(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-534571
(P2017-534571A)
(43)公表日　平成29年11月24日(2017.11.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	ZNA	4B064
C12N 5/09	(2010.01)	C12N	5/09		4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4C084
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00		4C085
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	N	4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 63 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-511183 (P2017-511183)
(86)(22)出願日　平成27年8月27日 (2015.8.27)
(85)翻訳文提出日　平成29年4月19日 (2017.4.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/047174
(87)国際公開番号　WO2016/033321
(87)国際公開日　平成28年3月3日 (2016.3.3)
(31)優先権主張番号　62/043,228
(32)優先日　平成26年8月28日 (2014.8.28)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　593152720
イェール　ユニバーシティー
Ｙａｌｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ
アメリカ合衆国　コネチカット　０６５１１，　ニュー　ヘイブン，　ウィットニー　アベニュー　２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体３Ｅ１０の多価フラグメントおよびその使用方法

(57)【要約】
３Ｅ１０のエピトープに結合する抗原結合分子およびそれらを使用する方法が提供される。その抗原結合分子は、例えば、モノクローナル抗体３Ｅ１０の２つまたはそれを超えるバリアント一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含み得、ここで、そのバリアントｓｃＦｖは、対応する３Ｅ１０ｓｃＦｖと比べて１つまたはそれを超える挿入、欠失または置換を有し、その分子は、３Ｅ１０のエピトープに結合し得、好ましくは特異的に結合し得る。癌およびウイルス感染を処置するためまたはウイルス感染を予防するためにそれらの抗原結合分子を使用する方法も提供される。

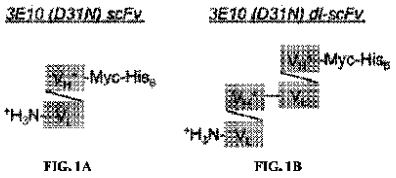


FIG. 1A　FIG. 1B

【特許請求の範囲】
【請求項１】
モノクローナル抗体３Ｅ１０の２つまたはそれを超えるバリアント一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む抗原結合分子であって、ここで、前記一本鎖可変フラグメントは、３Ｅ１０の対応する配列と比べて１つまたはそれを超える挿入、欠失または置換を含み、前記分子は、３Ｅ１０のエピトープに結合し得る、抗原結合分子。
【請求項２】
モノクローナル抗体３Ｅ１０の対応するｓｃＦｖに対して少なくとも９０％の配列同一性を含む、モノクローナル抗体３Ｅ１０の２つまたはそれを超えるバリアントｓｃＦｖを含む抗原結合分子であって、ここで、前記分子は、モノクローナル抗体３Ｅ１０のエピトープに結合し得る、抗原結合分子。
【請求項３】
モノクローナル抗体３Ｅ１０の１、２、３、４、５または６個の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む、モノクローナル抗体３Ｅ１０のヒト化バリアントの２つまたはそれを超えるｓｃＦｖを含む抗原結合分子であって、ここで、前記分子は、モノクローナル抗体３Ｅ１０のエピトープに結合し得る、抗原結合分子。
【請求項４】
２つまたはそれを超える前記ｓｃＦｖが、１つまたは複数のリンカーによって連結される、請求項１～３のいずれか１項に記載の抗原結合分子。
【請求項５】
前記ｓｃＦｖの各々が、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の抗原結合分子。
【請求項６】
前記重鎖可変ドメインが、配列番号１の１、２または３個のＣＤＲを含む、請求項５に記載の抗原結合分子。
【請求項７】
前記重鎖可変ドメインが、配列番号１を含む、請求項６に記載の抗原結合分子。
【請求項８】
前記重鎖可変ドメインが、配列番号２の１、２または３個のＣＤＲを含む、請求項５に記載の抗原結合分子。
【請求項９】
前記重鎖可変ドメインが、配列番号３のアミノ酸配列を含む、請求項６に記載の抗原結合分子。
【請求項１０】
前記軽鎖可変ドメインが、配列番号３の１、２または３個のＣＤＲを含む、請求項５～９のいずれか１項に記載の抗原結合分子。
【請求項１１】
前記軽鎖可変ドメインが、配列番号３のアミノ酸配列を含む、請求項１０に記載の抗原結合分子。
【請求項１２】
分子が、１つまたはそれを超える融合タンパク質を含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の抗原結合分子。
【請求項１３】
前記融合タンパク質のアミノ酸配列が、前記ｓｃＦｖのうちの少なくとも１つのアミノ酸配列を含み、前記分子が、前記融合タンパク質のうちの２つまたはそれより多くを含む、請求項１２に記載の抗原結合分子。
【請求項１４】
前記分子が、ダイアボディである、請求項１～１３のいずれか１項に記載の抗原結合分子。
【請求項１５】

前記分子が、トリボディである、請求項１～１３のいずれか１項に記載の抗原結合分子。
【請求項１６】
前記分子が、テトラボディである、請求項１～１３のいずれか１項に記載の抗原結合分子。
【請求項１７】
前記融合タンパク質のアミノ酸配列が、前記一本鎖可変フラグメントのうちの少なくとも２つのアミノ酸配列を含む、請求項１２に記載の抗原結合分子。
【請求項１８】
前記分子が、タンデム型のｊｓｃＦｖである、請求項１７に記載の抗原結合分子。
【請求項１９】
前記分子が、
（ｉ）配列番号２６のアミノ酸５～５１７であって、ここで、配列番号２６のアミノ酸１１５～１３５および／もしくは配列番号２６のアミノ酸３８１～３８６の一部または全部が、代替のリンカー配列で置換され；ならびに／またはアミノ酸２５２～２６４（配列番号２７）が、代替のリンカー配列で置換されている、配列番号２６のアミノ酸５～５１７；
（ｉｉ）配列番号２６のアミノ酸５～５１７；
（ｉｉｉ）配列番号２６のアミノ酸１～５１７；
（ｉｖ）配列番号２６のアミノ酸１～５３９；または
（ｖ）（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）もしくは（ｉｖ）のいずれかの機能的フラグメントもしくはバリアント
を含む、請求項１８に記載の抗原結合分子。
【請求項２０】
前記融合タンパク質のアミノ酸配列が、前記一本鎖可変フラグメントのうちの少なくとも３つのアミノ酸配列を含む、請求項１２に記載の抗原結合分子。
【請求項２１】
前記分子が、タンデム型のトリｓｃＦｖである、請求項２０に記載の抗原結合分子。
【請求項２２】
前記分子が、
（ｉ）配列番号２６のアミノ酸５～５１７であって、ここで、配列番号２７のアミノ酸１１５～１３５および／もしくは配列番号２７のアミノ酸３８１～３８６および／もしくは配列番号２７のアミノ酸６４７～６６７の一部または全部が、代替のリンカー配列で置換され；ならびに／またはアミノ酸２５２～２６４（配列番号２７）および／もしくはアミノ酸５１８～５３６（配列番号２７）が、代替のリンカー配列で置換されている、配列番号２６のアミノ酸５～５１７；
（ｉｉ）配列番号２７のアミノ酸５～７８３；
（ｉｉｉ）配列番号２７のアミノ酸１～７８３；
（ｉｖ）配列番号２７のアミノ酸１～８０５；または
（ｖ）（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）もしくは（ｉｖ）のいずれかの機能的フラグメントもしくはバリアント
を含む、請求項２１に記載の抗原結合分子。
【請求項２３】
タンパク質形質導入ドメインをさらに含む、請求項１～２２のいずれか１項に記載の抗原結合分子。
【請求項２４】
標的化シグナルをさらに含む、請求項１～２３のいずれか１項に記載の抗原結合分子。
【請求項２５】
核局在化シグナルをさらに含む、請求項１～２４のいずれか１項に記載の抗原結合分子。

【請求項２６】
請求項１～２２のいずれか１項に記載の抗原結合分子および薬学的に許容され得るキャリアを含む、薬学的組成物。
【請求項２７】
新生物細胞またはウイルスに曝露されたもしくは感染した細胞においてＤＮＡ修復を阻害する方法であって、前記細胞を請求項２６に記載の薬学的組成物と接触させる工程を含む、方法。
【請求項２８】
前記細胞が、ＤＮＡ損傷の修復が不十分である、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記細胞が、内因性の不完全なまたは欠損したＤＮＡ修復を有する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記細胞が、ＤＮＡ修復の欠陥もしくは欠損を有するかもしくは引き起こすウイルスに曝露されるかもしくは感染するか、または感染、組み込みもしくは複製のために宿主のＤＮＡ修復経路に依存する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３１】
前記細胞が、染色体の完全性の維持および／または遺伝子毒性ストレスからの保護が欠損している、請求項２７～３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３２】
前記細胞が、ＤＮＡ修復遺伝子に１つもしくはそれを超える変異を有するか、またはＤＮＡ修復遺伝子の異常な発現を有するか、またはＸＲＣＣ１、ＡＤＰＲＴ（ＰＡＲＰ－１）、ＡＤＰＲＴＬ２、（ＰＡＲＰ－２）、ポリメラーゼベータ、ＣＴＰＳ、ＭＬＨ１、ＭＳＨ２、ＦＡＮＣＤ２、ＰＭＳ２、ｐ５３、ｐ２１、ＰＴＥＮ、ＲＰＡ、ＲＰＡ１、ＲＰＡ２、ＲＰＡ３、ＸＰＤ、ＥＲＣＣ１、ＸＰＦ、ＭＭＳ１９、ＲＡＤ５１、ＲＡＤ５１ｂ．、ＲＡＤ５１Ｃ、ＲＡＤ５１Ｄ、ＤＭＣ１、ＸＲＣＣＲ、ＸＲＣＣ３、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＰＡＬＢ２、ＲＡＤ５２、ＲＡＤ５４、ＲＡＤ５０、ＭＲＥ１１、ＮＢ５１、ＷＲＮ、ＢＬＭ、ＫＵ７０、ＫＵ８０、ＡＴＭ、ＡＴＲ　ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、ＦＡＮＣファミリーの遺伝子、ＦＡＮＣＡ、ＦＡＮＣＢ、ＦＡＮＣＣ、ＦＡＮＣＤ１、ＦＡＮＣＤ２、ＦＡＮＣＥ、ＦＡＮＣＦ、ＦＡＮＣＧ、ＦＡＮＣＬ、ＦＡＮＣＭ、ＦＡＮＣＩ、ＦＡＮＣＪ、ＦＡＮＣＮ、ＦＡＮＣＰ、ＲＡＤ１およびＲＡＤ９からなる群より選択される遺伝子産物の損なわれた機能を有する、請求項２７～３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３３】
前記細胞が、ＰＴＥＮ欠損である、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記細胞が、不完全な癌抑制遺伝子、例えば、ＢＲＣＡ１またはＢＲＣＡ２を有する、請求項２７～３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３５】
前記細胞が、放射線抵抗性である、請求項２７～３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３６】
前記細胞が、化学療法に対して抵抗性である、請求項２７～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
前記新生物細胞が、肉腫、リンパ腫、白血病、癌腫および腺癌、芽腫、胚細胞性腫瘍、神経膠腫、神経内分泌腫瘍、メラノーマ、ラブドイド腫瘍、胚芽腫、神経外胚葉性腫瘍、カルチノイド腫瘍、頭蓋咽頭腫、組織球腫、髄上皮腫、中皮腫、多発性骨髄腫、慢性骨髄増殖性疾患、未分化神経外胚葉性腫瘍、唾液腺腫瘍、胸腺腫、胸腺癌腫、甲状腺癌およびウィルムス腫瘍からなる群より選択される癌細胞である、請求項２７～３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】

前記細胞が、低酸素性腫瘍の一部である、請求項２７～３７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３９】
前記細胞が、レンチウイルスに曝露されているかまたは感染している、請求項２７～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
前記細胞を放射線増感剤と接触させる工程をさらに含む、請求項２７～３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
前記放射線増感剤が、シスプラチン、ドキソルビシン、ゲムシタビン、５－フルオロウラシル、ＰＡＲＰ１阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、上皮成長因子レセプター（ＥＧＲＦ）阻害剤、インスリン様成長因子－１（ＩＧＦ－１）レセプター阻害剤、ＣＨＫ１阻害剤、ｍＴＯＲ阻害剤、キナーゼ阻害剤、ペントキシフィリンおよびビノレルビンからなる群より選択される、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記被験体を放射線治療で処置する工程をさらに含み、ここで、前記抗原結合分子は、放射線治療に対する前記細胞の感受性を高める、請求項２７～４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４３】
前記被験体を化学療法剤または抗新生物剤で処置する工程をさらに含む、請求項２７～４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４４】
前記抗原結合分子が、前記抗新生物薬に対する前記細胞の感受性を高める、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記接触させる工程が、被験体においてインビボで行われる、請求項２７～４４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４６】
前記被験体が、癌を有する、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記癌の１つまたはそれを超える症状を減少させるためまたは軽減するために、前記被験体に有効量の前記薬学的組成物が投与される、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記癌が、腫瘍を含み、癌の前記症状が、腫瘍量の減少または腫瘍成長の減少である、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記被験体が、ウイルス感染を有する、請求項４５～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５０】
前記ウイルス感染の１つまたはそれを超える症状を減少させるためまたは軽減するために、前記被験体に有効量の前記薬学的組成物が投与される、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記被験体が、ウイルスに曝露されたことがある、請求項４５～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５２】
ウイルスへの曝露の後に、ウイルス感染を予防するためまたはウイルス感染の重症度を低下させるために、前記被験体に有効量の前記薬学的組成物が投与される、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記細胞が、低酸素に起因してＤＮＡ損傷の修復が欠損している、請求項２７～４５の

いずれか１項に記載の方法。
【請求項５４】
前記細胞が、低酸素症を呈している、請求項２７～４５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５５】
前記細胞が、低酸素に起因して放射線抵抗性である、請求項２７～４５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５６】
前記細胞が、低酸素に起因して化学療法に対して抵抗性である、請求項２７～４５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５７】
前記接触させる工程によって、癌細胞またはウイルスに曝露されたもしくは感染した細胞の死または成長の減少がもたらされる、請求項２７～４４のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
この出願は、２０１４年８月２８日に出願された米国仮特許出願第６２／０４３，２２８号（許容される場合、この全体が参考として本明細書に援用される）の利益およびそれに対する優先権を主張する。
【０００２】
配列表に対する言及
２０１５年８月２６日に作成され、「ＹＵ＿６２８４＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」という名称であり、２３，４８５バイトのサイズを有する、テキストファイルとして提出された配列表は、参照により本明細書に援用される。
【０００３】
発明の分野
本発明の分野は、概して、細胞透過性抗体フラグメント、特に、３Ｅ１０の二価、三価および多価の一本鎖可変フラグメント、ならびにそれらのバリアント、ならびにＤＮＡ修復が欠損した悪性疾患の標的化治療のためにそれらを使用する方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
発明の背景
標的化癌治療の合理的なデザインには、腫瘍標的の安全かつ特異的な調節物質（ｍｏｄｕｌａｔｏｒ）の開発が必要である。抗体とその抗原との結合がこのうえなく特異性であるおかげで、抗体には、有意なオフターゲット効果を有する他の分子にまさる魅力的な治療上の利点がもたらされる。しかしながら、ほとんどの抗体は、原形質膜を横切らず、細胞内のプロセスに直接影響できない。ゆえに、多くの腫瘍特異的標的が細胞内および核内に隔離されていて、ほとんどの抗体がそれらに到達できないという事実は、抗体に基づく癌治療における制限因子であることを明らかにしている。現在、７つの抗体しか、固形腫瘍の処置のためにＦＤＡに承認されておらず、これらのすべてが、細胞外の抗原（ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、ＣＴＬＡ－４またはＶＥＧＦ）を標的化する（Ｓｃｏｔｔら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｃａｎｃｅｒ，１２：２７８－２８７（２０１２））。
【０００５】
選択性ループス自己抗体（ｓｅｌｅｃｔ　ｌｕｐｕｓ　ａｕｔｏａｎｔｉｂｏｄｙ）は、細胞内に浸透する珍しい能力を有する。細胞透過性のループス自己抗体を用いることにより、細胞内の重要なプロセスを乱して、癌細胞に選択的に影響を及ぼすという抗体に基づく癌治療における新しいパラダイムが台頭しつつある。核に局在するループス抗ＤＮＡ自己抗体３Ｅ１０は、このアプローチを例証するプロトタイプである。３Ｅ１０は、細胞核に浸透し、その細胞核においてＤＮＡに結合して、正常な細胞にとっては毒性でないが

ＢＲＣＡ２欠損に起因してＤＮＡ修復が不完全な腫瘍細胞にとっては合成致死であるような方法でＤＮＡ修復を阻害する（Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１５７ｒａ１４２（２０１２））。この知見は、ＤＮＡ修復が欠損した腫瘍に対する３Ｅ１０の使用についての原理証明を提供した。癌細胞上の膜抗原を標的化する抗体は、補体を活性化するためおよび抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を誘導するために、Ｆｃフラグメントを必要とする。対照的に、細胞内および核内の標的に影響する３Ｅ１０などの細胞透過性抗体にとって、Ｆｃ領域は、いかなる治療上の利点にも寄与しない可能性があり、それどころか、ＡＤＣＣおよび補体の全身作用に起因して有害であり得る。

【０００６】

核に浸透し、元の抗体よりも高い効率でＤＮＡに結合する、ＣＤＲ１にＤ３１Ｎ変異を有する３Ｅ１０一本鎖可変フラグメントが作製されたが、それは、ＢＲＣＡ２欠損癌細胞に対しては、高用量であってもわずかな効果しかなかった（Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１５７ｒａ１４２（２０１２），Ｗｅｉｓｂａｒｔら、Ｊ．Ａｕｔｏｉｍｍｕｎ．，１１：５３９－５４６（１９９８），Ｗｅｉｓｂａｒｔら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，２５：１８６７－１８７３（２００４））。そのｓｃＦｖは、単独では、ＰＴＥＮ欠損Ｕ２５１神経膠腫細胞に対しても有意に毒性でなかった（Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１５７ｒａ１４２（２０１２），Ｐｕｃら、Ｃｅｌｌ Ｃｙｃｌｅ，４：９２７－９２９（２００５），Ｂａｓｓｉら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，３４１：３９５－３９９（２０１３））。

【０００７】

したがって、改善された３Ｅ１０に基づく組成物が必要とされている。

【０００８】

ゆえに、本発明の目的は、モノクローナル３Ｅ１０および／または一価３Ｅ１０ｓｃＦｖと比べて、高い効力、高い有効性、低い毒性またはそれらの組み合わせを有する、３Ｅ１０に基づく作用物質を提供することである。

【０００９】

本発明の別の目的は、癌細胞ならびに／またはウイルスに感染したおよび／もしくはウイルスによって形質転換した細胞を処置するため、好ましくは、それらの細胞を殺滅するために、それらを使用する方法を提供することである。

【００１０】

本発明の別の目的は、ＤＮＡ損傷の修復が不十分である細胞、特に、ＢＲＣＡ２経路および／またはＰＴＥＮ経路が欠損した細胞の化学的感受性（ｃｈｅｍｏｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ）を高めるおよび／または放射線感受性を高める方法を提供することである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】Ｓｃｏｔｔら、Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｃａｎｃｅｒ，（２０１２）１２：２７８～２８７

【非特許文献２】Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，（２０１２）４：１５７ｒａ１４２

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１２】

発明の要旨

モノクローナル抗体３Ｅ１０のジｓｃＦｖ、トリｓｃＦｖ、および他の二価、三価および多価の抗原結合フラグメントならびに融合タンパク質、ならびにそれらのバリアント、特にバリアントＤ３１Ｎは、いかなる治療的タンパク質にも結合体化されずに、放射線療法または化学療法の非存在下であっても、ＤＮＡ修復が欠損した癌細胞にとって選択的に

致死であることが発見された。さらに、モノクローナル抗体３Ｅ１０のジｓｃＦｖ、トリｓｃＦｖ、および他の二価、三価および多価の抗原結合フラグメントならびに融合タンパク質、ならびにそれらのバリアント、特にバリアントＤ３１Ｎは、癌細胞の放射線感受性および化学的感受性を高める。この効果は、ＤＮＡ修復が欠損した細胞において増強される。下記の実施例は、$Ｖ_Ｈ$領域のＣＤＲ１にＤ３１Ｎ変異を有する３Ｅ１０ジ一本鎖可変フラグメント（ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ））が、対応する一価ｓｃＦｖと比べてＢＲＣＡ２欠損癌細胞に対して有意に大きな影響を及ぼすこと、およびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、インビボにおいてＢＲＣＡ２欠損腫瘍の成長を抑制することを示している。実施例はまた、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、ＰＴＥＮ欠損癌細胞にとっても合成致死であること、およびＤ３１Ｎ変異を有する３Ｅ１０トリ一本鎖可変フラグメントが、ＤＮＡ修復欠損細胞に対してジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）よりもさらに大きな影響を及ぼすことも示している。

【００１３】

ゆえに、３Ｅ１０のエピトープに結合する抗原結合分子およびその使用方法が提供される。最も好ましい実施形態において、その抗原結合分子には、（１）モノクローナル抗体３Ｅ１０の２つまたはそれを超えるバリアント一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）であって、ここで、そのバリアントｓｃＦｖは、対応する３Ｅ１０ｓｃＦｖと比べて１つまたはそれを超える挿入、欠失または置換を有し、その分子は、３Ｅ１０のエピトープに結合し得、好ましくは特異的に結合し得る、バリアント一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）；（２）モノクローナル抗体３Ｅ１０のｓｃＦｖに対して少なくとも９０％の配列同一性を含む、モノクローナル抗体３Ｅ１０の２つまたはそれを超えるバリアントｓｃＦｖであって、ここで、その分子は、モノクローナル抗体３Ｅ１０のエピトープに結合し得、好ましくは特異的に結合し得る、バリアントｓｃＦｖ；または（３）モノクローナル抗体３Ｅ１０の１、２、３、４、５または６個の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む、モノクローナル抗体３Ｅ１０のヒト化バリアントの２つまたはそれを超えるｓｃＦｖであって、ここで、その分子は、モノクローナル抗体３Ｅ１０のエピトープに結合し得、好ましくは特異的に結合し得る、ｓｃＦｖが含まれる。

【００１４】

好ましい実施形態において、上記ｓｃＦｖは、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態において、その重鎖可変ドメインは、配列番号１または配列番号２の１、２または３個のＣＤＲを含む。その重鎖可変ドメインは、配列番号１または２のアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、その軽鎖可変ドメインは、配列番号３の１、２または３個のＣＤＲを含む。その軽鎖可変ドメインは、配列番号３のアミノ酸配列を含み得る。

【００１５】

上記２つまたはそれを超えるｓｃＦｖは、１つまたは複数のリンカー、例えば、ペプチド、好ましくは、グリシンならびにセリンおよび／またはトレオニンを含むペプチドによって連結され得る。ゆえに、いくつかの実施形態において、その分子は、１つまたはそれを超える融合タンパク質を含む。例えば、その融合タンパク質のアミノ酸配列は、少なくとも１つの上記ｓｃＦｖのアミノ酸配列を含み得、その分子は、２つまたはそれを超える融合タンパク質（例えば、二量体、三量体など）を含む。例えば、その分子は、ダイアボディ、トリボディ（ｔｒｉｂｏｄｙ）、テトラボディ（ｔｅｔｒａｂｏｄｙ）などであり得る。

【００１６】

いくつかの実施形態において、上記融合タンパク質のアミノ酸配列は、少なくとも２つ、３つまたはそれを超える上記一本鎖可変フラグメントのアミノ酸配列を含む。例えば、その分子は、タンデム型のジｓｃＦｖ、タンデム型のトリｓｃＦｖなどであり得る。例示的なジｓｃＦｖは、配列番号２６のアミノ酸配列を有し得る。例示的なトリｓｃＦｖは、配列番号２７のアミノ酸配列を有し得る。

【００１７】

上記抗原結合分子は、必要に応じて、タンパク質形質導入ドメイン、標的化シグナル、核局在化シグナルまたはそれらの組み合わせを含み得るかまたはそれらに結合体化され得る。

