

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3936339号

(P3936339)

(45) 発行日 平成19年6月27日(2007.6.27)

(24) 登録日 平成19年3月30日(2007.3.30)

|                                 |                |   |
|---------------------------------|----------------|---|
| (51) Int.Cl.                    | F I            |   |
| <b>C O 7 K 16/00 (2006.01)</b>  | C O 7 K 16/00  |   |
| <b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b> | A 6 1 K 39/395 | C |
| <b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 39/395 | L |
| <b>A 6 1 K 51/00 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 45/00  |   |
| <b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 49/02  | A |
| 請求項の数 1 (全 24 頁) 最終頁に続く         |                |   |

|              |                               |           |                     |
|--------------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2004-13610 (P2004-13610)    | (73) 特許権者 | 503469843           |
| (22) 出願日     | 平成16年1月21日(2004.1.21)         |           | ペレグリン ファーマシューティカルズ、 |
| (62) 分割の表示   | 特願平3-517817の分割                |           | インコーポレイテッド          |
| 原出願日         | 平成3年8月28日(1991.8.28)          |           | アメリカ合衆国、92780、カリフォル |
| (65) 公開番号    | 特開2004-210793 (P2004-210793A) |           | ニア、タスティン、フランクリン アベニ |
| (43) 公開日     | 平成16年7月29日(2004.7.29)         |           | ュー 14272番地          |
| 審査請求日        | 平成16年1月21日(2004.1.21)         | (74) 代理人  | 100100549           |
| (31) 優先権主張番号 | 579,375                       |           | 弁理士 川口 嘉之           |
| (32) 優先日     | 平成2年9月7日(1990.9.7)            | (74) 代理人  | 100090516           |
| (33) 優先権主張国  | 米国(US)                        |           | 弁理士 松倉 秀実           |
| 微生物の受託番号     | ATCC PTA-6950                 | (74) 代理人  | 100089244           |
|              |                               |           | 弁理士 遠山 勉            |
|              |                               | 最終頁に続く    |                     |

(54) 【発明の名称】 調節された浄化時間を有する修飾抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1の付着部位に付着した所定の種類のヘテロ2官能価試薬を有するTNT-1抗体であって、第2の付着部位に付着した生物学的に活性な分子をも有する前記TNT-1抗体（前記第2の付着部位は、前記TNT-1抗体上で前記第1の付着部位とは異なる部位であり、前記第2の付着部位は、前記所定の種類のヘテロ2官能価試薬たる付着したヘテロ2官能価試薬を有しない）。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は修飾抗体に関する。詳しくは、本発明は、ヘテロ2官能価試薬による化学的接合によって修飾された抗体、並びにガンおよび他の哺乳動物疾患の診断および治療におけるこれら修飾MAbの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体、特にモノクローナル抗体（「MAb」）の使用は、ガンの診断および処置における非常に価値のあるアプローチへの可能性を有している。MAbの重要な性質は、単一の抗原に対するその特異性である。

【0003】

10

20

これまでに、腫瘍細胞抗原に特異的なMAbが製造されてきている。またMAbは、放射性核種のような補助剤と効率的に結合し得ることも示されている。この種の放射性標識MAbは、 $\gamma$ カメラ画像形成または放射性免疫画像形成としても知られる免疫シントグラフィ (immunoscintigraphy) による腫瘍画像形成のような臨床データを提供するのに有用である。免疫シントグラフィでは、MAbにより認識される抗原を有する特異的組織または腫瘍の種類に対してMAbを結合させる。その後適切な技術の使用により、例えばゲルマニウムカメラの使用によって放射性核種を視覚化する。腫瘍および他の種類の組織の免疫シントグラフィにおけるその応用を可能とするのは、MAbの独特の特異性である。

#### 【0004】

しかしながら、免疫シントグラフィにおけるMAbの使用は、高いバックグラウンドレベルやその抗原に対するMAbの低い結合能力のために制限されていた。実験的検討は、放射性標識MAbの生物分布は、抗体の特異性および浄化時間を含む多くの因子に依存することを示唆している。免疫シントグラフィによる腫瘍の有効な診断のためには、腫瘍細胞表面上で濃密かつ均一な抗原に結合する抗体を選択することが必要である。また、免疫シントグラフィによる有効な診断には、選択した抗体が腫瘍抗原に有効に結合すべきことも必要である。しかしながら、多くの場合適切な抗原に結合するMAbは、要求される高い結合親和力を持たない。更に、他のMAbと比較して高い親和力で結合するようなMAbを使用したとしても、高いレベルの非特異的結合がなお生成し得て、この結果免疫シントグラフィで使用了場合に高いバックグラウンドレベルとなる。したがって、診断の道具としての免疫シントグラフィを改良するためには、MAbの結合の有効性を改良する方法が必要となる。

#### 【0005】

更に、MAbの細胞毒性効果は、放射性核種、薬物または毒素との結合によって顕著に増加させることができる。MAbの独特の特異性は、免疫治療の発展に希望を与えるものである。免疫治療では、MAbを使用して生物学的に活性な薬品を腫瘍細胞のような特定の望ましくない種類の細胞に配送し、これにより対象の他の細胞に効果を与えることなく、望ましくない種類の細胞に効果を与える。しかしながら、健全な組織に効果を与えることを回避するため、免疫治療では極めて高い特異性の抗体が必要である。よって、MAbの特異性を増加させる方法は、安全で有効な免疫治療の目標に到達するために非常に有益である。

