\sim4}$ アルキルカルバミルから独立して選択される1つまたは複数の基で置換されていてもよく；

D^3 はそれぞれ、H、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、 $C_{1\sim6}$ アルキル、 $C_{1\sim6}$ ハロアルキル、 $C_{2\sim6}$ アルケニル、 $C_{2\sim6}$ アルキニル、 $C_{3\sim14}$ シクロアルキル、 $C_{3\sim14}$ シクロアルキル- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{2\sim14}$ ヘテロシクロアルキル、 $C_{2\sim14}$ ヘテロシクロアルキル- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{6\sim14}$ アリール、 $C_{6\sim14}$ アリール- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{1\sim13}$ ヘテロアリール、 $C_{1\sim13}$ ヘテロアリール- $C_{1\sim4}$ アルキルから独立して選択され；前記 $C_{1\sim6}$ アルキル、 $C_{1\sim6}$ ハロアルキル、 $C_{2\sim6}$ アルケニル、 $C_{2\sim6}$ アルキニルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^6 基でそれぞれ置換されていてもよく；前記 $C_{3\sim14}$ シクロアルキル、 $C_{3\sim14}$ シクロアルキル- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{2\sim14}$ ヘテロシクロアルキル、 $C_{2\sim14}$ ヘテロシクロアルキル- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{6\sim14}$ アリール、 $C_{6\sim14}$ アリール- $C_{1\sim4}$ アルキル、 $C_{1\sim13}$ ヘテロアリール、 $C_{1\sim13}$ ヘテロアリール- $C_{1\sim4}$ アルキルは、1、2、3または4個の独立して選択される R^7 基でそれぞれ置換されていてもよく；

D^4 はそれぞれ、-O-、-S-、-NR^aC(=O)-、-NR^aC(=S)-、-NR^bC(=O)NR^c-、-NR^bC(=S)NR^c-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、-S(=O)NR^a-、-C(=O)-、-C(=S)-、-C(=O)O-、-OC(=O)NR^a-、-OC(=S)NR^a-、-NR^a-、-NR^bS(=O)NR^c-、

および $\text{NR}^b\text{S} (= \text{O})_2\text{NR}^o$ から独立して選択され；

R^4 および R^6 はそれぞれ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルコキシ、 $\text{C}_1 \sim 4$ ハロアルコキシ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルチオ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルスルフィニル、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルスルホニル、アミノ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルアミノ、ジ- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルアミノ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルカルボニル、カルボキシ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルコキシカルボニル、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルカルボニルアミノ、ジ- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルカルボニルアミノ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルコキシカルボニルアミノ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルコキシカルボニル- ($\text{C}_1 \sim 4$ アルキル) アミノ、カルバミル、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルカルバミル、およびジ- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルカルバミルから独立して選択され；

R^5 はそれぞれ、ハロゲン、シアノ、シアネート、イソチオシアネート、ニトロ、ヒドロキシル、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $\text{C}_2 \sim 4$ アルケニル、 $\text{C}_2 \sim 4$ アルキニル、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルコキシ、 $\text{C}_1 \sim 4$ ハロアルコキシ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルチオ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルスルフィニル、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルスルホニル、アミノ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルアミノ、ジ- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルアミノ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルカルボニル、カルボキシ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルコキシカルボニル、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルカルボニルアミノ、ジ- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルカルボニルアミノ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルコキシカルボニルアミノ、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルコキシカルボニル- ($\text{C}_1 \sim 4$ アルキル) アミノ、カルバミル、 $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルカルバミル、およびジ- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルカルバミルから独立して選択され；

R^7 はそれぞれ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、 $\text{C}_1 \sim 6$ アルキル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルケニル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルキニル、 $\text{C}_3 \sim 7$ シクロアルキル、 $\text{C}_3 \sim 7$ シクロアルキル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $\text{C}_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル、 $\text{C}_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、フェニル、フェニル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim 7$ ヘテロアリール、 $\text{C}_1 \sim 7$ ヘテロアリール- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $-\text{OR}^o$ 、 $-\text{SR}^o$ 、 $-\text{S} (= \text{O}) \text{R}^p$ 、 $-\text{S} (= \text{O})_2 \text{R}^p$ 、 $-\text{S} (= \text{O}) \text{NR}^s \text{R}^t$ 、 $-\text{C} (= \text{O}) \text{R}^p$ 、 $-\text{C} (= \text{O}) \text{OR}^p$ 、 $-\text{C} (= \text{O}) \text{NR}^s \text{R}^t$ 、 $-\text{OC} (= \text{O}) \text{R}^p$ 、 $-\text{OC} (= \text{O}) \text{NR}^s \text{R}^t$ 、 $-\text{NR}^s \text{R}^t$ 、 $-\text{NR}^q \text{C} (= \text{O}) \text{R}^r$ 、 $-\text{NR}^q \text{C} (= \text{O}) \text{OR}^r$ 、 $-\text{NR}^q \text{C} (= \text{O}) \text{NR}^r$ 、 $-\text{NR}^q \text{S} (= \text{O})_2 \text{R}^r$ 、および $\text{NR}^p \text{S} (= \text{O})_2 \text{NR}^s \text{R}^t$ から独立して選択され；前記 $\text{C}_1 \sim 6$ アルキル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルケニル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルキニルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R' 基でそれぞれ置換されていてもよく；前記 $\text{C}_3 \sim 7$ シクロアルキル、 $\text{C}_3 \sim 7$ シクロアルキル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $\text{C}_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル、 $\text{C}_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、フェニル、フェニル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim 7$ ヘテロアリール、 $\text{C}_1 \sim 7$ ヘテロアリール- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R'' 基でそれぞれ置換されていてもよく；

R^a 、 R^b 、および R^c はそれぞれ、H、 $\text{C}_1 \sim 6$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim 6$ ハロアルキル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルケニル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルキニル、 $\text{C}_3 \sim 7$ シクロアルキル、 $\text{C}_3 \sim 7$ シクロアルキル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $\text{C}_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル、 $\text{C}_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、フェニル、フェニル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim 7$ ヘテロアリール、 $\text{C}_1 \sim 7$ ヘテロアリール- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルから独立して選択され；前記 $\text{C}_1 \sim 6$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim 6$ ハロアルキル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルケニル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルキニルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^w 基でそれぞれ置換されていてもよく；前記 $\text{C}_3 \sim 7$ シクロアルキル、 $\text{C}_3 \sim 7$ シクロアルキル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $\text{C}_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル、 $\text{C}_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、フェニル、フェニル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim 7$ ヘテロアリール、 $\text{C}_1 \sim 7$ ヘテロアリール- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^x 基でそれぞれ置換されていてもよく；

R^o 、 R^p 、 R^q 、 R^r 、 R^s および R^t はそれぞれ、H、 $\text{C}_1 \sim 6$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim 6$ ハロアルキル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルケニル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルキニル、 $\text{C}_3 \sim 7$ シクロアルキル、 $\text{C}_3 \sim 7$ シクロアルキル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $\text{C}_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル、 $\text{C}_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、フェニル、フェニル- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim 7$ ヘテロアリール、 $\text{C}_1 \sim 7$ ヘテロアリール- $\text{C}_1 \sim 4$ アルキルから独立して選択され；前記 $\text{C}_1 \sim 6$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim 6$ ハロアルキル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルケニル、 $\text{C}_2 \sim 6$ アルキニルは、1、2、

10

20

30

40

50

3、または4個の独立して選択される R^Y 基でそれぞれ置換されていてもよく；前記 $C_3 \sim 7$ シクロアルキル、 $C_3 \sim 7$ シクロアルキル- $C_1 \sim 4$ アルキル、 $C_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル、 $C_2 \sim 7$ ヘテロシクロアルキル- $C_1 \sim 4$ アルキル、フェニル、フェニル- $C_1 \sim 4$ アルキル、 $C_1 \sim 7$ ヘテロアリール、 $C_1 \sim 7$ ヘテロアリール- $C_1 \sim 4$ アルキルは、1、2、3、または4個の独立して選択される R^Z 基でそれぞれ置換されていてもよく；

R^Y 、 R^W および R^Y はそれぞれ、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 $C_1 \sim 4$ アルコキシ、 $C_1 \sim 4$ ハロアルコキシ、アミノ、 $C_1 \sim 4$ アルキルアミノ、およびジ- $C_1 \sim 4$ アルキルアミノから独立して選択され；

$R^{Y'}$ 、 R^W および R^Z はそれぞれ、ヒドロキシル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、 $C_1 \sim 4$ アルキル、 $C_1 \sim 4$ ハロアルキル、 $C_1 \sim 4$ アルコキシ、 $C_1 \sim 4$ ハロアルコキシ、アミノ、 $C_1 \sim 4$ アルキルアミノ、およびジ- $C_1 \sim 4$ アルキルアミノから独立して選択されるが；

但し、置換されていてもよい部分のそれぞれの原子の価数を超えないことを条件とする]であってよい。

【0156】

好適には、上記式の機能的バリエーション／誘導体は、DOTAMのものと同等であるか、またはそれより高い本発明の抗体に対する親和性を有し、DOTAMのものと同等であるか、またはそれより高い、Pbに対する結合強度を有する（「親和性」は、上記のように、解離定数によって測定される）。例えば、本発明の抗体または／Pbとの機能的バリエーション／誘導体の解離定数は、同じ抗体／PbとのDOTAMの解離定数よりも1.1倍以下、1.2倍以下、1.3倍以下、1.4倍以下、1.5倍以下、または2倍以下であってもよい。

【0157】

R^N はそれぞれ、H、 $C_1 \sim 6$ アルキル、または $C_1 \sim 6$ ハロアルキル；好ましくは、H、 $C_1 \sim 4$ アルキル、または $C_1 \sim 4$ ハロアルキルであってよい。最も好ましくは、 R^N はそれぞれHである。

【0158】

DOTAMバリエーションについて、1、2、3個または最も好ましくは、それぞれの L^2 は、 C_2 アルキレンである。有利には、DOTAMの C_2 アルキレンバリエーションは、Pbに対する特に高い親和性を有してもよい。 L^2 のための任意の置換基は、 R^1 、 $C_1 \sim 4$ アルキル、または $C_1 \sim 4$ ハロアルキルであってもよい。好適には、 L^2 のための任意の置換基は、 $C_1 \sim 4$ アルキルまたは $C_1 \sim 4$ ハロアルキルであってもよい。

【0159】

必要に応じて、 L^2 はそれぞれ、非置換 C_2 アルキレン- CH_2CH_2 -であってもよい。

【0160】

L^1 はそれぞれ、好ましくは、 $C_1 \sim 4$ アルキレン、より好ましくは、 $-CH_2-$ などの C_1 アルキレンである。

【0161】

機能的バリエーション／誘導体はまた、1つまたは複数のさらなる部分、例えば、低分子、ポリペプチドまたは炭水化物にコンジュゲートされた、DOTAMまたは上記の化合物を含んでもよい。この結合は、大員環の骨格中の1個の炭素を介して生じてよい。低分子は、例えば、色素（Alexa 647もしくはAlexa 488）、ビオチンまたはビオチン部分であってもよい。ポリペプチドは、例えば、オリゴペプチド、例えば、抗体などの治療ペプチドまたはポリペプチドであってもよい。例示的な炭水化物としては、デキストラン、直鎖状または分枝状ポリマーまたはコポリマー（例えば、ポリアルキレン、ポリ（エチレン-リジン）、ポリメタクリレート、ポリアミノ酸、多糖またはオリゴ糖、デンドリマー）が挙げられる。

【0162】

DOTAMの機能的バリエーション／誘導体は、以下の式：

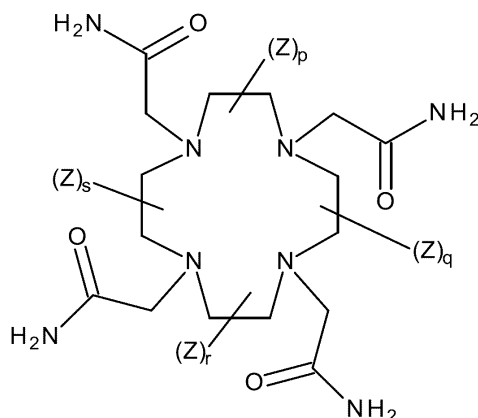
10

20

30

40

50



10

【式中、Zはそれぞれ独立して、上で定義された R^1 であり；p、q、r、およびsは、0、1または2であり； $p+q+r+s$ は1以上である】

の化合物であってもよい。好ましくは、p、q、r、およびsは、0もしくは1である、および／または $p+q+r+s$ は1である。例えば、化合物は、 $p+q+r+s=1$ を有してもよく、Zはp-SCN-ベンジル部分であり、そのような化合物は、Macrocyclics, Inc. (Plano, Texas) から市販されている。

【0163】

20

詳細な説明

組成物および方法

抗体

一態様では、本発明は、部分的には、Pb-DOTAM（すなわち、本明細書では「Pb-SOTAMキレート」とも呼ばれる、Pbと複合体化したDOTAMを含むキレート）に特異的に結合する抗体の提供に基づく。

【0164】

ある特定の実施形態では、Pb-DOTAMに特異的に結合する抗体は、以下の特性のうちの1つまたは複数を含む：

- ・Pb-DOTAMおよびBi-DOTAMに特異的に結合する；
- ・Cu-DOTAMなどの他のキレート化された金属と比較して、Pb-DOTAMに対して選択的である；
- ・非常に高い親和性でPb-DOTAMに結合する；
- ・本明細書に記載の抗体、例えば、PRIT-0213もしくはPRIT-0214と同じPb-DOTAM上のエピトープに結合する、および／または前記抗体と同じ接触残基を有する。

30

【0165】

Pbの放射性同位体は、診断および療法の方法において有用である。本発明において有用であり得る鉛の特定の放射性同位体としては、 ^{212}Pb および ^{203}Pb が挙げられる。鉛の安定な同位体、例えば、 ^{204}Pb 、 ^{206}Pb 、 ^{207}Pb または ^{208}Pb を、除去剤において使用することもできる。Pbは、安定な（非放射性）同位体 ^{204}Pb 、 ^{206}Pb 、 ^{207}Pb および ^{208}Pb の混合物である、天然に存在する鉛であってもよい。

40

【0166】

α 粒子放射体である放射性核種は、短い経路長と、高い線エネルギー付与との組合せのため、 β 放射体よりも周囲の組織に対する損傷が少なく、より特異的な腫瘍細胞殺傷の能力を有する。 ^{212}Bi は、 α 粒子放射体であるが、その短い半減期はその直接的使用を阻む。 ^{212}Pb は、 ^{212}Bi の親放射性核種であり、 ^{212}Bi のin vivoでの生成元として働き、それによって、 ^{212}Bi の短い半減期を効率的に克服することができる（YongおよびBrechtel, Dalton Trans. 2001年6月21日；40(23)6068～6076頁）。

50

【0167】

^{203}Pb は、イメージング同位体として有用である。かくして、 ^{203}Pb -DOTAMに結合した抗体は、放射線免疫イメージング（RII）において有用であってよい。

【0168】

一般に、放射性金属は、キレート化された形態で使用される。本発明の態様では、DOTAMは、キレート剤として使用される。DOTAMは、 Pb(II) の安定なキレート剤である（YongおよびBrechtel、Dalton Trans. 2001年6月21日；40（23）6068～6076頁；Chappellら、Nuclear Medicine and Biology、第27巻、93～100頁、2000）。かくして、DOTAMは、 ^{212}Pb および ^{203}Pb などの、上で考察された鉛の同位体とのコンジュゲーションにおいて特に有用である。

10

【0169】

上で考察された通り、本発明による抗体は、 Pb -DOTAMに結合する。一部の実施形態では、抗体は、100 pM、50 pM、20 pM、10 pM、5 pM、1 pM以下、例えば、0.9 pM以下、0.8 pM以下、0.7 pM以下、0.6 pM以下または0.5 pM以下の結合親和性のKd値で Pb -DOTAMに結合することが好ましい。

【0170】

抗体はさらに、DOTAMによってキレート化されたBiに結合する。一部の実施形態では、抗体は、1 nM、500 pM、200 pM、100 pM、50 pM、10 pM以下、例えば、9 pM、8 pM、7 pM、6 pM、5 pM以下の結合親和性のKd値でBi-DOTAM（すなわち、本明細書では「Bi-DOTAMキレート」とも呼ばれる、ビスマスと複合体化したDOTAMを含むキレート）に結合することが好ましい。

20

【0171】

一部の実施形態では、抗体は、同様の親和性でBi-DOTAMおよび Pb -DOTAMに結合してもよい。例えば、Bi-DOTAM/ Pb -DOTAMに関する、親和性の比、例えば、Kd値の比は、0.1～10、例えば、1～10の範囲にあることが好ましい。

【0172】

本発明による例示的な抗体（PRI T-0213）に関する試料親和性値は、以下に提供される：

30

CEA-DOTAM BsAb の金属-DOTAM キレート親和性

抗原	KD [pM]	95% CI[pM]
Pb-DOTAM	0.84	0.44-1.4
Ca-DOTAM	0.95	0.43-1.7
Bi-DOTAM	5.7	4.6-6.2
Cu-DOTAM	122000	60000 - 206000

40

【0173】

親和性は、KinExA平衡測定によって決定した。

【0174】

さらに、本発明の抗体は、好ましくは、Cu-DOTAMなどの他のキレート化された金属と比較して、Bi-DOTAMおよび／または Pb -DOTAMについて選択的である。例えば、 Pb -DOTAM/ Cu -DOTAMに関する、親和性の比、例えば、Kd値の比は、少なくとも100,000であってもよい。

【0175】

一部の実施形態では、抗体は、

50

- i) 配列番号 22 のアミノ酸配列を有する第 1 の重鎖；
- ii) 配列番号 23 のアミノ酸配列を有する第 2 の重鎖；および
- iii) 配列番号 21 のアミノ酸配列を有する 2 つの抗体軽鎖

を有する、二重特異性抗体（本明細書では P R I T - 0 2 1 3 と呼ばれる）のものと等しいか、またはそれより高い親和性（例えば、親和性の K d 値）で、P b - D O T A M および／または B i - D O T A M に結合することが好ましい。

【0176】

一部の実施形態では、抗体は、

- i) 配列番号 19 のアミノ酸配列を有する第 1 の重鎖；
- ii) 配列番号 20 のアミノ酸配列を有する第 2 の重鎖；および
- iii) 配列番号 21 のアミノ酸配列を有する 2 つの抗体軽鎖

を有する、二重特異性抗体（本明細書では P R I T - 0 2 1 4 と呼ばれる）のものと等しいか、またはそれより高い親和性（例えば、親和性の K D 値）で、D O T A M - キレート化 P b および／または D O T A M - キレート化 B i に結合することが好ましい。

【0177】

一部の実施形態では、本発明による抗体は、本明細書に開示される抗体と、同じか、または重複する、キレート化された放射性核種のエピトープに結合する。

【0178】

一部の実施形態では、抗体は、

- i) 配列番号 22 のアミノ酸配列を有する第 1 の重鎖；
- ii) 配列番号 23 のアミノ酸配列を有する第 2 の重鎖；および
- iii) 配列番号 21 のアミノ酸配列を有する 2 つの抗体軽鎖

を有する、F a b P R I T - 0 2 1 3 と同じか、または重複する、P b - D O T A M キレート（P b - D O T A M）のエピトープに結合する。

【0179】

所与の抗体が結合するキレート化された放射性核種（例えば、P b - D O T A M）のエピトープを決定することができ、これを、本明細書に開示される抗体（例えば、F a b P R I T - 0 2 1 3）が結合するキレート化された放射性核種のエピトープと比較することができる。

【0180】

本開示は、実施例 14 において、1.40 Å の分解能で P b - D O T A M と複合体化した F a b P R I T - 0 2 1 3 の結晶構造の決定、ならびにタンパク質界面表面およびアセンブリ（P I S A）プログラム（K r i s s i n e l および H e n r i c k、J M o l B i o l（2007）372（3）：774～97頁）を使用したこの構造の分析に基づく、F a b P R I T - 0 2 1 3 と P b - D O T A M との結合相互作用の特性評価を記載する。

【0181】

一部の実施形態では、本発明による抗体は、例えば、P b - D O T A M と複合体化した抗体の構造の P I S A 分析によって決定された場合、P b - D O T A M に関して以下の部位の 1 つまたは複数：アザシクロドデカン環より下のアザシクロドデカン環領域（例えば、テトラシクロドデカン環）に対してエッジ・トゥー・フェイス、N 6、N 7、N 8、N 5 および／または C 1 2 との相互作用を示してもよい。一部の実施形態では、抗体は、P b - D O T A M に関して以下の部位の 1 つまたは複数：N 7、N 8、アザシクロドデカン環に対してエッジ・トゥー・フェイス、テトラシクロドデカン環および／または N 6 との相互作用を示してもよい。

【0182】

一部の実施形態では、抗体は、例えば、P b - D O T A M と複合体化した抗体の構造の P I S A 分析によって決定された場合、P b - D O T A M に関して以下の相互作用の 1 つまたは複数：アザシクロドデカン環に対してエッジ・トゥー・フェイスの無極性相互作用、N 8 との極性相互作用、N 7 との水素結合、N 8 との水素結合、N 5 との極性相互作用

10

20

30

40

50

、C 1 2 との無極性相互作用、N 7 との極性相互作用、N 6 との極性（水素）結合、および／またはテトラシクロドデカン環との無極性相互作用を示してもよい。

【0183】

一部の実施形態では、抗体は、例えば、P b-D O T A M と複合体化した抗体の構造の P I S A 分析によって決定された場合、P b-D O T A M に関して以下の相互作用の1つまたは複数：抗体重鎖 C D R 3 の1つもしくは複数の残基と N 7 との水素結合、抗体重鎖 C D R 3 の1つもしくは複数の残基と N 8 との水素結合、アザシクロドデカン環に対してエッジ・トゥー・フェイスの抗体重鎖 C D R 2 の1つもしくは複数の残基間の無極性相互作用、抗体軽鎖 C D R 3 とテトラシクロドデカン環の間の無極性相互作用、および／または抗体軽鎖 C D R 1 と N 6 の間の無極性相互作用を示してもよい。

10

【0184】

他の実施形態では、抗体は、本明細書に記載のように同じ接触残基を共有してもよい：例えば、これらの残基は、インバリエントであってもよい。これらの残基は、以下のもの：

a) 重鎖 C D R 2 中に：P h e 5 0、A s p 5 6 および／または T y r 5 8、必要に応じて、G l y 5 2 および／または A r g 5 4 も；

b) 重鎖 C D R 3 中に：G l u 9 5、A r g 9 6、A s p 9 7、P r o 9 8、T y r 9 9、A l a 1 0 0 C および／または T y r 1 0 0 D、必要に応じて、P r o 1 0 0 E も；

c) 軽鎖 C D R 1 中に：T y r 2 8 および／または A s p 3 2 ；

d) 軽鎖 C D R 3 中に：G l y 9 1、T y r 9 2、A s p 9 3、T h r 9 5 c および／または T y r 9 6 ；

20

e) 軽鎖 C D R 2 中に：必要に応じて、G l n 5 0 を含んでもよい。

【0185】

本発明による抗体のある特定の態様および実施形態は、上で考察されている。本発明によるさらに好適な態様および実施形態は、以下で考察される。全ての実施形態において、抗体は、P b-D O T A M に、好ましくは、B i-D O T A M にも結合する能力を保持し、さらにより好ましくは、上で考察された親和性および／または選択性で結合する能力を保持する。

【0186】

一実施形態では、本発明は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ； (b) 配列番号2のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ； (c) 配列番号3のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 ； (d) 配列番号4のアミノ酸配列を含む C D R-L 1 ； (e) 配列番号5のアミノ酸配列を含む C D R-L 2 ； および (f) 配列番号6のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 から選択される少なくとも1、2、3、4、5、または6つの C D R を含む抗 P b-D O T A M 抗体を提供することができる。

30

【0187】

一実施形態では、本発明は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ； (b) 配列番号2のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ； および (c) 配列番号3のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全部の V H C D R 配列を含む抗体を提供する。一実施形態では、抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 を含む。別の実施形態では、抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 および配列番号6のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む。さらなる実施形態では、抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を含む C D R-H 3、配列番号6のアミノ酸配列を含む C D R-L 3、および配列番号2のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 を含む。さらなる実施形態では、抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を含む C D R-H 3、配列番号6のアミノ酸配列を含む C D R-L 3、配列番号2のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 および配列番号4のアミノ酸配列を含む C D R-L 1 を含む。さらなる実施形態では、抗体は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ； (b) 配列番号2のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ； および (c) 配列番号3のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 を含む。

40

50

【0188】

別の態様では、本発明は、(a) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-L1；(b) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および(c) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全部のVL CDR配列を含む抗体を提供する。一実施形態では、抗体は、(a) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-L1；(b) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および(c) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む。

【0189】

別の態様では、本発明の抗体は、(a) (i) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号3から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全部のVH CDR配列を含むVHドメイン；ならびに(b) (i) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L2から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全部のVL CDRを含むVLドメイン、ならびに(c) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む。

10

【0190】

別の態様では、本発明は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR-H1；(b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR-H2；(c) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H3；(d) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-L1；(e) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および(f) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む抗体を提供する。

20

【0191】

一部の実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号1～6のアミノ酸配列と比較して置換、例えば、1、2または3個の置換を有する、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2および／またはCDR-L3のうちの1つまたは複数を含んでもよい。これらの置換は、上記のようなインバリエントな位置には存在しないことが好ましい。

【0192】

例えば、一部の実施形態では、CDR-H2は、アミノ酸配列F I G S R G D T Y Y A S W A K G (配列番号2)、または配列番号2中に1、2、もしくは3個までの置換を有し、これらの置換がP h e 5 0、A s p 5 6、および／もしくはT y r 5 8を含まず、必要に応じて、G l y 5 2および／もしくはA r g 5 4 (全てK a b a tによって番号付けられる) も含まない、そのバリエーションを含んでもよい。

30

【0193】

一部の実施形態では、CDR-H2は、以下に示される1つまたは複数の位置で置換されていてもよい。ここで、および以下の置換表において、置換は、生殖系列残基(下線付き)に基づくか、または理論的に立体的に適合し、また、その部位で結晶化されたレパートリー中に存在するアミノ酸によるものである。一部の実施形態では、上記の残基を固定し、他の残基を以下の表に従って置換してもよい：他の実施形態では、任意の残基の置換を、以下の表に従って行ってもよい。

40

WolfGuy	Kabat	AA	置換
251	50	F	<u>Y</u> , <u>H</u>
252	51	I	
253	52	G	
254	53	S	<u>A</u> , <u>G</u> , <u>T</u> , I, N
288	54	R	<u>A</u> , <u>D</u> , <u>G</u> , <u>N</u> , <u>S</u> , T, F, Y
289	55	G	<u>D</u> , <u>S</u> , Y, T, A, N, R, V
290	56	D	
291	57	T	<u>K</u> , <u>I</u> , A, P, S
292	58	Y	<u>E</u> , W, H
293	59	Y	<u>N</u> , F, H, L, S
294	60	A	<u>G</u> , <u>N</u> , <u>S</u> , <u>I</u>
295	61	S	<u>A</u> , <u>G</u> , <u>N</u> , <u>Q</u> , <u>I</u>
296	62	W	<u>K</u> , <u>P</u> , <u>S</u> , A, T, D, N, R, Q
297	63	A	<u>E</u> , <u>L</u> , <u>V</u> , M, I
298	64	K	<u>N</u> , <u>Q</u> , R, E
299	65	G	<u>S</u> , <u>T</u> , D, N, A

10

20

【0194】

必要に応じて、CDR-H3は、アミノ酸配列ERDPYGGGAYPPHL（配列番号3）、または配列番号3中に1、2、もしくは3個までの置換を有し、これらの置換がGlu95、Arg96、Asp97、Pro98を含まず、必要に応じて、Ala100C、Tyr100D、および／もしくはPro100Eも含まない、ならびに／または必要に応じて、Tyr99も含まない、そのバリエーションを含んでもよい。例えば、一部の実施形態では、置換は、Glu95、Arg96、Asp97、Pro98、Tyr99、Ala100CおよびTyr100Dを含まない。

30

【0195】

ある特定の実施形態では、CDR-H3は、以下に示される1つまたは複数の位置で置換されていてもよい。一部の実施形態では、上記の残基を固定し、他の残基を以下の表に従って置換してもよい：他の実施形態では、任意の残基の置換を、以下の表に従って行ってもよい。

40

50

WolfGuy	Kabat	AA	置換
351	95	E	
352	96	R	K, E
353	97	D	
354	98	P	
355	99	Y	F, G, S, T, D
356	100	G	
392	100A	G	
393	100B	G	
394	100C	A	S, T
395	100D	Y	F
396	100E	P	
397	100F	P	
398	101	H	A, T, V, D
399	102	L	Y, V, I, H, F

10

20

【0196】

必要に応じて、CDR-L1は、アミノ酸配列QSSHSVYSDNDLA（配列番号4）、または配列番号4中に1、2、もしくは3個までの置換を有し、これらの置換がTyr28およびAsp32（カバット番号付け）を含まない、そのバリエーションを含んでもよい。

【0197】

ある特定の実施形態では、CDR-L1は、以下に示される1つまたは複数の位置で置換されていてもよい。再度、一部の実施形態では、上記の残基を固定し、他の残基を以下の表に従って置換してもよい：他の実施形態では、任意の残基の置換を、以下の表に従って行ってもよい。

30

40

50

WolfGuy	Kabat	AA	置換
551	24	Q	<u>R</u> , <u>K</u>
552	25	S	<u>A</u> , <u>G</u>
554	26	S	<u>I</u>
555	27	H	<u>Q</u> , <u>S</u> , R, K
556	27A	S	Q
557	27B	V	<u>I</u> , <u>D</u> , <u>N</u>
561	28	Y	F
562	29	S	T, <u>V</u>
571	30	D	<u>R</u> , <u>S</u> , <u>N</u> , <u>G</u>
572	31	N	K
597	32	D	
598	33	L	<u>I</u> , <u>V</u> , <u>M</u>
599	34	A	<u>S</u>

10

20

【0198】

必要に応じて、CDR-L3は、アミノ酸配列LGGYDDSDTYG（配列番号6）、または配列番号6中に1、2、もしくは3個までの置換を有し、これらの置換がGly91、Tyr92、Asp93、Thr95cおよび/もしくはTyr96（カバット）を含まない、そのバリエーションを含んでもよい。

【0199】

ある特定の実施形態では、CDR-L3は、以下に示される以下の位置で置換されていてもよい（多くの残基は溶媒露出されており、抗原接触を持たないため、多くの置換が想定される）。再度、一部の実施形態では、上記の残基を固定し、他の残基を以下の表に従って置換してもよい：他の実施形態では、任意の残基の置換を、以下の表に従って行ってもよい。

30

40

50

WolfGuy	Kabat	AA	置換
751	89	L	A, V, Q
752	90	G	A
753	91	G	
754	92	Y	A, D, E, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, V
755	93	D	A, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
756	94	D	A, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
794	95	E	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
795	95A	S	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
796	95B	D	A, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y
797	95C	T	S
798	96	Y	F, H, R
799	97	G	A, E, I, K, L, M, N, Q, S, T, V

10

20

【0200】

抗体はさらに、必要に応じて、それぞれ、配列番号1もしくは配列番号5の配列を有するCDR-H1およびCDR-L2、またはそれと比較して少なくとも1、2、もしくは3個の置換、必要に応じて、保存的置換を有するそのバリエーションを含んでもよい。

30

【0201】

上記実施形態のいずれかにおいて、抗Pb-DOTAM抗体は、ヒト化されていてもよい。一実施形態では、抗Pb-DOTAM抗体は、上記実施形態のいずれかにおけるようなCDRを含み、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。別の実施形態では、抗Pb-DOTAM抗体は、上記実施形態のいずれかにおけるようなCDRを含み、vk 139および／またはvh 226に由来するフレームワーク領域をさらに含む。vk 139について、一部の実施形態では、復帰突然変異が存在しなくてもよい。vh 226について、生殖系列Ala49残基は、Gly49に復帰突然変異しなくてもよい。

40

【0202】

必要に応じて、抗原結合部位は、配列番号7および配列番号9からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、または配列番号7もしくは配列番号9に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーションを含んでもよい。ある特定の実施形態では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVH配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗体は、好ましくは、本明細書に記載のような親和性で、Pb-DOTAMに結合する能力を保持する。VH配列

50

は、上記のようなインバリエントな残基を保持してもよい。ある特定の実施形態では、配列番号7または配列番号9において、合計1～10個のアミノ酸が置換、挿入および／または欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、CDR外の領域（すなわち、FR）に存在する。必要に応じて、抗体は、配列番号7または配列番号9中のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、VHは、（a）配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR-H1；（b）配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR-H2；および（c）配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される1、2または3つのCDRを含む。

【0203】

別の態様では、抗体が、配列番号8または配列番号10のアミノ酸配列に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（VL）を含む、抗Pb-DOTAM抗体が提供される。ある特定の実施形態では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVL配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗Pb-DOTAM抗体は、好ましくは、本明細書に記載のような親和性で、Pb-DOTAMに結合する能力を保持する。VL配列は、上記のようなインバリエントな残基を保持してもよい。ある特定の実施形態では、配列番号8または配列番号10において、合計1～10個のアミノ酸が置換、挿入および／または欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、CDR外の領域（すなわち、FR）に存在する。必要に応じて、抗Pb-DOTAM抗体は、配列番号8または配列番号10中のVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、VLは、（a）配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-L1；（b）配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および（c）配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される1、2または3つのCDRを含む。

【0204】

別の態様では、抗体が、上に提供された実施形態のいずれかに記載のようなVHと、上に提供された実施形態のいずれかに記載のようなVLとを含む、抗Pb-DOTAM抗体が提供される。一実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号7および配列番号8のVHおよびVL配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。別の実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号9および配列番号10のVHおよびVL配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0205】

本発明のさらなる態様では、上記実施形態のいずれかに記載の抗体は、キメラ、ヒト化またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一実施形態では、抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFab、scFv、ダイアボディ、またはF(ab')₂断片である。抗体断片としては、限定されるものではないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、およびscFv断片、ならびに以下に記載される他の断片が挙げられる。ある特定の抗体断片の概説については、Hudsonら、Nat. Med. 9:129～134頁（2003）を参照されたい。scFv断片の概説については、例えば、Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、vol. 113、RosenburgおよびMoore（編）、（Springer-Verlag、New York）、269～315頁（1994）を参照されたい；また、WO93/16185；ならびに米国特許第5,571,894号および第5,587,458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、in vivoでの半減期が増大したFabおよびF(ab')₂断片の考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

【0206】

ダイアボディは、二価または二重特異性であってよい2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、EP404,097；WO1993/01161；Hudsonら

10

20

30

40

50

【 0 2 0 7 】

【 0 2 0 8 】

【 0 2 0 9 】

【0 2 1 0】

【 0 2 1 1 】

【 0 2 1 2 】

【 0 2 1 3 】

本発明が治療方法および治療方法における使用のための生成物に関する限り、それは、患者の疾患細胞に標的化される細胞傷害活性によって治療可能である任意の状態に適用可能である。治療は、好ましくは、腫瘍またはがん（例えば、膵臓がん、乳がんまたは前立腺がん）のものである。しかしながら、本発明の適用可能性は、腫瘍およびがんに限定されない。例えば、治療はまた、ウイルス感染のものであってもよい。感染細胞の表面上に発現されるウイルス抗原に対するイムノトキシンが、HIV、狂犬病およびEBVなどの様々なウイルス感染について精査されている。CaiおよびBerger 2011 Antiviral Research 90 (3) : 143~50頁は、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスに感染した細胞の標的化された殺傷のためにPE38を含有するイムノトキ

シンを使用した。さらに、Resimmune（登録商標）（A-dmDT390-bisFv（UCHT1））は、ヒト悪性T細胞を選択的に殺傷し、正常T細胞を一過的に枯渇させ、多発性硬化症および移植片対宿主疾患などのT細胞誘導性自己免疫疾患、ならびに臨床試験を受けているT細胞血液がんの治療のための潜在能力を有すると考えられる。

【0214】

かくして、好適な標的抗原は、がん細胞抗原、特に、ヒトがん細胞抗原、ウイルス抗原または微生物抗原を含んでもよい。

【0215】

本明細書に記載の標的抗原は、腫瘍細胞などの疾患細胞に、その細胞表面抗原を介して結合するように設計される。抗原は、通常、過剰発現される、または異常な時間に発現される正常細胞表面抗原である。理想的には、標的抗原は、疾患細胞（腫瘍細胞など）上でのみ発現されるが、これが実際に観察されるのは稀である。結果として、標的抗原は通常、疾患組織と健康な組織との間での示差的発現に基づいて選択される。

【0216】

かくして、標的抗体は、任意の好適な細胞表面マーカーに特異的に結合することができる。特定のターゲティング部分および／または細胞表面マーカーの選択は、標的化される特定の細胞集団に応じて選択することができる。細胞表面マーカーは、当業界で公知であり（例えば、Mufsonら、Front. Biosci.、11：337～43頁（2006）；Frankelら、Clin. Cancer Res.、6：326～334頁（2000）；およびKreitmanら、AAPS Journal、8（3）：E532～E551頁（2006）を参照されたい）、例えば、タンパク質または炭水化物であってもよい。本発明の実施形態では、ターゲティング部分（細胞結合剤）は、細胞表面上の受容体に特異的に結合するリガンドである。例示的なリガンドとしては、限定されるものではないが、血管内皮増殖因子（VEGF）、Fas、TNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）、サイトカイン（例えば、IL-2、IL-15、IL-4、IL-13）、リンホカイン、ホルモン、および増殖因子（例えば、トランスフォーミング増殖因子（TGfα）、神経成長因子、上皮増殖因子）が挙げられる。

【0217】

細胞表面マーカーは、例えば、腫瘍関連抗原であってもよい。

【0218】

本明細書で使用される場合、用語「腫瘍関連抗原」または「腫瘍特異的抗原」とは、抗原が腫瘍および／またはがんに関連するような、腫瘍細胞および／またはがん細胞によって専ら、もしくは主に発現される、または過剰発現される任意の分子（例えば、タンパク質、ペプチド、脂質、炭水化物など）を指す。腫瘍関連抗原はさらに、正常な、非腫瘍、または非がん性細胞によって発現されてもよい。しかしながら、そのような場合、正常な、非腫瘍、または非がん性細胞による腫瘍関連抗原の発現は、腫瘍またはがん細胞による発現ほどロバストではない。これに関して、腫瘍またはがん細胞は、抗原を過剰発現するか、または正常な、非腫瘍、もしくは非がん性細胞による抗原の発現と比較して、有意に高いレベルで抗原を発現することができる。また、腫瘍関連抗原はさらに、発生または成熟の異なる段階の細胞によって発現されてもよい。例えば、腫瘍関連抗原はさらに、成体宿主には通常見出されない、胚段階または胎児段階の細胞によって発現されてもよい。あるいは、腫瘍関連抗原はさらに、成体宿主には通常見出されない、幹細胞または前駆細胞によって発現されてもよい。

【0219】

腫瘍関連抗原は、本明細書に記載のがんおよび腫瘍を含む、任意のがんまたは腫瘍の任意の細胞によって発現される抗原であってもよい。腫瘍関連抗原は、腫瘍関連抗原が、ただ1つの型のがんまたは腫瘍と関連するか、またはそれに特徴的であるような、ただ1つの型のがんまたは腫瘍の腫瘍関連抗原であってもよい。あるいは、腫瘍関連抗原は、1つより多い型のがんまたは腫瘍の腫瘍関連抗原であってもよい（例えば、それに特徴的であってもよい）。例えば、腫瘍関連抗原は、乳がん細胞と前立腺がん細胞の両方によって発現

され、正常な、非腫瘍、または非がん細胞によっては全く発現されなくてもよい。

【0220】

細胞結合剤が特異的に結合することができる例示的な腫瘍関連抗原としては、限定されるものではないが、ムチン1 (MUC1; 腫瘍関連上皮ムチン)、優先的に発現される黒色腫抗原 (PRAME)、がん胎児性抗原 (CEA)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、PSCA、EpCAM、Trop2、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子受容体 (GM-CSFR)、CD56、ヒト上皮増殖因子受容体2 (HER2/neu) (erbB-2としても知られる)、CDS、CD7、チロシナーゼ関連タンパク質 (TRP) I、およびTRP2が挙げられる。好ましい実施形態では、ターゲティング部分 (細胞結合剤) が特異的に結合する細胞表面マーカーは、分化抗原群 (CD) 19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD30、CD33 (シアル酸結合Ig様レクチン3、骨髓細胞表面抗原)、CD79b、CD123 (インターロイキン3受容体アルファ)、トランスフェリン受容体、EGF受容体、メソテリン、カドヘリン、Lewis Y、グリピカン-3、FAP (線維芽細胞活性化タンパク質アルファ)、PSMA (前立腺特異的膜抗原)、CA9=CAIX (炭酸脱水酵素IX)、L1CAM (神経細胞接着分子L1)、エンドシアリン、HER3 (上皮増殖因子受容体ファミリーメンバー3の活性化コンフォメーション)、Alk1/BMP9複合体 (未分化リンパ腫キナーゼ1/骨形成タンパク質9)、TPBG=5T4 (トロホブラスト糖タンパク質)、ROR1 (受容体チロシンキナーゼ様表面抗原)、HER1 (上皮増殖因子受容体の活性化コンフォメーション)、およびCLL1 (C型レクチンドメインファミリー12、メンバーA) からなる群から選択される。メソテリンは、例えば、卵巣がん、中皮腫、非小細胞肺癌、肺腺癌、ファローピウス管がん、頭頸部がん、子宮頸がん、および膵臓がんにおいて発現される。CD22は、例えば、毛様細胞性白血病、慢性リンパ性白血病 (CLL)、前リンパ球性白血病 (PLL)、非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫 (SLL)、および急性リンパ性白血病 (ALL) において発現される。CD25は、例えば、毛様細胞性白血病およびホジキンリンパ腫を含む、白血病およびリンパ腫において発現される。Lewis Y抗原は、例えば、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、結腸直腸がん、食道がん、胃がん、肺がん、および膵臓がんにおいて発現される。CD33は、例えば、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性骨髓単球性白血病 (CMML)、および骨髓増殖性疾患において発現される。

【0221】

本発明の実施形態では、ターゲティング部分は、標的、例えば、腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体 (抗体断片を含む) である。そのような実施形態では、薬剤は、二重特異性または多重特異性抗体と呼んでもよい。

【0222】

腫瘍関連抗原に特異的に結合する例示的な抗体としては、限定されるものではないが、トランスフェリン受容体に対する抗体 (例えば、HB21およびそのバリエーション)、CD22に対する抗体 (例えば、RFB4およびそのバリエーション)、CD25に対する抗体 (例えば、抗Tacおよびそのバリエーション)、メソテリンに対する抗体 (例えば、SS1、MORAb-009、SS、HN1、HN2、MN、MB、およびそのバリエーション) およびLewis Y抗原に対する抗体 (例えば、B3およびそのバリエーション) が挙げられる。これに関して、ターゲティング部分 (細胞結合剤) は、ofB3、RFB4、SS、SS1、MN、MB、HN1、HN2、HB21、およびMORAb-009からなる群から選択される抗体、ならびにその抗原結合性部分であってもよい。本発明のキメラ分子における使用にとって好適なさらなる例示的なターゲティング部分は、例えば、米国特許第5,242,824号 (抗トランスフェリン受容体); 第5,846,535号 (抗CD25抗体); 第5,889,157号 (抗Lewis Y抗体); 第5,981,726号 (抗Lewis Y抗体); 第5,990,296号 (抗Lewis Y抗体); 第7,081,518号 (抗メソテリン抗体); 第7,355,012号 (抗CD22抗体および抗CD25抗体); 第7,368,110号 (抗メソテリン抗体); 第7,470,775号 (抗CD30抗体); 第7,521,054号 (抗CD25抗体); および第7,

10

20

30

40

50

541, 034号(抗CD22抗体); 米国特許出願公開第2007/0189962号(抗CD22抗体); Frankelら、Clin. Cancer Res.、6:326~334頁(2000)、ならびにKreitmanら、AAPS Journal、8(3):E532~E551頁(2006)(それぞれ、参照により本明細書に組み込まれる)に開示されている。

【0223】

Cripto、CD30、CD19、CD33、糖タンパク質NMB、CanAg、Her2(ErbB2/Neu)、CD56(NCAM)、CD22(Siglec2)、CD33(Siglec3)、CD79、CD138、PSCA、PSMA(前立腺特異的膜抗原)、BCMA、CD20、CD70、E-セレクトイン、EphB2、メラノトランスフェリン、Muc16およびTMEEF2などの特異的腫瘍関連抗原を標的化するための抗体を生じさせてきた。

10

【0224】

本発明の一部の実施形態では、腫瘍関連抗原はがん胎児性抗原(CEA)であることが好ましい場合がある。CEAは、ヒトCEA、特に、UniProt(www.uniprot.org)受託番号P06731(バージョン119)、またはNCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/)RefSeq NP_004354.2に示される、がん胎児性抗原関連細胞接着分子5(CEACAM5)のアミノ酸配列を有してもよい。CEAに対して生じさせてきた抗体としては、WO2016/075278A1および/またはWO2017/055389に記載されたT84.66-LCHA、CH1A1a、WO2011/034660に記載された抗CEA抗体、ならびに以下の表2に記載されるCEA hMN-14(米国特許第6,676,924号および米国特許第5,874,540号も参照されたい)などの、T84.66ならびにそのヒト化およびキメラバージョンが挙げられる。

20

【0225】

CEAは、比較的ゆっくりと内在化され、かくして、高いパーセンテージの抗体が、放射性核種への結合のために、初期処理後に細胞の表面上で利用可能なままであるため、本発明の文脈において有利である。他の低内在化標的/腫瘍関連抗原も好ましい。例えば、一部の実施形態では、腫瘍関連抗原は、CD20またはHER2であってもよい。GenBank受託番号:NP_001005862、NP_004439、XP_005257196、およびXP_005257197は、2013年10月4日にGenBankによって提供された、Her2タンパク質配列を開示し、SwissProtデータベース登録番号P11836は、CD20配列を開示している。さらなる実施形態では、標的は、EGP-1(トロホブラスト-2としても知られる、上皮糖タンパク質-1)、結腸特異的抗原-p(CSAP)または膵臓ムチンMUC1であってもよい。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Goldenbergら、2012(Theranostics 2(5))を参照されたい。この参考文献はまた、CSAPに結合するMu-9(Sharkeyら、Cancer Res. 2003;63:354~63頁も参照されたい)、MUC1に結合するhPAM4(Goldら、Cancer Res. 2008:68:4819~26頁も参照されたい)、CD20に結合するバルツズマブ(Sharkeyら、Cancer Res. 2008;68:5282~90頁も参照されたい)およびEGP-1に結合するhRS7(Cubasら、Biochim Biophys Acta 2009;1796:309~14頁も参照されたい)などの抗体も記載している。これらの抗体、またはその抗原結合性部分はいずれも、本発明において有用であってよい、すなわち、本明細書に記載の抗体に組み込むことができる。

30

40

【0226】

多重特異性抗体

上で考察されたように、ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。二重特異性抗体を、完全

50

長抗体または抗体断片として調製することができる。

【0227】

近年、様々な組換え抗体形式、例えば、IgG抗体形式および単鎖ドメインの融合による四価二重特異性抗体（例えば、Coloma, M. J. ら、Nature Biotech 15 (1997) 159～163頁；WO2001/077342；およびMorrisson, S. L.、Nature Biotech 25 (2007) 1233～1234頁を参照されたい）が開発されてきた。

【0228】

また、2つ以上の抗原に結合することができる、ダイアボディ、トリアボディまたはテトラボディ、ミニボディ、いくつかの単鎖形式（scFv、ビス-scFv）などの、抗体コア構造（IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgM）がもはや保持されない他の新しい形式も開発されている（Holliger, P. ら、Nature Biotech 23 (2005) 1126～1136頁；Fischer, N.、Leger, O.、Pathobiology 74 (2007) 3～14頁；Shen, J. ら、Journal of Immunological Methods 318 (2007) 65～74頁；Wu, C. ら、Nature Biotech. 25 (2007) 1290～1297頁）。

【0229】

そのような形式は全て、抗体コア（IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgM）を、さらなる結合タンパク質（例えば、scFv）に融合させる、または例えば、2つのFab断片もしくはscFv（Fischer, N.、Leger, O.、Pathobiology 74 (2007) 3～14頁）を融合させるリンカーを使用する。当業者であれば、天然に存在する抗体に対する高い程度の類似性を維持することによって、Fc受容体結合により媒介される、例えば、補体依存性細胞傷害（CDC）または抗体依存性細胞傷害（ADCC）などの、エフェクター機能を保持することを望むことができることに留意しなければならない。

【0230】

WO2007/024715では、操作された多価および多重特異性結合タンパク質として、二重可変ドメイン免疫グロブリンが報告されている。生物活性抗体ダイマーの調製のためのプロセスが、米国特許第6,897,044号に報告されている。ペプチドリンカーを介して互いに連結される少なくとも4つの可変ドメインを有する多価Fv抗体コンストラクトが、米国特許第7,129,330号に報告されている。二量体および多量体抗原結合構造が、US2005/0079170号に報告されている。タンパク質が天然の免疫グロブリンではない接続構造によって互いに共有的に結合する3つまたは4つのFab断片を含む三価または四価単一特異性抗原結合タンパク質が、米国特許第6,511,663号に報告されている。WO2006/020258では、原核および真核細胞中で効率的に発現させることができ、治療および診断方法において有用である四価二重特異性抗体が報告されている。2つの型のポリペプチドダイマーを含む混合物に由来する少なくとも1つの鎖間ジスルフィド結合によって連結されないダイマーに由来する少なくとも1つの鎖間ジスルフィド結合によって連結されるダイマーを分離するか、または優先的に合成する方法は、US2005/0163782に報告されている。二重特異性四価受容体が、米国特許第5,959,083号に報告されている。3つ以上の機能的な抗原結合部位を有する操作された抗体が、WO2001/077342に報告されている。

【0231】

多重特異性および多価抗原結合ポリペプチドが、WO1997/001580に報告されている。WO1992/004053は、典型的には、合成架橋剤によって共有的に連結される同じ抗原決定基に結合するIgGクラスモノクローナル抗体から調製されるホモコンジュゲートを報告している。抗原に対する高いアビディティを有するオリゴマーモノクローナル抗体が、WO1991/06305に報告されており、それによって、典型的には、一緒になって結合して、四価または六価IgG分子を形成する2つ以上の免疫グ

10

20

30

40

50

ロブリンモノマーを有するIgGクラスのオリゴマーが分泌される。ヒツジ由来抗体および操作された抗体コンストラクトが、米国特許第6,350,860号に報告されており、これを使用して、インターフェロンガンマ活性が病原性である疾患を治療することができる。US2005/0100543では、二重特異性抗体の多価担体である標的化可能なコンストラクト、すなわち、標的化可能なコンストラクトの各分子が、2つ以上の二重特異性抗体の担体として働くことができる、標的化可能なコンストラクトが報告されている。遺伝子操作された二重特異性四価抗体が、WO1995/009917に報告されている。WO2007/109254では、安定化されたscFvからなる、またはそれを含む安定化された結合分子が報告されている。

【0232】

また、同じ抗原特異性の1つまたは複数の結合アームにドメインクロスオーバーを有する非対称形態で、すなわち、VH/VLドメイン（例えば、WO2009/080252およびWO2015/150447を参照されたい）、CH1/CLドメイン（例えば、WO2009/080253を参照されたい）または完全なFabアーム（例えば、WO2009/080251、WO2016/016299を参照されたい、また、Schaeferら、PNAS、108（2011）1187～1191頁、およびKleinら、MAbs 8（2016）1010～20頁も参照されたい）を交換することにより、多重特異性抗体を提供することもできる。一態様では、多重特異性抗体は、交差Fab断片を含む。用語「交差Fab断片」または「xFab断片」または「クロスオーバーFab断片」とは、重鎖および軽鎖の可変領域または定常領域のいずれかが交換されるFab断片を指す。交差Fab断片は、軽鎖可変領域（VL）と重鎖定常領域1（CH1）とから構成されるポリペプチド鎖、および重鎖可変領域（VH）と軽鎖定常領域（CL）とから構成されるポリペプチド鎖を含む。荷電または非荷電アミノ酸突然変異を、ドメイン接触面に導入して、正確なFabペアリングを指向させることによって、非対称性Fabアームを操作することもできる。例えば、WO2016/172485を参照されたい。

【0233】

上記形式はいずれも、本発明による多重特異性抗体のために使用することができる。

【0234】

1つの例示的な形式では、二重特異性抗体は、例えば、WO214/180754に記載されたような「トリマライザー」である。これは、ヒト軟骨マトリックスタンパク質（CMP）に由来する三量体化ドメインに融合された少なくとも1つの抗原結合部分をそれぞれ含み、前記三量体化ドメインが、三量体抗原結合分子の安定な結合を媒介することができる、3つの融合ポリペプチドを含む三量体抗原結合分子を指す。抗原結合部分は、例えば、Fab分子、クロスオーバーFab分子、scFab、Fv分子、scFv、または単ドメイン抗体（VHH）であってもよい。一部の実施形態では、融合タンパク質はそれぞれ、例えば、両方とも必要に応じて、ペプチドリンカーを介して、第1の抗原結合部分が、前記三量体化ドメインのN末端アミノ酸に融合されており、第2の抗原結合部分が、前記三量体化ドメインのC末端アミノ酸に融合されている、2つ（第1および第2）の抗原結合部分を含む。この形式では、第1または第2の抗原結合部分のいずれかは、Pb-DOTAMキレートに結合することができる。その他方は、標的抗原、例えば、腫瘍関連抗原に結合するであろう。C末端に融合されている3つの抗原結合分子はそれぞれ、同じ抗原に特異的であってもよい；N末端に融合されている3つの抗原結合分子はそれぞれ、他の抗原に特異的であってもよい。

【0235】

本明細書において有用なCMP三量体化ドメインは、以下に示されるヒト軟骨タンパク質に由来しており、一実施形態では、以下に示される三量体化ドメインの配列に対する少なくとも95%の同一性および最も好ましくは、少なくとも98%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、前記三量体化ドメインは、前記三量体化ドメインの配列を含む。

【0236】

10

20

30

40

50

ヒト軟骨タンパク質の配列 (496aa)

MRVLSGTSML LCSLLLLLQA LCSPGLAPQS RGHLCRTRPT DLVFVVDSSR
SVRPVEFEKV KVFLSQVIES LDVGNATRV GMVNYASTVK QEFSLRAHVS
KAALLQAVRR IQPLSTGTMT GLAIQFAITK AFGDAEGGRS RSPDISKVVI
VVTDGRPQDS VQDVSARARA SGVELFAIGV GSVDKATLRQ IASEPQDEHV
DYVESYSVIE KLSRKFEAF CVVSDLCATG DHDCEQVCIS SPGSYTCACH
EGFTLNSDGK TCNVCSGGGG SSATDLVFLI DGSKSVRPEN FELVKKFISQ
IVDTLDVSDK LAQVGLVQYS SSVRQEFPLG RFHTKKDIKA AVRNMSYMEK
GTMTGAALKY LIDNSFTVSS GARPGAQKVG IVFTDGRSQD YINDAAKKAK
DLGFKMFAVG VGNAVEDEL R EIASEPVAEH YFYTADFKTI NQIGKKLQKK
ICVEEDPCAC ESLVKFQAKV EGLLQALTRK LEAVSKRLAI LENTVV

10

三量体化ドメインの例示的配列 (39aa)

CACESLVKFQ AKVEGLLQAL TRKLEAVSKR LAILENTVV

【0237】

別の例示的な形式は、二重特異性または多重特異性抗体は、第1および第2の抗体重鎖と、第1および第2の抗体軽鎖とを含む完全長抗体（例えば、IgG）であって、第1の重鎖と第1の軽鎖とが集合して、第1の抗原のための抗原結合部位を形成し、第2の重鎖と第2の軽鎖とが集合して、第2の抗原のための抗原結合部位を形成する、完全長抗体を含む。

20

【0238】

ヘテロ二量体重鎖の正確な集合を、例えば、ノブ・イントゥー・ホール突然変異および／または以下でさらに考察される他の修飾の使用によって支援することができる。

【0239】

軽鎖と、それぞれの対応する重鎖との正確な集合を、交差mab技術によって支援することができる。この手法では、第1の重鎖と第1の軽鎖、または第2の重鎖と第2の軽鎖は、集合して交差Fab断片を形成することができる（その一方、その他は集合して従来のFabを形成する）。かくして、一実施形態では、第1の重鎖は、VHドメインの代わりにVLドメインを含んでもよく（例えば、VL-CH1-ヒンジ-CH2-CH3）、第1の軽鎖は、VLドメインに交換されたVHドメイン（例えば、VH-CL）を含んでもよく、または第1の重鎖は、HC1ドメインの代わりにCLドメインを含んでもよく（例えば、VH-CL-ヒンジ-CH2-CH3）、第1の軽鎖は、CLドメインの代わりにCH1ドメインを含んでもよい（例えば、VL-CH1）。この実施形態では、第2の重鎖および第2の軽鎖は、従来のドメイン構造（例えば、それぞれ、VH-CH1-ヒンジ-CH2-CH3およびVL-CL）を有する。代替的な実施形態では、第2の重鎖は、VHドメインの代わりにVLドメインを含んでもよく（例えば、VL-CH1-ヒンジ-CH2-CH3）、第2の軽鎖は、VLドメインに交換されたVHドメイン（例えば、VH-CL）を含んでもよく、または第2の重鎖は、HC1ドメインの代わりにCLドメインを含んでもよく（例えば、VH-CL-ヒンジ-CH2-CH3）、第2の軽鎖は、CLドメインの代わりにCH1ドメインを含んでもよい（例えば、VL-CH1）。この実施形態では、第1の重鎖および第1の軽鎖は、従来のドメイン構造を有する。

30

40

【0240】

一部の実施形態では、軽鎖と、その対応する重鎖との正確な集合は、さらに、またはあるいは、以下に考察されるような電荷修飾を使用することによって支援することができる。

【0241】

1つのそのような抗体は、P1AE1768として図37に示される。ここで、第2の重鎖は、HC1ドメインの代わりにCLドメインを含み（例えば、VH-CL-ヒンジ-CH2-CH3）、第2の軽鎖は、CLドメインの代わりにCH1ドメインを含む（例えば、VL-CH1）；第1の重鎖および第1の軽鎖は、従来のドメイン構造を有する。従

50

来の構造を有する F a b は、電荷修飾を含む。かくして、一実施形態では、本発明の抗体は、それぞれ、配列番号 59 および配列番号 58 の第 1 および第 2 の重鎖、ならびにそれぞれ、配列番号 57 および配列番号 60 の第 1 および第 2 の軽鎖を含む。

【0242】

上記形式の一部の実施形態では、形式は、二価であってもよい。別の可能な実施形態では、さらなる抗原結合部分を、例えば、第 1 および／または第 2 の重鎖に融合して、一方または両方の抗原の価数を増加させることができる。例えば、第 1 の抗原のためのさらなる抗原結合部分を、重鎖分子の一方または両方の N 末端に融合することができる。抗体は、第 1 の抗原（例えば、腫瘍関連抗原）について、多価、例えば、二価であってもよく、第 2 の抗原（例えば、D O T A M－キレート化された P b）について一価であってもよい。

10

【0243】

さらなる抗原結合部分は、例えば、第 1 の抗原（例えば、腫瘍関連抗原）のための抗原結合部位を含む、例えば、s c F a b であってもよい。s c F a b は、単鎖として発現されるように、V L および C L ドメインの代わりドメインにポリペプチドリinker によって連結された、V H および C H 1 ドメインを含む。換言すれば、s c F a b は、F d と軽鎖との間のポリペプチドリinker を含む。

【0244】

別の実施形態では、さらなる抗原結合部分は、F a b または交差 F a b である。例えば、一方の重鎖の N または C 末端を、V L および C L ドメインからなる第 2 のポリペプチドと会合して、F a b を形成する、V H ドメインおよび C H 1 ドメインからなる第 1 のポリペプチドに、ポリペプチドリinker によって連結することができる。別の実施形態では、一方の重鎖の N または C 末端を、V H および C L ドメインからなる第 2 のポリペプチドと会合する、V L ドメインおよび C H 1 ドメインからなる第 1 のポリペプチドに、ポリペプチドリinker によって連結することができる。別の実施形態では、一方の重鎖の N または C 末端を、V L および C H 1 ドメインからなる第 2 のポリペプチドと会合する、V H ドメインおよび C L ドメインからなる第 1 のポリペプチドに、ポリペプチドリinker によって連結することができる。