【００１８】

上記抗原結合分子および薬学的に許容され得るキャリアを含む薬学的組成物、ならびにその使用方法も提供される。例示的な方法は、新生物細胞またはウイルスに曝露されたもしくは感染した細胞を、抗原結合分子を含む薬学的組成物と接触させることによって、その細胞におけるＤＮＡ修復を阻害する工程を含む。好ましい実施形態において、その細胞は、ＤＮＡ損傷の修復が欠損している、染色体の完全性の維持が欠損している、および／または遺伝子毒性ストレスからの保護が欠損している。その細胞は、ＸＲＣＣ１、ＡＤＰＲＴ（ＰＡＲＰ－１）、ＡＤＰＲＴＬ２、（ＰＡＲＰ－２）、ポリメラーゼベータ、ＣＴＰＳ、ＭＬＨ１、ＭＳＨ２、ＰＭＳ２、ｐ５３、ｐ２１、ＰＴＥＮ、ＲＰＡ、ＲＰＡ１、ＲＰＡ２、ＲＰＡ３、ＸＰＤ、ＥＲＣＣ１、ＸＰＦ、ＭＭＳ１９、ＲＡＤ５１、ＲＡＤ５１ｂ、ＲＡＤ５１Ｃ、ＲＡＤ５１Ｄ、ＤＭＣ１、ＸＲＣＣＲ、ＸＲＣＣ３、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＰＡＬＢ２、ＲＡＤ５２、ＲＡＤ５４、ＲＡＤ５０、ＭＲＥ１１、ＮＢ５１、ＷＲＮ、ＢＬＭ、ＫＵ７０、ＫＵ８０、ＡＴＭ、ＡＴＲ、ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、ＦＡＮＣファミリーのタンパク質、ＦＡＮＣＡ、ＦＡＮＣＢ、ＦＡＮＣＣ、ＦＡＮＣＤ１、ＦＡＮＣＤ２、ＦＡＮＣＥ、ＦＡＮＣＦ、ＦＡＮＣＧ、ＦＡＮＣＬ、ＦＡＮＣＭ、ＦＡＮＣＩ、ＦＡＮＣＪ、ＦＡＮＣＮ、ＦＡＮＣＰ、ＲＡＤ１およびＲＡＤ９からなる群より選択されるＤＮＡ修復遺伝子に１つまたはそれを超える変異を有し得るか、またはそのＤＮＡ修復遺伝子の異常な発現を有し得る。

【００１９】

いくつかの実施形態において、上記癌細胞は、ＤＮＡ損傷の修復が不完全である。特定の実施形態において、上記癌細胞は、低酸素に起因してＤＮＡ損傷の修復が不完全である。

【００２０】

いくつかの実施形態において、上記癌細胞は、放射線または化学療法に抵抗性である。特定の実施形態において、上記癌細胞は、低酸素に起因して放射線または化学療法に抵抗性である。

特に好ましい実施形態において、上記細胞は、ＰＴＥＮ欠損、ＢＲＣＡ１欠損、ＢＲＣＡ２欠損またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、上記細胞は、放射線抵抗性および／または化学療法に対して抵抗性である。

【００２１】

上記新生物細胞は、肉腫、リンパ腫、白血病、癌腫および腺癌、芽腫、胚細胞性腫瘍、神経膠腫、神経内分泌腫瘍、メラノーマ、ラブドイド腫瘍、胚芽腫、神経外胚葉性腫瘍、カルチノイド腫瘍、頭蓋咽頭腫、組織球腫、髄上皮腫、中皮腫、多発性骨髄腫、慢性骨髄増殖性疾患、未分化神経外胚葉性腫瘍、唾液腺腫瘍、胸腺腫、胸腺癌腫、甲状腺癌ならびにウィルムス腫瘍からなる群より選択される癌細胞であり得る。

【００２２】

上記細胞は、低酸素性腫瘍（ｈｙｐｏｘｉｃ　ｔｕｍｏｒ）の一部であり得る。上記細胞は、レンチウイルスに曝露され得るかまたは感染し得る。

【００２３】

上記方法は、上記細胞を放射線増感剤、例えば、シスプラチン、ドキソルビシン、ゲムシタビン、５－フルオロウラシル、ＰＡＲＰ１阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、上皮成長因子レセプター（ＥＧＲＦ）阻害剤、インスリン様成長因子－１（ＩＧＦ－１）レセプター阻害剤、ＣＨＫ１阻害剤、ｍＴＯＲ阻害剤、キナーゼ阻害剤、ペントキシフィリンまたはビノレルビンと接触させる工程を含み得る。上記方法は、上記被験体を放射線治療で処置する工程を含み得、ここで、上記抗原結合分子が、放射線治療に対する細胞の感受性を高める。

【００２４】

上記方法は、上記被験体を化学療法剤または抗新生物剤で処置する工程を含み得る。いくつかの実施形態において、上記抗原結合分子が、その抗新生物薬に対する上記細胞の感受性を高める。

【００２５】

好ましい実施形態において、上記接触は、被験体においてインビボで行われる。その被験体は、癌またはウイルス曝露またはウイルス感染を有し得る。上記薬学的組成物は、その癌または感染の１つまたはそれを超える症状を減少させるかまたは軽減するために、有効量でその被験体に投与され得る。特定の実施形態において、その癌には、腫瘍が含まれ、処置される癌の症状は、腫瘍量の減少または腫瘍成長の減少である。

【００２６】

ゆえに、癌もしくはウイルス感染の１つもしくはそれを超える症状を減少させるためもしくは軽減するため、またはウイルスへの曝露の後にウイルス感染を予防するために、その癌または感染を有する被験体に、有効量の、抗原結合分子を含む薬学的組成物を投与する工程を含む、その被験体を処置する方法も提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２７】

【図１】図１Ａおよび１Ｂは、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）一本鎖フラグメント（１Ａ）および３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）のジ一本鎖フラグメント（１Ｂ）のドメイン構造を示している図である。V_L：３Ｅ１０軽鎖の可変領域。V_H＊：ＣＤＲ１に促進性Ｄ３１Ｎ変異を有する３Ｅ１０重鎖の可変領域。

【００２８】

【図２】図２は、コントロール緩衝液または１０μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置された、ＢＲＣＡ２＋およびＢＲＣＡ２－細胞の生存率を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０１。

【００２９】

【図３】図３は、０～６．６μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置され、コロニー形成アッセイにおいて評価された、ＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１膵癌細胞の生存率を示している濃度効果曲線である。

【００３０】

【図４】図４Ａは、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）または緩衝液コントロールによる処置の後のヌードマウスにおけるＣＡＰＡＮ－１皮下異種移植モデルにおける、平均腫瘍体積を経時的に示している折れ線グラフ（最初の処置後の日数）である。図４Ｂは、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）または緩衝液コントロールで最初に処置した後の２８日目のヌードマウスにおけるＣＡＰＡＮ－１皮下異種移植モデルの平均腫瘍質量（ｇ）を示している棒グラフである。＊ｐ＝０．０３。

【００３１】

【図５】図５は、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）または緩衝液コントロールによる処置の後のＣＡＰＡＮ－１皮下異種移植モデルにおけるヌードマウスの平均体重（ｇ）を経時的に示している折れ線グラフ（日数）である。

【００３２】

【図６】図６は、３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）のトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）一本鎖フラグメントのドメイン構造を示している図である。

【００３３】

【図７】図７は、コントロールまたは低濃度（１μＭ）のジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置され、コロニー形成アッセイにおいて評価された、ＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１膵癌細胞の生存率を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０１。

【００３４】

【図８Ａ】図８Ａは、コントロール培地中のまたは２５μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の４時間後および２４時間後の

Ｕ２５１細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。図８Ｂは、コントロール培地中のまたは２５μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。図８Ｃは、コントロール培地中のまたは２０μＭのジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＵ２５１およびＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の平均ホスホ－５３ＢＰ１フォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。図８Ｄは、コントロール培地または３．３μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置した後のコロニー形成アッセイによって決定されたときのＵ２５１細胞およびＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の生存率を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。

【図８Ｂ】図８Ａは、コントロール培地中のまたは２５μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の４時間後および２４時間後のＵ２５１細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。図８Ｂは、コントロール培地中のまたは２５μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。図８Ｃは、コントロール培地中のまたは２０μＭのジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＵ２５１およびＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の平均ホスホ－５３ＢＰ１フォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。図８Ｄは、コントロール培地または３．３μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置した後のコロニー形成アッセイによって決定されたときのＵ２５１細胞およびＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の生存率を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。

【図８Ｃ】図８Ａは、コントロール培地中のまたは２５μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の４時間後および２４時間後のＵ２５１細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。図８Ｂは、コントロール培地中のまたは２５μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。図８Ｃは、コントロール培地中のまたは２０μＭのジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＵ２５１およびＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の平均ホスホ－５３ＢＰ１フォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。図８Ｄは、コントロール培地または３．３μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置した後のコロニー形成アッセイによって決定されたときのＵ２５１細胞およびＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の生存率を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。

【図８Ｄ】図８Ａは、コントロール培地中のまたは２５μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の４時間後および２４時間後のＵ２５１細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。図８Ｂは、コントロール培地中のまたは２５μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。図８Ｃは、コントロール培地中のまたは２０μＭのジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＵ２５１およびＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の平均ホスホ－５３ＢＰ１フォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。図８Ｄは、コントロール培地または３．３μＭのｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置した後のコロニー形成アッセイによって決定されたときのＵ２５１細胞およびＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞の生存率を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０００１。

【００３５】

【図９Ａ】図９Ａは、コントロール培地中のまたは２５μＭのジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＝０．０４。図９Ｂは、０～６．６μ

Ｍ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置後の、コロニー形成アッセイによって評価された、ＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１細胞の生存率を示している濃度反応曲線である。図９Ｃは、コントロール緩衝液または１０μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置され、コロニー形成アッセイによって評価された、ＢＲＣＡ２＋およびＢＲＣＡ２－ＤＬＤ１細胞の同質遺伝子対の各々の生存率を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０１。図９Ｄは、コントロール緩衝液または３．３μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置され、コロニー形成アッセイによって評価された、Ｈ１９７５（ＢＲＣＡ２機能正常（ｐｒｏｆｉｃｉｅｎｔ））、ＳＷ４８（ＢＲＣＡ２機能正常、ＭＬＨ１欠損）およびＨＣＴ１１６（ＢＲＣＡ２機能正常、ＭＬＨ１欠損）細胞の各々の生存率を示している棒グラフである。

【図９Ｂ】図９Ａは、コントロール培地中のまたは２５μＭのジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＝０．０４。図９Ｂは、０～６．６μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置後の、コロニー形成アッセイによって評価された、ＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１細胞の生存率を示している濃度反応曲線である。図９Ｃは、コントロール緩衝液または１０μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置され、コロニー形成アッセイによって評価された、ＢＲＣＡ２＋およびＢＲＣＡ２－ＤＬＤ１細胞の同質遺伝子対の各々の生存率を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０１。図９Ｄは、コントロール緩衝液または３．３μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置され、コロニー形成アッセイによって評価された、Ｈ１９７５（ＢＲＣＡ２機能正常）、ＳＷ４８（ＢＲＣＡ２機能正常、ＭＬＨ１欠損）およびＨＣＴ１１６（ＢＲＣＡ２機能正常、ＭＬＨ１欠損）細胞の各々の生存率を示している棒グラフである。

【図９Ｃ】図９Ａは、コントロール培地中のまたは２５μＭのジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＝０．０４。図９Ｂは、０～６．６μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置後の、コロニー形成アッセイによって評価された、ＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１細胞の生存率を示している濃度反応曲線である。図９Ｃは、コントロール緩衝液または１０μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置され、コロニー形成アッセイによって評価された、ＢＲＣＡ２＋およびＢＲＣＡ２－ＤＬＤ１細胞の同質遺伝子対の各々の生存率を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０１。図９Ｄは、コントロール緩衝液または３．３μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置され、コロニー形成アッセイによって評価された、Ｈ１９７５（ＢＲＣＡ２機能正常）、ＳＷ４８（ＢＲＣＡ２機能正常、ＭＬＨ１欠損）およびＨＣＴ１１６（ＢＲＣＡ２機能正常、ＭＬＨ１欠損）細胞の各々の生存率を示している棒グラフである。

【図９Ｄ】図９Ａは、コントロール培地中のまたは２５μＭのジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置の２４時間後のＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１細胞の平均γＨ２ＡＸフォーカス／細胞を示している棒グラフである。＊ｐ＝０．０４。図９Ｂは、０～６．６μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による処置後の、コロニー形成アッセイによって評価された、ＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１細胞の生存率を示している濃度反応曲線である。図９Ｃは、コントロール緩衝液または１０μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置され、コロニー形成アッセイによって評価された、ＢＲＣＡ２＋およびＢＲＣＡ２－ＤＬＤ１細胞の同質遺伝子対の各々の生存率を示している棒グラフである。＊ｐ＜０．０１。図９Ｄは、コントロール緩衝液または３．３μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置され、コロニー形成アッセイによって評価された、Ｈ１９７

５（ＢＲＣＡ２機能正常）、ＳＷ４８（ＢＲＣＡ２機能正常、ＭＬＨ１欠損）およびＨＣＴ１１６（ＢＲＣＡ２機能正常、ＭＬＨ１欠損）細胞の各々の生存率を示している棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【００３６】

発明の詳細な説明

Ｉ．定義

本明細書中で使用されるとき、用語「３Ｅ１０」とは、ＡＴＣＣアクセッション番号ＰＴＡ２４３９ハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体のことを指す。

【００３７】

本明細書中で使用されるとき、用語「ｓｃＦｖ」は、本明細書中で使用されるとき、リンカーによって繋がった軽鎖可変領域（V_L）および重鎖可変領域（V_H）を含む一本鎖可変フラグメントを意味する。そのV_LおよびV_H領域は、親抗体に由来し得るか、または化学的にもしくは組換え的に合成され得る。

【００３８】

本明細書中で使用されるとき、用語「可変領域」は、そのような免疫グロブリンのドメインを、抗体が広く共有するドメイン（例えば、抗体のＦｃドメイン）と区別することを目的としている。可変領域は、その残基が抗原結合に関与する「超可変領域」を含む。超可変領域は、「相補性決定領域」もしくは「ＣＤＲ」のアミノ酸残基（すなわち、通常、軽鎖可変ドメインのおよそ残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）および８９～９７（Ｌ３）ならびに重鎖可変ドメインのおよそ残基２７～３５（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）および９５～１０２（Ｈ３）；Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１））および／または「超可変ループ」の残基（すなわち、軽鎖可変ドメインにおける残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）および９１～９６（Ｌ３）ならびに重鎖可変ドメインにおける２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）および９６～１０１（Ｈ３）；Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，１９８７，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７）を含む。

【００３９】

本明細書中で使用されるとき、用語「フレームワーク領域」または「ＦＲ」残基は、本明細書中で定義されるような超可変領域の残基以外の可変ドメイン残基である。

【００４０】

本明細書中で使用されるとき、用語「抗体」とは、標的抗原に結合する天然または合成の抗体のことを指す。この用語には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。インタクトな免疫グロブリン分子に加えて、それらの免疫グロブリン分子のフラグメントまたはポリマー、および標的抗原に結合する免疫グロブリン分子のヒトバージョンまたはヒト化バージョンもまた、用語「抗体」に含まれる。

【００４１】

本明細書中で使用されるとき、用語「細胞透過性抗ＤＮＡ抗体」とは、生存している哺乳動物細胞の核に運搬されてＤＮＡ（例えば、一本鎖および／または二本鎖ＤＮＡ）に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメントもしくは抗原結合分子のことを指す。好ましい実施形態において、その抗体は、キャリアまたは結合体の助けなしに、細胞の核に運搬される。他の実施形態において、その抗体は、細胞透過性部分（例えば、細胞透過性ペプチド）に結合体化される。

【００４２】

本明細書中で使用されるとき、用語「特異的に結合する」とは、他の抗原に有意に結合せずに、抗体とその同族抗原（例えば、ＤＮＡ）とが結合することを指す。好ましくは、抗体は、その第２の分子を用いて、約$10^5 mol^{-1}$を超える（例えば、$10^6 mol^{-1}$、$10^7 mol^{-1}$、$10^8 mol^{-1}$、$10^9 mol^{-1}$、$10^{10} mol^{-1}$、

$10^{11}mol^{-1}$および$10^{12}mol^{-1}$またはそれを超える）親和性定数（Ｋａ）で抗原に「特異的に結合する」。

【００４３】

本明細書中で使用されるとき、用語「モノクローナル抗体」または「ＭＡｂ」とは、実質的に均一な抗体集団から得られた抗体のことを指し、すなわち、その集団内の個々の抗体は、抗体分子の小サブセットに存在し得る天然に存在する可能性のある変異を除いては同一である。

【００４４】

本明細書中で使用されるとき、用語「ＤＮＡ修復」とは、細胞がＤＮＡ分子に対する損傷を特定してそれを訂正する一連のプロセスのことを指す。一本鎖の欠陥は、塩基除去修復（ＢＥＲ）、ヌクレオチド除去修復（ＮＥＲ）またはミスマッチ修復（ＭＭＲ）によって修復される。二本鎖切断は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）、マイクロホモロジー媒介末端結合（ＭＭＥＪ）または相同組換えによって修復される。ＤＮＡ損傷の後、細胞周期チェックポイントが活性化され、それによって細胞周期が停止することにより、その細胞に損傷を修復する時間が与えられた後、分裂が続けられる。チェックポイントメディエータータンパク質としては、ＢＲＣＡ１、ＭＤＣ１、５３ＢＰ１、ｐ５３、ＡＴＭ、ＡＴＲ、ＣＨＫ１、ＣＨＫ２およびｐ２１が挙げられる。

【００４５】

本明細書中で使用されるとき、用語「損なわれたＤＮＡ修復」とは、変異した細胞または遺伝子発現が変化した細胞が、ＤＮＡ修復をできない状態、または１つもしくはそれを超えるＤＮＡ修復経路の低減された活性もしくは効率を有する状態、またはそのＤＮＡに対する損傷を修復する時間が野生型細胞と比べてさらにかかる状態のことを指す。

【００４６】

本明細書中で使用されるとき、用語「化学的感受性」とは、抗癌薬の効果に対する癌細胞の相対的な感受性のことを指す。癌細胞は、化学的感受性であるほど、その細胞を殺滅するために必要な抗癌薬の量は少なくなる。

【００４７】

本明細書中で使用されるとき、用語「放射線感受性」とは、電離放射線の悪影響に対する細胞の相対的な感受性のことを指す。細胞は、放射線感受性であるほど、その細胞を殺滅するために必要な放射線は少なくなる。一般に、細胞の放射線感受性は、細胞分裂の速度に正比例し、ＤＮＡ修復に対する細胞の能力に反比例すると見出されている。

【００４８】

本明細書中で使用されるとき、用語「放射線抵抗性」とは、臨床的に好適な線量の放射線に曝露されたとき、死滅しない細胞のことを指す。

【００４９】

本明細書中で使用されるとき、用語「新生物細胞」とは、異常な細胞増殖（「新形成」）を起こしている細胞のことを指す。新生物細胞の成長は、その周辺の正常組織の成長を上回っており、その周辺の正常組織の成長と協調しない。その成長は、通常、それらの刺激が無くなった後であっても同じ過剰な様式で持続し、通常、腫瘍を形成させる。

【００５０】

本明細書中で使用されるとき、用語「腫瘍」または「新生物」とは、新生物細胞を含む異常な組織の塊のことを指す。新生物および腫瘍は、良性、前悪性または悪性であり得る。

【００５１】

本明細書中で使用されるとき、用語「癌」または「悪性新生物」とは、無制御の成長および分裂、隣接する組織の浸潤を示し、身体の他の場所に転移することが多い、細胞のことを指す。

【００５２】

本明細書中で使用されるとき、用語「抗新生物」とは、癌の成長、浸潤および／または転移を阻害し得るかまたは予防し得る組成物（例えば、薬物または生物製剤）のことを指

す。

【００５３】

本明細書中で使用されるとき、用語「抗癌部分」とは、開示される抗ＤＮＡ抗体の抗癌特性を高めるために、その抗体と併用され得る任意の作用物質（例えば、ペプチド、タンパク質、核酸または小分子）のことを指す。この用語には、抗新生物薬、癌細胞における他の治療標的に結合して阻害する抗体、および癌細胞に向かう標的化のために癌細胞に対して親和性を有する物質が含まれる。

【００５４】

本明細書中で使用されるとき、用語「ウイルスによって形質転換した細胞」とは、ウイルスに感染した細胞またはウイルスのＤＮＡもしくはＲＮＡをゲノムに組み込んだ細胞のことを指す。そのウイルスは、急性的に形質転換するまたはゆっくり形質転換する腫瘍ウイルスであり得る。急性的に形質転換するウイルスにおいて、ウイルス粒子は、ウイルス癌遺伝子（ｖ－ｏｎｃ）と呼ばれる過活性の癌遺伝子をコードする遺伝子を有し、感染した細胞は、ｖ－ｏｎｃが発現されるや否や形質転換する。対照的に、ゆっくり形質転換するウイルスでは、そのウイルスゲノムは、宿主ゲノムの癌原遺伝子の近くに挿入される。例示的な腫瘍ウイルスとしては、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、Ｂ型肝炎（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎（ＨＣＶ）、ヒトＴリンパ向性ウイルス（ＨＴＬＶ）、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（ＨＨＶ－８）、メルケル細胞ポリオーマウイルス、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）およびヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）が挙げられる。

【００５５】

本明細書中で使用されるとき、「ウイルスに感染した細胞」とは、ウイルスに曝露されたもしくは感染した細胞、またはウイルスの遺伝物質、ＲＮＡもしくはＤＮＡを有する細胞のことを指す。そのウイルスは、腫瘍ウイルスまたは溶解性ウイルスまたは潜伏性ウイルスであり得、癌、免疫不全、肝炎、脳炎、肺臓炎、呼吸器疾患または他の疾患状態を引き起こし得る。レトロウイルス（ｒｅｔｏｒｖｉｒｕｓ）、特にＨＩＶは、宿主ＤＮＡへの組み込みのために塩基除去修復（ＢＥＲ）経路に部分的に依存することが以前に示された。３Ｅ１０がＤＮＡ修復を阻害できることによって、３Ｅ１０および他の抗ＤＮＡ抗体が、特に、ＤＮＡ修復を干渉し、それによってウイルスの生活環の一部ならびに細胞のウイルス感染の一部であるＤＮＡまたはＲＮＡの代謝を阻止することによって、ウイルスによって引き起こされた疾患を回復させ得る機構が提供される。

【００５６】

本明細書中で使用されるとき、用語「個体」、「宿主」、「被験体」および「患者」は、投与または処置の標的である任意の個体のことを指すために交換可能に使用される。その被験体は、脊椎動物、例えば、哺乳動物であり得る。したがって、その被験体は、ヒト患者または動物患者であり得る。

【００５７】

本明細書中で使用されるとき、用語「治療的に有効な」は、使用される組成物の量が、疾患または障害の１つまたはそれを超える原因または症状を回復させるのに十分な量であることを意味する。そのような回復は、減少または変化だけを必要とし、必ずしも排除を必要としない。癌を処置するための組成物の治療有効量は、好ましくは、腫瘍退縮を引き起こすかまたは腫瘍を放射線もしくは化学療法に感作させるのに十分な量である。

【００５８】

本明細書中で使用されるとき、用語「薬学的に許容され得る」とは、生物学的にもその他の点でも望ましくないことはない材料のことを指し、すなわち、その材料は、いかなる望ましくない生物学的作用も引き起こさずに、またはそれが含められる薬学的組成物の他のいずれの構成要素とも有害な様式で相互作用せずに、被験体に投与され得る。キャリアは、当業者に周知であり得るように、当然、活性成分のいかなる分解も最小限にするように、および被験体におけるいかなる有害な副作用も最小限にするように、選択されるだろう。

