

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-109988

(P2017-109988A)

(43) 公開日 平成29年6月22日(2017.6.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/04 (2006.01)</b>	C07K 7/04	4B063
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18 ZNA	4B064
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C07K 16/46	4C084
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02	4C085
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28	4H045

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-205669 (P2016-205669)  
 (22) 出願日 平成28年10月20日 (2016.10.20)  
 (62) 分割の表示 特願2013-533010 (P2013-533010) の分割  
 原出願日 平成23年10月10日 (2011.10.10)  
 (31) 優先権主張番号 61/391, 558  
 (32) 優先日 平成22年10月8日 (2010.10.8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513083369  
 ウィリアムズ, ジョン シー.  
 アメリカ合衆国 91016 カリフォルニア州 モンロビア, ステッドマン プレイス 462  
 (71) 出願人 513083370  
 ドナルドソン, ジョシュア, マイケル  
 アメリカ合衆国 08048 ニュージャージー州 ランバートン, ホープウェル アヴェニュー 8  
 (71) 出願人 513083381  
 ホルン, デヴィッド, エー  
 アメリカ合衆国 91010 カリフォルニア州 ドゥアーテ, フラワー アヴェニュー 1710

最終頁に続く

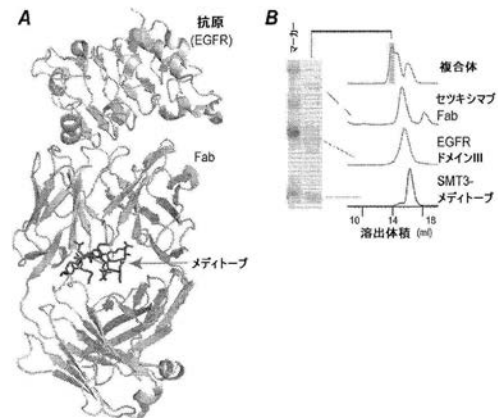
(54) 【発明の名称】 メディトープ (Meditope) のためのモノクローナル抗体フレームワーク結合インターフェース、メディトープ送達系、およびその使用方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】メディトープのためのモノクローナル抗体フレームワーク結合インターフェース、メディトープ送達系、及びその使用方法の提供。

【解決手段】特定の配列を有する環状メディトープ、cQFD及びcQYNのための抗体フレームワーク結合インターフェース、及びその使用方法。また、結合インターフェースは、抗体又はその機能性フラグメントの、相補性決定領域ではなくフレームワーク領域により形成される。他では、ヒトまたはヒト化治療用抗体は、1つ又はそれ以上のヒト・フレームワーク残基が1つ又はそれ以上の対応するマウス残基で置換され、それによってcQFD又はcQYNを有するメディトープは1つ又はそれ以上のヒト・フレームワーク残基に安定に結合できる。

【選択図】図4 A B



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列CQFDLSTRRLKC (SEQ ID NO:1)、CQYNLSSRALKC (SEQ ID NO:2)、またはその改変体を有するメディトープに結合するマウス-ヒト・キメラ抗体またはその機能性フラグメントのフレームワーク領域を含有するフレームワーク結合インターフェース。

## 【請求項 2】

メディトープは環状である、請求項 1 記載のフレームワーク結合インターフェース。

## 【請求項 3】

メディトープは直鎖状である、請求項 1 記載のフレームワーク結合インターフェース。

## 【請求項 4】

結合インターフェースはマウス-ヒト・キメラ抗体またはその機能性フラグメントのFab軽鎖およびFab重鎖の間に位置する、請求項 1 記載のフレームワーク結合インターフェース。

10

## 【請求項 5】

フレームワーク領域はFab部分から構成される、請求項 1 記載のフレームワーク結合インターフェース。

## 【請求項 6】

抗体はセツキシマブまたはその機能性フラグメントである、請求項 1 記載のフレームワーク結合インターフェース。

## 【請求項 7】

長鎖リンカー、多価スキャホールド、小化学スキャホールド、ビオチン-ストレプトアビジン、またはIgG Fcドメインのいずれか 1 つを用いて結合している 2 つまたはそれ以上のメディトープを含有する多価メディトープ連結体。

20

## 【請求項 8】

2 つまたはそれ以上のメディトープはCQFDLSTRRLKC (SEQ ID NO:1)、CQYNLSSRALKC (SEQ ID NO:2)、またはその改変体から選択される、請求項 7 記載の多価メディトープ連結体。

## 【請求項 9】

多価メディトープ連結体は 2 価、3 価、または 4 価のメディトープ連結体である、請求項 7 記載の多価メディトープ連結体。

30

## 【請求項 10】

多価メディトープ連結体は 2 つまたはそれ以上のメディトープ使用可能治療用抗体またはその機能性フラグメントを連結するために使用される、請求項 7 記載の多価メディトープ連結体。

## 【請求項 11】

多価メディトープ連結体はメディトープ使用可能モノクローナル抗体またはその機能性フラグメントの結合安定性および/または有効性を向上する、請求項 7 記載の多価メディトープ連結体。

## 【請求項 12】

メディトープ使用可能モノクローナル抗体は、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アダリムマブ、アデカツムマブ、アレムツズマブ、アトリズムマブ、ペンテト酸アルツムマブ、アナツムマブマフェナトックス、アルシツムマブ、バシリキシマブ、ベクツムマブベンラリズムマブ、カプロマブペンデチド、カツマキソマブ、セルトリズマブ、セツキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、ダクリズマブ、デノスマブ、エクリズマブ、エファリズムマブ、エトラシズマブエトルマキソマブファノレソマブ、FBTA05、フォントリズムマブ、ゲムツズマブ、ギレンツシキマブ、ゴリムマブ、イブリツモマブ、イゴボマブ、インフリキシマブ、イピリムマブ、ラベツズマブ、メポリズマブ、ムロモナブ-CD3、ナタリズムマブ、ニモツズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、オレゴモマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、チウキセタン、トシツモマブ、トラスツズマブ、TRBS07、ウステキヌマブ、ビジリズムマブ、ボツムマブ、ザルツムマブ、またはそれらの機能性フラ

40

50

グメントから選択されるメディトープ使用可能治療用抗体である、請求項 1 1 記載の多価メディトープ連結体。

【請求項 1 3】

イメージング剤、治療剤、またはその両方を更に含有する、請求項 7 記載の多価メディトープ連結体。

【請求項 1 4】

イメージング剤、治療剤、またはその両方が金属イオンに結合した金属キレート剤である、請求項 1 3 記載の多価メディトープ連結体。

【請求項 1 5】

1 つまたはそれ以上の治療物質、イメージング物質、またはそれらを組み合わせたものと共にメディトープを含有する組成物。

10

【請求項 1 6】

メディトープは配列CQFDLSTRRLKC (SEQ ID NO:1) またはCQYNLSSRALKC (SEQ ID NO:2) を含有する、請求項 1 5 記載の組成物。

【請求項 1 7】

治療物質は 1 つまたはそれ以上の小分子、化学療法剤、治療用抗体もしくはその機能性フラグメント、毒物、放射性同位体、酵素、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、RNAi 分子、キレート剤、ホウ素化合物、光反応性物質、色素、またはそれらを組み合わせたものである、請求項 1 5 記載の組成物。

【請求項 1 8】

イメージング物質は 1 つまたはそれ以上の蛍光もしくは発光物質、酵素、造影剤、放射性物質、またはナノ粒子である、請求項 1 5 記載の組成物。

20

【請求項 1 9】

治療物質はCovX-Body™を伴う、請求項 1 5 記載の組成物。

【請求項 2 0】

治療用ヒトまたはヒト化抗体を改変する方法であって、Fab中央空洞部分のヒト・フレームワーク領域内に位置する 1 つまたはそれ以上のヒト・フレームワーク残基を、配列CQFDLSTRRLKC (SEQ ID NO:1)、CQYNLSSRALKC (SEQ ID NO:2)、またはその改変体を有するメディトープが 1 つまたはそれ以上のヒト・フレームワーク残基に結合するように、対応する 1 つまたはそれ以上のマウス残基で置換することを含む、上記方法。

30

【請求項 2 1】

1 つまたはそれ以上の置換は、軽鎖のP8、V9、I10、S14、E17、Q38、R39、T40、N41、G42、S43、P44、D82、I83、A84、D85、Y86、Y87、G99、A100、G101、T102、K103、L104、E105、K107、R142、S162、V163、T164、E165、Q166、D167、S168、もしくはY173位；または重鎖のQ6、P9、R38、Q39、S40、P41、G42、K43、G44、L45、S87、D89、T90、A91、I92、Y93、Y94、W109、G110、Q111、G112、T113、L114、V115、T116、Y151、E154、P155、V156、T171、F172、P173、A174、V175、Y182、S183、もしくはL184位のフレームワーク残基である、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

1 つまたはそれ以上の置換は、セツキシマブ軽鎖のS9I、S10L、K39R、P40T、P40S、G41N、K42G、A43S、F83I、F83V、T85N、T85D、もしくはQ100A；または重鎖のA36SもしくはV89Iである、請求項 2 0 記載の方法。

40

【請求項 2 3】

置換によって、治療用ヒト抗体またはその機能性フラグメントの結合および/または治療効果を向上させる多価メディトープ連結体の結合が可能となる、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 4】

フレームワークへの結合は、メディトープとフレームワークとの間に少なくとも 1 つのジスルフィド結合または少なくとも 1 つの非天然アミノ酸との結合を伴う、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 5】

50

配列CQFDLSTRRLKC (SEQ ID NO:1)、CQYNLSSRALKC (SEQ ID NO:2)、またはその改変体を有するメディトープに結合するキメラ化マウス抗体またはその機能性フラグメントのフレームワーク結合インターフェースを有する治療用抗体を含有するメディトープ使用可能モノクローナル抗体。

【請求項 26】

結合インターフェースはキメラ化マウス抗体またはその機能性フラグメントのFab軽鎖とFab重鎖との間に位置する、請求項 25 記載のメディトープ使用可能モノクローナル抗体。

【請求項 27】

フレームワーク領域はFab部分から構成される、請求項 25 記載のメディトープ使用可能モノクローナル抗体。

10

【請求項 28】

抗体は、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アダリムマブ、アデカツムマブ、アレムツズマブ、アトリズムマブ、ペント酸アルツムマブ、アナツムマブマフェナトックス、アルシツムマブ、バシリキシマブ、ベクツムマブ、ベンラリズムマブ、カプロマブペンデチド、カツマキシマブ、セルトリズマブ、クリバツズマブテトラキセタン、ダクリズマブ、デノスマブ、エクリズマブ、エファリズムマブ、エタラシズマブ、エトルマキシマブ、ファノレソマブ、FBTA05、フォントリズムマブ、ゲムツズマブ、ギレンツシキシマブ、ゴリムマブ、イブリツモマブ、イゴボマブ、インフリキシマブ、イピリムマブ、ラベツズマブ、メポリズマブ、ムロモナブ-CD3、ナタリズムマブ、ニモツズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、オレゴモマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、チウキセタン、トシツモマブ、トラスツズマブ、TRBS07、ウステキヌマブ、ビシリズマブ、ボツムマブ、ザルツムマブ、またはそれらの機能性フラグメントである、請求項 25 記載のメディトープ使用可能モノクローナル抗体。

20

【請求項 29】

モノクローナル抗体またはその機能性フラグメントの精製法であって、

メディトープまたはメディトープ改変体を固相に結合させ；

結合したメディトープまたはメディトープ改変体を、モノクローナル抗体またはその機能性フラグメントを含有するかまたは含有する疑いのある溶液と接触させて、モノクローナル抗体またはその機能性フラグメントをメディトープに結合させる

ことを含む、上記方法。

30

【請求項 30】

モノクローナル抗体は、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アダリムマブ、アデカツムマブ、アレムツズマブ、アトリズムマブ、ペント酸アルツムマブ、アナツムマブマフェナトックス、アルシツムマブ、バシリキシマブ、ベクツムマブ、ベンラリズムマブ、カプロマブペンデチド、カツマキシマブ、セルトリズマブ、セツキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、ダクリズマブ、デノスマブ、エクリズマブ、エファリズムマブ、エタラシズマブ、エトルマキシマブ、ファノレソマブ、FBTA05、フォントリズムマブ、ゲムツズマブ、ギレンツシキシマブ、ゴリムマブ、イブリツモマブ、イゴボマブ、インフリキシマブ、イピリムマブ、ラベツズマブ、メポリズマブ、ムロモナブ-CD3、ナタリズムマブ、ニモツズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、オレゴモマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、チウキセタン、トシツモマブ、トラスツズマブ、TRBS07、ウステキヌマブ、ビシリズマブ、ボツムマブ、ザルツムマブ、またはそれらの機能性フラグメントから選択されるメディトープ使用可能治療用抗体である、請求項 29 記載の方法。

40

【請求項 31】

疾病または病態の治療、イメージング、または診断の方法であって、治療的有効量の医薬組成物を被験体に投与することを含み、医薬組成物は、抗体-メディトープ複合体；モノクローナル抗体またはその機能性フラグメントと組み合わせた多価連結剤；またはそれらを組み合わせたものを含有する、上記方法。

【請求項 32】

抗体-メディトープ複合体；モノクローナル抗体またはその機能性フラグメントと組み合

50

わせた多価連結剤；またはそれらを組み合わせたものは、疾病もしくは病態の診断もしくはイメージングのための1つもしくはそれ以上の診断剤もしくはイメージング剤、疾病を治療するための1つもしくはそれ以上の治療剤、またはそれらを組み合わせたものにコンジュゲートされている、請求項31記載の方法。

【請求項33】

治療剤は、1つまたはそれ以上の小分子、化学療法剤、治療用抗体もしくは機能性フラグメント、毒物、放射性同位体、酵素、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、RNAi分子、キレート剤、ホウ素化合物、光反応性物質、色素、またはそれらを組み合わせたものである、請求項32記載の方法。

【請求項34】

診断剤またはイメージング剤は、1つまたはそれ以上の蛍光もしくは発光物質、酵素、造影剤、放射性物質、またはナノ粒子である、請求項32記載の方法。

【請求項35】

抗体-メディトープ複合体；モノクローナル抗体もしくはその機能性フラグメントと組み合わせた多価連結剤；またはそれらを組み合わせたものは、治療用抗体単独での治療、診断、またはイメージングの有効性を向上する、請求項31記載の方法。

【請求項36】

抗体-メディトープ複合体は、メディトープおよびメディトープ使用可能モノクローナル抗体を含有し、メディトープ使用可能モノクローナル抗体またはその機能性フラグメントは、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アダリムマブ、アデカツムマブ、アレムツズマブ、アトリスマブ、ペンテト酸アルツムマブ、アナツムマブマフェナトックス、アルシツムマブ、バシリキシマブ、ベクツムマブ、ベンラリズマブ、カプロマブペンデチド、カツマキソマブ、セルトリズマブ、セツキシマブ、クリバツズマブテトラキセタン、ダクリズマブ、デノスマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、エタラシズマブ、エトルマキソマブ、ファノレソマブ、FBTA05、フォントリズマブ、ゲムツズマブ、ギレンツシキマブ、ゴリムマブ、イブリツモマブ、イゴボマブ、インフリキシマブ、イピリムマブ、ラベツズマブ、メポリズマブ、ムロモナブ-CD3、ナタリズマブ、ニモツズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、オレゴモマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、チウキセタン、トシツモマブ、トラスツズマブ、TRBS07、ウステキヌマブ、ビシリズマブ、ボツムマブ、ザルツムマブ、またはそれらの機能性フラグメントから選択される治療用抗体である、請求項31記載の方法。

【請求項37】

多価連結剤は、治療的有効量のセツキシマブを被験体に投与した後、または治療的有効量のセツキシマブを被験体に投与すると同時に投与される、請求項31記載の方法。

【請求項38】

腫瘍バイオマーカーを過剰発現する細胞を標的化する方法であって、治療的有効量のメディトープ使用可能モノクローナル抗体またはその機能性フラグメントを、メディトープ、メディトープ改変体、または多価連結剤と組み合わせ、バイオマーカーを過剰発現する、または過剰発現する疑いのある細胞集団に投与することを含む、上記方法。

【請求項39】

腫瘍バイオマーカーはEGFRであり、メディトープ使用可能モノクローナル抗体はセツキシマブである、請求項38記載の方法。

【請求項40】

メディトープ改変体の結合親和性を改変する方法であって、メディトープ改変体を1つまたはそれ以上の位置で改変して、低pHレベルでのメディトープの結合親和性を増加または低下させることを含む、上記方法。

【請求項41】

リソソーム薬剤送達を行うために、メディトープ改変体は低pHレベルにおいて低下した結合親和性を有する、請求項40記載の方法。

【請求項42】

10

20

30

40

50

腫瘍細胞への特異的結合を行うために、メディトープ改変体は低pHおよび低酸素環境において増加した結合親和性を有する、請求項40記載の方法。

【請求項43】

メディトープまたはメディトープと同様のフレームワーク結合機能性を有する小分子をスクリーニングする方法であって、

推定されるメディトープまたは小分子のライブラリーをメディトープ使用可能抗体と接触させ；

推定されるメディトープまたは小分子がメディトープ使用可能抗体にフレームワーク結合インターフェースで結合するか否かを測定し；

1つまたはそれ以上の候補となるメディトープまたはメディトープと同様のフレームワーク結合機能性を有する小分子を同定し；

1つまたはそれ以上の候補の結合親和性を測定し；そして、

結合解離定数が少なくとも $0.70\ \mu\text{M}$ である場合に、1つまたはそれ以上の候補をメディトープまたはメディトープと同様のフレームワーク結合機能性を有する小分子であると同定する

ことを含む、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権

本出願は米国特許仮出願第61/391,558号（2010年10月8日出願）（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に基づく優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

癌は、活発に免疫系を抑制することによって免疫監視を回避する。このような免疫抑制に対抗することを目的とする方法の一つは、腫瘍細胞によって特異的に発現または過剰発現される抗原のエピトープを用いるワクチン接種によるものである。例えば、シグナル伝達経路を阻害する、増殖因子を抑制する、および/または免疫応答を誘導するモノクローナル抗体（mAb）は、癌および他の疾病を治療するために臨床導入され、成果を上げてきた。その好適な特性および臨床における成果のため、mAbは、これまでも、また現在も、タンパク質工学において重点的な取り組み課題となっている。これらの取り組みにより、改善された標的化のための二重特異性mAb；向上された腫瘍浸潤性および血液クリアランスのための1本鎖Fab可変領域フラグメント（scFv）、ダイアボディ（diabody）、およびミニボディ（minibody）；そして、（変異またはグリコシル化による）免疫刺激の変更または薬物動態学的/薬力学的特性の改善を目的とした改変型Fcが開発されてきた。同様に、mAbを再設計し、送達改善のために小分子の部位特異的コンジュゲートを可能にすること（例えばThioMAB）、または、その抗原に不可逆的に結合させること（例えば無限（infinite）親和性mAb）が行われてきた。また、生体活性ペプチドおよび他の生物製剤（例えばCovXbody）の循環および提示を向上するためのmAbも開発されてきた。ヘテロ多量体scFv、または、アビジンに融合したscFvもしくはmAbも、事前標的化療法および腫瘍イメージングの検出限界向上のために開発されてきた。

【0003】

mAbは有効であり、小分子より優れた点もあるが、オフターゲット相互作用による有害な副作用または放射性核種がコンジュゲートしたmAbの長時間循環に付随する損傷のような問題点から、その有効性（向上された標的化および相乗効果など）を改善する余地がかなり残されている。従って、抗体および小分子の治療有効性の向上は、癌および他の疾病の治療に有用かつ必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

## 【0004】

## 発明の概要

抗体結合ペプチドである、C-QFDLSTRRLK-C (cQFD;SEQ ID NO:1) およびC-QYNLSSRALK-C (cQYN;SEQ ID NO:2) は、新規のmAb結合特性を有することが明らかにされた。特に、cQFDおよびcQYN (別名「メディトープ (meditope) 」) は、抗EGFR mAbであるセツキシマブのFabフレームワーク領域に結合し、抗原が結合する相補性決定領域 (CDR) には結合しないことが明らかにされた。そのFabフレームワーク上の結合領域は、他のフレームワーク結合抗原 (例えばスーパー抗原、黄色ブドウ球菌プロテインA (SpA) (Graillera, 2000) およびペプトストレプトコッカス・マグヌス (Peptostreptococcus magnus) プロテインL (PpL) (Graillera, 2001) ) とは異なっており、これまで知られていなかった。従って、第1の態様は、配列CQFDLSTRRLKC (SEQ ID NO:1) またはCQYNLSSRALKC (SEQ ID NO:2) を有する環状メディトープに結合する、ユニークなマウス-ヒト抗体またはその機能性フラグメントのフレームワーク領域を含有するフレームワーク結合インターフェースである。

10

## 【0005】

表面プラズモン共鳴によるメディトープのキャラクタリゼーションによれば、cQFDおよびcQYNは、それぞれ約0.70-0.95および2-5  $\mu$ Mの解離定数でFabに結合する。特異的相互作用が破綻するように設計した点変異により、その構造モデルが更に立証されている。FACS分析から、高濃度のcQFDメディトープ (60  $\mu$ M) によって生ずる、EGFR受容体を過剰発現するMDA-MB-468細胞へのセツキシマブの結合能の相違は、無視できる程度のものであることが明らかになった。従って、メディトープ結合は、抗原結合に影響しない。更に、メディトープを蛍光基とコンジュゲートさせたところ、セツキシマブで前処理したMDA-MB-468細胞には結合するが、マウス抗EGFR抗体 (M425) で前処理したMDA-MB-468細胞には結合しないことが明らかとなった (図29)。総合すると、これらのデータからFabフレームワーク内のメディトープ結合インターフェースが明確となり、メディトープ結合は抗原結合を阻害しない (例えばアロステリック調節剤として作用しない) ことが明らかとなる。

20

## 【0006】

別の態様では、上記の新規結合特性を有するメディトープ (例えばcQYNまたはcQFD) またはその改変体を用いて治療用モノクローナル抗体 (「mAb」) に機能性を付与することができる。更なる態様では、本明細書に記載するメディトープを使用して、治療物質、例えばモノクローナル抗体またはその機能性フラグメント、または他の物質、例えば小分子の有効性に作用を及ぼすことができる。更に別の態様では、タグまたは検出可能標識をメディトープに結合させることによって、診断または治療に使用するために特定のタイプの細胞または組織を同定することができる。

30

## 【0007】

別の態様では、メディトープはシステインを含有し、これがFabのメディトープ結合部位のシステインと共有結合を形成する。メディトープを任意の物質、分子、または化合物にコンジュゲートさせる。それらは治療用分子、例えば診断用小分子、例えばマーカーであることができる。「Cysメディトープ」は、コンジュゲートをIgGへ誘導し、共有結合を介して結合する。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0008】

【図1】セツキシマブのメディトープ・ペプチド結合フレームワーク・ループを示す。図1A: セツキシマブFab (軽鎖をV<sub>L</sub>およびC<sub>L</sub>、重鎖をV<sub>H</sub>およびC<sub>H</sub>で示す) および環状CQFDLSTRRLKC (灰色で示し、「メディトープ」と表示する部分) (SEQ ID NO:1) の複合体は、メディトープが、セツキシマブのCDRループとは異なる、Fabフレームワークのインターフェースに結合することを示している。図1Bは、cQFDメディトープを棒モデルで示したものである。図1Cは、cQYNメディトープを棒モデルで示したものである。N末端およびC末端システインは溶媒に暴露されており、高い温度因子を示す。

【図2】セツキシマブのFab結合インターフェースの態様を示す。セツキシマブはマウス

50

キメラであり、従って、マウスIg可変ドメインおよびヒト定常Igドメインを混合して有する。図2Aは、ファージ「陰性」選択(ch14.18)、およびメディトープと接触するヒト化トラスツズマブの対応する残基を示す。図2B(上段)は、セツキシマブのマウス配列にコードされる異なるポケットを占めるcQFDメディトープのArg9の立体像を示す(最前面)。トラスツズマブFab(1N8Z.pdb;後面)(Choら, 2003)を重ね合わせてある。Asp85からメディトープArg9のグアニジニウム基およびLeu10のバックボーンアミドまで塩橋がある。図2B(下段)は、Fabフラグメントを重ね合わせたものであり、メディトープ中のFによるYへのわずかな影響を示している。特に、疎水性基F/Y3 L5およびL10はほぼ同じ位置にあるが、cQYNメディトープ中のY5のヒドロキシル基は、cQFDメディトープで観察されるように、R8とQ111バックボーンとの相互作用を妨害する(「立体的衝突」)。この再配列により、回転(「バックボーン回転」)のバックボーン残基が同時に変化する。