20

【0245】

この形式では、同じ抗原特異性の結合アームが同じ軽鎖との結合によって形成されることが好ましい場合がある。かくして、第 1 の抗原のための抗原結合部分／アームは交差 F a b であってもよく、第 2 の抗原のための抗原結合部分／アームは従来の F a b であってもよい。あるいは、第 1 の抗原のための抗原結合部分／アームは従来の F a b であってもよく、第 2 の抗原のための抗原結合部分／アームは交差 F a b であってもよい。

30

【0246】

この形式はまた、以下でさらに考察されるように、電荷修飾を含んでもよい。

【0247】

この形式の一実施形態では、

第 1 および第 2 の抗体重鎖と、第 1 および第 2 の抗体軽鎖とを含む完全長抗体であって、第 1 の重鎖と第 1 の軽鎖とが集合して、第 1 の抗原（例えば、腫瘍特異的抗原、例えば、C E A）のための抗原結合部位を含む F a b を形成し、第 2 の重鎖と第 2 の軽鎖とが集合して、第 2 の抗原（例えば、D O T A M－キレート化された P b）のための抗原結合部位を含む交差 F a b を形成し（例えば、第 2 の重鎖が V H ドメインの代わりに V L ドメインを有し、第 2 の軽鎖が V L ドメインの代わりに V H ドメインを有する）；

40

第 1 または第 2 の抗体重鎖のいずれかが、リンカーを介して、C H 1 および V H ドメインを含むポリペプチドに融合されており、第 1 および第 2 のポリペプチドが集合して、第 1 の抗原のための抗原結合部位を含む F a b を形成するように、前記第 1 のポリペプチドが、C L および V L を含む第 2 のポリペプチドと集合する、完全長抗体を含む多価抗体が提供される。

【0248】

融合は、完全長抗体の重鎖の一方、必要に応じて、第 2 の重鎖の N 末端にあってもよい。

50

【0249】

必要に応じて、電荷修飾を使用することもできる。例えば、第1の抗原のための抗原結合部位を含むFabは、以下に考察されるように、電荷修飾置換を含んでもよい。

【0250】

そのような形式の例は、図37に示されるP1AE1769である。かくして、一実施形態では、本発明の抗体は、それぞれ、配列番号64および配列番号63の第1および第2の重鎖、ならびにそれぞれ、配列番号62および配列番号61の第1および第2の軽鎖を含む。

【0251】

別の例示的な形式は、第2の抗原のための抗原結合部分に連結された、第1の抗原のための抗原結合部位（例えば、第1の抗原について二価であってもよい）を含むIgGなどの完全長抗体を含む。

10

【0252】

例えば、第2の抗原のための抗原結合部分は、第2の抗原（例えば、Pb-DOTALキレート）のための抗原結合部位を含むscFabであってもよい。一部の実施形態では、scFabを、完全長抗体の2つの重鎖の一方のC末端、例えば、そのCH3ドメインのC末端に融合することができる。ヘテロ二量体重鎖の正確な集合を、例えば、ノブ・イントゥー・ホール突然変異および／または以下でさらに考察される他の修飾の使用によって支援してもよい。1つのそのような抗体は、P1AE1770として図37に例示される。かくして、一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号66および配列番号67の重鎖と、配列番号65の軽鎖とを含む。

20

【0253】

別の例示的な形式は、第1の抗原のための抗原結合部位（例えば、第1の抗原について二価であってもよい）を含む完全長抗体であって、重鎖の一方のNまたはC末端が、ポリペプチドリinkerを介して、第1のポリペプチドに連結されており、第1のポリペプチドが第2のポリペプチドと会合して、第2の抗原のための結合部位を含むFabまたは交差Fabを形成する、完全長抗体を含む。例えば、この形式は、第1および第2のポリペプチドが、一緒になって、第2の抗原のための抗原結合部位を形成するような、

i) VLおよびCLドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VHドメインおよびCH1ドメインからなる第1のポリペプチド；または

30

ii) VHおよびCLドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VLドメインおよびCH1ドメインからなる第1のポリペプチド；または

iii) VLおよびCH1ドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VHドメインおよびCLドメインからなる第1のポリペプチドを含んでもよい。

【0254】

ヘテロ二量体重鎖の正確な集合を、例えば、ノブ・イントゥー・ホール突然変異および／または以下でさらに考察される他の修飾の使用によって支援してもよい。例えば、完全長抗体のFabドメインは、電荷修飾を含んでもよい。

【0255】

40

一実施形態では、第1のポリペプチドは、ポリペプチドリinkerを介して、重鎖の一方のC末端に、例えば、そのCH3ドメインのC末端に連結される。第1のポリペプチドは、N末端VLドメインと、C末端CH1ドメインとを含んでもよい。かくして、融合物を有する重鎖は、N末端からC末端に向かって、VH-CH1-ヒンジーCH2-CH3-リンカー-VL-CH1を含んでもよい。軽鎖は、VH-CLを含んでもよい。完全長抗体のFabは、電荷修飾置換を含んでもよい。1つのそのような抗体は、P1AE1767として図37に示される。かくして、一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号63および配列番号64の重鎖と、配列番号61および配列番号62の軽鎖とを含む。

【0256】

別の実施形態では、第1のポリペプチドは、ポリペプチドリinkerを介して、重鎖のV

50

HドメインのN末端に連結される。第1のポリペプチドは、N末端V Lドメインと、C末端C H 1ドメインとを含んでもよい。かくして、融合物を有する重鎖は、N末端からC末端に向かって、V L－C H 1－リンカー－V H－C H 1－ヒンジーC H 2－C H 3を含んでもよい。軽鎖は、V H－C Lを含んでもよい。

【0257】

別の例示的な形式では、抗体は、第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなり、それぞれの重鎖のC末端が、第2の抗原に特異的に結合する抗原結合部分に融合されている、完全長抗体を含んでもよい。

【0258】

一実施形態では、第1の抗原は標的、例えば、腫瘍特異的抗原であり、第2の抗原はP b－D O T A Mキレートであるが、これらのものは逆であってもよい。

【0259】

別の例示的な形式では、抗体は、

a) 第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長抗体；

b)

i) 抗体重鎖可変ドメイン (V H) ；または

i i) 抗体重鎖可変ドメイン (V H) および抗体重鎖定常ドメイン (C H 1) ；または

i i i) 抗体重鎖可変ドメイン (V H) および抗体軽鎖定常ドメイン (C L)

からなるポリペプチドであって、

V HドメインのN末端が、ペプチドリナーを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の一方のC末端に融合されているポリペプチド；

c)

i) 抗体軽鎖可変ドメイン (V L) ；または

i i) 抗体軽鎖可変ドメイン (V L) および抗体軽鎖定常ドメイン (C L) ；または

i i i) 抗体軽鎖可変ドメイン (V L) および抗体重鎖定常ドメイン (C H 1)

からなるポリペプチドであって、

V LドメインのN末端が、ペプチドリナーを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の他方のC末端に融合されているポリペプチド

を含み；

(b) の下のペプチドの抗体重鎖可変ドメインおよび (c) の下のペプチドの抗体軽鎖可変ドメインが、一緒になって第2の抗原への抗原結合部位を形成する、二重特異性抗体であってもよい。

【0260】

この形式では、第1のポリペプチドがb (i) に記載のものである場合、第2のポリペプチドはc (i) に記載のものである；第1のポリペプチドがb (i i) に記載のものである場合、第2のポリペプチドはc (i i) に記載のものである；および第1のポリペプチドがb (i i i) に記載のものである場合、第2のポリペプチドはc (i i i) に記載のものである。電荷修飾置換を、例えば、完全長抗体のF a bにおいて使用することもできる。

【0261】

この形式では、第1または第2の抗原は、D O T A M－キレート化されたP bであってもよい。他方は、標的、例えば、腫瘍関連抗原、例えば、C E A、C D 2 0またはE R B B 2であってもよい。一部の実施形態では、第2の抗原はD O T A M－キレート化されたP bであり、第1の抗原は標的である。

【0262】

上記の抗体は、三価であってもよい。別のあり得る実施形態では、さらなる抗原結合部分を融合させて、一方または両方の抗原に関する価数を増加させることができる。例えば、抗体が、第1の抗原について4の価数を有し（それが両方の重鎖のカルボキシ末端に融合される場合）、第2の抗原について1の価数を有するように、例えば、第1の抗原のた

10

20

30

40

50

めのさらなる抗原結合部分を、完全長抗体（例えば、腫瘍関連抗原）の重鎖のいずれかまたは両方のカルボキシ末端に融合させてもよい。

【0263】

(b)の抗体がVHドメインからなり、(c)の抗体がVLドメインからなる上記形式の例は、PRIIT-213およびPRIIT214である。(b)がVHドメインおよびCLドメインからなり、(c)がVLドメインおよびCH1ドメインからなる上記形式の例は、図37に示されるようなP1AE1766である。かくして、一実施形態では、本発明の抗体は、それぞれ、配列番号51および配列番号52の第1および第2の重鎖と、配列番号50の軽鎖とを含む。

【0264】

必要に応じて、本発明の多重特異性抗体のために使用される形式は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、WO2010/115589A1 (Roche Glycart AG)に記載されたような三価形式であってもよい。

【0265】

WO2010/115589は、構造の任意の安定化を記載し、それにより、(b)の下ポリペプチドの抗体重鎖可変領域(VH)と、(c)の下ポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(VL)とが連結されており、鎖間ジスルフィド架橋によって、例えば、以下の位置：

i) 重鎖可変ドメインの44位から軽鎖可変ドメインの100位、

ii) 重鎖可変ドメインの105位から軽鎖可変ドメインの43位、または

iii) 重鎖可変ドメインの101位から軽鎖可変ドメインの100位(カバットのE Uインデックスによって常に番号付ける)

の間でのジスルフィド結合の導入によって安定化される。

【0266】

WO2010/115589はまた、本発明による前記完全長抗体のCH3ドメインを、例えば、WO96/027011、Ridgway, J. B.ら、Protein Eng 9 (1996) 617~621頁；およびMerchan, A. M.ら、Nat Biotechnol 16 (1998) 677~681頁にいくつかの例と共に詳細に記載されている「ノブ・イントゥー・ホール」技術によって変更することができる。

【0267】

かくして、一部の実施形態では、前記三価の二重特異性抗体はさらに、完全長抗体の一方の重鎖のCH3ドメインと、完全長抗体の他方の重鎖のCH3ドメインとがそれぞれ、抗体CH3ドメイン間の元の接触面を含む接触面に向かい会い、前記接触面が、三価の二重特異性抗体の形成を促進するように変更されていることを特徴とし、その変更は、

a) 三価の二重特異性抗体内の他方の重鎖のCH3ドメインの元の接触面に向かい会う一方の重鎖のCH3ドメインの元の接触面内で、アミノ酸残基が、より大きい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられることによって、一方の重鎖のCH3ドメインの接触面内に、他方の重鎖のCH3ドメインの接触面内の空洞に位置し得る突起を生成するように、一方の重鎖のCH3ドメインが変更されていること、

および

b) 三価の二重特異性抗体内の第1のCH3ドメインの元の接触面に向かい会う第2のCH3ドメインの元の接触面内で、アミノ酸残基が、より小さい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられることによって、第2のCH3ドメインの接触面内に、第1のCH3ドメインの接触面内の突起が位置し得る空洞を生成するように、他方の重鎖のCH3ドメインが変更されていること

を特徴とする。

【0268】

より大きい側鎖体積を有する前記アミノ酸残基は、必要に応じて、アルギニン(R)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)からなる群から選択することができる。より小さい側鎖体積を有する前記アミノ酸残基は、必要に応じて、アラ

10

20

30

40

50

ニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）からなる群から選択することができる。

【0269】

必要に応じて、一部の実施形態では、CH3ドメインは両方とも、両方のCH3ドメイン間のジスルフィド架橋を形成することができるように、それぞれのCH3ドメインの対応する位置にアミノ酸としてシステイン（C）を導入することによってさらに変更される。

【0270】

WO2010/115589A1に記載された二重特異性三価抗体形式のこれらの、および他の詳細を、本発明において利用することができる。

【0271】

本明細書で使用される場合、用語「完全長抗体」は、2つの「完全長抗体重鎖」および2つの「完全長抗体軽鎖」からなる抗体を示す。「完全長抗体重鎖」は、抗体重鎖可変ドメイン（VH）のN末端からC末端の方向に、VH-CH1-HR-CH2-CH3と省略される、抗体定常重鎖ドメイン1（CH1）、抗体ヒンジ領域（HR）、抗体重鎖定常ドメイン2（CH2）、および抗体重鎖定常ドメイン3（CH3）；ならびに必要なに応じて、サブクラスIgEの抗体の場合、抗体重鎖定常ドメイン4（CH4）からなるポリペプチドであってもよい。好ましくは、「完全長抗体重鎖」は、N末端からC末端の方向に、VH、CH1、HR、CH2およびCH3からなるポリペプチドである。交差Mab形成の可能性は、「完全長」に対する参照によって排除されることを意図しない、かくして、重鎖は、VLドメインに交換されたVHドメイン、またはCLドメインに交換されたCH1ドメインを有してもよい。「完全長抗体軽鎖」は、N末端からC末端の方向に、VL-CLと省略される、抗体軽鎖可変ドメイン（VL）、および抗体軽鎖定常ドメイン（CL）からなるポリペプチドであってもよい。あるいは、交差Mabの場合、VLドメインをVHドメインに交換するか、またはCLドメインをCH1ドメインに交換することができる。抗体軽鎖定常ドメイン（CL）は、κ（カッパ）またはλ（ラムダ）であってもよい。2つの完全長抗体鎖は、CLドメインとCH1ドメインとの間および完全長抗体重鎖のヒンジ領域間のポリペプチド間ジスルフィド結合を介して一緒に連結される。典型的な完全長抗体の例は、IgGのような天然抗体（例えば、IgG1およびIgG2）、IgM、IgA、IgD、およびIgE）である。本発明による完全長抗体は、単一の種、例えば、ヒトに由来するものであってよい、またはそれらはキメラ化もしくはヒト化抗体であってもよい。本明細書に記載の完全長抗体は、それぞれ、一对のVHとVLによって形成される2つの抗原結合部位を含む。前記完全長抗体の重鎖または軽鎖のC末端は、前記重鎖または軽鎖のC末端の最後のアミノ酸を示す。

【0272】

b)の下ポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン（VH）およびc)の下ポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン（VL）のN末端は、VHまたはVLドメインのN末端の最後のアミノ酸を示す。

【0273】

上記形式のいずれかにおいて、第1の抗原は腫瘍関連抗原であってよく、第2の抗原はPb-DOTAMであってもよい（が、これらのものは、一部の実施形態では逆であってもよい）。

【0274】

上記形式のいずれかにおいて、重鎖ヘテロダイマーの正確な集合を、重鎖の配列に対する修飾によって支援することができる。一実施形態では、ノブ・イントゥー・ホール技術が使用される。2つのCH3ドメインの相互作用表面を、これらの2つのCH3ドメインを含有する両方の重鎖のヘテロ二量体化を増加させるように変更することができる。2つのCH3ドメイン（2つの重鎖の）はそれぞれ、「ノブ」であってよいが、他方は「ホール」である。例えば、一方は、EUインデックスの番号付けによる、いわゆる「ノブ突然変異」（T366Wおよび必要に応じて、S354CまたはY349Cのうちの1つ、好ましくは、S354C）を含み、他方は、いわゆる「ホール突然変異」（T366S、L

10

20

30

40

50

368AおよびY407V、必要に応じて、Y349CまたはS354C、好ましくは、Y349C)を含む(例えば、Carter, Pら、Immunotechnol. 2 (1996) 73を参照されたい)。

【0275】

さらに、またはあるいは、ジスルフィド架橋の導入を使用して、ヘテロダイマーを安定化し(Merchant, A. M.ら、Nature Biotech 16 (1998) 677~681頁; Atwell, S.ら、J. Mol. Biol. 270 (1997) 26~35頁)、収量を増加させることができる。例としては、以下の位置:

i) 重鎖可変ドメインの44位から軽鎖可変ドメインの100位、

ii) 重鎖可変ドメインの105位から軽鎖可変ドメインの43位、または

iii) 重鎖可変ドメインの101位から軽鎖可変ドメインの100位(カバットのE Uインデックスによって常に番号付ける)

の間でのジスルフィド結合の導入が挙げられる。

【0276】

電荷修飾

本発明の多重特異性抗体は、1つ(または複数(2つを超える抗原結合Fab分子を含む分子の場合))のその結合アーム中にVH/VL交換を有するFabベースの二重/多重特異性抗原結合分子の生産において起こり得る、軽鎖と、非一致重鎖とのミスペアリング(Bence-Jones型副生成物)の低減において特に効率的である、そこに含まれるFab分子中にアミノ酸置換を含んでもよい(全体が参照により本明細書に組み込まれる、PCT公開番号WO2015/150447、特に、その中の実施例も参照されたい)。望ましくない副生成物、特に、その結合アームの一方において生じるBence-Jones型副生成物と比較した、所望の多重特異性抗体の比率を、Fab分子のCH1およびCLドメイン中の特定のアミノ酸位置での反対の電荷を有する荷電アミノ酸の導入によって改善することができる(本明細書では「電荷修飾」と呼ばれることもある)。

【0277】

したがって、一部の実施形態では、Fab分子を含む本発明の抗体は、本明細書に記載の電荷修飾を含む重鎖定常ドメインCH1ドメインと、本明細書に記載の電荷修飾を含む軽鎖定常CLドメインとを有する少なくとも1つのFabを含む。

【0278】

電荷修飾は、本発明の抗体に含まれる従来のFab分子(例えば、図37に示されるものなど:P1AE1766、P1AE1767、P1AE1768、P1AE1769)、または本発明の抗体に含まれるクロスオーバーFab分子のいずれか(両方ではない)において作製される。特定の実施形態では、電荷修飾は、本発明の抗体に含まれる従来のFab分子(特定の実施形態では、標的細胞抗原に特異的に結合する)において作製される。

【0279】

したがって、一部の実施形態では、本発明の抗体は、a)第1の抗原(例えば、腫瘍関連抗原)に結合する第1の抗原結合部分およびb)第2の抗原(例えば、Dotam-Pb)に結合する第2の結合部分を含み、二重特異性抗原結合分子の第1および第2の抗原結合部分は両方ともFab分子であり、抗原結合部分(一部の実施形態では、特に、第2の抗原結合部分)の一方は交差Fab断片であり、Fab分子の一方は本明細書に記載の電荷修飾を含むCH1ドメイン、および本明細書に記載の電荷修飾を含むCLドメインを含む。電荷修飾を含むFabは、従来の(非交差)Fabである、例えば、一部の実施形態では、第1の抗原に結合する抗原結合部分であることが好ましい場合がある。

【0280】

本発明による抗体はさらに、第1の抗原に特異的に結合する第3のFab分子を含んでもよい。特定の実施形態では、前記第3のFab分子は、a)の下で第1のFab分子と同一である。これらの実施形態では、以下の実施形態によるアミノ酸置換(電荷修飾)を、第1のFab分子および第3のFab分子のそれぞれの定常ドメインCLおよび定常ドメ

10

20

30

40

50

イン C H 1 において作製することができる。あるいは、以下の実施形態によるアミノ酸置換を、第 1 の F a b 分子および第 3 の F a b 分子の定常ドメイン C L および定常ドメイン C H 1 ではなく、b) の下の第 2 の F a b 分子の定常ドメイン C L および定常ドメイン C H 1 において作製することができる。

【0281】

一部の実施形態では、電荷修飾を含む軽鎖定常ドメイン C L および電荷修飾を含む重鎖定常ドメイン C H 1 を含む F a b 分子において、軽鎖定常ドメイン C L における電荷修飾は 1 2 4 位、および必要に応じて、1 2 3 位（カバットによる番号付け）にあり、重鎖定常ドメイン C H 1 における電荷修飾は 1 4 7 位および／または 2 1 3 位（カバットによる番号付け）にある。

10

【0282】

一部の実施形態では、軽鎖定常ドメイン C L において、1 2 4 位のアミノ酸は、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）（カバットによる番号付け）によって独立して置換され（1つの好ましい実施形態では、リジン（K）によって独立して置換される）、重鎖定常ドメイン C H 1 において、1 4 7 位のアミノ酸および／または 2 1 3 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）（カバットの E U インデックスによる番号付け）によって独立して置換される。

【0283】

別の実施形態では、軽鎖定常ドメイン C L において、1 2 4 位のアミノ酸は、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）（カバットによる番号付け）によって独立して（1つの好ましい実施形態では、リジン（K）またはアルギニン（R）によって独立して）置換され、重鎖定常ドメイン C H 1 において、1 4 7 位のアミノ酸または 2 1 3 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）（カバットの E U インデックスによる番号付け）によって独立して置換される。

20

【0284】

さらなる実施形態では、軽鎖定常ドメイン C L において、1 2 4 位のアミノ酸は、リジン（K）またはアルギニン（R）（カバットによる番号付け）によって独立して（1つの好ましい実施形態では、リジン（K）またはアルギニン（R）によって独立して）置換され、重鎖定常ドメイン C H 1 において、2 1 3 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）（カバットの E U インデックスによる番号付け）によって独立して置換される。

30

【0285】

さらなる実施形態では、軽鎖定常ドメイン C L において、1 2 4 位のアミノ酸は、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）によって独立して（1つの好ましい実施形態では、リジン（K）またはアルギニン（R）によって独立して）置換され（カバットによる番号付け）、重鎖定常ドメイン C H 1 において、1 4 7 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）によって独立して置換される（カバットの E U インデックスによる番号付け）。

【0286】

さらなる実施形態では、軽鎖定常ドメインにおいて、1 2 4 位のアミノ酸は、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）（カバットによる番号付け）によって独立して（1つの好ましい実施形態では、リジン（K）またはアルギニン（R）によって独立して）置換され、1 2 3 位のアミノ酸は、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）（カバットによる番号付け）によって独立して（1つの好ましい実施形態では、リジン（K）またはアルギニン（R）によって独立して）置換され、重鎖定常ドメイン C H 1 において、1 4 7 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）（カバットの E U インデックスによる番号付け）によって独立して置換され、2 1 3 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）（カバットの E U インデックスによる番号付け）によって独立して置換される。

40

【0287】

50

さらなる実施形態では、軽鎖定常ドメインC Lにおいて、1 2 4 位のアミノ酸は、リジン（K）（カバットによる番号付け）によって置換され、1 2 3 位のアミノ酸は、アルギニン（R）（カバットによる番号付け）によって置換され、重鎖定常ドメインC H 1において、1 4 7 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）（カバットのE Uインデックスによる番号付け）によって置換され、2 1 3 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）（カバットのE Uインデックスによる番号付け）によって置換される。

【0 2 8 8】

さらなる実施形態では、軽鎖定常ドメインC Lにおいて、1 2 4 位のアミノ酸は、リジン（K）（カバットによる番号付け）によって置換され、1 2 3 位のアミノ酸は、リジン（K）（カバットによる番号付け）によって置換され、重鎖定常ドメインC H 1において、1 4 7 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）（カバットのE Uインデックスによる番号付け）によって置換され、2 1 3 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）（カバットのE Uインデックスによる番号付け）によって置換される。

【0 2 8 9】

さらなる実施形態では、軽鎖定常ドメインC Lにおいて、1 2 4 位のアミノ酸は、リジン（K）（カバットによる番号付け）によって置換され、1 2 3 位のアミノ酸は、アルギニン（R）（カバットによる番号付け）によって置換され、重鎖定常ドメインC H 1において、1 4 7 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）（カバットのE Uインデックスによる番号付け）によって置換され、2 1 3 位のアミノ酸は、アスパラギン酸（D）（カバットのE Uインデックスによる番号付け）によって置換される。

【0 2 9 0】

さらなる実施形態では、軽鎖定常ドメインにおいて、1 2 4 位のアミノ酸は、リジン（K）（カバットによる番号付け）によって置換され、1 2 3 位のアミノ酸は、リジン（K）（カバットによる番号付け）によって置換され、重鎖定常ドメインC H 1において、1 4 7 位のアミノ酸は、グルタミン酸（E）（カバットのE Uインデックスによる番号付け）によって置換され、2 1 3 位のアミノ酸は、アスパラギン酸（D）（カバットのE Uインデックスによる番号付け）によって置換される。

【0 2 9 1】

一実施形態では、抗体は、第1の抗原に特異的に結合する第1の重鎖および第1の軽鎖と、第2の抗原に特異的に結合する第2の重鎖および第2の軽鎖を含み、

a) 第1の軽鎖の定常ドメインC Lおよび第1の重鎖の定常ドメインC H 1は、本明細書に記載の電荷変異置換を含み；

b) 第2の軽鎖および第2の重鎖の軽鎖定常ドメインC Lおよび重鎖定常ドメインC H 1は互いに置き換えられる（かくして、公差F a bを形成する）。そのような配置の例は、P 1 A E 1 7 6 8について示される。

【0 2 9 2】

別の実施形態では、抗体は、

第1の抗原に特異的に結合し、2つの重鎖および2つの軽鎖からなる完全長抗体であって、完全長抗体の2つの重鎖定常ドメインC H 1および2つの軽鎖定常ドメインC Lが本明細書に記載の電荷修飾を含む、完全長抗体；ならびに

ポリペプチドリンカーを介してV LおよびC Lドメインに連結されたV HおよびC H 1ドメイン（V H－C H 1－リンカー－V L－C L）を含むs c F a bであって、s c F a bが重鎖の一方のN末端に融合されており、s c F a bが第2の抗原に対する抗原結合部位を形成する、s c F a bを含む。そのような配置の例は、P 1 A E 1 7 7 0である。

【0 2 9 3】

別の実施形態では、多重特異性抗体は、第1の抗原のための抗原結合部位を含む完全長抗体（例えば、第1の抗原について二価であってもよい）であって、完全長抗体の2つの重鎖定常ドメインC H 1および2つの軽鎖定常ドメインC Lが、本明細書に記載の電荷修飾を含み、

重鎖の一方のC末端（例えば、そのC H 3ドメインのC末端）が、ポリペプチドリンカ

10

20

30

40

50

ーを介して、第1のポリペプチドに連結されており、第1のポリペプチドが、第2のポリペプチドと会合して、第2の抗原のための結合部位を含む交差 F a b を形成する、完全長抗体を含む。

【0294】

第1のポリペプチドは、N末端 V L ドメインと、C末端 C H 1 ドメインとを含んでもよい。かくして、融合物を有する重鎖は、N末端からC末端に向かって、V H - C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 - リンカー - V L - C H 1 を含んでもよい。軽鎖は、V H - C L を含んでもよい。そのような配置の例は、P 1 A E 1 7 6 7 である。

【0295】

さらなる実施形態では、抗体は、

a) 第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長抗体であって、重鎖の C H 1 ドメインおよび軽鎖の C L ドメインが本明細書に記載の電荷修飾を含む、完全長抗体；

b)

i) 抗体重鎖可変ドメイン (V H) ; または

i i) 抗体重鎖可変ドメイン (V H) および抗体重鎖定常ドメイン (C H 1) ; または

i i i) 抗体重鎖可変ドメイン (V H) および抗体軽鎖定常ドメイン (C L)

からなるポリペプチドであって、

V H ドメインのN末端が、ペプチドリッカーを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の一方のC末端に融合されているポリペプチド；

c)

i) 抗体軽鎖可変ドメイン (V L) ; または

i i) 抗体軽鎖可変ドメイン (V L) および抗体軽鎖定常ドメイン (C L) ; または

i i i) 抗体軽鎖可変ドメイン (V L) および抗体重鎖定常ドメイン (C H 1)

からなるポリペプチドであって、

V L ドメインのN末端が、ペプチドリッカーを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の他方のC末端に融合されているポリペプチドを含む；

(b) の下のペプチドの抗体重鎖可変ドメインおよび (c) の下のペプチドの抗体軽鎖可変ドメインが、一緒になって第2の抗原への抗原結合部位を形成する、二重特異性抗体であってもよい。そのような配置の例は、P R I T - 2 1 3 および p 1 A E 1 7 6 6 である。

【0296】

一部の実施形態では、本発明の抗体は、a) 第1の抗原に結合する第1の抗原結合部分、b) 第2の抗原に結合する第2の抗原結合部分、およびc) 第1の抗原に結合する第3の抗原結合部分を含み、抗体の第1、第2および第3の抗原結合部分は、全て F a b 分子であり、抗原結合部分 (特に、第2の抗原結合部分) の1つにおいて、F a b 軽鎖および F a b 重鎖の可変ドメイン V L および V H はそれぞれ、互いに置き換えられ、

i) 上記実施形態によるアミノ酸置換は、b) の下の第2の F a b 分子の定常ドメイン C L および定常ドメイン C H 1 ではなく、第1の F a b 分子および第3の F a b 分子のそれぞれの定常ドメイン C L および定常ドメイン C H 1 において作製される；または

i i) 上記実施形態によるアミノ酸置換は、第1の F a b 分子および第3の F a b 分子の定常ドメイン C L および定常ドメイン C H 1 ではなく、b) の下の第2の F a b 分子の定常ドメイン C L および定常ドメイン C H 1 において作製される。一部の実施形態では、電荷修飾は、従来の (非交換) F a b に存在する：かくして、例えば、第2の抗原結合部分が交差 F a b である場合、選択肢 (i) が好ましい。

【0297】

1つの特定の実施形態では、本発明の多価抗体は、

第1および第2の抗体重鎖と、第1および第2の抗体軽鎖とを含む完全長抗体であって、第1の重鎖と第1の軽鎖とが集合して、第1の抗原 (例えば、腫瘍特異的抗原、例えば

10

20

30

40

50

、C E A) のための抗原結合部位を含む F a b を形成し、第 2 の重鎖と第 2 の軽鎖とが集合して、第 2 の抗原 (例えば、D O T A M-キレート化された P b) のための抗原結合部位を含む交差 F a b を形成し (例えば、第 2 の重鎖が V H ドメインの代わりに V L ドメインを有し、第 2 の軽鎖が V L ドメインの代わりに V H ドメインを有する) ;

第 1 または第 2 の抗体重鎖のいずれかが、リンカーを介して、C H 1 および V H ドメインを含むポリペプチドに融合されており、第 1 および第 2 のポリペプチドが集合して、第 1 の抗原のための抗原結合部位を含む F a b を形成するように、前記第 1 のポリペプチドが、C L および V L を含む第 2 のポリペプチドと集合し、

第 1 の重鎖の C H 1 ドメインおよび第 1 の軽鎖の C L ドメインが、本明細書に記載の電荷修飾を含む、完全長抗体を含む。

【0298】

また、第 1 のポリペプチドの C H 1 ドメインおよび第 2 のポリペプチドの C L ドメインは、本明細書に記載の電荷修飾を含んでもよい。

【0299】

融合は、完全長抗体の重鎖の一方、必要に応じて、第 2 の重鎖の N 末端にあってもよい。そのような配置の例は、P 1 A E 1 7 6 9 である。

【0300】

P b-D O T A M および C E A に結合する多重特異性抗体

一部の実施形態では、本発明の抗体は、P b-D O T A M と C E A の両方に結合する多重特異性、例えば、二重特異性抗体であることが好ましい場合がある。かくして、それらは、P b-D O T A M キレートのための抗原結合部位と、C E A のための抗原結合部位とを含む。そのような実施形態では、P b-D O T A M キレートに特異的な抗原結合部位は、本明細書に記載の実施形態のいずれかによるものであってもよい。この形式は、本明細書に記載の形式のいずれかであってもよい。

【0301】

必要に応じて、C E A に結合する抗原結合部位は、一価の結合について 1 n M 以下、5 0 0 p M 以下、2 0 0 p M 以下、または 1 0 0 p M 以下の K d 値で結合してもよい。

【0302】

必要に応じて、C E A に結合する抗原結合部位は、(a) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ; (b) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ; (c) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 ; (d) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1 ; (e) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2 ; および (f) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、または 6 つの C D R を含んでもよい。

【0303】

必要に応じて、C E A に結合する抗原結合部位は、(a) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ; (b) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ; および (c) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全部の V H C D R 配列を含んでもよい。一実施形態では、抗体は、配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 を含む。別の実施形態では、抗体は、配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 および配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む。さらなる実施形態では、抗体は、配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3、および配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 を含む。さらなる実施形態では、抗体は、(a) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ; (b) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ; および (c) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 を含む。

【0304】

必要に応じて、C E A に結合する抗原結合部位は、(a) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1 ; (b) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2 ; および (

10

20

30

40

50

c) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全部の VL CDR 配列を含む。一実施形態では、抗体は、(a) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む CDR-L1 ; (b) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む CDR-L2 ; および (c) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含む。

【0305】

必要に応じて、CEA に結合する抗原結合部位は、(a) (i) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む CDR-H1、(ii) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む CDR-H2、および (iii) 配列番号 13 から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-H3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全部の VH CDR 配列を含む VH ドメイン；ならびに (b) (i) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む CDR-L1、(ii) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む CDR-L2 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全部の VL CDR を含む VL ドメイン、ならびに (c) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含む。

【0306】

別の態様では、CEA に結合する抗原結合部位は、(a) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む CDR-H1 ; (b) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む CDR-H2 ; (c) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 ; (d) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む CDR-L1 ; (e) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む CDR-L2 ; および (f) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含む。

【0307】

上記実施形態のいずれかにおいて、多重特異性抗体は、ヒト化されていてもよい。一実施形態では、抗 CEA 抗原結合部位は、上記実施形態のいずれかにおけるような CDR を含み、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【0308】

別の実施形態では、CEA に結合する抗原結合部位は、配列番号 17 のアミノ酸配列に対する少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン (VH) 配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する VH 配列は、参照配列と比較して置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは、上記のような親和性で、CEA に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号 17 において、合計 1 ~ 10 個のアミノ酸が置換、挿入および／または欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVR 外の領域 (すなわち、FR) に存在する。必要に応じて、CEA に結合する抗原結合部位は、配列番号 17 中の VH 配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、VH は、(a) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む CDR-H1 ; (b) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む CDR-H2 ; および (c) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 から選択される 1、2 または 3 つの CDR を含む。

【0309】

別の実施形態では、CEA に結合する抗原結合部位は、配列番号 18 のアミノ酸配列に対する少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン (VL) を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する VL 配列は、参照配列と比較して置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは、上記のような親和性で、CEA に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号 18 において、合計 1 ~ 10 個のアミノ酸が置換、挿入および／または欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は

、H V R外の領域（すなわち、F R）に存在する。必要に応じて、C E Aのための抗原結合部位は、配列番号18中のV L配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、V Lは、（a）配列番号14のアミノ酸配列を含むC D R-L 1；（b）配列番号15のアミノ酸配列を含むC D R-L 2；および（c）配列番号16のアミノ酸配列を含むC D R-L 3から選択される1、2または3つのC D Rを含む。

【0310】

別の実施形態では、C E Aに結合する抗原結合部位は、上で提供された実施形態のいずれかに記載のV Hと、上で提供された実施形態のいずれかに記載のV Lとを含む。一実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号17および配列番号18のV HおよびV L配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

10

【0311】

一部の実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書で提供されるP R I T-0213またはP R I T-0214と同じC E Aエпитープに結合することができる。

【0312】

P b-D O T A MおよびE R B B 2に結合する多重特異性抗体

一部の実施形態では、本発明の抗体は、P b-D O T A MとE R B B 2の両方に結合する多重特異性、例えば、二重特異性抗体であることが好ましい場合がある。かくして、それらは、P b-D O T A Mキレートのための抗原結合部位と、E R B B 2のための抗原結合部位とを含む。そのような実施形態では、P b-D O T A Mキレートに特異的な抗原結合部位は、本明細書に記載の実施形態のいずれかによるものであってもよい。この形式は、本明細書に記載の形式のいずれかであってもよい。

20

【0313】

必要に応じて、E R B B 2に結合する抗原結合部位は、一価の結合について1 n M以下、500 p M以下、200 p M以下、または100 p M以下のK d値で結合してもよい。

【0314】

必要に応じて、E R B B 2に結合する抗原結合部位は、（a）配列番号28のアミノ酸配列を含むC D R-H 1；（b）配列番号29のアミノ酸配列を含むC D R-H 2；（c）配列番号30のアミノ酸配列を含むC D R-H 3；（d）配列番号31のアミノ酸配列を含むC D R-L 1；（e）配列番号32のアミノ酸配列を含むC D R-L 2；および（f）配列番号33のアミノ酸配列を含むC D R-L 3から選択される少なくとも1、2、3、4、5、または6つのC D Rを含んでもよい。

30

【0315】

必要に応じて、E R B B 2に結合する抗原結合部位は、（a）配列番号28のアミノ酸配列を含むC D R-H 1；（b）配列番号29のアミノ酸配列を含むC D R-H 2；および（c）配列番号30のアミノ酸配列を含むC D R-H 3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全部のV H C D R配列を含んでもよい。一実施形態では、抗体は、配列番号30のアミノ酸配列を含むC D R-H 3を含む。別の実施形態では、抗体は、配列番号30のアミノ酸配列を含むC D R-H 3および配列番号33のアミノ酸配列を含むC D R-L 3を含む。さらなる実施形態では、抗体は、配列番号30のアミノ酸配列を含むC D R-H 3、配列番号33のアミノ酸配列を含むC D R-L 3、および配列番号29のアミノ酸配列を含むC D R-H 2を含む。さらなる実施形態では、抗体は、（a）配列番号28のアミノ酸配列を含むC D R-H 1；（b）配列番号29のアミノ酸配列を含むC D R-H 2；および（c）配列番号30のアミノ酸配列を含むC D R-H 3を含む。

40

【0316】

必要に応じて、E R B B 2に結合する抗原結合部位は、（a）配列番号31のアミノ酸配列を含むC D R-L 1；（b）配列番号32のアミノ酸配列を含むC D R-L 2；および（c）配列番号33のアミノ酸配列を含むC D R-L 3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全部のV L C D R配列を含む。一実施形態では、抗体は、（a）配列番号31のアミノ酸配列を含むC D R-L 1；（b）配列番号32のアミノ

50

酸配列を含むCDR-L2；および（c）配列番号33のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む。

【0317】

必要に応じて、ERBB2に結合する抗原結合部位は、（a）（i）配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR-H1、（ii）配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および（iii）配列番号30から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全部のVH CDR配列を含むVHドメイン；ならびに（b）（i）配列番号31のアミノ酸配列を含むCDR-L1、（ii）配列番号32のアミノ酸配列を含むCDR-L2から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全部のVL CDRを含むVLドメイン、ならびに（c）配列番号33のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む。

10

【0318】

別の態様では、ERBB2に結合する抗原結合部位は、（a）配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR-H1；（b）配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR-H2；（c）配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-H3；（d）配列番号31のアミノ酸配列を含むCDR-L1；（e）配列番号32のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および（f）配列番号33のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む。

【0319】

上記実施形態のいずれかにおいて、多重特異性抗体は、ヒト化されていてもよい。一実施形態では、抗ERBB2抗原結合部位は、上記実施形態のいずれかにおけるようなCDRを含み、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

20

【0320】

別の実施形態では、ERBB2に結合する抗原結合部位は、配列番号34のアミノ酸配列に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（VH）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVH配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは、上記のような親和性で、ERBB2に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号34において、合計1～10個のアミノ酸が置換、挿入および／または欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVR外の領域（すなわち、FR）に存在する。必要に応じて、ERBB2に結合する抗原結合部位は、配列番号34中のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、VHは、（a）配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR-H1；（b）配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR-H2；および（c）配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される1、2または3つのCDRを含む。

30

【0321】

別の実施形態では、ERBB2に結合する抗原結合部位は、配列番号35のアミノ酸配列に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVL配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは、上記のような親和性で、ERBB2に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号35において、合計1～10個のアミノ酸が置換、挿入および／または欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVR外の領域（すなわち、FR）に存在する。必要に応じて、CEAのための抗原結合部位は、配列番号35中のVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、VLは、（a）配列番号31のアミノ酸配列を含むCDR-L1；（

40

50

b) 配列番号 32 のアミノ酸配列を含む CDR-L2 ; および (c) 配列番号 33 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 から選択される 1、2 または 3 つの CDR を含む。

【0322】

別の実施形態では、ERBB2 に結合する抗原結合部位は、上で提供された実施形態のいずれかに記載の VH と、上で提供された実施形態のいずれかに記載の VL とを含む。一実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号 34 および配列番号 35 の VH および VL 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0323】

一部の実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書で提供される PAD9827 抗体と同じ ERBB2 エピトープに結合することができる。

【0324】

Pb-DOTAM および CD20 に結合する多重特異性抗体

一部の実施形態では、本発明の抗体は、Pb-DOTAM と CD20 の両方に結合する多重特異性、例えば、二重特異性抗体であることが好ましい場合がある。かくして、それらは、Pb-DOTAM キレートのための抗原結合部位と、CD20 のための抗原結合部位とを含む。そのような実施形態では、Pb-DOTAM キレートに特異的な抗原結合部位は、本明細書に記載の実施形態のいずれかによるものであってもよい。この形式は、本明細書に記載の形式のいずれかであってもよい。

【0325】

必要に応じて、CD20 に結合する抗原結合部位は、一価の結合について 1 nM 以下、500 pM 以下、200 pM 以下、または 100 pM 以下の Kd 値で結合してもよい。

【0326】

必要に応じて、CD20 に結合する抗原結合部位は、(a) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む CDR-H1 ; (b) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む CDR-H2 ; (c) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 ; (d) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む CDR-L1 ; (e) 配列番号 43 のアミノ酸配列を含む CDR-L2 ; および (f) 配列番号 44 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、または 6 つの CDR を含んでもよい。

【0327】

必要に応じて、CD20 に結合する抗原結合部位は、(a) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む CDR-H1 ; (b) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む CDR-H2 ; および (c) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全部の VH CDR 配列を含んでもよい。一実施形態では、抗体は、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む。別の実施形態では、抗体は、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 および配列番号 44 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含む。さらなる実施形態では、抗体は、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む CDR-H3、配列番号 44 のアミノ酸配列を含む CDR-L3、および配列番号 40 のアミノ酸配列を含む CDR-H2 を含む。さらなる実施形態では、抗体は、(a) 配列番号 39 のアミノ酸配列を含む CDR-H1 ; (b) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む CDR-H2 ; および (c) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む。

【0328】

必要に応じて、CD20 に結合する抗原結合部位は、(a) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む CDR-L1 ; (b) 配列番号 43 のアミノ酸配列を含む CDR-L2 ; および (c) 配列番号 44 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つ全部の VL CDR 配列を含む。一実施形態では、抗体は、(a) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む CDR-L1 ; (b) 配列番号 43 のアミノ酸配列を含む CDR-L2 ; および (c) 配列番号 44 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含む。

【0329】

必要に応じて、CD20に結合する抗原結合部位は、(a) (i) 配列番号39のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(i i) 配列番号40のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(i i i) 配列番号41から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全部のVH CDR配列を含むVHドメイン；ならびに(b) (i) 配列番号42のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(i i) 配列番号43のアミノ酸配列を含むCDR-L2から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全部のVL CDRを含むVLドメイン、ならびに(c) 配列番号44のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む。

【0330】

別の態様では、CD20に結合する抗原結合部位は、(a) 配列番号39のアミノ酸配列を含むCDR-H1；(b) 配列番号40のアミノ酸配列を含むCDR-H2；(c) 配列番号41のアミノ酸配列を含むCDR-H3；(d) 配列番号42のアミノ酸配列を含むCDR-L1；(e) 配列番号43のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および(f) 配列番号44のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む。

【0331】

上記実施形態のいずれかにおいて、多重特異性抗体は、ヒト化されていてもよい。一実施形態では、抗CD20抗原結合部位は、上記実施形態のいずれかにおけるようなCDRを含み、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【0332】

別の実施形態では、CD20に結合する抗原結合部位は、配列番号45のアミノ酸配列に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVH配列は、参照配列と比較して置換(例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは、上記のような親和性で、CD20に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号45において、合計1~10個のアミノ酸が置換、挿入および/または欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVR外の領域(すなわち、FR)に存在する。必要に応じて、CD20に結合する抗原結合部位は、配列番号45中のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、VHは、(a) 配列番号39のアミノ酸配列を含むCDR-H1；(b) 配列番号40のアミノ酸配列を含むCDR-H2；および(c) 配列番号41のアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される1、2または3つのCDRを含む。

【0333】

別の実施形態では、CD20に結合する抗原結合部位は、配列番号46のアミノ酸配列に対する少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVL配列は、参照配列と比較して置換(例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは、上記のような親和性で、CD20に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号46において、合計1~10個のアミノ酸が置換、挿入および/または欠失されている。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVR外の領域(すなわち、FR)に存在する。必要に応じて、CD20のための抗原結合部位は、配列番号46中のVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、VLは、(a) 配列番号42のアミノ酸配列を含むCDR-L1；(b) 配列番号43のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および(c) 配列番号44のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される1、2または3つのCDRを含む。

【0334】

別の実施形態では、C D 2 0 に結合する抗原結合部位は、上で提供された実施形態のいずれかに記載の V H と、上で提供された実施形態のいずれかに記載の V L とを含む。一実施形態では、抗体は、それぞれ、配列番号 4 5 および配列番号 4 6 の V H および V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0335】

一部の実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書で提供される P 1 A D 9 8 2 6 抗体と同じ C D 2 0 エピトープに結合することができる。

【0336】

抗体バリエーション

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列バリエーションが企図される。例えば、抗体の結合親和性および／または他の生物学的特性を改善するのが望ましい場合がある。抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な修飾を導入することによって、またはペプチド合成によって、抗体のアミノ酸配列バリエーションを調製することができる。そのような修飾としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および／またはそれへの挿入、および／またはその置換が挙げられる。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有するという条件で、最終コンストラクトに到達するために、任意の組合せの欠失、挿入、および置換を作製することができる。

【0337】

置換、挿入、および欠失バリエーション

ある特定の実施形態では、1 つまたは複数のアミノ酸置換を有する抗体バリエーションが提供される。置換突然変異誘発のための目的の部位としては、H V R (C D R) および F R が挙げられる。保存的置換を、「好ましい置換」の見出しの下で表 1 に示す。より実質的な変化は、「例示的な置換」の見出しの下で表 1 に提供され、アミノ酸側鎖クラスを参照して以下にさらに記載される。アミノ酸置換を、目的の抗体に導入し、生成物を、所望の活性、例えば、抗原結合の保持／改善、免疫原性の低下、または A D C C もしくは C D C の改善についてスクリーニングすることができる。

10

20

30

40

50

表 1

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【0338】

アミノ酸を、共通の側鎖特性に従って分類することができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖配向に影響を与える残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0339】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスに交換することを必要とするであろう。

【0340】

1つの型の置換バリエーションは、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の1つまたは複数の超可変領域残基の置換を含む。一般に、さらなる試験のために選択される得られるバリエーションは、親抗体と比較して、ある特定の生物学的特性（例えば、親和性の増大、免疫原性の低下）における修飾（例えば、改善）を有するであろう、および／または親抗体のある特定の生物学的特性を実質的に保持しているであろう。例示的な置換バリエーションは、例えば、本明細書に記載のものなどのファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を

使用して、簡便に生成することができる親和性成熟抗体である。簡単に述べると、1つまたは複数のHVR残基を変異させ、変異抗体をファージ上に展示させ、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。

【0341】

変更（例えば、置換）を、例えば、抗体親和性を改善するために、HVRにおいて行うことができる。そのような変更を、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス（例えば、Chowdfury、Methods Mol. Biol. 207:179~196頁（2008）を参照されたい）中に高頻度で突然変異を受けるコドンによってコードされる残基、および／または結合親和性について試験される、得られるバリエーションVHもしくはVLを有する抗原と接触する残基において行うことができる。二次ライブラリーを構築し、それから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboomら、Methods in Molecular Biology 178:1~37頁（O'Brienら（編）、Human Press、Totowa、NJ（2001））に記載されている。親和性成熟の一部の実施形態では、様々な方法（例えば、変異性PCR、鎖シャッフリング、またはオリゴヌクレオチド指定突然変異）のいずれかによって成熟について選択された可変遺伝子中に多様性を導入する。次いで、二次ライブラリーを作出する。次いで、ライブラリーをスクリーニングして、所望の親和性を有する任意の抗体バリエーションを同定する。多様性を導入するための別の方法は、いくつかのHVR残基（例えば、1回で4~6個の残基）を無作為化するHVR指定手法を含む。抗原結合に関与するHVR残基を、例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発またはモデリングを使用して特異的に同定することができる。特に、CDR-H3およびCDR-L3が標的化されることが多い。

【0342】

ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、そのような変更が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、1つまたは複数のHVR内で行ってもよい。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的変更（例えば、本明細書で提供される保存的置換）を、HVR中で行うことができる。そのような変更は、例えば、HVR中の抗原接触残基の外部にあってよい。上で提供されたバリエーションVHおよびVL配列のある特定の実施形態では、それぞれのHVRは、変更されないか、または1、2もしくは3つ以下のアミノ酸置換を含有する。

【0343】

突然変異誘発のために標的化することができる抗体の残基または領域の同定のための有用な方法は、CunninghamおよびWells（1989）Science、244:1081~1085頁によって記載されたように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、残基または標的残基群（例えば、arg、asp、his、lys、およびgluなどの荷電残基）を同定し、中性の、または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）で置き換えて、抗体と抗原との相互作用が影響されるかどうかを決定する。さらなる置換を、初期の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置に導入してもよい。あるいは、またはさらに、抗体と抗原との接触点を同定するための、抗原-抗体複合体の結晶構造。そのような接触残基および隣接残基を、置換のための候補として標的化するか、または除去することができる。バリエーションをスクリーニングして、それらが所望の特性を含有するかどうかを決定することができる。

【0344】

アミノ酸配列挿入としては、1つの残基から、100以上の残基を含有するポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端融合および／またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入バリエーションとしては、酵素（例えば、ADEPTのためのもの）または抗体の血清半減期を増大させるポリペプチドに対する抗体のNまたはC末端への融合物が挙げられる。

【0345】

グリコシル化バリエーション

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体を変更して、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させる。1つまたは複数のグリコシル化部位が作出されるか、または除去されるように、アミノ酸配列を変更することによって、抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失を簡便に達成することができる。

【0346】

抗体がFc領域を含む場合、それに結合した炭水化物を変更することができる。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297へのN結合によって一般的に結合する分枝状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wrightら、TIBTECH 15:26~32 (1997)を参照されたい。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、およびシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「ステム」においてGlcNAcに結合したフコースを含んでもよい。一部の実施形態では、本発明の抗体におけるオリゴ糖の修飾を行って、ある特定の特性が改善された抗体バリエーションを作出することができる。

【0347】

一実施形態では、Fc領域に結合した（直接または間接に）フコースを欠く糖鎖構造を有する抗体バリエーションが提供される。例えば、そのような抗体中のフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%または20%~40%であってもよい。フコースの量は、例えば、WO2008/077546に記載されたような、MALDI-TOF質量分析によって測定された場合、Asn297に結合した全ての糖鎖構造体（例えば、複合ハイブリッドおよび高マンノース構造体）と比較した、Asn297での糖鎖内のフコースの平均量を算出することによって決定される。Asn297とは、Fc領域中の297位付近に位置するアスパラギン残基（Fc領域残基のEU番号付け）を指すが、Asn297はまた、抗体における少しの配列差異のため、297位の約±3アミノ酸上流または下流、すなわち、294位と300位の間に位置してもよい。そのようなフコシル化バリエーションは、改善されたADCC機能を有してもよい。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号（Presta, L.）；第2004/0093621号（Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd）を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体バリエーションに関する刊行物の例としては、US2003/0157108号；WO2000/61739；WO2001/29246；US2003/0115614；US2002/0164328；US2004/0093621；US2004/0132140；US2004/0110704；US2004/0110282；US2004/0109865；WO2003/085119；WO2003/084570；WO2005/035586；WO2005/035778；WO2005/053742；WO2002/031140；Okazakiら、J. Mol. Biol. 336:1239~1249頁（2004）；Yamane-Ohnukiら、Biotech. Bioeng. 87:614頁（2004）が挙げられる。脱フコシル化された抗体を産生することができる細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損したLec13 CHO細胞（Ripkaら、Arch. Biochem. Biophys. 249:533~545頁（1986））；米国特許出願第2003/0157108A1号、Presta, L；およびWO2004/056312A1、Adamsら、特に、実施例11）、およびアルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞などのノックアウト細胞株（例えば、Yamane-Ohnukiら、Biotech. Bioeng. 87:614頁（2004））；Kanda, Y.ら、Biotechnol. Bioeng.、94(4):680~688頁（2006）；およびWO2003/085107を参照されたい）が挙げられる。

【0348】

例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分された、二分されたオリゴ糖を有する抗体バリエーションがさらに提供される。そのような抗体バリエーション

10

20

30

40

50

アントは、減少したフコシル化および／または改善されたADCC機能を有してもよい。そのような抗体バリエーションの例は、例えば、WO2003/011878 (Jean-Mairetら)；米国特許第6,602,684号 (Umanaら)；およびUS2005/0123546 (Umanaら)に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖中に少なくとも1個のガラクトース残基を有する抗体バリエーションも提供される。そのような抗体バリエーションは、改善されたCDC機能を有してもよい。そのような抗体バリエーションは、例えば、WO1997/30087 (Patelら)；WO1998/58964 (Raju, S.)；およびWO1999/22764 (Raju, S.)に記載されている。

【0349】

抗体を修飾して、グリコシル化の程度を減少させることが好ましい場合がある。一部の実施形態では、抗体は、無グリコシル化または脱グリコシル化されていてもよい。抗体は、N297の置換、例えば、N297D/Aを含んでもよい。

【0350】

Fc領域バリエーション

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸修飾を、本明細書に提供される抗体のFc領域中に導入することによって、Fc領域バリエーションを生成することができる。Fc領域バリエーションは、1つまたは複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾 (例えば、置換) を含むヒトFc領域配列 (例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4 Fc領域) を含んでもよい。

【0351】

ある特定の実施形態では、本発明は、エフェクター機能が低下した、例えば、CDC、ADCCおよび／またはFcγR結合が低下した、または除去された抗体バリエーションを企図する。ある特定の態様では、本発明は、全てではないが、いくつかのエフェクター機能を有する抗体バリエーションを企図し、それを、*in vivo*での抗体の半減期が重要であるが、ある特定のエフェクター機能 (補体依存性細胞傷害 (CDC) および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC)) が不必要であるか、または有害である適用のための望ましい候補にする。

【0352】

*in vitro*および／または*in vivo*での細胞傷害アッセイを行って、CDCおよび／またはADCC活性の低下／枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体 (FcR) 結合アッセイを行って、抗体がFcγR結合を欠く (したがって、おそらくADCC活性を欠く) ことを確保することができる。ADCCを媒介するための一次細胞、NK細胞は、FcγRIIIのみを発現するが、単球は、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、RavetchおよびKinnet、Annu. Rev. Immunol. 9:457~492頁 (1991) の464頁の表3にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するための*in vitro*アッセイの非限定例は、米国特許第5,500,362号 (例えば、Hellstrom, I.ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059~7063頁 (1986) およびHellstrom, I.ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499~1502頁 (1985) を参照されたい)；米国特許第5,821,337号 (Bruggemann, M.ら、J. Exp. Med. 166:1351~1361頁 (1987) を参照されたい)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いてもよい (例えば、フローサイトメトリーのためのACTI (商標) 非放射性細胞傷害アッセイ (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA)；およびCytotox 96 (登録商標) 非放射性細胞傷害アッセイ (Promega, Madison, WI) を参照されたい)。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞 (PBMC) およびナチュラルキラー (NK) 細胞が挙げられる。あるいは、またはさらに、目的の分子のADCC活性を、*in vivo*で、例えば、Clynesら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652~656頁に開示されたものなどの動物モデルにおいて評価する

10

20

30

40

50

ことができる。また、C1q結合アッセイを実行して、抗体がC1qに結合することができず、したがって、CDC活性を欠くことを確認することもできる。例えば、WO2006/029879およびWO2005/100402に記載のC1qおよびC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを実施してもよい（例えば、Gazzano-Santoroら、J. Immunol. Methods 202:163頁（1996）；Cragg, M. S. ら、Blood 101:1045～1052頁（2003）；ならびにCragg, M. S. およびM. J. Glennie、Blood 103:2738～2743頁（2004）を参照されたい）。また、FcRn結合およびin vivoでのクリアランス／半減期の決定を、当業界で公知の方法を使用して実施することもできる（例えば、Petkova, S. B. ら、Int'l. Immunol. 18(12):1759～1769頁（2006）；WO2013/120929A1を参照されたい）。

10

【0353】

エフェクター機能が低下した抗体としては、Fc領域残基238、265、269、270、297、327および329のうちの1つまたは複数の置換を有するもの（米国特許第6,737,056号）、例えば、P329Gが挙げられる。そのようなFc変異体としては、残基265および297のアラニンへの置換を有する、いわゆる「DANA」Fc変異体（米国特許第7,332,581号）を含む、アミノ酸265位、269位、270位、297位および327位のうちの2つ以上に置換を有するFc変異体が挙げられる。

20

【0354】

ある特定の態様では、抗体バリエーションは、FcγR結合を減弱させる1つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の234位および235位（残基のEU番号付け）の置換を有するFc領域を含む。一態様では、置換は、L234AおよびL235A（LALA）である。ある特定の態様では、抗体バリエーションは、ヒトIgG1 Fc領域に由来するFc領域中にD265Aおよび／またはP329Gをさらに含む。一態様では、置換は、ヒトIgG1 Fc領域に由来するFc領域中のL234A、L235AおよびP329G（LALA-PG）である（例えば、WO2012/130831を参照されたい）。別の態様では、置換は、ヒトIgG1 Fc領域に由来するFc領域中のL234A、L235AおよびD265A（LALA-DA）である。

30

【0355】

他の実施形態では、IgG4またはIgG2などのエフェクター機能が減少したIgGサブタイプを使用することが可能であってよい。

【0356】

FcRへの結合が改善された、または減弱したある特定の抗体バリエーションが記載されている（例えば、米国特許第6,737,056号；WO2004/056312、およびShieldsら、J. Biol. Chem. 9(2):6591～6604頁（2001）を参照されたい）。

【0357】

一部の実施形態では、例えば、米国特許第6,194,551号、WO99/51642、およびIdusogieら、J. Immunol. 164:4178～4184頁（2000）に記載されたような、C1q結合および／または補体依存性細胞傷害（CDC）の変更（すなわち、改善または減弱、好ましくは、減弱）をもたらす変更を、Fc領域中で行う。

40

【0358】

一部の実施形態では、例えば、半減期がより短くなるように、FcRn結合を減少させてもよい。他の実施形態では、FcRnの結合は正常であってよい。例えば、一部の実施形態では、正常なFcRn結合を、除去剤を含む方法において使用することができる。

【0359】

ある特定の態様では、抗体バリエーションは、FcRn結合を減少させる1つまたは複数の

50

アミノ酸置換、例えば、Fc領域の253位および／または310位および／または435位（残基のEU番号付け）の置換を有するFc領域を含む。ある特定の態様では、抗体バリエーションは、253位、310位および435位にアミノ酸置換を有するFc領域を含む。一態様では、置換は、ヒトIgG1 Fc領域に由来するFc領域中のI253A、H310AおよびH435Aである。例えば、Grevys, A.ら、J. Immunol. 194 (2015) 5497～5508頁を参照されたい。

【0360】

ある特定の態様では、抗体バリエーションは、FcRn結合を減少させる1つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の310位および／または433位および／または436位（残基のEU番号付け）の置換を有するFc領域を含む。ある特定の態様では、抗体バリエーションは、310位、433位および436位にアミノ酸置換を有するFc領域を含む。一態様では、置換は、ヒトIgG1 Fc領域に由来するFc領域中のH310A、H433AおよびY436Aである（例えば、WO2014/177460A1を参照されたい）。例えば、一部の実施形態では、正常なFcRn結合を使用することができる。

10

【0361】

また、Fc領域バリエーションの他の例に関しては、Duncan & Winter, Nature 322: 738～40頁（1988）；米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821号；およびWO94/29351も参照されたい。

