(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6872376号
(P6872376)
(45)発行日　令和3年5月19日(2021.5.19)　(24)登録日　令和3年4月21日(2021.4.21)

(51)Int.Cl.　　F I
A61K 39/395 (2006.01)　　A61K 39/395 ZNAL
A61K 31/704 (2006.01)　　A61K 39/395 C
A61P 35/00 (2006.01)　　A61K 39/395 T
A61P 35/02 (2006.01)　　A61K 31/704
　　A61P 35/00

請求項の数 26　(全 92 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-11948(P2017-11948)
(22)出願日　平成29年1月26日(2017.1.26)
(62)分割の表示　特願2014-256667(P2014-256667)の分割
　原出願日　平成15年5月2日(2003.5.2)
(65)公開番号　特開2017-105801(P2017-105801A)
(43)公開日　平成29年6月15日(2017.6.15)
　審査請求日　平成29年2月22日(2017.2.22)
　審判番号　不服2019-12589(P2019-12589/J1)
　審判請求日　令和1年9月24日(2019.9.24)
(31)優先権主張番号　60/377,440
(32)優先日　平成14年5月2日(2002.5.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
　米国(US)

(73)特許権者　591000791
ワイス・ホールディングズ・コーポレイション
アメリカ合衆国ニュージャージイ州０７９４０－０８７４マディソン・フアイブジラルダフアームス（番地なし）
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史
(72)発明者　アーサー・クンツ
アメリカ合衆国１０９５６ニューヨーク州ニュー・シティ、ジェニファー・ドライブ１１番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】カリチェアミシン誘導体－キャリアコンジュゲート

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
式：
Ｐｒ（－Ｘ－Ｗ）ｍ
［式中：
Ｐｒは抗ＣＤ２２抗体であり；
Ｘは式：
（ＣＯ－Ａｌｋ^{1}－Ｓｐ^{1}－Ａｒ－Ｓｐ^{2}－Ａｌｋ^{2}－Ｃ（Ｚ^{1}）＝Ｑ－Ｓｐ）
を有する加水分解可能なリンカーであり、
式中；
Ａｌｋ^{1}およびＡｌｋ^{2}は、独立に、結合手または分枝したあるいは分枝していない（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$）アルキレン鎖であり；
Ｓｐ^{1}は結合、－Ｓ－、－Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＲ’－、－Ｎ（ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$）$_{2}$Ｎ－、または－Ｘ－Ａｒ’－Ｙ－（ＣＨ$_{2}$）ｎ－Ｚであり、ここに、Ｘ、ＹおよびＺは、独立にて、結合手、－ＮＲ’－、－Ｓ－または－Ｏ－である；ただし、ｎ＝０ならばＹおよびＺのうち少なくとも一つは結合手でなければならず、Ａｒ’は一個、二個または三個の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）アルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、－ＣＯＯＲ’、－ＣＯＮＨＲ’、－（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ’、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ’、－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ’または－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ’基で置換されていてもよい１，２－、１，３－または１，４－フ

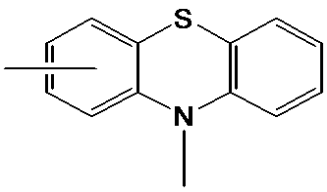
ェニレンであり、Ａｌｋ^{1}が結合手であるとき、Ｓｐ^{1}は結合手であり；

ｎは０から５までの整数であり；

Ｒ’は、一個または二個の－ＯＨ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）アルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{3}$）ジアルキルアミノ、または（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{3}$）トリアルキルアンモニウム－Ａ$^{-}$基によって置換されていてもよい分枝したまたは分枝していない（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）鎖であり、ここに、Ａ$^{-}$は塩を完成させる医薬上許容される陰イオンであり、

Ａｒは、一個、二個または三個の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、－ＣＯＯＲ’、－ＣＯＮＨＲ’、－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ’、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ’、－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ’または－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ’基で置換されていてもよい１，２－、１，３－または１，４－フェニレンであり、その式中でｎおよびＲ’は上記で定義したとおりであるか、またはＡｒは１，２－、１，３－、１，４－、１，５－、１，６－、１，７－、１，８－、２，３－、２，６－または２，７－ナフチリデンまたは

【化１】



であり、それぞれのナフチリデンまたはフェノチアジンは、一個、二個、三個または四個の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、－ＣＯＯＲ’、－ＣＯＮＨＲ’、－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ’、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ’または－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ’基で置換されていてもよく、式中のｎおよびＲ’は上で定義されたとおりである；ただし、ＡｒがフェノチアジンであるときはＳｐ^{1}は窒素と結合するだけの結合手であり；

Ｓｐ^{2}は結合手、－Ｓ－または－Ｏ－である；ただし、Ａｌｋ^{2}が結合手であるとき、Ｓｐ^{2}は結合手であり；

Ｚ^{1}は、Ｈ、あるいは一個、二個または三個の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、－ＣＯＯＲ’、－ＯＮＨＲ’、－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ’、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ’、－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ’または－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ’基で置換されていてもよい（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルキルまたはフェニルであり、式中でｎおよびＲ’は上で定義したとおりであり；

Ｓｐは、直鎖または分枝鎖の二価または三価の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{18}$）基、二価または三価のアリールまたはヘテロアリール基、二価または三価の（Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{18}$）シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキル基、二価または三価のアリールまたはヘテロアリール－アリール（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{18}$）基、二価または三価のシクロアルキルまたはヘテロシクロアルキル－アルキル（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{18}$）基あるいは二価または三価の（Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{18}$）不飽和アルキル基であり、式中でＳｐが三価の基ならば、Ｓｐはさらに低級（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）ジアルキルアミノ、低級（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルコキシ、ヒドロキシまたは低級（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルキルチオ基によって置換され得る；

Ｑは＝ＮＨＮＣＯ－、＝ＮＨＮＣＳ－、＝ＮＨＮＣＯＮＨ－、＝ＮＨＮＣＳＮＨ－または＝ＮＨＯ－であり；

但し、該加水分解可能なリンカーは、４－（４－アセチルフェノキシ）酪酸（ＡｃＢｕｔ）を含むリンカーではない；

Ｗはカリチェアミシンであり；

ｍは、カリチェアミシンがコンジュゲートの４～１０重量％を構成するように精製したコンジュゲーション生成物についての平均の負荷であり；

および（－Ｘ－Ｗ）ｍはカリチェアミシンの誘導体である］

を有する単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを含む、コンジュゲーションの低い画分（ＬＣＦ）が１０％未満に減少した組成物であって、
（１）カリチェアミシン誘導体が抗ＣＤ２２抗体の４．５～１１重量％となるように、カリチェアミシン誘導体を抗ＣＤ２２抗体に加える工程；
（２）カリチェアミシン誘導体および抗ＣＤ２２抗体を、ｐＨが７から９の範囲で非求核性でタンパク融和性の緩衝溶液中でインキュベートして、単量体カリチェアミシン誘導体／抗体コンジュゲートを含む組成物を生成する工程；ここで該溶液はさらに（ａ）有機共溶媒および（ｂ）少なくとも一つのC_9－C_{18}カルボン酸またはその塩を含む添加剤を含み、該インキュベーションを３０℃から３５℃までの範囲の温度で１５分から２４時間までの範囲の期間行う；および
（３）工程（２）で生成した組成物をクロマトグラフィーによる分離法に付して、４～１０重量％の範囲のカリチェアミシンの負荷および１０％未満のコンジュゲーションの低い画分（ＬＣＦ）を有する単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを、コンジュゲートしていない抗ＣＤ２２抗体、カリチェアミシン誘導体、および凝集したコンジュゲートから分離する工程
を含む方法によって製造される組成物。

【請求項２】
抗ＣＤ２２抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、一本鎖の抗体、生物学的に活性な抗体フラグメント、または重鎖単量体もしくは二量体からなる群から選択され、ここに、該生物学的に活性な抗体フラグメントがＦａｂ、修飾Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$またはＦｖであるところの請求項１記載の組成物。

【請求項３】
抗ＣＤ２２抗体がヒト化抗体である、請求項１または２記載の組成物。

【請求項４】
抗ＣＤ２２抗体がＣＤＲ移植抗体であるところの、請求項１～３のいずれか１項記載の組成物。

【請求項５】
抗ＣＤ２２抗体が、ＣＤＲ－Ｈ１については配列番号：１、ＣＤＲ－Ｈ２については配列番号：２または配列番号：１３または配列番号：１５または配列番号：１６または配列番号：２３の残基５０－６６または配列番号：２７の残基５０－６６、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については配列番号：３に示される配列のうち少なくとも一つを有するＣＤＲをその可変領域に含む重鎖、およびＣＤＲ－Ｌ１については配列番号：４、ＣＤＲ－Ｌ２については配列番号：５、あるいはＣＤＲ－Ｌ３については配列番号：６に示される配列のうち少なくとも一つを有するＣＤＲをその可変領域に含む軽鎖を含むところの請求項１～４のいずれか１項記載の組成物。

【請求項６】
抗ＣＤ２２抗体が、ＣＤＲ－Ｈ１については配列番号：１、ＣＤＲ－Ｈ２については配列番号：２または配列番号：１３または配列番号：１５または配列番号：１６または配列番号：２３の残基５０－６６または配列番号：２７の残基５０－６６、ＣＤＲ－Ｈ３については配列番号：３、ＣＤＲ－Ｌ１については配列番号：４、ＣＤＲ－Ｌ２については配列番号：５、およびＣＤＲ－Ｌ３については配列番号：６を含むところの請求項１～５のいずれか１項記載の組成物。

【請求項７】
抗ＣＤ２２抗体が、ＣＤＲ－Ｈ１については配列番号：１、ＣＤＲ－Ｈ２については配列番号：２７の残基５０－６６、ＣＤＲ－Ｈ３については配列番号：３、ＣＤＲ－Ｌ１については配列番号：４、ＣＤＲ－Ｌ２については配列番号：５、およびＣＤＲ－Ｌ３については配列番号：６を含むところの請求項１～６のいずれか１項記載の組成物。

【請求項８】
抗ＣＤ２２抗体が、ヒトアクセプターフレームワーク領域およびヒト以外のドナーのＣＤＲを含む可変部領域を含むところの、請求項１～７のいずれか１項記載の組成物。

【請求項９】
抗ＣＤ２２抗体が、Ｇｌｕ、Ａｒｇ、Ｉｌｅ、ＡｌａおよびＴｈｒによって各々、占有されている配列番号：８の１、２８、４８、７２および９７位にドナー残基を含む重鎖フレームワーク領域を含む重鎖可変領域を含み、ここに、重鎖フレームワーク領域の残りは、配列番号：２１または２２のヒトアクセプターフレームワークの対応する残基によって占有されている、請求項１～８のいずれか１項記載の組成物。
【請求項１０】
抗ＣＤ２２抗体が、Ｇｌｕ、Ａｒｇ、Ｉｌｅ、Ａｌａ、Ｌｅｕ、ＡｌａおよびＴｈｒによって各々、占有されている配列番号：８の１、２８、４８、６８、７０、７２および９７位にドナー残基を含む重鎖フレームワーク領域を含む重鎖可変領域を含み、ここに、重鎖フレームワーク領域の残りは、配列番号：２１または２２のヒトアクセプターフレームワークの対応する残基によって占有されている、請求項１～９のいずれか１項記載の組成物。
【請求項１１】
抗ＣＤ２２抗体が、Ｖａｌ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｈｉｓ、ＧｌｎおよびＡｓｐによって各々、占有されている配列番号：７の２、４、４２、４３、５０および６５位にドナー残基を含む軽鎖フレームワーク領域を含む軽鎖可変領域を含み、ここに、軽鎖フレームワーク領域の残りは、配列番号：１７または１８のヒトアクセプターフレームワークの対応する残基によって占有されている、請求項１～９のいずれか１項記載の組成物。
【請求項１２】
抗ＣＤ２２抗体が、Ｖａｌ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｈｉｓ、ＧｌｎおよびＡｓｐによって各々、占有されている配列番号：７の２、４、４２、４３、５０および６５位にドナー残基を含む軽鎖フレームワーク領域を含む軽鎖可変領域を含み、ここに、軽鎖フレームワーク領域の残りは、配列番号：１７または１８のヒトアクセプターフレームワークの対応する残基によって占有されている、請求項１０記載の組成物。
【請求項１３】
抗ＣＤ２２抗体が、Ｖａｌ、Ｖａｌ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｈｉｓ、ＧｌｎおよびＡｓｐによって各々、占有されている配列番号：７の２、３、４、４２、４３、５０および６５位にドナー残基を含む軽鎖フレームワーク領域を含む軽鎖可変領域を含み、ここに、軽鎖フレームワーク領域の残りは、配列番号：１７または１８のヒトアクセプターフレームワークの対応する残基によって占有されている、請求項１～９および１１のいずれか１項記載の組成物。
【請求項１４】
抗ＣＤ２２抗体が、Ｖａｌ、Ｖａｌ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｈｉｓ、ＧｌｎおよびＡｓｐによって各々、占有されている配列番号：７の２、３、４、４２、４３、５０および６５位にドナー残基を含む軽鎖フレームワーク領域を含む軽鎖可変領域を含み、ここに、軽鎖フレームワーク領域の残りは、配列番号：１７または１８のヒトアクセプターフレームワークの対応する残基によって占有されている、請求項１０または１２記載の組成物。
【請求項１５】
抗ＣＤ２２抗体が配列番号：２７を含む重鎖可変領域を含む、請求項１～９および１１のいずれか１項記載の組成物。
【請求項１６】
抗ＣＤ２２抗体が配列番号：２７を含む重鎖可変領域を含む、請求項１３記載の組成物。
【請求項１７】
抗ＣＤ２２抗体が配列番号：１９を含む軽鎖可変領域を含む、請求項１～９、１１および１５のいずれか１項記載の組成物。
【請求項１８】
抗ＣＤ２２抗体が配列番号：１９を含む軽鎖可変領域を含む、請求項１０または１２記載の組成物。

【請求項１９】
抗ＣＤ２２抗体が、配列番号：２８の残基２１～２３９からなる軽鎖および配列番号：３０の残基２０～４６６からなる重鎖を含み、ここに、該抗体が哺乳動物細胞中で発現されるところの請求項１～９、１１、１５および１７のいずれか１項記載の組成物。
【請求項２０】
抗ＣＤ２２抗体が、哺乳動物細胞中での配列番号：２９および配列番号：３１の発現に由来する、請求項１９記載の組成物。
【請求項２１】
抗ＣＤ２２抗体が、配列番号：２８を含む軽鎖を含む、請求項１～１２、１５および１７のいずれか１項記載の組成物。
【請求項２２】
抗ＣＤ２２抗体が、配列番号：３０を含む重鎖を含む、請求項１～９、１１、１３、１５、１７、１９および２０のいずれか１項記載の組成物。
【請求項２３】
抗ＣＤ２２抗体が、配列番号：２８を含む軽鎖を含み、配列番号：３０を含む重鎖を含む、請求項１～９、１１、１７、１９および２０のいずれか１項記載の組成物。
【請求項２４】
カリチェアミシンが、β－カリチェアミシン、γ－カリチェアミシンおよびＮ－アセチルγ－カリチェアミシンからなる群から選択されるところの請求項１～２３のいずれか１項記載の組成物。
【請求項２５】
カリチェアミシンが、３－メルカプト－３－メチルブタノイルヒドラジドによって機能化されるところの請求項１～２４のいずれか１項記載の組成物。
【請求項２６】
コンジュゲーションの低い画分（ＬＣＦ）の少ない単量体カリチェアミシン／抗体コンジュゲートを含む安定して凍結乾燥した組成物の調製方法であって、
（ａ）請求項１～２５のいずれか１項記載の組成物を、１．５重量％～５重量％の濃度の凍結防止剤、０．５重量％～１．５重量％の濃度のポリマー充填剤、０．０１Ｍ～０．１Ｍの濃度の電解質、０．００５重量％～０．０５重量％の濃度の溶解促進剤、溶液の最終ｐＨが７．８～８．２になるような５～５０ｍＭの濃度の緩衝化剤および水を含む溶液中に溶解して、０．５～２ｍｇ／ｍｌの最終濃度とし；
（ｂ）上記溶液を＋５℃～＋１０℃の温度でガラス瓶に分配し；
（ｃ）該溶液を－３５℃～－５０℃の凍結温度で凍結させ；
（ｄ）該凍結した溶液を、２０～８０ミクロンの一次乾燥圧で、棚の温度が－１０℃～－４０℃で、２４～７８時間最初の凍結乾燥工程に付し；
（ｅ）工程（ｄ）の凍結乾燥生成物を、２０～８０ミクロンの乾燥圧で、棚の温度が＋１０℃～＋３５℃で、１５～３０時間第二次乾燥工程に付す
ことを含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、高薬物負荷および実質的にコンジュゲーションの低い画分（ＬＣＦ）の減少した単量体細胞傷害薬－キャリアコンジュゲート（以降「コンジュゲート」と呼ぶ）の生成法に関する。特に本発明は抗ＣＤ２２抗体単量体カリチェアミシンコンジュゲートに関する。本発明はまた、本発明のコンジュゲート、コンジュゲートの精製法、コンジュゲートを含む医薬組成物、およびコンジュゲートの使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
全身薬物療法のために開発された薬剤コンジュゲートは、標的特異的細胞傷害試薬である。その概念は治療薬を限定された標的細胞群に対して特異性を有するキャリア分子に結

合させることを含む。抗原に対して高い親和性を持つ抗体は、標的とする部分として当然の選択である。高い親和性を持つモノクローナル抗体は有効であるので、抗体ターゲッティング療法の展望は有望になってきている。モノクローナル抗体に抱合される有毒物質には、毒素、低分子量細胞傷害薬、生物学的反応修飾物および放射性核種を含む。抗体およびメトトレキサートならびにアドリアマイシンのような低分子量薬剤とからなる免疫コンジュゲートが化学免疫コンジュゲートと呼ばれるのに対して、抗体毒素コンジュゲートはしばしば抗毒素と呼ばれる。免疫調節剤には、リンフォカイン、成長因子および補体活性化コブラ毒素因子（ＣＶＦ）のような調節機能を持つことが知られている生物学的反応修飾物を含む。放射性免疫コンジュゲートは、放射線によって細胞を殺す治療法としてまたは画像化のために用いられるような、放射性同位体からなる。細胞傷害薬の腫瘍細胞への抗体の媒介する特異的な輸送には、抗腫瘍効力の増大だけでなく、正常細胞による標的外の取り込みも防ぎ、従ってその治療指数は向上すると考えられる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００３】

【特許文献１】米国特許第４９７０１９８号
【特許文献２】米国特許第５０５３３９４号
【特許文献３】米国特許第５８７７２９６号
【特許文献４】米国特許第５７７３００１号
【特許文献５】米国特許第５７１２３７４号
【特許文献６】米国特許第５７１４５８６号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

本発明は、ターゲッティングの媒介物としての抗体からなり、細胞傷害薬に結合した悪性腫瘍細胞の表面にある抗原決定基に対して特異性を持つ免疫コンジュゲートに関する。本発明は、抗体がＢ細胞悪性腫瘍、リンパ組織増殖性疾患、慢性炎症性疾患（の細胞上）にある抗原決定基に対して特異性を持つような、細胞傷害薬抗体コンジュゲートに関する。本発明はまた、免疫コンジュゲートの生成法およびそれらの治療への利用に関する。

癌および関節リウマチを含む多様な疾患を治療するためのいくつかの抗体を基礎とする治療法は、非ホジキンリンパ腫のようなＢ細胞悪性腫瘍を含めた多様な悪性腫瘍に対して、すでに臨床応用が認可されているかまたは臨床試験が行われているところである。一つのそのような抗体を基礎とする治療法が、非標識のキメラヒトγ１（＋ｍγ１Ｖ領域）抗体であるリツキシマブ（リツキサン（登録商標））であり、Ｂ細胞に発現している細胞表面抗原ＣＤ２０に対して特異的である。これらの抗体を基礎とする治療法は、Ｂ細胞に対する補体媒介性細胞傷害（ＣＤＣＣ）または抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、または^{131}Ｉや^{90}Ｙの様な放射性核種に頼るものであり、このことが臨床医および患者にとっての（この薬剤の）調製および利用における問題に関係している。その結果、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）のような造血系の悪性腫瘍を含めた多様な悪性腫瘍を治療するための、現在の抗体を基礎とする治療法の短所を克服でき、容易かつ効率的に生成でき、免疫応答を誘導せずに繰り返し使用できるような免疫コンジュゲートを生み出すことが必要である。

【０００５】

集合的にカリチェアミシンまたはＬＬ－Ｅ３３２８８コンジュゲート（米国特許第４９７０１９８号参照）として知られている抗菌薬および抗腫瘍薬の有力な集団の構成員からなる免疫コンジュゲートは、骨髄腫の治療への利用のために開発された。カリチェアミシンのうち最も強力なものをγ１と呼び、本明細書では単にγと呼ぶ。これらの化合物はメチルトリスルフィドを含み、それは適切なチオールと反応してジスルフィドを形成し、同時にヒドラジドまたはカリチェアミシン誘導体をキャリアに結合させるのに有用な他の官能基のような官能基を導入する（米国特許第５０５３３９４号参照）。キャリアに結合し

ているカリチェアミシン誘導体（すなわち薬物負荷）が増加するとタンパクの凝集体が形成されることになるという結合方法論だけでなく、特異的標的試薬（キャリア）が有効であることによっても、多種多様な癌に対する治療法を発達させる上で単量体カリチェアミシン誘導体－キャリアコンジュゲートを用いることは制限されてきた。高薬物負荷にするとコンジュゲートの本来の薬効が向上するので、キャリアタンパクの親和性を堅実に保持できる限りの多くの薬剤をキャリアに結合させることが望ましい。非特異的な毒性および免疫原性を持ち、それゆえに治療への適用から除外されるべき凝集タンパクが存在すると、これらのコンジュゲートの生成量を増加させる過程がより困難となり、生成物の収率は減少する。キャリアタンパクに結合させるカリチェアミシンの量（薬物負荷）、結合反応の際に形成される凝集体の量、および得られる精製した単量体のコンジュゲートの最終的な収率は全て相関している。それゆえに結合反応に加えられる反応性のカリチェアミシン誘導体の量を調節することによって、高薬物負荷および最終的な単量体の収率の中間で妥協せざるを得ない。

【０００６】

細胞傷害薬コンジュゲート、特にカリチェアミシンコンジュゲートの凝集しやすい傾向は、米国特許第５８７７２９６号と米国特許第５７７３００１号（その内容を本明細書の一部とする）に記述されているリンカーを用いて結合反応を行うときに特に問題となる。この場合、生成する大多数のコンジュゲートは凝集体の中にあり、元来の方法（ＣＭＡ法）によって作られるコンジュゲートを薬用として精製することは極めて困難である。いくつかのキャリアタンパクにおいては、小規模なもの以外は、適度の負荷のコンジュゲートを作ることでさえ事実上不可能である。その結果、凝集量を最小限とし、それによって妥当な収率の生成物とともにできるだけ高薬物負荷を見込めるようなキャリアに、カリチェアミシンのような細胞傷害薬を結合させる方法を改良していくことが決定的に必要となる。

【０００７】

以前に、高薬物負荷、高収率かつ凝集量を減らした単量体カリチェアミシン誘導体／キャリアを調整する結合方法が開示された（米国特許第５７１２３７４号と米国特許第５７１４５８６号参照、その内容を本明細書の一部とする）。これらの方法は十分に凝集量を減らしたコンジュゲート調製法となったけれども、後にこの方法は、望ましくない高い水準の（４５－６５％　ＨＰＬＣ　面積％）、大部分が結合していない抗体からなるコンジュゲーションの低い画分（ＬＣＦ）を含むコンジュゲートを生成することが発見された。ＬＣＦは細胞傷害薬を含まず、生成物中にＬＣＦが存在すると、抗体の利用が非能率的となる。ＬＣＦはまたカリチェアミシン－キャリアコンジュゲートと標的細胞について競合し、潜在的に後者の目標を定める能力を低下させて細胞傷害薬の薬効を結果として低下させる可能性がある。それゆえに、コンジュゲートの物理的性質を有意に変えることなく、ＬＣＦが有意に低い水準となり、凝集が許容できる水準にあるような改良した結合法が望ましい。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

（発明の開示）

本発明は、高薬物負荷およびコンジュゲーションの低い画分（low conjugate fraction（ＬＣＦ））の実質的に減少した単量体細胞傷害薬－キャリアコンジュゲート（「コンジュゲート」）の生成法に関する。特に、本発明は単量体カリチェアミシン誘導体／キャリアコンジュゲートの生成、そのコンジュゲート、その組成物、コンジュゲートの精製法、およびコンジュゲートの使用に関する。さらに特に、本発明は単量体カリチェアミシン誘導体－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート（ＣＭＣ－５４４）の生成法に関する。

【０００９】

一つの具体例として、本発明は、何らかの有意な物理的または化学的性質の変化なしに、有意に低い水準のＬＣＦ（１０パーセント以下）となるような、コンジュゲートの生成についての改良した結合法を開示する。本発明はまた、ＬＣＦの水準の有意に低下させる

だけでなく、以前に開示された方法より有意に凝集体が少なくなり、十分に薬物負荷を増加させるような結合法についてのさらなる改良を開示する。本発明のコンジュゲートは、式：

Ｐｒ（－Ｘ－Ｗ）ｍ

［式中：

Ｐｒはタンパク質のキャリアであり；

Ｘはタンパク質のキャリアと反応できる何らかの反応基を有する生成物からなるリンカーであり；

Ｗは細胞傷害薬であり；

ｍは、細胞傷害薬が重量でコンジュゲートの７～９％を構成するように精製したコンジュゲーション生成物についての平均の負荷である；

（－Ｘ－Ｗ）ｍは細胞傷害薬の誘導体である］

を有する。

【００１０】

本発明のコンジュゲートは、一つの具体例として、各工程：

（１）細胞傷害薬誘導体が重量でタンパク質キャリアの４．５～１１％となるように、細胞傷害薬誘導体をタンパク質キャリアに加え；

（２）細胞傷害薬誘導体およびタンパク質キャリアを、ｐＨが約７から９の範囲で非求核性でタンパク融和性の緩衝液で処理された溶液中でインキュベートし、単量体細胞傷害薬－キャリアコンジュゲートを生成した。その溶液はさらに（ａ）有機共溶媒および（ｂ）少なくとも一つのC_{6}－C_{18}カルボン酸またはその塩を含む添加剤を含んでおり、インキュベーションは約３０℃から３５℃までの範囲の温度で約１５分から２４時間までの範囲の期間行われ；

（３）工程（２）で生成したコンジュゲートをクロマトグラフィーによる分離法にかけて、重量で４～１０％の範囲の細胞傷害薬の負荷で、コンジュゲーションの低い画分（ＬＣＦ）が１０％未満である単量体細胞傷害薬誘導体－タンパク質キャリアコンジュゲートを、結合していないタンパク質キャリア、細胞傷害薬誘導体、および凝集したコンジュゲートから分離する

工程を含む本発明の方法によって生成される。

【００１１】

本発明の一つの側面として、コンジュゲートのタンパク質のキャリアは、ホルモン、成長因子、抗体、抗体の断片、抗体の模擬物、およびそれらを遺伝子的または酵素的に処理したものからなる群から選ばれる。

一つの具体例としては、タンパク質のキャリアは抗体である。好ましい具体例としては、抗体がモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、一本鎖の抗体、Ｆａｂ断片およびＦ（ａｂ）２断片からなる群から選ばれる。

【００１２】

他の具体例としては、ヒト化抗体は細胞表面抗原ＣＤ２２に対するものである。

好ましい具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体はＣＤＲを移植した抗体であり、軽鎖の可変部５／４４－ｇＬ１（配列番号：１９）および重鎖の可変部５／４４－ｇＨ７（配列番号：２７）を含む。

他の好ましい具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、配列番号：２８に示す配列を持った軽鎖からなる、ＣＤＲを移植した抗体である。

さらに他の好ましい具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、配列番号：３０に示す配列を持った重鎖からなる、ＣＤＲを移植した抗体である。

【００１３】

他の好ましい具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、配列番号：２８に示す配列を持った軽鎖および、配列番号：３０に示す配列を持った重鎖を含む、ＣＤＲを移植した抗体である。

他の具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、親和性成熟プロトコールによって得ら

れる変異した抗体であり、ヒトＣＤ２２に対する特異性を高めたＣＤＲ移植抗体である。
他の側面として、本発明の単量体細胞傷害薬－キャリアコンジュゲートを生成するために用いられる細胞傷害薬は、チューブリン重合の阻害剤、ＤＮＡに結合して分裂させるアルキル化剤、タンパク質合成阻害剤、またはチロシンキナーゼ阻害剤のいずれかである。
【００１４】
一つの具体例としては、細胞傷害薬は、カリチェアミシン、チオテパ、タキサン類、ビンクリスチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エスペラミシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、タモキシフェン、イダルビシン、ドラスタチン／アウリスタチン、ヘミアスタリンまたはマイタンシノイドから選ばれる。
好ましい具体例としては、細胞傷害薬はカリチェアミシンである。特に好ましい具体例としては、そのカリチェアミシンはγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルγカリチェアミシン誘導体である。
【００１５】
さらに他の側面としては、細胞傷害薬は、３－メルカプト－３－メチルブタノイルヒドラジドによって機能化し、標的細胞と結合してその中に入った後にコンジュゲートから細胞傷害薬を放出することのできる加水分解が可能なリンカーを介して、タンパク質のキャリアと結合する。
この側面の好ましい具体例としては、その加水分解可能なリンカーは、４－（４－アセチルフェノキシ）酪酸（ＡｃＢｕｔ）である。
【００１６】
本発明のさらに他の側面として、オクタン酸またはその塩、あるいはデカン酸またはその塩は、結合過程の間凝集を減らして薬物負荷を増加させるために添加剤として用いられる。
本発明のさらに他の側面として、本発明のコンジュゲートは、クロマトグラフィー分離法によって精製される。
一つの具体例として、単量体薬剤誘導体－キャリアコンジュゲートを分離するために用いられるクロマトグラフィー分離法は、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）である。
他の具体例としては、単量体薬剤誘導体－キャリアコンジュゲートを分離するために用いられるクロマトグラフィー分離法は、ＨＰＬＣ、ＦＰＬＣまたはＳｅｐｈａｃｒｙｌＳ－２００クロマトグラフィーである。
【００１７】
好ましい具体例としては、単量体薬剤誘導体－キャリアコンジュゲートを分離するために用いられるクロマトグラフィー分離法は、疎水的相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）である。特に好ましい具体例としては、ＨＩＣは、フェニルセファロース６ファーストフロー（Fast Flow）クロマトグラフィー媒体、ブチルセファロース４ファーストフロークロマトグラフィー媒体、オクチルセファロース４ファーストフロークロマトグラフィー媒体、トヨパールエーテル－６５０Ｍクロマトグラフィー媒体、マクロプレップ（Macro-Prep）メチルＨＩＣ媒体またはマクロプレップｔ－ブチルＨＩＣ媒体を用いて行われる。より特に好ましい具体例としては、ＨＩＣは、ブチルセファロース４ファーストフロークロマトグラフィー媒体を用いて行われる。
他の側面としては、本発明は、本発明の方法によって生成する単量体細胞傷害薬剤誘導体－キャリアコンジュゲートに焦点が当てられている。この側面の好ましい具体例としては、用いられる細胞傷害薬はカリチェアミシンであって、用いられるキャリアは抗体である。
【００１８】
他の好ましい具体例としては、抗体はモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、一本鎖の抗体、Ｆａｂ断片およびＦ（ａｂ）２断片からなる群から選ばれる。より特に好ましい側面としては、細胞表面抗原ＣＤ２２に対するヒト化抗体が用いられる

。
一つの具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体はＣＤＲを移植した抗体であり、軽鎖の可変部５／４４－ｇＬ１（配列番号：１９）および重鎖の可変部５／４４－ｇＨ７（配列番号：２７）を含む。
他の具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、配列番号：２８に示す配列を持った軽鎖を含む、ＣＤＲを移植した抗体である。
【００１９】
好ましい具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、配列番号：３０に示す配列を持った重鎖からなる、ＣＤＲを移植した抗体である。
他の好ましい具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、配列番号：２８に示す配列を持った軽鎖および、配列番号：３０に示す配列を持った重鎖からなる、ＣＤＲを移植した抗体である。
さらに他の具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、親和性成熟プロトコールによって得られる変異した抗体であり、ヒトＣＤ２２に対する特異性を高めたＣＤＲ移植抗体である。
好ましい具体例としては、カリチェアミシンはγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルγカリチェアミシンである。
一つの具体例としては、カリチェアミシン誘導体は３－メルカプト－３－メチルブタノイルヒドラジドによって機能化される。
他の具体例としては、薬剤をキャリアに結合させるために用いられるリンカーは、標的細胞と結合してその中に入った後にコンジュゲートから細胞傷害薬を放出することのできる加水分解が可能なリンカーである。好ましい具体例としては、加水分解が可能なリンカーは４－（４－アセチルフェノキシ）酪酸（ＡｃＢｕｔ）である。
【００２０】
本発明の他の側面は、式：
Ｐｒ（－Ｘ－Ｓ－Ｓ－Ｗ）ｍ
［式中：
Ｐｒは抗ＣＤ２２抗体であり；
Ｘは抗体と反応できる反応基を有する生成物からなる加水分解が可能なリンカーであり；
Ｗはカリチェアミシンラジカルであり；
ｍは、カリチェアミシンが重量でコンジュゲートの４～１０％を構成するように精製したコンジュゲーション生成物についての平均の負荷であり；
（－Ｘ－Ｓ－Ｓ－Ｗ）ｍは本発明の方法によって生成したカリチェアミシンの誘導体である］
を有する単量体カリチェアミシン誘導体－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートに焦点が当てられている。
【００２１】
この側面についての一つの具体例としては、抗体はモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、一本鎖の抗体、Ｆａｂ断片およびＦ（ａｂ）２断片からなる群から選ばれる。
好ましい具体例としては、抗体はヒトＣＤ２２に対する特異性を持ち、且つＣＤＲ－Ｈ１については図１中でＨ１（配列番号：１）として、ＣＤＲ－Ｈ２については図１でＨ２（配列番号：２）またはＨ’２（配列番号：１３）またはＨ''２（配列番号：１５）またはＨ'''２（配列番号：１６）として、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については図１中でＨ３（配列番号：３）として与えられる配列のうち少なくとも一つ持つＣＤＲをその可変領域に含むような重鎖およびＣＤＲ－Ｌ１については図１中でＬ１（配列番号：４）として、ＣＤＲ－Ｌ２については図１中でＬ２（配列番号：５）として、あるいはＣＤＲ－Ｌ３については図１中でＬ３（配列番号：６）として与えられる配列のうち少なくとも一つ持つＣＤＲをその可変領域に含むような軽鎖とからなるような抗ＣＤ２２抗体である。

【００２２】
他の好ましい具体例としては、抗ＣＤ２２抗体は、ＣＤＲ－Ｈ１については配列番号：１中で、ＣＤＲ－Ｈ２については配列番号：２または配列番号：１３または配列番号：１５または配列番号：１６中で、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については配列番号：３中で与えられる配列のうち少なくとも一つ持つＣＤＲをその可変領域に含むような重鎖および、ＣＤＲ－Ｌ１については配列番号：４中で、ＣＤＲ－Ｌ２については配列番号：５中で、あるいはＣＤＲ－Ｌ３については配列番号：６中で与えられる配列のうち少なくとも一つ持つＣＤＲをその可変領域に含むような軽鎖からなる。
【００２３】
さらに他の好ましい具体例としては、抗ＣＤ２２抗体は、ＣＤＲ－Ｈ１については配列番号：１、ＣＤＲ－Ｈ２については配列番号：２または配列番号：１３または配列番号：１５または配列番号：１６、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については配列番号：３、ＣＤＲ－Ｌ１については配列番号：４、ＣＤＲ－Ｌ２については配列番号：５、およびＣＤＲ－Ｌ３については配列番号：６からなる。
【００２４】
他の具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、ＣＤＲを移植した抗ＣＤ２２抗体であり、ヒトアクセプターフレームワーク部およびヒト以外のドナーのＣＤＲからなる可変領域からなっている。
他の具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、抗体の重鎖の可変部の領域がヒトサブグループＩ共通配列を基にしているヒトアクセプターフレームワークを持ち、１、２８、４８、７１、および９３位にヒト以外のドナー残基を含む。他の具体例としては、ヒト化抗体はさらに６７位と６９位にヒト以外のドナー残基を含む。
【００２５】
一つの好ましい具体例としては、ＣＤＲを移植したヒト化抗体は、ヒトサブグループＩ共通配列を基にしているヒトアクセプターフレームワーク領域からなり、さらに２、４、３７、３８、４５および６０位でヒト以外のドナー残基を含むような軽鎖の可変部を含む。他の具体例としては、ＣＤＲを移植した抗体は、さらに３位にヒト以外のドナー残基を含む。
さらに他の具体例としては、ＣＤＲを移植した抗体は、軽鎖可変領域５／４４－ｇＬ１（配列番号：１９）および重鎖可変領域５／４４－ｇＨ７（配列番号：２７）からなる。
【００２６】
他の具体例としては、ＣＤＲを移植した抗体は、配列番号：２８に示すような配列を持つ軽鎖および配列番号：３０に示すような配列を持つ重鎖からなる。
さらに他の具体例としては、ＣＤＲを移植した抗体は、配列番号：２８に示すような配列を持つ軽鎖および配列番号：３０に示すような配列を持つ重鎖からなる。
一つの具体例としては、抗ＣＤ２２ＣＤＲ移植抗体は、親和性成熟プロトコールによって得られる変異した抗体であり、ヒトＣＤ２２に対する特異性が高まっている。
【００２７】
他の具体例としては、抗ＣＤ２２抗体は、それぞれ配列番号：７および配列番号：８に示すモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の可変領域の配列を含むキメラ抗体である。
さらに他の具体例としては、抗ＣＤ２２抗体は、ドナーＣＤＲの欠けた部分が異なった配列で置換され、機能的ＣＤＲを形成するような切断されたドナーＣＤＲをもつハイブリッドＣＤＲを含む。
特に好ましい具体例としては、細胞傷害薬誘導体が、γカリチェアミシンまたはＮ－アセチルγカリチェアミシン誘導体である。
【００２８】
他の側面としては、本発明は、単量体細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲートの安定な凍結乾燥した組成物の調製法に焦点が当てられている。好ましい具体例としては、単量体細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲートの安定な凍結乾燥した組成物を、
（ａ）単量体細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲートを、重量で１．５％～５％の