10

【図3A】cQFDおよびcQYNとFabフラグメントとの表面プラズモン共鳴(SPR)トレースを示す二重線グラフである。結晶学的解析に使用したセツキシマブFabを、CM5チップに低密度で結合させた。cQFD(図3A)およびcQYN(図3B)メディトープの濃度を漸増した時のトレースを示す。一連のトレースは、単純な指数(例えば、シグナル= $A * \exp[kon * time]$ )を用いる単結合部位モデルにフィットさせた。それぞれの残差を下段に示す。

【図3B】cQFDおよびcQYNとFabフラグメントとの表面プラズモン共鳴(SPR)トレースを示す二重線グラフである。結晶学的解析に使用したセツキシマブFabを、CM5チップに低密度で結合させた。cQFD(図3A)およびcQYN(図3B)メディトープの濃度を漸増した時のトレースを示す。一連のトレースは、単純な指数(例えば、シグナル= $A * \exp[kon * time]$ )を用いる単結合部位モデルにフィットさせた。それぞれの残差を下段に示す。

20

【図4AB】本発明のメディトープは過去に仮定されていたようにCDRに結合するのではないことを示す。図4Aは2.0Aの結晶構造を示し、メディトープはセツキシマブFabの中央部の「穴」に結合する。抗原であるEGFRドメインIIIは、メディトープ結合部位から有意に離れた位置にある相補性決定領域に結合する。図4Bの左側にゲルの結果を、右側に関連するサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示す。個々の成分、Fab、EGFRドメインIII、およびSMT-cQFDメディトープ、並びに3つ全ての混合物のサイズ排除実験は、ヘテロ3量体複合体の形成および共溶出を示している。非還元SDS-PAGEゲルは第1に溶出された画分を示しており、混合物で観察された新規のピーク(「複合体」の最も左側の灰色で示すピーク)中に3つの成分全てが存在することを示している。図4CはFACS分析の結果を示しており、メディトープがセツキシマブの存在下でのみ、EGFR陽性MD-MBA-468細胞に結合することを示している(矢印)。メディトープ単独またはM425(マウスEGFR抗体)存在下でのメディトープは結合しない。図4Dおよび4Eは、セツキシマブのscFvを結合させたセンサーチップを用いた表面プラズモン共鳴実験の結果を示す。実験は、cQFDメディトープが、100  $\mu$ Mという高濃度でもscFvを飽和しないことを示している。セツキシマブFabを結合させたセンサーチップを用いた同じ実験では、完全な飽和を示した。この実験の解離定数は660nMであった。コントロールSPR実験は、セツキシマブscFvが可溶性EGFRドメインIIIフラグメントに容易に結合することを示しており、CDRループが機能的であることを示している。

30

【図4C】本発明のメディトープは過去に仮定されていたようにCDRに結合するのではないことを示す。図4Aは2.0Aの結晶構造を示し、メディトープはセツキシマブFabの中央部の「穴」に結合する。抗原であるEGFRドメインIIIは、メディトープ結合部位から有意に離れた位置にある相補性決定領域に結合する。図4Bの左側にゲルの結果を、右側に関連するサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示す。個々の成分、Fab、EGFRドメインIII、およびSMT-cQFDメディトープ、並びに3つ全ての混合物のサイズ排除実験は、ヘテロ3量体複合体の形成および共溶出を示している。非還元SDS-PAGEゲルは第1に溶出された画分を示しており、混合物で観察された新規のピーク(「複合体」の最も左側の灰色で示すピーク)中に3つの成分全てが存在することを示している。図4CはFACS分析の結果を示しており、メディトープがセツキシマブの存在下でのみ、EGFR陽性MD-MBA-468細胞に結合することを示している(矢印)。メディトープ単独またはM425(マウスEGFR抗体)存在下でのメ

40

50

ディトープは結合しない。図4Dおよび4Eは、セツキシマブのscFvを結合させたセンサーチップを用いた表面プラズモン共鳴実験の結果を示す。実験は、cQFDメディトープが、100 $\mu$ Mという高濃度でもscFvを飽和しないことを示している。セツキシマブFabを結合させたセンサーチップを用いた同じ実験では、完全な飽和を示した。この実験の解離定数は660nMであった。コントロールSPR実験は、セツキシマブscFvが可溶性EGFRドメインIIIフラグメントに容易に結合することを示しており、CDRループが機能的であることを示している。

【図4D】本発明のメディトープは過去に仮定されていたようにCDRに結合するのではないことを示す。図4Aは2.0Aの結晶構造を示し、メディトープはセツキシマブFabの中央部の「穴」に結合する。抗原であるEGFRドメインIIIは、メディトープ結合部位から有意に離れた位置にある相補性決定領域に結合する。図4Bの左側にゲルの結果を、右側に関連するサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示す。個々の成分、Fab、EGFRドメインIII、およびSMT-cQFDメディトープ、並びに3つ全ての混合物のサイズ排除実験は、ヘテロ3量体複合体の形成および共溶出を示している。非還元SDS-PAGEゲルは第1に溶出された画分を示しており、混合物で観察された新規のピーク（「複合体」の最も左側の灰色で示すピーク）中に3つの成分全てが存在することを示している。図4CはFACS分析の結果を示しており、メディトープがセツキシマブの存在下でのみ、EGFR陽性MD-MBA-468細胞に結合することを示している（矢印）。メディトープ単独またはM425（マウスEGFR抗体）存在下でのメディトープは結合しない。図4Dおよび4Eは、セツキシマブのscFvを結合させたセンサーチップを用いた表面プラズモン共鳴実験の結果を示す。実験は、cQFDメディトープが、100 $\mu$ Mという高濃度でもscFvを飽和しないことを示している。セツキシマブFabを結合させたセンサーチップを用いた同じ実験では、完全な飽和を示した。この実験の解離定数は660nMであった。コントロールSPR実験は、セツキシマブscFvが可溶性EGFRドメインIIIフラグメントに容易に結合することを示しており、CDRループが機能的であることを示している。

【図5】細胞カウントに対する蛍光強度のグラフであり、cQFDの存在下における蛍光標識したセツキシマブのMDA-MB468細胞への結合を示す。セツキシマブはペプチドの非存在下、および6 $\mu$ Mおよび60 $\mu$ Mのペプチドの存在下、並びにアイソタイプコントロールの存在下でMDA-MB468細胞に結合する。

【図6】メディトープおよびEGFRがどのように異なる部位に結合するかを示す。上段の図は、cQFD-Fab複合体およびEGFR-Fab複合体（1YY8）を立体的に重ね合わせたものである。下段の図は、重鎖の残基39-46がフレキシブルであり、メディトープを受容できることを示す。

【図7】Fabフレームワーク結合物質を示す。メディトープ、プロテインA、およびプロテインLに結合したFabを重ね合わせたものであり、それぞれがFab上の独自の部位に結合することを示している。

【図8】腫瘍治療向上のための1つの作用機序を示す。腫瘍細胞上に過剰発現した抗原（例えばErbB受容体ファミリー）は2価抗体に結合し（左図）、受容体シグナリングを阻害し、エンドサイトーシスおよび受容体リサイクリングを改変し、そして/または免疫応答を惹起する。多価メディトープの添加によって治療用mAbが連結/架橋され、その治療可能性を向上することができる（右）。右側に、3価メディトープから予測されるダイジチェーンの図を示す。

【図9】scFv-メディトープ・リンカーを示す。scFvを、12-20アミノ酸長のリンカー（一般的に{GGGS}<sub>3-5</sub>）を介して軽鎖可変ドメインを重鎖可変ドメインに（またはその逆で）融合させることによって作製する。

【図10】メディトープがマウス・セツキシマブに選択的に結合することを示すゲルの画像である。ビオチン化したcQFDペプチドを、アビジンを結合したビーズに添加し、完全に洗浄し、PBS中で平衡化した。次いで、セツキシマブをビーズに添加し（レーン1）、洗浄し（レーン2-4）、その後、溶出した（レーン5）。最上部のバンドはIgG重鎖であり、下部のバンドはIgG軽鎖である。

10

20

30

40

50

【図 1 1】立体的遮蔽を示す図である。メディトープを、腫瘍関連プロテアーゼ部位を含有するフレキシブル・リンカーを介してFab軽鎖または重鎖のN末端に融合させることができる。図に示すように、分子内相互作用により抗原結合部位は立体的に遮蔽される。

【図 1 2】セツキシマブ上のアビジン-ペプチド遮蔽のオフレート測定を示す。左図は、ビオチン化したcQFDメディトープの結合反応速度を、固定化したセツキシマブIgGを用いるSPRによって測定した。表面プラズモン共鳴トレースの上の図は、2価IgG上部を通過する1価メディトープを示すイラストである。右図に示すように、アビジンはビオチン化したメディトープで飽和され、同じ固定化されたセツキシマブIgG上を通過する。多価メディトープのオフレートは、少なくとも36倍低下した(2つの実験ではタイムスケールが異なることに留意されたい)。SPRトレース上部の図は、4価メディトープおよび2価IgG間の「2価-2価相互作用」を示す。

【図 1 3】いくつかの態様にかかる2量体および3量体メディトープの合成を図示する。

【図 1 4】フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識したメディトープ2量体7のキャラクタリゼーションを示す。左図は最終の2価メディトープのHPLCトレースを、右図はそのマスペクトルを示す。

【図 1 5】いくつかの態様にかかるメディトープ-Fc連結剤の核酸配列(SEQ ID NO:3)および対応するアミノ酸配列(SEQ ID NO:4)を示す。

【図 1 6】2価メディトープの構造を示す。メディトープはIgGのFc領域に直接融合したペプチドリンカーのN末端に直接融合している。Fcは天然ではホモ2量体である。従って、メディトープ-Fc構築物は2価である。

【図 1 7】代表的なFACS分析結果を示す。EGFR受容体を過剰発現するMDA-MB-468細胞を10 nMのセツキシマブで30分間前処理し、洗浄した後、4段階の濃度のメディトープ-Fc構築物または単量体メディトープで処理した。一番下のトレースは陰性コントロールである(抗体無し)。次の4つのトレースは、単量体メディトープがセツキシマブで前処理した細胞に濃度依存的に結合することを示している。上から4つのトレースは、2価のメディトープFcがセツキシマブで前処理した細胞に、濃度依存的に、しかし、より高度の親和性で結合する(例えば右にシフトする)ことを示している。これは予測されたことであり、多価相互作用と一致する。

【図 1 8】特定の態様で 사용할 ことができる、代替となるリンカー(コイルト、コイルなど)を示す。

【図 1 9】NMRによるフラグメント・スクリーニング。セツキシマブ添加前(赤色トレース)および添加後(青色トレース)のフラグメントプールの代表的なNMRスペクトルを示す。この方法を用いてリード化合物を同定し、回折解析を用いて結合部位を決定する。

【図 2 0】標的化ランダムライブラリーを用いて、メディトープ部位でのメディトープまたは化合物結合のためにmAbの結合親和性を改変および/または向上する段階を示す。特に、メディトープ結合部位の内表面に並ぶmAb残基のコードがNNKで置換される場合、FACSソーティング(メディトープおよび抗原は異なる発色団で標識される)によって遺伝子ライブラリーを選択することができる。GPIリンカーにより、選択されたmAbが遺伝子配列をコードする細胞に結合したままとなる。選択された細胞由来の軽鎖および重鎖をコードする遺伝子のシーケンシングにより、高親和性を有するmAbが同定される。方法を反復して、より親和性の高いメディトープまたはメディトープ類似体を選択することができる。

【図 2 1】配列相違の表面の3D表示。上段の濃灰色の部分はセツキシマブと完全長ヒト・トラスツズマブ・フレームワーク間のアミノ酸の相違を示す。囲み内の残基は、トラスツズマブ・フレームワーク上で変異が施与されている。トラスツズマブのCDRループを同定し(下段;暗色部分)、セツキシマブ・フレームワーク上に移植した。

【図 2 2】メディトープ使用可能トラスツズマブはメディトープ-Fcに結合することを示す。上段のグラフは、メディトープ結合部位をトラスツズマブ(腫瘍抗原Her2に結合する完全長ヒトmAb)上に作製した。FACS分析では、メディトープ使用可能トラスツズマブがHer2を過剰発現するSKBR3細胞に結合することを示している(上から2つのトレース)。下段のグラフでは、メディトープ-Fcがメディトープ使用可能トラスツズマブに結合するが

10

20

30

40

50

(上から2つのトレース; ピークが右にシフトしている)、野生型トラスツズマブ(下から2番目のトレース)または陰性コントロール(一番下のトレース)とは結合しないことを示している。

【図2.3A B】図2.3Aは、メディトープ使用可能トラスツズマブ重鎖配列の核酸配列(SEQ ID NO:5)を示す。シグナルペプチド配列を灰色の網掛けで示す。図2.3Bは、メディトープ使用可能トラスツズマブ重鎖配列のアミノ酸配列(SEQ ID NO:6)を、野生型(SEQ ID NO:7)と比較して示す。相違を灰色の網掛けで示す。図2.3Bに示すアミノ酸の後には、ヒト重鎖配列と相違はない。図2.3Cは、メディトープ使用可能トラスツズマブ軽鎖配列の核酸配列(SEQ ID NO:8)を示す。シグナルペプチド配列を灰色の網掛けで示す。図2.3Dは、メディトープ使用可能トラスツズマブ軽鎖配列のアミノ酸配列(SEQ ID NO:9)を、野生型(SEQ ID NO:10)との比較で示す。相違を灰色の網掛けで示す。

10

【図2.3C D】図2.3Aは、メディトープ使用可能トラスツズマブ重鎖配列の核酸配列(SEQ ID NO:5)を示す。シグナルペプチド配列を灰色の網掛けで示す。図2.3Bは、メディトープ使用可能トラスツズマブ重鎖配列のアミノ酸配列(SEQ ID NO:6)を、野生型(SEQ ID NO:7)と比較して示す。相違を灰色の網掛けで示す。図2.3Bに示すアミノ酸の後には、ヒト重鎖配列と相違はない。図2.3Cは、メディトープ使用可能トラスツズマブ軽鎖配列の核酸配列(SEQ ID NO:8)を示す。シグナルペプチド配列を灰色の網掛けで示す。図2.3Dは、メディトープ使用可能トラスツズマブ軽鎖配列のアミノ酸配列(SEQ ID NO:9)を、野生型(SEQ ID NO:10)との比較で示す。相違を灰色の網掛けで示す。

【図2.4】セツキシマブ・フレームワーク上に移植されたHer2 CDRループがメディトープ-Fcに結合することを示す。図2.4Aは、トラスツズマブのHer2 CDRループがセツキシマブ上に移植されており、これがメディトープに結合する。FACS分析は、Her2 CDRを移植したメディトープ使用可能mAbがHer2を過剰発現するSKBR3細胞に結合することを示している(種々の濃度での上から3つのトレース)。図2.4Bは、メディトープ-FcがHer2 CDRを移植したメディトープ使用可能mAbに結合し(上から3つのトレース。ピークは濃度依存的に右側にシフトしている)、野生型トラスツズマブ(下から2番目)または陰性コントロール(一番下のトレース)には結合しないことを示している。

20

【図2.5A】図2.5Aに、Her2 CDRを移植したメディトープ結合mAb重鎖の核酸配列(SEQ ID NO:11)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:12)を、制限酵素部位および分泌配列と共に示す。図2.5Bに、Her2 CDRを移植したメディトープ結合mAb軽鎖の核酸配列(SEQ ID NO:13)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:14)を、制限酵素部位および分泌配列と共に示す。下線および網掛け部分は、メディトープの結合を可能とするために使用した変更を示す。メディトープの特異性を向上または変更するための更なる変更を、同様に移植してもよい。

30

【図2.5B】図2.5Aに、Her2 CDRを移植したメディトープ結合mAb重鎖の核酸配列(SEQ ID NO:11)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:12)を、制限酵素部位および分泌配列と共に示す。図2.5Bに、Her2 CDRを移植したメディトープ結合mAb軽鎖の核酸配列(SEQ ID NO:13)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO:14)を、制限酵素部位および分泌配列と共に示す。下線および網掛け部分は、メディトープの結合を可能とするために使用した変更を示す。メディトープの特異性を向上または変更するための更なる変更を、同様に移植してもよい。

40

【図2.6】IgGおよびIgE Fabドメインの配列および構造アラインメントの例であり、メディトープ結合部位の近傍にあるIgE上の残基を示す。

【図2.7】表面プラズモン共鳴(SPR)実験のグラフである。種々のメディトープ(cQFD、cQYN、およびcQYD)のセツキシマブへの結合親和性を、種々のpHで測定した。

【図2.8】2価メディトープ-Fcの有効性を単量体メディトープのものと比較したMTTアッセイの結果を示す。図2.8Aは、セツキシマブと合わせた際に、メディトープ-Fcだけが細胞増殖を阻害し、単量体メディトープは阻害しないことを示している。図2.8Bは、メディトープ-Fcによってセツキシマブの細胞死滅能が向上されることを示している。

【図2.9】メディトープがユニークなセツキシマブ・フレームワークに結合し、ヒト・フ

50

レームワークまたは他のマウスキメラ・フレームワークには結合しないことを示す。表面プラズモン共鳴実験では、野生型メディトープをCM5チップにコンジュゲートさせ、セツキシマブ（メディトープ結合Fab）、トラスツズマブ（完全長ヒト・フレームワーク）、およびリツキシマブ（マウス-ヒト・キメラ・フレームワーク）を0.01、0.05、0.1、0.5、および1 $\mu$ Mの濃度で試験した。セツキシマブだけがメディトープをコンジュゲートさせたチップに結合した。トラスツズマブ（1N8Z；Choら 2003）およびリツキシマブ（20SL；Duら 2007）の分子構造を、メディトープが結合したセツキシマブFab構造に重ね合わせることによって、フレームワークの独自性が更に明らかになる。更に、この構造比較により、セツキシマブFabに由来するいずれの残基がメディトープ結合に寄与し、それらをどのように他のFabフレームワーク領域に移植できるかが明白となる。

10

【発明を実施するための形態】

【0009】

#### 発明の詳細な説明

治療剤またはイメージング剤を標的組織に選択的に送達させる抗体送達システム、およびそれらの使用法を本明細書で提供する。抗体送達システムは、抗体フレームワーク結合インターフェース（「フレームワーク結合インターフェース」または「結合インターフェース」）が抗体結合分子（または「メディトープ」）に結合して抗体-メディトープ複合体を形成したものを含んでもよい。抗体-メディトープ複合体は、下記に詳述する方法に使用するための1つまたはそれ以上の更なる抗体-メディトープ複合体、治療剤、イメージング剤、またはそれらを組み合わせたものに更にコンジュゲートしていてもよい。

20

【0010】

ある態様では、メディトープが結合できる抗体フレームワーク結合インターフェースは、抗体またはその機能性フラグメントの相補性決定領域（CDR）ではなく、フレームワーク領域で形成される。本明細書で使用する「抗体またはその機能性フラグメント」とは、特定の抗原またはエピトープに特異的に結合する、またはそれらと免疫学的に反応する免疫グロブリン分子をいい、それらにはポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方が包含される。「抗体」という用語は、遺伝子操作または他の改変を行った免疫グロブリン、例えばイントラボディ（intrabody）、ペプチボディ（peptibody）、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、メディトープ使用可能抗体、およびヘテロコンジュゲート抗体（例えば二重特異性抗体、ディアボディ（diabody）、トリアボディ（triabody）、テトラボディ（tetrabody）、タンデムdi-scFv、タンデムtri-scFv）を包含する。「機能性抗体フラグメント」という用語は抗体の抗原結合フラグメントを包含し、それらには、限定される訳ではないが以下がある：抗原結合（Fab）フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fab'フラグメント、Fvフラグメント、組換えIgG（rIgG）フラグメント、1本鎖可変フラグメント（scFv）、および単一ドメイン抗体（例えばsdAb、sdFv、ナノボディ（nanobody））フラグメント。

30

【0011】

ある態様では、抗体またはその機能性フラグメントの結合およびイメージングを向上するために、結合インターフェースを開発または最適化することができる。別の態様では、メディトープはシステイン残基を含有し、これがメディトープ結合部位で、Fabに組換え導入したシステインに結合することができる（例えばThioMAb）。これによって、メディトープを任意の診断および/または治療ための物質、分子、または化合物にコンジュゲートする。例えば、物質は診断用小分子、例えばマーカーであってもよい。「Cysメディトープ」は、コンジュゲートをIgGへ誘導し、共有結合を介して結合する。あるいはまた、メディトープはFabのメディトープ結合部位に導入された1つまたはそれ以上の非天然アミノ酸にコンジュゲートすることができる。非天然アミノ酸と共に形成することができる結合の例として以下がある：(i) p-アセチルフェニルアラニン、m-アセチルフェニルアラニン、p-(3-オキソブタノイル)-1-フェニルアラニン、およびp-(2-アミノ-3-ヒドロキシエチル)フェニルアラニンの導入による安定なヒドラゾン結合およびオキシム結合、(ii) フェニルセレニジルアラニン（phenylselenidylalanine）の導入による反応性チオ

40

50

ール、(iii)p-ベンゾイル-1-フェニルアラニンの導入によるベンゾフェノン含有UV架橋、(iv)p-イソプロピルチオカルボニルまたはp-エチルチオカルボニルフェニルアラニンの導入による反応性アミン、(v)p-プロパルギルオキシフェニルアラニンまたはp-アジドフェニルアラニンの導入によるアジド-アルキン・ヒュスゲン環化付加、または当該分野で公知の任意の他の好適な非天然アミノ酸。ある態様では、メディトープがFabに導入された非天然アミノ酸(例えばp-アセチルフェニルアラニン)に反応基を誘導してもよい。

#### 【0012】

更に、メディトープのためのフレームワーク結合インターフェースを他のmAbに移植し、メディトープ使用可能mAbを作製することができる。メディトープ結合部位を他のmAbに移植できるため、この結合インターフェースは、EGFRを標的とする場合のセツキシマブとだけでなく、任意のモノクローナル抗体と共に使用することができる、汎用性の高いプラットフォーム技術である。「メディトープ使用可能な(meditope-enabled)」抗体、モノクローナル抗体、または治療用抗体とは、そのフレームワーク結合インターフェースでメディトープと結合することができる任意の抗体(例えばセツキシマブ)をいう。従って、プラットフォームは、治療用抗体を用いて治療または標的化しうる任意の癌、疾病、または他の症状の治療、診断、またはイメージングへの使用まで拡大することができ、それらの癌、疾病、または症状には、限定される訳ではないが以下がある：白血病およびリンパ腫(例えばアレムツズマブ、ベクツムマブ(bectumumab)、ゲムツズマブ、FBTA05、イブリツモマブ・チウキセタン、オフアツムマブ、リツキシマブ、トシツモマブを用いて治療またはイメージングできるもの)、乳癌(例えばトラスツズマブ、アデカツムマブ(adecatumumab)、エトルマキシマブ(etrumaxomab)を用いて治療またはイメージングできるもの)、前立腺癌(例えばアデカツムマブ、カプロマブペンデチド(capromabpendetide)、エタラシズマブ(etaracizumab)を用いて治療またはイメージングできるもの)、結腸直腸癌(例えばラベツズマブ(labetuzumab)、パニツムマブ、ペンテト酸アルツムマブ(altumumabpentetate)、ボツムマブ(votumumab)を用いて治療またはイメージングできるもの)、消化管癌(例えばアルシツムマブ(arcitumumab)、カツマキシマブ(catumaxomab)を用いて治療またはイメージングできるもの)、卵巣癌(例えばアバゴボマブ(abagovomab)、カツマキシマブ、エタラシズマブ、イゴボマブ(igovomab)、オレゴモマブ(oregovomab)を用いて治療またはイメージングできるもの)、肺癌(例えばアナツムマブマフェナトックス(anatumumabmafenatox)を用いて治療またはイメージングできるもの)、膵臓癌(例えばクリバツズマブテトラキセタン(clivatuzumabtetraxetan)を用いて治療またはイメージングできるもの)、腎臓癌(例えばギレンツシキマブ(girentuximab)を用いて治療またはイメージングできるもの)、黒色腫(例えばエタラシズマブ、イピリムマブ、TRBS07を用いて治療またはイメージングできるもの)、神経膠腫(例えばニモツズマブを用いて治療またはイメージングできるもの)、骨転移(例えばデノスマブを用いて治療またはイメージングできるもの)、頭頸部癌(例えばザルツムマブ(zalutumumab)を用いて治療またはイメージングできるもの)、心血管疾患(例えばアブキシマブを用いて治療またはイメージングできるもの)、自己免疫疾患(例えばアダリムマブ、インフリキシマブを用いて治療またはイメージングできるもの)、リウマチ性関節炎(例えばアトリスマブ(atlizumab)、ゴリムマブ、インフリキシマブを用いて治療またはイメージングできるもの)、移植拒絶反応(例えばバシリキシマブ、ダクリズマブ、ムロモナブ-CD3を用いて治療またはイメージングできるもの)、クローン病(例えばセルトリズマブ、フォントリスマブ、ナタリスマブ、インフリキシマブ、ビジリズマブ(visilizumab)を用いて治療またはイメージングできるもの)、ヘモグロビン尿症(例えばエクリズマブを用いて治療またはイメージングできるもの)、乾癬(例えばエファリズムマブ、インフリキシマブ、ウステキヌマブを用いて治療またはイメージングできるもの)、多発性硬化症(例えばナタリスマブ、ウステキヌマブを用いて治療またはイメージングできるもの)、喘息(例えばベンラリスマブ(benralizumab)、メボリスマブ、オマリズマブを用いて治療またはイメージングできるもの)、呼吸器合胞体ウイルス(例えばバリビズ