#### 【0006】

多くのMAbは、対象への導入の後数日間、循環系に残存する。これは少なくとも2つの理由から望ましくない。1つの理由は、循環するMAbにより免疫シントグラフィにおいて高いバックグラウンドレベルが生成するというものである。第2の理由は、放射性核種または他の潜在的に細胞毒性の薬品に結合した循環するMAbにより、長い路程の後には対象中に望ましくない副作用が生成し得るというものである。そこで、MAbの浄化時間を減少させる方法が必要となる。勿論、減少があまりに大きければ、結果的にMAbがなし得るあるゆる有効な使用の前に、MAbが除去されることとなる。よって、腫瘍または他の標的組織によるMAbの取込みに実質的に影響を与えることなく、MAbの浄化時間を減少させる方法が必要となる。

#### 【0007】

抗体の特異性および浄化時間の両者を決定するのに重要な1つの因子は抗体の形態である。ここで使用するように、「無傷 (intact)」の抗体分子は、2つの重鎖および2つの軽鎖から構成される未修飾抗体分子を指すものとする。無傷の全体の抗体分子は、図1の化学式の反応物側に認められる。図1から分るように、無傷の分子は $F_c$ および $F_{ab}$ ドメインに分割される。 $F_{ab}$ 断片の2個形態である $F(ab')_2$ は、プロテアーゼによる $F_c$ ドメインの消化により製造することができる。

#### 【0008】

2つの重鎖 (図1では「H」として示す) は、1つ以上のジスルフィド結合によって互いに保持される。無傷の分子では、これらのジスルフィド架橋は通常は還元剤から保護さ

10

20

30

40

50

れている。しかしながら、Fcドメインを除去することにより、ジスルフィド架橋の容易な還元が可能であることが突き止められた。よって、1価形態であるF(ab')は、穏やかな還元剤の作用によりF(ab')<sub>2</sub>から製造することができる。パルハム・ピー、「BALB/cマウス由来のモノクローナルIgG1、IgG2aおよびIgG2bの断片化に当って」、J. Immunol. 131:2895(1983)(この開示を参考によりここに取入れる)には、F(ab')およびF(ab')<sub>2</sub>の製造方法が記載されている。この方法で生起すると考えられる変化を表示すると、図1に示す化学式のようになる。

#### 【0009】

Fcは、抗体分子の非特異的結合の多くに関与することが認められている。また、断片の分子量は糸球体によるろ過の閾値より小さく、このため断片の迅速な除去が可能であるとも考えられている。したがって、放射性画像形成における使用のために抗体の浄化時間を増加させる1つのアプローチは、無傷の抗体を種々の断片、例えばFabおよびその2価形態、F(ab')<sub>2</sub>に分解することであった。予期されるように、これらの断片は体から非常に迅速に浄化されるため、その有用性は低減される。更に、これらの断片は、結果的に、無傷の抗体と比較して、腫瘍または他の標的組織による低減された取込みをすると考えられる。よって、免疫シントグラフィにおけるこれらの断片の使用は、無傷のMAbを用いる場合と比較し、より良好な浄化およびバックグラウンド比率に関してより高い標的組織を与え得るにも拘らず、MAbが結合し得る抗原を含む標的組織中のMAbの絶対濃度が、いずれの断片を用いた場合も無傷のMAbを用いるより、多くともせいぜい3倍以上までであることが認められた。

#### 【0010】

更に、両者の種類の断片は血液流から非常に迅速に除去される。よって、これらの断片を使用する診断または治療技術については、有効性の時間は非常に短い。

#### 【0011】

ヘテロ2官能価試薬は、異なる反応に参与することのできる2つの基を有する試薬である。例えば、スクシニミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)は、そのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル基がアミノ基と反応し、2-ピリジルジスルフィド構造が脂肪族チオールと反応するという点でヘテロ2官能性である。

#### 【0012】

オルランディら、「2-ピリジルジスルフィド基の導入後の抗腫瘍モノクローナル抗体の結合反応性の変化」、Hybridoma 5:1-8(1986)には、ヒト卵巣カルシノーマに対して高められたMAbの試験管内結合の増加を、ヘテロ2官能価試薬、SPDPとの化学的接合の後に得ることができたことが報告されている。

#### 【0013】

オルランディらにより使用された接合されたMAbは、平均して1分子当たり11のPDP基を有していた。オルランディらは、修飾されたMAbは、未修飾MAbによっては検出されない分子を検出できる程度に、その試験管内結合活性を増加させることを認めた。これらの研究者は、生体内での接合したMAbの使用の検討は報告していない。更に、これらの研究者は、非常に少数の抗原性部位を有する分子が、接合されたMAbによって検出されると考えていた。よって、PDP修飾MAbは、未修飾対応物と比較し、大きく低減された標的細胞特異性を有するものであった。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0014】

したがって、前記の進展にも拘らず、腫瘍中に蓄積する抗体のより大きい絶対濃度を可能とすると共に、血液プールからの相対的に迅速な浄化時間を有し(ただし治療または診断の有効性を低減する程は迅速ではない)、腫瘍抗原に対するより大きい特異的活性を示す修飾抗体断片がなお必要とされている。

#### 【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

## 【0015】

本発明は、F (a b ' )<sub>2</sub>断片の浄化速度と同じ種類の無傷の抗体との間の生体内浄化速度を有する、ヘテロ2官能価試薬により化学的に修飾された抗体を提供するものである。好適な態様では、ヘテロ2官能価試薬をSPDPとし、モノクローナル抗体、ヒト抗体、遺伝子操作による抗体、キメラ抗体、合成抗体およびポリクローナル抗体よりなる群から抗体を選択する。

