

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6970017号
(P6970017)

(45) 発行日 令和3年11月24日(2021.11.24)

(24) 登録日 令和3年11月1日(2021.11.1)

(51) Int.Cl.

F 1

C 07 K	16/46	(2006.01)	C 07 K	16/46
C 12 N	15/13	(2006.01)	C 12 N	15/13
C 12 P	21/08	(2006.01)	C 12 P	21/08
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19

請求項の数 15 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-541675 (P2017-541675)
 (86) (22) 出願日 平成28年2月9日(2016.2.9)
 (65) 公表番号 特表2018-505681 (P2018-505681A)
 (43) 公表日 平成30年3月1日(2018.3.1)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2016/017141
 (87) 國際公開番号 WO2016/130539
 (87) 國際公開日 平成28年8月18日(2016.8.18)
 審査請求日 平成31年2月6日(2019.2.6)
 (31) 優先権主張番号 62/113,988
 (32) 優先日 平成27年2月9日(2015.2.9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73) 特許権者 500213834
メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー
— 1275
(73) 特許権者 596060697
マサチューセッツ インスティテュート
オブ テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139ケンブリッジ, マサチューセッツ・アヴェニュー・77
(74) 代理人 100094569
弁理士 田中 伸一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒトA33抗原とDOTA金属複合体に親和性を有する多重特異性抗体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第一の抗原結合部位及び第二の抗原結合部位を含む二重特異性抗体であって、前記第一の抗原結合部位がA33に結合し、

D1QMTQSPSSLSVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPG LAPKTLIYL ASN RHTGVPSRFSGSGSGTDF TFTSSLQP
EDIATYFCQQHWSYPLTFGQGTKVEVKR

のV_Lドメイン配列、および、

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTYDMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSYTYLDSVKGRFTISRDSSKNL TYLQ MNSLQAEDSAIYYCAPTTVVPFAYWGQGT LTVSS

のV_Hドメイン配列を含み、

前記第二の抗原結合部位がDOTAに結合し、

HVKLQESGPGLVQPSQSLSLTCTVSGFS LTDYGVHW VRQSPGKGLEWLGV IWSGGTAYNTAL ISRLN IYRDNSKNQVFL
EMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPNYFDAWGCGTT VTVSS、

のV_Hドメイン配列、および、

QAVVIQESALTTPPGETVLT CGSSTGAVT ASNYANWVQEKP DHCF TGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKA ALTIAGT
QTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTRLTVLG、

のV_Lドメイン配列、

または、

HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS LTDYGVHW VRQAPGKGLEWLGV IWSGGTAYNTAL ISRFT ISRDNSKNL TYL
QMNSLRAEDTAVYYCARRGSYPNYFDAWGCGT LTVSS

10

20

のV_Hドメイン配列、および、

QAVVTQEPLTVSPGGTVTLCGSSTGAVTASNYANWVQQKPGQCPRGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAALTLLGA
QPEDEAEYYCALWYSDHWV1GGGTKLTVLG

のV_Lドメイン配列を含む、前記二重特異性抗体。

【請求項 2】

配列番号：2、配列番号：3、又は配列番号：4のいずれか1つを含み、及び、更に配列番号：6又は配列番号：7を含む、請求項1記載の二重特異性抗体。

【請求項 3】

第二の抗原結合部位がC825 scFvであって、

HVKLQESGPLVQPSQSLSLTCTVSGFS LTDYGVHWVRQSPGKGLEWLGV IWSGGTAYNTAL ISRLN IYRDNSKNQVFL 10
EMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPNYFDAWGCGTTVTVSS、および、

QAVV1QESALTTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQEKPDCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIA GT
QTEDEAIYFCALWYSDHWV1GGGTRLTVLG、の配列を含む、請求項1に記載の二重特異性抗体。

【請求項 4】

第一の抗原結合部位及び/又は第二の抗原結合部位が単鎖可変フラグメント(scFv)を含む、請求項1に記載の二重特異性抗体。

【請求項 5】

第一の抗原結合部位が免疫グロブリン分子の一部であり、当該第二の抗原結合部位がscFv、scFab、Fab又はFvを含む、請求項1に記載の二重特異性抗体。

【請求項 6】

第二の抗原結合部位がヒト化C825 scFvであり、

HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDYGVHWVRQAPGKGLEWLGV IWSGGTAYNTAL ISRFT ISRDNSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCARRGSYPNYFDAWGCGTLVTVSS、および、

QAVVTQEPLTVSPGGTVTLCGSSTGAVTASNYANWVQQKPGQCPRGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAALTLLGA
QPEDEAEYYCALWYSDHWV1GGGTKLTVLG、の配列を含む、

請求項5に記載の二重特異性抗体。

【請求項 7】

C825 scFvが免疫グロブリン分子の重鎖のC-末端に連結されている、又は、C825 scFvが免疫グロブリン分子の軽鎖のC-末端に連結されている、請求項3または6に記載の二重特異性抗体。

30

【請求項 8】

請求項1-7のいずれか1項に記載の二重特異性抗体のポリペプチド鎖のコード配列を含む核酸分子。

【請求項 9】

請求項8に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 10】

請求項9に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 11】

請求項1-7のいずれか1項の二重特異性抗体を作製する方法であって、

当該二重特異性抗体の発現を可能にする条件下で培養培地中で請求項10の宿主細胞を培養すること、及び、

40

当該培養培地から当該二重特異性抗体を分離すること、
を含む、前記方法。

【請求項 12】

請求項1-7のいずれか1項に記載の二重特異性抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 13】

請求項1-7のいずれか1項に記載の二重特異性抗体を含む、A33発現に関連する症状の治療又は診断のための医薬組成物。

【請求項 14】

症状が結腸直腸癌、胃癌又は膵臓癌である、請求項13に記載の医薬組成物。

50

【請求項 15】

請求項 7 記載の二重特異性抗体を含む、対象動物でA33陽性癌を治療又は診断するための医薬組成物であって、

前記治療又は診断が、請求項 7 に記載の二重特異性抗体を、A33抗原を発現する 1 つ以上の腫瘍に当該二重特異性抗体を局在させる条件及び十分な時間で対象動物に投与すること、

続いて、除去剤を当該対象動物に投与し、当該除去剤が未結合二重特異性抗体を除去すること、

続いて放射能標識DOTA-Bn を当該対象動物に投与すること、を含む、前記医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】**【0001】**

(関連出願の相互引用) 本出願は、米国仮特許出願62/113,988 (2015年2月9日出願) (その内容は参照によりその全体が本明細書に含まれる) に関し優先権を主張する。

【背景技術】**【0002】**

抗体系治療薬は特に癌の治療で極めて有望である。多様な形式(モノクローナル型、ネズミ型、キメラ型、ヒト化型、ヒト型、完全長型、Fab型、PEG化型、放射能標識型、因子複合体化型、多重特異性型などを含む)が利用されている。米国又は欧州で販売認可を得た30を超える治療用抗体因子(以下を参照されたい:Reichert, mAbs 4:3, 413, May/Jun e 2012 (参照によりその全体が本明細書に含まれる))のうち、別個の技術を用いて製造された2つの二重特異性抗体(カツマキソマブ(Catumaxomab)及びブリナツモマブ(Blinatumomab))がヒトでの使用について承認された。それでもなお、優れて有効な抗体の開発が希求されている。

20

【発明の概要】**【0003】**

本発明はとりわけ多重特異性結合因子を提供し、前記は特定の標的と相互作用する結合部分を含む。多くの実施態様で、そのような結合部分は抗体構成要素であるか、又は抗体構成要素を含む。いくつかの実施態様では、本発明の多重特異性結合因子はヒト化抗体A33(本明細書ではhuA33と称される)の結合エレメントを含む。いくつかの実施態様では、本発明の多重特異性結合因子は、huA33を土台とする第一の結合部分及び有機又は無機化合物と相互作用する第二の結合部分を含む。そのような提供因子は、本明細書に記載するそのような構成要素を欠く親の結合因子と比較して改善された機能的特徴を有する。

30

特に、本発明は改善された多重特異性(例えば二重特異性)抗体因子を提供し、前記は、A33糖タンパク質及びベンジル-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸(DOTA-Bn)と結合する。ここで、前記多重特異性結合因子は、ヒト化抗体A33の1つ以上の構造的特徴(例えば1つ以上のCDR)及びモノクローナル抗体2D12.5の1つ以上の特徴(例えば1つ以上のCDR)を含む。いくつかの実施態様では、提供する多重特異性結合因子は、親抗体A33及び2D12.5と比較して高い腫瘍取り込み及び正常組織(例えば骨髄及び腎)に対し低毒性を示す。いくつかの実施態様では、提供する多重特異性結合因子は、A33陽性腫瘍の改善のために予備標的誘導されてある放射線免疫療法アプローチで用いるときは至適未満の腫瘍線量及び治療指數の欠陥を克服する。

40

いくつかの実施態様では、本発明は、ヒト化抗体A33(huA33)を土台とする第一の抗原結合部位及びモノクローナル抗体2D12.5を土台とする第二の抗原結合部位を含む二重特異性抗体を提供する。いくつかの実施態様では、2D12.5抗体はヒト化される。

いくつかの実施態様では、第一の抗原結合部位及び/又は第二の抗原結合部位は1つ又は複数のポリペプチド鎖であるか、又はポリペプチド鎖を含む。

【0004】

いくつかの実施態様では、1つ又は複数のポリペプチド鎖は、表8に記載される配列で見出される重鎖CDRを含む。いくつかのある種の実施態様では、重鎖CDRはヒト化A33抗体(h

50

uA33)で見出される。いくつかの実施態様では、1つ又は複数のポリペプチド鎖は、表8に記載される配列で見出される軽鎖CDRを含む。いくつかのある種の実施態様では、軽鎖CDRはヒト化A33抗体(huA33)で見出される。いくつかの実施態様では、1つ又は複数のポリペプチド鎖は、表8に記載の1つ以上の配列で見出される重鎖及び軽鎖CDRを含む。いくつかのある種の実施態様では、重鎖及び軽鎖CDRはヒト化A33抗体(huA33)で見出される。

いくつかの実施態様では、第一及び/又は第二の抗原結合部位は単鎖可変フラグメント(scFv)であるか、又は当該フラグメントを含む。いくつかの実施態様では、第一の抗原結合部位は免疫グロブリン分子から構成され、第二の抗原結合部位はscFv、scFab、Fab又はFvから構成される。いくつかの実施態様では、第二の抗原結合部位はscFvである。いくつかのある種の実施態様では、第二の抗原結合部位はC825 scFvである。いくつかの実施態様では、C825 scFvはヒト化される。いくつかの実施態様では、scFvは免疫グロブリン分子の重鎖のC-末端に連結される。いくつかの実施態様では、scFvは免疫グロブリン分子の軽鎖のC-末端に連結される。10

いくつかの実施態様では、本発明は二重特異性抗体を提供し、前記二重特異性抗体は、ヒト化抗体A33(huA33)を土台とする免疫グロブリン分子及びベンジル-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸(DOTA-Bn)と結合するscFvから構成され、ここで、scFvはC825を土台とし、huA33の軽鎖のC-末端に連結され、さらに当該二重特異性抗体は、生物に投与したとき免疫学的影響が限定的であることを特徴とする。

いくつかの実施態様では、免疫グロブリン分子はIgGである。いくつかの実施態様では、免疫グロブリン分子は非グリコシル化IgGである。いくつかの実施態様では、免疫グロブリン分子はK322A置換を有するIgGである。いくつかの実施態様では、免疫グロブリン分子はK322置換を有する非グリコシル化IgGである。20

【0005】

多様な実施態様では、本発明の二重特異性抗体は、配列番号:2、配列番号:3又は配列番号:4を含む。多様な実施態様では、本発明の二重特異性抗体は配列番号:6又は配列番号:7を含む。多様な実施態様では、本発明の二重特異性抗体は、配列番号:2、配列番号:3又は配列番号:4を含み、さらに配列番号:6又は配列番号:7を含む。

多様な実施態様では、本発明の二重特異性抗体は、配列番号:2及び配列番号:6、配列番号:2及び配列番号:7、配列番号:3及び配列番号:6、配列番号:3及び配列番号:7、配列番号:4及び配列番号:6、又は配列番号:4及び配列番号:7を含む。30

いくつかの実施態様では、本発明は単離された核酸を提供し、前記は、本明細書に記載する二重特異性抗体のポリペプチド鎖の部分又は全部のためのコード配列を含む。いくつかのある種の実施態様では、コード配列はコドン最適化される。

いくつかの実施態様では、本発明は発現ベクターを提供し、前記は本明細書に記載する核酸分子を含む。

いくつかの実施態様では、本発明は宿主細胞を提供し、前記は本明細書に記載する宿主細胞を含む。

いくつかの実施態様では、本発明は本明細書に記載する二重特異性抗体を作製する方法を提供し、前記方法は、二重特異性抗体の発現を可能にする条件下に培養培地で本明細書に記載する宿主細胞を培養する工程、及び当該培養培地から当該二重特異性抗体を分離する工程を含む。40

いくつかの実施態様では、本発明は本明細書に記載する二重特異性抗体を含む組成物を提供する。

いくつかの実施態様では、本発明は、本明細書に記載する組成物又は本明細書に記載する二重特異性抗体を含む、医薬組成物を提供する。

いくつかの実施態様では、本発明は、癌の治療又は診断のための、本明細書に記載する医薬組成物又は本明細書に記載する組成物の使用を提供する。

いくつかの実施態様では、本発明は、A33発現に関連する症状の治療又は検出のための、本明細書に記載する二重特異性抗体、組成物又は医薬組成物の使用を提供する。

【0006】

いくつかの実施態様では、本発明は、本明細書に記載する二重特異性抗体を含むキットを提供する。

いくつかの実施態様では、本発明は、医療で使用される医薬の製造における本明細書に記載する二重特異性抗体の使用を提供する。

いくつかの実施態様では、本発明は、診断検査又はアッセイで使用される医薬の製造における本明細書に記載する二重特異性抗体の使用を提供する。

いくつかの実施態様では、本発明は、癌の診断用医薬の製造における本明細書に記載する二重特異性抗体の使用を提供する。

いくつかの実施態様では、本発明は、癌の治療用医薬の製造における本明細書に記載する二重特異性抗体の使用を提供する。 10

いくつかの実施態様では、本発明は、結腸直腸癌、胃癌又は膵臓癌の治療用医薬の製造における本明細書に記載する二重特異性抗体の使用を提供する。

いくつかの実施態様では、本発明は、対象動物で医学的症状を治療する方法を提供し(ここで当該医学的症状はA33発現を特徴とする)、前記方法は、前記対象動物に本明細書に記載する二重特異性抗体の治療的に有効な量を投与する工程を含む。いくつかの実施態様では、医学的症状にはA33陽性腫瘍が含まれる。いくつかのある種の実施態様では、医学的症状は、結腸直腸癌、胃癌又は膵臓癌である。

いくつかの実施態様では、本発明は腫瘍細胞を殺滅する方法を提供する。前記方法は、腫瘍細胞を二重特異性抗体と接触させる工程を含み、当該二重特異性抗体は、ヒト化抗体A33(huA33)を土台とする第一の抗原結合部位及びベンジル-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸(DOTA-Bn)と結合する第二の抗原結合部位から構成され、当該接触は、腫瘍細胞の殺滅が観察される条件及び十分な時間で実施される。 20

【0007】

いくつかの実施態様では、本発明は腫瘍増殖を阻害する方法を提供し、前記方法は、腫瘍細胞を二重特異性抗体と接触させる工程を含み、当該二重特異性抗体は、ヒト化抗体A33を土台とする第一の抗原結合部位及びベンジル-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸(DOTA)と結合する第二の抗原結合部位から構成され、当該接触は、毒物と複合体化したDOTA-Bnが腫瘍細胞を殺滅する最後の工程を可能にするために非結合(結合していない)二重特異性抗体が血液から除去されるに十分な条件及び時間で実施される。 30

いくつかの実施態様では、接触工程は、本明細書に記載する二重特異性抗体を生物に投与する工程を含み、さらに当該投与は未結合二重特異性抗体が血液から除去されるように実施される。いくつかの実施態様では、投与工程は、ペイロードと複合体化したDOTA-Bnを含む抱合体と併用して本明細書に記載する二重特異性抗体を投与する工程を含み、当該投与は、当該ペイロードが腫瘍細胞にデリバリーされるように実施される。いくつかの実施態様では、投与は、腫瘍細胞が本明細書に記載する二重特異性抗体で実質的に飽和されるように実施される。いくつかの実施態様では、投与は、抱合体の投与前に本明細書に記載する二重特異性抗体によって腫瘍細胞が実質的に飽和されるように実施される。いくつかの実施態様では、投与は併用レジメンにしたがって実施され、前記併用レジメンは、当該抱合体が单一工程単独療法として投与される参照レジメンで観察される治療指數よりも少なくとも10倍良好な抱合体の治療指數を特徴とする。 40

いくつかの実施態様では、投与は1サイクル以上を含むレジメンによる。いくつかの実施態様では、投与は、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10サイクル又は11サイクル以上を含むレジメンによる。

いくつかの実施態様では、投与は、二重特異性抗体が投与される第一の投与工程、抱合体が投与される第二の投与工程、及び同じ抱合体又はペイロードと複合体化された異なるDOTA-Bn抱合体が投与される少なくとも1回の第三の投与工程の1サイクル以上を含むレジメンによる。いくつかの実施態様では、第一の工程は、腫瘍細胞が二重特異性抗体で実質的に飽和されるように実施される。いくつかの実施態様では、第一の投与工程は、第二の投与工程の前及び一切の第三の投与工程の前に実施され、二重特異性抗体の更なる投与は 50

当該サイクル内では実施されない。いくつかのある種の実施態様では、第一のサイクルの後のサイクルは二重特異性抗体の投与を全く含まない。いくつかの実施態様では、投与は数時間から数日の期間にわたって実施される。

【0008】

いくつかの実施態様では、抱合体は数分にわたって投与される。

いくつかの実施態様では、第二の抗原結合部位はモノクローナル抗体2D12.5を土台にする。いくつかの実施態様では、第二の抗原結合部位はヒト化2D12.5を土台にする。

いくつかの実施態様では、本発明は、A33陽性癌を対象動物で治療又は診断する方法を提供する。前記方法は、本明細書に記載する二重特異性抗体を対象動物に投与する工程を含み、当該投与は、A33抗原を発現する1つ以上の腫瘍に当該二重特異性抗体を局在させる条件及び十分な時間で実施され、その後で除去剤を当該対象動物に投与し(ここで当該除去剤は未結合二重特異性抗体を除去する)、続いて放射能標識DOTA-Bnを当該対象動物に投与する。いくつかのある種の実施態様では、前記方法はさらに当該二重特異性抗体を再度当該対象動物に投与する工程を含む。10

いくつかの実施態様では、二重特異性抗体を対象動物に再度投与する工程は、除去剤の投与後に実施される。いくつかの実施態様では、二重特異性抗体を対象動物に再度投与する工程の後に、除去剤の対象動物への再度の投与が続く。

いくつかの実施態様では、本明細書に記載する治療方法は、正常組織に放射線障害を実質的にもたらさない。いくつかの実施態様では、本明細書に記載する治療方法は、10倍を超える治療指數の増加をもたらす。いくつかの実施態様では、本明細書に記載する治療方法は治癒効果を有する。20

多くの実施態様で、除去剤はデキストラン系除去剤である。多くの実施態様で、放射能標識DOTAは¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn、⁹⁰Y-DOTA-Bn又は⁸⁶Y-DOTA-Bnである。

いくつかの実施態様では、ペイロードは有毒ペイロードである。いくつかの実施態様では、ペイロードは生物学的応答の変換物質である。いくつかの実施態様では、ペイロードは、検出可能部分及び活性部分から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、ペイロードは、放射性同位元素、ペプチド、核酸、小分子、ナノ粒子、ウイルス及び前記の組み合わせから成る群から選択される群であるか、又は前記群を含む。

以下の図から構成される、本明細書に含まれる図面は単に例示のためであり、限定を意図しない。30

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】SE-HPLCクロマトグラフィー(UV 280nm)によるhuA33-C825の生化学的純度のin vitro評価を示す。7.583分の主要ピークは、約210kDaの分子量を有する完全なペアを有する二重特異性抗体である。

【図2】ヒトA33抗原(A)及びBSA-(Y)-DOTA-Bn(B)と結合する抗体の例示的ビアコア(Biacore)のセンサーグラムを示す。

【図3 A - B】以下の例示的な活性を示す：(A)種々の用量の除去剤(CA)及びコントロール(生理食塩水)における腫瘍及び多様な正常組織に対するルテチウム-177の活性。活性は、組織1グラム当たりのパーセント注射用量(%/ID/g)として表される。(B)多様な濃度のCAにおけるルテチウム-177の活性。活性は、組織1グラム当たりのパーセント注射用量(%/ID/g)として表される。腫瘍では数時間に及ぶ滞留延長があり、他の組織では除去は迅速である。40

【図3 C - D】以下の例示的な活性を示す：(C)多様な濃度のCAにおける腫瘍対器官比。(D)注射後の時間に対するルテチウム-177の活性。活性は、組織1グラム当たりのパーセント注射用量(%/ID/g)として表される。腫瘍では数時間に及ぶ滞留延長があり、他の組織では除去は迅速である。

【図4 A - B】ヒト結腸癌異種移植片(SW1222)を保持するマウスの処置で放射能の関数として注射後24時間における¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの例示的な腫瘍取り込みを示す。(A)多様な組織における¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの取り込み量；(B)SW1222腫瘍における¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの取50

り込み量；飽和は約40MBqの注射活性後に達成される。

【図4 C - D】ヒト結腸癌異種移植片(SW1222)を保持するマウスの処置で放射能の関数として注射後24時間における¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの例示的な腫瘍取り込みを示す。(C)¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn注射量当たりの注射24時間後のSW1222腫瘍及び腎における¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの活性；(D)¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn注射量当たりの注射24時間後の結合¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnピコモル。飽和は約40MBqの注射活性後に達成される。

【図5】単一サイクルのPRITを受けたマウスグループの例示的な腫瘍増殖の測定値(mm^3)を示す。(A)コントロール(無処置、n=8)；(B)0.9mCi(33.3MBq；1mCi=37MBq)¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnのみ(n=6)；(C)huA33-C825+0.3mCi¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn(n=8)；(D)huA33-C825+0.9mCi¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn(n=8)。コントロール及び処置(huA33-C825)SW122腫瘍は、SW1222腫瘍の増殖パターンは一回分用量の放射能では(たとえ用量が増加しても)最小限の影響しか受けないことを示す。最高用量(0.9mCi)はいくらかの影響を示す。矢印は¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnが投与された日を表示する。huA33-C825の用量はt=-24時間、続いてデキストラン-除去剤がt=-4時間、さらに¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnはt=0時間で投与された。10

【図6】二サイクルのPRITを受けたマウスの例示的な腫瘍増殖測定値(mm^3)を示す。(A)2×huA33-C825 PRIT+11.1MBq(合計22.2MBq)；(B)2×huA33-C825 PRIT+33.3MBq(合計66.6MBq)；(C)2×huA33-C825 PRIT+55.5MBq(合計111MBq)；(D)1×huA33-C825 PRIT+111MBq(合計111MBq)。腫瘍接種後10日及び17日に実施した二サイクルPRITに関しては、全用量レベルで顕著な応答があり、完全応答が用量依存様で観察された。図6C(2×huA33-C825 PRIT+55.5MBq(合計111MBq))では、全ての腫瘍が処置に応答した。20
毒性は、少なくとも週に3回の重量及び全体的外観のモニタリングとともに、比較病理学M SKCC Labによる肝、腎、脾及び骨髄の組織病理学的評価によって決定した。これらマウスで検出可能な毒性はなかった。

【図7】SW1222結腸癌腫瘍を保持するヌードマウスによるDOTA-PRITマルチサイクル療法の例示的な腫瘍応答曲線の要旨を示す。3通りの治療肢が示されている：無処置(三角)；¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnのみ(四角)；及び55MBqの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnによる3サイクルのDOTA-PRIT処置(合計165MBqの投与活性(丸)、各処置はx軸の下の矢印で示される)。

【図8】例示的な最大強度のnanoSPECT/CT画像及び時間経過時の腫瘍における活性濃度を示す。画像は、抗GPA33 PRIT+55MBqの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの単一サイクルで処置したSW1222担癌ヌードマウスから収集し、¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの注射後1、24及び160時間にnanoSPECT/CTによって画像化された。脇腹の下部領域(腫瘍が局在する)の最大強度のnanoSPECT/CT画像が示されている。腫瘍の活性濃度は調整画像の問題領域分析によって決定した。30

【発明を実施するための形態】

【0010】

定義

本発明の範囲は本明細書に添付された特許請求の範囲によって規定され、本明細書に記載する具体的な実施態様によって制限されない。当業者は、本開示を熟読して、当該記載の実施態様と等価であるか或いはまた本発明の範囲内にあり得る多様な改変に気付くであろう。

一般的には、本明細書で用いられる用語は、特段の指示がなければ当業界で理解されるその意味にしたがう。ある種の用語の明確な定義が下記で提供され、本明細書の具体的な事例におけるこれらの用語及び他の用語の意味は文脈から当業者には明白であろう。

本明細書に引用した参考文献又はその関連部分は参考により本明細書に含まれる。

本発明をより容易に理解できるように、最初にある種の用語を下記に規定する。下記の用語及び他の用語について追加される規定は本明細書を通して示される。

“親和性”：当業界で知られているように、“親和性”は特定のリガンドがそのパートナーと結合する緊密性の量である。親和性は種々の方法で測定できる。いくつかの実施態様では、親和性は定量的アッセイで測定される。いくつかのそのような実施態様では、結合パートナーの濃度をリガンド濃度より過剰であるように固定して、生理学的条件を模倣することができる。また別には或いは前記に付け加えれば、いくつかの実施態様では、結4050

合パートナー濃度及び/又はリガンド濃度を変動させることができる。いくつかのそのような実施態様では、親和性は比較可能な条件（例えば濃度）下で参照と比較することができる。

本明細書で用いられる“親和性成熟”（又は“親和性成熟抗体”）は、その1つ以上のCDRに1つ以上の改変を有する抗体を指し、前記改変は、それらの改変を持たない親抗体と比較して当該抗体の抗原に対する親和性の改善をもたらす。いくつかの実施態様では、親和性成熟抗体は標的抗原に対してナノモル親和性、場合によってはピコモル親和性すら有するであろう。親和性成熟抗体は、当業界で公知の多様な手順のいずれかによって作製できる。Marksら（Marks et al., 1992, BioTechnology 10:779-783）はV_H及びV_Lドメインシャフリングによる親和性成熟を記載している。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダム変異導入は以下に記載されている：Barbas et al., 1994, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A 91:3809-3813；Schier et al., 1995, Gene 169: 147-155；Yelton et al., 1995, J. Immunol. 155: 1994-2004；Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9；及びHawkins et al., 1992, J. Mol. Biol. 226:889-896。10

【0011】

本明細書で用いられる“改善”は、ある状態の予防、軽減若しくは緩和、又はある対象動物の状態の改善を指す。改善は、疾患、異常又は症状（例えば放射線損傷）の完全な回復又は完全な予防を含むが、必然ではない。

本明細書で用いられる“動物”は動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの実施態様では、“動物”は、任意の性別及び任意の発育段階のヒトを指す。いくつかの実施態様では、“動物”は、任意の発育段階の非ヒト動物を指す。ある種の実施態様では、非ヒト動物は哺乳動物である（例えばげっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長動物、及び/又はブタ）。いくつかの実施態様では、動物には哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫、及び/又は蠕虫が含まれるが、ただしこれらに限定されない。ある種の実施態様では、動物はDVによる感染に感受性である。いくつかの実施態様では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝的に操作された動物、及び/又はクローンでもよい。20

