グロブリン結合ペプチド若しくは小分子リガンド、抗体結合ペプチド若しくは小分子リガンド又は長い半減期の血清タンパク質に対して親和性を有する別のペプチド若しくは小分子が含まれる。（例えば、Blaney et al.，Method and compositions for increasing the serum half-life of pharmacologically active agents by binding to transthyretin-selective ligands，米国特許第５，７１４，１４２号；Sato et al.，Serum albumin binding moieties，US ２００３／００６９３９５ Ａ１；Jones et al.，Pharmaceutical active conjugates，米国特許第６，３４２，２２５号を参照）。「長い半減期の血清タンパク質」は、いわゆる「担体タンパク質」（アルブミン、トランスフェリン及びハプトグロビンなど）、フィブリノーゲン及びその他の血液凝固因子、補体成分、免疫グロブリン、酵素阻害剤、アンギオテンシン及びブラジキンなどの物質の前駆体並びにタンパク質の他の多くの種類など、哺乳動物の血漿中に溶解された様々な何百ものタンパク質の１つである。本発明は、本発明に記載されているものなど（但し、これらに限定されない。）、医薬として許容される半減期伸長部分のあらゆる単一種の使用又はＰＥＧ及び免疫グロブリンＦｃドメイン又はＦｃのＣＨ２ドメイン、アルブミン（例えば、ＨＳＡ）、アルブミン結合タンパク質、トランスサイレチン又はＴＢＧなど２つ又はそれ以上の半減期延長部分の組み合わせの使用を包含する。

【０１５３】

本発明の幾つかの実施形態において、Ｆｃドメイン又はその一部（ＦｃのＣＨ２ドメインなど）が、半減期延長部分として使用される。Ｆｃドメインは、トキシンペプチドのＮ末端（例えば、式F^1-（Ｌ）$_f$-Ｐに従って）又はＣ末端（例えば、式Ｐ-（Ｌ）$_g$-F^1に従って）又はＮ末端及びＣ末端の両方に（例えば、式F^1-（Ｌ）$_f$-Ｐ-（Ｌ）$_g$-F^2又はＰ-（Ｌ）$_g$-F^1-（Ｌ）$_f$-Ｐに従って）融合することが可能である。本明細書に記載されているように、Ｆｃドメインとトキシンペプチドの間に、ペプチドリンカー配列を場合によって含めることが可能である。式F^1-（Ｌ）$_f$-Ｐの例には、Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（Ｋ２２Ａ）[２-３５]；Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（Ｒ１Ｋ／Ｋ２２Ａ）[１-３５]；Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（Ｒ１Ｈ／Ｋ２２Ａ）[１-３５]；Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（Ｒ１Ｑ／Ｋ２２Ａ）[１-３５]；Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（Ｒ１Ｙ／Ｋ２２Ａ）[１-３５]；Ｆｃ-Ｌ１０-ＰＰ-ＳｈＫ（Ｋ２２Ａ）[１-３５]及び本明細書に記載されている他の全ての実施例が含まれる。式Ｐ-（Ｌ）$_g$-F^1の例には、ＳｈＫ（１-３５）-Ｌ１０-Ｆｃ；ＯｓＫ１（１-３８）-Ｌ１０-Ｆｃ；Ｍｅｔ-ＳｈＫ（１-３５）-Ｌ１０-Ｆｃ；ＳｈＫ（２-３５）-Ｌ１０-Ｆｃ；Ｇｌｙ-ＳｈＫ（１-３５）-Ｌ１０-Ｆｃ；Ｏｓｋ１（１-３８）-Ｌ１０-Ｆｃ；及び本明細書に記載されている他の全ての実施例が含まれる。

【０１５４】

Ｆｃバリアントが、本発明の範囲に属する適切な半減期延長部分である。サルベージ受容体への結合が維持される限り、固有Ｆｃは、本発明において、Ｆｃバリアントを形成するために広く修飾することが可能である。例えば、ＷＯ９７／３４６３１、ＷＯ９６／３２４７８及びＷＯ０４／１１０４７２参照。このようなＦｃバリアントにおいて、本発明の融合分子によって必要とされない構造的特徴又は機能的活性を与える固有Ｆｃの１つ又はそれ以上の部位を除去することが可能である。例えば、残基を置換若しくは欠失させ、部位中に残基を挿入し、又は部位を含有する部分を末端切断させることによって、これらの部位を除去することが可能である。挿入された又は置換された残基は、ペプチド模倣体又はＤアミノ酸などの変化されたアミノ酸であることも可能である。Ｆｃバリアントは、多数の理由のために望ましいことがあり得、これらの幾つかは以下に記載されている。典型的なＦｃバリアントには、以下の分子及び配列が含まれる。

【０１５５】

１．ジスルフィド結合の形成に関与する部位が除去される。このような除去は、本発明

の分子を作製するために使用される宿主細胞中に存在する他のシステイン含有タンパク質との反応を避けることが可能である。この目的のために、Ｎ末端のシステイン含有セグメントは末端切断することが可能であり、又はシステイン残基は欠失されるか、若しくは他のアミノ酸（例えば、アラニル、セリル）で置換することが可能である。特に、配列番号２のＮ末端の２０アミノ酸セグメントを末端切断するか、又は配列番号２の７位及び１０位のシステイン残基を欠失又は除去することが可能である。システイン残基が除去されている場合でさえ、一本鎖Ｆｃドメインは、非共有的に互いに結合された二量体Ｆｃドメインをなお形成することができる。

【０１５６】

２．固有Ｆｃは、選択された宿主細胞とより適合性があるように修飾される。例えば、プロリンイミノペプチダーゼなどの、Ｅ．コリ中の消化酵素によって認識され得る典型的な固有ＦｃのＮ末端に近いＰＡ配列を除去することが可能である。分子が、Ｅ．コリなどの細菌細胞中で組み換え的に発現されている場合には特に、Ｎ末端メチオニン残基を付加することも可能である。配列番号２のＦｃドメイン（図４Ａ－Ｂ）は、このようなＦｃバリアントの１つである。

【０１５７】

３．固有ＦｃのＮ末端の一部は、選択された宿主細胞中で発現されたときにＮ末端の不均一性を防ぐために除去される。この目的のために、Ｎ末端の最初の２０アミノ酸残基、特に位置１、２、３、４及び５の残基の何れをも欠失させることが可能である。

【０１５８】

４．１つ又はそれ以上のグリコシル化部位が除去される。典型的にグリコシル化される残基（例えば、アスパラギン）は、細胞溶解応答を付与することが可能である。このような残基は、欠失させるか、又はグリコシル化されない残基（例えば、アラニン）で置換することが可能である。

【０１５９】

５．Ｃ１ｑ結合部位などの補体との相互作用に関与する部位が除去される。例えば、ヒトＩｇＧ１のＥＫＫ配列を欠失又は置換することが可能である。補体の動員は、本発明の分子にとって有利でない場合があり得、このようなＦｃバリアントを用いて回避することが可能である。

【０１６０】

６．サルベージ受容体以外のＦｃ受容体への結合に影響を与える部位が除去される。固有Ｆｃは、本発明の融合分子に対して必要とされないある種の白血球を妨害するための部位を有することがあり、従って、除去され得る。

【０１６１】

７．ＡＤＣＣ部位が除去される。ＡＤＣＣ部位は、本分野において公知である。例えば、ＩｇＧ１中のＡＤＣＣ部位に関して、Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９（５）６３３－９（１９９２）を参照。これらの部位も、本発明の融合分子にとって不要であり、従って、除去することが可能である。

【０１６２】

８．固有Ｆｃが非ヒト抗体に由来する場合には、固有Ｆｃはヒト化することが可能である。典型的には、固有Ｆｃをヒト化するために、ヒト固有Ｆｃ中に通常見出される残基で、非ヒト固有Ｆｃ中の選択された残基を置換する。抗体のヒト化のための技術は、本分野において周知である。

【０１６３】

好ましいＦｃバリアントには、以下のものが含まれる。配列番号２では、１５位のロイシンはグルタミン酸で、９９位のグルタミン酸はアラニンで、並びに１０１位及び１０３位のリジンはアラニンで置換されることが可能である。さらに、フェニルアラニン残基は、１つ又はそれ以上のチロシン残基を置換することが可能である。

【０１６４】

別の半減期延長部分は、サルベージ受容体に結合することが可能な、タンパク質、ポリ

ペプチド、ペプチド、抗体、抗体断片又は小分子（例えば、ペプチド模倣化合物）である。例えば、１９９８年４月１４日にＰｒｅｓｔａらに付与された米国特許第５，７３９，２７７号に記載されているような半減期延長部分としてポリペプチドを使用することが可能である。ペプチドは、ＦｃＲｎサルベージ受容体への結合について、ファージディスプレイによって選択することも可能である。このようなサルベージ受容体結合化合物も、「半減期延長部分」の意味の中に含まれ、本発明の範囲に属する。このような半減期延長部分は、（例えば、プロテアーゼによって認識される配列を避けることによって）増加した半減期について選択されるべきであり、及び（例えば、抗体のヒト化で発見されるように、非免疫原性配列を優先することによって）減少した免疫原性について選択されるべきである。

【０１６５】

上述のように、ポリマー半減期延長部分は、F^1及びF^2に対して使用することも可能である。半減期延長部分として有用な化学的部分を付着させるための様々な手段が、現在利用可能である。例えば、「Ｎ-Ｔｅｒｍｉｎａｌｌｙ Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ」と題された特許協力条約（「ＰＣＴ」）国際公開ＷＯ９６／１１９５３号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。このＰＣＴ公報は、とりわけ、タンパク質のＮ末端への、水溶性ポリマーの選択的付着を開示している。

【０１６６】

本発明の組成物の幾つかの実施形態において、ポリマー半減期延長部分は、F^1及び／又はF^2としてのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）であるが、本発明の組成物は、位置F^1及び／又はF^2以外に、トキシンペプチド上の１つ又はそれ以上の部位など、分子中の他の部位に抱合された１つ又はそれ以上のＰＥＧを含むことも可能である。従って、本発明の組成物の幾つかの実施形態は、F^1及び／又はF^2である非ＰＥＧ半減期延長部分に、又はトキシンペプチド（Ｐ）に、又はこれらの何れかのあらゆる組み合わせに抱合された１つ若しくはそれ以上のＰＥＧ部分をさらに含む。例えば、本発明の組成物中のＦｃドメイン又はその一部（F^1及び／又はF^2として）は、還元的アルキル化の方法によって、モノＰＥＧ化され、ジＰＥＧ化され又はその他マルチＰＥＧ化されることが可能である。

【０１６７】

ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）との、タンパク質及びペプチドの共有的抱合は、治療的タンパク質のインビボ循環半減期を著しく延長させるためのアプローチとして広く認識されている。ＰＥＧ部分は、タンパク質にかなりの流体力学的半径を加えるので、ＰＥＧ化は、主として腎クリアランスを遅延させることによって、この効果を達成する。（Ｚａｌｉｐｓｋｙ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．，Ｕｓｅ ｏｆ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚｅｄ ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｓ ｆｏｒ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ．，ｉｎ ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｃａｌ ａｎｄ ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．，Ｊ．Ｍ．Ｈａｒｒｉｓ，Ｅｄ．，Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ：Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ．，３４７-３７０（１９９２））。タンパク質及びペプチドのＰＥＧ化によってしばしば付与されるさらなる利点には、増加した溶解度、タンパク分解による分解に対する耐性及び治療用ポリペプチドの減少した免疫原性が含まれる。タンパク質ＰＥＧ化の長所は、ＰＥＧ-アデノシンデアミナーゼ（Ａｄａｇｅｎ™／Ｅｎｚｏｎ Ｃｏｒｐ，）、ＰＥＧ-Ｌ-アスパラギナーゼ（Ｏｎｃａｓｐａｒ™／Ｅｎｚｏｎ Ｃｏｒｐ．）、ＰＥＧ-インターフェロンα-２ｂ（ＰＥＧ-Ｉｎｔｒｏｎ™／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ／Ｅｎｚｏｎ）、ＰＥＧ-インターフェロンα-２ａ（ＰＥＧＡＳＹＳ™／Ｒｏｃｈｅ）及びＰＥＧ-Ｇ-ＣＳＦ（Ｎｅｕｌａｓｔａ™／Ａｍｇｅｎ）並びに臨床試験中の多数のその他など、幾つかのＰＥＧ化されたタンパク質の商品化によって証明されている。

【０１６８】

要約すると、ＰＥＧ基は、一般に、ＰＥＧ部分上の反応性基（例えば、アルデヒド、アミノ、チオール又はエステル基）を通じた、本発明の化合物上の反応性基（例えば、アルデヒド、アミノ又はエステル基）へのアシル化又は還元的アルキル基を介して、本発明の組成物のペプチド部分へ付着される。

【０１６９】

合成ペプチドのＰＥＧ化のための有用な戦略は、溶液中での抱合体結合を形成することを通じて、ペプチド及びＰＥＧ部分（各々が他のＰＥＧ部分に対して相互に反応性である特別な官能性を有する。）を結合させることからなる。ペプチドは、慣用の固相合成を用いて容易に調製することが可能である（例えば、図５及び６並びに本明細書に添付されている説明文を参照されたい。）。ペプチドは、特異的な部位における適切な官能基で「予め活性化」される。前駆体は、ＰＥＧ部分との反応前に精製され、完全に性質決定される。ペプチドのＰＥＧとの連結は、通常、水相で起こり、逆相分析ＨＰＬＣによって容易にモニターすることが可能である。ＰＥＧ化されたペプチドは、調製用ＨＰＬＣによって容易に精製し、分析用ＨＰＬＣ、アミノ酸分析及びレーザー脱離質量分析法によって性質決定することが可能である。

【０１７０】

ＰＥＧは、市販されている周知の水溶性ポリマーであるか、又は、当技術分野で周知の方法に従い、エチレングリコールの開環重合により調製することができる（Ｓａｎｄｌｅｒ及びＫａｒｏ、Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｖｏｌ．３、１３８－１６１頁）。本願において、「ＰＥＧ」という用語は、サイズ又はＰＥＧの末端への修飾に関わらず、１、２又は多官能型のあらゆるポリエチレングリコール分子を包含するために広く使用され、式：

$$X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH \quad (X)$$

（ｎは２０～２３００であり、Ｘは、Ｈ又は末端修飾、例えばC_{1-4}アルキルである。）

によって表される。

【０１７１】

幾つかの有用な実施形態において、本発明で使用されるＰＥＧは、一方の末端がヒドロキシ又はメトキシで終わっている（即ち、Ｘは、Ｈ又はCH_3（「メトキシＰＥＧ」）である。）。ＰＥＧの他の末端（式（ＩＩ）では、ＯＨで終結するように示されている。）は、エーテル酸素結合、アミン結合又はアミド結合を介して活性化部分に共有結合することが注目される。化学的構造において使用される場合、「ＰＥＧ」という用語は、示されている水酸基の水素なしの上記式（ＩＩ）を含み、エーテル結合を形成するためにリンカーの遊離炭素原子との反応に利用可能な酸素が残存する。より具体的には、ＰＥＧをペプチドに抱合するために、ペプチドは、「活性化された」形態のＰＥＧと反応されなければならない。活性化されたＰＥＧは、式：

$$(PEG)-(A) \quad (XI)$$

（ＰＥＧ（上で定義されている。）は、活性化部分（Ａ）の炭素分子に共有結合して、エーテル結合、アミン結合又はアミド結合を形成し、（Ａ）は、ペプチドのアミノ酸残基上のアミノ、イミノ若しくはチオール基又はペプチドに共有結合されたリンカー部分と反応することが可能な反応性基を含有する。）

によって表すことができる。

【０１７２】

活性化されたＰＥＧの調製及び生物学的に活性なペプチドへのその抱合のための技術は、本分野において周知である。（例えば、米国特許第５，６４３，５７５号、同第５，９１９，４５５号、同第５，９３２，４６２号及び同第５，９９０，２３７号；Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，ＰＥＧｙｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ，ＥＰ ０５７５５４５ Ｂ１；Ｐｅｔｉｔ，Ｓｉｔｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｐｒｏｔｅｉｎ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ，米国特許第６，４５１，９８６号及び同第６，５４８，６４４号；Ｓ．Ｈｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）

with reactive endgroups：I．Modification of proteins，J．Bioactive Compatible Polymers，10：145-187（1995）；Y．Lu et al，Pegylated peptides III：Solid-phase synthesis with PEGylating reagents of varying molecular weight：synthesis of multiply PEGylated peptides，Reactive Polymers，22：221-229（1994）；A．M．Felix et al．，PEGylated Peptides IV：Enhanced biological activity of site-directed PEGylated GRF analogs，Int．J．Peptide Protein Res．，46：253-264（1995）；A．M．Felix，Site-specific polyethylene glycol）ylation of peptides，ACS Symposium Series 680（poly（ethylene glycol））：218-238（1997）；Y．Ikeda et al．，Polyethylene glycol derivatives，their modified peptides，methods for producing them and use of the modified peptides，EP 0473084 B1；G．E．Means et al．，Selected techniques for the modification of protein side chains，in：Chemical modification of proteins，Holden Day，Inc．，219（1971）参照。）。

【0173】

ＰＥＧ-アルデヒド又はＰＥＧ-アルデヒド水和物などの活性化されたＰＥＧは、公知の手段によって化学的に合成し、又は商業的な入手源（例えば、Ｓｈｅａｒｗａｔｅｒ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，（Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ，Ａｌ）又はＥｎｚｏｎ，Ｉｎｃ．（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．））から取得することができる。

【0174】

本発明における有用な活性化されたＰＥＧの例は、Ｓｈｅａｒｗａｔｅｒ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ（Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ，ＡＩ）から市販されているＰＥＧ-プロピオンアルデヒドなどのＰＥＧ-アルデヒド化合物（例えば、メトキシＰＥＧ-アルデヒド）である。ＰＥＧ-プロピオンアルデヒドは、式ＰＥＧ-CH_2CH_2ＣＨＯによって表される。（例えば、米国特許第５，２５２，７１４号参照）。有用な活性化されたＰＥＧの他の例は、ＰＥＧアセトアルデヒド水和物及びＰＥＧビスアルデヒド水和物であり、後者は、二機能性に活性化された構造を与える。（例えば、Ｂｅｎｔｌｅｙｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ａｌｄｅｈｙｄｅ ｈｙｄｒａｔｅｓ ａｎｄ ｒｅｌａｔｅｄ ｐｏｌｙｍｅｒｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｍｏｄｉｆｙｉｎｇ ａｍｉｎｅｓ，米国特許第５，９９０，２３７号参照）。

【0175】

本発明のＰＥＧ抱合されたペプチドを作製するための別の有用な活性化されたＰＥＧは、メトキシＰＥＧ-マレイミド（マレイミドモノメトキシＰＥＧなど）などの（但し、これに限定されない。）ＰＥＧ-マレイミド化合物であり、本発明のＰＥＧ抱合されたペプチドを作製するために特に有用である。（例えば、Ｓｈｅｎ，Ｎ-ｍａｌｅｉｍｉｄｙｌ ｐｏｌｙｍｅｒ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ，米国特許第６，６０２，４９８号；Ｃ．Ｄｅｌｇａｄｏ et al．，The uses and properties of PEG-linked proteins．，Crit．Rev．Therap．Drug Carrier Systems，9：249-304（1992）；Ｓ．Ｚａｌｉｐｓｋｙ et al．，Use of functionalized polyethylene glycol）ｓ for modification of polypeptides，in：Polyethylene glycol） chemis

try：Biotechnical and biomedical applications（J.M.Harris，Editor，Plenum Press：New York，347-370（1992）；S.Herman et al.，Polyethylene glycol）with reactive endgroups：I.Modification of proteins，J.Bioactive Compatible Polymers，10：145-187（1995）；P.J.Shadle et al.，Conjugation of polymer to colony stimulating factor-1，米国特許第4，847，325号；G.Shaw et al.，Cysteine added variants IL-3 and chemical modifications thereof，米国特許第5，166，322号及びEP 0469074 B1；G.Shaw et al.，Cysteine added variants of EPO and chemical modifications thereof，EP 0668353 A1；G.Shaw et al.，Cysteine added variants G-CSF and chemical modifications thereof，EP 0668354 A1；N.V.Katre et al.，Interleukin-2 muteins and polymer conjugation thereof，米国特許第5，206，344号；R.J.Goodson and N.V.Katre，Site-directed pegylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylate site，Biotechnology，8：343-346（1990））。

【0176】

ポリ（エチレングリコール）ビニルスルホンは、チオール化されたアミノ酸残基での、例えば、C残基での抱合によって、本発明のPEG抱合されたペプチドを作製するための別の有用な活性化されたPEGである。（例えば、M.Morpurgo et al.，Preparation and characterization of poly（ethylene glycol）vinyl sulfone，Bioconj.Chem.，7：363-368（1996）；Harris，Functionalization of polyethylene glycol for formation of active sulfone-terminated PEG derivatives for binding to proteins and biologically compatible materials，米国特許第5，446，090号；同第5，739，208号；同第5，900，461号；同第6，610，281号及び同第6，894，025号；and Harris，Water soluble active sulfones of poly（ethylene glycol），WO 95/13312 A1も参照されたい。）。

【0177】

本発明において有用であるPEGの別の活性化された形態は、PEG-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル化合物、例えば、メトキシPEG-N-ヒドロキシスクシンイミジル（NHS）エステルである。

【0178】

PEGのヘテロ二機能的に（heterobifunctionally）活性化された形態も有用である。（例えば、Thompson et al.，PEGylation reagents and biologically active compounds formed therewith，米国特許第6，552，170号を参照されたい。）

典型的には、トキシンペプチド又はトキシンペプチドを含む融合タンパク質は、チオール活性化されたPEG化合物、ジオール活性化されたPEG化合物、PEGヒドラジド化合物、PEG-オキシアミン化合物又はPEG-ブロモアセチル化合物など（但し、これ

らに限定されない。）などの活性化されたＰＥＧ化合物と、公知の化学的技術によって反応される。（例えば、Ｓ．Ｈｅｒｍａｎ，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｗｉｔｈ Ｒｅａｃｔｉｖｅ Ｅｎｄｇｒｏｕｐｓ：Ｉ．Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｊ．Ｂｉｏａｃｔｉｖｅ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｔｉｂｌｅ Ｐｏｌｙｍｅｒｓ，１０：１４５－１８７（１９９５）；Ｓ．Ｚａｌｉｐｓｋｙ，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ Ｇｌｙｃｏｌ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｗｉｔｈ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ Ａｃｔｉｖｅ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ，１６：１５７－１８２（１９９５）；Ｒ．Ｇｒｅｅｎｗａｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ ｄｒｕｇｓ ａｎｄ ｐｒｏｄｒｕｇｓ：ａ ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ ｒｅｖｉｅｗ，Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，１７：１０１－１６１（２０００）を参照されたい。）。

【０１７９】

Ｎ末端のＰＥＧ化のための方法は、実施例３１～３４、４５及び４７～４８において、本明細書に例示されているが、当業者によって利用可能なＰＥＧ化法を決して限定するものではない。

【０１８０】

実際に所望されるように、ＰＥＧに対するあらゆる分子量、例えば、約１，０００又は２，０００ダルトン（Ｄａ）～約１００，０００Ｄａ（ｎは、２０～２３００）である。）を使用することが可能である。好ましくは、本発明のＰＥＧ抱合されたペプチド中で使用されるＰＥＧの総分子量又は合計分子量は、約３，０００Ｄａ又は５，０００Ｄａから約５０，０００Ｄａ又は６０，０００Ｄａ（合計のｎは、７０～１，４００）、より好ましくは約１０，０００Ｄａ～約４０，０００Ｄａ（合計のｎは、約２３０～約９１０）である。ＰＥＧに対する最も好ましい総質量は、約２０，０００Ｄａ～約３０，０００Ｄａ（合計のｎは、約４５０～約６８０である。）である。ＰＥＧ中の反復単位の数「ｎ」は、ダルトンで記載された分子量に対して近似される。活性化されたリンカー上のＰＥＧの総分子量は、医薬用途に対して適切であることが好ましい。従って、ＰＥＧ分子の総分子量は、約１００，０００Ｄａを超えるべきでない。

【０１８１】

多糖ポリマーは、タンパク質修飾のために使用することができる水溶性ポリマーの別の種類である。デキストランは、主にα１－６結合によって連結されたグルコースの各サブユニットから構成される多糖ポリマーである。デキストラン自体は、多くの分子量範囲で入手可能であり、約１ｋＤ～約７０ｋＤまでの分子量で容易に入手可能である。デキストランは、単独の半減期延長部分として、又は別の半減期延長部分（例えば、Ｆｃ）と組み合わせて、本発明において使用するための適切な水溶性ポリマーである。例えば、ＷＯ９６／１１９５３及びＷＯ９６／０５３０９を参照されたい。治療用免疫グロブリン又は診断用免疫グロブリンに抱合されたデキストランの使用が報告されており、例えば、欧州特許公報０３１５４５６号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。本発明における半減期延長部分としてデキストランが使用される場合、約１ｋＤ～約２ｋＤのデキストランが好ましい。

【０１８２】

リンカー。何れの「リンカー」基又は部分（すなわち、式Ｉ－ＩＸ中の「－（Ｌ）$_f$－」又は「－（Ｌ）$_g$－」）も、場合によって使用される。リンカーが存在する場合、リンカーは、主にスペーサーとして働くので、その化学構造は重要でない。本明細書に上述されているように、リンカー部分（－（Ｌ）$_f$－及び／又は－（Ｌ）$_g$－）は、存在するとすれば、本発明の組成物中に存在し得る、他の何れのリンカーとも独立に同一又は別異であることが可能である。例えば、「（Ｌ）$_f$」は、本発明における他の何れの「（Ｌ）$_f$」又は何れの「（Ｌ）$_g$」とも同一の部分又は異なる部分を表すことが可能である。リンカーは、好ましくは、ペプチド結合により連結されたアミノ酸から構成される。したがっ

て、幾つかの実施形態において、リンカーは、ペプチド結合により連結された１～約３０個のアミノ酸から構成され、アミノ酸は、天然に存在する２０個のアミノ酸から選択される。これらのアミノ酸の幾つかは、当業者によって十分に理解されているように、グリコシル化することが可能である。例えば、シアル化部位を構成する有用なリンカー配列は、$X_1X_2NX_4X_5G$（配列番号６３７）であり、X_1、X_2、X_4及びX_5は、各々独立に、任意のアミノ酸残基である。）である。

【０１８３】

幾つかの実施形態において、１～２０個のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン及びリジンから選択される。より好ましくは、リンカーは、グリシン及びアラニンなどの、立体的に妨害されないアミノ酸の過半数から構成される。従って、好ましいリンカーには、ポリグリシン（特に、$(Gly)_4$、(Gly_5)）、ポリ（Ｇｌｙ-Ａｌａ）及びポリアラニンが含まれる。他の好ましいリンカーは、本明細書において「Ｌ５」（ＧＧＧＧＳ；配列番号６３８）、「Ｌ１０」（ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ；配列番号７９）、「Ｌ２５」ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ；配列番号８４）として特定されるリンカー、並びに、以下の実施例に使用されている全てのリンカーである。しかしながら、本明細書に記載されているリンカーは、典型的なものであり、本発明の範囲に属するリンカーは、さらに長くすることが可能であり、他の残基を含むことが可能である。

【０１８４】

ペプチドリンカーブ部分（Ｌ）を含む、本発明の組成物の幾つかの実施形態において、酸性残基、例えば、グルタミン酸又はアスパラギン酸残基が、リンカー部分（Ｌ）のアミノ酸配列中に配置される。例には、以下のペプチドリンカー配列が含まれる。

【０１８５】

【化１】

GGEGGG (配列番号： 639);

GGEEEGGG (配列番号： 640);

GEEEG (配列番号： 641);

GEEE (配列番号： 642);

GGDGGG (配列番号： 643);

GGDDDGG (配列番号： 644);

GDDDG (配列番号： 645);

GDDD (配列番号： 646);

GGGGSDDSDEGSDGEDGGGGS (配列番号： 647);

WEWEW (配列番号： 648);

FEFEF (配列番号： 649);

EEEWWW (配列番号： 650);

EEEFFF (配列番号： 651);

WWEEEWW (配列番号： 652); or

FFEEEFF (配列番号： 653).

【０１８６】

他の実施形態においては、リンカーは、リン酸化部位、例えば、$X_1X_2YX_3X_4G$（配列番号６５４）（X_1、X_2、X_3及びX_4は、各々独立に、任意のアミノ酸残基である。）；$X_1X_2SX_3X_4G$（配列番号６５５）（X_1、X_2、X_3及びX_4は、各々独立に、任意のアミノ酸残基である。）；又は$X_1X_2TX_3X_4G$（配列番号６５６）（X_1、X_2、X_3及びX_4は、各々独立に、任意のアミノ酸残基である。）を構成す

る。

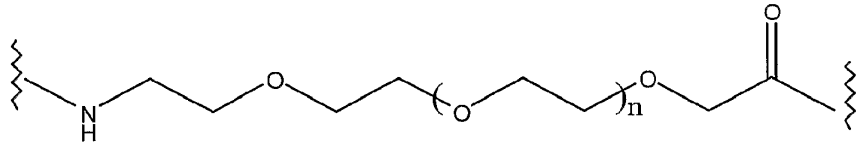
【０１８７】

非ペプチドリンカーも可能である。例えば、－ＮＨ－（ＣＨ$_2$）$_s$－Ｃ（Ｏ）－（式中、ｓ＝２～２０）などのアルキルリンカーを使用することが可能である。これらのアルキルリンカーは、さらに、低級アルキル（例えば、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）低級アシル、ハロゲン（例えば、Ｃｌ、Ｂｒ）、ＣＮ、ＮＨ$_2$、フェニルなどの、立体的に妨害を生じないあらゆる基によって置換することが可能である。典型的な非ペプチドリンカーは、ＰＥＧリンカー、

【０１８８】

【化２】

(XII)



（ｎは、リンカーが１００～５０００ｋＤ、好ましくは１００～５００ｋＤの分子量を有するようになる。）

である。ペプチドリンカーは、上記と同一の様式で誘導体を形成するために改変することが可能である。

【０１８９】

誘導体。本発明者らは、化合物のペプチド及び／又は半減期延長部分の一部を誘導体化することも想定している。このような誘導体は、化合物の溶解度、吸収、生物学的半減期などを改善することが可能である。あるいは、前記部分は、化合物の全ての望ましくない副作用などを削除又は軽減することが可能である。典型的な誘導体には、以下のとおりである化合物が含まれる。

【０１９０】

１．化合物又はそのある部分が環状である。例えば、ペプチド部分は、（例えばリンカー中に）２つ又はそれ以上のＣｙｓ残基を含有するように修飾することが可能であり、これはジスルフィド結合形成によって環状化することができる。

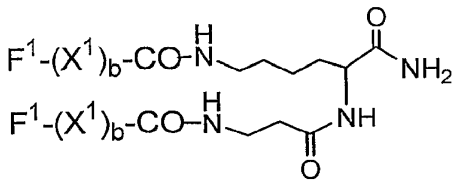
【０１９１】

２．化合物は、架橋されているか、又は分子間を架橋できるようにされる。例えば、ペプチド部分は、１つのＣｙｓ残基を含有し、これにより、リンカー分子と分子間ジスルフィド結合を形成することができるように修飾することが可能である。化合物は、以下に示されている分子におけるように、そのＣ末端を通じて架橋することも可能である。

【０１９２】

【化３】

(XIII)



【０１９３】

３．非ペプチジル連結（結合）が、１つ又はそれ以上のペプチジル［－Ｃ（Ｏ）ＮＲ－］連結を置換する。典型的な非ペプチジル連結は、－ＣＨ$_2$－カルバマート［－ＣＨ$_2$－ＯＣ（Ｏ）ＮＲ－］、ホスホナート結合、－ＣＨ$_2$－スルホンアミド［－ＣＨ$_2$－Ｓ（Ｏ

)$_2$ＮＲ－]、尿素[－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ－]、－ＣＨ$_2$－二級アミン及びアルキル化されたペプチド[－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^6－（式中、Ｒ^{6}は低級アルキルである。）]である。

【０１９４】

４．Ｎ末端が、化学的に誘導体化されている。典型的には、Ｎ末端は、アシル化され、又は置換されたアミンへと修飾することが可能である。典型的なＮ末端誘導体基には、－ＮＲＲ^1（－ＮＨ$_2$以外）、－ＮＲＣ（Ｏ）Ｒ^1、－ＮＲＣ（Ｏ）ＯＲ^1、－ＮＲＳ（Ｏ）$_2$Ｒ^1、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨＲ^1、スクシンイミド又はベンジルオキシカルボニル－ＮＨ－（ＣＢＺ－ＮＨ－）（Ｒ及びＲ$_1$は、各々独立に、水素又は低級アルキルであり、フェニル環は、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルコキシ、クロロ及びブロモからなる群から選択される１～３この置換基で置換されることが可能である。）が含まれる。

【０１９５】

５．遊離のＣ末端が、誘導体化されている。典型的には、Ｃ末端は、エステル化され又はアミド化される。例えば、配列番号５０４～５０８の何れかを有する本発明の化合物のＣ末端に、（ＮＨ－ＣＨ$_2$－ＣＨ$_2$－ＮＨ$_2$）$_2$を付加するために、本分野で記載されている方法を使用することが可能である。同様に、例えば、配列番号９２４～９５５、９６３～９７２、１００５～１０１３又は１０１８～１０２３の何れかを有する本発明の化合物のＣ末端に、ＮＨ$_2$を付加するために、本分野で記載されている方法を使用することが可能である。典型的なＣ末端誘導体基には、例えば、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^2（Ｒ^{2}は、低級アルコキシ又は－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}である（Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、独立に、水素又はＣ$_1$－Ｃ$_8$アルキル（好ましくは、Ｃ$_1$－Ｃ$_4$アルキル）である。）。）が含まれる。

【０１９６】

６．ジスルフィド結合は、別の、好ましくはより安定な、架橋部分（例えば、アルキレン）と置換される。例えば、Ｂｈａｔｎａｇａｒ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３９：３８１４－９；Ａｌｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．（１９９３） Ｔｈｉｒｔｅｅｎｔｈ Ａｍ．Ｐｅｐ．Ｓｙｍｐ．，３５７－９を参照されたい。

【０１９７】

７．１つ又はそれ以上の各アミノ酸残基が修飾される。以下に詳しく記載されているように、様々な誘導体化剤が、選択された側鎖又は末端残基と特異的に反応することが知られている。

【０１９８】

リジン残基及びアミノ末端残基を、コハク酸又は他のカルボキシル酸無水物と反応させることが可能であり、これは、リジン残基の電荷を逆転させる。αアミノ含有残基を誘導体化するための他の適切な試薬には、イミドエステル（メチルピコリンイミダートなど）、ピリドキサルリン酸、ピリドキサール、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、Ｏ－メチルイソ尿素、２，４－ペンタンジオン及びグリオキシラートとのトランスアミナーゼ触媒反応が含まれる。

【０１９９】

アルギニル残基は、１個又は数個の慣用の試薬の組み合わせ（フェニルグリオキサール、２，３－ブタンジオン、１，２－シクロヘキサンジオン及びニンヒドリンなど）との反応により修飾することができる。グアニジン官能基のｐＫａが高いため、アルギニン残基の誘導体化の際には、該反応をアルカリ条件中で行う必要がある。さらに、これらの試薬は、リシンの基及びアルギニンのε アミノ基と反応させることができる。

【０２００】

チロシン残基の具体的な修飾は広範に研究されており、特に、芳香族ジアゾニウム化合物又はテトラニトロメタンとの反応によるチロシン残基内へのスペクトル標識の導入に関心がもたれている。最も一般的には、Ｎ－アセチルイミジゾール及びテトラニトロメタンを使用して、それぞれＯ－アセチルチロシル種及び３－ニトロ誘導体が形成される。

【０２０１】

カルボキシル側鎖基（アスパルチル又はグルタミル）は、カルボジイミド（Ｒ’－Ｎ＝Ｃ＝Ｎ－Ｒ’）（１－シクロヘキシル－３－（２－モルホリニル－（４－エチル）カルボ

ジイミド又は１－エチル－３－（４－アゾニア－４，４－ジメチルペンチル）カルボジイミドなど）との反応により選択的に修飾することができる。さらに、アスパルチル及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によりアスパラギニル及びグルタミニル残基に変換することができる。

【０２０２】

グルタミン及びアスパラギン残基は、対応するグルタミン酸及びアスパラギン酸残基に脱アミド化することが可能である。あるいは、これらの残基は、穏やかな酸性条件下で脱アミド化され得る。これらの残基のいずれの形態も本発明の範囲内に含まれる。

【０２０３】

システイン残基は、ジスルフィド結合を除去するために、又は、逆に架橋を安定化させるために、アミノ酸残基又は他の部分によって置換することが可能である。例えば、「Ｂｈａｔｎａｇａｒ ｅｔ ａｌ．，（１９９６），Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３９：３８１４－９」を参照されたい。

【０２０４】

二官能性物質での誘導体化は、ペプチド若しくはそれらの官能性誘導体を水溶性支持マトリックスに、又は他の高分子半減期延長部分に架橋するのに有用である。一般に用いられる架橋剤には、例えば、１，１－ビス（ジアゾアセチル）－２－フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（例えば、４－アジドサリチル酸とのエステルなど）、ホモ二官能性イミドエステル（３，３’－ジチオビス（スクシンイミジルプロピオナートなどのジスクシンイミジルエステルなど）、及び二官能性マレイミド（ビス－Ｎ－マレイミド－１，８－オクタンなど）が含まれる。メチル－３－［（ｐ－アジドフェニル）ジチオ］プロピオイミダートなどの誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成しうる光活性化可能な中間体を与える。あるいは、反応性の水不溶性マトリックス、例えば、臭化シアンで活性化される炭水化物、及び米国特許第３，９６９，２８７号、第３，６９１，０１６号、第４，１９５，１２８号、第４，２４７，６４２号、第４，２２９，５３７号及び第４，３３０，４４０号に記載の反応性基質が、タンパク質の固定化に使用される。

【０２０５】

炭水化物（オリゴ糖）基は、タンパク質中のグリコシル化部位であることが知られている部位に都合よく結合させることができる。一般には、それらが配列Ａｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ（式中、Ｘは、プロリン以外の任意のアミノ酸でありうる。）の一部である場合には、Ｏ－結合オリゴ糖はセリン（Ｓｅｒ）又はトレオニン（Ｔｈｒ）残基に、Ｎ結合オリゴ糖はアスパラギン（Ａｓｎ）残基に結合させる。Ｘは、好ましくは、プロリンを除く１９個の天然に存在するアミノ酸の１つである。Ｎ結合及びＯ－結合オリゴ糖ならびに各タイプに見出される糖残基の構造は様々である。それらの両方に一般に存在する糖の１つのタイプは、Ｎ－アセチルノイラミン酸（シアル酸と称される。）である。シアル酸は、通常、Ｎ－結合及びＯ－結合オリゴ糖の両方の末端残基であり、その負電荷のため、グリコシル化化合物に酸性特性を付与する。このような部位を本発明の化合物のリンカー内に含めることが可能であり、該部位は、好ましくは、（例えば、ＣＨＯ、ＢＨＫ、ＣＯＳなどの哺乳動物細胞中での）ポリペプチド化合物の組換え産生中に細胞によりグリコシル化される。しかしながら、このような部位は、当技術分野で公知の合成又は半合成方法により更にグリコシル化することができる。

【０２０６】

他の可能な修飾には、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリン又はトレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化が、Ｃｙｓ中の硫黄原子の酸化、リジン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のα－アミノ基のメチル化が含まれる。Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ Ｈ Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ），ｐｐ．７９－８６（１９８３）を参照されたい。

【０２０７】

本発明の化合物は、ＤＮＡレベルでも変化させることが可能である。化合物の何れの部分のＤＮＡ配列も、選択された宿主細胞とより適合的なコドンへと変化させることが可能である。好ましい宿主細胞であるＥ．コリの場合、最適化されたコドンが本分野において公知である。制限部位を除去するために、又はサイレントな制限部位を含めるためにコドンを置換することが可能であり、これは、選択された宿主細胞中でのＤＮＡのプロセッシングを補助することができる。半減期延長部分、リンカー及びペプチドＤＮＡ配列は、先述の配列の変化の何れをも含むように修飾することが可能である。

【０２０８】

抱合誘導体を調製する方法も想定される。腫瘍細胞は、例えば、腫瘍細胞の正常な対応物には見出されないエピトープを示す。このようなエピトープには、例えば、それらの迅速な増殖から生じる様々な翻訳後修飾が含まれる。従って、本発明の一態様は、

ａ）標的エピトープに特異的に結合する少なくとも１つの無作為化されたペプチドを選択すること、並びに

ｂ）（ｉ）少なくとも１つの半減期延長部分（Ｆｃドメインが好ましい。）、（ｉｉ）選択されたペプチドの少なくとも１つのアミノ酸配列及び（ｉｉｉ）エフェクター分子を含む薬剤を調製すること、

を含む方法である。

【０２０９】

標的エピトープは、好ましくは、腫瘍特異的エピトープ又は病原性生物に対して特異的なエピトープである。エフェクター分子は、上記抱合対の何れでもあり得、好ましくは放射性同位体である。

【０２１０】

製造の方法

本発明は、本発明のポリペプチドを作製する上で有用な核酸、発現ベクター及び宿主細胞にも関する。宿主細胞は、真核細胞とすることが可能であり、哺乳動物細胞が好ましく、ＣＨＯ細胞が最も好ましい。宿主細胞は、原核細胞とすることも可能であり，Ｅ．コリ細胞が最も好ましい。

【０２１１】

本発明の化合物は、概ね、組換えＤＮＡ技術を用いて、形質転換された宿主細胞中で作製することが可能である。これを行うために、ペプチドをコードする組換えＤＮＡ分子が調製される。このようなＤＮＡ分子を調製する方法は、本分野において周知である。例えば、ペプチドをコードする配列は、適切な制限酵素を用いてＤＮＡから切り出すことが可能である。あるいは、ＤＮＡ分子は、ホスホルアミダート法などの化学的合成技術を用いて合成することが可能である。また、これらの技術の組み合わせも使用することが可能である。

【０２１２】

本発明は、適切な宿主中でペプチドを発現することが可能なベクターも含む。ベクターは、適切な発現調節配列に作用可能に連結されたペプチドをコードするＤＮＡ分子を含む。ＤＮＡ分子の前又は後の何れかに、ベクター中にこの作用可能な結合を挿入する方法は、周知である。発現調節配列には、プロモーター、アクチベーター、エンハンサー、オペレーター、リボソーム結合部位、開始シグナル、停止シグナル、キャップシグナル、ポリアデニル化シグナル及び転写又は翻訳の調節に関わる他のシグナルが含まれる。

【０２１３】

その上にＤＮＡ分子を有する生じたベクターは、適切な宿主を形質転換するために使用される。この形質転換は、本分野において周知な方法を用いて実施することが可能である。

【０２１４】

多数の利用可能な、周知の宿主細胞の何れをも、本発明の実施において使用することが可能である。特定の宿主の選択は、本分野によって認知される多数の因子に依存する。これらには、例えば、選択された発現ベクターとの適合性、ＤＮＡ分子によってコードされ

るペプチドの毒性、形質転換の速度、ペプチドの回収の容易さ、発現の特徴、生物学的安全性及び費用が含まれる。全ての宿主が特定のＤＮＡ配列の発現に対して等しく効果的であり得るわけではないことを理解して、これらの因子の釣り合いを決定しなければならない。これらの一般的な指針の中で、有用な微生物宿主には、細菌（Ｅ．コリ種など）、酵母（サッカロミセス種など）及び他の真菌、昆虫、植物、培養中の哺乳動物（ヒトを含む。）細胞又は本分野において公知の他の宿主が含まれる。

【０２１５】

次に、形質転換された宿主は、培養及び精製される。宿主細胞は、所望の化合物が発現されるように慣用の発酵条件下で培養することが可能である。このような発酵条件は、本分野において周知である。最後に、ペプチドは、本分野において周知の方法によって、培養物から精製される。

【０２１６】

化合物は、合成法によって作製することも可能である。固相合成は、小ペプチドを作製する最も費用対効果が優れた方法であるので、各ペプチドを作製する好ましい技術である。例えば、周知の固相合成技術には、保護基、リンカー及び固相支持体の使用、並びに特異的な保護及び脱保護反応条件、リンカー切断条件、スカベンジャーの使用及び固相ペプチド合成の他の態様が含まれる。適切な技術は、本分野において周知である。（例えば、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ（１９７３），Ｃｈｅｍ．Ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ，ｐｐ．３３５-６１（Ｋａｔｓｏｙａｎｎｉｓ ａｎｄ Ｐａｎａｙｏｔｉｓ ｅｄｓ．）；Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ（１９６３），Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９；Ｄａｖｉｓ ｅｔａｌ．（１９８５）．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｉｎｔｌ．１０：３９４-４１４；Ｓｔｅｗａｒｔ ａｎｄ Ｙｏｕｎｇ（１９６９），Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：米国特許第３，９４１，７６３号；Ｆｉｎｎ ｅｔ ａｌ．（１９７６），Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ（３ｒｄ ｅｄ．） ２：１０５-２５３；ａｎｄ Ｅｒｉｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，（１９７６），Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ（３ｒｄ ｅｄ．） ２：２５７-５２７；“Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，” ３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｔ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅ ａｎｄ Ｐ．Ｇ．Ｍ．Ｗｕｔｓ，Ｅｄｓ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，１９９９；ＮｏｖａＢｉｏｃｈｅｍ Ｃａｔａｌｏｇ，２０００；“Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，Ａ Ｕｓｅｒ’ｓ Ｇｕｉｄｅ，” Ｇ．Ａ．Ｇｒａｎｔ，Ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，１９９２；“Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｃｈｅｍｔｅｃｈ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ ＆ Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，” Ｗ．Ｄ．Ｂｅｎｎｅｔ，Ｊ．Ｗ．Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ，Ｌ．Ｋ．Ｈａｍａｋｅｒ，Ｍ．Ｌ．Ｐｅｔｅｒｓｏｎ，Ｍ．Ｒ．Ｒｈｏｄｅｓ，ａｎｄ Ｈ．Ｈ．Ｓａｎｅｉｉ，Ｅｄｓ．，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｃｈｅｍｔｅｃｈ，１９９８；“Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，２ｎｄ ｅｄ．，” Ｍ．Ｂｏｄａｎｓｚｋｙ，Ｅｄ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ-Ｖｅｒｌａｇ，１９９３；“Ｔｈｅ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，２ｎｄ ｅｄ．，” Ｍ．Ｂｏｄａｎｓｚｋｙ ａｎｄ Ａ．Ｂｏｄａｎｓｚｋｙ，Ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ-Ｖｅｒｌａｇ，１９９４；“Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐｓ，” Ｐ．Ｊ．Ｋｏｃｉｅｎｓｋｉ，Ｅｄ．，Ｇｅｏｒｇ Ｔｈｉｅｍｅ Ｖｅｒｌａｇ，Ｓｔｕｔｔｇａｒｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ，１９９４；“Ｆｍｏｃ Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，” Ｗ．Ｃ．Ｃｈａｎ ａｎｄ Ｐ．Ｄ，Ｗｈｉｔｅ，Ｅｄｓ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｐｒｅｓｓ，２０００，Ｇ．Ｂ．Ｆｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ａ Ｕｓｅｒ’ｓ Ｇｕｉｄｅ，１９９０，７７-１８３）。

【０２１７】

本発明の組成物が合成技術又は組換え技術によって調製されるか否かによらず、適宜、適切なタンパク質精製技術を含めることも可能である。本発明の組成物の幾つかの実施形

態において、トキシンペプチド部分及び／又は半減期延長部分又は他の何れかの部分は、定量又は検出を容易にするために、適切な同位体標識（例えば、^{125}Ｉ、^{14}Ｃ、^{13}Ｃ、^{35}Ｓ、^{3}Ｈ、^{2}Ｈ、^{13}Ｎ、^{15}Ｎ、^{18}Ｏ、^{17}Ｏなど）を含むように調製することが可能である。

【０２１８】

誘導体化されたペプチドを含有し、又は非ペプチド基を含有する化合物は、周知の有機化学技術によって合成することが可能である。

【０２１９】

化合物の使用

総論。本発明の化合物は、このような対象タンパク質の固有リガンドのアゴニスト、模倣物又はアンタゴニストとして、対象タンパク質に結合するそれらの能力に起因する薬理学的活性を有する。イオンチャンネルへの公知の関連を有する遺伝病（「チャンネル症（ｃｈａｎｎｅｌｏｐａｔｈｙ）」）は、医薬の様々な分野を包含し、その幾つかには、神経学、腎臓学、筋肉学及び心臓学が含まれる。イオンチャンネルを原因とする遺伝疾患のリストには、以下のものが含まれる。

【０２２０】

・嚢胞性繊維症（Cl^-チャンネル；ＣＦＴＲ）、
・デント病（タンパク質尿及び高カルシウム尿症；Cl^-チャンネル；ＣＬＣＮ５）、
・骨粗鬆症（Cl^-チャンネル；ＣＬＣＮ７）、
・家族性高インシュリン血症（ＳＵＲ１；ＫＣＮＪ１１；Ｋチャンネル）、
・糖尿病（ＫＡＴＰ／ＳＵＲチャンネル）、
・アンデルセン症候群（ＫＣＮＪ２、Ｋｉｒ２．１Ｋチャンネル）、
・バーター症候群（ＫＣＮＪ１；Ｋｉｒ１．１／ＲＯＭＫ；Ｋチャンネル）、
・遺伝性難聴（ＫＣＮＱ４；Ｋチャンネル）、
・遺伝成高血圧（リドル症候群）；ＳＣＮＮ１；上皮Ｎａチャンネル）、
・拡張型心筋症（ＳＵＲ２、Ｋチャンネル）、
・ＱＴ延長症候群又は心不整脈（心臓のカリウム及びナトリウムチャンネル）、
・ティモシー症候群（ＣＡＣＮＡ１Ｃ、Ｃａｖ１．２）、
・筋無力症（ＣＨＲＮＡ、ＣＨＲＮＢ、ＣＮＲＮＥ；ｎＡＣｈＲ）及び他の様々なミオパシー、
・高カリウム性周期性四肢麻痺（Ｎａ及びＫチャンネル）、
・てんかん（Na^+及びK^+チャンネル）、
・方麻痺性偏頭痛（ＣＡＣＮＡ１Ａ、Ｃａｖ２．１Ca^{2+}チャンネル及びＡＴＰ１Ａ２）、
・セントラルコア病（ＲＹＲ１、ＲｙＲ１；Ca^{2+}チャンネル）、及び
・パラミオトニア及びミオトニア（Na^+、Cl^-チャンネル）。

【０２２１】

Ｌ．Ｊ．Ｐｔａｃｅｋ ａｎｄ Ｙ－Ｈ Ｆｕ（２００４），Ａｒｃｈ．Ｎｅｕｒｏｌ．６１：１６６－８；Ｂ．Ａ．Ｎｉｅｍｅｙｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００１），ＥＭＢＯ ｒｅｐｏｒｔｓ ２１：５６８－７３；Ｆ．Ｌｅｈｍａｎｎ－Ｈｏｒｎ ａｎｄ Ｋ．Ｊｕｒｋａｔ－Ｒｏｔｔ（１９９９），Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｒｅｖ．７９：１３１７－７２参照。

先述のリストは遺伝性の疾患に関するが、これらの疾患中に引用されているチャンネルを標的とする分子も、他の起源又は起源が不明な関連疾患を治療する上でも有用であり得る。

【０２２２】

先述の疾患に加えて、イオンチャンネルを以下の治療のための標的として裏付ける証拠も提供されている。

【０２２３】

・鎌型赤血球貧血症（ＩＫＣａ１）－鎌型赤血球貧血症では、赤血球からの水分の喪失

が、ヘモグロビンの重合をもたらし、その後、溶血及び血管の閉塞をもたらす。いわゆるガルドスチャンネル（すなわち、ＩＫＣａ１）を通じたカルシウム流出後に、水分の喪失が起こる。従って、ＩＫＣａ１の遮断は、鎌形赤血球貧血症に対する治療的処置となり得る。

【０２２４】

・緑内障（ＢＫＣａ）-緑内障では、眼内圧が高すぎ、視神経の損傷、異常な眼機能を引き起こし、失明に至る場合もある。ＢＫＣａカリウムチャンネルの遮断は、眼内液の分泌を低下させ、平滑筋収縮を増加させることが可能であり、より低い眼内圧と眼内の神経保護をもたらす可能性がある。

【０２２５】

・多発性硬化症（Ｋｖ、ＫＣａ）、
・乾癬（Ｋｖ、ＫＣａ）、
・関節炎（Ｋｖ、ＫＣａ）、
・喘息（ＫＣａ、Ｋｖ）、
・アレルギー（ＫＣａ、Ｋｖ）、
・ＣＯＰＤ（ＫＣａ、Ｋｖ、Ｃａ）
・アレルギー性鼻炎（ＫＣａ、Ｋｖ）、
・肺繊維症、
・狼瘡（ＩＫＣａ１、Ｋｖ）、
・移植、ＧｖＨＤ（ＫＣａ、Ｋｖ）、
・炎症性骨吸収（ＫＣａ、Ｋｖ）、
・歯周病（ＫＣａ、Ｋｖ）、
・糖尿病、Ｉ型（Ｋｖ）-Ｉ型糖尿病は、異常なグルコース、タンパク質及び脂質代謝を特徴とする自己免疫疾患であり、インシュリン欠乏又は耐性を伴う。本疾患では、Ｋｖ１．３発現Ｔリンパ球が、膵島を攻撃及び破壊し、β細胞の喪失をもたらす。Ｋｖ１．３の遮断は、炎症性サイトカインを減少させる。さらに、Ｋｖ１．３の遮断は、形質膜へのＧＬＵＴ４の転位を促進し、これにより、インシュリン感受性を増加させる。

【０２２６】

・肥満（Ｋｖ）、-Ｋｖ１．３は、エネルギー恒常性の調節及び食事によって誘発される肥満からの保護において重大な役割を果たしているようである。従って、Ｋｖ１．３遮断剤は、代謝速度を増加させることが可能であり、より大きなエネルギー使用及び減少した体重をもたらす。

【０２２７】

・再狭窄（ＫＣａ、Ca^{2+}）、-血管平滑筋細胞の増殖及び遊走は、新生内膜肥厚及び血管の再狭窄をもたらすことが可能である。過剰な新生内膜血管平滑筋細胞増殖には、ＩＫＣａ１の上昇した発現を伴う。従って、ＩＫＣａ１の遮断は、血管形成術後の再狭窄を防ぐための治療的戦略となり得る。

【０２２８】

・虚血（ＫＣａ、Ca^{2+}）-神経又は心虚血、細胞膜の脱分極は、電圧開口型ナトリウム及びカルシウムチャンネルの開口をもたらす。次いで、これにより、カルシウムの過剰負荷が引き起こされ得、これは細胞毒性である。電圧開口型ナトリウム及び／又はカルシウムチャンネルの遮断は、カルシウムの過剰負荷を低減し、細胞保護効果を与えることが可能である。さらに、細胞膜電位の調節及び安定化におけるそれらの重大な役割のために、電圧及びカルシウム活性化されるカリウムチャンネルの調節物質も、カルシウムの過剰負荷を低減し、細胞を保護するように作用することが可能である。

【０２２９】

・腎失禁（ＫＣａ）、腎失禁は、機能亢進した膀胱平滑筋細胞に関連する。カルシウムによって活性化されるカリウムチャンネルは、膀胱平滑筋細胞中で発現され、これらは膜電位を調節し、細胞収縮の力及び頻度を間接的に調節する。従って、カルシウムによって活性化されるカリウムチャンネルの開口剤は、膀胱内の電気的及び収縮活性を弱め、排尿

の刺激の低下をもたらす機構を提供する。

【０２３０】

・骨粗鬆症（Ｋｖ）、

・偏頭痛を含む疼痛（Na_v、ＴＲＰ［一過性受容体電位チャンネル］。Ｐ２Ｘ、Ca^{2+}、Ｎ型電圧開口型カルシウムチャンネルは、脊髄中の侵害受容神経伝達の中心的制御物質である。ジコノチド（Ｎ型カルシウムチャンネルのペプチド遮断剤）は、侵害受容神経伝達を低下させ、ヒトにおける重度の慢性痛の症状の緩和について、世界で広く承認されている。侵害受容特異的Ｎ型カルシウムチャンネルの新規遮断剤は、減少した副作用特性を有する鎮痛剤で改善される。

【０２３１】

・高血圧（Ca^{2+}）、-Ｌ型及びＴ型電圧開口型カルシウムチャンネルは、血管平滑筋細胞中で発現され、ここで、興奮-収縮のカップリング及び細胞の増殖を調節する。特に、Ｔ型カルシウムチャンネルの活性は、高血圧時の新生内膜形成に関連している。Ｌ型及びＴ型カルシウムチャンネルの遮断剤は、カルシウム流入を低下させ、平滑筋細胞の収縮を阻害するので、高血圧の臨床的治療に対して有用である。

【０２３２】

・創傷治癒、細胞遊走は、創傷治癒において中心的な役割を果たしている。細胞内カルシウム勾配は、ケラチン生成細胞及び繊維芽細胞中の細胞遊走機構の重要な制御物質として推定されている。さらに、細胞膜を横切るイオン流動は、細胞容積の変化を伴う。細胞容積を調節することによって、イオンチャンネルは、細胞遊走機構の稼働に必要とされる細胞内環境に寄与する。特に、ＩＫＣａ１は、細胞遊走のために、全般的に必要とされるようである。さらに、Ｋｖ１．３、Ｋｖ３．１、ＮＭＤＡ受容体及びＮ型カルシウムチャンネルは、リンパ球及び神経細胞の遊走と関連する。

【０２３３】

・発作又は卒中、

・アルツハイマー病、

・パーキンソン病（ｎＡＣＨＲ、Ｎａｖ）

双極性疾患（Ｎａｖ、Ｃａｖ）

・癌、多くのカリウムチャンネル遺伝子が増幅され、タンパク質サブユニットが多くの癌性症状において上方制御されている。カリウムチャンネル上方制御のための病態生理学的役割と合致して、カリウムチャンネル遮断剤は、おそらくは、カルシウム流入の阻害及びカルシウム依存性遺伝子発現に対する効果を通じて、子宮癌細胞及び肝細胞癌細胞の増殖を抑制することが示されている。

【０２３４】

・様々な神経系疾患、新血管疾患、代謝疾患及び自己免疫疾患。

【０２３５】

イオンチャンネルのアゴニスト及びアンタゴニストは何れも、治療的な利益を達成することが可能である。治療的な利益は、例えば、Ｋｖ１．３、ＩＫＣａ１、ＳＫＣａ、ＢＫＣａ、Ｎ型又はＴ型Ca^{2+}チャンネルなどを拮抗することから得ることが可能である。これらのチャンネルの小分子及びペプチドアンタゴニストは、インビトロ及びインビボでの有用性を有することが示されている。しかしながら、産生効率及び薬物動態における限界が、イオンチャンネルの阻害剤ペプチドの臨床的な調査を大きく妨げてきた。

【０２３６】

電位開口型カリウムチャンネルＫｖ１．３のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の組成物は、自己免疫疾患に対する治療的価値を有する免疫抑制剤として有用である。例えば、このような分子は、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患及び関節リウマチを治療する上で有用である。（例えば、Ｈ．Ｗｕｌｆｆ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１１，１７０３-１７１３ ａｎｄ Ｈ．Ｒｕｓ ｅｔ ａｌ．（２００５）ＰＮＡＳ １０２，１１０９４-１１０９９；Ｂｅｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｍｅｍｏｒｙ Ｔ ｃｅｌｌ

s with a selective inhibitor peptide of Kv1.3 channnels for therapy of autoimmune diseases, Molec. Pharmacol. 67(4):1369-81(2005);1 Beeton et al.(2006), Kv1.3:therapeutic target for cell-mediated autoimmune disease, electronic preprint at //webfiles.uci.edu/xythoswfs/webui/ 267029.1を参照)。電圧開口型カリウムチャンネルの阻害剤であるKv1.3は、炎症の様々な前臨床動物モデルにおいて調べられてきた。Kv1.3の小分子及びペプチド阻害剤は、オボアルブミン[C.Beeton et al.(2005) Mol.Pharmacol.67,1369]及び破傷風トキソイド[G.C.Koo et al.(1999) Clin.Immunol.197,99]に対する遅延型過敏症応答を遮断することが示されている。皮膚中の炎症を抑制することに加え、阻害剤は、抗体産生も低下させた[G.C.Koo et al.(1997) J.Immunol.158,5120]。Kv1.3アンタゴニストは、多発性硬化症(MS)のラット養子免疫伝達実験自己免疫脳脊髄炎(AT-EAE)モデルにおいて有効性を示した。KV1.3チャンネルは、MS患者から得たミエリン特異的T細胞上に過剰発現されており、MSを治療する上でKv1.3阻害剤が与え得る有用性に対するさらなる裏づけをもたらす。炎症性骨吸収も、歯周病の前臨床養子免疫伝達モデルにおけるKv1.3阻害剤によって抑制された[P.Valverde et al.,(2004) J.Bone Mineral Res.19,155]。本研究では、阻害剤は、細菌の外膜タンパク質(歯肉の炎症を誘発するために使用される細菌の一成分)に対する抗体産生をさらに遮断した。最近、前臨床ラットモデルにおいて、Kv1.3阻害剤の有効性が、プリスタンによって誘発された関節炎及び糖尿病を治療する上で示された[C.Beeton et al.(2006) preprint available at //webfiles.uci.edu/xythoswfs/webui/__xy-267029__1.]。Kv1.3チャンネルは、T細胞及びB細胞の全てのサブセット上に発現されているが、エフェクターメモリーT細胞及びクラスが転換されたメモリーB細胞は、Kv1.3に特に依存している[H.Wulff et al.(2004) J.Immunol.173,776].Gad5/insulin-specific T cells from patients with new onset type 1 diabetes, myelin-specific T cells from MS patients and T cells from the synovium of rheumatoid arthritis patients all overexpress Kv1.3 [C.Beeton et al.(2006) preprint at //webfiles.uci.edu/xythoswfs/webui/__xy-267029__1]。高脂肪食上に配置されたときに、Kv1.3を欠失したマウスの体重増加はより少なく[J.Xu et al.(2003) Human Mol.Genet.12,551]、変化したグルコース利用を示した[J.Xu et al.(2004) Proc.Natl.Acad.Sci.,101,3112]からである。Kv1.3は、肥満及び糖尿病の治療に対しても調査されている。乳癌試料[M.Abdul et al.(2003)Anticancer Res.23,3347]及び前立腺癌細胞株[S.P.Fraser et al.(2003) Pflugers Arch.446,559]も、Kv1.3を発現することが示されており、Kv1.3の遮断は、癌の治療に対して有用であり得る。Kv1.3阻害剤トキシンペプチドが関与する自己免疫疾患を治療する本発明の方法に従って治療することが可能な疾患は、多発性硬化症、1型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病並びに全身性紅斑性狼瘡(SLE)及び狼瘡の他の形態が含まれる。

【０２３７】
中間伝導ＩＫＣａ１のカルシウム活性化カリウムを発現する細胞の幾つかには、Ｔ細胞、Ｂ細胞、肥満細胞及び赤血球（ＲＢＣ）が含まれる。ＩＫＣａ１を欠損するマウスから得られたＴ細胞及びＲＢＣは、容積制御の欠損を示す[Ｔ．Ｂｅｇｅｎｉｓｉｃｈ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７９，４７６８１]。前臨床及び臨床試験は、鎌形赤血球貧血症を治療する上でのＩＫＣａ１阻害剤の有用性を示した[Ｊ．Ｗ．Ｓｔａｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００３） Ｂｌｏｏｄ １０１，２４１２；ｗｗｗ．ｉｃａｇｅｎ．ｃｏｍ]。ＩＫＣａ１チャンネルの遮断剤は、ＥＡＥを遮断することも示されており、それらがＭＳの治療において有用性を有し得ることを示唆している[Ｅ．Ｐ．Ｒｅｉｃｈ ｅｔ ａｌ．（２００５） Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３５，１０２７]。肥満細胞からのＩｇＥ媒介性ヒスタミン産生も、ＩＫＣａ１阻害剤によって遮断され[Ｓ．Ｍａｒｋ Ｄｕｆｆｙ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１４，６６]、従って、ＩＫＣａ１阻害剤は、喘息の治療においても有益であり得る。ＩＫＣａ１チャンネルは、活性化されたＴ及びＢリンパ球上で過剰発現されており[Ｈ．Ｗｕｌｆｆ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７３，７７６]、従って、多様な免疫疾患の治療において有用性を示し得る。免疫系以外では、ＩＫＣａ１阻害剤は、血管再狭窄のラットモデルにおいても有効性を示しており、従って、血管形成術後における再狭窄を防ぐための新規治療戦略となり得る[Ｒ．Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００３） Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ １０８，１１１９]。阻害剤は、インビボで内皮細胞増殖及び血管新生を抑制したので、ＩＫＣａ１アンタゴニストは、腫瘍血管新生の治療において有用であるとも考えられる[Ｉ．Ｇｒｇｉｃ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ．Ｔｈｒｏｍｂ．Ｖａｓｃ．Ｂｉｏｌ．２５，７０４]。ＩＫＣａ１チャンネルは、膵臓腫瘍において上方制御されており、阻害剤は、膵臓癌細胞株の増殖を遮断した[Ｈ．Ｊａｇｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００４） Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．６５，６３０]。ＩＫＣａ１アンタゴニストは、外傷性脳傷害によって引き起こされた急性脳損傷を軽減するためのアプローチにもなり得る[Ｆ．Ｍａｕｌｅｒ（２００４）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２０，１７６１]。ＩＫＣａ１阻害剤で治療可能な疾患には、多発性硬化症、喘息、乾癬、接触媒介性皮膚炎、関節及び乾癬性関節炎、炎症性腸疾患、移植拒絶、移植片対宿主病、狼瘡、再狭窄、膵臓癌、腫瘍血管新生及び外傷性脳傷害が含まれる。

【０２３８】
従って、中間伝導度のカルシウム活性化カリウムチャンネルのペプチドアンタゴニストを取り込む本発明の分子ＩＫＣａは、免疫機能不全、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病及び狼瘡を治療するために使用することが可能である。

【０２３９】
従って、本発明は、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病又は狼瘡などの自己免疫疾患と診断された患者に、前記疾患の少なくとも１つの症候が前記患者において緩和されるように、本発明の組成物の治療的有効量を投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法を含む。「緩和された」とは、当該患者において、対象の症候が完全に消滅され、根絶され、除去され又は予防されているかどうかを問わず、和らげられ、提言され、減弱され、軟化され、軽減され（すなわち、より穏やか又は緩やかにする。）、鎮静され、鎮められ、減衰され、開放され、無化され、又は弱化されることを意味する。

【０２４０】
さらに、本発明は、多発性硬化症の少なくとも１つの症候を以前に経験した患者に、多発性硬化症の少なくとも１つの症候の再発が予防され、又は多発性硬化症の少なくとも１

つの症候が軽減されるように、本発明の組成物の予防的有効量を投与することを含む、多発性硬化症の症候の再発を予防又は軽減する方法に関する。

【０２４１】

自己免疫疾患を治療する本発明の方法及び多発性硬化症の症候の再発を予防又は軽減する方法において使用するのに好ましい本発明の組成物は、Ｐ（式Ｉにおけるように抱合される。）として、ＳｈＫペプチド、ＯＳＫ１ペプチド、ＣｈＴｘペプチド及び／又はマウロトキシン（Ｍｔｘ）ペプチドなどのＫｖ１．３若しくはＩＫＣａ１アンタゴニストペプチド又はこれらの何れかのペプチド類縁体を含む。

【０２４２】

例えば、抱合されたＳｈＫペプチドペプチド又はＳｈＫペプチド類縁体は、以下のものから選択されるアミノ酸配列を含むことが可能である。

【０２４３】

表２に記されている配列番号５、８８～２００、５４８～５６１、８８４～９５０又は１２９５～１３００。

【０２４４】

抱合されたＯＳＫ１ペプチドペプチド又はＯＳＫ１ペプチド類縁体は、以下のものから選択されるアミノ酸配列を含むことが可能である。

【０２４５】

表７に記されている配列番号２５、２９４～２９８、５６２～６３６、９８０～１２７４、

【０２４６】

【化４】

GVIINVSCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK (OSK1-S7)（配列番号：1303), 又は

GVIINVSCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK (OSK1-S7,K16,D20)（配列番号：1308)

【０２４７】

同じく例として、抱合されたＭＴＸペプチド、ＭＴＸペプチド類縁体、ＣｈＴｘペプチド又はＣｈＴｘペプチド類縁体は、以下から選択されるアミノ酸を含むことが可能である。

【０２４８】

表１３に記されている配列番号２０、３３０～３４３、１３０１、１３０２、１３０４～１３０７、１３０９、１３１１、１３１２若しくは１３１５～１３３６；又は表１４に記されている配列番号３６、５９、３４４～３４６若しくは１３６９～１３９０。

【０２４９】

同じくこれらの方法において有用なのは、以下から選択されたアミノ酸配列を含む、抱合された又は抱合されていない、Ｋｖ１．３又はＩＫＣａ１阻害剤トキシンペプチド類縁体である。

【０２５０】

表２に示されている配列番号８８、８９、９２、１４８～２００、５４８～５６１、８８４～９４９若しくは１２９５～１３００；又は表７に示されている配列番号９８０～１２７４；

【０２５１】

【化５】

GVIINVSCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK (OSK1-S7)（配列番号：1303), or GVIINVSCKISRQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK (OSK1-S7,K16,D20)（配列番号：1308)

又は、表１３に記されている配列番号３３０～３３７、３４１、１３０１、１３０２、１３０４～１３０７、１３０９、１３１１、１３１２及び１３１５～１３３６。

【０２５２】
これらの本発明の方法に従って、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病若しくは狼瘡など（但し、これらに限定されない。）自己免疫疾患と診断された患者、又は多発性硬化症の少なくとも１つの症候を以前に経験したことがある患者は、自己免疫疾患及びそれらの症候を熟知した、熟練した医療従事者（医師など）によって、十分に認識可能であり、及び／又は診断される。
【０２５３】
例えば、多発性硬化症の症候には、以下のものが含まれ得る。視覚的な症候、視神経炎（かすみ眼、眼痛、色覚の喪失、失明）；複視（複視）；眼振（痙攣性の眼の動き）；眼の測定障害（ｏｃｕｌａｒ　ｄｙｓｍｅｔｒｉａ）（定常的な過少又は過剰な眼の動き）；核間性眼筋麻痺（両眼間の協調の欠如、眼振、複視）；運動及び音の眼内閃光（眼を動かしたとき、又は突然の騒音に応答した閃光）；求心性の瞳孔の異常（異常な瞳孔の応答）など；
運動的症候、不全麻痺、不全単麻痺、不全対麻痺、不全片麻痺、四肢不全麻痺（筋衰弱-部分的な又は穏やかな麻痺）；麻痺、対麻痺、片麻痺、四肢麻痺（ｔｅｔｒａｐｌｅｇｉａ）、四肢麻痺（ｑｕａｄｒａｐｌｅｇｉａ）（麻痺-筋力の完全な喪失又はほぼ完全な喪失）；痙性（剛直、疼痛を引き起こし、罹患した四肢の自由な運動を制限する筋緊張の喪失）；構音障害（不明瞭な発語及び関連する発語上の問題）；筋萎縮（使用の欠如による筋肉の萎縮）；痙攣、こむら返り（筋肉の不随意的収縮）；緊張低下、間代性痙攣（姿勢に伴う問題）；間代性筋痙攣、筋波動症（痙動及び単収縮する筋肉、チック）；下肢静止不能症候群（特に、夜間に厄介な問題となる、不随意的な下肢の運動）；下垂足（歩行時に床に沿って足を引きずる）；反射機能不全（ＭＳＲ、バビンスキー反射、ホフマン反射、チャドック反射）など；
感覚性の症候、知覚異常（部分的な無感覚、刺痛、耳鳴り及び振動感覚）；知覚麻痺（完全な無感覚／感覚の喪失）；神経痛、神経病及び神経性の疼痛（明確な原因のない疼痛、灼熱感、掻痒感及び電気ショック感覚）；レルミッテ症候（頭を動かしているときの電気ショック及び耳鳴り感覚）など；
固有感覚機能不全（身体部分の位置感覚の喪失）；三叉神経痛（顔面痛）；
協調及び平衡の症候、運動失調（協調運動障害）；企図振戦（細かい運動を行うときの震え）；測定障害（恒常的な過少又は過剰な四肢運動）；前庭運動失調（内耳中の異常な平衡機能）；めまい（前庭運動失調に由来する悪心／嘔吐／乗り物酔いに対する感覚）；会話運動失調（協調した会話の困難、吃音）；ジストニア（四肢位置フィードバックの遅延）；反復拮抗運動不全（素早く交互運動（例えば、リズムに合わせて運動する）を行う能力の喪失）など；
腸、膀胱及び性的症候、頻尿、膀胱痙性（尿意逼迫及び失禁）；弛緩性膀胱、排尿筋・括約筋筋失調（排尿困難及び尿閉）；勃起障害（男性及び女性の性的不能）；オルガズム障害（オルガズムに達することができない）；逆行性射精（膀胱内への射精）；冷感症（性的に興奮した状態になることができない）；便秘（低頻度又は不定期な腸運動）；便意逼迫（腸の逼迫）；便失禁（腸失禁）など；
認知症候、うつ病；認知機能障害（短期及び長期記憶障害、健忘症、言葉を思い出す速度の遅延）；認知症；気分変動、情動不安定、多幸感；躁鬱症候群；不安；失語症、不全失語症（会話の理解及び発語の障害）など；並びに
その他の症候、疲労、ウートホフ症候群（熱を伴う症候の重度の増加）；胃食道逆流（胃酸逆流）；味覚及び嗅覚の障害；てんかん発作；嚥下困難、呼吸困難；並びに睡眠障害など。
【０２５４】
上に列記されている多発性硬化症の症候は単なる例示であり、一人の患者によって、又は複合した数人の患者によって経験され、本発明が適用される全ての可能な症候を網羅的

に記載することを意図したものではない。当業者は、各患者によって罹患される自己免疫疾患の様々な臨床症候及び様々な症状を知悉しており、自己免疫疾患を治療し、又は多発性硬化症の症候の再発を予防若しくは軽減する本発明の方法は、これらの症候にも向けられる。

【０２５５】

自己免疫疾患を治療する本発明の方法又は多発性硬化症の症候の再発を予防若しくは軽減する本発明の方法に関与する治療的有効量、予防的有効量及び投薬計画は、患者の年齢、症状、体重、性別及び食事、治療されている症状の重度、投与の時間及び他の臨床的因子など、治療剤の作用を変化させる様々な因子を考慮して、担当医によって決定される。一般的に、一日の量又は投薬計画は、体重キログラム（ｋｇ）当りのビヒクル抱合されたペプチドの約１～約１０，０００マイクログラム（μｇ）の範囲、好ましくは体重キログラム当り約１～約５０００μｇ、最も好ましくは体重キログラム当り約１～約１０００μｇの範囲とすべきである。

【０２５６】

電位開口型カリウムチャンネルＫｖ２．１のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、ＩＩ型糖尿病を治療するために使用することが可能である。

【０２５７】

Ｍ電流のペプチドアンタゴニスト（例えば、ＢｅＫｍ－１）を取り込んだ本発明の分子はアルツハイマー病を治療するために、及び認知を増強させるために使用することが可能である。

【０２５８】

電位開口型カリウムチャンネルＫｖ４．３のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、アルツハイマー病を治療するために使用することが可能である。

【０２５９】

小伝導度のカルシウム活性化カリウムチャンネルＳＫＣａのペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、てんかん、記憶、学習、神経精神病、神経性、神経筋肉性及び免疫疾患、統合失調症、躁うつ病、睡眠時無呼吸、神経変性並びに平滑筋疾患を治療するために使用することが可能である。

【０２６０】

Ｎ型カルシウムチャンネルアンタゴニストペプチドを取り込んだ本発明の分子は、疼痛を緩和する上で有用である。このような活性を有するペプチド（例えば、Ｚｉｃｏｎｏｔｉｄｅ^{TM}、ω－コノトキシン－ＭＶＩＩＡ）は、臨床的に有効性が確認されている。

【０２６１】

Ｔ型カルシウムチャンネルアンタゴニストペプチドを取り込んだ本発明の分子は、疼痛を緩和する上で有用である。証拠の複数の系列が合わさって、後根神経節中のＣａｖ３．２の阻害が慢性的疼痛からの緩和をもたらし得ることを示している。Ｔ型カルシウムチャンネルは、ＤＲＧ中の神経細胞のサブセットの細胞体中に極めて高いレベルで見出されている。これらは、ゆっくり移動する刺激を検出するように適合された機械的受容体であると思われ（Ｓｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ ６：７２４－７３０，２００３）、Ｔ型チャンネル活性は、バーストスパイクに必要であると思われる（Ｎｅｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ ２５：８７６６－８７７５，２００５）。ミベフラジル又はエトスキシミドによるＴ型チャンネルの阻害は、神経傷害によって（Ｄｏｇｒｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐａｉｎ １０５：１５９－１６８，２００３）又は化学療法によって（Ｆｌａｔｔｅｒｓ ａｎｄ Ｂｅｎｎｅｔｔ，Ｐａｉｎ １０９：１５０－１６１，２００４）誘発された、動物中の機械的異痛を回復させる。Ｃａｖ３．２に対するアンチセンスは、動物における疼痛の閾値を増加させるが、Ｃａｖ３．１又はＣａｖ３．３は増加させず、Ｃａｖ３．２に対するアンチセンスは、ＤＲＧ中でのＣａｖ３．２タンパク質の発現を低下させる（Ｂｏｕｒｉｎｅｔ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ ２４：３１５－３２４，２００５）同様に、局所的に注射された還元剤は、疼痛を引き起こし、Ｃａｖ３．２電流を増加させ、酸化剤は疼痛を減少

させ、Ｃａｖ３．２電流を阻害し、末梢に投与された神経ステロイドは鎮痛性であり、ＤＲＧからのＴ型電流を阻害する（Ｔｏｄｏｒｏｖｉｃ ｅｔ ａｌ．，Ｐａｉｎ １０９：３２８－３３９，２００４；Ｐａｔｈｉｒａｔｈｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｐａｉｎ １１４：４２９－４４３，２００５）。従って、ＤＲＧ神経細胞の細胞体中のＣａｖ３．２の阻害は、慢性疼痛状態を伴うこれらの神経細胞の反復的スパイクを阻害することが可能であると考えられている。

【０２６２】

Ｌ型カルシウムチャンネルアンタゴニストペプチドを取り込んだ本発明の分子は、高血圧を治療する上で有用である。このような活性を有する小ペプチド（例えば、ＤＨＰ）は、臨床的に有効性が確認されている。

【０２６３】

Na_v1（TTX_S型）チャンネルのペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、疼痛を緩和するために使用することが可能である。このような活性を有する局所麻酔及び三環系抗鬱剤は、臨床的に有効性が確認されている。本発明のこのような分子は、特に、筋弛緩剤として有用であり得る。

【０２６４】

Na_v1（TTX_R型）チャンネルのペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、神経及び／又は組織傷害から生じる疼痛を緩和するために使用することが可能である。

【０２６５】

膠細胞及び上皮細胞のCa^{2+}活性化塩化物チャンネルのペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、癌及び糖尿病を治療するために使用することが可能である。

【０２６６】

ＮＭＤＡ受容体のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、疼痛、てんかん、脳及び脊髄の傷害を治療するために使用することが可能である。

【０２６７】

ニコチン性受容体のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、筋弛緩剤として使用することが可能である。このような分子は、疼痛、胃の運動障害、尿失禁、ニコチン中毒及び気分障害を治療するために使用することが可能である。

【０２６８】

５ＨＴ３受容体のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、悪心、疼痛及び不安を治療するために使用することが可能である。

【０２６９】

ノルエピネフリン輸送体のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、疼痛、抗うつ剤、学習、記憶及び尿失禁を治療するために使用することが可能である。

【０２７０】

ニューロテンシン受容体のペプチドアンタゴニストを取り込んだ本発明の分子は、疼痛を治療するために使用することが可能である。

【０２７１】

治療的用途に加えて、本発明の化合物は、それらの関連する対象タンパク質の機能不全を特徴とする疾病を診断する上で有用であり得る。一実施形態において、生物学的試料中に、活性化されることができる対象タンパク質（例えば、受容体）を検出する方法であり、（ａ）前記試料を、本発明の化合物と接触させる工程と、及び（ｂ）前記化合物による、前記対象タンパク質の活性化を検出する工程とを含む前記方法。生物学的試料には、組織試料、完全な状態の細胞又はそれらの抽出物が含まれる。本発明の化合物は、生物学的試料中における、それらの関連する対象タンパク質の存在を検出するための診断キットの一部として使用することが可能である。このようなキットは、検出を可能とするために付着された標識を有する本発明の化合物を使用する。前記化合物は、正常な又は異常な対象タンパク質を同定するのに有用である。

【０２７２】

本発明の治療法、組成物及び化合物は、疾病の治療において、単独で、又は他の分子と組み合わせて使用することも可能である。

【０２７３】

医薬組成物

総論。本発明は、本発明の組成物と、及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物も提供する。このような医薬組成物は、多様な送達経路、例えば、注射若しくは注入によるなどの血管内送達経路、皮下、筋肉内、腹腔内、硬膜外又は髄腔内送達経路、又は経口、腸内、経肺（例えば、吸入）、鼻内、経粘膜（例えば、舌下投与）、経皮又はその他の送達経路及び／又は本分野において公知の投与の形態によって、患者に投与するように設定することが可能である。本発明の医薬組成物は、液体形態で調製することができ、又は凍結乾燥された形態などの乾燥された粉末形態であり得る。経口又は経腸用途の場合、医薬組成物は、例えば、錠剤、トローチ剤、舐剤、水性若しくは油性懸濁液剤、分散性散剤又は顆粒剤、エマルジョン、硬若しくは軟カプセル剤、シロップ、エリキシル、経腸処方として、設定することが可能である。

【０２７４】

本発明の実施において、「医薬として許容される担体」は、単一で又は組み合わせた、医薬として許容される全ての希釈剤、賦形剤、分散剤、結合剤、充填剤、流動促進剤、抗摩擦剤、圧縮補助、錠剤崩壊剤（崩壊剤）、懸濁剤、潤滑剤、着香剤、着臭剤、甘味剤、浸透若しくは貫通強化物質、防腐剤、界面活性剤、可溶化剤、乳化剤、濃縮剤、アジュバント、色素、コーティング、封入材料及び／又は他の添加物など、医薬組成物を調合する上で有用である、当業者に公知の生理的に耐容される全ての物質である。このような医薬組成物は、様々な緩衝液内容物（例えば、Ｔｒｉｓ-ＨＣｌ、アセタート、ホスファート）、ｐＨ及びイオン強度の希釈剤；界面活性剤及び可溶化剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ（Ｒ）８０、Ｐｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ８０）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、Ｔｉｍｅｒｓｏｌ（Ｒ）、ベンジルアルコール）及び増量物質（例えば、ラクトース、マニトール）などの添加物；ポリ乳酸、ポリグリコール酸などのポリマー性化合物の粒状調製物中への、又はリポソーム中への材料の取り込みを含むことが可能である。ヒアルロン酸も使用することが可能であり、これは、循環中の持続時間を促進する効果を有し得る。このような組成物は、本発明のタンパク質及び誘導体の物理的状態、安定性、インビボ放出の速度及びインビボクリアランス速度に影響を与えることが可能である。例えば、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄ．（１９９０，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ １８０４２）ｐａｇｅｓ １４３５-１７１２」（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。前記組成物は、液体形態で調製することが可能であり、又は凍結乾燥された形態などの乾燥された粉末とすることが可能である。経皮又は経粘膜製剤のように、埋め込み可能な徐放製剤も有用である。これに加えて（又はこれに代えて）、本発明は、当業者に公知の様々な持続放出若しくは徐放製剤又は微粒子製剤の何れかにおいて、例えば、経肺、鼻内又は皮下送達経路を介して投与されることが可能な徐放微粒子製剤において使用するための組成物を提供する。

【０２７５】

不活性材料を用いて、本発明の組成物を希釈し、又は本発明の医薬組成物の容量を増加させることが可能である。このような希釈剤は、炭水化物、特に、マニトール、α-ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、修飾されたデキストラン及びデンプンを含むことが可能である。ある種の無機塩は、カルシウム三リン酸、炭酸マグネシウム及び塩化ナトリウムなど、充填剤としても使用し得る。幾つかの市販の希釈剤は、Ｆａｓｔ-Ｆｌｏ、Ｅｍｄｅｘ、ＳＴＡ-Ｒｘ １５００、Ｅｍｃｏｍｐｒｅｓｓ及びＡｖｉｃｅｌｌである。

【０２７６】

様々な慣用の濃縮剤が、アルギナート、キサンタンガム又は石油など（これらに限定さ

れない。）、医薬組成物のクリーム、軟膏、坐薬及びゲル構造において有用であり、本発明の医薬組成物のこのような構成においても使用し得る。ポリエチレングリコールモノラウラート、ジメチルスルホキシド、Ｎ－ビニル－２－ピロリドン、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）－ピロリドン又は３－ヒドロキシ－Ｎ－メチル－２－ピロリドンなどの浸透又は貫通増強物質も使用することが可能である。ヒドロゲルマトリックスを製造するための有用な技術は公知である。（例えば、Ｆｅｉｊｅｎ，Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ ｈｙｄｒｏｇｅｌ ｍａｔｒｉｃｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ ｒｅｌｅａｓｅ ｏｆ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ ａｃｔｉｖｅ ａｇｅｎｔｓ，米国特許第４，９２５，６７７号；Ｓｈａｈ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ ｐＨ／ｔｈｅｒｍｏｓｅｎｓｉｔｉｖｅ ｈｙｄｒｏｇｅｌｓ ｆｏｒ ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ ａｃｔｉｖｅ ａｇｅｎｔｓ，ＷＯ ００／３８６５１ Ａ１）。このような生物分解性ゲルマトリックスは、例えば、タンパク質成分と多糖又はムコポリ多糖成分を架橋した後、送達すべき本発明の組成物を充填することによって形成することが可能である。

【０２７７】

無菌溶液又は懸濁液である本発明の液体医薬組成物は、例えば、筋肉内、髄腔内、硬膜外、血管内（例えば、静脈内又は動脈内）、腹腔内又は皮下注射によって、患者に投与することが可能である。（例えば、Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｕｓｐｅｎｓｉｏｎｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ｒｅｌｅａｓｅ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，米国特許第６，２４５，７４０号及びＷＯ００／３８６５２Ａ１を参照されたい。）。無菌溶液は、静脈内注入によって投与することも可能である。本発明の組成物は、無菌水、生理的食塩水、緩衝化された生理的食塩水又は他の適切な無菌注射可能溶媒を用いて患者に投与する前に、都合の良い時点で溶解又は懸濁することが可能な無菌固体医薬組成物（凍結乾燥された粉末など）中に含めることが可能である。

【０２７８】

埋め込み可能な徐放製剤も、本発明の医薬組成物の有用な実施形態である。例えば、医薬として許容される担体（体内又はヒト若しくはヒト以外の脊椎動物の皮膚の下に埋め込まれた生物分解性マトリックスである。）は、上記のものと類似のヒドロゲルであり得る。あるいは、医薬として許容される担体は、ポリ－αアミノ酸成分から形成され得る。（Ｓｉｄｍａｎ，Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ，ｉｍｐｌａｎｔａｂｌｅ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｄｅｖｉｃｅ，ａｎｄ ｐｒｏｃｅｓｓ ｆｏｒ ｐｒｅｐａｒｉｎｇ ａｎｄ ｕｓｉｎｇ ｓａｍｅ，米国特許第４，３５１，３３７号）。薬物の送達用インプラントを作製するための他の技術も公知であり、本発明において有用である。

【０２７９】

粉末形態において、医薬として許容される担体は、細かく分割された固体であり、これは、本発明の組成物を含む細かく分割された活性成分と混合される。例えば、幾つかの実施形態において、医薬組成物が吸入剤として構成されている場合には、粉末形態が有用である。（例えば、Ｚｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ ｐｒｅｐａｒｉｎｇ ｄｒｙ ｐｏｗｄｅｒ ｉｎｈａｌａｔｉｏｎ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ，ＷＯ ２００４／０１７９１８；Ｔｒｕｎｋ ｅｔ ａｌ．，Ｓａｌｔｓ ｏｆ ｔｈｅ ＣＧＲＰ ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ ＢＩＢＮ４０９６ ａｎｄ ｉｎｈａｌａｂｌｅ ｐｏｗｄｅｒｅｄ ｍｅｄｉｃａｍｅｎｔｓ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｔｈｅｍ，米国特許第６，９００，３１７号を参照されたい。）。

【０２８０】

不活性材料を用いて、本発明の化合物を希釈し、又は本発明の化合物の容量を増加させることが可能である。これらの希釈剤は、炭水化物、特に、マニトール、α－ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、修飾されたデキストラン及びデンプンを含むことが可能である。ある種の無機塩は、カルシウム三リン酸、炭酸マグネシウム及び塩化ナトリウムなど、充填剤としても使用することが可能である。幾つかの市販の希釈剤は、Ｆａｓｔ－Ｆｌｏ™、Ｅｍｄｅｘ™、ＳＴＡ－Ｒｘ™１５００、Ｅｍｃｏｍｐｒ

ｅｓｓ™及びＡｖｉｃｅｌｌ™である。

【０２８１】

固体剤形への医薬組成物の製剤化中に、崩壊剤を含めることが可能である。崩壊剤として使用される材料には、デンプンをベースとした市販の崩壊剤Ｅｘｐｌｏｔａｂ™を含むデンプンが含まれるが、これに限定されない。デンプングリコール酸ナトリウム、Ａｍｂｅｒｌｉｔｅ™、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ウルトラミロペクチン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、橙皮、酸性カルボキシメチルセルロース、海綿及びベントナイトを使用することが可能である。不溶性陽イオン交換樹脂は、崩壊剤の別の形態である。粉末化されたゴムは、崩壊剤として、及び結合剤として使用することが可能であり、これらは、寒天、Ｋａｒａｙａ又はトラガカントなどの粉末化されたゴムを含むことが可能である。アルギン酸及びそのナトリウム塩は、崩壊剤としても有用である。

【０２８２】

結合剤は、治療剤を一体化させて硬い錠剤を形成するために使用することが可能であり、アラビアゴム、トラガカント、デンプン及びゼラチンなどの天然産物から得られる材料を含む。その他には、メチルセルロース（ＭＣ）、エチルセルロース（ＥＣ）及びカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）が含まれる。ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）及びヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）は何れも、治療剤を顆粒化するためにアルコール溶液中で使用することが可能である。

【０２８３】

抗摩擦剤は、調合プロセス時の粘着を防ぐために、治療剤の製剤中に含めることが可能である。潤滑剤は、治療剤とダイ壁との間の層として使用することが可能であり、これらには、ステアリン酸のマグネシウム及びカルシウム塩などのステアリン酸、ポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ）、液体パラフィン、植物油及び蝋が含まれ得るが、これらに限定されるものではない。ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、様々な分子量のポリエチレングリコール、Ｃａｒｂｏｗａｘ４０００及び６０００などの可溶性潤滑剤も使用することが可能である。

【０２８４】

調合時の薬物の流動特性を改善することができ、及び圧縮時の転位を補助するための流動促進剤を添加し得る。流動促進剤には、デンプン、タルク、焼成シリカ及び水和されたケイアルミン酸が含まれ得る。

【０２８５】

本発明の化合物の水性環境中への溶解を補助するために、界面活性剤を、湿潤剤として添加し得る。界面活性剤には、ラウリル硫酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウム及びスルホン酸ジオクチルナトリウムなどの陰イオン性界面活性剤が含まれ得る。陽イオン性界面活性剤を使用し得、塩化ベンズアルコニウム又は塩化ベンゾエトニウムを含み得る。界面活性剤として製剤中に含めることができる可能性がある非イオン性界面活性剤のリストは、ラウロマクロゴール４００、ポリオキシル４０ステアラート、ポリオキシエチレン硬化ひまし油１０、５０及び６０、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート４０、６０、６５及び８０、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロース並びにカルボキシメチルセルロースである。これらの界面活性剤は、単独で、又は異なる比率での混合物として、タンパク質又は誘導体の製剤中に存在することができる。

【０２８６】

経口剤形。本発明の組成物の経口剤形も有用である。必要であれば、組成物は、経口送達が有効であるように化学的に修飾することが可能である。一般的に、想定される化学的修飾は、分子自体への少なくとも１つの部分の付着であり、前記部分は、（ａ）タンパク質分解の阻害及び（ｂ）胃又は腸からの血流中への取り込みを可能とする。化合物の全体的な安定性の増加及び体内での循環時間の増加も望まれる。本発明において、共有結合された半減期延長部分として有用な部分も、この目的のために使用することが可能である。このような部分の例には、ＰＥＧ，エチレングリコールとプロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピ

ロリドン及びポリプロリンが含まれる。例えば、「Ａｂｕｃｈｏｗｓｋｉ ａｎｄ Ｄａｖｉｓ（１９８１），Ｓｏｌｕｂｌｅ Ｐｏｌｙｍｅｒ-Ｅｎｚｙｍｅ Ａｄｄｕｃｔｓ，Ｅｎｚｙｍｅｓ ａｓ Ｄｒｕｇｓ（Ｈｏｃｅｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｒｏｂｅｒｔｓ，ｅｄｓ．），Ｗｉｌｅｙ-Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ，ｐｐ ３６７-８３；Ｎｅｗｍａｒｋ，ｅｔ ａｌ．，（１９８２），Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ，４：１８５-９」を参照されたい。使用され得る他のポリマーは、ポリ-１，３-ジオキソラン及びポリ-１，３，６-チオキソカンである。前記のとおり、医薬的な使用に好ましいのは、ＰＥＧ部分である。

【０２８７】

経口送達剤形の場合、本発明の治療用化合物の吸収を増加させるための担体として、ナトリウムＮ-（８-［２-ヒドロキシベンゾイル］アミノ）カプリラート（ＳＮＡＣ）などの修飾された脂肪族アミノ酸の塩を使用することも可能である。ＳＮＡＣを使用するヘパリン製剤の臨床的効力は、Ｅｍｉｓｐｈｅｒｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓにより行われた第ＩＩ相試験において証明されている。米国特許第５，７９２，４５１号，「Ｏｒａｌ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ ａｎｄ ｍｅｔｈｏｄｓ」を参照されたい。

【０２８８】

一実施形態において、医薬として許容される担体は液体とすることが可能であり、医薬組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エリキシル又は圧縮された組成物の形態で調製される。活性成分（例えば、本発明の組成物）は、水、有機溶媒、両者の混合物、又は医薬として許容される油若しくは脂肪などの医薬として許容される液体担体中に溶解し、希釈し又は懸濁することが可能である。液体担体は、界面活性剤及び／又は可溶化剤（例えば、Ｔｗｅｅｎ ８０、Ｐｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ８０）、乳化剤、適切なｐＨの緩衝液（例えば、Ｔｒｉｓ-ＨＣｌ、アセタート、ホスファート）、アジュバント、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、Ｔｈｉｍｅｒｓｏｌ、ベンジルアルコール）、甘味剤、着香剤、懸濁剤、濃縮剤、増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）；着色料、粘度調節物質、安定化物質、電解質、浸透溶質又は浸透圧制御物質などの他の適切な医薬添加物を含有することが可能である。本発明の組成物の取り込みを増強させるために、製剤中に添加物を含めることも可能である。この特性を有する可能性がある添加物は、例えば、脂肪酸オレイン酸、リノール酸及びリノレン酸である。

【０２８９】

有用なのは、上記Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１９９０）の第８９章（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に一般的に記載されている経口固体剤形である。固体剤形には、錠剤、カプセル、丸薬、トローチ又はドロップ、カプセル又はペレットが含まれる。また、本組成物を調合するために、（例えば、米国特許第４，９２５，６７３号に報告されているプロテイノイド小球体のような）リポソーム封入又はプロテイノイド封入を使用することが可能である。リポソーム封入を使用することが可能であり、様々なポリマーでリポソームを誘導体化することが可能である（例えば、米国特許第５，０１３，５５６号）。治療剤に対して可能な固体剤形の記述は、「Ｍａｒｓｈａｌｌ，Ｋ．，Ｍｏｄｅｒｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ（１９７９），ｅｄｉｔｅｄ ｂｙ Ｇ．Ｓ．Ｂａｎｋｅｒ ａｎｄ Ｃ．Ｔ．Ｒｈｏｄｅｓ，ｉｎ Ｃｈａｐｔｅｒ １０」（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に記載されている。一般に、製剤は、本発明の化合物、及び胃環境に対する保護及び腸内での生物学的に活性な材料の放出を可能とする不活性成分を含む。

【０２９０】

本発明の組成物は、粒径約１ｍｍの顆粒又はペレットの形態の細かい多微粒子状物質として、製剤中に含めることが可能である。カプセル投与用の材料の製剤は、粉末、軽く圧縮されたプラグ又は錠剤でもあり得る。治療剤は、圧縮によって調製することが可能であ

る。
【０２９１】
着色剤及び着香剤は、全て含めることが可能である。例えば、（リポソーム又は小球体封入などによって）タンパク質（又は誘導体）を調合し、次いで、着色剤及び着香剤を含有する冷蔵された飲料などの飲食物内にさらに含有させることが可能である。
【０２９２】
錠剤形態で、活性成分は、適切な割合で、必要な圧縮特性を有する医薬として許容される担体と混合され、所望の形状及びサイズに圧縮される。
【０２９３】
粉末及び錠剤は、好ましくは、活性成分の最大９９％を含有する。適切な固体担体には、例えば、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、デキストリン、デンプン、ゼラチン、セルロース、ポリビニルピロリドン、低融点蝋及びイオン交換樹脂が含まれる。
【０２９４】
徐放製剤が望ましい場合があり得る。本発明の組成物は、拡散又は浸出機構の何れか、例えばガムによって放出を可能とする不活性マトリックス中に取り込ませることが可能である。ゆっくり変性するマトリックス、例えば、アルギナート、多糖を、製剤中に取り込ませることも可能である。本発明の組成物の徐放の別の形態は、Ｏｒｏｓ^{TM}治療システム（Ａｌｚａ　Ｃｏｒｐ．）に基づく方法による。すなわち、薬物は、水の浸入を可能とし、浸透圧効果によって、単一の小さな開口部を通じて薬物を押し出すことが可能な半透膜中に封入される。幾つかの腸溶コーティングも、遅延した放出効果を有する。
【０２９５】
製剤化のために、他のコーティングを使用することが可能である。これらには、コーティングパン中に適用可能な様々な糖が含まれる。また、治療剤は、フィルムコーティングされた錠剤として提供されることも可能であり、この場合に使用される物質は、２つのグループに分類される。第１のグループは、非腸溶性物質であり、これらには、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、プロビドン及びポリエチレングリコールが含まれる。第２のグループは、一般にはフタル酸のエステルである腸溶性物質からなる。
【０２９６】
最適なフィルムコーティングを得るために、材料の混合物を使用し得る。フィルムコーティングは、パンコーター内若しくは流動床内で、又は圧縮コーティングにより行なうことができる。
【０２９７】
経肺送達形態。本発明の組成物の経肺送達も有用である。該タンパク質（又は誘導体）は、吸入されて哺乳動物の肺に送達され、肺上皮内層（ｌｕｎｇ　ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ　ｌｉｎｉｎｇ）を越えて血流に入る。（これに関する他の報告には、Ａｄｊｅｉら，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．７：５６５-５６９（１９９０）；Ａｄｊｅｉら，Ｉｎｔｅｒｎａｔｌ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ　６３：１３５-４４（１９９０）（酢酸ロイプロリド）；Ｂｒａｑｕｅｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９），Ｊ．Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．１３（ｓｕｐｐｌ．５）：ｓ．１４３-１４６（エンドセリン-１；Ｈｕｂｂａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９），Ａｎｎａｌｓ　Ｉｎｔ．Ｍｅｄ，３：２０６-１２（α１-アンチトリプシン）；Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９），Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８４：１１４５-６（α１-プロテイナーゼ）；Ｏｓｗｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍａｒｃｈ　１９９０），“Ａｅｒｏｓｏｌｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，”Ｐｒｏｃ．Ｓｙｍｐ．Ｒｅｓｐ．Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ＩＩ，Ｋｅｙｓｔｏｎｅ，Ｃｏｌｏｒａｄｏ（組換えヒト成長ホルモン）；Ｄｅｂｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８），Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４０：３４８２-８（インターフェロンγ及び腫瘍壊死因子ルファ）及びＰｌａｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，米国特

許第５，２８４，６５６号（顆粒球コロニー刺激因子）が含まれる）。

【０２９８】

本発明の実施において有用であるのは、治療用産物の経肺送達用に設計された多種多様な機械装置（例えば、噴霧器、定量吸入器及び粉末吸入器などの、いずれも当業者によく知られたものが含まれるが、これらに限定されるものではない。）である。本発明の実施に適した市販の装置のいくつかの具体例としては、Ｍａｌｌｉｎｃｋｒｏｄｔ，Ｉｎｃ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉ製のＵｌｔｒａｖｅｎｔ噴霧器、Ｍａｒｑｕｅｓｔ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｅｎｇｌｅｗｏｏｄ，Ｃｏｌｏｒａｄｏ製のＡｃｏｒｎ ＩＩ噴霧器、Ｇｌａｘｏ Ｉｎｃ．，Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｔｒｉａｎｇｌｅ Ｐａｒｋ，Ｎｏｒｔｈ Ｃａｒｏｌｉｎａ製のＶｅｎｔｏｌｉｎ定量吸入器及びＦｉｓｏｎｓ Ｃｏｒｐ．，Ｂｅｄｆｏｒｄ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ製のＳｐｉｎｈａｌｅｒ粉末吸入器が挙げられる。（例えば、Ｈｅｌｇｅｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｈａｌａｔｉｏｎ ｄｅｖｉｃｅ，米国特許第６，８９２，７２８号；ＭｃＤｅｒｍｅｎｔ ｅｔ ａｌ．，Ｄｒｙ ｐｏｗｄｅｒ ｉｎｈａｌｅｒ，ＷＯ ０２／１１８０１ Ａ１；Ｏｈｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｈａｌａｎｔ ｍｅｄｉｃａｔｏｒ，米国特許第６，２７３，０８６号）。

【０２９９】

このような何れの装置においても、本発明の化合物の投薬に適した製剤を使用することが必要である。典型的には、各製剤は、用いる装置のタイプに特有のものであり、治療に有用な希釈剤、佐剤及び／又は担体に加えて適切な噴射物質の使用を伴いうる。

【０３００】

遠位の肺への最も有効な送達のためには、本発明の化合物は、１０μｍ（又はミクロン）未満、最も好ましくは０．５～５μｍの平均粒径を有する粒子形態で調製されるのが最も有利なはずである。

【０３０１】

医薬として許容される担体には、トレハロース、マンニトール、キシリトール、スクロース、ラクトース、ソルビトールなどの炭水化物が含まれる。製剤中で使用する他の成分には、ＤＰＰＣ、ＤＯＰＥ、ＤＳＰＣ及びＤＯＰＣが含まれ得る。天然又は合成界面活性剤を使用することができる。ＰＥＧを使用することができる（これは、該タンパク質又は類縁体の誘導体化におけるその使用と独立して使用することさえ可能である）。シクロデキストランなどのデキストランを使用することができる。胆汁酸塩及び他の関連した増強剤を使用することができる。セルロース及びセルロース誘導体を使用することができる。緩衝液製剤中での使用など、アミノ酸を使用することができる。

【０３０２】

また、リポソーム、マイクロカプセル又は小球体、包接複合体、又は担体の他のタイプの使用も想定される。

【０３０３】

噴霧器（ジェット式又は超音波式のいずれか）と併用するのに適した製剤は、典型的には、溶液１ｍＬ当たり生物学的活性タンパク質約０．１～２５ｍｇの濃度で水に溶解された本発明の化合物を含む。また、該製剤は、緩衝液及び単糖（例えば、タンパク質の安定化及び浸透圧の調節用のもの）を含み得る。エーロゾルの形成において該溶液の噴霧により生じる該タンパク質の界面誘導凝集を抑制又は防止するために、該噴霧製剤は界面活性剤を含有することも可能である。

【０３０４】

定量吸入装置と併用する製剤は、一般に、界面活性剤の補助により噴射剤中に懸濁された本発明の化合物を含有する微細化粉末を含む。該噴射剤は、この目的に用いる任意の慣用物質（クロロフルオロカーボン、ハイドロクロロフルオロカーボン、ハイドロフルオロカーボン、又は炭化水素、トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール、１，１，１，２－テトラフルオロエタンなど、又はそれらの組合せ）とすることが可能である。適切な界面活性剤には、ソルビタントリオレアー

ト及び大豆レシチンが含まれる。オレイン酸も界面活性剤として有用であり得る。（例えば、Backstrom et al., Aerosol drug formulations containing hydrofluoroalkanes and alkyl saccharides, 米国特許第６，９３２，９６２号を参照されたい。）。

【０３０５】

粉末吸入装置からの投薬のための製剤は、本発明の化合物を含有する微細化乾燥粉末を含み、装置からの粉末の分散を促進する量（例えば、製剤の５０～９０重量％）の増量剤（ラクトース、ソルビトール、スクロース、マンニトール、トレハロース又はキシリトールなど）を含むことも可能である。

【０３０６】

経鼻送達形態。本発明において、本発明の組成物及び／又は医薬組成物の鼻内送達も有用であり、鼻内運搬においては、鼻の内部への投与後、該産物の肺内への堆積を要することなく、本発明の組成物及び／又は医薬組成物を直接血流へ通過させることが可能である。鼻内投与に適した製剤には、デキストラン又はシクロデキストランを有する製剤が含まれ、鼻内送達装置は公知である。（例えば、Freezer，Inhaler，米国特許第４，０８３，３６８号を参照）。

【０３０７】

経皮及び経粘膜（例えば、口腔）送達形態。幾つかの実施形態において、本発明の組成物は、医薬として許容される経皮又は経粘膜パッチ又はトローチの一部として構成される。経皮パッチ薬物送達系、例えば、マトリックスタイプの経皮パッチは公知であり、本発明の医薬組成物の幾つかの実施形態を実施するのに有用である。（例えば、Chien et al., Transdermal estrogen/progestin dosage unit, system and process, 米国特許第４，９０６，１６９号及び同第５，０２３，０８４号；Cleary et al., Diffusion matrix for transdermal drug administration and transdermal drug delivery devices including same, 米国特許第４，９１１，９１６号；Teillaud et al., EVA-based transdermal matrix system for the administration of an estrogen and/or a progestogen，米国特許第５，６０５，７０２号；Venkateshwaran et al., Transdermal drug delivery matrix for coadministering estradiol and another steroid，米国特許第５，７８３，２０８号；Ebert et al., Methods for providing testosterone and optionally estrogen replacement therapy to women，米国特許第５，４６０，８２０号）。治療剤の経粘膜送達用の医薬として許容される様々なシステムも本分野において公知であり、本発明の実施と適合性がある。（例えば、Heiber et al., Transmucosal delivery of macromolecular drugs，米国特許第５，３４６，７０１号及び同第５，５１６，５２３号；Longenecker et al., Transmembrane formulations for drug administration, 米国特許第４，９９４，４３９号）。

【０３０８】

本発明の組成物の口腔送達も有用である。口腔送達製剤は、ペプチドとともに使用するために、本分野において公知である。例えば、経口粘膜（例えば、舌下粘膜）を通じた薬物送達用に設計された公知の錠剤又はパッチ系には、薬物を含有する内側層と、胆汁酸塩又はフシジン酸塩（fusidate）などの浸透増強物質と、及びヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、デキ

ストラン、ペクチン、ポリビニルピロリドン、デンプン、ゼラチン又はこの目的に対して有用であることが知られた他のポリマーのあらゆる数などの親水性ポリマーとを含む幾つかの実施形態が含まれる。内側層は、口腔の湿った粘膜組織と接触して、これに粘着するように適合された１つの表面を有することが可能であり、上に存在する非粘着性の不活性層に付着する反対側表面を有することが可能である。場合によって、このような経皮送達系は、内側層がさらなる結合剤、着香剤又は充填剤も含有する二層錠剤の形態であり得る。幾つかの有用な系は、浸透増強物質とともに、非イオン性界面活性剤を使用する。経粘膜送達装置は、クリーム、ゲル若しくは軟膏など遊離形態であり得、又は錠剤、パッチ若しくはトローチなどの明確な形態を含み得る。例えば、本発明の組成物の送達は、例えば、粘着層、裏打ち層、本発明の組成物を含有する貯蔵槽を画する浸透膜、該膜の下に位置する剥離シールディスク、１つ又はそれ以上の熱シール及び除去可能な剥離ライナーの薄層化された複合物を含む経皮送達系を介することが可能である。（例えば、Ｅｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｓｙｓｔｅｍ ｗｉｔｈ ａｄｈｅｓｉｖｅ ｏｖｅｒｌａｙ ａｎｄ ｐｅｅｌ ｓｅａｌ ｄｉｓｃ，米国特許第５，６６２，９２５号；Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖｉｃｅ ｆｏｒ ａｄｍｉｎｉｓｔｅｒｉｎｇ ａｎ ａｃｔｉｖｅ ａｇｅｎｔ ｔｏ ｔｈｅ ｓｋｉｎ ｏｒ ｍｕｃｏｓａ，米国特許第４，８４９，２２４号及び同第４，９８３，３９５号）。これらの例は、利用可能な経粘膜薬物送達技術の単なる例示であり、本発明を限定するものではない。

【０３０９】

投薬量。上記症状の治療方法に関わる投与計画は、薬物の作用を改変する種々の要因（例えば、患者の年齢、状態、体重、性別及び食事、いずれかの感染の重症度、投与時間ならびに他の臨床的要因）を考慮して担当医師により決定される。一般には、１日用量は、本発明の化合物０．１～１０００μｇ／ｋｇ体重、好ましくは０．１～１５０μｇ／ｋｇの範囲とすべきである。

【０３１０】

実施例

上記の組成物は以下の記載に従って調製することができる。これらの実施例は、いかなる場合においても、本願の特許請求の範囲を限定するものと解釈してはならない。

【実施例１】

【０３１１】

Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[１-３５]の哺乳類動物での発現

Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[１-３５]は、Ｆｃ-２ｘＬ-ＳｈＫ[１-３５]とも呼ばれ、Ｋｖｌ．３の阻害剤である。リンカー配列及びＫｖｌ．３阻害剤ペプチドＳｈＫ[１-３５]の単量体ヘインフレームに融合されたヒトＩｇＧ１のＦｃ領域をコードするＤＮＡ配列を後述のように構築した。哺乳類細胞（ＨＥＫ２９３及びチャイニーズハムスター卵巣細胞）からペプチボディ（ｐｅｐｔｉｂｏｄｙ）を発現及び精製するための方法は、本明細書に開示されている。

【０３１２】

ｐｃＤＮＡ３．１（＋）中のＭｌｕＩとＨｉｎｄＩＩＩの間のＣＭＶプロモーターをＣＭＶプロモーター＋イントロン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と置換することによって、発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ（図１３Ａ）を構築した。５’コザック配列、シグナルペプチド及びヒトＦｃリンカー―ＨｉｎｄＩＩＩ-ＮｏｔＩで消化されたｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉの大きな断片とのアクチビンＲＩＩＢ融合タンパク質を含有するＨｉｎｄＩＩＩ-ＮｏｔＩで消化されたＰＣＲ産物をクローニングすることによって、発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ-ｈＦｃ-アクチビンＲＩＩＢ（図１３Ｂ）を作製した。ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ-ｈＦｃ-アクチビンＲＩＩＢ中のヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列を図３Ａ-Ｂに示す。このベクターは、ＢａｍＨＩ部位によって分断されたＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（「Ｌ１０」、配列番号７９）も有し、これにより、以下のオリゴを用いて、最終Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[１-３５

]ヌクレオチド及びアミノ酸配列（図１４Ａ－Ｂ並びに配列番号７７及び配列番号７８）に対して、ＦｃとＳｈＫ[１－３５]ペプチド（図１４Ａ－Ｂ参照）間に１０個アミノ酸のリンカーを形成することが可能となる。

【０３１３】

以下に示されているように、２つの停止コドンを有し、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限部位が隣接した、４個のグリシン及び１個のセリンアミノ酸リンカー（本明細書での小文字は、Ｌ型アミノ酸残基のリンカー配列を示す）に連結された完全長ＳｈＫ遺伝子を作製するためのＰＣＲ戦略を使用して、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ[１－３５]発現ベクターを構築した。

【０３１４】

【化６】

BamHI
GGATCCGGAGGAGGAGGAAGCCGCAGCTGCATCGACACCATCCCCAAGAGCCGCTGCACCGCCTTCCAG
g g g g s R S C I D T I P K S R C T A F Q

TGCAAGCACAGCATGAAGTACCGCCTGAGCTTCTGCCGCAAGACCTGCGGCACCTGCTAATGAGCGGCCGC//SEQ ID NO:657
C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C NotI
//配列番号：658

【０３１５】

以下に記載される配列を有する２つのオリゴを、９４℃－３０秒、５０℃－３０秒、７２℃－１分の３０周期で、Ｈｅｒｃｕｌａｓｅ（商標）ポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を使用するＰＣＲ反応で使用した。

【０３１６】

【化７】

cat gga tcc gga gga gga gga agc cgc agc tgc atc gac acc atc ccc aag agc
cgc tgc acc gcc ttc cag tgc aag cac //SEQ ID NO:659

cat gcg gcc gct cat tag cag gtg ccg cag gtc ttg cgg cag aag ctc agg cgg
tac ttc atg ctg tgc ttg cac tgg aag g //配列番号：660

【０３１７】

得られたＰＣＲ産物を１％アガロースゲル上で１５０ｂｐバンドとして分離した。１５０ｂｐのＰＣＲ産物を、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ（Ｒｏｃｈｅ）制限酵素で消化し、ゲル精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）によってアガロースゲル精製した。同時に、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ－ｈＦｃ－アクチビンＲＩＩＢベクター（図１３Ｂ）を、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素で消化し、ゲル精製キットにより、大きな断片を精製した。ゲル精製されたＰＣＲ断片を、精製された大きな断片へ連結し、ＸＬ－１ブルーバクテリア（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）へと形質転換した。形質転換された細菌コロニー由来のＤＮＡを単離し、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素消化で消化し、１％アガロースゲル上で分離した。予想されたパターンを生じるＤＮＡを配列決定へ供した。クローンの幾つもの配列の分析は、上述の配列と１００％一致したが、大規模プラスミド精製のために単一のクローンを選択した。Ｆｃ及びリンカー領域を確認するため、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ中のＦｃ－２ｘＬ－ＳｈＫからのＤＮＡを再配列決定し、配列は、図１４Ａ－Ｂに示される推定されたコード化配列と１００％同一であった。

【０３１８】

ＤＭＥＭ高グルコース（Ｇｉｂｃｏ）、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ、Ｇｉｂｃｏ製）、１× 非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、Ｇｉｂｃｏ製）を含有する増殖培地中で、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉタンパク質中のＦｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ[１－３５]の一過性形質移入発現において使用されるＨＥＫ－２９３細胞を培養した。Ｆｕｇｅｎｅ６（Ｒｏｃｈｅ）を使用して、フェノール／クロロホルム抽出したｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉプラ

スミド中のＦｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ［１－３５］５．６μｇを、ＨＥＫ－２９３細胞に形質移入した。細胞を２４時間回復した後、ＤＭＥＭ高グルコース及び１×ＮＥＡＡ培地中に４８時間配置した。Ｃｅｎｔｒｉｐｒｅｐ　ＹＭ－１０フィルター（Ａｍｉｃｏｎ）へ３０ｍＬを流し、さらにＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　ＹＭ－１０（Ａｍｉｃｏｎ）フィルターによって濃縮することによって、培養上清を５０倍濃縮した。濃縮した培地の多様な量を自家４×添加液（Ｂ－メルカプトエタノールなし）と混合し、Ｎｏｖｅｘ　Ｘｃｅｌｌ　ＩＩ装置を使用して、ＢｅｎｃｈＭａｒｋ染色済みタンパク質ラダー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）１０μＬとともに、５×タンク緩衝液（０．１２３トリス塩基、０．９６Ｍグリシン）中、１０１Ｖ／４６ｍＡで２時間、Ｎｏｖｅｘ４ないし２０％トリス－グリシンゲル上で電気泳動した。次に、ゲルをエレクトロブロット緩衝液（３５ｍＭトリス塩基、２０％メタノール、１９２ｍＭグリシン）中に３０分間浸漬した。Ｎｏｖｅｘ製のＰＤＶＦメンブレン（カタログ番号ＬＣ２００２、孔サイズ０．２μｍ）を活性化させるため、前記ＰＶＤＦメンブレンをメタノール中に３０秒浸漬し、脱イオン水ですすぎ、エレクトロブロット緩衝液中に浸漬した。ＸＣｅｌｌ　ＩＩブロットモジュールを使用して、製造者の説明書（Ｎｏｖｅｘ）に従って、ＰＶＤＦメンブレンへ４０ｍＡで２時間、あらかじめ浸漬したゲルをブロットした。次に、まずトリス緩衝塩類溶液ｐＨ７．５（ＴＢＳ）中の５％ミルク（Ｃａｒｎａｔｉｏｎ）中に室温で、ブロットを１時間浸漬し、０．１％トゥイーン２０含有ＴＢＳ（ＴＢＳＴ、Ｓｉｇｍａ）及び１％ミルク緩衝液中で、ＨＲＰ結合抗ヒトＦｃ抗体（Ｚｙｍｅｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｅｓカタログ番号０５－３３２０）の１：５００希釈を、室温で２時間浸漬するために温置した。次に、室温で１回の洗浄につき１５分間、ＴＢＳＴ中で、ブロットを３回洗浄した。製造者の説明書に従ってＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＢｉｏｔｅｃｈのＥＣＬウェスタンブロット検出試薬を使用して、一次抗体を検出した。ＥＣＬ検出に際し、ウェスタンブロット分析は、非還元型ゲル条件下で、６６ｋＤａの予期されるサイズを表示した（図２４Ａ）。

【０３１９】

ＤＭＥＭ高グルコース、１０％ウシ胎仔血清、１×ヒポキサンチン／チミジン（ＨＴ、Ｇｉｂｃｏ製）、１×ＮＥＡＡを含有するＡＭ１　ＣＨＯｄ増殖培地中で、Ｆｃ－ＬＩ０－ＳｈＫ［１－３５］タンパク質の安定した発現に使用されるＡＭ１ＣＨＯｄ（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）細胞を培養した。Ｆｕｇｅｎｅ６を使用して、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ－Ｆｃ－ＳｈＫプラスミド６．５μｇもＡＭ１　ＣＨＯｄ細胞へと形質移入した。翌日、形質移入した細胞を２０個の１５ｃｍ皿へと播種し、ＤＭＥＭ高グルコース、１０％ＦＢＳ、１×ＨＴ、１×ＮＥＡＡ、ジェネテシン（Ｇ４１８ｍｉあたり８００μｇ、Ｇｉｂｃｏ製）を使用して１３日間選択した。４８個の生存コロニーを、２つの２４ウェルプレート中に摘出した。増殖させるため、プレートを１週間放置した後、凍結のために複製した。１０％ＦＢＳなしのＡＭ１　ＣＨＯｄ増殖培地へ、各プレートの１セットを４８時間移動させて、培養上清を回収した。安定したＣＨＯクローンを発現させるための培養上清１５μＬを選別するために、同一の抗ヒトＦｃ抗体による検出を使用する一過性ウェスタンブロット分析と同様のウェスタンブロット分析を使用した。４８個の安定したクローンのうち、５０％超は６６ｋＤａの予期されたサイズでＳｈＫを発現した。一次クローンＢＢ６に対するバックアップとして、ＢＢ６、ＢＤ５、ＢＤ６クローンをＢＤ５及びＢＤ６で選択した（図２４Ｂ）。

【０３２０】

ＡＭ１　ＣＨＯｄ増殖培地を使用して、ＢＢ６クローンを、１０個のローラー瓶（Ｃｏｒｎｉｎｇ）へとスケールアップし、顕微鏡下で判断される培養密度まで増殖させた。次に、培地を、５０％ＤＭＥＭ高グルコース並びに１×ＨＴ及び１×ＮＥＡＡ含有５０％ＨａｍのＦ１２（Ｇｉｂｃｏ）を含有する無血清培地と交換し、１週間温置した。培養上清を１週間の温置時点で回収し、０．４５μｍフィルター（Ｃｏｒｎｉｎｇ）でろ過し、凍結した。新鮮な無血清培地を添加し、さらに１週間温置した。培養無血清上清を初回と同様に回収し、凍結した。

【０３２１】

水槽中、室温で、培養上清約４Ｌを解凍した。Ｓａｔｏｒｉｕｓ Ｓａｒｔｏｃｏｎ Ｐｏｌｙｓｕｌｆｏｎ１０接線流限外ろ過カセット（０．１m^2）を室温で使用して、培地を約４５０ｍＬまで濃縮した。次に、プレフィルターを有する０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターで保持液（ｒｅｔｅｎｔａｔｅ）をろ過した。次に、７℃、５ｍＬ／分で、５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＨｉＴｒａｐタンパク質Ａカラムへ保持液をかけ、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０にする工程で、試料を溶出した。タンパク質Ａ溶出プール（約９ｍＬ）を、５０ｍＬになるように水で希釈し、Ｓ-緩衝液Ａ（２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．０）中の５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＨｉＴｒａｐ ＳＰ-ＨＰカラムへと、７℃、５ｍＬ／分で負荷した。次に、数カラム容積のＳ-緩衝液Ａで、カラムを洗浄した後、２５％から７５％のＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭNaH_2PO_4、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配を５ｍＬ／分で使用した後、７℃で１００％のＳ-緩衝液Ｂまでの工程を展開した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、Ｐａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｍａｃｒｏｓｅｐ １０Ｋ Ｏｍｅｇａ遠心限外ろ過装置を使用して、プールした材料を約３．４ｍＬまで濃縮した後、Ｃｏｓｔａｒ０．２２μｍ酢酸セルロースシリンジフィルターでろ過した。

【０３２２】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈したろ過済み材料１０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２６Ａ）。３２，４２０ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び４７，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が５．４ｍｇ／ｍＬであると決定した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２６Ｂ）。次に、ＰＢＳ中の試料の１０８倍希釈を使用するＣｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｅｎｄｏｓａｆｅ-ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、タンパク質１ｍｇあたり１ＥＵであった。次に、５０ｍＭＮａＨ２ＰＯ４、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物２０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２６Ｃ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）中に希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）を、ＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーが装備されたＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して、外部質量較正を実施し（図２６Ｄ）、精製されたペプチボディの完全性を（実験誤差内で）確認した。その後、生成物を-８０℃で保存した。

【０３２３】

精製されたＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[１-３５]は、電気生理学法によって測定されるように、ヒトＫｖ１．３を強く遮断した（図３０Ａ及び図３０Ｂ）（実施例３６参照）。精製されたＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[１-３５]分子は、Ｔ細胞増殖（図３６Ａ及び図３６Ｂ）並びにサイトカインＩＬ-２（図３５Ａ及び図３７Ａ）及びＩＦＮ-ｇ（図３５Ｂ及び図３７Ｂ）の生成も遮断した。

【実施例２】

【０３２４】

Ｆｃ-Ｌ-ＳｈＫ[２-３５]の哺乳類での発現

標準的なＰＣＲ技術を使用して、Ｋｖ１．３阻害剤ペプチドＳｈＫ［２－３５］の単量体へ、インフレームで融合されたヒトＩｇＧ１のＦｃ領域をコードするＤＮＡ配列を構築した。ＳｈＫ［２－３５］及び前記分子の５、１０又は２５アミノ酸リンカー部分を、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ中の固有Ｆｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ［１－３５］をテンプレートとして使用するＰＣＲ反応において生成させた（実施例１、図１４Ａ－Ｂ）。全てのＳｈＫコンストラクトは、以下のアミノ酸配列

【０３２５】

【化８】

SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC
（配列番号：92）

を有するべきであり、配列番号野生型配列の最初のアミノ酸は欠失している。

【０３２６】

「Ｆｃ－１ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］」とも呼ばれるＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ［２－３５］を作製するために使用されるプライマーの配列を以下に示す。

【０３２７】

【化９】

cat gga tcc agc tgc atc gac acc atc// 配列番号：661；

cat gcg gcc gct cat tag c// 配列番号：662；

【０３２８】

「Ｆｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］」とも呼ばれるＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］を作製するために使用されるプライマーの配列を以下に示す。

【０３２９】

【化１０】

cat gga tcc gga gga gga gga agc agc tgc a //配列番号：663；

cat gcg gcc gct cat tag cag gtg c //配列番号：664；

【０３３０】

「Ｆｃ－５ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］」とも呼ばれるＦｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］を作製するために使用されるプライマーの配列を以下に示す。

【０３３１】

【化１１】

cat gga tcc ggg ggt ggg ggt tct ggg ggt ggg ggt tct gga gga

gga gga agc gga gga gga gga agc agc tgc a//配列番号：665；

cat gcg gcc gct cat tag cag gtg c//配列番号：665；

【０３３２】

ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ（Ｒｏｃｈｅ）制限酵素でＰＣＲ産物を消化し、ゲル精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）によってアガロースゲル精製した。同時に、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ－ｈＦｃ－アクチビンＲＩＩＢベクターを、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素で消化し、ゲル精製キットによって大きな断片を精製した。精製した各ＰＣＲ産物を大きな断片へ連結し、ＸＬ－１ブルーバクテリア中に形質転換した。形質転換された細菌コロニー由来のＤＮＡを単離し、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素消化に供し、１％アガロースゲル上で分離した。予想されたパターンを生じるＤＮＡを配列決定へ供した。クローンの幾つもの配列の分析は、上述の配列と１００％一致したが、大規模プラスミド精製のために１つのクローンのみを選択した。Ｆｃ領域及びリンカー領域を確認するために、このクローン由来のＤＮＡを再配列決定し、配列は予想された配列と１００％同一であった。

【０３３３】

ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉベクター中にＦｃ－１ｘＬ－Ｓｈｋ［２－３５］、Ｆ

ｃ－２ｘＬ－Ｓｈｋ及びＦｃ－５ｘＬ－Ｓｈｋ［２－３５］インサートを含有するプラスミドを、Ｘｂａ１及びＸｈｏ１（Ｒｏｃｈｅ）制限酵素で消化し、ゲル精製した。ＮｏｔＩ及びＳａｌＩ（Ｒｏｃｈｅ）で消化したｐＤＳＲα－２２（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）発現ベクターへ、前記インサートを個々に連結した。得られたコンストラクトの完全性をＤＮＡ配列決定によって確認した。最終的なプラスミドＤＮＡ発現ベクターコンストラクトは、ｐＤＳＲα－２２－Ｆｃ－１ｘＬ－Ｓｈｋ［２－３５］、ｐＤＳＲα－２２-Ｆｃ－２ｘＬ－Ｓｈｋ［２－３５］（図１３Ｃ及び図１５Ａ－Ｂ）及びｐＤＳＲα－２２－Ｆｃ－５ｘＬ－Ｓｈｋ［２－３５］（図１６Ａ－Ｂ）であり、それぞれ５、１０及び２５アミノ酸リンカーを含有していた。

【０３３４】

形質移入の２４時間前に、１．２ｅ７　ＡＭ－１／Ｄ　ＣＨＯｄ（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）細胞を、Ｔ－１７５ｃｍの滅菌済み組織培養フラスコ中に播種し、形質移入当日に７０ないし８０％培養密度にした。ＤＭＥＭ高グルコース、５％ＦＢＳ、１×グルタミンＰｅｎ／Ｓｔｒｅｐ（Ｇｉｂｃｏ）、１×ＨＴ、１×ＮＥＡＡ及び１×ピルビン酸ナトリウム（Ｇｉｂｃｏ）を含有するＡＭ－１／Ｄ　ＣＨＯｄ培地中で前記細胞を維持した。翌日、直鎖状にしたｐＤＳＲα２２：Ｆｃ－１ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］、ｐＤＳＲα２２：Ｆｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］及びｐＤＳＲα２２：Ｆｃ－５ｘＬ－ＳｈＫ［２－３５］（ＲＤＳ番号２００５００３７６８５、２００５００５３７０９、２００５００７３２９５）の各プラスミド１８μｇを、直鎖状Ｓｅｌｅｘｉｓ　ＭＡＲプラスミド７２μｇ及びｐＰＡＧＯ１（ＲＤＳ２００４２００９８９６）と混合し、５０ｍＬコニカルチューブ中のＯｐｔｉＭＥＭ６ｍＬ中へ希釈し、５分間温置した。ＬＦ２０００（２１０μＬ）をＯｐｔｉＭＥＭ６ｍＬへ添加し、５分間温置した。希釈したＤＮＡ及びＬＦ２０００を互いに混合し、室温で２０分間温置した。その間、細胞をＰＢＳで１回洗浄した後、抗生物質を有さない３０ｍＬのＯｐｔｉＭＥＭを細胞へ添加した。ＯｐｔｉＭＥＭを吸引除去し、ＤＮＡ／ＬＦ２０００混合物１２ｍＬとともに、振とうしている３７℃インキュベーター中で６時間又は一晩、細胞を温置した。形質移入から２４時間後、コロニー選択のために、異なる希釈で、ＡＭ－１／Ｄ　ＣＨＯｄ培地中に細胞を１：５に分割した。形質移入から７２時間後、細胞培地を、ＤＭＥＭ高グルコース、及び１×グルタミンＰｅｎ／Ｓｔｒｅｐ、１×ＮＥＡＡ及び１×ピロリン酸ナトリウム中に１０％透析済みＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）を含有するＤＨＦＲ選択培地と置換し、細胞培地中へタンパク質を発現及び分泌させた。コロニーが、摘み取るのに十分大きくなるまで、選択培地を１週間に２回交換した。ｐＤＳＲａ２２発現ベクターは、形質移入した細胞をヒポキサンチン及びチミジンの不存在下で増殖させるＤＨＦＲ発現カセットを含有する。得られたコロニーの５つのＴ－１７５プールを、ローラー瓶へスケールアップし、無血清条件下で培養した。馴化培地を回収し、１週間置きに交換した。得られた馴化培地３Ｌを、０．４５μｍ酢酸セルロースフィルター（Ｃｏｒｎｉｎｇ，　Ａｃｔｏｎ，　ＭＡ）でろ過し、精製のためにＰｒｏｔｅｉｎ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙに転移させた。バックアップとして、ＤＨＦＲ選択培地上で、１０ないし１４日後に、１０ｃｍプレートから１２個のコロニーを選択し、ＨＲＰ抱合された抗ヒトＩｇＧＦｃをプローブとして使用するウェスタンブロットによって、発現レベルを評価した。異なるリンカー長のＦｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］融合タンパク質の各々の最高レベルを発現する３つの最良のクローンを繁殖させ、将来の使用のために凍結した。

【０３３５】

Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）の精製

室温、水槽中で、培養上清約１Ｌを解凍した。５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＨｉＴｒａｐタンパク質Ａカラムへ、７℃、５ｍＬ／分で、培地を負荷し、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０への工程で、試料を溶出した。タンパク質Ａ溶出プール（約８．５ｍＬ）を、３Ｍ酢酸ナトリウム７１μＬと組み合わせた後、５０ｍＬになるように水で希釈した。次に、７℃、５ｍＬ／分で、Ｓ－緩衝液Ａ（２０ｍＭNaH_2PO_4、

ｐＨ７．０）中の５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ-ＨＰカラムへと、希釈した材料を負荷した。次に、Ｓ-緩衝液Ａの数カラム容積で、カラムを洗浄した後、０％から７５％までのＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭＮａＨ２ＰＯ４、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配を５ｍＬ／分で使用して展開した後、７℃で１００％Ｓ-緩衝液Ｂにする工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、プールした材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、Ｐａｌｌ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｍａｃｒｏｓｅｐ　１０Ｋ　Ｏｍｅｇａ遠心限外ろ過装置を使用して、約３．９ｍＬまで濃縮した。次に、室温、２ｍＬ／分で、０．２２μｍ、２５ｍｍのＭｕｓｔａｎｇ　Ｅメンブレンを有するＰａｌｌ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ａｃｒｏｄｉｓｃを用いて、濃縮した材料をろ過した。次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈したろ過済み材料１０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２７Ｅ）。３０，００８ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が２．７６ｍｇ／ｍＬであることを決定した。透過液中に材料が認められたため、新しいＭａｃｒｏｓｅｐカートリッジを使用して、透過液に対して濃縮工程を反復した。次に、室温、２ｍＬ／分で、０．２２μｍ、２５ｍｍのＭｕｓｔａｎｇ　Ｅメンブレンを有するＰａｌｌ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ａｃｒｏｄｉｓｃを通して、濃縮された材料の新たなバッチをろ過した。濃縮された材料の両ロットを１つのプールへと組み合わせた。

【０３３６】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した、合わせたプール１０μＬに対して、スペクトル走査を実施した。３０，００８ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が３．３３ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２７Ａ）。次に、ＰＢＳ中への試料の６７倍希釈を使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｅｎｄｏｓａｆｅ-ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭＮａH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に１ｍＬ／分で注入された生成物５０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２７Ｂ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）中に希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２７Ｆ）、本実験は、ペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を-８０℃で保存した。

【０３３７】

図３１Ｂは、精製されたＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[２-３５]がヒトＫｖ１．３電流を強く遮断することを示す（電気生理学的実験を実施例３６に記載されるとおり実施した。）。精製したＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[２-３５]分子は、ヒト全血中のＩＬ-２（図６４Ａ及び図６４Ｂ）及びＩＦＮ-ｇ（図６５Ａ及び図６５Ｂ）の生成も、Ｔ細胞に関するＣＤ４０Ｌ（図６６Ａ及び図６６Ｂ）及びＩＬ-２Ｒ（図６７Ａ及び図６７Ｂ）の上方制御と同様に遮断した。

【０３３８】

Ｆｃ－Ｌ５－ＳｈＫ（２－３５）の精製

５mLのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＨｉＴｒａｐタンパク質Ａカラムへ、７℃、５ｍＬ／分で、培養上清約１Ｌを負荷し、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０への工程で試料を溶出した。タンパク質Ａ溶出プール（約９ｍＬ）を１ＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．５の４５０μＬと組み合わせた後、２Ｍ酢酸２３０μＬと組み合わせ、次に水で５０ｍＬに希釈した。次に、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、７℃、５ｍＬ／分でＳ－緩衝液Ａ（２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．０）中の５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ－ＨＰカラムへ負荷した。次に、Ｓ－緩衝液Ａの数カラム容積でカラムを洗浄した後、０％から７５％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭNaH_2PO_4、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配を５ｍＬ／分で使用して展開した後、７℃で１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、Ｐａｌｌ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｍａｃｒｏｓｅｐ　１０Ｋ　Ｏｍｅｇａ遠心限外ろ過装置を使用して、プールした材料を約５．５ｍＬまで濃縮した。次に、濃縮した材料を室温で２ｍＬ／分で、０．２２μｍ、２５ｍｍのＭｕｓｔａｎｇ　Ｅメンブレンを有するＰａｌｌ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ａｃｒｏｄｉｓｃでろ過した。

【０３３９】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール１０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２７Ｇ）。２９，７５０ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が４．５９ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２７Ｃ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液ＢＧ１２０中に試料を９２倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｅｎｄｏｓａｆｅ－ＰＴＳシステム（０．０５ないし-５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物５０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２７Ｈ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）へと希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２７Ｉ）、ペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を－８０℃で保存した。

【０３４０】

図３１Ｃは、精製したＦｃ－Ｌ５－ＳｈＫ[２－３５]が非常に活発で、全細胞パッチクランプ電気生理学的実験によって測定されるように、ヒトＫｖ１．３を遮断することを示す（実施例３６参照）。

【０３４１】

Ｆｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ（２－３５）の精製

７℃、５ｍＬ／分で、５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＨｉＴｒａｐ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａカラムへ、培養上清約１Ｌを負荷し、前記カラムを二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）の数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３

．０への工程で試料を溶出した。タンパク質Ａ溶出プール（約９．５ｍＬ）を３Ｍ酢酸ナトリウム１１９μＬと組み合わせた後、水で５０ｍＬに希釈した。次に、７℃、５ｍＬ／分でＳ－緩衝液Ａ（２０ｍＭＮａH_2PO_4、ｐＨ７．０）中の５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ－ＨＰカラムへと、ｐＨ調整した材料を負荷した。次に、カラムをＳ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から７５％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭＮａH_2PO_4、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配を５ｍＬ／分で使用して展開した後、７℃で１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。クロマトグラムからの主要ピークを含有する画分をプールし、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した。

【０３４２】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２７Ｊ）。３１，０１１ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が１．４０ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２７Ｄ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液ＢＧ１２０中に試料を２８倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｅｎｄｏｓａｆｅ－ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭＮａH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に１ｍＬ／分で注入された生成物５０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２７Ｋ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ中に希釈する（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２７Ｌ）、これにより、ペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を－８０℃で保存した。

【０３４３】

精製したＦｃ－Ｌ２５－ＳｈＫ［２－３５］は、ＨＥＫ２９３／Ｋｖ１．３細胞に関するホールセルパッチクランプ電気生理学によって、約１５０ｐＭのIC_{50}でヒトＫｖ１．３を阻害した（実験３６）。

【実施例３】

【０３４４】

Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［１－３５］の細菌での発現

細菌のペプチボディ発現ベクター並びにペプチボディのクローニング及び発現に関する手法の記載

細菌発現に使用されるクローニングベクター（実施例３ないし３０）は、（米国特許第２００４／００４４１８８号に元来記載される）ｐＡＭＧ２１に基づいている。ベクターのユニークなＢｓｔＢＩ部位とＮｓｉＩ部位の間でＤＮＡを切り出し、アンピシリンに対する耐性を付与するβ－ラクタマーゼ遺伝子のテンプレート源としてのｐＵＣ１９ＤＮＡとともに、ＰＣＲプライマー

【０３４５】

【化１２】

CCA ACA CAC TTC

GAA AGA CGT TGA TCG GCA C （配列番号：667）及び CAC CCA ACA ATG CAT CCT

TAA AAA AAT TAC GCC C（配列番号：668）

を使用して、β－ラクタマーゼ遺伝子を搭載する適切に消化されたＰＣＲ断片と置換することによって、カナマイシン耐性要素がアンピシリン耐性と置換された点が改変されている。新たなバージョンは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲと呼ばれる。

【０３４６】

１５及び１６を除く、実施例３ないし３０において使用されるクローニングベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐの記載。

【０３４７】

図１１Ａ－Ｃ及び図１１Ｄ（模式図）は、Ｆｃ遺伝子のＣ末端へのペプチド融合のクローニングを可能にするために基本ベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲへ付加された二本鎖ＤＮＡを示す。前記ＤＮＡは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲベクター中のユニークなＮｄｅｌ部位とＢａｍＨＩ部位の間に導入されている。ＤＮＡのこの完全な領域を図１１ＡないしＣに示す。Ｆｃのコード領域は、ヌクレオチド５１３４から５８１７まで及び、タンパク質配列はＤＮＡ配列の下に表される。この後に、フレーム中にｇｌｙＸ５リンカーが続く（ヌクレオチド５８１８ないし５８３２）。ＢｓｍＢＩ部位（ＧＡＧＡＣＧ）は、ヌクレオチド５８３４ないし５８３９に及ぶ。ＤＮＡ開裂は、上部ＤＮＡ鎖のヌクレオチド５８２８と５８２９の間、及び下部ＤＮＡ鎖のヌクレオチド５８３２と５８３３の間に生じる。本明細書に示されるように、消化によって、４ｂｐの付着末端が作製される。ＢｓｍＢＩ部位には下線を付されている。

【０３４８】

【化１３】

AGGTGG
TCCACCACCA
配列番号：684

TGGTTGAGACG 配列番号：683
ACTCTGC

【０３４９】

第二ＢｓｍＢＩ部位は、ヌクレオチド６６４３ないし６６４８、すなわちＣＧＴＣＴＣに存在する。ＤＮＡ開裂は、上部鎖のヌクレオチド６６５０と６６５１の間、及び下部鎖の６６５４と６６５５の間に生じる。

【０３５０】

【化１４】

CGTCTCT
GCAGAGAATTC
配列番号：686

TAAGGATCCG 配列番号：685
CTAGGC

【０３５１】

２つのＢｓｍＢＩ部位の間に存在するのは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを構成的に発現する非必須クロラムフェニコール耐性カセットである（ｃａｔ遺伝子）。ｃａｔタンパク質配列、すなわち

【０３５２】

【化１５】

```
  1  MEKKITGYTT VDISQWHRKE HFEAFQSVAQ CTYNQTVQLD ITAFLKTVKK
 51  NKHKFYPAFI HILARLMNAH PEFRMAMKDG ELVIWDSVHP CYTVFHEQTE
101  TFSSLWSEYH DDFRQFLHIY SQDVACYGEN LAYFPKGFIE NMFFVSANPW
151  VSFTSFDLNV ANMDNFFAPV FTMGKYYTQG DKVLMPLAIQ VHHAVCDGFH
201  VGRMLNELQQ YCDEWQGGA //配列番号：1337
```

は、図１１ＡないしＣに示されており、ヌクレオチド５９５４から６６１０まで及ぶ。（実施例１５及び１６を除く）各実施例における、ペプチドをコードする二本鎖は、ベクターによって表されるものと相補的な付着末端を有する。

【０３５３】

実施例１５及び１６において使用されるクローニングベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ-Ｐｅｐ-Ｆｃに関する記載。

【０３５４】

図１２ＡないしＣ、及び図１２Ｄの模式図は、Ｆｃ遺伝子のＮ末端へのペプチド融合のクローニングを可能にするために、基本ベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲへ付加された二本鎖ＤＮＡ配列を示す。ＤＮＡは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲベクター中のユニークなＮｄｅ１部位とＢａｍＨＩ部位との間に導入されている。Ｆｃに対するコード領域は、ヌクレオチド５６４０から６３０９まで及び、タンパク質配列はＤＮＡ配列の下に表されている。この後、フレーム中にｇｌｙＸ５リンカーが続く（ヌクレオチド５６１４ないし５６２８）。ＢｓｍＢＩ部位は、ヌクレオチド５１３８ないし５１４３、すなわちＧＡＧＡＣＧに及ぶ。切断は、上部ＤＮＡ鎖のヌクレオチド５１３２と５１３３の間、及び下部ＤＮＡ鎖の５１３６と５１３７の間で生じる。

【０３５５】

示されるように、消化によって４ｂｐの付着末端が作製される。ＢｓｍＢＩ部位は下線を付されている。

【０３５６】

【化１６】

```
AATAACA                          TATGCGAGACG 配列番号：687
TTATTGTATAC                          GCTCTGC
配列番号：688
```

【０３５７】

第二ＢｓｍＢＩ部位は、ヌクレオチド５６０７ないし５６１２、すなわちＣＧＴＣＴＣに存在する。切断は、上部鎖のヌクレオチド５６１３と５６１４の間、及び下部鎖の５６１７と５６１８の間に生じる。

【０３５８】

【化１７】

```
CGTCTCA                  GGTGGTGGT
GCAGAGTCCAC                  CACCA
配列番号：689
```

【０３５９】

ＢｓｍＢＩ部位の間に存在するのは、赤痢菌ｂｌｅタンパク質を構成的に発現する必須で無いゼオシン耐性カセットである。ｂｌｅタンパク質配列、すなわち

【０３６０】

【化１８】

```
  1  MAKLTSAVPV LTARDVAGAV EFWTDRLGFS RDFVEDDFAG VVRDDVTLFI
 51  SAVQDQVVPD NTLAWVWVRG LDELYAEWSE VVSTNFRDAS GPAMTEIGEQ
101  PWGREFALRD PAGNCVHFVA EEQD //配列番号：1338
```

は、図１２ＡないしＣにおいてヌクレオチド５２１７から５５８８まで及ぶことが示されている。実施例１５及び１６における、ペプチドをコードする二本鎖は、ベクターによって表されるものと相補的な付着末端を有する。

【０３６１】

実施例５２及び５３において使用されるクローニングベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ-Ｐｅｐ-Ｆｃに関する記載。

【０３６２】

図１２ＥないしＧは、ペプチドの最初の２つのコドンがｍｅｔ-ｇｌｙであるべきＦｃ遺伝子の、Ｎ末端へのペプチド融合のクローニングを可能にするために、基本ベクターｐＡＭＧ２１ａｍｐＲへ付加された二本鎖ＤＮＡ配列を示す。前記ＤＮＡは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲベクター中の独特なＮｄｅ１部位とＢａｍＨＩ部位との間に導入されている。Ｆｃに対するコード領域は、ヌクレオチド５６３２から６３１２まで及び、タンパク質配列はＤＮＡ配列の下に表されている。この後、フレーム中にｇｌｙＸ５リンカーが続く（ヌクレオチド５６１７ないし５６３１）。ＢｓｍＢＩ部位は、ヌクレオチド５１４１ないし５１４６、すなわちＧＡＧＡＣＧに及ぶ。切断は、上部ＤＮＡ鎖のヌクレオチド５１３５と５１３６の間、及び下部ＤＮＡ鎖の５１３９と５１４０の間で生じる。

【０３６３】

示されるように、消化によって４ｂｐの付着末端が作製される。ＢｓｍＢＩ部位には下線が付されている。

【０３６４】

【化１９】

AATAACATAT　　GGGTCGAGACG 配列番号：1344
配列番号：1343
TTATTGTATACCCA　　GCTCTGC
配列番号：1345

【０３６５】

第二のＢｓｍＢＩ部位は、ヌクレオチド５６０７ないし５６１２、すなわちＣＧＴＣＴＣに存在する。切断は、上部鎖のヌクレオチド５６１３と５６１４との間、及び下部鎖の５６１７と５６１８との間に生じる。

【０３６６】

【化２０】

CGTCTCA　　GGTGGTGGT
GCAGAGTCCAC　　CACCA
配列番号：1346

【０３６７】

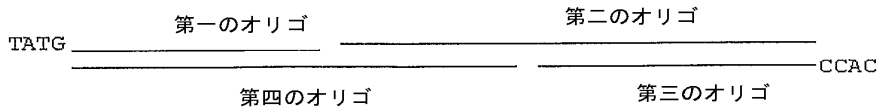
ＢｓｍＢＩ部位の間に存在するのは、赤痢菌ｂｌｅタンパク質を構成的に発現する必須でないゼオシン耐性カセットである。ｂｌｅは、上述のように、ヌクレオチド５２２０から５５９１まで及ぶことが示されている。本明細書で以下の実施例５２及び５３におけるペプチドコード化二本鎖は、ベクターによって表されるものと相補的な付着末端を有する。

【０３６８】

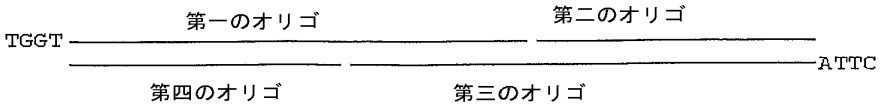
全てが細菌発現用である実施例３ないし３０において、クローニングされたペプチド配列は全て、適切なベクター中に直接連結されたＤＮＡ二本鎖を作製するための、オリゴヌクレオチドのアニーリングから得られる。実施例２０については、２つのオリゴで十分であり、全ての他の実施例には４つが必要である。二本鎖がＦｃのＮ末端において挿入されるべき場合（本明細書の実施例１５、１６、５２及び５３参照）には、デザインは次のとおりであり、順序を示す数は、各実施例におけるオリゴのリストと一致する。

【０３６９】

【化２１】



二重鎖がFcのC末端に挿入される場合（実施例３、４、５、１０、１１，１２、１３及び３０）、デザインは以下のとおりである。

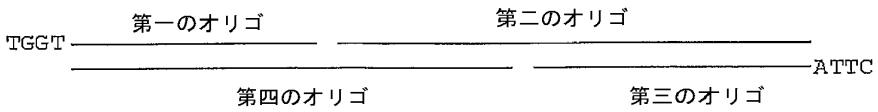


【０３７０】

残りの全ての実施例は、ＦｃのＣ末端において二本鎖が挿入され、次のデザインを利用する。

【０３７１】

【化２２】



【０３７２】

何れのオリゴのリン酸化にも、キナーゼ化（ｋｉｎａｓｉｎｇ）工程は必要ではない。二本鎖が首尾よく挿入されると、必須でない抗生物質耐性カセット（ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃについてはゼオシン耐性、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐについてはクロラムフェニコール耐性）が置換される。得られた表現型の変化は、組換えクローンを非組換えクローンと識別するのに有用である。

【０３７３】

以下の記載は、本明細書で具体化されている、細菌によって発現された３０個の組換えタンパク質全てのクローニングを実施するための一様な方法を与える。オリゴヌクレオチド及びベクターのセットのみが変動する。これらの仕様は、以下の各実施例に記載されている。

【０３７４】

各実施例に列挙されているオリゴヌクレオチドのアニーリングによって、所定のペプチドに対するコード領域を含有するオリゴヌクレオチド二本鎖を形成した。制限酵素ＢｓｍＢＩで予め消化された適切なベクター０．３μｇとともに１×連結緩衝液を含有する１０μＬの最終容積中に、各オリゴ１０ｐｍｏｌを混合した。混合物を８０℃まで加熱し、０．１℃／秒で室温まで冷却させた。これに、１×連結緩衝液１０μＬ及びＴ４ＤＮＡリガーゼ４００単位を添加した。試料を１４℃で２０分間温置した。６５℃で１０分間加熱することによって、リガーゼを失活させた。次に、制限酵素ＢｓｍＢＩを１０単位添加した後、再形成された全ての親ベクター分子も開裂させるために、５５℃で１時間温置した。化学的に形質転換受容性のあるＥ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞５０μＬを添加し、２℃で

２０分間保持した後、４２℃で５秒間熱ショックを付与した。２００μｇ／ｍＬのカルベニシリンを補充したルリアアガープレートへ、全容積を拡散させた。置換可能な抗生物質耐性マーカーに対する耐性の損失に関して、コロニーを検査した。二本鎖インサートの予想されたサイズを確認するため、標準的なＰＣＲ検査を使用し得る。プラスミド調製物を得、組換えインサートをＤＮＡ配列決定によって確認した。配列の確認されたコンストラクトの０．５Ｌ培養物をＴｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ中で増殖させ、５０ｎｇ／ｍＬのＮ-（３-オキソ-ヘキサノイル）-ホモセリンラクトンの添加によって、ペプチボディの発現を誘導し、３７℃で４ないし６時間振とうした後、細胞を遠心分離し、細胞ペーストを-２０℃で保存した。

【０３７５】

以下では、各実施例について、クローニングベクター及び各融合タンパク質を構築するために使用されるオリゴヌクレオチドのセットを記載する。ＤＮＡ／タンパク質地図も示されている。

【０３７６】

Ｋｖ１．３のＦｃ-Ｌ-ＳｈＫ[１-３５]阻害剤の細菌での発現

細菌中で、ペプチボディをクローニング及び発現させるための方法は上述されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ-Ｆｃ-Ｐｅｐであり、Ｆｃ-Ｌ-ＳｈＫ[１-３５]の細菌中でのクローニング及び発現のために二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０３７７】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴ：

【０３７８】

【化２３】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTTCCTGCATCGACACCAT //配列番号：669；

CCCGAAATCCCGTTGCACCGCTTTCCAGTGCAAACACTCCATGAAATACCGTCTGTCCTTCTGCCGTAAAACC
TGCGGTACCTGC //配列番号：670；

CTTAGCAGGTACCGCAGGTTTTACGGCAGAAGGACAGACGGT //配列番号：671；

ATTTCATGGAGTGTTTGCACTGGAAAGCGGTGCAACGGGATTTCGGGATGGTGTCGATGCAGGAACGGGAACC
ACCACCACCGGA //配列番号：672；

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTTCCTGCATCGACACCATCCCGAAATCCCGTTGCAC
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
   AGGCCACCACCACCAAGGGCAAGGACGTAGCTGTGGTAGGGCTTTAGGGCAACGTG

    G  S  G  G  G  G  S  R  S  C  I  D  T  I  P  K  S  R  C  T  -

   CGCTTTCCAGTGCAAACACTCCATGAAATACCGTCTGTCCTTCTGCCGTAAAACCTGCGG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GCGAAAGGTCACGTTTGTGAGGTACTTTATGGCAGACAGGAAGACGGCATTTTGGACGCC

    A  F  Q  C  K  H  S  M  K  Y  R  L  S  F  C  R  K  T  C  G  -

   TACCTGC //配列番号：673
121 -------
   ATGGACGATTC //配列番号：675

    T  C  - //配列番号：674
```

【０３７９】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。細菌で発現されたＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（１-３５）の精製は、本明細書の以下の実施例３８でさらに記載されている。

【実施例４】

【０３８０】

Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］の細菌での発現

細菌中で、ペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０３８１】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０３８２】

【化２４】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCATCGACACCATCCCGAAATCCCGTTGCACCGCTTTCCAGTGCAAACACTCCATGAAA
T //配列番号：676；

ACCGTCTGTCCTTCTGCCGTAAAACCTGCGGTACCTGC //配列番号：677；

CTTAGCAGGTACCGCAGGTTTTACGGCAGAAGGACAGACGGTATTTCATGGAGTGTTTGCACTGGAAAGCGGTGCAACGGGA
//配列番号：678；

TTTCGGGATGGTGTCGATGCAGGAACCACCACCACCGGA //配列番号：679；

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCATCGACACCATCCCGAAATCCCGTTGCACCGCTTT
 1 ----------+---------+----------+----------+---------+----------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGACGTAGCTGTGGTAGGGCTTTAGGGCAACGTGGCGAAA

    G  S  G  G  G  G  S  C  I  D  T  I  P  K  S  R  C  T  A  F  -

   CCAGTGCAAACACTCCATGAAATACCGTCTGTCCTTCTGCCGTAAAACCTGCGGTACCTG
61 ----------+---------+----------+---------+----------+----------+ 120
   GGTCACGTTTGTGAGGTACTTTATGGCAGACAGGAAGACGGCATTTTGGACGCCATGGAC

    Q  C  K  H  S  M  K  Y  R  L  S  F  C  R  K  T  C  G  T  C  - //配列番号：681

   C // 配列番号：680
121 -
   GATTC // 配列番号：682
```

【０３８３】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。細菌で発現するＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）の精製は、本明細書の以下の実施例３９に、さらに記載されている。

【実施例５】

【０３８４】

Ｆｃ－Ｌ－ＨｍＫの細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＨｍＫの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＨｍＫの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０３８５】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０３８６】

【化２５】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTACCTGCAAAGACCTGAT //配列番号：690；

CCCGGTTTCCGAATGCACCGACATCCGTTGCCGTACCTCCATGAAATACCGTCTGAACCTGTGCCGTAAAACCTGCGGTTCC
TGC 配列番号：692；

CTTAGCAGGAACCGCAGGTTTTACGGCACAGGTTCAGACGGT // 配列番号：693；

4142-94
ATTTCATGGAGGTACGGCAACGGATGTCGGTGCATTCGGAAACCGGGATCAGGTCTTTGCAGGTACGGGAACCAC
CACCACCGGA //配列番号：694

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTACCTGCAAAGACCTGATCCCGGTTTCCGAATGCAC
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGGCATGGACGTTTCTGGACTAGGGCCAAAGGCTTACGTG

     G  S  G  G  G  G  S  R  T  C  K  D  L  I  P  V  S  E  C  T  -

   CGACATCCGTTGCCGTACCTCCATGAAATACCGTCTGAACCTGTGCCGTAAAACCTGCGG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GCTGTAGGCAACGGCATGGAGGTACTTTATGGCAGACTTGGACACGGCATTTTGGACGCC


     D  I  R  C  R  T  S  M  K  Y  R  L  N  L  C  R  K  T  C  G  - // 配列番号：696

   TTCCTGC //配列番号：695
121 -------
   AAGGACGATTC //配列番号：697

     S  C  -
```

【０３８７】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例６】

【０３８８】

Ｆｃ－Ｌ－ＫＴＸ１の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＫＴＸ１の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＫＴＸ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０３８９】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０３９０】

【化２６】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTGAAATCAACGTTAAATGCT //配列番号：698；

CCGGTTCCCCGCAGTGCCTGAAACCGTGCAAAGACGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCCACTGCAC
CCCGAAA //配列番号：699；

CTTATTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACGGTTCATGCATTTACCGAAA //配列番号：700；

CGCATACCAGCGTCTTTGCACGGTTTCAGGCACTGCGGGGAACCGGAGCATTTAACGTTGATTTCAACACCGGAACCACCAC
CACCGGA //配列番号：701；

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTGAAATCAACGTTAAATGCTCCGGTTCCCCGCA
 1 ----------+----------+----------+----------+----------+----------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGCCACAACTTTAGTTGCAATTTACGAGGCCAAGGGGCGT

    G  S  G  G  G  G  S  G  V  E  I  N  V  K  C  S  G  S  P  Q  -

   GTGCCTGAAACCGTGCAAAGACGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACCGTAAATG
61 ----------+----------+----------+----------+----------+----------+ 120
   CACGGACTTTGGCACGTTTCTGCGACCATACGCAAAGCCATTTACGTACTTGGCATTTAC

    C  L  K  P  C  K  D  A  G  M  R  F  G  K  C  M  N  R  K  C  -

   CCACTGCACCCCGAAA //配列番号：702
121 ----------+------
   GGTGACGTGGGGCTTTATTC  //配列番号：704

    H  C  T  P  K  - //配列番号：703
```

【０３９１】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【０３９２】

細菌中で発現されたＦｃ－Ｌ－ＫＴＸ１の精製及び再折りたたみ

凍結したＥ．コリペースト（２８ｇ）を室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ８．０の２１ｍＬと組み合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置（ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｚｅｒ）へ１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、細胞可溶化液を４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを２００ｍＬの１％デオキシコール酸中に再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを２００ｍＬの水中に再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、ペレット（４．８ｇ）を４８ｍＬの８Ｍグアニジン ＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に溶解した。次に、３０μＬの１Ｍジチオスレイトールを前記溶液３ｍＬへ添加し、３７℃で３０分間温置することによって、溶解したペレットを還元した。次に、還元したペレット溶液を室温、１４，０００ｇで５分間遠心分離した後、上清２．５ｍＬを、再折りたたみ緩衝液（２Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、１ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ８．５）２５０ｍＬへ、４℃で激しく撹拌しながら転移させた。次に、撹拌速度を低下させ、４℃で２日間、温置を継続した。次に、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターで再折りたたみ溶液をろ過し、４℃で３日間保存した。

【０３９３】

次に、保存した再折りたたみ液を水１Ｌで希釈し、１Ｍ H_3PO_4 を使用して、ｐＨを７．５へ調整した。次に、７℃、１０ｍＬ／分でＳ－緩衝液Ａ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、ｐＨ７．３）中の１０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＨｉＴｒａｐカラムへと、ｐＨ調整した材料を負荷した。次に、カラムをＳ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から６０％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．３）の直線勾配で溶出した後、７℃、５ｍＬ／分で１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした（４５ｍＬ）。次に、７℃、２ｍＬ／分でＰＢＳ中の１ｍＬのＡｍｅ

ｒｓｈａｍ ｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａ ＨｉＴｒａｐカラムへと前記プールを負荷した。次に、カラムをＰＢＳの数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０で溶出した。溶出ピーク（２．５ｍＬ）へ、６２．５μＬの２Ｍトリス塩基を添加した後、ｐＨ調整した材料を室温、２ｍＬ／分で、０．２２μｍ、２５ｍｍのＭｕｓｔａｎｇ Ｅメンブレンを有するＰａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ａｃｒｏｄｉｓｃでろ過した。

【０３９４】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２８Ｃ）。３０，５０４ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，４１０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が２．４９ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２８Ａ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液ＢＧ１２０中に試料を５０倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｅｎｄｏｓａｆｅ-ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物４５μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２８Ｂ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）へと希釈することによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２８Ｄ）、本実験は、精製されたペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を-８０℃で保存した。

【０３９５】

精製したＦｃ-Ｌ-ＫＴＸ１は、電気生理学的手法によって、用量依存的様式でヒトＫｖ１．３電流を遮断した(図３２Ａ及び図３２Ｂ)（方法を実施例３６に記載した。）。

【実施例７】

【０３９６】

Ｆｃ-Ｌ-ＨｓＴｘ１の細菌での発現

Ｆｃ-Ｌ-ＨｓＴ１の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ-Ｆｃ-Ｐｅｐであり、Ｆｃ-Ｌ-ＨｓＴｘ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０３９７】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０３９８】

【化２７】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTTCCTGCCGTACCCCGAAAGAC //配列番号：705；

TGCGCTGACCCGTGCCGTAAAGAAACCGGTTGCCCGTACGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCAACC
GTTGC //配列番号：706；

CTTAGCAACGGTTGCATTTGCATTTACGGTTCATGCATTTACCGTACG //配列番号：707；

GGCAACCGGTTTCTTTACGGCACGGGTCAGCGCAGTCTTTCGGGGTACGGCAGGAAGCGGAACCACCACCACC
GGA //配列番号：708；

オリゴ二本鎖は、以下に示されている。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTTCCTGCCGTACCCCGAAAGACTGCGCTGACCCGTG
 1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCGAAGGACGGCATGGGGCTTTCTGACGCGACTGGGCAC
    G  S  G  G  G  G  S  A  S  C  R  T  P  K  D  C  A  D  P  C  -