【0362】

本明細書で報告される抗体の重鎖のC末端は、アミノ酸残基PGKを有する完全なC末端であってもよい。重鎖のC末端は、1つまたは2つのC末端アミノ酸残基が除去された短縮されたC末端であってもよい。1つの好ましい態様では、重鎖のC末端は、短縮されたC末端PGである。

20

【0363】

本明細書で報告される全ての態様の一態様では、本明細書で特定されるC末端CH3ドメインを含む重鎖を含む抗体は、C末端グリシン残基（G446、アミノ酸位置のEUIンデックスによる番号付け）を含む。これは、本明細書で使用される用語「完全長抗体」または「完全長重鎖」と共に依然として明示的に包含される。

【0364】

抗体誘導体

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体をさらに修飾して、当業界で公知であり、容易に利用可能であるさらなる非タンパク質性部分を含有させることができる。抗体の誘導体化にとって好適な部分としては、限定されるものではないが、水溶性ポリマーが挙げられる。水溶性ポリマーの非限定例としては、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリエチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ－1,3-ジオキサラン、ポリ－1,3,6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸類（ホモポリマーまたはランダムコポリマー）、およびデキストランまたはポリ（n-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロプロピレン（propylene）グリコールホモポリマー類、プロロプロピレン（prolypropylene）オキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール類（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、ならびにその混合物が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造における利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量のものであってよく、分枝状または非分枝状であってもよい。抗体に結合したポリマーの数は変化してもよく、1つより多いポリマーが結合する場合、それらは同じか、または異なる分子であってもよい。一般に、誘導体化のために使用されるポリマーの数および／または型を、限定されるものではないが、改善しようとする抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が規定の条件下での治療において使用されるかどうかなどの考慮に基づいて決定することができる。

30

40

50

【0365】

別の実施形態では、抗体と、放射線への曝露によって選択的に加熱することができる非タンパク質性部分とのコンジュゲートが提供される。一実施形態では、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである（Kamra, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600~11605頁（2005））。放射線は、任意の波長のものであってもよく、限定されるものではないが、通常の細胞には害を及ぼさないが、抗体-非タンパク質性部分に近い細胞が殺傷される温度に非タンパク質性部分を加熱する波長が挙げられる。

【0366】

組換え法および組成物

例えば、米国特許第4,816,567号に記載されたような、組換え法および組成物を使用して、抗体を生産することができる。一実施形態では、本明細書に記載の抗体をコードする単離された核酸が提供される。そのような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および／または抗体のVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖および／または重鎖）をコードしてもよい。さらなる実施形態では、そのような核酸を含む1つまたは複数のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。さらなる実施形態では、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。1つのそのような実施形態では、宿主細胞は、（1）抗体のVLを含むアミノ酸配列および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または（2）抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクターおよび抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む（例えば、それを形質転換されている）。

【0367】

多重特異性抗体の場合、特定の抗体形式の重鎖および軽鎖成分のそれぞれをコードする核酸を提供することができる。そのような核酸を含むベクターまたはベクターのセットも提供される。

【0368】

一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはリンパ系細胞（例えば、Y0、NS0、Sp20細胞）である。一実施形態では、本発明による抗体を作製する方法であって、上で提供された抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現にとって好適な条件下で培養すること、および必要に応じて、宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から抗体を回収することを含む方法が提供される。

【0369】

抗体の組換え生産のために、例えば、上記のような、抗体をコードする核酸を単離し、さらなるクローニングおよび／または宿主細胞中での発現のために1つまたは複数のベクター中に挿入する。そのような核酸は、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離および配列決定することができる。

【0370】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現のための好適な宿主細胞としては、本明細書に記載の原核または真核細胞が挙げられる。例えば、特に、グリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされない場合、抗体を細菌中で産生させてもよい。細菌中での抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、第5,789,199号、および第5,840,523号を参照されたい（また、大腸菌（E. coli）中での抗体断片の発現を記載する、Charlton, Methods in Molecular Biology, 第248巻（B. K. C. Lo（編）、Humana Press, Totowa, NJ, 2003, 245~254頁も参照されたい）。発現後、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから抗体を単離し、さらに精製することができる。

【0371】

原核生物に加えて、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的または完全にヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす、真菌株および酵母株を含む、糸状菌または酵母などの真核微生物が、抗体をコードするベクターのための好適なクローニングまたは発現宿主である。Gerngross、Nat. Biotech. 22: 1409~1414頁(2004)、およびLiら、Nat. Biotech. 24: 210~215頁(2006)を参照されたい。

【0372】

グリコシル化抗体の発現のための好適な宿主細胞も、多細胞生物(無脊椎動物および脊椎動物)に由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物および昆虫細胞が挙げられる。特に、ヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*)細胞のトランスフェクションのための昆虫細胞と共に使用することができる、いくつかのバキュロウイルス株が同定されている。

【0373】

植物細胞培養物を宿主として利用することもできる。例えば、米国特許第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号、および第6,417,429号(トランスジェニック植物中で抗体を生産するためのPLANTIBODIES(商標)技術を記載している)を参照されたい。

【0374】

脊椎動物細胞を宿主として使用してもよい。例えば、懸濁液中で増殖するように適合された哺乳動物細胞株が有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1細胞株(COS-7)；ヒト胚性腎臓細胞株(例えば、Grahamら、J. Gen Virol. 36: 59頁(1977)に記載された293または293細胞；ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)；マウスセルトリ細胞(例えば、Mather、Biol. Reprod. 23: 243~251頁(1980)に記載されたTM4細胞；サル腎臓細胞(CV1)；アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)；ヒト子宮頸癌細胞(HELA)；イヌ腎臓細胞(MDCK；バッファローラット肝臓細胞(BRL3A)；ヒト肺細胞(W138)；ヒト肝臓細胞(HepG2)；マウス乳房腫瘍(MMT060562)；例えば、Matherら、Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44~68頁(1982)に記載されたTRI細胞；MRC5細胞；およびFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、DHFR-CHO細胞(Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216頁(1980))を含む、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞；ならびにY0、NS0およびSp2/0などの骨髓腫細胞株が挙げられる。抗体生産にとって好適なある特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、YazakiおよびWu、Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo (編)、Humana Press, Totowa, NJ)、255~268頁(2003)を参照されたい。

【0375】

アッセイ

本明細書で提供される抗体を、当業界で公知の様々なアッセイによって、その物理的／化学的特性および／または生物活性について同定、スクリーニング、または特性評価することができる。

【0376】

結合アッセイおよび他のアッセイ

一態様では、本発明の抗体は、例えば、ELISA、ウェスタンブロットなどの公知の方法によって、その抗原結合活性について試験される。

【0377】

別の態様では、競合アッセイを使用して、Pb-DOTAMまたはCEAへの結合について、例えば、PRIIT-0213またはPRIIT-0214と競合する抗体を同定することができる。ある特定の実施形態では、そのような競合抗体は、PRIIT-0213ま

たはP R I T-0 2 1 4が結合する同じエピトープ（例えば、線状または立体エピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的方法は、Morris (1996)、「Epitope Mapping Protocols」、Methods in Molecular Biology vol. 66 (Human a Press、Totowa、NJ)に提供されている。

【0378】

例示的な競合アッセイにおいては、固定化された抗原を、抗原（例えば、P R I T-0 2 1 3およびP R I T-0 2 1 4）に結合する第1の標識化抗体および抗原への結合について第1の抗体と競合するその能力について試験される第2の未標識化抗体を含む溶液中でインキュベートする。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。コントロールとして、固定化された抗原を、第2の未標識化抗体ではなく、第1の標識化抗体を含む溶液中でインキュベートする。第1の抗体の抗原への結合を可能にする条件下でインキュベートした後、過剰の未結合の抗体を除去し、固定化された抗原と結合した標識の量を測定する。固定化された抗原と結合した標識の量が、コントロール試料と比較して試験試料中で実質的に減少している場合、それは第2の抗体が抗原への結合について第1の抗体と競合していることを示す。HarlowおよびLane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY)を参照されたい。

【0379】

抗体親和性

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、1 nM以下、500 pM以下、200 pM以下、100 pM以下、50 pM以下、20 pM以下、10 pM以下、5 pM以下もしくは1 pM以下の、またはそうでなければ本明細書に記述されるような解離定数 (Kd) を有する。

【0380】

一実施形態では、Kdは、放射標識抗原結合アッセイ (RIA) によって測定される。一実施形態では、RIAは、目的の抗体のFabバージョンおよびその抗原を用いて実施される。例えば、抗原に対するFabの溶解結合親和性は、未標識抗原の滴定系列の存在下で、Fabと、最小濃度の (^{125}I) 標識された抗原とを平衡化させた後、抗Fab抗体でコートされたプレートを用いて結合した抗原を捕捉することによって測定される（例えば、Chenら、J. Mol. Biol. 293: 865~881頁 (1999)を参照されたい）。アッセイのための条件を確立するために、MICROTITER (登録商標) マルチウェルプレート (Thermo Scientific) を、50mM炭酸ナトリウム (pH 9.6) 中の $5\mu\text{g/ml}$ の捕捉抗Fab抗体 (Cappel Labs) で一晚コートした後、室温 (約23°C) で2~5時間にわたってPBS中の2% (w/v) ウシ血清アルブミンでブロックする。非吸着プレート (Nunc #269620) 中で、100 pMまたは26 pMの [^{125}I] -抗原を、目的のFabの段階希釈液と混合する（例えば、Prestaら、Cancer Res. 57: 4593~4599頁 (1997)における、抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一致する）。次いで、目的のFabを一晚インキュベートする；しかしながら、インキュベーションは、平衡に達するのを確保するために、より長い期間（例えば、約65時間）にわたって継続してもよい。その後、混合物を、室温でのインキュベーション（例えば、1時間にわたる）のために捕捉プレートに移す。次いで、溶液を除去し、PBS中の0.1%ポリソルベート20 (TWEEN-20 (登録商標)) でプレートを8回洗浄する。プレートが乾燥した時、150 μL /ウェルの閃光物質 (MICROSCINT-20 (商標); Packard) を添加し、TOPCOUNT (商標) ガンマカウンター (Packard) 上で10分間、プレートを計測する。20%未満またはそれと等しい最大結合を与えるそれぞれのFabの濃度が、競合結合アッセイにおける使用のために選択される。

【0381】

別の実施形態によれば、 K_d は、BIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。例えば、BIACORE（登録商標）-2000またはBIACORE（登録商標）-3000（BIACORE, Inc.、Piscataway、NJ）を使用するアッセイを、約10反応単位（RU）の固定された抗原CM5チップを用いて25℃で実施する。一実施形態では、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE, Inc.）を、供給業者の説明書に従ってN-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）およびN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化する。約10反応単位（RU）のカップリングしたタンパク質を達成するために、抗原を、10mM酢酸ナトリウム、pH4.8を用いて、5 μ l/分の流量での注入前に5 μ g/ml（約0.2 μ M）に希釈する。抗原の注入後、1Mのエタノールアミンを注入して、未反応の基をブロックする。動力学測定のために、Fabの2倍段階希釈液（0.78nM~500nM）を、約25 μ l/分の流量、25℃で0.05%ポリソルベート20（TWEEN-20（商標））界面活性剤（PBST）を含むPBS中に注入する。結合および解離センサーグラムを同時に適合させることによって、単純な1対1のLangmuir結合モデル（BIACORE（登録商標）Evaluation Softwareバージョン3.2）を使用して、結合速度（ k_{on} ）および解離速度（ k_{off} ）を算出する。平衡解離定数（ K_d ）は、 k_{off}/k_{on} 比として算出される。例えば、Chenら、J. Mol. Biol. 293: 865~881頁（1999）を参照されたい。上の表面プラズモン共鳴アッセイにより会合速度が10⁶M⁻¹s⁻¹を超える場合、流動停止を備えた分光光度計（Aviv Instruments）または攪拌キュベットを含む8000シリーズのSLM-AMINCO（商標）分光光度計（ThermoSpectronic）などの、分光光度計で測定された場合、漸増濃度の抗原の存在下、PBS、pH7.2中の20nM抗抗原抗体（Fab型）の25℃での蛍光放出強度（励起=295nm；放出=340nm、16nm帯域通過）の増大または低下を測定する蛍光消光技術を使用することによって、会合速度を決定することができる。

【0382】

別の実施形態では、 K_d は、SET（溶液平衡滴定）アッセイを使用して測定される。このアッセイによれば、試験抗体を、典型的には一定の濃度で適用し、試験抗原の段階希釈液と混合する。平衡を確立するためにインキュベートした後、遊離抗体の一部を、抗原でコートされた表面上に捕捉し、一般的には、電気化学発光（例えば、Haenelら、Analytical Biochemistry 339（2005）182~184頁に記載されている）を使用して、標識/タグ付けされた抗種抗体で検出する。

【0383】

例えば、一実施形態では、384ウェルのストレプトアビジンプレート（Nunc、Microcoat #11974998001）を、20ng/mlの濃度でPBSバッファー中の25 μ l/ウェルの抗原-ビオチン-異性体混合物と共に4℃で一晩インキュベートする。抗体試料と、遊離抗原との平衡化のために、0.01nM~1nMの抗体を、2500nM、500nMまたは100nMの抗原の濃度から開始して、1:3、1:2または1:1.7の希釈段階の関連抗原で滴定する。試料を、密閉されたREMP保存ポリプロピレンマイクロプレート（Brooks）中、4℃で一晩インキュベートする。一晩インキュベートした後、ストレプトアビジンプレートを、ウェルあたり90 μ lのPBSTで3回洗浄する。平衡化プレートに由来する15 μ lの各試料を、アッセイプレートに移し、RTで15minインキュベートした後、PBSTバッファー90 μ lで3回洗浄工程を行う。25 μ lのヤギ抗ヒトIgG抗体-PODコンジュゲート（Jackson、109-036-088、OSEP中で1:4000）を添加した後、PBSTバッファー90 μ lで6回洗浄工程を行うことによって、検出を実行する。25 μ lのTMB基質（Roche Diagnostics GmbH、カタログ番号11835033001）を、各ウェルに添加する。Safire2リーダー（Tecan）上、370/492nmで測定を行う。

【0384】

別の実施形態では、 K_d を、 $KinExA$ （結合平衡除外）アッセイを使用して測定する。このアッセイによれば、典型的には、抗原を、一定濃度の抗体結合部位中で滴定し、試料を平衡化させた後、抗原飽和抗体複合体を洗浄除去しながら、遊離抗体結合部位が抗原コートビーズ上に捕捉されるフローセルに通す。次いで、ビーズに捕捉された抗体を、標識された、例えば、蛍光標識された抗種抗体で検出する（Beeら、PloS One、2012；7（4）：e36261）。例えば、一実施形態では、 $KinExA$ 実験を、ランニングバッファーとしてPBS pH7.4を使用して、室温（RT）で実施する。1mg/mlのBSAを添加したランニングバッファー（「試料バッファー」）中で試料を調製する。0.25ml/分の流量を使用する。5pMの結合部位濃度を有する一定量の抗体を、100pMから開始する2倍段階希釈（0.049pM～100pMの濃度範囲）によって抗原で滴定する。抗原を含まない抗体の1つの試料は、100%のシグナル（すなわち、阻害なし）として働く。抗原-抗体複合体を、少なくとも24時間にわたってRTでインキュベートして、平衡に到達させる。次いで、平衡化した混合物を、5mlの容量で $KinExA$ システム中の抗原結合ビーズのカラムに通して、溶液の平衡状態を乱すことなく、未結合の抗体をビーズによって捕捉させる。捕捉された抗体を、試料バッファー中の250ng/mlのDyLight 650（C）にコンジュゲートした抗ヒトFc断片特異的二次抗体を使用して検出する。各試料を、全ての平衡実験のために2回測定する。「標準分析」法を使用する $KinExA$ ソフトウェア（バージョン4.0.11）に含まれる1部位均一結合モデルを使用して、データの非線形回帰分析からKDを得る。

10

20

【0385】

治療方法および組成物

上で考察された通り、本発明による多重特異性抗体は、放射性核種を標的に送達することが望ましい任意の治療にとって好適である。したがって、本発明は、治療方法における使用のための本明細書に記載の多重特異性または二重特異性抗体などの標的化された抗体を提供する。より具体的には、プレターゲティングされた放射線免疫療法の方法における使用のための本明細書に記載の標的化された抗体（例えば、多重特異性または二重特異性抗体）が提供される。そのような実施形態では、キレート化されたPbは、好ましくは、 ^{212}Pb である。

30

【0386】

上述の通り、治療は、患者の疾患細胞に標的化される細胞傷害活性によって治療可能である任意の状態のものであってよい。治療は、好ましくは、腫瘍またはがんのものである。しかしながら、本発明の適用可能性は、腫瘍およびがんに限定されない。例えば、治療は、ウイルス感染、または別の病原性生物、例えば、原核生物による感染のものであってもよい。必要に応じて、ターゲティングは、T細胞誘導性自己免疫性疾患またはT細胞性血液がんの治療のためのT細胞であってもよい。かくして、治療される状態は、HIV、狂犬病、EBVおよびカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスなどのウイルス感染、ならびに多発性硬化症および移植片対宿主疾患薬などの自己免疫性疾患を含んでもよい。

【0387】

本明細書で使用される場合、用語「がん」は、リンパ腫、リンパ性白血病、肺がん、非小細胞肺（NSCL）がん、細気管支肺胞上皮細胞肺がん、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭頸部がん、皮膚または眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃（stomach）がん、胃（gastric）がん、結腸がん、乳がん、子宮がん、ファローピアス管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、ホジキン病、食道がん、小腸がん、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、軟部組織肉腫、尿道がん、陰茎がん、前立腺がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎細胞癌、腎盂癌、中皮腫、肝細胞がん、胆管がん、中枢神経系（CNS）の新生物、脊椎腫瘍、脳幹神経膠腫、多形神経膠芽腫、星状細胞腫、神経鞘腫、上衣腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫およびユーイング肉腫などの固形がんと血液がんの両方を含み、上記がんのいずれ

40

50

かの難治性型、または上記がんの1つもしくは複数の組合せを含む。

【0388】

療法のために放射性同位体を組織または臓器に標的化する方法は、

i) 対象に、本明細書に記載の多重特異性または二重特異性抗体であって、標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化する、前記抗体を投与すること；および
ii) 続いて、DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種であって、細胞表面に局在化された抗体に結合する、DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種を個体に投与すること
を含んでもよい。

【0389】

必要に応じて、工程(i)と(ii)の間に、除去剤／ブロッキング剤を投与する。除去剤／ブロッキング剤は、Pb-DOTAMに特異的な抗原結合部位に結合し、キレート化された放射性核種によるその後の結合をブロックすることができる。除去剤は、金属イオンとキレート化され、除去部分にコンジュゲートされた、DOTAMまたはその機能的バリエーションを含んでもよい。

【0390】

好適な除去部分の例は、分子のサイズおよび／または流体力学半径を増大させ、循環中の抗体に結合する分子の能力と干渉することなく、腫瘍に接近する分子の能力を阻害する部分を含んでもよい。例示的な部分としては、親水性ポリマーが挙げられる。部分は、例えば、デキストラン、デキストリン、PEG、ポリシアル酸(PSA)、ヒアルロン酸、ヒドロキシエチルデンプン(HES)またはポリ(2-エチル2-オキサゾリン)(PEOZ)のポリマーまたはコポリマーであってもよい。他の実施形態では、部分は、XTENポリペプチド(非構造化親水性タンパク質ポリマー)、ホモアミノ酸ポリマー(HAP)、プロリン-アラニン-セリンポリマー(PAS)、エラスチン様ペプチド(ELP)、またはゼラチン様タンパク質(GLK)などの非構造化ペプチドまたはタンパク質であってもよい。ポリマーに関する好適な分子量は、例えば、少なくとも50kDa、例えば、50kDa~2000kDaの範囲にあってもよい。例えば、分子量は、200~800kDa、必要に応じて、300、350、400または450kDaより大きく、必要に応じて、700、650、600または550kDaより小さい、必要に応じて、約500kDaであってもよい。

【0391】

一部の実施形態では、除去剤は、例えば、以下にさらに記載されるような、デキストランまたはその誘導体にコンジュゲートされた、DOTAMまたはその機能的バリエーション(金属イオンとキレート化される)であってもよい。

【0392】

一部の実施形態では、抗体の除去剤に対する重量比は、1:1、2:1、3:1または4:1から、20:1、15:1、10:1、8:1、6:1または5:1までの範囲、例えば、1:1~20:1、1:1~10:1、2:1~8:1または2:1~6:1の範囲にあってもよい。

【0393】

一部の実施形態では、除去剤を、多重特異性抗体による治療の数時間または数日後に投与してもよい。一部の実施形態では、除去剤を、多重特異性抗体の少なくとも2、4、6、8、10、12、16、18、22もしくは24時間後、または少なくとも1、2、3、4、5、6もしくは7日後に投与することが好ましい場合がある。一部の実施形態では、除去剤を、抗体後14日以内、例えば、10、9、8、7、6、5、4、3または2日以内に投与することが好ましい場合がある。

【0394】

必要に応じて、除去剤を、多重特異性抗体の後、4~10日、4~7日、2~7日、または2~4日の間の期間で投与する。

【0395】

一部の実施形態では、P b放射性核種を、除去剤の後、数分、数時間または数日で投与する。一部の実施形態では、P b放射性核種を、除去剤の少なくとも30分後に、必要に応じて、除去剤の投与の48時間、24時間、8時間または4時間以内に投与することが好ましい場合がある。一部の実施形態では、P b放射性核種を、除去剤の投与の翌日に投与してもよい。

【0396】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体を、併用療法の一部として投与することができる。例えば、それらを、1つまたは複数の化学療法剤と共に投与することができる：化学療法剤と抗体とを、同時的に、またはいずれかの順序で連続的に投与することができる。

10

【0397】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体を、さらにまたはあるいは、放射線増感剤と共に投与してもよい。放射線増感剤と抗体とを、同時に、またはいずれかの順序で連続的に投与することができる。

【0398】

薬学的製剤

本明細書に記載の抗P b-DOTAM抗体、例えば、多重特異性または二重特異性抗体の薬学的製剤を、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、所望の純度を有するそのような抗体と、1つまたは複数の任意選択の薬学的に許容される担体とを混合することによって調製する(Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A. (編) (1980))。薬学的に許容される担体は、一般的には、用いられる用量および濃度でレシピエントに対して非毒性的であり、限定されるものではないが、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンなどの抗酸化剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンザルコニウムクロライド；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンなどのパラベン類；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、および他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成性対抗イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；および／またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。本明細書の例示的な薬学的に許容される担体は、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えば、rHuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質などの間質薬分散剤をさらに含む。rHuPH20を含む、ある特定の例示的なsHASEGPおよび使用方法は、米国特許出願公開第2005/0260186号および第2006/0104968号に記載されている。一態様では、sHASEGPを、コンドロイチナーゼなどの1つまたは複数のさらなるグリコサミノグリカナーゼと組み合わせる。

20

30

40

【0399】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤としては、米国特許第6,171,586号およびWO2006/044908に記載のものが挙げられ、後者の製剤は、ヒスチジン-酢酸バッファーを含む。

【0400】

本明細書の製剤はまた、治療される特定の適応症にとって必要な1つより多い活性成分、好ましくは、互いに有害に影響しない相補的活性を有するものを含有してもよい。例えば、上で考察された化学療法剤および／または放射線増感剤をさらに提供することが望ま

50

しい場合がある。そのような活性成分は、好適には、意図される目的にとって有効である量と一緒に存在する。

【0401】

活性成分を、例えば、液滴形成技術によって、または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョン中の、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリマー（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に捕捉することができる。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A.（編）（1980）に開示されている。

10

【0402】

徐放性調製物を調製することができる。徐放性調製物の好適な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、これらのマトリックスは、造形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態にある。

【0403】

in vivoでの投与のために使用される製剤は、一般的には滅菌性である。無菌状態は、例えば、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成することができる。

【0404】

診断および検出のための方法および組成物

本発明は、対象に対して実行される診断方法における使用のための、標的抗体、例えば、本明細書に記載の多重特異性抗体をさらに提供する。診断方法は、例えば、増殖性疾患または感染症を有すると疑われる対象を診断するための、プレターゲットングされた放射線免疫イメージングの方法であってもよい。そのような実施形態では、キレート化されたPbは、好ましくは、 ^{203}Pb である。

20

【0405】

イメージングのために放射性同位体を組織または臓器に標的化する方法は、

i) 対象に、本明細書に記載の多重特異性または二重特異性抗体であって、標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化する、前記抗体を投与すること；および

ii) 続いて、DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種であって、細胞の表面に局在化された抗体に結合する、DOTAMまたはその前記機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種を個体に投与することを含んでもよい。

30

【0406】

別の実施形態では、本明細書に記載の多重特異性または二重特異性抗体を、投与の時点でキレート化されたPb放射性核種と結合させてもよい。

【0407】

必要に応じて、方法は、

iii) DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種が局在化されるか、または局在化されると期待される組織または臓器をイメージングすることをさらに含んでもよい。

40

【0408】

別の実施形態では、本発明の方法は、対象が、

i) 標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化する、本明細書に記載の多重特異性または二重特異性抗体；および

ii) DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種であって、細胞の表面に局在化された抗体に結合する、DOTAMまたはその前記機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種を個体に以前に投与された、対象の組織または臓器をイメージングすることを含んでもよい。

【0409】

50

必要に応じて、工程 (i) と (ii) の間に、除去剤／ブロッキング剤を投与する。除去剤、除去剤のための投与レジメンおよび抗体の除去剤に対する重量比は、上記の通りであってよい。

【0410】

標的抗原は、本明細書で考察される任意の標的抗原であってもよい。一部の実施形態では、標的抗原は、上で考察された腫瘍特異的抗原であってよく、イメージングは、腫瘍または複数の腫瘍をイメージングする方法であってもよい。個体は、腫瘍を有することが知られているか、または有すると疑われてもよい。

【0411】

例えば、方法は、肺がん、非小細胞肺 (NSCL) がん、細気管支肺胞上皮細胞肺がん、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭頸部がん、皮膚または眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃 (stomach) がん、胃 (gastric) がん、結腸がん、乳がん、子宮がん、ファローピアス管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、ホジキン病、食道がん、小腸がん、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、軟部組織肉腫、尿道がん、陰茎がん、前立腺がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎細胞癌、腎盂癌、中皮腫、肝細胞がん、胆管がん、中枢神経系 (CNS) の新生物、脊椎腫瘍、脳幹神経膠腫、多形神経膠芽腫、星状細胞腫、神経鞘腫、上衣腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫およびユーイング肉腫 (上記がんのいずれかの難治性型、または上記がんの1つもしくは複数の組合せを含む) を有するか、または有すると疑われる個体において腫瘍をイメージングする方法であってもよい。

【0412】

除去剤

本発明のさらなる態様では、本発明者らは、新規除去剤を開発した。そのような除去剤を、本明細書に記載のような診断、イメージングまたは治療の方法のいずれかにおいて使用することができる。

【0413】

一態様では、本発明は、M-DOTAMまたはその機能的バリエーションにコンジュゲートされた、デキストランまたはその誘導体を含むデキストランベースの除去剤に関する。

【0414】

一部の実施形態では、除去剤は、以下の式：

デキストラン- (リンカー- (M-DOTAM))_x

[式中、

デキストランは、デキストランまたはその誘導体であり；

リンカーは、連結部分であり；

M-DOTAMは、DOTAMまたは金属イオンが組み込まれたその機能的バリエーションであり；および

$x \geq 1$ である]

の化合物であってもよい。

【0415】

一部の実施形態では、連結部分は、尿素基 (-NH-C(O)-NH-)、置換された尿素基 (-NR^x-C(O)-NR^x- [式中、一方もしくは両方のR^x基はHではない])、チオウレア基 (-NH-C(S)-NH-)、置換されたチオウレア基 (-NR^x-C(S)-NR^x- [式中、一方もしくは両方のR^x基はHではない])、アミド基 (-C(O)-NH-)、置換されたアミド基 (-C(O)-NR^x- [式中、R^xはHではない])、チオアミド基 (-C(S)-NH-)、置換されたアミド基 (-C(S)-NR^x- [式中、R^xはHではない])、トリアゾール基、または置換されたトリアゾールから選択される1つまたは複数の二価官能基であってよい、またはそれを含んでもよい。これらの実施形態では、連結部分は、必要に応じて、アルキレン基、アリーレン基、ヘテロアリーレン基、アルキレン基およびヘテロアルキレン基などの、1つまたは複数のさらなる二価官能基を含んでもよい。置換基R^xは、特に限定されない。特定の実施形態

では、 R^x は、存在する場合、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_5 \sim C_{12}$ アリーール、 $C_5 \sim C_{12}$ ヘテロアリーールおよびハロ基から選択される。

【0416】

特定の実施形態では、連結部分は、尿素基、チオウレア基、アミド基、チオアミド基、またはトリアゾール基から選択される1つまたは複数の二価官能基であってもよい、またはそれを含んでもよい。

【0417】

好ましい実施形態では、連結部分は、二価チオウレア官能基または二価チオアミド官能基を含む。

【0418】

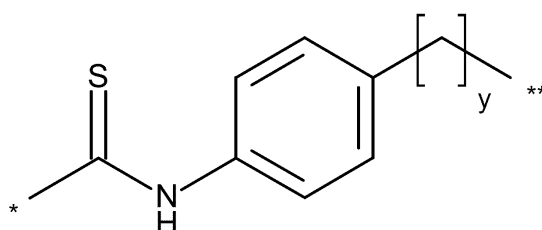
一部の実施形態では、連結部分は、二価チオウレア官能基および置換されていてもよいアリーレン基を含む。一部の実施形態では、連結部分は、二価チオウレア官能基、置換されていてもよいアリーレン基および置換されていてもよいアルキレン基を含む。特定の実施形態では、連結部分は、その窒素原子の1つを介して、置換されていてもよいアリーレン基に共有的に結合した二価チオウレア官能基を含む。さらなる実施形態では、連結部分は、その窒素原子の1つを介して、置換されていてもよいアリーレン基に共有的に結合した二価チオウレア官能基を含み、置換されていてもよいアリーレン基は、置換されていてもよいアルキレン基に共有的に結合している。好ましい実施形態では、アリーレン基は、非置換である。特定の実施形態では、アリーレン基は、フェニレン基である。好ましい実施形態では、アルキレン基は、非置換である。特定の実施形態では、アルキレン基は、 $C_1 \sim C_6$ アルキエン (alkylene) 基である。特に好ましい実施形態では、アルキレン基は、メチレンおよびエチレンから選択される。連結部分に存在する場合、アリーレン基およびアルキレン基は、非置換であってもよい。特定の実施形態では、連結部分は、その窒素原子の1つを介して、アリーレン基に共有的に結合した二価チオウレア官能基からなり、アリーレン基は、アルキレン基に共有的に結合している。

【0419】

一部の実施形態では、連結部分は、二価チオアミド官能基および置換されていてもよいアリーレン基を含む。一部の実施形態では、連結部分は、二価チオアミド官能基、置換されていてもよいアリーレン基および置換されていてもよいアルキレン基を含む。特定の実施形態では、連結部分は、その窒素原子の1つを介して、置換されていてもよいアリーレン基に共有的に結合した二価チオアミド官能基を含む。さらなる実施形態では、連結部分は、その窒素原子の1つを介して、置換されていてもよいアリーレン基に共有的に結合した二価チオアミド官能基を含み、置換されていてもよいアリーレン基は、置換されていてもよいアルキレン基に共有的に結合している。好ましい実施形態では、アリーレン基は、非置換である。特定の実施形態では、アリーレン基は、フェニレン基である。好ましい実施形態では、アルキレン基は、非置換である。特定の実施形態では、アルキレン基は、 $C_1 \sim C_6$ アルキエン基である。特に好ましい実施形態では、アルキレン基は、メチレンおよびエチレンから選択される。連結部分に存在する場合、アリーレン基およびアルキレン基は、非置換であってもよい。特定の実施形態では、連結部分は、その窒素原子の1つを介して、アリーレン基に共有的に結合した二価チオアミド官能基からなり、アリーレン基は、アルキレン基に共有的に結合している。

【0420】

一部の実施形態では、連結部分は、以下の式：



10

20

30

40

50

〔式中、 y は 1 ～ 6（好ましくは、1 または 2）であり、* はデキストランまたはその誘導体への結合点を表し、** は D O T A M またはその機能的バリエーションの環原子への結合点を表す〕

の基であってもよい、またはそれを含んでもよい。

【0421】

一部の実施形態では、連結部分を、アミン（好ましくは、第 1 級アミン）と、イソシアネートまたはイソチオシアネートとのコンジュゲーションから形成させることができる。そのようなコンジュゲーションは、それぞれ、二価尿素官能基およびチオウレア官能基を形成する。そのような実施形態では、イソシアネートが反応物の 1 つである場合、連結部分は、必要に応じて、二価尿素官能基または二価アミド官能基を含むと考えることもよい。そのような実施形態では、イソチオシアネートが反応物の 1 つである場合、連結部分は、適宜、二価チオウレア官能基または二価チオアミド官能基を含むと考えることもよい。

【0422】

好ましくは、 x が 1 より大きい場合、それぞれのデキストランは、1 分子あたり 1 より大きい平均数の M-D O T A M またはその機能的バリエーションを有する。例えば、 x は、2 以上、5 以上、10 以上、15 以上、20 以上、25 以上、30 以上、35 以上、40 以上、または好ましくは 50 以上であってもよい。本発明者らは、複数の M-D O T A M 基で標識されたデキストランを使用して、改善された除去を達成することができることを見出した。

【0423】

D O T A M またはその機能的バリエーションは、ただ 1 つのリンカーを含み、デキストランの架橋を防止することができる。

【0424】

除去剤において有用であり得るデキストランの誘導体としては、デキストランが 1 つまたは複数のアミンで置換されているアミノデキストランが挙げられる。特に有用なものは、デキストランの 1 つまたは複数のヒドロキシル基が、アミノ置換カルボキシメチルアミド基で置換されているアミノデキストランである。デキストランをカルボキシメチル基で修飾し（例えば、クロロ酢酸と反応させ）、次いで、置換されていてもよいジアミン（好ましくは、 α , ω -アルキレンジアミン、例えば、エチレンジアミンなどのアルキルジアミン）とさらに反応させることによって、そのような化合物を生産することができる。

【0425】

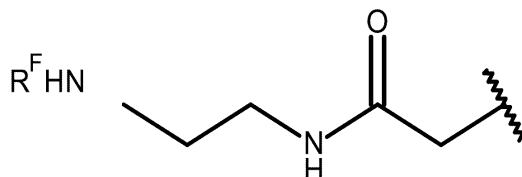
アミノ基は、リンカーのための結合点を提供する。少なくとも 30 %、好ましくは少なくとも 40 %、より好ましくは少なくとも 50 % の利用可能なアミノ基を、D O T A M またはその機能的バリエーションで置換することができる。

【0426】

好ましくは、上の式中の「デキストラン」は、それ自身、エチレンジアミンで置換されている 1 つまたは複数のカルボキシメチル基で置換されたデキストランに対応する、アミノデキストランである。

【0427】

デキストランは、式 $\text{-CH}_2\text{C(=O)NH(CH}_2\text{)}_f\text{NHR}^f$ [式中、 R^f は水素または D O T A M に対するリンカーを示し、 f は 1 ～ 6、最も好ましくは、2 である] の 1 つまたは複数の基で置換されていてもよい。例えば、基は、以下の式：

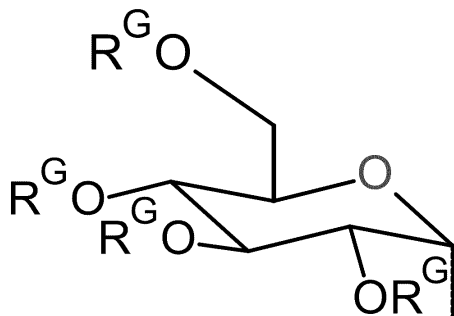


〔式中、破線は、デキストラン上の酸素への結合点を示す〕

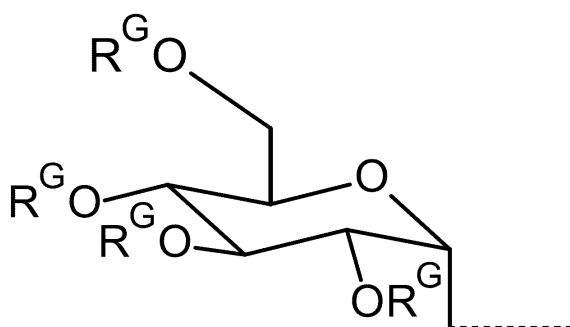
を有してもよい。

【0428】

アミノデキストランは、例えば、 α (1, 2)、 α (1, 3) または α (1, 4) グリコシド結合によって連結された他のグルコピラノシル単位の分枝を有してもよい、主に α (1, 6) 結合グルコピラノシル反復単位の骨格を有してもよい。ヒドロキシル基の少なくともいくつかは、上で考察されたようにアミノ置換カルボキシメチルアミド基（特に、式 $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHR}^{\text{F}}$ の基）で置換される。換言すれば、アミノデキストランは、以下の式：



10



20

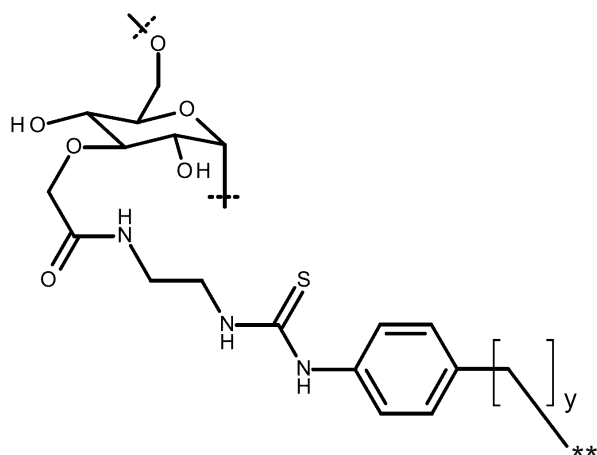
〔 R^{G} はそれぞれ、H、アミノ置換カルボキシメチルアミド基（ $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHR}^{\text{F}}$ など）、または主に、 α (1, 6) 結合を介する、さらなるグルコピラノシル単位への結合であり、破線は隣接単位への結合を示す〕

30

の単位を含んでもよい。

【0429】

除去剤は、以下の式：



40

50

〔式中、**は、DOTAMまたはその機能的バリエーションへの結合点を表し、yは上で定義された通りである〕の1つまたは複数の単位を含んでもよい。

【0430】

デキストランの誘導体は、アミノ酸、またはグルコース以外の糖類から選択される1つまたは複数の基で修飾されたデキストランまたはアミノデキストランを含んでもよい。例えば、デキストランは、Glu、(Glu)₂、(Glu)₃、または(Glu)₄を含む、1つまたは複数のグルタミン酸またはポリグルタミン酸単位で修飾（例えば、キャップ）されていてもよい。さらに、またはあるいは、デキストランは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)などのグルコース以外の糖類、またはtri-GalNAcなどのそのような糖類から形成される多糖類で修飾（例えば、キャップ）されていてもよい。

10

【0431】

一部の実施形態では、デキストラン成分の分子量は、少なくとも50 kDa、例えば、50 kDa~2000 kDaの間であってもよい。例えば、分子量は、200~800 kDa、必要に応じて、300、350、400または450 kDaより大きく、必要に応じて、700、650、600または550 kDaより小さい、必要に応じて、約500 kDaであってもよい。

【0432】

デキストランまたはそのデキストラン誘導体のグルコース単位の数のパーセンテージとしてのアミノ基の数（アミノ基によるグルコース単位の「飽和」）は、少なくとも0.5%、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%であってよい、または100%であることが好ましい場合がある。一部の実施形態では、アミノ基によるデキストランの飽和は、少なくとも、または約1%または10%、例えば、1%~10%であることが好ましい場合がある。

20

【0433】

デキストラン誘導体のアミノ単位の数のパーセンテージとしてのDOTAM基の数（DOTAMによるアミノデキストラン成分の「飽和」）は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%であってよい、または100%であることが好ましい場合がある。一部の実施形態では、DOTAMによるデキストラン誘導体の利用可能なアミノ基の飽和は、少なくとも、または約40%または50%、例えば、40~60%であることが好ましい場合がある。

30

【0434】

除去剤の使用に伴う1つの潜在的な困難は、それらが腫瘍に進入し、腫瘍関連抗原に結合し、放射性リガンドのその後の結合に負に影響し得る可能性である。

【0435】

本発明者らはさらに、i) 高い平均分子量を有する、およびii) ある特定のサイズより下の断片が除去されるように分子量カットオフにかけられた、デキストランベースの除去剤を使用する場合、腫瘍への低い除去剤浸透と共に、血液からの良好なクリアランスを達成することができることを見出した。カットオフを、コンジュゲーション工程の前にデキストランもしくはデキストラン誘導体に適用する；および／またはコンジュゲーション後に除去剤に適用する；および／または金属との複合体化の後に除去剤に適用することができる。

40

【0436】

かくして、本発明において有用な除去剤は、金属キレートにコンジュゲートされた、デキストランまたはその誘導体（例えば、上で定義されたもの、好ましくは、アミノデキストラン）を含むデキストランベースの除去剤であって、i) デキストランまたはその誘導体の平均分子量が、好ましくは200~800 kDa、必要に応じて、300、350、400または450 kDaより大きく、必要に応じて、700、650、600または5

50

50 kDa未満であり、必要に応じて、約500 kDaである、およびii) 分子量カットオフ未満のデキストラン、デキストラン誘導体または除去剤が除去されており、分子量カットオフが50 kDa以上、100 kDa以上または200 kDa以上、必要に応じて、50 kDa～250 kDaまたは50 kDa～200 kDa、必要に応じて、100 kDa～200 kDaの範囲にあり、必要に応じて、約100 kDaまたは150 kDaまたは200 kDaである、デキストランベースの除去剤であってもよい（疑いを避けるために、本発明者らは、カットオフが50 kDa以上と記述される場合、これは、カットオフが50 kDaまたは50 kDaを超える任意の値であってもよいことが、それは依然として、除去されるカットオフ未満のデキストラン、デキストラン誘導体または除去剤であることを意味する）。

10

【0437】

カットオフより下の分子量を有する種の量は、例えば、除去剤の重量パーセントとして、5 wt%以下、4 wt%以下、3 wt%以下、2 wt%以下、1 wt%以下、0.5 wt%以下、0.4 wt%以下、0.3 wt%以下、0.2 wt%以下、0.1 wt%以下または0.01 wt%以下であってもよい。好ましくは、除去剤は、本質的にはカットオフより下の分子量を有する種を含まない。

【0438】

分子量カットオフは、濾過、例えば、ダイアフィルトレーション、限外濾過、タンジェント流濾過またはクロスフロー濾過によって達成することができる。好ましくは、少なくとも2回、必要に応じて、少なくとも3回の濾過工程が実行される。「平均分子量」とは、本発明者らは、SEC-MALS分析によって決定される重量平均分子量を意味する。

20

【0439】

DOTAMまたはその機能的バリエーションに組み込まれた場合、金属が金属イオンとして存在し、酸化状態が特定の元素に応じて変化することが理解されるであろう。かくして、知識のある読者であれば、例えば、鉛、Pb、または ^{206}Pb という用語が、その元素のイオン形態、特に、Pb(II)を包含することが意図されることを理解できる。

【0440】

除去剤中に存在する金属は、鉛の安定な（非放射性）同位体、または別の金属イオンの安定な、もしくは本質的に安定な同位体であってもよいが、但し、金属イオン-DOTAM複合体は、抗体によって高い親和性で認識される。例えば、他の好適な金属は、Zn (Zn^{2+})、Ca (Ca^{2+}) または ^{209}Bi (Bi^{2+}) であってもよく、後者は放射性であるが、その非常に長い半減期のため、実質的に安定であると考えられる。

30

【0441】

さらなる態様では、本発明は、デキストランまたはデキストラン誘導体をDOTAMまたはその機能的バリエーションもしくは誘導体にコンジュゲートすることを含む、除去剤を調製する方法であって、DOTAMまたはその機能的バリエーションのデキストランへのコンジュゲーションの前および／または後に、DOTAMをPbまたは上記の別の金属イオン〔例えば、Pb(II)〕でキレート化することを含む、除去剤を調製する方法に関する。

【0442】

さらなる態様では、本発明は、除去剤を調製する方法であって、

40

DOTAMまたはその機能的バリエーションもしくは誘導体をデキストランまたはデキストラン誘導体にコンジュゲートすることによって、コンジュゲートを形成することを含む；

コンジュゲーションの前に、デキストランまたはデキストラン誘導体を濾過工程にかけて、例えば、50 kDa以上、100 kDa以上もしくは200 kDa以上、必要に応じて、50 kDa～250 kDaもしくは50 kDa～200 kDa、必要に応じて、100 kDa～200 kDaの範囲の分子量カットオフ／閾値より下の種、例えば、100 kDa、150 kDaもしくは200 kDaより下の種を除去するか、または

方法が、コンジュゲートを濾過工程にかけて、例えば、50 kDa以上、100 kDa以上もしくは200 kDa以上、必要に応じて、50 kDa～250 kDaもしくは50

50

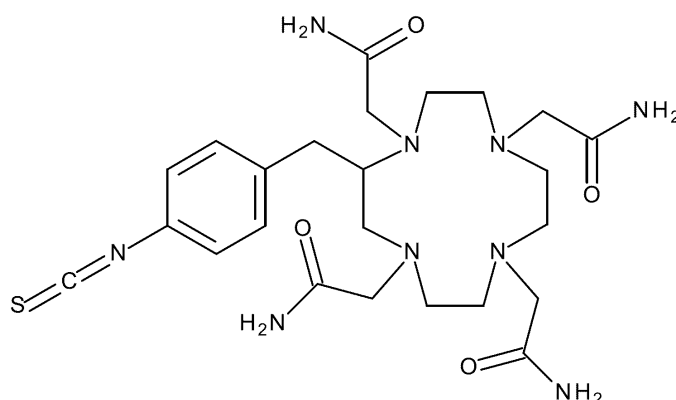
kDa～200kDa、必要に応じて、100kDa～200kDaの範囲の分子量カットオフ／閾値より下の種、例えば、100kDa、150kDaもしくは200kDaより下の種を除去することをさらに含む、除去剤を調製する方法に関する。

【0443】

上記のように、本発明者らは、分子量カットオフを適用して、ある特定のサイズより下の断片を除去することが有益であることを見出した。濾過方法は、例えば、ダイアフィルトレーションであってもよい。知識のある読者であれば、「分子量カットオフ／閾値より下の種を除去する」における単語「除去する」は、「数を減少させる」と同義であり、用いられる特定の濾過方法に応じて、いくらかの残留低分子量種が残存してもよいことを理解できる。カットオフより下の分子量を有する種の量は、例えば、除去剤の重量パーセントとして、5wt%以下、4wt%以下、3wt%以下、2wt%以下、1wt%以下、0.5wt%以下、0.4wt%以下、0.3wt%以下、0.2wt%以下、0.1wt%以下または0.01wt%以下であってもよい。好ましくは、除去剤は、本質的には、濾過後にカットオフ／閾値より下の分子量を有する種を含まない。

【0444】

DOTAMの機能的バリエーションまたは誘導体は、上で定義された通りであってよく、少なくとも1つのR¹基は、リンカー部分として働く。例えば、好適な（リンカー（M-DOTAM））基を、以下の式の化合物と、上記のアミノデキストランとを反応させることによって形成させることができる：



【0445】

この化合物の合成は、Chappellら、Nuclear Medicine and Biology、第27巻、93～100頁、2000に記載されており、DOTAM誘導体は、Macrocyclics, Inc. (Plano, Texas) から市販されている。

【0446】

それぞれのデキストラン誘導体が平均で1個より多いDOTAMを有するように、DOTAMまたはその機能的バリエーションを過剰に添加してもよい。それぞれのデキストラン上のDOTAMまたはその機能的バリエーションの平均数は、1より大きい、例えば、2以上、3以上、4以上、5以上、10以上、15以上、20以上、25以上、30以上、35以上、40以上、50以上、100以上、または好ましくは、40以上であってもよい。本発明者らは、複数のM-DOTAM基にコンジュゲートされたデキストランを使用して、改善された除去を達成することができることを見出した。

【0447】

好ましくは、デキストランは、200～800kDa、必要に応じて、300、350、400または450kDaより大きく、必要に応じて、700、650、600または550kDaより小さい、必要に応じて、約500kDaの平均分子量を有する。

【0448】

除去剤を調製する方法はまた、D O T A Mまたはその機能的バリエーションを、金属イオンとキレート化することを含む、キレート化工程を含んでもよい。金属イオンは、非放射性同位体、例えば、P b、C a、Z nの非放射性同位体、または ^{209}Bi などの実質的に安定な同位体であってもよい。

【0449】

キレート化工程は、D O T A Mもしくはその機能的バリエーションのデキストランへのコンジュゲーションの前に、および／またはD O T A Mもしくはその機能的バリエーションのデキストランへのコンジュゲーションの後に、必要に応じて、濾過工程の前に実行される。D O T A Mまたはその機能的バリエーションによる金属イオンのキレート化は、二重特異性抗体の除去剤への適切な結合を確保する、例えば、D O T A Mまたはその機能的バリエーションが抗体と遭遇するための正確なコンフォメーションを採ることを確保するのに必要であってよい。

10

【0450】

方法がキレート化工程を含む場合、方法は好ましくは、未結合の金属を除去するその後の工程も含む。これは、さらなるキレート剤を添加することによって達成することができ、その後、濾過工程中にデキストランに結合したD O T A Mまたはその機能的バリエーションから分離することができる。さらなるキレート剤は好ましくは、D O T A Mまたはその機能的バリエーションとは異なる。好ましくは、さらなるキレート剤は、サイズに基づく分離を容易にするために、デキストラン-キレート剤コンジュゲートよりも低い分子量を有する。例えば、さらなるキレート剤は、エチレンジアミノ四酢酸（E D T A）などの、ポリアミノカルボン酸またはその塩であってもよい。

20

【0451】

好ましくは、キレート剤を調製する方法は、

i) D O T A Mまたはその機能的バリエーションもしくは誘導体をデキストランまたはデキストラン誘導体にコンジュゲートすることによって、コンジュゲートを形成すること；

ii) 必要に応じて、工程(i)の生成物から低分子量種を除去すること；

iii) コンジュゲートを、金属イオン、例えば、P b、B i、Z nまたはC aのイオンでキレート化すること；

iv) さらなるキレート剤を添加して、未結合の金属イオンをキレート化すること；および

30

v) 濾過工程を実行して、分子量カットオフ／閾値より下の種を除去することを含む。

【0452】

D O T A M-キレート化されたP b放射性核種

D O T A Mまたはその機能的バリエーションでキレート化されたP b放射性核種を、本明細書に記載の診断、イメージングまたは治療の方法のいずれかにおいて使用することができる。そのような方法において使用される場合、D O T A Mまたはその機能的バリエーションでキレート化されたP b放射性核種は、組成物中に含まれることが理解されるであろう。1つの特定の実施形態では、組成物は、D O T A Mまたはその機能的バリエーションによってキレート化されたP b放射性核種と、P b放射性核種でキレート化されていないD O T A Mまたはその機能的バリエーションを含む。かくして、別の態様では、本発明は、そのような組成物、および／または本明細書に記載のイメージングもしくは治療の方法のいずれかにおける使用のためのそのような組成物に関する。そのような方法において言及されるD O T A Mでキレート化されたP b放射性核種は、本明細書に記載の組成物の形態であってもよい。

40

【0453】

P b放射性核種でキレート化されていないD O T A Mまたはその機能的バリエーションは、キレート化されていないD O T A Mまたはその機能的バリエーションであってもよい。i n v i v oで使用される場合、キレート化されていないD O T A Mまたはその機能的バリエーションは、環境由来の金属イオン、例えば、カルシウムイオンとの複合体を形成することが

50

できる。DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化されたそのようなカルシウムイオンは、薬理的に不活性であり、腫瘍中の標的に由来するDOTAMまたはそのバリエーションでキレート化された薬理的に活性なPb放射性核種を潜在的にブロックすることができ、したがって、治療の有効性、ならびに／またはイメージングおよび診断の標準化された取込み値を減少させ得る。

【0454】

本発明者らは、規定の条件下で、キレート化されていないDOTAMまたはその機能的バリエーションを消光することによって、キレート化されたPb放射性核種の*in vivo*製剤の制御を増大させることができる、および／または薬学的に活性なキレートと薬学的に不活性なキレートとの潜在的な競合を回避するか、もしくは減少させることができる。したがって、一部の実施形態では、Pb放射性核種でキレート化されていないDOTAMまたはその機能的バリエーションは、非放射性金属イオンとキレート化されているDOTAMまたはその機能的バリエーションである。

10

【0455】

一部の実施形態では、キレート化されたPb放射性核種は、 ^{212}Pb である。一部の実施形態では、キレート化されたPb放射性核種は、 ^{203}Pb である。

【0456】

DOTAMまたはその機能的バリエーションに組み込まれた場合、Pb放射性核種が金属イオンとして存在し、酸化状態が特定の元素に応じて変化することが理解されるであろう。かくして、知識のある読者であれば、例えば、鉛、Pb、または ^{206}Pb という用語が、その元素のイオン形態、特に、Pb(II)を包含することが意図されることを理解できる。

20

【0457】

組成物中に存在する非放射性金属は、鉛の安定な（非放射性）同位体、または別の金属イオンの安定な、もしくは本質的に安定な同位体であってもよい。例えば、他の好適な金属は、Gd、(Gd²⁺)、Cu(Cu²⁺)、Zn(Zn²⁺)、Ca(Ca²⁺)または ^{209}Bi (Bi²⁺)であってもよく、後者は放射性であるが、その非常に長い半減期のため、実質的に安定であると考えられる。一部の実施形態では、金属は、CaまたはCuであり、一部の実施形態では、金属はCaである。

【0458】

DOTAMの機能的バリエーションまたは誘導体は、上で定義された通りであってもよい。

30

【0459】

さらなる態様では、本発明は、DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化されたPb放射性核種を含む組成物を調製する方法であって、

i) Pb放射性核種を提供すること、

ii) Pb放射性核種を、DOTAMまたはその機能的バリエーションでキレート化すること、

iii) キレート化されていないDOTAMまたはその機能的バリエーションを、非放射性金属イオンとキレート化すること

を含む方法に関する。

【0460】

工程iii)におけるキレート化されていないDOTAMまたはその機能的バリエーションは、工程ii)においてPb放射性核種でキレート化されなかったDOTAMまたはその機能的バリエーションである。

40

【0461】

非放射性金属イオンは、Pb、Ca、Zn、GdまたはCuのイオンであってもよい。一部の実施形態では、金属イオンは、CaまたはCuのイオンである。一部の実施形態では、金属イオンは、Caのイオン、特に、Ca²⁺である。

【0462】

一部の実施形態では、工程ii)後に残存するキレート化されていないDOTAMまたはその機能的バリエーションは、Pb放射性核種に添加されたDOTAMまたはその機能的バリエーションである。

50

リアントの少なくとも90mol%、少なくとも95mol%、少なくとも99mol%である。1つの特定の実施形態では、工程i i)後に残存するキレート化されていないDOTAMまたはその機能的バリエーションは、少なくとも99mol%である。

【0463】

一部の実施形態では、工程i i i)後に残存するキレート化されていないDOTAMまたはその機能的バリエーションは、Pb放射性核種に添加されたDOTAMまたはその機能的バリエーションの5mol%未満、2mol%未満、1mol%未満、0.1mol%未満、0.01mol%未満である。1つの特定の実施形態では、工程i i i)後に残存するキレート化されていないDOTAMまたはその機能的バリエーションは、1mol%未満、0.1mol%未満、0.01mol%未満である。

10

【0464】

工程a)で提供されるPb放射性核種を、目的のPb放射性核種を崩壊させる放射性材料であって、固体材料に結合する放射性材料を生成器に入れることによって生成することができる。例えば、 ^{212}Pb の生産におけるそのような放射性材料は、 $^{224}\text{ラジウム}$ であってもよい。次いで、目的の放射性核種を、生成器から放射性および化学的不純物を含む水溶液中に抽出する。目的のPb放射性核種および不純物を含む水溶液を、カラム上での液体クロマトグラフィーによって精製する。カラム上での液体クロマトグラフィーは、抽出クロマトグラフィーまたは分配クロマトグラフィーであってもよい。抽出または分配クロマトグラフィーは、有機相、または抽出物と、水性相との間で分離される要素の分布に基づくものであり、抽出物は、不活性支持体に結合し、固定相を形成するが、水性相は移動相である。

20

【0465】

抽出クロマトグラフィーは、水と混和しない有機希釈剤、典型的には、長い炭化水素鎖アルコール、換言すれば、Cx鎖以上中の溶液中で、抽出物としてエーテルクラウン、特に、シクロヘキシルまたはベンジル基が、直鎖または分枝鎖を有する、1または複数のC[Cに対する]2アルキル基で置換されている、ジシクロヘキサノー1,8-クラウン-6またはジベンゾ-1,8-クラウン-6を含む固定相を使用してもよい。

【0466】

特に、好ましくは、オクタン-1-オール中で希釈された、抽出物として4,4'-(5'-ジ-エール(er)-ブチルシクロヘキサノー1,8-クラウン-6を含む固定相を使用してもよい。そのような固定相は、典型的には、ラジウム- ^{224} 生成器から ^{212}Pb を抽出するために使用される水溶液の型に対応する、1.5~2.5mol/Lの強酸を含む水溶液中に、99%を超えて選択的に残存する ^{212}Pb が存在する利点を有する。この型の固定相は、例えば、ボトル中で利用可能であるだけでなく、商品名「Pb樹脂」の下でTRISKEM Internationalという会社から、クロマトグラフィーのための即時使用可能なカラムまたはカートリッジ中に包装される。

30

【0467】

あるいは、所望の放射性核種および不純物を含む溶液を、イオン交換クロマトグラフィー、例えば、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製することもできる。

【0468】

^{212}Pb を生産し、精製する方法は、WO2013174949に記載されている。

40

【0469】

配列

本明細書に記載のある特定の配列を、以下の表に提供する。

50

表 2

配列番号	説明	配列
1	重鎖 CDR1 <Pb-Dotam> PRIT-213	gfslstysms
2	重鎖 CDR2 <Pb-Dotam> PRIT-213	figsrgdtyyaswakg
3	重鎖 CDR3 <Pb-Dotam> PRIT-213	erdpygggapphl
4	軽鎖 CDR1 <Pb-Dotam> PRIT-213	qsshsvysdndla
5	軽鎖 CDR2 <Pb-Dotam> PRIT-213	qasklas
6	軽鎖 CDR3 <Pb-Dotam> PRIT-213	lggyddesdyg
7	重鎖可変ドメイン 1 <Pb-Dotam> PRIT-213	vtlkesgpvl vkptetltlt ctvsgfslst ysmswirqpp gkalewlgfi gsergdyyas wakgrltisk dtsksqvvlt mtnmdpvda tyycarerdp ygggapphl wgrgtlvtvs s
8	軽鎖可変ドメイン <Pb-Dotam> PRIT-213	iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq pedfatyycl ggyddesdy gfgggtkvei k
9	重鎖可変ドメイン <Pb-Dotam> PRIT-214	vqlqqwgagl lkpsetlslt cavygfslst ysmswirqpp gkglewigfi gsergdyyas wakgrvtisr dtsknqvsik lssvtaadta vyycarerdp ygggapphl wgrgtlvtvs s
10	軽鎖可変ドメイン <Pb-Dotam> PRIT-214	iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq pedfatyycl ggyddesdy gfgggtkvei k
11	重鎖 CDR1 <CEA>	GFNIKDTYMH
12	重鎖 CDR2 <CEA>	RIDPANGNSKYVPKFQG
13	重鎖 CDR3 <CEA>	FGYYVSDYAMAY
14	軽鎖 CDR1 <CEA>	RAGESVDIFGVGFLH
15	軽鎖 CDR2 <CEA>	RASNRAT
16	軽鎖 CDR3 <CEA>	QQTNEDPYT
17	重鎖可変ドメイン <CEA> 84.66	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLE WMGRIDPANGNSKY VPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCAPFGYYVSDYAM AYWGQGTTLVTVSS
18	軽鎖可変ドメイン <CEA> 84.66	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQKPGQAP RLLIYRASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIK
19	二重特異性、三価 <CEA/Pb-Dotam> PRIT- 214 VH_84.66 の重鎖 1	1 qvqlvsgae vkkpgsskv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfgrvti tadtststay melsslr sed tavvycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdckve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtrvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keyckvsnk algapiekti skakgqprep