## 【0016】

また本発明は、哺乳動物中の特異的組織の画像を形成する方法も提供するものであり、これは特異的組織に対する抗体を取得し、ヘテロ2官能価試薬との接合によりこの抗体を修飾し、さらにこの抗体に標識を導入し、それを哺乳動物に導入して、前記抗体上の標識を明らかにする画像を生成することからなる。好適な態様では、抗体は、平均して抗体1分子当たり約1つのPDP基を用いる接合によって修飾され、 $\gamma$ 線を放射する放射性核種を用いて標識する。

10

## 【0017】

更に本発明は、哺乳動物中の疾患状態を処置する方法を提供するものであり、これは哺乳動物の疾患組織に対して特異的な抗体を取得し、ヘテロ2官能価試薬および生物学的に活性な分子との化学的接合によりその抗体を修飾し、それを哺乳動物に投与することからなる。好適な態様では、平均して抗体分子当たり1つのPDP基を用いる化学的接合によって抗体を修飾し、植物毒素、薬物、放射性核種およびキレートよりなる群から生物学的に活性な分子を選択する。

20

## 【0018】

また本発明は、本発明の方法と共に使用する薬学的組成物も提供するものである。この組成物は、薬学的に許容し得るキャリア（担体）、賦形剤または基剤中に修飾抗体を含む。

## 【0019】

本発明者は、SPDPのようなヘテロ2官能価試薬を用いる接合によるMAb、ヒト抗体、遺伝子操作による抗体、キメラ抗体、合成抗体およびポリクローナル抗体を含む抗体の修飾が、抗体が結合し得る抗原を含む標的細胞中で、修飾抗体の驚くべき増強された蓄積をもたらすことを見い出した。スルホスクシニミジル2-(p-アジドサリチルアミド)エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート(SASD)、スルホスクシニミジル2-(m-アジド-ortho-ニトロベンズアミド)-エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート(SAND)、スルホスクシニミジル(4-アジドフェニル-ジチオ)プロピオネート(スルホSADP)および2-アミノチオランHCl(トラウトの試薬)(Traut's reagent)等を含む他のヘテロ2官能価試薬も、本発明によって抗体と接合した場合、SPDPを用いる抗体の接合によりここに示すのと同様の結果を与えられと考えられる。

30

## 【0020】

修飾抗体の増強された蓄積は、増幅された特異的結合能力によると考えられる。本発明者は、平均して抗体1分子当たり唯1つのPDP基を接合することにより、未修飾抗体と比較し、その標的細胞に対する分子の特異性の劇的な増加が起こることを見い出した。

40

## 【0021】

本発明者はまた、1つ以上のPDP基の接合によるIgGの修飾は、正常組織からの浄化も有利に増強することを見い出した。この効果の如何なる特定の説明にも拘束されることを意図するものではないが、これはSPDPを用いる修飾が糸球体ろ過の閾値より小さい分子量を有する形態への抗体の断片化を導き、これにより断片の迅速な除去が可能となるためと考えられる。抗体の1価形態への抗体の断片化が起こることは可能である。結果的に得られる断片の正確な形態が如何なるものであれ、これらの断片の除去は、有利なことに修飾抗体の診断または治療的有效性を低減する程には迅速ではない。

## 【発明の効果】

## 【0022】

50

本発明の修飾抗体は、 $F(ab')$  または  $F(ab')_2$  のような抗体の断片と比較し、有利なことに驚くべき増強された診断および治療有効性を有する。

#### 【実施例】

##### 【0023】

以下の実施例は、平均して1つのPDP基をモノクローナル抗体へ導入する例示的な方法を示すものである。

##### (実施例1)

##### 【0024】

##### SPDPによるLym-1の修飾

エプステイン・エー・エルら、「ヒトB-リンパ球および誘導された腫瘍と反応性で免疫診断および免疫反応性の潜在能力を有する2つの新しいモノクローナル抗体、Lym-1およびLym-2」、Cancer Res. 47: 830-840 (1987) (その開示を参考によりここに取入れる) における方法で、Lym-1 ( $IgG_{2a}$ )、B細胞リンパ腫に対するモノクローナル抗体を取得した。カールソン・ジェイら、「蛋白質チオール化および可逆的蛋白質-蛋白質接合: N-スクシニミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、新しいヘテロ2官能価試薬」、Biochem. J. 173: 723-737 (1973) (その開示を参考によりここに取入れる) における方法で、SPDP、抗体上の遊離のアミノ基と反応するヘテロ2官能価試薬を使用してLym-1MAbを官能化した。Lym-1を10mg/mL含むPBS (pH 7.3) 1mLを入れた5mLの試験管に、1mLエタノールおよび40μLのN,N-ジメチルホルムアミド中に3mgのSPDPを含む溶液20μLを添加した。通常の方法に設定した軌道振盪機装置を使用する連続混合により、この混合物を室温で15分間インキュベートした。インキュベートの後、PBSで平衡化したPD-10カラムを通過させることにより、官能化したLym-1溶液を精製した。

##### 【0025】

グラセッチ・ディ・アールとムライ・ジェイ・エフ、「2, 2'-または4, 4'-ジチオピリジンを用いるスルホヒドリル基の決定」、Arch. Biochem. Biophys. 119: 41-49 (1967) (その開示を参考によりここに取入れる) における方法で、pH 7.2のリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) 中でモル過剰の7mgジチオエリスリトールを用いてLym-1溶液の画分を還元した後、343nmでピリジン-2-チオンの放出を測定することにより、SPDPによるLym-1の官能化の程度を、平均して1分子当たり1つのPDP基であると決定した。