   CCGTAAAGAAACCGGTTGCCCGTACGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCAACCG
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GGCATTTCTTTGGCCAACGGGCATGCCATTTACGTACTTGGCATTTACGTTTACGTTGGC
    R  K  E  T  G  C  P  Y  G  K  C  M  N  R  K  C  K  C  N  R  -


   TTGC  配列番号：709
121 ----  124
   AACGATTC 配列番号：711

    C   - 配列番号710
```

【０３９９】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例８】

【０４００】

Ｆｃ－Ｌ－ＭｇＴｘの細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＭｇＴｘの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＭｇＴｘの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４０１】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４０２】

【化２８】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTC //配列番号：712；

CCCGAAACAGTGCCTGCCGCCGTGCAAAGCTCAGTTCGGTCAGTCCGCTGGTGCTAAATGCATGAACGGTAAA
TGCAAATGCTACCCGCAC //配列番号：713；

CTTAGTGCGGGTAGCATTTGCATTTACCGTTCATGCATTTAGCACCAG //配列番号：714；

CGGACTGACCGAACTGAGCTTTGCACGGCGGCAGGCACTGTTTCGGGGAGGTGCATTTAACGTTGATGATGGT
GGAACCACCACCACCGGA //SEQ ID NO:715;

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTCCCCGAAACAGTG
 1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGTGGTAGTAGTTGCAATTTACGTGGAGGGGCTTTGTCAC

    G  S  G  G  G  G  S  T  I  I  N  V  K  C  T  S  P  K  Q  C  -

   CCTGCCGCCGTGCAAAGCTCAGTTCGGTCAGTCCGCTGGTGCTAAATGCATGAACGGTAA
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GGACGGCGGCACGTTTCGAGTCAAGCCAGTCAGGCGACCACGATTTACGTACTTGCCATT

    L  P  P  C  K  A  Q  F  G  Q  S  A  G  A  K  C  M  N  G  K  -

   ATGCAAATGCTACCCGCAC 配列番号：716；
121 ---------+---------
   TACGTTTACGATGGGCGTGATTC 配列番号：718；

    C  K  C  Y  P  H   - 配列番号：717
```

【０４０３】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例９】

【０４０４】

Ｆｃ－Ｌ－ＡｇＴｘ２の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＡｇＴｘ２の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＡｇＴｘ２の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４０５】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４０６】

【化２９】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTCCGATCAACGTTTCCTGCACCGGT //配列番号：719；

TCCCCGCAGTGCATCAAACCGTGCAAAGACGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCCACT
GCACCCCGAAA //配列番号：720；

CTTATTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACGGTTCATGCATTTACCGAAACGCATA //配列番号：721；

CCAGCGTCTTTGCACGGTTTGATGCACTGCGGGGAACCGGTGCAGGAAACGTTGATCGGAACACCGGAACCAC
CACCACCGGA //配列番号：722；

【０４０７】

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

【０４０８】

【化３０】

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTCCGATCAACGTTTCCTGCACCGGTTCCCCGCA
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGCCACAAGGCTAGTTGCAAAGGACGTGGCCAAGGGGCGT

    G   S   G   G   G   G   S   G   V   P   I   N   V   S   C   T   G   S   P   Q  -

   GTGCATCAAACCGTGCAAAGACGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACCGTAAATG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   CACGTAGTTTGGCACGTTTCTGCGACCATACGCAAAGCCATTTACGTACTTGGCATTTAC

    C   I   K   P   C   K   D   A   G   M   R   F   G   K   C   M   N   R   K   C  -

   CCACTGCACCCCGAAA_配列番号：723
121 ----------+------
   GGTGACGTGGGGCTTTATTC 配列番号：725

    H   C   T   P   K   - 配列番号：724
```

【０４０９】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【０４１０】

細菌中で発現したＦｃ－Ｌ－ＡｇＴｘ２の再折りたたみ及び精製

冷凍したＥ．コリペースト（１５ｇ）を、室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ８．０の１２０ｍＬと合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、２２，０００ｇで２０分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、１％デオキシコール酸２００ｍＬ中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、２００ｍＬの水中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、ペレット（４．６ｇ）を４６ｍＬの８Ｍグアニジン　ＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に溶解した。次に、３０μＬの１Ｍジチオスレイトールを前記溶液３ｍＬへ添加し、３７℃で３０分間温置することによって、溶解したペレットを還元した。次に、還元されたペレット溶液を、室温、１４，０００ｇで５分間遠心分離した後、上清２．５ｍＬを、再折りたたみ緩衝液（２Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、１ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ９．５）２５０ｍＬへ、４℃で激しく撹拌しながら転移させた。次に、撹拌速度を低下させ、温置を４℃で２日間続行した。次に、再折りたたみ溶液を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、－７０℃で保存した。

【０４１１】

次に、保存した再折りたたみ液を水１Ｌで希釈し、１Ｍ　H_3PO_4を使用して、ｐＨを７．５へ調整した。次に、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、７℃、１０ｍＬ／分でで、Ｓ－緩衝液Ａ（２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．３）中の１０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＳＰ－ＨＰ　ＨｉＴｒａｐカラムへと負荷した。次に、カラムをＳ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から６０％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭNaH_2PO_4、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．３）の直線勾配で溶出した後、７℃、５ｍＬ／分で１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした（１５ｍＬ）。次に、７℃、２ｍＬ／分でＰＢＳ中の１ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ｒＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ　ＨｉＴｒａｐカラムへ前記プールを負荷した。次に、カラムを２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ６．５、１Ｍ　ＮａＣｌの数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０で溶出した。溶出ピーク（１．５ｍＬ）へ、１ＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．５を添加した後、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した。

【０４１２】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬ

のＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２９Ｃ）。３０，４４６ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，４１０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が１．６５ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２９Ａ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液ＢＧ１２０中に試料を３３倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｅｎｄｏｓａｆｅ-ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物２０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２９Ｄ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ中に希釈する（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２９Ｅ）、本実験は、精製されたペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。その後、生成物を-８０℃で保存した。

【実施例１０】

【０４１３】

Ｆｃ-Ｌ-ＯＳＫ１の細菌での発現

Ｆｃ-Ｌ-ＯＳＫ１の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ-Ｆｃ-Ｐｅｐであり、Ｆｃ-Ｌ-ＯＳＫ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４１４】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４１５】

【化３１】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGGAACCG
TGCAAAAAAG //配列番号：726；

CTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCCGAAA //配列番号：727；

CTTATTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACCGTTCATGCATTTACCGAAACGCATACCAGCTTTTTTGCACGGTTC
CAGGCACTGA //配列番号：728；

CGGGAGATTTTGCATTTAACGTTGATGATAACACCGGAACCACCACCACCGGA //配列番号：729；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCA
 1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGCCACAATAGTAGTTGCAATTTACGTTTTAGAGGGCAGT

    G  S  G  G  G  G  S  G  V  I  I  N  V  K  C  K  I  S  R  Q  -

   GTGCCTGGAACCGTGCAAAAAAGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATG
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   CACGGACCTTGGCACGTTTTTTCGACCATACGCAAAGCCATTTACGTACTTGCCATTTAC

    C  L  E  P  C  K  K  A  G  M  R  F  G  K  C  M  N  G  K  C  -

   CCACTGCACCCCGAAA 配列番号：730
121 ----------+------
   GGTGACGTGGGGCTTTATTC 配列番号：732

    H  C  T  P  K   - 配列番号：731
```

【０４１６】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、これより後の使用のためにペーストを冷凍保存した。Ｅ．コリペーストからのＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１の精製を、以下の本明細書の実施例４０に記載する。

【実施例１１】

【０４１７】

Ｆｃ－Ｌ－ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４１８】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４１９】

【化３２】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGAAACCG
TGCAAAGACG //配列番号：733；

CTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCCGAAA //配列番号：734；

CTTATTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACCGTTCATGCATTTACCGAAACGCATACCAGCGTCTTTGCACGGTTT
CAGGCACTGA //配列番号：735；

CGGGAGATTTTGCATTTAACGTTGATGATAACACCGGAACCACCACCACCGGA //配列番号：736；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
  TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCA
1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCCACAATAGTAGTTGCAATTTACGTTTTAGAGGGCAGT

   G  S  G  G  G  G  S  G  V  I  I  N  V  K  C  K  I  S  R  Q  -

  GTGCCTGAAACCGTGCAAAGACGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
  CACGGACTTTGGCACGTTTCTGCGACCATACGCAAAGCCATTTACGTACTTGCCATTTAC

   C  L  K  P  C  K  D  A  G  M  R  F  G  K  C  M  N  G  K  C  -

  CCACTGCACCCCGAAA 配列番号：737
121 ----------+------
  GGTGACGTGGGGCTTTATTC 配列番号：739

   H  C  T  P  K  - 配列番号：738
```

【０４２０】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、これより後の使用のためにペーストを冷凍保存した。

【実施例１２】

【０４２１】

Ｆｃ－Ｌ－アニュロクトキシン（Ａｎｕｒｏｃｔｏｘｉｎ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－アニュロクトキシンの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－アニュロクトキシンの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４２２】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４２３】

【化３３】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCAAAGAATGCACCGGTCCGCAGCACTGCACCAACTTCTGCCGTAAAAACAAA
TGCACCCACG //配列番号：740；

GTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCTTCAACTGCAAA //配列番号：741；

CTTATTTGCAGTTGAAGCATTTGCATTTACGGTTCATGCATTTACCGTGGGTGCATTTGTTTTTACGGCAGAA
GTTGGTGCAG //配列番号：742；

TGCTGCGGACCGGTGCATTCTTTGGAACCACCACCACCGGA //配列番号：743；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
  TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCAAAGAATGCACCGGTCCGCAGCACTGCACCAACTTCTG
1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGTTTCTTACGTGGCCAGGCGTCGTGACGTGGTTGAAGAC

   G  S  G  G  G  G  S  K  E  C  T  G  P  Q  H  C  T  N  F  C  -
```

```
   CCGTAAAAACAAATGCACCCACGGTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCTTCAACTG
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------- 120
   GGCATTTTTGTTTACGTGGGTGCCATTTACGTACTTGGCATTTACGTTTACGAAGTTGAC

    R  K  N  K  C  T  H  G  K  C  M  N  R  K  C  K  C  F  N  C  -

   CAAA 配列番号：744
121 ----
   GTTTATTC 配列番号：746

    K   - 配列番号：745
```

【０４２４】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例１３】

【０４２５】

Ｆｃ－Ｌ－ノキシウストキシン（Ｎｏｘｉｕｓｔｏｘｉｎ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ノキシウストキシン又はＦｃ－Ｌ－ＮＴＸの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記述される。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＮＴＸの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４２６】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４２７】

【化３４】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTCCCCGAAACAGTGCTCCAAACCGTGC
AAAGAACTGT // 配列番号：747；

ACGGTTCCTCCGCTGGTGCTAAATGCATGAACGGTAAATGCAAATGCTACAACAAC // 配列番号：748；

CTTAGTTGTTGTAGCATTTGCATTTACCGTTCATGCATTTAGCACCAGCGGAGGAACCGTACAGTTCTTTGCA
CGGTTTGGAG // 配列番号：749；

CACTGTTTCGGGGAGGTGCATTTAACGTTCATGATGGTGGAACCACCACCACCGGA // 配列番号：750；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCATCAACGTTAAATGCACCTCCCCGAAACAGTG
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------- 60
     AGGCCACCACCACCAAGGTGGTAGTAGTTGCAATTTACGTGGAGGGGCTTTGTCAC

    G  S  G  G  G  G  S  T  I  I  N  V  K  C  T  S  P  K  Q  C  -

   CTCCAAACCGTGCAAAGAACTGTACGGTTCCTCCGCTGGTGCTAAATGCATGAACGGTAA
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------- 120
   GAGGTTTGGCACGTTTCTTGACATGCCAAGGAGGCGACCACGATTTACGTACTTGCCATT

    S  K  P  C  K  E  L  Y  G  S  S  A  G  A  K  C  M  N  G  K  -

   ATGCAAATGCTACAACAAC 配列番号：751
121 ----------+---------
   TACGTTTACGATGTTGTTGATTC 配列番号：753

    C  K  C  Y  N  N   - 配列番号：752
```

【０４２８】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例１４】

【０４２９】

Ｆｃ－Ｌ－Ｐｉ２の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－Ｐｉ２の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－Ｐｉ２の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、

以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４３０】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４３１】

【化３５】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCTCCTGCACCAACCCG //配列番号：754；

AAACAGTGCTACCCGCACTGCAAAAAAGAAACCGGTTACCCGAACGCTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAAT
GCTTCGGTCGT //配列番号：755；

CTTAACGACCGAAGCATTTGCATTTACGGTTCATGCATTTAGCG //配列番号：756；

TTCGGGTAACCGGTTTCTTTTTTGCAGTGCGGGTAGCACTGTTTCGGGTTGGTGCAGGAGATGGTGGAACCAC
CACCACCGGA //配列番号：757；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
    TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCACCATCTCCTGCACCAACCCGAAACAGTGCTACCCGCA
 1  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
        AGGCCACCACCACCAAGGTGGTAGAGGACGTGGTTGGGCTTTGTCACGATGGGCGT

     G  S  G  G  G  G  S  T  I  S  C  T  N  P  K  Q  C  Y  P  H  -

    CTGCAAAAAAGAAACCGGTTACCCGAACGCTAAATGCATGAACCGTAAATGCAAATGCTT
61  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
    GACGTTTTTTCTTTGGCCAATGGGCTTGCGATTTACGTACTTGGCATTTACGTTTACGAA

     C  K  K  E  T  G  Y  P  N  A  K  C  M  N  R  K  C  K  C  F  -

    CGGTCGT 配列番号：758
121 -------
    GCCAGCAATTC 配列番号：760

     G  R  - 配列番号：759
```

【０４３２】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例１５】

【０４３３】

ＳｈＫ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌での発現

ＳｈＫ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃであり、ＳｈＫ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４３４】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４３５】

【化３６】

TATGCGTTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACATTCTATGAAATAT
CGTCTTTCTT //配列番号：761；

TTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT //配列番号：762；

CACCAGAACCACCACCACCAGAACAAGTACCACAAGTTTTACGACAAAAAGAAAGACGATATTTCATAGAATG
TTTACATTGA //配列番号：763

AAAGCAGTACAACGAGATTTTGGAATAGTATCAATACAAGAACG //配列番号：764；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TATGCGTTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACA
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     GCAAGAACATAACTATGATAAGGTTTTAGAGCAACATGACGAAAAGTTACATTTGT

    M  R  S  C  I  D  T  I  P  K  S  R  C  T  A  F  Q  C  K  H  -

   TTCTATGAAATATCGTCTTTCTTTTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGG
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   AAGATACTTTATAGCAGAAAGAAAAACAGCATTTTGAACACCATGAACAAGACCACCACC

    S  M  K  Y  R  L  S  F  C  R  K  T  C  G  T  C  S  G  G  G  -

   TGGTTCT 配列番号：765
121 ------- 127
   ACCAAGACCAC 配列番号：767

    G  S  - 配列番号：766
```

【０４３６】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。ｍｅｔ－ＳｈＫ［１－３５］－Ｆｃの精製は、以下の本明細書の実施例５１に記載されるとおりであった。

【実施例１６】

【０４３７】

ＳｈＫ［２－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌での発現

ＳｈＫ［２－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｐｅｐ－Ｆｃであり、ＳｈＫ［２－３５］－Ｌ－Ｆｃの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４３８】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４３９】

【化３７】

TATGTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACATTCTATGAAATATCGT
CTTTCTT //配列番号：768；

TTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT //配列番号：769；

CACCAGAACCACCACCACCAGAACAAGTACCACAAGTTTTACGACAAAAAGAAAGACGATATTTCATAGAATG
TTTACATTGA //配列番号：770；

AAAGCAGTACAACGAGATTTTGGAATAGTATCAATACAAGA 配列番号：771；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TATGTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACATTC
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGAACATAACTATGATAAGGTTTTAGAGCAACATGACGAAAAGTTACATTTGTAAG

    M  S  C  I  D  T  I  P  K  S  R  C  T  A  F  Q  C  K  H  S  -

   TATGAAATATCGTCTTTCTTTTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGGTGG
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   ATACTTTATAGCAGAAAGAAAAACAGCATTTTGAACACCATGAACAAGACCACCACCACC

    M  K  Y  R  L  S  F  C  R  K  T  C  G  T  C  S  G  G  G  G  -
```

TTCT 配列番号：772
121 ----
AAGACCAC 配列番号：774

S - 配列番号：773

【０４４０】
ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。ＳｈＫ［２－３５］－Ｆｃの精製は、以下の本明細書の実施例５０に記載されるとおりであった。
【実施例１７】
【０４４１】
Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘの細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘの細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４４２】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。
【０４４３】
【化３８】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCAACGTT //配列番号：775；

TCCTGCACCACCTCCAAAGAATGCTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGA
ACAAAAAATGCCGTTGCTACTCC //配列番号：776；

CTTAGGAGTAGCAACGGCATTTTTTGTTCATGCATTTA //配列番号：777；

CCACGGGAGGTGTTGTGCAGACGCTGGCAAACGGACCAGCATTCTTTGGAGGTGGTGCAGGAAACGTTGGTGA
ACTGGGAACCACCACCACCGGA //配列番号：778；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCAACGTTTCCTGCACCACCTCCAAAGAATG
1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
AGGCCACCACCACCAAGGGTCAAGTGGTTGCAAAGGACGTGGTGGAGGTTTCTTAC

G S G G G G S Q F T N V S C T T S K E C -

CTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGAACAAAAAATG
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
GACCAGGCAAACGGTCGCAGACGTGTTGTGGAGGGCACCATTTACGTACTTGTTTTTTAC

W S V C Q R L H N T S R G K C M N K K C -

CCGTTGCTACTCC 配列番号：779
121 ----------+---
GGCAACGATGAGGATTC 配列番号：781

R C Y S - 配列番号：780

【０４４４】
ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。
【実施例１８】
【０４４５】
Ｆｃ－Ｌ－ＭＴＸの細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－ＭＴＸの細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させるための方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターはｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＭＴＸの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４４６】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４４７】

【化３９】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGTTTCCTGCACCGGT //配列番号：782；

TCCAAAGACTGCTACGCTCCGTGCCGTAAACAGACCGGTTGCCCGAACGCTAAATGCATCAACAAATCCTGCA
AATGCTACGGTTGC //配列番号：783；

CTTAGCAACCGTAGCATTTGCAGGATTTGTTGATGCAT //配列番号：784；

TTAGCGTTCGGGCAACCGGTCTGTTTACGGCACGGAGCGTAGCAGTCTTTGGAACCGGTGCAGGAAACGGAAC
CACCACCACCGGA //配列番号：785；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGTTTCCTGCACCGGTTCCAAAGACTGCTACGCTCCGTG
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
       AGGCCACCACCACCAAGGCAAAGGACGTGGCCAAGGTTTCTGACGATGCGAGGCAC

    G  S  G  G  G  G  S  V  S  C  T  G  S  K  D  C  Y  A  P  C  -

   CCGTAAACAGACCGGTTGCCCGAACGCTAAATGCATCAACAAATCCTGCAAATGCTACGG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GGCATTTGTCTGGCCAACGGGCTTGCGATTTACGTAGTTTGTTTAGGACGTTTACGATGCC

    R  K  Q  T  G  C  P  N  A  K  C  I  N  K  S  C  K  C  Y  G  -

   TTGC 配列番号：786
121 ----
   AACGATTC 配列番号：788

    C    - 配列番号：787
```

【０４４８】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例１９】

【０４４９】

Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘ（Ｋ３２Ｅ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘ（Ｋ３２Ｅ）の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＣｈＴｘ（Ｋ３２Ｅ）の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４５０】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４５１】

【化４０】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCAACGTTTCCTG //配列番号：789；

CACCACCTCCAAAGAATGCTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGAACAAA
GAATGCCGTTGCTACTCC //配列番号：790；

CTTAGGAGTAGCAACGGCATTCTTTGTTCATGCATTTACCACG //配列番号：791；

GGAGGTGTTGTGCAGACGCTGGCAAACGGACCAGCATTCTTTGGAGGTGGTGCAGGAAACGTTGGTGAACTGG
GAACCACCACCACCGGA //配列番号：792；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCAACGTTTCCTGCACCACCTCCAAAGAATG
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGGTCAAGTGGTTGCAAAGGACGTGGTGGAGGTTTCTTAC

    G  S  G  G  G  G  S  Q  F  T  N  V  S  C  T  T  S  K  E  C  -

   CTGGTCCGTTTGCCAGCGTCTGCACAACACCTCCCGTGGTAAATGCATGAACAAAGAATG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GACCAGGCAAACGGTCGCAGACGTGTTGTGGAGGGCACCATTTACGTACTTGTTTCTTAC

    W  S  V  C  Q  R  L  H  N  T  S  R  G  K  C  M  N  K  E  C  -

   CCGTTGCTACTCC 配列番号 : 793
121 ----------+---
   GGCAACGATGAGGATTC 配列番号 : 795

    R  C  Y  S  - 配列番号 : 794
```

【０４５２】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２０】

【０４５３】

Ｆｃ－Ｌ－アパミン（Ａｐａｍｉｎ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－アパミンの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－アパミンの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４５４】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４５５】

【化４１】

```
TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAACTGCAAAGCTCCGGAAACCGCTCTGTGCGCTCGTCGTTGCCAGCAG
CACGGT //配列番号 : 796 ;

CTTAACCGTGCTGCTGGCAACGACGAGCGCACAGAGCGGTTTCCGGAGCTTTGCAGTTGCAGGAACCACCACC
ACCGGA //配列番号 : 797 ;
```

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAACTGCAAAGCTCCGGAAACCGCTCTGTGCGCTCG
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     AGGCCACCACCACCAAGGACGTTGACGTTTCGAGGCCTTTGGCGAGACACGCGAGC

    G  S  G  G  G  G  S  C  N  C  K  A  P  E  T  A  L  C  A  R  -

   TCGTTGCCAGCAGCACGGT 配列番号 : 798
61 ----------+---------
   AGCAACGGTCGTCGTGCCAATTC 配列番号 : 800

    R  C  Q  Q  H  G  - 配列番号 : 799
```

【０４５６】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２１】

【０４５７】

Ｆｃ－Ｌ－スキラトキシン（Ｓｃｙｌｌａｔｏｘｉｎ）の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－スキラトキシン又はＦｃ－Ｌ－ＳｃｙＴｘの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現する方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＳｃｙＴｘの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４５８】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４５９】

【化４２】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTTTCTGCAACCTGCG //配列番号：801；

TATGTGCCAGCTGTCCTGCCGTTCCCTGGGTCTGCTGGGTAAATGCATCGGTGACAAATGCGAATGCGTTAAA
CAC //配列番号：802；

CTTAGTGTTTAACGCATTCGCATTTGTCACCGATGCATTT //配列番号：803；

ACCCAGCAGACCCAGGGAACGGCAGGACAGCTGGCACATACGCAGGTTGCAGAAAGCGGAACCACCACCACCG
GA //配列番号：804；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
  TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTTTCTGCAACCTGCGTATGTGCCAGCTGTCCTGCCG
1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCGAAAGACGTTGGACGCATACACGGTCGACAGGACGGC

   G  S  G  G  G  G  S  A  F  C  N  L  R  M  C  Q  L  S  C  R  -

  TTCCCTGGGTCTGCTGGGTAAATGCATCGGTGACAAATGCGAATGCGTTAAACAC  配列番号：805
61 ----------+---------+---------+---------+---------+-----
  AAGGGACCCAGACGACCCATTTACGTAGCCACTGTTTACGCTTACGCAATTTGTGATTC 配列番号：807

   S  L  G  L  L  G  K  C  I  G  D  K  C  E  C  V  K  H   - 配列番号：806
```

【０４６０】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２２】

【０４６１】

Ｆｃ－Ｌ－ＩｂＴｘの細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＩｂＴＸの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＩｂＴｘの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４６２】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４６３】

【化４３】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCGACGTTGACTGCTCCGT //配列番号：808；

TTCCAAAGAATGCTGGTCCGTTTGCAAAGACCTGTTCGGTGTTGACCGTGGTAAATGCATGGGTAAAAAATGC
CGTTGCTACCAG //配列番号：809；

CTTACTGGTAGCAACGGCATTTTTTACCCATGCATTTACCACGGTCAA //配列番号：810；

CACCGAACAGGTCTTTGCAAACGGACCAGCATTCTTTGGAAACGGAGCAGTCAACGTCGGTGAACTGGGAACC
ACCACCACCGGA //配列番号：811；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
  TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCAGTTCACCGACGTTGACTGCTCCGTTTCCAAAGAATG
1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGGTCAAGTGGCTGCAACTGACGAGGCAAAGGTTTCTTAC
```

```
     G  S  G  G  G  G  S  Q  F  T  D  V  D  C  S  V  S  K  E  C  -

    CTGGTCCGTTTGCAAAGACCTGTTCGGTGTTGACCGTGGTAAATGCATGGGTAAAAAATG
 61 ----------+----------+----------+----------+----------+----------+ 120
    GACCAGGCAAACGTTTCTGGACAAGCCACAACTGGCACCATTTACGTACCCATTTTTTAC

     W  S  V  C  K  D  L  F  G  V  D  R  G  K  C  M  G  K  K  C  -

    CCGTTGCTACCAG 配列番号：812
121 ----------+---
    GGCAACGATGGTCATTC 配列番号：814

     R  C  Y  Q  - 配列番号：813
```

【０４６４】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２３】

【０４６５】

Ｆｃ－Ｌ－ＨａＴｘ１の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＨａＴｘ１の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＨａＴｘ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４６６】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４６７】

【化４４】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGAATGCCGTTACCTGTTCGGTGGTTG //配列番号：815；

CAAAACCACCTCCGACTGCTGCAAACACCTGGGTTGCAAATTCCGTGACAAATACTGCGCTTGGGACTTCACC
TTCTCC //配列番号：816；

CTTAGGAGAAGGTGAAGTCCCAAGCGCAGTATTTGTCACGGAATTTGC //配列番号：817；

AACCCAGGTGTTTGCAGCAGTCGGAGGTGGTTTTGCAACCACCGAACAGGTAACGGCATTCGGAACCACCACC
ACCGGA //配列番号：818；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
    TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGAATGCCGTTACCTGTTCGGTGGTTGCAAAACCACCTC
  1 ----------+----------+----------+----------+----------+----------+ 60
         AGGCCACCACCACCAAGGCTTACGGCAATGGACAAGCCACCAACGTTTTGGTGGAG

     G  S  G  G  G  G  S  E  C  R  Y  L  F  G  G  C  K  T  T  S  -

    CGACTGCTGCAAACACCTGGGTTGCAAATTCCGTGACAAATACTGCGCTTGGGACTTCAC
 61 ----------+----------+----------+----------+----------+----------+ 120
    GCTGACGACGTTTGTGGACCCAACGTTTAAGGCACTGTTTATGACGCGAACCCTGAAGTG

     D  C  C  K  H  L  G  C  K  F  R  D  K  Y  C  A  W  D  F  T  -

    CTTCTCC 配列番号：819
121 --------
    GAAGAGGATTC 配列番号：821

     F  S  - 配列番号：820
```

【０４６８】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【０４６９】

細菌中で発現したＦｃ－Ｌ－ＨａＴｘ１の再折りたたみ及び精製

凍結したＥ．コリペースト（１３ｇ）を、室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ８．０の１００ｍＬと合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬの二ワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、２２，０００ｇで２０分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次

に、組織粉砕機を使用して、２００ｍＬの１％デオキシコール酸中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを２００ｍＬの水中に再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで２０分間遠心分離した。次に、ペレット（２．６ｇ）を２６ｍＬの８ＭグアニジンHCl、５０ｍＭトリスHCl、ｐＨ８．０中に溶解した。次に、３０μＬの１Ｍジチオスレイトールを前記溶液３ｍＬへ添加し、３７℃で３０分間温置することによって、溶解したペレットを還元した。次に、還元されたペレット溶液を室温、１４，０００ｇで５分間遠心分離した後、上清２．５ｍＬを、再折りたたみ緩衝液（２Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンHCl、５ｍＭＥＤＴＡ、１ｍＭシスタミンHCl、４ｍＭシステイン、ｐＨ８．５）２５０ｍＬへ、４℃で激しく撹拌しながら転移させた。次に、撹拌速度を低下させ、温置を４℃で２日間続行した。次に、再折りたたみ溶液を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、－７０℃で保存した。

【０４７０】

次に、保存した再折りたたみ液を解凍した後、水１Ｌで希釈し、１Ｍ H_3PO_4 を使用して、ｐＨを７．５へ調整した。次に、７℃、１０ｍＬ／分でＳ－緩衝液Ａ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、ｐＨ７．３）中の１０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＳＰ－ＨＰ ＨｉＴｒａｐカラムへと、ｐＨ調整した材料を負荷した。次に、カラムをＳ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から６０％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．３）の直線勾配で溶出した後、７℃、５ｍＬ／分で１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした（１５ｍＬ）。次に、７℃、２ｍＬ／分でＰＢＳ中の１ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａ ＨｉＴｒａｐカラムへと前記プールを負荷した。次に、カラムを２０ｍＭの NaH_2PO_4、ｐＨ６．５、１Ｍ ＮａＣｌの数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０で溶出した。溶出ピーク（１．４ｍＬ）へ、１ＭトリスHCl、ｐＨ８．５の７０μＬを添加した後、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した。

【０４７１】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図２９Ｆ）。３０，４６９ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び４３，８９０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が１．４４ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図２９Ｂ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液ＢＧ１２０中に試料を３３倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｅｎｄｏｓａｆｅ－ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、4ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭ NaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物２０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図２９Ｇ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ中に希釈する（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液（１μＬ）をＭＡＬＤＩ試料プレートへ点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ ＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製タンパク質を使用して外部質量較正を実施し（図２９Ｈ）、本実験は、精製されたペプチボディの完全性を実験誤差内で確認した。次に、生成物を－８０℃で保存した。

【実施例２４】
【０４７２】
Ｆｃ－Ｌ－ＰａＴｘ２の細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－ＰａＴｘ２の細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＰａＴｘ２の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４７３】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。
【０４７４】
【化４５】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTACTGCCAGAAATGGA //配列番号：822；

TGTGGACCTGCGACGAAGAACGTAAATGCTGCGAAGGTCTGGTTTGCCGTCTGTGGTGCAAACGTATCATCAA
CATG //配列番号：823；

CTTACATGTTGATGATACGTTTGCACCACAGACGGCAAA //配列番号：824；

CCAGACCTTCGCAGCATTTACGTTCTTCGTCGCAGGTCCACATCCATTTCTGGCAGTAGGAACCACCACCACC
GGA //配列番号：825；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTACTGCCAGAAATGGATGTGGACCTGCGACGAAGAACG
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGATGACGGTCTTTACCTACACCTGGACGCTGCTTCTTGC

    G  S  G  G  G  G  S  Y  C  Q  K  W  M  W  T  C  D  E  E  R  -

   TAAATGCTGCGAAGGTCTGGTTTGCCGTCTGTGGTGCAAACGTATCATCAACATG 配列番号：826
61 ----------+---------+---------+---------+---------+-----
   ATTTACGACGCTTCCAGACCAAACGGCAGACACCACGTTTGCATAGTAGTTGTACATTC 配列番号：828

    K  C  C  E  G  L  V  C  R  L  W  C  K  R  I  I  N  M   - 配列番号：827
```

【０４７５】
ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。
【実施例２５】
【０４７６】
Ｆｃ－Ｌ－ｗＧＶＩＡの細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－ｗＧＶＩＡの細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ｗＧＶＩＡの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４７７】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。
【０４７８】

【化４６】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAATCCCCGGGTT //配列番号：829；

CCTCCTGCTCCCCGACCTCCTACAACTGCTGCCGTTCCTGCAACCCGTACACCAAACGTTGCTACGGT
配列番号：830；

CTTAACCGTAGCAACGTTTGGTGTACGGGTTGCAGGAA //配列番号：831；

CGGCAGCAGTTGTAGGAGGTCGGGGAGCAGGAGGAACCCGGGGATTTGCAGGAACCACCACCACCGGA
//配列番号：832；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAATCCCCGGGTTCCTCCTGCTCCCCGACCTCCTA
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
       AGGCCACCACCACCAAGGACGTTTAGGGGCCCAAGGAGGACGAGGGGCTGGAGGAT

    G  S  G  G  G  G  S  C  K  S  P  G  S  S  C  S  P  T  S  Y  -

   CAACTGCTGCCGTTCCTGCAACCCGTACACCAAACGTTGCTACGGT 配列番号：833
61 ----------+---------+---------+---------+------
   GTTGACGACGGCAAGGACGTTGGGCATGTGGTTTGCAACGATGCCAATTC 配列番号：835

    N  C  C  R  S  C  N  P  Y  T  K  R  C  Y  G  配列番号：834
```

【０４７９】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２６】

【０４８０】

Ｆｃ－Ｌ－ωＭＶＩＩＡの細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ωＭＶＩＩＡの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ωＭＶＩＩＡの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４８１】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４８２】

【化４７】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAAGGTAAA //配列番号：836；

GGTGCTAAATGCTCCCGTCTGATGTACGACTGCTGCACCGGTTCCTGCCGTTCCGGTAAATGCGGT //
配列番号：837；

CTTAACCGCATTTACCGGAACGGCAGGAACCGGT //配列番号：838；

GCAGCAGTCGTACATCAGACGGGAGCATTTAGCACCTTTACCTTTGCAGGAACCACCACCACCGGA //
配列番号：839；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCTGCAAAGGTAAAGGTGCTAAATGCTCCCGTCTGATGTA
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
       AGGCCACCACCACCAAGGACGTTTCCATTTCCACGATTTACGAGGGCAGACTACAT

    G  S  G  G  G  G  S  C  K  G  K  G  A  K  C  S  R  L  M  Y  -

   CGACTGCTGCACCGGTTCCTGCCGTTCCGGTAAATGCGGT 配列番号：840
61 ----------+---------+---------+---------+
   GCTGACGACGTGGCCAAGGACGGCAAGGCCATTTACGCCAATTC 配列番号：842

    D  C  C  T  G  S  C  R  S  G  K  C  G   - 配列番号：841
```

【０４８３】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２７】
【０４８４】
Ｆｃ－Ｌ－Ｐｔｕｌの細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－Ｐｔｕ１の細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－Ｐｔｕ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４８５】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。
【０４８６】
【化４８】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTGAAAAAGACTGCATC // 配列番号：843；

GCTCCGGGTGCTCCGTGCTTCGGTACCGACAAACCGTGCTGCAACCCGCGTGCTTGGTGCTCCTCCTACGCTA
ACAAATGCCTG //配列番号：844；

CTTACAGGCATTTGTTAGCGTAGGAGGAGCACCAAGCACG //配列番号：845；

CGGGTTGCAGCACGGTTTGTCGGTACCGAAGCACGGAGCACCCGGAGCGATGCAGTCTTTTTCAGCGGAACCA
CCACCACCGGA //配列番号：846；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGCTGAAAAAGACTGCATCGCTCCGGGTGCTCCGTGCTT
 1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
      AGGCCACCACCACCAAGGCGACTTTTTCTGACGTAGCGAGGCCCACGAGGCACGAA

    G   S  G  G  G  G  S  A  E  K  D  C  I  A  P  G  A  P  C  F  -

   CGGTACCGACAAACCGTGCTGCAACCCGCGTGCTTGGTGCTCCTCCTACGCTAACAAATG
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GCCATGGCTGTTTGGCACGACGTTGGGCGCACGAACCACGAGGAGGATGCGATTGTTTAC

    G   T  D  K  P  C  C  N  P  R  A  W  C  S  S  Y  A  N  K  C  -

   CCTG 配列番号：847
121 ----
    GGACATTC 配列番号：849

     L   - 配列番号：848
```

【０４８７】
ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。
【実施例２８】
【０４８８】
Ｆｃ－Ｌ－ＰｒｏＴｘ１の細菌での発現
Ｆｃ－Ｌ－ＰｒｏＴｘ１の細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＰｒｏＴｘ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０４８９】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。
【０４９０】

【化４９】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGAATGCCGTTACTGGCTGG //配列番号：850；

GTGGTTGCTCCGCTGGTCAGACCTGCTGCAAACACCTGGTTTGCTCCCGTCGTCACGGTTGGTGCGTTTGGGA
CGGTACCTTCTCC //配列番号：851；

CTTAGGAGAAGGTACCGTCCCAAACGCACCAACCGTCACGA //配列番号：852；

CGGGAGCAAACCAGGTGTTTGCAGCAGGTCTGACCAGCGGAGCAACCACCCAGCCAGTAACGGCATTCGGAAC
CACCACCACCGGA //配列番号：853；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
    TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGAATGCCGTTACTGGCTGGGTGGTTGCTCCGCTGGTCA
  1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
       AGGCCACCACCACCAAGGCTTACGGCAATGACCGACCCACCAACGAGGCGACCAGT

     G  S  G  G  G  G  S  E  C  R  Y  W  L  G  G  C  S  A  G  Q  -

    GACCTGCTGCAAACACCTGGTTTGCTCCCGTCGTCACGGTTGGTGCGTTTGGGACGGTAC
 61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
    CTGGACGACGTTTGTGGACCAAACGAGGGCAGCAGTGCCAACCACGCAAACCCTGCCATG

     T  C  C  K  H  L  V  C  S  R  R  H  G  W  C  V  W  D  G  T  -

    CTTCTCC 配列番号：854
121 -------
    GAAGAGGATTC 配列番号：856

     F  S   - 配列番号：855
```

【０４９１】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例２９】

【０４９２】

Ｆｃ－Ｌ－ＢｅＫＭ１の細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＢｅＫＭ１の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＢｅＫＭ１の細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４９３】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４９４】

【化５０】

TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTCCGACCGACATCAAATG // 配列番号：857；

CTCCGAATCCTACCAGTGCTTCCCGGTTTGCAAATCCCGTTTCGGTAAAACCAACGGTCGTTGCGTTAACGGT
TTCTGCGACTGCTTC //配列番号：858；

CTTAGAAGCAGTCGCAGAAACCGTTAACGCAACGACCGTTGG //配列番号：859；

TTTTACCGAAACGGGATTTGCAAACCGGGAAGCACTGGTAGGATTCGGAGCATTTGATGTCGGTCGGACGGGA
ACCACCACCACCGGA //配列番号：860；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCCGTCCGACCGACATCAAATGCTCCGAATCCTACCAGTG
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
       AGGCCACCACCACCAAGGGCAGGCTGGCTGTAGTTTACGAGGCTTAGGATGGTCAC

    G   S   G   G   G   G   S   R   P   T   D   I   K   C   S   E   S   Y   Q   C  -

   CTTCCCGGTTTGCAAATCCCGTTTCGGTAAAACCAACGGTCGTTGCGTTAACGGTTTCTG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   GAAGGGCCAAACGTTTAGGGCAAAGCCATTTTGGTTGCCAGCAACGCAATTGCCAAAGAC

    F   P   V   C   K   S   R   F   G   K   T   N   G   R   C   V   N   G   F   C  -

   CGACTGCTTC 配列番号：861
121 ----------+
   GCTGACGAAGATTC 配列番号：863

    D   C   F   - 配列番号：862
```

【０４９５】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例３０】

【０４９６】

Ｆｃ－Ｌ－ＣＴＸの細菌での発現

Ｆｃ－Ｌ－ＣＴＸの細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されている。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｐＲ－Ｆｃ－Ｐｅｐであり、Ｆｃ－Ｌ－ＣＴＸの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０４９７】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０４９８】

【化５１】

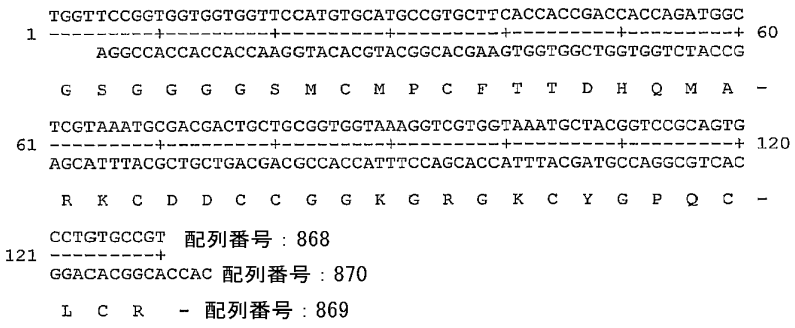
TGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCATGTGCATGCCGTGCTTCAC //配列番号：864；

CACCGACCACCAGATGGCTCGTAAATGCGACGACTGCTGCGGTGGTAAAGGTCGTGGTAAATGCTACGGTCCG
CAGTGCCTGTGCCGT //配列番号：865；

CTTAACGGCACAGGCACTGCGGACCGTAGCATTTACCACGAC //配列番号：866；

CTTTACCACCGCAGCAGTCGTCGCATTTACGAGCCATCTGGTGGTCGGTGGTGAAGCACGGCATGCACATGGA
ACCACCACCACCGGA //配列番号：867；

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。



【０４９９】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例３１】

【０５００】

Ｎ末端がＰＥＧ化されたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ

還元型Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫのペプチド合成

Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）－Ｓ　ＰＨＢ　Ｆｍｏｃ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）樹脂上にて、０．１ｍｍｏｌ当量の樹脂スケールで、ヘキサフルオロリン酸２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウム（ＨＢＴＵ）／Ｎ－メチルモルフォリン（ＮＭＭ）／Ｎ，Ｎ－ジメチル－ホルムアミド（ＤＭＦ）カップリング化学反応を使用する固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）によって、Ｓｙｍｐｈｏｎｙ（商標）多重ペプチド合成装置上で、段階的な様式で、配列

ＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＱＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ

（ペプチド１、配列番号９２）

を有するＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫを合成した。Ｎ－アルファ－（９－フルオレニルメチルオキシカルボニル）－及び側鎖保護されたアミノ酸は、Ｍｉｄｗｅｓｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄから購入した。Ｆｍｏｃ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）樹脂は、Ｆｌｕｋａから購入した。以下の側鎖保護戦略、すなわち、Ａｓｐ（Ｏ^{t}Ｂｕ）、Ａｒｇ（Ｐｂｆ）、Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）、Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（Ｎ$^{\varepsilon}$－Ｂｏｃ）、Ｓｅｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）、Ｔｈｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）及びＴｙｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）を使用した。２つのオキサゾリジンジペプチド、すなわちＦｍｏｃ－Ｇｌｙ－Ｔｈｒ（Ψ$^{Ｍｅ，Ｍｅ}$Ｐｒｏ）－ＯＨ及びＦｍｏｃ－Ｌｅｕ－Ｓｅｒ（Ψ$^{Ｍｅ，Ｍｅ}$Ｐｒｏ）－ＯＨを鎖重合に使用し、ＮｏｖａＢｉｏｃｈｅｍから入手し、配列の合成に使用した。保護されたアミノ酸誘導体（２０ｍｍｏｌ）をＤＭＦ中の２０％（ｖ／ｖ）ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）１００ｍＬ中に溶解した。ＤＭＦ中の２０％ＤＭＳＯ中の２０ｍＭＨＢＴＵ、４００ｍＭＮＭＭで、保護されたアミノ酸を活性化し、２０％ＤＭＦ／ＤＭＳＯ中の０．５ｍｍｏｌの保護されたアミノ酸、０．５ｍｍｏｌのＨＢＴＵ、１ｍｍｏｌのＮＭＭで、２５分間、次いで４０分間の２回の処理を使用して、カップリングを実施した。ＤＭＦ中の２０％（ｖ／ｖ）ピペリジンの溶液を使用する、１０分間、次いで１５分間の２回の処理で、Ｆｍｏｃ脱保護反応を実施した。合成の後、次に、樹脂を排水し、ＤＣＭ、ＤＭＦ、ＤＣＭで洗浄した後、真空で乾燥した。ＴＦＡ／ＥＤＴ／ＴＩＳ／H_2O（９２．５：２．５：２．５：２．５（ｖ／ｖ））溶液で、室温で１時間処理することによって、ペプチド－樹脂を脱保護し、樹脂から放出した。次に、揮発性物質を窒素ガス流で除去し、粗ペプチドを冷ジエチルエーテルで２回沈殿させ、遠心分離により回収した。次に、Ｊｕｐｉｔｅｒ　４μｍＰｒｏｔｅｏ（商標）９０Åカラム上での直線勾配（０ないし６０％緩衝液Ｂ、１２分、Ａ：水中の０．１％ＴＦＡ、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ＴＦＡ）を使用するＷａｔｅｒｓ２７９５分析用ＲＰ－ＨＰＬＣシステムで、粗ペプチドを分析した。正確なペプチド生成量を確認するために、ＰＥ－Ｓｃｉｅｘ（商標

）ＡＰＩ電気スプレー質量分析計を使用した。分析用ＲＰ－ＨＰＬＣ分析によって概算されるもの基づいて約７０％純度で、粗ペプチドを１４３ｍｇ収量で入手した。還元型Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ（ペプチド１）の保持時間（室温）＝５．３１分、算出された分子量＝３９０４．６９１７Ｄａ（平均）、実験的に観察された分子量３９０７．０Ｄａであった。

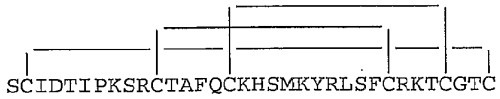
【０５０１】

Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫの折りたたみ（ジスルフィド結合形成）

ＴＦＡ開裂及びペプチド沈殿の後、ペプチドを折りたたむため、還元型Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫを、空気で酸化した。水中の２０％ＡｃＯＨ（ｖ／ｖ）を使用して、開裂した粗ペプチドを抽出した後、約０．１５ｍｇ／ｍＬの還元型Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫの濃度まで水で希釈し、NH_4OH（２８ないし３０％）を使用してｐＨを約８．０に調整し、室温で３６時間静かに撹拌した。ＬＣ－ＭＳ分析により、折りたたみ工程をモニターした。この後、０ないし４０％の直線勾配の緩衝液Ｂで１２０分間（Ａ＝水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ＝アセトニトリル中０．１％ＴＦＡ）１”Ｌｕｎａ　５μｍ　Ｃ１８　１００Å　Ｐｒｏｔｅｏ（商標）カラムを使用する逆相ＨＰＬＣを使用して、折りたたまれたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫペプチドを精製した。折りたたまれた粗Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫペプチドを、約２５％の緩衝液Ｂで（その還元型における溶出時間と比較して）早期に溶出した。分析用ＲＰ－ＨＰＬＣ分析によって概算されるように、９７％超の純度で、折りたたまれたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ（ペプチド２）を２３．２ｍｇの収量で入手した（図２０）。算出された分子量＝３８９５．７６９３（モノアイソトピック）、実験的に観察された分子量＝３８９６．５Ｄａ（Ｗａｔｅｒｓ　ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒ　Ｍｉｃｒｏｍａｓｓ　ＭＳ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓで分析）であった。Ｄｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫジスルフィドの結合性は、Ｃ１－Ｃ６、Ｃ２－Ｃ４、Ｃ３－Ｃ５であった。

【０５０２】

【化５２】



（ペプチド２、配列番号５８）

【０５０３】

折りたたまれたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫのＮ末端ＰＥＧ化

折りたたまれたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫ（ペプチド２）を、１ｍｇ／ｍＬの濃度で水中に溶解した。５０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４．５中の２Ｍ　ＭｅＯ－ＰＥＧ－アルデヒド、$CH_3O-[CH_2CH_2O]n-CH_2CH_2CHO$（平均分子量２０ｋＤａ）溶液、及び別途の$NaCNBH_3$の１Ｍ溶液を新たに調製した。次に、ペプチド溶液をＭｅＯ－ＰＥＧ－アルデヒド含有溶液へ添加した後、$NaCNBH_3$溶液を添加した。反応化学量論はそれぞれ、ペプチド：ＰＥＧ：ＮａＣＮＢＨ３（１：２：０．０２）であった。反応を４８時間放置し、直線勾配（１６分中６ないし６０％Ｂ、Ａ：水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ：水中０．１％ＴＦＡ／９０％ＡＣＮ）で、４０℃でＺｏｒｂａｘ（商標）３００ＳＢ－Ｃ８　５μｍカラムを使用するＡｇｉｌｅｎｔ１１００ＲＰ－ＨＰＬＣシステムで分析した。モノＰＥＧ化された、折りたたまれたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫは、分析用ＲＰ－ＨＰＬＣによって粗生成物の約５８％を構成した。次に、２５カラム容積中の０ないし５０％Ｂの勾配を使用して、４℃、１ｍＬ／分でＡＫＴＡ　ＦＰＬＣシステムにおいてＨｉＴｒａｐ（商標）５ｍＬ　ＳＰ　ＨＰ陽イオン交換カラムを使用して、モノＰＥＧ化されたＤｅｓ－Ａｒｇ１－ＳｈＫを単離した（緩衝液：Ａ＝２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０、Ｂ＝１Ｍ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０）。（粗生成物に関して記載されるとおり）４ないし２０のトリス－Ｇｌｙ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル及びＲＰ－ＨＰＬＣを使用して、画分を分析した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを１２５Ｖ、３５ｍＡ、５

Ｗで１．５時間使用した。次に、プールした生成物を４℃で、Ａ４Ｓ緩衝液（１０ｍＭＮａＯＡｃ、５％ソルビトール、ｐＨ４．０）１Ｌの３回の交換で透析した。次に、透析した生成物を１０Ｋの微量遠心フィルター中で２ｍＬ容積まで濃縮し、最終生成物を付与するため、０．２μＭシリンジフィルターを使用してろ過滅菌した。Ｎ末端がＰＥＧ化されたＤｅｓ-Ａｔｇ１-ＳｈＫ（ペプチド３）を、分析用ＲＰ-ＨＰＬＣ分析によって８５％純度と概算された１．７ｍｇ収量で単離した（図２３）。

【０５０４】

「ＰＥＧ-ＳｈＫ[２-３５]とも呼ばれる」Ｎ末端がＰＥＧ化されたＤｅｓ-Ａｒｇ１-ＳｈＫは、パッチクランプ電気生理学的実験によって測定されるように（図３６）、ヒトＫｖ１．３を遮断する上で活性があった（図３８Ａ及び図３８Ｂ）。

【実施例３２】

【０５０５】

Ｎ末端がＰＥＧ化されたＳｈｋ

作働する本実施例の実験的手法は、図１７に示される結果に対応する。

【０５０６】

還元型ＳｈＫのペプチド合成

Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）-Ｓ　ＰＨＢ　Ｆｍｏｃ-Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）樹脂上、０．１ｍｍｏｌ当量の樹脂規模で、ヘキサフルオロリン酸２-（１Ｈ-ベンゾトリアゾール-１-イル）-１，１，３-３-テトラメチルウロニウム（ＨＢＴＵ）／Ｎ-メチルモルフォリン（ＮＭＭ）／Ｎ，Ｎ-ジメチル-ホルムアミド（ＤＭＦ）カップリング化学反応を使用する固相ペプチド合成（ＳＰＰＦ）によるＳｙｍｐｈｏｎｙ（商標）多重ペプチド合成装置での段階的な方法で、アミノ酸配列

ＲＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＱＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ

（ペプチド４、配列番号５）

を有するＳｈＫを合成した。Ｎ-アルファ-９-フルオレニルメチルオキシカルボニル及び側鎖保護されたアミノ酸は、Ｍｉｄｗｅｓｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄから購入した。Ｆｍｏｃ-Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）-Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）樹脂は、Ｆｌｕｋａから購入した。以下の側鎖保護戦略を採用した。すなわち、Ａｓｐ（Ｏ^{t}Ｂｕ）、Ａｒｇ（Ｐｂｆ）、Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）、Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（Ｎ$^{\varepsilon}$-Ｂｏｃ）、Ｓｅｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）、Ｔｈｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）及びＴｙｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）であった。２つのオキサゾリジンジペプチドであるＦｍｏｃ-Ｇｌｙ-Ｔｈｒ（Ψ$^{Ｍｅ，Ｍｅ}$Ｐｒｏ）-ＯＨ及びＦｍｏｃ-Ｌｅｕ-Ｓｅｒ（Ψ$^{Ｍｅ，Ｍｅ}$Ｐｒｏ）-ＯＨを鎖重合に使用し、ＮｏｖａＢｉｏｃｈｅｍから得、配列の合成に使用した。保護されたアミノ酸誘導体（２０ｍｍｏｌ）をＤＭＦ中の２０％（ｖ／ｖ）ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）１００ｍＬ中に溶解した。保護されたアミノ酸をＤＭＦ中の２０％ＤＭＳＯ中の２００ｍＭＨＢＴＵ、４００ｍＭＮＭＭで活性化し、２０％ＤＭＦ／ＤＭＳＯ中の０．５ｍｍｏｌの保護されたアミノ酸、０．５ｍｍｏｌのＨＢＴＵ、１ｍｍｏｌのＮＭＭで２５分間、次いで４０分間の２回の処理を使用して、カップリングを実施した。ＤＭＦ中の２０％（ｖ／ｖ）ピペリジンの溶液を１０分間、次いで１５分間使用する２回の処理で、Ｆｍｏｃ脱保護反応を実施した。合成の後、次に、樹脂を排水し、ＤＣＭ、ＤＭＦ、ＤＣＭで洗浄した後、真空で乾燥した。室温で１時間ＴＦＡ／ＥＤＴ／ＴＩＳ／H_2O（９２．５：２．５：２．５：２．５（ｖ／ｖ））溶液による処理によって、ペプチド-樹脂を脱保護し、樹脂から放出した。次に、揮発性物質を窒素ガス流で除去し、粗ペプチドを冷ジエチルエーテルで２回沈殿させ、遠心分離により回収した。次に、Ｊｕｐｉｔｅｒ　４μｍＰｒｏｔｅｏ（商標）９０Åカラム上での直線勾配（０ないし６０％緩衝液Ｂ、１２分、Ａ：水中の０．１％ＴＦＡ、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ＴＦＡ）を使用するＷａｔｅｒｓ２７９５分析用ＲＰ-ＨＰＬＣシステムで、粗ペプチドを分析した。正確なペプチド生成量を確認するため、ＰＥ-Ｓｃｉｅｘ　ＡＰＩ電気スプレー質量分析計を使用した。分析用ＲＰ-ＨＰＬＣ分析によって約４５％純度と概算される約１７０ｍｇの収量の粗ペプチドを入手した。還元型Ｄｅｓ-Ａｒｇ４-ＳｈＫ（ペプチド１）の保持時間（室温）=

５．０５４分、算出された分子量＝４０６０．８７９３Ｄａ（平均）、実験的に観察された分子量４０６３．０Ｄａであった。

【０５０７】

ＳｈＫの折りたたみ（ジスルフィド結合形成）

ＴＦＡ開裂及びペプチド沈殿の後、ペプチドを折りたたむため、還元型ＳｈＫを空気で酸化した。水中の２０％ＡｃＯＨ（ｖ／ｖ）を使用して、開裂した粗ペプチドを抽出した後、約０．１５ｍｇ／ｍＬの還元型ＳｈＫの濃度まで水で希釈し、NH_4OH（２８ないし３０％）を使用してｐＨを約８．０に調整し、室温で３６時間静かに撹拌した。ＬＣ-ＭＳ分析により、折りたたみ工程をモニターした。この後、０ないし４０％の直線勾配の緩衝液Ｂで１２０分間（Ａ＝水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ＝アセトニトリル中０．１％ＴＦＡ）１″Ｌｕｎａ　５μｍ　Ｃ１８　１００Å　Ｐｒｏｔｅｏ（商標）カラムを使用する逆相ＨＰＬＣによって、折りたたまれたＳｈＫペプチドを精製した。折りたたまれた粗ＳｈＫペプチドを、約２５％の緩衝液Ｂで（その還元型における溶出時間と比較して）早期に溶出した。分析用ＲＰ-ＨＰＬＣ分析によって概算されるように、９７％超の純度で、折りたたまれたＳｈＫ（ペプチド５）を２５．５ｍｇの収量で入手した。図６０を参照されたい。算出された分子量＝４０５１．８７６４Ｄａ（モノアイソトピック）、実験的に観察される分子量＝４０５２．５Ｄａ（Ｗａｔｅｒｓ　ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒ　Ｍｉｃｒｏｍａｓｓ　ＭＳ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓで分析）であった。ＳｈＫジスルフィドの結合性は、Ｃ１-Ｃ６、Ｃ２-Ｃ４、Ｃ３-Ｃ５であった。

【０５０８】

【化５３】



（ペプチド５、配列番号１０）

折りたたまれたＳｈＫのＮ末端のＰＥＧ化　以下のアミノ酸配列を有する折り畳まれたＳｈＫは、

RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC

（配列番号：５）

は、水中に１ｍｇ／ｍＬ濃度で溶解させることができる。５０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４．５中の２Ｍ　ＭｅＯ-ＰＥＧ-アルデヒド、CH_3O-[CH_2CH_2O]ｎ-CH_2CH_2CHO（平均分子量２０ｋＤａ）溶液、及び$NaCNBH_3$の別個の１Ｍ溶液は、新たに調製できる。次に、ペプチド溶液をＭｅＯ-ＰＥＧ-アルデヒド含有溶液へ添加した後、$NaCNBH_3$溶液を添加できる。反応化学量論はそれぞれ、ペプチド：ＰＥＧ：ＮａＣＮＢＨ３（１：２：０．０２）であり得る。反応を４８時間放置し、直線勾配（１６分中６ないし６０％Ｂ、Ａ：水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ：水中０．１％ＴＦＡ／９０％ＡＣＮ）で、４０℃でＺｏｒｂａｘ（商標）３００ＳＢ-Ｃ８　５μｍカラムを使用するＡｇｉｌｅｎｔ（商標）１１００ＲＰ-ＨＰＬＣシステムで分析できる。次に、２５カラム容積中の０ないし５０％Ｂの勾配を使用して、４℃、１ｍＬ／分でＡＫＴＡ　ＦＰＬＣシステムにおいて、ＨｉＴｒａｐ（商標）５ｍＬ　ＳＰ　ＨＰ陽イオン交換カラムを使用して、モノＰＥＧ化されたＳｈｋを単離できる（緩衝液：Ａ＝２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０、Ｂ＝１Ｍ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０）。４ないし２０のトリス-Ｇｌｙ　ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲル及びＲＰ-ＨＰＬＣを使用して、画分を分析できる。ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲルを１２５Ｖ、３５ｍＡ、５Ｗで１．５時間使用できる。次に、プールした生成物を４℃で、Ａ４Ｓ緩衝液（１０ｍＭ酢酸ナトリウム、５％ソルビトール、ｐＨ４．０）１Ｌの３回の交換で透析できる。次に、透析した生成物を１０Ｋの微量遠心フィルター中で２ｍＬ容積まで濃縮し、最終生成物を付与するため、０．２μＭシリンジフィルターを使用してろ過滅菌できる。

【実施例３３】

【０５０９】
オキシム形成によってＮ末端がＰＥＧ化されたＳｈＫ還元型ＳｈＫのペプチド合成
配列
【０５１０】
【化５４】

RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC
（配列番号５）

を有するＳｈＫは、Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）-Ｓ ＰＨＢ Ｆｍｏｃ-Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）樹脂上、０．１ｍｍｏｌ当量の樹脂規模で、ヘキサフルオロリン酸２-（１Ｈ-ベンゾトリアゾール-１-イル）-１，１，３，３-テトラメチルウロニウム（ＨＢＴＵ）／Ｎ-メチルモルフォリン（ＮＭＭ）／Ｎ，Ｎ-ジメチル-ホルムアミド（ＤＭＦ）を使用する固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）によって、Ｓｙｍｐｈｏｎｙ（商標）多重ペプチド合成装置で段階的な様式で合成できる。Ｎ-アルファ-（９-フルオレニルメチルオキシカルボニル）-及び側鎖保護されたアミノ酸は、Ｍｉｄｗｅｓｔ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄから購入できる。Ｆｍｏｃ-Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）-Ｔｅｎｔａｇｅｌ（商標）樹脂は、Ｆｌｕｋａから購入できる。以下の側鎖保護戦略が採用できる。すなわち、Ａｓｐ（Ｏ^{t}Ｂｕ）、Ａｒｇ（Ｐｂｆ）、Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｎ（Ｔｒｔ）、Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（Ｎ$^{\varepsilon}$-Ｂｏｃ）、Ｓｅｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）、Ｔｈｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）及びＴｙｒ（Ｏ^{t}Ｂｕ）であった。２つのオキサゾリジンジペプチド、すなわちＦｍｏｃ-Ｇｌｙ-Ｔｈｒ（Ψ$^{Ｍｅ，Ｍｅ}$Ｐｒｏ）-ＯＨ及びＦｍｏｃ-Ｌｅｕ-Ｓｅｒ（Ψ$^{Ｍｅ，Ｍｅ}$Ｐｒｏ）-ＯＨは、鎖重合に使用でき、ＮｏｖａＢｉｏｃｈｅｍから入手でき、配列の合成に使用できる。保護されたアミノ酸誘導体（２０ｍｍｏｌ）は、ＤＭＦ中の２０％（ｖ／ｖ）ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）１００ｍＬ中に溶解できる。保護されたアミノ酸は、ＤＭＦ中の２０％ＤＭＳＯ中の２００ｍＭＨＢＴＵ、４００ｍＭＮＭＭで活性化でき、２０％ＤＭＦ／ＤＭＳＯ中の０．５ｍｍｏｌの保護されたアミノ酸、０．５ｍｍｏｌのＨＢＴＵ、１ｍｍｏｌのＮＭＭで２５分間、次いで４０分間の２回の処理を使用して、カップリングを実施できる。ＤＭＦ溶液中の２０％（ｖ／ｖ）ピペリジンを１０分間、次いで１５分間使用する２回の処理で、Ｆｍｏｃ脱保護反応を実施できる。Ｓｈｋペプチドの鎖重合の後、ＤＭＦ中の０．５Ｍ ＨＢＴＵを４当量のコリジンとともに５分間使用して、Ｂｏｃ-アミノオキシ酢酸（１．２当量）をＮ末端にカップリングできる。合成の後、次に、樹脂を排水し、ＤＣＭ、ＤＭＦ、ＤＣＭで洗浄した後、真空で乾燥できる。室温で１時間、ＴＦＡ／アミノオキシ酢酸／ＴＩＳ／ＥＤＴ／Ｈ２Ｏ（９０：２．５：２．５：２．５）溶液での処理によって、ペプチド-樹脂を脱保護でき、樹脂から放出できる。次に、揮発性物質を窒素ガス流で除去し、粗ペプチドを冷ジエチルエーテルで２回沈殿し、遠心分離により回収できる。次に、Ｊｕｐｉｔｅｒ ４μｍ Ｐｒｏｔｅｏ（商標）９０Åカラム上での直線勾配（１２分で０ないし６０％緩衝液Ｂ、Ａ：０．１％アミノオキシ酢酸も含有する水中の０．１％ＴＦＡ、Ｂ：アセトニトリル中の０．１％ＴＦＡ）を使用するＷａｔｅｒｓ２７９５分析用ＲＰ-ＨＰＬＣシステムで、アミノオキシ-Ｓｈｋペプチド（ペプチド７）を分析できる。
【０５１１】
逆相ＨＰＬＣ精製
調製用逆相高速液体クロマトグラフィーを、Ｃ１８（５μｍ、２．２ｃｍ×２５ｃｍ）カラムで実施できる。クロマトグラフィー分離は、１５ｍＬ／分で９０分にわたって、典型的には５ないし９５％のＡ中の緩衝液の直線勾配（Ａ＝０．１％ＴＦＡ水溶液、Ｂ＝０．０９％ＴＦＡ及び０．１％アミノオキシ酢酸を含有する９０％ＡＣＮ水溶液）を使用して達成できる。調製用ＨＰＬＣ画分は、ＥＳＭＳ及び光ダイオードアレイ（ＰＤＡ）ＨＰＬＣによって性質決定でき、合わせて、凍結乾燥できる。
【０５１２】

オキシム形成によるＳｈｋのＮ末端のＰＥＧ化

凍結乾燥したアミノオキシＳｈｋ（ペプチド７）は、５０％ＨＰＬＣ緩衝液Ａ／Ｂ（５ｍｇ／ｍＬ）中に溶解でき、ＭｅＯ-ＰＥＧ-アルデヒド、$CH_3O-[CH_2CH_2O]_n-CH_2CH_2CHO$（平均分子量２０ｋＤａ）の２倍モル過剰量へ添加できる。反応を２４時間放置でき、直線勾配（１６分中６ないし６０％Ｂ、Ａ：水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ：水中０．１％ＴＦＡ／９０％ＡＣＮ）で、４０℃でＺｏｒｂａｘ（商標）３００ＳＢ-Ｃ８　５μｍカラムを使用するＡｇｉｌｅｎｔ（商標）１１００ＲＰ-ＨＰＬＣシステムで分析できる。モノＰＥＧ化された還元型ＳｈＫは、分析用ＲＰ-ＨＰＬＣによって粗生成物の約５８％を占めた。次に、２５カラム容積中の０ないし５０％Ｂの勾配を使用して、４℃、１ｍＬ／分でＡＫＴＡ　ＦＰＬＣシステムにおいてＨｉＴｒａｐ（商標）５ｍＬ　ＳＰ　ＨＰ陽イオン交換カラムを使用して、モノＰＥＧ化されたＳｈＫを単離できる（緩衝液：Ａ＝２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０、Ｂ＝１Ｍ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．０）。４ないし２０のトリス-Ｇｌｙ　ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲル及びＲＰ-ＨＰＬＣを使用して、画分を分析できる。ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲルを、１２５Ｖ、３５ｍＡ、５Ｗで１．５時間使用できる。次に、プールした生成物を４℃で、Ａ４Ｓ緩衝液（１０ｍＭＮａＯＡｃ、５％ソルビトール、ｐＨ４．０）１Ｌの３回の交換で透析できる。次に、透析した生成物を、１０Ｋの微量遠心フィルター中で２ｍＬ容積まで濃縮でき、最終生成物を付与するため、０．２μＭシリンジフィルターを使用してろ過滅菌できる。

【０５１３】

ＳｈＫの折りたたみ（ジスルフィド結合形成）

モノＰＥＧ化された（オキシム化された）ＳｈＫは、水中の２０％ＡｃＯＨ（ｖ／ｖ）中に溶解でき、次に約０．１５ｍｇペプチドｍＬの濃度まで水で希釈し、NH_4OH（２８ないし３０％）を使用してｐＨを約８．０に調整し、室温で３６時間静かに撹拌することができる。ＬＣ-ＭＳ分析により、折りたたみ工程をモニターすることができる。この後、０ないし４０％の直線勾配の緩衝液Ｂで１２０分間（Ａ＝水中０．１％ＴＦＡ、Ｂ＝アセトニトリル中０．１％ＴＦＡ）１″Ｌｕｎａ　５μｍ　Ｃ１８　１００Å　Ｐｒｏｔｅｏ（商標）カラムを使用する逆相ＨＰＬＣを使用することによって、折りたたまれたモノＰＥＧ化された（オキシム化された）ＳｈＫ（ペプチド９）を精製できる。モノＰＥＧ化された（オキシム化された）ＳｈＫジスルフィドの結合性は、Ｃ１-Ｃ６、Ｃ２-Ｃ４、及びＣ３-Ｃ５であり得る。

【０５１４】

【化５５】



（ペプチド９、配列番号１０）

【実施例３４】

【０５１５】

Ｎ末端がＰＥＧ化されたＳｈＫ（アミド化）

本実施例の実験的手法は、図１８に示される結果に対応する。

【０５１６】

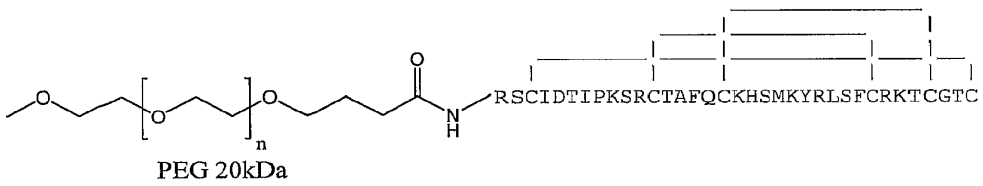
アミド形成によるＳｈｋのＮ末端のＰＥＧ化

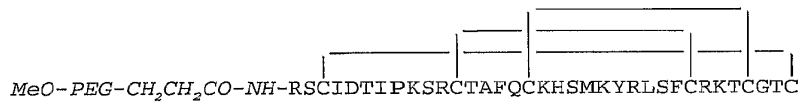
Ｓｈｋに対するｍＰＥＧ-ＳＰＡ１．５モル濃度過剰量を使用して、室温で２０ｋＤａ　ＰＥＧプロピオン酸（ｍＰＥＧ-ＳＰＡ；$CH_3O-[CH_2CH_2O]n-CH_2CH_2CO-NHS$）の固体サクシニミジルエステルへ、１００ｍＭビシン、ｐＨ８．０中の折りたたまれたＳｈＫ（ペプチド５）の１０ｍｇ／ｍＬ溶液を添加できる。静かに撹拌した１時間後、混合物を水で２ｍｇ／ｍＬへ希釈でき、ｐＨを希ＨＣｌで４．０へ調整で

きる。１ｍＬ／分で０．０５Ｍ NaH_2PO_4、０．０５Ｍ Na_2HPO_4、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０１Ｍ NaN_3、ｐＨ６．８で溶出したＳｕｐｅｒｄｅｘ（商標）７５ＨＲ１０／３０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ）を使用するＳＥＣ ＨＰＬＣによって、モノＰＥＧ化されたＳｈｋ（ペプチド１０）、幾つかのジＰＥＧ化されたＳｈｋ又はトリＰＥＧ化されたＳｈｋ、修飾されていないＳｈｋ及びサクシニミジルエステル加水分解の程度を測定できる。４ないし２０のトリス-Ｇｌｙ ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲル及びＲＰ-ＨＰＬＣを使用して、画分を分析できる。ＳＤＳ-ＰＡＧＥゲルを１２５Ｖ、３５ｍＡ、５Ｗで１．５時間使用できる。次に、４℃で、Ａ４Ｓ緩衝液（１０ｍＭＮａＯＡｃ、５％ソルビトール、ｐＨ４．０）１Ｌの３回の交換で、プールした生成物を透析できる。次に、透析したＮ末端ＰＥＧ化（アミド化）ＳｈＫ（ペプチド１０）を、１０Ｋの微量遠心フィルター中で２ｍＬ容積まで濃縮でき、最終生成物を付与するため、０．２μＭシリンジフィルターを使用してろ過滅菌できる。

【０５１７】

【化５６】





（ペプチド１０、配列番号１０）

【実施例３５】

【０５１８】

Ｆｃ-Ｌ-ＳｍＩＩＩＡ

Ｆｃ-ＳｍＩＩＩＡ発現ベクター

部分的リンカー配列及びヒト高頻度コドンでコードされるＳｍＩＩＩＡペプチドを含有する１０４ｂｐのＢａｍＨＩ-ＮｏｔＩ断片を、重複プライマー３６５４-５０及び３６５４-５１を使用するＰＣＲによって重合し、実施例１に記載されているｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ-ｈＦｃ-ＳｍＩＩＩＡを作製するために、７．１ｋｂのＮｏｔＩ-ＢａｍＨＩ主鎖中にクローニングした。

【０５１９】

【化５７】

BamHI
5′GGATCCGGAGGAGGAGGAAGCTGCTGCAACGGCCGCCGCGGCTGCAGCAGCCGCTGG
C C N G R R G C S S R W
TGCCGCGACCACAGCCGCTGCTGCTGAGCGGCCGC3′ //SEQ ID NO:872
C R D H S R C C NotI
配列番号：873

ﾌｫﾜｰﾄﾞ 5′-3′:
GGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAAGCTGCTGCAACGGCCGCCGCGGCTGCAGCAGC CGC //
配列番号：874

ﾘﾊﾞｰｽ 5′-3′:
ATTATTGCGGCCGCTCAGCAGCAGCGGCTGTGGTCGCGGCACCAGCGGCTGCTGCAG CCGC
配列番号：875

【０５２０】

最終コンストラクト中のＢａｍＨＩからＮｏｔＩへの断片の配列を、配列決定により確認した。

【０５２１】

Ｆｃ-Ｌ-Ｓｍｌｌａの一過性発現

毒素ペプチドＦｃ融合コンストラクトｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ-ｈＦｃ-ＳｍＩＩＩＡ７．５μｇを、形質移入剤ＦｕＧＥＮＥ６を有する１０ｃｍ組織培養プレート中の２９３-Ｔ細胞に形質移入した。形質移入から２４時間後、培地を無血清培地と交換し、形質移入の５日目に培養上清を回収した。抗ｈＦｃ抗体で標識したウェスタンブロットによって、２９３-Ｔ細胞からのＦｃ-ＳｍＩＩＩＡの一過性発現を分析した（図２５Ａ及び図２５Ｂ）。概算された分子量を有する発現されたタンパク質の単一バンドが、還元型及び非還元型試料の両者において示された。さらに、Ｆｃ-ＳｍＩＩＩＡの一過性発現レベルが、ＥＬＩＳＡによると、７３．４μｇ／ｍＬであることを決定した。

【実施例３６】

【０５２２】

電気生理学実験

細胞培養ヒトＫｖ１．３チャネルを発現する安定な細胞系が、Ｂｉｏｆｏｃｕｓから使用許諾された。５％CO_2環境中、３７℃で、細胞を維持した。培地は、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１×非必須アミノ酸、１０％ウシ胎仔血清及び５００μｇ／ｍＬジェネテシンを有するＤＭＥＭを含有する。電気生理学実験の少なくとも２４時間前に、細胞を播種し、３５ｍｍ培養皿上で低集密度で増殖させた。

【０５２３】

パッチクランプによる電気生理学記録

パッチクランプ技術の密封配置を使用することによって、全細胞電流を単一細胞から記録した。１３５ｍＭＮａＣｌ、５ｍＭＫＣｌ、１．８ｍＭ$CaCl_2$、１０ｍＭＨＥＰＥＳ及び５ｍＭグルコースを含有する記録緩衝液を有する培地ですすぎ、交換した後、３５ｍｍ培養皿を記録ステージへと移した。ＮａＯＨで、ｐＨを７．４になるように調整し、モル浸透圧濃度を３００ｍＯｓｍに設定した。平行に配置され、電動ロッド（電動ロッドは、記録されている細胞の上に、ガラス毛細管を直接配置する。）に装着されたガラス毛細管の１つを介して、細胞に、記録緩衝液を連続的に灌流した。記録ピペット溶液は、９０ｍＭＫ-グルコン酸塩、２０ｍＭＫＦ、１０ｍＭＮａＣｌ、１ｍＭ$MgCl_2$-$6H_2O$、１０ｍＭＥＧＴＡ、５ｍＭK_2-ＡＴＰ及び１０ｍＭＨＥＰＥＳを含有した。内部溶液に対するｐＨを、ＫＯＨで７．４に調整し、モル浸透圧濃度を２８０ｍＯｓｍに設定した。実験は室温（２０ないし２２℃）で実施し、Ｍｕｌｔｉｃｌａｍｐ（商標）７００Ａ増幅装置（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ Ｉｎｃ．）を使用して記録した。ピペットの抵抗は、典型的には、２ないし３ＭΩであった。

【０５２４】

Ｋｖ１．３電流に関するタンパク質毒素作用強度測定

ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現するＨＥＫ２９３細胞を、-８０ｍＶ保持電位で電位固定した。-８０ｍＶの保持電位から+３０ｍＶへの２００ミリ秒長の脱分極工程を付与することによって、外向きのＫｖ１．３電流を活性化し、３ｋＨｚでフィルターにかけた。各脱分極工程は、その後の脱分極工程から１０秒間間隔で分離した。類縁体信号をＤｉｇｉｄａｔａ（商標）１３２２Ａデジタイザー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ）によってデジタル化した後、Ｃｌａｍｐｆｉｔ（商標）９（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ Ｉｎｃ．）を使用するオフライン分析のために、コンピュータディスクに保存した。全ての研究において、漸増濃度のタンパク質毒素の灌流を開始する４分間前に、安定したベースラインＫｖ１．３電流振幅を確立した。タンパク質毒素のその後の濃度の灌流を開始する前に、定常状態の遮断を常に達成した。

【０５２５】

データ解析

対照の百分率（ＰＯＣ）を次式に基づいて算出する。すなわち（タンパク質毒素添加後

のＫｖ１．３電流／対照におけるＫｖ１．３電流）×１００である。IC_{50}値を算出するため、タンパク質毒素の少なくとも５つの濃度（例えば、０．００３、０．０１、０．０３、０．１、０．３、１００ｎＭ）を使用した。ＸＬｆｉｔソフトウェア（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｃｏｒｐ．）の４つのパラメータロジスティック適合を使用して、IC_{50}値及び曲線適合を概算した。IC_{50}値を平均値±ｓ．ｅ．ｍ．（平均の標準誤差）として表す。

【０５２６】

薬物の調製

タンパク質毒素（典型的には１０ないし１００μＭ）を蒸留水中に溶解し、－８０℃で冷凍保存した。タンパク質毒素原液の連続希釈物を、０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有する記録緩衝液中へ混合した後、ガラス灌流貯蔵器へと転移させた。電子挟みバルブは、貯蔵器から記録される細胞へのタンパク質毒素の流量を調節した。

【実施例３７】

【０５２７】

免疫生物学及びチャネル結合

ＰＢＭＣのＰＭＡ及び抗ＣＤ３抗体刺激後のＴ細胞サイトカイン生成の阻害。正常ヒトドナーＬｅｕｌｏｐｈｏｒｅｓｉｓパックから、ＰＢＭＣを予め単離し、密度勾配遠心（Ｆｉｃｏｌｌ　Ｈｙｐａｑｕｅ）によって精製し、ＣＰＺ　Ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ（ＩＮＣＥＬＬ，　ＭＣＰＺＦ－１００プラス最終濃度１０％ＤＭＳＯ）中で冷凍保存さした。ＰＢＭＣを解凍し（９５％生存率）、洗浄し、９６ウェル平底組織培養プレート中の１０％ウシ胎仔血清、１００Ｕ／ｍＬペニシリン、１００ｍｇ／ｍＬストレプトマイシン、２ｍＭＬ－グルタミン、１００μＭ非必須アミン酸及び２０μＭ２－ＭＥを補充した培地（ＲＰＭＩ培地１６４０、ＧＩＢＣＯ）中に、2×10^5細胞／ウェルで播種した。２００μＬの最終アッセイ容積中のＰＭＡ／抗ＣＤ３（それぞれ１ｎｇ／ｍＬ及び５０ｎｇ／ｍＬ）で４８時間刺激する前の９０分間、連続希釈した（最終濃度１００ｎＭないし０．００１ｎＭ）ＳｈＫ［１－３５］、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］又はｆｃ対照とともに、細胞をあらかじめ温置した。電気化学発光（ＥＣＬ）を利用することによってＩＬ－２及びＩＦＮｇのタンパク質レベルを測定するため、Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（ＭＳＤ）ＳＥＣＴＯＲ（商標）Ｉｍａｇｅｒ６０００（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，　Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｙ，　ＭＤ）を使用して、アッセイ試料の分析を実施した。培養上清（５０μＬ）をＭＳＤ多重スポット９６ウェルプレートへ添加した（各ウェルは、３つの捕捉抗体すなわちＩＬ－２、ＴＮＦ，ＩＦＮγを含有した）。プレートを密封し、スズ箔で包み、プレート振とう器上、室温で２時間温置した。ウェルを２００μＬのＰＢＳＴ（ＢＩＯＴＥＫ、Ｅｌｘ４０５Ａｕｔｏ　Ｐｌａｔｅ　Ｗａｓｈｅｒ）で１回洗浄した。各ウェルに対して、ルテニウム標識した検出抗体（抗体希釈緩衝液中の終濃度１μｇ／ｍＬ、ＩＬ－１、ＴＮＦ、ＩＦＮγ）２０μＬ及び２×ＭＳＤ　Ｒｅａｄ　Ｂｕｆｆｅｒ１３０μＬを添加し、終容積１５０μＬとした。プレートを密封し、スズ箔で包み、プレート振とう器上、室温で１時間温置した。次に、プレートをＳＥＣＴＯＲ（商標）Ｉｍａｇｅｒ６０００で読み取った。図３５Ａ及び３５Ｂは、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、Ｔ細胞由来のＩＬ－２及びＩＦＮｇ生成を用量依存的な様式で有力に阻害することを示す。固有のＳｈＫ［１－３５］ペプチドと比較して、ペプチボディは、阻害の程度がより大きい（阻害剤の不在下での反応のＰＯＣ＝対照の百分率）。

【０５２８】

ＰＢＭＣのＰＭＡ及び抗ＣＤ３抗体刺激後のＴ細胞サイトカイン生成の阻害

正常ヒトドナーＬｅｕｋｏｐｈｅｒｅｓｉｓパックから、ＰＢＭＣをあらかじめ単離し、密度勾配遠心（Ｆｉｃｏｌｌ　Ｈｙｐａｑｕｅ）により精製し、ＩＮＣＥＬＬ　Ｆｒｅｚｉｎｇ　Ｍｅｄｉｕｍを使用して冷凍保存した。ＰＢＭＣを解凍し（９５％生存率）、洗浄し、（血清交換物ＰＳＧを含有するＲＰＭＩ完全培地中で）2×10^5細胞／ウェルで９６ウェル平底プレートへ播種した。２００ｍＬの最終アッセイ容積でａＣＤ３及び

ａＣＤ２８の添加（それぞれ２．５ｎｇ／ｍＬ及び１００ｎｇ／ｍＬ）の前の１時間、連続希釈した（終濃度１００ｎＭないし０．００３ｎＭ）ＳｈＫ［１－３５］、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］、又はＦｃ対照とともに、細胞をあらかじめ温置した。ＭＳＤ多重スポット９６ウェルプレートへ上清２０ｍＬを添加した（各ウェルは、ＩＬ－２、ＴＮＦα及びＩＦＮｇ捕捉抗体を含有した）。プレートを密封し、プレート振とう器上、室温で１時間温置した。次に、ルテニウム標識した検出抗体（抗体希釈緩衝液中のＩＬ－２、ＴＮＦα及びＩＦＮγの終濃度１μｇ／ｍＬ）２０ｍＬ及び２×ＭＳＤ　Ｒｅａｄ　Ｂｕｆｆｅｒ１１０ｍＬを添加した。プレートを密封し、スズ箔で包み、プレート振とう器上、室温で１時間温置した。次に、プレートをＳＥＣＴＯＲ（商標）Ｉｍａｇｅｒ６０００で読み取った。図３７Ａ及び３７Ｂは、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、Ｔ細胞由来のＩＬ－２及びＩＦＮｇ生成を用量依存的な様式で有力に阻害することを示す。部分的な阻害のみを示す固有のＳｈＫ［１－３５］ペプチドと比較して、ペプチボディは、炎症性サイトカイン反応をほぼ完全に阻害する。（阻害剤の不在下での反応のＰＯＣ＝対照の百分率）。

【０５２９】

ＰＢＭＣの抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８抗体刺激後のＴ細胞増殖の阻害

正常ヒトドナーＬｅｕｋｏｐｈｅｒｅｓｉｓパックから、ＰＢＭＣをあらかじめ単離し、密度勾配遠心（Ｆｉｃｏｌｌ　Ｈｙｐａｑｕｅ）により精製し、ＣＰＺ　Ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ（ＩＮＣＥＬＬ，　ＭＣＰＺＦ－１００プラス終濃度１０％ＤＭＳＯ）を使用して冷凍保存した。ＰＢＭＣを解凍し（９５％生存率）、洗浄し、９６ウェル平底組織培養プレート中の１０％ウシ胎仔血清、１００Ｕ／ｍＬペニシリン、１００ｍｇ／ｍＬストレプトマイシン、２ｍＭＬ－グルタミン、１００μＭ非必須アミン酸及び２０μＭ２－ＭＥを補充した培地（ＲＰＭＩ培地１６４０、ＧＩＢＣＯ）中で２×１０^{5}細胞／ウェルで播種した。抗ヒトＣＤ３２（ＦｃｙＲＩＩ）ブロッキング抗体（製造者の使用説明書ＥＡＳＹ　ＳＥＰ　Ｈｕｍａｎ　Ｂｉｏｔｉｎ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ１８５５３番、ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，　ＢＣに従った。）又はＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（終濃度１００ｎＭないし０．００１ｎＭ）のいずれかとともに、細胞を４５分間予め温置した。次に、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（終濃度１００ｎＭないし０．００１ｎＭ）を、抗ヒトＣＤ３２ブロッキング抗体を含有する細胞へ添加する一方で、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＬを含有する細胞へ培地を添加した。ａＣＤ３／ａＣＤ２８（それぞれ０．２ｎｇ／ｍＬ及び１００ｎｇ／ｍＬ）で４８時間刺激する前のさらなる４５分間に両セットを温置した。最終的なアッセイ容積は２００μＬであった。［３Ｈ］ＴｄＲ（１μＣｉ／ウェル）を添加し、プレートをさらに１６時間温置した。次に、細胞をガラスファイバーフィルターへと回収し、放射能をＢシンチレーションカウンタで測定した。図３６Ａ及び３６Ｂは、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、Ｔ細胞の増殖を用量依存的な様式で有力に阻害することを示す。抗ＣＤ３２（ＦｃＲ）ブロッキング抗体による前ブロッキングは、Ｔ細胞増殖を阻害するペプチボディの能力にほとんど効果を及ぼさず、ＦｃＲ結合ではなくＫｖ１．３阻害が、観察される阻害に関するメカニズムであることを示唆する（阻害剤の不在下での反応のＰＯＣ＝対照の百分率）。

【０５３０】

ヒトＫｖ１．３を過剰発現するＨＥＫ２９３細胞に対するＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］結合の免疫組織化学分析

ヒトＫｖ１．３を過剰発現するＨＥＫ２９３細胞（ＨＥＫ　Ｋｖ１．３）をＢｉｏＦｏｃｕｓ　ｐｌｃ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）から入手し、製造者の推奨に従って維持した。親ＨＥＫ２９３細胞系を対照として使用した。ポリ－Ｄ－リジン２４ウェルプレート（３５－４４１４番、Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）上に細胞を播種し、約７０％の集密状態まで増殖させた。培地１ｍＬ／ウェル中に、ＨＥＫ　ＫＶ１．３を、０．５×１０^{5}細胞／ウェルで播種した。ＨＥＫ２９３細胞を、培地１ｍＬ／ウェル中に、１．５×１０^{5}細胞／ウェルの密度で播種した。染色前、細胞増殖培地

を除去し、０．２ｍＬ／ウェルのホルマリン溶液（Ｓｉｇｍａ　ＨＴ５０－１－１ホルマリン溶液、ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで使用前に１：１希釈）を添加し、室温で１０分間温置することによって、細胞をホルマリンで固定した。ＰＢＳ／ＢＳＡ中の５μｇ／ｍＬのＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］０．２ｍＬ／ウェルとともに温置することによって細胞を染色した。Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］を吸引した後、細胞をＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで１回洗浄した。検出抗体（ヤギＦ（ａｂ）２抗ヒトＩｇＧフィコエリスリン、Ｓｏｕｔｈｅｍ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ、ＡＬ）をＰＢＳ／０．５％ＢＳＡ中で５μｇ／ｍＬでウェルへ添加し、室温で３０分間温置した。ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで、細胞を１回洗浄し、共焦点顕微鏡（ＬＳＭ５１０Ｍｅｔａ　Ｃｏｎｆｏｃａｌ　Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅ、Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　ＡＧ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して検査した。図３３Ｂは、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、ＨＥＫ２９３細胞を過剰発現するＫｖ１．３に対する結合を保持することを示すが、形質移入されていない細胞に対する結合はほとんど示さず（図３３Ａ）、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］ペプチボディが、Ｋｖ１．３チャネルを過剰発現する細胞を検出するための試薬として使用できることを示す。活性化されたＴエフェクターメモリ細胞がＫｖ１．３を過剰生成することが報告されている疾病状況において、この試薬は、これらの細胞をターゲットにする上でも、それらの検出においても有用性を見出せる。

【０５３１】

固定されたＨＥＫ２９３細胞に対して結合するＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］を示すＥＬＩＳＡアッセイ

図３４Ａは、Ｋｖ１．３を過剰発現する固定された細胞に対するペプチボディ結合の用量依存的な増加を示し、前記ペプチボディがその標的に対する高親和性結合及び、チャネルを発現する細胞の検出におけるＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］の有用性を示す。多発性硬化症患者において疾病を発症させる抗原特異的Ｔ細胞は、困難なアプローチであるホールセルパッチクランプ電気生理学によって、Ｋｖ１．３を過剰発現することが示されてきた。本ペプチボディ試薬は、患者におけるＫｖ１．３チャネル発現をモニターするための有用かつ簡便なツールであり得、診断適用において有用である。図３４Ａ及び図３４Ｂに示される手法は、以下のとおりである。

【０５３２】

図３４Ａ。Ｋｖ１．３の形質移入されたＨＥＫ２９３細胞に対する無処置のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］の結合を示すため、細胞全体の免疫アッセイを実施した（ＢｉｏＦｏｃｕｓ　ｐｌｃ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）。ポリ－Ｄ-リジンでコーティングした９６ウェルプレート（３５－４４６１番、Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）において、親ＨＥＫ２９３細胞又はＨＥＫ　Ｋｖ１．３細胞を３×10^4細胞／ウェルで播種した。細胞増殖培地を除去し、０．２ｍＬ／ウェルのホルマリン溶液（Ｓｉｇｍａ　ＨＴ５０－１－１ホルマリン溶液、ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡで使用前に１：１希釈）を添加し、室温で２５分間温置した後、ＰＢＳ／０．５％ＢＳＡ１００μＬ／ウェルで１回洗浄することによって、細胞をホルマリンで固定した。ＢＳＡブロッカー（５０－６１－００、ＫＰＬ１０％ＢＳＡ希釈剤／ブロッキング溶液、ＰＢＳで１：１希釈、ＫＰＬ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）０．３ｍＬ／ウェルの添加後、振とうしながら室温で３時間温置することによって、ウェルをブロッキングした。プレートを１×ＫＢ洗浄緩衝液（５０－６３－００、ＫＰＬ）で２回洗浄した。試料を希釈緩衝液（ＰＢＳ／０．５％トゥイーン２０）又は１％雄ルイスラット血清（ＲＡＴＳＲＭ－Ｍ、Ｂｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ　Ｉｎｃ．、Ｈｉｃｋｓｖｉｌｌｅ、ＮＹ）含有希釈緩衝液中に希釈し、ブロッキングされたプレートへ０．１ｍＬ／ウェルを添加し、振とうしながら室温で１時間温置した。プレートを１×ＫＰ洗浄緩衝液で３回洗浄した後、ＰＢＳ／０．１％トゥイーン２０中に１：５０００で希釈したＨＲＰ－ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（３１４１６番、Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）とともに、振とうしながら室温で１時間温置した。プレートを１×ＫＰ洗浄緩衝液で３回洗浄した後、０．１ｍＬ／ウェルのＴＭＢ基質（５２－００－０１、ＫＰＬ）を添加した。０．１ｍＬ／ウェルの２Ｎ硫酸の添

加により、反応を停止させた。Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ ＳｐｅｃｔｒｏＭａｘ３４０（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ、ＣＡ）で、４５０ｎｍの吸光度を読み取った。

【０５３３】

図３４Ｂ。細胞全体の免疫アッセイを、以下の改変とともに上述のとおり実施した。ポリ-Ｄ-リジンでコーティングした９６ウェルプレート中で、ＨＥＫ２９３細胞を1×10^5細胞／ウェルで播種し、ＨＥＫ Ｋｖ１．３細胞を６×１０４細胞／ウェルで播種した。Ｆｃ対照を０．０５ｍＬ／ウェルの容積で５００ｎｇ／ｍＬで添加した。ＨＲＰ-ヤギ抗ヒトＩｇＧ Ｆｃ（３１４１６番、Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）をＰＢＳ／０．１％トゥイーン２０中に１：１０，０００希釈した。ＡＢＴＳ（５０-６６-００、ＫＰＬ）を基質として使用した。１％ＳＤＳの０．１ｍＬ／ウェルの添加によって反応を停止させた後、４０５ｎｍで吸光度を読み取った。

【実施例３８】

【０５３４】

Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（1-３５）の精製

Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[１-３５]の発現は、本明細書の上述の実施例３において記載されているとおりであった。凍結したＥ．コリペースト（１８ｇ）を室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ８．０の２００ｍＬと組み合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬの二ワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、細胞可溶化液を、４℃、２２，０００ｇで１５分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを１％デオキシコール酸２００ｍＬ中に再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで１５分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、２００ｍＬの水中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで１５分間遠心分離した。次に、３２ｍＬの８ＭグアニジンＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に、ペレット（３．２ｇ）を溶解した。次に、室温、２７，０００ｇで１５分間、ペレット溶液を遠心分離した後、再折りたたみ緩衝液（３Ｍ尿素、２０％グリセロール、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、１ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ９．５）５００ｍＬへ、４℃で激しく撹拌しながら、上清５ｍＬを移動させた。次に、撹拌速度を低下させ、４℃で２日間、温置を続行した。次に、再折りたたみ溶液を-７０℃で保存した。

【０５３５】

保存した再折りたたみ液を解凍した後、水２Ｌで希釈し、１Ｍ H_3PO_4 を使用して、ｐＨを７．３へ調整した。次に、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、７℃、２０ｍＬ／分でＳ-緩衝液Ａ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、ｐＨ７．３）中の６０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＳＰ-ＦＦ（内径２．６ｃｍ）カラムへと負荷した。次に、カラムをＳ-緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から６０％までのＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭ NaH_2PO_4、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．３）の直線勾配で溶出した後、７℃、１０ｍＬ／分で１００％Ｓ-緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、７℃、１ｍＬ／分でＰＢＳ中の１ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａ ＨｉＴｒａｐカラムへと前記プールを負荷した。次に、カラムを２０ｍＭの NaH_2PO_4、ｐＨ６．５、１Ｍ ＮａＣｌの数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０で溶出した。溶出ピークへ、３Ｍ酢酸ナトリウム０．０１２５容積（２５ｍＬ）を添加した。

【０５３６】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬの水中に希釈した組み合わせたプール５０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図４６Ａ）。３０，４１０ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が２．５６ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ

-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図４６Ｂ）。次に、５０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９でＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物２０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図４６Ｃ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ中に希釈する（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液１ｍＬをＭＡＬＤＩ試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。次に、生成物を-８０℃で保存した。

【０５３７】

「Ｆｃ-Ｌ-ＳｈＫ[１-３５]」とも呼ばれる、精製されたＥ．コリ由来のＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[１-３５]によるヒトＫｖ１．３の遮断のためのＩＣ$_{50}$を、（本明細書の以下の実施例５０における）表３５に示す。

【実施例３９】

【０５３８】

細菌で発現したＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ（２-３５）の精製

Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[２-３５]の発現は、本明細書の上述の実施例４において記載されているとおりであった。冷凍したＥ．コリペースト（１６．５ｇ）を室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ８．０の２００ｍＬと組み合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、２２，０００ｇで１５分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、２００ｍＬの１％デオキシコール酸中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで１５分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、２００ｍＬの水中にペレットを再懸濁した後、４℃、２２，０００ｇで15分間遠心分離した。次に、３９ｍＬの８Ｍグアニジン　ＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に、ペレット（３．９ｇ）を溶解した。次に、室温、２７，０００ｇで１５分間、ペレット溶液を遠心分離した後、再折りたたみ緩衝液（３Ｍ尿素、２０％グリセロール、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、１ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ９．５）５００ｍＬへ、４℃で激しく撹拌しながら、上清５ｍＬを移動させた。次に、撹拌速度を低下させ、４℃で２日間、温置を続行した。次に、再折りたたみ溶液を-７０℃で保存した。

【０５３９】

保存した再折りたたみ液を解凍した後、水２Ｌで希釈し、１Ｍ　Ｈ$_3$ＰＯ$_4$を使用して、ｐＨを７．３へ調整した。次に、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターで、ｐＨ調整した材料をろ過し、７℃でＳ-緩衝液Ａ（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、ｐＨ７．３中の６０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＳＰ-ＦＦ（内径２．６ｃｍ）カラムへ２０ｍＬ／分で負荷した。次に、カラムをＳ-緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、０％から６０％までのＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．３）の直線勾配で溶出した後、７℃、１０ｍＬ／分で１００％Ｓ-緩衝液Ｂへの工程で溶出した。望ましい生成物を含有する画分をプールし、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した。次に、７℃、２ｍＬ／分でＰＢＳ中の１ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ｒＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ　ＨｉＴｒａｐカラムへ前記プールを負荷した。次に、カラムを２０ｍＭのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、ｐＨ６．５、１Ｍ　ＮａＣｌの数カラム容積で洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０で溶出した。溶出ピークへ、３Ｍ酢酸ナトリウム０．０１２５容積（１８ｍＬ）を添加し、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターで試料をろ過した。

【０５４０】

次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬの水中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図４０Ａ）。２９，２８２ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が３．２０ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図４０Ｂ）。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９でＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物５０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図４０Ｃ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ中に希釈する（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）ことによって、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液１ｍＬをＭＡＬＤＩ試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した（図４０Ｄ）。次に、生成物を-８０℃で保存した。

【０５４１】

「Ｆｃ-Ｌ-ＳｈＫ[２-３５]」とも呼ばれる、精製されたＥ．コリ由来のＦｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ[２-３５]によるヒトＫｖ１．３の遮断のためのIC_{50}を、（本明細書の以下の実施例５０における）表３５に示す。

【実施例４０】

【０５４２】

細菌で発現したＦｃ-Ｌ１０-Ｏｓｋ１の精製

冷凍したＥ．コリペースト（１２９ｇ、実施例１０参照）を室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ７．８の１２９０ｍＬと組み合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬの二ワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、１７，７００ｇで１５分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、１％デオキシコール酸１２９０ｍＬ中にペレットを再懸濁し、４℃、１７，７００ｇで１５分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、１２９０ｍＬの水中にペレットを再懸濁した後、４℃、１７，７００ｇで１５分間遠心分離した。次に、１６０ｍＬの８ＭグアニジンＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に、ペレット８ｇ（合計１６．３ｇ）を溶解した。次に、ペレット溶液１００ｍＬを１Ｍ　ＤＴＴ１ｍＬとともに、３７℃で６０分間温置した。再折りたたみ緩衝液（１Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、２．５ｍＭＥＤＴＡ、１．２ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ１０．５）５０００ｍＬへ、激しく撹拌しながら４℃、２ｍＬ／分で、還元した材料を移した。次に、撹拌速度を低下させ、温置を４℃で３日間続行した。

【０５４３】

酢酸を使用して、再折りたたみ液のｐＨを８．０に調整した。次に、ｐＨ調整した材料を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、室内の５０Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａカラム（内径２．６ｃｍ）で、８℃でＱ-緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス、ｐＨ８．５）中の５０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｑセファロース-ＦＦ（内径２．６ｃｍ）カラムへ１０ｍＬ／分で負荷した。負荷した後、Ｑセファロースカラムを回路から除去し、残存するクロマトグラフィーをタンパク質Ａカラムで実施した。カラムをＱ-緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０への工程を使用して溶出した。望ましい生成物を含有する画分をプールし、Ｓ-緩衝液Ａ（２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．０）中の５０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＳＰ-セファロースＨＰカラム（内径２．６ｃｍ）へ、８℃、２０ｍＬ／分で即時負荷した。次に、カラムをＳ-緩衝液Ａの

数カラム容積で洗浄した後、５％から６０％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭNaH_2PO_4、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配の後、１００％Ｓ－緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析した。望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした後、８℃、５ｍＬ／分で、ＭＥＰ緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス、２００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ８．０）中の７５ｍＬのＭＥＰ　Ｈｙｐｅｒｃｅｌカラム（内径２．６ｃｍ）へ適用した。５％から５０％までの直線勾配のＭＥＰ緩衝液Ｂ（５０ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ４．０）でカラムを溶出した後、１００％ＭＥＰ緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした。

【０５４４】

次に、１０ｋＤａメンブレンを備えたＰａｌｌ　Ｊｕｍｂｏ－Ｓｅｐを使用して、ＭＥＰプールを約２０ｍＬまで濃縮した後、同一メンブレンを使用して製剤緩衝液（２０ｍＭNaH_2PO_4、２００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ７．０）と緩衝液交換した。次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬの製剤緩衝液中に希釈した組み合わせたプール５０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図４１Ａ）。３０，５５８ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，７２０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、材料の濃度が４．１２ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、前記材料の純度を評価した（図４１Ｂ）。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９でＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物１２３μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図４１Ｃ）。次に、ＲＰ－ＨＰＬＣカラム（Ｖｙｄａｃ　C_4、１×１５０ｍｍ）を通じて試料約４μｇをクロマトグラフィーにかけることによって、生成物を質量スペクトル分析へ供した。溶媒Ａは、水中の０．１％トリフルオロ酢酸であり、溶媒Ｂは、９０％アセトニトリル、１０％水中の０．１％トリフルオロ酢酸であった。８０μＬ／分の流速で、１０％溶媒Ｂ中でカラムをあらかじめ平衡化した。１０％ないし９０％の溶媒Ｂの直線勾配を３０分かけて使用して、タンパク質を溶出した。溶出液の一部をＬＣＱイオントラップ質量分析計へ配向させた。質量分析計の製造者によって提供されるＢｉｏｗｏｒｋｓソフトウェアを使用して、質量スペクトルの逆重畳を行った（図４１Ｄ）。生成物を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した後、－８０℃で保存した。

【０５４５】

Ｅ．コリにより発現されたＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１プレップの収量は、細胞ペースト４０ｇから（１２９ｇ×（８ｇ／１６．３ｇ）×（１００ｍＬ／１６０ｍＬ）＝３９．６ｇ、四捨五入により４０ｇ）８１ｍｇであり、純度は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって判断すると、８０％よりも大きく、ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって判断する予想されと二量体として走行しており、質量はＭＳによって判断すると、予想された分子量の範囲内であった。

【０５４６】

精製されたＥ．コリ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１（「Ｆｃ－Ｌ－ＯＳＫ１」とも呼ばれる。）によるヒトＫｖ１．３の遮断に対するIC_{50}が、（本明細書の以下の実施例５０中の）表３５に示されている。

【実施例４１】

【０５４７】

哺乳類細胞によって発現されるＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］、及びＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］

Ｋｖ１．３の阻害剤であるＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ

]、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］、及びＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］を、哺乳類細胞中で発現させた。リンカー配列及びＫｖ１．３阻害剤ペプチドＳｈＫ［１－３５］の単量体へ、インフレームで融合されるヒトＩｇＧ１のＦｃ領域をコードするＤＮＡ配列を後述のように構築した。哺乳類細胞（ＨＥＫ２９３及びチャイニーズハムスター卵巣細胞）からペプチボディを発現及び精製するための方法は、本明細書に開示されている。

【０５４８】

Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］及びＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］発現ベクターの構築のために、２つの終止コドンを有する、４つのグリシン及び１つのセリンアミノ酸リンカーへ各々連結され、以下に示されるようにＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限部位によって隣接され完全長の遺伝子ＯＳＫ１、ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］、ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］及びＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］を作製させるためにＰＣＲ戦略を採用した。

【０５４９】

以下に示される配列を有するＯＳＫ１、ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］、ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］及び［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］ＯＳＫ１の各々に対する２つのオリゴを、９５℃－３０秒、５５℃－３０秒、７５℃－４５秒で３５サイクル、ＰｆｕＴｕｒｂｏ ＨｏｔＳｔａｒｔ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を使用するＰＣＲ反応において使用した。ＢａｍＨＩ（ｇｇａｔｃｃ）及びＮｏｔＩ（ｇｃｇｇｃｃｇｃ）制限部位に下線が付されている。

【０５５０】

【化５８】

OSK1:

ﾌｫﾜｰﾄﾞﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg aag tgc aag atc agc cgc cag tgc ctg gag ccc tgc aag aag gcc g（配列番号：876）；

ﾘﾊﾞｰｽﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc atg ccg gcc ttc ttg cag ggc tcc a（配列番号：877）；

OSK1[K7S]:

ﾌｫﾜｰﾄﾞﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg agc tgc aag atc agc cgc cag tgc ctg gag ccc tgc aag aag gcc g（配列番号：878）；

ﾘﾊﾞｰｽﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc atg ccg gcc ttc ttg cag ggc tcc a（配列番号：879）；

OSK1[E16K,K20D]:

ﾌｫﾜｰﾄﾞﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg aag tgc aag atc agc cgc cag tgc ctg aag ccc tgc aag gac gcc g（配列番号：880）；

ﾘﾊﾞｰｽﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc atg ccg gcg tcc ttg cag ggc ttc a（配列番号：881）；

OSK1[K7S,E16K,K20D]:

ﾌｫﾜｰﾄﾞﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gga tcc gga gga gga gga agc ggc gtg atc atc aac gtg agc tgc aag atc agc cgc cag tgc ctg aag ccc tgc aag gac gcc g（配列番号：882）；

ﾘﾊﾞｰｽﾌﾟﾗｲﾏｰ：cat gcg gcc gct tac tac ttg ggg gtg cag tgg cac ttg ccg ttc atg cac ttg ccg aag cgc atg ccg gcg tcc ttg cag ggc ttc a（配列番号：883）

【０５５１】

得られたＰＣＲ産物を、４％アガロースゲル上で１５５ｂｐバンドとして分離した。ＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して１５５ｂｐＰＣＲ産物を精製した後、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ（Ｒｏｃｈｅ）制限酵素で消化し、アガロースゲルをゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）によって精製した。同時に、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ-ｈＦｃ-Ｓｈｋ[２-３５]ベクターをＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素で消化し、大きな断片をゲル抽出キットによって精製した。ゲル精製されたＰＣＲ断片を、精製された大きな断片へ連結し、Ｔｏｐ１０Ｆ’（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中に形質転換した。形質転換された細菌コロニー由来のＤＮＡを単離し、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ制限酵素で消化し、２％アガロースゲル上で分離した。予想されたパターンを生じるＤＮＡを配列決定へ供した。クローンの数個の配列の分析は、上述の配列と１００％一致したが、大規模プラスミド精製のために各遺伝子から１つのクローンのみを選択した。Ｆｃ及びリンカー領域を確認するため、ｐＣＭＶｉベクター中のＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]、及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]のＤＮＡを再配列決定し、配列は上述の配列と１００％同一であった。Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]、及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]の配列及び模式図による表示を、図４２ＡないしＢ、図４３ＡないしＢ、図４４ＡないしＢ及び図４５ＡないしＢにそれぞれ示す。

【０５５２】

ｐＣＭＶｉタンパク質中のＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]の一過性形質移入発現において使用されるＨＥＫ-２９３細胞を、ＤＭＥＭ高グルコース（Ｇｉｂｃｏ）、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ、Ｇｉｂｃｏ製）、１× 非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、Ｇｉｂｃｏ製）及び１× ペニシリン／ストレプトマイシン／グルタミン（Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ／Ｇｌｕ、Ｇｉｂｃｏ製）を含有する増殖培地中で培養した。ＦｕＧＥＮＥ６（Ｒｏｃｈｅ）を使用して、フェノール／クロロホルム抽出されたｐＣＭＶｉプラスミド中のＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]、及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]各５．６μｇを、ＨＥＫ-２９３細胞中に形質移入した。細胞を２４時間回復させた後、ＤＭＥＭ高グルコース、１× ＮＥＡＡ及び１× Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ／Ｇｌｕ培地中に配置した。本明細書の以下の実施例５０に記載のプロトコールを使用して、これらの形質移入されたＨＥＫ-２９３細胞によって、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]を培養上清から精製した。

【０５５３】

培養上清１５μＬを自家４× 負荷緩衝液（β-メルカプトエタノールなし）と混合し、Ｎｏｖｅｘ　Ｘｃｅｌｌ　ＩＩ装置を使用して、ＢｅｎｃｈＭａｒｋ染色済みタンパク質ラダー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）２０μＬとともに５× ランニング溶液（２５ｍＭトリス塩基、１９２ｍＭグリシン、３．５ｍＭＳＤＳ）中で１０１Ｖ／４６ｍＡで２時間、Ｎｏｖｅｘ４ないし２０％トリス-グリシンゲル上で電気泳動した。次に、エレクトロブロット緩衝液（２５ｍＭトリス塩基、１９２ｍＭグリシン、２０％メタノール）中に、ゲルを

５分間浸漬した。エレクトロブロット緩衝液中に、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製ニトロセルロースメンブレン（カタログ番号ＬＣ２００、孔サイズ０．２μｍ）を浸漬した。製造者の説明書（Ｂｉｏ-Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）に従って、Ｍｉｎｉ　Ｔｒａｎｓ-Ｂｌｏｔ　Ｃｅｌｌモジュールを使用して、あらかじめ浸漬されたゲルを、ＰＶＤＦメンブレンへ３００ｍＡで２時間ブロットした。０．１％トゥイーン２０含有トリス緩衝塩類溶液、ｐＨ７．５（ＴＢＳＴ）中でブロットをすすいだ。次に、まずＴＢＳＴ中の５％ミルク（Ｃａｒｎａｔｉｏｎ）中に、室温で１時間、ブロットを浸漬した後、１回の洗浄につき１０分間で３回、ＴＢＳＴ中で洗浄した。次に、５％ミルク緩衝液を加えたＴＢＳＴ中のＨＲＰの結合したヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃγ）抗体（Ｐｉｅｒｅｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙカタログ番号３１４１３）の１：１０００希釈とともに、室温で１時間振とうしながら温置した。次に、室温で１回の洗浄につき１５分間、ＴＢＳＴ中で３回、ブロットを洗浄した。製造者の説明書に従ってＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　ＢｉｏｔｅｃｈのＥＣＬウェスタンブロット検出試薬を使用して、一次抗体を検出した。ＥＣＬ検出に際し、ウェスタンブロット分析は、非還元型ゲル条件下で６６ｋＤａの予想されたサイズを表示した（図４６）。

【０５５４】

ｐＣＭＶｉベクター中のＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ]、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１[Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ]インサートを含有するプラスミドを、ＸｂａＩ及びＮｏｔＩ（Ｒｏｃｈｅ）制限酵素で消化し、ゲル精製した。ＳｐｅＩ及びＮｏｔＩ及びＳａｌＩ（Ｒｏｃｈｅ）で消化したｐＤＳＲα-２４（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）発現ベクターへ、前記インサートを個々に連結した。得られるコンストラクトの完全性をＤＮＡ配列決定によって確認した。クローンの数個の配列の分析は、上述の配列と１００％の一致を与えたが、大規模プラスミド精製のために１つのクローンのみを選択した。

【０５５５】

Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１タンパク質の安定した発現において使用されるＡＭ１　ＣＨＯｄ-（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）細胞を、ＤＭＥＭ高グルコース、１０％ウシ胎仔血清、１×ヒポキサンチン／チミジン（ＨＴ、Ｇｉｂｃｏ製）、１×ＮＥＡＡ及び１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ／Ｇｌｕを含有するＡＭ１　ＣＨＯｄ増殖培地中で、Ｆｃ-ＬＩ０-ＳｈＫ[１-３５]タンパク質の安定した発現に使用されるＡＭ１ＣＨＯｄ（Ａｍｇｅｎ　Ｐｒｏｐｒｉｅｔａｒｙ）細胞を培養した。ＦｕＧｅｎｅ６を使用して、ｐＤＳＲα-２４-Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１プラスミド５．６μｇをＡＭ１　ＣＨＯｄ-細胞に形質移入した。形質移入から２４時間後、ＤＨＦＲ選択培地（ＤＭＥＭ高グルコースプラス１０％透析済みウシ胎仔血清（ｄＦＢＳ）、１×ＮＥＡＡ及び１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ／Ｇｌｕ）中へ、細胞を１：１１で分割し、コロニー選択の場合には１：５０で分割した。ＤＨＦＲ選択培地中で１３日間、細胞選択した。得られたコロニーの１０個の１０ｃｍ^{2}プールを１０個のＴ-１７５フラスコへ展開した後、１０個のローラー瓶にスケールアップし、ＡＭ１　ＣＨＯｄ産生培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２（１：１）、１×ＮＥＡＡ、１×ピルビン酸ナトリウム（ピルビン酸Ｎａ）、１×Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ／Ｇｌｕ及び１．５％ＤＭＳＯ）のもとで培養した。馴化培地を回収し、１週間置きに交換した。得られた馴化培地６Ｌを０．４５μｍ酢酸セルロースフィルター（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ａｃｔｏｎ、ＭＡ）でろ過し、図４７に示されるようにＳＤＳ-ＰＡＧＥ分析によって特徴付けた。次に、精製のために、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙに移した。

【０５５６】

ＤＨＦＲ選択培地上で１３日後に、１２個のコロニーを選択し、１個の２４ウェルプレートへと摘出した。前記プレートを１週間増殖させた後、ＡＭ１ＣＨＯｄ産生培地へ、４８ないし７２時間移し、培養上清を回収した。培養上清５μＬをスクリーニングするため、同一のＨＲＰ結合型ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃγ）抗体によって検出する一過性ウェスタンブロット分析と同様のウェスタンブロッティングによって、発現レベルを評価した。１２個の全ての安定したクローンは、６６ｋＤａの予想されたサイズでの発現を示した。２

つのクローン、Ａ３及びＣ２を選択し、一次クローンＣ２に対するバックアップとしてのＡ３とともに凍結するため、Ｔ１７５フラスコへ展開した（図４８）。

【０５５７】

選択培地を使用して、Ｃ２クローンを１５個のローラー瓶（Ｃｏｒｎｉｎｇ）へスケールアップし、集密状態まで増殖させた。次に、培地を産生培地と交換し、１週間温置させた。馴化培地を採集し、１週間置きに交換した。０．４５μｍ酢酸セルロースフィルター（Ｃｏｒｎｉｎｇ、Ａｇｔｏｎ、ＭＡ）で、得られた培養上清１５Ｌをろ過し、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ分析によって特徴付けた（データ非表示）。以下の本明細書の実施例４２に記載されているとおり、さらなる精製を行った。

【実施例４２】

【０５５８】

哺乳類細胞によって発現されたＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｋ７Ｓ）、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の精製

Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１の精製

ＣＨＯ（ＡＭ１ ＣＨＯｄ-）細胞培養上清約６Ｌ（上述の実施例４１参照）を、３５ｍＬのモノクローナル抗体選択カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）へ、７℃、１０ｍＬ／分で負荷し、二価の陽イオンを有さないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）の数カラム容積で前記カラムを洗浄し、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０にする工程で試料を溶出した。Ｓ-緩衝液Ａ（２０ｍＭＮａＨ２ＰＯ４、ｐＨ７．０）中の室内の６５ｍＬのＳＰ-ＨＰカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）へ、７℃、１０ｍＬ／分で、モノクローナル抗体選択溶出液を直接負荷した。モノクローナル抗体選択カラムをはずした後、数カラム容積のＳ-緩衝液Ａで、ＳＰ-ＨＰカラムを洗浄した後、５％から６０％までのＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配を１０ｍＬ／分で使用して展開した後、７℃で１００％Ｓ-緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルーで染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、画分を分析し、これらのデータを基に、望ましい生成物を含有する画分をプールした。次に、Ｐａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｊｕｍｂｏｓｅｐ １０Ｋ Ｏｍｅｇａ遠心限外ろ過装置を使用して、プールした材料を約２０ｍＬに濃縮した。次に、２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、ｐＨ７．０の２０ｍＬで希釈することによって、濃縮した材料を緩衝液交換し、Ｊｕｍｂｏｓｅｐ １０Ｋ Ｏｍｅｇａフィルターを使用して２０ｍＬに再濃縮した。次に、２０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ７．０の２０ｍＬで材料を希釈した後、２２ｍＬに再濃縮した。次に、緩衝液交換した材料を、室温、１ｍＬ／分で、０．２２μｍ、２５ｍｍのＭｕｓｔａｎｇ Ｅメンブレンを有するＰａｌｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ａｃｒｏｄｉｓｃでろ過した。次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈したろ過済み材料50μＬに対して、スペクトルの走査を実施した（図４９Ａ、黒のトレース）。３０，３７１ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，４１０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が４．９６ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図４９Ｂ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液中に試料を３０倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｅｎｄｏｓａｆｅ-ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１．８ＥＵ／タンパク質ｍｇであった。次に、５０ｍＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９でＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へ、１ｍＬ／分で注入された生成物１４９μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図４９Ｃ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）へと希釈することによ

って、生成物を質量分析へ供した。得られた溶液１ｍＬをＭＡＬＤＩ試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した（図４９Ｄ）。次に、生成物を-８０℃で保存した。

【０５５９】

哺乳類Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１プレップに関する収量は、６Ｌから１１５ｍｇであり、純度は、ＳＤＳ-ＰＡＧＥによる判断によれば９０％超であり、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１は、ＳＥＣ-ＨＰＬＣによる判断によれば予想された二量体として測定され、質量は、ＭＳによる判断によれば予想された範囲であった。

【０５６０】

ヒトＫｖ１．３及びヒトＫｖ１．１を遮断する上での精製されたＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１の活性を、本明細書の以下の実施例４３に記載する。

【０５６１】

Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｋ７Ｓ）、Ｆｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）及びＦｃ-Ｌ１０-ＯＳＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）の精製

形質移入されたＨＥＫ-２９３による培養上清約５００ｍＬ（上述の実施例４１参照）を、モノクローナル抗体選択樹脂（１．５ｍＬ）（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）の６５％スラリー及び５００μＬの２０％NaN_3と合わせた。次に、スラリーを４℃で３日間静かに撹拌した後、ブレーキを使用せずに４℃、１０００ｇで５分間遠心分離した。次に、上清の大部分を吸引し、ペレット中に残存するスラリーを１４ｍＬのコニカルチューブへ転移させ、二価の陽イオンを含まないダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ）１２ｍＬと組み合わせた。低ブレーキを使用しながら、前記スラリーを４℃、２０００ｇで１分間遠心分離し、上清を吸引した。ＰＢＳ洗浄周期をさらに３回反復した。次に、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０の１ｍＬを添加し、室温で静かに５分間撹拌することによって、結合されたタンパク質を溶出した。次に、低ブレーキを使用しながら、前記スラリーを４℃、２０００ｇで１分間遠心分離し、上清を第一溶出液として吸引した。溶出周期をさらに２回反復し、３つの全上清を合わせて単一プールとした。ｐＨを上昇させるために、酢酸ナトリウム（３Ｍ溶液３７．５μＬ）を溶出プールへ添加した後、１０ｋＤａ　ＳｌｉｄｅＡｌｙｚｅｒ（Ｐｉｅｒｃｅ）を使用して、１０ｍＭ酢酸、５％ソルビトール、ｐＨ５．０に対して室温で２時間透析した。透析緩衝液を交換し、透析を４℃で一晩続行した。次に、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターシリンジフィルターで、透析した材料をろ過した。次に、３０，３３０の算出された分子量及び３５，４１０$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、ろ過済み材料の濃度が１．２７ｍｇ／ｍＬであると測定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、ろ過済み材料の純度を評価した（図５０Ｂ）。次に、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒｓエンドトキシン特異的緩衝液中に試料を２５倍希釈したものを使用して、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｅｎｄｏｓａｆｅ-ＰＴＳシステム（０．０５ないし５ＥＵ／ｍＬ感度）を使用して、エンドトキシンレベルを測定した結果、１ＥＵ／タンパク質ｍｇ未満であった。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９でＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物５０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図５０Ｃ）。次に、試料１μＬをシナピン酸１０μＬ（０．０５％トリフルオロ酢酸、５０％アセトニトリル中１０ｍｇ／ｍＬ）中に希釈することによって、生成物を質量スペクトル分析へ供した。得られた溶液１ｍＬをＭＡＬＤＩ試料プレート上に点状滴下した。試料を乾燥させた後、窒素レーザーの装備されたＶｏｙａｇｅｒ　ＤＥ-ＲＰ飛行時間質量分析装置を使用して分析した（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）。２５ｋＶ

の加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した（図５０Ｄ）。次に、生成物を－８０℃で保存した。

【０５６２】

図５１ＡないしＤは、以下の点を除いて、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）分子に関するものと同一プロトコールを使用して実施した、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）に対する精製及び分析からの結果を示す。３０，３５７ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，４１０の算出された吸光係数を使用して、濃度は１．５９ｍｇ／ｍＬであることが明らかとなった。発熱物質レベルは、３２倍希釈を使用して、１ＥＵ／ｍｇ未満であることが明らかとなった。

【０５６３】

図５２ＡないしＤは、以下の点を除いて、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ）分子（上述）に関するものと同一プロトコールを使用して実施した、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯｓＫ１（Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ）に対する精製及び分析からの結果を示す。３０，３１６ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３５，４１０の算出された吸光係数を使用して、濃度は０．８１ｍｇ／ｍＬであることが明らかとなった。発熱物質レベルは、１６倍希釈を使用して、１ＥＵ／ｍｇ未満であることが明らかとなった。

【０５６４】

ヒトＫｖ１．３及びヒトＫｖ１．１を遮断する上での精製されたＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］及びＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］の活性を、本明細書の以下の実施例４３に記載する。

【実施例４３】

【０５６５】

ＯＳＫ１及びＯＳＫ１ペプチボディ類縁体の電気生理学

カリウムチャネルファミリーのサブタイプであるヒトＫｖ１．１及びＫｖ１．３チャネルに及ぼす影響を評価するために、アジアサソリであるオルトキルススクロビキュロサス（Ｏｒｔｈｏｃｈｉｒｕｓ　Ｓｃｒｏｂｉｃｕｌｏｓｕｓ）の毒液の３８残基ペプチド毒素（ＯＳＫ１）を合成した（実施例４１参照）。ＨＥＫ２９３細胞発現系及び電気生理学の使用によって、ヒトＫｖ１．１及びＫｖ１．３チャネルを阻害する上での合成ＯＳＫ１の有効性及び選択性を評価した（図５３）。安定して発現したＫｖ１．３チャネルのホールセルパッチクランプ記録によって、合成ＯＳＫ１ペプチドは、Ｋｖ１．１と比較したとき、ヒトＫｖ１．３を阻害する上でより有力であることが明らかとなった（表３３）。

【０５６６】

ＯＳＫ１ペプチボディを作製するための、抗体へのＯＳＫ１ペプチド毒素の融合

血漿半減期を改善し、ＯＳＫ１ペプチド毒素が中枢神経系を貫通するのを防止するため、本明細書の実施例４１に記載されるとおり、１０個のアミノ酸残基のリンカー鎖長を介して、ヒト抗体ＩｇＧ１のＦｃ断片へＯＳＫ１ペプチド毒素を融合した。この融合によって、合成ＯＳＫ１ペプチドと比較すると、Ｋｖ１．３の有効性は5倍まで低下した。しかしながら、合成ペプチド単独のもの（４倍、表３３及び図５４）と比較すると、ＯＳＫ１のＫｖ１．１に対する選択性は２１０倍まで有意に改善した。

【０５６７】

ＯＳＫ１ペプチボディ（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１）の修飾

ＯＳＫ１は、集合的にα－ＫＴｘ３と呼ばれるサソリ毒素の他のメンバーと６０ないし８０％の配列相同性を共有する。ＯＳＫ１及びα－ＫＴｘ３ファミリーの他のメンバーの配列アラインメントによって、位置１２、１６、２０及び３６における４つの異なる構造的な差異が明らかとなった。ＯＳＫ１のこれらの構造的な差異は、他のカリウムチャネルに対するそれらの多様な活性において重要な役割を果たしているものと推測され、これは、α－ＫＴｘ３ファミリーの他のメンバーでは観察されない。従って、Ｋｖ１．２とのヘ

テロ四量体として、主に中枢神経系中に見出されるＫｖ１．１などの他のカリウムチャネルに対する選択性に及ぼす影響を評価するために、位置１６及び２０に存在する２つのアミノ酸残基を、ＯＳＫ１配列内のより保存されたアミノ酸残基へと回復させた。それぞれ保存されたリジン及びアスパラギン酸残基を、位置１６のグルタミン酸、及び位置２０のリジンと置換することによって（すなわち、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］）、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１の効力と比較したとき、効力に有意な変化は観察されなかった（１．３倍差、図５６及び表３３）。しかしながら、この二重変異によって、Ｋｖ１．１に対する遮断活性が排除された。Ｋｖ１．１／Ｋｖ１．３の選択性の比は４０３倍であり、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１に関する選択比（２１０倍）に比べて有意に向上した。位置７のリジンからセリンへの単一アミノ酸突然変異（Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ］）は、Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１の有効性及び選択性と比較すると、有効性及び選択性が、それぞれ２倍及び１．３倍までわずかに変化した（図５５及び表３３）。Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１［Ｋ７Ｓ，Ｅ１６Ｋ，Ｋ２０Ｄ］を作製させるために、３つの残基全てを突然変異させると、有効性が著しく低下した（図５７及び表３３）。

【０５６８】

表３３の結果によって示されるように、ヒト抗体ＩｇＧ１のＦｃ断片へＯＳＫ１ペプチド毒素を融合させることによって、Ｋｖ１．１に対する選択性が劇的に改善されたが、Ｋｖ１．３に対する標的有効性は低下した。２つの重要な位置にある２残基がα－ＫＴｘ３ファミリーの他のメンバーで見られる保存された残基へ回復されると、Ｋｖ１．１に対する選択性をさらに改善した。

【０５６９】

【表３４】

表３３は、ｈＫｖ１．３及びｈＫｖ１．１チャネルに対するＯＳＫ１及びＯＳＫ１類縁体のＩＣ５０値の要約を示している。全ての類縁体は、ｈＫｖ１．３に対する有効性に基づいて順位付けされる。全てのＯＳＫ１類縁体に関するｈＫｖ１．１／ｈＫｖ１．３の選択性の比も表に示される。

化合物	hKv1.3:IC_{50} [pM]	hKv1.1:IC_{50} [pM]	hKv1.1/hKv1.3
合成 OSK1	39	160	4
Fc-L10-OSK1	198	41600	210
Fc-L10-OSK1[E16K, K20D]	248	100000	403
Fc-L10-OSK1[K7S]	372	100000	269
Fc-L10-OSK1[K7S, E16K, K20D]	812	10000	12

【実施例４４】

【０５７０】

ラットにおけるＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］分子の薬物動態学的研究

約２４ｋＤａの２０Ｋ　ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］分子及び約４ｋＤａの小固有ＳｈＫペプチドの静脈内（ＩＶ）薬物動態学的特性を、スプラーグドーリー系ラットで測定した。固有ＳｈＫペプチド及び新規の本発明の２０Ｋ　ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］分子に関するＩＶ用量は、１ｍｇ／ｋｇであった。この用量は、これら２つの分子の等しいモル量を表した。ラットの平均体重は約０．３ｋｇであり、用量及び分子に関して各２匹のラットを使用した。ＩＶ注射後の多様な時点で採血し、血清約０．１ｍＬを回収した。分析時まで、血清試料を－８０℃で冷凍保存した。

【０５７１】

電気生理学のためのアッセイプレート調製

薬物動態学的研究由来の２０Ｋ　ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］分子又は固有ＳｈＫペプ

チドを含有するラット血清試料を凍結した。実験前に、各試料を室温で解凍し、一定分量（７０ないし８０μＬ）を９６ウェルポリプロピレンプレート中の１ウェルへ転移させた。アッセイプレートを調製するため、検査溶液を付与するために、薬物動態学的血清試料から何回も希釈した。薬物動態学的研究由来の血清試料を、１０％リン酸緩衝塩類溶液（ＰＢＳ、Ca^{2+}及びMg^{2+}含有）へと希釈した。薬物動態学的研究から得られた血清試料中の新規の本発明の２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]分子の量を測定する場合、検査溶液中の血清最終濃度は、９０％、３０％、１０％、３．３％及び１．１％であった。精製された２０Ｋ　ＰＥＧ-Ｓｈｋ[１-３５]標準阻害曲線も、Ａｓｓａｙ　Ｐｌａｔｅ中に調製した。これを実施するため、精製された２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]分子（標準物質）の８点連続希釈液を、９０％、３０％、１０％、３．３％又は１．１％のラット血清に調製し、標準物質の最終濃度は、５０、１６．７、５．５、１．８５、０．６２、０．２１、０．０６８及び０．０２３ｎＭであった。

【０５７２】

電気生理学のための細胞調製

電位により活性化されるＫ$^{+}$チャネルであるＫｖ１．３を安定的に発現するＣＨＯ細胞を、実験の２日前に、Ｔ-１７５組織培養フラスコ中に（５×１０^{6}個の密度で）播種し、約９５％の集密状態まで生育させた。実験の直前に、ＰＢＳで細胞を洗浄した後、トリプシン（０．２５％）及びベルセン（１：５０００）の２ｍＬ混合物（１：１容積比）を使用して、３７℃で（３分間）剥離させた。その後、フラスコ中で、１０％ＦＢＳ、１×ＮＥＡＡ及Ｇ４１８の７５０μｇ／ｍＬを有する組織培地（Ｇｌｕｔａｍａｘ含有ＨＡＭのＦ-１２、ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号３１７６５）１０ｍＬ中に細胞を再懸濁し、約１０００ｒｐｍで１．５分間遠心分離した。得られた細胞ペレットを、ＰＢＳ中に、３ないし５×１０^{6}細胞／ｍＬで再懸濁した。

【０５７３】

ＩｏｎＷｏｒｋｓ電気生理学及びデータ分析

ＣＨＯ-Ｋｖ１．３細胞中のＫ$^{+}$電流を阻害するための血清中の検査溶液又は標準物質の能力を、自動電気生理学システムＩｏｎＷｏｒｋｓ　Ｑｕａｔｔｒｏを使用して研究した。細胞を再懸濁し、Ａｓｓａｙ　Ｐｌａｔｅ、Ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ　Ｐａｔｃｈ　Ｃｌａｍｐ（ＰＰＣ）ＰａｔｃｈＰｌａｔｅ並びに適切な細胞内緩衝液（９０ｍＭグルコン酸Ｋ、２０ｍＭＫＦ、２ｍＭＮａＣｌ、１ｍＭＭｇＣｌ２、１０ｍＭＥＧＴＡ、１０ｍＭＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．３５）及び細胞外緩衝液（Ca^{2+}及びMg^{2+}含有ＰＢＳ）をＩｏｎＷｏｒｋｓ　Ｑｕａｔｔｒｏに配置した。アンフォテリシンベースの穿孔パッチクランプ法を使用して、ＣＨＯ-Ｋｖ１．３細胞からの電気生理学記録を実施した。ＩｏｎＷｏｒｋｓ　Ｑｕａｔｔｒｏの電位クランプ回路素子を使用して、細胞を-８０ｍＶの膜電位に保持し、＋３０ｍＶへ４００ミリ秒、膜電位を停止させることによって電位活性型Ｋ$^{+}$電流を惹起させた。対照条件下、すなわち、実験開始時阻害剤の不存在下で、及び検査溶液又は標準物質の存在下での１０分間の温置の後に、Ｋ$^{+}$電流を惹起させた。４３０ミリ秒と４４０ミリ秒との間に、平均Ｋ＋電流振幅を測定し、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌスプレッドシートへ、データを転送した。検査溶液又は標準物質の各濃度の存在下でのＫ$^{+}$電流の振幅を、同一ウェル中の対照条件下でのＫ$^{+}$電流の百分率として表した。

【０５７４】

ラット血清の多様なレベルの各標準物質に対して標準物質阻害曲線を作製し、対照の電流百分率（ＰＯＣ）対ｎＭ濃度の対数として表した。対照の百分率（ＰＯＣ）は、阻害と逆相関しており、ここで、１００ＰＯＣは阻害が全く存在せず、０ＰＯＣは１００％阻害である。検査溶液内での薬物濃度の算出を可能にする方程式を導くために、前記曲線の選択された領域にわたる線形回帰を使用した。検査溶液中の薬物の濃度を算出するため、標準曲線の線形部分内の電流値のみを使用した。血清の所定レベルでの対応する標準曲線を、薬物レベルを算出するときの検査溶液の血清の同一レベルと常に比較した。ＳｈＫ及び２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]に対する標準曲線が、それぞれ図５８Ａ及び図５８Ｂに示されており、各図は、血清の所定の百分率での各標準物質に対する線形回帰方程式

を含んでいる。２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]標準曲線については、標準曲線の線形部分は２０ＰＯＣから７０ＰＯＣまでであり、検査溶液内での薬物濃度を算出するため、この範囲内に収まる検査溶液から得られた電流値のみを使用した。

【０５７５】

静脈内注射後における、本発明の新規２０Ｋ　ＰＥＧ　ＳｈＫ[１-３５]分子の薬物動態学的特性を図５９に示す。この曲線から、前記分子の終末半減期（$t_{1/2}$ｂ）は、６時間と１２時間の間の長さであると推定される。４８時間を超えると、薬物のレベルは、標準曲線の線形範囲の外側に収まり、算出されない。本発明の新規２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]分子の算出された6ないし１２時間の半減期は、Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．[Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．９８，１３９４２-１３９４７]によって以前に報告された固有のＳｈＫ分子の約０．３３時間（又は２０分）の半減期よりも実質的に長く、これは治療用分子の望ましい特徴である。ＳｈＫ対２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]の等モルの静脈内注射後のＫｖ１．３阻害剤の相対的なレベルの比較を、図６０に示す。５％血清検査溶液を検討する前記図から明らかなように、２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ[１-３５]分子は、２４時間超の間、Ｋｖ１．３電流の有意な抑制（７０ＰＯＣ未満）を示したのに対し、固有なＳｈＫペプチドは、最初の１時間にＫｖ１．３電流の阻害の有意なレベルを示したに過ぎず、１時間を超えると有意な遮断を示さなかった。本データは、自己免疫疾患の治療用治療薬としての２０Ｋ　ＰＥＧ　ＳｈＫ[１-３５]の望ましい特徴を再び示している。

【実施例４５】

【０５７６】

ＰＥＧ化された毒素ペプチドは、動物モデルにおいて重度の自己免疫性脳脊髄炎を抑制した

Ｋｖ１．３の２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ阻害剤は、ラットにおける重度の自己免疫性能脊髄炎を抑制する上で改善された有効性を示す。以前に記載された多発性硬化症の適応性転移型実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＡＴ-ＥＡＥ）モデル[Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６６，９３６]を使用して、本発明者は、本発明の新規２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ分子のインビボでの活性を検討し、その有効性をＳｈＫ毒素ペプチド単独の有効性と比較した。研究デザインを図６１に図示する。本インビボ研究からの結果を図６２及び図６３に示す。第１日から第３日まで１０μｇ／ｋｇで毎日皮下送達される２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ分子は、疾病の重度を有意に低下させ、生存性を亢進したのに対し、小さなＳｈＫペプチドの等モル投与量（１０μｇ／ｋｇ）で処理した動物は、重度の疾病を発症し、死亡した。

【０５７７】

３５個のアミノ酸の毒素ペプチドＳｈＫ（スティコダクチラ・ヘリアンサス（Ｓｔｉｃｈｏｄａｃｔｙｌａ　ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ）神経毒）をＢａｃｈｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅから購入し、Ｋｖ１．３を有力に遮断するために電気生理学によって確認した（本明細書の実施例３６参照）。２０Ｋ　ＰＥＧ　ＳｈＫ分子の合成、ＰＥＧ化、精製は、本明細書に上記されている。ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）に特異的な脳骨髄性ＣＤ４＋ラットＴ細胞系ＰＡＳは、Ｅｖｅｌｙｎｅ　Ｂｅｒａｕｄ博士から入手した。インビトロでの前記細胞の維持及びＡＴ-ＥＡＥモデルにおけるそれらの使用は、以前に記載されている[Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）ＰＮＡＳ　９８，１３９４２]。抗原刺激又はＭＢＰ及び照射された胸腺細胞（２日）による活性化のラウンドを交互に行い、Ｔ細胞成長因子による伝播（５日）によって、ＰＡＳ　Ｔ細胞をインビトロで維持した。ＰＡＳ　Ｔ細胞（3×10^5／ｍＬ）は、前記細胞を、１０μｇ／ｍＬのＭＢＰ及び15×10^6／ｍＬの同系の照射された（３５００ラド）胸腺細胞とともに温置することを包含した。インビトロでの活性化から２日後に、１０ないし15×10^6個の生存可能なＰＡＳ　Ｔ細胞を、6ないし１２週齢の雌のルイスラット（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）の尾静脈に注射した。媒体（ＰＢＳ中２％ルイスラット血清）、２０Ｋ　ＰＥＧ-ＳｈＫ又はＳｈＫの毎日の皮下注射を第-１日から第３日ま

で付与し（図６１）、第－１日は、ＰＡＳ　Ｔ細胞の注射（第０日）の１日前を表す。媒体で処理されたラットでは、一過性のＥＡＥが、ＰＡＳ　Ｔ細胞の注射後４ないし５日目に発症した（図６２）。阻害剤のレベルの分析のため、第４日目に眼窩後部の出血により、第８日に心臓穿刺により、血清を回収した。第－１、４、６及び８日目にラットの体重を測定した。細胞転移当日（第０日）から第３日まで１日に１回、第４日から第８日まで１日に２回、動物を盲検した。各肢及び尾部の不全麻痺の程度の全体的なスコアとして、臨床徴候を評価した。臨床的なスコア化は、０＝徴候なし、０．５＝遠位跛行尾部、１．０＝跛行尾部、２．０＝軽度不全対麻痺、運動失調、３．０＝中等度不全対麻痺、３．５＝片後肢麻痺、４．０＝完全後肢麻痺、５．０＝完全後肢麻痺及び失禁、５．５＝四肢麻痺、６．０＝瀕死状態又は死亡であった。５．５のスコアに到達しているラットを安楽死させた。

【０５７８】

ＥＡＥの開始前のＫｖ１．３遮断薬ＰＥＧ－ＳｈＫによるラットの処理は、疾病の惹起を遅延させ、疾病の進行を阻害し、用量依存的様式で死亡を予防した（図６２）。１０μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫ又は１００μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫで処理されたラットにおける第４．５日と比較して、媒体単独、１０μｇ／ｋｇのＳｈＫ又はＰＥＧ－ＳｈＫ１μｇ／ｋｇで処理したラットにおける疾病の惹起を第４日で観察した。さらに、媒体単独、１０μｇ／ｋｇのＳｈＫ又はＰＥＧ－ＳｈＫ１μｇ／ｋｇで処理したラットは全て、５．５以上のＥＡＥスコアで研究を終了するまで重度の疾病を発展させた。対照的に、１０μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫ又は１００μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫで処理したラットは、２未満の臨床重度スコア平均のピークに到達し、１匹を除く全部のラットが研究の終了時まで生存した。さらに、本発明者は、ラットの体重が疾病の重度と相関することを発見した（図６３）。媒体単独、１０μｇ／ｋｇのＳｈＫ又はＰＥＧ－ＳｈＫ１μｇ／ｋｇで処理したラットは全部、それぞれ３１ｇ、３０ｇ及び３０ｇの平均を喪失したのに対して、１０μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫ又は１００μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫで処理したラットは、それぞれ１８ｇ及び１１ｇを喪失した。後者の２群中のラットは、研究の終了時までに回復の徴候である体重の増加を表した。１０μｇ／ｋｇのＳｈＫ及び１０μｇ／ｋｇのＰＥＧ－ＳｈＫで処理したラットは、ＳｈＫペプチドのモル当量を受容したことに留意すべきである。非結合型ＳｈＫに対してＰＥＧ－ＳｈＫ分子の有意により大きな有効性は、ＰＥＧ－ＳｈＫ分子のより大きな安定性及びインビボでの長期間の半減期によるものであるらしい（実施例４４参照）。

【実施例４６】

【０５７９】

Ｋｖ１．３アンタゴニストペプチドを包含する組成物は、ヒト全血において炎症を遮断する

ＩＬ－２及びＩＦＮ－ｇの分泌に及ぼすＫｖ１．３阻害剤の影響を検討するためのエクスビボアッセイ

健常で、投薬を受けていないドナーから、ヘパリンバキュテナー（ｖａｃｕｔａｉｎｅｒ）中にヒト全血を取得した。ＤＭＥＭ完全培地は、０．１％ヒトアルブミン（Ｂａｙｅｒ６８４７１番）、５５μＭ２－メルカプトエタノール（Ｇｉｂｃｏ）及び１× Ｐｅｎ－Ｓｔｒｅｐ－Ｇｌｎ（ＰＳＧ、Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１０３７８－０１６）を含有する（Ｌ－グルタミン及び２５ｍＭＨｅｐｅｓ緩衝液を有する）イスコブＤＭＥＭであった。タプシガルジンは、Ａｌｏｍｏｎｅ　Ｌａｂｓ（Ｉｓｒａｅｌ）から入手した。カルシウム動員のための４× タプシガルジンの刺激を与えるために、１００％ＤＭＥＭ中のタプシガルジンの１０ｍＭストック溶液をＤＭＥＭ完全培地で４０μＭ、４× 溶液に希釈した。Ｋｖ１．３阻害剤であるペプチドＳｈＫ（スティコダシトラ・ヘリアンサス（Ｓｔｉｃｈｏｄａｃｙｔｌａ　ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ）毒素、カタログ番号Ｈ２３５８）及びＢＫＣａ１阻害剤であるペプチドＩｂＴｘ（イベリオトキシン、カタログ番号Ｈ９９４０）はＢａｃｈｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入し、Ｋｖ１．１阻害剤であるペプチドＤＴＸ－ｋ（デンドロトキシン－Ｋ）はＡｌｏｍｏｎｅ　Ｌａｂｓ（Ｉｓｒａｅｌ）製であ

った。Ｋｖ１．３のＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］ペプチド阻害剤は、実施例４及び実施例３９で本明細書に記載されているとおりに入手した。カルシウム阻害剤であるシクロスポリンＡをＡｍｇｅｎ試料バンクから入手したが、多様な売主からも市販されている。阻害剤の１０個の３倍連続希釈を、４倍濃度の最終濃度で、ＤＭＥＭ完全培地中に調製し、９６ウェルＦａｌｃｏｎ３０７５平底マイクロタイタープレートのウェルに各々５０μＬを添加した。マイクロタイタープレートの列１ないし５及び７ないし１１は阻害剤を含有した（各行は個別の阻害剤の希釈の連続を有した）のに対し、列６中の８個のウェルには、ＤＭＥＭ完全培地単独５０μＬを添加し、列１２の８ウェルには、ＤＭＥＭ完全培地単独１００μＬを添加した。実験を開始するために、マイクロタイタープレートの各ウェルへ、全血１００μＬを添加した。次に、プレートを３７℃、５％CO_2で１時間温置した。１時間後、プレートを取り外し、８ウェルであった列１２を除き、４倍濃度のタプシガルジン刺激（４０μＭ）５０μＬを、プレートの全ウェルへ添加した。３７℃、５％CO_2に、プレートを４８時間再配置した。全血中に分泌されたＩＬ－２及びＩＦＮ－ｇの量を測定するため、９６ウェルプレートの各ウェルからの上清（培養上清）１００μＬを保存プレートに移した。サイトカイン産生のＭＳＤ電気化学発光分析のため、ＭＳＤ　Ｍｕｌｔｉ－Ｓｐｏｔ　Ｃｕｓｔｏｍ　Ｃｏａｔｅｄプレート（ｗｗｗ．ｍｅｓｏ－ｓｃａｌｅ．ｃｏｍ）へ、上清（馴化培地）２０μＬを添加した。これらのプレート上の作業電極を、４つの捕捉抗体（ｈＩＬ－５、ｈＩＬ－２、ｈＩＦＮｇ及びｈＩＬ－４）であらかじめコーティングした。馴化培地２０μＬをＭＳＤプレートへ添加した後、検出抗体及びＰ４緩衝液の混合物１５０μＬを各ウェルへ添加した。１５０μＬ混合物は、各１μｇ／ｍＬの４つの検出抗体（ｈＩＬ－５、ｈＩＬ－２、ｈＩＦＮｇ及びｈＩＬ－４）２０μL及び２×Ｐ４緩衝液１３０μＬを含有した。プレートを覆い、振とうプラットフォーム上に一晩（暗所に）配置した。翌朝、ＭＳＤ　Ｓｅｃｔｏｒ　Ｉｍａｇｅｒで、プレートを読み取った。各プレートの列６中の８ウェルには、タプシガルジン刺激のみのみが与えられ、阻害剤が与えられなかったので、プレートに対して「高い」値を算出するために、ここでは、平均ＭＳＤ反応を使用した。プレートに対して算出された「低い」値は、タプシガルジン刺激及び阻害剤を含有しない列１２の８ウェルから得られた平均ＭＳＤ反応から求められた。対照の百分率（ＰＯＣ）は、刺激されていない対照と刺激された対照に対する反応の測定結果であり、１００ＰＯＣは、タプシガルジン刺激単独の平均反応又は「高い」値と等しい。それ故、１００ＰＯＣは、反応の０％阻害を表す。対照的に、０ＰＯＣは、反応の１００％阻害を表し、刺激が付与されない反応又は「低」値と等価である。対照の百分率（ＰＯＣ）を算出するため、次式：［（ウェルのＭＳＤ反応）－（「低い値」）］／［（「高い値」）－（「低い値」）］×１００を使用する。カーブフィッティングの後、全血中の分子の有効性を阻害曲線（ＩＣ）から算出し、ＩＣ５０は標準的なカーブフィッティングソフトウェアを使用して求めた。本発明者らは、ここに、高処理量のＭＳＤ電気化学発光アッセイを用いたサイトカイン産生の測定を記載しているが、当業者は、サイトカイン産生を測定するために、より小さな処理量のＥＬＩＳＡアッセイを等しく適用できることに容易に想到する。

【０５８０】

Ｋｖ１．３がＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－２Ｒの細胞表面活性化を遮断することを示す生体外アッセイ

健常で、投薬を受けていないドナーから、ヘパリンバキュテナー中に、ヒト全血を入手した。ＤＭＥＭ完全培地は、０．１％ヒトアルブミン（Ｂａｙｅｒ６８４７１番）、５５μＭ２－メルカプトエタノール（Ｇｉｂｃｏ）及び1×Ｐｅｎ－Ｓｔｒｅｐ－Ｇｌｎ（ＰＳＧ、Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１０３７８－０１６）を含有する（Ｌ－グルタミン及び２５ｍＭＨｅｐｅｓ緩衝液を有する）イスコブＤＭＥＭであった。タプシガルジンは、Ａｌｏｍｏｎｅ　Ｌａｂｓ（Ｉｓｒａｅｌ）より入手した。カルシウム動員のための４×タプシガルジンの刺激を与えるために、１００％ＤＭＥＭ中のタプシガルジンの１０ｍＭストック溶液をＤＭＥＭ完全培地で４０μＭ、４×溶液に希釈した。Ｋｖ１．３阻害剤であるペプチドＳｈＫ（スティコダシトラ・ヘリアンサス毒素、カタログ番号Ｈ２３５８）及

びＢＫＣａ１阻害剤であるペプチドＩｂＴｘ（イベリオトキシン、カタログ番号Ｈ９９４０）は、Ｂａｃｈｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから購入し、Ｋｖ１．１阻害剤であるペプチドＤＴＸ－ｋ（デンドロトキシン－Ｋ）はＡｌｏｍｏｎｅ Ｌａｂｓ（Ｉｓｒａｅｌ）製であった。Ｋｖ１．３のＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］ペプチボディ阻害剤を、実施例４及び実施例３９に記載されているとおりに入手した。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡはＡｍｇｅｎ試料バンクから入手したが、多様な売主から市販されている。イオンチャネル阻害剤であるＳｈＫ、ＩｂＴｘ又はＤＴＫ－ｋを、ＤＭＥＭ完全培地中に、望ましい最終濃度の４×となるように希釈した（終濃度＝５０又は１００ｎＭ）。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンＡも、ＤＭＥＭ完全培地中に、４×最終濃度となるように希釈した（最終濃度＝１０μＭ）。９６ウェルＦａｌｃｏｎ３０７５平底マイクロタイタープレートの適切なウェルへ、ＤＭＥＭ完全培地又は４×阻害剤溶液のいずれか５０μＬを添加した。次に、ヒト全血１００μＬを添加し、プレートを、３７℃、５％CO_2で１時間温置した。１時間後、プレートを取り外し、阻害剤を含有するプレートの全ウェルへ、４×タプシガルジン刺激（４０μＭ）５０μＬを添加した。阻害剤を含有しないが、ＤＭＥＭ完全培地のみを含有する幾つかのウェルにタプシガルジンも添加したのに対し、ＤＭＥＭ完全培地のみを有する他のウェルには、ＤＭＥＭ完全培地をさらに５０μＬ添加した。阻害剤及びタプシガルジン刺激を有しないウェルは、処理されていない「低」対照を相当した。阻害剤を有しないが、タプシガルジン刺激を与えられたウェルは、最大刺激のための対照又は「高」対照に相当した。プレートを、３７℃、５％CO_2に２４時間再配置した。２４時間後、プレートを取り出し、ウェルをＦＡＣＳ分析のために処理した。細胞をウェルから摘出し、染色緩衝液（熱失活済みの２％ウシ胎仔血清を含有するリン酸緩衝塩類溶液）中で洗浄した。製造者の指示に従って、１．５％ホルムアルデヒド（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を含有するＢＤ ＦＡＣＳ Ｌｙｓｉｎｇ Ｓｏｌｕｔｉｏｎを使用して、赤血球細胞を溶解した。チューブあたり染色緩衝液１００μＬあたり１００万個の細胞の濃度で細胞を分配した。まず、ビオチン標識した抗ヒトＣＤ４の１μＬで、細胞を染色し、洗浄した後、１μＬのストレプトアビジン－ＡＰＣ、ＦＩＴＣ標識した抗ヒトＣＤ４５ＲＡ、及びフィコエリトリン（ＰＥ）標識した抗ヒトＣＤ２５（ＩＬ－２Ｒａ）又はＰＥ標識した抗ヒトＣＤ４０Ｌで同時に染色した。抗体添加工程の間に、細胞を染色緩衝液で洗浄した。全ての抗体は、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）から入手した。各試料に対して、２万ないし５万の生存事象を、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＦＡＣＳＣａｌｉｂｅｒ（Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ、ＣＡ）フローサイトメーターで回収し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ Ｓｔａｒ Ｉｎｃ．、Ｓａｎ Ｃａｒｌｏｓ、ＣＡ）を使用して分析した。前方向及び側部の散乱特性に基づいて、死滅した細胞、単球及び顆粒球を分析から排除した。

【０５８１】

図６４及び図６７は、ＣＤ４＋Ｔ細胞に及ぼすＩＬ－２Ｒの活性を抑制したことに加え、Ｋｖ１．３阻害剤であるＳｈＫ及びＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］がヒト全血中のＩＬ－２分泌を有効に遮断したことを示す。Ｋｖ１．３阻害剤であるＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］は、ＩＣ５０によって反映されるように、シクロスポリンＡよりもヒト全血中のＩＬ－２生成を遮断する上で２００倍超有力であった（図６４）図６５は、Ｋｖ１．３阻害剤が、ヒト全血中のＩＦＮｇの分泌も有力に遮断したことを示し、図６６は、Ｔ細胞に及ぼすＣＤ４０Ｌの上方制御をさらに遮断したことを示す。図６４ないし６７中のデータは、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］分子が３７℃で４８時間まで全血中で安定であり、炎症反応の強力な遮断を提供したことを示す。Ｋｖ１．３を標的にし、延長された半減期を有する毒素ペプチド治療薬が、インビボで、長期にわたって、これらの反応の持続的遮断を与えるために探索される。これに対して、Ｋｖ１．３阻害剤であるペプチドＳｈＫは、全血中で強力な遮断を示した事実にもかかわらず、ＳｈＫペプチドはインビトロで半減期が短く（約２０分）（Ｃ．Ｂｅｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９８，１３９４２）、それ故、長時間の遮断を提供で

きない。全血は、動物における反応を予測するための生理的に適切なアッセイに相当する。ここに記載されている全血アッセイは、患者の投与後の標的適用範囲及び薬物暴露を測定するための薬力学的（ＰＤ）アッセイとしても使用できる。これらのヒト全血データは、多発性硬化症、１型糖尿病、乾癬、炎症性腸疾患、接触仲介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄、全身性強皮症、線維症、皮膚硬化症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植片拒絶反応、移植片対宿主病及び狼瘡などの、多様な免疫疾患の治療のための、本発明の組成物の治療的有用性を裏付ける。

【実施例４７】

【０５８２】

ＰＥＧ化したペプチボディ

実施例を通じて、本発明のＰＥＧ化したペプチボディを以下の方法によって作製した。ＣＨＯにより発現された、１９．２mLのＡ５Ｓ、２０mMのＮａＢＨ$_3$ＣＮ、ｐＨ５中のＦｃＬ１０-ＯｓＫ１（１９．２mg、分子量３０，３７１Ｄａ、０．６３μｍｏｌ）を、３８mgのＰＥＧアルデヒド（分子量２０ｋＤａ、３×、ロット１０４０８６）で処理した。密閉した反応混合物を冷温室で一晩撹拌した。Ｓｕｐｅｒｒｏｓｅ　６　ＨＲ　１０／３０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して、０．４mL／分で０．０５Ｍリン酸塩緩衝液、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０で溶出したＳＥＣ　ＨＰＬＣにより、反応の経過中のタンパク質修飾度をモニターした。反応混合物をＡ５Ｓ、ｐＨ５で一晩透析した。次に、透析した材料をＡ５Ｓ、ｐＨ５中のＳＰ　ＨＰ　ＦＰＬＣカラム（１６／１０）へ負荷し、１Ｍ　ＮａＣｌ勾配で溶出した。回収した画分をＳＥＣ　ＨＰＬＣにより分析し、３つのプール中にプールし、ＤＰＢＳ中へと交換し、濃縮し、官能基検査に供した（表３４）。

【０５８３】

別の実施例において、１６．５mLのＡ５Ｓ、２０mMのＮａＢＨ$_3$ＣＮ、ｐＨ５中のＦｃＬ１０-ＳｈＫ１（１６．５mg、分子量３０，０６５Ｄａ、０．５５μｍｏｌ）を４４mgのＰＥＧアルデヒド（分子量２０ｋＤａ、４×、ロット１０４０８６）で処理した。密閉した反応混合物を冷温室で一晩撹拌した。Ｓｕｐｅｒｒｏｓｅ　６　ＨＲ　１０／３０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して、０．４mL／分で０．０５Ｍリン酸塩緩衝液、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０で溶出したＳＥＣ　ＨＰＬＣにより、反応の経過中のタンパク質修飾度をモニターした。反応混合物をＡ５Ｓ、ｐＨ５で一晩透析した。透析した材料をＡ５Ｓ、ｐＨ５中のＳＰ　ＨＰ　ＦＰＬＣカラム（１６／１０）へ負荷し、１Ｍ　ＮａＣｌ勾配で溶出した。回収した画分をＳＥＣ　ＨＰＬＣにより分析し、３つのプール中にプールし、ＤＰＢＳ中へと交換し、濃縮し、官能基検査に供した（表３４）。

【０５８４】

表３４中のデータは、Ｋｖ１．３阻害剤としてのＰＥＧ化されたペプチボディ分子の有効性を示す。

【０５８５】

【表３５】

表３４は、本明細書で上述した実施例３６に記載されているように、ＨＥＫ２９３によるホールセルパッチクランプ電気生理学によって行われたＩＣ５０の測定結果を示す。持続的ＩＣ５０は、－８０ｍＶから＋３０ｍＶへの電位勾配の４００ミリ秒後における電流から求められた。２番プールの試料は、ジＰＥＧ化されたペプチボディを含み、３番プールの試料は、モノＰＥＧ化されたペプチボディを含んだ。

PEG化されたペプチボディ	プール番号	持続したIC50 (nM)
PEG-Fc-L10-SHK(2-35)	3	0.175 (n=4)
PEG-Fc-L10-SHK(2-35)	2	0.158 (n=4)
PEG-Fc-L10-OSK1	3	0.256 (n=3)
PEG-Fc-L10-OSK1	2	0.332 (n=3)

【実施例４８】

【０５８６】

ＰＥＧ化された毒素ペプチド

ＳｈＫ及びＯｓｋ－１のＰＥＧ化、精製及び分析

合成ＳｈＫ又はＯＳＫ１－１毒素ペプチドのＮ末端での還元的アルキル化によって、ペプチドを選択的にＰＥＧ化した。２０ｍＭシアノ水素化ホウ素ナトリウム及び２０ｋＤａのモノメトキシ－ＰＥＧ－アルデヒド（Ｎｅｋｔａｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ、ＡＬ）の２モル過剰量を含有する５０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ４．５反応緩衝液中の２ｍｇ／ｍＬで、Ｓｈｋ又はＯＳＫ－１のいずれかの毒素ペプチドを使用して、結合を達成した。結合反応物を室温で一晩撹拌し、その進行をＲＰ－ＨＰＬＣによってモニターした。完了した反応を、２０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４による４倍希釈により停止し、ｐＨ３．５に調整し、４℃に冷却した。次に、４℃で、ＳＰセファロースＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を使用して、２０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４．０中の直線的な０ないし１ＭのＮａＣｌ勾配で溶出して、ＰＥＧ－ペプチドをクロマトグラフィー精製した（図６８Ａ及び図６８Ｂ）。溶出したピーク画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＲＰ－ＨＰＬＣにより分析し、プールしたものを測定したところ、純度９７％超であった。観察される主な夾雑物質は、ジＰＥＧ化した毒素ペプチド及び修飾されていない毒素ペプチドであった。３ｋＤａ　ＭＷＣＯ膜に対する遠心ろ過によって、選択されたプールを２ないし５ｍｇ／ｍＬに濃縮し、５％ソルビトールを有する１０ｍＭＮａＯＡｃ、ｐＨ４中へと透析した。次に、透析したプールを０．２ミクロンフィルターでろ過滅菌し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＲＰ－ＨＰＬＣによって純度が９７％超であることを決定した（図６９Ａ及び図６９Ｂ）。０．１％ＴＦＡ／H_2O中のＺｏｒｂａｘ５μｍ　３００ＳＢ－Ｃ８　４．６×５０ｍｍカラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ）を１ｍＬ／分で稼動させ、カラム温度を４０℃に維持したＡｇｉｌｅｎｔ１１００モデルＨＰＬＣで、逆相ＨＰＬＣを実施した。ＰＥＧ－ペプチドの試料（２０μｇ）を注入し、直線的な６ないし６０％勾配中に溶出する間、２１５ｎｍ及び２８０ｎｍの波長でモニターした。

【０５８７】

ホールセルパッチクランプによって実施される電気生理学的実験（実施例３６参照）は、ヒトＫｖ１．３チャネルを安定して発現するＨＥＫ２９３細胞から記録される外向きカリウム電流の濃度依存的遮断において、ＰＥＧ－ＯＳＫ１は１．２８５ｎＭの、ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］は０．１６９ｎＭのピークＩＣ５０を生じた（図７４）。「２０ＫのＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］」及び「ＰＥＧ－ＳｈＫ」とも呼ばれる精製されたＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］分子は、小さなＳｈＫペプチドよりもインビボでの半減期が非常に長

かった（図５９及び図６０）。ＰＥＧ－ＳｈＫ［１－３５］はラットにおいて重度の自己免疫性脳脊髄炎を抑制し（実施例４５、図６１ないし６３）、小さな固有のＳｈＫペプチドよりも大きな有効性を示した。

【実施例４９】

【０５８８】

ＳｈＫ及びＯＳＫ１毒素ペプチドのＦｃループ挿入

図７０、図７１、図７２及び図７３に例示されているように、Ｇｅｇｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｆｃ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ、ＷＯ２００６／０３６８３４ Ａ２［ＰＣＴ／ＵＳ２００５／０３４２７３］中の実施例１に公開されている方法に従って、配列$D_{137}E_{138}L_{139}T_{140}K_{141}$として定義されるヒトＩｇＧ１Ｆｃ－ループドメイン中にジスルフィドにより抑制される毒素ペプチドを挿入した。３つの連結されたドメインを有する典型的なＦｃループ－Ｌ２－ＯｓＫ１－Ｌ２、Ｆｃループ－Ｌ２－ＳｈＫ－Ｌ２、Ｆｃループ－Ｌ２－ＳｈＫ－Ｌ４及びＦｃループ－Ｌ４－ＯｓＫ１－Ｌ２を調製した。これらを回収、精製し、官能基検査へ供した。

【０５８９】

これらの実施例に関するペプチド挿入は、Ｆｃ残基Leu_{139}とThr_{140}との間であり、挿入されたペプチドのいずれかの側に隣接するリンカーとして２ないし４個のＧｌｙ残基を包含した。しかしながら、本分野で公知のように、例えばＧｅｇｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｆｃ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，ＷＯ２００６／０３６８３４ Ａ２［ＰＣＴ／ＵＳ２００５／０３４２７３］の実施例１３に記載されるとおり、ヒトＩｇＧ１ Ｆｃ配列に関する代替的な挿入部位又は異なるリンカーも、本発明の実施においても有用である。

【実施例５０】

【０５９０】

Ｅ．コリからのＳｈＫ（２－３５）－Ｌ－Ｆｃの精製

本明細書の上述の実施例１６に記載されるように入手された冷凍したＥ．コリペースト（１１７ｇ）を、室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ７．５の１２００ｍＬと組み合わせ、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。冷却した懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置に１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、１７，７００ｇで３０分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを１％デオキシコール酸１２００ｍＬ中に再懸濁した後、４℃、１７，７００ｇで３０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、ペレットを１２００ｍＬの水中に再懸濁した後、４℃、１７，７００ｇで３０分間遠心分離した。次に、ペレット６．４ｇ（合計１４．２ｇ）を１２８ｍＬの８Ｍグアニジン ＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に溶解した。次に、ペレット溶液を１ＭのＤＴＴ０．６７ｍＬとともに、３７℃で６０分間温置した。還元した材料を４℃、２ｍＬ／分で再折りたたみ緩衝液（３Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、２．５ｍＭＥＤＴＡ、２．５ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ９．５）５５００ｍＬへと、激しく撹拌しながら移した。次に、撹拌速度を低下させ、温置を４℃で３日間続行した。