10

20

30

40

50

マブを用いて治療またはイメージングできるもの)、黄斑変性症(例えばラニビズマブを用いて治療またはイメージングできるもの)、虫垂炎(例えばファノレソマブ(fanoleso mab)を用いて治療またはイメージングできるもの)、および、抗体で標的化(targeting)または治療する他の任意の病態。上記の抗体および関連する疾病または障害は単なる実例であり、プラットフォームを制限するものではない。

#### 【0013】

ある態様では、環状抗体結合ペプチドC-QFDLSTRRLK-C(cQFD; SEQ ID NO:1)およびC-QYNLSSRALK-C(cQYN; SEQ ID NO:2)は、非共有結合性相互作用を介して抗体フレームワーク結合インターフェースに結合できる。この結合相互作用の非共有結合性により、フレームワーク結合インターフェース、ペプチド、またはその両方を改変するための新規の代替法が得られ、特異性の高いメディトープ改変体作製の可能性が広がる。ある態様では、cQFDおよびcQYNペプチドは、下記の回折データおよび生物物理学データが示すように、セツキシマブのFab領域の(CDR領域ではなく)フレームワーク領域に結合する。この結合部位は、他のフレームワーク結合抗原(例えばスーパー抗原、黄色ブドウ球菌プロテインA(SpA)およびペプトストレプトコッカス・マグヌス・プロテインL(PpL))の結合部位とは異なる(図7)。更に、プロテインAおよびプロテインLは、患者中に存在するIgGと結合する。従って、相互作用は特異的である。

#### 【0014】

X線結晶解析により、ペプチドは、重鎖および軽鎖を輪郭とするFab空洞内に-700nMの結合定数で結合することが明らかにされている。この相互作用を利用して、特に、ネイキッドmAbの治療有効性の改善、イメージング剤または治療剤の標的化送達の向上、およびmAbに基づくイメージング法の改善を行うことができる。

#### 【0015】

cQFDおよびcQYNメディトープは、セツキシマブ中に存在するような、キメラ・フレームワーク結合領域に結合する。本明細書で使用する「メディトープ(meditope)」(medius(ラテン語で「中間」)+topos(ギリシャ語で「場所」))という用語は、抗体のFab軽鎖および重鎖の間に結合する抗体結合ペプチド(例えばcQFDおよびcQYNペプチドまたはその改変体)をいう。他の分子も、メディトープと同様のフレームワーク結合機能性で抗体のFab重鎖および軽鎖の間に結合しうる。それらの分子には、限定される訳ではないが小分子、アダプター、核酸分子、ペプチド、および任意の他の物質で、メディトープと同じ結合インターフェースに結合できるものが包含される。本明細書に記載するフレームワーク結合インターフェースは、抗原エпитープに結合するCDRとは別のもので、離れた位置にある(図4)。更に、生化学アッセイおよび細胞に基づくアッセイでは、cQFDおよびcQYN環状ペプチドは予めEGFRに結合させたマウスキメラ化セツキシマブと結合できることが明らかになっている(図4)。

#### 【0016】

セツキシマブはユニークなマウス-ヒト・キメラであり、cQFDおよびcQYNメディトープとセツキシマブFabの間の数種の相互作用は、このマウス-ヒト・キメラIgGフレームワーク残基に特異的であることが、本明細書に記載する原子モデルから明らかになっている。更に、メディトープはヒトIgGフレームワーク(例えばトラスツズマブ)には結合せず、この相互作用はこのマウスキメラ抗体に特異的であって、他のマウスキメラ(例えばリツキシマブ)には特異的でないことを示している(図29)。これは、セツキシマブ・フレームワークが高度に特異的であることを立証するものである。セツキシマブ-環状ペプチド構造上に複数のヒトおよびマウスFabを重ね合わせることにより、このペプチドとマウス-ヒト・キメラFab間の鍵となる相互作用は、ヒトのみ、およびマウスのみIgG構造には存在しないことが明らかとなる。環状ペプチド内の主要な残基に点変異を施与するとFabへの結合親和性は低下し、このことは高度な特異性および構造モデルを裏付けている(データ未掲載)。従って、相互作用はこの特異的マウス-ヒト・キメラFabの中央空洞部に特異的であると考えられる。これに対し、PpLおよびSpAはマウス特異的ではない。PpLはマウスIgGカッパ軽鎖の~66%、ヒトIgGカッパ軽鎖の~50%に結合し、SpAはマウス

10

20

30

40

50

重鎖可変領域の12%、ヒト重鎖可変領域の50%に結合する (Grailleら, 2002)。

【0017】

セツキシマブは現在、EGFRを発現する転移性結腸直腸癌および頭頸部癌の治療に使用されている。セツキシマブは立体構造エピトープ (例えば、折りたたまれたEGFRドメインII1) を認識する。小分子抗原、ペプチド、およびタンパク質エピトープを認識する抗体を比較することにより、インターフェースが異なる特性を有する傾向にあることが明らかになっている (Collisら, 2003)。小分子は小さなポケットにはめ込まれ; ペプチドは並列して (linear groove) フィットし; タンパク質は広い表面と接触する傾向がある。従って、セツキシマブ-EGFRとの場合と同様のタンパク質-抗体相互作用を再現できるペプチドは、一般に、広い接触表面があり、折りたたまれていないドメインを有するタンパク質抗原のものである。例えば、トラスツズマブはタンパク質抗原 (立体構造エピトープ) を認識するが、主として、多くの幾何学的に拘束されたループと接触する (Duら, 2007; Choら, 2003)。このタイプの生物学的認識は、ペプチド模倣物との適合性がより高い。

10

20

30

40

50

【0018】

cQFDおよびcQYNメディトープは、当初、セツキシマブのCDR領域に結合するペプチド候補として同定された。ファージディスプレイ・ライブラリーが、確立された治療用抗体の相補性決定領域 (CDR) に結合するペプチドを同定するために使用されてきたが、これは、ペプチドが抗原エピトープを模倣して、その抗原への免疫応答を人工的に惹起するという推測に基づいている (Riemerら, 2004; Riemerら., 2005; Liら, 2006)。これらのペプチド模倣物 (別名ミモトープまたは抗イデオタイプ) を化学的に合成し、起こりうる生物学的汚染を回避し、コストを低減することができる。しかしながら、この意図に基づくワクチンで得られるのは部分的な応答であり、多くの場合、その後、腫瘍抗原への免疫応答は消失せず、疾病が再発する (Sharavら, 2007)。

【0019】

cQFDおよびcQYNメディトープはCDR領域ではなくフレームワークに結合するので、それらのメディトープがワクチン用の特異的セツキシマブ様抗体の免疫原候補となる可能性は低い。Reimerらの知見によれば、KLHを結合させたメディトープで免疫化したマウスから回収した血清から、A431細胞に結合してその増殖を阻害する抗体が産生されたが (Riemerら, 2005)、本明細書に記載する研究は、アジュバントに結合した複数コピーのメディトープによって、ワクチンがマウスIgGとの無差別架橋剤となる (スーパー抗原と類似する) ことを示している。この態様を裏付けるものとして、BLASTにおいて、類似した生殖細胞系またはB細胞由来フレームワーク配列がマウス軽鎖、並びにマウスおよびヒトの重鎖に見られる。従って、メディトープ・ペプチドをアジュバントに連結させた場合、保存されたフレームワーク領域を有するB細胞集団を活性化し、ワクチンに必要とされる特異的免疫応答ではなく、全身免疫応答を惹起しうる。報告されているELISA競合アッセイでは、EGFRの特異的結合部位も、ポリクローナル血清がEGFR上のセツキシマブ・エピトープにどの程度特異的であるかも明らかにされていない (例えば報告は、血清由来IgGが未標識セツキシマブによって阻害されるか否かを示していない)。回折解析および生化学的試験は、ヒトにおけるワクチンとしてのcQYNまたはcQFDメディトープの使用を支持していない。

【0020】

本明細書に記載する態様において使用することができる更なるメディトープには、セツキシマブまたは他の治療用抗体の抗体フレームワーク結合インターフェース (すなわちFabの軽鎖および重鎖の間) に結合する任意の小ペプチドが含まれる。例えば、環状ペプチドcQFDおよびcQYNの他に、ある態様ではcQFDおよびcQYNの1つまたはそれ以上の改変体が含まれる。

【0021】

構造的および生物物理学的方法または改変を化学合成と併用し、(例えばpHの変更 (下記実施例に記載) によって) セツキシマブへの親和性が未改変メディトープ、cQFDおよびcQYNに比較して向上または改変されたメディトープ改変体を開発することができる。更に

、未改変メディトープまたは改変型メディトープを多価連結体 (tether entity) またはスキャホールドにコンジュゲートさせることにより、全体の親和性、および腫瘍関連抗原に結合したメディトープ使用可能mAbへの多価メディトープの標的化が有意に向上される。高親和性を有するメディトープ改変体の作製に使用することができるcQFDおよびcQYNメディトープへの改変には、当該分野で公知の任意のペプチド改変法が包含される。各アミノ酸位置は、変性アミノ酸に変更するか、または化学的にフラグメントにコンジュゲートさせてもよい。

#### 【0022】

ある態様では、1つまたはそれ以上のメディトープ、メディトープ改変体、多価メディトープ連結剤、または多価メディトープ改変体連結剤を1つまたはそれ以上のイメージング剤、治療的有効量の治療的有効薬剤もしくは化合物、またはその両方にコンジュゲートさせ、メディトープまたはその改変体が治療的に有効な化合物を有する1つまたはそれ以上のメディトープ使用可能抗体に結合することによって疾病または病態を治療、予防、診断、またはモニタリングできるようにすることができる。そのような高親和性かつ/またはメディトープ使用可能mAbに結合した多価メディトープのコンジュゲーションにより、非常に汎用性の高いプラットフォーム技術が得られ、それによって、疾病の治療および検出のためのmAbに基づく治療法およびイメージング法が著しく向上される (図8参照)。

10

#### 【0023】

ある態様では、マウス特異的cQFDおよびcQYNメディトープまたはその誘導体を使用して、2つまたはそれ以上の抗体またはその機能性フラグメントを連結させることができる。後述の連結法に使用する場合、メディトープは多価連結剤 (別名「メディトープ・スキャホールド」または「スキャホールド」) の一部であって、癌または腫瘍の治療およびイメージングを向上させることができる。

20

#### 【0024】

多価連結剤には、2つまたはそれ以上のcQFDおよびcQYNメディトープ、または任意の他の新規メディトープ改変体で、長鎖リンカーおよびビオチンを介してストレプトアビジンに結合し、多価メディトープ連結体を形成しているものがある。ある態様では、多価メディトープ連結体は4価メディトープ連結剤である。表面プラズモン共鳴によれば、4量体連結体は1価ペプチドに比較してIgGへの結合が向上されており、これは多価相互作用と整合性がある。FACS分析によれば、4価メディトープはEGFR陽性細胞におけるセツキシマブの結合親和性も向上する。

30

#### 【0025】

多価メディトープ・スキャホールドを腫瘍関連抗原に結合したスキャホールドまたは「デージーチェーン」メディトープ使用可能mAbに使用し、リガンド拮抗作用の向上、受容体エンドサイトーシスの改変、および/またはADCC/CDCを介する免疫応答の向上を行うことができる (図8)。モノクローナル抗体 (mAb) は2量体Fcに結合した2つのFabドメインをコードする。そのため、これらの2価IgGは抗原を発現する細胞に高密度で結合する。同じ抗原上の独自のエピトープに結合する第2のmAbにより、受容体のクラスター形成および、より効果的な腫瘍細胞の死滅が可能となることが明らかになっている。このクラスター形成は、多価メディトープの使用によって再現できる。多価メディトープを使用すれば第2のmAbを同定する必要がなく、その開発に伴う多額の費用が回避される。

40

#### 【0026】

メディトープ、メディトープ改変体、多価メディトープ連結剤、および多価メディトープ改変体連結剤の特性および結合を使用し、1つまたはそれ以上のメディトープ使用可能モノクローナル抗体と併せて投与して、治療剤、診断剤 (例えばイメージング剤)、またはそれらを組み合わせたものを送達し、疾病または病態の治療、診断、またはイメージングを行うことができる。従って、メディトープ使用可能モノクローナル抗体を投与した後にメディトープ、メディトープ改変体、多価メディトープ連結剤、または多価メディトープ改変体連結剤を投与することにより、多価メディトープを使用して事前標的化療法およびイメージングを行うことができる。更に、多価メディトープの使用によって、遺伝子操

50

作によって得たscFvまたは化学的にコンジュゲートさせたmAbで明らかになっているのと同様に選択性を向上し、腫瘍検出を改善しつつ、それらの非ヒト構築物に内在する免疫原性の可能性を回避することができる。

【0027】

ある態様では、メディトープ使用可能抗体と共投与されるメディトープ、抗体-メディトープ複合体、メディトープ使用可能抗体と共投与される多価連結剤、またはそれらを組み合わせたものを、1つまたはそれ以上のイメージング剤にコンジュゲートさせることができる。ある観点では、イメージング剤には、限定される訳ではないが、蛍光、発光、または磁性のタンパク質、ペプチド、またはそれらの誘導體（例えば遺伝子操作した改変体）がある。mRNA要素によって発現させることができる蛍光タンパク質には緑色蛍光タンパク質（GFP）、改良型GFP（EGFP）、赤色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、サファイア蛍光タンパク質、およびサンゴ蛍光タンパク質がある。mRNA要素によって発現させることができる発光タンパク質には、ルシフェラーゼ、エクオリン、およびそれらの誘導體がある。多数の蛍光および発光色素およびタンパク質が当該分野で知られている（例えば以下参照：米国特許出願第2004/0067503号；Valeur, B., "Molecular Fluorescence: Principles and Applications," John Wiley and Sons, 2002；Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes社, 増補第9版, 2002；およびThe Handbook--A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Invitrogen社, 第10版（Invitrogen社ウェブサイト入手可）（いずれも、参照により、本明細書に完全に記載されているのと同様に本明細書に組み込まれる））。

【0028】

他の観点では、メディトープ使用可能抗体と共投与されるメディトープ、抗体-メディトープ複合体、メディトープ使用可能抗体と共投与される多価連結剤、またはそれらを組み合わせたものを、非タンパク質イメージング剤または送達媒体、例えばナノ粒子、放射性物質（例えば放射性同位体、放射性核種、放射能標識、または放射性トレーサ）、色素、造影剤、蛍光化合物もしくは分子、生物発光化合物もしくは分子、酵素、および増強剤（例えば常磁性イオン）に更にコンジュゲートまたは結合させることができる。更に、留意すべきことに、一部のナノ粒子、例えば量子ドットおよび金属ナノ粒子（後述）も、イメージング剤または治療剤として使用するのに好適であり得る（例えば高温療法および光線力学療法を使用して、また、蛍光および/もしくはMRI造影剤によるイメージング剤）。

【0029】

本開示の態様において更なるイメージング剤として使用することができる蛍光物質および発光物質には、限定される訳ではないが、一般に「色素」、「標識」、または「指示薬」と呼ばれる多様な有機または無機小分子がある。それらの例として、フルオレセイン、ローダミン、アクリジン色素、Alexa色素、およびシアニン色素がある。

【0030】

本開示の態様において更なるイメージング剤として使用することができる酵素には、限定される訳ではないが、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコロニダーゼ、または $\beta$ -ラクトマーゼがある。それらの酵素を色原体、蛍光性化合物、または発光性化合物と併用して検出可能シグナルを生成させてもよい。

【0031】

本開示の態様において更なるイメージング剤として使用することができる放射性物質には、限定される訳ではないが、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{45}\text{Ti}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{77}\text{As}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{105}\text{Pd}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{154}\text{-}^{158}\text{Gd}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{169}\text{Er}$ 、 $^{175}\text{Lu}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{189}\text{Re}$ 、 $^{194}\text{Ir}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{211}\text{Pb}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ 、および $^{225}\text{Ac}$ がある。本開示の態様

10

20

30

40

50

において更なるイメージング剤として使用することができる常磁性イオンには、限定される訳ではないが、遷移イオンおよびランタニド金属（例えば、原子番号21-29、42、43、44、または57-71の金属）がある。これらの金属には、Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb、およびLuイオンがある。

#### 【0032】

イメージング剤が放射性金属または常磁性イオンの場合、物質を別の長い尾部を有する物質（それらのイオンを結合させるための1つまたはそれ以上のキレート化基が結合した長い尾部を有するもの）と反応させることができる。長い尾部は、ポリマー、例えばポリリシン、多糖、または、金属もしくはイオンへの結合のためのペンダント基を有する誘導体化された、もしくは誘導体化可能な鎖であってもよい。本開示において使用することができるキレート化基の例には、限定される訳ではないが、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、DOTA、NOTA、NETA、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビスチオセミカルバゾン、ポリオキシムなどの基がある。キレートのPSMA抗体または機能性抗体フラグメントへの結合は、通常、免疫反応性の喪失を最小限に抑え、凝集および/または内部架橋を最小限に抑えて分子との結合形成を可能とするような基によってなされる。同じキレートが、非放射性金属（例えばマンガン、鉄、およびガドリニウム）と複合体を形成する場合、本明細書に記載する抗体およびキャリアと併用すると、MRIに有用である。大環状キレート（例えばNOTA、DOTA、およびTETA）は、種々の金属および放射性金属と併用すると有益であり、それらにはそれぞれ、限定される訳ではないが、ガリウム、イットリウム、および銅の放射性核種がある。核種を安定に結合することを目的とする、大環状ポリエーテルのような他の環状キレート（例えばRAIT用の $^{223}\text{Ra}$ 複合体）を使用してもよい。ある態様では、キレート部分を用いてPETイメージング剤（例えばAl- $^{18}\text{F}$ 複合体）を標的分子に結合させ、PET分析に使用してもよい。

#### 【0033】

ある態様では、メディトープ、抗体-メディトープ複合体、多価連結剤、またはそれらを組み合わせたものを、1つまたはそれ以上の治療剤にコンジュゲートさせてもよい。

#### 【0034】

本明細書で使用する「治療剤」とは、本明細書に記載する癌または他の病態の治療に有用な原子、分子、または化合物である。抗体-メディトープ複合体、多価連結剤、またはそれらを組み合わせたものにコンジュゲートさせることができる治療剤の例には、限定される訳ではないが、薬物、化学療法剤、治療用抗体および抗体フラグメント、毒物、放射性同位体、酵素（例えば腫瘍部位でプロドラッグを開裂して細胞傷害性物質とする酵素）、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、RNAi分子（例えばsiRNAまたはshRNA）、キレート剤、ホウ素化合物、光反応性物質、および色素がある。また治療剤には、金属、金属合金、金属間化合物、またはコアシェルのナノ粒子をキレート剤に結合させたものがあり、これは放射線増感剤として作用し、標的細胞の放射線治療に対する感受性を健常細胞に比較してより高くする。更に、治療剤にはMRI造影剤用の常磁性ナノ粒子（例えばマグネタイトまたは $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ）があり、これを他のタイプの療法（例えば光線力学療法および高温療法）およびイメージング（例えば蛍光イメージング（AuおよびCdSe））と併用してもよい。

#### 【0035】

化学療法剤は多くの場合、細胞傷害性または細胞増殖抑制性を有し、それらには、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤、ホルモン療法、標的化療法、および免疫療法がある。本開示の態様において治療剤として使用することができる化学療法剤には、限定される訳ではないが以下がある：13-cis-レチノイン酸、2-クロロデオキシアデノシン、5-アザシチジン、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、アクチノマイシン-D、アドリアマイシン、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アイトレチノイン、オールトランスレチノイン酸、アルファインターフェロン、アルトレタミン、アメトプテリン、アミフォスチン、アナグレリド、アナストロゾール、アラビノシルシトシン、三酸化ヒ素、アムサクリン、アミノカンブトテ

シン、アミノグルテチミド、アスパラギナーゼ、アザシチジン、バチルス・カルメット・ゲラン (bacillus calmette-guerin、BCG)、ペンダムスチン、ベバシズマブ、ベキサロテン、ピカルタミド、ボルテゾミブ、プレオマイシン、ブスルファン、ロイコボリンカルシウム、シトロバラム因子、カペシタビン、カネルチニブ、カルボプラチン、カルムスチン、セツキシマブ、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、コルチゾン、シクロホスファミド、シタラビン、ダルベポエチン・アルファ、ダサチニブ、ダウノマイシン、デシタビン、デニロイキン・ディフティトックス、デキサメタゾン、デキサゾン、デキスラゾキサ、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ダカルバジン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、ドキシフルリジン、エニルウラシル、エピルピシン、エポエチン・アルファ、エルロチニブ、エベロリムス、エキセメスタン、エストラムスチン、エトボシド、フィルグラスチム、フルオキシメステロン、フルベストラント、フラボピリドール、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルタミド、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゲムツズマブ・オゾガマイシン、ゴセレリン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ヘキサメチルメラミン、ヒドロコルチゾン、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ、インターフェロン・アルファ、インターロイキン2、インターロイキン11、イソトレチノイン、イクサベピロン、イダルピシン、イマチニブメシレート、イホスファミド、イリノテカン、ラパチニブ、レナリドミド、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、リボソーマルAra-C、ロムスチン、メクロレタミン、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、メチルプレドニゾン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ネララビン、ニルタミド、オクトレオチド、オブレルベキン、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペメトレキサド、パニツムマブ、ペグインターフェロン、ペグアスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、ペグ-L-アスパラギナーゼ、ペントスタチン、プリカマイシン、プレドニゾン、プレドニゾン、プロカルバジン、ラロキシフェン、リツキシマブ、ロミブロスチム、ラリトレキサド (ralitrexed)、サパシタビン、サルグラモスチム、サトラプラチン、ソラフェニブ、スニチニブ、セムスチン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テガフル、テガフル・ウラシル、テムシロリムス、テモゾロミド、テニボシド、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、トポテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、トリメトレキサート、バルルピシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、ピノレルピン、ポリノスタット、またはゾレドロン酸。

10

20

30

## 【0036】

本開示の態様において治療剤として使用することができる治療用抗体およびその機能性フラグメントには、限定される訳ではないが、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、エドレコロマブ、ゲムツズマブ、イブリツモマブ・チウキセタン、パニツムマブ、リツキシマブ、トシツモマブ、およびトラスツズマブ、そして、本明細書に記載する特定の疾病に関連する抗体がある。

## 【0037】

本開示の態様において治療剤として使用することができる毒素には、限定される訳ではないが、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ (RNase)、DNase I、ブドウ球菌エンテロトキシンA、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン (gelonin)、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素、および緑膿菌内毒素がある。

40

## 【0038】

本開示の態様において治療剤として使用することができる放射性同位体には、限定される訳ではないが、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{89}\text{Sr}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ 、および $^{225}\text{Ac}$ がある。

## 【0039】

メディトープ-mAb技術により、抗体-メディトープ複合体の作製に使用できるシステムが可能となり、その複合体を1つまたはそれ以上のメディトープ使用可能抗体、治療剤、イメージング剤、またはそれらを組み合わせたものに更にコンジュゲートさせることができる。従って、一式のメディトープまたは高親和性メディトープ改変体 (それぞれ独自の