10

20

30

40

		351 qvylppcrd eltknqvsllw clvkgyfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl yskltvdksr wqggnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsgsgsggs gggsgsgsggs vqlqwgagl lkpsetlsit cavygfslst 501 ysmswirapp gkglewlgfi gsrldtyyas wakgrvtisr dtsknqvsllk 551 lssvtaadta vyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
20	二重特異性、三価 ＜CEA/Pb-Dotam＞ PRIT- 214 VL_84.66 の重鎖 2	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwwrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslr sed tavyyapfg 101 yvvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalglclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvffppk 251 pkdtlmisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keyckvsnk algapiekti skakqprep 351 qvctlpssrd eltknqvslls cavkgyfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl vskltvdksr wqggnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsgsgsggs gggsgsgsggs iqtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys 501 dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq 551 pedfatyycl ggyddesdty gfgggtkvei k
21	軽鎖 ＜CEA＞ 84.66	1 eivltqspat lslspgerat lscragesvd ifgvglhwy qqkpgqaprl 51 liyrasnrat giparfsgsg sgt dftltis slepdefavy ycqqtneqpy 101 tfgqgkklai krtvaapsvf ifppsdeqlk sgtasvvcil nnfyreakv 151 qwkvdnalqs gnsqesvteq dskdstsysl stltiskady ekhkvayacev 201 thqglsspvt ksfnrgec
22	二重特異性、三価 ＜CEA/Pb-Dotam＞ PRIT- 213 VH_84.66 の重鎖 1 → ノブ	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwwrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslr sed tavyyapfg 101 yvvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalglclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvffppk 251 pkdtlmisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keyckvsnk algapiekti skakqprep 351 qvylppcrd eltknqvsllw clvkgyfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl yskltvdksr wqggnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsgsgsggs gggsgsgsggs vtikesgpvl vkptetltit ctvsfglsit 501 ysmswirapp gkalewlgfi gsrldtyyas wakgrltisk dtsksqvvt 551 mtnmdpvdta tyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
23	二重特異性、三価 ＜CEA/Pb-Dotam＞ PRIT- 213 VL_84.66 の重鎖 2 → ホール	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwwrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslr sed tavyyapfg 101 yvvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalglclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvffppk 251 pkdtlmisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keyckvsnk algapiekti skakqprep 351 qvctlpssrd eltknqvslls cavkgyfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl vskltvdksr wqggnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsgsgsggs gggsgsgsggs iqtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys 501 dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq 551 pedfatyycl ggyddesdty gfgggtkvei k
24	二重特異性＜CEA/Pb- Dotam＞ ウサギ Dotam _84.66 の重鎖 1	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwwrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslr sed tavyyapfg 101 yvvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalglclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvffppk 251 pkdtlmisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keyckvsnk algapiekti skakqprep 351 qvctlpssrd eltknqvslls cavkgyfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl vskltvdksr wqggnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsgsgsggs gggsgsgsggs avltqtpspv spavggtvti scqsshsvys 501 dndlawyqqk lgqppklliy qasklasgvs srfsgsgsgt qftltisgvq 551 sddaatyycl ggyddesdty gfgggtvkv k

10

20

30

40

50

25	二重特異性、四価 ＜CEA/Pb-Dotam＞ ウサ ギ Dotam_84.66 の重鎖 2	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslr sed tavyy capfg 101 yyvsdyamay wqggtlvtsv sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc pcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtrvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwling keyckvsnk algapiekti skakqprep 351 qvytlppord eltknqvslw clvkgfypsd iavewesngq pennyktpp 401 vldsgsffl yskltvdksr wqggnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsgggsgs gggsgggsgs qsveesggrl vtpgtpltit ctvsfslst 501 ysmwvrqap gglewigfi gsrddyas wakgrftvsr tttvdikit 551 spttedaty fcarerdp yg gga ypphlwg pgtltvss
26	リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
27	Immunomedics hNM14	1 evqlvesggg vvqpgsrllr scsasgf dft tywmwvrqa pgkglewige 51 ihpdsstiny apslkdrfti srdnakntlf lqmdslrp ed tgvvf casly 101 fgfpwfaywg qgtpvtvssa stkgpsvfpl apssksts gg taalgclvkd 151 yfpepvtvsw nsgaltsgvh tfpavlqssg lyslssvvtv pssslgtqty 201 icnvnhkpsn tkvdkkvepk scdkthtcpp cpapeaaggp svflfppkpk 251 dtlmisrtpe vtrvvvdvsh edpevkfnwy vdgvevhnak tkpreeqyns 301 tyrvvsvltv lhqdwlingke ykckvsnkal gapiektisk akqprepqv 351 ytlppordel tknqvslwcl vkgfyps dia wewesngqpe nnyktppvl 401 dsdgsffly kltvdksrwq qgnvfscsvm healhnhytq kslslspggg 451 gsgsgggsgs gsgsgggsgs veesggrlvt pgtpltitct vsfslstys 501 mswvrqapgk glewigfigs rgdtyyaswa kgrftvsrts ttvdkit sp 551 ttedatyfc arerdp yggg aypphlwpg tltvss 1 evqlvesggg vvqpgsrllr scsasgf dft tywmwvrqa pgkglewige 51 ihpdsstiny apslkdrfti srdnakntlf lqmdslrp ed tgvvf casly 101 fgfpwfaywg qgtpvtvssa stkgpsvfpl apssksts gg taalgclvkd 151 yfpepvtvsw nsgaltsgvh tfpavlqssg lyslssvvtv pssslgtqty 201 icnvnhkpsn tkvdkkvepk scdkthtcpp cpapeaaggp svflfppkpk 251 dtlmisrtpe vtrvvvdvsh edpevkfnwy vdgvevhnak tkpreeqyns 301 tyrvvsvltv lhqdwlingke ykckvsnkal gapiektisk akqprepqv 351 ctlppsr del tknqvslsca vkgfyps dia wewesngqpe nnyktppvl

10

20

30

40

		401 dsdgsfflvs kitvdksrwq qgnvfscsvm healnhytq kslslspggg 451 ggsggggggg ggsgggggsav ltqtspvpvp avggtvtisc qsshsvysdn 501 dlawyqqklg qppklliyqa sklasgvssr fsgsgsgtqf tltisgvqsd 551 daatyyclgg yddesdygf gggtevvvk 1 diqltqspss lsasvgdrvt itckasqdvq tsvawyqqkp gkapklliyw 51 tstrhtgvps rfsgsgsgtd ftttisslpq ediatyyccq yslyrsfgqg 101 tkveikrtva apsvfifpps deqlksgtas vvcllnnfyp reakvqwkvd 151 nalqsgnsqe svteqdsksd tyslsstltl skadyekhhv yacevthqgl 201 sspvtksfnr gec
28	重鎖 CDR1 <ERBB2>	DTYIH
29	重鎖 CDR2 <ERBB2>	RIYPTNGYTRYADSVKG
30	重鎖 CDR3 <ERBB2>	WGGDGFYAMDY
31	軽鎖 CDR1 <ERBB2>	RASQDVNTAVA
32	軽鎖 CDR2 <ERBB2>	SASFLYS
33	軽鎖 CDR3 <ERBB2>	QQHYTTPPT
34	重鎖可変ドメイン <ERBB2>	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRWGGDGFYAMDYWGQGTSLTVSS
35	軽鎖可変ドメイン <ERBB2>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPP TFGQGTKEIK
36	二重特異性、三価 ERbB2/Pb-Dotam (P1AD9827)の重鎖 1 (ノブ)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRWGGDGFYAMDYWGQGTSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVT LKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRPPGKALEWLGFIG SRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARER DPYGGGAYPPHLWGRGTLTVSS
37	二重特異性、三価 ERbB2/Pb-Dotam (P1AD9827)の重鎖 2 (ホール)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRWGGDGFYAMDYWGQGTSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHVSVDNDLAWYQQKPGKAPKLLIY QASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESD TYGFGGGTKVEIK

10

20

30

40

50

38	軽鎖<ErbB2> (P1AD9827)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPP TFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
39	重鎖 CDR1 <CD20>	YSWIN
40	重鎖 CDR2 <CD20>	RIFPGDGD TDYNGKFKG
41	重鎖 CDR3 <CD20>	NVFDGYWL VY
42	軽鎖 CDR1 <CD20>	RSSKSLLSHNGITYLY
43	軽鎖 CDR2 <CD20>	QMSNLVS
44	軽鎖 CDR3 CD20>	AQNLELPYT
45	重鎖可変ドメイン <CD20>	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGGGLE WMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVY YCARNVFDGYWL VYWGQGLTVTVSS
46	軽鎖可変ドメイン <CD20>	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSP QLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNL ELPYTFGGGTKVEIK
47	二重特異性、三価 CD20/Pb-Dotam (P1AD9826)の重鎖 1 (ノブ)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGGGLE WMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVY YCARNVFDGYWL VYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVT LKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIG SRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVL TMTNMDPVD TATYYCARER DPYGGGAYPPHLWGRGTLTVTVSS
48	二重特異性、三価 CD20/Pb-Dotam (P1AD9826)の重鎖 2 (ホール)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGGGLE WMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVY YCARNVFDGYWL VYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKISKAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGIQ MTQSPSSLSASVGDRTITCQSSHVSYSNDLAWYQQKPGKAPKLLIY QASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGGYDDES TYGFGGGTKVEIK
49	軽鎖<CD20> (P1AD9826)	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSP QLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNL ELPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
50	P1AE1766 >CEA 軽鎖 RK	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASAAGTYVAVYQQKPGKAPKLLI YSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPL FTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
51	P1AE1766 CEA 重鎖と DOTAM VL / CH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGGLE WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELSLRSDDTAVY YCARWDFAYYVEAMDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG

10

20

30

40

50

		GTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGSGGGSGGGG SIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPK LLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGGYDD ESDYGFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSC
52	P1AE1766 CEA 重鎖と DOTAM VH / CK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGGLE WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGSGGGSGGGG SVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWL GFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATATYYCA RERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
53	P1AE1767 > DOTAM “LC”と VH/CK	VTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWL GFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATATYYCAR ERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
54	P1AE1767 CEA 軽鎖 RK	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASAAGVGYVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPL FTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	P1AE1767 CEA 重鎖と DOTAM VL / CH1 (ノブ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGGLE WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGSGGGSGGGG SIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPK LLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGGYDD ESDYGFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSC
56	P1AE1767 CEA 重鎖(ホール)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGGLE WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA

10

20

30

40

		PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	P1AE1768 >CEA LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYVAVYQKPKGAPKLLI YSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPL FTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
58	P1AE1768 > DOTAM 重鎖と VL/CH1 (ホール)	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQKPKGAPKL LIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDE SDTYGFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEAL LHNHYTQKSLSLSPGK
59	P1AE1768 CEA 重鎖(ノブ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGGLE WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
60	P1AE1768 DOTAM “LC” VH / CK	VTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLG FIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAR ERDPYGGGAYPPLWGRGTLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
61	P1AE1769 DOTAM “LC”と VH/CK	VTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLG FIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAR ERDPYGGGAYPPLWGRGTLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
62	P1AE1769 CEA LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYVAVYQKPKGAPKLLI YSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPL FTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
63	P1AE1769 CEA HC と CEA VH / CH1 / DOTAM VL / CH1 (ホー ル)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGGLE WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGSGGGGS IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQKPKGAPKL LIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDE SDTYGFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN

10

20

30

40

50

		GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
64	PIAE1769 CEA HC (ノブ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGGLE WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65	PIAE1770 CEA LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYAWYQKPKGKAPKLLI YSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPL FTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
66	PIAE1770 CEA HC と DOTAM _{scFab} : DOTAM VL / Ck / リンカ ー / VH CH1 (ノブ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQA PGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGG SGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVSDNDLAWYQKPK GKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL GGYDDESDTYGFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSL STYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQ VVLTMNMDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSC
67	PIAE1770 CEA HC (ホール)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGGLE WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

【0470】

本明細書で引用された全ての特許文献および科学文献の開示は、その全体が参照により明示的に組み込まれる。

【0471】

本発明をここで具体例を参照してさらに説明する。様々な他の実施形態を、上に提供された一般的説明を考慮して実行することができることが理解されるであろう。

【実施例】

【0472】

実施例1：免疫化の説明

50

ウサギの免疫化

2種のエナンチオマーPb-DOTAM-アルキル-PEG₄-KLH画分(MS2-DOTAM KLH画分1およびMS2-DOTAM KLH画分2)の1:1ミックスを、WO2000/46251、WO2002/12437、WO2005/007696、WO2006/047367、US2007/0033661およびWO2008/027986に報告される通り、ニュージーランドホワイト(New Zealand White)ウサギまたはヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニックウサギの免疫化に使用した。各ウサギは、0日目に皮内適用により、完全フロイントアジュバントで乳化した500ugの免疫原ミックスで免疫化し、7、14、28、56日目に交互の筋肉内および皮下適用により、各500ugで免疫化した。その後、ウサギは、500ugの皮下免疫化を毎月受け、血清力価の決定のため、免疫化の7日後に少量の血液試料を採取した。免疫化の3番目の月および9番目の月に(免疫化後5~7日目に)、より大量の血液試料(推定総血液体積の10%)を採取し、末梢単核細胞を単離し、これを、B細胞クローニングプロセス(実施例2)における抗原特異的B細胞の供給源として使用した。

【0473】

血清力価の決定(ELISA)

2種のエナンチオマーPb-DOTAM画分(PJRD05.133F1またはPJRD05.133F2)のそれぞれを、PBS中の1ug/ml、100ul/ウェルで、96ウェルNUNC Maxisorpプレート上に固定化し、続いて:200ul/ウェルでPBS中の2%クロテイン(Crotein)Cによるプレートのブロッキング;100ul/ウェルでPBS中の0.5%クロテインCにおける2回複製した抗血清の段階希釈の適用;100ul/ウェルでPBS中の0.5%クロテインCにそれぞれ希釈した、HRPコンジュゲートロバ抗ウサギIgG抗体(Jackson ImmunoResearch/Dianova 711-036-152;1/16000)およびストレプトアビジン-HRPによる検出を行った。全ステップのため、プレートを1時間37℃でインキュベートした。全ステップの間に、プレートをPBS中の0.05%Tween 20で3回洗浄した。100ul/ウェルのBM Blue POD基質可溶型(Roche)の添加によりシグナルを発色させ;100ul/ウェルの1M HClの添加により停止した。参照としての690nmに対し450nmで吸光度を読み取った。力価は、最大半量シグナルをもたらし抗血清の希釈として定義した。

【0474】

実施例2:ウサギからのB細胞クローニング

ウサギ末梢血単核細胞(PBMC)の単離

免疫化されたウサギの血液試料を採取した。EDTA含有全血を1xPBS(PAA、オーストリア、パッシング)で2倍に希釈し、その後、製造業者の仕様書に従ってlympholyte mammal(Cedarlane Laboratories、カナダ、オンタリオ州バーリントン)を使用して密度遠心分離した。PBMCを1xPBSで2回洗浄した。

【0475】

EL-4 B5培地

10%FCS(Hyclone、米国ユタ州ローガン)、2mMグルタミン、1%ペニシリン/ストレプトマイシン溶液(PAA、オーストリア、パッシング)、2mMピルビン酸ナトリウム、10mM HEPES(Pan Biotech、ドイツ、アイデンバッハ)および0,05mM b-メルカプトエタノール(Gibco、スコットランド、ペーザリー)を補充したRPMI 1640(Pan Biotech、ドイツ、アイデンバッハ)を使用した。

【0476】

プレートのコーティング

滅菌細胞培養6ウェルプレートを、炭酸塩バッファー(0,1M重炭酸ナトリウム、34mM炭酸水素二ナトリウム(Disodiumhydrogencarbonate)、pH9,55)中の

10

20

30

40

50

2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ K L Hで一晩4℃にてコーティングした。プレートを使用前に滅菌P B Sにおいて3回洗浄した。滅菌ストレプトアビジン被覆6ウェルプレート (M i c r o c o a t、ドイツ、ベルンリート) を、P B S中のビオチン化T C M C - P b - d P E C 3 - ビオチン異性体A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびB (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の1 + 1エナンチオマー混合物で3時間室温にてコーティングした。パニングステップに先立ち、このような6ウェルプレートを滅菌P B Sで3回洗浄した。

【0477】

マクロファージ／単球の枯渇

滅菌K L H被覆6ウェルプレートにP B M Cを播種して、非特異的接着によりマクロファージおよび単球を枯渇させ、K L Hに結合する細胞を除去した。各ウェルに、4 mL培地および免疫化されたウサギ由来の最大 6×10^6 個のP B M Cを最大限に充填し、1時間、37℃および5% C O 2で結合させた。上清中の細胞 (末梢血リンパ球 (P B L)) を抗原パニングステップに用いた。

【0478】

P b含有T C M CエナンチオマーにおけるB細胞の濃縮

T C M C - P b - d P E C 3 - ビオチン異性体AおよびBのエナンチオマー混合物でコーティングされた6ウェルプレートに、4 mL培地あたり最大 6×10^6 個のP B Lを播種し、1時間37℃および5% C O 2で結合させた。ウェルを1 $\times$ P B Sで1～3回慎重に洗浄することにより、非接着性細胞を除去した。残っている粘着性細胞を、10分間37℃および5% C O 2のトリプシンによって剥離した。E L - 4 B 5培地によりトリプシン処理 (Trypsination) を停止した。免疫蛍光染色まで細胞を氷上に維持した。

【0479】

免疫蛍光染色およびフローサイトメトリー

抗I g G F I T C (A b D S e r o t e c、ドイツ、デュッセルドルフ) を単一細胞選別に使用した。表面染色のため、枯渇および濃縮ステップ由来の細胞を、P B Sにおいて抗I g G F I T C抗体と共にインキュベートし、45分間暗所で4℃にてインキュベートした。染色後に、P B M Cを氷冷P B Sで2回洗浄した。最後に、P B M Cを氷冷P B Sに再懸濁し、F A C S解析に直ちに付した。F A C S解析に先立ち5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のヨウ化プロピジウム (B D P h a r m i n g e n、米国カリフォルニア州サンディエゴ) を添加して、死細胞と生細胞との間を識別した。

【0480】

コンピュータおよびF A C S D i v aソフトウェアを備えるB e c t o n D i c k i n s o n F A C S A r i a (B D B i o s c i e n c e s、米国) を単一細胞選別に使用した。

【0481】

B細胞培養

L i g h t w o o dら (J I m m u n o l M e t h o d s、2006、316:133～143) によって記載された方法により、ウサギB細胞の培養物を調製した。簡潔に説明すると、単一の選別されたウサギB細胞を、インキュベーター内で、96ウェルプレートにおいてP a n s o r b i n細胞 (1:100000) (C a l b i o c h e m (M e r c k)、ドイツ、ダルムシュタット)、5%ウサギ胸腺細胞上清 (M i c r o C o a t、ドイツ、ベルンリート) およびガンマ線照射されたマウスE L - 4 B 5胸腺腫細胞 (5×10^5 個の細胞/ウェル) を含有する200 μL /ウェルE L - 4 B 5培地と共に7日間37℃でインキュベートした。B細胞培養物の上清をスクリーニングのために除去し、残っている細胞を直ちに採集し、100 μL R L Tバッファー (Q i a g e n、ドイツ、ヒルデン) において-80℃で凍結した。

【0482】

実施例3：ウサギ抗体の発現

V - ドメインのP C R増幅

製造業者のプロトコールに従ってN u c l e o S p i n 8 / 9 6 R N Aキット (M a

10

20

30

40

50

cherey & Nagel; 740709.4, 740698) を使用して、B細胞溶解物 (RLTバッファー - Qiagen - Cat. N° 79216に再懸濁) から全RNAを調製した。60 µlのRNase不含有水でRNAを溶出した。6 µlのRNAを使用して、製造業者の説明書に従ってSuperscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 18080-400) およびオリゴdTプライマーを使用した逆転写酵素反応によりcDNAを生成した。全ステップを、Hamilton ML Star Systemにおいて行った。4 µlのcDNAを使用して、重鎖のためにプライマーrbHC.upおよびrbHC.doならびに軽鎖のためにrbLC.upおよびrbLC.do (表3) を使用した最終体積50 µlにおけるAccuPrime Supermix (Invitrogen 12344-040) により免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域 (VHおよびVL) を増幅した。全フォワードプライマーは、(それぞれVHおよびVLの) シグナルペプチドに特異的であった一方、リバースプライマーは、(それぞれVHおよびVLの) 定常領域に特異的であった。RbVH+RbVLのためのPCR条件を次に示す: 94℃5分間のホットスタート; 35サイクルの20秒間94℃、20秒間70℃、45秒間68℃、および68℃7分間の最終伸長。

表3

rbHC.up	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC
rbHCf.do	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
rbLC.up	AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC
rbLC.do	CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC

【0483】

50 µl PCR溶液のうち8 µlを、48 E-ゲル2% (Invitrogen G8008-02) にロードした。陽性PCR反応液を、製造業者のプロトコールに従ってNucleoSpin Extract IIキット (Macherey & Nagel; 740609250) を使用して浄化し、50 µl溶出バッファーに溶出した。全浄化ステップをHamilton ML Starlet Systemにおいて行った。

【0484】

ウサギモノクローナル二価抗体の組換え発現

ウサギモノクローナル二価抗体の組換え発現のため、オーバーハングクローニング方法 (RS Haunら、Biotechniques (1992) 13、515~518; MZ Liら、Nature Methods (2007) 4、251~256) により、VHまたはVLをコードするPCR産物を、cDNAとして発現ベクターにクローニングした。発現ベクターは、イントロンAを含む5' CMVプロモーターおよび3' BGHポリアデニル化配列からなる発現カセットを含有した。発現カセットに加えて、プラスミドは、大腸菌 (E.coli) におけるプラスミド増幅のためのpUC18由来複製開始点、およびアンピシリン抵抗性を付与するベクターラクタマーゼ遺伝子を含有した。次の、基礎プラスミドの3種のバリエーションを使用した: VH領域を受け入れるように設計されたウサギIgG定常領域を含有する1種のプラスミド、一方、VL領域を受け入れるためのウサギまたはヒトカップLC定常領域を含有する2種の追加的なプラスミド。カップまたはガンマ定常領域およびVL/VHインサートをコードする直鎖化された発現プラスミドを、重複

プライマーを使用したPCRにより増幅した。精製されたPCR産物をT4 DNAポリメラーゼと共にインキュベートし、これにより、一本鎖オーバーハングを生成した。dCTP添加により反応を停止した。次のステップにおいて、プラスミドおよびインサートを組み合わせ、部位特異的組換えを誘導するrecAと共にインキュベートした。組換えプラスミドを大腸菌に形質転換した。翌日、成長したコロニーを採取し、プラスミド調製、制限解析およびDNA配列決定により、正確な組換えプラスミドに関して試験した。抗体発現のため、試薬サプライヤーによって示唆される手順に従い239-Freeトランスフェクション試薬(Novagen)を使用することにより、単離されたHCおよびLCプラスミドを、2ml(96ウェルプレート)のFreeStyle HEK293-F細胞(Invitrogen R790-07)に一過性にコトランスフェクトした。1週間後に上清を採集し、精製のために送達した。

10

【0485】

実施例4：ウサギモノクローナル抗体の選択

下表は、様々なモノクローナル二価ウサギ抗体の特性を示す。キレート化PbおよびBiへの匹敵する結合、他のキレート化金属への低下した結合、ならびに高い親和性(<100pM)を有することから、リード候補としてPRIIT-0128を選択した。

【0486】

SET(溶解平衡滴定)アッセイを後述する通りに実行した。

【0487】

アッセイプレートの調製：384ウェルストレプトアビジンプレート(Nunc、Microcoat#11974998001)を、20ng/mlの濃度のPBSバッファー中の25μl/ウェルのDOTAM-ビオチン-異性体ミックスと共に一晩4℃でインキュベートした。

20

【0488】

遊離DOTAM-金属キレート(Pb、Bi、Ca、Cu、Zn、Mg、Fe)による抗DOTAM抗体試料の平衡：0.01nM~1nMの抗体を、関連するDOTAM-金属キレートにより、2500nM、500nMまたは100nMのDOTAM-金属キレートの濃度から開始する1:3、1:2または1:1.7希釈ステップにおいて滴定した。試料を、密封したREMP Storageポリプロピレンマイクロプレート(Brooks)において4℃で一晩インキュベートした。

30

【0489】

一晩インキュベーション後に、ストレプトアビジンプレートをウェルあたり90μlのPBSTで3×洗浄した。平衡プレートから15μlの各試料をアッセイプレートに移し、15分間RTでインキュベートし、続いてPBSTバッファで3×90μl洗浄ステップを行った。25μlのヤギ抗ヒトIgG抗体-PODコンジュゲート(Jackson、109-036-088、OSEPで1:4000)を添加し、続いてPBSTバッファで6×90μl洗浄ステップを行うことにより検出を実行した。25μlのTMB基質(Roche Diagnostics GmbH、カタログ番号：11835033001)を各ウェルに添加した。Safire2リーダー(Tecan)において370/492nmで測定を行った。

40

【0490】

材料：

1. DOTAM-ビオチン-異性体ミックス：

次の成分、濃度=20ng/mlの混合物、

— Pb-Dotam-Bn-ビオチン/TCMC-Pb-dPEG3-ビオチン、異性体A

— Pb-Dotam-Bn-ビオチン/TCMC-Pb-dPEG3-ビオチン、異性体B

— Pb-Dotam-アルキル-ビオチン異性体A

— Pb-Dotam-アルキル-ビオチン異性体B

50

2. PBS: DPBS、PAN、P04-36500
3. BSA: Roche、10735086001
4. Tween 20: ポリソルベート20 (usb、#20605、500ml)
5. PBST: 10×、Roche、#11666789001/0, 1% Tween 20
6. OSEP: PBS (10×、Roche、#11666789001) / 0, 5% BSA (ウシ血清アルブミン画分V、脂肪酸不含、Roche、#10735086001) / 0, 0.5% Tween 20

表 4

名称	種	KD [SET-滴定]			
		Pb	Bi	Ca	Zn
PRIT-0135	WTRa	0.000	0.000	0.001	0.285
PRIT-0129	WTRa	0.001	0.024	0.013	9.251
PRIT-0128	WTRa	0.002	0.003	0.003	8.152
PRIT-0132	WTRa	0.002	0.046	0.002	0.217
PRIT-0134	WTRa	0.002	0.059	0.003	0.443
PRIT-0136	WTRa	0.004	0.029	0.014	131.926
PRIT-0127	WTRa	0.014	0.092	0.015	222.339
PRIT-0107	TgRa	1.1	51.0	48.0	>1000

WTRa:野生型ウサギ; TgRa:トランスジェニックウサギ

【0491】

実施例5：分子生物学

組換えDNA技法

Sambrook、J. ら、Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1989に記載されている通り、標準方法を使用してDNAを操作した。製造業者の説明書に従って、分子生物学的試薬を使用した。

【0492】

遺伝子およびオリゴヌクレオチド合成

Geneart GmbH (ドイツ、レーゲンスブルク) における化学合成により、所望の遺伝子セグメントを調製した。合成された遺伝子断片を、繁殖／増幅のために大腸菌プラスミドにクローニングした。サブクローニングされた遺伝子断片のDNA配列を、DNA配列決定により検証した。あるいは、化学合成されたオリゴヌクレオチドをアニーリングすることにより、またはPCRにより、短い合成DNA断片をアセンブルした。metabion GmbH (ドイツ、プラネック-マーティンスリッド (Planegg-Martinsried)) により、それぞれのオリゴヌクレオチドを調製した。

【0493】

タンパク質決定

ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて計算されるモル消衰係数を使用して、280nmにおける光学濃度(OD)を決定することにより、精製されたポリペプチドのタンパク質濃度を決定した。

【0494】

抗体重鎖または軽鎖の組換え発現のためのプラスミドの生成

ヒト胎児性腎細胞(HEK293)の一過性トランスフェクションにより、所望のタン

パク質を発現させた。所望の遺伝子／タンパク質（例えば、完全長抗体重鎖、完全長抗体軽鎖、または追加的なドメイン（例えば、そのC末端における免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメイン）を含有する完全長抗体重鎖）の発現のため、次の機能的エレメントを含む転写単位を使用した：

- － イントロンAを含む、ヒトサイトメガロウイルス由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター（P－CMV）、
- － ヒト重鎖免疫グロブリン5'－非翻訳領域（5'UTR）、
- － マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列（SS）、
- － 発現されるべき遺伝子／タンパク質、ならびに
- － ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列（BGH pA）。

10

【0495】

発現されるべき所望の遺伝子を含む発現単位／カセットに加えて、基礎／標準哺乳動物発現プラスミドは、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および大腸菌におけるアンピシリン抵抗性を付与するベクターラクタマーゼ遺伝子を含有した。

【0496】

a) 抗体重鎖のための発現プラスミド

G4S×4リンカーによってそれぞれ分離されたそれぞれの配列エレメント（V－重またはV－軽）をコードするDNA断片をヒトIgG分子のCH3ドメインのC末端に融合することにより、完全かつ機能的な抗体重鎖に続く、追加的な抗体V－重またはV－軽ドメインを含むC末端融合遺伝子を含む抗体重鎖コード化遺伝子をアSEMBルした（VH－CH1－ヒンジ－CH2－CH3－リンカー－VHまたはVH－CH1－ヒンジ－CH2－CH3－リンカー－VL）。それぞれ2個のCH3ドメインのC末端に1個のVHおよび1個のVLドメインを有する組換え抗体分子を、ノブ・イントゥー・ホール技術を使用して発現させた。

20

【0497】

HEK293細胞における抗体重鎖と、C末端VHまたはVLドメインの一過性発現のための発現プラスミドは、抗体重鎖断片と、C末端VHまたはVLドメイン発現カセットの他に、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および大腸菌におけるアンピシリン抵抗性を付与するベクターラクタマーゼ遺伝子を含んだ。抗体重鎖断片と、C末端VHまたはVLドメイン融合遺伝子の転写単位は、次の機能的エレメントを含む：

30

- － イントロンAを含む、ヒトサイトメガロウイルス由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター（P－CMV）、
- － ヒト重鎖免疫グロブリン5'－非翻訳領域（5'UTR）、
- － マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- － 抗体重鎖（VH－CH1－ヒンジ－CH2－CH3－リンカー－VHまたはVH－CH1－ヒンジ－CH2－CH3－リンカー－VL）コード化核酸、ならびに
- － ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列（BGH pA）。

【0498】

前に概要を述べた方法に従って、表2に言及されている全ての重鎖ポリペプチド／タンパク質をコードする発現プラスミドを構築した。

40

【0499】

b) 抗体軽鎖のための発現プラスミド

それぞれの配列エレメントをコードするDNA断片を融合することにより、完全かつ機能的な抗体軽鎖を含む抗体軽鎖コード化遺伝子をアSEMBルした。

【0500】

抗体軽鎖の一過性発現のための発現プラスミドは、抗体軽鎖断片の他に、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および大腸菌におけるアンピシリン抵抗性を付与するベクターラクタマーゼ遺伝子を含んだ。抗体軽

50

鎖断片の転写単位は、次の機能的エレメントを含む：

- － イントロンAを含む、ヒトサイトメガロウイルス由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター（P-CMV）、
- － ヒト重鎖免疫グロブリン5'-非翻訳領域（5'UTR）、
- － マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- － 抗体軽鎖（VL-CL）コード化核酸、ならびに
- － ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列（BGH pA）。

【0501】

前に概要を述べた方法に従って、表2に言及されている全ての軽鎖ポリペプチド／タンパク質をコードする発現プラスミドを構築した。

【0502】

使用されている形式の模式図を図1に描写する。星印は、PGLALA置換を指す：1は、DOTAM結合剤を指し、2および3は、抗標的（本明細書においてはCEA）結合剤を指す。

【0503】

実施例6：PRIIT分子の一過性発現

抗体分子の一過性発現

F17培地（Invitrogen Corp.）において培養される、一過性にトランスフェクトされたHEK293細胞（ヒト胎児性腎細胞株293由来）において抗体分子を生成した。トランスフェクションのため、「293-Free」トランスフェクション試薬（Novagen）を使用した。上述のそれぞれの抗体重鎖および軽鎖分子は、個々の発現プラスミドから発現させた。トランスフェクションは、製造業者の説明書に指定される通りに行った。トランスフェクションの3から7（3～7）日後に、免疫グロブリン含有細胞培養上清を採集した。上清は、精製するまで、低下した温度（例えば、-80℃）で貯蔵した。

【0504】

例えば、HEK293細胞におけるヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般情報は：Meissner、P.ら、Biotechnol. Bioeng. 75（2001）197～203で得られる。

【0505】

実施例7：タンパク質の精製

採集された細胞培養上清を、流量5ml／分で、5mlのプロテインA樹脂（Mab Select Sure）を充填したカラム（1.1cm直径、5cm長さ）にアプライした。20ml PBSバッファーによる洗浄後に、25mlクエン酸Na、pH3.0により抗体を溶出させた。

【0506】

次に、1Mトリス、pH9.0で溶出液をpH5.0に調整し、4℃で一晩インキュベートした。

【0507】

10分間10000×gの遠心分離および0.2μmフィルターを通した濾過の後に、20mMヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0を含有するバッファーにおいて前平衡したサイズ排除クロマトグラフィーのSuperdex 200カラム（2.6cm直径、60cm長さ）に濾液をアプライし、同バッファーにより溶出させた。

【0508】

精製された抗体を含有する主要溶出ピークを収集し、最終純度を解析した。

10

20

30

40

50

材料 - 表 5

	ベンダー	ストック濃度 [mg/mL]	識別#	ロット#
RS-CEA_I12v	インハウス	10.5	R06895882	GMP-バッチ 1
Chrome Pure ヒト IgG	Jackson Immuno Research	12.0	009-000-003	116598
Pb-DOTAM-FITC	Macrocyclics	1.0	FRRD04-37	
ヤギ<hu IgG(H+L)> - AlexaFluor 488	Invitrogen	2.0	A11013	1173476
PBS、Mg および Ca 不含	PAN Biotech		P04-36500	4780114
FKS Gibco	Gibco		10500-064	07Q1416K
5ml 丸底チューブ(FACS チューブ)	BD Falcon		352054	1094065
96 ウェル PP プレート V 字底型	Costar		3357	10113004

10

20

【0509】

実施例 8 : FACS

トリプシンを使用して培養ボトルから MKN-45 細胞を剥離し、Casy 細胞計数器を使用して計数した。4℃、300g でペレットにした後に、細胞を FACS バッファー (PBS 中に 2.5% FCS) に再懸濁し、 2.0×10^6 個の細胞/mL となるように調整し、96 ウェル PP V 字底型 Plate に分配した ($25 \mu\text{L}$ / ウェル = 5.0×10^4 Zellen / ウェル)。

30

【0510】

- DOTAM-FITC を使用した FACS 染色

一次 CEA 特異的抗体を、FACS バッファーにおいて $40 \mu\text{g}$ / mL となるように調整し、最終濃度 $10 \mu\text{g}$ / mL をもたらした。RS-CEA-I12v を参照として用いた。FITC で標識された Pb-DOTAM および一次抗体は、等モル比で用いた。これらを混合し、10 分間 RT でインキュベートして、抗体を Pb-DOTAM に結合させた。その後、 $20 \mu\text{L}$ の調製されたミックスを $25 \mu\text{L}$ 細胞懸濁液に添加し、1 時間 4℃ でインキュベートした。次に、細胞を FACS バッファーにおいて 2 回洗浄し、FACS Canto (BD、Pharmingen) を使用した測定のために $70 \mu\text{L}$ / ウェルの FACS バッファーに再懸濁した。

40

【0511】

- <hu カッパ> を使用した FACS 染色

一次 CEA 特異的抗体は、FACS バッファーにおいて $20 \mu\text{g}$ / mL となるように調整し、最終濃度 $10 \mu\text{g}$ / mL をもたらした。RS-CEA-I12v を参照として用いた。 $20 \mu\text{L}$ を $25 \mu\text{L}$ 細胞懸濁液に添加し、1 時間 4℃ でインキュベートした。次に、細胞を FACS バッファーにおいて 2 回洗浄した。洗浄後に、二次抗体 (<hu IgG> - Alexa488、 $c = 10 \mu\text{g}$ / mL) を含有する $50 \mu\text{L}$ FACS バッファーに細胞を再懸濁し、1 時間 4℃ でインキュベートした。次に、細胞を FACS バッファーにおいて 2 回洗浄し、FACS Canto (BD、Pharmingen) を使用した測定のために $70 \mu\text{L}$ / ウェルの FACS バッファーに再懸濁した。

50

【0512】

MKN-45細胞への1種の抗体(PRIIT-0165)の結合、二次検出(右パネル、Alexa 488)またはDOTAM FITC(左パネル、FITC-A)のいずれかを使用したその検出を示す例が、図36に描写されている。

【0513】

実施例9：ヒト化：

DOTAM結合剤PRIIT-0128のヒト化における適したヒトアクセプターフレームワークの同定のため、2種の方法論の組合せを使用した。一方では、親抗体に対し高い配列相同性を有するアクセプターフレームワークを検索し、その後、このアクセプターフレームワークにCDR領域を移植することによる、古典的手法を採用した。親抗体に対する同定されたフレームワークの各アミノ酸差は、結合剤の構造的統合性における影響に関して判断し、適切であれば常に、親配列に向けた復帰突然変異(backmutation)を導入した。

10

【0514】

他方では、インハウス開発された*in silico*ツールを使用して、ヒト化型のVHおよびVLドメインの互いに対する配向を予測した(WO2016/062734を参照)。これは、あらゆる可能なヒト生殖系列組合せにおけるCDRのバーチャルな移植のために実行された。この結果を、親結合剤のVH-VLドメイン配向と比較して、幾何学の点で出発抗体に近いフレームワーク組合せを選択した。

20

【0515】

各場合において、親抗体の次のCDR領域をアクセプターフレームワークに移植した(カバットに従った番号付け)：

VH_CDR1：31～35

VH_CDR2：50～65

VH_CDR3：95～102

VL_CDR1：24～34

VL_CDR2：50～56

VL_CDR3：89～97。

【0516】

VH/VL Fv融合体(それぞれCH1およびCkなし)として腫瘍標的化IgGのFcのC末端に融合されたDOTAM結合剤を有する最終形式で、ヒト化バリエーションを産生した。最終形式の親(非ヒト化)DOTAM結合剤PRIIT-0128由来分子は、PRIIT-0156と呼ばれる。

30

【0517】

VH/VL予測の観点からの適合性およびフレームワークの安定性増加のため、ハーセプチンフレームワークも同様に含まれた。全てのVHヒト化バリエーションのため、ヒトJエレメントhJH2を使用した。全てのVKヒト化バリエーションのため、ヒトJエレメントhJK4を使用した。

【0518】

HC4は、1個の復帰突然変異カバットA49Gを有するヒト生殖系列IGHV3-30-02におけるPRIIT-128の移植である。

40

【0519】

可変重鎖HC5を得るために、復帰突然変異(backmutation)としてA49Gおよび本来のウサギN末端を反映するための最初のアミノ酸の欠失を有するヒト生殖系列hVH_2_26にCDRを移植した。

【0520】

ハーセプチンV-領域(ヒト生殖系列hVH3_66に由来する)に移植されると、バリエーションHC7は、アクセプターフレームワークにおける数個の修飾によって特徴づけられる：N末端Eの欠失、A49G、A71RおよびS93A。

【0521】

50

H C 1 0 のため、P R I T - 1 2 8 の C D R は、ヒト生殖系列 I G H V 4 _ 3 4 _ 0 1 に移植された。

【 0 5 2 2 】

そこで、Q 2 から開始する本来のウサギ抗体を反映するように、V 2 から開始する N 末端が修飾された。加えて、フレームワーク 3 における V 7 1 R および F 7 8 V と共に、G 2 9 F および F 3 1 L は、復帰突然変異 w r t カバット命名法として考慮された。

【 0 5 2 3 】

軽鎖 L C 1 のため、C D R は、いかなる復帰突然変異もないヒト生殖系列 I G K V 1 _ 3 9 _ 0 1 に移植された。A 2 から開始する本来のウサギ A b を反映するように、開始は I 2 として選ばれた。

【 0 5 2 4 】

ヒト生殖系列 h V K 1 _ 5 における C D R の移植により、軽鎖バリエーション L C 3 を得た。D 1 が欠失され、I 2 A 復帰突然変異は、新たな N 末端として考慮された。追加的な復帰突然変異として、K 4 2 Q および A 4 3 P を考慮に入れた。

【 0 5 2 5 】

ヒト化マトリックスのあらゆる可能な組合せが産生された訳ではなく、所与の組合せの V H / V L 予測および配列リスク等の考慮に基づき、選択された特定の組合せが選ばれた。

【 0 5 2 6 】

ヒト化の目標は、D O T A M に対する親和性の観点から 1 0 倍を超えて失わず、可能であれば増加した安定性を呈する、ヒト化結合剤を得ることであった。これは、D O T A M に対する匹敵するまたはさらにはより優れた親和性と共に、約 1 0 ~ 1 5 ° C の D L S によって測定される熱安定性の増加の、いくつかの結合剤により達成された。下の表 7 および 8 を参照されたい。

【 0 5 2 7 】

実施例 1 0 : 溶解平衡に基づく k d 決定

P b - D O T A M に対するその親和性に関してより大量のヒト化候補をスクリーニングするために、溶解平衡滴定 (S E T) を使用した。

【 0 5 2 8 】

表 6 は、P b - D O T A M に対する選択されたヒト化 D O T A M 結合剤の S E T に基づく親和性決定を詳述する。表 6 における全ての抗体は、C E A への二価結合および P b - D o t a m への一価結合を含む二重特異性抗体である (2 : 1 形式、図 1 を参照) :

10

20

30

40

50

表 6

分子名	ヒト化 HC/LC 組合せ	SET Pb-DOTAM (pM)
PRIT-0187-0002	HC10 LC1	0.03
PRIT-0193-0002	HC5 LC3	0.36
PRIT-0195-0004	HC10 LC3	0.40
PRIT-0156-0004	親分子	0.43
PRIT-0182-0002	HC8 LC7	5.54
PRIT-0189-0002	HC7 LC2	5.81
PRIT-0185-0002	HC 2 LC1	5.87
PRIT-0192-0002	HC2 LC3	8.04
PRIT-0183-0004	HC2 LC2	8.11
PRIT-0197-0002	HC7 LC1	8.69
PRIT-0198-0002	HC7 LC3	9.09
PRIT-0182-0004	HC8 LC7	17.14
PRIT-0183-0002	HC2 LC2	22.45
PRIT-0180-0004	HC9 LC6	26.10
PRIT-0190-0002	HC9 LC2	33.83
PRIT-0194-0002	HC8 LC3	34.63
PRIT-0199-0002	HC9 LC1	43.91
PRIT-0180-0002	HC9 LC6	47.70
PRIT-0188-0002	HC4 LC2	54.34
PRIT-0178-0004	HC1 LC6	60.06
PRIT-0179-0004	HC4 LC6	64.92
PRIT-0181-0002	HC4 LC7	65.11
PRIT-0179-0002	HC4 LC6	65.81
PRIT-0178-0002	HC1 LC6	66.68
PRIT-0187-0004	HC10 LC1	78.09
PRIT-0184-0002	HC1 LC1	80.56
PRIT-0200-0002	HC9 LC3	83.24
PRIT-0191-0002	HC1 LC3	111.10

【 0 5 2 9 】

実施例 11 : K i n e x a に基づく k d 決定

親和性決定に関するより詳細な解析および直交性方法のため、K i n e x a を使用した。

【 0 5 3 0 】

計測手段および材料

オートサンプラーを備える S a p i d y n e I n s t r u m e n t s (アイダホ州ボイシ) 製の K i n E x A 3 2 0 0 機器を使用した。ポリメチルメタクリレート (PMM A) ビーズは、S a p i d y n e から購入し、一方、P B S (リン酸緩衝生理食塩水)、B S A (ウシ血清アルブミン画分 V) および抗 D O T A M 抗体は、インハウス (R o c h

e) で調製した。D y l i g h t 6 5 0 (登録商標) コンジュゲートされたアフィニティ-精製ヤギ抗ヒト I g G - F c 断片交差吸着 (cross-adsorbed) 抗体は、B e t h y l L a b o r a t o r i e s (テキサス州モントゴメリー) から購入した。ビオチン化 P b - D O T A M 抗原 (P b - D O T A M - アルキル-ビオチン異性体 A および B、P b - D O T A M - B n - ビオチン / T C M C - P b - d P E G 3 - ビオチン、異性体 A および B) および非ビオチン化 P b - D O T A M は、A R E V A M e d (メリーランド州ベセスダ) から得た。

【0531】

抗原コーティングされたビーズの調製

ビオチン化分子のための K i n E x A ハンドブックプロトコール (S a p i d y n e) に従って、P M M A ビーズをコーティングした。簡潔に説明すると、第一に、1 m l の P B S (p H 7 . 4) 中の 1 0 μ g のビオチン-BSA (T h e r m o S c i e n t i f i c) を、吸着コーティングのために 1 本のバイアル (2 0 0 m g) のビーズにつき添加した。2 時間室温で回転させた後に、上清を除去し、ビーズを 1 m l P B S で 5 回洗浄した。第二に、1 0 m g / m l B S A を含有する P B S 中の 1 m l の 1 0 0 μ g のニュートラアビジン、ビオチン結合タンパク質 (T h e r m o S c i e n t i f i c) をビーズに添加し、室温でさらなる 2 時間インキュベートして、ニュートラアビジンをビーズにカップリングさせ、ビオチン化タンパク質のその後の結合のための追加的なビオチン結合部位をもたらした。次に、ニュートラアビジンコーティングされたビーズを 1 m l P B S で 5 回リンスした。最後に、ビーズを P B S 中の 2 0 0 n g / m l ビオチン化 P b - D O T A M - 異性体ミックス (異性体毎に 5 0 n g) でコーティングし、さらに 2 時間室温でインキュベートした。次に、ビーズを 3 0 m l P B S に再懸濁し、直ちに使用した。

【0532】

K i n E x A 平衡アッセイ

全ての K i n E x A 実験は、ランニングバッファーとして P B S、p H 7 . 4 を使用して室温 (R T) で行った。試料は、1 m g / m l B S A を補充したランニングバッファー (「試料バッファー」) において調製した。0 . 2 5 m l / 分の流量を使用した。5 p M 結合部位濃度を有する一定量の抗 D O T A M 抗体を、1 0 0 p M から開始する 2 倍段階希釈 (濃度範囲 0 . 0 4 9 p M ~ 1 0 0 p M) により P b - D O T A M 抗原で滴定した。抗原なし抗体の 1 種の試料は、1 0 0 % シグナル (すなわち、阻害なし) とした。抗原-抗体複合体を R T で少なくとも 2 4 時間インキュベートして、平衡に達するようにした。次に、平衡した混合物を、体積 5 m l の K i n E x A システムにおける P b - D O T A M カップリングビーズのカラムに通して、溶液の平衡状態を乱すことなく、結合していない抗体をビーズによって捕捉させた。捕捉された抗体は、試料バッファーにおける 2 5 0 n g / m l D y l i g h t 6 5 0 (C) コンジュゲートされた抗ヒト F c 断片特異的二次抗体を使用して検出した。各試料は、全平衡実験で 2 回複製して測定した。

【0533】

「標準解析」方法を使用して、K i n E x A ソフトウェア (バージョン 4 . 0 . 1 1) 内に含有される 1 部位均一結合モデルを使用して、データの非線形回帰解析から K D を得た。ソフトウェアは、K D を計算し、データ点を理論的 K D 曲線にフィットさせることにより 9 5 % 信頼区間を決定する。9 5 % 信頼区間 (S a p i d y n e T e c h N o t e T N 2 0 7 R 0) は、K D 低および K D 高として得られる。

【0534】

P R I T - 2 1 3 に関して、K i n e x a によって決定される親和性値の他の例を下に提示する。P R I T - 0 2 1 3 は、別の C E A 結合 V H / V L を除いて、P R I T - 0 1 8 6 と同じ分子であり、表 8 を参照されたい。

10

20

30

40

50

PRIT-213

CEA-DOTAM BsAb の金属-DOTAM キレート親和性

抗原	KD [pM]	95% CI[pM]
Pb-DOTAM	0.84	0.44-1.4
Ca-DOTAM	0.95	0.43-1.7
Bi-DOTAM	5.7	4.6-6.2
Cu-DOTAM	122000	60000 - 206000

10

追加的な値は下に示す通りである:

TheraPS 名	抗原	KD [pM]	95%信頼区間[pM]
PRIT-0213-0005	Ca - DOTAM	0.95	0.43 - 1.7*
PRIT-0214-0005		0.52	0.34 - 0.74
PRIT-0213-0005	Bi - DOTAM	5.7	4.6 - 6.2*
PRIT-0214-0005		6.0	5.5 - 6.4
PRIT-0213-0005	Cu - DOTAM	122000	60000 - 206000*°
PRIT-0214-0005		38000	19000 - 63000*°

20

*幅広い信頼区間、それほど正確でない測定 K_D を指示

°nM - 親和性に対し完全には最適化されていないアッセイ

30

【0535】

実施例12: ヒト化PRIT分子の熱安定性測定

方法およびデータ解析

最終形式でのヒト化PRIT分子の異なるバリエーション（20 mM ヒスチジン、140 mM NaCl、pH 6.0 における）を、1 mg/ml となるように同じバッファーに希釈した。30 µl の各試料を、384 ウェルプレートフィルターデバイスに移した（参照としての抗HER3抗体と一緒に）。1,000 g、1 分間の遠心分離後に、ウェルを10 µl のパラフィン油で覆った。プレートを再度遠心分離し（1,000 g で1 分間）、DLS plateリーダー（Dyna Pro Plate Reader-II、Wyatt）に移した。25 °C から開始して、温度を0.05 °C/分のスピードで79.9 °C まで増加させた。Dynamicsソフトウェア（V7.0）を使用して散乱光を記録した。

40

【0536】

データをExcel（Microsoft）に移し、試料および（und）温度によって選別し、ソフトウェアアドインを使用して、融解曲線を作成した。温度は、ベースラインからの明らかな逸脱が起こった箇所を「凝集開始」として定義し、融解曲線の変曲点を「融解温度」として定義した。

50

結果 - 表 7

試料	凝集開始(°C単位)	融解温度(°C単位)
Her 3	63 ±1	67.5 ±1
PRIT-0156(ウサギ DOTAM 結合剤を有する親分子)	45 ±1	51 ±1
PRIT 205	51 ±1	51.5 ±1
PRIT 206	51 ±1	58.1 ±1
PRIT 207	49 ±1	58.1 ±1
PRIT 208	54 ±1	57.7 ±1
PRIT 209	54 ±1	57.7 ±1
PRIT-0213	54 ±1	57.7 ±1

【0537】

実施例 13：候補の選択

PRIT-0156は、CEA 結合剤 CH1A1A と組み合わせたウサギ DOTAM 結合剤 PRIT-0128 を含む 2：1 抗体である。PRIT-0178 から PRIT-0204 は、同じ形式で、同じ CEA 結合剤を有する、ヒト化バリエーションである。PRIT-0205 から PRIT-0221 までは、DOTAM 結合部分において PRIT-0178 から PRIT-0204 ヒト化バリエーションに対応するが、T84.66 に変化された CEA 結合剤を有する。

【0538】

下表は、様々な PRIT 分子の特性を比較する。好まれる化合物は、PRIT-213 および PRIT-214 であった。

抗体	CEA 結合剤	Dotam 結合剤	形式
PRIT-0218	なし	WT	ウサギ抗体
PRIT-0156	CH1A1A	PRIT-0218	PRIT 0128 dotam 結合剤を有する 2:1 抗体
PRIT-0186	CH1A1A	HC5/LC1 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 形式
PRIT-0213	T84.86	HC5/LC1 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 形式
PRIT-0187	CH1A1A	HC10/LC1 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 形式
PRIT-0214	T84.86	HC10/LC1 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 形式
PRIT-0206	T84.86	HC5/LC3 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 形式
PRIT-0216	T84.86	HC5/LC3 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 形式
PRIT-0217	T84.86	HC5/LC3 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 形式
PRIT-0208	T84.86	HC7/LC1 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 形式

10

20

30

40

50

	CEA BiCEAnder	DOTAM Binder	SET PbDOTAM [pM]	Kinexa PbDOTAM [pM]	収量 [mg/l]	T Agg 266nm	ヒト化度 (Humanness)		体内分布
PRIT-0156	CH1A1A	WT ウサギ	0.01	0.25	25	45	---	---	可
PRIT-0186	CH1A1A	HC5 / LC1	0.4	0.92	38	50	HC 58%	LC 57%	可
PRIT-0213	T84.66	HC5/LC1	0.4	0.84	4.0	54	HC 58%	LC 57%	可
PRIT-0187	CH1A1A	HC10/ LC1	0.03	0.99	17.8	57	HC 40%	LC 57%	可
PRIT-0214	T84.66	HC10/LC1	0.03	0.84	6.0	55	HC 40%	LC 57%	可
PRIT-0206	T84.66	HC5/LC3	0.36	1.0	1.32	50	HC 58%	LC 55%	可
PRIT-0216	T84.66	HC5/LC3	---	51	7.0	50	HC 58%	LC 55%	可
PRIT-0217	T84.66	HC5/LC3	---	3	10.0	54	HC 58%	LC 55%	可
PRIT-0208	T84.66	HC7/LC1	8.7	8.3	7.6	59	HC 51%	LC 57%	可

10

20

(a) 表 8: 候補の選択

【 0 5 3 9 】

30

40

50

配列

HC5: VTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGF¹IGSRGDT²YASWAKGRLTISKDTSK
SQVVLTMNDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGLTVTVSS

LC1: SIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQSSHVS¹SDND²LAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK

LC3: aqmtqspstl sasvgdrvti tcqsshsvs

501 dndlawyqqk pgqppklliy qasklasgvp srfsgsgsgt eftltisslq

551 pddfattyyl ggyddesdy gfgggtkvei k

HC7: vqlvesgggl vqpggsrls caasgfslst

501 ysmwvrqap gkglewvfi gsgdtyyas wakgrftisr dtskntaylq

551 mnsdraeda vyycarerdp yggaypphl wgrgtltvts s

HC10: vqlqqwgagl lkpsetlslt cavygfslst

501 ysmwvrqap gkglewvfi gsgdtyyas wakgrvtisr dtsknqvslk

551 lssvtaada vyycarerdp yggaypphl wgrgtltvts s

T84.66 VH 1 qvqlvqsgae vkkpgssvk sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr

51 idpangnsky vpkfgrvti tadtststay melsslrdsd tavyycapfg

101 yyvsdyamay wgqgtltvts s

T84.66 VL:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISLPEPDAFVYYCQQTNEPYPYFGQGTKEIK

CH1A1A VH:

qvqlvqsgae vkkpgasvk sckasgytft efgmnwvrqa pgqglewmgw

51 intktgeaty veefkgrvtf tadtststay melsslrdsd tavyycarwd

101 fayyveamdy wgqgtltvts s

CH1A1A VL:

1 diqmtqspss lsasvgdrvt itckasaavg tyvawyqqk gkapklliys

51 asyrkrvps rfsrgsgsgtd ftltisslqp edfatyychq yytyplftfg

101 qgtkleik

【0540】

実施例14: Fab P1AA1227 Pb-DOTAM複合体の結晶化、データ収集および構造決定

複合体形成のため、26 mg/mlのP1AA1227と呼ばれるPRIT-0213におけるヒト化VH/VLに由来するFabを、Pb-DOTAM粉末と1:4.2のモル比で混合した。4℃での2時間インキュベーション後に、JCSG+スクリーン(Qiagen、ヒルデン)を使用して、21℃でシッティングドロップ蒸気拡散(sitting drop vapor diffusion)装置において初期結晶化の試みを行った。結晶は、0.2 M (NH₄)₂SO₄、0.1 Mピストリス、pH 5.5、25%w/v PEG 3350から5日以内に出現した。結晶は、いかなるさらなる最適化ステップも用いず、スクリーニングプレートから直接的に採集した。

【0541】

データ収集および構造決定。データ収集のため、10%エチレングリコール(ethyleneglycol)を含有する沈殿剤溶液において結晶を100 Kで瞬間(flash)凍結した。Swiss Light Source(スイス、ビリゲン(Villigen))のビームラインX10SAでPILATUS 6M検出器を使用して、1.0000 Åの波長で回折データを収集した。データは、XDS(Kabsch、W. Acta Cryst. D66、133~144(2010))により処理し、SADABS(BRUKER)により調整した。複合体の結晶は、a = 135.63 Å、b = 56.42 Å、c = 64.52 Åおよびβ =

108.36°のセル軸による空間群C2に属し、1.40 Åの分解能に対し回折する。検索モデルとしてインハウスFab構造の座標を使用して、PHASER (McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Storoni, L. C. および Read, R. J. J. Appl. Cryst. 40, 658~674 (2007)) による分子置換えによって構造を決定した。差電子密度を使用して、Pb-DOTAMを配置し、実空間精密化により配列差に従ってアミノ酸を変化させた。CCP4一式 (Collaborative Computational Project, Number 4 Acta Cryst. D50, 760~763 (1994)) およびBUSTER (Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O. S., Vonrhein, C., Womack, T. O. (2011). Buster version 2.9.5、英国、ケンブリッジ: Global Phasing Ltd.) 由来のプログラムにより構造を精密化した。COOT (Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. および Cowtan, K. Acta Cryst D66, 486~501 (2010)) により手動復元を行った。

【0542】

データ収集および精密化統計は、表9に要約されている。

【0543】

全てのグラフィック提示は、PYMOL (The Pymol Molecular Graphics System、バージョン1.7.4、Schrodinger、LLC.) により調製した。

10

20

30

40

50

表 9 – Fab P1AA1227-Pb-DOTAM 複合体のためのデータ収集および精密化統計

P1AA1227-Pb-DOTAM		
データ収集		
空間群	C2	
セル寸法		
a, b, c (Å)	135.63, 56.42, 64.52	10
α, β, γ (°)	90, 108.36, 90	
分解能(Å)	1.40	
R_{sym} または R_{merge}	0.041	
$I / \sigma I$	10.3 (0.94)	
完成度(%)	94.4 (86.1)	
冗長性	3.37 (3.33)	20
精密化		
分解能(Å)	48.9 – 1.40	
反射数	81631	
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	19.21/22.38	
原子数		
タンパク質	3342	
水	523	
Pb-Dotam	29	30
B 因子		
タンパク質	14.81	
水	37.46	
Pb-Dotam	21.09	
R.m.s. 偏差		
結合の長さ(Å)	0.011	
結合角(°)	1.57	

*括弧内の値は、最高分解能シェルのためのものである。

40

【 0 5 4 4 】

P b – D o t a m と複合体形成した F a b P 1 A A 1 2 2 7 の構造

F a b P 1 A A 1 2 2 7 と P b – D o t a m との相互作用の詳細を特徴づけるため、本出願人は、1.40 Å の分解能で複合体の結晶構造を決定した。構造は、軽鎖の C D R 1 および C D R 3 の主な寄与ならびに重鎖の C D R 2 および C D R 3 により P b – D O T A M に結合する F a b P 1 A A 1 2 2 7 を明らかにする。

【 0 5 4 5 】

プログラム P I S A による結合接触面の解析は、3 個の水素結合、極性相互作用およびファンデルワールス接触を介した P b – D O T A M と F a b P 1 A A 1 2 2 7 との相互

50

作用パターンを明らかにする。Pb-DOTAMは、重鎖および軽鎖によって形成されたポケット内で結合する。このポケットは、1側面が開いた箱の形状を有する。ポケットの側壁および底面は、無極性相互作用に寄与し、一方、壁の周縁部では、極性相互作用が優勢である。側鎖水素結合は、DOTAMカルバモイル窒素原子N7およびN8と重鎖Glu95およびAsp97のCDR3残基の間で形成される。DOTAMの原子N7とArg96の主鎖カルボニル原子により、追加的な水素結合が確立される。複合体は、アザシクロドデカン環に面する配向された縁である、重鎖CDR2 Phe50およびTyr58側鎖の無極性相互作用によりさらに安定化される。軽鎖は、大部分が、ポケットの「底面」に寄与し、CDR3残基Gly91~Tyr96は、テトラシクロドデカン環への無極性接触をもたらす。Asp32は、DOTAMのカルバモイル窒素原子N6への水素結合を受け入れる（カバットに従った番号付け）。