【０５９１】

再折りたたみ液を水５．５Ｌで希釈し、酢酸を使用してｐＨを８．０に調整した後、溶液を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過し、室内の３５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ Ｍａｂ Ｓｅｌｅｃｔカラム（内径２．６ｃｍ）で、８℃でＱ－緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス、ｐＨ８．５）中の３５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ Ｑセファロース－ＦＦ（内径２．６ｃｍ）カラムへ１０ｍＬ／分で負荷した。負荷した後、Ｑセファロースカラムを回路から除去し、残存するクロマトグラフィーをＭａｂ Ｓｅｌｅｃｔカラムで実施した。カラムをＱ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０への工程を使用して溶出した。望ましい生成物を含有する画分を８℃でＳ－緩衝液Ａ（１０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．０）中の５．０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ ＳＰ－セファロースＨＰカラムへ５．０ｍＬ／分で直ちに負荷した。次に、クーマシーブリリアントブルー

染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、画分を分析した。望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした後、８℃でＭＥＰ緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス、２００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ８．０）中の５０ｍＬのＭＥＰ Ｈｙｐｅｒｃｅ１カラム（内径２．６ｃｍ）へ１０ｍＬ／分で適用した。５％ないし５０％の直線勾配のＭＥＰ緩衝液（５０ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ４．０）で、カラムを溶出した後、１００％ＭＥＰ緩衝液Ｂへの工程で溶出した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して画分を分析し、望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした。

【０５９２】

次に、１０ｋＤａメンブレンを有するＰａｌｌ Ｊｕｍｂｏ-Ｓｅｐを使用して、ＭＥＰプールを約１０ｍＬに濃縮した。次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ ８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール５０μＬに対して、スペクトル走査を実施した（図７６Ａ）。次に、３０，２５３の算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、材料の濃度が３．７ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス-グリシン４ないし２０％ＳＤＳ-ＰＡＧＥを使用して、材料の純度を評価した（図７６Ｂ）。次に、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＢｉｏＳｅｐ ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物７０μｇに対して、２８０ｎｍでの吸光度を観察するサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図７６Ｃ）。次に、ＲＰ-ＨＰＬＣカラム（Ｖｙｄａｃ C_4、１×１５０ｍｍ）を通じて、試料約４μｇをクロマトグラフィーにかけることによって、生成物を質量スペクトル分析へ供した。溶媒Ａは、水中の０．１％トリフルオロ酢酸であり、溶媒Ｂは、９０％アセトニトリル、１０％水中の０．１％トリフルオロ酢酸であった。８０μＬ／分の流速で、１０％溶媒Ｂ中でカラムをあらかじめ平衡化した。質量分析計の製造者によって提供されるＢｉｏｗｏｒｋｓソフトウェアを使用して、質量スペクトルの逆重畳を行った（図７６Ｄ）。生成物を０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した後、-８０℃で保存した。

【０５９３】

表３５では、Ｅ．コリ由来の精製されたＳｈＫ[２-３５]-Ｌ-Ｆｃに関するＩＣ５０データを、本発明の組成物の他の幾つかの実施形態と比較する。

【０５９４】

OnCusp
Ex. 1002

【表３６】

表３５　Ｎ末端又はＣ末端のいずれかにＦｃを含有するＥ．コリ由来の組換えＦｃ－Ｌ－ＳｈＫ［１－３５］、Ｆｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］、Ｆｃ－Ｌ－ＯＳＫ１、Ｓｈｋ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃ及びＳｈＫ［２－３５］－Ｌ－Ｆｃペプチボディは、ヒトＫｖ１．３の強力な遮断を示す。ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］Ｒ１Ｑ突然変異体の活性も示す。実施例３６に記載されている方法によって、ＨＥＫ２９３／Ｋｖ１．３細胞を使用して、ホールセルパッチクランプ電気生理学（ＷＣＶＣ）を実施し、示されるＩＣ５０は、３個以上の細胞由来の用量－反応曲線からの平均である。実施例４４に記載されている方法によるＩｏｎＷｏｒｋｓ（商標）（ＩＷＱ）平面型パッチクランプ電気生理学は、ＣＨＯ／Ｋｖ１．３細胞に対するものであり、平均ＩＣ５０が示されている。表記された実施例に記載されている方法によって、本発明の分子を取得した。すなわち、Ｅ．コリ由来のＦｃ－Ｌ－ＳｈＫ［１－３５］（実施例３及び実施例３８）、Ｅ．コリ由来のＦｃ－Ｌ－ＳｈＫ［２－３５］（実施例４及び実施例３９）、Ｅ．コリＦｃ－Ｌ－ＯＳＫ１（実施例１０及び実施例４０）、ＳｈＫ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃ（実施例１５及び実施例５１）及びＳｈＫ［２－３５］－Ｌ－Ｆｃ（実施例１６及び本実施例５０）であった。ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］に関して記載されている方法と同様の方法を使用して、ＣＨＯ由来のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］Ｒ１Ｑ分子を作製した。

分子	WCVCによるKv1.3 IC_{50} (nM)	IWQによるKv1.3 IC_{50} (nM)
E.コリ由来のFc-L-ShK[1-35]	1.4	
E.コリ由来のFc-L-ShK[2-35]	1.3	2.8
E.コリ由来のFc-L-OSK1	3.2	
E.コリ由来のShk[1-35]-L-Fc		2.4
E.コリ由来のShK[2-35]-L-Fc		4.9
CHO由来のFc-L10-ShK[1-35]R1Q		2.2

【実施例５１】

【０５９５】

Ｅ．コリからのＳｈＫ（１－３５）－Ｌ－Ｆｃの精製

本明細書の上述の実施例１５に記載されているように入手された、冷凍したＥ．コリペースト（６５ｇ）を、室温の５０ｍＭトリスＨＣｌ、５ｍＭＥＤＴＡ、ｐＨ７．５の６６０ｍＬと合わせて、約０．１ｍｇ／ｍＬのニワトリ卵白色リゾチームへ添加した。懸濁したペーストを、冷却した微量液化装置へ、１２，０００ＰＳＩで２回通過させた。次に、４℃、１７，７００ｇで３０分間、細胞可溶化液を遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、６６０ｍＬの１％デオキシコール酸中にペレットを再懸濁した後、４℃、１７，７００ｇで３０分間遠心分離した。次に、組織粉砕機を使用して、６６０ｍＬの水中にペレットを再懸濁した後、４℃、１７，７００ｇで３０分間遠心分離した。次に、ペレット１３ｇを１３０ｍＬの８ＭグアニジンＨＣｌ、５０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８．０中に溶解した。次に、１ＭのＤＴＴ０．１ｍＬとともに、ペレット溶液１０ｍＬを、３７℃で６０分間温置した。４℃、２ｍＬ／分で、激しく撹拌しながら、再折りたたみ緩衝液（２Ｍ尿素、５０ｍＭトリス、１６０ｍＭアルギニンＨＣｌ、２．５ｍＭＥＤＴＡ、２．５ｍＭシスタミンＨＣｌ、４ｍＭシステイン、ｐＨ８．５）１０００ｍＬへと、還元した材料を移した。次に、撹拌速度を低下させ、４℃で３日間、温置を続行した。

【０５９６】
再折りたたみ液を水1Ｌで希釈し、０．２２μｍ酢酸セルロースフィルターでろ過した後、室内の３５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｍａｂ　Ｓｅｌｅｃｔカラム（内径２．６ｃｍ）で、８℃でＱ－緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス、ｐＨ８．５）中の３５ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｑセファロース－ＦＦ（内径２．６ｃｍ）カラムへ１０ｍＬ／分で負荷した。負荷した後、Ｑセファロースカラムを回路から除去し、残存するクロマトグラフィーをＭａｂ　Ｓｅｌｅｃｔカラムで実施した。Ｑ－緩衝液Ａの数カラム容積でカラムを洗浄した後、１００ｍＭグリシン、ｐＨ３．０への工程を使用して溶出した。望ましい生成物を含有する画分を８℃、５．０ｍＬ／分で、Ｓ－緩衝液Ａ（２０ｍＭNaH_2PO_4、ｐＨ７．０）中の５．０ｍＬのＡｍｅｒｓｈａｍ　ＳＰ－セファロースＨＰカラムへと直ちに負荷した。次に、カラムをＳ－緩衝液Ａの数カラム容積で洗浄した後、５％から６０％までのＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭNaH_2PO_4、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）の直線勾配の後、１００％Ｓ－緩衝液Ｂに至る工程を実施した。クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、画分を分析した。望ましい生成物のバルクを含有する画分をプールした。
【０５９７】
次に、１０ｋＤａメンブレンを有するＰａｌｌ　Ｊｕｍｂｏ－Ｓｅｐを使用して、Ｓ－プールを約１０ｍＬに濃縮した。次に、Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　８４５３分光光度計を使用して、７００μＬのＰＢＳ中に希釈した組み合わせたプール２０μＬに関して、スペクトル走査を実施した（図７７Ａ）。次に、３０，４０９ｇ／ｍｏｌの算出された分子量及び３６，９００$M^{-1}cm^{-1}$の吸光係数を使用して、材料の濃度が３．１ｍｇ／ｍＬであることを決定した。次に、クーマシーブリリアントブルー染色したトリス－グリシン４ないし２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、材料の純度を評価した（図７７Ｂ）。次に、２８０ｎｍでの吸光度を観察する、５０ｍＭNaH_2PO_4、２５０ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．９中のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）へと１ｍＬ／分で注入された生成物９３μｇに関して、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生成物の巨大分子状態を測定した（図７７Ｃ）。次に、ＭＡＬＤＩ質量分析法による質量スペクトル分析へ、前記生成物を供した。試料プレート上で、ＭＡＬＤＩマトリクスシナピン酸とともに、試料の一定分量を点状滴下した。スペクトルを回収するために、窒素レーザー（３３７ｎｍ、３ナノ秒パルス）を装備したＶｏｙａｇｅｒＤＥ－ＲＰ飛行時間質量分析計を使用した。２５ｋＶの加速電位で陽イオン／直線モードを使用した。約２００のレーザーショットから得られたデータを蓄積することによって、各スペクトルを得た（図７７Ｄ）。公知の分子量の精製されたタンパク質を使用して、外部質量較正を達成した。
【０５９８】
「ＳｈＫ［１－３５］－Ｌ－Ｆｃ」とも呼ばれる、Ｅ．コリ由来の精製されたＭｅｔ－ＳｈＫ（１－３５）－ＦｃによるヒトＫｖ１．３の遮断のためのIC_{50}が、本明細書の上述の表３５に示されている。
【実施例５２】
【０５９９】
Ｋｖ１．３のＯｓＫ１－Ｌ－Ｆｃ阻害剤の細菌での発現
細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されているとおりであった。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｇＲ－ｐｅｐ－Ｆｃであり、ＯｓＫ１－Ｌ－Ｆｃの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。
【０６００】
二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。
【０６０１】

【化５９】

GGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGGAACCGTGCAAAAAAGCTGGTATGCGT
//配列番号：1347；

TTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCCGAAATCTGGTGGTGGTGGTTCT //
配列番号：1348；

CACCAGAACCACCACCACCACCAGATTTCGGGGTGCAGTGGCATTTACCGTTCATGCATTTACCGAAACGCAT
//配列番号：1349；

ACCAGCTTTTTTGCACGGTTCCAGGCACTGACGGGAGATTTTGCATTTAACGTTGATGATAAC //
配列番号：1310

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
    GGGTGTTATCATCAACGTTAAATGCAAAATCTCCCGTCAGTGCCTGGAACCGTGCAAAAA
  1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
       CAATAGTAGTTGCAATTTACGTTTTAGAGGGCAGTCACGGACCTTGGCACGTTTTT

     G  V  I  I  N  V  K  C  K  I  S  R  Q  C  L  E  P  C  K  K  -

    AGCTGGTATGCGTTTCGGTAAATGCATGAACGGTAAATGCCACTGCACCCCGAAATCTGG
 61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
    TCGACCATACGCAAAGCCATTTACGTACTTGCCATTTACGGTGACGTGGGGCTTTAGACC

     A  G  M  R  F  G  K  C  M  N  G  K  C  H  C  T  P  K  S  G  -

    TGGTGGTGGTTCT   //配列番号：1350
121 ----------+------- 137
    ACCACCACCAAGACCAC      //配列番号：1352

     G  G  G  S  G   -  //配列番号：1351
```

【０６０２】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【実施例５３】

【０６０３】

Ｋｖ１．３のＧｌｙ－ＳｈＫ（１－３５）－Ｌ－Ｆｃ阻害剤の細菌での発現

細菌中でペプチボディをクローニング及び発現させる方法は、実施例３に記載されているとおりであった。使用されるベクターは、ｐＡＭＧ２１ａｍｇＲ－ｐｅｐ－Ｆｃであり、Ｇｌｙ－ＳｈＫ（１－３５）－Ｌ－Ｆｃの細菌中でのクローニング及び発現のための二本鎖（以下参照）を作製するために、以下に列挙されているオリゴを使用した。

【０６０４】

二本鎖を形成するために使用されるオリゴを以下に示す。

【０６０５】

【化６０】

GGGTCGTTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACATTCTA
TGAAATATCGTCTTTCTT // 配列番号：1313；

TTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT // 配列番号：1314；

CACCAGAACCACCACCACCAGAACAAGTACCACAAGTTTTACGACAAAAAGAAAGACGATATTT
CATAGAATGTTTACATTGA // 配列番号：1353

AAAGCAGTACAACGAGATTTTGGAATAGTATCAATACAAGAACG // 配列番号：1354

以下に示されている二本鎖を形成するために、上記オリゴを使用した。

```
   GGGTCGTTCTTGTATTGATACTATTCCAAAATCTCGTTGTACTGCTTTTCAATGTAAACA
 1 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     GCAAGAACATAACTATGATAAGGTTTTAGAGCAACATGACGAAAAGTTACATTTGT

    G  R  S  C  I  D  T  I  P  K  S  R  C  T  A  F  Q  C  K  H  -

   TTCTATGAAATATCGTCTTTCTTTTTGTCGTAAAACTTGTGGTACTTGTTCTGGTGGTGG
61 ----------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
   AAGATACTTTATAGCAGAAAGAAAAACAGCATTTTGAACACCATGAACAAGACCACCACC

    S  M  K  Y  R  L  S  F  C  R  K  T  C  G  T  C  S  G  G  G  -

   TGGTTCT    //配列番号：1355
121 ----------+- 131
   ACCAAGACCAC   // 配列番号：1357

    G  S  G   -   //配列番号：1356
```

【０６０６】

ペプチボディの細菌での発現は、実施例３に記載されているとおりであり、ペーストを冷凍保存した。

【０６０７】

略語

本明細書を通じて使用される略語は、特異的な事情において別段の定義がなければ、以下に定義されるとおりである。

【０６０８】

Ａｃ	（アセチル化残基を指すのに使用される）アセチル
ＡｃＢｐａ	アセチル化ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン
ＡＤＣＣ	抗体依存的な細胞傷害性
Ａｉｂ	アミノイソブチル酸
ｂＡ	β－アラニン
Ｂｐａ	ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン
ＢｒＡｃ	ブロモアセチル（$BrCH_2C(O)$）
ＢＳＡ	ウシ血清アルブミン
Ｂｚｌ	ベンジル
Ｃａｐ	カプロン酸
ＣＯＰＤ	慢性閉塞性肺疾患
ＣＴＬ	細胞傷害性Ｔリンパ球
ＤＣＣ	ジシクロヘキシルカルボジイミド
Ｄｄｅ	１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソ－シクロヘキシリデン）エチル
ＥＳＩ－ＭＳ	電子スプレーイオン化質量分析法
Ｆｍｏｃ	フルオレニルメトキシカルボニル
ＨＯＢｔ	１－ヒドロキシベンゾトリアゾール
ＨＰＬＣ	高速液体クロマトグラフィー

ＨＳＬ	ホモセリンラクトン
ＩＢ	封入体
ＫＣａ	（ＩＬＣａ、ＢＫＣａ、ＳＫＣａを含む）カルシウム活性化カリウムチャネル
Ｋｖ	電位開口型カリウムチャネル
Ｌａｕ	ラウリン酸
ＬＰＳ	リポ多糖
ＬＹＭＰＨ	リンパ球
ＭＡＬＤＩ－ＭＳ	マトリクス介助レーザーデソープションイオン化質量分析法
Ｍｅ	メチル
ＭｅＯ	メトキシ
ＭＨＣ	主要組織適合遺伝子複合体
ＭＭＰ	マトリクスメタロプロテアーゼ
１－Ｎａｐ	１－ナフチルアラニン
ＮＥＵＴ	好中球
Ｎｌｅ	ノルロイシン
ＮＭＰ	Ｎ－メチル－２－ピロリジノン
ＰＡＧＥ	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
ＰＢＭＣ	末梢血単核細胞
ＰＢＳ	リン酸緩衝塩類溶液
Ｐｂｆ	２，２，４，６，７－ペンダメチルジヒドロベンゾフラン－５－スルホニル
ＰＣＲ	ポリメラーゼ連鎖反応
Ｐｅｃ	ピペコリン酸
ＰＥＧ	ポリ（エチレングリコール）
ｐＧｌｕ	ピログルタミン酸
Ｐｉｃ	ピコリン酸
ｐＹ	ホスホチロシン
ＲＢＳ	リボソーム結合部位
ＲＴ	室温（２５℃）
Ｓａｒ	サルコシン
ＳＤＳ	ドデシル硫酸ナトリウム
ＳＴＫ	セリン－トレオニンキナーゼ
ｔ－Ｂｏｃ	ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル
ｔＢｕ	ｔｅｒｔ－ブチル
ＴＨＦ	胸腺体液性因子
Ｔｒｔ	トリチル

【手続補正２】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号９１４、配列番号９１５、配列番号９１６、配列番号９１７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＳｈＫペプチド類縁体を含む組成物、或いはその生理的に許容される塩。
【請求項２】
請求項１に記載の組成物と、医薬として許容される担体とを含む医薬組成物。
【請求項３】

患者において、多発性硬化症の症状の再発を予防する又は軽減するための医薬の調製における組成物の使用であって、前記組成物が請求項１に記載の組成物から選択される、前記使用。

【請求項４】

患者における、多発性硬化症、１型糖尿病、疥癬、炎症性腸疾患、接触媒介性皮膚炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、喘息、アレルギー、再狭窄（ｒｅｓｔｉｎｏｓｉｓ）、全身性硬化症、繊維症、強皮症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、炎症性骨吸収、移植拒絶、移植片対宿主病及び狼瘡からなる群から選択される自己免疫疾患を治療するための医薬の調製における組成物の使用であって、治療的有効量の前記組成物により前記疾患の少なくとも１つの症状が前記患者において緩和され、前記組成物が請求項１に記載の組成物から選択される、前記使用。

【請求項５】

配列番号９１４のアミノ酸配列を有するＳｈＫペプチド類縁体を含む請求項１に記載の組成物。

【請求項６】

配列番号９１５のアミノ酸配列を有するＳｈＫペプチド類縁体を含む請求項１に記載の組成物。

【請求項７】

配列番号９１６のアミノ酸配列を有するＳｈＫペプチド類縁体を含む請求項１に記載の組成物。

【請求項８】

配列番号９１７のアミノ酸配列を有するＳｈＫペプチド類縁体を含む請求項１に記載の組成物。

【請求項９】

請求項１に記載の組成物をコードするＤＮＡ。

【請求項１０】

請求項９に記載のＤＮＡを含む発現ベクター。

【請求項１１】

請求項１０に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項１２】

細胞が真核細胞である請求項１１に記載の宿主細胞。

【請求項１３】

細胞が哺乳動物細胞である請求項１１に記載の宿主細胞。

【請求項１４】

細胞がＣＨＯ細胞である請求項１１に記載の宿主細胞。

【請求項１５】

細胞が原核細胞である請求項１１に記載の宿主細胞。

【請求項１６】

細胞がＥ．コリ細胞である請求項１１に記載の宿主細胞。

【手続補正３】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

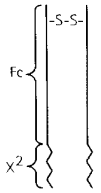
【補正方法】変更

【補正の内容】

OnCusp
Ex. 1002

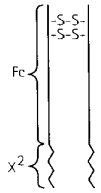
【図１Ａ】

FIG. 1A



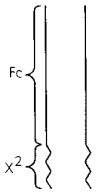
【図１Ｂ】

FIG. 1B



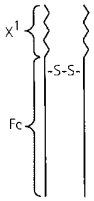
【図１Ｃ】

FIG. 1C



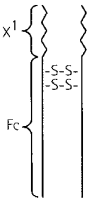
【図１Ｄ】

FIG. 1D



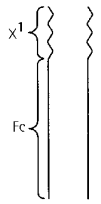
【図１Ｅ】

FIG. 1E



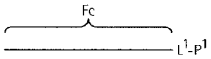
【図１Ｆ】

FIG. 1F



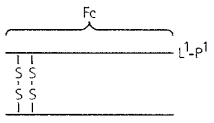
【図２Ａ】

FIG. 2A



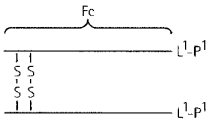
【図２Ｂ】

FIG. 2B



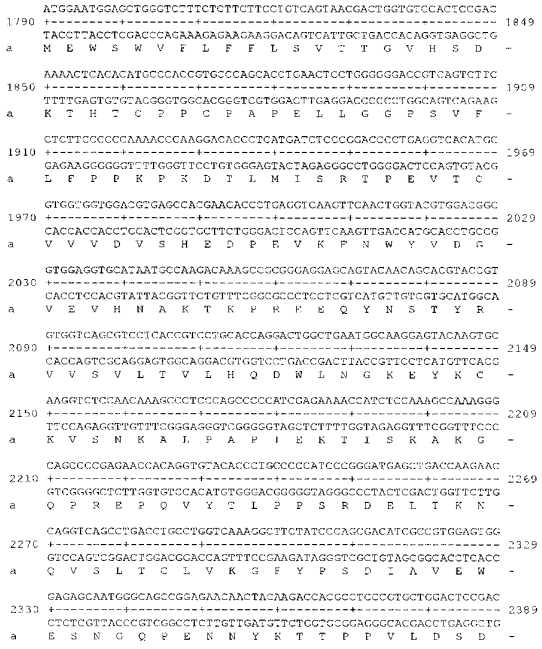
【図２Ｃ】

FIG. 2C



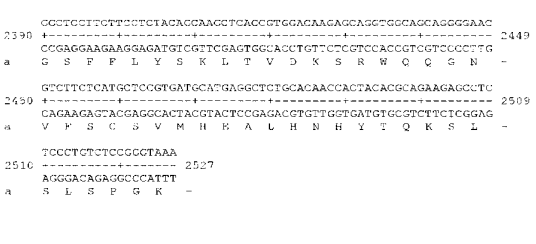
【図３Ａ】

FIG. 3A



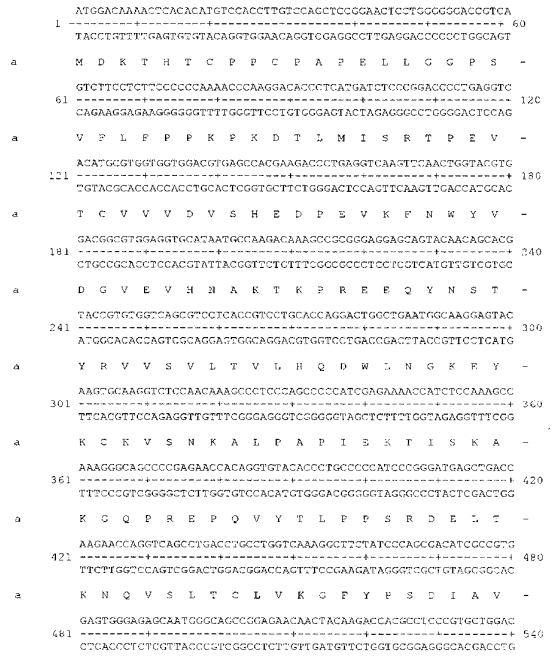
【図３Ｂ】

FIG. 3B



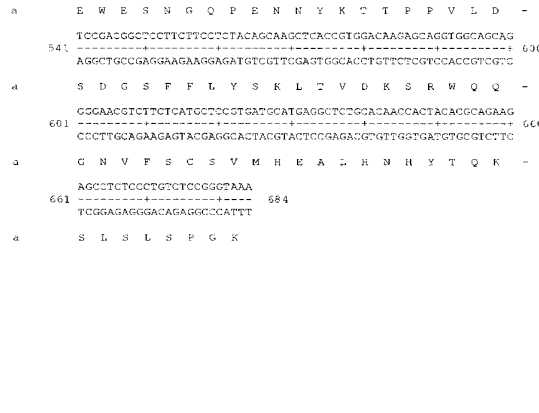
【図４Ａ】

FIG. 4A



【図４Ｂ】

FIG. 4B



OnCusp
Ex. 1002

【図５Ａ】

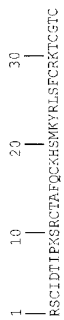


FIG. 5A

【図５Ｂ】

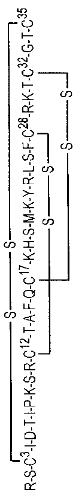


FIG. 5B

【図６Ａ】

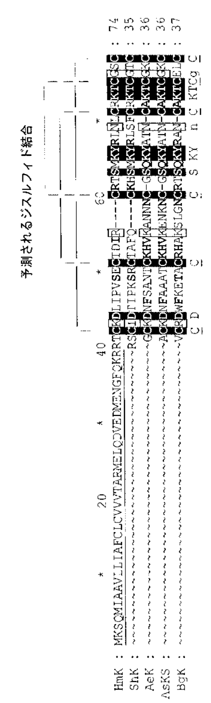


FIG. 6A

【図６Ｂ】

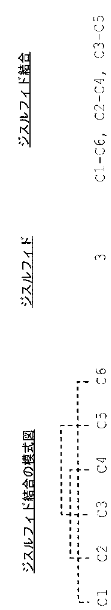
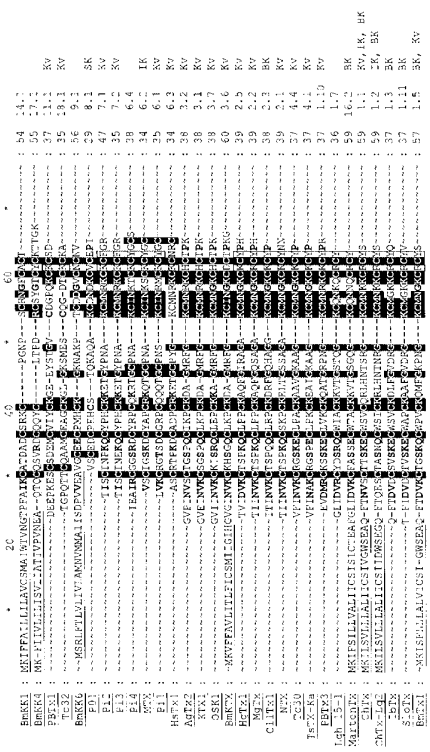


FIG. 6B

OnCusp
Ex. 1002

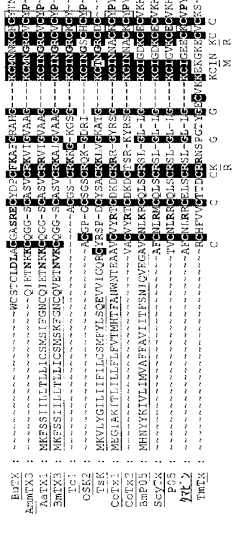
【図７Ａ】

FIG. 7A



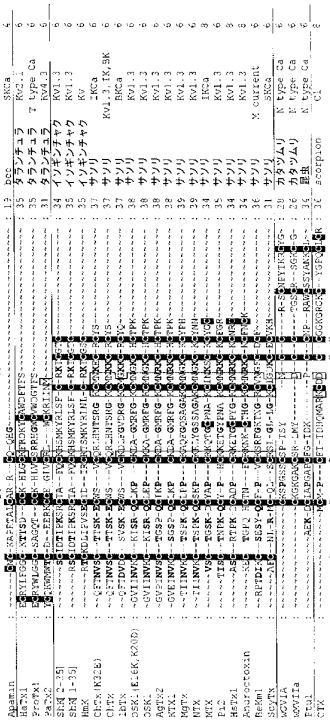
【図７Ｂ】

FIG. 7B



【図８】

FIG. 8



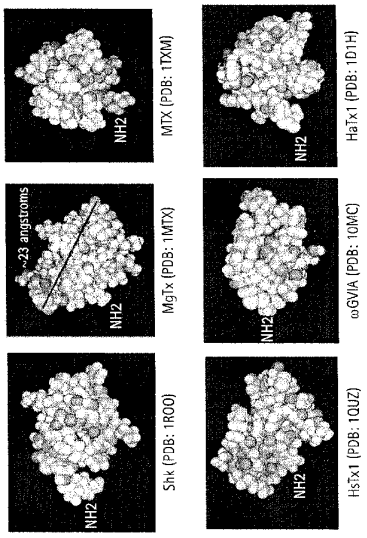
【図９】

FIG. 9

OnCusp
Ex. 1002

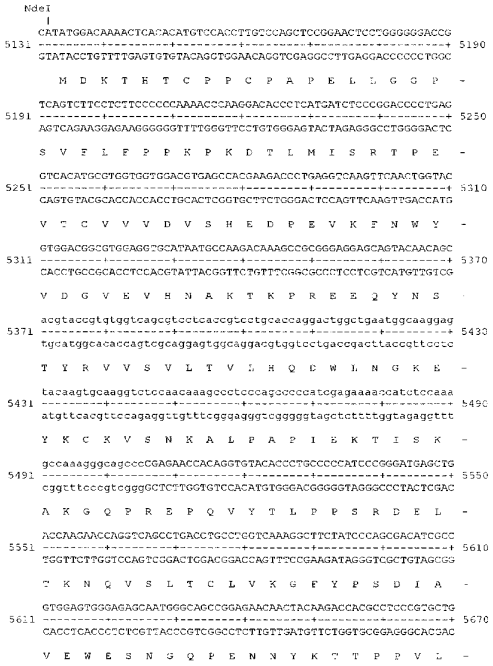
【図１０】

FIG. 10



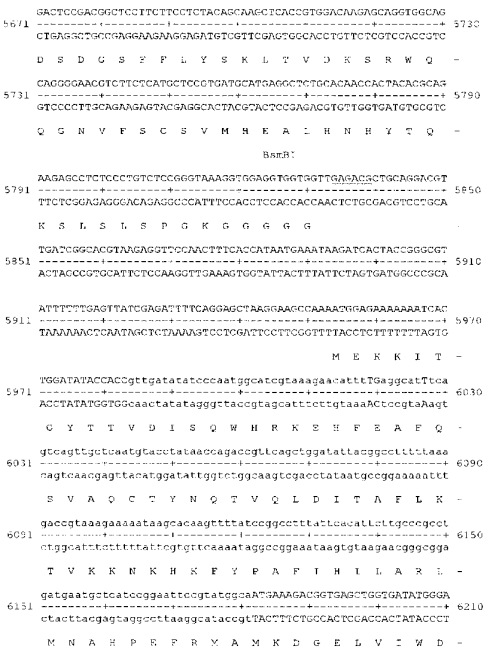
【図１１Ａ】

FIG. 11A



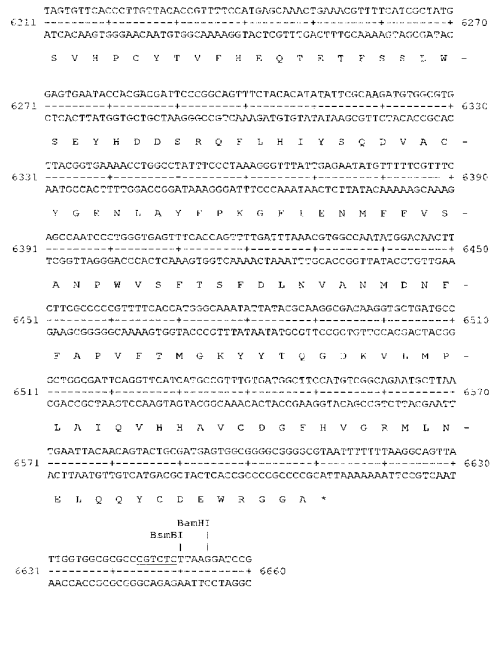
【図１１Ｂ】

FIG. 11B



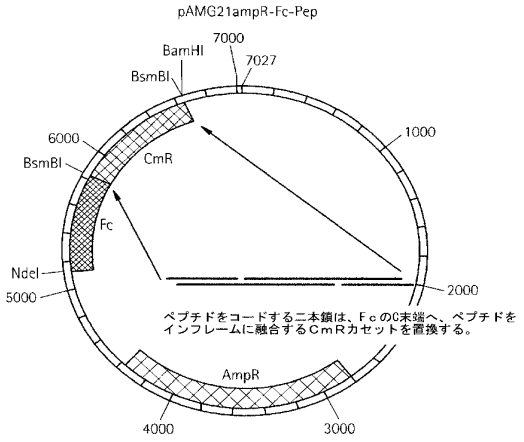
【図１１Ｃ】

FIG. 11C



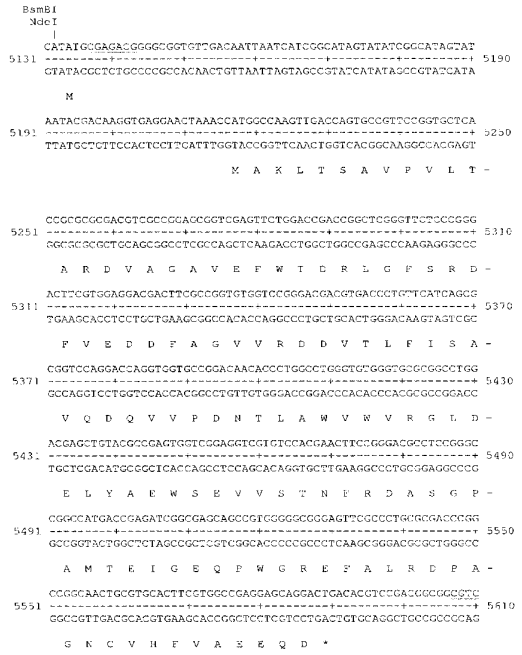
【図１１Ｄ】

FIG. 11D



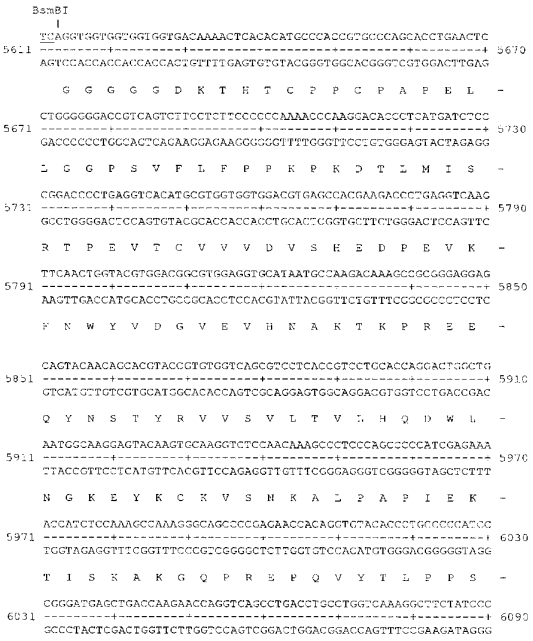
【図１２Ａ】

FIG. 12A



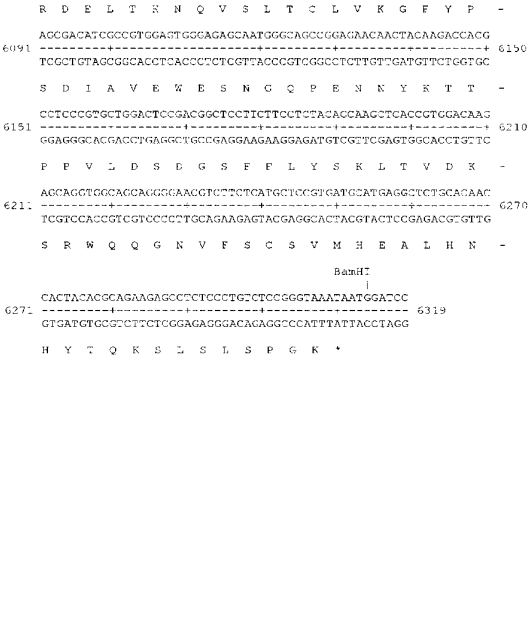
【図１２Ｂ】

FIG. 12B



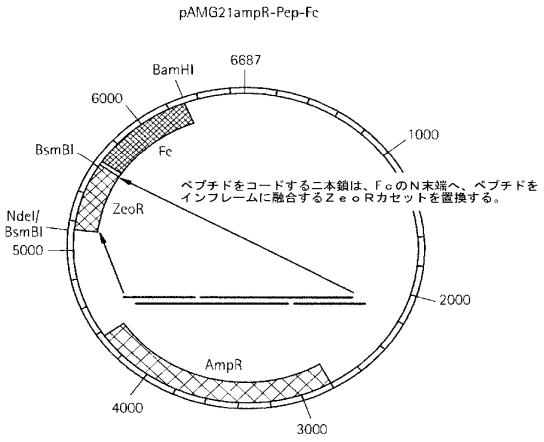
【図１２Ｃ】

FIG. 12C



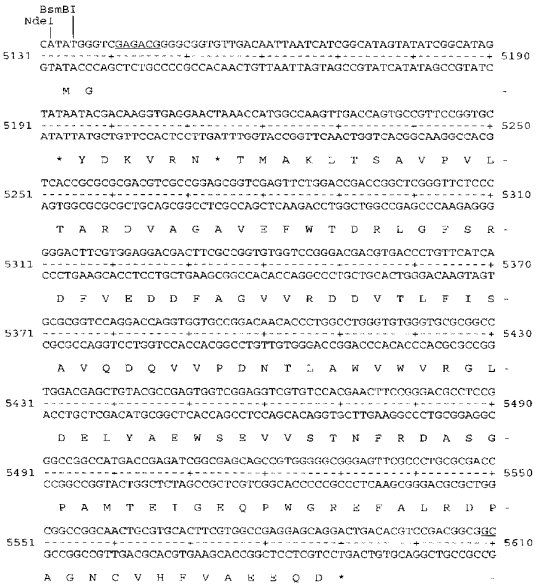
【図１２Ｄ】

FIG. 12D



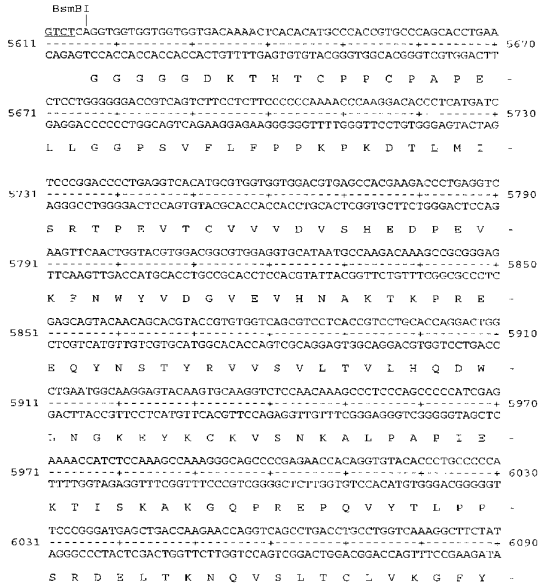
【図１２Ｅ】

FIG. 12E



【図１２Ｆ】

FIG. 12F



【図１２Ｇ】

FIG. 12G



【図１３Ａ】

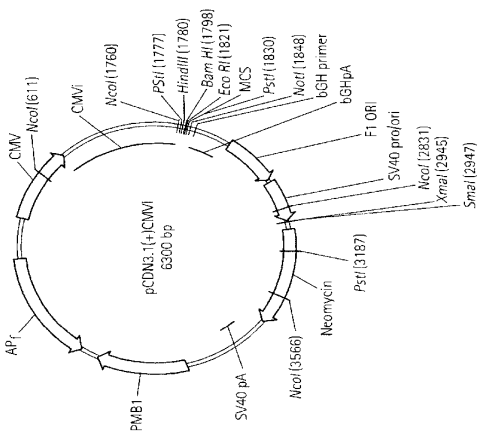


FIG. 13A

【図１３Ｂ】

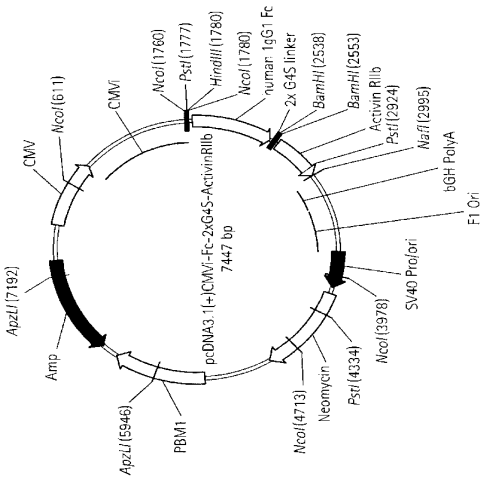


FIG. 13B

【図１３Ｃ】

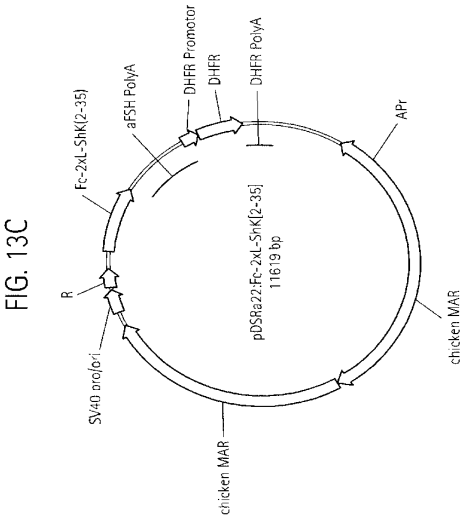
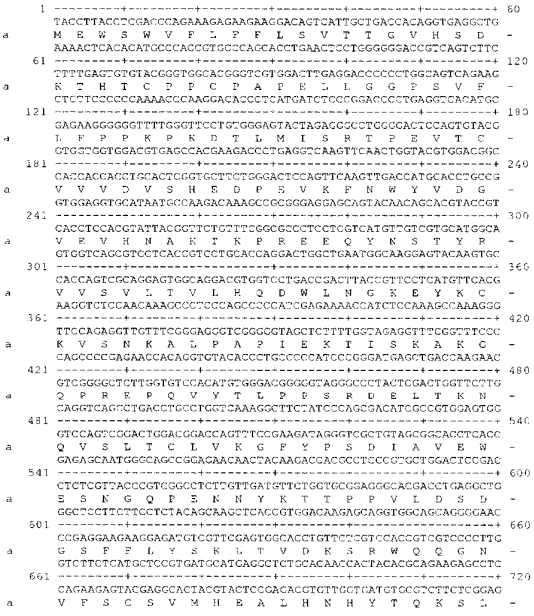


FIG. 13C

【図１４Ａ】

FIG. 14A



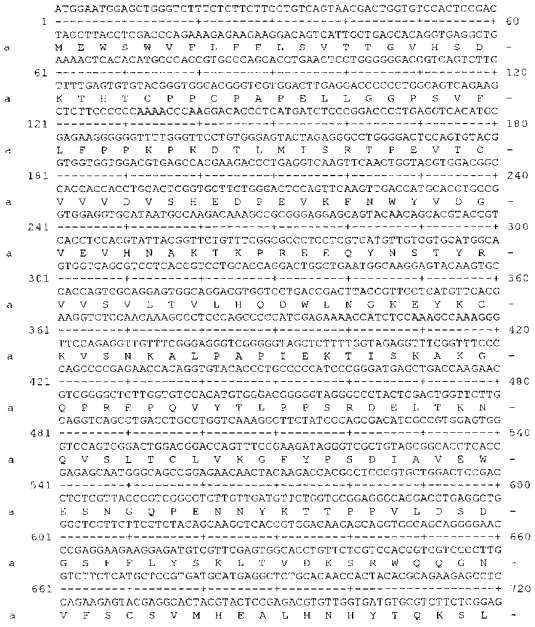
【図１４Ｂ】

FIG. 14B



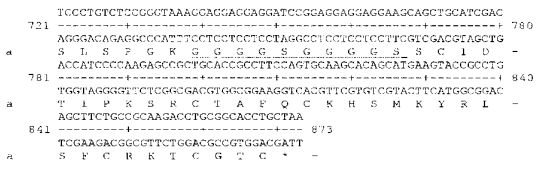
【図１５Ａ】

FIG. 15A



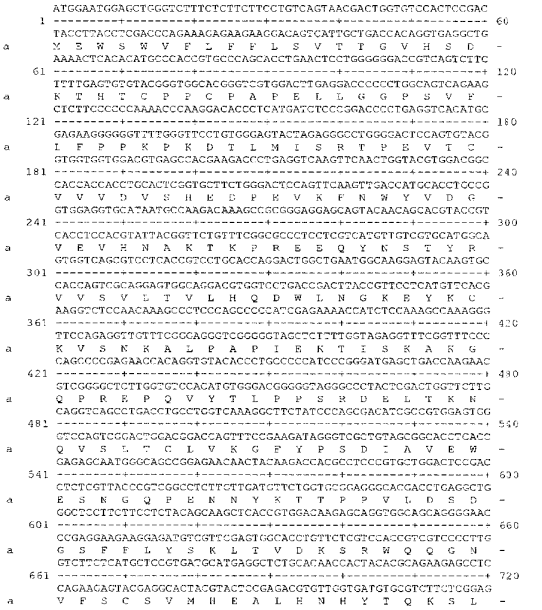
【図１５Ｂ】

FIG. 15B



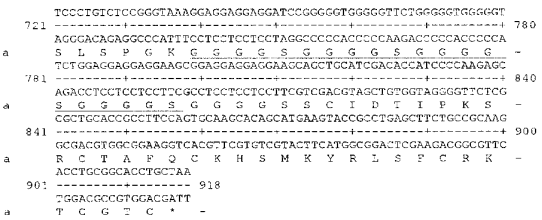
【図１６Ａ】

FIG. 16A



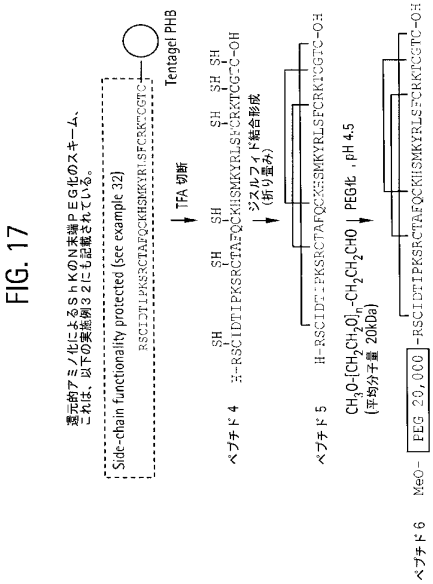
【図１６Ｂ】

FIG. 16B



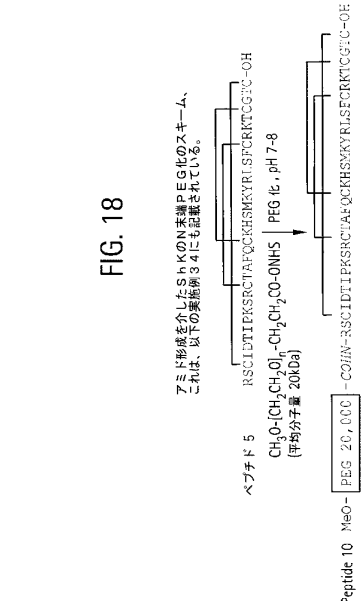
【図１７】

FIG. 17



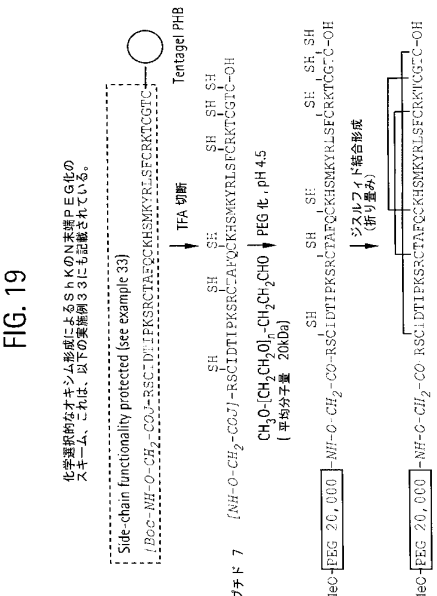
【図１８】

FIG. 18



【図１９】

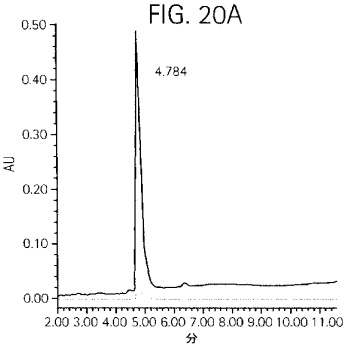
FIG. 19



OnCusp
Ex. 1002

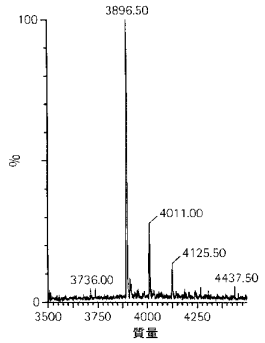
【図２０Ａ】

FIG. 20A



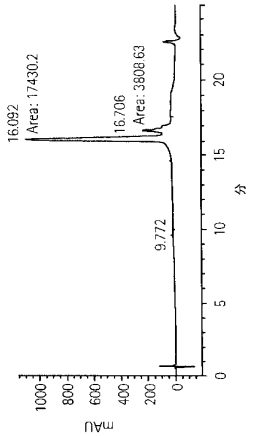
【図２０Ｂ】

FIG. 20B



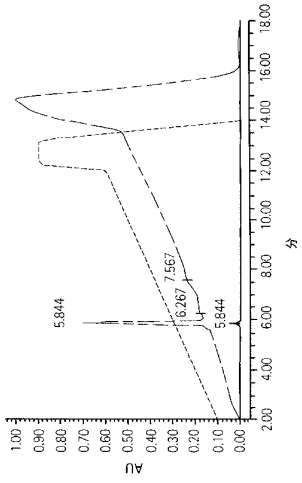
【図２１】

FIG. 21



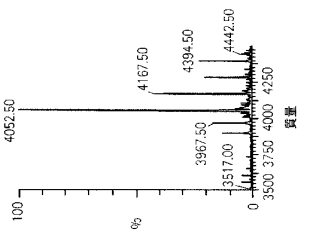
【図２２Ａ】

FIG. 22A



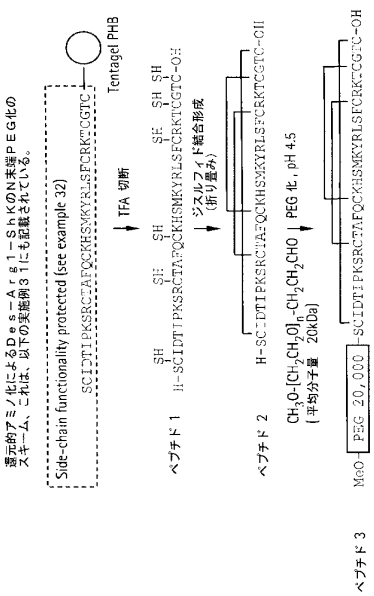
【図２２Ｂ】

FIG. 22B



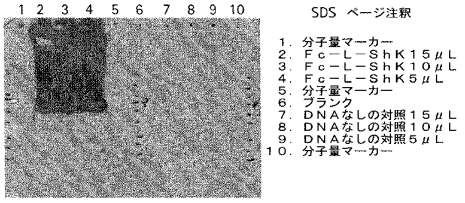
【図２３】

FIG. 23



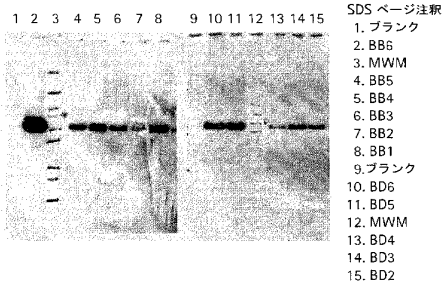
【 図 2 4 A 】

FIG. 24A



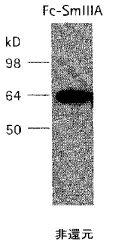
【 図 2 4 B 】

FIG. 24B



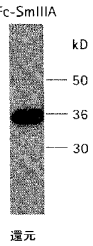
【 図 2 5 A 】

FIG. 25A



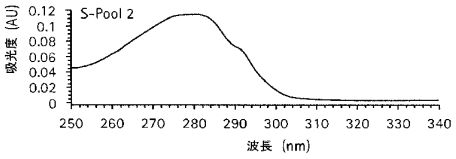
【 図 2 5 B 】

FIG. 25B



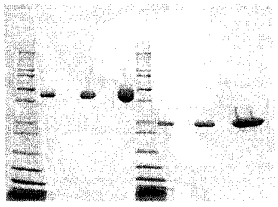
【 図 2 6 A 】

FIG. 26A



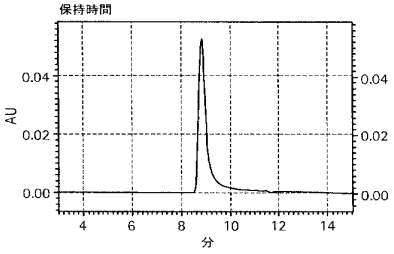
【 図 2 6 B 】

FIG. 26B



【 図 2 6 C 】

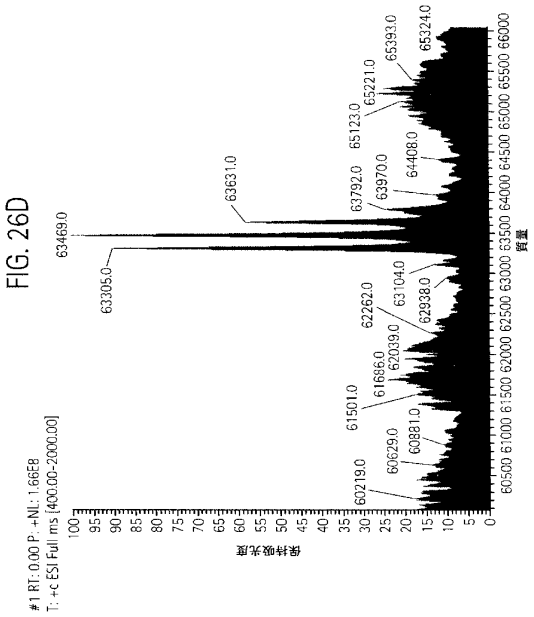
FIG. 26C



OnCusp
Ex. 1002

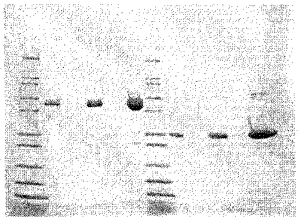
【図２６Ｄ】

FIG. 26D



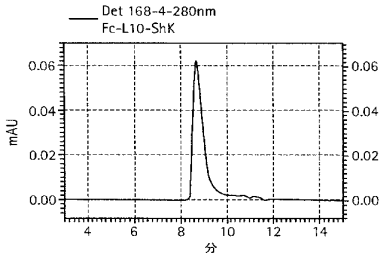
【図２７Ａ】

FIG. 27A



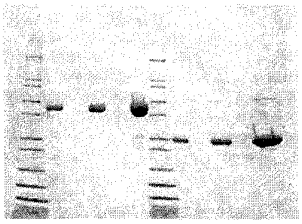
【図２７Ｂ】

FIG. 27B



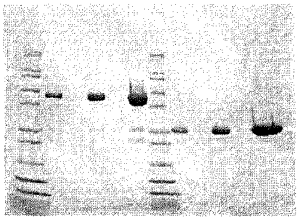
【図２７Ｃ】

FIG. 27C



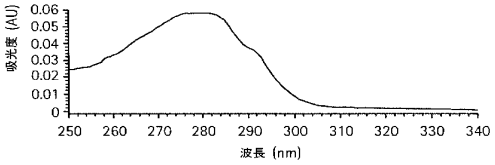
【図２７Ｄ】

FIG. 27D



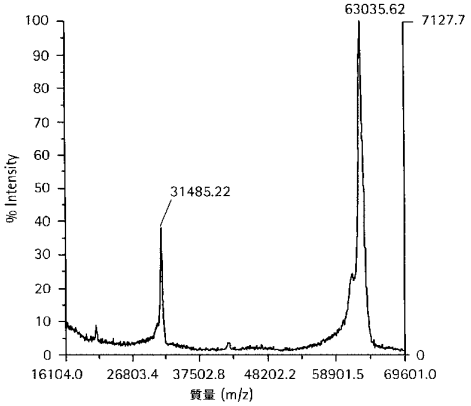
【図２７Ｅ】

FIG. 27E



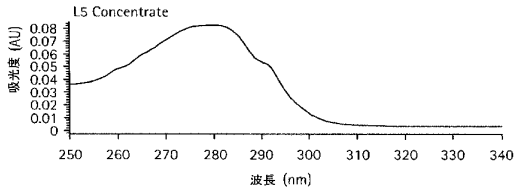
【図２７Ｆ】

FIG. 27F



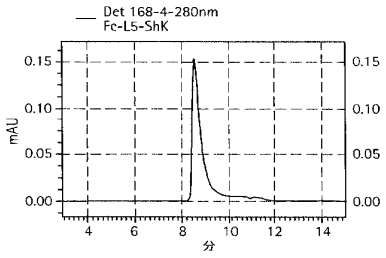
【図２７Ｇ】

FIG. 27G



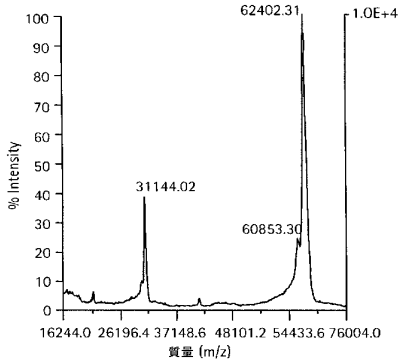
【図２７Ｈ】

FIG. 27H



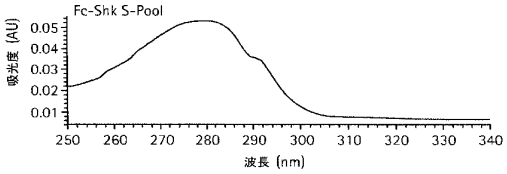
【図２７Ｉ】

FIG. 27I



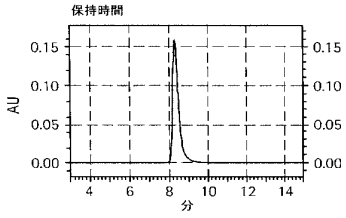
【図２７Ｊ】

FIG. 27J



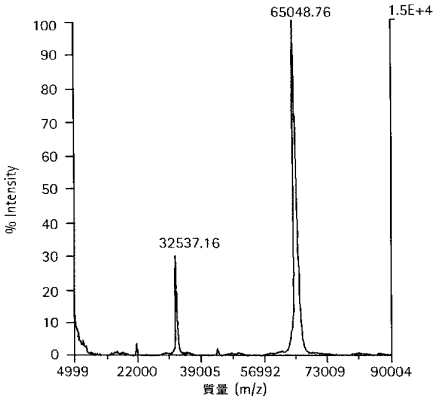
【図２７Ｋ】

FIG. 27K



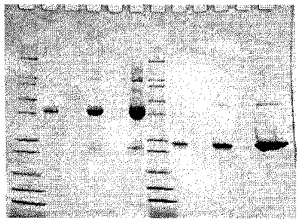
【図２７Ｌ】

FIG. 27L



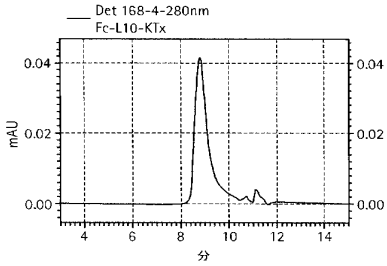
【図２８Ａ】

FIG. 28A



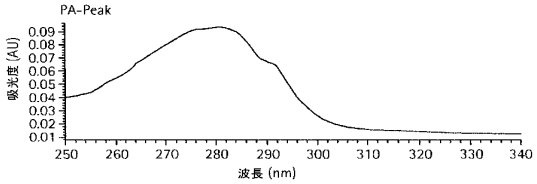
【図２８Ｂ】

FIG. 28B



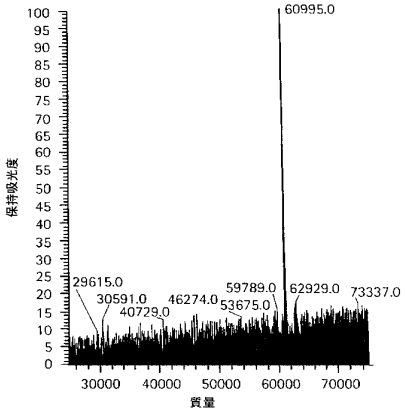
【図２８Ｃ】

FIG. 28C



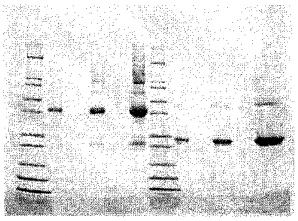
【図２８Ｄ】

FIG. 28D



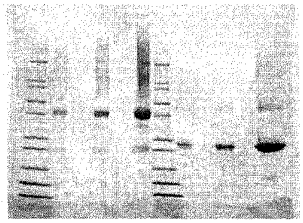
【図２９Ａ】

FIG. 29A



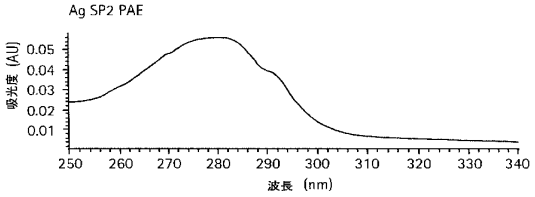
【図２９Ｂ】

FIG. 29B



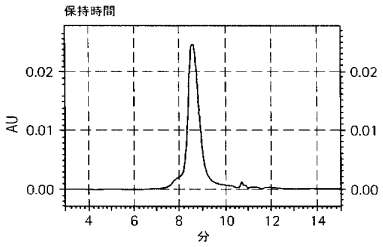
【図２９Ｃ】

FIG. 29C



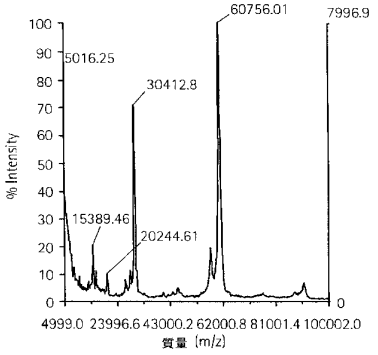
【図２９Ｄ】

FIG. 29D



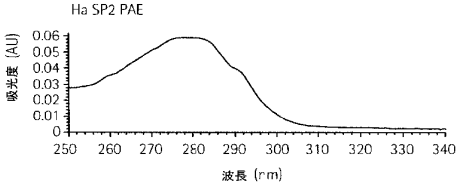
【図２９Ｅ】

FIG. 29E



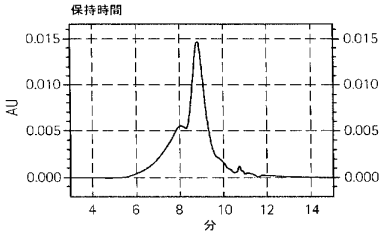
【図２９Ｆ】

FIG. 29F



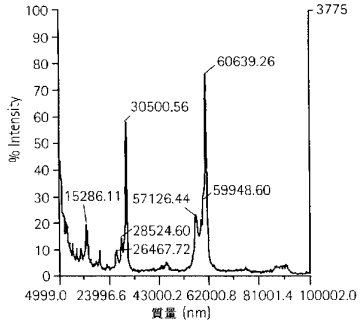
【図２９Ｇ】

FIG. 29G



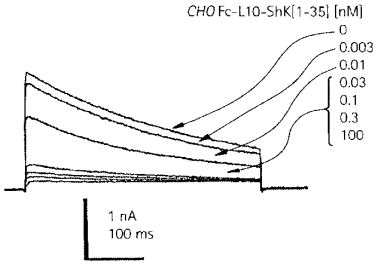
【図２９Ｈ】

FIG. 29H



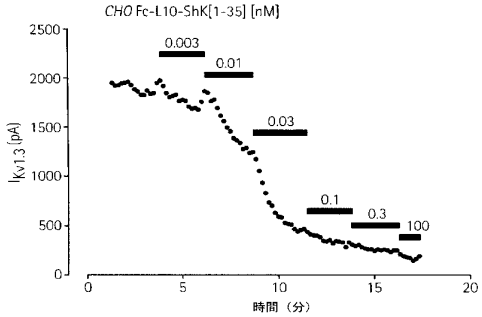
【図３０Ａ】

FIG. 30A



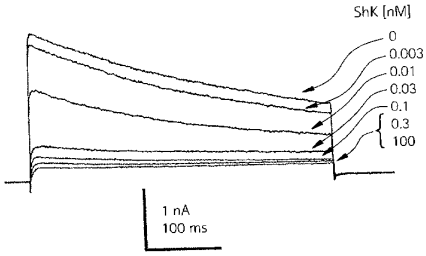
【図３０Ｂ】

FIG. 30B



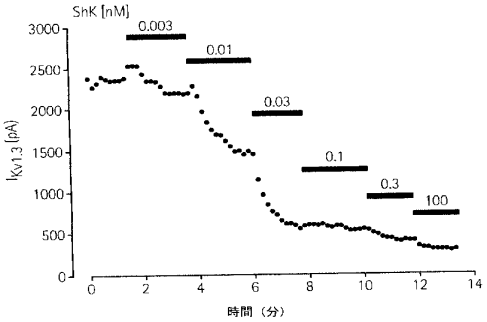
【図３０Ｃ】

FIG. 30C



【図３０Ｄ】

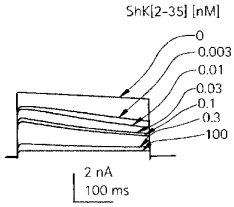
FIG. 30D



OnCusp
Ex. 1002

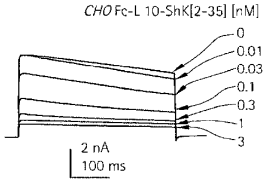
【図３１Ａ】

FIG. 31A



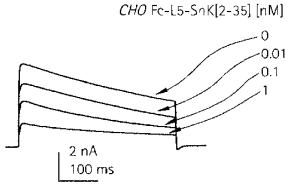
【図３１Ｂ】

FIG. 31B



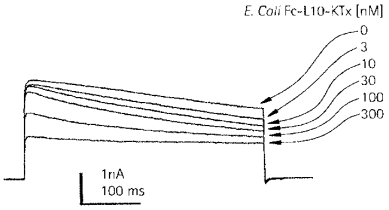
【図３１Ｃ】

FIG. 31C



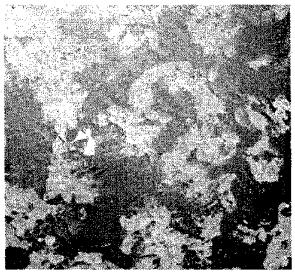
【図３２Ａ】

FIG. 32A



【図３２Ｂ】

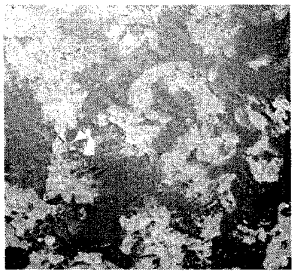
FIG. 33B



HEK 293/hKv1.3 形質移入細胞

【図３３Ｂ】

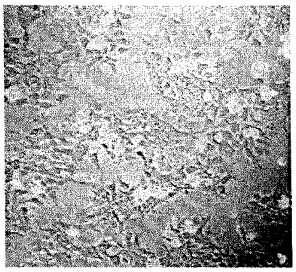
FIG. 33B



HEK 293/hKv1.3 形質移入細胞

【図３３Ａ】

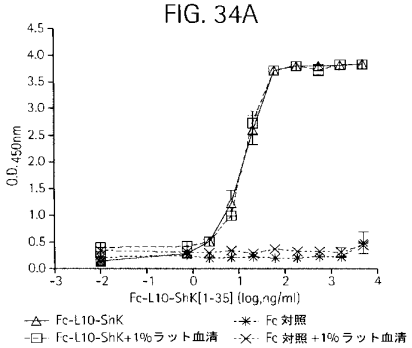
FIG. 33A



HEK 293 非形質移入細胞

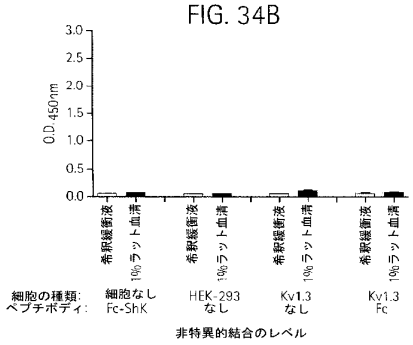
【図３４Ａ】

FIG. 34A



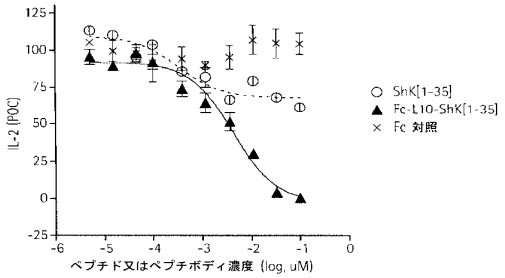
【図３４Ｂ】

FIG. 34B



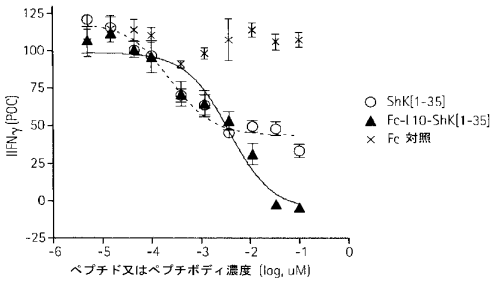
【図３５Ａ】

FIG. 35A



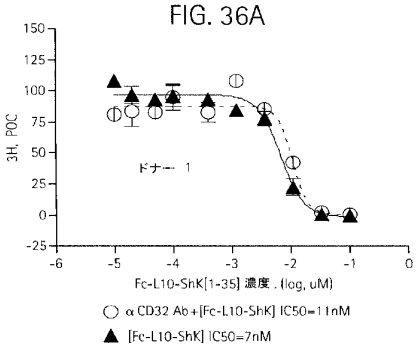
【図３５Ｂ】

FIG. 35B



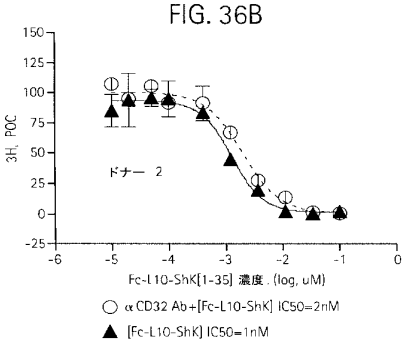
【図３６Ａ】

FIG. 36A



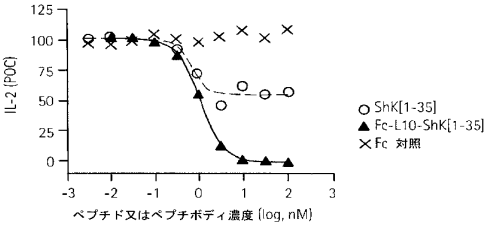
【図３６Ｂ】

FIG. 36B



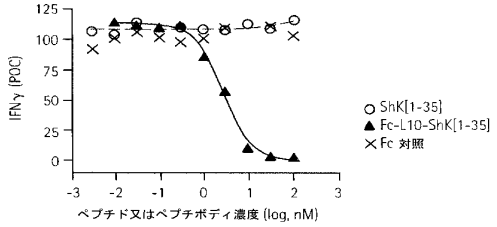
【図３７Ａ】

FIG. 37A



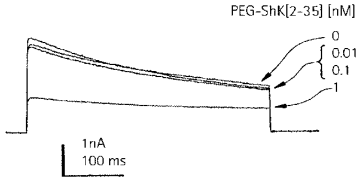
【図３７Ｂ】

FIG. 37B



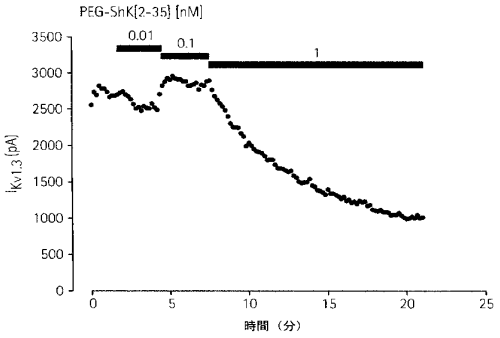
【図３８Ａ】

FIG. 38A



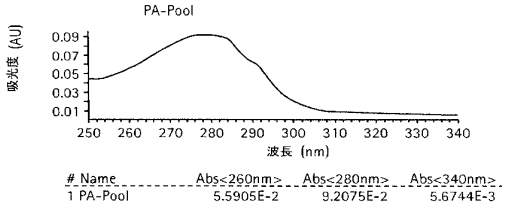
【図３８Ｂ】

FIG. 38B



【図３９Ａ】

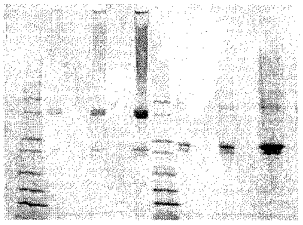
FIG. 39A



# Name	Abs<260nm>	Abs<280nm>	Abs<340nm>
1 PA-Pool	5.5905E-2	9.2075E-2	5.6744E-3

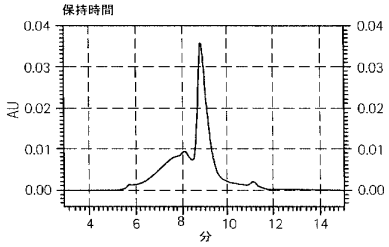
【図３９Ｂ】

FIG. 39B



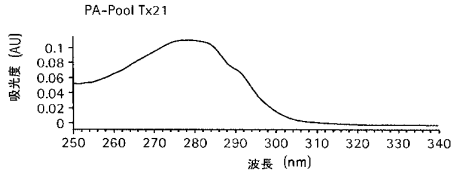
【図３９Ｃ】

FIG. 39C



【図４０Ａ】

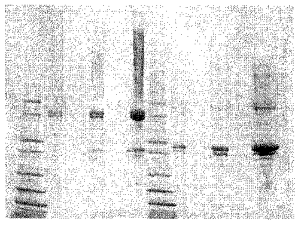
FIG. 40A



# Name	Abs<260nm>	Abs<280nm>	Abs<340nm>
1 PA-Pool Tx21	6.4667E-2	0.10996	-2.1558E-3

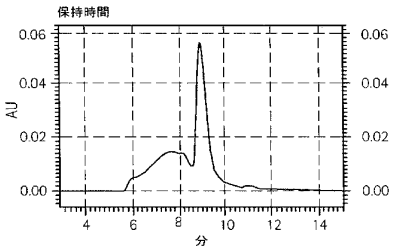
【図４０Ｂ】

FIG. 40B



【図４０Ｃ】

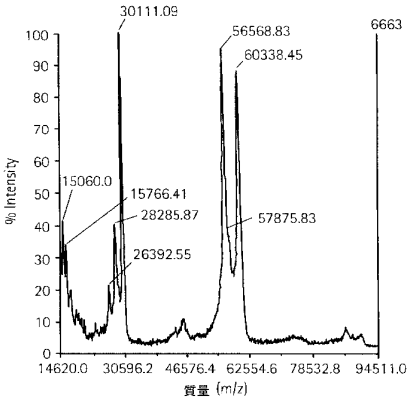
FIG. 40C



OnCusp
Ex. 1002

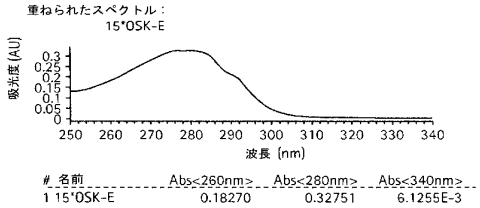
【図４０Ｄ】

FIG. 40D



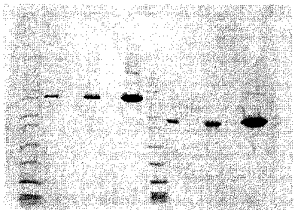
【図４１Ａ】

FIG. 41A



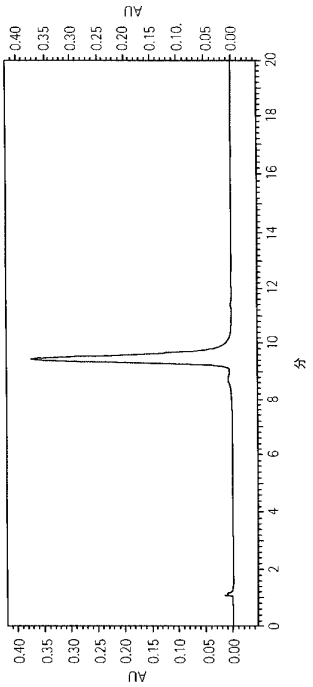
【図４１Ｂ】

FIG. 41B



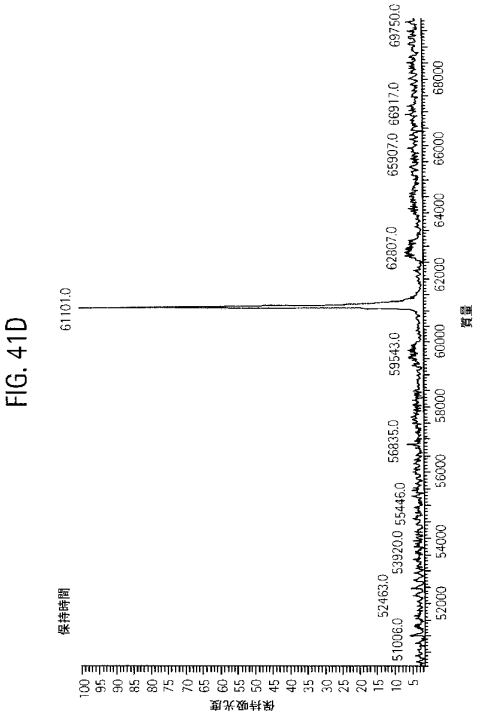
【図４１Ｃ】

FIG. 41C



【図４１Ｄ】

FIG. 41D



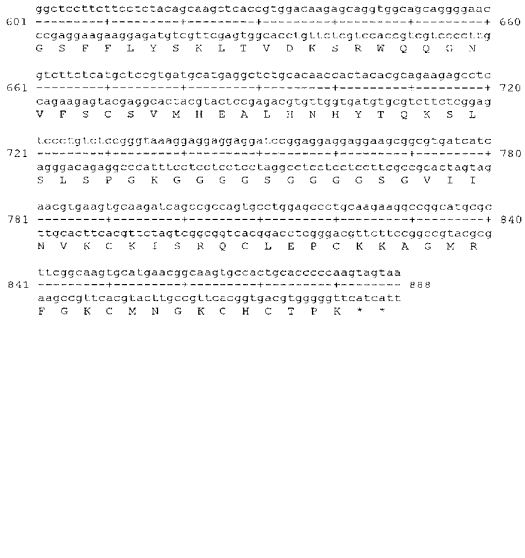
【図４２Ａ】

FIG. 42A



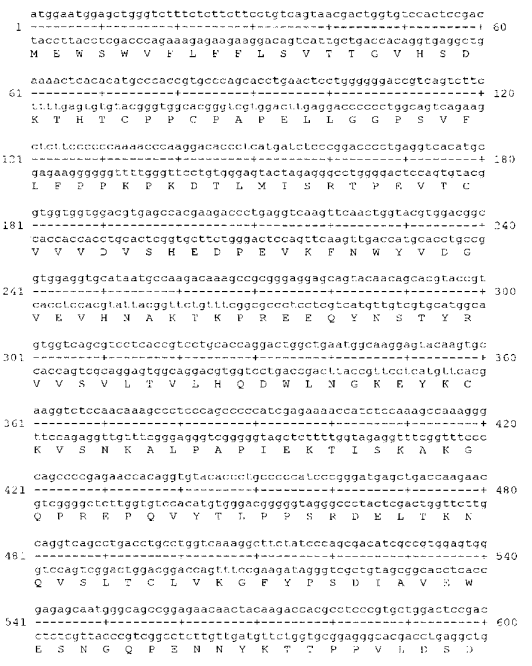
【図４２Ｂ】

FIG. 42B



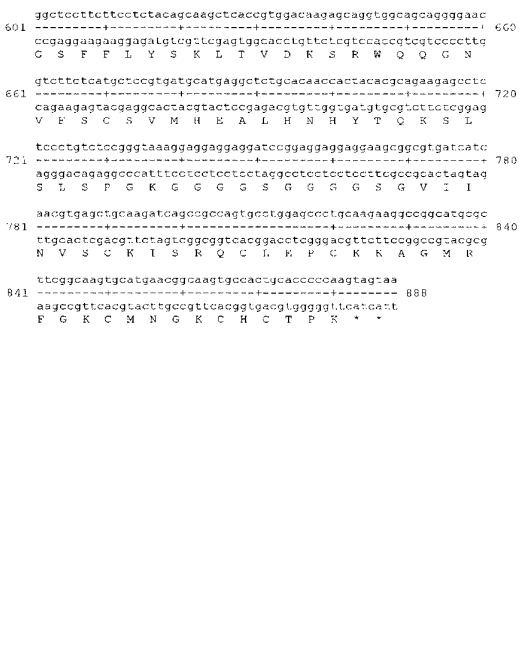
【図４３Ａ】

FIG. 43A



【図４３Ｂ】

FIG. 43B



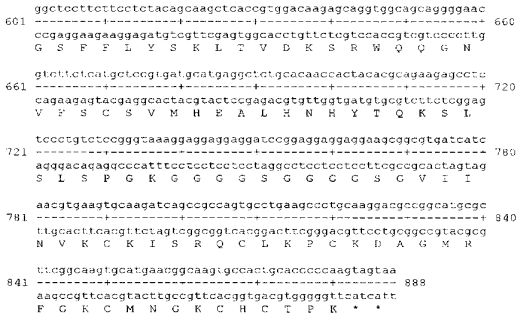
【図４４Ａ】

FIG. 44A



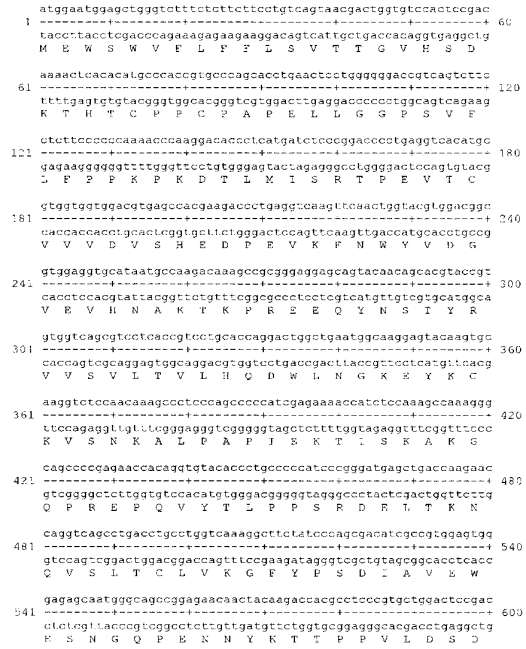
【図４４Ｂ】

FIG. 44B



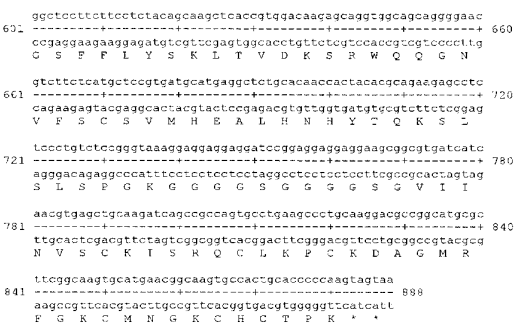
【図４５Ａ】

FIG. 45A



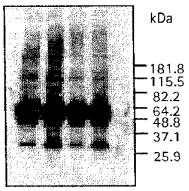
【図４５Ｂ】

FIG. 45B



【図４６】

FIG. 46



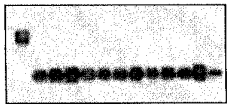
【図４７】

FIG. 47



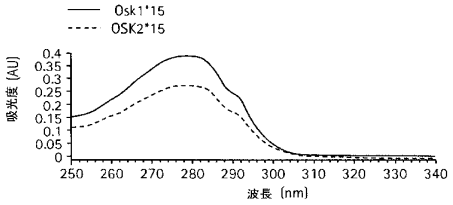
【図４８】

FIG. 48



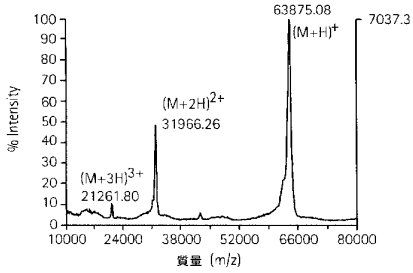
【図４９Ａ】

FIG. 49A



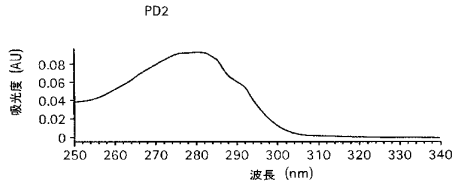
【図４９Ｄ】

FIG. 49D



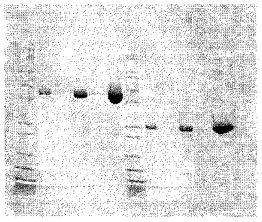
【図５０Ａ】

FIG. 50A



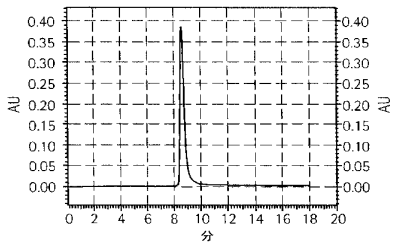
【図４９Ｂ】

FIG. 49B



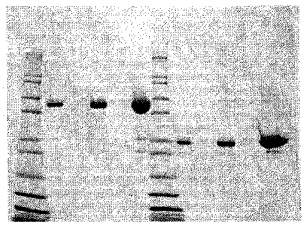
【図４９Ｃ】

FIG. 49C



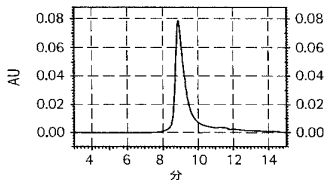
【図５０Ｂ】

FIG. 50B



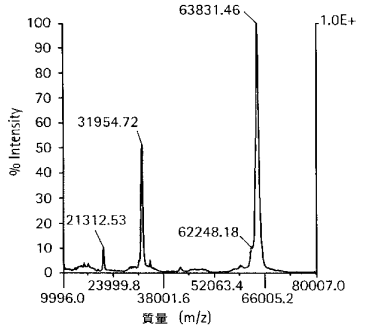
【図５０Ｃ】

FIG. 50C



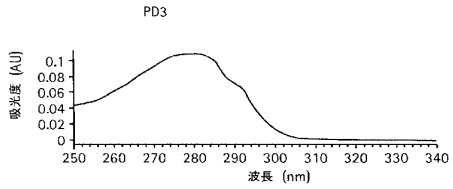
【図５０Ｄ】

FIG. 50D



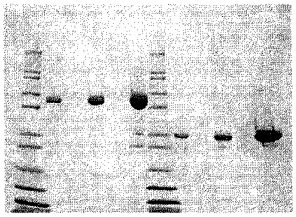
【図５１Ａ】

FIG. 51A



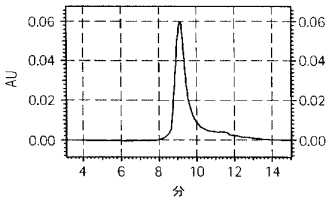
【図５１Ｂ】

FIG. 51B



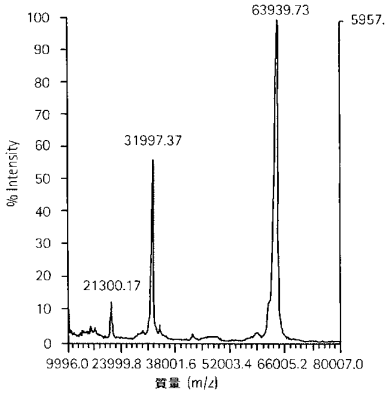
【図５１Ｃ】

FIG. 51C



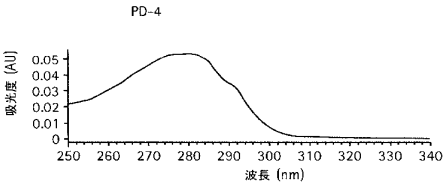
【図５１Ｄ】

FIG. 51D



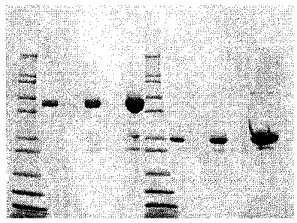
【図５２Ａ】

FIG. 52A



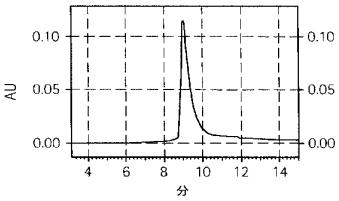
【図５２Ｂ】

FIG. 52B



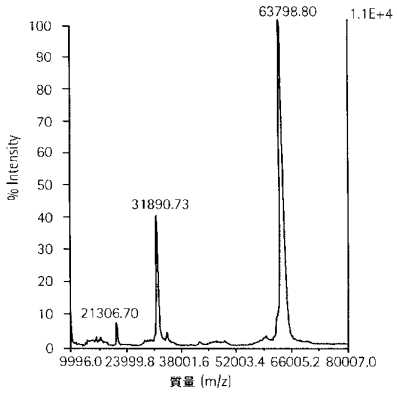
【図５２Ｃ】

FIG. 52C



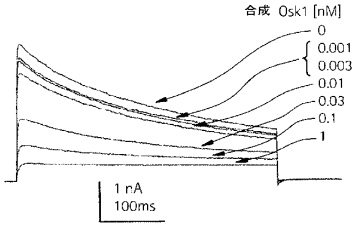
【図５２Ｄ】

FIG. 52D



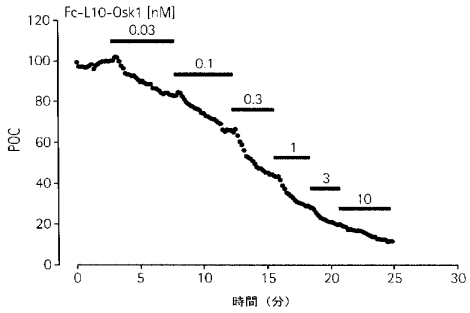
【図５３Ａ】

FIG. 53A



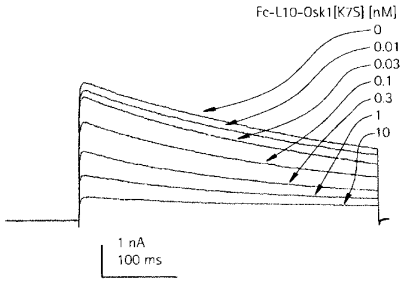
【図５４Ｂ】

FIG. 54B



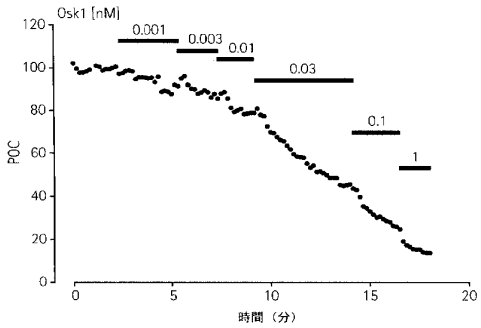
【図５５Ａ】

FIG. 55A



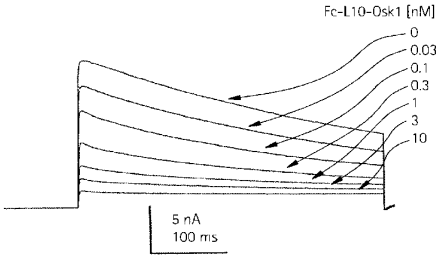
【図５３Ｂ】

FIG. 53B



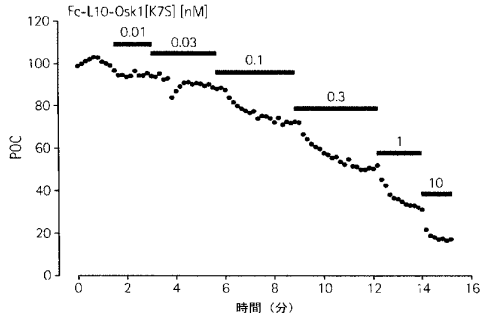
【図５４Ａ】

FIG. 54A



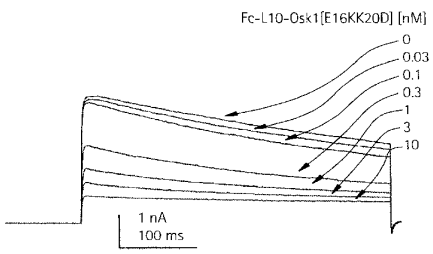
【図５５Ｂ】

FIG. 55B



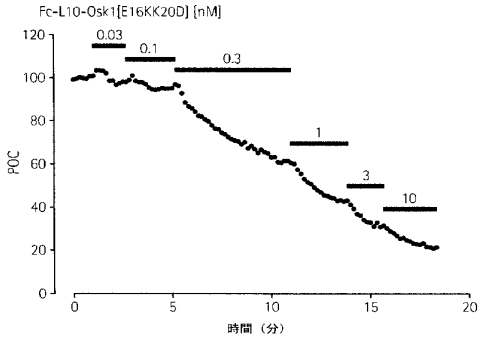
【図５６Ａ】

FIG. 56A



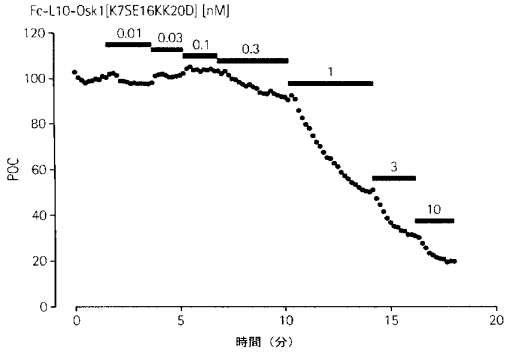
【図５６Ｂ】

FIG. 56B



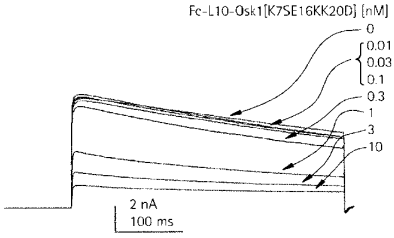
【図５７Ｂ】

FIG. 57B



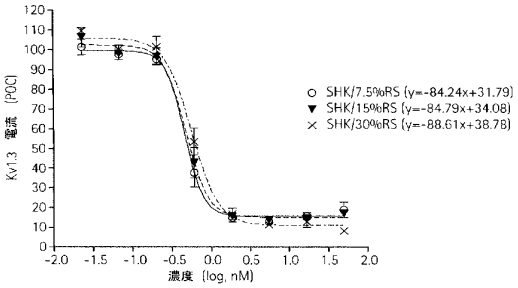
【図５７Ａ】

FIG. 57A



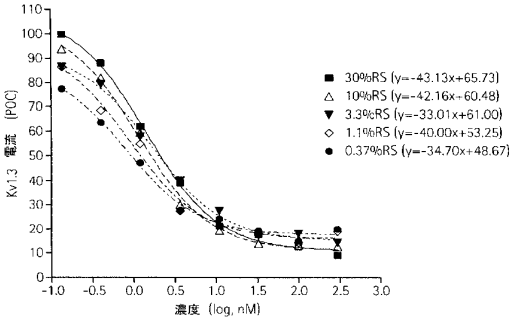
【図５８Ａ】

FIG. 58A



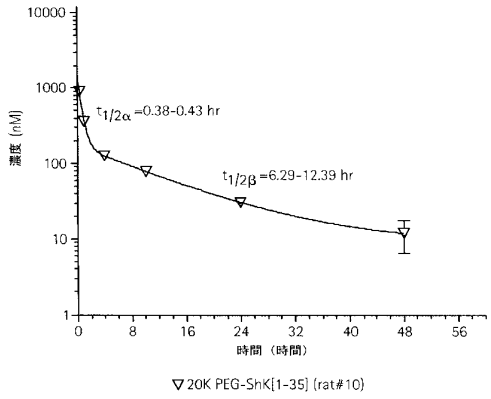
【図５８Ｂ】

FIG. 58B



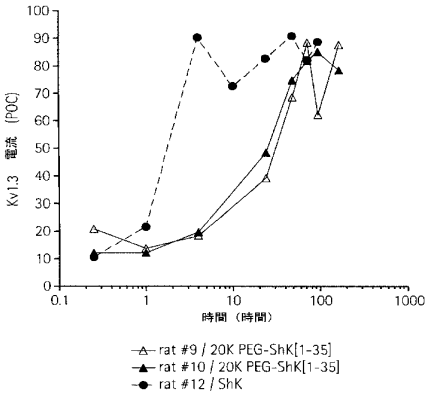
【図５９】

FIG. 59



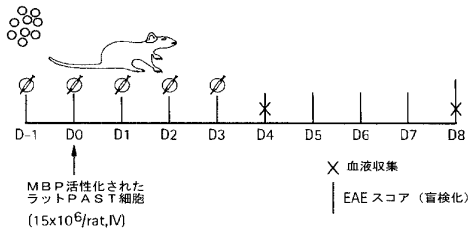
【図６０】

FIG. 60



【図６１】

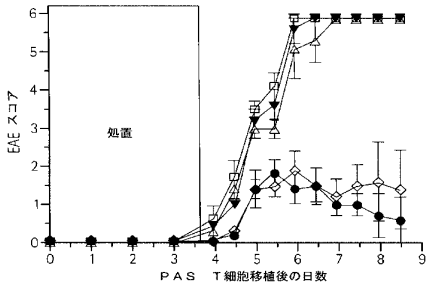
FIG. 61



1.ビヒクル(2%ルイスラット血清-PBS) SC d-1-d3
2. ShK 10μg/kg (2.47nmoles/kg) SC d-1-d3
3. PEG-ShK 1μg/kg (0.247nmoles/kg) SC d-1-d3
4. PEG-ShK 10μg/kg (2.47nmoles/kg) SC d-1-d3
5. PEG-ShK 100μg/kg (24.7nmoles/kg) SC d-1-d3

【図６２】

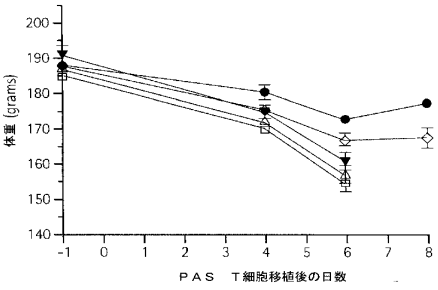
FIG. 62



ビヒクル
ShK 10μg/kg (2.47nmol/kg)
PEG-ShK 1μg/kg (0.247nmol/kg)
PEG-ShK 10μg/kg (2.47nmol/kg)
PEG-ShK 100μg/kg (24.7nmol/kg)

【図６３】

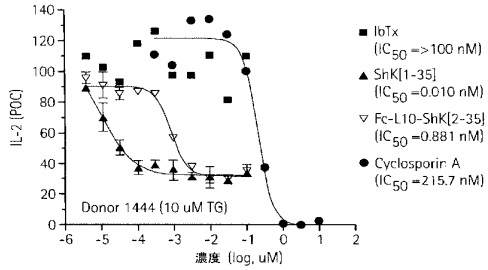
FIG. 63



ビヒクル
ShK 10μg/kg
PEG-ShK 1μg/kg
PEG-ShK 10μg/kg
PEG-ShK 100μg/kg

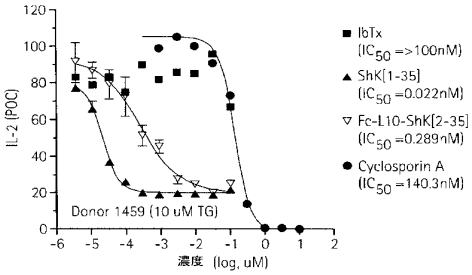
【図６４Ａ】

FIG. 64A



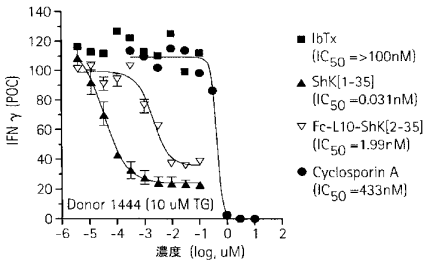
【図６４Ｂ】

FIG. 64B



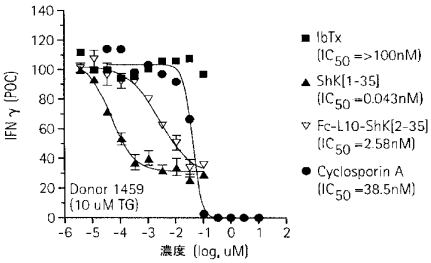
【図６５Ａ】

FIG. 65A



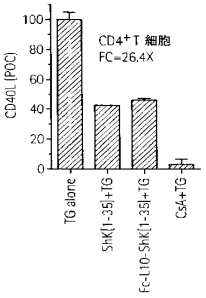
【図６５Ｂ】

FIG. 65B



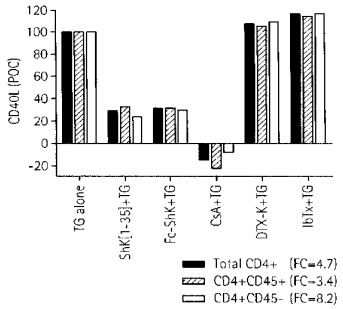
【図６６Ａ】

FIG. 66A



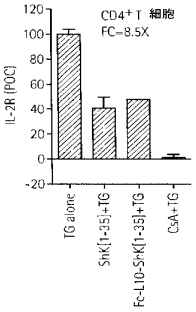
【図６６Ｂ】

FIG. 66B



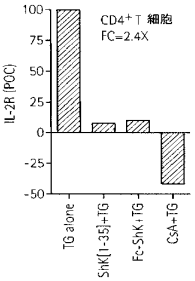
【図６７Ａ】

FIG. 67A



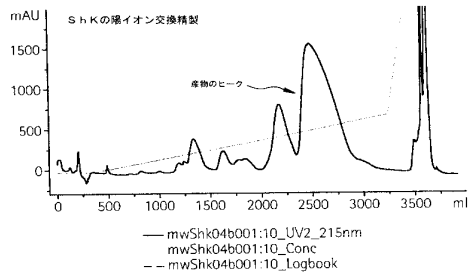
【図６７Ｂ】

FIG. 67B



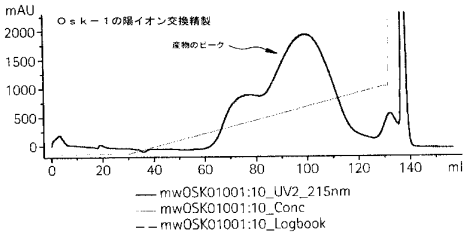
【図６８Ａ】

FIG. 68A



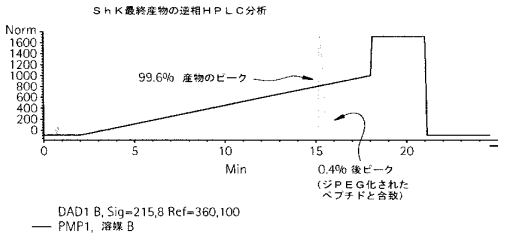
【図６８Ｂ】

FIG. 68B



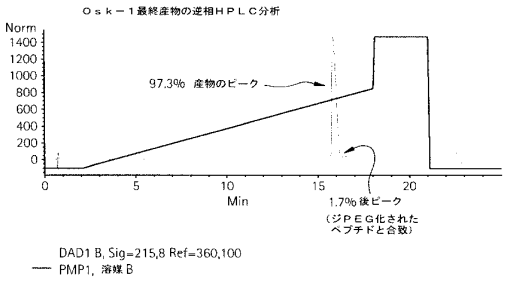
【図６９Ａ】

FIG. 69A



【図６９Ｂ】

FIG. 69B



【図７０】

FIG. 70

```
1   mdkthtcppc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe
51  dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsrdelg ggviinvkck
151 isrgclepck kagmrfgkcm ngkchctpkg gtknqvsltc lvkgfypsdi
201 avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksrw qqgnvfscsv
251 mhealhnhyt qkslslspgk
```

【図７１】

FIG. 71

```
1   mdkthtcppc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe
51  dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsrdelg grscidtipk
151 srctafqckh smkyrlsfcr ktcgtcggtk nqvsltclvk gfypsdiave
201 wesngqpenn ykttppvlds dgsfflyskl tvdksrwqqg nvfscsvmhe
251 alhnhytqks lslspgk
```

【図７２】

FIG. 72

```
1   mdkthtcppc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe
51  dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsrdelg grscidtipk
151 srctafqckh smkyrlsfcr ktcgtcgggg tknqvsltcl vkgfypsdia
201 vewesngqpe nnykttppvl dsdgsfflys kltvdksrwq qgnvfscsvm
251 healhnhytq kslslspgk
```

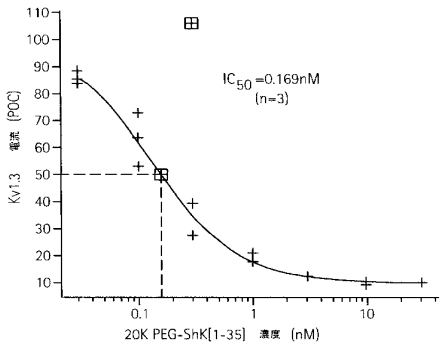
【図７３】

FIG. 73