【００５９】
本明細書中で使用されるとき、用語「処置」とは、疾患、病理学的な状態または障害を治癒するか、回復させるか、安定化するかまたは予防する目的での患者の医学的管理のことを指す。この用語には、積極的治療、つまり、特に疾患、病理学的な状態または障害の改善を対象とした処置が含まれ、原因治療、つまり、関連する疾患、病理学的な状態または障害の原因の除去を対象とした処置も含まれる。さらに、この用語には、姑息的治療、つまり、疾患、病理学的な状態または障害の治癒ではなく症状の軽減のためにデザインされた処置；予防的処置、つまり、関連する疾患、病理学的な状態または障害の発症を最小限にすることまたは部分的にもしくは完全に阻害することに関する処置；および支持的処置、つまり、関連する疾患、病理学的な状態または障害の改善を対象とした別の特定の治療を補うために用いられる処置も含まれる。

【００６０】
本明細書中で使用されるとき、用語「阻害する」は、活性、応答、状態、疾患または他の生物学的パラメータを減少させることを意味する。これには、活性、応答、状態または疾患の完全な消失が含まれ得るがこれらに限定されない。これには、例えば、天然またはコントロールのレベルと比べたときの、活性、応答、状態または疾患の１０％の減少も含まれ得る。したがって、その減少は、天然またはコントロールのレベルと比べたときの、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００％またはその中間の任意の減少量であり得る。

【００６１】
本明細書中で使用されるとき、用語「融合タンパク質」とは、１つのポリペプチドのアミノ末端と別のポリペプチドのカルボキシル末端との間に形成されるペプチド結合を介して、またはアミノ酸側鎖の間の反応による１つのポリペプチドと別のポリペプチドとの連結（例えば、各ポリペプチド上のシステイン残基間のジスルフィド結合）を介して、２つまたはそれを超えるポリペプチドを繋ぐことによって形成されたポリペプチドのことを指す。融合タンパク質は、構成成分であるポリペプチドの化学的カップリングによって形成され得るか、または単一の連続した融合タンパク質をコードする核酸配列から単一のポリペプチドとして発現され得る。融合タンパク質は、２つの遺伝子をインフレームで繋いで単一の核酸配列にして、次いで、融合タンパク質が産生される条件下においてその核酸を適切な宿主細胞において発現させる、分子生物学における従来の手法を用いて調製され得る。

【００６２】
本明細書中で使用されるとき、用語「バリアント」とは、参照ポリペプチドまたは参照ポリヌクレオチドと異なるが本質的な特徴を保持している、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドのことを指す。ポリペプチドの代表的なバリアントは、別の参照ポリペプチドとアミノ酸配列が異なる。一般に、差は限られており、参照ポリペプチドの配列とバリアントの配列とは、全体的によく似ており、多くの領域において同一である。バリアントと参照ポリペプチドとは、１つまたはそれを超える改変（例えば、置換、付加および／または欠失）によって、アミノ酸配列が異なり得る。置換されたまたは挿入されたアミノ酸残基は、遺伝暗号によってコードされるものであってもよいし、そうでなくてもよい。ポリペプチドのバリアントは、対立遺伝子バリアントなどの天然に存在するものであってよいか、または天然に存在すると知られてないバリアントであってよい。

【００６３】
改変および変更は、本開示のポリペプチドの構造において行うことができ、そのポリペプチドと同様の特性を有する分子をなおももたらす（例えば、保存的アミノ酸置換）。例えば、ある特定のアミノ酸は、かなりの活性喪失を伴わずに、ある配列において、他のアミノ酸の代わりに用いることができる。ポリペプチドの相互作用能および性質こそが、そのポリペプチドの生物学的機能活性を定義するので、ある特定のアミノ酸配列の置換を、あるポリペプチド配列において行うことができるが、それにもかかわらず、同様の特徴を有するポリペプチドがもたらされる。

【００６４】
そのような変更を行う際、アミノ酸の疎水性親水性指標（ｈｙｄｒｏｐａｔｈｉｃ ｉｎｄｅｘ）が考慮され得る。相互作用的生物学的機能をポリペプチドに付与する際のアミノ酸の疎水性親水性指標の重要性は、当該分野において広く理解されている。ある特定のアミノ酸は、類似の疎水性親水性指標または疎水性親水性スコアを有する他のアミノ酸の代わりに用いることができ、なおも類似の生物学的活性を有するポリペプチドがもたらされることが知られている。各アミノ酸には、その疎水性および電荷の特性に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられている。それらの指標は、イソロイシン（＋４．５）；バリン（＋４．２）；ロイシン（＋３．８）；フェニルアラニン（＋２．８）；システイン／シスチン（＋２．５）；メチオニン（＋１．９）；アラニン（＋１．８）；グリシン（－０．４）；トレオニン（－０．７）；セリン（－０．８）；トリプトファン（－０．９）；チロシン（－１．３）；プロリン（－１．６）；ヒスチジン（－３．２）；グルタミン酸（－３．５）；グルタミン（－３．５）；アスパラギン酸（－３．５）；アスパラギン（－３．５）；リジン（－３．９）；およびアルギニン（－４．５）である。

【００６５】
アミノ酸の相対的な疎水性親水性の性質は、生じるポリペプチドの二次構造を決定し、そしてそれがそのポリペプチドと他の分子（例えば、酵素、基質、レセプター、抗体、抗原および補因子）との相互作用を定義すると考えられている。あるアミノ酸は、類似の疎水性親水性指標を有する別のアミノ酸によって置換され、なおも機能的に等価なポリペプチドをもたらし得ることが当該分野で公知である。そのような変更において、疎水性親水性指標が±２以内のアミノ酸の置換が好ましく、±１以内のアミノ酸の置換が特に好ましく、±０．５以内のアミノ酸の置換がなおもより特に好ましい。

【００６６】
類似のアミノ酸の置換は、特に、それによって作製された生物学的に機能的に等価なポリペプチドまたはペプチドを免疫学的実施形態において使用することが意図される場合、親水性に基づいても行うことができる。以下の親水性値が、アミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（＋３．０）；リジン（＋３．０）；アスパラギン酸（＋３．０±１）；グルタミン酸（＋３．０±１）；セリン（＋０．３）；アスパラギン（＋０．２）；グルタミン（ｇｌｕｔａｍｎｉｎｅ）（＋０．２）；グリシン（０）；プロリン（－０．５±１）；トレオニン（－０．４）；アラニン（－０．５）；ヒスチジン（－０．５）；システイン（－１．０）；メチオニン（－１．３）；バリン（－１．５）；ロイシン（－１．８）；イソロイシン（－１．８）；チロシン（－２．３）；フェニルアラニン（－２．５）；トリプトファン（－３．４）。あるアミノ酸は、類似の親水性値を有する別のアミノ酸の代わりに用いることができ、なおも生物学的に等価なポリペプチド、特に、免疫学的に等価なポリペプチドをもたらし得ると理解される。そのような変更において、親水性値が±２以内のアミノ酸の置換が好ましく、±１以内のアミノ酸の置換が特に好ましく、±０．５以内のアミノ酸の置換がなおもより特に好ましい。

【００６７】
上で概要を述べたように、アミノ酸の置換は、一般に、アミノ酸側鎖の置換基、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、およびサイズなどの相対的な類似性に基づく。前述の様々な特性を考慮した例示的な置換は、当業者に周知であり、それらとしては、以下が挙げられる（元の残基：例示的な置換）：（Ａｌａ：Ｇｌｙ、Ｓｅｒ）、（Ａｒｇ：Ｌｙｓ）、（Ａｓｎ：Ｇｌｎ、Ｈｉｓ）、（Ａｓｐ：Ｇｌｕ、Ｃｙｓ、Ｓｅｒ）、（Ｇｌｎ：Ａｓｎ）、（Ｇｌｕ：Ａｓｐ）、（Ｇｌｙ：Ａｌａ）、（Ｈｉｓ：Ａｓｎ、Ｇｌｎ）、（Ｉｌｅ：Ｌｅｕ、Ｖａｌ）、（Ｌｅｕ：Ｉｌｅ、Ｖａｌ）、（Ｌｙｓ：Ａｒｇ）、（Ｍｅｔ：Ｌｅｕ、Ｔｙｒ）、（Ｓｅｒ：Ｔｈｒ）、（Ｔｈｒ：Ｓｅｒ）、（Ｔｉｐ：Ｔｙｒ）、（Ｔｙｒ：Ｔｒｐ、Ｐｈｅ）および（Ｖａｌ：Ｉｌｅ、Ｌｅｕ）。したがって、本開示の実施形態は、上に示されたようなポリペプチドの機能的等価物または生物学的等価物を企図する。特に、ポリペプチドの実施形態は、目的のポリペプチドに対して約５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれを超

える配列同一性を有するバリアントを含み得る。

【００６８】

本明細書中で使用されるとき、用語「パーセント（％）配列同一性」は、参照核酸配列と候補配列とをアラインメントし、最大パーセント配列同一性を得るために、必要であればギャップを挿入した後の、参照核酸配列におけるヌクレオチドまたはアミノ酸と同一である、候補配列におけるヌクレオチドまたはアミノ酸のパーセンテージと定義される。パーセント配列同一性を決定する目的のアラインメントは、当該分野の技術の範囲内である様々な方法で、例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェア（例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、ＡＬＩＧＮ－２またはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェア）を用いて、達成され得る。アラインメントを測定するための適切なパラメータ（比較されている配列の全長にわたって最大アラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む）は、公知の方法によって決定され得る。

【００６９】

本明細書中の目的で、所与の核酸配列Ｄへの、それとの、またはそれに対する所与のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列Ｃの％配列同一性（あるいは、所与の配列Ｄへの、それとの、またはそれに対するある特定の％配列同一性を有するかまたは含む所与の配列Ｃと言い表され得る）は、以下のとおり算出される：

１００×分数Ｗ／Ｚ

ここで、Ｗは、配列アラインメントプログラムによって、そのプログラムの、ＣとＤとのアラインメントにおいて完全一致とスコア付されたヌクレオチドまたはアミノ酸の数であり、Ｚは、Ｄにおけるヌクレオチドまたはアミノ酸の総数である。配列Ｃの長さが、配列Ｄの長さと等しくない場合、Ｄに対するＣの％配列同一性は、Ｃに対するＤの％配列同一性と等しくないことがあることが理解されるだろう。

【００７０】

ＩＩ．組成物

Ａ．活性な作用物質

抗体３Ｅ１０の２つまたはそれを超える（ｔｗｏ　ｍｏｒｅ）抗原結合抗体フラグメントおよび／または抗原結合融合タンパク質から構成される抗原結合分子またはそのバリアントが提供される。３Ｅ１０は、ＤＮＡ一本鎖テイルに優先的に結合し、ＤＮＡの一本鎖および二本鎖切断修復における重要な工程を阻害する（Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１５７ｒａ１４２（２０１２））。本明細書中に開示される抗原結合分子は、通常、３Ｅ１０のエピトープに結合し、好ましくは、ＤＮＡの一本鎖および二本鎖切断修復における工程を阻害する。

【００７１】

例示的なフラグメントおよび融合物としては、一本鎖抗体、一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）、ジスルフィド連結Ｆｖ（ｓｄＦｖ）、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖおよび単一ドメイン抗体フラグメント（ｓｄＡｂ）が挙げられるがこれらに限定されない。

【００７２】

好ましい実施形態において、上記抗原結合分子には、２つまたはそれを超えるｓｃＦｖが含まれる。各ｓｃＦｖは、３Ｅ１０の重鎖可変領域（Ｖ$_L$）の１つ、２つ、もしくは好ましくは３つすべての相補性決定領域（ＣＤＲ）またはそのバリアントを含み得る。そのｓｃＦｖは、３Ｅ１０の軽鎖可変領域（Ｖ$_L$）の１つ、２つ、もしくは好ましくは３つすべてのＣＤＲまたはそのバリアントを含み得る。上記抗原結合分子は、３Ｅ１０の重鎖可変領域および／もしくは軽鎖可変領域またはそれらのバリアントを含み得る。

【００７３】

一本鎖バリアントフラグメントは、短いペプチドリンカーを用いて重鎖および軽鎖の可変ドメインを共に融合することによって、作製され得、それにより、単一分子上に抗原結合部位が再構成される。一方の可変ドメインのＣ末端が、リンカーを介して他方の可変ドメインのＮ末端に繋ぎ止められている一本鎖抗体可変フラグメント（ｓｃＦｖ）が、抗原結合性または結合の特異性を有意に乱すことなく、開発された。そのリンカーは、重鎖お

よび軽鎖が、適切なコンフォメーション上の配向で互いに結合することを可能にするように選択される。そのリンカーは、通常、可撓性のためにグリシンに富んでおり、代表的には、溶解度のためにセリンまたはトレオニンも含む。そのリンカーは、例えば、V_HのＮ末端をV_LのＣ末端と連結し得るか、またはその逆であり得る。ｓｃＦｖはまた、ハイブリドーマに由来するサブクローニングされた重鎖および軽鎖から直接作製され得る。好ましくは、ｓｃＦｖは、定常領域を除去し、リンカーを挿入しているが、元の免疫グロブリンの特異性を保持するか、または改善するか、または高める。

【００７４】

抗体３Ｅ１０の、３Ｅ１０の軽鎖可変領域（V_L）またはそのバリアントおよび３Ｅ１０の重鎖可変領域（V_H）またはそのバリアントを含む２つまたはそれを超える一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含む例示的な抗原結合分子としては、二価ｓｃＦｖ（ジｓｃＦｖ）、三価ｓｃＦｖ（トリｓｃＦｖ）、多価ｓｃＦｖ（マルチｓｃＦｖ）、ｓｃＦｖのダイアボディ、トリアボディ、テトラボディなどが挙げられるがこれらに限定されない。

【００７５】

二価の一本鎖可変フラグメントは、２つのｓｃＦｖを連結することによって操作され得る。これは、２つのＶＨ領域および２つのＶＬ領域を有する単一のペプチド鎖を産生して、タンデム型ジｓｃＦｖと称されるジｓｃＦｖを得ることによって、行うことができる。ＳｃＦｖは、それらの２つの可変領域が一緒に折り畳まれるには短すぎてｓｃＦｖが二量体化せざるを得ないリンカーペプチド（約５アミノ酸）を有するようにもデザインされ、ダイアボディと称される二価の一本鎖可変フラグメントを形成し得る。ダイアボディは、対応するｓｃＦｖよりも最大４０倍低い解離定数を有すると示されており、これは、それらのダイアボディがそれらの標的に対してかなり高い親和性を有することを示す。さらにより短いリンカー（１または２アミノ酸）は、三量体（トリアボディまたはトリボディ）の形成をもたらす。テトラボディも産生され、それらの標的に対して、ダイアボディよりもさらに高い親和性を示すことが示された。

【００７６】

開示される抗原結合分子には、３Ｅ１０の抗原結合抗体フラグメントおよび融合タンパク質ならびに通常モノクローナル抗体３Ｅ１０と同じエピトープに結合するそれらのバリアントが含まれる。最も好ましい実施形態において、その抗原結合分子は、二価、三価または多価のｓｃＦｖである。抗原結合抗体フラグメントまたは抗原結合分子の融合タンパク質はさらなる抗体ドメイン（例えば、定常ドメイン、ヒンジドメインなど）を含み得るが、好ましくは含まない。３Ｅ１０は、ＤＮＡに結合してＤＮＡ修復を阻害し、これが、ＤＮＡ修復欠損細胞にとって合成致死である。この機能は、いずれの３Ｅ１０定常領域とも無関係である。対照的に、細胞外レセプターを標的化するセツキシマブなどの非透過性抗体は、腫瘍に対して影響を及ぼすために、ＡＤＣＣおよび補体のＦｃ媒介性活性化に部分的に依存する。ゆえに、非透過性抗体からＦｃを排除すると、腫瘍に対するそれらの効果の規模は小さくなり得るが、３Ｅ１０が癌細胞に対して影響を及ぼすためにＦｃは必要ない。ゆえに、Ｆｃ領域を欠く３Ｅ１０フラグメントまたは融合物は、ＡＤＣＣおよび補体を活性化できないはずであり、ゆえに、非特異的副作用のリスクがより低い。

【００７７】

Ｂ．一本鎖可変フラグメント

本明細書中に開示される一本鎖可変フラグメントは、通常、３Ｅ１０の抗原結合フラグメントまたはそのバリアントを含む。モノクローナル抗体３Ｅ１０、ならびに細胞傷害作用なしにインビボにおいて哺乳動物細胞の核に運搬されるその活性なフラグメントおよび例示的なバリアントは、米国特許第４，８１２，３９７号および同第７，１８９，３９６号ならびに米国出願公開番号２０１４／００５０７２３において論じられている。

【００７８】

可変ドメインは、抗体の間で配列が異なり、特定の抗原に対する特定の各抗体の結合および特異性において用いられる。しかしながら、可変性は、通常、抗体の可変ドメインに

均等に分布していない。可変性は、通常、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの両方における相補性決定領域（ＣＤＲ）または超可変領域と呼ばれる３つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク（ＦＲ）と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々、大部分がベータシート配置をとる４つのＦＲ領域を含み、それらのＦＲ領域は、３つのＣＤＲによって接続されており、それらのＣＤＲは、そのベータシート構造を接続している、場合によってはそのベータシート構造の一部を形成している、ループを形成している。各鎖におけるＣＤＲは、ＦＲ領域によって近接して共に保持され、他の鎖のＣＤＲとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。

【００７９】

本明細書中に開示される抗体のフラグメントおよび融合物は、生物活性を有する。それらのフラグメントおよび融合物は、そのフラグメントまたは融合物の活性が、未改変の抗体または抗体フラグメントと比べて有意に減少しないかまたは損なわれないという条件であれば、他の配列に付着されているかまたは付着されていないかを問わず、特定の領域または特異的なアミノ酸残基の挿入、欠失、置換または他の選択された改変を含むことができる。

【００８０】

１．重鎖可変領域

例えば、３Ｅ１０の重鎖可変領域についてのアミノ酸配列は、

【化１】

EVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFS***D***YGMHWVRQAPEKGLE

WVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAM

YYCARRGLLLDYWGQGTTLTVSS

（配列番号１；Ｚａｃｋら、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，７２：５１３－５２０（１９９４）；ＧｅｎＢａｎｋ：Ｌ１６９８１．１－マウスＩｇ再配列Ｌ鎖遺伝子，部分的ｃｄｓ；およびＧｅｎＢａｎｋ：ＡＡＡ６５６７９．１－免疫グロブリン重鎖，部分的［Ｍｕｓ ｍｕｓｃｕｌｕｓ］）である。相補性決定領域（ＣＤＲ）には下線をつけて示している。

【００８１】

３Ｅ１０の重鎖可変領域の好ましいバリアントについてのアミノ酸配列は、

【化２】

EVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFS***N***YGMHWVRQAPEKGLE

WVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAM

YYCARRGLLLDYWGQGTTLTVSS (配列番号　:2)

である。相補性決定領域（ＣＤＲ）には下線をつけて示している。

【００８２】

３Ｅ１０の重鎖可変領域の３１位のアミノ酸は、その抗体およびそのフラグメントが核に浸透してＤＮＡに結合する能力に影響すると決定された。例えば、ＣＤＲ１におけるＤ３１Ｎ変異（配列番号１および２における太字の斜体）は、元の抗体よりもかなり高い効率で、核に浸透してＤＮＡに結合する（Ｚａｃｋら、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，７２：５１３－５２０（１９９４），Ｗｅｉｓｂａｒｔら、Ｊ．Ａｕｔｏｉｍｍｕｎ．，１１，５３９－５４６（１９９８）；Ｗｅｉｓｂａｒｔ，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，２５，１８６７－１８７３（２００４））。

【００８３】

２．軽鎖可変領域

３Ｅ１０の軽鎖可変領域についてのアミノ酸配列は、

【化３】

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQP

PKLLIKYASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHS

REFPWTFGGGTKLEIKRADAAP (配列番号　:3)

である。相補性決定領域（ＣＤＲ）には下線をつけて示している。他の３Ｅ１０軽鎖配列は、当該分野で公知である。例えば、Ｚａｃｋら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５；１５４（４）：１９８７－９４（１９９５）；ＧｅｎＢａｎｋ：Ｌ１６９８１．１－マウスＩｇ再配列Ｌ鎖遺伝子，部分的ｃｄｓ；ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＡＡ６５６８１．１－免疫グロブリン軽鎖，部分的［Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ］）を参照のこと。

【００８４】

３．リンカー

用語「リンカー」は、本明細書中で使用されるとき、ペプチドリンカーを含むがこれに限定されない。ペプチドリンカーは、可変領域によるエピトープの結合を干渉しないという条件であれば、任意のサイズであり得る。いくつかの実施形態において、リンカーは、１つまたはそれを超えるグリシンおよび／またはセリンアミノ酸残基を含む。通常、１つの可変ドメインのＣ末端が、１５～２５アミノ酸のペプチドまたはリンカーを介して、他の可変ドメインのＮ末端に繋がっている、一価の一本鎖抗体可変フラグメント（ｓｃＦｖ）。リンカーは、重鎖および軽鎖が適切なコンフォメーション上の配向で共に結合できるように選択される。ダイアボディ、トリアボディなどにおけるリンカーは、通常、上で論じられたような一価ｓｃＦｖのリンカーよりも短いリンカーを含む。二価、三価および他の多価のｓｃＦｖは、通常、３つまたはそれを超えるリンカーを含む。それらのリンカーは、長さおよび／またはアミノ酸組成が同じであり得るかまたは異なり得る。ゆえに、リンカーの数、リンカーの組成およびリンカーの長さは、当該分野で公知であるように、ｓｃＦｖの所望の結合価に基づいて決定され得る。好ましくは、リンカーは、二価、三価および他の多価のｓｃＦｖの形成を可能にするかまたは駆動する。

【００８５】

例えば、リンカーは、４～８アミノ酸を含み得る。特定の実施形態において、リンカーは、アミノ酸配列ＧＱＳＳＲＳＳ（配列番号４）を含む。別の実施形態において、リンカーは、１５～２０アミノ酸、好ましくは、１８アミノ酸を含む。特定の実施形態において、リンカーは、アミノ酸配列ＧＱＳＳＲＳＳＳＧＧＧＳＳＧＧＧＧＳ（配列番号５）を含む。他の可撓性リンカーとしては、アミノ酸配列Ｇｌｙ－Ｓｅｒ、Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号６）、Ａｌａ－Ｓｅｒ、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号７）、$(Gly_4-Ser)_2$（配列番号８）および$(Gly_4-Ser)_4$（配列番号９）および$(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_3$（配列番号２８）が挙げられるがこれらに限定されない。

【００８６】

４．バリアント

上記ｓｃＦｖは、３Ｅ１０の可変重鎖および／または軽鎖のアミノ酸配列（例えば、それぞれ配列番号１もしくは２；および／または３）と少なくとも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％または少なくとも９９％同一であって、３Ｅ１０のエピトープに結合する、可変重鎖および／または可変軽鎖のアミノ酸配列を含む抗体フラグメントまたは融合タンパク質から構成され得、ＤＮＡ修復が欠損した細胞に選択的に致死であるか、またはＤＮＡ修復が欠損した細胞の放射線感受性および／もしくは化学的感受性を選択的に高めるか、またはそれらの組み合わせである。上記ｓｃＦｖは、３Ｅ１０の可変重鎖および／または軽鎖のＣＤＲのアミノ酸配列（例えば、配列番号１もしくは２；および／または３）と少なくとも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％または少なくとも９９％同一であって、３Ｅ１０のエピトープに結合する、ＣＤＲを含む抗体フラグメントまたは融合タンパク質から構成され得、ＤＮＡ修復が欠損した細胞に選択的に致死であるか、またはＤＮＡ修復が欠損した細胞の放射線感受性および／もしくは化学的感受性を選択的に高めるか、またはそれらの組み合わせである。２つのアミノ酸配列の同一性パーセントの決定は、ＢＬＡＳＴタンパク質比較によって決定され得る。好ましい実施形態において、ｓｃＦｖは、上に記載された好ましい可変ドメインの１、２、３、４、５個またはより好ましくは６個すべてのＣＤＲを含み、３Ｅ１０のエピトープに結合し、ＤＮＡ修復が欠損した細胞に選択的に致死であるか、またはＤＮＡ修復が欠損した細胞の放射線感受性および／もしくは化学的感受性を選択的に高めるか、またはそれらの組み合わせである。