本明細書で用いられる“抗体”は当該分野で理解されている意味を有し、特定の抗原と特異的に結合する免疫グロブリン（Ig）を指す。当業者には公知のように、天然に生じる抗体は典型的には4つのポリペプチド鎖、2つの重（H）鎖及び2つの軽（L）鎖から構成される。各重鎖及び軽鎖は可変領域（本明細書ではHCVR又はV_H及びLCVR又はV_Lと略される）及び定常領域から構成される。重鎖の定常領域はC_H1、C_H2及びC_H3ドメイン（並びにIgM及びIgEの事例では場合によってC_H4ドメイン）を含む。軽鎖の定常領域は1つのドメイン（C_L）から構成される。V_H及びV_L領域はさらに相補性決定領域（CDR）と称される超可変性の領域を含み、前記CDRには、フレームワーク領域（FR）と称されるより保存的な領域が点在する。各V_H及びV_Lは3つのCDR及び4つのFRから構成され、それらは、アミノ末端からカルボキシ末端に向けて以下の順序で配置される（FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4）。免疫グロブリン分子は任意のタイプ（例えばIgM、IgD、IgG、IgA及びIgE）、任意のクラス（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）又は任意のサブクラスであり得る。3040

【0012】

抗体因子：本明細書で用いられるように、“抗体因子”という用語は特定の抗原と特異的に結合する因子を指す。いくつかの実施態様では、当該用語は、特異的な結合を付与するために十分な免疫グロブリンの構造エレメントを有する任意のポリペプチドを包含する。多様な実施態様では、適切な抗体因子には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、霊長動物化抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、二重特異性若しくは多重特異性抗体、単一ドメイン抗体（例えばサメ単一ドメイン抗体（例えばIgNAR又はそのフラグメント）、複合体化抗体（すなわち他のタンパク質、放射能標識、細胞毒と複合体化又は融合された抗体）、小モジュール型免疫医薬（Small Modular ImmunoPharmaceuticals（“SMIP™”））、单鎖抗体、類ラクダ抗体、抗体フラグメントなどが含まれるが、ただしこ

れらに限定されない。いくつかの実施態様では、当該用語はステープルペプチドを指すことができる。いくつかの実施態様では、当該用語は抗体様結合ペプチド模倣体を指すことができる。いくつかの実施態様では、当該用語は抗体様結合足場タンパク質を指すことができる。多くの実施態様で、抗体因子は、当業者が相補性決定領域（CDR）と認識する1つ以上の構造エレメントをそのアミノ酸配列が含むポリペプチドであるか、又はそのようなポリペプチドを含む。いくつかの実施態様では、抗体因子は、そのアミノ酸配列が少なくとも1つのCDR（例えば少なくとも1つの重鎖CDR及び/又は少なくとも1つの軽鎖CDR）（参照抗体で見出されるものと実質的に同一である）を含むポリペプチドであるか又はそのようなポリペプチドを含む。いくつかの実施態様では、含まれるCDRは参照CDRと実質的に同一であり、すなわち、当該CDRは参照CDRと比較して配列が同一であるか、又は1から5アミノ酸置換を含む。いくつかの実施態様では、含まれるCDRは参照CDRと実質的に同一であり、すなわち、当該CDRは、参照CDRと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%配列同一性を示す。いくつかの実施態様では、含まれるCDRは参照CDRと実質的に同一であり、すなわち、当該CDRは、参照CDRと少なくとも96%、97%、98%、99%又は100%配列同一性を示す。いくつかの実施態様では、含まれるCDRは参照CDRと実質的に同一であり、すなわち、含まれるCDR内の少なくとも1つのアミノ酸は参照CDRと比較して欠失されるか付加されるか又は置換されるが、それ以外では当該CDRは当該参照CDRのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、含まれるCDRは参照CDRと実質的に同一であり、すなわち、含まれるCDR内の1から5アミノ酸が参照CDRと比較して欠失されるか付加されるか又は置換されるが、それ以外では当該含まれるCDRは参照CDRと同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様では、含まれるCDRは参照CDRと実質的に同一であり、すなわち、当該含まれるCDR内の少なくとも1つのアミノ酸は参照CDRと比較して置換されるが、それ以外では当該含まれるCDRは参照CDRのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、含まれるCDRは参照CDRと実質的に同一であり、すなわち、当該含まれるCDR内の1から5アミノ酸は、参照CDRと比較して欠失され付加され又は置換されるが、それ以外では当該含まれるCDRは参照CDRと同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、抗体因子は、当業者が免疫グロブリン可変ドメインと認識する1つ以上の構造エレメントをそのアミノ酸配列が含むポリペプチドであるか、又はそのようなポリペプチドを含む。いくつかの実施態様では、抗体因子は結合ドメインを有するポリペプチドであって、前記結合ドメインは、免疫グロブリン結合ドメインと相同であるか又は大部分が相同である。いくつかの実施態様では、抗体因子は、1つの又は複数の特定の参照抗体鎖（例えば重鎖及び/又は軽鎖）で見出される全てのCDRを含むポリペプチドであるか、またはそのようなポリペプチドを含む。

【 0 0 1 3 】

本明細書で用いられる“抗体構成要素”は、エピトープ又は抗原と特異的に結合し、かつ1つ以上の免疫グロブリンの構造的特徴物を含むポリペプチドエレメントを指す（前記エレメントは完全なポリペプチドでもより大きなポリペプチド（例えば本明細書に記載の融合ポリペプチド）の部分でもよい）。一般的には、抗体構成要素は、そのアミノ酸配列が抗体の結合領域に特徴的なエレメントを含む任意のポリペプチドである（前記領域は、例えば抗体の軽鎖若しくは可変領域若しくは前記の1つ以上の相補性決定領域（“CDR”）、又は抗体の重鎖若しくは可変領域若しくは前記の1つ以上のCDR（場合によって1つ以上のフレームワーク領域を含む））。いくつかの実施態様では、抗体構成要素は、完全長抗体であるか又は完全長抗体を含む。いくつかの実施態様では、抗体構成要素は完全長未満であるが、少なくとも1つの結合部位を含む（当該結合部位は、抗体“可変領域”として知られる構造を有する少なくとも1つの（好ましくは少なくとも2つの）配列を含む）。いくつかの実施態様では、“抗体構成要素”という用語は、結合ドメインを有する任意のタンパク質を包含し、前記タンパク質は免疫グロブリン結合ドメインと相同であるか又は大部分が相同である。具体的な実施態様では、含まれる“抗体構成要素”は、免疫グロブリ

10

20

30

40

50

ン結合ドメインと少なくとも99%同一性を示す結合ドメインを有するポリペプチドを包含する。いくつかの実施態様では、含まれる“抗体構成要素”は、免疫グロブリン結合ドメイン（例えば参照免疫グロブリン結合ドメイン）と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%又は98%同一性を示す結合ドメインを有する任意のポリペプチドである。含まれる“抗体構成要素”は、天然の供給源で見出される抗体（その部分、例えばその抗原結合部分）のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有し得る。抗体構成要素は、一特異性、二重特異性又は多重特異性であり得る。抗体構成要素は、任意の免疫グロブリンクラス（ヒトのクラスのいずれか（IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE）を含む）に特徴的な構造エレメントを含むことができる。抗体の抗原結合機能は完全長抗体のフラグメントによって実行され得ることが示されている。そのような抗体の実施例はまた、2つ以上の異なる抗原と特異的に結合する双特異性、二重特異性、又は多重特異性様式であり得る。抗体の“抗原結合部分”という用語に包含される結合フラグメントの例には以下が含まれる：(i) Fabフラグメント、V_H、V_L、C_H1及びC_Lドメインから成る一価フラグメント；(ii) F(ab')₂フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結される2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント；(iii) V_H及びC_H1ドメインから成るFdフラグメント；(iv) 抗体の单一アームのV_H及びV_Lドメインから成るFvフラグメント；(v) dAbフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341 :544-546）、前記はただ1つの可変ドメインを含む；及び(vi) 单離された相補性決定領域（CDR）。さらにまた、Fvフラグメントの2つのドメイン（V_H及びV_L）は別々の遺伝子によってコードされるが、組換え方法を用いて、或いはV_H及びV_L領域が対を形成して一価分子（单鎖Fv（scFv））として公知（例えば以下を参照されたい：Bird et al., 1988, Science 242:423-426；及びHuston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883））を形成する單一タンパク質鎖にし得る合成リンカーによって、前記2つのドメインを結合させることができる。いくつかの実施態様では、本明細書に記載する“抗体構成要素”はそのような单鎖抗体であるか、又はそのような单鎖抗体を含む。いくつかの実施態様では、“抗体構成要素”はジアボディであるか、又はジアボディを含む。ジアボディは二価の二重特異性抗体であり、前記では、V_H及びV_Lドメインはただ1つのポリペプチド鎖として発現されるが、同じ鎖上のこの2つのドメインの間で対を形成できないほど短いリンカーが用いられ、したがってこれらドメインは別の鎖の相補性ドメインと対を形成しなければならず2つの抗原結合部位を生じる（例えば以下を参照されたい：Holliger, P., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448；Poljak, R. J., 1994, Structure 2(12):1121-1123）。そのような抗体結合部分は当業界で公知である（Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp., ISBN 3-540-41354-5）。いくつかの実施態様では、抗体は单鎖“直鎖状抗体”であるか又はそのような抗体を含む。前記直鎖状抗体は、1対の縦に並ぶFvセグメント（V_H-C_H1-V_H-C_H1）を含み、前記は、相補性軽鎖ポリペプチドと一緒にになって1対の抗原結合領域を形成する（Zapata et al., 1995, Protein Eng. 8(10): 1057-1062；及び米国特許5,641,870号）。いくつかの実施態様では、抗体構成要素はキメラ又はヒト化抗体の特徴を有する構造エレメントを有することができる。一般的には、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）が、所望の特異性、親和性及び性能を有する非ヒト種（例えばマウス、ラット又はウサギ、ドナー抗体）のCDR由来の残基によって置き換えられるヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの実施態様では、抗体構成要素はヒト抗体の特徴を有する構造エレメントを有することができる。

【0014】

本明細書で用いられる“生物学的活性”は、問題の因子又は実体によって達成される観察可能な生物学的作用又は成果を指す。例えば、いくつかの実施態様では、特異的な結合相互作用は生物学的活性である。いくつかの実施態様では、生物学的経路又は事象の調整（例えば誘発、強化又は阻害）は生物学的活性である。いくつかの実施態様では、生物学的活性の存在又は程度は、問題の生物学的経路又は事象によって生じる直接生成物又は間接生成物の検出により査定される。

本明細書で用いられる“二重特異性抗体”は二重特異性結合因子を指し、前記結合因子

10

20

30

40

50

では、結合部分の少なくとも一方（典型的には両方）が抗体構成要素であるか、又は抗体構成要素を含む。多様な異なる二重特異性抗体構造物が当業界では公知である。いくつかの実施態様では、抗体構成要素であるか又は抗体構成要素を含む二重特異性抗体の各結合部分は V_H 及び/又は V_L 領域を含み、いくつかのそのような実施態様では、 V_H 及び/又は V_L 領域は個々のモノクローナル抗体で見出されるものである。二重特異性抗体が2つの抗体構成要素の結合部分を含む、いくつかの実施態様では、各抗体構成要素は異なるモノクローナル抗体に由来する V_H 及び/又は V_L 領域を含む。二重特異性抗体が2つの抗体構成要素の結合部分を含む、いくつかの実施態様では、当該2つの抗体構成要素の結合部分の1つは、第一のモノクローナル抗体由来のCDRを含む V_H 及び/又は V_L 領域を有する免疫グロブリン分子を含み、さらに当該2つの抗体構成要素の結合部分の1つは、第二のモノクローナル抗体由来のCDRを含む V_H 及び/又は V_L 領域を有する抗体フラグメント（例えば $F(ab')$ 、 $F(ab')_2$ 、 Fd 、 Fv 、 dAB 、 $scFv$ など）を含む。10

本明細書で用いられる“二重特異性結合因子”は、2つの分離した結合部分を有し、その各々が別個の標的と結合するポリペプチドを指す。いくつかの実施態様では、二重特異性結合因子はただ1つのポリペプチドであるか又はただ1つのポリペプチドを含み、いくつかの実施態様では、二重特異性結合因子は複数のペプチドであるか又は複数のペプチドを含み、いくつかのそのような実施態様では、前記は、例えば架橋によって互いに共有結合により結合され得る。いくつかの実施態様では、二重特異性結合因子の2つの結合部分は同じ標的（例えば抗原）の異なる部位（例えばエピトープ）を認識し、いくつかの実施態様では、それらは異なる標的を認識する。いくつかの実施態様では、二重特異性結合因子は、異なる構造の2つの標的と同時に結合することができる。20

【0015】

本明細書で用いられる“担体”はアジュバント、賦形剤又はビヒクルを指し、前記と一緒に組成物が投与される。いくつかの例示的な実施態様では、担体は無菌的液体、例えば水及び油を含むことができ、石油、動物、植物又は合成起源の油、例えば落花生油、大豆油、鉱物油、ゴマ油などが含まれる。いくつかの実施態様では、担体は1つ以上の固体成分であるか又は1つ以上の固体成分を含む。

本明細書で用いられる“CDR”は抗体可変領域内の相補性決定領域を指す。重鎖及び軽鎖の可変領域の各々には3つのCDRが存在し、それらは可変領域の各々についてCDR1、CDR2及びCDR3と称される。“CDRのセット”又は“CDRセット”は、抗原と結合できるただ1つの可変領域又は抗原と結合できる同族の重鎖及び軽鎖可変領域に存在する3つ又は6つのCDR群を指す。CDR境界を規定するある種の系が当業界で確立されている（例えばKabat、Chothiaなど）。当業者はこれらの系の相違を理解し、かつ本発明を理解し実行するために必要な程度にCDR境界を理解することができよう。30

本明細書で用いられる“CDR移植抗体”は、そのアミノ酸配列が1つの種に由来する重鎖及び軽鎖可変領域配列を含むが、 V_H 及び/又は V_L の1つ以上のCDR領域の配列が別の種のCDR配列で置き換えられる抗体、例えば1つ以上のネズミCDR（例えばCDR3）がヒトCDR配列で置き換えてあるネズミ V_H 及び/又は V_L 領域を有する抗体を指す。同様に、“CDR移植抗体”はまた、1つ以上のヒトCDR（例えばCDR3）がマウスCDR配列で置き換えてあるヒト V_H 及び V_L 領域を有する抗体を指すことができる。40

本明細書で用いられる“キメラ抗体”は、そのアミノ酸配列が、第一の種で見出される V_H 及び V_L 領域配列及び第二の種（第一の種とは異なる）で見出される定常領域配列を含む抗体を指す。多くの実施態様で、キメラ抗体は、ヒト定常領域に連結されたネズミ V_H 及び V_L 領域を有する。いくつかの実施態様では、非ヒト定常領域（例えばマウス定常領域）に連結されたヒト V_H 及び V_L 領域を有する抗体は“逆キメラ抗体”と称される。

【0016】

“併用療法”：本明細書で用いられるように、“併用療法”という用語は、対象動物が2つ以上の治療レジメン（例えば2つ以上の治療因子）に同時に暴露される状況を指す。いくつかの実施態様では、そのような因子は連続的に投与できる。いくつかの実施態様では、そのような因子は重なり合う投与レジメンで投与される。50

本明細書で用いられる“匹敵する”は、互いに同一ではないが十分に類似し比較が許容され、したがって観察される相違又は類似性に基づいて結論を合理的に引き出すことができる、2つ以上の因子、実体、状況、条件セットを指す。2つ以上のそのような因子、実体、状況、条件セットなどが匹敵すると考えられるためには、どの程度の同一性が任意の与えられた環境下で必要かは当業者には文脈から理解されよう。

本明細書で用いられる“～と対応する”は、問題のポリペプチド内のアミノ酸残基の位置/同一性を示す。簡潔性のために、ポリペプチド内の残基はしばしば参照と関連するポリペプチドを基準にする標準的番号付与系を用いて示され、したがって、ある具体的なアミノ酸鎖で例えば190位の残基に“対応する”アミノ酸は実際に190位のアミノ酸である必要はないが、参照ポリペプチドで190位に見出される残基と対応することは当業者には理解されよう(“対応する”アミノ酸をどのように同定するかは当業者には容易に理解されよう)。

本明細書で用いられる“検出因子”は、例えば部分又は作用因子の特異的な構造的及び/又は化学的特徴、及び/又はそれらの機能的特性のために検出を容易にする当該部分又は作用因子を指す。そのような因子の非限定的な例には、酵素、放射能標識、ハプテン、蛍光標識、熒光性分子、化学発光性分子、発色団、発光性分子、光親和性分子、着色粒子又はリガンド(例えばビオチン)が含まれる。多くの検出因子が、抗体とのそれらの結合のための系のように当業界では公知である(例えば米国特許5,021,236号、4,938,948号及び4,472,509を参照されたい(前記の各々は参考により本明細書に含まれる))。具体的な例には、とりわけ常磁性イオン、放射性同位元素、蛍光色素、NMR検出性物質、X線画像化剤が含まれる。本発明のいくつかの実施態様では、複合体化検出因子は診断剤又は画像化剤である。

【0017】

“投薬形”及び“ユニット投薬形”：本明細書で用いられるように、“投薬形”という用語は、対象動物(例えば人間の患者)を処置するために物理的に分離した治療因子ユニットを指す。各ユニットは、該当する集団に適切な投与レジメンにしたがって投与されたときに、所望の治療効果を生じるように計算された又は明らかになった予め定められた量の活性物質を含む。例えばいくつかの実施態様では、そのような量は、該当する集団(すなわち治療的投与レジメンを有する)に投与されたとき所望の又は有益な成果と相関性があると決定された投与レジメンで投与に適したユニット投薬量である。しかしながら、任意の個々の患者に投与される合計投薬量は、慎重な医学的判断の範囲内で医学の専門家(例えば医師)によって選択されることは理解されよう。

本明細書で用いられる“投与レジメン”(又は“治療レジメン”)は、対象動物にそれぞれ、典型的には期間を空けて(典型的には2回以上)投与される一組のユニット用量である。いくつかの実施態様では、与えられる治療因子は推奨される投与レジメンを有し、前記は1回以上の用量を含むことができる。いくつかの実施態様では、投与レジメンは複数回の用量を含み、その各々は同じ長さの期間によって互に離されている。いくつかの実施態様では、投与レジメンは複数回の用量を含み、少なくとも2つの異なる期間によってそれぞれの用量は離されている。いくつかの実施態様では、治療因子は予め定めた期間にわたって持続的に(例えば輸液によって)投与される。いくつかの実施態様では、治療因子は1日に1回(QD)又は1日に2回(BID)投与される。いくつかの実施態様では、投与レジメンは複数回の用量を含み、用量の各々は同じ長さの期間によって互に離されている。いくつかの実施態様では、投与レジメンは複数回の用量を含み、各々の用量は少なくとも2つの異なる期間によって離されている。いくつかの実施態様では、投与レジメン中の全ての用量が同じユニット用量の量である。いくつかの実施態様では、投与レジメン中の別個の用量は量が異なる。いくつかの実施態様では、投与レジメンは、第一の用量量での第一の用量、続いて第一の用量量と異なる第二の用量量での1回以上の追加の用量を含む。いくつかの実施態様では、投与レジメンは、第一の用量量での第一の用量、続いて第一の用量量と同じ第二の用量量での1回以上の追加の用量を含む。いくつかの実施態様では、投与レジメンは、該当する集団に対して投与されるとき(すなわち治療的投与レジメンで

10

20

30

40

50

あるとき)所望の又は有益な成果と相関性がある。

【0018】

本明細書で用いられる“エフェクター機能”は、抗体のFc領域とFc受容体又はリガンドとの相互作用から生じる生化学的事象を指す。エフェクター機能には、抗体依存細胞媒介細胞傷害(ADCC)、抗体依存細胞媒介食作用(ADCP)、及び補体媒介細胞傷害(CMC)が含まれるが、ただしこれらに限定されない。いくつかの実施態様では、エフェクター機能は、抗原の結合後に作動するもの、抗原結合とは別個に作動するもの、またはその両方である。

本明細書で用いられる“エフェクター細胞”は、1つ以上のFc受容体を発現し、1つ以上のエフェクター機能を媒介する免疫系の細胞を指す。いくつかの実施態様では、エフェクター細胞には単球、マクロファージ、好中球、樹状突起細胞、好酸球、肥満細胞、血小板、大リンパ球系顆粒球、ラングルハンス細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、Tリンパ球、Bリンパ球(ただしこれらに限定されない)の1つ以上が含まれ、前記は任意の生物(ヒト、マウス、ラット、ウサギ及びサルを含む)に由来し得る。10

本明細書で用いられる“操作された”は、人為的に操作されてあるという特徴を指す。例えば、いくつかの実施態様では、自然界の秩序では一緒に連結されていない2つ以上のポリヌクレオチド配列が人為的に操作されて操作ヌクレオチドとして互いに直接的に連結されるとき、ポリヌクレオチドは“操作された”と考えることができる。いくつかのそのような具体的な実施例では、操作されたポリヌクレオチドは調節配列を含むことができる。前記調節配列は、自然界では第一のコード配列と作動的関係で見出されるが、第二のコード配列とは作動的関係ではなく人為的に連結され、したがって、第二のコード配列と作動的関係にある。また別に或いは付け加えれば、いくつかの実施態様では、第一及び第二の核酸配列(各々は、自然界では互に連結されていないポリペプチドエレメント又はドメインをコードする)は、単一の操作されたポリヌクレオチドとして互いに連結され得る。同様に、いくつかの実施態様では、細胞又は生物が操作されてその遺伝的情報が改変される場合(例えば、以前には存在しない新規な遺伝物質が導入され、又は以前に存在した遺伝物質が改変又は除去される場合)、細胞又は生物は“操作された”と考えることができる。一般的慣行であり当業者にも理解されるように、操作されたポリヌクレオチド又は細胞の子孫は、たとえ実際の操作が以前の実体に対して実施されたとしても典型的にはなお“操作された”と言われる。さらにまた、当業者には理解されようが、本明細書に記載の“操作”を達成することができる多様な方法が利用可能である。例えば、いくつかの実施態様では、“操作”は、分析又は比較を実施する、或いはまた配列、改変を分析、推奨及び/又は選別するためにプログラムされたコンピュータシステムの使用を介する、(例えば核酸配列、ポリペプチド配列、細胞、組織及び/又は生物の)選別又は設計を含むことができる。また別に或いは付け加えれば、いくつかの実施態様では、“操作”は、in vitroの化学的な合成方法及び/又は組換え核酸技術(例えば核酸増幅(例えばポリメラーゼ連鎖反応による)、ハイブリダイゼーション、変異導入、形質転換など)及び/又は任意の多様な管理交配方法の使用を含むことができる。当業者には理解されようが、確立されたそのような多様な技術(例えば組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、並びに組織培養及び形質転換(例えばエレクトロポレーション、リポフェクションなど)のための技術)は当業界で公知であり、本明細書を通して引用及び考察する種々の一般的で詳細な参考文献に記載されている(例えば以下を参照されたい: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)(任意の目的のために参照により本明細書に含まれる))。3040

【0019】

本明細書で用いられる“エピトープ”は、免疫グロブリン(例えば抗体又は受容体)結合要素によって特異的に認識される任意の部分を含む。いくつかの実施態様では、エピトープは、抗原上の複数の化学的原子又は化学基から構成される。いくつかの実施態様では、そのような化学的原子又は基は、抗原が該当する三次元配座をとるときに表面に暴露される。いくつかの実施態様では、そのような化学的原子又は基は抗原がそのような配座を50

となるときは空間的に互に物理的に接近する。いくつかの実施態様では、少なくともいくつかのそのような化学的原子及び基は、抗原がまた別の配座をとるときは（例えば直鎖状化されるときは）互に物理的に離れる。

本明細書で用いられる“賦形剤”は、例えば所望の不变性又は安定化作用を提供するか又は促進するために医薬組成物に加えることができる非治療性因子を指す。適切な医薬的賦形剤には例えば以下が含まれる：デンプン、グルコース、ラクトース、シュクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、白墨、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセリル、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセリン、プロピレングリコール、水、エタノールなど。

本明細書で用いられる“Fcリガンド”は、抗体のFc領域と結合してFc-リガンド複合体を形成する、任意の生物に由来する分子（好ましくはポリペプチド）を指す。Fcリガンドには以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：Fc RIIA (CD32A)、Fc RIIB (CD32B)、Fc RIIIA (CD16A)、Fc RIIIB (CD16B)、Fc RI (CD64)、Fc RII (CD23)、FcRn、Clq、C3、スタフィロコッカスタンパク質A、ストレプトコッカスタンパク質G、及びウイルスFc R。FcリガンドはFcと結合する未発見分子を含むことができる。10

当業界で知られている“蛍光標識”は、蛍光性の性質を有し、いくつかの実施態様では、そのような蛍光に基づいて検出され得る部分又は実体である。いくつかの実施態様では、蛍光標識はとりわけ以下の1つ以上を含むことがあり、又は含まなくてもよい：Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、カスケードブルー、Cy3、Cy5、6-FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6-JOE、オレゴングリーン488、オレゴングリーン500、オレゴングリーン514、パシフィックブルー、REG、ローダミングリーン、ローダミンレッド、レノグラフィン、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、及び/又はテキサスレッド。20

【0020】

本明細書で用いられる“フレームワーク”又は“フレームワーク領域”は、CDRを除いた可変領域の配列を指す。CDR配列は種々のシステムで決定できるので、同様にフレームワーク配列もそれに応じて異なる解釈を受ける。6つのCDRが、重鎖及び軽鎖上のフレームワーク領域を各鎖上で4つのサブ領域（FR1、FR2、FR3及びFR4）に分ける。この場合、CDR1はFR1とFR2の間に、CDR2はFR2とFR3の間に、CDR3はFR3とFR4の間に位置する。個々のサブ領域をFR1、FR2、FR3又はFR4と特定せずに、他の人々が言うように、フレームワーク領域は天然に存在する単一免疫グロブリン鎖の可変領域内でひとまとめにされたFRを表す。本明細書で用いられるように、FRは4つのサブ領域の1つを表し、例えばFR1は、可変領域のアミノ末端にもっとも近く、CDR1に対しては5'にある第一のフレームワーク領域を表し、FRはフレームワーク領域を構成する2つ以上のサブ領域を表す。30

本明細書で用いられる“宿主細胞”は、その中に外因性DNA（組換え体又はそれ以外）が導入されてある細胞を指す。この開示を読む当業者には、そのような用語は個々の対象細胞だけでなくそのような細胞の子孫も指すことは理解されるであろう。変異又は環境的影響のために、ある種の修飾が後続の世代に生じる可能性があるので、実際のところそのような子孫は親細胞とは同一ではないかもしないが、前記はなお本明細書で用いられる“宿主細胞”という用語の範囲内に含まれる。いくつかの実施態様では、宿主細胞には、外因性DNA（例えば組換え核酸配列）の発現に適切な生命界のいずれかから選択される原核細胞及び真核細胞が含まれる。例示的な細胞には以下が含まれる：原核細胞及び真核細胞の細胞（単細胞又は多細胞）、細菌細胞（例えば大腸菌（E. coli）、バシリス属、ストレプトマイセス属などの株）、マイコバクテリア細胞、真菌細胞、酵母細胞（例えばS. cerevisiae (S. cerevisiae)、S. pombe (S. pombe)、P. pastoris (P. pastoris)、P. methanolica (P. methanolica)など）、植物細胞、昆虫細胞（例えばSF-9、SF-21、Trichoplusia ni (Trichoplusia ni)など）、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、又は細胞融合物（ハイブリドーマ又はハイブリドーマ-ハイブリドーマ融合細胞）。いくつかの実施態様では、細胞は、ヒトの細胞、サルの細胞、類人猿の細胞、ハムスターの細胞、ラット細胞又はマウス細胞である。いくつかの実施態4050