##### 【0026】

抗体が実質的に無傷で残留することを示すため、実施例1で得られた修飾抗体を高速蛋白質液体クロマトグラフィ (FPLC) によって分析した。この分析を実施例2に示す。

##### (実施例2)

##### 【0027】

##### 高速蛋白質液体クロマトグラフィ (FPLC) による修飾Lym-1の分析

280nmに設定した固定波長UV分光光度計を備えた高速蛋白質液体クロマトグラフィ (FPLC) を用いて実施例1で得られた修飾抗体の分析を行った。溶媒系としてPBS, pH 7.2を用い、1mL/分の流速で溶出させ、スーパーコース (superose) -12カラム (ファルマシア) による寸法排除 (size exclusion) クロマトグラフィを行った。修飾Lym-1は690秒の保持時間に現れ、未標識の無傷Lym-1の保持時間と同一であった。

##### 【0028】

つまり実施例2では、SPDP修飾抗体はFPLCにおいて未修飾抗体と実質的に同一の挙動であったことが示されている。このデータは、修飾によっては無傷の分子の試験管内での分解は起こり得ないことを示す。

##### 【0029】

生体内試験について修飾MAbを更に検討するため、修飾MAbの放射性標識化を行っ

た。放射性標識化を実施例 3 に示す。

(実施例 3)

【0030】

修飾 L y m-1 の直接的放射性ヨウ素化

ミルス・エス・エルら、「試験管内手順のためのモノクローナル抗体の<sup>123</sup>I 放射性標識化」、Hybridoma 5:265-275 (1986) (その開示を参考によりここに取入れる) の改変クロラミン T 法を使用し、1 バッチの P D P 修飾 L y m-1 および無傷の L y m-1 を<sup>125</sup>I によりヨウ素化し、もう一方のバッチを<sup>131</sup>I により標識した。簡単に説明すれば、先ず 100 μL の P B S 中に 100 μg のモノクローナル抗体を含む溶液を 5 mL の試験管に入れ、バッチに応じて適切なヨウ素アイソトープ、<sup>125</sup>I または<sup>131</sup>I、および 10 μl のクロラミン T の 43 mM 水溶液を添加し、さらに 3 分後に、20 μL のメタ重亜硫酸ナトリウムの 120 mM 溶液を加え、反応を静めた。その後セフアデックス G-25 カラムを使用し、放射性標識した抗体を精製した。このカラムは、端部に綿を詰めた血清学用プラスチックピペット (8 mm×200 mm) (V<sub>0</sub>=4.5 mL、V<sub>t</sub>=12 mL) よりなるものとし、それぞれの反応混合物をそのカラムにかけ、P B S、pH 7.2 を用いて溶出させた。1 mL 画分を含む個々のチューブをカウントし、チューブ 6 に、放射性標識した抗体を 85~90% の収率で回収した。これらの放射性標識抗体を冷蔵庫に保存し、標識化の 4 時間以内にマウスに投与した。

10

【0031】

標識した M A b の純度を決定するため、実施例 3 からの放射性標識 M A b を瞬間薄層クロマトグラフィ (I T L C) に供した。この分析を実施例 4 に示す。

20

(実施例 4)

【0032】

瞬間薄層クロマトグラフィ (I T L C) による放射性標識した修飾 L y m-1 の分析

シリカゲルを含浸したガラス繊維よりなる分析用 I T L C 装置を使用し、実施例 3 のクロラミン T 法により<sup>131</sup>I で放射性標識した修飾 L y m-1 および<sup>125</sup>I で放射性標識した修飾 L y m-1 を分析した。使用の前に 110-1/2 °C で 15 分間加熱することにより供試片 (2×20 cm) を活性化し、1 μl のサンプルをスポットし、風乾し、MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20) を用いて約 12 cm 溶出させ、再度風乾し、半分に切断してカウントし、蛋白質結合および非蛋白質結合放射性活性を決定した。放射性標識 L y m-1 抗体は、両者とも 0 の R<sub>f</sub> 値を有し、≥99% の放射性化学純度を示した。実施例 3 と同様に標識した無傷の L y m-1 の分析により、同じ純度であることが確認された。

30

【0033】

つまり実施例 4 では、高い純度の放射性標識抗体が得られたことを示している。ラージ (Raji) 細胞に結合するその能力により、これらの放射性標識 M A b の免疫反応性を試験した。その分析を実施例 5 に示す。

(実施例 5)

【0034】

免疫反応性評価による放射性標識修飾 L y m-1 の分析

エプステイン・エー・エルらの前記の方法による従来の 10<sup>6</sup> ラージ細胞/チューブ生体検定により、放射性標識した修飾 L y m-1 および無傷 L y m-1 の試験管内免疫反応性を評価した。簡単に説明すると、100 μL の 1% ウシ血清アルブミン P B S 溶液中に再懸濁させたラージ細胞を、三連の試験管にピペットで注入した。100 μL の標識した L y m-1 を各試験管に添加し (100, 100 c p m/チューブ)、軌道振盪機を使用する連続混合により室温で 30 分間インキュベートした。インキュベートの後、チューブを 1000 r p m で 5 分間回転させ、上澄をデカントし、細胞を 200 μL の P B S に再懸濁することにより、1% ウシ血清 P B S 溶液を用いて細胞を 3 回洗浄した。洗浄の完了後、ガンマカウンタを使用して細胞に結合した放射性活性を測定することにより、結合した L y m-1 を検出した。結果は、修飾 L y m-1 の結合活性が 87% であったのに対し、標準対照である無傷 L y m-1 は 80% の結合活性を有していたことを示した。