10

【0546】

図2は、Pb-DOTAMと複合体形成したP1AA1227の構造を示す。

【0547】

図3は、相互作用部位における表示を示す。

【0548】

下表は、プログラムPISAによる解析に基づく、重鎖パルトープ残基を示す。

表 10

重鎖残基(カバット番号)	相互作用の種類	Pb-DOTAM
Phe50	無極性	アザシクロドデカン環に面する縁
Asp56	極性	N8
Tyr58	無極性	アザシクロドデカン環に面する縁
Glu95	H-結合	N7
Arg96	H-結合(mc カルボニル)	N7
Asp97	H-結合	N8
Pro98	面する縁(Edge-face)	Pb-Dotam の上、4 Å 距離
Tyr99	極性(ただし距離 6Å)	N5
Ala100C	無極性	C12
Tyr100D	極性(mc 原子)	N7

20

30

40

【0549】

下表は、プログラムPISAによる解析に基づく、軽鎖パルトープ残基を示す。

50

表 11

軽鎖残基(カバット番号)	相互作用の種類	Pb-DOTAM
Tyr28	無極性	アザシクロデカン環に面する縁
Asp32	極性、H-結合	N6
Gly91	無極性	アザシクロデカン環の下
Tyr92	無極性	アザシクロデカン環の下
Asp93	無極性	アザシクロデカン環の下
Thr95C	無極性	アザシクロデカン環の下
Tyr96	無極性	アザシクロデカン環に面する縁

【 0 5 5 0 】

パラトープ残基はまた、下に示す配列において下線を引く：

> P1AA1227_HC

VTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFISGRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVL
TMTNMDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

> P1AA1227_LC

SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTSS
LQPEDFATYYCLGGVDDESDTYGFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 5 5 1 】

実施例 15：i n v i v o 体内分布および有効性：材料および方法

10

20

30

40

50

次の実施例のための用語集

BD	体内分布
bsAb	二重特異性抗体
CA	除去剤
CEA	がん胎児性抗原
Dex500	デキストラン 500-TCMC-Pb
Dex[n]	デキストラン[n]-TCMC-Pb
DOTAM	1,4,7,10-テトラキス(カルバモイルメチル)-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン
H&E	ヘマトキシリンおよびエオシン
ID	注射用量
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法
i.p.	腹腔内
i.v.	静脈内
MIRD	医療内部被ばく線量
MW	分子量
NBF	中性緩衝ホルマリン
OCT	最適切削温度(Optimum cutting temperature)
OS	全生存
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
p.i.	注射後
PK	薬物動態
PRIT	プレターゲティングされた放射免疫療法
RBE	相対生物学的有効性
RT	室温
PSCA	前立腺幹細胞抗原
s.c.	皮下
SCID	重症複合免疫不全
SD	標準偏差
SOPF	特定のおよび日和見性の病原体がない
SPF	特定の病原体がない
TA	標的抗原
TCMC	1,4,7,10-テトラキス(カルバモイルメチル)-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン
TGI	腫瘍増殖阻害
TR	腫瘍縮小

【0552】

プロトコルの材料および方法

一般

全ての実験プロトコルは、地方当局 (Comite Regional d'Ethique de l'Experimentation Animale du Limousin (CREEAL)、Laboratoire Departemental d'Analyses et de Recherches de la Haute-Vienne) によって審査および承認された。雌重症複合免疫不全 (SCID) マウス (Charles River) は、倫理指針に沿って、明暗の日周サイクル (12時間 / 12時間)

により、特定の病原体がない条件下で維持した。到着後最初の1週間において操作は行わず、動物を新たな環境に順化させた。全てのマウスを、体調および全般的な健全性の評価に関して毎日モニターした。

【0553】

腫瘍体積をノギス計測により推定し、式：体積＝0.5×長さ×幅²に従って計算した。プロトコルによって指示される通り、血液を終結時に後眼窩出血を使用して静脈洞から収集し、続いて放射能測定および／または組織学的解析のための追加的な組織採集を行った。予想外なまたは異常な状態を記録した。

【0554】

GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) および JMP 8 (SAS Institute Inc.) を使用して統計解析を行った。

【0555】

試薬

二重特異性抗体は、Roche Diagnostics GmbH, Pharma Research Penzberg (ドイツ、ペンツベルク) によって提供され、注射日まで-80℃で貯蔵された。次に、二重特異性抗体を解凍し、標準ビヒクルバッファー (20mMヒスチジン／ヒスチジンHCl、140mM NaCl; pH6.0) に希釈した。

二重特異性抗体

化合物	標的	プロトコル	サプライヤー
PRIT-0155	PSCA	83, 87	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0156	CH1A1A	80, 91	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0165	T84.66	80, 85, 90, 91, 95	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0175	ジゴキシゲニン	80, 91, 93	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0186	CH1A1A	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0187	CH1A1A	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0205	T84.66	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0206	T84.66	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0207	T84.66	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0208	T84.66	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0209	T84.66	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0213 =	T84.66	93, 105, 106	Roche Pharma Research PZ
CEA-PRIT			
PRIT-0214	T84.66	93	Roche Pharma Research PZ

【0556】

除去試薬は、Macrocyclics (米国テキサス州ブレイノ) によって提供された。除去試薬は、注射日まで-80℃で貯蔵し、注射日に解凍し、所望の濃度となるようにPBSに希釈した。

10

20

30

40

50

除去剤

化合物	TCMC 置換	プロトコール	サプライヤー
Dex500-トリ GalNAc 3:1†	81-1	44	Macrocy clics
Dex500-トリ GalNAc 9:1†	101-1	44, 70	Macrocy clics
Dex20	14-1	83, 85, 87	Macrocy clics
Dex20†	16-1	70	Macrocy clics
Dex70	8-1	83, 85, 87	Macrocy clics
Dex70†	10-1	44, 70	Macrocy clics
Dex70-トリ GalNac†		70	Macrocy clics
Dex250	19-1	83, 87	Macrocy clics
Dex250†	24-1	44, 70	Macrocy clics
Dex500†*		70	Macrocy clics
Dex500*	84-1	80, 83, 85, 87, 90, 91	Macrocy clics
CDex500-(Glu)3*	95-1	83, 87	Macrocy clics
CDex500-(Glu)2*	84-1	83, 87	Macrocy clics
CDex500-(Glu)4*	78-1	83, 85, 87	Macrocy clics
Dex500-M(Glu)2*	11-1	83, 85, 87	Macrocy clics
Dex20-M(Glu)2	2-1	83, 87	Macrocy clics
Dex500-(10%)**	9-1	95	Macrocy clics
Dex500-(20%)**	20-1	95	Macrocy clics
Dex500-(40%)**	39-1	95	Macrocy clics
Dex500-(100%)**	84-1	90, 95	Macrocy clics
Dex500-(50%)**	47-1	105, 106	Macrocy clics

†Pb-クエンチなし; *30kDa 濾過カットオフ; **100kDa 濾過カットオフ

【 0 5 5 7 】

放射標識のためのDOTAMキレートは、Macrocy clicsによって提供され、放射標識前に-20℃で維持された。鉛-203 (^{203}Pb) または鉛-212 (^{212}Pb) のいずれかによるその後の標識は、AREVA Med (フランス、ラゼ (Razes)) によって行われた。マウスに、所望のPb線量/放射能濃度を得るようPBSで希釈された、それぞれのPb-DOTAM溶液の100 μL を静脈内 (i. v.) 注射した。 ^{203}Pb -DOTAMは、二重特異性抗体と予め結合して使用し、一方、 ^{212}Pb -DOTAMは、PRITおよび除去剤の後に投与した。放射能測定は、2470 WIZARD² 自動ガンマ計数器 (PerkinElmer) を使用して行った。

放射標識されたキレート

化合物	製剤バッファー	サプライヤー
^{212}Pb -DOTAM	PBS	Macrocy clics, AREVA Med
^{203}Pb -DOTAM	PBS	Macrocy clics, AREVA Med

10

20

30

40

50

【0558】

BxPC3は、CEAを天然に発現するヒト初代膵臓腺癌細胞株である。BxPC3細胞は、10%ウシ胎仔血清および1%GlutaMAX (Gibco、参照番号35050-061)を強化したRPMI-1640培地 (Gibco、参照番号42401-018)において培養した。LS174Tは、CEAを天然に発現するヒト結腸直腸腺癌細胞株である。LS174T細胞は、10%ウシ胎仔血清を強化したDMEM培地 (Gibco、参照番号42430-082)において培養した。MKN45は、CEAを天然に発現するヒト胃腺癌細胞株である。MKN45細胞は、20%ウシ胎仔血清を強化したRPMI-1640培地 (Gibco、参照番号42401-018)において培養した。固形異種移植片は、Corning (登録商標) Matrigel (登録商標) 基底膜マトリックス (増殖因子低下; カタログ番号354230) と1:1混合したRPMIまたはDMEM培地における細胞の、右側腹部への皮下注射により確立した。

細胞株

細胞株	マウス1匹あたりの細胞数	注射体積	サプライヤー
BxPC3	5×10^6	100 μ L	ECACC*
LS174T	1×10^6	100 μ L	ATCC**
MKN45	0.5×10^6	100 μ L	DSMZ ***

*欧州認証細胞培養物コレクション(European Collection of Authenticated Cell Cultures)(英国、ソールズベリー)

**アメリカ培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)(米国バージニア州マナサス)

***Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(ドイツ、ブラウンシュヴァイク)

【0559】

実施例16: 様々なCEA標的化二重特異性抗体によるプレターゲティング (プロトコール80 (a、b、c))

本試験は、レジメンを最適化し、臨床治験への移行に最も適した候補を選択するために、様々なCEA標的化二重特異性抗体によるプレターゲティング後のマウスにおける膵臓腺癌異種移植片におけるPb蓄積を評価することを目標とした。実験を3種の別々のプロトコールに分け、i) 80b、ii) 80cおよびiii) 80aの順序で行った。プロトコール80bは、 2×10^3 Pb-DOTAMと予め結合させた、5種の完全にヒト化された二重特異性抗体コンストラクトの腫瘍取込みを評価した。プロトコール80cは、注射後の3つの異なる時点における、 2×10^3 Pb-DOTAMと予め結合させた二重特異性抗体コンストラクトの腫瘍取込みを評価して、プレターゲティングレジメンにおけるPRIIT注射およびCA/キレート注射の間のタイミングを最適化した。最後に、プロトコール80aは、T84.66またはCH1A1Aのいずれかを標的とする5種の完全にヒト化された二重特異性抗体コンストラクトを使用して、標準プレターゲティング設定における 2×10^2 Pb-DOTAMの腫瘍取込みを評価した。

10

20

30

40

50

試験設計、プロトコール 80a

試験日	日付	実験手順
1	2016-02-10	BxPC3 細胞の s.c.注射*
6	2016-02-15	PRIT bsAb の i.v.注射*
9	2016-02-18	CA の i.v.注射*
9	2016-02-18	^{212}Pb -DOTAM の溶出
9	2016-02-18	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射*
10	2016-02-19	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数

*注射体積 100 μL

10

試験設計、プロトコール 80b

試験日	日付	実験手順
1	2016-01-13	BxPC3 細胞の s.c.注射*
6	2016-01-18	^{203}Pb -DOTAM の溶出および PRIT bsAb と予め結合
6	2016-01-18	^{203}Pb -DOTAM-bsAb の i.v.注射*
10	2016-01-22	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数

*注射体積 100 μL

20

試験設計、プロトコール 80c

試験日	日付	実験手順
1	2016-01-20	BxPC3 細胞の s.c.注射*
6	2016-01-25	^{203}Pb -DOTAM の溶出および PRIT bsAb と予め結合
6	2016-01-25	^{203}Pb -DOTAM-bsAb の i.v.注射*
7	2016-01-26	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数
9	2016-01-28	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数
13	2016-02-01	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数

*注射体積 100 μL

30

【0560】

各マウス（6～7週齢）に、100 μL RPMI/MatrigelにおけるBxPC3細胞（継代30）を、右側腹部へと皮下（s.c.）注射した。腫瘍細胞注射5日後に、160～170mm³の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。100 μL あたり30 μg の最終濃度となるように抗体を希釈し、その後、単独で（80a）、または ^{203}Pb -DOTAMと予め結合して（80b、80c）のいずれかでi.v.投与した。PRIT-0165およびPRIT-0156は、それぞれT84.66およびCH1A1Aを標的とするポジティブCEA結合コントロールとして使用した。PRIT-0175は、非CEA結合コントロールとして使用した。

40

【0561】

プロトコール80aにおいて、二重特異性抗体の3日後に、除去剤を100 μL あたり30 μg の濃度で静脈内注射し、続いて2時間後に、 ^{212}Pb -DOTAMを注射した。

50

試験群、プロトコール 80a ($n_{\text{tot}} = 24$)

群	A	B	C	D	E	F	G	H
bsAb	PRIT-	PRIT-	PRIT-	PRIT-	PRIT-	PRIT-	PRIT-	PRIT-
	0206	0207	0208	0165	0186	0187	0156	0175
				*			**	***
bsAb 用量 (μg)	30	30	30	30	30	30	30	30
CA	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500
CA 用量 (μg)	30	30	30	30	30	30	30	30
キレート	$^{212}\text{Pb-}$	$^{212}\text{Pb-}$	$^{212}\text{Pb-}$	$^{212}\text{Pb-}$	$^{212}\text{Pb-}$	$^{212}\text{Pb-}$	$^{212}\text{Pb-}$	$^{212}\text{Pb-}$
	DOTAM	DOTAM	DOTAM	DOTAM	DOTAM	DOTAM	DOTAM	DOTAM
Pb 放射能 (μCi)	13	13	13	13	13	13	13	13
n	3	3	3	3	3	3	3	3

*ポジティブコントロール(T84.66); **ポジティブコントロール(CH1A1A); ***ネガティブコントロール

試験群、プロトコール 80b ($n_{\text{tot}} = 21$)

群	A	B	C	D	E	F	G
bsAb	PRIT-	PRIT-	PRIT-	PRIT-	PRIT-	PRIT-	PRIT-
	0205	0206	0207	0208	0209	0165	0175
						*	**
bsAb 用量 (μg)	30	30	30	30	30	30	30
CA	—	—	—	—	—	—	—
CA 用量 (μg)	—	—	—	—	—	—	—
予め結合さ せたキレート	$^{203}\text{Pb-}$	$^{203}\text{Pb-}$	$^{203}\text{Pb-}$	$^{203}\text{Pb-}$	$^{203}\text{Pb-}$	$^{203}\text{Pb-}$	$^{203}\text{Pb-}$
	DOTAM	DOTAM	DOTAM	DOTAM	DOTAM	DOTAM	DOTAM
Pb 放射能 (μCi)	4	4	4	4	4	4	4
n	3	3	3	3	3	3	3

*ポジティブコントロール(T84.66); **ネガティブコントロール

10

20

30

40

50

試験群、プロトコール 80c ($n_{\text{tot}} = 27$)

群	A	B	C
bsAb	PRIT-0206	PRIT-0165	PRIT-0175
		*	**
bsAb 用量 (μg)	30	30	30
CA	—	—	—
CA 用量 (μg)	—	—	—
予め結合させた キレート	^{203}Pb -DOTAM	^{203}Pb -DOTAM	^{203}Pb -DOTAM
Pb 放射能 (μCi)	1-2	1-2	1-2
剖検時点(時間 p.i.)	24, 72, 168	24, 72, 168	24, 72, 168
n	9	9	9
(時点あたり)	(3)	(3)	(3)

*ポジティブコントロール(T84.66); **ネガティブコントロール

【0562】

24時間(80a); 96時間(80b); または24、72もしくは168時間(80c)後に、体内分布を調べる目的のためにマウスを殺した。プロトコール80aにおいて全マウスから、次のものを採集した: 血液、膀胱、脾臓、腎臓、肝臓、肺、心臓、筋肉および腫瘍。プロトコール80bおよび80cにおける全マウスから、次のものを採集した: 血液、膀胱、小腸、結腸、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、肺、心臓、大腿骨(femoral bone)、筋肉および腫瘍。収集された試料を秤量し、即時放射能測定のためにプラスチックチューブに入れた。次に、放射能崩壊およびバックグラウンドのための補正を含む、組織1グラムあたりのパーセント注射用量(%ID/g)を計算した。

【0563】

結果、80a

全てのCEA結合二重特異性抗体が、 ^{212}Pb -DOTAMの特異的腫瘍標的化をもたらし、DOTAM注射24時間後に正常組織における取り込みは殆どなかったまたは全くなかった。PRIT-0206、PRIT-0207およびPRIT-0208に関して、平均腫瘍取込み $\pm$ SDは、それぞれ 8.62 ± 1.05 、 7.30 ± 3.84 および 7.75 ± 2.61 %ID/gであり、それらの対応するT84.66結合ポジティブコントロールPRIT-0165は、 9.13 ± 1.82 %ID/gであった。CH1A1A結合剤PRIT-0186およびPRIT-0187は、 17.44 ± 1.39 および 16.50 ± 3.25 %ID/gの腫瘍値をもたらし、それらのポジティブコントロールPRIT-0156は、 18.98 ± 1.89 %ID/gであった。非CEA結合PRIT-0175は、腫瘍において 0.41 ± 0.42 %ID/gをもたらした。

【0564】

全体的に見て、CH1A1Aを標的とする二重特異性抗体は、T84.66を標的とする抗体よりも有意に高い腫瘍取込みをもたらした(独立t検定、 $p < 0.0001$); CH1A1AおよびT84.66は両者共に、ネガティブコントロールと比較して、有意に

より高い取り込みをもたらした（一方向ANOVA、 $p < 0.0001$ ）。結果を図4に示す。

【0565】

結果、80b

腫瘍の特異的標的化は、全ての予め結合させたCEA結合二重特異性抗体により達成されたが、%ID/gは、ポジティブコントロールPRIT-0165と比較して、完全にヒト化型に関して僅かにより低かった。非CEA結合コントロールは、比較的無視できる腫瘍蓄積をもたらした。

【0566】

全体的に見て、この予め結合させる実験設定において計算された%ID/gは、対応するPRITレジメンのものよりもおよそ10倍高いレベルに達した；しかし、アウトプットデータは、ガンマ計数器放射能測定値を反映し、計算誤差は見出されなかった。重要なことに、腫瘍対正常組織比は、予想される範囲内のままであった。具体的には、腫瘍対血液比（ $\pm$ SD、 $n=3$ ）は、PRIT-0205で 6.76 ± 2.95 、PRIT-0206で 7.56 ± 2.27 、PRIT-0207で 9.33 ± 0.91 、PRIT-0208で 10.77 ± 0.84 、PRIT-0209で 11.71 ± 0.84 、PRIT-0165で 10.78 ± 0.88 、PRIT-0175で 0.85 ± 0.12 であった。結果を図5に示す。

【0567】

結果、80c

両方のCEA結合抗体が、ネガティブコントロールと比較して、有意な腫瘍蓄積をもたらした。統計解析は、試験された時点のいずれに関しても、PRIT-0206またはPRIT-0165を使用した腫瘍標的化の間に有意差を示さず、試験された抗体のいずれに関しても、どちらにも、3および7日目の間で%ID/gにいかなる有意差もなかった（二方向ANOVA、 $p < 0.05$ ）。プロトコール80bと類似して、計算された%ID/g値は全体的に高かった；しかし、腫瘍対血液比は、予想される範囲内のままであった。1および3日目の間に、腫瘍対血液比に有意差は見られなかったが、PRIT-0165およびPRIT-0206に関して、7日間の待機は、比を有意に増加させる（二方向ANOVA、 $p < 0.05$ ）。結果を図6に示す。

注射後の様々な時点における ^{203}Pb -DOTAM-bsAbの腫瘍対血液比（ $\pm$ SD; $n=3$ ）

注射後日数	PRIT-0206	PRIT-0165	PRIT-0175
1	4.48 ± 0.38	4.28 ± 1.31	0.84 ± 0.22
3	8.73 ± 4.07	7.13 ± 0.33	0.75 ± 0.30
7	29.67 ± 10.52	17.87 ± 12.15	0.76 ± 0.25

【0568】

概要および結論

T84.66またはCH1A1Aのいずれかを標的とする全ての完全にヒト化された二重特異性抗体が、これらそれぞれのポジティブコントロールのものに匹敵する、BxPC3腫瘍における放射能の有意な蓄積をもたらした。

【0569】

腫瘍における ^{203}Pb -DOTAM-bsAbの%ID/gは、3および7日間の間で有意に異ならなかったが、対応する腫瘍対血液比は、血中放射能の減少のため、より後の時点をサポートした。

【0570】

実施例17：除去剤の体内分布（プロトコール44）

本試験の目標は、異なる特性（例えば、分子骨格、サイズおよび電荷）を有する選択された除去剤の体内分布、より具体的には、腫瘍におけるそれらの存在および／または蓄積

に取り組むことであった。除去剤が潜在的に、腫瘍内に進入する、腫瘍結合抗体に結合する、および／またはこれらを腫瘍から抜き出し、放射性リガンドのその後の結合にマイナスに影響を与える可能性があるため、このことを知ることは興味深かった。

試験設計、プロトコール 44

試験日	日付	実験手順
1	2015-03	^{212}Pb 標識 CA の i.v. 注射*
1	2015-03	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数(2 時間 p.i.)
2	2015-03	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数(24 時間 p.i.)

*注射体積 100 μL

10

試験群、プロトコール 44 ($n_{\text{tot}} = 24$)

群	CA†	CA 用量 (μg)	^{212}Pb 放射能 (μCi)	時点 (時間 p.i.)	n
A	Dex70	30	5	2	3
B	Dex250	30	5	2	3
C	Dex500-トリ GalNAc 3:1	30	5	2	3
D	Dex500-トリ GalNAc 9:1	30	5	2	3
E	Dex70	30	5	24	3
F	Dex250	30	5	24	3
G	Dex500-トリ GalNAc 3:1	30	5	24	3
H	Dex500-トリ GalNAc 9:1	30	5	24	3

† ^{212}Pb -標識前の Pb-クエンチなしの全ての除去剤

20

30

【0571】

30 μg の Dex 70、Dex 250 およびトリ GalNAc 修飾除去剤を、5 μCi ^{212}Pb でクエンチし、PBS において希釈して、i.v. 注射のために 100 μL 総体積あたり 30 μg を得た。

【0572】

^{212}Pb -CA の注射 2 または 24 時間後に、マウスを 殺し、剖検した。血液、膀胱、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、腸（十二指腸、空腸、回腸）、結腸、膵臓、胃、卵巣、脳、骨髄を有する大腿骨、および腫瘍を収集し、秤量し、放射能含有量に関して測定し、% ID および % ID / g をその後計算した。加えて、24 時間の時点で尿をサンプリングした。

40

【0573】

結果、44

全ての除去剤は、血流から急速に除去され、既に注射後 2 時間目には肝臓および結腸に主に蓄積する。臓器別の (% ID) 放射能分布によって実証される通り、注射された ^{212}Pb の約 50 % は、注射 24 時間後に肝臓に見出された。トリ GalNAc 分子の存在によって説明される通り、トリ GalNAc 修飾除去剤も、ある程度まで脾臓に蓄積した。一般に、24 時間後に尿に放射能は殆ど見出されなかった。しかし、最も小型の除去剤 (Dex 70) は、予想よりもゆっくりと排泄された。

【0574】

50

図 7 は、M K N 4 5 腫瘍を有するマウスにおける、 ^{212}Pb 標識された除去剤の注射 2 時間後の、選択された組織における放射能分布を示す ($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$ 、 $n = 3$)。

【0575】

図 8 は、M K N 4 5 腫瘍を有するマウスにおける、 ^{212}Pb 標識された除去剤の注射 2 4 時間後の、選択された組織および尿における放射能分布を示す ($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$ 、 $n = 3$)。

【0576】

図 9 は、M K N 4 5 腫瘍を有するマウスにおける、 ^{212}Pb 標識された除去剤の注射 2 4 時間後の、選択された組織および尿における臓器別の放射能分布を示す ($\% \text{ID} \pm \text{SD}$ 、 $n = 3$)。

【0577】

概要および結論

放射標識された C A のいずれも、マウス 1 匹あたり $30 \mu\text{g}$ の用量で投与された場合、 ^{212}Pb の腫瘍取込みをもたらさなかった。トリ G a l N a c による D e x 5 0 0 の修飾は、修飾されていない D e x 7 0 および D e x 2 5 0 除去剤と比較して有益ではなかった。

【0578】

実施例 18：除去剤の長期体内分布（プロトコール 70）

本試験は、6 種の異なる除去剤の長期体内分布を比較した。 ^{203}Pb による放射標識により、i n v i v o 追跡を行った。

試験設計、プロトコール 70

試験日	日付	実験手順
1	2015-09	^{203}Pb 標識 C A の i.v. 注射*
8	2015-09	安楽死および剖検：組織のガンマ計数

*注射体積 $100 \mu\text{L}$

試験群、プロトコール 70 ($n_{\text{tot}} = 18$)

群	CA†	CA 用量 (μg)	^{203}Pb 放射能 (μCi)	n
A	Dex500	30	50	3
B	Dex500-トリ GalNAc 9:1	30	50	3
C	Dex250	30	50	3
D	Dex70	30	50	3
E	Dex70-トリ GalNAc	30	50	3
F	Dex20	30	50	3

† ^{203}Pb -標識前の Pb-クエンチなしの全ての除去剤

【0579】

結果、70

図 10 は、腫瘍がないマウスにおける、 ^{203}Pb 標識された除去剤の注射 1 週間後の、選択された組織における放射能分布を示す ($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$ 、 $n = 3$)。

【0580】

図 11 は、腫瘍がないマウスにおける、 ^{203}Pb 標識された除去剤の注射 1 週間後の、選択された組織における臓器別の放射能分布を示す ($\% \text{ID} \pm \text{SD}$ 、 $n = 3$)。

【0581】

実施例 19：血液における除去剤（プロトコール 83 および 87）

このパートは、2つの試験を網羅し、そのうち第1の試験は、血液中の滞留時間の観点から、9種の異なるデキストランベースの除去剤をPBSと比較する初期スクリーニングを含む。目標は、3週間隔で反復処置を可能にする、将来のプレターゲットング実験の有望な候補を同定することであった。延長した時間にわたり循環中に残る除去剤が、投与された二重特異性抗体に結合し、その後に注射される放射標識されたDOTAMの結合を有効にブロックするという仮説を立てた。除去試薬は、サイズ、電荷、および1, 4, 7, 10-テトラキス（カルバモイルメチル）-1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン（TCMC）ロードの観点から変動した。

【0582】

第2の試験は、抗体除去効率の観点から9種の除去剤を評価した。この実験は、CA投与後の保持されるbsAbの指標として血液における ^{212}Pb -DOTAM保持を評価する、腫瘍がないマウスにおける標準単一注射PRITレジメンとして設計された。

試験設計、プロトコール 83

試験日	日付	実験手順
1	2016-01-19	PRIT bsAb の i.v.注射*
2	2016-01-20	CA または PBS の i.v.注射*
24	2016-02-11	PRIT bsAb の i.v.注射*
25	2016-02-12	^{212}Pb -DOTAM の溶出
25	2016-02-12	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射*
25	2016-02-12	安楽死および血液サンプリング+ガンマ計数

*注射体積 100 μL

試験設計、プロトコール 87

試験日	日付	実験手順
6	2016-02-29	PRIT bsAb の i.v.注射*
9	2016-03-01	CA または PBS の i.v.注射*
9	2016-03-01	^{212}Pb -DOTAM の溶出
9	2016-03-01	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射*
10	2016-03-02	安楽死および血液サンプリング+ガンマ計数

*注射体積 100 μL

10

20

30

40

50

プロトコール 83 および 87 における試験群(プロトコールあたり $n_{\text{tot}}=30$)

群	bsAb	bsAb 用量 (μg)	CA	CA 用量 83/87 (μg)	キレート	Pb 放射能 (μCi)	n
A	PRIT-0155	30	Dex20	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
B	PRIT-0155	30	Dex70	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
C	PRIT-0155	30	Dex250	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
D	PRIT-0155	30	Dex500	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
J	PRIT-0155	30	CDex500-(Glu)3	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
K	PRIT-0155	30	CDex500-(Glu)2	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
L	PRIT-0155	30	CDex500-(Glu)4	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
M	PRIT-0155	30	Dex500-M(Glu)2	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
N	PRIT-0155	30	Dex20-M(Glu)2	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
O	PRIT-0155	30	—	0/0	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3

【0583】

第1のPRIT注射時に、マウスは7～9週齢であった。試験における全マウスは腫瘍がなかった；したがって、いかなるDOTAM結合二重特異性抗体をスクリーニング目的で使用することもできる。100 μL あたり30（プロトコール83）または60（プロトコール87） μg の最終濃度となるようPBSに希釈したPRIT-0155の1日後に、除去剤を静脈内投与した。群Oは、除去剤の代わりにPBSを受けた。群A～Dにおける化合物は、変動するTCMC置換を有する、20、70、250または500 kDaのデキストランサイズに基づいた。群J～Nにおける化合物は、変動する電荷（Glu）を有するキャッピングされた（すなわち、過剰アミンの中和による）デキストラン-500（CDex）、またはモノバージョンのGlu（M（Glu））を有するデキストラン-500およびデキストラン-20に基づいた。—（Glu）4、—（Glu）3および—（Glu）2を有するキャッピングされたデキストランは、それぞれ強く負、負および中性の正味電荷に対応した；モノバージョン-M（Glu）2は、負から僅かに正の正味電荷に対応した。

【0584】

結果、83

PBSコントロール群のもの（41.1 $\pm$ 1.4 % ID/g）と有意に異なった血液における放射能含有量（% ID/g）の群平均は、投与3週間後の循環における除去剤の保持を示した。3種の化合物は、コントロールと有意に異ならなかった：キャッピングされたDex500-（Glu）4、Dex500-モノ-（Glu）2およびDex20-モノ-（Glu）3；その他は、変動する程度で異なった。

【0585】

図12は、 ^{212}Pb -DOTAMの注射4時間後の、血液における放射能含有量を示す（% ID/g $\pm$ SD、 $n=3$ ）。縞模様のバーは、全候補試薬を比較した、CAなしコントロールを表す。アステリスクは、低（*）から高（***）へと、統計的有意性のレベルをマークする。

【0586】

結果、87

被験除去剤は、次の1つの例外を除いて、全般に良い成績を収めた：Dex500-M

(Glu) 2は際立っており、24時間後に $8.07 \pm 0.61\% \text{ ID/g}$ が血液に残っていた。

【0587】

図13は、 $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ の注射24時間後の、血液における平均放射能含有量を示す($\% \text{ ID/g} \pm \text{SD}$ 、 $n=3$)。縞模様のバーは、全候補試薬を比較した、CAなしコントロールを表す。

【0588】

概要および結論

スクリーニングした試薬は、自己クリアランスの観点から全体的に良い成績を収め、循環からの抗体クリアランスを達成した。CA注射間3週間による反復処置は、二重特異性抗体への $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ 結合にリスクを生じることなく実現可能と判明した。加えて、二重特異性抗体は、被験化合物の大部分を使用したCA注射後2時間以内に除去された。

【0589】

実施例20：除去剤の腫瘍浸透（プロトコール85）

浸透するDOTAM結合CA断片は、抗体でプレターゲットングされた腫瘍細胞への結合において $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ と競合し得るため、除去剤の腫瘍浸透は、PRITレジメンにおける潜在的な問題である。本試験において、腫瘍への $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ 会合の阻害の観点から、6種の異なる除去剤を比較した。i) デキストランサイズおよびii) 分子の電荷から、腫瘍会合性放射能における影響を評価するために、ベースラインCAスクリーニング（プロトコール83）の結果に基づき候補を選んだ。

試験設計、プロトコール85

試験日	日付	実験手順
1	2016-02-17	BxPC3 細胞の i.v.注射*
6	2016-02-22	PRIT bsAb の i.v.注射*
9	2016-02-25	CA または PBS の i.v.注射*
9	2016-02-25	$^{212}\text{Pb-DOTAM}$ の溶出
9	2016-02-25	$^{212}\text{Pb-DOTAM}$ の i.v.注射*
10	2016-02-26	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数

*注射体積 100 μL

10

20

30

40

50

プロトコール 85 における試験群 ($n_{\text{tot}} = 18$)

群	bsAb	bsAb 用量 (μg)	CA	CA 用量 (μg)	キレート	Pb 放射能 (μCi)	n
A	PRIT-0165	30	Dex20	30	^{212}Pb -DOTAM	10	3
B	PRIT-0165	30	Dex70	30	^{212}Pb -DOTAM	10	3
D	PRIT-0165	30	Dex500	30	^{212}Pb -DOTAM	10	3
E	PRIT-0165	30	CDex500-(Glu)4	30	^{212}Pb -DOTAM	10	3
F	PRIT-0165	30	Dex500-M(Glu)2	30	^{212}Pb -DOTAM	10	3
G	PRIT-0165	30	—	0	^{212}Pb -DOTAM	10	3

【0590】

各マウス（7週齢）に、 $100\mu\text{L}$ RPMI/MatrigelにおけるBxPC3細胞（継代33）を右側腹部へとs.c.注射した。腫瘍細胞注射5日後に、 200mm^3 の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。

【0591】

除去剤は、変動するTCMC置換を有する、20、70または500kDaのデキストランサイズに基づいた。CDex500-(Glu)4は、負の正味電荷を有するキャッピングされた（すなわち、過剰アミンの中和による）デキストラン-500（CDex）に基づいた；Dex500-M(Glu)2は、モノバージョンのGlu(M(Glu))および中性から僅かに正の正味電荷を有した。PRIT-0165の3日後に $100\mu\text{L}$ あたり $30\mu\text{g}$ で、全て静脈内投与した。群Gは、除去剤の代わりにPBSを受けた。

【0592】

^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後に、マウスを殺した。血液および腫瘍を収集し、これらそれぞれの%ID/gを、試料重量および放射能含有量から計算した。

【0593】

結果、85

候補のうち3種：Dex20 ($0.26 \pm 0.03\%$ ID/g)、Dex70 ($4.06 \pm 2.06\%$ ID/g) およびCDex500-(Glu)4 ($2.98 \pm 0.73\%$ ID/g) が、腫瘍取込みを殆ど呈さずまたは全く呈さず、腫瘍への大規模CA浸透を示す。対照的に、Dex500-M(Glu)2は、bsAbクリアランス失敗として解釈される、PBSコントロールのもの（それぞれ腫瘍および血液における 59.02 ± 15.53 および $27.92 \pm 2.38\%$ ID/g）と同様のレベルで、腫瘍 ($69.39 \pm 9.70\%$ ID/g) および血液 ($20.68 \pm 1.22\%$ ID/g) の両方において高い放射能をもたらした。Dex500は、腫瘍における放射能の相当の蓄積を呈し ($20.78 \pm 3.76\%$ ID/g)、僅かな腫瘍浸透を示し、一方、血液クリアランスは、基本的に完全であった ($0.17 \pm 0.01\%$ ID/g)。にもかかわらず、CAなしコントロールにおいて達成された腫瘍取込みは、ある程度の低分子量(MW) DOTAM-デキストラン断片が、Dex500バッチにも存在したことを示した。

【0594】

図14は、 ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、血液および腫瘍における放射能含有量を示す($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$, $n=3$)。

【0595】

概要および結論

本実験は、低MW CA種の存在が、 ^{212}Pb -DOTAMの腫瘍蓄積に実質的に干渉し得るという概念を確認した。本実験は、指定されたサイズに関係なく、CAのいずれかのバッチに存在する分子の幅広いMW範囲も実証した。そのため、指定されたCAサイズが大きいほど、腫瘍に浸透し得る低MW断片を導入するリスクは低くなる。しかし、Dex 500であっても、CAなしコントロールと比較した腫瘍取込みの差によって示される通り、あるレベルの浸透が明らかになった。結果的に、この溶液は、将来、より高いMWカットオフを使用してダイアフィльтраーションして、このような干渉断片を可能な限り多く除去すべきである。Dex 500のために30から100 kDaへとMWカットオフを増加させる判断を下した。

【0596】

実施例21：Dex 500のための除去剤製造プロセス

アミノデキストラン(20.0 g)を、 H_2O (400 mL)における0.1 M Na_2CO_3 および H_2O (400 mL)における0.1 M NaHCO_3 の混合物に溶解した。清澄な無色溶液が得られたら、 $p\text{-SCN-Bn-DOTAM} \cdot 4\text{HCl}$ (S-2-(4-イソチオシアナトベンジル)-1, 4, 7, 10-テトラアザ-1, 4, 7, 10-テトラ(2-カルバモイルメチル)シクロドデカン四塩酸塩、2.03 g)を攪拌下添加した。その結果生じる僅かに濁りがある溶液を室温で4時間攪拌し、その後、2 M HCl を添加することにより反応混合物をpH 6~7に中和した。その結果生じる溶液を、100 kDaカットオフによるタンジェント流濾過(Sartorius Hydrosart、Slice 200 100 kDa 0.02 m²、安定化されたセルロースベースの膜、限外濾過カセット)により精製して、低分子量不純物を除去した。その結果生じる溶液を減圧下で凍結乾燥して、17.9 gの所望の中間体を得た。

【0597】

フリーズドライから得た16.1 gの固体を、 H_2O (60 mL)における0.1 M AcOH および0.1 M $\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (540 mL)の混合物に溶解した。清澄な無色溶液に、 $\text{Pb(OAc)}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (744 mg)を固体として添加した。清澄な無色溶液を60分間攪拌し、その後、キシレノールオレンジの溶液(H_2O における1%、250 μL)を添加した。紫色は、溶液における遊離Pb(II)の存在を示した。黄色への色変化が観察されるまで、EDTAの溶液(H_2O における0.01 M)を添加した(65.2 mL)。その結果生じる溶液を、100 kDaカットオフによるタンジェント流濾過(Sartorius Hydrosart、Slice 200 100 kDa 0.02 m²、安定化されたセルロースベースの膜、限外濾過カセット)により精製して、低分子量不純物を除去した。その結果生じる溶液を減圧下で凍結乾燥して、14.0 gの所望の除去剤を得た。

【0598】

その結果生じる除去剤は、下に模式的に示す形態の複数のPb-DOTAM部分で置換される：

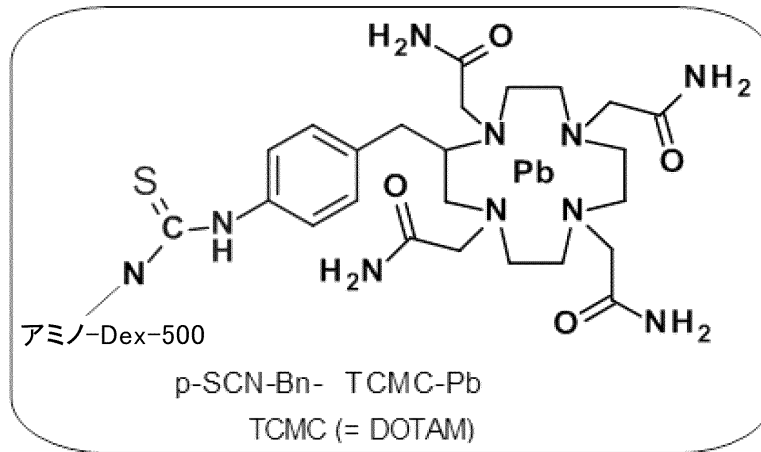
10

20

30

40

50



10

【0599】

実施例22：腫瘍蓄積における除去剤用量（プロトコール90）

本試験は、より多い量の除去剤が、腫瘍へのより高い程度の除去剤浸透をもたらし、これにより、腫瘍結合した二重特異性抗体のDOTAM結合アームをブロックすることにより標識されたキレートのその後の取り込みを減少させ得ることを仮定する、皮下腫瘍モデルにおける腫瘍蓄積における除去剤用量の影響を調査することを目指とした。しかし、低すぎる用量は、循環におけるより高いレベルのDOTAM結合二重特異性抗体のため、効率が低い腫瘍会合性放射能蓄積をもたらすであろう。

20

【0600】

加えて、DOTAM結合デキストラン断片の腫瘍浸透を減少させる試みにおいて、30または100kDaのいずれかでのカットオフで低MW成分を除去するためにダイアフィルトレーションされた除去剤バッチの間で比較を行った。

試験設計、プロトコール 90

試験日	日付	実験手順
1	2016-03-21	BxPC3 細胞の s.c.注射*
6	2016-03-26	PRIT bsAb の i.v.注射*
10	2016-03-30	Dex500 の i.v.注射*
10	2016-03-30	²¹² Pb-DOTAM の溶出
10	2016-03-30	²¹² Pb-DOTAM の i.v.注射*
11	2016-03-31	安楽死および剖検；組織のガンマ計数

30

*注射体積 100μL

40

50

プロトコール 90 における試験群 ($n_{\text{tot}} = 24$)

群	A	B	C	D	E	F	G	H
bsAb	PRIT- 0165	PRIT- 0165	PRIT- 0165	PRIT- 0165	PRIT- 0165	PRIT- 0165	PRIT- 0165	PRIT- 0165
bsAb 用量 (μg)	100	100	100	100	30	30	30	100
CA	Dex500 *	Dex500 *	Dex500 *	Dex500 *	Dex500 *	Dex500 **	0	0
CA 用量 (μg)	10	25	50	100	30	30	0	0
キレート	$^{212}\text{Pb-}$ DOTAM	$^{212}\text{Pb-}$ DOTAM	$^{212}\text{Pb-}$ DOTAM	$^{212}\text{Pb-}$ DOTAM	$^{212}\text{Pb-}$ DOTAM	$^{212}\text{Pb-}$ DOTAM	$^{212}\text{Pb-}$ DOTAM	$^{212}\text{Pb-}$ DOTAM
Pb 放射能 (μCi)	10	10	10	10	10	10	10	10
n	3	3	3	3	3	3	3	3

*100kDa 濾過カットオフ; **30kDa 濾過カットオフ

【0601】

固形異種移植片は、Corning（登録商標）Matrigel（登録商標）基底膜マトリックス（増殖因子低下；カタログ番号354230）と1：1混合したRPMI培地におけるBxPC3細胞（継代30）の皮下注射により確立した。各マウス（11週齢）に、100 μL RPMI/Matrigelにおける 5×10^6 個の細胞を右側腹部へとs.c.注射した。腫瘍細胞注射5日後に、150mm³の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。

【0602】

100 μL あたり30または100 μg のいずれかの濃度でPRIT-0165をi.v.注射し、続いて4日後に、100 μL あたり10、25、30、50または100 μg の濃度の除去剤（群A～F）を注射した。CAの2時間後に $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ を注射した。群GおよびHは、二重特異性抗体および放射標識キレートの投与の間に除去剤を受けなかった。

【0603】

$^{212}\text{Pb-DOTAM}$ の注射24時間後に、体内分布を調べる目的のためにマウスを殺し、血液、膀胱、脾臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、尾および腫瘍を収集した。試料を秤量し、放射能に関して測定し、崩壊およびバックグラウンドに対する補正を含む、臓器毎の%ID/gをその後計算した。

【0604】

結果、90

正常組織における ^{212}Pb 蓄積は、除去剤が投与された全群で低かった；対照的に、除去剤を受けなかった群は、全体的に有意なレベルの放射能を呈した。

【0605】

体内分布データは、除去剤（100-kDaカットオフ）量の変動の効果を実証する。個々の腫瘍データの線形回帰は、有意な勾配を生じ、減少する量のDex500によるより高い腫瘍取込みを示す（ $p = 0.03$ 、 $R^2 = 0.31$ ）。血液における放射能含有量における効果は劇的であり、PBSを使用した $31.5 \pm 0.2\%$ ID/gから、10 μ

g の D e x 5 0 0 を使用した $1.6 \pm 0.5 \% \text{ID} / \text{g}$ に至った。

【0606】

2 群は、等しい (1 : 1) 比の P R I T - 0 1 6 5 および D e x 5 0 0 を受けた ; 1 0 0 または $30 \mu \text{g}$ のいずれかの各薬剤。腫瘍におけるその結果生じる $\% \text{ID} / \text{g}$ は、2 群の間で有意に異ならなかった (独立 t 検定、 $p = 0.726$)。重要なことに、異なる濾過カットオフによる等しい量の D e x 5 0 0 の間の比較は、 $32.5 \pm 4.4 \% \text{ID} / \text{g}$ の代わりに 54.9 ± 6.9 (独立 t 検定、 $p = 0.009$) の、より高い MW カットオフを使用したところ、腫瘍蓄積の有意な増加を示した。

【0607】

図 15 は、30 もしくは $100 \mu \text{g}$ の二重特異性抗体、および 100 もしくは 30kDa 濾過カットオフによる $10 \sim 100 \mu \text{g}$ の除去剤、または除去剤完全不含 (P B S) を使用した、放射標識された D O T A M の注射 24 時間後の、 ^{212}Pb の分布を示す ($\% \text{ID} / \text{g} \pm \text{SD}$ 、 $n = 3$)。

【0608】

図 16 は、漸増量の除去剤 ($0 \sim 100 \mu \text{g}$) による、血液および腫瘍における ^{212}Pb の放射能濃度における効果を示す。 $100 \mu \text{g}$ の P R I T - 0 1 6 5、続いて 4 日後に、 100-kDa カットオフによりダイアフィルトレーションした D e x 5 0 0、または P B S を使用して腫瘍をプレターゲットティングした。C A の 2 時間後に ^{212}Pb - D O T A M を投与した。記号は、放射能注射 24 時間後の $\% \text{ID} / \text{g}$ を表し、線は、腫瘍データの線形回帰を表す。

【0609】

概要および結論

本試験は、低レベルの循環放射能を維持しながらの、 ^{212}Pb の腫瘍蓄積の徹底的な増加を実証した。次の 2 つの鍵となる知見が結論付けられた：1) 100-kDa カットオフによるダイアフィルトレーションは、D O T A M 結合デキストラン断片の腫瘍浸透を有意に減少させたこと、および 2) C A の b s A b に対する比が、絶対 C A 量を超えて成績に影響を与えたこと。優れた腫瘍対血液比は、 $100 \mu \text{g}$ の二重特異性抗体の投与後に、10 : 1 の抗体 : C A 比を使用して達成された。さらに、D e x 5 0 0 ベースの除去剤を使用した将来の試験は全て、 100-kDa カットオフを使用してダイアフィルトレーションされた試薬を使用するべきであると結論付けられた。

【0610】

実施例 23 : 腫瘍会合性放射能における影響 (プロトコール 95)

本試験において、腫瘍への ^{212}Pb - D O T A M 会合の阻害の観点から、デキストラン - 500 に基づく 9 種の異なる除去剤を比較した。より具体的には、実験は、i) T C M C 飽和、ii) 除去剤対抗体比および iii) 産生 / 精製方法から、腫瘍会合性放射能における影響を評価した。加えて、プレターゲットティングまたは C A なしで、10 または $30 \mu \text{Ci}$ の ^{212}Pb - D O T A M の注射後に、腫瘍取込みを比較して、腫瘍の放射能飽和が低い方の用量で既に達成されたか評価した。

10

20

30

40

50

試験設計、プロトコール 95

試験日	日付	実験手順
1	2016-06-14	BxPC3 細胞の i.v.注射*
13	2016-06-26	PRIT bsAb の i.v.注射*
16	2016-06-29	CA または PBS の i.v.注射*
16	2016-06-29	^{212}Pb -DOTAM の溶出
16	2016-06-29	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射*
17	2016-06-30	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数

*注射体積 100 μL プロトコール 95 における試験群 ($n_{\text{tot}} = 27$)

群	bsAb	bsAb 用量 (μg)	CA	CA 用量 (μg)	キレート	Pb 放射能 (μCi)	n
C	PRIT-0165	100	Dex500-(10%)	10	^{212}Pb -DOTAM	10	3
D	PRIT-0165	100	Dex500-(10%)	25	^{212}Pb -DOTAM	10	3
E	PRIT-0165	100	Dex500-(10%)	50	^{212}Pb -DOTAM	10	3
F	PRIT-0165	100	Dex500-(10%)	100	^{212}Pb -DOTAM	10	3
G	PRIT-0165	100	Dex500-(20%)	40	^{212}Pb -DOTAM	10	3
H	PRIT-0165	100	Dex500-(40%)	20	^{212}Pb -DOTAM	10	3
I	PRIT-0165	100	Dex500-(100%)	10	^{212}Pb -DOTAM	10	3
J	PRIT-0165	100	—	0	^{212}Pb -DOTAM	10	3
K	PRIT-0165	100	—	0	^{212}Pb -DOTAM	30	3

【0611】

固形異種移植片は、Corning（登録商標）Matrigel（登録商標）基底膜マトリックス（増殖因子低下；カタログ番号354230）と1：1混合したRPMI培地におけるBxPC3細胞（継代20）の皮下注射により確立した。各マウス（8週齢）に、100 μL RPMI/Matrigelにおける 5×10^6 個の細胞を右側腹部へとs.c.注射した。腫瘍細胞注射15日後に、210 mm^3 の平均腫瘍体積により、マ

ウスを実験群へと選別した。

【0612】

P R I T - 0 1 6 5 (100 μ Lあたり100 μ g)をi. v. 投与し、続いて3日後に、変動するTCMC置換(10~100%)を有するデキストラン-500ベースの除去試薬(100 μ Lあたり10~170 μ g)を投与した。群JおよびKは、除去剤の代わりにPBSを受けた。2時間後、マウスに、100 μ Lのそれぞれの ^{212}Pb -DOTAM溶液(10または30 μ Ci)をi. v. 注射した。

【0613】

^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後に、マウスを殺し、剖検した。血液、膀胱、脾臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、尾および腫瘍を収集し、秤量し、放射能含有量に関して測定し、%ID/gをその後計算した。

10

【0614】

結果、95

体内分布データは、投与された量に依存した、 ^{212}Pb -DOTAM注射24時間後の収集された組織における平均放射能含有量(%ID/g $\pm$ SD)における明らかな傾向を明らかにし、より低いCA量により、血液および正常組織におけるより高い ^{212}Pb 濃度を得られた。加えて、より高い ^{212}Pb 放射能は、対応する正常組織取り込み増加を伴わずに、腫瘍におけるより高い ^{212}Pb 蓄積をもたらした。

【0615】

図17は、 ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、選択された組織における放射能分布を示す(%ID/g $\pm$ SD、n=3)。暗灰色および黒色のバーは、候補試薬を比較した、CAなしポジティブコントロールを表す。

20

【0616】

多重比較のための補正による一方向ANOVAは、Dex500-(40%) (76.79 $\pm$ 33.28、p<0.0001)およびDex500-(100%) (43.26 $\pm$ 24.66、p=0.0115)のみが、腫瘍対血液比の観点から、10 μ Ciネガティブコントロール(2.26 $\pm$ 0.25)とは有意に異なったことを明らかにした。最高の腫瘍対血液比を有する除去試薬(Dex500-(40%))および以前の標準(Dex500-(100%))の間の認知される差は、統計的に有意ではなかった(独立t検定、p=0.2336)。

30

【0617】

図18は、 ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、血液および腫瘍における ^{212}Pb 含有量(%ID/g $\pm$ SD、n=3)、ならびに対応する腫瘍対血液比を示す。暗灰色および黒色のバーは、候補試薬を比較した、CAなしポジティブコントロールを表す。

【0618】

線形回帰および多項式(三次)曲線適合を行って、腫瘍対血液比における、漸増除去剤(Dex500-(10%))量およびTCMCロード(CAなし、Dex500-(10%)、Dex500-(20%)、Dex500-(40%)、Dex500-(100%))からの影響を解析した。線形曲線の勾配は、増加した腫瘍対血液比のためにより大量のDex500-(10%)を支持して、統計的に有意であった(p<0.0001)が、一方、注射したある量のTCMCのため、100 μ gのDex500-(10%)に基づき、60前後のTCMC対Dex500比において最大が示された。これらの結果が、試薬量またはTCMC飽和に関する一般的な結論を出すにあたって、その文脈から切り離されて解釈されるべきではないことを認めることが重要である；これらは、適用された設定でのみ妥当である。

40

【0619】

図19は、CA量(PJRD08-46)およびTCMC飽和(9対、20対、39対または84対1)の関数として、 ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の腫瘍対血液比を示す。破線は、それぞれのデータの線形回帰($R^2=0.82$)および非線形曲線適合($R^2=0.74$)を表す。

50

【0620】

最終試験は、抗体または除去剤の注射なしで、10対30 μ Ciの ^{212}Pb -DOTAMを比較した。血液における含有量は、2種の試験群で同様であったが、30 μ Ciは、10 μ Ciよりも高い腫瘍蓄積をもたらした：107.74 $\pm$ 14.71対72.38 $\pm$ 10.83%ID/g ($\pm$ SD、n=3)。その結果生じる腫瘍対血液比は、有意に異なっていた：それぞれ30および10 μ Ciに関して、3.20 $\pm$ 0.20対2.26 $\pm$ 0.25（独立t検定、p=0.007）。

【0621】

概要および結論

結論として、1分子あたり39個のTCMCを有する20 μ gのDex500（Dex500-（40%））は、 ^{212}Pb -DOTAMの投与24時間後に、低い血液中保持と組み合わせて、プレターゲティングされた腫瘍における ^{212}Pb の非常に高い蓄積を生成した。これは、1分子あたり84個のTCMCを有する、10 μ gの以前の標準CA、Dex500-（100%）によるサイド・バイ・サイドで、最も成績が良い除去剤であった。相当な群内可変性および小さい標本サイズにより、腫瘍対血液比における差は、2種の試薬の間で統計的に異ならなかったが、平均値は、Dex500-（100%）が好ましい可能性があることを示した。加えて、30 μ Ciの ^{212}Pb -DOTAMが、10 μ Ciよりも高い腫瘍蓄積を生じ得る、すなわち、低い方の用量で飽和に達しなかったことが結論付けられた。

【0622】

実施例24：腫瘍蓄積における二重特異性抗体用量の影響（プロトコール91）

本試験は、皮下腫瘍モデルにおける腫瘍蓄積における二重特異性抗体用量の影響を調査することを目標とした。より多い量の二重特異性抗体が、腫瘍細胞における利用できる結合部位をより容易に飽和させ、これにより、標識されたキレートのその後の取り込みを増加させることができるという仮説を立てた。他方では、用量の過度の増加は、より高いレベルの循環二重特異性抗体により、腫瘍会合性放射能の効率が低い蓄積をもたらすことができる。

試験設計、プロトコール 91

試験日	日付	実験手順
1	2016-03-29	BxPC3 細胞の s.c.注射*
6	2016-04-03	PRIT bsAb の i.v.注射*
10	2016-04-07	Dex500 の i.v.注射*
10	2016-04-07	^{212}Pb -DOTAM の溶出
10	2016-04-07	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射*
11	2016-04-08	安楽死および剖検；組織のガンマ計数

*注射体積 100 μ L

プロトコール 91 における試験群 ($n_{\text{tot}} = 21$)

群	A	B	C	D	E	F	G
bsAb	PRIT- 0165	PRIT- 0165	PRIT- 0165	PRIT- 0156	PRIT- 0156	PRIT- 0156	PRIT- 0175 *
bsAb 用量 (μg)	30	100	200	30	100	200	100
CA	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500
CA 用量 (μg)	3	10	20	3	10	20	10
キレート	^{212}Pb - DOTAM	^{212}Pb - DOTAM	^{212}Pb - DOTAM	^{212}Pb - DOTAM	^{212}Pb - DOTAM	^{212}Pb - DOTAM	^{212}Pb - DOTAM
Pb 放射能 (μCi)	10	10	10	10	10	10	10
n	3	3	3	3	3	3	3

*非 CEA 結合コントロール

【0623】

固形異種移植片は、Corning（登録商標）Matrigel（登録商標）基底膜マトリックス（増殖因子低下；カタログ番号354230）と1：1混合したRPMI培地におけるBxPC3細胞（継代34）の皮下注射により確立した。各マウス（7～12週齢）に、100 μL RPMI/Matrigelにおける 5×10^6 個の細胞を右側腹部へとs.c.注射した。腫瘍細胞注射5日後に、220 mm^3 の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。

【0624】

マウスに、100 μL あたり30～200 μg の濃度のCEA結合二重特異性抗体PRIT-0165もしくはPRIT-0156、または100 μg の非CEA結合コントロール抗体PRIT-0175をi.v.投与した。4日後に、全群に、100 μL あたり3、10または20 μg の濃度（注射された抗体用量の1/10）の除去剤、続いて2時間後に、10 μCi の ^{212}Pb -DOTAMをi.v.注射した。24時間後にマウスを

殺し、剖検を行った。血液、膀胱、脾臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、尾および腫瘍を収集した。試料を秤量し、放射能に関して測定し、%ID/gを臓器毎に計算した。

【0625】

結果、91

100 μg のいずれかのCEA結合二重特異性抗体を使用したプレターゲットイングは、100 μg の非CEA結合コントロールと比較して、腫瘍における ^{212}Pb の有意な蓄積をもたらした（独立t検定、それぞれPRIT-0156およびPRIT-0165との比較について、 $p = 0.027$ および 0.008 ）。いずれかのCEA結合コンストラクトのために30から200 μg へと抗体用量を増加させた場合、腫瘍取込みに有意差は観察されなかった。しかし、全体的な放射能レベルは、30 μg を上回る抗体用量に関して、大部分の正常組織において僅かに上昇した。重要なことに、PRIT-0156の100および200 μg の間を除いて、血液における%ID/gは、用量増分毎に有意に増加

した（独立 t 検定、 $p < 0.05$ ）。

【0626】

図20は、放射標識されたDOTAMの注射24時間後の、 ^{212}Pb の分布を示す（%ID/g $\pm$ SD、 $n = 3$ ）。白色および灰色の背景を有するバーは、それぞれT84.66およびCH1A1Aのターゲティングを表す；黒色のバーは、非CEA結合コントロールを表す。

【0627】

概要および結論

全3種の抗体用量レベル（30、100および200 μg ）が、両方の被験二重特異性コンストラクトに関して、腫瘍における放射能の高い、特異的な取り込みをもたらした。増加した用量による腫瘍蓄積における差の欠如は、結合部位が、低い方の投薬量で既に飽和されたこと、またはPRIT投与および除去剤注射の間の時間（4日間）が、さらなる腫瘍蓄積を可能にするには短すぎたことを示した。予想通り、血液における放射能レベルが、漸増用量に伴い増加し、処置の治療ウィンドウが僅かに狭くなる。

【0628】

実施例25：CEA-PRITの有効性（プロトコール93（a、b））

本試験において、2種の臨床bsAb候補（PRIT-0213およびPRIT-0214）を使用したCEA-PRITの有効性を、2種の平行皮下腫瘍モデル：BxPC3およびLS174Tにおいて評価した。単一および二重サイクル処置レジメンにおいて、二重特異性抗体をサイド・バイ・サイドで比較した。

試験設計、プロトコール 93a (BxPC3)

試験日	日付	実験手順
1	2016-04-13	BxPC3 細胞の i.v.注射*
13	2016-04-25	PRIT bsAb の i.v.注射*
17	2016-04-29	CA の i.v.注射*
17	2016-04-29	^{212}Pb -DOTAM の溶出
17	2016-04-29	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射*
18	2016-04-30	安楽死および剖検；組織のガンマ計数
41	2016-05-23	PRIT bsAb の i.v.注射*
45	2016-05-24	CA の i.v.注射*
45	2016-05-24	^{212}Pb -DOTAM の溶出
45	2016-05-24	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射*
46	2016-05-25	安楽死および剖検；組織のガンマ計数

*注射体積 100 μL

試験設計、プロトコール 93b (LS174T)

試験日	日付	実験手順
1	2016-04-25	LS174T 細胞の i.v.注射*
5	2016-04-29	PRIT bsAb の i.v.注射*
9	2016-05-03	CA の i.v.注射*
9	2016-05-03	²¹² Pb-DOTAM の溶出
9	2016-05-03	²¹² Pb-DOTAM の i.v.注射*
10	2016-05-04	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数
33	2016-05-27	PRIT bsAb の i.v.注射*
37	2016-05-31	CA の i.v.注射*
37	2016-05-31	²¹² Pb-DOTAM の溶出
37	2016-05-31	²¹² Pb-DOTAM の i.v.注射*
38	2016-06-01	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数

*注射体積 100μL

【 0 6 2 9 】

群 A ~ G は、有効性の評価のために追跡された処置されたマウスを表し、一方、群 H ~ L は、その最後の ²¹²Pb-DOTAM 注射の 24 時間後に体内分布を調べる目的のため殺されたマウスを含む。

プロトコール 93a における試験群 (BxPC3; n_{tot} = 71)