50

細胞傷害性物質またはイメージング剤にコンジュゲートされている)によって、所望のメディトープ・コンジュゲートおよびメディトープ使用可能mAbを共投与して治療を行うことが可能となる。メディトープ・コンジュゲートは、化学修飾による特異性の低下またはペイロードの遊離のようなマイナス面を有する現行の抗体-薬剤コンジュゲートより優れている。

#### 【0040】

このプラットフォーム技術はmAb送達分野に広範な影響を及ぼすものであり、セツキシマブが適応となるEGFR陽性癌、例えば結腸直腸癌、扁平上皮癌、頭頸部癌の治療および診断に有用な手段となる。更に、フレームワーク結合インターフェースを他の治療用抗体上に移植することにより、このプラットフォーム技術を、いくつかの他の癌、疾病、および他の病態(例えば前述のもの)の治療法および診断法に用いることができる。

10

#### 【0041】

治療用抗体またはその機能性フラグメントの結合親和性を向上する方法を本明細書で提供する。それらの方法には、治療的有効量の医薬組成物を好適な投与経路で被験体に投与するものがある。医薬組成物は、メディトープ使用可能抗体と組み合わせたメディトープまたはメディトープ改変体、メディトープ使用可能治療用抗体と組み合わせた多価メディトープまたはメディトープ改変体連結体、メディトープ使用可能治療用抗体またはその機能性フラグメント、医薬的に許容されるキャリア、およびそれらを任意に組み合わせたものを含んでもよい。細胞表面に結合したIgGの多価架橋によって多価メディトープの結合親和性を向上することができる。(親マウス425抗体を介する、または抗IgGIgMを用いる) IgGの架橋により、シグナリング、受容体エンドサイトーシスおよびリサイクリング、そして細胞死に有意な影響が与えられる。従って、多価ペプチドは治療用モノクローナル抗体と相乗的に作用し、その治療効果を向上しうる。

20

#### 【0042】

ある態様では、メディトープ(単独で、または連結体の一部として)はシステイン、または結合部位でFabシステインに結合する他の好適なアルキル化剤を含有し、それによってシステイン-システイン相互作用を形成してもよい。あるいはまた、メディトープは非天然アミノ酸(例えばp-アセチルフェニルアラニン)でFabに結合してもよい。Cysメディトープを任意の物質にコンジュゲートさせ、そのコンジュゲートをIgGに結合させてもよい。

30

#### 【0043】

抗体-メディトープ複合体は、治療用抗体が標的としうる疾病または病態における特定のタイプの細胞または細胞集団に対して治療を行うための方法に使用することができる。それらの治療法には、治療的有効量の医薬組成物を疾病または病態に罹患した被験体に好適な投与経路で投与するものがある。医薬組成物は、メディトープ使用可能抗体と組み合わせたメディトープまたはメディトープ改変体、メディトープ使用可能抗体と組み合わせた多価メディトープまたはメディトープ連結体、メディトープ使用可能治療用抗体またはその機能性フラグメントがある。

#### 【0044】

他の態様では、腫瘍または他の組織のイメージング法を提供する。それらの方法では、未改変治療用抗体を、対応する抗原を過剰発現する腫瘍または他の組織を標的として投与することができる。その後、イメージング剤で標識した多価メディトープ連結体を任意の投与経路で投与し、標的腫瘍または組織に結合した治療用抗体に結合させる。図8参照。イメージング剤の例として、限定される訳ではないが、放射性標識(例えば $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、および $^{153}\text{Sm}$ )、金属または磁気標識(例えば金、鉄、ガドリニウム)、ビオチン、キレート剤(例えば1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(「DOTA」))、または任意の上記物質がある。ある態様では、本明細書に記載する方法で使用するイメージング剤はDOTAである。

40

#### 【0045】

上記のイメージング法または治療法には、既知の方法より優れた点がいくつかある。第

50

1 に、治療用モノクローナル抗体IgGが2価であることにより、腫瘍への選択性が向上される。以下に詳述するように、この選択性の向上はscFvおよび他のミニボディを使用すると失われ、親和性の向上では創出できないものである。第2に、標識された多価メディトープ連結体の体積は腎臓での濾過閾値未満(60kD未満、おそらくは-10kDという低さ)であり、このため容易に体外に排出される。一方、治療用抗体IgGをイメージング剤または他の治療剤で直接標識することは、それが体内で長時間にわたって循環されるため、回避される。従って、腫瘍または他の疾病臓器のイメージングは、多くの場合、選択性のより低いscFvを使用して行われる。

#### 【0046】

更なる態様では、cQFDおよびcQYNメディトープまたはその改変体を使用し、2つまたはそれ以上の治療分子を結合させて医薬品とし、医薬組成物の一部として治療の有効量で被験体に投与して、癌、自己免疫疾患、または他の症状の治療を行うことができる。2つまたはそれ以上の治療分子には、それに限定される訳ではないが、腫瘍または疾病特異的受容体(例えば前述のもの)を標的とする機能性抗体フラグメント(例えばF(ab')<sub>2</sub>またはFabフラグメント)、ペプチド、または他の小分子がある。治療分子は、2つまたはそれ以上の同じ治療分子であるか、または、同じ腫瘍もしくは疾病罹患組織を標的とする2つまたはそれ以上の異なる分子であってもよい。

#### 【0047】

ある態様では、医薬品は、特許抗体またはその一部(例えばCovX-Body<sup>TM</sup>)の使用を含んでもよい。例えば、メディトープをリンカーとして使用して、特異的に設計したCovX抗体の結合インターフェースまたは結合部位に2つまたはそれ以上の治療分子を結合させてもよい。CovX特異的リンカーの機能を果たすメディトープに結合する小分子、ペプチド、またはscFvは、そのフレームワーク結合インターフェース(CovX抗体の活性結合部位である)によって認識される。これらの成分が合わさって得られる2価CovX-Body<sup>TM</sup>は、小分子、ペプチド、またはscFvの生体作用を有しつつ、抗体の延長された半減期も保持する。

#### 【0048】

上記の治療用モノクローナル抗体に関する利点に加え、治療分子に連結または結合するためのリンカーとして使用されるメディトープは、合成可能であり、製造のためのコスト効率がモノクローナル抗体より優れている。例えば、多くの前臨床試験/臨床試験において2つのモノクローナル抗体の共投与が研究されるが、そのような治療の製造コストおよびマーケティングコストは法外な高さとなりうる。

#### 【0049】

セツキシマブFabのscFv(1本鎖Fab可変フラグメント)フォーマットのEGFRドメインII Iへの結合親和性はFab自体より実質的に低く、これは他の臨床的に興味を持たれているscFvも同様である。これは、少なくとも一部には、Fab定常ドメインの欠如(これは、Fvドメインの配向性、構造的揺らぎに直接影響を与える)によるものであり、そしておそらくは、リンカー設計が十分でないことによるものである。

#### 【0050】

従って、ある態様では、scFvの安定性および親和性を向上する方法を提供する。方法は、scFvリンカーにペプチド・メディトープを導入してscFvを安定化させることを含む。これによって可変ドメインが適正な配向性となり、それによって親和性が向上する(図9)。

#### 【0051】

上記の態様は、1つまたはそれ以上のヒト・フレームワーク残基を対応するマウス残基で置換する(すなわち1つまたはそれ以上の点変異を導入することによって、ヒトまたはヒト化抗体(例えばトラスツズマブ)に適用することができる。対応するマウス残基で置換されるヒト残基はヒト・フレームワークのFab中央の空洞内に存在しており、免疫系に暴露されることがない(例えば、抗原とならない)。更に、抗原性予測アルゴリズムを用いて、点変異を有するヒト配列が抗原性を有しないと考えられることを示してもよい。

#### 【0052】

10

20

30

40

50

ある態様では、対応するマウス残基で置換される1つまたはそれ以上のヒト・フレームワーク残基は、軽鎖フレームワーク残基10、39-43、83、85、100、および104 (Kabatナンバー) および/または重鎖フレームワーク残基40、89、111 (Kabatナンバー) から選択することができる (図2参照)。ある態様では、対応するマウス残基で置換される1つまたはそれ以上のヒト・フレームワーク残基には、限定される訳ではないが軽鎖フレームワーク残基40、41、83、および85などがある。特に、ある態様では、軽鎖フレームワークPro40がThr (P40T) またはSer (P40S) で置換され、軽鎖フレームワークGly41がAsn (G41N) で置換され、軽鎖フレームワークPhe83がIle (F83I) またはVal (F83V) で置換され、軽鎖フレームワークThr85がAsp (T85D) またはAsn (T85N) で置換される。このヒト・モノクローナル抗体内にあるFab空洞部へのメディトープ部位の移植 (または「マウス化 (murinization) 」もしくは「マウス様化 (mousification) 」) を用いて、メディトープ結合のためのユニークなハンドルを作製し、前述の技術と共に使用してもよい。更に、ファーマコフォア結合モデルを作製することによって更なる点変異を作製し、メディトープの親和性を更に向上してもよい。

10

#### 【0053】

本明細書に記載する態様により、Fabフレームワーク内の新規のインターフェースが同定およびキャラクタライズされ、Fabの抗原への結合を妨害しない、またはEGFR結合のアロステリックなアンタゴニストとして作用しないことが明らかとなる。更に、2つのペプチドはセツキシマブCDRに結合せず、抗原 (EGFR) を模倣しない。

20

#### 【0054】

「治療的有効量」、「治療的有効濃度」、または「治療的有効用量」とは、被験体において所望の治療効果を生じる (例えば、標的病態を予防もしくは治療する、病態に伴う症状を緩和する、所望の生理学的効果を生ずる、または、疾病もしくは病態の治療につながる病態のイメージングもしくは診断を可能とする) 化合物の量である。正確な治療的有効量は、所定の被験体において、治療有効性の点で最も有効な結果をもたらす組成物の量である。この量は種々の因子によって異なるが、それらの因子には、限定される訳ではないが以下がある: 治療化合物の特性 (活性、薬物動態、薬力学、および生物学的利用能など)、被験体の生理学的状態 (年齢、性別、疾病のタイプおよびステージ、全身的な身体状態、所定の用量に対する反応性、および薬物のタイプなど)、製剤中の医薬的に許容されるキャリア (単数または複数) の性質、および投与経路。医学および薬理学分野の当業者は、慣例的な試験、すなわち、化合物の投与に対する被験体の反応性をモニタリングし、投与量を適宜調整することによって、治療的有効量を決定することができる。更なる指針は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, ペンシルバニア州フィラデルフィア (2005) を参照されたい。

30

#### 【0055】

「医薬的に許容されるキャリア」とは、医薬的に許容される物質、組成物、または媒体で、1つの組織、器官、または身体部分から別の組織、器官、または身体部分への目的化合物の送達または輸送に関与するものをいう。例えばキャリアは、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、もしくはカプセル化材料、またはそれらを組み合わせたものであってもよい。キャリアの各成分は、製剤中の他の成分と適合性を有するという点で「医薬的に許容され」なければならない。また、遭遇しうるいずれの組織、器官、または身体部分との接触にも好適でなければならない。すなわち、その治療効果を過度に上回る毒性、刺激、アレルギー反応、免疫原性、または他の問題のリスクを伴ってはならない。

40

#### 【0056】

「投与経路」とは、当該分野で公知の任意の投与経路をいい、それらには、限定される訳ではないがエアロゾル、経腸、経鼻、眼、経口、非経口、直腸、経皮、または経膈がある。「経皮」投与は、局所クリームまたは軟膏を使用するか、または経皮パッチによって行ってもよい。「非経口」とは、一般に注射を伴う投与経路をいい、それらには眼窩下、輸液、動脈内、関節包内、心臓内、皮内、筋肉内、腹腔内、肺内、脊髄内、胸骨内、髄腔

50

内、子宮内、静脈内、くも膜下、被膜下、皮下、経粘膜、または経気管がある。

【0057】

本明細書で使用する「組み合わせる」または「～と組み合わせる」とは、被験体における同じ疾病または病態を治療する過程で、2つまたはそれ以上の物質、薬剤、治療計画、治療様式、またはそれらを組み合わせたもの（例えばメディトープまたは多価連結剤と組み合わせた抗体）を任意の順序で使用することをいう。これには、同時投与（または「共投与」）、第1の薬剤の投与前または投与後に第2の薬剤を投与すること、および、第1の薬剤と第2の薬剤を最大で数日間の間隔を開けて投与することが含まれる。それらの併用療法には、任意の1つまたはそれ以上の薬剤、薬物、治療計画、または治療様式の複数回投与も含まれる。更に、2つまたはそれ以上の薬剤、薬物、治療計画、治療様式、またはそれらを組み合わせたものの投与は、同じ投与経路または異なる投与経路によって行ってもよい。

10

【0058】

「治療用抗体」とは、癌、自己免疫疾患、移植拒絶反応、心血管疾患、または他の疾病もしくは病態（例えば本明細書に記載するもの）を治療するために使用する任意の抗体またはその機能性フラグメントをいう。本明細書に記載する態様において使用することができる治療用抗体の例として、限定される訳ではないがマウス抗体、マウス化もしくはヒト化キメラ抗体、またはヒト抗体があり、それらには、限定される訳ではないが以下がある：エルピタックス（セツキシマブ）、レオプロ（アブシキマブ）、シムレクト（バシリキシマブ）、レミカデ（Remicade）（インフリキシマブ）；オルソクロンOKT3（ムロモナブ-CD3）；リツキサン（リツキシマブ）、ベキサール（Bexxar）（トシツモマブ）、ヒュミラ（アダリムマブ）、キャンパス（アレムツズマブ）、シムレクト（バシリキシマブ）、アバステン（ベパシズマブ）、シムジア（セルトリズマブ・ペゴル）、ゼナパックス（ダクリズマブ）、ソリリス（エクリズマブ）、ラプティヴァ（エファリズマブ）、マイロターグ（ゲムツズマブ）、ゼヴァリン（イブリツモマブ・チウキセタン）、タイサブリ（ナタリズマブ）、ゾレア（オマリズマブ）、シナジス（パリビズマブ）、ベクティビックス（パニツムマブ）、ルセンティス（ラニビズマブ）、およびハーセプチン（トラスツズマブ）。

20

【0059】

病態を「治療する」または病態の「治療」とは、病態の予防、病態の発症または進行の遅延、病態の発症リスクの低減、病態に伴う症状の発症の予防もしくは遅延、病態に伴う症状の低減もしくは終息、病態の完全もしくは部分的軽減、またはそれらを組み合わせたものをいう。

30

【0060】

ある態様では、新規のメディトープまたはメディトープと同様のフレームワーク結合機能を有する小分子のスクリーニング法を提供する。それらの方法には、限定される訳ではないが以下の段階が含まれる：推定されるメディトープまたは小分子のライブラリーをメディトープ使用可能抗体と接触させ；推定されるメディトープまたは小分子がフレームワーク結合インターフェースでメディトープ使用可能抗体に結合するか否かを測定し；1つまたはそれ以上の候補となるメディトープまたはメディトープと同様のフレームワーク結合機能を有する小分子を同定し；1つまたはそれ以上の候補の結合親和性を測定し；そして、1つまたはそれ以上の候補の結合解離定数が少なくとも $0.70 \mu\text{M}$ であれば、その候補をメディトープまたはメディトープと同様のフレームワーク結合機能を有する小分子であると同定する。更に、新規のフレームワーク結合インターフェースをスクリーニングする方法も提供し、これについては以下の実施例で更に記述する。

40

【0061】

本発明について態様および実施例に関連して記載したが、当業者に認識されるように、記載および例証する本発明を、本明細書に開示する本発明の意図および範囲から逸脱することなく変更することができる。実施例は本発明の理解を促すために記載するものであり、その範囲をいかなるようにも制限することを意図せず、また制限するものと解釈される

50

べきではない。実施例では、慣例的な方法の詳細な説明を行っていない。それらの方法は当業者に公知であり、多くの文献に報告されている。更に、上記および下記の実施例で引用する文献は全て、参照により、本明細書に完全に記載するのと同様に、その全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【実施例】

#### 【0062】

#### 実施例1：結晶構造の決定

##### 試料と方法

試料。セツキシマブの抗原結合フラグメント [F(ab)'] (または「Fab」) を得るため、IgGを固定化パパイン (Pierce社) で消化し、その後、プロテインAによる逆相精製およびSuperdex75カラム (GE Healthcare社) によるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を行った。セツキシマブの1本鎖結合フラグメント (scFvC225) を、軽鎖および重鎖の間に20アミノ酸長のリンカーを挿入して合成した。scFvC225および可溶性上皮細胞増殖因子受容体ドメインIII (sEGFRdIII) をSf9細胞で発現させ、過去の報告 (Donaldsonら, 2009) に従って精製した。

#### 【0063】

過去の報告 (Riemerら, 2005) でファージディスプレイから単離されたメディトープCQFDLSTRRLKC (cQFD; SEQ ID NO:1) およびCQYNLSSRALKC (cQYN; SEQ ID NO:2) を、シティ・オブ・ホープ 合成化学 / 高分子化学コア施設 (City of Hope Synthetic and Polymer Chemistry Core Facility) で合成、酸化、および精製した。

#### 【0064】

結晶化および回折データ。セツキシマブのFabフラグメント (5mg/mL) を個々のメディトープと1:10 (モル比) で混合し、Qiagen社JCSG Core Suites (IIV) を使用し、20においてスクリーニングを行った。2.2Å以上の回折を示す共結晶が、100mMリン酸ナトリウム / クエン酸 (pH4.5)、2.5Mリン酸ナトリウム / カリウム、および1.6% (w/v) メソ・エリスリトール中で形成された。結晶を14% (w/v) メソ・エリスリトールを通してウィッキングし、液体窒素中で急速冷凍した。結晶化試験と初期スクリーニングはシティ・オブ・ホープのX線施設で実施した。Stanford Synchrotron Radiation Labで回折データを得た (ビームライン9.1および11.1)。リガンド非結合型セツキシマブ (pdb:1YY8-A鎖およびB鎖) (Liら, 2005) で、Phaserプログラム (McCoyら, 2007) を使用し、分子置換法によって初期位相を求めた。2つのFabを非対称単位に配置したところ、Mathews係数は3.26、溶媒含有率は62.4%であった。Zスコア (平均値に対する解の標準偏差) は、ローテーション・サーチでは27および25、トランスレーション・サーチでは38および71であった。第3のFabフラグメントは配置することができなかった (非対称単位セル中のFabを3分子とすると、溶媒43%で適正なMathews係数 (2.18) となる)。Coot (Emsleyら, 2004) およびPhenix (Adamsら, 2002) を用いて複数回反復し、手動でメディトープを密度に組み込んだ。

#### 【0065】

##### 結晶化および構造決定

セツキシマブ上のメディトープ結合部位を同定するために、Fabフラグメントを作製および精製し、cQFDメディトープと1:10の割合で混合し、市販の因子 (factorials) を用いて結晶形成のスクリーニングを行った。20で1-3日後に結晶が形成された。これらの結晶の初期回折解析から、ユニット・セルは、既にProtein Data Bankに登録されているセツキシマブFab (1YY8.pdb) (Liら, 2005) と同様であることが明らかとなり、結晶パッキング (例えば、CDRが除去された) から、ペプチドがCDRループに存在しないことが示唆された。しかしながら、分子置換によって構造が解明され、実験で得られたマップの解析から、メディトープと一致するモデリングされていない電子密度が同定された。初期Fo-Fcマップは、Fabフラグメントの中央部分が可能性のある結合部位であることを明示している (図1)。Fabモデルだけを用いる初期ラウンドの精密化の後、メディトープと一致するひと続きのモデリングされていない密度が観察された。メディトープを密度に組み込み

、それに伴ってRおよびRFreeは低下した。Phenix (Adamsら, 2002) を用いた精密化の際に、水分子を付加した。回折データおよび精密化統計値を、以下の表3に示す。

【0066】

【表1】

共結晶構造の実験および精密化の統計値

	cQFD	cQYN	
データコレクション			
空間群	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	
セル寸法			10
$a, b, c$ (Å)	64.29, 82.53, 211.7	64.16, 82.52, 211.9	
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00	
解像度 (Å)	20 - 2.24 (2.3-2.24)	30 - 2.20 (2.36-2.20)	
$R_{\text{work}}, R_{\text{free}}$	0.078 (0.50)	0.067 (0.26)	
$I/\sigma(I)$	17 (3.1)	25.5 (6.0)	
コンプライアンス (%)			
$I/\sigma > 0$	91.6 (74.4)	97.0 (92.8)	
$I/\sigma > 3$	97.4 (83.3)	99.9 (100)	
冗長	4.2 (3.2)	7.9 (8.2)	
精密化			
解像度 (Å)	19 - 2.24	29.6 - 2.20	20
No. reflections <sup>‡</sup>	53791	58047	
$R_{\text{work}}, R_{\text{free}}$	18.4/23.4	18.6/23.0	
No. atoms			
タンパク質	6602	6529	
ミエトープ	200	188	
水	556	539	
B-factors			
タンパク質			
Fab	31.4	31.2	
ミエトープ	49.7	62.6	
水	37.1	37.1	
r.m.s.d.			
結合距離 (Å)	0.003	0.007	30
結合角 (°)	0.710	1.07	
Ramachandran			
好適/許容/無効	96.7/0.2/0.1	98.0/2.0/0.0	

\* 括弧内の数値は $I/\sigma(F) > 0$ の最高解像度シェル

‡ cQFDまたはcQYN共結晶の $F/\sigma(F)$ はそれぞれ $> 1.99$ および $> 1.36$

【0067】

これらの知見と比較から、ファージディスプレイで同定された第2のメディトープ、cQYNに結合したセツキシマブFabの結晶を得た。前述同様、明らかなモデリングされていない電子密度が、Fabの中央部分に観察された。第1の構造を用いて、配列の相違を適宜モデリングし、複数回ラウンドの精密化を行った。両メディトープの代表的な電子密度マップを図1BおよびCに示す。

40

【0068】

実施例2：メディトープはセツキシマブFabのマウス・フレームワーク領域に特異的である

試料と方法

上記実施例1に記載するものに加え、以下の試料および方法を使用した。

メディトープおよび点変異。上記のように、CQFDLSTRRLKC (cQFD; SEQ ID NO:1) およびCQYNLSSRALKC (cQYN; SEQ ID NO:2) の合成、酸化、および精製をシティ・オブ・ホープ合成化学/高分子化学コア施設で行った。アラニン点変異をcQFDメディトープ中の残基3 (Phe3をAlaに)、残基5 (Leu5をAlaに)、残基8 (Arg8をAlaに)、および残基1

50

0 (Leu10をAlaに) に作製し、SMT3のC末端にこのペプチドをコードさせ、細菌を用いて生成した (Mossessovaら, 2000)。ユビキチン様プロテアーゼ (Ulp1) をサンプルに添加してペプチドを遊離させた後、表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析を行った。

#### 【0069】

メディトープ-Fabインターフェースのキャラクタリゼーション。SPRのアフィニティー分析を、過去の報告 (Donaldsonら, 2009; Liら, 2005) に従って実施した。簡潔に記載すると、scFvC225またはFabC225を、アミン化学を用いてCM5チップ上に固定化した。ペプチドまたはsEGFRdIIIの親和性を20において平衡法によって測定し、式 $RU = \frac{R_{max} \cdot [L]}{[L] + K_d} + R_{offset}$ に適用した。Superdex 200 10/30カラム (GE Healthcare社) を用いてSECを行った。タンパク質を混合し、室温で20分間インキュベートし、4でカラムに適用した。

10

#### 【0070】

MDA-MB-468細胞株を用いて、ペプチドメディトープの存在下で、セツキシマブの結合を試験した。標識したセツキシマブ (AF488, Invitrogen社) を、60  $\mu$ MのcQFDペプチドの存在下または非存在下、4で20分間添加した。標識したMOPC-21を同位体コントロールとして使用した。FACS Calibur装置 (BD Biosciences社) を用いて細胞の蛍光を測定した。

#### 【0071】

メディトープ/Fabインターフェースの解析

本明細書で同定されたメディトープおよびFab間の結合部位のインターフェースは、IgGの4つのドメイン全てで形成される (例えば重鎖および軽鎖の可変ドメインおよび定常ドメイン)。PISAサーバーを用いて、cQFDまたはcQYNメディトープ-Fabインターフェースの埋没した表面領域は、それぞれ904 ( $\pm 28$ ) A<sup>2</sup>および787 ( $\pm 42$ ) A<sup>2</sup>であり、軽鎖および重鎖に等しく分布していた。図2および4に、メディトープと接触するFabの残基およびループを示す。