【００８７】

３Ｅ１０に対する重鎖可変配列の予測される相補性決定領域（ＣＤＲ）は、当該分野で公知である。例えば、Ｚａｃｋら、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，７２：５１３－５２０（１９９４）およびＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＡＡ６５６７９．１を参照のこと。３Ｅ１０に対する軽鎖可変配列の予測される相補性決定領域（ＣＤＲ）は、当該分野で公知である。例えば、ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＡＡ６５６８１．１－免疫グロブリン軽鎖，部分的［Ｍｕｓ ｍｕｓｃｕｌｕｓ］を参照のこと。

【００８８】

いくつかの実施形態において、抗体フラグメントまたは融合タンパク質は、その半減期を変化させるために改変される。いくつかの実施形態において、その抗体フラグメントまたは融合タンパク質が、循環中または処置部位に、より長い期間存在するように、それらの半減期を延長することが望ましい。例えば、抗体フラグメントまたは融合タンパク質が、癌、例えば、損なわれたＤＮＡ修復を有する癌細胞を処置するために単独で使用されている場合、その抗体フラグメントまたは融合タンパク質の力価を、循環中または処置されるべき場所において延長された期間にわたって維持することが望ましい場合がある。他の実施形態において、抗体フラグメントまたは融合タンパク質の半減期は、潜在的な副作用を減少させるために短縮される。例えば、抗体フラグメントまたは融合タンパク質が、放射線療法または化学療法とともに使用されている場合、その抗体フラグメントまたは融合タンパク質は、好ましくは、放射線または抗新生物薬による処置の間、高用量で循環中に存在するが、その他の場合では循環から速やかに除去される。３Ｅ１０ｓｃＦｖなどの抗体フラグメントは、フルサイズの抗体よりも短い半減期を有すると予想される。半減期を変化させる他の方法は、公知であり、記載された方法において使用され得る。例えば、抗体フラグメントおよび融合タンパク質は、半減期を延長するＦｃバリアントを用いて、例えば、Ｘｔｅｎｄ^{TM}抗体半減期延長技術（Ｘｅｎｃｏｒ，Ｍｏｎｒｏｖｉａ，ＣＡ）を用いて、操作され得る。

【００８９】

５．さらなるドメインおよび部分

本明細書中に開示される抗体、抗原結合フラグメントおよび融合タンパク質は、１つまたはそれを超えるさらなるドメイン、標的化部分および／またはタグなどを必要に応じて含み得る。

【００９０】

ａ．タンパク質形質導入ドメイン

いくつかの実施形態において、上記抗原結合分子は、原形質膜を横切って細胞内部にポリペプチドを送達することを増加させるための１つまたはそれを超えるドメインを含む。例えば、抗体フラグメントおよび融合タンパク質は、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰＳ）としても知られるタンパク質形質導入ドメイン（ＰＴＤ）を含むように改変され得る。ＰＴＤは、当該分野で公知であり、それには、レセプター非依存的機構で細胞膜を横切ることができるタンパク質の小領域が含まれるがこれに限定されない（Ｋａｂｏｕｒｉｄｉｓ，Ｐ．，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１１）：４９８－５０３（２００３））。いくつかのＰＴＤが実証されているが、最もよく使用されている２つのＰＴ

Dは、ＨＩＶのＴＡＴ（Ｆｒａｎｋｅｌ ａｎｄ Ｐａｂｏ，Ｃｅｌｌ，５５（６）：１１８９－９３（１９８８））タンパク質およびＤｒｏｓｏｐｈｉｌａのアンテナペディア転写因子に由来し、アンテナペディア転写因子のＰＴＤは、ペネトラチンとして知られている（Ｄｅｒｏｓｓｉら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６９（１４）：１０４４４－５０（１９９４））。

【００９１】

アンテナペディアのホメオドメインは、６８アミノ酸残基長であり、４つのアルファヘリックスを含む。ペネトラチンは、このタンパク質の活性ドメインであり、アンテナペディアの３つ目のヘリックスに由来する１６アミノ酸配列からなる。ＴＡＴタンパク質は、８６アミノ酸からなり、ＨＩＶ－１の複製に関わっている。ＴＡＴ ＰＴＤは、１１アミノ酸配列ドメイン（取り込みにとって欠かせないとみられる、親タンパク質の残基４７～５７；ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号１０）からなる。さらに、塩基性ドメインＴａｔ（４９－５７）またはＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号１１）は、ＰＴＤであると示された。ＴＡＴは、細胞移入のための目的のタンパク質との融合のために好まれている。グルタミン（Ｇｌｕｔａｔｍｉｎｅ）からアラニンへの、すなわち、Ｑ→Ａの置換をはじめとしたＴＡＴに対するいくつかの改変が、哺乳動物細胞において、細胞取り込みを概して９０％（Ｗｅｎｄｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，９７（２４）：１３００３－８（２０００））から最大３３倍高めると実証された（Ｈｏら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，６１（２）：４７４－７（２００１））。改変されたタンパク質の最も効率的な取り込みは、１１個続いたアルギニンが、細胞間送達ビヒクルとして数桁高い効率であったことを示した、ＴＡＴ－ＰＴＤの変異誘発実験によって明らかにされた。したがって、いくつかの実施形態は、陽イオン性または両親媒性のＰＴＤを含む。さらに例示的なＰＴＤとしては、ポリＡｒｇ－ＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号１２）；ＰＴＤ－５－ＲＱＲＲＴＳＫＬＭＫＲ（配列番号１３）；トランスポータンＧＷＴＬＮＳＡＧＹＬＬＧＫＩＮＬＫＡＬＡＡＬＡＫＫＩＬ（配列番号１４）；ＫＡＬＡ－ＷＥＡＫＬＡＫＡＬＡＫＡＬＡＫＨＬＡＫＡＬＡＫＡＬＫＣＥＡ（配列番号１５）；およびＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ（配列番号１６）が挙げられるがこれらに限定されない。

【００９２】

いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、細胞内部へのタンパク質の送達を改善するエンドソームエスケープ（ｅｎｄｏｓｏｍａｌ ｅｓｃａｐｅ）配列を含む。エンドソームエスケープ配列は、当該分野で公知である。例えば、Ｂａｒｋａら、Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．，４８（１１）：１４５３－６０（２０００）およびＷａｄｉａ ａｎｄ Ｓｔａｎ，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．，１０（３）：３１０－５（２００４）を参照のこと。

【００９３】

ｂ．標的化シグナルまたは標的化ドメイン

いくつかの実施形態において、上記抗体フラグメントまたは融合タンパク質は、１つまたは標的化シグナルまたは標的化ドメインを含むように必要に応じて改変される。標的化シグナルまたは標的化配列は、宿主、組織、器官、細胞、細胞小器官、核などの細胞小器官または細胞内コンパートメントに特異的であり得る。さらに、本明細書中に開示される組成物は、他の特定の細胞間領域、コンパートメントまたは細胞型に標的化され得る。

【００９４】

いくつかの実施形態において、標的化シグナルは、例えば、標的細胞の表面に位置するリガンドまたはレセプターに結合して、融合タンパク質および細胞膜を互いに十分に近くして、融合タンパク質が細胞内に浸透するようにする。さらなる実施形態は、融合タンパク質を特定の組織または細胞型に特異的に送達することに関する。

【００９５】

好ましい実施形態において、標的化分子は、規定された細胞に特異的に結合するファージディスプレイによって選択される、抗体またはその抗原結合フラグメント、抗体ドメイン、抗原、細胞表面レセプター、細胞表面接着分子、ウイルスエンベロープタンパク質お

よびペプチドからなる群より選択される。

【００９６】

特定の細胞に対する標的化ドメインは、特異的な細胞標的化シグナルおよび組織標的化シグナルを含むように、開示される抗体フラグメントまたは融合タンパク質を改変することによって達成され得る。これらの配列は、特定の細胞および組織を標的化するが、いくつかの実施形態では、その細胞と標的化シグナルとの相互作用は、従来のレセプター：リガンド相互作用を介して生じない。真核細胞は、いくつかの異なる細胞表面分子を含む。各分子の構造および機能は、その細胞の起源、発現、形質および構造に特異的であり得る。特定の細胞型の分子のユニークな細胞表面補体（ｃｅｌｌ　ｓｕｒｆａｃｅ　ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ）の決定は、当該分野で周知の手法を用いて決定され得る。当業者は、抗体フラグメントまたは融合タンパク質の向性が、標的化シグナルを変更することによって変化し得ることを認識するだろう。

【００９７】

哺乳動物生物の組織におけるほぼすべての細胞型が、いくらかのユニークな細胞表面レセプターまたは抗原を有することは、当該分野で公知である。したがって、その細胞表面レセプターまたは抗原に対するほぼあらゆるリガンドを標的化シグナルとして組み込むことが可能である。例えば、ペプチジルホルモンが、そのようなホルモンに対するレセプターを有する細胞に送達を標的化するための標的化部分として使用され得る。ケモカインおよびサイトカインも同様に、それらの標的細胞への複合体の送達を標的化するための標的化シグナルとして使用され得る。ある特定の細胞または細胞状態において優先的に発現される遺伝子を同定するために、種々の技術が開発され、当業者は、そのような技術を用いて、目的の標的組織上で優先的にまたはユニークに発現される標的化シグナルを同定することができる。

【００９８】

いくつかの実施形態において、標的化シグナルは、腫瘍細胞を選択的に標的化するために使用される。腫瘍細胞は、腫瘍のみに発現され得るかまたは非腫瘍細胞に存在し得るが腫瘍細胞において優先的に提示され得る、細胞表面マーカーを発現する。例示的な腫瘍特異的細胞表面マーカーとしては、アルファ－フェトプロテイン（ＡＦＰ）、Ｃ反応性タンパク質（ＣＲＰ）、癌抗原－５０（ＣＡ－５０）、卵巣癌に関連する癌抗原－１２５（ＣＡ－１２５）、乳癌に関連する癌抗原１５－３（ＣＡ１５－３）、消化器癌に関連する、癌抗原－１９（ＣＡ－１９）および癌抗原－２４２、癌胎児抗原（ＣＥＡ）、癌腫関連抗原（ＣＡＡ）、上皮成長因子レセプター（ＥＧＦＲ）、ＨＥＲ－２、クロモグラニンＡ、上皮性ムチン抗原（ＭＣ５）、ヒト上皮特異的抗原（ＨＥＡ）、Ｌｅｗｉｓ（ａ）抗原、メラノーマ抗原、メラノーマ関連抗原１００、２５および１５０、ムチン様癌腫関連抗原、多剤耐性関連タンパク質（ＭＲＰｍ６）、多剤耐性関連タンパク質（ＭＲＰ４１）、Ｎｅｕ癌遺伝子タンパク質（Ｃ－ｅｒｂＢ－２）、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）、Ｐ－糖タンパク質（ｍｄｒ１遺伝子産物）、多剤耐性関連抗原、ｐ１７０、多剤耐性関連抗原、前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）、ＣＤ５６、ならびにＮＣＡＭが挙げられるがこれらに限定されない。１つの実施形態において、標的化シグナルは、腫瘍細胞表面マーカーに特異的な抗体からなる。

【００９９】

さらなる実施形態は、融合タンパク質を細胞内コンパートメントまたは細胞小器官に特異的に送達することに関する。真核細胞は、膜結合型の構造または細胞小器官を含む。細胞小器官は、単一膜または多重膜を有し得、植物細胞と動物細胞の両方に存在する。細胞小器官は、その細胞小器官の機能に応じて、タンパク質および補因子などの特異的な構成要素からなり得る。細胞小器官に送達されるポリペプチドは、その細胞小器官の機能を高め得るか、またはその機能に寄与し得る。好ましくは、細胞小器官標的化シグナルは、核への抗体フラグメントまたは融合タンパク質の送達を増大させる。ゆえに、好ましい実施形態において、細胞小器官標的化シグナルは、核局在化シグナル（ＮＬＳ）である。ＮＬＳは、当該分野で公知であり、それには、例えば、ＳＶ４０Ｔ抗原またはそのフラグメン

ト、例えば、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号１７）が含まれる。ＮＬＳは、約４～約８アミノ酸の単純な陽イオン性配列であり得るか、または約１０～１２アミノ酸の変異抵抗性リンカー領域によって分断された相互依存的な２つの正に荷電したクラスターを有する二部構成であり得る。さらなる代表的なＮＬＳとしては、ＧＫＫＲＳＫＶ（配列番号１８）；ＫＳＲＫＲＫＬ（配列番号１９）；ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫＬＤＫ（配列番号２０）；ＲＫＫＲＫＴＥＥＥＳＰＬＫＤＫＡＫＫＳＫ（配列番号２１）；ＫＤＣＶＭＮＫＨＨＲＮＲＣＱＹＣＲＬＱＲ（配列番号２２）；ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ（配列番号２３）；およびＫＫＹＥＮＶＶＩＫＲＳＰＲＫＲＧＲＰＲＫ（配列番号２４）が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１００】

ｃ．精製タグ

ポリペプチドは、例えば、クロマトグラフィー法、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、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、ＤＥＡＥイオン交換、ゲル濾過およびヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーを用いて、単離され得る。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、そのポリペプチドが親和性マトリックス上に捕捉されるのを可能にするアミノ酸配列を含むさらなるドメインを含むように操作され得る。例えば、細胞培養上清中または細胞質抽出物中のＦｃ含有ポリペプチドは、プロテインＡカラムを用いて単離され得る。さらに、ポリペプチド精製を助けるために、ｃ－ｍｙｃ、赤血球凝集素、ポリヒスチジン、マンノース結合タンパク質（ＭＢＰ）またはＦｌａｇ（商標）（Ｋｏｄａｋ）などのタグを用いることができる。ＳＵＭＯ／ＳＭＴ３などのポリペプチド増強アミノ酸配列もまた、目的のポリペプチドの発現を増大させるために追加され得る。そのようなタグは、カルボキシル末端またはアミノ末端を含むそのポリペプチド内の任意の箇所に挿入され得る。いくつかの実施形態において、タグは、ポリペプチドの発現後に除去される。有用であり得る他の融合物としては、そのポリペプチドの検出を助ける酵素、例えば、アルカリホスファターゼが挙げられる。イムノアフィニティークロマトグラフィーもまた、ポリペプチドを精製するために用いることができる。ポリペプチドはさらに、そのポリペプチドを産生する細胞によるそのポリペプチドの分泌を引き起こす分泌シグナルを含むように操作され得る（既に存在する分泌シグナルが無い場合）。次いで、分泌されたポリペプチドは、細胞培地から単離され得る。

【０１０１】

上記抗原結合分子の治療的機能は、その抗原結合分子を治療薬とカップリングすることによって高められ得る。そのようなカップリングは、免疫結合体を作製するか、または融合タンパク質を作製するか、またはその抗原結合分子を、例えば、ｓｉＲＮＡなどの核酸もしくは小分子に連結することによって、達成され得る。

【０１０２】

６．ヒト化配列

多くの非ヒト抗体（例えば、マウス、ラットまたはウサギに由来する抗体）は、ヒトにおいて天然に抗原性であり、ゆえに、ヒトに投与されたとき、望ましくない免疫応答を生じ得る。ゆえに、ヒト化３Ｅ１０抗体フラグメントおよび融合物が提供される。そのヒト化抗原結合分子は、そのｓｃＦｖがヒトに投与されたとき、望ましくない免疫応答を誘発する機会を減らし得る。

【０１０３】

非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化型として、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメントが挙げられる。ヒト化抗体には、レシピエント抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）からの残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラットまたはウサギのＣＤＲからの残基によって置き換えられたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が含まれる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されるＣＤＲ配列またはフレームワーク配列にも見られない残基も含み得

る。一般に、ヒト化抗体は、ＣＤＲ領域のすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリンのＣＤＲ領域に対応し、ＦＲ領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のＦＲ領域である、少なくとも１つの可変ドメイン、および代表的には２つの可変ドメインの実質的にすべてを含む。ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部、代表的には、ヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域を含み得る。

【０１０４】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からそのヒト化抗体に導入された１つまたはそれを超えるアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「移入」残基と称されることが多く、それらは、代表的には「移入」可変ドメインから選び取られる。抗体のヒト化の技法は、一般に、抗体分子の１つまたはそれを超えるポリペプチド鎖をコードするＤＮＡ配列を操作する組換えＤＮＡ技術の使用を含む。ヒト化は、本質的には、げっ歯類のＣＤＲまたはＣＤＲ配列を、ヒト抗体の対応する配列の代わりに用いることによって行うことができる。したがって、非ヒト抗体（またはそのフラグメント）のヒト化型は、キメラ抗体またはフラグメントであり、ここで、実質的にインタクト未満のヒト可変ドメインが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は、通常、いくつかのＣＤＲ残基およびおそらくいくつかのＦＲ残基がげっ歯類抗体における類似の部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

【０１０５】

ヒト化抗体を作製する際に使用される軽鎖と重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低下させるために非常に重要である。「ベストフィット」法によると、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列は、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングされる。次いで、げっ歯類の配列に最も近いヒト配列が、ヒト化抗体に対するヒトフレームワーク（ＦＲ）として受け入れられる。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを用いる。同じフレームワークを、いくつかの異なるヒト化抗体に対して用いてもよい。

【０１０６】

抗原に対する高親和性および他の好ましい生物学的特徴を保持する抗体がヒト化されることがさらに重要である。この目標を達成するために、ヒト化抗体は、好ましくは、親配列およびヒト化配列の３次元モデルを用いて親配列および様々な概念的なヒト化産物の解析プロセスによって調製される。３次元免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の有望な３次元コンフォメーション構造を図示し、表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を調べることにより、候補免疫グロブリン配列が機能する際のそれらの残基の見込みのある役割の解析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響する残基の解析が可能になる。このようにして、ＦＲ残基が、選択され得、コンセンサス移入配列から組み合わされ得、所望の抗体特性（例えば、標的抗原（複数可）に対する親和性の増加）が達成される。一般に、ＣＤＲ残基は、抗原結合への影響に直接かつ最も実質的に関与する。

【０１０７】

７．例示的なｓｃＦＶ

下記の実施例は、特定の例示的なモノｓｃＦｖ（配列番号２７）、ジｓｃＦｖ（配列番号２６）およびトリｓｃＦｖ（配列番号２７）、ならびにジｓｃＦｖおよびトリｓｃＦｖがそれらの一価の対応物と比べて改善された活性およびさらなる活性を有することを例証するデータを提供する。それらの例示的な融合タンパク質の各々の異なるドメインに対応する部分配列もまた、下記に提供される。当業者は、それらの例示的な融合タンパク質またはそのドメインが、上でより詳細に論じられた融合タンパク質を構築するために利用され得ることを認識するだろう。例えば、いくつかの実施形態において、ジｓｃＦｖは、Ｖ

Ｈ可変ドメイン（例えば、配列番号２６のアミノ酸４０２～５１７またはその機能的バリアントもしくはフラグメント）に連結されたＶｋ可変領域（例えば、配列番号２６のアミノ酸２７１～３８０またはその機能的バリアントもしくはフラグメント）を含む第２のｓｃＦｖに連結された、ＶＨ可変ドメイン（例えば、配列番号２６のアミノ酸１３６～２５１またはその機能的バリアントもしくはフラグメント）に連結されたＶｋ可変領域（例えば、配列番号２６のアミノ酸５～１１４またはその機能的バリアントもしくはフラグメント）を含む第１のｓｃＦｖを含む。いくつかの実施形態において、トリｓｃＦｖは、ＶＨ可変ドメイン（例えば、配列番号２７のアミノ酸６６８～７８３またはその機能的バリアントもしくはフラグメント）に連結されたＶｋ可変領域（例えば、配列番号２７のアミノ酸５３７～６４６またはその機能的バリアントもしくはフラグメント）を含む第３のｓｃＦｖドメインに連結されたジｓｃＦｖを含む。

【０１０８】

上記Ｖｋ可変領域は、ＶＨ可変ドメインに、例えば、リンカー（例えば、（ＧＧＧＧＳ）$_3$（配列番号２８）によって、単独でまたは軽鎖ＣＨ１の（６ａａ）（配列番号２６のアミノ酸１１５～１２０）とともに連結され得る。他の好適なリンカーは、上で論じられたものであり、当該分野で公知である。ｓｃＦｖは、リンカー（例えば、配列番号２６のヒトＩｇＧ　ＣＨ１の最初の１３アミノ酸（２５２～２６４））によって、単独でまたはスイベル（ｓｗｉｖｅｌ）配列（例えば、配列番号２６のアミノ酸２６５～２７０）とともに、連結され得る。他の好適なリンカーは、上で論じられたものであり、当該分野で公知である。

【０１０９】

ゆえに、ジｓｃＦｖは、配列番号２６のアミノ酸５～５１７を含み得る。トリｓｃＦｖは、配列番号２７のアミノ酸５～７８３を含み得る。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、さらなるドメインを含む。例えば、いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、溶解度を高める配列（例えば、配列番号２６のアミノ酸１～４）を含む。ゆえに、いくつかの実施形態において、ジｓｃＦｖは、配列番号２６のアミノ酸１～５１７を含み得る。トリｓｃＦｖは、配列番号２７のアミノ酸１～７８３を含み得る。いくつかの実施形態において、その融合タンパク質は、その融合タンパク質の精製、単離、捕捉、識別、分離などを高める１つまたはそれを超えるドメインを含む。例示的なドメインとしては、例えば、Ｍｙｃタグ（例えば、配列番号２６のアミノ酸５１８～５３３）および／またはＨｉｓタグ（例えば、配列番号２６のアミノ酸５３４～５３９）が挙げられる。ゆえに、いくつかの実施形態において、ジｓｃＦｖは、配列番号２６のアミノ酸配列を含み得る。トリｓｃＦｖは、配列番号２７のアミノ酸配列を含み得る。他の代用可能なドメインおよびさらなるドメインは、上でより詳細に論じられたものである。

【０１１０】

Ｃ．製剤

開示される抗原結合分子は、例えば、薬学的に許容され得るキャリアとともに、薬学的組成物として製剤化され得る。その抗原結合分子は、溶液、エマルジョンまたは懸濁液中に存在し得る（例えば、微小粒子、リポソームまたは細胞の中に組み込まれ得る）。代表的には、製剤を等張性にするために、適切な量の薬学的に許容され得る塩がその製剤において使用される。本明細書中で使用されるとき、用語「薬学的に許容され得るキャリア」は、任意の標準的な薬学的キャリア、例えば、リン酸緩衝食塩溶液、水およびエマルジョン、例えば、油／水または水／油エマルジョン、様々なタイプの湿潤剤、ならびに本明細書中に開示されるおよび／または当該分野で公知のその他のものを含む。薬学的に許容され得るキャリアの例としては、食塩水、リンガー溶液およびデキストロース溶液が挙げられるがこれらに限定されない。その溶液のｐＨは、好ましくは、約５～約８、より好ましくは、約７～約７．５である。薬学的組成物は、キャリア、増粘剤、希釈剤、緩衝剤、保存剤および界面活性剤を含み得る。さらなるキャリアとしては、徐放調製物、例えば、上記抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形された粒子、例えば、フィルム、リポソームまたは微小粒子の形態である。ある特

定のキャリアが、例えば、投与される組成物の投与経路および濃度に応じて、より好ましいことがあることは、当業者には明らかであろう。薬学的組成物は、１つまたはそれを超える活性成分、例えば、抗菌剤、抗炎症剤および麻酔薬も含み得る。

【０１１１】

例示的な好ましい実施形態において、上記抗原結合分子は、非経口的経路による投与に適した薬学的組成物、特に、注射可能または注入可能な調製物として製剤化され、それらは、活性成分の即時放出または遅延放出および制御放出を可能にする形態である。

【０１１２】

上記組成物は、全身投与され得る。好ましくは、上記組成物は、活性な作用物質が標的組織と接触して、有毒な事象または有害事象を引き起こし得る組織には接触しないかまたは最小限にだけ接触するように送達される。いくつかの実施形態において、上記組成物は、腫瘍から腫瘍の微小環境に局所的に送達される。例えば、特定の実施形態において、上記組成物は、腫瘍内注射によって送達される。