様では、細胞は真核細胞であり、以下の細胞から選択される：CHO（例えばCHO K1、DXB-1 1 CHO、Veggie-CHO）、COS（例えばCOS-7）、網膜細胞、Vero、CV1、腎（例えばHEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK）、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 806 5、HL-60（例えばBHK21）、Jurkat、Daudi、A431（表皮）、CV-1、U937、3T3、L細胞、C1 27細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、セルトリ細胞、BRL3A細胞、HT1080細胞、ミエローマ細胞、腫瘍細胞、及び前述の細胞から誘導された細胞株。いくつかの実施態様では、細胞は1つ以上のウイルス遺伝子を含む（例えばウイルス遺伝子を発現する網膜細胞、例えばP ER.C6TM細胞）。

【0021】

本明細書で用いられる“ヒト抗体”は、ヒト免疫グロブリン配列から作製された（又はアッセンブリングされた）可変及び定常領域を有する抗体を含むことが意図される。いくつかの実施態様では、たとえ抗体（又は抗体構成要素）のアミノ酸配列が、ヒトの生殖細胞系列の免疫グロブリン配列によってコードされない残基又はエレメントを例えれば1つ以上のCDRに（特にCDR3に）含んでいたとしても（例えば、ランダム変異導入又は位置特異的変異導入によってin vitroで、又は体細胞変異導入によってin vivoで当初導入された配列変化を含んでいたとしても）、それらは“ヒト抗体”と考えることができる。10

当業界で公知の“ヒト化”：“ヒト化”という用語は、抗体のアミノ酸配列が、非ヒト種（例えばマウス）で生じた参照抗体由来するV_H及びV_L領域配列を含むが、さらにまた当該参照抗体に対してそれら配列に修飾を含み、それらの配列をいっそう“ヒト様”にするように（すなわち、ヒト生殖細胞系列の可変配列により類似するように）意図された抗体を指す。いくつかの実施態様では、“ヒト化”抗体（又は抗体構成要素）は、問題の抗原と免疫特異的に結合し、かつヒト抗体のアミノ酸配列のようなアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク（FR）領域及び非ヒト抗体のアミノ酸配列のようなアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域（CDR）を有する抗体である。ヒト化抗体は、少なくとも1つ（典型的には2つ）の可変ドメインの実質的に全部を含み（Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab C、Fv）、前記抗体では、CDR領域の全部又は実質的に全部が非ヒト免疫グロブリン（すなわちドナー免疫グロブリン）のものと対応し、さらにフレームワーク領域の全部又は実質的に全部がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列のものである。いくつかの実施態様では、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリン定常領域の一部分を含む。いくつかの実施態様では、ヒト化抗体は、軽鎖とともに重鎖の少なくとも可変ドメインを含む。抗体はまた、重鎖定常領域のC_H1、ヒンジ、C_H2、C_H3及び場合によってC_H4領域を含むことができる。いくつかの実施態様では、ヒト化抗体はヒト化V_L領域のみを含む。いくつかの実施態様では、ヒト化抗体はヒト化V_H領域のみを含む。いくつかの実施態様では、ヒト化抗体はヒト化V_H及びV_L領域を含む。20
。

【0022】

本明細書で用いられる“改善する”、“増加する”若しくは“低下する”又は前記の文法的同等型は、基準測定値（例えば本明細書に記載する処置の開始前の同じ個体の測定値、又は本明細書に記載する処置の非存在下における1人のコントロール個体（又は複数のコントロール個体）の測定値）に対する比較である値を示す。“コントロール個体”は、処置個体と同じ疾患又は損傷形態を罹患する個体である。30

本明細書で用いられる“in vitro”は、多細胞生物内の環境ではなく人工的環境下（例えば試験管内又は反応容器内、細胞培養など）で生じる事象を指す。

本明細書で用いられる“in vivo”は、多細胞生物（例えばヒト及び非ヒト動物）で生じる事象を指す。細胞を土台とする系の関係では、当該用語は、（例えばin vitro系とは対照的に）生きている細胞内で生じる事象を指すために用いることができる。

本明細書で用いられる“単離された”は、（1）ある物質及び/又は実体が（天然であれ及び/又は実験環境であれ）当初の生成時に付随していた成分の少なくともいくつかから分離されてあるか、及び/又は（2）人為的に設計、生成、調製、及び/又は製造された物質及び/又は実体を指す。単離された物質及び/又は実体は、それらが当初付随していた他40

の成分の約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%から又は99%を超えて分離され得る。いくつかの実施態様では、単離された因子は、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又は99%を超えて純粋である。本明細書で用いられるように、物質が実質的に他の成分を含まない場合には、当該物質は“純粋”である。いくつかの実施態様では、当業者には理解されようが、ある物質が一定の他の成分（例えば1つ以上の担体又は賦形剤、例えば緩衝液、溶媒、水など）と一緒にされた後でも、当該細胞はなお“単離された”と又は“純粋”とさえみなすことができる。そのような実施態様では、物質の単離又は純度パーセントはそのような担体又は賦形剤を含まずに計算できる。一例を挙げれば、いくつかの実施態様では、天然に存在する生物学的ポリマー（例えばポリペプチド又はポリヌクレオチド）は以下の場合に“単離された”とみなされる：a) その起源又は誘導源のために、当該ポリマーの天然の本来の状態で付随する成分のいくつか又は全部が当該ポリマーに付随しない；b) 当該ポリマーを天然に生成する種と同じ種の他のポリペプチド又は核酸を実質的に含まない；c) 当該ポリマーを天然に生成する種ではない細胞又は発現系によって発現されるか或いはそうでなければ前記細胞又は発現系に由来する成分を付随する。したがって、例えばいくつかの実施態様では、化学的に合成されるか又は当該ポリペプチドを天然に生成する細胞系とは異なる細胞系で合成されるポリペプチドは、“単離された”ポリペプチドとみなされる。また別に或いは付け加えれば、いくつかの実施態様では、1つ以上の精製技術に付されてあるポリペプチドは、a) 当該ポリペプチドに天然の状態で付隨する他の成分から、及び/又は当初生成されたときに当該ポリペプチドに付隨した他の成分から分離されてある程度に“単離された”ポリペプチドとみなすことができる。

【0023】

本明細書で用いられる“ K_D ”は、結合因子（例えば抗体又はその結合成分）のそのパートナー（例えば抗体又はその結合要素が結合するエピトープ）との複合体からの解離定数を指す。

本明細書で用いられる“ k_{off} ”は、結合因子（例えば抗体又はその結合要素）のそのパートナー（例えば抗体又はその結合要素が結合するエピトープ）との複合体からの解離の解離速度定数を指す。

本明細書で用いられる“ k_{on} ”は、結合因子（例えば抗体又はその結合要素）とそのパートナー（例えば抗体又はその結合要素が結合するエピトープ）との結合の結合速度定数を指す。

本明細書で用いられる“リンカー”は典型的には、問題の2つ以上の異なる領域（例えば個々の構造的及び/又は機能的ドメイン又は部分）を繋ぐ分子又は実体の部分を指す。いくつかの実施態様では、リンカーは該当する問題の機能に有意には加わらない（例えば、該当する問題のドメイン又は部分との結合でリンカーが存在するか否かは当該ドメイン又は部分の該当する機能を実質的には変化させない）。いくつかの実施態様では、リンカーは、範囲が制限された構造又は剛直な構造を欠くという特徴を有する。いくつかの実施態様では、特に問題の1つ以上のドメイン又は部分がポリペプチドから構成されるときは、リンカーはポリペプチドであるか又はポリペプチドを含む。いくつかの具体的な実施態様では、本明細書に記載するポリペプチド（例えば操作されたポリペプチド）は一般構造S1-L-S2を有し、ここでS1及びS2は問題の部分又はドメインである。いくつかの実施態様では、S1及びS2の一方又は両方が、本明細書に記載する結合エレメント（例えば抗体構成要素）であるか又は前記を含むことができる。いくつかの実施態様では、ポリペプチドリンカーレは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100又は100を超えるアミノ酸長であり得る。いくつかの実施態様では、ポリペプチドリンカーレは、以下の文献に記載される配列であるか又は当該配列を含むアミノ酸配列を有することができる（Holliger, P., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448；又はPoljak, R. J., et al., 1994, Structure 2: 1121-1123）。いくつか

10

20

30

40

50

の実施態様では、ポリペプチドリンクーは、GGGGSGGGGSGGGGS (すなわち[G₄S]₃) 又はGGGGSAGGGSGGGGSAGGGSGGGGS (すなわち[G₄S]₆) であるか又は前記配列を含むアミノ酸配列を有することができる。

【0024】

本明細書で用いられる“多価結合因子”は2つ以上の抗原と結合することができる結合因子を指し、前記2つ以上の抗原は同じ分子又は異なる分子上に存在し得る。本明細書に記載する多価結合因子は、いくつかの実施態様では3つ以上の抗原結合部位を有するように操作され、さらに典型的には天然には存在しないタンパク質である。本明細書に記載する多価結合因子は、2つ以上の関連性がある又は関連性がない標的と結合できる結合因子を指す。多価結合因子は、ただ1つの抗体構成要素の複数のコピー又は別個の抗体構成要素の複数のコピーから構成され得る。そのような結合因子は、2つ以上の抗原と結合することができ、四価又は多価結合因子である。多価結合因子は、治療用因子（例えば免疫調整剤、毒素又はRNase）を追加で含むことができる。本明細書に記載する多価結合因子は、いくつかの実施態様では少なくとも2つの標的と同時に結合することができ、前記標的是異なる構造物、例えば2つの異なる抗原、同じ抗原上の2つの異なるエピトープ、又はハプテン及び/又は抗原若しくはエピトープである。多くの実施態様では、本発明の多価結合因子は、本明細書に記載する多価結合因子の特徴を有するように操作されたタンパク質である。本発明の多価結合因子は一特異性（1つの抗原と結合できる）又は多重特異性（2つ以上の抗原と結合できる）であることができ、さらに2つの重鎖ポリペプチド及び2つの軽鎖ポリペプチドから構成され得る。各結合部位は、いくつかの実施態様では1つの重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインから構成され、抗原結合部位毎に抗原結合に関与する合計6つのCDRを有する。10 20

【0025】

本明細書で用いられる“核酸”は、そのもっとも広い意味ではオリゴヌクレオチド鎖に取り込まれているか、又はオリゴヌクレオチド鎖に取り込まれ得る任意の化合物及び/又は物質を指す。いくつかの実施態様では、核酸は、ホスホジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖に取り込まれているか、又はオリゴヌクレオチド鎖に取り込まれ得る化合物及び/又は物質である。文脈から明瞭であろうが、いくつかの実施態様では“核酸”は個々の核酸残基（例えばヌクレオチド及び/又はヌクレオシド）を指し、いくつかの実施態様では“核酸”は個々の核酸残基を含むオリゴヌクレオチド鎖を指す。いくつかの実施態様では“核酸”はRNAであるか又はRNAを含む。いくつかの実施態様では、“核酸”はDNAであるか又はDNAを含む。いくつかの実施態様では、核酸は1つ以上の天然の核酸残基であるか、前記を含むか又は前記から成る。いくつかの実施態様では、核酸は1つ以上の核酸アナローグであるか、前記を含むか、又は前記から成る。いくつかの実施態様では、核酸アナローグは、ホスホジエ斯特爾結合を利用しないという点で核酸と異なる。例えばいくつかの実施態様では、核酸は1つ以上の“ペプチド核酸”であるか、前記を含むか又は前記から成る。ペプチド核酸は当業界で公知であり、骨格にホスホジエ斯特爾結合の代わりにペプチド結合を有し、それらは本発明の範囲内であると考えられる。また別には或いは前記に付け加えれば、いくつかの実施態様では、核酸は1つ以上のホスホロチオエート及び/又は5'-N-ホスホラミダイト結合をホスホジエ斯特爾結合に代わって有する。いくつかの実施態様では、核酸は1つ以上の天然のヌクレオシド（例えばアデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン及びデオキシチミジン）であるか、前記を含むか又は前記から成る。いくつかの実施態様では、核酸は、1つ以上の下記のヌクレオシドアナローグであるか、前記を含むか又は前記から成る：2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロ-ピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、0(6)-メチルグアニン、2-チオシチジン、メチル化塩基、イン30 40 50

ターカレート塩基、及び前記の組み合わせ。いくつかの実施態様では、核酸は、天然の核酸の糖と比べて1つ以上の修飾糖（例えば2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース及びヘキソース）を含む。いくつかの実施態様では、核酸は、機能的遺伝子生成物（例えばRNA又はタンパク質）をコードするヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施態様では、核酸は1つ以上のイントロンを含む。いくつかの実施態様では、核酸は、天然の供給源からの1回以上の単離、相補性鑄型に基づく重合化による酵素合成（*in vitro*又は*in vivo*）、組換え細胞又は系での再生、及び化学合成によって調製される。いくつかの実施態様では、核酸は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000又は前記を超える残基長である。¹⁰ いくつかの実施態様では、核酸は一本鎖である。いくつかの実施態様では、核酸は二本鎖である。いくつかの実施態様では、核酸は、あるポリペプチドをコードする配列の相補鎖をコードするか又は相補鎖である少なくとも1つのエレメントを含むヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施態様では、核酸は酵素活性を有する。

【0026】

本明細書で用いられる“作動できるように連結された”は、記載の構成要素がそれらの意図された態様で機能することを許容する関係で並置されることを指す。コード配列に“作動できるように連結された”制御配列は、コード配列の発現が当該制御配列に適合する条件下で達成される態様で連結されている。“作動できるように連結される”配列には、問題の遺伝子と隣接する発現制御配列及び問題の遺伝子を制御するためにトランスで（又はある距離で）作用する発現制御配列の両方が含まれる。本明細書で用いられる“発現制御配列”という用語は、当該配列が連結されるコード配列の発現及びプロセッシングに必要なポリヌクレオチド配列を指す。発現制御配列には以下が含まれる：適切な転写開始配列、終了配列、プロモーター及びエンハンサー配列；効率的なRNAプロセッシングシグナル、例えばスプライシング及びポリアデニル化シグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を強化する配列（すなわちKozakコンセンサス配列）；タンパク質安定性を強化する配列；及び所望の場合はタンパク質分泌を強化する配列。そのような制御配列の特質は宿主生物に応じて異なる。例えば原核細胞では、そのような制御配列には一般的にはプロモーター、リボソーム結合部位、及び転写終了配列が含まれ、一方、真核細胞では典型的にはそのような制御配列にはプロモーター及び転写終了配列が含まれる。“制御配列”という用語は、その存在が発現及びプロセッシングに必須である構成要素を含むことが意図され、さらにまたその存在が有益である追加の構成要素（例えばリーダー配列及び融合パートナー配列）を含むことができる。²⁰³⁰

【0027】

当業界で知られている“常磁性イオン”は、常磁性の特徴を有するイオンを指す。いくつかの実施態様では、常磁性イオンは、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(I⁻)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)、エルビウム(III)、ランタン(II⁺)、金(III)、鉛(II)、及び/又はビスマス(III)の1つ以上である。⁴⁰

本明細書で用いられる“ペイロード”は、別の実体との結合によって問題の部位（例えば細胞、組織、腫瘍又は生物）にデリバーされる部分又は実体を指す。いくつかの実施態様では、ペイロードは検出因子であるか又は検出因子を含む。いくつかの実施態様では、ペイロード物質は治療用因子であるか又は治療用因子を含む。いくつかの実施態様では、ペイロード物質は触媒性因子であるか又は触媒性因子を含む。ペイロード物質は任意の化学物質クラスでもよいことは当業者には理解されるであろう。例えばいくつかの実施態様では、ペイロード物質は以下であるか又は以下を含むことができる：炭水化物、同位元素、脂質、核酸、金属、ナノ粒子（例えばセラミック又はポリマーナノ粒子）、ポリペプチ⁵⁰

ド、小分子、ウイルスなど。数例を挙げれば、いくつかの実施態様では、治療用因子ペイロードは毒素（例えば毒性ペプチド、小分子又は同位元素（例えば放射性同位元素））であるか又は前記を含む。いくつかの実施態様では、検出因子ペイロードは、蛍光性物質又は因子、放射性物質又は因子、結合によって検出可能な因子又は物質（例えばタグ、ハプテン、リガンドなど）、触媒性因子などであるか、又は前記を含む。

本明細書で用いられる“生理学的条件”は、細胞又は生物が生存及び/又は再生する条件を指す当業界で理解されている意味を有する。いくつかの実施態様では、当該用語は、ある生物又は細胞系について天然に存在し得る外的又は内的環境条件を指す。いくつかの実施態様では、生理学的条件は、ヒト又は非ヒト動物の体内に存在する条件、特に手術部位に及び/又は手術部位内に存在する条件である。生理学的条件は典型的には、例えは20
10

から40 の温度範囲、1大気圧、6から8のpH、1から20mMのグルコース濃度、大気レベルの酸素濃度、及び地球上に存在する重力を含む。いくつかの実施態様では、実験室条件は生理学的条件に操作され及び/又は維持される。いくつかの実施態様では、生理学的条件は生物に存在する。

【0028】

本明細書で用いられる“ポリペプチド”はアミノ酸の任意のポリマー鎖を指す。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは天然に存在するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは天然に存在しないアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは、人為的作用を介して設計され及び/又は生成されるという点で操作されたアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは、天然のアミノ酸、非天然のアミノ酸又はその両方を含むか又は前記から成ることがある。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは天然のアミノ酸のみ又は非天然のアミノ酸のみを含むか又は前記から成ることがある。いくつかの実施態様では、ポリペプチドはD-アミノ酸、L-アミノ酸又はその両方を含むことができる。いくつかの実施態様では、ポリペプチドはD-アミノ酸のみを含むことができる。いくつかの実施態様では、ポリペプチドはL-アミノ酸のみを含むことができる。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは、（例えは1つ以上のアミノ酸側鎖を修飾するか又は前記に結合される）1つ以上のペンダント基又は他の修飾を当該ポリペプチドのN-末端に、当該ポリペプチドのC-末端に、又は前記の任意の組合せで含むことができる。いくつかの実施態様では、そのようなペンダント基又は修飾は、アセチル化、アミド化、脂質化、メチル化、PEG化など（前記の組み合わせを含む）から成る群から選択できる。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは環状であってもよく、及び/又は環状部分を含むことができる。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは環状ではなく、及び/又は環状部分を全く含まない。いくつかの実施態様では、ポリペプチドは直鎖状である。いくつかの実施態様では、ポリペプチドはステープルポリペプチドであるか又はステープルポリペプチドを含むことができる。いくつかの実施態様では、“ポリペプチド”という用語は、参照ポリペプチドの名称、活性又は構造に添付されることがある。そのような事例では、当該用語は、該当する活性又は構造を共有し、したがって同じクラス又はファミリーのポリペプチドのメンバーであるとみなされ得るポリペプチドを指すために本明細書では用いられる。そのようなクラスの各々について、本明細書は、そのアミノ酸配列及び/又は機能が公知であるクラス内の例示的ポリペプチドを提供し、当業者もそれらを承知しているであろう。いくつかの実施態様では、そのような例示的ポリペプチドは当該ポリペプチドクラスについての参照ポリペプチドである。いくつかの実施態様では、あるポリペプチドクラス又はファミリーのメンバーは、当該クラスの参照ポリペプチドと（いくつかの実施態様では、当該クラス内の全ポリペプチドと）、有意な配列相同性又は同一性を示し、共通の配列モチーフ（例えは特徴的な配列エレメント）を共有し、及び/又は（いくつかの実施態様では匹敵するレベルで又は指定の範囲内で）共通の活性を共有する。例えは、いくつかの実施態様では、メンバーポリペプチドは、参照ポリペプチドと全体的な配列相同性又は同一性の度合いを示し、前記相同性又は同一性は、少なくとも約30から40%であり、しばしば約50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は前記を超える、及び/又は、非常に高い配列同一性（しばしば
20
30
40
50

90%、場合によって95%、96%、97%、98%又は99%を超える)を示す少なくとも1つの領域を含む(すなわち前記領域は保存領域であり、いくつかの実施態様では、特徴的な配列エレメントであるか又は配列エレメントを含むことができる)。そのような保存領域は通常、少なくとも3つから4つ、しばしば20まで又は前記を超えるアミノ酸を包含する。いくつかの実施態様では、保存領域は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16以上の連続するアミノ酸の少なくとも一続きを包含する。いくつかの実施態様では、有用なポリペプチドは親ポリペプチドの1つのフラグメントを含むか、1つのフラグメントから成ることができる。いくつかの実施態様では、有用なポリペプチドは複数のフラグメントを含むか又は複数のフラグメントから成ることができ、それら複数のフラグメントの各々は、問題のポリペプチドで見出される編成とは互に異なる空間的編成で同じ親ポリペプチドでは見出され(例えば、親では直に連結されるフラグメントが問題のポリペプチドでは空間的に離されていることがあり逆もまた可能で、及び/又はフラグメントは問題のポリペプチドで親とは異なる順番で存在することがある)、したがって問題のポリペプチドはその親ポリペプチドの誘導体である。

【0029】

疾患、異常及び/又は症状の出現に関連して本明細書で用いられる“予防する”又は“予防”は、疾患、異常及び/又は症状の発生リスクの低下、又は疾患、異常及び/又は症状の徵候の1つ以上の特徴の開始を遅らせることを指す。予防は、疾患、異常及び/又は症状の開始が予め定めた期間引き延ばされたときに完全であったと考えることができる。

“放射性同位元素”：本明細書で用いられる“放射性同位元素”という用語は、放射性崩壊を経る同位元素を指す当業界で理解されている意味を有する。いくつかの実施態様では、放射性同位元素は、アクチニウム-225、アスタチン-211、ビスマス-212、炭素-14、クロム-51、塩素-36、コバルト-57、コバルト-58、銅-67、ユウロピウム-152、ガリウム-67、水素-3、ヨウ素-123、ヨウ素-124、ヨウ素-125、ヨウ素-131、インジウム-111、鉄-59、鉛-212、ルテチウム-177、リン-32、ラジウム-223、ラジウム-224、レニウム-186、レニウム-188、セレンイウム-75、硫黄-35、テクネチウム-99m、トリウム-227、イットリウム-90及びジルコニウム-89の1つ以上であるか前記を含むことができる。

本明細書で用いられる“組換え体”は、組換え手段によって設計、操作、調製、発現、作製、又は単離されたポリペプチド(例えば本明細書に記載する抗体若しくは抗体構成要素、又は多重特異性結合因子)を指すことが意図される。前記ポリペプチドは例えば以下である：宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターにより発現されたポリペプチド、組み換え体、コンビナトリアルヒトポリペプチドライブラーーから単離されたポリペプチド(Hoogenboom H. R., 1997, TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W. E., 2002, Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo, J. V. and Lerrick, J. W., 2002, BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom H., and Chames, P., 2000, Immunology Today 21:371-378)、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックな動物から単離された抗体(Taylor, L. D. et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Little M. et al., 2000, Immunology Today 21:364-370; Kellermann S-A., and Green L. L., 2002, Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Murphy, A.J. et al., 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-5158)、又は選択した配列エレメントを別の配列エレメントにスプライシングする工程を含む任意の他の手段によって調製、発現、作製又は発現されたポリペプチド。いくつかの実施態様では、そのような選択された配列エレメントの1つ以上は天然で見出される。いくつかの実施態様では、1つ以上のそのような選択配列エレメントは、公知の配列エレメント(例えば天然又は合成起源)の変異導入(例えばin vitro又はin vivo)から生じる。例えば、いくつかの実施態様では、組換え抗体ポリペプチドは、問題の供給源生物(例えばヒト、マウスなど)の生殖細胞系列で見出される配列から構成される。いくつかの実施態様では、組換え抗体は、変異導入(例えばin vitroで又はトランスジェニック動物においてin vivoで)から生じたアミノ酸配列を有し、したがって、組換え抗体のV_H及びV_L領域のアミノ酸配列は、生殖細

10

20

30

40

50

胞系列のin vivo抗体レパートリー内に天然には存在しないことがある。

【0030】

本明細書で用いられる“回収”は、以前に付隨していた成分から、例えば単離することによって(例えば当業界で公知の精製技術を用いて)、ある因子又は実体を実質的に自由にするプロセスを指す。いくつかの実施態様では、ある因子又は実体は天然の供給源及び/又は細胞を含む供給源から回収される。

本明細書で用いられる“参照物”は、本明細書に記載する比較を実施する標準物、コントロール、又は適切な他の参照物を言う。例えば、いくつかの実施態様では、参照物は、標準物又はコントロール因子、動物、個体、集団、サンプル、配列、一連の工程、条件セット、又は値であって、前記に対して、問題の因子、動物、個体、集団、サンプル、配列、一連の工程、条件セット又は値が比較される。いくつかの実施態様では、参照物は、問題の試験又は測定と実質的に同時に試験及び/又は測定される。いくつかの実施態様では、参照物は、経歴的参照物、場合によって重要な媒体によって実体化された参照物である。典型的には、当業者には理解されようが、参照物は問題の査定で利用された条件に匹敵する条件下で測定又は特徴づけられる。

“リスク”：疾患、異常及び/又は症状の“リスク”という文脈から理解されるように、特定の個体が疾患、異常及び/又は症状(例えば放射線障害)を生じる公算を含む。いくつかの実施態様では、リスクはパーセンテージとして表現される。いくつかの実施態様では、リスクは0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90から100%までである。いくつかの実施態様では、リスクは、参照サンプル又は参照サンプル群に付隨するリスクに対する相対的なリスクとして表現される。いくつかの実施態様では、参照サンプル又は参照サンプル群は、疾患、異常、症状及び/又は事象(例えば放射線障害)の公知のリスクを有する。いくつかの実施態様では、参照サンプル又は参照サンプル群は特定の個体に匹敵する個体に由来する。いくつかの実施態様では、相対リスクは0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又は前記を超える。

【0031】

本明細書で用いられる“特異的結合”は、結合が生じる環境中で可能なパートナーを識別する結合因子の能力を指す。他の潜在的な標的が存在するときに1つのパートナーと相互作用する結合因子は、当該結合因子が相互作用する当該標的と“特異的に結合する”と称される。いくつかの実施態様では、特異的結合は、当該結合因子とそのパートナーとの間の結合度を検出又は測定することによって査定される。いくつかの実施態様では、特異的結合は、結合因子-パートナー複合体の解離度を検出又は測定することによって査定される。いくつかの実施態様では、特異的結合は、当該パートナーと別の実体とのまた別の相互作用に競合する当該結合因子の能力を検出又は測定することによって査定される。いくつかの実施態様では、特異的結合は、ある濃度範囲にわたってそのような検出又は測定を実施することによって査定される。

本明細書で用いられる“対象動物”は、任意の哺乳動物(ヒトを含む)を意味する。本発明のある種の実施態様では、対象動物は成人、若者又は幼児である。いくつかの実施態様では、“個体”又は“患者”という用語は、“対象動物”と互換的に用いられ、互換的であることが意図される。さらにまた本発明によって意図されるものは、医薬組成物の投与及び/又は子宮内治療方法の実施である。

“実質的に”：本明細書で用いられるように、“実質的に”という用語は、問題の特徴又は特性の程度又は度合いの全部又は全部に近いことを示す質的状態を指す。生物学的及び化学的現象は極めて稀にしか完結せず及び/又は完了まで進行せず又は絶対的結果が達成も回避もされないことは、生物学分野の業者には理解されるであろう。したがって、“実質的に”という用語は本明細書では、多くの生物学的及び化学的現象で固有である完結性の潜在的欠如を捕捉するために用いられる。

本明細書で用いられる“実質的な配列相同性”は、アミノ酸又は核酸間の比較を指す。当業者には理解されるように、2つの配列が対応する位置で相同な残基を含む場合、それらは“実質的に相同”であると考えられる。相同性残基は同一残基であり得る。また別に

10

20

30

40

50

は、相同性残基が、適切に類似する構造的及び/又は機能的特徴を有しながら非同一残基であることがある。例えば、当業者には周知であるが、ある種のアミノ酸は典型的には、“疎水性”又は“親水性”アミノ酸に、及び/又は“極性”又は“非極性”側鎖を有するアミノ酸として分類される。1つのアミノ酸の同じタイプの別のアミノ酸への置換はしばしば“相同性”置換と考えることができる。典型的なアミノ酸分類は表1及び2に要約される。

