

(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2015-512247

(P2015-512247A)

(43) 公表日 平成27年4月27日 (2015. 4. 27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 7 6
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C 0 8 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-500780 (P2015-500780)
 (86) (22) 出願日 平成24年3月21日 (2012. 3. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年9月18日 (2014. 9. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/055022
 (87) 国際公開番号 W02013/139391
 (87) 国際公開日 平成25年9月26日 (2013. 9. 26)

(71) 出願人 500253069
 フラウンホーファーゲゼルシャフト ツァー
 フォルデルング デア アンゲバンデ
 ン フォルシュング エー. ファオ.
 FRAUNHOFER-GESELLSC
 HAFT ZUR FORDERUNG
 DER ANGEWANDTEN FOR
 SCHUNG E. V.
 ドイツ国 ミュンヘン 80686, ハ
 ンサシュトラッセ 27ツェー
 Hansastr. 27C, 80686
 Munchen, Germany

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光線力学的療法に使用するための新規光免疫複合体

(57) 【要約】

抗体またはその誘導体もしくはその断片、s c F vなどの合成ペプチド、ミモトープからなる群より選択され、C D抗原、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、ホルモン受容体、成長因子受容体、特にE r b Bファミリーのチロシンキナーゼ成長因子受容体、と結合したタンパク質と共有結合した光増感剤を含み、該光増感剤が修飾ヒトDNA修復タンパク質であるO 6 - アルキルグアニン - DNAアルキルトランスフェラーゼ (h A G T m) を介して該結合タンパク質と結合している化合物。

【選択図】 図 1

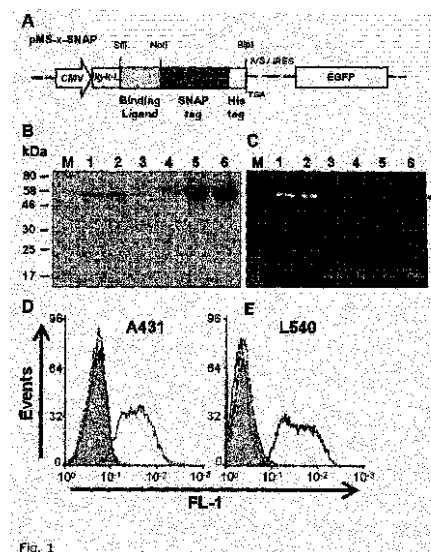


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体またはその誘導体もしくはその断片、s c F v などの合成ペプチド、ミモトープからなる群より選択され、C D 抗原、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、ホルモン受容体、成長因子受容体、特に E r b B ファミリーのチロシンキナーゼ成長因子受容体、と結合したタンパク質と共有結合した光増感剤を含み、

該光増感剤が修飾ヒト D N A 修復タンパク質である O 6 - アルキルグアニン - D N A アルキルトランスフェラーゼ (h A G T m) を介して該結合タンパク質と結合している化合物。

【請求項 2】

内部移行性且つ疾患特異的な細胞表面受容体の特異的に標的とする、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

前記チロシンキナーゼ成長因子受容体に結合するタンパク質が s c F v 抗体断片、特に配列番号 2 のポリヌクレオチド配列によりコードされる配列番号 1 の s c F v 抗体断片である、請求項 1 または請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

配列番号 4 のポリヌクレオチド配列によりコードされる配列番号 3 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 5】

前記光増感剤が O 6 - アルキルグアニン - D N A アルキルトランスフェラーゼの活性部位と結合している、請求項 1 ~ 請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

前記光増感剤がポルフィリン、クロロフィル、および色素からなる群から選択される、請求項 1 ~ 請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 7】

抗体またはその誘導体もしくはその断片、s c F v などの合成ペプチド、ミモトープからなる群から選択される結合タンパク質を含み、該結合タンパク質が、C D 抗原、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、ホルモン受容体、成長因子受容体、特に E r b B ファミリーのチロシンキナーゼ成長因子受容体、と結合し、O 6 - アルキルグアニン - D N A アルキルトランスフェラーゼ (h A G T m) と称される修飾ヒト D N A 修復タンパク質と共有結合している化合物。

【請求項 8】

前記結合タンパク質が s c F v 抗体断片、特に配列番号 1 および / または配列番号 3 の s c F V 抗体断片である、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 9】

特に配列番号 2 および / または配列番号 4 を含む、請求項 7 に記載の化合物をコードするポリヌクレオチド配列。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の化合物をコードする、配列番号 5 のヌクレオチド配列のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

O 6 - アルキルグアニン - D N A アルキルトランスフェラーゼ (h A G T m) を、抗体またはその誘導体もしくはその断片、s c F v などの合成ペプチド、ミモトープからなる群から選択される結合タンパク質と融合するステップを含み、該結合タンパク質が、C D 抗原、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、ホルモン受容体、成長因子受容体、特に E r b B ファミリーのチロシンキナーゼ成長因子受容体、と結合する、請求項 7 に記載の化合物を製造する方法。

【請求項 12】

真核生物発現ベクター p M S - S N A P の S i f I および N o t I による消化部位に s

10

20

30

40

50

c F v - 4 2 5 配列が挿入されて、N末端結合リガンド (s c F v - 4 2 5) およびC末端 S N A P タグ配列を与える、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 s c F v - 4 2 5 - S N A P 融合タンパク質が、ヒト胎児腎臓細胞株、特に H E K - 2 9 3 T 細胞 (A T C C : C R L - 1 1 2 6 8) で発現する、請求項 1 1 または請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

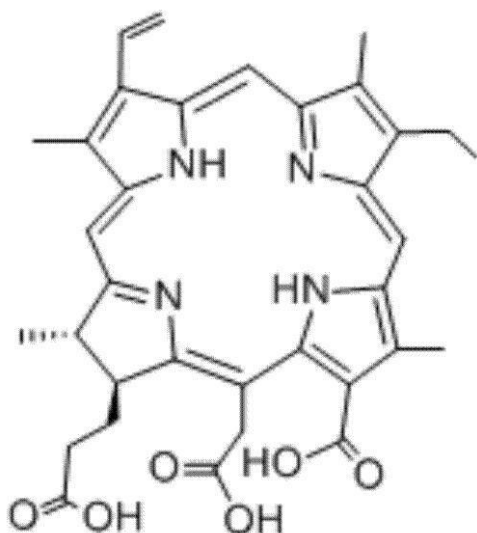
前記 s c F v - 4 2 5 - S N A P 融合タンパク質がアフィニティークロマトグラフィー、特に N i - N T A アフィニティークロマトグラフィーにより無細胞上清から精製される、請求項 1 1 ~ 請求項 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

請求項 7 の化合物と結合した、以下の式のポルフィリン誘導体。

【化 1】



20

【請求項 1 6】

クロリン e 6 などのポルフィリン光増感剤のカルボキシ基の少なくとも一部を、活性化エステルへと、またはカップリング剤により、反応させ、続いて O 6 - ベンジルグアニン、O 2 - ベンジルシトシン、またはコエンザイム A (C o A) と反応させる、請求項 1 5 に記載の化合物の製造方法。

30

【請求項 1 7】

O 6 - ベンジルグアニン、O 2 - ベンジルシトシン、またはコエンザイム A (C o A) が、P E G - 2 4 - N H ₂ などのリンカー分子と結合しており、および / または、前記活性化エステルが、N H S などのスクシンイミドから形成されるか、または前記カップリング剤が E D C、E D A C、および D C C などのカルボジイミドからなる群から選択される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 請求項 8 の少なくとも 1 項に記載の化合物と、光免疫療法に関連した薬学的効果を改善または可能にする薬学的に許容可能なアジュバントと、を含む医薬。

40

【請求項 1 9】

光免疫療法により癌を治療するための、請求項 1 ~ 請求項 8 の少なくとも 1 項に記載の化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

光線力学的療法 (P D T) は、癌治療に対する有望で低侵襲な方法である。改良された光増感剤および臨床応用プロトコルの導入に続き、F D A に認可されたいくつかの P D T

50

薬が利用可能となり、種々の前臨床段階および臨床開発段階にあるものもある¹。光感作性薬剤は、無害な光により活性化された場合、細胞障害性を示すことにより直接的に、または有毒なフリーラジカルもしくは活性酸素種（ROS）の*in situ*での産生を開始することにより間接的に、その効果を発揮する。これらの処理により細胞に損傷が生じ、最終的にアポトーシスまたはネクローシスによる細胞死が誘導される²。細胞の損傷部位は、光増感剤の種類、インキュベーション期間、および送達方法に依存している。疎水性光増感剤は細胞膜を損傷する傾向があるが、カチオン性光増感剤はミトコンドリアなどの膜小胞内に蓄積して局所的損傷を引き起こす³。

【0002】

PDTにおける最大の課題の一つは、標的特異性がないことである。光増感剤は、光による活性化の後、癌組織だけでなく正常組織にも損傷を与え、これにより長期の皮膚光過敏がもたらされる場合がある⁴。PDTの特異性を高めるため、光増感剤を癌特異的なモノクローナル抗体または一本鎖抗体断片（scFv）と結合して、光増感剤を直接的に癌組織に送達するいわゆる光免疫複合体が得られている。この方法は、光免疫療法（PIT）として知られている⁵。抗体-光増感剤複合体の最適な理論混合比での産生を保証する確実な方法が存在しないため、標準的なカップリング反応は光増感剤と抗体の結合には適していない⁶。さらに、光増感剤の化学的特性（例えば、疎水性、ならびに荷電基の数および位置）により、抗体の薬物動態特性および生体内分布が変化する場合があり、最終的に非特異的結合および内部移行反応が引き起こされる。ランダム結合によって光増感剤励起状態の自己消光が引き起こされて光線力学的活性が減少する場合もある⁵。したがって、これらの制限を克服するためには、より制御された結合反応が必要とされる。