```
1   mdkthtcppc papellggps vflfppkpkd tlmisrtpev tcvvvdvshe
51  dpevkfnwyv dgvevhnakt kpreeqynst yrvvsvltvl hqdwlngkey
101 kckvsnkalp apiektiska kgqprepqvy tlppsrdelg ggggviinvk
151 ckisrgclep ckkagmrfgk cmngkchctp kggtknqvsl tclvkgfyps
201 diavewesng qpennykttp pvldsdgsff lyskltvdks rwqqgnvfsc
251 svmhealhnh ytqkslslsp gk
```

【図７４】

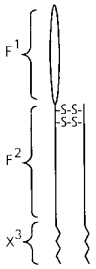
FIG. 74



OnCusp
Ex. 1002

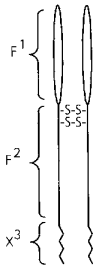
【図７５Ａ】

FIG. 75A



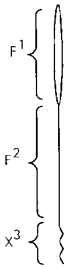
【図７５Ｂ】

FIG. 75B



【図７５Ｃ】

FIG. 75C



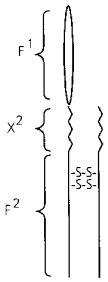
【図７５Ｄ】

FIG. 75D



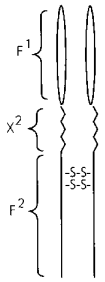
【図７５Ｅ】

FIG. 75E



【図７５Ｆ】

FIG. 75F



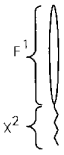
【図７５Ｇ】

FIG. 75G



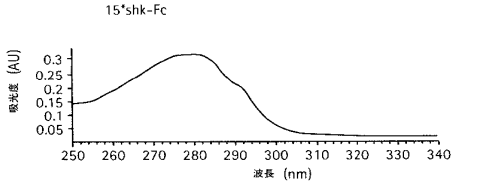
【図７５Ｈ】

FIG. 75H



【図７６Ａ】

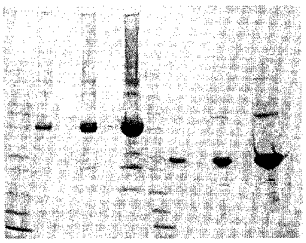
FIG. 76A



#	名前	Abs<260nm>	Abs<280nm>	Abs<340nm>
1	15*shk-Fc	0.18855	0.32489	1.7233E-3

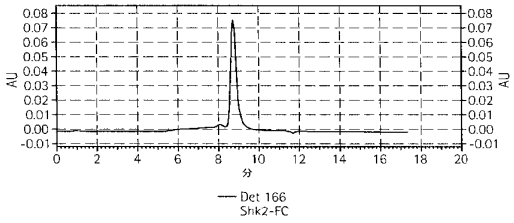
【図７６Ｂ】

FIG. 76B



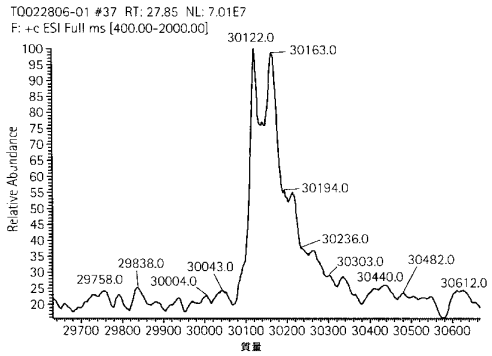
【図７６Ｃ】

FIG. 76C



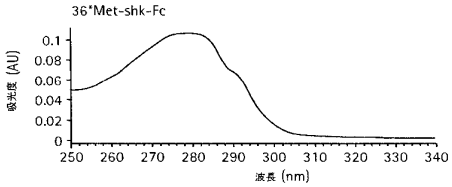
【図７６Ｄ】

FIG. 76D



【図７７Ａ】

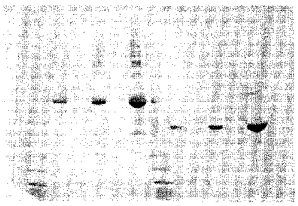
FIG. 77A



#	名前	Abs<260nm>	Abs<280nm>	Abs<340nm>
1	36*Met-shk-Fc	6.3299E-2	0.10720	2.8033E-3

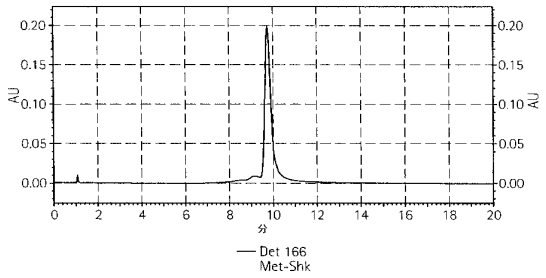
【 図 7 7 B 】

FIG. 77B



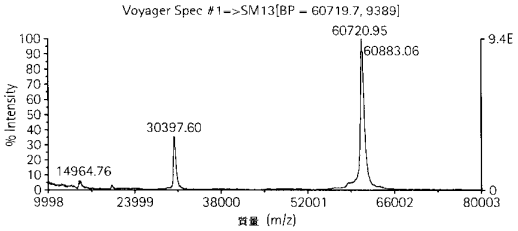
【 図 7 7 C 】

FIG. 77C



【 図 7 7 D 】

FIG. 77D



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード(参考)
C07K 14/00	***(2006.01)***	C07K	14/00	
A61K 38/00	***(2006.01)***	A61K	37/02	
A61K 47/48	***(2006.01)***	A61K	47/48	
A61P 43/00	***(2006.01)***	A61P	43/00	111
A61P 25/00	***(2006.01)***	A61P	25/00	
A61P 3/10	***(2006.01)***	A61P	3/10	
A61P 1/00	***(2006.01)***	A61P	1/00	
A61P 17/00	***(2006.01)***	A61P	17/00	
A61P 19/02	***(2006.01)***	A61P	19/02	
A61P 29/00	***(2006.01)***	A61P	29/00	101
A61P 11/06	***(2006.01)***	A61P	29/00	
A61P 37/08	***(2006.01)***	A61P	11/06	
A61P 37/00	***(2006.01)***	A61P	37/08	
		A61P	37/00	

(72)発明者 ジヨージフ・ジー・マツギバーン
アメリカ合衆国、カリフオルニア・91377、オーク・パーク、ノルマンデイ・テラス・6208
(72)発明者 レスリー・ピー・ミランダ
アメリカ合衆国、カリフオルニア・91362、サウザンド・オークス、メイプルノール・プレイス・3586
(72)発明者 ヒユン・キユー・グエン
アメリカ合衆国、カリフオルニア・91360、サウザンド・オークス、セント・チヤールズ・ドライブ・881、アパートメント・10
(72)発明者 ケネス・ダブリユ・ウオーカー
アメリカ合衆国、カリフオルニア・91320、ニユーベリー・パーク、メサ・アベニユー・175
(72)発明者 シヨウ-フエン・シルビア・フー
アメリカ合衆国、カリフオルニア・91360、サウザンド・オークス、リンミア・ドライブ・986
(72)発明者 コリン・ブイ・ゲツグ・ジユニア
アメリカ合衆国、カリフオルニア・91320、ニユーベリー・パーク、デルウツド・コート・487
(72)発明者 ステフアン・アイ・マクドナフ
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・02138、ケンブリツジ、コンコード・アベニユー・12、ナンバー・3

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 GA11 HA01
4B065 AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C076 CC03 CC04 CC07 CC15 EE23 EE59 FF31 FF36
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA02 BA08 BA22 BA44 DA32 DA35
NA14 ZA02 ZA021 ZA022 ZA59 ZA591 ZA592 ZA66 ZA661 ZA662
ZA81 ZA811 ZA812 ZA89 ZA891 ZA892 ZA96 ZA961 ZA962 ZB05
ZB051 ZB052 ZB07 ZB071 ZB072 ZB08 ZB081 ZB082 ZB11 ZB111
ZB112 ZB13 ZB131 ZB132 ZB15 ZB151 ZB152 ZC35 ZC351 ZC352
4H045 AA10 BA10 DA83 EA20 FA74

OnCusp
Ex. 1002

【外国語明細書】
2012100671000001.pdf

(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2012-509259
(P2012-509259A)
(43)公表日　平成24年4月19日(2012.4.19)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07K 19/00	(2006.01)	C07K 19/00		4B024
C07K 14/76	(2006.01)	C07K 14/76	ZNA	4C076
C07K 16/18	(2006.01)	C07K 16/18		4C084
A61K 38/00	(2006.01)	A61K 37/02		4C085
A61P 37/00	(2006.01)	A61P 37/00		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 96 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-536365 (P2011-536365)
(86)(22)出願日　平成21年10月14日 (2009.10.14)
(85)翻訳文提出日　平成23年7月8日 (2011.7.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/060721
(87)国際公開番号　WO2010/059315
(87)国際公開日　平成22年5月27日 (2010.5.27)
(31)優先権主張番号　PCT/US2009/040259
(32)優先日　平成21年4月10日 (2009.4.10)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/115,797
(32)優先日　平成20年11月18日 (2008.11.18)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　508044829
メリマック　ファーマシューティカルズ　インコーポレーティッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　ケンブリッジ　ワン　ケンドル　スクエア　スイート　ビー７２０１
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

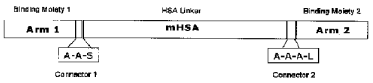
最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト血清アルブミンリンカーおよびそのコンジュゲート

(57)【要約】
ヒト血清アルブミン（HSA）リンカー、ならびに、結合剤、診断剤、および治療剤を結合させたHSAリンカーを開示する。また、該HSAリンカーと第一および第二の単鎖Fv分子（scFv）であるアミノ末端およびカルボキシ末端の結合部分とが共有結合した、コンジュゲートも開示する。例示的なコンジュゲートは、例えば、治療用途等のために腫瘍細胞の増殖を低下させるのに有用である。HSAリンカーコンジュゲートの診断用途および治療用途のための方法およびキットも開示する。



Figure 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下を含む、HSAリンカーコンジュゲート：
(i) SEQ ID NO: 6～15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列を含む、ヒト血清アルブミン（HSA）リンカー；ならびに
(ii) 抗体、単鎖Fv分子、二重特異性単鎖Fv（$(scFv')_2$）分子、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボディ（triabody）、ホルモン、Fab断片、$F(ab')_2$分子、タンデムscFv（taFv）断片、レセプター、リガンド、アプタマー、およびこれらの生物学的に活性な断片からなる群より選択される第一および第二の結合部分であって、該第一の結合部分が、該HSAリンカーのアミノ末端に結合し、かつ該第二の結合部分が、該HSAリンカーのカルボキシ末端に結合している、第一および第二の結合部分。
【請求項２】
前記HSAリンカーが、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載のHSAリンカーコンジュゲート。
【請求項３】
前記第一の結合部分がErbB3に特異的に結合し、かつ前記第二の結合部分がErbB2に特異的に結合する、請求項1記載のHSAリンカーコンジュゲート。
【請求項４】
SEQ ID NO: 16であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-1。
【請求項５】
SEQ ID NO: 17であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-2。
【請求項６】
SEQ ID NO: 18であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-3。
【請求項７】
SEQ ID NO: 19であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-4。
【請求項８】
SEQ ID NO: 20であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-5。
【請求項９】
SEQ ID NO: 21であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-6。
【請求項１０】
SEQ ID NO: 22であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-7。
【請求項１１】
SEQ ID NO: 23であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-8。
【請求項１２】
SEQ ID NO: 24であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-9。
【請求項１３】
SEQ ID NO: 25であるアミノ酸配列を有するまたは含む、HSAリンカーコンジュゲートB2B3-10。
【請求項１４】
薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合された、請求項1～13のいずれか一項記載のHSAリンカーコンジュゲート。

【請求項１５】
請求項1~13のいずれか一項記載のHSAリンカーコンジュゲートの有効量を哺乳動物に投与する工程を含む、疾患または障害を有する患者を治療するための方法。
【請求項１６】
シクロホスファミド、カンプトテシン、ホモカンプトテシン、コルヒチン、コンブレスタチン（combrestatin）、コンブレスタチン、リゾキシン、ドリスタチン（dolistatin）、アンサマイトシンp3、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリチアマイシン（calecahimicin）、メトトレキサート、5-フルオロウラシル（5-FU）、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン、ラロキシフェン、レトロゾール、エピルビシン、ベバシズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、およびこれらの誘導体からなる群より選択される1つまたは複数の治療剤と組み合わせた、請求項1~13のいずれか一項記載のHSAリンカーコンジュゲートを含む、組成物。
【請求項１７】
前記治療剤がトラスツズマブである、請求項16記載の組成物。
【請求項１８】
前記HSAリンカーコンジュゲートが、SEQ ID NO: 16であるアミノ酸配列を有するまたは含むHSAリンカーコンジュゲートB2B3-1である、請求項16記載の組成物。
【請求項１９】
前記治療剤がトラスツズマブであり、かつ前記HSAリンカーコンジュゲートが、SEQ ID NO: 16であるアミノ酸配列を有するまたは含むHSAリンカーコンジュゲートB2B3-1である、請求項16記載の組成物。
【請求項２０】
ヒト乳房腫瘍細胞を用いたヒト異種移植モデルのヌードマウスにおいて第一の用量の治療剤および第二の用量のHSAリンカーコンジュゲートにより試験した場合に、同一モデルにおいて第一の用量の治療剤のみまたは第二の用量のHSAリンカーコンジュゲートのみにより提供されるよりも大きな効果が該組み合わせによって提供される、請求項19記載の組成物。
【請求項２１】
少なくとも3 mg/kgのB2B3-1および少なくとも0.1 mg/kgのトラスツズマブを提供するように対象に投与することが可能な剤形である、請求項20記載の組成物。
【請求項２２】
3 mg/kgのB2B3-1および0.1 mg/kgのトラスツズマブを提供するように対象に投与されるのに適合化された剤形である、請求項21記載の組成物。
【請求項２３】
10 mg/kgのB2B3-1および1 mg/kgのトラスツズマブを提供するように対象に投与されるのに適合化された剤形である、請求項21記載の組成物。
【請求項２４】
3 mg/kgのB2B3-1および0.1 mg/kgのトラスツズマブを提供するように対象に投与された場合に、対応する対象の3 mg/kgのB2B3-1のみまたは0.1 mg/kgのトラスツズマブのみによる処理よりも効果的である、請求項22記載の組成物。
【請求項２５】
10 mg/kgのB2B3-1および1 mg/kgのトラスツズマブを提供するように対象に投与された場合に、対応する対象の10 mg/kgのみまたは1 mg/kgのトラスツズマブのみによる処理よりも効果的である、請求項23記載の組成物。
【請求項２６】
3 mg/kgのB2B3-1および0.1 mg/kgのトラスツズマブをそれぞれに提供するように複数の対象に投与された場合に、20日後に該対象の10%超において腫瘍の退縮を誘導する、請求項22記載の組成物。
【請求項２７】
10 mg/kgのB2B3-1および1 mg/kgのトラスツズマブをそれぞれに提供するように複数の

対象に投与された場合に、20日後に該対象の少なくとも50%において腫瘍の退縮を誘導する、請求項23記載の組成物。
【請求項２８】
前記治療剤がラパチニブである、請求項16記載の組成物。
【請求項２９】
前記治療剤がタキサンである、請求項16記載の組成物。
【請求項３０】
タキサンがパクリタキセルまたはドセタキセルである、請求項29記載の組成物。
【請求項３１】
前記治療剤がレトロゾールである、請求項16記載の組成物。
【請求項３２】
前記第一の結合部分が約16 nMのK_dでErbB3に結合し、かつ前記第二の結合部分が約0.3 nMのK_dでErbB2に結合する、請求項3記載のHSAリンカーコンジュゲート。
【請求項３３】
対象を治療する方法であって、該対象が腫瘍の治療を必要としており、該治療が、請求項1~14および32のいずれか一項記載のHSAリンカーコンジュゲートの有効量を該対象に投与する工程を含む、方法。
【請求項３４】
対象を治療する方法であって、該対象が腫瘍の治療を必要としており、該治療が、請求項16~30のいずれか一項記載の組成物の有効量を該対象に投与する工程を含む、方法。
【請求項３５】
腫瘍の治療のための医薬の調製における、請求項1~14および32のいずれか一項記載のHSAリンカーコンジュゲートの使用。
【請求項３６】
腫瘍の治療のための医薬の調製における、請求項16~30のいずれか一項記載の組成物の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
ヒト血清アルブミン（HSA）リンカーコンジュゲート、ならびにその結合用、診断用、および治療用のコンジュゲートを提供する。一態様では、HSAリンカーは、2つのアミノ酸置換を包含する。別の態様は、第一および第二の単鎖Fv分子（scFv）であるアミノ末端およびカルボキシ末端の結合部分にHSAリンカーが共有結合している、コンジュゲートである。例示的なコンジュゲートは、例えば治療用途等のために腫瘍細胞の増殖を低下させるのに有用である。診断用および治療用のHSAリンカーコンジュゲートの製造および投与のための方法を、さらに提供する。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
抗体様結合部分（無傷の抗体、抗体断片、およびscFv内のものを含む）は、治療用途のためにしばしば使用される。一般に抗体断片およびscFvは無傷の抗体よりも短い血清半減期を呈し、一部の治療用途においては、そのような断片およびscFvの機能を保有する治療剤に関してインビボ半減期の延長が望ましいことがあり得る。
【０００３】
ヒト血清アルブミン（HSA）は、約66,500kDのタンパク質であって、少なくとも17個のジスルフィド架橋を含む585アミノ酸から構成される。アルブミンファミリーの多くのメンバーと同様に、ヒト血清アルブミンはヒトの生理機能において重要な役割を果たし、実質的にあらゆるヒトの組織および身体分泌物に存在する。HSAは、長鎖脂肪酸を含む広範なリガンドを結合させて循環系全体に輸送する能力を有し、これらはさもなくば循環血漿

中で不溶性である。

【０００４】

血清アルブミンは、ビタミンD結合タンパク質としても公知である、α-フェトプロテインおよびヒト群に特異的な成分を含むタンパク質ファミリーに属する。血清アルブミンは循環系の主要な可溶性タンパク質であって、多くの生命維持に必要な生理学的プロセスに寄与している。血清アルブミンは一般に、乾燥重量あたり約50%の全血成分を含む。アルブミンおよびその関連する血液タンパク質はまた、種々の化学的に異なる分子、例えば脂肪酸、アミノ酸、ステロイド、カルシウム、金属、例えば銅および亜鉛、ならびに種々の薬剤を含む、人体における多くの内因性および外因性のリガンドの、輸送、分布、および代謝において重要な役割も果たしている。アルブミンファミリーの分子は一般に、肝臓、腸、腎臓、および脳などの器官-循環の境界を横断する、多くのこれらのリガンドの輸送を促進すると考えられている。アルブミンはこのように、広範な循環機能および代謝機能に関与している。

【発明の概要】

【０００５】

第一の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 6~15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列を含むヒト血清アルブミン（HSA）リンカーと、抗体、単鎖Fv分子、二重特異性単鎖Fv（$(scFv')_2$）分子、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボディ（triabody）、ホルモン、Fab断片、$F(ab')_2$分子、タンデムscFv（taFv）断片、レセプター（例えば細胞表面レセプター）、リガンド、アプタマー、およびこれらの生物学的に活性な断片からなる群より選択される、第一および第二の結合部分とを含むHSAリンカーコンジュゲートを提供し、ここで、該第一の結合部分は該HSAリンカーのアミノ末端に結合し、該第二の結合部分は該HSAリンカーのカルボキシ末端に結合している。一態様では、該第一の結合部分はErbB3に特異的に結合し、該第二の結合部分はErbB2に特異的に結合している。他の態様では、HSAリンカーはSEQ ID NO: 1、9、10、14、または15に示されるアミノ酸配列を含む。

【０００６】

第二の局面では、3つ以上の結合部分（例えば、4、5、6、7、8、9、10個以上）を上記剤に含めることができ；これら追加の結合部分は、例えば第一または第二の結合部分と一列になって（例えば、2、3、4もしくは5個以上が一列になって）該剤に付加されうる。

【０００７】

第三の局面では本発明は、SEQ ID NO: 1に示される配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列と、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列の34位のセリン残基と、503位のグルタミン残基とを含む、HSAリンカーを提供する。一態様では、該アミノ酸配列はSEQ ID NO: 1に示される配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する。別の態様では、該HSAリンカーはSEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列を含む。さらに別の態様では、該HSAリンカーはSEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列を有する。

【０００８】

第四の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1に示される配列に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するHSAリンカーと、少なくとも第一の結合部分とを含む、HSAリンカーコンジュゲートを提供する。一態様では、該HSAリンカーコンジュゲートは、第一の結合部分をHSAリンカーに結合させる、第一のペプチドコネクターを含む。

【０００９】

第五の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 11~15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列またはこれらの配列のいずれか一つの断片もしくは変異体を有するHSAリンカーと、少なくとも第一の結合部分とを含む、HSAリンカーコンジュゲートを特徴とする。

【００１０】

本発明の第四または第五の局面どちらかの特定の態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、第一の結合部分をHSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に結合させる、第一のペプチドコネクター（例えば、AAS、AAQ、またはAAAL（SEQ ID NO: 5））をさらに含む。ある態様では、第一のコネクターは、第一の結合部分をHSAリンカーに共有結合さ

せる。

【００１１】

本発明の第四または第五の局面どちらかの特定の態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、少なくとも第二の結合部分をさらに含む。ある態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、第二の結合部分をHSAリンカーに結合させる第二のペプチドコネクター（例えば、AAS、AAQ、またはAAAL（SEQ ID NO: 5））をさらに含む。他の態様では、第二のコネクターは、第二の結合部分をHSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に結合させる。さらなる態様では、第二のコネクターは、第二の結合部分をHSAリンカーに共有結合させる。他の態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、第一または第二の結合部分と一列になって含まれている3つ以上の結合部分をさらに含み；該3つ以上の結合部分は、該3つ以上の結合部分を該第一または第二の結合部分に結合させかつ互いに結合させるコネクター配列をさらに含むことができる。

【００１２】

本発明の第四または第五の局面どちらかの特定の態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、第一の結合部分をHSAリンカーのアミノ末端に共有結合させる第一のペプチドコネクターと、第二の結合部分をHSAリンカーのカルボキシ末端に共有結合させる第二のペプチドコネクターとを含む。一態様では、第一のコネクターはアミノ酸配列AASまたはAAQを有し、第二のコネクターはSEQ ID NO: 5に示されるアミノ酸配列を有する。

【００１３】

本発明の第四または第五どちらかの局面の特定の態様では、第一または第二の結合部分（または第三以降の結合部分）は、抗体、単鎖Fv分子、二重特異性単鎖Fv（$(scFv')_2$）分子、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボディ、ホルモン、Fab断片、$F(ab')_2$分子、タンデムscFv（taFv）断片、レセプター（例えば、細胞表面レセプター）、リガンド、アプタマー、またはこれらの生物学的に活性な断片である。他の態様では、本明細書で提供されるHSAリンカーコンジュゲートは、これらの別々のタイプの結合部分の組み合わせを含む。一態様では、少なくとも第一または第二の結合部分はヒト単鎖Fv分子またはヒト化単鎖Fv分子である。

【００１４】

本発明の第一、第二、第三、第四、または第五の局面のいずれか一つの態様では、上記第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数が、インスリン様成長因子1レセプター（IGF1R）、IGF2R、インスリン様成長因子（IGF）、間葉上皮移行因子レセプター（c-met；肝細胞成長因子レセプター（HGFR）としても公知）、肝細胞成長因子（HGF）、上皮細胞成長因子レセプター（EGFR）、上皮細胞成長因子（EGF）、ヘレグリン、線維芽細胞成長因子レセプター（FGFR）、血小板由来成長因子レセプター（PDGFR）、血小板由来成長因子（PDGF）、血管内皮成長因子レセプター（VEGFR）、血管内皮成長因子（VEGF）、腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）、腫瘍壊死因子α（TNF-α）、TNF-β、葉酸レセプター（FOLR）、葉酸、トランスフェリンレセプター（TfR）、メソセリン、Fcレセプター、c-kitレセプター、c-kit、インテグリン（例えば、α4インテグリンまたはβ-1インテグリン）、P-セレクチン、スフィンゴシン-1-リン酸レセプター-1（S1PR）、ヒアルロン酸レセプター、白血球機能抗原-1（LFA-1）、CD4、CD11、CD18、CD20、CD25、CD27、CD52、CD70、CD80、CD85、CD95（Fasレセプター）、CD106（血管細胞付着分子1（VCAM））、CD166（活性化白血球細胞接着分子（ALCAM））、CD178（Fasリガンド）、CD253（TNF関連アポトーシス誘導性リガンド（TRAIL））、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、CCR5、CXCL12（間質細胞由来因子1（SDF-1））、インターロイキン1（IL-1）、CTLA-4、MART-1、gp100、MAGE-1、エフリン（Eph）レセプター、粘膜アドレシン細胞付着分子1（MAdCAM-1）、癌胎児性抗原（CEA）、$Lewis^Y$、MUC-1、上皮細胞接着分子（EpCAM）、癌抗原125（CA125）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、TAG-72抗原、およびこれらの断片からなる群より選択されるタンパク質であるかまたはそれらのタンパク質に特異的に結合する。さらなる態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、赤芽球白血病ウイルス癌遺伝子ホモロ

グ（ErbB）レセプター（例えば、ErbB1レセプター；ErbB2レセプター；ErbB3レセプター；およびErbB4レセプター）であるか、またはこれに特異的に結合する。別の態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、α-フェトプロテイン（AFP）もしくはインターフェロン、またはこれらの生物学的に活性な断片であるか、またはこれに特異的に結合する。さらなる態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、ナタリズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、ダクリズマブ、エファリズマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブ、トラスツズマブ、アバタセプト、エタネルセプト、ペルツズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、またはアナキンラである。

【００１５】

本発明の第一、第二、第三、第四、または第五の局面のうちのいずれか一つでは、HSAリンカーコンジュゲートは診断剤、治療剤またはその両方に結合している。一態様では、診断剤は検出可能標識、例えば、放射性標識、蛍光標識、または重金属標識である。別の態様では、治療剤は細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、または免疫調節剤である。細胞毒性剤としてはアルキル化剤、抗生物質、抗腫瘍剤、抗増殖剤、代謝拮抗剤、チューブリンインヒビター、トポイソメラーゼIもしくはIIのインヒビター、ホルモンのアゴニストもしくはアンタゴニスト、免疫調節剤、DNAマイナーグルーブバインダー、および放射性剤、または、腫瘍細胞に結合して該細胞を殺傷できるかもしくは腫瘍細胞増殖を阻害できる任意の剤が挙げられる。抗腫瘍剤としてはシクロホスファミド、カンプトテシン、ホモカンプトテシン、コルヒチン、コンブレスタチン（combrestatin）、コンブレスタチン、リゾキシン、ドリスタチン（dolistatin）、アンサマイトシンp3、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリチアマイシン（caleachimicin）、メトトレキサート、5-フルオロウラシル（5-FU）、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン、ラロキシフェン、レトロゾール、エピルビシン、ベバシズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、およびこれらの誘導体が挙げられる。

【００１６】

本発明の第一、第二、第三、第四、または第五の局面のうちのいずれか一つでは、HSAリンカーコンジュゲートは薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合される。一態様では、該剤は6時間～7日間のインビボ半減期を呈する。別の態様では、該剤は、8時間超のインビボ半減期を呈する。

【００１７】

第六の局面では、本発明は、本明細書に記載のHSAリンカーコンジュゲートのいずれか一つを投与することによって疾患または障害を有する哺乳動物を治療するための方法を特徴とする。一態様では、該疾患または障害は、細胞表面レセプターを通じた細胞シグナル伝達に関連する。別の態様では、該哺乳動物はヒトである。さらなる態様では、該疾患または障害は増殖性疾患または自己免疫疾患である。増殖性疾患としては、黒色腫、明細胞肉腫、頭頸部癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、卵巣癌、子宮内膜癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、前立腺癌、唾液腺癌、肺癌、肝臓癌、皮膚癌、および脳癌などの癌が挙げられる。自己免疫疾患としては、多発性硬化症、乾癬、重症筋無力症、ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデス、および関節リウマチが挙げられる。一態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、1つまたは複数の治療剤と、例えば抗腫瘍剤と組み合わせて投与される。

【００１８】

第七の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1、3、もしくは6～15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列、または、SEQ ID NO: 1、3、もしくは6～15のいずれか一つに示される配列に対して少なくとも90%、95%、97%、もしくは100%の配列同一性を有する配列を有するHSAリンカーのアミノ末端に少なくとも第一の結合部分を、およびカルボキシ末端に第二の結合部分を結合させることによって、HSAリンカーコンジュゲートを作製するための方法を特徴とする。一態様では、第一または第二の結合部分はHSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に共有結合している。他の態様では、第三以降の結合部分（例え

ば、第四、第五、第六、第七、第八、第九、または第十の結合部分）は、第一または第二の結合部分と一列になって、HSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に共有結合する。別の態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、抗体、単鎖Fv分子、二重特異性単鎖Fv（$(scFv')_2$）分子、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボディ、ホルモン、Fab断片、$F(ab')_2$分子、タンデムscFv（taFv）断片、レセプター（例えば、細胞表面レセプター）、リガンド、またはアプタマーである。別の態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）はヒト単鎖Fv分子またはヒト化単鎖Fv分子である。さらに別の態様では、この第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、インスリン様成長因子1レセプター（IGF1R）、IGF2R、インスリン様成長因子（IGF）、間葉上皮移行因子レセプター（c-met；肝細胞成長因子レセプター（HGFR）としても公知）、肝細胞成長因子（HGF）、上皮細胞成長因子レセプター（EGFR）、上皮細胞成長因子（EGF）、ヘレグリン、線維芽細胞成長因子レセプター（FGFR）、血小板由来成長因子レセプター（PDGFR）、血小板由来成長因子（PDGF）、血管内皮成長因子レセプター（VEGFR）、血管内皮成長因子（VEGF）、腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）、腫瘍壊死因子α（TNF-α）、TNF-β、葉酸レセプター（FOLR）、葉酸、トランスフェリンレセプター（TfR）、メソセリン、Fcレセプター、c-kitレセプター、c-kit、インテグリン（例えば、α4インテグリンまたはβ-1インテグリン）、P-セレクチン、スフィンゴシン-1-リン酸レセプター-1（S1PR）、ヒアルロン酸レセプター、白血球機能抗原-1（LFA-1）、CD4、CD11、CD18、CD20、CD25、CD27、CD52、CD70、CD80、CD85、CD95（Fasレセプター）、CD106（血管細胞付着分子1（VCAM1）、CD166（活性化白血球細胞接着分子（ALCAM））、CD178（Fasリガンド）、CD253（TNF関連アポトーシス誘導性リガンド（TRAIL））、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、CCR5、CXCL12（間質細胞由来因子1（SDF-1））、インターロイキン1（IL-1）、CTLA-4、MART-1、gp100、MAGE-1、エフリン、（Eph）レセプター、粘膜アドレシン細胞付着分子1（MAdCAM-1）、癌胎児性抗原（CEA）、$Lewis^Y$、MUC-1、上皮細胞接着分子（EpCAM）、癌抗原125（CA125）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、TAG-72抗原、およびこれらの断片であるかまたはこれに特異的に結合する。さらなる態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、赤芽球白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ（ErbB）レセプター（例えば、ErbB1レセプター；ErbB2レセプター；ErbB3レセプター；およびErbB4レセプター）であるかまたはこれに特異的に結合する。別の態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、α-フェトプロテイン（AFP）もしくはインターフェロン、またはこれらの生物学的に活性な断片であるか、またはこれに特異的に結合する。さらなる態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、ナタリズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、ダクリズマブ、エファリズマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブ、トラスツズマブ、アバタセプト、エタネルセプト、ペルツズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、またはアナキンラである。別の態様では、該剤は診断剤または治療剤に結合している。一態様では、診断剤は検出可能標識、例えば、放射性タグ、生物発光タグ、蛍光タグ、重金属タグ、またはエピトープタグである。別の態様では、治療剤は細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、または免疫調節剤である。細胞毒性剤としては、アルキル化剤、抗生物質、抗腫瘍剤、抗増殖剤、代謝拮抗剤、チューブリンインヒビター、トポイソメラーゼIおよびIIのインヒビター、ホルモンのアゴニストもしくはアンタゴニスト、免疫調節剤、DNAマイナーグルーブバインダー、および放射性剤、または、腫瘍細胞に結合して該細胞を殺傷できるかもしくは腫瘍細胞増殖を阻害できる、任意の剤が挙げられる。抗腫瘍剤としてはシクロホスファミド、カンプトテシン、ホモカンプトテシン、コルヒチン、コンブレスタチン、コンブレスタチン、リゾキシン、ドリスタチン、アンサマイトシンp3、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリチアマイシン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル（5-FU）、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン、ラロキシフェン、レトロ

ゾール、エピルビシン、ベバシズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、およびこれらの誘導体が挙げられる。さらなる態様では、該剤は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合される。

【００１９】

第八の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1、3、および6～15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列中の1つまたは複数の表面露出アミノ酸残基を、診断剤または治療剤の結合を可能にする化学修飾が可能な置換アミノ酸で置換することによって、HSAリンカーを作製するための方法を特徴とする。一態様では、置換アミノ酸はシステインであり、表面露出アミノ酸残基はセリンまたはトレオニンである。別の態様では、化学修飾によって、置換アミノ酸と診断剤または治療剤との間の共有結合が生じる。さらなる態様では、表面露出アミノ酸残基は、496位のトレオニン、58位のセリン、76位のトレオニン、79位のトレオニン、83位のトレオニン、125位のトレオニン、236位のトレオニン、270位のセリン、273位のセリン、304位のセリン、435位のセリン、478位のトレオニン、506位のトレオニン、または508位のトレオニンである。

【００２０】

第九の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1、3、および6～15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列内の残基の1つまたは複数をアスパラギン、セリン、またはトレオニンで置換して、それによりHSA剤内部にグリコシル化部位を組み込むことによって、HSAリンカーを作製するための方法を特徴とする。

【００２１】

第十の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1、3、および6～15のいずれか一つに示されるアミノ酸配列内の残基アスパラギン、セリン、またはトレオニンのうちの1つまたは複数を、アスパラギン、セリン、またはトレオニン以外の任意のアミノ酸で置換し、それによりHSA剤からグリコシル化部位を取り除くことによって、HSAリンカーを作製するための方法を特徴とする。

【００２２】

第十一の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 16～25に示されるアミノ酸配列の一つに対して少なくとも90％の配列同一性を有する配列を含む、HSAリンカーを特徴とする。一態様では、該HSAリンカーはSEQ ID NO: 16～25に示されるアミノ酸配列のうちの一つに対して少なくとも95％の配列同一性を有する。別の態様では、該HSAリンカーはSEQ ID NO: 16～25に示されるアミノ酸配列のうち一つを含む。さらに別の態様では、該HSAリンカーはSEQ ID NO: 16～25に示されるアミノ酸配列のうち一つを有する。

【００２３】

さらなる態様では、該HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、診断剤または治療剤に結合している。診断剤としては、検出可能標識、例えば放射性標識、生物発光標識、蛍光標識、もしくは重金属標識、またはエピトープタグが挙げられる。検出可能標識として役立ち得る蛍光分子としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）、高感度GFP（eGFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、赤色蛍光タンパク質（RFP）およびdsRedが挙げられる。一態様では、生物発光分子はルシフェラーゼである。別の態様では、エピトープタグはc-myc、赤血球凝集素、またはヒスチジンタグである。さらなる態様では、治療剤は、シトクロムc、カスパーゼ1～10、グランザイムAまたはB、腫瘍壊死因子-α（TNF-α）、TNF-β、Fas、Fasリガンド、Fas関連死ドメイン様IL-1β変換酵素（FLICE）、TRAIL/APO2L、TWEAK/APO3L、Bax、Bid、Bik、Bad、Bak、RICK、血管アポトーシス誘導性タンパク質1および2（VAP1およびVAP2）、ピエリシン、アポトーシス誘導性タンパク質（AIP）、IL-1α プロピース（propiece）ポリペプチド、アポプチン、アポプチン関連タンパク質1（AAP-1）、エンドスタチン、アンギオスタチン、およびこれらの生物学的に活性な断片などの、細胞毒性ポリペプチドである。HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、1つまたは複数の治療剤、例えば、シクロホスファミド、カンプトテシン、ホモカンプトテシン、コルヒチン、コンブレスタチン、コンブレスタチン、リゾキシン、ドリスタチン、アンサマイトシンp3、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリ

チアマイシン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル（5-FU）、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン、ラロキシフェン、レトロゾール、エピルビシン、ベバシズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、およびこれらの誘導体と組み合わせる（例えば、薬学的組成物中で結合させるまたは混合する）ことができる。

【００２４】

本明細書に記載の任意の局面のある態様では、第一および第二の結合部分（および、存在する場合には第三以降の結合部分のうちの1つまたは複数）が、同じ標的分子に特異的に結合する。任意の局面の別の態様では、第一および第二の結合部分（および、存在する場合には第三以降の結合部分のうちの1つまたは複数）が、異なる標的分子に特異的に結合する。任意の局面のさらなる態様では、第一および第二の結合部分（および、存在する場合には第三以降の結合部分のうちの1つまたは複数）が、同じ標的分子上の異なるエピトープに特異的に結合する。

【００２５】

第十二の局面では、本発明は、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列のアミノ酸残基25～44および494～513の1つまたは複数を含む、HSAリンカーを特徴とする。一態様では、該HSAリンカーは、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基25～70および450～513を含む。別の態様では、該HSAリンカーは、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基15～100および400～520を含む。さらなる態様では、該HSAリンカーは、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基10～200および300～575を含む。別の態様では、該HSAリンカーは、SEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基5～250および275～580を含む。

【００２６】

本発明の第十二の局面では、該HSAリンカーは、HSAリンカーコンジュゲートを形成するために、少なくとも第一の結合部分に結合している。一態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、HSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に第一の結合部分を結合させる第一のペプチドコネクターを少なくとも含む。別の態様では、該第一のペプチドコネクターは、第一の結合部分をHSAリンカーに共有結合させる。さらなる態様では、該HSAリンカーは、第二の結合部分を含む。一態様では、該HSAリンカーは、第二の結合部分を該HSAリンカーに結合させる第二のペプチドコネクターを含む。他の態様では、第二のコネクターは、第二の結合部分をHSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に結合させる。さらなる態様では、第二のコネクターは、第二の結合部分をHSAリンカーに共有結合させる。他の態様では、該HSAリンカーは、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、または第十の結合部分を含む。他の態様では、これら追加の結合部分は、第一または第二の結合部分の一方または両方と一列になって存在する。さらに他の態様では、ペプチドコネクター（例えば、AAS、AAQ、またはAAAL（SEQ ID NO: 5））によって、これらの追加の結合部分の1つまたは複数は、互いから、第一もしくは第二の結合部分から、またはHSAリンカーから隔てられる。

【００２７】

本発明の第十二の局面では、該HSAリンカーは、該ポリペプチドリンカーのアミノ末端に第一の結合部分を共有結合させる第一のペプチドコネクターと、該HSAリンカーのカルボキシ末端に第二の結合部分を共有結合させる第二のペプチドコネクターとを含む。一態様では、第一のコネクターはアミノ酸配列AASまたはAAQを有し、第二のコネクターはSEQ ID NO: 5に示されるアミノ酸配列を有する。

【００２８】

本発明の第十二の局面では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、抗体、単鎖Fv分子、二重特異性単鎖Fv（$(scFv')_2$）分子、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボディ、ホルモン、Fab断片、$F(ab')_2$分子、タンデムscFv（taFv）断片、レセプター（例えば、細胞表面レセプター）、リガンド、アプタマー、またはこれらの生物学的に活性な断片である。一態様では、第一または第

二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）のうちの1つまたは複数は、ヒト単鎖Fv分子またはヒト化単鎖Fv分子である。

【００２９】

本発明の第十二の局面では、この第一および第二の結合部分（または存在する場合には第三以降の結合部分）のうちの1つまたは複数が、インスリン様成長因子1レセプター（IGF1R）、IGF2R、インスリン様成長因子（IGF）、間葉上皮移行因子レセプター（c-met；肝細胞成長因子レセプター（HGFR）としても公知）、肝細胞成長因子（HGF）、上皮細胞成長因子レセプター（EGFR）、上皮細胞成長因子（EGF）、ヘレグリン、線維芽細胞成長因子レセプター（FGFR）、血小板由来成長因子レセプター（PDGFR）、血小板由来成長因子（PDGF）、血管内皮成長因子レセプター（VEGFR）、血管内皮成長因子（VEGF）、腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）、腫瘍壊死因子α（TNF-α）、TNF-β、葉酸レセプター（FOLR）、葉酸、トランスフェリンレセプター（TfR）、メソセリン、Fcレセプター、c-kitレセプター、c-kit、インテグリン（例えば、α4インテグリンまたはβ-1インテグリン）、P-セレクチン、スフィンゴシン-1-リン酸レセプター-1（S1PR）、ヒアルロン酸レセプター、白血球機能抗原-1（LFA-1）、CD4、CD11、CD18、CD20、CD25、CD27、CD52、CD70、CD80、CD85、CD95（Fasレセプター）、CD106（血管細胞付着分子1（VCAM）、CDI66（活性化白血球細胞接着分子（ALCAM））、CD178（Fasリガンド）、CD253（TNF関連アポトーシス誘導性リガンド（TRAIL））、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、CCR5、CXCL12（間質細胞由来因子1（SDF-1））、インターロイキン1（IL-1）、CTLA-4、MART-1、gp100、MAGE-1、エフリン（Eph）レセプター、粘膜アドレシン細胞付着分子1（MAdCAM-1）、癌胎児性抗原（CEA）、Lewis^{Y}、MUC-1、上皮細胞接着分子（EpCAM）、癌抗原125（CA125）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、TAG-72抗原、およびこれらの断片からなる群より選択されるタンパク質であるかまたはこれに特異的に結合する。さらなる態様では第一または第二の結合部分は、赤芽球白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ（ErbB）レセプター（例えば、ErbB1レセプター；ErbB2レセプター；ErbB3レセプター；およびErbB4レセプター）であるかまたはこれに特異的に結合する。別の態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、α-フェトプロテイン（AFP）もしくはインターフェロン、またはこれらの生物学的に活性な断片であるか、またはこれに特異的に結合する。さらなる態様では、第一または第二の結合部分（または、存在する場合には第三以降の結合部分）の1つまたは複数は、ナタリズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、ダクリズマブ、エファリズマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブ、トラスツズマブ、アバタセプト、エタネルセプト、ペルツズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、またはアナキンラである。

【００３０】

本発明の第十二の局面では、該HSAリンカーは、診断剤、治療剤、またはその両方に結合している。一態様では、診断剤は検出可能標識、例えば、放射性標識、蛍光標識、または重金属標識である。別の態様では、治療剤は細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、または免疫調節剤である。細胞毒性剤としてはアルキル化剤、抗生物質、抗腫瘍剤、抗増殖剤、代謝拮抗剤、チューブリンインヒビター、トポイソメラーゼIもしくはIIのインヒビター、ホルモンのアゴニストもしくはアンタゴニスト、免疫調節剤、DNAマイナーグルーブバインダー、および放射性剤、または、腫瘍細胞に結合して該細胞を殺傷できるかもしくは腫瘍細胞増殖を阻害できる任意の剤が挙げられる。抗腫瘍剤としてはシクロホスファミド、カンプトテシン、ホモカンプトテシン、コルヒチン、コンブレスタチン、コンブレスタチン、リゾキシン、ドリスタチン、アンサマイトシンp3、メイタンシノイド、アウリスタチン、カリチアマイシン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル（5-FU）、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、タモキシフェン、ラロキシフェン、レトロゾール、エピルビシン、ベバシズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、およびこれらの誘導体が挙げられる。一態様では、結合したHSAリンカーは、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤と混合される。別の態様では、該HSAリンカーは、6時間～7日間のインビボ半減期を呈する。さらなる態様では、該HSAリンカーは8時

間超のインビボ半減期を呈する。

【００３１】

本発明の第十三の局面は、本発明の前述の局面（一～十二）のいずれかの剤であって、該HSAリンカーが別のポリペプチドリンカーで置き換えられた剤を特徴とする。例えば、ポリペプチドリンカー配列は、哺乳動物、非ヒト血清アルブミンポリペプチド配列、例えば、ウシ、マウス、ネコ、およびイヌの血清アルブミン（BSA）ポリペプチド配列などであってもよい。他の態様では、このポリペプチドリンカー配列は、5～1,000アミノ酸長、例えば、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、もしくは900アミノ酸長、またはこの範囲内の任意の数のアミノ酸である。他の態様では、ポリペプチドリンカー配列は、単一のアミノ酸（例えば、これらに限定されるわけではないが、グリシン、アラニン、セリン、グルタミン、ロイシン、およびバリンが挙げられる）またはアミノ酸の組み合わせを含む。

【００３２】

別の態様では、HSAリンカーは、α-フェトプロテイン（AFP）ポリペプチド、例えば哺乳動物AFPポリペプチド、例えばヒト、マウス、ウシ、またはイヌのAFPポリペプチドによって置き換えられる。ある態様では、AFPリンカーは、全長ヒトAFPポリペプチド配列（アミノ酸1～609；SEQ ID NO: 58）、シグナル配列のアミノ酸1～18を欠いている成熟ヒトAFPポリペプチド配列（SEQ ID NO: 58のアミノ酸19～609）、またはこれらの断片に相当する。他の態様では、AFPポリペプチドリンカーは、SEQ ID NO: 58の少なくとも5～8個の連続アミノ酸、好ましくは少なくとも10、20、または50個の連続アミノ酸、より好ましくは少なくとも100個の連続のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも200、300、400個、もしくはそれ以上の連続アミノ酸を含むか、あるいは、これらの長さのうちの1つまたは複数を有するSEQ ID NO: 58の連続ポリペプチド配列に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、少なくとも95%、97%、99%、またはそれ以上の配列同一性）を有する。例えば、SEQ ID NO: 58のアミノ酸446～479
(LSEDKLLACGEGAADIIIGHLCIRHEMTPVNPGV; SEQ ID NO:59)
に相当する34merのヒトAFPペプチドに対して90%の配列同一性を有するAFPポリペプチドリンカー配列は、SEQ ID NO: 58の446～479セグメントから改変されたアミノ酸を最大3個含みうる。生物学的に活性なヒトAFP断片における配列変更のこのような例の一つは、米国特許第5,707,963号（参照により本明細書に組み入れられる）で見出され、これは例えば、2つのアミノ酸残基（SEQ ID NO: 59のアミノ酸9および22）に柔軟性（flexibility）を有するヒトAFPの34アミノ酸断片（SEQ ID NO: 59）を開示している。AFPポリペプチドリンカー配列のその他の例としては、例えば、SEQ ID NO: 58のアミノ酸19～198（ヒトAFPドメインI）、SEQ ID NO: 58のアミノ酸217～408（ヒトAFPドメインII）、SEQ ID NO: 58のアミノ酸409～609（ヒトAFPドメインIII）、SEQ ID NO: 58のアミノ酸19～408（ヒトAFPドメインI+II）、SEQ ID NO: 58のアミノ酸217～609（ヒトAFPドメインII+III）、およびSEQ ID NO: 58のアミノ酸285～609（ヒトAFP断片I）が挙げられる。別の態様では、ヒトAFPポリペプチドリンカー配列は、SEQ ID NO: 58のアミノ酸489～496を含む8アミノ酸の配列（すなわち、EMTPVNPG）である。

【００３３】

本発明の第十四の局面は、HSAリンカー、HSAリンカーコンジュゲート、または上述の第一、第二、第三、第四、第五、第十一、第十二、および第十三の局面に記載される任意の他の剤のいずれかを包含する、キットを特徴とする。キットは、実施者（例えば、医師、看護師、または患者）がそれに含まれる組成物および剤を投与することを可能にするための説明書をさらに備える。一態様では、キットは、剤の有効量を含む、例えば、本明細書記載のHSAリンカーコンジュゲートまたは、例えば、1つもしくは複数の結合部分（例えば、抗体または抗体断片（例えば、scFv））、診断剤（例えば、放射性核種またはキレート剤）、および/もしくは治療剤（例えば、細胞毒性剤または免疫調節剤）を含む、HSAリンカーの有効量を含む、単一用量または複数回用量の薬学的組成物の複数のパッケージを備える。任意で、薬学的組成物を投与するために必要な説明書またはデバイスをキットに含

めてもよい。例えばキットは、HSAリンカーコンジュゲートもしくはHSAリンカー、またはそれに結合した任意の結合剤、診断剤および/もしくは治療剤の有効量を含む、1つまたは複数の充填済み注射器を提供し得る。さらにキットは、疾患または病状（例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管系疾患）に罹患している患者が、例えばHSAリンカーコンジュゲートもしくはHSAリンカーまたはそれに結合した任意の結合剤、診断剤、および/もしくは治療剤を含む薬学的組成物を用いるための説明書または投与スケジュールなどの、追加の構成要素を備えてもよい。

【００３４】

定義

「抗体」という用語は、本明細書において互換的に用いる場合、抗体または免疫グロブリンの全体および、任意の抗原結合断片またはその単鎖を包含する。抗体とは、本明細書において用いる場合、哺乳動物（例えば、ヒトまたはマウス）のものでもよく、ヒト化されても、キメラであっても、組み換えられていても、合成的に作製されても、または天然から単離されてもよい。ヒトを含むほとんどの哺乳動物では、抗体全体とは、ジスルフィド結合によって接続された少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を有する。各々の重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてV_Hと省略される）および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、3つのドメインであるC_H1、C_H2、およびC_H3、ならびにC_H1とC_H2との間のヒンジ領域からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてV_Lと省略される）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、一つのドメインであるC_Lからなる。V_HおよびV_L領域はさらに、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域と、より保存された、散在するフレームワーク領域（FR）と呼ばれる領域に細分することができる。V_HおよびV_Lは各々、3つのCDRと4つのFRから構成され、これらは、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で、整列されている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）、および古典的な補体系の第一成分（Clq）などを含む宿主の組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。本発明の抗体には、全ての公知の形態の抗体および抗体様特性を有するその他のタンパク質骨格が挙げられる。例えば抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、または抗体様特性を有するタンパク質骨格、例えばフィブロネクチンまたはアンキリンリピートであってもよい。抗体はまた、Fab、Fab'2、scFv、SMIP、ダイアボディ、ナノボディ、アプタマー、またはドメイン抗体であってもよい。抗体は、以下のアイソタイプのいずれを有してもよい：IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4）、IgM、IgA（例えば、IgA1、IgA2、およびIgAsec）、IgD、またはIgE。本明細書において規定される結合部分として、HSAリンカーと組み合わせて使用可能な抗体には、これらに限定されるわけではないが、ナタリズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、リツキシマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、ダクリズマブ、エファリズマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブ、トラスツズマブ、アバタセプト、エタネルセプト、ペルツズマブ、セツキシマブ、およびパニツムマブが含まれる。

【００３５】

「抗体断片」という用語は、本明細書において用いる場合、抗原（例えば、ErbB2）に特異的に結合する能力を保持している抗体の1つまたは複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって発揮することが可能である。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例としては、これらに限定されるわけではないが、以下が挙げられる：（ｉ）Fab断片、V_L、V_H、C_LおよびC_H1ドメインからなる一価断片；（ｉｉ）$F(ab')_2$断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合した2つのFab断片を含む二価断片；（ｉｉｉ）V_HおよびC_H1ドメインからなるFd断片；（ｉｖ）抗体の単独のアームのV_LおよびV_HドメインからなるFv断片；（ｖ）V_HおよびV_Lドメインを含むdAb；（ｖｉ）V_HドメインからなるdAb断片（Wardら、Nature 341:544～546（1989））；（ｖｉｉ）V_HまたはV_LドメインからなるdAb；（ｖｉｉｉ）単離された相補性決定領域（CDR）；ならびに（ｉｘ）任意で合成リンカーによって接続され得る、2つ以上の単離されたCDRの組み合わせ。さらに、Fv断片

の2つのドメインであるV_LおよびV_Hは別々の遺伝子によってコードされているが、組換え法を用いて、これらを、V_LおよびV_H領域が対になって一価の分子を形成する単一のタンパク質鎖（単鎖Fv（scFv）として公知；例えば、Birdら、Science 242:423~426（1988）；ならびに、Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879~5883(1988)を参照のこと）として作製することが可能である合成リンカーによって、接続することができる。これらの抗体断片は当業者に公知の従来技術を用いて得られ、かつ該断片は、無傷の抗体と同じ様式で有用性についてスクリーニングされる。抗体断片は、組み換えDNA技術によって、または無傷の免疫グロブリンの酵素切断もしくは化学切断によって作製することができる。

【００３６】

「自己免疫疾患」とは、自己のエピトープまたは抗原に対して免疫系応答が生じる疾患を意味する。自己免疫疾患の例としては、これらに限定されるわけではないが、円形脱毛症、強直性脊髄炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー皮膚炎、慢性疲労免疫機能障害症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発神経神経障害、チャーグ・ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状狼瘡、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛-線維筋炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、甲状腺機能低下症、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病、若年性関節炎、扁平苔癬、ループス、メニエール病、混合結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多内分泌腺症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフ－マン症候群、全身性エリテマトーデス（SLE）、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎（例えば、散弾状脈絡網膜炎およびサルコイドブドウ膜炎）、脈管炎、白斑、ウェゲネル肉芽腫症および重症筋無力症が挙げられる。

【００３７】

「結合部分」とは標的のエピトープ、抗原、リガンド、またはレセプターに特異的に結合する任意の分子を意味する。結合部分としては、これらに限定されるわけではないが、抗体（例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組み換え抗体、ヒト化抗体、およびキメラ抗体）、抗体断片（例えば、Fab断片、Fab'2、scFv抗体、SMIP、ドメイン抗体、ダイアボディ、ミニボディ、scFv-Fc、アフィボディ、ナノボディ、およびドメイン抗体）、レセプター、リガンド、アプタマー、および、公知の結合パートナーを有するその他の分子が挙げられる。

【００３８】

「生物学的に活性である」とは、核酸、ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質などの生物学的分子を含む分子が、それ自体または他の分子に対して物理的または化学的な活性を発揮することを意味する。例えば、「生物学的に活性な」分子は、例えば、酵素的活性、タンパク質結合活性（例えば、抗体相互作用）、あるいは細胞毒性活性を有してもよく、「生物学的に活性」である。

【００３９】

「キメラ抗体」という用語は、第一の種に由来する可変領域と、第二の種に由来する定常領域とを有する、免疫グロブリンまたは抗体を指す。キメラ抗体は、例えば、別々の種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから（例えば、マウスおよびヒトから）、遺伝子操作によって構築され得る。

【００４０】

「コネクター」または「ペプチドコネクター」とは、HSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端の一方もしくは両方に共有結合しているか、またはHSAリンカーの1つもしくは複数の残基（例えば、アミノ末端残基とカルボキシ末端残基の間の残基）に共有結合

している、2~20残基長のアミノ酸配列を意味する。好ましい態様では、HSAリンカーのアミノ末端に結合したペプチドコネクターはアミノ酸配列AASまたはAAQを有し、カルボキシ末端に結合したコネクターはアミノ酸配列AAAL（SEQ ID NO: 5）を有する。

【００４１】

「有効量」または「~に有効な量」または「治療上有効量」という用語は、剤（例えば、コネクター配列有りまたは無しで1つもしくは複数の結合部分または診断剤または治療剤と結合させたHSAリンカー）が、所望の結果、例えば、癌細胞の殺傷、腫瘍細胞増殖の低減、疾患組織もしくは器官における炎症の低減、または組織、器官、もしくは生物体（例えば、ヒト）における特定の細胞集団の標識をもたらすのに十分な量を意味する。

【００４２】

「ヒト抗体」という用語は、本明細書において用いる場合、例えばKabatら、（Sequences of proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91~3242(1991)）によって記載される、フレームワーク領域とCDR領域の両方がヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来するような可変領域を有する抗体、またはその断片を含むことが意図される。さらに、抗体が定常領域を含む場合、該定常領域もヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列由来である。ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基（例えば、インビトロにおける無作為もしくは部位特異的な突然変異誘発またはインビボにおける体細胞変異によって導入された変異）を含んでもよい。しかしながら、「ヒト抗体」という用語は、本明細書において用いる場合、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列がヒトのフレームワーク配列に移植された抗体（すなわち、ヒト化抗体または抗体断片）を含むことは意図していない。

【００４３】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリンまたはヒト抗体に実質的に由来する可変フレームワーク領域を含む可変領域を有する少なくとも一つの免疫グロブリンドメインと、非ヒト免疫グロブリンまたは非ヒト抗体に実質的に由来する相補性決定領域（例えば、少なくとも一つのCDR）とを含む、任意の抗体または抗体断片を指す。

【００４４】

本明細書において用いる場合、「炎症性シグナル伝達インヒビター」または「ISI」とは、炎症促進性サイトカイン（例えば、TNF-α、TNF-β、またはIL-1）とそのレセプター（例えばそれぞれ、TNFレセプター1もしくは2、またはIL-1レセプター）との間の結合を低下させる剤；炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子（例えば、CD20、CD25、CTLA-4、CD80/CD86、またはCD28）と活性化分子との結合を低下させる剤；あるいは、炎症促進性サイトカインとそのレセプターとの結合の後に、または炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子と活性化分子との結合の後に活性化される細胞内シグナル伝達分子の下流の活性化またはその活性を低下させる剤（例えば、p38 MAPKシグナル伝達経路におけるシグナル伝達分子の活性化またはその活性を低下させる剤）である。ISIによって媒介される該低下とは、炎症促進性サイトカインとそのレセプターとの間の結合の低下、炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子と活性化分子との結合の低下、あるいは、炎症促進性サイトカインとそのレセプターとの結合の後に起こるか、または炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子と活性化分子との結合の後に起こる、細胞内シグナル伝達の低下である。好ましくは、ISIによって媒介されるそのような低下は、少なくとも約10%、好ましくは少なくとも20%、30%、40%、または50%、より好ましくは少なくとも60%、70%、80%、または90%(最大100%)の低下である。ISIは、レセプターへの結合のために自由に使用可能な炎症促進性サイトカイン（例えば、TNF-α、TNF-β、またはIL-1）の量を減らすことによって作用し得る。例えばISIは、可溶性の炎症促進性サイトカインレセプタータンパク質（例えば、可溶性のTNFレセプター融合タンパク質、例えば、エタネルセプト（ENBREL（登録商標））またはレネルセプト）であってもよく、または、可溶性で炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子（例えば、可溶性CTLA-4（アバタセプト））であってもよく、または、炎症促進性サイトカインもしくは炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子に対する抗体（例えば、抗

TNF抗体、例えば、アダリムマブ、セルトリズマブ、インフリキシマブ、もしくはゴリムマブ；抗CD20抗体、例えば、リツキシマブ；またはTRU-015（Trubion Pharmaceuticals））であってもよい。さらにISIは、内因性の野性型炎症促進性サイトカインまたは炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子がそのレセプター（例えば、TNFレセプター1もしくは2、IL-1レセプター－例えばアナキンラ、またはCD11a－例えばエファリズマブ（RAPTIVA（登録商標）、Genentech））に結合する能力を妨害することによって作用し得る。ドミナントネガティブなTNF-α変異体の例は、XENP345（TNF変異体A145R/I97Tのペグ化型）およびXproTMI595、ならびに、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2003 0166559号および同第20050265962号に開示された、さらなる変異体である。ドミナントネガティブなIL-1変異体の例はアナキンラ（KINERET（登録商標））であり、これは、細胞内のシグナル伝達経路を活性化することなくIL-1レセプターに結合するIL-1の可溶型である。本発明で使用可能な炎症性シグナル伝達インヒビターはまた、炎症促進性サイトカインまたは炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子（例えば、DE 096）の下流のシグナル伝達経路を阻害または低減する低分子でもある。この種のISIの例としてはp38 MAPキナーゼのインヒビター、例えば、5-アミノ-2-カルボニルチオペン（thiopene）誘導体（本明細書に組み入れられる、WO 04/089929に記載）；ARRY-797；BIRB 796 BS、（1-5-tert-ブチル-2-p-トリル-2H-ピラゾール-3-イル）-3-［4-2（モルホリン-4-イル-エトキシ）-ナフタレン-1-イル］-尿素）；CHR-3620；CNI-1493；FR-167653（藤沢薬品、日本、大阪）；ISIS 101757（Isis Pharmaceuticals）；ML3404；NPC31145；PD169316；PHZ1112；RJW67657、（4-（4-（4-フルオロフェニル）-1-（3-フェニルプロピル）-5-（4-ピリジニル）-1H-イミダゾール-2-イル）-3-ブチン-1-オール；SCIO-469；SB202190；SB203580、（4-（4-フルオロフェニル）-2-（4-メチルスルフィニルフェニル）-5-（4-ピリジル）1H-イミダゾール）；SB239063、トランス-1-（4-ヒドロキシシクロヘキシル）-4-（4-フルオロフェニル-メトキシピリジミジン-4-イル）イミダゾール；SB242235；SD-282；SKF-86002；TAK 715；VX702；およびVX745が挙げられる。さらに、ISIは、炎症促進性サイトカイン（例えば、TNF-αおよびTNF-β）がその膜結合型から可溶性型へとプロセシングされることを妨げ得る。TACEのインヒビターはこのクラスのISIである。TACEのインヒビターの例としては、BB-1101、BB-3103、BMS-561392、ブチニルオキシフェニルβ-スルホンピペリジンヒドロキソマート（hydroxomate）、CH4474、DPC333、DPH-067517、GM6001、GW3333、Ro 32-7315、TAPI-1、TAPI-2、およびTMI 005が挙げられる。ISIの追加の例としては、疾患特異的な免疫調節活性について操作された、大腸菌（E. coli）の熱ショックタンパク質由来の短いペプチドが挙げられる（例えば、dnaJ P1）。

【００４５】

「インテグリンアンタゴニスト」とは、インテグリン分子、例えばインテグリン分子のα4サブユニットの生物学的活性を低減または阻害する（例えば、インテグリンアンタゴニスト非存在下の生物学的活性に対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、またはそれ以上の低減または阻害）、任意の剤を意味する。該剤は、α4インテグリンサブユニット（NCBIアクセッション番号P13612；Takadaら、EMBO J. 8: 1361 ~ 1368(1989)）の活性または発現を阻害することによって、直接的または間接的にα4インテグリンサブユニットに作用してもよく、α4サブユニットを含む無傷のインテグリンが結合する標的に作用してもよい。例えば、血管細胞接着分子-1（VCAM-1）に結合することによってα4β1インテグリンとVCAM-1との結合を妨げる抗体またはブロッキングペプチドは、本発明の目的に関してインテグリンアンタゴニストとみなされる。本発明での使用に適した非限定的な例示的インテグリンアンタゴニストとしては、タンパク質、ブロッキングペプチド、抗体、例えばナタリズマブ（TYSABRI（登録商標））、および低分子インヒビターを挙げることができる。α4インテグリンアンタゴニストの例としては、これらに限定されるわけではないが、ナタリズマブ（Elan/Biogen Idec；例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,840,299号；同第6,033,665号；同第6,602,503号；同第5,168,062号；同第5,385,839号；および同第5,730,978号を参照されたい）、oMEPUPA-V（Biogen；参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,495,525

号）、アレファセプト、CDP-323（Celltech）；フィラテグラスト（SB-68399; GlaxoSmithKline）；TR-9109（Pfizer）；ISIS-107248（Antisense Therapeutics）；R-1295（Roche）；およびTBC-4746（Schering-Plough）が挙げられる。α4インテグリンアンタゴニストのさらなる非限定的な例としては、以下に記載の低分子が挙げられる：米国特許第5,821,231号；同第5,869,448号；同第5,936,065号；同第6,265,572号；同第6,288,267号；同第6,365,619号；同第6,423,728号；同第6,426,348号；同第6,458,844号；同第6,479,666号；同第6,482,849号；同第6,596,752号；同第6,667,331号；同第6,668,527号；同第6,685,617号；同第6,903,128号；および同第7,015,216号（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる）；米国特許出願公開第2002/0049236号；同第2003/0004196号；同第2003/0018016号；同第2003/0078249号；同第2003/0083267号；同第2003/0100585号；同第2004/0039040号；同第2004/0053907号；同第2004/0087574号；同第2004/0102496号；同第2004/0132809号；同第2004/0229858号；同第2006/0014966号；同第2006/0030553号；同第2006/0166866号；同第2006/0166961号；同第2006/0241132号；同第2007/0054909号；および同第2007/0232601号（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる）；欧州特許EP 0842943；EP 0842944；EP 0842945；EP 0903353；およびEP 0918059；ならびに国際公開公報WO 95/15973；WO 96/06108；WO 96/40781；WO 98/04247；WO 98/04913；WO 98/42656；WO 98/53814；WO 98/53817；WO 98/53818；WO 98/54207；WO 98/58902；WO 99/06390；WO 99/06431；WO 99/06432；WO 99/06433；WO 99/06434；WO 99/06435；WO 99/06436；WO 99/06437；WO 99/10312；WO 99/10313；WO 99/20272；WO 99/23063；WO 99/24398；WO 99/25685；WO 99/26615；WO 99/26921；WO 99/26922；WO 99/26923；WO 99/35163；WO 99/36393；WO 99/37605；WO 99/37618；WO 99/43642；WO 01/42215；およびWO 02/28830；これら全てが参照により本明細書に組み入れられる。α4インテグリンアンタゴニストのさらなる例としては、以下に記載のフェニルアラニン誘導体が挙げられる：米国特許第6,197,794号；同第6,229,011号；同第6,329,372号；同第6,388,084号；同第6,348,463号；同第6,362,204号；同第6,380,387号；同第6,445,550号；同第6,806,365号；同第6,835,738号；同第6,855,706号；同第6,872,719号；同第6,878,718号；同第6,911,451号；同第6,916,933号；同第7,105,520号；同第7,153,963号；同第7,160,874号；同第7,193,108号；同第7,250,516号；および同第7,291,645号（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる）。α4インテグリンアンタゴニストであるさらなるアミノ酸誘導体としては、以下に記載のものが挙げられる：例えば、米国特許出願公開第2004/0229859号および同第2006/0211630号（参照により本明細書に組み入れられる）；ならびに国際公開公報WO 01/36376；WO 01/47868；およびWO 01/70670；これら全てが参照により本明細書に組み入れられる。α4インテグリンアンタゴニストのその他の例としては、以下に記載のペプチド、およびペプチドと半ペプチド（semi-peptide）の化合物が挙げられる：例えば、国際公開公報WO 94/15958；WO 95/15973；WO 96/00581；WO 96/06108；WO 96/22966（Leu-Asp-Valトリペプチド；Biogen, Inc.）；WO 97/02289；WO 97/03094；およびWO 97/49731。α4インテグリンアンタゴニストのさらなる例としては、以下に記載のペグ化分子が挙げられる：米国特許出願公開第2007/066533号（参照により本明細書に組み入れられる）。α4インテグリンアンタゴニストである抗体の例としては、以下に記載のものが挙げられる：例えば、国際公開公報WO 93/13798；WO 93/15764；WO 94/16094；およびWO 95/19790。さらなるα4インテグリンアンタゴニストの例は、本明細書に記載される。

【００４６】

「インターフェロン」とは、哺乳動物（例えばヒト）のインターフェロン-α、-β、-γ、もしくは-τのポリペプチド、またはこれらの生物学的に活性な断片、例えば、IFN-α（例えばIFN-α-1a；参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願第20070274950号を参照されたい）、IFN-α-1b、IFN-α-2a（参照により本明細書に組み入れられる国際公開公報WO 07/044083を参照されたい）、およびIFN-α-2b）、IFN-β（例えば参照により組み入れられる米国特許第7,238,344号；参照により組み入れられる米国特許第6,962,978に記載のIFN-b-1a（AVONEX（登録商標）およびREBIF（登録商標））、およびIFN-β-1b（その全文が参照により組み入れられる、米国特許第4,588,585号；同第4,959,314号；同

第4,737,462号；および同第4,450,103号に記載のBETASERON（登録商標））、IFN-g、ならびにIFN-t（参照により組み入れられる米国特許第5,738,845号および米国特許出願公開第20040247565号および同第20070243163号に記載）を意味する。

【００４７】

「HSAリンカーコンジュゲート」とは、1つまたは複数の結合部分、ペプチドコネクター、診断剤、または治療剤と組み合わされた（好ましくは共有結合した）、ヒト血清アルブミン（HSA）リンカーを意味する。

【００４８】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書において使用する場合、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、該集団を含む個々の抗体は、僅かな量で存在し得る潜在的な天然の変異を除いて、同一である。モノクローナル抗体は極めて特異的であって、単一の抗原部位に対して指向している。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して指向した様々な抗体を典型的には含む従来の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対して指向している。モノクローナル抗体は、任意の当技術分野で認められている技術、および本明細書に記載される技術、例えば、Kohlerら、Nature, 256:495（1975）に記載されるハイブリドーマ法、トランスジェニック動物（例えば、Lonbergら、Nature 368（6474）:856~859（1994））、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号）を用いて、または、例えばClacksonら、Nature、352:624~628（1991）およびMarksら、J. Mol. Biol, 222:581~597（1991）に記載の技術を用いるファージ、酵母、もしくは合成骨格（scaffold）抗体ライブラリーを用いて、調製することができる。

【００４９】

「薬学的に許容される担体」とは、治療される哺乳動物に生理学的に許容される一方で一緒に投与される化合物の治療特性を保持する、担体を意味する。薬学的に許容される担体の一例は生理食塩水である。その他の生理学的に許容される担体およびそれらの配合は当業者に公知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences,（第18版）,. ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載される。

【００５０】

「増殖性疾患」または「癌」とは、異常なまたは無秩序な細胞増殖を特徴とする任意の病態を意味する。増殖性疾患の例としては例えば、固形腫瘍、例えば、肉腫（例えば、明細胞肉腫）、癌腫（例えば、腎細胞癌）、およびリンパ腫；乳癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、中咽頭癌、下咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢癌、胆管癌、小腸癌、泌尿器系（腎臓、膀胱および尿管の上皮を含む）の癌、女性生殖器系（子宮頸、子宮、卵巣、絨毛癌および妊娠性栄養膜）の癌、男性生殖器系（前立腺、精嚢および精巣を含む）の癌、内分泌腺（甲状腺、副腎および下垂体を含む）の癌、皮膚（血管腫、黒色腫、骨または軟部組織由来の肉腫およびカポジ肉腫を含む）の癌；脳および髄膜（星状細胞腫、神経膠腫、神経膠芽細胞腫、網膜芽腫、神経腫、神経芽腫、神経鞘腫および神経芽腫を含む）の癌、神経の癌、眼の癌、造血系の癌（緑色白血病、プラズマ細胞腫、および真皮T細胞リンパ腫/白血病を含む）、ならびに免疫系の癌（リンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫および非ホジキン病リンパ腫を含む）が挙げられる。非固形腫瘍増殖性疾患の例は白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病）である。

【００５１】

「組み換え抗体」という用語は、組み換え手段によって調製、発現、作製または単離された抗体、例えば以下を指す：（a）免疫グロブリン遺伝子（例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子）について遺伝子導入されたか染色体導入された動物（例えば、マウス）から、またはそこから調製されたハイブリドーマから、単離された抗体、（b）抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された該抗体、（c）ファージ、酵母、または合成骨格ディスプレイを用いる組み換えコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒト抗体配列を含む）から単離された抗体、ならびに（d）免疫グロブリン遺伝子配列（例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子）を他のDNA配列へと

スプライシングする工程を伴う任意の他の手段によって調製、発現、作製、または単離された、抗体。

【００５２】

「特異的に結合する」とは、結合部分（例えば、本明細書に記載の抗体、抗体断片、レセプター、リガンド、または剤の低分子部分）と、標的分子を欠く非標的細胞または組織ではなく、標的分子（例えば、分泌された標的分子、例えばサイトカイン、ケモカイン、ホルモン、レセプター、またはリガンド）との、または標的分子（例えば、細胞表面抗原、例えばレセプターまたはリガンド）を保有する細胞もしくは組織との、優先的な結合を意味する。結合部分と非標的分子（単独でまたは細胞もしくは組織と共に存在する）との間で、ある程度の非特異的な相互作用が起こり得ることが認識される。それにもかかわらず、特異的結合は、標的分子の特異的認識を通じて媒介されるとして区別され得る。特異的結合は、例えば標的分子（例えば、抗原）を保有する細胞と結合部分（例えば、抗体）との間に、例えば標的分子を欠いている細胞と結合部分との間よりも強力な結合をもたらす。特異的結合は典型的に、例えば、標的分子またはマーカーを欠いている細胞または組織と比較して、該標的分子またはマーカーを保有している細胞または組織に結合した結合部分の量（単位時間あたり）を、2倍超、好ましくは5倍超、より好ましくは10倍超、最も好ましくは100倍超に増大させる。結合部分は、例えば、10^{-6}M未満、より好ましくは10^{-7}M未満、10^{-8}M未満、10^{-9}M未満、10^{-10}M未満、10^{-11}M未満、または10^{-12}M未満、最も好ましくは10^{-13}M未満、10^{-14}M未満、または10^{-15}M未満の解離定数で、標的分子またはマーカーに結合する。そのような条件下でのタンパク質への特異的結合には、該特定のタンパク質に対する特異性について選択された結合部分が必要である。種々のアッセイ形式が、特定の標的分子に特異的に結合できる結合部分（例えば、抗体）を選択するのに適している。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質との特異的免疫反応性を有するモノクローナル抗体を選択するのに常用される。特異的免疫反応性を決定するために使用できるイムノアッセイの形式および条件の記載については、Harlow & Lane、Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Publications、New York(1988)を参照のこと。

【００５３】

（参照配列に対してポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列を比較する文脈において）「配列同一性」とは、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列が、該参照配列と同一であるか、または、二つの配列を最適に整列させた場合に該参照配列内の対応する位置において同一であるヌクレオチド残基もしくはアミノ酸残基を所与のパーセンテージで有することを意味する。

【００５４】

「表面露出アミノ酸残基」または「表面露出した」とは、折り畳まれかつ立体配置的に正しい三次構造であるHSAポリペプチドの外面上に存在する、アミノ酸残基を意味する。このような残基は、診断剤または治療剤の部位特異的結合を可能にするように、例えば、化学反応性を有する他のアミノ酸（例えば、システイン）で置換することができる。さらに、表面露出アミノ酸残基は、グリコシル化を（例えば、セリン、トレオニン、もしくはアスパラギン残基、またはグリコシル化モチーフの追加によって）可能にするかまたは（例えば、セリン、トレオニン、もしくはアスパラギン残基、またはグリコシル化モチーフの除去によって）妨害するように、置換することができる。表面露出アミノ酸残基としては、これらに限定されるわけではないが、496位のトレオニン、58位のセリン、76位のトレオニン、79位のトレオニン、83位のトレオニン、125位のトレオニン、236位のトレオニン、270位のセリン、273位のセリン、304位のセリン、435位のセリン、478位のトレオニン、506位のトレオニン、および508位のトレオニンが挙げられる（アミノ酸の番号付けは、例えば、SEQ ID NO: 1に示されるHSAリンカーの配列を基準とする）。他の表面露出残基は、HSA結晶構造を用いて当業者によって同定され得る（Sugioら、「Crystal structure of human serum albumin at 2.5 A resolution」Protein Eng. 12:439~446(1999)）。

【００５５】

「対象」とは、ヒト患者または、ヒト腫瘍細胞を有するヌードマウス異種移植モデルを指す。

【００５６】

「標的分子」または「標的細胞」とは、結合部分（例えば、抗体）または1つもしくは複数の結合部分を含むHSAコンジュゲート（例えば、1つまたは複数の抗体または抗体断片に結合したHSAリンカー）が特異的に結合できる分子（例えば、タンパク質、エピトープ、抗原、レセプター、またはリガンド）または細胞を意味する。好ましい標的分子は標的細胞の外側上に露出している（例えば、細胞表面タンパク質または分泌タンパク質）が、標的分子は代替的にもしくはさらに、標的細胞の内側に存在してもよい。

【００５７】

好ましくは、「治療」により、対象における、ヒトの疾患もしくは障害（例えば、自己免疫疾患または増殖性疾患）の進行もしくは重症度が、または、ヒトの該疾患または障害の1つまたは複数の症状の進行、重症度、もしくは頻度が、低減（例えば、少なくとも10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％、または100％までも）する。

【図面の簡単な説明】

【００５８】

【図１】例示的なHSAリンカーコンジュゲートの模式図を示す図である。アミノ末端結合部分とHSAリンカーとの間のコネクターは、アラニン-アラニン-セリンの配列を有する。HSAリンカーとカルボキシ末端結合部分との間のコネクターはアラニン-アラニン-アラニン-ロイシンの配列（SEQ ID NO: 5）を有する。

【図２】B2B3変異体がZR75-1乳癌細胞においてHRG誘導性pErbB3を阻害することを示すグラフである。

【図３Ａ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-2（A5-HSA-B1D2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ErbB3の阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図３Ｂ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-1（H3-HSA-B1D2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ErbB3の阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図３Ｃ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-10（H3-HSA-F5B6H2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ErbB3の阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図３Ｄ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-8（F4-HSA-F5B6H2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ErbB3の阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図４Ａ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-2（A5-HSA-B1D2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化AKTの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図４Ｂ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-1（H3-HSA-B1D2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化AKTの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図４Ｃ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-10（H3-HSA-F5B6H2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化AKTの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図４Ｄ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-8（F4-HSA-F5B6H2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化AKTの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図５Ａ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-2（A5-HSA-B1D2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ERKの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。

【図５Ｂ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB1D2-1（H3-HSA-B1D2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ERKの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。
【図５Ｃ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-10（H3-HSA-F5B6H2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ERKの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。
【図５Ｄ】B2B3 HSAリンカーコンジュゲートであるB2B3-8（F4-HSA-F5B6H2）における24時間の前処理後の、BT474乳癌細胞におけるリン酸化ERKの阻害を示すグラフである。このHSAリンカーコンジュゲートに関するさらなる詳細は、以下、例えば表6で述べる。
【図６】B2B3-1変異体によるBT474乳癌細胞の処理がG1停止およびS期の細胞数の減少をもたらすことを示すグラフである。
【図７】BT-474-M3細胞と1μＭB2B3-1のプレインキュベーションによってHRGの結合が実質的に遮断されることを示すフローサイトメトリーヒストグラムである。
【図８】図8A～図8Dは、B2B3-1がB-T474-M3細胞株およびZR75-30細胞株におけるErbB3およびAKTのリン酸化を阻害することを示すグラフである。乳癌細胞株BT-474-M3（図8Aおよび図8C）およびZR75-30（図8Bおよび図8D）を、24時間にわたりB2B3-1の用量滴定によって前処理し、次いで10分間にわたり5nMのHRG 1β EGFドメインで刺激した。その後、ErbB3およびAKTのリン酸化状態をELISAアッセイを用いて調べた。
【図９】BT474乳癌細胞におけるシグナル伝達タンパク質に対する漸増濃度のB2B3-1による処理の有効性を示す、ウエスタンブロットの写真である。「p-」は、チロシンリン酸化型のシグナル伝達タンパク質を示す。β チューブリン（本文脈においてシグナル伝達タンパク質ではない）は、ローディング対照を規定する。β チューブリン（本文脈においてシグナル伝達タンパク質ではない）は、ローディング対照を規定する。
【図１０】B2B3-1処理したBT474乳癌細胞の免疫沈降を示すウエスタンブロットの写真である。β チューブリンは、免疫沈降反応に入力された細胞タンパク質のレベルに関する対照を規定する。
【図１１】図11A～図11Cは、BT-474細胞株のB2B3-1処理により、G1停止およびS期における細胞数の減少がもたらされること（図11A）、および、処理なしの細胞と比較してBT-474細胞およびSKBr3細胞の両方においてコロニー形成が阻害されること（図11B）を示すグラフである。さらに、B2B3-1は細胞インピーダンスアッセイにおいてBT-474-M3細胞の増殖を阻害する（図11C）。
【図１２】B2B3-1がZR75-1細胞においてErbB3リン酸化を刺激しないことを示すグラフである。
【図１３】図13A～図13Bは、B2B3-1がErbB3（図13A）およびErbB2（図13B）に特異的に結合することを示すグラフである。
【図１４】MALME-3細胞に対するB2B3-1の高親和力の（avidity）結合が、ErbB2のみの結合変異体であるSKO-3、およびErbB3のみの結合変異体であるSKO-2と比較して、見かけの結合親和性における有意な増大をもたらすことを示す、グラフである。
【図１５】図15A～図15Cは、マウス、カニクイザル（Cynomolgus monkey）、およびヒトの血清におけるB2B3-1の安定性を示すグラフである。100nMのB2B3-1を、マウス（図15A）、カニクイザル（図15B）、またはヒト（図15C）の血清中で120時間、37℃でインキュベーションした。試料を0、24、48、72、96、および120時間目に取り出し、B2B3-1がErbB2およびErbB3の両方に結合する能力をELISAによって測定した（RLU＝相対的発光量）。
【図１６】BT-474-M3乳癌異種移植モデルにおけるB2B3-1の用量応答を示すグラフである。腫瘍応答に対するB2B3-1用量の関連性を、示した用量においてBT-474-M3乳房腫瘍株で評価した。HSAは、90mg/kgのB2B3-1用量と等モル用量である52.5mg/kgで与えた。
【図１７】図17A～図17Eは、B2B3-1がErbB2依存的様式で、複数の異種移植モデルにおいて有効であることを示すグラフである。Calu-3（ヒト肺腺癌；図17A）、SKOV-3（ヒト卵巣腺癌；図17B）、NCI-N87（ヒト胃癌；図17C）、ACHN（ヒト腎臓腺癌；図17D）、およびMDA-MB-361（ヒト乳房腺癌；図17E）の異種移植モデルが示される。マウスを、30mg/kgの

B2B3-1で3日毎に、またはB2B3-1と等モル用量のHSA対照で処理した。
【図１８Ａ】ErbB2の過剰発現によって、B2B3-1不応答のADRr乳癌異種移植モデルが応答モデルに変換されることを示すグラフである。レトロウイルス発現系を用いて、野性型ADRr異種移植片においてErbB2を過剰発現させた。
【図１８Ｂ】ErbB2の過剰発現によって、B2B3-1不応答のADRr乳癌異種移植モデルが応答モデルに変換されることを示すグラフである。レトロウイルス発現系を用いて、ADRr-E2異種移植片においてErbB2を過剰発現させた。
【図１９Ａ】B2B3-1活性が、インビトロにおいてErbB2発現レベルと正に相関していることを示すグラフである。
【図１９Ｂ】B2B3-1活性が、インビボにおいてErbB2発現レベルと正に相関していることを示すグラフである。
【図２０】図20A～図20Bは、B2B3-1処理によって腫瘍細胞の周期が改変されることを示している。図20Aは、6時間にわたるBT474-MB乳房腫瘍細胞のB2B3-1処理によって細胞周期インヒビター$p27^{kip1}$の核への移行がもたらされることを示す、蛍光顕微鏡写真を含む。Hoechst染色を用いて核を同定した。図20BはB2B3-1で72時間処理したBT-474-MB細胞のウエスタンブロットであり、これにより、細胞周期調節因子Cyclin D1のレベルの低下がもたらされた。この実験では、細胞骨格タンパク質であるビンクリンをタンパク質ローディング対照としてプローブした。
【図２１】図21A～図21Bは、BT474乳房腫瘍異種移植片のB2B3-1処理によって$p27^{kip1}$の核への移行がもたらされることを示す、顕微鏡写真である。BT474乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図21A）または等モル用量のHSA（図21B）で、3日毎に計4回処理し、$p27^{kip1}$について染色した。
【図２２】図22A～図22Bは、B2B3-1処理によってBT474-MB乳癌異種移植片における増殖マーカーKi67の減少がもたらされることを示す、蛍光顕微鏡写真である。BT474-MB乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図22A）または等モル用量のHSA（図22B）で、3日毎に計4回処理した。
【図２３】図23A～図23Bは、B2B3-1処理によって、BT474-MB乳癌異種移植腫瘍における血管密度の減少（CD31染色の低下により判定される）がもたらされることを示す、蛍光顕微鏡写真である。BT474-MB乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図23A）または等モル用量のHSA（図23B）で、3日毎に計4回処理した。
【図２４】図24A～図24Bは、B2B3-1がインビボにおいてErbB3のリン酸化を阻害することを示すグラフである。B2B3-1（M1～M5）または対照HSA（H1～H2）で処理した個別のBT-474-MB異種移植腫瘍に由来する溶解物をSDS-PAGEに供し、ウエスタンブロット分析を用いてpErbB3およびβチューブリンについてプローブした（図24A）。βチューブリンシグナル平均値に対するpErbB3シグナル平均値の正規化によって、B2B3-1処理された腫瘍はHSA腫瘍よりも有意に少ないpErbB3を含んでいたことが実証された（図24B）。
【図２５Ａ】BT-474-MB shPTENおよびBT-474-MB shControlの異種移植におけるB2B3-1のインビボ活性を示すグラフである。培養したBT-474-MB腫瘍細胞を対照ベクター（図25A）で、または、PTEN活性をノックアウトするshPTENを発現するレトロウイルスベクター（図25B）でトランスフェクトする。このようにPTEN活性をノックアウトするように操作されたBT-474-MB乳癌細胞をマウスの右側腹部に注射し、対照ベクターでトランスフェクトした細胞を同じマウスの左側腹部に注射した。マウスを、30mg/kgのB2B3-1で3日毎に、または10mg/kgのハーセプチンで毎週処理し、対照としてHSAをB2B3-1と等モル用量で注射した。B2B3-1およびハーセプチンは、対照のBT-474-MB乳癌細胞によって形成された腫瘍の大きさの低下を促進した。
【図２５Ｂ】BT-474-MB shPTENおよびBT-474-MB shControlの異種移植におけるB2B3-1のインビボ活性を示すグラフである。培養したBT-474-MB腫瘍細胞を対照ベクター（図25A）で、または、PTEN活性をノックアウトするshPTENを発現するレトロウイルスベクター（図25B）でトランスフェクトする。このようにPTEN活性をノックアウトするように操作されたBT-474-MB乳癌細胞をマウスの右側腹部に注射し、対照ベクターでトランスフェクトし

た細胞を同じマウスの左側腹部に注射した。マウスを、30mg/kgのB2B3-1で3日毎に、または10mg/kgのハーセプチンで毎週処理し、対照としてHSAをB2B3-1と等モル用量で注射した。B2B3-1のみ（かつハーセプチンなし）は、PTENの発現を欠くBT-474-MB乳癌細胞によって形成された腫瘍の大きさの低下を促進させた。

【図２６Ａ】B2B3-1が、PTEN活性が低下しているBT-474-MB異種移植片におけるAKTのリン酸化を阻害することを示す。処理（q3d× 11）の完了後に腫瘍を溶解させて、ウエスタンブロット分析によってPTEN、pErbB3、およびpAKTの発現レベルについて試験した。

【図２６Ｂ】B2B3-1が、PTEN活性が低下しているBT-474-MB異種移植片におけるAKTのリン酸化を阻害することを示す。総AKTおよび総タンパク質に対して正規化したpAKTのバンド強度に対する濃度測定によって、B2B3-1はこのタンパク質のリン酸化を阻害でき、ハーセプチンはしなかったことが実証される。

【図２７】図27A～図27Dは、nu/nuマウスにおけるボーラス用量5mg/kg（図27A）、15mg/kg（図27B）、30mg/kg（図27C）、および45mg/kg（図27D）のB2B3-1の単一用量薬物動態特性を示すグラフである。B2B3-1血清濃度の測定値は、HSAアッセイまたはErbB2/ErbB3アッセイにおいて同程度であり、このことは、B2B3-1の抗原結合活性が循環中で保持されていることを示している。

【図２８】ヌードマウスにおけるボーラス用量5、15、30、および45mg/kgのB2B3-1の用量-曝露の関係を示すグラフである。用量の増大は、B2B3-1に対する全体的曝露の直線的な増大をもたらす。

【図２９】4mg/kg（n＝2）、20mg/kg（n＝2）、および200mg/kg（336時間の時点までn＝4、384時間、552時間および672時間の時点についてn＝2）を3日毎に4回投与したカニクイザルで測定した、B2B3-1血清濃度を示すグラフである。

【図３０】B2B3-1発現プラスミドpMP10k4H3-mHSA-B1D2の説明図である。

【図３１】ネオマイシン耐性プラスミドpSV2-neoの説明図である。

【図３２】ハイグロマイシン耐性プラスミドpTK-Hygの説明図である。

【図３３】q7dで投与したB2B3-1がq3d投与と同等の有効性を示すことを実証するデータを示す。

【図３４】B2B3-1およびトラスツズマブが異なるErbB3阻害機序を呈することを実証するウエスタンブロットのデータを示す。

【図３５Ａ】ヒト乳房腫瘍のモデルとなる様々なヒト乳癌細胞株のスフェロイドにおいてB2B3-1とトラスツズマブの組み合わせ治療を調べた、実施例43で詳述する実験の結果を示す。BT-474-MB細胞を用いて得たデータを示す。単独または組み合わせたB2B3-1のモル濃度をX軸に示す。単独または組み合わせたトラスツズマブのモル濃度は、示されたB2B3-1の各濃度の1/3である。

【図３５Ｂ】ヒト乳房腫瘍のモデルとなる様々なヒト乳癌細胞株のスフェロイドにおいてB2B3-1とトラスツズマブの組み合わせ治療を調べた、実施例43で詳述する実験の結果を示す。SKBR3細胞を用いて得たデータを示す。単独または組み合わせたB2B3-1のモル濃度をX軸に示す。単独または組み合わせたトラスツズマブのモル濃度は、示されたB2B3-1の各濃度の1/3である。

【図３５Ｃ】ヒト乳房腫瘍のモデルとなる様々なヒト乳癌細胞株のスフェロイドにおいてB2B3-1とトラスツズマブの組み合わせ治療を調べた、実施例43で詳述する実験の結果を示す。MDA-MB-361細胞を用いて得たデータを示す。単独または組み合わせたB2B3-1のモル濃度をX軸に示す。単独または組み合わせたトラスツズマブのモル濃度は、示されたB2B3-1の各濃度の1/3である。

【図３６】実施例44で詳述する、インビボにおける腫瘍異種移植実験の結果を示す。X軸の「日数」とは、腫瘍移植後日数を示す。各データ点のエラーバーは、少なくとも2つの独立した異種移植片に対する応答を表す。

【図３７】使用した腫瘍細胞が米国国立癌研究所より入手され得るN-87胃腫瘍細胞であることを除き、本質的には実施例44で説明するような、異種移植モデルから得られたデータを示す。

【図３８】図36に提示したデータのサブセットを示す。
【発明を実施するための形態】
【００５９】
詳細な説明
本発明は、ヒト血清アルブミン（HSA）リンカー、ならびに、HSAリンカーと1つまたは複数のさらなる部分、例えば結合部分とを含むHSAリンカーコンジュゲート（例えば、結合剤、診断剤、または治療剤）を提供する。そのようなHSAリンカーコンジュゲートは、例えば6時間～7日間という延長されたインビボ半減期などの望ましい特性を有し、かつ、哺乳動物（例えばヒト）にインビボで投与されても、体液性または細胞媒介性の有意な免疫応答を誘導しない。一局面では、本発明は、2つの所定のアミノ酸置換（すなわち、SEQ ID NO: 1に示される「C34S」および「N503Q」の置換）を有する変異HSAリンカーを提供する。別の局面では、本発明は、インビボでの哺乳動物（例えば、ヒト）における診断用途もしくは治療用途のための、または哺乳動物の細胞、組織、もしくは器官と関連したインビトロでの使用のための、1つまたは複数の結合部分（例えば、抗体、抗体断片、レセプター/リガンド、または低分子）に結合したHSAリンカーを提供する。さらなる局面において、哺乳動物における（または哺乳動物の細胞、組織、または器官と関連した）診断用途または治療用途のために、HSAリンカーを1つまたは複数の免疫調節剤、細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤、検出可能標識、または放射性剤と連結してもよい。HSAリンカーを含むHSAリンカーコンジュゲートは任意で、1つまたは複数の薬学的に許容される担体または賦形剤と組み合わされてもよく、かつ、静脈内に、筋肉内に、経口的に、吸入によって、非経口的に、腹腔内に、動脈内に、経皮的に、舌下に、経鼻的に、座剤の使用を通じて、経類的に、リポソームで、脂肪に（adiposally）、眼球に（opthalmically）、眼内に、皮下に、髄腔内に、局部的に、または局所的に投与されるように製剤化されてもよい。HSAリンカーコンジュゲートは、1つまたは複数の生物学的活性剤（例えば、生物学的または化学的な剤、例えば化学療法剤および抗腫瘍剤）と組み合わせたり同時投与することができるが、必ずしもその必要はない。さらなる局面において本発明は、結合部分（例えば、抗体、抗体断片、レセプター、またはリガンド）、免疫調節剤、細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤、検出可能標識、または放射性剤をHSAリンカーに結合させて、診断または治療の用途に使用できるHSAリンカーコンジュゲートを調製するための、説明書を備えたキットを提供する。
【００６０】
ヒト血清アルブミン（HSA）リンカー
HSAリンカーは、SEQ ID NO: 3に示される野生型HSAアミノ酸配列を含みうる。あるいは、HSAリンカーは、改変配列または変異配列を含んでもよい。1つの変異HSAリンカーは、SEQ ID NO: 3に示される野性型HSAアミノ酸配列を基準として34位および503位に2つのアミノ酸変異を含む。34位のシステイン残基（すなわち、C34）はシステイン以外の任意のアミノ酸残基（例えば、セリン、トレオニン、またはアラニン）に変異してもよい。同様に、503位のアスパラギン残基（すなわち、N503）はアスパラギン以外の任意のアミノ酸残基（例えば、グルタミン、セリン、ヒスチジン、またはアラニン）に変異してもよい。一態様では、HSAリンカーは、それぞれSEQ ID NO: 1およびSEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を有する。この変異HSAリンカーは、2つのアミノ酸置換（すなわち、アミノ酸残基34のシステインの代わりにセリン（「C34S」）、およびアミノ酸残基503のアスパラギンの代わりにグルタミン（「N503Q」））を含む。1つまたは複数の結合部分（例えば、抗体、抗体断片（例えば、単鎖抗体）、または他の標的化剤もしくは生物学的に活性な剤（例えば、レセプターおよびリガンド））に結合させた場合、HSAリンカーは、これらのコンジュゲートに対して、および、同じく結合させた追加の診断剤もしくは治療剤（例えば、免疫調節剤、細胞毒性剤、もしくは細胞増殖抑制剤、検出可能標識、または放射性剤）に対して、該HSAリンカーの非存在下におけるこれらの剤の薬理学的特性と比べて有益な、いくつかの薬理学的特性を付与する。哺乳動物（例えば、ヒト）への投与の場合、これらの恩典には、免疫原性の低下（例えば、リンカー-抗体

コンジュゲートの宿主抗体中和反応の低減）、（例えば、質量分析による）HSAリンカーコンジュゲートの検出の増大、および薬理学的半減期の延長（例えば、6時間超、8時間超、12時間超、24時間超、36時間超、2日超、3日超、4日超、5日超、6日超、または7日超の半減期）が含まれる。具体的には、アミノ酸残基34のシステインをセリンで置換することにより、HSAリンカーの酸化およびタンパク質不均一性が低減する。野性型HSAにおいて、アミノ酸残基503のアスパラギンは脱アミノ反応に感受性であり、これは薬理学的半減期の低下をもたらす可能性が高い。アミノ酸残基503のアスパラギンをグルタミンで置換することにより、HSAリンカーの薬理学的半減期の延長と、それに対応して、哺乳動物（例えば、ヒト）またはその細胞、組織、または器官に投与された場合のHSAリンカーを含むコンジュゲート剤の薬理学的半減期の延長をもたらすことができる。

【００６１】

他の態様では、変異HSAリンカーは、HSAのドメインI（SEQ ID NO: 53；SEQ ID NO: 1の残基1～197）、HSAのドメインIII（SEQ ID NO: 55；SEQ ID NO: 1の残基381～585）、HSAのドメインIおよびIIIの組み合わせ、またはHSAのドメインIまたはIIIとHSAのドメインII（SEQ ID NO: 54；SEQ ID NO: 1の残基189～385）との組み合わせを含む。例えば、HSAリンカーはドメインIとII、IとIII、またはIIとIIIを含むことができる。さらに、ドメインI（SEQ ID NO: 53）の34位のシステイン残基（すなわち、C34）を、システイン以外の任意のアミノ酸残基（例えば、セリン、トレオニン、またはアラニン）に変異させてもよい。同様に、ドメインIII（SEQ ID NO: 55）の503位のアスパラギン残基（すなわち、N503）を、アスパラギン以外の任意のアミノ酸残基（例えば、グルタミン、セリン、ヒスチジン、またはアラニン）に変異させてもよい。これらのHSAリンカーは、各々が下記で詳述されている、1つまたは複数のペプチドコネクター、結合部分、および治療剤または診断剤を含む、HSAリンカーコンジュゲートに組み込むことができる。

【００６２】

ペプチドコネクター

HSAリンカーに対する、本明細書において定義される結合部分の結合を容易にするために、短い（例えば、2～20アミノ酸長の）ペプチドコネクターを、HSAリンカーのアミノ末端またはカルボキシ末端に結合させることができる（例えば、共有結合（例えば、ペプチド結合）、イオン結合、または疎水性結合させるか、または高親和性のタンパク質-タンパク質結合相互作用を介する（例えば、ビオチンとアビジン））。これらのコネクターは、本明細書に記載の任意の結合部分が結合可能である、柔軟なテザーを提供する。ペプチドコネクターは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上のアミノ酸長であってもよい。一態様では、コネクターは、例えばグリシン、アラニン、セリン、グルタミン、ロイシン、またはバリン残基の配列である。本明細書において具体的に列挙されてはいないが、コネクターは、グリシン、アラニン、セリン、グルタミン、ロイシン、もしくはバリン残基のみであってもよく、または最大約20アミノ酸長までのこれらの残基の任意の組み合わせであってもよい。好ましい態様では、HSAリンカーのアミノ末端に結合したコネクターはアミノ酸配列AASまたはAAQを有し、カルボキシ末端に結合したコネクターはアミノ酸配列「AAAL」（SEQ ID NO: 5）を有する。コネクターは、HSAリンカー内のアミノ酸残基に対して、HSAリンカーのアミノ末端もしくはカルボキシ末端と共有結合してもよいし、または存在する場合には1つまたは複数の結合部分の間に含まれてもよい。

【００６３】

HSAリンカーの作製

1つまたは複数の上述のペプチドコネクター、1つまたは複数の後述の結合部分、ポリペプチドベースの検出可能標識、および他のポリペプチドベースの治療剤を含むまたは含まない、HSAリンカーは、組み換えにより作製することができる。例えば、HSAリンカー（および1つまたは複数の任意のエレメント）をコードするヌクレオチド配列は、細菌（例えば、大腸菌）、昆虫、酵母、もしくは哺乳動物の細胞（例えば、CHO細胞）、または、哺乳動物の組織、器官、もしくは生物体（例えば、トランスジェニックのげっ歯類、有蹄類

（例えば、ヤギ）または非ヒト霊長類）において、（例えば、プラスミド内で、ウイルスベクター内で、または遺伝子導入により）発現させてもよい。宿主の細胞、組織、または器官でHSAリンカーを発現させた後、当業者は、標準的なタンパク質精製法（例えば、FPLCまたはアフィニティクロマトグラフィー）を用いて該HSAリンカーを単離および精製し得る。2つの結合部分と組み合わせたHSAリンカーの産生のための組み換え発現系を図1に図示する。

【００６４】

あるいは、1つまたは複数の上述の任意のエレメントを含むまたは含まないHSAリンカーを、合成により作製することができる。例えば、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、固相アプローチのようなペプチド合成の分野において一般に確立されている技術によって、調製することができる。固相合成は、ポリスチレンのような不溶性の支持体またはマトリックスに連結させた、伸長するペプチド鎖へのアミノ酸残基の段階的な付加を伴う。ペプチドのC末端残基をまず、t-ブチルオキシカルボニル基（tBoc）またはフルオレニルメトキシカルボニル（FMOC）基などのN保護剤で保護されたアミノ基をもつ市販の支持体に固定する。アミノ保護基を、適切な脱保護剤、例えば、tBOCについてはTFA、FMOCについてはピペリジンで除去し、次のアミノ酸残基（N保護型）を、ジシクロカルボジイミド（DCC）などのカップリング剤によって付加する。ペプチド結合が形成されたら、該試薬を支持体から洗浄によって除く。最後の残基の付加後、トリフルオロ酢酸（TFA）またはフッ化水素（HF）などの適切な試薬を用いて剤を支持体から切断する。望ましい場合、1つまたは複数の上述の任意のエレメントを含むまたは含まないHSAリンカーを1つ、2つ、3つ、またはそれ以上のセグメントで作製することができ、次にこれらを連結してHSAリンカー構築物全体を形成することができる。

【００６５】

結合部分

HSAリンカーコンジュゲートはまた、標的の細胞、組織、または器官へのHSAリンカーコンジュゲートの選択的かつ特異的な結合を可能にする、1つまたは複数の結合部分、例えば、抗体、抗体断片（本明細書記載のとおり、例えば、単鎖Fv（scFv））、またはレセプター/リガンド（すなわち、タンパク質または糖タンパク質のリガンドまたはレセプター）を含んでもよい。結合部分を、（例えば、共有結合（例えば、ペプチド結合）、イオン結合、もしくは疎水性結合を介して、または高親和性のタンパク質-タンパク質の結合相互作用を介して（例えば、ビオチンとアビジン））HSAリンカーに結合させることができる。

【００６６】

1つまたは複数の結合部分をHSAリンカーに結合させることができる。一態様では、2つ以上の同一の結合部分（すなわち、同じ構造および結合親和性を有する部分）の1つまたは複数（例えば、一列になって）それぞれをHSAリンカーのアミノ末端およびカルボキシ末端に結合させ、それによって該HSAリンカーは、その標的抗原に対する該結合部分の結合活性の向上を提供する。あるいは、2つ以上の異なる結合部分（例えば、2つ以上の異なる標的分子に対して結合親和性を有するscFv、または同じ標的分子上の2つ以上の異なるエピトープに対して結合親和性を有するscFvなどの、抗体）をHSAリンカー（例えば、二重特異性HSAリンカーコンジュゲート）に結合させて、複数の標的抗原またはエピトープをHSAリンカーコンジュゲートによって結合させることができる。別の態様では、例えば、リンカーコンジュゲートに2つ以上の異なる結合特異性または生物学的な作動/拮抗（agonistic/antagonistic）特性をもたらすために、異なる種の結合部分をHSAリンカーに結合させることもできる。二重特異性HSAリンカーコンジュゲートの調製において使用するための結合部分対の有用な組み合わせは、例えば、参照により本明細書に組み入れられる国際公開公報WO 2006/091209およびWO 2005/117973に開示されている。他の態様では、3つ以上の結合部分（例えば、同じまたは異なる結合部分）をHSAリンカーに結合させて、HSAリンカーコンジュゲートを形成させることができる。

【００６７】

本発明は、少なくとも第一および第二の結合部分を有するHSAリンカーコンジュゲートを特徴とし、その各々がHSAリンカーのアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれかに結合可能であるか、または、該末端のいずれかもしくは両方に存在する、本明細書において規定されるようなペプチドコネクターに結合可能である。図1は例示的な変異HSAリンカーを図示し、ここで2つの結合部分（「アーム1」および「アーム2」）は、アミノ末端ペプチドコネクターAASおよびカルボキシ末端ペプチドコネクターAAAL（SEQ ID NO: 5）によって該変異HSAリンカーに結合している。また結合部分（例えば、抗体またはscFv）を、例えば共有結合でまたはイオン結合によって、例えばビオチン-アビジン相互作用を用いて、他の遺伝子座（例えば、HSAリンカーの内部アミノ酸残基）に結合させることができる。アミン（例えば、リジン残基）およびスルフヒドリル（例えば、システイン残基）のアミノ酸側鎖のビオチン化は当技術分野において公知であり、結合部分をHSAリンカーに結合させるために用いることができる。

【００６８】

HSAリンカーコンジュゲートに含まれ得る結合部分としては、抗体、抗体断片、レセプター、およびリガンドが挙げられる。HSAリンカーに結合させた結合部分は組み換え（例えば、ヒト、マウス、キメラ、またはヒト化）型でも、合成型でも、天然型でもよい。代表的な結合部分としては、例えば、完全抗体、ドメイン抗体、ダイアボディ、トリアボディ、二重特異性抗体、抗体断片、Fab断片、F(ab')2分子、単鎖Fv（scFv）分子、二重特異性単鎖Fv（$(scFv')_2$）分子、タンデムscFv断片、抗体融合タンパク質、ホルモン、レセプター、リガンド、およびアプタマー、ならびにこれらの生物学的に活性な断片が挙げられる。

【００６９】

抗体

抗体には、IgG、IgA、IgM、IgD、およびIgEアイソタイプが含まれる。抗体またはその抗体断片は、本明細書において用いる場合、標的細胞の外側上にまたは内部に存在する標的タンパク質、糖タンパク質、またはエピトープに結合する、1つまたは複数の相補性決定領域（CDR）または結合ペプチドを含む。

【００７０】

本明細書に記載される多くの抗体またはその断片は、結合特異性もエフェクター機能も失うことなく、かつ、容認できない結合親和性低下（例えば、約10^{-7}M未満）も伴うことなく、可変領域および定常領域の両方で、不可欠ではないアミノ酸の置換、付加、または欠失を受けることができる。通常、そのような改変を組み込んだ抗体または抗体断片は、それが由来する参照の抗体または抗体断片に対して実質的な配列同一性を呈する。場合によっては、自身が由来する参照の抗体または抗体断片と比較して同じ特異性と増大した親和性とを有する変異抗体または変異抗体断片が選択される場合がある。ファージディスプレイ技術によって、このような抗体を選択するための強力な技術が提供される。例えば、Dowerら、WO 91/17271 McCaffertyら、WO 92/01047；およびHuse、WO 92/06204（参照により本明細書に組み入れられる）を参照のこと。

【００７１】

またHSAリンカーを、標的抗原に対して特異性を有して結合する能力を保持している抗体の1つまたは複数の断片に結合させることができる。抗体断片としては、個別の可変重鎖、可変軽鎖、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fabc、およびscFvが挙げられる。断片は、無傷の免疫グロブリンの酵素的または化学的な分離によって作製することができる。例えば、$F(ab')_2$断片は、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pubs., N. Y. (1988)に記載の方法のような標準的な方法を用いた、pH3.0～3.5でペプシンを用いるタンパク質分解性消化によって、IgG分子から得ることができる。Fab断片は、限定的な還元によって$F(ab')_2$断片から、または、還元剤の存在下でのパパインを用いた消化によって抗体全体から得てもよい。断片はまた、組み換えDNA技術によって作製することもできる。選択した断片をコードする核酸のセグメントを、制限酵素を用いた全長コード配列の消化によって、または新規合成によって、作製する。断片は、ファージ被覆（

phage-coat ）融合タンパク質の形態で発現されることが多い。この発現様式は、抗体の親和性強化（ sharpening ）のために有利である。

【００７２】

ヒト化抗体

またヒト化抗体をHSAリンカーと組み合わせて使用してもよく、ここで、該抗体CDRの1つまたは複数は非ヒト抗体配列由来であり、該CDRの1つまたは複数（ただし好ましくは全て）は、抗原（例えば、タンパク質、糖タンパク質、または他の適切なエピトープ）に特異的に結合する。

【００７３】

ヒト化抗体は、ヒト抗体（アクセプター抗体と称する）に実質的に由来する定常フレームワーク領域、ならびに、場合によっては、ヒト抗体に由来する可変領域の大部分を含む。該CDRの1つまたは複数（全てまたはその一部、ならびに、CDRの1つまたは複数の周囲の目立たないアミノ酸）は、マウス抗体などの非ヒト抗体から提供される。該抗体の定常領域は存在してもしなくてもよい。

【００７４】

1つまたは複数のマウスCDRを置換によりヒト可変ドメインフレームワークに入れることは、該CDRが由来するマウス可変フレームワークと同じまたは類似している高次構造を該ヒト可変領域ドメインフレームワークがとる場合にその正確な空間的配向の保持をもたらす可能性が最も高い。これは、該CDRが由来する該マウス可変フレームワークドメインと高度な配列同一性および構造同一性を呈するフレームワーク配列を有するヒト抗体由来の該ヒト可変ドメインを得ることによって、達成される。重鎖および軽鎖の可変フレームワーク領域は、同じまたは異なるヒト抗体配列に由来することができる。ヒト抗体配列は、天然ヒト抗体の配列であっても、いくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であっても、またはヒト生殖系列可変ドメイン配列であってもよい。例えば、Kettleboroughら、Protein Engineering 4:773(1991) ; Kolbingerら、Protein Engineering 6:971(1993)を参照のこと。

【００７５】

適切なヒト抗体配列は、マウス可変領域のアミノ酸配列と公知のヒト抗体の配列とのアラインメントによって特定される。比較は、重鎖および軽鎖について別々に行うが、その原理はどちらについても同様である。

【００７６】

キメラ抗体およびヒト化抗体ならびに抗体断片を調製する方法は、米国特許第4,816,567号、同第5,530,101号、同第5,622,701号、同第5,800,815号、同第5,874,540号、同第5,914,110号、同第5,928,904号、同第6,210,670号、同第6,677,436号、および同第7,067,313号ならびに米国特許出願第2002/0031508号、同第2004/0265311号、および同第2005/0226876号に記載されている。抗体またはその抗体断片の調製は、例えば米国特許第6,331,415号、同第6,818,216号、および同第7,067,313号にさらに記載されている。

【００７７】

レセプターおよびリガンド

特定のHSAリンカーコンジュゲート内部では、タンパク質または糖タンパク質のレセプターまたはリガンドがHSAリンカーと結合している。レセプターまたはリガンドと結合したHSAリンカーを用いて、例えば、分泌タンパク質、細胞（例えば、癌細胞）、組織、または器官を特異的に標的してもよい。さらにHSAリンカー-レセプターまたは-リガンドコンジュゲートと、同起源の標的レセプターまたはリガンドとの特異的結合によって、細胞内または細胞間のシグナル伝達経路における生物学的な作動/拮抗活性を生じさせることができる。本明細書に記載の他の結合部分と同様に、レセプターおよびリガンドまたはこれらの断片を、HSAリンカーのアミノ末端および/もしくはカルボキシ末端に、HSAリンカーに連結したペプチドコネクターに、またはHSAリンカー内のアミノ酸残基に、結合させることができる。

【００７８】

HSAリンカーに結合され得る例示的なレセプターおよびリガンドとしては、これらに限定されるわけではないが、インスリン様成長因子1レセプター（IGF1R）、IGF2R、インスリン様成長因子（IGF）、間葉上皮移行因子レセプター（c-met；肝細胞成長因子レセプター（HGFR）としても公知）、肝細胞成長因子（HGF）、上皮細胞成長因子レセプター（EGFR）、上皮細胞成長因子（EGF）、ヘレグリン、線維芽細胞成長因子レセプター（FGFR）、血小板由来成長因子レセプター（PDGFR）、血小板由来成長因子（PDGF）、血管内皮成長因子レセプター（VEGFR）、血管内皮成長因子（VEGF）、腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）、腫瘍壊死因子α（TNF-α）、TNF-β、葉酸レセプター（FOLR）、葉酸、トランスフェリンレセプター（TfR）、メソセリン、Fcレセプター、c-kitレセプター、c-kit、α4インテグリン、P-セレクチン、スフィンゴシン-1-リン酸レセプター-1（S1PR）、ヒアルロン酸レセプター、白血球機能抗原-1（LFA-1）、CD4、CD11、CD18、CD20、CD25、CD27、CD52、CD70、CD80、CD85、CD95（Fasレセプター）、CD106（血管細胞付着分子1（VCAM1）、CD166（活性化白血球細胞接着分子（ALCAM））、CD178（Fasリガンド）、CD253（TNF関連アポトーシス誘導性リガンド（TRAIL））、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、CCR5、CXCL12（間質細胞由来因子1（SDF-1））、インターロイキン1（IL-1）、CTLA-4、レセプターαおよびβ、MART-1、gp100、MAGE-1、エフリン（Eph）レセプター、粘膜アドレシン細胞付着分子1（MAdCAM-1）、癌胎児性抗原（CEA）、Lewis^{Y}、MUC-1、上皮細胞接着分子（EpCAM）、癌抗原125（CA125）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、TAG-72抗原、およびその生物学的に活性な断片が挙げられる。

【００７９】

上述の任意の方法を用いて、レセプターおよびリガンドを発現させることができ、単離することができ、またはHSAリンカーに結合させることができる。

【００８０】

診断剤

HSAリンカー、またはそれに結合した任意の結合部分（例えば、抗体、抗体断片、レセプター、またはリガンド）を、キレート剤または検出可能標識に連結して、診断剤をすることができる。また、本明細書に記載のような検出可能標識と、1つまたは複数の本明細書に記載の治療剤または結合部分とを含む、HSAリンカーコンジュゲートも意図される。

【００８１】

HSAリンカー（またはHSAリンカーコンジュゲート）のトレオニン残基の遊離アミノ基と、キレーターの適切な官能基、例えばカルボキシル基または活性化エステルとを反応させることによって、HSAリンカー（またはHSAリンカーコンジュゲート）とキレーター成分を連結することができる。例えばそのような連結は、キレーターであるエチレンジアミン四酢酸（EDTA）（錯体化学の分野では一般的である）を、エチレン鎖上のカルボキシル置換基によって官能基化される際に組み込むことによって、達成され得る。この種のEDTA誘導体の合成はAryaら（Bioconjugate Chemistry 2:323(1991)）において報告されており、剤のペプチド部分のアミノ基と反応させるためのエチレン鎖上のカルボキシル置換基が遊離している一方で、4つの配位するカルボキシル基の各々をt-ブチル基で遮断することが記載されている。

【００８２】

HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、ペプチド性である、すなわち固相ペプチド合成に適合性である、金属キレーター成分を組み込んでもよい。この場合、該キレーターは、上記のEDTAと同じ様式で連結されてもよく、あるいは、より好都合には、該キレーターおよびHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、該HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートのC末端残基から開始して該キレーターのN末端残基で終結するように全体として合成される。

【００８３】

HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートは、該HSAリンカーをキレーターに連結させるようにはたらく一方で、該HSAリンカーの生物学的特性、該HSAリンカーコンジュゲートの結合部分の標的化機能、または該キレーターの金属結合機能にとって有害な影響を

有さない、連結基成分をさらに組み込んでもよい。適切な連結基としては、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートに対する、およびキレーターに対する連結のための反応性基によって官能基化された、アミノ酸鎖およびアルキル鎖が挙げられる。HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを固相技術によって全体として合成できるようにキレーターがペプチド性である場合、好ましい連結基はアミノ酸鎖である。アルキル鎖連結基は、HSAリンカーのペプチド部分のトレオニン残基のアミノ基と、アルキル鎖上の第一の官能基、例えばカルボキシル基または活性化エステルとの反応によって、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートに組み込まれ得る。続いて、該キレーターを該アルキル鎖に付加して、該アルキル鎖上の第二の官能基と該キレーター上の適切な基とを反応させることによって、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートの形成を完了する。アルキル鎖上の第二の官能基は、変異HSAリンカーのトレオニン残基に対して反応性ではないがキレーター上の官能基に対して反応性を有する置換基から選択される。例えば、キレーターがカルボキシル基または活性化エステルなどの官能基を組み込んでいる場合、アルキル鎖連結基の第二の官能基は、アミノ基であってもよい。HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートの形成には、望ましくない産物の形成を回避するために存在する官能基の保護および脱保護を要する場合があることを認識されたい。保護および脱保護は保護基、試薬、および有機合成分野で一般的なプロトコールを用いて達成される。特に上記の固相ペプチド合成で使用される保護および脱保護の技術を用いてもよい。

【００８４】

アルキル鎖に対する代替的な化学連結基はポリエチレングリコール（PEG）であり、これは、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートへの組み込みについて上記されたアルキル鎖と同じ様式で官能基化される。代替的に、連結基をまずキレーターに連結し、次いでHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートに連結してもよいことを、認識されたい。

【００８５】

一局面では、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを、錯体を形成することができる診断上有用な金属に連結する。適切な金属としては、例えば、種々の形態のテクネチウムおよびレニウム（例えば、$^{99m}TcO^{3+}$、$^{99m}TcO_2^{+}$、ReO^{3+}、およびReO_2^{+}）などの放射性核種が挙げられる。HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートへの金属の組み込みは、錯体化学分野で一般的な種々の方法によって達成できる。金属がテクネチウム-99 mである場合、以下の一般的手順を用いて、テクネチウム錯体を形成してもよい。エタノールなどのアルコール水溶液中にHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを溶解することによって、HSAリンカー-キレーターコンジュゲート溶液を最初に形成する。次いで、該溶液を脱気して酸素を除いた後、適切な試薬を用いて、例えば水酸化ナトリウムを用いてチオール保護基を取り除き、次いで、有機酸、例えば酢酸（pH6.0～6.5）で中和する。標識工程では、モリブデン発生源から得た化学量論的に過剰な過テクネチウム酸ナトリウムを、テクネチウムを還元するのに十分な量の還元剤、例えば塩化第一スズとともに該コンジュゲート溶液に添加して、加熱する。標識されたHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを、混入物である$^{99m}TcO_4^{-}$およびコロイド状$^{99m}TcO_2$から、例えばC-18Sep Pakカートリッジを用いるクロマトグラフィーによって分離させてもよい。

【００８６】

別の方法では、HSAリンカーの標識はトランスキレート化（transchelation）反応によって達成できる。テクネチウム供給源とは、選択されたキレーターとのリガンド交換を容易にする不安定性リガンドと複合体化されたテクネチウムの溶液である。トランスキレート化に適したリガンドとしては、酒石酸塩、クエン酸塩、およびヘプタグルコン酸塩が挙げられる。この場合、好ましい還元試薬は亜ジチオン酸ナトリウムである。HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを上記の技術を用いて標識してもよいし、あるいは、キレーター自体を標識した後にHSAリンカーに連結して、HSAリンカー-キレーターコンジュゲートを形成させてもよい（「前標識（prelabeled）リガンド」方法と呼ばれるプロセス）ことを認識されたい。

【００８７】
HSAリンカーまたはそれに結合させた任意の剤を標識するための別のアプローチは、金属キレート化の際に切断される連結を通じて、固相支持体上でHSAリンカー-キレーターコンジュゲートを固定する工程を伴う。これは、錯化原子の一つによってキレーターが支持体の官能基に連結されると、達成される。好ましくは、マレイミドのような硫黄保護基で官能基化された支持体に、錯化硫黄原子を連結する。
【００８８】
診断上有用な金属で標識されている場合、HSAリンカー-キレーターコンジュゲートを含む剤を用いて、癌（例えば、肺癌、乳癌、結腸癌、および前立腺癌）、加齢関連疾患（例えば、心血管系疾患、脳血管疾患、またはアルツハイマー病）、タバコ関連疾患（例えば、肺気腫、大動脈瘤、食道癌、または頭頸部扁平上皮癌）を発症するリスクのある組織を、診断画像化分野で確立された手順によって検出することができる。テクネチウム-99mなどの放射性核種金属で標識されたHSAリンカーを組み込んでいる剤を、等張食塩水などの薬学的に許容される溶液中での静脈注射によって、または本明細書に記載の他の方法によって、哺乳動物（例えば、ヒト）に投与してもよい。急速に除去されるHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを組み込んでいる剤は、それほど急速には除去されないHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを組み込んでいる剤よりも高用量で投与され得るという観点から、標識された剤の、投与に適した量は、選択されるHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートの分布プロフィールに依存する。組織を画像化するために許容可能な単位用量は、体重70kgの個体に対して約5～40mCiの範囲である。標識されたHSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートを組み込んでいる剤のインビボでの分布および局在化は、投与後の適切な時点で、非標的組織でのクリアランス速度に対する標的部位での蓄積速度に応じて典型的には30分後～180分後および最大約5日後まで、本明細書に記載の標準的技術によって追跡することができる。
【００８９】
また、診断上または治療上の使用を容易にするために、HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を修飾または標識することもできる。検出可能標識、例えば、放射性分子、蛍光分子、重金属分子、または他の分子を該剤のいずれに結合させてもよい。剤の一重、二重、または多重の標識が有利である場合がある。例えば、例えば^{90}Yをキレート基を介してアミン含有側鎖または反応性基にさらに連結することと組み合わせた、放射性ヨウ素化による1つまたは複数の残基の二重標識によって、組み合わせ標識が可能になるであろう。これは、広範に分散した小さな新生細胞塊の特定などの、専門的な診断要件に有用であり得る。
【００９０】
また、HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、例えばペプチド成分のチロシン残基のハロゲン化によって修飾することもできる。ハロゲンとしては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、およびアスタチンが挙げられる。例えばハロゲンが、例えば^{18}F、^{75}Br、^{77}Br、^{122}I、^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{129}I、^{131}I、または^{211}Atなどの放射性同位体である場合に、このようなハロゲン化剤は検出可能に標識され得る。ハロゲン化剤は、各剤の分子内の少なくとも一つのアミノ酸に、および好ましくはD-Tyr残基に共有結合したハロゲンを含む。他の適切な検出可能修飾としては、剤またはアナログ、特にリジンを含むリンカーを有する剤またはアナログの、リジン残基に対する他の化合物（例えば、フルオレセインなどの蛍光色素）の結合が挙げられる。
【００９１】
HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を放射性標識するための放射性同位体としては、剤またはそのアナログのペプチド成分の残基に対して共有結合され得る任意の放射性同位体が挙げられる。また放射性同位体を、β線もしくはγ線のいずれかを放射する放射性同位体から選択することもでき、あるいは代替的に、任意の剤を、例えば、HSAリンカーまたはそれに結合された任意のペプチド剤のリジン残基に共有結合できるキレート基を含むように、修飾することもできる。次いでキレート基を、任意の

種々の放射性同位体、例えば、ガリウム、インジウム、テクネチウム、イッテルビウム、レニウム、またはタリウム（例えば、^{125}I、^{67}Ga、^{111}In、^{99m}Tc、^{169}Yb、^{186}Re）を含むように修飾することができる。

【００９２】

HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、放射性同位体の付加によって修飾することができる。好ましい放射性同位体は、用いられるHSAコンジュゲートの生物学的半減期に相当するかまたはそれより長い放射性半減期を有している、放射性同位体である。より好ましくは、該放射性同位体は、ハロゲン原子の放射性同位体（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、およびアスタチンの放射性同位体）であり、さらにより好ましくは^{75}Br、^{77}Br、^{76}Br、^{122}I、^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{129}I、^{131}I、または^{211}Atである。

【００９３】

HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を組み込んでいる剤を、放射性金属に連結して、X線画像解析または放射線療法で用いることができる。同じく好ましい放射性同位体としては、^{99m}Tc、^{51}Cr、^{67}Ga、^{68}Ga、^{111}In、^{168}Yb、^{140}La、^{90}Y、^{88}Y、^{153}Sm、^{156}Ho、^{165}Dy、^{64}Cu、^{97}Ru、^{103}Ru、^{186}Re、^{188}Re、^{203}Pb、^{211}Bi、^{212}Bi、^{213}Bi、および^{214}Biが挙げられる。金属の選択は、所望の治療用途または診断用途に基づいて決定される。

【００９４】

診断剤または治療剤を作製するために、HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、金属成分に連結することができる。検出可能標識は、重元素または希土類イオン由来の金属イオン、例えばGd^{3+}、Fe^{3+}、Mn^{3+}、またはCr^{2+}であり得る。常磁性または超常磁性の金属が結合されたHSAリンカーを組み込んでいる剤が、MRI画像化用途における診断剤として有用である。常磁性金属としては、これらに限定されるわけではないが、クロム（III）、マンガン（II）、鉄（II）、鉄（III）、コバルト（II）、ニッケル（II）、銅（II）、プラセオジム（III）、ネオジム（III）、サマリウム（III）、ガドリニウム（III）、テルビウム（III）、ジスプロシウム（III）、ホルミウム（III）、エルビウム（III）、およびイッテルビウム（III）が挙げられる。

【００９５】

検出可能標識または他の分子を、HSAリンカーまたはそれに結合された剤に間接的に連結するために、キレート基を用いてもよい。キレート基は、剤と放射性標識、例えば、安定な二官能性キレーターとを連結させることもでき、または、1つもしくは複数の末端もしくは内部のアミノ酸反応性基に連結されることもできる。HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、イソチオシアネートβ-Alaを介して、または、エドマン分解を妨げる適切な非α-アミノ酸リンカーを介して連結させることができる。当技術分野で公知のキレーターの例としては、例えば、イニノカルボン（ininocarboxylic）およびポリアミノポリカルボン反応性基、イニノカルボン（ininocarboxylic）およびポリアミノポリカルボン反応性基、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、および1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（DOTA）が挙げられる。

【００９６】

HSAリンカーを組み換え発現させた場合、検出可能ペプチド標識または診断剤に結合させることができる。HSAリンカーとともに検出可能標識として使用可能なペプチドおよびタンパク質としては、これらに限定されるわけではないが、蛍光タンパク質、生物発光タンパク質、およびエピトープタグが挙げられ、その各々が以下で詳述される。また、これらの検出可能標識の1つまたは複数を、同じく治療剤、細胞毒性剤、または細胞増殖抑制剤も含む、HSAリンカーコンジュゲートに組み込むことができる。

【００９７】

蛍光タンパク質または蛍光色素、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP；SEQ ID NO: 47）、高感度GFP（eGFP）、黄色蛍光タンパク質（SEQ ID NO: 48；YFP）、シアン蛍光性タンパク質（SEQ ID NO: 49；CFP）、および赤色蛍光性タンパク質（SEQ ID NO: 50；RFPまた

はDsRed）を、HSAリンカーに結合される検出可能標識として使用することができる。蛍光タンパク質は、該蛍光タンパク質のヌクレオチド配列をコードする発現ベクターを細胞（例えば、リンパ球などの血液細胞）にトランスフェクションまたは形質導入した後に、該細胞中で組み換え発現させることができる。蛍光タンパク質を刺激周波数の光に曝露すると、該蛍光タンパク質は、顕微鏡下の肉眼でまたは光学画像化デバイスで観察できる低、中、または高強度の光を放射する。剤における診断用配列として用いるのに適した例示的な蛍光タンパク質は、例えば、その各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第7,417,131号および同第7,413,874号に記載されている。

【００９８】

生物発光タンパク質もまた、HSAリンカーに組み込まれる検出可能標識として使用可能である。生物発光タンパク質、例えば、ルシフェラーゼ（例えば、ホタル（SEQ ID NO: 51）、ウミシイタケ（Renilla）（SEQ ID NO: 52）、およびキノコ（Omphalotus）のルシフェラーゼ）およびエクオリンは、基質（例えば、ルシフェリンおよびセレンテラジン）との化学反応の一部として発光する。一態様では、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするベクターにより、本明細書に記載のものなどの標準的な方法に従って形質導入またはトランスフェクトされている細胞（例えば、リンパ球などの血液細胞）のインビボ、インビトロ、またはエクスビボにおける検出が提供される。診断用配列としての使用に適した例示的な生物発光タンパク質およびそれらの使用に関する方法は、例えば、その各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,292,658号、同第5,670,356号、同第6,171,809号、および同第7,183,092に記載される。

【００９９】

エピトープタグは短いアミノ酸配列、例えば、5~20アミノ酸残基長であり、これを、一旦細胞中で発現されるか、細胞から分泌されるか、または標的細胞に結合されたら検出を容易にするための検出可能標識として、HSAリンカーコンジュゲートに組み込むことができる。診断用配列としてエピトープタグを組み込んでいる剤は、該エピトープタグに特異的な抗体、抗体断片、または他の結合分子とのその相互作用のおかげで、検出可能である。エピトープタグをコードするヌクレオチド配列は、天然遺伝子の適切な部分をクローニングすることによって、または該エピトープタグをコードするポリヌクレオチドを合成することによって、作製される。エピトープタグに結合する抗体、抗体断片、または他の結合分子は、検出可能標識（例えば、蛍光色素、放射性標識、重金属、または酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）を直接組み込んでもよいし、または、このような標識を組み込んでいる二次抗体、抗体断片、もしくは他の結合分子の標的としてそれ自体が機能してもよい。診断用配列として使用することができる例示的なエピトープタグとしては、c-myc（SEQ ID NO: 33）、赤血球凝集素（HA；SEQ ID NO: 34）、およびヒスチジンタグ（His_6；SEQ ID NO: 35）が挙げられる。さらに、蛍光タンパク質（例えば、GFP）および生物発光タンパク質も、エピトープタグとして、抗体、抗体断片として機能でき、かつ、これらのタンパク質の検出用に他の結合分子が市販されている。

【０１００】

診断用配列（例えば、蛍光タンパク質、生物発光タンパク質、またはエピトープタグ）を組み込んでいるHSAリンカーコンジュゲート、またはそれを発現しているかそれに結合した任意の細胞のインビボ、インビトロ、またはエクスビボでの検出、画像化、または追跡は、顕微鏡、フローサイトメーター、ルミノメーター、または他の最先端の光学画像化デバイス、例えば、IVIS（登録商標）Imaging System(Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA）を用いて達成することができる。

【０１０１】

HSAリンカーに連結される治療剤または細胞毒性剤

HSAリンカー、またはそれに結合した任意の分子もしくは部分を任意の公知の細胞毒性部分または治療部分に連結して、疾患（例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管系の疾患）または疾患の1つまたは複数の症状を治療、阻害、軽減、または緩和するために投与可能な剤（HSAリンカーコンジュゲート）を形成させることができる。例としては、これ

らに限定されるわけではないが、抗腫瘍剤、例えば：アシビシン；アクラルビシン；塩酸アコダゾール；アクロニン；アドゼレシン；アドリアマイシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン（ambomycin）；酢酸アメタントロン；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アスペルリン（asperlin）；アザシチジン；アゼテパ（azetepa）；アゾトマイシン（azotomycin）；バチマスタット；ベンゾデパ；ビカルタミド；塩酸ビサントレン；ビスナフィドジメシレート（bisnafide dimesylate）；ビゼレシン；硫酸ブレオマイシン；ブレキナルナトリウム；ブロピリミン；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カンプトテシン；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルムスチン；塩酸カルビシン；カルゼレシン；セデフィンゴール；クロラムブシル；シロレマイシン；シスプラチン；クラドリビン；コンブレテスタチンa-4；クリスナトールメシレート；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダカ（n-［2-（ジメチル-アミノ）エチル］アクリジン-4-カルボキサミド）；ダクチノマイシン；塩酸ダウノルビシン；ダウノマイシン；デシタビン；デキソルマプラチン；デザグアニン；デザグアニンメシレート；ジアジクオン（diaziquone）；ドセタキセル；ドラサチン；ドキソルビシン；塩酸ドキソルビシン；ドロロキシフェン；クエン酸ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン；エダトレキサート；塩酸エフロールニチン；エリプチシン；エルサミトルシン；エンロプラチン；エンプロマート；エピプロピジン；塩酸エピルビシン；エルブロゾール；塩酸エソルビシン；エストラムスチン；リン酸エストラムスチンナトリウム；エタニダゾール；ヨード化ケシ油エチルエステルi131；エトポシド；リン酸エトポシド；エトプリン；塩酸ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フロクスウリジン；リン酸フルダラビン；フルオロウラシル；5-fdump；フルオロシタビン；ホスキドン；ホストリエシンナトリウム；ゲムシタビン；塩酸ゲムシタビン；金au198；ホモカンプトテシン；ヒドロキシ尿素；塩酸イダルビシン；イホスファミド；イルモホシン；インターフェロンα-2a；インターフェロンα-2b；インターフェロンα-n1；インターフェロンα-n3；インターフェロンβ-ia；インターフェロンγ-ib；イプロプラチン；塩酸イリノテカン；ランレオチド酢酸；レトロゾール；酢酸リュープロリド；塩酸リアロゾール；ロメトレキソールナトリウム；ロムスチン；塩酸ロソキサントロン；マソプロコール；メイタンシン；塩酸メクロレタミン；酢酸メゲストロール；メレンゲストロール酢酸；メルファラン；メノガリル；メルカプトプリン；メトトレキサート；メトトレキサートナトリウム；メトプリン；メツレデパ；ミチンドミド；ミトカルシン（mitocarcin）；ミトクロミン；ミトジリン（mitogillin）；ミトマルシン（mitomalcin）；マイトマイシン；ミトスペル（mitosper）；ミトタン；塩酸ミトキサントロン；ミコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマプラチン；オキシスラン；パクリタキセル；ペガスパルガーゼ；ペリオマイシン（peliomycin）；ペンタムスチン；硫酸ペプロイシン；ペルホスファミド；ピポブロマン；ピポスルファン；塩酸ピロキサントロン；プリカマイシン；プロメスタン；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；プレドニムスチン；塩酸プロカルバジン；ピューロマイシン；塩酸ピューロマイシン；ピラゾフリン；リゾキシン；リゾキシンd；リボプリン；ログレチミド；サフィンゴール；塩酸サフィンゴール；セムスチン；シムトラゼン；スパルホサートナトリウム；スパルソマイシン；塩酸スピロゲルマニウム；スピロムスチン；スピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプトゾシン；塩化ストロンチウムsr89；スロフェヌル；タリソマイシン；タキサン；タキソイド；テコガラン（tecogalan）ナトリウム；テガフール；塩酸テロキサントロン；テモポルフィン；テニポシド；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテパ；チミタック（thymitaq）；チアゾフリン；チラパザミン；トムデックス；top53；塩酸トポテカン；クエン酸トレミフェン；酢酸トレストロン；リン酸トリシリビン；トリメトレキサート；グルクロン酸トリメトレキサート；トリプトレリン；塩酸ツブロゾール；ウラシルマスタード；ウレデパ；バプレオチド；ベルテポルフィン；ビンブラスチン；硫酸ビンブラスチン；ビンクリスチン；硫酸ビンクリスチン；ビンデシン；硫酸ビンデシン；硫酸ビネピジン；硫酸ビングリシナート；硫酸ビンロイロシン；酒石酸ビノレルビン；硫酸ビンロシジン（vinrosidine

）；硫酸ビンゾリジン；ボロゾール；ゼニプラチン；ジノスタチン；塩酸ゾルビシン；2-クロロデオキシアデノシン；2'-デオキシホルマイシン；9-アミノカンプトテシン；ラルチトレキセド；N-プロパルギル-5,8-ジデアザ葉酸；2-クロロ-2'-アラビノ-フルオロ-2'-デオキシアデノシン；2-クロロ-2'-デオキシアデノシン；アニソマイシン；トリコスタチンA；hPRL-G129R；CEP-751；リノミド（linomide）；硫黄マスタード；ナイトロジェンマスタード（メクロレタミン）；シクロホスファミド；メルファラン；クロラムブシル；イホスファミド；ブスルファン；N-メチル-N-ニトロソ尿素（MNU）；N,N'-ビス（2-クロロエチル）-N-ニトロソ尿素（BCNU）；N-（2-クロロエチル）-N'-シクロヘキシル-N-ニトロソ尿素（CCNU）；N-（2-クロロエチル）-N'-（トランス-4-メチルシクロヘキシル-N-ニトロソ尿素（MeCCNU）；N-（2-クロロエチル）-N'-（ジエチル）エチルホスホン酸-N-ニトロソ尿素（フォテムスチン）；ストレプトゾトシン；ジアカルバジン（DTIC）；ミトゾロミド；テモゾロミド；チオテパ；マイトマイシンC；AZQ；アドゼレシン；シスプラチン；カルボプラチン；オルマプラチン；オキサリプラチン；C1-973；DWA2114R；JM216；JM335；ビス（白金）；トムデックス；アザシチジン；シタラビン；ゲムシタビン；6-メルカプトプリン；6-チオグアニン；ヒポキサンチン；テニポシド9-アミノカンプトテシン；トポテカン；CPT-11；ドキソルビシン；ダウノマイシン；エピルビシン；ダルビシン；ミトキサントロン；ロソキサントロン；ダクチノマイシン（アクチノマイシンD）；アムサクリン；ピラゾロアクリジン；オールトランスレチノール；14-ヒドロキシ-レトロ-レチノール；オールトランスレチノイン酸；N-（4-ヒドロキシフェニル）レチナミド；13-シス-レチノイン酸；3-メチルTTNEB；9-シス-レチノイン酸；フルダラビン（2-F-アラ-AMP）；または2-クロロデオキシアデノシン（2-Cda）が挙げられる。

【０１０２】

他の治療用化合物としては、これらに限定されるわけではないが、20-ピ-1,25ジヒドロキシビタミンD3；5-エチニルウラシル；アビラテロン；アクラルビシン；アシルフルベン；アデシペノール；アドゼレシン；アルデスロイキン；ALL-TKアンタゴニスト；アルトレタミン；アンバムスチン；アミドックス；アミホスチン；アミノレブリン酸；アムルビシン；アムサクリン；アナグレリド；アナストロゾール；アンドログラホリド；脈管形成インヒビター；アンタゴニストD；アンタゴニストG；アンタレリックス；抗背側化形態形成タンパク-1（anti-dorsalizing morphogenetic protein-1）；抗アンドロゲン、前立腺癌；抗エストロゲン；抗新生物薬；アンチセンスオリゴヌクレオチド；アフィジコリングリシネート；アポトーシス遺伝子モジュレーター；アポトーシス調節因子；アプリン酸；アラ-CDP-DL-PTBA；アルギニンデアミナーゼ；アシュラクリン；アタメスタン；アトリムスチン；アクシナスタチン1；アクシナスタチン2；アクシナスタチン3；アザセトロン；アザトキシン；アザチロシン；バッカチンIII誘導体；バラノール；バチマスタット；BCR/ABLアンタゴニスト；ベンゾクロリン；ベンゾイルスタウロスポリン；β ラクタム誘導体；β -アレチン；ベタクラマイシンB；ベツリン酸；bFGFインヒビター；ビカルタミド；ビサントレン；ビサジリジニルスペルミン；ビスナフィド；ビストラテンA；ビゼレシン；ブレフレート；ブレオマイシンA2；ブレオマイシンB2；ブロピリミン；ブドチタン；ブチオニンスルホキシイミン；カルシポトリオール；カルホスチンC；カンプトテシン誘導体（例えば、10-ヒドロキシ-カンプトテシン）；カナリポクスIL-2；カペシタビン；カルボキサミド-アミノ-トリアゾール；カルボキサミドトリアゾール；CaRest M3；CARN 700；軟骨由来インヒビター；カルゼレシン；カゼインキナーゼインヒビター（ICOS）；カスタノスペルミン；セクロピンB；セトロレリックス；クロリン（chlorins）；クロロキノキサリンスルホンアミド；シカプロスト；シス-ポルフィリン；クラドリビン；クロミフェンアナログ；クロトリマゾール；コリスマイシンA；コリスマイシンB；コンブレタスタチンA4；コンブレタスタチンアナログ；コナゲニン；クラムベスシジン816（crambescidin 816）；クリスナトール；クリプトフィシン8；クリプトフィシンA誘導体；クラシンA；シクロペンタントラキノン；シクロプラタム；シペマイシン；シタラビンオクホスファート；細胞溶解因子；サイトスタチン；ダクリキシマブ；デシタビン；デヒドロジデムニンB；2'デオキシコホルマイシン（DCF）；デスロレリン；デキシホスファミド；デキシラゾキサ

ン；デキシベラパミル；ジアジクオン；ジデムニンB；ジドックス；ジエチルノルスペルミン；ジヒドロ-5-アザシチジン；ジヒドロタキソール，9-；ジオキサマイシン；ジフェニルスピロムスチン；ジスコデルモリド；ドコサノール；ドラセトロン；ドキシフルリジン；ドロロキシフェン；ドロナビノール；デュオカルマイシンSA；エブセレン；エコムスチン；エデルホシン；エドレコロマブ；エフロルニチン；エレメン；エミテフール；エピルビシン；エポチロン（A、R＝H；B、R＝Me）；エピチロン；エプリステリド；エストラムスチンアナログ；エストロゲンアンタゴニスト；エストロゲンアンタゴニスト；エタニダゾール；エトポシド；エトポシド4'-ホスフェート（エトポホス（etopofos））；エキセメスタン；ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フィルグラスチム；フィナステリド；フラボピリドール；フレゼラスチン；フルアステロン；フルダラビン；塩酸フルオロダウノルニシン；ホルフェニメックス；ホルメスタン；ホストリエシン；フォテムスチン；ガドリニウムテキサフィリン；硝酸ガリウム；ガロシタビン；ガニレリックス；ゼラチナーゼインヒビター；ゲムシタビン；グルタチオンインヒビター；ヘプスルファム；ヘレグリン；ヘキサメチレンビスアセトアミド；ホモハリントニン（HHT）；ヒペリシン；イバンドロン酸；イダルビシン；イドキシフェン；イドラマノトン；イルモホシン；イロマスタット；イミダゾアクリドン；イミキモド；免疫刺激ペプチド；インスリン様成長因子-1レセプターインヒビター；インターフェロンアゴニスト；インターフェロン；インターロイキン；イオベングアン；ヨードドキソルビシン；イポメアノール，4-；イリノテカン；イロプラクト；イルソグラジン；イソベンガゾール；イソホモハリコンドリンB；イタセトロン；ジャスプラキノリド；カハラリドF；三酢酸ラメラリン-N；ラノレオチド；レイナマイシン；レノグラスチム；硫酸レンチナン；レプトールスタチン；レトロゾール；白血病抑制因子；白血球αインターフェロン；ロイプロリド＋エストロゲン＋プロゲステロン；ロイプロレリン；レバミソール；リアロゾール；線状ポリアミンアナログ；親油性二糖類ペプチド；親油性白金化合物；リソクリナミド7；ロバプラチン；ロムブリシン；ロメトレキソール；ロニダミン；ロソキサントロン；ロバスタチン；ロキソルビシン；ルートテカン（lurtotecan）；ルテチウムテキサフィリン；リゾフィリン；溶菌ペプチド；メイタンシン；マンノスタチンA；マリマスタット；マソプロコール；マスピン；マトリリシンインヒビター；マトリックスメタロプロテアーゼインヒビター；メノガリル；メルバロン；メテレリン；メチオニナーゼ；メトクロプラミド；MIFインヒビター；イフェプリストン；ミルテホシン；ミリモスチム；ミスマッチ二本鎖RNA；ミトラシン；ミトグアゾン；ミトラクトール；マイトマイシンアナログ；ミトナフィド；ミトトキシン線維芽細胞成長因子サポリン；ミトキサントロン；モファロテン；モルグラモスチム；モノクローナル抗体；ヒト絨毛性ゴナドトロピン；モノホスホリルリピドA＋ミオバクテリア細胞壁sk；モピダモール；多剤耐性遺伝子インヒビター；多発性腫瘍抑制因子-1ベースの療法；マスタード抗癌剤；ミカペルオキシドB；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ミリアポロン；N-アセチルジナリン；N-置換ベンズアミド；ナファレリン；ナグレスチップ；ナロキソン＋ペンタゾシン；ナパビン；ナフテルピン；ナルトグラスチム；ネダプラチン；ネモルビシン；ネリドロン酸；中性エンドペプチダーゼ；ニルタミド；ニサマイシン；酸化窒素モジュレーター；ニトロキシド抗酸化物質；ニトルリン；06-ベンジルグアニン；オクトレオチド；オキセノン；オリゴヌクレオチド；オナプリストン；オンダンセトロン；オンダンセトロン；オラシン；経口サイトカイン誘導物質；オルマプラチン；オサテロン；オキサリプラチン；オキサウノマイシン；パクリタキセルアナログ；パクリタキセル誘導体；パラウアミン（palauamine）；パルミトイルリゾキシン；パミドロン酸；パナキシトリオール；パノミフェン；パラバクチン；パゼルリプチン；ペガスパルガーゼ；ペルデシン；ペントサン多硫酸ナトリウム；ペントスタチン；ペントロゾール；ペルフルブロン；ペルホスファミド；ペリリルアルコール；フェナジノマイシン；フェニルアセテート；ホスファターゼインヒビター；ピシバニル；塩酸ピロカルピン；ピラルビシン；ピリトレキシム；プラセチンA；プラセチンB；プラスミノーゲン・アクチベータ・インヒビター；白金錯体；白金化合物；白金-トリアミン複合体；ポドフィロトキシン；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；プロピルビス-アクリドン；プロスタグランジンJ2；

プロテアソームインヒビター；プロテインAベースの免疫調節物質；プロテインキナーゼCインヒビター；プロテインキナーゼCインヒビター、微小藻類（microalgal）；プロテインチロシンホスファターゼインヒビター；プリンヌクレオシドホスホリラーゼインヒビター；プルプリン；ピラゾロアクリジン；ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレンコンジュゲート；rafアンタゴニスト；ラルチトレキセド（raltitrexed）；ラモステロン；rasファルネシルプロテイントランスフェラーゼインヒビター；rasインヒビター；ras-GAPインヒビター；ジメチル化レテルリプチン；エチドロン酸レニウムRe 186；リゾキシン；リボザイム；RIIレチナミド；ログレチミド；ロヒツカイン（rohitukine）；ロムルチド；ロキニメックス；ルビジノンB1；ルボキシル；サフィンゴール；サントピン；SarCNU；サルコフィトールA；サルグラモスチム；Sdi 1模倣物；セムスチン；老化誘導インヒビター1（senescence derived inhibitor 1）；センスオリゴヌクレオチド；シグナル伝達インヒビター；シグナル伝達モジュレーター；単鎖抗原結合タンパク質；シゾフィラン；ソブゾキサン；ナトリウムボロカプテート；フェニル酢酸ナトリウム；ソルベロール；ソマトメジン結合蛋白；ソネルミン；スパルホス酸（sparfosic acid）；スピカマイシンD；スピロムスチン；スプレノペンチン；スポンジスタチン1；スクアラミン；幹細胞インヒビター；幹細胞分裂インヒビター；スチピアミド、ストロメリシンインヒビター；スルフィノシン；過活性血管作用性小腸ペプチドアンタゴニスト；スラジスタ；スラミン；スワインソニン；合成グリコサミノグリカン；タリムスチン；タモキシフェンメチオダイド；タウロムスチン；タザロテン；テコガランナトリウム；テガフール；テルルラピリリウム；テロメラーゼインヒビター；テモポルフィン；テモゾロミド；テニポシド；テトラクロロデカオキシド；テトラゾミン；サリブラスチン；サリドマイド；チオコラリン；トロンボポエチン；トロンボポエチン模倣物；チマルファシン；サイモポイエチンレセプターアゴニスト；サイモトリナン；甲状腺刺激ホルモン；スズ・エチル・エチオプルプリン；チラパザミン；チタノセンジクロライド；トポテカン；トプセンチン；トレミフェン；全能性幹細胞因子；翻訳インヒビター；トレチノイン；トリアセチルウリジン；トリシリビン；トリメトレキセート；トリプトレリン；トロピセトロン；ツロステリド；チロシンキナーゼインヒビター；チルホスチン；UBCインヒビター；ウベニメックス；尿生殖洞由来成長阻害因子；ウロキナーゼレセプターアンタゴニスト；バプレオチド；バリオリンB；ベクター系、赤血球遺伝子療法；ベラレゾール；ベラミン；ベルジン；ベルテポルフィン；ビノレルビン；ビンキサルチン；ビタキシン；ボロゾール；ザノテロン；ゼニプラチン；ジラスコルブおよびジノスタチンスチマラマーが挙げられる。

【０１０３】

HSAリンカーコンジュゲートはまた、部位特異的に結合した分子および部分を含むこともできる。部位特異的結合によって、例えば抗チューブリン剤、DNAマイナーグルーブバインダー、DNA複製インヒビター、アルキル化剤、アントラサイクリン、抗生物質、葉酸代謝拮抗剤、代謝拮抗剤、化学療法増感剤または放射線増感剤、デュオカルマイシン、エトポシド、フッ化ピリミジン、イオノフォア、レキシトロプシン、ニトロソ尿素、プラチノール、プリン代謝拮抗剤、ピューロマイシン、ステロイド、タキサン、トポイソメラーゼインヒビター、およびビンカアルカロイド、または本明細書に記載の任意の他の分子もしくは部分を含む、細胞毒性剤、免疫調節剤、または細胞増殖抑制剤のHSAリンカー中の特定残基に対する、制御された化学量論的付着が可能になる。

【０１０４】

治療剤をタンパク質、特に抗体に結合させるための技術は周知である（例えば、Arnon et al., “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy,” in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld et al., eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., “Antibodies For Drug Delivery,” in Controlled Drug Delivery (Robinson et al., eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,” in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera et al., eds., 1985); “Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Us

e of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin et al., eds., Academic Press, 1985); Thorpe et al., Immunol. Rev. 62:119-58 (1982); およびDoronina et al., " Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy," Nature Biotech. 21:(7)778-784 (2003))。同じく、例えば国際公開公報WO 89/12624も参照されたい。

【０１０５】

HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、溶解性ペプチドに連結することもできる。そのような溶解性ペプチドは細胞死を誘導し、これらに限定されるわけではないが、ストレプトリシンO; イソギンチャク（stoichactis）毒素；ファロリシン；ブドウ球菌（staphylococcus）のα毒素；ホロスリンA; ジギトニン；メリチン；リゾレシチン；カルジオトキシン；およびヒモムシ（cerebratulus）のA毒素（Kemら、J. Biol. Chem 253（16）:5752~5757, 1978）を含む。HSAリンカー、またはそれに結合した任意の分子もしくは部分（例えば、抗体または抗体断片のコンジュゲート）を、任意の天然ペプチドリシンの配列相同性または化学的特徴の一部と共通している合成ペプチドに連結してもよい；このような特徴としては、これらに限定されるわけではないが、直線性、正電荷、両親媒性、および疎水性環境におけるαヘリックス構造の形成が挙げられる（Leuschnerら、Biology of Reproduction 73:860-865, 2005）。また、HSAリンカー、またはそれに結合した任意の分子もしくは部分を、補体媒介性細胞溶解を誘発する剤、例えば免疫グロブリンF_cサブユニットなどに連結することもできる。また、HSAリンカー、またはそれに結合した任意の分子もしくは部分を、酵素のホスホリパーゼファミリーの任意のメンバー（ホスホリパーゼA、ホスホリパーゼB、ホスホリパーゼC、またはホスホリパーゼDを含む）に、またはその触媒活性サブユニットに連結することもできる。

【０１０６】

また、HSAリンカー、またはそれに結合した任意の分子もしくは部分を、検出用途または治療用途のために用いられ得る剤を形成するように放射性剤に連結することもできる。用いられ得る放射性剤としては、これらに限定されるわけではないが、フィブリノーゲン^{125}I；フルデオキシグルコース^{18}F；フルオロドーパ^{18}F；インスリン^{125}I；インスリン^{131}I；ロベングアン^{123}I；ヨージパミドナトリウム^{131}I；ヨードアンチピリン^{131}I；ヨードコレステロール^{131}I；ヨード馬尿酸ナトリウム^{123}I；ヨード馬尿酸ナトリウム^{125}I；ヨード馬尿酸ナトリウム^{131}I；ヨードピラセト^{125}I；ヨードピラセト^{131}I；ロフェタミン塩酸塩^{123}I；イオメシン^{125}I；イオメシン^{131}I；ヨータラム酸ナトリウム^{125}I；ヨータラム酸ナトリウム^{131}I；チロシン^{131}I；リオチロニン^{125}I；リオチロニン^{131}I；メリソプロールアセテート^{197}Hg；メリソプロールアセテート^{203}Hg；メリソプロール^{197}Hg；セレノメチオニン^{75}Se；テクネチウム^{99m}Tc三硫化アンチモンコロイド；テクネチウム^{99m}Tcビシセート；テクネチウム^{99m}Tcジソフェニン；テクネチウム^{99m}Tcエチドロネート；テクネチウム^{99m}Tcイクサメタジム；テクネチウム^{99m}Tcフリフォスミン；テクネチウム^{99m}Tcグルセプテート；テクネチウム^{99m}Tcリドフェニン；テクネチウム^{99m}Tcメブロフェニン；テクネチウム^{99m}Tcメドロネート；テクネチウム^{99m}Tcメドロネート二ナトリウム；テクネチウム^{99m}Tcメルチアチド；テクネチウム^{99m}Tcオキシドロネート；テクネチウム^{99m}Tcペンテテート；テクネチウム^{99m}Tcペンテテートカルシウム三ナトリウム；テクネチウム^{99m}Tcセスタミビ；テクネチウム^{99m}Tcシボロキシム；テクネチウム^{99m}Tcスクシマー；テクネチウム^{99m}Tcイオウコロイド；テクネチウム^{99m}Tcテボロキシム；テクネチウム^{99m}Tcテトロフォスミン；テクネチウム^{99m}Tcチアチド；チロキシン^{125}I；チロキシン^{131}I；トルポビドン^{131}I；トリオレイン^{125}I；またはトリオレイン^{131}Iが挙げられる。

【０１０７】

さらに、放射性同位体を、HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートに対して部位特異的に結合させることができる。利用可能な反応性基を用いて、^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I、^{99m}Tc、^{111}In、^{64}Cu、^{67}Cu、^{186}Re、^{188}Re、^{177}Lu、^{90}Y、^{77}As、^{72}As、^{86}Y、^{89}Zr、^{211}At、^{212}Bi、^{213}Bi、または^{225}Acを含む放射性同位体の標識のために部位特異的二官能

性キレート剤を結合させてもよい。

【０１０８】

HSAリンカーまたはHSAリンカーコンジュゲートに組み込まれるかまたは連結される治療剤または細胞毒性剤はさらに、例えば、抗癌補助的増強剤を含んでもよく、これには、これらに限定されるわけではないが以下が挙げられる：三環系抗うつ薬（例えば、イミプラミン、デシプラミン、アミトリプチリン、クロミプラミン、トリミプラミン、ドキセピン、ノルトリプチリン、プロトリプチリン、アモキサピンおよびマプロチリン）；非環系抗うつ剤（例えば、セルトラリン、トラゾドンおよびシタロプラム）；Ca^{2+} アンタゴニスト（例えば、ベラパミル、ニフェジピン、ニトレンジピンおよびカロベリン）、カルモジュリンインヒビター（例えば、プレニルアミン、トリフルオロペラジン、およびクロミプラミン）；アンホテリシンB；トリパラノールアナログ（例えば、タモキシフェン）；抗不整脈薬（例えば、キニジン）；抗高血圧薬（例えば、レセルピン）；チオール枯渇剤（例えば、ブチオニンおよびスルホキシミン）ならびに多剤耐性低減剤、例えばクレマホル（Cremaphor）EL。

【０１０９】

また、HSAリンカーまたはそれに結合した任意の分子もしくは部分を含む剤を、1つまたは複数のサイトカイン（例えば、顆粒球コロニー刺激因子、インターフェロン-α、および腫瘍壊死因子-α）と連結することができ、または一緒に投与することができる。また、HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、代謝拮抗剤に連結することもできる。代謝拮抗剤としては以下の化合物およびこれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されるわけではない：アザチオプリン、クラドリビン、シタラビン、ダカルバジン、リン酸フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビンクロルハイドレート（gencitabine chlorhydrate）、メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトブロニトール、ミトタン、プログアニルクロルハイドレート、ピリメタミン、ラルチトレキセド、トリメトレキセートグルクロネート、ウレタン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンクリスチンなど。より好ましくは、HSAリンカーまたはコンジュゲートを、葉酸タイプの代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート、プログアニルクロルハイドレート、ピリメタニン、トリメトプリン、またはトリメトレキセートグルクロネートを含む、ある種の薬剤、またはこれらの化合物の誘導体と連結することができる。

【０１１０】

また、HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、アクラルビシンクロルハイドレート、ダウノルビシンクロルハイドレート、ドキソルビシンクロルハイドレート、エピルビシンクロルハイドレート、イダルビシンクロルハイドレート、ピラルビシン、またはゾルビシンクロルハイドレートを非限定的に含む、アントラサイクリンファミリーメンバーの腫瘍剤；カンプトテシン、またはその誘導体もしくは関連化合物、例えば、10,11メチレンジオキシカンプトテシン；あるいは、種々の構造的に関連する化合物を含むメイタンシノイドファミリーメンバーの化合物、例えば、アンサミトシンP3、メイタンシン、2'-N-デメチルメイタンブチン、およびメイタンビシクリノールに連結することもできる。

【０１１１】

HSAリンカー、またはそれに結合された任意の分子もしくは部分を、公知の化学的方法を用いて細胞毒性剤もしくは治療剤に直接的に連結することもでき、または間接的な結合を介して細胞毒性剤もしくは治療剤に間接的に連結することもできる。例えば、HSAリンカーを、細胞毒性剤または治療剤と結合しているキレート基に結合させることができる。キレート基としては、これらに限定されるわけではないが、イニノカルボキシ（ininocarboxylic）反応性基およびポリアミノポリカルボキシ反応性基である、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、および1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（DOTA）が挙げられる。一般的な方法に関しては、例えば、Liu et al., Bioconjugate Chem 12(4):653, 2001；Cheng et al., WO 89/12631；Kieffer et al., WO 93/12112；Albert et al., U.S.P.N. 5,753,627；およびWO 91/01144（それぞれが本明細書において参照に

より組み入れられる）を参照されたい。

【０１１２】

例えばHSAリンカー、（本明細書で定義した介在性ペプチドコネクターを伴うまたは伴わない）1つまたは複数の結合部分、および治療剤または細胞毒性剤を含む、HSAリンカーコンジュゲートを、該結合部分（例えば抗体、抗体断片、またはレセプター/リガンド）によって、細胞または組織に対して特異的に標的とすることができ、それによって、該結合部分が指向される該標的細胞または組織の選択的な破壊が可能になる。例えば、HSAリンカーコンジュゲートが肺、乳房、前立腺、および結腸の癌細胞に特異的に結合する結合部分を含む場合、これらの器官に由来する癌を予防、安定化、その進行を阻害、または治療するために、該HSAリンカーコンジュゲートを用いてこれらの器官における該癌細胞を標的としかつ破壊することができる。また、例えば自己免疫疾患の場合には、（例えば、自己反応性T細胞上に存在する腫瘍壊死因子レセプター2（TNFR2）に結合させかつ拮抗させることによって）自己反応性T細胞を標的とすることによって、脈管構造、脳、肝臓、腎臓、心臓、肺、前立腺、結腸、上咽頭、中咽頭、喉頭、気管支、および皮膚に関連する、加齢関連疾患もしくは状態、タバコ関連疾患もしくは状態、または自己免疫疾患もしくは状態を、予防、安定化、その進行を阻害、または治療するために、例えば、HSAリンカーコンジュゲートを用いて、これらの器官の細胞を標的としかつ破壊することができる。

【０１１３】

HSAリンカーを組み換え的に発現させる場合、細胞毒性ポリペプチドに結合させることができる。細胞毒性ポリペプチドは、標的細胞（例えば、癌細胞）と接触させると、該細胞に対して細胞毒性効果または細胞増殖抑制効果を発揮する。例えば、細胞毒性ポリペプチドは、HSAリンカーと連結された場合、標的細胞の結合の際に標的細胞中で、細胞死をもたらすイベント、例えばアポトーシス、壊死、または老化を誘発できる。あるいは、HSAリンカーと結合させた細胞毒性ポリペプチドは、正常な生物学的細胞活性、例えば、分裂、代謝、および増殖、または異常な生物学的細胞活性、例えば、転移を妨害または阻害できる。

【０１１４】

例えば、カスパーゼ3に結合させたHSAリンカーは、標的細胞（例えば、癌細胞）に結合して、エンドサイトーシスを受けると考えられる。標的細胞によって一旦内部移行されれば、HSAリンカーコンジュゲートのカスパーゼ部分がアポトーシス促進性のカスパーゼカスケードを開始することができ、最終的には該標的細胞のアポトーシスが起こる。

【０１１５】

好ましい態様では、HSAリンカーコンジュゲートは、癌細胞を殺傷できる細胞毒性ポリペプチドを含む。別の態様では、細胞毒性ポリペプチドは、癌細胞の増殖または転移を阻害する。また、HSAリンカーに結合した細胞毒性ポリペプチドを用いて、固形腫瘍を還流する血管を形成する内皮細胞などの、癌増殖に関連するか、必須であるか、または有益である細胞を殺傷することまたはその増殖を阻害することもできる。

【０１１６】

一態様では、HSAリンカーコンジュゲートには、標的細胞（例えば、癌細胞）に対する細胞毒性効果または細胞増殖抑制効果の特異性、強度、または持続期間を調節する（例えば、延長させる）ように2つ以上の細胞毒性ポリペプチドを含めることができる。

【０１１７】

別の態様では、HSAリンカーを、活性化可能型の細胞毒性ポリペプチド（例えば、酵素または薬物による切断の際に活性化が可能である、生物学的に不活性なプロ薬剤）に結合させる。この態様では、該細胞毒性ポリペプチドを切断できる酵素または薬物に対して該細胞毒性ポリペプチドプロ薬剤を（例えば、インビボにおいて）曝露することにより、該細胞毒性ポリペプチドを生物学的に活性（例えば、細胞毒性または細胞増殖抑制性）にする。HSAリンカーとの使用のために生物学的活性型へと変換することが可能な生物学的に不活性な細胞毒性ポリペプチドの一例は、プロカスパーゼ（例えば、プロカスパーゼ8または3）である。例えば、HSAリンカーのプロカスパーゼ8ドメインは、標的細胞（例えば

、癌細胞）による内部移行の際にTRAILまたはFasLによって切断できる。一旦切断されれば、生物学的に活性なカスパーゼ8は、標的細胞のアポトーシスを促進することができる。

【０１１８】

一態様では、HSAリンカーに結合した細胞毒性ポリペプチドは、細胞毒性または細胞増殖抑制性を有することが公知である、全長のペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質、またはこれらの生物学的に活性な断片（例えば、「死ドメイン」）を含むことができる。細胞毒性または細胞増殖抑制性を有するペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を（例えば、アミノ酸を置換、変異、短縮、または付加することによって）改変して、本明細書記載の剤への細胞毒性配列の組み込みを容易にすることができる。望ましい改変としては、例えば、タンパク質の発現、寿命、細胞分泌、および標的細胞毒性を促進するアミノ酸配列への変更が挙げられる。

【０１１９】

本発明はまた、任意で結合部分およびペプチドコネクターを含むHSAリンカーとの融合タンパク質として細胞毒性ポリペプチドをコードする核酸分子も提供する。ベクター（例えば、発現ベクター）をトランスフェクトまたは形質導入した細胞中でのHSAリンカーの発現の際に、細胞毒性ポリペプチド、HSAリンカー、および結合部分が（存在するならば）、操作可能に連結される（例えば、融合されるか、隣接して結合されるか、または一緒につながれる）ように、核酸分子を該ベクター内に組み込むことができる。本発明の細胞毒性ポリペプチドとして用いられ得るペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質の例としては、これらに限定されるわけではないが、アポトーシス誘導性タンパク質、例えば、シトクロムc（SEQ ID NO: 39）；カスパーゼ（例えば、カスパーゼ3（SEQ ID NO: 36）およびカスパーゼ8（SEQ ID NO: 37））；プロカスパーゼ、グランザイム（例えば、グランザイムAおよびB（SEQ ID NO: 38））；腫瘍壊死因子（TNF）およびTNFレセプターファミリーのメンバー、例としては、TNF-α（TNFα；SEQ ID NO: 40））、TNF-β、Fas（SEQ ID NO: 41）およびFasリガンド；Fas-関連死ドメイン様IL-1β 変換酵素（FLICE）；TRAIL/APO2L（SEQ ID NO: 45）およびTWEAK/APO3L（例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2005/0187177号を参照のこと）；Bcl-2ファミリーのアポトーシス促進性メンバー、例としては、Bax（SEQ ID NO: 46）、Bid、Bik、Bad（SEQ ID NO: 42）、Bak、およびRICK（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第2004/0224389号を参照のこと）；血管アポトーシス誘導性タンパク質1および2（VAP1およびVAP2；Masudaら、Biochem Biophys. Res. Commun. 278:197~204（2000））；ピエリシン（pierisin）（SEQ ID NO: 44；Watanabeら、Biochemistry 96:10608~10613（1999））；アポトーシス誘導性タンパク質（SEQ ID NO: 43；AIP；Murawakaら、Nature 8:298~307（2001））；IL-1α プロピースポリペプチド（例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,191,269号を参照のこと）；アポプチンおよびアポプチン関連タンパク質、例えば、AAP-1（例えば、参照により本明細書に組み入れられる欧州特許出願公開第EP 1083224号を参照のこと）；抗血管形成因子、例えば、エンドスタチンおよびアンギオスタチン；ならびに他のアポトーシス誘導性タンパク質、例としては、各々が参照により本明細書に組み入れられる以下の国際特許出願公開公報番号および米国特許出願公開：米国特許出願公開第2003/0054994号、同第2003/0086919号、同第2007/0031423号、WO 2004/078112、WO 2007/012430、およびWO 2006/0125001（デルタ1およびジャグド（jagged）1の細胞内ドメイン）に記載されるものが挙げられる。

【０１２０】

野性型HSAリンカーコンジュゲート

本発明はまた、結合剤、診断剤、または治療剤の形成における、天然の野性型HSAリンカーを包含し、そのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列をそれぞれSEQ ID NO: 3および4に示す。SEQ ID NO: 3に列挙されるアミノ酸配列を有するHSAリンカーを利用する全ての態様では、1つまたは複数の上記のペプチドコネクターを、該HSAリンカーのアミノ末端および/もしくはカルボキシ末端に共有結合させるか、または該HSAリンカー配列内のアミノ

酸残基に共有結合させて、1つまたは複数の結合部分の結合を容易にする。

【０１２１】

短縮

本発明はさらに、1つまたは複数のペプチドコネクターまたは結合部分と組み合わせてもよい、短縮した野性型HSAポリペプチドを用いて形成される、HSAリンカーコンジュゲートを提供する。野性型の全長HSAアミノ酸配列（すなわち、SEQ ID NO: 3）のアミノ酸のうち1個、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個、50個、100個、200個、またはそれ以上を欠いている野性型HSAポリペプチドを、本明細書において記載されるような任意の結合部分または診断剤または治療剤のいずれかに結合させることができる。短縮は、HSAリンカーの一端または両端で行うことができ、または内部残基の欠失を含むことができる。2つ以上のアミノ酸残基の短縮は一列に並んでいる（すなわち、連続的である）必要はない。野性型HSAリンカーの例としては、1つまたは複数のペプチドコネクターまたは結合部分、1つまたは複数のドメインI（SEQ ID NO: 56；SEQ ID NO: 3の残基1～197）、ドメインII（SEQ ID NO: 54；SEQ ID NO: 3の残基189～385）、もしくはドメインIII（SEQ ID NO: 57；；SEQ ID NO: 3の残基381～585）、またはこれらの組み合わせを有するもお、例えば、ドメインIとII、IとIII、およびIIとIIIを組み合わせて有するものが挙げられる。

【０１２２】

コンジュゲート（例えば、二重特異性のHSA-薬物、または放射性同位体含有剤）の血清クリアランス速度は、上記のような短縮型の野性型HSAリンカーを含むコンジュゲートを試験することによって最適化することができる。

【０１２３】

追加的なHSAリンカー修飾

HSAリンカーを、該HSAリンカーのアミノ酸残基の部位特異的化学的修飾によって修飾してもよいが、必須ではない。正確に折り畳まれた三次構造のHSAは、該タンパク質の外面上に特定のアミノ酸残基を提示している。化学的反応性を有するアミノ酸残基（例えば、システイン）を、表面露出したこれらの残基に対して置換することができ、これによって診断剤または治療剤の部位特異的結合が可能になる。

【０１２４】

代替的または追加的に、任意でHSAリンカー配列からのアスパラギン残基、セリン残基、またはトレオニン残基の追加または除去によってHSAリンカーを修飾して、これらのアミノ酸残基のグリコシル化を改変してもよい。本明細書で述べるように、HSAリンカーに追加されたグリコシル化部位は、表面露出していることが好ましい。HSAリンカーに導入されたグリコシル部分または他の糖質部分を、診断剤、治療剤、または細胞毒性剤に直接結合させることができる。

【０１２５】

システイン（チオール）結合

HSAリンカーの表面露出アミノ酸残基は、診断剤、治療剤、または細胞毒性剤の化学結合を可能にするためにシステイン残基で置換されてもよい。（その天然の三次構造に折り畳まれている場合に）HSAリンカーの表面上に露出したシステイン残基は、マレイミドまたはハロアセチルなどのチオール反応性基に対する診断剤、治療剤、または細胞毒性剤の特異的結合を可能にする。マレイミド基に対するシステイン残基のチオール官能基の求核反応性は、リジン残基のアミノ基またはN末端アミノ基などのタンパク質内の他の全てのアミノ酸官能基と比較して約1000倍高い。ヨードアセチル試薬およびマレイミド試薬におけるチオール特異的な官能性はアミン基と反応し得るが、より高いpH（＞9.0）およびより長い反応時間が必要である（Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London）。タンパク質中の遊離チオールの量は、標準的なエルマンアッセイを用いて推定され得る。反応性の遊離チオールを生成するために、ジチオスレイトール（DTT）またはセレノールなどの試薬によるジスルフィド結合の還元（Singhら、Anal. Biochem 304: 147～156（2002））が必要である場合もある。

【０１２６】

システイン置換のための部位は、HSAリンカーの表面接触性の解析によって特定され得る（例えば、置換に適したセリン残基およびトレオニン残基の特定は下記の実施例1に記載される）。該表面接触性は、溶媒分子、例えば、水が接触し得る表面積（例えば、平方オングストローム）として表現できる。水の占有領域は半径1.4オングストロームの球に近似される。タンパク質の各のアミノ酸の表面接触性を算出するためのソフトウェアは自由に入手可能であるかまたは使用許可され得る。例えば、結晶学プログラムCCP4 Suiteは、公知のx線結晶学由来の座標を用いてタンパク質の各々のアミノ酸の表面接触性を算出するためのアルゴリズムを使用する（「The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography」Acta. Cryst. D50: 760-763 (1994); www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html）。また溶媒接触性は、スイスバイオインフォマティクス研究所（Swiss Institute of Bioinformatics）からダウンロードしたフリーソフトウェアDeep View Swiss PDB Viewerを用いて評価してもよい。表面露出部位でのシステインの置換によって、診断剤または治療剤に連結したチオール反応性基に対する反応性システインの結合が可能になる。

【０１２７】

グリコシル化

さらに、血清クリアランス速度の改変は、HSAリンカー内部にグリコシル化部位を設計することによって達成できる。特定の態様では、HSAリンカーはグリコシル化されている。ポリペプチドのグリコシル化は、典型的にはN結合型かO結合型のどちらかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への糖質部分の結合を指す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン（ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸を表す）は、アスパラギン側鎖に対する糖質部分の酵素的結合に対する認識配列である。従って、ポリペプチド内にこれらのトリペプチド配列のどちらかが存在することによって、可能性のあるグリコシル化部位が作製される。O結合型グリコシル化とは、糖であるN-アセチルガラクトサミン（aceylgalactosamine）、ガラクトース、またはキシロースのうち一つの、ヒドロキシアミノ酸に対する、最も一般的にはセリンまたはトレオニンに対する結合を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンを用いてもよい。

【０１２８】

（N結合型グリコシル化部位について）HSAリンカーに対するグリコシル化部位の付加または欠失は、上記したトリペプチド配列の1つまたは複数が作製されるようにアミノ酸配列を改変することによって、好都合に達成される。（O結合型グリコシル化部位について）元のHSAリンカーの配列に対する1つまたは複数のセリン残基またはトレオニン残基の付加、欠失、または置換によって改変を行ってもよい。また、HSA上で得られた糖質構造を、上述の細胞毒性剤、免疫調節剤、または細胞増殖抑制剤の部位特異的結合に用いることができる。

【０１２９】

他の治療剤と組み合わせたHSAリンカーコンジュゲート

本明細書に記載のHSAリンカーコンジュゲートを、本明細書に記載の治療剤、細胞毒性剤、または細胞増殖抑制剤の1つまたは複数と共に投与してもよい。例えば、乳癌に罹患している患者に、ErbB2およびErbB3 scFv（例えば、B2B3-1）を含むHSAリンカーを投与することができ、これは、乳癌の治療のための一般的な化学療法レジメンである、例えばドキソルビシン、シクロホスファミド、およびパクリタキセルと同時投与することができる。この点に関して使用のために好ましい治療剤は、トラスツズマブである。この組み合わせに関するデータは、後述の実施例42～44に示される。癌治療に有用である追加の生物学的および化学的な剤は、本明細書に、例えば付表2に示される。

【０１３０】

放射線療法または外科手術と組み合わせたHSAリンカーコンジュゲート

放射線療法または外科手術の前に、それと同時に、またはその後に、HSAリンカーコンジュゲートを投与してもよい。例えば、増殖性障害（例えば、乳癌）に罹患している患者に、HSAリンカーコンジュゲートを単独で、または、癌性組織の部位における標的放射線

療法または外科的処置（例えば、乳腺腫瘍摘出術または乳房切除術）と同時に本明細書に記載のその他の治療剤、細胞毒性剤、もしくは細胞毒性剤と組み合わせて、投与することができる。HSAリンカーコンジュゲートとの組み合わせに適した放射線療法としては、近接照射療法および標的術中放射線療法（TARGIT）が挙げられる。

【０１３１】

薬学的組成物

本明細書で提供される薬学的組成物は、1つまたは複数の結合部分（例えば、抗体または抗体断片）、診断剤（例えば、放射性核種またはキレート剤）、または治療剤（例えば、細胞毒性剤または免疫調節剤）を含むHSAリンカーコンジュゲートの、治療上有効量または診断上有効量を包含する。活性成分であるHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合部分、診断剤、または治療剤と共に調製される）は、種々の薬物送達系における使用のために製剤化することができる。1つまたは複数の生理学的に許容可能な賦形剤または担体を、適切な製剤化のために組成物に含めることができる。本発明での使用に適した製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版（1985）に見出される。薬物送達のための方法の概説については、Langer Science 249:1527~1533（1990）を参照のこと。

【０１３２】

該薬学的組成物は、予防的および/または治療的な処置のための、例えば経皮手段による、非経口の、経鼻の、局部的な、経口の、または局所的な投与を目的としている。通常は、該薬学的組成物は、非経口的に（例えば、静脈内、筋肉内、または皮下の注射によって）、または経口摂取によって、または局所塗布によって、投与される。従って非経口投与のための組成物は、許容可能な担体に、好ましくは水性の担体に、例えば水、緩衝水、生理食塩水、PBSなどに溶解するかまたは懸濁された、1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤が結合されたまたは結合されていない、HSAリンカーを含み得る。組成物は、適切な生理学的条件に必要な、薬学的に許容される補助物質、例えばpH調節剤およびpH緩衝剤、等張化剤、湿潤剤および界面活性剤などを含んでもよい。本発明はまた、経口送達のための組成物も提供し、これには、錠剤およびカプセルなどの製剤化のための、結合剤または充填剤などの不活性成分が含まれうる。さらに本発明は局所投与のための組成物を提供し、これには、クリームおよび軟膏の製剤化のための、溶媒または乳化剤などの不活性成分が含まれうる。

【０１３３】

これらの組成物は従来の滅菌技術によって滅菌されてもよいし、滅菌ろ過されてもよい。得られた水溶液は、そのまま使用するために包装されてもよく、または凍結乾燥されてもよく、該凍結乾燥調製物は、滅菌済の水性担体と投与前に混合される。調製物のpHは、典型的には3~11であり、より好ましくは5~9、または6~8であり、最も好ましくは7~8、例えば7~7.5である。得られた固体形態の組成物は複数の単回投与単位で包装され得、そのそれぞれが、例えば、錠剤またはカプセルの密封包装1つの中の、一定量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を含む。また、固体形態の組成物を、局部適用可能なクリームまたは軟膏用に設計された絞り出し可能なチューブなどの、量を可変にするための容器内に、包装することもできる。

【０１３４】

有効量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を含む組成物を、予防的および/または治療的な処置のために哺乳動物（例えば、ヒト）に投与することができる。予防的用途において、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を含む組成物は、疾患もしくは病態（例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管系疾患）に感受性であるか、またはさもなくば該疾患もしくは病態を発症するリスクを有する患者に投与される。そのような量は、「予防上有効な用量」と定義される。この使用において、正確な量はやはり患者の健康状態に依存するが、一般的には、1用量あたり

約0.5mg～約400mgの（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）HSAリンカーコンジュゲート（例えば、1用量あたり10mg、50mg、100mg、200mg、300mg、または400mg、またはそれ以上）、および、1用量あたり約0.1μg～約300mgの1つまたは複数の免疫調節剤（例えば、1用量あたり10μg、30μg、50μg、0.1mg、10mg、50mg、100mg、または200mg）の範囲にわたる。1用量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、患者に対して予防的に、1時間あたり、1日あたり、1週間あたり、1ヶ月あたり、または1年あたり1回以上（例えば、1時間あたり、1日あたり、1週間あたり、1ヶ月あたり、または1年あたり2、4、5、6、7、8、9、10、11、または12回）投与することができる。より一般的には、1週間あたり1用量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）が投与される。

【０１３５】

治療用途において、1用量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/、または治療剤とともに調製された）は、疾患または病態（例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管系疾患）に既に罹患している哺乳動物（例えば、ヒト）に、治癒に十分な量で、または該疾患もしくは病態およびその合併症の症状の1つもしくは複数を少なくとも部分的に停止もしくは軽減するのに十分な量で、投与される。この目的を達成するのに十分な量は、「治療上有効な用量」と定義される。この使用に有効な量は、疾患または病態の重症度および患者の全身状態に依存し得るが、一般的には、1用量あたり約0.5mg～約400mgの（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）HSAリンカーコンジュゲート（例えば、1用量あたり10mg、50mg、100mg、200mg、300mg、または400mg、またはそれ以上）の範囲にわたる。1用量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、患者に対して治療的に、1時間あたり、1日あたり、1週間あたり、1ヶ月あたり、または1年あたり1回以上（例えば、1時間あたり、1日あたり、1週間あたり、1ヶ月あたり、または1年あたり2、4、5、6、7、8、9、10、11、または12回）投与することができる。より一般的には、1週間あたり1用量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）が投与される。

【０１３６】

いくつかの態様において、患者に、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、1用量あたり約0.5mg～約400mgの範囲で、1週間あたり1回以上（例えば、1週間あたり2、3、4、5、6、または7回、またはそれ以上）、好ましくは、1用量あたり約5mg～約300mgで1週間あたり1回以上、さらにより好ましくは、1用量あたり約5mg～約200mgで1週間あたり1回以上、投与してもよい。また患者に、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を約50mg～約800mgの範囲で隔週に1回、または、HSAリンカー、またはこれに結合された任意の結合剤、診断剤、および/もしくは治療剤を約50mg～約1,200mgの範囲で月1回、投与してもよい。

【０１３７】

他の態様において、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、患者に対して、約0.5mg/週～約2,000 mg/週、約1.0mg/週～約1,000 mg/週、約5mg/週～約500 mg/週、約10mg/週～約100mg/週、約20mg/週～約80mg/週、約100mg/週～約300mg/週、または約100mg/週～約200mg/週の通常の用量範囲で投与してもよい。別の局面では、70 kgの患者へ投与するための本明細書で提供するHSAリンカーコンジュゲートの用量は、例えば約1μg～約5000 mg、約2μg～約4500 mg、約3μg～約4000 mg、約4μg～約3,500 mg、約5μg～約3000 mg、約6μg～約2500 mg、約7μg～約2000 mg、約μg～約1900 mg、約9μg～約1,800 mg、約10μg～約1,700 mg、約15μg～約1,600 mg、約20μg～約1,575 mg、約30μg～約1,550 mg、約40μg～約1,500 mg、約50μg～約1,475 mg、約100μg～約1,450 mg、約200μg～約1,425 mg、約300μg～約1,000 mg、約400μg～約975 mg、約500μg～約650 mg、約0.5 mg～約625 mg、約1 mg～約6

00 mg、約1.25 mg～約575 mg、約1.5 mg～約550 mg、約2.0 mg～約525 mg、約2.5 mg～約500 mg、約3.0 mg～約475 mg、約3.5 mg～約450 mg、約4.0 mg～約425 mg、約4.5 mg～約400 mg、約5 mg～約375 mg、約10 mg～約350 mg、約20 mg～約325 mg、約30 mg～約300 mg、約40 mg～約275 mg、約50 mg～約250 mg、約100 mg～約225 mg、約90 mg～約200 mg、約80 mg～約175 mg、約70 mg～約150 mg、または約60 mg～約125 mgの範囲であり得る。最適な治療応答を提供するように投与レジメンを調整してもよい。別の局面では、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、隔日で約0.5mg～隔日で約500 mg、好ましくは、隔日で約5mg～隔日で約75mg、より好ましくは、隔日で約10mg～隔日で約50mg、さらにより好ましくは、隔日で20 mg～隔日で約40mgの範囲で、投与してもよい。HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）はまた、約0.5mg× 3回/週～約100mg× 3回/週、好ましくは、約5mg× 3回/週～約75mg× 3回/週、より好ましくは、約10mg× 3回/週～約50mg× 3回/週、さらにより好ましくは、約20mg× 3回/週～約40mg× 3回/週の範囲で、投与されてもよい。

【０１３８】

本発明における方法の非限定的な態様では、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）は、哺乳動物（例えば、ヒト）に対して、継続的に1、2、3、または4時間；1日に1、2、3、または4回；隔日で、または3日、4日、5日、もしくは6日毎に；1週間に1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回；隔週で；1ヵ月に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、または30回；隔月で；6ヵ月毎に1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回；1年に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20回；あるいは1年に2回、投与される。HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、治療レジメンの間に異なる頻度で投与してもよい。追加の態様では、HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、同じ頻度で患者に投与してもよく、または異なる頻度で患者に投与してもよい。

【０１３９】

所望の治療効果を達成するために必要な、1つまたは複数の診断剤もしくは治療剤およびHSAリンカーまたはそこに結合された任意の剤の量は、選択した具体的な診断剤または治療剤、投与方式、およびレシピエントの臨床状態などの、いくつかの要素に依存する。当業者であれば、1つまたは複数の診断剤または治療剤およびHSAリンカー、またはそこに結合された任意の剤の、所望の結果を達成するのに適した投薬量を決定することができるであろう。

【０１４０】

有効量のHSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を含む組成物の単回または複数回の投与は、処理を行っている医師によって選択された用量レベルおよびパターンで実施可能である。用量および投与スケジュールは、哺乳動物（例えば、ヒト）における疾患または病態の重症度に基づいて決定および調節することができ、これは、臨床医が一般に実施する方法または本明細書に記載の方法により治療経過全体にわたってモニターされ得る。

【０１４１】

HSAリンカーコンジュゲート（1つまたは複数の結合剤、診断剤、および/または治療剤とともに調製された）を、哺乳動物対象、例えばヒトに、直接、または当技術分野で公知の任意の薬学的に許容される担体もしくは塩と組み合わせて、投与することができる。薬学的に許容される塩としては、製薬業界で一般に用いられる非毒性の酸付加塩または金属錯体を挙げることができる。酸付加塩の例としては、酢酸、乳酸、パモ酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、パルミチン酸、スベリン酸、サリチル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、またはトリフルオロ酢

酸などの有機酸；タンニン酸、またはカルボキシメチルセルロースなどの重合酸（polymeric acid）；および、塩酸、臭化水素酸、硫酸、またはリン酸などの無機酸が挙げられる。金属錯体としては亜鉛および鉄などが挙げられる。薬学的に許容される担体の一例は生理食塩水である。その他の生理学的に許容される担体およびそれらの配合は当業者に公知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載される。

【０１４２】

診断用途および治療用途

HSAリンカーコンジュゲートは、例えば、増殖性疾患（例えば、黒色腫、明細胞肉腫、および腎臓癌などの癌）、および自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、およびブドウ膜炎）の診断または治療を含む、ヒトにおける診断用途および治療用途に用いることができる。ヒトの増殖性疾患および自己免疫疾患についての以下の記載は、診断用途および治療用途においてHSAリンカーコンジュゲートをどのように適用できるのかについての全体的な理解を当業者に与えるためのものであり、本発明の範囲を限定する意図はない。

【０１４３】

増殖性疾患（癌）

HSAリンカーコンジュゲートは、これらに限定されるわけではないが、乳癌、黒色腫、明細胞肉腫、腎臓癌（例えば、腎細胞癌）、前立腺癌、肺癌、胃癌、および卵巣癌などの増殖性疾患を、診断、治療、予防、または除去するために使用できる。増殖性疾患を有することが疑われるまたはそれに罹患している患者における診断用途または治療用途のためにHSAリンカーと結合させる結合部分は、増殖性疾患に関連する標的分子（例えば、チロシンキナーゼレセプターなどの細胞表面レセプター）を特異的に結合させるか、アゴナイズするか、活性化するか、拮抗するか、または阻害する能力に基づいて、選択され得る。例えば、インスリン様成長因子レセプター（IGFR、例えば、IGF1RおよびIGF2R）、線維芽細胞成長因子レセプター（FGFR）、血小板由来成長因子レセプター（PDGFR）、血管内皮成長因子レセプター（VEGFR）、腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）、上皮細胞成長因子レセプター（EGFR、例えば、ErbB2（HER2/neu））、Fcレセプター、c-kitレセプター、または間葉上皮移行因子レセプター（c-met；肝細胞成長因子レセプター（HGFR）としても公知）を標的する結合部分をHSAリンカーに結合させて、増殖性疾患を診断または治療することができる。HSAリンカーコンジュゲートによる癌細胞の特異的結合は、結合された癌細胞の検出（例えば、本明細書で定義したような検出可能標識に結合させたHSAリンカー）または破壊（例えば、細胞毒性剤に結合させたHSAリンカー）を可能にし得る。乳癌および腎臓癌の治療に関するHSAリンカーコンジュゲートの具体的な用途を、下記に記載する。

【０１４４】

乳癌

一般的な形態の乳癌としては、浸潤性の乳管癌つまり乳管の悪性癌、および浸潤性の小葉癌つまり乳腺小葉の悪性癌が挙げられる。ある種の乳癌細胞は、高レベルの上皮細胞成長因子レセプター、特にErbB2（すなわち、HER2/neu）を発現することが公知である。EGFRの異常なシグナル伝達または無秩序な活性化は、乳癌を含む多くの癌の発達および進行に関連づけられている。機能不全EGFR経路を介して媒介される無制限細胞増殖は、上皮由来の多種多様な固形腫瘍で見出され、データによって、腫瘍のEGFR発現、過剰発現、および調節不全と、疾患の進行、転移の表現型、化学療法に対する耐性、および全体的な予後不良とが関連付けられている。

【０１４５】

EGFRに特異的な1つまたは複数の結合部分（例えば、抗ErbB2；トラスツズマブ）に結合させたHSAリンカーを、本明細書に記載のように、診断剤（例えば、検出可能標識）、または細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、もしくは治療剤とともに用いて、乳癌を診断または治療することができる。あるいは、本明細書においてさらに記載される、ErbB2およびErbB3

に特異的な結合部分、例えば「B2B3-1」を含む二重特異性HSAリンカーコンジュゲートを用いて、癌、例えば、乳癌、腎臓癌、卵巣癌、および肺癌を診断または治療することができる。

【０１４６】

上記のとおり、乳癌を治療するために用いられるHSAリンカーコンジュゲートは、放射線療法または外科的処置の前に（例えば、ネオアジュバント化学療法）、同時に、または後に（例えば、アジュバント化学療法）、投与することができる。また、HSAリンカーコンジュゲートを、乳癌の治療に有用な他の化合物（例えば、生物学的治療剤または化学的治療剤などの抗腫瘍剤）と同時に投与することもできる。例えば、有糸分裂阻害剤（例えば、タキサン）、トポイソメラーゼインヒビター、アルキル化剤（例えば白金ベースの剤を含む）、選択的エストロゲンモジュレーター（SERM)、アロマターゼインヒビター、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生物質（例えば、アントラサイクリン抗生物質）、抗VEGF剤、抗ErbB2（HER2/neu）剤、および抗ErbB3剤を含む、表1に列挙される抗腫瘍剤が、乳癌の治療に特に有用であることが公知である。臨床医は、乳癌の治療のために有益であると考えられるかまたはそれが公知である、付表2に列挙されるものを含む任意の化合物と組み合わせて、HSAリンカーコンジュゲートを投与することができる。

【０１４７】

（表１）HSAリンカーコンジュゲートと組み合わせた乳癌の治療のための例示的な抗腫瘍剤

治療薬の分類	例示的な剤 (一般名/商品名)	例示的な用量
有糸分裂阻害剤	パクリタキセル (TAXOL (登録商標) ; ABRAXANE (登録商標))	175 mg/m^2
	ドセタキセル (TAXOTERE (登録商標))	60-100 mg/m^2
トポイソメラーゼインヒビター	カンプトテシン	
	塩酸トポテカン (HYCAMTIN (登録商標))	
	エトポシド (EPOSIN (登録商標))	
アルキル化剤	シクロホスファミド (CYTOXAN (登録商標))	600 mg/m^2
白金ベースの剤	シスプラチン	20-100 mg/m^2
	カルボプラチン (PARAPLATIN (登録商標))	300 mg/m^2
	ネダプラチン (AQUPLA (登録商標))	
	オキサリプラチン (ELOXATIN (登録商標))	65-85 mg/m^2
	サトラプラチン (SPERA (登録商標))	
	四硝酸トリプラチン	
選択的エストロゲン モジュレーター (SERM)	タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標))	20-40 mg/日
	ラロキシフェン (EVISTA (登録商標))	60 mg/日
	トレミフェン (FARESTON (登録商標))	
代謝拮抗剤	メトトレキサート	40 mg/m^2
	フルオロウラシル (5-FU)	500 mg/m^2
	ラルチトレキセド	
抗腫瘍抗生物質	ドキソルビシン (ADRIAMYCIN (登録商標))	40-75 mg/m^2
	エピルビシン (ELLENCE (登録商標))	60-120 mg/m^2
アロマターゼインヒビター	アミノグルテチミド (CYTADREN (登録商標))	250-2000 mg/日
	アナストロゾール (ARIMIDEX (登録商標))	1 mg/日
	レトロゾール (FEMARA (登録商標))	2.5 mg/日
	ボロゾール	
	エキセメスタン (AROMASIN (登録商標))	25-50 mg/日
	テストラクトン	
	ファドロゾール (AFEMA (登録商標))	
抗VEGF剤	ベバシズマブ (AVASTIN (登録商標))	10 mg/kg
抗ErbB2 (HER2/neu) 剤	トラスツズマブ (HERCEPTIN (登録商標))	2-8 mg/kg
	ペルツズマブ (OMNITARG (登録商標))	
抗ErbB3 (HER3) 剤	U3-1287 (AMG 888)	

【０１４８】

腎臓癌

腎臓癌、例えば腎細胞癌は、従来の放射線療法および化学療法に対して特に耐性である。そういう訳で、HSAリンカーと結合させた生物学的治療剤の適用は、これらの癌に罹患

している患者にとっての魅力的な選択肢に相当する。例えば、腎癌を治療するために、I型インターフェロンまたはインターロイキン2レセプターをアゴナイズする結合部分と結合させたHSAリンカーを用いることができる。固形腫瘍として、腫瘍血管新生を標的および阻害する結合部分（例えば、ベバシズマブなどの抗血管内皮成長因子（VEGF）抗体）も、治療効果のために用いることができる。

【０１４９】

自己免疫疾患

HSAリンカーコンジュゲートを用いて、例えばヒト患者における自己免疫疾患および自己免疫障害、例えば、多発性硬化症（MS）、インスリン依存性糖尿病（IDDM)、関節リウマチ（RA）、ブドウ膜炎、シェーグレン症候群、グレーブス病、乾癬、および重症筋無力症などを、診断、治療、予防、または安定化することができる。自己免疫疾患および自己免疫障害は、免疫系の自己反応性要素（例えば、T細胞、B細胞、および自己反応性抗体）によって生じる。そういう訳で、自己反応性の免疫細胞および抗体を阻害、遮断、拮抗、または枯渇させる結合部分（例えば、抗リンパ球または抗胸腺細胞グロブリン；モノクローナル抗体であるバシリキシマブ、ダクリズマブ、またはムロモナブ-CD3）を、治療用途のためにHSAリンカーと結合させることができる。本明細書で定義された、炎症性シグナル伝達インヒビター（ISI）として機能する結合部分を、自己免疫の治療のためにHSAリンカーに結合させることができる。さらに、インテグリン機能を阻害またはこれに拮抗する結合部分（例えば、本明細書で定義されたインテグリンアンタゴニスト）は、疾患の進行を回復または停止できる。

【０１５０】

他の態様では、該結合部分は、可溶性TNFレセプター、例えばエタネルセプトまたはレネルセプト；炎症促進性サイトカインまたは炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子に対して指向した抗体、例えばアダリムマブ、セルトリズマブ、インフリキシマブ、ゴリムマブ、およびリツキシマブ；ドミナントネガティブな炎症促進性サイトカイン変異体、例えばXENP345、XPROTM1595、アナキンラ、ならびに、米国特許出願公開第20030166559号および同第20050265962号に開示された変異体；炎症促進性サイトカインまたは炎症促進性の細胞表面シグナル伝達分子の下流のシグナル伝達経路のインヒビター、例えば、DE 096、5-アミノ-2-カルボニルチオペン誘導体（WO2004089929に記載）、ARRY-797、BIRB 796 BS、(1-5-tert-ブチル-2-p-トリル-2H-ピラゾール-3-イル)-3-[4-2(モルホリン-4-イル-エトキシ)-ナフタレン-1-イル]-尿素、CHR-3620、CNI-1493、FR-167653（Fujisawa Pharmaceutical, Osaka, Japan）、ISIS 101757（Isis Pharmaceuticals）、ML3404、NPC31145、PD169316、PHZ1112、RJW67657、4-(4-(4-フルオロフェニル)-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル)-3-ブチン-1-オール、SCIO-469、SB202190、SB203580、(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)1H-イミダゾール)、SB239063、トランス-1-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)-4-(4-フルオロフェニル-メトキシピリジミジン-4-イル)イミダゾール、SB242235、SD-282、SKF-86002、TAK 715、VX702、およびVX745；あるいは、TNF-α変換酵素（TACE）のインヒビター、例えばBB-1101、BB-3103、BMS-561392、ブチニルオキシフェニルβ-スルホンピペリジンヒドロキソマート、CH4474、DPC333、DPH-067517、GM6001、GW3333、Ro 32-7315、TAPI-1、TAPI-2、およびTMI 005)；あるいは、抗イディオタイプ剤、例えばモノクローナル抗体、LJP 394（abetimus, RIQUENT（登録商標）, La Jolla Pharmaceuticals）である。

【０１５１】

他の態様では、該結合部分は、本明細書に記載のインターフェロンである。HSAリンカーに結合可能な結合部分としては、例えば、インターフェロン-β（REBIF（登録商標）（IFN-β-1a）、AVONEX（登録商標）（IFN-β-1a）、およびBETASERON（登録商標）（IFN-β-1b））、インターフェロン-t（TAUFERONTM)、インターフェロン-α（例えば、ROFERON-A（登録商標）（IFN-α-2a）、INTRON-A（登録商標）（IFN-α-2b）、REBETRON（登録商標）（IFN-α-2b）、ALFERON-N（登録商標）（IFN-α-n3）、PEG-INTRON（登録商標）（モノメトキシポリエチレングリコールと共有結合したIFN-α-2b）、INFERGEN（登録商

標）（IFN-α-2bに対して88％の相同性を有する、非天然1型インターフェロン）、またはPEGASYS（登録商標）（ペグ化IFN-α-1a））、ならびにACTIMMUNE（登録商標）（IFN-g-1b）が挙げられる。

【０１５２】

本発明はさらに、自己免疫を治療するための、これらの炎症促進性分子またはその特異的レセプターに拮抗する結合部分を有するHSAリンカーコンジュゲートを提供する。MSおよびRAの診断および治療に関するHSAリンカーコンジュゲートの具体的な適用は、下記に記載されている。

【０１５３】

多発性硬化症

多発性硬化症（MS）は、中枢神経系（CNS）の神経の不可逆的な変性を特徴とする神経学的疾患である。根源的な原因は不明であるが、MSにおける神経変性は、脱髄すなわち、通常は外層を裏打ちして神経を絶縁するタンパク質であるミエリンの剥離の直接的結果である。T細胞は、MSの発症に重要な役割を果たしている。正常な白質でない、炎症を起こしたMS病変は、ヒトHLA-DR2などのMHCクラスII関連分子によって提示される自己抗原に応答する、浸潤性$CD4^+$ T細胞を有し得る。浸潤性CD4T細胞（T_H1細胞）は、炎症促進性サイトカインIL-2、IFN-γ、およびTNF-αを産生し、これが、マクロファージなどの抗原提示細胞（APC）を活性化して、さらなる炎症促進性サイトカイン（例えば、IL-1β、IL-6、IL-8、およびIL-12）を産生させる。IL-12はさらにIFN-γ合成を誘導する。その結果、神経鞘の進行性脱髄が起こり、これがヒト疾患につながる。

【０１５４】

MSの診断を補助するためにHSAリンカーコンジュゲートを用いることができる。診断用HSAリンカーコンジュゲート（例えば、二重特異性HSAリンカーコンジュゲート）は、1つまたは複数の免疫細胞活性化マーカー（例えば、CD69、CD28、HLA-DR、およびCD45）を特異的に標的する結合部分を含む。他の因子または細胞に対する1つまたは複数のこれらの炎症促進性または免疫細胞活性化メディエーターの不均衡は、診断剤（例えば、放射性同位体または蛍光色素）と結合されたHSAリンカーコンジュゲートを用いることによって測定され得る。

【０１５５】

MSに罹患しているかもしくはその発症リスクを有する人を治療するため、または該疾患の症状を予防、寛解、もしくは治癒するために、HSAリンカーコンジュゲートを用いることができる。例えば、α4インテグリン（例えば、ナタリズマブ）、CD52（例えば、アレムツズマブ）、CD80、P-セレクチン、スフィンゴシン-1-リン酸レセプター-1（S1PR1）、ヒアルロン酸レセプター、白血球機能抗原-1（LFA-1）、CD11（例えば、エファリズマブ）、CD18、CD20（例えば、リツキシマブ）、CD85、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、またはCCR5を特異的に標的しかつ拮抗する結合部分は、MSに罹患している患者での治療用途のためにHSAリンカーに結合させた場合に、有用であり得る。同様に、I型インターフェロン（例えば、インターフェロンαおよびインターフェロンβ）を中和するかまたはI型インターフェロンレセプター（例えば、IFNα R1）に拮抗する結合部分もまた、治療用途のためにHSAリンカーに結合させることができる。

【０１５６】

関節リウマチ

関節リウマチ（RA）は、免疫系による関節の攻撃が起こっている慢性的な炎症性自己免疫障害である。これは、日常生活に支障を来し（disabling）かつ疼痛性の炎症状態であり、疼痛および関節破壊によって運動機能の実質的な喪失をもたらし得る。RAは全身性の疾患であって、皮膚、血管、心臓、肺、および筋肉を含む身体全体にわたって関節外組織に影響を与える場合が多い。

【０１５７】

RAに罹患している患者ではしばしば、HLA-DR4/DR1クラスターの細胞性発現が増大している。これらの細胞表面分子の一つまたは両方に特異的なHSAリンカーコンジュゲートは

、RAの診断に有用である。
【０１５８】
RAに罹患しているかもしくはその発症リスクを有する人を治療するため、または該疾患の症状を予防、寛解、もしくは治癒するために、HSAリンカーコンジュゲートを用いることができる。例えば、本明細書で定義された結合部分は、TNF-α（例えば、エタネルセプト、インフリキシマブ、およびアダリムマブ）、IL-1（例えば、アナキンラ）、またはCTLA-4（例えば、アバタセプト）を特異的に標的しかつこれに拮抗する。RAを治療または予防するために、B細胞を特異的に標的しかつ枯渇させる結合部分（例えば、リツキシマブなどの抗CD20抗体）もまた、本明細書に記載のHSAリンカーに結合させることができる。
【０１５９】
ブドウ膜炎
ブドウ膜炎とは、具体的には眼球の中間層の炎症を指すが、眼球の内部に関与する任意の炎症性プロセスを指す場合もある。ブドウ膜炎は、自己免疫性原因によっても特発性原因によってもよい。
【０１６０】
自己免疫性ブドウ膜炎に罹患しているかもしくはその発症リスクを有する人を治療するため、または該疾患の症状を予防、寛解、もしくは治癒するために、HSAリンカーコンジュゲートを用いることができる。自己免疫性または特発性のブドウ膜炎に関連する炎症を低減または消失させるために、例えば、α-フェトプロテイン（例えば、ヒトAFP；NCBIアクセッション番号NM_001134）またはその生物学的活性断片を、HSAリンカーに結合させることができる。
【０１６１】
キット
本発明はさらに、HSAリンカーならびに1つまたは複数の結合部分（例えば、抗体または抗体断片）、診断剤（例えば、放射性核種またはキレート剤）、および治療剤（例えば、細胞毒性剤または免疫調節剤）と共に、必要に応じて、これらを該HSAリンカーに結合させるために使用可能である試薬を含む、薬学的組成物と、薬学的に許容される担体とを、疾患または病態（例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管疾患）を治療するための治療上有効量で含む、キットを提供する。キットは、それに含まれる組成物を実施者（例えば、医師、看護師、または患者）が投与することを可能にするための説明書を含む。
【０１６２】
好ましくは、キットは、有効量のHSAリンカーまたは、任意のその結合コンジュゲート（例えば、抗体または抗体断片（例えば、scFv））、診断用コンジュゲート（例えば、放射性核種またはキレート剤）、および/もしくは治療用コンジュゲート（例えば、細胞毒性剤または免疫調節剤）を含む、単一用量の薬学的組成物の複数パッケージを含む。任意で、薬学的組成物を投与するのに必要な説明書またはデバイスをキットに含めてもよい。例えばキットは、有効量のHSAリンカー、またはそれに結合した任意の結合剤、診断剤、および/もしくは治療剤を含む、1つまたは複数の充填済み注射器を提供し得る。さらに、疾患または病態（例えば、癌、自己免疫疾患、または心血管疾患）に罹患している患者がHSAリンカーまたはそれに結合させた任意の結合剤、診断剤、および/もしくは治療剤を含む薬学的組成物を用いるための、説明書または投与スケジュールなどの追加の構成要素を、キットに含めてもよい。
【０１６３】
本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、本発明の組成物、方法、およびキットにおいて種々の修飾および変更がなされ得ることは、当業者には明白であろう。従って、添付の特許請求の範囲およびその等価物内の範囲に入るという条件で、本発明の修飾および変更は本発明に包含されることが意図される。
【実施例】
【０１６４】
以下の実施例は、限定目的ではなく、単なる例示の目的で提供されるものである。当業

者は、本質的に同じまたは類似した結果を得るために種々の重要でないパラメーターを変更または改変できることを容易に認識するであろう。

【０１６５】

実施例1：細胞毒性薬または細胞増殖抑制薬の部位特異的結合のためのHSAリンカー中の残基を同定する方法

HSAに対する薬物の特異的結合のための部位を特定するために、結晶構造を調査して、表面に露出したセリン残基およびトレオニン残基を同定する。これらの特定の表面露出したアミノ酸をその後システインに変異させることができ、これによって、マレイミドのようなチオール特異的結合を用いた、置換されたシステインへの薬物の結合が可能になる。薬物結合の前には、温和な還元が必要であり得る。結合させる薬物の数は、HSAに導入される、表面露出したシステイン残基の数によって、制御される。どちらも大部分の構造がシステインと同一であるので、セリンおよびトレオニンは変異のための最も適切な残基として選択されるが、他の表面露出した残基を変異させてシステインとしてもよく、細胞増殖抑制薬または細胞毒性薬に対して成功裏に結合しうる。

【０１６６】

HSAの結晶構造は、RSCB Protein Data Bankに寄託されている（1bm0 - Sugio et al., “Crystal structure of human serum albumin at 2.5 A resolution,” Protein Eng. 12: 439-446 (1999)）。この構造は、スイスバイオインフォマティクス研究所からダウンロードしたDeep View Swiss PDB Viewerを用いて解析された。50%、40%、および30%表面露出したセリンおよびトレオニンの残基を、システインへの変異に最も適しているとした（表2）。標準的な分子生物学的手順を用いて変異を導入することができる。導入されたシステインへのチオール反応薬またはキレート剤の結合は、標準的なタンパク質化学技術を用いて試験することができる。

【０１６７】

（表２）

%表面露出	残基
50	T496
40	S58
30	T76, T79, T83, T125, T236, S270, S273, S304, S435, T478, T50 T508

【０１６８】

実施例2：アスパラギン連結グリコシル化部位の導入のためのHSAリンカー中の残基を同定する方法

HSA中のアスパラギン連結グリコシル化部位の導入のための領域を特定するために、結晶構造を調査して、表面露出した（＞30%）アスパラギン、セリン、およびトレオニンの残基が変異に適しているとする。コンセンサス配列であるアスパラギン-x-セリン/トレオニン（ここで、xはプロリンではない）が存在する場合、グリコシル化はアスパラギン残基で起こる。表2は、アスパラギン連結グリコシル化の導入のためのHSA中の可能な変異部位を列挙している。

【０１６９】

（表３）

残基	提案される変異
Gln32	Asn
Val46	Ser/Thr
Asp56	Asn
Asp63	Ser/Thr*
Glu231	Asn
Asp237	Asn
Gln268	Asn
Asp269	Ser/Thr
Glu285	Asn
Ala320	Ser/Thr*
Asp340	Asn
Glu354	Asn
Gln437	Asn
Glu425	Asn
Glu465	Asn
Asp494	Asn*

*これらの変異がHSA内で起こることは滅多に無いことも、報告されている（Carlson et al., “ Alloalbuminemia in Sweden: Structural study and phenotypic distribution of nine albumin variants,” Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:8225- 8229 (1992); Madison et al., “ Genetic variants of human serum albumin in Italy: point mutants and a carboxyl-terminal variant,” Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:6476-6480 (1994); Hutchinson et al., “ The N-terminal sequence of albumin Redhill, a variant of human serum albumin,” FEBS Lett. 193:211-212 (1985); Brennan et al., “ Albumin Redhill (-1 Arg, 320 Ala-Thr): a glycoprotein variant of human serum albumin whose precursor has an aberrant signal peptidase cleavage site,” Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:26-30 (1990); Minchiotti et al., “ Structural characterization of four genetic variants of human serum albumin associated with alloalbuminemia in Italy,” Eur. J. Biochem 247:476-482 (1997); Peach et al., “ Structural characterization of a glycoprotein variant of human serum albumin: albumin Casebrook (494 Asp-Asn),” Biochim Biophys. Acta 1097:49-54 (1991)）。

【０１７０】

実施例３

B2B3-1は、ヒト抗ErbB2 scFv抗体であるB1D2（SEQ ID NO: 27）、および、ヒト抗ErbB3 scFvであるH3（SEQ ID NO: 26）を含む、二重特異性scFv抗体融合分子である。2つのscFvは、修飾されたヒト血清アルブミン（HSA）リンカーによって連結されている。抗ErbB3 scFvであるH3は、短いコネクターポリペプチドを組み込んでいるHSAリンカーのアミノ末端に組み換えによって融合されており、抗ErbB2 scFvであるB1D2は、さらなる短いコネクターポリペプチドを組み込んでいる該修飾HSAリンカーのカルボキシ末端に組み換えによって融合されている。各々のコネクターポリペプチドは、プロテアーゼ耐性の特性に基づいて選択される。該修飾HSAリンカーは2つのアミノ酸置換を含む。天然HSAの34位のシステイン残基を、この部位での酸化に起因する潜在的なタンパク質の不均一性を低下させるために、セリンに変異させる。薬理学的半減期を低下させ得る脱アミドに対して天然HSAでは感受性であり得る、天然HSAのアミノ酸503のアスパラギン残基を、グルタミンに変異させる。その抗ErbB2 scFv結合部分の高い親和性（10.0nM~ 0.01nMの範囲のkD、より好ましくは約0.3nMのkDを有する）のために、B2B3-1は、ErbB2を過剰発現している腫瘍に選択的に結合すると考えられている。続いて50~ 1nMの範囲、より好ましくは約16nMのkDを有する抗ErbB3 scFvによりErbB3が結合することによって、ErbB3のHRG誘導性リン酸化が阻害される。修飾HSAリンカーは、該二重特異性分子の循環半減期を延長させる。B2B3-1は分子量119.6kDaを有し、好ましくはグリコシル化されていない。

【０１７１】
B2B3-1は、ナノモル未満の力価でErbB3のリガンド誘導性リン酸化を阻害し；この活性は少なくとも部分的に、その二量体化パートナーであるErbB2の大量発現によるものと考えられ、このことによって、両方のレセプターを発現している癌細胞の特異的標的化が容易になる。
【０１７２】
実施例４
図2に示されるとおり、B2B3-1変異体は、ZR75-1乳癌細胞においてHRG誘導性のpErbB3を阻害する。ZR75-1乳癌細胞を、ある用量範囲のB2B3-1変異体で24時間処理した後、HRG刺激を行う。ELISAによって細胞溶解物中でpErbB3レベルを測定し、パーセント阻害と共にIC_{50}値を算出する。繰り返し実験を表すエラーバーと共にIC_{50}平均値（Y軸）を示す。対応するバーの上にパーセント阻害値を示す。
【０１７３】
ELISAアッセイ
特記しない限り、全ErbB3およびリン酸化ErbB3のELISAのためのELISA試薬は、R&D Systemsより購入したDUOSETキットである。96ウェルのNUNC MAXISORBプレートを抗体50μlで被覆し、室温で一晩インキュベーションする。翌朝、カルシウムおよびマグネシウムを含まないDulbeccoリン酸緩衝生理食塩水（PBS）にTween界面活性剤を含めたもの（PBST）（0.05% Tween-20）を用いるBIOTEKプレートウォッシャー内で1000μl/ウェルでプレートを3回洗浄する。続いて、2% BSAを含むPBSを用いて、室温で約1時間プレートをブロッキングする。PBSTを用いるBIOTEKプレートウォッシャー内で1000μl/ウェルでプレートを3回洗浄する。細胞は、37℃および5%二酸化炭素で増殖させ、冷PBSで洗浄した後、150mM NaCl、5mMピロリン酸ナトリウム、10uM bpV(phen)、50uMフェニルアルシン、1mMオルトバナジン酸ナトリウム、およびプロテアーゼインヒビターカクテル（Sigma、P2714）を添加した哺乳動物タンパク質抽出（MPER）溶解緩衝液（Pierce, 78505）を用いて回収する。さらなる処理に関しては、50%溶解緩衝液および1% BSAで希釈した50μL の細胞溶解物および標準を2つ組で使用する。試料を4℃で2時間、プレートシェーカー上でインキュベーションし、上述のように洗浄する。約50μlの検出抗体を2% BSAで希釈し、PBSTを添加し、室温で約1~2時間インキュベーションする。リン酸化ErbB3については検出抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）に直接結合させるが、全ErbB3についてはビオチン化マウス抗ヒトErbB3二次検出抗体を使用する。プレートを上述のように洗浄する。全ErbB3については約50μlのストレプトアビジン-HRPを添加して30分間インキュベーションし、プレートを上述のように洗浄する。約50μlのSUPERSIGNAL ELISA Pico（Thermo Scientific）基質を添加し、FUSIONプレートリーダーを用いてプレートを読み取る。2つ組の試料は平均され、存在する場合、エラーバーは2つの複製物の間の標準偏差を表す。
【０１７４】
実施例５
B2B3-1変異体A5-HSA-B1D2（図3~5のパネルA）、H3-HSA-B1D2（図3~5のパネルB）、H3-HSA-F5B6H2（図3~5のパネルC）、およびF4-HSA-F5B6H2（図3~5のパネルD）による24時間の前処理の後に、リン酸化ErbB3（図3A~D）、AKT（図4A~D）、およびERK（図5A~D）の阻害を測定する。BT474乳癌細胞を、ある用量範囲のB2B3-1変異体で24時間処理した後、HRG刺激を行う。ELISAによって細胞溶解物中でpErbB3、pAKT、およびpERKのレベルを測定し、パーセント阻害と共にIC_{50}値を算出する。これらの結果は、10^{-8}モルおよびそれ以上の濃度においてAKT、ERK、およびErbB3のHRG誘導性リン酸化を50%超阻害するHSAリンカーコンジュゲートは、試験したものの中でB1B2-1のみであることを実証するものである。
【０１７５】
実施例６
図6に示すとおり、B2B3-1変異体によるBT474乳房腫瘍細胞の処理は、G1細胞周期停止、およびS期の細胞群の減少を引き起こす。BT474細胞を、1μMのB2B3-1変異体および対照を用いて72時間処理する。処理の終了後、細胞をトリプシン処理して、ヨウ化プロピジウム

を含む低張液中に穏やかに再懸濁し、単一の細胞をフローサイトメトリーによって解析する。G1期およびS期の細胞周期分布は、細胞周期分析のために設計された曲線あてはめアルゴリズム（Flowjoソフトウェア細胞周期プラットフォーム）を用いて測定する。

【０１７６】

実施例7

B2B3-1（SEQ ID NO: 16）は、その二量体化パートナーであるErbB2の大量発現を利用してErbB3活性化を阻害し、腫瘍細胞を標的する。高親和性抗ErbB2 scFv抗体であるB1D2は、ErbB2を過剰発現している腫瘍細胞をB2B3-1が標的とするのを容易にする。修飾HSAリンカーによってB1D2を低親和性の抗ErbB3 scFv抗体であるH3に接続し、これが、ErbB3のリガンドであるHRGの結合を遮断する。B2B3-1によって媒介される、ErbB3リン酸化および下流のAKTシグナル伝達の阻害は、この遮断によるものと考えられる。ErbB2結合性scFvであるB1D2は、作動作用も拮抗作用も有さない親scFvのC6.5に由来する。従ってB1D2は、単なる標的剤として機能する可能性が高い。ErbB3結合性scFvの比較的低い結合親和性により、ErbB3を発現しているがErbB2はほとんどまたは全く発現していない正常な非癌性組織とB2B3-1との強い結合が妨害されると考えられ、それによって非特異的な毒性の可能性が低下する。ErbB2とErbB3の両方を発現している腫瘍細胞では、両方のレセプターに結合する二重特異性B2B3-1の結合活性の影響が存在し、これによって、ErbB3 scFvの親和性の低さが克服され、ErbB3レセプター複合体とのHRG相互作用の強力な阻害が可能になる。

【０１７７】

ErbB3に対するHRG結合をB2B3-1が阻害する能力は、フローサイトメトリー（FACS）を用いて調べる。ヒト乳癌細胞株（ErbB2を過剰発現するBT-474の変異体）の細胞を、1μMのB2B3-1で前処理した後、10nMのビオチン化HRG 1β EGFドメインとともにインキュベーションする。徹底的に洗浄した後、ストレプトアビジン-AlexaFluor 647コンジュゲートを用いて結合を評価する。全てのインキュベーションを4℃で行う。図7は、ErbB3に対するHRGの結合をB2B3-1が遮断できることを示し、濃度1μMで100%遮断が提供されるようである。

【０１７８】

実施例8

ErbB3に対するHRGの結合を遮断できるB2B3-1の能力を実証した後、ErbB3を発現しかつErbB2を過剰発現している2つの細胞株におけるインビトロErbB3シグナル伝達に対するB2B3-1の効果を調査する。ヒト乳癌細胞株BT-474-MB（例えばDrummond et al.（2005）Clin. Cancer Res. 11:3392; Park et al.（2002）Clin. Cancer Res. 8:1172; Kirpotin et al.（2006）Cancer Res. 66:6732に記載）およびZR7530（US NIH Lawrence Berkeley National Laboratory breast cancer cell collectionより入手可能）を、一晩にわたり血清飢餓処理し、24時間にわたりB2B3-1の用量滴定で前処理した後、10分間にわたり5 nMのHRG 1β EGFドメインで刺激する。その後、ほぼ上述したとおりにELISAアッセイを用いてErbB3およびAKTのリン酸化状態を調べる。その結果、両細胞株において、用量依存的様式で、かつ強力なIC_{50}で、ErbB3およびAKT両方のリン酸化のHRG誘導性活性化をB2B3-1が阻害することが示される（図8A~D）。

【０１７９】

実施例9

図9は、BT474乳癌細胞におけるシグナル伝達タンパク質に対するB2B3-1処理の効果を示す。細胞を、ある用量範囲のB2B3-1を用いて24時間処理した後、ヘレグリン刺激を行う。pErbB2、pErbB3、pErk、およびpAKTのレベル、ならびにこれらの対応する総タンパク質レベルを、細胞溶解物についてウエスタンブロット分析によって測定する。少なくともpErbB2およびpErbB3のレベルはB2B3-1処理によって用量依存的様式で低下することが、結果により示される。

【０１８０】

実施例10

図10は、B2B3-1処理したBT474乳癌細胞の免疫沈降-ウエスタンブロット分析を示す。細

胞を、ある用量範囲のB2B3-1を用いて24時間処理した後、ヘレグリン刺激を行う。ErbB2に会合した複合体を、抗ErbB2抗体を用いて細胞溶解物から単離した後、ウエスタンブロット分析によってpErbB2およびpErbB3、ならびに対応する総タンパク質のレベルを検出する。抗ErbB2抗体によって実質的により多くのErbB3およびリン酸化ErbB3が沈降するように、B2B3-1がErbB2をErbB3に架橋させていることが、結果により示される。

【０１８１】

実施例11

B2B3-1の抗腫瘍活性を、いくつかのアッセイを用いてインビトロで調べる。第一のアッセイでは、G1期のBT-474細胞またはSKBR3細胞の蓄積に対するB2B3-1の影響、ならびに随伴するS期の細胞周期の減少を調べる。簡潔に言うと、細胞を1μMのB2B3-1またはPBSビヒクルを用いて72時間処理する。処理の終了後、細胞をトリプシン処理して、ヨウ化プロピジウムを含む低張液中に穏やかに再懸濁し、単一の細胞をフローサイトメトリーによって解析する。G1期およびS期の細胞周期分布は、細胞周期分析のために設計された曲線あてはめアルゴリズム（FlowJoソフトウェア細胞周期プラットフォーム，Tree Star，Inc.）を用いて測定する。B2B3-1は、S期の細胞の割合をわずかに低下させ、G1期の細胞群を増大させることが見出された（図11A）。第二の実験では、B2B3-1による処理の後に形成された細胞コロニーの数を調べる。乳癌細胞BT-474およびSKBR3を1μMのB2B3-1の存在下でプレーティングし、培地のみにプレーティングした細胞と比較する。培地のみまたは処理を含む培地は、3日毎に補充する。14日後、コロニー数を計数して、処理なしの細胞と比較する。図11Bは、B2B3-1で細胞を処理した場合に形成されるコロニーの数が対照細胞と比較して40～45％低下することを示している。最後に、B2B3-1が細胞増殖を阻害する能力を、Real-Time Cell Electronic Sensing System(RT-CES；ACEA Biosciences)を用いる細胞インピーダンスアッセイで評価する。BT-474細胞を、マイクロエレクトロニクスセンサーアレイを組み込んだプレート上に播種して、B2B3-1または培地のみの用量滴定で72時間処理する。細胞-電極インピーダンス応答の発生を表すデータを72時間にわたり1時間毎に収集し、IC_{50}値を処理から68時間後に算出する。図11Cは、B2B3-1がBT-474細胞のインピーダンスを33nMのIC_{50}で阻害できたことを示す。

【０１８２】

実施例12

本発明者らはまた、B2B3-1が、ErbB2レセプターとErbB3レセプターに同時に結合して架橋できるその能力に基づいて、アゴニスト活性を呈するか否かも検討した。血清飢餓処理したZR75-1乳癌細胞を1μMのB2B3-1またはPBSビヒクルとともに24時間インキュベーションする。また細胞を、B2B3-1またはPBSビヒクルで24時間処理した後、5nMのHRG 1β EGFドメインを用いて10分間刺激する。細胞を溶解し、ほぼ上述したとおりのELISAによって、溶解物のpErbB3含量を評価する。図12は、B2B3-1のみで処理した細胞が、処理なしの細胞のレベルと同等レベルのリン酸化ErbB3を含んでいたことを示し、これにより、B2B3-1はErbB3リン酸化を促進するアゴニストとしては作用しないことが示される。

【０１８３】

実施例13

ErbB2およびErbB3に対して特異的に結合でき、関連するErbBファミリーメンバーであるEGFRおよびErbB4には結合できないB2B3-1の能力を、ELISAによって調べる。プレートを、ErbB2またはErbB3いずれかの組み換え細胞外ドメインで被覆する。プレートをブロッキングして、競合するEGFR、ErbB2、ErbB3、またはErbB4の組み換え細胞外ドメインの連続希釈物の存在下で、半最大結合濃度のB2B3-1を用いてインキュベーションする。ErbB2被覆プレートに対するB2B3-1結合を遮断したのは可溶性ErbB2細胞外ドメインだけであったことが、結果により示される（図13A）。同様に、ErbB3被覆プレートに対するB2B3-1結合を遮断したのは、可溶性ErbB3細胞外ドメインだけであった（図13B）。これらの結果は、ErbB2に対する、抗ErbB2アームであるB1D2の特異性、およびErbB3に対する、抗ErbB3アームであるH3の特異性を実証するものと考えられる。ErbB3被覆プレート上でB2B3-1と共に可溶性ErbB2細胞外ドメインをインキュベーションした場合に観察されたシグナルの増大は

、該プレート上でのErbB2-ErbB3-B2B3-1複合体の形成によるものと考えられる。

【０１８４】

実施例14

B2B3-1の単特異性変異体を用いて、ErbB2およびErbB3の両方を発現している腫瘍細胞に結合できるB2B3-1の能力を調査した。SKO-2（SEQ ID NO: 67）およびSKO-3（SEQ ID NO: 68）は、それぞれErbB2またはErbB3と相互作用できる能力を欠いた、B2B3-1の変異体である。

【０１８５】

鋳型ベクターの対向する鎖にそれぞれ相補的なオリゴヌクレオチドプライマー対を用いるQUIKCHANGE部位特異的突然変異誘発キット（STRATAGENE）を用いて、SKO-2およびSKO-3を構築する。これらは温度サイクルの間に伸長し、互い違いのニックを含む変異プラスミドを生じる。温度サイクルに続いて、親DNA鋳型を消化するために用いられるDpn Iで生成物を処理する。所望の変異を含む、ニックの入ったベクターDNAを次に、XL1-BLUE supercompetent cells（STRATAGENE）内に形質転換し、プラスミドDNAを増殖させる。

【０１８６】

SKO-2を作製するために、抗ErbB2 scFvであるB1D2のVH CDR3ループ内の5ヌクレオチドを変異させて、以下のアミノ酸置換を生じる：H95A、Wl00hA、およびE100jA。これらの位置における変異は、B1D2親scFvであるC6.5のErbB2に対する結合をノックアウトすることが実証されている（Schier et al, 1996 JMB）。段階的な様式で、B2B3-1プラスミドpMP9043（SEQ ID NO: 60）に変異を導入する。まず、プライマー

5'- GTA CTT TTG TGC CCG GGC CGA TGT GGG CTA CTG C -3 '(SEQ ID NO:61)

および

5'- GCA GTA GCC CAC ATC GGC CCG GGC ACA AAA GTA C -3' (SEQ ID NO:62)

と、以下の温度サイクルを用いて、変異c295gおよびa296cを作成する：95℃1分間の後、95℃1分間、55℃分間、および65℃17.2分間を30サイクル。プラスミドDNAのDNA配列決定によって、変異を確認する。t334g、g335c、およびa341cに変異を導入するために、c295gおよびa296cに配列確認済みの変異を有するプラスミドに対して、プライマー

5'- GAC ATG TGC CAA GGC CCC CGC GTG GCT GGG AGT G -3' (SEQ ID NO:63)

および

5'- CAC TCC CAG CCA CGC GGG GGC CTT GGC ACA TGT C -3' (SEQ ID NO:64)

と以下の温度サイクルを用いて、2回目の部位特異的突然変異誘発を実施する：95℃30秒間ならびに、95℃30秒間、55℃1分間、および68℃17.2分間を18サイクル。得られるプラスミドDNAのDNA配列決定によって、変異を確認する。

【０１８７】

SKO-3を作製するために、変異B1D2 scFvを元のB2B3-1プラスミド内にサブクローニングして抗ErbB3 scFvであるH3を除く。SKO-2にアニーリングするプライマーである

5'ACAGTGGCGGCCGCCACCATGGGCTGGTCTCTGATCCTGCTGTTCCTGGTGG

CCGTGGCCACGCGTGTGCTGTCCCAGGTGCAGCTCGTCCAGAGCGGCGC (SEQ

ID NO:65)

および

5'GGAGGCGGCGCCCAGGACTGTCAGCTTGGTGCCACCGCCG (SEQ ID NO:66)

を用いて、変異B1D2 scFvをSKO-2から単離し、Kas I/ Not I制限消化B2B3-1プラスミドへのサブクローニングのためにKas I制限部位およびNot I制限部位を導入する。PCRは以下の通り実施する：変異B1D2の増幅のため、94℃1分間の後、94℃30秒間、58℃1分間、72℃1分間を30サイクル、その後72℃5分間を1サイクル。クローニングの成功は、DNA配列決定によりモニタリングする。SKO-2およびSKO-3プラスミドは、振とうフラスコまたは10L WAVEバッグ中のCHO-K1細胞より安定に発現され、Blue SEPHAROSEおよび陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて調整培地から精製される。

【０１８８】

ほぼ同数のErbB2レセプターおよびErbB3レセプターを発現するMALME-3M黒色腫細胞を、飽和濃度のAlexafluor-647結合ヤギ抗HSA抗体の存在下で、B2B3-1、SKO-2、またはSKO-3の連続希釈物とともにインキュベーションする。細胞結合をフローサイトメトリーによって評価し、見かけの結合親和性を各分子について決定する。対照細胞は、二次抗体のみとインキュベーションする。SKO-2については測定可能な細胞結合が観察されず、これは、H3に媒介されるErbB3に対する低親和性の結合しか保持しておらず、ErbB2結合活性が欠如している。SKO-3は、機能性かつ高親和性のErbB2結合B1D2 scFvを保持するが、ErbB3に結合する能力は欠如しており、6.7 nMのK_Dを有していた。B2B3-1は0.2 nMのK_Dで細胞に結合した。このことは、該分子の二重特異性設計に媒介される結合の増大を示している（図14）。

【０１８９】

実施例15

100nMのB2B3-1を、ヒト、カニクイザル、またはマウスの血清中で120時間にわたり37℃でインキュベーションすることによって、生理学的条件下でのB2B3-1の安定性を評価する。試料を0、24、48、72、96、および120時間目に取り出して、B2B3-1がErbB2およびErbB3の両方に結合する能力をELISAによって測定する。このELISAは、組み換えErbB2細胞外ドメインで96ウェルプレートを一晩被覆する工程、引き続くブロッキング工程、およびその後のB2B3-1の連続希釈物とのインキュベーションを伴う。次いで、プレートをFc-ErbB3細胞外ドメイン融合タンパク質と共に、続いてヤギ抗ヒトFc-HRPコンジュゲートと共に、インキュベーションする。スーパーシグナル化学発光基質の添加によって、プレートを現像する。図15A~Cは、B2B3-1が、3つの種全てに由来する血清において生理学的条件下で安定であり続け、測定した全ての時点でErbB2およびErbB3の両方に結合できる同等の能力を維持していることを示している。

【０１９０】

実施例16：BT-474-Mヒト乳癌インビボ異種移植モデルにおけるB2B3-1の用量応答

ヒトBT-474-M異種移植片を保有しているヌードマウスを用いて、インビボでのB2B3-1の効果を評価する。1群あたり10匹のマウスを、0.3、1、3、10、30、または90mg/kgのB2B3-1で12回、3日毎に処理する。対照群には、90mg/kgのB2B3-1用量と等モル用量のPBSビヒクルまたはHSAを投与する。全ての用量を腹腔内（i.p.）投与する。腫瘍の大きさを週2回測定して、相当する腫瘍容積を算出する。B2B3-1処理は、対照群と比較してBT-474-M腫瘍の大きさを有意に低下させることが、結果により示される（図16）。最低用量のB2B3-1（0.1mg/kg）で処理されたマウス以外のB2B3-1処理群の各々で、完全退縮が観察された。

【０１９１】

実施例17

図17A~図17Eで示されるとおり、B2B3-1は複数の異種移植モデルにおいて、腫瘍の大きさをErbB2依存的様式で低下させる。B2B3-1は、ErbB2をレセプター>1× 10^5個/細胞で発現しているCalu-3（図17A）、SKOV-3（図17B）、NCI-N87（図17C）、およびMDA-MB-361（図17E）の異種移植モデルでは有効であったが、4.5× 10^4個/細胞のErbB2レセプターを発現するACHN（図17D）異種移植モデルではそれほど作用しなかった。マウスは、30mg/kgのB2B3-1で3日毎に処理した。

【０１９２】

実施例18

ErbB2の過剰発現によって、B2B3-1不応答のADRr乳癌異種移植モデルがB2B3-1に対する応答モデルに変換される（図18Aおよび18B）。ErbB2は、レトロウイルス発現系を用いてADRr乳癌細胞で過剰発現する。高レベルのErbB2を発現しているトランスフェクト細胞（ADRr-E2）をFACSを用いて選択し、続いてヌードマウス中に皮下注射して、異種移植腫瘍を樹立する。マウスは、30mg/kgのB2B3-1で3日毎に処理する。野性型ADRr異種移植片（図18A）ではB2B3-1に対する応答は観察されなかったが、ADRr-E2異種移植片（図18B）はB2B3-1に応答した。

【０１９３】

実施例19

図19A～Bに示すように、B2B3-1活性は、インビトロ（図19A）およびインビボ（図19B）においてErbB2発現レベルと正に相関する。B2B3-1によるErbB3リン酸化の阻害を、ErbB2発現レベルがレセプター5× 10^4個/細胞～レセプター2.4× 10^6個/細胞の範囲である9種類の腫瘍細胞株において、ELISAアッセイを用いて判定する。B2B3-1がErbB3リン酸化を基底レベル（%pErbB3阻害）まで阻害する能力の程度は、ErbB2発現レベルと正に相関していることが見出された。同様に、低～高レベルのErbB2を発現している10種類の異種移植モデルにおいてB2B3-1活性を評価する。異種移植片応答は同じく、ErbB2発現レベルと正に相関していた。

【０１９４】

実施例20

BT474-M3乳房腫瘍細胞のB2B3-1処理によって、核に対する$p27^{kip1}$の転位が生じる（図20A）。BT474-M3細胞を1μMのB2B3-1で6時間処理する。$p27^{kip1}$の細胞内位置を、免疫蛍光技術を用いて評価する。B2B3-1で処理した細胞において、$p27^{kip1}$は核へと転位し、これは細胞増殖の阻害をもたらすことが示されている。$p27^{kip1}$は処理なしの細胞の細胞質内に残存した。

【０１９５】

細胞周期に対するB2B3-1の効果をさらに調査するため、B2B3-1で72時間処理したBT-474-M3細胞を、ウエスタンブロット分析を用いて細胞周期調節因子サイクリンD1についてプローブする（図20B）。この実験におけるタンパク質ローディング対照として、細胞骨格タンパク質であるビンクリンを用いる。B2B3-1処理によって、処理なしの細胞と比較してサイクリンD1のレベルの低下が生じた。

【０１９６】

実施例21

図21A～Bに示すように、BT474-M3乳房腫瘍異種移植片のB2B3-1処理によって核への$p27^{kip1}$の転位が起こる。BT474乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図21A）、または等モル用量のHSA（図21B）で3日毎に計4回処理する。HSA対照腫瘍と比較して、B2B3-1処理した腫瘍において$p27^{kip1}$に関する核染色の増大が観察され、このことはインビボにおけるB2B3-1の抗増殖効果を示した。

【０１９７】

実施例22

B2B3-1処理によって、BT474乳癌異種移植腫瘍における増殖マーカーKi67の減少がもたらされる。BT474-M3乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図22A）または等モル用量のHSA（図22B）で3日毎に計4回処理する。その後のKi67に対する腫瘍切片の染色により、HSA処理腫瘍と比較して、B2B3-1処理腫瘍に関する発現パターンの低下が実証された。

【０１９８】

実施例23

CD31発現に関するアッセイによって判定されるように（図23A～図23B）、B2B3-1処理は、BT474-M3乳癌異種移植腫瘍において血管密度の低下をもたらす。BT474乳房腫瘍異種移植片を、用量30mg/kgのB2B3-1（図23A）または等モル用量のHSA（図23B）で、3日毎に計4回処理する。腫瘍を、血管マーカーCD31の存在について染色する。B2B3-1で処理した腫瘍は、HSAで処理した対照腫瘍と比較して、血管密度の顕著な低下を示す。

【０１９９】

実施例24：B2B3-1は、インビボにおけるErbB3のリン酸化を阻害する

BT-474-M3異種移植腫瘍を30mg/kgのB2B3-1または17.5 mg/kgのHSAで、3日毎に計4回処理して、最後の投与から24時間後に腫瘍を回収する。腫瘍を溶解し、SDS-PAGE、続いてウエスタン分析に供して、B2B3-1の標的であるErbB3のリン酸化の相対レベルを評価する。等量のタンパク質を各レーンにロードし、βチューブリンについてプローブすることによって総タンパク質レベルを制御する。リン酸化ErbB3に特異的な抗体を用いるウエスタン

ブロット分析によって、B2B3-1処理腫瘍が含むpErbB3は、HSA処理腫瘍よりも少ないことが示される（図24A）。ウエスタンブロット分析の濃度測定と、その後の、βチューブリン積分バンド強度平均値に対するpErbB3積分バンド強度平均値の正規化によって、B2B3-1処理腫瘍が含むpErbB3は対照のHSA処理腫瘍よりも有意に少ないことが、実証された（図24B）。これらのデータによって、B2B3-1はインビボにおいてその標的ErbB3のリン酸化を阻害することが確認された。

【０２００】

実施例25：PTEN活性が減少したBT-474-MB異種移植片におけるB2B3-1のインビボ活性

BT-474-MB乳癌細胞において腫瘍サプレッサー遺伝子であるホスファターゼ・テンシンホモログ（PTEN）の活性をノックアウトするために、shRNA技術を適用する。簡潔に言うと、レトロウイルストランスフェクションによって、shPTENまたはshControl RNAでBT-474-MB培養細胞をトランスフェクトする。PTENが減少したトランスフェクト細胞を、FACSを用いて選択し、続いてヌードマウスの右側腹部に皮下注射して異種移植腫瘍を樹立する。対照ベクターでトランスフェクトした細胞を、同じマウスの左側腹部に注射する。30mg/kgのB2B3-1で3日毎に、または10mg/kgのトラスツズマブで毎週、マウスを処理する。B2B3-1と等モル用量のHSAを対照として注射する。全て、腹腔内（i.p.）注射とする。

【０２０１】

B2B3-1およびトラスツズマブは、対照のBT-474-MB乳癌細胞によって形成された腫瘍の大きさの低下を促進させた（図25A）一方、B2B3-1のみ（かつトラスツズマブなし）は、PTENの発現を欠くBT-474-MBヒト乳癌細胞によって形成された腫瘍の大きさの低下を促進させた（図25B）。

【０２０２】

実施例26：B2B3-1は、PTEN活性が減少しているBT-474-MB乳癌細胞におけるErbB3シグナル伝達を阻害する

腫瘍異種移植片でシグナル伝達するErbB3のリン酸化をB2B3-1が阻害する能力を、上述のPTEN欠損BT-474-MBモデルを用いて調査する。操作された細胞株または対照細胞株の異種移植腫瘍を、30mg/kgのB2B3-1、17.5mg/kgのHSAで3日毎に、または10mg/kgのトラスツズマブで毎週処理して、腫瘍を最終回の24時間後に回収する。腫瘍を溶解し、SDS-PAGEに続いてウエスタン分析に供し、B2B3-1の標的であるErbB3、AKTのリン酸化の相対レベル、および総PTENレベルを評価する。等量のタンパク質を各レーンにロードし、PCNAについてプローブすることによって総タンパク質レベルを制御する。リン酸化ErbB3特異的な抗体を用いるウエスタンブロット分析によって、B2B3-1処理腫瘍が含むpAKTは、HSA処理腫瘍やハーセプチン処理腫瘍よりも少ないことが示される（図26A）。ウエスタンブロット分析の濃度測定と、その後の、PCNA積分バンド強度平均値に対するpAKT積分バンド強度平均値の正規化によって、B2B3-1処理腫瘍が含むpAKTは、対照のHSA処理腫瘍およびハーセプチン処理腫瘍よりも有意に少ないことが実証された（図26B）。

【０２０３】

実施例27

B2B3-1の薬物動態学的パラメーターをnu/nuマウスで調べる。動物を無作為にグループ分けし、単一用量5、15、30、または45mg/kgのB2B3-1を静脈内（IV）投与する（それぞれ、図27A～図27D）。投与前、ならびに投与から0.5、4、8、24、48、72、および120時間後に、採血する。各時点について3匹のマウスを用いる。B2B3-1の血清レベルを、2つのELISA方法を用いて測定する。第一の方法は、ErbB2およびErbB3の両方に対するB2B3-1の機能的な結合を要するが、第二の方法は、血清中のB2B3-1のHSA成分しか測定しない。HSAのELISAは、ポリクローナル抗HSA捕捉抗体およびHRP結合ポリクローナル抗HSA検出抗体を利用する。HSA法に対してErbB2/ErbB3結合法を用いて測定したB2B3-1血清濃度が低下していることは、機能性B2B3-1の損失を示しうる。図27A～Dは、いずれのELISA法を用いて評価した場合にもB2B3-1の薬物動態特性が同等であることを示しており、これは、B2B3-1がマウスの循環中で安定であることを示している。

【０２０４】

実施例28

B2B3-1血清濃度は、2コンパートメントの双指数関数モデルを用いてあてはめられ、二相性の配置を示す。5、15、30、または45mg/kg用量に対して、終末半減期はそれぞれ17、16、23、および18時間と算出され、これを表4に示す。B2B3-1用量の増加によって、曝露の直線的な増大がもたらされた（図28）。

【０２０５】

（表４）マウスおよびカニクイザルにおけるB2B3-1の薬物動態特性

用量 (mg/kg)	種	N	T½β (hr)	AUC (hr-μg/ml)	クリアランス (ml/hr/kg)
5	マウス（単回投与）	3	16.9	1.58E+03	3.19
15	マウス（単回投与）	3	16.2	6.10E+03	2.47
30	マウス（単回投与）	3	22.6	1.18E+04	2.54
45	マウス（単回投与）	3	17.5	1.84E+04	2.46
4	カニクイザル（初回投与）	2	39.1	3.44E+03	1.17
4	カニクイザル（4回目の投与）	2	44.9	7.20E+03	0.60
20	カニクイザル（初回投与）	2	33.1	2.29E+04	0.88
20	カニクイザル（4回目の投与）	2	122.5	8.20E+04	0.25
200	カニクイザル（初回投与）	4	68.8	3.18E+05	0.64
200	カニクイザル（4回目の投与）	2	69.7	5.72E+05	0.35
200	カニクイザル（4回目の投与）*	2	66.6	5.99E+05	0.34

* 回復した動物

【０２０６】

実施例29

薬物動態分析のための血液試料は、雌性カニクイザルにおける用量範囲決定用の毒性試験からも得る。この試験では、動物に4、20、または200mg/kgのB2B3-1を3日毎に4回、注入投与する。サンプリングは、投与前濃度およびピーク/トラフ濃度を得るために、各投与日（試験1日目、4日目、7日目、および10日目）における投与の前および5分後に、ならびに、1日目の初回注入から1、2、4、8、24、および48時間後と、10日目の最終注入から1、2、4、8、24、48、72、および120時間後とに行った。200mg/kgを投与した動物の回復に関しては、最終注入から168、336、および456時間後にも血清試料を採取する。

【０２０７】

カニクイザルの血清試料は、上述のErbB2/ErbB3 ELISA法を用いて分析する。各用量に対する経時的な血清濃度は図29に示す。1日目および10日目の投与後の血清中B2B3-1の平均濃度-時間のプロフィールは、一般に時間とともにCmaxから下落する濃度と質的に類似していたことが、この分析によって示される。推定の半減期平均値は、1日目に38.3～67.2時間の範囲であり、10日目に45.0～121.0時間の範囲であった（表4）。

【０２０８】

実施例30

B2B3-1二重特異性scFv抗体融合タンパク質をコードするプラスミドは、固有のヒト抗ErbB3 scFv（「H3」と命名される）、ヒト抗ErbB2 scFv（「B1D2」と命名される）、および改変されたヒト血清アルブミン（HSA）リンカーの遺伝子配列を組み合わせて作製される。抗ErbB3 scFvであるH3は、接続用ペプチド（Ala-Ala-Ser）を介してHSAリンカーのアミノ末端に組み換え的に連結され、抗ErbB2 scFvであるB1D2は接続用ペプチド（Ala-Ala-Ala-Leu；SEQ ID NO: 5）を介してHSAリンカーのカルボキシ末端に遺伝子的に連結される。ペプチドコネクターは、哺乳動物の発現ベクター構築の際に制限部位を導入することによって形成され、単鎖抗体断片およびHSAリンカーと一緒に哺乳動物で発現するのに適したコドン使用頻度で合成される。

【０２０９】

B1D2 scFvは、非免疫ファージディスプレイライブラリーから選択されたErbB2結合scFv C6.5の突然変異誘発によって作成した、コンビナトリアルファージディスプレイライブラリーから選択される。H3 scFvは、元はSheetsらにより作製された非免疫ファージディスプレイライブラリーから選択される。B1D2およびH3の単鎖抗体断片をコードする遺伝子配列を、CHO細胞コドン選択について最適化し、B2B3-1をコードするプラスミドのその後の構築のために合成する。

【０２１０】

修飾HSAリンカーは2つのアミノ酸置換を含む。34位のシステイン残基を、この部位での酸化に起因する潜在的なタンパク質不均一性を低下させるために、セリンに変異させる。アミノ酸503のアスパラギン残基を、野性型HSAにおいては脱アミノ反応に対して感受性でありかつ薬理学的半減期の低下を生じ得る、グルタミンに変異させる。

【０２１１】

修飾HSAリンカーをコードする遺伝子配列を、B2B3-1をコードするプラスミドを続いて構築するために哺乳動物での発現に適したコドン使用頻度で合成する。

【０２１２】

実施例31

標準的な分子生物学的技術を用いてB2B3-1コード配列をpMP10kベースのベクター中にクローニングし、図30に示されるプラスミドpMP10k4H3-mHSA-B1D2を作製する。この構築物は大部分が、一般に用いられる遺伝子エレメントを使用している。B2B3-1発現は、ヒトGAPDプロモーターによって駆動される。このベクターは、マトリックス付着領域またはMARエレメントと呼ばれる遺伝子エレメントを利用している。MAR遺伝子レエレメントは、クロマチンの動的な機構を制御し、隣接する遺伝子を周囲のクロマチンの影響から遮断することによって、遺伝子のコピー数依存性、位置独立性、発現を増大させる。MARエレメントは、組み換えタンパク質の産生に関して所望のレベルの発現を呈しているクローンの単離確率を向上させ、かつ産生の安定性を増大させることが示されている。B2B3-1構築物で用いられるMARエレメントは非コードヒトMARエレメントである。B2B3-1プラスミドに加えて、ネオマイシン抗生物質耐性プラスミド（図31）およびハイグロマイシン耐性プラスミド（図32）も、安定な形質転換体を選択するために用いられる。

【０２１３】

実施例32：初回の遺伝子トランスフェクション

チャイニーズハムスター卵巣CHO-K1細胞は、ATCC（ATCC # CCL-61）から購入する。CHO-K1細胞株は、T. T. Puckが作製した、親CHO細胞株の血清依存的かつプロリン依存的な接着性サブクローンである。B2B3-1トランスフェクションに用いるCHO-K1細胞は、トランスフェクションの前に無血清培地での懸濁増殖について予め適合させる。B2B3-1細胞株を発生させるために、反復トランスフェクション手順を用いる。トランスフェクションの24時間前に、CHO-K1細胞を、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、および0.016mMのチミジンを補充したSFM4CHO（無血清）培地（HyClone, Logan, UT）中で、細胞1.0×10^6個/mLまで事前継代（sub passage）する。トランスフェクション当日、細胞をOpti MEM培地（Invitrogen Corp, Carlsbad, CA）中に再懸濁し、細胞40,000個を24ウェル

プレートの各ウェル中に入れる。最初のトランスフェクションでは、B2B3-1発現プラスミド（pMP10k4H3-mHSA-B1D2）およびネオマイシン耐性プラスミド（図30；pSV2-neo（Selexis, Inc., Marlborough, MA）を、プラスミドモル比75：1（B2B3-1：ネオマイシン耐性）で一緒に混合する。該プラスミド混合物を次に、陽イオン性脂質トランスフェクション試薬（Lipofectamine LTX, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA）と混合し、30分間にわたり脂質/DNA複合体を形成させる。その後、該DNA/脂質複合体をCHO-K1細胞に添加して、24ウェルプレートを37℃、5% CO_2 のインキュベーター内に入れる。

【０２１４】

実施例33：高産生株の選択およびスクリーニング

各トランスフェクションウェルの内容物をPBSで洗浄し、トリプシン処理して、2つの96ウェルプレートに分配する。用いる増殖培地は、10%FBS（Invitrogen Corp, Carlsbad, CA）および500mg/Lのジェネティシン（G418；Invitrogen Corp, Carlsbad, CA）を含むDMEM/F12（Invitrogen Corp, Carlsbad, CA）からなる。96ウェルプレート中の培地を、4日目に、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、0.016mMのチミジン、および500mg/Lのジェネティシンを補充したSFM4CHO培地に交換する。選択培地中でさらに2週間培養した後、生存細胞は明確なコロニーを形成している。該クローンを、定量用スポットブロット技術を用いて評価する。産生性最大のコロニーをトリプシン処理して、24ウェルプレートの単一ウェルに広げる。

【０２１５】

B2B3-1高産生性コロニーをスクリーニングするために、7日間の生産性分析を用いる。広げた後に、24ウェルプレート中の細胞を、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、および0.016mMのチミジンを補充したSFM4CHO培地中で7日間にわたり増殖させる。使用した培地中のB2B3-1濃度を測定する。24ウェル規模で最高のクローンを125mLのバッフル付き振とうフラスコ中に広げる。振とうフラスコにおける、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、および0.016mMのチミジンを補充したSFM4CHO培地中での7日間の試験を用いて、細胞プールを増殖およびB2B3-1産生についてスクリーニングする。

【０２１６】

実施例34：2回目の遺伝子トランスフェクション

初回のトランスフェクション（前記）から決定された産生性最大の細胞プールを、産生を増大させるために2回目のトランスフェクションに供する。トランスフェクションの24時間前、細胞プールを、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、および0.016mMのチミジンを補充したSFM4CHO（無血清）培地中で細胞1.0× 10^6 個/mLまで事前継代する。トランスフェクション当日、細胞をOptiMEM培地（Invitrogen Corp, Carlsbad, CA）中に再懸濁し、細胞40,000個を24ウェルプレートの各ウェル中に再度入れる。最初のトランスフェクションでは、B2B3-1およびハイグロマイシン耐性プラスミド（図32；pTK-Hyg（Clontech, Mountain View, CA））を50：1（B2B3-1：ハイグロマイシン耐性）というプラスミドモル比で一緒に混合する。該プラスミド混合物を次に、陽イオン性脂質トランスフェクション試薬（Lipofectamine LTX, Invitrogen Corp）と混合し、30分間にわたり脂質/DNA複合体を形成させる。その後、該DNA/脂質複合体を前記細胞プールに添加して、24ウェルプレートを37℃、5% CO_2 のインキュベーター内に配置する。

【０２１７】

実施例35：2回目のトランスフェクションからの高産生株の選択およびスクリーニング

各トランスフェクションウェルの内容物をPBSで洗浄し、トリプシン処理して、2つの96ウェルプレートに分配する。用いる増殖培地は、10%のFBSおよび400mg/Lのハイグロマイシン B（Invitrogen Corp）を補充したDMEM/F12からなる。96ウェルプレート中の培地を、4日目に、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、0.016mMのチミジン、および400 mg/Lのハイグロマイシン Bを補充したHyclone SFM4CHO培地に交換する。さらに2週間の選択の後、生存細胞は明確なコロニーを形成している。該クローンを、定量用スポットブロット技術を用いて評価する。産生性最大のコロニーをトリプシン処理して、24

ウェルプレートの単一ウェルに広げる。

【０２１８】

B2B3-1高産生性コロニーをスクリーニングするために、7日間の生産性分析を用いる。

【０２１９】

広げた後に、細胞を7日間にわたり増殖させ、使用した培地中のB2B3-1濃度を測定する。

【０２２０】

24ウェルプレートからの最高クローンを、125mLのバッフル付き振とうフラスコ内の、8mMのL-グルタミン、0.1mMのヒポキサンチンナトリウム、および0.016mMのチミジンを補充したHyclone SFM4CHO培地中に広げる。振とうフラスコにおける7日間の試験を用いて、増殖およびB2B3-1産生性について細胞プールをスクリーニングする。使用した培地を、Protein AresinおよびHPLC装置を用いて定量する。

【０２２１】

実施例36：限界希釈クローニング

前記産生分析によって特定される、増殖性が最高でB2B3-1産生性が最大であるコロニーを、125mLの振とうフラスコから移して、5つの96ウェルプレート中に、細胞1個/ウェルとなるよう算出した細胞濃度でプレーティングする。96ウェルプレートを37℃かつ5% CO_2 のインキュベーター内に配置する。ウェルを週2回試験して、コロニーの形成を追跡する。単一細胞から生じるコロニーを、該コロニーの対称形状に基づいて特定する。そのようなコロニーを含むウェルを、24ウェルでの7日間の評価、および125mL振とうスラスコでの7日間の評価による、さらなるスクリーニングのために選び出す。

【０２２２】

2回目の限界希釈クローニングは、1回目と同様の様式で行う。クローンの選択を確認するために、さらに100mLの流加培養による評価を行う。播種前バンク（pre-seed bank）を凍結保存する。

【０２２３】

実施例37：B2B3-1の製剤化

B2B3-1は、患者の耐容度に応じて、60分間または90分間にわたる点滴静注によって週1回投与される。B2B3-1は、患者（例えば、ヒト）への投与用に、20mMのL-ヒスチジン塩酸塩、150mMの塩化ナトリウム、pH6.5の滅菌溶液中に25mg/mLの濃度で処方される。

【０２２４】

実施例38：乳癌の治療

患者の癌が、ErbB2（HER2/neu）を含む上皮細胞成長因子レセプターを高レベルで発現していると考えられる場合、ErbB2結合部分と結合したHSAリンカー、例えばB2B3-1、B2B3-2、v-3、B2B3-4、B2B3-5、B2B3-6、B2B3-7、B2B3-8、B2B3-9、またはB3B3-10（後述の表6を参照のこと）による治療が適応であり得る。癌生検の遺伝型スクリーニングまたは組織学的スクリーニングによって患者腫瘍におけるErbB2高発現が明らかになる場合も該当しうる。

【０２２５】

乳癌と診断された患者に、患者の耐容度に応じて例えば60分間または90分間にわたる点滴静注を介して、B2B3 HSAリンカーコンジュゲート（例えばB2B3-1、SEQ ID NO: 16）を30mg/kg以下の用量で週1回または週2回投与する。B2B3 HSAリンカーコンジュゲートは、該患者への投与用に20mM L-ヒスチジン塩酸塩、150mMの塩化ナトリウム、pH6.5の滅菌溶液中に25mg/mLの濃度で処方される。B2B3 HSAリンカーコンジュゲートの投与を監督する臨床医は、一般的な処方および投与の慣例に従って患者の適切な治療経過を判定する。

【０２２６】

臨床医は、B2B3 HSAリンカーコンジュゲートと共に1つまたは複数の療法をさらに同時に施してもよい。例えばドキソルビシン、シクロホスファミド、およびパクリタキセルを含む乳癌治療用の一般的な化学療法レジメンなどの1つまたは複数の治療薬または化合物を、B2B3 HSAリンカーコンジュゲートと組み合わせて投与してもよい。あるいは、臨床医

は、B2B3 HSAリンカーコンジュゲートを、乳癌患者を治療するための外科的療法または放射線療法と組み合わせて投与することができる。

【０２２７】

実施例39：卵巣癌の治療

患者の癌がErbB2（HER2/neu）を含む上皮細胞成長因子レセプターを高レベルで発現していると考えられる場合、ErbB2結合部分と結合させたHSAリンカー、例えばB2B3-1、B2B3-2、v-3、B2B3-4、B2B3-5、B2B3-6、B2B3-7、B2B3-8、B2B3-9、またはB3B3-10（後述の表6を参照のこと）による治療が適応であり得る。癌生検の遺伝型スクリーニングまたは組織学的スクリーニングによって患者腫瘍におけるErbB2高発現が明らかになる場合も該当しうる。

【０２２８】

B2B3 HSAリンカーコンジュゲート（例えばB2B3-1、SEQ ID NO: 16）を、卵巣癌と診断された患者に、単独で、または前述の実施例で本質的に述べた通りの1つもしくは複数のその他の療法と組み合わせて、投与する。

【０２２９】

実施例40：さらなるHSAリンカーコンジュゲート

HSAリンカーコンジュゲートは、後述の表5で列挙する1つまたは複数のエレメント（グループA~E）を用いて構築される。特に、後述の表5でグループCとして示されるHSAリンカーコンジュゲートは、表5に示されるグループAおよびEから選択される1つまたは複数の結合部分を組み込んでいる。さらに、HSAリンカーコンジュゲートはまた、表5のグループBおよびDから選択される1つまたは複数のペプチドコネクターを、HSAリンカーのアミノ末端およびカルボキシ末端の各々に含んでもよい。ペプチドコネクターは、コネクター配列の長さを増大または減少させるために、繰り返されてもよいし短縮されてもよい。

【０２３０】

実施例41：インビボにおいてq7dで投与したB2B3-1は、q3dで投与したB2B3-1と同等の効果を示す

q7d（7日毎に1回）投与レジメンを使用したB2B3-1の効果を、ヒト乳癌細胞株BT-474-MBの異種移植腫瘍を有する、Charles River Labsより入手した5~6週齢の雌性無胸腺ヌードマウス（nu/nu）において測定する（図33）。PBS中のヒトBT-474-MB細胞20× 10^6個を注射する24時間前に、マウスの反対側腹部にエストロゲン放出インプラントを皮下移植する（0.72 mgペレット、60日、遅延放出、Innovative Research of America, Sarasota, FL）。腫瘍増殖（腫瘍容積約400 mm^3）が確認されたら投与を開始し、試験全体にわたって30 mg/kgを3日毎に1回（q3d）、あるいは、22 mg/kg、66 mg/kg、132 mg/kg、または198 mg/kgを7日毎に1回、1群あたり10匹のマウスに腹腔内注射によりB2B3-1を投与する。デジタル式キャリパーを用いて、1週間に2回、腫瘍を計測する。腫瘍容積は下記式を用いて算出する：$\pi/6 \times (W^2 \times L)$、式中、Wは短径であり、Lは長径である。異種移植腫瘍に対して、66 mg/kgのq7d投与によって与えられるB2B3-1の曝露は、30 mg/kgのq3d投与と類似していることが、薬物動態の算出によって示唆される。PBSビヒクルを陰性対照として用いる。B2B3-1の効果は、B2B3-1の30 mg/kg、q3d投与および高い順に3種類の用量のq7d投与について同等であった。このことは、B2B3-1に関するq7d投与スケジュールが本モデルに適していることを示す。

【０２３１】

実施例42：B2B3-1およびトラスツズマブは異なるErbB3阻害機序を有する

B2B3-1がヘレグリン誘導性ErbB3活性を阻害する能力を、ウエスタンブロット解析を用いて試験する。血清飢餓させたBT-474-MB細胞の単層を100 nM B2B3-1またはトラスツズマブで24時間処理した後、5 nM HRG 1β EGFで10分間刺激する。細胞は、10nMおよび100 nMのB2B3-1または10nMおよび100 nMのトラスツズマブでも処理し、刺激せずに放置する。溶解物を、ErbB3、pErbB3、AKT、およびpAKTに対する免疫ブロット解析に供する。B2B3-1処理はリガンド依存的様式でpErbB3およびpAKTの阻害をもたらすことがウエスタンブロット解析（図34）によって実証されたが、一方、トラスツズマブによるpErbB3およびpAKTの阻

害はリガンド非存在下でしか認められなかった。

【０２３２】

実施例43：B2B3-1はインビトロにおいてトラスツズマブと共に投与された場合に相加効果を有する

4種類の異なる乳癌細胞株を用いて、B2B3-1、トラスツズマブ、および両薬物の組み合わせが癌細胞スフェロイドの増殖に与える効果を調べた。ヒト乳癌細胞BT-474-MB、SKBR3（ATCC）、またはMDA-MB-361（ATCC）2,000個を低接着性の丸底96ウェルプレート（Corning（登録商標） 96 Well Clear Round Bottom Ultra Low Attachment Microplate - Product #7007）に播種し、翌日、スフェロイドを計測して、ある用量範囲のB2B3-1、トラスツズマブ、または、トラスツズマブに対してB2B3-1が3倍モル過剰である両者の組み合わせで処理した。増殖の12日後、スフェロイドの表面積を計測し、処理なしの細胞と比較した。図35A～Cで認められるように、ある濃度範囲にわたるB2B3-1とトラスツズマブの組み合わせは、最低濃度を除く全ての薬物濃度で試験した全細胞株において、単一の剤を上回るスフェロイド増殖阻害をもたらした。またこれらの結果は、ErbB2（HER2）への結合に関してB2B3-1がトラスツズマブとは競合しないことも示す。

【０２３３】

実施例44：B2B3-1はインビボにおいてトラスツズマブと共に投与された場合に相加効果を有する

トラスツズマブと同時投与された場合のB2B3-1のインビボにおける効果を、Charles River Labsより入手した5～6週齢の雌性無胸腺ヌードマウス（nu/nu）において、BT-474-MB異種移植モデルを用いて調べる。PBS中のヒトBT-474-MB細胞20× 10^6個を注射する24時間前に、マウスの反対側腹部にエストロゲン放出インプラントを皮下移植する（0.72 mgペレット、60日、遅延放出、Innovative Research of America, Sarasota, FL）。腫瘍増殖（腫瘍容積約400 mm^3）が確認されたら投与を開始する。デジタル式キャリパーを用いて、1週間に2回、腫瘍を計測する。腫瘍容積は下記式を用いて算出する：$\pi/6 \times (W^2 \times L)$、式中、Wは短径であり、Lは長径である。1群あたり10匹のマウスに、B2B3-1を3 mg/kgまたは10 mg/kgでq3d投与するか、トラスツズマブを1 mg/kgまたは0.1 mg/kgでq7d投与するか、あるいは両薬物の組み合わせを、試験全体にわたって腹腔内注射により投与する。B2B3-1とトラスツズマブの組み合わせ（10 mg/kg B2B3-1 + 1 mg/kgトラスツズマブ、10 mg/kg B2B3-1 + 0.1 mg/kgトラスツズマブ、3 mg/kg B2B3-1 + 1 mg/kgトラスツズマブ、3 mg/kg B2B3-1 + 0.1 mg/kgトラスツズマブ）は全て、対応する単一の剤と同様に投与する。

【０２３４】

図36に示すように、全組み合わせに関して、単一の剤よりも実質的に大きな効果が認められ、かつ、10 mg/kg B2B3-1と両用量のトラスツズマブ、および3 mg/kg B2B3-1と1 mg/kgトラスツズマブを投与した組み合わせ群に関しては、少なくとも早くも20日目以降には有意な効果が観察された。10 mg/kg B2B3-1 + 1 mg/kgトラスツズマブの組み合わせ群においてマウス10匹中5匹で腫瘍の完全な退縮が生じたが、これに対し、組み合わせと同用量で単一の剤を投与された群では10匹中0匹であった。3 mg/kg B2B3-1 + 1 mg/kgトラスツズマブの組み合わせ群においてはマウス10匹中7匹で腫瘍の完全な退縮が生じたが、これに対し、組み合わせと同用量で単一の剤を投与された群では10匹中0匹であった。これらの結果は、ErbB2（HER2）への結合に関してB2B3-1がトラスツズマブとは競合しないことを示す。またこれらの結果は、少なくとも3 mg/kgのB2B3-1と少なくとも0.1 mg/kgのトラスツズマブの組み合わせによる処理が、3 mg/kgもしくは10 mg/kgのB2B3-1単独または0.1 mg/kgもしくは1 mg/kgのトラスツズマブ単独による処理より有効であることも、実証している。特に、少なくとも3 mg/kgのB2B3-1と1 mg/kgのトラスツズマブの組み合わせは、ヒト乳房腫瘍細胞異種移植片を有するヌードマウスの少なくとも約50%において本質的に完全な腫瘍退縮を誘導するが、同じ濃度のB2B3-1またはトラスツズマブのどちらか単独では、同マウスの10%においてさえも完全な退縮をもたらさない。

【０２３５】

上述のHSAリンカー、ペプチドコネクター、および結合部分の特定の態様もさらに提供される。後述の表6は、HSAリンカーのアミノ末端およびカルボキシ末端に種々のErbB2特異的結合部分またはErbB3特異的結合部分ならびにペプチドコネクターを有する、10個のHSAリンカーコンジュゲートを列挙する。

【０２３６】

当業者は、本明細書に記載された具体的な態様についての多くの等価物を認識し、かつ、ルーチンの実験法のみを使用して確認および実行することができるであろう。そのような等価物は、添付の特許請求の範囲に含まれることが意図される。従属する請求項に開示された態様の任意の組み合わせは、当該開示の範囲内に含まれることが意図される。

【０２３７】

本明細書において言及される、米国および外国の特許および係属中の特許出願ならびに刊行物の各々および全ての開示は、その全文が参照により本明細書に組み入れられる。

【０２３８】

（表６）

HSAリンカーコンジュゲート	アミノ末端結合部分	N末端コネクター	HSA	C末端コネクター	カルボキシ末端結合部分
B2B3-1 (SEQ ID NO:16)	H3 (SEQ ID NO:26)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	B1D2 (SEQ ID NO:27)
B2B3-2 (SEQ ID NO:17)	A5 (SEQ ID NO:28)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	B1D2 (SEQ ID NO:27)
B2B3-3 (SEQ ID NO:18)	A5 (SEQ ID NO:28)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	F5B6H2 (SEQ ID NO:32)
B2B3-4 (SEQ ID NO:19)	A5 (SEQ ID NO:28)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	ML3.9 (SEQ ID NO:29)
B2B3-5 (SEQ ID NO:20)	B12 (SEQ ID NO:30)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	B1D2 (SEQ ID NO:27)
B2B3-6 (SEQ ID NO:21)	B12 (SEQ ID NO:30)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	F5B6H2 (SEQ ID NO:32)
B2B3-7 (SEQ ID NO:22)	F4 (SEQ ID NO:31)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	B1D2 (SEQ ID NO:27)
B2B3-8 (SEQ ID NO:23)	F4 (SEQ ID NO:31)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	F5B6H2 (SEQ ID NO:32)
B2B3-9 (SEQ ID NO:24)	H3 (SEQ ID NO:26)	AAS	HSA (SEQ ID NO:3)	AAAL (SEQ ID NO:5)	B1D2 (SEQ ID NO:27)
B2B3-10 (SEQ ID NO:25)	H3 (SEQ ID NO:26)	AAS	mHSA (SEQ ID NO:1)	AAAL (SEQ ID NO:5)	F5B6I12 (SEQ ID NO:32)

【０２３９】

付表A

配列、配列アノテーション、および配列アラインメント

SEQ ID NO:60

pMP9043

gtgccgacgatagagcagacctcgctaaatatatctgcgagaatcaggattccattagctctaagctgaaagaatgttgcgagaagccc
ctcctggaaaagagtcattgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgccagcagatctgccatcactcgctgccgactttgtggaat
ccaaagatgtctgcaagaattacgcagaggctaaagacgtgttcctggggatgtttctgtatgagtacgcccggcgtcaccccgattat
agcgtcgtgctcctgctccgactggcaaagacctacgaaacaactctggagaaatgttgcgctgccgcagaccctcatgaatgttatgc
taaggtgttcgatgagtttaagccactcgtcgaagagccccagaacctgattaaacagaattgcgaactgttcgagcagctcggtgaat
acaagtttcagaacgccctgctcgtgcgttataccaaaaaggtccctcaggtgtctacaccaactctggtggaggtcagtaggaatctg
ggcaaagtgggatcaaagtgttgcaaacacccccgaggcaaagagaatgccttgtgctgaagattacctctccgtcgtgctgaaccagc
tctgcgtgctgcatgaaaagacccccagtcagcgatcgggtgacaaaatgttgcaccgaatctctggtcaatcgccgaccctgtttcagt
gccctcgaagtggacgaaacttatgtgcctaaggagtttcaggctgaaacattcacctttcacgccgatatctgcactctgtccgagaaa
gaaaggcagattaagaaacagacagcactggtcgagctcgtgaagcataaaccaaaggctaccaaggagcagctgaaagccgtca
tggacgatttcgcagcttttgtggaaaagtgttgcaaagccgacgataaggagacttgtttcgcagaagaggggaaaaagctcgtggc
tgccagccaggcagctctgggtctggccgcagctctgcaggtgcagctcgtccagagcggcgctgaggtgaagaagccaggcgag
tccctgaagatctcctgtaagggctccggctacagcttcacctcctactggatcgcttgggtgaggcagatgccaggaaagggactgg
agtacatgggcctgatctaccctggcgactccgacaccaagtactccccatccttccagggccaggtgaccatcagcgtggacaagtc
cgtgtctaccgcctacctgcaatggtcctccctgaagccttctgactctgccgtgtacttttgtgcccggcacgatgtgggctactgcacc
gaccggacatgtgccaagtggcccgagtggctgggagtgtggggacagggaacactggtgacagtgagttctggcggtggcggct
cttccggcggtggctctggtggcggcggatctcagagcgtgctgacacagccacctagcgtgtccgctgccccctggccagaaggtg
acaatcagctgctccggcagctcttccaacatcggcaacaactacgtgtcttggtatcagcagctgcccggaacagctccaaaactgct
gatctatgaccacaccaatcggcctgccggcgtgccagatcggttctctggctctaagagcggcacctccgccagcctggctatctct
ggcttcagatctgaggatgaggctgactactattgtgcctcctgggactacaccctgtctggctgggtgttcggcggtggcaccaagct
gacagtcctgggatgatgactcgagtctagagggcccgtttaaacccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgt
tgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtct
gagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggg
gatgcggtgggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctctagggggtatccccacgcgccctgtagcggcgcatta
agcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcccttcctttt
ctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggtcccttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaa
aaaacttgattagggtgatggttcacgtacctagaagtttcctattccgaagttcctattctctagaaagtataggaacttccttggccaaaa
agcctgaactcaccgcgacgtctgtcgagaagtttctgatcgaaaagttcgacagcgtctccgacctgatgcagctctcggagggcga
agaatctcgtgctttcagcttcgatgtaggagggcgtggatatgtcctgcgggtaaatagctgcgccgatggtttctacaaagatcgttat
gtttatcggcactttgcatcggccgcgctcccgattccggaagtgcttgacattggggaattcagcgagagcctgacctattgcatctcc
cgccgtgcacagggtgtcacgttgcaagacctgcctgaaaccgaactgcccgctgttctgcagccggtcgcggaggccatggatgc
gatcgctgcggccgatcttagccagacgagcgggttcggcccattcggaccgcaaggaatcggtcaatacactacatggcgtgatttc
atatgcgcgattgctgatccccatgtgtatcactggcaaactgtgatggacgacaccgtcagtgcgtccgtcgcgcaggctctcgatga
gctgatgctttgggccgaggactgccccgaagtccggcacctcgtgcacgcggatttcggctccaacaatgtcctgacggacaatgg
ccgcataacagcggtcattgactggagcgaggcgatgttcggggattcccaatacgaggtcgccaacatcttcttctggaggccgtgg
ttggcttgtatggagcagcagacgcgctacttcgagcggaggcatccggagcttgcaggatcgccgcggctccgggcgtatatgctc
cgcattggtcttgaccaactctatcagagcttggttgacggcaatttcgatgatgcagcttgggcgcagggtcgatgcgacgcaatcgt
ccgatccggagccgggactgtcgggcgtacacaaatcgcccgcagaagcgcggccgtctggaccgatggctgtgtagaagtactc
gccgatagtggaaaccgacgccccagcactcgtccgagggcaaaggaatagcacgtactacgagatttcgattccaccgccgccttc
tatgaaaggttgggcttcggaatcgttttccgggacgccggctggatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagttcttcgccca
ccccaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagtt
gtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgtataccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcct
gtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagcta
actcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcgg
ggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatca

gctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaagg
ccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtca
gaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccg
cttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgt
tcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccgg
taagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaa
gtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtag
ctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaag
aagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatc
ttcacctagatcctttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcag
tgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttac
catctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagg
gccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagtt
aatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacg
atcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgc
agtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaacc
aagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttt
aaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgt
gcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaat
aagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacata
tttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatct
cccgatcccctatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatctgctccctgcttgtgtgttggaggtcgc
tgagtagtgcgcgagcaaaatttaagctacaacaaggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggttaggcgttttg
cgctgcttcgcgatgtacgggccagatatacgcgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcata
gcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaata
atgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtac
atcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttat
gggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatag
cggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaat
gtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactag
agaacccactgcttactggcttatcgaaattaatacgactcactatagggagacccaagcttctagaattcgctgtctgcgagggccagc
tgttggggtgagtactccctctcaaaagcgggcatgacttctgcgctaagattgtcagtttccaaaaacgaggaggatttgatattcacct
ggcccgcggtgatgcctttgagggtggccgcgtccatctggtcagaaaagacaatctttttgttgtcaagcttgaggtgtggcaggcttg
agatctggccatacacttgagtgacaatgacatccactttgcctttctctccacaggtgtccactcccaggtccaactgcagatatccagc
acagtggcggccgccaccatgggctggtctctgatcctgctgttcctggtggccgtggccacgcgtgtgctgtcccaggtgcagctgc
aggagtctggcggcggactggtgaagcctggcggctccctgcggctgtcctgcgccgcctccggcttcaccttctcctcctactggat
gtcctgggtgcggcaggccctggcaagggcctggagtgggtggccaacatcaaccgggacggctccgcctcctactacgtggact
ccgtgaagggccggttcaccatctcccgggacgacgccaagaactccctgtacctgcagatgaactccctgcgggccgaggacacc
gccgtgtactactgcgccagggaccggggcgtgggctacttcgacctgtggggcaggggcaccctggtgaccgtgtcctccgctag
tactggcggcggaggatctggcggaggagggagcgggggcggtggatcccagtccgccctgacccagcctgcctccgtgtccgg
ctcccctggccagtccatcaccatcagctgcaccggcacctcctccgacgtgggcggctacaacttcgtgtcctggtatcagcagcac
cccggcaaggcccctaagctgatgatctacgacgtgtccgaccggccttccggcgtgtccgacaggttctccggctccaagtccggc
aacaccgcctccctgatcatcagcgggctgcaggcagacgacgaggccgactactactgctcctcctacggctcctcctccacccac
gtgatctttggcggcggaacaaaggtgaccgtgctgggcgccgcctccgacgctcacaagagcgaagtggcacataggttcaaaga
tctgggcgaagagaactttaaggccctcgtcctgatcgctttcgcacagtacctccagcagtctccctttgaagatcacgtgaaactggt
caatgaggtgaccgaatttgccaagacatgcgtggctgatgagagtgcagaaaactgtgacaaatcactgcatactctctttggagata
agctgtgcaccgtcgccacactcagagagacttatggggaaatggctgactgttgcgcaaaacaggagcctgaacggaatgagtgttt
cctccagcacaaggatgacaacccaaatctgccccgcctcgtgcgacctgaggtcgatgtgatgtgcaccgcctttcatgacaacgaa
gagacattcctgaagaaatacctgtatgaaattgctcgtaggcacccatacttttatgccccgagctcctgttctttgcaaagagataca
aagctgccttcactgaatgttgccaggcagctgataaggccgcatgtctcctgcctaaactggacgagctccgggatgaaggtaaggc

10

20

30

40

ttccagcgccaaacagcgcctgaagtgcgcttctctccagaagtttggcgagcgagcattcaaagcctgggctgtggcccgtctcagt
cagaggtttccaaaggcagaatttgctgaggtctcaaaactggtgaccgacctcacaaaggtccatactgagtgttgccacggagatct
gctggaat

SEQ ID NO:67

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGDS
DTKYSPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARADVGYCTDRTCAKAP
AWLGVWGQGTLVTVSSGGGGSSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGS
SSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSED
EADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLGAASDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVL
IAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLR
ETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKK
YLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSA
KQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDL
LECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAAD
FVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAA
DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTP
TLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC
TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH
KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQ
VQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGDSD
TKYSPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDVGYCTDRTCAKWP
EWLGVWGQGTLVTVSSGGGGSSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSS
SNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDE
ADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLG

SEQ ID NO:68

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANINRDG
SASYYVDSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGVGYFDLWGR
GTLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGY
NFVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSDRPSGVSDRFSGSKSGNTASLIISGLQADDEADYY
CSSYGSSSTHVIFGGGTKVTVLGAASDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYL
QQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEM
ADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIA
RRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLK
CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECAD
DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK
DVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHE
CYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVE
VSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESL
VNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKA
TKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLV
QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGDSDTKYSP
SFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARADVGYCTDRTCAKAPAWLGV
WGQGTLVTVSSGGGGSSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGN
NYVSWYQQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYY
CASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLG

B2B3-1 (H3-mHSA-B1D2)

1 QVQLQESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS ***SYWMS***WVRQA PGKGLEWVA***N***

51 ***INRDGSASYY VDSVKG***RFTI SRDDAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR***DR***

101 ***GVGYFDLW***GR GTLVTVSSAS TGGGGSGGGG SGGGGSQSAL TQPASVSGSP

151 GQSITISC***TG TSSDVGGYNF VS***WYQQHPGK APKLMIY***DVS DRPS***GVSDRF

201 SGSKSGNTAS LIISGLQADD EADYYC***SSYG SSSTHVI***FGG GTKVTVLGAA

251 SDAHKSEVAH RFKDLGEENF KALVLIAFAQ YLQQSPFEDH VKLVNEVTEF

301 AKTCVADESA ENCDKSLHTL FGDKLCTVAT LRETYGEMAD CCAKQEPERN

351 ECFLQHKDDN PNLPRLVRPE VDVMCTAFHD NEETFLKKYL YEIARRHPYF

401 YAPELLFFAK RYKAAFTECC QAADKAACLL PKLDELRDEG KASSAKQRLK

451 CASLQKFGER AFKAWAVARL SQRFPKAEFA EVSKLVTDLT KVHTECCHGD

501 LLECADDRAD LAKYICENQD SISSKLKECC EKPLLEKSHC IAEVENDEMP

551 ADLPSLAADF VESKDVCKNY AEAKDVFLGM FLYEYARRHP DYSVVLLLRL

601 AKTYETTLEK CCAAADPHEC YAKVFDEFKP LVEEPQNLIK QNCELFEQLG

651 EYKFQNALLV RYTKKVPQVS TPTLVEVSRN LGKVGSKCCK HPEAKRMPCA

701 EDYLSVVLNQ LCVLHEKTPV SDRVTKCCTE SLVNRRPCFS ALEVDETYVP

751 KEFQAETFTF HADICTLSEK ERQIKKQTAL VELVKHKPKA TKEQLKAVMD

801 DFAAFVEKCC KADDKETCFA EEGKKLVAAS QAALGL***AAAL*** QVQLVQSGAE

851 VKKPGESLKI SCKGSGYSFT ***SYWIA***WVRQM PGKGLEYMG***L IYPGDSDTKY***

901 ***SPSFQG***QVTI SVDKSVSTAY LQWSSLKPSD SAVYFCAR***HD VGYCTDRTCA***

951 ***KWPEWLGV***WG QGTLVTVSSG GGGSSGGGSG GGGSQSVLTQ PPSVSAAPGQ

1001 KVTISC***SGSS SNIGNNYVS***W YQQLPGTAPK LLIY***DHTNRP A***GVPDRFSGS

1051 KSGTSASLAI SGFRSEDEAD YYC***ASWDYTL SGWV***FGGGTK LTVLG

CDRループを、H3（下線部1～248、CDRをイタリック太字体で示す）およびB1D2（下線部841～1095、CDRをイタリック太字体で示す）内でハイライトしている。
修飾HSAに対するコネクターを破線で示す。

B2B3およびmHSAを含む様々なHSAリンカーコンジュゲートに対する配列アラインメント