【0032】

表1

アラニン	Ala	A	非極性	中性	1.8	10
アルギニン	Arg	R	極性	陽性	-4.5	
アスパラギン	Asn	N	極性	中性	-3.5	
アスパラギン酸	Asp	D	極性	陰性	-3.5	
システイン	Cys	C	非極性	中性	2.5	
グルタミン酸	Glu	E	極性	陰性	-3.5	
グルタミン	Gln	Q	極性	中性	-3.5	
グリシン	Gly	G	非極性	中性	-0.4	
ヒスチジン	His	H	極性	陽性	-3.2	
イソロイシン	Ile	I	非極性	中性	4.5	
ロイシン	Leu	L	非極性	中性	3.8	
リジン	Lys	K	極性	陽性	-3.9	20
メチオニン	Met	M	非極性	中性	1.9	
フェニルアラニン	Phe	F	非極性	中性	2.8	
プロリン	Pro	P	非極性	中性	-1.6	
セリン	Ser	S	極性	中性	-0.8	
スレオニン	Thr	T	極性	中性	-0.7	
トリプトファン	Trp	W	非極性	中性	-0.9	
チロシン	Tyr	Y	極性	中性	-1.3	
バリン	Val	V	非極性	中性	4.2	

30

表2

曖昧なアミノ酸	3-文字	1-文字
アスパラギン又はアスパラギン酸	Asx	B
グルタミン又はグルタミン酸	Glx	Z
ロイシン又はイソロイシン	Xle	J
未指定又は未知アミノ酸	Xaa	X

【0033】

当業界で周知のように、アミノ酸又は核酸配列は任意の多様なアルゴリズムを用いて比較できる。前記アルゴリズムには、市場のコンピュータプログラムで入手可能なものの、例えば核酸配列のためにはBLASTN並びにアミノ酸配列のためにはBLASTP、ギャップBLAST及びPSI-BLASTが含まれる。そのようなプログラムの例は以下に記載されている：Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410 ; Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-80 ; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 ; Baxevanis et al., 1998, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley ; 及びMisener et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999 (前述の文献はいずれも参照により本明細書に含まれる)。相同配列の同定に加えて、上述のプログラムは典型的には相同性の度合いの表示を提供する。いくつかの実施態様では、2つの配列

40

50

の対応する残基の少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又はそれを超えるものが、対応する一続きの残基で相同であるならば、2つの配列は実質的に相同であると考えられる。いくつかの実施態様では、当該対応する一続きは完全な配列である。いくつかの実施態様では、当該対応する一続きは、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも100、少なくとも125、少なくとも150、少なくとも175、少なくとも200、少なくとも225、少なくとも250、少なくとも275、少なくとも300、少なくとも325、少なくとも350、少なくとも375、少なくとも400、少なくとも425、少なくとも450、少なくとも475、少なくとも500又は500を超える残基である。

【0034】

本明細書で用いられる“実質的な同一性”はアミノ酸又は核酸配列間の比較を指す。当業者には理解されるところであるが、2つの配列が対応する位置に同一の残基を含む場合、それらは一般的には“実質的に同一”であるとみなされる。当業界で周知のように、アミノ酸又は核酸配列は任意の多様なアルゴリズムを用いて比較できる。前記アルゴリズムには、市場のコンピュータプログラムで入手可能なものの、例えば核酸配列のためにはBLASTN並びにアミノ酸配列のためにはBLASTP、ギャップBLAST及びPSI-BLASTが含まれる。そのようなプログラムの例は以下に記載されている：Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410; Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-80; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Baxevanis et al., 1998, Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley; 及び Misener et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999。同一配列の同定に加えて、上述のプログラムは典型的には同一性の度合いの表示を提供する。いくつかの実施態様では、2つの配列の対応する残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は前記を超える残基がある対応する一続きの残基にわたって同一である場合、2つの配列は実質的に同一であるとみなされる。いくつかの実施態様では、当該対応する一続きは完全な配列である。いくつかの実施態様では、当該対応する一続きは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500又は前記を超える残基である。CDRの関係では、“実質的な同一性”と言えば、参照CDRのアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するCDRを指す。

【0035】

本明細書で用いられる“表面プラズモン共鳴”は、特異的な結合相互作用のリアルタイムの分析を可能にする光学現象を指し、前記分析は、例えばバイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を、例えばビアコア (BIAcore) システム (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.) を用いることによって検出する。更なる説明については以下のを参照されたい：Jonsson, U., et al., 1993, Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., et al., 1991, Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al., 1995, J. Mol. Recognit. 8:125-131; 及び Johnsson, B., et al., 1991, Anal. Biochem. 198:268-277。

本明細書で用いられる“治療的に有効な量”は、そのために投与が実施される所望の効果を生じる量を意味する。いくつかの実施態様では、当該用語は、ある疾患、異常及び/又は症状に罹患しているか又は前記に感受性を有する集団に治療的投与レジメンにしたがって投与したときに当該疾患、異常及び/又は症状の治療のために十分な量を指す。いく

10

20

30

40

50

つかの実施態様では、治療的に有効な量は、当該疾患、異常及び/又は症状の発生及び/又は重篤度を低下させるか、及び/又はその開始を遅らせる量である。“治療的に有効な量”という用語は、実際には個々の個体での首尾よい治療の達成を要求しないことは当業者には承知されよう。むしろ、治療的に有効な量は、そのような治療の必要がある患者に投与したときに、有意な数の対象者に具体的な所望の薬理学的応答を提供する量であり得る。いくつかの実施態様では、治療的に有効な量と言えば、1つ以上の特定の組織（例えば当該疾患、異常及び/又は症状によって影響を受ける組織）又は液体（例えば血液、唾液、血清、汗、涙、尿など）で測定される量を指すことができる。いくつかの実施態様では、具体的な薬剤又は治療の治療的に有効な量は、単一用量で処方され及び/又は投与され得ることは、当業者には理解されるであろう。いくつかの実施態様では、治療的に有効な量は、複数用量で、例えば投与レジメンの部分として処方され及び/又は投与され得る。

【0036】

本明細書で用いられる“形質転換”は、外因性DNAが宿主細胞に導入される任意のプロセスを指す。形質転換は、当業界で周知の多様な方法を用いて天然の条件下又は人工的条件下で生じ得る。形質転換は、原核又は真核宿主細胞に外来核酸配列を挿入する任意の公知の方法に拠ることができる。いくつかの実施態様では、具体的な形質転換方法は、形質転換される宿主細胞にしたがって選択され、前記方法には、ウイルス感染、エレクトロポレーション、交配、リポフェクションが含まれ得るが、ただしこれらに限定されない。いくつかの実施態様では、“形質転換された”細胞は、挿入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして又は宿主染色体の部分として複製することができるという点で安定的に形質転換される。いくつかの実施態様では、形質転換細胞は、導入された核酸を限定された期間一過性に発現する。

本明細書で用いられる“ベクター”は、核酸分子であって、前記分子が連結されている別の核酸を移送することができるものを指す。ベクターの一タイプは“プラスミド”であり、環状二本鎖DNAループを指し、追加のDNAセグメントを連結することができる。別のタイプのベクターはウイルスベクターであって、ウイルスベクターでは追加のDNAセグメントは当該ウイルスゲノムに連結され得る。ある種のベクターは、それらが導入された宿主細胞で自律的に複製する能力を有する（例えば細菌起源の複製を有する細菌性ベクター及びエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（非エピソーム性哺乳動物ベクター）は宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれることができ、それによって宿主ゲノムと一緒に複製される。さらにまた、ある種のベクターは、作動できるように連結された遺伝子の発現を指令することができる。そのようなベクターは本明細書では“発現ベクター”と称される。

【0037】

ある種の実施態様の詳細な説明

本発明は、結腸直腸癌の確立された抗原と結合する多重特異性結合剤（例えば二重特異性抗体）の首尾よい構築物を提示する。特に、本開示は、二重特異性抗体（ヒトA33糖タンパク質抗原及びベンジル-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（DOTA-Bn）と結合する）を用いる結腸直腸癌における放射線免疫療法の首尾よい標的誘導を具体的に提示し、特異的なそのような二重特異性抗体を提供し、その驚くべき有用性及び/又は有効性を提示する。

とりわけ、本発明は特に、ヒトA33抗原を標的とする二重特異性抗体の最初の首尾よい治療的使用を提供し、さらにまたA33発現腫瘍の治療のための予備標的誘導放射線免疫療法の改善された治療方法を提供する。本発明はまた、A33陽性癌のシンチグラフィー画像化及び放射線免疫療法を同時に用いる“治療診断両用（theranostic）”（すなわち治療用かつ診断用）薬剤を提供し、さらに特にその驚くべき有用性及び/又は有効性を提示する。

A33（正常組織での発現が限定されるヒト結腸直腸癌上の糖タンパク質抗原）は、正常な腸上皮の迅速な生理学的ターンオーバーとは対照的に長時間の抗体結合後にも腫瘍細胞表面で保持される（腫瘍に固有の組織保持を基準とする治療指数）。直接複合体化抗体（例えば¹³¹I-huA33）を用いる進行性結腸直腸癌（“CRC”）の放射能シンチグラフィー

10

20

30

40

50

及び放射線免疫療法 (RIT) では、至適未満の腫瘍線量及び治療指數がもたらされた (Welt et al., 1994, J. Clin. Oncol. 12:1561-1571)。本発明は、多重工程の予備標的誘導RIT (PRIT) アプローチを用いてこれらの両欠陥を克服できるという認識を包含する。前記アプローチでは、ベンジル-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA-Bn)-放射性金属複合体に対して高い親和性を有する二重特異性四価huA33-C825二重特異性抗体構築物がまず初めに当該腫瘍に標的誘導される。本開示は特に、未結合huA33-C825二重特異性抗体の循環からのクリアランスに続いて、¹⁷⁷Lu-放射能標識DOTA-Bn ハプテンを注射して腫瘍殺滅線量のPRITをA33陽性腫瘍へデリバーアーすることを示す。1つの具体的な例を提供するために、本開示は、SW1222のヒト結腸直腸腫瘍モデルで、皮下腫瘍が定着したマウスは正常組織（骨髄及び腎を含む）への毒性を最小限にしつつ治癒され得ることを示す。

理論に拘束されることを望まないが、我々は、本明細書に提供するデータは、いくつかの実施態様では、huA33-C825二重特異性抗体の二サイクル投与を用いるPRITレジメンは、単一サイクル投与を用いる同じPRITレジメンと比較して腫瘍に対し絶大な効果をもたらしたことを特記する。さらにまた、本開示はとりわけ、本明細書に記載するhuA33-C825二重特異性抗体のそのような二サイクル投与は、試験対象動物のおよそ80%で完全応答をもたらしたことを見た。さらによく本明細書に示されることは追加サイクルによる処置であり、前記は高度に有効な応答を示した。例えば、3サイクル投与レジメンは、標的器官（骨髄、脾及び腎）に検出可能な毒性を生じることなく10/10マウスで治癒効果を有した。したがって、本開示は、少なくともいくつかの実施態様では、ヒトA33糖タンパク質抗原を効果的に標的とする二重特異性抗体様式を用い、臨床的又は組織学的放射線障害を最小限からゼロにしつつ腫瘍への標的誘導及び/又は腫瘍除去の強化を達成する改善されたPRITレジメンの開発を包含する。

【0038】

ヒト結腸直腸癌

ヒトA33抗原は、43kDの分子量を有するトランスメンブレン糖タンパク質（213アミノ酸ポリペプチド）であり、95%を超えるヒト結腸癌で発現され、正常な発現（結腸及び腸上皮）は限定され、きわめてわずかしか循環に排出されない。最初はネズミモノクローナル抗体（A33）、続いてヒト化型（huA33）が開発され（King et al., 1995, British J. Cancer 72:1364-1372）、診断及び治療用の放射線療法のための標的誘導因子として使用するために理想的な特異性、親和性並びに抗体・抗原取り込み及び内在化特性を有することが見出された。結腸直腸癌患者における¹²⁴I-huA33画像化の臨床研究では、抗原陽性腫瘍と腸との間の弁別的クリアランスによって、著者らは、非放射性二重特異性A33抗体型による最初の投与（又は“予備標的誘導”）、その後の放射能標識ハプテンによる投与を含むまた別の多重工程アプローチが好ましいであろうという結論に至った（O'Donoghue et al., 2011, J. Nucl. Med. 52:1878-1885）。A33の放射性ヨード型（例えば¹²⁵I-A33）の高い腫瘍持続性は、A33抗体・抗原複合体の内在化特性の重点的な研究を促進し、抗A33抗体が長期間にわたって表面に滞留することを示し、いくつかの実施態様では、特に腸における正常な発現が最後のリガンド工程の前にターンオーバーされるときには、そのような抗体を予備標的誘導アプローチに大いにふさわしいものにした（Ackerman et al., 2008, Mol. Cancer Ther. 7(7):2233-2240）。腸上皮が一緒に抗原及び結合抗体を保持しながら1日から3日かけて剥離するという固有の生理学は、標的抗原がこれらの正常な細胞で発現されるならば重大である（Scott et al., 2005, Clin. Cancer Res. 11:4810-4817）。本明細書に記載するように、PRITでは、未結合抗体は最後の細胞傷害性リガンド工程の前に除去剤（CA）を用いて血液から除去される。正常な腸細胞の自然な剥離は腸における除去工程と機能的に等価である。多様な他の腫瘍付随抗原を指向する予備標的誘導放射線免疫療法（PRIT）がこれまで結腸直腸癌のために研究されてきた。前記には以下が含まれる：CEA（hMN-14-抗-DTPA-インジウム+¹³¹I-ジ-DTPA-インジウムハプテン、及び最近では抗-CEACAM5-抗-ヒスタミン-スクシニル-グリシン“TF2”に¹⁷⁷Lu-IMP288ハプテン付加）、TAG-72（CC49 scFv-ストレプトアビジン+⁹⁰Y-DOTA-ビオチン）、Ep-CAM（NR-LU-10-SA

10

20

30

40

50

に⁹⁰Y-DOTA-ビオチン付加)。

【0039】

毒物を腫瘍に誘導するために抗体を用いる療法、例えば直接複合体化抗体による放射線免疫療法(RIT)は、部分的には至適未満の腫瘍線量及び治療指数(TI)のためにこれまで限定的な首尾しか得られていない。さらにまた、正常組織のバイスタンダー毒性のために、用量増加は実施不可能であり、かくしてそのような治療法は限定的な抗腫瘍効果しかもたらさない。したがって、本発明は以下の認識に基づく：ヒトA33糖タンパク質抗原は結腸直腸癌に存在し、固有の滞留特性を有するので、log変換倍の高さのTI及びいずれの主要器官に対しても毒性を生じない定着異種移植片の完全緩解を達成するPRIT方法論を開発し、A33と結合する第一の抗原結合部位及びDOTA-Bn(金属)複合体に対して高い親和性(10
例えばC825と称される単鎖Fv(scFv)による特異性)を有する第二の抗原結合部位を有する二重特異性抗体(本明細書ではhuA33-C825と称される)を用いて腫瘍細胞上のヒトA33を効果的に標的にできよう。本明細書に記載するように、PRIT方法論は、SW1222の皮下結腸直腸癌異種移植モデルを用い、huA33-C825、デキストラン系除去剤(デキストラン-CA)及び¹⁷⁷Lu-放射能標識DOTA-Bnハプテン(¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn)の用量を滴定することによってin vivoで改善された。

本明細書に記載するように、本発明の二重特異性結合因子は診断用画像化/線量測定及び治療的応用で二通りの機能性を提供する。標的誘導放射線療法(放射線免疫療法(RIT)と称される)は、TIが良好であるかぎり、十分な放射線をデリバリーしていずれの腫瘍抵抗性も克服することができる。従来の放射線標識IgG医薬(例えば⁹⁰Y-ゼバリン)は3.1の至適未満のTIを有し、これは治癒的療法の境界線である(この場合、血液学的毒性が用量を制限する)。本発明は、予備標的誘導RIT(PRIT)では抗体標的誘導工程はペイロード工程から分離されるという認識を包含する。本開示は、いくつかの実施態様ではPRITは患者の看護を容易にできるという、従来のRITを超えるPRITの1つの潜在的な追加的利点を評価する。いくつかの実施態様では、コールドの抗体の最初の輸液(いくつかの実施態様では除去剤の投与)は医師の診察室(例えばマネージング医の診察室)で実施できる。いくつかの実施態様では、放射能標識DOTA-Bnの工程(典型的には1つ以上の(いくつかの実施態様では全ての)他の工程に続いて実施される)のみが核医学熟練医によって実施されねばならないであろうが、いったん放射能が身体から消失したら、続けて患者を担当医の監督下に戻すことができる(24時間以内)。したがって、大きなリガンド及び小さなリガンドの固有の薬物動態を利用することによって、PRITは高度に効果的であることを本発明者らは本明細書で明らかにする。本発明は特に、DOTA-Bn(Bn=ベンジル)を利用する完全ヒト化PRIT系の使用はマウス異種移植モデルで顕著な治癒的潜在能力を有することを示す。TIが>10倍改善されるとき、臨床的又は組織学的毒性は観察されない。治療診断両用薬剤として、PET又はSPECTを用いるPRIT線量測定法は、高度に再現性を有する線量概算をもたらした。放射性同位元素は初めに原理を証明したが、PRITは、DOTA-Bnに連結される任意のペイロード(ナノ粒子、ペプチド、毒素、薬物及びウイルスを含む)に応用することができる。本発明者らは、米国におけるその高い死亡率のゆえにそのPRIT法をヒトA33抗原への標的誘導に応用した。例えば、A33陽性腫瘍は以下の癌の高い死亡率に関与している：結腸直腸癌(年間49700人死亡)、胃癌(年間10720人死亡)及び膵臓癌(年間39590人死亡)。現在のところ、これらの転移性癌について治癒効果を有する治療法は存在しない。(40
40

【0040】

本明細書に記載するように、本発明者らは、huA33-C825と称される二重特異性抗体(ヒト化抗体A33の可変領域配列(King et al., 1995, Brit. J. Cancer 72:1364-1372)及びC825、ベンジル-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA-Bn)-放射性金属複合体に対して高い親和性を有するネズミscFv抗体(Orcutt et al., 2011, Nucl. Med. Biol. 38:223-233)を用いる)を開発し、皮下SW1222ヒト結腸直腸癌の定着異種移植片を有するマウスで改善されたPRIT方法論を明らかにした。我々は、本明細書に提供するデータは特に、本明細書に記載する改善PRITは、注射後(p.i.)24時間で10
50

5:1(血液)及び18:1(腎)の腫瘍対正常組織比を提供することを特記する。さらにまた、本明細書に記載するように、注射後2-120時間において、¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの生体分布、PRITに対する腫瘍、肝、脾及び腎の見積もられた吸収線量(cGy/MBq)は、それぞれ65.8、0.9(治療指数(TI):73)、6.3(TI:10)、6.6(TI:10)及び5.3(TI:12)であった。したがって、いくつかの実施態様では、本明細書に記載するhuA33-C825二重特異性抗体を利用するPRITレジメンは、ヒト結腸直腸癌異種移植の治療において改善された治療指數及び最適腫瘍線量を提供する。我々はまた、本明細書に提供するデータは特に、定着腫瘍の二サイクルPRIT処置(66.6又は111 MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn、表7参照)は9/9の完全応答及び2/9の140日超の無再発生存をもたらしたことを見ていることを特記する。さらによりまた、他の7匹では、腫瘍サイズが500mm³に達する期間は、無処置マウスの13±2日に対して66.6 MBqでは27±26日及び111 MBqでは40±6日であった。放射線誘発障害の臨床的又は組織学的証拠は存在しなかった。したがって、本明細書に提供するデータは、本明細書に記載する二重特異性抗体は、有効性及び安全性プロフィールの改善を特徴とする癌の治療薬であること、本明細書に記載するマルチ工程のPRITアプローチは、定着した結腸直腸腫瘍の除去のために、-放出同位元素の¹⁷⁷Luを用いて安全かつ効果的な放射線をデリバリーできる可能性があることを立証する。

【0041】

ヒト化抗体

いくつかの実施態様では、本発明にしたがって用いられる抗体はモノクローナル抗体であるか、及び/又はいくつかの実施態様では他の種で調製された同系の抗A33抗体のヒト化型であり得る。いくつかの実施態様では、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリンの抗原結合に要求されない軽鎖又は重鎖(例えば定常領域及び可変ドメインのフレームワーク領域)のアミノ酸のいくつか又は全部が、同系の非ヒト抗体の軽鎖又は重鎖の対応するアミノ酸の代用に用いられる抗体である。例示すれば、ある抗原に対するネズミ抗体のヒト化型はその重鎖及び軽鎖の両方に、(1)ヒト抗体の定常領域；(2)ヒト抗体の可変ドメインのフレームワーク領域；及び(3)ネズミ抗体由来のCDRを有する。いくつかの実施態様では、ヒトフレームワーク領域の1つ以上の残基がネズミ抗体の対応する位置の残基に変更され、したがって当該抗体に対するヒト化抗体の結合親和性を保存することができる。そのような変更は時に“復帰変異”と称される。同様に、正変異は、所望の理由(例えば安定性又は結合親和性)のためにネズミ配列に復帰するために実施され得る。ヒト化抗体は、非ヒト要素が顕著に少ないので一般的にはキメラヒト抗体と比較して免疫応答を誘引する公算が低い。

いくつかの実施態様では、ヒト化抗体は組換えDNA技術によって生成される。また別には或いは前記に付け加えれば、本発明のヒト化抗体を作製する適切な方法は例えば以下に記載されている:EP0239400; Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029; 米国特許6,180,370号；及びOrlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833(前記文献のいずれの開示も参照によりその全体が本明細書に含まれる)。一般的には、ネズミ(又は他の非ヒト)CDRのヒト抗体への移植は以下のように達成される。重鎖及び軽鎖可変ドメインをコードするcDNAをハイブリドーマから単離する。可変ドメイン(CDRを含む)のDNA配列をシーケンシングによって決定する。CDRをコードするDNAを、ヒト抗体の重鎖又は軽鎖可変ドメインコード配列の対応する領域に挿入し、所望のアイソタイプ(例えばC_Hのために1及びC_Lのために)のヒト定常領域遺伝子フラグメントに結合して、遺伝子が合成される。ヒト化重鎖及び軽鎖遺伝子を哺乳動物宿主細胞(例えばCHO又はNSO細胞)で共同発現させて、可溶性ヒト化抗体を生成する。抗体の大規模生産を容易にするために、生産株でDHFR遺伝子又はGS遺伝子を用いて高発現体を選別することがしばしば所望される。これらの生産細胞株をバイオリアクター又は中空糸培養系又はWAVE技術で培養し、可溶性抗体のバルク培養を製造するか、又は乳汁中に抗体を発現するトランスジェニック哺乳動物(例えばヤギ、乳牛又はヒツジ)を作製する(例えば米国特許5,827,690号を参照され

10

20

30

40

50

たい)。

【0042】

本明細書に記載するように、多重特異性結合因子（例えば二重特異性抗体）は、Kingら(1995、上掲書)が記載するヒト化抗体A33で見出される配列及び/又は構成要素を利用して操作された。他のネズミ講A33抗体を（例えば本明細書に記載するように）ヒト化してもよいし、本明細書に記載する多重特異性結合因子の操作に利用してもよい。例えば、1つ以上の（典型的にはただ1つの）候補抗体ネズミ抗A33抗体の軽鎖及び/又は重鎖の可変領域をコードするcDNAを用いて、ネズミヒトキメラの発現ベクターを構築する（前記キメラでは以前に記載したように、ネズミA33抗体可変領域はヒトIgG1（重鎖のため）及びヒトカッパ（軽鎖のため）定常領域に連結される）。また別には或いは前記に付け加えれば、いくつかの実施態様では、変種グリコシル化を有する新規な型のヒト化抗A33抗体を、例えば、（そのように所望されるならば）Fc受容体の結合強化及び抗原親和性の強化のために作製することができる。10

いくつかの実施態様では、ヒト化抗A33抗体を製造するために、ヒトアクセプターフレームワードメインをヒト生殖細胞系列配列との相同性一致によって選別することができる。そのような選別ヒトアクセプターフレームワークを用いて、軽鎖及び重鎖可変ドメインを設計して、それぞれの多数の変種/変型を作製し発現させることができる。

ヒト患者の治療的処置のためには完全にヒトの抗体が特に所望される。ヒト抗体は、上記に記載したヒト免疫グロブリン配列から得られる抗体ライブラリーを用いるファージディスプレー法を含む、当業界で公知の多様な方法によって作製することができる。例えば以下を参照されたい：米国特許4,444,887号及び4,716,111号；並びに国際特許出願公開広報WO 98/46645、WO 98/60433、WO 98/24893、WO 98/16664、WO 96/34096、WO 96/33735及びWO 91/1074（前記の各々は参考によりその全体が本明細書に含まれる）。ヒトモノクローナル抗体の調製には、Coleらの技術（Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. R.A. Reisfeld & S. Sell, pp.77-96, New York, Alan R. Liss）及びBoerderらの技術（Boerder et al., 1991, J. Immunol, 147(1):86-95）もまた利用できる。20

【0043】

他の技術を用いて生成されるヒト抗体（ただし本発明の抗A33抗体の可変領域を保持する）は本発明に含まれる。また別に或いは付け加えれば、ヒト抗体はまたトランスジェニックマウスを用いて製造できる。トランスジェニックマウスは機能的な内因性マウス免疫グロブリンを発現することができないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができる（例えば以下を参照されたい：Lonberg and Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93；Taylor, L. D., et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295；Kellermann S-A., and Green L. L., 2002, Current Opinion in Biotechnology 13:593-597；Little M. et al., 2000, Immunol. Today 21:364-370；Murphy, A.J. et al., 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-5158）。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体の作製についてのこの技術及びそのような抗体を作製するためのプロトコルに関する詳細な考察については、例えば以下を参照されたい：国際特許出願公開広報WO 98/24893、WO 92/01047、WO 96/34096、WO 96/33735；欧州特許0 598 877号；米国特許5,413,923号、5,625,126、5,633,425号、5,569,825号、5,661,016号、5,545,806号、5,814,318号、5,886,793号、5,916,771号、5,939,598号及び8,502,018号（前記は参考によりその全体が本明細書に含まれる）。

30

さらにまた、ヒトモノクローナル抗体は、ヒト末梢血の白血球、脾細胞又は骨髄細胞を移植したマウスを免疫することによって作製できる（例えばXTLのトリオーマ技術）。選択したエピトープを認識する完全にヒトの抗体は、“ガイド選別”と称される技術を用いて作製することができる。このアプローチでは、選別非ヒトモノクローナル抗体（例えばマウス抗体）は、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選別のためのガイドに用いられる（Jespers et al., 1988, Biotechnol. 12:899-903）。

【0044】

本明細書で用いられるように、“抗A33抗体”、“抗A33抗体部分”又は“抗A33抗体フラグメント”及び/又は“抗A33抗体変種”などは、いくつかの実施態様では、A33と結合する免疫グロブリンの少なくとも一部分を含むポリペプチド含有実体を指し、特に、A33と結合する本明細書に記載する個々のモノクローナル抗体のいずれかで見出される、重鎖若しくは軽鎖の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）又はそのリガンド結合領域（典型的には対応する鎖で見出される全CDR又はその部分を含む）のポリペプチドを含む実体を指す。いくつかの実施態様では、当該用語は、そのようなCDRだけでなく非ネズミ起原（好ましくはヒト起源）の本発明の抗体に取り込むことができる他の配列（重鎖若しくは軽鎖可変領域、重鎖若しくは軽鎖定常領域、フレームワーク、又は前記の任意の部分で見出される配列）もまた含む実体を指す。いくつかの具体的な実施態様では、“抗A33抗体”という用語は、文脈から明白であろうが、集合的に又は個々にhuA33、hA33、A33、ヒト化抗体A33、ヒト化A33及び前記の組み合わせ、及び/又は該当するフラグメント又は構成要素、ドメイン若しくはその領域、例えば単鎖可変フラグメント（例えばhuA33 scFv、hA33 scFv、A33 scFv及びその組合せ）を指すために用いられる。