【0003】

PDTの主な欠点の一つは、活性化光増感剤の非選択的效果であり、これにより癌細胞だけでなく正常細胞にも損傷を与えられる傾向がある。抗体を用いた標的療法は癌治療に大きな変化をもたらし、癌細胞抗原に結合するいくつかの抗体が画期的新薬となっている。治療用抗体の有効性は、追加的なエフェクター分子（例えば、放射性核種、薬剤、または毒素）との共有結合により改善されることがあり⁷、これにより選択的送達が実現され、従来低分子薬剤に付随していた全身毒性が低減されるはずである⁸。同様の原理は光増感剤にも適用され得る。エフェクター分子は一般に、システイン残基の還元スルフヒドリル基またはリジン側鎖中のアミノ基のいずれかを用いて抗体に結合される。しかし、いずれの方法によっても、様々な部位にエフェクターが結合した複合体化抗体の混合物を含む不均一な産物が生じ、各抗体に結合したエフェクターの数が変動するため、様々なモル比、ならびに全く異なる薬物動態、有効性、および安全性プロファイルがもたらされる。

【0004】

Hamblettら⁹は、不均一な抗体-薬剤複合体の毒性、薬物動態特性、および治療有効性を、2分子、4分子、または8分子のモノメチル-オーリスタチンE（MMAE）を複合体化した分子を含む、3つの抗体画分に精製することにより検討した。MMAE基を8個有する画分は、他の画分と比較して耐性に乏しく素早く除去され、有効性が最も低かった。このことから、抗体-薬剤複合体に対する主要な設計パラメータは、抗体に結合した薬剤分子の数であることが示唆される。しかし、同じ数の薬剤分子を有する精製抗体であっても、多数の異なった結合部位により、複雑な混合物を構成する。例えば、典型的な抗体には約40個のリジン残基が存在するため、100万種類以上の異なった複合体化抗体が生じる可能性がある。同様に、1～8個のシステイン残基が存在し、典型的に約100の異なった複合体化変種が生じる。抗体-薬剤複合体の各バージョンは、典型的には固有の予測不可能な薬物動態プロファイルを示す⁹。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

癌細胞は、無害な光を当てた場合に毒性作用を誘導する光感作性薬剤により死滅し得るが、これにより周囲の正常細胞にも深刻な損傷を与えられる。光線力学的療法の特異性は

10

20

30

40

50

、光感作性薬剤を癌関連細胞表面抗原と特異的に結合する抗体および抗体断片と結合させることにより増大させることが可能である。しかし、標準的な結合反応では不均一な産物が産生され、その標的特異性と分光学的特性が損なわれることがある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明では、S N A P タグ融合体の使用を改良された結合方法として調べるためのモデルとして、上皮成長因子受容体 (E G F R) と結合する抗体断片 (s c F v - 4 2 5) を用いた。s c F v - 4 2 5 - S N A P タグ融合タンパク質により、O (6) - ベンジルグアニン修飾クロリン e 6 などの光増感剤の特異的結合が可能となり、E G F R + 癌細胞に特異的に送達されて顕著な癌細胞特異的細胞毒性をもたらす、均一な産物が生じた。光線力学的療法の発展に対する本発明の結果の影響について説明する。

10

【0007】

本発明は、抗体またはその誘導体もしくはその断片、s c F v などの合成ペプチド、ミモトープからなる群から選択される結合構造と共有結合した光増感剤を含み、該結合構造がC D 抗原、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、ホルモン受容体、成長因子受容体、特にE r b Bファミリーのチロシンキナーゼ成長因子受容体、と結合し、該光増感剤が修飾ヒトD N A 修復タンパク質であるO 6 - アルキルグアニン - D N A アルキルトランスフェラーゼ (h A G T m) を介して内部移行性を有する受容体に結合するタンパク質 (internalizing receptor binding protein) と結合している化合物を提供する。

20

【0008】

本発明のある態様では、上皮成長因子受容体結合タンパク質はs c F V 抗体断片、特に配列番号2のポリヌクレオチド配列によりコードされる配列番号1のs c F V 抗体断片である。

【0009】

本発明の別の態様では、本発明の化合物は、配列番号4のポリヌクレオチド配列によりコードされる配列番号3のアミノ酸を含むか、またはこれを有する。

【0010】

本発明の化合物の別の態様では、光増感剤は、O 6 - アルキルグアニン - D N A アルキルトランスフェラーゼの活性部位と結合している。

30

【0011】

本発明の化合物において、光増感剤は、ポルフィリン、クロロフィル、および光増感能を有する色素からなる群から選択される。

【0012】

光増感剤を欠く化合物もまた本発明の対象である。該化合物は、抗体またはその誘導体もしくはその断片、s c F v などの合成ペプチド、ミモトープからなる群から選択される結合タンパク質を含み、該結合タンパク質がC D 抗原、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、ホルモン受容体、成長因子受容体、特にE r b Bファミリーのチロシンキナーゼ成長因子受容体、と結合し、O 6 - アルキルグアニン - D N A アルキルトランスフェラーゼ (h A G T m) と称される修飾ヒトD N A 修復タンパク質と共有結合している。

40

【0013】

具体的には、結合タンパク質はs c F v 抗体断片、特に配列番号1および/または配列番号3のs c F V 抗体断片である。この化合物は、配列番号2および/または配列番号4の配列を有するポリヌクレオチドによりコードされることがある。特定の態様ではE r b Bファミリーのチロシンキナーゼ成長因子受容体と結合する。

【0014】

特定の態様の化合物は、配列番号5のヌクレオチド配列のポリヌクレオチドにコードされる。

【0015】

本発明の他の対象は、O 6 - アルキルグアニン - D N A アルキルトランスフェラーゼ (h A G T m) を、抗体またはその誘導体もしくはその断片、s c F v などの合成ペプチド

50

、ミモトープからなる群から選択される結合タンパク質と融合するステップを含み、該結合タンパク質がCD抗原、サイトカイン受容体、インターロイキン受容体、ホルモン受容体、成長因子受容体、特にErbbファミリーのチロシンキナーゼ成長因子受容体、と結合する、本発明の化合物の製造方法である。具体的には、scFv-425のDNA配列を、N末端結合リガンド(scFv-425)およびC末端SNAPタグ配列を与える、真核生物発現ベクターpMS-SNAPのSfiIおよびNotIによる消化部位に挿入する。

【0016】

具体的には、His₆タグもまたタンパク質に融合される。融合タンパク質はヒト細胞、特にHEK-293T細胞(ATCC: CRL-11268)などの胎児腎臓細胞株で発現させて、例えばNi-NTA修飾樹脂などのタグに対する親和性樹脂を用いて精製することが可能である。

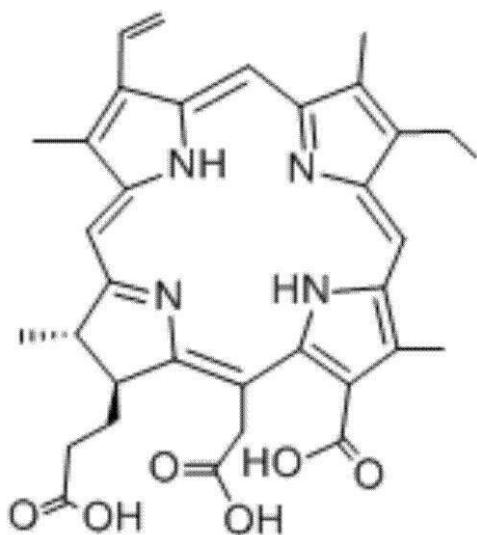
10

【0017】

本発明の他の対象は、以下の式のポルフィリン誘導体である。

【0018】

【化1】



20

30

クロリンe6 (C₃₄H₃₆N₄O₆)

【0019】

ここで、クロリンe6などのポルフィリン光増感剤のカルボキシ基の少なくとも一部は、活性化エステルに、またはカップリング剤により、反応し、続いてO6-ベンジルグアニン、O2-ベンジルシトシン、またはコエンザイムA(CoA)と反応する。

【0020】

本発明の方法において、O6-ベンジルグアニン、O2-ベンジルシトシン、またはコエンザイムA(CoA)が、PEG-24-NH₂などのリンカー分子と結合し、および/または、活性化エステルがNHSなどのスクシンイミドにより、もしくはEDC、EDAC、およびDCCなどのカルボジイミドからなる群から選択されるカップリング剤により形成される。