```
                          1                                                  45
  A5-mHSA-ML3.9      (1) QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFNTYDMNWVRQAPGKGL
    A5-mHSA-B1D2     (1) QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFNTYDMNWVRQAPGKGL
  A5-mHSA-F5B6H2     (1) QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFNTYDMNWVRQAPGKGL
    B12-mHSA-B1D2    (1) QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL
  B12-mHSA-F5B6H2    (1) QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL
     F4-mHSA-B1D2    (1) QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL
   F4-mHSA-F5B6H2    (1) QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL
     H3-mHSA-B1D2    (1) QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGL
   H3-mHSA-F5B6H2    (1) QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGL

                          46                                                 90
  A5-mHSA-ML3.9     (46) EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED
    A5-mHSA-B1D2    (46) EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED
  A5-mHSA-F5B6H2    (46) EWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED
    B12-mHSA-B1D2   (46) EWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPED
  B12-mHSA-F5B6H2   (46) EWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPED
     F4-mHSA-B1D2   (46) EWVSTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
   F4-mHSA-F5B6H2   (46) EWVSTISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
     H3-mHSA-B1D2   (46) EWVANINRDGSASYYVDSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAED
   H3-mHSA-F5B6H2   (46) EWVANINRDGSASYYVDSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAED

                          91                                                135
  A5-mHSA-ML3.9     (91) TAVYYCARDG---VATTPFDYWGQGTLVTVS---SGGGGSGGGGS
    A5-mHSA-B1D2    (91) TAVYYCARDG---VATTPFDYWGQGTLVTVS---SGGGGSGGGGS
  A5-mHSA-F5B6H2    (91) TAVYYCARDG---VATTPFDYWGQGTLVTVS---SGGGGSGGGGS
    B12-mHSA-B1D2   (91) TAVYYCARDLGAKQWLEGFDYWGQGTLVTVSSASTGGGGSGGGGS
  B12-mHSA-F5B6H2   (91) TAVYYCARDLGAKQWLEGFDYWGQGTLVTVSSASTGGGGSGGGGS
     F4-mHSA-B1D2   (91) TAVYYCAKGYSSSWSEVASGYWGQGTLVTVSSASTGGGGSGGGGS
   F4-mHSA-F5B6H2   (91) TAVYYCAKGYSSSWSEVASGYWGQGTLVTVSSASTGGGGSGGGGS
     H3-mHSA-B1D2   (91) TAVYYCARDR----GVGYFDLWGRGTLVTVSSASTGGGGSGGGGS
   H3-mHSA-F5B6H2   (91) TAVYYCARDR----GVGYFDLWGRGTLVTVSSASTGGGGSGGGGS

                         136                                                180
  A5-mHSA-ML3.9    (130) GGGGSQSVLTQPPS-VSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQ
    A5-mHSA-B1D2   (130) GGGGSQSVLTQPPS-VSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQ
  A5-mHSA-F5B6H2   (130) GGGGSQSVLTQPPS-VSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQ
    B12-mHSA-B1D2  (136) GGGGSSYELTQDPA-VSVALGQTVRITCQGDSLRS---YYASWYQ
  B12-mHSA-F5B6H2  (136) GGGGSSYELTQDPA-VSVALGQTVRITCQGDSLRS---YYASWYQ
     F4-mHSA-B1D2  (136) GGGGSAIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIR---NDLGWYQ
   F4-mHSA-F5B6H2  (136) GGGGSAIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIR---NDLGWYQ
     H3-mHSA-B1D2  (132) GGGGSQSALTQPAS-VSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNFVSWYQ
   H3-mHSA-F5B6H2  (132) GGGGSQSALTQPAS-VSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNFVSWYQ

                         181                                                225
  A5-mHSA-ML3.9    (174) QLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED
    A5-mHSA-B1D2   (174) QLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED
  A5-mHSA-F5B6H2   (174) QLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED
    B12-mHSA-B1D2  (177) QKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNSASLTITGAQAED
  B12-mHSA-F5B6H2  (177) QKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNSASLTITGAQAED
     F4-mHSA-B1D2  (178) QKAGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDD
   F4-mHSA-F5B6H2  (178) QKAGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDD
     H3-mHSA-B1D2  (176) QHPGKAPKLMIYDVSDRPSGVSDRFSGSKSGNTASLIISGLQADD
   H3-mHSA-F5B6H2  (176) QHPGKAPKLMIYDVSDRPSGVSDRFSGSKSGNTASLIISGLQADD

                         226                                                270
  A5-mHSA-ML3.9    (219) EADYYCQSYDSS-LSALFGGGTKLTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD
    A5-mHSA-B1D2   (219) EADYYCQSYDSS-LSALFGGGTKLTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD
  A5-mHSA-F5B6H2   (219) EADYYCQSYDSS-LSALFGGGTKLTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD
```

```
B12-mHSA-B1D2    (222) EADYYCNSRDSSGNHWVFGGGTKVTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD
B12-mHSA-F5B6H2  (222) EADYYCNSRDSSGNHWVFGGGTKVTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD
F4-mHSA-B1D2     (223) FATYFCQQAHSF--PPTFGGGTKVEIKRGAASDAHKSEVAHRFKD
F4-mHSA-F5B6H2   (223) FATYFCQQAHSF--PPTFGGGTKVEIKRGAASDAHKSEVAHRFKD
H3-mHSA-B1D2     (221) EADYYCSSYGSSSTHVIFGGGTKVTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD
H3-mHSA-F5B6H2   (221) EADYYCSSYGSSSTHVIFGGGTKVTVLG-AASDAHKSEVAHRFKD

                       271                                       315
A5-mHSA-ML3.9    (262) LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
A5-mHSA-B1D2     (262) LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
A5-mHSA-F5B6H2   (262) LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
B12-mHSA-B1D2    (266) LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
B12-mHSA-F5B6H2  (266) LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
F4-mHSA-B1D2     (266) LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
F4-mHSA-F5B6H2   (266) LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
H3-mHSA-B1D2     (265) LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
H3-mHSA-F5B6H2   (265) LGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES

                       316                                       360
A5-mHSA-ML3.9    (307) AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL
A5-mHSA-B1D2     (307) AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL
A5-mHSA-F5B6H2   (307) AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL
B12-mHSA-B1D2    (311) AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL
B12-mHSA-F5B6H2  (311) AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL
F4-mHSA-B1D2     (311) AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL
F4-mHSA-F5B6H2   (311) AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL
H3-mHSA-B1D2     (310) AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL
H3-mHSA-F5B6H2   (310) AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL

                       361                                       405
A5-mHSA-ML3.9    (352) QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPY
A5-mHSA-B1D2     (352) QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPY
A5-mHSA-F5B6H2   (352) QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPY
B12-mHSA-B1D2    (356) QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPY
B12-mHSA-F5B6H2  (356) QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPY
F4-mHSA-B1D2     (356) QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPY
F4-mHSA-F5B6H2   (356) QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPY
H3-mHSA-B1D2     (355) QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPY
H3-mHSA-F5B6H2   (355) QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPY

                       406                                       450
A5-mHSA-ML3.9    (397) FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASS
A5-mHSA-B1D2     (397) FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASS
A5-mHSA-F5B6H2   (397) FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASS
B12-mHSA-B1D2    (401) FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASS
B12-mHSA-F5B6H2  (401) FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASS
F4-mHSA-B1D2     (401) FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASS
F4-mHSA-F5B6H2   (401) FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASS
H3-mHSA-B1D2     (400) FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASS
H3-mHSA-F5B6H2   (400) FYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASS

                       451                                       495
A5-mHSA-ML3.9    (442) AKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
A5-mHSA-B1D2     (442) AKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
A5-mHSA-F5B6H2   (442) AKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
B12-mHSA-B1D2    (446) AKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
B12-mHSA-F5B6H2  (446) AKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
F4-mHSA-B1D2     (446) AKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
F4-mHSA-F5B6H2   (446) AKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
H3-mHSA-B1D2     (445) AKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
H3-mHSA-F5B6H2   (445) AKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
```

```
                          496                                       540
A5-mHSA-ML3.9      (487) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL
A5-mHSA-B1D2       (487) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL
A5-mHSA-F5B6H2     (487) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL
B12-mHSA-B1D2      (491) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL
B12-mHSA-F5B6H2    (491) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL
F4-mHSA-B1D2       (491) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL
F4-mHSA-F5B6H2     (491) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL
H3-mHSA-B1D2       (490) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL
H3-mHSA-F5B6H2     (490) TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPL

                          541                                       585
A5-mHSA-ML3.9      (532) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG
A5-mHSA-B1D2       (532) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG
A5-mHSA-F5B6H2     (532) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG
B12-mHSA-B1D2      (536) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG
B12-mHSA-F5B6H2    (536) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG
F4-mHSA-B1D2       (536) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG
F4-mHSA-F5B6H2     (536) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG
H3-mHSA-B1D2       (535) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG
H3-mHSA-F5B6H2     (535) LEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG

                          586                                       630
A5-mHSA-ML3.9      (577) MFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV
A5-mHSA-B1D2       (577) MFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV
A5-mHSA-F5B6H2     (577) MFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV
B12-mHSA-B1D2      (581) MFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV
B12-mHSA-F5B6H2    (581) MFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV
F4-mHSA-B1D2       (581) MFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV
F4-mHSA-F5B6H2     (581) MFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV
H3-mHSA-B1D2       (580) MFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV
H3-mHSA-F5B6H2     (580) MFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV

                          631                                       675
A5-mHSA-ML3.9      (622) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQV
A5-mHSA-B1D2       (622) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQV
A5-mHSA-F5B6H2     (622) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQV
B12-mHSA-B1D2      (626) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQV
B12-mHSA-F5B6H2    (626) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQV
F4-mHSA-B1D2       (626) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQV
F4-mHSA-F5B6H2     (626) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQV
H3-mHSA-B1D2       (625) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQV
H3-mHSA-F5B6H2     (625) FDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQV

                          676                                       720
A5-mHSA-ML3.9      (667) STPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL
A5-mHSA-B1D2       (667) STPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL
A5-mHSA-F5B6H2     (667) STPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL
B12-mHSA-B1D2      (671) STPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL
B12-mHSA-F5B6H2    (671) STPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL
F4-mHSA-B1D2       (671) STPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL
F4-mHSA-F5B6H2     (671) STPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL
H3-mHSA-B1D2       (670) STPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL
H3-mHSA-F5B6H2     (670) STPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL

                          721                                       765
A5-mHSA-ML3.9      (712) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
A5-mHSA-B1D2       (712) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
A5-mHSA-F5B6H2     (712) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
B12-mHSA-B1D2      (716) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
```

```
B12-mHSA-F5B6H2   (716) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
   F4-mHSA-B1D2   (716) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
 F4-mHSA-F5B6H2   (716) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
   H3-mHSA-B1D2   (715) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT
 H3-mHSA-F5B6H2   (715) HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETFT

                        766                                       810
  A5-mHSA-ML3.9   (757) FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
   A5-mHSA-B1D2   (757) FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
 A5-mHSA-F5B6H2   (757) FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
   B12-mHSA-B1D2  (761) FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
B12-mHSA-F5B6H2   (761) FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
   F4-mHSA-B1D2   (761) FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
 F4-mHSA-F5B6H2   (761) FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
   H3-mHSA-B1D2   (760) FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA
 H3-mHSA-F5B6H2   (760) FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAA

                        811                                       855
  A5-mHSA-ML3.9   (802) FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVQSGA
   A5-mHSA-B1D2   (802) FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVQSGA
 A5-mHSA-F5B6H2   (802) FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVESGG
   B12-mHSA-B1D2  (806) FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVQSGA
B12-mHSA-F5B6H2   (806) FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVESGG
   F4-mHSA-B1D2   (806) FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVQSGA
 F4-mHSA-F5B6H2   (806) FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVESGG
   H3-mHSA-B1D2   (805) FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVQSGA
 H3-mHSA-F5B6H2   (805) FVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVESGG

                        856                                       900
  A5-mHSA-ML3.9   (847) EVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPG
   A5-mHSA-B1D2   (847) EVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPG
 A5-mHSA-F5B6H2   (847) GLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGR
   B12-mHSA-B1D2  (851) EVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPG
B12-mHSA-F5B6H2   (851) GLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGR
   F4-mHSA-B1D2   (851) EVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPG
 F4-mHSA-F5B6H2   (851) GLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGR
   H3-mHSA-B1D2   (850) EVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPG
 H3-mHSA-F5B6H2   (850) GLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGR

                        901                                       945
  A5-mHSA-ML3.9   (892) DSDTKYSPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARH
   A5-mHSA-B1D2   (892) DSDTKYSPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARH
 A5-mHSA-F5B6H2   (892) GDNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKM
   B12-mHSA-B1D2  (896) DSDTKYSPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARH
B12-mHSA-F5B6H2   (896) GDNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKM
   F4-mHSA-B1D2   (896) DSDTKYSPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARH
 F4-mHSA-F5B6H2   (896) GDNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKM
   H3-mHSA-B1D2   (895) DSDTKYSPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARH
 H3-mHSA-F5B6H2   (895) GDNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKM

                        946                                       990
  A5-mHSA-ML3.9   (937) DVGYCSSSNCAKWPEYFQHWGQGTLVTVSSGGGGSSGGGSGGGGS
   A5-mHSA-B1D2   (937) DVGYCTDRTCAKWPEWLGVWGQGTLVTVSSGGGGSSGGGSGGGGS
 A5-mHSA-F5B6H2   (937) TSNAVG----------FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSG
   B12-mHSA-B1D2  (941) DVGYCTDRTCAKWPEWLGVWGQGTLVTVSSCGGGSSGGGSGGGGS
B12-mHSA-F5B6H2   (941) TSNAVG----------FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSG
   F4-mHSA-B1D2   (941) DVGYCTDRTCAKWPEWLGVWGQGTLVTVSSGGGGSSGCGSCGGGS
 F4-mHSA-F5B6H2   (941) TS----------NAVGFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSG
   H3-mHSA-B1D2   (940) DVGYCTDRTCAKWPEWLGVWGQGTLVTVSSGGGGSSGGGSGGGGS
 H3-mHSA-F5B6H2   (940) TSNAVG----------FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSG
```

```
                        991                                                1035
  A5-mHSA-ML3.9    (982) QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY-VSWYQQLPGTA
    A5-mHSA-B1D2   (982) QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY-VSWYQQLPGTA
  A5-mHSA-F5B6H2   (972) QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGRHSNIGLGYGVHWYQQLPGTA
   B12-mHSA-B1D2   (986) QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY-VSWYQQLPGTA
 B12-mHSA-F5B6H2   (976) QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGRHSNIGLGYGVHWYQQLPGTA
    F4-mHSA-B1D2   (986) QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY-VSWYQQLPGTA
  F4-mHSA-F5B6H2   (976) QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGRHSNIGLGYGVHWYQQLPGTA
    H3-mHSA-B1D2   (985) QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY-VSWYQQLPGTA
  H3-mHSA-F5B6H2   (975) QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGRHSNIGLGYGVHWYQQLPGTA

                        1036                                               1080
  A5-mHSA-ML3.9    (1026) PKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC
    A5-mHSA-B1D2   (1026) PKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC
  A5-mHSA-F5B6H2   (1017) PKLLIYGNTNRPSGVPDRFSGFKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC
   B12-mHSA-B1D2   (1030) PKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC
 B12-mHSA-F5B6H2   (1021) PKLLIYGNTNRPSGVPDRFSGFKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC
    F4-mHSA-B1D2   (1030) PKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC
  F4-mHSA-F5B6H2   (1021) PKLLIYGNTNRPSGVPDRFSGFKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC
    H3-mHSA-B1D2   (1029) PKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYC
  H3-mHSA-F5B6H2   (1020) PKLLIYGNTNRPSGVPDRFSGFKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC

                        1081                1104
  A5-mHSA-ML3.9    (1071) ASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLG--
    A5-mHSA-B1D2   (1071) ASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLG--
  A5-mHSA-F5B6H2   (1062) QSYDRRTPCWVFGGGTKLTVLG--
   B12-mHSA-B1D2   (1075) ASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLG
```

【０２４０】

付表２

抗癌剤

B2B3-1と併用するための抗癌剤	商品名	製造元/所有元
抗IGF1R抗体		
AMG 479 (完全ヒト化mAb)		Amgen
IMCA12 (完全ヒト化mAb)		ImClone
NSC-742460		Dyax
19D12 (完全ヒト化mAb)		
CP751-871 (完全ヒト化mAb)		Pfizer
H7C10 (ヒト化mAb)		
alphaIR3 (マウス)		
scFV/FC (マウス/ヒトのキメラ)		
EM/164 (マウス)		
MK-0646, F50035		Pierre Fabre Medicament, Merck
IGF1Rを標的とする低分子		
NVP-AEW541		Novartis
BMS-536,924 (1H-ベンゾイミダゾール-2-イル)-1H-ピリジン-2-オン)		Bristol-Myers Squibb
BMS-554,417		Bristol-Myers Squibb
シクロリガン (Cycloligan)		
TAE226		
PQ401		
抗EGFRモノクローナル抗体		
INCB7839		Incyte
ベバシズマブ	Avastin(登録商標)	Genentech
セツキシマブ	Erbitux(登録商標)	IMCLONE
mAb 806		
マツズマブ (EMD72000)		
ニモツズマブ (TheraCIM)		
パニツムマブ	Vectibix(登録商標)	Amgen
抗ErbB3治療薬		
U3-1287 / AMG888		U3 Pharma/Amgen
MM-121		Merrimack Pharmaceuticals
抗ErbB2治療薬		
トラツズマブ	Herceptin(登録商標)	Genentech
HKI-272 -ネラチニブ		Wyeth
KOS-953 - タネスピマイシン		Kosan Biosciences
Her/ErbB二量体化インヒビター		
2C4, R1273 - ペルツズマブ	, Omnitarg(登録商標)	Genentech, Roche

EGFRを標的とする低分子		
CI-1033 (PD 183805)		Pzifer, Inc.
EKB-569		
ゲフィチニブ	IRESSA(商標)	AstraZeneca
ラパチニブ(GW572016)		GlaxoSmithKline
ラパチニブジトシレート	Tykerb(登録商標)	SmithKline Beecham
エルロチニブHCl(OSI-774)	Tarceva(登録商標)	OSI Pharms
PD158780		
PKI-166		Novartis
チロホスチンAG1478（4-(3-クロロアニリノ)-6,7-ジメトキシキナゾリン)		
抗cmet抗体療法		
AVEO (AV299)		AVEO
AMG102		Amgen
5D5 (OA-5D5)		Genentech
cmetを標的とする低分子		
PHA665752		
ARQ-650RP		ArQule
ARQ 197		ArQule
アルキル化剤		
BCNU→1,3-ビスt2-クロロエチル)-ニトロソ尿素		
ベンダムスチン		
ブスルファン	Myleran	GlaxoSmithKline
カルボプラチン	Paraplatin	Bristol-Myers Squibb
カルボコン		
カルムスチン		
CCNU→1,-(2-クロロエチル)-3-シクロヘキシル-1-ニトロソ尿素（メチルCCNU)		
クロラムブシル	Leukeran(登録商標)	Smithkline Beecham
クロルメチン		
シスプラチン(Cisplatinum, CDDP)	Platinol	Bristol-Myers
シクロホスファミド	Cytoxan Neosar	Bristol-Myers Squibb Teva Parenteral
ダカルバジン (DTIC)		
フォテムスチン		
ヘキサメチルメラミン（アルトレタミン、HMM)	Hexalen(登録商標)	MGI Pharma, Inc.
イホスファミド	Mitoxana(登録商標)	ASTA Medica
ロムスチン		
マンノスルファン		
メルファラン	Alkeran(登録商標)	GlaxoSmithKline

ネダプラチン		
ニムスチン		
オキサリプラチン	Eloxatin(登録商標)	Sanofi-Aventis US
プレドニムスチン		
プロカルバジン HCL	Matulane	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
リボヌクレオチドリダクターゼインヒビター（RNR）		
ラニムスチン		
サトラプラチン		
セムスチン		
ストレプトゾシン		
テモゾロミド		
トレオスルファン		
トリアジコン		
トリエチレンメラミン		
チオテパ		Bedford, Abraxis, Teva
四硝酸トリプラチン		
トロホスファミド		
ウラムスチン		
代謝拮抗剤		
5-アザシチジン		
フルオロウラシル（5-FU）/カペシタビン		
6-メルカプトプリン（メルカプトプリン、6-MP）		
6-チオグアニン（6-TG）	Purinethol(登録商標)	Teva
シトシンアラビノシド（シタラビン、Ara-C）	Thioguanine(登録商標)	GlaxoSmithKline
アザチオプリン	Azasan(登録商標)	AAIPHARMA LLC
カペシタビン	XELODA(登録商標)	HLR (Roche)
クラドリビン（2-CdA, 2-クロロデオキシアデノシン）	Leustatin(登録商標)	Ortho Biotech
5-トリフルオロメチル-2'-デオキシウリジン		
リン酸フルダラビン	Fludara(登録商標)	Bayer Health Care
フロクスウリジン（5-フルオロ-2）	FUDR(登録商標)	Hospira, Inc.
メトトレキサートナトリウム	Trexall	Barr
ペメトレキセド	Alimta(登録商標)	Lilly
ペントスタチン	Nipent(登録商標)	Hospira, Inc.
ラルチトレキセド	Tomudex(登録商標)	AstraZeneca
テガフール		
アロマトース（aromatose）インヒビター		
ケトコナゾール		
グルココルチコイド		

デキサメタゾン	Decadron(登録商標)Dexasone, Diodex, Hexadrol, Maxidex	Wyeth, Inc.
プレドニゾロン		
プレドニゾン	Deltasone, Orasone, Liquid Pred, Sterapred(登録商標)	
免疫療法薬		
αインターフェロン		
血管形成インヒビター	Avastin(登録商標)	Genentech
IL-12→インターロイキン12		
IL-2→インターロイキン2（アルデスロイキン）	Proleukin(登録商標)	Chiron
キナーゼインヒビター		
AMG 386		Amgen
アキシチニブ((AG-013736)		Pfizer, Inc
ボスチニブ(SKI-606)		Wyeth
ブリバニブアラリナート(BMS-582664)		BMS
セディラニブ(AZD2171)	Recentin	AstraVeneca
ダサチニブ(BMS-354825)	Sprycel(登録商標)	Bristol-Myers Squibb
メシル酸イマチニブ	Gleevec	Novartis
レスタウルチニブ(CEP-701)		Cephalon
モテサニブ二リン酸 (AMG-706)		Amgen/Takeda
ニロチニブ塩酸塩一水和物	Tasigna(登録商標)	Novartis
パゾパニブHCL (GW786034)	Armala	GSK
セマキサニブ(SU5416)		Pharmacia,
トシル酸ソラフェニブ	Nexavar (登録商標)	Bayer
リンゴ酸スニチニブ	Sutent(登録商標)	Pfizer, Inc.
バンデタニブ(AZD647)	Zactima	AstraZeneca
バタラニブ; PTK-787		Novartis; Bayer Schering Pharma
XL184, NSC718781		Exelixis, GSK
微小管標的化剤		
コルヒチン		
ドセタキセル	Taxotere(登録商標)	Sanofi-Aventis US
イクサベピロン	IXEMPRA(商標)	Bristol-Myers Squibb
ラロタキセル		Sanofi-aventis
オルタタキセル		Spectrum Pharmaceuticals
ナノ粒子パクリタキセル(ABI-007)	Abraxane(登録商標)	Abraxis BioScience, Inc.
パクリタキセル	Taxol(登録商標)	Bristol-Myers Squibb
テセタキセル		Genta
硫酸ビンブラスチン	Velban(登録商標)	Lilly
ビンクリスチン	Oncovin(登録商標)	Lilly
硫酸ビンデシン	Eldisine(登録商標)	Lilly
ビンフルニン		Pierre Fabre
酒石酸ビノレルビン	Navelbine(登録商標)	Pierre Fabre

mTORインヒビター		
デフォロリムス(AP23573, MK 8669)		ARIAD Pharmaceuticals, Inc
エベロリムス(RAD001, RAD001C)	Certican(登録商標), Afinitor	Novartis
シロリムス（ラパマイシン）	Rapamune(登録商標)	Wyeth Pharama
テムシロリムス(CCI-779)	Torisel(登録商標)	Wyeth Pharama
タンパク質合成インヒビター		
L-アスパラギナーゼ	Elspar(登録商標)	Merck & Co.
ソマトスタチンアナログ		
酢酸オクトレオチド	Sandostatin(登録商標)	Novartis
トポイソメラーゼインヒビター		
アクチノマイシンD		
カンプトテシン(CPT)		
ベロテカン		
クエン酸ダウノルビシン	Daunoxome(登録商標)	Gilead
塩酸ドキソルビシン	Doxil(登録商標)	Alza
	Vepesid(登録商標)	Bristol-Myers Squibb
エトポシド	Etopophos	Hospira, Bedford, Teva Parenteral, Etc.
イリノテカンHCL (CPT-11)	Camptosar(登録商標)	Pharmacia & Upjohn
ミトキサントロンHCL	Novantrone	EMD Serono
ルビテカン		
テニポシド(VM-26)	Vumon(登録商標)	Bristol-Myers Squibb
トポテカンHCL	Hycamtin(登録商標)	GlaxoSmithKline

化学療法剤 アドリアマイシン、5-フルオロウラシル、サイトキシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラミシン、 クロファラビン、メルカプトプリン、ペントスタチン、チオグアニン、シタラビン、デシタビン、フロクスウリジン、ゲムシタビン(Gemzar) 、エノシタビン、サパシタビン		
ホルモン療法		
アバレリックス	Plenaxis (商標)	Amgen
酢酸アビラテロン	CB7630	BTG plc
アフィモキシフェン	TamoGel	Ascend Therapeutics, Inc.
アナストラゾール	Arimidex(登録商標)	AstraZeneca
アロマターゼインヒビター	Atamestane plus toremifene	Intarcia Therapeutics, Inc.
	Arzoxifene	Eli Lilly & Co.
アセンタール (Asentar) ; DN-101		Novartis; Oregon Health & Science Univ.
ビカルタミド	Casodex(登録商標)	AstraZeneca
ブセレリン	Suprefact(登録商標)	Sanofi Aventis
セトロレリックス	Cetrotide(登録商標)	EMD Serono
エキセメスタン	Aromasin(登録商標)	Pfizer
エキセメスタン	Xtane	Natco Pharma, Ltd.
ファドロゾール(CGS 16949A)		
フルタミド	Eulexin(登録商標)	Schering
フルタミド	Prostacur	Laboratorios Almirall, S.A.
フルベストラント	Faslodex(登録商標)	AstraZeneca
酢酸ゴセレリン	Zoladex(登録商標)	AstraZeneca
レトロゾール	Femara(登録商標)	Novartis
レトロゾール(CGS20267)	Femara	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.
レトロゾール	Estrochek	Jagsonpal Pharmaceuticals, Ltd.
レトロゾール	Letrozole	Indchemie Health Specialities
酢酸ロイプロリド	Eligard(登録商標)	Sanofi Aventis
酢酸ロイプロリド	Leopril	VHB Life Sciences, Inc.
酢酸ロイプロリド	Lupron(登録商標)/Lupron Depot	TAP Pharma
酢酸ロイプロリド	Viador	Bayer AG
酢酸メゲストロール	Megace(登録商標)	Bristol-Myers Squibb
酢酸メゲストロール	Estradiol Valerate (Delestrogen)	Jagsonpal Pharmaceuticals, Ltd.
酢酸メドロキシプロゲステロン	Veraplex	Combiphar
MT206		Medisyn Technologies, Inc.
ナファレリン		
デカン酸ナンドロロン	Zestabolin	Mankind Pharma, Ltd.

ニルタミド	Nilandron(登録商標)	Aventis Pharmaceuticals
ラロキシフェンHCL	Evista(登録商標)	Lilly
タモキシフェン	Taxifen	Yung Shin Pharmaceutical
タモキシフェン	Tomifen	Alkem Laboratories, Ltd.
クエン酸タモキシフェン	Nolvadex	AstraZeneca
クエン酸タモキシフェン	Soltamox	EUSA Pharma, Inc.
クエン酸タモキシフェン	Tamoxifen citrate SOPHARMA	Sopharma JSCo.
クエン酸トレミフェン	Fareston(登録商標)	GTX, Inc.
トリプトレリンパモエート	Trelstar(登録商標)	Watson Labs
トリプトレリンパモエート	Trelstar Depot	Paladin Labs, Inc.
プロテインキナーゼB（PKB）インヒビター		
AKTインヒビターASTEX		Astex Therapeutics
AKTインヒビターNERVIANO		Nerviano Medical Sciences
AKTキナーゼインヒビターTELIK		Telik, Inc.
AKT DECIPHERA		Deciphera Pharmaceuticals, LLC
ペリホシン(KRX0401, D-21266)		Keryx Biopharmaceuticals, Inc., AEterna Zentaris, Inc.
ペリホシン＋ドセタキセル		Keryx Biopharmaceuticals, Inc., AEterna Zentaris, Inc.
ペリホシン＋ゲムシタビン		AEterna Zentaris, Inc.
ペリホシン＋パクリタキセル		Keryx Biopharmaceuticals, Inc, AEterna Zentaris, Inc.
プロテインキナーゼBインヒビターDEVELOGEN		DeveloGen AG
PX316		Oncothyreon, Inc.
RX0183		Rexahn Pharmaceuticals, Inc.
RX0201		Rexahn Pharmaceuticals, Inc.
VQD002		VioQuest Pharmaceuticals, Inc.
XL418		Exelixis, Inc.
ZEN027		AEterna Zentaris, Inc.
ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3K）インヒビター		
BEZ235		Novartis AG
BGT226		Novartis AG
CAL101		Calistoga Pharmaceuticals, Inc.
CHR4432		Chroma Therapeutics, Ltd.
Erk/PI3KインヒビターETERNA		AEterna Zentaris, Inc.
GDC0941		Genentech Inc./Piramed Limited/Roche Holdings, Ltd.
エンザスタウリンHCL (LY317615)	Enzastaurin	Eli Lilly
LY294002/ワートマニン		
PI3KインヒビターSEMAFORE		Semafore Pharmaceuticals
PX866		Oncothyreon, Inc.

SF1126		Semafore Pharmaceuticals
VMD-8000		VM Discovery, Inc.
XL147		Exelixis, Inc.
XL147 + XL647		Exelixis, Inc.
XL765		Exelixis, Inc.
PI-103		Roche/Piramed
サイクリン依存性キナーゼインヒビター		
CYC200, r-ロスコビチン	Seliciclib	Cyclacel Pharma
NSC-649890, L86-8275, HMR-1275	Alvocidib	NCI
TLr9, CD289		
IMオキシン		Merck KGaA
HYB2055		Idera
IMO-2055		Isis Pharma
1018 ISS		Dynavax Technologies/UCSF
PF-3512676		Pfizer
酵素インヒビター		
ロナファルニブ(SCH66336)	Sarasar	SuperGen, U Arizona
抗TRAIL		
AMG-655		Aeterna Zentaris, Keryx Biopharma
Apo2L/TRAIL, AMG951		Genentech, Amgen
Apomab (完全ヒト化mAb)		Genentech

B2B3-1と併用するための抗癌剤	標的	製造元/所有元
その他		
Imprime PGG		Biothera
CHR-2797	アミノペプチダーゼM1	Chroma Therapeutics
E7820, NSC 719239	インテグリンα2	Eisai
INCB007839	ADAM 17, TACE	Incyte
CNF2024, BIIB021	Hsp90	Biogen Idec
MP470, HPK-56	Kit/Met/Ret	Shering-Plough
SNDX-275/MS-275	HDAC	Syndax
ザーネストラ、ティピファニブ, R115777	Ras	Janssen Pharma
ボロシキシマブ; Eos 200-4, M200	α581インテグリン	Biogen Idec; Eli Lilly/UCSF/PDL BioPharma
アプリコキシブ(Apricoxib) (TP2001)	COX-2インヒビター	Daiichi Sankyo; Tragara Pharma

【０２４１】

他の態様

本発明をその特定の態様を参酌して記載してきたが、さらなる改変が可能であること、および、概して本発明の原理に従い、かつ本発明が属する技術分野内で公知のまたは慣例の実施に近くかつ本明細書で上述される本質的な特徴に適用され得るような本発明の開示からの逸脱を含む、本発明の任意の改変、用途、または適応を、本出願が包含することを意図していることが理解されるであろう。

【０２４２】

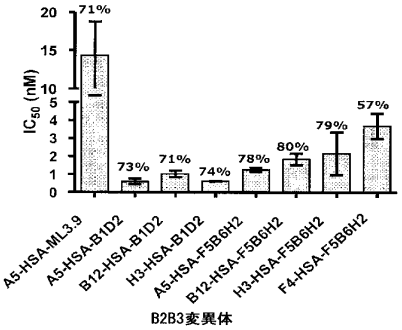
本明細書で言及される全ての特許および特許出願は、個々の独立した特許または特許出願がその全体が参照により組み入れられると具体的かつ個別に示されたのと同じ程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

OnCusp
Ex. 1002

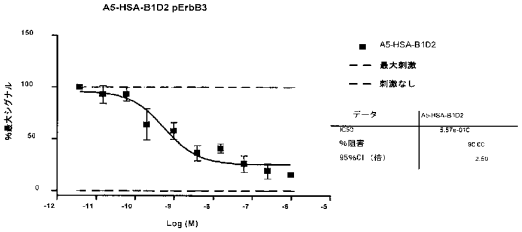
【図１】



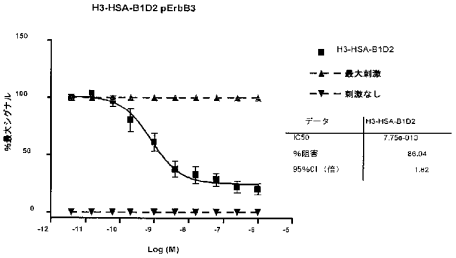
【図２】



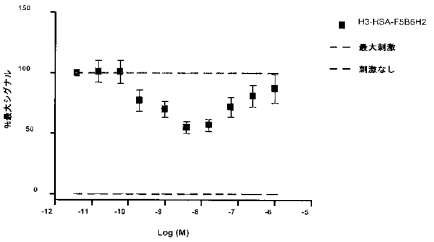
【図３Ａ】



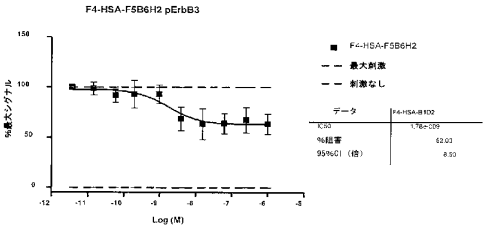
【図３Ｂ】



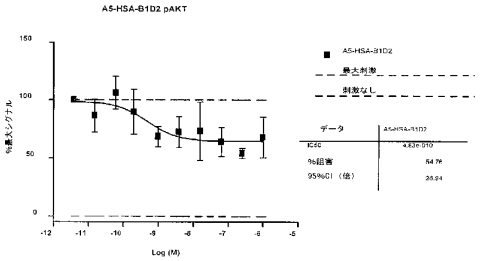
【図３Ｃ】



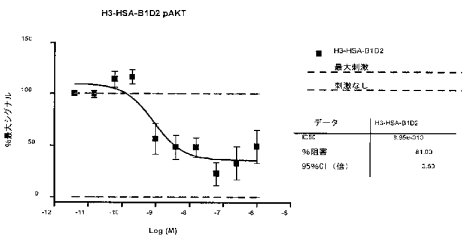
【図３Ｄ】



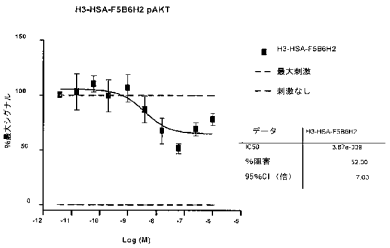
【図４Ａ】



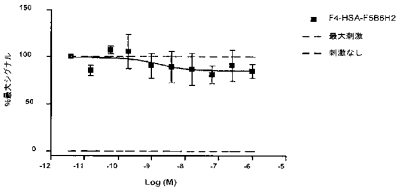
【図４Ｂ】



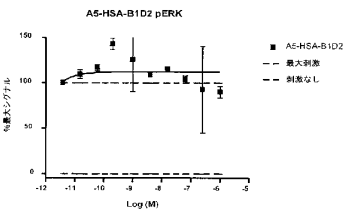
【図４Ｃ】



【図４Ｄ】

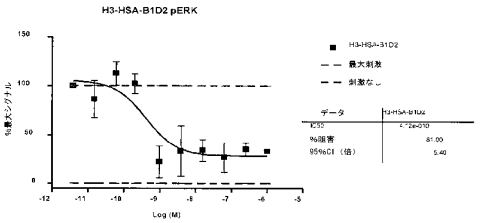


【図５Ａ】

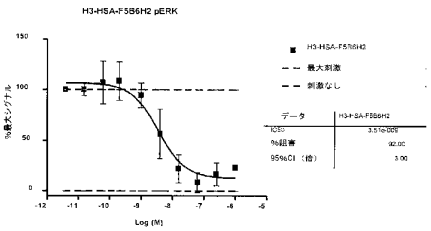


OnCusp
Ex. 1002

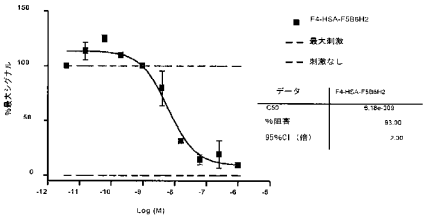
【図５Ｂ】



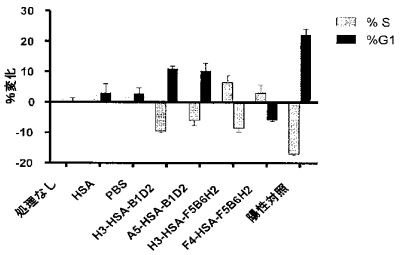
【図５Ｃ】



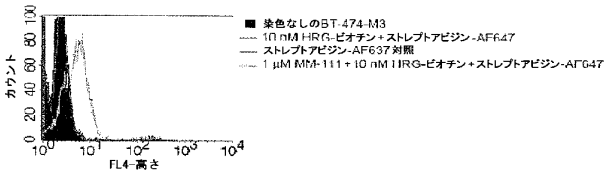
【図５Ｄ】



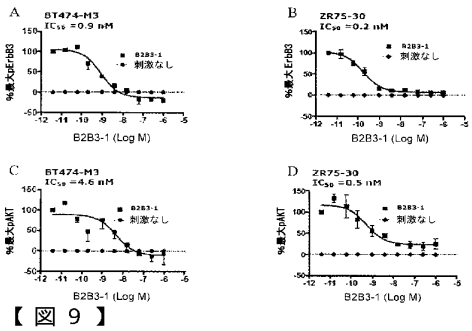
【図６】



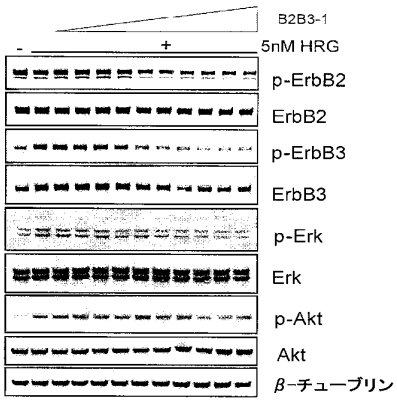
【図７】



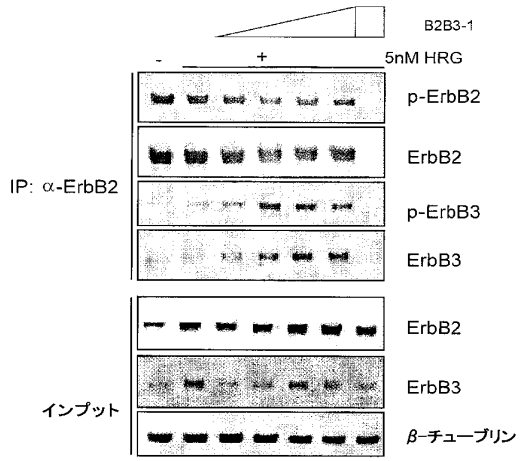
【図８】



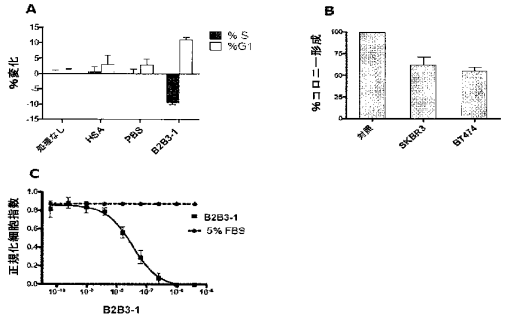
【図９】



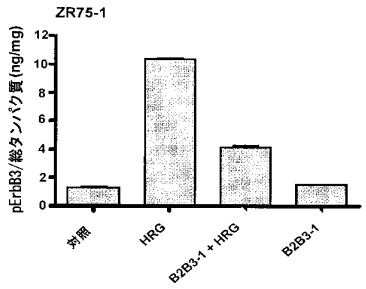
【図１０】



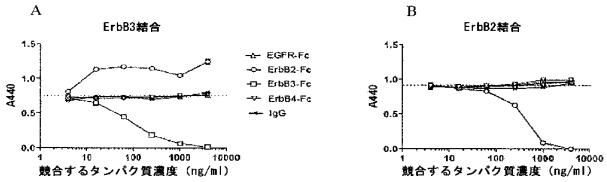
【図１１】



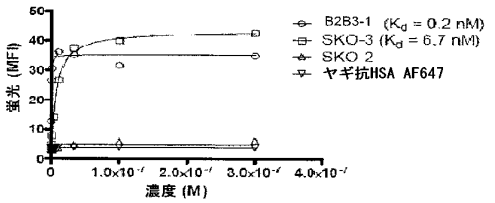
【図１２】



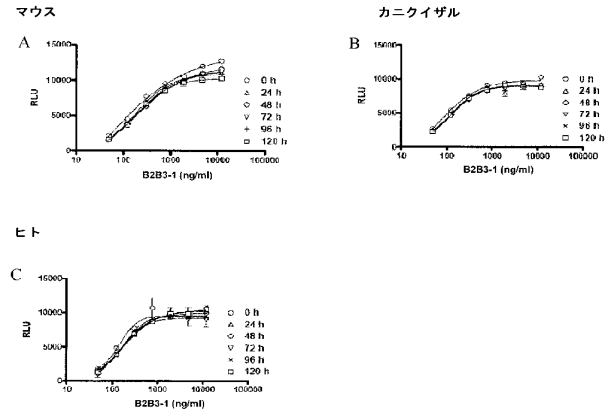
【図１３】



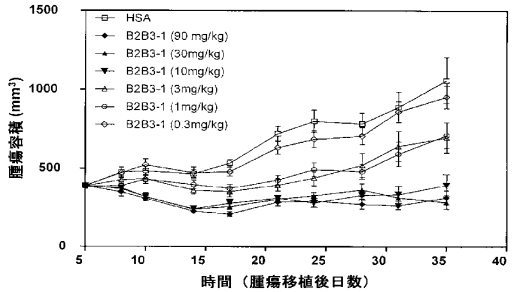
【図１４】



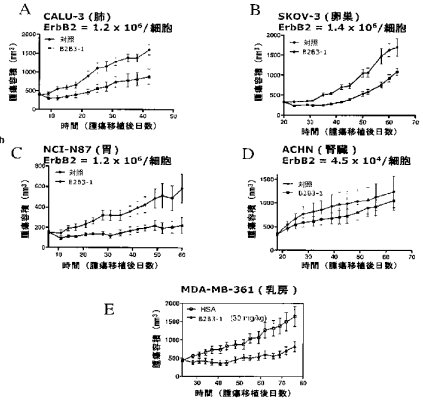
【図１５】



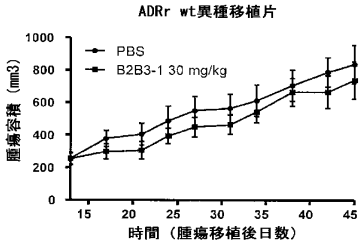
【図１６】



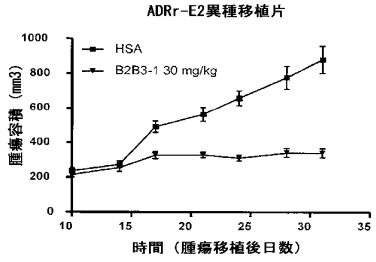
【図１７】



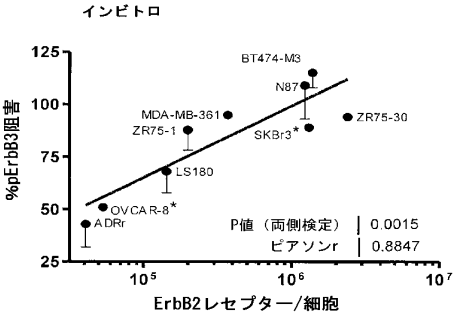
【図１８Ａ】



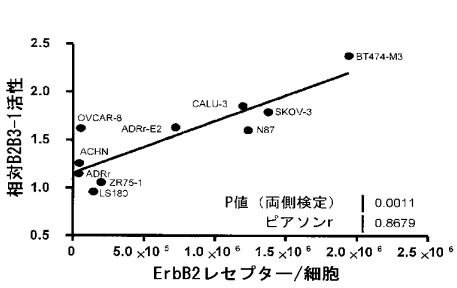
【図１８Ｂ】



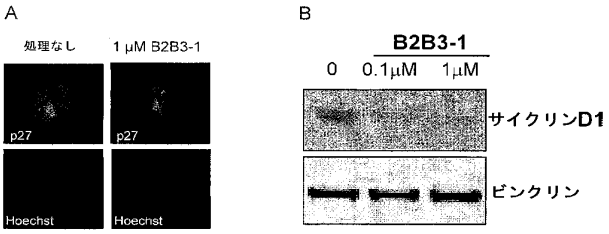
【図１９Ａ】



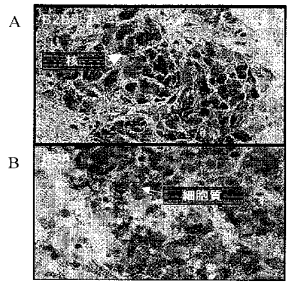
【図１９Ｂ】



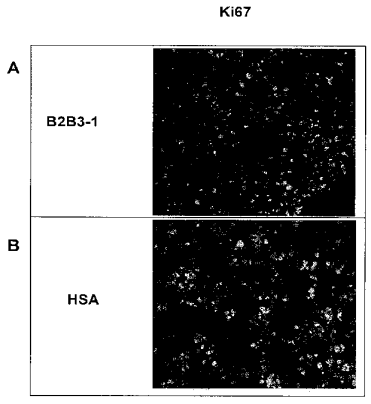
【図２０】



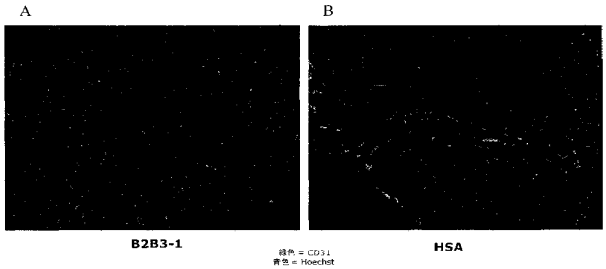
【図２１】



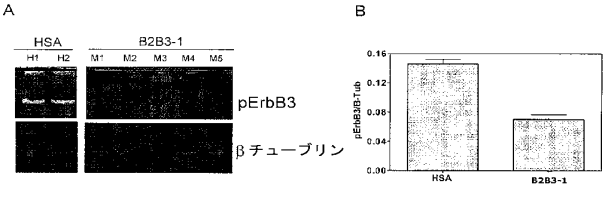
【図２２】



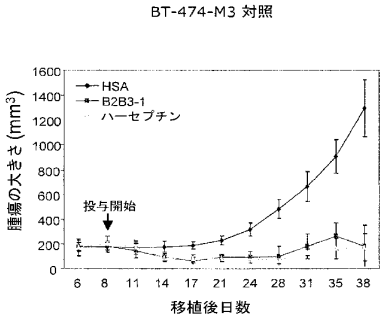
【図２３】



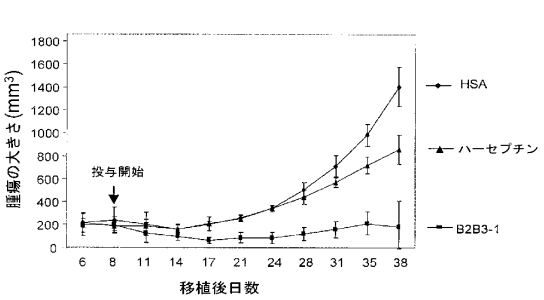
【図２４】



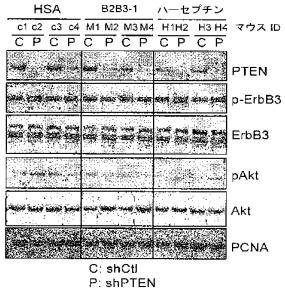
【図２５Ａ】



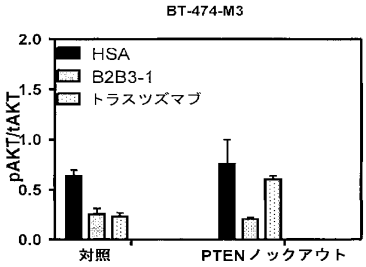
【図２５Ｂ】



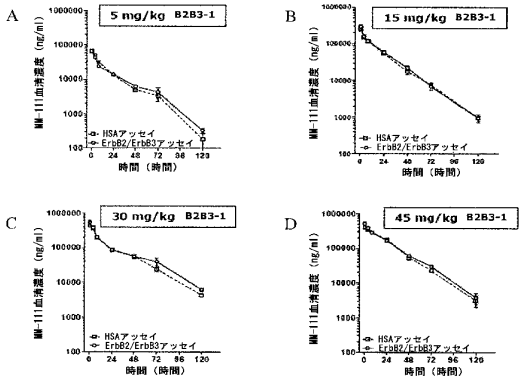
【図２６Ａ】



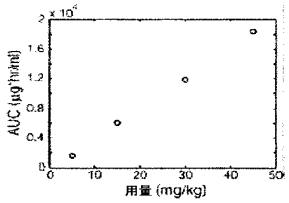
【図２６Ｂ】



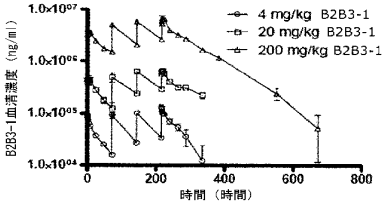
【図２７】



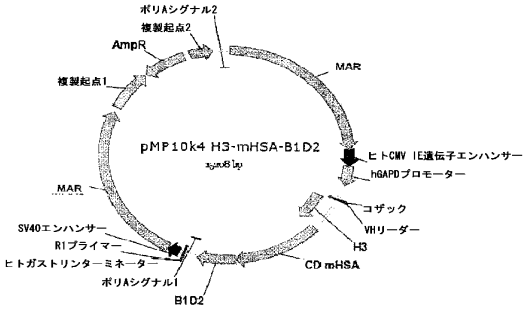
【図２８】



【図２９】

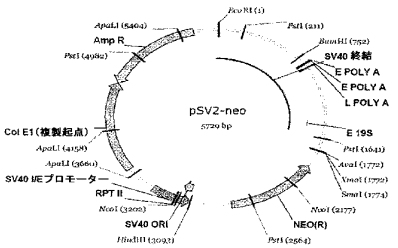


【図３０】

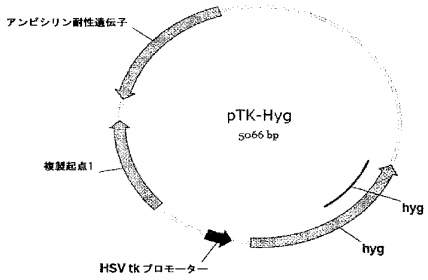


OnCusp
Ex. 1002

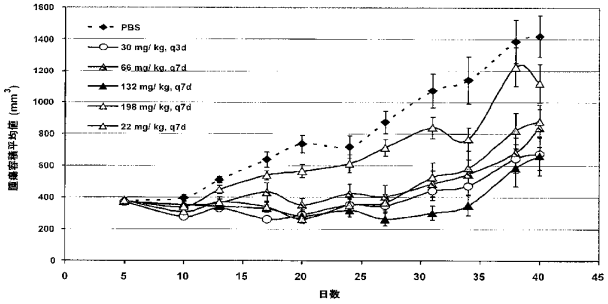
【図３１】



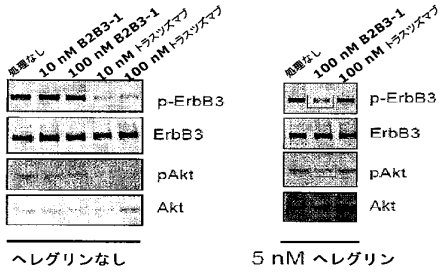
【図３２】



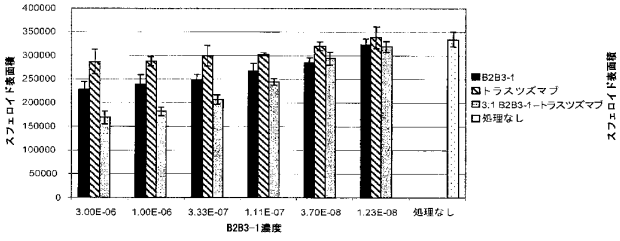
【図３３】



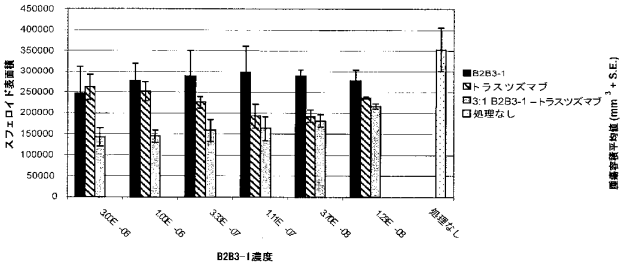
【図３４】



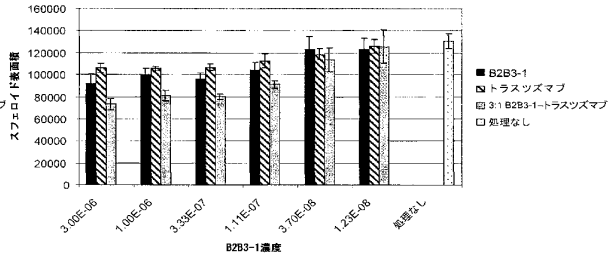
【図３５Ａ】



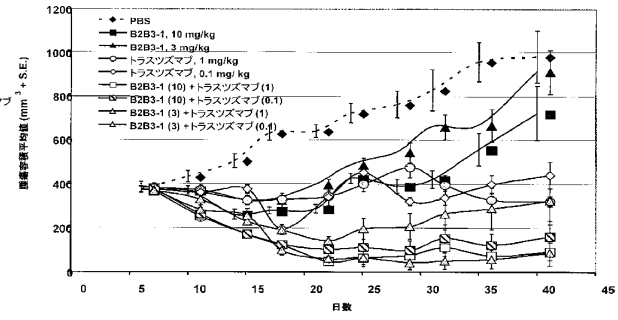
【図３５Ｂ】



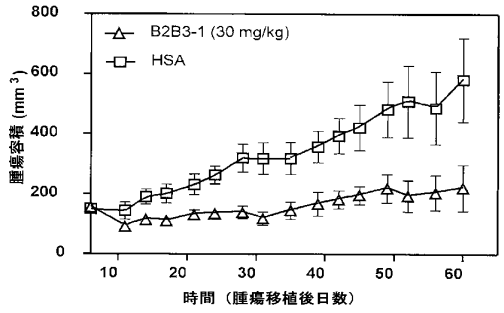
【図３５Ｃ】



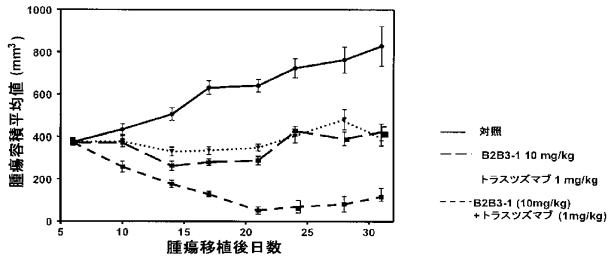
【図３６】



【図３７】



【図３８】



【配列表】
2012509259000001. app
【手続補正書】
【提出日】平成23年7月26日(2011. 7. 26)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】変更
【補正の内容】
【配列表】
2012509259000001. app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/60721

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 14/76; A61K 38/38 (2010.01)
USPC - 530/362; 514/2
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)
IPC(8) - C07K 14/76; A61K 38/38 (2010.01)
USPC - 530/362; 514/2

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)
WEST - DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=YES; OP=ADJ; Google Scholar
Search terms: HSA, human serum albumin, albumin, linker, conjugate, construct, fusion, HER2, NEU, NGL, CD340, HER-2, ErbB-2, herstatin, TKR1, erbB2, letrozole, trastuzumab, lapatinib, taxane, paclitaxel, docetaxel, HER3, HER-3, ErbB-3, ErbB3, LCCS2, lethal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y --- A	US 2005/0186664 A1 (ROSEN et al.) 25 August 2005 (25.08.2005) para [0006]-[0009]; [0047]-[0049]; [0066]-[0068]; [0113]-[0117]; [0126]-[0131]; [0228]; [0305]; [0306]; [0604]-[0612]; [0618]; Tables 1 and 2; SEQ ID NOs: 262; 269; 1038.	1, 2, 14-16, 29, 30 --- 3, 17, 28, 31, 32 --- 4, 18-27
Y	US 2008/0124334 A1 (AKITA et al.) 29 May 2008 (29.05.2008) para [0021]; [0026]; [0049]; [0050]; [0068]; [0219]-[0221].	3, 32
Y	US 2008/0166358 A1 (TUNG) 10 July 2008 (10.07.2008) para [0004]; [0089]; [0090].	17, 28, 31

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

* 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
06 April 2010 (06.04.2010)	13 APR 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/60721

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 33-36
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1: claims 1-4 and 14-32, directed to a human serum albumin conjugate comprising any one of SEQ ID NOs: 6-15, wherein a first binding moiety is bonded to the amino terminus of the albumin, and a second binding moiety is bonded to the carboxy terminus of the albumin; limited to wherein the albumin linker comprises SEQ ID NO: 6 or 1, further wherein the first binding moiety binds to ErbB3, and the second moiety binds to ErbB2, wherein the linker conjugate comprises SEQ ID NO: 16.

- Please see extra sheet for continuation -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4 and 14-32, limited to SEQ ID NOs: 1, 6, and 16

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/60721

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

Group 2: claims 5 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 17.
Group 3: claims 6 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 18.
Group 4: claims 7 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 19.
Group 5: claims 8 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 20.
Group 6: claims 9 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 21.
Group 7: claims 10 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 22.
Group 8: claims 11 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 23.
Group 9: claims 12 and 14-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 24.
Group 10: claims 13-32, directed to a human serum albumin linker conjugate comprising SEQ ID NO: 25.

The inventions listed as Groups 1 - 10 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the claims of Groups 1-10 is a human serum albumin linker conjugate, wherein each Group is directed to a conjugate comprising a particular sequence. The Groups may share the further common technical element of being conjugates that comprise binding moieties that bind to both ErbB2 and ErbB3.

The only common technical element shared by the above groups is that they are related to albumin fusion proteins comprising binding moieties that bind to ErbB2 and ErbB3. This common technical element does not improve upon the prior art of US 2007/0086942 A1 to Chang et al. (see para [0016], [0017]). The claims of Group 1 share a further common technical element of comprising a particular albumin linker sequence. This common technical element does not improve upon the prior art of US 2005/0186664 A1 to Rosen et al. (see para [0097], [0099], [0162], [0172], [0305], and SEQ ID NO: 262 in comparison to Applicants' SEQ ID NO: 12). Therefore, the inventions of Groups 1 - 10 lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

(Applicants may elect for additional albumin sequences to be searched in Group 1 by specifying the SEQ ID NO: and paying an additional invention search fee for each sequence. Where the sequence comprises at least a portion of the sequence of another Group stated above, the additional Group will not be searched unless the Applicant can further demonstrate that the sequence associated with the Group can be formed using the sequences of the binding moieties of Group 1 (e.g. SEQ ID NO's: 26 and 27), or the sequences of the binding moieties of another Group for which an additional invention search payment has been made).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 31/517	***(2006.01)***	A61K	31/517		4H045
A61K 31/337	***(2006.01)***	A61K	31/337		
A61K 31/4196	***(2006.01)***	A61K	31/4196		
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00		
A61P 43/00	***(2006.01)***	A61P	43/00	121	
A61K 39/395	***(2006.01)***	A61K	39/395	N	
A61K 47/48	***(2006.01)***	A61K	47/48		
C12N 15/09	*(2006.01)*	C12N	15/00	A	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(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,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,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邉 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 マクドナー シャーロット
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウィンチェスター サージェント ロード 11
(72)発明者 フェルダウス マイケル
アメリカ合衆国 ニューハンプシャー州 グランサム ピー．オー． ボックス 1888
(72)発明者 フハロブ アレクサンドラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ サクラメント ストリート 47 アパートメント 3

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA20 DA02 EA04 GA11
4C076 CC03 CC27 EE41 EE59
4C084 AA02 AA07 BA44 CA18 DA37 NA14 ZB07 ZB071 ZB072 ZB26
ZB261 ZB262 ZC75 ZC751 ZC752
4C085 AA14 BB15 CC23
4C086 AA01 AA02 BA02 BC46 BC60 GA02 GA07 MA02 MA06 NA05
NA13 ZB07 ZB26 ZC75
4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA70 DA75 EA20 FA74

(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2013-500253
(P2013-500253A)
(43)公表日　平成25年1月7日(2013.1.7)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48		4B024
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	111	4C076
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4C084
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4C085
A61K 31/7088	(2006.01)	A61K	31/7088		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 48 頁）　最終頁に続く

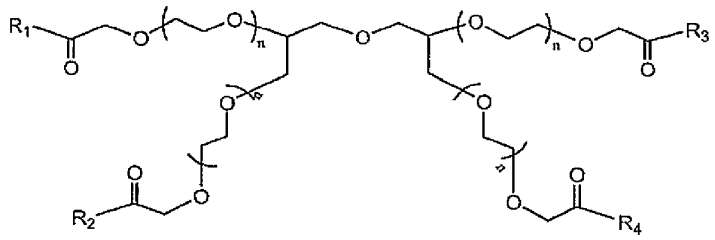
(21)出願番号　特願2012-521744 (P2012-521744)
(86)(22)出願日　平成22年7月21日 (2010.7.21)
(85)翻訳文提出日　平成24年3月15日 (2012.3.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/042686
(87)国際公開番号　WO2011/011474
(87)国際公開日　平成23年1月27日 (2011.1.27)
(31)優先権主張番号　61/227,599
(32)優先日　平成21年7月22日 (2009.7.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

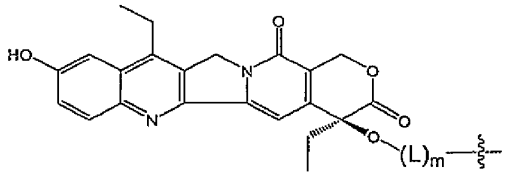
(71)出願人　596124151
エンゾン　ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国　０８８０７　ニュージャージー州，ブリッジウォーター，ルート２０２／２０６　６８５
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100122389
弁理士　新井　栄一
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】７－エチル－１０－ヒドロキシカンプトテシンのマルチアーム型ポリマー性複合体と組み合わせたＨＥＲ２受容体拮抗薬を用いるＨＥＲ２陽性がんの治療方法

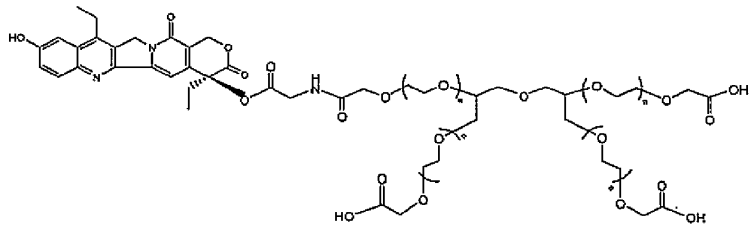
(57)【要約】
本発明は、哺乳動物におけるHER2陽性がんの治療方法に関する。本発明は、それを必要とする哺乳動物にHER2拮抗薬を7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンのポリマー性プロドラッグと組み合わせて投与することを含む。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
哺乳動物におけるHER2陽性がんの治療方法であって、前記哺乳動物にHER2受容体拮抗薬を有効量の式(I)の化合物:
【化１】
(I)


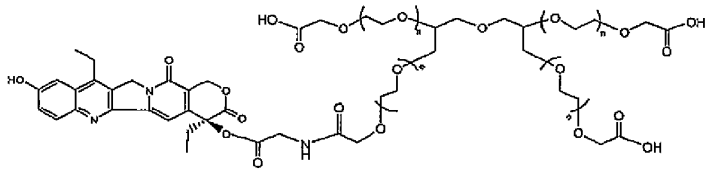
[式中、
R_1、R_2、R_3及びR_4は、独立にOH、又は
【化２】


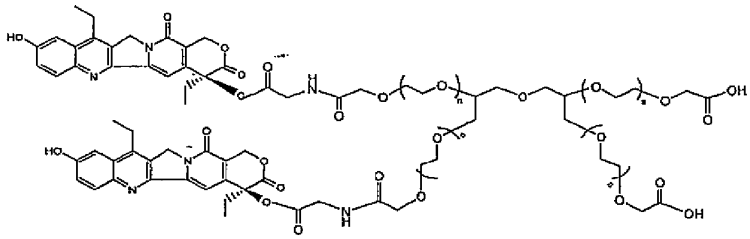
(ここで、
Lは、二官能性リンカーであり、
(m)は、0又は正の整数であり、(m)が2以上であるなら、各Lは同一であるか、或いは異なる)
であり、
(n)は、正の整数である、
但し、R_1、R_2、R_3及びR_4のすべてがOHであることはない]
又はその薬学的に許容される塩と組み合わせて投与することを含む方法。
【請求項２】
HER2受容体拮抗薬が、抗HER2抗体、アンチセンスErbB2オリゴヌクレオチド、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
抗HER2抗体が、細胞外ドメインのHER2ドメインIV又はHER2ドメインIIに結合する、請求項2に記載の方法。
【請求項４】
抗HER2抗体が、トラスツズマブ又はペルツズマブを含む、請求項2に記載の方法。
【請求項５】
HER2陽性がんが、転移性又は非転移性である、請求項1に記載の方法。
【請求項６】
HER2陽性がんが、HER2受容体拮抗薬に対して抵抗性又は不応性である、請求項1に記載の方法。
【請求項７】
HER2陽性がんが、固形腫瘍、乳がん、胃がん(gastric cancer)、卵巣がん、胃がん(stomach cancer)、子宮がん、子宮体部漿液性子宮内膜癌、前立腺がん、膀胱がん、唾液腺癌、腎腺癌、及び乳腺癌からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。
【請求項８】
(n)が約28～約341の整数であり、その結果、式(I)の化合物のポリマー性部分の総分子量が、約5,000～約60,000ダルトンの範囲にある、請求項1に記載の方法。

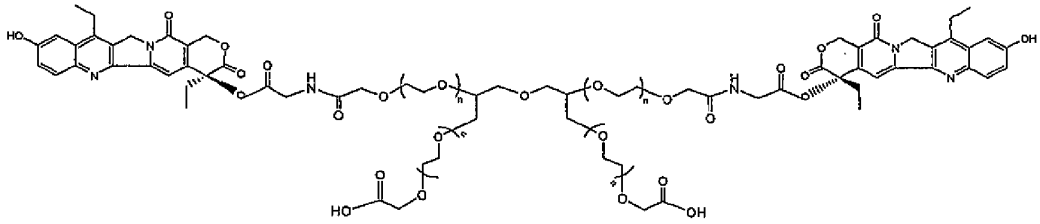
【請求項９】
(n)が約114～約239の整数であり、その結果、式(I)の化合物のポリマー性部分の総分子量が、約20,000～約42,000ダルトンの範囲にある、請求項8に記載の方法。
【請求項１０】
式(I)の化合物が、
【化３】

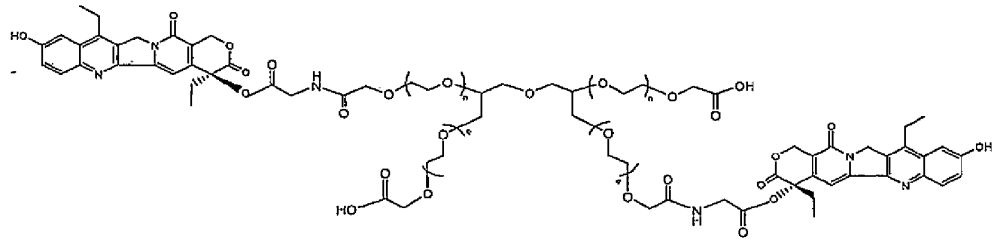


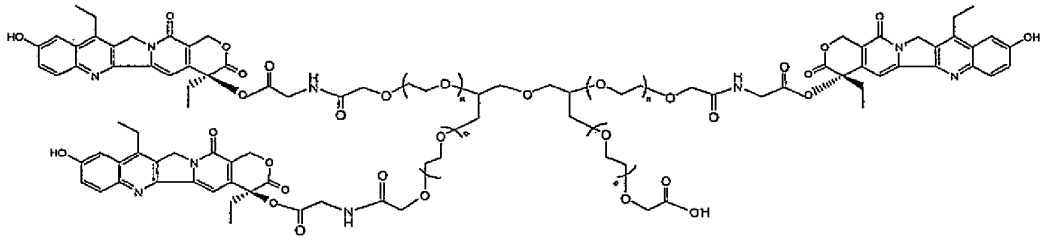
10

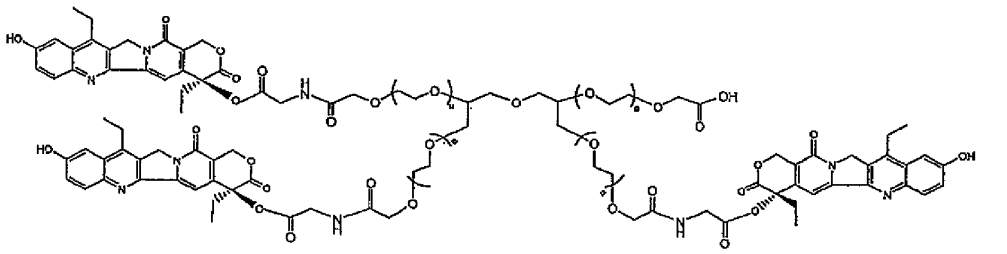

,


,

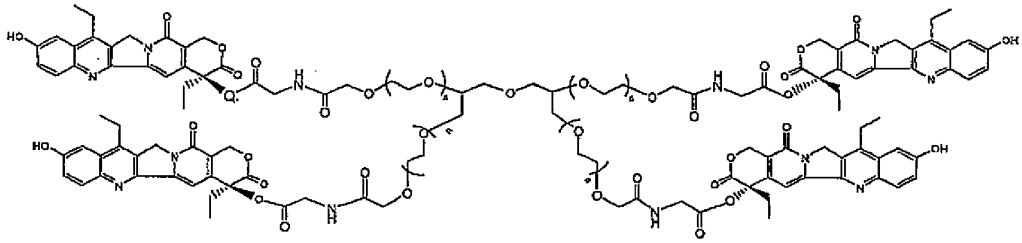

,


,


,



及び

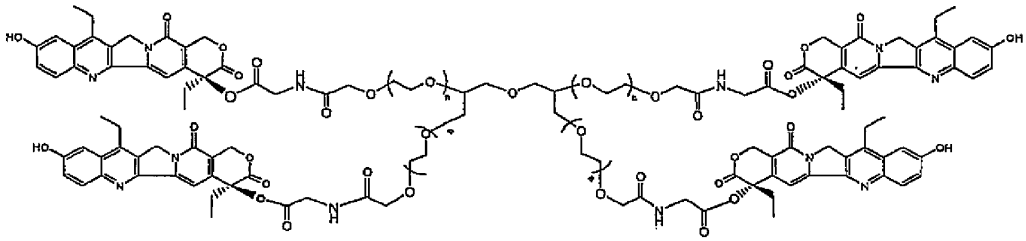


からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項１１】

式(I)の化合物が、(Ia)

【化４】



である、請求項1に記載の方法。

【請求項１２】

式(I)の化合物が、哺乳動物に約0.5mg/m²体表面/回～約50mg/m²体表面/回の量で投与され、該量が、式(I)の化合物中に含まれる7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの重量である、請求項1に記載の方法。

【請求項１３】

式(I)の化合物が、哺乳動物に約1mg/m²体表面/回～約18mg/m²体表面/回の量で投与され、該量が、式(I)の化合物中に含まれる7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの重量である、請求項1に記載の方法。

【請求項１４】

式(I)の化合物が、約1.25mg/m²体表面/回～約16.5mg/m²体表面/回の量で週1回、3週間の間付与され、続いて1週間治療を休止するプロトコールに従って、哺乳動物に投与され、該量が、式(I)の化合物中に含まれる7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの重量である、請求項1に記載の方法。

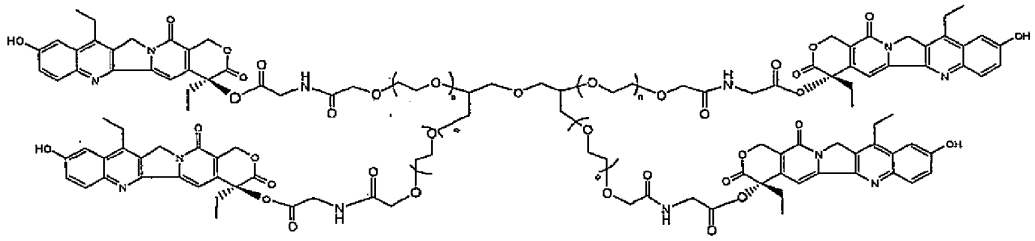
【請求項１５】

哺乳動物に週1回投与される量が、約5mg/m²体表面/回であり、該量が、式(I)の化合物中に含まれる7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの重量である、請求項14に記載の方法。

【請求項１６】

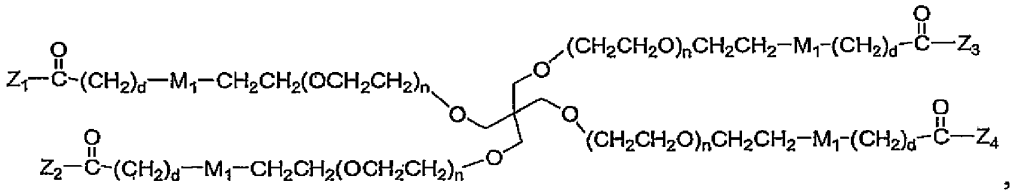
抗HER2受容体抗体が、哺乳動物に約2mg/kg～約8mg/kgの量で投与される、請求項4に記

載の方法。
【請求項１７】
アンチセンスErbB2オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩が、哺乳動物に式(I)の化合物又はその薬学的に許容される塩と組み合わせて投与される、請求項2に記載の方法。
【請求項１８】
アンチセンスErbB2オリゴヌクレオチドが、ErbB2プレmRNA又はmRNAの少なくとも8連続のヌクレオチドに対して相補的である、請求項17に記載の方法。
【請求項１９】
アンチセンスErbB2オリゴヌクレオチドが、長さが約8～50個のヌクレオチドを含む、請求項17に記載の方法。
【請求項２０】
アンチセンスErbB2オリゴヌクレオチドが、配列番号１に示された少なくとも8連続のヌクレオチドに対して相補的であるヌクレオチドを含む、請求項17に記載の方法。
【請求項２１】
アンチセンスErbB2オリゴヌクレオチドが、一つ又は複数のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む、請求項17に記載の方法。
【請求項２２】
アンチセンスErbB2オリゴヌクレオチドが、一つ又は複数のロックド核酸(LNA)を含む、請求項17に記載の方法。
【請求項２３】
アンチセンスErbB2オリゴヌクレオチドが、約2～約50mg/kg/回の量で投与される、請求項17に記載の方法。
【請求項２４】
哺乳動物におけるHER2陽性がんの存在を判定することをさらに含む、請求項1に記載の方法。
【請求項２５】
哺乳動物におけるHER2陽性がんの治療方法であって、
(a)哺乳動物におけるHER2を過剰発現するがんの存在を判定することによってHER2陽性がんを有する哺乳動物を識別すること、及び
(b)HER2陽性がんを有する哺乳動物にトラスツズマブを含む有効量のHER2受容体拮抗薬を有効量の式(Ia)の化合物:
【化５】



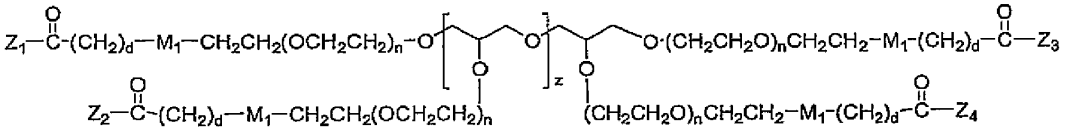
(ここで、(n)は約227であり、その結果、式(Ia)の化合物のポリマー性部分の総分子量は約40,000ダルトンである)
又はその薬学的に許容される塩と組み合わせて投与すること、を含む方法。
【請求項２６】
HER2陽性がんを有する哺乳動物におけるHER2受容体拮抗薬の効果を増強する方法であって、哺乳動物にHER2受容体拮抗薬を有効量の請求項1に記載の式(I)の化合物又はその薬学的に許容される塩と組み合わせて投与することを含む方法。
【請求項２７】
哺乳動物におけるHER2陽性細胞の成長又は増殖を抑制する方法であって、

(a) 哺乳動物の細胞中でのHER2発現の存在を判定すること、及び
(b) HER2陽性細胞を有する哺乳動物にHER2受容体拮抗薬を請求項1に記載の式(I)の化合物又はその薬学的に許容される塩と組み合わせて投与すること、を含む方法。
【請求項２８】
哺乳動物におけるHER2陽性がんの治療方法であって、
前記哺乳動物にHER2受容体拮抗薬を有効量のカンプトテシン、カンプトテシン類似体、カンプトテシン又はその類似体のポリマー性複合体、或いはこれらの薬学的に許容される塩と組み合わせて投与することを含む方法。
【請求項２９】
ポリマー性複合体が、式(II)又は式(III)の化合物:
【化６】
(II)



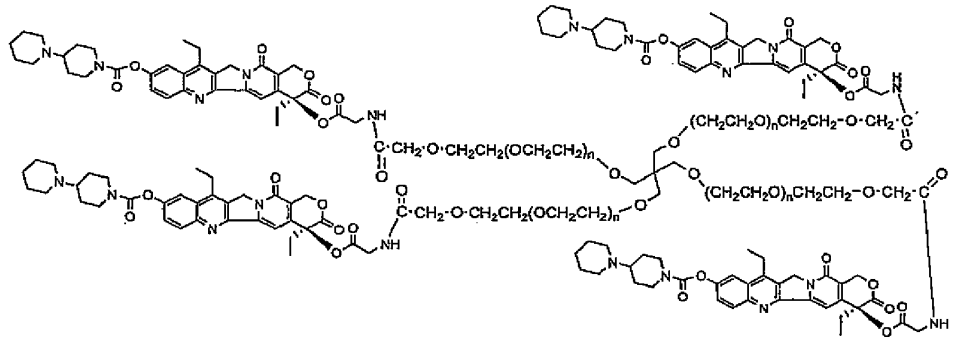
,

又は
(III)

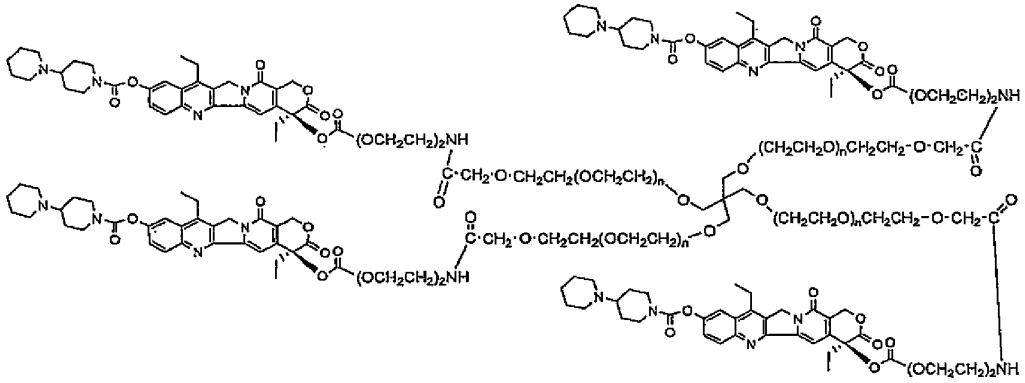


(ここで、
Z_1、Z_2、Z_3及びZ_4は、独立にOH又は$(L)_m$-Dであり、
Lは、二官能性リンカーであり、
Dは、カンプトテシン又はカンプトテシン類似体であり、
M_1は、O、S、又はNHであり、
(d)は、0、又は約1～約10の正の整数であり、
(z)は、0、又は約1～約29の正の整数であり、
(m)は、0、又は正の整数であり、かつ
(n)は約10～約2300の正の整数であり、その結果、化合物のポリマー性部分は約2,000～約100,000ダルトンの総数平均分子量を有する、
但し、Z_1、Z_2、Z_3及びZ_4のすべてがOHであることはない)
である、請求項28に記載の方法。
【請求項３０】
Dが、カンプトテシン、SN38、トポテカン、及びCPT-11からなる群から選択される、請求項29に記載の方法。
【請求項３１】
ポリマー性複合体が、

【化７】



又は



(ここで、(n)は約28～約341の整数であり、その結果、式(II)の化合物のポリマー性部分の総分子量が、約5,000～約60,000ダルトンの範囲にある)
である、請求項29に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、その内容が参照により本明細書に組み込まれる、2009年7月22日に出願の米国特許仮出願第61/227,599号に基づく優先権の特典を要求する。

【０００２】

本発明は、HER2陽性がんの治療方法に関する。詳細には、本発明は、HER2拮抗薬を7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンのポリエチレングリコール複合体と組み合わせて投与することによって、哺乳動物におけるHER2陽性がんを治療する方法に関する。

【背景技術】

【０００３】

乳がんは、合衆国の女性の間で最も広く知られた部類のがんである。最近の研究は、乳がんのほぼ20～25%がHER2(ヒト上皮成長因子受容体2)陽性であることを示している。HER2タンパク質は、HER2受容体又はHER2/neu又はErbB2とも呼ばれ、体中の一部の正常細胞の表面上で見出される。HER2は、細胞の成長及び生存を調節することに関して役割を演じる。HER2タンパク質、コードしている遺伝子、及びHER2タンパク質に対する抗体は、参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、米国特許第6,165,464号中に詳細に記載されている。

【０００４】

研究は、乳がん腫瘍がHER2タンパク質を過剰発現している場合に、乳がんはより侵襲性である可能性があることを示している。HER2陽性腫瘍は、HER2陽性でない腫瘍に比べてよ

り急速に成長し拡大する。HER2陽性乳がんにおいて、がん細胞は、細胞当たりの異常に大きなHER2遺伝子コピー数を有する。Slamon DJ.ら、Science 244:707~712,1989;及びPegram Mら、Semin.Oncol.27:13~19,2000を参照されたい。HER陽性乳がんは、HER2陽性でないがんに比べて2.5倍より多く再発することが報告されている。また、HER2の過剰発現は、化学療法薬に対する抵抗性と関連していることが示唆されている。

【０００５】

トラスツズマブは、HER2(又はHER2/neu)受容体のドメインIVに選択的に結合するヒト化モノクロナール抗体である。トラスツズマブは、HER2タンパク質に結合することによって腫瘍細胞の成長を抑制する。臨床研究は、トラスツズマブの使用が、侵襲性HER2陽性がんを有する者の中での再発リスクを半分未満まで低減することを示した。

【０００６】

治療薬の相乗効果を達成するか、或いはその副作用を低減するための試みにおいて、化学療法薬と組み合わせたトラスツズマブを用いてがんを治療する種々の試験がおこなわれてきた。少し例を挙げれば、トラスツズマブとの併用療法には、ドセタキセル/ゲフィチニブ/トラスツズマブ、カペシタビン/パクリタキセル/トラスツズマブ、カルボプラチン/ドセタキセル/トラスツズマブ、カルボプラチン/ゲムシタビン/パクリタキセル/トラスツズマブ、カルボプラチン/パクリタキセル/トラスツズマブ、シスプラチン/ドセタキセル/トラスツズマブ、シクロホスファミド/ドキソルビシン/トラスツズマブ、シクロホスファミド/フルオロウラシル/メトトレキサート/トラスツズマブなどがある。また、例えば、米国特許第6,313,138号、6,462,017号、6,537,988号、及び6,846,816号を参照されたい。化学療法と組み合わせたトラスツズマブは、初期及び後期の双方の転移性がんの女性を延命することが示されている。例えば、生存期間中央値は、化学療法のみを受け入れている患者での20.0ヶ月と比較して、トラスツズマブ及び化学療法を受け入れている患者では26.2ヶ月まで増加する。

【０００７】

残念ながら、患者は、1年などの長期にわたってトラスツズマブ療法を受け入れる必要がある。トラスツズマブでのこのような長期治療は、有害な効果を有する。トラスツズマブの単独又は化学療法と組み合わせた治療は、心不全をもたらしたことが報告されている。また、患者が、トラスツズマブを、アントラサイクリンをベースにした化学療法と組み合わせて受け入れることは危険であることも報告されている。トラスツズマブを、ドキソルビシン、シクロホスファミド、及びパクリタキセル又はドセタキセルのどちらかなどの化学療法薬と組み合わせて受け入れているかなりの数の患者が心不全を発症した。かくして、トラスツズマブを含めた療法は、トラスツズマブを含めた療法に先立って、及び療法中に、患者が心機能検査を受けることを必要とし、心臓に問題がある患者は、トラスツズマブを含めた療法を受け入れないか、或いは中止することが推奨される。トラスツズマブの長期使用は、また、化学療法で誘発される好中球減少症を悪化させる可能性がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

したがって、HER2陽性がんの治療方法に対する必要性が相変わらず存在する。本発明は、この必要性に取り組むものである。

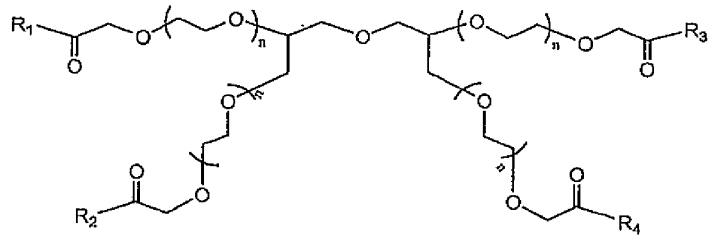
【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明の一態様において、哺乳動物におけるHER2陽性がんの治療方法が提供される。該方法は、哺乳動物にHER2受容体拮抗薬を、有効量の式(I)の化合物:

【化１】

(I)

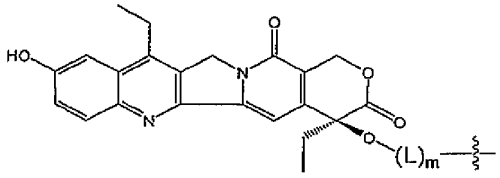


【００１０】

[式中、

R_1、R_2、R_3及びR_4は、R_1、R_2、R_3及びR_4のすべてがOHであることはないとの条件で、独立に、OH、又は

【化２】



【００１１】

(ここで、Lは、二官能性リンカーであり、各Lは、(m)が2以上であるなら、同一であるか或いは異なり、(m)は0又は正の整数である)

であり、

(n)は正の整数である]

又は哺乳動物に対して薬学的に許容されるその塩と組み合わせて投与することを含む。

【００１２】

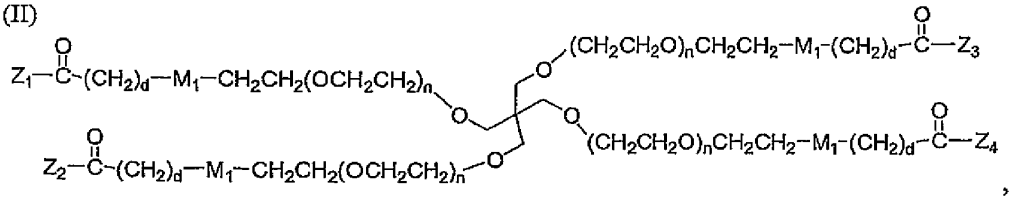
代わりの態様では、哺乳動物におけるHER2陽性がんの治療方法が提供される。該方法は、前記哺乳動物にHER2受容体拮抗薬を、有効量のカンプトテシン、カンプトテシン類似体、カンプトテシン又はその類似体のポリマー性複合体、或いはそれらの薬学的に許容される塩と組み合わせて投与することを含む。

【００１３】

一実施形態において、該方法は、HER2陽性がんを有する哺乳動物にHER2受容体拮抗薬をカンプトテシン又はその類似体のポリマー性複合体をプラスして投与することによって実施される。ポリマー性複合体は、式(II)又は(III)の化合物:

【化３】

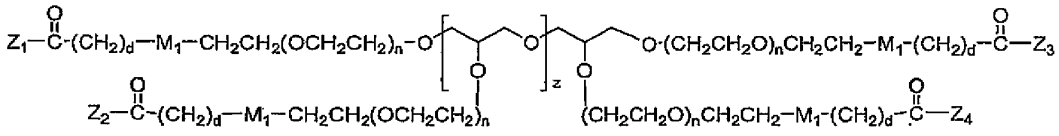
(II)



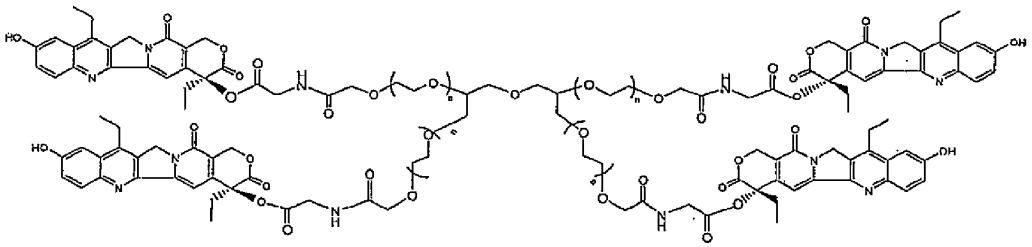
,

又は

(III)



【００１４】
(ここで、
Z_1、Z_2、Z_3及びZ_4は、Z_1、Z_2、Z_3及びZ_4のすべてがOHであることはないとの条件で、独立にOH又は$(L)_m$-Dであり、
Lは、二官能性リンカーであり、
Dは、カンプトテシン又はカンプトテシン類似体であり、
Mは、O、S、又はNHであり、
(d)は、0、又は約1～約10の正の整数であり、
(z)は、0、又は1～約29の正の整数であり、
(m)は、0、又は正の整数であり、(m)が2以上であるなら、各Lは同一であるか、或いは異なる、且つ
(n)は約10～約2,300の正の整数であり、その結果、化合物のポリマー性部分は約2,000～約100,000ダルトンの数平均総分子量を有する)
を含む。
【００１５】
一実施形態において、本明細書に記載の方法中で採用されるHER2拮抗薬としては、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,821,337号及び6,165,464号によって詳細に説明されているような、Herceptin(登録商標)の商標で市販されているトラスツズマブが挙げられる。
【００１６】
一つの好ましい実施形態において、本明細書に記載の方法中で採用される7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンのポリマー性プロドラッグとしては、次の構造:
【化４】



【００１７】
(式中、(n)は、約28～約341、好ましくは約114～約239、より好ましくは約227である)
を有する4アーム型PEG-7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン複合体が挙げられる。
【００１８】
さらに別の実施形態において、本明細書に記載の方法は、
(a)がんを有する哺乳動物におけるHER2陽性がんの存在を判定すること;及び
(b)HER2陽性がんを有する哺乳動物に有効量のHER2受容体拮抗薬を、有効量の式(I)(或いは、式(II)又は(III))の化合物と組み合わせて投与することを含む。
【００１９】
別の態様において、本発明は、HER2陽性がんを有する哺乳動物におけるHER2受容体拮抗薬の効果を増大させる方法を提供する。
【００２０】
さらに別の態様において、本発明は、HER2陽性細胞の成長又は増殖を抑制する方法、並びに7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンなどのカンプトテシンを哺乳動物中のHER2陽性細胞に送達する方法を提供する。
【００２１】
本発明の一つの利点は、本発明が、HER2拮抗薬を含む療法に応答しなかった患者、又はHER2拮抗薬に初めは応答したが後に抵抗性を発現した患者を治療するために、HER2拮抗薬をベースにした療法を有効に利用する手段を提供する。患者は、トラスツズマブ及びペル

ツズマブなどのHER2拮抗薬に対する抵抗性の予想外の欠如及び/又は低下から利益を得ることができる。

【００２２】

別の利点は、本発明が、予後の思わしくない患者を治療する手段を提供することである。HER2は、薬物抵抗性及び全般的に思わしくない予後と相互に関連していると考えられる。HER2拮抗薬は、本発明による本明細書に記載の式(I)の化合物(或いは、式(II)又は(III)の化合物)と共に投与すると、HER2拮抗薬を本明細書に記載の化合物と組み合わせないで投与する治療と比較して、腫瘍の成長及び/又は増殖を抑制する上で有意に効果的である。

【００２３】

さらに別の利点は、本発明が、HER2拮抗薬の治療効力を増加させ、且つ必要とする特定の患者が、HER2の関連する療法をHER2療法の単独と比較してより短い期間又はより少ない量で受け入れることを許容することである。HER2の関連する療法に付随する、又は由来する任意の副作用を、HER2拮抗薬療法の高められた効力によって軽減することができる。

【００２４】

さらなる利点は、以下の説明及び図面から明らかであろう。

【００２５】

本発明の目的に関して、「HER2陽性がん」及び「HER2過剰発現性がん」は、互換的に使用される。HER2陽性のがん細胞には、過剰な量の細胞表面上のHER2タンパク質、及び/又はHER2/neuをコードする遺伝子の増幅が存在する。HER2の発現レベルは、当技術分野で公知の技術、及び後に記載の方法で測定することができる。HER2陽性がんは、HER2非陽性がん又は正常な細胞若しくは組織に比較して、HER2タンパク質又は遺伝子のより大きな発現を有する。例えば、HER2は、がん細胞の表面上に発現されたHER2タンパク質の量を測定する免疫組織化学(「IHC」)アッセイによって測定される。IHCアッセイは、染色強度及び細胞膜染色の完全性に基づいて0~3+の尺度で評点化される。例えば、IHCアッセイで評点が3+であるがんは、HER2陽性がんであると見なされる。IHCアッセイで評点が2+であるがんは、蛍光in-situハイブリダイゼーション(「FISH」)アッセイによってさらに検査することができ、そこで陽性のFISHアッセイは、そのがんがHER2陽性であることを裏付ける。FISHアッセイは、がん細胞中に存在するHER2/neu遺伝子のコピー数を測定する。FISH検査の結果は、腫瘍細胞中の20個の間期核中でのHER2のシグナル数の染色体17のシグナル数に対する比率によって示される。正常検体は、2.0未満の比率を示し、一方、HER2/neuの増幅を有する検体は、2.0以上の比率を有し、HER2陽性(FISH+)と画定される。

【００２６】

用語「HER2受容体拮抗薬」及び「HER2拮抗薬」は、HER2のタンパク質又は遺伝子の発現又は機能を抑制する化合物を指す。本発明の目的に関して、HER2拮抗薬は、例えば、受容体チロシンキナーゼ阻害薬、特にHER2受容体タンパク質阻害薬を指す。単純に例を挙げれば、HER2拮抗薬には、抗HER2抗体が含まれる。HER2拮抗薬の定義は、また、アンチセンスHER2オリゴヌクレオチドを包含すると解釈される。

【００２７】

本発明の目的に関して、用語「補助治療」は、一次(初期)治療に付加して与えられる治療を指す。補助治療は、最終目標に到達するのを助けるように設計された付加的治療である。

【００２８】

本発明の目的に関して、用語「早期」又は「初期」乳がんは、そのがんが、乳房又は上腕下のリンパ節(腋窩リンパ節として知られる)を超えて拡がっていないことを意味する。ステージ0、I及びII、並びにステージIIIの一部のがんは、通常、初期と見なされる。

【００２９】

本発明の目的に関して、不応性又は抵抗性がんは、本明細書に記載の式(I)の化合物(或いは、式(II)又は(III)の化合物)を含まない先行の抗がん療法又は治療に対して応答しなかったがんと定義される。一態様において、がんは、単独で又は式(I)の化合物(或いは、

式(II)又は(III)の化合物)を含まない化学療法と組み合わせて使用した場合に、HER2抗体(例えば、トラスツズマブ及びペルツズマブ)などのHER2受容体拮抗薬に対して抵抗性又は不応性である。一実施形態において、がんは、Herceptin(登録商標)治療の単独に対して、又は本明細書に記載の式(I)の化合物を含まない化学療法をプラスしたHerceptin(登録商標)に対して不応性又は抵抗性である。がんは、治療の初期段階で不応性又は抵抗性であることがあり、或いはがんは、治療中/治療後に不応性又は抵抗性になる可能性もある。したがって、不応性がんは、治療の開始時に応答しない、又は初めに短期間応答するが、治療に応答しなくなる腫瘍を包含する。不応性がんは、また、抗がん療法での治療に応答するが、それに続く療法の繰り返しに応答しなくなる腫瘍を包含する。本発明の目的に関して、不応性がんは、また、抗がん療法での治療によって抑制されるように見えるが、治療を中止した後に5年までに、時には10年、又はそれ以上までに再発する腫瘍を包含することができる。抗がん療法は、化学療法薬の単独、放射線の単独、又はこれらの組合せを採用することができる。限定するものではないが説明を容易にするため、不応性がんは、抵抗性がんと互換性があると理解される。

【００３０】

本発明の目的に関して、不応性又は抵抗性がんの成功的治療は、不応性又は抵抗性の症状又は状態が、本明細書に記載の併用治療の間及び/又は後に、本明細書に記載の併用療法の不在下で観察されるものと比較して、抑制され、最小化され、又は和らげられることを意味すると理解されるものとする。最小化され、和らげられ、又は抑制された不応状態は、当業者によって想定される臨床マーカーによって確認することができる。一例において、不応性又は抵抗性がんの成功的治療は、本明細書に記載の治療の不在下で観察されるものと比較して、当業者によって想定されるその他の臨床マーカーを含め、少なくとも5%、好ましくは10% より好ましくは20%以上(すなわち、30、40、又は50%以上)の抑制、或いは腫瘍成長及び/又は再発の減少が認識される場合に、実現したと考えるものとする。臨床医は、不応性がんの重症度及び重大性の変化を示す臨床マーカーを判定することができる。

【００３１】

本発明の目的に関して、用語「がん」及び「腫瘍」は、そうでないことを指摘しない限り、互換的に使用される。がんは、そうでないことを指摘しない限り、良性、悪性、及び/又は転移性がんを包含する。がんは、より侵襲性であっても、或いはより侵襲性が小さくてもよい。侵襲性表現型は、腫瘍を形成し、且つ転移する増殖速度及び能力を指す。侵襲性がんは、侵襲性のより小さい腫瘍と比較して、より急速に増殖し、腫瘍を形成し、より容易に転移する。

【００３２】

本発明の目的に関して、「腫瘍/がんの治療」は、本明細書に記載の併用療法の完了後に、本明細書に記載の併用療法を受け入れなかった患者と比較して、患者において認識される腫瘍成長、腫瘍量及び転移の抑制、低下、又は改善、腫瘍の緩解、或いは腫瘍再発及び/又は新生物成長の抑制を意味すると理解されるものとする。成功的治療は、患者が肯定的な臨床結果を達成する場合に現れると考えられる。例えば、腫瘍の成功的治療は、本明細書に記載の併用治療の不在下で観察されるものと比較して、当業者によって想定されるその他の臨床マーカーを含め、腫瘍成長の少なくとも10% 好ましくは20% より好ましくは30%以上の減少が認識される場合に、現れると考えられるものとする。本明細書に記載の治療に由来する腫瘍臨床状態の変化を判定するためのその他の方法としては、腫瘍生体組織検査などの生検、抗体、放射性同位元素、色素を使用する免疫組織化学研究、及び総血球数(CBC)が挙げられる。

【００３３】

本発明の目的に関して、本発明により想定されるHER2の過剰発現に関連する疾患又は障害は、HER2のタンパク質又は遺伝子が状態の病理又は進行において役割を演じる状態を包含する。

【００３４】

本発明の目的に関して、用語「有効量」及び「十分な量」は、そのような効果が当業者によって理解されるような、所望の効果又は治療効果を達成する量を意味するものとする。治療すべき各哺乳動物又はヒト患者に対する有効量は、良好な実施と相反する望ましくない効果を回避しながら、所望の臨床応答を提供する範囲で当業者が容易に決定する。投与量の範囲は後に示される。

【００３５】

本発明の目的に関して、用語「残留物」は、化合物が別の化合物との置換反応を受けた後に残留している、例えば、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン、アミノ酸などを指す化合物の一部を意味すると理解されるものとする。

【００３６】

本発明の目的に関して、用語「ポリマー性残基」又は「PEG残基」は、それが、例えば、アミノ酸、化合物を含有する7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンとの反応を経た後に残留しているポリマー又はPEGの部分をそれぞれ意味すると理解されるものとする。

【００３７】

本発明の目的に関して、用語「アルキル」は、直鎖、分枝鎖、及び環状アルキル基を含む飽和脂肪族炭化水素を指す。用語「アルキル」は、また、アルキル-チオ-アルキル、アルコキシアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、及び$C_{1\sim6}$アルキルカルボニルアルキル基を包含する。好ましくは、該アルキル基は1~12個の炭素を有する。より好ましくは、それは、約1~7個の炭素、さらにより好ましくは約1~4個の炭素からなる低級アルキルである。該アルキル基は、置換されていても、置換されていなくてもよい。置換されているなら、置換基としては、好ましくは、ハロ、オキシ、アジド、ニトロ、シアノ、アルキル、アルコキシ、アルキル-チオ、アルキル-チオ-アルキル、アルコキシアルキル、アルキルアミノ、トリハロメチル、ヒドロキシル、メルカプト、ヒドロキシ、シアノ、アルキルシリル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリール、アルケニル、アルキニル、$C_{1\sim6}$ヒドロカルボニル、アリール、及びアミノ基が挙げられる。

【００３８】

本発明の目的に関して、用語「置換された」は、ある官能基又は化合物内に含まれる一つ又は複数の原子が、ハロ、オキシ、アジド、ニトロ、シアノ、アルキル、アルコキシ、アルキル-チオ、アルキル-チオ-アルキル、アルコキシアルキル、アルキルアミノ、トリハロメチル、ヒドロキシル、メルカプト、ヒドロキシ、シアノ、アルキルシリル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリール、アルケニル、アルキニル、$C_{1\sim6}$アルキルカルボニルアルキル、アリール、及びアミノ基からなる群に由来する部分の一つでもって付加されること、或いは置き換えられることを指す。

【００３９】

本発明の目的に関して、用語「アルケニル」は、直鎖、分枝鎖、及び環状基を含み、少なくとも一つの炭素-炭素二重結合を含む基を指す。好ましくは、該アルケニル基は、約2~12個の炭素を有する。より好ましくは、それは、約2~7個の炭素、さらにより好ましくは約2~4個の炭素からなる低級アルケニルである。該アルケニル基は、置換されていても、置換されていなくてもよい。置換されているなら、置換基としては、ハロ、オキシ、アジド、ニトロ、シアノ、アルキル、アルコキシ、アルキル-チオ、アルキル-チオ-アルキル、アルコキシアルキル、アルキルアミノ、トリハロメチル、ヒドロキシル、メルカプト、ヒドロキシ、シアノ、アルキルシリル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリール、アルケニル、アルキニル、$C_{1\sim6}$ヒドロカルボニル、アリール、及びアミノ基が挙げられる。

【００４０】

本発明の目的に関して、用語「アルキニル」は、直鎖、分枝鎖、及び環状基を含み、少なくとも一つの炭素-炭素三重結合を含む基を指す。好ましくは、該アルキニル基は、約2~12個の炭素を有する。より好ましくは、それは、約2~7個の炭素、さらにより好ましくは約2~4個の炭素からなる低級アルキニルである。該アルキニル基は、置換されていても

、置換されていなくてもよい。置換されているなら、置換基としては、ハロ、オキシ、アジド、ニトロ、シアノ、アルキル、アルコキシ、アルキル-チオ、アルキル-チオ-アルキル、アルコキシアルキル、アルキルアミノ、トリハロメチル、ヒドロキシル、メルカプト、ヒドロキシ、シアノ、アルキルシリル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロアリール、アルケニル、アルキニル、$C_{1\sim6}$ヒドロカルボニル、アリール、及びアミノ基が挙げられる。「アルキニル」の例には、プロピニル(すなわち、プロパルギル)、及び3-ヘキシニルが含まれる。

【００４１】

本発明の目的に関して、用語「アリール」は、少なくとも一つの芳香族環を含む芳香族炭化水素の環系を指す。該芳香族環は、任意選択で、他の芳香族炭化水素環又は非芳香族炭化水素環と縮合しているか、さもなければ結合していることができる。アリール基の例には、例えば、フェニル、ナフチル、1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフタレン及びビフェニルが含まれる。アリール基の好ましい例には、フェニル及びナフチルが含まれる。

【００４２】

本発明の目的に関して、用語「シクロアルキル」は、$C_{3\sim8}$環状炭化水素を指す。シクロアルキルの例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが含まれる。

【００４３】

本発明の目的に関して、用語「シクロアルケニル」は、少なくとも一つの炭素-炭素二重結合を含む$C_{3\sim8}$環状炭化水素を指す。シクロアルケニルの例には、シクロペンテニル、シクロペンタジエニル、シクロヘキセニル、1, 3-シクロヘキサジエニル、シクロヘプテニル、シクロヘプタトリエニル、及びシクロオクテニルが含まれる。

【００４４】

本発明の目的に関して、用語「シクロアルキルアルキル」は、$C_{3\sim8}$シクロアルキル基で置換されたアルキル基を指す。シクロアルキルアルキル基の例には、シクロプロピルメチル及びシクロペンチルエチルが含まれる。

【００４５】

本発明の目的に関して、用語「アルコキシ」は、指定数の炭素原子からなり、酸素橋を介して親分子部分に結合されたアルキル基を指す。アルコキシ基の例には、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、及びイソプロポキシが含まれる。

【００４６】

本発明の目的に関して、「アルキルアリール」基は、アルキル基で置換されたアリール基を指す。

【００４７】

本発明の目的に関して、「アラルキル」基は、アリール基で置換されたアルキル基を指す。

【００４８】

本発明の目的に関して、用語「アルコキシアルキル」基は、アルコキシ基で置換されたアルキル基を指す。

【００４９】

本発明の目的に関して、用語「アミノ」は、一つ又は複数の水素基ラジカルを有機基で置き換えることによってアンモニアから誘導される当技術分野で周知の窒素含有基を指す。例えば、用語「アシルアミノ」及び「アルキルアミノ」は、それぞれアシル及びアルキル置換基を有する特定のN-置換有機基を指す。

【００５０】

本発明の目的に関して、用語「ハロゲン」又は「ハロ」は、フッ素、塩素、臭素、及びヨウ素を指す。

【００５１】

本発明の目的に関して、用語「ヘテロ原子」は、窒素、酸素、及び硫黄を指す。

【００５２】

本発明の目的に関して、用語「ヘテロシクロアルキル」は、窒素、酸素、及び硫黄から選択される少なくとも一つのヘテロ原子を含む非芳香族環系を指す。該ヘテロシクロアルキル環は、任意選択で、他のヘテロシクロアルキル環及び/又は非芳香族炭化水素環へ縮合されているか、さもなければ結合されていてもよい。好ましいヘテロシクロアルキル基は、3~7個の環員を有する。ヘテロシクロアルキル基の例には、例えば、ピペラジン、モルホリン、ピペリジン、テトラヒドロフラン、ピロリジン、及びピラゾールが含まれる。好ましいヘテロシクロアルキル基としては、ピペリジニル、ピペラジニル、モルホリニル、及びピロリジニルが挙げられる。

【００５３】

本発明の目的に関して、用語「ヘテロアリール」は、窒素、酸素、及び硫黄から選択される少なくとも一つのヘテロ原子を含む芳香族環系を指す。該ヘテアリール環は、一つ又は複数のヘテロアリール環、芳香族又は非芳香族の炭化水素環又はヘテロシクロアルキル環へ縮合されているか、さもなければ結合されていてもよい。ヘテロアリール基の例には、例えば、ピリジン、フラン、チオフェン、5,6,7,8-テトラヒドロイソキノリン、及びピリミジンが含まれる。ヘテロアリール基の好ましい例には、チエニル、ベンゾチエニル、ピリジル、キノリル、ピラジニル、ピリミジル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、フラニル、ベンゾフラニル、チアゾリル、ベンゾチアゾリル、イソキサゾリル、オキサジアゾリル、イソチアゾリル、ベンズイソチアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピロリル、インドリル、ピラゾリル、及びベンゾピラゾリルが含まれる。

【００５４】

一部の実施形態において、置換アルキルには、カルボキシアルキル、アミノアルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシアルキル、及びメルカプトアルキルが含まれ、置換アルケニルには、カルボキシアルケニル、アミノアルケニル、ジアルケニルアミノ、ヒドロキシアルケニル、及びメルカプトアルケニルが含まれ、置換アルキニルには、カルボキシアルキニル、アミノアルキニル、ジアルキニルアミノ、ヒドロキシアルキニル、及びメルカプトアルキニルが含まれ、置換シクロアルキルには、4-クロロシクロヘキシルなどの部分が含まれる。

【００５５】

本発明の目的に関して、「正の整数」は、1以上の整数(例えば、約1~約10、約1~約6の整数)を含むと理解されるものとし、且つ当業者によって道理に合う範囲内にあると理解されるものとする。

【００５６】

本発明の目的に関して、用語「連結された」は、ある基の別の基への、すなわち化学反応の結果としての共有(好ましくは)又は非共有結合を含むと理解されるものとする。

【００５７】

本発明の目的に関して、用語「核酸」又は「ヌクレオチド」は、そうでないことを特記しない限り、一本鎖であろうと二本鎖であろうと、デオキシリボ核酸(「DNA」)、リボ核酸(「RNA」)及びその任意の化学修飾体にあてはまる。

【００５８】

好ましくは、本発明により治療される予定の哺乳動物はヒトである。

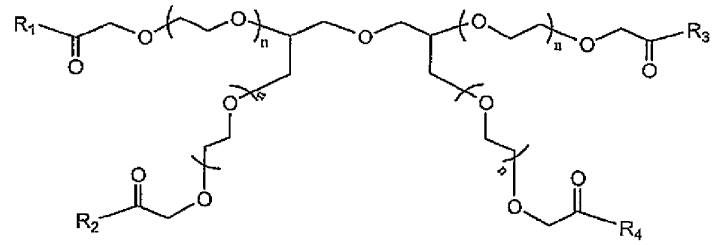
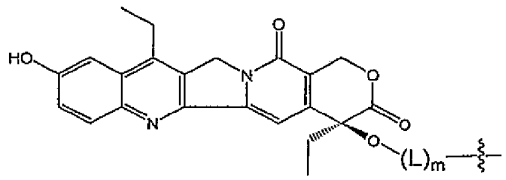
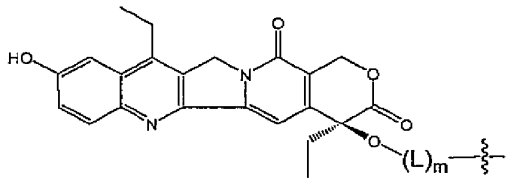
【図面の簡単な説明】

【００５９】

【図１】実施例4で説明する、ヒト血漿、リン酸塩緩衝液、及び生理食塩水中での4アーム型-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)の安定性を例示する図である。

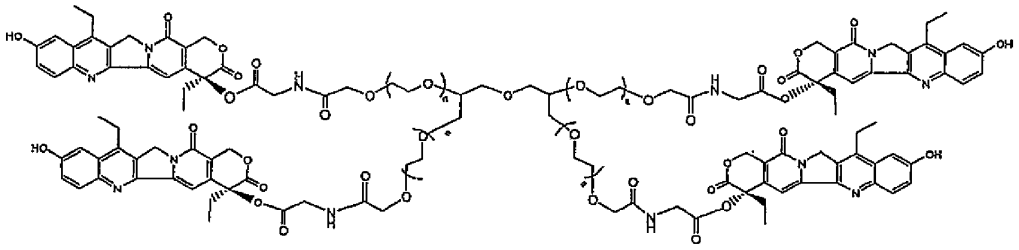
【図２】実施例4で説明する、4アーム型-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)の安定性に対するpHの効果を例示する図である。

【図３】図3Aは、実施例5で説明する、4アーム型-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)の薬物動態プロフィールを例示する図である。図3Bは、実施例5で説明する、4アーム型-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)の薬物動態プロフィールを例示する図である。4アーム型-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体

の腸肝循環を示す。
【図４】実施例6で説明する、Herceptin(登録商標)及びペルツズマブに不応性であるヒトJIMT-1乳房腫瘍を異種移植されたマウスにおける腫瘍成長の抑制を例示する図である。
【図５】実施例7で説明する、ヒトN87胃がんを異種移植されたマウスにおける腫瘍成長の抑制を例示する図である。
【発明を実施するための形態】
【００６０】
A. 概要
本発明の一態様では、哺乳動物におけるHER2陽性がんの治療方法が提供される。該方法は、前記哺乳動物にHER2受容体拮抗薬を有効量の式(I)の化合物:
【化５】
(I)

【００６１】
[式中、
R_1、R_2、R_3及びR_4は、R_1、R_2、R_3及びR_4のすべてがOHであることはないとの条件で、独立にOH、又は
【化６】

【００６２】
(ここで、
Lは、二官能性リンカーであり、
(m)は、0又は正の整数であり、好ましくは0又は約1～約10(例えば、1、2、3、4、5、6)の整数であり、(m)が2以上であるなら、各Lは同一であるか、或いは異なる)
であり、
(n)は、正の整数である]
又はその薬学的に許容される塩と組み合わせて投与することを含む。
【００６３】
一つの好ましい実施形態において、該方法は、哺乳動物にHER2受容体拮抗薬を、該式中のR_1、R_2、R_3及びR_4がすべて:
【化７】

である式(I)の化合物と組み合わせて投与することを含む。
【００６４】

より好ましい態様において、該方法は、HER2受容体拮抗薬を、式(Ia)の化合物:

【化８】



【００６５】

(ここで、(n)は約227であり、その結果、該化合物のポリマー性部分は約40,000ダルトンの総数平均分子量を有する)

と組み合わせて投与することを含む。

【００６６】

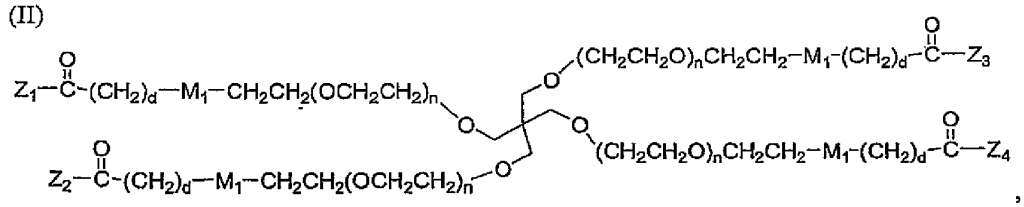
代わりの態様では、哺乳動物におけるHER2陽性がんの治療方法が提供される。該方法は、前記哺乳動物にHER2受容体拮抗薬を、有効量のカンプトテシン、カンプトテシン類似体、カンプトテシン又はその類似体のポリマー性複合体、或いはそれらの薬学的に許容される塩と組み合わせて投与することを含む。

【００６７】

一実施形態において、該方法は、HER2陽性がんを有する哺乳動物にHER2受容体拮抗薬をカンプトテシン又はその類似体のポリマー性複合体をプラスして投与することによって実施される。ポリマー性複合体は、式(II)又は(III)の化合物:

【化９】

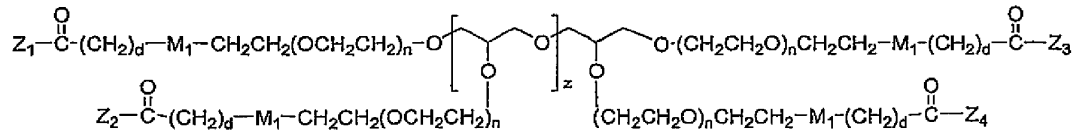
(II)



,

又は

(III)



【００６８】

(ここで、

Z_1、Z_2、Z_3及びZ_4は、Z_1、Z_2、Z_3及びZ_4のすべてがOHであることはないとの条件で、独立にOH又は$(L)_m$-Dであり、

Lは、二官能性リンカーであり、

Dは、カンプトテシン又はカンプトテシン類似体であり、

M_1は、O、S、又はNH、好ましくはOであり、

(d)は、0、又は約1~約10の正の整数であり、好ましくは0、1、2又は3であり、より好ましくは0又は1であり

(z)は、0、又は1~約29の正の整数であり、好ましくは1、5、13又は29であり、

(m)は、0、又は正の整数であり、好ましくは0又は約1~約10(例えば、1、2、3、4、5、6)の整数であり、(m)が2以上であるなら、各Lは同一であるか、或いは異なる、且つ

(n)は約10～約2,300の正の整数であり、その結果、化合物のポリマー性部分は約2,000～約100,000ダルトンの数平均総分子量を有する)
を含む。

【００６９】

一つの特定の実施形態では、SN38を、その20-OHの位置で式(II)又は(III)のマルチアーム型ポリエチレングリコールにグリシン、アラニン、メチオニンなどの二官能性リンカーを介して結合する。代わりに、カンプトテシン、トポテカン、又はCPT-11を、その20-OHの位置で式(II)又は(III)のマルチアーム型ポリエチレングリコールにグリシン、アラニン、メチオニン、サルコシンなどの二官能性リンカーを介して結合する。

【００７０】

HER2拮抗薬及び式(I)の化合物(或いは、式(II)又は(III)の化合物)を、所望の治療効果を達成するのに十分な量で投与する。

【００７１】

本明細書に記載の方法で治療することのできるHER2陽性がんには、限定はされないが、固形腫瘍、乳がん、胃がん(gastric cancer)、卵巣がん、胃がん(stomach cancer)、子宮がん、子宮体漿膜性子宮内膜癌、前立腺がん、膀胱がん、唾液腺癌、腎腺癌、及び乳腺癌が含まれる。前記リストは、排他的であることを意味せず、当業者は、本明細書中で具体的に言及しないHER2がんも包含されると解釈されることを認識するであろう。

【００７２】

HER2陽性がんは、転移性又は非転移性であり得る。

【００７３】

一態様において、本明細書に記載の方法は、単独で、又は式(I)の化合物(或いは、式(II)又は(III)の化合物)を含まない化学療法と組み合わせて使用した場合に、トラスツズマブ及びペルツズマブなどのHER2受容体拮抗薬に抵抗性又は不応性であるHER2陽性がんの治療において有用であり得る。本明細書に記載の併用治療は、また、抗HER2抗体に敏感であるHER2陽性がんを治療するのに有用である。何らかの理論によって拘束されるものではないが、本明細書に記載の方法は、HER2拮抗薬の治療効力を増強し、且つ/又は本明細書に記載の式(I)の化合物を含まない抗HER2抗体での治療と比較して、HER2陽性がんによるHER2受容体拮抗薬に対する抵抗性を軽減する。

【００７４】

さらなる態様において、本明細書に記載の方法は、HER2陽性がんを有する患者を識別するステップを含む。

【００７５】

代わりの態様において、本発明は、HER2の発現が正常な(又はHER2の過剰発現がない)哺乳動物で観察されるレベルと比較してより高いHER2タンパク質又は遺伝子のレベル(例えば、遺伝子発現)に関連する疾患又は障害を治療する方法を提供する。HER2タンパク質又は遺伝子の過剰発現に関係する病理学的状態は、本明細書に記載の治療から利益を得る。該方法は、HER2受容体拮抗薬を式(I)の化合物(或いは、式(II)又は(III)の化合物)又はその薬学的に許容される塩と組み合わせて投与して実施することができる。

【００７６】

一実施形態において、HER2受容体拮抗薬は、式(I)の化合物(或いは、式(II)又は(III)の化合物)と共に、同時に又は逐次的に投与することができる。

【００７７】

別の実施形態において、HER2受容体拮抗薬としては、抗HER2抗体、アンチセンスErbB2オリゴヌクレオチド、及びこれらの組合せが挙げられる。

【００７８】

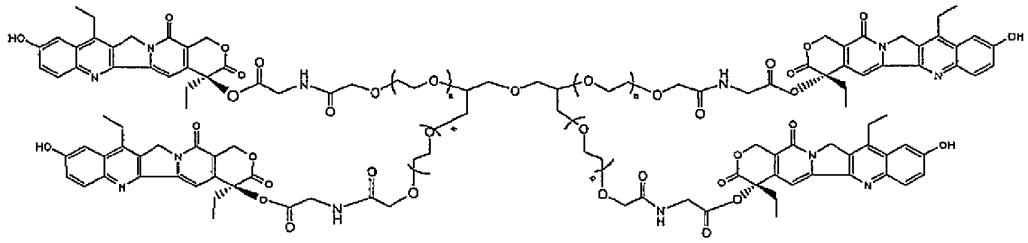
一つの好ましい実施形態において、該方法は、

(a)例えば、哺乳動物におけるHER2を過剰発現するがんの存在を判定することによってHER2陽性がんを有する哺乳動物を識別するステップ、及び

(b)HER2陽性がんを有する哺乳動物に、有効量のHER2受容体拮抗薬、好ましくはトラス

ツズマブを有効量の式(Ia)の化合物:

【化１０】



【００７９】

(ここで、(n)は、好ましくは約227であり、その結果、式(Ia)の化合物のポリマー性部分の総分子量は約40,000ダルトンである)

又はその薬学的に許容される塩と組み合わせて投与するステップを含む。

【００８０】

代わりの態様において、哺乳動物におけるチロシンキナーゼ依存性の疾患又は障害の治療方法が提供される。HER2受容体はチロシンキナーゼであり、それは、がんなどの病理学的状態に関与する。該方法は、過剰発現しているHER2に依存する疾患を有する哺乳動物にHER2受容体拮抗薬を、式(I)(或いは式(II)又は(III))の化合物と組み合わせて投与することを含む。これらの方法は、好ましくは、このような疾患又は障害を有する患者を識別するステップを含む。

【００８１】

さらに別の態様において、本発明は、HER2陽性がんを有する哺乳動物においてHER2受容体拮抗薬の効果を増大させる方法を提供する。該方法は、HER2受容体拮抗薬を、有効量の式(I)の化合物(或いは、式(II)又は(III)の化合物)と組み合わせて投与することを含む。

【００８２】

さらに別の態様において、本発明は、哺乳動物にHER2受容体拮抗薬を本明細書に記載の式(I)の化合物(或いは、式(II)又は(III)の化合物)又はその薬学的に許容される塩と組み合わせて投与することによって、或いは本明細書に記載の式(I)の化合物(或いは、式(II)又は(III)の化合物)又はその薬学的に許容される塩と組み合わせたHER2受容体拮抗薬をがんの細胞又は組織と接触させることによって、哺乳動物におけるHER2陽性細胞の成長、増殖、又は転移を抑制する方法を提供する。一つの特定の実施形態において、該方法は、

(a)細胞中のHER2発現の存在を測定すること、及び

(b)HER2受容体拮抗薬、及び有効量の請求項1に記載の式(I)(或いは、式(II)又は(III))の化合物又はその薬学的に許容される塩を、それを必要とする哺乳動物に投与することを含む。特定の態様において、細胞は癌性細胞である。

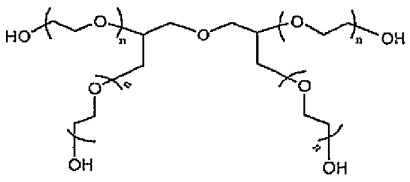
【００８３】

B.ポリマー性化合物

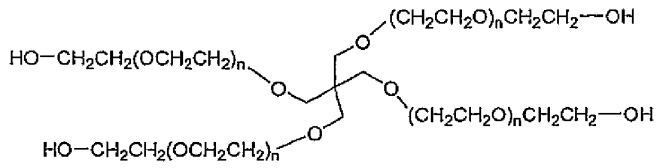
1.マルチアーム型ポリマー

本明細書に記載の化合物のポリマー性部分は、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの20-OH基に結合されたマルチアーム型PEGを含む。本発明の一態様において、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンのポリマー性プロドラッグは、複合化に先立って、次の構造:

【化１１】

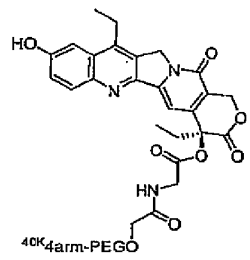


【００８４】
(ここで、(n)は正の整数である)
を有する4アーム型PEGを含む。
【００８５】
別法として、該ポリマー性化合物は、複合化に先立って、構造:
【化１２】

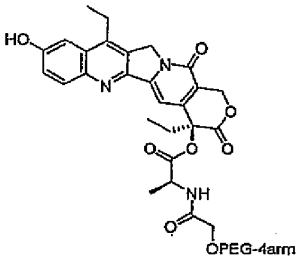


を有する4アーム型PEGを採用する。
【００８６】
マルチアーム型PEGは、その開示が参照により本明細書に組み込まれるNOF社のDrug Delivery Systemカタログ、バージョン8、2006年4月の中に記載のものである。
【００８７】
本発明の一つの好ましい実施形態において、ポリマーの重合度(n)は、約28～約341であり約5,000Da～約60,000Daの総数平均分子量を有するポリマーを提供し、好ましくは約114～約239であり約20,000Da～約42,000Daの総数平均分子量を有するポリマーを提供する。(n)は、ポリマー鎖中での繰返し単位の数を表し、ポリマーの分子量に依存する。本発明の一つの特に好ましい実施形態において、(n)は約227であり、約40,000Daの総数平均分子量を有するポリマー性部分を提供する。
【００８８】
2.二官能性リンカー
本発明の特定の好ましい態様において、二官能性リンカーにはアミノ酸が含まれる。天然に存在する既知のL-アミノ酸のいずれかから選択することのできるアミノ酸は、少し例を挙げれば、例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、セリン、トレオニン、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニン、ヒスチジン、プロリン、及び/又はこれらの組合せである。代わりの態様において、Lはペプチド残基であってもよい。ペプチドは、例えば、約2～約10個(例えば、2、3、4、5又は6個)のアミノ酸残基の大きさに及ぶことができる。
【００８９】
疎水性又は非疎水性の天然に存在するアミノ酸、及び当技術分野で公知の天然に存在しない種々のアミノ酸(D又はL)の誘導体及び類似体も、本発明の範囲に包含されると考えられる。単に例を挙げれば、アミノ酸の類似体及び誘導体には、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、β-アラニン、β-アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、ピペリジン酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、2,4-アミノ酪酸、デスモシン、2,2-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロ-イソロイシン、N-メチルグリシン若しくはサルコシン、N-メチルイソロイシン、6-N-メチルリシン、N-メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチン、及び参照により本明細書に組み込まれる連邦官報63FR29620、29622中に挙げられている言及するにはあまりにも多いその他のものが含まれる。一部の好ましいL基としては、グリシン、アラニン、メチオニン又はサルコシンが挙げられる。例えば、化合物は、

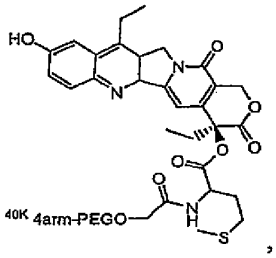
【化１３】



(化合物9:グリシン)

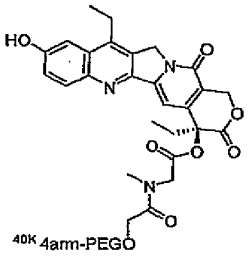


(化合物12:アラニン)



, 及び

(化合物18:メチオニン)



(化合物23:サルコシン)

の中の一つでよい。限定するものではないが説明を容易にするため、4アーム型PEGの一つのアームのみを示す。4アーム型PEGの一つのアームから四つのアームまでを、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンと複合化することができる。

【００９０】

より好ましくは、本明細書に記載の治療は、リンカー基(L)としてグリシンを含む化合物を採用する。

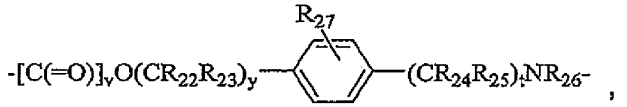
【００９１】

本発明の代わりの態様において、ポリマーと7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンとの間の連結をねらったLは、

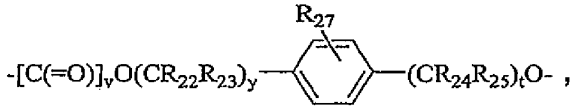
- [C(=O)]$_v$ ($CR_{22}R_{23}$)$_t$ - 、
- [C(=O)]$_v$ ($CR_{22}R_{23}$)$_t$ - O- 、
- [C(=O)]$_v$ ($CR_{22}R_{23}$)$_t$ - NR_{26} - 、
- [C(=O)]$_v$ O($CR_{22}R_{23}$)$_t$ - 、
- [C(=O)]$_v$ O($CR_{22}R_{23}$)$_t$ O- 、
- [C(=O)]$_v$ O($CR_{22}R_{23}$)$_t$ NR_{26} - 、
- [C(=O)]$_v$ NR_{21} ($CR_{22}R_{23}$)$_t$ - 、
- [C(=O)]$_v$ NR_{21} ($CR_{22}R_{23}$)$_t$ O- 、
- [C(=O)]$_v$ NR_{21} ($CR_{22}R_{23}$)$_t$ NR_{26} - 、
- [C(=O)]$_v$ ($CR_{22}R_{23}O$)$_t$ - 、
- [C(=O)]$_v$ O($CR_{22}R_{23}O$)$_t$ - 、
- [C(=O)]$_v$ NR_{21} ($CR_{22}R_{23}O$)$_t$ - 、
- [C(=O)]$_v$ ($CR_{22}R_{23}O$)$_t$ ($CR_{24}R_{25}$)$_y$ - 、
- [C(=O)]$_v$ O($CR_{22}R_{23}O$)$_t$ ($CR_{24}R_{25}$)$_y$ - 、
- [C(=O)]$_v$ NR_{21} ($CR_{22}R_{23}O$)$_t$ ($CR_{24}R_{25}$)$_y$ - 、
- [C(=O)]$_v$ ($CR_{22}R_{23}O$)$_t$ ($CR_{24}R_{25}$)$_y$ O- 、
- [C(=O)]$_v$ ($CR_{22}R_{23}$)$_t$ ($CR_{24}R_{25}O$)$_y$ - 、
- [C(=O)]$_v$ O($CR_{22}R_{23}O$)$_t$ ($CR_{24}R_{25}$)$_y$ O- 、
- [C(=O)]$_v$ O($CR_{22}R_{23}$)$_t$ ($CR_{24}R_{25}O$)$_y$ - 、
- [C(=O)]$_v$ NR_{21} ($CR_{22}R_{23}O$)$_t$ ($CR_{24}R_{25}$)$_y$ O- 、

-[C(=O)]$_v$NR$_{21}$(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$O)$_y$-、
-[C(=O)]$_v$(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$O-(CR$_{28}$R$_{29}$)$_{t'}$-、
-[C(=O)]$_v$(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$NR$_{26}$-(CR$_{28}$R$_{29}$)$_{t'}$-、
-[C(=O)]$_v$(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$S-(CR$_{28}$R$_{29}$)$_{t'}$-、
-[C(=O)]$_v$O(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$O-(CR$_{28}$R$_{29}$)$_{t'}$-、
-[C(=O)]$_v$O(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$NR$_{26}$-(CR$_{28}$R$_{29}$)$_{t'}$-、
-[C(=O)]$_v$O(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$S-(CR$_{28}$R$_{29}$)$_{t'}$-、
-[C(=O)]$_v$NR$_{21}$(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$O-(CR$_{28}$R$_{29}$)$_{t'}$-、
-[C(=O)]$_v$NR$_{21}$(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$NR$_{26}$-(CR$_{28}$R$_{29}$)$_{t'}$-、
-[C(=O)]$_v$NR$_{21}$(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$S-(CR$_{28}$R$_{29}$)$_{t'}$-、
-[C(=O)]$_v$(CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$NR$_{26}$-、
-[C(=O)]$_v$(CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$-、
-[C(=O)]$_v$O(CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$NR$_{26}$-、
-[C(=O)]$_v$O(CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$-、
-[C(=O)]$_v$NR$_{21}$(CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$NR$_{26}$-、
-[C(=O)]$_v$NR$_{21}$(CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$-、
-[C(=O)]$_v$(CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$)$_y$-、
-[C(=O)]$_v$O(CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$)$_y$-、
-[C(=O)]$_v$NR$_{21}$(CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$)$_y$-、
-[C(=O)]$_v$ (CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$)$_y$O-、
-[C(=O)]$_v$ (CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_y$-、
-[C(=O)]$_v$ (CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_y$NR$_{26}$-、
-[C(=O)]$_v$O(CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$)$_y$O-、
-[C(=O)]$_v$O(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_y$-、
-[C(=O)]$_v$O(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$(CR$_{24}$CR$_{25}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_y$NR$_{26}$-、
-[C(=O)]$_v$NR$_{21}$(CR$_{22}$R$_{23}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$)$_y$O-、
-[C(=O)]$_v$NR$_{21}$(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_y$-、
-[C(=O)]$_v$NR$_{21}$(CR$_{22}$R$_{23}$)$_t$(CR$_{24}$R$_{25}$CR$_{28}$R$_{29}$O)$_y$NR$_{26}$-、

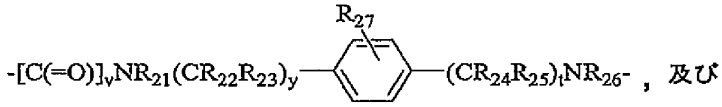
【化１４】



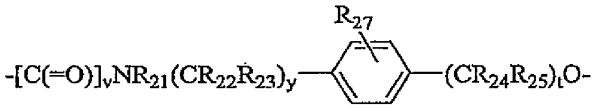
,



,



, 及び



の中から選択することができ、ここで、

R_{21}～R_{29}は、水素、アミノ、置換アミノ、アジド、カルボキシ、シアノ、ハロ、ヒドロキシル、ニトロ、シリルエーテル、スルホニル、メルカプト、$C_{1～6}$アルキルメルカプト、アリールメルカプト、置換アリールメルカプト、置換$C_{1～6}$アルキルチオ、$C_{1～6}$アルキル、$C_{2～6}$アルケニル、$C_{2～6}$アルキニル、$C_{3～19}$分枝アルキル、$C_{3～8}$シクロアルキル、$C_{1～6}$置換アルキル、$C_{2～6}$置換アルケニル、$C_{2～6}$置換アルキニル、$C_{3～8}$置換シクロアル

キル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、$C_{1\sim6}$ヘテロアルキル、置換$C_{1\sim6}$ヘテロアルキル、$C_{1\sim6}$アルコキシ、アリールオキシ、$C_{1\sim6}$ヘテロアルコキシ、ヘテロアリールオキシ、$C_{2\sim6}$アルカノイル、アリールカルボニル、$C_{2\sim6}$アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、$C_{2\sim6}$アルカノイルオキシ、アリールカルボニルオキシ、$C_{2\sim6}$置換アルカノイル、置換アリールカルボニル、$C_{2\sim6}$置換アルカノイルオキシ、置換アリールオキシカルボニル、$C_{2\sim6}$置換アルカノイルオキシ、及び置換アリールカルボニルオキシの中から独立に選択され;

(t)、(t')及び(y)は、0又は正の整数から、好ましくは約1~約10、例えば、1、2、3、4、5及び6から独立に選択され;且つ

(v)は、0又は1である。

【００９２】

本発明の範囲内で考えられる二官能性リンカーには、そのような組合せが安定な化合物をもたらすような、置換基と変数との組合せが許容されるものが含まれる。

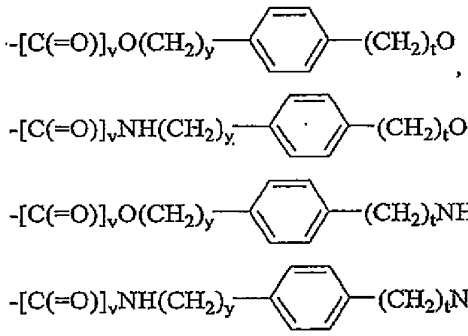
【００９３】

一部の好ましい実施形態では、Lとして、

- $[C(=O)]_v(CH_2)_t$-、
- $[C(=O)]_v(CH_2)_t$-O-、
- $[C(=O)]_v(CH_2)_t$-NH-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2)_t$-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2)_tO$-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2)_tNH$-、
- $[C(=O)]_vNH(CH_2)_t$-、
- $[C(=O)]_vNH(CH_2)_tO$-、
- $[C(=O)]_vNH(CH_2)_tNH$-、
- $[C(=O)]_v(CH_2O)_t$-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2O)_t$-、
- $[C(=O)]_vNH(CH_2O)_t$-、
- $[C(=O)]_v(CH_2O)_t(CH_2)_y$-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2O)_t(CH_2)_y$-、
- $[C(=O)]_vNH(CH_2O)_t(CH_2)_y$-、
- $[C(=O)]_v(CH_2O)_t(CH_2)_yO$-、
- $[C(=O)]_v(CH_2)_t(CH_2O)_y$-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2O)_t(CH_2)_yO$-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2)_t(CH_2O)_y$-、
- $[C(=O)]_vNH(CH_2O)_t(CH_2)_yO$-、
- $[C(=O)]_vNH(CH_2)_t(CH_2O)_y$-、
- $[C(=O)]_v(CH_2)_tO$-$(CH_2)_{t'}$-、
- $[C(=O)]_v(CH_2)_tNH$-$(CH_2)_{t'}$-、
- $[C(=O)]_v(CH_2)_tS$-$(CH_2)_{t'}$-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2)_tO$-$(CH_2)_{t'}$-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2)_tNH$-$(CH_2)_{t'}$-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2)_tS$-$(CH_2)_{t'}$-、
- $[C(=O)]_vNH(CH_2)_tO$-$(CH_2)_{t'}$-、
- $[C(=O)]_vNH(CH_2)_tNH$-$(CH_2)_{t'}$-、
- $[C(=O)]_vNH(CH_2)_tS$-$(CH_2)_{t'}$-、
- $[C(=O)]_v(CH_2CH_2O)_tNH$-、
- $[C(=O)]_v(CH_2CH_2O)_t$-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2CH_2O)_tNH$-、
- $[C(=O)]_vO(CH_2CH_2O)_t$-、
- $[C(=O)]_vNH(CH_2CH_2O)_tNH$-、

- [C(=O)] $_v$ NH(CH_2 CH_2 O) $_t$ -、
- [C(=O)] $_v$ (CH_2 CH_2 O) $_t$ (CH_2) $_y$ -、
- [C(=O)] $_v$ O(CH_2 CH_2 O) $_t$ (CH_2) $_y$ -、
- [C(=O)] $_v$ NH(CH_2 CH_2 O) $_t$ (CH_2) $_y$ -、
- [C(=O)] $_v$ (CH_2 CH_2 O) $_t$ (CH_2) $_y$ O-、
- [C(=O)] $_v$ (CH_2) $_t$ (CH_2 CH_2 O) $_y$ -、
- [C(=O)] $_v$ (CH_2) $_t$ (CH_2 CH_2 O) $_y$ NH-、
- [C(=O)] $_v$ O(CH_2 CH_2 O) $_t$ (CH_2) $_y$ O-、
- [C(=O)] $_v$ O(CH_2) $_t$ (CH_2 CH_2 O) $_y$ -、
- [C(=O)] $_v$ O(CH_2) $_t$ (CH_2 CH_2 O) $_y$ NH-、
- [C(=O)] $_v$ NH(CH_2 CH_2 O) $_t$ (CH_2) $_y$ O-、
- [C(=O)] $_v$ NH(CH_2) $_t$ (CH_2 CH_2 O) $_y$ -、
- [C(=O)] $_v$ NH(CH_2) $_t$ (CH_2 CH_2 O) $_y$ NH-、

【化１５】



を挙げることができ、ここで、

(t)、(t')及び(y)は、0又は正の整数、好ましくは約1～約10(例えば、1、2、3、4、5及び6)から独立に選択され;且つ

vは、0又は1である。

【００９４】

本発明の一部の態様において、式(I)(或いは、式(II)又は(III))の化合物は、1～約10(例えば、1、2、3、4、5又は6)単位の二官能性リンカーを含む。本発明の一部の好ましい態様において、該化合物は、1単位の二官能性リンカーを含み、それゆえ(m)は1である。

【００９５】

さらなるリンカーは、その内容が参照により本明細書に組み込まれるGreenwaldら(Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1998, 6: 551～562)の表1中に見出される。

【００９６】

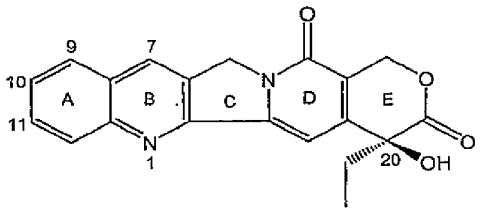
3. カンプトテシン及び関連するカンプトテシン類似体

カンプトテシンは、中国原産の樹木であるカンレンボク(camptoteca acuminata)、及びインド原産の樹木であるクサミズキ(nothapodytes foetida)によって産生される非水溶性の細胞障害性アルカロイドである。カンプトテシン並びに関連する化合物及び類似体は、また、潜在的な抗がん又は抗腫瘍薬であることが知られており、インビトロで及び実験動物でのインビボでこれらの活性を呈示することが示されている。例えば、本明細書に記載の治療で有用なカンプトテシン類似体には、SN38、カンプトテシン、トポテカン、及びCPT-11が含まれる。

【００９７】

カンプトテシン及び特定の関連類似体は、構造

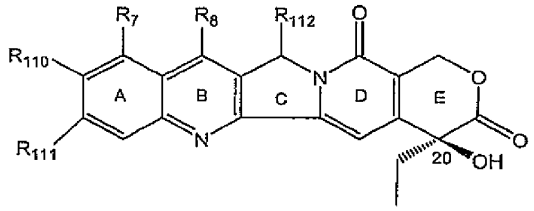
【化１６】



を共有する。このコア構造から、いくつかの既知類似体が調製されている。例えば、A環は、10-及び11-位のどちらか又は双方がOHで置換されていてもよい。A環は、ヘテロ原子、すなわち-O又は-Sによって環に連結されていてもよい直鎖又は分枝鎖の$C_{1\sim30}$アルキル又は$C_{1\sim17}$アルコキシで置換されていてもよい。B環は、7-位が直鎖又は分枝鎖の$C_{1\sim30}$アルキル(好ましくはC_2アルキル)、$C_{5\sim8}$シクロアルキル、$C_{1\sim30}$アルコキシ、フェニルアルキルなど、アルキルカルバメート、アルキルカルバジド、フェニルヒドラジン誘導体などで置換されていてもよい。C、D及びE環でのその他の置換も可能である。例えば、その内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,004,758号、4,943,579号、米国再発行特許RE32,518号を参照されたい。当業者が認識するように、10-ヒドロキシカンプトテシン、11-ヒドロキシカンプトテシン、及び10,11-ジヒドロキシカンプトテシン類似体は、カンレンボク及びその近縁植物中の少量成分の1種として天然に存在する。これらの化合物に対するさらなる置換、すなわち、7-アルキル-、7-置換アルキル-、7-アミノ-、7-アミノアルキル-、7-アラルキル-、9-アルキル-、9-アラルキル-カンプトテシンなどの誘導体を、過度の実験なしに公知の合成技術を使用して調製することができる。一部のカンプトテカ属アルカロイドは、下記に示す構造:

【化１７】

(IV)



を有し、ここで、

R_7は、NO_2、NH_2、N_3、水素、ハロゲン、F、Cl、Br、I、COOH、OH、O-$C_{1\sim8}$アルキル、SH、S-$C_{1\sim3}$アルキル、CN、CH_2NH_2、NH-$C_{1\sim3}$アルキル、CH_2-NH-$C_{1\sim3}$アルキル、N($C_{1\sim3}$アルキル)$_2$、$CH_2N(C_{1\sim3}$アルキル)$_2$、O-、NH-及びS-$CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)_2$、O-、NH-及びS-$CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)_2$、O-、NH-及びS-$CH_2CH_2N(CH_2CH_2CH_2OH)_2$、O-、NH-及びS-$CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2CH_2OH)_2$、O-、NH-及びS-$CH_2CH_2N(C_{1\sim3}$アルキル)$_2$、O-、NH-及びS-$CH_2CH_2CH_2N(C_{1\sim3}$アルキル)$_2$、CHO及び$C_{1\sim3}$アルキルの中から選択され;

R_8は、$C_{1\sim8}$アルキル及び$CH_2NR_9R_{10}$の中から選択され(ここで、R_9は、水素、$C_{1\sim6}$アルキル、$C_{3\sim7}$シクロアルキル、$C_{3\sim7}$シクロアルキル-$C_{1\sim6}$アルキル、$C_{2\sim6}$アルケニル、ヒドロキシ-$C_{1\sim6}$アルキル、及び$C_{1\sim6}$アルコキシ-$C_{1\sim6}$アルキルからなる群から選択され、

R_{10}は、水素、$C_{1\sim6}$アルキル、$C_{3\sim7}$シクロアルキル、$C_{3\sim7}$シクロアルキル-$C_{1\sim6}$アルキル、$C_{2\sim6}$アルケニル、ヒドロキシ-$C_{1\sim6}$アルキル、$C_{1\sim6}$アルコキシ-$C_{1\sim6}$アルキル、及びCOR_{11}の中から選択され、ここで、R_{11}は、水素、$C_{1\sim6}$アルキル、パーハロ-$C_{1\sim6}$アルキル、$C_{3\sim7}$シクロアルキル、$C_{3\sim7}$シクロアルキル-$C_{1\sim6}$アルキル、$C_{2\sim6}$アルケニル、ヒドロキシ-$C_{1\sim6}$アルキル、$C_{1\sim6}$アルコキシ、及び$C_{1\sim6}$アルコキシ-$C_{1\sim6}$アルキルからなる群から選択される);

R_{110}～R_{111}は、水素、ハロ、アシル、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、アジド、アミド、ヒドラジン、アミノ、置換アミノ、ヒドロキシカルボニル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、アルキルカルボニルアミノ、カルバモイルオキシ、アリールスルホニルオキシ、アルキルスルホニルオキシ、$-C(R_{117})=N-(O)_j-R_{118}$（ここで、$R_{117}$は、H、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、又はアリールであり、jは、0又は1であり、R_{118}は、H、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、又はヘテロシクロアルキルである）、及び$R_{119}C(O)O-$（ここで、R_{119}は、ハロゲン、アミノ、置換アミノ、ヘテロシクロアルキル、置換ヘテロシクロアルキル、又は$R_{120}-O-(CH_2)_k-$であり、(k)は1～10の整数であり、R_{120}は、アルキル、フェニル、置換フェニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、又は置換ヘテロシクロアルキルである）の中からそれぞれ独立に選択される

或いは

R_7はR_{110}と一緒になって、又はR_{110}はR_{111}と一緒になって、置換又は非置換のメチレンジオキシ、エチレンジオキシ、又はエチレンオキシを形成し；且つ

R_{112}は、H又はOR'（ここで、R'は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、ハロアルキル、又はヒドロキシアルキルである）である。

【００９８】

好ましいアリール基は、フェニル及びナフチルである。好ましいヘテロシクロアルキル環としては、ビピペリジンが挙げられる。R_9及びR_{10}が、それらが結合されている窒素原子と一緒になっている適切な複素環としては、アジリジン、アゼチジン、ピロリジン、ピペリジン、ヘキサメチレンイミン、イミダゾリジン、ピラゾリジン、イソキサゾリジン、ピペラジン、N-メチルピペラジン、テトラヒドロアゼピン、N-メチル-テトラヒドロアゼピン、チアゾリジンなどが挙げられる。

【００９９】

限定ではなく説明を容易にするために、説明は、好ましい且つ例示化合物としてのカンプトテシン類似体として、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン、又はCPT-11を引き合いに出す。特許を請求する発明は、類似体が、ポリマーへの結合点として20-OH基などのOHを有する限り、すべてのこのような誘導体及び類似体を包含すると理解される。カンプトテシン又はカンプトテシン類似体は、ラセミ混合物又は光学的に純粋な異性体でよい。好ましくは、20(S)カンプトテシン又はカンプトテシン類似体などの実質的に純粋で活性な形態が、マルチアーム型ポリマー性プロドラッグ中で採用される。

【０１００】

4.ポリマー性化合物の合成

一般に、本明細書に記載の治療で採用されるポリマー性化合物は、活性化されたマルチアーム型ポリマーの1種又は複数の同等物を、例えばアミノ酸-(20)-7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの活性部位ごとに1種又は複数の同等物と、アミノ基がポリマーのカルボン酸との反応をへて結合の形成を効果的に引き起こすのに十分である条件下で反応させることによって調製される。合成の詳細は、その内容が参照によりその全体で本明細書に組み込まれる米国特許第7,462,627号中に記載されている。

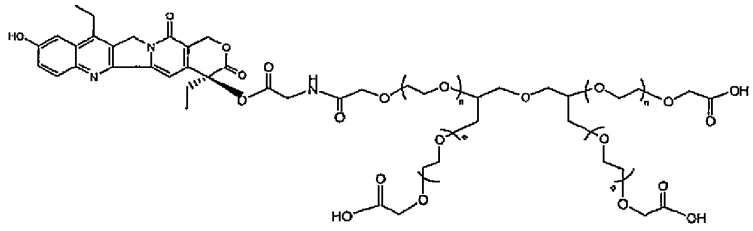
【０１０１】

好ましい二官能性リンカー基の例には、グリシン、アラニン、メチオニン、サルコシンなどが含まれ、合成は、米国特許第7,462,627号の実施例中に記載されている。

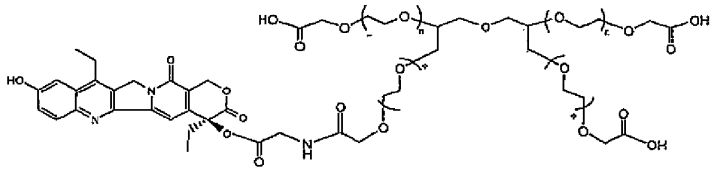
【０１０２】

本発明によれば、投与される化合物としては、

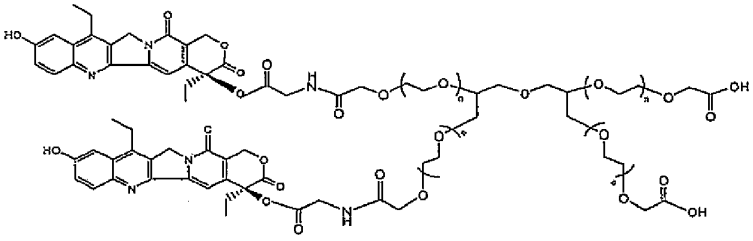
【化１８】



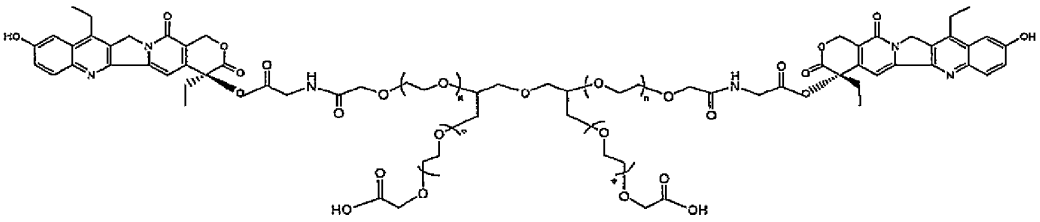
,



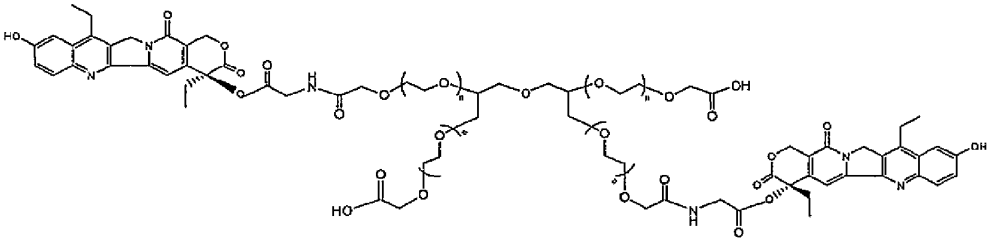
,



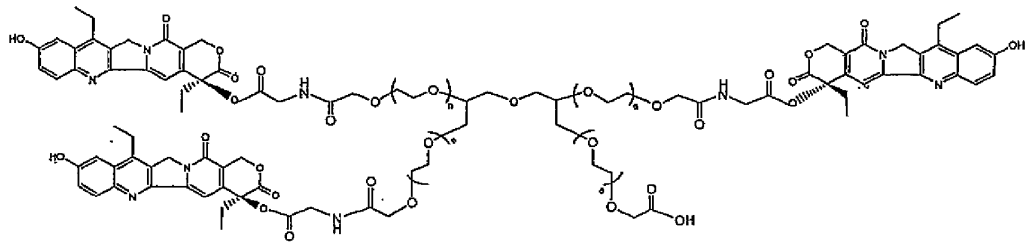
,



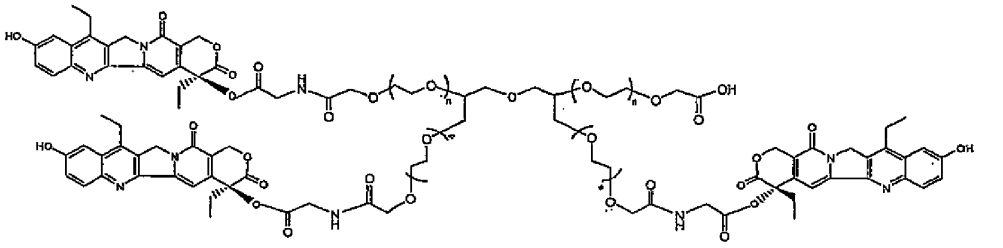
,



,

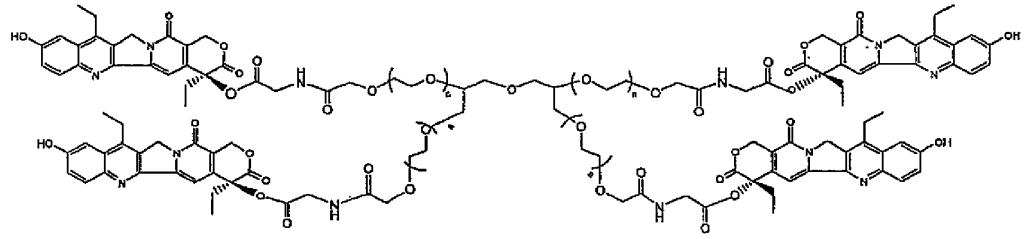


,



,

及び



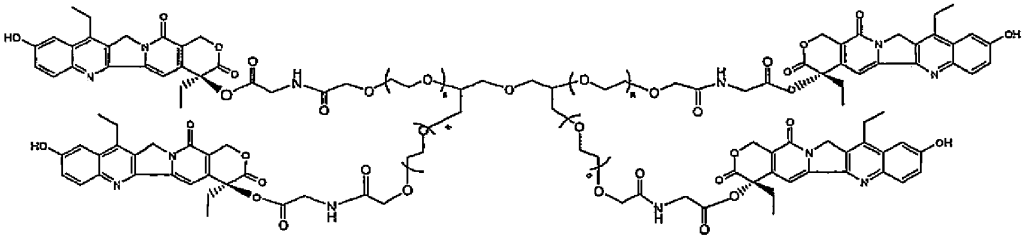
.

が挙げられる。

【０１０３】

一つの特に好ましい実施形態は、構造(Ia)を有する化合物:

【化１９】



【０１０４】

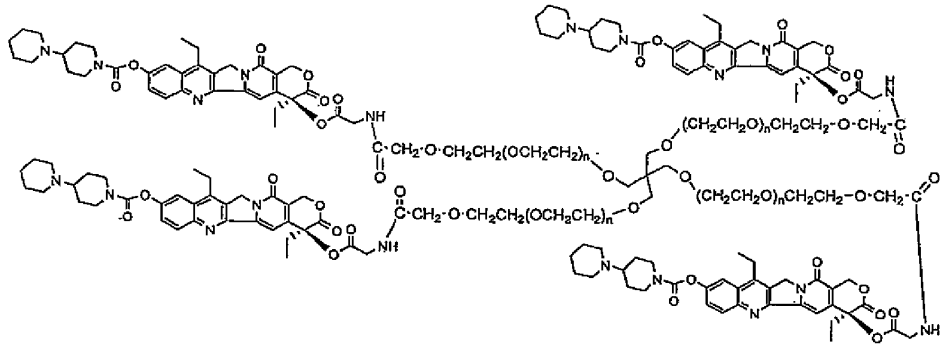
(ここで、ポリマーの四つのアームは、すべて、グリシンを介して7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンと複合されており、ポリマー部分は、約40,000ダルトンの総数平均分子量を有する)

を投与することを含む。

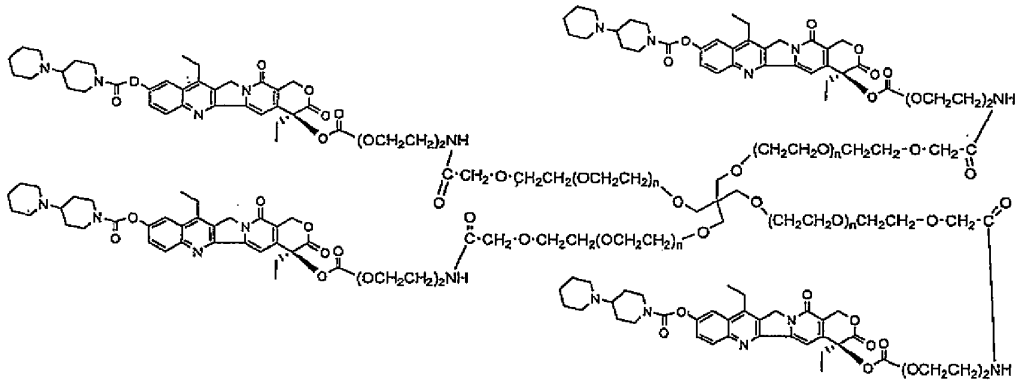
【０１０５】

本明細書に記載の治療で有用な代わりの実施形態は、

【化２０】



又は



を含み、ここで、(n)は、約28～約341の整数であり、結果として、式(II)の化合物のポリマー性部分の総分子量は、約5,000～約60,000ダルトン、好ましくは約20,000又は40,000ダルトンの範囲にある。

【０１０６】

さらなる実施形態において、本明細書に記載の治療は、その内容が参照によりその全体で本明細書に組み込まれる国際公開第2005/028539号中に記載のポリマー性化合物を採用する。

【０１０７】

C. HER2拮抗薬

多くの部類のがんは、HER2タンパク質及び遺伝子のレベル上昇に関連している。HER2タンパク質は、ATPからタンパク質基質のチロシン残基への末端リン酸の移転を触媒する。HER2受容体拮抗薬及びHER2拮抗薬は、一般に、HER2タンパク質又は遺伝子の機能又は発現を抑制する化合物を指す。HER2受容体拮抗薬は、HER2受容体の機能を直接的に又はHER2タンパク質が関与する下流又は上流の細胞シグナル伝達経路を介して抑制することができる。詳細には、本明細書に記載の併用治療で使用されるHER2受容体拮抗薬としては、抗HER2抗体、及び下流又は上流のシグナル伝達経路を介してHER2受容体の機能を抑制する代わりに、HER2受容体の機能、又はHER2受容体の発現を直接的に抑制するアンチセンスHER2オリゴヌクレオチドが挙げられる。

【０１０８】

一実施形態において、本明細書に記載の併用治療は、抗HER2受容体抗体を式(I)(或いは式(II)又は(III))の化合物と組み合わせて投与することによって実施される。抗体は、HER2受容体タンパク質(p185)に結合する。好ましくは、本明細書に記載の治療で有用な抗体は、HER2受容体の細胞外ドメイン、例えばHER2のドメインII及び/又はIVなどに結合する。一つの特定の実施形態は、トラスツズマブを採用する。別の特定の実施形態は、ペルツ

ズマブを採用する。

【０１０９】

Herceptin(登録商標)の商品名で知られるトラスツズマブは、ヒト上皮成長因子受容体2(HER2)に向けられた組換えヒト化モノクロナール抗体である。腫瘍細胞表面上のHER2受容体に結合した後、トラスツズマブは、HER2受容体を過剰発現する腫瘍細胞に対して抗体依存性の細胞介在性細胞毒性を誘発する。HER2は、多くの腺癌、とりわけ乳房腺癌によって過剰発現される。トラスツズマブは、CAS登録番号180288-69-1で登録されている。トラスツズマブについての詳細な情報は、その内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,165,464号中に記載されている。

【０１１０】

Omnitarg(商標)の商品名で知られるペルツズマブも、HER2受容体の細胞外二量形成領域に向けられた組換えヒト化モノクロナール抗体(2C4)である。(CAS登録番号380610-27-5)。ペルツズマブは、HER2受容体の二量形成領域に結合し、HER2受容体タンパク質が、他のHERチロシンキナーゼ受容体タンパク質と二量化する能力を抑制する。受容体タンパク質の二量化を抑制すると、HERシグナル伝達経路の活性化が妨害され、腫瘍細胞のアポトーシスをもたらす。rhuMAb 2C4としても知られるペルツズマブは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,949,245号及び5,821,337号中に記載されている。

【０１１１】

別の実施形態において、本明細書に記載の方法は、式(I)(或いは、式(II)又は(III))の化合物をアンチセンスHER2(ErbB2)オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩と共に投与して実行することができる。アンチセンスHER2オリゴヌクレオチドは、同時に又は逐次的に投与することができる。

【０１１２】

一実施形態において、アンチセンスHER2オリゴヌクレオチドは、HER2のプレmRNA又はmRNAの少なくとも8個の連続したヌクレオチドに相補的な核酸を含む。

【０１１３】

「オリゴヌクレオチド」は、一般に、例えば、大きさが約2~約200個のヌクレオチド、好ましくは約8~約50個のヌクレオチド、又はより好ましくは約8~約30個のヌクレオチドに及ぶ、比較的短いポリヌクレオチドである。本発明によるオリゴヌクレオチドは、そうでないことを明記しない限り、一般に、合成核酸であり、且つ一本鎖である。用語「ポリヌクレオチド」及び「ポリ核酸」は、本明細書中で同義的に使用することもできる。

【０１１４】

オリゴヌクレオチド(類似体)は、単一種のオリゴヌクレオチドに限定されないが、代わりに、広範な種類のこのような部分と作用するように設計される。考えられる核酸分子としては、ホスホロチオエート化ヌクレオチド間結合改変体、糖改変体、核酸塩基改変体、及び/又はリン酸骨格改変体を挙げることができる。オリゴヌクレオチドは、天然のホスホロジエステル骨格又はホスホロチオエート骨格、或いはその内容が参照により本明細書に組み込まれるTides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conference、2002年5月6~8日、ラスベガス、ネバダ州;及びOligonucleotide & Peptide Technologies、2003年11月18及び19日、ハンブルグ、ドイツで開示されたような、LNA(ロックド核酸)、PNA(ペプチド骨格を有する核酸)、CpGオリゴマーなどの任意のその他の改変された骨格類似体を含むことができる。

【０１１５】

オリゴヌクレオチドに対する本発明により想定される改変には、例えば、オリゴヌクレオチドに対してさらなる電荷、分極性、水素結合、静電相互作用、及び機能性を組み込む、機能性部分の付加又は置換が含まれる。このような改変には、限定はされないが、2'-位の糖の改変、5-位のピリミジンの改変、8-位のプリンの改変、環外アミン位での改変、4-チオウリジンの置換、5-ブロモ又は5-ヨードウラシルの置換、骨格の改変、メチル化、イソ塩基であるイソシチジン及びイソグアニジンなどの塩基対組合せ、及び類似の組合せが含まれる。本発明の範囲内で想定されるオリゴヌクレオチドは、3'及び/又は5'のキャ

ップ構造を含むこともできる。

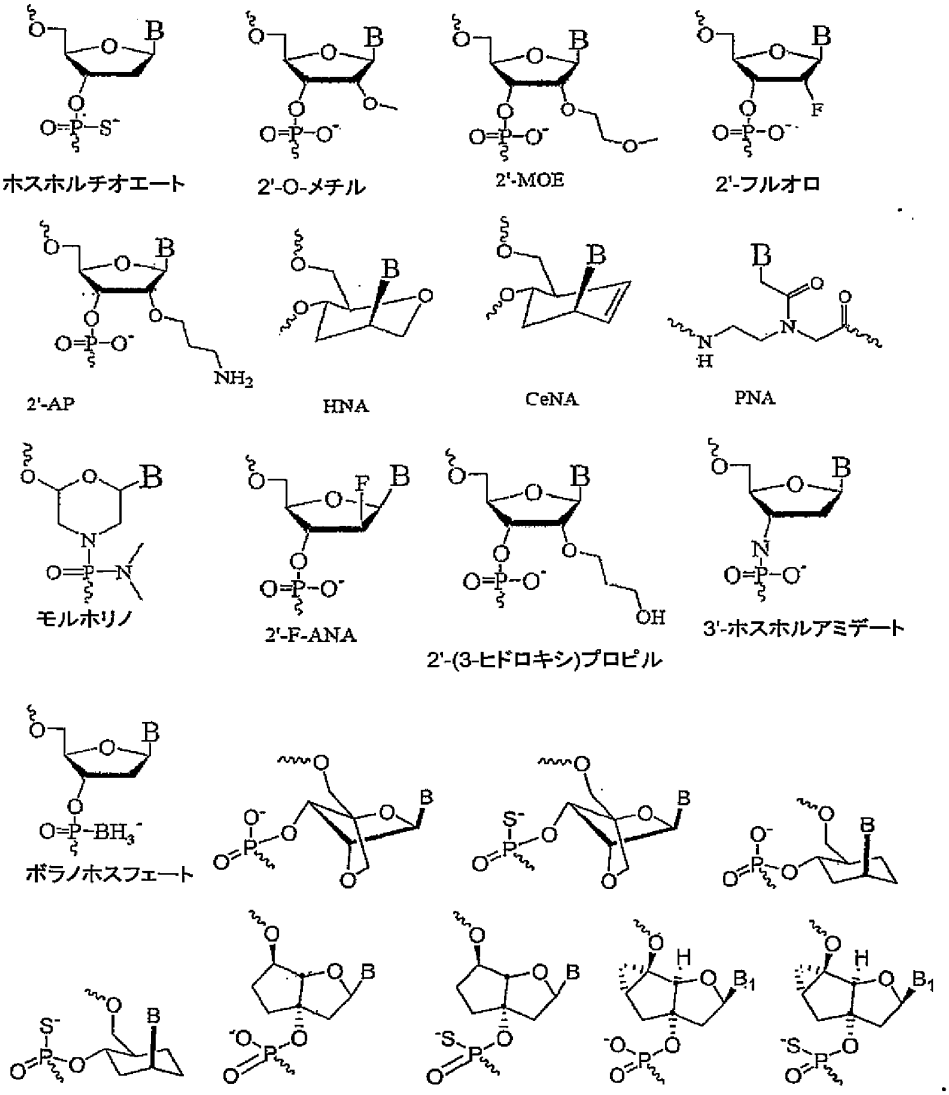
【０１１６】

本発明の目的に関して、「キャップ構造」は、オリゴヌクレオチドのどちらかの末端に組み込まれている化学的改変を意味すると理解されるものとする。キャップは、5'-末端(5'-キャップ)又は3'-末端(3'-キャップ)に存在することができ、或いは双方の末端に存在することができる。5'-キャップの非限定的例には、反転脱塩基型残基(部分)、4',5'-メチレンヌクレオチド、1-(β-D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、1,5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド、L-ヌクレオチド、α-ヌクレオチド、改変型塩基ヌクレオチド、ホスホロジチオエート連鎖、threo-ペントフラノシルヌクレオチド、非環式3',4'-セコヌクレオチド、非環式3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド、非環式3,5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3'-3'-反転型ヌクレオチド部分、3'-3'-反転脱塩基型部分、3'-2'-反転型ヌクレオチド部分、3'-2'-反転脱塩基型部分、1,4-ブタンジオールホスフェート、3'-ホスホルアミデート、ヘキシルホスフェート、アミノヘキシルホスフェート、3'-ホスフェート、3'-ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、又は架橋又は非架橋のメチルホスホネート部分が含まれる。詳細は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第97/26270号中に記載されている。3'-キャップとしては、例えば、4',5'-メチレンヌクレオチド、1-(β-D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、5'-アミノ-アルキルホスフェート、1,3-ジアミノ-2-プロピルホスフェート、3-アミノプロピルホスフェート、6-アミノヘキシルホスフェート、1,2-アミノドデシルホスフェート、ヒドロキシプロピルホスフェート、1,5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド、L-ヌクレオチド、α-ヌクレオチド、改変型塩基ヌクレオチド、ホスホロジチオエート、threo-ペントフラノシルヌクレオチド、非環式3',4'-セコヌクレオチド、3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド、3,5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、5'-5'-反転型ヌクレオチド部分、5'-5'-反転脱塩基型部分、5'-ホスホルアミデート、5'-ホスホロチオエート、1,4-ブタンジオールホスフェート、5'-アミノ、架橋及び/又は非架橋の5'-ホスホルアミデート、ホスホロチオエート、及び/又はホスホロジチオエート、架橋又は非架橋のメチルホスホネート、及び5'-メルカプト部分を挙げることができる。その内容が参照により本明細書に組み込まれるBeaucage及びIyerの論文、1993年、Tetrahedron、49巻、1925頁を参照されたい。

【０１１７】

ヌクレオチド類似体の非限定的リストは、次の構造を有する:

【化２１】



その内容が参照により本明細書に組み込まれるFreier及びAltman、Nucl.Acid Res.,1997,25,4429~4443、及びUhlmann、Curr Opinion in Drug Development,2000,3(2),293~213に記載のヌクレオチド類似体のより多くの例を参照されたい。

【０１１８】

用語「アンチセンス」は、本明細書中で使用する場合、遺伝子産物をコードする、又は調節配列をコードする特定のDNA又はRNA配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を指す。用語「アンチセンス鎖」は、「センス」鎖に対して相補的である核酸鎖を言及するのに使用される。正常な働きの細胞代謝において、DNA分子のセンス鎖は、ポリペプチド及び/又は他の遺伝子産物をコードする鎖である。アンチセンス鎖は、メッセンジャーRNA(「mRNA」)転写物(センス鎖)を合成するための鋳型として役立ち、次いで、該転写物は、コードされた任意の遺伝子産物の合成を指図する。アンチセンス核酸分子は、注目の遺伝子を、相補鎖の合成を可能にするウイルスプロモーターに対して逆配向で連結することによる合成を含む、当技術分野で公知の任意の方法によって作り出すことができる。細胞中に一旦導入されると、この転写された鎖は、細胞によって産生される天然の配列と結合して二本鎖を形成する。これらの二本鎖は、次いで、さらなる転写又は翻訳のどちらかを遮

断する。呼称「ネガティブ」又は(-)は、また、アンチセンス鎖を指すことが当技術分野で公知であり、「ポジティブ」又は(+)も、センス鎖を指すことが当技術分野で公知である。

【０１１９】

本発明の目的に関して、「相補的」は、ある核酸配列が、別の核酸配列と水素結合を形成することを意味すると理解されるものとする。パーセント相補性は、第二の核酸配列と水素結合、すなわちワトソン-クリックの塩基対を形成することができる核酸分子中の近接残基の比率を示す。すなわち、10のうちの5、6、7、8、9、10個が近接するなら、50%、60%、70%、80%、90%及び100%相補的である。「完全に相補的」は、核酸配列のすべての近接残基が、第二の核酸配列中の同数の近接残基と水素結合を形成することを意味する。

【０１２０】

本明細書に記載の方法で有用なオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド誘導体としては、約10～約100個の核酸、及び好ましくは、大きさが、例えば約8～約30個(例えば、約8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30個)のヌクレオチド長の範囲の比較的短いポリヌクレオチドを挙げることができる。

【０１２１】

本明細書に記載の方法中で使用される有用な核酸の一態様において、天然のホスホロジエステル骨格又はホスホロチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチド及びオリゴデオキシヌクレオチド、或いは任意のその他の改変された骨格類似体としては、その内容が参照により本明細書に組み込まれるTides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conference、2002年5月6～8日、ラスベガス、ネバダ州;及びOligonucleotide & Peputide Technologies、2003年11月18及び19日、ハンブルグ、ドイツで開示されたような、

LNA(ロックド核酸)、
PAN(ペプチド骨格を有する核酸)
短鎖干渉RNA(siRNA)、
microRNA(miRNA)、
ペプチド骨格を有する核酸(PNA)、
ホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド(PMO)、
トリシクロ-DNA、
デコイODN(二本鎖オリゴヌクレオチド)、
触媒性RNA配列(RNAi)、
リボザイム、
アプタマー、
スピーゲルマー(spiegelmer)(L-配置のオリゴヌクレオチド)、
CpGオリゴマー、などが挙げられる。

【０１２２】

本明細書に記載の方法中で使用される核酸の別の態様において、オリゴヌクレオチドとしては、任意選択で、下表1に列挙するもの:

【表１】

表1. 代表的なヌクレオチド類似体及び誘導体

4-アセチルシチジン	5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン	β,D-マンノシルキューオシン
2'-O-メチルシチジン	5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン
5-メトキシカルボニルメチルウリジン	5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン
5-メトキシウリジン	5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン
ジヒドロウリジン	2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン
2'-O-メチルプソイドウリジン	N-[(9-β-D-リボフラノシル-2-メチルチオプリン-6-イル)カルバモイル]トレオニン
D-ガラクトシルキューオシン	N-[(9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル]トレオニン
2'-O-メチルグアノシン	ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル
2'-ハロ-アデノシン	2'-ハロ-シチジン
2'-ハロ-グアノシン	2'-ハロ-チミン
2'-ハロ-ウリジン	2'-ハロ-メチルシチジン
2'-アミノ-アデノシン	2'-アミノ-シチジン
2'-アミノ-グアノシン	2'-アミノ-チミン
2'-アミノ-ウリジン	2'-アミノ-メチルシチジン
イノシン	ウリジン-5-オキシ酢酸
N6-イソペンテニルアデノシン	ウィブトキソシン
1-メチルアデノシン	プソイドウリジン
1-メチルプソイドウリジン	キューオシン
1-メチルグアノシン	2-チオシチジン
1-メチルイノシン	5-メチル-2-チオウリジン
2,2-ジメチルグアノシン	2-チオウリジン
2-メチルアデノシン	4-チオウリジン
2-メチルグアノシン	5-メチルウリジン
3-メチルシチジン	N-[(9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)-カルバモイル]トレオニン
5-メチルシチジン	2'-O-メチル-5-メチルウリジン
N6-メチルアデノシン	2'-O-メチルウリジン
7-メチルグアノシン	ウィブトシン
5-メチルアミノメチルウリジン	3-(3-アミノ-3-カルボキシ-プロピル)ウリジン
ロックド-アデノシン	ロックド-シチジン
ロックド-グアノシン	ロックド-チミン
ロックド-ウリジン	ロックド-メチルシチジン

を含む、任意の適切な当技術分野で公知のヌクレオチド類似体及び誘導体を挙げることができる。

【０１２３】

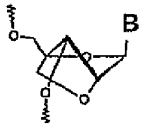
特定の一実施形態において、アンチセンスHER2(ErbB2)オリゴヌクレオチドには、配列番号１(GenBank受入れ番号X03363)に示す配列の少なくとも8個の連続ヌクレオチドに対して相補的であるヌクレオチドが含まれる。また、そのそれぞれの内容が参照によりその全体で本明細書に組み込まれるYamamoto, T.らの論文、Nature 319: 230 ~ 234, 1986、Papewal

is,J.らの論文、Nucleic Acids Res.1:5452,1991を参照されたい。

【０１２４】

好ましくは、本明細書に記載の本発明によるオリゴヌクレオチドには、一つ又は複数のホスホロチオエートヌクレオチド間連鎖(骨格)及び一つ又は複数のロックド核酸(LNA)が含まれる。好ましくは、LNAモノマーには、下記に示す2'-O、4'-Cメチレンビシクロヌクレオチドが含まれる:

【化２２】



LNAモノマー
β-D配置

【０１２５】

D.HER2陽性がんを有する患者の選抜

本明細書に記載の治療は、HER2陽性がんを有する患者の利益になる。本明細書に記載の治療は、生存を有意に延長する。HER2陽性がんを有し本明細書に記載の治療を受け入れる患者の選抜は、HER2の発現レベルを測定することによって、あらかじめ決められる。本明細書に記載の治療に向けた患者を選抜するに際しては、HER2の発現レベルに加えて、患者の臨床履歴を考慮しなければならない。

【０１２６】

HER2タンパク質又は遺伝子のレベルは、限定はされないが、免疫組織化学(IHC)、シルバーin situハイブリダイゼーション(SISH)、化学発色in situハイブリダイゼーション(CISH)、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、仮想核型分析、PCRをベースにした方法、及び当技術分野で公知のその他の方法を含む、当技術分野で公知の技術で測定することができる。それぞれの種類のアッセイは、長所及び制約を有する。したがって、HER2陽性がんを有する患者の選抜は、本明細書に記載の治療の潜在的利益を排除する単一のアッセイに依拠するよりも、アッセイの組合せによって確認すると、より信頼できる場合がある。現在、推奨されるアッセイは、IHCとFISHとの組合せである。

【０１２７】

概して、細胞又は組織中でのHER2発現は、HER2受容体タンパク質の発現レベル、又はHER2遺伝子の増幅レベルを測定することによって評価することができる。FDAは、HER2の発現を測定するのを助けるいくつかのHER2検査を承認しており、商業的に利用できるいくつかの検査が存在する。これらのアッセイは、IHC及び/又はFISHアッセイを利用する。例えば、商業的に利用できるアッセイには、HER2タンパク質のレベル(IHCアッセイ)を測定するDako HercepTest(商標)(Carpinteria社、カリフォルニア州、米国)及びVentana Pathway(登録商標)HER-2/neu(アリゾナ州、米国)、並びに遺伝子増幅のレベル(FISHアッセイ)を測定するPathVysion(登録商標)及びHER2 FISH pharmDx(商標)が含まれる。検体中のHER2発現を評価するための詳細な情報及び指針は、それぞれの検査キットの包装内挿入物中に示され、前述の検査キットのそれぞれの包装内挿入物の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。HER2発現測定の評価及び検証は、検査キットの包装内挿入物中に見出される指針に従うべきである。

【０１２８】

HercepTest(商標)及びPathway(商標)検査キットは、双方とも、IHCを利用し、検査組織/細胞中のHER2タンパク質のレベルを測定する。これらは、高度に標準化された半定量的アッセイである。IHCの検査結果の解釈は、染色強度及び細胞膜染色の完全性に関する審査員の解釈をベースにした0~3+の尺度:0(陰性)、1+(陰性)、2+(境界線/弱陽性)、又は3+(陽性)に基づく評点化システムを使用する。評点0は、細胞当たり20,000未満の受容体が存在すること、及び認識できる膜染色が存在しないか、膜染色が腫瘍細胞の10%未満で観察されることを示す。評点1+は、細胞当たりほぼ100,000の受容体が存在すること、微弱な膜染色が10%を超える腫瘍細胞中で観察されるが、膜は部分的に染色されていることを

示す。評点2+は、細胞当たりほぼ500,000の受容体が存在すること、微弱から中程度の完全膜染色が10%を超える腫瘍細胞中で観察されることを示す。評点3+は、細胞当たりほぼ2,000,000の受容体が存在すること、及び強烈で完全な膜染色が10%を超える腫瘍細胞中で得られることを示す。

【０１２９】

FISH検査で、腫瘍は、HER2/neu遺伝子のコピー数を数えることによって、HER2陰性(FISH-)又は陽性(FISH+)と解釈される。HER2タンパク質の過剰発現及び遺伝子増幅の存在は、高度に相関している。FISH分析は、IHC 2+又はIHC 3+を有する一部の患者が、遺伝子増幅を有さない(FISH-)ことを明らかにし、これらの患者は偽陽性である可能性があることを示唆する。PathVysion(登録商標)技術によれば、IHC陽性(2+/3+)患者のほぼ40%は、遺伝子増幅を有さず、FISH陰性であった。したがって、IHCで2+の患者は、FISH検査に廻されることが推奨される。

【０１３０】

本明細書に記載の併用治療は、好ましくは、IHCで2+又は3+、及び/又はFISH+の患者に付与される。さらに、該併用治療は、PCR法などのその他の技術をHER2陽性患者の選抜に使用した場合に、IHC 2+若しくは3+及び/又はFISH+に匹敵するHER2状態を有する患者に付与することができる。

【０１３１】

E.組成物/製剤

本明細書に記載のポリマー複合体及びHER2拮抗薬を含む医薬組成物は、例えば、種々の周知の混合、溶解、造粒、摩砕、乳化、カプセル化、封入、又は凍結乾燥方法を使用する、当技術分野で周知の方法によって製造することができる。該組成物は、活性化合物の薬理学的に使用できる調合製剤への加工処理を容易にする、添加剤及び補助薬を含む1種又は複数の生理学的に許容される担体と一緒にして製剤化することができる。適切な製剤は、選択される投与経路に依存する。非経口経路は、本発明の多くの態様において好ましい。

【０１３２】

限定はされないが、静脈内、筋内及び皮下注射を含む注射の場合、本明細書に記載の式(I)(或いは、式(II)又は(III))の化合物は、水溶液中、好ましくは生理食塩水緩衝液又は限定はされないがピロリドン又はジメチルスルホキシドを含む極性溶媒などの生理学的に適合性のある緩衝液中で製剤化することができる。

【０１３３】

本明細書に記載の化合物は、また、例えば、ボーラス注入又は連続点滴による非経口投与用に製剤化することができる。注入用製剤は、単位剤形で、例えば、アンプルで又は複数回投与容器で提供することができる。有用な組成物としては、限定はされないが、懸濁液、溶液、又は油性若しくは水性媒質中の乳液が挙げられ、懸濁剤、安定剤及び/又は分散剤などの添加物を含むことができる。非経口投与用の医薬組成物としては、限定はされないが、活性化合物の塩(好ましくは)などの水溶性形態の水溶液が挙げられる。さらに、活性化合物の懸濁液を、親油性媒質中で調製することができる。適切な親油性媒質としては、ゴマ油などの脂肪油、オレイン酸エチル及びオレイン酸トリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、又はリポソームなどの材料が挙げられる。注入用水性懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、又はデキストランなどの、該懸濁液の粘度を高める物質を含むことができる。任意選択で、懸濁液は、また、適切な安定剤、及び/又は化合物の溶解度を高めて高濃度溶液の調製を可能にする薬剤を含むことができる。代わりに、活性成分は、適切な媒質、例えば無菌で発熱物質を含まない水を用いて使用前に再構成するための粉末形態で存在することができる。一実施形態において、トラスツズマブは、注射用静菌水を用いて再構成することができる。

【０１３４】

経口投与の場合、化合物は、活性成分を当技術分野で周知の薬学的に許容される担体と組み合わせて製剤化することができる。このような担体は、本発明の化合物を、患者が経

口で摂取するための錠剤、丸剤、ロゼンジ剤、糖衣錠剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、パスタ剤、スラリー剤、溶液剤、懸濁剤、患者の飲料水で希釈するための濃縮溶液剤及び懸濁剤、患者の食事で希釈するための事前混合物として製剤化することを可能にする。経口で使用するための医薬調合製剤は、固形添加剤を使用し、場合によっては生じる混合物を磨り潰し、且つ所望なら錠剤又は糖衣錠剤の芯を得るためにその他の適切な補助薬を添加した後に顆粒の混合物を加工して、調製することができる。有用な添加剤は、とりわけ、乳糖、蔗糖、マンニトール、又はソルビトールを含む糖類、例えばトウモロコシ澱粉、小麦澱粉、米澱粉及び馬鈴薯澱粉などのセルロース調合製剤、並びにゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピル-メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、及び/又はポリビニルピロリドン(PVP)などのその他の材料などの賦形剤である。所望なら、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、又はアルギン酸などの崩壊剤を添加することができる。アルギン酸ナトリウムなどの塩を使用することもできる。

【０１３５】

吸入で投与する場合、本発明の化合物は、好都合には、加圧容器又はネブライザーと適切な噴射剤を使用するエアロゾルスプレーの形態で送達することができる。

【０１３６】

化合物は、例えば、カカオバター又はその他のグリセリドなどの通常の座剤用基剤を使用して、座剤又は貯留浣腸剤などの直腸用組成物に製剤化することもできる。

【０１３７】

前に記載した製剤に加えて、化合物をデポー調合製剤として製剤化することもできる。このような長時間作用性製剤は、埋込み(例えば、皮下又は筋内)によって、又は筋内注入によって投与することができる。この投与経路のためには、本発明の化合物を、適切なポリマー性又は疎水性材料(例えば、薬理学的に許容されるオイルを用いたエマルジョン中の)と共に、イオン交換樹脂と共に、又は限定はされないがやや難溶性の塩などのやや難溶性の誘導体として製剤化することができる。

【０１３８】

リポソーム及びエマルジョンなどのその他の送達システムも使用できる。

【０１３９】

さらに、該化合物は、治療薬を含む固体の疎水性ポリマーからなる半透性マトリックスなどの徐放性システムを使用して送達することができる。種々の徐放性材料が、確立されており、当技術分野で周知である。徐放性カプセルは、それらの化学的性質に応じて、化合物を数週間から100日間にわたって放出し得る。個々の化合物の化学的性質及び生物学的安定性に応じて、さらなる安定化戦略を採用することができる。

【０１４０】

F.投与量

本発明の方法で使用される任意の化合物に関して、治療有効量は、初めはin vitroアッセイから推定することができる。次いで、動物モデルで使用するために、投与量を、有効投与量を含む循環濃度範囲を達成するように製剤化することができる。次いで、このような情報を利用して患者で有用な投与量をより正確に決定することができる。

【０１４１】

例えば、プロドラッグとして使用される組成物の量は、該組成物中に含まれる親分子(この場合、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)によって決まる。一般に、本明細書に記載の方法で使用されるプロドラッグの量は、哺乳動物で所望の治療結果を効果的に達成する量である。当然、種々のプロドラッグ化合物の投与量は、親化合物、in vivoでの加水分解速度、ポリマーの分子量などに応じて多少変化することができる。加えて、投与量は、もちろん、剤形及び投与経路に応じて変化することができる。

【０１４２】

しかし、一般に、本明細書に記載の7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンのポリマー性エステル誘導体は、全身送達の場合、約0.3~約90mg/m^2(体表面)/回、好ましくは約0.5

～約50mg/m²(体表面)/回、さらに好ましくは約1～約18mg/m²(体表面)/回、さらにより好ましくは約1.25mg/m²(体表面)/回～約16.5mg/m²(体表面)/回の範囲の量で投与することができる。一部の特定の投与は、次の量:1.25、2.5、5、9、10、12、13、14、15、16及び16.5mg/m²/回の中の一つを含む。一つの好ましい投与量は、5mg/m²(体表面)/回を含む。

【０１４３】

本明細書に記載の式(I)(或いは式(II)又は(III))の化合物は、約0.3～約90mg/m²(体表面)/週、例えば約1～約18mg/m²(体表面)/週の範囲の量で投与することができる。特定の実施形態において、投与レジメンは、例えば、4週間サイクルで3週間は毎週約5～約7mg/m²(体表面)の注入、3週毎に約1.25～約45mg/m²の1回注入、及び/又は4週間サイクルで毎週約1～約16mg/m²の3回注入でよい。

【０１４４】

治療プロトコールは、例えば、3週毎に1回投与される単回投与に基づくか、或いは複数週の治療プロトコールの一部として付与される複数回投与に分割することができる。したがって、治療レジメンは、例えば、各治療サイクルに対して3週毎に1回の投与、或いは、各サイクルに対して3週間の間、毎週1回の投与とそれに続く1週間の休薬を含むことができる。また、治療は、所望の臨床結果が得られるまで、1又は複数のサイクルが付与されることが想定される。

【０１４５】

前に示した範囲の集合は、例示であり、当業者は、臨床経験及び治療徴候に基づいて選択されるプロドラッグの最適投与量を決定するであろう。さらに、的確な製剤化、投与経路、及び投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師が選択することができる。正確な用量は、当業者が認識するように、治療される患者の状態の段階及び重症度、及び個別的特性に依存する。

【０１４６】

さらに、本明細書に記載の化合物の毒性及び治療効力は、当技術分野で周知の方法を使用する細胞培養又は実験動物において標準的な薬学的手順によって判定することができる。

【０１４７】

一部の好ましい実施形態において、治療プロトコールは、3週間の間、毎週、約1.25～約16.5mg/m²(体表面)/回の範囲の量を投与し、続いて1週間治療を休止すること、そして所望の結果が観察されるまで約3サイクル以上繰り返すことを含む。各サイクルにつき投与される量は、約2.5～約16.5mg/m²(体表面)/回の範囲でよい。

【０１４８】

一つの特定の実施形態において、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンのポリマー性エステル誘導体は、3週間の間、毎週5、9又は10mg/m²などの1回投与で投与し、続いて1週間治療を休止することができる。治療サイクルの投与量は、2回以上の治療サイクルを適用するなら、投与量を段階的に増大させるレジメンとして計画することができる。ポリマー性薬物は、好ましくは静脈内(IV)点滴で投与される。

【０１４９】

別の特定の実施形態において、式(I)(或いは式(II)又は(III))の化合物は、約12～約16mg/m²(体表面)/回の投与量で投与される。投与量は毎週付与することができる。治療プロトコールは、3週間の間、毎週、式(I)(或いは式(II)又は(III))の化合物を、約12～約16mg/m²(体表面)/回の範囲の量で投与し、続いて治療を1週間休止することを含む。

【０１５０】

さらに別の特定の実施形態において、投与レジメンは、3週間毎の約10mg/m²(体表面)/回でよい。

【０１５１】

代わりの実施形態は、小児患者の治療の場合、3週間毎に5日間毎日の約1.85mg/m²(体表面)/回のプロトコール、25日間毎に3日間毎日の約1.85～約7.5mg/m²(体表面)/回のプロトコール、又は3週間毎に1回の約22.5mg/m²(体表面)/回のプロトコールに基づいたレジメン

、成人患者の治療の場合、3週間毎に約13mg/m²(体表面)/回、又は6週間毎に4週間毎週の約4.5mg/m²(体表面)/回に基づいたプロトコールを含む。本明細書に記載の化合物は、第二の治療薬剤と組み合わせて投与することができる。一実施形態において、併用療法は、第二薬剤と組み合わせた、サイクル毎に5日間毎日の約0.75mg/m²(体表面)/回のプロトコールを含む。

【0152】

代わりに、化合物は、体重に基づいて投与することができる。哺乳動物における式(I)(或いは式(II)又は(III))の化合物の全身送達のための投与量範囲は、約1~約100mg/kg/週であり、好ましくは約2~約60mg/kg/週である。したがって、量は、約0.1mg/kg体重/回~約30mg/kg体重/回、好ましくは約0.3mg/kg~約10mg/kgの範囲でよい。2日毎に5回投与(q2d×5)(複数回投与)レジメンでの5又は10mg/kg、又は単回投与レジメンでの20又は30mg/kgなどの具体的投与量を投与することができる。

【0153】

ポリマー性複合体が投与される本発明のすべての態様において、言及される投与量は、投与されるポリマー性複合体の量ではなく、活性薬剤(好ましくは、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)の量に基づく。治療は、1又は複数サイクルの間、所望の臨床結果が得られるまで付与されることが想定される。本発明の化合物の正確な量、投与の頻度及び期間は、もちろん、患者の性別、年齢及び医学的状態、並びに掛かりつけ臨床医によって判定された疾患の重症度に応じて変化する。前に挙げた重量は、治療に採用されるPEG複合型7-エチル-10-ヒドロキシ-カンプトテシン中に存在する7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの重量を表す。PEG複合型7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの実際の重量は、PEGの負荷量(例えば、任意選択で1モルのPEGにつき1~4モルの7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)に応じて変化する。

【0154】

HER2拮抗薬は、式(I)(或いは式(II)又は(III))の化合物と組み合わせて、同時に又は逐次的に投与することができる。併用療法のプロトコールは、約0.5mg/kg~約15mg/kg体重、すなわち、約2mg/kg~約8mg/kg/回の範囲の、例えば、2、4、5、6、8mg/kg/回の抗HER2抗体を投与することを含む。

【0155】

一実施形態において、トラスツズマブは、プロトコール: 4mg/kg(静脈内)の初期投与、それに続く併用療法の間及び後の毎週2mg/kg/回(静脈内)、或いは8mg/kg(静脈内)の初期投与、それに続く所望の臨床結果が達成されるまでの3週間毎の6mg/kg(静脈内)に基づいて投与される。トラスツズマブの詳細な投与情報は、その内容が参照により本明細書に組み込まれる、Herceptin(登録商標)の包装内挿入物中に記載されている。

【0156】

別の実施形態において、ペルツズマブは、本明細書に記載の併用治療の間又は後に、3週間毎に約0.5~約15mg/kg(静脈内)/回の範囲の量で投与される。ペルツズマブは、プロトコール:3週間毎に5mg/kg/回に基づいて付与される。その内容が参照により本明細書に組み込まれる、Agus, D. B.らの論文、Journal of Clinical Oncology, 23: 2534~2543, 2005を参照されたい。

【0157】

併用療法のプロトコールは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを約2~約100mg/kg/回(例えば、2、3、4、5、6、8、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、100mg/kg/回)の量で投与することを含む。例えば、併用療法のレジメンは、約2~約50mg/kg/回の量のアンチセンスHER2オリゴヌクレオチドでの治療を含む。好ましくは、併用療法で投与されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、約4~約25mg/kg/回の量で存在する。

【0158】

併用療法の一態様において、プロトコールは、アンチセンスHER2オリゴヌクレオチドを併用療法の間、毎週約4~約18mg/kg/回、又は毎週約4~約9.5mg/kg/回の量で投与することを含む。

【０１５９】
一つの特定の実施形態において、併用療法のプロトコールは、6週サイクルでの3週間の間、毎週約4～約18mg/kg/回(すなわち、約8mg/kg/回)の量のアンチセンスHER2オリゴヌクレオチドを含む。別の特定の実施形態は、毎週約4～約9.5mg/kg/回(すなわち、約4.1mg/kg/回)を含む。
【０１６０】
本発明に包含されるHER2拮抗薬が、本明細書に記載の式(I)(或いは、式(II)又は(III))の化合物と組み合わせて投与される場合、該組合せの個々の成分は、別々の又は合わせた医薬製剤の状態で、任意の都合のよい経路で逐次的又は同時的のどちらかで投与することができる。HER2拮抗薬及び式(I)(或いは、式(II)又は(III))の化合物を逐次的に投与する場合、式(I)(或いは、式(II)又は(III))の化合物又はHER拮抗薬のどちらかを最初に投与することができる。例えば、HER2拮抗薬及び式(I)(或いは、式(II)又は(III))の化合物を、組合せの有益な効果を提供するレジメンにおいて逐次的方式で投与することができる。HER2拮抗薬及び式(I)(或いは、式(II)又は(III))の化合物を同時的方式で投与する場合、該組合せは、同一又は異なる医薬組成物の状態のどちらかで投与することができる。
【０１６１】
本発明のさらなる態様は、HER2拮抗薬及び本明細書に記載の化合物を、さらなる利益のためにその他の化学療法又は放射線療法と組み合わせることを含む。
【実施例】
【０１６２】
以下の実施例は、本発明に関するさらなる認識を提供するのに役立つが、いかなる意味でも本発明の有効範囲を限定することを意味しない。
【０１６３】
(実施例1)毒性データ
4アーム型-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)(化合物9)の最大耐容量(「MTD」)を、ヌードマウスを使用して調べた。マウスを、死亡数及び病気の徴候について14日間モニターし、体重減少が治療前体重の20%を超えた時点で屠殺した。
【０１６４】
下記表2に、単回投与及び複数回投与の場合の各化合物の最大耐容量を示す。複数回投与の場合の各用量は、1日おきに10日間マウスに与えられ、マウスを、さらに4日間、したがって全部で14日間観察した。
【表２】

表2. ヌードマウスでのMTDデータ

化合物	用量レベル (mg/kg)	生存/総数	コメント
化合物9 単回投与	25	5/5	
	30	5/5	
	35	4/5	20%を超える体重減少のためマウスを安楽死させた
化合物9 複数回投与*	10	5/5	
	15	3/5	20%を超える体重減少のためマウスを安楽死させた
	20	0/5	20%を超える体重減少のためマウスを安楽死させた

【０１６５】
4アーム型-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)(化合物9)について見出

されたMTDは、単回投与で与えた場合には30mg/kg、複数回投与(2日ごとに5回)で与えた場合には10mg/kgであった。

【0166】

(実施例2)PEG複合体の特性

下記表3に、4種の異なるPEG-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体の生理食塩水溶液への溶解度を示す。4種のPEG-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体は、すべて、4mg/mLまでの7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンに相当する良好な溶解度を示した。ヒト血漿中で、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンは、PEG複合体から22~52分の倍増時間で絶え間なく放出され、該放出は、次の実施例3に記載のように、pH及び濃度に依存すると思われた。

【表3】

表3. PEG-7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン複合体の特性

化合物	生理食塩水への溶解度 (mg/mL)[a]	ヒト血漿中での $t_{1/2}$(分)[b]	血漿中での倍増時間(分)[c]		
			ヒト	マウス	ラット
化合物9 (Gly)	180	12.3	31.4	49.5	570
化合物12 (Ala)	121	12.5	51.9	45.8	753
化合物23 (Sar)	ND	19.0	28.8	43.4	481
化合物18 (Met)	142	26.8	22.2	41.9	1920

[a]7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンは生理食塩水に溶解性でない。

[b]PEG複合体の半減期

[c]複合体からの7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの生成速度

【0167】

PEG-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体は、生理食塩水及びその他の水性媒質中、室温において24時間まで良好な安定性を示す。

【0168】

(実施例4)安定性に対する濃度及びpHの効果

本発明者らの以前の研究によれば、20-OH位のアシル化は、活性な閉環形態のラクトン環を保護する。ラット及びヒトの血漿中での水に対する安定性及び加水分解特性を、UVをベースにしたHPLC法でモニターした。4アーム型PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体を各サンプルと共に室温で5分間インキュベートした。

【0169】

緩衝液中でのPEG-7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン複合体の安定性は、pH依存性であった。図1に、種々のサンプル中での4アーム型PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体の安定性を示す。図2は、PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体からの7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの放出速度が、pHの増加と共に増大することを示す。

【0170】

(実施例5)薬物動態特性

腫瘍のないBalb/Cマウスに、20mg/kgの4アーム型PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体を単回注入した。異なる時点でマウスを屠殺し、血漿を、完全な複合体及び放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンについてHPLCで分析した。薬物動態の解析は、非コンパートメント解析(WinNonlin)を使用して行った。下記表4に詳細を示す。

【表４】

表4. 薬物動態データ

パラメーター	化合物9	化合物9から放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン
AUC (h*μg/mL)	124,000	98.3
終末$t_{1/2}$(Hr)	19.3	14.2
C_{max} (μg/mL)	20,500	13.2
CL(mL/hr/kg)	5.3	202
Vss (mL/kg)	131	3094

【０１７１】

図3A及び3Bに示すように、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンのPEG化は、長い循環半減期及び本来の薬物7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンに対する高い暴露を可能にする。4アーム型PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体の腸肝循環が観察された。マウスでのPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体の薬物動態プロフィールは二相性であり、複合体に関する最初の2時間中の急速な血漿分布相、それに続く18~22時間の終末排出半減期、及び7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンに関する随伴性の18~26時間の終末排出半減期を示す(図3B)。

【０１７２】

さらに、4アーム型PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体の薬物動態プロフィールをラットで調べた。ラットにおいて、3、10及び30mg/kgの7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン相当量を使用した。ラットでの薬物動態プロフィールは、マウスでのそれと一致した。

【０１７３】

ラットにおいて、4アーム型PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体は、12~18時間の排出半減期での循環からの二相性クリアランスを示した。4アーム型PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体から放出される7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンは、21~22時間の見掛けの排出半減期を有した。最大血漿中濃度(C_{max})及び曲線下面積(AUC)は、ラットにおいて用量依存的方式で増加した。マウス又はラットにおいて4アーム型PEG-Gly複合体から放出される7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの見掛けの半減期は、CPT-11から放出される7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの報告された見掛けの半減期に比べて有意により長く、4アーム型PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)複合体から放出される7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの露出は、CPT-11から放出される7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの報告された露出に比べて有意により高い。親化合物のクリアランスは、ラットで0.35mL/hr/kgであった。親化合物の予測される定常状態での分布容積(Vss)は、5.49mL/kgであった。放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンのクリアランスは、ラットで131mL/hr/kgであった。放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの予測されるVssは、ラットで2384mL/kgであった。放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの腸肝循環は、マウス及びラットの双方で観察された。

【０１７４】

(実施例6)ヒト乳房腫瘍を異種移植されたHerceptin(登録商標)不応性マウスにおける治療効力

HER2受容体拮抗薬を含む療法のヌードマウス中で成長した不応性ヒトJIM7乳房腫瘍に対する治療効力を評価した。腫瘍は、小さな腫瘍断片をヌードマウスの左副側腹領域の一つの皮下部位中へ埋め込むことによって確立した。腫瘍埋込み部位を、週に2回観察し、1回は触診で測定した。各マウスの腫瘍体積を、キャリパーで二次元を測定し、計算した。腫瘍が100mm^3の平均体積に到達したら、マウスを、非治療対照、Herceptin(登録商標)のみ、化合物9のみ、及び化合物9+Herceptin(登録商標)の組合せからなるそれらの実験群に分割した。Herceptin(登録商標)は、5mg/kg体重/回を週1回腹腔内で与えた。化合物9は、4m

g/kg/回を2日ごとに5回静脈内で与えた。併用治療の場合には、Herceptin(登録商標)及び化合物9を、それぞれ、5mg/kg/回を週1回、4mg/kg/回を2日ごとに5回与えた。化合物9は、0日目のHerceptin(登録商標)治療の1分後に投与した。その他の日は、化合物9とHerceptin(登録商標)での治療は同時に行われる。これらの実験において、投与される化合物9の量は、投与されるポリマー性複合体の量ではなく、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの量に基づいた。マウスの体重及び腫瘍の大きさを、研究開始時及び28日目に測定した。