40

50

## 【0035】

よって実施例5により、修飾Lym-1は、試験管内で未修飾Lym-1より免疫反応性であったことが示される。生体内における修飾抗体の活性の安定性の予備的確認を得るため、実施例6に示すように、血清中でのその安定性について修飾MAbを分析した。

(実施例6)

## 【0036】

血清安定性による放射性標識修飾Lym-1の分析

修飾Lym-1およびI-125で直接標識した無傷Lym-1のモノクローナル抗体を、新鮮なマウス血清が入った幾つかの三連の試験管の各々に添加し、100μg/mLの最終濃度とした。空気を5%CO<sub>2</sub>に維持した湿潤したインキュベータ内で試験管を37-1/2℃でインキュベートした。0～8日の間に、100μlの画分に対して900μLの100%トリクロロ酢酸(TCA)を添加することにより蛋白質結合活性を決定した。室温での5分間のインキュベートの後、蛋白質沈殿物を遠心分離により沈降させ、各試験管から500μLの上澄を採取し、ガンマカウンタ内で放射性活性についてカウントした。データを、沈殿物の平均パーセントカウントから対照試験管のそれを引いたものとして示した。結果は、インキュベート後のそれぞれの時点で、修飾<sup>125</sup>I-Lym-1は、標準対照である<sup>125</sup>I標識無傷Lym-1と同程度安定であったことを示した。更に、結果は、37-1/2℃での8日間インキュベート後に修飾Lym-1中に存在する≥92%の放射性活性物がTCA沈殿性であったことを示した。

## 【0037】

このように実施例6により、修飾抗体の活性の安定性は、血清中で少なくとも8日間維持されたことが示された。修飾MAbは血清中でのインキュベート後に無傷のまま止まるか否かを評価するため、実施例7に示すように、インキュベート後の修飾Lym-1のHPLC分析を行った。

(実施例7)

## 【0038】

HPLCによる修飾Lym-1の分析

溶出溶媒として0.1Mの中性リン酸緩衝液を用い、流速を1ml/分とし、寸法排除カラム(SW300)を備えたウォーターズの装置によりHPLC分析を行った。放射性アイソトープ検出器を用いて溶出物を検出した。実施例6で標識した修飾Lym-1生成混合物では、750秒の溶出時間の低分子量化学種の1つの主要なピーク、加えて690秒の少量のものが明らかとなった。無傷のLym-1では、690秒の保持時間の単一ピークが現れた。

## 【0039】

つまり、実施例7では、血清インキュベートした修飾Lym-1サンプルは、HPLC分析において、無傷のLym-1のものより低い見かけの分子量を有することが示された。これに対して、実施例2では、インキュベートしていない修飾Lym-1は無傷のLym-1と同一の保持時間を有することが示されている。つまり、修飾Lym-1は、血清中でのインキュベートに際してFPLC分析において、見かけ上分子量の喪失を示したことになる。

## 【0040】

血清中でのインキュベートの際の修飾Lym-1の分子量の見かけ上の喪失を更に確認するため、実施例8に示すように、サンプルのポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

(実施例8)

## 【0041】

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による放射性標識した修飾Lym-1の分析

実施例6の各インキュベート血清混合物と同じ画分を、非還元SDS-PAGEによって連続的に調べた。この検討のため、ラエミリ・ユー・ケー、「バクテリオファージT4

10

20

30

40

50

の頭部の会合の際の構造蛋白質の開裂」、Nature 227:680-685 (1979) (その開示を参考によりここに取り入れる) におけるように、10%アクリルアミドゲル上でサンプルを流し、注意深く乾燥させ、通常の方法で写真フィルムに露呈した。この分析により、無傷の<sup>125</sup>I-Lym-1はMr 200,000で明白であったのに対し、修飾した<sup>125</sup>I-Lym-1は約Mr 116,000で、より小さい分子量に対応する別個のバンドに認められたことが明らかとなった。よって、本実施例により、血清中での修飾抗体のインキュベートは、結果的にアクリルアミドゲル上で修飾されたみかけの分子量を与えることが示され、HPLC分析の結果が確認された。

(実施例9)

#### 【0042】

##### 血清中における標識したLym-1の脱ヨウ素化についての試験

また実施例6と同じサンプルを8日間にわたって調べ、放射性標識したLym-1からの放射性活性の何らかの喪失があったか否かを見た(この種の喪失は血清中における脱ヨウ素化の証拠であると解釈することができる)。データは、この期間に渡って放射性活性の喪失は実質的にないことを示し、これらの免疫接合体では非常に安定なヨウ素の付着が得られていることが確認された。

#### 【0043】

よって実施例7~9により、修飾抗体は、血清中でのインキュベート後も実質的に完全な活性を保持しつつ、見かけ分子量116,000の分子に分解されると認められた。前述したように、分子量のこの喪失は、抗体がその1価値形態へと分解するところによって起こっているという可能性がある。いずれにしろ、見かけの分子量の喪失は、修飾抗体がその断片へと分解することによるものと考えられる。

#### 【0044】

前述したような、血清中でインキュベートした場合の修飾抗体の見かけの分子量の前記した予期しない変化を突き止めた後、修飾MAbの生体内での安定性を試験した。全体浄化時間を決定するためにこれらの生体内試験を行った。これらの試験の例を実施例10に示す。