濃度の凍結防止剤、重量で０．５％～１．５％の濃度のポリマー充填剤、０．０１Ｍ～０．１Ｍの濃度の電解質、重量で０．００５％～０．０５％の濃度の溶解促進剤、溶液の最終ｐＨが７．８～８．２になるような５～５０ｍＭの濃度の緩衝液および水からなる溶液中に溶解して、０．５～２ｍｇ／ｍｌの最終濃度とし、

（ｂ）上の溶液を＋５℃～＋１０℃の温度でガラス瓶に分配し、

（ｃ）その溶液を－３５℃～－５０℃の温度で凍結させ、

（ｄ）その凍結した溶液を、２０～８０ミクロンの一次乾燥圧で、棚の温度が－１０℃～－４０℃で、２４～７８時間最初の凍結乾燥工程にかけ、

（ｅ）工程（ｄ）の凍結乾燥生成物を、２０～８０ミクロンの乾燥圧で、棚の温度が＋１０℃～＋３５℃で、１５～３０時間第二次乾燥工程にかける

ことによって、調製する。

【００２９】

一つの具体例としては、細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲートの凍結乾燥に用いられる凍結防止剤が、アルジトール、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、ポリエチレングリコール、アルドン酸、ウロン酸、アルダン酸、アルドース類、ケトース類、アミノ糖類、アルジトール類、イノシトール類、グリセルアルデヒド類、アラビノース、リキソース、ペントース、リボース、キシロース、ガラクトース、グルコース、ヘキソース、イドース、マンノース、タロース、ヘプトース、グルコース、フルクトース、グルコン酸、ソルビトール、ラクトース、マンニトール、メチルα－グルコピラノシド、マルトース、イソアスコルビン酸、アスコルビン酸、ラクトン、ソルボース、グルカル酸、エリトロース、トレオース、アラビノース、アロース、アルトロース、グロース、イドース、タロース、エリトルロース、リブロース、キシルロース、プシコース、タガトース、グルクロン酸、グルコン酸、グルカル酸、ガラクツロン酸、マンヌロン酸、グルコサミン、ガラクトサミン、スクロース、トレハロース、ノイラミン酸、アラビナン類、フルクタン類、フカン類、ガラクタン類、ガラクツロナン類、グルカン類、マンナン類、キシラン類、レバン、フコイダン、カラゲーニン、ガラクトカロロース、ペクチン類、ペクチン酸、アミロース、プルラン、グリコーゲン、アミロペクチン、セルロース、デキストラン、プスツラン、キチン、アガロース、ケラチン、コンドロイチン、デルマタン、ヒアルロン酸、アルギン酸、キサンゴム、澱粉、スクロース、グルコース、ラクトース、トレハロース、エチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、グリセロールまたはペンタエリトリロールから選ばれる。

【００３０】

好ましい具体例としては、凍結防止剤が、重量で１．５％の濃度で存在するようなスクロースである。

一つの具体例としては、凍結乾燥工程の間に用いられるポリマー充填剤が、デキストラン４０またはヒドロキシエチル澱粉４０から選ばれ、重量で０．９％の濃度である。

他の具体例としては、凍結乾燥溶液中に用いられる電解質が、０．０５Ｍの濃度で存在しているような塩化ナトリウムである。

好ましい具体例としては、溶解促進剤は凍結乾燥工程の間に用いられる。好ましくは、この溶解促進剤は界面活性剤である。特に好ましい具体例としては、その界面活性剤は、重量で０．０１％の濃度で存在しているポリソルベート８０である。

【００３１】

一つの具体例として、用いられている緩衝剤は、０．０２Ｍの濃度で存在しているトロメタミンである。溶液のｐＨは凍結乾燥工程の開始時点において８．０であることが好ましい。細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲートを含む溶液を、凍結乾燥工程の開始より前に＋５℃の温度でガラス瓶に分配する。

好ましい具体例としては、ガラス瓶中の溶液を－４５℃で冷凍し；冷凍した溶液を６０ミクロンの一次乾燥圧で、棚の温度が－３０℃で、６０時間最初の凍結乾燥工程にかけ；、凍結乾燥生成物を、６０ミクロンの乾燥圧で、棚の温度が＋２５℃で、２４時間第二次乾燥工程にかける。

【００３２】
本発明の他の側面は、本発明の方法によって調製した治療上有効量の単量体細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲートに焦点が当てられている。
一つの具体例としては、単量体細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲート中のキャリアは、ホルモン、成長因子、抗体、および抗体の模擬物から選ばれるようなタンパク質のキャリアである。
好ましい具体例としては、タンパク質のキャリアが、ヒトモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体である。
好ましい具体例としては、ヒト化抗体は、細胞表面抗原ＣＤ２２に対するものである。
【００３３】
特に好ましくは、本発明のこの側面についての具体例は、抗ＣＤ２２抗体はヒトＣＤ２２に対する特異性を持ち、且つＣＤＲ－Ｈ１については図１中でＨ１（配列番号：１）として、ＣＤＲ－Ｈ２については図１でＨ２（配列番号：２）またはＨ２’（配列番号：１３）またはＨ２''（配列番号：１５）またはＨ２'''（配列番号：１６）として、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については図１中でＨ３（配列番号：３）として与えられる配列のうち少なくとも一つを持つＣＤＲをその可変領域に含むような重鎖および、ＣＤＲ－Ｌ１については図１中でＬ１（配列番号：４）として、ＣＤＲ－Ｌ２については図１中でＬ２（配列番号：５）として、あるいはＣＤＲ－Ｌ３については図１中でＬ３（配列番号：６）として与えられる配列のうち少なくとも一つを持つＣＤＲをその可変領域に含むような軽鎖からなる。
【００３４】
他の好ましい具体例としては、抗ＣＤ２２抗体は、ＣＤＲ－Ｈ１については配列番号：１中で、ＣＤＲ－Ｈ２については配列番号：２または配列番号：１３または配列番号：１５または配列番号：１６中で、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については配列番号：３中で与えられる配列のうち少なくとも一つを持つＣＤＲをその可変領域に含むような重鎖および、ＣＤＲ－Ｌ１については配列番号：４中で、ＣＤＲ－Ｌ２については配列番号：５中で、あるいはＣＤＲ－Ｌ３については配列番号：６中で与えられる配列のうち少なくとも一つを持つＣＤＲをその可変領域に含むような軽鎖を持つ。
【００３５】
さらに他の好ましい具体例としては、抗ＣＤ２２抗体は、ＣＤＲ－Ｈ１については配列番号：１、ＣＤＲ－Ｈ２については配列番号：２または配列番号：１３または配列番号：１５または配列番号：１６、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については配列番号：３、ＣＤＲ－Ｌ１については配列番号：４、ＣＤＲ－Ｌ２については配列番号：５、およびＣＤＲ－Ｌ３については配列番号：６からなる。
特に好ましい具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、ＣＤＲを移植したヒト化抗ＣＤ２２抗体であり、軽鎖可変領域５／４４－ｇＬ１（配列番号：１９）および重鎖可変領域５／４４－ｇＨ７（配列番号：２７）を含む。
【００３６】
他の特に好ましい具体例としては、ヒト化抗ＣＤ２２抗体は、ヒトＣＤ２２に対する特異性を持ったＣＤＲ移植抗体であり、配列番号：２８に示すような配列を持つ軽鎖および、配列番号：３０に示すような配列を持つ重鎖からなる。
一つの具体例としては、ＣＤＲ移植抗体は、ヒトＣＤ２２に対する特異性を高めた変異した抗体であり、その抗体は親和性成熟プロトコールによって得られる。
一つの具体例としては、単量体細胞傷害薬はカリチェアミシンであり、好ましくはγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルカリチェアミシンである。
一つの具体例としては、組成物は所望により追加の生物活性試薬を含んでいてよい。そのような生物活性のある試薬は、細胞傷害薬、成長因子またはホルモンであってよい。
【００３７】
本発明のさらに他の側面としては、治療上有効量の本発明の組成物を患者に投与することによって、増殖性疾患の患者を治療する方法に焦点が当てられている。その組成物への

投薬は、皮下でも、腹膜内でも、静脈内でも、動脈内でも、脊髄内でも、鞘内でも、経皮的でも、皮膚を介してでも、鼻腔内でも、局所的でも、経腸でも、経膣的でも、舌下でも、または経直腸でもよい。好ましい具体例としては、本発明の組成物は、静脈内投与される。

一つの具体例として、組成物は癌のような増殖性疾患に罹患している人間の患者に投与する。好ましい具体例としては、癌はＢ細胞悪性腫瘍である。Ｂ細胞悪性腫瘍は、細胞表面抗原ＣＤ２２を発現するような白血病またはリンパ腫でよい。

さらに他の具体例としては、癌は癌腫または肉腫でよい。

【００３８】

本発明の他の側面は、治療上有効量の本発明の細胞傷害薬抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートからなる組成物を、悪性腫瘍の患者に投薬することによって、Ｂ細胞悪性腫瘍の治療法に焦点が当てられている。好ましい具体例としては、Ｂ細胞悪性腫瘍は、リンパ腫、特に非ホジキンリンパ腫である。

一つの具体例としては、本発明のコンジュゲートを調製するのに用いられる細胞傷害薬剤はカリチェアミシン、チオテパ、タキサン類、ビンクリスチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、タモキシフェン、イダルビシン、ドラスタチン／アウリスタチン、ヘミアスタリン、マイタンシノイドおよびエスペラミシンからなる群より選ばれる。

好ましい具体例としては、細胞傷害薬はγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルカリチェアミシンである。

【００３９】

他の具体例としては、本治療法は、抗体、成長因子、ホルモン、サイトカイン、抗ホルモン、キサンチン、インターロイキン、インターフェロンおよび細胞傷害薬から選ばれる一つまたはそれ以上の生物活性試薬とともに、本発明の細胞傷害薬コンジュゲートを投薬することからなる。

好ましい具体例としては、生物活性試薬は抗体であり、Ｂ細胞悪性腫瘍上に発現する細胞表面抗原に対するものである。さらに好ましい具体例としては、Ｂ細胞悪性腫瘍上に発現する細胞表面抗原に対する抗体は、抗ＣＤ１９、抗ＣＤ２０および抗ＣＤ３３抗体からなる群から選ばれる。そのような抗体には抗ＣＤ２０抗体であるリツキシマブ（リツキサン（登録商標））を含める。

【００４０】

他の具体例としては、生物活性試薬はサイトカインまたは成長因子であり、インターロイキン２（ＩＬ－２）、ＴＮＦ、ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦおよびＧ－ＣＳＦを含むが、これらに限定されるものではない。

他の具体例としては、生物活性試薬はホルモンであり、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲスチンおよびコルチコステロイドを含める。

さらに他の具体例としては、生物活性試薬は、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、アクラルビシン、ゾルビシン、ミトザントロン、エピルビシン、カルビシン、ノガラマイシン、メノガリル、ピタルビシン、バルビシン、シタラビン、ゲムシタビン、トリフルリジン、アンシタビン、エノシタビン、アザシチジン、ドキシフルリジン、ペントスタチン、ブロクスリジン、カペシタビン、クラドリビン、デシタビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゴウゲロチン、ピューロマイシン、テガフール、チアゾフリン、アドリアマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダカーバジン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ミトザントロン、ブレオマイシン、メクロレタミン、ブレドニゾン、プロカルバジン、メトトレキサート、フルオロウラシル、エトポシド、タクソール、タクソール類似物またはマイトマイシンから選ばれる細胞傷害薬である。

【００４１】

好ましい具体例としては、細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物を、治療養生法の一部として一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬と組み合わせて投与することであり、細胞傷害性試薬の組み合わせは：ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド

、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）；ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）；ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）；ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）；ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）；ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）；ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）；ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）；ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）；ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）；ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）をＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交替で；ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）をＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交替で；ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）；ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）；ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）；ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）；ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）；ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）；ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）；またはＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）から選ばれる。

【００４２】

好ましい具体例としては、細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物を、上記の細胞傷害薬を一つまたはそれ以上を組み合わせて投与するのに先立って投与することである。他の好ましい具体例としては、細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物を、治療養生法の一部として上記の細胞傷害薬を一つまたはそれ以上を組み合わせて投与した後に投与することである。

本発明の他の側面は、前述の治療法の必要性のある患者に対して、治療上有効量の単量体カリチェアミシン誘導体抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの組成物を一つまたはそれ以上の生物活性試薬と共に投与することを含む、浸潤性のリンパ腫の治療法に焦点が当てられている。

本発明のさらなる他の側面は、癌のような増殖性疾患の患者の治療に際して、本発明の組成物を利用することに焦点が当てられている。特に、細胞表面にＣＤ２２抗原を発現するＢ細胞悪性腫瘍である。特に、Ｂ細胞悪性腫瘍は白血病かまたはリンパ腫のどちらかである。一つの具体例としては、癌は癌腫または白血病である。

【００４３】

一つの具体例としては、治療上有効量の組成物は、皮下、腹膜内、静脈内、動脈内、脊髄内、鞘内、経皮的、皮膚を介して、鼻腔内、局所的、経腸、経膣的、舌下、または経直腸で投与する。

好ましい具体例としては、本発明の医薬組成物の治療上有効量を静脈内に投与する。

【００４４】

本発明の他の側面は、非ホジキンリンパ腫のようなＢ細胞悪性腫瘍の患者の治療への利用のために、本発明の単量体カリチェアミシン誘導体抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの組成物を使用することに焦点が当てられている。一つの具体例としては、本発明の単量体カ

リチェアミシン誘導体抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを一つまたはそれ以上の生物活性試薬と共に投与することである。

一つの具体例としては、生物活性試薬は、抗体、成長因子、ホルモン、サイトカイン、抗ホルモン、キサンチン、インターロイキン、インターフェロンおよび細胞傷害薬からなるグループより選ばれる。

好ましい具体例としては、生物活性試薬は、抗ＣＤ１９、抗ＣＤ２０および抗ＣＤ３３抗体のような、Ｂ細胞悪性腫瘍で発現する細胞表面の抗原に対する抗体である。好ましい具体例としては、抗ＣＤ２０抗体はリツキシマブ（リツキサン（登録商標））である。

他の具体例としては、生物活性試薬には、サイトカイン、またはインターロイキン２（ＩＬ－２）、ＴＮＦ、ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦおよびＧ－ＣＳＦのような成長因子、またはエストロゲン、アンドロゲン、プロゲスチンおよびコルチコステロイドを含めたホルモンを含める。

【００４５】

他の具体例としては、生物活性試薬は、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、アクラルビシン、ゾルビシン、ミトザントロン、エピルビシン、カルビシン、ノガラマイシン、メノガリル、ピタルビシン、バルビシン、シタラビン、ゲムシタビン、トリフルリジン、アンシタビン、エノシタビン、アザシチジン、ドキシフルリジン、ペントスタチン、ブロクスリジン、カペシタビン、クラドリビン、デシタビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゴウゲロチン、ピューロマイシン、テガフール、チアゾフリン、アドリアマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダカーバジン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ミトザントロン、ブレオマイシン、メクロレタミン、ブレドニゾン、プロカルバジン、メトトレキサート、フルオロウラシル、エトポシド、タクソール、タクソール類似物およびマイトマイシンから選ばれる細胞傷害薬である。

【００４６】

好ましい具体例としては、治療上有効量の単量体カリチェアミシン誘導体抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを、治療養生法の一部として一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬と組み合わせて投与することであり、細胞傷害性試薬の組み合わせは：ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）；ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）；ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）；ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）；ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）；ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）；ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）；ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）；ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）；ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）；ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）をＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびビンブラスチン）と交替で；ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）をＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交替で；ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）；ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）；ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）；ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレ

ジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）；ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）；ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）；ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）；ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）；ＥＰＯＣＨ（エトポシド、ビンクリスチン、ドキソルビシンを９６時間シクロホスファミドの丸薬投与、およびブレドニゾン経口投与、）、ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）、ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）、ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）ＣＥＰＰ－Ｂ（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジンおよびブレオマイシン）およびＰ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドまたはプレドニゾン）から選ばれる。

【００４７】

一つの好ましい具体例としては、単量体カリチェアミシン誘導体抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを、細胞傷害薬を治療養生法の一部として一つまたはそれ以上を組み合わせて投与するのに先立って投与することである。

他の好ましい具体例としては、治療上有効量の単量体カリチェアミシン誘導体抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを、治療養生法の一部として細胞傷害薬を一つまたはそれ以上を組み合わせて投与した次に投与することである。

さらに他の好ましい具体例としては、治療上有効量の単量体カリチェアミシン誘導体抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを、所望により治療養生法の一部として一つまたはそれ以上を組み合わせ他細胞傷害薬も含めて、Ｂ細胞悪性腫瘍上の細胞表面抗原に対する抗体と共に投薬することである。

他の側面としては、本発明は、増殖性疾患の治療のための医薬品の製造に本発明の単量体カリチェアミシン誘導体抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを利用することに焦点が当てられている。そのような医薬品は、Ｂ細胞増殖性疾患を治療するために、単独かまたは他の生物活性試薬と組み合わせて用いられ得る。

【図面の簡単な説明】

【００４８】

【図１】図１は、マウスのモノクローナル抗体５／４４のＣＤＲのアミノ酸配列（配列番号：１から６）を示す。

【図２】図２は、マウスのモノクローナル抗体５／４４の軽鎖可変領域（V_L）のＤＮＡおよびタンパク質の配列を示す。

【図３】図３は、マウスのモノクローナル抗体５／４４の重鎖可変領域（V_H）の完全配列を示す。

【図４】図４は、ＣＤＲ－Ｈ２における、グリコシル化部位および反応性リシンの除去の計画を示す。

【図５】図５は、５／４４軽鎖配列の移植設計を示す。ＤＰＫ－９はヒト生殖細胞系細胞のアクセプターフレームワーク配列である。縦の線はマウスおよびヒトの残基の間の違いを示す。下線を引いた配列は、移植時に確保されたドナー残基を示す。ＣＤＲはイタリック文字で際だたせて示されている（ＤＰＫ－９についてはそのように示されていない）。移植断片ｇＬ１は６ドナーフレームワーク残基を持ち、ｇＬ２は７ドナーフレームワーク残基を持つ。

【００４９】

【図６】図６は、５／４４重鎖配列の移植設計を示す；ＤＰ７はヒト生殖細胞系細胞のアクセプターフレームワーク配列である。縦の線はマウスおよびヒトの残基の間の違いを示す。下線を引いた配列は、移植時に確保されたドナー残基を示す。ＣＤＲは、際だたせた文字、イタリック体で示されている（ＤＰ７についてはそのように示されていない）。移植断片ｇＨ４およびｇＨ６は６ドナーフレームワーク残基を持ち、ｇＨ５およびｇＨ７は

４ドナーフレームワーク残基を持つ。
【図７】図７はベクターｐＭＲＲ１４の遺伝子地図を示す。
【図８】図８はベクターｐＭＲＲ１０．１の遺伝子地図を示す
【図９】図９はキメラ５／４４変異体のバイアコア（Ｂｉａｃｏｒｅ）アッセイの結果を示す。
【図１０－１】図１０は５／４４ｇＨ１およびｇＬ１遺伝子群のオリゴヌクレオチドを示す。
【図１０－２】図１０は５／４４ｇＨ１およびｇＬ１遺伝子群のオリゴヌクレオチドを示す。
【図１１】図１１は、媒介ベクターｐＣＲ２．１（５４４ｇＨ１）のプラスミドマップを示す。
【図１２】図１２は、媒介ベクターｐＣＲ２．１（５４４ｇＬ１）のプラスミドマップを示す。
【図１３】図１３は、さらなる移植を行うために用いるオリゴヌクレオチドカセットを示す。
【図１４】図１４は、蛍光標識したマウス５／４４抗体および移植した変異体の間の競合アッセイを示すグラフである。
【００５０】
【図１５】図１５は、蛍光標識したマウス５／４４抗体および移植した変異体の間の競合アッセイを示すグラフである。
【図１６－１】図１６は、移植した重鎖と軽鎖の完全ＤＮＡおよびタンパク質配列を示す。
【図１６－２】図１６は、移植した重鎖と軽鎖の完全ＤＮＡおよびタンパク質配列を示す。
【図１６－３】図１６は、移植した重鎖と軽鎖の完全ＤＮＡおよびタンパク質配列を示す。
【図１６－４】図１６は、移植した重鎖と軽鎖の完全ＤＮＡおよびタンパク質配列を示す。
【図１６－５】図１６は、移植した重鎖と軽鎖の完全ＤＮＡおよびタンパク質配列を示す。
【図１６－６】図１６は、移植した重鎖と軽鎖の完全ＤＮＡおよびタンパク質配列を示す。
【図１７】図１７は、抗体－ＮＡｃ－γカリチェアミシンＤＭＨコンジュゲートを図解で表したものである。
【図１８】図１８は、ＲＡＭＯＳ－Ｂ細胞リンパ腫の成長に対するＣＭＣ－５４４の効果を示すグラフである。
【図１９】図１９は、ヌードマウスの生体内異種移植モデルの大Ｂ細胞リンパ腫に対するＣＭＣ－５４４の効果を示すグラフである。
【図２０】図２０は、ＲＬリンパ腫の成長について、ＣＭＡ－６７６結合工程で作られたＣＭＣ－５４４およびＣＭＣ－５４４結合工程で作られたものの効果を比較するグラフである。
【図２１】図２１は、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））で治療した大ＲＬリンパ腫がＣＭＣ－５４４治療に敏感であることを示すグラフである。
【図２２】図２２は、ＣＭＣ－５４４の細胞傷害効果におけるリツキシマブ（リツキサン（登録商標））の効果を示すグラフである。
【００５１】
【図２３】図２３は、散在性の早期ＲＡＭＯＳ－Ｂ細胞リンパ腫を持つ生存したＳＣＩＤマウスについての、ＣＭＣ－５４４、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））およびＣＭＣ６７６の効果を示すグラフである。
【図２４】図２４は、散在性の末期ＲＡＭＯＳ－Ｂ細胞リンパ腫を持つ生存したＳＣＩＤ

マウスについての、ＣＭＣ－５４４、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））およびＣＭＣ６７６の効果を示すグラフである。
【図２５】図２５は、散在性の末期ＲＡＭＯＳ－Ｂ細胞リンパ腫を持つ生存したＳＣＩＤマウスについての、ＣＭＣ－５４４、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））およびＣＭＣ６７６の効果を示すグラフである。
【図２６】図２６は、散在性の末期ＲＡＭＯＳ－Ｂ細胞リンパ腫を持つ生存したＳＣＩＤマウスについての、ＣＭＣ－５４４、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））およびＣＭＣ６７６の効果を示すグラフである。
【図２７】図２７は、散在性の末期ＲＡＭＯＳ－Ｂ細胞リンパ腫を持つ生存したＳＣＩＤマウスについての、ＣＭＣ－５４４、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））およびＣＭＣ６７６の効果を示すグラフである。
【図２８】図２８は、ＲＬ非ホジキンリンパ腫についての、ＣＭＣ－５４４のリツキシマブ（リツキサン（登録商標））と併用したときおよび併用しなかったときの抗腫瘍活性を示すグラフである。
【図２９】図２９は、ＲＬ非ホジキンリンパ腫についての、ＣＭＣ－５４４およびＣＨＯＰの抗腫瘍活性を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００５２】
（発明の詳細な記載）
本発明のコンジュゲートには、タンパク質キャリアと反応して細胞傷害薬誘導体－タンパク質のキャリアコンジュゲートを形成するような、反応基を含むリンカーで誘導される細胞傷害薬を含める。特に、本発明のコンジュゲートには、タンパク質キャリアとして用いられる抗体と反応して細胞傷害薬誘導体－抗体コンジュゲートを形成するような、反応基を含むリンカーで誘導される細胞傷害薬を含める。特に、その抗体は、Ｂ細胞悪性腫瘍上の細胞表面抗原に対する抗体と反応する。そのようなコンジュゲートを調製し、精製する改良した方法を以下に記述する。分離過程と共に、特定の共溶媒、添加剤、および特定の反応条件を用いると、ＬＣＦを有意に減少させた上で、単量体細胞傷害薬誘導体－抗体コンジュゲートを形成することになる。凝集体にならない単量体形成には、重要な治療上の価値があり、ＬＣＦを最小限にして十分に凝集を減少させると、ＬＣＦの形成がより高結合の画分（ＨＣＦ）と競合するのを阻害する治療上有意義な方法で、抗体の出発物質を利用できることになる。
【００５３】
１．キャリア
本発明のキャリア／標的試薬は、好ましくはタンパク質のキャリア／標的試薬である。以下で単独あるいは官能基として「キャリア」と呼ばれるような、ホルモン、成長因子、抗体、抗体の断片、抗体の模擬物、およびそれらを遺伝子的または酵素的に処理したものがキャリア／標的試薬として含まれる。キャリアにとって不可欠の性質は、抗原または、望ましくない細胞に結合するアクセプターを認識して結合し、続いてそれを内在化する能力である。本発明に適用できるキャリアの例が米国特許第５０５３３９４号（出典明示により本明細書の一部とする）に開示されている。本発明の利用における好ましいキャリアは、抗体および抗体の模擬物である。
【００５４】
いくつかの非免疫グロブリンタンパク質の骨格は、ある抗体に特異性を持つ抗原のエピトープに結合する抗体の模擬物を生成するために用いられてきた（ＰＣＴ出版　ナンバーＷＯ００／３４７８４）。例えば、免疫グロブリンの折りたたみに関係する、「小体」骨格は、モノクローナル抗体の重鎖可変領域から３つのβらせんを除くことによって作られてきた（Ｔｒａｍｏｎｔａｎｏら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．７：９，１９９４）。このタンパク質は、６１残基を含み、二個の超可変ループをもたらすのに用いられ得る。これら二個のループは無作為に作られ、抗原の結合によって選別される生成物であったが、今までのところはフレームワーク部は、溶解度の問題のために、その実用が幾分制限

されてきたように思われる。ループを明らかにするために用いられる他のフレームワークはテンダミスタットであり、哺乳類のαアミラーゼを特異的に阻害し、二個のジスルフィド結合によって結合した６本鎖βシートの積み重ねの、７４残基のタンパクである（ＭｃＣｏｎｎｅｌｌおよびＨｏｅｓｓ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２５０：４６０、１９９５年）。この骨格は、三個のループを持つが、現在のところ、三個のループのうち二個のみがランダム化ポテンシャルについて試験されてきた。

【００５５】

他のタンパク質はフレームワークとして試験され、αらせん表面上のランダム化残基（Ｎｏｒｄら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５：７７２、１９９７；Ｎｏｒｄら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ ８：６０１、１９９５）、αらせんの束の間のループ（ＫｕおよびＳｃｈｕｌｔｚ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９２：６５５２、１９９５）、および小さいプロテアーゼ阻害薬のもののようなジスルフィド架橋によって束縛されたループ（Ｍａｒｋｌａｎｄら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３５：８０４５、１９９６；Ｍａｒｋｌａｎｄら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３５：８０５８、１９９６；ＲｏｔｔｇｅｎおよびＣｏｌｉｎｓ、Ｇｅｎｅ １６４；２４３、１９９５；Ｗａｎｇら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：１２２５０、１９９５）を明らかにしてきた。

【００５６】

本発明で用いられている抗体キャリアの例には、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体およびそれらの生物活性断片を含める。好ましくは、そのような抗体は、標的細胞および／もしくは癌のような増殖性疾患の組織に発現している細胞表面抗原に対するものである。標的細胞上の細胞表面抗原に対する特異的抗体の例は、ほとんどのＢ細胞悪性腫瘍で過剰発現するＣＤ２２抗原に対する抗体；Ｇ５／４４、ネズミの抗ＣＤ２２モノクローナル抗体のヒト化型；ある種のヒトの骨髄腫瘍、特に急性骨髄性白血病に多くみられる細胞表面抗原ＣＤ３３に対する抗体；ｈＰ６７．６、抗ＣＤ３３ネズミ抗体のヒト化型（米国特許第５７７３００１号参照）；ｍｐ６７．６で指定される上皮由来の多くの腫瘍でみられるＰＥＭ抗原に対する抗体（Ｉ．Ｄ．Ｂｅｍｓｔｅｉｎら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．７９：１１５３（１９８７）およびＩ．Ｄ．Ｂｅｍｓｔｅｉｎら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２２８：８６７－８８１（１９９２）参照）；およびｈｕ３Ｓ１９３で指定される多くの固形腫瘍で過剰発現しているＬｅｗｉｓＹ炭水化物抗原に対するヒト化抗体（米国特許第６３１０１８５号Ｂ１）を包含するが、限定されるものではない。加えて、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））およびトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））のようないくつかの市販で入手できる抗体もあり、それらもまたキャリア／標的試薬として用いられている。リツキシマブ（リツキサン（登録商標））は、多様なＢ細胞リンパ腫の治療に用いられる抗ＣＤ２０キメラ抗体であり、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））は、乳癌の治療に用いられるヒト化抗Ｈｅｒ２抗体である。

【００５７】

本発明においてキャリアとしての利用のために本明細書で例示しているのは、Ｇ５／４４で指定される細胞表面抗原ＣＤ２２に対するＣＤＲ移植ヒト化抗体分子である。この抗体は、ある種のヒトのリンパ腫でみられる細胞表面抗原ＣＤ２２に対するネズミの抗ＣＤ２２モノクローナル抗体をヒト化したものである。本明細書で用いられる「ＣＤＲ移植抗体分子」という用語は、重鎖および／または軽鎖が一つあるいはそれ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むような抗体分子のことを指し、必要であれば、ドナー抗体（例えばネズミのモノクローナル抗体）由来の修飾されたＣＤＲ（以下ＣＤＲと呼ぶ）をアクセプターの抗体（例えばヒト抗体）の重鎖および／または軽鎖可変領域のフレームワーク部に移植したものも含める。好ましくは、そのようなＣＤＲ移植抗体は、上記の一つあるいはそれ以上のドナーＣＤＲと同様に、ヒトアクセプターフレームワーク部も含む可変ドメインを持っている。

ＣＤＲを移植する場合、マウス、霊長類およびヒトのフレームワーク領域を含め、ＣＤＲを誘導するドナー抗体の種／型に関心のある適当なアクセプターの可変領域フレームワーク配列を用いてもよい。本発明で用いられ得るヒトのフレームワークの例は、ＫＯＬ、

ＮＥＷＭ、ＲＥＩ、ＥＵ、ＴＵＲ、ＴＥＩ、ＬＡＹおよびＰＯＭ（Ｋａｂａｔら Ｓｅｑ．ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，１：３１０－３３４（１９９４））である。例えば、ＫＯＬおよびＮＥＷＭは重鎖に対して用いられ、ＲＥＩは軽鎖に対して用いられ、ＥＵ、ＬＡＹおよびＰＯＭは重鎖と軽鎖両方に対して用いられ得る。

【００５８】

本発明のＣＤＲ移植抗体において、ドナー抗体の鎖と相同の鎖を持つものがアクセプター抗体として用いられるのが好ましい。アクセプターの重鎖と軽鎖は必ずしも同一の抗体に由来しなくてもよく、必要であれば、異なる鎖に由来するフレームワーク領域を持つ複合鎖を含んでもよい。

本発明のＣＤＲ移植抗体においてはまた、フレームワーク領域はそのアクセプター抗体と正確に同一である必要はない。例えば、珍しい残基は、アクセプター鎖のクラスまたはタイプとしてより頻繁に生じる残基へと変換される可能性がある。あるいは、アクセプターフレームワーク中の選ばれた残基は、変換された結果ドナー抗体の同じ位置にみられる残基またはドナー抗体の同じ位置にみられる残基に対する伝統的な置換基であるような残基と一致している可能性がある。そのような変換は、ドナー抗体の親和性を回復する必要が最小限になるようにとどめるべきである。変換する必要のあるアクセプターフレームワーク領域で残基を選ぶためのプロトコールは、ＰＣＴ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．ＷＯ９１／０９９６７（その内容を本明細書の一部とする）に示す。

ドナー残基は、ドナー抗体、すなわち元来ＣＤＲの由来となる抗体由来の残基である。

【００５９】

本発明の抗体は、可変ドメインが、ＣＤＲ－Ｈ２（Ｋａｂａｔら（前掲）によって定義される）として、抗原に対する抗体の親和性を高めるために潜在的なグリコシル化部の配列を除いたものであるようなＨ２’を含むような、重鎖を含んでもよい。

あるいは、または加えて、本発明の抗体は、可変ドメインが、ＣＤＲ－Ｈ２（Ｋａｂａｔら（前掲）によって定義される）として、リシン残基は６０位にあるようなＨ２’’を含むような、重鎖を含んでもよい。ＣＤＲ－Ｈ２中の露出した位置に局在し、潜在的に結合試薬と反応して抗原の結合親和性を低下させる能力を持つと考えられているようなリシン残基は、他のアミノ酸で置換されている。

加えて、本発明の抗体は、可変ドメインが、ＣＤＲ－Ｈ２（Ｋａｂａｔら（前掲）によって定義される）として、潜在的なグリコシル化部の配列と６０位のリシン残基が共に他のアミノ酸で置換されているようなＨ２’’’を含むような、重鎖を含んでいてもよい。

本発明の抗体は、重鎖と軽鎖の全長を持つ完全な抗体；Ｆａｂ、修飾されたＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、またはＦｖ断片のようなそれらの生物活性を持つような断片；軽鎖または重鎖の単量体または二量体；あるいは、例えば重鎖と軽鎖の可変ドメインがペプチドリンカーによって結合しているような一本鎖Ｆｖのような、一本鎖抗体、からなっていてもよい。同様に、重鎖と軽鎖の可変領域は適切に他の抗体のドメインに結合している。

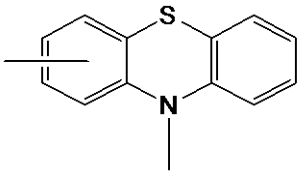
【００６０】

本発明の抗体はまた、修飾がその重鎖Ｃ末端への作動体またはアクセプター分子の結合を考慮した一つまたはそれ以上の付加であるような修飾されたＦａｂも含める。好ましくは、アミノ酸の付加が、作動体またはアクセプター分子の結合している一つまたは二つのシステインを含む修飾されたヒンジ領域を形成する。

本発明の抗体の定常部ドメインは、存在するならば、抗体の提示された機能、特に要求される可能性も要求されない可能性もあるような作動体機能に関心を持って選んでよい。例えば、定常部ドメインはヒトＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧまたはＩｇＭドメインであってよい。抗体が治療への利用を意図しており、抗体作動体機能が必要な場合は、特に、ヒトＩｇＧ定常部ドメイン、特にＩｇＧ１およびＩｇＧ３アイソトープのものが用いられてもよい。あるいは、抗体が治療への利用を意図しており、抗体作動体機能が必要でないまたは望まれない場合は、ＩｇＧ２およびＩｇＧ４アイソトープを用いるかまたはＩｇ