【０１７５】

Herceptin(登録商標)及び化合物9の単独での治療は、28日にそれぞれ約28%及び51%のTGI(腫瘍増殖阻害率)に至った。Herceptin(登録商標)と化合物9との組合せでの治療は、約81%のTGIをもたらした。結果を表5に示す。

【表５】

表5. JIMT-1乳房腫瘍を異種移植されたマウスモデルでの治療効力

治療	TGI (%)
対照	-
Herceptin(登録商標)　腹腔内	28.34
化合物9　静脈内	50.74
Herceptin(登録商標)　腹腔内.+化合物9　静脈内	80.80

【０１７６】

いくつかの時点で測定された腫瘍体積を図4に示す。化合物9とHerceptin(登録商標)との組合せは、化合物9又はHerceptin(登録商標)の単独と比較して、腫瘍の成長を有意に抑制した。結果は、乳がんの治療において化合物9と共に投与されるとHerceptin(登録商標)は、Herceptin(登録商標)又は化合物9のどちらと比べても有意により有効であることを示す。

【０１７７】

本明細書に記載の化合物をHER2受容体拮抗薬と組み合わせて使用する療法は、HER2拮抗薬を含む療法に付随する抵抗性を予想外に改善及び/又は回避する。ヒトJIMT-1乳房腫瘍は、トラスツズマブ及びペルツズマブなどのHER2抗体に対して不応性である。本明細書に記載の療法は、HER2拮抗薬に対して不応性のがんを、潜在的な薬物抵抗性を回避及び低減することによってより効果的に治療する方策を提供する。患者及び臨床医は、HER2拮抗薬を本明細書に記載の化合物と共に投与すると、HER2拮抗薬を含む療法に対する抵抗性の予想外の欠如及び/又は低減から利益を得ることができる。

【０１７８】

(実施例7)ヒト胃癌を異種移植されたマウスでの治療効力

HER2受容体拮抗薬を含む療法のヌードマウス中で成長したヒト胃癌N87に対する治療効力を測定した。ヒトN87胃癌は、ヌードマウス中で皮下注入によって確立した。マウスの群を無作為に分割し、Herceptin(登録商標)単独、化合物9単独、及び双方の組合せで治療した。Herceptin(登録商標)は、20mg/kg体重/回で週1回腹腔内で与えた。化合物9は、5mg/kg/回で2日ごとに5回静脈内で与えた。併用治療の場合には、化合物9及びHerceptin(登録商標)を、それぞれ、5mg/kg/回で2日ごとに5回、及び20mg/kg/回で週1回与えた。投与した化合物9の量は、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシンの量に基づいた。

【０１７９】

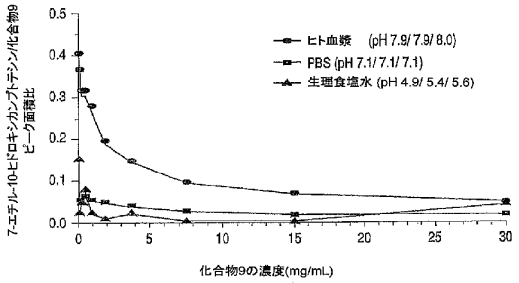
結果を図5に示す。腫瘍は、Herceptin(登録商標)単独で治療されたマウスでは成長し続けた。40日目に、腫瘍体積は、0日目に比較して613%まで増加した。Herceptin(登録商標)単独で治療されたマウスでの腫瘍体積は、非治療対照マウスと同等であった。Herceptin(登録商標)の単独は、胃の腫瘍成長を抑制しなかった。化合物9単独での治療は、腫瘍の成長を効果的に抑制した。Herceptin(登録商標)と化合物9との組合せで治療されたマウスに

おいて、腫瘍体積は、0日目と比較して、40日目までに23%まで減少した。組合せ治療を受けている腫瘍は、研究5日目から48日目まで縮退(ベースライン値未満)した。Herceptin(登録商標)の単独で治療された動物の71%を、過剰な腫瘍量(>1700mm^3)又は腫瘍潰瘍化のため、52日目まで屠殺した。Herceptin(登録商標)+化合物9で治療された群において、マウスの86%は、95日目(研究の最終日)まで生存した。4アーム型^{40K}PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)で治療された5匹の生存マウス(71%)の中で、すべてが、80日目まで1500mm^{3}未満の腫瘍を有した。結果は、HER2受容体拮抗薬の治療効力及び生存率が、本明細書に記載の化合物と組み合わせて投与した場合に、有意に高められたことを示す。本明細書に記載の治療は、HER2拮抗薬をベースにした療法をより効果的に利用する方策を提供する。

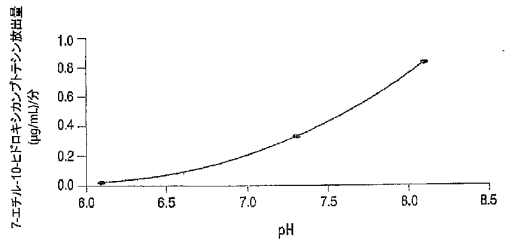
【０１８０】

種々の参考文献が本明細書中で引用されているが、そのすべての内容は、参照によりその全体で本明細書に組み込まれる。

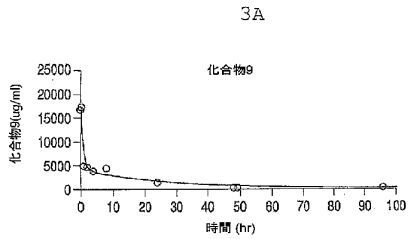
【図１】

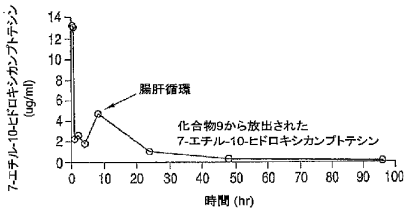


【図２】

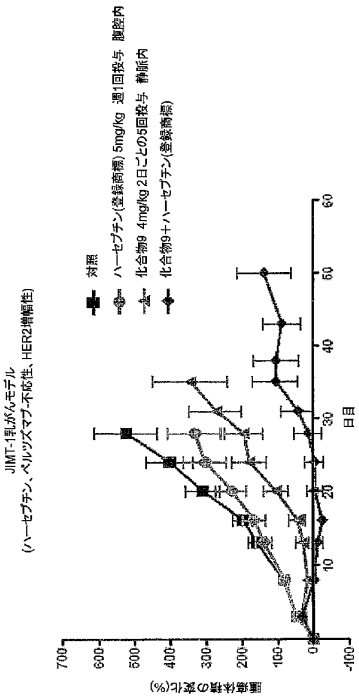


【図３】

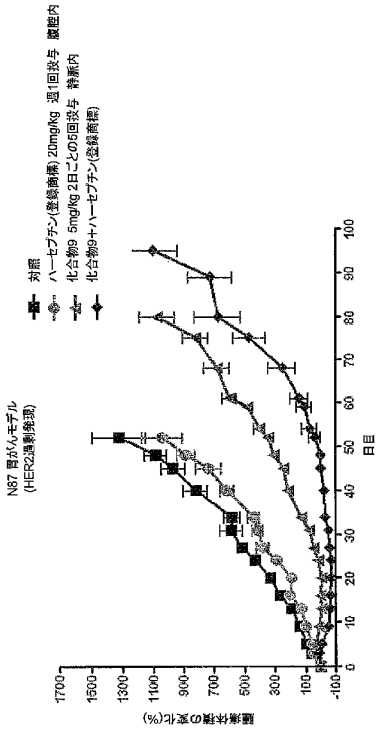




【図４】



【図５】



【配列表】

2013500253000001. app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/42686

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/395; A61K 31/44 (2010.01)
USPC - 424/155.1; 514/283
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)
USPC- 424/155.1; 514/283

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 424/142.1; 514/17; 514/171; 514/183; 514/251; 514/254.07; 514/263.32; 514/320; 514/34; 514/44R; 514/49; 514/493; 514/54; 514/575; 514/650; 514/651; 514/8 (keywords below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patents/Scholar: Her2, camptothecin conjugate, PEG, trastuzumab, petuzumab, antisense, LNA
GenCore 6.3: SEQ ID NO:1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2008/0102069 A1 (Friess et al.) 01 May 2008 (01.05.2008) para [0009], [0015], [0018], [0039], [0078], [0081]-[0082]	28 --- 1-27, 29-31
Y	US 7,462,627 B2 (Zhao et al.) 09 December 2008 (09.12.2008) col 1, ln 44-53, col 4, ln 3-4, col 9, ln 1-67, col 15, ln 1-38, col 17, ln 57 to col 18, ln 4	1-27
Y	US 2008/0194612 A1 (Zhao et al.) 14 August 2008 (14.08.2008) para [0011], [0030], [0136], [0139], [0155]-[0156]	29-31
Y	US 6,395,266 B1 (Martinez et al.) 28 May 2002 (28.05.2002) col 11, ln 10-30; col 23, ln 1-29 and 44-60	12-15
Y	US 5,968,748 A (Bennett et al.) 19 October 1999 (19.10.1999) col 12, ln 1-16, col 17, ln 10-30, ln 36-55, SEQ ID NO 1	17-23
Y	US 2009/0105139 A1 (Kole et al.) 23 April 2009 (23.04.2009) para [0015], [0018]	22

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

* 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
02 November 2010 (02.11.2010)	08 NOV 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 48/00	***(2006.01)***	A61K	48/00	
A61K 47/34	***(2006.01)***	A61K	47/34	
A61K 45/00	***(2006.01)***	A61K	45/00	
A61K 31/4745	*(2006.01)*	A61K	31/4745	
C12N 15/09	*(2006.01)*	C12N	15/00 ZNAA	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,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,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,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 サプラ，プージャ
アメリカ合衆国 ０７６６１ ニュージャージー州，リバー エッジ，ウェイン アベニュー ２５４

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01
4C076 CC27 EE23A EE59
4C084 AA13 AA17 NA14 ZB261
4C085 AA13 BB31 EE03
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB26 ZC42

(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2013-534535
(P2013-534535A)
(43)公表日　平成25年9月5日(2013.9.5)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4C076
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA	4C085
C07K 14/00	(2006.01)	C07K	14/00		4H045
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	
A61P 35/00	(2006.01)	A61K	39/395	N	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 146 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-519199 (P2013-519199)
(86)(22)出願日　平成23年7月11日 (2011.7.11)
(85)翻訳文提出日　平成25年3月6日 (2013.3.6)
(86)国際出願番号　PCT/IB2011/053092
(87)国際公開番号　WO2012/007896
(87)国際公開日　平成24年1月19日 (2012.1.19)
(31)優先権主張番号　61/363,507
(32)優先日　平成22年7月12日 (2010.7.12)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　509129244
コヴェックス・テクノロジーズ・アイルランド・リミテッド
アイルランド国　カウンティ・コーク　リンガスキディー　オペレーションズ・サポート・グループ
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行
(74)代理人　100092967
弁理士　星野　修

最終頁に続く

(54)【発明の名称】多機能性抗体複合体

(57)【要約】
本発明は、Ｋａｂａｔ番号によるＫ^{188}を含んでなる軽鎖定常カッパ領域（ＣＬκ）の少なくとも断片を含んでなる、抗体又はその抗原結合部位を含んでなる多機能性抗体複合体（Multifunctional Antibody Conjugates）；式Ｘ－Ｙ－Ｚを含んでなるリンカーに関し、式中、Ｚは、Ｋ^{188}の側鎖によって抗体に共有的に接続された基であり、Ｙは、直鎖又は分枝鎖の生物学的に適合性の接続鎖であり、そしてＸは、少なくとも一つのエフェクター分子に共有的に接続した基である。本発明は、更に本発明の特異的ＭＡＣ化合物及び組成物を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の(i)(ii)を含む多機能性抗体複合体（ＭＡＣ）
（ｉ）抗体又はその抗原結合部位であって、少なくともＫａｂａｔ番号によるＫ^{188}を含んでなる軽鎖定常カッパ領域（ＣＬκ）の断片を含んでなる抗体又はその抗原結合部位；
（ｉｉ）式Ｘ－Ｙ－Ｚを含んでなるリンカーであって、式中、ＺはＫ^{188}の側鎖によって抗体に共有結合的に接続している基であり、Ｙは直鎖又は分枝鎖の生物学的に適合性の接続鎖であり、そしてＸは少なくとも一つのエフェクター分子に共有結合的に接続された基である、リンカー；並びに
その医薬的に受容可能な塩、立体異性体、互変異性体、溶媒和物、及びプロドラッグ。
【請求項２】
更にＨ^{188}－ＣＬκを含んでなる、請求項１に記載のＭＡＣ。
【請求項３】
更にＤ^{151}－ＬＣκを含んでなる、請求項１又は２のいずれか１項に記載のＭＡＣ。
【請求項４】
前記ＣＬκ領域が、少なくとも配列番号１５、配列番号４５、配列番号４６又は配列番号４７の残基６２－１０３を含んでなる、請求項１から３のいずれか１項に記載のＭＡＣ。
【請求項５】
前記ＣＬκ領域が、少なくとも配列番号１５、配列番号４５、配列番号４６又は配列番号４７の残基１－１０６を含んでなる、請求項１から４のいずれか１項に記載のＭＡＣ。
【請求項６】
前記エフェクター分子が、Ｋ^{188}ＣＬκにおいてのみＭＡＣに結合している、請求項１から５のいずれか１項に記載のＭＡＣ。
【請求項７】
前記エフェクター分子が、少なくとも一つの軽鎖上のＫ^{188}ＣＬκにおいて、そして抗体上の一つの他の位置においてＭＡＣに結合している、請求項１－５のいずれか１項に記載のＭＡＣ。
【請求項８】
前記エフェクター分子が、少なくとも一つの軽鎖上のＫ^{188}ＣＬκにおいて、そして抗体上の二つの他の位置においてＭＡＣに結合している、請求項１－５のいずれか１項に記載のＭＡＣ。
【請求項９】
前記エフェクター分子が、両方の軽鎖上のＣＬκ Ｋ^{188}に結合している、請求項１から８のいずれか１項に記載のＭＡＣ。
【請求項１０】
前記エフェクター分子が、一つのみの軽鎖上のＣＬκ Ｋ^{188}に結合している、請求項１－８のいずれか１項に記載のＭＡＣ。
【請求項１１】
前記エフェクター分子が、治療剤、タンパク質、ペプチド、核酸、アプタマー、小分子、タンパク質アゴニスト、タンパク質アンタゴニスト、代謝制御物質、ホルモン、毒素、成長因子、又は診断剤である、請求項１から１０のいずれか１項に記載のＭＡＣ。
【請求項１２】
前記少なくとも一つのエフェクター分子が、タンパク質又はペプチドである、請求項１から１１のいずれか１項に記載のＭＡＣ。
【請求項１３】
前記リンカーのＸ基が、タンパク質又はペプチド中のペプチド連結残基のアミノ末端、カルボキシル末端、又は側鎖に共有結合的に接続している、請求項１２に記載のＭＡＣ。
【請求項１４】

前記ペプチド連結残基が、Ｋ、Ｒ、Ｃ、Ｔ、Ｙ、Ｓ、Ｄａｐ、Ｄａｂ、Ｋ（ＳＨ）、並びにＫ及びＣの同族体からなる群から選択される、請求項１３に記載のＭＡＣ。

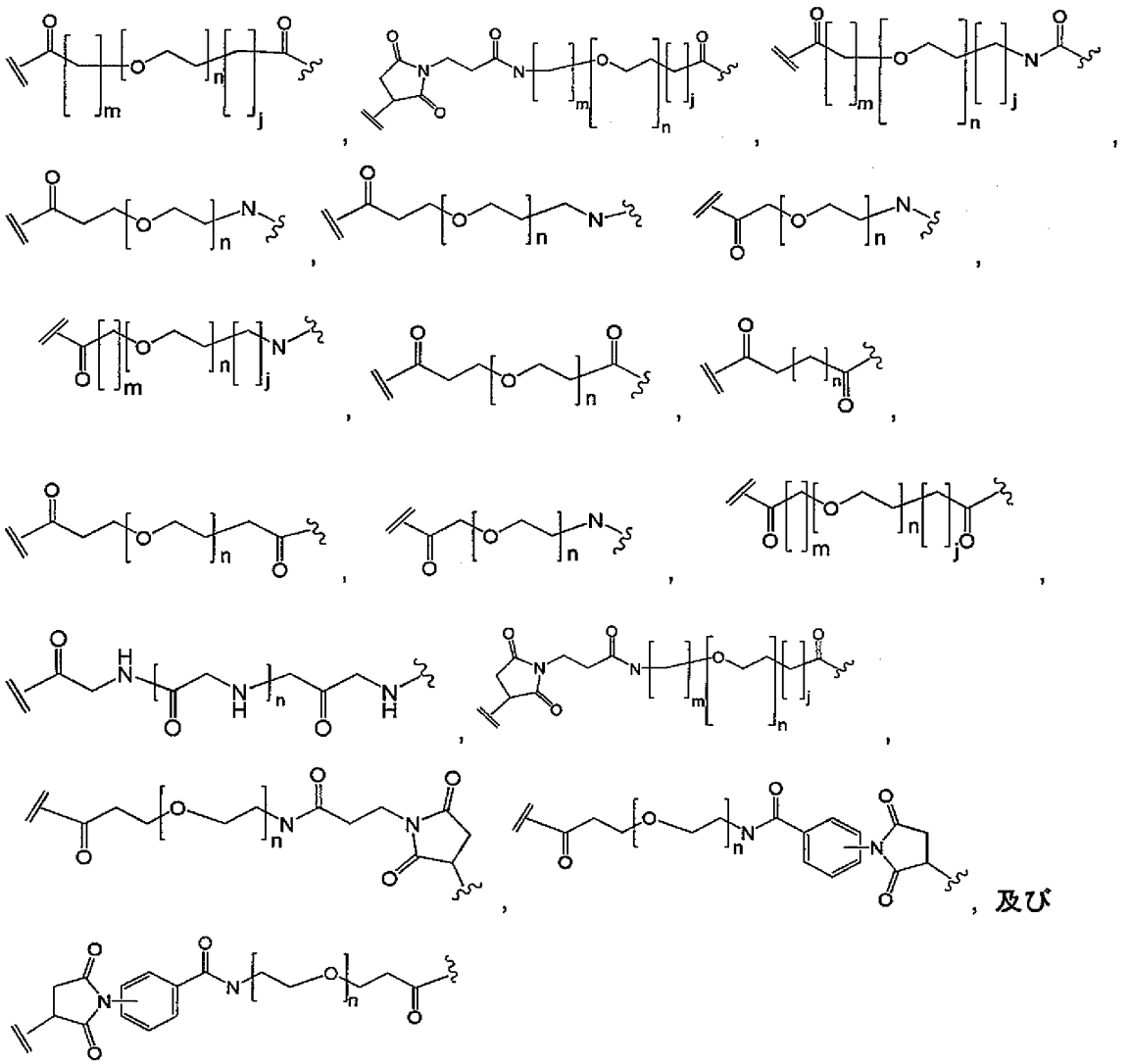
【請求項１５】

前記連結残基が、Ｋである、請求項１４に記載のＭＡＣ。

【請求項１６】

Ｙ、Ｘ－Ｙ、Ｙ－Ｚ、又はＸ－Ｙ－Ｚが：

【化１】



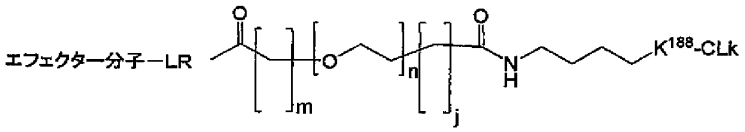
からなる群から選択され、式中、ｍ、ｎ及びｊは、それぞれ独立に、その下限が、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から選択され、そしてその上限が、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、及び３０からなる群から選択される範囲であり、そしてここにおいて、リンカーの全長が、２００個の原子を超えない、請求項１から１５のいずれか１項に記載のＭＡＣ。

【請求項１７】

以下の式を含んでなる、請求項１から１６のいずれか１項に記載のＭＡＣ：

OnCusp
Ex. 1002

【化２】



式中、K^{188}-ＣＬκは、前記K^{188}-ＣＬκの側鎖への共有結合的な連結であり、エフェクター分子-ＬＲは、エフェクター分子への共有結合的連結であり、そしてｍ、ｎ及びｊは、それぞれ独立に、その下限が、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から選択され、そしてその上限が、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、及び３０からなる群から選択される範囲であり、そしてここにおいて、リンカーの全長が、２００個の原子を超えない。

【請求項１８】

前記リンカーの全長が、１５０個の原子を超えない、請求項１から１７のいずれか１項に記載のＭＡＣ。

【請求項１９】

前記リンカーの全長が、１００個の原子を超えない、請求項１８に記載のＭＡＣ。

【請求項２０】

前記リンカーの全長が、６０個の原子を超えない、請求項１９に記載のＭＡＣ。

【請求項２１】

前記抗体が、リツキシマブ、セツキシマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、ラニビズマブ、及びパリビズマブからなる群から選択される、請求項１から２０のいずれか１項に記載のＭＡＣ。

【請求項２２】

前記抗体が、触媒性アルドラーゼ抗体である、請求項１-２０のいずれか１項に記載のＭＡＣ。

【請求項２３】

前記抗体が、全長の抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$、F_V、ｄｓF_V、ｓｃF_V、V_H、二特異性抗体、又はｈ３８ｃ２からのV_H及びV_Lドメインを含んでなるミニボディーである、請求項２２に記載のＭＡＣ。

【請求項２４】

前記抗体が、配列番号５１及び配列番号５２、又は配列番号５３及び配列番号５４を含んでなる、請求項２２に記載のＭＡＣ。

【請求項２５】

前記抗体が、配列番号５を含んでなるＨＣ領域、配列番号６を含んでなるＶＨ領域、配列番号１６を含んでなるＶＬ領域、及び配列番号１５、配列番号４５、配列番号４６又は配列番号４７の一つを含んでなるＣＬ領域を含んでなる、請求項１-１９のいずれか１項に記載のＭＡＣ。

【請求項２６】

前記抗体が、配列番号３及び配列番号４を含んでなる、請求項２５に記載のＭＡＣ。

【請求項２７】

前記エフェクター分子が、Ａｎｇ２結合ペプチドである、請求項１から２６のいずれか１項に記載のＭＡＣ。

【請求項２８】

前記Ａｎｇ２結合ペプチドが、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、及び配列番号３２からなる群から選択される配列を含んでなる、請求項１から２７のいずれか１項に記載のＭＡＣ。

【請求項２９】

前記Ａｎｇ２結合ペプチドが、配列番号２７を含んでなる、請求項２８に記載のＭＡＣ。

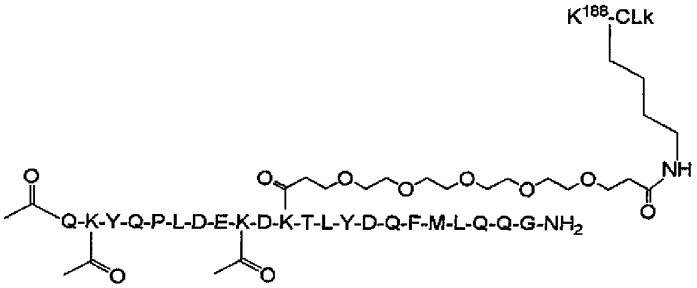
【請求項３０】

前記ペプチド連結残基が、配列番号２７のＫ１１である、請求項２９に記載のＭＡＣ。

【請求項３１】

以下の構造：

【化３】



を含んでなり、式中、Ｋ１８８－ＣＬκは、前記Ｋ１８８－ＣＬκの側鎖への共有連結であり、そして前記抗体が、配列番号３及び配列番号４を含んでなる、請求項３０に記載のＭＡＣ。

【請求項３２】

請求項１から３１のいずれか１項に記載のＭＡＣを含んでなる組成物であって、前記組成物又は試料中のエフェクター分子の少なくとも約５０％が、Ｋ１８８－ＣＬκに結合している、前記組成物。

【請求項３３】

前記組成物又は試料中のエフェクター分子の少なくとも約６０％が、Ｋ１８８－ＣＬκに共役している、請求項３２に記載の組成物。

【請求項３４】

前記組成物又は試料中のエフェクター分子の少なくとも約７０％が、Ｋ１８８－ＣＬκに共役している、請求項３２に記載の組成物。

【請求項３５】

前記組成物又は試料中のエフェクター分子の少なくとも約８０％が、Ｋ１８８－ＣＬκに共役している、請求項３２に記載の組成物。

【請求項３６】

前記抗体の少なくとも約５０％が、Ｋ１８８－ＣＬκに共有的に接続しているエフェクター分子を含んでなる、請求項１－３１のいずれか１項に記載のＭＡＣを含んでなる組成物。

【請求項３７】

前記抗体の少なくとも約６０％が、Ｋ１８８－ＣＬκに共有的に接続しているエフェクター分子を含んでなる、請求項３６に記載の組成物。

【請求項３８】

前記抗体の少なくとも約７０％が、Ｋ１８８－ＣＬκに共有的に接続しているエフェクター分子を含んでなる、請求項３６に記載の組成物。

【請求項３９】

前記抗体の少なくとも約８０％が、Ｋ１８８－ＣＬκに共有的に接続しているエフェクター分子を含んでなる、請求項３６に記載の組成物。

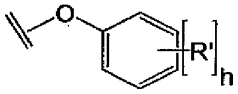
【請求項４０】

戦記重鎖分子の少なくとも約７０％が、エフェクター分子と複合体形成していない、請求項１－３１のいずれか１項に記載のＭＡＣを含んでなる組成物。

【請求項４１】

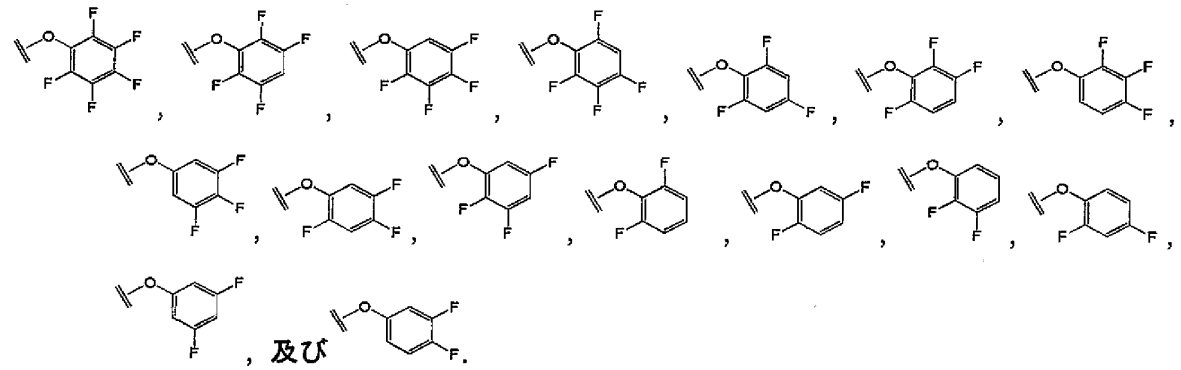
前記重鎖分子の少なくとも約８０％が、エフェクター分子と複合体形成していない、請

求項４０に記載の組成物。
【請求項４２】
前記重鎖分子の少なくとも約９０％が、エフェクター分子と複合体形成していない、請求項４１に記載の組成物。
【請求項４３】
前記エフェクター分子に対して一つの結合部位を含んでなる個々の軽鎖断片の量が、約２５から９５％間である、請求項１－３１のいずれか１項に記載のＭＡＣを含んでなる組成物。
【請求項４４】
前記抗体当たりの結合の数が、約０．５から約５個間である、請求項１－３１のいずれか１項に記載のＭＡＣを含んでなる組成物。
【請求項４５】
前記抗体当たりの結合の数が、約０．５から約３個間である、請求項４４に記載の組成物。
【請求項４６】
前記抗体当たりの結合の数が、約０．５から約１．５個間である、請求項４４に記載の組成物。
【請求項４７】
前記抗体当たりの結合の数が、約１．５から約５．０個間である、請求項４４に記載の組成物。
【請求項４８】
前記抗体当たりの結合の数が、約１．５から約３．０個間である、請求項４４に記載の組成物。
【請求項４９】
前記抗体当たりの結合の数が、約１．５から約２．５個間である、請求項４４に記載の組成物。
【請求項５０】
前記抗体当たりの結合の数が、約１．７から約２．３個間である、請求項４４に記載の組成物。
【請求項５１】
請求項１－３１のいずれか１項に記載の多機能性抗体複合体（ＭＡＣ）、又は請求項３２－５０のいずれか１項に記載の組成物を調製するための方法であって、
エフェクター分子を、以下の式：
【化４】



の脱離基Z^*で終結するリンカーに共有的に接続することを含む結合反応（式中、R^1はＦ又はＣｌであり、ｈ＝２、３、４、又は５である）、及びこのように形成されたエフェクター分子－リンカー－Z^*複合体を、抗体と反応させることを含んでなる、方法。
【請求項５２】
R^1がＦである、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
ｈ＝３、４又は５である、請求項５１－５２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５４】
Z^*が：

【化５】



，及び

からなる群から選択される、請求項５１－５３のいずれか１項に記載の方法。

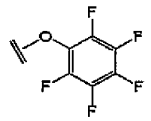
【請求項５５】

ｈ＝４又は５である、請求項５１－５４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５６】

Ｚ＊が：

【化６】



の式のものである、請求項５１－５５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５７】

エフェクター分子：抗体の比が、約１：１から約１５：１間である、請求項５１－５６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５８】

前記比が、約２：１から約５：１間である、請求項５７に記載の方法。

【請求項５９】

前記比が、約３：１から約６：１間である、請求項５７に記載の方法。

【請求項６０】

前記比が、約３．５：１から約５：１間である、請求項５７に記載の方法。

【請求項６１】

前記比が、約５：１から約１５：１間である、請求項５７に記載の方法。

【請求項６２】

前記比が、約５：１から約７：１間である、請求項５７に記載の方法。

【請求項６３】

前記結合反応中の抗体濃度が、約１から約１００ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$間である、請求項５１－６２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６４】

前記結合反応中の抗体濃度が、少なくとも約５ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$である、請求項５１－６２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６５】

前記結合反応中の抗体濃度が、少なくとも約１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$である、請求項５１－６２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６６】

前記結合反応中の抗体濃度が、約５から約５０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$間である、請求項５１－６２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６７】

前記反応が、約４℃から約４０℃間の温度で行われる、請求項５１－６６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６８】
前記反応が、約４℃から約３０℃間の温度で行われる、請求項５１－６６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６９】
前記反応が、約１５℃から約２５℃間の温度で行われる、請求項５１－６６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７０】
前記反応が、約６から約９間のｐＨで行われる、請求項１－６９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７１】
前記反応が、約６．５から約８間のｐＨで行われる、請求項１－６９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７２】
前記抗体が、ＣＬλ領域を含んでなり、更にＣＬλ領域の対応する部分（Ｋａｂａｔ番号による）を、少なくとも配列番号１５、配列番号４５、配列番号４６又は配列番号４７の残基６２－１０３で置換する最初の工程を含んでなる、請求項５１－７１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７３】
前記抗体の対応するＣＬλ領域が、少なくとも配列番号１５、配列番号４５、配列番号４６又は配列番号４７の残基１－１０６で置換される、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
請求項５１－７３のいずれか１項に記載の方法によって製造される、ＭＡＣ。
【請求項７５】
請求項７４に記載のＭＡＣを含んでなる、組成物。
【請求項７６】
請求項１－３１、又は請求項７５のいずれか１項に記載のＭＡＣ、或いは請求項３２－５０のいずれか１項に記載の医薬組成物を含んでなり、そして更に受容可能な担体を含んでなる、医薬組成物。
【請求項７７】
更に５－フルオロウラシル、イリノテカン、オキシラプラチン、セツキシマブ、スニチニブ、及びリツキシマブからなる群から選択される一つ又はそれより多い化合物を含んでなる、請求項７６に記載の医薬組成物。
【請求項７８】
治療的に有効な投与量の請求項７６－７７のいずれか１項に記載の医薬組成物を、患者に投与することを含んでなる、血管新生を阻害又は減少する、或いは血管新生性疾患に伴う疾病又は徴候を治療若しくは予防する方法。
【請求項７９】
前記疾病が、癌である、請求項７８に記載の方法。
【請求項８０】
前記癌が、肺（ＮＳＣＬＣ及びＳＣＬＣ）、頭頸部、卵巣、大腸、直腸、前立腺、肛門領域、胃、乳房、腎臓又は尿管、腎盂、甲状腺、膀胱、脳の癌、腎細胞細胞腫、中枢神経系（ＣＮＳ）の腫瘍の細胞腫、原発性ＣＮＳリンパ腫、非ホジキンスリンパ腫、脊髄軸腫瘍、中咽頭、下咽頭、食道、膵臓、肝臓、胆嚢及び胆管、小腸、尿管の細胞腫；又はリンパ腫、肺癌（ＮＳＣＬＣ及びＳＣＬＣ）、乳癌、卵巣癌、大腸癌、直腸癌、前立腺癌、肛門領域の癌、或いは一つ又はそれより多い前述の癌の組合せである、請求項７９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
本発明は、多機能性抗体複合体（Multifunctional Antibody Conjugates）に関する。
【背景技術】
【０００２】
二機能性治療剤の開発は、併用療法の戦略を増大するために大きな潜在性を有する。二機能性治療剤は、一つの治療成分で二つの異なった経路を調節することによる併用療法の利益を提供することができる。更に、二機能性治療剤は、更に経路間の相乗作用からの利益を得て、そして単機能性薬剤と比較して増加した活性を示すことができる。更に、二機能性治療剤は、減少された製造、保存及び運搬費用、並びに患者に与える治療剤の数を減少し、そして投与管理を簡略化することに関して利益を提供することができる。
【０００３】
ＩＧＦ１Ｒは、膜貫通型ヘテロ四量体タンパク質であり、これは、ジスルフィド結合中の二つの細胞外α鎖及び二つの膜貫通β鎖（β－α－α－β）配置を有する。ＩＧＦ１Ｒは、ＩＧＦ１と高い親和性で結合する。ＩＧＦ１は、７０アミノ酸のペプチドであり、これは、主として成長ホルモンの刺激に反応して肝臓によって産生されるが、しかし身体中の殆どいずれもの組織によって合成することができ、そして１００－２００ｎｇ／ｍＬの濃度まで血清中で循環する。ＩＧＦ１Ｒのシグナル伝達は、多数の腫瘍種において役割を演じることができ、そして特に肺癌に関係する。例えば、ＩＧＦ１の上昇した血漿レベルは、増加した肺癌の危険性を伴う。更に、ＩＧＦ１、ＩＧＦ２、及びＩＧＦ１Ｒは、正常な肺細胞によって発現されるが、しかし肺癌細胞によって過剰発現される。ＩＧＦ１Ｒシグナル伝達は、更に、乳癌、前立腺癌、大腸直腸癌、肉腫、多発性骨髄腫、及び他の悪性腫瘍に関係している。ＷＯ０２０５３５９６、ＷＯ２００５０１６９６７、ＷＯ２００５００５６３５、及びＷＯ２００９０３２１４５は、ＩＧＦ１Ｒ抗体及びその抗原結合部位を開示している。
【０００４】
アンジオポイエチン－１（Ａｎｇ１）及びアンジオポイエチン－２（Ａｎｇ２）は、ＶＥＧＦ及び他の血管新生制御因子と共に内皮細胞受容体Ｔｉｅ２のリガンドとして血管新生過程を媒介する。Ａｎｇ１は、Ｔｉｅ２のリン酸化を刺激し、新しく形成された血管に周皮細胞を補充し、そしてその成熟を促進する。Ａｎｇ２は、血管形成誘導性であり、そして多くの癌において過剰発現することが知られている。Ａｎｇ２は、Ｔｉｅ２の結合に対してＡｎｇ１と競合し、周皮細胞の解離を促進し、そして不安定な血管をもたらす。ＶＥＦＧ及び他の血管新生誘導性因子の存在中で、これらの不安定な血管の内皮細胞は、増殖し、そして遊走して、新しい血管を形成する。
【０００５】
固形腫瘍を持つ患者の約５０％は、Ａｎｇ２の増加した発現を有するが、しかし癌組織中のＡｎｇ２のレベルは、高度に可変性である。より高いＡｎｇ２の発現は、不良な生存率、後期疾病及び更に浸潤性の癌と明確に相関している。Ａｎｇ１及びＡｎｇ２間のより低い比は、更に卵巣癌の不良な予後と相関している。Ｔｉｅ２発現は、肝細胞腫、星状細胞種、カポジ肉腫、皮膚血管肉腫、及び非小細胞肺癌中で上方制御されることが報告されている。Ｔｉｅ２は、多くの腫瘍の血管において過剰発現する。Ｔｉｅ２を発現している単球は、腫瘍性血管の形成に寄与する。新しく公開されたデータは、特異的に隔離するＡｎｇ２が、腫瘍の成長を阻害し、そして段階分けされた腫瘍の退行を起こすことを示している。ＷＯ２００８０５６３４６は、Ａｎｇ２結合ペプチドを開示している。
【０００６】
同一療法中でＩＧＦ１Ｒ及びＡｎｇ２の両方を標的とすることは、多剤治療設定において使用する腫瘍学者のために有効な道具であることを証明することができる。このような方法は、想定されている（例えば、ＷＯ２００９０８８８０５及びＷＯ２０１００４０５０８）が、今日までどれも認可されていない。従って、ＩＧＲ－１Ｒ及びＡｎｇ２の両方を標的とする別の腫瘍学治療剤を提供する必要性が存在する。
【０００７】

本明細書中のいずれもの技術に対する言及は、言及された技術が普通の一般的知識の一部を形成することのいずれもの形態の確認又は示唆ではなく、そしてそのように解釈されるべきではない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】国際特許出願公開ＷＯ２０５３５９６；
【特許文献２】ＷＯ２００５０１６９６７；
【特許文献２】ＷＯ２００５００５６３５；
【特許文献２】ＷＯ２００９０３２１４５；
【特許文献２】ＷＯ２００８０５６３４６；
【特許文献２】ＷＯ２００９０８８８０５；
【特許文献２】ＷＯ２０１００４０５。

【発明の概要】

【０００９】

本発明は、少なくとも一つのエフェクター分子に結合（conjugate, 共役、複合体化）した抗体又はその抗原結合部位を含んでなる、多機能性抗体複合体（Multifunctional Antibody Conjugates：ＭＡＣ）、並びにその医薬的に受容可能な塩、立体異性体、互変異性体、溶媒和物、及びプロドラッグを提供する。本発明は、更に本発明のＭＡＣを含んでなる医薬組成物及び試料を提供する。

【００１０】

本発明は、更に少なくとも一つのＡｎｇ２結合ペプチドに共役（結合）した抗体又はその抗原結合部位を含んでなる多機能性抗体複合体（ＭＡＣ）を提供する。

本発明は、少なくとも一つのＡｎｇ２結合ペプチドに共役した抗ＩＧＦ１Ｒ抗体又はその抗原結合部位を含んでなる多機能性抗体複合体（ＭＡＣ）を提供する。

【００１１】

幾つかの態様において、少なくとも一つのＡｎｇ２結合ペプチドは、抗体の、共役する残渣の側鎖にリンカーを経由して共役する。

幾つかの態様において、エフェクター分子は、抗体又はその抗原結合部位のＦａｂ領域中のリシン残基の側鎖に共有的に接続される。幾つかの態様において、エフェクター分子は、定常重鎖（ＣＨ）又は定常軽鎖（ＣＬ）領域中のリシン残基の側鎖に共有的に接続される。抗体のＣＬドメインとのエフェクター分子の反応は、抗体のＦｃ部分のＦｃ受容体（ＦｃγＲ及びＦｃＲｎのような）への結合、或いはそのそれぞれの標的への抗体の結合によるいずれもの干渉を、最小化、又は防止するために特に好ましい。対照的に、抗体のＦｃ部分へのそれぞれのエフェクター分子の共役は、抗体のｉｎ ｖｉｖｏの半減期及び／又は免疫系との相互作用するその能力（エフェクター機能）を減少することができる。抗体の可変重鎖（ＶＨ）又は可変軽鎖（ＶＬ）領域中のエフェクター分子の共役は、抗体のその同族への結合を減少する危険を保有する。

【００１２】

幾つかの態様において、エフェクター分子は、定常軽鎖カッパ領域（ＣＬκ）ドメイン中のリシン残基の側鎖に共有的に接続される。ＣＬκドメインへのエフェクター分子の優先的な共役は、抗体へのエフェクター分子の共役部位に影響することなく、抗体のＣＨドメインのアイソタイプスイッチを可能にすることによって、ＭＡＣアイソタイプの作成を簡単にする。

【００１３】

エフェクター分子は、軽鎖カッパドメイン定常領域（ＣＬκ）のK^{80}の側鎖に共有的に接続されることができる（配列番号：１５、配列番号：４５、配列番号：４６：又は配列番号：４７）（Ｋａｂａｔ番号によりK^{188}）。幾つかの態様において、エフェクター分子は、配列番号：１５のK^{80}に共有的に接続される。配列番号：１５のK^{80}は、パラトープ領域、ＦｃＲｎ結合ドメイン、ヒンジ、ＦｃＲ結合ドメインのように、それぞ

れの抗体の重要な領域から離れて位置する；これは、ＭＡＣがエフェクター分子に共役する場合、これらの部位における優先的な結合が、抗体 - 抗原相互作用への干渉の量を制約する利点を提供する。

【００１４】

幾つかの側面において、エフェクター分子は、モチーフＫ* ＨＫのＫ* に共有的に接続される。Ｋ* ＨＫモチーフのＫ* は、配列番号：１５のＫ80 に対応することができる。幾つかの側面において、エフェクター分子は、Ｋｏｂａｔ番号系による、ＣＬκ領域に位置するモチーフＫ188 ＨのＫ188 に共有的に接続される。幾つかの側面において、ＣＫκ領域は、少なくとも配列番号：１５、４５、４６、又は４７の残基６２ - １０３を含んでなる。幾つかの側面において、ＣＫκ領域は、配列番号：１５、４５、４６、又は４７を含んでなる。

【００１５】

幾つかの側面において、ＣＬκ領域は、少なくとも配列番号：１５の残基６２ - １０３を含んでなる。幾つかの側面において、ＣＫκ領域は、配列番号：１５を含んでなる。幾つかの側面において、ＣＬκ領域は、少なくとも配列番号：４５の残基６２ - １０３を含んでなる。幾つかの側面において、ＣＫκ領域は、配列番号：４５を含んでなる。幾つかの側面において、ＣＬκ領域は、少なくとも配列番号：４６の残基６２ - １０３を含んでなる。幾つかの側面において、ＣＫκ領域は、配列番号：４６を含んでなる。幾つかの側面において、ＣＬκ領域は、少なくとも配列番号：４７の残基６２ - １０３を含んでなる。幾つかの側面において、ＣＫκ領域は、配列番号：４７を含んでなる。

【００１６】

幾つかの側面において、ＣＫκ領域は、配列番号：４５又は４７を含んでなる。ＣＫκ領域が、配列番号：４５又は４７を部分的に或いは全体的に含んでなる場合、ｘ82 は、Ｋ、Ｒ、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｓ、Ｔ、Ｃ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｆ、Ｗ又はＹからなる群から選択することができる。幾つかの側面において、ｘ82 は、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、又はＩであることができる。幾つかの側面において、ｘ82 は、Ｋ、Ｒ、Ｎ、又はＱであることができる。幾つかの側面において、ｘ82 は、Ｄ、又はＥであることができる。幾つかの側面において、ｘ82 は、Ｋ、Ｒ、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｎ、又はＱであることができる。幾つかの側面において、ｘ82 は、Ｄ、又はＥであることができる。幾つかの側面において、ｘ82 は、Ｋ、Ｒ、Ｇ、Ａ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｎ、Ｑ、Ｄ又はＥであることができる。幾つかの側面において、ｘ82 は、Ｄ、又はＥであることができる。幾つかの側面において、ｘ82 は、Ｈ、Ｆ、Ｗ又はＹであることができる。幾つかの側面において、ｘ82 は、プロリンではない。幾つかの側面において、Ｘ82 （配列番号：１５、４５、４６、及び／又は４７の）は、Ｒである。幾つかの側面において、Ｋ190 - ＣＬκは、Ｒである。

【００１７】

配列番号：４５及び４７は、ＣＬκ中で確認された多形；Ｖ／Ａ153 及びＬ／Ｖ191 （Ｋａｂａｔ番号による）を含んでなる。従って、三つの多形は：Ｋｍ（１）：Ｖ153 ／Ｌ191 ；Ｋｍ（１，２）：Ａ153 ／Ｌ191 ；及びＫｍ（３）Ａ153 ／Ｖ191 である。配列番号：４５及び／又は４７を含んでなる本発明の幾つかの側面において、ｘ45 は、Ｖであり、そしてｘ83 は、Ｌ（Ｋｍ（１））である。配列番号：４５及び／又は４７を含んでなる本発明の幾つかの側面において、ｘ45 は、Ａであり、そしてｘ83 は、Ｌ（Ｋｍ（１，２））である。配列番号：４５及び／又は４７を含んでなる本発明の幾つかの側面において、ｘ45 は、Ａであり、そしてｘ83 は、Ｖ（Ｋｍ（３））である。

【００１８】

幾つかの側面において、ＭＡＣは、両方の軽鎖のＣＫκ Ｋ188 に共役したエフェクター分子を含んでなる。幾つかの側面において、ＭＡＣは、一つの軽鎖のみ上のＣＫκ Ｋ188 に共役したエフェクター分子を含んでなる。幾つかの側面において、エフェクター分子は、Ｋ188 ＣＬκにおいてのみＭＡＣに共役する。幾つかの側面において、エフェク

ター分子は、一つの軽鎖上のK188 CLκにおいて、そして抗体上の一つの他の位置でMACに共役する。幾つかの側面において、エフェクター分子は、一つの軽鎖上のK188 CLκにおいて、そして抗体上の二つの他の位置でMACに共役する。幾つかの側面において、エフェクター分子は、一つの軽鎖上のK188 CLκにおいて、そして抗体上の三つの他の位置でMACに共役する。幾つかの側面において、エフェクター分子は、両方の軽鎖上のK188 CLκにおいて、そして一つの他の位置においてMACに結合する。幾つかの側面において、エフェクター分子は、両方の軽鎖上のK188 CLκにおいて、そして二つの他の位置においてMACに共役する。幾つかの側面において、エフェクター分子は、両方の軽鎖上のK188 CLκにおいて、そして三つの他の位置においてMACに共役する。

【００１９】

本発明の試料及び組成物

幾つかの側面において、本発明は、エフェクター分子に共有的に共役された抗体（又はその抗原結合部位）を含んでなるMACの組成物又は試料を提供し、ここにおいて、組成物又は試料中のエフェクター分子の少なくとも約５０％は、K188-CLκに共役している。幾つかの側面において、本発明は、エフェクター分子に共有的に共役された抗体（又はその抗原結合部位）を含んでなるMACの組成物又は試料を提供し、ここにおいて、組成物又は試料中のエフェクター分子の少なくとも約６０％は、K188-CLκに共役している。幾つかの側面において、本発明は、エフェクター分子に共有的に共役された抗体（又はその抗原結合部位）を含んでなるMACの組成物又は試料を提供し、ここにおいて、組成物又は試料中のエフェクター分子の少なくとも約７０％は、K188-CLκに共役している。幾つかの側面において、本発明は、エフェクター分子に共有的に共役された抗体（又はその抗原結合部位）を含んでなるMACの組成物又は試料を提供し、ここにおいて、組成物又は試料中のエフェクター分子の少なくとも約８０％は、K188-CLκに共役している。幾つかの側面において、本発明は、エフェクター分子に共有的に共役された抗体（又はその抗原結合部位）を含んでなるMACの組成物又は試料を提供し、ここにおいて、組成物又は試料中のエフェクター分子の少なくとも約９０％は、K188-CLκに共役している。

【００２０】

幾つかの側面において、本発明は、抗体（又はその抗原結合部位）を含んでなるMACの組成物（又は試料）を提供し、ここにおいて、抗体の少なくとも約５０％は、少なくとも一つの軽鎖上のK188-CLκに共有的に接続しているエフェクター分子を含んでなる。幾つかの側面において、本発明は、抗体（又はその抗原結合部位）を含んでなるMACの組成物（又は試料）を提供し、ここにおいて、抗体の少なくとも約６０％は、少なくとも一つの軽鎖上のK188-CLκに共有的に接続しているエフェクター分子を含んでなる。幾つかの側面において、本発明は、抗体（又はその抗原結合部位）を含んでなるMACの組成物（又は試料）を提供し、ここにおいて、抗体の少なくとも約７０％は、少なくとも一つの軽鎖上のK188-CLκに共有的に接続しているエフェクター分子を含んでなる。幾つかの側面において、本発明は、抗体（又はその抗原結合部位）を含んでなるMACの組成物（又は試料）を提供し、ここにおいて、抗体の少なくとも約８０％は、少なくとも一つの軽鎖上のK188-CLκに共有的に接続しているエフェクター分子を含んでなる。幾つかの側面において、本発明は、抗体（又はその抗原結合部位）を含んでなるMACの組成物（又は試料）を提供し、ここにおいて、抗体の少なくとも約９０％は、少なくとも一つの軽鎖上のK188-CLκに共有的に接続しているエフェクター分子を含んでなる。幾つかの側面において、エフェクター分子は、両方の軽鎖上の両方のK188-CLκに共有的に共役している。

【００２１】

幾つかの側面において、本発明は、エフェクター分子に共有的に共役された抗体又はその抗原結合部位を含んでなるMACの試料を提供し、ここにおいて、試料の少なくとも約３０％は、抗体当たり約２か所で共役されたエフェクター分子を含んでなり、そしてここ

において、少なくとも一つのエフェクター分子共役部位は、K^{188}-CLκである。幾つかの側面において、この量は、約４０％である。幾つかの側面において、この量は、約５０％である。幾つかの側面において、この量は、約６０％である。幾つかの側面において、この量は、約７０％である。幾つかの側面において、この量は、約８０％である。幾つかの側面において、この量は、約９０％である。幾つかの側面において、この量は、約９５％である。幾つかの側面において、この量は、約９９％である。

【００２２】

幾つかの側面において、本発明は、エフェクター分子に共有的に共役された抗体又はその抗原結合部位を含んでなるＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、試料の少なくとも約３０％は、抗体当たり約３か所で共役されたエフェクター分子を含んでなり、そしてここにおいて、少なくとも二つのエフェクター分子共役部位は、それぞれの軽鎖上のK^{188}-CLκである。幾つかの側面において、この量は、約４０％である。幾つかの側面において、この量は、約５０％である。幾つかの側面において、この量は、約６０％である。幾つかの側面において、この量は、約７０％である。幾つかの側面において、この量は、約８０％である。幾つかの側面において、この量は、約９０％である。幾つかの側面において、この量は、約９５％である。幾つかの側面において、この量は、約９９％である。

【００２３】

幾つかの側面において、本発明は、エフェクター分子に共有的に共役された抗体又はその抗原結合部位を含んでなるＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、試料の少なくとも約３０％は、抗体当たり約４か所で共役されたエフェクター分子を含んでなり、そしてここにおいて、少なくとも二つのエフェクター分子共役部位は、それぞれの軽鎖上のK^{188}-CLκである。幾つかの側面において、この量は、約４０％である。幾つかの側面において、この量は、約５０％である。幾つかの側面において、この量は、約６０％である。幾つかの側面において、この量は、約７０％である。幾つかの側面において、この量は、約８０％である。幾つかの側面において、この量は、約９０％である。幾つかの側面において、この量は、約９５％である。幾つかの側面において、この量は、約９９％である。

【００２４】

幾つかの側面において、本発明は、エフェクター分子に共有的に共役された抗体又はその抗原結合部位を含んでなるＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、試料の少なくとも約３０％は、抗体当たり約５か所で共役されたエフェクター分子を含んでなり、そしてここにおいて、少なくとも二つのエフェクター分子共役部位は、それぞれの軽鎖上のK^{188}-CLκである。幾つかの側面において、この量は、約４０％である。幾つかの側面において、この量は、約５０％である。幾つかの側面において、この量は、約６０％である。幾つかの側面において、この量は、約７０％である。幾つかの側面において、この量は、約８０％である。幾つかの側面において、この量は、約９０％である。幾つかの側面において、この量は、約９５％である。幾つかの側面において、この量は、約９９％である。

【００２５】

幾つかの側面において、本発明は、ＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、軽鎖分子の少なくとも５０％は、少なくとも一つのエフェクター分子と共役している。幾つかの側面において、本発明は、ＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、軽鎖分子の少なくとも６０％は、少なくとも一つのエフェクター分子と共役している。幾つかの側面において、本発明は、ＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、軽鎖分子の少なくとも６５％は、少なくとも一つのエフェクター分子と共役している。幾つかの側面において、本発明は、ＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、軽鎖分子の少なくとも７０％は、少なくとも一つのエフェクター分子と共役している。幾つかの側面において、本発明は、ＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、軽鎖分子の少なくとも７５％は、少なくとも一つのエフェクター分子と共役している。幾つかの側面において、本発明は、ＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、軽鎖分子の少なくとも８０％は、少なくとも一つのエフェクター分子と共役している。幾つかの側面において、本発明は、ＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、軽鎖分子の少なくとも８５％は、少なくとも一つのエフェクター分子と共役している。幾つかの側面にお

いて、本発明は、ＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、軽鎖分子の少なくとも９０％は、少なくとも一つのエフェクター分子と共役している。幾つかの側面において、本発明は、ＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、軽鎖分子の少なくとも９５％は、少なくとも一つのエフェクター分子と共役している。

【００２６】

幾つかの側面において、本発明は、ＭＡＣの試料を提供し、ここにおいて、重鎖分子の少なくとも７０％は、エフェクター分子と共役していない。幾つかの側面において、この量は、約７５％である。幾つかの側面において、この量は、約８０％である。幾つかの側面において、この量は、約８５％である。幾つかの側面において、この量は、約９０％である。幾つかの側面において、この量は、約９５％である。幾つかの側面において、この量は、約９９％である。幾つかの側面において、重鎖分子の実質的に全ては、エフェクター分子と共役していない。

【００２７】

幾つかの側面において、本発明は、リンカーによってエフェクター分子に共有的に共役している抗体、又はその抗原結合部位を含んでなるＭＡＣを提供し、抗体又はその抗原結合部位がモチーフＫＨＫを含んでなり、そしてエフェクター分子がK^{188}残基（Ｋｏｂａｔ番号による）の側鎖に共役していることを特徴とする。

【００２８】

幾つかの側面において、共役されていない個々の軽鎖断片の量は、約１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、及び５５％からなる群から選択される下限を、そして約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、及び６０％からなる群から選択される上限を有する。幾つかの側面において、一つの位置で共役されている個々の軽鎖断片の量は、約２５、３０、３５、４０、４５、５０、及び５５％からなる群から選択される下限を、そして約３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、及び９５％からなる群から選択される上限を有する。幾つかの側面において、二つの位置で共役されている個々の軽鎖断片の量は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、５、１０、１５、２０、及び２５％からなる群から選択される下限を、そして５、１６、７、８、９、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、及び４０％からなる群から選択される上限を有する。

【００２９】

幾つかの側面において、共役されていない個々の重鎖断片の量は、約５０、５５、６０、６５、７０、７５、及び８０％からなる群から選択される下限を、そして約６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５及び９９％からなる群から選択される上限を有する。幾つかの側面において、一つの位置で共役されている個々の重鎖断片の量は、約１、２、５、１０、１５、２０、及び２５％からなる群から選択される下限を、そして約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、及び５０％からなる群から選択される上限を有する。幾つかの側面において、二つの位置で共役されている個々の重鎖断片の量は、約０、１、２、３、４、５、１０、及び１５％からなる群から選択される下限を、そして約２、３、４、５、１０、１５及び２０％からなる群から選択される上限を有する。

【００３０】

幾つかの側面において、本発明の試料又は組成物中の抗体当たりの共役の数は、約０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．５５、１．６、１．６５、１．７、１．７５、１．８、１．８５、１．９、１．９５、及び２からなる群から選択される下限を、そして約１．６、１．７、１．７５　１．８、１．８５、１．９、１．９５、２．０、２．０５、２．１、２．１５、２．２、２．２５、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．５、４．０、４．５及び５からなる群から選択される上限を有する。幾つかの側面において、本発明の試料又は組成物中の抗体当たりの共役の数は、約１．５ないし約２．５の間である。幾つかの側面において、本発明の試料又は組成物中の抗体当たりの共役の数は、約１．６ないし約２．４の間である。幾つかの側面において、本発明の試料又は組成物中の抗体当

たりの共役の数は、約１．７ないし約２．３の間である。幾つかの側面において、本発明の試料又は組成物中の抗体当たりの共役の数は、約１．８ないし約２．２の間である。幾つかの側面において、本発明の試料又は組成物中の抗体当たりの共役の数は、約１．５、約１．５５、約１．６、約１．６５、約１．７、約１．７５、約１．８、約１．８５、約１．９、約１．９５、約２．０、約２．０５、約２．１、約２．１５、約２．２、約２．２５、約２．３、約２．４及び約２．５からなる群から選択される。幾つかの側面において、この量は約１．７である。幾つかの側面において、この量は約１．８である。幾つかの側面において、この量は約１．９である。幾つかの側面において、この量は約２である。幾つかの側面において、この量は約２．１である。幾つかの側面において、この量は約２．１である。幾つかの側面において、この量は約２．３である。

【００３１】

本発明の幾つかの側面において、抗体当たりの共役の数は、２より小さく、抗体集団の少なくとも５０％は、抗体当たり一つの共役のみを有する。これらの試料は、これらが残りのＣＬκ部位において標的とされる更なる結合（共役）反応を可能にするため、好都合である。幾つかの側面において、本発明の試料又は組成物中の抗体当たりの共役の数は、約０．５ないし約１．５の間である。幾つかの側面において、本発明の試料又は組成物中の抗体当たりの共役の数は、約０．６ないし約１．４の間である。幾つかの側面において、本発明の試料又は組成物中の抗体当たりの共役の数は、約０．７ないし約１．３の間である。幾つかの側面において、本発明の試料又は組成物中の抗体当たりの共役の数は、約０．８ないし約１．２の間である。幾つかの側面において、本発明の試料又は組成物中の抗体当たりの共役の数は、約０．９ないし約１．１の間である。

【００３２】

本発明の利点の一つは、試薬及び反応条件（特に脱離基エステル及びリンカー：抗体のモル比）によるが、ＭＡＣの組成物及び試料は、規定された数の抗体に対して規定された数のエフェクター分子を伴って産生することができることである。これは、エフェクター分子及び抗体の相対的反応性及び治療領域を均衡させる場合、特に有用であることができる。更に、幾つかの状況において、ある閾値を超えて抗体当たりのペプチドの数を増加することは、増加した標的結合又は治療効果をもたらさないかもしれない。従って、抗体当たりの共役するペプチドの数を制御することが可能であることは有用であり、そしてそうすることによって、Ｆｃ又は結合部位の干渉を最小化するように、共役の位置を指示する。従って、幾つかの状況において、一つのK^{188}-ＣＬκのみを優先的に修飾する減少した共役を可能にする本発明の側面が、好都合であることができる。

幾つかの側面において、ＭＡＣの試料は医薬組成物であることができる。

【００３３】

ＩＧＦＲ抗体

幾つかの態様において、少なくとも一つのＡｎｇ２結合ペプチドが、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体上のリシン残基の側鎖によって共役される。幾つかの態様において、少なくとも一つのＡｎｇ２結合ペプチドが、ＣＬドメインに共有的に結合される。幾つかの態様において、少なくとも一つのＡｎｇ２結合ペプチドが、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体のＦ（ａｂ）領域に共有的に結合される。幾つかの態様において、少なくとも一つのＡｎｇ２結合ペプチドが、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体の軽鎖定常領域に共有的に結合される。幾つかの態様において、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体は、リンカーによってＡｎｇ２結合ペプチドに共有的に接続される。幾つかの態様において、Ａｎｇ２結合ペプチドは、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体のＣ’又はＮ’末端に融合されていない。

【００３４】

幾つかの態様において、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体は、ＷＯ０２０５３５９６（米国特許第７，０３７，４９８号）及びＷＯ２００５０１６９６７（米国特許第７，３７１，３７８号）（そのそれぞれの内容は本明細書中に援用される）中に記載されているものから選択される。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：５を含んでなる重鎖定常ドメインを含んでなる。

【００３５】
幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：６、配列番号：１の残基１－１２２、及び配列番号：３の残基１－１２２からなる群から選択される重鎖可変ドメインを含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：３の残基１－１２２を含んでなる重鎖可変ドメインを含んでなる。
【００３６】
幾つかの態様において、ＭＡＣの重鎖は、配列番号：７、配列番号：１の残基２６－３５、及び配列番号：３の残基２６－３５からなる群から選択される配列を含んでなるＶＨＣＤＲ１領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：７を含んでなるＶＨＣＤＲ１領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣの重鎖は、配列番号：８、配列番号：３の残基５０－６４、及び配列番号：５の残基５０－６４からなる群から選択される配列を含んでなるＶＨＣＤＲ２領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：８を含んでなるＶＨＣＤＲ２領域を含んでなる。
【００３７】
幾つかの態様において、ＭＡＣの重鎖は、配列番号：９、配列番号：１の残基９９－１１４、及び配列番号：３の残基９９－１１４からなる群から選択される配列を含んでなるＶＨＣＤＲ３領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：９を含んでなるＶＨＣＤＲ３領域を含んでなる。
【００３８】
幾つかの態様において、ＭＡＣの重鎖は、配列番号：１０、配列番号：１の残基１－２５、配列番号：３の残基１－２５、及び配列番号：１１からなる群から選択される配列を含んでなるＶＨＦＲ１領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：１１を含んでなるＶＨＦＲ１領域を含んでなる。
【００３９】
幾つかの態様において、ＭＡＣの重鎖は、配列番号：１２、配列番号：１の残基３６－４９、及び配列番号：３の残基３６－４９からなる群から選択される配列を含んでなるＶＨＦＲ２領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：１２を含んでなるＶＨＦＲ２領域を含んでなる。
【００４０】
幾つかの態様において、ＭＡＣの重鎖は、配列番号：１３、配列番号：１の残基６５－９８、及び配列番号：３の残基６５－９８からなる群から選択される配列を含んでなるＶＨＦＲ３領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：１３を含んでなるＶＨＦＲ３領域を含んでなる。
【００４１】
幾つかの態様において、ＭＡＣの重鎖は、配列番号：１４、配列番号：１の残基１１５－１２２、及び配列番号：３の残基１１５－１２２からなる群から選択される配列を含んでなるＶＨＦＲ４領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：１４を含んでなるＶＨＦＲ４領域を含んでなる。
【００４２】
幾つかの態様において、抗ＩＧＦＲ１抗体のＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２及びＶＨＣＤＲ３領域は、それぞれ、配列番号：３の残基２６－３５、配列番号：３の残基５０－６４、及び配列番号：３の残基９９－１１４を含んでなる。
【００４３】
幾つかの態様において、抗ＩＧＦＲ１抗体のＶＨＦＲ１、ＶＨＦＲ２、ＶＨＦＲ３、及びＶＨＦＲ４領域は、それぞれ、配列番号：３の残基１－２５、配列番号：３の残基３６－４９、配列番号：３の残基６５－９８、及び配列番号：３の残基１１５－１２２を含んでなる。
【００４４】
幾つかの態様において、抗ＩＧＦＲ１抗体は、配列番号：１及び配列番号：３からなる群から選択される重鎖を含んでなる。幾つかの態様において、抗ＩＧＦＲ１抗体は、配列

番号：３を含んでなる重鎖を含んでなる。
【００４５】
幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：１５を含んでなる軽鎖定常ドメインを含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：４５、４６又は４７を含んでなる軽鎖定常ドメインを含んでなる。
【００４６】
幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：１６、配列番号：２の残基１－１０８、及び配列番号：４の残基１－１０８からなる群から選択される軽鎖可変ドメインを含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：４の残基１－１０８を含んでなる軽鎖可変ドメインを含んでなる。
【００４７】
幾つかの態様において、ＭＡＣの軽鎖は、配列番号：１７、配列番号：２の残基２４－３４、及び配列番号：４の残基２４－３４からなる群から選択される配列を含んでなるＶＬＣＤＲ１（可変軽鎖相補性決定領域－１）領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：１７を含んでなるＶＬＣＤＲ１領域を含んでなる。
【００４８】
幾つかの態様において、ＭＡＣの軽鎖は、配列番号：１８、配列番号：２の残渣４８－５４、及び配列番号：４の残基４８－５４からなる群から選択される配列を含んでなるＶＬＣＤＲ２領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：１８を含んでなるＶＬＣＤＲ２領域を含んでなる。
【００４９】
幾つかの態様において、ＭＡＣの軽鎖は、配列番号：１９、配列番号：２の残渣８９－９７、及び配列番号：４の残基８９－９７からなる群から選択される配列を含んでなるＶＬＣＤＲ３領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：１９を含んでなるＶＬＣＤＲ３領域を含んでなる。
【００５０】
幾つかの態様において、ＭＡＣの軽鎖は、配列番号：２０、配列番号：２１、配列番号：２の残渣１－２３、及び配列番号：４の残基１－２３からなる群から選択される配列を含んでなるＶＬＦＲ１領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：２１を含んでなるＶＬＦＲ１領域を含んでなる。
【００５１】
幾つかの態様において、ＭＡＣの軽鎖は、配列番号：２２、配列番号：２の残渣３５－４７、及び配列番号：４の残基３５－４７からなる群から選択される配列を含んでなるＶＬＦＲ２領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：２２を含んでなるＶＬＦＲ２領域を含んでなる。
【００５２】
幾つかの態様において、ＭＡＣの軽鎖は、配列番号：２３、配列番号：２の残渣５５－８８、及び配列番号：４の残基５５－８８からなる群から選択される配列を含んでなるＶＬＦＲ３領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：２３を含んでなるＶＬＦＲ３領域を含んでなる。
【００５３】
幾つかの態様において、ＭＡＣの軽鎖は、配列番号：２４、配列番号：２５、配列番号：２の残渣９８－１０８、及び配列番号：６の残基９８－１０８からなる群から選択される配列を含んでなるＶＬＦＲ４領域を含んでなる。幾つかの態様において、ＭＡＣは、配列番号：２５を含んでなるＶＬＦＲ４領域を含んでなる。
【００５４】
幾つかの態様において、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体のＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２及びＶＬＣＤＲ３領域は、それぞれ、配列番号：４の残基２４－３４、配列番号：４の残基４８－５４、及び配列番号：４の残基８９－９６を含んでなる。
【００５５】

幾つかの態様において、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体のＶＬＦＲ１、ＶＬＦＲ２、ＶＬＦＲ３、及びＶＬＦＲ４領域は、それぞれ、配列番号：４の残基１－２４、配列番号：４の残基３５－４７、配列番号：４の残基５５－８８、及び配列番号：４の残基９７－１０８を含んでなる。

【００５６】

幾つかの態様において、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体は、配列番号：２及び配列番号：４からなる群から選択される軽鎖を含んでなる。幾つかの態様において、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体は、配列番号：４を含んでなる軽鎖を含んでなる。

【００５７】

幾つかの態様において、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体は、配列番号：１を含んでなる重鎖及び配列番号：２を含んでなる軽鎖を含んでなる。

幾つかの態様において、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体は、配列番号：３を含んでなる重鎖及び配列番号：４を含んでなる軽鎖を含んでなる。

【００５８】

抗体２．１２．１は、ＷＯ０２０５３５９６中に記載されている。ＩＧＦ１Ｒに対して特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ２．１２．１は、米国培養細胞系統保存機関（ＡＴＣＣ）１０８０１　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ　２０１１０－２２０９に、２０００年１２月１２日に供託番号ＰＴＡ－２７９２で供託された。

【００５９】

幾つかの態様において、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体は、モチーフ$K^{188}H^{189}x^{190}$をＣＬκ領域に含んでなり、ここにおいてｘは、Ｋａｂａｔ番号によるＧ、Ａ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｓ、Ｔ、Ｃ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｈ、Ｒ又はＫである。幾つかの側面において、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体は、その両方の内容が本明細書中で援用される、ＷＯ２００９０３２１４５（ＵＳ２００９０９２６１４）又はＷＯ２００５００５６３５（米国特許第７，５７９，１５７号）から選択されるものである。幾つかの態様において、本発明のＭＡＣは、抗体のＩＧＦ１Ｒ結合親和性を抑制しないような方法で、少なくとも一つのＡｎｇ２結合ペプチドに共役する抗ＩＦＧ１Ｒ抗体又はその抗原結合部位を含んでなる。

【００６０】

幾つかの側面において、抗体は、エフェクター分子と同じ経路内の異なった標的を標的とする。幾つかの側面において、抗体は、エフェクター分子とは異なった標的を標的とする。

【００６１】

幾つかの側面において、共役のために使用される抗体は、腫瘍学の分野において有用であることができる。適した抗体は；癌を、そして特に非ホジキンスリンパ腫を、そして更にリウマチ様関節炎を治療するために使用される、キメラのＩｇＧ1_{κ}抗ＣＤ２０抗体のリツキシマブ（リツキサン^{TM}）；癌を、そして特に大腸、頭頸部癌を治療するために使用される、キメラのＩｇＧ1_{κ}抗ＥＧＦ受容体抗体のセツキシマブ（エルビタックス^{TM}）を含む。

【００６２】

幾つかの側面において、共役のために使用される抗体は、自己免疫及び他の免疫学的疾患の分野において有用であることができる。適した抗体は、リウマチ様関節炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、乾癬、乾癬性関節炎、及び強直性脊椎炎を治療するために使用される、キメラのＩｇＧ1_{κ}抗ＴＮＦα抗体のインフリキシマブ（レミケード^{TM}）；リウマチ様関節炎、クローン病、乾癬、乾癬性関節炎、若年性特発性関節炎及び強直性脊椎炎を治療するために使用される、ヒトのＩｇＧ1_{κ}抗ＴＮＦα抗体のアダリムマブ（ヒューミラ^{TM}）；多発性硬化症、リウマチ様関節炎、乾癬、若年性特発性関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病を治療するために使用される、ヒト化ＩｇＧ4_{κ}抗α４インテグリン抗体のナタリズマブ（タイサブリＴＭ）；アレルギー性喘息を治療するために使用される、ヒト化ＩｇＧ1_{κ}抗ＩｇＥ抗体のオマリズマブ（ゾレア^{TM}）；滲出型ＡＭＤを

治療するために使用される、ヒト化IgG1κ抗VEGF抗体のラニビズマブ（ルセンチス™）；及び呼吸器多核体ウイルスを含む感染性疾病を治療するために使用される、ヒト化IgG1κ抗RSV抗体のパリビズマブ（シナジス™）を含む。

【００６３】

幾つかの側面において、本発明の化合物及び組成物は、上述の症状を治療するために使用することができる。

エフェクター分子（Effector Mbieties）

エフェクター分子は、治療剤、タンパク質、ペプチド、核酸、アプタマー、小分子、タンパク質アゴニスト、タンパク質アンタゴニスト、代謝調節物質、ホルモン、毒素、成長因子又は他の調節性タンパク質であることができ、或いはホースラディッシュペルオキシダーゼのような容易に検出又は可視化可能であることができる酵素のような診断剤であることができる。

【００６４】

幾つかの側面において、エフェクター分子は、タンパク質又はペプチドであることができ、そしてペプチド連結残基を経由してリンカーに接続することができる。タンパク質又はペプチドは、アミノ末端キャッピング基R^1及びカルボキシル末端キャッピング基R^2の片方又は両方を含んでなることができる。R^1は、CH_3、C(O)CH_3、C(O)CH_3、C(O)CH_2CH_3、C(O)$CH_2CH_2CH_3$、C(O)$CH(CH_3)CH_3$、C(O)$CH_2CH_2CH_2CH_3$、C(O)$CH(CH_3)CH_2CH_3$、C(O)C_6H_5、C(O)$CH_2CH_2(CH_2CH_2O)_{1-5}Me$、ジクロロベンゾイル（DCB）、ジフルオロベンゾイル（DFB）、ピリジニルカルボン酸（PyC）又はアミド-2-PEG、アミノ保護基、脂質　脂肪酸基又は炭水化物であることができる。R^2は、OH、NH_2、$NH(CH_3)$、$NHCH_2CH_3$、$NHCH_2CH_2CH_3$、$NHCH(CH_3)CH_3$、$NHCH_2CH_2CH_2CH_3$、$NHCH(CH_3)CH_2CH_3$、NHC_6H_5、$NHCH_2CH_2OCH_3$、$NHOCH_3$、$NHOCH_2CH_3$、カルボキシ保護基、脂質　脂肪酸基又は炭水化物であることができる。

【００６５】

タンパク質又はペプチド連結残基は、K、K(SH)、リシン同族体、Dap、Dab、Orn、R、C、チオール含有残基、S、T、Y、D、E、N又はQであることができる。タンパク質又はペプチドは、N末端アミノ酸のアミノ末端を経由してリンカーに接続することができる。タンパク質又はペプチドは、C末端アミノ酸のカルボキシル末端を経由してリンカーに接続することができる。更なるアミノ酸残基を、連結残基として機能させるために、アミノ酸側鎖、或いはアミノ又はカルボキシル末端を経由するかを問わない接続によって、N又はC末端に加えることができる。

【００６６】

Ang2-結合ペプチド

エフェクター分子は、Ang2結合ペプチドであることができる。幾つかの態様において、Ang2結合ペプチドは、WO2008056346（US20081663 64）（この内容は本明細書中に援用される）中に記載されているものから選択される配列を含んでなる。幾つかの態様において、Ang2結合ペプチドは、配列：

$Q^1(AcK)^2Y^3Q^4P^5L^6D^7E^8X^9D^{10}K^{11}T^{12}L^{13}Y^{14}D^{15}Q^{16}F^{17}M^{18}L^{19}Q^{20}Q^{21}G^{22}$（：２６）

を含んでなり、ここにおいて、配列番号：２６のX^9は、アシル-リシン（AcK）又はロイシンであり（本明細書中で以下Ang2-X^9と命名される）、そして

ここにおいて、Ang2結合ペプチドのX^9、K^{11}、L^{13}、Q^{16}、M^{18}、又はL^{19}は、リンカーに共有的に接続された求核性側鎖を含んでなるAng2連結残基によって置換され、連結残基は、K、Y、S、T、H、K(SH)、ホモシステイン、ホモセリン、Dap、及びDabのようなリシンの同族体からなる群から選択される。幾つかの態様において、Ang2連結残基は、K、K(SH)、Y、S、T、H、Dap、及びDabからなる群から選択することができる。幾つかの態様において、Ang2連結残基は、

Ｋである。Ａｎｇ２連結残基は、K^{11}であることができる。幾つかの態様において、Ａｎｇ２連結残基は、Ｋ（ＳＨ）であることができる。Ａｎｇ２連結残基は、$K(SH)^{11}$であることができる。

【００６７】

幾つかの態様において、Ａｎｇ２結合ペプチドは、配列：
$Q^{1}(AcK)^{2}Y^{3}Q^{4}P^{5}L^{6}D^{7}E^{8}(AcK)^{9}D^{10}K^{11}T^{12}L^{13}Y^{14}D^{15}Q^{16}F^{17}M^{18}L^{19}Q^{20}Q^{21}G^{22}$（配列番号：２７）
を含んでなり、ここにおいて、Ａｎｇ２-K^{11}は、Ａｎｇ２連結残基である。

【００６８】

幾つかの態様において、Ａｎｇ２結合ペプチドは、配列：
$Q^{1}(AcK)^{2}Y^{3}Q^{4}P^{5}L^{6}D^{7}E^{8}L^{9}D^{10}K^{11}T^{12}L^{13}Y^{14}D^{15}Q^{16}F^{17}M^{18}L^{19}Q^{20}Q^{21}G^{22}$（配列番号：２８）
を含んでなり、ここにおいて、Ａｎｇ２-K^{11}は、Ａｎｇ２連結残基である。

【００６９】

幾つかの態様において、Ａｎｇ２結合ペプチドは、配列：
配列番号：２９　$Q^{1}(AcK)^{2}Y^{3}Q^{4}P^{5}L^{6}D^{7}E^{8}K^{9}D^{10}(AcK)^{11}T^{12}L^{13}Y^{14}D^{15}Q^{16}F^{17}M^{18}L^{19}Q^{20}Q^{21}G^{22}$
を含んでなり、ここにおいて、Ａｎｇ２-K^{9}は、Ａｎｇ２連結残基である。

【００７０】

幾つかの態様において、Ａｎｇ２結合ペプチドは、配列：
配列番号：３０　$Q^{1}(AcK)^{2}Y^{3}Q^{4}P^{5}L^{6}D^{7}E^{8}L^{9}D^{10}(AcK)^{11}T^{12}L^{13}Y^{14}D^{15}K^{16}F^{17}M^{18}L^{19}Q^{20}Q^{21}G^{22}$
を含んでなり、ここにおいて、Ａｎｇ２-K^{16}は、Ａｎｇ２連結残基である。

【００７１】

幾つかの態様において、Ａｎｇ２結合ペプチドは、配列：
配列番号：３１　$Q^{1}(AcK)^{2}Y^{3}Q^{4}P^{5}L^{6}D^{7}E^{8}L^{9}D^{10}(AcK)^{11}T^{12}L^{13}Y^{14}D^{15}Q^{16}F^{17}K^{18}L^{19}Q^{20}Q^{21}G^{22}$
を含んでなり、ここにおいて、Ａｎｇ２-K^{18}は、Ａｎｇ２連結残基である。

【００７２】

幾つかの態様において、Ａｎｇ２結合ペプチドは、配列：
配列番号：３２　$Q^{1}(AcK)^{2}Y^{3}Q^{4}P^{5}L^{6}D^{7}E^{8}L^{9}D^{10}(AcK)^{11}T^{12}L^{13}Y^{14}D^{15}Q^{16}F^{17}M^{18}K^{19}Q^{20}Q^{21}G^{22}$
を含んでなり、ここにおいて、Ａｎｇ２-K^{19}は、Ａｎｇ２連結残基である。

【００７３】

幾つかの態様において、Ａｎｇ２結合ペプチドは、更にＮ末端キャッピング基R^{1}を含んでなり-ここにおいて、R^{1}は、CH_3、$C(O)CH_3$、$C(O)CH_3$、$C(O)CH_2CH_3$、$C(O)CH_2CH_2CH_3$、$C(O)CH(CH_3)CH_3$、$C(O)CH_2CH_2CH_2CH_3$、$C(O)CH(CH_3)CH_2CH_3$、$C(O)C_6H_5$、$C(O)CH_2CH_2(CH_2CH_2O)_{1-5}Me$、ジクロロベンゾイル（ＤＣＢ）、ジフルオロベンゾイル（ＤＦＢ）、ピリジニルカルボン酸（ＰｙＣ）又はアミド-２-ＰＥＧ、アミノ保護基、脂質脂肪酸基又は炭水化物である。

【００７４】

幾つかの態様において、Ａｎｇ２結合ペプチドは、更にＣ末端キャッピング基-R^{2}を含んでなり、ここにおいて、R^{2}は、ＯＨ、NH_2、$NH(CH_3)$、$NHCH_2CH_3$、$NHCH_2CH_2CH_3$、$NHCH(CH_3)CH_3$、$NHCH_2CH_2CH_2CH_3$、$NHCH(CH_3)CH_2CH_3$、NHC_6H_5、$NHCH_2CH_2OCH_3$、$NHOCH_3$、$NHOCH_2CH_3$、カルボキシ保護基、脂質脂肪酸基又は炭水化物である。

【００７５】

幾つかの態様において、R^{1}は、$C(O)CH_3$であることができる。幾つかの態様において、R^{2}は、NH_2であることができる。

Ｎ末端及びＣ末端キャッピング基と一緒のＡｎｇ２結合ペプチドは、式：[Ｃ（Ｏ）ＣＨ$_3$]-[配列番号：２７]-[ＮＨ$_2$]：[Ｃ（Ｏ）ＣＨ$_3$]-Ｑ^1（Ａ$_c$Ｋ）^{2}Ｙ^{3}Ｑ^{4}Ｐ^{5}Ｌ^{6}Ｄ^{7}Ｅ^8（Ａ$_c$Ｋ）^{9}Ｄ^{10}Ｋ^{11}Ｔ^{12}Ｌ^{13}Ｙ^{14}Ｄ^{15}Ｑ^{16}Ｆ^{17}Ｍ^{18}Ｌ^{19}Ｑ^{20}Ｑ^{21}Ｇ^{22}-[ＮＨ$_2$]を含んでなることができ、ここにおいて、Ａｎｇ２-Ｋ^{11}は、Ａｎｇ２連結残基である。

【００７６】

本明細書中に記載されるＡｎｇ２ペプチドは、記載したように多くの抗体、特に癌又は増加した血管新生のような増殖性疾患の治療において有用な抗体に共役することができ、そしてｈ３８Ｃ２のような触媒抗体に共役して、ＭＡＣを形成することができる。

【００７７】

リンカー

本発明のエフェクター分子（小分子、アプタマー、核酸、タンパク質、又はペプチド（例えばＡｎｇ２結合ペプチド）のような）は、抗体又はその抗原結合部位（例えば抗ＩＧＦ１Ｒ抗体）にリンカーによって共有的に接続することができる。リンカーは、ペプチド連結残基の側鎖のアミノ基によってペプチドに共有的に接続することができる。これは、リシン残基であることができる。幾つかの態様において、連結残基は、Ｃｙｓ又はＫ（ＳＨ）のようなチオール保有残基であり、そしてリンカーは、連結残基の末端チオール基によってペプチドに共有的に接続される。

【００７８】

リンカーは、直鎖又は分枝鎖であることができ（共役付加当たり一つより多いエフェクター分子と共役するために）、そして所望により一つ又はそれより多い炭素環又は複素環基を含んでいてもよい。リンカーの長さは、エフェクター分子及び抗体間の直鎖原子の数の観点から考えることができ、芳香族環等のような環式分子は、環の周りの最短の経路をとることによって数えられる。幾つかの態様において、リンカーは、５-１５個の原子、他の態様では１５-３０個の原子、なお他の態様では３０-５０個の原子、なお他の態様では５０-１００個の原子、そしてなお他の態様では１００-２００個の原子間の直線的広がりを有する。幾つかの態様において、リンカーの長さは、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０からなる群から選択される下限、及び７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、及び２００からなる群から選択される上限の範囲である。

【００７９】

他のリンカーの留意事項は、溶解度、親油性、親水性、疎水性、安定性（計画された分解と同様に事実上安定）、強剛性、融通性、免疫原性、抗体結合の調節、ミセル又はリポソームへの組込みの能力、等のような得られた化合物の物理的又は薬物動態学的特性を含む。

【００８０】

リンカーは、ペプチジルリンカーであることができる。幾つかの態様において、ペプチジルリンカーは、単一アミノ酸残基の繰返し（例えばポリグリシン）、又はエフェクター分子の好ましい提示又は薬物動態を与えるペプチドリンカーを得るための、アミノ酸残基の組合せのような３-２０個間のアミノ酸の長さであることができる。活性化基の存在と最も適合性であるものであるペプチジルリンカーは、リシン及びヒスチジン残基を欠くことができる。配列番号：５９は、例示的なペプチジルリンカーである。

【００８１】

別の方法として、リンカーは、非ペプチジルリンカーであることができる。これらの種類のリンカーの典型的な例は、直鎖又は分枝鎖炭化水素、或いは各種の長さのポリエチレ

ングリコールに基づくものであるものである。これらは、芳香族又は非芳香族環、ハロゲン、ケトン、アルデヒド、エステル、スルホニル、リン酸基、等のような他の基を、安定性、強剛性、等電点を達成するために組込むことができる。

【００８２】

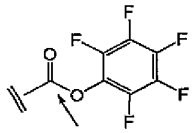
本発明の幾つかの側面において、リンカーは、式：－Ｘ－Ｙ－Ｚ－を含んでなることができ；ここにおいて、Ｘは、エフェクター分子への接続基であり（例えば、ペプチド連結残基による）、Ｙは、スペーサー領域であり、そしてＺは、抗体（例えば、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体）上のリシン又はシステイン残基の側鎖への接続分子である。幾つかの側面において、リンカーは、抗体に共役していない場合、式ＸＹＺ*のものであることができ、ここで、Ｚ*は、抗体に接続した場合、脱離基Ｚ*が抗体の共役部位と反応して、共役リンカーＸＹＺを形成するような脱離基である。

【００８３】

Ｘは、エフェクター分子への（例えば、ペプチド連結残基によって）特異的方向性共有連結戦略が可能であるように選択することができる。幾つかの側面において、Ｘは、ＣＯＯＨ、イソシアン酸塩、イソチオシアン酸塩、アシルアジド、スルホン酸、ハロゲン化スルホニル、アルデヒド、ケトン、エポキシド、炭酸塩、アルキル化試薬、イミドエステル、アミン基、及びマレイミド（ｍａｌｅｍｉｄｅ）基からなる群から選択することができる。例えば、ペプチド連結残基が求核性基を含んでなる場合、Ｘは、求電子基であることができ、そして逆の場合も同じである。例えば、ペプチド連結残基の側鎖がＫ、Ｈ、オルニチン、Ｄａｐ、又はＤａｂのようなアミノ基を含んでなる場合、Ｘは、ＣＯＯＨ、又は他の類似の反応性求電子物質、例えば、イソシアン酸塩、イソチオシアン酸塩、アシルアジド、スルホン酸又はハロゲン化スルホニル、アルデヒド又はケトン、エポキシド、炭酸塩、アルキル化試薬或いはイミドエステルであることができる。ペプチド連結残基がＤ又はＥである場合、Ｘは、アミン基のような求核基を含んでなることができる。これらの戦略のいずれかは、Ｘ基及びペプチド連結残基間に、アミド結合形成戦略によって共有結合が形成されることを可能にする。例えば、ＸがＣＯＯＨである場合、これは、ペンタフルオロフェニルエステルとして活性化されることができる。この場合、ペプチド連結ペプチド上のアミノ基との反応は、アミド結合の形成に導き、一方ペンタフルオロフェノールは脱離基（これはＸ*と呼ばれる）である。

【００８４】

【化１】

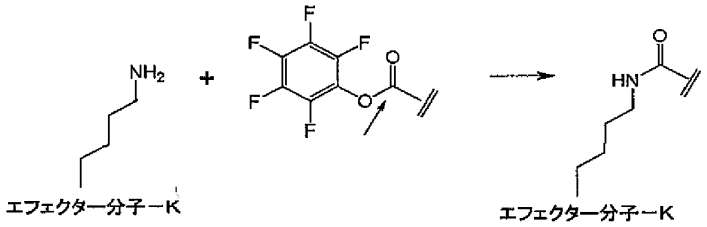


【００８５】

矢印は、ペプチド連結残基への接続点を示し、そして平行線は、リンカーのＹ基への接続点である。

【００８６】

【化２】



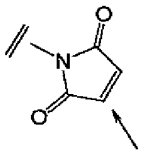
【００８７】

ペプチド連結基が、Ｃ、Ｃの相同体、又は他のチオール基含有残基（Ｋ（ＳＨ）のよう

な）である場合、Ｘは、ペプチド連結残基にＸ基を共有的に連結するための、チオール-マレイミド付加反応戦略を可能にするマレイミド基を含んでなることができる。幾つかの側面において、Ｘは：

【００８８】

【化３】

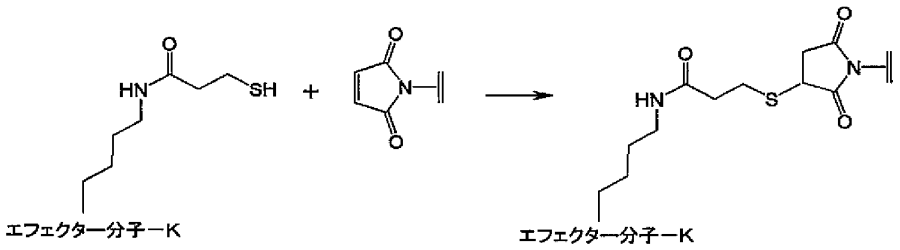


【００８９】

のマレイミドであることができ、式中、矢印は、ペプチド連結残基への接続点を示し、そして平行線は、リンカーのＹ基への接続である。命名の容易さのために、マレイミド基を使用して構築された本明細書中に記載されるリンカーは、リンカーの構築後、マレイミド基は一般的にスクシンイミド環に転換されるが、マレイミド含有リンカーと記載され、そしてこれを示すためにＭＡＬと呼ばれる。

【００９０】

【化４】



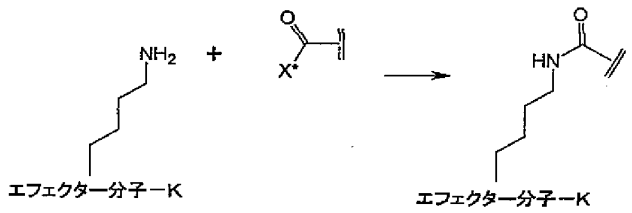
【００９１】

幾つかの側面において、連結残基は、Ｋ（ＳＨ）であり、そしてＸ基は、マレイミドである。

幾つかの側面において、Ｘは、ペンタフルオロフェニルエステルで活性化されたカルボキシル官能基を含んでなり、これは、ペプチド上のリシン側鎖とアミドを形成することができる。

【００９２】

【化５】



【００９３】

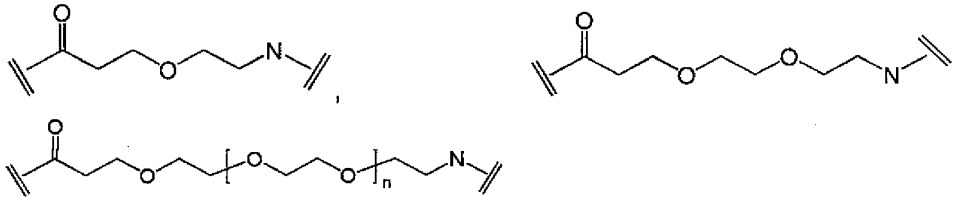
幾つかの側面において、Ｘは、チオール基を含んでなることができ、ペプチド連結残基及びＸ基間にジスルフィド橋を形成することを可能にする。

幾つかの態様において、Ｙは、Ｃ、Ｈ、Ｎ、Ｏ、Ｐ、Ｓ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、及びＩからなる群から選択されるいずれもの原子を含み、そして一つ又はそれより多いアミノ酸、ポリマー或いはブロックコポリマーを含んでなることができる生物学的に適合性の接続鎖である。Ｙは、２-１００個の原子間のリンカーの全長を提供するように選択することができる。Ｙは、リンカーの全長が５ないし３０個の原子間であるように選択することができる。Ｙは、リンカーの全長が１５-２５個の原子間であるように選択することができる。

Ｙは、リンカーの全長が約１７ないし約１９個の原子間であるように選択することができる。幾つかの態様において、Ｙは：

【００９４】

【化６】



【００９５】

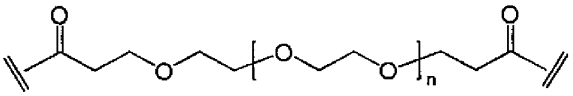
のようなアミノポリエチレングリコール酸であることができ、式中、ｎ＝０ないし１０、幾つかの側面において１－１０、幾つかの側面において１－５、そして幾つかの側面において１である。

【００９６】

幾つかの側面において、Ｙは：

【００９７】

【化７】



【００９８】

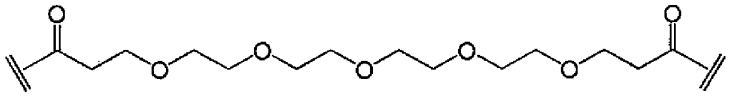
のようなポリエチレングリコール二酸であることができ、式中、ｎ＝０ないし１０、幾つかの側面において１－１０、幾つかの側面において１－５、そして幾つかの側面において１、そして幾つかの側面において、２である。

【００９９】

本発明の幾つかの側面において、リンカーのＹ部分は、式：

【０１００】

【化８】



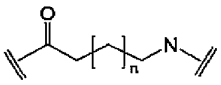
【０１０１】

を含んでなる。

幾つかの側面において、Ｙは：

【０１０２】

【化９】



【０１０３】

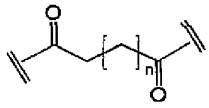
のようなアミノアルカン酸であることができ、式中、ｎ＝０ないし２０、幾つかの側面において１－１０、幾つかの側面において１－５、そして幾つかの側面において１、そして幾つかの側面において、２である。

【０１０４】

幾つかの側面において、Ｙは：

【０１０５】

【化１０】



【０１０６】

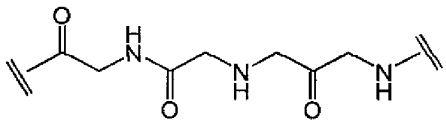
のようなアルカン二酸であることができ、式中、ｎ＝０ないし２０、幾つかの側面において１－１０、幾つかの側面において１－５、そして幾つかの側面において１、そして幾つかの側面において、２である。

【０１０７】

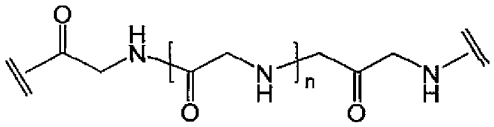
幾つかの側面において、Ｙは：

【０１０８】

【化１１】



又は



【０１０９】

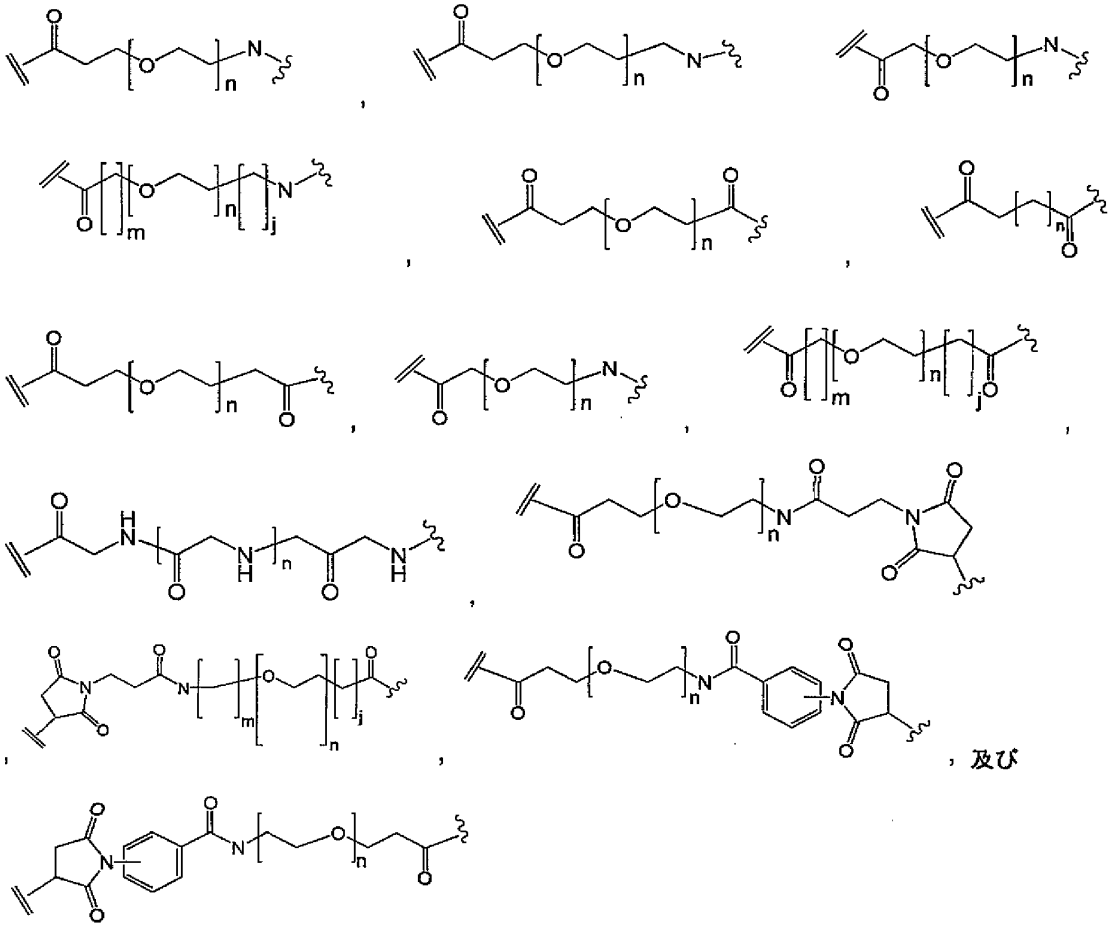
のようなポリグリシンであることができ、式中、ｎ＝０ないし１０、幾つかの側面において１－１０、幾つかの側面において１－５、そして幾つかの側面において１、そして幾つかの側面において、２である。

【０１１０】

幾つかの側面において、Ｙ、Ｘ－Ｙ、Ｙ－Ｚ、及びＸ－Ｙ－Ｚは：

【０１１１】

【化１２】



【０１１２】

からなる群から選択することができ、式中、ｍ、ｎ及びｊは、それぞれ独立に０ないし３０である。幾つかの側面において、ｎ＝１－１０、幾つかの側面において、ｎ＝１－５である。幾つかの側面において、ｎの値の範囲の下限は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から選択され、そしてｎの値の範囲の上限は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、及び３０からなる群から選択される。Ｎは、１であることができる。Ｎは、２であることができる。Ｎは、３であることができる。Ｎは、４であることができる。Ｎは、５であることができる。Ｎは、６であることができる。幾つかの側面において、ｍ＝１－１０、幾つかの側面において、ｍ＝１－５である。幾つかの側面において、ｍの値の範囲の下限は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から選択され、そしてｍの値の範囲の上限は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、及び３０からなる群から選択される。Ｍは、１であることができる。Ｍは、２であることができる。Ｍは、３であることができる。Ｍは、４であることができる。Ｍは、５であることができる。Ｍは、６であることができる。幾つかの側面において、ｊ＝１－１０、幾つかの側面において、ｊ＝１－５である。幾つかの側面において、ｊの値の範囲の下限は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から

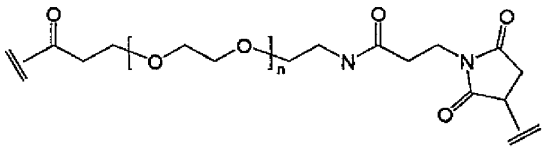
選択され、そしてｊの値の範囲の上限は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、及び３０からなる群から選択される。Ｊは、１であることができる。Ｊは、２であることができる。Ｊは、３であることができる。Ｊは、４であることができる。Ｊは、５であることができる。Ｊは、６であることができる。幾つかの側面において、Ｙの全長は、２００個の原子を超えない。幾つかの側面において、Ｙの全長は、１５０個の原子を超えない。幾つかの側面において、Ｙの全長は、１００個の原子を超えない。幾つかの側面において、Ｙの全長は、５０個の原子を超えない。幾つかの側面において、原子の数におけるＹの全鎖長の範囲は、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、及び６０からなる群から選択される下限、並びに５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、及び１００からなる群から選択される上限を有することができる。幾つかの側面において、ＸＹＺリンカーは、上記のＹ基と同一であることができる。幾つかの側面において、波線は、Ｘ基に接続する。幾つかの側面において、平行線は、Ｘ基に接続する。幾つかの側面において、波線は、Ｚ基に接続する。幾つかの側面において、平行線は、Ｚ基に接続する。幾つかの側面において、波線は、K^{188}-ＣＬκの側鎖に接続する。幾つかの側面において、平行線は、K^{188}-ＣＬκの側鎖に接続する。幾つかの側面において、波線は、エフェクター分子に接続する。幾つかの側面において、平行線は、エフェクター分子に接続する。

【０１１３】

幾つかの側面において、Ｙ、Ｙ-Ｚ及び／又はＸ-Ｙは：

【０１１４】

【化１３】



【０１１５】

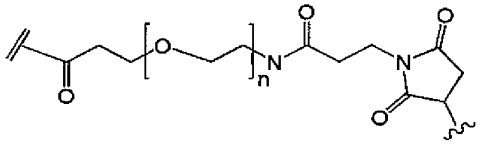
のようなマレイミドＰＥＧ酸であることができ、式中、ｎ＝０ないし１２、幾つかの側面において１-１０、幾つかの側面において１-５、そして幾つかの側面において１、そして幾つかの側面において、２である。

【０１１６】

幾つかの側面において、Ｙ、Ｙ-Ｚ及び／又はＸ-Ｙは：

【０１１７】

【化１４】



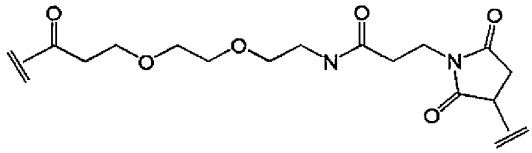
【０１１８】

のような、ｎの値の範囲の下限が０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から選択され、そしてｎの値の範囲の上限が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、及び３０からなる群から選択されるようなマレイミドＰＥＧ酸であることができる。Ｎは、１であることができる。Ｎは、２であることができる。Ｎは、３であることができる。Ｎは、４であることができる。Ｎは、５であることができる。Ｎは

、６であることができる。幾つかの側面において、Ｙ、Ｙ－Ｚ及び／又はＸ－Ｙは、式：

【０１１９】

【化１５】



【０１２０】

を含んでなり、Ｚ＊は、抗体上のリシン側鎖に対して特異的方向性共有連結戦略が可能であるように選択することができる。例えば、Ｚは、表面のリシン側鎖のε－アミノと、多くの可能なアミド結合形成戦略の一つを使用して、反応させるためのＣＯＯＨ、又は他の類似の反応性求電子物質であることができる。

【０１２１】

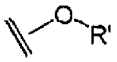
幾つかの側面において、Ｚ＊は、活性なエステルを形成するために使用することができる。活性なエステルは、アミンに接続し、そして従って抗体のリシン側鎖のε－アミノに共役することができる。活性なエステルの形成を可能にするＺカルボキシル官能基は、Ｙ基の末端に存在するものである。活性なエステルのアルコール又はフェノール官能基は、結合反応中に脱離基Ｚ＊として作用し、抗体上のリシン側鎖とのアミドの産生による接続を可能にする。

【０１２２】

幾つかの態様において、Ｚ＊基は、式：

【０１２３】

【化１６】



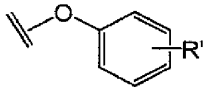
【０１２４】

の構造を含んでなり、式中、Ｒ’は、脂肪族又は芳香族基である。

幾つかの態様において、Ｚ＊基は、式：

【０１２５】

【化１７】

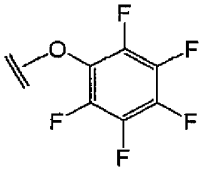


【０１２６】

のものであり、式中、Ｒ’＝単独又は組合せのＦ、Ｃｌ、Ｂｒ又はＩ、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチルのいずれかであり、そして１ないし５個間の量で存在することができる。幾つかの態様において、Ｒ^{1}は、ハロゲンであることができ、そして４又は５個のハロゲン原子が存在することができる。幾つかの態様において、４個のＲ^{1}原子が存在することができる。幾つかの態様において、５個のＲ^{1}原子が存在することができる。幾つかの態様において、Ｚ＊は、テトラフルオロフェニルであることができる。幾つかの態様において、Ｚ＊は、式：

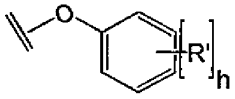
【０１２７】

【化１８】

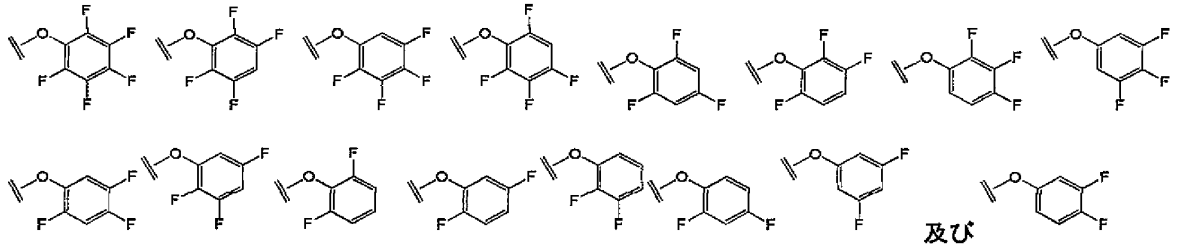


ペンタフルオロフェニル

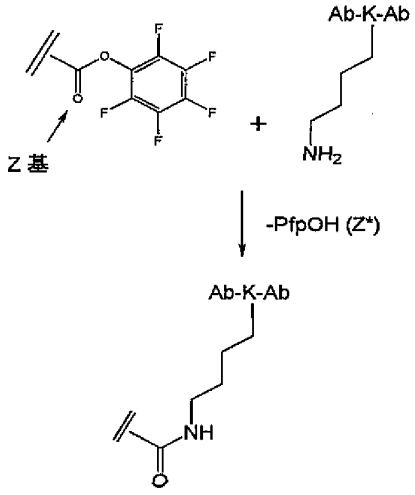
【０１２８】
を含んでなることができ、式中、平行線は、リンカーのＹ部分への接続点である。
幾つかの側面において、Ｚ＊基は、式：
【０１２９】
【化１９】



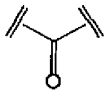
【０１３０】
のものであり、式中、Ｒ’＝単独又は組合せのＦ、Ｃｌ、Ｂｒ又はＩ、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチルのいずれかであり、そしてｈ＝１、２、３、４、又は５である。幾つかの態様において、Ｒ[1]は、ハロゲンであることができる。幾つかの態様において、Ｒ[1]は、Ｆ又はＣｌであり、そしてｈ＝４又は５である。幾つかの態様において、Ｒ[1]は、Ｆ又はＣｌであり、そしてｈ＝５である。幾つかの態様において、Ｒ[1]は、Ｆであり、そしてｈ＝２、３、４又は５である。幾つかの態様において、Ｒ[1]は、Ｆであり、そしてｈ＝３，４又は５である。幾つかの態様において、Ｒ[1]は、Ｆであり、そしてｈ＝４又は５である。幾つかの態様において、Ｒ[1]は、Ｆであり、そしてｈ＝５である。幾つかの側面において、Ｚ＊は：
【０１３１】
【化２０】



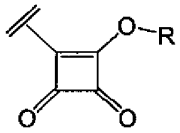
【０１３２】
からなる群から選択することができる。
このような活性なエステルのために、脱離基はＺ＊であり、そしてＺ基自体は、Ｙ基に接続されたカルボニルである。抗体と反応した場合、Ｚ＊基は、以下に示すようにアミドを形成する：
【０１３３】
【化２１】



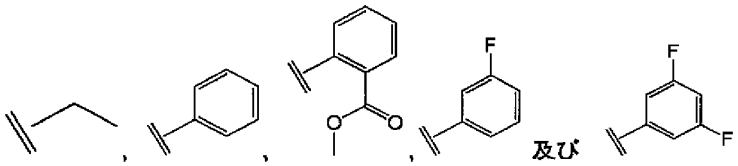
【０１３４】
幾つかの態様において、Ｚは：
【０１３５】
【化２２】



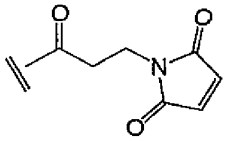
【０１３６】
である。
幾つかの態様において、Ｚ＊基は：
【０１３７】
【化２３】



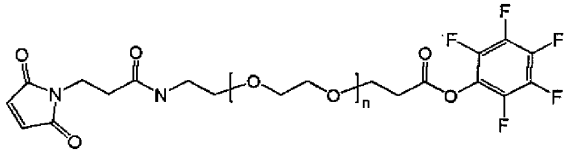
【０１３８】
のようなスクアリン酸（ｓｑｕａｒａｔｅ）エステルを含んでなり、式中、Ｒ＝脂肪族基又は置換された芳香族であり、そして：
【０１３９】
【化２４】



【０１４０】
からなる群から選択することができる。
幾つかの態様において、Ｚ基は、マレイミド基：
【０１４１】
【化２５】

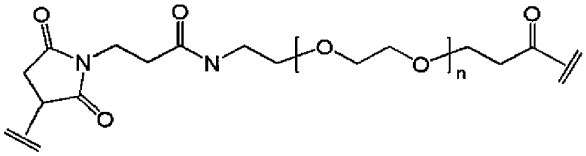


【０１４２】
を含んでなる。
幾つかの側面において、Ｘ＊ＹＺ＊リンカーは：
【０１４３】
【化２６】

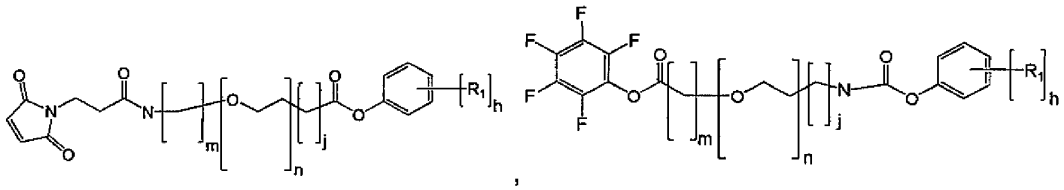


【０１４４】
の構造のマレイミド-ＰＥＧ-ＰＦＰエステルを含んでなり、式中、ｎ＝１ないし１２である。幾つかの側面において、ｎ＝１ないし５である。幾つかの側面において、ｎ＝２で

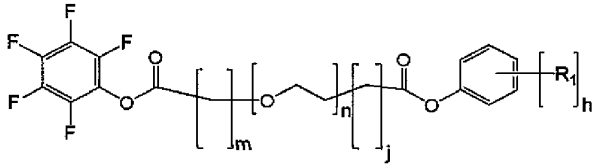
ある。幾つかの側面において、ｎ＝１である。
【０１４５】
幾つかの側面において、ＭＡＣは、式：
【０１４６】
【化２７】



【０１４７】
のＸＹＺリンカーを含んでなり、式中、ｎ＝１－１２である。幾つかの側面において、ｎ＝１ないし５である。幾つかの側面において、ｎ＝１ないし３である。幾つかの側面において、ｎ＝２である。幾つかの側面において、ｎ＝１である。
【０１４８】
幾つかの側面において、Ｘ＊ＹＺ＊リンカーは：
【０１４９】
【化２８】



,



及び
【０１５０】
からなる群から選択される構造を含んでなり、
そして
式中、ｍ、ｎ及びｊは、それぞれ独立に０ないし３０であり、Ｒ[1]はＦであり、そしてｈ＝２、３、４、又は５である。幾つかの側面において、ｎ＝１－１０であり、幾つかの側面において、ｎ＝１－５である。幾つかの側面において、ｎの値の範囲の下限は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から選択され、そしてｎの値の範囲の上限は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、及び３０からなる群から選択される。Ｎは、１であることができる。Ｎは、２であることができる。Ｎは、３であることができる。Ｎは、４であることができる。Ｎは、５であることができる。Ｎは、６であることができる。幾つかの側面において、ｍ＝１－１０であり、幾つかの側面において、ｍ＝１－５である。幾つかの側面において、ｍの値の範囲の下限は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から選択され、そしてｍの値の範囲の上限は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、及び３０からなる群から選択される。Ｍは、１であることができる。Ｍは、２であることができる。Ｍは、３であることができる。Ｍは、４であることができる。Ｍは、５であることができる。

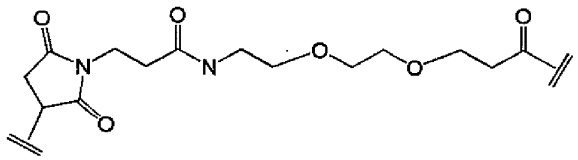
Ｍは、６であることができる。幾つかの側面において、ｊ＝１－１０であり、幾つかの側面において、ｊ＝１－５である。幾つかの側面において、ｊの値の範囲の下限は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から選択され、そしてｊの値の範囲の上限は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、及び３０からなる群から選択される。Ｊは、１であることができる。Ｊは、２であることができる。Ｊは、３であることができる。Ｊは、４であることができる。Ｊは、５であることができる。Ｊは、６であることができる。幾つかの側面において、Ｙの全長は、２００個の原子を超えない。幾つかの側面において、Ｙの全長は、１５０個の原子を超えない。幾つかの側面において、Ｙの全長は、１００個の原子を超えない。幾つかの側面において、Ｙの全長は、５０個の原子を超えない。幾つかの側面において、原子の数におけるＹの全鎖長の範囲は、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、及び６０からなる群から選択される下限、並びに５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、及び１００からなる群から選択される上限を有することができる。

【０１５１】

幾つかの側面において、ＭＡＣは、式：

【０１５２】

【化２９】



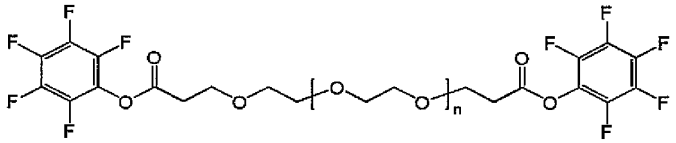
【０１５３】

のＸＹＺリンカーを含んでなる。

幾つかの側面において、Ｘ＊ＹＺ＊リンカーは、式：

【０１５４】

【化３０】



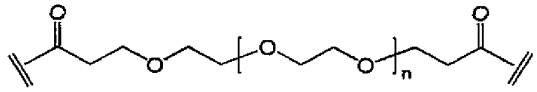
【０１５５】

のＰＥＧ－ビス－ペンタフルオロフェニルエステルを含んでなり、式中、ｎ＝１ないし１２である。幾つかの側面において、ｎ＝１ないし１０である。幾つかの側面において、ｎ＝１ないし５である。幾つかの側面において、ｎ＝２である。幾つかの側面において、ｎ＝１である

幾つかの側面において、ＭＡＣは、式：

【０１５６】

【化３１】

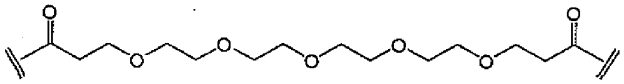


【０１５７】

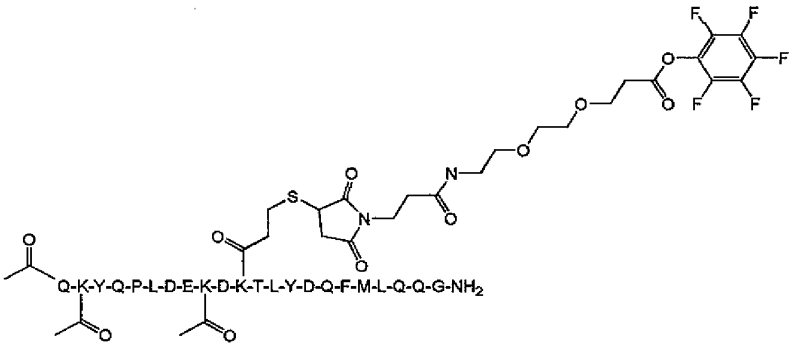
のＸＹＺリンカーを含んでなる。

幾つかの側面において、ＭＡＣは、式：

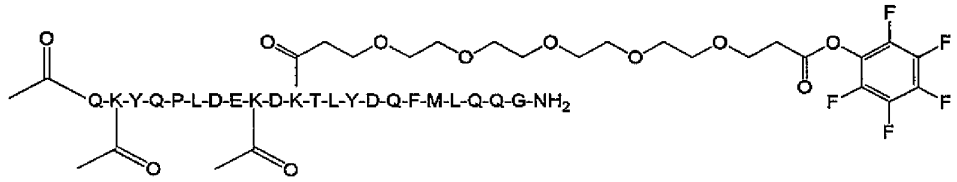
【０１５８】
【化３２】



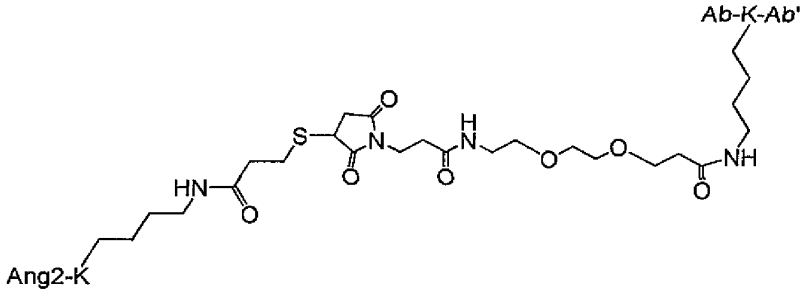
【０１５９】
のＸＹＺリンカーを含んでなる。
幾つかの態様において、ペプチドは、ＸＹＺ＊に束縛された場合、式：
【０１６０】
【化３３】



【０１６１】
を含んでなる。
幾つかの態様において、ＸＹＺ＊に束縛されたペプチドは、式：
【０１６２】
【化３４】

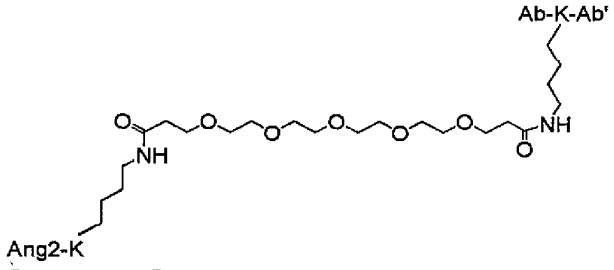


【０１６３】
を含んでなる。
幾つかの側面において、ＭＡＣは、式：
【０１６４】
【化３５】

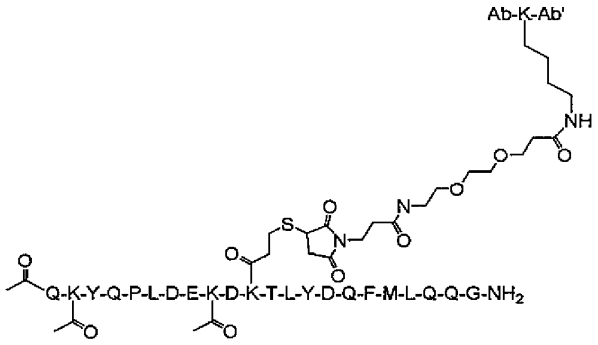


【０１６５】
の化合物を含んでなり、式中、Ａｎｇ２－Ｋは、Ａｎｇ２結合ペプチドのリシン又は修飾されたリシン残基であり、そしてＡｂ－Ｋ－Ａｂ’は、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体上のリシン残基である。

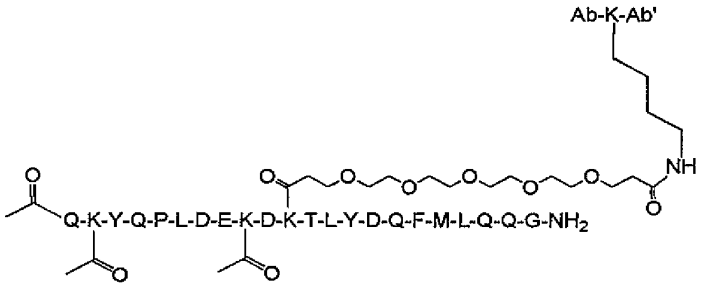
【０１６６】
幾つかの側面において、ＭＡＣは、式：
【０１６７】
【化３６】



【０１６８】
の化合物を含んでなり、式中、Ａｎｇ２－Ｋは、Ａｎｇ２結合ペプチドのリシン又は修飾されたリシン残基であり、そしてＡｂ－Ｋ－Ａｂは、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体上のリシン残基である。
【０１６９】
幾つかの側面において、ＭＡＣは、式：
【０１７０】
【化３７】



【０１７１】
の化合物を含んでなり、式中、Ａｂ－Ｋ－Ａｂは、抗体２．１２．１．ｆｘのＫ^{188}である。
幾つかの側面において、ＭＡＣは、式：
【０１７２】
【化３８】



【０１７３】
を含んでなり、式中、Ａｂ－Ｋ－Ａｂは、抗体２．１２．１．ｆｘのＫ^{188}である。
幾つかの側面において、ＭＡＣは、抗体（これは抗ＩＧＦ１Ｒ抗体であることができる）当たり共役された二つのペプチド（これはＡｎｇ２結合ペプチドであることができる）

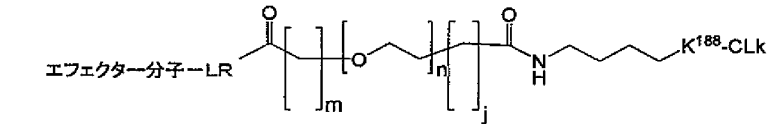
を含んでなる。幾つかの側面において、一つのペプチドは、抗体の二つのK^{188}残基、又はその抗原結合断片のそれぞれに共役される（これは抗体２．１２．１．ｆｘであることができる）。

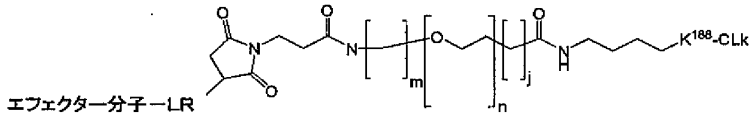
【０１７４】

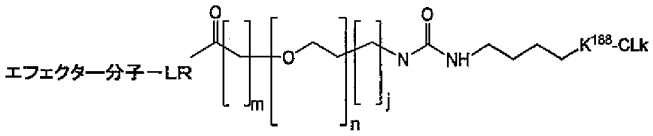
幾つかの側面において、ＭＡＣは：

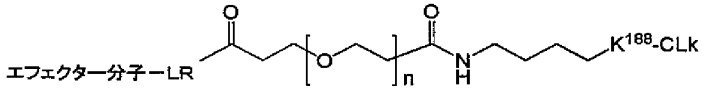
【０１７５】

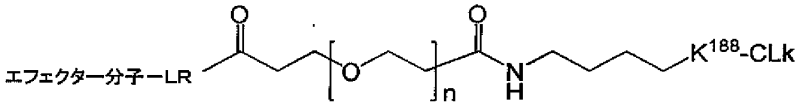
【化３９】

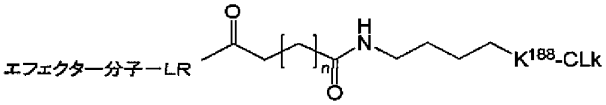


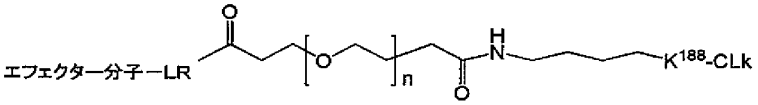


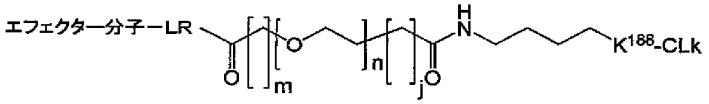


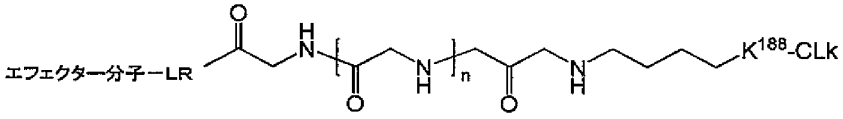


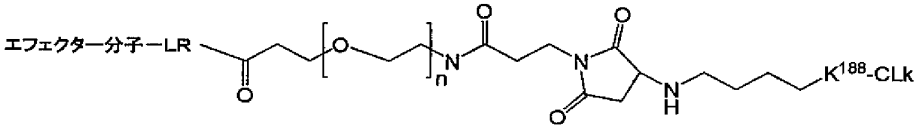












【０１７６】

からなる群から選択される式を含んでなり、式中、Ｋ１８８－ＣＬｋは、前記Ｋ１８８－ＣＬｋの側鎖への共有連結であり、エフェクター分子－ＬＲは、エフェクター分子への共有連結であり、そしてｍ、ｎ及びｊは、それぞれ独立に０－３０である。幾つかの側面に

おいて、ｎ＝１－１０であり、幾つかの側面において、ｎ＝１－５である。幾つかの側面において、ｎの値の範囲の下限は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から選択され、そしてｎの値の範囲の上限は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、及び３０からなる群から選択される。Ｎは、１であることができる。Ｎは、２であることができる。Ｎは、３であることができる。Ｎは、４であることができる。Ｎは、５であることができる。Ｎは、６であることができる。幾つかの側面において、ｍ＝１－１０であり、幾つかの側面において、ｍ＝１－５である。幾つかの側面において、ｍの値の範囲の下限は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から選択され、そしてｍの値の範囲の上限は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、及び３０からなる群から選択される。Ｍは、１であることができる。Ｍは、２であることができる。Ｍは、３であることができる。Ｍは、４であることができる。Ｍは、５であることができる。Ｍは、６であることができる。幾つかの側面において、ｊ＝１－１０であり、幾つかの側面において、ｊ＝１－５である。幾つかの側面において、ｊの値の範囲の下限は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、及び２０からなる群から選択され、そしてｊの値の範囲の上限は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、及び３０からなる群から選択される。Ｊは、１であることができる。Ｊは、２であることができる。Ｊは、３であることができる。Ｊは、４であることができる。Ｊは、５であることができる。Ｊは、６であることができる。幾つかの側面において、Ｙの全長は、２００個の原子を超えない。幾つかの側面において、Ｙの全長は、１５０個の原子を超えない。幾つかの側面において、Ｙの全長は、１００個の原子を超えない。幾つかの側面において、Ｙの全長は、５０個の原子を超えない。幾つかの側面において、原子の数におけるＹの全鎖長の範囲は、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、及び６０からなる群から選択される下限、並びに５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、及び１００からなる群から選択される上限を有することができる。

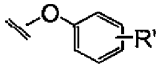
【０１７７】

共役(結合conjugation)の方法

幾つかの側面において、本発明は、抗体又は抗原結合部位を含んでなる多機能性抗体複合体（ＭＡＣ）を調製する方法を提供し、抗体は、ＣＬκ－Ｋ^{188}（Ｋａｂａｔ番号による）の側鎖に接続されるリンカーを経由して少なくとも一つのエフェクター分子に共有的に共役され、前記方法は：式：

【０１７８】

【化４０】



【０１７９】

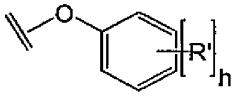
の脱離基ｚ* 中で終結するリンカーにエフェクター分子を共有的に接続することを含んでなり、式中、Ｒ^{1}は、単独又は組合せのＦ、Ｃｌ、Ｂｒ又はＩ、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチルのいずれかであり、そして１ないし５間の値で存在することができ、そしてこのように形成されたエフェクター分子－リンカー－脱離基複合体を抗体と、約３．５：１ないし約４．５：１間のエフェクター分子：抗体のモル比で反応させる。幾つかの側面において、モル比は、約３．７：１ないし４．３：１である。

【０１８０】

幾つかの側面において、Ｚ＊基は、式：

【０１８１】

【化４１】

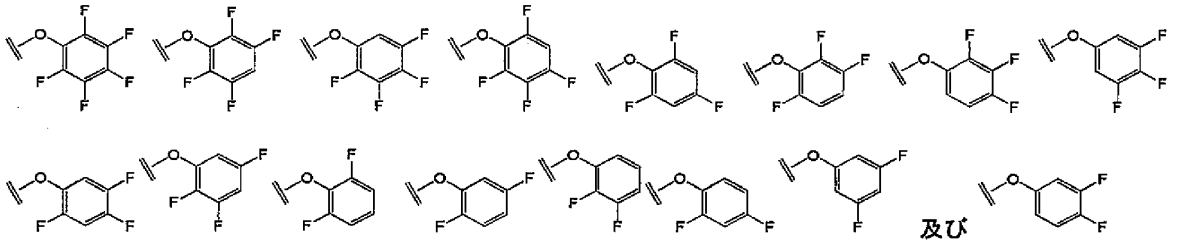


【０１８２】

のものであり、式中、Ｒ１は、単独又は組合せのＦ、Ｃｌ、Ｂｒ又はＩ、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチルのいずれかであり、そしてｈ＝１、２、３、４、又は５である。幾つかの態様において、Ｒ１は、ハロゲンであることができる。幾つかの態様において、Ｒ１は、Ｆ又はＣｌであり、そしてｈ＝４又は５である。幾つかの態様において、Ｒ１は、Ｆ又はＣｌであり、そしてｈ＝５である。幾つかの態様において、Ｒ１は、Ｆであり、そしてｈ＝１、２、３、４又は５である。幾つかの態様において、Ｒ１は、Ｆであり、そしてｈ＝３、４又は５である。幾つかの態様において、Ｒ１は、Ｆであり、そしてｈ＝４又は５である。幾つかの態様において、Ｒ１は、Ｆであり、そしてｈ＝５である。幾つかの側面において、Ｚ＊は：

【０１８３】

【化４２】



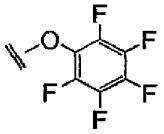
【０１８４】

からなる群から選択することができる。

Ｒ１は、３ないし５個間の量で存在することができる。３個のＲ１基が存在することができる。Ｒ１は、４ないし５個間の量で存在することができる。４個のＲ１基が存在することができる。５個のＲ１基が存在することができる。Ｒ１は、フッ素であることができる。Ｒ１は、塩素であることができる。Ｒ１は、臭素であることができる。脱離基は、式：

【０１８５】

【化４３】



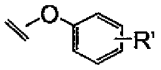
【０１８６】

を含んでなることができる。

幾つかの側面において、本発明は、ＭＡＣを製造する方法を提供し、ここにおいて、ＭＡＣは、更なる標的を結合する少なくとも一つのエフェクター分子と共有的に連結する抗体又はその断片（ペプチド、小分子、アプタマー、核酸分子、又はタンパク質のような）を含んでなり、エフェクター分子が抗体の表面のリシン残基のε－アミノと反応することが可能なＰＦＰ脱離基を伴うリンカーを含んでなることを特徴とする。幾つかの側面において、本発明は、エフェクター分子（ペプチドのような）を、配列番号：１５、配列番号：４５、配列番号：４６又は配列番号：４７の残基６２－１０３を含んでなるカッパー軽鎖定常領域を含んでなる抗体と共役するための方法を提供し、エフェクター分子を、式：

【０１８７】

【化４４】



【０１８８】

の脱離基を含んでなるリンカーと共役することを含んでなり、式中、R^1は、単独又は組合せのＦ、Ｃｌ、Ｂｒ又はＩ、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチルのいずれかであり、そして１ないし５間の値で存在し、そして脱離基を、定常軽鎖領域と共役したエフェクター分子を伴う抗体を提供するように、配列番号：１５のK^{80}の側鎖と反応させることができる。

【０１８９】

抗体は、配列番号：１５の残基７４－１０５と実質的に相同性の軽鎖定常領域を含んでなることができる。抗体は、配列番号：１５、配列番号：４５、配列番号：４６又は配列番号：４７の残基６２－１０３と実質的に相同性の軽鎖定常領域を含んでなることができる。幾つかの側面において、抗体は、配列番号：１５の残基７４－９０と実質的に相同性の軽鎖領域を含んでなることができる。幾つかの側面において、エフェクター分子は、配列番号：１５のK^{80}において共役される。幾つかの側面において、エフェクター分子は、K^{82}において共役される。幾つかの形態において、Ａｎｇ２結合ペプチドは、ＣＬκ－K^{188}（Ｋａｂａｔ番号による）において抗ＩＧＦ１Ｒ抗体に共役される。

【０１９０】

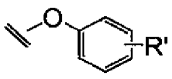
幾つかの側面において、この方法は、抗体又はその抗原結合部位をエフェクター分子と組合せることを含んでなり、ここにおいて、エフェクター分子は、ＰＦＰ脱離基を含んでなるリンカーに共有的に接続される。

【０１９１】

幾つかの側面において、本発明は、エフェクター分子をタンパク質に共役する方法を提供し、ここにおいて、エフェクター分子は、式：

【０１９２】

【化４５】



【０１９３】

の脱離基Z^*中で終結するリンカーに接続され、式中、Ｒ’は、単独又は組合せのＦ、Ｃｌ、Ｂｒ又はＩ、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチルのいずれかであり、そして１ないし５間の値で存在し、そしてタンパク質は、エフェクター分子がK^{80}残基のε－アミノ基に共役されるように、K^{80}を含む配列番号：１５、配列番号：４５、配列番号：４６又は配列番号：４７の残基６２－１０３を含んでなり、エフェクター分子及び接続されたリンカーを、タンパク質と、約３．７：１ないし約４．３：１のエフェクター分子：タンパク質のモル比で反応させることを含んでなる。

【０１９４】

幾つかの側面において、エフェクター分子、リンカー及び脱離基は、本明細書中に記載したとおりであることができる。幾つかの側面において、タンパク質は、抗体の軽鎖定常領域を含んでなることができる。幾つかの側面において、タンパク質は、配列番号：１５を含んでなることができ、そして共役の部位は、K^{80}である。

【０１９５】

幾つかの側面において、エフェクター分子：抗体（例えば、ＡＢＰ：抗ＩＧＦ１Ｒ抗体）のモル比は、約２．５ないし約４．６：１の間である。本発明の幾つかの側面において、モル比は、約３．７：１であり、そして約４．３：１である。本発明の幾つかの側面において、エフェクター分子：抗体のモル比は、約４：１である。幾つかの側面において、モル比は、約２：１ないし約７：１の間である。幾つかの側面において、モル比は、約３：１ないし約６：１の間である。幾つかの側面において、モル比は、約３：１ないし約７

：１の間である。幾つかの側面において、モル比は、約３：１ないし約５：１の間である。

【０１９６】

抗体当たり１．５より少ない共役を有することが好ましい本発明の側面において（単一のエフェクター分子が必要である場合のような）、モル比は、約１：１ないし約６：１の間であることができ、ここにおいて、緩衝液は、ＨＥＰＥＳを少なくとも０．０２Ｍの濃度で含んでなる。ＨＥＰＥＳの濃度は、約０．１Ｍないし約１Ｍの間であることができる。ＨＥＰＥＳの濃度は、約０．１Ｍないし約０．５Ｍの間であることができる。抗体当たり１．５より少ない共役を有することが好ましい本発明の側面において（単一のエフェクター分子が必要である場合のような）、モル比は、約１：１ないし約３：１の間であることができる。

【０１９７】

幾つかの側面において、好ましいモル比は、約１、約１．２、約１．４、約１．５、約１．６、約１．８、約２，、約２．２、約２．４、約２．５、約２．６、約２．８、約３、約３．２、約３．３、約３．４、約３．５、約３．６、約３．７、約３．８、約３．９、約４．０、約４．１、約４．２、約４．３、約４．４、約４．５、約４．６、約４．７、約４．８、約４．９、約５、約５．２、約５．４、約５．５、約５．６、約５．８、約６、約６．２、約６．４、約６．５、約６．６、約６．８、約７、約７．３、約７．５、約７．７、約８、約８．５、約９、約９．５、及び約１０対１からなる群から選択される下限、並びに約１．５、約１．６、約１．８、約２、約２．２、約２．４、約２．５、約２．６、約２．８、約３、約３．２、約３．３、約３．４、約３．５、約３．６、約３．７、約３．８、約３．９、約４．０、約４．１、約４．２、約４．３、約４．４、約４．５、約４．６、約４．７、約４．８、約４．９、約５、約５．２、約５．４、約５．５、約５．６、約５．８、約６、約６．２、約６．４、約６．５、約６．６、約６．８、約７、約７．３、約７．５、約７．７、約８、約８．５、約９、約９．５、約１０、及び約１５対１からなる群から選択される上限の範囲である。

【０１９８】

幾つかの側面において、本発明は、更にエフェクター分子及びタンパク質を少なくとも約３０分間一緒に共役させることを含んでなる。幾つかの側面において、持続時間は、少なくとも約６０分間である。幾つかの側面において、持続時間は、少なくとも約２時間である。幾つかの側面において、本発明は、更にエフェクター分子及び抗体を約４℃ないし約４０℃の間で共役させることを含んでなる。幾つかの側面において、本発明は、更にエフェクター分子及び抗体を約１０℃ないし約３０℃の間で共役させることを含んでなる。幾つかの側面において、本発明は、更にエフェクター分子及び抗体を約１５℃ないし約３０℃の間で共役させることを含んでなる。幾つかの側面において、反応は、約１８℃ないし約２５℃で行われる。幾つかの側面において、反応は、約２２℃で行われる。幾つかの側面において、反応は、概略室温で行われる。

【０１９９】

幾つかの側面において、結合反応（conjugation reaction）は、ｐＨ約６．５ないしｐＨ約８間で行われる。幾つかの側面において、結合反応は、ｐＨ約６．７５ないしｐＨ約８．０間で行われる。幾つかの側面において、結合反応は、ｐＨ約７．７で行われる。幾つかの側面において、結合反応は、ｐＨ約７で行われる。幾つかの側面において、結合反応は、ｐＨ約７．２で行われる。幾つかの側面において、結合反応は、ｐＨ約７．５で行われる。幾つかの側面において、結合反応は、その下限が５．５、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９及び８からなる群から選択され、そしてその上限が６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．５、及び９からなる群から選択されるｐＨ値の範囲の間で行われる。

【０２００】

幾つかの側面において、ｐＨは、６．５以下であることができる；これは、抗体当たり約１．５より少ない共役（結合）が必要である適用において、特に有用であることができる。幾つかの側面において、ｐＨは、約５．５ないし約６．５の間である。

【０２０１】

幾つかの側面において、塩濃度は、約０．２Ｍ以下であることができる。塩は、ハロゲン化物塩（Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ）であることができ、そしてＬｉ、Ｎａ、Ｋ、Ｂｅ、Ｍｇ、Ｃａのような金属を含んでなることができる。塩は、ＮａＣｌであることができる。塩は、ＫＣｌであることができる。約０．１Ｍより上の塩濃度を、速度及び／又は抗体当たりの共役の数を制約するために使用することができる。塩濃度は、約０ないし約０．１Ｍの間であることができる。塩濃度は、約０ないし約０．５Ｍの間であることができる。塩濃度は、約０ないし約０．３Ｍの間であることができる。

【０２０２】

幾つかの側面において、本発明の方法は、抗体又はその抗原結合部位を、製剤緩衝液中でｐＨ約５．５で処方することを含んでなる。製剤緩衝液は、酢酸ナトリウム及びトレハロース緩衝液であることができる。この緩衝液は、いずれもの第一アミンを含有せず、そしてそれ自体がｐＨ調節のために十分に役立つ利点を有する。抗体は、約１５ないし約２５ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$の量で存在することができる。幾つかの側面において、抗体は、約２０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$の量で存在することができる。

【０２０３】

製剤緩衝液のｐＨは、ｐＨ約７．２ないしｐＨ約８．０に調節することができる；幾つかの態様において、製剤緩衝液は、ｐＨ７．７に調節することができる。製剤緩衝液のｐＨは、リン酸緩衝液で調節することができる。リン酸緩衝液は、約４０ｍＭないし約８０ｍＭの間の濃度であることができる。リン酸緩衝液は、約１０ｍＭないし約２００ｍＭの間の濃度であることができる。

【０２０４】

幾つかの側面において、エフェクター分子／リンカー及び脱離基Ｚ*との結合反応中の抗体の濃度は、範囲の下限が、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１５、約２０、約３０、及び約４０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$から選択され、そして範囲の上限が、約７、約８、約９、約１０、約１５、約２０、約３０、約４０、約５０、約６０、約７０、約８０、約９０、約１００、約１５０、約２００、約５００ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$からなる群から選択される範囲であることができる。

【０２０５】

エフェクター分子（ペプチド又はＡＢＰのような）は、少なくとも約２ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$の濃度で元に戻すことができる。エフェクター分子は、少なくとも約５ないし約２０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$の濃度で、そして幾つかの態様において、１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$であることができる濃度で、使用に先だって希釈されたプロピレングリコール中で元に戻すことができる。

【０２０６】

結合反応は、抗体又はその抗原結合部位及びエフェクター分子を、４モルのエフェクター分子対１モルの抗体のモル比で混合し、そして１８℃ないし２５℃で約２時間ないし約２４時間インキュベーションすることによって行うことができる。幾つかの態様において、抗体及びエフェクター分子間の結合反応は、室温で２時間である。幾つかの態様において、結合反応は、少なくとも約２時間である。幾つかの態様において、結合反応は、少なくとも約３０分間である。

【０２０７】

反応物は、クエンチし、そしてｐＨ約５．０ないしｐＨ約６．０に調節することができる。幾つかの態様において、クエンチされた反応物は、ｐＨ５．５に調節することができる。これは、コハク酸塩及びグリシン緩衝液を、例えばｐＨ約４．０で使用して達成することができる。この緩衝液は、ＴＲＩＳ又は他のアミノ酸緩衝液のような他の更に普通の緩衝液を超える利点がある。コハク酸塩は、共役分子に対してストレス性であることがで

きるダイアフィルトレーション中の凝集及び沈殿の抑制を援助し、そしてグリシンは更なる第一アミンを含有する（特にＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２の場合）。

【０２０８】

反応物を濃縮することができ、そして未反応のエフェクター分子（例えばペプチド又はＡＢＰ）、関連する種（リンカーが水溶媒との反応によって加水分解されたペプチドのような）及び反応混合物の他の未反応成分（ＰＦＰのような）を、５０ｋＤａの膜又はサイズ排除クロマトグラフィーを使用するダイアフィルトレーションによって、コハク酸塩、グリシン、塩化ナトリウム、及びｐＨ５．５の３０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$のトレハロース緩衝液中に除去することができる。

【０２０９】

幾つかの側面において、この方法は、エフェクター分子をＣＬκ－Ｋ^{188}（Ｋａｂａｔ番号による）に共役することを含んでなることができる。幾つかの側面において、本発明は、ペプチドを、抗体又はその抗原結合部位の軽鎖λドメインと共役し、ＣＬｙ領域の一部をＣＬκ領域の対応する部分と置換することを含んでなり、ペプチドに本明細書中で定義したとおりの脱離基Ｚ*を含んでなるリンカーを接続し、そして前記ペプチド－リンカー－脱離基複合体を抗体と反応させることを含んでなり、抗体中で置換されたＣＬκ領域が、少なくとも配列番号：１５、４５、４６、又は４７の残基６２－１０６を含んでなることを特徴とする。幾つかの側面において、ＣＬκ領域は、少なくとも配列番号：１５、４５、４６、又は４７の残基６２－１０６を含んでなる。幾つかの側面において、ＣＬκ領域は、少なくとも配列番号：１５、４５、４６、又は４７の残基１－１０３を含んでなる。幾つかの側面において、ＣＬκ領域は、少なくとも配列番号：１５、４５、４６、又は４７の残基１－１０６を含んでなる。

【０２１０】

幾つかの側面において、本発明は、ペプチドをマウスの抗体又はその抗原結合部位に共役し、マウスのＣＬ領域の一部をヒトＣＬκ領域の対応する部分と置換することを含んでなり、ペプチドを本明細書中で定義したとおりの脱離基Ｚ*を含んでなるリンカーと接続し、そして前記ペプチド－リンカー－脱離基複合体を抗体と反応させることを含んでなり、抗体中で置換されたヒトＣＬκ領域が少なくとも配列番号：１５、４５、４６、又は４７の残基６２－１０３を含んでなることを特徴とする。幾つかの側面において、ヒトＣＬκ領域は、少なくとも配列番号：１５、４５、４６、又は４７の残基６２－１０６を含んでなる。幾つかの側面において、ヒトＣＬκ領域は、少なくとも配列番号：１５、４５、４６、又は４７の残基６２－１０３を含んでなる。幾つかの側面において、ヒトＣＬκ領域は、少なくとも配列番号：１５、４５、４６、又は４７の残基１－１０６を含んでなる。本発明のこれらの側面は、マウスのＣＬκ領域がＫ^{188}を含まずになるため、好都合であることができる（マウスのＣＬκ中の対応する配列は、ＲＨＮである；配列番号：４９の残基７９－８１を参照されたい）。

【０２１１】

本発明の医薬組成物

本発明は、ＭＡＣ及び医薬的に受容可能な担体を含んでなる医薬組成物を提供する。本明細書中で使用する場合、“医薬的に受容可能な担体”は、いずれもの、そして全ての生理学的に適合性の溶媒、分散媒体、被覆、抗微生物及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤、等を含む。医薬的に受容可能な担体の例は、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等の一つ又はそれより多く、並びにこれらの組合せを含み、そして等張剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールのようなポリアルコール、又は塩化ナトリウムを組合せて含むことができる。湿潤或いは少量の湿潤剤又は乳化剤、抗体又は抗体部分の保存期間若しくは有効性を向上する保存剤或いは緩衝液のような補助物質のような医薬的に受容可能な物質。

【０２１２】

本発明の組成物は、各種の形態であることができる。これらは、例えば、液体溶液（例えば、注射用及び注入用溶液）、分散物又は懸濁液、錠剤、丸薬、散薬、リポソーム及び

座薬のような液体、半固体及び固体剤形を含む。好ましい形態は、投与の意図する様式及び治療的適用に依存する。典型的な好ましい組成物は、一般的に抗体によるヒトの受動免疫のために使用されるものと同様な組成物のような注射用又は注入用溶液の形態である。投与の好ましい様式は、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。好ましい態様において、抗体は、静脈内注入又は注射によって投与される。もう一つの好ましい態様において、抗体は、筋肉内又は皮下注射によって投与される。

【０２１３】

医薬組成物は、更に抗腫瘍剤又は造影試薬のようなもう一つの成分を含んでなることができる。本発明のもう一つの側面は、本発明のＭＡＣ及びこれらの抗体を含んでなる医薬組成物を含んでなるキットを提供する。キットは、ＭＡＣ又は医薬組成物に加えて、診断又は治療剤を含むことができる。キットは、更に診断又は治療法における使用のための説明書を含むこともできる。幾つかの態様において、キットは、抗体又はその医薬組成物及び診断剤を含む。他の態様において、キットは、抗体又はその医薬組成物及び一つ又はそれより多い更なる抗悪性腫瘍剤、抗腫瘍剤又は化学療法剤のような治療剤を含む。

【０２１４】

これらの薬剤及び本発明の化合物は、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、等のような医薬的に受容可能な賦形剤と組合せることができる。特定の投与管理、即ち、投与量、時間及び頻度は、特定の個体及びその個体の病歴に依存するものである。

【０２１５】

受容可能な担体、賦形剤、又は安定剤は、使用される投与量及び濃度において受容者にとって非毒性であり、そしてリン酸、クエン酸、及び他の有機酸のような緩衝液；塩化ナトリウムのような塩；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベンのようなアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；及びｍ－クレゾールのような）；低分子量（約１０残基より少ない）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシンのようなアミノ酸；単糖、二糖、及びグルコース、マンノース、又はデキストリンを含む他の炭水化物；ＥＤＴＡのようなキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールのような糖；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）；及び／又はＴＷＥＥＮ^{TM}、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ^{TM}又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）のような非イオン性界面活性剤を含んでなることができる。

【０２１６】

本発明のリポソーム含有化合物は、米国特許第４，４８５，０４５号及び４，５４４，５４５号中に記載されているような当技術において既知の方法によって調製される。向上された循環時間を持つリポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号中に開示されている。特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びＰＥＧ誘導ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＤ－ＰＥ）を含んでなる脂質組成物による逆相蒸発法によって産生することができる。リポソームは、規定された細孔サイズのフィルターを通して押し出されて、所望の直径を持つリポソームを得る。

【０２１７】

活性成分は、更に例えば、コアセルベーション技術又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ－（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に、コロイド状薬物供給系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロ球、マイクロ乳剤、ナノ粒子及びナノカプセル）或いはマクロ乳剤中で封入することもできる。このような技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ，Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２０ｔｈ Ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ（２０００）中に開示されている。

【０２１８】
持続放出製剤を調製することができる。持続放出製剤の適した例は、抗体を含有する固体の疎水性ポリマーの半浸透性基質を含み、この基質は、成形された物品の形態、例えば、フィルム、又はマイクロカプセルであることができる。持続放出基質の例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸及び７エチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン－酢酸ビニル、ＬＵＰＲＯＮ ＤＥＰＯＴ™（乳酸－グリコール酸コポリマー及び酢酸リュープロリドからなる注射用マイクロ球）のような分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、酢酸イソ酪酸スクロース、及びポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸を含む。

【０２１９】
Ｉｎ ｖｉｖｏ投与のために使用される製剤は、滅菌でなければならない。これは、例えば、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。本発明の治療化合物は、一般的に滅菌アクセスポート、例えば、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアルを有する容器内に入れられる。

【０２２０】
適した乳剤は、Ｉｎｔｒａｌｉｐｉｄ™、Ｌｉｐｏｓｙｎ™、Ｉｎｆｏｎｕｔｒｏｌ™、Ｌｉｐｏｆｕｎｄｉｎ™及びＬｉｐｉｐｈｙｓａｎ™のような商業的に入手可能な脂肪乳剤を使用して調製することができる。活性成分は、予備混合された乳剤組成物中に溶解するか、又は別の方法として、これを油（例えば、大豆油、紅花油、綿実油、ゴマ油、コーン油又はアーモンド油）並びにリン脂質（例えば、卵リン脂質、大豆リン脂質又は大豆レシチン）及び水との混合によって形成された乳剤中に溶解することができるかのいずれかであることができる。乳剤の等張性を調節するために、他の成分、例えばグリセロール又はグルコースを加えることができることは認識されるものである。適した乳剤は、典型的には２０％までの、例えば５ないし２０％の間の油を含有するものである。脂肪乳剤は、０．１ないし１．０μｍ、特に０．１ないし０．５μｍ間の脂肪液滴を含んでなることができ、そして５．５ないし８．０間の範囲のｐＨを有する。

【０２２１】
乳剤組成物は、本発明の化合物を、Ｉｎｔｒａｌｉｐｉｄ™又はその成分（大豆油、卵リン脂質、グリセロール及び水）と混合することによって調製されたものであることができる。

【０２２２】
吸入又は吹送のための組成物は、医薬的に受容可能な水性又は有機溶媒、或いはこれらの混合物中の溶液及び懸濁液、並びに粉末を含む。液体又は固体の組成物は、先に提示したような適した医薬的に受容可能な賦形剤を含有することができる。幾つかの態様において、組成物は、局所又は全身性効果のために、経口或いは鼻腔の呼吸経路によって投与される。好ましい滅菌の医薬的に受容可能な溶媒中の組成物は、ガスの使用によって噴霧することができる。噴霧された溶液は、噴霧デバイスから直接呼吸することができるか、又は噴霧デバイスは、顔面マスク、テント又は間欠的陽圧呼吸器に接続することができる。溶液、懸濁液又は粉末組成物は、好ましくは経口又は鼻腔的に、製剤を適用な様式で供給するデバイスから投与することができる。

【０２２３】
本発明の化合物及び組成物は、関連する指示のための確立された治療と共に使用することができる。例は、血管新生疾患、特に癌の治療のための５－フルオロウラシル、イリノテカン、オキサリプラチン（ｏｘｉｌａｐｌａｔｉｎ）、セツキシマブ、スニチマブ及びリツキシマブを含む。他の例は、ラニビズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、及びパリビズマブを含む。

【０２２４】
本発明の治療法
治療法も更に本発明によって提供される。治療法は、本発明の化合物又は組成物を、そ

れを必要とする患者に投与することを含んでなる。

【０２２５】

本発明は、本発明の化合物又は本発明の組成物の、血管新生を阻害又は減少する、或いは血管新生性疾患に伴う疾病又は徴候を治療若しくは予防する方法における使用を提供する。本発明は、血管新生を阻害又は減少する、或いは血管新生性疾患に伴う疾病又は徴候を治療若しくは予防する、治療的に有効な量の本発明の化合物又は組成物を患者に投与することを含んでなる方法を提供する。更に提供されるものは、本発明の化合物又は組成物を供給或いは投与する方法、及び本発明の化合物又は組成物を使用する治療の方法である。更に提供されるものは、治療的に有効な量の本発明による化合物又は医薬組成物を患者に投与することを含んでなる癌を治療する方法である。本明細書中で使用する場合、血管新生が媒介する症状は、異常な血管新生活性によって起こされる症状、又は血管新生活性を調節する化合物が、治療的用途を有するものである。本発明の化合物又は組成物で治療及び／又は診断することができる疾病及び症状は、癌、関節炎、高血圧、腎臓疾患、乾癬、眼疾患に伴う眼の血管新生、感染又は外科的介入、黄斑変性症、糖尿病性網膜症、等を含む。

【０２２６】

更に具体的には、“癌”の例は、本発明に関連して本明細書中で使用する場合、肺（ＮＳＣＬＣ及びＳＣＬＣ）、頭頸部、卵巣、大腸、直腸、前立腺、肛門領域、胃、乳房、腎臓及び尿管、腎盂、甲状腺、膀胱、脳の癌、腎細胞癌、中枢神経系（ＣＮＳ）の腫瘍の癌、原発性ＣＮＳリンパ腫、非ホジキンスリンパ腫、脊髄軸腫瘍、中咽頭、下咽頭、食道、膵臓、肝臓、胆嚢及び胆管、小腸、尿路の癌；又はリンパ腫、或いは一つ又はそれより多い前述の癌の組合せを含む。なお更に具体的には、“癌”の例は、本発明に関連して本明細書中で使用する場合、肺癌（ＮＳＣＬＣ及びＳＣＬＣ）、乳癌、卵巣癌、大腸癌、直腸癌、前立腺癌、肛門領域の癌、或いは一つ又はそれより多い前述の癌の組合せから選択される癌を含む。

【０２２７】

他の態様において、本発明の医薬組成物は、制約されるものではないが、加齢関連黄斑変性症、血管形成術及び乾癬後の再狭窄のような非癌性過剰増殖性疾患に関する。もう一つの態様において、本発明は、ＩＧＦ１Ｒ及び／又はＡｎｇ２の活性化を必要とする哺乳動物の治療のための医薬組成物に関し、ここにおいて、医薬組成物は、治療的に有効な量の本発明の活性化抗体及び医薬的に受容可能な担体を含んでなる。本発明の医薬組成物は、骨粗鬆症、虚弱或いは哺乳動物が少なすぎる活性な成長ホルモンを分泌するか、又は成長ホルモンに反応することが不可能な疾患を治療するために使用することができる。

【０２２８】

本明細書中で使用する場合、薬物、化合物、又は医薬組成物の“有効な投与量”或いは“有効な量”は、いずれもの一つ又はそれより多い有益な或いは所望の結果を得るために十分な量である。予防的使用において、有益な又は所望の結果は、危険度を排除又は減少すること、重篤度を減少すること、又は疾病の生化学的、組織学的及び／又は行動的徴候、疾病の発症中に存在するその合併症及び中間の病理学的表現型を含む疾病の発症を遅延することを含む。治療的使用において、有益な又は所望の結果は、腫瘍のサイズ、広がり、腫瘍の脈管構造、或いは癌又は増加した血管新生に伴う他の疾病の一つ又はそれより多い徴候を減少すること、疾病を治療するために必要な他の薬物の投与量を減少すること、他の薬物の効果を向上すること、及び／又は患者の疾病の進行を遅延することのような臨床的結果を含む。有効な投与量は、一回又はそれより多い投与で投与することができる。本発明の目的のために、薬物、化合物、又は医薬組成物の有効な投与量は、予防的又は治療的治療を直接若しくは間接的のいずれかで達成するために十分な量である。臨床的文脈から理解されるように、薬物、化合物、又は医薬組成物の有効な投与量は、もう一つの薬物、化合物、又は医薬組成物との関連で、達成することができるか、或いは達成することができない。従って、“有効な投与量”は、一つ又はそれより多い治療剤が投与される文脈において考慮することができ、そして一つの薬剤は、一つ又はそれより多い他の薬剤と

の関連において所望の結果を達成することができた又は達成された場合、有効な量で与えられたと考えることができる。

【０２２９】

“個体”又は“患者”は、哺乳動物、更に好ましくは、ヒトである。哺乳動物は、更に、制約されるものではないが、家畜、競技動物、愛玩動物、霊長類、及びウマを含む。

好都合には、本発明の組成物の治療的投与は、血管新生の減少及び／又は癌の場合、腫瘍体積の安定化又は減少をもたらす。好ましくは、腫瘍体積は、本発明のＭＡＣの投与前より少なくとも約１０％又は約１５％低い。更に好ましくは、腫瘍体積は、ＭＡＣの投与前より少なくとも約２０％低い。なお更に好ましくは、腫瘍体積は、ＭＡＣの投与前より少なくとも約３０％低い。好都合には、腫瘍体積は、ＭＡＣの投与前より少なくとも約４０％低い。更に好都合には、腫瘍体積は、ＭＡＣの投与前より少なくとも約５０％低い。非常に好ましくは、腫瘍体積は、ＭＡＣの投与前より少なくとも約６０％低い。最も好ましくは、腫瘍体積は、ＭＡＣの投与前より少なくとも約７０％低い。

【０２３０】

本発明の方法による本発明の化合物の投与は、例えば、受容者の生理学的状態、投与の目的が治療的又は予防的のいずれであるか、そして熟練した医師にとって既知の他の因子によって、連続的又は間欠的であることができる。本発明の化合物の投与は、前もって選択された期間にわたって本質的に連続的であることができるか、又は一連の間隔を置いた投与であることができる。

【０２３１】

抗体

“免疫グロブリン”は、四量体の分子である。天然に存在する免疫グロブリンにおいて、それぞれのテトラマーは、ポリペプチド鎖の二つの同一のペアからなり、それぞれのペアは、一つの“軽”（約２５ｋＤａ）及び一つの“重”鎖（約５０－７０ｋＤａ）を有する。それぞれの鎖のアミノ末端部分は、主として抗原認識に責任のある１００ないし１１０個、又はそれより多いアミノ酸の可変領域を含む。それぞれの鎖のカルボキシ末端部分は、主としてエフェクター機能に責任のある定常領域を定義する。ヒトの軽鎖は、κ及びλ軽鎖として分類される。重鎖は、α、δ、ε、γ、及びμと分類され、そして抗体のアイソタイプは、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＭとしてそれぞれ定義される。軽及び重鎖内で、可変及び定常領域は、約１２個又はそれより多いアミノ酸の“Ｊ”領域によって接続され、重鎖は更に約１０個のアミノ酸の“Ｄ”領域を含む。それぞれの軽／重鎖ペアの可変領域は、インタクトな免疫グロブリンが、二つの結合部位を有するように抗体結合部位を形成する。

【０２３２】

免疫グロブリン鎖は、更に相補性決定領域又はＣＤＲとも呼ばれる三つの超可変領域によって接続された比較的保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）の同じ一般構造を示す。それぞれのペアの二つの鎖からのＣＤＲは、フレームワーク領域によって整列させられ、特異的エピトープへの結合を可能にする。Ｎ末端からＣ末端まで、両方の軽及び重鎖は、ドメインＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４を含んでなる。アミノ酸のそれぞれのドメインへの帰属は、Ｋａｂａｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｌｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９８７ ａｎｄ １９９１））の定義による。

【０２３３】

ＣＤＲを構成する特定の抗体中のアミノ酸残基の確認は、当技術において公知の方法を使用して決定することができる。例えば、抗体のＣＤＲは、最初にＫａｂａｔ等（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ ｅｄ．，Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，ＮＩＨ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ Ｄ．Ｃ．）によって定義された超可変領域として確認することができる。ＣＤＲの位置は、更に最初にＣｈｏｔｈｉ

ａ等（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７７-８８３）によって記載された構造的ループ構造として確認することができる。ＣＤＲ確認のための他の方法は、Ｋａｂａｔ及びＣｈｏｔｈｉａ間の妥協であり、そしてＯｘｆｏｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ’ｓ ＡｂＭ抗体モデル化ソフトウェア（現在Ａｃｃｅｌｒｙｓ（登録商標））を使用して誘導される“ＡｂＭ決定”、又はＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６２：７３２-７４５中に明記された、観察された抗原接触に基づくＣＤＲの“接触決定”を含む。ＣＤＲの“立体配置決定”として本明細書中で言及されるもう一つの方法において、ＣＤＲの位置は、抗原結合に対してエンタルピー的寄与をする残基として確認することができる（Ｍａｋａｂｅ ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２８３：１１５６-１１６６）。更に他のＣＤＲ境界決定は、上記方法の一つに厳密に従うことはできないが、しかしこれらを、特定の残基又は残基の群或いは全体のＣＤＲさえも、抗原の結合に有意に影響しないという予測又は実験的結果に照らして、短く或いは長くすることができるが、それにもかかわらず、ＫａｂａｔのＣＤＲの少なくとも一部と重複するものである。本明細書中で使用する場合、ＣＤＲは、方法の組合せを含む等技術において既知のいずれもの方法によって決定されるＣＤＲを指す。本明細書中で使用される方法は、これらの方法のいずれかによって決定されたＣＤＲを使用することができる。一つより多いＣＤＲを含有するいずれもの与えられた態様において、ＣＤＲ（又は抗体の他の残基）は、Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、延長された、ＡｂＭ、接触、及び／又は立体構造的決定のいずれかによって決定することができる。

【０２３４】

本明細書中で使用する場合、ある残基は、そのＫａｂａｔ番号と一致している；従って、K^{188}-ＣＬκは、カッパー軽鎖の初めから数える、Ｋａｂａｔ番号によるカッパー軽鎖の残基１８８を指す。残基の番号が、適用される具体的な番号の慣例によって変化することができることは認識されることである。

【０２３５】

“抗体”は、特異的結合のためにインタクトな抗体と競合するインタクトな免疫グロブリン又はその抗原結合部位を指す。抗原結合部位は、組換えＤＮＡ技術、或いはインタクトな抗体の酵素的又は化学的開裂によって産生することができる。抗原結合部位は、特に、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ｄＡｂ、及び相補性決定領域（ＣＤＲ）断片、単鎖抗体（ｓｃＦｖ）、キメラ抗体、二重特異性抗体及びポリペプチドに特異的抗原結合を与えるために十分である免疫グロブリンの少なくとも一部を含有するポリペプチドを含む。Ｆａｂ断片は、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ及びＣＨＩドメインからなる一価の断片である；Ｆ（ａｂ’）２断片は、ヒンジ領域においてジスルフィド橋によって連結された二つのＦａｂ断片を含んでなる二価の断片である；Ｆｄ断片は、ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなる；Ｆｖ断片は、抗体の一本腕のＶＬ及びＶＨドメインからなる；そしてｄＡｂ断片は、ＶＨドメイン又はＶＬドメイン（例えば、ヒト、ラクダ科、又はサメ）からなる。

【０２３６】

一般的に、抗体に対する言及は、更にその抗原結合部位に、そして特に、ＣＬκのK^{188}を含んでなるその抗原結合部位を指すと解釈されるべきである。

単鎖抗体（ｓｃＦｖ）は、ＶＬ及びＶＨ領域がペアとなって、合成リンカーにより一価の分子を形成し、これが一本のタンパク質鎖となることを可能にする抗体である。二重特異性抗体は、ＶＨ及びＶＬドメインが一本のポリペプチド鎖上に発現するが、しかし同一鎖上の二つのドメイン間のペア形成を可能にするためには短すぎるリンカーを使用し、これによって、ドメインがもう一つの鎖の相補的ドメインとペアを作り、そして二つの抗原結合部位を作成させる二価の二重特異性抗体である。一つ又はそれより多いＣＤＲを、共有的又は非共有的のいずれかで分子に組込んで、これをイムノアドヘシンにすることができる。イムノアドヘシンは、ＣＤＲ（等）を大きいポリペプチド鎖の一部として組込むことができ、ＣＤＲ（等）をもう一つのポリペプチド鎖に共有的に連結することができ、又はＣＤＲ（等）を非共有的に組込むことができる。ＣＤＲは、イムノアドヘシンが、関心

のある特定の抗原に特異的に結合することを可能にする。

【０２３７】

抗体は、一つ又はそれより多い結合部位を有することができる。一つより多い結合部位が存在する場合、結合部位は、互いに同一であることができ、又は異なっていることができる。例えば、天然に存在する免疫グロブリンは、二つの同一の結合部位を有し、単鎖抗体又はＦａｂ断片は、一つの結合部位を有し、一方“二重特異的”又は“二機能性”抗体は、二つの異なった結合部位を有する。

【０２３８】

“単離された抗体”は、（１）その天然の状態でそれを伴う他の天然に結合された抗体を含む天然に結合された成分と結合していない、（２）同一種からの他のタンパク質を含まない、（３）抗体を天然には発現しない細胞によって発現される、又は異なった種からの細胞によって発現される、或いは（４）天然に存在しない抗体である。

【０２３９】

用語“ヒト抗体”は、ヒト免疫グロブリン配列から誘導される一つ又はそれより多い可変及び定常領域を有する全ての抗体を含む。本発明の幾つかの態様において、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体の全ての可変及び定常ドメインは、ヒト免疫グロブリン配列から誘導される（全ヒト抗体）。ヒト化抗体は、重及び軽鎖のフレームワーク並びに定常ドメイン中のある種のアミノ酸が、ヒトにおける免疫反応を回避又は抑制するように変異された非ヒト種から誘導される抗体である。別の方法として、ヒト化抗体は、ヒト抗体からの定常領域を非ヒト種の可変ドメインに融合することによって産生することができる。

【０２４０】

用語“キメラ抗体”は、一つの抗体からの一つ又はそれより多い領域及び一つ又はそれより多い他の抗体からの一つ又はそれより多い領域を含有する抗体を指す。

用語“エピトープ”は、免疫グロブリン又はＴ細胞受容体への特異的結合が可能ないずれものタンパク質決定基を含む。エピトープの決定基は、通常アミノ酸又は糖側鎖のような分子の化学的に活性な表面の集団からなり、そして通常特異的な三次元構造的特徴、並びに特異的荷電的特徴を有する。抗体は、解離係数が＜１ｕＭ、好ましくは＜１００ｎＭ、そして更に好ましくは：＜１０ｎＭである場合、抗原を特異的に結合すると言われる。

【０２４１】

用語、多機能性抗体複合体、又はＭＡＣは、標的に結合する少なくとも一つのエフェクター分子に共有的に共役する本明細書中で定義されるとおりの抗体、又はその抗原結合部位を指す。エフェクター分子は、ペプチド、小分子、タンパク質、核酸分子、毒素、アプタマー、又は抗原結合性抗体或いはその断片であることができる。ペプチド等の共役に対する言及は、本明細書を通して、タンパク質及び（抗原結合性）抗体又はその断片への共役に対して一般的に適用されることを指す。エフェクター分子及び抗体（又はその断片）間の接続は、共有的連結であることができる。エフェクター分子がタンパク質又はペプチドである幾つかの態様において、エフェクター分子は、抗体鎖の一つのＮ又はＣ末端に融合することができる。融合によって、エフェクター分子及び抗体が、そのそれぞれのペプチド骨格間のペプチド結合によって融合されることは理解されることである。幾つかの側面において、エフェクター分子は、リンカーによって抗体に共有的に共役され、そして二つをペプチド骨格で接続するペプチド結合を経由して融合されない。

【０２４２】

幾つかの態様において、本発明のＭＡＣは、ヒト化抗ＩＧＦ１Ｒ抗体を含んでなる。本発明のＭＡＣは、齧歯類が全ヒト抗体を産生するように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を齧歯類に導入することによって全ヒト抗ＩＧＦ１Ｒ抗体を含んでなることができる。更に提供されるものは、全ヒト抗ＩＧＦ１Ｒ抗体である。全ヒト抗ＩＧＦ１Ｒ抗体は、マウス又はマウス誘導モノクローナル抗体（Ｍａｂｓ）に固有の免疫原性及びアレルギー性反応を最小化し、そして従って投与された抗体の効力及び安全性が増加することが予測される。全ヒト抗体の使用は、繰返した抗体の投与を必要とすることができる炎症及び癌のような慢性及び再発性のヒト疾病の治療において、実質的な利点を提供することが予測すること

ができる。もう一つの態様において、本発明は、補体を結合しない抗ＩＧＦ１Ｒ抗体を含んでなるＭＡＣを提供する。

【０２４３】

本発明において使用するための抗ＩＧＦ１Ｒ抗体を産生する方法は、ＷＯ０２０５３５９６及びＷＯ２００５０１６９６７中に記載され、この両方は、本明細書中に参考文献として援用される。

【０２４４】

幾つかの態様において、変異前の抗ＩＧＦ１Ｒ抗体と比較して、変異された抗ＩＧＦ１Ｒ抗体のＶＨ又はＶＬ領域のいずれかにおいて１０個より多くないアミノ酸変化が存在する。幾つかの態様において、変異された抗ＩＧＦ１Ｒ抗体のＶＨ又はＶＬ領域のいずれかにおいて５個より多くないアミノ酸変化が存在する。３個より多くないアミノ酸変化が存在することができる。他の態様において、定常ドメインにおいて１５個より多くないアミノ酸変化が存在する。定常ドメインにおいて１０個より多くないアミノ酸変化が存在することができる。定常ドメインにおいて５個より多くないアミノ酸変化が存在することができる。

【０２４５】

更に、二つ（又はそれより多い）単鎖抗体が互いに連結された、融合抗体を作成することができる。これは、一本のポリペプチド鎖上に二価又は多価の抗体を作成することを所望する場合、或いは二重特異性抗体を作成することを所望する場合に有用である。

【０２４６】

一つの種類の誘導された抗体が、二つ又はそれより多い抗体（同一種類の又は異なった種類の；例えば二重特異性抗体を作成するため）を架橋することによって産生される。適した架橋剤は、適当なスペーサーによって分離された二つの別個の反応性基を有するヘテロ二機能性であるもの（例えば、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）、又はホモ二機能性（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）を含む。

【０２４７】

もう一つ種類の誘導された抗体は、標識された抗体である。本発明の抗体又は抗体の一部を誘導体化することができる有用な検出剤は、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、塩化５－ジメチルアミン－１－ナフタレンスルホニル、フィコエリトリン、ランタニドリン等を含む蛍光性化合物を含む。抗体は、更にホースラディッシュペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリリン酸塩、グルコースオキシダーゼ等のような検出のために有用である酵素で標識することもできる。抗体が検出可能な酵素で標識された場合、これは、識別することができる反応生成物を酵素が産生するために使用する、更なる試薬を加えることによって検出される。例えば、試薬ホースラディッシュペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素及びジアミノベンジジンの添加は、検出可能である着色された反応生成物に導く。抗体は、更にビオチンで標識し、そしてアビジン又はストレプトアビジン結合の間接的測定によって検出することができる。抗体は、更にガドリニウムのような磁性試薬で標識することもできる。抗体は、更に二次レポーター（例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープ標識）によって認識される所定のポリペプチドエピトープで標識することもできる。幾つかの態様において、標識は、各種の長さのスペーサーアームによって接続されて、潜在的な立体障害を減少する。

【０２４８】

抗体は、更にポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、メチル又はエチル基、或いは炭水化物基のような化学基で誘導することもできる。これらの基は、抗体の生物学的特徴を改良するために、例えば、血清半減期を増加する又は組織結合性を増加するために有用であることができる。

【０２４９】

触媒抗体（Catalytic Antibodies）

本発明の幾つかの側面において、ＭＡＣは、触媒抗体、又はその抗原結合部位を含んで

なる。幾つかの側面において、抗体は、アルドラーゼ抗体であることができる。

【０２５０】

抗体技術の他の要素中で、抗体、有用な断片並びにその変種及び修飾、結合部位及びＣＤＲ、抗体標品、発現、ヒト化、アミノ酸修飾、グリコシル化、ＡＤＣＣ、ＣＤＣ、抗体の血清半減期の増加、発現ベクター、哺乳動物宿主系、及び折畳みを記載しているＵＳ２００６２０５６７０の内容、特に段落［０１５３］-［０２３３］は、本明細書中に参考文献として援用される。

【０２５１】

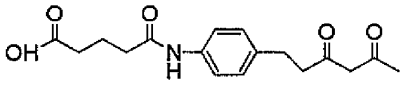
“結合部位”（更に抗原結合部位としても知られる）は、本明細書中で使用される場合、適当な抗原（又は構造的に類似のタンパク質）の決定基と結合する（又は結合することができる）免疫グロブリンの領域又はＩｇドメインを指す。この用語は、一般的にＣＤＲ及び抗原結合に関係する隣接するフレームワーク残基を含む。

【０２５２】

“アルドラーゼ抗体”は、本明細書中で使用する場合、重荷（例えば共役による）から解放された場合、脂肪族ケトン供与体及びアルデヒド受容体間のアルドール付加反応を触媒する結合部位部分を含有する抗体を指す。アルドラーゼ抗体は、担体タンパク質にカップリングし、そして更に抗体の結合部位において反応性ε-アミノ基を伴うリシンを有することによって特徴づけられる、式：

【０２５３】

【化４６】



【０２５４】

の１，３-ジケトンハプテンを含む免疫原による免疫反応性動物の免疫化によって産生することは可能である。アルドラーゼ抗体は、更に１，３-ジケトンハプテンによる、１，３-ジケトンハプテン及び触媒抗体のリシンのε-アミノ基間の複合体の形成による阻害にかけられるその触媒活性によって特徴づけられる。

【０２５５】

考察したように、ある態様において、本発明のＭＡＣ、組成物及び試料を製造するために使用されるある種の抗体は、抗体結合部位における反応性側鎖を含んでなることができる。反応性側鎖は、天然に存在することができるか、又は変異によって抗体中に入れることができる。抗体結合部位の反応性残基は、残基が抗体を製造するために最初に確認したリンパ系細胞中に存在する核酸によってコードされる場合のように、抗体に伴われることができる。別の方法として、アミノ酸残基は、特定の残基をコードするようにＤＮＡを意図的に変異することによって生じることができる。反応性残基は、例えば、本明細書中で考察されるような独特なコドン、ｔＲＮＡ、及びアミノアシル-ｔＲＮＡを使用する生合成的組込みによって生じる非天然の残基であることができる。もう一つの方法において、アミノ酸残基又はその反応性官能基（例えば、求核性アミノ基又はスルフヒドリル基）は、抗体結合部位中のアミノ酸残基に接続されることができる。従って、“抗体の結合部位中のアミノ酸残基を経由して”生じる抗体との共有連結は、本明細書中で使用する場合、連結が、抗体結合部位のアミノ酸残基に直接的であるか、又は抗体結合部位のアミノ酸残基の側鎖に連結する化学分子を経由することができることを意味する。幾つかの態様において、アミノ酸はシステインであり、そして側鎖の反応性基は、スルフヒドリル基である。他の態様において、アミノ酸残基は、リシンであり、そして側鎖の反応性基は、ε-アミノ基である。幾つかの態様において、アミノ酸は、Ｋａｂａｔ番号による重鎖上のK^{93}である。幾つかの態様において、アミノ酸は、配列番号：５２及び５４の番号付けによるＨＣｈ３８Ｃ２上のK^{99}である。

【０２５６】

触媒抗体は、一つ又はそれより多い反応性アミノ酸側鎖を含んでなる適した結合部位を

伴う抗体の一つの供給源である。このような抗体は、アルドラーゼ抗体、ベータラクタマーゼ抗体、エステラーゼ抗体、及びアミダーゼ抗体を含む。

【０２５７】

一つの態様は、マウスモノクローナル抗体ｍＡｂ３３Ｆ１２及びｍＡｂ３８Ｃ２（そのＶＬ及びＶＨは、配列番号：５６及び５７を含んでなる）のようなアルドラーゼ抗体、並びにこのような抗体の適当にキメラ及びヒト化された変種（例えば、ｈ３８Ｃ２ＩｇＧ１：配列番号：５１及び５２、並びにｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ２：配列番号：５３及び５４）を含んでなる。マウスｍＡｂ３８Ｃ２（及びｈ３８Ｃ２）は、反応性リシンをＨＣＤＲ３の近くに、しかしその外側に有し、そして反応性免疫化によって産生され、そして機構的に天然のアルドラーゼ酵素を模倣する触媒抗体の新しい分類のプロトタイプである。使用することができる他のアルドラーゼ触媒抗体は、ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－１０１５を有するハイブリドーマ８５Ａ２；ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－１０１４を有するハイブリドーマ８５Ｃ７；ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－１０１７を有するハイブリドーマ９２Ｆ９；ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－８２３を有するハイブリドーマ９３Ｆ３；ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－８２４を有するハイブリドーマ８４Ｇ３；ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－１０１８を有するハイブリドーマ８４Ｇ１１；ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－１０１９を有するハイブリドーマ８４Ｈ９；ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－８２５を有するハイブリドーマ８５Ｈ６；ＡＴＣＣ寄託番号ＰＴＡ－１０１６を有するハイブリドーマ９０Ｇ８によって製造される抗体を含む。反応性リシンを経由して、これらの抗体は、天然のアルドラーゼのエナミン機構を使用してアルドール及びレトロ－アルドール反応を触媒する。

【０２５８】

本発明の化合物は、更にチオエステラーゼ及びエステラーゼ触媒抗体の結合部位において見だされるもののように、標的剤を、反応性システインに連結させることによって形成することができる。反応性アミノ酸を含有する抗体は、反応性アミノ酸をコードするように抗体結合部位残基を変異すること、又は抗体結合部位中のアミノ酸側鎖を、反応性基を含有するリンカーで化学的に誘導することを含む当技術において公知の手段によって調製することができる。

【０２５９】

抗体は、ヒト化抗体であることができる。本発明の化合物が抗体の結合部位に共有的に連結し、そしてこのような抗体がヒト化される場合、このような抗体が、Ｗ基に対する高い連結親和性の維持を伴ってヒト化されることが重要である。各種の形態のヒト化マウスアルドラーゼ抗体は意図されている。一つの態様は、ヒト定常ドメインC_{κ}及び$C_{\gamma 1}$１を伴うヒト化アルドラーゼ触媒抗体ｈ３８ｃ２ＩｇＧ１又はｈ３８ｃ２Ｆａｂを使用する。Ｃヒト生殖系列V_{κ}遺伝子ＤＰＫ－９及びヒトJ_{κ}遺伝子ＪＫ４を、ｍ３８ｃ２のカッパ軽鎖可変ドメインのヒト化のためのフレームワークとして使用し、そしてヒト生殖系列遺伝子ＤＰ－４７及びヒトJ_{H}遺伝子ＪＨ４を、ｍ３８ｃ２の重鎖可変ドメインのヒト化のためのフレームワークとして使用した。図１８Ｃは、ｍ３８ｃ２、ｈ３８ｃ２、及びヒト生殖系列中の可変軽及び重鎖間の配列アラインメントを例示する。ｈ３８ｃ２は、そのアロタイプのいずれかを含むＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４の定常ドメインを使用することができる。もう一つの抗体は、ｈ３８ｃ２（配列番号：５５及び５６）の可変ドメイン（V_{L}及びV_{H}）及びK^{188}－ＣＬκを含んでなるＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４抗体からの定常ドメインを含んでなるキメラ抗体を使用する。抗体は、全長の抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_{2}$、F_{V}、dsF_{V}、scF_{V}、V_{H}、V_{L}、二重特異性抗体、又はｈ３８ｃ２からのV_{H}及びV_{L}ドメインを含んでなるミニボディであることができる。抗体は、ｈ３８ｃ２からのV_{L}及びV_{H}ドメイン、並びにＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４からなる群から選択される定常ドメインを含んでなる抗体であることができる。抗体は、ｈ３８Ｃ２ＩｇＧ１（配列番号：５１及び５２）であることができる。抗体は、ｈ３８Ｃ２ＩｇＧ２（配列番号：５３及び５４）であることができる。抗体は、ヒトＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、又はＩｇＥ抗体からの定常領域を含んでなるマウスアルドラーゼ抗体のヒト化変種であることができる。も

う一つの態様において、抗体は、マウスアルドラーゼ抗体（例えば配列番号：５７及び５８）からのV_L及びV_H領域、並びにヒトＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、又はＩｇＥ抗体からの定常領域を含んでなるキメラ抗体である。更なる態様において、抗体は、天然の又は未変性のヒトＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、又はＩｇＥ抗体からのポリペプチド配列を含んでなるマウスアルドラーゼ抗体の完全なヒト変種である。

【０２６０】

各種の形態のヒト化アルドラーゼ抗体断片も更に意図されている。一つの態様は、ｈ３８ｃ２Ｆ（ａｂ’）$_2$を使用する。ｈ３８ｃ２Ｆ（ａｂ’）$_2$は、ｈ３８ｃ２ＩｇＧ１のタンパク質分解消化によって産生することができる。もう一つの態様は、ｈ３８ｃ２からのV_L及びV_Hドメインを含んでなるｈ３８ｃ２ｓｃＦｖを使用し、これは、介入リンカー（$Gly_4Ser)_3$（配列番号：５９）によって所望により接続されていてもよい。ヒト化の代替として、ヒト抗体を産生することができる。例えば、免疫化（又は触媒抗体の場合反応性免疫化）によって内因性免疫グロブリンの産生の非存在中で、ヒト抗体の全レパートリーを産生することが可能である遺伝子導入動物（例えばマウス）を産生することが今や可能である。

【０２６１】

本明細書中で使用する場合、“薬物動態”は、時間をかけた血清中の投与された化合物の濃度を指す。薬物力学は、時間をかけた標的及び非標的組織中の投与された化合物の濃度、並びに標的組織（例えば、効力）及び非標的組織（例えば、毒性）に対する効果を指す。例えば、薬物動態又は薬物力学における改良は、不安定な連結を使用することにより、又はいずれものリンカーの化学的性質を改変する（例えば、溶解度、電荷、等を変化する）ことによるような、特定の標的剤或いは生物学的薬剤に対して設計することができる。用語“K_{off}”は、抗体／抗原複合体からの抗体の解離の切断（ｏｆｆ）速度定数を指す。用語“K_d”は、特定の抗体－抗原相互作用の解離定数を指す。

【０２６２】