20

#### 【0072】

両メディトープは、セツキシマブFabと複数の水素結合および疎水性接触を成す。図2Aは、セツキシマブFab (マウスキメラIgG)、ファージディスプレイ実験で同位体コントロールとして使用したヒト化モノクローナルIgG (ch14.18)、およびヒト化トラスツズマブFabの間のわずかな相違を示している。ヒト化トラスツズマブFabをセツキシマブFabに重ね合わせるにより、cQFDメディトープのArg9はマウス軽鎖可変領域が形成するユニークな空洞に結合することが判明した。特に、マウス軽鎖可変領域のAsp85、Ile83、およびThr40は、cQFDメディトープのArg9残基への結合に重要である (図2B)。マウス・フレームワーク中のAsp85は、cQFDメディトープのArg9のグアニジニウム基と塩橋を形成する ( $d_{NE---OD1}=2.8A$  &  $d_{NH1/2---OD2}=3.0A$ )。また、Asp85のカルボキシル基はcQFDメディトープのLeu10のバックボーンアミドと水素結合を形成する ( $d_{OD2---HN}=2.7A$ )。更に、軽鎖のThr40の水素基はメディトープArg9のグアニジニウム基と水素結合を形成する ( $d_{OG1---NH1}=3.1A$ )。ヒトFab中のPhe83のフェニル環およびPro40のプロリジン環は、Arg9の側鎖を立体的に遮蔽する。

30

#### 【0073】

cQFDメディトープ中のArg9側鎖の選択によってマウスおよびヒトFab配列間の相違が明らかとなったが、これだけでなく、cQYNメディトープがcQFDメディトープ中のArg9と同じ位置にアラニンをコードしており、従って、ヒトFabに結合する可能性があることが明らかになった。ファージライブラリーをhu14.18抗体で前処理したにも拘わらず、なぜcQYNメディトープが選択されたのかを解明するために、cQFDおよびcQYNメディトープ間の相違およびそれらのセツキシマブFabとの相互作用を測定した。cQFDおよびcQYN構造からの重鎖および軽鎖FabのCa原子の重ね合わせにより、各メディトープのPhe/Tyr3、Leu5、およびLeu10残基の疎水性側鎖がほぼ同じ場所に位置することが明らかである (図2B)。しかしながら、cQFDおよびcQYNペプチドのバックボーン・トレースはかなり逸脱する。特に、cQFDメディトープのArg8側鎖構造は伸長されており、Fab重鎖のGln111のバックボーン・カルボニルと強力なバックボーン水素結合を形成している ( $d_{NH---O=C}=2.8A$ )。一方、cQ

40

50

YNペプチドのTyr3のヒドロキシル基は立体的にArg8側鎖に干渉し(図2B)、cQYNメディトープのArg8と重鎖のAsn111間の相互作用を阻害する。この知見と一致して、cQYN複合体中の両Arg8側鎖は、電子密度マップ中で不明瞭であり、少なくとも2つの異なる回転体をとる(非対称単位中に2つのFab-メディトープ複合体が存在する)。この変化に伴って、バックボーン水素結合パターンのシフトが観察された。cQFDメディトープ中のThr7のアミドカルボニルは、セツキシマブFab軽鎖中のアミドAsn41と水素結合を形成する( $d_{NH\cdots O} = 2.7\text{\AA}$ )。この水素結合は、cQYNペプチドではAsn41バックボーンのアミドでArg8バックボーンのカボニルにシフトする( $d_{C=O\cdots H} = 3.0\text{\AA}$ )。

#### 【0074】

総合すると、cQFDおよびcQYN間の相違(例えばR8および重鎖Fab間の塩橋の喪失)およびcQFD中のArg9が結合するFab軽鎖中の箇所における配列の相違(例えばいずれのメディトープもAsp85とLeu10のアミド間の水素結合が喪失している)は、マウスキメラに結合するように選択されたメディトープが、ヒトFabフレームワークと実質的により弱い相互作用を有し、選択の際の洗浄で除去されたことを示唆している。

#### 【0075】

メディトープはFabに大きなコンフォメーション変化をもたらさない

メディトープ-Fabインターフェースの位置に基づいて、メディトープがリガンド非結合型構造および/またはリガンド結合型構造に対するIgGドメインの相対配向を妨害するかどうかを確認した。まず、両メディトープ複合体の非対称単位セル内の軽鎖および重鎖を比較した後、各鎖をリガンド非結合型構造およびEGFRリガンド結合型構造と比較した。いずれのメディトープに結合した軽鎖の可変ドメインも、本質的にセツキシマブのリガンド非結合型構造と同一であった(r.m.s.d.平均:cQFD, $0.231 \pm 0.014\text{\AA}$ ; cQYN, $0.18 \pm 0.01\text{\AA}$ )。しかしながら、重鎖の可変ドメインは、有意に高い相違性を示した(r.m.s.d.平均:cQFD, $0.85 \pm 0.01\text{\AA}$ ; cQYN, $0.88 \pm 0.01\text{\AA}$ )。留意すべきことに、この相違は主に、フレームワーク・ループ2(残基39-46)の位置に起因するものであり、これは、このループ中の残基を欠失させてr.m.s.d.を再計算すると、かなり低い値となるためである(cQFD, $0.18 \pm 0.01\text{\AA}$ ; cQYN, $0.31 \pm 0.01\text{\AA}$ )(図6)。更に、このループはFab C225-EGFR共結晶構造中では移動され、その相対B-factor値は、これがフレキシブルであることを示している(図6)。最後に、メディトープの存在は、EGFR結合型または非結合型構造に関してCDR構造に有意な変化を与えない。EGFRリガンド結合型構造の重鎖CDRループ3中のTyr101のバックボーンは、いずれのメディトープに結合したFab構造と比較しても反転しているが、この反転は、リガンド非結合型セツキシマブFab構造でも観察される(Liら, 2005)。

#### 【0076】

メディトープ残基のインターフェースへの寄与

cQFDメディトープ-Fab複合体の構造、並びに、cQYNおよびcQFDの配列同一性に基づき、いくつかの点変異をcQFDメディトープ中に作製し(Phe3 Ala、Leu5 Ala、Arg8 Ala、およびLeu10 Ala)、メディトープの全体的な結合親和性に対するこれらの残基の役割をキャラクタライズした。結合親和性を評価するために、標準的なアミン化学を用いてFabフラグメントをCM5チップに結合させた。次に、合成cQFDおよびcQYNメディトープのセツキシマブFabに対する親和性を測定した。cQFDメディトープは $950 \pm 30\text{nM}$ の親和性でFabに結合し、cQYNメディトープの結合親和性は $3.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ であった( $n=3$ )。結合反応速度も測定した(図3)。二分子相互作用とした場合の結合定数は、cQFDおよびcQYNでそれぞれ $4.2(\pm 0.1) \times 10^4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ および $1.8(\pm 0.1) \times 10^4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。解離定数は、cQFDおよびcQYNでそれぞれ $2.5(\pm 0.1) \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ および $8.6(\pm 0.1) \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。それらの測定値に基づくKD値(cQFDで $430(\pm 30)\text{nM}$ 、およびcQYNで $3.5(\pm 0.1) \mu\text{M}$ )は、平衡測定とほぼ一致する。

#### 【0077】

次に、各変異型cQFDメディトープの親和性を測定した。点変異型および野生型cQFDメディトープを、SMT3のC末端融合体として作製し、Ulp1で開裂した後、分析した。生物学的に生成した野生型cQFDメディトープは合成したcQFDと同様、 $770\text{nM}$ の親和性で結合したが

、Phe3 Ala、Leu5 Ala、およびArg8 Ala変異は、Fabに対する親和性を著しく低下させた（表4）。特に、Arg8 Ala変異では、結合親和性が140倍低下した。

【0078】

【表2】

cQFDミモトープ改変体の解離定数

リガンド	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
WT	0.77	-
F3A	34	2.3
L5A	57	2.6
R8A	141	3.1
L10A	2.2	0.63

10

【0079】

最後に、ヒト化治療用モノクローナル抗体、トラスツズマブのFabをCM5チップに結合させ、ヒト・フレームワークに対するcQFDおよびcQYNメディトープの親和性をキャラクタライズした。平衡測定により、いずれのメディトープの解離定数も150  $\mu\text{M}$ を超えることが明らかになった。

20

【0080】

#### 実施例3：セツキシマブFabはメディトープおよびEGFRに同時に結合する

##### 試料と方法

上記実施例1および2に記載するものに加え、以下の試料および方法を使用した。

試薬。セツキシマブの1本鎖結合フラグメント（scFvC225）を、軽鎖および重鎖の間に20アミノ酸長のリンカーを挿入して合成した。ScFvC225および可溶性上皮細胞増殖因子受容体ドメインIII（sEGFRdIII）をSf9細胞中で発現させ、過去の報告（Donaldsonら、2009）に従って精製した。

【0081】

メディトープおよび点変異。上記のように、CQFDLSTRRLKC（cQFD；SEQ ID NO:1）およびCQYNLSSRALKC（cQYN；SEQ ID NO:2）の合成、酸化、および精製をシティ・オブ・ホープ合成化学/高分子化学コア施設で行った。アラニン点変異をcQFDメディトープ中の残基3（Phe3をAlaに）、残基5（Leu5をAlaに）、残基8（Arg8をAlaに）、および残基10（Leu10をAlaに）に作製し、SMT3のC末端にこのペプチドをコードさせ、細菌を用いて生成した（Mossessovaら、2000）。ユビキチン様プロテアーゼ（Ulp1）をサンプルに添加してペプチドを遊離させた後、表面プラズモン共鳴（SPR）分析を行った。

30

【0082】

##### FabへのEGFRおよびメディトープの同時結合

回折データは、これらのペプチドがワクチンとして有効であるという仮説と矛盾する。特に、原子モデルは、メディトープがCDRに直接結合しておらず、そのため、抗原エピトープを模倣しないことを示している。しかしながら、cQYNメディトープを接種したマウスから採取した血清は、細胞増殖を阻害した（Riemerら、2005）。従って、メディトープが抗原結合を遮蔽するか否かを試験するために、セツキシマブFabをEGFRドメインIIIおよびcQFDと共にインキュベートし、SEC分析カラムに施与した。13.9mLにピークが観察され、このピークの非還元SDS-PAGEにより、3つの成分全ての存在が確認された（図4B）。個々の成分は15.2mL（Fab C225）、15.6mL（sEGFRdIII）、および16.3mL（SMT-CQFDLSTRRLKC；SEQ ID NO:1）に溶出された。

40

【0083】

更に、メディトープがセツキシマブのscFvに結合しうるか否かを確認した。scFvでは、

50

CDRループは無傷のままであるが、Fab可変ドメインは短鎖ペプチドリンカーを介して直接結合しており、Fab定常ドメインは除去されている。すなわち、scFvではメディトープ結合ポケットが除去されており、CDRは最低限の影響しか受けていない。SPRは、EGFRドメインIIIおよびcQFDメディトープがCM5チップに連結されたセツキシマブFabに結合することを示している（図4B参照）。更に、EGFRドメインIIIは、第2のCM5チップに連結したscFvに、親和性をほとんど喪失せずに結合した。しかしながら、Fab結合に比較して、cQFDメディトープは、100  $\mu$ Mという高濃度でもscFvを飽和しなかった。これは、メディトープのCDRへの親和性が（あったとしても）最低限であることを示しており、結晶学的解析と一致している。

#### 【0084】

10

メディトープはセツキシマブのEGFR発現細胞への結合に影響を与えない

FabはメディトープおよびEGFRドメインIIIへ同時に結合できるが、メディトープが完全長IgGとしてのセツキシマブのEGFR発現細胞への結合に影響を与えるか否かを確認した。これを試験するために、FACS分析を用いて、メディトープ濃度の関数として、IgGのMDA M B-468細胞（EGFRを過剰発現する）への結合を追跡した。細胞を、漸増濃度のcQFDメディトープ存在下でセツキシマブと共にインキュベートした。60  $\mu$ Mを超えるメディトープ濃度でも、セツキシマブの細胞への結合に有意な変化は見られなかった（図5）。この知見は上記のSEC分析と一致しており、メディトープが抗原結合のアロステリック調節剤として作用しないことを示している。

#### 【0085】

20

EGFRドメインIIIおよびメディトープがFabに同時に結合していることが、メディトープのKdより有意に高い濃度で明らかになっている。cQFDおよびcQYNメディトープと同様、スーパー抗原SpAおよびPpLはFabフレームワーク領域に結合し、抗原結合に影響を与えない（Grailleら, 2000 ; Grailleら, 2001 ; Grailleら, 2002 ; Youngら, 1984）。

#### 【0086】

更に、固相に化学結合させたメディトープを用いてマウスキメラ化セツキシマブを精製することができ、これは、マウスキメラIgG、並びに、メディトープを移植したIgGの新規の精製法である。図10参照。この精製法にはいくつかの利点がある。第1に、メディトープは合成が容易であり、一般的な固相（例えば磁性ビーズ）に容易に付加することができる。第2に、メディトープの親和性は点変異によって容易に調節されるため、精製工程の微調整が可能であり、激しい条件（例えば、抗体の溶出に一般的に使用される低pH）が回避される。最後に、本明細書に記載するように、メディトープを2価または多価とし（例えば後述の実施例4に記載するように）、これを使用して無傷のマウスまたはマウス化ヒトIgGを抽出することができる。また、ペプチドの使用には、プロテインAまたはプロテインLを使用する現行の精製法に優る利点がある（例えば、プロテインAまたはプロテインLの生成に伴う高コスト、ライフサイクルが限られていること、および外来の生体物質（例えば細菌性病原体）導入の可能性）。

30

#### 【0087】

立体的遮蔽

メディトープを、マウスキメラ化またはマウス化ヒトmAbの軽鎖または重鎖N末端に、フレキシブルなリンカーを介して連結することができる（図11）。mAb IgGのN末端は抗原結合部位と並列しており、フレキシブル・リンカーを介するN末端からの伸長によって抗原結合は立体的に妨害される。リンカー内に腫瘍特異的プロテアーゼ部位（例えばMMP9、MMP14、前立腺特異的抗原（PSA）セリンプロテアーゼ、または他の好適な部位）をコードさせることにより、分子内「遮蔽された」IgG構築物の立体的な制約が腫瘍部位切断され、抗体結合が可能となる。この設計原理では、分子内「遮蔽された」IgGの正常組織への結合が阻害され、オフターゲット結合による有害な副作用が回避される。セツキシマブ上のアビジン-ペプチド遮蔽のオフレート測定を図12に示す。この図は、多価メディトープが1価メディトープより高い親和性で結合するが、遮蔽はしないことを示している。

40

#### 【0088】

50

#### 実施例 4：多価メディトープの作製

同じ抗原（例えばEGFR）上の独自のエピトープを認識する複数のモノクローナル（mAb）を組み合わせることにより、細胞死が促進され、腫瘍増殖が阻害されることが明らかになっている。この細胞死促進の正確なメカニズムは議論されているところであるが（免疫応答vs受容体の抑制的制御vsリガンド拮抗の促進）、過去の研究から、いずれのmAbも、細胞死を促進するためには多価（例えば完全長IgGまたはF(ab)'<sub>2</sub>）である必要があることが示唆されている。そのように、多価メディトープを、後述のように第2の抗体として代用してもよい。従って、本明細書に記載するメディトープをスキャホールドに連結させ、選択性および結合親和性を向上するための多価メディトープ作製してもよい。

##### 【0089】

特異性および親和性は、多くの場合、多価性によって得られる。これは、2価リガンドでは  $G_{Total} = G1 + G2 - G_{linker}$  で表され、 $K_{Total} = K_1 * K_2 / K_{linker}$  と等しい。リンカーが自由エネルギーに寄与しない場合 ( $K_{linker} \sim 1$ )、2価標的では、2価リガンドの見かけの親和性は単量体結合定数の積である。従って、親和性を有意に増加させることができる（例えば  $K_D = 1 \mu$  のメディトープでは、2価メディトープの親和性の「理論値」は1pMである）。しかしながら、そのような増加が見られるのは稀であり、これは主に、2価/3価/多価受容体の幾何学的構造による。受容体の幾何学的構造によってリンカーは厳しい制約を受けるが、これによって、標的化送達の重要なゴールである特異性が保証される。

##### 【0090】

リンカーに対する受容体の制約に対処するため、未改変メディトープまたは最適化メディトープを多価スキャホールドに結合させることができる。これを行うために、リンカーを最適化する。腫瘍細胞は抗原密度が高いため、多価メディトープを隣接するIgGにはめ込むように結合（latch-on）させ、「デージーチェーン」様アレイを形成させるべきである（図8）。2価メディトープとIgGの分子内結合が可能であるが、IgGのC2対称性により、それらの相互作用ではリンカーに厳しい幾何学的制約が与えられる。3価またはそれ以上のスキャホールドにより、1つより多い抗体が「デージーチェーン」を成すことが保証される。第3のメディトープ・アームを包含させることにより、3価メディトープの抗原結合抗体への初期接触のライフタイムが延長される。同様に、これにより、近接する抗原結合抗体に更なるアームが結合する可能性が上昇し、複合体全体が安定化される。

##### 【0091】

#### スキャホールドの合成

FITC標識した2価メディトープの合成を、（化合物2）を用い、「クリック」ケミストリーに基づいて行った（図13）。テンプレート4および5（図13）を使用することにより、それぞれから2価および3価メディトープの形成が可能となる。この合成はすばらしい進歩である。なぜなら、この発見は多価メディトープ調製のために開発された化学を表すものであり、最適な結合のために種々の長さのポリエチレングリコール（PEG）（または他の）リンカーの検討に重点的に取り組むことができる。合成法はまた、放射性核種イメージングのためのDOTA導入にも適している。例えば30AのPEG 2価アームが、FITC標識された2価メディトープ（すなわち化合物13）の合成で導入された（図13）。IgG内でのCDR領域間の距離は~130Aである。このように、PEGリンカーの長さは体系的に多様であり、この方法は確かに最適である。市販のPEGの末端から末端までの距離は90Aであり（Pierce社）、IgGの距離より長い。

##### 【0092】

#### 多価性のキャラクタリゼーション

それぞれの多価メディトープのキャラクタリゼーションをSPRおよびITCによって行い、多価スキャホールドへのコンジュゲーションがメディトープ-IgG相互作用に影響しないことを確認した。しかしながらこれらの測定は、IgGが腫瘍表面に結合しないため、多価性の測定における有効性に限界がある。これに代わって、FACS分析および細胞生存率アッセイを使用して、多価メディトープの影響をEGFRを過剰発現する細胞上で直接定量してもよい

10

20

30

40

50

。

## 【0093】

FACS分析では、EGFRを過剰発現する細胞株（MDA-MB-468およびA431）を、種々の濃度（1nMから100nM）のセツキシマブと共にインキュベートした。次に、セツキシマブ処理した細胞を漸増濃度（0.1nMから1 $\mu$ M）の標識された多価メディトープと共にインキュベートし（図17；メディトープ-Fc）、CyAn FACSソーターを用いて結合特性を分析した。1価メディトープで観察されたよりかなり低い濃度でのシフト（図17）および/またはシフトする細胞のパーセンテージの増加が観察される。多価メディトープで期待されるこれ以外の効果を更に確認するために、標識されていない1価メディトープを用いて、抗原が結合したセツキシマブを巡って、標識された多価メディトープと競合させてもよい。

10

## 【0094】

細胞生存率アッセイを用いて、セツキシマブ介在型細胞死の向上の際の多価メディトープの有効性を測定することができる。簡潔に記載すると、MDA-MB-468およびA431細胞を播種し、種々の濃度のセツキシマブおよび多価メディトープで処理する。セツキシマブ単独と同じ結果を生じる1価メディトープをコントロールとして用いる。MTT（3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド）を用いて生存細胞数を定量してもよい。活性を示す多価メディトープは、ウエスタンブロット分析を行い、EGFR並びにEGFRシグナリング経路の一部であるAKTおよびMAPのリン酸化状態を追跡してもよい。その後、これらのデータをセツキシマブ単独処理細胞およびチロシンキナーゼ阻害剤処理細胞（AG1478）からのデータと比較する。総合すると、これによって細胞死が多価メディトープ濃度の関数として増加すると考えられる。

20

## 【0095】

## MTTアッセイ

セツキシマブと併用した場合の単量体メディトープまたは2価メディトープ-Fcの細胞死誘導に対する効果を、MTTアッセイを用いて評価した。4000個のMDA-MB-468細胞を80 $\mu$ lの培養液中、96ウェルプレートの各ウェルに播種した。10 $\mu$ lの1 $\mu$ Mセツキシマブを10 $\mu$ lの0.1、1、または10 $\mu$ Mのメディトープまたはメディトープ-Fcと共に添加し、最終濃度を0.1 $\mu$ Mセツキシマブ、および、0.01、0.1、および1 $\mu$ Mメディトープまたはメディトープ-Fcとする。また、コントロールとして各成分を単独でPBSと共に添加した。48時間のインキュベーション後、10 $\mu$ lのMTT試薬を添加し、更に4時間インキュベートした。その後、培養液上清を除去し、100 $\mu$ lのMTT結晶溶解液を添加し、プレートを630nmで測定した。メディトープまたはメディトープ-Fc単独では細胞増殖は有意に変更されなかったが、メディトープ-Fcだけがセツキシマブとの併用で細胞増殖を阻害した（単量体メディトープは阻害しなかった）（図28A）。

30

## 【0096】

多価メディトープがセツキシマブへの添加で第2の抗EGFR抗体の効果と同様の細胞死減促進効果を有することを示すために、セツキシマブ+メディトープ-Fcまたはセツキシマブ+M425のいずれかによる腫瘍細胞増殖阻害効果を比較した。4000個のMDA-MB-468細胞を80 $\mu$ lの培養液中、96ウェルプレートの各ウェルに播種した。10 $\mu$ lの1 $\mu$ Mセツキシマブを10 $\mu$ lの2、4、または8 $\mu$ MのメディトープFcまたはM425と共に添加し、最終濃度を0.1 $\mu$ Mセツキシマブ、および、0.2、0.4、または0.8 $\mu$ Mメディトープ-FcまたはM425とする。コントロールとしてセツキシマブをPBSと共に添加した。48時間のインキュベーション後、100 $\mu$ lのMTT試薬を添加し、更に4時間インキュベートした。その後、培養液上清を除去し、100 $\mu$ lのMTT結晶溶解液を添加し、プレートを630nmで測定した。メディトープ-Fcはセツキシマブの細胞死減能の向上を示したが、M425ほどの有効性はなかった（図28B）。

40

## 【0097】

別の方法として、種々のスキャホールドおよびリンカーを用いて高親和性多価メディトープを作製してもよい。例えば、DNAをメディトープのスキャホールドとして使用し、より柔軟性の低いスキャホールドを作製してもよい。

## 【0098】

50

メディトープ（野生型）をIgGのFc領域のN末端に、フレキシブルなリンカーを介して融合させた（「メディトープ-Fc」）（図15；SEQ ID NO:3-4）。メディトープ-Fcの配列および構造をそれぞれ図15および16に示す。Fc領域の「2量体化」リガンドへの使用は十分確立されている（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18215087>）。この例ではグリシンおよびセリンから成る17アミノ酸長のリンカーを選択したが、任意の好適な長さのリンカーを使用してもよい。多価性による結合の向上を証明するために、 $0.5 \times 10^6$ 個のMDA-MB-468細胞を10nMのセツキシマブで、室温において30分間標識し、洗浄した後、0.1、0.3、1、および3 $\mu$ Mの2価メディトープ-Fcまたは単量体メディトープと共に室温で30分間インキュベートし、洗浄し、FACS分析を行った。図17に示すように、FACS分析は、メディトープ-Fc（化学量論的に補正）がセツキシマブで前処理した細胞に有意に高い親和性で結合することを示している。更に出願人は、この相互作用がメディトープ使用可能mAb（セツキシマブ）に特異的であることを証明する。このデータは、メディトープ-Fcとメディトープ使用可能mAbの組み合わせが相乗的であり、第2の抗体を代替できることを示している。