Ｇ１Ｆｃ領域を変異させて作動体機能を排除してもよい。
本発明の抗体は、少なくとも５×１０$^{-8}$Ｍ、好ましくは少なくとも１×１０$^{-9}$Ｍ、より好ましくは少なくとも０．７５×１０$^{-10}$Ｍ、最も好ましくは少なくとも０．５×１０$^{-10}$Ｍの結合親和性を持つ。
【００６１】
一つの具体例として、本発明は抗毒素コンジュゲートに関し、これらのコンジュゲートを抗体変異体または抗体の模擬物を用いて合成する方法に関する。好ましい具体例としては、本発明の抗体の変異体はＣＤ２２に対するものであり、ＣＤ２２に対して強い親和性を示す。そのような変異体は、ＣＤＲの変異（Ｙａｎｇら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２５４、３９２－４０３、１９９５）、鎖の組換え（Ｍａｒｋｓら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１０、７７９－７８３、１９９２）、イー・コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）の突然変異誘発菌株の利用（Ｌｏｗら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２６０、３５９－３６８、１９９６）、ＤＮＡの組換え（Ｐａｔｔｅｎら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、８、７２４－７３３、１９９７）、ファージディスプレイ（Ｔｈｏｍｐｓｏｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２５６、７７－８８、１９９６）およびセクシャルＰＣＲ（Ｃｒａｍｅｒｉら、Ｎａｔｕｒｅ、３９１、２８８－２９１、１９９８）を含めたいくつかの親和性成熟プロトコールによって得られる。
あらゆる適当な宿主細胞／ベクター系は、本発明の抗体を含めたキャリアを暗号化したＤＮＡ配列の発現のために用いられる。例えばイー・コリのような細菌および他の微生物系は、ＦａｂおよびＦ（ａｂ’）$_2$断片のような抗体断片、特にＦｖ断片、および例えば一本鎖Ｆｖｓのような一本鎖抗体断片の発現のために幾分用いられてよい。例えば哺乳類のような真核生物の宿主細胞発現系は、完全な抗体分子を含めた大きな抗体の生成のために用いられてよい。適当な哺乳類の宿主細胞には、ＣＨＯ、骨髄腫、酵母菌細胞、昆虫細胞、ハイブリドーマ細胞、ＮＳＯ、ＶＥＲＯ、またはＰＥＲＣ６細胞を含む。適当な発現系にはまた、トランスジェニック動物および植物も含む。
【００６２】
２．治療薬
本発明における利用に適した治療薬は、チューブリンの重合を阻害したりまたは分離させる細胞傷害薬、ＤＮＡに結合して分離させるアルキル化剤、およびタンパク質合成を阻害したりまたはタンパク質キナーゼ、酵素およびサイクリンのような必要不可欠な細胞タンパク質を阻害する試薬である。そのような細胞傷害薬には、それだけには限らないが、チオテパ、タキサン類、ビンクリスチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、タモキシフェン、イダルビシン、ドラスタチン／アウリスタチン、ヘミアスタリン、カリチェアミシン、エスペラミシン、およびマンタンシノイドを含む。好ましい細胞傷害性試薬はカリチェアミシンであり、メチルトリスルフィド抗腫瘍抗生物質の例である。本発明における利用に適したカリチェアミシンの例は、例えば米国特許第４６７１９５８号；米国特許第４９７０１９８号；米国特許第５０５３３９４号；米国特許第５０３７６５１号；および米国特許第５０７９２３３号（その内容を本明細書の一部とする）に開示されている。好ましいカリチェアミシンは、γカリチェアミシン誘導体またはＮ－アセチルγカリチェアミシン誘導体である。
【００６３】
３．細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲート
本発明のコンジュゲートは式：
Ｐｒ（－Ｘ－Ｗ）ｍ
［式中；
Ｐｒはタンパク質のキャリアであり；
Ｘはタンパク質のキャリアと反応できる何らかの反応基を有する生成物からなるリンカーであり；
Ｗは細胞傷害薬であり；

mは、カリチェアミシンがコンジュゲートの４～１０重量％を構成するように精製したコンジュゲーション生成物についての平均の負荷である；
（－Ｘ－Ｗ）mは細胞傷害薬である］
を有する。
【００６４】
好ましくは、Ｘは式：
（ＣＯ－Ａｌｋ^{1}－Ｓｐ^{1}－Ａｒ－Ｓｐ^{2}－Ａｌｋ^{2}－Ｃ（Ｚ^{1}）＝Ｑ－Ｓｐ）
［式中；
Ａｌｋ^{1}およびＡｌｋ^{2}は、独立に、結合手または分枝したあるいは分枝していないアルキレン鎖であり；
Ｓｐ^{1}は結合、－Ｓ－、－Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－ＮＲ^{1}－、－Ｎ（ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$）$_{2}$Ｎ－、または－Ｘ－Ａｒ^{1}－Ｙ－（ＣＨ$_{2}$）ｎ－Ｚであり、－Ｘ－Ａｒ^{1}－Ｙ－（ＣＨ$_{2}$）ｎ－Ｚ中のＸ、ＹおよびＺは、独立にて、結合手、－ＮＲ’－、－Ｓ－または－Ｏ－である；ただし、ｎ＝０ならばＹおよびＺのうち少なくとも一つは結合手でなければならず、Ａｒ^{1}は所望により一個、二個または三個の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）アルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、－ＣＯＯＲ^{1}、－ＣＯＮＨＲ^{1}、－（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ^{1}、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ^{1}、－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ^{1}または－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ^{1}で置換される１，２－、１，３－または１，４－フェニレンであり、Ａｌｋ^{1}が結合手であるとき、Ｓｐ^{1}は結合手であり；
ｎは０から５までの整数であり；
Ｒ^{1}は、所望により一個または二個の－ＯＨ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）アルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{3}$）ジアルキルアミノ、またはＡ$^{－}$が塩を完成させる医薬上許容される陰イオンであるような（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{3}$）トリアルキルアンモニウム－Ａ$^{－}$基によって置換されてもよい分枝したまたは分枝していない（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）鎖である。
【００６５】
Ａｒは、所望により一個、二個または三個の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、－ＣＯＯＲ^{1}、－ＣＯＮＨＲ^{1}、－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ^{1}、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ^{1}、－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ^{1}または－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ^{1}で置換される１，２－、１，３－または１，４－フェニレンであり、その式中でｎおよびＲ^{1}は本明細書上文で定義したとおりであるか、またはＡｒは１，２－、１，３－、１，４－、１，５－、１，６－、１，７－、１，８－、２，３－、２，６－または２，７－ナフチリデンまたは
【化１】



であり、それぞれのナフチリデンまたはフェノチアジンは、所望により一個、二個、三個または四個の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$）アルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルコキシ、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、－ＣＯＯＲ^{1}、－ＣＯＮＨＲ^{1}、－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ^{1}、－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＯＲ^{1}または－Ｓ（ＣＨ$_{2}$）ｎＣＯＮＨＲ^{1}で置換されており、式中のｎおよびＲ^{1}は上で定義されたとおりである；ただし、ＡｒがフェノチアジンであるときはＳｐ^{1}は窒素と結合するだけの結合手であり；
Ｓｐ^{2}は結合手、－Ｓ－または－Ｏ－である；ただし、Ａｌｋ^{2}が結合手であるとき、Ｓｐ^{2}は結合手であり；
【００６６】
Ｚ^{1}は、所望により一個、二個または三個の（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）アルキル、（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{5}$）

アルコキシ、（C_1－C_4）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、－$COOR^1$、－$ONHR^1$、－O（CH_2）nCOOR^1、－S（CH_2）nCOOR^1、－O（CH_2）nCONHR^1または－S（CH_2）nCONHR^1で置換されるH、（C_1－C_5）アルキルまたはフェニルであり、式中でnおよびR^1は上で定義したとおりであり；

Spは、直鎖または分枝鎖の二価または三価の（C_1－C_{18}）基、二価または三価のアリールまたはヘテロアリール基、二価または三価の（C_3－C_{18}）シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキル基、二価または三価のアリールまたはヘテロアリール－アリール（C_1－C_{18}）基、二価または三価のシクロアルキルまたはヘテロシクロアルキル－アルキル（C_1－C_{18}）基あるいは二価または三価の（C_2－C_{18}）不飽和アルキル基であり、式中でヘテロアリールは好ましくはフリル、チエニル、Ｎ－メチルピローリル、ピリジニル、Ｎ－メチルイミダゾーリニル、オキサゾーリル、ピリミジニル、キノリル、イソキノリル、Ｎ－メチルカルバゾイル、アミノクマリニルまたはフェナジニルであり、式中でSpが三価の基ならば、Spはさらに低級（C_1－C_5）ジアルキルアミノ、低級（C_1－C_5）アルコキシ、ヒドロキシまたは低級（C_1－C_5）アルキルチオ基によって置換され得る；

Qは＝NHNCO－、＝NHNCS－、＝NHNCONH－、＝NHNCSNH－または＝NHO－である。

【００６７】

好ましくは、Alk^1は直鎖または分枝鎖の（Ｃ１－Ｃ１０）アルキレン鎖であり；Sp^1は結合手、－Ｓ－、－Ｏ－、－ＣＯＮＨ－、－ＮＨＣＯ－、－NR^1であり、式中でR^1は本明細書上文で定義したとおりである；ただしAlk^1が結合手であるとき、Sp^1は結合手であり；

Arは、所望により一個、二個または三個の（C_1－C_6）アルキル、（C_1－C_5）アルコキシ、（C_1－C_4）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、－$COOR^1$、－$CONHR^1$、－O（CH_2）nCOOR^1、－S（CH_2）nCOOR^1、－O（CH_2）nCONHR^1または－S（CH_2）nCONHR^1で置換される１，２－、１，３－または１，４－フェニレンであり、その式中でnおよびR^1は本明細書上文で定義したとおりであるか、またはArは１，２－、１，３－、１，４－、１，５－、１，６－、１，７－、１，８－、２，３－、２，６－または２，７－ナフチリデンであり、それぞれ所望により一個、二個、三個または四個の（C_1－C_6）アルキル、（C_1－C_5）アルコキシ、（C_1－C_4）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、－$COOR^1$、－$CONHR^1$、－O（CH_2）nCOOR^1、－S（CH_2）nCOOR^1、－O（CH_2）nCONHR^1または－S（CH_2）nCONHR^1で置換されていてもよく；

Z^1は、所望により一個、二個または三個の（C_1－C_5）アルキル、（C_1－C_4）アルコキシ、（C_1－C_4）チオアルコキシ、ハロゲン、ニトロ、－$COOR^1$、－$CONHR^1$、－O（CH_2）nCOOR^1、－S（CH_2）nCOOR^1、－O（CH_2）nCONHR^1または－S（CH_2）nCONHR^1で置換されていてもよい（C_1－C_5）アルキルまたはフェニルであり；

Alk^2およびSp^2は共に単結合であり；

SpおよびQは、まさに上で定義した通りである］

を有する。

【００６８】

米国特許第５７７３００１号（出典明示により本明細書の一部とする）は、求核性誘導体、特にヒドラジドおよびカリチェアミシンから調製される関連求核試薬と共に用いられ得るリンカーを開示する。これらのリンカーは、薬剤とリンカーの間に形成される結合が加水分解され得る時により高い活性が得られるような場合に特に有用である。これらのリンカーは二つの官能基を含む。一つの基は典型的にはキャリアと反応するのに利用するカルボン酸である。酸官能基は、適切に活性化すれば、例えば抗体または他のタンパク質キャリアの側鎖のリシンのアミンのような、キャリアの自由アミン基とアミド結合を形成し得る。他方の官能基は一般にはカルボニル基、すなわちアルデヒドまたはケトンであり、

適当に修飾した治療薬と反応することを想定している。カルボニル基は、ヒドラゾン結合を形成するような薬剤のヒドラジド基と反応し得る。この結合は、標的細胞に結合した後コンジュゲートから治療薬を放出するのを考慮して、加水分解できる。

【００６９】

本発明に利用するための最も好ましい二官能性のリンカーは４－（４－アセチルフェノキシ）酪酸（ＡｃＢｕｔ）であり、それは好ましい生成物をもたらし、ここに、コンジュゲートは、３－メルカプト－３－メチルブタノイルヒドラジドと反応させることによって機能化されたβ－カリチェアミシン、γ－カリチェアミシンまたはＮ－アセチルγ－カリチェアミシン、ＡｃＢｕｔリンカー、およびヒトまたはヒト化ＩｇＧ抗体標的キャリアを含む。

【００７０】

４．単量体コンジュゲート

カリチェアミシンを含めた多くの細胞傷害薬本来の疎水性によって、治療への適用に必要である十分な薬剤負荷と妥当な収率での、単量体薬剤コンジュゲートの調製が困難になる。米国特許第５７７３００１号に開示されているＡｃＢｕｔリンカーのようなリンカーによって形成された結合の疎水性が高まることは、治療薬をキャリア（抗体）から解離させる共有結合距離が大きくなることと共に、こうした問題を悪化させる。

高薬物負荷での細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲートの凝集は、その薬剤の疎水性によって起こる。薬物負荷は、しばしば妥当な量の単量体生成物を得るために制限しなければならない。米国特許第５８７７２９６号記載のコンジュゲートを用いたような、いくつかの事例では、しばしば過度の凝集のために、米国特許第５０５３３９４号に開示されているような反応条件を用いて治療への適用に有用な負荷で有用な収率のコンジュゲートを合成することが難しい。これらの反応条件では、結合反応における共溶媒としてＤＭＦを利用していた。それゆえに、凝集および原料の固有の損失なく、高薬物負荷／高収率を考慮した方法が必要となる。

【００７１】

凝集を減少させるための改良法は、米国特許第５７１２３７４号および５７１４５８６号（出典明示により本明細書の一部とする）に開示されている。それらの特許出願に開示されていることは、それだけには限定されないが、細胞傷害性治療薬を標的とするために用いられているヒトまたはヒト化抗体のようなタンパク質を含めたタンパク質キャリアであり、その細胞傷害性治療薬は例えばｈＰ６７．６および他の特許出願内で開示されているヒト化抗体である。それらの特許出願内で、（１）共溶媒としてのプロピレングリコールおよび（２）少なくとも一つのC_6－C_{18}カルボン酸を含む添加剤を含む、非求核性、タンパク質融和性の、緩衝溶液を利用することによって、一般に、高薬物負荷／高収率で凝集が減少して非常によい活性を持った、単量体細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲートが生成することが分かった。それらの特許出願内で記述されている好ましい酸は、炭素数７ないし１２の酸であり、最も好ましい酸は（カプリル酸のような）オクタン酸またはその塩であった。Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド（ＯＳｕ）エステルまたは他の類似した活性化したエステルから作られたコンジュゲートに対する好ましい緩衝溶液は、リン酸塩緩衝塩類（ＰＢＳ）または２－ヒドロキシエチルピペラジン－N^1－２－エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ緩衝液）であった。それらの結合反応に用いられる緩衝溶液は、遊離アミンまたは求核基を含むことはできない。他のタイプのコンジュゲートについては、許容される緩衝液はすぐに決定し得る。あるいは、追加の添加剤を用いないｔ－ブタノールを含む、非求核性、タンパク質融和性の、緩衝溶液を利用することによってもまた、高薬物負荷／高収率で凝集の減少した、単量体カリチェアミシン誘導体－キャリアコンジュゲートが生成することが分かった。

【００７２】

単量体コンジュゲートを形成するために必要となる共溶媒の量は、タンパク質によって幾分異なり、過度の実験なしに当業者によって決定され得る。単量体コンジュゲートを効果的に形成するために必要となる添加剤の量はまた、抗体によっても異なる。この量もま

た、過度の実験なしに当業者によって決定され得る。米国特許第５７１２３７４号および第５７１４５８６号において、体積で全溶液の１０％から６０％までの範囲の、好ましくは１０％から４０％までの、最も好ましくは約３０％の量のプロピレングリコールの添加剤、および少なくとも一つのＣ$_{6}$－Ｃ$_{18}$カルボン酸またはその塩、好ましくはカプリル酸またはその塩を、２０ｍＭから１００ｍＭまで範囲の量、好ましくは４０ｍＭから９０ｍＭまで、最も好ましくは約６０ｍＭから９０ｍＭまでの量結合反応系に加え、高薬物負荷／高収率で凝集を減らした上で単量体細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲートを生成した。プロピレングリコール以外の、エチレングリコール、エタノール、ＤＭＦ、ＤＭＳＯその他のような、他のタンパク質融和性有機共溶媒もまた、用いられ得た。その有機共溶媒の一部または全ては、 コンジュゲート混合物に薬物を移すために用いられた。

【００７３】

あるいは、それらの特許出願において、Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{18}$カルボン酸またはその塩の濃度は、１５０ないし３００ｍＭまで増加でき、共溶媒は１ないし１０％まで減少できた。一つの具体例としては、カルボン酸は、オクタン酸またはその塩であった。好ましい具体例としては、カルボン酸は、デカン酸またはその塩であった。他の好ましい具体例としては、カルボン酸は、カプリル酸またはその塩であり、５％のプロピレングリコールまたはエタノールと共に２００ｍＭの濃度のカプリル酸が存在していた。

特許出願における他のもう一つの具体例としては、全溶液の１０容量％から２５％までの範囲の、好ましくは１５％の濃度のｔ－ブタノールを、結合反応系に加えて、高薬物負荷／高収率で凝集を減らした上で単量体細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲートを生成することができた。

【００７４】

これらの確立された結合条件は、現在、ミロターグ（登録商標）として市販されているＣＭＡ－６７６（ゲムツズマブ　オゾガマイシン）の形成に適用された。この治療法を急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）に対して導入されて以来、イオン交換クロマトグラフィーの利用を通して、カリチェアミシンは抗体上に同一の様式で配置されているのではないということが分かってきた。ほとんどのカリチェアミシンはおよそ半分の抗体の上に存在し、一方残りの半分は少量のカリチェアミシンしか含まないＬＣＦに存在している。結果として、カリチェアミシンのような細胞傷害薬は、凝集量を最小限にしてコンジュゲーション生成物の収率を有意に改良した上で一様な高薬物負荷を考慮したようなキャリアに結合する方法を改良する重大な必要性がある。

明確な例は、Ｇ５／４４－ＮＡｃ－γ－カリチェアミシンＤＭＨ－ＡｃＢｕｔコンジュゲートであり、ＣＭＣと呼ばれ、一般名で図１７に示されている。ＬＣＦの量を全抗体の１０％未満に減少させることは、ＣＭＣ－５４５の開発にあたり望まれたことであり、ＬＣＦの量を減少させるための様々な選択肢が考慮されてきた。抗原結合および細胞傷害性のような免疫コンジュゲートの他の特性については、最終的な溶液によって影響されてはならない。考慮された選択肢として、抗体の遺伝的または物理的修飾、クロマトグラフィー分離技術または反応条件の修飾が挙げられる。

【００７５】

旧反応条件（ＣＭＡ－６７６工程条件）を用いてＧ５／４４抗体をＮＡｃ－γ－カリチェアミシンＤＭＨＡｃＢｕｔＯＳｕと反応させると、ＣＭＡ－６７６に類似した物理的特性（薬物負荷、ＬＣＦおよび凝集）を持つ生成物が得られる。しかしながら、結合後に存在する高濃度（５０－６０％）のＬＣＦは好ましくないものと考えられた。最適の反応条件は、温度、ｐＨ、カリチェアミシン誘導体投与量および添加剤の濃度のような、鍵となる反応の変数を評価した統計的実験計画方法論によって決定された。これらの実験の分析によって、カリチェアミシン投与量および添加剤の濃度はコンジュゲーションの低い画分（ＬＣＦ）および凝集の形成量に最も重大な影響を持ち、一方温度およびｐＨは小さな影響しか与えないということが明らかになった。追加の実験において、タンパク質のキャリア（抗体）および共溶媒（エタノール）の濃度は、ＬＣＦおよび凝集量を抑制する上での重要性は同様に低い（カリチェアミシン投与量および添加剤の濃度と比較して）というこ

ともまた示された。ＬＣＦを１０％未満に減少させるために、カリチェアミシン誘導体投与量は、反応系の抗体の量と比較して３％から８．５％（重量比）まで増加させた。添加剤は、２００ｍＭの濃度のオクタン酸またはその塩（ＣＭＡ－６７６工程）から、３７．５ｍＭの濃度のデカン酸またはその塩に変更した。結合反応は僅かに高くした温度（３０－３５℃）およびｐＨ（８．２－８．７）でよりよく進行した。これらの変更点を組み込んだ反応条件で、ＬＣＦが１０パーセント以下にまで低下し、一方カリチェアミシンの負荷は増加し、本明細書にてＣＭＣ－５４４工程条件または「新」工程条件と称される。ＣＭＣ－６７６およびＣＭＣ－５４４工程条件で得られた結果を比較したものを表１に示す。

【００７６】

【表１】

条件／結果	CMA-676工程条件	CMC-544工程条件
カリチェアミシン投与量	3.0% (w/w粉末重量)	8.5% (w/w)
添加物および濃度	オクタン酸／オクタン酸ナトリウム; 200 mM	デカン酸／デカン酸ナトリウム; 37.5 mM
温度	26°C	31-35°C
PH	7.8	8.2-8.7
カリチェアミシン負荷 (重量%;UVアッセイ)	2.4-3.5	7.0-9.0
低コンジュゲーテッドフ画分(LCF) (精製前)	45-65 HPLC 面積%	<10%
凝集(精製前)	~5%	<5%
凝集(精製後)	≤2%	<2%

【００７７】

カリチェアミシン投与量の増加は、薬物負荷を２．５－３．０重量パーセントから７．０－９．０（最も典型的には７．５－８．５）重量パーセントまで増加させ、反応中のタンパク質凝集は増加させない。凝集およびＬＣＦが減少するので、ＣＭＣ－５４４工程条件は、より均質な生成物を与えた。ＣＭＣ－５４４はマルチグラム抗体重量計での新しい結合手順によって、再現して調製できた。

前述の反応によって、抗体の濃度は１から１５ｍｇ／ｍｌの範囲で変化でき、例えばＮ－アセチルγ－カリチェアミシンＤＭＨＡｃＢｕｔＯＳｕエステル（図１７に示すコンジュゲートを作るのに用いられる）のような、カリチェアミシン誘導体は重量で抗体の約４．５－１１％の範囲で変化する。共溶媒は、６から１１．４％（体積基準）の濃度の範囲でよい結果が実証された、エタノールであった。反応は、ＰＢＳ、ＨＥＰＥＳ、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ’－（４－ブタンスルホン酸）（ＨＥＰＢＳ）または他の融和性のｐＨ８ないし９の緩衝剤中で、３０℃から約３５℃までの範囲の温度で、１５分から２４時間までの範囲の時間実行された。当業者は、他のタイプのコンジュゲートについての許容できるｐＨ範囲をすぐに決定できる。様々な抗体において、前述の添加剤の組み合わせを僅かに変化させて使用することによって、薬物負荷および単量体コンジュゲート収率が改善する事が分かってきており、あらゆる特定のタンパク質のキャリアは、最前の結果を達成するために、厳密な条件または添加剤の選択にいくつかの小さな変化を必要とする可能性があることが分かった。

【００７８】

５．コンジュゲートの精製および分離

結合反応に続いて、単量体コンジュゲートを、例えばサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）、イオン交換クロマトグラフィ

ー（ＩＥＣ）またはクロマトフォーカシングのような慣例的な方法によって、（タンパク質キャリアおよび遊離細胞傷害薬／カリチェアミシンのような）非結合反応物および／またはコンジュゲートの凝集体から分離してもよい。精製したコンジュゲートは単量体であり、通常４から１０重量％までの細胞傷害薬／カリチェアミシンを含む。好ましい具体例としては、コンジュゲートは疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）を用いて精製する。細胞傷害薬／カリチェアミシン－抗体コンジュゲート（ＣＭＣ－６７６工程）の生成物の大規模製造に以前用いられていた工程において、使用された唯一の結合後の分離過程は、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）であった。この工程は、凝集コンジュゲートの除去および調製における緩衝剤交換の達成に極めて効果的であるが、ＬＣＦ含有量を減少させるのには効果がない。結果として、ＳＥＣを基盤とした工程は、結合反応系の化学反応が最終生成物におけるＬＣＦ含有量を抑制することに完全に依存している。ＳＥＣの他の不利な点は、カラムに注ぐ結合反応混合物の体積についての制限である（典型的には工程のカラム床体積の５％を越えない）。これは、所定の生成スペースに維持できる一回分の量（およびそれゆえに生成物容量）を厳しく制限する。最後に、ＳＥＣ精製工程はまた、結合溶液を有意に希釈することになり、調製を達成可能にするために依存しているタンパク質の濃度に制約を与える。

【００７９】

カリチェアミシン誘導体のように、細胞傷害薬が高い疎水性を持ち、コンジュゲートに用いられる場合、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）は、結合した抗体および結合していない抗体の効果的な分離を行うための好ましい候補である。ＨＩＣはＳＥＣよりも三つの重要な利点をもたらす：（１）凝集と同様にＬＣＦ含有量も効果的に減少させることができる；（２）ＨＩＣのカラム負荷容量は非常に高い；（３）ＨＩＣは生成物の過度な希釈を防止する。

ブチル、フェニルおよびオクチルセファロース４ファーストフロー（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｓｅｓ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）のような、大規模製造への利用に適したいくつかの高容量ＨＩＣ媒体は、結合工程の後、単量体結合成分から効果的に非結合成分およびコンジュゲートの凝集体を分離することができる。

【００８０】

６．組成物および処方

本発明はまた、本発明の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲートを医薬上許容される賦形剤、希釈剤またはキャリアと共に混合することからなる、治療上または診断上の組成物／処方の調製法も提供する。

単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲートは、治療上または診断上の組成物／処方において唯一の活性を持つ構成成分であってもよいし、または、例えば抗ＣＤ１９、抗ＣＤ２０、抗ＣＤ３３、抗Ｔ細胞、抗ＩＦＮγまたは抗ＬＰＳ抗体のような他の抗体成分、またはサイトカイン、成長因子、ホルモン、抗ホルモン、細胞傷害薬およびキサンチンのような非抗体成分を含めた他の活性を持つ構成成分が共に存在していてもよい。

癌のような増殖性疾患の治療に用いられ、本発明の細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲートと共に用いてよいサイトカインおよび成長因子には、インターフェロン、インターロイキン２（ＩＬ－２）のようなインターロイキン類、ＴＮＦ、ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦおよびＧ－ＣＳＦを含む。

【００８１】

癌のような増殖性疾患の治療に通例用いられ、本発明の細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲートと共に用いてよいホルモンには、ジエチルスチルベストロールおよびエストラジオールのようなエストロゲン、テストステロンおよびハロテスチンのようなアンドロゲン、メガースおよびプロベラのようなプロゲスチン、およびプレドニゾン、デキサメタゾンおよびヒドロコルチゾンのようなコルチコステロイドを含む。

アンチエストロゲンすなわちタモキシフェン、アンチアンドロゲンすなわちフルタミド、および抗副腎試薬のような抗ホルモンは、癌のような増殖性疾患の治療に通例用いられ、本発明の細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲートと共に用いてよい。

癌のような増殖性疾患の治療に通例用いられ、本発明の細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲートと共に用いてよい化学療法薬／抗新生物薬は、それだけには限定しないが、アドリアマイシン、シスプラチン、カルボプラスチン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、メトトレキサート、ドキソルビシン、フルオロウラシル、エトポシド、タクソールおよびその様々な類似物、およびマイトマイシンを含む。

【００８２】

組成物は、好ましくは、治療上有効量の本発明のコンジュゲートを含むべきである。本明細書で用いる「治療上有効量」という用語は、標的とする疾患または不調を治療、改善、予防するか、または検出可能な治療効果または予防効果を示すのに必要となる治療薬の量のことを指す。あらゆるコンジュゲートにおいて、治療上有効な用量は、最初は細胞培養アッセイまたは動物モデル、通常は齧歯類、ウサギ、犬、豚または霊長類のどちらかによって評価する。動物モデルはまた、投薬の適切な濃度の範囲および経路を決定するのにも用いてもよい。それからそのような情報は、ヒトにおける投薬の有用な用量および経路を決定するのに用いられ得る。

人間の患者に対する正確な有効量は、その病期の重篤さ、患者の全身の健康状態、年齢、患者の体重および性別、食事、投薬の時間および頻度、薬剤の組み合わせ、反応感受性および治療に対する耐性／応答に依存する。この量は日常的な試行によって決定でき、臨床医の判断の範疇である。一般に、有効用量は０．１ｍｇ／ｍ^{2}から５０ｍｇ／ｍ^{2}までであり、好ましくは０．４ｍｇ／ｍ^{2}から３０ｍｇ／ｍ^{2}まで、より好ましくは２ｍｇ／ｍ^{2}から９ｍｇ／ｍ^{2}までであり、用量はタンパク質のキャリアを基準として計算される。

組成物は、患者に単独で投薬してもよく、または他の試薬、薬剤またはホルモンと組み合わせて投薬してもよい。本発明の細胞傷害薬誘導体／抗体コンジュゲートを投与する用量は、治療する病気の性質、悪性リンパ腫または白血病、およびコンジュゲートが予防に用いられるかもしくは既存の病気の治療に用いられるかに依存する。

【００８３】

投薬の頻度は、コンジュゲートの半減期および薬効の持続時間に依存するであろう。コンジュゲートが短い半減期（例えば２ないし１０時間）を持つならば、一日一回またはそれ以上の投薬が必要となる可能性がある。あるいは、コンジュゲート分子が長い半減期（例えば２ないし１５時間）を持つならば、一日一回、一週間に一回あるいは１または２ヶ月に一回しか投薬する必要がない可能性すらある。

組成物は、抗体コンジュゲートの投薬に対する医薬上許容されるキャリアもまた含んでいてもよい。キャリアは、抗体の生成物を、組成物を投薬された人間にとって有害なものに誘導するべきではなく、毒であるべきでない。適当なキャリアはタンパク質、ポリペプチド、リポソーム、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、アミノ酸重合体、アミノ酸共重合体および不活性ウイルス粒子のように大きく、ゆっくりと代謝される高分子であってよい。

医薬上許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩および硫酸塩のような無機酸塩、または酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩および安息香酸塩のような有機酸塩が用いられ得る。

【００８４】

これらの組成物中の医薬上許容されたキャリアは、さらに水、食塩水、グリセロールおよびエタノールのような液体を含んでいてもよい。加えて、湿潤剤または乳化剤またはｐＨ緩衝物質のような補助物質が、そのような組成物に存在していてもよい。そのようなキャリアによって、組成物が患者による経口摂取のために、錠剤、丸薬、ドラジェ、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリーまたは懸濁液として処方することができる。

好ましい投薬の形態には、例えば注射または輸液、例えばボーラス注射または継続的輸液のような非経口的投薬に適した形態も含める。生成物が注射または輸液のためのものである場合、油性または水性の溶媒中の懸濁液、溶液または乳液の形態で服用してよく、懸濁剤、保存剤、安定剤および／または分散剤のような処方薬を含んでいてもよい。

【００８５】
緩衝液処理したコンジュゲートの安定性は、短期の安定には十分であるけれども、長期の安定性は乏しい。コンジュゲートの安定性を高め、貯蔵寿命を増加させるために、抗体－薬剤コンジュゲートは冷凍乾燥して、使用前に適当な無菌の液体を用いて復元するための乾燥した形態としてもよい。タンパク質溶液の冷凍乾燥に関連した問題は、十分に立証されている。二次構造、三次構造、四次構造の損害は凍結および乾燥工程中に起こり得る。結果として、凍結防止剤は、コンジュゲートの不定形の安定剤として作用し、冷凍凍結工程中にタンパク質の構造の健全さを維持することを包含していなくてはならない可能性がある。一つの具体例として、本発明に有用な凍結防止剤は、アルジトール、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、ポリエチレングリコールおよびそれらの組み合わせのような糖アルコールである。他の具体例として、凍結防止剤は、アルドン酸、ウロン酸、アルダン酸およびそれらの組み合わせを含めた糖酸である。

【００８６】
本発明の凍結防止剤はまた、炭水化物であってもよい。適当な炭水化物は、二個またはそれ以上のヒドロキシル基を含むアルデヒドまたはケトン組成物である。炭水化物は環状または鎖状であってもよく、例えば、アルドース、ケトース、アミノ糖、アルジトール、イノシトール、アルドン酸、ウロン酸またはアルダン酸またはそれらの組み合わせを含める。炭水化物はまた、例えば二糖類または多糖類のような、モノ、ジまたはポリ炭水化物であってもよい。適当な炭水化物には、例えば、グリセルアルデヒド、アラビノース、リキソース、ペントース、リボース、キシロース、ガラクトース、グルコース、ヘキソース、イドース、マンノース、タロース、ヘプトース、グルコース、フルクトース、グルコン酸、ソルビトール、ラクトース、マンニトール、メチルα－グルコピラノシド、マルトース、イソアスコルビン酸、アスコルビン酸、ラクトン、ソルボース、グルカル酸、エリトロース、トレオース、アラビノース、アロース、アルトロース、グロース、イドース、タロース、エリトルロース、リブロース、キシルロース、プシコース、タガトース、グルクロン酸、グルコン酸、グルカル酸、ガラクツロン酸、マンヌロン酸、グルコサミン、ガラクトサミン、スクロース、トレハロースまたはノイラミン酸、またはそれらの誘導体を含む。適当なポリ炭水化物には、例えば、アラビナン、フルクタン、フカン、ガラクタンガラクツロナン、グルカン、マンナン、（例えばイヌリンのような）キシラン、レバン、フコイダン、カラゲーニン、ガラクトカロロース、ペクチン、ペクチン酸、アミロース、プルラン、グリコーゲン、アミロペクチン、セルロース、デキストラン、プスツラン、キチン、アガロース、ケラチン、コンドロイチン、デルマタン、ヒアルロン酸、アルギン酸、キサンゴムまたは澱粉を含める。特に有用な炭水化物はスクロース、グルコース、ラクトース、トレハロースおよびそれらの組み合わせである。スクロースは特に有用な凍結防止剤である。

【００８７】
好ましくは、本発明の凍結防止剤は炭水化物または糖アルコールであり、それらは多価のアルコールであってよい。多価の組成物は、一つ以上のヒドロキシル基を含む組成物である。好ましくは、多価の組成物は鎖状である。適当な組成物には、例えば、エチレングリコール、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールのようなグリコール、グリセロールまたはペンタエリトリトール；またはそれらの組み合わせを含む。

いくつかの好ましい具体例としては、凍結防止剤はスクロース、トレハロース、マンニトールまたはソルビトールである。

一旦処方されると、本発明の組成物は、直接患者に投薬できる。治療される患者は動物であってもよい。しかしながら、組成物はヒトの患者への投薬に適していることが好ましい。

【００８８】
本発明の組成物は、それだけには限定されないが、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、脊髄内、鞘内、心室内、経皮、皮膚を介する（ＰＣＴ出版Ｎｏ．ＷＯ９８／２０７３４参照）、皮下、腹膜内、鼻腔内、腸内、局所、舌下、膣内または直腸内経路を含めたいくつか

の経路によって、投薬してよい。ハイポスプレーはまた、本発明の組成物を投薬するのに用いてもよい。典型的には、組成物は、液状の溶液または懸濁液のいずれかであるような、注射可能物質として調製してよい。注射に先立って液状の溶媒に溶解または懸濁するのに適した固体もまた調製してよい。

組成物の直接輸送は、一般に注射、皮下、腹膜内、静脈内または筋肉内によって達成されるか、または組織の間質空間に輸送される。組成物はまた、病変に投薬する事もできる。投薬療法は、一回投与日程または複数回投与日程でもよい。

本組成物中で活性のある構成成分が細胞傷害薬／タンパク質キャリアコンジュゲートであることは高く評価されるだろう。それ自体は、腸管内で劣化を受けやすいであろう。よって組成物を腸管を用いる経路で投薬したいならば、組成物はコンジュゲートを劣化から保護する試薬を含むが、一旦腸管から吸収されるとコンジュゲートを放出する必要があるであろう。

【００８９】

医薬上許容されるキャリアについての徹底的な議論は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎ．Ｊ．１９９１）で得られる。

本発明は、表面にＣＤ２２抗原を発現している細胞によって特徴づけられる増殖性疾患の治療のために、特に単量体カリチェアミシン誘導体／ヒト化抗ＣＤ２２抗体（Ｇ５／４４）、ＣＭＣ－５４４を提供する。

本発明は、ＣＤ２２を発現している細胞によって特徴づけられる増殖性疾患の治療のための組成物または医薬の製造におけるＣＭＣ－５４４の使用をさらに提供する。

ＣＭＣ－５４４はまた、本明細書で開示している組成物または医薬で治療される患者に存在している、ＣＤ２２を発現する細胞の量を減少させることが望まれるあらゆる治療法において、利用されてもよい。特に、組成物または医薬は、細胞表面にＣＤ２２抗原を発現している増殖性疾患、すなわちリンパ腫および白血病の人間または動物の治療のために用いてもよい。これらのＣＤ２２発現細胞は、体内を循環していてもよく、または体内の特定の部位に望ましくないほど体内に局在して存在してもよい。

【００９０】

ＣＭＣ－５４４はまた、好ましくは、リンパ腫および白血病を含めたＢリンパ細胞系統の悪性腫瘍の治療に対して、最も好ましくは、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、多発性骨髄腫、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）および慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）の治療に対して用いられてよい。ＣＭＣ－５４４は単独で用いられるか、またはＢ細胞悪性腫瘍に罹患している患者を治療するための他の生物活性試薬と組み合わせて用いられる可能性がある。