【０１１３】

薬物は、即時放出、持続放出または改変放出のために製剤化され得る。遅延放出剤形は、投与の直後以外の時点において薬物（または複数の薬物）を放出する剤形である。持続放出剤形は、従来の剤形として（例えば、液剤として、または薬物を迅速に放出する従来の固形剤形として）提供される薬物と比べて、投与頻度を少なくとも２倍減少させることを可能にする剤形である。改変放出剤形は、薬物放出の時間経過および／または場所の特徴が、従来の剤形（例えば、液剤、軟膏または迅速に溶解する剤形）によって提供されない治療上の目的または利便性の目的を達成するように選択される剤形である。遅延放出剤形および持続放出剤形ならびにそれらの組み合わせは、改変放出剤形の一種である。

【０１１４】

製剤は、安全かつ有効であると考えられる材料から構成される薬学的に許容され得る「キャリア」を用いて調製され、望ましくない生物学的副作用または望まれない相互作用を引き起こさずに個体に投与され得る。その「キャリア」は、薬学的製剤中に存在する活性成分以外のすべての構成要素である。用語「キャリア」は、希釈剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤（ｄｅｓｉｎｔｅｇｒａｔｏｒ）、充填剤およびコーティング組成物を含むがこれらに限定されない。

【０１１５】

上記化合物は、送達ビヒクルの助けありまたはなしで被験体に投与され得る。上記化合物にとって適切な送達ビヒクルは、当該分野で公知であり、特定の活性な作用物質に適するように選択され得る。例えば、いくつかの実施形態において、その活性な作用物質は、ナノ粒子、微小粒子、ミセル、合成リポタンパク質粒子またはカーボンナノチューブに組み込まれるか、またはそれらに被包されるか、またはそれらに結合される。例えば、上記組成物は、ビヒクル、例えば、活性な作用物質の制御放出をもたらすポリマー微小粒子の中に組み込まれ得る。いくつかの実施形態において、薬物の放出は、微小粒子の中からの活性な作用物質の拡散、ならびに／または加水分解および／もしくは酵素分解によるポリマー粒子の分解によって制御される。

【０１１６】

好適なポリマーとしては、エチルセルロースおよび他の天然または合成のセルロース誘導体が挙げられる。水性環境においてゆっくり可溶性であり、ゲルを形成するポリマー、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはポリエチレンオキシドもまた、薬物を含む微小粒子または粒子に対する材料として適している場合がある。他のポリマーとしては、ポリ無水物、ポリ（エステル無水物）、ポリヒドロキシ酸、例えば、ポリラクチド（ＰＬＡ）、ポリグリコリド（ＰＧＡ）、ポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）（ＰＬＧＡ）、ポリ－３－ヒドロキシブチレート（ｈｙｄｒｏｘｙｂｕｔ　ｒａｔｅ）（ＰＨＢ）およびその共重合体、ポリ－４－ヒドロキシブチレート（Ｐ４ＨＢ）およびその共重合体、ポリカプロラクトンおよびその共重合体、ならびにそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、両方の作用物質が、同じ粒子の中

に組み込まれ、異なる時点におけるおよび／または異なる期間にわたる放出のために製剤化される。例えば、いくつかの実施形態において、それらの作用物質のうちの１つが、粒子から完全に放出された後、第２の作用物質の放出が開始する。他の実施形態では、第１の作用物質の放出が開始した後、すべての第１の作用物質が放出される前に、第２の作用物質の放出が開始する。なおも他の実施形態では、両方の作用物質が、同じ期間にわたってまたは異なる期間にわたって同時に放出される。

【０１１７】

作用物質およびその薬学的組成物は、水溶液として非経口的注射によって投与され得る。その製剤は、懸濁液またはエマルジョンの形態で存在することもある。一般に、有効量の活性な作用物質（複数可）を含む薬学的組成物が提供され、その薬学的組成物は、必要に応じて、薬学的に許容され得る希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、佐剤および／またはキャリアを含む。そのような組成物は、希釈剤　滅菌水、様々な緩衝剤の内容物（例えば、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、酢酸塩、リン酸塩）、ｐＨおよびイオン強度の緩衝食塩水；および必要に応じて、添加物、例えば、界面活性剤および可溶化剤（例えば、ポリソルベート２０または８０とも称される、ＴＷＥＥＮ（登録商標）２０、ＴＷＥＥＮ（登録商標）８０）、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）および保存剤（例えば、Ｔｈｉｍｅｒｓｏｌ、ベンジルアルコール）および増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）を含む。非水性溶媒または非水性ビヒクルの例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油およびトウモロコシ油）、ゼラチン、および注射可能な有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）である。上記製剤は、凍結乾燥され得、使用の直前に再溶解／再懸濁され得る。上記製剤は、例えば、細菌保持フィルターによる濾過、滅菌剤を組成物に組み込むこと、組成物に照射すること、または組成物を加熱することによって滅菌され得る。

【０１１８】

水性環境中への抗体フラグメントまたは融合タンパク質の溶解を助けるために、界面活性物質が、湿潤剤として加えられ得る。界面活性物質としては、陰イオン洗浄剤、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウムおよびジオクチルスルホン酸ナトリウムが挙げられ得る。陽イオン性洗浄剤も使用され得、それらとしては、塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトニウム（ｂｅｎｚｅｔｈｏｍｉｕｍ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ）が挙げられ得る。界面活性物質として製剤に含められ得る潜在的な陰イオン洗浄剤のリストは、ラウロマクロゴール４００、ステアリン酸ポリオキシル４０、ポリオキシエチレン硬化ひまし油１０、５０および６０、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート２０、４０、６０、６５および８０、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロース、ならびにカルボキシメチルセルロースである。これらの界面活性物質は、単独でまたは種々の比率の混合物として、タンパク質または誘導体の製剤中に存在し得る。ペプチドの取り込みを潜在的に高める添加物は、例えば、脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸およびリノレン酸である。

【０１１９】

ＩＩＩ．使用方法

Ａ．処置方法

抗原結合抗体フラグメントおよび／または融合タンパク質を含む開示される抗原結合分子は、薬学的に許容され得るキャリアと組み合わせて治療的に使用され得る。いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、薬学的に許容され得る賦形剤に抗原結合分子を含む単位投与量であり、ここで、その抗原結合分子は、癌細胞または感染細胞においてＤＮＡ修復を阻害するのに有効な量で存在する。

【０１２０】

正確な投与量は、種々の因子、例えば、被験体に依存する変数（例えば、齢、免疫系の健康状態、臨床症状など）に従って変動し得る。例示的な投与量、症状、薬理学的効果および生理学的効果は、下記でさらに詳細に論じられる。例えば、組成物を投与するのに有効な投与量およびスケジュールは、経験的に決定され得、そのような決定は、当該分野の

技術の範囲内である。組成物の投与に対する投与量の範囲は、標的細胞においてＤＮＡ修復を損なうのに十分な範囲ならびに／または標的細胞を放射線療法および／または化学療法に対して感作するのに十分な範囲である。投与量は、有害な副作用、例えば、望まれない交差反応、アナフィラキシー反応などを引き起こすほど多くない量であるべきである。一般に、投与量は、患者の齢、状態および性別、投与経路、当該レジメンに他の薬物が含まれているか否か、ならびに処置されるべき癌または感染のタイプ、ステージおよび場所によって変動し得る。何らかの禁忌適応症（ｃｏｕｎｔｅｒ－ｉｎｄｉｃａｔｉｏｎ）の場合には、投与量は、個々の医師によって調整され得る。投与量は、変動し得、１日間または数日間にわたって毎日１回またはそれを超える用量の投与で投与され得る。所与のクラスの医薬品に対する適切な投与量についてのガイダンスは、文献に見られる。単独で使用される抗体の典型的な１日投与量は、上で述べた因子に応じて、１日あたり約１μｇ／ｋｇ～最大２００ｍｇ／ｋｇ体重またはそれを超える範囲であり得る。

【０１２１】

組成物の投与のタイミングは、使用される製剤および／または投与経路に依存し得る。いくつかの実施形態において、組成物の投与は、長期間の処置レジメンとして与えられ、それによって、薬物動態学的な定常状態条件に達し得る。

【０１２２】

一般に、単なる例として、開示される方法において有用な剤形は、約１ｍｇ／ｋｇ～約２００ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ～７５ｍｇ／ｋｇまたは３０ｍｇ／ｋｇ～６０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲内の用量を含み得る。他の実施形態において、投与量は、約２００ｍｇ／ｍ^2～約１０００ｍｇ／ｍ^2、より好ましくは、約２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００または１０００ｍｇ／ｍ^{2}である。いくつかの実施形態において、単位投与量は、静脈内注射に対する単位剤形におけるものである。いくつかの実施形態において、単位投与量は、腫瘍内注射に対する単位剤形におけるものである。

【０１２３】

下記の実施例は、二価、三価および多価の３Ｅ１０ｓｃＦｖが、３Ｅ１０モノクローナル抗体または一価の３Ｅ１０ｓｃＦｖよりも、強力であり得、効果的であり得、および／または毒性でない場合があることを示している。ゆえに、二価、三価および多価の３Ｅ１０ｓｃＦｖの投与量は、同じ結果を達成するが、関連する一価の３Ｅ１０ｓｃＦｖの投与量よりも少ない場合がある。さらにまたはあるいは、二価、三価および多価の３Ｅ１０ｓｃＦｖの投与量は、等価な投与量の３Ｅ１０モノクローナル抗体または一価の３Ｅ１０ｓｃＦｖでは達成できない効果を達成することができる場合がある。さらにまたはあるいは、より多い投与量の二価、三価および多価の３Ｅ１０ｓｃＦｖは、被験体において、３Ｅ１０モノクローナル抗体または一価の３Ｅ１０ｓｃＦｖの最大耐性投与量よりも許容され得る。

【０１２４】

投与頻度は、例えば、１日に、１週間に、２週間毎に、３週間毎に、または１ヶ月に、１、２、３、４回またはそれを超える回数であり得る。いくつかの実施形態において、上記阻害剤は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０または３１日毎に１回、被験体に投与される。いくつかの実施形態において、投与頻度は、１週間に１回であるか、または２週間毎に１回であるか、または４週間ごとに１回であるか、または１週間に２回である。いくつかの実施形態において、単回投与が有効である。いくつかの実施形態において、２回またはそれを超える投与が必要とされる。

【０１２５】

上記薬学的組成物は、局所的処置が望まれるかまたは全身性処置が望まれるか、および処置されるべき区域に応じて、いくつかの方法で投与され得る。例えば、上記組成物は、静脈内、筋肉内、髄腔内、腹腔内または皮下に投与され得る。上記組成物は、腫瘍または

組織に直接、例えば、定位的に投与され得る。いくつかの実施形態において、上記組成物は、注射または外科的に埋め込まれたシャントによって、脳または肝臓に投与される。

【０１２６】

好ましい実施形態において、上記薬学的組成物は、注射または注入によって被験体に投与される。特定の実施形態において、その注射は、ボーラス注射である。別の好ましい実施形態において、上記薬学的組成物は、静脈内注入によって被験体に投与される。その注入は、数秒間、数分間または数時間にわたって、例えば、少なくとも１、２、３、４、５、１０、３０秒間またはそれを超えて、少なくとも５、１０、１５、３０、４５もしくは６０分間、または約１、１．５、２、３、４、５時間もしくはそれを超えて、行われ得る。

【０１２７】

いくつかの実施形態において、被験体に対する上記組成物の効果は、コントロールと比較される。例えば、特定の症状、薬理学指標または生理学的指標に対する上記組成物の効果は、未処置の被験体、すなわち、処置前の被験体の状態と比較され得る。いくつかの実施形態において、その症状、薬理学的指標または生理学的指標は、処置前、および処置が開始された後に再度、１回またはそれを超える回数、被験体において測定される。いくつかの実施形態において、コントロールは、参照レベル、すなわち、処置される疾患または状態を有しない１つまたはそれを超える被験体（例えば、健常な被験体）におけるその症状、薬理学的指標または生理学的指標の測定に基づいて決定された平均値である。いくつかの実施形態において、その処置の効果は、当該分野において公知の従来の処置、例えば、本明細書中で論じられる処置のうちの１つと比較される。

【０１２８】

１．癌

本明細書中に開示される抗原結合分子は、被験体における癌を処置するため、減少させるため、および／または予防するために使用され得る。ゆえに、その抗原結合分子は、被験体における癌を処置する、減少させる、および／または予防する有効量で投与され得る。癌またはその腫瘍を処置するための抗原結合分子の有効量または治療有効量は、通常、その癌の少なくとも（ａ　ｌｅａｓｔ）１つの症状を減少させるもしくは予防するのに十分か、または所望の薬理学的効果および／もしくは生理学的効果を別途提供するのに十分な投与量である。その症状は、物理的なもの、例えば、腫瘍量であり得るか、または生物学的なもの、例えば、増殖の減少または癌細胞死の増加であり得る。いくつかの実施形態において、その量は、腫瘍細胞を殺滅するのに有効であるか、または腫瘍細胞の増殖もしくは転移を減少させるかもしくは阻害するのに有効である。いくつかの実施形態において、その量は、腫瘍量を減少させるのに有効である。いくつかの実施形態において、その量は、当該癌の少なくとも１つの共存症を減少させるかまたは予防するのに有効である。

【０１２９】

成熟した動物では、通常、ほとんどの器官および組織において、細胞再生と細胞死とのバランスが保たれている。身体内の様々なタイプの成熟細胞が、所与の寿命を有し；これらの細胞が死ぬと、様々なタイプの幹細胞の増殖および分化によって新しい細胞が産生される。正常な状況下では、新しい細胞の産生は、任意の特定のタイプの細胞の数が一定のままであるように制御されている。それにもかかわらず、しばしば、正常な成長調節機構にもはや応答しない細胞が生じる。これらの細胞は、かなりのサイズに拡大して腫瘍または新生物をもたらし得る細胞のクローンを生じさせる。無限に成長できず、健康な周辺組織を広範に浸潤しない腫瘍は、良性である。成長し続けて徐々に浸潤性になる腫瘍は、悪性である。癌という用語は、通常、悪性腫瘍のことを指す。悪性腫瘍は、無制御の成長に加えて、転移を示す。このプロセスでは、小クラスターの癌性細胞が、腫瘍から出て、血管またはリンパ管に侵入し、他の組織に運ばれて、そこで増殖し続ける。このように、１つの部位における原発腫瘍は、別の部位に二次性腫瘍を生じさせ得る。

【０１３０】

本明細書中に記載される組成物および方法は、被験体における腫瘍の成長を遅延させる

かもしくは阻害すること、その腫瘍の成長もしくはサイズを減少させること、その腫瘍の転移を阻害するかもしくは減少させること、および／または腫瘍の発生もしくは成長に関連する症状を阻害するかもしくは減少させることによって、良性腫瘍または悪性腫瘍を有する被験体を処置するために有用である。

【０１３１】

処置され得る悪性腫瘍は、その腫瘍が由来する組織の胚起源に従って分類され得る。癌腫は、内胚葉または外胚葉の組織、例えば、皮膚、または内部器官および腺の上皮内層から生じる腫瘍である。開示される組成物は、癌腫の処置において特に有効である。肉腫は、それほど頻繁に生じず、中胚葉の結合組織、例えば、骨、脂肪および軟骨に由来する。白血病およびリンパ腫は、骨髄の造血細胞の悪性腫瘍である。白血病は、単一の細胞として増殖するのに対して、リンパ腫は、腫瘤として成長する傾向がある。悪性腫瘍は、身体の数多くの器官または組織に現れて、癌を確立し得る。

【０１３２】

開示される抗原結合分子は、無制御の成長、浸潤または転移を起こしている細胞を処置するために使用され得る。

【０１３３】

腫瘍細胞の低酸素は、癌細胞を放射線およびいくつかの化学療法剤による処置に対して抵抗性にしてしまうので、現在、癌治療における問題として認識されている。低酸素は、癌細胞において損なわれたＤＮＡ修復を引き起こすとも知られている。したがって、いくつかの実施形態において、開示される活性な作用物質は、低酸素性腫瘍細胞に対する標的化された作用物質として使用される。

【０１３４】

損なわれたＤＮＡ修復を有する癌細胞は、開示される抗原結合分子に対する特に良好な標的である。いくつかの実施形態において、上記抗原結合分子は、損なわれたＤＮＡ修復を有する細胞にとって致死である。好ましい実施形態において、それらの細胞は、ＤＮＡ修復、ＤＮＡ合成または相同組換えに関わる遺伝子の発現またはタンパク質の機能が不完全である。例示的な遺伝子および関連産物としては、ＸＲＣＣ１、ＡＤＰＲＴ（ＰＡＲＰ－１）、ＡＤＰＲＴＬ２（ＰＡＲＰ－２）、ポリメラーゼベータ、ＣＴＰＳ、ＭＬＨ１、ＭＳＨ２、ＦＡＮＣＤ２、ＰＭＳ２、ｐ５３、ｐ２１、ＰＴＥＮ、ＲＰＡ、ＲＰＡ１、ＲＰＡ２、ＲＰＡ３、ＸＰＤ、ＥＲＣＣ１、ＸＰＦ、ＭＭＳ１９、ＲＡＤ５１、ＲＡＤ５１Ｂ、ＲＡＤ５１Ｃ、ＲＡＤ５１Ｄ、ＤＭＣ１、ＸＲＣＣＲ、ＸＲＣＣ３、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２，ＰＡＬＢ２、ＲＡＤ５２、ＲＡＤ５４、ＲＡＤ５０、ＭＲＥ１１、ＮＢ５１、ＷＲＮ、ＢＬＭ、ＫＵ７０、ＫＵ８０、ＡＴＭ、ＡＴＲ　ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、ＦＡＮＣファミリーの遺伝子、ＦＡＮＣＡ、ＦＡＮＣＢ、ＦＡＮＣＣ、ＦＡＮＣＤ１、ＦＡＮＣＤ２、ＦＡＮＣＥ、ＦＡＮＣＦ、ＦＡＮＣＧ、ＦＡＮＣＬ、ＦＡＮＣＭ、ＲＡＤ１およびＲＡＤ９が挙げられる。

【０１３５】

いくつかの実施形態において、上記不完全な遺伝子は、癌抑制遺伝子である。いくつかの実施形態において、その遺伝子は、染色体の完全性の維持および／または遺伝子毒性ストレスからの保護に関連する。最も好ましい実施形態において、それらの細胞は、一本鎖および／または二本鎖切断の修復が欠損している。

【０１３６】

好ましい実施形態において、上記細胞は、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２および／またはＰＴＥＮに１つまたはそれを超える変異を有する。ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＰＴＥＮ変異などの遺伝子変異は、標準的なＰＣＲ、ハイブリダイゼーションまたは配列決定技術を用いて特定され得る。

【０１３７】

特定の実施形態において、癌細胞は、低酸素に起因してＤＮＡ損傷の修復が不完全である。

【０１３８】

ゆえに、いくつかの実施形態において、上記抗原結合分子は、ＤＮＡ修復欠損の家族性の症候群から生じた癌、例えば、乳癌、卵巣癌および膵癌を処置するために使用され得る。これらの実施形態では、抗ＤＮＡ抗体が、放射線療法または化学療法なしで有効であり得る。例えば、上記抗原結合分子は、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＰＡＬＢ２またはＲＡＤ５１Ｂ、ＲＡＤ５１Ｃ、ＲＡＤ５１Ｄまたは関連遺伝子における変異に関係する癌を処置するために使用され得る。上記抗原結合分子は、ＤＮＡミスマッチ修復に関連する遺伝子（例えば、ＭＳＨ２、ＭＬＨ１、ＰＭＳ２および関連遺伝子）における変異に関係する結腸癌、子宮内膜腫瘍または脳腫瘍を処置するためにも使用され得る。上記抗原結合分子は、ＤＮＡ修復遺伝子（例えば、ＢＲＣＡ１、ＭＬＨ１またはＲＡＤ５１Ｂ、ＲＡＤ５１Ｃもしくはは ＲＡＤ５１Ｄ）が発現停止した癌を処置するためにも使用され得る。上記抗原結合分子は、染色体の維持または遺伝子毒性ストレスに関連する癌、例えば、ＰＴＥＮが変異しているかまたは発現停止している癌を処置するためにも使用され得る。ＰＴＥＮは、乳癌、前立腺癌、神経膠腫、メラノーマおよび肺癌をはじめとした多くの癌において不活性化されていることが多い。これらの好ましい実施形態では、上記抗原結合分子が、これらの癌の固有の修復欠損または他の感受性と組み合わせてＤＮＡ修復を阻害する能力は、細胞死を誘導するのに十分であり得る。

【０１３９】

上記抗体を使用して処置され得る癌の代表的であって非限定的なリストとしては、血液およびリンパ系の癌（白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、孤立性形質細胞腫、多発性骨髄腫を含む）、泌尿生殖器系の癌（前立腺癌、膀胱癌、腎癌、尿道癌、陰茎癌、精巣癌を含む）、神経系の癌（髄膜腫（ｍｅｎｇｉｏｍａ）、神経膠腫、神経膠芽腫、上衣腫を含む）、頭頸部の癌（口腔、鼻腔、鼻咽頭腔、中咽頭腔、喉頭および副鼻腔の扁平上皮癌腫を含む）、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌を含む）、婦人科の癌（子宮頸癌、子宮体癌、膣癌、外陰癌、卵巣およびファロピウス管癌を含む）、消化器癌（胃癌、小腸癌、直腸結腸癌、肝臓癌、肝胆道癌および膵癌を含む）、皮膚癌（メラノーマ、扁平上皮癌腫および基底細胞癌を含む）、乳癌（腺管癌および小葉癌ならびにトリプルネガティブ乳癌を含む）および小児癌（神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、ウィルムス腫瘍、髄芽腫を含む）が挙げられる。

【０１４０】

いくつかの実施形態において、上記癌は、放射線療法または化学療法に対していくらか抵抗性を示す新生物または腫瘍である。特定の実施形態において、上記癌細胞は、低酸素に起因して、放射線または化学療法に抵抗性である。

【０１４１】

標準的な方法を用いた放射線療法に抵抗性である癌としては、肉腫、腎細胞癌、メラノーマ、リンパ腫、白血病、癌腫、芽腫および胚細胞性腫瘍が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１４２】

２．ウイルスによって形質転換した細胞

いくつかの実施形態において、抗体フラグメントまたは融合タンパク質を含む抗原結合分子は、ウイルスによって形質転換した細胞、例えば、腫瘍ウイルスに感染した細胞を処置するために使用され得る。ウイルスによってトランスフェクトされた細胞を処置するための有効量または治療有効量は、通常、それらの細胞を殺滅するのに十分および／もしくはそれらを別の細胞傷害剤に感作する（ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ）のに十分、または所望の薬理学的効果および／もしくは生理学的効果を別途提供するのに十分な投与量である。例えば、ウイルス形質転換は、細胞に対して表現型の変化（例えば、高い飽和密度、足場非依存性の成長、接触阻止の喪失、有向の成長（ｏｒｉｅｎｔａｔｅｄ ｇｒｏｗｔｈ）の喪失、不死化およびそれらの細胞の細胞骨格の破壊）を課し得る。その細胞内のウイルスゲノムの少なくとも一部の存続が、細胞の形質転換にとって必要である。これは、いくつかのウイルス遺伝子、例えば、癌遺伝子からの継続的な発現によって達成され得る。これらの遺伝子は、その細胞の観察される表現型の変化を引き起こす、細胞のシグナル伝達経路

を干渉し得る。場合によっては、ウイルスゲノムは、宿主ゲノムの癌原遺伝子の近くに挿入される。その最終結果は、細胞分裂の増加を示す形質転換した細胞であり、その細胞分裂の増加は、ウイルスにとって好ましい。いくつかの実施形態において、ウイルス形質転換、ウイルス感染および／または代謝は、ＤＮＡ修復の機構に依存する。これらの実施形態において、開示される抗原結合分子を用いたＤＮＡ修復の阻害は、その細胞において、ウイルス形質転換、ウイルス感染および／または代謝も阻害する。

【０１４３】

いくつかの実施形態において、ウイルス形質転換、ウイルス感染および／または代謝は、ウイルスの生活環の一部としての、ウイルスによってコードされるＲＮＡまたはＤＮＡの代謝に依存し、それによって、開示される抗体フラグメントまたは融合タンパク質による結合および／または阻害に左右される中間体が生成される。これらの実施形態において、開示される抗原結合分子による処置は、その細胞において、ウイルス形質転換、ウイルス感染および／または代謝も阻害する。