群	bsAb	bsAb 用量 (μg)	CA	CA 用 量 (μg)	キレート	Pb 放射 能 (μCi)	サイクル	n
A	PRIT-0213	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30/10	2	8
B	PRIT-0213	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30/30	2	8
C	PRIT-0214	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30/10	2	8
D	PRIT-0214	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30/30	2	8
E	PRIT-0175	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30/30	2	8
F	—	0	—	0	²¹² Pb-DOTAM	30/30	2	8
G	—	0	—	0	—	0	2	8
H	PRIT-0213	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30	1	3
I	PRIT-0213	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30/30	2	3
J	PRIT-0214	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30	1	3
K	PRIT-0214	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30/30	2	3
L	PRIT-0175	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30	1	3

10

20

30

40

50

プロトコール 93b における試験群 (LS174T; $n_{\text{tot}} = 71$)

群	bsAb	bsAb 用量 (μg)	CA	CA 用 量 (μg)	キレート	Pb 放射 能 (μCi)	サイクル	n
A	PRIT-0213	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1	8
B	PRIT-0213	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	8
C	PRIT-0214	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1	8
D	PRIT-0214	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	8
E	PRIT-0175	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	8
F	—	0	—	0	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	8
G	—	0	—	0	—	0	2	8
H	PRIT-0213	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1	3
I	PRIT-0213	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	3
J	PRIT-0214	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1	3
K	PRIT-0214	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	3
L	PRIT-0175	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1	3

【0630】

固形異種移植片は、Corning（登録商標）Matrigel（登録商標）基底膜マトリックス（増殖因子低下；カタログ番号354230）と1：1混合したRPMI（BxPC3）またはDMEM（LS174T）培地における細胞の皮下注射により確立した。

【0631】

プロトコール93aのため、マウス（7週齢）に、 $100\mu\text{L}$ RPMI/Matrigelにおける 5×10^6 個のBxPC3細胞（継代33）を右側腹部へとs.c.注射した。腫瘍細胞注射12日後に、 235mm^3 の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。

【0632】

プロトコール93bのため、マウス（9週齢）に、 $100\mu\text{L}$ DMEM/Matrigelにおける 1×10^6 個のLS174T細胞（継代26）を右側腹部へとs.c.注射した。腫瘍細胞注射3日後に、 150mm^3 の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。

【0633】

各処置サイクルは、ヒト化bsAb（PRIT-0213、PRIT-0214またはPRIT-0175）の注射により開始した。4日後に、除去剤（Dex500）、続いて2時間後に、 ^{212}Pb -DOTAMを投与した。処置サイクル1後に放射能尿／糞便の再経口摂取を最小化するために、 ^{212}Pb -DOTAM投与4時間後に、次いで再度、24時間p.i.にケージを交換した。サイクル2のため、 ^{212}Pb -DOTAM投与後、標準寝床を備える新たなケージに移す前に、焼却処理した床（grilled floor）を備えるケージにマウスを4時間配置した。次に、サイクル1後として、24時間p.i.に全ケージを交換した。

【0634】

1週間に3回の反復ノギス計測により、マウスにおける腫瘍発達を追跡した。必要であ

れば、スケジュールにある測定間の間隙で、追加的なノギス計測を行った。動物の体重を同じ様式で反復して測定した。その腫瘍体積が 3000 mm^3 に達したマウスは直ちに安楽死させた。倫理的な理由から安楽死に考慮される他の要因は、動物の体重減少、腫瘍状態（例えば、潰瘍）および全身的外観であった。放射線誘発毒性による急性体重減少（集団的または個体的）があったために要求される場合、全個体が十分に回復するまで、放射能注射の5日後から、全動物にウェットタイプの食物を与えた。

【0635】

安楽死の時点で群A～Gから次の臓器および組織を採集した：膀胱、卵巣、肝臓、脾臓、腎臓、大腿骨（骨髄を含む）、結腸、空腸、胃および腫瘍。予想外なまたは異常な状態を記述および写真撮影した。組織は、10%中性緩衝ホルマリン（4℃）に直ちに入れ、次いで5日後にPBS（4℃）に移した。次に、ホルマリン固定した試料は、さらなる処理および解析のため、Roche Pharma Research and Early Development、Roche Innovation Center Baselに輸送した。

【0636】

群H、JおよびLにおけるマウスは、 ^{212}Pb -DOTAMのそれらの第1のかつ唯一の注射の24時間後に殺し剖検した；群IおよびKは、それらの第2の ^{212}Pb -DOTAM注射の24時間後に殺し剖検した。次の臓器および組織を採集した：血液、膀胱、小腸、結腸、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、肺、心臓、大腿骨、筋肉、尾および腫瘍。収集された試料を秤量し、放射能に関して測定し、崩壊およびバックグラウンドに対する補正を含む、組織1グラムあたりのパーセント注射用量（%ID/g）をその後計算した。

【0637】

結果、93a

処置サイクル1後の結果は、このモデルにおける以前に達成された組織取り込みと良く対応し、高い腫瘍蓄積（それぞれPRIIT-0213およびPRIIT-0214で 25.0 ± 9.7 および $19.5 \pm 6.4\%$ ID/g）および正常組織における低い蓄積であった。しかし、サイクル2は、異なる ^{212}Pb 分布プロファイルをもたらし、全ての収集された組織において放射能含有量が増加した。

【0638】

図21は、BxPC3モデルにおける処置サイクル1および2に関する、 ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、選択された組織における放射能分布を示す（%ID/g $\pm$ SEM、n=3）。

【0639】

$30\text{ }\mu\text{Ci}$ の ^{212}Pb -DOTAMを注射した全マウスが、体重の初期降下を経験し、これは、第1の放射能注射後10日目までに軽減された。おそらくは、関連するサイクル2体内分布において観察される、よりゆっくりした放射能クリアランスおよびその結果生じる正常組織における ^{212}Pb 蓄積のため、第2の $30\text{ }\mu\text{Ci}$ 注射を投与した群は、より顕著な急性体重減を患った。第2のサイクルの $10\text{ }\mu\text{Ci}$ を受けた群では、このような効果は観察されず、その後の体重減は中等度であった。

【0640】

図22は、BxPC3モデルにおけるCEA-PRIIT後の群A～G（n=8）における平均体重を示す。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM投与を示す。

【0641】

図23は、初期体重のパーセンテージとして表現される、BxPC3モデルにおけるCEA-PRIIT後の群A～G（n=8）における平均体重変化を示す。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM投与を示す。

【0642】

全群が、ベースラインと比較して、14～19日目までにその腫瘍体積を倍加させた。

16日目に第1の ^{212}Pb -DOTAM処置を与え、その後、PRIT-0213およびPRIT-0214群における腫瘍は、約1週間成長し続け、その後、体積の縮小を示した。腫瘍は完全には縮小しなかったが、体積は、40~47日目まで低レベルで相対的に一定のままであり、その時点でもう一度、ベースラインと比較して二倍体積に達した。このポイント(44日目)で、第2の $30\mu\text{Ci}$ ^{212}Pb -DOTAM注射を投与し、これにより、以前に記述された通り、翌週内に大部分の罹患マウスで急性体重減およびその後の安楽死がもたらされた。 $30\mu\text{Ci}$ の代わりに $10\mu\text{Ci}$ の ^{212}Pb -DOTAMによる第2の処置サイクルを与えたマウス(55日目)は、少ない放射線誘発毒性を経験した。 $10\mu\text{Ci}$ 注射は、およそ58~75日目の間持続する腫瘍縮小の第2フェーズをもたらした。非特異的bsAbによるPRITは、 ^{212}Pb -DOTAM単独またはPBSと比較して、有意な、ただし限られた腫瘍増殖阻害をもたらした。ダネット法を使用した比較手段は、PRIT-0213およびPRIT-0214を使用した全処置レジメンが、等しい処置対コントロール比をもたらし、全て、23~26日目およびそれ以降で、いずれかのコントロール群と比較して有意に異なることを明らかにした。

【0643】

全処置群がまだ表されている最後の日である47日目に、腫瘍増殖阻害(TGI)は、PBSと比較して、それぞれ群「PRIT-0213、 $30+10\mu\text{Ci}$ 」、「PRIT-0213、 $30+30\mu\text{Ci}$ 」、「PRIT-0214、 $30+10\mu\text{Ci}$ 」、「PRIT-0214、 $30+30\mu\text{Ci}$ 」、「PRIT-0175、 $30+30\mu\text{Ci}$ 」および「DOTAM単独、 $30+30\mu\text{Ci}$ 」について、87.3、88.8、84.1、88.7、57.5および15.8%であった。ビヒクルコントロール群における最後のマウスは、66日目に相当し、この時点で、TGIは、残っている3群：それぞれ「PRIT-0213、 $30+10\mu\text{Ci}$ 」、「PRIT-0214、 $30+10\mu\text{Ci}$ 」および「PRIT-0214、 $30+30\mu\text{Ci}$ 」について87.8、84.5および87.3%であった。群「PRIT-0213、 $30+10\mu\text{Ci}$ 」から1匹、群「PRIT-0214、 $30+10\mu\text{Ci}$ 」から3匹および群「PRIT-0214、 $30+30\mu\text{Ci}$ 」から2匹の、総計6匹のマウスが、実験の終わり(84日目)まで生存した。

【0644】

図24は、BxPC3モデルにおける群A~Gに関する腫瘍増殖平均と標準誤差を示す($n=8$)。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM投与を示す。

【0645】

図25は、BxPC3モデルにおける群A~Gに関する個々の腫瘍増殖曲線を示す。垂直な点線は、 ^{212}Pb -DOTAMの投与を示す。

【0646】

図26は、BxPC3モデルにおける群A~Gにおける生存を示すカプラン・マイヤー曲線を示す($n=8$)。垂直な点線は、 ^{212}Pb -DOTAMの投与を示す。

【0647】

ペア毎の検定を行って、いずれの群が生存の観点から有意に異なったかを指定した：ログランク検定(後期の生存事象に重きを置く)およびウィルコクソン検定(初期の生存時間に重きを置く)、両者共に多重検定するためのボンフェローニ補正を使用。放射線誘発毒性のため、「PRIT-0213、 $30+30\mu\text{Ci}$ 」は、コントロール群に等しいまたはそれよりも悪い成績であった。対応するPRIT-0214処置は、僅かにより良い結果を達成し、PBSおよび非特異的抗体と比較して生存を増加させた。第2のサイクルにおける $10\mu\text{Ci}$ の ^{212}Pb -DOTAMによる2群は、互いおよび「PRIT-0214、 $30+30\mu\text{Ci}$ 」を除いて、全群と比較して生存を有意に増加させた。

10

20

30

40

50

ペア毎のログランク検定(多重検定レベル=0.00238)

群	ビヒクル (PBS)	DOTAM 単独 30 + 30 μ Ci	PRIT-0175 30 + 30 μ Ci	PRIT-0213 30 + 10 μ Ci	PRIT-0213 30 + 30 μ Ci	PRIT-0214 30 + 10 μ Ci	PRIT-0214 30 + 30 μ Ci
ビヒクル (PBS)	1.0000	0.5271	0.9420	0.0002*	0.6178	0.0003*	0.0425*
DOTAM 単独 30 + 30 μ Ci	0.5271	1.0000	0.0032*	0.0001*	0.8474	<.0001*	0.0685
PRIT-0175 30 + 30 μ Ci	0.9420	0.0032*	1.0000	0.0001*	0.0007*	0.0001*	0.0001*
PRIT-0213 30 + 10 μ Ci	0.0002*	0.0001*	0.0001*	1.0000	<.0001*	0.6377	0.2894
PRIT-0213 30 + 30 μ Ci	0.6178	0.8474	0.0007*	<.0001*	1.0000	<.0001*	0.0302*
PRIT-0214 30 + 10 μ Ci	0.0003*	<.0001*	0.0001*	0.6377	<.0001*	1.0000	0.1392
PRIT-0214 30 + 30 μ Ci	0.0425*	0.0685	0.0001*	0.2894	0.0302*	0.1392	1.0000

10

20

ペア毎のウィルコクソン検定(多重検定レベル=0.00238)

群	ビヒクル (PBS)	DOTAM 単独 30 + 30 μ Ci	PRIT-0175 30 + 30 μ Ci	PRIT-0213 30 + 10 μ Ci	PRIT-0213 30 + 30 μ Ci	PRIT-0214 30 + 10 μ Ci	PRIT-0214 30 + 30 μ Ci
ビヒクル (PBS)	1.0000	0.1439	0.6563	0.0004*	0.1290	0.0006*	0.0219*
DOTAM 単独 30 + 30 μ Ci	0.1439	1.0000	0.0042*	0.0004*	0.8704	0.0002*	0.0827
PRIT-0175 30 + 30 μ Ci	0.6563	0.0042*	1.0000	0.0002*	0.0008*	0.0002*	0.0002*
PRIT-0213 30 + 10 μ Ci	0.0004*	0.0004*	0.0002*	1.0000	0.0002*	0.7489	0.0790
PRIT-0213 30 + 30 μ Ci	0.1290	0.8704	0.0008*	0.0002*	1.0000	0.0002*	0.0648
PRIT-0214 30 + 10 μ Ci	0.0006*	0.0002*	0.0002*	0.7489	0.0002*	1.0000	0.0350*
PRIT-0214 30 + 30 μ Ci	0.0219*	0.0827	0.0002*	0.0790	0.0648	0.0350*	1.0000

30

40

結果、93b

両方の処置サイクルが、高い ^{212}Pb 腫瘍蓄積および正常組織における低い ^{212}Pb 蓄積をもたらした。サイクル1の後の腫瘍取込みは、それぞれ PRIIT-0213 および PRIIT-0214 で 30.9 ± 2.9 および $21.4 \pm 1.9\% \text{ID/g}$ であった；サイクル2の後に、対応する数値は、 33.2 ± 0.7 および $40.1 \pm 6.5\% \text{ID/g}$ であった。

【0649】

図27は、 LS174T モデルにおける処置サイクル1および2に関する、 $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ の注射24時間後の、選択された組織における放射能分布を示す（ $\% \text{ID/g} \pm \text{SD}$ 、 $n=3$ ）。

【0650】

$^{212}\text{Pb-DOTAM}$ を注射した全マウスは、両方の $30 \mu\text{Ci}$ 処置サイクル後に同様に、体重の中等度減少を経験した。しかし、多くの動物は、不良な腫瘍状態のため、倫理的な理由から時期を早めて安楽死させた。

【0651】

図28は、 LS174T モデルにおける CEA-PRIIT 後の群A～G（ $n=8$ ）における平均体重を示す。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ 投与を示す。

【0652】

図29は、初期体重のパーセンテージとして表現される、 LS174T モデルにおける CEA-PRIIT 後の群A～G（ $n=8$ ）における平均体重変化を示す。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ 投与を示す。

【0653】

第1の $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ 処置を8日目に与えた。腫瘍はベースラインと比較して縮小しなかったが、 PRIIT-0213 および PRIIT-0214 群平均は、相対的に一定のままであり、非常にゆっくり増加した。第2の $30 \mu\text{Ci}$ $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ 注射を36日目に投与した；しかし、コントロール群における急速腫瘍増殖、および全群にわたる不良な腫瘍状態に伴う以前に記述された問題により、その時点までに多くのマウスが既に安楽死されていた。 $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ の第2の $30 \mu\text{Ci}$ 注射を受けなかったマウスは、その腫瘍制御を回復または保持したが、腫瘍は完全には縮小しなかった。ダネット法を使用した比較手段は、 PRIIT-0213 および PRIIT-0214 を使用した全処置レジメンが、14日目から、 PBS 群と比較して、有意に異なる処置対コントロール比をもたらしたことを明らかにした。また、 PRIIT-0175 および DOTAM コントロールは、それぞれ16および22日目から、ビヒクルコントロールとは有意に異なった。

【0654】

全処置群がまだ表されている最後の日である22日目に、 TGI は、 PBS と比較して、それぞれ群「 PRIIT-0213 、 $30 \mu\text{Ci}$ 」、「 PRIIT-0213 、 $30+30 \mu\text{Ci}$ 」、「 PRIIT-0214 、 $30 \mu\text{Ci}$ 」、「 PRIIT-0214 、 $30+30 \mu\text{Ci}$ 」、「 PRIIT-0175 、 $30+30 \mu\text{Ci}$ 」および「 DOTAM 単独、 $30+30 \mu\text{Ci}$ 」に関して、 83.1 、 88.8 、 87.5 、 91.0 、 53.0 および 64.7% であった。ビヒクルコントロール群における最後のマウスは、30日目に相当し、この時点で、 TGI は、それぞれ残っている群「 PRIIT-0213 、 $30 \mu\text{Ci}$ 」、「 PRIIT-0213 、 $30+30 \mu\text{Ci}$ 」、「 PRIIT-0214 、 $30 \mu\text{Ci}$ 」、「 PRIIT-0214 、 $30+30 \mu\text{Ci}$ 」および「 PRIIT-0175 、 $30+30 \mu\text{Ci}$ 」に関して、 92.5 、 89.5 、 90.8 、 92.6 および 79.9% であった。2匹のマウスが実験の終わり（101日目）まで生存し、両者とも、群「 PRIIT-0214 、 $30+30 \mu\text{Ci}$ 」に由来した。

【0655】

図30は、 LS174T モデルにおける群A～Gに関する腫瘍増殖平均と標準誤差（ n

= 8) を示す。各群における最初の死亡で曲線を打ち切った。垂直な点線は、試験設計に従った、一部または全ての群のための ^{212}Pb -DOTAM 投与を示す。

【0656】

図31は、LS174Tモデルにおける群A～Gに関する個々の腫瘍増殖曲線を示す。垂直な点線は、 ^{212}Pb -DOTAMの投与を示す。

【0657】

図32は、LS174Tモデルにおける群A～Gにおける生存を示すカプラン・マイヤー曲線を示す (n = 8)。垂直な点線は、 ^{212}Pb -DOTAMの投与を示す。

【0658】

ボンフェローニ補正によりログランクおよびウィルコクソン検定を行って、いずれの群が生存の観点から有意に異なったか指定した。鍵となる知見は、「PRIT-0214、30 + 30 μCi 」が、「PRIT-0213、30 μCi 」を除いた全群と比較して、生存を有意に増加させたことであった。しかし、群「PRIT-0213、30 + 30 μCi 」における全生存は、「PRIT-0213、30 μCi 」のものと有意に異ならず、よって、「PRIT-0214、30 + 30 μCi 」のものとごく僅かに異なった。

ペア毎のログランク検定(多重検定レベル=0.00238)

群	ビヒクル (PBS)	DOTAM 単独 30 + 30 μCi	PRIT-0175 30 + 30 μCi	PRIT-0213 30 + 30 μCi	PRIT-0213 30 μCi	PRIT-0214 30 + 30 μCi	PRIT-0214 30 μCi
ビヒクル (PBS)	1.0000	0.0034*	0.4728	0.0002*	<.0001*	<.0001*	0.0399*
DOTAM 単独 30 + 30 μCi	0.0034*	1.0000	0.0090*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0091*
PRIT-0175 30 + 30 μCi	0.4728	0.0090*	1.0000	0.0051*	<.0001*	<.0001*	0.3974
PRIT-0213 30 + 30 μCi	0.0002*	<.0001*	0.0051*	1.0000	0.9883	0.0353*	0.0357*
PRIT-0213 30 μCi	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.9883	1.0000	0.1428	0.0002*
PRIT-0214 30 + 30 μCi	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0353*	0.1428	1.0000	<.0001*
PRIT-0214 30 μCi	0.0399*	0.0091*	0.3974	0.0357*	0.0002*	<.0001*	1.0000

10

20

30

40

50

ペア毎のウィルコクソン検定(多重検定レベル=0.00238)

群	ビヒクル (PBS)	DOTAM 単独 30 + 30 μ Ci	PRIT-0175 30 + 30 μ Ci	PRIT-0213 30 + 30 μ Ci	PRIT-0213 30 μ Ci	PRIT-0214 30 + 30 μ Ci	PRIT-0214 30 μ Ci
ビヒクル (PBS)	1.0000	0.0111*	0.8734	0.0005*	0.0002*	0.0002*	0.1330
DOTAM 単独 30 + 30 μ Ci	0.0111*	1.0000	0.0417*	0.0002*	0.0002*	0.0002*	0.0160*
PRIT-0175 30 + 30 μ Ci	0.8734	0.0417*	1.0000	0.0047*	0.0002*	0.0002*	0.3994
PRIT-0213 30 + 30 μ Ci	0.0005*	0.0002*	0.0047*	1.0000	0.5630	0.0193*	0.0541
PRIT-0213 30 μ Ci	0.0002*	0.0002*	0.0002*	0.5630	1.0000	0.1100	0.0004*
PRIT-0214 30 + 30 μ Ci	0.0002*	0.0002*	0.0002*	0.0193*	0.1100	1.0000	0.0002*
PRIT-0214 30 μ Ci	0.1330	0.0160*	0.3994	0.0541	0.0004*	0.0002*	1.0000

【0659】

概要および結論

1 または 2 処置サイクルで、2 種の二重特異性抗体 P R I T - 0 2 1 3 および P R I T - 0 2 1 4 のいずれかを使用した C E A - P R I T は、両方の試験された腫瘍モデルで、有意な腫瘍増殖阻害および生存増加をもたらした。B x P C 3 試験における予想外の第 2 サイクル^{2 1 2} P b 体内分布およびその後の放射線誘発毒性後のトラブルシューティングの試みは、この状況が、未同定の注射関連の課題によって引き起こされた可能性があることと結論付けた。B x P C 3 有効性試験を反復して、問題が処置レジメンに固有のものでないことを確認するべきである。L S 1 7 4 T モデルにおける将来の実験は、不良な腫瘍状態の問題が解決されるまで行うべきではない。第 2 の処置サイクルの効率を増加させるために、2 つのサイクルの間のタイミングが、腫瘍再増殖を回避するために短縮されることが提案される。加えて、レジメンに第 3 の処置サイクルを加えることも、さらなる評価のための選択肢となり得る。

【0660】

最後に、腫瘍増殖の根底にある機序の試験は、その増殖は、明らかに阻害されるが、腫瘍が完全には縮小せず、その代わりに、ある時間量の後に再増殖を開始する理由を明らかにするために大変興味深い。

【0661】

実施例 26：除去剤用量（プロトコール 105）

本試験において、50% T C M C 飽和を有するデキストラン-500 ベースの除去剤の用量の範囲は、プレターゲットイングされた腫瘍への^{2 1 2} P b - D O T A M 会合における効果の観点から評価した。

10

20

30

40

50

試験設計、プロトコール 105

試験日	日付	実験手順
1	2016-08-30	BxPC3 細胞の i.v.注射*
13	2016-09-12	PRIT bsAb の i.v.注射*
16	2016-09-15	CA または PBS の i.v.注射*
16	2016-09-15	^{212}Pb -DOTAM の溶出
16	2016-09-15	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射*
17	2016-09-16	安楽死および剖検; 組織のガンマ計数

*注射体積 100 μL プロトコール 105 における試験群 ($n_{\text{tot}} = 18$)

群	bsAb	bsAb 用量 (μg)	CA	CA 用量 (μg)	キレート	Pb 放射能 (μCi)	n
A	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	5	^{212}Pb -DOTAM	10	3
B	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	10	^{212}Pb -DOTAM	10	3
C	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	30	^{212}Pb -DOTAM	10	3
D	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	75	^{212}Pb -DOTAM	10	3
E	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	250	^{212}Pb -DOTAM	10	3
F	CEA-DOTAM	100	—	0	^{212}Pb -DOTAM	10	3

【0662】

固形異種移植片は、Corning（登録商標）Matrigel（登録商標）基底膜マトリックス（増殖因子低下；カタログ番号354230）と1：1混合したRPMI培地におけるBxPC3細胞（継代26）の皮下注射により確立した。各マウス（6週齢）に、100 μL RPMI/Matrigelにおける 5×10^6 個の細胞を右側腹部へとs.c.注射した。腫瘍細胞注射15日後に、222 mm^3 の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。

【0663】

CEA-PRIT（100 μL あたり100 μg ）、続いて3日後に、Dex500-(50%)（100 μL あたり5～250 μg ）をi.v.投与した。群Fは、除去剤の代わりにPBSを受けた。2時間後、マウスに、100 μL の ^{212}Pb -DOTAM（10 μCi ）をi.v.注射した。

【0664】

^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後に、マウスを殺し、剖検した。血液、膀胱、脾臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、尾および腫瘍を収集し、秤量し、放射能含有量に関して測定し、%ID/gをその後計算した。

【0665】

結果、105

^{212}Pb の腫瘍蓄積は、250 μg を除いて全CA用量で全般に高かった。CEA-PRIT二重特異性抗体の血液クリアランスは、30、75および250 μg のCA用量で最も効率的であった。結果的に、最高の腫瘍対血液比は、30、75および250 μg のCAで達成され、それぞれ187.7、180.2および243.5であった。 ^{212}Pb の

対応する腫瘍取込みは、 91.8 ± 18.9 、 70.5 ± 11.1 および 35.2 ± 17.0 % ID/g ($\pm$ SD、 $n=3$) であった。

【0666】

図33は、 ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、選択された組織における放射能分布を示す(% ID/g $\pm$ SD、 $n=3$)。灰色のバーは、様々な量のDex500-(50%) CAの注射後の組織蓄積を表す；黒色のバーは、CAなしコントロールを表す。

【0667】

図34は、 ^{212}Pb -DOTAMの注射24時間後の、血液および腫瘍における ^{212}Pb 含有量(% ID/g $\pm$ SD、 $n=3$)、および対応する腫瘍対血液比を示す。灰色のバーは、様々な量のDex500-(50%) CAの注射後の組織蓄積を表す；黒色のバーは、CAなしコントロールを表す。

10

【0668】

概要および結論

腫瘍における達成された ^{212}Pb 蓄積、血液クリアランスおよびその後の腫瘍対血液比に基づき、 $30 \mu\text{g}$ のDex500-(50%)の用量は、BxPC3モデルにおけるCEA-PRITに好ましいと思われた。

【0669】

実施例27：デキストラン-500ベースの除去剤の血液中の滞留時間（プロトコール106）

本試験において、50%TCMC飽和を有するデキストラン-500ベースの除去剤は、血液中の滞留時間の観点から評価した。目標は、反復処置に適した時間枠（1～4週間）を同定し、投与された二重特異性抗体に結合し得る除去剤が循環中に殆どまたは全く残っておらず、その後に注射される放射標識されたDOTAMの結合を有効にブロックすることを確実にすることであった。

20

30

40

50

試験設計、プロトコール 106

試験日	日付	実験手順
1	2016-09-19	PRIT bsAb の i.v.注射*
2	2016-09-12	CA または PBS の i.v.注射*
9	2016-09-27	PRIT bsAb の i.v.注射* (1 週間)
10	2016-09-28	^{212}Pb -DOTAM の溶出
10	2016-09-28	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射* (1 週間)
10	2016-09-28	安楽死および血液サンプリング+ガンマ計数 (1 週間)
16	2016-10-04	PRIT bsAb の i.v.注射* (2 週間)
17	2016-10-05	^{212}Pb -DOTAM の溶出
17	2016-10-05	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射* (2 週間)
17	2016-10-05	安楽死および血液サンプリング+ガンマ計数 (2 週間)
23	2016-10-11	PRIT bsAb の i.v.注射* (3 週間)
24	2016-10-12	^{212}Pb -DOTAM の溶出
24	2016-10-12	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射* (3 週間)
24	2016-10-12	安楽死および血液サンプリング+ガンマ計数 (3 週間)
30	2016-10-18	PRIT bsAb の i.v.注射* (4 週間)
31	2016-10-19	^{212}Pb -DOTAM の溶出
31	2016-10-19	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射* (4 週間)
31	2016-10-19	安楽死および血液サンプリング+ガンマ計数 (4 週間)

*注射体積 100 μL プロトコール 106 における試験群 ($n_{\text{tot}} = 24$)

群	bsAb	bsAb 用量 (μg)	CA	CA 用量 (μg)	間隔 (週)	キレート	Pb 放射 能 (μCi)	n
A	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	25	1	^{212}Pb -DOTAM	10	3
B	CEA-DOTAM	100	—	0	1	^{212}Pb -DOTAM	10	3
C	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	25	2	^{212}Pb -DOTAM	10	3
D	CEA-DOTAM	100	—	0	2	^{212}Pb -DOTAM	10	3
E	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	25	3	^{212}Pb -DOTAM	10	3
F	CEA-DOTAM	100	—	0	3	^{212}Pb -DOTAM	10	3
G	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	25	4	^{212}Pb -DOTAM	10	3
H	CEA-DOTAM	100	—	0	4	^{212}Pb -DOTAM	10	3

【0670】

マウス (9 週) に、CEA-PRIT (100 μL あたり 100 μg)、続いて 1 日後

、Dex 500- (50%) (100 μ Lあたり25 μ g)をi.v.投与した。群B、D、FおよびHは、除去剤の代わりにPBSを受けた。1、2、3または4週間後に、マウスに、CEA-PRIT (100 μ Lあたり100 μ g)、続いて1日後、100 μ Lの ^{212}Pb -DOTAM (10 μ Ci)を再度i.v.注射した。

【0671】

^{212}Pb -DOTAMの注射4時間後にマウスを殺した。安楽死の時点で血液を収集し、試料を秤量し、放射能含有量に関して測定した。崩壊およびバックグラウンドに対する補正を含む、血液1グラムあたりのパーセント注射用量(%ID/g)をその後計算した。

【0672】

結果、106

試験した時点のいずれにおいても、Dex 500- (50%)またはPBSを受けたマウスの間に平均放射能含有量に統計的有意差はなかった(1方向ANOVA、シダックの多重比較検定、 $p > 0.05$)。

【0673】

図35は、 ^{212}Pb -DOTAMの注射4時間後の、血液における放射能含有量を示す(%ID/g $\pm$ SD、 $n = 3$)。

【0674】

概要および結論

結果は、反復したCEA-PRIT処置サイクルが、CEA-DOTAM bsAbへのその後投与された ^{212}Pb -DOTAMの結合をブロックすることなく、Dex 500- (50%)の最後の注射の1週間後に既に開始され得ることを示す。

【0675】

実施例28：二重特異性抗体の追加的な形式

抗体重鎖または軽鎖の組換え発現のためのプラスミドの生成

ヒト胎児性腎細胞(HEK293)の一過性トランスフェクションにより、所望のタンパク質を発現させた。所望の遺伝子/タンパク質(例えば、完全長抗体重鎖、完全長抗体軽鎖、または追加的なドメイン(例えば、そのC末端における免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメイン))を含有する完全長抗体重鎖の発現のため、次の機能的エレメントを含む転写単位を使用した：

- ー イントロンAを含む、ヒトサイトメガロウイルス由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター(P-CMV)、
- ー ヒト重鎖免疫グロブリン5'-非翻訳領域(5'UTR)、
- ー マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列(SS)、
- ー 発現されるべき遺伝子/タンパク質、ならびに
- ー ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列(BGH pA)。

【0676】

発現されるべき所望の遺伝子を含む発現単位/カセットに加えて、基礎/標準哺乳動物発現プラスミドは、

- ー 大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および
- ー 大腸菌におけるアンピシリン抵抗性を付与するベクターラクタマーゼ遺伝子を含む。

【0677】

P1AE1766

G4S $\times$ 4リンカーによってそれぞれ分離されたそれぞれの配列エレメントをコードするDNA断片をヒトIgG分子のCH3ドメインのC末端に融合することにより、完全かつ機能的な抗体重鎖に続く、追加的な抗体VL-CH1またはVH-C-カップドメインを含むC末端融合遺伝子を含む抗体重鎖コード化遺伝子をアセンブルした(VH-CH1-ヒンジ-CH2-CH3-リンカー-VL-CH1またはVH-CH1-ヒンジ-CH2-CH3-リンカー-VH-Ck)。それぞれ2個のCH3ドメインのC末端に1個の

10

20

30

40

50

V L - C H 1 および 1 個の V H - C k ドメインを有する組換え抗体分子を、ノブ・イントゥー・ホール技術を使用して発現させた。

【 0 6 7 8 】

それぞれの配列エレメントをコードする D N A 断片を融合することにより、完全かつ機能的な抗体軽鎖を含む抗体軽鎖コード化遺伝子をアセンブルした。

【 0 6 7 9 】

P 1 A E 1 7 6 8

ノブ・イントゥー・ホール技術を使用することにより、C E A または D O T A M のいずれかを標的とする完全かつ機能的な抗体重鎖を含む抗体重鎖コード化遺伝子をアセンブルした。

【 0 6 8 0 】

それぞれの配列エレメントをコードする D N A 断片を融合することにより、完全かつ機能的な抗体軽鎖を含む抗体軽鎖コード化遺伝子をアセンブルした。C r o s s M a b 技術を使用して (C L および C H 1 ドメインをアームの 1 本と取り替えて)、正確な会合を確実にした。

【 0 6 8 1 】

P 1 A E 1 7 6 9

V H - C H 1 ドメインをコードする D N A 断片を、G 4 S × 4 リンカーを介して、V H ドメインに代えた V L ドメインの交換を含有するヒト I g G 分子の V L ドメインの N 末端に融合する (よって、構造 V H - C H 1 - リンカー - V L - C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 をコードする融合遺伝子を作製する) ことにより、融合遺伝子をアセンブルした。1 個の V H - C H 1 を有し、それぞれの N 末端に融合がない組換え抗体分子を、ノブ・イントゥー・ホール技術を使用して発現させた。

【 0 6 8 2 】

それぞれの配列エレメントをコードする D N A 断片を融合することにより、完全かつ機能的な抗体軽鎖を含む抗体 V H - C カッパコード化遺伝子をアセンブルした。

【 0 6 8 3 】

それぞれの配列エレメントをコードする D N A 断片を融合することにより、完全かつ機能的な抗体軽鎖を含む抗体軽鎖コード化遺伝子をアセンブルした。

【 0 6 8 4 】

C r o s s M a b 技術を使用して、正確な会合を確実にした。

【 0 6 8 5 】

P 1 A E 1 7 6 7

G 4 S × 4 リンカーによってそれぞれ分離されたそれぞれの配列エレメントをコードする D N A 断片を、ヒト I g G 分子の C H 3 ドメインの C 末端に融合することにより、完全かつ機能的な抗体重鎖に続く、追加的な抗体 V - 軽 - C H 1 ドメインを含む C 末端融合遺伝子を含む抗体重鎖コード化遺伝子をアセンブルした (V H - C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3 - リンカー - V L - C H 1) 。 1 個の V L - C H 1 を有し、それぞれ 2 個の C H 3 ドメインの C 末端に融合がない組換え抗体分子を、ノブ・イントゥー・ホール技術を使用して発現させた。

【 0 6 8 6 】

それぞれの配列エレメントをコードする D N A 断片を融合することにより、完全かつ機能的な抗体軽鎖を含む抗体 V H - C カッパコード化遺伝子をアセンブルした。

【 0 6 8 7 】

それぞれの配列エレメントをコードする D N A 断片を融合することにより、完全かつ機能的な抗体軽鎖を含む抗体軽鎖コード化遺伝子をアセンブルした。

【 0 6 8 8 】

C r o s s M a b 技術を使用して、正確な会合を確実にした。

【 0 6 8 9 】

P 1 A E 1 7 7 0

10

20

30

40

50

G4S×4リンカーによってそれぞれ分離されたそれぞれの配列エレメントをコードするDNA断片を、ヒトIgG分子のCH3ドメインのC末端に融合することにより、完全かつ機能的な抗体重鎖に続く、追加的な抗体V-軽-C-カッパーリンカー-V-重-CH1ドメインを含むC末端融合遺伝子を含む抗体重鎖コード化遺伝子を実装した（VH-CH1-ヒンジ-CH2-CH3-リンカー-VL-Ck-リンカー-VH-CH1）。1個の単鎖Fabを有し、それぞれ2個のCH3ドメインのC末端に融合がない組換え抗体分子を、ノブ・イントゥー・ホール技術を使用して発現させた。

【0690】

それぞれの配列エレメントをコードするDNA断片を融合することにより、完全かつ機能的な抗体軽鎖を含む抗体軽鎖コード化遺伝子を実装した。

【0691】

抗体分子の一過性発現

F17培地（Invitrogen Corp.）において培養される、一過性にトランスフェクトされたHEK293細胞（ヒト胎児性腎細胞株293由来）において抗体分子を生成した。トランスフェクションのため、「293-Free」トランスフェクション試薬（Novagen）を使用した。上述のそれぞれの抗体重鎖および軽鎖分子は、個々の発現プラスミドから発現させた。トランスフェクションは、製造業者の説明書に指定される通りに行った。トランスフェクションの3から7（3～7）日後に、免疫グロブリン含有細胞培養上清を採集した。上清は、精製するまで、低下した温度（例えば、-80℃）で貯蔵した。

【0692】

例えば、HEK293細胞におけるヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般情報は：Meissner、P.ら、Biotechnol. Bioeng. 75（2001）197～203で得られる。

TapirID	発現体積	収量 [mg]	モノマー含有量 (SEC)
P1AE1766	2 l	2.5	>98%
P1AE1767	2 l	2	>98%
P1AE1768	2 l	20	>95%
P1AE1769	2 l	2	>96%
P1AE1770	2 l	0.4	>96%

【0693】

MabSelect Sure（アフィニティークロマトグラフィー）およびそれに続くSuperdex 200（サイズ排除クロマトグラフィー）によって、分子を精製した。

【0694】

異なる形式のDOTAM結合特性のKinexa評価

親和性決定の詳細な解析のため、Kinexaを使用した。

【0695】

計測手段および材料

オートサンプラーを備えるSapidyne Instruments（アイダホ州ボイシ）製のKinexA 3200機器を使用した。ポリメチルメタクリレート（PMM A）ビーズは、Sapidyneから購入し、一方、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）、BSA（ウシ血清アルブミン画分V）および抗DOTAM抗体は、インハウス（Roche）で調製した。DyLight 650（登録商標）コンジュゲートされたアフィニティー精製ヤギ抗ヒトIgG-Fc断片交差吸着抗体は、Bethyl Laboratories（テキサス州モントゴメリー）から購入した。ビオチン化Pb-DOTAM抗原（Pb-DOTAM-アルキル-ビオチン異性体AおよびB、Pb-DOTAM-Bn-ビオチン/TCMC-Pb-dPEG3-ビオチン、異性体AおよびB）および非ビオチン化Pb-DOTAMは、AREVA Med（メリーランド州ベセスダ）から得た。

【0696】

抗原コーティングされたビーズの調製

ビオチン化分子のためのK i n E x Aハンドブックプロトコール (S a p i d y n e) に従って、PMMAビーズをコーティングした。簡潔に説明すると、第一に、1mlのPBS (pH 7.4) 中の10μgのビオチン-BSA (Thermo Scientific) を、吸着コーティングのために1本のバイアル (200mg) のビーズにつき添加した。2時間室温で回転させた後に、上清を除去し、ビーズを1ml PBSで5回洗浄した。第二に、10mg/ml BSAを含有するPBS中の1mlの100μgのニュートラアビジン、ビオチン結合タンパク質 (Thermo Scientific) をビーズに添加し、室温でさらなる2時間インキュベートして、ニュートラアビジンをビーズにカップリングさせ、ビオチン化タンパク質のその後の結合のための追加的なビオチン結合部位をもたらした。次に、ニュートラアビジンコーティングされたビーズを1ml PBSで5回リンスした。最後に、ビーズを、PBS中の200ng/mlビオチン化Pb-DOTAM-異性体ミックス (異性体毎に50ng) でコーティングし、さらに2時間室温でインキュベートした。次に、ビーズを30ml PBSに再懸濁し、直ちに使用した。

10

【0697】

K i n E x A 平衡アッセイ

全てのK i n E x A実験は、ランニングバッファーとしてPBS、pH 7.4を使用して室温 (RT) で行った。1mg/ml BSAを補充したランニングバッファー (「試料バッファー」) において試料を調製した。0.25ml/分の流量を使用した。5pM 結合部位濃度を有する一定量の抗DOTAM抗体を、100pMから開始する2倍段階希釈 (濃度範囲0.049pM~100pM) によってPb-DOTAM抗原で滴定した。抗原なし抗体の1種の試料は、100%シグナル (すなわち、阻害なし) とした。抗原-抗体複合体をRTで少なくとも24時間インキュベートして、平衡に達するようにした。次に、平衡した混合物を、体積5mlのK i n E x AシステムにおけるPb-DOTAMカップリングビーズのカラムに通して、溶液の平衡状態を乱すことなく、結合していない抗体をビーズによって捕捉させた。試料バッファー中の250ng/ml D y l i g h t 650 (C) コンジュゲートされた抗ヒトFc断片特異的二次抗体を使用して、捕捉された抗体を検出した。各試料は、全平衡実験で2回複製して測定した。

20

30

【0698】

「標準解析」方法を使用して、K i n E x Aソフトウェア (バージョン4.0.11) 内に含有される1部位均一結合モデルを使用してデータの非線形回帰解析からKDを得た。ソフトウェアは、KDを計算し、データ点を理論的 (theroretical) KD曲線にフィットさせることにより95%信頼区間を決定する。95%信頼区間 (S a p i d y n e T e c h N o t e T N 2 0 7 R 0) は、KD低およびKD高として得られる。

試料	KD (pM)	信頼区間 (pM)
P1AE1766	1.4	0.4-3
P1AE1767	1.0	0.8-1.4
P1AE1768	0.8	0.5-1.3
P1AE1769	0.9	0.4-1.5
P1AE1770	1.3	0.9-1.8
PRIT-213	1.0	0.6-1.5

40

【0699】

全コンストラクトは、信頼区間が重複するためKDが匹敵する。

【0700】

異なる形式での分子の配列：

必要に応じた電荷修飾は、太字文字列および下線で示す：E Q - > R K または K K - >

50

E E

P 1 A E 1 7 6 6

> C E A 軽鎖 R K

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASAAVGTYYAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> C E A 重鎖と D O T A M V L / C H 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDSTSTAY
MELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSP
SSLSASVGDRTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY
YCLGGYDDSDTYGFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

10

> C E A 重鎖と D O T A M V H / C K

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDSTSTAY
MELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESG
PVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPV
DTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

30

P 1 A E 1 7 6 7

> D O T A M 「 L C 」 と V H / C K

VTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVL
TMNMDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> C E A 軽鎖 R K

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASAAVGTYYAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

> C E A 重鎖と D O T A M V L / C H 1

50

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNVWRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAY
MELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTCPPCPAPEA
AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSP
SSLSASVGRVITITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPKGAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY
YCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

> C E A 重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVFTTDDTSTSTAY
MELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYYEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
AGGSPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTKSKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

P 1 A E 1 7 6 8

> C E A L C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLP
EDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKSDSTYSLSSTLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

> DOTAM重鎖とVL/CH1

IQMTQSPSSLSASVGRVTITICQSSHVSYSNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSSLQ
PEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSGF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> C E A 重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVFTTDTSTSTAY
MELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTSKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>DOTAM「LC」VH/CK

VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFISRGDTYYASWAKGRILTISKDTSKSQVVL
MTNMDPVDATATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

P 1 A E 1 7 6 9

> D O T A M 「 L C 」 と V H / C K

VTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVL
MTNMDPVDATATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> C E A L C

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASAAVGTYYAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFLT
ISSLPQEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

> C E A H C と C E A V H / C H 1 / D O T A M V L / C H 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTF
TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDE
KVEPKSCDGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASG
VPSRFSGSGSGTDFLTISSLPQEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

20

> C E A H C

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTF
TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDE
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

30

P 1 A E 1 7 7 0

> C E A L C

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASAAVGTYYAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFLT
ISSLPQEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

> C E A H C と D O T A M s c F a b : D O T A M V L / C k / リンカー / V H C H 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAY
 MELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 AGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYCKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSP
 SSLASVGRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPKGAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY
 YCLGGYDDESDTYGFGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESV
 TEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
 SGGVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQV
 VLTMTNMDPVDATATYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

10

> C E A H C

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAY
 MELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 AGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYCKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

【0701】

実施例29：Pb-DOTAMおよびCD20またはHer2に結合する二重特異性抗体抗体重鎖または軽鎖の組換え発現のためのプラスミドの生成

ヒト胎児性腎細胞（HEK293）の一過性トランスフェクションにより、所望のタンパク質を発現させた。所望の遺伝子／タンパク質（例えば、完全長抗体重鎖、完全長抗体軽鎖、または追加的なドメイン（例えば、そのC末端における免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメイン）を含有する完全長抗体重鎖）の発現のため、次の機能的エレメントを含む転写単位を使用した：

30

- － イントロンAを含む、ヒトサイトメガロウイルス由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター（P-CMV）、
- － ヒト重鎖免疫グロブリン5'－非翻訳領域（5'UTR）、
- － マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列（SS）、
- － 発現されるべき遺伝子／タンパク質、ならびに
- － ウシ成長ホルモンポリアダニル化配列（BGH pA）。

【0702】

発現されるべき所望の遺伝子を含む発現単位／カセットに加えて、基礎／標準哺乳動物発現プラスミドは、

40

- － 大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および
- － 大腸菌におけるアンピシリン抵抗性を付与するベクターラクタマーゼ遺伝子を含む。

【0703】

a) 抗体重鎖のための発現プラスミド

G4S×4リンカーによってそれぞれ分離されたそれぞれの配列エレメント（V－重またはV－軽）をコードするDNA断片を、ヒトIgG分子のCH3ドメインのC末端に融合することにより、完全かつ機能的な抗体重鎖に続く、追加的な抗体V－重またはV－軽ドメインを含むC末端融合遺伝子を含む抗体重鎖コード化遺伝子を実装した（VH

50

－CH1－ヒンジ－CH2－CH3－リンカー－VHまたはVH－CH1－ヒンジ－CH2－CH3－リンカー－VL）。それぞれ2個のCH3ドメインのC末端に1個のVHおよび1個のVLドメインを有する組換え抗体分子を、ノブ・イントゥー・ホール技術を使用して発現させた。

【0704】

HEK293細胞における抗体重鎖と、C末端VHまたはVLドメインの一過性発現のための発現プラスミドは、抗体重鎖断片と、C末端VHまたはVLドメイン発現カセットの他に、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および大腸菌におけるアンピシリン抵抗性を付与するベクターラクタマーゼ遺伝子を含んだ。抗体重鎖断片と、C末端VHまたはVLドメイン融合遺伝子の転写単位は、次の機能的エレメントを含む：

10

- － イントロンAを含む、ヒトサイトメガロウイルス由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター（P－CMV）、
- － ヒト重鎖免疫グロブリン5'－非翻訳領域（5'UTR）、
- － マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- － 抗体重鎖（VH－CH1－ヒンジ－CH2－CH3－リンカー－VHまたはVH－CH1－ヒンジ－CH2－CH3－リンカー－VL）コード化核酸、ならびに
- － ウシ成長ホルモンポリアダニル化配列（BGH pA）。

【0705】

成熟抗体重鎖断片と、C末端VHまたはVLドメイン融合タンパク質のアミノ酸配列を次に示す。

20

P1AD9826 → CD20-DOTAM

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSA
SVGDRVITITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGG
YDDESDTYGFGGGTKVEIK

30

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVK
PTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATY
YCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLTVSS

40

【0706】

P1AD9827 → ERBB2-DOTAM

50

EVQLVESGGGLVQPQGLSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY
 LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALGAPIIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLS
 ASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPKGAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLG
 GYDDESDTYGFGGGTKVEIK

EVQLVESGGGLVQPQGLSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY
 LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALGAPIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLV
 KPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDAT
 YYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLTVTVSS

10

【0707】

b) 抗体軽鎖のための発現プラスミド

20

それぞれの配列エレメントをコードするDNA断片を融合することにより、完全かつ機能的な抗体軽鎖を含む抗体軽鎖コード化遺伝子をアセンブルした。

【0708】

抗体軽鎖の一過性発現のための発現プラスミドは、抗体軽鎖断片の他に、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18由来の複製開始点、および大腸菌におけるアンピシリン抵抗性を付与するベクターラクタマーゼ遺伝子を含んだ。抗体軽鎖断片の転写単位は、次の機能的エレメントを含む：

- － イントロンAを含む、ヒトサイトメガロウイルス由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター（P-CMV）、
- － ヒト重鎖免疫グロブリン5'－非翻訳領域（5'UTR）、
- － マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- － 抗体軽鎖（VL-CL）コード化核酸、ならびに
- － ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列（BGH pA）。

30

【0709】

P1AD9827 → ERBB2-DOTAM

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

【0710】

P1AD9826 → CD20-DOTAM

DIVMTQTPSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGITYLYWLKQPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDVGVYYCAQNLPELPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0711】

抗体分子の一過性発現

F17 培地（Invitrogen Corp.）において培養される、一過性にトラ

50

ンスフェクトされたHEK293細胞（ヒト胎児性腎細胞株293由来）において抗体分子を生成した。トランスフェクションのため、「293-Free」トランスフェクション試薬（Novagen）を使用した。上述のそれぞれの抗体重鎖および軽鎖分子は、個々の発現プラスミドから発現させた。トランスフェクションは、製造業者の説明書に指定される通りに行った。トランスフェクションの3から7（3～7）日後に、免疫グロブリン含有細胞培養上清を採集した。上清は、精製するまで、低下した温度（例えば、-80℃）で貯蔵した。

【0712】

例えば、HEK293細胞におけるヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般情報は：Meissner、P.ら、Biotechnol. Bioeng. 75（2001）197～203で得られる。

【0713】

抗体分子P1AD8926およびP1AD8927の精製

MabSelect Sure（アフィニティークロマトグラフィー）およびそれに続くSuperdex 200（サイズ排除クロマトグラフィー）によって、PRIT分子を精製した。

TapirID	発現体積	濃度プール [mg/mL]	量プール [mg]	モノマー 含有量	純度
P1AD8926	2 l	2.03	22	> 99%	> 95%
P1AD8927	2 l	2.07	69	> 99%	> 95%

【0714】

質量分析：

PRIT分子の同一性を確認するために、ESI-MSを使用した。

TapirID	同一性	純度	コメント
P1AD8926	確認	副生物 A、A2C2(小)	オキシ化 (Oxylosation)検出
P1AD8927	確認	副生物 A、A2C2(小)	オキシ化 (Oxylosation)検出

【0715】

P1AD8927機能性のFACS解析

P1AD8927の機能性を評価するため、37℃で10分間アキュターゼ（accutase）を使用して培養容器からKPL-4細胞を剥離した。その後（Subsequently）、細胞をPBSにおいて2回洗浄し、4×10⁶個の細胞／ウェルの最終密度となるように96ウェルv字底型プレートに播種した。

【0716】

抗体を、Zenon<ヒトIgG>A488で前標識し、図38に示される濃度で細胞に添加した。その後、細胞を氷上で1時間インキュベートし、PBSにおいて2回洗浄し、FACS cantoを使用したFITC蛍光の測定のために200 μl PBS／5% FCSに再懸濁した。

【0717】

結果を図38に示す。

【0718】

DOTAMへの抗体の結合能を評価するために、KPL-4細胞への結合後に、細胞を洗浄して、結合していない抗体 (antibdy) を除去した。その後、Pb-DOTAM-FITCを添加して、DOTAM結合能力がある細胞結合抗体を検出した (図39)。P1AD8927は、アイソタイプ補正された用量依存性FITCシグナルを示す。本実験は、DOTAM結合が、この抗体において機能的であることを示す。

【0719】

P1AD8926機能性のFACS解析

P1AD8926の機能性を評価するため、Raji細胞をPBSにおいて2回洗浄し、 4×10^6 個の細胞/ウェルの最終密度となるように96ウェルv字底型プレートに播種した。

【0720】

抗体を、Zenon<ヒトIgG>A488で前標識し、図40に示される濃度で細胞に添加した。その後、細胞を氷上で1時間インキュベートし、PBSにおいて2回洗浄し、FACS cantoを使用したFITC蛍光の測定のために200 μ l PBS/5% FCSに再懸濁した。

【0721】

DOTAMへの抗体の結合能を評価するために、Raji細胞への結合後に、細胞を洗浄して、結合していない抗体を除去した。その後、Pb-DOTAM-FITCを添加して、DOTAM結合能力がある細胞結合抗体を検出した (図41)。P1AD8927は、アイソタイプ補正された用量依存性FITCシグナルを示す。本実験は、DOTAM結合が、この抗体において機能的であることを示す。

【0722】

実施例30：実施例31～37の材料および方法

本実施例は、実施例31～37の試験のための材料および方法を設定する。

3段階PRIT (1サイクル)

ステップ1：BsAbの投与 (Administration) (i.v. または i.p.) : 試験で使用するBsAbは、高い親和性でPb-DOTAMに結合し、例えばCEAを介して腫瘍を標的とする。

ステップ2：CAの投与 (i.v. または i.p.) : ^{212}Pb -DOTAMの効率的な腫瘍蓄積を可能にするために、循環BsAbは、腫瘍へと浸透することなく、結合していないBsAbへの ^{212}Pb -DOTAM結合をブロックし、結果的に、プレターゲットングされた部位をブロックするCAを使用して血液中で中和される必要がある。BsAbが腫瘍に十分な程度まで蓄積したら、一般に、4～10日後に、CAが投与される。Pb-DOTAM-デキストラン-500 CAは、下に示す通り、チオウレアリンカーを介してDOTAMがコンジュゲートされている、500 kDaの平均分子量を有するアミノデキストランに基づき開発された。

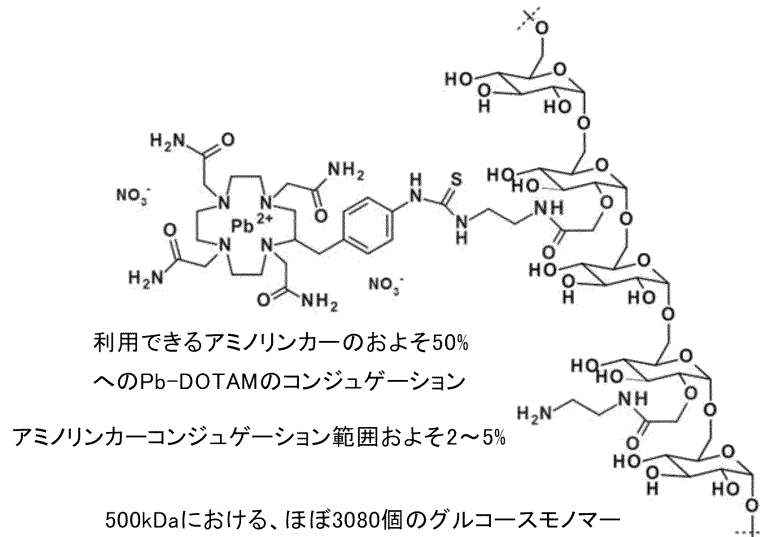
10

20

30

40

50



10

ステップ3： ^{212}Pb -DOTAMの投与（i.v.）：最後のステップにおいて、一般に、CA注射の24~48時間後に、放射能注射を行って、 ^{212}Pb -DOTAMが、プレターゲットされた腫瘍部位に優先的に結合することを可能にし、全身性放射線曝露を効率的に低下させる。

20

【0723】

一般的な材料および方法

ARCoLabで行われる実験プロトコルは、地方当局（Comite Regional d'Ethique de l'Experimentation Animale du Limousin (CREEAL)、Laboratoire Departemental d'Analyses et de Recherches de la Haute-Vienne）によって審査および承認された。重症複合免疫不全（SCID）およびCD1マウスは、Charles Riverによって提供され、倫理指針に沿って、明暗の日周サイクル（12時間／12時間）による特定のおよび日和見性の病原体がない（SOPF）条件下で維持された。試験121は、Envigoによって提供されたマウスにより、特定の病原体がない（SPF）条件を用いた。到着後の最初の5日間、操作は行わず、動物を新たな環境に順化させた。臨床症状および有害事象検出に関して全マウスを毎日管理した。

30

【0724】

固形異種移植片は、Corning（登録商標）Matrigel（登録商標）基底膜マトリックス（増殖因子低下；カタログ番号354230）と1：1混合した細胞培養培地におけるCEA発現腫瘍細胞の皮下（s.c.）注射により確立した。腫瘍体積を手動ノギス計測により推定し、式：体積＝0.5×長さ×幅²に従って計算した。

【0725】

放射能尿／糞便の再経口摂取を最小化するために、全ての有効性試験マウスは、 ^{212}Pb -DOTAM投与後、標準寝床を備える新たなケージに移すまで、焼却処理した床を備えるケージ内に4時間配置した。次に、注射後（p.i.）24時間目に全ケージを交換した。放射能注射24時間後までに体内分布を調べる目的のため安楽死されるマウスに対して、この手順は行わなかった。

40

【0726】

試験動物の体重（BW）を1週間に少なくとも3回測定し、必要であれば、健康状態に応じて追加的な測定を行った。そのBW減少が自身の初期BWの25%を超えた、またはその腫瘍体積が3000mm³に達したマウスは、直ちに安楽死させた。倫理的な理由から安楽死に考慮される他の要因は、腫瘍状態（例えば、壊死性区域、血液／体液漏出、自

50

傷の徴候)および動物の全身的外観(例えば、毛皮、姿勢、動作)であった。急性BW減少(集団的または個体的)があったために要求される場合、全個体が十分に回復するまで、放射能注射5日後から、全マウスにウェットタイプの食物を与えた。

【0727】

プロトコルによって指示される通り、血液を終結時に後眼窩出血を使用して静脈洞から収集し、続いて放射能測定および／または組織学的解析のための追加的な組織採集を行った。予想外なまたは異常な状態を記録した。ホルマリン固定のために収集された組織を10%中性緩衝ホルマリン(4℃)に直ちに投入し、次いで5日後にリン酸緩衝生理食塩水(PBS; 4℃)に移した。体内分布を調べる目的のため収集された臓器および組織を秤量し、2470 WIZARD²自動ガンマ計数器(PerkinElmer)を使用して放射能に関して測定し、崩壊およびバックグラウンドに対する補正を含む、組織1グラムあたりのパーセント注射用量(%ID/g)をその後計算した。

【0728】

GraphPad Prism 6(GraphPad Software, Inc.)およびJMP 8(SAS Institute Inc.)を使用して統計解析を行った。次式を使用して、平均腫瘍体積に基づき腫瘍増殖阻害(TGI)の曲線解析を行った：

$$TGI = 100 - \frac{v_{処置,d} - v_{処置,0}}{v_{参照,d} - v_{参照,0}} \times 100$$

(式中、dは、処置日を示し、0は、ベースライン値を示す)。参照群としてビヒクル(PBS)を選択した。腫瘍縮小(TR)は、次式に従って計算した：

$$TR = \frac{v_{処置,0} - v_{処置,d}}{v_{処置,0}}$$

(式中、正の値は、腫瘍縮小を示し、-1を下回る値は、ベースライン値の二倍を越えた増殖を示す)。

【0729】

ペア毎の検定を行って、いずれの群が生存の観点から有意に異なったかを指定した：ログランク検定(後期の生存事象に重きを置く)およびウィルコクソン検定(初期の生存時間に重きを置く)、両者共に多重検定するためのボンフェローニ補正を使用。

【0730】

被験化合物

記載の試験で利用されている化合物は、下の「二重特異性抗体」、「除去剤」および「放射標識キレート」という見出しの表に提示されている。

【0731】

CEA-DOTAM(PRIT-0213)は、CEAのT84.66エピトープを標的とする完全ヒト化BsAbであり、一方、DIG-DOTAM(PRIT-0175)は、ネガティブコントロールとして使用される非CEA結合BsAbである。P1AE1766、P1AE1767、P1AE1768、P1AE1769およびP1AE1770は、上の実施例28に記載されている通り、CEAのCH1A1Aエピトープを標的とするヒト化CEA-DOTAM BsAbである。抗体コンストラクトは、注射日まで-80℃で貯蔵し、注射日に、解凍し、静脈内(i.v.)または腹腔内(i.p.)投与のためのそれら最終のそれぞれの濃度となるよう標準ビヒクルバッファー(20mMヒスチジン、140mM NaCl; pH6.0)または0.9%NaClに希釈した。

【0732】

Ca-DOTAM-デキストラン-500およびPb-DOTAM-デキストラン-500 CAは、注射日まで-20℃で貯蔵し、注射日に、解凍し、i.v.またはi.p.