10

20

30

40

50

#### 【0099】

生物学および化学的起源の異なるスキャホールドを使用して多価性を得ることができる。これには、限定される訳ではないが、ストレプトアビジンまたはコラーゲン（<http://ip.com/patapp/EP2065402A1>）を用いる2価または3価スキャホールド、4価スキャホールドとしてのストレプトアビジンを用いるもの、ユニークなスキャホールド（<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283611000283>）、Origami DNA（<http://www.nature.com/nnano/journal/v4/n4/abs/nnano.2009.5.html>）などを使用するものがある。化学スキャホールドの作製は、限定される訳ではないが以下のような分子を使用することができる：DNA（1本鎖、2本鎖、ホリディ構造（Holliday junction）、アプタマーなど）、RNA（1本鎖、ヘパリン、ステム・ループ、アプタマーなど）、PNA（ペプチド核酸）、DNA/PNA 2本鎖および3本鎖（柔軟性を低くするため）、ナノ粒子（直接結合するか、またはPEGのような有機ポリマーを介して結合する）、それ自身と、および/またはDNAもしくはPNAと2本鎖を形成することができる有機ポリマー。例えば図13では、3価のメディトープの合成に成功した。図14は、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識したメディトープダイマー7のキャラクタリゼーションを示す。

#### 【0100】

更に、Fcおよびメディトープの組成およびその間の距離は、親和性および特異性が最適となるように、体系的に検討することができる。ある態様では、それぞれの天然型または非天然型残基をリンカー内の任意の位置で置換して最適化を行うことができる。更に、2-100、またはそれ以上の残基間にリンカーを施与することが可能である（例えば、現行の、および今後開発されるDNA合成装置によって作製し、メディトープおよびFc領域間に挿入してもよい）。また、リンカーの「柔軟性を低下」させ、旋回範囲を制限してFc-メディトープの親和性および特異性を向上してもよい。例えば、コイルドコイルドメインをメディトープおよびFc間に配してもよい（図18）。あるいはまた、不活性なタンパク質ドメイン（例えば免疫グロブリン折りたたみ構造）をリンカーの代わりに用いてもよい。複数の免疫グロブリン折りたたみ構造を、メディトープおよびFcドメイン間に配することができる。ある態様では、リンカーの組成は、抗原性の可能性を軽減するために、ヒト由来のものであってもよい。

#### 【0101】

##### 実施例5：メディトープポケットの改変

メディトープ部位の内表面に並ぶ残基を体系的または無作為的に変更し（縮重ライブラリーおよび選択）、メディトープまたはメディトープ類似体の特異性を向上および/または変更することができる（改変方法については、例えばSheedyら 2007およびAkamatsuら 2007（参照により本明細書に組み込まれる）参照）。これらの位置を非天然アミノ酸、天然アミノ酸、またはその両方で置換し、メディトープ相互作用の親和性を向上することができる。近年、二重特異性抗体を作製するための非天然アミノ酸の抗体への導入が報告さ

れた (Hutchinsら 2001)。

【0102】

メディトープに接触し/空洞の内表面に並ぶ(結合したメディトープ-cQFDのいずれかの原子から8Å以内にある)残基で、体系的または無作為的に変更して水素結合、イオン相互作用、静電相互作用、または立体相互作用を介するメディトープ親和性を向上することができるものとして、1つまたはそれ以上の軽鎖残基(例えば、軽鎖のP8、V9、I10、S14、E17、Q38、R39、T40、N41、G42、S43、P44、D82、I83、A84、D85、Y86、Y87、G99、A100、G101、T102、K103、L104、E105、K107、R142、S162、V163、T164、E165、Q166、D167、S168、もしくはY173;または重鎖のQ6、P9、R38、Q39、S40、P41、G42、K43、G44、L45、S87、D89、T90、A91、I92、Y93、Y94、W109、G110、Q111、G112、T113、L114、V115、T116、Y151、E154、P155、V156、T171、F172、P173、A174、V175、Y182、S183、もしくはL184)、またはそれらを組み合わせたものがある。更に、メディトープ結合領域中の他の残基を変異させ、メディトープ群がこれと水和し、高親和性で結合できるようにしてもよい。例えば、軽鎖のTyr87残基、重鎖のTyr94残基、またはその両方を使用して、メディトープ類似体由来のアルデヒドまたはハウ素含有化合物と水和させてもよい。

10

【0103】

メディトープ部位の発展。メディトープは抗原結合に影響を与えず、薬物の送達、他の抗体のデイズチェーン/架橋、または治療用抗体の効率および有効性を増加させるための他の方法に使用できることが明らかにされた。メディトープ結合部位の組成を改変し、現行のメディトープに高親和性で結合できるように、または、種々のメディトープ類似体もしくはDOTA(放射性物質送達のための)のような小分子に結合できるようにしてもよい。メディトープ結合部位の内表面に並ぶ各残基を体系的に改変、作製、およびキャラクタライズしてもよい。しかしながら、変異の数は膨大である(>20<sup>6</sup>の組み合わせ、可能性としては>20<sup>16</sup>の組み合わせ)。メディトープへの結合を可能とするFab中の変異をより効率的に同定するために、各アミノ酸が所定の部位で置換されるようにして、IgGのライブラリーをDNAレベルで構築してもよい。最も有用な組み合わせを選択し、詳細にキャラクタライズし、それを用いて更なる改変を行う。

20

【0104】

これを行う一つの方法は、目的の部位(例えば重鎖のIle90、Thr92、Leu114、およびThr116、および、軽鎖のLys103およびGlu165)に縮重オリゴを用いてDNAライブラリーを作製し、これらの部位に20個の天然型アミノ酸全てをコードさせる。更に、GPIドメインをIgG重鎖のC末端に付加してもよい。標準的な方法によってライブラリーをトランスフェクトし、独自のIgGを発現させてもよい。抗原結合が影響されないようにするため、蛍光標識した抗原(例えばHer2、EGFR、IGFR、CLTA-4など)に結合する細胞をFACSでソーティングしてもよい(図20)。その後、抗原に結合した細胞を、特定のメディトープ、メディトープ類似体、または他の目的分子(例えばDOTA)への結合について選択する。細胞をソーティングした後、PCRを用いてメディトープ/類似体/小分子結合を可能とする、または促進する変異を同定する。これを複数回反復し、結合を「発展/最適化」することができる。

30

【0105】

実施例6:メディトープ使用可能抗体の作製

ある態様では、メディトープ結合部位を既存の抗体および全ての今後開発される抗体、例えばIgG1-4(およびアイソフォーム)、IgE、IgA1、IgA2、IgD、およびIgM上に、他のIgG(例えばヒト、マウス、またはニワトリ)の残基の変異を介して作製することができる。

40

【0106】

メディトープに結合するフレームワークはユニークであり、Fab可変領域(Fv)がマウスであり、Fab定常領域(CH1)がヒトである。更に、このFabは成熟して(既知のIgGの配列アラインメントに基づいて)マウスまたはヒトキメラIgGには見られない残基の組み合わせを各IgGドメイン内に生ずる。これを明らかにするために、元のメディトープが完全

50

長ヒト血清IgGまたは完全長マウス血清IgGに結合しないことを実証した。そのため、メディトープ結合部位を任意のフレームワーク（ヒトIgGを含む）上にマッピング（または遺伝子操作もしくは変異）し、メディトープ結合を可能にすることができる。現行のメディトープ使用可能モノクローナル抗体の抗原特異性を、既存のモノクローナル抗体のCDRを移植するによって改変してもよい（図21）。

#### 【0107】

ヒトフレームワーク配列およびセツキシマブ・フレームワーク間の配列相違をセツキシマブFabの結晶構造上にマッピングした。メディトープ部位の内表面に並ぶヒトフレームワーク中の残基（トラスツズマブ-1N8Z.pdb）を、セツキシマブ中の対応する残基に変異した。標準的な方法を用いて重鎖および軽鎖を合成し、標準的な哺乳動物発現ベクターにサブクローニングし、標準的な方法を用いて変異型IgGを精製し、Her2およびメディトープ結合についてキャラクタライズした。図23Aおよび23Cは、それぞれ重鎖（SEQ ID NO:5）および軽鎖（SEQ ID NO:8）の核酸配列を示す；図23Bおよび23Dに、軽鎖（SEQ ID NO:6）および重鎖（SEQ ID NO:9）の対応するアミノ酸配列をメディトープ使用可能トラスツズマブの野生型配列（SEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:10）と比較して示す。

10

#### 【0108】

抗原結合をキャラクタライズするために、標準的なプロトコルを使用して野生型トラスツズマブおよびメディトープ使用可能トラスツズマブをAlexa647で標識した。同様に、メディトープ-Fcを同じプロトコルを用いてAlexa488で標識した。メディトープ-Fcがメディトープ使用可能トラスツズマブに結合し、野生型トラスツズマブには結合しないことを示すために、Her2を過剰発現するSKBR3細胞（ $0.5 \times 10^6$ ）を、標識された野生型トラスツズマブまたはメディトープ使用可能トラスツズマブと共に30分間インキュベートした。未結合の抗体を洗浄し、細胞をメディトープ-Fcコンストラクトと共に30分間インキュベートした。抗体結合およびメディトープ結合のFACS分析を行った。「メディトープ移植」の重要な要素として、メディトープ使用可能トラスツズマブはSKBR3で発現されたHer2に結合することがFACSのデータから明らかである（例えば、抗原特異性を喪失させずにメディトープ部位を抗体上に移植できる）（図22A）。また、FACSデータから、メディトープ-Fcはメディトープ使用可能トラスツズマブに結合するが、野生型トラスツズマブには結合しないことが明らかである（図22B）。

20

#### 【0109】

留意されるように、メディトープ使用可能トラスツズマブの生成は、正確な定量的キャラクタリゼーションを行えるよう、より多くの物質が得られるように最適化しなくてはならず、これはみかけ上の親和性の低下（例えば、メディトープ使用可能トラスツズマブの最終濃度とAlexa647での標識が不確実であること）の要因である。同様に、抗原結合並びにメディトープ結合を最適化する標準的な方法もある（メディトープ結合部位の最適化を参照）。いずれにせよ、データから、メディトープ使用可能トラスツズマブがHer2過剰発現SKBR3細胞に結合し、メディトープ使用可能トラスツズマブで前処理した細胞はメディトープに結合することは明らかである。

30

#### 【0110】

Her2CDRを移植したメディトープ使用可能抗体。CDR移植は現在、ヒト化モノクローナル抗体の作製に標準的に実施されている。メディトープ結合部位はセツキシマブ・フレームワークに独自のものである（そして、ヒト、マウス、または他のマウス-ヒトキメラ（例えばリツキシマブ）にはない）。別の態様では、他の抗体のCDRループをセツキシマブ・フレームワーク上に移植し、トラスツズマブのCDRループをセツキシマブ・フレームワーク上に移植することによってメディトープ結合を提供することができる。mAbのCDRループの「境界線」は一般に配列ホモロジー構造法によって明確に定義されているが、トラスツズマブの結晶構造をセツキシマブ上に重ね合わせ、各残基の位置を確認して、CDRループのコンフォメーションへの二次的影響を有しうるCDRループ外の相違の可能性を検討した。得られた軽鎖および重鎖のアミノ酸配列（例えばセツキシマブ上のトラスツズマブCDRループ）をDNA配列に翻訳し、それぞれをコードする遺伝子を合成した。その後、遺伝子

40

50

を残りのIgG DNA配列中にインフレームでサブクローニングし、DNAシーケンシングによって確認し、個々の発現ベクターに配した。得られた発現ベクターをNS0細胞に形質転換し、重鎖および軽鎖を共発現させた。発現された完全長のCDR移植IgGが分泌されるので、遠心分離によって上清を得、濃縮し、プロテインAカラムを通過させた。低pH溶液を用いてIgGを溶出し、直ちに中和した。還元条件下で完全長CDR移植IgGのSDS-PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）を行ったところ、軽鎖および重鎖の質量と一致する明白な2つのタンパク質バンドが観察された。バンドの位置は野生型セツキシマブと同様の位置に泳動した。

#### 【0111】

抗原結合をキャラクタライズするために、標準的なプロトコルを使用して、野生型トラスツズマブおよびトラスツズマブのCDRを移植したメディトープ使用可能mAbをAlexa647で標識した。前回同様、メディトープ-Fcを同じプロトコルを用いてAlexa488で標識した。メディトープ-FcがトラスツズマブCDRを移植したメディトープ使用可能mAbに結合し、野生型トラスツズマブには結合しないことを示すために、Her2を過剰発現するSKBR3細胞（ $0.5 \times 10^6$ ）を標識した野生型トラスツズマブまたはメディトープ使用可能mAbと共に30分間インキュベートした。未結合の抗体を洗浄し、細胞をメディトープ-Fc構築物と共に30分間インキュベートした。抗体結合およびメディトープ結合をFACSで分析した。「CDR移植」の重要な要素として、トラスツズマブCDRを移植したメディトープ使用可能mAbはSKBR3細胞で発現されたHer2に結合することがFACSのデータから明らかである（例えば、CDRループをセツキシマブ・フレームワーク領域上に移植し、Her2に結合させることができる）（図24A）。また、FACSデータから、メディトープ-FcはトラスツズマブのCDRを移植したメディトープ使用可能mAbに結合するが、野生型トラスツズマブには結合しないことが明らかである（図24B）。

#### 【0112】

留意されるように、メディトープ使用可能トラスツズマブの生成は、正確/定量的なキャラクタリゼーションを行えるよう、より多くの物質が得られるように最適化しなくてはならず、これはみかけ上の親和性の低下（例えば、メディトープ使用可能トラスツズマブの最終濃度とAlexa647での標識が不確実であること）の要因である。当該分野で公知の抗原結合最適化のための方法があり、これをメディトープ結合に適用することができる。データはメディトープ使用可能トラスツズマブがHer2過剰発現SKBR3細胞に結合し、メディトープ使用可能トラスツズマブで前処理した細胞はメディトープに結合することを明らかに示している。Her2CDRを移植したメディトープ結合mAbの配列を図25A（重鎖；SEQ ID NO:11-12）および図25B（軽鎖；SEQ ID NO:13-14）に示す。

#### 【0113】

この方法を、抗体を産生する任意の生物（限定される訳ではないが、ニワトリ、マウス、ラット、ウシ、霊長類、およびヤギ）由来の、任意の抗体（IgA、IgE、IgD、およびIgMなど）に使用することができる。一例として、IgGおよびIgEの「Fab」ドメインの配列および構造アラインメント（メディトープ結合部位近傍のIgE上の残基）を示す（図26）。

#### 【0114】

##### 実施例7：pHの関数としてのメディトープ結合親和性

メディトープの組成を変更して、pHの関数として結合親和性に影響を与えることができる。図27に示すように、3つの異なるメディトープ改変体の結合親和性を、バッファーpHの関数として測定した。QYDメディトープ改変体は、低pHで著しい親和性の低下を示す。QYN改変体中のアスパラギン酸をアスパラギンに置換すると、pH依存性はフラットとなる。同様に、QFD改変体の親和性は、pHが高くなるにつれ、わずかに上昇する。総合すると、これらの実験は、メディトープ-mAb相互作用の親和性はpHに合わせて調整できることを示している。

#### 【0115】

従って、ある態様では、低pHで（例えば薬剤送達のためのリボソーム中で）特異的に遊

離されるようなメディトープ改変体（または「類似体」）の改変；および低酸素環境において高度の親和性で結合するようなメディトープの改変を提供する（例えば腫瘍間質のpHは多くの場合、正常組織より低い）。

【0116】

前述の本発明の実施例および方法は、単に例証であって、本発明をいかなる様にも制限することを意図しない。当業者に認識されるように、前述の種々の改変は本発明の意図の範囲内にある。

【0117】

参考文献

下記および明細書に引用されるすべての参考文献は、すべてが本明細書に記載されているように、その全体が参照として組み込まれる。

1. Accardi, L., and Di Bonito, P. (2010) Antibodies in single-chain format against tumour-associated antigens: present and future applications, *Curr Med Chem* 17, 1730-1755.
2. Adams, G. P., Schier, R., McCall, A. M., Simmons, H. H., Horak, E. M., Alpaugh, R. K., Marks, J. D., and Weiner, L. M. (2001) *Cancer Res* 61, 4750-4755.
3. Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A. A., Dick, L. R., Grenier, L., Klunder, J. M., Ma, Y. T., Plamondon, L., and Stein, R. L. (1998) Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids, *Bioorg Med Chem Lett* 8, 333-338.
4. Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K., and Terwilliger, T. C. (2002) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 1948-1954.
5. Adessi, C., and Soto, C. (2002) Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability, *Curr Med Chem* 9, 963-978.
6. Akamatsu, Y., Pakabunto, K., Xu, Z., Zhang, Y., and Tsurushita, N. (2007) Whole
7. IgG surface display on mammalian cells: Application to isolation of neutralizing chicken monoclonal anti-IL-12 antibodies, *J Immunol Methods* 327, 40-52.
8. Alley, S. C., Okeley, N. M., and Senter, P. D. (2010) Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer, *Curr Opin Chem Biol* 14, 529-537.
9. Auffinger, P., Hays, F. A., Westhof, E., and Ho, P. S. (2004) Halogen bonds in biological molecules, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16789-16794.
10. Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., and Corvaia, N. (2010) Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies, *Nat Rev Immunol* 10, 345-352.
11. Beck, A., Wagner-Rousset, E., Bussat, M. C., Lokteff, M., Klinguer-Hamour, C., Haeuw, J. F., Goetsch, L., Wurch, T., Van Dorsselaer, A., and Corvaia, N. (2008) Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins, *Curr Pharm Biotechnol* 9, 482-501.
12. Bilgicer, B., Moustakas, D. T., and Whitesides, G. M. (2007) A synthetic trivalent hapten that aggregates anti-2,4-DNP IgG into bicyclic trimers, *J Am Chem Soc* 129, 3722-3728.
13. Bilgicer B, Thomas SW 3rd, Shaw BF, Kaufman GK, Krishnamurthy VM, Estroff LA, Yang J, Whitesides GM., A non-chromatographic method for the purification of a bivalently active monoclonal IgG antibody from biological fluids. *J AM CHEM SOC* . 2009 JUL 8;131(26):9361-7.
14. Bilgier, B., Thomas, III, S.W., Shaw, B.F., Kaufman, G.K., Krishnamurthy, V. M., Estroff, L.A., Yang, J. and Whitesides, G.M. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 9361-9367.

10

20

30

40

50

15. Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Makhson, A., Hartmann, J. T., Aparicio, J., de Braud, F., Donea, S., Ludwig, H., Schuch, G., Stroh, C., Loos, A. H., Zubel, A., and Koralewski, P. (2009) Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer, *J Clin Oncol* 27, 663-671.
16. Bretscher, L. E., Li, H., Poulos, T. L., and Griffith, O. W. (2003) Structural characterization and kinetics of nitric-oxide synthase inhibition by novel N5-(iminoalkyl)- and N5-(iminoalkenyl)-ornithines, *J Biol Chem* 278, 46789-46797.
17. Butlin, N. G., and Meares, C. F. (2006) Antibodies with infinite affinity: origins and applications, *Acc Chem Res* 39, 780-787. 10
18. Cardarelli, P. M., Quinn, M., Buckman, D., Fang, Y., Colcher, D., King, D. J., Bebbington, C., and Yarranton, G. (2002) Binding to CD20 by anti-B1 antibody or F(ab')<sub>2</sub> is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines, *Cancer Immunol Immunother* 51, 15-24.
19. Carson, K. R., Focosi, D., Major, E. O., Petrini, M., Richey, E. A., West, D. P., and Bennett, C. L. (2009) *Lancet Oncol* 10(8), 816-824
20. Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 12-21. 20
21. Chih, H. W., Gikanga, B., Yang, Y., and Zhang, B. (2011) Identification of amino acid residues responsible for the release of free drug from an antibody-drug conjugate utilizing lysine-succinimidyl ester chemistry, *J Pharm Sci* 100, 2518-2525.
22. Chmura, A. J., Orton, M. S., and Meares, C. F. (2001) Antibodies with infinite affinity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8480-8484.
23. Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr., and Leahy, D. J. (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab, *Nature* 421, 756-760.
24. Collis, A. V., Brouwer, A. P., and Martin, A. C. (2003) *J Mol Biol* 325, 337-354. 30
25. Dechant, M., Weisner, W., Berger, S., Peipp, M., Beyer, T., Schneider-Merck, T., Lammerts van Bueren, J. J., Bleeker, W. K., Parren, P. W., van de Winkel, J. G., and Valerius, T. (2008) Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies, *Cancer Res* 68, 4998-5003.
26. Demarest, S. J., and Glaser, S. M. (2008) Antibody therapeutics, antibody engineering, and the merits of protein stability, *Curr Opin Drug Discov Devel* 11, 675-687.
27. DeNardo, G., and DeNardo, S. (2010) Dose intensified molecular targeted radiotherapy for cancer-lymphoma as a paradigm, *Semin Nucl Med* 40, 136-144. 40
28. Derksen, D. J., Stymiest, J. L., and Vederas, J. C. (2006) Antimicrobial leucocin analogues with a disulfide bridge replaced by a carbocycle or by noncovalent interactions of allyl glycine residues, *J Am Chem Soc* 128, 14252-14253.
29. Donaldson, J. M., Kari, C., Fragoso, R. C., Rodeck, U., and Williams, J. C. (2009) Design and development of masked therapeutic antibodies to limit off-target effects: application to anti-EGFR antibodies, *Cancer Biol Ther* 8, 2147-2152.
30. Doppalapudi, V. R., Huang, J., Liu, D., Jin, P., Liu, B., Li, L., Desharnais, J., Hagen, C., Levin, N. J., Shields, M. J., Parish, M., Murphy, R. E., Del Rosario, J., Oates, B. D., Lai, J. Y., Matin, M. J., Ainekulu, Z., Bhat, A., Brads 50

- haw, C. W., Woodnutt, G., Lerner, R. A., and Lappe, R. W. (2010) Chemical generation of bispecific antibodies, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22611-22616.
31. Doppalapudi, V. R., Tryder, N., Li, L., Aja, T., Griffith, D., Liao, F. F., Roxas, G., Ramprasad, M. P., Bradshaw, C., and Barbas, C. F., 3rd. (2007) Chemically programmed antibodies: endothelin receptor targeting CovX-Bodies, *Bioorg Med Chem Lett* 17, 501-506.
32. Dornan, D., Bennett, F., Chen, Y., Dennis, M., Eaton, D., Elkins, K., French, D., Go, M. A., Jack, A., Junutula, J. R., Koeppen, H., Lau, J., McBride, J., Rawstron, A., Shi, X., Yu, N., Yu, S. F., Yue, P., Zheng, B., Ebens, A., and Polson, A. G. (2009) Therapeutic potential of an anti-CD79b antibody-drug conjugate, anti-CD79b-vc-MMAE, for the treatment of non-Hodgkin lymphoma, *Blood* 114, 2721-2729. 10
33. Du, J., Wang, H., Zhong, C., Peng, B., Zhang, M., Li, B., Huo, S., Guo, Y., and Ding, J. (2007) Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab, *J Biol Chem* 282, 15073-15080
34. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.
35. Erlanson, D. A., Arndt, J. W., Cancilla, M. T., Cao, K., Elling, R. A., English, N., Friedman, J., Hansen, S. K., Hession, C., Joseph, I., Kumaravel, G., Lee, W. C., Lind, K. E., McDowell, R. S., Miatkowski, K., Nguyen, C., Nguyen, T. B., Park, S., Pathan, N., Penny, D. M., Romanowski, M. J., Scott, D., Silvian, L., Simmons, R. L., Tangonan, B. T., Yang, W., and Sun, L. (2011) Discovery of a potent and highly selective PDK1 inhibitor via fragment-based drug discovery, *Bioorg Med Chem Lett* 21, 3078-3083. 20
36. Ferenczy, G. G., and Keseru, G. M. (2010) Thermodynamics guided lead discovery and optimization, *Drug Discov Today* 15, 919-932.
37. Gencoglan, G., and Ceylan, C. (2007) *Skin Pharmacol Physiol* 20, 260-262.
38. Goodwin, D. A., and Meares, C. F. (1999) Pretargeted peptide imaging and the rapy, *Cancer Biother Radiopharm* 14, 145-152.
39. Graille, M., Stura, E. A., Corper, A. L., Sutton, B. J., Taussig, M. J., Charbonnier, J. B., and Silverman, G. J. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5399-5404. 30
40. Graille, M., Stura, E. A., Housden, N. G., Beckingham, J. A., Bottomley, S. P., Beale, D., Taussig, M. J., Sutton, B. J., Gore, M. G., and Charbonnier, J. B. (2001) *Structure* 9, 679-687.
41. Graille, M., Harrison, S., Crump, M. P., Findlow, S. C., Housden, N. G., Muller, B. H., Battail-Poirot, N., Sibai, G., Sutton, B. J., Taussig, M. J., Jolivet-Reynaud, C., Gore, M. G., and Stura, E. A. (2002) *J Biol Chem* 277, 47500-47506.
42. Green, D. J., Pagel, J. M., Pantelias, A., Hedin, N., Lin, Y., Wilbur, D. S., Gopal, A., Hamlin, D. K., and Press, O. W. (2007) Pretargeted radioimmunotherapy for B-cell lymphomas, *Clin Cancer Res* 13, 5598-5603. 40
43. Guay, D., Beaulieu, C., and Percival, M. D. (2010) Therapeutic utility and medicinal chemistry of cathepsin C inhibitors, *Curr Top Med Chem* 10, 708-716.
44. Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A., and George, A. J. (2010) The safety and side effects of monoclonal antibodies, *Nat Rev Drug Discov* 9, 325-338.
45. Hardegger, L. A., Kuhn, B., Spinnler, B., Anselm, L., Ecabert, R., Stihle, M., Gsell, B., Thoma, R., Diez, J., Benz, J., Plancher, J. M., Hartmann, G., Banner, D. W., Haap, W., and Diederich, F. (2011) Systematic investigation of haloge 50

n bonding in protein-ligand interactions, *Angew Chem Int Ed Engl* 50, 314-318.