【００９１】

通常用いられる生物活性試薬には、成長因子、サイトカインおよび細胞傷害薬を含む。癌のような増殖性疾患の治療のために通常用いられ、ＣＭＣ－５４４と共に用いてよい生物活性試薬には、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、アクラルビシン、ゾルビシン、ミトザントロン、エピルビシン、カルビシン、ノガラマイシン、メノガリル、ピタルビシン、バルビシンのようなアントラサイクリンを三日間まで；およびシタラビン、ゲムシタビン、トリフルリジン、アンシタビン、エノシタビン、アザシチジン、ドキシフルリジン、ペントスタチン、ブロクスリジン、カペシタビン、クラドリジン、デシタビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゴウゲロチン、ピューロマイシン、テガフール、チアゾフリンのようなピリミジンまたはプリンヌクレオシドを含める。ＣＭＣ－５４４と共に組み合わせて投薬してもよい他の化学療法薬／抗新生物薬には、アドリアマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダカーバジン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ミトザントロン、ブレオマイシン、メクロレタミン、ブレドニゾン、プロカルバジン、メトトレキサート、フルオロウラシル、エトポシド、タクソールおよびその様々な類似物およびマイトマイシンを含む。ＣＭＣ－５４４は、一つまたはそれ以上のこれらの治療薬と同時に投薬してよい。あるいは、ＣＭＣ－５４４は、一つまたはそれ以

上のこれらの治療薬に続いて投薬してよい。

【００９２】

ＣＭＣ－５４４はまた単独で、成長因子、サイトカイン、ステロイド、抗ＣＤ２０抗体であるリツキシマブ（リツキサン（登録商標））のような抗体のような他の生物活性試薬、および治療養生法の一部として化学療法薬の組み合わせと同時に、あるいはそれに続いて投薬してもよい。悪性のリンパ組織増殖性疾患の治療に対して確立された治療養生法には、ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）、ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）、ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）、ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）、ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）、ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）、ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）、ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）、ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）、ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）、ＭＯＰＰをＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびビンブラスチン）と交替で、ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）をＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交替で、およびＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）を含む。治療法は、誘導療法段階、合同療法段階および維持療法段階からなっていてもよい。ＣＭＣ－５４４はまた単独で、誘導療法段階、合同療法段階および維持療法段階の一部として上で同定したあらゆる治療養生法と同時に、またはそれに続いて投薬してよい。

【００９３】

本発明のコンジュゲートはまた、再発した浸潤性のリンパ腫の治療に対する組み合わせ化学治療養生法の一部として、他の生物活性試薬および化学治療薬と共に投薬してよい。そのような治療養生法には、ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）、ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）、ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）、ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）、ＥＰＯＣＨ（エトポシド、ビンクリスチン、ドキソルビシンを９６時間シクロホスファミドの丸薬投与、およびブレドニゾン経口投与）、ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）、ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）、ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）、ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）、ＣＥＰＰ－Ｂ（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジンおよびブレオマイシン）およびＰ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）を含む。浸潤性のリンパ腫の治療に対するさらなる治療養生法には、段階１にＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）－リツキシマブ（リツキサン（登録商標））－ＣＭＣ５４４での治療を第１線に、続いて段階２および段階３にＣＨＯＰ－リツキシマブ（リツキサン（登録商標））、ＣＨＯＰ－ＣＭＣ－５４４またはＣＨＯＰ－リツキシマブ（リツキサン（登録商標））－ＣＭＣ５４４での治療を含む。あるいは、段階１は、ＣＯＰ（シクロホスファミド、

ビンクリスチンおよびプレドニゾン）－リツキシマブ（リツキサン（登録商標））－ＣＭＣ－５４４での治療を第１線に持ち、続いて段階２および段階３にＣＯＰ－リツキシマブ（リツキサン（登録商標））、ＣＯＰ－ＣＭＣ－５４４またはＣＯＰ－リツキシマブ（リツキサン（登録商標））－ＣＭＣ－５４４を持つ。さらなる具体例としては、浸潤性のリンパ腫の治療は、段階１に抗体薬物コンジュゲートＣＭＣ－５４４での治療を第１線または第２線に、続いて段階２および段階３にＣＭＣ－５４４およびＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）、ＣＭＣ－５４４および、ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）、ＣＭＣ－５４４をリツキシマブ（リツキサン（登録商標））と共に、またはリツキシマブ（リツキサン（登録商標））単独での治療を含む。さらに他の具体例としては、浸潤性のリンパ腫の治療には、抗体薬物コンジュゲートＣＭＣ－５４４での治療を第１線に、続いて段階２および段階３にＣＭＣ－５４４単独または、それだけには限定しないが、ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）、ＥＰＯＣＨ（エトポシド、ビンクリスチン、ドキソルビシンを９６時間シクロホスファミドの丸薬投与、およびブレドニゾン経口投与）、ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）、ＡＳＨＡＰ（アドリアマイシン、ソルメドロール、Ａｒａ－Ｃ、およびシスプラチン）、ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）およびＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）を含めた他の治療養生法との組み合わせでの治療を含む。この出願に記載の化学療法養生法、投薬その他を含めた悪性腫瘍の化学療法に用いられる様々な細胞傷害薬の詳細は、Ｃａｎｃｅｒ ＰｒｉｎｃｉｐｌｅおよびＰｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ、Ｅｄｓ．Ｖｉｎｃｅｎｔ Ｔ．ＤｅＶｉｔａ、Ｓａｍｕｅｌｏ Ｈｅｌｌｍａｎｎ、Ｓｔｅｖｅｎ Ａ．Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ、６^{ｔｈ}Ｅｄｉｔｉｏｎ、Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ：Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ、ＷｉｌｌｉａｍおよびＷｉｌｋｉｎｓ（２００１）、およびＰｈｙｓｉｃｉａｎ’ｓ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ Ｄｒｕｇ Ｍａｎｎｕａｌ、Ｅｄｓ．Ｅｄｗａｒｄ ＣｈｕおよびＶｉｎｃｅｎｔ Ｔ．Ｄｅｖｉｔａ、Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ：ＪｏｎｅｓおよびＢａｒｔｌｅｔｔ（２００２）にみられる。

【００９４】

本発明はまた、ＣＤ２２を発現している細胞で特徴づけられる増殖性疾患に罹患しているもしくはその危険性があるヒトまたは動物の患者を治療する方法、すなわち有効量の本発明のＣＭＣ－５４４を患者に投薬することを含む方法を提供する。

本発明は、さらに特に有効な例について以下で記述しているが、本発明の範疇を限定することなく本発明をさらに記述することを意図している。

【実施例】

【００９５】

実施例１

候補の抗体の生成

ＣＤ２２に対する抗体の試料は、次の選択基準：ダウディ細胞への結合、ダウディ細胞への取り込み、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）への結合、ＰＢＭＣへの取り込み、親和性（$１０^{－９}$Ｍより高い）、マウスγ１および生成速度を用いて、ハイブリドーマから選ばれた。５／４４が好ましい抗体として選ばれた。

【００９６】

Ｉ．遺伝子クローニングおよびキメラ５／４４抗体分子の発現

ａ）５／４４ハイブリドーマ細胞の調製およびそれからのＲＮＡの調製

ハイブリドーマ５／４４は、ヒトＣＤ２２タンパクによるマウスの免疫化に続いて、従来のハイブリドーマ技術によって生成した。ＲＮＡは、５／４４ハイブリドーマ細胞からＲＮＥａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ、Ｃｒａｗｌｅｙ、イギリス；カタログナンバー７４１０６）を用いて調製した。得られたＲＮＡは、以下に記述したようにしてｃＤＮＡに逆転写した。

【００９７】
ｂ）ＮＨＬ腫瘍中でのＣＤ２２の分布
５／４４抗ＣＤ２２モノクローナル抗体を用いて染色の有無および分布を検査するために、免疫組織化学研究に着手した。対照群の抗ＣＤ２０および抗ＣＤ７９ａ抗体は、腫瘍のＢ細胞領域を確認するために、研究に加えた。
総数５０の腫瘍が研究され、これらをワーキングフォーミュレーションおよびＲＥＡＬ分類体系を用いて次のように分類した。
・７個　Ｂリンパ芽球性白血病／リンパ腫（高悪性度／Ｉ）
・４個　Ｂ細胞／小リンパ球性リンパ腫（低悪性度／Ａ）
・３個　リンパ形質細胞腫／免疫細胞腫（低悪性度／Ａ）
・１個　マントル細胞（中悪性度／Ｆ）
・１４個　濾胞中心リンパ腫（低～中悪性度／Ｄ）
・１３個　瀰漫性大細胞型リンパ腫（中～高悪性度／Ｇ、Ｈ）
・６個　分類不能（Ｋ）
・２個　Ｔ細胞リンパ腫
４０個のＢ細胞リンパ腫は、０．１μｇ／ｍｌの５／４４抗体を用いて、ＣＤ２２抗原陽性であり、濃度を０．５μｇ／ｍｌまで増加させると、さらに６個が陽性となった。残りの０．１μｇ／ｍｌで陰性の２個のＢ細胞腫瘍については、より高濃度で検査するために十分な組織が残っていなかった。しかしながら、６／１３と呼ばれ、５／４４より強く染色する他の抗ＣＤ２２抗体で検査した対照群は、４８個のＢ細胞リンパ腫全てがＣＤ２２染色陽性となった。
従って、ＣＤ２２抗原はＢ細胞リンパ腫に広範に発現し、それゆえにＮＨＬにおける免疫療法についての適当な標的を提供すると結論できる。
【００９８】
ｃ）５／４４V_HおよびV_LのＰＣＲクローニング
５／４４重鎖および軽鎖の可変領域を指定するｃＤＮＡ配列は、完全ＲＮＡ中に存在するｍＲＮＡの一本鎖ｃＤＮＡコピーを生成するための逆転写酵素を用いて合成した。それからこれは、特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によってネズミのＶ領域配列を増幅するための鋳型として用いられる。
【００９９】
ｉ）ｃＤＮＡ合成
ｃＤＮＡは、次のような試薬：５０ｍＭＴｒｉｓ－ＨＣｌｐＨ８．３、７５ｍＭＫＣｌ、１０ｍＭジチオトレイトール、３ｍＭ$MgCl_2$、０．５ｍＭのｄＡＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＣＴＰおよびｄＧＴＰ、２０単位のＲＮＡｓｉｎ、７５ｎｇ無作為ヘキサヌクレオチドプライマー、２μｇ５／４４ＲＮＡおよび２００単位マロニーネズミ白血病ウイルス逆転写酵素を含んだ２０μｌの反応体積で合成した。４２℃で６０分間インキュベートした後、９５℃で５分間加熱して反応を終結させた。
【０１００】
ｉｉ）ＰＣＲ
等分したｃＤＮＡを、重鎖および軽鎖に特異的なプライマーの組み合わせを用いて、ＰＣＲにかけた。保存された一本鎖ペプチドの配列とアニールする予定の変性したプライマープールは、先頭部のプライマーとして用いられた。これらの配列は全て、順番に、５’末端から始まる７ヌクレオチドである制限部位（V_LＳｆｕｌ；V_HＨｉｎｄＩＩＩ）、生じたｍＲＮＡを最善の形で翻訳させる配列ＧＣＣＧＣＣＡＣＣ（配列番号：５０）、開始コドンおよび既知のマウス抗体（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ　第５版、１９９１、アメリカ　保険・福祉省、公衆衛生局、国立衛生研究所）の先頭ペプチド配列を基にした２０－３０ヌクレオチドを含む。
３’プライマーは、抗体のフレームワーク部の４個のＪ－Ｃ結合を連結する事を企図しており、V_LＰＣＲ断片のクローニングを促進する酵素ＢｓｉＷｌに対する制限部位を含

む。重鎖３’プライマーは、抗体のＪ－Ｃ結合を連結する事を企図した混合物である。３’プライマーは、クローニングを促進するＡｐａｌ制限部位を含む。プライマーの３’領域は、既知のマウス抗体（Ｋａｂａｔら、１９９１、上記）にみられる配列を基にした混合配列を含む。

【０１０１】

上記のプライマーを組み合わせることによって、V_HおよびV_LについてのＰＣＲ生成物を、キメラ（マウス－ヒト）重鎖および軽鎖を生成するための適切な発現ベクター（下文参照）に直接クローニングでき、これらの遺伝子を哺乳類の細胞で発現して望ましいアイソタイプのキメラ抗体を生成できる。

ＰＣＲの培養（１００μｌ）は、次のように計画した。それぞれの反応系は、１０mMのＴｒｉｓ－ＨＣｌｐＨ８．３、１．５mMの$MgCl_2$、５０mMのＫＣｌ、０．０１％（重量／体積）のゼラチン、０．２５mMのｄＡＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＣＴＰおよびｄＧＴＰ、１０ピコモルの５’プライマー混合物、１０ピコモルの３’プライマー、１μｌのｃＤＮＡおよび１単位のＴａｑポリメラーゼを含む。反応系を９５℃で５分間インキュベートし、その後９４℃で１分、５５℃で１分および７２℃で１分のインキュベートを繰り返した。３０回繰り返した後、等分した各反応系をアガロースゲルでの電気泳動によって分析した。

【０１０２】

重鎖Ｖ領域について、増幅したＤＮＡ生成物は、フレームワークＩの開始部の範囲にアニールしているプライマープールがシグナルペプチドプライマーと置き換わった時にのみ、得られた。断片は、ＤＮＡ配列決定ベクターにクローニングした。ＤＮＡ配列を決定し、翻訳してアミノ酸配列を推定した。推定したアミノ酸配列を、実験に基づいて決定したＮ末端のタンパク質配列と照合することによって検証した。図１は、マウスモノクローナル抗体５／４４のＣＤＲのアミノ酸配列を示す。図２および図３は、それぞれマウスモノクローナル抗体５／４４の、成熟した軽鎖および重鎖Ｖ領域のＤＮＡ／タンパク質配列を示す。

【０１０３】

ｉｉｉ）ＰＣＲ断片の分子クローニング

ネズミのＶ領域配列を、その後発現ベクターｐＭＲＲ１０．１およびｐＭＲＲ１４（図７および８）にクローニングした。これらは、ヒトκ軽鎖およびヒトγ－４重鎖の定常部をコードするＤＮＡを含んだ軽鎖および重鎖を発現するためのベクターである。V_L領域を、ＳｆｕｌおよびＢｓｉＷｌ制限部位を用いて、配列決定ベクターから制限消化および連結によって発現ベクターにサブクローンして、プラスミドｐＭＲＲ１０（５４４ｃＬ）（図８）を創作した。クローニング戦略－異なった集団内のハイブリドーマ（１６２と呼ばれる）由来のマウス重鎖抗体先頭部を用いた－では得られなかったので、重鎖ＤＮＡを５’プライマーを用いてＰＣＲで増幅し、シグナルペプチドを導入した。５’プライマーは、次の配列：５’ＧＣＧＣＧＣＡＡＧＣＴＴＧＣＣＧＣＣＡＣＣＡＴＧＧＡＣＴＴＧＧＡＴＴＣＴＣＴＣＴＣＧＴＧＴＴＣＣＴＧＧＣＡＣＴＣＡＴＴＣＴＣＡＡＧＧＧＡＧＴＧＣＡＧＴＧＴＧＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＣＧＴＣＧＡＧＴＣＴＧＧ３’（配列番号：５１）を持つ。

反対のプライマーは、元のV_H遺伝子クローニングに用いられるものと同一であった。生じたＰＣＲ生成物を酵素ＨｉｎｄＩＩＩおよびＡｐａｌで消化し、サブクローニングし、そのＤＮＡ配列を確認し、プラスミドｐＭＲＲ１４（５４４ｃＨ）（図７）を創作した。両発現ベクターをＣＨＯ細胞に瞬間的に共感染させることによって、キメラｃ５／４４抗体を生成した。これは、製造業者のプロトコール（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ：Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｇｒｏｎｉｎｇｅｎ、オランダ　カタログナンバー１１６６８－０２７）に従って、リポフェクタミン試薬を用いて達成される。

【０１０４】

ＩＩ．グリコシル化部位および反応性リシン

潜在的なＮ－結合グリコシル化部位は、アミノ酸配列Ｎ－Ｙ－Ｔ（図３）を持つＣＤＲ

－Ｈ２にみられる。５／４４のゲルおよびその断片（Ｆａｂを含む）の、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウエスタンブロッティングおよび炭水化物染色によって、この部位が実際にグリコシル化されていることが示された（図は示していない）。それに加えて、リシン残基は、抗体が結合する可能性がある試薬と結合するための追加の部位を提供することによって、抗体の結合親和性を低下させる可能性のある、ＣＤＲ－Ｈ２の中の露出した部位にみられた。

ＰＣＲ戦略は、図４に示すように、グリコシル化部位および／または反応性リシンを除去することを試みて、ＣＤＲ－Ｈ２にアミノ酸置換基を導入するために用いられた。変異体Ｎ５５Ｑ、Ｔ５７ＡまたはＴ５７Ｖをコードする先頭部のプライマーはグリコシル化部位（図４）を除くために用いられ、置換基Ｋ６０Ｒを含む先頭から４番目のプライマーは、反応性リシン残基の除去を起こした。フレームワーク４反対側プライマーは、これらそれぞれのＰＣＲ増幅に用いられた。ＰＣＲ生成物を酵素ＸｂａｌおよびＡｐａｌで消化し、これらの変異体をコードする発現プラスミドを生成するためにｐＭＲＲ（５４４ｃＨ）に挿入した（ＸｂａｌおよびＡｐａｌによる開裂も）。Ｎ５５Ｑ、Ｔ５７ＡおよびＴ５７Ｖ変異体は、グリコシル化部位を、アミノ酸を変化させて共通配列Ｎ－Ｘ－Ｔ／Ｓを解離させることによって除去し、一方Ｋ６０Ｒ変異体は、潜在的な反応性リシンを同様の陽電荷を持つアルギニンに置き換える。生じたｃＨ変異プラスミドは、ｃＬプラスミドと共感染して発現したキメラ抗体変異体を生成した。

【０１０５】

ＩＩＩ．キメラ遺伝子の活性の評価

キメラ遺伝子の活性は、ＣＨＯ細胞への瞬間的感染およびバイアコア分析による親和性定数の決定に従って評価した。

グリコシル化部位または反応性リシンを除去した、キメラ５／４４またはその変異体の親和性を、ＣＤ２２－ｍＦｃ構造との結合についてＢＩＡを用いて調査した。結果を図９に示す。全ての結合の測定を、商標バイアコア２０００機器（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ　ＡＢ、Ｕｐｐｓａｌａ、スウェーデン）で実行した。このアッセイは、固定した抗マウスＦｃを介してＣＤ２２ｍＦｃを補足することにより実行した。抗体は可溶層に存在した。試料、標準細胞、対照群（５０μｌ）に、固定した抗マウスＦｃ、続いて可溶層に存在する抗体を、繰り返し注入した。各周期の後、３０μｌ／分で５０μｌの４０ｍＭＨＣｌを加えて表面を再生した。運動性分析は、ＢＩＡ評価３．１ソフトウェア（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を用いて行った。

【０１０６】

構造体Ｔ５７Ａ中のグリコシル化部位を除去することによって、キメラ５／４４と比較して僅かに速い活性化速度および著しく遅い不活化速度となり、親和性が約５倍に向上した。Ｎ５５Ｑ変異は親和性に影響を与えなかった。この結果は、炭水化物自体の除去が（Ｎ５５Ｑの変化と同じように）結合に影響を与えないであろうということを示唆し、予期しないものであった。親和性の向上は、Ｔ５７Ａの変化によってのみみられる。一つの可能性のある説明としては、炭水化物の存在に関わらず、５７位のトレオニンはトレオニンからアラニンへの変化で除去される結合に負の影響を与えるということである。アラニンの大きさが小さいことが重要であり、トレオニンによる負の影響はその大きさに関係しているという仮説は、Ｔ５７変異体を用いて得られた結果：５７位をバリンで置換することは有益でない、によって支持される（結果は示していない）。

Ｋ６０Ｒ変異体によってリシン残基を除去すると、親和性に中立的影響を与える、すなわちアルギニン残基を導入すると、親和性を損なうことなく潜在的反応部位が除去される。

グリコシル化部位の除去および潜在的反応性リシン残基の除去についての変異は、それゆえに共にヒト化計画に含まれる。

【０１０７】

実施例２

５／４４のＣＤＲ移植

５／４４抗体の重鎖および軽鎖の可変領域に関する遺伝子の分子クローニング、およびキメラ（マウス／ヒト）５／４４抗体を生成するためのその使用は、上で記述してきた。マウス５／４４V_LおよびV_H領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、それぞれ図２および図３に示す（配列番号：７および８）。この実施例では、Ａｄａｉｒらの方法（ＰＣＴ公開番号ＷＯ９１／０９９６７）に従った、ヒトにおける潜在的な免疫原性を低下させるための、ヒトのフレームワークへの５／４４抗体のＣＤＲ移植を記載する。

【０１０８】

Ｉ．５／４４軽鎖のＣＤＲ移植

ヒトのサブグループＩκ軽鎖Ｖ領域の共通配列と提携しているタンパク質配列は、６４％の配列の同一性を示した。結果として、ＣＤＲ移植軽鎖の構成について、選ばれるアクセプターフレームワーク領域は、ヒトＶＫサブグループＩ生殖細胞系Ｏ１２、ＤＰＫ９配列のものに一致していた。フレームワーク４アクセプター配列は、ヒトＪ領域生殖細胞系配列ＪＫ１に由来した。

ネズミ５／４４のフレームワーク領域のアミノ酸配列およびアクセプター配列の比較を図５に記載し、ドナーおよびアクセプター鎖の間に２７の相違点が存在することを示す。それぞれの位置について、ネズミ残基の抗原結合に寄与する潜在的能力が、直接的または間接的に、パッキングまたはV_H／V_L相互作用領域に影響を与えるという分析がなされた。ネズミ残基が重要でヒトの残基と大きさ、極性または電荷の点で十分に異なっていると考えられたならば、そのネズミの残基は保持された。この分析に基づいて、配列番号：１９および配列番号：２０（図５）で与えられる配列を持つＣＤＲ移植軽鎖の二つの型が、構築された。

【０１０９】

ＩＩ．５／４４重鎖のＣＤＲ移植

５／４４重鎖のＣＤＲ移植は、軽鎖に対して記述したのと同じ戦略を用いることでなされた。５／４４重鎖のＶ領域は、サブグループＩに所属するヒトの重鎖と相同であることが判明し（７０％の配列が同一）、それゆえに、ヒトサブグループＩ生殖細胞系フレームワークＶＨ１－３、ＤＰ７がアクセプターフレームワークとして用いられた。フレームワーク４アクセプター配列は、ヒトＪ領域生殖細胞系配列ＪＨ４に由来した。

５／４４重鎖のフレームワークとの比較を図６に示したが、そこから５／４４重鎖はアクセプター配列と２２位において異なるということが分かる。これらがなし得る抗原結合に対する寄与を分析することによって、配列番号：２３、配列番号：２４、配列番号：２５、配列番号：２６および配列番号：２７で与えられる配列を持った、５つの型のＣＤＲ移植重鎖が構築された（図６）。

【０１１０】

ＩＩＩ．移植配列についての遺伝子の構築

遺伝子は移植した配列ｇＨ１およびｇＬ１をコードするように設計され、一連の一部重複したオリゴヌクレオチドが設計、構築された（図１０）。ＰＣＲ組み立て技術は、ＣＤＲ移植Ｖ領域遺伝子を構築するのに用いられた。１００μｌの反応体積には、１０ｍＭのＴｒｉｓ－ｐＨ８．３、１．５ｍＭの$MgCl_2$、５０ｍＭのＫＣｌ、０．００１％ゼラチン、０．２５ｍＭのｄＡＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＣＴＰおよびｄＧＴＰ、１ピコモルの各「内部」プライマー（Ｔ１、Ｔ２、Ｔ３、Ｂ１、Ｂ２、Ｂ３）、１０ピコモルの各「外部」プライマー（Ｆ１、Ｒ１）および１単位のＴａｑポリメラーゼ（ＡｍｐｌｉＴａｑ、Ａｐｐｌｉｅｄ　ＢｉｏＳｙｓｔｅｍ、カタログナンバーＮ８０８－０１７１）を含むようにした。ＰＣＲ周期のパラメーターは、９４℃で一分、５５℃で一分および７２℃で一分を３０周期であった。その後反応生成物を１．５％アガロースゲル上に流し込み、ＱＩＡＧＥＮスピンカラム（ＱＩＡ急速ゲル抽出キット、カタログナンバー２８７０６）を用いて、抽出して回収した。ＤＮＡは体積にして３０μｌが抽出された。その後ｇＨ１およびｇＬ１ＤＮＡを等分したもの（１μｌ）を、製造業者の指示に従って、ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ　ＴＯＰＯ　ＴＡクローニングベクターｐＣＲ２．１ＴＯＰＯ（カタログナンバーＫ４５００－０１）にクローニングした。この非発現ベクターは、大量のクローンの配列の決

定を容易にするクローニング中間生成物として有用であった。ベクター特異的プライマーを用いたＤＮＡ配列決定は、ｇＨ１およびｇＬ１を含めた、ｐＣＲ２．１（５４４ｇＨ１）およびｐＣＲ２．１（５４４ｇＬ１）プラスミドを創作する正確なクローンを同定するのに利用された（図１１および１２）。

【０１１１】

オリゴヌクレオチドカセット置換法は、ヒト化移植ｇＨ４、５、６および７、およびｇＬ２を創作するのに用いられた。図１３はオリゴヌクレオチドカセットの設計図を示す。各変異体を構築するために、ｐＣＲ２．１（５４４ｇＨ１）またはｐＣＲ２．１（５４４ｇＬ１）を、示した制限酵素によって切断した（重鎖のＸｍａｌ／Ｓａｃｌｌ、軽鎖のＸｍａｌ／Ｂｓｔｌｌ）。大きいベクター断片は、アガロースでゲル精製し、オリゴヌクレオチドカセットとの連結に用いられた。これらのカセットは、二つの相補的なオリゴヌクレオチドから構成されていて（図１３に示す）、１２．５ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌｐＨ７．５、２．５ｍＭの$MgCl_2$、２５ｍＭのＮａＣｌ、０．２５ｍＭジチオエリトリトール体積２００μｌに０．５ピコモル／μｌの濃度で混合される。アニーリングは、水浴（体積５００μｌ）中で９５℃まで３分間加熱し、その後反応系が室温までゆっくり冷却されるようにすることによってなされた。アニーリングしたオリゴヌクレオチドカセットを、その後適切に切断ベクターと連結する前に水に１０倍に希釈した。ＤＮＡ配列決定は、ｐＣＲ２．１（５４４ｇＨ１）およびｐＣＲ２．１（５４４ｇＬ１）プラスミドを創作する、正確な配列を確認するために用いられた。実証された移植配列を、その後、発現ベクターｐＭＲＲ１４（重鎖）およびｐＭＲ１０．１（軽鎖）にサブクローニングした。

【０１１２】

ＩＶ．ＣＤＲ移植配列のＣＤ２２結合活性

移植した変異体をコードするベクターは、元々のキメラ抗体鎖と共に、様々な組み合わせでＣＨＯ細胞に共感染した。結合活性は、競合アッセイにおいて比較され、元々のマウス５／４４抗体の結合をラモス細胞（ＡＴＴＣから得られる、表面ＣＤ２２を発現するバーキットリンパ腫のリンパ芽球ヒト細胞系）に対する結合について競合させた。このアッセイは、細胞表面のＣＤ２２を結合する能力について、移植片を比較する最善の方法と考えられた。結果は図１４および図１５に示す。見て分かるように、全ての移植片の間には非常にわずかな違いしかなく、それらは全てネズミの親に対する競合において、キメラよりも効果的に作用した。３つの追加のヒト残基をＣＤＲ－Ｈ２の末端に導入しても（ｇＨ６およびｇＨ７）、結合に影響は与えないようであった。

【０１１３】

最小数のネズミの残基を組み合わせた移植片ｇＬ１ｇＨ７が選ばれた。軽鎖移植片ｇＬ１は、６個のドナー残基を持つ。残基Ｖ２、Ｖ４、Ｌ３７およびＱ４５は、潜在的に重要なパッキング残基である。残基Ｈ３８は、V_H／V_L相互作用領域にある。残基Ｄ６０は、ＣＤＲ－Ｌ２に近接した表面残基であり、直接抗原結合に寄与する可能性がある。これらの残基のうち、Ｖ２、Ｌ３７、Ｑ４５およびＤ６０は、他のサブグループのヒトκ遺伝子の生殖細胞系の配列に見られる。重鎖移植片ｇＨ７は４個のドナーフレームワーク残基を持つ（残基Ｒ２８はＣＤＲ移植に用いられる構造定義の下でＣＤＲ－Ｈ１の一部と考えられる（Adairら、(1991)、PCT出願第WO91/09967号参照））。残基Ｅ１およびＡ７１はＣＤＲに近接した表面残基である。残基Ｉ４８は潜在的なパッキング残基である。残基Ｔ９３はV_H／V_L相互作用領域に存在する。これらの残基のうち、Ｅ１およびＡ７１はヒトのサブグループＩの他の生殖細胞系の遺伝子に見られる。残基Ｉ４８は、ヒトの生殖細胞系サブグループ４に見られ、Ｔ７３はヒトの生殖細胞系サブグループ３に見られる。

【０１１４】

ベクターによって提供される定常部遺伝子の中にあるイントロンのおおよその位置を含めた、軽鎖および重鎖の両方の完全なＤＮＡおよびタンパク質配列は図１６に示され、軽鎖についてはそれぞれ配列番号：２９および配列番号：２８で与えられ、重鎖についてはそれぞれ配列番号：３１および配列番号：３０で与えられる。

これら軽鎖および重鎖の遺伝子をコードするＤＮＡは、これらのベクターから削除され

た。重鎖ＤＮＡは５’ＨｉｎｄＩＩＩ部位で消化され、その後イー・コリ（大腸菌）ＤＮＡポリメラーゼＩのＫｌｅｎｏｗ断片で処理され、５’平滑末端を形成した。３’ＥｃｏＲＩ部位での開裂によって、精製されてアガロースゲルから重鎖断片が生じた。同様にして、５’Ｓｆｕｌ部位で平滑で、３’ＥｃｏＲＩ部位を持つ軽鎖が生成した。両フラグメントは、発現ベクターに基づいたＤＨＦＲにクローニングされ、ＣＨＯ細胞中の安定した細胞系を生成するのに用いられた。

【０１１５】

実施例３

ＮＡｃ－γカリチェアミシンＤＭＨＡＣＢＵＴのヒト化抗ＣＤ２２抗体（Ｇ５／４４）への結合

典型的な結合反応において、ヒト化抗ＣＤ２２抗体（Ｇ５／４４）は、ＮＡｃ－γカリチェアミシンＤＭＨＡｃＢｕｔＯＳｕ（カリチェアミシン誘導体）に結合し（図１７参照）、その目標タンパク質濃度は７．５ｍｇ／ｍｌであり、目標カリチェアミシン誘導体負荷は重量でタンパク質の８．５％であった。目標反応ｐＨは８．５±０．２であり、他の反応組成物の目標濃度は次の通りであった：５０ｍＭのＮ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ’－（４－ブタンスルホン酸）（ＨＥＰＢＳ）、３７．５ｍＭデカン酸ナトリウム、および体積比９％の完全なエタノール。反応は３３±２℃で１時間行った。精製に先立ったこの典型的な反応の分析の結果は次の通りだった：タンパク質：７．３４ｍｇ／ｍｌ；カリチェアミシン負荷：８２．７μｇ／ｍｇ；凝集：９３．２５％；および非結合タンパク質（ＬＣＦ）：１．０７％（ＵＶ　Ａｒｅａ％ＨＰＬＣによる）

様々な界面活性剤添加剤の効果および生成物の収率および純度に対するそれらの濃度を検査して、コンジュゲート単量体の生成に対するそれらの影響を決定した（表２参照）。反応は、添加剤とその濃度を除いて全てが一定に保たれて行われた。これらの反応から生成されるコンジュゲートを、タンパク質濃度、カリチェアミシン負荷、凝集量およびＬＣＦについて分析した。C_6（ヘキサン酸塩）からC_{12}（ドデカン酸塩）までの範囲の全てのｎ－カルボン酸は許容できる結果が得られたけれども、全てにおいて最高の結果（低ＬＣＦ、低凝集および単量体コンジュゲートの高回収率）は、３０ｍＭから５０ｍＭまでの範囲の濃度のデカン酸によって得られた。

【０１１６】

【表２】

添加剤および濃度のコンジュゲーション結果に対する効果

添加物／濃度	タンパク質回収(回収%)	凝集%	ＬＣＦ%
ヘキサン酸塩-500mM	51.3	3.36	38.3
ヘプタン酸塩-400mM	49.9	4.7	20.6
オクタン酸塩-200mM	57.3	3.27	10.6
ナノン酸塩-100mM	54.7	1.41	0.3
デカン酸塩-50mM	56.7	1.35	0.2
ウンデカン酸塩-20mM	46.9	2.95	0.6
ドデカン酸塩-5mM	65.6	0.78	7.0

【０１１７】

実施例４

クロマトグラフィー精製工程

Ｉ．クロマトグラフィー分離工程

ブチルセファロース４ファーストフローは、最高のＨＩＣの媒質として認められたけれども、許容できる結果は、オクチルセファロース４ファーストフロー、ＰＰＧ－６００Ｃ（Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｅｐ）、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ　ＥＭＤプロピル（ＥＭ　Ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ）およびＳｏｕｒｃｅ１５ＩＳＯ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃ

ｅｓ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）のような他の樹脂を用いたクロマトグラフィー条件でも、わずかに修正を加えて、得ることができる。

精製の出発物質は、カリチェアミシン誘導体負荷が８３μｇ／ｍｇで、凝集量が１０．１％（エリアパーセント　ＨＰＬＣによる）およびＬＣＦ含有量が５．６％（エリアパーセント　ＨＰＬＣによる）である７．２ｍｇ／ｍＬのタンパク質を含む結合反応混合物であった。

結合反応が完結した後、反応混合物はリン酸カリウム溶液を加えて４倍に希釈され、最終的な燐酸濃度が０．７Ｍとなった（ｐＨ８．２）。混合した後、この溶液を０．４５ミクロンフィルターによって濾過した。希釈した溶液をブチルセファロース４ファーストフローカラムに負荷した。カラムに負荷したタンパク質の総量はｍｌ床体積あたり２９ｍｇであった。０．７Ｍのリン酸カリウムで洗浄した後、カラムを、ｐＨ８．２、０．７Ｍから４ｍＭまでのリン酸カリウムの段階勾配を用いて溶出された。段階勾配で溶出されたフラクションをさらなる工程のために蓄え、そのプールは、それぞれの凝集体およびＬＣＦが１エリアパーセント未満である単量体コンジュゲートからなる。このプールをセファデックスＧ－２５（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）に負荷し、処方に適した、ｐＨ８．０で２０ｍＭＴｒｉｓ－Ｃｌおよび１００ｍＭ塩化ナトリウムからなる緩衝液に交換するためにカラムを脱塩した。精製し、緩衝液を交換したＣＭＣ－５４４調製物は、次のような特性を有した：カリチェアミシン負荷：８１μｇ／ｍｇ；凝集：０．４％（エリアパーセント　ＨＰＬＣによる）ＬＣＦ：０．８％エリアパーセント　ＨＰＬＣによる）。

【０１１８】

実施例５

Ｎａｃ－γカリチェアミシンＤＭＨＡｃＢｕｔ－Ｇ５／４４免疫コンジュゲート（ＣＭＣ－５４４）の結合分析

上の結合工程によって生成したヒト化抗ＣＤ２２抗体（Ｇ５／４４）のカリチェアミシンとの免疫コンジュゲート（ＣＭＣ－５４４）を、改良された工程を用いて生成したコンジュゲートが抗原結合に何らかの不都合な影響を及ぼすかを決定するための結合研究において、分析した。表３は、結合工程が抗体の抗原結合親和性に何ら影響しないことを示す。古いまたは新しい結合工程のいずれかによって作られたＣＭＣ－５４４免疫コンジュゲートは、標的抗原に同様の親和性で結合し、非結合抗体Ｇ５／４４と違いはなかった。

【０１１９】

【表３】

ＣＭＡ－６７６およびＣＭＣ－５４４コンジュゲーション操作を用いて得られるＣＭＣ－５４４の結合親和性

抗-CD22抗体	K_D (M)	K_A (1/M)	k_d (1/s)	k_a (1/Ms)	%ＬＣＦ
ヒト化G5/44	1.30×10^{-10}	7.90×10^{9}	2.80×10^{-5}	2.20×10^{5}	100
CMC-544 (21 μg/mg) (CMA-676 操作)	1.20×10^{-10}	8.10×10^{9}	6.10×10^{-5}	4.90×10^{5}	25
CMC-544 (87 μg/mg) (CMC-544 操作)	1.50×10^{-10}	6.60×10^{9}	6.90×10^{-5}	4.60×10^{5}	3.3