。投与のためにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）において希釈した。

【0733】

放射標識のためのDOTAMキレートは、Macrocyclicsによって提供され、放射標識まで -20°C で維持された。トリウム発生装置からのDOTAMとの溶出により、 ^{212}Pb -DOTAMを生成し、その後、標識後にCu、Ca、Zn、GdまたはPbによりクエンチした。 ^{212}Pb -DOTAM溶液をPBSまたは0.9% NaClで希釈して、i.v.注射のための所望の ^{212}Pb 放射能濃度を得た。

【0734】

ビヒクルコントロール群におけるマウスは、BsAb、CAおよび ^{212}Pb -DOTAMの代わりにPBSの複数の注射を受けた。

二重特異性抗体

化合物	標的	プロトコール
CEA-DOTAM (PRIT-0213)	T84.66	103, 116, 131, 146, 154
DIG-DOTAM (PRIT-0175)	ジゴキシゲニン	103, 151, 152, 154
CD20-DOTAM (P1AD9826)	CD20	151, 162
HER2-DOTAM (P1AD9827)	HER2	152
P1AE1766	CH1A1A	154
P1AE1767	CH1A1A	154
P1AE1768	CH1A1A	154
P1AE1769	CH1A1A	154
P1AE1770	CH1A1A	154

【表64】

除去剤

化合物	プロトコール
Pb-DOTAM-デキストラン-500	103, 116, 131,
Ca-DOTAM-デキストラン-500	146, 151, 152, 154, 162

【表 6 5】

放射標識されたキレート(サプライヤー: Orano Med)

化合物	クエンチング	プロトコール
^{212}Pb -DOTAM	Cu	103, 116, 131
^{212}Pb -DOTAM	Ca	131, 146, 151, 152, 154, 162
^{212}Pb -DOTAM	Zn	131
^{212}Pb -DOTAM	Gd	131
^{212}Pb -DOTAM	Pb	131
^{203}Pb -DOTAM-CEA-DOTAM	Cu	121
^{203}Pb -DOTAM-DIG-DOTAM	Cu	121
^{212}Pb -DOTAM-CD20-DOTAM	Ca	162

10

20

【0735】

腫瘍モデル

使用される腫瘍細胞株およびマウスにおける接種のための注射量は、下の表「腫瘍細胞株」に記載されている。BxPC3は、CEAを天然に発現するヒト初代膵臓腺癌細胞株である。BxPC3細胞は、10%ウシ胎仔血清（GE Healthcare Hyclone SH30088.03）を強化したRPMI-1640培地、GlutaMAX（商標）Supplement、HEPES（Gibco、参照番号72400-021）において培養した。HPAF-II（CRL-1997）は、CEAを天然に発現するヒト膵臓腺癌細胞株である。HPAF-II細胞は、10%標準ウシ胎仔血清、1%GlutaMAX 100×、1%MEM NEAA（最小必須培地非必須アミノ酸）100×（Gibco 11140-035）および1%ピルビン酸ナトリウム（100mM；Gibco 11360-070）を強化したEMEM培地（Gibco 31095-029）において培養した。WSU-DLCL2は、CD20を天然に発現するヒトB細胞リンパ腫細胞株である。WSU-DLCL2細胞は、10%ウシ胎仔血清を強化したRPMI-1640培地（Gibco、参照番号72400-021）において培養した。NCI-N87は、HER2を天然に発現する胃がん細胞株である。NCI-N87細胞は、10%ウシ胎仔血清を強化したRPMI-1640培地（Gibco、参照番号72400-021）において培養した。固形異種移植片は、Corning（登録商標）Matrigel（登録商標）基底膜マトリックス（増殖因子低下；カタログ番号354230）と1：1混合したRPMIまたはDMEM培地における細胞の右側腹部への皮下注射により、試験0日目に各SCIDマウスにおいて確立した。

30

40

50

腫瘍細胞株

細胞株	マウス 1 匹あたりの細胞数	注射体積	プロトコール	サプライヤー
BxPC3	5×10^6	100 μ L	103, 116, 121, 131, 146	ECACC*
HPAF-II (CRL-1997)	1×10^6	100 μ L	114, 154	ATCC**
WSU-DLCL2	1.5×10^6	100 μ L	151, 162	DSMZ***
NCI-N87	1.5×10^6	100 μ L	152	ATCC**

*欧州認証細胞培養物コレクション(英国、ソールズベリー)

**アメリカ培養細胞系統保存機関(米国バージニア州マナサス)

***Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(ドイツ、ブラウンシュヴァイク)

【 0 7 3 6 】

試験

実施例 3 1：腫瘍モデルにおける C E A – P R I T の有効性（プロトコール 1 0 3）

本試験は、マウスにおける s . c . B x P C 3 腫瘍の処置のために C E A – D O T A M B s A b を使用して C E A – P R I T の有効性を評価した。治療法は、1 0 もしくは 3 0 μ C i の ^{212} P b – D O T A M による単一処置として、または 2 種の放射能レベルのいずれかのための 3 回の反復サイクルにおいて投与した。非 C E A 結合コントロール抗体（D I G – D O T A M）、C E A – D O T A M B s A b 単独（放射能なし）および処置なし（P B S）を使用した P R I T との比較を行った。第 1 および第 2 のサイクル後に体内分布検査を行って、 ^{212} P b – D O T A M 標的化およびクリアランスを確認し、T G I、T R および生存の観点から処置有効性を評価した。試験を通してマウスを慎重にモニターして、異なる処置スケジュールの忍容性を評価した。試験概要を図 4 2 に示す。

【 0 7 3 7 】

試験設計

プロトコール 1 0 3 の経時変化および設計を下の表に示す。

10

20

30

40

50

プロトコール 103 の経時変化

試験日	実験手順	
0	BxPC3 細胞の s.c.注射	
20	PRIT BsAb の i.v.注射(群 C～G、J～L)	
21	PRIT BsAb の i.v.注射(群 A、B、H、I)	
24	CA の i.v.注射(群 C～G、J～L)	10
24	^{212}Pb -DOTAM の溶出	
24	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射(群 C～G、J～L)	
25	安楽死および組織採集+ガンマ計数(群 J)	
25	CA の i.v.注射(群 A、B、H、I)	
25	^{212}Pb -DOTAM の溶出	
25	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射(群 A、B、H、I)	20
26	安楽死および組織採集+ガンマ計数(群 H)	
34	PRIT BsAb の i.v.注射(群 B、D～G、I、K、L)	
38	CA の i.v.注射(群 B、D～G、I、K、L)	
38	^{212}Pb -DOTAM の溶出	
38	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射(群 B、D～G、I、K、L)	
39	安楽死および組織採集+ガンマ計数(群 I、K、L)	30
48	PRIT BsAb の i.v.注射(群 B、D～G)	
52	CA の i.v.注射(群 B、D～G)	
52	^{212}Pb -DOTAM の溶出	
52	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射(群 B、D～G)	

40

50

プロトコール 103 における試験群

群	n	BsAb	BsAb 用量 (μg)	Pb-DOTAM- デキストラン- 500 用量 (μg)	キレート	^{212}Pb 放 射能 (μCi)	サイクル
A	10	CEA-DOTAM	100	25	^{212}Pb -DOTAM	10	1
B	10	CEA-DOTAM	100	25	^{212}Pb -DOTAM	10	3
C	10	CEA-DOTAM	100	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1
D	10	CEA-DOTAM	100	25	^{212}Pb -DOTAM	30	3
E	10	CEA-DOTAM	100	0	—	0	3
F	10	DIG-DOTAM	100	25	^{212}Pb -DOTAM	30	3
G	10	—	0	0	—	0	3
H	3	CEA-DOTAM	100	25	^{212}Pb -DOTAM	10	1
I	3	CEA-DOTAM	100	25	^{212}Pb -DOTAM	10	2
J	3	CEA-DOTAM	100	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1
K	3	CEA-DOTAM	100	25	^{212}Pb -DOTAM	30	2
L	3	DIG-DOTAM	100	25	^{212}Pb -DOTAM	30	2

【0738】

右側腹部へのRPMI/Matrigelにおける 5×10^6 個の細胞（継代24）のs.c.注射により、試験0日目に各SCIDマウスにおいて固形異種移植片を確立した。腫瘍細胞注射20日後に、 290mm^3 の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。

【0739】

ロジスティックな理由により、上の表に記載されている通り初日における群C、D、E、F、G、J、KおよびLのBsAbまたはPBS注射、続いて翌日における群A、B、HおよびIのBsAb注射により、2日間の経過中に処置を開始した。4日後に、CAを注射し、続いて2時間後に、 ^{212}Pb -DOTAMまたはPBSを注射した。30または $0\mu\text{Ci}$ を受ける群が、先ず注射され、続いて翌日、 $10\mu\text{Ci}$ を受ける群が注射される。群B、D、E、F、G、I、KおよびLは、放射能注射間が2週間で複数の処置を受けた。全ての反復処置サイクル（第2および第3）は、同時に始めた、すなわち、全マウスは、同日にBsAbまたはPBS注射を受け、続いて、CAおよび ^{212}Pb -DOTAMまたはPBSを4日後に受けた。安楽死の時点で群A～Gから次の臓器および組織を採集した：膀胱、卵巣、肝臓、脾臓、腎臓、大腿骨（骨髄を含む）、結腸、空腸、胃および腫瘍。

【0740】

群HおよびJにおけるマウスは、 ^{212}Pb -DOTAMのそれらの第1のかつ唯一の注射の24時間後に殺し剖検した；群I、KおよびLは、それらの第2の ^{212}Pb -DOTAM注射の24時間後に殺し剖検した。安楽死時に放射能測定のために、血液、膀胱、小腸、結腸、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、肺、心臓、大腿骨、筋肉、尾および腫瘍を採集した。

【0741】

結果

24時間p.i.の ^{212}Pb のin vivo分布は、図43から分かる通り、皮下BxPC3腫瘍における高い取り込みおよび正常組織における低い蓄積を実証した。CEA-DOTAMによってプレターゲティングされた腫瘍および非CEA結合BsAbDIG-DOTAMによってプレターゲティングされた腫瘍の間の有意差は、処置の高い特異

性を確認した。シダックの多重比較検定による一方向分散分析 (ANOVA) は、1 (50.3% ID/g) および 2 (43.0% ID/g) 回の 10 μ Ci 注射の間にも、1 (37.6% ID/g) および 2 (24.1% ID/g) 回の 30 μ Ci 注射の間にも、²¹²Pb の平均腫瘍取込みに有意差がなかったことを示した。同様に、1 サイクルの 10 μ Ci および 1 サイクルの 30 μ Ci の投与の間に有意差はなかった ($p > 0.05$)。しかし、いずれかの CEA-DOTAM 処置と比較した DIG-DOTAM によりプレターゲットティングされた腫瘍における 2 サイクルの 30 μ Ci (2.9% ID/g) 後の腫瘍取込みと同様に、腫瘍取込みは、2 サイクルの 10 μ Ci と比較して、2 サイクルの 30 μ Ci の後に有意により低かった。図 43 のパネル B は、% ID/g が、様々な処置群内で、異なるサイズの腫瘍に関して匹敵したことを示す。

10

【0742】

平均腫瘍発達および個々の腫瘍増殖曲線をそれぞれ図 44 および図 45 に示す。20 ~ 24 日目までに全群がその腫瘍体積を倍加させた。24 日目に第 1 の ²¹²Pb-DOTAM 処置を与え、その後、CEA-DOTAM 群における腫瘍は、縮み始める前に、およそ 1 週間増殖し続けた。腫瘍は完全には縮小しなかったが、複数の処置群 (B および D) の体積は、52 日目の最後の処置まで相対的に一定のままであった。10 または 30 μ Ci のいずれかで 1 回のみ注射したマウスにおける腫瘍は、44 日目に再増殖を開始したが、より高い放射能を受ける腫瘍は、僅かによりゆっくりした増殖速度を有した。DIG-DOTAM を有する非特異的 PRIT は、CEA-DOTAM 単独またはビヒクルと比較して、統計的に有意だが限られた TGI をもたらした。2 種の後者コントロール群は、同一の腫瘍発達を示した。

20

【0743】

手段に基づき全処置群を解析することができる最後の日である 63 日目に、TGI は、処置なしと比較して、それぞれ群 A、B、C、D、E および F に関して、57.2、89.8、77.7、96.6、-6.2 および 67.3% であった。ビヒクルコントロール群における最後のマウスは、74 日目に相当し、この時点で、TGI は、それぞれ残っている 4 群：A、B、C および D に関して 48.5、83.3、63.5 および 95.7% であった。試験は、最後の残っているマウス (群 D) の安楽死により、細胞注射後 118 日目に終結した。

【0744】

30

ログランクおよびウィルコクソン検定を行って、いずれの群が生存の観点から有意に異なったか指定し、結果を下の 2 つの表に示す。全ての CEA-DOTAM PRIT レジメンは、3 種のコントロール群と比較して生存を有意に増加させた。全生存は、3 サイクルの 10 μ Ci 後に、単一の 10 μ Ci サイクル後よりも僅かに優れていた ($p = 0.0110$) が、3 サイクルの 10 μ Ci および CEA-DOTAM プレターゲットティングによる 30 μ Ci レジメンのいずれかの間に有意差はなかった。カプラン・マイヤー生存曲線を図 46 に示す。

40

50

ペア毎のログランク検定(多重検定レベル=0.00238)

群	ビヒクル (PBS)	CEA- DOTAM 単独	CEA- DOTAM 10 μ Ci $\times$ 1	CEA- DOTAM 10 μ Ci $\times$ 3	CEA- DOTAM 30 μ Ci $\times$ 1	CEA- DOTAM 30 μ Ci $\times$ 3	DIG- DOTAM 30 μ Ci $\times$ 3
ビヒクル (PBS)	1.0000	0.3197	0.0005*	<.0001*	<.0001*	0.0043*	0.5588
CEA-DOTAM 単独	0.3197	1.0000	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0024*	0.8491
CEA-DOTAM 10 μ Ci $\times$ 1	0.0005*	<.0001*	1.0000	0.0110*	0.1114	0.1562	0.0002*
CEA-DOTAM 10 μ Ci $\times$ 3	<.0001*	<.0001*	0.0110*	1.0000	0.0980	0.8798	<.0001*
CEA-DOTAM 30 μ Ci $\times$ 1	<.0001*	<.0001*	0.1114	0.0980	1.0000	0.3839	<.0001*
CEA-DOTAM 30 μ Ci $\times$ 3	0.0043*	0.0024*	0.1562	0.8798	0.3839	1.0000	0.0034*
DIG-DOTAM 30 μ Ci $\times$ 3	0.5588	0.8491	0.0002*	<.0001*	<.0001*	0.0034*	1.0000

10

ペア毎のウィルコクソン検定(多重検定レベル=0.00238)

群	ビヒクル (PBS)	CEA- DOTAM 単独	CEA- DOTAM 10 μ Ci $\times$ 1	CEA- DOTAM 10 μ Ci $\times$ 3	CEA- DOTAM 30 μ Ci $\times$ 1	CEA- DOTAM 30 μ Ci $\times$ 3	DIG- DOTAM 30 μ Ci $\times$ 3
ビヒクル (PBS)	1.0000	0.3792	0.0009*	<.0001*	<.0001*	0.0255*	0.4931
CEA-DOTAM 単独	0.3792	1.0000	0.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0130*	1.0000
CEA-DOTAM 10 μ Ci $\times$ 1	0.0009*	0.0001*	1.0000	0.0033*	0.0370*	0.3590	0.0005*
CEA-DOTAM 10 μ Ci $\times$ 3	<.0001*	<.0001*	0.0033*	1.0000	0.1007	0.5963	<.0001*
CEA-DOTAM 30 μ Ci $\times$ 1	<.0001*	<.0001*	0.0370*	0.1007	1.0000	0.8797	<.0001*
CEA-DOTAM 30 μ Ci $\times$ 3	0.0255*	0.0130*	0.3590	0.5963	0.8797	1.0000	0.0122*
DIG-DOTAM 30 μ Ci $\times$ 3	0.4931	1.0000	0.0005*	<.0001*	<.0001*	0.0122*	1.0000

20

30

【0745】

有害事象および毒性

倫理的な理由からマウスの 殺を動機づける観察された有害事象は、2群に選別することができる：1) 腫瘍状態および2) 放射線誘発毒性。第1の群は、壊死性および／または潰瘍性腫瘍を指し、これは、マウスが、自身のまたはケージ仲間の腫瘍区域を「清潔にする」よう促す。このステージに達したマウスは、苦痛を回避するため直ちに安楽死させた。

40

【0746】

第2の群の有害事象は、放射線誘発毒性の典型的症状、例えば、BW減少、下痢および嗜眠を含んだ。図47は、治療群におけるBW発達を示す。30 μ Ciの²¹²Pb-DOTAMを注射した全マウスは、初期BW降下を経験し、これは、第1の放射能注射後8日目までに軽減された。複数の30 μ Ci注射を投与した群(DおよびF)は、より延長したBW減少を患った。BW減少は、複数の注射であっても、10 μ Ciを受けた群(AおよびB)において軽度であった。よって、10および30 μ Ciの²¹²Pb-DOTAM

50

を受けたマウスの間に明らかな差が認知された。反復 $10 \mu\text{Ci}$ 処置の後であっても、マウスは、全般に、有害毒性の主要徴候を呈さなかった。1 サイクルの $30 \mu\text{Ci}$ で処置したマウスは、一過性体重減を表したが、回復した。しかし、第2および第3の $30 \mu\text{Ci}$ サイクルは、より大規模な有害毒性をもたらし、BW減少ならびに疼痛および／または不快の徴候の組合せにより、多数の動物を 殺させた。このことから、 $10 \mu\text{Ci}$ が、適用される条件下で、安全な放射能レベルである一方、 $30 \mu\text{Ci}$ が、最大耐容放射能に近づいていると結論付けることができる。

【0747】

結論

本出願人らは、単剤療法レジメンとして与えると、反復 CEA-PRIT と 10 または $30 \mu\text{Ci}$ の ^{212}Pb -DOTAM が、生存および TGI の有意な増加をもたらしたが、この設定において、完全腫瘍根絶も持続性腫瘍制御ももたらさなかったと結論付ける。経時的な腫瘍制御を維持しつつ放射線誘発毒性を回避するために、これらの結果は、 $30 \mu\text{Ci}$ 未満だが $10 \mu\text{Ci}$ を超える ^{212}Pb -DOTAM の使用を示唆する。

【0748】

実施例 32：CEA-PRIT のための BSAb および CA 注射間の適切な時間の選択（プロトコル 116 および 121）

プロトコル 116 および 121 は、高い腫瘍取込みおよび均一な腫瘍内 BSAb 分布に基づいて、CEA-PRIT のための BSAb および CA 注射間の適切な時間の選択をガイドするように設計した。プロトコル 116 は、免疫蛍光染色によって検出される、i.v. 注射後 4、7 および 14 日目に、BxPC3 モデルにおける CEA 発現と比較して腫瘍内 BSAb 分布を評価した。プロトコル 121 は、1、4、7 および 10 日後の BxPC3 腫瘍における、鉛-203 (^{203}Pb) で直接的に標識した BSAb の蓄積を評価した。BSAb は、 ^{212}Pb （半減期 10.6 時間）と比較してより長い期間にわたり発達を追跡することができるように、Pb 同位体 ^{203}Pb （半減期 2.2 日間）で標識した。

【0749】

試験設計

プロトコル 116 および 121 の経時変化および設計を下の 4 つの表に示す。

10

20

30

40

50

プロトコール 116 の経時変化

試験日	実験手順
0	BxPC3 細胞の s.c.注射(群 A、B、C、D、E)
0*	BxPC3 細胞の s.c.注射(群 F、G)
20	PRIT BsAb の i.v.注射(群 A、B、C、D、E)
18*	PRIT BsAb の i.v.注射(群 F、G)
24	CA の i.v.注射(群 C)
24	安楽死および剖検(群 A、B、C; 4 日 p.i.)
22*	CA および ^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射(群 F、G)
27	安楽死および剖検(群 D; 7 日 p.i.)
34	安楽死および剖検(群 E; 14 日 p.i.)
32*	PRIT BsAb の i.v.注射(群 F)
36*	安楽死および剖検(群 F、G)

10

20

プロトコール 116 における試験群

群	n	BsAb	BsAb (μg)	時間 (日)	CA (μg)	時間 (時)	^{212}Pb (μCi)	PRIT サイ クル	試料採取 時間(日)
A	2	—	0	—	0	—	0	—	4
B	3	CEA-DOTAM	100	—	0	—	0	—	4
C	3	CEA-DOTAM	100	4	25	2	0	—	4
D	3	CEA-DOTAM	100	—	0	—	0	—	7
E	3	CEA-DOTAM	100	—	0	—	0	—	14
F	3	CEA-DOTAM	100	4	25	2	10	2	4*
G	3	CEA-DOTAM	100	4	25	2	10	1	4*

30

*第 2 の BsAb 注射(^{212}Pb -DOTAM の 1.5 週間後に開始)後の日数

40

50

プロトコール 121 の経時変化

試験日	実験手順
0	BxPC3 細胞の s.c. 注射
20	^{203}Pb -DOTAM-BsAb の i.v. 注射
21	安楽死および剖検(群 A; 1 日 p.i.);組織のガンマ計数
24	安楽死および剖検(群 B、E;4 日 p.i.);組織のガンマ計数
27	安楽死および剖検(群 C; 7 日 p.i.);組織のガンマ計数
30	安楽死および剖検(群 D; 10 日 p.i.);組織のガンマ計数

10

プロトコール 121 における試験群

群	n	^{203}Pb -BsAb	BsAb (μg)	時間 (日)	CA (μg)	時間 (時)	^{203}Pb (μCi)	試料採取時間 (日)
A	5	CEA-DOTAM	100	—	0	—	20	1
B	5	CEA-DOTAM	100	—	0	—	20	4
C	5	CEA-DOTAM	100	—	0	—	20	7
D	5	CEA-DOTAM	100	—	0	—	20	10
E	5	DIG-DOTAM	100	—	0	—	20	4

20

【 0 7 5 0 】

固形異種移植片は、B x P C 3 細胞の s . c . 注射により確立した。接種 1 9 日後に、プロトコール 1 1 6 におけるマウスは、 227mm^3 の平均腫瘍体積により実験群へと選別した。プロトコール 1 2 1 において、平均腫瘍体積は、2 0 日後に 203mm^3 であった。

30

【 0 7 5 1 】

免疫蛍光染色

プロトコール 1 1 6 におけるマウスを安楽死の後に剖検し、脾臓、腎臓、肝臓、筋肉および腫瘍を採集した。収集された組織を 2 つの小片に分割した：一方は、T i s s u e - T e k (登録商標) 最適切削温度 (O C T) 包埋化合物を含有する凍結用の型 (cryomold) に入れ、急速凍結のためにドライアイスの上に置き、他方は、1 0 % 中性緩衝ホルマリン (N B F) 中で 2 4 時間固定し、次いで、パラフィン包埋まで貯蔵のために P B S に移した。O C T 中の凍結した試料は、切片作製まで -80°C で維持した。下表に収載されている試薬を使用して、組織学的染色を行った。

40

50

プロトコール 116 における組織学的染色に使用される試薬

化合物	ロット/参照番号	濃度/希釈	サプライヤー
ウサギ IgG 抗ヒト CEA(クローン T84.66)	P1AD5732	1 μg/mL	Roche Glycart
ヤギ抗ウサギ IgG(H+L)高度交差吸着二次抗体、 Alexa Fluor 488	A11034	1/400	Fisher
ヤギ抗ヒト IgG(H+L)交差吸着二次抗体、Alexa Fluor 555	A21433	1/300	Fisher
ブロッキング血清(ヤギ)	G9023-10ML	5%	Sigma
ヘキスト染色	94403-1ML	1/1000	Sigma

【0752】

CEAの染色

凍結した腫瘍は、Leica CM1850 UVクライオトーム (cryotome) を使用して、12 μmスライスとなるよう切片作製し、-20℃でスライドを貯蔵した。染色前に、スライドを1時間室温 (RT) で解凍し、次いで、PBS (1×、pH 7.4) で5分間、続いて冷アセトン (-20℃) において5分間、もう一度PBSで5分間洗浄した。紙片を組織の周りに置いてスライドを乾燥させ、疎水性のペン (Dako; Agilent) を使用して組織を囲むように丸を描いた。1時間RTにおいて、400 μLのブロッキング血清 (ヤギ) と共に切片のインキュベーションを行った。ブロッキング血清を除去し、200 μLの一次抗体 (ウサギIgG抗ヒトCEA) を切片に添加し、続いて暗くしたチャンバー内で一晩4℃でインキュベーションした。2日目に、切片を10分間PBSで2回洗浄し、400 μLのブロッキング血清を添加した。1時間RTにおけるインキュベーション後に、ブロッキング血清を除去し、200 μLの二次抗体 (Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギIgG) および対比染色 (ヘキスト) を切片に添加し、続いて暗くしたチャンバー内で2時間RTでインキュベーションした。次に、スライドを10分間PBSで2回洗浄した。最後に、蛍光マウント用培地 (Dako S3023; Agilent) およびカバーガラスをスライドに加え、その後これを風乾させ、-20℃の暗所に貯蔵した。染色したスライドの解析は、Zeiss Axio Scope. A1モジュラー顕微鏡を使用して行った。

【0753】

CEA-DOTAMの染色

凍結した腫瘍切片は、一次抗体の代わりにPBSを用いた以外は上のCEA染色について記載されている通りに、貯蔵および処理した。二次抗体は、Alexa Fluor 555で標識したヤギ抗ヒトIgGであった。

【0754】

H&E染色

プロトコール116由来の凍結した腫瘍切片のヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) 染色は、Leica Autostainer XL自動スライド染色装置を使用して行った。

【0755】

体内分布

プロトコール121におけるマウスは、体内分布を調べる目的のため 殺し、終結後に後眼窩出血によりその血液を収集した。加えて、膀胱、小腸、結腸、脾臓、膵臓、腎臓、胃、肝臓、肺、心臓、脳、大腿骨、筋肉、皮膚、尾および腫瘍を安楽死後に採集し、放射能に関して測定した。

【0756】

結果

免疫蛍光染色 — プロトコール 1 1 6

未処置コントロールは、収集した腫瘍に均一に分布した高レベルの C E A を呈した。C E A - D O T A M B s A b のコントロール染色は、予想通りシグナルをもたらしなかった。

【0 7 5 7】

C E A - D O T A M B s A b を注射したマウス由来の腫瘍を 4、7 および 1 4 日 p . i . に採取した。4 日目に、B s A b は、組織内の腫瘍細胞小結節の境界を完全に覆っていたが、より大きい小結節には完全に浸透した訳ではなかった。これは、明るく赤色の境界にある細胞層に囲まれた、より暗いヘキスト染色区域の存在によって示される。7 日後に、C E A - D O T A M 染色由来のシグナルは、より均一に分布しているように見え、暗い内部区域を有するより少ない腫瘍細胞構造が存在した。1 週間後、1 4 日 p . i . に、蛍光シグナルの分布は、7 日間時点と同様のままであったが、全体的により低いシグナルであった。

【0 7 5 8】

2 1 2 P b - D O T A M の照射を含む全 P R I T サイクルを投与した 2 群由来の腫瘍試料は、放射線誘発性細胞死による壊死区域を呈した。知見は、細胞膨張、細胞細部の喪失（ゴースト細胞）、一部の核非定型性（nuclear atypia）、および間質性線維症の潜在的増加を含んだ。第 1 の B s A b 注射の 2 週間後に C E A - D O T A M の第 2 の用量を受けた群 F におけるマウス由来の腫瘍は、高く均一な C E A 発現を保持し、第 2 の B s A b 注射の 4 日間後の C E A - D O T A M 分布は、非照射腫瘍のものに似ていた、すなわち、B s A b は、腫瘍の全ての C E A 発現部分に分布したが、ある特定のより大きい構造への浸透は限られており、画像上により暗い区域をもたらし、対応するコントロール試料は、初期 P R I T サイクル後に第 2 の B s A b 注射を受けなかった群 G から同時に取得した。これらの腫瘍切片において、C E A - D O T A M 染色に微かなシグナルを観察することができ、ある量の B s A b が、注射 1 8 日後に依然として腫瘍結合性であったことを示す。

【0 7 5 9】

体内分布 — プロトコール 1 2 1

B x P C 3 腫瘍を有する S C I D マウスにおける平均 ^{203}Pb 蓄積およびクリアランスを図 4 8 に示す。C A の助けなしの抗体から予想される通り、血液クリアランスはゆっくりであった。正常臓器または組織において、標識 B s A b の予想外の取り込みがないことが明らかになった。注射 1 日後の 4 9 % I D / g の平均から開始し、それぞれ 4、7 および 1 0 日目に 1 3 0、1 8 9 および 1 9 7 % I D / g へと増加する、経時的な腫瘍蓄積を図 4 9 に示す。標識ネガティブコントロールは、注射後 4 日目に 3 % I D / g により、腫瘍蓄積をもたらしなかった。

【0 7 6 0】

シダックの多重比較検定を使用した一方向分散分析（A N O V A）により統計解析を行って、異なる時点での腫瘍取込みにおける認知される差が有意であったか評価した。検定によると、有意な ^{203}Pb 蓄積増加は、1 および 7 日目、ならびに 1 および 1 0 日目の間でのみ達成された；他の時点は互いに有意に異ならなかった。独立 t 検定を使用した単なる 4 対 7 日間の検定は、7 日間に統計的に有意な増加をもたらした（ $p = 0.0468$ ）、一方、7 対 1 0 日間に対応する検定を行っても、有意な増加は見られなかった（ $p = 0.8316$ ）。

【0 7 6 1】

結論

結果は、注射 4 および 7 日後の間で腫瘍における ^{203}Pb - B s A b 取り込みの全体的な増加を示したが、時間間隔を 1 0 日間に拡張した場合に、さらなる改善は達成されなかった。顕微鏡下で、腫瘍への B s A b 浸透は、4 日後と比較して、7 日後に改善された。1 4 日時点での利益は見られず、この時点までに、全体的な蛍光シグナルは、腫瘍内分布を改善することなく、減少するように思われる。本試験は、4 日間よりも、7 日間の B

s A b - C A 時間間隔を選ぶことを支持する。

【0762】

実施例33：体内分布（腫瘍および正常組織への吸収放射線量の推定のための、i n v i v o ²¹²Pb-DOTAM 分布データ）（プロトコル146）

プロトコル146は、s.c. BxPC3 腫瘍を保有するSCIDマウスにおける、腫瘍および正常組織への吸収放射線量の推定のために、PRIT後のi n v i v o ²¹²Pb-DOTAM 分布データをもたらすように設計した。Caを使用して²¹²Pb-DOTAMのクエンチングを行った（実施例34を参照）。

【0763】

CEA-DOTAM BsAb、続いて7日後、CAの注射により、プレターゲティングを行った。24時間後に、²¹²Pb-DOTAMを投与した。放射能注射5分後から48時間後の複数の時点で、マウスの群を殺し、放射能測定のために血液および臓器を採集した。代謝ケージの使用により、選択された時点で排泄物をサンプリングして、放射能化合物の排泄率を評価した。その結果生じる時間-放射能曲線を使用した確立された方法により、吸収線量を最後に計算した。

【0764】

試験設計

プロトコル146の経時変化および設計を下の2つの表に示す。

プロトコル146の経時変化

試験日	実験手順
0	BxPC3 細胞の s.c.注射
21	PRIT BsAb の i.v.注射
28	CA の i.v.注射
29	²¹² Pb-DOTAM の溶出
29	²¹² Pb-DOTAM の i.v.注射
29	安楽死および剖検(5 分～6 時間 p.i.);組織のガンマ計数
30	安楽死および剖検(24 時間 p.i.);組織のガンマ計数
31	安楽死および剖検(48 時間 p.i.);組織のガンマ計数

プロトコル146における試験群

群	n	BsAb (μg)	時間 (日)	CA (μg)	時間 (時)	²¹² Pb (μCi)	DOTAM クエンチ	試料採取時間
A	5	100	7	25	24	20	Ca	5 分
B	5	100	7	25	24	20	Ca	30 分
C	5	100	7	25	24	20	Ca	2 時間
D	5	100	7	25	24	20	Ca	6 時間
E	5	100	7	25	24	20	Ca	24 時間
F	5	100	7	25	24	20	Ca	48 時間

【0765】

固形異種移植片は、8週齢SCIDマウス（Envigo）へのBxPC3細胞のs.c.注射により確立した。接種28日後に、310mm³の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。

【0766】

群EおよびFにおけるマウスは、焼却処理した床の代謝ケージ内に、個々に収容した（すなわち、1ケージにつき1匹のマウス）。放射能注射2、6および24時間後に、各ケージから尿および糞便を収集し、放射能に関して個々の試料をその後測定した。群Fにおけるマウスは、24時間p.i.に通常ケージに移した。

【0767】

終結前に後眼窩出血により全マウスから血液／血清を収集した。安楽死の後に、放射能測定および%ID/gの計算のため、次の追加的な臓器および組織を採集した：膀胱、子宮、小腸、結腸、脾臓、膵臓、腎臓、胃、肝臓、肺、心臓、脳、大腿骨、皮膚、筋肉、腹部脂肪、尾および腫瘍。

【0768】

照射線量測定

医療内部被ばく線量（Medical Internal Radiation dose）（MIRD）委員会のパンフレット21号（Bolch WE、Eckerman KF、Sgouros GおよびThomas SR. J Nucl Med 2009；50：477～484）に概要が述べられている形式に従って、吸収線量を計算した。公式には、標的組織または領域 r_T における吸収線量 $D(r_T)$ は、全ての供給源領域 r_S を合計した、単位放射能あたりの吸収線量率 $S(r_T \leftarrow r_S)$ を乗じた、放射能 $A(r_S, t)$ の時間積分として計算される。²¹²Pb崩壊系列によって放出された圧倒的多数のエネルギーが、アルファ線に由来し、さらに、アルファ線のはるかにより高い生物学的有効性（相対生物学的有効性、RBEによって特徴づけられる通り）によると仮定すると、次の2つの見積もりが得られた：

1. エネルギーは、アルファ粒子の短い範囲により、局所的に吸収され、これは、項 $S(r_T \leftarrow r_T)$ のみが考慮されることを意味し、
2. ベータおよびガンマ線からの寄与が無視される。

【0769】

アルファ崩壊によって放出されるエネルギー、またはむしろ、ここで単位J/($\mu Ci \cdot h$)で表現される²¹²Pbの崩壊系列におけるアルファ崩壊によって放出される平均エネルギーの和である $\Delta\alpha$ により、標的組織または領域 r_T における吸収線量は、次式によって計算される：

$$D_{\alpha}(r_T) = \sum_{r_S} \int_0^{\infty} A(r_S, t) \cdot S(r_T \leftarrow r_S) \cdot dt = \Delta_{\alpha} \cdot \int_0^{\infty} \frac{A(r_T, t)}{M(r_T)} \cdot dt$$

【0770】

計算は、[%ID/g]_tとして表現される、時間tにおける複合（平均）崩壊補正放射能濃度に基づく。第1のステップにおいて、これは、標的組織 r_T に関する組織重量1kgあたりの μCi としての放射能濃度へと転換される：

$$\frac{A(r_T, t)}{M(r_T)} = \frac{A_0[\mu Ci]}{100\%} \cdot e^{-\lambda \cdot t} \cdot [\%ID/g]_t \cdot 1000 \frac{g}{kg}$$

$A_0[\mu Ci]$ は、注射された放射能であり、 λ は、²¹²Pbの指数関数的崩壊速度0.0651h⁻¹（10.6時間の半減期に対応）である。

【0771】

第2のステップにおいて、放射能濃度は、組織毎に時間について積分された。これは、薬物動態ソフトウェアPhoenix WinNonlin 6.4（Certara U

10

20

30

40

50

S A、I n c.、米国08540ニュージャージー州プリンストン、スイート101、100オーバーlookセンター(100 Overlook Center, Suite 101)における「線形対数台形計算方法」を使用して達成された。モデルタイプ「P l a s m a」を均一重み付けにより使用した。

【0772】

最終ステップにおいて、放射能濃度の時間積分に、エネルギー放出 $\Delta \alpha = 170 \cdot 10^{-6} \text{ J} / (\mu \text{Ci} \cdot \text{h})$ を乗じることにより、吸収線量を計算した。その上、MIRDパンフレット22号(S g o u r o s G、R o e s k e J C、M c D e v i t t M Rら、J N u c l M e d 2010; 51: 311~328)に示唆される通り、5のRBEを使用して、RBE重み付け吸収線量を計算した。

10

【0773】

結果

体内分布

腫瘍を有するS C I Dマウスにおける平均 ^{212}Pb 蓄積およびクリアランスを図50に示す。放射能蓄積は、腫瘍において高く、既に注射5分後に17% I D / gであり、6時間p. i. までに40%超に増加し、当該レベルで少なくとも48時間残っていた。腫瘍がない状態と比較して、正常組織において、大きな差は発見されなかった。

【0774】

吸収線量

プロトコル146のために計算されたG y単位の平均吸収線量を表24に、絶対値として(RBE=1)、およびアルファ放射体のより高い細胞毒性に対する補正して(RBE=5)の両方で示す。S C I Dマウスに関して、平均体重は、18.5 gであった; $20 \mu \text{Ci}$ の注射された ^{212}Pb 放射能により、これは、 $1.1 \mu \text{Ci} / \text{g}$ 体重の正規化された注射された放射能をもたらした。

20

【0775】

およそ20 G yの吸収線量が、腫瘍において達成されたが、吸収線量は、膀胱を除いた大部分の正常組織において2 G yをはるかに下回ったままであった。膀胱における ^{212}Pb 含有量は、個々のマウスの間で有意に異なり、この組織に対する高い可変性を示す。RBE補正された線量を提供して、外部ガンマ線を使用した放射線療法との比較を可能にし、注射した $^{212}\text{Pb-DOTAM}$ の $20 \mu \text{Ci}$ あたりおよそ100 G yの腫瘍への推定吸収線量をもたらした。

30

40

50

20 μCi ^{212}Pb -DOTAM の注射後の収集された臓器および組織への平均吸収線量(Gy)

臓器/組織	プロトコール(Protocol)146 プレターゲティングされた ^{212}Pb -DOTAM (腫瘍を有する SCID)	
	RBE = 1	RBE = 5
腹部脂肪	1.25	6.25
膀胱	6.53	32.64
血液	0.72	3.60
脳	0.04	0.19
結腸	0.43	2.17
大腿骨	0.27	1.33
心臓	0.33	1.63
腎臓	1.43	7.14
肝臓	0.22	1.09
肺	1.34	6.69
筋肉	0.29	1.47
脾臓	0.36	1.80
血清	1.64	8.20
皮膚	0.47	2.33
小腸	0.22	1.08
脾臓	0.27	1.36
胃	0.24	1.20
尾	0.54	2.69
子宮	0.61	3.04
腫瘍(BxPC3)	19.91	99.55

10

20

30

【0776】

結論

およそ20 Gyの吸収線量が、腫瘍において達成されたが、大部分の正常組織における吸収線量は、2 Gyをはるかに下回ったままであった。全体的に見て、本試験は、評価されるPRIITレジメンを使用した、用量規制毒性の主要リスクを示さなかった。

【0777】

実施例34：非キレート化DOTAMのクエンチング（プロトコール131）

アルファ放射体 ^{212}Pb は、トリウム含有樹脂からの溶出後にDOTAMにキレート化され、薬理的に活性な ^{212}Pb -DOTAMを産生する。放射標識後に、過剰(>99%)な遊離非キレート化DOTAMが、溶液中に残り、環境から金属イオンを容易に捕捉する。患者への注射後に、これは、循環中の Ca^{2+} に急速に結合し、薬理的に不活性な Ca-DOTAM を形成するであろう。 CEA-DOTAM B s A bは、 Pb-DOTAM に優先的に結合するように設計されているが、匹敵する程度で Ca-DOTAM とも安定した複合体を形成するであろう。結果として、プレターゲティングされた腫瘍部位からの ^{212}Pb -DOTAMのブロックが、飽和条件で起こり得、PRIIT処置の有効性を潜在的に減少させる。したがって、潜在的な競合を回避するために、クエンチングステップが、 ^{212}Pb -DOTAM溶出プロセスに加えられ、それによると、金属イオン(「X」)が、有意により高い解離定数(K_d)を有する「X-DOTAM」の形成を制御す

40

50

るために導入される。K i n E x A（動力学排除アッセイ）平衡測定によって決定される、様々なX-DOTAMキレートに対するDOTAM結合剤の親和性を下表に示す。

CEA-DOTAM BsAb の金属-DOTAM キレート親和性

キレート	Kd [pM]	95% CI [pM]
Pb-DOTAM	0.84	0.44-1.4
Ca-DOTAM	0.95	0.43-1.7
Cu-DOTAM	122 000	60 000-206 000
Zn-DOTAM	15 000	9 000-19 000

10

【0778】

クエンチングのための初期選択は、Cuであったため、非キレート化DOTAMをクエンチされた非競合Cu-DOTAMに置き換え、この条件を使用してCEA-PRITプログラム内の多数の試験を実行した。しかし、Cu-DOTAM複合体が、実際には、i n v i v oで安定していなかったことが後に発見され、試験を行って、ヒトおよびマウスの血清、血漿および血液において、代替クエンチングイオンと比較してその安定性を評価した。選択されたイオンは、一方では、同様の親和性を有するPbおよびCaであり、他方では、有意により低い親和性を有するZnおよびCuであった。本試験は、35分p . i .における自発的Ca-DOTAM形成によって測定される、ヒトおよびマウス血液における、Cu-DOTAMと比較してZn-DOTAMの有意により高い安定性を実証し、Zn-DOTAMの0%および0%、ならびにPb-DOTAMの4%および4%と比較して、初期に注射されたCu-DOTAMに関して、それぞれマウスおよびヒトの血液においておよそ25%および30%に達した。

20

【0779】

プロトコル131は、i n v i v oでDOTAMクエンチング候補金属を評価し、CEA-DOTAMによるプレターゲットイングおよびPb-DOTAM-デキストラン-500による除去後の²¹²Pb-DOTAMの腫瘍および正常組織蓄積におけるその効果を比較するように設計した。DOTAMとの合理的なi n v i t r o複合体安定性を有するZnおよびGdを、Cuとのサイド・バイ・サイドで評価した。加えて、Caおよび安定Pbをコントロールとして使用した。試験概要を図51に示す。

30

【0780】

プロトコル131の経時変化および設計を下の2つの表に示す。

プロトコル 131 の経時変化

試験日	実験手順
0	BxPC3 細胞の調製およびシリンジ充填
0	BxPC3 細胞の s.c.注射
18	BsAb の i.v.注射
25	CA の i.v.注射
26	²¹² Pb-DOTAM の溶出およびシリンジ充填
26	²¹² Pb-DOTAM の i.v.注射
26	安楽死および組織採集(2 時間 p.i.)+ガンマ計数

40

50

プロトコール 131 における試験群

群	n	BsAb	BsAb (μg)	時間 (日)	CA (μg)	時間 (時)	^{212}Pb (μCi)	クエンチ	BD (時間 p.i.)
A	4	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	Zn	2
B	4	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	Gd	2
C	4	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	Cu	2
D	4	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	Ca	2
E	4	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	Pb	2

10

【0781】

固形異種移植片は、5～7週齢SCIDマウスの右側腹部へのB x PC3細胞のs.c.注射により確立した。腫瘍細胞注射18日後に、 200mm^3 の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。接種後26日目に ^{212}Pb -DOTAMを注射し、このポイントで、平均腫瘍体積は 350mm^3 であった。

【0782】

表「プロトコール131における試験群」および図51に従ったi.v.投与のために $100\mu\text{L}$ あたり $100\mu\text{g}$ の最終濃度となるよう、 20mM His/His-HCl、 140mM NaCl、pH6.0において抗体を希釈した。BsAb注射7日後に、CAを解凍し、i.v.投与のために $100\mu\text{L}$ あたり $25\mu\text{g}$ の最終濃度となるようPBSにおいて希釈した。さらに24時間後、5種の異なる金属のいずれかを使用してクエンチされた ^{212}Pb -DOTAMをi.v.注射した($100\mu\text{L}$ 0.9% NaClにおける $10\mu\text{Ci}$)。

20

【0783】

^{212}Pb -DOTAMの注射2時間後に、体内分布を調べる目的のためにマウスを殺し、次の組織および臓器を採集した：血液、膀胱、脾臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、尾および腫瘍。

【0784】

結果

^{212}Pb -DOTAM注射2時間後の全ての収集された組織における平均 ^{212}Pb 蓄積およびクリアランスを図52に示す。Pbコントロールと比較して、クエンチング金属のいずれかの間の平均%ID/gに統計的有意差はなかった(ダネットの多重比較検定による二方向ANOVA)。腫瘍および選択された正常組織の個々の値を図53に示す。 ^{212}Pb 含有量におけるより大きい個々の差異が、他の金属と比較して、ZnおよびGdによるクエンチング後の脾臓および筋肉において観察されたが、異なる処置群の間の平均%ID/gにおける差は、有意でなかった(チューキーの多重比較検定による一方向ANOVA)。

30

【0785】

結論

プロトコール131は、Ca-またはPb-クエンチングと比較して、DOTAMのZn-、Gd-またはCu-クエンチングからの、プレターゲットティングされた ^{212}Pb -DOTAMの腫瘍および正常組織蓄積における効果を評価した。 ^{212}Pb の腫瘍取込みにおける差は観察されず、適用された実験条件下でコントロールCaおよびPbを使用して、プレターゲットティングされた結合部位の有意なブロックがないことを示す。ZnおよびGdによるクエンチング後に、脾臓および筋肉における ^{212}Pb 含有量の差異増加が観察され、 ^{212}Pb -DOTAMと競合する金属-DOTAM複合体が、非標的化組織における非CA結合CEA-DOTAMの中和に寄与し得ることを示す。Cuによるクエンチングは、Caクエンチングに匹敵する結果をもたらし、示されたCu-DOTAMのin vivo不安定性をさらに確認する。3つの主要な理由により、DOTAMのクエンチングの

40

50

ためにCaを最終的に選んだ：Cuクエンチングと比較した、 ^{212}Pb -DOTAM溶液の*in vivo*製剤の制御増加； ^{212}Pb の正常組織取り込みにおける可変性を低下させる、非CA結合BsAbの中和を増大させる潜在力；および垂飽和条件下で容易に到達可能な標的への即時結合により、抗原に対し高い親和性を有する分子の浸透が制限される、仮定上の「結合部位障壁」現象の効果を低下させる潜在力。

【0786】

実施例35：PRITのためのCD20-DOTAMおよびHER2-DOTAMの評価（プロトコール151および152）

プロトコール151および152は、それぞれ完全ヒト化BsAbのCD20-DOTAMおよびHER2-DOTAMによってプレターゲットティングされたマウスにおける皮下腫瘍への ^{212}Pb -DOTAMの結合を評価することを目標とした。抗体コンストラクト、続いて7日間後にCa-DOTAM-デキストラン-500 CA、最後に24時間後に ^{212}Pb -DOTAMの注射により、3段階PRITを行った。放射能注射24時間後にマウスを殺し、放射能測定のために血液および臓器を採集した。

【0787】

試験設計

プロトコール151および152の経時変化および設計を次の4つの表に示す。

プロトコール151の経時変化

試験日	実験手順
0	WSU-DLCL2 細胞の調製およびシリンジ充填
0	WSU-DLCL2 細胞の s.c.注射
5	CD20-DOTAM BsAb の i.v.注射
12	CA の i.v.注射(群 A、B)
12	腫瘍採集およびホルマリン固定(群 C、D)
13	^{212}Pb -DOTAM の溶出およびシリンジ充填
13	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射(群 A、B)
14	安楽死および組織採集(24 時間 p.i.)+ガンマ計数(群 A、B)

プロトコール151における試験群

群	n	BsAb	BsAb (μg)	時間 (日)	CA (μg)	時間 (時)	^{212}Pb (μCi)	BD (時間 p.i.)
A	3	CD20-DOTAM	100	7	25	24	20	6
B	3	DIG-DOTAM	100	7	25	24	20	6
C	2	CD20-DOTAM	100	7	0	—	0	—
D	2	DIG-DOTAM	100	7	0	—	0	—
E	5	—	0	—	0	—	0	—

プロトコール 152 の経時変化

試験日	実験手順
0	NCI-N87 細胞の調製およびシリンジ充填
0	NCI-N87 細胞の s.c.注射
14	HER2-DOTAM BsAb の i.v.注射
21	CA の i.v.注射(群 A、B)
21	腫瘍採集およびホルマリン固定(群 C、D)
22	^{212}Pb -DOTAM の溶出およびシリンジ充填
22	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射(群 A、B)
23	安楽死および組織採集(24 時間 p.i.)+ガンマ計数(群 A、B)

10

プロトコール 152 における試験群

群	n	BsAb	BsAb (μg)	時間 (日)	CA (μg)	時間 (時)	^{212}Pb (μCi)	BD (時間 p.i.)
A	3	HER2-DOTAM	100	7	25	24	20	6
B	3	DIG-DOTAM	100	7	25	24	20	6
C	2	HER2-DOTAM	100	7	0	—	0	—
D	2	DIG-DOTAM	100	7	0	—	0	—
E	5	—	0	—	0	—	0	—

20

【0788】

固形異種移植片は、プロトコール151において、DMEM培地におけるCD20発現WSU-DLCL2ヒトB細胞リンパ腫細胞の、9週齢SCIDマウスへのs.c.注射により確立した。腫瘍細胞注射4日後に、 105mm^3 の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。接種後13日目に ^{212}Pb -DOTAMを注射し、このポイントで、平均腫瘍体積は 242mm^3 であった。

【0789】

プロトコール152において、10週齢SCIDマウスに、RPMI1640培地におけるHER2発現NCI-N87ヒト胃癌細胞のs.c.注射により異種移植した。腫瘍細胞注射14日後に、 74mm^3 の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。接種後22日目に ^{212}Pb -DOTAMを注射した；21日目に平均腫瘍体積は 61mm^3 であった。

30

【0790】

放射能注射24時間後に、体内分布検査マウスを殺した。麻酔下で後眼窩出血により終結前に血液を収集した。安楽死の後に全マウスを剖検し、皮膚、膀胱、胃、小腸、結腸、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、肺、心臓、大腿骨、筋肉、尾および腫瘍の追加的な収集を行った。

【0791】

結果

体内分布 — プロトコール151

40

50

注射24時間後の全ての収集された組織における平均 ^{212}Pb 含有量を図54に示す。ネガティブコントロールBsAb DIG-DOTAMは、WSU-DLCL2腫瘍に放射能蓄積を生じなかったが($0.4 \pm 0.3\% \text{ID/g}$)、CD20-DOTAM BsAbは、 $25.0 \pm 3.7\% \text{ID/g}$ をもたらした。膀胱($12.5 \pm 4.5\% \text{ID/g}$)、腎臓($3.1 \pm 0.3\% \text{ID/g}$)および肺($2.2 \pm 0.2\% \text{ID/g}$)を除いて、正常組織／臓器に有意な ^{212}Pb 取り込みは見られなかった。

【0792】

体内分布 — プロトコール152

注射24時間後の全ての収集された組織における平均 ^{212}Pb 含有量を図55に示す。ネガティブコントロールBsAb DIG-DOTAMは、NCI-N87腫瘍に放射能蓄積を生じなかったが($0.8 \pm 0.4\% \text{ID/g}$)、HER2-DOTAM BsAbは、 $24.6 \pm 1.5\% \text{ID/g}$ をもたらした。非常に低い値の腎臓($1.6 \pm 0.1\% \text{ID/g}$)および肺($1.4 \pm 0.2\% \text{ID/g}$)を除いて、正常組織／臓器に有意な ^{212}Pb 取り込みは見られなかった。

【0793】

結論

プロトコール151および152の結果は、CEA-PRITのために開発された3段階プレターゲティング手法を使用した、CD20-PRITおよびHER2-PRITの特異的標的化およびin vivo概念実証を実証した。

【0794】

実施例36：他の形式のためのin vivo分布および腫瘍蓄積データ（プロトコール154）

プロトコール154は、PRITのための5種の新規CEA-DOTAM BsAbコンストラクトの使用を評価することを目標とした。本プロトコールは、皮下HPAF-II異種移植片を保有するSCIDマウスにおける ^{212}Pb -DOTAMのin vivo分布および腫瘍蓄積データをもたらすように設計された。CEA-DOTAMコンストラクト、続いて7日後にCa-DOTAM-デキストラン-500 CA、最後にCAの24時間後に ^{212}Pb -DOTAMの注射により、3段階PRITを行った。放射能注射6時間後にマウスを殺し、放射能測定のために血液および臓器を採集した。標準CEA-DOTAM BsAbおよび非CEA結合BsAbを使用したPRITとの比較を行った。試験概要を図56に示す。

【0795】

試験設計

プロトコール154の経時変化および設計を下の2つの表に示す。

プロトコール154の経時変化

試験日	実験手順
0	HPAF-II 細胞の調製およびシリンジ充填
0	HPAF-II 細胞の s.c.注射
12	BsAb の i.v.注射
19	CA の i.v.注射
19	^{212}Pb -DOTAM の溶出およびシリンジ充填
20	^{212}Pb -DOTAM の i.v.注射
20	安楽死および組織採集(6 時間 p.i.)+ガンマ計数

10

20

30

40

50

プロトコール 154 における試験群

群	n	BsAb	BsAb (μ g)	時間 (日)	CA (μ g)	時間 (時)	^{212}Pb (μCi)	BD (時間 p.i.)
A	3	DIG-DOTAM	100	7	25	24	10	6
B	3	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	6
C	3	P1AE1766	100	7	25	24	10	6
D	3	P1AE1767	100	7	25	24	10	6
E	3	P1AE1768	100	7	25	24	10	6
F	3	P1AE1769	100	7	25	24	10	6
G	3	P1AE1770	100	7	25	24	10	6

10

【0796】

固形異種移植片は、9週齢マウスの右側腹部へのHPAF-II細胞のs.c.注射により確立した。腫瘍細胞注射11日後に、 79mm^3 の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。接種後20日目に ^{212}Pb -DOTAMを注射し、このポイントで、平均腫瘍体積は 230mm^3 であった。

【0797】

表「プロトコール154における試験群」および図56に従ったi.v.投与のために $100\mu\text{L}$ あたり $100\mu\text{g}$ の最終濃度となるように、 20mM His/His-HCl、 140mM NaCl、 $\text{pH}6.0$ において全ての抗体を希釈した。BsAb注射7日後に、CAを解凍し、i.v.投与のために $100\mu\text{L}$ あたり $25\mu\text{g}$ の最終濃度となるようにPBSにおいて希釈した。さらに24時間後、Caによりクエンチされた ^{212}Pb -DOTAMをi.v.注射した($100\mu\text{L}$ 0.9% NaClにおける $10\mu\text{Ci}$)。

20

【0798】

^{212}Pb -DOTAMの注射6時間後に、体内分布を調べる目的のためにマウスを殺し、次の組織および臓器を採集した：血液、皮膚、膀胱、胃、小腸、結腸、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、肺、心臓、大腿骨、筋肉、脳、尾および腫瘍。

30

【0799】

結果

注射6時間後の全ての収集された組織における平均 ^{212}Pb 蓄積およびクリアランスを図57に示す。血液含有量および腫瘍蓄積を図58にさらに詳細に示す。ネガティブコントロールBsAb DIG-DOTAMは、腫瘍における放射能蓄積を生じなかったが($1.4 \pm 0.1\%$ ID/g)、標準CEA-DOTAM BsAbは、 $36.8 \pm 3.4\%$ ID/gをもたらした。新規コンストラクトに関して、対応する数値は、 $31.8 \pm 3.1\%$ ID/g (P1AE1766)、 $35.0 \pm 8.5\%$ ID/g (P1AE1767)、 $14.2 \pm 6.7\%$ ID/g (P1AE1768)、 $38.8 \pm 10.1\%$ ID/g (P1AE1769) および $39.5 \pm 6.8\%$ ID/g (P1AE1770) であった。P1AE1768の有意により低い腫瘍蓄積は、この抗体コンストラクトのCEA一価性によって説明することができる。

40

【0800】

放射能が、このPRITレジメンのための6時間p.i.で一般に見られるレベルに達した膀胱を除いて、正常組織/臓器に有意な ^{212}Pb 取り込みは見られなかった。

【0801】

結論

本試験の結果は、3段階PRITのために全ての被験CEA-DOTAM抗体コンストラクト(P1AE1766、P1AE1767、P1AE1768、P1AE1769およびP1AE1770)のin vivo概念実証を実証した。

50

【 0 8 0 2 】

実施例 37 : C D 2 0 - P R I T 有効性 (プロトコール 1 6 2)

本試験の目標は、代替標的：表面抗原分類 2 0 (C D 2 0) に対して作製された C E A - P R I T のために開発された処置レジメンの概念実証を示すことであった。皮下 W S U - D L C L 2 腫瘍を有するマウスにおける 3 サイクルの C D 2 0 - P R I T の後に、治療有効性を評価した。次のものとの比較も行った：注射前に ^{212}Pb -D O T A M とプレインキュベートした B s A b を使用した 1 段階 C D 2 0 - R I T ; C D 2 0 に対して作製された I 型モノクローナル抗体であるリツキシマブ、および C D 2 0 + 疾患の処置における参照；ならびに同様に C D 2 0 に対して作製された I I 型モノクローナル抗体である G A 1 0 1 。

試験設計、プロトコール 162

試験日	実験手順
0	WSU-DLCL2 細胞の調製およびシリンジ充填
0	WSU-DLCL2 細胞の s.c.注射
7	PRIT BsAb またはヒスチジンバッファの i.p.注射(群 A、B、C、E、H、I、J、K)
14	CA またはヒスチジンバッファの i.p.注射(群 A、B、C、H、I、J、K)
15	^{212}Pb -DOTAM の溶出およびシリンジ充填
15	^{212}Pb -DOTAM-CD20-DOTAM の i.v.注射(群 D、L)
15	^{212}Pb -DOTAM または 0.9%NaCl の i.v.注射(群 A、B、C、H、I、J、K)
15	GA101 またはリツキシマブの i.v.注射(群 F、G)
16	安楽死および組織採集(24 時間 p.i.)+ガンマ計数(群 H、I、L)
21	PRIT BsAb またはヒスチジンバッファの i.p.注射(群 A、B、C、E、J、K)
28	CA またはヒスチジンバッファの i.p.注射(群 A、B、C、J、K)
29	^{212}Pb -DOTAM の溶出およびシリンジ充填
29	^{212}Pb -DOTAM-CD20-DOTAM の i.v.注射(群 D)
29	^{212}Pb -DOTAM または 0.9%NaCl の i.v.注射(群 A、B、C、J、K)
29	GA101 またはリツキシマブの i.v.注射(群 F、G)
30	安楽死および組織採集(24 時間 p.i.)+ガンマ計数(群 J)
35	PRIT BsAb またはヒスチジンバッファの i.p.注射(群 A、B、C、E、K)
42	CA またはヒスチジンバッファの i.p.注射(群 A、B、C、K)
43	^{212}Pb -DOTAM の溶出およびシリンジ充填
43	^{212}Pb -DOTAM-CD20-DOTAM の i.v.注射(群 D)
43	^{212}Pb -DOTAM または 0.9%NaCl の i.v.注射(群 A、B、C、K)
43	GA101 またはリツキシマブの i.v.注射(群 F、G)
44	安楽死および組織採集(24 時間 p.i.)+ガンマ計数(群 K)

10

20

30

40

50

プロトコール 162 における試験群 ($n_{\text{tot}} = 85$)

群	BsAb	1 サイクルあたりの BsAb (μg)	1 サイクルあたりの CA (μg)	1 サイクルあたりの ^{212}Pb -DOTAM (μCi)	処置サイクル (#)	n (マウス)
A	—	0	0	0	3	10
B	DIG-DOTAM	100	25	20	3	10
C	CD20-DOTAM	100	25	20	3	10
D	^{212}Pb -DOTAM- CD20-DOTAM	20	0	10	3	10
E	CD20-DOTAM	100	0	0	3	10
F	GA101	600	0	0	3	10
G	リツキシマブ	600	0	0	3	10
H	DIG-DOTAM	100	25	20	1	3
I	CD20-DOTAM	100	25	20	1	3
J	CD20-DOTAM	100	25	20	2	3
K	CD20-DOTAM	100	25	20	3	3
L	^{212}Pb -DOTAM- CEA-DOTAM	20	0	10	1	3