(実施例10)

#### 【0045】

##### 全体浄化

3群の胸腺欠損ヌードマウス(n=5)に対し、クロラミンT法を使用してI-131により標識したLym-1の(a)無傷抗体、(b)F(ab')<sub>2</sub>断片及び(c)修飾抗体を、各々腹腔内注射する実験を行った。注射の時点及びその後経時的に、全体活性を線量計を用いて測定した。この検討により、放射性活性の全体浄化は、抗体調製物により変動することが示された。結果を図2に示す。

#### 【0046】

図2に示す通り、修飾Lym-1は、20時間の生物学的半減期( $t_{1/2}$ )で無傷のLym-1( $t_{1/2}=5$ 日)より速く全体から浄化された。しかしながら、F(ab')<sub>2</sub>断片の浄化は10時間の生物学的半減期で、修飾Lym-1より2倍速かった。データは、迅速に浄化されるF(ab')<sub>2</sub>断片と遅く浄化される無傷抗体との間の中間の速度で修飾Lym-1が浄化されることを示している。

#### 【0047】

よって、実施例10のデータから、修飾抗体は比較的高度に持続性の無傷抗体より迅速に体から浄化されるが、F(ab')<sub>2</sub>断片程は迅速ではないことが理解できる。

#### 【0048】

免疫治療のための理想的な薬品は、所望する毒性効果を与えるのに十分長い期間は血流中で持続するが、意図しない毒性副作用を生起する程までは長くないものであろう。実施例10のデータは、修飾抗体は、免疫治療で使用した場合に潜在的に理想的な持続時間を示すことを示唆している。

#### 【0049】

10

20

30

40

50



前述したように、免疫治療のための薬品は、その標的細胞に対して高度に特異的であるものでもあろう。よって、以下の実施例では、無傷MAbおよびF(ab')<sub>2</sub>断片の両者と相対して修飾MAbの特異性を試験した。実施例11は、後述する生体内分布の検討全てに使用した方法を示すものである。

(実施例11)

#### 【0050】

##### 生体内分布の検討

2つの群の6週齢ヌードマウスに対し、ラージ細胞(10<sup>7</sup>)を腿領域に皮下注射した。直径1cmより大きくなるまで腫瘍を3週間生育させた。各群のマウスを使用し、以下に記載するように対標識による検討を行った。第1の群(n=6)では、各マウスに対し、12μCi/μg(120μCi/マウス)のI-131により標識した10μgの修飾Lym-1、及び2.5μCi/μg(25μCi/マウス)のI-125により標識した10μgの無傷Lym-1を含む0.2mLの接種物を腹腔内(i.p.)に注射した。第2の群(n=4)では、マウスは、12μCi/μg(120μCi/マウス)のI-131により標識した10μgの修飾Lym-1、および2.5μCi/μg(25μCi/マウス)のI-125により標識した10μgのF(ab')<sub>2</sub>断片を含む0.2mLの接種物を受容するものとした。全ての実験において、注射後予備選択した時間に頸部脱臼によりマウスを犠牲にし、種々の器官、血液および腫瘍を除去し、分析用天秤で秤量した。その後ガンマカウンタ内でサンプルをカウントし、<sup>131</sup>Iおよび<sup>125</sup>I活性を測定した。<sup>125</sup>Iカウントは、17%の<sup>131</sup>Iチャンネルカウントを差引くことにより、<sup>131</sup>Iチャンネルからの重複について調整した(1282コンピュガンマ・ガンマカウンタ(LKB))を使用して実験的に決定された式)。動物を犠牲にした日にしたがって<sup>131</sup>Iアイソトープの放射性崩壊についてもデータを補正した。それぞれのマウスについて、グラム腫瘍当りのcpm/グラム器官当りのcpm、%投与量/グラムおよび%投与量/器官としてデータを示した。これらのデータから、それぞれの群について平均および標準偏差を計算した。

#### 【0051】

実施例12は、実施例11の方法を使用し、修飾MAbの生体内分布を無傷MAbと比較するものである。

(実施例12)

#### 【0052】

##### 修飾Lym-1対無傷Lym-1の生体内分布の検討

ここでは、実施例11の方法で無傷Lym-1抗体を修飾Lym-1抗体と比較した。表Iに示すように、無傷Lym-1では、注射後7日目には、血液活性は0.64%ID/gであった。同じく注射後7日目には、腫瘍は3.92%ID/gの活性を有していた。

#### 【0053】

表Iに示すように、無傷Lym-1と比較し、修飾Lym-1は血液からより速く浄化され、7日目には、血液活性は0.14%ID/gであった。同じく注射後7日目には、腫瘍は7.7%の活性を有していたが、これは無傷Lym-1の対応する活性より有意に高い傾向であった。