40

【0021】

本発明の他の対象はまた、本発明の化合物および光免疫療法に関連した薬学的効果を改善または可能にする薬学的に許容可能なアジュバントを含む医薬である。

【0022】

本発明はまた、光免疫療法により癌を治療するための本発明の化合物の使用を提供する。

50

【 0 0 2 3 】

当業者は、本明細書の内容を超える新規事項を導入することなく、用語「～を含む」が「～からなる」と置換可能であることを理解している。

【 0 0 2 4 】

以下に本発明の化合物の効果を、具体例により実証しより詳細に説明する。チロシンキナーゼ成長因子受容体の E r b B ファミリーの 4 つのメンバーの 1 つである上皮成長因子受容体 (E G F R 、 e r b B 1 、 H E R 1) は、約 3 0 % の上皮癌において過剰発現しており、そのため癌免疫療法の魅力的な標的となっている¹⁰。組み換え抗 E G F R 抗体断片 s c F v - 4 2 5 は、E G F R と癌細胞表面上で結合し効率的に受容体内部移行 (r e c e p t o r i n t e r n a l i z a t i o n) を誘導する¹¹。s c F v - 4 2 5 は、P I T の特異性および有効性を改善するための新しい複合体化方法の開発のためのモデルとして使用される。これらの目的を達成するため、当初、光学活性分子で抗体を部位特的に標識するために開発された O 6 - アルキルグアニン - D N A アルキルトランスフェラーゼ (h A G T m) と呼ばれる 2 0 k D の修飾ヒト D N A 修復タンパク質に基づく、S N A P タグ技術が用いられてきた¹¹。S N A P タグにより、受容基である O (6) - ベンジルグアニン (B G) で修飾された任意の基質に対する効率的な共有結合が可能となる。S N A P タグは、求核置換反応により活性部位に置換ベンジル基を転移して遊離グアニンを放出することにより、パラ置換された B G 誘導体と反応する¹¹。

【 0 0 2 5 】

本発明によれば、s c F v - 4 2 5 - S N A P タグ融合タンパク質を設計および合成した。B G 修飾クロリン e 6 (C e 6) 光増感剤を E G F R + 癌細胞に送達した。コンストラクトには、光増感剤とタンパク質の距離を増大するためのリンカー領域および 2 4 個のポリエチレングリコール (P E G) 鎖も含まれる。B G 修飾 C e 6 を、抗体の結合活性および内部移行活性に有害な影響を及ぼすことなく、特異的かつ共有結合的に s c F v - 4 2 5 - S N A P タグ融合タンパク質と結合した。C e 6 を 4 系統の E G F R + 癌細胞株 (A 4 3 1 、 M D A - M B - 2 3 1 、 M D A - M B - 4 6 8 、 および S i H a) に特異的に送達し、顕著な癌細胞特異的細胞毒性がもたらされた。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 6 】

【 図 1 】 S N A P タグ融合タンパク質のコンストラクト、発現、および結合。(a) 組み換え S N A P タグ融合タンパク質のためのバイシストロニック真核生物発現カセットの模式図。p M S - s c F V - 4 2 5 - S N A P ベクターは、C M V プロモーターの転写制御下に結合リガンド (s c F V - 4 2 5) 、およびインフレームで連結された S N A P タグをコードする。免疫グロブリン リーダー配列 (I g - L) によりタンパク質の分泌が容易になり、T G A 終止コドンが C 末端の H i s₆ タグの直下に位置している。コントロールベクターのための発現カセットは、P M S - s c F V - 4 2 5 - S N A P と同様であるが、結合リガンドとして s c F V - 4 2 5 の代わりに s c F V - K i 4 を含む。(b) s c F V - 4 2 5 - S N A P タンパク質の精製画分を S D S - P A G E で分離し、次にクーマシーブリリアントブルーで染色した。(c) s c F V - 4 2 5 - S N A P を B G - V i s t a g r e e n とインキュベートし、U V 光でタンパク質を可視化した。M : タンパク質マーカー、1 : 2 5 0 m M イミダゾールで溶出した 3 μ l の s c F V - 4 2 5 - S N A P 、2 : 2 5 0 m M イミダゾールで溶出した 1 . 5 μ l の s c F V - 4 2 5 - S N A P 、3 : 4 0 m M イミダゾールで溶出した 1 0 μ l の s c F V - 4 2 5 - S N A P 、4 : 1 0 m M イミダゾールで溶出したタンパク質、5 : 通過画分、6 : H E K - 2 9 3 T 細胞上清。s c F V - 4 2 5 - S N A P および s c F V - K i 4 - S N A P の結合解析は、(d) E G F R + A 4 3 1 細胞および (e) E G F R - L 5 4 0 細胞を用いて、フローサイトメトリーにより評価した。灰色で塗りつぶされた曲線は未処理細胞を表す。細胞を 0 . 5 μ g / m l の精製融合タンパク質である s c F V - 4 2 5 - S N A P (薄灰色の曲線) および K i 4 - S N A P (黒色の曲線) とインキュベートした。二次抗体として、P e n t a H i s A l e x a F l u o r 4 8 8 複合体 (1 / 5 0 0 希釈) (キアゲン

10

20

30

40

50

社)を用いた。抗-His Alexa Fluor 488 検出抗体の非特異的染色を排除するために、His タグ融合タンパク質を除いたものをコントロールとした(黒い点線の曲線)。

【図2】ベンジルグアニン(BG)による修飾の前後におけるCe6光増感剤の質量分析による解析。(a)Ce6、BG-PEG24-NH₂、およびBG-PEG24-Ce6のESI質量スペクトル。一番上の図はCe6(597.215Da)を表し、真ん中の図はBG-PEG24-NH₂(1398.761Da)を表し、一番下の図はBG-PEG24-Ce6(1979.004Da)を表す。(b)BG-PEG24-Ce6のscFV-425-SNAPとの結合。M:タンパク質マーカー、1:1.5倍モル過剰量のBG-VistaGreenとインキュベートしたscFV-425-SNAP、2:3倍モル過剰量のプロモテニルブテリジン(BTP)で阻害し、BG-Ce6と2時間インキュベートし、最後にBG-VistaGreenと混合したscFV-425-SNAP、3:1.5倍モル過剰量のBG-Ce6と2時間インキュベートした後、1.5倍モル過剰量のBG-VistaGreenとインキュベートしたscFV-425-SNAP。結合したタンパク質はSDS-PAGEにより分離し、CRi Maestro Imaging Systemで可視化した。(c)異なった色素のスペクトルをMaestroソフトウェアを用いて分解し、相当するゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色した。

【図3】EGFR⁺細胞を特異的に認識するscFV-425-SNAP-VistaGreenおよびscFV-425-SNAP-Ce6の結合活性。フローサイトメトリ分析は、 4×10^5 個の細胞を各融合タンパク質とともにPBS中、37℃で20分間インキュベーションした後にを行った。(a)scFV-425-SNAP-VistaGreen(薄灰色の曲線)を、A431細胞、MDA-MB-468細胞、MDA-MB-231細胞、SiHa細胞、L540細胞、およびCHO-K1細胞について試験した(灰色で塗りつぶされた曲線)。コントロールとして、scFV-Ki4-SNAPをBG-VistaGreenで標識し(黒色の曲線)、その結合活性をA431細胞、L540細胞、およびCHO-K1細胞について試験した(灰色で塗りつぶされた曲線)。(b)scFV-425-SNAP-Ce6の結合能を、A431細胞、MDA-MB-468細胞、MDA-MB-231細胞、SiHa細胞、L540細胞、およびCHO-K1細胞について試験した(灰色で塗りつぶされた曲線)。コントロールとして、BG-Ce6で標識したscFV-Ki4-SNAP(黒色の曲線)を、A431細胞、L540細胞、およびCHO-K1細胞について試験した(灰色で塗りつぶされた曲線)。

【図4】共焦点顕微鏡で分析した融合タンパク質の内部移行。0.5μgのscFV-425-SNAP-Ce6と(a)4℃で30分間、または(b)37℃で60分間インキュベートした、EGFR⁺細胞株であるA431細胞、MDA-MB-468細胞、MDA-MB-231細胞、およびSiHa細胞、ならびにEGFR⁻細胞株であるL540細胞およびCHO-K1細胞について、共焦点画像を得た。(1)Ce6蛍光シグナル、(2)透過光、(3)蛍光シグナルと透過光のオーバーレイ。

【図5】光線力学的療法の効果の評価。細胞増殖アッセイおよびアポトーシスアッセイは、scFV-425-SNAP-Ce6を用いて行った。scFV-425-BG-Ce6の細胞毒性は、A431細胞株()、MDA-MB-468細胞株()、MDA-MB-231細胞株()、SiHa細胞株()、およびCHO-K1細胞株()に対して、(a)照射細胞または(b)未照射細胞についてのXTT解析を用いて測定した。scFV-Ki4-SNAP-Ce6のA431細胞株(x)に対する細胞毒性をコントロールとして試験した。同じ細胞を種々の濃度のBG-Ce6で処置し、細胞生存率を(c)光活性化して分析、および(d)光活性化せずに分析した。(e)アポトーシスは、Apo-ONE(登録商標)Homogeneous Caspase-3/7 Assayを、50nMのBG-Ce6、200nMのscFV-SNAP-Ce6、および200nMのscFV-Ki4-SNAP-Ce6で用いて評価した。(f)ジクロロフルオレセイン誘導体であるカルボキシ-H₂DCFDAを用いて検出した、光増感された

10

20

30

40

50

A 4 3 1 細胞の照射による活性酸素種の発生。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明を、光増感剤としてC e 6を用い、結合としてE r b Bファミリーのチロシンキナーゼ成長因子受容体を用いて、より詳細にさらに例示的に説明する。