【０１２０】

バイオセンサー分析は、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ　ＡＢ、Ｕｐｐｓａｌａ、スウェーデン）を用いて行われた。ＣＤ２２ｍＦｃは、およそ２０００共鳴単位のタンパク質密度で、標準アミン結合化学を用いて、Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミドで活性化されたカルボキシメチルデキストラン被覆バイオセンサーチップ（ＣＭ５）上に、共有結合で固定された。ＣＭＣ－５４４またはＧ５／４４の試料を、ＨＢＳ緩衝剤（１５０ｍＭのＮａＣｌ、３ｍＭのＥＤＴＡおよび体積比０．００５％のポリソルベートを含む１０

ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４）で希釈し、１から１００ｎＭの範囲の濃度で、３０μｌ／分の流速で結合のために３分間、ＣＤ２２ｍＦｃ被覆バイオセンサーチップ表面に注ぎ込んだ。結合段階の後、１５分以上ＨＢＳ緩衝剤をチップで洗浄する事によって、結合した抗体が解離するのを、モニターした。抗原表面は、３０秒間１５μｌの再生緩衝剤（１０ｍＭのＮａＯＨおよび２００ｍＭのＮａＣｌ）でバイオセンサーチップを洗浄することによって再生し、続いて次の周期の前に２分間の安定時間をおく。運動定数を、１：１ラングミュア結合曲線適合モデルおよびＢＩＡ評価プログラム（バージョン３．０　Ｂｉａｃｏｒｅ）を用いた、非線形最小二乗回帰分析によって、算出した。ＣＭＣ－５４４の抗原結合を、バイオセンサーチップ上に共有結合で固定されたＣＤ２２ｍＦｃを用いて、表面プラスモン共鳴分析によって評価した。ＣＭＣ－５４４およびＧ５／４４のＣＤ２２ｍＦｃに対する結合の運動分析の結果は、大量移転の代償として包括的に１：１ラングミュア結合モデルに適合させた後、ＣＭＣ－５４４および非結合Ｇ５４４両方を同様の親和性でＣＤ２２に結合させたことを示す（ＣＭＣ－５４４：ＣＤ２２　K_D＝２００ｐＭ；Ｇ５／４４：ＣＤ２２　K_D＝２３５ｐＭ）。カリチェアミシンに対する結合は、ＣＤ２２ｍＦｃに効果的に結合するＧ５／４４の能力に影響を与えなかった。

【０１２１】

Ｂリンパ腫細胞の表面に発現されるＣＤ２２に対するＣＭＣ－５４４およびＧ５／４４の結合はまた、フローサイトメトリーによって検査された。抗ＣＤ３３ｍＡｂであるゲムツズマブ（ｈｐ６７．６）およびそのカリチェアミシンコンジュゲートであるＣＭＣ－６７６（ゲムツズマブオゾガマイシン）は、この評価法においてアイソタイプ適合対照群として用いられた。キメラヒトＩｇＧ１抗ヒトＣＤ２０ｍＡｂであるリツキシマブ（リツキサン（登録商標））は、陽性対照群として用いられた。精製したヒトポリクローナルＩｇＧ１およびＩｇＧ４もまた、陰性対照群として用いられた。ＲａｍｏｓまたはＲＬＢＣＬ上のＣＤ２２に対するＣＭＣ－５４４およびＧ５／４４の結合は類似しており、ヒトポリクローナルＩｇＧ４との結合と区別できた。ＲＬＢＣＬはＲａｍｏｓＢＣＬよりも低いＣＤ２２の表面発現を呈した。対照的に、ＣＭＡ－６７６またはｇＬ１ｇＨ７のどちらかのＢＣＬに対する結合は、ＣＤ３３の発現がないことと一致して、ヒトポリクローナルＩｇＧ４との結合と類似していた（データは示していない）。同じ細胞が、抗ＣＤ２０リツキシマブ（リツキサン（登録商標））には、強い結合を呈した。ｈＰ６７．６およびＣＭＡ－６７６とは異なり、ＣＭＣ－５４４もＧ５／４４も、ＣＤ２２$^-$ＣＤ３３$^+$ＨＬ－６０白血病細胞に対して全く結合を呈さなかった（データは示していない）。これらの結果は、Ｇ５／４４のカリチェアミシンとの結合はその抗原特異性に影響を与えないことを示唆している。ＣＭＣ－５４４は、ヒトＢ細胞上のＣＤ２２を特異的に認識するが、ネズミ、ラット、イヌ、ブタまたは霊長類（カニクイザルおよびアカゲザル）Ｂ細胞上のＣＤ２２は認識しない（データは示していない）。

【０１２２】

実施例６

ＣＭＣ－５４４の試験管内および生体内効果の分析

Ｉ．試験管内細胞傷害性

ＣＭＡ－６７６およびＣＭＣ－５４４工程を用いて作られたＣＭＣ－５４４の、ＣＤ２２$^+$Ｂ細胞リンパ腫細胞系、ＲＬ、Ｄａｕｄｉ、ＲａｊｉおよびＲａｍｏｓの試験管内腫瘍に対する効果を比較した。ヒトＣＤ３３を標的とするアイソタイプ適合カリチェアミシンコンジュゲート（ＣＭＡ－６７６）は、コンジュゲートの抗原非特異的効果を反映するために用いられた。この評価法における非結合Ｎ－Ａｃγカリチェアミシンの加水分解でコンジュゲートから解離した薬剤）は、用いられたこれらの細胞系のそれぞれがカリチェアミシンの致死効果に感受性であることを示唆している。表４は、カリチェアミシン相当量を基にしたこれらの評価の結果を示し、表５は、結合した抗体タンパク質の濃度として表されるこれらの結果を示す。ＣＤ２２$^+$細胞へのカリチェアミシンのＣＤ２２媒介輸送は、標的細胞を殺す上で、非結合薬剤そのままよりも少なくとも１０倍有効であった。アイソタイプ適合対照群コンジュゲート（ＣＭＡ－６７６）は、非結合カリチェア

ミシン誘導体より低いかまたは同じくらいの細胞傷害性を示した。ＣＭＣ－５４４結合工程を用いて作られたコンジュゲートは、ＣＭＡ－６７６結合工程によって作られたコンジュゲートよりも低い抗体濃度で同等の細胞傷害効果を生むということは、表４から明らかである。

【０１２３】

【表４】

コンジュゲーテッドカリチェアミシンによる増殖の阻害

B-細胞リンパ腫系統	CMC-544工程 CMC-544負荷: 65 μG/MG	CMA-676工程 CMC-544負荷: 35 μG/MG	負の対照 CMA-676負荷: 35 μG/MG	N-アセチルガンマカリチェアミシン DMH
RL #1	6	30	600	226
#2	12	40	400	270
Daudi #1	21	80	1886	260
Raji #1	500	ND*	2800	460
#2	560	520	4100	490
Ramos #1	200	130	ND	700
#2	260	ND	ND	1000

＊ＮＤ；測定せず

【０１２４】

【表５】

B-細胞リンパ腫系統	CMC-544工程 CMC-544負荷: 65 μg/mg	CMA-676工程 CMC-544負荷: 35 μg/mg	負の対照 CMA-676負荷: 35 μg/mg	抗体対照 G5/44
RL #1	0.09	0.86	17.14	>100
#2	0.18	1.14	11.43	>100
Daudi #1	0.32	2.29	53.89	>100
Raji #1	7.69	ND*	80.00	>100
#2	8.62	14.86	117.14	>100
Ramos #1	3.08	3.71	ND	>100
#2	4.00	ND	ND	>100

＊ＮＤ；測定せず

【０１２５】

生体内細胞傷害性。ＣＭＣ－５４４工程で作られたＣＭＣ－５４４を、Ｂ細胞リンパ腫異種移植片においてさらに評価した。この研究において、二つのＢ細胞リンパ腫腫瘍である、ＲＡＭＯＳおよびＲＬが用いられた。ＲＬリンパ腫は、非バーキットリンパ腫の非ホジキンリンパ腫由来の細胞系であるが、ＲＡＭＯＳは元々バーキットリンパ腫に由来した。図１８に示す代表的な実験において、ＣＭＣ－５４４およびそのネズミ抗体の場合のものは、ＲＡＭＯＳＢ細胞リンパ腫の成長を、用量依存的に抑制するのに有効であることを示した。

ヒト化抗体のコンジュゲートは、ネズミ抗体のコンジュゲートより強力であることが示された。この研究で、リンパ腫の成長の抑制を有意に起こすことのできる最小のカリチェアミシンコンジュゲートの用量は、結合したＮＡｃ－γカリチェアミシンＤＭＨ１０μｇ／ｋｇであった。対照的に、コンジュゲートと同様の日程で１０ｍｇ／Ｋｇを腹膜投与されていた非結合抗体であるＧ５／４４は、腫瘍の成長に何も影響を与えなかった。

【０１２６】

類似した研究がＲＬリンパ腫モデルを用いて行われた。表６は、ＣＭＣ－５４４の抗腫瘍作用を、ヌードマウスの大きさが３００－４００ｍｇの段階であるＲＬＮＨＬ腫瘍において評価した、三つの独立した実験の分析を組み合わせたものを示す。ＣＭＣ－５４４は、用量依存的に、３週間という時間枠以上の腫瘍の退縮を引き起こした。ＲＬリンパ腫モデルにおけるＣＭＣ－５４４の最小有効量は、これらの研究の統計的分析から、カリチェアミシン含有量を基にして２０μｇ／ｋｇと確立された。これら三つの実験のいずれにおいても死ぬものはなかった。ＣＭＣ－５４４を高用量（６０－３２０μｇ／ｋｇ）投与すると、ＲＬリンパ腫はほぼ完全に退縮した。要約すると、二つのＢ細胞リンパ腫モデルから得られた結果は、明瞭に、ＣＭＣ－５４４が腫瘍の退縮を起こすことができるということを実証している。

【０１２７】

【表６】

ヌードマウスにおけるＲＬ　ＮＨＬ異種移植片に対するＣＭＣ－５４４の抗腫瘍効果

カルチェアミシン用量 μg/kg	平均相対腫瘍増殖[1]	% T/C[2]	p−値vs ビヒクル[3]
ビヒクル	6.74	…	…
20	2.87	43	0.011
40	1.34	20	<0.001
60	0.58	9	<0.001
80	0.54	8	<0.001
160	0.21	3	<0.001
320	0.10	1	<0.001

[1] 各動物について(３週目の腫瘍重量／１日目の腫瘍重量として)コンピューター処理した相対的腫瘍増殖（ＲＴＧ）

[2] 100*(CMC-544 投与の平均ＲＴＧ／ビヒクル群の平均ＲＴＧ)

[3] 応答変数としてランク形質転換されたＴＲＧを用いるＣＭＣ－５４４ｖｓビヒクルの片側ｔ－試験比較からのｐ−値。処理群全体を通して合併分散変数、s^2 (s^2=154.54)を基礎としたすべてのｔ－試験の誤差項。

【０１２８】

新しい工程によって作られたＣＭＣ－５４４が、ＲＡＭＯＳおよびＲＬリンパ腫モデルの両方を用いた、大きな確立されたＢ細胞リンパ腫異種移植片の成長を抑制することができることもまた調査された。ＣＭＣ－５４４またはアイソタイプ適合陰性対照群コンジュゲート（ＣＭＡ－６７６）を、結合したカリチェアミシンが１６０μｇ／Ｋｇの投与量で腹腔内投与し、最初の投薬日程を１日、５日および９日維持した後、腫瘍が成長できるようにして１．５または２ｇの腫瘍塊の段階とした。同様の投薬日程で、小さい段階の腫瘍は長く持続する退縮がより簡単に起こった（表６参照）。図１９に示すように、ＣＭＣ－５４４を大きいＲＡＭＯＳリンパ腫を持つマウスに投薬すると、前から存在しているリンパ腫塊は緩やかに退縮し、２０日目までに４匹の腫瘍を持つマウスのうち３匹が、腫瘍が消失した。これらの腫瘍が消失したマウスを５０日目までモニターしたが、退縮したＲＡＭＯＳリンパ腫は全く再発を示さなかった。対照的に、アイソタイプ適合対照群であるＣＭＡ－６７６は、腫瘍の成長に影響しなかった。５匹のＣＭＡ－６７６で治療された大き

な腫瘍を持つマウスのうち４匹が、その腫瘍の負荷量が体重の１５％近くに達したために、１５日目より前に犠牲となった。

【０１２９】

ＣＭＣ－５４４を用いた類似した実験をＲＬリンパ腫モデルにおいて行った。前に記述したのと同様の日程で１６０μｇ／ｋｇの用量のＣＭＣ－５４４を腹膜内に投与すると、３０日以内に９０％より多くの存在していたＲＬリンパ腫塊の退縮が起こった。しかしながら４５日目までに、リンパ腫が退縮したこのグループのうち二匹のマウスが、腫瘍の再増殖を示した。これらの結果は、ＣＭＣ－５４４が、大きく確立されたリンパ腫と同様に、小さいリンパ腫の退縮も起こすことができることを示唆している。本明細書に示していない少数の研究においては、最初のＣＭＣ－５４４で退縮が引き起こされた後、散発的に増殖したＲＬリンパ腫を、ＣＭＣ－５４４で再び治療した。これらの研究は、ＲＬ腫瘍が第２クールのＣＭＣ－５４４による治療にもなお反応し、再び退縮することを示した。従って、ＣＭＣ－５４４による治療は、反復的な治療が可能であり、Ｂ細胞リンパ腫の大きい塊および小さい塊両方に対して有効である可能性がある。

【０１３０】

ＩＩ．ＣＭＡ－６７６およびＣＭＣ－５４４結合工程によって作られたコンジュゲートの生体内での比較

図２０は、作為的に作ったＲＬリンパ腫を持つマウスが、ＣＭＡ－６７６結合工程およびＣＭＣ－５４４結合工程を用いて作られたＣＭＣ－５４４を、標準的な投薬日程で、二つの異なった用量（８０および３２０μｇ／ｋｇの結合したカリチェアミシン）で与えられるような、代表的な実験の結果を示す。観察された抗腫瘍効果は、予期されたとおり用量依存的であり、二つのＣＭＣ－５４４調整法のどちらにおいても薬効に違いはなかった。対照的に、１６０μｇ／ｋｇで腹膜内投与された非結合Ｎ－アセチルγカリチェアミシンＤＭＨは不活性であった。しかしながら、結合したカリチェアミシンの各用量において、コンジュゲートの形で投薬された抗体タンパク質の量は、ＣＭＣ－５４４で作られたＣＭＣ－５４４に対して、ＣＭＡ－６７６で作られたＣＭＣ－５４４の方が４倍多いということは強調すべきである。標的とされたコンジュゲートのカリチェアミシン含有量が主に起こし得る抗腫瘍作用を規定するので、新しい工程によって作ったコンジュゲートを介して、遙かに少量の標的抗体を用いて必要量のカリチェアミシンを輸送することは可能である。ＣＭＣ－５４４工程によって作られたコンジュゲートの負荷量が増加したのは、事実上、コンジュゲーションの低い画分（ＬＣＦ）の量を有意に減少させたためである。

【０１３１】

ＩＩＩ．リツキシマブ（リツキサン（登録商標））抵抗性の腫瘍の治療

次の調査すべき問題は、市販されている抗ＣＤ２２リツキシマブ（リツキサン（登録商標））治療を停止した後に成長したＢ細胞リンパ腫は、依然としてＣＭＣ－５４４治療に感受性であるのかであった。このため、成長中の（人為的でない）ＲＬリンパ腫を３週間リツキシマブ（リツキサン（登録商標））で治療した。リツキシマブ（リツキサン（登録商標））療法を継続している間は、ＲＬリンパ腫の成長は抑制された。リツキシマブ（リツキサン（登録商標））療法を中止すると、ＲＬリンパ腫は急速に成長し、ＣＭＣ－５４４の１６０μｇ／Ｋｇの腹膜内投与によって治療され始め、約１ｇの大きさの塊となった。図２１および図２２で示すように、これらのＲＬリンパ腫は、６０日目までに腫瘍が消失したマウスの８０％で、依然としてＣＭＣ－５４４に感受性であった。従って、ＣＭＣ－５４４は、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））連続投与によって抑制され得る３回の投与で、Ｂ細胞リンパ腫の退縮を引き起こすことができる。

【０１３２】

実施例８

ＣＭＣ－５４４の試験管中および試験管中効果

Ｉ．結合および毒性研究

ＣＭＣ－５４４をＣＤ２２に対する結合について評価し、また試験管中および生体内モデルにおけるその活性についても評価した。ＣＭＣ－５４４はまた、ＡｃＢｕｔ結合カリ

チェアミシンを持つｈＰ６７．６（ＩｇＧ４）のアイソタイプ適合対照群コンジュゲートであるＣＭＡ－６７６、およびキメラＩｇＧ１抗ＣＤ２０ｍＡｂであり（ＩＤＥＣ　Ｐｈａｒｍｃｅｕｔｉｃａｌｓ、サンディエゴ、中央アメリカ）、市販で入手できてメドワールド製薬（Ｃｈｅｓｔｎｕｔ　Ｒｉｄｇｅ、ＮＹ）から購入したリツキシマブ（リツキサン（登録商標））と比較した。次の抗体はＧ５／４４結合領域研究に用いられた：ＢＵ１２（Ｃｅｌｌｔｅｃｈ、Ｓｌｏｕｇｈ、イギリス）；ＢＬＣＡＭ、ＨＤ２３９（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、中央アメリカ）；ＲＦＢ－４（Ａｎｃｅｌｌ　Ｃｏｒｐ、Ｂａｙｐｏｒｔ、ＭＮ）；ＳＨＣＬ－１、Ｌｅｕ１４（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ、ＮＪ）；４ＫＢ１２８およびＴｏ１５（Ｄａｋｏ　Ｃｏｒｐ、Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ、中央アメリカ）；Ｍ６／１３およびＭ５／４４（Ｃｅｌｌｔｅｃｈ、Ｓｌｏｕｇｈ、イギリス）。バーキットリンパ腫細胞系Ｒａｍｏｓ（ＣＲＬ－１９２３）および非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）細胞系ＲＬ（ＣＲＬ－２２６１）を含めた研究用の細胞系が、アメリカンタイプカルチャーコレクションから全て得られた。細胞系は、ポリメラーゼ連鎖反応マイコプラズマ検出アッセイ（ＡＴＣＣ、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）によって、マイコプラズマがいないことが確定された。細胞系は、１０％ＦＢＳ、１０ｍＭＨＥＰＥＳ、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、０．２％グルコース、ペニシリンＧ塩１００Ｕ／ｍｌ、およびストレプトマイシン硫酸塩を加えたＲＰＭＩ媒体中に懸濁培養液として維持された。

【０１３３】

Ｇ５／４４が、ＣＤ２２に対する特異性が知られているネズミのｍＡｂｓの結合を抑制できるか否かを、ＢｉａｃｏｒｅＣＭ５チップに固定したＦｃ－ＣＤ２２を用いたＢｉａｃｏｒｅ分析によって、評価した。事前に固定したＦｃ－ＣＤ２２をＧ５／４４で飽和させて、あるいは飽和させないで得られた表面プラスモン共鳴単位（ＲＵ）を比較した。生体分子相互作用分析をＢＩＡＣＯＲＥ２０００を用いて行われた。抗体は、空の対照群の表面（フローセル１、何のタンパク質も結合しておらず、対照群をつとめる）、およびＣＭ５センサーチップに固定されたＦｃ－ＣＤ２２（フローセル２）の試験表面に、アミン結合化学反応を介して、９０４２単位の濃度まで与えた。生じたセンサーグラムは、フローセル１の反応（ＲＵ）を差し引いたフローセル２の反応（ＲＵ）であった。第二センサーグラムは、以前結合を特徴づけていたＣＤ２２に対してネズミのｍＡｂを導入する前に、フローセルをＧ５／４４（１００μｇ／ｍｌ）で最初に飽和させることによって得られた。Ｇ５／４４反応を測定すると直ちに、ネズミの抗ＣＤ２２ｍＡｂを、Ｇ５４４を除去せずに個別に灌流した。ネズミの抗ＣＤ２２ｍＡｂのＧ５／４４被覆ＣＤ２２に対する結合によって生成した二次結合反応もまた記録した。ネズミの抗体がＧ５／４４で占められる部位と関連しない部位で結合するならば、その結合反応は相加的であろう。Ｇ５／４４のＣＤ２２に対する結合が第２の抗体の結合を干渉するかまたは妨げるならば、その結合反応は相加的ではないであろう。各第二の結合の測定を、Ｇ５／４４：ＣＤ２２相互作用の不活化速度について補正した。

【０１３４】

Ｇ５／４４は、ＣＤ２２のエピトープＡ／Ｉｇ様領域１に結合する抗体のみに対する結合を妨げ、Ｇ５／４４はまたＣＤ２２のこの領域内に結合するということを示唆した。

ＣＤ２２のエピトープＢ／Ｉｇ様領域３（ＲＦＢ－４）、ＣＤ２２のエピトープＣ／Ｉｇ様領域４（Ｔｏ１５）、およびＣＤ２２のＩｇ様領域２（４ＫＢ１２８）に結合する抗体は、Ｇ５／４４によって結合が妨げられない。これらの結果はＣＤ２２上のＧ５／４４結合部位は、ＣＤ２２の最初のＩｇ様領域（エピトープＡ）を認識する抗ＣＤ２２ｍＡｂの結合を阻害するので、最初のＩｇ様領域に局在していることを示唆している。未知の副特異性を持つ他の抗ＣＤ２２抗体、Ｍ６／１３（Ｃｅｌｌｔｅｃｈ、Ｓｌｏｕｇｈ、イギリス）もまたＧ５／４４によって結合が妨げられ、従ってＭ６／１３のＣＤ２２のエピトープＡ／Ｉｇ様領域１に対する結合部位を地図に位置づけた。Ｇ５／４４と同様の特異性を持つネズミの原種のＧ５／４４である、抗体Ｍ５／４４は、Ｇ５／４４の結合を阻害し、陽性対照群として働く。抗ＣＤ１９抗体ＢＵ１２は、これらの評価法において陰性対照

群として働く。結果を表７に要約した。

【０１３５】

【表７】

特定の特異性を有するネズミ抗－ＣＤ２２Ｍ／ＡＢのＧ５４４で予め処理されたＦＣ－ＣＤ２２との結合。表面プラスモン共鳴単位（ＲＵ）として表される結合応答

抗体	エピトープ Ig CD22のドメイン	G544での応答1	第２の抗-CD22 mAb処理後の応答2	応答3（応答2-1）	G544の「オフ」レートについて調整した応答3	バックグラウンドについて調整したG544なしでの第２のｍＡｂの結合	G544による阻害（%）
抗CD22, SHCL-1 Leu 14	A 1,2	654.3	579.8	-74.5	9	29.3	69
抗CD22 HD239	A 1	710.5	628.7	-81.8	1.7	19.3	91
抗CD22 M 6/13	? ?	710.0	652.7	-57.3	26.2	152.4	83
抗CD22 RFB-4	B 3	703.5	1108.5	405	488.5	534	9
抗CD22 4KB128	? 2	691.0	1343.5	652.5	736.0	738.8	0
抗CD22 To 15	C 4	676.9	1163.6	486.7	570.2	614.6	7
抗CD22 M 5/44	陽性対照	725.1	679.3	-45.8	37.7	613.9	94
抗CD19 BU12	陰性対照	686.2	602.7	-83.5	0	0	0

【０１３６】

個々の領域のＣＤ２２に対する結合特異性が知られているネズミのｍＡｂを用いて、Ｂ細胞に対する抗体の結合を妨げるＧ５／４４の能力は調査された。加えて、Ｂ細胞に対するＧ５／４４の結合を妨げるｍＡｂの能力もまた調査された。これらの研究について、１×１０^{5}Ｒａｍｏｓ細胞を、Ｇ５／４４（１０μｇ／ｍｌ）にその細胞を曝露するのに先立って、ネズミ抗ＣＤ２２抗体（１０μｇ／ｍｌのヒト化Ｇ５／４４またはマウスモノクローナル抗ＣＤ２２）に、４℃で１時間まず曝露した。細胞はさらに４℃で１時間インキュベートした。抗体処理の後、Ｂ細胞を球状にして、ＰＢＳ－１％ＢＳＡで洗浄し、適切な二次抗体（ＦＩＴＣ－ヤギ抗ヒト（重鎖および軽鎖）またはＦＩＴＣ－ヤギ抗マウス（重鎖および軽鎖））を、１００μｌのＰＢＳ１％ＢＳＡの１：１００の希釈液に加え、４℃で３０分間おいた。細胞を再び球状にして洗浄し、ＰＢＳ－１％ＢＳＡ中に再び懸濁し、ＰＢＳ－１％ホルムアルデヒド２５０μｌを含む管に加えた。細胞と関連した蛍光強度を、ＢＤＦＡＣＳｏｒｔフローサイトメーターを用いて、フローサイトメトリーによって測定した。

【０１３７】

その結果は、事前にＣＤ２２陽性Ｂ細胞に対してＧ５／４４に曝露すると、その後の抗ＣＤ２２ｍＡｂであるＭ５／４４およびＭ６／１３の結合を有意に抑制するということを示した。対照的に、抗ＣＤ２２ｍＡｂであるＲＦＢ４、Ｔｏ１５、ＨＤ２３９および４ＫＢのＢ細胞に対する結合は、Ｇ５／４４によって阻害されなかった。特にＢｉａｃｏｒｅ分析はＧ５／４４がＨＤ２３９のＣＤ２２への結合を阻害し得ることが示唆したので、フローサイトメトリーによる検出でＧ５／４４によってＨＤ２３９のＢ細胞への結合の有意

な阻害が見られなかったのは、予期しないことであった。Ｇ５／４４によってＨＤ２３９のＢ細胞への結合に対して強い阻害が見られなかったことは、それらのＣＤ２２に対する相対的親和性における違いに基づくと説明される可能性がある。上記のネズミの抗ＣＤ２２ｍＡｂをＣＤ２２陽性Ｂ細胞に対するＧ５／４４の結合を阻害する能力を調査すると、ＳＨＣＬ１およびＭ６／１３は、他の抗ＣＤ２２ｍＡｂではみられないが、Ｇ５／４４の結合を阻害した。ＨＤ２３９およびＳＨＣＬ１の結合エピトープは、ＣＤ２２の最初のＩｇ様領域に位置づけられた。しかしながら、Ｍ６／１３またはＭ５／４４によって認識されるエピトープは、位置づけられなかった。上で詳述した阻害研究は、上記の抗体は、集合的にエピトープＡとして知られている、ＣＤ２２の最初のＩｇ様領域に局在しているエピトープを認識することを示唆している。

【０１３８】

２万個のＲａｍｏｓ細胞を、様々な用量のＣＭＣ－５４４をリツキシマブ（リツキサン（登録商標））と共にまたはリツキシマブ（リツキサン（登録商標））なしで加えて、９６時間インキュベートした。９６時間後、細胞生存能力をフローサイトメトリーで分析したプロピジウムヨウ化物排除によって測定した。３ないし６ウェルの平均生存能力を算出し、細胞生存能力の用量反応性抑制を様々な治療法について算出した。細胞生存能力のバックグラウンドの反応抑制を濃度０のＣＭＣ－５４４から算出した。ロジスティック回帰分析は、ＣＭＣ－５４４が０．０１から３ｎｇ／ｍｌの範囲のカリチェアミシンＤＭＨで統計的に有意な用量依存性のＲａｍｏｓ細胞の成長抑制を起こすか検査するために用いられた。ロジスティック回帰分析はまた、ＣＭＣ－５４４のリツキシマブ（リツキサン（登録商標））との相互作用が統計的に重要であるかを決定するためにも用いられた。５０％阻害濃度（IC_{50}）もまた算出し、それぞれの治療法のＣＭＣ－５４４単独治療と比較した有効性を記録した。統計的分析は、ＳＡＳ第８版におけるＰＲＯＢＩＴ法を用いて行った。

【０１３９】

研究の結果は、ＣＭＣ－５４４が０．０１から３ｎｇ／ｍｌの範囲のカリチェアミシンＤＭＨで用量依存性のＲａｍｏｓ細胞の成長抑制を起こすことを示した。ＣＭＣ－５４４単独での５０％阻害濃度（IC_{50}）は０．０２９ｎｇ／ｍｌであった。ＣＭＣ－５４４の細胞傷害活性とリツキシマブ（リツキサン（登録商標））の相互作用が統計的に重要であるかを決定するために、２，２０および２００μｇ／ｍｌのリツキシマブ（リツキサン（登録商標））を、ＣＭＣ－５４４で治療した細胞に加えた。リツキシマブ（リツキサン（登録商標））は、ＣＭＣ－５４４を加えずに２０および２０μｇ／ｍｌ加えても、それだけでは細胞成長に何ら有意な影響を与えなかった（それぞれ１１１．７％および９４．０％の培地の増量）。ＣＭＣ－５４４と組み合わせると、三つ全ての濃度の（リツキサン（登録商標））で、統計的に有意な（ｐ＜０．０５）ＣＭＣ－５４４用量反応曲線の傾斜および切片の左方移動が起こった。２および２００μｇ／ｍｌのリツキシマブを組み合わせで、用量反応曲線の最も大きな移動が起こった。これら二つの曲線は互いには統計的に違いはないが、２０μｇ／ｍｌの用量の組み合わせとは有意差があった（ｐ＜０．０５）。二次的な研究が（結果は報告されていない）、最初の研究でみられた結果を確証した。ＣＭＣ－５４４を加えた２，２０および２００μｇ／ｍｌのリツキシマブ（リツキサン（登録商標））の組み合わせについての５０％阻害濃度は、それぞれ０．００７２、０．００８１および０．００７２ｎｇ／ｍｌであった。リツキシマブ（リツキサン（登録商標））を加えたＣＭＣ－５４４の５０％阻害濃度は、ＣＭＣ－５４４単独の５０％阻害濃度より約４倍強力である。

【０１４０】

ＩＩ．生体内抗腫瘍活性皮下異種移植片およびスキッドマウスにおける体系的散在性Ｂ細胞リンパ腫

メスの無胸腺のヌードマウス１８－２２ｇを全身放射線照射した（４００ｒａｄ）。腫瘍の発生を促進するために、さらなる放射線照射によって、マウスの免疫系を抑制した。放射線照射の３日後、マウスにマトリゲル（Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｍｅｄ

ｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔ　Ｂｅｌｆｏｒｄ、ＭＡ、ＲＰＭＩ中に１：１で希釈）中の１０７ＲＬ細胞で、背側の側腹部に皮下注射した。腫瘍が適当な大きさまで達したら（０．３ｇ、典型的には２１日後）、ＣＭＣ－５４４、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））またはＣＨＯＰ療法（以下参照）を、無菌の塩で、マウスあたり０．２ｍｌ投薬した。投薬の最初の日を第１日とみなした。二回の追加投与を５日目および９日目に行った（治療＝ｑ４Ｄｘ３）。ＣＨＯＰ療法は、シクロホスファミド（Ｃ）４０ｍｇ／ｋｇ静注（商標シトキサン、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｅｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｃｏ．、Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ、ＮＪ）；ドキソルビシンＨＣｌ（Ｈ）３．３ｍｇ／ｋｇ静注（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｃｏ．、Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）；ビンクリスチン（Ｏ）０．５ｍｇ／ｋｇ静注（ＧｅｎｓｉａＳｉｃｏｒ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｉｒｖｉｎｅ、ＣＡ）；およびプレドニゾン０．２ｍｇ／ｋｇ経口投与（Ｒｏｘａｎｅ　Ｌａｂｓ．、Ｃｏｌｕｍｂｉａ、ＯＨ）からなる。ＣＨＯは、ＣＭＣ－５４４およびリツキシマブ（リツキサン（登録商標））療法と同様の投薬日程に従って投薬し（ｑ４Ｄｘ３）、一方プレドニゾンは、経口的に隔日で５回投与した（ｑ２Ｄｘ５）。腫瘍を、少なくとも１週間に１回測定し、腫瘍質量＝０．５（腫瘍の幅／２）（腫瘍の長さ）で計算した。グループ平均、ＳＥＭを算出して媒質処理グループと多変量ｔ検定を用いて統計的有意性について比較した。グループ平均は、５０日まで、またはマウスが死ぬまで（グループ平均を乱す）または腫瘍が大きく成長しすぎるまで（＞３．５ｇ）およびマウスを安楽死させなければならなくなるまで記録した。この後、腫瘍質量は、全ての治療グループ中の個々のマウスそれぞれについてのみ報告された。それぞれの治療グループに対する各研究の最後に腫瘍の消失していたマウスの数もまた記録された。

【０１４１】

ＣＭＣ－５４４単独または他の散在性リンパ腫に対する生物活性試薬と組み合わせた効果を決定するために、スキッドマウスモデルが用いられた。オスのスキッドマウス（ＣＢ１７ＳＣＩＤ）体重２０～２５ｇに、尾の静脈から１０６Ｒａｍｏｓ細胞を注射した。細胞注射の３または９日後、マウスに媒質、コンジュゲート（ＣＭＣ－５４４またはＣＭＣ－６７６）、またはリツキシマブ（リツキサン（登録商標））を静注で合計３回投与した。３日治療日程については、マウスに３、７、および１１日に投薬した。９日治療日程については、マウスに９、１３、および１７日に投薬した。９日治療日程において、ＣＭＣ－５４４およびリツキシマブ（リツキサン（登録商標））の組み合わせはまた、以下に記述するように与えられた。マウスは、殺された時に後肢の麻痺が出現するのを、毎日モニターした。グループ平均生存時間（±ＳＤ）、中央値、最小および最大生存時間を全て算出した。グループ間の生存時間の分布における違いは、ノンパラメトリック対数順位検定を用いて決定され、０．０５の有意水準で報告された。生存曲線をカプラン－マイヤー法を用いて作図した。

【０１４２】

最初の研究は、散在性のリンパ腫のＳＣＩＤマウスの生存時間に対する、二つの異なる投薬日程の影響を検査した。一つ目の研究では、腫瘍細胞を静脈内に注射した３日後（進行したモデル）の反応開始剤の投与を考察し、一方二つ目の研究では、腫瘍細胞注射後９日まで、薬剤の投与を遅らせた（安定したモデル）。各研究において、ＣＭＣ－５４４（１６０μｇ／ｋｇ）、ＣＭＡ－６７６（１６０μｇ／ｋｇ）またはリツキシマブ（リツキサン（登録商標））（２０ｍｇ／ｋｇ）を、静注で３回、４日おきに投与した。進行したモデルでは、媒質処理マウスは平均生存時間が２７日であった（図２３、表８）。ＣＭＡ－６７６は、ＣＭＣ－５４４に対するアイソタイプ適合対照群であるが、生存時間は有意に増加しなかった（ｐ＞０．０５）。ＣＭＣ－５４４は、生存時間が４１日まで有意に増加したが、一方リツキシマブは重大な効果を持ち、生存時間が１２５日より長くなるまで増加した（有意にＣＭＣ－５４４より効果が大きい）。腫瘍細胞が循環し（ホーミングし）、標的組織に集積するまで（安定したモデル）投薬を遅らせると、ＣＭＣ－５４４およびリツキシマブ（リツキサン（登録商標））に対する結果が変化した。ＣＭＡ－６７６この場合もまた生存時間に有意な影響を与えなかった（図２４、表８）。リツキシマブ（リ

ツキサン（登録商標））は、平均生存時間を６２．６日まで増加させ、一方ＣＭＣ－５４４は、平均生存時間を８３．５日まで改善した。安定したモデルにおいては、ＣＭＣ－５４４およびリツキシマブ（リツキサン（登録商標））の効果の間に、有意差はなかった。

【０１４３】

【表８】

生存時間の記述的測定

実験	化合物	平均生存時間	中央生存時間	標準偏差	最低生存時間	最高生存時間	動物の数
開発中の実験	CMA-676	32.9	34.0	3.9	28.0	36.0	7
	CMC-544	41.0	38.0	10.1	32.0	60.0	7
	リツキシマブ	128.4	>130.0	4.7	119.0	>130.0	7
	ビヒクル	27.2	28.0	1.4	25.0	28.0	8
確立された実験	CMA-676	33.7	31.0	4.6	30.0	42.0	7
	CMC-544	83.5	76.5	41.6	34.0	>130.0	8
	リツキシマブ	62.6	37.0	46.2	31.0	>130.0	7
	ビヒクル	30.5	29.0	3.6	27.0	36.0	8