#### 【0054】

幾つかの器官における実施例12で得られた抗体反応性の結果を表Iに示し、図3(%投与量/グラム)および図4(腫瘍/器官比率)にグラフにより示す。

#### 【0055】

【表 1】

表 I

注射後 7 日目のラージ腫瘍担持ヌードマウス (N = 6) における  
修飾および無傷モノクローナル抗体 L Y M - 1 の生体内分布

修飾 L y m - 1

| 器 官 | c p m / g 腫瘍<br>c p m / g 器官 | % 投与量 / g   | % 投与量 / 器官  |
|-----|------------------------------|-------------|-------------|
| 血 液 | 140.07 (81.30)*              | 0.14 (0.20) | —           |
| 皮 膚 | 93.98 (43.40)                | 0.09 (0.04) | —           |
| 筋 肉 | 364.53 (232.97)              | 0.03 (0.03) | —           |
| 骨   | 126.96 (55.86)               | 0.06 (0.02) | —           |
| 心 臓 | 137.34 (67.96)               | 0.07 (0.04) | 0.01 (0.00) |
| 肺   | 28.31 (10.34)                | 0.28 (0.10) | 0.06 (0.02) |
| 肝 臓 | 96.80 (49.03)                | 0.09 (0.05) | 0.15 (0.08) |
| 脾 臓 | 12.02 (5.62)                 | 0.79 (0.53) | 0.03 (0.01) |
| 膵 臓 | 286.43 (159.92)              | 0.04 (0.02) | 0.00 (0.00) |
| 胃   | 71.21 (30.72)                | 0.11 (0.03) | 0.02 (0.01) |
| 腸   | 133.31 (80.82)               | 0.07 (0.04) | —           |
| 腎 臓 | 17.63 (7.63)                 | 0.45 (0.12) | 0.14 (0.03) |
| 腫 瘍 | —                            | 7.70 (3.95) | 2.98 (1.71) |

無傷 L y m - 1 (対照)

| 器 官 | c p m / g 腫瘍<br>c p m / g 器官 | % 投与量 / g   | % 投与量 / 器官  |
|-----|------------------------------|-------------|-------------|
| 血 液 | 30.72 (17.74)                | 0.64 (1.26) | —           |
| 皮 膚 | 8.83 (3.05)                  | 0.41 (0.20) | —           |
| 筋 肉 | 44.39 (26.16)                | 0.15 (0.21) | —           |
| 骨   | 19.49 (6.08)                 | 0.21 (0.18) | —           |
| 心 臓 | 28.79 (13.76)                | 0.19 (0.22) | 0.02 (0.02) |
| 肺   | 16.98 (8.22)                 | 0.36 (0.46) | 0.07 (0.01) |
| 肝 臓 | 11.84 (5.95)                 | 0.37 (0.25) | 0.59 (0.46) |
| 脾 臓 | 3.93 (3.74)                  | 1.52 (1.14) | 0.06 (0.03) |
| 膵 臓 | 29.35 (12.88)                | 0.16 (0.17) | 0.02 (0.02) |
| 胃   | 11.00 (4.55)                 | 0.32 (0.11) | 0.07 (0.03) |
| 腸   | 18.06 (8.79)                 | 0.23 (0.13) | —           |
| 腎 臓 | 22.44 (10.61)                | 0.20 (0.17) | 0.06 (0.05) |
| 腫 瘍 | —                            | 3.92 (3.11) | 1.02 (0.27) |

\* 平均 (標準偏差)

## 【0056】

図 3 から、修飾抗体は、腫瘍中で無傷抗体より高いシグナルを生成したことがわかる。更に、腎臓を除く試験したあらゆる器官で、修飾抗体は無傷 M A b より弱く反応した。より高いシグナルが腎臓に認められることは予期できないことではない。というのは、抗体はこの器官を介して浄化されると予期されるからである。実施例 10 で無傷 M A b と比較して修飾 M A b はより迅速な浄化速度を有することが認められているので、腎臓中により

10

20

30

40

50

高い量の修飾MAbが存在することを予期し得る。

【0057】

図3と同じデータを異なる形式で示した図4を参照すると、修飾MAbは、腎臓を除く試験したあらゆる器官で、無傷MAbより有意に高い腫瘍／器官比率を与えることが理解できる。よって、修飾抗体は、免疫シントグラフィで使用する場合、有意に低いバックグラウンドを与えることを予期し得る。更に、修飾抗体は、免疫治療で使用する場合、腫瘍に対するその高い親和力および非標的組織に対する低い親和力の両者により、より有効であることを予期し得る。よって免疫治療で使用する場合、修飾抗体は腫瘍に対してより毒性が高く、非標的組織に対してより毒性が低いことを予期し得る。本発明の修飾抗体の免疫治療への使用は、後に更に詳細に説明する。

10

【0058】

次に、修飾MAbの生体内分布を他の未修飾抗体のF(ab')<sub>2</sub>断片と比較した。実施例13はこれらの実験を示すものである。

(実施例13)

【0059】

修飾Lym-1対Lym-1のF(ab')<sub>2</sub>断片の生体内分布の検討

ここでは、F(ab')<sub>2</sub>断片を修飾Lym-1MAbと比較した。実験は、実施例11と同様に行った。結果を表IIに示し、図4および図5にグラフにより示す。

【0060】

【表 2】

表 II

注射後 5 日目のラージ腫瘍担持ヌードマウス (N = 4) における  
修飾および無傷モノクローナル抗体 L Y M - 1 の生体内分布

修飾 L y m - 1

| 器 官 | c p m / g 腫瘍<br>c p m / g 器官 | % 投与量 / g   | % 投与量 / 器官  |
|-----|------------------------------|-------------|-------------|
| 血 液 | 39.59 (14.84)*               | 0.09 (0.03) | —           |
| 皮 膚 | 13.69 (3.15)                 | 0.24 (0.06) | —           |
| 筋 肉 | 75.32 (16.22)                | 0.04 (0.01) | —           |
| 骨   | 26.79 (7.18)                 | 0.12 (0.04) | —           |
| 心 臓 | 44.42 (11.34)                | 0.08 (0.04) | 0.01 (0.01) |
| 肺   | 15.78 (3.88)                 | 0.21 (0.07) | 0.04 (0.01) |
| 肝 臓 | 12.19 (4.25)                 | 0.29 (0.12) | 0.27 (0.10) |
| 脾 臓 | 2.68 (1.01)                  | 1.34 (0.55) | 0.07 (0.03) |
| 膵 臓 | 42.17 (11.23)                | 0.08 (0.03) | 0.01 (0.00) |
| 胃   | 14.16 (4.43)                 | 0.24 (0.07) | 0.05 (0.02) |
| 腸   | 28.36 (9.96)                 | 0.12 (0.05) | —           |
| 腎 臓 | 12.53 (3.15)                 | 0.27 (0.09) | 0.09 (0.03) |
| 腫 瘍 | —                            | 3.18 (0.89) | 3.16 (1.09) |