【0028】

光線力学的療法(P D T)は、非毒性光増感剤および無害な可視光を酸素と組み合わせることで、悪性細胞をアポトーシスおよび/またはネクローシスにより死滅させる細胞毒性活性酸素種を産生させる、低侵襲な治療である^{1 2}。多くの異なった光増感剤が開発されてきたが、C e 6はP D T研究において詳細に評価されてきており物理的特性および化学的特性において有利であるため、モデルとして選択されてきた。C e 6の吸収極大は、光量子効率と細胞透過との良好なバランスが得られる664nmであり^{1 3}、カルボキシ基が存在することによりさらに機能付与が可能である⁵。

【0029】

本発明のS N A Pタグ技術により抗体上に固有の結合部位が提供され、均一な複合体製剤の産生が可能になる。E G F Rと特異的に結合するs c F V抗体のコード配列がh A G Tカセットと遺伝子融合されている本発明のコンストラクトは、抗体にS N A Pタグを与えることにより、B G修飾基質、とくにC e 6との部位特異的結合を可能にする。この結合方法は、抗体がS N A Pタグを有し基質がB G基で修飾されている限り、任意の抗体と光増感剤の組み合わせに適用可能である。

【0030】

結合反応は効率的であり、s c F V - 4 2 5 - S N A P - C e 6およびs c F V - K i 4 - S N A P - C e 6の均一サンプルの調製が可能となる。癌細胞を特異的に死滅させる能力についてこれらの調製物を試験した。s c F V - 4 2 5 - S N A P - C e 6が、上皮癌、乳癌、および頸部癌を示す4系統のヒト癌細胞株(A 4 3 1、M D A - M B - 2 3 1、M D A - M B 4 6 8、およびS i H a)において、光照射後にE G F R⁺細胞を選択的に死滅させることが分かった。s c F V - 4 2 5 - S N A P - C e 6の光毒性は、E G F Rおよび光の存在に依存しており、受容体を最も多く発現する(1 ~ 1.3 × 10⁶個の受容体/細胞)A 4 3 1細胞およびM D A - M B 4 6 8細胞において最も顕著であった^{1 4}、^{1 5}。他の細胞株はより少ないE G F Rを発現し(M D A - M B - 2 3 1細胞において1.3 × 10⁵個の受容体/細胞、およびS i H a細胞において2 × 10⁴ ~ 2 × 10⁵個の受容体/細胞)^{1 5}、^{1 6}、これに付随して、融合タンパク質が治療的に無効果であるポイントまでではないが、s c F V - 4 2 5 - S N A P - C e 6の毒性は減少した。このことは、s c F V - 4 2 5 - S N A P - C e 6が、発現レベルの最も高いE G F R⁺細胞のみならず、広い範囲のE G F R⁺細胞を標的にすることができることを意味する。E G F R⁻細胞(C H O - K 1)がs c F V - 4 2 5 - S N A P - C e 6に暴露された場合には、毒性は観察されなかった。

【0031】

s c F V - 4 2 5 - S N A Pは注射後にマウス腎臓に直接蓄積し、次に膀胱で検出されることが以前に示されており、腎臓濾過によるクリアランスが示唆される^{1 0}。迅速なクリアランスにもかかわらず、癌細胞におけるs c F V - 4 2 5 - S N A Pの蓄積および滞留は、注射10時間後に非常に高い癌細胞対バックグラウンド比をもたらすのに明らかに十分である。

【0032】

s c F V / S N A Pタグ融合タンパク質の発現、精製、および機能分析

E G F R特異的s c F V - 4 2 5抗体断片^{1 0}、および異なった抗原(C D 3 0)と結合するコントロール断片(s c F V - K i 4)^{1 7}をコードする配列をp M S - S N A P バイシストロニックベクターに導入して、(図1a)に示すように完全なs c F V - 4 2 5 - S N A Pカセットおよびs c F V - K i 4 - S N A Pカセットを作製した。これらのコンストラクトをH E K - 2 9 3 T細胞に形質導入により導入して、安定的に形質転換さ

10

20

30

40

50

れた細胞をゼオシン選択および緑色蛍光タンパク質 (GFP) 活性のモニタリングにより同定した。融合タンパク質を (C末端His₆ タグを用いた) アフィニティークロマトグラフィーにより培養上清から分離して最終純度約90%とし、最終収量は上清中のタンパク質が18mg/Lであった (図1b)。

【0033】

SNAPTagsの活性は、各融合タンパク質において、未処理の培養上清、通過画分、およびクロマトグラフィーステップからの溶出液を、BG修飾VistaGreenと混合することにより確認した (図1c)。scFV-425-SNAPタンパク質の結合活性は、EGFR発現標的細胞株 (A431) を1系統と、この抗原を欠くCD30を発現するコントロール細胞株 (L540) と、を1系統用いたフローサイトメトリーにより確認した。結合は、二次抗体である抗His₅ Alexa488抗体を用いて検出した。フローサイトメトリーのデータにより、scFV-425-SNAPはEGFR⁺ 標的細胞に特異的に迅速かつ効果的に結合する (図1d) が、scFV-Ki4/SNAPはCD30⁺ L540細胞にのみ結合する (図1e) ことが確認された。

10

【0034】

光増感剤クロリンe6のベンジルグアニンによる修飾

光増感剤クロリンe6 (Ce6) を、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC)、ヒドロキシスルホスクシンイミドのナトリウム塩 (sulfo-NHS)、およびBG-PEG24-NH₂ リンカーを用いて修飾することに成功した。Ce6のカルボキシ基をBG基に修飾し、反応効率をHPLCにより決定した (データ示さず)。高純度のBG-PEG24-Ce6は質量分析により確認した。Ce6、BG-PEG24-NH₂、およびBG-PEG24-Ce6の正確な質量は、Micromass QTOF II質量分析器で検出し、連結されたCe6とBG-PEG24-NH₂について計算された理論質量と同じ質量を精製BG-PEG24-Ce6が有することを確認した (図2a)。

20

【0035】

BG修飾蛍光色素分子団およびCe6によるタンパク質標識化

SNAPTagsの機能性をBG修飾蛍光色素とカップリングすることにより調査し、室温で2時間インキュベーション後の標識化効率が85~90%であることが明らかになった (データ示さず)。反応は、BG修飾Ce6を用いて繰り返した。光増感剤は融合タンパク質中の活性SNAPTagsとのみ反応し、反応は、1.5倍モル過剰量のBG-VistaGreenとの後インキュベーションによって示されるように、プロモテニルプテリジン (BTP) で不可逆的に阻害することができた。CRIMAGEストロイメーキングシステムを用いた分析では、予め阻害された融合タンパク質と関連した蛍光は示されなかった (図2b、c)。

30

【0036】

フローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡

標識化scFV-425-SNAP融合タンパク質の活性を決定するために、BG-VistaGreenまたはBG-Ce6のいずれかで標識化したタンパク質を用いてフローサイトメトリー分析を行った。全ての標識化タンパク質は、氷上で30分間のインキュベーション後、相当する標的細胞株 (A431、MDA-MB-231、MDA-MB-468、およびSiHa) 上で強い蛍光シグナルを示したが、コントロール細胞 (L540およびCHO-K1) 上では示さなかった。予想通り、標識化scFV-Ki4-SNAPはL540上で強い蛍光シグナルを示したが、A431細胞およびCHO-K1細胞上では示さなかった (図3)。

40

【0037】

共焦点顕微鏡では、scFV-425-SNAP-Ce6とインキュベートしたA431細胞、MDA-MB-231細胞、MDA-MB-468細胞、およびSiHa細胞上で特異的で均一な強い膜染色が見られた (図4a)。標識化融合タンパク質は、37で30分間インキュベートした後のA431細胞、MDA-MB-231細胞、MDA-MB

50

468細胞、およびSiHa細胞に、特異的に且つ効率的に吸収されたが、4でのインキュベーションでは吸収されなかった(図4b)。一方、EGFR⁺細胞株であるL540およびCHO-K1をscFV-425-SNAP-Ce6と同じ条件下でインキュベートした場合、シグナルは検出されなかった(図4a、b)。

【0038】

scFV-425-SNAP-Ce6の光細胞毒性

scFV-425-SNAP-Ce6および複合体化していないBG-Ce6の濃度依存的細胞毒性効果を、4系統のEGFR⁺細胞株およびネガティブコントロールとしてCHO-K1を用いて、XTTに基づいた比色細胞増殖アッセイにより評価した。scFV-425-SNAP-Ce6で処理したA431細胞、MDA-MB-231細胞、MDA-MB-468細胞、およびSiHa細胞の生存率は、光活性化に続く24時間のインキュベーション後、濃度依存的に著しく減少した。IC₅₀値は、48nM(A431)、220nM(MDA-MB-231)、38nM(MDA-MB-468)、および218nM(SiHa)であった。CHO-K1細胞は800nMの複合体化融合タンパク質に暴露した場合であっても影響されないままであり、コントロールコンストラクトであるscFV-Ki4-SNAP-Ce6はA431細胞およびCHO-K1細胞のいずれにおいてもほとんど影響を及ぼさなかった。対照的に、複合体化していないCe6はすべての細胞株に対して有毒であり、IC₅₀値は、16nM(A431)、22nM(MDA-MB-231)、22nM(MDA-MB-468)、26nM(SiHa)、および18nM(CHO-K1)であった。これらのデータを(図5a、c)に示す。