【０１４４】

予備研究は、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））は、ＣＭＣ－５４４の生存反応に、促進的または抑制的に、何らかの影響を与えるのかを決定するために行った。ＣＭＣ－５４４は、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））（２０ｍｇ／ｋｇ、高用量薬剤組み合わせ（ＨＤ）と名付けた）と共におよびリツキシマブを加えないで、投薬した。加えて、低用量のＣＭＣ－５４４（８０μｇ／ｋｇ）は、低用量のリツキシマブ（リツキサン（登録商標））と共に投薬した。研究におけるマウスの数が限られているために、組成物は８０μｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇの用量それぞれに個別で与えられなかった。この組み合わせ、ＣＭＣ－５４４（８０μｇ／ｋｇ）およびリツキシマブ（リツキサン（登録商標））（１０ｍｇ／ｋｇ）を、中用量薬剤組み合わせ（ＭＤ）と名付け、スキッドマウスの生存がより低用量の薬剤の組み合わせで可能であるかを決定するために用いた。ＣＭＣ－５４４（１６０μｇ／ｋｇ）およびリツキシマブ（リツキサン（登録商標））（２０ｍｇ／ｋｇ）は、単独で投与すると、安定したモデルにおいて報告されたとおりに作用した。それぞれの平均生存時間は、それぞれ５８．５および５０．５日まで延長した（図２５、表９）。組み合わせると、高用量薬剤組み合わせ（ＨＤ）については、平均生存時間は、わずかに（統計的に有意ではないけれども　ｐ＞０．０５）６４．４日まで改善した。８０μｇ／ｋｇのＣＭＣ－５４４および１０ｍｇ／ｋｇのリツキシマブ（リツキサン（登録商標））の中用量薬剤組み合わせでは、生存時間が有意に平均９２．４日まで改善した（媒質処理グループに対してｐ＜０．０５）。これらの結果は、より低用量のＣＭＣ－５４４およびリツキシマブ（リツキサン（登録商標））の組み合わせが正当化されたことを示唆した。

【０１４５】

【表９】

初期の組み合わせ実験についての生存時間の記述的測定

化合物	平均生存時間	中央生存時間	標準偏差	最低生存時間	最高生存時間	動物の数
CMC MD+Ritux MD	92.4	>100.0	16.0	62.0	>100.0	10
CMC HD+Ritux HD	64.4	58.5	26.7	29.0	>100.0	10
CMC-544	58.5	34.5	35.8	27.0	>100.0	10
Rituximab	50.5	41.0	26.4	30.0	>100.0	10
Vehicle	31.0	27.0	9.7	27.0	56.0	9

CMC MD＝CMC544中用量；80 μg/kg
CMC HD＝CMC-544高用量；160 μg/kg
Ritux MD＝リツキシマブ中用量；10 mg/kg
Ritux HD＝リツキシマブ高用量；20 mg/kg

【０１４６】

ＣＭＣ－５４４およびリツキシマブ（リツキサン（登録商標））についてのさらなる組み合わせの研究が行われた。次の治療グループを用いた：ＣＭＣ－５４４を４０、８０および１６０μｇ／ｋｇ；リツキシマブ（リツキサン（登録商標））を5、１０および２０ｍｇ／ｋｇ；およびＣＭＣ－５４４を４０μｇ／ｋｇに加えてリツキシマブ（リツキサン（登録商標））を５ｍｇ／ｋｇ、ＣＭＣ－５４４を８０μｇ／ｋｇに加えてリツキシマブ（リツキサン（登録商標））を１０ｍｇ／ｋｇ、およびＣＭＣ－５４４を１６０μｇ／ｋｇに加えてリツキシマブ（リツキサン（登録商標））を２０ｍｇ／ｋｇ。全てのリツキシマブ（リツキサン（登録商標））投与によって、平均生存時間がわずかに改善し、３３－４０日の範囲となった（媒質処理グループの平均生存時間２５．８日と比較して全ての用量でｐ＜０．０５、図２６、表１０）。１６０μｇ／ｋｇのＣＭＣ－５４４高用量投与は、先の二つの研究で報告された結果と一致して、平均生存時間を８５日まで改善した。ＣＭＣ－５４４をリツキシマブ（リツキサン（登録商標））と組み合わせても、生存時間は有意に改善しなかった（図２７、表１０）。二つの低用量ＣＭＣ－５４４（８０および４０μｇ／ｋｇ）は、それぞれ有意に平均生存時間を高用量ＣＭＣ－５４４よりも高く改善した（ｐ＜０．０５）。４０および８０μｇ／ｋｇの用量のＣＭＣ－５４４において、それぞれ９０％および８０％のマウスが、１２５日目で依然として生存していた。両方の薬剤の組み合わせのグループは、１００％のマウスを１２５日目まで生存させた。低用量ＣＭＣ－５４４は高用量１６０μｇ／ｋｇよりも有効である。

【０１４７】

リツキシマブ（リツキサン（登録商標））は、ＣＭＣ－５４４と組み合わせると、試験済み（上文参照）の用量でスキッドマウスの散在性Ｂ細胞モデルにおけるＣＭＣ－５４４活性に明らかな影響は示さない。ＣＭＣ－５４４をリツキシマブ（リツキサン（登録商標））と共に投与すると抗腫瘍活性を向上または抑制するかもまた、Ｂａｌｂ／ｃヌードマウスの皮下ＲＬＢリンパ腫異種移植片モデルを用いて評価した。皮下Ｂリンパ腫モデルにおいて、研究中の二つの治療薬を静脈注射で投与した後、腫瘍は平均腫瘍質量３００ｍｇの段階となった。ＣＭＣ－５４４は、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））（２０ｍｇ／ｋｇ　Ｑ４Ｄ×３）と共にまたはリツキシマブを加えないで、２０または８０μｇ／ｋｇＱ４Ｄ×３用いられた。リツキシマブ（リツキサン（登録商標））の共投与は、ＣＭＣ－５４４の治療効果を有意に（ｐ＞０．０５）向上も抑制もしない（図２８）。リツキシマブ（リツキサン（登録商標））は、単独で投与すると、低用量ＣＭＣ－５４４でみられるのと同様に、この研究中でＲＬＢリンパ腫の成長を抑制した（２０日目に腫瘍の成長を５７％抑制、媒質処理グループに対してｐ＜０．０５）。

【０１４８】
組み合わせ化学療法養生法ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）は、非ホジキンリンパ腫患者に対する最も一般に用いられている治療法である。ＣＨＯＰの抗腫瘍効果を、確立したＲＬＢリンパ腫異種移植片におけるＣＭＣ－５４４の抗腫瘍効果と比較した。ＣＨＯＰ療法の個々の組成物は、ヌードマウスで評価したそれぞれの最大許容投与量で用いられ、次の通りであった：シクロホスファミド（Ｃ）４０ｍｇ／ｋｇ静注；ドキソルビシン（Ｈ）３．３ｍｇ／ｋｇ静注；ビンクリスチン（Ｏ）０．５ｍｇ／ｋｇ静注；およびプレドニゾン０．２ｍｇ／ｋｇ経口投与。ＣＨＯは、Ｑ４Ｄ×３投与し、ＰはＱ２Ｄ×５経口投与した。ＣＭＣ－５４４はカリチェアミシン相当量１６０μｇ／ｋｇの投与量でＱ４Ｄ×３静注で投与した。ＣＨＯＰ治療は、最初はＲＬＢリンパ腫の成長の有意な抑制を引き起こした（図２９）。しかしながら、３週間後、腫瘍は媒質処理グループと同様の成長速度で再び増殖した。対照的に、ＣＭＣ－５４４の抗腫瘍効果は完全であり、実験時間の間持続した。これらの結果は、ＣＭＣ－５４４は、ヌードマウスにおける非致死量の最大より有意に低い用量で、ＣＨＯＰ組み合わせ療法より効果的であった。

【０１４９】
これらの研究は、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））をＣＭＣ－５４４に加えると、ＲａｍｏｓＢリンパ腫細胞でみられるＣＭＣ－５４４の細胞傷害性活性の有意な増加が起こった。Ｒａｍｏｓ細胞中でのリツキシマブ（リツキサン（登録商標））およびグルココルチコイドの相乗的相互作用もまた最近報告されている。加えて、八つの追加の細胞系のうち四つで相乗的成長抑制は、１０μＭのデキサメタゾンと組み合わせて与えられたリツキシマブ（リツキサン（登録商標））でみられた。

【０１５０】
リツキシマブ（リツキサン（登録商標））は、単独で０．４ないし１０μｇ／ｍｌで、有意ではあるがわずかな（最大１８％）Ｒａｍｏｓ細胞の成長抑制を引き起こすことが報告された。加えて、１０μｇ／ｍｌでインキュベートしたとき（４８時間インキュベート）、それは八つのＢ細胞非ホジキンリンパ腫細胞系のうち六つで活性があった。Ｇｈｅｔｉｅらは、Ｒａｍｏｓ細胞を用いて、２４時間インキュベート後、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））が６．２％アポトーシスを増加させる（媒質処理細胞の３．５％に対して）ことを示した。現在の研究では、単独で投与すると、２０および２００μｇ／ｍｌの用量でＲａｍｏｓ細胞の成長に何ら影響を与えなかった。マウスでは、散在モデルでもまたは皮下異種移植片モデルでも、ＣＭＣ－５４４およびリツキシマブ（リツキサン（登録商標））の間の何らかの相互作用の証拠はなかった。検査された薬剤の組み合わせは、互いの効果を抑制したりまたは向上させることはなかった。散在モデルにおいて各薬剤の投与量を減少させることでこの実験結果が変わるかどうかは、決定する必要がある。

【０１５１】
Ｒａｍｏｓ細胞を用いた散在性Ｂ細胞リンパ腫モデルは、Ｆｌａｖｅｌｌらによって記述されてきた。媒質処理マウスの生存時間の中央値は、３４－３６日と報告された。マウスは後肢麻痺になり、進行して瀕死になり、その後まもなく死亡した。臓器の組織学的分析によって、最も一般に関連している臓器は、副腎、脾臓およびくも膜下腔であることが明らかになった。くも膜下腔は浸潤し、しばしば脳まで拡大する。散在性のスキッドマウスにおいて病期の早い段階で投薬すれば、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））はよく機能するが（図２３）、そのモデルの９日目の安定期に投薬すると、リツキシマブは印象的な効果を示さなかった（図２４）。ＩｇＧ１アイソタイプである、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））はマウスの宿主エフェクター機構によって最も機能しやすい。この機構には、スキッドマウス中に存在するナチュラルキラー細胞の漸増による、補体媒介性細胞傷害、および／または抗体依存性細胞傷害を含む。注射したＲａｍｏｓ腫瘍細胞は、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））によって活性化される宿主の免疫機構に対して、おそらく腫瘍細胞が作用した臓器に浸潤する機会を得る前に、早期から敏感である。非結合Ｇ５／４４抗体（ＣＭＣ－５４４中の標的分子）は、スキッドマウスの散在性腫瘍

モデルでまだ検査されていなかったが、皮下異種移植片に対する投薬では効果がなかった。Ｇ５／４４は、ＩｇＧ４アイソタイプであるので、宿主エフェクター機構を活性化することは予期されないであろうし、それゆえに抗腫瘍活性も発揮しないであろう。

【０１５２】

カリチェアミシン結合Ｇ５／４４は、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））とは反対の様式で振る舞い、病気の安定期に投薬すると、よい結果が得られた。ＣＭＣ－５４４が安定期によく機能する理由は明らかではないが、安定期はより臨床的な状況を厳密に表している。ＣＭＡ－６７６は、アイソタイプ適合非結合対照群のコンジュゲートであり、平均生存時間に何らかの有意な影響を与えなかった。散在性スキッドマウスにおける結果は、ＣＭＣ－５４４の用量を減らして最大有効量（ＭＥＤ）を決定する必要があるということを明らかに示唆している。１６０μｇ／ｋｇの用量は、より低用量の８０および４０μｇ／ｋｇより有効でなかった。なぜそのようになるのかは明らかでないが、１６０μｇ／ｋｇの用量は十分ＭＥＤを越えていると言ってよい。この問題に取り組むためにさらなる研究が計画された。

【０１５３】

Ｍｏｈａｍｍａｄらは、瀰漫性大細胞型リンパ腫の細胞系ＤＬＣＬを持つ皮下異種移植片モデルにおいて、ＣＨＯＰ療法（シクロホスファミド（Ｃ）４０ｍｇ／ｋｇ静注；ドキソルビシン（Ｈ）３．３ｍｇ／ｋｇ静注；ビンクリスチン（Ｏ）０．５ｍｇ／ｋｇ静注；およびプレドニゾン０．２ｍｇ／ｋｇ経口投与）を用いた。ＣＨＯＰ療法について用いられる用量は、その最大許容量になるように決定した。治療法、静注および経口投与で一回投与するＣＨＯ、５日間毎日投与するＣＨＯは、「有効」と評価され、２５．８％のＴ／Ｃを生成した。腫瘍の治癒は記録されなかった。Ｍｏｈａｍｍａｄらにとって記述されるそのモデルの結果は、本明細書で記述したＲＬモデルにおけるＣＨＯＰ療法（静注で投与、Ｑ４Ｄ×３）でみられた結果に類似しているように思われる。ＣＭＣ－５４４と異なり、ＣＨＯＰはどの研究でも長期間の治癒がみられなかった。

【０１５４】

【表１０】

処理	平均生存時間	中央生存時間	標準偏差	最低生存時間	最高生存時間	動物の数
CMC-544 40μg/kg	118.90	125.00	19.29	64.00	125.00	10
CMC LD + Ritux LD	125.00	125.00	0.00	125.00	125.00	10
CMC-544 80μ/kg	118.22	125.00	17.86	71.00	125.00	9
CMC MD + Ritux MD	125.00	125.00	0.00	125.00	125.00	10
CMC-544 160 μg/kg	85.22	82.00	40.37	35.00	125.00	9
CMC HD + Ritux HD	91.30	100.00	36.31	44.00	125.00	10
リツキシマブ 5 mg/kg	40.70	36.50	9.57	34.00	64.00	10
リツキシマブ 10 mg/kg	33.80	34.00	3.26	29.00	41.00	10
リツキシマブ 20 mg/kg	40.50	34.00	15.45	31.00	82.00	10
ビヒクル	25.80	25.00	3.12	22.00	34.00	10

CMC LD＝CMC-544低用量；40μg/kg　Ritux LD＝リツキシマブ低用量；5 mg/kg
CMC MD＝CMC-544中用量；80μg/kg　Ritux MD＝リツキシマブ中用量；10 mg/kg
CMC HD＝CMC-544高用量；160μg/kg　Ritux HD＝リツキシマブ高用量；20 mg/kg

【０１５５】

実施例９

ＣＭＣ－５４４の安定な処方

ＣＭＣ－５４４の生体内投与のための安定な処方は、希釈剤、賦形剤、キャリアおよび安定剤によって調製した。ＨＩＣクロマトグラフィーに続いて、クロマトグラフィー断片をＳＥＣ－ＨＰＬＣおよび多波長ＵＶ分析によってアッセイする。凝集量、タンパク質濃度およびカリチェアミシン負荷量についての情報を提供する上記の分析を基にして、適切な断片をプールするために選択した。賦形剤、安定剤、体積増加薬剤および緩衝剤を、溶液を安定させるために加えた。ＣＭＣ－５４４はいくつかの分解経路を介して分解を受ける可能性があるので、処方の開発において物理的不安定性は考慮される必要がある。処方の開発において熟考すべき一つが抗体からのカリチェアミシンの加水分解速度を最小限にしなければならないが、一方抗ＣＤ２２抗体の物理的および化学的性質の完全性を維持しなければならないということである。加えて、カリチェアミシン抗体コンジュゲートの析出は、特定のｐＨおよび濃度条件下で起こり得るが、最小限にする必要がある。

【０１５６】

単量体カリチェアミシン誘導体－抗体コンジュゲートの処方を開発する上で、処方のｐＨは分解および物理的不安定性を最小にするので、決定的である。カリチェアミシンの加水分解を最小にし、コンジュゲートの適当な安定性を維持するために８．０のｐＨが選ばれた。ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび抗原結合ＥＬＩＳＡを用いて得られた追加のデータは、重要な構造の完全性および抗体の特異性が８．０のｐＨで維持されることを示している。結果として、トロメタミンがｐＨ８．０を維持するための緩衝剤として選ばれた。代替の緩衝剤には二塩基性の塩またはリン酸カリウムを含めることができた。緩衝剤の濃度の範囲は５ないし５０ｍＭであってよい。好ましいＰＨ範囲の７．５ないし８．５は、最適の安定性／可溶性として示唆された。最終生成物における現在のｐＨの明細は７．０－９．０である。

【０１５７】
緩衝剤処理したコンジュゲート溶液の安定性は短時間には適しているけれども、長期間の安定性は乏しい。冷結乾燥はコンジュゲートの棚の温度を改善するために用いられる。タンパク質溶液の冷結乾燥に関する問題はよく立証され、二次、三次および四次構造の損失が凍結および乾燥工程中に起こり得る。コンジュゲートの不定形の安定剤として作用し、凍結および乾燥中抗体の完全な構造を維持するために、スクロースを処方に含めた。加えてデキストラン４０またはヒドロキシエチル澱粉のようなポリマー充填剤は、重量で０．５－１．５％の濃度で冷結乾燥したケーキの外見および物理的剛性を高めるために組み込んでもよい。これらの原料は、相対的に低濃度で冷結乾燥したケーキを形成し、冷結乾燥した処方の全固体量を最小にしてより急速な冷結乾燥を可能にするために用いられ得る。処方研究は重量で０．９％のデキストラン４０濃度を用いた。

【０１５８】
ポリソルベート８０は、コンジュゲートの可溶性を高めるために処方に含める。好ましい０．０１％の濃度は、０．００５－０．０５％の可能範囲で用いられる。ツィーンもまた、重量で０．９１－０．０５％の濃度で処方に加える。
電解質もまた処方中に存在してよく、最後の精製工程の効率を向上させるために用いてもよい。塩化ナトリウムは典型的には０．０１Ｍないし０．１Ｍの濃度で用いられる。硫化ナトリウムのような追加の電解質は、容易に冷結乾燥されるため、塩化ナトリウムの代わりに用いてもよい。最適であるのは、最終的なＣＭＣ－５４４溶液は、１．５％スクロース（重量で）、０．９％デキストラン４０（重量で）、０．０１％ツィーン８０、５０ｍＭ塩化ナトリウム、０．０１％ポリソルベート８０（重量で）および２０ｍＭトロメタミンからなることである。

【０１５９】
冷結乾燥前の溶液の代表的な処方は以下で提示される：ＣＭＣ－５４４０．５ｍｇ／ｍｌ、スクロースを重量で１．５％、デキストラン４０を重量で０．９％、塩化ナトリウム０．０５Ｍ、ツィーンを重量で０．０１－０．０５％、ポリソルベート８０を重量で０．０１％、トロメタミン０．０２Ｍ、ｐＨ８．０および水。溶液をコハクの薬瓶に＋５℃ないし１０℃の温度で懸濁し（最適は＋５℃）；溶液を－３５℃ないし－５０℃の冷結温度で冷結し（最適は－４５℃）；冷結した溶液を２０ないし８０ミクロンの一次乾燥圧で最初の冷結乾燥工程にかけ（最適は６０ミクロン）；冷結乾燥した生成物を棚の温度－１０℃ないし－４０℃で（最適は－３０℃）２４ないし７２時間保存し（最適は６０時間）；最後に冷結乾燥した生成物を２０－８０ミクロンの乾燥圧で（最適は６０ミクロン）、棚の温度が＋１０℃ないし＋３５℃で（最適は＋２５℃）、１５ないし３０時間（最適は２４時間）二次乾燥工程にかける。圧力上昇試験は、一次乾燥の終結を決定するために用いられる。冷結乾燥周期が終結すると、薬瓶を窒素で埋め戻し、栓をした。

【０１６０】
表１１は、ＣＭＣ－５４４に用いられる処方およびＣＭＡ－６７６に用いられる処方の違いを示す。ＣＭＡ－６７６処方とＣＭＣ－５４４に用いられる処方の間の有意な違いには、新しい処方におけるタンパク質濃度の減少（０．５ｍｇ／ｍｌ）、緩衝剤としてのトロメタミンの利用および０．０１％ツィーン８０の存在を含む。これによって、復元したＣＭＡ－６７６処方にみられる濁りとは対照的に、新しい処方における復元したＣＭＣ－５４４は透明となる（表１２および１３を参照のこと）。

【０１６１】

【表１１】

ＣＭＣ－５４４についてのＣＭＡ－６７６処方とＣＭＣ－５４４処方の比較

	CMA-676処方	CMC-544処方
タンパク質濃度	1.0 mg/mL	0.5 mg/mL
処方	1.5%スクロース、0.9%デキストラン40、100 MM塩化ナトリウム、5 MMリン酸緩衝液	1.5%スクロース、0.9%デキストラン40、0.01%ツウィーン80、０.01%ポリソルベート80、50 mM塩化ナトリウム、20 mMトロメタミン

【０１６２】

【表１２】

５℃でのＣＭＣ－５４４についてのＣＭＡ－６７６処方とＣＭＣ－５４４処方の安定性および物理化学的観察

	CMA-676処方		CMC-544処方	
時間	初期	２週間	初期	２週間
物理的観察	若干の濁り	若干の濁り	透明	透明
PH	7.5	7.5	7.8	7.8
全タンパク質（mg/mL）	1.07	1.07	0.52	0.52
全カリチェアミシン(μｇ／タンパク質ｍｇ)	67	67	57	57
コンジュゲートしていないカリチェアミシン（μｇ／タンパク質ｍｇ）	1.21	2.82	0.97	1.13
凝集%	3.03	2.81	1.59	1.70

【０１６３】

【表１３】

凍結乾燥させて２５℃で貯蔵したＣＭＡ－６７６およびＣＭＣ－５４４処方の安定性および物理化学的観察

	CMA-676処方		CMC-544処方	
時間	初期	４週間	初期	４週間
復元されたコンジュゲートの物理的観察	若干の濁り	若干の濁り	透明	透明
PH	7.5	7.5	7.8	7.8
全タンパク質（mg/mL）	1.03	1.03	0.51	0.51
全カリチェアミシン(μｇ／タンパク質ｍｇ)	67	67	57	57
コンジュゲートしていないカリチェアミシン(μｇ／タンパク質ｍｇ)	1.13	1.03	1.03	0.94
凝集%	2.63	2.96	1.49	2.09

【０１６４】

上で引用した全ての参考文献および特許出願を本明細書の参考文献の項にて示す。本発明の非常に多くの修飾および変異は、上で同定した明細書に含まれており、当業者にとって自明であると考える。結合工程、その工程によって作られたコンジュゲート、およびコ

ンジュゲートを含む組成物／処方についてのそのような修飾および変化は、本請求書の範疇の中に包含されると考える。

【０１６５】

本発明の態様を下記に例示する。

［１］コンジュゲーションの低い画分（ＬＣＦ）の少ない、式：

Ｐｒ（－Ｘ－Ｗ）ｍ

［式中；

Ｐｒはタンパク質キャリアであり；

Ｘはタンパク質キャリアと反応できる何らかの反応基の生成物を含むリンカーであり；

Ｗは細胞傷害薬であり；

ｍは細胞傷害薬がコンジュゲートの７～９重量％を構成するように精製したコンジュゲーション生成物についての平均の負荷であり；

（－Ｘ－Ｗ）ｍは細胞傷害薬誘導体である］

で示される単量体細胞傷害薬／キャリアコンジュゲートの調製方法であって、

（１）細胞傷害薬誘導体がタンパク質キャリアの４．５～１１重量％となるように、細胞傷害薬誘導体をタンパク質キャリアに加え；

（２）細胞傷害薬誘導体およびタンパク質キャリアを、ｐＨが約７から９の範囲で非求核性でタンパク融和性の緩衝溶液中でインキュベートし、単量体細胞傷害薬－キャリアコンジュゲートを生成する；ここでその溶液はさらに（ａ）有機共溶媒および（ｂ）少なくとも一つのC_6－C_{18}カルボン酸またはその塩を含む添加剤を含み、このインキュベーションを約３０℃から３５℃までの範囲の温度で約１５分から２４時間までの範囲の期間行い；および

（３）工程（２）で生成したコンジュゲートをクロマトグラフィーによる分離法に付して、４～１０重量％の範囲の細胞傷害薬の負荷で、コンジュゲーションの低い画分（ＬＣＦ）が１０％未満である単量体細胞傷害薬誘導体／タンパク質キャリアコンジュゲートを、コンジュゲートしていないタンパク質キャリア、細胞傷害薬誘導体、および凝集したコンジュゲートから分離する工程を含む方法。

［２］　タンパク質キャリアがホルモン、成長因子、抗体、抗体の断片、抗体の模擬物、およびそれらを遺伝子操作または酵素的に処理した等価物からなる群から選ばれるところの上記［１］記載の方法。

［３］　タンパク質キャリアが抗体であるところの上記［１］記載の方法。

［４］　抗体がモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、一本鎖の抗体、Ｆａｂ断片およびＦ（ａｂ）２断片からなる群から選ばれるところの上記［３］記載の方法。

［５］　ヒト化抗体が細胞表面抗原ＣＤ２２に対するものであるところの上記［４］記載の方法。

［６］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体がＣＤＲ移植抗体であり、軽鎖の可変領域５／４４－ｇＬ１（配列番号：１９）および重鎖の可変領域５／４４－ｇＨ７（配列番号：２７）を含むところの上記［５］記載の方法。

［７］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体が配列番号：２８に示す配列を持った軽鎖を含むＣＤＲ移植抗体であるところの上記［５］記載の方法。

［８］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体が配列番号：３０に示す配列を持った重鎖を含むＣＤＲ移植抗体であるところの上記［５］記載の方法。

［９］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体が配列番号：２８に示す配列を持った軽鎖および配列番号：３０に示す配列を持った重鎖を含むＣＤＲ移植抗体であるところの上記［５］記載の方法。

［１０］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体が、親和性成熟プロトコールによって得られる変異した抗体であり、ヒトＣＤ２２に対する特異性を高めたＣＤＲ移植抗体であるところの上記［５］記載の方法。

［１１］　細胞傷害薬がチューブリン重合の阻害剤であるところの上記［１］記載の方法

。
［１２］　細胞傷害薬が、ＤＮＡに結合して分裂させるアルキル化剤であるところの上記［１］記載の方法。
［１３］　細胞傷害薬がタンパク質合成を阻害するところの上記［１］記載の方法。
［１４］　細胞傷害薬がチロシンキナーゼ阻害剤であるところの上記［１］記載の方法。
［１５］　細胞傷害薬が、カリチェアミシン、チオテパ、タキサン、ビンクリスチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エスペラミシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、タモキシフェン、イダルビシン、ドラスタチン／アウリスタチン、ヘミアスタリンおよびマイタンシノイドから選ばれるところ上記［１］記載の方法。
［１６］　細胞傷害薬がカリチェアミシンであるところの上記［１］記載の方法。
［１７］　カリチェアミシンがγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルγカリチェアミシンであるところの上記［１６］記載の方法。
［１８］　細胞傷害薬を３－メルカプト－３－メチルブタノイルヒドラジドを用いて機能化するところの上記［１］記載の方法。
［１９］　標的細胞と結合して細胞内に入った後にリンカーがコンジュゲートから細胞傷害薬を放出することのできる加水分解可能なリンカーであるところの上記［１］記載の方法。
［２０］　加水分解可能なリンカーが、４－（４－アセチルフェノキシ）酪酸（ＡｃＢｕｔ）であるところの上記［１９］記載の方法。
［２１］　工程（２）（ｂ）の添加剤がオクタン酸またはその塩であるところの上記［１］記載の方法。
［２２］　工程（２）（ｂ）の添加剤がデカン酸またはその塩であるところの上記［１］記載の方法。
［２３］　工程（３）のクロマトグラフィー分離法がサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）であるところの上記［１］記載の方法。
［２４］　工程（３）のクロマトグラフィー分離法がＨＰＬＣ、ＦＰＬＣまたはＳｅｐｈａｃｒｙｌＳ－２００クロマトグラフィーであるところの上記［１］記載の方法。
［２５］　工程（３）のクロマトグラフィー分離法が疎水的相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）であるところの上記［１］記載の方法。
［２６］　疎水的相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）が、フェニルセファロース６高流速クロマトグラフィー媒体、ブチルセファロース４高流速クロマトグラフィー媒体、オクチルセファロース４高流速クロマトグラフィー媒体、トヨパールエーテル－６５０Ｍクロマトグラフィー媒体、マクロプレップメチルＨＩＣ媒体またはマクロプレップｔ－ブチルＨＩＣ媒体を用いて行われるところの上記［２５］記載の方法。
［２７］　疎水的相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）が、ブチルセファロース４高流速クロマトグラフィー媒体を用いて行われるところの上記［２５］記載の方法。
［２８］　請求項１記載の方法によって生成される単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［２９］　細胞傷害薬がカリチェアミシンであるところの上記［２８］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［３０］　キャリアが抗体であるところの、上記［２８］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［３１］　抗体がモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、一本鎖の抗体、Ｆａｂ断片およびＦ（ａｂ）２断片からなる群から選ばれるところの上記［３０］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［３２］　ヒト化抗体が細胞表面抗原ＣＤ２２に対するものであるところの上記［３１］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［３３］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体がＣＤＲ移植抗体であり、軽鎖の可変領域５／４４－ｇＬ１（配列番号：１９）および重鎖の可変領域５／４４－ｇＨ７（配列番号：２７）を含

むところの上記［３２］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［３４］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体が配列番号：２８に示す配列を持った軽鎖を含むＣＤＲ移植抗体であるところの上記［３２］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［３５］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体が配列番号：３０に示す配列を持った重鎖を含むＣＤＲ移植抗体であるところの上記［３２］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［３６］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体が配列番号：２８に示す配列を持った軽鎖および配列番号：３０に示す配列を持った重鎖を含むＣＤＲ移植抗体であるところの上記［３２］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［３７］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体が、親和性成熟プロトコールによって得られる変異した抗体であり、ヒトＣＤ２２に対する特異性を高めたＣＤＲ移植抗体であるところの上記［３２］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［３８］　細胞傷害薬誘導体がカリチェアミシンであるところの上記［３２］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［３９］　カリチェアミシンがγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルγカリチェアミシンであるところの上記［３８］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［４０］　カリチェアミシン誘導体が３－メルカプト－３－メチルブタノイルヒドラジドを用いて機能化されているところの上記［３８］または［３９］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［４１］　標的細胞と結合してその細胞中に入った後にリンカーがコンジュゲートから細胞傷害薬を放出することのできる加水分解可能なリンカーであるところの上記［３８］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［４２］　加水分解可能なリンカーが４－（４－アセチルフェノキシ）酪酸（ＡｃＢｕｔ）であるところの上記［４１］記載の単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲート。
［４３］　式：
Ｐｒ（－Ｘ－Ｓ－Ｓ－Ｗ）ｍ
［式中：
Ｐｒは抗ＣＤ２２抗体であり；
Ｘは抗体と反応できるいずれかの反応基の生成物を含む加水分解可能なリンカーであり；
Ｗはカリチェアミシンラジカルであり；
ｍは、カリチェアミシンがコンジュゲートの４～１０重量％を構成するように精製したコンジュゲーション生成物についての平均の負荷であり；
および（－Ｘ－Ｓ－Ｓ－Ｗ）ｍはカリチェアミシンの誘導体である］
を有する単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［４４］　抗体がモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、一本鎖の抗体、Ｆａｂ断片およびＦ（ａｂ）２断片からなる群から選ばれるところの上記［４３］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［４５］　抗ＣＤ２２抗体が、ヒトＣＤ２２に対する特異性を持ち、且つＣＤＲ－Ｈ１については図１中でＨ１（配列番号：１）として、ＣＤＲ－Ｈ２については図１でＨ２（配列番号：２）またはＨ２’（配列番号：１３）またはＨ２''（配列番号：１５）またはＨ２'''（配列番号：１６）として、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については図１中でＨ３（配列番号：３）として与えられる配列のうち少なくとも一つ持つＣＤＲをその可変領域に含むような重鎖、およびＣＤＲ－Ｌ１については図１中でＬ１（配列番号：４）として、ＣＤＲ－Ｌ２については図１中でＬ２（配列番号：５）として、あるいはＣＤＲ－Ｌ３については図１中でＬ３（配列番号：６）として与えられる配列のうち少なくとも一つ持つＣＤＲをその可変領域に含むような軽鎖を含むところの上記［４４］記載の単量体カリチェア

ミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［４６］　抗体が、ＣＤＲ－Ｈ１については配列番号：１中で、ＣＤＲ－Ｈ２については配列番号：２または配列番号：１３または配列番号：１５または配列番号：１６中で、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については配列番号：３中で与えられる配列のうち少なくとも一つ持つＣＤＲをその可変領域に含む重鎖、およびＣＤＲ－Ｌ１については配列番号：４中で、ＣＤＲ－Ｌ２については配列番号：５中で、あるいはＣＤＲ－Ｌ３については配列番号：６中で与えられる配列のうち少なくとも一つ持つＣＤＲをその可変領域に含むような軽鎖を含むところの上記［４４］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［４７］　抗体分子が、ＣＤＲ－Ｈ１については配列番号：１、ＣＤＲ－Ｈ２については配列番号：２または配列番号：１３または配列番号：１５または配列番号：１６、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については配列番号：３、ＣＤＲ－Ｌ１については配列番号：４、ＣＤＲ－Ｌ２については配列番号：５、およびＣＤＲ－Ｌ３については配列番号：６を含むところの上記［４４］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［４８］　ヒト化抗体が、ＣＤＲ移植の抗ＣＤ２２抗体であるところの、上記［４４］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［４９］　抗体が、ヒトアクセプターアクセプターフレームワーク領域およびヒト以外のドナーのＣＤＲからなる可変部からなるところの、上記［４８］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［５０］　抗体の重鎖の可変部のヒトアクセプターアクセプターフレームワーク領域がヒトサブグループＩ共通配列を基にしており、１、２８、４８、７１および９３位にヒト以外のドナー残基を含むところの上記［４９］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［５１］　抗体がさらに６７位および６９位にヒト以外のドナー残基を含むところの上記［５０］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［５２］　ＣＤＲ移植抗体がヒトサブグループＩ共通配列を基にしているヒトアクセプターアクセプターフレームワーク領域を含み、さらに２、４、３７、３８、４５および６０位でヒト以外のドナー残基を含む軽鎖の可変部を含むところの上記［４８］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［５３］　ＣＤＲ移植抗体が、さらに３位にヒト以外のドナー残基を含むところの上記［５２］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［５４］　ＣＤＲ移植抗体が、軽鎖可変領域５／４４－ｇＬ１（配列番号：１９）および重鎖可変領域５／４４－ｇＨ７（配列番号：２７）を含むところの上記［４８］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［５５］　ＣＤＲ移植抗体が、配列番号：２８に示すような配列を持つ軽鎖を含むところの上記［４８］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［５６］　ＣＤＲ移植抗体が、配列番号：３０に示すような配列を持つ重鎖を含むところの上記［４８］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［５７］　ＣＤＲ移植抗体が、配列番号：２８に示すような配列を持つ軽鎖および、配列番号：３０に示すような配列を持つ重鎖を含むところの上記［４８］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［５８］　ＣＤＲ移植抗体が、親和性成熟プロトコールによって得られる変異した抗体であり、ヒトＣＤ２２に対して高い特異性を有するところの上記［４８］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［５９］　抗ＣＤ２２抗体が、それぞれ配列番号：７および配列番号：８に示すモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の可変部の配列を含むキメラ抗体であるところの上記［４４］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［６０］　抗ＣＤ２２抗体が、ドナーＣＤＲの欠けた部分が異なった配列で置換され、機能的ＣＤＲを形成するような切断されたドナーＣＤＲをもつハイブリッドＣＤＲを含むと

ころの上記［４４］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［６１］　カリチェアミシン誘導体が、γカリチェアミシンまたはＮ－アセチルγカリチェアミシン誘導体であるところの上記［４３］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［６２］　カリチェアミシン誘導体が、３－メルカプト－３－メチルブタノイルヒドラジドによって機能化されるところの上記［６１］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［６３］　加水分解可能なリンカーが、標的細胞と結合してその中に入った後にコンジュゲートからカリチェアミシン誘導体を放出することのできる二機能を有するリンカーであるところの上記［４３］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［６４］　二機能を有するリンカーが、４－（４－アセチルフェノキシ）酪酸（ＡｃＢｕｔ）であるところの上記［６３］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート。
［６５］　単量体細胞障害薬誘導体／キャリアコンジュゲートの安定して凍結乾燥した組成物の調製方法であって、
（ａ）単量体細胞傷害薬誘導体／キャリアコンジュゲートを、１．５重量％～５重量％の濃度の凍結防止剤、０．５重量％～１．５重量％の濃度のポリマー充填剤、０．０１Ｍ～０．１Ｍの濃度の電解質、０．００５重量％～０．０５重量％の濃度の溶解促進剤、溶液の最終ｐＨが７．８～８．２になるような５～５０ｍＭの濃度の緩衝液および水を含む溶液中に溶解して、０．５～２ｍｇ／ｍｌの最終濃度とし；
（ｂ）上の溶液を＋５℃～＋１０℃の温度でガラス瓶に分配し；
（ｃ）その溶液を－３５℃～－５０℃の凍結温度で凍結させ；
（ｄ）その凍結した溶液を、２０～８０ミクロンの一次乾燥圧で、棚の温度が－１０℃～－４０℃で、２４～７８時間最初の凍結乾燥工程に付し；
（ｅ）工程（ｄ）の凍結乾燥生成物を、２０～８０ミクロンの乾燥圧で、棚の温度が＋１０℃～＋３５℃で、１５～３０時間第二次凍結乾燥工程に付す
ことを含む、方法。
［６６］　細胞傷害薬誘導体がチューブリン重合の阻害剤であるところの上記［６５］記載の方法。
［６７］　細胞傷害薬誘導体がＤＮＡに結合して分裂させるアルキル化剤であるところの上記［６５］記載の方法。
［６８］　細胞傷害薬誘導体がタンパク質合成阻害剤であるところの上記［６５］記載の方法。
［６９］　細胞傷害薬誘導体がチロシンキナーゼ阻害剤であるところの上記［６５］記載の方法。
［７０］　細胞傷害薬誘導体がカリチェアミシン、チオテパ、タキサン、ビンクリスチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、タモキシフェン、イダルビシン、ドラスタチン／アウリスタチン、ヘミアスタリンおよびマイタンシノイドから選ばれるところの上記［６５］記載の方法。
［７１］　細胞傷害薬誘導体がカリチェアミシンであるところの上記［６５］記載の方法。
［７２］　細胞傷害薬誘導体がγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルカリチェアミシンであるところの上記［６５］記載の方法。
［７３］　さらに治療上有効濃度の生物活性試薬を含んでいてもよい上記［６５］記載の方法。
［７４］　生物活性試薬が細胞傷害薬であるところの上記［７３］記載の方法。
［７５］　生物活性試薬が成長因子であるところの上記［７３］記載の方法。