【0803】

図 59 に図示されている実験スケジュールに従って動物を処置した。固形 WSU-DLCL2 異種移植片は、右側腹部への 1.5×10^5 個の細胞の皮下注射により、8 週齢 SCID マウスにおいて試験 0 日目に確立した。腫瘍細胞注射 7 日後に、 144 mm^3 の平均腫瘍体積により、マウスを実験群へと選別した。接種後 15 日目に ^{212}Pb -DOTAM を注射した；平均腫瘍体積は 14 日目に 306 mm^3 であった。

【0804】

群 A～G におけるマウスを追跡して、処置の有効性を評価した。PRIT のため、投与された放射能は、1 サイクルあたり $20 \mu\text{Ci}$ であったが、1 段階 RIT のための対応する放射能は、このレジメンを使用した血液および正常組織におけるより長い保持時間続く急性放射線誘発毒性を回避するために、 $10 \mu\text{Ci}$ であった。

【0805】

^{212}Pb -DOTAM または ^{212}Pb -DOTAM-BsAb のそれらの第 1 のかつ唯一の注射の 24 時間後に、群 H、I および L におけるマウスを殺し、体内分布を調べる目的のため剖検した；群 J および K は、それぞれそれらの第 2 および第 3 の ^{212}Pb -DOTAM 注射の 24 時間後に殺し剖検した。これらのマウスから次の臓器および組織を採集した：血液、膀胱、脾臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、尾、皮膚および腫瘍。収集された試料を秤量し、次いで 2470 WIZARD² 自動ガンマ計数器 (PerkinElmer) を使用して放射能に関して測定し、崩壊およびバックグラウンドに対する補正を含む、組織 1 グラムあたりのパーセント注射用量 (%ID/g) をその後計算した。

【0806】

PRIT のため、i.p. 投与のために $200 \mu\text{L}$ あたり $100 \mu\text{g}$ の最終濃度となるように、 20 mM ヒスチジン、 140 mM NaCl (pH 6.0) において CEA-DOTAM BsAb または DIG-DOTAM (ネガティブコントロール BsAb) のいずれかを希釈した。BsAb 注射 7 日後に、Ca-DOTAM-デキストラン-500 CA を i.p. 投与し ($200 \mu\text{L}$ あたり $25 \mu\text{g}$)、続いて 24 時間後、Ca クエンチされた ^{212}Pb -DOTAM ($100 \mu\text{L}$ における $20 \mu\text{Ci}$) を投与した。

【0807】

1段階RITで処置したマウスは、i.v.注射（100 μ Lの0.9%NaClにおける20 μ Ci／20 μ g BsAb）前に²¹²Pb-DOTAMをCD20-DOTAM BsAbと共に10分間37℃でインキュベートすることにより調製された、予め結合した²¹²Pb-DOTAM-CD20-DOTAMを受けた。

【0808】

リツキシマブ（MabThera（登録商標））またはGA101（オビヌツズマブ）で処置したマウスは、200 μ Lにおける600 μ gの最終濃度となるように20mMヒスチジン、140mM NaCl（pH6.0）において希釈したそれぞれの抗体をi.v.注射した。PRITおよびRIT処置群のための放射能注射と同日に注射を行った。

10

【0809】

予備的結果、162

本試験は、本実施例の執筆時にまだ進行中であるが、それ相応の予備的結果を報告することができる：

注射24時間後の全ての収集された組織における平均²¹²Pb蓄積およびクリアランスを第1の処置サイクルに関して図60に示す。ネガティブPRITコントロールは、腫瘍における取り込みをもたらさなかった（0.7%ID／g）。腫瘍取り込みは、CD20-PRITおよびCD20-RITの両方に関して22%ID／gであった。

【0810】

評価される処置に関する平均腫瘍発達を図61に示す。非処置ビヒクル群、DIG-DOTAM群および抗体ベースの処置群における腫瘍は、着実に増殖した。対照的に、CD20-RITおよびCD20-PRIT群における腫瘍は、第1の処置サイクル後にサイズが減少した。

20

【0811】

全ての治療群におけるBW発達を図62に示す。20 μ Ciの²¹²Pb-DOTAMの複数の注射は、良好な耐容性を示したが、10 μ Ciの予め結合した²¹²Pb-DOTAM-CD20-DOTAMは、BWの有意な降下をもたらした。

【0812】

概要および結論

本試験は、CEA-PRITのために以前に実証されたものに匹敵する腫瘍増殖阻害の指標により、CD20-PRITの概念実証を示した。CD20-PRIT処置は、良好な耐容性を示し、これは、1段階CD20-RIT処置には当てはまらなかった。

30

【0813】

本発明のさらなる実施形態

以下の番号付きの陳述は、本発明のある特定のさらなる態様および実施形態である。

【0814】

1. DOTAM-鉛（Pb）キレートに特異的な抗原結合部位を含む抗体であって、前記抗原結合部位が、少なくとも、

a) アミノ酸配列FIGSRGDTYYASWAKG（配列番号2）を含む重鎖CDR2、または配列番号2中に1、2、もしくは3個までの置換を有し、これらの置換がPhe50、Asp56、およびTyr58を含まず、必要に応じて、Gly52および／もしくはArg54も含まない、そのバリエーション；

40

b) アミノ酸配列ERDPYGGGAYPPHL（配列番号3）を含む重鎖CDR3、または配列番号3中に1、2、もしくは3個までの置換を有し、これらの置換がGlu95、Arg96、Asp97、Pro98を含まず、必要に応じて、Ala100C、Tyr100D、および／もしくはPro100Eも含まない、ならびに／または必要に応じて、Tyr99も含まない、そのバリエーション；

c) アミノ酸配列QSSHVVYSDNDLA（配列番号4）を含む軽鎖CDR1、または配列番号4中に1、2、もしくは3個までの置換を有し、これらの置換がTyr28およびAsp32を含まない、そのバリエーション；

50

d) アミノ酸配列 L G G Y D D E S D T Y G (配列番号 6) を含む軽鎖 C D R 3、または配列番号 6 中に 1、2、もしくは 3 個までの置換を有し、これらの置換が G l y 9 1、T y r 9 2、A s p 9 3、T h r 9 5 c および T y r 9 6 を含まない、そのバリエーションを含み、

番号付けが、カバットによるものである、抗体。

【0815】

2. 重鎖 C D R 1 と軽鎖 C D R 2 とをさらに含む、段落 1 に記載の抗体。

【0816】

3. i) アミノ酸配列 G F S L S T Y S M S (配列番号 1) を含む重鎖 C D R 1 もしくは配列番号 1 中に 1、2、もしくは 3 個までの置換、必要に応じて、保存的置換を有するそのバリエーション；および／または

i i) アミノ酸配列 Q A S K L A S (配列番号 5) を含む軽鎖 C D R 2 もしくは配列番号 5 中に少なくとも 1、2、もしくは 3 個の置換、必要に応じて、保存的置換を有するそのバリエーション

を含む、段落 2 に記載の抗体。

【0817】

4. 抗原結合部位が、

a) アミノ酸配列 G F S L S T Y S M S (配列番号 1) を含む重鎖 C D R 1

b) アミノ酸配列 F I G S R G D T Y Y A S W A K W G (配列番号 2) を含む重鎖 C D R 2

c) アミノ酸配列 E R D P Y G G G A Y P P H L (配列番号 3) を含む重鎖 C D R 3

d) アミノ酸配列 Q S S H S V Y S D N D L A (配列番号 4) を含む軽鎖 C D R 1

e) アミノ酸配列 Q A S K L A S (配列番号 5) を含む軽鎖 C D R 2

f) アミノ酸配列 L G G Y D D E S D T Y G (配列番号 6) を含む軽鎖 C D R 3

から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、または 6 つの C D R を含む、段落 1 から 3 のいずれかに記載の抗体。

【0818】

5. i) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを有する抗体；または

i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを有する抗体

と、P b-D O T A M キレート、同じエピトープ、または重複するエピトープに結合する、段落 1 から 4 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【0819】

6. ヒト、キメラまたはヒト化されたものである、段落 1 から 5 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【0820】

7. 抗原結合部位が、配列番号 7 および配列番号 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、または配列番号 7 もしくは配列番号 9 に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーションを含む、段落 1 から 6 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【0821】

8. 抗原結合部位が、配列番号 8 および配列番号 10 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または配列番号 8 もしくは配列番号 10 に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーションを含む、段落 1 から 7 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【0822】

9. 抗原結合部位が、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号

10

20

30

40

50

8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む、段落1から8のいずれか1つに記載の抗体。

【0823】

10. 抗原結合部位が、配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む、段落1から11のいずれか1つに記載の抗体。

【0824】

11. 抗原結合部位が、100 pM、50 pM、20 pM、10 pM、5 pM、1 pM以下のKd値でPb-DOTAMキレートに結合する、段落1から10のいずれか1つに記載の抗体。

【0825】

12. 抗原結合部位が、Pb-DOTAMキレートおよびBi-DOTAMキレートに結合し、Bi-DOTAMキレート/Pb-DOTAMキレートのKd値の比が、0.1~10または1~10の範囲にある、段落1から11のいずれか1つに記載の抗体。

【0826】

13. 全抗体である、またはFv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)₂ダイアボディ、直鎖状抗体、もしくは単鎖抗体分子からなる群から選択される抗体断片である、段落1から12のいずれか1つに記載の抗体。

【0827】

14. 抗体が、標的抗原に特異的に結合する部分にカップリングされている、段落1から13のいずれか1つに記載の抗体。

【0828】

15. 標的抗原が、腫瘍特異的抗原である、段落14に記載の抗体。

【0829】

16. 多重特異性または二重特異性抗体、必要に応じて、段落17から51のいずれか1つに記載の多重特異性抗体または二重特異性抗体である、段落14または15に記載の抗体。

【0830】

17. Pb-DOTAMキレートに特異的な少なくとも1つの抗原結合部位と、標的抗原のための少なくとも1つの抗原結合部位とを含む多重特異性または二重特異性抗体。

【0831】

18. Pb-DOTAMキレートに特異的な抗原結合部位が、段落1から12のいずれか1つに定義された通りである、段落17に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0832】

19. 標的抗原が、腫瘍特異的抗原である、段落17または18に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0833】

20. 腫瘍特異的抗原が、CEA、HER2およびCD20からなる群から選択される、段落19に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0834】

21. 腫瘍特異的抗原が、がん胎児性抗原(CEA)である、段落20に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0835】

22. 多重特異性または二重特異性抗体が、Pb-DOTAMキレートに特異的な少なくとも1つの抗原結合部位と、CEAに特異的な少なくとも1つの抗原結合部位とを含み、CEAに特異的な抗原結合部位が、少なくとも1、2もしくは3つの重鎖CDRを含む重鎖を含み、

d) 重鎖CDR1が、配列番号11のアミノ酸配列を含む

e) 重鎖CDR2が、配列番号12のアミノ酸配列を含む

f) 重鎖CDR3が、配列番号13のアミノ酸配列を含む；

10

20

30

40

50

および／または C E A に特異的な抗原結合部位が、少なくとも 1、2、もしくは 3 つの軽鎖 C D R を含む、

- a) 軽鎖 C D R 1 が、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む；
- b) 軽鎖 C D R 2 が、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む；
- c) 軽鎖 C D R 3 が、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む、

段落 1 7 から 2 1 のいずれか 1 つに記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0836】

23. C E A のための抗原結合部位が、

- a) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1 ；
- b) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 ；
- c) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 ；
- d) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1 ；
- e) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2 ；
- f) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3

から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、または 6 つ（すなわち、全部）の C D R を含む、段落 2 2 に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0837】

24. 多重特異性または二重特異性抗体が、P b - D O T A M キレートに特異的な少なくとも 1 つの抗原結合部位と、C E A に特異的な少なくとも 1 つの抗原結合部位とを含み、C E A に特異的な抗原結合部位が、

i) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、もしくは配列番号 1 7 に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーション；および／または

i i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、もしくは配列番号 1 8 に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーション

を含む、段落 1 7 から 2 3 のいずれか 1 つに記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0838】

25. C E A に特異的な抗原結合部位が、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび／または配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、段落 2 4 に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0839】

26. 多重特異性または二重特異性抗体が、P b - D O T A M キレートに特異的な少なくとも 1 つの抗原結合部位と、E R B B 2 に特異的な少なくとも 1 つの抗原結合部位とを含み、E R B B 2 に特異的な抗原結合部位が、(a) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 ；(b) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 ；(c) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 ；(d) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 ；(e) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 ；および (f) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、または 6 つの C D R を含む、段落 1 7 から 2 0 のいずれか 1 つに記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0840】

27. 多重特異性または二重特異性抗体が、P b - D O T A M キレートに特異的な少なくとも 1 つの抗原結合部位と、E R B B 2 に特異的な少なくとも 1 つの抗原結合部位とを含み、E R B B 2 に特異的な抗原結合部位が、

i) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、もしくは配列番号 3 4 に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーション；および／または

i i) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、もしくは配列番号 3 5 に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは 9

10

20

30

40

50

9%の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーションを含む、段落17から20または26のいずれか1つに記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0841】

28. ERBB2に特異的な抗原結合部位が、配列番号34のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび／または配列番号35のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、段落27に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0842】

29. 多重特異性または二重特異性抗体が、Pb-DOTAMキレートに特異的な少なくとも1つの抗原結合部位と、CD20に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位とを含み、CD20に特異的な抗原結合部位が、(a) 配列番号39のアミノ酸配列を含むCDR-H1；(b) 配列番号40のアミノ酸配列を含むCDR-H2；(c) 配列番号41のアミノ酸配列を含むCDR-H3；(d) 配列番号42のアミノ酸配列を含むCDR-L1；(e) 配列番号43のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および(f) 配列番号44のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される少なくとも1、2、3、4、5、または6つのCDRを含む、段落17から20のいずれか1つに記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0843】

30. 多重特異性または二重特異性抗体が、Pb-DOTAMキレートに特異的な少なくとも1つの抗原結合部位と、CD20に特異的な少なくとも1つの抗原結合部位とを含み、CD20に特異的な抗原結合部位が、

i) 配列番号45のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、もしくは配列番号45に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーション；および／または

ii) 配列番号46のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、もしくは配列番号46に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むそのバリエーションを含む、段落17から20または29のいずれか1つに記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0844】

31. CD20に特異的な抗原結合部位が、配列番号45のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび／または配列番号46のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、段落30に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0845】

32. Fc領域を含む、段落17から31のいずれか1つに記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0846】

33. Fc領域がエフェクター機能を低下させるように操作されている、段落32に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0847】

34. Fc領域残基234、235、238、265、269、270、297、327および／または329のうちの1つまたは複数の置換によるFc領域、段落33に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0848】

35. 第1および第2の抗体重鎖と、第1および第2の抗体軽鎖とを含む完全長抗体を含み、第1の重鎖と第1の軽鎖とが集合して、第1の抗原のための抗原結合部位を形成し、第2の重鎖と第2の軽鎖とが集合して、第2の抗原のための抗原結合部位を形成し、

第1または第2の抗原のいずれかがPb-DOTAMキレートであり、他方が標的抗原である、段落32から34のいずれか1つに記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0849】

36. 第1の抗原のためのさらなる抗原結合部分をさらに含む、段落35に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0850】

37. 第1および第2の抗体重鎖と、第1および第2の抗体軽鎖とを含む完全長抗体であって、第1の重鎖と第1の軽鎖とが集合して、第1の抗原のための抗原結合部位を含むFabを形成し、第2の重鎖と第2の軽鎖とが集合して、第2の抗原のための抗原結合部位を含む交差Fabを形成する、完全長抗体を含み；

第1または第2の抗体重鎖のいずれかが、リンカーを介して、CH1およびVHドメインを含むポリペプチドに融合されており、第1および第2のポリペプチドが集合して、第1の抗原のための抗原結合部位を含むFabを形成するように、前記第1のポリペプチドが、CLおよびVLを含む第2のポリペプチドと集合する、段落36に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

10

【0851】

38. 第2の抗体重鎖のN末端が、リンカーを介して前記第1のポリペプチドに融合されている、段落37に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0852】

39. i) 第1の抗原のための抗原結合部位を含む完全長抗体；および

ii) 第2の抗原のための抗原結合部位と一緒に形成する、少なくとも第2の重鎖可変ドメインと第2の軽鎖可変ドメインを含み、

第1または第2の抗原のいずれかがPb-DOTAMキレートであり、他方が標的抗原である、段落32から34のいずれか1つに記載の多重特異性または二重特異性抗体。

20

【0853】

40. 第1の抗原のための抗原結合部位を含む完全長抗体を含み、重鎖の1つのNまたはC末端が、ポリペプチドリンカーを介して、第1のポリペプチドに連結されており、第1のポリペプチドが、第2のポリペプチドと会合して、第2の抗原のための結合部位を含むFabまたは交差Fabを形成する、段落39に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0854】

41. i) VLおよびCLドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VHドメインおよびCH1ドメインからなる第1のポリペプチド；または

30

ii) VHおよびCLドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VLドメインおよびCH1ドメインからなる第1のポリペプチド；または

iii) VLおよびCH1ドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VHドメインおよびCLドメインからなる第1のポリペプチドを含み；

第1および第2のポリペプチドが、一緒になって、第2の抗原のための抗原結合部位を形成する、段落40に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0855】

42. 第1の抗原のための抗原結合部位を含む完全長抗体を含み、重鎖の1つのC末端が、ポリペプチドリンカーを介して、VHおよびCLドメインからなる第2のポリペプチドと会合している、VLドメインおよびCH1ドメインからなる第1のポリペプチドに連結される、段落41に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

40

【0856】

43. a) 第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長抗体；

b) i) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)；または

ii) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)および抗体定常ドメイン(CH1)；または

iii) 抗体重鎖可変ドメイン(VH)および抗体軽鎖定常ドメイン(CL)

からなるポリペプチドであって、

VHドメインのN末端が、ペプチドリンカーを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の一方のC末端に融合されているポリペプチド；

50

- c) i) 抗体軽鎖可変ドメイン (V L) ; または
- i i) 抗体軽鎖可変ドメイン (V L) および抗体軽鎖定常ドメイン (C L) ; または
- i i i) 抗体軽鎖可変ドメイン (V L) および抗体重鎖定常ドメイン (C H 1)

からなるポリペプチドであって、

V LドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の他方のC末端に融合されているポリペプチド

を含み；

(b) の下のペプチドの抗体重鎖可変ドメインおよび (c) の下のペプチドの抗体軽鎖可変ドメインが、一緒になって第2の抗原への抗原結合部位を形成し、

第1または第2の抗原のいずれかがP b-D O T A Mキレートであり、他方が標的抗原である、段落39に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

10

【0857】

44. 第1の抗原が標的抗原であり、第2の抗原がP b-D O T A Mキレートである、段落35から43のいずれか1つに記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0858】

45. 第1の抗原がC E Aである、段落44に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0859】

46. a) C E Aに特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長抗体であって、

重鎖が配列番号22もしくは23のアミノ酸1~450の重鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有し；

20

軽鎖が配列番号21の軽鎖に対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する、完全長抗体；

b) i) 配列番号7の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する抗体重鎖可変ドメイン (V H) ; もしくは

i i) 配列番号7の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン (V H) および抗体重鎖定常ドメイン (C H 1) ; および

30

i i i) 配列番号7の重鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン (V H) および抗体軽鎖定常ドメイン (C L)

からなるポリペプチドであって、

V HドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の一方のC末端に融合されているポリペプチド；ならびに

c) i) 配列番号8の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する抗体軽鎖可変ドメイン (V L) ; もしくは

i i) 配列番号8の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン (V L) および抗体軽鎖定常ドメイン (C L) ; もしくは

40

i i i) 配列番号8の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99もしくは100%の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン (V L) および抗体重鎖定常ドメイン (C H 1)

からなるポリペプチドであって、

V LドメインのN末端が、ペプチドリinkerを介して、前記完全長抗体の2つの重鎖の他方のC末端に融合されているポリペプチドを含み；

(b) の下のペプチドの抗体重鎖可変ドメインおよび (c) の下のペプチドの抗体軽鎖可変ドメインは、一緒になってP b-D O T A Mキレートへの抗原結合部位を形成する、

50

段落 45 に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0860】

47. a) CEA に特異的に結合し、2 つの抗体重鎖および 2 つの抗体軽鎖からなる完全長抗体であって、

重鎖が配列番号 19 もしくは 20 のアミノ酸 1 ～ 450 の重鎖に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 もしくは 100 % の同一性を有し；

軽鎖が配列番号 21 の軽鎖に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 もしくは 100 % の同一性を有する、完全長抗体；

b) i) 配列番号 9 の重鎖可変ドメインに対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 もしくは 100 % の同一性を有する抗体重鎖可変ドメイン (VH)；もしくは

ii) 配列番号 9 の重鎖可変ドメインに対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 もしくは 100 % の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン (VH) および抗体重鎖定常ドメイン (CH1)；もしくは

iii) 配列番号 9 の重鎖可変ドメインに対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 もしくは 100 % の同一性を有する前記抗体重鎖可変ドメイン (VH) および抗体軽鎖定常ドメイン (CL)

からなるポリペプチドであって、

VH ドメインの N 末端が、ペプチドリinker を介して、前記完全長抗体の 2 つの重鎖の一方の C 末端に融合されているポリペプチド；

c) i) 配列番号 10 の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 もしくは 100 % の同一性を有する抗体軽鎖可変ドメイン (VL)；もしくは

ii) 配列番号 10 の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 もしくは 100 % の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン (VL) および抗体軽鎖定常ドメイン (CL)；もしくは

iii) 配列番号 10 の軽鎖可変ドメインに対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 もしくは 100 % の同一性を有する前記抗体軽鎖可変ドメイン (VL) および抗体重鎖定常ドメイン (CH1)

からなるポリペプチドであって、

VL ドメインの N 末端が、ペプチドリinker を介して、前記完全長抗体の 2 つの重鎖の他方の C 末端に融合されているポリペプチド

を含み；

(b) の下のペプチドの抗体重鎖可変ドメインおよび (c) の下のペプチドの抗体軽鎖可変ドメインが、一緒になって Pb-DOTAM キレートへの抗原結合部位を形成する、段落 45 に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0861】

48. i) 配列番号 22 の重鎖に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する第 1 の重鎖、

ii) 配列番号 23 の重鎖に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する第 2 の重鎖、および

iii) 配列番号 21 の軽鎖に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 または 100 % の同一性を有する 2 つの抗体軽鎖を含む、段落 45 に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0862】

49. i) 配列番号 22 のアミノ酸配列を有する第 1 の重鎖；

ii) 配列番号 23 のアミノ酸配列を有する第 2 の重鎖；および

i i i) 配列番号 21 のアミノ酸配列を有する 2 つの抗体軽鎖を含む、段落 48 に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0863】

50. i) 配列番号 19 の重鎖に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する第 1 の重鎖、

i i) 配列番号 20 の重鎖に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 または 100 % の同一性を有する第 2 の重鎖、

i i i) 配列番号 21 の軽鎖に対する少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 または 100 % の同一性を有する 2 つの抗体軽鎖を含む、段落 45 に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

10

【0864】

51. i) 配列番号 19 のアミノ酸配列を有する第 1 の重鎖；

i i) 配列番号 20 のアミノ酸配列を有する第 2 の重鎖；および

i i i) 配列番号 21 のアミノ酸配列を有する 2 つの抗体軽鎖を含む、段落 50 に記載の多重特異性または二重特異性抗体。

【0865】

52. 段落 1 から 51 のいずれか 1 つに記載の抗体をコードする、単離されたポリヌクレオチドまたは単離されたポリヌクレオチドのセット。

【0866】

53. 段落 52 に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを含むベクター。

【0867】

54. 段落 52 に記載のポリヌクレオチドのセットと一緒に含む、ベクターのセットを含むキットまたは組成物。

【0868】

55. 発現ベクターである、段落 53 に記載のベクターまたは段落 54 に記載のベクターのセット。

【0869】

56. 必要に応じて、段落 53 に記載のベクターまたは段落 54 に記載のベクターのセットを含む、段落 52 に記載の単離されたポリヌクレオチドまたは単離されたポリヌクレオチドのセットを含む原核または真核宿主細胞。

30

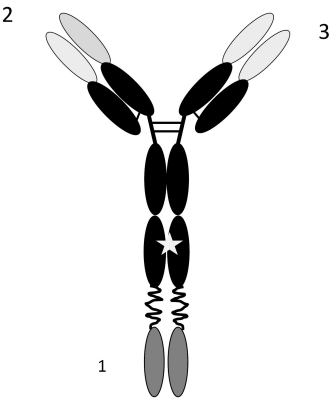
【0870】

57. 段落 56 に記載の宿主細胞から抗体を発現させることを含む、段落 1 から 51 のいずれか 1 つに記載の抗体を生産する方法。

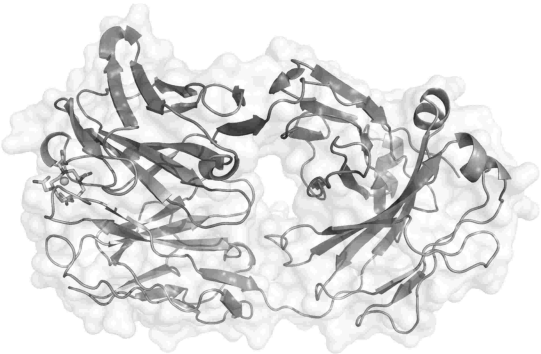
40

50

【図面】
【図 1】

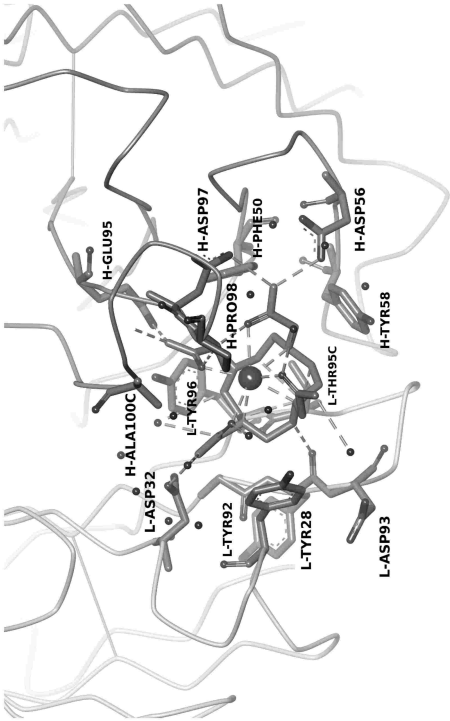


【図 2】

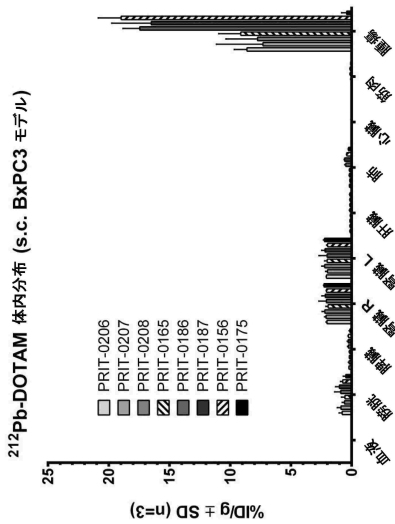


Fab PRIT-0213

【図 3】



【図 4】



10

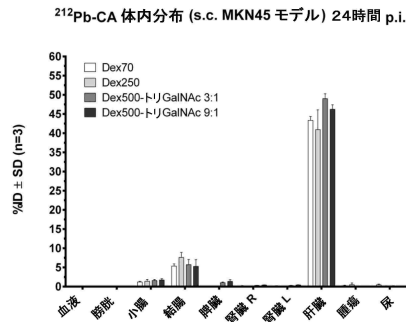
20

30

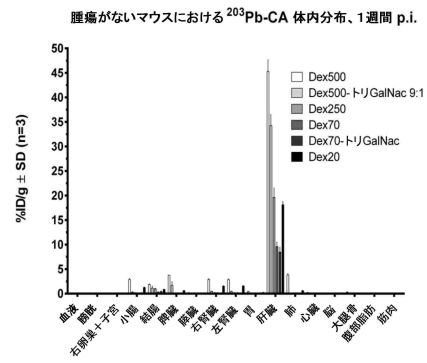
40

50

【図 9】

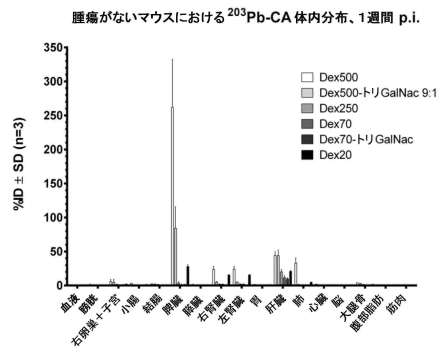


【図 10】

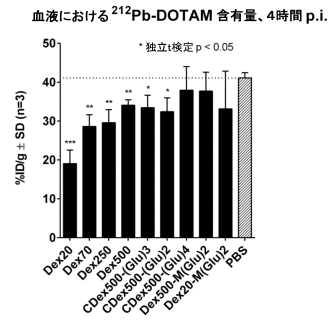


10

【図 11】



【図 12】



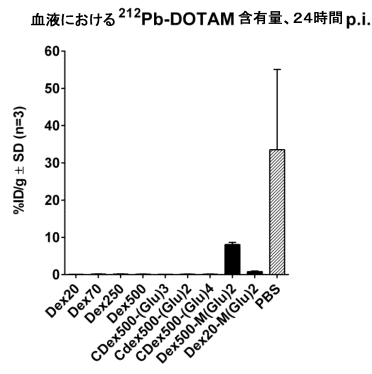
20

30

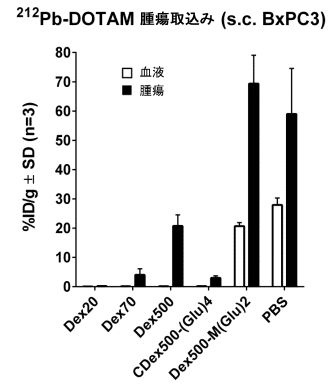
40

50

【図 1 3】

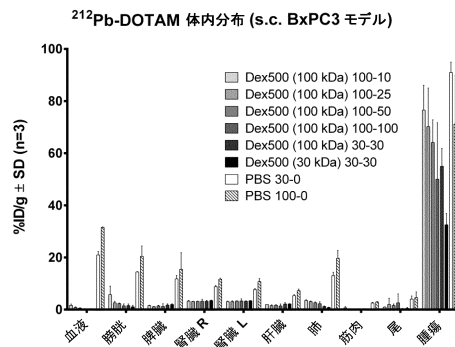


【図 1 4】

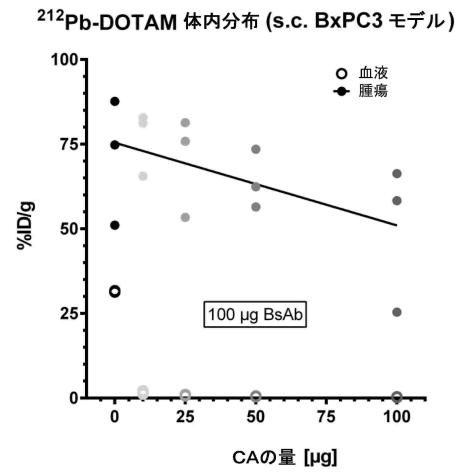


10

【図 1 5】



【図 1 6】



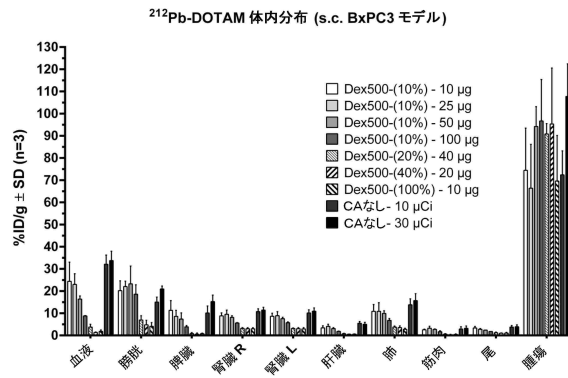
20

30

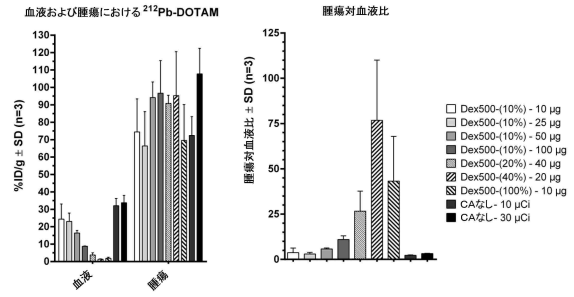
40

50

【図 17】

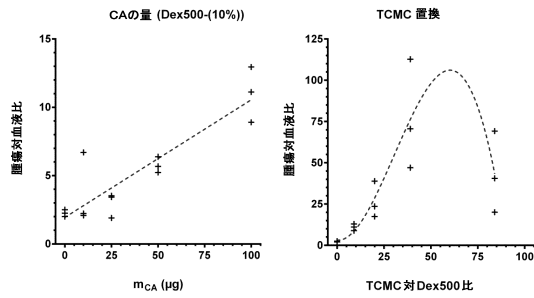


【図 18】

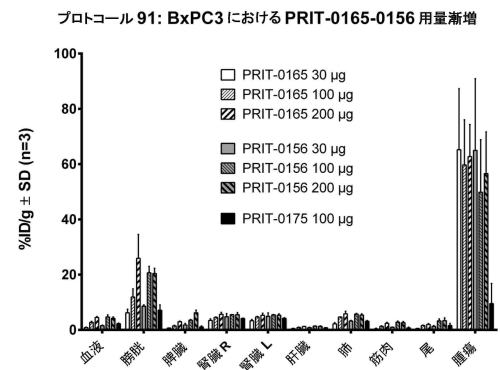


10

【図 19】



【図 20】



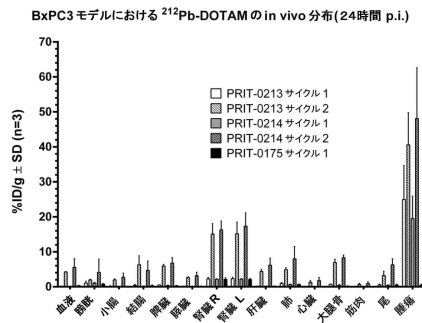
20

30

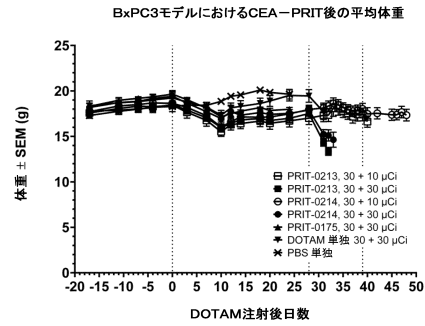
40

50

【図 2 1】

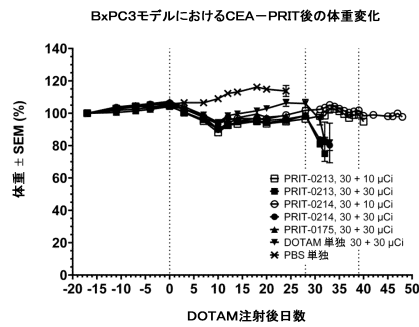


【図 2 2】

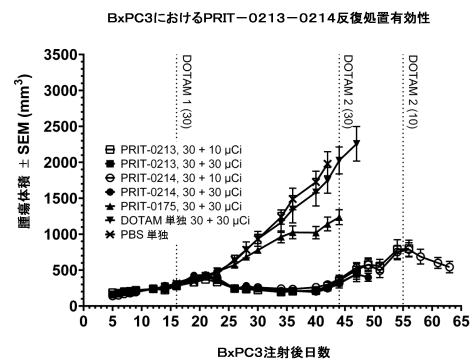


10

【図 2 3】



【図 2 4】



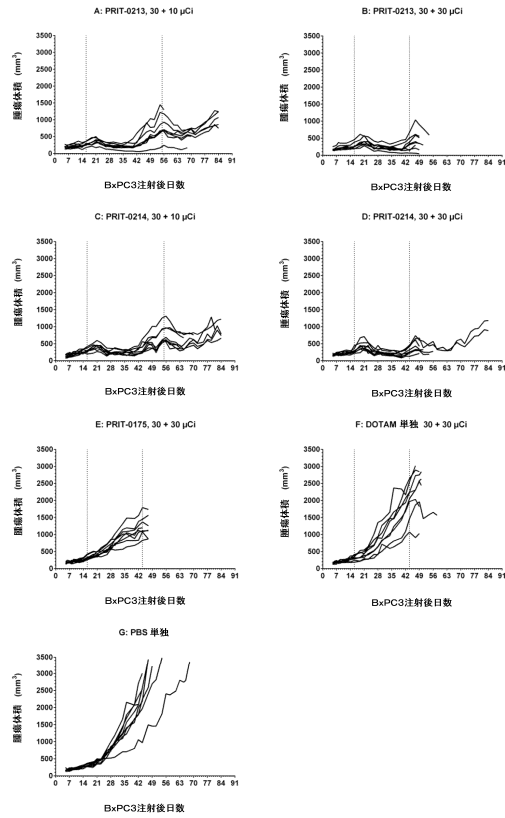
20

30

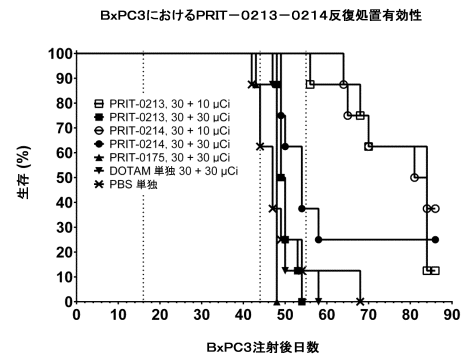
40

50

【図 2 5】



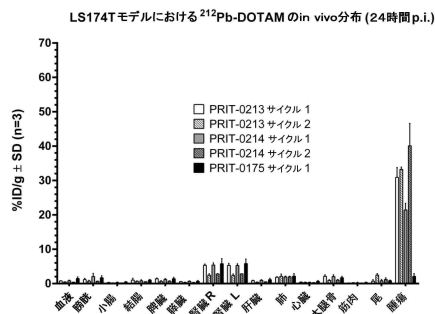
【図 2 6】



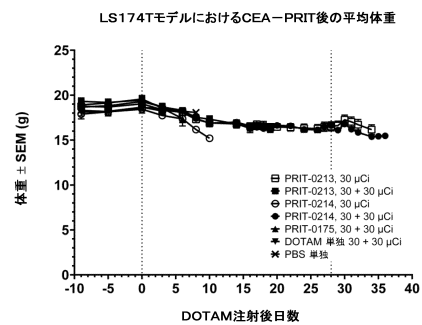
10

20

【図 2 7】



【図 2 8】

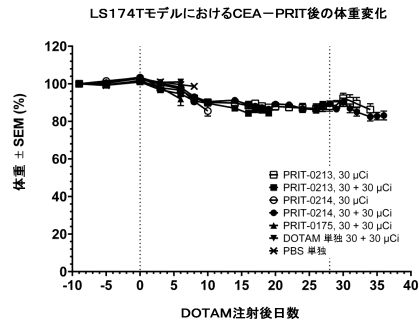


30

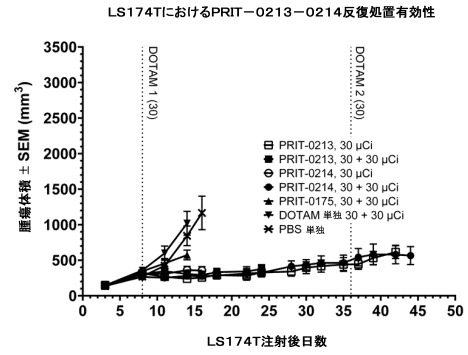
40

50

【図 29】

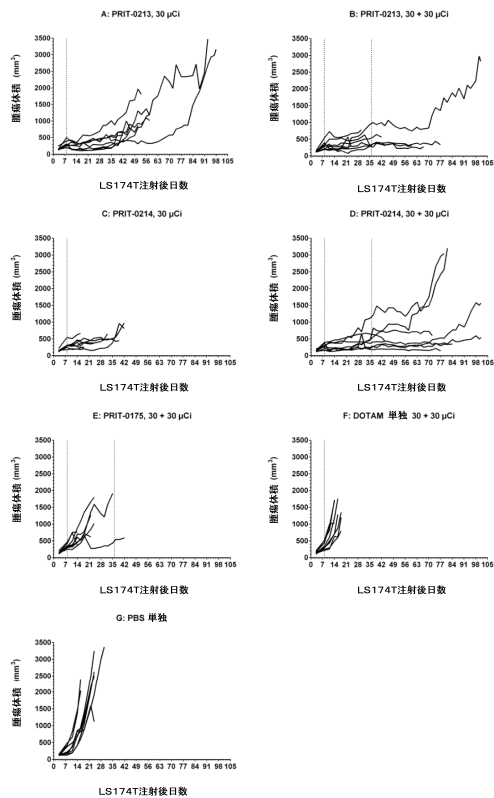


【図 30】

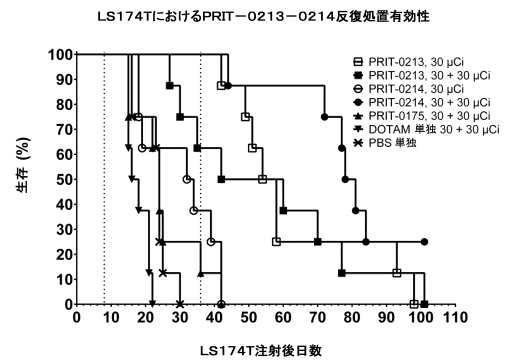


10

【図 31】



【図 32】



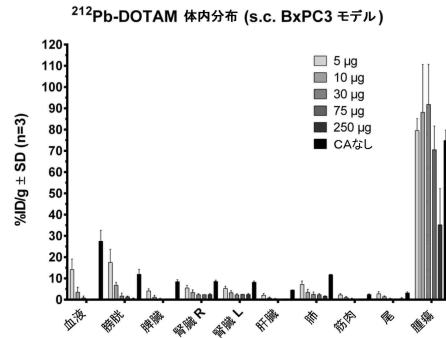
20

30

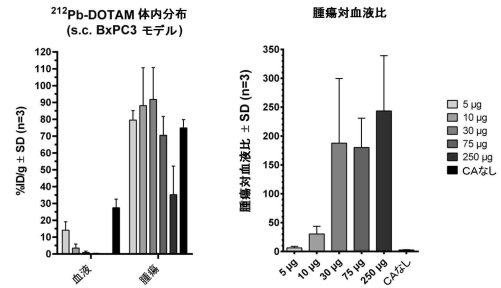
40

50

【図 3 3】

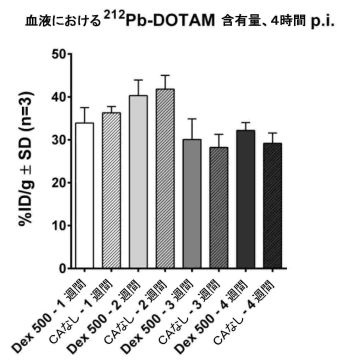


【図 3 4】

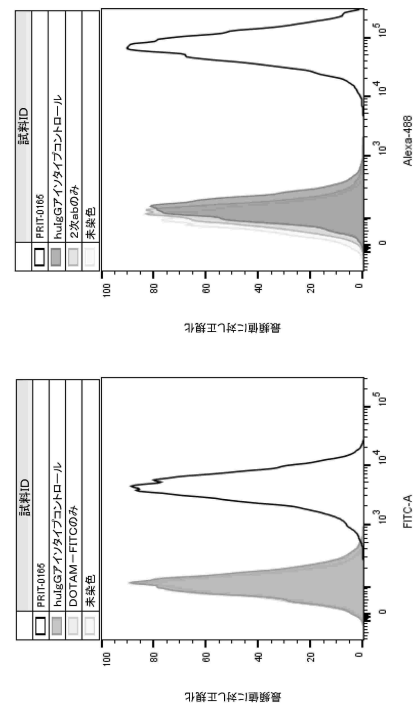


10

【図 3 5】



【図 3 6】



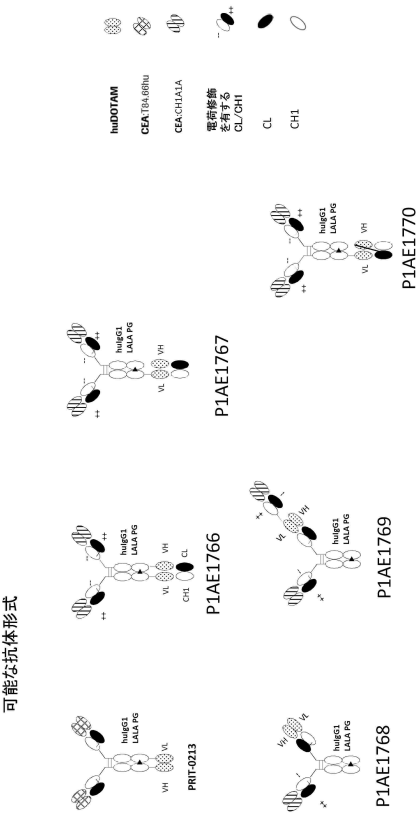
20

30

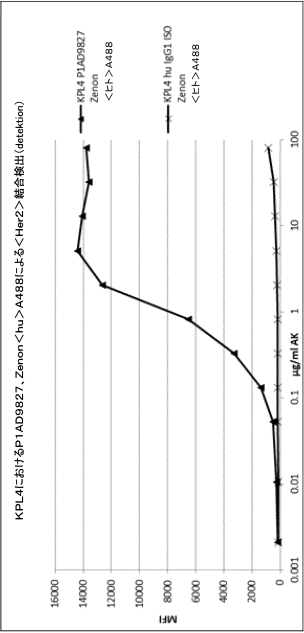
40

50

【図 3 7】

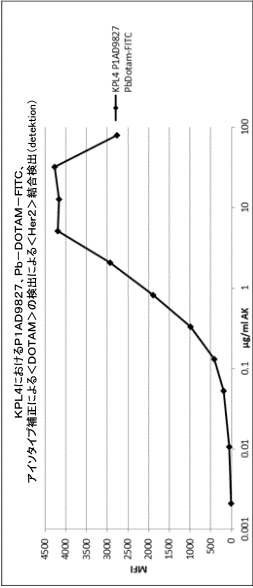


【図 3 8】



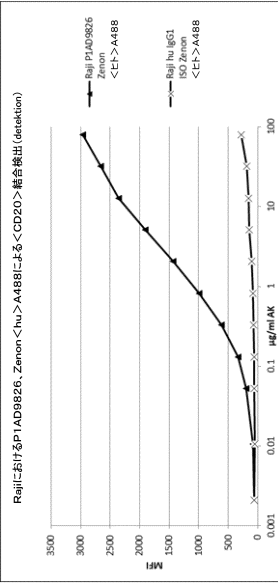
Her2結合能を実証するための、KPL-4細胞へのP1AD9827の結合：
ヒトIgG特異的二次抗体を使用した抗体の検出

【図 3 9】



DOTAM結合能を実証するための、KPL-4細胞へのP1AD9827の結合：
Pb-DOTAM-FITCを使用した、アイソタイプ補正された検出

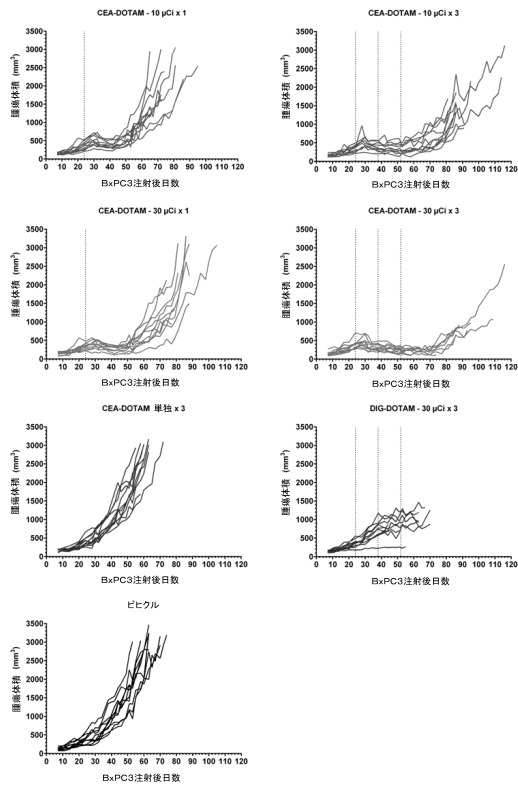
【図 4 0】



CD20結合能を実証するための、Raji細胞へのP1AD9826の結合：
ヒトIgG特異的二次抗体を使用した抗体の検出

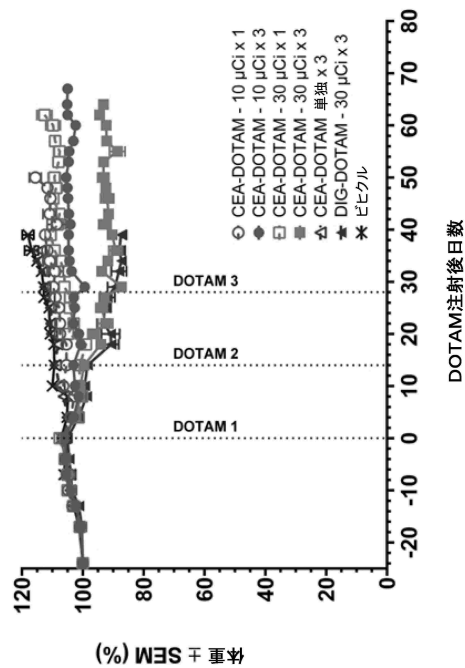
【図 4 5】

BxPC3モデルにおけるCEA PRIT後の個々の腫瘍増殖曲線



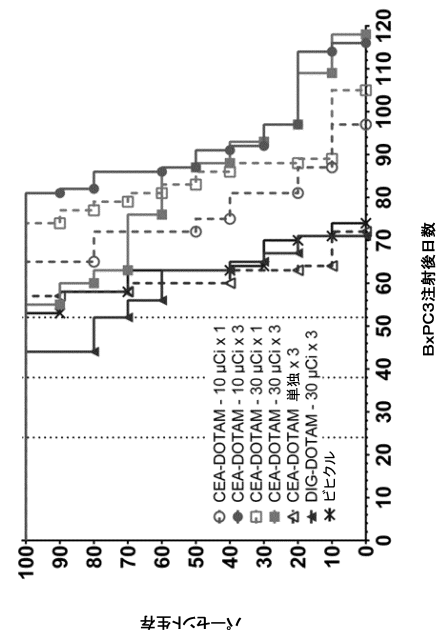
【図 4 7】

BxPC3モデルにおけるCEA PRIT後の平均体重変化



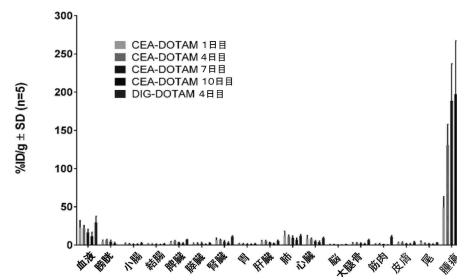
【図 4 6】

BxPC3モデルにおけるCEA PRIT後の生存



【図 4 8】

SC BxPC3腫瘍を有するSCIDマウスにおける203Pb-BsAb分布



10

20

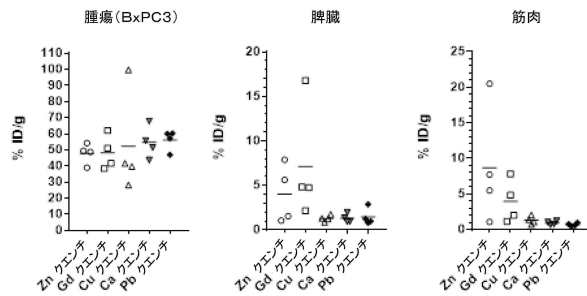
30

40

50

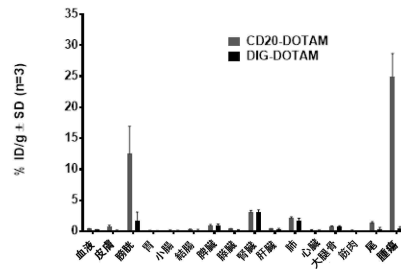
【図 5 3】

選択された正常組織における ^{212}Pb -DOTAMの分布(2時間p. i.)



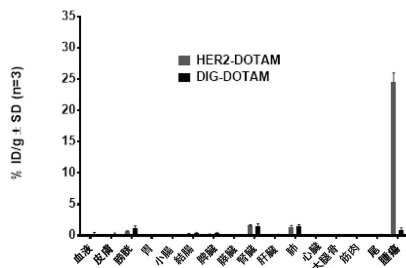
【図 5 4】

SC WSU-DLCL2腫瘍を保有するSCIDマウスにおける
プレターゲティングされた ^{212}Pb -DOTAMの体内分布(24時間p. i.)

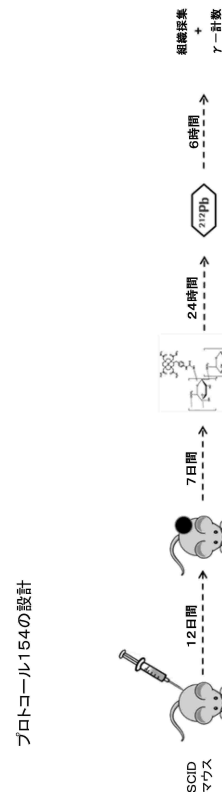


【図 5 5】

SC NCI-N87腫瘍を保有するSCIDマウスにおける
プレターゲティングされた ^{212}Pb -DOTAMの体内分布(24時間p. i.)



【図 5 6】



10

20

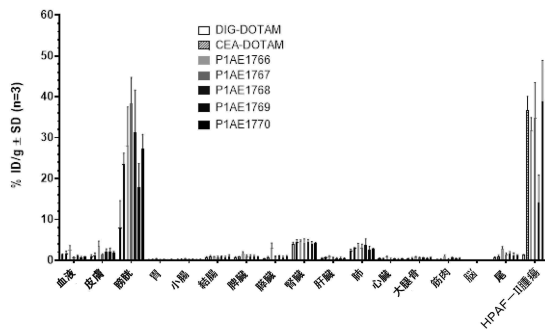
30

40

50

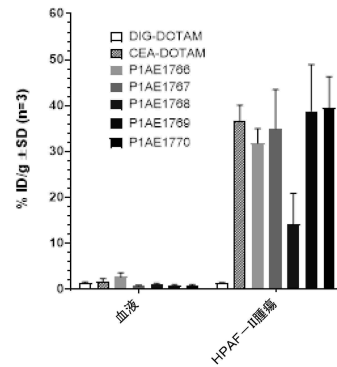
【図 5 7】

SC HPAF-II腫瘍を保有するSCIDマウスにおける
プレターゲティングされた212Pb-DOTAMの体内分布(6時間p. i.)



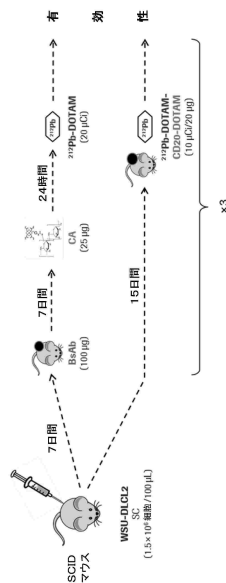
【図 5 8】

HPAF-II腫瘍におけるプレターゲティングされた
212Pb-DOTAMの蓄積



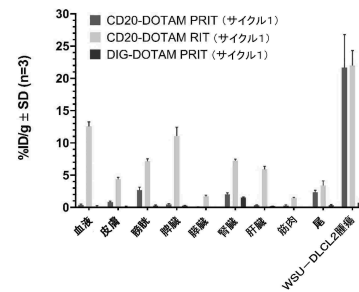
【図 5 9】

プロトコール162の実験スケジュール



【図 6 0】

SC WSU-DLCL2腫瘍を保有するSCIDマウスにおける
プレターゲティングされた212Pb-DOTAMおよび
212Pb-DOTAM-CD20-DOTAMの体内分布(24時間p. i.)



10

20

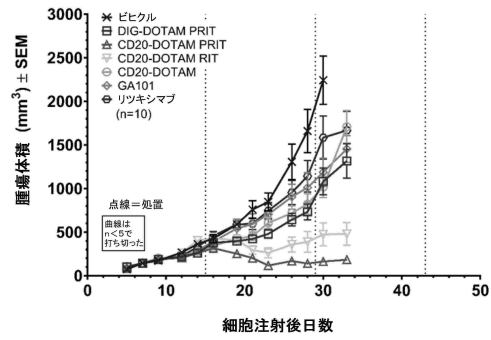
30

40

50

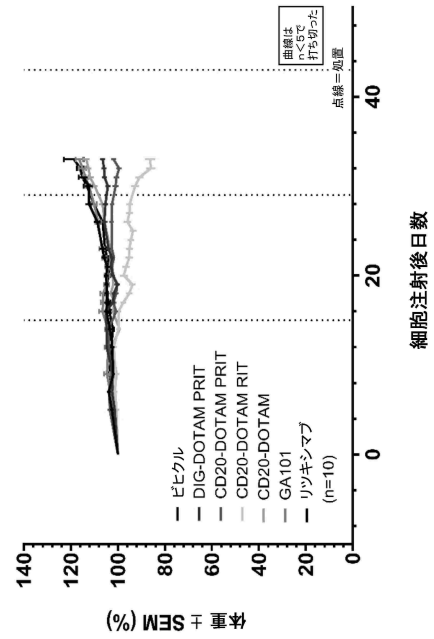
【図 6 1】

CD20標的化療法またはネガティブコントロールで処置した
SCIDマウスにおける平均SC WSU-DLCL2腫瘍体積



【図 6 2】

CD20標的化療法またはネガティブコントロールで処置した
SCIDマウスにおける平均体重発達



【配列表】

0007582867000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	16/44	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/44		Z N A
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K	16/46		
A 6 1 K	103/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/30		
			A 6 1 K	103:00		

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 ユレク, ポール

アメリカ合衆国 7 5 1 5 4 テキサス, レッド オーク, ウッディド クリーク ドライブ 1 2 8

(72)発明者 ロハスーキハーノ, フェデリコ

アメリカ合衆国 7 6 0 2 1 テキサス, ベッドフォード, オーク ティンバー ドライブ 1 9 2 4

(72)発明者 キーファー, ギャリー イー.

アメリカ合衆国 7 5 0 8 2 テキサス, リチャードソン, ジャスミン レーン 3 3 0 1

(72)発明者 フライターク, オリヴィエ

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン-チューリッヒ, ヴァーギシュトラッセ 1 8, シー/オー
ロッシュ グリクアート アーゲー

(72)発明者 ゲルデス, クリスティアン

アルゼンチン国 1 4 2 5 ブエノスアイレス, ウガルテチェ 3 0 5 0

(72)発明者 クライン, クリスティアン

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン-チューリッヒ, ヴァーギシュトラッセ 1 8, シー/オー
ロッシュ グリクアート アーゲー

(72)発明者 ウマーニャ, パブロ

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン-チューリッヒ, ヴァーギシュトラッセ 1 8, シー/オー
ロッシュ グリクアート アーゲー

(72)発明者 ハース, アレクサンダー

ドイツ国 8 2 3 7 7 ベンツベルク, ノンネンヴァルト 2, シー/オー ロッシュ ダイアグノス
ティックス ゲーエムベアー

(72)発明者 フロスト, ソフィア

フランス国 8 7 6 4 0 ラゼ, リュ デュ ラック 7, シー/オー アルコラブ

(72)発明者 サイディ, アマル

フランス国 トノン-レーバン, シュマン デ ティソット 5

(72)発明者 ナヤック, タパン

アメリカ合衆国 ペンシルベニア, ランズデール, ウェスト セカンド ストリート 7 5 2

審査官 石井 裕美子

(56)参考文献 特表 2 0 1 8 - 5 0 5 6 8 1 (J P, A)

特表 2 0 0 8 - 5 3 8 9 7 2 (J P, A)

米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 8 7 3 8 1 (U S, A 1)

Mol Cancer Ther, 2014年, Vol.13, pp.1803-1812

Mol Cancer Ther, 2014年, Vol.11, pp.1365-1372

Cancer Res, 2016年, Vol.72, pp.6669-6679

Bioconjugate Chem., 2017年, Vol.28, pp.3007-3015

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

A 6 1 K 5 1 / 0 0 - 5 1 / 1 2

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

A61K 103:00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)