【0039】

光活性化ステップを含まない平行実験を行うことにより確認されたように、複合体化型Ce6および非複合体化型Ce6はいずれも光活性化後にのみ有毒であった。いずれの細胞株においても、生存率の顕著な減少は見られなかった(図5b、d)。

【0040】

scFV-425-SNAP-Ce6がアポトーシス経路を誘発することにより標的細胞において選択的にプログラム細胞死を誘導するか否かを調べるため、カスパーゼ3およびカスパーゼ7の活性を、光活性化の24時間後のA431細胞、MDA-MB-231細胞、MDA-MB-468細胞、SiHa細胞、およびCHO-K1細胞において解析した。scFV-425-SNAP-Ce6(200nM)および非複合体化Ce6(50nM)はいずれも、カスパーゼ3およびカスパーゼ7のレベルを上昇させたが、200nMのscFV-Ki4-SNAP-Ce6で処理したA431細胞においては顕著な上昇は見られなかった(図5e)。

【0041】

光活性化されたA431細胞におけるROSの産生を、6-カルボキシ-20,70-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセタートジ-(アセトキシ-メチル)エステル(H₂DCFDA)の酸化および脱アセチル化により産生されるDCFの485/535nm蛍光を測定することにより調べた。200nMの複合体化Ce6および50nMの非複合体化Ce6の存在下で、光活性化に続いてROSが爆発的に合成されるが、非照射細胞においてはROSレベルの増加は非常に小さく、光増感剤で処理していない細胞において観察されるバックグラウンドレベルをほとんど上回らないことが分かった(図5f)。

【実施例】

【0042】

方法

細胞培養

EGFR⁺細胞であるA431細胞、MDA-MB-231細胞、MDA-MB-468細胞、およびSiHa細胞、ならびにEGFR⁻細胞であるL540細胞、CHO-K1細胞、およびHEK-293T細胞を含む全ての細胞株は、ヒト由来であった。A431細胞、L540細胞、CHO-K1細胞、およびHEK-293T細胞は、2mMのL-グルタミン、10%(v/v)のウシ胎児血清(FBS)、および100U/mlのペニ

シリシン - ストレプトマイシンを添加した R P M I - 1 6 4 0 培地中で培養した。M D A - M B - 2 3 1 細胞、M D A - M B 4 6 8 細胞、および S i H a 細胞は、1 0 % (v / v) のウシ胎児血清 (F B S) および 1 0 0 U / m l のペニシリン - ストレプトマイシンを添加した D M E M 培地中で培養した。全ての細胞は、5 % C O ₂ 雰囲気中、3 7 °C で培養した。全ての培地および添加物は、インビトロジェン社 (ドイツ、ダルムシュタット) から入手した。

【 0 0 4 3 】

タンパク質の発現および精製

各 s c F v の配列を、N 末端の結合リガンド (s c F v - 4 2 5 または s c F v - K i 4) および C 末端の O 6 - アルキルグアニン - D N A アルキルトランスフェラーゼ (S N A P タグ) 配列を与える発現カセット中に挿入した。T G A 終止コドンは H i s ₆ タグ配列の直下に作成した。H i s ₆ タグ標識された融合タンパク質は、無細胞上清から N i - N T A 金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。より多くの容量は、A k t a F L P C システム上で、4 × 緩衝液 (2 0 0 m M N a H ₂ P O ₄ 、 1 . 2 M N a C l 、 4 0 m M イミダゾール、p H 8) で平衡化後に 5 m L の N i - N T A S u p e r f l o w カートリッジ (キアゲン社、ドイツ、ヒルデン) を用いて精製した。結合した H i s タグ標識化タンパク質は、5 0 m M N a H ₂ P O ₄ 、 3 0 0 m M N a C l 、 2 5 0 m M イミダゾール、p H 8) 中に溶出した。溶出後、タンパク質を 1 m M ジチオエリスリトール (C a r l R o t h 社、ドイツ、カールスルーエ) を含むリン酸緩衝食塩水 (P B S) に対して 4 °C で一晚透析した。エクソイン凍結保存材を 5 0 m M の最終濃度になるよう添加し、アリコート - 2 0 °C で保存した。

10

20

【 0 0 4 4 】

C e 6 のベンジルグアニンによる修飾

ジメチルホルムアミド中で 2 m g の C e 6 を 5 倍モル過剰量の E D C および s u l f o - N H S (シグマアールドリッチ社、ミズーリ州、セントルイス) と室温で 3 0 分間混合することにより、C e 6 (P o r p h y r i n P r o d u c t s 社、ユタ州、ローガン) のカルボキシ基をベンジルグアニンで修飾した。次に活性化混合物を 4 倍モル過剰量のベンジルグアニンリンカーである B G - P E G 2 4 - N H ₂ (C o v a l y s B i o s c i e n c e s 社、スイス、ヴィッターズヴィル) と暗所にて室温で一晩混合した。修飾 C e 6 は、S h i m a d z u P r o m i n e n c e H P L C システム、および 2 . 5 μ m (4 . 6 × 5 0 m m) の W a t e r X B r i d g e (登録商標) O S T C _{1 8} カラム (W a t e r s 社、マサチューセッツ、ミルフォード) を用いた H P L C により、流速 1 m L / 分で精製した。分離は、1 0 0 % の 0 . 1 M T E A A から 1 0 0 % のアセトニトリルまで 2 0 分の勾配で行い、2 8 0 n m および 4 1 0 n m でモニタリングした。C e 6 、 B G - P E G 2 4 - N H ₂ 、および B G - P E G 2 4 - C e 6 の質量は、M i c r o m a s s Q T O F I I 質量分析器を、エレクトロスプレーイオン源である A d v i o n N a n o m a t e (A d v i o n 社、米国、ニューヨーク州、イサカ) を用い、7 μ l のサンプル容量、1 . 4 k V で確認した。正確な質量は、M a x E n t 3 (登録商標) アルゴリズム (M i c r o m a s s 社) を 4 0 0 ~ 2 0 0 0 D a の範囲で用いた 3 0 0 ~ 2 5 0 0 m / z の範囲における質量スペクトルから得た。

30

40

【 0 0 4 5 】

タンパク質の標識化

精製 S N A P タグ融合タンパク質は、B G 修飾色素 (c o v a l y s B i o s c i e n c e s 社、スイス、ヴィッターズヴィル) または B G 修飾 C e 6 と、暗所で 1 . 5 ~ 3 倍モル過剰量の色素と室温で 2 時間インキュベーションすることにより複合体化した。残存する色素を z e b a s p i n 脱塩カラム 7 K M W C O (サーモフィッシャーサイエントフィック社、イリノイ州、ロックフォード) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより除去した。結合効率は、相当する色素の吸光係数および融合タンパク質の理論上の吸光係数を用いて測光的に決定した。標識化タンパク質は S D S - P A G E で分離後に、U V トランスイルミネーター G e l D o c X R ゲルドキュメンテーション (バイオラ

50

ッドラボラトリー社、ドイツ、ミュンヘン)または青色および黄色のフィルターセットを用いたC R i M a e s t r oイメージングシステム(C R i社、米国、マサチューセッツ、ウォバーン)のいずれかで可視化した。

【0046】

フローサイトメトリー

標識化融合タンパク質および未標識融合タンパク質の結合効果は、F A C S C a l i b u r (ベクトン・ディッキンソン社、ドイツ、ハイデルベルク)およびC e l l Q u e s t ソフトウェアを用いたフローサイトメトリーにより決定した。E G F R⁺細胞株であるA 4 3 1、M D A - M B - 2 3 1、M D A - M B 4 6 8、およびS i H aを用いてs c F v - 4 2 5 - S N A Pの結合効果を試験し、E G F R⁺細胞株であるL 5 4 0およびC H O - K 1をネガティブコントロールとして用いた。コントロール融合タンパク質であるs c F v - K i 4 - S N A Pは抗原であるC D 3 0を認識するため、L 5 4 0細胞に結合するが他の細胞株には結合しないはずである。約 4×10^5 細胞を、0.5 μ gの標識化タンパク質を含む200 μ LのP B S中で、氷上、20分間インキュベーションした。その後、細胞を1.8 mLのP B Sを用いて通常の細胞洗浄器で2回洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。

10

【0047】

共焦点顕微鏡

画像はT C S S P 5共焦点顕微鏡(ライカマイクロシステムズ社、ドイツ、ウェットラー)で可視化した。細胞はフローサイトメトリー用に記載したように調製した。結合効率は、細胞を標識化融合タンパク質と氷上で30分間インキュベートすることにより決定した。内部移行は、細胞を標識化融合タンパク質と37で30分間インキュベートすることによりモニタリングした。