幾つかの態様において、ＭＡＣの抗ＩＧＦ１Ｒ抗体部分は、そのインスリン受容体に対する選択性より少なくとも５０倍大きいＩＧＦ１Ｒに対する選択性を有する。幾つかの態様において、ＭＡＣの抗ＩＧＦ１Ｒ抗体部分の選択性は、そのインスリン受容体に対する選択性より１００倍より多く大きい。幾つかの態様において、ＭＡＣの抗ＩＧＦ１Ｒ抗体部分は、ＩＧＦ１Ｒ以外のいずれもの他のタンパク質に対していずれもの認識可能な特異的結合を示さない。

【０２６３】

本発明の幾つかの側面において、ＭＡＣは、高い親和性でＩＧＦ１Ｒに結合する。幾つかの態様において、ＭＡＣは、1×10^{-8}Ｍ又はそれより小さいK_dでＩＧＦ１Ｒに結合する。幾つかの態様において、ＭＡＣは、1×10^{-9}Ｍ又はそれより小さいK_dでＩＧＦ１Ｒに結合する。幾つかの態様において、ＭＡＣは、5×10^{-1}Ｍ又はそれより小さいK_dでＩＧＦ１Ｒに結合する。幾つかの態様において、ＭＡＣは、1×10^{-1}Ｍ又はそれより小さいK_dでＩＧＦ１Ｒに結合する。

【０２６４】

本発明の幾つかの側面において、ＭＡＣは、ＩＧＦ１Ｒからの低い解離速度を有する。一つの態様において、ＭＡＣは、$1\times10^4 s^{-1}$又はそれより低いK_{off}を有する。幾つかの態様において、K_{off}は、$1\times10^{-5} s^{-1}$又はそれより低い。

【０２６５】

幾つかの側面において、本発明は、化合物の医薬的に受容可能な塩、立体異性体、互変異性体、溶媒和物、及びプロドラッグ、本発明の試料、組成物並びに医薬組成物を提供する。

【０２６６】

触媒抗体リンカー

標的剤を触媒抗体の結合部位に接続するために適したある種のリンカー（触媒抗体リンカー：ＣＡリンカー）が、その内容が本明細書中に参考文献として援用されるＵＳ２００

９０９８１３０中に開示されている。用語“標的剤”は、用語“エフェクター分子”と区別するために本明細書中で使用されが、しかしＣＡリンカー又はＭＡＣ－リンカーの末端において接続される分子の種類が、互換的であることができることは明白である。特に、（ＣＡ－）リンカー、特異的（ＣＡ－）リンカー構造、（ＣＡ－）リンカーの合成及びＰ、Ｑ及びＷの異なった要素の組合せを記載する一般式に関するＵＳ２００９０９８１３０の、並びに（その中にそれぞれＸ、Ｙ及びＺとして分類されている）具体的に、そして一般的にその中に記載されているような側面は、本明細書中に含まれる。

【０２６７】

ＣＡリンカーは、ＣＡ－直鎖又は分枝鎖であることができ、そして一つ又はそれより多い炭素環又は複素環基を所望により含んでいてもよい。ＣＡリンカーの長さは、環の周りの最短の経路を取ることによって数えられる芳香族環等のような環式分子を伴う直鎖分子の数に関して考えることができる。幾つかの態様において、ＣＡリンカーは、５－１５個間の原子、他の態様において１５－３０個の原子、なお他の態様において３０－５０個の原子、なお他の態様において５０－１００個の原子、そしてなお他の態様において１００－２００個の原子の直鎖の長さを有する。他のＣＡリンカーの考慮事項は、溶解性、親油性、親水性、疎水性、安定性（計画された分解のようにおおよそ安定）、強直性、柔軟性、免疫原性、及び抗体結合の調節、ミセル又はリポソーム中に組込まれる能力、等のような、得られた化合物の物理的又は薬物動態学的特性上の影響を含む。

【０２６８】

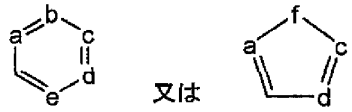
幾つかの側面において、ＣＡリンカーは、ＴＡ連結残渣の側鎖に共有的に連結することができる。リンカーは、式：Ｐ－Ｑ－Ｗを含んでなることができ；ここにおいて、Ｐは、Ｃ、Ｈ、Ｎ、Ｏ、Ｐ、Ｓ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、及びＩからなる群から選択されるいずれもの原子を含む生物学的に適合性な接続鎖であり、そしてポリマー又はブロックコポリマーを含んでなることができ、そしてリンカーが直鎖である場合、連結残基（適宜に、側鎖、アミノ末端又はカルボキシル末端経由）に共有的に連結され、Ｑは、少なくとも一つの環構造を含んでなる所望により存在する認識基であり；そしてＷは、抗体の結合部位中のアミノ酸側鎖への共有連結を含んでなる接続分子である。

【０２６９】

存在する場合、Ｑは、所望により置換された構造：

【０２７０】

【化４７】



【０２７１】

を有することができ、式中、ａ、ｂ、ｃ、ｄ、及びｅは、独立に炭素又は窒素であり；ｆは、炭素、窒素、酸素、又は硫黄であり；Ｑは、十分な原子価の何れもに二つの環の位置で独立にＰ及びＷに接続し；そして四つより多くないａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、又はｆは、同時に窒素であり、そして好ましくは環構造中のａ、ｂ、ｃ、ｄ、及びｅは、それぞれ炭素である。幾つかの側面において、Ｑは、フェニルであることができる。いずれもの理論に束縛されることを望むものではないが、Ｗ基が反応性アミノ酸側鎖と反応することができるように、Ｑ基は、反応基が適した抗体結合部位中に位置決めすることを援助することができると信じられる。

【０２７２】

ＣＡリンカーは、抗体、タンパク質、又はこれらの断片のようなマクロ分子と共有的に又は非共有的に結合を形成することが可能な反応基を、これが含有するように設計することができる。反応性基は、特定の結合部位中の反応性残基と共に使用するために選択される。例えば、アルドラーゼ抗体によって改変される化学分子は、ケトン、ジケトン、ベータラクタム、活性なエステル　ハロケトン、ラクトン、酸無水物、マレイミド、アルファ

－ハロアセトアミド、シクロヘキシルジケトン、エポキシド、アルデヒド、アミジン、グアニジン、イミン、エナミン、リン酸塩、ホスホン酸塩、エポキシド、アジリジン、チオエポキシド、遮蔽又は保護されたジケトン（例えばケタール）、ラクタム、ハロケトン、アルデヒド、等であることができる。

【０２７３】

幾つかの態様において、Ｗは、抗体の結合部位中の残基の側鎖と共役する前に、アゼチジノン、ジケトン、アシルベータ－ラクタム、活性なエステル、ハロケトン、シクロヘキシルジケトン基、アルデヒド、マレイミド、活性化されたアルケン、活性化されたアルキン、又は一般的に、求核性又は求電子性置換に感受性な脱離基を含んでなる分子を形成するために配置された一つ又はそれより多いＣ＝Ｏ基を含む。他の基は、ラクトン、酸無水物、アルファ－ハロアセトアミド、イミン、ヒドラジド、又はエポキシドを含むことができる。抗体の結合部位中の反応性求核基（例えば、リシン又はシステイン側鎖）に共有的に結合することができる例示的なリンカーの求電子反応基は、アシルベータ－ラクタム、単純なジケトン、スクシンイミド活性なエステル、マレイミド、リンカーを伴うハロアセトアミド、ハロケトン、シクロヘキシルジケトン、アルデヒド、アミジン、グアニジン、イミン、エナミン、リン酸塩、ホスホン酸塩、エポキシド、アジリジン、チオエポキシド、遮蔽又は保護されたジケトン（例えばケタール）、ラクタム、スルホン酸塩、等、イミン、ケタール、アセタールのような遮蔽されたＣ＝Ｏ基、並びにいずれもの他の既知の求電子基を含む。ある態様において、反応性基は、アシルベータ－ラクタム、単純なジケトン、スクシンイミド活性なエステル、マレイミド、リンカーを伴うハロアセトアミド、ハロケトン、シクロヘキシルジケトン、又はアルデヒドを形成するように配置された一つ又はそれより多いＣ＝Ｏ基を含む。Ｗは、置換されたアルキル、置換されたシクロアルキル、置換されたアリール、置換されたアリールアルキル、置換されたヘテロシクリル、又は置換されたヘテロシクリルアルキルであることができ、ここにおいて、少なくとも一つの置換基は、１，３－ジケトン分子、アシルベータ－ラクタム、活性なエステル、アルファ－ハロケトン、アルデヒド、マレイミド、ラクトン、酸無水物、アルファ－ハロアセトアミド、アミン、ヒドラジド、又はエポキシドである。幾つかの側面において、Ｗ基は、本発明のペプチドに増加した半減期を提供することができるマクロ分子骨格に共有的に連結される。幾つかの側面において、Ｗ基は、存在する場合、抗体の結合部位に共有的に連結される。

【０２７４】

幾つかの側面において、共役の前に（例えば、抗体の結合部位との）、Ｗは、構造：

【０２７５】

【化４８】



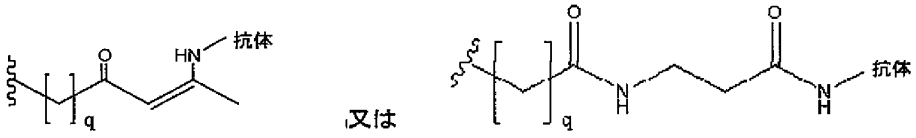
【０２７６】

を有し、式中、ｑ＝０－５である。ｑは、１又は２であることができる。ｑは、１であることができる。他の側面において、ｑは、２であることができる。

幾つかの側面において、抗体の結合部位との共役後、Ｗは、構造：

【０２７７】

【化４９】



【０２７８】

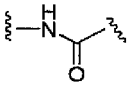
を有し、式中、ｑ＝０－５であり、そして抗体－Ｎ－は、抗体の結合部位中の側鎖への共有結合である。ｑは、１又は２であることができる。ｑは、１であることができる。他の側面において、ｑは、２であることができる。

【０２７９】

Ｐは、三つの成分；Ｐｐ－Ｐｓ－Ｐｙを含んでなる基であることができ、ここにおいて、Ｐｐは、標的剤と結合可能なように特異的に適合された基であり、Ｐｓは、Ｐ基のスペーサー領域であり、そしてＰｙは、Ｗ基に結合するように適合された基である。幾つかの側面において、Ｐｙは、アミド結合、エナミン結合、又はグアニジニウム結合から選択される。Ｐｙは、Ｑ基に隣接した（２個の原子以内）水素原子を提供するように選択することができる。理論に束縛されることを望むものではないが、Ｈ原子が、Ｈ結合相互作用による疎水性ポケットの、特にｈ３８Ｃ２のような触媒抗体の結合間隙の疎水性ポケットに関するＱ基の認識を援助することができると信じられる。従って、例えば、アミド結合は、ＮＨ基のＨを水素結合のために提供し、ＮＨ基がＱ基に直接結合するように方向付けすることができる。別の方法として、アミドのＣ＝Ｏ基は、Ｑ基に原子約２個分隣接するが、しかしなおＨ－結合のために利用可能なＮＨ基のＨにより、Ｑ基に結合することができる。幾つかの態様において、Ｐｙは、非存在である。幾つかの態様において、Ｐｙ基は、式：

【０２８０】

【化５０】



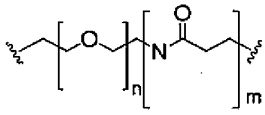
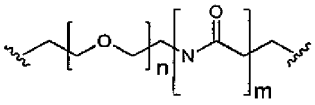
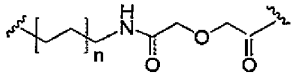
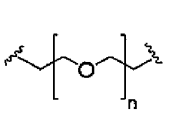
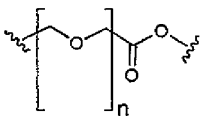
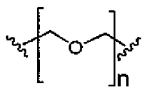
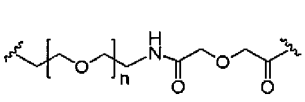
【０２８１】

を有する。

幾つかの側面において、Ｐｓは、Ｐｓがいずれもの過度に反応性の基を提供しないように選択される。Ｐｓは、２－１５個間の原子の全長のＰ基を提供するように選択することができる。Ｐｓは、Ｐ基の全長が２ないし１０個間の原子であるように選択することができる。Ｘｓは、Ｐ基の全長が、４－８個の原子であるように選択することができる。Ｐｓは、Ｐ基の全長が５個の原子であるように選択することができる。Ｐｓは、Ｐ基の全長が６個の原子であるように選択することができる。幾つかの側面において、Ｐは、以下の式：

【０２８２】

【化５１】


,

,

,

,

,

,


【０２８３】

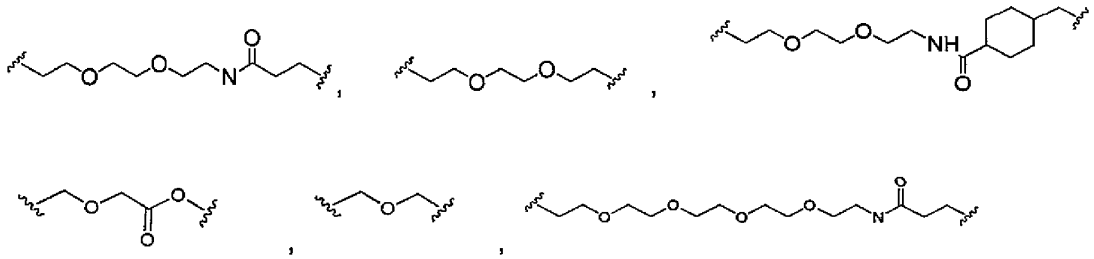
の一つを含んでなることができ、式中、ｎ＝１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０であり、そしてｍは、存在又は非存在である；ｎは、１、２、３、４、５、又は６であることができる；ｎは、１、２、３、又は４であることができる；ｎは、１であることができる；ｎは、２であることができる；ｎは、３であることができる；ｎは、４であることができる。

【０２８４】

幾つかの側面において、Ｐｓは、以下の式：

【０２８５】

【化５２】



【０２８６】

の一つを含んでなる。

Ｐｐは、理想的には、ペプチド、タンパク質、小分子、核酸又はアプタマーのような標的分子（ＴＡ連結残基）の連結残基への特異的方向性共有連結戦略が可能なように選択される。例えば、ＴＡ連結残基が、求核基を含んでなる場合、Ｐｐは、求電子基であることができ、そして逆もまた同じである。例えば、ＴＡ連結残基の側鎖が、Ｋ、Ｈ、Ｙ、オルニチン（ｏｒｔｈｉｎｉｎｅ）、Ｄａｐ、又はＤａｂのようなアミノ基を含んでなる場合、Ｘｐは、ＣＯＯＨ、又は他の類似の反応性求電子物質であることができる。ＴＡ連結残基がＤ又はＥである場合、Ｐｐは、アミン基のような求核基を含んでなることができる。これらの戦略のいずれかは、Ｐｐ基及びＴＡ連結残基間に形成される共有結合を、アミド結合形成戦略によって可能にする。ＴＡ連結基がアミノ基である場合、Ｐｐは、式：

【０２８７】

【化５３】



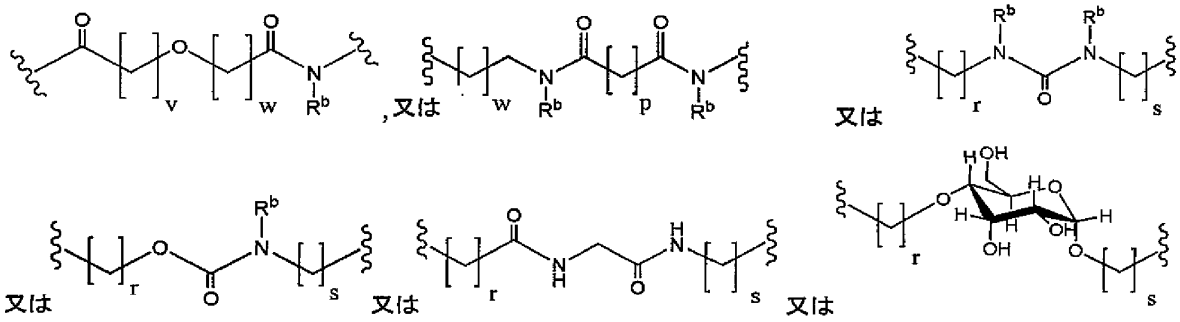
【０２８８】

を含んでなることができる。

Ｐは、所望により存在する生物学的に適合性のポリマー又はブロックコポリマーであることができる。Ｐは、構造：

【０２８９】

【化５４】



【０２９０】

のものであることができ、式中、Ｐ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、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、３２、４３、４４、又は４５であり；ｗ、ｒ、及びｓは、それぞれ独立に０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０であり；そしてＲ^{b}は、それぞれの出現において

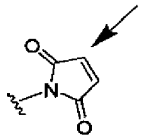
、独立に水素、置換された又は非置換のC$_{1-10}$アルキル、置換された又は非置換のC$_{3-7}$シクロアルキル-C$_{0-6}$アルキル、或いは置換された又は非置換のアリール-C$_{0-6}$アルキルである。

【０２９１】

ＴＡ連結残基がＣ、Ｃの相同体、又は他のチオール基含有残基である場合、Ｐｐは、マレイミド基（又は類似）を含んでなることができ、Ｐｐ基のＴＡ連結残基に共有的に連結するチオール-マレイミド付加反応戦略を可能にする。幾つかの側面において、Ｐｐは、更にチオール基を含んでなることができ、ＴＡ連結残基及びＰｐ基間にジスルフィド橋を形成することを可能にする。幾つかの側面において、Ｐｐは、マレイミド：

【０２９２】

【化５５】

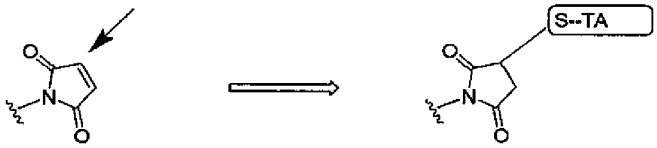


【０２９３】

であることができ、式中、矢印は、標的分子への接続点を示し、そして平行線は、リンカーのＱ基への接続である。標的分子への接続点が、システイン残基、又は他のチオール保有側鎖を含んでなる場合、共役の機構は、以下：

【０２９４】

【化５６】



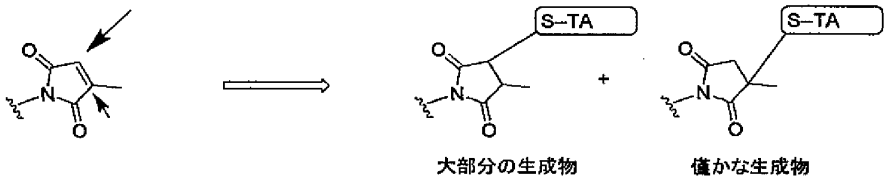
【０２９５】

のとおりであることができる。

幾つかの側面において、Ｐｐ基は、置換されたマレイミド：

【０２９６】

【化５７】



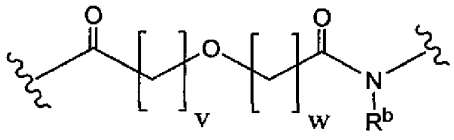
【０２９７】

を含んでなる。

幾つかの側面において、Ｐは：

【０２９８】

【化５８】



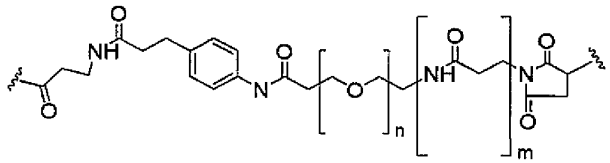
【０２９９】

であり、式中、ｖ及びｗは、Ｘの骨格長が６-１２個の原子であるように選択される；

幾つかの側面において、ＴＡリンカーは、式：

【０３００】

【化５９】



【０３０１】

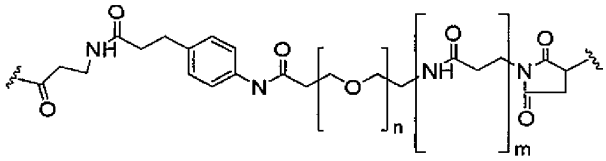
のものであり、式中、ｎ＝１、又は２、又は３、又は４、５、６、７、８、９、或いは１０である；ｎは、１、２、３、４、５、又は６であることができる；ｎは、１であることができる；ｎは、２であることができる；ｎは、３であることができる；ｎは、４であることができる。Ｍは、非存在であることができる。Ｍは、存在であることができる。

【０３０２】

幾つかの側面において、ＴＡリンカーは、式：

【０３０３】

【化６０】



【０３０４】

のものであることができ、式中、ｎ＝１、又は２、又は３、又は４、５、６、７、８、９、或いは１０である；ｎは、１、２、３、４、５、又は６であることができる；ｎは、１であることができる；ｎは、２であることができる；ｎは、３であることができる；ｎは、４であることができる。Ｍは、非存在であることができる。Ｍは、存在であることができる。

【０３０５】

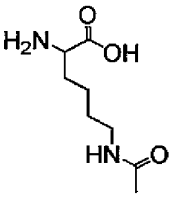
幾つかの側面において、ＣＡリンカーのＰ部分は、本発明のＭＡＣのためのリンカーのＹ、Ｘ－Ｙ、Ｙ－Ｚ及びＸ－Ｙ－Ｚ部分として使用することができる。

ペプチド及びタンパク質

アシルリシン、又はＫａｃ（更にＡｃＫ）は：

【０３０６】

【化６１】

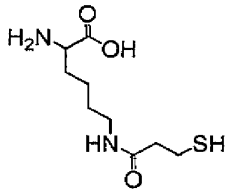


【０３０７】

を指し、Ｋ（ＳＨ）は：

【０３０８】

【化６２】

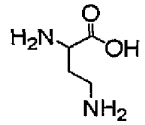


【０３０９】

ジアミノ酪酸（Ｄａｂ）：

【０３１０】

【化６３】

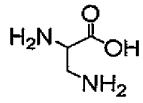


【０３１１】

ジアミノプロピオン酸（Ｄａｐ）：

【０３１２】

【化６４】

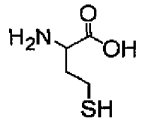


【０３１３】

ホモシステイン：

【０３１４】

【化６５】

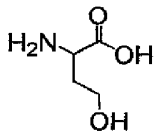


【０３１５】

ホモセリン：

【０３１６】

【化６６】

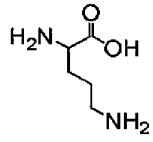


【０３１７】

オルニチン：

【０３１８】

【化６７】



【０３１９】

を指す。

一般的に、本明細書中に記載される細胞及び組織培養物、分子生物学、免疫学、微生物

学、遺伝子学及びタンパク質、並びに核酸化学及びハイブリダイゼーションに関連して、そしてその技術において使用される命名法は、当技術において公知の、そして普通に使用されるものである。本発明の方法及び技術は、一般的に、当技術において公知の、そして他に示さない限り、本明細書を通して引用され、そして考察された各種の一般的な、そして更に具体的な参考文献中に記載されるような、慣用的な方法によって行われる。本明細書中で使用する場合、２０個の慣用的なアミノ酸及びその略語は、慣用的な使用に従う。“ポリペプチド”、“ペプチド”及び“タンパク質”は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。本明細書中で使用される場合、これらの用語は、一つ又はそれより多いアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的化学類似体であるアミノ酸ポリマーに適用される。これらの用語は、更に天然に存在するアミノ酸ポリマーにも適用される。アミノ酸は、結合及びペプチドの他の所望の特徴が維持されている限り、Ｌ又はＤ型であることができる。ポリペプチドは、モノマー性又はポリマー性であることができる。

【０３２０】

“Ｄ”接頭辞、例えば、Ｄ－Ａｌａ又はＮ－Ｍｅ－Ｄ－Ｉｌｅ、或いは小文字様式、例えば、ａ、ｉ、ｌ、（Ａｌａ、Ｉｌｅ、ＬｅｕのＤ変種）によって他に示されない限り、本明細書及び付属する特許請求の範囲中で記載されるペプチド中のアミノ酸及びアミノアシル残基のアルファ炭素の立体構造は、天然の又は“Ｌ”配置である。

【０３２１】

全てのペプチド配列は、α－Ｎ－末端アミノ酸残基が左にあり、そしてα－Ｃ－末端アミノ酸が右にある一般的に受容される習慣によって書かれている。本明細書中で使用する場合、用語“Ｎ末端”は、ペプチド中のアミノ酸の遊離α－アミノ基を指し、そして用語“Ｃ末端”は、ペプチド中のアミノ酸の遊離α－カルボン酸末端を指す。一つの基でＮ終結したペプチドは、Ｎ末端アミノ酸残基のアルファ－アミノ窒素上に一つの基を保有するペプチドを指す。一つの基でＮ終結されたアミノ酸は、α－アミノ窒素上に一つの基を保有するアミノ酸を指す。

【０３２２】

本明細書中で使用する場合、“ハロ”、“ハロゲン”又は“ハロゲン化物”は、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ又はＩを指す。

本明細書中で使用する場合、“生物学的活性”は、化合物、組成物、又は他の混合物のｉｎ　ｖｉｖｏの活性、或いは化合物、組成物又は他に混合物のｉｎ　ｖｉｖｏの投与の結果である生理学的反応を指す。従って生物学的反応は、このような化合物、組成物、及び混合物の治療効果、診断効果及び医薬的活性を包含する。用語“生物学的に活性”又は“機能的”は、ＡＡ標的剤の特徴であるか又はそれに類似した少なくとも一つの活性を示すポリペプチドを指す。

【０３２３】

用語“生物学的に適合性のもの”は、本明細書中で使用する場合、細胞内及び細胞外の生物学的分子と、生物学的に不活性又は非反応性であり、そして非毒性である何物かを意味する。

【０３２４】

語句“置換されたアルキル”は、炭素（等）又は水素（等）に対する一つ又はそれより多い結合が、制約されるものではないが、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、及びＩのようなハロゲン化物中のハロゲン原子；ヒドロキシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、及びエステル基のような基中の酸素原子；チオール基、アルキル及びアリールスルフィド基、スルホン基、スルホニル基、及びスルホキシド基のような基中の硫黄原子；アミン、アミド、アルキルアミン、ジアルキルアミン、アリールアミン、アルキルアリールアミン、ジアリールアミン、Ｎ－オキシド、イミド、及びエナミンのような基中の窒素原子；トリアルキルシリル基、ジアルキルアリールシリル基、アルキルジアリールシリル基、及びトリアリールシリル基のような基中のケイ素原子；並びに各種の他の基中の他の異種原子のような、非水素及び非炭素原子への結合によって置換されているアルキル基を指す。置換されたアルキ

ル基は、更に炭素（等）又は水素（等）原子への一つ又はそれより多い結合が、カルボニル、カルボキシル、及びエステル基中の酸素；イミン、オキシム、ヒドラゾン、及びニトリルのような基中の窒素のような、異種原子への結合によって置換された基を含む。置換されたアルキル基は、特に、炭素又は水素への一つ又はそれより多い結合がフッ素原子への一つ又はそれより多い結合によって置換されたアルキル基を含む。置換されたアルキル基の一つの例は、トリフルオロメチル基及びトリフルオロメチル基を含有する他のアルキル基である。他のアルキル基は、炭素又は水素原子への一つ又はそれより多い結合が、置換されたアルキル基が、ヒドロキシル、アルコキシ、アリールオキシ基、又はヘテロシクリルオキシ基を含有するように酸素原子への結合によって置換されているものを含む。なお他のアルキル基は、アミン、アルキルアミン、ジアルキルアミン、アリールアミン、（アルキル）（アリール）アミン、ジアリールアミン、ヘテロシクリルアミン、（アルキル）（ヘテロシクリル）アミン、（アリール）（ヘテロシクリル）アミン、又はジヘテロシクリルアミン基を有するアルキル基を含む。

【０３２５】

語句“非置換のアルキル”は、先に定義したとおりの二価の非置換のアルキル基を指す。従って、メチレン、エチレン、及びプロピレンは、非置換のアルキレンのそれぞれの例である。語句“置換されたアルキル”は、先に定義したとおりの二価の置換されたアルキル基を指す。置換された又は非置換の低級アルキレン基は、１から約６個までの炭素を有する。

【０３２６】

語句“非置換のシクロアルキル”は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルのような環式アルキル基、並びに先に定義したとおりの直鎖又は分枝鎖アルキル基で置換されたこのような環を指す。この語句は、更に制約されるものではないが、アダマンチル、ノルボルニル、及びビシクロ［２．２．２］オクチル等のような多環式アルキル基、並びに先に定義したとおりの直鎖又は分枝鎖アルキル基で置換されたこのような環を含む。従って、この語句は、特にメチルシクロヘキシル基を含むものである。この語句は、異種原子を含有する環式アルキル基を含まない。非置換のシクロアルキル基は、親化合物中の一つ又はそれより多い炭素原子（等）、酸素原子（等）、窒素原子（等）、及び／又は硫黄原子（等）に結合することができる。幾つかの態様において、非置換のシクロアルキル基は、３から２０個の炭素原子を有する。他の態様において、このような非置換のシクロアルキル基は、３から８個までの炭素原子を有し、一方、他において、このような基は、３から７個の炭素原子を有する。

【０３２７】

語句“置換されたシクロアルキル”は、非置換のシクロアルキルに対して、置換されたアルキル基が、非置換のアルキル基に対して有するものと同じ意味を有する。従って、この語句は、制約されるものではないが、オキソシクロヘキシル、クロロシクロヘキシル、ヒドロキシシクロペンチル、及びクロロメチルシクロヘキシル基を含む。

【０３２８】

図面の詳細な説明

【図面の簡単な説明】

【０３２９】

【図１Ａ】図１Ａは、可変領域に対するコンセンサス配列を伴う抗体２．１２．１及び２．１２．１．ｆｘの重鎖からのアミノ酸配列の整列を示す。

【図１Ｂ】図１Ｂは、可変領域に対するコンセンサス配列を伴う抗体２．１２．１及び２．１２．１．ｆｘの軽鎖からのアミノ酸配列の整列を示す。ＣＤＲは、下線を引かれ、そして定常領域は、イタリックで示す。抗体２．１２．１及び２．１２．１．ｆｘの配列は、ＷＯ２００５０１６９６７及びＷＯ２００５０１６９６７中に開示されているとおりである。

【図２Ａ】図２は、質量分析によるＭＡＣのインタクトな分子量分析は、多数のペプチド

が抗ＩＧＦ１Ｒ抗体２．１２．１．ｆｘに接続していることを示す。図２Ａは、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体２．１２．１．ｆｘの質量分析データである。
【図２Ｂ】図２Ｂ－２Ｄは、ＭＡＣ－２の質量分析データであり、三つの別個のロットの複製実験を示す。
【図２Ｃ】図２Ｂ－２Ｄは、ＭＡＣ－２の質量分析データであり、三つの別個のロットの複製実験を示す。
【図２Ｄ】図２Ｂ－２Ｄは、ＭＡＣ－２の質量分析データであり、三つの別個のロットの複製実験を示す。
【図３Ａ】図３は、２．１２．１．ｆｘ（ＩＧＦ１Ｒ）及びＭＡＣ－２の三つのロット（ＭＡＣ）の質量分析データであり、ここで、ジスルフィド結合は還元されている。図３Ａは、２．１２．１．ｆｘ（ＩＧＦ１Ｒ）、軽鎖の質量分析データである。
【図３Ｂ】図３Ｂは、２．１２．１．ｆｘ（ＩＧＦ１Ｒ）、重鎖の質量分析データである。
【図３Ｃ】図３Ｃは、ＭＡＣ－２、ロット１の軽鎖の質量分析データである。
【図３Ｄ】図３Ｄは、ＭＡＣ－２、ロット１の重鎖の質量分析データである。
【図３Ｅ】図３Ｅは、ＭＡＣ－２、ロット２の軽鎖の質量分析データである。
【図３Ｆ】図３Ｆは、ＭＡＣ－２、ロット２の重鎖の質量分析データである。
【図３Ｇ】図３Ｇは、ＭＡＣ－２、ロット３の軽鎖の質量分析データである。
【図３Ｈ】図３Ｈは、ＭＡＣ－２、ロット３の重鎖の質量分析データである。
【図４】図４Ａは、黒丸で記述されたキモトリプシン開裂部位を伴う抗体２．１２．１．ｆｘの軽鎖のアミノ酸配列である。Ｌｙｓ残基（潜在的な共役の部位）を含有するキモトリプシン断片は、Ｎ末端からの番号によって標識されている。軽鎖のＹ１５断片は、下線を引かれている。図４Ｂは、黒丸で記述されたキモトリプシン開裂部位を伴う抗体２．１２．１．ｆｘの重鎖のアミノ酸配列である。Ｌｙｓ残基（潜在的な共役の部位）を含有するキモトリプシン断片は、Ｎ末端からの番号によって標識されている。
【図５Ａ】図５Ａは、共役されたリシン含有ペプチド：軽鎖Ｙ１５の質量分析データであり、非共役の（複合体形成していない）抗ＩＧＦ１Ｒ抗体２．１２．１．ｆｘ（ＩＧＦ１ｒ）及びＭＡＣ－２（ＭＡＣ）に対する質量分析データ、並びにＹ１５断片の代表を示す。
【図５Ｂ】図５Ｂは、非共役の軽鎖Ｙ１５断片の質量分析データであり、非共役の抗ＩＧＦ１Ｒ抗体２．１２．１．ｆｘ（ＩＧＦ１ｒ）及びＭＡＣ－２（ＭＡＣ）に対する質量分析データ、並びにＹ１５断片の代表を示す。
【図６Ａ】図６Ａは、２．１２．１．ｆｘのトリプシン断片に対する選択されたイオンのＬＣＭＳクロマトグラムのデータである。
【図６Ｂ】図６Ｂは、Lys^{188}がＭＡＣ－２のＡＢＰで修飾された場合のトリプシン断片に対する選択されたイオンのＬＣＭＳクロマトグラムのデータである。
【図７Ａ】図７Ａは、２．１２．１．ｆｘのトリプシン断片に対する選択されたイオンのＬＣＭＳクロマトグラムのデータである。
【図７Ｂ】図７Ｂは、Lys^{190}がＭＡＣ－２のＡＢＰで修飾された場合のトリプシン断片に対する選択されたイオンのＬＣＭＳクロマトグラムのデータである。
【図８】図８は、インタクトなＭＡＣ－２の質量スペクトルである。
【図９Ａ】図９Ａは、ＭＡＣ－２に対する還元された重鎖の質量スペクトルである。
【図９Ｂ】図９Ｂは、ＭＡＣ－２に対する還元された軽鎖の質量スペクトルである。
【図１０】Ａｎｇ１－４の結合ＥＬＩＳＡである。Ａｎｇファミリー（Ａｎｇ１－４）のメンバーへのＭＡＣの結合の代表的グラフである。
【図１１】Ａｎｇ２の競合ＥＬＩＳＡである。ＭＡＣに対するＡｎｇ２のＴｉｅ２受容体への結合に対する競合の代表的グラフである。
【図１２】ＩＧＦ１Ｒの競合ＥＬＩＳＡである。ＭＡＣに対するＩＧＦ１のＩＧＦ１Ｒへの結合に対する競合の代表的グラフである。
【図１３】３Ｔ３－ｈＩＧＦ１Ｒ細胞に対するＭＡＣによるＩＧＦ１誘導のＩＧＦ１Ｒ自

己リン酸化の阻害である。
【図１４Ａ】図１４Ａは、ベヒクル、Ａｎｇ２－ｈ３８ｃ２、ＩＧＦ１Ｒ抗体（２．１２．１．ｆｘ）又はＭＡＣ－２（ＩＰ、１×／週）による治療後の、Ｃｏｌｏ２０５大腸腺癌異種移植腫瘍の体積である。データは、ｎ＝１０／群の０－２８日間の平均及びＳＥとして示す（２８日を超える全ての群に対してｎ＝１０）。＊：Ｐ＜０．０５、ＩＧＦ１Ｒ抗体（２．１２．１．ｆｘ）１０ｍｇ／ｋｇ対ＭＡＣ－２、１０ｍｇ／ｋｇ；＊＊：Ｐ＜０．０１、Ａｎｇ２－ｈ３８Ｃ２対ＭＡＣ－２；二元Ａｎｏｖａ、ボンフェローニ事後検定。
【図１４Ｂ】図１４Ｂは、切除され、そして冷凍された腫瘍から調製された溶菌液中の相対的ＩＧＦ１Ｒ発現レベルである。
【図１５Ａ】図１５Ａは、ベヒクル又はＭＡＣ－２（ＩＰ、１×／週、０．３－１０ｍｇ／ｋｇ）による毎週のＩＰ治療後の、Ｃｏｌｏ２０５大腸腺癌異種移植腫瘍の体積である。データは、ｎ＝１０／群の平均及びＳＥとして示す。＊＊＊：Ｐ＜０．００１、ＰＢＳ対ＭＡＣ－２（全ての投与量）；二元Ａｎｏｖａ、ボンフェローニ事後検定。
【図１５Ｂ】図１５Ｂは、２８日目の最終腫瘍重量である。
【図１５Ｃ】図１５Ｃは、ベヒクル又はＭＡＣ－２（ＩＰ、毎週１回）による治療後の、Ｃｏｌｏ２０５大腸腺癌異種移植腫瘍の微小血管密度である。
【図１５Ｄ】図１５Ｄは、切除され、そして冷凍された腫瘍から調製された溶菌液中の相対的Ａｎｇ２発現レベルである。
【図１５Ｅ】図１５Ｅは、切除され、そして冷凍された腫瘍から調製された溶菌液中の相対的ＩＧＦ１Ｒ発現レベルである。
【図１６Ａ】図１６Ａは、ベヒクル、Ａｎｇ２－ｈ３８ｃ２（１０ｍｇ／ｋｇ）、ＩＧＦ１Ｒ抗体（２．１２．１．ｆｘ）（１０ｍｇ／ｋｇ）又はＭＡＣ－２（１、３又は１０ｍｇ／ｋｇ）による毎週１回のＩＰ治療後の、Ｃｏｌｏ２０５大腸腺癌異種移植腫瘍の体積である。
【図１６Ｂ】図１６Ｂは、ベヒクル、ＩＧＦ１Ｒ抗体（２．１３．２）（１０ｍｇ／ｋｇ）又はＭＡＣ－２（１０ｍｇ／ｋｇ）による毎週１回のＩＰ治療後の、Ｃｏｌｏ２０５大腸腺癌異種移植腫瘍の体積である。
【図１６Ｃ】図１６Ｃは、ベヒクル、Ａｎｇ２－ｈ３８ｃ２（１０ｍｇ／ｋｇ）、ＩＧＦ１Ｒ抗体（２．１２．１．ｆｘ及び２．１３．２）（１０ｍｇ／ｋｇ）、ＭＡＣ－２（１、３又は１０ｍｇ／ｋｇ）或いは２．１２．１．ｆｘ又は２．１３．２（１０ｍｇ／ｋｇ）のいずれかと組合せたＡｎｇ２－ｈ３８ｃ２（１０ｍｇ／ｋｇ）による毎週１回のＩＰ治療後の、Ｃｏｌｏ２０５大腸腺癌異種移植腫瘍の体積である。全てのデータは、ｎ＝１０／群の平均及びＳＥとして示す。
【図１７】図１７は、ベヒクル又はＭＡＣ－２（ＩＰ、週１回）による毎週の治療後のＭＤＡ－ＭＢ－４３５黒色腫の腫瘍体積である。＊＊：Ｐ＜０．０５、ＰＢＳ対ＭＡＣ－２、２０ｍｇ／ｋｇ；＊＊＊：Ｐ＜０．０１、ＰＢＳ対Ａｎｇ２－ｈ３８ｃ２、１０ｍｇ／ｋｇ又はＭＡＣ－２、３ｍｇ／ｋｇ：二元Ａｎｏｖａ、ボンフェローニ事後検定。データは、ｎ＝１０／群の平均及びＳＥとして示す。
【図１８Ａ】図１８Ａは、ｍ３８ｃ２、ｈ３８ｃ２、及びヒト生殖系列の可変ドメインのアミノ酸配列の整列である。フレームワーク領域（ＦＲ）及び相補性決定領域（ＣＤＲ）は、Ｋａｂａｔ等によって定義されている。星印は、ｍ３８ｃ２及びｈ３８ｃ２間又はｈ３８ｃ２及びヒト生殖系列間の差を示す。
【図１８Ｂ】図１８Ｂは、マウス定常軽鎖カッパ領域（ｍＣＬκ）、ヒト定常軽鎖カッパ領域（ｈＣＬκ）、及びヒト定常軽鎖ラムダ領域（ＨＣＬλ）のアミノ酸配列の整列である。ｍＣＬκ及びｈＣＬκ間；並びにｈＣＬκ及びｍＣＬλ間の差は、星印として示し、そして保存された置換（ｓｕｂｓｔａｔｉｏｎ）は、十字で示している。
【発明を実施するための形態】
【０３３０】
本発明をよりよく理解することができるために、以下の実施例が記載される。これらの

実施例は、例示のみの目的のためであり、そしていずれもの様式で本発明の範囲を制約すると解釈されるべきではない。

【０３３１】

実施例

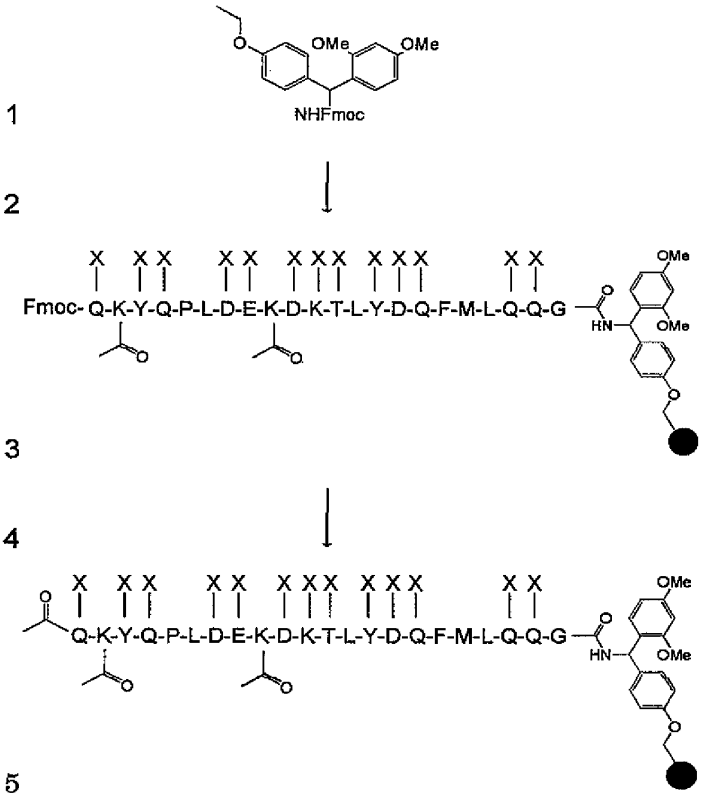
【実施例１】

【０３３２】

実施例１　本発明で使用されるペプチドの合成

【０３３３】

【化６８】



Rinkアミド樹脂

Fmoc化学を使用するSPPSのための工程：(i)20%ピペリジン／DMFによるFmoc除去、(ii)アミノ酸カップリング；樹脂のアミン付加に対するHBTU：アミノ酸：HOBt：NMM比は、5：5：5：20である。使用する溶媒は、NMPである、(iii)それぞれのアミノ酸カップリングのための工程を繰返す。X＝酸に不安定な側鎖保護基である。

完全に保護された樹脂に結合したペプチドの構築を完了する：

(i)20%ピペリジン／DMFによるFmoc除去、(ii)アセチル化：無水酢酸／NMM／NMP。

Ｎ－アセチル化され、保護された樹脂に結合したペプチドの構築を完了する。

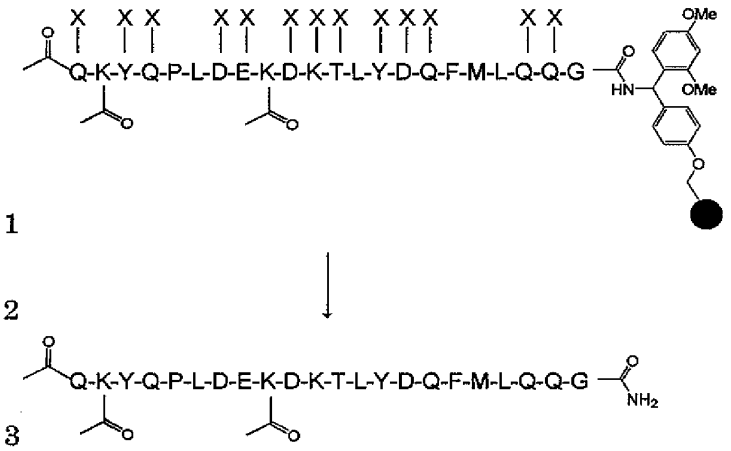
スキーム　１．　Fmoc化学を使用するペプチド鎖の固相合成（典型的なAng2結合ペプチド（ABP）配列番号：27で例示）

【実施例２】

【０３３４】

実施例２：実施例１のように調製したペプチドの樹脂からの開裂。

【０３３５】
【化６９】

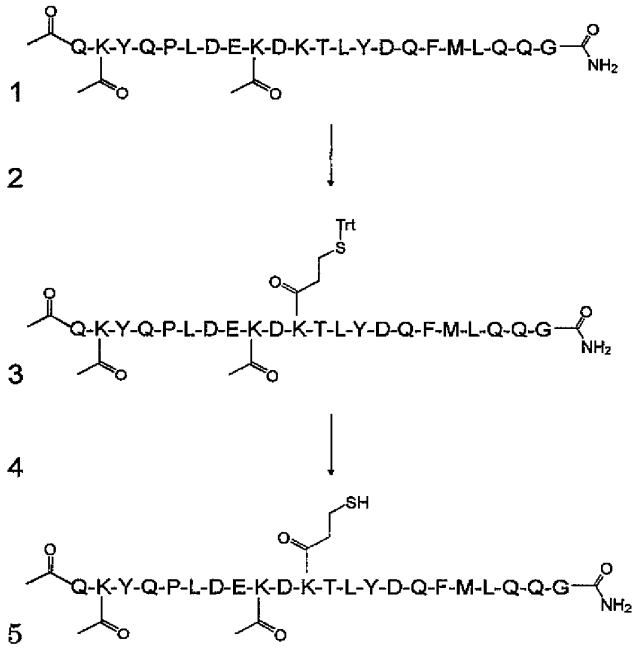


1. Ｎ－アセチル化され、保護された樹脂に結合されたペプチドの構築を完了。
2. TFA／水／フェノール／トリイソプロピルシラン（90:4:4:2）。

スキーム ２． 樹脂からのABP（配列番号：27）の開裂

【実施例３】
【０３３６】
実施例３　ＡＢＰ－チオール－リンカー化合物の合成
【０３３７】

【化７０】



1. Ang2結合ペプチド。
2. Ｓ－トリチル－メルカプトプロピオン酸／HBTU／NMM(Ang2ペプチドに対して5:5:10の比)。
3. トリチル－保護されたチオールAng2中間体。
4. TFA／DCM／TIPS(5:93:2の比)。
5. チオール保有Ang2修飾ペプチド。

スキーム ３： ABP－１－ti(3. 3)(連結残基K(SH)で置換されたK^{11}を伴う配列番号:27)の合成

【０３３８】

異なった繋留点を伴うＡｎｇ２結合ペプチド（ＡＢＰ）の類似体を合成した（実施例１及び２を参照）。最初に、遊離のチオールＡＢＰ中間体を、合成及び精製し、そして次いでマレイミド-ＰＥＧ$_2$-ＰＦＰリンカーを加え、続いて最終的な精製工程により、純粋なＰＦＰで活性化されたＡＢＰを得た。ペプチド鎖の構築及び開裂を、スキーム１及び２に概略示すように行って、純粋なＡＢＰを産生した。

【０３３９】

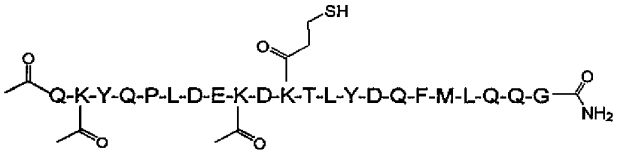
ＡＢＰ（２８４ｍｇ、０．１ｍｍｏｌ）を、ジメチルホルムアミド（０．５ｍｌ）中に撹拌しながら溶解した。別に、Ｓ-トリチル-メルカプトプロピオン酸（ＭＰＡ、６２ｍｇ、概略０．１２５ｍｍｏｌ）、ＨＢＴＵ（４８ｍｇ、０．１２５ｍｍｏｌ）及びＮ-メチルモルホリン（０．０２５ｍｌ、０．２５ｍｍｏｌ）を、ＤＭＦ（０．５ｍｌ）中で溶解するまで５分間撹拌した。ＡＢＰ溶液及び活性化されたＭＰＡ溶液を、２時間一緒に混合した。反応の進行をＬＣＭＳによってモニターした。２時間後、溶液を、氷冷のエーテル（４０ｍｌ）中にゆっくりと加えて、ＡＢＳ-Ｓ-トリチル-ＭＰＡ生成物を沈殿させた。白色の沈殿物を濾過によって収集し、次いで乾燥した。次いで固体の残渣を、トリフルオロ酢酸のジクロロメタン中の溶液（１：１０、１０ｍｌ）中に溶解し、トリイソプロピルシラン（ＴＩＰＳ）を加え（０．０５０ｍｌ）、そして１時間撹拌した。溶液を減圧下で明るい黄色の油状物まで蒸発し、次いで粗製のチオールペプチドを氷冷のエーテルの添加によって沈殿させた。生成物を遠心によって収集し、そして真空中で乾燥した。残渣

をアセトニトリルの５０％水溶液中に溶解し、次いで凍結乾燥して、粗製のチオールペプチド（ＨＰＬＣ分析により概略８０％の純度）を得た。粗製のチオールペプチドを準分離用ＨＰＬＣによって精製して、１４５ｍｇの配列番号：２７を得た。

配列番号：２７-Ｋ（ＳＨ）^{11}-ＭＡＬ-２ＰＥＧ-ＰＦＰの合成

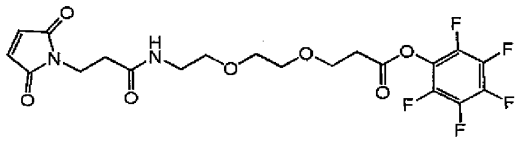
【０３４０】

【化７１】

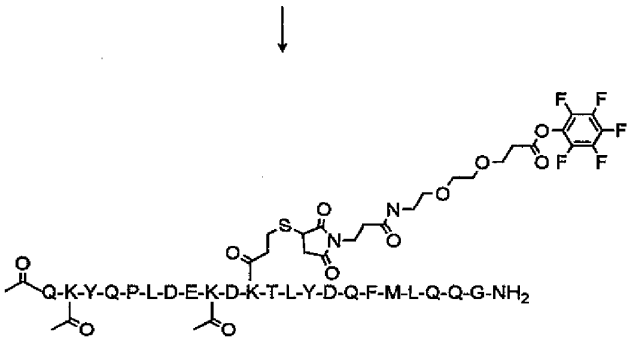


4.1 配列番号:27-K(SH)^{11}

+



4.2 (MAL-2PEG-PFP リンカー)



4.3 （配列番号:27－K(SH)^{11}－MAL－2PEG－PFP）

スキーム ４ 配列番号:27－K(SH)^{11}－MAL－2PEG－PFPの合成

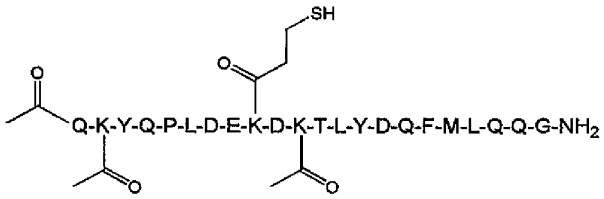
【実施例４】

【０３４１】

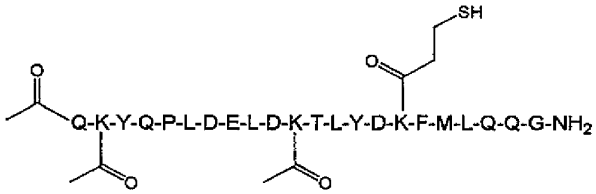
実施例４　Ａｎｇ-２結合ペプチド-チオール中間体（ＡＢＰ-ｔｉ）の産生

ペプチド鎖の構築を、０．１ミリモル規模で行った。使用した樹脂は、Ｆｍｏｃ-Ｒｉｎｋ-ＰＬ樹脂（１５０ｍｇ、０．６７ｍｍｏｌ／ｇ置換）であった。標準的なＦｍｏｃ化学プロトコルを使用して、ペプチドを構築した。Ｆｍｏｃの除去は、２０％ピペリジン／ＤＭＦで3× ５分間であり、そして全ての樹脂の洗浄工程はＤＭＦを使用した。アミノ酸を組込むために、それぞれの残基に対して、ＨＢＴＵ／ＨＯＢｔ／ＮＭＭ活性化を使用する一回のカップリング工程を２時間使用した。連結残基（Ｋ（ＳＨ））を、Ｆｍｏｃ-Ｌｙｓ（Ｎ$^{\varepsilon}$-メルカプトプロピオン酸-Ｓ-Ｔｒｔ）-ＯＨとして組込んだ。鎖の構築後、Ｎ末端のＦｍｏｃ基を除去し、そしてペプチド樹脂をアセチル化によってキャップした。最終の樹脂をＤＣＭで洗浄し、そして一晩真空中で乾燥した。得られた最終の樹脂の重量は次のとおり：配列番号：２９-Ｋ（ＳＨ）^{9}：６２７ｍｇ、配列番号：３０-Ｋ（ＳＨ）^{16}：５７３ｍｇ、配列番号：３１-Ｋ（ＳＨ）^{18}：６４２ｍｇ、そして配列番号：３２-Ｋ（ＳＨ）^{19}：６４１ｍｇであった。

【０３４２】
保護基の加酸分解的（ａｃｉｄｏｌｙｔｉｃ）除去及び樹脂からのペプチドの開裂は、ＴＦＡ／水／ジチオトレイトール／トリイソプロピルシラン（９０：４：４：２の比、５ｍｌ）のカクテルを２時間使用して達成した。溶液を樹脂から濾過し、そして樹脂を更なる５ｍｌの未希釈のＴＦＡで洗浄した。混合した濾液をシロップ状まで蒸発し、次いで氷冷のエーテルの添加により、白色の粉末が沈殿物した。粉末を遠心によって収集し、次いでアセトニトリルの５０％水溶液（２０ｍｌ）中に溶解し、冷凍し、そして一晩凍結乾燥した。
【０３４３】
結果：
配列番号：２９－Ｋ（ＳＨ）^{9}
【０３４４】
【化７２】

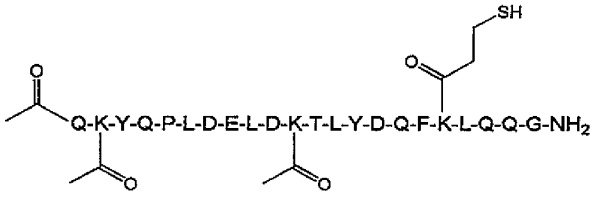


【０３４５】
得られた粗製の配列番号：２９－Ｋ（ＳＨ）^{9}の量は、２５２ｍｇであった。ＨＰＬＣによる粗製の配列番号：２９－Ｋ（ＳＨ）^{9}の分析は、きれいな主要ピークを示した；５－９５％Ｂ／３０分、Ｃ１８、Ｒｔ＝１８．３分。粗製の配列番号：２９－Ｋ（ＳＨ）^{9}の更なるＬＣＭＳ分析は、主要ピークが所望の生成物であることを示した；［Ｍ＋Ｈ］＋＝２９３０、＋２＝１４６５、＋３＝９７７を観察した。
【０３４６】
配列番号：３０－Ｋ（ＳＨ）^{16}
【０３４７】
【化７３】



【０３４８】
得られた粗製の配列番号：３０－Ｋ（ＳＨ）^{16}の量は、２２９ｍｇであった。ＨＰＬＣによる粗製の配列番号：３０－Ｋ（ＳＨ）^{16}の分析は、きれいな主要ピークを示した；５－９５％Ｂ／３０分、Ｃ１８、Ｒｔ＝２２．０分。粗製の配列番号：３０－Ｋ（ＳＨ）^{16}の更なるＬＣＭＳ分析は、主要ピークが所望の生成物であることを示した；［Ｍ＋Ｈ］＋＝２９１５、＋２＝１４５８、＋３＝９７２を観察した。
【０３４９】
配列番号：３１－Ｋ（ＳＨ）^{18}
【０３５０】

【化７４】



【０３５１】

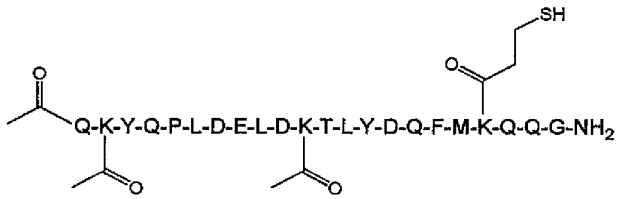
得られた粗製の配列番号：３１－Ｋ（ＳＨ）[18]の量は、２５２ｍｇであった。ＨＰＬＣによる粗製の配列番号：３１－Ｋ（ＳＨ）[18]の分析は、きれいな主要ピークを示した；５－９５％Ｂ／３０分、Ｃ１８、Ｒｔ＝２１．１分。粗製の配列番号：３１－Ｋ（ＳＨ）[18]の更なるＬＣＭＳ分析は、主要ピークが所望の生成物であることを示した；［Ｍ＋Ｈ］＋＝２９１２、＋２＝１４５６、＋３＝９７１を観察した。

【０３５２】

配列番号：３２－Ｋ（ＳＨ）[19]

【０３５３】

【化７５】



【０３５４】

得られた粗製の配列番号：３２－Ｋ（ＳＨ）[19]の量は、２６１ｍｇであった。ＨＰＬＣによる粗製の配列番号：３２－Ｋ（ＳＨ）[19]の分析は、きれいな主要ピークを示した；５－９５％Ｂ／３０分、Ｃ１８、Ｒｔ＝２０．０分。粗製の配列番号：３２－Ｋ（ＳＨ）[19]の更なるＬＣＭＳ分析は、主要ピークが所望の生成物であることを示した；［Ｍ＋Ｈ］＋＝２９３０、＋２＝１４６５、＋３＝９７７を観察した。

【０３５５】

精製：

分離用ＨＰＬＣカラムを、ＴＦＡの希釈水溶液及びアセトニトリルで事前平衡した。粗製のＡＢＰ－チオール中間体（即ち、連結残基としてＫ（ＳＨ）を伴うＡＢＰ）をＤＭＦ（３ｍｌ）中に溶解し、次いでカラム上に吸着させ、そして希釈ＴＦＡ中のアセトニトリルの勾配を適用することによって溶出した。画分を、質量（Ｍ＝１４６５）によって自動的に収集した。カラムからの溶出を、ＵＶによってモニターし、得られた画分を分析用ＲＰ－ＨＰＬＣによって分析した。最も純粋な画分（分析用ＨＰＬＣにより＞９５％）を混合し、そして凍結乾燥して、次の量：８７ｍｇの純粋な配列番号：２９－Ｋ（ＳＨ）[9]、５０ｍｇの純粋な配列番号：３０－Ｋ（ＳＨ）[16]、５９ｍｇの純粋な配列番号：３１－Ｋ（ＳＨ）[18]、及び３９ｍｇの純粋な配列番号：３２－Ｋ（ＳＨ）[19]を得た。

【０３５６】

リンカーの合成

ＡＢＰを、本発明の抗ＩＧＦ１Ｒ抗体に共役するために、五つの異なった活性化戦略を考慮した、（実施例５－９）（例示的構造は、配列番号：２７－Ｋ（ＳＨ）[11]を使用して示す）：

【実施例５】

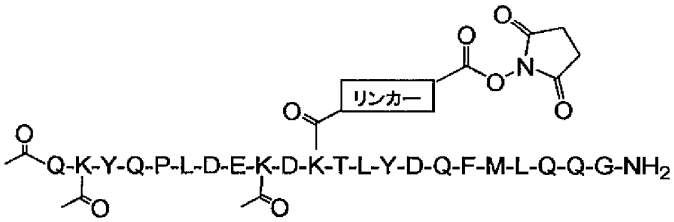
【０３５７】

実施例５　Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＮＨＳ）（配列番号：２７－Ｋ[1]

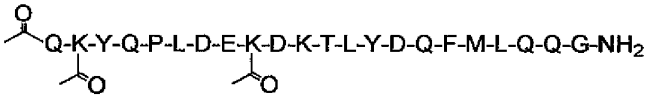
[1] - ＮＨＳ）

【０３５８】

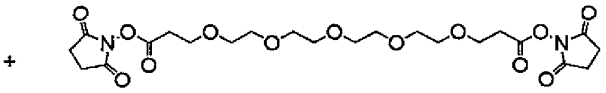
【化７６】



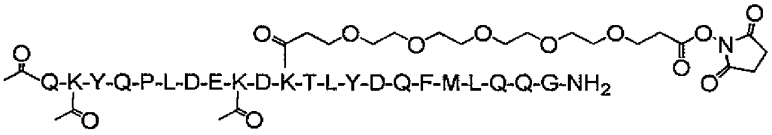
N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS) (配列番号:27-K^{11}-NHS)



5.1 配列番号:27



5.2 ビス-PEG_5-NHS エステル



5.3 配列番号:27-K^{11}-5PEG-NHS

スキーム ５　配列番号:27－K(SH)^{11}－5PEG－NHSの合成

【０３５９】

配列番号：２７－Ｋ[11]－５ＰＥＧ－ＮＨＳの合成

配列番号：２７－Ｋ（５．１）を、ＮＨＳで活性化されたカルボキシル基が最終の活性化されたペプチド精製物（５．３）上に残り、そしてその後の共役のために使用可能なままであるように、ビス－ＮＨＳ、PEG_x－リンカー（５．２）と反応させた。これは、ＡＢＰ上の４個の他の遊離カルボキシル基の存在によって必要とされた。これらは、活性化された基の位置が、容易に制御することができず、そしてこれが多数のカルボキシル側鎖が活性化されるものである可能性があるものであるために、簡単なｉｎ　ｓｉｔｕの活性化戦略を妨げる。

【０３６０】

ビス－PEG_5－ＮＨＳエステル及びＡＢＰ（配列番号：２７）間の反応を試験した。ＤＭＳＯ中の１０倍過剰のリンカーの溶液を使用して、ＡＢＰ及びＮ－メチルモルホリン（塩基として）のＤＭＳＯ中の溶液を、十分に撹拌された溶液中でゆっくりと滴定した。試料を採取し、そしてＨＰＬＣ及びＬＣＭＳによって各種の時点で試験した。約２時間後、かなりの生成物の形成があり（５．１から５．３を形成するための概略８０％転換）、そしてこれは、ビス－ＮＨＳリンカー試薬から容易に分離された。然しながら、ＤＭＳＯ

中でさえ、生成物５．３は時間をかけて遊離酸の形態にゆっくりと転換された（ここでＮＨＳ－エステル基は、不活性な遊離カルボキシルに転換される）。更に、粗製の反応混合物を分画して、所望の生成物５．３を単離する場合、これは、更に精製及びその後の凍結乾燥行程中に加水分解にさらされた。この方法は、ある程度の生成物を合成することにおいて好結果であったが、得られたＮＨＳ－エステルの水に対する不安定性が、その後の結合反応におけるその適用を制約するものであると考えられた。ＭＡＬ－ＰＥＧ２－ＮＨＳの更なる試験を、実施例３０（Z^{*}基Ｚ１３を含んでなる）に示す。

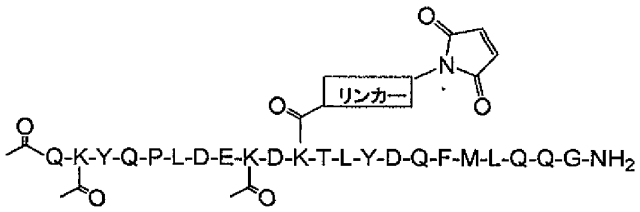
【実施例６】

【０３６１】

実施例６　マレイミド（Ｍａｌ）（配列番号：２７－K^{11}－Ｍａｌ）

【０３６２】

【化７７】



【０３６３】

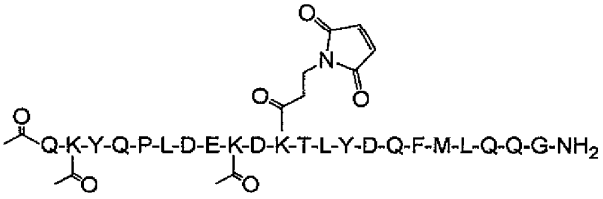
マレイミド活性化は、一般的に遊離チオール共役パートナーと協調して使用される。抗体２．１２．１．ｆｘ中に遊離チオール残基は存在しないが、遊離チオールをタンパク質に導入するために使用することができる、幾つかの化学的方法があり、そして従ってマレイミドに基づく共役のための連結部位が提供される。

【０３６４】

Ｍａｌ含有ペプチドは、一般的に簡単なマレイミド／酸含有リンカーを使用して比較的単純に合成される。幾つかの配列番号：２７－ＭＡＬ化合物が以下に示すように合成される。一般的に、マレイミドで活性化されたペプチドは、内因性チオール（遊離システイン側鎖から誘導される）又は他の化学的手段、例えばトラウト（Ｔｒａｕｔ’ｓ）試薬によって導入されるチオールのいずれかを欠くタンパク質又は抗体にはよく共役しなかった。

【０３６５】

【化７８】

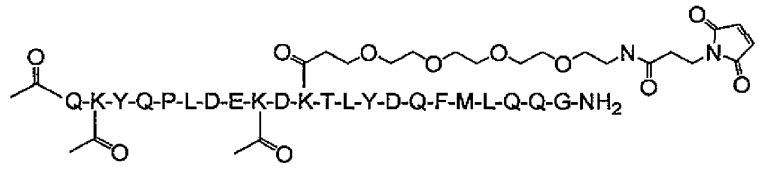


【０３６６】

配列番号：２７－K^{11}－Ｍａｌ

【０３６７】

【化７９】



【０３６８】

配列番号：２７－Ｋ^{11}－４ＰＥＧ－Ｍａｌ－２

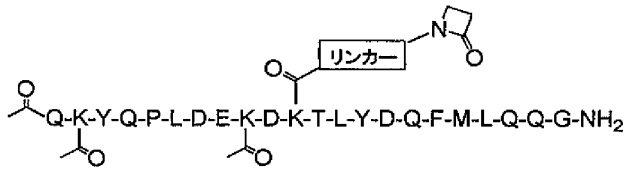
【実施例７】

【０３６９】

実施例７　アゼチジノン（ＡＺＤ）（配列番号：２７－Ｋ^{11}－ＡＺＤ）

【０３７０】

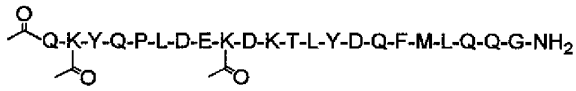
【化８０】



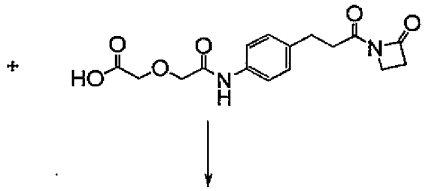
配列番号:27-AZD

AZD で活性化された ABP を、AZD−酸リンカーを ABP に溶液中で接続することによって合成した。

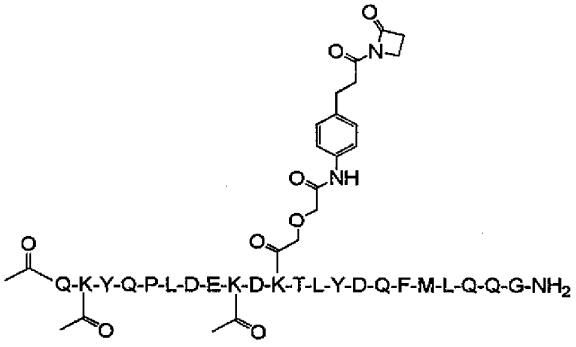
AZD 活性化:



6.1 配列番号:27



6.2 AZD-酸リンカー



6.3　配列番号:27-K^{11}-AZD

スキーム 6: 配列番号:27−K^{11}−AZD(6.3)の合成

【０３７１】

ＡＺＤで活性化されたＡＢＰは、リシン側鎖のアミノ酸と非常にゆっくりと反応した。リン酸緩衝液中のｐＨ７ないし９で、共役を試みて、その電荷を減少することによって抗体表面のリシンの求核性の傾向を増加した（表面タンパク質上のリシンのｐＫａは、約９．１ないし１１．２である）。抗体の安定性に伴う問題点及びＡＺＤの加水分解は、９より上のｐＨの使用を妨げた。１５モルのＡＺＤで活性化されたＡＢＰを、抗体の１モル当

たり）３日間の反応時間をかけて加え、低いレベルの共役を得た（抗体当たり平均２個のＡＺＤで活性化されたＡＢＰ）。塩基性のｐＨにおいて、ＡＺＤの加水分解が急速に起こり（２４時間後５０％）、減少したレベルの共役に寄与した。

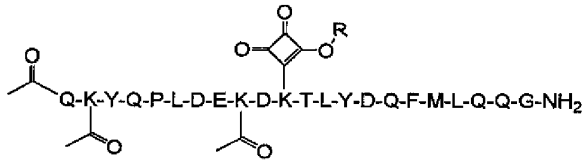
【実施例８】

【０３７２】

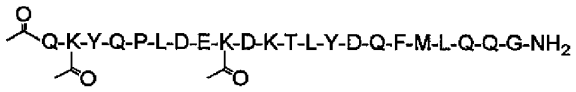
実施例８　スクアリン酸のエステル（スクアリン酸塩）。（配列番号：２７－スクアリン酸）

【０３７３】

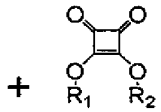
【化８１】



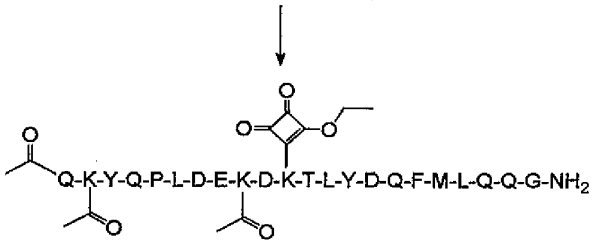
配列番号:27-K^{11} スクアリン酸-R



7.1　配列番号:27



7.2　R1及びR2は、スクアリン酸に誘導され、この実施例において、R1及びR2 は、両方ともCH2CH3である。



スキーム 7: 7.3　配列番号:27-K^{11}-スクアリン酸-

スキーム 7: スクアリン酸誘導体 配列番号:27－K^{11}－スクアリン酸塩リンカー－1→ABP－1－スクアリン酸塩－1

【０３７４】

スクアリン酸から製造されたアルキルエステルは、中性のｐＨでチオールと選択的に反応し、一方高いｐＨ（概略８．５以上）において、これらは、更にアミンと、しかし更にゆっくりと反応することができること知られている。スクアリン酸塩の反応性は、アルキル基のアリール基による置換によって有意に向上することができる。本発明は、ＡＢＰの幾つかのスクアリン酸塩誘導体を提供し、ここで、‘Ｒ’の性質（Ｒは、エチル、フェニル、２－メトキシカルボニルフェニル、３－フルオロフェニル及び３，５－ジフルオロフェニルからなる群から選択される）、及びリンカーの位置が変化する場合、他の誘導体が変化する。スクアリン酸エチルは、遊離チオールによく共役するが、しかしタンパク質及び抗体上の遊離アミンに対して、ｐＨが９より上の場合でない限り不良である。スクアリン酸アリールは、本発明の抗体上の遊離リシンに中性のｐＨで共役する場合、良好な効率

を示す。

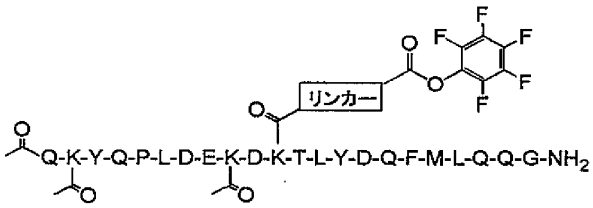
【実施例９】

【０３７５】

実施例９　ペンタフルオロフェニルエステル（ＰＦＰ）（配列番号：２７－ＰＦＰ）

【０３７６】

【化８２】



【０３７７】

本発明は、更に比較的安定な活性化されたペプチドを形成するためのペンタフルオロフェニル（ＰＦＰ）エステルの使用を提供する。この方法は、ＰＦＰ基が安定な活性化されたペプチド生成物から溶液中で容易に導入することができ、これ自体は観察される僅かなＰＦＰエステルの加水分解を伴って標準的なＨＰＬＣ法を使用して精製することができることにおいて他の方法を超える幾つかの利点を有する。抗体に共役することが可能な反応性基を伴うリンカーに共有的に接続したＡＢＰを合成することにおける挑戦は、ＡＢＳ配列中の四つの酸性側鎖（三つのアスパラギン酸及び一つのグルタミン酸）の存在である。これらは、一つの酸側鎖上の部位特異的活性化を確実にする既知の簡単な方法がないため、ペプチド及び活性化剤を使用する簡単な活性化戦略を妨げる。

【０３７８】

この問題を解決するために、本発明は、これによって、ＰＦＰのような活性化されたエステル基が、化学選択性反応（チオール／マレイミド化学を使用して）又はペプチド側鎖とアミドを形成するが、しかし他の末端を活性なエステルとして残す二重活性なエステルを使用するかのいずれかによって、ペプチド上の側鎖リシンに直接カップリングすることができる合成経路を提供する。

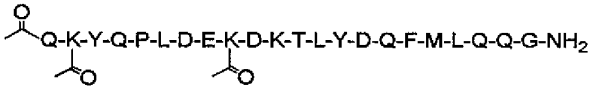
【０３７９】

幾つかの態様において、戦略は、ＰＦＰエステルとして活性化されたそれぞれの酸を伴うビス－酸ＰＥＧであることができる。ある塩基の存在を伴う有機溶液において、ビス－ＰＦＰリンカーの末端は、リシンのＮ－ε－アミノ側鎖と必要な繋留点で反応して、安定なアミド連結を形成し、一方他端は、他のＰＦＰ基を維持した。この戦略に伴う一つの潜在的な問題は、ペプチドが、リンカーのそれぞれの末端に存在するＰＦＰ分子のそれぞれに付加するものであるペプチドダイマーを形成する可能性である。幾つかの側面において、本発明は、化学量論並びにそれぞれのペプチド及びビス－ＰＥＧ－ＰＦＰリンカーの付加を変更することによってこの更なる問題を克服する。本発明によって提供される一つの解答は、ペプチドを超える過剰のリンカーが常に存在するように、過剰のビス－Ｐｆｐリンカーを溶液中に有し、そして溶液中のペプチドをゆっくりと加えることである。約３．７：１ないし約４．３：１間の比を、又は幾つかの態様において、約４：１のペプチドを超えるリンカーの比を有することによって、ダイマーの存在を伴わずに必要なＰＦＰで活性化されたペプチドを合成することができる。配列番号：２７－Ｋ^{11}－５ＰＥＧ－ＰＦＰのための合成スキームを、以下のスキーム８に示す：

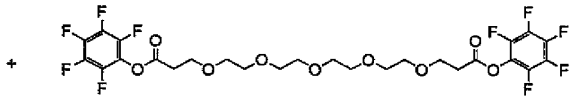
【０３８０】

OnCusp
Ex. 1002

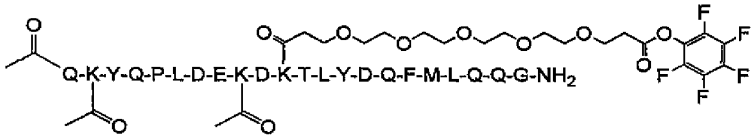
【化８３】



配列番号:27 (8.1)



ビス-dPEG$_5$-OPfp (8.2)



配列番号:27-K^{11}-5PEG-PFP (8.3)

スキーム ８　配列番号:27－K^{11}－5PEG－PFP

【０３８１】

ビス-ｄＰＥＧ$_5$-ＯＰｆｐリンカー（８．２）の合成

ビス-ｄＰＥＧ$_5$-酸（１ｍｍｏｌ、３３８ｍｇ）を、無水のジクロロメタン（５ｍｌ）中に溶解し、次いでペンタフルオロフェノール（２ｍｍｏｌ、３６８ｍｇ）を、ジシクロヘキシカルボジイミド（１ｍｍｏｌ、２０８ｍｇ）と共に加えた。溶液を一晩室温で撹拌した。この時間後、微細な白色のジシクロヘキシル尿素副産物を濾過して除去し、そして濾液を乾燥状態まで蒸発して、淡黄色の軽油状物を得た。ＴＬＣ及びＨＰＬＣによる分析は、正しいＭＳ＝６７０を持つ純粋な生成物を示した。生成物を更なる精製無しに次の工程で使用した。生成物は-２０℃で数ヶ月間安定である。

【０３８２】

配列番号：２７-Ｋ^{11}-５ＰＥＧ-ＰＦＰ（８．３）の合成

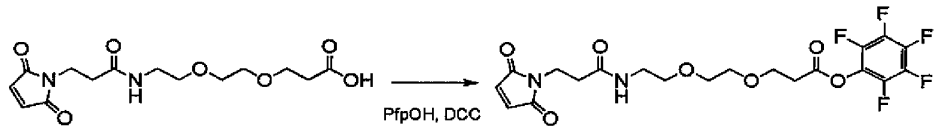
配列番号：２７（８．１）（７３０ｍｇ）を、無水のジメチルホルムアミド（８ｍｌ）中に溶解し、そしてＮ-メチルモルホリン（０．０５ｍｌ）を加えた。未希釈のビス-ｄＰＥＧ$_5$-ＯＰｆｐ試薬（８．２）（０．５ｍｌ）のアリコートをガラスバイアル（２０ｍｌ）中に入れた。激しく撹拌しながら、配列番号：２７／ＮＭＭ溶液を、４×２ｍｌのアリコートでビス-ｄＰＥＧ$_5$-ＯＰｆｐ試薬に２時間かけて加え、次いで最終混合物を更に１時間撹拌した。配列番号：２７-Ｋ^{11}-５ＰＥＧ-ＰＦＰ生成物への転換の進行を分析用ＨＰＬＣによってモニターした。反応の終りに、溶液を濾過し、そして２．５４ｃｍ（１”）のＣ８カラムの準分離用ＨＰＬＣによって直接精製した。最も純粋な画分（分析用ＨＰＬＣによって＞９５％）を混合し、そして凍結乾燥して、４００ｍｇ（４８％収率）の最終ＡＢＰ-１-５ＰＥＧ-ＰＦＰペプチドリンカー-２生成物を得た。類似の機構を、配列番号：２７-Ｋ（ＳＨ）^{11}-マレイミド-２ＰＥＧ-ＰＦＰを産生するために使用することができる（スキーム４参照）。

【０３８３】

マレイミド-２ＰＥＧ-ＰＦＰの合成

【０３８４】

【化８４】



スキーム ９　マレイミド－dPEG2－酸(９．１)→マレイミド－2PEG－PFP(９．２)

【０３８５】

マレイミド-ｄＰＥＧ$_2$-酸（３２８ｍｇ、１ｍｍｏｌ、Ｑｕａｎｔａ Ｂｉｏｄｅｓｉｇｎ）、ペンタフルオロフェノール（０．１０３ｍｌ、１ｍｍｏｌ、ＰＦＰ）及びジシクロヘキシルカルボジイミド（２０６ｍｇ、１ｍｍｏｌ、ＤＣＣ）を、乾燥ＤＣＭ（１０ｍｌ）中に溶解し、そして１時間室温で撹拌した。形成した微細な白色の沈殿物（ＤＣＵ副産物）を濾過によって除去し、そして濾液を乾燥状態まで真空中で蒸発した。生成物を微細な白色の粉末として高い収率（４９０ｍｇ、定量的）で得た。純度は、分析用ＨＰＬＣによって＞９５％であった；ＭＳは、$[M+H]^+$ ＝４９５を示した。

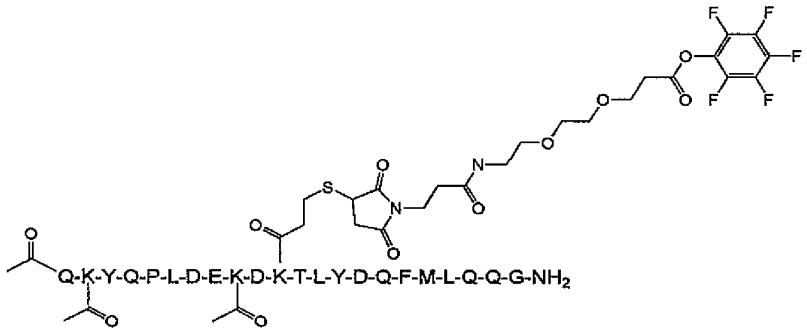
【０３８６】

ＰＦＰで活性化されたＡＢＰ類似体の合成

精製されたＡＢＰ-チオール中間体（即ち、連結残渣としてＫ（ＳＨ）を伴うＡＢＰ）のそれぞれの試料（３０-４０ｍｇ）を、無水のＤＭＦ（２ｍｌ）中に溶解した。Ｍａｌ-ＰＥＧ$_2$-ＰＦＰ（２０ｍｇ）を、Ｎ-メチルモルホリン（５ｍＬ）と共に加えた。反応物を撹拌し、そして生成物の形成の時間経過を追跡するために室温でモニターした。出発ペプチドのＰＦＰで活性化されたＡＢＰ生成物への完全な転換は、最初の２時間で観察された。溶液を濾過し、そして生成物のピークを、準分離用ＨＰＬＣによって直接単離した。それぞれの場合、凍結乾燥後、生成物を概略４０％の収率で単離した。

【０３８７】

【化８５】

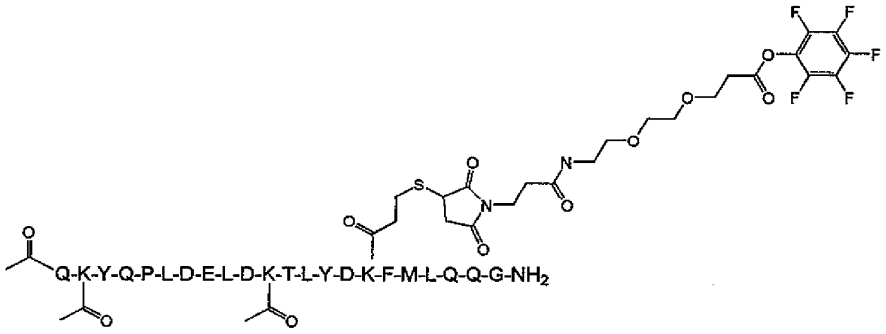


【０３８８】

配列番号：２７-Ｋ（ＳＨ）^{11}-ＭＡＬ-２ＰＥＧ-ＰＦＰ：２１ｍｇ、

【０３８９】

【化８６】

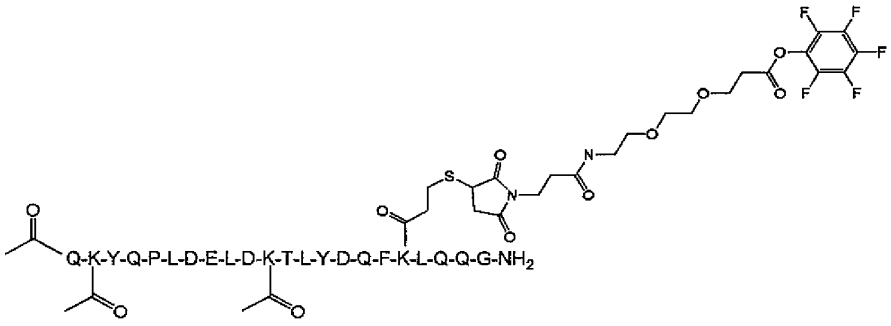


【０３９０】

配列番号：３０－Ｋ（ＳＨ）^{16}－ＭＡＬ－２ＰＥＧ－ＰＦＰ：６ｍｇ、

【０３９１】

【化８７】

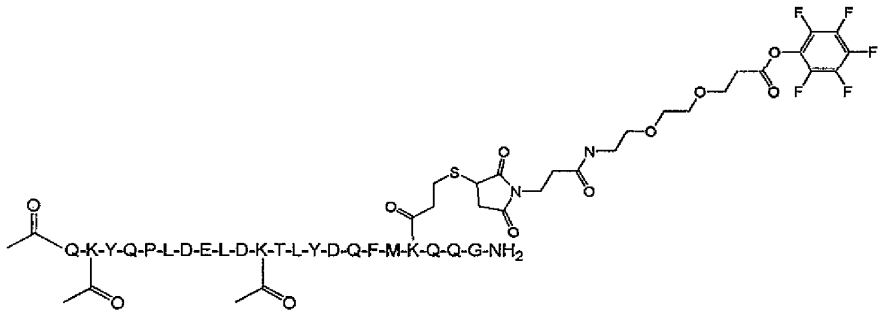


【０３９２】

配列番号：３１－Ｋ（ＳＨ）^{18}－ＭＡＬ－２ＰＥＧ－ＰＦＰ：９ｍｇ、

【０３９３】

【化８８】



【０３９４】

配列番号：３２－Ｋ（ＳＨ）^{19}－ＭＡＬ－２ＰＥＧ－ＰＦＰ：１２ｍｇ。

【実施例１０】

【０３９５】

実施例１０　抗体の結合

ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２薬物の生成物を、２．１２．１．ｆｘをＡｎｇ２結合ペプチドと共役することによって製造した。ＭＡＣ－１は、配列番号：２７－Ｋ（ＳＨ）^{11}－ＭＡＬ－２ＰＥＧ－ＰＦＰを伴う２．１２．１．ｆｘを含んでなり、そしてＭＡＣ－２は、配列番号：２７－Ｋ^{11}－５ＰＥＧ－ＰＦＰを伴う２．１２．１．ｆｘを含んでなる。それぞれのＭＡＣの試料中の２．１２．１．ｆｘ分子当たりのペプチド共役の数を計算し

た（表１参照）。

【０３９６】

【表１】

	共役付加 (CA) (%)					
	0	1	2	3	4	平均 CA
MAC-2	2	20	47	26	5	2.12
MAC-1	3	26	42	25	3	1.97

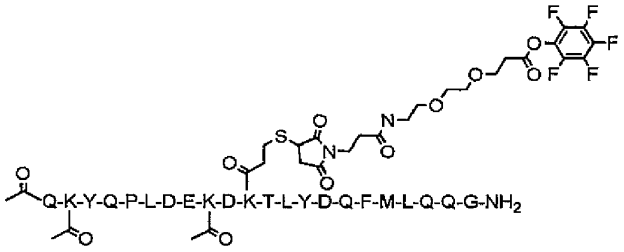
表1： MAC－1及びMAC－2の共役特性

【０３９７】

ＭＡＣ－１の産生

【０３９８】

【化８９】



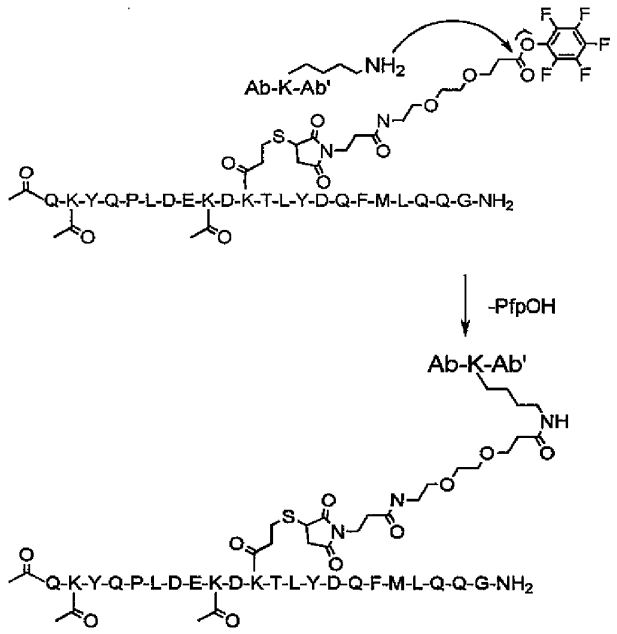
【０３９９】

配列番号：２７－Ｋ（ＳＨ）[11]－ＭＡＬ－２ＰＥＧ－ＰＦＰ。

【０４００】

OnCusp
Ex. 1002

【化９０】



MAC-1

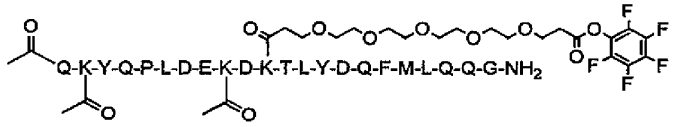
スキーム １０　配列番号：27－Ｋ（ＳＨ）[11]－ＭＡＬ－２ＰＥＧ－ＰＦＰの抗体（Ａｂ－Ｋ－Ａｂ）のリシン側鎖との反応：ここで、抗体は２．１２．１．ｆｘであり、ＭＡＣは、ＭＡＣ－１である。

【０４０１】

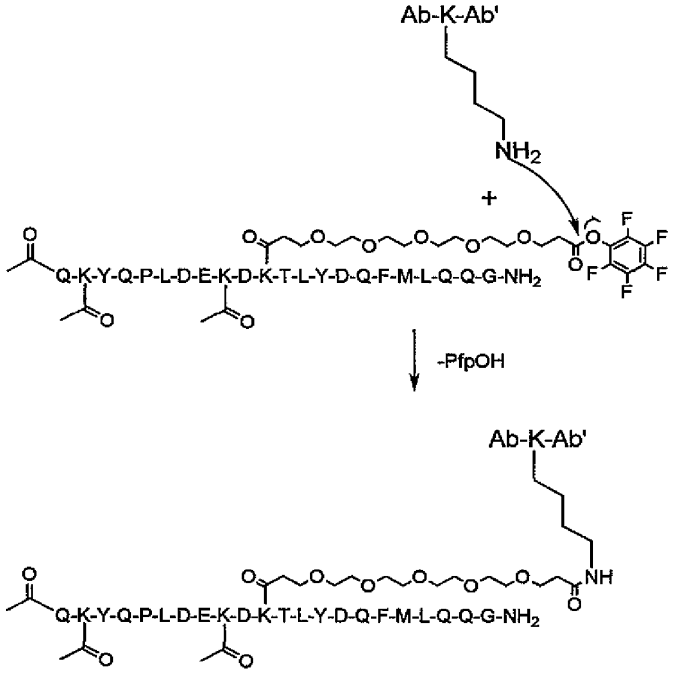
ＭＡＣ－２の産生

【０４０２】

【化９１】



配列番号：27-K^{11}-5PEG-PFP



MAC-2

スキーム 11：配列番号：27－K^{11}－5PEG－PFPの抗体（Ab－K－Ab）のリシン側鎖との反応：ここで、抗体は2. 12. 1. fxであり、MACは、MAC－2である。

【実施例１１】

【０４０３】

実施例１１　ＰＦＰベースの共役のための条件の最適化

方向性共役のための最適反応条件を確立するために一連の実験を行った。それぞれの反応の共役の終了時に、反応をコハク酸塩及びグリシン緩衝液でクエンチし、ｐＨを概略５．５に低下し、そしていずれもの遊離ペプチド又はペプチド／リンカーをクエンチした。ＭＡＣ－２の分析を、ＭＡＣのインタクトな分子量（ＭＷ）を、エレクトロスプレー飛行時間型質量分析法検出を、続いてサイズ排除クロマトグラフィーカラムによる塩及び賦形剤からのタンパク質の分離を使用して測定することによって行った。

【０４０４】

温度

２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．７で１８ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、リン酸緩衝液で０．０６Ｍのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。ペプチド／リンカー（配列番号：２７－K^{11}　５ＰＥＧ－ＰＦＰ）を、プロピレングリコール溶液中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に４．３：１のモル比で加え、そして２時間、１８、２２、又は２５℃で反応させた。結果を表２に示す。

【０４０５】

【表２】

	CA (%)					
温度	0	1	2	3	4	平均 CA
18C	1	16	51	23	8	2.21
22C	3	15	57	21	5	2.11
25C	2	12	53	25	7	2.24

表2： 4. 3:1のペプチド:抗体における0. 06Mのリン酸塩中の反応温度

【０４０６】

反応ｐＨ

２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ６．５、６．７５、７．０、７．２５、７．５、７．７５、又は８．０で、１８ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、リン酸緩衝液で０．０６Ｍのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。配列番号：２７－Ｋ^{11}　５ＰＥＧ－ＰＦＰ（Ｌ２）を、プロピレングリコール溶液中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に４．３：１のモル比で加え、そして２時間室温で反応させた。結果を表３に示す。

【０４０７】

【表３】

	CA (%)					
pH	0	1	2	3	4	平均 CA
6.5	7	42	41	9	0	1.51
6.75	3	31	52	12	3	1.83
7.0	3	24	53	16	4	1.94
7.25	2	18	54	22	5	2.12
7.5	2	12	57	23	7	2.23
7.75	3	15	55	22	6	2.15
8.0	1	14	52	29	4	2.21

表3： 4. 3:1のペプチド:抗体における0. 06のMリン酸ナトリウム緩衝液中のpH

【０４０８】

２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．０、７．５及び８．０で、２ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、ＨＥＰＥＳ緩衝液で０．０２Ｍの最終濃度に調節した。配列番号：２７－Ｋ^{11}　５ＰＥＧ－ＰＦＰを、ＤＭＳＯ中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に５：１のモル比で加え、そして一晩室温で反応させた。結果を表４に示す。共役のレベルは、ｐＨ８．０より上で減少した。

【０４０９】

【表４】

	ABP 付加 (%)					
pH	0	1	2	3	4	平均 CA
7	2	21	41	28	4	2.03
7.5	3	22	44	26	5	2.08
8	9	30	42	17	2	1.73

表4： 5:1のペプチド:抗体における0. 02MのHEPES緩衝液中のpH

【０４１０】
結合反応の時間
２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．７で１８ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、リン酸緩衝液で０．０６Ｍのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。配列番号：２７／５ＰＥＧ-ＰＦＰを、プロピレングリコール溶液中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に４．３：１のモル比で加え、そして３０、６０、１２０、１８０、２４０、３００、又は２４００分間、室温で反応させた（表５）。
【０４１１】
【表５】

	CA (%)					
時間 (分)	0	1	2	3	4	平均 CA
30	6	38	44	13	0	1.64
60	1	22	52	21	3	2.02
120	0	15	50	29	6	2.24
180	1	12	51	31	5	2.28
240	1	9	51	33	5	2.33
300	1	9	50	35	5	2.35
2400	1	10	48	35	6	2.35

表5： 表3:4. 3:1のペプチド:抗体における0. 06Mリン酸ナトリウム緩衝液中の共役反応の時間

【０４１２】
ペプチドとタンパク質のモル比
２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．５で１８ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、ＨＥＰＥＳ緩衝液で０．２ＭのＨＥＰＥＳの最終濃度に調節した。配列番号：２７-Ｋ^{11} ５ＰＥＧ-ＰＦＰを、プロピレングリコール溶液中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に１、２、３，４、及び５：１のモル比で加え（表６）、そして少なくとも２時間、室温で反応させたが、しかし高濃度のＨＥＰＥＳ緩衝液は、共役の減少したレベルをもたらした。
【０４１３】

【表６】

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
1:1	80	20	0	0	0				0.20
2:1	60	35	5	0	0				0.45
3:1	39	49	12	0	0				0.73
4:1	27	51	19	3	0				0.98
5:1	11	47	37	5	0				1.36

表6: 0. 2MのHEPES中の1:1ー5:1のペプチドとタンパク質のモル比

【０４１４】

２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．７で１８ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、リン酸緩衝液で０．０６Ｍのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。配列番号：２７-Ｋ^{11}　５ＰＥＧ-ＰＦＰを、プロピレングリコール溶液中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド/リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に５、７、１０、１２、及び１５：１のモル比で加え（表７）、そして２時間、室温で反応させて、ＭＡＣを高いレベルの共役で産生した。

【０４１５】

【表７】

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
7:1	1	1	29	39	17	10	2	0	3.06
10:1	1	1	18	33	25	19	3	0	3.49
12:1	3	1	11	22	26	26	8	3	3.92
15:1	1	2	9	19	23	32	12	3	4.22

表7: 0. 06Mのリン酸ナトリウム中の7:1ー15:1のペプチドとタンパク質のモル比

【０４１６】

２．１２．１．ｆｘ抗体及び配列番号：２７-Ｋ^{11}　５ＰＥＧ-ＰＦＦのモル比を更に最適化するために、２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．７で１８ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、リン酸緩衝液で０．０６Ｍのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。ペプチド/リンカーを、プロピレングリコール溶液中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド/リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に２．５、２．８、３．１、３．４、３．７、４．０、４．３、又は４．６：１のモル比で加え（表８）、そして２時間、室温で反応させた。

【０４１７】

【表８】

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
2.5:1	14	53	30	4	0				1.25
2.8:1	10	45	37	8	0				1.43
3.1:1	7	39	45	8	0				1.53
3.4:1	5	40	44	11	0				1.61
3.7:1	4	25	51	15	5				1.92
4.0:1	2	26	55	15	2				1.89
4.3:1	1	24	55	16	4				1.98
4.6:1	2	19	56	19	5				2.08

表8： 0. 06Mのリン酸ナトリウム中の2. 5:1－4. 6:1のペプチドとタンパク質のモル比

【０４１８】

２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．０で、２ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、ＨＥＰＥＳ緩衝液で０．０２Ｍの最終濃度に調節した。配列番号：２７－Ｋ^{11}　５ＰＥＧ－ＰＦＰを、ＤＭＳＯ中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に、５、６、７、８、１０：１のモル比で加え、そして一晩室温で反応させた。結果を表９に示す。

【０４１９】

【表９】

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
5:1	2	21	49	24	4	0	0	0	2.07
6:1	2	15	42	32	9	0	0	0	2.31
7:1	1	11	34	42	13	0	0	0	2.57
8:1	0	9	32	42	16	1	0	0	2.68
10:1	0	4	21	47	25	4	0	0	3.07

表9： 0. 02MのHEPES中の5:1－10:1のペプチドとタンパク質のモル比

【０４２０】

各種のタンパク質濃度における２．１２．１．ｆｘの共役特性（conjugation profile）

２．１２．１．ｆｘの、各種の濃度における配列番号：２７－Ｋ^{11}－５ＰＥＧ－ＰＦＰとの共役特性を分析した。２．１２．１．ｆｘを＞５０ｍｇ／ｍＬに濃縮し、２０ｍＭの酢酸ナトリウム、ｐＨ５．５の２００ｍのトレハロースで所望の濃度に希釈し、そして６０ｍＭのｐＨ７．７のリン酸ナトリウムと混合した　配列番号：２７－Ｋ^{11}－５ＰＥＧ－ＰＦＰを５０％のプロピレングリコールで再懸濁し、そして抗体と４．３：１のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を２ｍｇ／ｍｌに希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー－質量分析法（ＳＥＣ－ＭＳ）によってインタクトな共役タンパク質として分析して、タンパク質の共役した形態の数及び量を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数の共役部位は、ペプチドの質量差によって分離される個別のシグナルとして観察される。多数の共役種の相対的な量は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表１０は、抗体の各種の濃度における２．１２．１．ｆｘのペプチドとの共役特性を示す。１０ｍｇ／ｍＬないし５０ｍｇ

／ｍＬの抗体濃度において、共役は、１．８個又はそれより大きい付加の平均で０－５個間の付加の分布で起こる。０．５ないし５ｍｇ／ｍＬの抗体濃度において、共役は、１．５個又はそれより小さい付加の平均で、０－３個間の付加の分布で起こる。

【０４２１】

【表１０】

	CA (%)						
抗体濃度 (mg/ml)	0	1	2	3	4	5	平均 CA
0.5	65	32	3	-	-	-	0.37
1	44	44	12	-	-	-	0.67
5	10	41	40	8	-	-	1.45
10	3	30	47	17	2	1	1.87
15	1	24	51	20	3	1	2.02
20	1	16	57	22	2	1	2.11
30	2	20	55	20	3	1	2.04
40	2	21	53	22	2	0	2.04
50	2	19	50	24	4	1	2.11

表10：抗体濃度の影響

【０４２２】

反応緩衝液の選択

２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．７で１８ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、炭酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、又はリン酸ナトリウム緩衝液で、０．０５Ｍのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。配列番号：２７－Ｋ^{11}－５ＰＥＧ－ＰＦＰを、プロピレングリコール溶液中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に、１、２、３、４、又は５：１のモル比で加え、そして２時間、室温で反応させた。低い反応ｐＨは、減少したレベルの共役をもたらした（表１１）。

【０４２３】

【表１１】

	CA (%)					
緩衝液	0	1	2	3	4	平均 CA
50mM 炭酸ナトリウム pH 7.4	2	24	48	26	0	1.98
50mM ホウ酸ナトリウム pH 7.0	1	17	45	31	5	2.20
50mM リン酸ナトリウム pH 7.0	10	48	38	4	0	1.36

表11：緩衝液及びpHの変更

【０４２４】

２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．５、７．７及び８．０で、１８ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、ホウ酸ナトリウム及びリン酸ナトリウム緩衝液で、０．０４Ｍの最終濃度に調節した。配列番号：２７－Ｋ^{11}－５ＰＥＧ－ＰＦＰを、プロピレングリコール溶液中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に、４．３：１のモル比で加え、そして２時間、室温で反応させた（表１２）。

【０４２５】

【表１２】

	CA (%)					
緩衝液	0	1	2	3	4	平均 CA
リン酸, pH 7.5	1	21	53	21	3	2.02
リン酸, pH 7.7	0	15	50	29	6	2.26
リン酸, pH 8.0	1	14	52	29	4	2.21
ホウ酸, pH 7.5	46	44	10	0	0	0.64
ホウ酸, pH 7.7	22	51	23	4	0	1.09
ホウ酸, pH 8.0	1	17	48	30	4	2.19

表12：緩衝液及びpHの変更

【０４２６】

２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．７で１８ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、リン酸ナトリウム緩衝液で、０．０４Ｍ、０．０６Ｍ、又は０．０８Ｍのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。ペプチド／リンカー（配列番号：２７－Ｋ^{11}　５ＰＥＧ－ＰＦＰ）を、プロピレングリコール溶液中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に４．３：１のモル比で加え、そして２時間、室温で反応させた。結果を表１３に示す。

【０４２７】

【表１３】

	CA (%)					
pH 7.7 における リン酸塩の濃度 (mM)	0	1	2	3	4	平均 CA
40	2	23	54	16	4	1.95
60	2	28	51	15	4	1.91
80	2	29	51	13	4	1.86

表13：リン酸塩の濃度

【０４２８】

共役に対する緩衝液成分の影響

プロピレングリコール：　２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．７で、１８ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、リン酸ナトリウム緩衝液で、０．０６Ｍのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節した。ペプチド／リンカー（配列番号：２７－Ｋ^{11}　５ＰＥＧ－ＰＦＰ）を、プロピレングリコール溶液（結合反応物中の５％プロピレングリコール）中で２０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に４．３：１のモル比で加え、そして更なる０ないし１５％のプロピレングリコールと混合し（５、１０、１５、及び２０％の最終プロピレングリコールのパーセント）、そして２時間、室温で反応させた。結果を表１４に示す。

【０４２９】

【表１４】

	CA (%)					
プロピレングリコールパーセント(%)	0	1	2	3	4	平均 CA
5	2	18	55	20	5	2.08
10	2	20	53	21	5	2.09
15	2	23	49	20	5	2.01
20	4	23	50	19	4	1.96

表14：０．０６Ｍのリン酸ナトリウム中のプロピレングリコールのパーセント

【０４３０】

塩化ナトリウム：２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．０で、２ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、ＨＥＰＥＳ緩衝液で０．０２Ｍの最終濃度に、０．１４Ｍの塩化ナトリウムの存在及び非存在中で調節した。配列番号：２７－Ｋ^{11}　５ＰＥＧ－ＰＦＰを、ＤＭＳＯ中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に５：１のモル比で加え、そして一晩室温で反応させた。結果を表１５に示す。共役のレベルは、塩化ナトリウムの存在中で減少する。

【０４３１】

【表１５】

	ABP 付加 (%)					
塩化ナトリウム濃度 (mM)	0	1	2	3	4	平均 CA
0	2	21	41	28	4	2.03
0.14	9	34	42	14	1	1.64

表15：０．０２MのHEPES中の塩化ナトリウムの濃度

【０４３２】

ＨＥＰＥＳ：２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．０で、２ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、ＨＥＰＥＳ緩衝液で０．２Ｍ及び０．０２Ｍの最終濃度に調節した。配列番号：２７－Ｋ^{11}－５ＰＥＧ－ＰＦＰを、５０％のプロピレングリコール中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に５：１のモル比で加え、そして２時間、室温で反応させた。結果を表１６に示す。共役のレベルは、０．２ＭのＨＥＰＥＳ緩衝液で減少する。

【０４３３】

【表１６】

	ABP 付加 (%)					
HEPES 濃度 (mM)	0	1	2	3	4	平均 CA
0.02	2	35	47	16	0	1.77
0.2	21	49	26	4	0	1.13

表16：HEPES濃度

【０４３４】

ＤＭＳＯ：２．１２．１．ｆｘ抗体を、ｐＨ７．７で、１５ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に、リン酸ナトリウム緩衝液で０．０６Ｍのリン酸ナトリウムの最終濃度に調節し、そしてＤＭＳＯを３０％の最終濃度で加えた。配列番号：２７－Ｋ^{11}－５ＰＥＧ－ＰＦＰを、プロピレングリコール溶液中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に４：１のモル比で加え、そして２時間室温で反応させた。結果を表１７に示す。

【０４３５】
【表１７】

	ABP 付加 (%)					
DMSO パーセント	0	1	2	3	4	平均 CA
0	3	28	49	14	6	1.92
30	8	28	32	22	10	1.98

表17: 0. 06Mのリン酸ナトリウム中のDMSO

【０４３６】
結合（共役）反応のパラメーターの考察
エフェクター分子（この実施例の場合、ペプチド）と抗体のモル比が、約３．５：１より低く減少した場合、共役のレベルは、表８に示すように減少する。別の場合として、表９は、モル比を増加することが、増加したレベルの共役をもたらすことを示す。抗体当たりのペプチドの数を増加することは、一般的にその抗原（この場合ＩＧＦ１Ｒ受容体）に対する抗体（この場合２．１２．１　ｆｘ）の結合効率を減少し、従って、ペプチドと抗体のモル比は、抗体－抗原、及びペプチド－同族の結合の両方を最大にするように最適化された。
【０４３７】
共役緩衝液を変更することは、共役パターンを変更することができることも更に見出された。アミンを含有する賦形剤は、これらがＰＦＰ基と反応することができるため、一般的にあまり好ましくない。炭酸塩及びホウ酸塩のような緩衝液は、共役のために使用することができるが、しかしこれらのｐＫａ（ホウ酸はｐＫａが約９並びに炭酸塩は二つのｐＫａが約６及び約１１）が、ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２のために最適として確認された７．７の共役ｐＨから離れていた（表１１）ために回避された。共役のレベルは、反応の化学的条件のみに依存的ではなく、更に時間にも基づいている。２時間後、殆どのＰＦＰで活性化されたペプチドは、抗体と反応してしまったか、又はＰＦＰＺ* は、加水分解されている（表５）。
【０４３８】
ＰＦＰで活性化されたペプチド／リンカーは、リシンの側鎖のアミノ基と急速に反応した。共役は、リン酸緩衝液中のｐＨ６．５ないし８で行われて、抗体表面のリシンの求核性の傾向を、表３及び４に示すようにその電荷（表面タンパク質上のリシンのｐＫａは約９．１ないし１１．２である）を減少することによって増加した。
【０４３９】
ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２の共役のための最適な条件は、次のように記載される：２．１２．１．ｆｘ抗体を、リン酸緩衝液で０．０６Ｍのリン酸ナトリウムの最終濃度にｐＨ７．７に調節した。ペプチド／リンカー（配列番号：２７－Ｋ^{11}－５ＰＥＧ－ＰＦＰ）を、プロピレングリコール中で１０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$に再構成した（反応物中の最終プロピレングリコール濃度は１０％）。ペプチド／リンカーを、２．１２．１．ｆｘ抗体に４．３：１のモル比で加え、そして２時間周囲の室温で反応させた。反応をコハク酸塩及びグリシン緩衝液でクエンチし、ｐＨを概略６．０に低下させ、そしていずれもの遊離のペプチドをクエンチした。幾つかの側面において、反応混合物を濃縮することができ、そしてペプチド関連種（リンカーが水溶媒との反応によって加水分解されたペプチドのような）及び反応混合物中の他の要素（ＰＦＰのような）は、例えば５０ｋＤａ膜を使用するダイアフィルトレーション、又はサイズ排除クロマトグラフィーによって、コハク酸塩、グリシン、塩化ナトリウム、及び３０ｍｇ・ｍｌ$^{-1}$でｐＨ５．５のトレハロース緩衝液に除去することができる。
【０４４０】
先に列挙した共役条件を、それぞれの工程パラメーターの範囲を決定するために変化させた。パラメーターの範囲は、共役中に起こることができる及び／又は種の集団中に１０

%より大きい変化が観察される迄拡大した可変性に基づいて設定した。表１８は、ＭＡＣ-２に対して同様な共役特性をもたらすパラメーターを要約する。

【０４４１】

【表１８】

試験されたパラメーター	試験されたパラメーターの範囲	パラメーターの好ましい範囲	最適反応条件
温度	18-25°C	18-25°C	RT
反応 pH	6.5 ないし 8.0	pH 7.25-8.0	7.7
反応時間	30-2400 分	180- 2400 分	>約 2 時間
ペプチドと抗体のモル比	2.5 ないし 4.6	3.7:1 ないし 4.3:1	4.3:1
共役反応に加えられた 2.12.1.fx 濃度	0.5 ないし 50 mg/mL	10 ないし 50 mg/mL	20mg/mL
反応緩衝液中のリン酸塩濃度	40 ないし 80mM	40-80mM	60mM
最終プロピレングリコール濃度	5 ないし 20%	5-20%	10 %

表18：MAC－2に対して最適化された工程パラメーター

【実施例１２】

【０４４２】

実施例１２　抗体上のリンカー部位

一般的に、スクアリン酸塩及びＮＨＳエステルが、ある状況において使用するためのある程度の可能性を示したが、ハロゲンフェニルエステルを含んでなるＺ* 脱離基のみが方向性の共役の一貫したレベルを示した。

【０４４３】

５個の提案されたリンカーの２個のみ（ＰＦＰエステル及びスクアリン酸塩）が、ＭＡＣの調製において好結果であった。求電子性リンカーが、一般的にペプチド（Ａｎｇ２ペプチド（ＡＢＰ）のような）の抗体（ＩＧＦ１Ｒ抗体のような）への共役を可能にするものであることを仮定したが、アゼチジノンリンカーは、受容可能な速度におけるペプチドの抗体への共役を可能にしなかった（反応は有意に過剰のアゼチジノンリンカーを要し、そして極端に遅かった）。表１９にＭＡＣの調製のために使用したそれぞれのリンカーの幾つかの考慮事項を示す。

【０４４４】

【表１９】

	PFP	スクアリン酸塩
合成の容易さ	チオール／マレイミドの使用により容易，ペプチドへの直接付加は困難	アミンとの反応で容易
リンカーの抗体表面のリシンとの反応の援助となる条件下のペプチド試薬の安定性	遊離酸への加水分解、半減期概略4時間	僅かな加水分解
形成される結合	アミド	スクアラミド
共役の速度	速い	かなり遅い
反応性の変更の容易さ	他のアルコール、例えば、NHS、HOBtの添加により容易。関連する化合物、例えば、テトラフルオロフェノールエステルは、活性が少ない。反応性の増加は、加水分解速度の増加を同時にもたらす。	フェノール上の置換のパターンを変更することによりかなり容易；PFPによる場合、更に反応性な形態は、Lys以外の抗体の他の側鎖との反応を含む副作用にさらされることができる。

表19：PFPエステル及びスクアリン酸塩による活性化法

【実施例１３】

【０４４５】

実施例１３　抗体上の共役したペプチドの位置

ＭＡＣ－２薬物生成物分子は、２．１２．１．ｆｘ抗体（α－ＩＧＦ１Ｒ－１）に、スキーム１１に記載したような５ＰＥＧ－ＰＦＰリンカーを使用して接続した１－４個の配列番号：２７分子の分布からなる。これは、サイズ排除クロマトグラフィーカラムによる塩及び賦形剤からのタンパク質分離後に、エレクトロスプレー飛行時間型質量分析検出を使用してＭＡＣ－２のインタクトな分子量（ＭＷ）を測定することによって決定された。２．１２．１．ｆｘ抗体及びＭＡＣ－２の３個のロットのインタクトな分子量（ＭＷ）を示す質量分析データを、図３に示す。図２Ａは、共役前の２．１２．１．ｆｘを示す。これは、単一のＭＷを示す均一な分子である。ＭＡＣ－２のロットは、２．１２．１．ｆｘに共役したペプチドの分布を示す；１－４個間の共役付加（ＣＡ）が観察される。それぞれの形態の相対的量は、ロット間で一貫し、そしてそれぞれのロット中の最も普通の形態は、それぞれの個々の２．１２．１．ｆｘ抗体に接続された２個のペプチド（配列番号：２７）を有する。

【０４４６】

２．１２．１．ｆｘ抗体中のジスルフィド結合を還元することによって、軽及び重鎖を別個に観察することができる。ジスルフィドの還元は、インタクトな２．１２．１．ｆｘ抗体を２０ｍＭのトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）で処理することによって行われる。得られた重及び軽鎖の混合物を、先に記載したようにインタクトな分子量のために分析する。図３に示したデータは、２．１２．１．ｆｘ上のＡＢＰの位置に対する証拠を提供する。ＭＡＣ－２のロット中の軽鎖の大部分（＞６５％）は、共役している。殆どの共役した軽鎖は、１個のＣＡを含有する。２個のＣＡも低いレベルで更に観察される。殆ど全ての観察された重鎖（＞９０％）は、非修飾であり、これは、非常に僅かな共役したペプチドが重鎖上に位置することを示唆している。

【０４４７】

ペプチドマッピングを、共役の正確な位置を決定するために使用した。この方法は、次のとおりであった：ＭＡＣ－２のアリコートを８Ｍのグアニジン塩酸塩で変性し、ジスルフィド結合をＴＣＥＰで還元し、そして得られたシステインスルフヒドリルをヨードアセトアミドでアルキル化する。次いでこの処理されたタンパク質の試料を、プロテアーゼキモトリプシン（１：１２５のプロテアーゼ：ＭＡＣの重量比）で消化した。次いで得られ

たキモトリプシンペプチドを、Ｃ８液体クロマトグラフィーカラムによる分離後、質量分析によって個別に検出した。この技術により、ＭＡＣ－２は、キモトリプシンによって、重及び軽鎖上で図４中の配列中に注記された（黒丸で）位置において断片に消化された。次いでそれぞれのペプチドのＭＷの液体クロマトグラフィー－質量分析（ＬＣ－ＭＳ）検出を使用して、どのリシン残基が共役ペプチドによって修飾されたかを決定した。断片が共役ペプチドの接続によって修飾された場合、そのＭＷはそれに応じて変化する。

【０４４８】

重鎖の断片Ｙ１、Ｙ６、Ｙ９、Ｙ１０、Ｙ２０、Ｙ２５、Ｙ２６、Ｙ２９、Ｙ３２、Ｙ３３、Ｙ３４、Ｙ３７、Ｙ４０及びＹ４３は、Ｌｙｓ残基を含有する。これらの中で、ペプチドの共役は、Ｙ６、Ｙ１０、Ｙ２５、Ｙ３３、及びＹ３７において検出された。軽鎖の断片Ｙ３、Ｙ１０、Ｙ１１、Ｙ１２、Ｙ１３、Ｙ１４、Ｙ１５、及びＹ１６は、Ｌｙｓ残基を含有する。これらの中で、共役は、Ｙ３、Ｙ１３、及びＹ１５において検出された。

【０４４９】

Ｙ１５と呼ばれる軽鎖断片（軽鎖上のＮ末端から１５番目のキモトリプシン断片）は、図５に示したデータに基づき共役していることが見いだされた。ＭＡＣの修飾されたＹ１５断片のＭＷは、明確に検出された。非共役の２．１２．１．ｆｘ試料において、修飾されたＹ１５断片の証拠は存在しなかった。非修飾のＹ１５断片は、ＭＡＣ及び２．１２．１．ｆｘの両方で観察された。この断片の大きさは、この断片の全てが非修飾の形態で存在するために、２．１２．１．ｆｘ試料において高い。この断片がＭＡＣ－２中で共役されるため、非修飾Ｙ１５の観察されるレベルは減少し、これは、図５中でより小さい面積を持つピークとして観察される。

【０４５０】

ＭＡＣ－２の軽鎖断片Ｙ１５上で観察される配列番号：２７－５ＰＥＧの共役の量は、非修飾のＹ１５の減少したピーク面積を測定することによって推定される。非共役の２．１２．１．ｆｘが、１００％を示すようにシグナル強度を正規化した後、ＭＡＣ－２の３個の独立したロットは、それぞれ１７％、２７％及び２２％の非共役のＹ１５断片を示した。

【０４５１】

ＭＡＣ試料中のＹ１５の観察された大きさを、２．１２．１．ｆｘ試料中のＹ１５の大きさに正規化した。７５－８５％間のＹ１５断片を、ＭＡＣ－２中で修飾されたと決定した。ＭＡＣ－２が殆ど１－２個の共役付加を含有することを考慮して、これは、ＭＡＣ－２中の共役の殆どが、軽鎖断片Ｙ１５の２個のＫ残基（K^{188}又はK^{190}）の一つに位置することを示唆する。２．１２．１．ｆｘの配列に関係する断片Ｙ１５の位置を、図４に示す。

【０４５２】

トリプシン酵素消化を、K^{188}及びK^{190}間を識別するために使用した（トリプシンはＫ及びＲのＣ末端に対して特異性を有する）。トリプシンは、共役したＫ残基を消化しないため、酵素的消化は、どのＫ残基が共役されるかによって異なったペプチドの長さを産生する。トリプシンで消化されたＭＡＣ－２からのＬＣＭＳデータの試験は、ペプチドが、K^{188}に特異的に接続する証拠を提供する。修飾されたK^{190}の証拠は、観察されなかった。

【０４５３】

ＭＡＣ－２を、ＴＣＥＰで還元し、そして先に記載したようにグアニジン塩酸塩で変性した。タンパク質濃度を、２ｍｇ／ｍｌに、そしてｐＨを７．８にトリス消化緩衝液で調節した。精製したトリプシンを、１：１２５のプロテアーゼ：ＭＡＣの重量比で加え、そして３０℃で４時間インキュベートした。試料を、ＬＣＭＳによって分析するまで、－２０℃で保存した。断片の試料を、Ｃ１８逆相カラムで、水／アセトニトリル＋０．１％ＴＦＡの移動相を使用して分離した。断片の検出を、２１４ｎｍのＵＶ及びＥＳＩ－ＴＯＦ質量分析の両方によってモニターした。全てのデータの解析を、ＭａｓｓＬｙｎｘソフト

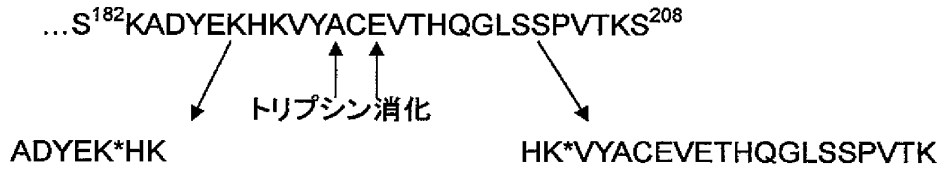
ウェアを使用して行った。

【０４５４】

ＭＡＣ－２のトリプシン消化による断片の形成は、ペプチド共役の部位に依存する。リシンは、共役のために標的とされる残基である。図２－５に示したデータは、ペプチド結合の支配的な部位が、K^{188}又はK^{190}のいずれかであることを示す。以下のスキームは、K^{188}又はK^{190}における共役によって起こるトリプシン消化反応を示す。

【０４５５】

【化９２】

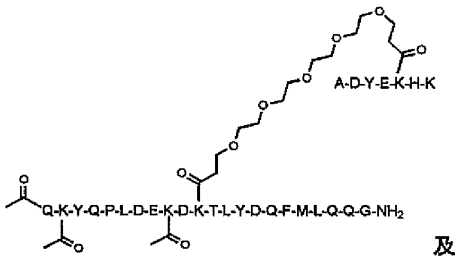


【０４５６】

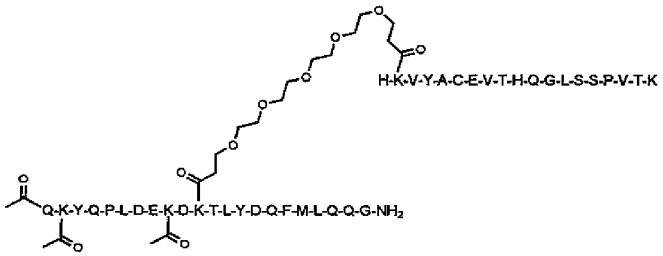
問題となっている二つの潜在的な消化断片の化学構造は以下のとおりである：

【０４５７】

【化９３】



及び



【０４５８】

図６は、K^{188}が、ペプチドに共役した場合のトリプシンペプチドに対する選択されたイオンのＬＣＭＳクロマトグラムデータを示す。図７は、K^{190}が、共役したペプチドで修飾された場合のトリプシン断片に対する選択されたイオンのＬＣＭＳクロマトグラムデータを示す。これらのデータは、単独のK^{188}のみが共役されることを示唆する；この状況は、ＭＡＣ－２中で検出されるが、しかし２．１２．１．ｆｘ対照実験において非存在である有意なシグナルをもたらす。K^{190}における修飾からの結果は、負の対照と比較して独特であるいずれものデータを提供しない。

【０４５９】

予測できるものとは対照的に、ペプチド／リンカーは、２．１２．１．ｆｘの軽鎖のK^{188}（配列番号：１５のK^{80}）を優先的に装飾するように見受けられる。これは、２．１２．１．ｆｘ抗体のＦｃ部分が、影響されていないという驚くべき利点を有する。試験は、得られたＭＡＣ－２のＰＫが、非共役の２．１２．１．ｆｘのＰＫと概略等しいことを示す。抗体上の多数の部位に対する乱雑な非特異的共役は、より低いＰＫを持つ生成物をもたらすことができる。ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２によって例示される本発明の方向

性共役は、より低いＰＫを含む乱雑な非特異的共役によって起こされることができる可能な有害な影響の幾つかを最小にする利益を提供する。

【０４６０】

この方法の再現性を確立するために、実験を繰り返した。ＭＡＣ－２を２ｍｇ／ｍｌに希釈し、そしてインタクトな共役タンパク質として、サイズ排除クロマトグラフィー－質量分析（ＳＥＣ－ＭＳ）によって分析して、タンパク質の共役形態の数及び量を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数の共役部位が、共役されたペプチド／リンカーの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数の共役種の相対的な定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われた。図８は、代表的なＭＡＣ－２のスペクトルを示す；定量化のために使用された計算を、表２０に示す。インタクトなＭＡＣ－２に対する平均共役付加は、次：ＳＵＭＰＲＯＤＵＣＴ（共役付加の数（ＣＡ）、ＣＡ当たりパーセント）の式を使用して、２．１１と計算される。この例は、０－４個間のペプチド付加の分布として起こるペプチドの共役を示し、最大の形態は、２個のペプチド付加であり、そしてペプチド付加の平均数は２．１１である。多数の個体による再現分析は、共役の特性が一貫し、そして再現可能であることを示す。

【０４６１】

【表２０】

共役付加	予測質量	強度	パーセント
0	149210	1615	1%
1	152350	20533	17%
2	155490	69395	56%
3	158630	27708	22%
4	161770	4818	4%
		124069	100%

表20：共役付加の加重平均:2.11

【０４６２】

ペプチド結合（共役）の程度を、２．１２．１．ｆｘの軽及び重鎖で別個に試験した。ＭＡＣ－２を変性し、そしてジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩及びジチオトレイトールを使用して還元した。得られた遊離の軽及び重鎖を、ＬＣＭＳを使用して分析して、それぞれの共役特性を決定した。図９は、それぞれの鎖の代表的なスペクトルを示す；定量化のために使用した計算を、表２１に示す。還元された重鎖ＭＡＣ－２に対する平均共役付加（平均ＣＡ）は、次：ＳＵＭＰＲＯＤＵＣＴ（共役付加の数（ＣＡ）、ＣＡ当たりパーセント）の式を使用して、０．１４と計算され、そして還元された軽鎖ＭＡＣ－２に対する平均ＣＡは、０．８６と計算された。これらのデータは、共役の位置が軽鎖においてより高いことを証明する；軽鎖上の最も豊富な形態は、一つのペプチド付加を含有し、そして軽鎖は、平均０．８６個のペプチド付加を含有する。重鎖上の共役は、有意に低いレベルで観察される。多数の個体によるこの実験の再現分析は、共役の特性が一貫し、そして再現可能であることを示す。

【０４６３】

【表２１】

質量 (Da)	共役付加	種	強度	パーセント	平均 CA
51020	0	HC	102093	86%	
54165	1	HC + (1x) ABP-1	16204	14%	
		HC 合計	**118297**	**100%**	**0.14**
23584	0	LC	19752	21%	
26729	1	LC + (1x) ABP-1	68757	72%	
29874	2	LC + (2x) ABP-2	6561	7%	
		LC 合計	**95070**	**100%**	**0.86**

表21：共役の特異的位置を確認するMAC－2のペプチドマッピング評価

【０４６４】

ＭＡＣ－２を、ジチオトレイトールで還元し、そしてシステイン残基を、ヨードアセトアミドによるカルボキシメチル化によってアルキル化した。キモトリプシンをタンパク質分解消化のために使用した。溶液中の消化された断片を、液体クロマトグラフィー　質量分析（ＬＣＭＳ）を使用して分析した。個々の断片をＣ１８のＨＰＬＣカラムで分離し、そしてその正確な質量を四重飛行時間（Ｑ－ＴｏＦ）質量分析器で測定した。得られた断片の質量を使用して、非修飾の断片又は共役ペプチドで修飾された断片を確認した。この実験は、リシン残基を含有するキモトリプシン断片に焦点を当てることによって、これらがペプチド共役のための可能な部位であると解釈された。表２２は、全てのこのような断片の列挙を示す。空白の項目は、この技術を使用して検出されない断片である。ペプチド修飾物質を伴って観察された検出された断片は、共役の潜在的部位であると考えられる。

【０４６５】

表１６の表の項目を以下に説明する：

・　断片番号：Ｎ末端からのキモトリプシン断片番号；連結された断片（即ち、Ｙ１－２）は、欠損した開裂部位を示す。

【０４６６】

・　始点／終点：Ｎ末端からの断片位置の番号。

・　ペプチド質量（Ｄａ）：ダルトンで記載された断片の理論的質量。

・　保持時間（対照／分析物）：ＬＣＭＳ断片マッピング実験におけるクロマトグラフーの保持／溶出の時間。

【０４６７】

・　ＭＳシグナル強度（対照／分析物）：ＭＳによって観察された観察シグナルの大きさ。

・　質量誤差－ｐｐｍ（対照／分析物）：断片の理論値対観察質量の比較；＞１０、そして特にゼロ（０）に近い値は、良好な質量の精度を示す。

【０４６８】

・　修飾物質：断片に対する潜在的共有付加；Ｌｙｓ残基のペプチド－抗体結合断片、ＣＡＭ－システイン残基のカルボキシメチル化。

・　星印は、それぞれの断片の修飾された（例えば、共役された）変種を示す。

【０４６９】

・　Ｐｅｐは、共役されたペプチドを示す。

Ｙ１５断片へのペプチドの方向性共役は、共役レベルを定量化することによって示される。次の分析は、２．１２．１．ｆｘ基準生成物のペプチドマッピング実験中に共役を有することが観察されたそれぞれのペプチド断片に対して行われた。共役された基準生成物（ＭＡＣ－２）と比較した、非共役対照（２．１２．１．ｆｘ抗体骨格－共役無し）中の非修飾ペプチドに対して観察されたシグナル強度の比を、表２３に示す。それぞれの試料の同じペプチドの直接の比較が可能であるため、非修飾シグナルが使用される。例えば、非共役ペプチドは、－（１）の比をもたらす、対照対生成物試料の同じ観察されたシグナル強度を有することが予測されるものである。共役は、生成物試料中の非修飾ペプチドの

観察される量の減少をもたらすものであり、これは、－（１）より大きい比によって示されるものである。表２３のデータは、対照及び生成物間の試料並びに実験の変動を補正するために更に正規化される。表２３は、軽鎖ペプチドＹ１５が、それぞれの他の共役されたペプチドより有意に高いレベルで共役されることを示す。これは、共役が、方向性の様式で起こり、そしてＫ残基間に無作為に分布されないことを示唆する。

【０４７０】

【表２２－１】

断片番号	始点	終点	ペプチド質量 (Da)	保持時間		MS シグナル強度		質量誤差(ppm)		修飾物質
				対照	分析物	対照	分析物	対照	分析物	
Y1	1	27	2617.3533							
Y1-2	1	29	2865.4695							
Y5-6	34	47	1657.8398							
Y6	37	47	1253.688	19.2	19.2	516640	583534	1.9	-1.1	
Y6-7	37	50	1602.8518	22.1	22.1	26537	37988	-1.6	-2.2	
Y6-7*	37	50	3295.7017		21.8		6316		-19.4	Pep(1)
Y8-9	51	68	1931.9337	16.5	16.5	60894	85742	-2.2	0.4	
Y9	61	68	878.461	11.3	11.3	376224	412997	0	-1	
Y9-10	61	80	2241.1501							
Y10	69	80	1380.6997	13.3	13.3	261813	299847	-1.1	0.7	
Y10*	69	80	3073.5498		23.4		6350		-8.7	Pep (1)
Y10-011	69	94	2972.4661							
Y19-20	111	157	4748.2773							
Y20	116	157	4160.0405							
Y20-21	116	166	5202.5527							
Y20-21*	116	166	5316.5957	34.1		6445		0.5		CAM(2)
Y24-25	202	245	4702.2109							
Y25	207	245	4151.9722							
Y25*	207	245	4437.0796	20.9	20.9	1495322	1800079	1.1	-3.1	CAM(5)
Y25*	207	245	6129.9297		24.4		6652		-4.5	CAM(5) Pep(1)
Y25-26	207	279	7985.9092							
Y26	246	279	3851.9478							
Y26-27	246	281	4152.0698							

表22 MAC－2重鎖参考生成物のペプチドマッピングの特徴

【０４７１】

【表２２－２】

				保持時間		MSシグナル強度		質量誤差(ppm)		
断片番号	始点	終点	ペプチド質量 (Da)	対照	分析物	対照	分析物	断片番号	始点	終点
Y28-29	282	300	2245.1128							
Y29	283	300	2082.0493	14.6	14.6	20665	16662	-0.6	-3.8	
Y29-30	283	304	2531.2405							
Y31-32	305	323	2241.1907							
Y32	318	323	722.3599	7.9	7.9	93966	96639	0.1	2.6	
Y32	318	323	722.3599	17.7	18.4	37943	12802	11.4	30.6	
Y32	318	323	722.3599	18.4		11761		23.8		
Y32-33	318	353	4028.188							
Y33	324	353	3323.8386	20		5422		3.1		
Y33*	324	353	3380.8601	19.7	19.7	2196329	2497507	-2.5	-3.1	CAM(1)
Y33*	324	353	5073.71		24		5973		1.3	CAM(1) Pep(1)
Y33-34	324	376	5883.1577							
Y34	354	376	2577.3293							
Y34-35	354	385	3637.8159							
Y34-35*	354	385	3694.8374	33	32.9	10095	20682	1.9	-2.4	CAM(1)
Y36-37	386	408	2527.0808							
Y37	396	408	1394.6388	19.6	19.6	62942	71902	-0.9	-0.4	
Y37-38	396	409	1541.7072	25.1	25.1	827336	878570	0	-1.9	
Y37-38*	396	409	3234.5571		29.7		7749		-5.3	Pep(1)
Y39-40	410	421	1494.8195							
Y40	412	421	1218.672	15.8	15.8	77917	88243	-0.3	-1.6	
Y40-41	412	427	1891.9905	20.3	20.3	107513	149676	0.2	-2	
Y42-43	428	450	2525.1792							
Y43	441	450	1016.5502							

表22（続き） MAC－2重鎖参考生成物のペプチドマッピングの特徴

【０４７２】

【表２２－３】

断片番号	始点	終点	ペプチド質量 (Da)	保持時間 対照	保持時間 分析物	MSシグナル強度 対照	MSシグナル強度 分析物	質量誤差(ppm) 断片番号	質量誤差(ppm) 始点	終点
Y2-3	36	49	1688.9725	16.2	16.2	145374	170451	-1.7	-2.6	
Y2-3*	36	49	3381.8225		24.2		7192		-9.2	Pep(1)
Y3	37	49	1525.9093	15.5	15.5	331068	393638	-2.7	-2.9	
Y3*	37	49	3218.7593		24		28193		-9	Pep(1)
Y3-4	37	62	2882.6355							
Y9-10	88	116	3244.729							
Y10	99	116	1871.0992							
Y10-11	99	139	4331.335							
Y11	117	139	2478.2463		22.8		47035		-5.9	
Y11-12	117	148	3635.8445							
Y12	140	148	1175.6088							
Y12-13	140	173	3886.8245							
Y13	149	173	2729.2263	13.1	13.1	1140556	1218022	-1.1	0.1	
Y13*	149	173	4422.0762		21.4		8424		-6.5	Pep(1)
Y13-14	149	186	4095.9243							
Y14	174	186	1384.7086							
Y14-15	174	192	2169.1318							
Y15	187	192	802.4337	7.5	7.5	275639	62720	-1.9	-0.2	
Y15*	187	192	2495.2837		20.9		936267		-9.8	Pep(1)
Y15-16	187	209	2574.29							
Y16	193	209	1789.8668	18.7		5400		4.4		
Y16*	193	209	1846.8883	18.1	18.1	169490	235914	-1.7	-2.5	CAM(1)
Y16-17	193	214	2349.0842	17.8		9211		0.1		

表22 MAC－2経鎖参考生成物のペプチドマッピングの特徴

【０４７３】

【表２３】

断片	非修飾強度比: 対照/分析物- 正規化済
軽鎖 Y3	1.000
軽鎖 Y13	1.112
軽鎖 Y15	5.218
重鎖 Y6	0.831
重鎖 Y10	1.038
重鎖 Y25	0.988
重鎖 Y33	1.045
重鎖 Y37	1.120

表23：軽鎖上のY15断片へのペプチドの方向性共役

[実施例１３]

【０４７４】

実施例１３　Ａｎｇ１-４結合ＥＬＩＳＡ

ハイバインディングハーフウェル（Ｈｉｇｈ-ｂｉｎｄｉｎｇ　ｈａｌｆ-ｗｅｌｌ）プレートを、５０ｕｌのＰＢＳ中の組換えヒトＡｎｇ１、ヒトＡｎｇ２、マウスＡｎｇ３又はヒトＡｎｇ４（全ての試薬はＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから、２５０μｇ/ｍｌ）で被覆し、そして４℃で一晩インキュベートした。プレートを３回洗浄緩衝液（０．１％のＴｗｅｅｎ２０、ＰＢＳ、ｐＨ７．４）で洗浄し、そして１５０μｌ/ウェルのＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋで室温で１時間遮断した。プレートを３回洗浄緩衝液で洗浄した。洗浄後、調製した投与溶液（範囲：０．００５-５０，０００ｎｇ/ｍｌ）をプレートに加え、そして１時間インキュベートして、プレート上の被覆されたＡｎｇファミリーのメンバーへの化合物の結合を可能にした。それぞれのアンギオポイエチンに対する正の対照は、それぞれのファミリーメンバー（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓによって供給された）に対するモノクローナル又はポリクローナル抗体のいずれかを含んでいた。プレートを３回洗浄し、そして５０μｌのＨＲＰと共役した抗ヒトＩｇＧ（０．８μｇ/ｍＬ）（又は正の対照に対してそれぞれの種）を加え、そして室温で１時間インキュベートした。プレートを３回洗浄し、そして５０μｌ（２５μｌのＴＭＢ＋２５μｌのH_2O_2）の基質溶液を加え、そして１-５分間インキュベートした。発色を２５μｌの２ＭのH_2SO_4で停止した。４５０ｎｍのＯＤを、４５０ｎｍの補正波長で測定した。

【実施例１４】

【０４７５】

実施例１４　Ａｎｇ２の逆競合アッセイ

Ａｎｇ２の逆競合ＥＬＩＳＡのために、ヒトＴｉｅ２-Ｆｃ、アンギオポイエチン-２タンパク質、ビオチニル化抗ヒトＡｎｇ２抗体、及びストレプトアビジンＨＲＰ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）並びにＰｉｅｒｃｅからのＴＭＢ基質を使用した。ハイバインディングハーフウェルプレートを、５０μｌのＰＢＳ中のＴｉｅ２-Ｆｃ（５０ｎｇ/ウェル）で被覆し、そして４℃で一晩インキュベートした。プレートを３回洗浄緩衝液（０．１％のＴｗｅｅｎ２０、ＰＢＳ、ｐＨ７．４）で洗浄し、そして１５０μｌ/ウェルのＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋで室温で１時間遮断した。プレートを３回洗浄した。洗浄後、Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ中の５０ｎｇ/ｍｌ（０．８３ｎＭ）のＡｎｇ２の存在中の５０μｌのＡｎｇ２結合ペプチド化合物（５０ｎＭ、一連の５×希釈）を加え、そして室温で１時間インキュベートした。プレートを３回洗浄し、Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ中の５０μｌの１μｇ/ｍｌのビオチニル化抗Ａｎｇ２検出抗体を加え、そして２時間室温でインキュベートした。

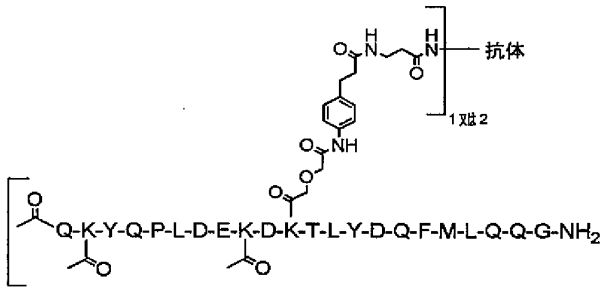
プレートを３回洗浄し、そして５０μｌのストレプトアビジンＨＲＰ（Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ中の１：２００希釈）を室温で２０分間で加えた。プレートを３回洗浄し、そして５０μｌ（２５μｌのＴＭＢ＋２５μｌのH_2O_2）の基質溶液を加え、そして２０－３０分間インキュベートした。発色を２５μｌの２ＭのH_2SO_4で停止した。４５０ｎｍのＯＤを、５４０ｎｍの補正波長で測定した。ＩＣ５０値（Ａｎｇ２－Ｔｉｅ２結合の５０％阻害）を、Ｐｒｉｓｍ４ソフトウェア中の非線形Ｓ字状用量－反応曲線フィッティング機能を使用して計算した。

【０４７６】

Ａｎｇ２－ｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ１を、ある実施例における対照として使用した。Ａｎｇ２－ｈ３８Ｃ２の産生及び構造は、ＷＯ２００８０５６３４６中の化合物４３として完全に記載され、その内容、化合物４３の産生に関する側面に対する特別な言及は、本明細書中に組込まれる。簡単には、構造は、以下：

【０４７７】

【化９４】



【０４７８】

のとおりであり、式中、そしてリンカーは、抗体の結合部位のK^{99}（Ｋａｂａｔ番号によりK^{93}）のε－アミノ基に共有的に接続し、そして抗体は、ｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ１（配列番号：５１及び５２）（ＷＯ２００８／０５６３４６の配列番号：１８９及び配列番号：１９０）である。

【実施例１５】

【０４７９】

実施例１５　ＩＧＦ１Ｒ競合アッセイ

ＩＧＦ１Ｒ競合ＥＬＩＳＡのために、組換えヒトＩＧＦ１Ｒ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ビオチニル化ＩＧＦ１（ＧｒｏＰｅｐ　Ｌｔｄ．）ストレプトアビジン－ポリ－ＨＲＰ２０（ＳＤＴ）、Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ、及びＴＭＢ基質（Ｐｉｅｒｃｅ）を使用した。ハイバインディングハーフウェルプレートを、５０ｕｌのＰＢＳ中のＩＧＦ１Ｒ（６２．５ｎｇ／ウェル）で被覆し、そして４℃で一晩インキュベートした。プレートを３回洗浄緩衝液（０．１％のＴｗｅｅｎ２０、ＰＢＳ、ｐＨ７．４）で洗浄し、そして１５０μｌ／ウェルのＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋで室温で１時間遮断した。プレートを３回洗浄緩衝液で洗浄した。洗浄後、Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ中の１００ｎｇ／ｍＬ（１３．３ｎＭ）のビオチニル化ＩＧＦ１の存在中の５０μｌのＩＧＦ１Ｒ結合化合物（１μＭ、一連の５×希釈）を加え、そして室温で１時間インキュベートした。プレートを３回洗浄し、そして５０μｌのストレプトアビジン－ポリ－ＨＲＰ２０（Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ中の１：５０００希釈）を室温で２０分間で加えた。プレートを３回洗浄し、そして５０μｌ（２５μｌのＴＭＢ＋２５μｌのH_2O_2）の基質溶液を加え、そして５－１０分間インキュベートした。発色を２５μｌの２ＭのH_2SO_4で停止した。４５０ｎｍのＯＤを、４５０ｎｍの補正波長で測定した。IC_{50}値（ＩＧＦ１とＩＧＦ１Ｒの結合の５０％阻害）を、Ｐｒｉｓｍ４ソフトウェア中の非線形Ｓ字状用量－反応曲線フィッティング機能を使用して計算した。

【実施例１６】

【０４８０】

実施例１６　ＩＧＦ１誘導ＩＧＦ１Ｒ自己リン酸化阻害アッセイ

ＩＧＦ１Ｒ自己リン酸化阻害アッセイのために、ヒトＩＧＦ１Ｒを発現するように操作されたマウス３Ｔ３細胞を使用し、そしてリン酸化を、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのホスホ-ＩＧＦＩ受容体β（Ｔｙｒ１１３１）サンドイッチＥＬＩＳＡキット＃７３０２によって決定した。ヒトＩＧＦ１Ｒを発現しているインタクトな細胞を、９６ウェルの組織培養処理丸底プレート中に播種し（５．０×１０^{4}細胞／ウェル）、そして５０μｌの増殖培地（３７℃、５％CO_2、１０％のＦＢＳ、２ｍＭのＬ-グルタミン、ペニシリン-ストレプトマイシン、及び５００μｇ／ｍＬのジェネチシンを伴うＤＭＥＭからなる培養培地）中で一晩付着させた。１６時間後、増殖培地を吸引によって除去し、そしてウェル当たり５０μｌの１００ｎｇ／ｍＬ（１３．３ｎＭ）の組換えヒトＩＧＦ１の存在中のＩＧＦ１Ｒ結合化合物（１ｍＭ、一連の8×希釈）を含有する新しい増殖培地を加え、そして１０分間室温でインキュベートした。プレートを液体を吸引により除去し、そしてウェル当たり１００μｌの氷冷のＰＢＳを加えることによって洗浄した。冷ＰＢＳを直ちに吸引して除去し、そして６０μＬの溶菌緩衝液（溶菌緩衝液で開始、全ての以下の試薬は、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによって製造された、チロシン１１３１におけるＩＧＦ１Ｒのリン酸化を定量するために設計された商業的キットの一部として供給された）を、それぞれのウェルに加え、そして振盪しながら室温で１０分間インキュベートした。次いでプレートを４℃で５分間遠心した。次いで上清（ウェル当たり５０μｌ）を除去し、そしてホスホ-ＩＧＦ１受容体ベータ（Ｔｙｒ１１３１）ウサギ抗体で事前被覆され、そしてウェル当たり５０μｌの試料希釈物を含有する９６ウェルプレートに加えた。プレートを一晩１６時間穏やかに振盪しながら４℃でインキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄緩衝液で４回洗浄し、そして１００μＬのヒトＩＧＦ１受容体検出抗体（マウス由来）を、それぞれのウェルに１時間で３７℃で加えた。プレートを洗浄緩衝液で４回洗浄し、そして１００μＬのＨＲＰと連結したマウスＩｇＧ二次抗体を、それぞれのウェルに３０分間で３７℃で加えた。プレートを４回洗浄し、そして１００μＬのＴＭＢ基質をそれぞれのウェルに加え、そして３０分間インキュベートした。発色を、５０μｌの２ＭのH$_2$SO$_4$で停止した。４５０ｎｍのＯＤを、５４０ｎｍの補正波長で測定した。ＩＧＦ１処理を伴う及び伴わない内部対照は、リン酸化現象の特異性を確認し、そして膜通過シグナル伝達の阻害％を決定した。EC_{50}値（最大半量シグナルが達成される濃度）を、Ｐｒｉｓｍ４ソフトウェア中の非線形Ｓ字状用量-反応曲線フィッティング機能を使用して計算した。

【実施例１７】

【０４８１】

実施例１７　ＩＧＦ１Ｒ下方制御アッセイ

ＩＧＦ１Ｒの下方制御のために、ヒト大腸腺癌Ｃｏｌｏ２０５細胞を使用し、そしてＩＧＦ１Ｒの細胞表面の発現を、フローサイトメトリーによって決定した。増殖培地（ＲＰＭＩ、１０％胎児ウシ血清、グルタミン）中の5×１０^{4}細胞／ウェルを蒔かれた組織培養９６ウェルプレートを、化合物の滴定で３時間３７℃で処理した。細胞をＰＢＳで洗浄し、ＣｅｌｌＳｔｒｉｐｐｅｒで取出し、そして新しい９６ウェルプレートに移した。細胞を、２．５％の胎児ウシ血清を伴うＰＢＳで３回洗浄した。細胞を、フィコエリトリンと共役したマウスモノクローナル抗-ヒトＩＧＦ１Ｒ（Ｒ＆Ｄ　ＦＡＢ３９１Ｐ、１０μｌ／5×１０^{5}細胞）と共に暗所で１時間インキュベートした。次いで細胞を、３回、２．５％の胎児ウシ血清を伴うＰＢＳで洗浄した。細胞表面上のＩＧＦ１Ｒの存在を、ＦＡＣＳアレイを使用するフローサイトメトリーによって決定し、そしてデータをＦｌｏＪｏソフトウェアで解析した。受容体の数を、ＱｕａｎｔｉＢＲＩＴＥ　ＰＥビーズ（ＢＤ　３４０４９５）を使用して発生した標準曲線に、データを適合させることによって計算した。データを、負の対照のｈＩｇＧ２に対する試験化合物による下方制御のパーセントとして報告した。

【０４８２】

結果及び考察

ヒトＡｎｇ２に特異的に結合するＭＡＣ－２の能力を、図１０に示す。ＭＡＣ－２及びＡｎｇ２－ｈ３８ｃ２は、ヒトＡｎｇ２に結合することが可能であったが、しかしヒトＡｎｇ１、ヒトＡｎｇ４又はマウスＡｎｇ３には可能ではなく、Ａｎｇ２に対して高い特異性を示し、そして他のアンギオポイエチンファミリーのメンバーに対しては示さなかった。

【０４８３】

ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２は、Ａｎｇ２競合アッセイ（図１１及び表２４）に示すように、Ａｎｇ２を結合することが可能であり、そしてＴｉｅ２への結合を防止した。驚くべきことに、Ａｎｇ２－ｈ３８ｃ２との比較において、ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２の両方は、Ａｎｇ２を競合的に結合する能力の増加を示した。共役したＭＡＣが結合し、そしてＡｎｇ２のＴｉｅ２への結合が阻害されたことを確認した後、ＩＧＦ１が、ＩＧＦ１Ｒに結合することに対して競合する能力を、ＩＧＦ１Ｒ競合アッセイ（図１２）によって決定した。ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２は、ＩＧＦ１Ｒ結合に対してＩＧＦ１と競合するために、親の抗－ＩＧＦ１Ｒ抗体（２．１２．１．ｆｘ）のように効率的であった。ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２は、低いナノモルの範囲のIC_{50}値を示した。対照的に、ある他の抗－ＩＧＦ１Ｒ抗体による試験において、ペプチドの共役は、ＩＧＦ１Ｒと相互作用する抗体の能力と干渉することが観察された（データは示していない）。

【０４８４】

競合アッセイにおいて観察されたＩＧＦ阻害を、ＩＧＦ誘導のシグナル伝達現象を阻害することに翻訳することを確認するために、細胞ベースの機能アッセイを使用して、ＩＧＦ刺激後のＩＧＦ１Ｒの自己リン酸化の阻害を決定した（図１３及び表２４）。ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２は、親の抗－ＩＧＦ１Ｒ抗体（２．１２．２、ｆｘ）と、同様な活性を有していた；従って、制約されたＡｎｇ２ペプチドの共役は、ＭＡＣの自然の結合及び阻害を変化しないように見受けられる。

【０４８５】

ＩＧＦ１Ｒの自己リン酸化を阻害することに加えて、抗－ＩＧＦ１Ｒ抗体は、更にＩＧＦ１Ｒの内部移行及び分解を起こし、受容体の下方制御をもたらす。この行動は、処理の２時間内に観察され、そして２４時間維持される。ＭＡＣを、ヒト大腸腺癌細胞系Ｃｏｌｏ２０５上のＩＧＦ１Ｒレベルを下方制御する能力に対して試験した。細胞を、３時間培養液中でＭＡＣ化合物の滴定により処理した。細胞を収集し、そしてＩＧＦ１Ｒの表面発現をフローサイトメトリーによって決定した。負の対照のｈＩｇＧ２と比較したＩＧＦ１Ｒの下方制御のパーセントを決定した（表２４）。ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２は、親のＩＧＦ１Ｒ抗体（２．１２．１．ｆｘ）と同様なＩＧＦ１Ｒ下方制御活性を有する。

【０４８６】

【表２４】

	Ang2 IC_{50} (nM)	IGF1R IC_{50} (nM)	IGF1R リン酸化 IC_{50} (nM)	下方制御された IGF1R %
MAC-1	0.092 ± 0.049	5.1 ± 1.1	150.7 ± 59.6	43 ± 5
MAC-2	0.057 ± 0.022	6.1 ± 1.1	91.4 ± 40.2	50 ± 5
2.12.1.fx 抗体	決定せず	3.8 ± 0.8	48.7 ± 14.0	48 ± 3
Ang2-h38c2-IgG1	0.582 ± 0.242	決定せず	決定せず	決定せず

表24：IGF1R及びAng2を結合及び調節するMAC－1並びにMAC－2の能力

【０４８７】

抗体当たり２個のペプチドを共役することがＩＧＦ１Ｒの自己リン酸化及び下方制御を行うことに関して理想的であり、そして抗体当たり２個より多い又は少ないペプチドの共役が、これらの機能をＭＡＣが行う能力を減少することを示した。

【０４８８】
ＩＧＦ１Ｒ活性を調節するための２．１２．１．ｆｘの能力に対する、抗体当たりのペプチドの数の影響を評価するために、ＭＡＣ－１の２種類の試料を調製し、ここで、反応条件は、共役を減少する（低ＭＡＣ－１）か、又は共役を増加する（高ＭＡＣ－１）かのいずれかを提供するように設定された（表２５）。試料を、ＩＧＦ１Ｒを下方制御及びリン酸化する能力に対して分析した（表２５）。ＩＧＦ１Ｒ経路を効率よく調節するための高ＭＡＣ－１の、低ＭＡＣ－１と比較した能力に、有意な差が存在する。抗体当たり約２個より多いペプチドの共役は、抗体当たり約２個又はそれより少ないペプチドの共役と比較して、ＩＧＦ１Ｒの自己リン酸化を阻害する及びＩＧＦ１Ｒの下方制御を誘導するの両方に対するＭＡＣの機能の活性を制約する。従って、一つの二重機能性成分中の二つの異なった生物学的経路を効率よく調節するために、（ペプチド及び標的の薬物動態によるが）抗体当たり約２個のペプチドの共役が理想的であるかもしれない。
【０４８９】
【表２５】

	Ang2 IC_{50} (nM)	下方制御された IGF1R%	リン酸化 IGF1R IC_{50} (nM)	CA (%)						平均 CA
				0	1	2	3	4	5	
低 MAC-1	0.103	32±1	12.8	14	42	32	12	0	0	1.42
高 MAC-1	0.035	9±2	>300	0	4	19	41	32	5	3.18
2.12.1.fx	決定せず	36±3	3.5							
Ang2-h38c2-lgG1	0.252	決定せず	決定せず							

表25：高MAC－1及び低MAC－1の解析

【実施例１８】
【０４９０】
実施例１８　Ｉｎ　ｖｉｖｏの薬物動態
プロトコル
マウス及びサルの血清中の血清ＭＡＣレベルを測定するために、検証された直接結合の酵素結合免疫吸着検定（ＥＬＩＳＡ）法を使用した。簡単には、試料中のＭＡＣを、ＩＧＦＲ１又はＡｎｇ２と結合させ、これを、マイクロタイタープレートに受動的に吸着させ、そしてホースラディッシュペルオキシダーゼと共役した抗－ヒトＩｇＧを、発色性基質と共に使用して、血清試料中のＭＡＣ－２の濃度に比例するシグナルを発生させる。マウス血清中のＭＡＣ－２の定量化の上限及び下限は、２６．０及び１０００ｎｇ／ｍｌであり、そしてカニクイザルの血清中では、５２．０及び２０００ｎｇ／ｍｌである。
【０４９１】
Ａｎｇ２及びＩＧＦ１Ｒの逆ＥＬＩＳＡ
ハイバインディングハーフウェルプレートを、５０μｌのＰＢＳ中のＩＧＦ１Ｒ（６２．５ｎｇ／ウェル）又はＡｎｇ２（６．２５ｎｇ／ｍｌ）で被覆し、そして４℃で一晩インキュベートした。プレートを３回洗浄緩衝液（０．１％のＴｗｅｅｎ２０、ＰＢＳ、ｐＨ７．４）で洗浄し、そして１５０μｌ／ウェルのＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋで室温で１時間遮断した。プレートを３回洗浄緩衝液で洗浄した。洗浄後、調製した投与溶液の標準液（範囲：３．９１－５００ｎｇ／ｍｌ）及び血清試料をプレートに加え、そして１時間インキュベートして、ＭＡＣ複合体の、プレート上の被覆されたＡｎｇ２又はＩＧＦ１Ｒへの結合を可能にした。プレートを３回洗浄し、そして５０μｌのＨＲＰと共役したヤギ抗－ヒトＩｇＧ（０．８μｇ／ｍＬ）を加え、そして室温で１時間インキュベートした。プレートを３回洗浄し、そして５０μｌ（２５μｌのＴＭＢ＋２５μｌのH_2O_2）の基質溶液を加え、そして１－５分間インキュベートした。発色を２５μｌの２ＭのH_2SO_4で停止した。４５０ｎｍのＯＤを、４５０ｎｍの補正波長で測定した。ＭＡＣ複合体の血清濃度を、標準曲線を使用して計算した。ＥＬＩＳＡによって決定されたＭＡＣ複合体の濃度を、時間の関数としてプロットした。更なるデータ解析を、ＷｉｎＮｏｎｌｉｎバージ

ョン４．１（Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を使用して行って、ＭＡＣ複合体のβ半減期（Ｔ１／２）及び曲線下面積（ＡＵＣ）を決定した。

【０４９２】

マウス

ＰＫの研究を、投与の開始時の体重が概略２０－２２グラムのオスのＳｗｉｓｓ　Ｗｅｂｓｔｅｒマウス（ＣＦＷ，Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ，Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）を使用して行った。ＭＡＣ化合物を静脈内投与した。血液試料を、時点当たり４匹のマウスから、次の時点：０．０８、０．５、１、３、５、７及び２４時間に採取した。試料収集の前に、プロテアーゼ阻害剤カクテルを全ての血液試験管に加えた。血液を氷上で３０分間凝固させ、そして次いで１２０００ｒｐｍで５－１０分間４℃で遠心して、血清を収集し、そしてＥＬＩＳＡによる分析まで－８０℃で直ちに保存した。投与溶液を、Ａｎｇ２又はＩＧＦ１Ｒの逆ＥＬＩＳＡによる血清試料の分析のための標準曲線を確立するために使用した。それぞれの血清試料のアリコートを、Ａｎｇ２又はＩＧＦ１Ｒの逆ＥＬＩＳＡのいずれかによって分析した。

【０４９３】

サル

ＭＡＣ－２の薬物動態学的特性を決定した。２匹のオスのカニクイザル（Ｍａｃａｃａ　ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）を、研究において使用した；ＭＡＣ－２を、静脈内（ボーラス）注射によって１０ｍｇ／ｋｇの投与量レベルで投与した。全てのサルを、投与の一日目に、投与後５分、１５分、１時間、４時間及び８時間に、そしてその後一日二回、治療に対する何らかの反応に対して観察した。１、２、３、４、５，７及び１４日目に体重を測定し、そして記録した。血液試料を、毒物動態学的分析のために所定の時点で得て、そして血清を分離し、そして－８０℃で保存した。

【０４９４】

ＭＡＣ－２による治療に関係することができる注目すべき不都合な臨床的徴候は、研究中になかった。体重の特性は、満足であった。概略１．０ｍＬの血液試料を、それぞれのサルの大腿の静脈から時点（０．０８－５０４時間）に単純な凝固試験管に収集した。血液試料を、収集後室温で１時間静置させたままにし、そして次いで３０００ｒｐｍで１０分間４℃で遠心した。得られた血清試料を、分析に先だって概略－８０℃で保存した。

【０４９５】

結果

探索的非ＧＬＰ薬物動態（ＰＫ）研究を、オスのＳｗｉｓｓ　Ｗｅｂｓｔｅｒマウス及びオスのカニクイザルで行った（表２６及び２７）。ＭＡＣのＡｎｇ２及びＩＧＦ１Ｒ結合活性の両方を解析した。マウスにおいて、ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２は、３８３－３９７時間のベータ相半減期を持つ、親の抗－ＩＧＦ１Ｒ抗体と同様な滞留時間を示した。ＭＡＣ－１及びＭＡＣ－２Ａｎｇ２結合能力は、一回投与のＩＶ研究のマウスにおける１０５－１２０時間のベータ相半減期を持つ、Ａｎｇ２－ｈ３８ｃ２と同様な滞留時間を示した。カニクイザルにおいて、ＭＡＣ－２は、１００．４時間のベータ相半減期を持つ、親の抗－ＩＧＦ１Ｒ抗体よりわずかに短い滞留時間を示した。ＭＡＣ－２Ａｎｇ２結合能力は、９７．８時間のベータ相半減期と、Ａｎｇ２－ｈ３８ｃ２と同様な滞留時間を示した。

【０４９６】

【表２６】

化合物 (mg.Kg^{-1})	ベータ t½(時間) Ang2 部分	ベータ t½(時間) IGF1R 部分
Ang2-h38c2, (10)	95.2	--
α-IGF1R 抗体, (10)	--	390
MAC-1, (10)	105	383
MAC-2, (10)	120	397

表26：マウスに10mg／mkでIV投与されたMACの一回投与のPK

【０４９７】
【表２７】

化合物 (mg.Kg^{-1})	ベータ t½(時間) Ang2 部分	ベータ t½(時間) IGF1R 部分
Ang2-h38c2, (10) mpk	95.3	--
α-IGF1R 抗体, (5) mpk	--	146.4
MAC-2, (10) mpk	97.8	100.4

表27：カニクイザルに10mg／mkでIV投与されたMACの一回投与にPK

【実施例１９】
【０４９８】
実施例１９　Ｉｎ　ｖｉｖｏの薬理学
プロトコル
ＭＡＣ－２の抗腫瘍活性を、Ｃｏｌｏ２０５（ヒト大腸腺癌）又はＭＤＡ－ＭＢ－４３５（黒色腫）異種移植モデルで評価した。Ｃｏｌｏ２０５又はＭＤＡ－ＭＢ－４３５細胞を、１０％のＦＢＳ　ＲＰＭＩ培地で培養し、そして０．１ｍｌのハンクス平衡塩液（ＨＢＳＳ）中の3×10^{6}細胞を、生後５－７週のメスのｎｕ／ｎｕマウスの上部側腹部に皮下注射し、そして治療の開始に先立ち２００－４００ｍｍ^{3}の体積を確立させた。腫瘍が確立された後、マウスを、同一の腫瘍体積を持つ治療群（ｎ＝９－１０／群）にランダム化し、そしてＭＡＣ－２治療剤を腹腔内（ＩＰ）注射によって毎週１回投与した。組合せ研究において、更なる抗癌剤を、ＭＡＣ－２と同時に開始して毎週ＩＰ注射によって投与した。腫瘍体積をノギスを使用して週１回又は２回測定し、そして体重を、治療期間中毎週測定した。幾つかの研究において、ベヒクル治療の対照群の腫瘍体積が２０００ｍｍ^{3}に達した時点で、全てのマウスをCO_2窒息によって安楽死させ、そして腫瘍を切除し、秤量し、そして更なる組織学的及び／又は免疫化学的評価のために加工した。仮性生存研究において、それぞれの治療群の平均腫瘍体積が２０００ｍｍ^{3}を超えた時点で、マウスをCO_2窒息によって安楽死させ、そして腫瘍を切除し、そして秤量した。
【０４９９】
結果
Ｃｏｌｏ２０５（ヒト大腸腺癌）異種移植モデルで行った実験を、図１２Ａ及び１３Ａに例示する。Ａｎｇ２－ｈ３８ｃ２又は抗－ＩＧＦ１Ｒ抗体（２．１２．１．ｆｘ）の毎週の投与は、Ｃｏｌｏ２０５腫瘍の成長を阻害した。毎週投与されるＡｎｇ２－ｈ３８ｃ２及び抗－ＩＧＦ１Ｒ抗体の組合せは、Ｃｏｌｏ２０５腫瘍の成長を阻害することにおいて、更なる利点を示した。単独のＭＡＣ－２の毎週の投与は、組合せと同様な利益を示した（図１４Ａ）。別個の研究において、ＭＡＣ－２は、Ｃｏｌｏ２０５腫瘍の成長、及び最終腫瘍重量を用量依存的に阻害した（図１５Ａ、Ｂ）。
【０５００】

２８日目に、化合物で治療されたマウスを犠牲にし、そして腫瘍を切除し、そして瞬間冷凍した。ＭＡＣ－２の抗血管新生効果を評価するために、腫瘍の微小血管密度を、ベヒクル（ＰＢＳ）又はＭＡＣ－２（０．３ｍｇ／ｋｇから１０ｍｇ／ｋｇまでの用量反応範囲）で治療したＣｏｌｏ２０５大腸腺腫異種移植腫瘍の冷凍された切片に対して免疫組織化学的に評価した。腫瘍を、マウス特異的モノクローナル抗体でＣＤ３１に対して染色し、そして免疫反応性を、それぞれの腫瘍からの三つの切片の五つの部分から定量した（図１３Ｃ）。腫瘍の微小血管密度は、ＭＡＣ－２（１０ｍｇ／ｋｇ、毎週一回）によって、ベヒクル治療群との比較において、約４２％有意に減少され、ＭＡＣ－２治療の抗血管新生活性を確認した。

【０５０１】

ＭＡＣ－２が、ｉｎ　ｖｉｖｏでＡｎｇ２及びＩＧＦ１Ｒの両方を標的とするか否かを調査するために、Ａｎｇ２及びＩＧＦ１Ｒ発現レベルに対するＭＡＣ－２の効果を、ベヒクル、Ａｎｇ２－ｈ３２ｃ２、ＩＧＦ１Ｒ抗体（２．１２．１．ｆｘ）又はＭＡＣ－２（０．３ｍｇ／ｋｇから１０ｍｇ／ｋｇまでの用量反応範囲）で治療された二つの独立のＣｏｌｏ２０５異種移植腫瘍で評価した。溶菌液を冷凍された切除腫瘍から調製し、そしてＡｎｇ２及びＩＧＦ１Ｒの免疫反応性を、ＥＬＩＳＡによって定量した。Ａｎｇ２及びＩＧＦ１Ｒの免疫反応性は、ＭＡＣ－２の治療によって用量依存的様式（１、３及び１０ｍｇ／ｋｇ）で、ベヒクル治療群との比較において有意に減少した（図１４Ｂ、１５Ｄ、及び１５Ｅ）。ＩＧＦ１Ｒレベルに対するＭＡＣ－２の効果は、ＩＧＦ１Ｒ拮抗性抗体（２．１２．１．ｆｘ）に対して観察されたものと同様である（図１４Ｂ）。更に、リン酸化されたＩＧＦ１Ｒのレベルは、ＭＡＣ－２で治療されたマウスからの腫瘍中で減少された（データは示されていない）。これらに腫瘍の固定された切片の免疫蛍光も、更にＩＧＦ１Ｒ及びｐＩＧＦ１Ｒの減少を確認した（データは示されていない）。これらのデータは、ＭＡＣ－２治療が、Ｃｏｌｏ２０５異種移植モデルのＡｎｇ２及びＩＧＦ１Ｒ経路に両方に影響することを示す。

【０５０２】

三つの別個の研究において、ＭＡＣ－２治療は、ベヒクル（ＰＢＳ）、Ａｎｇ２－ｈ３８ｃ２及びＩＧＦ１Ｒ抗体（２．１２．１．ｆｘ及び２．１３．２）と比較して、継続した腫瘍阻害に導いた（図１６Ａ、１６Ｂ、１６Ｃ）。抗－ＩＧＦ１Ｒ抗体２．１３．１は、ＷＯ０２／０５３５９６中の、それぞれのシグナル配列を差引いた配列番号：４５及び配列番号：４７として記載されている。ＭＡＣ－２による腫瘍の阻害は、Ａｎｇ２－ｈ３８ｃ２及び２．１２．１．ｆｘの組合せと同様であり、そしてＡｎｇ２－ｈ３８ｃ２及び２．１３．２より更に活性である（図１６Ｃ）。ＭＡＣ－２治療は、体重増加に影響せず（データは示されていない）、そしてマウスは、研究を通して良好な健康状態であるように見受けられた。マウスのそれぞれの群の腫瘍を、疑似生存研究として２０００ｍｍ^{3}まで進行させた。Ａｎｇ２－ｈ３８ｃ２及び抗ＩＧＦ１Ｒ抗体治療群の両方は、４８日目に中止した；然しながら、ＭＡＣ－２治療（３－１０ｍｐｋ）の腫瘍は、研究を停止した９４日目においてなお２０００ｍｍ^{3}より小さかった。

【０５０３】

ＭＡＣ－２の抗腫瘍効力も、更にＭＤＡ－ＭＢ－４３５黒色腫異種移植モデルにおいて評価した。ＭＡＣ－２の毎週の投与（３及び２０ｍｇ／ｋｇＩＰ）は、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５モデルにおける腫瘍の成長の有意な４０％の減少（６７日目）をもたらした（図１７）。従って、ＭＡＣ－２は、二つの異なったヒト異種移植腫瘍モデルにおいて有意な抗腫瘍効力を示した。

【実施例２０】

【０５０４】

実施例２０　各種の抗体のペプチド共役特性

幾つかの異なった抗体のペプチドとの共役特性を、配列番号：２７及び５ＰＥＧをそれぞれ例示的ペプチド及びリンカーとして使用して解析した。全ての試験された抗体は、十分に確認され、そして特徴付けされた抗原相互作用を持つヒト又は完全にヒト化されたＩ

ｇＧ抗体であった。ｈＡｂλテストは、ＣＬλを含んでなり、一方、２．１２．１．ｆｘ、ｍＡｂκテスト１、ｈ２８Ｃ２-ＩｇＧ１（配列番号：５１及び５２）及びｈ３８Ｃ２-ＩｇＧ２（配列番号：５３及び５４）は、それぞれＣＬκを含んでなる。それぞれの抗体を、２０ｍＭのｐＨ７．０のＨＥＰＥＳに緩衝液交換し、そして５-２０ｍｇ／ｍＬに濃縮した。配列番号：２７／Ｋ[11]-５ＰＥＧ-ＰＦＰを、５０％のプロピレングリコールで再懸濁し、そして関連する抗体と４．３：１のモル比で混合し、そして少なくとも２時間室温で反応させた。全ての試料を２ｍｇ／ｍｌに希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー-質量分析（ＳＥＣ-ＭＳ）によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数のペプチド共役部位は、結合したペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表２２は、各種の抗体のペプチド共役特性を示す。

【０５０５】

ＣＬκを含有する抗体に対して、ペプチド共役は、０-４個間のペプチド付加の分布で起こり、最大の形態は２ないし３個のペプチド付加である。対照的に、ＣＬλを含んでなる抗体、ｈＡｂλテストに対して、ペプチドの共役は、０-４個間のペプチド付加の分布で起こり、最大の形態は、１又は２個のペプチド付加である。

【０５０６】

ペプチド共役の程度を、軽及び重鎖で別個に行った。それぞれの試料を変性し、そしてジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩及びジチオトレイトールを使用して還元した。得られた遊離の軽及び重鎖を、ＬＣＭＳを使用して分析して、それぞれの共役特性を決定した。各種の抗体の軽及び重鎖上のペプチド共役特性を、表２８に示す。２．１２．１．ｆｘ及びｈＡｂκテスト１において、データは、共役の位置が軽鎖において高いことを示す；軽鎖上の最も豊富な形態は、一つ（１個）のペプチド付加を含有する。重鎖上の共役は、有意に低いレベルで観察される。ｈ３８Ｃ２-ＩｇＧ１及びｈ３８Ｃ２-ＩｇＧ２において、共役の匹敵するレベルが軽及び重鎖上で観察され、軽鎖上に僅かな共役の優先性がある。ＣＬλを含有する抗体（ｈＡｂλテスト）において、共役の大部分は重鎖において起こり、低いレベルの共役が軽鎖において観察された。

【０５０７】

【表２８】

	CA (%)					平均	軽鎖%CA			重鎖%CA		
抗体	0	1	2	3	4	CA	0	1	2	0	1	2
2.12.1.fx	1	15	53	26	5	2.2	20	70	9	84	16	0
hAbλテスト	10	37	37	11	6	1.66	95	5	0	74	22	4
hAbκテスト1	7	10	35	27	14	2.55	11	74	14	87	13	0
h38C2 IgG1	1	3	28	55	13	2.75	49	46	4	70	30	0
h38C2 IgG2	4	6	31	44	15	2.6	61	35	4	73	27	0

表28：各種の抗体の共役特性

【０５０８】

それぞれの抗体２．１２．１．ｆｘ、ｈＡｂλテスト及びｈＡｂκテスト１を、共役過程の後に評価して、その受容体結合を保持する抗体骨格の能力に対する共役付加の効果を決定した（天然のｍＡｂと比較して）（表２９）。結果は、試験抗体へのペプチドの方向性共役が、抗体結合を変更しなかったように見受けられることを示す。

【０５０９】

【表２９】

	受容体結合	
抗体	天然(IC_{50}, nM)	共役後(IC_{50}, nM)
2.12.1.fx	3.2	5.7
hAbλテスト	0.4	1.7
hAbκテスト１	59	53

表29：共役の前後の天然の抗原への抗体の結合

【実施例２１】

【０５１０】

実施例２１　ＩｇＧ２－κの代表的抗体のペプチド共役特性

ＩｇＧ２－κ抗体（ｈＡｂκテスト２）の、３９－マーペプチドによる共役特性を解析した。抗体を８ｍｇ／ｍＬに濃縮し、そして緩衝されたものを、ｐＨ８．０の４０ｍＭのＨＥＰＥＳに交換した。ペプチドを１００％のＤＭＳＯで再懸濁し、そして抗体と５．０：１のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を２ｍｇ／ｍｌに希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー－質量分析（ＳＥＣ－ＭＳ）によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数のペプチド共役部位は、ペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表３０は、３９－マーペプチドによるｈＡｂκテスト２のペプチド共役特性を示す。ペプチドの共役は、０－４個間のペプチド付加の分布で起こり、２．０３個のペプチド付加の平均であり、そしてＣＬκ－K^{188}上の方向性共役と一致する。

【０５１１】

【表３０】

		%CA					
抗体骨格	結合ペプチド	0	1	2	3	4	平均CA
hAbκテスト2	39-マーペプチド	1	22	53	18	5	2.03

表30：39－マーペプチド及びhAbκTest2の共役特性

【０５１２】

別個の実験において、３９－マーペプチドを、先に記載したように、ｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ２にＭＡＬ－２ＰＥＧ－ＰＦＰと共に、異なったモル濃度で共役させた。更に、３９－マーペプチドに対する同族受容体の結合を分析した。示した結果（表３１）は、K^{188}－ＣＬκにおける方向性共役と一致する。更に、抗体当たりのペプチドの平均数の増加は、標的に対する全体的結合を、実質的に増加しなかった。これは、抗体当たりの共役の増加が標的結合を増加することができないというある種のシナリオを示し、本発明の利点の一つを示す；抗体当たりの共役したペプチドの数の制御は、単位ペプチド当たりの最大の標的結合を達成することを援助することができる。

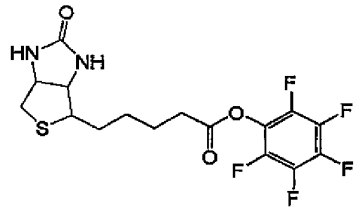
【０５１３】

【表３１】

39-マーペプチド: h38C2-IgG2 モル比	CA (%)				共役 平均数	ペプチド標的: EC50 (nM)
	0	*1*	*2*	*3*		
2:1	57	32	10	0	0.52	0.99
2.5:1	19	56	25	0	1.06	1.06
4:1	20	25	35	20	1.55	1.01
5:1	0	16	45	40	2.26	0.82

表31： 39－マーペプチド及びH38C2－IgG2の共役特性

【実施例２２】
【０５１４】
実施例２２：ビオチンの２．１２．１．ｆｘ　Ｆａｂへの共役
ビオチン－２．１２．１．ｆｘ
２．１２．１．ｆｘのＦａｂ領域（配列番号：５０及び４）の、ＰＦＰ－ビオチンとの共役特性を解析した。抗体Ｆａｂを２０ｍｇ／ｍＬに濃縮し、そして緩衝されたものを、ｐＨ５．５の２０ｍＭの酢酸ナトリウム＋２００ｍＭのトレハロースに交換し、そしてｐＨ７．７の６０ｍＭのリン酸ナトリウムを添加した。ＰＦＰ－ビオチンを１００％のＤＭＳＯで再懸濁し、そして抗体と一連のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を２ｍｇ／ｍｌに希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー－質量分析（ＳＥＣ－ＭＳ）によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数の共役部位は、共役したペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表３２は、２．１２．１．ｆｘのＰＦＰ－ビオチンのモル比による共役特性を示す。共役は、モル比の増加に従って、０－２個間の付加の分布で起こる。抗体当たりの低い分子の数は、使用されたモル比に基づき、先の結果と一致する。これは、一つ又はそれより多い反応のパラメーターを変更することによって共役の量を制御するこの方法の柔軟性の有用な証明である。
【０５１５】
【化９５】



【０５１６】
ビオチン－ＰＦＰ
【０５１７】

【表３２】

			%CA				
抗体 骨格	結合 ペプチド	ペプチド:抗体 モル比	0	1	2	3	平均 CA
2.12.1.fx Fab	ビオチン-PFP	1:1	54	46	-	-	0.46
2.12.1.fx Fab	ビオチン-PFP	1.5:1	42	51	7	-	0.65
2.12.1.fx Fab	ビオチン-PFP	2:1	34	55	10	-	0.76
2.12.1.fx Fab	ビオチン-PFP	3:1	28	55	17	-	0.88
2.12.1.fx Fab	ビオチン-PFP	4:1	21	46	26	8	1.21

表32：ビオチンの2. 12. 1. fx Fabへの共役特性

【実施例２３】

【０５１８】

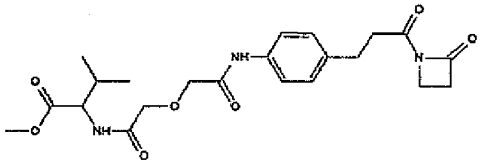
実施例２３　ビオチンのｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ１への共役

ビオチン－ｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ１

抗体ｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ１を、ｐＨ７．５のＨＥＰＥＳ緩衝液で、０．０２Ｍの最終濃度に、２０ｍｇ／ｍＬに調節した。ビオチン－ＰＦＰを、水中で１０ｍｇ／ｍＬに再構成し、そしてｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ１に５：１のモル比で加え、そして室温で２時間反応させた。未反応のＰＦＰ－ビオチンを、サイズ排除クロマトグラフィーによって除去し、そしてｐＨ６．５のヒスチジン、グリシン、及びスクロース緩衝液に緩衝液交換した。試料を２ｍｇ／ｍｌに希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー－質量分析（ＳＥＣ－ＭＳ）によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。表３３は、ｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ１のビオチン－ＰＦＰとの共役特性を示す。ｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ１の共役は、１．１個の共役の平均で、０－３個間のＣＡの分布で起こる。共役の増加は、反応条件の最適化後に可能となるものである。ｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ１上のＶＨ－Ｋ^{99}（Ｋａｂａｔ番号によればＫ^{93}）の反応性は、触媒抗体試験化合物ＣＡＴＣ－１と反応させた場合、＞９５％であることが確認され、そして逆相クロマトグラフィーによって分析された。

【０５１９】

【化９６】



【０５２０】

ＣＡＴＣ－１

ｈ３８Ｃ２－ＩｇＧ１

【０５２１】

【表３３】

抗体	0	1	2	3	平均 CA
h38C2-IgG1	16	61	20	3	1.1

表33：ビオチン及びh38C2－IgG1の共役

【実施例２４】

【０５２２】
実施例２４　２．１２．１．ｆｘ及びＫ^{188}、Ｋ^{190}変異体の共役特性
ペプチドマッピングに基づけば、Ｙ１５断片中には２個のＬｙｓが存在する。活性な共役部位を識別するために、Ｋ^{188}及びＫ^{190}を、Ｒにそれぞれ又は組合せて変異させた。変異体を、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ部位特異的変異誘発キット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）に記載されたプロトコルに従って産生した。変異を、オリゴヌクレオチドプライーマーによって誘発し、そしてＤＮＡ配列決定によって確認した。変異されたｍＡｂｓを、ＨＥＫ２９３細胞中で過渡的に発現させ、そしてタンパク質Ａ親和カラムを使用して精製した。精製したｍＡｂｓをＭＳを使用して特徴づけした。配列番号：３３、３４及び３５は、２．１２．１．ｆｘのＩＧＦ１ｒ変異体軽鎖配列を示す。

【０５２３】
抗体を、ｐＨ７．５又は６．５の０．０２ＭのＨＥＰＥＳに、２ｍｇ／ｍＬで緩衝液交換した。ｐＨが６．５の場合、次いでｐＨ７．７の６０ｍＭのリン酸ナトリウムを添加した。配列番号：２７-Ｋ^{11}-５ＰＥＧ-ＰＦＰを、５０％のプロピレングリコールで希釈し、そしてタンパク質と４．３：１のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を２ｍｇ／ｍｌに希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー-質量分析（ＳＥＣ-ＭＳ）によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数の共役部位は、結合したペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表３４は、非修飾の２．１２．１．ｆｘ、２．１２．１．ｆｘ-Ｋ^{188}Ｒ（ＬＣ：配列番号：３３）、２．１２．１．ｆｘ-Ｋ^{190}Ｒ（ＬＣ：配列番号：３４）、及び２．１２．１．ｆｘ-Ｋ^{188}Ｒ-Ｋ^{190}Ｒ（ＬＣ：配列番号：３５）の共役特性を示す。Ｋ^{188}Ｒ変異体は、減少した共役を示した。Ｋ^{190}Ｒは、未共役の２．１２．１．ｆｘと類似の共役を有していた。ＭＡＣ-２の共役は、組合せのＨＥＰＥＳ／リン酸塩緩衝液を使用するの他のアッセイで観察されたものより低かった。

【０５２４】
【表３４】

LCの配列番号:		CA (%)					
	変異体	0	1	2	3	4	平均CA
15	MAC-2	14	49	31	5	1	1.29
33	K188R	82	14	4	0	0	0.22
34	K190R	11	46	36	6	0	1.37
35	K188R / K190R	51	37	9	3	0	0.63

表34：2.12.1.fx並びにK^{188}及びK^{190}変異体の共役特性

【実施例２５】
【０５２５】
実施例２５　Ｋ^{188}に対する方向性共役の機構を解明するための２．１２．１．ｆｘ変異体
Ｋ^{188}に接近した残基を試験した。Ｈ^{189}側鎖は、Ｋ^{188}のε-アミノ基に非常に近い。Ｈｉｓは、プロトン移動反応にしばしば関係するために、Ｈ^{189}は、Ｋ^{188}共役のために必要である可能性が非常にある。Ｋ^{188}部位特異的共役におけるＨ^{189}の役割を研究するために、本出願人等は、ヒスチジンをアラニンで置換することによってイミダゾール環を除去した。

【０５２６】
Ｄ^{151}Ａ及びＤ^{151}Ａ／Ｈ^{189}Ａ変異体を、部位特異的共役におけるＤ^{151}の役割並びにＤ^{151}及びＨ^{189}の組合せ効果を研究するために製造した。
変異体を、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ部位特異的変異誘発キット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）に記載されたプロトコルに従って産生した。変異を、オリゴヌクレオチドプライーマーによって誘発し、そしてＤＮＡ配列決定によって確認した。変異されたｍＡｂｓを、ＨＥＫ２９３細胞中で過渡的に発現させ、そしてタンパク質Ａ親和カラムを使用して精製した。精製したｍＡｂｓを、ＭＳを使用して特徴づけした。次の２．１２．１．ｆｘ軽鎖変異体：Ｄ^{151}Ａ（配列番号：３６）、Ｋ^{188}Ａ（配列番号：３７）、Ｈ^{189}Ａ（配列番号：３８）、Ｋ^{190}Ａ（配列番号：３９）及びＤ^{151}Ａ／Ｈ^{189}Ａ（配列番号：４０）を産生した。
【０５２７】
それぞれの抗体を、ｐＨ５．５の２０ｍＭの酢酸ナトリウム、２００ｍのトレハロースに２００ｍｇ／ｍｌで緩衝液交換した。次いでタンパク質にｐＨ７．７の６０ｍＭのリン酸ナトリウムを添加した。配列番号：２７-Ｋ^{11}-５ＰＥＧ-ＰＦＰを、５０％のプロピレングリコールで再懸濁し、そして抗体と４．３：１のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を２ｍｇ／ｍｌに希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー-質量分析（ＳＥＣ-ＭＳ）によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数の共役部位は、共役したペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。
【０５２８】
表３５は、２．１２．１．ｆｘ、２．１２．１．ｆｘ-Ｄ^{151}Ａ、２．１２．１．ｆｘ-Ｋ^{188}Ａ、２．１２．１．ｆｘ-Ｈ^{189}Ａ、２．１２．１．ｆｘ-Ｋ^{190}Ａ、及び２．１２．１．ｆｘ-Ｄ^{151}Ａ／Ｈ^{189}Ａ変異体の共役特性を示す。方向性共役を維持したＫ^{190}Ａを除く、全ての変異体は、非修飾の２．１２．１．ｆｘ抗体と比較して、減少した平均共役レベルを示した。
【０５２９】
共役の程度を、軽及び重鎖上で別個に試験した。それぞれの試料を変性し、そしてジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩及びジチオトレイトールを使用して還元した。得られた遊離の軽及び重鎖を、ＬＣＭＳを使用して分析して、それぞれの共役特性を決定した。２．１２．１．ｆｘ及び変異体上の軽並びに重鎖上の共役特性を表３５に示す。表に記載した全ての変異体は、Ｋ^{190}Ａを除き、非修飾の２．１２．１．ｆｘと比較して軽鎖上の減少した共役レベルを示した。変異体の重鎖の共役レベルは、非修飾の２．１２．１．ｆｘと同様なレベルであった。
【０５３０】

【表３５】

LCの配列番号:	変異体	CA (%) 0	1	2	3	4	平均CA	LC CA% 0	1	2	LC平均CA-LC	HC CA % 0	1	2	HC平均CA-HC
15	MAC-2	1	15	53	26	5	2.2	23	69	8	0.85	86	14	0	0.14
36	$D^{151}A$	17	38	31	14	0	1.41	68	30	1	0.33	79	21	0	0.21
37	$K^{188}A$	56	31	10	4	0	0.61	89	11	0	0.11	91	9	0	0.09
38	$H^{189}A$	34	44	17	6	0	0.95	89	11	0	0.11	78	22	0	0.22
39	$K^{190}A$	9	7	31	37	16	2.42	8	77	15	1.06	83	17	0	0.17
40	$D^{151}A$/ $H^{189}A$	34	39	18	9	0	1.02	83	17	0	0.17	87	13	0	0.13

表35：MAC－2並びに$K^{188}A$、D^{151}及びH^{189}変異体の共役特性

【実施例２６】

【０５３１】

実施例２６　ラムダ／カッパ置換

ｈＡｂλテスト１中のＬＣλを、ＬＣκで置換して、これがＬＣ誘導体化のレベル、方向性及び／又は制御を増加するか否かを決定した。ＬＣλ／ＬＣκドメイン置換ハイブリッド構築物を、オーバーラップＰＣＲを使用して産生した。ＬＶλ及びＬＣκを、ｈＡｂλテスト及びカッパｍＡｂ軽鎖を、別個にテンプレートとして使用してＰＣＲで増幅した。これらの二つのＰＣＲ産物をテンプレートとして混合した；ｈＡｂλテスト１順方向プライマー及びＬＣκ逆方向プライマーを、オーバーラップＰＣＲ反応中で使用して、全長のｈＡｂλテストＬＶ／ＬＣκＤＮＡを増幅した。ハイブリッド抗体構築物を、ＨＥＫ２９３細胞中で過渡的に発現させ、そしてタンパク質Ａ親和カラムを使用して精製した。精製した抗体を、ＭＳを使用して特徴づけした。ｈＡｂλテストＬＣκハイブリッドは、その同族受容体に天然のｍＡｂ（ｈＡｂλテスト）と同様に結合した（表３６）。配列番号：４１、４２及び４３は、ｈＡｂλテスト、ｈＡｂλテスト-λκ（λＪを伴う）、及びｈＡｂλテスト-λκＪ（κＪを伴う）からの軽鎖定常領域である。

【０５３２】

【表３６】

hAbλテスト１変異体	LCの配列番号:	受容体結合 (IC_{50}, nM)
hAbλテスト(対照)	41	0.4
hAbλテスト-λκ	42	0.3
hAbλテスト-λκJ	43	0.3

表36：ラムダ／カッパ置換の抗体：抗原結合

【実施例２７】

【０５３３】

実施例２７　ｈＡｂλテスト１変異体：モチーフ修飾

短いモチーフ“ＫＨ”が、ＣＬλの対応する領域でＭＡＣ形成のために十分であるか否かを確立するために、ｈＡｂλテスト中の残基ＣＬλ$^{188/189}$の簡単な配列スイッチを伴う変異体を、K^{187}の傍のヒスチジンに入れるために製造し、従って“$K^{187}S^{188}H^{189}$”は、“$K^{187}H^{188}S^{189}$”となった。変異体を、Ｑｕｉｃｋ

Ｃｈａｎｇｅ部位特異的変異誘発キット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）に記載されたプロトコルに従って産生した。変異を、オリゴヌクレオチドプライーマーによって誘発し、そしてＤＮＡ配列決定によって確認した。変異抗体構築物を、ＨＥＫ２９３細胞中で過渡的に発現させ、そしてタンパク質Ａ親和カラムを使用して精製した。精製した抗体をＭＳを使用して特徴づけした。ｈＡｂλテスト-Ｓ^{188}Ｈ／Ｈ^{189}Ｓ（ＬＣ：配列番号：４４）変異体は、その受容体、並びに親ｈＡｂλテスト抗体にも結合した（表３７）。

【０５３４】

【表３７】

hAbλテスト１ 変異体	LCの配列番号:	受容体結合(IC_{50}, nM)
hAbλテスト(対照)	41	0.3
hAbλテスト-$S^{188}H/H^{189}S$	44	0.4

表37：hAbλテストー$S^{188}H／H^{189}S$

【実施例２８】

【０５３５】

実施例２８　ｈＡｂλテスト１変異体の共役特性

それぞれの抗体（ｈＡｂλテスト、ｈＡｂλテスト-λκ、ｈＡｂλテスト-λκＪ及びｈＡｂλテスト-Ｓ^{188}Ｈ／Ｈ^{189}Ｓ）を、ｐＨ５．５の２０ｍＭ酢酸ナトリウム、２００ｍのトレハロースに、２０ｍｇ／ｍｌで緩衝液交換した。次いでタンパク質にｐＨ７．７の６０ｍＭのリン酸ナトリウムを添加した。配列番号：２７-Ｋ^{11}-５ＰＥＧ-ＰＦＰを、５０％のプロピレングリコールで再懸濁し、そして抗体と４．３：１のモル比で混合し、そして一晩室温で反応させた。全ての試料を２ｍｇ／ｍｌに希釈し、そしてサイズ排除クロマトグラフィー-質量分析（ＳＥＣ-ＭＳ）によって、インタクトな共役したタンパク質として分析して、共役した形態のタンパク質の数及び定量化を決定した。この技術は、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；多数のペプチド共役部位は、ペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。多数のペプチド共役種の相対的定量化は、シグナルの大きさを測定することによって行われる。表３８は、共役の全体のレベルが、二つのＬＣがスイッチされたハイブリッド中で増加されたことを示す（λκ及びλκＪ-前者はラムダＪ断片を含み、後者はカッパＪ断片を含む）。共役レベルは、ｈＡｂλテスト対照の平均ＣＡを超えて増加し、１．６６から、それぞれ２．１９（λκ）及び２．５３（λκＪ）まで行った。変異体は、天然の配列と比較して僅かな影響を有し、単独の”ＫＨ”モチーフがＭＡＣに形成のために十分ではないことを示唆した。

【０５３６】

ペプチド共役の程度を、軽及び重鎖上で別個の試験した（表３８）。それぞれの試料を変性し、そしてジスルフィド結合をグアニジン塩酸塩及びジチオトレイトールを使用して還元した。得られた遊離の軽及び重鎖を、ＬＣＭＳを使用して分析して、それぞれの共役特性を決定した。還元分析において、天然のｈＡｂλテストのＬＣは、５％のみの１個のＣＡを有するが、然しこれは、ｈＡｂλテスト-λκにおいて５８％の１個のＣＡ及びｈＡｂλテストλκＪにおいて６３％の１個のＣＡに劇的に跳ね上がる。ＬＣスイッチは、ＨＣ共役のレベルに対して僅かな影響を有し、これは、かなり一定なままであった（ＨＣ共役が中程度に増加するλκＪを除く）。再び、変異体は、天然の配列と比較して僅かな影響を有し、単独の”ＫＨ”モチーフがＭＡＣ形成のために十分ではないことを示唆した。

【０５３７】

【表３８】

hAbλテスト変異体	LCの配列番号:	CA (%) 0	1	2	3	4	平均CA	LC CA% 0	1	2	平均CA-LC	HC CA % 0	1	2	平均CA-HC
hAbλテスト	41	10	37	37	11	6	1.66	95	5	0	0.05	74	22	4	0.3
hAbλテスト-λκ	42	3	18	43	29	7	2.19	42	58	0	0.58	78	22	0	0.22
hAbλテスト-λκJ	43	2	11	34	36	17	2.53	33	63	4	0.71	64	36	0	0.36
hAbλテスト-$S^{188}H/H^{189}S$	44	7	34	37	16	6	1.79	82	18	0	0.18	79	21	0	0.21

表38：hAbλテスト変異体の共役特性

【０５３８】

これらの共役形態の受容体結合特質を、更に評価して、共役した抗体のその受容体になお結合する能力に対する、配列番号：２７-K^{11}-５ＰＥＧ-ＰＦＰによる共役の効果を決定した（表３９）。

【０５３９】

【表３９】

配列番号:27 共役 hAbλテスト1変異体	LC配列番号:	受容体結合 (IC_{50}, nM)
hAbλテスト	41	1.7
hAbλテスト-λκ	42	1.5
hAbλテストλκJ	43	1.6
hAbλテスト1-$S^{188}H/H^{189}S$	44	1.6

表39：抗体におけるラムダの抗体:抗原結合

【実施例２９】

【０５４０】

実施例２９　異なった脱離基を使用するＭＡＣの産生

活性なエステル脱離基の活性の程度及び／又は構造が、方向性共役効果を規定することにおいて重要であるか否かを調査するために、配列番号：２７-K^{11}（ＳＨ）ＭＡＣ-２ＰＥＧ-ＰＦＰの一連の代替活性化エステル類似体を合成した。共役生成物の分布を、インタクトな複合体のＭＳによって試験し、そしてインパクトな複合体の還元及び軽及び重鎖の分離後、軽及び重鎖の両方へのペプチド付加の程度も更にＭＳによって決定した。

【０５４１】

代替活性化エステルの構造及び命名を、以下に示す。

代替活性化ペプチドを、実施例１-３に先に示したものと同じ戦略及び方法を使用して合成した。簡単には、それぞれの活性化された基を、Z^*がＰＦＰを置換する新しい脱離基であるマレイミド-２ＰＥＧ-Z^*リンカーに組込んだ。上記の化合物を合成するために、精製されたＡＢＰ-チオールペプチド（即ち、連結残基としてＫ（ＳＨ）を伴うＡＢＰ）の試料（３０-４０ｍｇ）を、無水のＤＭＦ（２ｍｌ）中に溶解した。ＭＡＬ-ＰＥＧ２-Z^*（２０ｍｇ）を、Ｎ-メチルモルホリン（５ｍＬ）と共に加えた。反応物を撹拌し、そして生成物の形成の時間経過を追跡するために室温でＨＰＬＣによってモニター

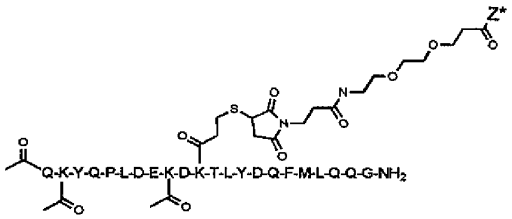
した。出発ペプチドの活性化エステルが連結したＡＢＰ生成物への完全な転換は、２－６時間内に観察された。溶液を濾過し、そして生成物のピークを、準分離用ＨＰＬＣによって直接単離した。生成物を、凍結乾燥後、概略３０－５０％の範囲の収率で単離した。

【０５４２】

結合反応を標準的な条件下で行った。簡単には、２．１２．１．ｆｘ溶液を、ｐＨ７．７のリン酸ナトリウムで０．０６Ｍの最終濃度に希釈することによって、２．１２．１．ｆｘ抗体溶液を調製した。別個に、ペプチドをプロピレングリコール中で２０ｍｇ／ｍｌに溶解し、次いでこの溶液を水で１０ｍｇ／ｍｌに希釈することによって、ペプチド溶液を調製した。結合反応のために、ペプチド及び抗体溶液を４：１のモル比で、処方された時間混合した。時間経過研究のために、結合反応の試料を、ｐＨ４．０の４０ｍＭのコハク酸、２００ｍＭのグリシン（１：１、容量／容量）の溶液と混合することによって、共役溶液の試料を各種の時点でクエンチした。結合反応の時間経過を、ＨＰＬＣによって追跡した。配列番号：２７を、例示的なペプチドとして使用した。

【０５４３】

【化９７】



【０５４４】

配列番号：２７－Ｋ[11]－ＭＡＬ－２ＰＥＧ－Ｚ*

【０５４５】

【表４０】

CA	Z1 PFP	Z2 2,3,4 TFP	Z3 2,3,6 TFP	Z4 2,3,6 TCP	Z5 2,6 DCP	Z6 2,4 DCN	Z7 5,7 DCQ	Z8 NH5 NB2, 3 DCI	Z9 2H I 1,3 D	Z10 4N P	Z11 2,6-DF P	Z12 1 NA P
0	3	32	17	100	81	38	73	34	20	41	50	100
1	34	45	43	0	19	45	25	40	36	42	39	0
2	51	20	30	0	0	16	2	18	31	15	11	0
3	12	3	11	0	0	2	0	5	12	3	0	0

表40：反応性エステル－24時間目のインタクトな複合体

【０５４６】

表４０は、結合反応の開始後２４時間目のインタクトな複合体の最終生成物分布を示す。結果は、幾つかのエステルは全く反応せず（Ｚ４、Ｚ１２）、他は緩慢に反応し（例えばＺ５）、一方幾つかはＰＦＰ（Ｚ１）のそれに近づく特性を与えた（例えばＺ３）ことを示す。

【０５４７】

共役の動態

それぞれの最終複合体に対する時間をかけた付加の速度を、表４１、４２、４３及び４４に示す。０ＣＡは、誘導体化されていない２．１２．１．ｆｘ抗体であり、一方、１、

２又は３ＣＡは、それぞれの試験された時点における２．１２．１．ｆｘ抗体への１、２又は３個のペプチドの付加である。

【０５４８】

【表４１】

0CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (時間)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 NAP
0	84	97	94	100	100	100	100	95	95	96	100	100
1	5	83	58	100	100	95	96	43	24	79	93	100
2	4	75	40	100	100	89	93	42	20	67	88	100
4	4	62	27	100	96	81	88	40	20	54	79	100
24	3	32	17	100	81	38	73	34	20	41	50	100

表41：0CAを得る異なったZ*基の共役動態

【０５４９】

【表４２】

1CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (時間)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 NAP
0	16	3	6	0	0	0	0	5	5	5	0	0
1	38	17	36	0	0	5	4	39	39	21	8	0
2	37	25	45	0	0	11	7	39	38	29	12	0
4	33	34	43	0	4	19	12	42	39	37	21	0
24	34	45	43	0	19	45	25	40	36	42	39	0

表42：1CAを得る異なったZ*基の共役動態

【０５５０】

【表４３】

2CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (時間)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 NAP
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	49	0	6	0	0	0	0	15	27	0	0	0
2	50	0	14	0	0	0	0	16	30	4	0	0
4	52	4	25	0	0	0	0	15	29	9	0	0
24	51	20	30	0	0	16	2	18	31	15	11	0

表43：2CAを得る異なったZ*基の共役動態

【０５５１】

【表４４】

3CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (時間)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 NAP
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	8	0	0	0	0	0	0	3	11	0	0	0
2	10	0	2	0	0	0	0	3	12	0	0	0
4	12	0	5	0	0	0	0	4	12	0	0	0
24	12	3	11	0	0	2	0	5	12	3	0	0

表44: 3CAを得る異なったZ*基の共役動態

【０５５２】

軽及び重鎖の分布

それぞれの代替活性化エステルに対するペプチド共役の程度を、軽及び重鎖に対して別個に試験した。それぞれの試料を変性し、そしてジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩及びジチオトレイトールを使用して還元した。得られた遊離の軽及び重鎖を、ＬＣＭＳを使用して分析して、それぞれの共役特性を決定した。２．１２．１．ｆｘの軽及び重鎖並びに変異体上のペプチド共役特性を、表４５に示す。表に記載した殆ど全ての活性化ペプチドは、ＰＦＰ（Ｚ１）を使用する化合物と比較して、同様な共役のレベルを示した２，３，６－トリフルオロフェニル（Ｚ３）を除き、軽鎖上の減少した共役レベルを示した。Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）から誘導された活性化されたエステル、即ち、Ｎ－ヒドロキシ－５－ノルボルネン－２，３－ジカルボン酸イミド及び２－ヒドロキシ－イソインドリン－１，３－ジオン（Ｚ８及びＺ９）は、重鎖の誘導体化に対してより大きい傾向を示した。

【０５５３】