いくつかの実施態様では、ヒト化抗体は、少なくとも1つの細胞機能をin vitroで、in situで及び/又はin vitroで調整し、低下させ、対抗させ、緩和し、軽減し、遮断し、阻害し、停止させ、及び/又は妨げることができる（この場合、当該細胞はヒトA33を発現する）。非限定的な例として、適切な抗A33抗体、特定の部分又は変種は、あるエピトープ（特にヒトA33のペプチドエピトープ）と高い親和性で結合する。

【0045】

抗体フラグメントは、当業界で公知の及び/又は本明細書に記載の酵素的切断、合成又は組み換え技術によって生成できる。抗体はまた、1つ以上の終止コドンが天然の終止コドンの上流に導入されてある抗体遺伝子を用いて多様な切詰め型として生成できる。例えば、F(ab')₂重鎖部分をコードする組合せ遺伝子を、重鎖のC_H1ドメイン及び/又はヒンジ領域をコードするDNA配列を含むように設計することができる。抗体の多様な部分を通常的な技術により化学的に一緒に結合させることができ、又は遺伝子操作技術を用いて一続きのタンパク質として調製することができる。

いくつかの実施態様では、本発明にしたがって用いられるキメラ又はヒト化抗体は、そのCDRが本明細書に記載する複数の抗A33抗体の1つ以上に見出され、さらに少なくとも抗体の一部分又は残余が1つ以上のヒト抗体で見出されるか又はヒト抗体に由来する抗体を含む。したがって、例えば、いくつかの実施態様では、抗体のヒト部分は、フレームワーク、C_L、C_Hドメイン（例えばC_H1、C_H2、C_H3）、ヒンジ、V_H、V_L領域（前記は実質的にヒトで非免疫原性である）を含むことができる。いくつかの実施態様では、本明細書の記載にしたがって利用される抗体の“ヒト部分”は、該当する供給源のヒト抗体で見出される対応する配列と100%同一性を示さないことがあることは、本開示を熟読する当業者には理解されるであろう。いくつかの実施態様では、免疫原性が無視できるように供給源のヒト抗体で見出されるヒトアミノ酸残基が可能なかぎり多く保持されるが、多様な実施態様では、ヒト化残基は、必要に応じて又はその他の所望に応じて、CDRによって形成される抗原結合部位を支援しつつ同時に抗体のヒト化を最大限するために修正できる。いくつかの実施態様では、そのような変更又は変動は、非修飾抗体と比較してヒト又は他の種での免疫原性を維持又は低下させる。

本明細書によって提供される抗体因子（本明細書に記載するヒト化抗体であるもの及び/又はヒト化抗体配列エレメントを利用するものを含む）は、機能的に再編成されたヒト免疫グロブリン（例えば重鎖及び/又は軽鎖）遺伝子を発現することができる非ヒト動物細胞又は原核若しくは真核細胞によって製造できることは、本開示を熟読する当業者には理解されるであろう。さらにまた、抗体因子が単鎖抗体であるときは、この抗体因子は自然のままのヒト抗体では見出されないリンカーペプチドを含むことができる。例えば、Fvはリンカーペプチドを含むことができ、前記リンカーペプチドは、例えば2から約20のグリシン又は他のアミノ酸残基、好ましくは8-15のグリシン又は他のアミノ酸残基であり、前記は重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域とをつなぐ。そのようなリンカーペプチドはヒ

10

20

30

40

50

ト起源であると考えられる。

【0046】

抗体のヒト化は、例えば、個々のヒトフレームワークのプールとインフレーム融合させた非ヒト標的モノクローナル抗体の6つのCDRを含むコンビナトリアルライブラリーの合成によって実施できる。公知の重鎖及び軽鎖ヒト生殖細胞系列遺伝子の全てを代表する遺伝子を含むヒトフレームワークライブラリーを利用することができる。得られたコンビナトリアルライブラリーを問題の抗原との結合についてスクリーニングすることができる。そのようなアプローチは、完全にヒトのフレームワークの特に好ましい（例えば親抗体に対する結合活性の維持という意味で）組合せのスクリーニング及び/又は選別を可能にすることができる。続いて、ヒト化抗体を多様な技術によってさらに最適化することができる。
10

抗体のヒト化を用いて、マウス又は他の非ヒト抗体を“完全にヒト”の抗体に進化させることができる。得られた抗体は唯一ヒト配列を含みマウス又は非ヒト抗体配列を全く含まず、一方、出発抗体に類似する結合親和性及び特異性を維持する。

いくつかの実施態様では、本発明にしたがって用いられる抗A33ヒト抗体は変種Fc領域を含み、この場合、前記変種Fc領域は、野生型Fc領域（又は親Fc領域）に対して少なくとも1つのアミノ酸修正を含み、その結果、前記分子はFc受容体（例えばFc_R）に対して改変された親和性を有するが、ただし前記変種Fc領域が、例えばSondermannらが開示するようにFc-Fc受容体相互作用の結晶学的及び構造的分析に基づいてFc受容体との直接接触を生じる位置には置換を持たないことを条件とする（Sondermann et al., 2000, Nature, 406:267-273（前記文献は参照によりその全体が本明細書に含まれる））。Fc受容体（例えばFc_R）との直接接触を生じるFc領域内の位置の例は、アミノ酸234 - 239（ヒンジ領域）、アミノ酸265 - 269（B/Cループ）、アミノ酸297 - 299（C' / Eループ）、及びアミノ酸327 - 332（F/Gループ）である。いくつかの実施態様では、変種Fc領域を含む本発明の抗A33抗体は、構造的及び結晶学的分析に基づいてFc_Rと直接的に接触する少なくとも1つの残基の修正を含む。
20

【0047】

いくつかの実施態様では、本発明にしたがって用いられる抗A33抗体は、活性化受容体及び/又は阻害性受容体に対して改変された親和性を有するヒト化A33抗体であり、前記改変抗体は1つ以上のアミノ酸修正を有する変種Fc領域を有し、この場合、前記1つ以上のアミノ酸修正は297位のアラニンによる置換であり、いくつかの実施態様では、239D、330L、332Eの置換はFcR親和性を強化し、いくつかの実施態様では、322Kの置換はFcR結合を低下させるか又は排除する。いくつかの実施態様では、本発明にしたがって用いられる抗A33抗体は、親のFc領域と比較して変種グリコシル化を有するFc領域を有する。いくつかの実施態様では、変種グリコシル化はフコースの欠如を含み、いくつかの実施態様では、変種グリコシル化はGnT1欠損CHO細胞での発現で生じる。いくつかの実施態様では、本発明は、K322A置換を特徴とする変種Fc領域を含むヒト化A33抗体構成要素を有する二重特異性結合因子を提供する。いくつかの実施態様では、提供される二重特異性結合因子は、その要素を誘導することができる親抗体と比較して、変種グリコシル化（例えばグリコシル化されていない）を示す抗体構成要素を含む。いくつかのそのような実施態様では、そのような変種は、K322A置換を特徴とする変種Fc領域であるか又は前記を含む。いくつか実施態様では、そのような変種要素（例えば変種Fc領域）は、補体活性化及びFcR結合の完全な排除をもたらし、前記はそれ以外では本明細書に記載する予備標的誘導放射線免疫療法で除去剤の添加前に腫瘍細胞膜を損傷させることができる。
30
40

いくつかの実施態様では、本発明は、変種Fc領域（すなわちFc領域が適切な参考Fcと対比して1つ以上の付加、欠失及び/又は置換を含む）を含む抗体又は抗体因子を提供及び/又は利用する。前記Fc領域は、当該参考Fcと比較して、そのエフェクター機能が改変されるか、及び/又はFcRに対するその親和性が強化又は低下することを特徴とする。これらの変更は当業者の技量範囲内である。

【0048】

したがって、とりわけ本発明は多重特異性結合因子（例えば抗体因子）を提供し、前記因子は、より強い親和性で1つ以上のFc Rと結合する変種Fc領域を含む。そのような因子は、下記で考察するように、好ましくはより効果的にエフェクター機能を媒介する。いくつかの実施態様では、本発明は、1つ以上のFc Rに対して弱い親和性で結合する変種Fc領域を含む多重特異性結合因子（例えば抗体因子）を提供する。エフェクター機能の低下又は排除は、ある種の事例、例えば抗体の作用メカニズムが標的抗原保有細胞の遮断又は相殺を含むが当該細胞を殺滅させない抗体の場合に所望される。さらにまた、エフェクター機能の排除は、下記で考察するように二重特異性抗体を作製するときに、いくつかの実施態様で所望される。エフェクター機能の低下又は排除は自己免疫疾患の場合に所望されよう（この場合には、エフェクター細胞（このタイプの機能は宿主細胞に存在しよう）でFc R活性化受容体が遮断されよう）。一般的には、エフェクター機能の増強を腫瘍及び外来細胞に向けることができる。いくつかの実施態様では、エフェクター機能を腫瘍細胞から遠ざけることができる。
10

本発明にしたがって用いられるFc変種は、エフェクター機能の改変（ただし前記に限定されない）を含む、他のFc修正と組み合わせることができる。本発明は、本明細書に記載するFc変種を他のFc修正と組み合わせて抗体又はFc融合物に累積的、相乗的又は新規な特性を提供することを包含する。いくつかのそのような実施態様では、Fc変種は、当該変種に組み合わされた修正の表現型を強化することができる。例えば、野生型Fc領域を含む類似の分子よりも高い親和性でFc RIIIAと結合することが知られている変異体とFc変種を組み合わせる場合、当該変異体との組合せはFc RIIIA親和性ではるか高倍数の強化をもたらす。
20

【0049】

本発明にしたがえば、いくつかの実施態様では、本明細書に記載するFc変種は抗体又はFc融合物に取り込まれ、Fc領域を含む1つの分子に対して1つ以上のFc糖型を含む操作された因子（すなわち1つ以上の炭水化物が共有結合で付加される1つ以上のFcポリペプチド）を生成する（この場合、当該糖型の炭水化物組成はFc領域を含む親分子の糖型とは異なる）。

いくつかの実施態様では、本明細書に記載する多重特異性結合因子（例えば抗体）は、変種グリコシリ化を示すFc変種を含むことができ、及び/又は、適切な参考Fc領域（例えば野生型）と比較してグリコシリ化を欠く当該因子のFc領域が生成されるようにグリコシリ化欠損細胞株（例えばGnT1欠損CHO細胞）で発現させることができ、又はグリコシリ化が欠損していない細胞株でFc領域を発現させることができる。
30

いくつかの実施態様では、本発明にしたがって利用される抗体は、好ましくは抗体の機能性（例えば抗原との結合活性）を改変することなく、問題の抗原（例えばA33）と結合する適切な参考抗体と対比して修正されたグリコシリ化部位を有することができる。本明細書で用いられるように、“グリコシリ化部位”には、オリゴ糖（すなわち一緒に連結された2つ以上の单糖類を含む炭水化物）が特異的にかつ共有結合により付加される抗体中の任意の指定のアミノ酸配列が含まれる。オリゴ糖の側鎖は、典型的には抗体の骨格にN-又はO-結合により連結される。N-結合グリコシリ化は、アスパラギン残基の側鎖へのオリゴ糖部分の付加を指す。O-結合グリコシリ化は、ヒドロキシアミノ酸（例えばセリン、スレオニン）へのオリゴ糖部分の付加を指す。例えば、ある種のオリゴ糖（フコースを含む）及び末端N-アセチルグルコサミンを欠くFc-グリコ型（huA33-IgG1n）は、特別なCHO細胞で生成され、ADCCエフェクター機能の強化を示すことができる。
40

【0050】

いくつかの実施態様では、本発明は、本発明の抗体の炭水化物含有量をグリコシリ化部位の付加又は欠失によって修正する方法を包含する。抗体の炭水化物含有量を修正する方法は当業界で周知であり、本発明に含まれている。例えば以下を参照されたい：米国特許6,218,149号；EP0359096B1；米国特許公開2002/0028486；国際特許出願公開広報WO 03/035835；米国特許公開2003/0115614；米国特許6,218,149号；米国特許6,472,511号（前記文献はいずれも参照によりその全体が本明細書に含まれる）。いくつかの実施態様では、本
50

発明は、本発明の抗体の炭水化物含有量を抗体の1つ以上の内因性炭水化物部分の欠失によって修正する方法を含む。いくつかの実施態様では、本発明は、297位をアスパラギンからアラニンに修正することによって抗体のFc領域のグリコシル化部位を欠失させる方法を含む。

操作された糖型は、多様な目的（エフェクター機能の強化又は低下を含むが、ただしこれらに限定されない）のために有用であり得る。操作された糖型は、当業者に公知の任意の方法によって、例えば、操作された又は変種発現株を用いることによって、1つ以上の酵素（例えばDIN-アセチルグルコサミントランスフェラーゼIII（GnTIII））の共同発現によって、Fc領域を含む分子を多様な生物又は多様な生物に由来する細胞株で発現させることによって、又はFc領域を含む分子を発現させた後で炭水化物を修正することによって生成できる。操作された糖型を生成する方法は当業界で公知であり、前記には以下の文献に記載された方法が含まれるが、ただしこれらに限定されない：Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180 ; Davies et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294 ; Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740 ; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-3473 ; 米国特許6,602,684号；米国特許出願10/277,370；米国特許出願10/113,929；国際特許出願公開広報WO 00/61739A1；WO 01/292246A1；WO 02/311140A1；WO 02/30954A1；POTILLEGENTTMtechnology (Biowa, Inc. Princeton, N.J.) ; GLYCOM ABTM glycosylation engineering technology (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)（前記文献の各々は参照によりその全体が本明細書に含まれる）。例えば以下を参照されたい：国際特許出願公開広報WO 00/061739；EA01229125米国特許出願公開2003/0115614；Okazaki et al., 2004, JMB, 336:1239-49（前記文献の各々は参照によりその全体が本明細書に含まれる）。

【0051】

多価結合因子

当業者には認識されているであろうが、多価結合因子は、2つ以上の標的（例えばエピトープ）に特異的に結合する結合要素を含む分子性実体又は複合体である。そのような多価結合因子には治療的使用を含む多様な使用が当業界で見出されている。当業者には認識されているように、一例を挙げれば、多価結合因子を操作し、細胞傷害性T細胞を腫瘍細胞に指向させることによって腫瘍細胞の殺滅が促進される。腫瘍抗原の例には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：アルファフェトプロテイン（AFP）、CA15-3、CA27-29、CA19-9、CA-125、カルレチニン、癌胎児性抗原、CD34、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、上皮膜タンパク質（EMA）、第VIII因子、CD31、FL1、グリア原線維酸性タンパク質（GFAP）、肉眼的囊胞病液性タンパク質（GCDFP-15）、HMB-45、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）、インヒビン、ケラチン、CD45、リンパ球マーカー、MART-1（メラン-A）、Myo DI、筋特異的アクチン（MSA）、ニューロフィラメント、ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）、胎盤性アルカリ性ホスファターゼ（PLAP）、前立腺特異的抗原、S100タンパク質、平滑筋アクチン、（SMA）、シナプトフィシン、甲状腺転写因子-1、サイログロブリン、腫瘍M2-PK及びビメンチン。

いくつかの実施態様では、本発明にしたがって使用される多価結合因子は二重特異性結合因子である。多くの実施態様では、そのような二重特異性結合因子は腫瘍細胞と結合することができる。多くの実施態様では、そのような二重特異性結合因子は、腫瘍細胞表面で発現されるA33抗原を介してヒト結腸直腸癌細胞に結合することができる。

いくつかの実施態様では、本発明によって提供される多価結合因子（例えば二重特異性結合因子）は抗体構成要素であるか、又は抗体構成要素を含む。抗体構成要素を含む多重特異性結合因子を設計し、構築し、及び/又は製造する多様な技術が当業界で公知である。

【0052】

例えば、完全な免疫グロブリンフレームワーク（例えばIgG）、単鎖可変フラグメント（scFv）又は前記の組み合わせを利用する多価結合因子は既に構築されている。タンデムに並んだ2つのscFv単位から構成される二重特異性結合因子は、臨床的に首尾の良い二重

10

20

30

40

50

特異性抗体様式であることが示されている。抗腫瘍免疫療法の事例では、タンデムに並んだ2つの単鎖可変フラグメントを含む二重特異性結合因子が、腫瘍抗原と結合するscFvが、CD3と結合することによってT細胞を束縛するscFvと連結されるように設計された。このようにして、T細胞は腫瘍部位に補充され、それらT細胞が、ある種のT細胞が有する細胞傷害特性によって腫瘍を構成する腫瘍細胞の殺滅を媒介できることが期待された。リンパ腫のCD19及びCD3を標的とするそのような二重特異性結合因子の例は既に実施されており、二重特異性T細胞束縛性（又はBiTE）と称され（例えば以下を参照されたい：Dreier et al., 2003, J. Immunol. 170:4397-4402；Bargou et al., 2008, Science 321:974-977）、動物の異種移植試験では腫瘍増殖の防止で既に成功している。ヒトの試験では、この二重特異性結合因子は、5例の部分的緩解及び2例の完全緩解を含む客観的な腫瘍応答を示した。

例示的な二重特異性結合因子には、腫瘍抗原に特異的な第一の抗体構成要素及び小分子ハプテン（例えばDTPA、IMP288、DOTA、DOTA-Bn、DOTA-デスフェリオキサミン、ビオチン、フルオレセイン又はGoodwinらが開示したもの（Goodwin, D.A. et al., 1994, Cancer Res. 54(22):5937-5946、前記文献は参照により本明細書に含まれる））に特異的な第二の抗体構成要素を有するものが含まれる。二重特異性結合因子は、例えば同じ又は異なる抗原の異なるエピトープを認識する重鎖及び/又は軽鎖を組み合せることによって作製することができる。いくつかの実施態様では、分子的機能によって、二重特異性結合因子は、その2つの結合アーム（1つのV_H/V_L対）の一方で1つの抗原（エピトープ）と結合し、さらにさらにその第二のアーム（異なるV_H/V_L対）で異なる抗原（又はエピトープ）と結合する。この定義によれば、二重特異性結合因子は、（特異性及びCDR配列の両方で）2つの別個の抗原結合アームを有し、それが結合する各抗原については一価である。

【0053】

いくつかの実施態様では、本発明の二重特異性結合因子は、異なる構造を有する2つの標的に同時に結合する能力を特徴とする。いくつかの実施態様では、本発明の二重特異性結合因子は、例えばB細胞、T細胞、骨髄細胞、形質細胞、又は肥満細胞抗原若しくはエピトープと特異的に結合する少なくとも1つの構成要素、及び治療用薬剤又は診断用薬剤を保持する標的誘導性複合物と特異的に結合する少なくとも1つの他の構成要素を有する。

本発明の二重特異性結合因子（例えば二重特異性抗体）は、ヒトA33抗原を標的とするマルチ工程の予備標的誘導放射線免疫療法（PRIT）法で用いたとき、ある種の様式が一定の標的（例えば腫瘍抗原）に対してより有益であり得るという具体的な洞察に基づく。例えば、本明細書で提供する二重特異性抗体は、完全なIgG及びscFvの組合せを利用する。そのような二重特異性抗体は、IgG要素（例えば抗A33）を介する二価結合及びscFv要素（例えば抗DOTA-Bn）を介する二価結合を示す。本明細書に記載するように、この様式を有する二重特異性抗体は第一にIgG要素（例えば抗A33）を介してA33陽性腫瘍細胞と結合し、過剰抗体は除去剤（CA、例えばデキストラン系除去剤）を介して血液から除去される。前記工程の後に、放射能標識小分子ハプテン（例えば¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn）の使用を含む工程が続く。例示的な放射能標識小分子には、放射性ランタン系列、例えばイットリウム及びルテチウム（例えば⁸⁶Y、⁹⁰Y及び¹⁷⁷Lu）の他に¹²⁴I及び¹³¹Iが含まれる。さらにまた、本発明の二重特異性抗体は、診断及び治療の両用標的誘導の特徴を提供する。

多様な実施態様では、本発明の二重特異性結合因子（例えば二重特異性抗体）は、第一の結合要素及び第二の結合要素から構成される。多くの実施態様では、本明細書に記載する二重特異性結合因子の第一及び第二の結合要素はそれぞれ、異なる特異性を特徴とする抗体構成要素から構成される。多くの実施態様では、抗体構成要素は表8から選択される。

【0054】

多様な実施態様では、本発明の二重特異性結合因子は第一の結合要素、第二の結合要素を含む。多様な実施態様では、本発明の二重特異性結合因子は、第一の結合要素、第二の結合要素、及び第一の結合要素及び第二の結合要素の両方をつなぐリンカー（例えば第一と第二の結合要素の間に配置される）を含む。

10

20

30

40

50

多様な実施態様では、本明細書に記載する第一及び/又は第二の結合要素は抗体構成要素であるか、又は抗体構成要素を含む。多様な実施態様では、本明細書に記載する第一及び/又は第二の結合要素はリンカー配列を含む。

いくつかの実施態様では、リンカーは、長さが少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、又は前記を超えるアミノ酸である。いくつかの実施態様では、リンカーは、硬直した三次元構造を探らない傾向があり、むしろ当該ペプチド（例えば第一及び第二の結合要素）に可撓性を提供するという特徴を有する。いくつかの実施態様では、リンカーは、二重特異性結合因子に付与する特殊な特性（例えば凝集の軽減及び/又は安定性の増強）に基づき、本明細書に記載する二重特異性結合因子で用いられる。いくつかの実施態様では、本発明の二重特異性結合因子はG₄Sリンカーを含む。いくつかの実施態様では、本発明の二重特異性結合因子は(G₄S)_nリンカーを含む（nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16以上）。

多様な実施態様では、本明細書に記載する第一及び/又は第二の結合要素は免疫グロブリン（例えばIgG）であるか、又は前記を含む。多様な実施態様では、本明細書に記載する第一及び/又は第二の結合要素は抗体フラグメント（例えばscFv）を含むか、又は抗体フラグメントである。多様な実施態様では、本明細書に記載する第一の結合要素は免疫グロブリンを含み、第二の結合要素は抗体フラグメントを含む。いくつかのある種の実施態様では、第一の結合要素は免疫グロブリンであり、第二の結合要素は抗体フラグメントである。いくつかのある種の実施態様では、第一の結合要素はIgGであり、第二の結合要素はscFvである。

【0055】

いくつかのある種の実施態様では、本発明の二重特異性結合因子は免疫グロブリンを含み、前記免疫グロブリンは重鎖及び軽鎖並びにscFvを含む。いくつかのある種の実施態様では、scFvは免疫グロブリンの重鎖のC-末端に連結される。いくつかのある種の実施態様では、scFvは免疫グロブリンの軽鎖のC-末端に連結される。多様な実施態様では、scFvはリンカーを介して重鎖又は軽鎖に連結される。

いくつかの実施態様では、本発明の二重特異性結合因子は、表8に記載の1つ以上の配列と少なくとも約50%（例えば少なくとも約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%）同一である1つ以上の配列を含む。

いくつかの実施態様では、本発明の二重特異性結合因子は、表8に記載の1つ以上の配列と実質的に同一である1つ以上の配列を含む。

いくつかの実施態様では、本発明の二重特異性結合因子は、表8に記載の1つ以上の配列と同一である1つ以上の配列を含む。

いくつかの実施態様では、本発明の二重特異性結合因子は、表8に記載の1つ以上の配列から選択される。いくつかのある種の実施態様では、本発明の二重特異性結合因子は、表8に記載の2つの配列、例えば重鎖及び軽鎖配列から選択される。

多様な実施態様では、本明細書に記載する二重特異性結合因子の第一の結合要素は、表8に記載の抗体構成要素と少なくとも約50%（例えば50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は前記を超えて）同一である配列を有する抗体構成要素を含む。

多様な実施態様では、本明細書に記載する二重特異性結合因子の第一の結合要素は、表8に記載の抗体構成要素と実質的に同一である配列を有する抗体構成要素を含む。

多様な実施態様では、本明細書に記載する二重特異性結合因子の第一の結合要素は、表8に記載の抗体構成要素と同一の配列を有する抗体構成要素を含む。

多様な実施態様では、本明細書に記載する二重特異性結合因子の第二の結合要素は、表8に記載の抗体構成要素と少なくとも約50%（例えば50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は前記を超えて）同一である配列を有する抗体構成要素を含む。

10

20

30

40

50

多様な実施態様では、本明細書に記載する二重特異性結合因子の第二の結合要素は、表8に記載の抗体構成要素と実質的に同一である配列を有する抗体構成要素を含む。

多様な実施態様では、本明細書に記載する二重特異性結合因子の第二の結合要素は、表8に記載の抗体構成要素と同一の配列を有する抗体構成要素を含む。

【0056】

本明細書に記載するように、本発明者らは、A33陽性ヒト結腸直腸腫瘍(SW1222)を保有する免疫不全マウスで、huA33-C825と称する二重特異性抗体を用いる改善されたマルチ工程PRIT法を提供する。そのような方法は、多様な用量のhuA33-C825及びデキストラン系CAの静脈内注射、その後の¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn治療診断両用(すなわち診断用かつ治療用)ハプテンの注射を、同時シンチグラフィー画像化及び放射線免疫療法のために含む。本発明は特に、最適なhuA33-C825及びCA用量を提供する生体分布試験、その後に続く追加的生体分布試験(¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn用量(~2.0 - 111.0 MBq)の関数として腫瘍の取り込みを決定する)を記載し、PRIT試験のための実際的及び線量測定ガイドとして役立てる。さらにまた本明細書に記載するように、異なる3通りの用量レベル(11.5、55.0及び111.0 MBq)の¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの注射から24時間後に腫瘍及び腎を摘出し、オートラジオグラフィーにより¹⁷⁷Lu活性のミクロ分布をex vivoで調べるとともに、ヘマトキシリンエオシン染色により¹⁷⁷Lu活性と異種移植片及び組織の形態学との相関性を調べた。さらにまた、¹³¹I-huA33-C825による放射性トレーサー試験に基づいて概算した注射後24時間のhuA33-C825(0.25 mg/マウス)のSW1222腫瘍の絶対取り込みは~90pmol/g腫瘍であった。したがって本発明は、1分子のhuA33-C825が2分子の¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnと結合する能力を有するとするなら(したがって¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの最大結合性能は180pmol/g腫瘍)、概算される最大占有率は(11 pmol ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn/180pmol = 0.061又は~6%)であることを示す。したがって、本発明は特に付随する有害な放射線応答をもたらすことなく有効であったことを示している。さらにまた、本発明は特に、少なくともいくつかの実施態様では、改善されたマルチ工程PRIT法(huA33-C825と称する抗A33/抗DOTA-Bn(金属)二重特異性抗体、デキストラン系CA及び¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnを利用する)を用いて、皮下に定着ヒト結腸直腸腫瘍異種移植片を有する免疫不全マウスは、正常組織(骨髄及び腎を含む)への毒性を最小限にしつつ治癒され得ることを示す。

SW1222は、これまで精査されたヒト結腸直腸癌(例えばLS174T)の中で比較的よく分化し血管形成された腫瘍として際立っている。標的誘導抗体の均質な分布を許容するが(Emir et al., 2007, Cancer Res. 15;67(24):11896-11905)、これらの腫瘍はまた比較的放射線耐性である。本明細書に記載するように、A33抗原は、95%を超えるヒト結腸癌で高度に発現され、正常な発現は限定的で循環にはわずかしか排出されない。ヒト結腸直腸癌ではA33抗原への臨床的治療的標的誘導はこれまで不首尾であった。本明細書に記載する二重特異性抗体はA33及びDOTA-Bn(金属)への親和性への親和性を示し、前記は放射能標識ルテチウム(例えば¹⁷⁷Lu)の腫瘍取り込み及びA33陽性腫瘍への標的誘導放射線免疫療法の首尾の良いデリバリーを促進する。さらにまた、本明細書に記載するヒト化A33抗体を利用する二重特異性結合タンパク質は、A33への二価結合及びDOTA-Bnへの二価結合の能力を有し、前記は、A33⁺腫瘍の殺滅性能の強化及びカタストロフィー的放射線応答の欠如による安全性の増強をもたらす。したがって、本明細書に記載する二重特異性結合タンパク質の様式を利用するPRIT戦略は、腫瘍殺滅の強化、有害作用の軽減のための固有のアプローチであり、重篤なA33陽性癌の治療のための強力な治療薬であることを示す。