20

【0048】

s c F v - 4 2 5 - S N A P - C e 6の光毒性

上記のようにインキュベートしたA 4 3 1細胞、M D A - M B - 2 3 1細胞、M D A - M B 4 6 8細胞、S i H a細胞、およびC H O - K 1細胞のアリコート(2×10^4 個)をP B S中で2回洗浄した後、C e 6、s c F v - 4 2 5 - S N A P - C e 6、またはK i 4 - s c F v / S N A P - C e 6のいずれかの濃度を増加させて処理して37で3時間インキュベートした。コントロールのインキュベート物は、光増感剤の代わりに500 μ g/mLのゼオシンとともにインキュベートした。その後、7mmの水キュベットおよびオレンジフィルターO G 5 9 0、580~1400nmの範囲のスペクトルでH y d r o s u nタイプ505(H y d r o s u n M e d i z i n t e c h n i k社、ドイツ、ミュールハイム)を用いて24 J / c m²の広帯域の可視/近赤外光を細胞に照射し、5% C O₂雰囲気中、37でさらに24時間インキュベートした。

30

【0049】

細胞生存率は、X T T細胞増殖キットI I (ロシュ社、ドイツ、マンハイム)を用いて、光活性化の24時間後に測定した。細胞を2,3-ビス(2-メトキシ-4-ニトロ-5スルホニル)-5[(フェニル-アミノ)カルボニル]-2H-テトラゾリウム塩酸塩試薬(1mg/mL)とインキュベートし、37で2時間インキュベートした。生存癌細胞によるX T Tのホルマザンへの還元は、吸収波長450nmおよび参照波長630nmにおいて、E L I S AプレートリーダーE l i s a r e a d e r E L x 8 0 8 (B i o - T E K社、ドイツ、パート・フリードリヒスハル)を用いて比色分析によりモニタリングした。

40

【0050】

細胞溶解物におけるカスパーゼ3/7活性は、A p o - O N E C a s p a s e - 3 / 7アッセイ(プロメガ社、ドイツ、マンハイム)を用いて光活性化の24時間後に測定した。すなわち、100 μ LのA p o - O N E試薬を細胞に添加して6時間インキュベートした後、E L I S AプレートリーダーE l i s a r e a d e r E L x 8 0 8 (B i o - T E K社、ドイツ、パート・フリードリヒスハル)を用いて、励起波長485nmおよび

50

発光波長 535 nm で蛍光を測定した。ROS 濃度は、H₂DCFDA (インビトロジェン社、ドイツ、ダルムシュタット) の 485 / 535 nm 蛍光比を測定することにより決定した。すなわち、 2×10^4 個の細胞を 50 nM の Ce6 または 200 nM の scFv-425-SNAP-Ce6 と 10 μ M の H₂DCFDA の存在下で、1% FCS を含む PBS 中で 30 分間インキュベーションした。2.5% FCS を含む温 PBS で細胞を 2 回洗浄し、RPMI-160 培地中で 2 時間インキュベートして上記のように照射した。蛍光測定は照射直後に行った。空のプロープ (細胞および培地) の測定値はバックグラウンドとして使用し、すべてのサンプルの測定値から差し引いた。

【0051】

データ分析

統計学的分析および曲線近似は Graph Pad Prism ソフトウェア (Graph Pad 社、カリフォルニア州、サンディエゴ) を用いて行った。データは平均 \pm M.E.S で示す。スチューデント t - 検定および二元分散分析を用いて、独立実験の有意性を評価した。基準 $p < 0.05$ を用いて統計的有意性を決定した。

【0052】

参考文献

1. Huang, Z. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol Cancer Res Treat.* 4, 283-293 (2005).
2. Palumbo, G. Photodynamic therapy and cancer: a brief sightseeing tour. *Expert Opin. Drug Deliv.* 4, 131-148 (2007).
3. Castano, A.P, Demidova, T.N. & Hamblin, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1, 279-293 (2004).
4. Olivo, M., Bhuvanewari, R., Lucky, S.S., Dendukuri, N. & Thong, P.S. Targeted Therapy of Cancer Using Photodynamic Therapy in Combination with Multi-faceted Anti-Tumor Modalities. *Pharmaceuticals* 3, 1507-1529 (2010).
5. Van Dongen, G.A.M.S., Visser, G.W.M. & Vrouenraets, M.B. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv. Drug. Delivery. Rev.* 56, 31-52 (2004).
6. Jeger, S. et al. Site-Specific and Stoichiometric Modification of Antibodies by Bacterial Transglutaminase. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 9995-9997 (2010).
7. Adams, G.P. & Weiner, L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* 23, 1147-1157 (2005).
8. Junutula, J.R. et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat. Biotechnol.* 26, 925-932 (2008).
9. Hamblett, K.J. et al. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin. Cancer Res.* 10, 7063-7070 (2004).
10. Kampmeier, F. et al. Rapid optical imaging of EGF receptor expression with a single-chain antibody SNAP-tag fusion protein. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 1926-1934 (2010).
11. Gronemeyer, T., Chidley, C., Juillerat, A., Heinis, C. & Johnsson, K. Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling. *PEDS* 19, 309-16 (2006).
12. Bhatti, M. et al. Targeted photodynamic therapy with multiply-loaded recombinant antibody fragments. *Int J Cancer* 1, 122:1155-63 (2008).
13. Douillard, S., Olivier, D. & Patrice, T. In vitro and in vivo evaluation of Radachlorin(R) sensitizer for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol. Sci* 8, 405-413 (2009).
14. Gamou, S., Kim, Y. S. & Shimizu, N. Different responses to EGF in two human carcinoma cell lines, A431 and UCVA-1, possessing high numbers of EGF receptors.

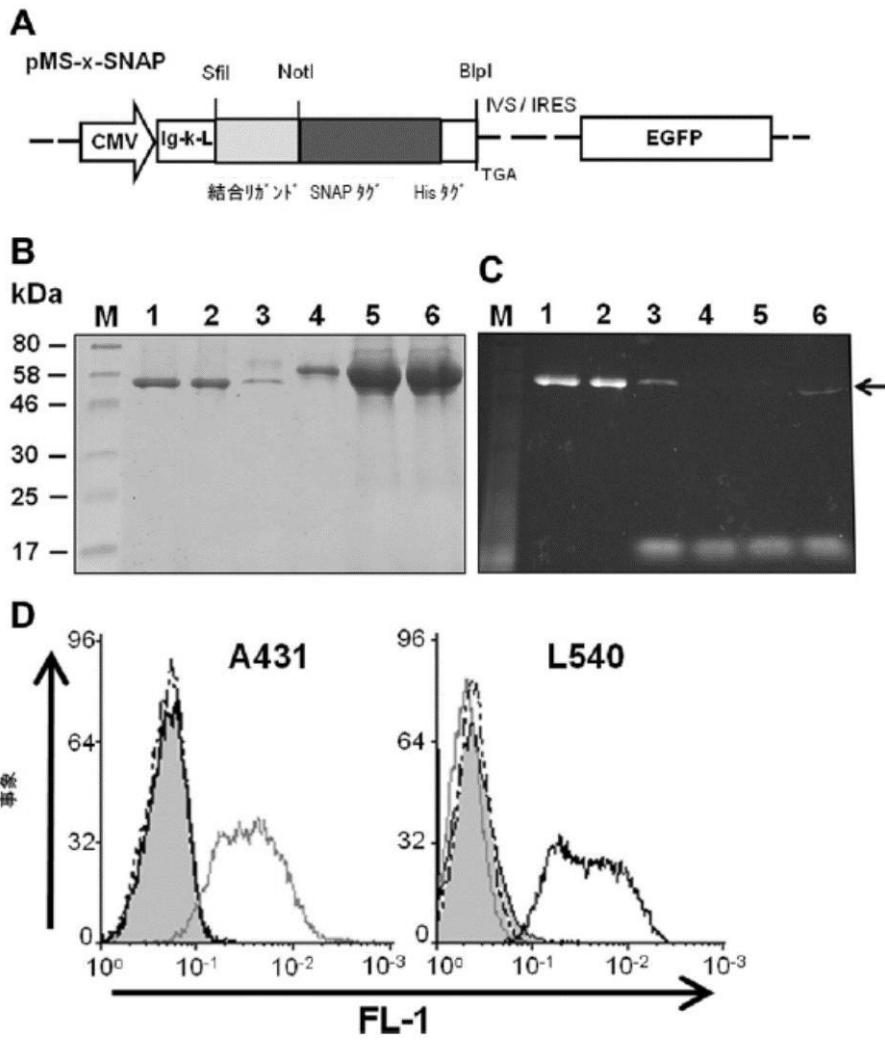
Mol. Cell. Endocrinol. 37, 205-213 (1986).

15. Cai, K. et al. Relationship between induction of phosphorylated H2AX and survival in breast cancer cells exposed to ¹¹¹In-DTPA-hEGF. J Nucl Med. 49, 1353-1361 (2008).