46. Hartmann, C., Muller, N., Blaukat, A., Koch, J., Benhar, I., and Wels, W. S. (2010) *Oncogene* 29, 4517-4527.

47. Hernandez, M. Z., Cavalcanti, S. M., Moreira, D. R., de Azevedo Junior, W. F., and Leite, A. C. (2010) Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design, *Curr Drug Targets* 11, 303-314.

48. Hughes, S. J., Millan, D. S., Kilty, I. C., Lewthwaite, R. A., Mathias, J. P., O'Reilly, M. A., Pannifer, A., Phelan, A., Stuhmeier, F., Baldock, D. A., and Brown, D. G. (2011) Fragment based discovery of a novel and selective PI3 kinase inhibitor, *Bioorg Med Chem Lett*.

10

49. Hutchins, B. M., Kazane, S. A., Staflin, K., Forsyth, J. S., Felding-Habermann, B., Schultz, P. G., and Smider, V. V. (2011) Site-specific coupling and sterically controlled formation of multimeric antibody fab fragments with unnatural amino acids, *J Mol Biol* 406, 595-603.

50. Junutula, J. R., Raab, H., Clark, S., Bhakta, S., Leipold, D. D., Weir, S., Chen, Y., Simpson, M., Tsai, S. P., Dennis, M. S., Lu, Y., Meng, Y. G., Ng, C., Yang, J., Lee, C. C., Duenas, E., Gorrell, J., Katta, V., Kim, A., McDorman, K., Flagella, K., Venook, R., Ross, S., Spencer, S. D., Lee Wong, W., Lowman, H. B., Vandlen, R., Sliwkowski, M. X., Scheller, R. H., Polakis, P., and Mallet, W. (2008) Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index, *Nat Biotechnol* 26, 925-932.

20

51. Kamat, V., Donaldson, J. M., Kari, C., Quadros, M. R., Lelkes, P. I., Chaiken, I., Cocklin, S., Williams, J. C., Papazoglou, E., and Rodeck, U. (2008) Enhanced EGFR inhibition and distinct epitope recognition by EGFR antagonistic mAbs C225 and 425, *Cancer Biol Ther* 7, 726-733.

52. Kiessling, L. L., and Splain, R. A. (2010) Chemical approaches to glycobiology, *Annu Rev Biochem* 79, 619-653.

53. Ladbury, J. E., Klebe, G., and Freire, E. (2010) Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip, *Nat Rev Drug Discov* 9, 23-27.

54. Lazar, G. A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J. S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H. S., Eivazi, A., Yoder, S. C., Vielmetter, J., Carmichael, D. F., Hayes, R. J., and Dahiyat, B. I. (2006) Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4005-4010.

30

55. Lesch, H. P., Kaikkonen, M. U., Pikkarainen, J. T., and Yla-Herttuala, S. (2010) Avidin-biotin technology in targeted therapy, *Expert Opin Drug Deliv* 7, 551-564.

56. Li, M., Yan, Z., Han, W., and Zhang, Y. (2006) *Cell Immunol* 239, 136-143.

57. Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P., and Ferguson, K. M. (2005) Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab, *Cancer Cell* 7, 301-311.

40

58. Liu, C. C., and Schultz, P. G. (2010) Adding new chemistries to the genetic code, *Annu Rev Biochem* 79, 413-444.

59. Lowe CR, Lowe AR, Gupta G. (2001) *J. Biochem. Bioph. Meth.* 49: 561-574.

60. Mammen, M., Choi, S.-K., and Whitesides, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors, (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 37, 2749-2798.

61. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) *J Appl Crystallogr* 40, 658-674.

62. Meares, C. F. (2008) The chemistry of irreversible capture, *Adv Drug Deliv Rev* 60, 1383-1388.

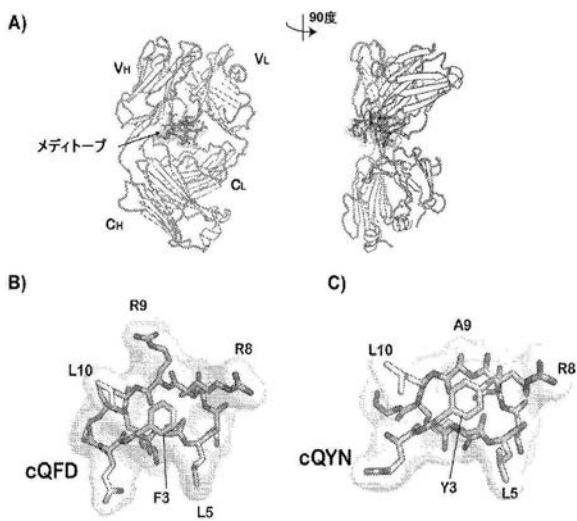
50

63. Meira, D. D., Nobrega, I., de Almeida, V. H., Mororo, J. S., Cardoso, A. M., Silva, R. L., Albano, R. M., and Ferreira, C. G. (2009) *Eur J Cancer* 45, 1265-1273.
64. Melosky, B., Burkes, R., Rayson, D., Alcindor, T., Shear, N., and Lacouture, M. (2009) *Curr Oncol* 16(1), 16-26.
65. Meredith, R. F., and Buchsbaum, D. J. (2006) Pretargeted radioimmunotherapy, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66, S57-59.
66. Milo, L. J., Lai, J. H., Wu, W., Liu, Y., Maw, H., Li, Y., Jin, Z., Shu, Y., Poplawski, S., Wu, Y., Sanford, D. G., Sudmeier, J. L., and Bachovchin, B. (2011) Chemical and Biological Evaluation of Dipeptidyl Boronic Acid Proteasome Inhibitors for Use in Pro- and Pro-soft Drugs Targeting Solid Tumors, *J Med Chem* (in press - DOI: 10.1021/jm200460q).
67. Molloy, E. S., and Calabrese, L. H. (2009) *Nat Rev Rheumatol* 5(8), 418-419.
68. Morse, L., and Calabrese, P. (2006) *Semin Oncol Nurs* 22(3), 152-162.
69. Moss, L. S., Starbuck, M. F., Mayer, D. K., Harwood, E. B., and Glotzer, J. (2009) *Oncol Nurs Forum* 36, 676-685.
70. Mossessova, E., and Lima, C. D. (2000) *Mol Cell* 5, 865-876.
71. Muller, D., and Kontermann, R. E. (2010) Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives, *BioDrugs* 24, 89-98.
72. Muller, S., Lange, S., Gautel, M., and Wilmanns, M. (2007) Rigid conformation of an immunoglobulin domain tandem repeat in the A-band of the elastic muscle protein titin, *J Mol Biol* 371, 469-480.
73. Nicola, G., Peddi, S., Stefanova, M., Nicholas, R. A., Gutheil, W. G., and Davies, C. (2005) Crystal structure of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5 bound to a tripeptide boronic acid inhibitor: a role for Ser-110 in deacylation, *Biochemistry* 44, 8207-8217.
74. Pagel, J. M., Lin, Y., Hedin, N., Pantelias, A., Axworthy, D., Stone, D., Hamlin, D. K., Wilbur, D. S., and Press, O. W. (2006) Comparison of a tetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein and an antibody-streptavidin chemical conjugate for pretargeted anti-CD20 radioimmunotherapy of B-cell lymphomas, *Blood* 108, 328-336.
75. Pakkala, M., Weisell, J., Hekim, C., Vepsalainen, J., Wallen, E. A., Stenman, U. H., Koistinen, H., and Narvanen, A. (2010) Mimetics of the disulfide bridge between the N- and C-terminal cysteines of the KLK3-stimulating peptide B-2, *Amino Acids* 39, 233-242.
76. Pugashetti, R., and Koo, J. (2009) *J Dermatolog Treat* 20(3), 132-136.
77. Rao, J., Lahiri, J., Isaacs, L., Weis, R. M., and Whitesides, G. M. (1998) A trivalent system from vancomycin-D-ala-D-Ala with higher affinity than avidin-biotin, *Science* 280, 708-711.
78. Riemer, A. B., Klinger, M., Wagner, S., Bernhaus, A., Mazzucchelli, L., Pehamberger, H., Scheiner, O., Zielinski, C. C., and Jensen-Jarolim, E. (2004) *J Immunol* 173, 394-401.
79. Riemer, A. B., Kurz, H., Klinger, M., Scheiner, O., Zielinski, C. C., and Jensen-Jarolim, E. (2005) Vaccination with cetuximab mimotopes and biological properties of induced anti-epidermal growth factor receptor antibodies, *J Natl Cancer Inst* 97, 1663-1670.
80. Rivera, F., Garcia-Castano, A., Vega, N., Vega-Villegas, M. E., and Gutierrez-Sanz, L. (2009) Cetuximab in metastatic or recurrent head and neck cancer: the EXTREME trial, *Expert Rev Anticancer Ther* 9, 1421-1428.
81. Roe, E., Garcia Muret, M. P., Marcuello, E., Capdevila, J., Pallares, C., and

- d Alomar, A. (2006) *J Am Acad Dermatol* 55(3), 429-437.
82. Rossi, E. A., Goldenberg, D. M., Cardillo, T. M., McBride, W. J., Sharkey, R. M., and Chang, C. H. (2006) Stably tethered multifunctional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6841-6846.
83. Rudnick, S. I., and Adams, G. P. (2009) *Cancer Biother Radiopharm* 24, 155-161.
84. Scheuer W, Friess T, Burtscher H, Bossenmaier B, Endl J, Hasmann M., Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res.* 2009 Dec 15;69(24):9330-6. 10
86. Schrag, D., Chung, K. Y., Flombaum, C., and Saltz, L. (2005) *J Natl Cancer Inst* 97(16), 1221-1224.
87. Seeman, N. C. (2003) DNA in a material world, *Nature* 421, 427-431.
88. Shaav, T., Wiesmuller, K. H., and Walden, P. (2007) *Vaccine* 25, 3032-3037.
89. Shan, D., Ledbetter, J. A., and Press, O. W. (1998) Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies, *Blood* 91, 1644-1652.
90. Sharkey, R. M., Rossi, E. A., McBride, W. J., Chang, C. H., and Goldenberg, D. M. (2010) Recombinant bispecific monoclonal antibodies prepared by the dock-and-lock strategy for pretargeted radioimmunotherapy, *Semin Nucl Med* 40, 190-203. 20
91. Sheedy, C., MacKenzie, C. R., and Hall, J. C. (2007) Isolation and affinity maturation of hapten-specific antibodies, *Biotechnol Adv* 25, 333-352.
92. Shirasaki, Y., Nakamura, M., Yamaguchi, M., Miyashita, H., Sakai, O., and Inoue, J. (2006) Exploration of orally available calpain inhibitors 2: peptidyl hemiacetal derivatives, *J Med Chem* 49, 3926-3932.
93. Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1996) Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR, *Science* 274, 1531-1534.
94. Spangler, J. B., Neil, J. R., Abramovitch, S., Yarden, Y., White, F. M., Luffenburger, D. A., and Wittrup, K. D. (2010) Combination antibody treatment down-regulates epidermal growth factor receptor by inhibiting endosomal recycling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13252-13257. 30
95. Stymiest, J. L., Mitchell, B. F., Wong, S., and Vederas, J. C. (2005) Synthesis of oxytocin analogues with replacement of sulfur by carbon gives potent antagonists with increased stability, *J Org Chem* 70, 7799-7809.
96. Teillaud, J. L. (2005) Engineering of monoclonal antibodies and antibody-based fusion proteins: successes and challenges, *Expert Opin Biol Ther* 5 Suppl 1, S15-27.
97. Thakur, A., and Lum, L. G. (2010) Cancer therapy with bispecific antibodies: Clinical experience, *Curr Opin Mol Ther* 12, 340-349. 40
98. Van Cutsem, E., Kohne, C. H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C. R., Makhson, A., D'Haens, G., Pinter, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J. K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting, M., Nippgen, J., and Rougier, P. (2009) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer, *N Engl J Med* 360, 1408-1417.
99. Wakankar, A. A., Feeney, M. B., Rivera, J., Chen, Y., Kim, M., Sharma, V. K., and Wang, Y. J. (2010) Physicochemical stability of the antibody-drug conjugate Trastuzumab-DM1: changes due to modification and conjugation processes, *Bioconjug Chem* 21, 1588-1595.
100. Young, W. W., Jr., Tamura, Y., Wolock, D. M., and Fox, J. W. (1984) *J Immunol* 133, 1588-1595. 50

ol 133, 3163-3166.

【 図 1 】



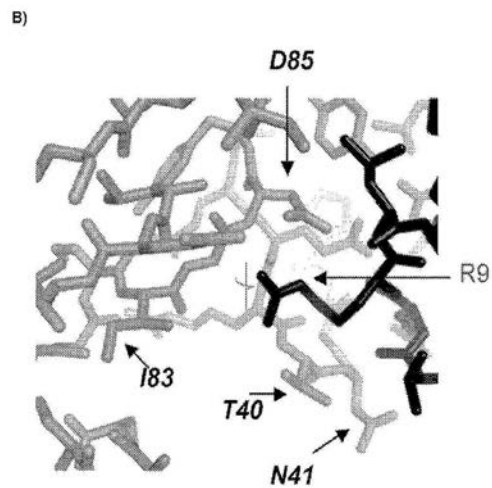
【 図 2 】

A)

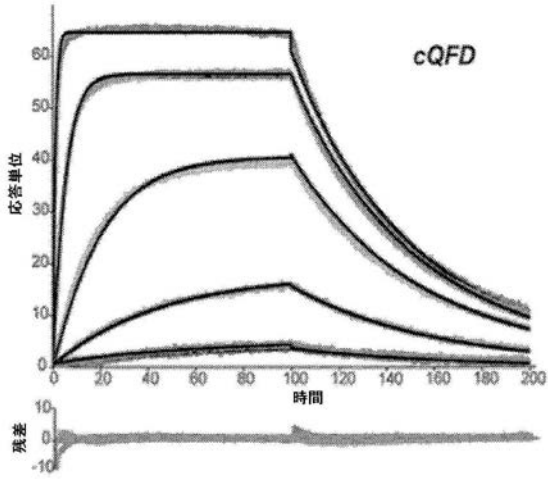
軽鎖					
Kabat ナンバー	10	38-----43	83-----87	100----105	165
セツキシマブ	I	QRTNGS	IADYY	AGTKLE	E
ch 14.18	S	QKPGQS	LGVYF	AGTKLE	E
トラスツマブ	S	QKPGKA	EATYY	QGTKVE	E

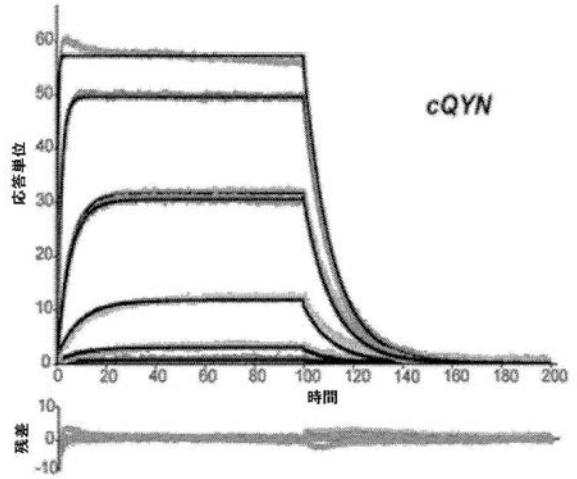
重鎖					
Kabat ナンバー	39-----44	87-89	105-108	149	168-169
セツキシマブ	QSPGKG	TAI	QGTL	E	PA
ch 14.18	QNIGKS	SAV	QGTS	E	PA
トラスツマブ	QAPGKG	TAV	QGTL	E	PA



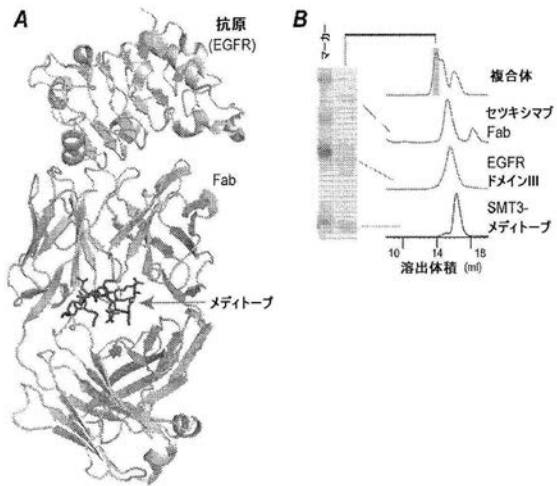
【 図 3 A 】



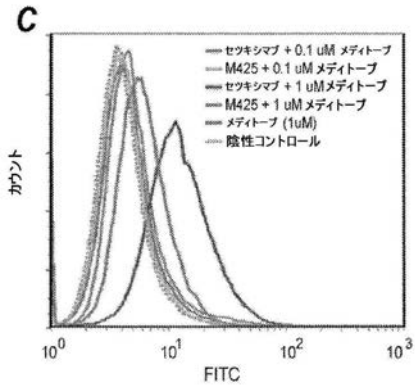
【 図 3 B 】



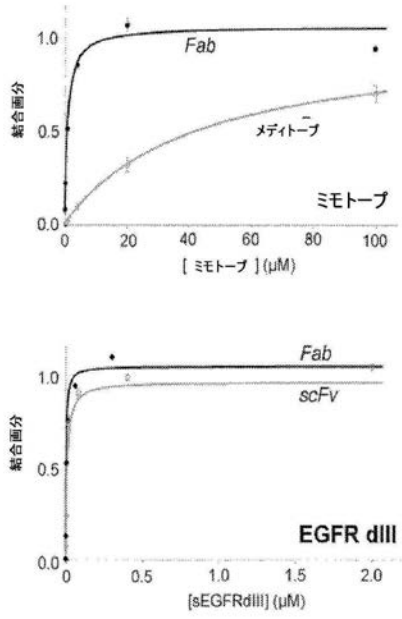
【 図 4 A B 】



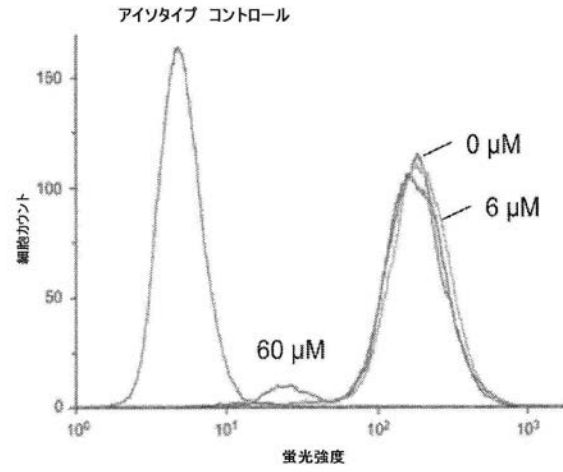
【 図 4 C 】



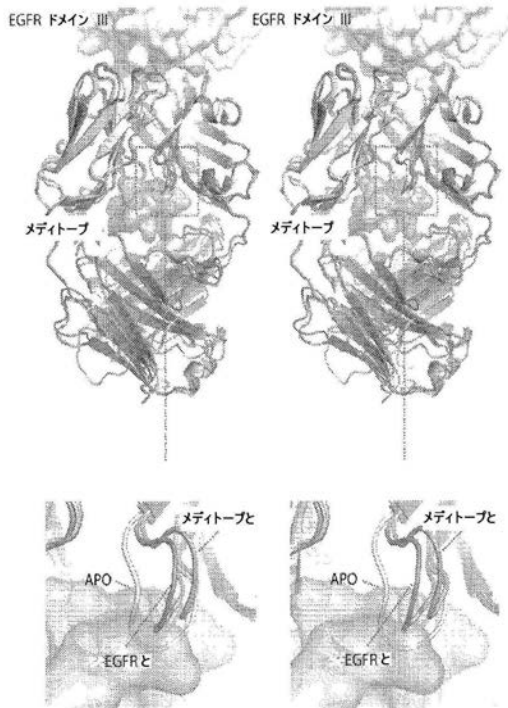
【 図 4 D 】



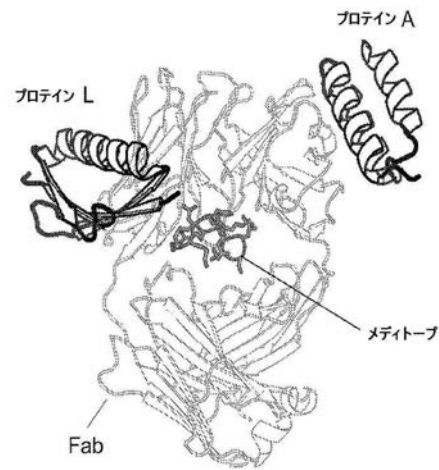
【 図 5 】



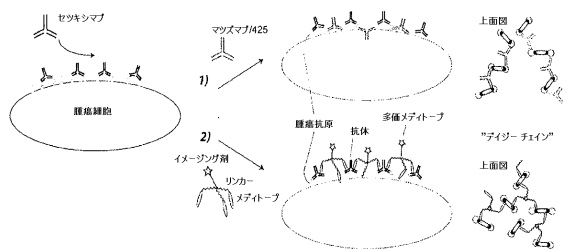
【 図 6 】



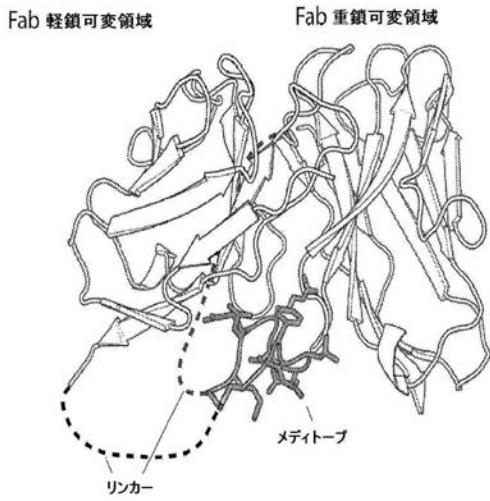
【 図 7 】



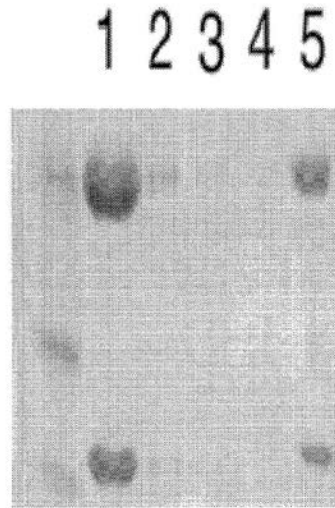
【 図 8 】



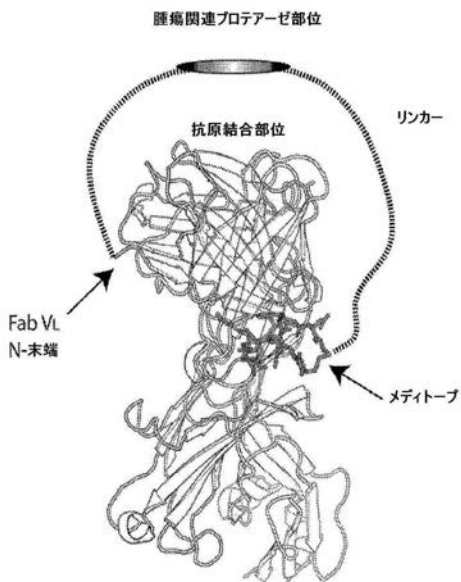
【 図 9 】



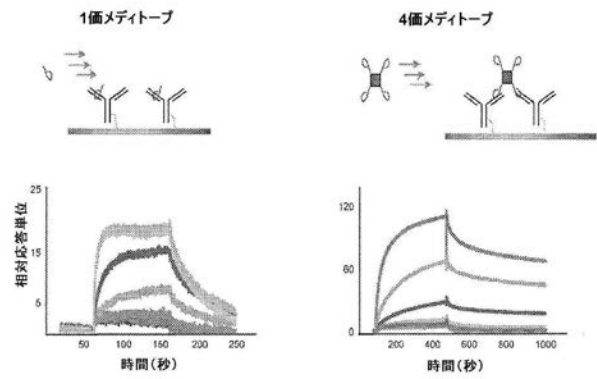
【 図 10 】



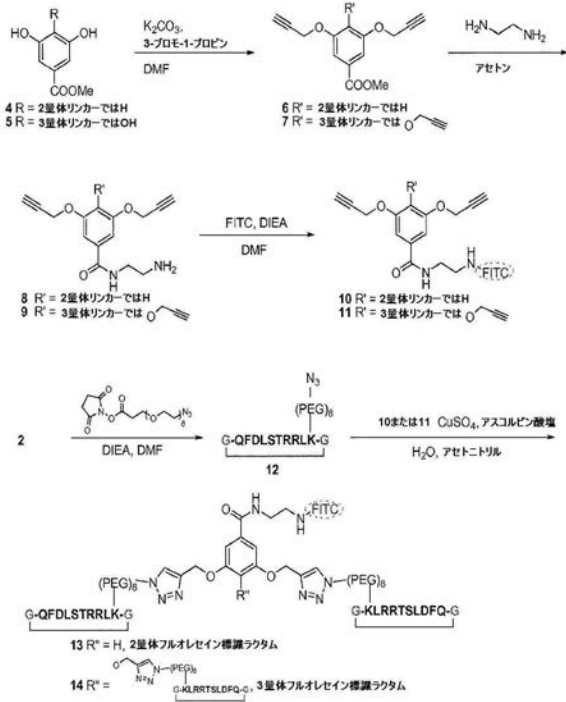
【 図 11 】



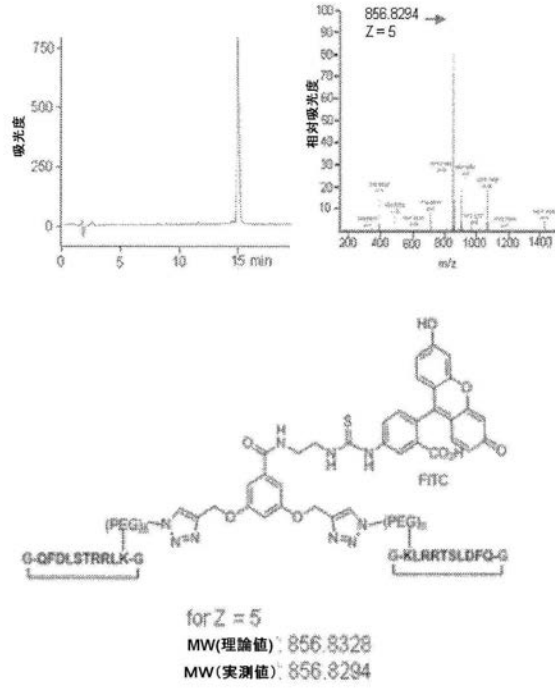
【 図 12 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