【0057】

標的

とりわけ、本発明は、多重特異性結合因子(特に二重特異性結合因子、例えば二重特異性抗体)は、細胞殺滅の促進に特に有用及び/又は有効であるという認識を包含する。特に本発明は、標的細胞付隨エピトープ(例えば腫瘍抗原)及び小分子ハプテン(例えばDOTA-Bn(金属))の両方と特異的に結合する多価結合因子の活性は結腸癌の有効な免疫療法であり得ることを示す。

例えば、本発明のいくつかの実施態様では、多価結合因子は腫瘍細胞付隨エピトープ及

10

20

30

40

50

び小分子ハプテンと特異的に結合する。そのような実施態様にしたがえば、多価結合因子は当該薬剤とその標的エピトープの一方又は両方との結合を促進することができ、及び/又は小分子ハプテンを介して放射線免疫療法によって媒介される標的腫瘍細胞の殺滅を強化することができる。

いくつかの実施態様では、殺滅される標的細胞には、例えば腫瘍抗原（例えばA33陽性腫瘍）を発現する細胞が含まれる。本明細書に記載する多価結合因子が所望のように結合する細胞上の適切な標的エピトープを当業者は認識しているであろう。

【0058】

核酸構築物及び発現

本明細書に記載するヒト化抗体及び多重特異性結合因子（例えば二重特異性抗体）は、10当業界で公知の分子生物学的方法を用いて作製することができる。核酸分子は、適切な宿主細胞に導入したときに融合タンパク質を発現できるベクターに挿入される。適切な宿主細胞には、細菌、酵母、昆虫及び哺乳動物細胞が含まれるが、ただしこれらに限定されない。当業者に公知の、ベクターにDNAフラグメントを挿入する方法のいずれかを用いて、転写/翻訳制御シグナルの制御下で本発明の融合タンパク質をコードする発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、in vitro組換え体DNA及び合成技術並びにin vivo組換えが含まれる（例えば以下を参照されたい：Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel, et al, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY
）。20

本発明による核酸分子の発現は、当該分子が組換えDNA分子で形質転換された宿主で発現されるように、第二の核酸配列によって調節することができる。例えば、本発明の核酸分子の発現は、当業界で公知のプロモーター及び/又はエンハンサー要素によって制御できる。

核酸構築物は、抗体及び/又は抗体構成要素から作製された多重特異性結合タンパク質をコードする領域を含む。典型的には、そのような多重特異性結合タンパク質はV_H及び/又はV_L領域から作製されるであろう。所望の結合及び/又は機能特性を示す抗体を同定及び選別した後、各抗体の可変領域を単離、增幅、クローニング及び配列決定する。V_H及び/又はV_Lヌクレオチド配列に修正を加えることができる。前記修正には、アミノ酸をコードする及び/又は制限部位を保持するヌクレオチド配列の付加、アミノ酸をコードするヌクレオチド配列の欠失、又はアミノ酸をコードするヌクレオチド配列の置換が含まれる。30抗体及び/又は抗体構成要素はヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体から作製できる。

本発明の核酸構築物は、当業界で公知の方法によって発現ベクター又はウイルスベクターに挿入され、核酸分子は発現制御配列に作動できるように連結される。

【0059】

適切な場合には、本明細書に記載するヒト化抗体及び多重特異性結合因子を修飾して、特定の細胞タイプ又は生物での発現に最適なコドンを含ませることができる（例えば米国特許5,670,356号及び米国特許5,874,304号を参照されたい）。コドン最適化配列は合成配列であり、好ましくは、コドン最適化していない親ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと同一のポリペプチド（或いは、完全長ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントであって、当該完全長ポリペプチドと実質的に同じ活性を有するもの）をコードする。いくつかの実施態様では、抗体構成要素をコードする遺伝物質のコード領域は、全体的に又は部分的に、特定の細胞タイプ（例えば真核細胞又は原核細胞）のコドン使用頻度に最適化するために改変配列を含むことができる。例えば、本明細書に記載するヒト化重鎖（又は軽鎖）可変領域のコード配列は細菌細胞での発現のために最適化できる。また別に、コード配列は哺乳動物細胞（例えばCHO）での発現のために最適化できる。そのような配列をコドン最適化配列と言うことができる。40

核酸分子を含む発現ベクターで適切な宿主細胞を形質転換し、当該核酸構築物によってコードされるタンパク質を産生させる。例示的な宿主細胞には原核細胞（例えば大腸菌）及び真核細胞（例えばCOS又はCHO細胞）が含まれる。発現ベクターで形質転換した宿主細

10

20

30

40

50

胞を、本発明のヒト化抗体又は多重特異性結合因子の產生を可能にする条件下で増殖させ、引き続いてヒト化抗体又は多重特異性結合因子を回収する。

本発明のヒト化抗体及び/又は多重特異性結合因子は任意の技術によって精製することができ、前記は、その後の安定な抗体又は結合因子分子の形成を可能にする。例えば、理論に拘束されないが、抗体及び/又は多重特異性結合因子は、可溶性ポリペプチド又は封入体として細胞から回収でき、前記から、抗体及び/又は多重特異性結合因子は8Mグアニジン塩酸塩によって定量的に抽出され、透析される。本発明の抗体及び/又は多重特異性結合因子の更なる精製のために、通常的なイオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー又はゲルろ過を用いることができる。本発明のヒト化抗体又は多重特異性結合因子はまた、真核細胞又は原核細胞による分泌に統一して条件付け培地から回収することができる。10

【0060】

スクリーニング及び検出方法

本発明のヒト化抗体又は多重特異性結合因子はまた、1つ又は複数の細胞の1つ以上の活性（例えばアポトーシス又は細胞増殖）の検出及び/又は測定が所望される、*in vitro*又は*in vivo*スクリーニング方法で用いることができる。スクリーニング方法は当業界で周知であり、無細胞系アッセイ、細胞系アッセイ及び動物アッセイが含まれる。*in vitro*アッセイは固相又は可溶性状態であることができ、標的分子の検出は当業界で公知の多数の方法によって検出することができる。前記は、ヒト化抗体又は多重特異性結合因子を同定することができる標識又は検出グループ（前記は標的分子（例えば細胞表面抗原）と結合する）の使用を含む。本発明のヒト化抗体又は多重特異性結合因子を用いるアッセイと一緒に検出可能標識を用いることができる。20

【0061】

治療用薬剤

本発明のヒト化抗体又は多重特異性結合因子は治療用薬剤として利用できる。いくつかの実施態様では、当業界では理解されるであろうが、前記は更なる修正を加えずに利用される。いくつかの実施態様では、それらを本明細書に記載する組成物又は処方物に取り込むことができる。いくつかの実施態様では、それらは、1つ以上の薬剤又は実体、例えばペイロードと化学的に結合又は連結（例えば複合体化）させることができる。

抗体薬剤又はその構成要素を他の部分又は実体と複合体化させる多様な技術が当業界では周知であり、それら技術を本発明にしたがって利用することができる。一例を示せば、当業界で周知の技術にしたがって放射能標識抗体薬剤を生成することができる。30

例えば、モノクローナル抗体は以下の物質と接触させることによってヨウ素化できる：ヨウ化ナトリウム及び/又はカリウム並びに化学酸化剤（例えば次亜塩素酸ナトリウム）又は酵素酸化剤（例えばラクトベルオキシダーゼ）。抗体薬剤は、リガンド交換プロセスによってテクネチウム-99mで標識できる。前記プロセスは、例えば過テクネチウム酸塩を第一スズ溶液で還元し、還元テクネチウムをセファデックスカラムでキレートし、抗体をこのカラムに適用することによって実施される。いくつかの実施態様では、提供する抗体因子は、直接標識技術を用いて、例えば過テクネチウム酸塩、還元剤（例えばSNCI₂）、緩衝溶液（例えばフタル酸ナトリウム-カリウム溶液）及び抗体をインキュベートすることによって標識される。放射性同位元素を抗体と結合させるためにしばしば用いられる媒介官能基（金属イオンとして存在する）は、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、又はエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、又は1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（DOTA）、又はp-アミノベンジル-DOTA（DOTA-Bn）である。放射性同位元素は、例えば線量測定法によって検出できる。40

【0062】

治療方法

本発明のヒト化抗体又は多重特異性結合因子が標的抗原の1つに対して高親和性結合を示す能力は、標的抗原発現細胞に効率的に標的を誘導するためにそれらを治療的に有用にする。したがって、いくつかの実施態様では、1つの標的抗原に対してヒト化抗体又は多50

重特異性結合因子の親和性を増強させ、かつ前記多重特異性結合因子（又は、ヒト化抗体の事例ではFc受容体）が結合するその他の標的抗原に対する親和性は増強させないことが所望され得る。例えば、腫瘍殺滅の関係では、ある種の条件では、腫瘍抗原に対して親和性を増減させるが、第二の抗原に対しては親和性を増減させないことは有益であり得る。したがって、本明細書に記載するヒト化抗体又は多重特異性結合因子の使用により、ヒト化抗体又は多重特異性結合因子の腫瘍抗原に対する結合親和性を当該腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者において増強することは有益であり得る。

本発明は、本明細書に記載するヒト化抗体及び/又は多重特異性結合因子を、そのような多重特異性結合因子が結合できる抗原を発現する腫瘍を有する患者を処置するための治療薬として提供する。そのようなヒト化抗体及び/又は多重特異性結合因子を、ヒト及び動物の身体を治療する方法で、又は診断する方法で用いることができる。10

【0063】

投与

本発明は、治療の必要がある対象動物に本明細書に記載する治療活性物質（例えばヒト化抗体及び/又は多重特異性結合因子）の有効量を投与する方法を提供する。

本明細書に記載するヒト化抗体又は多重特異性結合因子は、薬剤（例えばタンパク質又は核酸）の治療的デリバリーのために当業界で公知の多様な方法により投与することができる。そのような方法を用いて、ヒト化抗体若しくは多重特異性結合因子、又は本発明のヒト化抗体若しくは多重特異性結合因子をコードする核酸を、対象動物の標的細胞の殺滅又は増殖阻害のために用いることができる。前記方法は、例えば細胞のトランスフェクション、遺伝子療法、デリバリービヒクル又は医薬的に許容できる担体による直接投与、本発明の多重特異性結合因子をコードする核酸を含む組換え細胞の提供による間接デリバリーである。20

多様なデリバリー系が公知であり、それらを用いて本発明のヒト化抗体又は多重特異性結合因子を投与することができる。前記は、例えば、リポソーム、ミクロ粒子、ミクロカプセル中への被包化、当該化合物を発現できる組換え細胞、受容体媒介エンドサイトーシス（例えば以下を参照されたい：Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432）、レトロウイルス又は他のベクターの部分としての核酸の構築などである。投与ルートは経腸又は非経口であることができ、静脈内、皮下、筋肉内、非経口、経皮、又は経粘膜（例えば経口又は経鼻）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。いくつかの実施態様では、本発明の多重特異性結合因子は皮下に投与される。いくつかの実施態様では、多重特異性結合因子は他の生物学的に活性な因子と一緒に投与される。30

ある種の実施態様では、本明細書に記載の治療活性物質（例えばヒト化抗体又は多重特異性結合因子）を用いる療法は、他の療法（特に他の抗腫瘍療法を含む）と併用できることは、当業者には本開示を熟読して容易に理解されるであろう。いくつかの実施態様では、そのような他の抗腫瘍療法は、例えば1つ以上の化学療法剤、免疫調節剤の投与、放射線療法、高周波超音波療法、外科手術などであるか、又は前記を含む。

いくつかの実施態様では、本明細書に記載する治療活性物質（例えばヒト化抗体又は多重特異性結合因子）及び併用される別の療法との相対的投与タイミングは効果を最適化するためを選択することができる。40

数例を挙げれば、いくつかの実施態様では、本明細書に記載する治療活性物質は、前記が腫瘍細胞を飽和する条件及び十分な時間にわたって（例えば投与レジメンにしたがって）投与される。いくつかの実施態様では、未結合の治療活性物質は投与後血流から除去される。いくつかの実施態様では、そのような除去は別の因子の投与前に実施される（例えば実施が許容される）。

【0064】

いくつかの具体的な実施態様では、本明細書に記載する治療活性物質は、DOTA-Bnを標的とする別の因子と併用投与される。いくつかのそのような実施態様では、別の因子はペイロードを保持する。いくつかの実施態様では、ペイロードは治療薬剤ペイロードであるか、又は治療薬剤ペイロード（例えば有毒ペイロード）を含むことができる。いくつかの50

実施態様では、ペイロードは検出因子ペイロードであるか、又は前記を含むことができる。

いくつかの具体的な実施態様では、本明細書に記載する治療活性物質（例えばヒト化抗体又は多重特異性結合因子）は腫瘍細胞が飽和されるように投与され、引き続いてDOTA-Bnを標的とする（及びペイロードを保持する）第二の因子が投与される。場合によって、DOTA-Bnを標的とする（例えば、さらに異なるペイロードを保持することができる）少なくとも1つの第三の因子が投与される。

いくつかの実施態様では、第二及び場合によって第三の因子は、本明細書に記載する治療活性物質の投与からある期間の後に投与され、前記期間は未結合の因子の消失を可能にするために十分な期間であり得る。いくつかの実施態様では、第二及び場合によって第三の因子は当該治療薬剤の更なる投与無しに投与される。例えば、いくつかの実施態様では、本明細書に記載する治療活性物質は以下の少なくとも1サイクルを含むレジメンにしたがって投与される：(i) 当該治療因子の投与（場合によって該当する腫瘍細胞が飽和されるように投与する）；(ii) 第二及び場合によって少なくとも1つの第三の因子（例えばDOTA-Bnを標的とし、さらに場合によってペイロードを保持することができる因子）；場合によって第二及び/又は第三の因子の追加の投与、ただし当該治療因子の追加の投与はない。いくつかの実施態様では、治療用レジメンは複数のそのようなサイクルを含むことができる。いくつかの実施態様では、レジメンは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又は11サイクル以上を含むことができる。

いくつかの実施態様では、治療用レジメンは、当該治療因子の投与を含むただ1回の单一サイクルを含む。いくつかの実施態様では、そのような治療レジメンは、工程(ii)及び場合によって工程(iii)を含むが、当該治療因子の追加の投与を含まない1回以上のサイクルを含むことができる。

いくつかの実施態様では、本明細書に記載する治療因子の先駆け投与は、当該治療因子が併用される因子が、単独投与（すなわち本明細書に記載する治療因子の先駆け投与がない投与）の治療指數よりも広い治療指數を示す併用療法を可能にする。いくつかの実施態様では、そのようなより広い治療指數は少なくともlog変換倍で改善される。

【0065】

医薬組成物

本発明はさらに医薬組成物を提供し、前記は、本発明のヒト化抗体又は多重特異性結合因子及び医薬的に許容できる担体又は賦形剤を含む。当該組成物はまた、所望の場合には治療的に活性を有する1つ以上の追加の物質を含むことができる。

本明細書に提供する医薬組成物の記載は、基本的に人間への処方箋投与に適切な医薬組成物を目指しているが、一般的にはそのような組成物は全ての種類の動物への投与にも適切であることは当業者には理解されるであろう。当該組成物を多様な動物への投与に適するようにするために、ヒトへの投与に適切な医薬組成物を修正することは周知であり、獣医薬理学専門家は、必要であれば単に通常的な実験によりそのような修正を設計し及び/又は実施することができる。

本明細書に記載する医薬組成物の処方物は、薬理学分野で公知の又は今後開発される任意の方法によって調製することができる。一般的には、そのような調製方法は、活性成分を希釈剤又は別の賦形剤及び/又は1つ以上の他の付属成分と会合させる工程、さらに続けて必要及び/又は所望の場合には、生成物を成形し及び/又は所望の单一用量又は多用量ユニットに梱包する工程を含む。

本発明の医薬組成物は、單一ユニット用量として及び/又は複数の單一用量ユニットとして、調製され、梱包され、及び/又はばらで販売される。本明細書で用いられるよう、「ユニット用量」は、予め定められた量の活性成分を含む医薬組成物の別個に分離された量である。活性成分の量は、一般的には対象動物に投与される活性成分の当該投薬量、及び/又はそのような投薬量の使いやすい部分（例えばそのような投薬量の1/2又は1/3）に等しい。

本発明の医薬組成物中の活性成分、医薬的に許容できる賦形剤、及び/又は任意の追加

10

20

30

40

50

の成分の相対的な量は、治療される対象動物の実体、サイズ及び/又は状態に応じて、さらに当該組成物が投与されるルートに応じて変動するであろう。例示すれば、組成物は0.1%から100% (w/w) の活性成分を含むことができる。

【0066】

医薬処方物は医薬的に許容できる賦形剤を追加的に含むことができ、前記には、本明細書で用いられるように、任意の及び全ての溶媒、分散媒体、希釈剤、又は他の液体ビヒクル、分散若しくは懸濁補助剤、表面活性剤、等張剤、増粘若しくは乳化剤、保存料、固体結合剤、滑沢剤などが個々の所望される投薬形に適切なように含まれる。下記文献は、医薬組成物の処方で用いられる多様な賦形剤及びその調製のための公知の技術を開示する：Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)；前記は参照により本明細書に含まれる。いずれかの通常的な賦形剤が、例えば望ましくない生物学的作用を生じるか又はそれ以外に医薬組成物の任意の他の成分と有害な態様で相互作用することによって、ある物質又はその誘導体に不適合である場合を除いて、当該使用は本発明の範囲内であることが意図される。10

いくつかの実施態様では、医薬的に許容できる賦形剤は少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は少なくとも100%純粋である。いくつかの実施態様では、賦形剤は人間での使用又は獣医の使用について承認されている。いくつかの実施態様では、賦形剤は米国食品医薬局によって承認されている。いくつかの実施態様では、賦形剤は医薬等級である。いくつかの実施態様では、賦形剤は、米国局方(USP)、欧州局方(EP)、英国局方及び/又は国際局法の規準に合致する。20

医薬組成物の製造で用いられる医薬的に許容できる賦形剤には、不活性な希釈剤、分散及び/又は顆粒化剤、表面活性剤及び/又は乳化剤、崩壊剤、結合剤、保存料、緩衝剤、滑沢剤、及び/又は油が含まれるが、ただしこれらに限定されない。そのような賦形剤は、場合によって医薬処方物に加えることができる。賦形剤、例えばココナツバター及び座薬ワックス、着色剤、コーティング剤、甘味料、香味料、及び/又は香料は、調剤者の判断にしたがって当該組成物に存在し得る。

医因子の処方及び/又は製造における一般的な考慮は例えば下記の文献に見出すことができる：Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (前記は参照により本明細書に含まれる)。30

【0067】

キット

本発明はさらに、本明細書に記載する少なくとも1つのヒト化抗体又は多重特異性結合因子（例えば二重特異性抗体）を充填した1つ以上の容器を含む医薬パック又はキットを提供する。キットは、例えば治療又は診断を含む任意の適用方法で用いられ得る。場合によってそのような容器には、医薬品又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制する官庁の指定様式の通知が付隨し得る（前記通知は、(a) 製造、ヒトへの投与のために使用又は販売の監督官による承認、(b) 使用のための指示、又は前記の両方を示す）。

本発明の他の特徴物は、以下の例示的な実施態様を説明する過程で明瞭になるであろう。前記実施態様は本発明の例示のために提供され、本発明の限定は意図されない。40

実施例

以下の実施例は、本発明の方法及び組成物を作製及び使用する態様を当業者に説明するために提供され、本発明者らが彼らの発明とみなすものを制限することは意図されない。特段の指示がなければ、温度は摂氏で示され、圧は大気圧又は近大気圧である。

【実施例1】

【0068】

huA33-C825のin vitroの特徴付け

とりわけ、本発明は、ヒト化抗体A33 (huA33) は多重特異性結合因子（例えば二重特異性抗体）の構築のために特に重要であるという洞察を包含する。いずれの特定の理論にも拘束されないが、本発明者らは、放射能標識一特異性huA33（例えば¹³¹I-huA33）で観察50

される最適に達しない腫瘍線量及び治療指數は、多重特異性様式のhuA33を利用することによって克服され得ると提唱した。

本実施例は、ヒト化抗体A33を土台とする第一の抗原結合部位及び小分子ハプテン（例えばベンジル-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（DOTA-Bn））と結合する第二の抗原結合部位から構成される二重特異性抗体の作製を記載する。本明細書に提供するデータは、結腸直腸癌細胞を標的とする二重特異性抗体（A33-C825と称される）の好結果の作製を示す。本明細書に記載するように、親和性成熟2D12.5抗体を土台とする抗DOTA-Bn単鎖Fvフラグメント（ScFv）をヒト化A33軽鎖のカルボキシ末端に連結した。予備標的誘導放射線免疫療法（PRIT）の開発の主要な欠点は、正常組織の放射線過剰暴露、免疫原性、至適未満の腫瘍線量及び低い治療指數であった。下記に示すように、本発明の二重特異性抗体はそのような欠陥を克服し、ヒトA33抗原を発現する癌（例えば結腸直腸癌）に対する効果的なPRITの実現性を提供する。
10

SE-HPLCによるhuA33-C825の例示的な生化学的純度分析は図1に示される。SE-HPLCは、およそ210kDaのMWを有する主要ピーク（UV分析で90%）とともにいくつかの小ピーク（ゲルろ過によって除去できる凝集物と推定される）を示した。二重特異性抗体は、複数の凍結融解サイクル後にSE-HPLC及びビアコアにより安定の維持を示した。結合親和性はビアコアT100によって測定された。例示的な結果は表3に示されている。例示的センサーグラムは図2に示されている。

【0069】

表3

20

抗原	因子	k_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
Human A33	huA33-IgG1	6.14E+05	1.05E-03	1.71E-09
	huA33-C825	9.15E+04	5.81E-03	6.35E-08
BSA-DOTA-Bn(Y)	hu3F8-C825	1.60E+04	3.37E-04	2.12E-08
	huA33-C825	1.90E+04	2.20E-04	1.16E-08

【0070】

本実施例で示されるように、huA33-C825は、一特異性huA33抗体と比較してヒトA33抗原に対しより低い親和性を示した（ K_D は63.5nM対1.71nM、図2A）。huA33-C825は、A33抗原と結合しない第一の抗原結合部位及びDOTA-Bn（金属）と結合する第二の抗原結合部位を有するコントロール二重特異性抗体と比較して、BSA-(Y)-DOTA-Bnに対して高い結合親和性を維持した（ K_D は11.6nM対21.2nM、図2B）。総合すれば、本実施例は、ヒトA33抗原及び小分子ハプテン（例えばDOTA-Bn）と結合し両標的に對して高い親和性を維持する二重特異性抗体の構築を明らかにする。さらにまた、huA33-C825で観察されたヒトA33抗原に対する親和性の低下は、親huA33-IgG1抗体と比較してより迅速なクリアランスを提供する。
30

【実施例2】

【0071】

huA33-C825、デキストラン系除去剤（デキストラン-CA）及び¹⁷⁷Lu-DOTA-BnによるPRITの最適化
40

本実施例は、A33陽性腫瘍の予備標的誘導放射線免疫療法（PRIT）に対する多重特異性結合因子（例えば二重特異性抗体）の有効性を示す。特に、本実施例は、除去剤（CA）の量の関数として実施例1に記載した二重特異性抗体を用いて、SW1222担癌げっ歯類における予備標的誘導放射線免疫（PRIT）プロトコルの腫瘍標的誘導の最適化を記載する。下記に示すように、用量を増加させながら治療指數の漸進的増加が観察されるが、絶対腫瘍取り込みの低下は観察されない。

0.1 - 0.6mgのhuA33-C825（0.48 - 2.86nmol）及びCA対¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn（5.6MBq）の固定比を用いる¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn注射24時間後のSW1222担癌マウスの生体分布パイロット試験に基づいて（0.25 - 0.6mgのhuA33-C825で腫瘍の¹⁷⁷Lu活性濃度は～15 - 18%ID/gのプラト-

50

を示した)、0.25mg/マウス用量のhuA33-C825を選択した。次に追加の生体分布実験を実施して、huA33-C825用量として0.25mg(1.19nmol)を用いPRIT中のCA用量を最適化した。担癌マウスグループ(n=3から4/グループ)にhuA33-C825を注射し、続いて24時間後に生理食塩水(すなわちビヒクリル)、2.4%(0.25mgのhuA33-C825に対する%、w/w)、5%(w/w)、10%(w/w)又は25%(w/w)のCA用量(0-62.5μg/マウス)を注射した。さらに4時間してから、マウスに5.6MBqの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnを注射し、24時間後に生体分布分析のために犠牲にした。除去剤の例示的な最適化は図3A-3Dに示される。CAの25%(w/w)用量を投与したマウスグループのSW1222腫瘍及び多様な正常組織における例示的¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn活性は図4A-4Dに示される。

予想したとおり、CA投与は循環(すなわち血中)¹⁷⁷Lu-活性に顕著な影響を示した(生理食塩水(CA無し)から25%(w/w)についてそれぞれ~8から0.1%ID/g)。加えて、CA用量は、腫瘍のその後の¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn取り込み能力を低下させるように思われる。試験した最高のCA用量(25%)は最適と考えられた。なぜならば、最高の放射線感受性を有する組織(血液及び腎)の腫瘍対正常組織比は、より低いCA用量と比較して最高であったからである(ただし生理食塩水によるPRITと比較して¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの腫瘍取り込み低下という犠牲を払った(~50%低い取り込み))。特に、¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの腫瘍取り込み(%ID/gとして、平均±算術平均の標準誤差)は、生理食塩水及びCAの65μg用量レベル(25%w/w)についてそれぞれ17.51±0.90(n=3)及び8.46±3.74(n=4)であった。生理食塩水については、血液、腎及び筋肉の腫瘍対器官比はそれぞれ2.2±0.4、4.9±0.6、及び23.2±3.8であった。CAについては、65μgのCA用量レベル(25%w/w)では、血液、腎及び筋肉の腫瘍対器官比はそれぞれ105.8±52.3、18.4±13.4、及び282.1±208.7であった。次に、huA33-C825及びCAの最適化PRIT用量を用いて、¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの用量滴定試験を実施した。¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの用量滴定試験のために、腫瘍及び重要選別組織(血液、肝、脾及び腎)に対する¹⁷⁷Lu-活性の生体分布データを、¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn用量グループ間で%ID/g及び絶対取り込みの両方について比較した(kBq/g;図4A、4B参照)。最後に、¹³¹Iトレース標識huA33-C825(1.19nmolのコールドhuA33-C825の添加と併せて0.39-0.40MBq)の注射から24時間後の単一時点の生体分布実験をSW1222担癌マウスで実施し、PRIT中の腫瘍のhuA33-C825の絶対抗体取り込み(pmol/gとして)を概算した。例示的な集計値は表4に示される(データは算術平均±SDとして提示される)。例示的な腫瘍取り込みの計算は図4Dに示される。

本実施例で示されるように、腫瘍の¹³¹I-huA33-C825取り込み(平均±標準偏差)は3.71±0.97%ID/gであった。これは、44pmol/gの絶対huA33-C825取り込みに対応する(~50%の免疫反応比とすると88pmol/g)。

【0072】

表4

SW1222担癌マウス (n=5) への¹³¹I-huA33-C825
(0.39–0.40MBq、0.25mg/1.19nmol) のi.v.注射に続く
注射後24時間の生体分布試験