【０１４４】

レンチウイルス（例えば、ＨＩＶ）は、感染および組み込みのために宿主のＢＥＲ活性に依存すると以前に見出された（Ｙｏｄｅｒら、ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ，２０１１　Ｍａｒｃｈ　６（３）ｅ１７８６２）。さらに、血管拡張性失調症変異（ａｔａｘｉａ－ｔｅｌａｎｇｉｅｃｔｅｓｉａ－ｍｕｔａｔｅｄ）（ＡＴＭ）ＤＮＡ損傷応答は、ＨＩＶの複製にとって欠かせないとみられる（Ｌａｕら、Ｎａｔ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ，２００５　７（５）：４９３－５００）。いくつかの実施形態において、レトロウイルス（レンチウイルス、ＨＩＶを含む）の感染および組み込みは、宿主のＤＮＡ修復機構に依存する。これらの実施形態において、開示される抗原結合分子による処置は、ウイルスの感染／組み込みも抑制し、ウイルスの生活環における再感染も抑制する。

【０１４５】

いくつかの実施形態において、レンチウイルス（ＨＩＶ）の複製は、ＤＮＡ修復に依存する。これらの実施形態において、開示される抗原結合分子による処置は、ウイルスの複製も抑制し、ウイルスの生活環における再感染も抑制する。ゆえに、開示される抗原結合分子は、腫瘍ウイルスなどのウイルスに感染した細胞を処置するために使用され得る。いくつかの実施形態において、上記抗原結合分子は、ウイルスの形質転換、複製、代謝またはそれらの組み合わせを阻害する。開示される抗原結合分子によって影響され得る例示的なウイルスとしては、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、Ｂ型肝炎（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎（ＨＣＶ）、ヒトＴリンパ向性ウイルス（ＨＴＬＶ）、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（ＨＨＶ－８）、メルケル細胞ポリオーマウイルス、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）およびヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）が挙げられる。それらの抗原結合分子は、潜伏性ウイルスを処置するためにも使用され得る。いくつかの実施形態において、感染細胞がＨＳＶ－１などのウイルスに対してＤＮＡ損傷応答を開始できないことは、潜伏期の確立に寄与する。ゆえに、これらのウイルスに感染した細胞は、損なわれたＤＮＡ修復を有し、開示される抗原結合分子による処置に感受性である。例示的な潜伏性ウイルスとしては、ＣＭＶ、ＥＢＶ、単純ヘルペスウイルス（１および２型）および水痘帯状疱疹ウイルスが挙げられる。

【０１４６】

開示される抗原結合分子は、その抗原結合分子がＤＮＡに結合するできることおよびウイルスの生活環の一部であるＤＮＡ修復またはＲＮＡ代謝を干渉できることによって、癌、免疫不全、肝炎、脳炎、肺臓炎、呼吸器疾患または他の疾患状態を生じさせるウイルスに起因する、活動性ウイルス感染を処置するためにも使用され得る。

【０１４７】

生活環または結果として生じる感染の症状が上記抗体の投与によって影響され得る代表的なウイルスとしては、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、Ｂ型肝炎（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎（ＨＣＶ）、ヒトＴリンパ向性ウイルス（ＨＴＬＶ）、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（ＨＨＶ－８）、メルケル細胞ポリオーマウイルス、エプスタイン・バーウイルス（

ＥＢＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）およびヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）が挙げられる。

【表１】

表１：上記抗原結合分子の投与によって影響され得るさらなるウイルスとしては、パルボウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルスおよび他のＤＮＡウイルスが挙げられる：

ウイルス科	例 (一般名)	ビリオン裸/エンベロープ有（enveloped）	キャプシド対称性	核酸型	群
1.アデノウイルス科	アデノウイルス、伝染性イヌ肝炎ウイルス	裸	正二十面体	ds	I
2.パピローマウイルス科	パピローマウイルス	裸	正二十面体	環状ds	I
3.パルボウイルス科	パルボウイルスB19、イヌパルボウイルス	裸	正二十面体	ss	II
4.ヘルペスウイルス科	単純ヘルペスウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バー ウイルス	エンベロープ有	正二十面体	ds	I
5.ポックスウイルス科	痘瘡ウイルス、ウシポックスウイルス、ヒツジポックスウイルス、オルフウイルス、サルポックスウイルス、ワクシニアウイルス	複雑な外被	複合体	ds	I
6.ヘパドナウイルス科	B型肝炎ウイルス	エンベロープ有	正二十面体	環状、部分的にds	VII
7.ポリオーマウイルス科	ポリオーマウイルス; JCウイルス (進行性多巣性白質脳症)	裸	正二十面体	環状ds	I
8.アネロウイルス科	トルクテノウイルス				

【表２－１】

表２：上記抗原結合分子の投与によって影響され得るＲＮＡウイルスとしては、以下が挙げられる：

ウイルス科	例 (一般名)	キャプシド裸/エンベロープ有	キャプシド対称性	核酸型	群
1.レオウイルス科	レオウイルス、ロタウイルス	裸	正二十面体	ds	III
2.ピコルナウイルス科	エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルス、カルジオウイルス、アフトウイルス、ポリオウイルス、パレコウイルス、エルボウイルス、コブウイルス、テッショウウイルス、コクサッキー	裸	正二十面体	ss	IV
3.カリシウイルス科	ノーウォークウイルス	裸	正二十面体	ss	IV
4.トガウイルス科	風疹ウイルス	エンベロープ有	正二十面体	ss	IV
5.アレナウイルス科	リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス	エンベロープ有	複合体	ss(-)	V
6.フラビウイルス科	デングウイルス、C型肝炎ウイルス、黄熱病ウイルス	エンベロープ有	正二十面体	ss	IV
7.オルトミクソウイルス科	インフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスB、インフルエンザウイルスC、イサウイルス、トゴトウイルス	エンベロープ有	らせん形	ss(-)	V
8.パラミクソウイルス科	麻疹ウイルス、耳下腺炎ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、牛疫ウイルス、イヌジステンパーウイルス	エンベロープ有	らせん形	ss(-)	V
9.ブンヤウイルス科	カリフォルニア脳炎ウイルス、ハンタウイルス	エンベロープ有	らせん形	ss(-)	V
10.ラブドウイルス科	狂犬病ウイルス	エンベロープ有	らせん形	ss(-)	V
11.フィロウイルス科	エボラウイルス、マールブルグウイルス	エンベロープ有	らせん形	ss(-)	V
12.コロナウイルス科	コロナウイルス	エンベロープ有	らせん形	ss	IV
13.アストロウイルス科	アストロウイルス	裸	正二十面体	ss	IV
14.ボルナウイルス科	ボルナ病ウイルス	エンベロー	らせん形	ss(-)	V

【表２－２】

		プ有			
15.アルテリウイルス科	アルテリウイルス、ウマ動脈炎ウイルス	エンベロープ有	正二十面体	ss	IV
16.ヘペウイルス科	E型肝炎ウイルス	裸	正二十面体	ss	IV

【０１４８】
レトロウイルスも影響され得る：
・アルファレトロウイルス属；基準種：トリ白血症（Ａｖｉａｎ　ｌｅｕｋｏｓｉｓ）ウイルス；その他のものとしては、ラウス肉腫ウイルスが挙げられる。
・ベータレトロウイルス属；基準種：マウス乳癌ウイルス
・ガンマレトロウイルス属；基準種：マウス白血病ウイルス；その他のものとしては、ネコ白血病ウイルスが挙げられる。
・デルタレトロウイルス属；基準種：ウシ白血病ウイルス；その他のものとしては、発癌性ヒトＴリンパ球向性ウイルスが挙げられる。
・イプシロンレトロウイルス属；基準種：ウォールアイ皮膚肉腫ウイルス
・レンチウイルス属；基準種：ヒト免疫不全ウイルス１およびヒト免疫不全ウイルス２；その他のものとしては、サル、ネコ免疫不全ウイルスが挙げられる。
・スプマウイルス属；基準種：サル泡沫状ウイルス
・ヘパドナウイルス科－例えば、Ｂ型肝炎ウイルス
【０１４９】
開示される抗原結合分子の投与によって影響され得る他のウイルス性疾患としては、コロラドダニ熱（ＲＮＡウイルスであるコルチウイルスによって引き起こされる）、西ナイル熱（主に中東およびアフリカに存在するフラビウイルスによって引き起こされる脳炎）、黄熱、狂犬病（ラブドウイルス科の神経向性ウイルスのいくつかの異なる株によって引き起こされる）、ウイルス性肝炎、ノーウォークウイルスおよびノーウォーク様ウイルス、ロタウイルス、カリシウイルスおよびアストロウイルスによって引き起こされる胃腸炎（ウイルス性）－急性ウイルス性胃腸炎、灰白髄炎、頻繁に抗原変異を起こし得るオルトミクソウイルスによって引き起こされるインフルエンザ（フルー）、麻疹（はしか）、パラミクソウイルス科、耳下腺炎、急性呼吸器系ウイルスと集合的に称される種々のウイルスによって引き起こされるクループを含む、ウイルス性肺炎および急性呼吸器症候群を含む呼吸器症候群、ならびに呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ、低年齢小児における呼吸器感染症の最も危険な原因）によって引き起こされる呼吸器疾患が挙げられる。
【０１５０】
いくつかの実施形態において、開示される組成物は、ウイルス感染またはウイルス感染の拡散もしくは悪化を処置するためまたは予防するために使用される。例えば、いくつかの実施形態において、その組成物は、本明細書中で論じられるウイルスなどのウイルスに曝露されたかまたは曝露されるリスクがある被験体におけるウイルス感染またはウイルス感染の拡散もしくは悪化を処置するためまたは予防するために使用される。
【０１５１】
Ｂ．併用療法
いくつかの実施形態において、抗体フラグメントおよび／または融合タンパク質を含む開示される抗原結合分子は、癌腫、神経膠腫、肉腫またはリンパ腫をはじめとした任意の癌を処置するために、放射線療法、化学療法またはそれらの組み合わせと組み合わせて使用され得る。これらの実施形態において、抗体フラグメントおよび／または融合タンパク質を含む開示される抗原結合分子は、放射線療法または化学療法のＤＮＡ損傷作用に対して細胞を感作し得る。
【０１５２】
開示される抗原結合分子は、癌の放射線感受性または化学的感受性を高め得る。有効用

量の化学療法および／または放射線治療は、ある特定の癌にとって毒性であり得る。いくつかの実施形態において、その抗原結合分子は、癌を処置するために必要な抗新生物薬または放射線のレベルの必要とされる有効用量を減少させ、それによって、その有効用量の毒性を低下させる。例えば、ドキソルビシンの最も一般的に使用される投与量は、２１～２８日毎の４０～６０ｍｇ／ｍ^{2}ＩＶまたは２１日毎に１回の６０～７５ｍｇ／ｍ^{2}ＩＶである。患者が、１．２～３ｍｇ／ｄＬのビリルビンレベルを有する場合、用量を５０％減少させるべきである。患者が、３．１～５．０ｍｇ／ｄＬのビリルビンレベルを有する場合、用量を７５％減少させるべきである。ドキソルビシンの総投与量が４５０ｍｇ／ｍ^{2}に近づくにつれて、心臓の支持療法に反応しないことが多いうっ血性心不全に至る重篤な不可逆的な心筋毒性が発生し得る。開示される抗原結合分子と組み合わせて使用されるとき、ドキソルビシンの投与量は、有効性を低下させることなく心筋毒性を低下させるために減少され得る。

【０１５３】

他の実施形態において、開示される抗原結合分子は、有効性を高めるために、通常の用量の薬物または放射線とともに使用され得る。例えば、それらの抗原結合分子は、薬物抵抗性または放射線抵抗性である癌に対して薬物または放射線治療を増強するために使用され得る。標準的な方法を用いる放射線療法に抵抗性である癌としては、肉腫、メラノーマ、癌腫および低酸素性腫瘍が挙げられる。

【０１５４】

１．放射線療法

開示される抗原結合分子は、放射線治療と組み合わせて使用され得る。放射線治療（放射線療法としても知られる）は、悪性細胞を管理するための癌処置の一部として、電離放射線を医学的に使用することである。放射線治療は、非悪性の状態においてもいくつかの適用（例えば、三叉神経痛、重度の甲状腺眼疾患、翼状片、色素性絨毛結節性滑膜炎の処置、ケロイド瘢痕の成長の予防、および異所性骨化の予防）を有する。いくつかの実施形態において、開示される抗原結合分子は、非悪性の状態に対して放射線感受性を高めるために使用される。

【０１５５】

放射線療法は、分裂細胞、例えば、癌細胞のＤＮＡを損傷することによって働く。このＤＮＡ損傷は、２つのタイプのエネルギー、光子または荷電粒子のうちの１つによって引き起こされる。この損傷は、直接的または間接的である。間接的な電離は、水の電離の結果として起き、フリーラジカル、特にヒドロキシルラジカルを形成し、次いでそれがＤＮＡを損傷する。例えば、光子治療（ｐｈｏｔｏｎ　ｔｈｅｒａｐｙ）によって引き起こされる照射効果のほとんどが、フリーラジカルを通じたものである。光子放射線療法の主な限界の１つは、固形腫瘍の細胞が酸素欠乏になって、低酸素環境における腫瘍細胞が、通常の酸素環境における細胞よりも放射線損傷に対して２～３倍抵抗性になり得ることである。

【０１５６】

癌細胞のＤＮＡに対する直接的な損傷は、高ＬＥＴ（線エネルギー付与）の荷電粒子（例えば、プロトン、ホウ素、炭素またはネオンイオン）を通じて生じる。これらの粒子は、通常二本鎖ＤＮＡ切断を引き起こす直接的なエネルギー移動を主に介して作用するので、この損傷は、腫瘍の酸素供給とは無関係である。比較的大きな質量に起因して、プロトンおよび他の荷電粒子は、組織においてほとんど側方散乱を有さず；そのビームは、ほとんど広がらずに、その腫瘍の形状に集中したまま留まり、周辺組織にわずかな線量の副作用しか送達しない。光子放射線療法において使用される放射線の量は、グレイ（Ｇｙ）を単位として測定され、処置される癌のタイプおよびステージに応じて変動する。治癒症例の場合、固形上皮性腫瘍に対する典型的な線量は、６０～７０Ｇｙの範囲である一方で、リンパ腫は、それより低い線量で処置される。術後（アジュバント）線量は、通常、１．８～２Ｇｙずつのおよそ４５～６０Ｇｙである（乳癌、頭部癌および頸部癌の場合）。放射線腫瘍学者は、線量を選択する際、他の多くの因子を考慮し、その因子としては、患者

が化学療法を受けているか否か、患者の共存症、手術の前または後に放射線治療が施されるか、および手術の成功の程度が挙げられる。

【０１５７】

放射線に対する癌の応答は、その癌の放射線感受性によって説明される。高度に放射線感受性の癌細胞は、適度の線量の放射線によって迅速に殺滅される。これらには、白血病、ほとんどのリンパ腫および胚細胞性腫瘍が含まれる。上皮癌の大部分は、中程度にしか放射線感受性でなく、根治を達成するためには、著しく高い線量の放射線（６０～７０Ｇｙ）を必要とする。いくつかのタイプの癌は、特に放射線抵抗性であり、つまり、根治するためには、臨床実施において安全であり得る線量よりもはるかに高い線量を必要とする。一般に、腎細胞癌およびメラノーマが、放射線抵抗性であると考えられている。

【０１５８】

放射線療法に対する腫瘍の応答は、そのサイズにも関係する。複合的な理由で、非常に大きな腫瘍は、より小さい腫瘍または顕微鏡的疾患よりも放射線にあまり反応しない。この作用を克服するために、様々なストラテジーが用いられている。最も一般的な手法は、放射線療法の前に外科的切除を行うことである。これは、広範な局所切除または乳房切除に続くアジュバント放射線療法による乳癌の処置において最も一般的に見られる。別の方法は、ラジカル放射線療法の前のネオアジュバント化学療法によって腫瘍を収縮させることである。第３の手法は、放射線療法の過程においてある特定の薬物を投与することによってその癌の放射線感受性を高めることである。開示される抗原結合分子は、この第３の機能を果たし得る。これらの実施形態において、その抗原結合分子は、放射線療法に対する細胞の感受性を、例えば、少なくとも１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％高め得る。さらに、その抗原結合分子は、１つまたはそれを超えるさらなる放射線増感剤と併用され得る。公知の放射線増感剤の例としては、シスプラチン、ゲムシタビン、５－フルオロウラシル、ペントキシフィリン、ビノレルビン、ＰＡＲＰ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤およびプロテアソーム阻害剤が挙げられる。

【０１５９】

他の実施形態において、放射線の線量は、開示される抗原結合分子と組み合わせて投与されるとき、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％またはそれを超えて減少し得る。

【０１６０】

２．化学療法剤

数多くの化学療法剤、特に、抗新生物薬は、開示される抗原結合分子との組み合わせに利用可能である。化学療法薬の大部分は、アルキル化剤、代謝拮抗物質、アントラサイクリン、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、モノクローナル抗体および他の抗腫瘍剤に分けることができる。

【０１６１】

好ましい実施形態において、これらの活性は、開示される抗原結合分子と最も有効に相乗作用を示し得るので、抗新生物薬は、ＤＮＡを損傷するか、またはＤＮＡ修復を干渉する。これらの実施形態において、その抗原結合分子は、化学療法に対する細胞の感受性を、例えば、少なくとも１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％高める。ＤＮＡを損傷するかまたはＤＮＡ修復を阻害する抗新生物薬の非限定的な例としては、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、ダカルバジン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、イホスファミド、ロムスチン、メクロレタミン、ミトキサントロン、オキサリプラチン、プロカルバジン、テモゾロマイドおよびバルルビシンが挙げられる。いくつかの実施形態において、抗新生物薬は、テモゾロマイドであり、これは、神経膠芽腫に対して通常使用される、ＤＮＡを損傷するアルキル化剤である。いくつかの実施形態において、抗新生物薬は、ＰＡＲＰ阻害剤であり、これは、ＤＮＡ損傷の塩基除去修復の工程を阻害する。いくつかの実施形態において、抗新生物薬は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤で

あり、これは、転写レベルでＤＮＡ修復を抑制し、クロマチン構造を破壊する。いくつかの実施形態において、抗新生物薬は、プロテアソーム阻害剤であり、これは、細胞におけるユビキチン代謝の破壊によってＤＮＡ修復を抑制する。ユビキチンは、ＤＮＡ修復を制御するシグナル伝達分子である。いくつかの実施形態において、抗新生物薬は、キナーゼ阻害剤であり、これは、ＤＮＡ損傷応答シグナル伝達経路を変化させることによってＤＮＡ修復を抑制する。

【０１６２】

他の実施形態において、抗新生物薬は、癌細胞における異なる活性を標的化することによって上記抗原結合分子を補完する。これらの実施形態において、抗新生物薬は、ＤＮＡ修復を阻害しないか、またはＤＮＡを損傷しない。

【０１６３】

開示される抗原結合分子と併用され得る抗新生物薬の例としては、アルキル化剤（例えば、テモゾロマイド、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、ダカルバジン、ロムスチン、カルムスチン、プロカルバジン、クロラムブシルおよびイホスファミド）、代謝拮抗物質（例えば、フルオロウラシル、ゲムシタビン、メトトレキサート、シトシンアラビノシド、フルダラビンおよびフロクスウリジン）、いくつかの抗有糸分裂薬、およびビンカアルカロイド、例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビンおよびビンデシン）、アントラサイクリン（ドキソルビシン、ダウノルビシン、バルルビシン、イダルビシンおよびエピルビシン、ならびにアクチノマイシン、例えば、アクチノマイシンＤを含む）、細胞傷害性抗生物質（マイトマイシン、プリカマイシンおよびブレオマイシンを含む）、ならびにトポイソメラーゼ阻害剤（カンプトテシン、例えば、イリノテカンおよびトポテカン、ならびにエピポドフィロトキシンの誘導体、例えば、アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシドおよびテニポシドを含む）が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１６４】

他の実施形態において、化学療法の用量は、開示される抗原結合分子と組み合わせて投与されるとき、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％またはそれを超えて減少され得る。

【実施例】

【０１６５】

実施例１：ｊｓｃＦｖは細胞核に浸透する

材料および方法

省略形

ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、３Ｅ１０の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、その重鎖の３１位のアスパラギン酸がアスパラギンに変異している、一本鎖可変フラグメントである（図１Ａ）。

ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）についてのアミノ酸配列は、以下である。

【化４】

3E10scFv(D31N)の注釈つきアミノ酸配列

```
1         10         20         30         40         50
AGIHDIVLTQSPASLAVSLGQRTISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQP
          60         70         80         90
100
PKLLIKYASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRE
          110        120        130        140
150
FPWTFGGGTKLEIKRADAAPGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPG
          160        170        180        190
200
GSRKLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVK
          210        220        230        240
250
GRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARRGLLLDYWGQGTTLTVS
          260        270
SLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH
```

(配列番号 :25)

【０１６６】

配列番号２５に関連するｓｃＦｖタンパク質ドメインの注釈

・ＡＧＩＨ配列は溶解度を高める（配列番号２５のアミノ酸１～４）
・Ｖｋ可変領域（配列番号２５のアミノ酸５～１１４）
・軽鎖ＣＨ１の最初の（６ａａ）（配列番号２５のアミノ酸１１５～１２０）
・（ＧＧＧＧＳ）３リンカー（配列番号２５のアミノ酸１２１～１３５）
・ＶＨ可変領域（配列番号２５のアミノ酸１３６～２５１）
・Ｍｙｃタグ（配列番号２５のアミノ酸２５２～２６７）
・Ｈｉｓ６タグ（配列番号２５のアミノ酸２６８～２７３）

【０１６７】

３Ｅ１０ジｓｃＦｖ（Ｄ３１Ｎ）のアミノ酸配列

ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、３Ｅ１０の２×重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、その重鎖の３１位のアスパラギン酸がアスパラギンに変異している、ジ一本鎖可変フラグメントである（図１Ｂ）。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）についてのアミノ酸配列は、以下である。

【化５】

```
1         10         20         30         40         50
AGIHDIVLTQSPASLAVSLGQRTISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQP
          60         70         80         90
100
PKLLIKYASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRE
          110        120        130        140
150
FPWTFGGGTKLEIKRADAAPGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPG
          160        170        180        190
200
GSRKLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVK
          210        220        230        240
250
GRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARRGLLLDYWGQGTTLTVS
          260        270        280        290
300
SASTKGPSVFPLAPLESSGSDIVLTQSPASLAVSLGQRTISCRASKSVST
          310        320        330        340
350
SSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHP
          360        370        380        390
400
VEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIKRADAAPGGGGSGGGGSGGGG
          410        420        430        440
450
SEVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVA
          460        470        480        490
500
YISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARR
          510        520        530
GLLLDYWGQGTTLTVSSLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH
```

(配列番号 :26)

【０１６８】

配列番号２６に関連するジｓｃＦｖタンパク質ドメインの注釈

・ＡＧＩＨ配列は溶解度を高める（配列番号２６のアミノ酸１～４）
・Ｖｋ可変領域（アミノ酸５～１１４）
・軽鎖ＣＨ１の最初の（６ａａ）（配列番号２６のアミノ酸１１５～１２０）
・（ＧＧＧＧＳ）３リンカー（配列番号２６のアミノ酸１２１～１３５）
・ＶＨ可変領域（配列番号２６のアミノ酸１３６～２５１）
・ヒトＩｇＧ　ＣＨ１の最初の１３アミノ酸からなる、Ｆｖフラグメントの間のリンカー（配列番号２６のアミノ酸２５２～２６４）
・スイベル配列（配列番号２６のアミノ酸２６５～２７０）
・Ｖｋ可変領域（配列番号２６のアミノ酸２７１～３８０）

・軽鎖ＣＨ１の最初の（６ａａ）（配列番号２６のアミノ酸３８１～３８６）
・（ＧＧＧＧＳ）３リンカー（配列番号２６のアミノ酸３８７～４０１）
・ＶＨ可変領域（配列番号２６のアミノ酸４０２～５１７）
・Ｍｙｃタグ（配列番号２６のアミノ酸５１８～５３３）
・Ｈｉｓ６タグ（配列番号２６のアミノ酸５３４～５３９）