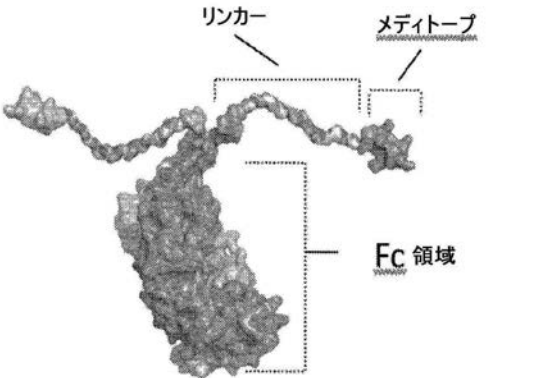
【 図 1 5 】

メディトープ-Fc (SEQ ID NO:3核酸およびSEQ ID NO:47アミノ酸)

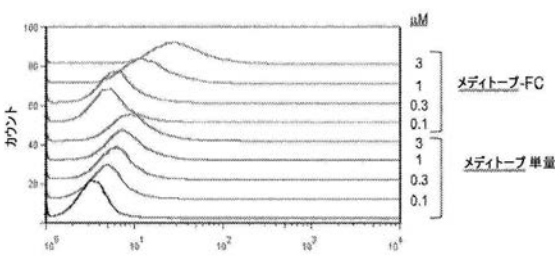
```

acaccgaagctggctagcgaaccatgaagtgtagctgggtcaotctctctgatggca
T P R L A S D T M K C S W V I F F L M A
gtcgtgacagagtgattcgtgccagtttgacotgtcaactcggcgactgaatggcgt
V V T G V N S C Q F D L S T R R L K C G
ggggctccggtcaggtcggcgggttcacgggaggggggaggggaaactaaagca
G G S G S G S G S G S G S G S G S G E F K S
tgcgataagacgcacacctgtctccatgccagccccaggttgcctggggccctca
C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S
gtattcctctccctcaaaacccaagacaccttgatgtttccgcagccggaaagtc
V F L F P F K P K E T L M I S R T P E V
acgtgtggtcgtggatgtgagccatgagatcccaggtgaagttcaattcgtacgtg
T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V
gatggatgagaggtacacacgcgaaacgaaagccaggggaaacagtaacattccaca
D G Y E V H N A K T R P R E E Q Y N S T
tatcgcgtgggtgctcgtgcttactgtgttgcacaaagactcgtgaaaggagagat
Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y
aagtgcaaglstcaaacagggcgtgctgctccaatcgaaaagaccatctcgaagcg
K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A
aaaggcaaacccagagaaacccaaggtotacacgcttccgcccctcgcgggatgagctcacc
R G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T
asaaaccaggtaccctcaactcttggtaaaagattctaccgctcggacattgcagtc
K N Q V S L T C L V R G F Y P S D T A V
gagtggagtcgaatggcgagccggaaaacactacaaaacacaccccgctctggac
E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
tccgatggtcgttcttctctattcgaagctcacogtagacaagtcgaggtgcagcag
S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q
ggcaacgtctttcgtcctcagtgatgcagggcccttcacaatcactatcgcagaaa
G N V F S C S V M B E A L H N H Y T Q K
agcctgagccctgcacggggaagtaa
S L S L S P G K -
  
```

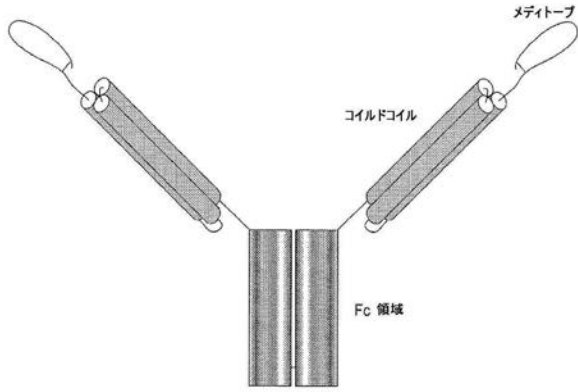
【 図 1 6 】



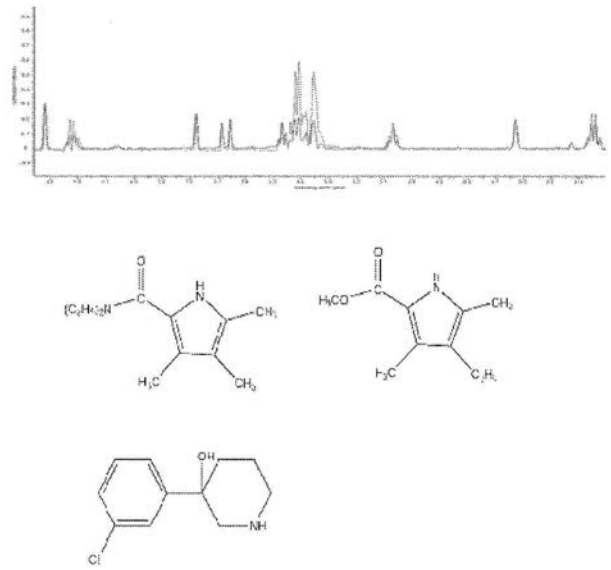
【 図 1 7 】



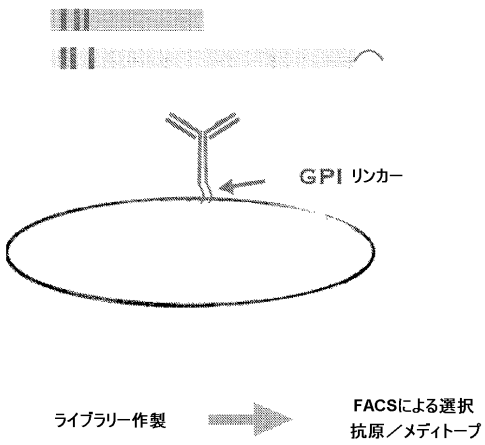
【図18】



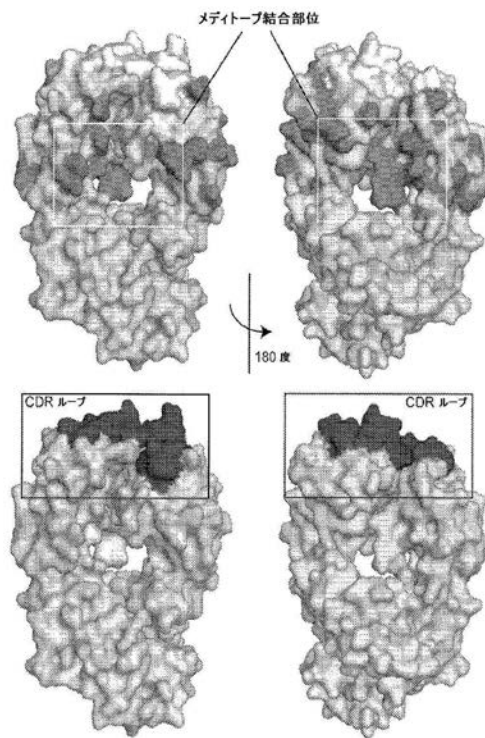
【図19】



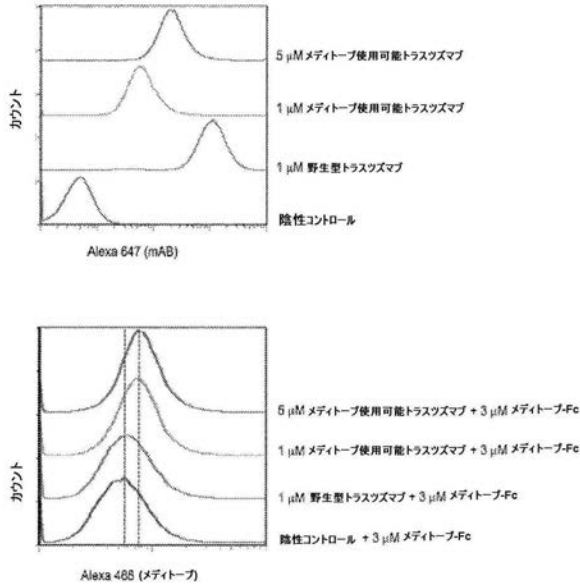
【図20】



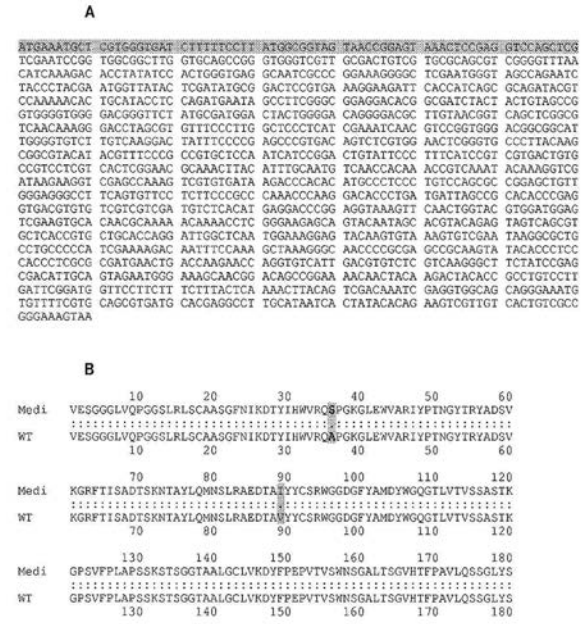
【図21】



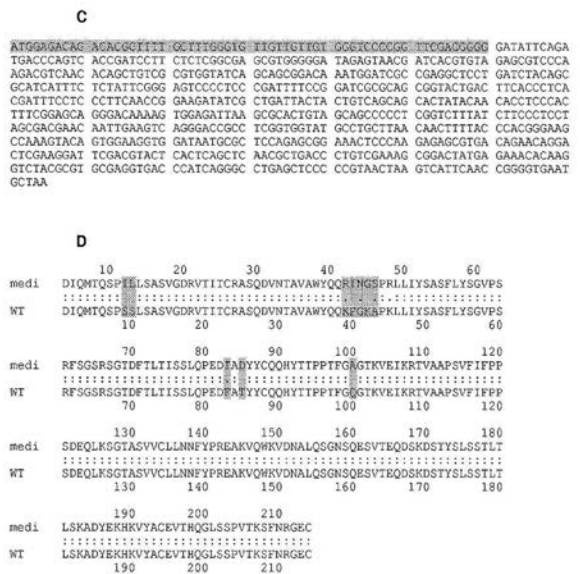
【 図 2 2 】



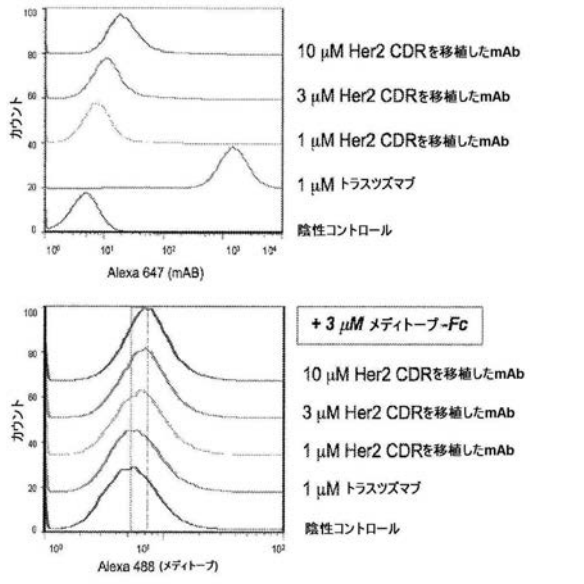
【 図 2 3 A B 】



【 図 2 3 C D 】

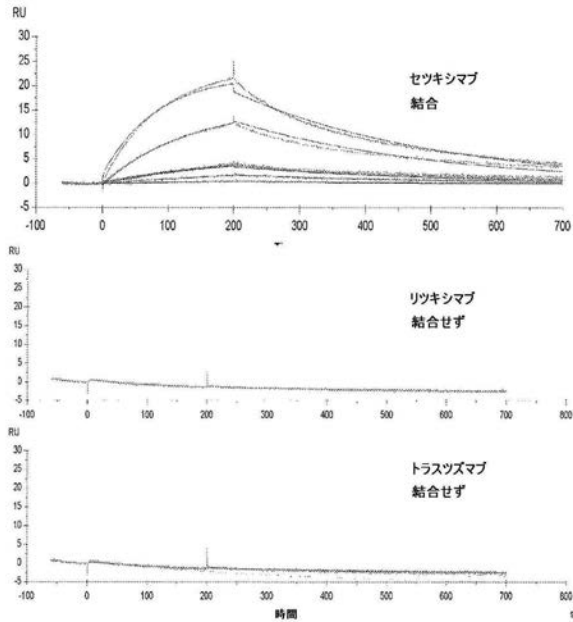


【 図 2 4 】





【 図 2 9 】



## 【 配列表 】

2017109988000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成28年11月18日(2016.11.18)

## 【 手続補正 1 】

【 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 】

長鎖リンカー、多価スキャホールド、小化学スキャホールド、ビオチン-ストレプトアビジン、scFv、またはIgG Fcドメインを用いて結合している2つまたはそれ以上のペプチドを含有する多価連結体であって、前記2つまたはそれ以上のペプチドが配列CQFDLSTRRLKC (SEQ ID NO:1) またはCQYNLSSRALKC (SEQ ID NO:2) から選ばれる抗体結合ペプチドである多価連結体。

【 請求項 2 】

イメージング剤、治療剤、またはその両方を更に含む、請求項1に記載の多価連結体。

【 請求項 3 】

ペプチドに結合可能なモノクローナル抗体の精製法であって、固相に結合させたペプチドを、モノクローナル抗体を含有する溶液と接触させ、それによってモノクローナル抗体をペプチドに結合させることを含み、前記ペプチドが配列CQFDLSTRRLKC (SEQ ID NO:1) またはCQYNLSSRALKC (SEQ ID NO:2) から選ばれる抗体結合ペプチドである方法。

【 請求項 4 】

モノクローナル抗体が、セツキシマブのFab領域のフレームワーク領域を含む、請求項3に記載の方法。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/02	C
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00	A
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
G 0 1 N	33/533 (2006.01)	G 0 1 N	33/531	A
G 0 1 N	33/532 (2006.01)	G 0 1 N	33/533	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	G 0 1 N	33/532	B
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
		C 1 2 P	21/08	

- (71)出願人 513083392  
マ, ユエロン  
アメリカ合衆国 9 1 0 1 0 カリフォルニア州 ドゥアーテ, フラワー アヴェニュー 1 7 1  
0
- (71)出願人 513083406  
ザー, シンディ  
アメリカ合衆国 9 1 0 1 0 カリフォルニア州 ドゥアーテ, フラワー アヴェニュー 1 7 1  
0, ルーム 1 3 7 シー
- (71)出願人 513083417  
ビジメク, クリストフ  
アメリカ合衆国 9 1 1 0 1 カリフォルニア州 パサデナ, サウス マレンゴ アヴェニュー  
3 2 8
- (71)出願人 513083428  
アヴェリー, ケンドラ, ニコル  
アメリカ合衆国 9 0 2 5 0 カリフォルニア州, ホーソン, ウェスト ワンハンドレッドサー  
ティーセカンド ストリート 4 7 4 1
- (71)出願人 598004424  
シティ・オブ・ホープ  
City of Hope  
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 1 0 1 0 - 0 2 6 9, デュアーテ, イースト・デュアーテ・ロ  
ード 1 5 0 0  
1 5 0 0 East, Duarte Road, Duarte, California 9 1 0 1  
0 - 0 2 6 9, United States of America
- (74)代理人 230104019  
弁護士 大野 聖二
- (74)代理人 230111590  
弁護士 金本 恵子
- (74)代理人 100105991  
弁理士 田中 玲子
- (74)代理人 100119183  
弁理士 松任谷 優子
- (74)代理人 100114465  
弁理士 北野 健
- (74)代理人 100149076  
弁理士 梅田 慎介

- (72)発明者 ウィリアムズ, ジョン シー .  
アメリカ合衆国 9 1 0 1 6 カリフォルニア州 モンロビア, ステッドマン プレイス 4 6 2
- (72)発明者 ドナルドソン, ジョシュア, マイケル  
アメリカ合衆国 0 8 0 4 8 ニュージャージー州 ランバートン, ホープウェル アヴェニュー  
8
- (72)発明者 ホルン, デヴィッド, エー  
アメリカ合衆国 9 1 0 1 0 カリフォルニア州 ドゥアーテ, フラワー アヴェニュー 1 7 1  
0
- (72)発明者 マ, ユエロン  
アメリカ合衆国 9 1 0 1 0 カリフォルニア州 ドゥアーテ, フラワー アヴェニュー 1 7 1  
0
- (72)発明者 ザー, シンディ  
アメリカ合衆国 9 1 0 1 0 カリフォルニア州 ドゥアーテ, フラワー アヴェニュー 1 7 1  
0, ルーム 1 3 7シー
- (72)発明者 ビジメク, クリストフ  
アメリカ合衆国 9 1 1 0 1 カリフォルニア州 パサデナ, サウス マレンゴ アヴェニュー  
3 2 8
- (72)発明者 アヴェリー, ケンドラ, ニコル  
アメリカ合衆国 9 1 1 0 7 カリフォルニア州 パサデナ, サウス オーク アヴェニュー 7  
4

F ターム(参考) 4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS36 QX01 QX02  
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13  
4C084 AA17 MA02 NA05 ZB262 ZC752  
4C085 AA14 AA15 AA16 CC23 DD63 EE01 EE05 GG01 HH03 HH11  
HH13 JJ01 KA04 KA27 KA29 KA36 LL18  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA16 BA40 BA50 CA40 DA75 DA76  
EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	用于Meditope , Meditope递送系统的单克隆抗体框架结合界面及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017109988A</a>	公开(公告)日	2017-06-22
申请号	JP2016205669	申请日	2016-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	约翰·威廉姆斯海 唐纳森迈克尔·约书亚 霍恩大卫代理 Mayueron ザーシンディ 忙伤口克里斯托夫 一个非常肯德拉妮可 希望之城		
申请(专利权)人(译)	威廉姆斯, 约翰·海. 唐纳森, 约书亚, 迈克尔· 霍恩, 大卫, 呃 マ, ユエロン 希瑟, 辛迪 Bijiimeku, 克里斯托夫 艾利, 肯德拉, 妮可 希望之城		
[标]发明人	ウィリアムズジョンシー ドナルドソンジョシュアマイケル ホルンデヴィッドエー マユエロン ザーシンディ ビジメククリストフ アヴェリーケンドラニコル		
发明人	ウィリアムズ, ジョン シー. ドナルドソン, ジョシュア, マイケル ホルン, デヴィッド, エー マ, ユエロン ザー, シンディ ビジメク, クリストフ アヴェリー, ケンドラ, ニコル		
IPC分类号	C07K7/04 C07K16/18 C07K16/46 C12Q1/02 C07K16/28 A61K39/395 A61K51/00 A61K49/00 A61P35/00 A61K45/00 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/532 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	A61K47/66 A61K47/6851 A61K47/6897 A61P35/00 A61P37/02 A61P39/04 B82Y5/00 C07K7/64 C07K16/2863 C07K16/32 C07K16/44 C07K2317/34 C07K2317/55 C07K2317/567 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/92 C07K2319/30		
FI分类号	C07K7/04 C07K16/18.ZNA C07K16/46 C12Q1/02 C07K16/28 A61K39/395.L A61K39/395.N A61K49/02.C A61K49/00.A A61P35/00 A61K45/00 G01N33/531.A G01N33/533 G01N33/532.B C12N15/00.A C12P21/08 A61K38/03 A61K38/16 A61K49/00 A61K49/18 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/08.200 A61K51/10.200 A61K51/12.200 C07K1/22 C07K14/00 C07K16/00 C07K7/04.ZNA C12N15/09.Z C12N15/11 C12N15/13		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA17 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/ZB262 4C084/ZC752 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085		

/AA16 4C085/CC23 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/EE05 4C085/GG01 4C085/HH03 4C085/HH11  
4C085/HH13 4C085/JJ01 4C085/KA04 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/KA36 4C085/LL18 4H045  
/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA16 4H045/BA40 4H045/BA50 4H045/CA40  
4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74

代理人(译)	田中玲子 松任谷裕子 北野 健
优先权	61/391558 2010-10-08 US
其他公开文献	JP6668216B2
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>

#### 摘要(译)

本文提供了Meditope变体及其使用方法。如本文所述的本发明变体包含在序列的至少一个氨基酸残基上具有一个或多个修饰的具有序列CQFDLSTRRLKC ( SEQ ID NO : 1 ) 或CQYNLSSRALKC ( SEQ ID NO : 2 ) 的肽。还提供了多重测井变体tethering实体。这样的实体可以包括通过长连接子, 多价支架, 生物素 - 链霉抗生物素蛋白或IgG Fc结构域偶联的两个或更多个中枢。此外, 提供了治疗, 成像或诊断疾病或病症的方法。这样的方法可以包括向受试者施用治疗有效量的药物组合, 所述药物化合物包含抗体 - 中间体复合物; 多价连结剂与单克隆抗体或其功能片段组合; 或其组合。