［７６］　生物活性試薬がホルモンであるところの上記［７３］記載の方法。
［７７］　凍結防止剤が、アルジトール、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、ポリエチレングリコール、アルドン酸、ウロン酸、アルダン酸、アルドース類、ケトース類、アミノ糖類、アルジトール類、イノシトール類、グリセルアルデヒド類、アラビノース、リキソース、ペントース、リボース、キシロース、ガラクトース、グルコース、ヘキソース、イドース、マンノース、タロース、ヘプトース、グルコース、フルクトース、グルコン酸、ソルビトール、ラクトース、マンニトール、メチルα－グルコピラノシド、マルトース、イソアスコルビン酸、アスコルビン酸、ラクトン、ソルボース、グルカル酸、エリトロース、トレオース、アラビノース、アロース、アルトロース、グロース、イドース、タロース、エリトルロース、リブロース、キシルロース、プシコース、タガトース、グルクロン酸、グルコン酸、グルカル酸、ガラクツロン酸、マンヌロン酸、グルコサミン、ガラクトサミン、スクロース、トレハロース、ノイラミン酸、アラビナン類、フルクタン類、フカン類、ガラクタン類、ガラクツロナン類、グルカン類、マンナン類、キシラン類、レバン、フコイダン、カラゲーニン、ガラクトカロロース、ペクチン類、ペクチン酸、アミロース、プルラン、グリコーゲン、アミロペクチン、セルロース、デキストラン、プスツラン、キチン、アガロース、ケラチン、コンドロイチン、デルマタン、ヒアルロン酸、アルギン酸、キサンガム、澱粉、スクロース、グルコース、ラクトース、トレハロース、エチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、グリセロールおよびペンタエリトリトールからなる群から選ばれるところの上記［７３］記載の方法。
［７８］　凍結防止剤がスクロースであるところの上記［６５］記載の方法。
［７９］　スクロースが１．５重量％の濃度で存在するところの上記［７８］記載の方法。
［８０］　ポリマー充填剤がデキストラン４０であり、０．９重量％の濃度であるところの上記［６５］記載の方法。
［８１］　ポリマー充填剤がヒドロキシエチル澱粉４０であり、０．９重量％の濃度であるところの上記［６５］記載の方法。
［８２］　電解質が塩化ナトリウムであり、０．０５Ｍの濃度で存在しているところの上記［６５］記載の方法。
［８３］　溶解促進剤が界面活性剤であるところの上記［６５］記載の方法。
［８４］　界面活性剤がポリソルベート８０であり、０．０１重量％の濃度で存在しているところの上記［８３］記載の方法。
［８５］　緩衝剤がトロメタミンであり、０．０２Ｍの濃度で存在しているところの上記［６５］記載の方法。
［８６］　工程（ａ）の溶液のｐＨが８．０であるところの上記［６５］記載の方法。
［８７］　工程（ｂ）の溶液を＋５℃の温度でガラス瓶に分配するところの上記［６５］記載の方法。
［８８］　工程（ｃ）においてガラス瓶中の溶液の冷凍を冷凍温度－４５℃で行うところの上記［６５］記載の方法。
［８９］　工程（ｄ）において、冷凍した溶液を６０ミクロンの一次乾燥圧で、棚の温度が－３０℃で、６０時間最初の凍結乾燥工程に付すところの上記［６５］記載の方法。
［９０］　工程（ｅ）において、工程（ｄ）の凍結乾燥生成物を、６０ミクロンの乾燥圧で、棚の温度が＋２５℃で、２４時間第二次凍結乾燥工程に付すところの上記［６５］記載の方法。
［９１］　上記［６５］記載の方法によって調製された治療上有効量の単量体細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲートを含む組成物。
［９２］　単量体細胞傷害薬誘導体－キャリアコンジュゲート中のキャリアが、タンパク質のキャリアであるところの上記［９１］記載の組成物。
［９３］　タンパク質のキャリアが、ホルモン、成長因子、抗体および抗体の模擬物からなる群から選ばれるところの上記［９２］記載の組成物。

［９４］　抗体がヒトモノクローナル抗体であるところの上記［９３］記載の組成物。
［９５］　抗体がキメラ抗体であるところの上記［９３］記載の組成物。
［９６］　抗体がヒト抗体であるところの上記［９３］記載の組成物。
［９７］　抗体がヒト化抗体であるところの上記［９３］記載の組成物。
［９８］　ヒト化抗体が細胞表面抗原ＣＤ２２に対するものであるところの上記［９７］記載の組成物。
［９９］　抗ＣＤ２２抗体がヒトＣＤ２２に対する特異性を持ち、且つＣＤＲ－Ｈ１については図１中でＨ１（配列番号：１）として、ＣＤＲ－Ｈ２については図１でＨ２（配列番号：２）またはＨ２’（配列番号：１３）またはＨ２''（配列番号：１５）またはＨ２'''（配列番号：１６）として、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については図１中でＨ３（配列番号：３）として与えられる配列のうち少なくとも一つを持つＣＤＲをその可変部に含むような重鎖ならびにＣＤＲ－Ｌ１については図１中でＬ１（配列番号：４）として、ＣＤＲ－Ｌ２については図１中でＬ２（配列番号：５）として、あるいはＣＤＲ－Ｌ３については図１中でＬ３（配列番号：６）として与えられる配列のうち少なくとも一つを持つＣＤＲをその可変部に含むような軽鎖を含むところの上記［９８］記載の組成物。
［１００］　抗体がＣＤＲ－Ｈ１については配列番号：１中で、ＣＤＲ－Ｈ２については配列番号：２または配列番号：１３または配列番号：１５または配列番号：１６中で、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については配列番号：３中で与えられる配列のうち少なくとも一つを持つＣＤＲをその可変部に含むような重鎖およびＣＤＲ－Ｌ１については配列番号：４中で、ＣＤＲ－Ｌ２については配列番号：５中で、あるいはＣＤＲ－Ｌ３については配列番号：６中で与えられる配列のうち少なくとも一つを持つＣＤＲをその可変部に含むような軽鎖を持つところの上記［９８］記載の組成物。
［１０１］　抗体が、ＣＤＲ－Ｈ１については配列番号：１、ＣＤＲ－Ｈ２については配列番号：２または配列番号：１３または配列番号：１５または配列番号：１６、あるいはＣＤＲ－Ｈ３については配列番号：３、ＣＤＲ－Ｌ１については配列番号：４、ＣＤＲ－Ｌ２については配列番号：５、およびＣＤＲ－Ｌ３については配列番号：６を含むところの上記［９８］記載の組成物。
［１０２］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体がＣＤＲ移植ヒト化抗ＣＤ２２抗体であり、軽鎖可変領域５／４４－ｇＬ１（配列番号：１９）および重鎖可変領域５／４４－ｇＨ７（配列番号：２７）を含むところの上記［９８］記載の組成物。
［１０３］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体がヒトＣＤ２２に対する特異性を持ったＣＤＲ移植抗体であり、配列番号：２８に示される配列を持つ軽鎖を含むところの上記［９８］記載の組成物。
［１０４］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体がヒトＣＤ２２に対する特異性を持ったＣＤＲ移植抗体であり、配列番号：３０に示される配列を持つ重鎖を含むところの上記［９８］記載の組成物。
［１０５］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体がヒトＣＤ２２に対する特異性を持ったＣＤＲ移植抗体であり、配列番号：２８に示される配列を持つ軽鎖および、配列番号：３０に示される配列を持つ重鎖を含むところの上記［９８］記載の組成物。
［１０６］　ヒト化抗ＣＤ２２抗体がヒトＣＤ２２に対して高い特異性を有する変異抗体であり、その変異抗体が親和性成熟プロトコールによって得られるところの上記［９８］記載の組成物。
［１０７］　細胞傷害薬がカリチェアミシンであるところの上記［９１］記載の組成物。
［１０８］　カリチェアミシンがγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルカリチェアミシンであるところの上記［１０７］記載の組成物。
［１０９］　さらに生物活性試薬を含んでいてもよいところの上記［９１］記載の組成物。
［１１０］　生物活性試薬が細胞傷害薬であるところの上記［１０９］記載の組成物。
［１１１］　生物活性試薬が成長因子であるところの上記［１０９］記載の組成物。
［１１２］　生物活性試薬がホルモンであるところの上記［１０９］記載の組成物。

［１１３］　増殖性障害の対象を治療する方法であり、治療上有効量の上記［９１］記載の組成物を投与することを含む方法。
［１１４］　治療上有効量の組成物を皮下、腹膜内、静脈内、動脈内、脊髄内、鞘内、経皮的、皮膚を介して、鼻腔内、局所的、経腸、経膣的、舌下、または経直腸で投与するところの上記［１１３］記載の方法。
［１１５］　治療上有効量の組成物を静脈内投与するところの上記［１１３］記載の方法。
［１１６］　対象がヒトであり、増殖性障害が癌であるところの上記［１１３］記載の方法。
［１１７］　癌がＢ細胞悪性腫瘍であるところの上記［１１６］記載の方法。
［１１８］　Ｂ細胞悪性腫瘍が白血病であるところの上記［１１７］記載の方法。
［１１９］　白血病が細胞表面抗原ＣＤ２２を発現するところの上記［１１８］記載の方法。
［１２０］　Ｂ細胞悪性腫瘍がリンパ腫であるところの上記［１１７］記載の方法。
［１２１］　リンパ腫が細胞表面抗原ＣＤ２２を発現するところの上記［１２０］記載の方法。
［１２２］　癌が癌腫であるところの上記［１１６］記載の方法。
［１２３］　癌が肉腫であるところの上記［１１６］記載の方法。
［１２４］　Ｂ細胞悪性腫瘍の治療法であり、治療上有効な細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを含む組成物を、当該治療を必要とする患者に投薬することを含む方法。
［１２５］　Ｂ細胞悪性腫瘍がリンパ腫であるところの上記［１２４］記載の方法。
［１２６］　Ｂ細胞悪性腫瘍が非ホジキンリンパ腫であるところの上記［１２５］記載の方法。
［１２７］　一つまたはそれ以上の生物活性試薬と共に、治療上有効な細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを投薬することを含むところの上記［１２４］記載の方法。
［１２８］　細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート中の細胞傷害薬がカリチェアミシン、チオテパ、タキサン類、ビンクリスチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、タモキシフェン、イダルビシン、ドラスタチン／アウリスタチン、ヘミアスタリン、マイタンシノイドおよびエスペラミシンからなる群より選ばれるところの上記［１２４］記載の方法。
［１２９］　細胞傷害薬がカリチェアミシンであるところの上記［１２４］記載の方法。
［１３０］　カリチェアミシンがγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルカリチェアミシンであるところの上記［１２６］記載の方法。
［１３１］　一つまたはそれ以上の生物活性試薬が、抗体、成長因子、ホルモン、サイトカイン、抗ホルモン、キサンチン、インターロイキン、インターフェロンおよび細胞傷害薬からなる群から選ばれるところの上記［１２７］記載の方法。
［１３２］　生物活性試薬が抗体であるところの上記［１３１］記載の方法。
［１３３］　抗体がＢ細胞悪性腫瘍上に発現する細胞表面抗原に対するものであるところの上記［１３２］記載の方法。
［１３４］　Ｂ細胞悪性腫瘍上に発現する細胞表面抗原に対する抗体は、抗ＣＤ１９、抗ＣＤ２０、および抗ＣＤ３３抗体からなる群から選ばれるところの上記［１３３］記載の方法。
［１３５］　抗ＣＤ２０抗体がリツキシマブであるところの上記［１３４］記載の方法。
［１３６］　サイトカインまたは成長因子が、インターロイキン２（ＩＬ－２）、ＴＮＦ、ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦおよびＧ－ＣＳＦからなる群から選ばれるところの上記［１３１］記載の方法。
［１３７］　ホルモンがステロイドホルモンであり、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲスチンおよびコルチコステロイドから選ばれるところの上記［１３１］記載の方法。
［１３８］　細胞傷害薬が、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、アクラル

ビシン、ゾルビシン、ミトザントロン、エピルビシン、カルビシン、ノガラマイシン、メノガリル、ピタルビシン、バルビシン、シタラビン、ゲムシタビン、トリフルリジン、アンシタビン、エノシタビン、アザシチジン、ドキシフルリジン、ペントスタチン、ブロクスリジン、カペシタビン、クラドリビン、デシタビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゴウゲロチン、ピューロマイシン、テガフール、チアゾフリン、アドリアマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダカーバジン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ミトザントロン、ブレオマイシン、メクロレタミン、ブレドニゾン、プロカルバジン、メトトレキサート、フルオロウラシル、エトポシド、タクソール、タクソール類似物およびマイトマイシンからなる群から選ばれるところの上記［１３１］記載の方法。

［１３９］　細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物を、治療養生法の一部として一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬と組み合わせて共に投与する方法であり、細胞傷害性試薬の組み合わせが：

Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）

Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）

Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）

Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）

Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）

Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）

Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）

Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）

Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）

Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）

Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）
Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）
Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）
Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１３１］記載の方法。
［１４０］　細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物を、治療養生法の一部として一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬を組み合わせて投与するのに先立って投与する方法であり、細胞傷害性試薬の組み合わせが：
Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）
Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）
Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）
Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）
Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）
Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）

Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）
Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）
Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）
Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１３１］記載の方法。
［１４１］　細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物を、治療養生法の一部として一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬を組み合わせて投与した後に投与する方法であり、生物活性試薬の組み合わせが：
Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）
Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）
Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）
Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）
Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）

Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）
Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）
Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）
Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１３１］記載の方法。
［１４２］　細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物をＢ細胞悪性腫瘍の細胞表面抗原に対する抗体と共に投与する方法であり、治療養生法の一部として、一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬の組み合わせを含んでいてもよく、その細胞傷害性試薬の組み合わせが：
Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）
Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）
Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）
Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）
Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）
Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）
Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）、ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）
Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）
Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１３１］記載の方法。

［１４３］　治療の必要のある患者に対して、治療上有効な単量体カリチェアミシン誘導体－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの組成物を、一つまたはそれ以上の生物活性試薬と共に投与することを含むところの浸潤性のリンパ腫の治療法。

［１４４］　単量体カリチェアミシン誘導体－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートがＣＭＣ－５４４であるところの上記［１４３］記載の方法。

［１４５］　増殖性疾患の対象の治療に際して、治療上有効量の組成物を投薬することを含む、上記［９１］記載の組成物の使用。

［１４６］　治療上有効量の組成物を、皮下、腹膜内、静脈内、動脈内、脊髄内、鞘内、経皮的、皮膚を介して、鼻腔内、局所的、経腸、経膣的、舌下、または経直腸で投与するところの上記［１４５］記載の使用。

［１４７］　治療上有効量の本発明の医薬組成物を静脈内に投与するところの上記［１４５］記載の使用。

［１４８］　対象がヒトであり、増殖性疾患が癌であるところの上記［１４５］記載の使用。

［１４９］　癌がＢ細胞悪性腫瘍であるところの上記［１４８］記載の使用。

［１５０］　Ｂ細胞悪性腫瘍が白血病であるところの上記［１４９］記載の使用。

［１５１］　白血病が細胞表面抗原ＣＤ２２を発現するところの上記［１５０］記載の使用。

［１５２］　Ｂ細胞悪性腫瘍がリンパ腫であるところの上記［１４９］記載の使用。

［１５３］　リンパ腫が細胞表面抗原ＣＤ２２を発現するところの上記［１５２］記載の使用。

［１５４］　癌が癌腫であるところの上記［１４８］記載の使用。
［１５５］　癌が肉腫であるところの上記［１４８］記載の使用。
［１５６］　治療上有効量の細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを含む組成物を治療を必要とする患者に対して投薬することを含む、Ｂ細胞悪性腫瘍を治療するための細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを含む組成物の使用。
［１５７］　Ｂ細胞悪性腫瘍がリンパ腫であるところの上記［１５６］記載の使用。
［１５８］　Ｂ細胞悪性腫瘍が非ホジキンリンパ腫であるところの上記［１５７］記載の使用。
［１５９］　細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物を、一つまたはそれ以上の生物活性試薬と共に投薬することからなる、上記［１５６］記載の使用。
［１６０］　細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲート中の細胞傷害薬が、カリチェアミシン、チオテパ、タキサン類、ビンクリスチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、タモキシフェン、イダルビシン、ドラスタチン／アウリスタチン、ヘミアスタリン、マイタンシノイド、およびエスペラミシンからなる群より選ばれるところの上記［１５６］記載の使用。
［１６１］　細胞傷害薬がカリチェアミシンであるところの上記［１５６］記載の使用。
［１６２］　カリチェアミシンがγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルカリチェアミシンであるところの上記［１６１］記載の使用。
［１６３］　生物活性試薬が、抗体、成長因子、ホルモン、サイトカイン、抗ホルモン、キサンチン、インターロイキン、インターフェロンおよび細胞傷害薬からなる群より選ばれるところの上記［１５９］記載の使用。
［１６４］　生物活性試薬が抗体であるところの上記［１６３］記載の使用。
［１６５］　抗体がＢ細胞悪性腫瘍で発現する細胞表面抗原に対するものであるところの上記［１６４］記載の使用。
［１６６］　Ｂ細胞悪性腫瘍で発現する細胞表面抗原に対するものであるような抗体が、抗ＣＤ１９、抗ＣＤ２０および抗ＣＤ３３抗体からなる群から選ばれるところの上記［１６５］記載の使用。
［１６７］　抗ＣＤ２０抗体がリツキシマブであるところの上記［１６６］記載の使用。
［１６８］　サイトカインまたは成長因子が、インターロイキン２（ＩＬ－２）、ＴＮＦ、ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦおよびＧ－ＣＳＦからなる群から選ばれるところの上記［１６３］記載の使用。
［１６９］　ホルモンがステロイドホルモンであり、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲスチンまたはコルチコステロイドから選ばれるところの上記［１６３］記載の使用。
［１７０］　細胞傷害薬が、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、アクラルビシン、ゾルビシン、ミトザントロン、エピルビシン、カルビシン、ノガラマイシン、メノガリル、ピタルビシン、バルビシン、シタラビン、ゲムシタビン、トリフルリジン、アンシタビン、エノシタビン、アザシチジン、ドキシフルリジン、ペントスタチン、ブロクスリジン、カペシタビン、クラドリビン、デシタビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゴウゲロチン、ピューロマイシン、テガフール、チアゾフリン、アドリアマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダカーバジン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ミトザントロン、ブレオマイシン、メクロレタミン、ブレドニゾン、プロカルバジン、メトトレキサート、フルオロウラシル、エトポシド、タクソール、タクソール類似物およびマイトマイシンからなる群から選ばれるところの上記［１６３］記載の使用。
［１７１］　細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物を、治療養生法の一部として一つまたはそれ以上の細胞傷害薬と組み合わせて共に投与する使用であり、細胞傷害薬の組み合わせが：
Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾ

ンおよびプロカルバジン）
Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）
Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）
Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）
Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）
Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）
Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）
Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）
Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）
Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１６３］記載の使用。

［１７２］　細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物を、治療養生法の一部として一つまたはそれ以上の細胞傷害薬を組み合わせて投与するのに先立って、投与する使用であり、細胞傷害薬の組み合わせが：

Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）

Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）

Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）

Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）

Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）

Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）

Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）

Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）

Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）

Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）

Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）

Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）

Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）

Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）

Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）

Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニ

ゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１６３］記載の使用。
［１７３］　細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物を、治療養生法の一部として一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬を組み合わせて投与した後に投与する使用であり、生物活性試薬の組み合わせが：
Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）
Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）
Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）
Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）
Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）
Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）
Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）

Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）
Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１６３］記載の使用。
［１７４］　細胞傷害薬－抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの治療上有効な組成物をＢ細胞悪性腫瘍の細胞表面抗原に対する抗体と共に投与する方法であり、治療養生法の一部として、一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬の組み合わせを含んでいてもよく、その細胞傷害性試薬の組み合わせが：
Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）
Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）
Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）
Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）
Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）
Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）

Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）、ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）
Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）
Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１６３］記載の使用。
［１７５］　治療上有効量のコンジュゲートを、治療を必要とする患者に対して投薬することを含む、Ｂ細胞悪性腫瘍の対象の治療における、上記［４３］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの使用。
［１７６］　対象がＢ細胞悪性腫瘍に罹患しているところの上記［１７５］記載の使用。
［１７７］　Ｂ細胞悪性腫瘍がリンパ腫であるところの上記［１７６］記載の使用。
［１７８］　Ｂ細胞悪性腫瘍が非ホジキンリンパ腫であるところの上記［１７７］記載の使用。
［１７９］　コンジュゲートを一つまたはそれ以上の生物活性試薬と一緒に投薬するところの上記［１７５］記載の使用。
［１８０］　カリチェアミシン誘導体がγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルカリチェアミシン誘導体であるところの上記［１７５］記載の使用。
［１８１］　生物活性試薬が、抗体、成長因子、ホルモン、サイトカイン、抗ホルモン、キサンチン、インターロイキン、インターフェロンおよび細胞傷害薬からなる群より選ばれるところの上記［１７９］記載の使用。
［１８２］　生物活性試薬が抗体であるところの上記［１８１］記載の使用。
［１８３］　抗体がＢ細胞悪性腫瘍で発現する細胞表面抗原に対するものであるところの上記［１８２］記載の使用。
［１８４］　Ｂ細胞悪性腫瘍で発現する細胞表面抗原に対するものであるような抗体が、抗ＣＤ１９、抗ＣＤ２０および抗ＣＤ３３抗体からなる群から選ばれるところの上記［１８３］記載の使用。
［１８５］　抗ＣＤ２０抗体がリツキシマブであるところの上記［１８４］記載の使用。
［１８６］　サイトカインまたは成長因子が、インターロイキン２（ＩＬ－２）、ＴＮＦ、ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦおよびＧ－ＣＳＦからなる群から選ばれるところの上記［１８１］記載の使用。
［１８７］　ホルモンがステロイドホルモンであり、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲスチン、またはコルチコステロイドから選ばれるところの上記［１８１］記載の使用。
［１８８］　細胞傷害薬が、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、アクラルビシン、ゾルビシン、ミトザントロン、エピルビシン、カルビシン、ノガラマイシン、メノガリル、ピタルビシン、バルビシン、シタラビン、ゲムシタビン、トリフルリジン、アンシタビン、エノシタビン、アザシチジン、ドキシフルリジン、ペントスタチン、ブロクスリジン、カペシタビン、クラドリビン、デシタビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゴウゲロチン、ピューロマイシン、テガフール、チアゾフリン、アドリアマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダカーバジン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ミトザントロン、ブレオマイシン、メクロレタミン、ブレドニゾン、プロカルバジン、メトトレキサート、フルオロウラシル、エトポシド、タクソール、タクソー

ル類似物およびマイトマイシンからなる群から選ばれるところの上記［１８１］記載の使用。

［１８９］　治療上有効量の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを、治療養生法の一部として一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬の組み合わせと共に投与する使用であり、細胞傷害性試薬の組み合わせが：

Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）

Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）

Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）

Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）

Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）

Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）

Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）

Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）

Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）

Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）

Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）

Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）

Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）

Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）

Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾ

ンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１８１］記載の使用。
［１９０］　治療上有効量の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを、治療養生法の一部として一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬を組み合わせて投与するのに先立って、投与する使用であり、細胞傷害性試薬の組み合わせが：
Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）
Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）
Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）
Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）
Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）
Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）
Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）

Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）
Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）
Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１８１］記載の使用。
［１９１］　治療上有効量の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートを、治療養生法の一部として一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬を組み合わせて投与した後に投与する使用であり、生物活性試薬の組み合わせが：
Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）
Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）
Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）
Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）
Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）
Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）

Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）
Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）
Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）
Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１８１］記載の使用。
［１９２］　治療上有効量の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートをＢ細胞悪性腫瘍の細胞表面抗原に対する抗体と共に投与する方法であり、治療養生法の一部として、一つまたはそれ以上の細胞傷害性試薬の組み合わせを含んでいてもよく、その細胞傷害性試薬の組み合わせが：
Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）
Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）
Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）
Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）
Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）
Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）
Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）
Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）
Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）

Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）
Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）
Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）、ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）
Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）
Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）
Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれるところの上記［１８１］記載の使用。

［１９３］　増殖性疾患の治療に対する医薬の製造における、上記［４３］記載の単量体カリチェアミシン誘導体／抗ＣＤ２２抗体コンジュゲートの使用。

［１９４］　カリチェアミシンがγカリチェアミシンまたはＮ－アセチルカリチェアミシンであるところの上記［１９３］記載の使用。

［１９５］　増殖性疾患がＢ細胞悪性腫瘍であるところの上記［１９３］記載の使用。

［１９６］　Ｂ細胞悪性腫瘍が非ホジキンリンパ腫であるところの上記［１９５］記載の使用。

［１９７］　医薬が一つまたはそれ以上の生物活性試薬を含んでいてもよいところの上記［１９３］記載の使用。

［１９８］　生物活性試薬が、抗体、成長因子、ホルモン、サイトカイン、抗ホルモン、キサンチン、インターロイキン、インターフェロンおよび細胞傷害薬からなる群より選ばれるところの上記［１９７］記載の使用。

［１９９］　生物活性試薬が抗体であるところの上記［１９８］記載の使用。

［２００］　抗体がＢ細胞悪性腫瘍で発現する細胞表面抗原に対するものであるところの上記［１９９］記載の使用。

［２０１］　Ｂ細胞悪性腫瘍で発現する細胞表面抗原に対するものである抗体が、抗ＣＤ１９、抗ＣＤ２０および抗ＣＤ３３抗体からなる群から選ばれるところの上記［２００］記載の使用。

［２０２］　抗ＣＤ２０抗体がリツキシマブであるところの上記［２０１］記載の使用。

［２０３］　サイトカインまたは成長因子が、インターロイキン２（ＩＬ－２）、ＴＮＦ、ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦおよびＧ－ＣＳＦからなる群から選ばれるところの上記［１９８］記載の使用。

［２０４］　ホルモンがステロイドホルモンであり、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲスチンまたはコルチコステロイドから選ばれるところの上記［１９８］記載の使用。

［２０５］　細胞傷害薬が、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、アクラルビシン、ゾルビシン、ミトザントロン、エピルビシン、カルビシン、ノガラマイシン、メノガリル、ピタルビシン、バルビシン、シタラビン、ゲムシタビン、トリフルリジン、アンシタビン、エノシタビン、アザシチジン、ドキシフルリジン、ペントスタチン、ブロクスリジン、カペシタビン、クラドリビン、デシタビン、フロクスウリジン、フルダラビン

、ゴウゲロチン、ピューロマイシン、テガフール、チアゾフリン、アドリアマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダカーバジン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ミトザントロン、ブレオマイシン、メクロレタミン、ブレドニゾン、プロカルバジン、メトトレキサート、フルオロウラシル、エトポシド、タクソール、タクソール類似物およびマイトマイシンからなる群から選ばれるところの上記［１９８］記載の使用。

［２０６］　細胞傷害薬が、

Ａ．ＣＨＯＰＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｂ．ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｃ．ＣＯＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｄ．ＣＡＰ－ＢＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）

Ｅ．ｍ－ＢＡＣＯＤ（メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン）

Ｆ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｇ．ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリン、シタラビン、ブレオマシンおよびビンクリスチン）

Ｈ．ＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブレオマイシンおよびロイコボリン）

Ｉ．ＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｊ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）

Ｋ．ＡＢＶ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシンおよびとビンブラスチン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｌ．ＡＢＶＤ（アドリアマイシン／ドキソルビシン、ブレオマイシン、ビンブラスチンおよびダカーバジン）と交互に用いるＭＯＰＰ（メクロレタミン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびプロカルバジン）

Ｍ．ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブチル、ビンブラスチン、プロカルバジンおよびプレドニゾン）

Ｎ．ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）

Ｏ．ＭＩＭＥ（メチルグリコサミノグリカン、イホスファミド、メトトレキサートおよびエトポシド）

Ｐ．ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）

Ｑ．ＥＳＨＡＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビンおよびシスプラチン）

Ｒ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）

Ｓ．ＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトザントロン、シタラビンおよびプレドニゾン）

Ｔ．ＣＶＰ－１（シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾン）、ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）

Ｕ．ＥＳＨＯＰ（エトポシド、メチルプレジソロン、高用量シタラビン、ビンクリスチンおよびシスプラチン）

Ｖ．ＥＰＯＣＨ（丸薬用量のシクロホスファミドおよび経口プレドニゾンと一緒に９６時間に及ぶエトポシド、ビンクリスチンおよびドキソルビシン）
Ｗ．ＩＣＥ（イホスファミド、シクロホスファミドおよびエトポシド）
Ｘ．ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）
Ｙ．ＣＨＯＰ－Ｂ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびブレオマイシン）および
Ｚ．Ｐ／ＤＯＣＥ（エピルビシンまたはドキソルビシン、ビンクリスチン、シクロホスファミドおよびプレドニゾン）
から選ばれる組み合わせであるところの上記［１９８］記載の使用。

【０１６６】

参考文献一覧

１．G. Kohler and Milstein, C., Nature, 256:495 (1975).
２．T. G. Hose and Blair, A.H. CRC Critical Rev. Drug Carrier Systems 3:263 (1987).
３．U.S. Patent No. 5,877,296
４．U.S. Patent No. 5,773,001
５．U.S. Patent No. 5,714,586
６．U.S. Patent No. 5,712,374
７．U.S. Patent. No. 5,053,394
８．J. Tramontano; et al., J. Mol. Recognit. 7:9 (1994).
９．H. McConnell and Hoess, J., J. Mol. Biol. 250:460 (1995).
１０．Nord et al., Nat Biotechnol. 15:772 (1997).
１１．Nord et al., Protein Eng. 8:601 (1995).
１２．Ku and Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 92:6552 (1995).
１３．Markand et al., Biochemistry 35:8045 (1996).
１４．Markand et al., Biochemistry 35:8098 (1996).
１５．Rottgen and Collins, Gene 164:243 (1995).
１６．Wang et al, J. Biol. Chem., 270:12250 (1995).
１７．I.D. Bernstein et al., J. Clin. Invest. 79:1153 (1987).
１８．I.D. Bernstein et al., J. Immunol. 128:867-881 (1992).
１９．Kabat et al. Seqencing. of Proteins of Immunological . Interest, 1:310-334 (1994).
２０．PCT publication No. WO 91/09967.
２１．Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403 (1995).
２２．Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368 (1996).
２３．Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, (1997).
２４．Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, (1996).
２５．Crameri et al., Nature, 391, 288-291, (1998).
２６．U.S. Patent No. 4,671,958
２７．U.S. Patent No. 4,970,198
２８．U.S. Patent No. 5,037,651
２９．U.S. Patent No. 5,079,233
３０．U.S. Patent No. 5,877,296
３１．PCT publication No. WO 98/20734
３２．Trail P and Bianchi A., Current Opin. Immunol. , 11:584-588, (1999).
３３．Dubowchik G. and Walker M., Pharmacol. & Therapeutics, 83:67-123 (1999).
３４．Bross P.F., Beitz J., Chen G., Chen X.H., Duffy E., Keiffer-Bross P., Beitz J., Chen G., Chen X., Duffy E., Kieffer L., Roy S., Sridhara R., Rahman A., Williams G., Pazdur R., Clin. Cancer Res., 7:1490-1496 (2001).

3 5. Berger M., Leopold L., Dowell J., Korth-Bradley J., Sherman M., Invest. New Drugs; 20: 395-406 (2002).
3 6. Sievers E., Larson R., Stadmauer E., Estey E., Lowenberg B., Dombret H., Karanes C., Theobald M., Bennet J., Sherman M., et al., J. Clin. Oncol.; 19:3244-3254 (2001).
3 7. Larson R., Boogaerts M., Estey E., Karanes C., Stadtmauer E., Sievers E., Mineur P., Bennett J., Berger M., Eten C. et al. Leukemia; 16:1627-1636 (2002).
3 8. Hamann P., Hinman L., Beyer C., Kindh D., Upeslacis J., Flowers D., Bernstein I., Choice of Linker. Bioconj. Chem.; 13:40-46 (2002).
3 9. Hamann P., Hinman L., Hollander I., Beyer C., Lindh D., Holcomb R., Hallet W., Tsou H., Upeslacis J., Shochat D., et al., Bioconj. Chem.; 13:47-58 (2002).
4 0. Lee M., Dunne T., Chang C., Siegal M., Morton G., Ellestad G., McGahren W., Borders D.. , J. Am. Chem. Soc. 1992; 114:985-987 (1992).
4 1. Zein N., Sinha A., McGahren W., Ellestad G., Science; 240:1198-1201 (1988).
4 2. Thorson J., Sievers E., Ahlert J., Shepard E., Whitwam R., Onwueme K., Ruppen M., Current Pharmaceut. Design; 6:1841-1879 (2000).
4 3. Andrews R., Singer J., Bernstein I., J. Exp. Med.; 169:1721-1731 (1989).
4 4. Kreitman R.J., Current Pharmaceut. Biotech.; 2:313-325 (2001).
4 5. Pastan I., Kreitman R.J., Current Opin. Investig. Drugs, 3(7):1089-1091 (2002).
4 6. Kreitman R.J., Curr. Opin. Mol. Ther. ; 5:44-551 (2003).
4 7. Crocker P.R. and Varki A. Siglecs, Trends in Immunol.; 22:337-342 (2001).
4 8. Hursey M., Newton D.L., Hansen H.J., Ruby D., Goldenberg D.M., Rybak S.M., Leukemia and Lymphoma; 43:953-959 (2002).
4 9. Nitschke L., Floyd H., and Crocker P.R., Scand. J. Immunol.; 53:227-234 (2001).
5 0. Moyron-Quiroz J.E., Partida-Sanchez S., Donis-Hernandez R., Sandoval-Montes C. and Santos-Argumedo L., Scand. J. Immunol.; 55:343-351 (2002).
5 1. Tedder T.F., Tuscano J., Sato S., Kehrl J.H., Ann. Rev. Immunol.; 15:481-504 (1997).
5 2. Hanna R., Ong G.L., Mattes M.J., Cancer Res.; 56:3062-3068 (1996).
5 3. Shan D. and Press O.W., J. Immunol. 1995; 154:4466-4475 (1995).
5 4. Dowell J.A., Korth-Bradley J., Liu H., King S.P., Berger M.S., J. Clin. Pharmacol.; 41:1206-1214 (2001).
5 5. Gibaldi M., Perrier D., Pharmacokinetics, 2nd ed., Marcel-Dekker Inc., NY (1982).
5 6. Van Horssen P.J., Preijers, F.W., Van Oosterhout, Y.V., Eling W.M. and De Witte, T., Leukemia & Lymphoma; 39(5-6):591-599 (2000).
5 7. Hinman L.M., Hamann P.R., Wallace R., Menendez A.T., Durr F.E., Upeslacis J., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993).
5 8. Kreitman R.J., Wilson W.H., Bergeron K., Raggio M., Stetler-Stevenson M., Fitzgerald D.J., Pastan I., N. Engl. J. Med.; 345:241-247 (2001).
5 9. Leonard J.P. and Link B.K., Sem. Oncol. 29:81-86 (2002).
6 0. Schindler J., Sausville E., Messmann R., Uhr J.W. & Vitetta, E.S., Clin.Cancer Res., 7,255-258 (2001).
6 1. Vincent T. DeVita, Samuelo Hellman, Steven A. Rosenberg, Eds., Cancer Principles and Practice of Oncology, 6th Edition, Publishers: Lippincott, Williams and Wilkins (2001).
6 2. Edward Chu and Vincent T. Devita, Physician's Cancer Chemotherapy Drug

Manual, Publishers: Jones and Bartlett (2002).