組織	24 hr	
血液	5.05 ± 0.97	10
心臓	2.10 ± 0.31	
肺臓	2.35 ± 0.52	
肝臓	2.04 ± 0.53	
脾臓	1.36 ± 0.30	
胃	6.92 ± 3.06	
小腸	0.98 ± 0.35	
大腸	0.83 ± 0.40	
腎臓	1.77 ± 0.31	
筋肉	0.49 ± 0.06	
骨	0.71 ± 0.20	
腫瘍	3.71 ± 0.97	20
腫瘍サイズ (g)	0.86 ± 0.34	

【実施例3】

【0073】

生体分布及び吸収線量の計算

先行実施例に記載したhuA33-C825をそのin vivo有効性について試験した。放射能標識DOTA-Bnの生体分布及び吸収線量の概算をSW1222腫瘍細胞移植マウスで決定した。

本実施例では、A33陽性SW1222担癌マウスのグループで、最適用量のhuA33-C825及びCAを用いてPRITを実施し、続いて2.0MBq (~10pmol) の¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnを投与し、さらに生体分布試験を¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの注射後2から120時間で実施し、腫瘍及び多様な正常組織における¹⁷⁷Lu活性の滞留時間を決定した。

略記すれば、最適なA33-C825 (0.25mg/マウス) 及びデキストラン-除去剤の用量 (25% (w/w)、62.5 μg) 並びに2.0MBq (~10pmol) の¹⁷⁷Lu-DOTA-BnによるPRITに続く生体分布アッセイを用いて、腫瘍及び多様な正常組織の¹⁷⁷Lu活性を決定した。SW1222担癌マウスのグループ (n=4から5) に250 μgのhuA33-C825を投与し、続いて24時間後に25% (w/w) (62.5 μg) のデキストラン-除去剤を投与し、さらにもう4時間後に2.0MBq (~10pmol) の¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnを投与した。生体分布分析のために、¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの注射後2、24及び120時間に一グループの動物を犠牲にした。これらのデータを材料と方法に記載したように用いて、¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnによる放射線免疫療法のための吸収線量を概算した(表5)。

腫瘍については、¹⁷⁷Lu取り込みは投与に続いて非常に迅速に生じ、注射2時間後に平均7.0%ID/gであった。最大腫瘍取り込みは24時間後の8.5%ID/gで、さらに続いて96時間が経過した注射後120時間にはおよそ半分の4.0%ID/gにまで低下した。腎、肝、脾及び血液のピーク取り込みは注射後2時間に観察され(平均値はそれぞれ0.87、0.70、0.92及び0.75%ID/g)、さらに、それぞれ平均値として0.27%ID/g(ピークの取り込みと比較して3.2倍の減少)、0.30%ID/g(2.3倍の減少)、0.32%ID/g(2.9倍の減少)及び0.02%ID/g(37.5倍の減少)に低下した。

皮下にA33陽性結腸直腸癌腫を保持する、雌の無胸腺マウスのPRIT(最適huA33-C825及びデキストラン除去剤の用量を含む)に対する腫瘍及び選別正常組織の吸収線量の例示的な概算は表6に示される。各標的領域について、吸収線量を非侵入照射(すなわちベータ線)の¹⁷⁷Lu平衡線量定数と標的領域の¹⁷⁷Lu累積活性の積として計算した(¹⁷⁷Luベータ線の局所吸収は完全であると仮定しガンマ線及び非自己線量寄与は無視した)。

10

20

30

40

50

【0074】

表5

組織	2 hr (n = 5)	24 hr (n = 4)	120 hr (n = 5)	
血液	0.75 ± 0.16	0.08 ± 0.02	0.02 ± 0.01	10
心臓	0.30 ± 0.05	0.11 ± 0.03	0.05 ± 0.01	
肺臓	0.59 ± 0.10	0.21 ± 0.07	0.06 ± 0.02	
肝臓	0.70 ± 0.14	0.43 ± 0.09	0.30 ± 0.03	
脾臓	0.92 ± 0.15	0.47 ± 0.14	0.32 ± 0.12	
胃	0.15 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	
小腸	0.14 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.00	
大腸	0.17 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.02	
腎臓	0.87 ± 0.09	0.46 ± 0.27	0.27 ± 0.09	
筋肉	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.00	
骨	0.09 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.00	
腫瘍	6.99 ± 1.24	8.46 ± 3.74	3.99 ± 0.44	
腫瘍サイズ (g)	1.31 ± 0.50	1.08 ± 0.45	0.98 ± 0.32	
腫瘍対組織比	2 hr (n = 5)	24 hr (n = 4)	120 hr (n = 5)	20
血液	9.3 ± 2.6	107.2 ± 54.0	181.0 ± 62.1	
心臓	23.7 ± 6.1	78.1 ± 41.3	78.6 ± 22.3	
肺臓	11.8 ± 3.0	40.2 ± 22.4	64.4 ± 25.0	
肝臓	10.0 ± 2.7	19.5 ± 9.5	13.5 ± 2.2	
脾臓	7.6 ± 1.8	18.0 ± 9.7	12.5 ± 4.8	
胃	46.6 ± 13.5	225.0 ± 113.5	166.2 ± 50.5	
小腸	49.7 ± 11.6	182.0 ± 91.8	210.5 ± 43.9	
大腸	41.5 ± 11.2	177.8 ± 89.8	104.3 ± 49.2	
腎臓	8.1 ± 1.7	18.3 ± 13.4	14.8 ± 4.9	
筋肉	58.6 ± 12.4	285.3 ± 212.8	249.4 ± 58.6	
骨	78.0 ± 22.4	293.8 ± 211.5	149.5 ± 31.0	30

表6

組織	cGy/MBq	治療指數	
血液	0.9	73	40
腫瘍	65.8		
心臓	1.4	47	
肺臓	1.8	37	
肝臓	6.3	10	
脾臓	6.6	10	
胃	0.6	110	
小腸	0.5	132	
大腸	0.8	82	
腎臓	5.3	12	
筋肉	0.3	219	
骨	0.6	110	

表6に示すように、血液、腫瘍、肝、脾及び腎に対する¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの概算吸収線量 (cGy/MBqとして) は、それぞれ0.9、65.8、6.3、6.6及び5.3であった。さらにまた、单一

サイクル処置の場合、血液に対して腫瘍の治療指数は73で、腎に対しては12であり、これは腫瘍標的誘導の累積幅を示し、大きな毒性は予想されない。実際、看過できる応答を示した対象動物では毒性は140日まで観察されなかった。

PET画像化によって判定したPRIT後の腫瘍取り込みは、上記の生体分布アッセイと同様な結果を、⁸⁶Y-DOTA-Bn及び¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnアイソタイプの両方に関して示した（データは示されていない）。

【実施例4】

【0075】

in vitro治療試験

本実施例は、A33陽性癌細胞を保持するマウスの腫瘍負荷軽減を媒介する、huA33-C825二重特異性抗体のin vivo有効性を例証する。特に、本実施例は、SW1222担癌マウスの腫瘍負荷における一サイクル及び二サイクル療法の効果を述べる。

第一の療法試験では、5グループの担癌マウス（n = 6から8/グループ）を下記のいずれかで処置した：ビヒクル（すなわち、未処置、n = 8、TV₇；76 ± 15mm³）、33.3MBqの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn単独（二重特異性抗体及びCA注射時にはビヒクルを投与、n = 6、TV₇；116 ± 23mm³）、一サイクルIgG-C825 PRIT + 33.3MBqの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn単独（n.s.huA33-C825の代わりにIgG-C825を投与、n = 8、TV₇；100 ± 10mm³）、又は一サイクルhuA33-C825 PRIT + 11.1MBq又は33.3MBqのいずれかの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn（両方ともにn = 8、TV₇はそれぞれ103 ± 17mm³及び93 ± 15mm³）。一サイクルhuA33-C825 PRIT + 11.1MBq又は33.3MBqのいずれかの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの場合の腫瘍の概算吸収線量は、それぞれ730及び2190cGyであった（表6の吸収線量概算値から）。本発明者らは、処置中に¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn用量が増加するにつれて相対的腫瘍取り込みは低下することを観察し、これは腫瘍においてあり得る飽和に近づいていることを示しているのかもしれない。このことは吸収腫瘍線量概算に影響する可能性がある。概算の7%ID/gが、PRIT + 33.3MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn用量後の腫瘍ピーク取り込みに用いられる場合（すなわちより高い¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn用量の相対的腫瘍取り込みの低下の理由となる）、~1800cGyの概算腫瘍吸収線量がより正確である可能性があり、総合すれば1800 - 2200cGyの有効線量範囲が提唱される。各¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn処置グループのマウスの例示的な腫瘍応答（腫瘍体積（mm³）として表される）は図5に示される。無処置又は処置（33.3MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn 単独、又は一サイクルのIgG-C825 PRIT + 33.3 MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnから成る）を受けた担癌マウスは腫瘍応答を示さなかった。¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnを投与された後者の2グループのシンチグラフィーは、腫瘍領域に最小限の活性を示した。対照的に、一サイクルのhuA33-C825 PRIT + 11.1 MBq又は33.3 MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnで処置されたグループは、処置後~15日まで腫瘍増殖のわずかな遅れを示したが、CRは生じなかった。比較のために、腫瘍接種後23日（¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn注射後16日）で、腫瘍体積（平均 ± SEMとして）は、無処置、33.3MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn単独、一サイクルIgG-C825 PRIT + 33.3 MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn、又は一サイクルhuA33-C825 PRIT + 11.1 MBq又は33.3 MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnについて、それぞれ1398 ± 206（n = 8）、1051 ± 167（n = 5）、877 ± 109（n = 7）、694 ± 138（n = 8）、及び495 ± 76（n = 8）であった。腫瘍接種後30日以内に、全グループの平均腫瘍サイズは1250mm³以上で、この試験は終了した。同様な結果が、111.1 MBqの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnを用いたより高い用量での一サイクルhuA33-C825 PRIT + ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn処置で観察された（データは示されていない）。

第二の療法試験では、二サイクルhuA33-C825 PRIT処置を精査した。二サイクル処置を受けたマウスの例示的な腫瘍応答（腫瘍体積（mm³）として表される）は図6A - 6Dに示される。

マウスが処置を全く受けなかつたとき（n = 5、TV₁₀ : 314 ± 77mm³）、腫瘍が大きくなりすぎたために全マウスを30日以内に犠牲にすることが必要であり、500mm³に達した期間は13 ± 2日であった。二サイクルのPRIT + 11.1 MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの合計用量は22.2 MBq、概算腫瘍線量は1460cGy) (n = 5、TV₁₀ : 462 ± 179mm³) で2/5の動物がCRを示した（図6A）。再発マウスでは、500mm³に達した期間は、9日（TV₁₀ : 391mm³）又は36日（TV₁₀ : 712mm³）であった。2サイクルのPRIT + 33.3 MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (¹⁷⁷Lu-DOTA

10

20

30

40

50

-Bnの合計用量は66.6 MBq、概算腫瘍線量は3600 - 4400cGy) (n = 5、 $344 \pm 105\text{mm}^3$) は5/5の動物でCRをもたらした(図6B)。これらの再発腫瘍では、500mm³に達した期間は、12日(TV₁₀ : 325mm³)、65日(TV₁₀ : 502mm³)、7日(TV₁₀ : 341mm³)及び23日(TV₁₀ : 345mm³)で、ただ1匹のマウスは犠牲にした時に腫瘍サイズが10mm³未満であった。2サイクルのPRIT + 55.5 mCi ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの合計用量は111.0 MBq;、概算腫瘍線量は2580 cGy (3%ID/gのピーク腫瘍取り込みを基準にした)) (n = 4、 $236 \pm 54\text{mm}^3$) は4/4の動物でCRをもたらした(図6C)。これらの再発腫瘍では、500mm³に達した期間は、34日(TV₁₀ : 295mm³)、45日(TV₁₀ : 263mm³)及び42日(TV₁₀ : 175mm³)で、ただ1匹のマウスは犠牲にした時に腫瘍サイズが44mm³であった。2サイクルのPRIT + 33.3 mCi ¹⁷⁷Lu-DOT A-Bn (¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの合計用量は66.6MBq)による処置後、500mm³への平均再発期間は27 ± 26日であった。2サイクルのPRIT + 55.5 mCi ¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの合計用量は111MBq)による処置では、500mm³への平均再発期間は40 ± 6日であった。各処置レジメンの吸収放射線量(Gyで表される)の見積りは表7に示される。

【0076】

表7

処置グループ	腫瘍	血液	腎臓	完全応答	処置後40日の治癒
コントロール					
予備標的誘導無し11.1MBq				0/5	0/5
予備標的誘導無し33.3MBq				0/6	0/6
IgG-C825 + 11.1MBq				0/5	0/5
IgG-C825 + 33.3MBq				0/7	0/7
一サイクル					
huA33-C825 + 11.1MBq	7.3	0.1	0.6	0/8	0/8
huA33-C825 + 33.3MBq	21.9	0.3	1.8	0/8	0/8
二サイクル					
huA33-C825 + 11.1MBq (x2) ; 22.2 MBq	14.6	0.2	1.2	2/5	1/5
huA33-C825 + 33.3MBq (x2) ; 66.6 MBq	43.8	0.6	3.5	5/5	2/5
huA33-C825 + 55.5MBq(x2);111.0MBq	73.0	1.0	5.9	4/4	2/4
三サイクル					
huA33-C825 + 55.5MBq (x3) ; 165.0 MBq	140	1.5	8.8	10/10	10/10

生存について同様な傾向が処置後140日の動物で観察された(データは示されていない)。

【実施例5】

【0077】

毒性

本実施例は、先行実施例で述べたヒト化A33二重特異性抗体のin vivo毒性を例証する。簡単に記せば、2サイクルのPRIT + 11.1 MBqの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (n = 3) 又は2サイクルPRIT + 1.5 mCiの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn (n = 3) のいずれかで処置した合計6匹のマウスを、処置後9週間まで腎、骨髄、肝及び脾の病理解剖評価に付した。2サイクルのPRIT + 0.3mCiの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnによる処置後にCRを示さなかった3/5のマウスは、第二の¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn用量の注射から(すなわち処置から)5日後に評価に付した。これらのマウスは処置後に腫瘍サイズの減少を全く示さず、過剰な腫瘍負荷のために犠牲にする必要があった。3/3のマウスで腎及び骨髄は正常で、放射線誘発傷害は存在しないことを示唆した。1/3のマウスについては、骨髄外造血を示し、このグループの他の2匹で肝は正常であった。1/3のマウス

ウスについては、脾臓（白髄）は濾胞性類リンパ球過形成を示し、このグループの他の2匹で脾臓は正常であった。2サイクルのPRIT + 55.5MBqで処置したマウスでは、ただ1匹のマウスを処置後7週間で評価に付し、一方、他の2匹は処置後9週間で評価に付した。これらマウスの3匹全てがCRを示し、その後に腫瘍は再発し、過剰な腫瘍負荷のために犠牲にすることが必要であった。3/3のマウスで、腎、骨髄及び肝は正常であった。1/3のマウスでは、脾臓（白髄）は濾胞性類リンパ球過形成を示し、さらにこのグループの他の2匹について脾臓は正常であった。

本実施例ではとりわけ、huA33-C825が腫瘍負荷を *in vivo*で効果的に減少させる（すなわち腫瘍増殖を低下させる）こと、及び効果的なPRITを提供することが確認される。

【実施例 6】

【0078】

治癒効果を有するセラノスティックPRIT

本実施例は、先行実施例に記載したヒト化A33二重特異性抗体の使用について記述し、とりわけ、これら抗体を用いる処置が治癒効果を有し得ることを明らかにする。特に本実施例は、治療診断用であり治癒効果を有する治療レジメンを示す。前記レジメンは、投与活性の合計量を増加させる追加の治療サイクルを含んでいた。

SW1222皮下定着異種移植片を有するヌードマウス（n = 20、腫瘍体積 = $102 \pm 40\text{mm}^3$ （平均 ± 標準偏差 (SD)）に以下の処置を施した（n = 5 - 10 / グループ）：無処置（n = 5）、¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnのみ（n = 5）、又は抗GPA33 PRIT + 55 MBqの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnから成る3サイクルPRITレジメン（n = 10、合計165MBq）。連続nanoSPECT/CT画像化を、任意抽出選択した5匹のマウスで実施した（前記マウスは、線量測定の計算のために¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの第一のサイクルの注射後160時間までDPRITを受けた）。

DPRITは、10/10のマウスで完全腫瘍応答を誘発し（コントロールでは腫瘍接種後21日で10/10が死亡）、全処置動物の100日の無腫瘍生存を示し明白な毒性は見られなかった。10日での5/10のマウスの剖検は、治癒を立証するとともに、腎、肝、脾及び/又は骨髄の評価で留意すべき組織病理学的所見は示さなかった（データは示されていない）。サイクル1に続く腫瘍への¹⁷⁷Lu-放射線暴露の線量概算は $4556 \pm 637\text{rad}$ （平均 ± SD、n = 5）であった。これらのデータに基づけば、治癒的DPRIT（すなわち3サイクル）に続く腫瘍への合計¹⁷⁷Lu-放射線暴露の一次近似値は、それぞれ14000rad（血液及び腎の放射線量は150rad（治療指數 (TI) : 93）及び875rad (TI : 16) であった。

3サイクルPRITレジメン処置マウスのルテチウム-177 nanoSPECT/CT画像化は、腫瘍の目視可能な取り込み及びバックグラウンド組織の最小限の取り込みの強いコントラストを示した。（データは示されていない）。TIは~70 : 1であった。マウス生体の非侵襲性 *in vivo*断面画像に基づけば、10mg以下の腫瘍の検出が観察された。本実施例ではとりわけ、huA33-C825は効果的に腫瘍負荷を *in vivo*で減少させること、及びPRIT系治療診断両用薬は治癒効果を有し得ること、及び/又は小腫瘍の検出に用い得ることが確認される。

【実施例 7】

【0079】

“リアルタイム”で同時進行するセラノスティック処置及び画像ガイド線量測定

本実施例は、先行実施例に記載したヒト化A33二重特異性抗体を用いる治療診断両用DOT-A-PRITレジメンに対する *in vivo*応答について記述し、同時進行する処置及び画像ガイド線量測定を介して治療有効性を明らかにする。特に、“リアルタイム”線量測定のために¹⁷⁷Lu-DPRIT処置を受けているマウスの高解析定量的画像化のためにnanoSPECT/CTを用いた。

1匹のSW1222担癌ヌードマウス（体積：ノギス測定により 100mm^3 ）を、抗GPA33 PRIT + 5 MBqの¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの單一サイクルで処置し、nanoSPECT/CT画像化により、¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの注射後3時点（注射後1、24及び160時間後）で画像化した。図8に示されているのは、腫瘍が存在する脇腹下部の最大強度のnanoSPECT/CT画像である。画像は注射時間修正崩壊で、既知の活性標準物を用いて調整された。腫瘍の活性濃度は、調整画像の問題領域の分析を用いて決定した。本実施例ではとりわけ、huA33-C825は効果的に腫瘍負荷を *in viv*

10

20

30

40

50

で減少させること、及び高解析定量的画像化は有効性測定に用いることができる1つの方法であることが確認される。

実施例のための材料と方法：

腫瘍細胞株及び細胞培養試薬

ヒト結腸直腸癌細胞株SW1222は下記施設から入手し (Ludwig Institute for Cancer Immunotherapy, New York, NY)、連続的継代によって維持した。細胞は、以下を補充した最小必須培地 (Minimal Essential Medium) で5% CO₂を含む37 °Cの環境で培養した：10% 熱不活化ウシ胎児血清、2.0mMグルタミン、100単位/mLペニシリン及び100単位/mLストレプトマイシン。当該細胞株の受取り時に、培養を樹立し、3カ月未満に継代を制限するために小アリコットで凍結保存した。さらに製造業者の仕様書にしたがい定期的に市販キット (Lonza) を用いてマイクロプラズマについて検査した。継代及び細胞の採集時のトリプシン処理のために、カルシウム及びマグネシウムを含まないハンクス緩衝塩溶液中の0.25%トリプシン/0.53mM EDTAの溶液を用いた。

huA33-C825のクローニング及び発現

huA33-C825は、以前にChealらの文献 (Cheal, S. M. et al. (2014, Mol. Cancer Ther. 13(7), 10ページ) に記載されたプラットフォームを用い、ヒト化抗体A33 (huA33 ; King, D.J. et al., 1995, British J. Cancer 72:1364-1372) の可変領域 (V_H及びV_L) を用いて作製した。huA33-C825は哺乳動物発現ベクターを用いCHO細胞で生成し、記載 (Cheal et al., 上掲書) にしたがってタンパク質A親和性クロマトグラフィーによって精製した。

本発明の例示的な二重特異性抗体は表8に提示される (huA33-C825 : ヒト化A33 IgG1 - ネズミC825 scFv、huA33-huC825 : ヒト化A33 IgG1 - ヒト化C825 scFv)。DNA配列については、リーダー配列は下線付きテキストとして提示される。アミノ酸配列については、リーダー配列は下線付きテキストとして提示され、リンカー配列は太字テキストとして提示され、可変領域配列は斜字体テキストとして提示される。

【 0 0 8 0 】

表8

huA33-C825軽鎖DNA

ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGACATCCAG
ATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGTGTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACA
TGCAAGGCCTCCCAGAACGTGCGGACCGTGGTGGCCTGGTATCAGCAGAACGCTGG
CCTGGCCCCAAGACCTGATCTACCTGGCCTTAACCGGACACCCGGCGTCCCTC
CAGATTCTCCGGATCTGGCTCTGGCACCGACTTACCTCACCATCTCCAGCCTGCA
GCCGAGGGATATGCCACCTACTTTGCCAGCAGCACTGGCCTACCCCTGACCTT
TGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAGTGAAGAGAACCGTGGCGCTCCCTCCGTGTTCA
TCTTCCCACCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTCGTGCGCTGC
TGAACAACTCTACCCCCCGAGGCCAAGGTGCACTGGAAGGTGGACAACGCCCTG
CAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTA
CAGCCTGTCCCTCACCTGACCCCTGTCCAAGGCCACTACGGAGAACGACAAGGTGT
ACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTCAACC
GGGGCGAATGTGGCGGCGAGGATCTGGCGGAGGCTCTGCTTCTCACGTGAAG
CTGCAGGAAAGCGGCCCTGGACTGGTGACGCTTCCAGTCTGTCCCTGACCTGC
ACCGTGTCCGGCTTCTCCCTGACCGATTACGGCGTGCACTGGTGCGACAGTCTCCA
GGCAAGGGCCTGGAATGGCTGGAGTGATTGGAGCGGTGGCGGAACCGCCTACAA
CACCGCCCTGATCTCCCGCTGAACATCTACCGGGACAACCTCAAGAACAGGTGTT
CCTGGAAATGAACTCCCTGACGGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGGCCAGAC
GGGGCTCTACCCCTACAACACTTCGACGCTGGGCTGCGGCACCACCGTGACAG
TGTCTAGCGGAGGTGGATCTGGGGCGGAGGTAGCGGAGGGGAGGTTCTCAG
GCTGTCGTGATCCAGGAATCTGCCCTGACCAACCCCCCTGGCGAGACAGTACACTG
ACCTGCGGATCTCCACCGCGCTGTGACCGCCTCCAACACTACGCCAACTGGGTGCAG
AAAAAGCCCACCACTGCTCACCGCCTGATGGCGGCCACAACAAACAGACCTCC
AGGCGTGCCAGCCGGTCTCCGGCTCTGATGGAGATAAGGCCGCCCTGACAAT
CGCCGGCACCCAGACAGAGGACGAGGCTATCTACTCTGCGCCCTGTGGTACAGCG
ACCACTGGGTATCGGCGGAGGCACCAGACTGACCGTGCTGGGATAG (配列番号1)

10

20

huA33-C825軽鎖アミノ酸

MGWSCIILFLVATATGDIQMTPSPSSLVSVGDRVITCKASQNVRTVVAWYQQKPG LAPKT
LIYLASNRRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFISSLQPEDIATYFCQOHWSYPLTFQGQTKVEVKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE CGGGGGGGASH
VKLQESCPGLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIVWSGGGTAYNTALI
SRLNIYRDN SKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPNYFDAWGCGTTVTSSGGGGSG
GGGSGGGGSQAVVIQESALTTPPGETVLTGSSTGAVTASNYANWVQEKP DHCFGLJGG
HNNRPPGPVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTRLTVLG
(配列番号2)

30

【 0 0 8 1 】

huA33-huC825 軽鎖アミノ酸 (15 aa リンカー)

MGWSCIILFLVATATGDIQMTQSPSSLSVSGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPG LAPKTLIYL ASN RHTGVPSR
FSGSGSGTDFFTFTISSLQPEDIA TYFCQQHWSYPLTFGQGT KVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECT
SGGGGSGGGGSGGGGSHVQLVESGGGLVQPGSRLSCAASGFS LT DYGVHW VRQAPGKGLEWLGVVIWSGGGTAYNT
ALISRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARRGSYP NYFDAWCGT LTVTSSGGGSGGGS QAVV
TQEPLTVSPGGTVLTCGSSTGA VTASNYANWVQQKPGQCPRGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKA ALTLLGAQ
PEDEAEYYCALWYSDHVVIGGGTKLTVLG (配列番号:3)

huA33-huC825 軽鎖アミノ酸 (30 aa リンカー)

MGWSCIILFLVATATGDIQMTQSPSSLSVSGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPG LAPKTLIYL ASN RHTGVPSR
FSGSGSGTDFFTFTISSLQPEDIA TYFCQQHWSYPLTFGQGT KVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECT
SGGGGSGGGGSGGGGSHVQLVESGGGLVQPGSRLSCAASGFS LT DYGVHW VRQAPGKGLEWLGVVIWSGGGTAYNT
ALISRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARRGSYP NYFDAWCGT LTVTSSGGGSGGGS QAVV
SGGGGSGGGS QAVV TQEPLTVSPGGTVLTCGSSTGA VTASNYANWVQQKPGQCPRGLIGGHNNRPPGVPARFSG
SLLGGKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSDHVVIGGGTKLTVLG (配列番号:4)

huA33-C825 重鎖 IgG1 DNA (非グリコシル化)

ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACGCCACCAGCGAGGTGCAGCTGCTGA ATCTGGCGAGG
ACTGGTGCAGCCTGGCGCTCTGAGACTGTCTTGCCGCTCTGGCTCGCCTCTCCACCTACGACATGT CCT
GGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCTGGAATGGGTGCCACAATCTCTCCGGCTCCTACACCTACTACCTG
GACTCTGTGAAGGGCCGGTCACCATCTCCGGACTCTCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGA ACTCCCTGCA
GGCGGAGGACTCCGCCATCTACTACTGTGCCCTACCACCGTGGTGCCCTCGCTTATTGGGCCAGGGCACCCCTCG
TGACCGTGTCCCTGCTTCTACCAAGGGCCCATCGGTCTCCCCCTGGCACCCCTCCAAAGAGCACCTCTGGGGC
ACAGCGGCCCTGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCAACCGGTGACGGTGTGTTGA ACTCAGGCCCTGAC
CAGCGGGTGCACACCTTCCCGGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCCT
CCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT
GAGCCCAAATCTGTGACAAA ACTCACACATGCCAACCGTGGCACCTGA ACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTT
CCTCTCCCCC AAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCCGTGGTACGTGA
GCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGG
GAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCC
GAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCGATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCGACGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC
TCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
AAATGA (配列番号:5)

【 0 0 8 2 】

huA33-C825重鎖IgG1アミノ酸(非グリコシル化)

MGWSCIILFLVATATGEVQLLES^GGGLVQPGGLRLSCAASGF^AFSTYDMSWVRQAPGKGL
EWVATISSGGSYTYLDSVKGRFTISRDSSKNTLYLQMNSLQAEDSAIYYCAPTTVVPFAYWGQ
GTLTVVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号6)

huA33-C825重鎖IgG1アミノ酸(非グリコシル化、K322A)

10

MGWSCIILFLVATATGEVQ^LLES^GGGLVQPGGLRLSCAASGF^AFSTYDMSWVRQAPGKGL
EWVATISSGGSYTYLDSVKGRFTISRDSSKNTLYLQMNSLQAEDSAIYYCAPTTVVPFAYWGQ
GTLTVVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号7)