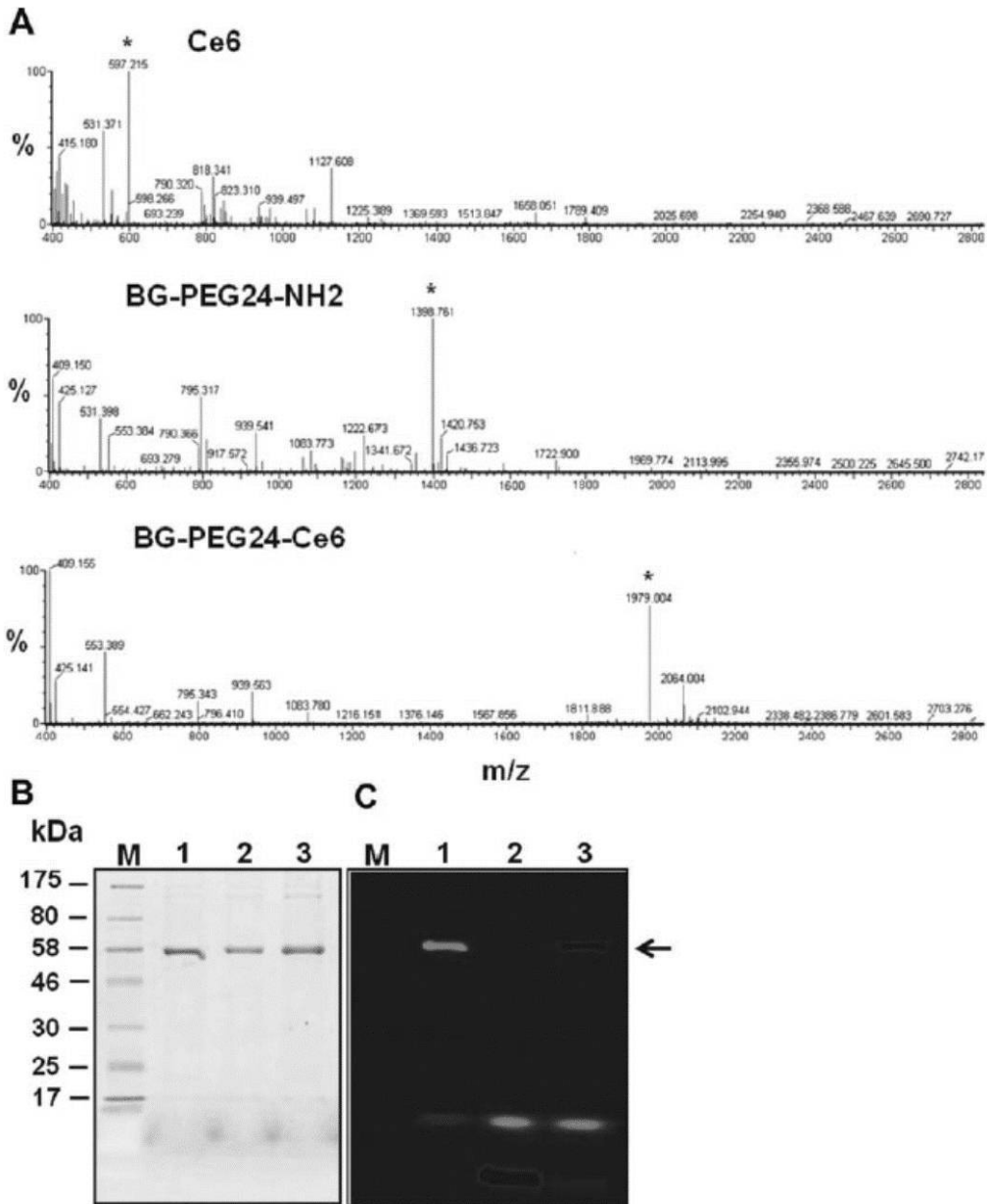
16. Nida, D.L., Rahman, M.S., Carlson, K.D., Richards-Kortum, R. & Follen, M. Fluorescent nanocrystals for use in early cervical cancer detection. Gynecologic Oncology 99, 89-94 (2005).

17. Kampmeier, F. et al. Site-specific, covalent labeling of recombinant antibody fragments via fusion to an engineered version of 6-Oalkylguanine DNA alkyltransferase. Bioconjug Chem. 20, 1010-1015 (2009).