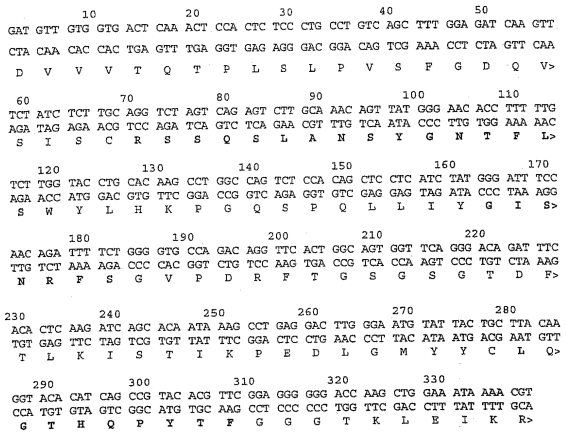
【図１】

FIGURE 1: マウスモノクローナル５/４４のＣＤＲの配列

H1	NYWIH	(配列番号 :1)
H2	GINPGNNYTTYKRNLKG	(配列番号 :2)
H3	EGYGNYGAWFAY	(配列番号 :3)
L1	RSSQSLANSYGNTFLS	(配列番号 :4)
L2	GISNRFS	(配列番号 :5)
L3	LQGTHQPYT	(配列番号 :6)

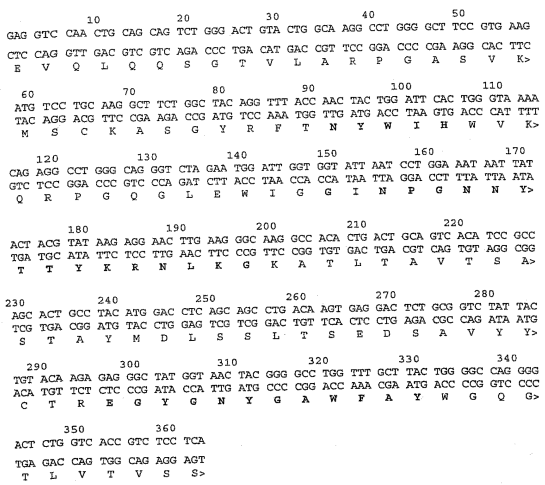
【図２】

FIGURE 2: 5/44 V_L のDNA/タンパク質配列



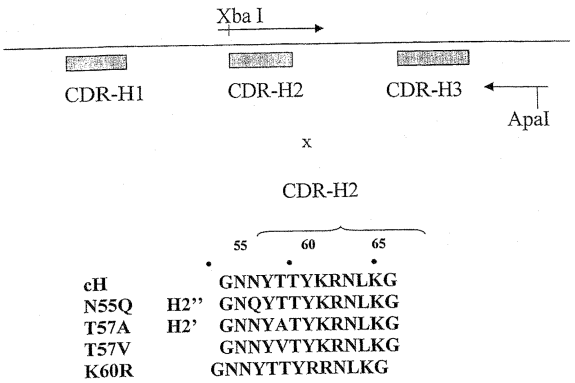
【図３】

FIGURE 3: 5/44 V_H のDNA/タンパク質配列



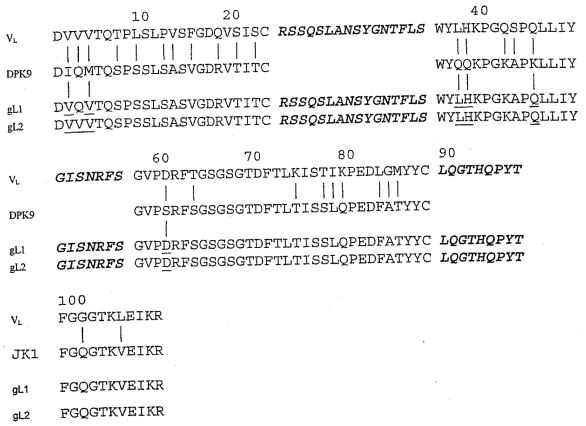
【図４】

FIGURE 4: グリコシル化部位および反応性リシンの除去：
PCRによりCHベクターのCDR-H2を変異させる計画



【図５】

FIGURE 5: 5/44 軽鎖配列移植設計



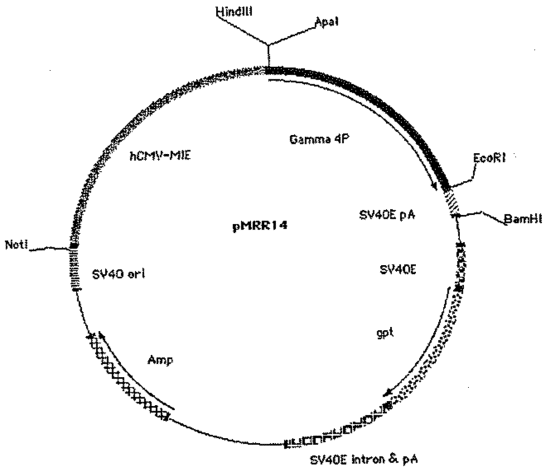
【図６】

FIGURE 6: 5/44重鎖配列移植設計



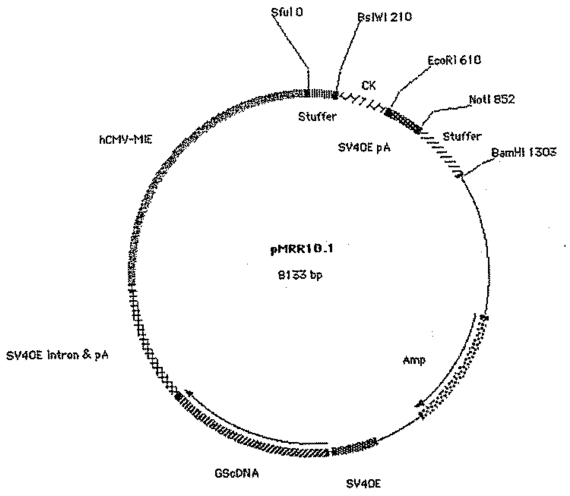
【図７】

FIGURE 7: ベクター PMRR14の地図



【図８】

FIGURE 8: ベクター PMRR10.1の地図



【図９】

FIGURE 9: キメラ５/４４および変異体のバイアコアアッセイ

5/44	Ka e^{5}	Kd e^{-4}	KD e^{-10}	~KD nM
cLcH	2.9	1.14	3.93	0.4
N55Q	5.81	1.9	3.27	0.3
T57A	7.8	0.51	0.66	0.07
K60R	4.95	1.01	2.04	0.2

【図１０－１】

FIGURE 10: 5/44 GH1およびGL1遺伝子群のオリゴヌクレオチド

重鎖

544gH1 T1
AGTGTGAGGTGCAATTGGTCCAGTCAGGAGCAGAGGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTC
AAAGTTTCGTGTAAGGCTAGCGGCTACAGGTTCAC

544gH1 T2
GTGGCATTAATCCCGGGAATCAGTACACTACATATAAAAGAAATCTAAAGGGCAGAGCA
ACGCTGACCGCGGACACCTCCACAAGCACTGTCTACA

544gH1 T3
AGAGAAGGCTACGGTAATTACGGAGCCTGGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGTACCCTAGT
CACAGTCTCCTCAGCTTCTACAAAGGGCCCAAGAAA

544 gH1 B1
GGACCAATTGCACCTCACACTGCACTCCCTTGAGAATGAGTGCCAGGAACACGAGAGAG
AATCCGAAGTCCATGGTGGCGGCAAGCTTTTATTC

544 gH1 B2
GATTCCCGGGATTAATGCCACCGATCCATTCCAGGCCTTGTCCCGGAGCCTGCCTGACCC
AATGAATCCAATAATTTGTGAACCTGTAGCCGCTAGC

544gH1 B3
CGTAATTACCGTAGCCTTCTCTAGTACAATAGTACACTGCGGTGTCCTCGGATCTCAGAG
ATGACAGCTCCATGTAGACAGTGCTTGTGGAGG

544gH1 F1
GAATAAAAGCTTGCCGCCACC

544gH1 R1
TTTCTTGGGCCCTTTGTAGAAG

【図１０－２】

FIGURE 10（続き）

軽鎖

544 gL1 T1
GCTTCCCGGGGTGACGTTCAAGTGACCCAGAGCCCATCCAGCCTGAGCGCATCTGTAGG
AGACCGGGTCACCATCACTTGTAGATCC

544 gL1 T2
TATCTGCACAAACCAGGTAAAGCCCCACAATTGCTCATCTACGGAATCTCTAACAGATTT
AGTGGTGTACCAGACAGGTTCAGCGGTTCC

544gL1 T3
AGATTTCGCCACTTATTACTGTTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACATTCGGTCAGGG
TACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGCGTGC

544gL1 B1
GAACGTCACCCCGGGAAGCAGGAATCCAGAACAACAGAAGCACCAACAGCCTAACAGG
CAACTTCATGGTGGCGGCTTCGAATCATCC

544gL1 B2
CTTTACCTGGTTTGTGCAGATACCAAGACAAAAAGGTGTTCCCATAACTGTTTGCAAGAC
TCTGACTGGATCTACAAGTGATGGTGAC

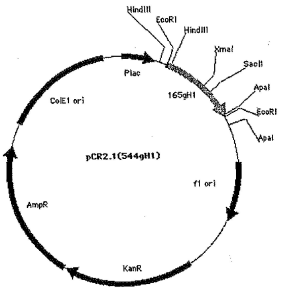
544gL1 B3
AACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGAGACGAGATCGTGAGGGTGAAATCA
GTACCACTTCCGGAACCGCTGAACCTGTCTG

544gL1 F1
GGATGATTCGAAGCCGCCAC

544gL1 R1
GCACGCCGTACGTTTGATTTC

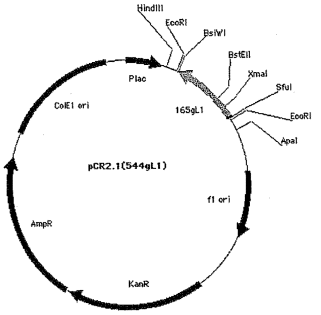
【図１１】

FIGURE 11: 中間ベクターPCR2.1(544GH1)のプラスミド地図



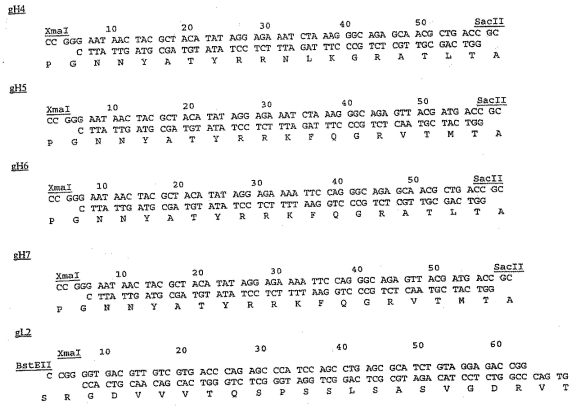
【図１２】

FIGURE 12: 中間ベクターPCR2.1 (544GL1) のプラスミド地図



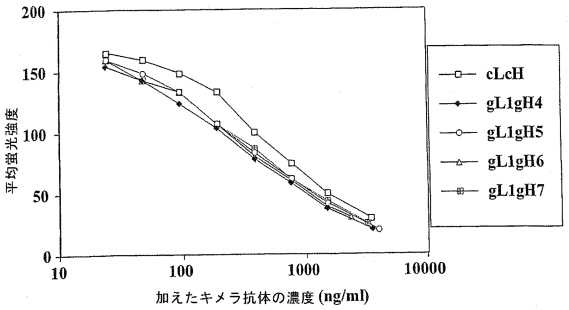
【図１３】

FIGURE 13: さらなる移植を行うために用いるオリゴヌクレオチドカセット



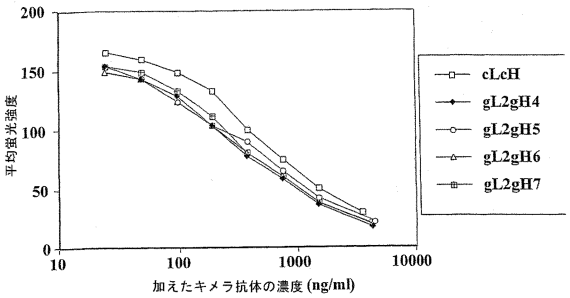
【図１４】

FIGURE 14: 蛍光標識したマウス５/４４抗体の結合を移植した変異体のそれと競合させる競合アッセイ



【図１５】

FIGURE 15: 蛍光標識したマウス５/４４抗体の結合を移植した変異体のそれと競合させる競合アッセイ



【図１６－１】

FIGURE 16: 移植した重鎖および軽鎖の全ＤＮＡ配列

a) 重鎖

```
          10                  20                  30                  40                  50                  60
AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TTC GGA TTC TCT CTC GTG TTC CTG GCA CTC ATT CTC AAG
TTCGAACGGC GGTGG TAC CTG AAG CCT AAG AGA GAG CAC AAG GAC CGT GAG TAA GAG TTC
                  M  D  F  G  F  S  L  V  F  L  A  L  I  L  K>

          70                  80                  90                 100                 110
GGA GTG CAG TGT GAG GTG CAA TTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT
CCT CAC GTC ACA CTC CAC GTT AAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA
 G  V  Q  C  E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G>

         130                 140                 150                 160                 170
GCT TCC GTC AAA GTT TCG TGT AAG GCT AGC GGC TAC AGG TTC ACA AAT TAT TGG ATT
CGA AGG CAG TTT CAA AGC ACA TTC CGA TCG CCG ATG TCC AAG TGT TTA ATA ACC TAA
 A  S  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  R  F  T  N  Y  W  I>

     180                 190                 200                 210                 220                 230
CAT TGG GTC AGG CAG GCT CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGT GGC ATT AAT CCC
GTA ACC CAG TCC GTC CGA GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAG CCA CCG TAA TTA GGG
 H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  G  I  N  P>

         240                 250                 260                 270                 280
GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GCG
CCC TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG CGC
 G  N  N  Y  A  T  Y  R  R  K  F  Q  G  R  V  T  M  T  A>

290                 300                 310                 320                 330                 340
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GTC TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC ACC
CTG TGG AGG TGT TCG TGA CAG ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG TGG
D  T  S  T  S  T  V  Y  M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T>

     350                 360                 370                 380                 390                 400
GCA GTG TAC TAT TGT ACT AGA GAA GGC TAC GGT AAT TAC GGA GCC TGG TTC GCC TAC
CGT CAC ATG ATA ACA TGA TCT CTT CCG ATG CCA TTA ATG CCT CGG ACC AAG CGG ATG
 A  V  Y  Y  C  T  R  E  G  Y  G  N  Y  G  A  W  F  A  Y>

         410                 420                 430                 440                 450
TGG GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC
ACC CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG
 W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  A  S  T  K  G  P  S  V>

460                 470                 480                 490                 500                 510
TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
AAG GGG GAC CGC GGG ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CGG CGG GAC CCG ACG
 F  P  L  A  P  C  S  R  S  T  S  E  S  T  A  A  L  G  C>

     520                 530                 540                 550                 560                 570
CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG
GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CGG GAC
 L  V  K  D  Y  F  P  E  P  V  T  V  S  W  N  S  G  A  L>

         580                 590                 600                 610                 620                 630
ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC
TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG
 T  S  G  V  H  T  F  P  A  V  L  Q  S  S  G  L  Y  S  L>
```

【図１６－２】

FIGURE 16（続き）

```
          640                 650                 660                 670                 680
AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC
TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG AGG TCG TCG AAC CCG TGC TTC TGG ATG TGG ACG TTG
 S  S  V  V  T  V  P  S  S  S  L  G  T  K  T  Y  T  C  N>

690                 700                 710                 720                 730                 740
GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT G GTGAGAGGCC
CAT CTA GTG TTC GGG TCG TTG TGG TTC CAC CTG TTC TCT CAA C CACTCTCCGG
 V  D  H  K  P  S  N  T  K  V  D  K  R  V>

         750                 760                 770                 780                 790                 800                 810
AGCACAGGGA GGGAGGGTGT CTGCTGGAAG CCAGGCTCAG CCCTCCTGCC TGGACGCACC CCGGCTGTGC
TCGTGTCCCT CCCTCCCACA GACGACCTTC GGTCCGAGTC GGGAGGACGG ACCTGCGTGG GGCCGACACG

         820                 830                 840                 850                 860                 870                 880
AGCCCCAGCC CAGGGCAGCA AGGCATGCCC CATCTGTCTC CTCACCCGGA GGCCTCTGAC CACCCCACTC
TCGGGGTCGG GTCCCGTCGT TCCGTACGGG GTAGACAGAG GAGTGGGCCT CCGGAGACTG GTGGGGTGAG

         890                 900                 910                 920                 930                 940                 950
ATGCCCAGGG AGAGGGTCTT CTGGATTTTT CCACCAGGCT CCGGGCAGCC ACAGGCTGGA TGCCCCTACC
TACGGGTCCC TCTCCCAGAA GACCTAAAAA GGTGGTCCGA GGCCCGTCGG TGTCCGACCT ACGGGGATGG

         960                 970                 980                 990                1000                1010                1020
CCAGGCCCTG CGCATACAGG GGCAGGTGCT GCGCTCAGAC CTGCCAAGAG CCATATCCGG GAGGACCCTG
GGTCCGGGAC GCGTATGTCC CCGTCCACGA CGCGAGTCTG GACGGTTCTC GGTATAGGCC CTCCTGGGAC

        1030                1040                1050                1060                1070                1080                1090
CCCCTGACCT AAGCCCACCC CAAAGGCCAA ACTCTCCACT CCCTCAGCTC AGACACCTTC TCTCCTCCCA
GGGGACTGGA TTCGGGTGGG GTTTCCGGTT TGAGAGGTGA GGGAGTCGAG TCTGTGGAAG AGAGGAGGGT

        1100                1110                1120                1130                1140                1150
GATCTGAGTA ACTCCCAATC TTCTCTCTGC A GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA CCA
CTAGACTCAT TGAGGGTTAG AAGAGAGACG T CTC AGG TTT ATA CCA GGG GGT ACG GGT GGT
                                    E  S  K  Y  G  P  P  C  P  P>

1160                1170                1180                1190                1200                1210                1220
    TGC CCA GGT AAGCCAACCC AGGCCTCGCC CTCCAGCTCA AGGCGGGACA GGTGCCCTAG AGTAGCCTGC
    ACG GGT CCA TTCGGTTGGG TCCGGAGCGG GAGGTCGAGT TCCGCCCTGT CCACGGGATC TCATCGGACG
     C  P>

        1230                1240                1250                1260                1270                1280
ATCCAGGGAC AGGCCCCAGC CGGGTGCTGA CGCATCCACC TCCATCTCTT CCTCA GCA CCT GAG TTC
TAGGTCCCTG TCCGGGGTCG GCCCACGACT GCGTAGGTGG AGGTAGAGAA GGAGT CGT GGA CTC AAG
                                                                A  P  E  F>

1290                1300                1310                1320                1330                1340
CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC
GAC CCC CCT GGT AGT CAG AAG GAC AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG
 L  G  G  P  S  V  F  L  F  P  P  K  P  K  D  T  L  M  I>

        1350                1360                1370                1380                1390                1400
TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG
AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGC ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTC CTT CTG GGG CTC
 S  R  T  P  E  V  T  C  V  V  V  D  V  S  Q  E  D  P  E>
```

【図１６－３】

FIGURE 16（続き）

```
      1410          1420          1430          1440          1450
GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC
 V  Q   F   N   W   Y   V   D   G   V   E   V   H   N   A   K   T   K   P>

1460          1470          1480          1490          1500          1510
CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
GCC CTC CTC GTC AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
 R  E   E   Q   F   N   S   T   Y   R   V   V   S   V   L   T   V   L   H>

      1520          1530          1540          1550          1560          1570
CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG
GTC CTG ACC GAC TTG CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGC
 Q  D   W   L   N   G   K   E   Y   K   C   K   V   S   N   K   G   L   P>

      1580          1590          1600          1610          1620          1630
TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGG GACCCACGGG GTGCGAGGGC
AGG AGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCACC CTGGGTGCCC CACGCTCCCG
 S   S   I   E   K   T   I   S   K   A   K>

      1640          1650          1660          1670          1680          1690          1700
CACATGGACA GAGGTCAGCT CGGCCCACCC TCTGCCCTGG GAGTGACCGC TGTGCCAACC TCTGTCCCTA
GTGTACCTGT CTCCAGTCGA GCCGGGTGGG AGACGGGACC CTCACTGGCG ACACGGTTGG AGACAGGGAT

      1710          1720          1730          1740          1750
CA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG
GT CCC GTC GGG GCT CTC GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GTC CTC CTC TAC
   G   Q   P   R   E   P   Q   V   Y   T   L   P   P   S   Q   E   E   M>

 1760          1770          1780          1790          1800          1810
ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC
TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATG GGG TCG CTG TAG
 T   K   N   Q   V   S   L   T   C   L   V   K   G   F   Y   P   S   D   I>

      1820          1830          1840          1850          1860          1870
GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC
CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG
 A   V   E   W   E   S   N   G   Q   P   E   N   N   Y   K   T   T   P   P>

      1880          1890          1900          1910          1920
GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC
CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TCC GAT TGG CAC CTG TTC TCG
 V   L   D   S   D   G   S   F   F   L   Y   S   R   L   T   V   D   K   S>

1930          1940          1950          1960          1970          1980
AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC
TCC ACC GTC CTC CCC TTA CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG
 R   W   Q   E   G   N   V   F   S   C   S   V   M   H   E   A   L   H   N>

      1990          2000          2010          2020          2030          2040
CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA GTGC CAGGGCCGGC
GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GAC CCA TTT ACT CACG GTCCCGGCCG
 H   Y   T   Q   K   S   L   S   L   S   L   G   K   *>

      2050          2060          2070          2080          2090          2100          2110
AAGCCCCCGC TCCCCGGGCT CTCGGGGTCG CGCGAGGATG CTTGGCACGT ACCCCGTCTA CATACTTCCC
TTCGGGGGCG AGGGGCCCGA GAGCCCCAGC GCGCTCCTAC GAACCGTGCA TGGGGCAGAT GTATGAAGGG
```

【図１６－４】

FIGURE 16（続き）

```
          2120          2130          2140          2150          2160
AGGCACCCAG CATGGAAATA AAGCACCCAC CACTGCCCTG GCTCGAATTC
TCCGTGGGTC GTACCTTTAT TTCGTGGGTG GTGACGGGAC CGAGCTTAAG
```

【図１６－５】

FIGURE 16（続き）

b) 軽鎖

```
          10            20            30            40            50            60
TTCGAAGCCG CCACC ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT
AAGCTTCGGC GGTGG TAC TTC AAC GGA CAA TCC GAC AAC CAC GAA GAC AAC AAG ACC TAA
                    M   K   L   P   V   R   L   L   V   L   L   L   F   W   I>

              70            80            90           100           110
CCT GCT TCC CGG GGT GAC GTT CAA GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT
GGA CGA AGG GCC CCA CTG CAA GTT CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA
 P   A   S   R   G   D   V   Q   V   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S>

120           130           140           150           160           170
GTA GGA GAC CGG GTC ACC ATC ACT TGT AGA TCC AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT
CAT CCT CTG GCC CAG TGG TAG TGA ACA TCT AGG TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA
 V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   S   S   Q   S   L   A   N   S   Y>

      180           190           200           210           220           230
GGG AAC ACC TTT TTG TCT TGG TAT CTG CAC AAA CCA GGT AAA GCC CCA CAA TTG CTC
CCC TTG TGG AAA AAC AGA ACC ATA GAC GTG TTT GGT CCA TTT CGG GGT GTT AAC GAG
 G   N   T   F   L   S   W   Y   L   H   K   P   G   K   A   P   Q   L   L>

              240           250           260           270           280
ATC TAC GGA ATC TCT AAC AGA TTT AGT GGT GTA CCA GAC AGG TTC AGC GGT TCC GGA
TAG ATG CCT TAG AGA TTG TCT AAA TCA CCA CAT GGT CTG TCC AAG TCG CCA AGG CCT
 I   Y   G   I   S   N   R   F   S   G   V   P   D   R   F   S   G   S   G>

290           300           310           320           330           340
AGT GGT ACT GAT TTC ACC CTC ACG ATC TCG TCT CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT
TCA CCA TGA CTA AAG TGG GAG TGC TAG AGC AGA GAG GTC GGT CTT CTA AAG CGG TGA
 S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T>

      350           360           370           380           390           400
TAT TAC TGT TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA
ATA ATG ACA AAT GTT CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT
 Y   Y   C   L   Q   G   T   H   Q   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   V>

              410           420           430           440           450
GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG
CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC
 E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V   F   I   F   P   P   S   D   E>

460           470           480           490           500           510
CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA
GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT
 Q   L   K   S   G   T   A   S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y   P   R>

      520           530           540           550           560           570
GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG
CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC
 E   A   K   V   Q   W   K   V   D   N   A   L   Q   S   G   N   S   Q   E>

              580           590           600           610           620           630
AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG
TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC
 S   V   T   E   Q   D   S   K   D   S   T   Y   S   L   S   S   T   L   T>

          640           650           660           670           680
```

【図１６－６】

FIGURE 16（続き）

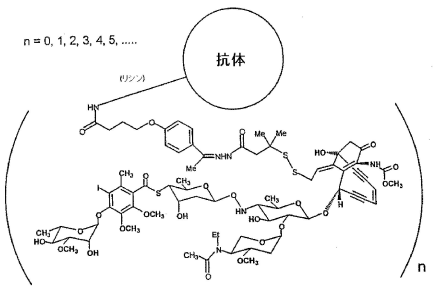
```
CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG
GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG GTA GTC
 L   S   K   A   D   Y   E   K   H   K   V   Y   A   C   E   V   T   H   Q>

690           700           710           720           730           740
GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG AGGGA
CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC CCT CTC ACA ATC TCCCT
 G   L   S   S   P   V   T   K   S   F   N   R   G   E   C   *>

          750           760           770           780
GAAGTGCCCC CACCTGCTCC TCAGTTCCAG CCTGGGAATT C
CTTCACGGGG GTGGACGAGG AGTCAAGGTC GGACCCTTAA G
```

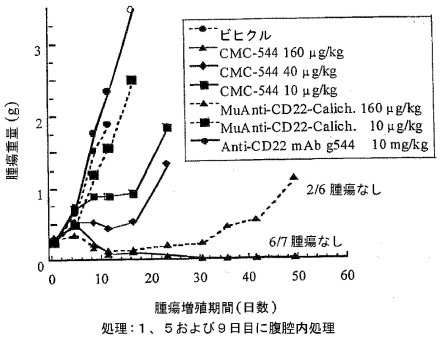
【図１７】

FIGURE 17: 抗体-NAC-ガンマ カルチェアミシン DMH コンジュゲートの構造



【図１８】

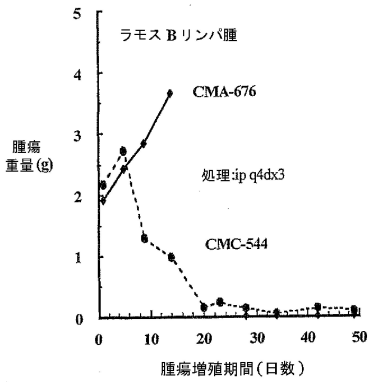
FIGURE 18: CMC-544のラモスB-細胞リンパ腫の増殖に対する効果



処理：１、５および９日目に腹腔内処理

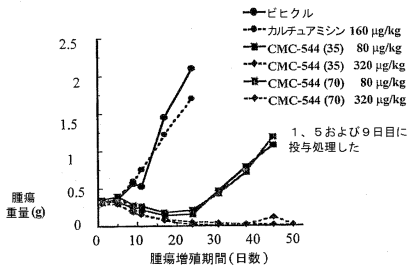
【図１９】

FIGURE 19: CMC-544のラージB-細胞リンパ腫に対する効果



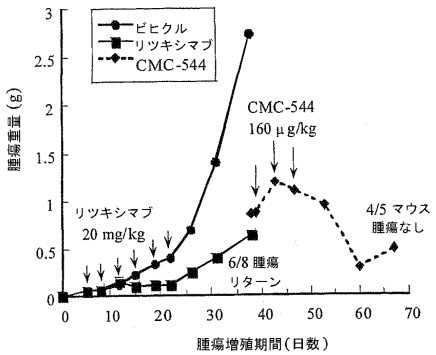
【図２０】

FIGURE 20: CMAとCMCのコンジュゲーション操作で作製されたCMC-544のRLリンパ腫の増殖に対する効果



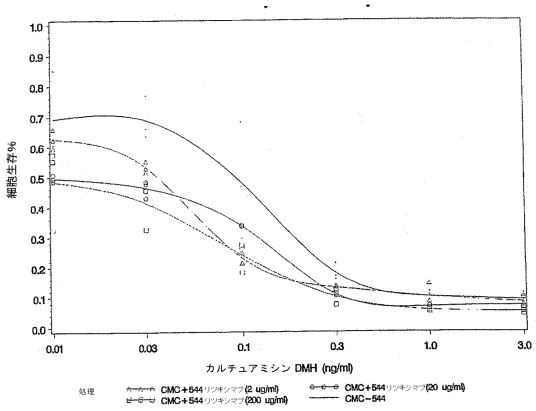
【図２１】

FIGURE 21: リツキシマブ（リツキサン（登録商標））処理したラージRLリンパ腫はCMC-544に対して感受的である。



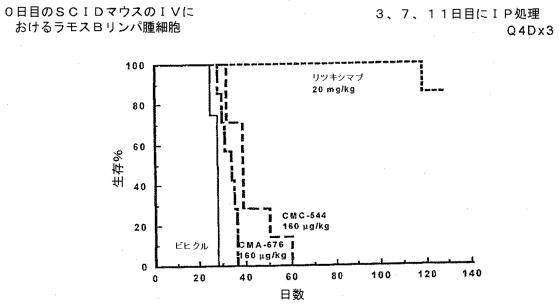
【図２２】

FIGURE 22: リツキシマブ（リツキサン（登録商標））のCMC-544の細胞障害活性に対する効果



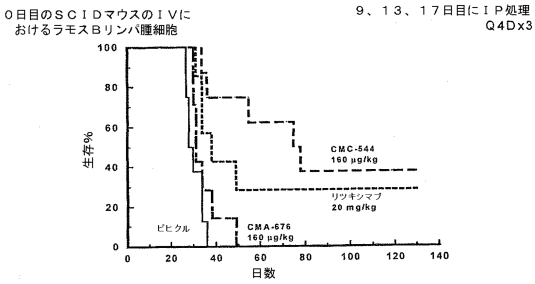
【図２３】

FIGURE 23: CMC-544,リツキシマブ（リツキサン（登録商標））,およびCMA-676の散在性早期ラモスBリンパ腫を有するＳＣＩＤマウスの生存に対する効果



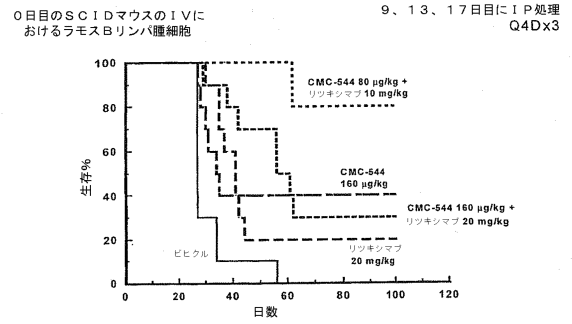
【図２４】

FIGURE 24: CMC-544,リツキシマブ（リツキサン（登録商標））,およびCMA-676の散在性末期ラモスBリンパ腫を有するＳＣＩＤマウスの生存に対する効果



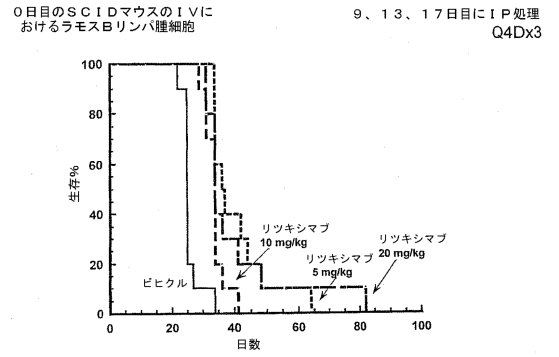
【図２５】

FIGURE 25: CMC-544,リツキシマブ（リツキサン（登録商標））,およびCMA-676の散在性末期ラモスBリンパ腫を有するＳＣＩＤマウスの生存に対する効果



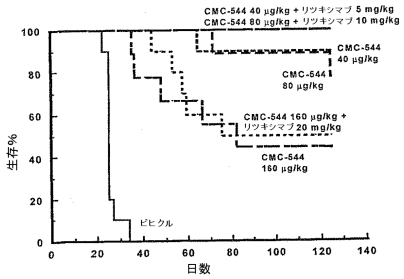
【図２６】

FIGURE 26: CMC-544,リツキシマブ（リツキサン（登録商標））,およびCMA-676の散在性末期ラモスBリンパ腫を有するＳＣＩＤマウスの生存に対する効果



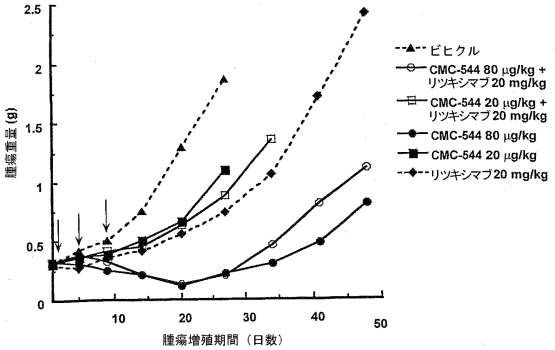
【図２７】

FIGURE 27: CMC-544, リツキシマブ（リツキサン（登録商標））, およびCMA-676の散在性末期ラモスBリンパ腫を有するＳＣＩＤマウスの生存に対する効果



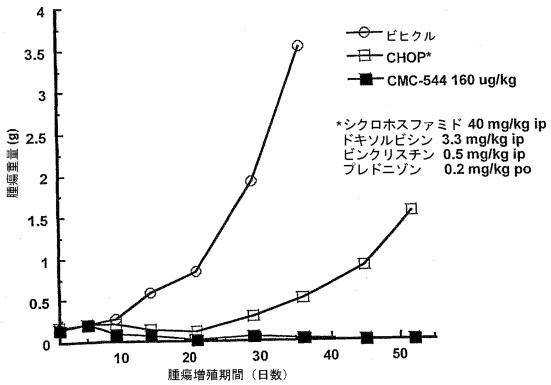
【図２８】

FIGURE 28: リツキシマブ（リツキサン（登録商標））と共に／なしで CMC-544 のＲＬ非ホジキンリンパ腫に対する抗腫瘍活性



【図２９】

FIGURE 29: CMC-544 およびCHOP のＲＬ非ホジキンリンパ腫に対する抗腫瘍活性



【配列表】
0006872376000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.　　FI
　　A61P　35/02

(72)発明者　ジャスティン・キース・モラン
アメリカ合衆国10989ニューヨーク州バレー・コティッジ、シエラ・ビスタ・レイン682番
(72)発明者　ジョゼフ・トーマス・ルビーノ
アメリカ合衆国07082ニュージャージー州トウェイコ、サンライズ・ウェイ4番
(72)発明者　ニーラ・ジェーン
アメリカ合衆国10956ニューヨーク州ニュー・シティ、キャプラル・レイン6番
(72)発明者　ユージーン・ジョゼフ・ビダナス
アメリカ合衆国10940ニューヨーク州ミドルタウン、ウィット・ドライブ30番
(72)発明者　ジョン・マクリーン・シンプソン
アメリカ合衆国10960ニューヨーク州アッパー・ニャック、メープル・アベニュー417番
(72)発明者　ポール・デイビッド・ロビンズ
アメリカ合衆国10960ニューヨーク州アッパー・ニャック、アスター・ストリート403番
(72)発明者　ニシス・マーチャント
アメリカ合衆国07650ニュージャージー州パリセーズ・パーク、イースト・ハリエット・アベニュー115番
(72)発明者　ジョン・フランシス・ディジョゼフ
アメリカ合衆国07095ニュージャージー州ウッドブリッジ、リンデン・アベニュー571番
(72)発明者　マーク・エドワード・ルッペン
アメリカ合衆国10923ニューヨーク州ガーナービル、リー・コート6番
(72)発明者　ニティン・クリシュナジ・ダムル
アメリカ合衆国07458ニュージャージー州アッパー・サドル・リバー、スティーブンソン・レイン53番
(72)発明者　アンドリュー・ジョージ・ポップルウェル
英国ティダブリュー18・2アールエヌ、ミドルセックス、ステインズ、グロスブナー・ロード77番

合議体
審判長　原田　隆興
審判官　冨永　みどり
審判官　大久保　元浩

(56)参考文献　特許第4486494（JP，B2）
特開2000－226336（JP，A）
特表平11－508232（JP，A）
特表2001－518930（JP，A）
国際公開第2001／012653（WO，A1）

(58)調査した分野(Int.Cl.，DB名)
A61K38/00-49/22
REGISTRY／CAPLUS／MEDLINE／EMBASE／BIOSIS（STN）