【０１６９】

トリｓｃＦｖについてのアミノ酸配列

トリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、３１０Ｅの３×重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、その重鎖の３１位のアスパラギン酸がアスパラギンに変異している、トリ一本鎖可変フラグメントである（図８）。トリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）についてのアミノ酸配列は、以下である。

【化６】

```
1         10         20         30         40         50
AGIHDIVLTQSPASLAVSLGQRTISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQP
          60         70         80         90
100
PKLLIKYASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRE
          110        120        130        140
150
FPWTFGGGTKLEIKRADAAPGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPG
```

【化７】

```
         160        170        180        190
200
GSRKLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVK
         210        220        230        240
250
GRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARRGLLLDYWGQGTTLTVS
         260        270        280        290
300
SASTKGPSVFPLAPLESSGSDIVLTQSPASLAVSLGQRTISCRASKSVST
         310        320        330        340
350
SSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHP
         360        370        380        390
400
VEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIKRADAAPGGGGSGGGGSGGGG
         410        420        430        440
450
SEVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVA
         460        470        480        490
500
YISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARR
         510        520        530        540
550
GLLLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPLESSGSDIVLTQSPASLAVS
         560        570        580        590
600
LGQRTISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASYLESGVPAR
         610        620        630        640
650
FSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIKRADA
         660        670        680        690
700
APGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFSNYG
         710        720        730        740
750
MHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQM
```

【化８】

760 770 780 790
800
TSLRSEDTAMYYCARRGLLLDYWGQGTTLTVSSLEQKLISEEDLNSAVDH

HHHHH

(配列番号 :27)

【０１７０】

配列番号２７に関連するトリｓｃＦｖタンパク質ドメインの注釈
・ＡＧＩＨ配列は、溶解度を高める（配列番号２７のアミノ酸１～４）
・Ｖｋ可変領域（配列番号２７のアミノ酸５～１１４）
・軽鎖ＣＨ１の最初の（６ａａ）（配列番号２７のアミノ酸１１５～１２０）
・（ＧＧＧＧＳ）$_3$リンカー（配列番号２７のアミノ酸１２１～１３５）
・ＶＨ可変領域（配列番号２７のアミノ酸１３６～２５１）
・ヒトＩｇＧ ＣＨ１の最初の１３アミノ酸からなる、Ｆｖフラグメントの間のリンカー（配列番号２７のアミノ酸２５２～２６４）
・スイベル配列（配列番号２７のアミノ酸２６５～２７０）
・Ｖｋ可変領域（配列番号２７のアミノ酸２７１～３８０）
・軽鎖ＣＨ１の最初の（６ａａ）（配列番号２７のアミノ酸３８１～３８６）
・（ＧＧＧＧＳ）３リンカー（配列番号２７のアミノ酸３８７～４０１）
・ＶＨ可変領域（配列番号２７のアミノ酸４０２～５１７）
・ヒトＩｇＧ C_H１の最初の１３アミノ酸からなる、Ｆｖフラグメントの間のリンカー（配列番号２７のアミノ酸５１８～５３０）
・スイベル配列（配列番号２７のアミノ酸５３１～５３６）
・Ｖｋ可変領域（配列番号２７のアミノ酸５３７～６４６）
・軽鎖ＣＨ１の最初の（６ａａ）（配列番号２７のアミノ酸６４７～６５２）
・（ＧＧＧＧＳ）３リンカー（配列番号２７のアミノ酸６５３～６６７）
・ＶＨ可変領域（配列番号２７のアミノ酸６６８～７８３）
・Ｍｙｃタグ（配列番号２７のアミノ酸７８４～７９９）
・Ｈｉｓ６タグ（配列番号２７のアミノ酸８００～８０５）

【０１７１】

組換えタンパク質

ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）を、概して、先に記載されたように（Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１５７ｒａ１４２（２０１２））作製した。Ｄ３１Ｎ変異を有する３Ｅ１０ジ一本鎖可変フラグメントであるジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）を、２つの３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）ｓｃＦｖフラグメントの組換え融合によって作製した。Ｄ３１Ｎ変異を有する３Ｅ１０トリ一本鎖可変フラグメントであるトリｓｃＦｖを、３つの３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）ｓｃＦｖフラグメントの組換え融合によって作製した。介在性のリンカー配列を、以前に記載されたように（Ｗｅｉｓｂａｒｔら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，２５：１１１３－１１１８（２００４））、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）におけるｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）セグメントの間に配置した。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）をコードするｃＤＮＡを、ｐＰＩＣＺαＡ酵母発現ベクターにライゲーションした後、Ｘ－３３細胞にトランスフェクションした。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）を、以前に記載されたような手法を用いて（Ｈａｎｓｅｎら、 Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．，１０８８：１８７－１９６（２００６）；Ｈａｎｓｅｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２８２：２０７９０－２０７９３（２００７）；Ｚｈａｎら、Ｓｔｒｏｋｅ，４１：５３８－５４３（２０

１０））発現させ、Ｘ－３３上清から精製した。タンパク質濃度を、ＮａｎｏＤｒｏｐ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を用いるＵＶ分光測光法によって決定した。

【０１７２】

細胞株

ＢＲＣＡ２機能正常および欠損のＤＬＤ１結腸癌細胞の対応する同質遺伝子対は、Ｈｏｒｉｚｏｎ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｌｔｄ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＵＫ）から入手した。ＰＴＥＮ欠損Ｕ２５１細胞、誘導性ＰＴＥＮを有するＵ２５１（Ｕ２５１－ＰＴＥＮ）細胞およびＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１細胞は、Ｐｅｔｅｒ Ｇｌａｚｅｒから寄贈された。Ｈ１９７５細胞、ＨＣＴ１１６細胞およびＳＷ４８細胞は、Ｈｏｒｉｚｏｎ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｌｔｄから入手した。Ｕ２５１細胞株、およびテトラサイクリン誘導性ＰＴＥＮ発現ベクター系でトランスフェクトされたＵ２５１（Ｕ２５１－ＰＴＥＮ）細胞株を、１０％ＦＢＳ（ＦＢＳ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓａｉｎｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）が補充されたＤＭＥＭ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中で生育した。ＰＴＥＮの発現を、４００μｇ／ｍｌ Ｇ４１８および２μｇ／ｍｌブラストサイジン、１μｇ／ｍｌドキシサイクリンを加えることによって、Ｕ２５１－ＰＴＥＮにおいて誘導した。他のすべての細胞株は、１０％ウシ胎仔血清が補充されたＲＰＭＩ１６４０（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中で生育した。

【０１７３】

細胞透過アッセイ

９６ウェルプレートにおいて生育されたＤＬＤ１細胞を、コントロール緩衝液または５μＭ ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で３７℃において１時間処置した。次いで、細胞をＰＢＳで広範囲に洗浄し、冷１００％エタノールで５分間固定し、ＰＢＳで再度洗浄し、次いで、抗Ｍｙｃ抗体（クローン９Ｅ１０）で４℃において一晩プロービングした。次いで、細胞を洗浄し、Ａｌｅｘａ４８８結合体化ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体で４℃において１時間プロービングした（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）。次いで、細胞を洗浄し、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で室温において３０分間対比染色することにより、細胞核を可視化させた。次いで、上記抗体による核透過およびＰＩ染色を、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）および赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）フィルターを使用するＥＶＯＳ ｆｌデジタル蛍光顕微鏡（Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ Ｇｒｏｕｐ，Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ）を用いて画像化した（４０×倍率；Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）。ＧＦＰおよびＲＦＰの画像を、ＩｍａｇｅＪ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）を用いてマージした。

【０１７４】

統計

スチューデントの両側ｔ検定によってＰ値を決定した。

【０１７５】

結果

本明細書中でジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）と称される３Ｅ１０ジ一本鎖可変フラグメントを作製した（図１Ａおよび１Ｂ）。精製されたｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）をＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットによって比較した。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、６０ｋＤａという予想される分子量に移動し、ウエスタンブロットから、Ｃ末端のＭｙｃタグの存在が確認されたことから、このタンパク質が、完全長の形態で産生され、精製されたことが証明された。

【０１７６】

ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、細胞核に浸透する。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が細胞核に浸透する能力を保持していることを確かめるために、ＤＬＤ１結腸癌細胞を、コントロール緩衝液または５μＭ ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ

３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で１時間処置した。次いで、細胞を洗浄し、固定し、３Ｅ１０フラグメントにおけるｃ末端のＭｙｃタグについて免疫染色した。ＰＩ対比染色によって、核の場所の直接的な可視化を可能にした。蛍光顕微鏡法によって、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）とジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の両方がＰＩ染色と共局在化することが明らかになったことから、核局在化が実証された。

【０１７７】

実施例２：ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）はＢＲＣＡ２欠損癌細胞に対してｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）よりも高い合成致死の効果を有する

材料および方法

クローン原性生存（ｃｌｏｎｏｇｅｎｉｃ　ｓｕｒｖｉｖａｌ）アッセイ

コントロール培地、またはｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）を含む培地で処置された細胞の生存率を、以前に記載されたようなコロニー形成アッセイ（Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１５７ｒａ１４２（２０１２））によって決定した。

【０１７８】

結果

ＢＲＣＡ２機能正常および欠損のＤＬＤ１結腸癌細胞の同質遺伝子対（Ｈｕｃｌら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６８：５０２３－５０３０（２００８））に対するｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の効果を比較した。ＢＲＣＡ２欠損ＤＬＤ１細胞では、ＤＮＡ二本鎖切断の相同組換え修復（ｈｏｍｏｌｏｇｙ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｒｅｐａｉｒ）（ＨＤＲ）が損なわれており、このことによって、この細胞は、塩基除去修復（ＢＥＲ）またはＨＤＲの阻害剤、例えば、３Ｅ１０に対して感受性になる。細胞を、コントロール培地、または１０μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）を含む培地で処置し、コントロールと比べたときの生存率を、以前に記載されたようなコロニー形成アッセイ（Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１５７ｒａ１４２（２０１２））によって決定した。図２に示されているように、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、ＢＲＣＡ２機能正常細胞に対しては有意に毒性でなかったが（生存率０．９２±０．０５）、ＢＲＣＡ２欠損細胞の生存率を０．７１±０．０６に低下させた（ｐ＝０．００６）。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）も同様に、ＢＲＣＡ２機能正常細胞に対しては毒性でなかったが（生存率０．９９±０．０６）、ＢＲＣＡ２欠損細胞に対してｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）よりもなお大きな影響を及ぼした（生存率０．２９±０．０９，ｐ＝０．００７）。

【０１７９】

ＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１ヒト膵癌細胞に対するｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の影響も評価した。ＣＡＰＡＮ－１細胞を、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）（０～６．６μＭ）で処置し、以前に記載されたようなコロニー形成アッセイによって生存率を決定した。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は再度、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）よりも上記細胞に対して有意に毒性であると観察され、用量依存効果が観察された（図３）。例えば、０．８μＭもの低い用量において、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）での０．９９±０．１３と比較して、上記細胞の生存率を０．５１±０．０４に低下させた（ｐ＝０．０５）。６．６μＭにおいて、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による０．２０±０．０４と比較して、上記細胞の生存率を０．０５±０．０２に低下させた（ｐ＝０．０３）。ＤＬＤ１細胞と比べて、ＣＡＰＡＮ－１細胞がよりｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）に対して感受性が高かったことは、ＣＡＰＡＮ－１細胞がＰＡＲＰ阻害剤に特に感受性であるという以前の報告（ＭｃＣａｂｅら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　＆　Ｔｈｅｒａｐｙ，４：９３４－９３６（２００５））と一致する。

【０１８０】
実施例３：ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）はインビボにおける皮下ＣＡＰＡＮ－１異種移植片の成長を抑制する
材料および方法
ＣＡＰＡＮ－１腫瘍モデル
５～６週齢の無胸腺（ＮＣｒ　ｎｕ／ｎｕ）雄マウスの右側腹部に、５×１０^{6}個のＣＡＰＡＮ－１細胞を皮下注射することによって、ＣＡＰＡＮ－１腫瘍を確立した。１６匹のマウスに腫瘍細胞を注射し、それらのマウスのうちの１５匹において、成長が一貫した腫瘍が首尾良く確立された。１匹のマウスの腫瘍が、早期に成長の停止を示したことから、解析から除外した。腫瘍が約１００ｍｍ^{3}の体積に達したら、マウスを、３週間にわたって毎週（例えば、０、７、１４日目）、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）（４０ｍｇ／ｋｇ）（ｎ＝８）または等体積のコントロールＰＢＳ（ｎ＝７）の腹腔内注射で処置した。この実験中、腫瘍の体積およびマウスの体重を追跡し、実験の完了時（２８日目）に、マウスを屠殺し、腫瘍を切除して質量を記録した。
【０１８１】
結果
完全な３Ｅ１０抗体は、以前に、インビボにおいてヒト神経膠腫異種移植片を電離放射線に対して感作すると示されたが、これまで、インビボにおいてＤＮＡ修復欠損腫瘍に対する３Ｅ１０またはそのフラグメントの効果は試験されてこなかった。ＣＡＰＡＮ－１皮下異種移植片を免疫不全マウスにおいて作製し、腫瘍が約１００ｍｍ^{3}のサイズに達したら、マウスを、コントロール緩衝液またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）（４０ｍｇ／ｋｇ）の毎週の腹腔内注射で３回処置した。腫瘍の体積を追跡し、質量を実験の終わりに記録した。
【０１８２】
結果は、腫瘍の体積および質量の減少によって証明されるように、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、腫瘍の成長を有意に抑制したことを示している（図４Ａおよび４Ｂ）。例えば、実験の中間点（１回目の処置の２週間後）において、コントロール緩衝液で処置されたマウスの平均腫瘍体積は、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置されたマウスにおける２７７±２９ｍｍ３に対して、４７６±５４ｍｍ^{3}であった（ｐ＝０．００５）。実験の終わり（１回目の処置の４週間後）において、コントロール緩衝液で処置されたマウスの平均腫瘍体積は、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置されたマウスにおける６０６±５７ｍｍ^{3}に対して、１１０２±２３５ｍｍ^{3}であった（ｐ＝０．０５）（図４Ａ）。コントロール緩衝液で処置されたマウスの実験の終わりにおける平均腫瘍質量は、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置されたマウスにおける０．３３±０．０３ｇに対して、０．７３±０．２ｇであった（ｐ＝０．０３）（図４Ｂ）。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、観察可能な毒性無しに、マウスによって十分許容された。平均体重は、コントロール緩衝液またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置されたマウスの間で区別がつかなかった（図５）。これは、インビボにおけるＤＮＡ修復欠損腫瘍に対するループス自己抗体フラグメントの直接的な毒性作用の最初の実証であると考えられる。
【０１８３】
実施例４：トリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）はＤＮＡ修復欠損癌細胞に対してジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）よりも強力な影響を及ぼす
３つのＤＮＡ結合部位を有するトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）をデザインし、作製し、ＤＮＡ修復欠損癌細胞に対する効果について試験した（図６）。上で論じられたようなｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）と同様に、トリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）をＸ－３３において発現させ、上清から精製した。精製されたトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の全タンパク質の染色から、９０ｋＤａという予想される分子量のタンパク質の単離が証明され、そのＣ末端のＭｙｃタグに対するウエスタンブロッティングから、完全長トリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の産生および精製が確かめられた。

【０１８４】
細胞に対して試験されたとき、トリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、蛍光顕微鏡法によって、細胞核に浸透する能力を保持していると確かめられた。ＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１細胞に対するトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の影響も比較した。細胞を、コントロール培地、または低用量（１μＭ）の３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）を含む培地で処置した。この低用量では、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）はなおもそれらの細胞に対して有意な影響を及ぼし、生存率が、０．５１±０．０２に低下した（コントロールに対してｐ＝０．００１）。これらのデータは、トリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が生存率を０．１２±０．０５に低下させたので（コントロールに対してｐ＜０．０００１および３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）に対してｐ＝０．００２）（図７）、トリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）がジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ））よりも有意に強力であるという結論を裏付ける。

【０１８５】
実施例５：ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、ＰＴＥＮ欠損細胞において検出可能なレベルのＤＮＡ　ＤＳＢの蓄積を引き起こす

材料および方法

γＨ２ＡＸおよびホスホ－５３ＢＰ１フォーカス

Ｕ２５１、Ｕ２５１－ＰＴＥＮおよびＣＡＰＡＮ－１細胞を、３７℃において一晩、カバーガラスに接着させた後、コントロール緩衝液またはｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置した。次いで、細胞を３７℃で４または２４時間インキュベートし、次いでＰＢＳで洗浄した後、ＰＢＳ中の４％ホルムアルデヒドで４℃において１５分間固定した。次に細胞を再度洗浄し、次いで、０．３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含むＰＢＳで希釈された５％ヤギ血清で４℃において６０分間ブロッキングした。次いで、細胞を、抗γＨ２ＡＸまたは抗ホスホ－５３ＢＰ１（Ｓｅｒ１７７８）（Ｃｅｌｌ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）抗体とともに４℃において一晩インキュベートした。続いて、細胞を洗浄し、Ａｌｅｘａ５５５結合体化ヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で４℃において６０分間プロービングした。次に、細胞をＰＢＳで洗浄し、核対比染色のためのＤＡＰＩを含むＰｒｏＬｏｎｇ　Ｇｏｌｄ　Ａｎｔｉｆａｄｅ試薬（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）とともに顕微鏡用スライド上にマウントした。スライドを暗所において２４時間硬化させた後、Ａｘｉｏｖｅｒｔ２００顕微鏡（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　ＭｉｃｒｏＩｍａｇｉｎｇ，Ｉｎｃ．）を用いて画像化した。細胞１つあたりのフォーカスの平均数を、１条件あたり少なくとも１００個の細胞におけるカウントから決定した。

【０１８６】
結果

ＰＴＥＮ欠損は、数多くの悪性疾患と関連し、ＤＮＡ　ＤＳＢのＨＤＲを乱すとみられるため、ＰＡＲＰ阻害剤などの作用物質によるＤＮＡ修復のさらなる阻害に対する細胞感受性を付与する（Ｐｕｃら、Ｃｅｌｌ　ｃｙｃｌｅ，４：９２７－９（２００５），Ｂａｓｓｉら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，３４１：３９５－９（２０１３），ＭｃＥｌｌｉｎら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，７０：５４５７－６４（２０１０））。ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、以前に、照射された細胞の核にγＨ２ＡＸフォーカス（ＤＮＡ　ＤＳＢのマーカー）が残存していることによって明示されたように、照射されたＰＴＥＮ欠損Ｕ２５１細胞におけるＤＮＡ　ＤＳＢの回復を遅延させると示された。しかしながら、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、照射されていないＵ２５１細胞では、γＨ２ＡＸフォーカスの数に対して観察可能な影響を及ぼさない（Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１５７ｒａ４２（２０１２））。

【０１８７】
ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、ＩＲの非存在下でさえもＰＴＥＮ欠損細胞において検出可能なレベルのＤＮＡ　ＤＳＢの蓄積をもたらすのに十分な効果をＤＮＡ修復に対

して有するか否かを決定するように実験をデザインした。Ｕ２５１細胞を、コントロール培地または２５γＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で４または２４時間処置し、次いで、γＨ２ＡＸフォーカスを免疫蛍光法によって可視化した。ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、処置の４または２４時間後に、γＨ２ＡＸフォーカスのいかなる増加ももたらさず、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置された細胞における細胞１つあたり１１．７±１．２および８．８±０．８個の平均フォーカスに対して、４および２４時間後におけるコントロール細胞では、それぞれ細胞１つあたり１１．７±１．３および１１．２±１．０個の平均フォーカスであった。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）も同様に、曝露の４時間後に、細胞１つあたりの平均フォーカスを有意に増加させなかった（細胞１つあたり１３．８±１．５個の平均フォーカス，ｐ＝０．２７）。しかしながら、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）への２４時間の曝露によって、細胞１つあたりのフォーカスの平均数が２５．１±１．２個まで有意に増加した（ｐ＜０．０００１）（図８Ａ）。これらのデータは、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、細胞核に浸透した後、直ちにＤＮＡ損傷を誘導しないが、その代わりに、より長い期間にわたってＤＮＡ修復を阻害し、ＤＮＡ　ＤＳＢの蓄積を引き起こすことを示唆しており、これは、３Ｅ１０がＤＮＡ修復を阻害し得る機構と一致する（Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１５７ｒａ４２（２０１２））。

【０１８８】

ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、インタクトなＨＤＲを有する細胞においても同様にＤＮＡ　ＤＳＢの蓄積を引き起こすかどうかを決定するために、ＰＴＥＮの機能が回復している同質遺伝子Ｕ２５１細胞株（Ｕ２５１－ＰＴＥＮ）（Ｃｌｅａｖｅｒら、Ｃｅｌｌ　ｃｙｃｌｅ，１０：３２２３－４（２０１１），Ｌｅｖｉｔｔら、Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ．，３３６：１０５６－６１（２００５））において、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）を試験した。Ｕ２５１－ＰＴＥＮ細胞を２５γＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で２４時間処置し、次いで、上に記載したようにγＨ２ＡＸフォーカスを調べた。図８Ｂに示されているように、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）とジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の両方ともが、Ｕ２５１－ＰＴＥＮ細胞において、γＨ２ＡＸフォーカスのいかなる有意な増加も引き起こさなかった（コントロール細胞における細胞１つあたりの１１．２±１．１個の平均フォーカスに対して、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）でそれぞれ処置された細胞における１３．７±１．２および１１．７±１．２個）。これらのデータは、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）によるＤＮＡ修復の阻害が、インタクトなＨＤＲを有する細胞においてＤＮＡ　ＤＳＢの蓄積を引き起こすのに十分でないことを示唆している。

【０１８９】

ｐ５３結合タンパク質１（５３ＢＰ１）は、ＤＮＡ損傷に応答してリン酸化され、ＤＮＡ　ＤＳＢの部位に動員されるものであり、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）がＰＴＥＮ欠損細胞においてＤＮＡ　ＤＳＢを増加させるがＰＴＥＮ機能正常細胞では増加させないことを確かめるためのさらなる試験として、Ｕ２５１およびＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞におけるホスホ－５３ＢＰ１フォーカスに対するジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の効果を評価した。対応する対の細胞を、コントロール培地または２０μＭジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で２４時間処置し、次いで、ホスホ－５３ＢＰ１フォーカスを免疫蛍光法によって可視化した。γＨ２ＡＸアッセイにおいて得られた結果と一致して、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、コントロール細胞における２．７±０．３に対して、Ｕ２５１細胞においてホスホ－５３ＢＰ１フォーカスの平均数を６．６±０．６にまで有意に増加させたが（ｐ＜０．０００１）、Ｕ２５１－ＰＴＥＮ細胞ではフォーカスの数を増加させなかった（コントロール細胞における１．５±０．４個のフォーカスおよびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置された細胞における１．５±０．３個のフォーカス，ｐ＝０．２）（図８Ｃ）。

【０１９０】

実施例６：ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）はＰＴＥＮ欠損ヒト神経膠腫細胞にとって合成致死である

修復されないＤＮＡ　ＤＳＢは、細胞傷害性であり、Ｕ２５１およびＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞におけるＤＮＡ　ＤＳＢの蓄積に対するｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の差次的効果に基づいて、ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）への長期の曝露が、ＰＴＥＮ欠損Ｕ２５１細胞にとっては毒性であるがＵ２５１－ＰＴＥＮ細胞にとっては毒性でないことを決定する実験をデザインした。細胞をコントロール培地または３．３μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置し、生存率をコロニー形成アッセイによって決定した。ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、ＰＴＥＮ欠損または機能正常細胞にとって有意に毒性でなく、それぞれ１．０３±０．１１（ｐ＝０．８１）および１．０４±０．０４（ｐ＝０．５５）の生存率であった。対照的に、ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、ＰＴＥＮ欠損Ｕ２５１細胞にとって高度に毒性であり、生存率が０．０６±０．０３に低下した（ｐ＜０．０００１）。しかしながら、Ｕ２５１－ＰＴＥＮ細胞は、ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）に抵抗性であり、生存率は、１．００±０．０３であった（ｐ＝０．９８）（図８Ｄ）。まとめると、ＰＴＥＮ欠損Ｕ２５１細胞におけるＤＮＡ　ＤＳＢの蓄積およびＰＴＥＮ欠損Ｕ２５１細胞の生存に対するｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）のより大きな影響は、ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）と比べてＤＮＡ修復およびＨＤＲ欠損細胞に対してより強力な影響を及ぼすという結論、およびｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、ＨＤＲ欠損癌細胞に対する標的化治療として見込みがあるという結論を裏付ける。