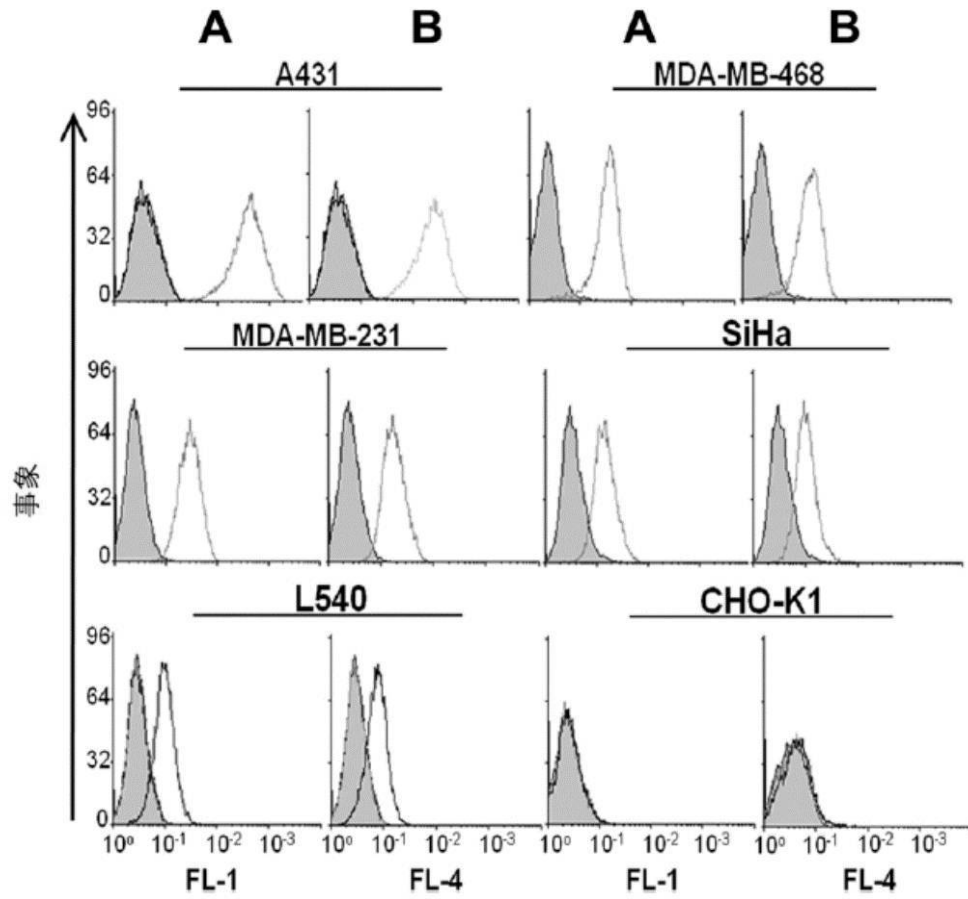
【 図 1 】



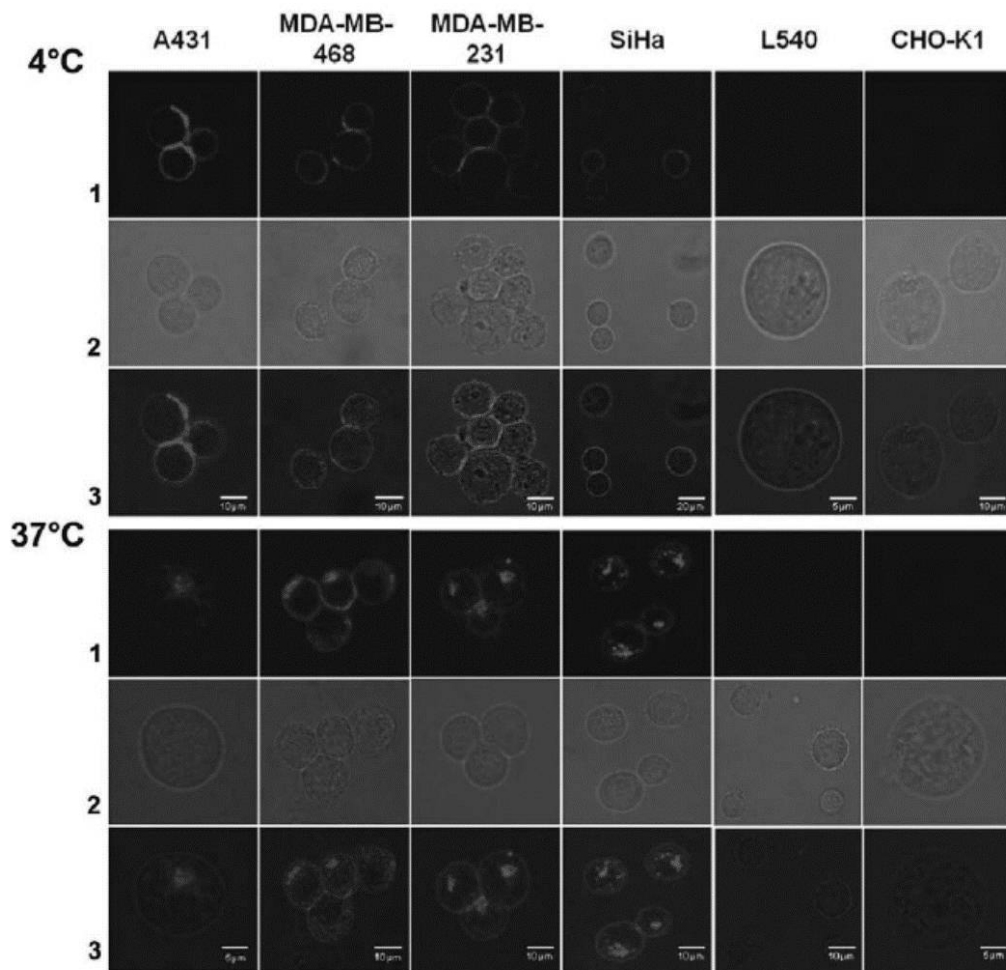
【図2】



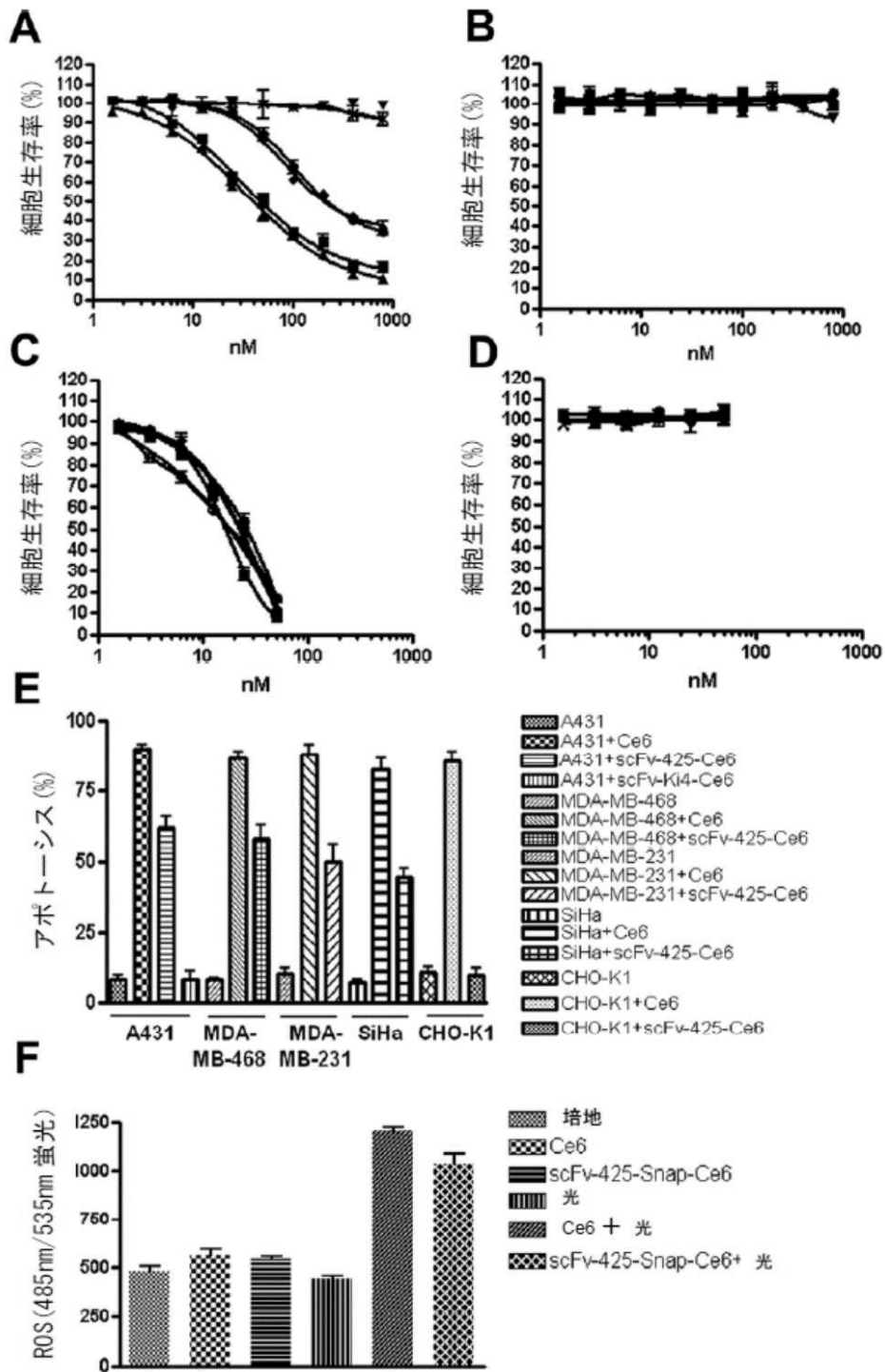
【図 3】



【 図 4 】



【図 5】



【配列表】

2015512247000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/055022

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 A61K41/00
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)

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/013359 A2 (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG [DE]; RWTH AACHEN [DE]; RIBBERT MARKUS [DE];) 29 January 2009 (2009-01-29)	1-3,5-9, 11,12, 14,17
Y	Page 59 lines 18, 19; page 65 lines 1-20; Figures 4-16, 98 and 112. Seq ID 14.	4,8,10, 13,15, 16,18,19
Y	----- NELA MALATESTI ET AL: "Synthesis and in vitro investigation of cationic 5,15-diphenyl porphyrin-monoclonal antibody conjugates as targeted photodynamic sensitizers.", INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 28, no. 6, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 1561-1569, XP055003794, ISSN: 1019-6439 Abstract, page 1566 Figure 1, page 1568 paragraphs 3-5 ----- -/-	15,16, 18,19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 October 2012

Date of mailing of the international search report

24/10/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bettio, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/055022

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GRONEMEYER T ET AL: "DIRECTED EVOLUTION OF 0<6>-ALKYLGUANINE-DNA ALKYLTRANSFERASE FOR APPLICATIONS IN PROTEIN LABELING", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB, vol. 19, no. 7, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 309-316, XP009079596, ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/PROTEIN/GZL014 Page 324 figure 3, lines 5-7. -----	13
Y	WO 95/25167 A1 (MERCK PATENT GMBH [DE]; KETTLEBOROUGH A CATHRINE [GB]; BENDIG MARY M []) 21 September 1995 (1995-09-21) Claim 4, Seq ID 20 -----	4,8
Y	US 6 936 469 B2 (DEJONG GARY [CA] ET AL) 30 August 2005 (2005-08-30) SEQ ID 13 -----	10
A	KEPPLER A ET AL: "Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 101, no. 27, 6 July 2004 (2004-07-06), pages 9955-9959, XP002462236, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0401923101 the whole document -----	1-19
A	BARTH STEFAN ET AL: "Ki-4(scFv)-ETA', a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 95, no. 12, 15 June 2000 (2000-06-15), pages 3909-3914, XP002245489, ISSN: 0006-4971 the whole document -----	1-19
A	EP 1 882 688 A1 (EPFL ECOLE POLYTECHNIQUE FEDER [CH]) 30 January 2008 (2008-01-30) Paragraphs 80-83 -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/055022

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009013359 A2	29-01-2009	CA 2693155 A1 CN 101828113 A EP 2171456 A2 US 2010183516 A1 WO 2009013359 A2	29-01-2009 08-09-2010 07-04-2010 22-07-2010 29-01-2009
WO 9525167 A1	21-09-1995	AT 232902 T AU 2071695 A CA 2163012 A1 CZ 9503014 A3 DE 69529649 D1 DE 69529649 T2 DK 699237 T3 ES 2191702 T3 HU 221001 B1 JP H08510922 A JP 2006025794 A NO 954626 A PL 311661 A1 PT 699237 E RU 2170257 C2 SK 143095 A3 US 5844093 A WO 9525167 A1	15-03-2003 03-10-1995 21-09-1995 14-02-1996 27-03-2003 18-12-2003 26-05-2003 16-09-2003 29-07-2002 19-11-1996 02-02-2006 16-11-1995 04-03-1996 31-07-2003 10-07-2001 06-11-1996 01-12-1998 21-09-1995
US 6936469 B2	30-08-2005	US 2003003435 A1 US 2005112661 A1	02-01-2003 26-05-2005
EP 1882688 A1	30-01-2008	CN 101516857 A EP 1882688 A1 EP 2049499 A1 JP 2009544660 A US 2011207157 A1 US 2012237961 A1 WO 2008012296 A1	26-08-2009 30-01-2008 22-04-2009 17-12-2009 25-08-2011 20-09-2012 31-01-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	

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

(71)出願人 514237828

ライニッシュ - ヴェストファリシェ テクニシェ ホッホシューレ アーヘン
ドイツ連邦共和国 5 2 0 6 2 アーヘン テンブレルグラベン 5 5

(74)代理人 100079049

弁理士 中島 淳

(74)代理人 100084995

弁理士 加藤 和詳

(74)代理人 100085279

弁理士 西元 勝一

(72)発明者 パース ステファン

ドイツ連邦共和国 8 0 6 8 6 ミュンヘン ハンザシュトラッセ 27 ツェー フラウンホーファ - ゲゼルシャフト ツァー フォルデルング デア アンゲバンデン フォルシュンク エー・ファオ・内

(72)発明者 ツール メーメット ケマル

ドイツ連邦共和国 5 2 0 7 4 アーヘン パウヴェルスシュトラッセ 30 ユニバーシタツツクリニクム アーヘン 内

(72)発明者 ハサイン アハマド

ドイツ連邦共和国 5 2 0 7 4 アーヘン パウヴェルスシュトラッセ 30 ユニバーシタツツクリニクム アーヘン 内

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA01 CA11 DA03 EA04 GA11 HA01

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA03

4C076 CC41 EE41 EE59

4C084 AA11 NA05 ZB262

4C085 AA21 AA24 BB11 DD62 EE01 GG01

4H045 AA11 BA41 BA70 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26