【 0 0 8 3 】

表面プラズモン共鳴試験

20

ピアコアT100バイオセンサー、CM5センサーチップ、及び関連試薬はGEヘルスケアから購入した。組換えヒトA33タンパク質はノボプロテイン (Novoprotein) から購入した。BS A-(Y)-DOTA-B抱合体は記載 (Cheal et al., 上掲書) にしたがって調製した。A33及びDOTA抗原はアミノカップリングキット (Amino Coupling kit, GE Healthcare) を用いて固定した。精製二重特異性抗体及びコントロール抗体を分析し、記載 (Cheal et al., 上掲書) にしたがってピアコアT100評価ソフトウェアを用い、データを二価分析物モデルに適合させた。

PRIT試薬、プロトコル及び異種移植試験

全ての動物実験が、スローンケッタリング記念癌センターの施設内動物管理使用委員会によって承認され、さらに適切かつ人道的使用のための施設内ガイドラインにしたがった。無胸腺nu/nu雌マウス (6 - 8週齢 (Harlan Sprague Dawley)) を少なくとも1週間飼育箱に順応させた。動物のグループにA33陽性SW1222を、マトリゲル (BD Biosciences) で1 : 1に処方した 5×10^6 細胞により左脇腹の皮下に注射した。定着腫瘍 (100 - 900mm³) は、橢円体の体積のための式 ($V = 4/3$ (長さ/2 × 幅/2 × 高さ/2)) を用いて7 - 10日で観察された。全ての試薬は尾静脈側方から静脈内 (i.v.) に投与された。PRITプロトコルは以下の注射を含んでいた : huA33-C825 [t = -28時間]、続いて24時間後にCA [t = -4時間] (CAは500kDaのデキストラン-(Y)-DOTA-Bn抱合体で、Orcuttら (Orcutt et al., 2011, Nucl. Med. Biol. 38:223-233) の記載にしたがって調製し、注射のために生理食塩水で処方した。デキストランモル数当たりの(Y)-DOTA-Bnのモル数の置換比は61(Y)-DOTA-Bn/デキストランであった)、さらに4時間後に¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn [t = 0時間] (以前に記載したように、アミノベンジル-DOTA(p-NH₂-Bn-DOTA) (Macrocyclics) 及び¹⁷⁷LuCl₃ (比活性 ~ 30Ci/mg ; Perkin Elmer) をインキュベートし、注射のために生理食塩水中で処方することによって調製した)。加えて、huA33-C825をI-131でトレース放射線標識し、PRIT中の腫瘍取り込みを概算した。IODOGEN法 (Cheal, S. et al., 2014, Mol. Cancer Ther. 13(7):1-10) を用いて¹³¹I-huA33-C825を調製し (最終比活性95.5 MBq/mg、コールドのhuA33-C825を添加して所望のmg用量を達成した。サイズ排除高圧液体クロマトグラフィーを用いた放射線化学純度は > 98% であった)、in vitro細胞結合免疫反応性は、本質的にLindmoの方法 (Lindmo, T. et al., 1990, J. Immunol. Meth. 126(2):183-189) の記載にしたがってSW1222細胞を用いて判定した。非特異的IgG-C825によるPRITのために、GD2標的誘導二重特異性抗体 (hu3F8-C825) の等価のmg用量をhuA33-C825の代わりに用いた。ex vivo生体分布

30

40

50

50

分析のために、CO₂（ガス）仮死によりマウスを安楽死させ、腫瘍及び選別器官を採取し、水洗及び風乾して秤量し、ガンマシンチレーション計測（Perkin Elmer Wallac Wizard 3）によって放射能アッセイを実施した。計測率は、バックグラウンド及び崩壊修正し、システムキャリブレーション係数を用いて活性に変換し、投与した活性に対して標準化し、パーセント注射用量/グラム (%ID/g)として表した。腫瘍及び多様な組織における¹⁷⁷Lu-活性濃度の相違は、適切な場合にはスクエアント独立t検定によって分析した。

【0084】

吸収線量の概算

A33陽性SW1222担癌マウスのグループ（n=4-5）に0.25mgのhuA33-C825、CA（62.5 μg ; 25% (w/w)）、及び1.85 - 2.0MBq (~10pmol) の¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnを投与し、注射後2、24及び120時間で犠牲にした。各組織について、非崩壊修正時間活性濃度のデータを、エクセルを用いて1成分、2成分、適切な場合にはより複雑な指數関数に適合させて分析的に統合し、単位投与活性当たりの累積活性濃度を得た。非侵入放射線のための¹⁷⁷Lu平衡用量定数（8.49g-cGy/MBq-h）を用いて、腫瘍対腫瘍及び選別器官対器官の自己吸収線量を概算した（このとき、¹⁷⁷Luベータ線のみの完全な局所吸収を仮定し、ガンマ線及び非自己線量寄与は無視した）。腫瘍及び最高の吸収線量を有する選別組織（すなわち血液、肝、脾及び腎）の¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの相対的取り込みに対する¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn量の影響を決定するために、SW1222担癌雌無胸腺ヌードマウス（n=5/グループ）に以下を投与した：0.25mg (1.19nmol) のhuA33-C825 (t = -28時間) 及び62.5 μgのCA (t = -4時間)、続いて11.1MBq (11.14 - 11.40MBq)、55.5MBq (54.61 - 55.06MBq)、又は111MBq (109.52 - 112.5MBq) のいずれか。¹⁷⁷Lu活性の生体分布分析のために、全てのグループを¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの注射後24時間（すなわち最大腫瘍取り込み時間）に犠牲にした。

PRIT + ⁸⁶Y-DOTA-BnのPET画像化

肩にA33陽性SW1222腫瘍を保持するマウスのただ1つのグループ（n=5）に、0.25mgのhuA33-C825、CA（62.5 μg ; 25% (w/w)）、及び8.6 - 8.8MBq (~50pmol) の⁸⁶Y-DOTA-Bnを投与し、注射後2及び20時間後にmicroPETフォーカス120 (CTI Molecular Imaging, Inc. Knoxville, TN) を用いて非侵襲的に画像化した。以下の画像化獲得パラメーターを用いた：350 - 750keVのエネルギーインドウ、6nsecの同時発生タイミングインドウ、及び20分の獲得時間。得られたリストモードデータをフーリエ再ビニングによって2Dヒストグラムに仕分けし、断面図をフィルターバック投影によって128 × 128 × 95マトリックスに再構築した（再構築された空間解析は2.6mmの半値全幅 (FWHM) である）。画像は、スキャナーの応答の非均質性、デッドタイムカウントロス、物理的崩壊（注射時間に対して）、及び⁸⁶Yポジトロン分岐比について修正された。減弱、分散、又は部分的体積平均化修正は適用しなかった。経験的に決定されるマウスのシステムキャリブレーション係数（すなわち μCi/mL/cps/ボクセル）を用いて、ボクセルカウント率を活性濃度に変換した。続いて、得られた画像データを投与活性に対して標準化し、問題領域分析によって、注射時間に対して放射能崩壊を修正した組織単位グラム当たりのパーセント注射用量 (%ID/g) を決定した。AsiPRO VM 5.0ソフトウェア (Concorde Microsystems, Knoxville, TN) を用いて、画像及び問題領域 (ROI) 分析（最大ROI、%ID/gとして）を実施した。ex vivo生体分布分析のために、動物を注射後24時間で犠牲にした。

【0085】

オートラジオグラフィーと免疫組織化学

huA33-C825 PRIT、続いて¹⁷⁷Lu-DOTA-Bnの11.1 (11.14 - 11.40)、55.5 (54.61 - 55.06)、又は111MBq (109.52 - 112.5 MBq) を注射した選別マウス（犠牲は注射後24時間）から、凍結してOCT包埋した腫瘍及び腎をクリオスタッフ (Avantik, Springfield, NJ) で10 μm切片として切り出し、直ちに画像化プレート (Fuji Photo Film, Kanagawa, Japan) に72時間暴露し、その後Typhoon FLA 7000スキャナー (GE, Pittsburg, PA) を用いてスキャンした。同じ切片にヘマトキシリソニンエオシン染色を施し、移動制御ステージを付けたオリンパスBX60顕微鏡 (Olympus, Central Valley, PA) 下でスキャンした。オートラジオグラフィー及び顕微鏡画像の両方を処理し、ImageJ (NIH) を用いて分析した。

治療法及びシンチグラフィー試験

皮下定着A33陽性SW1222担癌マウスのグループに、huA33-C825若しくは非特異的（n.s.）IgG-C825 PRIT（すなわち単一サイクル処置、腫瘍接種後7日目に¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn注射）、又は2サイクルのPRIT（すなわち二サイクル処置試験、腫瘍接種後10日目及び17日目に¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn注射を実施）を注射した。二サイクル処置試験については、腫瘍接種後10日の腫瘍体積（TV10）を記載し（すなわち最初の¹⁷⁷Lu-DOTA-Bn注射の日）、適切な時には平均±SDとして表した。以下の定義を用いて、処置応答を記載した：完全応答（CR）は、100mm³未満への腫瘍縮小と定義される。持続奏功応答（DR）は処置後140日における生存と定義される。過剰な腫瘍負荷は1000mm³を超えるものと定義される。シンチグラフィー試験については、処置を受けるA33陽性SW1222担癌マウス選別グループは、注射後20時間のnanoSPECT（Bioscan, Washington D.C.）による30分間（～10⁵カウント/画像）のスキャニングの前に、ガス吸入による麻酔下に置かれた。前記スキャニングでは、低エネルギー高解析コリメータ及び208keVのウインドウ設定が用いられた。画像をBioscan Hi SPECTソフトウェアを用いて256×256マトリックスに再構築し、分析のためにASIPRO VMにアップロードした。

【0086】

等価物

特許請求の範囲における請求項の要素の修飾に際して、順序を表す用語、例えば“第一の”、“第二の”、“第三の”などは、それ自体が、優先性、上位性、又は記載される要素の別の要素に対する順位若しくはある方法の作業が実施される時間的順番を暗示するものではなく、ある名称を有する1つの請求項の要素と同じ名称を有する別の請求項の要素と区別し当該複数の請求項の要素を識別するための標識として単に用いられる。

明細書及び特許請求の範囲においてここで用いられる“a”及び“an”という冠詞は、明確にそうではないことが示されないかぎり、複数の対応する語を含むと理解されるべきである。あるグループの1つ以上のメンバーの間に“又は”を含む請求項又は説明は、当該グループメンバーの1つ、2つ以上、又は全てがある与えられた生成物又はプロセスに存在するか、当該生成物又はプロセスで利用されるか、或いはそうでなければ当該生成物又はプロセスに関連するならば、そうではないことが示されないかぎり或いは文脈からそうではないことが明白でないかぎり、要件を満たしているとみなされる。本発明は複数の実施態様を含み、そのような実施態様では、当該グループの明白に1つのメンバーがある与えられた生成物又はプロセスに存在するか、前記で利用されるか、又はそうでなければ前記に関連する実施態様を含む。本発明はまた複数の実施態様を含み、そのような実施態様では、2つ以上のグループメンバー又は全グループメンバーが、ある与えられた生成物又はプロセスに存在するか、前記で利用されるか、又はそうでなければ前記に関連する。さらにまた、本発明は、列挙した請求項の1つ以上に由来する1つ以上の限定、要素、節、説明的語句などは、特段の指示がないかぎり又は矛盾若しくは不一致が生じることが当業者に明白でないかぎり、同じ基本請求項（又は関連するものとして、任意の他の請求項）に従属する別の請求項に導入される全ての変更、組合せ及び並べ換えを包含することは理解されよう。要素が列挙されて（例えばマーカッシュグループ又は同様な形式で）存在する場合、当該要素の各サブグループもまた開示され、さらに任意の要素が当該グループから除去され得ることは理解されよう。一般的には、本発明又は本発明の特徴が具体的な要素、特徴物などを含むと言う場合、本発明のある種の実施態様又は本発明の特徴はそのような要素、特徴物などから成るか、又は本質的にそのような要素、特徴物などから成る。簡潔にするために、それら実施態様は、本明細書では各事例において多くの語で個々に説明されてはいない。具体的な実施態様又は特徴の排除が本明細書に列挙されているか否かにかかわらず、本発明の任意の実施態様又は特徴を当該請求項から明示的に除外することができることは理解されるべきである。本発明の背景を記載するために、及び本発明の実施に關して追加的詳細を提供するために、本明細書に引用する刊行物、ウェブサイト及び他の参考材料は、引用により本明細書に含まれる。

本発明の少なくとも1つの実施態様のいくつかの特徴を記載したので、多様な変更、修

10

20

30

40

50

正及び改善は当業者には容易に明らかとなるであろうということは理解されよう。そのような変更、修正及び改善は本開示の部分であることが意図され、本発明の趣旨及び範囲内であることが意図される。したがって、前述の説明及び図面は単なる例示であり、本発明は下記の特許請求の範囲によって詳細に記載される。

【0087】

参考文献

- Ackerman, M.E. et al., 2008, A33 antigen displays persistent surface expression, *Cancer Immunol. Immunother.* 57(7):1017-1027.
- Ackerman, M.E. et al., 2008, Effect of antigen turnover rate and expression level on antibody penetration into tumor spheroids, *Mol. Cancer Ther.* 7(7):2233-2240. 10
- Barendswaard, E.C. et al., 1998, Rapid and specific targeting of monoclonal antibody A33 to a colon cancer xenograft in nude mice, *International J. Oncol.* 12: 45-53.
- Carrasquillo, J.A. et al., 2011, 124I-huA33 Antibody PET of Colorectal Cancer, *J. Nucl. Med.* 52:1173-1180.
- Cheal, S.M. et al., 2014, Preclinical Evaluation of Multistep Targeting of Disialoganglioside GD2 Using an IgG-scFv Bispecific Antibody with High Affinity for GD2 and DOTA Metal Complex, *Mol. Cancer Ther.* 13(7):1-10.
- Cheal, S.M. et al., 2014, Evaluation of glycodendron and synthetically-modified dextran clearing agents for multi-step targeting of radioisotopes for molecular imaging and radioimmunotherapy, *Mol. Pharm.* 11(2):400-416. 20
- El Emir, E. et al., 2007, Predicting Response to Radioimmunotherapy from the Tumor Microenvironment of Colorectal Carcinomas, *Cancer Res.* 67(24):11896-11905.
- Goodwin, D.A. et al., 1994, Pharmacokinetics of pretargeted monoclonal antibody 2D12.5 and 88Y-Janus-2-(p-nitrobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanetetraacetic acid (DOTA) in BALB/c mice with KHJJ mouse adenocarcinoma: a model for 90Y radioimmunotherapy, *Cancer Res.* 54(22):5937-5946.
- King, D.J. et al., 1995, Preparation and preclinical evaluation of humanised a33 immunoconjugates for radioimmunotherapy, *British J. Cancer* 72:1364-1372. 30
- Lindmo, T. et al., 1990, Immunometric assay by flow cytometry using mixtures of two particle types of different affinity, *J. Immunol. Meth.* 126(2):183-189.
- Orcutt, K.D. et al., 2010, A modular IgG-scFv bispecific antibody topology, *Protein Engineering Design & Selection* 23(4):221-228.
- Orcutt, K.D. et al., 2011, Engineering an antibody with picomolar affinity to DOTA chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging, *Nucl. Med. Biol.* 38(2):223-233.
- O'Donoghue, J.A. et al., 2011, 124I-huA33 antibody uptake is driven by a33 antigen concentration in tissues from colorectal cancer patients imaged by immuno-PET, *J. Nucl. Med.* 52:1878-1885. 40
- Scott, A. M. et al., 2005, A phase I trial of humanized monoclonal antibody A33 in patients with colorectal carcinoma: biodistribution, pharmacokinetics, and quantitative tumor uptake, *Clin. Cancer Res.* 11(13):4810-4817.
- Welt, S. et al., 1994, Phase I/II study of iodine 131-labeled monoclonal antibody A33 in patients with advanced colon cancer, *J. Clin. Oncol.* 12(8):1561-71.
- Welt, S. et al., 2003, Phase I study of anticancer humanized antibody A33, *Clin. Cancer Res.* 9:1338-1346.

【図1】

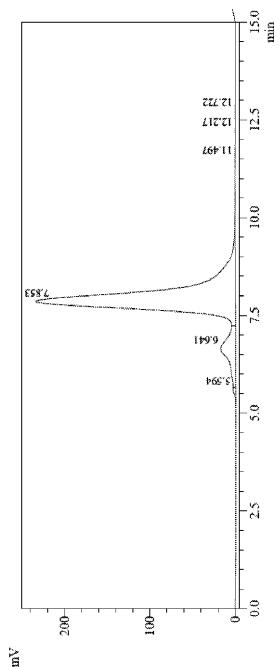


Figure 1

【図2】

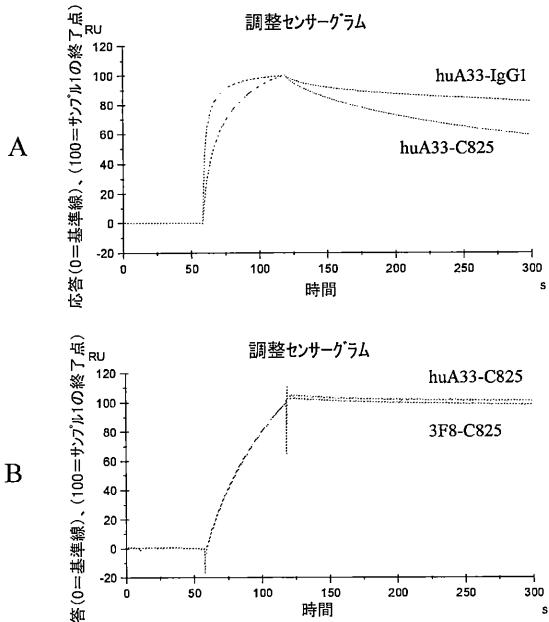


Figure 2

【図3 A - B】

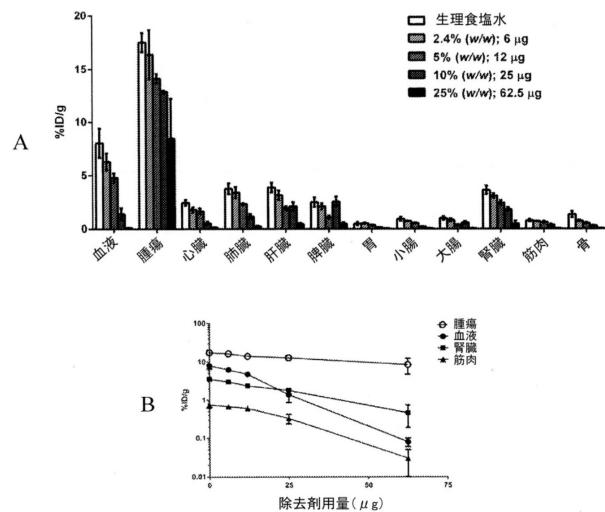


Figure 3A & 3B

【図3 C - D】

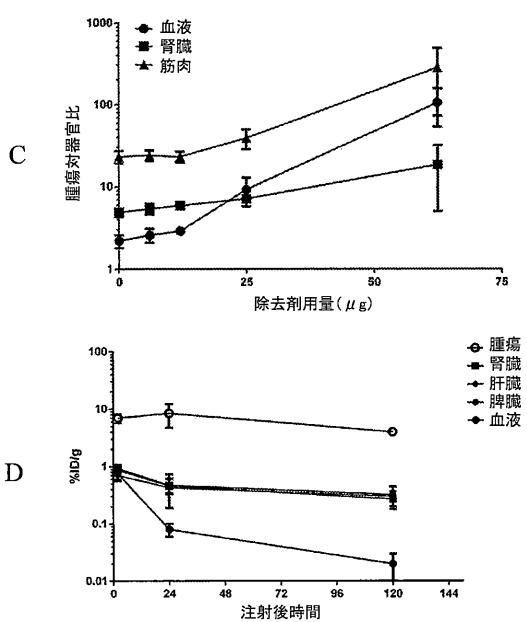


Figure 3C & 3D

【図 4 A - B】

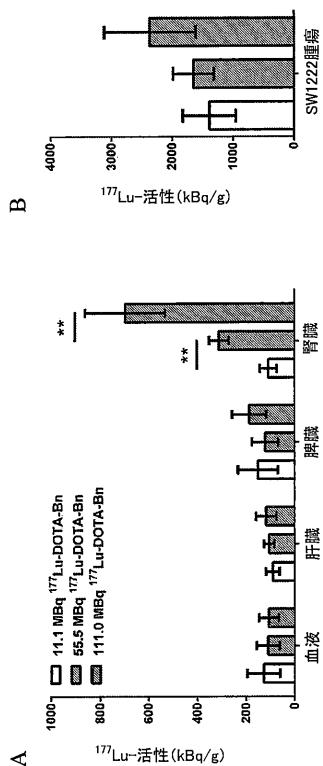


Figure 4A & 4B

【図 4 C - D】

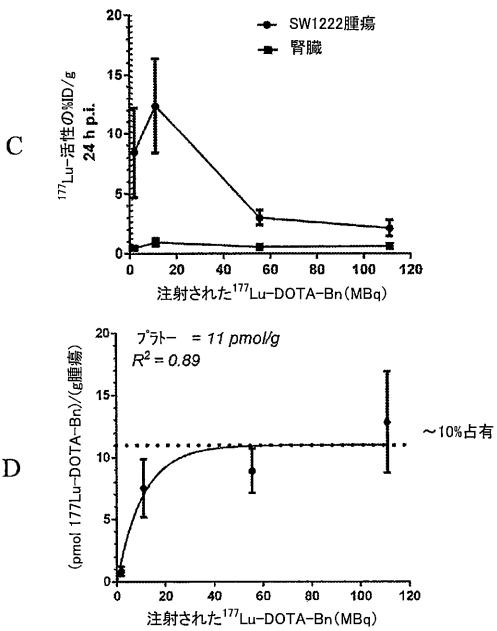
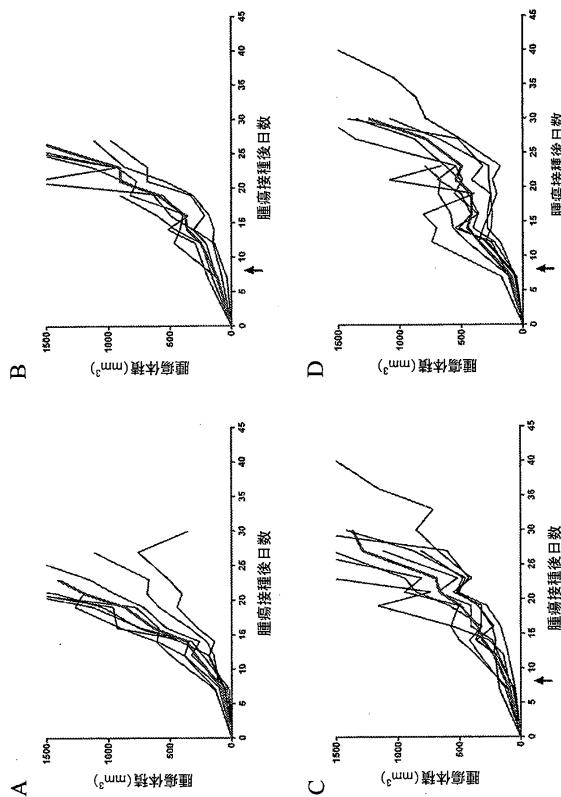


Figure 4C & 4D

【図 5】



【図 6】

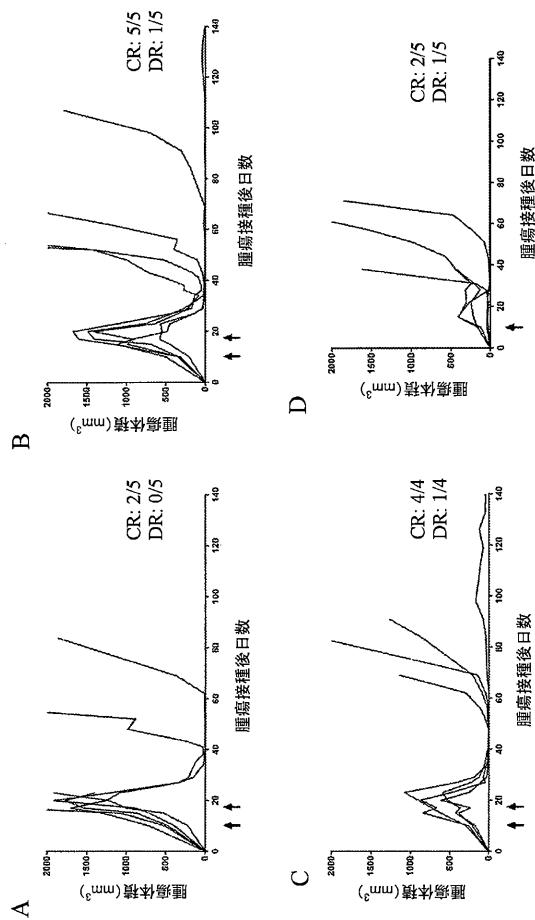
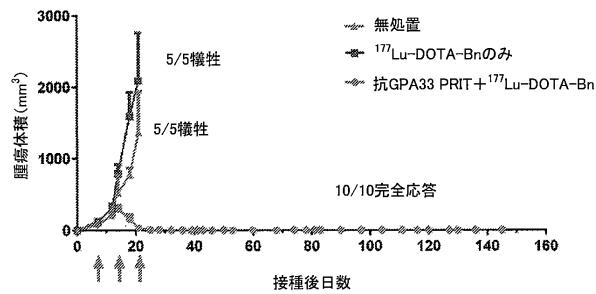
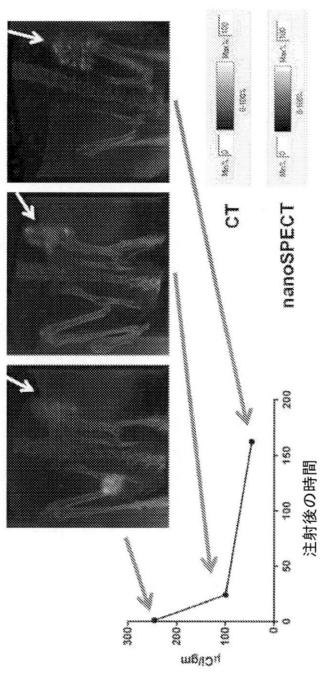


Figure 6

【図7】



【図8】



【配列表】

0006970017000001.app

フロントページの続き

			F	I
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 K	51/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/18
A 6 1 K	47/54	(2017.01)	A 6 1 K	51/04
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	47/54
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
			A 6 1 P	43/00
				1 2 1

(74)代理人 100088694
弁理士 弟子丸 健

(74)代理人 100103610
弁理士 吉田 和彦

(74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信

(74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 チール サラ エム
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10065 ニューヨーク ヨーク アヴェニュー 1275
メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター内

(72)発明者 シュイ ホン
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10065 ニューヨーク ヨーク アヴェニュー 1275
メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター内

(72)発明者 ラーソン スティーヴン エム
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10065 ニューヨーク ヨーク アヴェニュー 1275
メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター内

(72)発明者 チュン ナイ - コン
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10065 ニューヨーク ヨーク アヴェニュー 1275
メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター内

(72)発明者 ウィトラップ カール デイン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139-4307 ケンブリッジ メイン ストリート 500 ビルディング 76-261 マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー内

(72)発明者 ツエン アリス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139-4307 ケンブリッジ メイン ストリート

ト 500 ビルディング 76-261 マサチューセッツ インスティテュート オブ テク
ノロジー内

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0254987(US, A1)

特表平11-506435(JP, A)

国際公開第2012/133782(WO, A1)

特表2007-527391(JP, A)

国際公開第2014/144763(WO, A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-15/90

C07K 1/00-19/00

C12P 1/00-41/00

CA / MEDLINE / BIOSIS / WPIDS (STN)

JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

Genbank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

UniProt / GeneSeq

PubMed