【０１９１】

実施例７：ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、ＢＲＣＡ２欠損癌細胞においてＤＮＡ　ＤＳＢの蓄積を引き起こし、ＢＲＣＡ２欠損癌細胞にとって合成致死である

上に記載されたように、ＰＴＥＮ欠損は、ＤＮＡ　ＤＳＢの不完全なＨＤＲに関連する。ＨＤＲも同様に、ＢＲＣＡ２に欠陥を有する癌細胞において乱されており、ＢＲＣＡ２欠損癌細胞は、塩基除去修復（ＢＥＲ）またはＨＤＲの阻害剤、例えば、３Ｅ１０に感受性である（Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１５７ｒａ４２（２０１２），Ｈｕｃｌら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６８：５０２３－３０（２００８），ＭｃＣａｂｅら、Ｃａｎｃｅｒ　ｂｉｏｌｏｇｙ　＆　ｔｈｅｒａｐｙ，４：９３４－６（２００５））。ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、ＢＲＣＡ２欠損細胞において、ＰＴＥＮ欠損Ｕ２５１細胞に対する効果と同様のＤＮＡ　ＤＳＢの蓄積を引き起こすかどうかを決定するように実験をデザインした。γＨ２ＡＸフォーカス形成に対するｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の影響をＢＲＣＡ２欠損ＣＡＰＡＮ－１ヒト膵癌細胞において評価した。ＣＡＰＡＮ－１細胞をコントロール緩衝液または２５μＭｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で２４時間処置し、次いで、γＨ２ＡＸフォーカスを免疫蛍光法によって評価した。

【０１９２】

ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、フォーカスの数を増加させた（コントロール細胞における９．３±１．８個のフォーカスに対して、ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置された細胞において１４．９±２．０個のフォーカス；ｐ＝０．０４）（図９Ａ）ことから、ＰＴＥＮ欠損Ｕ２５１細胞において観察された効果と同様のＤＮＡ　ＤＳＢの蓄積が示唆される。次に、ＣＡＰＡＮ－１細胞のクローン原性生存に対するｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の影響を比較した。ＣＡＰＡＮ－１細胞をｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）（０～６．６μＭ）で処置し、生存率を以前に記載されたようなコロニー形成アッセイによって決定した。ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）よりも有意にそれらの細胞に対して毒性であった（図９Ｂ）。例えば、０．８μＭもの低い用量において、ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、上記細胞の生存率を、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）のときの０．９９±０．１３に対して、０．５１±０．０４に低下させた（ｐ＝０．０５）。６．６μＭにおいて、ｊｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、上記細胞の生存率

を、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）による０．２０±０．０４に対して、０．０５±０．０２に低下させた（ｐ＝０．０３）。

【０１９３】

ＨＤＲ欠損細胞に対するジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の作用の選択性をさらに探索するために、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）をさらなる細胞株において試験した。ＢＲＣＡ２機能正常および欠損のＤＬＤ１結腸癌細胞の同質遺伝子対（Ｈｕｃｌら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６８：５０２３－３０（２００８））をコントロール培地または１０μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）またはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）で処置し、コントロールと比較したときの生存率をコロニー形成アッセイによって決定した。図９Ｃに示されているように、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、ＢＲＣＡ２機能正常細胞に対して有意に毒性でなかった（生存率０．９２±０．０５，ｐ＝０．１）が、ＢＲＣＡ２欠損細胞の生存率を０．７１±０．０６に低下させた（ｐ＝０．００６）。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）も同様に、ＢＲＣＡ２機能正常細胞に対して毒性でなく（生存率０．９９±０．０６，ｐ＝０．６）、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）と比べて、ＢＲＣＡ２欠損細胞に対してかなり大きな影響を及ぼした（生存率０．２９±０．０９，ｐ＝０．００７）。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が単に普遍的に細胞傷害性ではないことをさらに確かめるために、ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）およびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）をさらなる細胞パネルに対しても試験した。Ｈ１９７５細胞（インタクトなＤＮＡ修復）、ＳＷ４８細胞（ＭＬＨ１欠損に起因して不完全なミスマッチ修復）およびＨＣＴ１１６細胞（ＭＬＨ１欠損に起因して不完全なミスマッチ修復）を、コントロール培地、または３．３μＭ　ｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）もしくはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）を含む培地で処置し、生存率をコロニー形成アッセイによって決定した。どちらのフラグメントも、これらの細胞株のいずれに対しても有意に毒性でなかった（図９Ｄ）。これらのデータは、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、ＨＤＲに欠陥を有する細胞に対して選択的に毒性であり、インタクトなＤＮＡ修復を有する細胞に対してまたはミスマッチ修復に欠陥を有する細胞に対してさえ毒性でないことを実証している。

【０１９４】

３Ｅ１０は、ほぼすべての細胞において発現される受動拡散型ヌクレオシドトランスポーター（ＥＮＴ２）を通じて細胞に浸透し（Ｈａｎｓｅｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２８２：２０７９０－２０７９３（２００７））、いったん核の内側に入ると、３Ｅ１０は、ＢＥＲおよびＨＤＲを不完全に阻害すると見られ、このことは、正常細胞に対しては毒性でないが、ＢＲＣＡ２欠損に起因してＤＮＡ修復に既存の欠陥を有する細胞にとって合成致死である（Ｈａｎｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，４：１５７ｒａ１４２（２０１２））。ゆえに、ＤＮＡ修復欠損癌細胞に対する３Ｅ１０の標的化された効果は、癌細胞への３Ｅ１０の選択的な透過に起因せず、むしろ、３Ｅ１０によるＤＮＡ修復のさらなる阻害に対するＤＮＡ修復欠損癌細胞の選択的な感受性に起因する。これは、ある特定の癌細胞の表面上に過剰発現される抗原（例えば、ＥＧＦＲ）を認識して結合することによって癌細胞を標的化する非透過性抗体とは明らかに異なる（Ｓｃｏｔｔら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｃａｎｃｅｒ，１２：２７８－２８７（２０１２））。

【０１９５】

３Ｅ１０と非透過性抗体とのさらなる区別は、それぞれの腫瘍毒性の方法にある。３Ｅ１０は、ＤＮＡに結合してＤＮＡ修復を阻害し、これが、ＤＮＡ修復欠損細胞にとって合成致死である。この機能は、いずれの３Ｅ１０定常領域とも無関係である。対照的に、細胞外レセプターを標的化するセツキシマブなどの非透過性抗体は、腫瘍に対して影響を及ぼすために、ＡＤＣＣおよび補体のＦｃ媒介性活性化に部分的に依存する（Ｋｅｌｌｎｅｒら、Ｍｅｔｈｏｄｓ，６５：１０５－１１３（２０１４））。ゆえに、非透過性抗体からＦｃを排除すると、腫瘍に対するそれらの効果の規模は小さくなり得るが、３Ｅ１０が癌細胞に対して影響を及ぼすためにＦｃは必要ない。Ｆｃ領域を欠く３Ｅ１０フラグメントは、ＡＤＣＣおよび補体を活性化できないはずであり、ゆえに、非特異的副作用のリス

クがより低い。

【０１９６】

上に記載されたように、ｓｃＦｖ３Ｅ１０は、比較的高用量でもＢＲＣＡ２欠損癌細胞に対してわずかな効果しか示さないと以前に示された。本明細書中に開示されるデータは、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、ＢＲＣＡ２機能正常細胞に対しては無毒性でありつつ、ＢＲＣＡ２欠損癌細胞に対して有意により強力な効果を有することを示している。これは、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、インビボにおいてＢＲＣＡ２欠損腫瘍の成長を抑制し、ＰＴＥＮ欠損癌細胞もジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）に対して高度に感受性であるという最初のデータであると考えられる。ＰＴＥＮは、染色体の完全性の維持に関連し、いくつかのＰＴＥＮ欠損癌細胞は、遺伝子毒性ストレスに対して高度に感受性である。ゆえに、ＢＲＣＡ２欠損細胞およびＰＴＥＮ欠損細胞に対してはジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）の毒性が観察されたが、インタクトなＤＮＡ修復を有する細胞またはさらにはＭＬＨ１欠損に起因してミスマッチ修復が欠損した細胞に対してはその毒性が観察されなかったことは、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）がＤＮＡ鎖切断修復を阻害することによって作用するという結論と一致する。ＰＴＥＮは、乳癌、前立腺癌、神経膠腫、メラノーマおよび肺癌をはじめとした複数の癌において不活性化されることが多く（Ｂａｓｓｉら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，３４１：３９５－３９９（２０１３），Ｋａｎｅら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５７：８０８－８１１（１９９７），Ｖｌｉｅｔｓｔｒａら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５８：２７２０－２７２３（１９９８），Ｓｔｅｃｋら、Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．，１５：３５６－３６２（１９９７），Ｌｉら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２７５：１９４３－１９４７（１９９７））、ＰＴＥＮ欠損癌細胞がジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）に対して感受性であるという知見は、３Ｅ１０に基づく治療に感受性であり得る悪性疾患の数を有意に増加させる。ゆえに、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、ＢＲＣＡ２欠損悪性疾患またはＰＴＥＮ欠損悪性疾患に対する有望な標的化治療であると考えられる。

【０１９７】

より大きな分子量の上記分子およびその２つのＤＮＡ結合部位の結果は、ＤＮＡ修復の阻害の効率を高めると考えられる。より大きなサイズのジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、ＤＮＡ修復因子のより大きな立体障害に寄与し得、その二価の構造は、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、ＢＲＣＡ２欠損細胞およびＰＴＥＮ欠損細胞に対して高度に毒性であるＤＮＡ架橋を形成するのを可能にし得る。このことと一致して、上記データは、３つのＤＮＡ結合部位およびジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）よりも大きな分子量を有するトリｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）が、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）よりもＤＮＡ修復欠損細胞に対してさらに大きな効果を有することも示している。ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、６０ｋＤａの分子量を有するので、インビボにおいてその腎濾過を最小限にするのに十分大きく、ジｓｃＦｖ３Ｅ１０（Ｄ３１Ｎ）は、血管透過性・滞留性亢進（ｅｎｈａｎｃｅｄ ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｔｙ ａｎｄ ｒｅｔｅｎｔｉｏｎ）（ＥＰＲ）現象に部分的に起因して腫瘍組織に蓄積することが予想される（Ｊａｎｇら、Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．，２０：１３３７－１３５０（２００３），Ｍａｅｄａら、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ：Ｏｆｆｉｃｉａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ，６５：２７１－２８４（２０００））。

【図１】

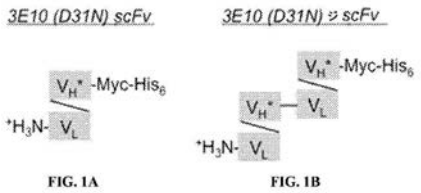


FIG. 1A FIG. 1B

【図２】

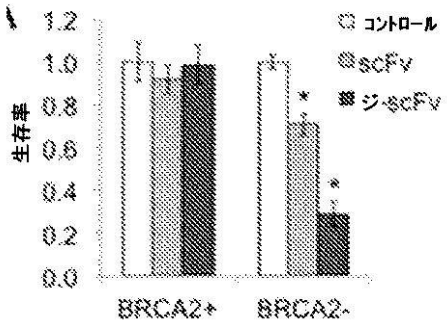


FIG. 2

【図３】

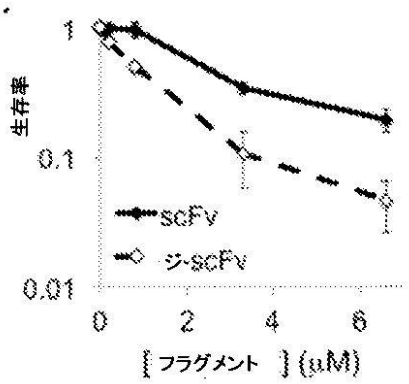


FIG. 3

【図４】

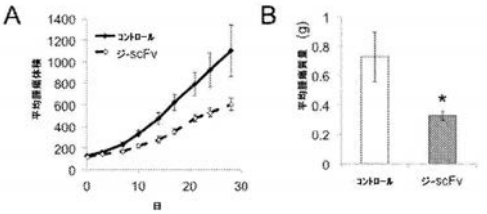


FIG. 4A FIG. 4B

【図５】

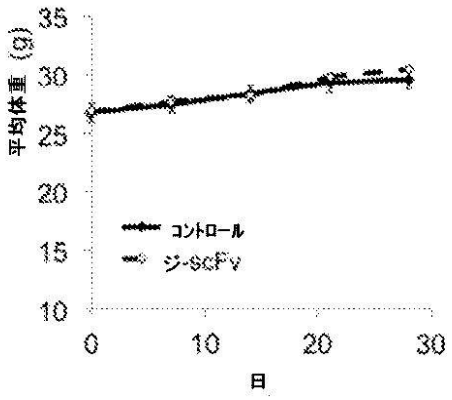


FIG. 5

【図６】

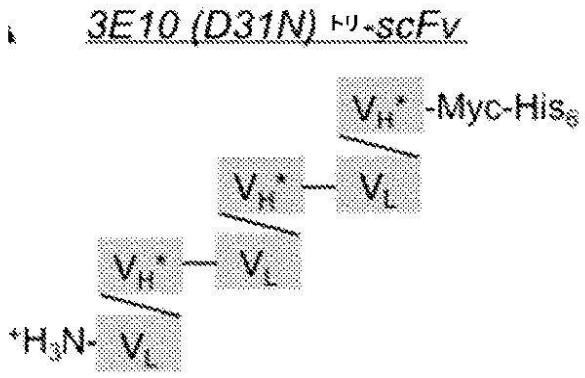


FIG. 6

【図７】

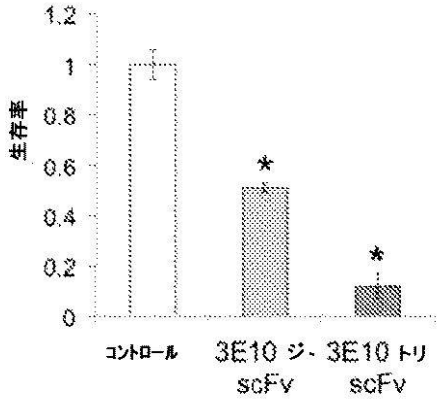


FIG. 7

【図８Ａ】

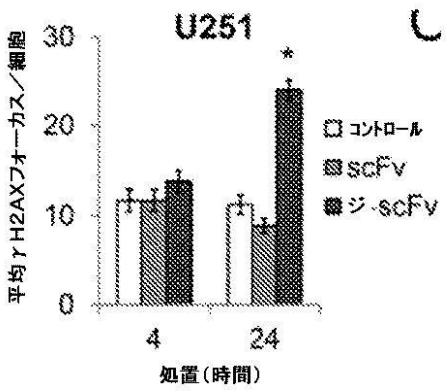


FIG. 8A

【図８Ｂ】

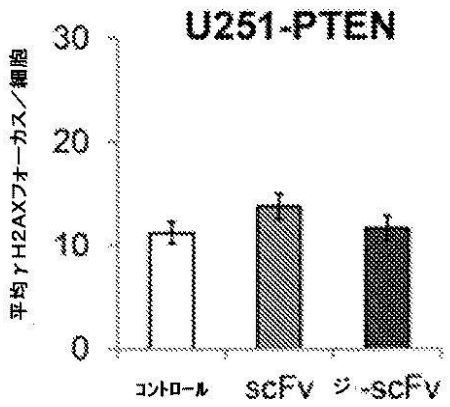


FIG. 8B

【図８Ｃ】

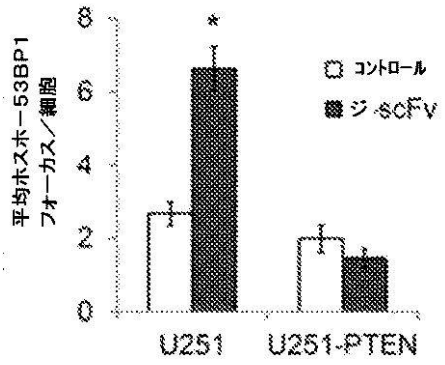


FIG. 8C

【図８Ｄ】

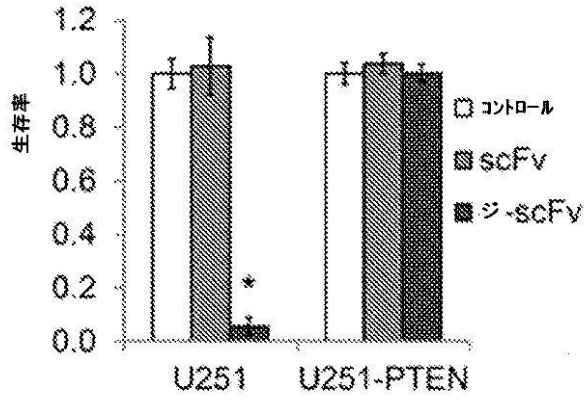


FIG. 8D

【図９Ａ】

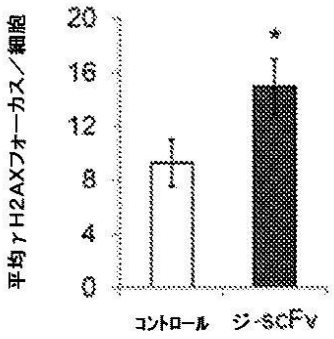


FIG. 9A

【図９Ｂ】

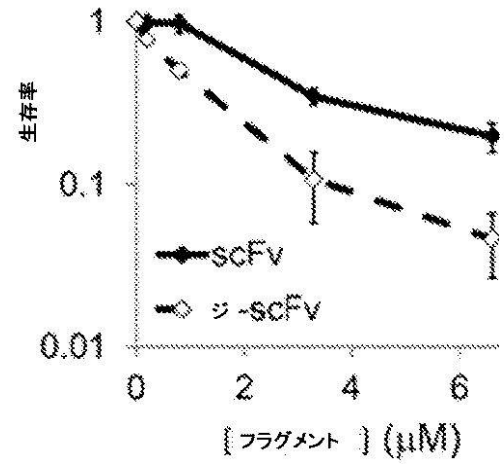


FIG. 9B

【図９Ｃ】

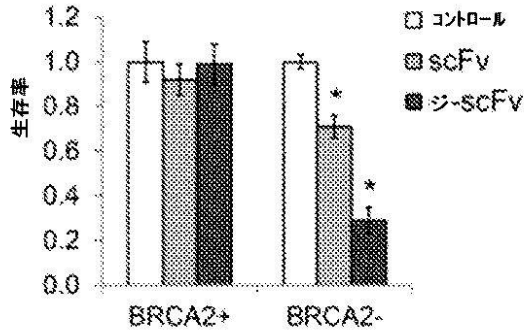


FIG. 9C

【図９Ｄ】

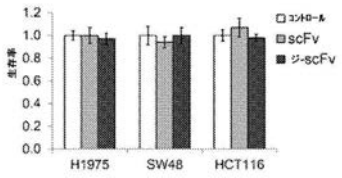


FIG. 9D

【配列表】
2017534571000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/047174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/44 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/135831 A1 (UNIV YALE [US]; HANSEN JAMES E [US]; GLAZER PETER M [US]; WEISBART RIC) 4 October 2012 (2012-10-04)	1-19, 23-57
A	page 16, line 26 - page 17, line 3; claims; examples page 18, line 13 - page 28, line 9 -----	20-22
X	WO 2012/145125 A1 (4S3 BIOSCIENCE INC [US]; ARMSTRONG DUSTIN D [US]) 26 October 2012 (2012-10-26) page 8, line 16 - line 28; claims; examples; sequences 1,2,4-9 page 33, line 32 - page 34, line 23 ----- -/--	1-19, 23-27, 40,42, 45-47

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 November 2015	16/11/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Loubradou, Gabriel

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/047174

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/047174

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CUESTA A M ET AL: "Multivalent antibodies: when design surpasses evolution", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 28, no. 7, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 355-362, XP027102411, ISSN: 0167-7799 [retrieved on 2010-05-04] page 358, Box 1; page 358, left-hand column, paragraph 2; figures 1,2	1-57
A	JAIN ET AL: "Engineering antibodies for clinical applications", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 25, no. 7, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 307-316, XP022116341, ISSN: 0167-7799 figure 1	1-57
A	DEYEV SERGEY M ET AL: "Multivalency: the hallmark of antibodies used for optimization of tumor targeting by design", BIOESSAYS, CAMBRIDGE; GB, vol. 30, no. 9, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 904-918, XP002663706, ISSN: 0265-9247, DOI: 10.1002/BIES.20805 figure 3	1-57
A	ZACK D J ET AL: "DNA MIMICS A SELF-PROTEIN THAT MAY BE A TARGET FOR SOME ANTI-DNA ANTIBODIES IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 154, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 1987-1994, XP002063314, ISSN: 0022-1767 abstract; figures 1,3,4; table V page 1991, left-hand column, paragraph 1	1-57

-/--

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/047174

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HANSEN ET AL: "Antibody mediated transduction of therapeutic proteins into living cells", THE SCIENTIFIC WORLD, THE SCIENTIFICWORLD LTD, GB, vol. 5, no. 9, 16 September 2005 (2005-09-16), pages 782-788, XP008110943, ISSN: 1532-2246, DOI: 10.1100/TSW.2005.98 abstract page 783, last paragraph	1-57
A	HANSEN J E ET AL: "Targeting Cancer with a Lupus Autoantibody.", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, vol. 4, no. 157, 24 October 2012 (2012-10-24), pages 155-161, XP008176380, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3004385 cited in the application abstract; figure 2	1-57
A	MENGYUAN LIU ET AL: "A novel bivalent single-chain variable fragment (scFV) inhibits the action of tumour necrosis factor [alpha]", BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, vol. 50, no. 4, 1 August 2008 (2008-08-01) , pages 173-179, XP055225197, US ISSN: 0885-4513, DOI: 10.1042/BA20070229 abstract; figures 1,3-5	1-57

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/047174

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012135831 A1	04-10-2012	CN 103874710 A	18-06-2014
		EP 2694555 A1	12-02-2014
		JP 2014513069 A	29-05-2014
		US 2014050723 A1	20-02-2014
		WO 2012135831 A1	04-10-2012
WO 2012145125 A1	26-10-2012	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 35/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ	
Ａ６１Ｐ 35/02	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｓ	
Ａ６１Ｐ 31/12	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ 31/14	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｋ 45/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/12		
Ａ６１Ｐ 43/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/14		
Ｃ１２Ｎ 15/09	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
Ｃ１２Ｐ 21/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ａ６１Ｐ 35/04	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	
		Ｃ１２Ｐ	21/08		
		Ａ６１Ｐ	35/04		

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

(71)出願人 503286251
ザ ユナイテッド ステイツ ガバメント アズ レプリゼンテッド バイ ザ デパートメント オブ ベテランズ アフェアーズ
アメリカ合衆国 ワシントン ディーシー ２０４２０， バーモント アベニュー エヌダブリュー ８１０， テクノロジー トランスファー プログラム （１２２ティーティー）
(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72)発明者 ハンセン， ジェイムズ イー.
アメリカ合衆国 コネチカット ０６４３７， ギルフォード， スコー レーン ７０
(72)発明者 ウェイズバート， リチャード エイチ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９００３５， ロサンゼルス， ロックフォード ストリート ９６２１
(72)発明者 ノーブル， フィリップ ダブリュー.
アメリカ合衆国 コネチカット ０６５１１， ニューヘブン， エドワーズ ストリート １２８， アパートメント ３

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA06 CA19 CC15 CC24 DA01
4B065 AA90X AA93X AA95Y AC20 BB25 BD39 CA44
4C084 AA11 AA19 MA22 MA23 MA55 MA56 MA65 MA66 NA05 NA14 ZB261 ZB271 ZB331 ZC751
4C085 AA14 BB01 BB11 BB44 CC21 CC23 DD62 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06
4H045 AA11 AA30 BA40 DA76 EA20 FA74