F ( a b ' ) <sub>2</sub>断片 (対照)

| 器 官 | c p m / g 腫瘍<br>c p m / g 器官 | % 投与量 / g   | % 投与量 / 器官  |
|-----|------------------------------|-------------|-------------|
| 血 液 | 29.27 (13.17)                | 0.05 (0.02) | —           |
| 皮 膚 | 10.54 (2.78)                 | 0.12 (0.02) | —           |
| 筋 肉 | 55.50 (14.49)                | 0.02 (0.01) | —           |
| 骨   | 23.73 (7.89)                 | 0.06 (0.02) | —           |
| 心 臓 | 35.19 (11.01)                | 0.04 (0.02) | 0.00 (0.00) |
| 肺   | 12.57 (3.69)                 | 0.10 (0.03) | 0.02 (0.00) |
| 肝 臓 | 10.43 (4.20)                 | 0.13 (0.05) | 0.12 (0.04) |
| 脾 臓 | 2.59 (1.03)                  | 0.54 (0.21) | 0.03 (0.01) |
| 膵 臓 | 31.55 (9.82)                 | 0.04 (0.02) | 0.00 (0.00) |
| 胃   | 8.08 (3.31)                  | 0.17 (0.06) | 0.03 (0.01) |
| 腸   | 22.27 (7.93)                 | 0.06 (0.02) | —           |
| 腎 臓 | 10.05 (2.71)                 | 0.13 (0.04) | 0.04 (0.01) |
| 腫 瘍 | —                            | 1.23 (0.24) | 1.42 (0.48) |

\* 平均 (標準偏差)

# 【0061】

表 I I から、修飾 L y m - 1 は、F ( a b ' ) <sub>2</sub>断片より遅く血液から浄化されたことがわかる。修飾 L y m - 1 では、注射後 5 日目には、断片 ( 0 . 0 5 % ) より高い 0 . 0 9 % I D / g の血液活性を有した。図 5 は、修飾 L y m - 1 の腫瘍活性が、F ( a b ' ) <sub>2</sub>断片の対応する活性より約 2 . 5 倍高いことを示している。修飾 L y m - 1 の活性は、腎臓を含む試験した全ての種々の器官について F ( a b ' ) <sub>2</sub>断片より高かった。これはより迅速に浄化される抗体は腎臓中に蓄積するという理論と一貫するものである。

## 【0062】

更に、図6は、修飾Lym-1についての腫瘍対組織比率は、試験した全ての器官に関してF(ab')<sub>2</sub>断片のものより高いことを示している。すなわち、実施例12および13の実験結果により、本発明の修飾抗体は、無傷MAbまたはF(ab')<sub>2</sub>断片のいずれよりもその標的腫瘍に対して高い活性を有することが確認される。更に、これらの実験の腫瘍対組織のデータは、修飾抗体は無傷MAbまたはF(ab')<sub>2</sub>断片のいずれよりも腫瘍に対する高い特異性を有することを示している。

## 【0063】

そこで、本発明の修飾MAbが有する免疫シントグラフィにより結果を与える能力を試験した。これらの試験の例を実施例14に示す。

10

(実施例14)

## 【0064】

Lym-1の画像形成の検討

ピンホールコリメータおよびスペクトル91ガンマカメラ（ライセオン）を使用し、腫瘍担持ヌードマウスの画像形成を行った。これらの動物の画像分析により、注射後の腫瘍／全体の抗体分布の評価が与えられた。注射後7日目に、2mgケタミンHClおよび0.4mgキシラジンを0.2mL皮下(s.c.)接種により投与してマウスを麻酔した。その後、記録10,000カウントに予備設定したカメラを用い、固定したマウスを背部位置で画像形成に供した。バックグラウンドの差引きは行わなかった。ポラロイドのタイプ330バックフィルムを使用して写真画像を得た。それぞれの画像で2つの領域（(a)領域1：全体、(b)領域2：腫瘍）を特定した。図6～8は、これらの実験により得られたシントグラフ（シントグラムとしても知られる）の例を示すものである。無傷Lym-1を用いる免疫シントグラフィ画像形成を注射後7日に試みたが、図6に認められるように満足し得るものではなかった。図6は、腫瘍は視覚化されたものの、動物の残部も視覚化されたことを示している。図7および図8は、注射後の同じ時間における、標識した修飾Lym-1を用いて注射した2つの異なるラージ腫瘍担持動物の画像を示す。図7および図8の両者は、図6に認められる無傷Lym-1により生成された腫瘍の位置のものと比較し、遥かに高いレベルで腫瘍の位置の標識した修飾Lym-1の濃度を示している。更に重要なことに、修飾Lym-1により生成されたマウス全体のバックグラウンドに対する腫瘍の位置の標識の比率は、無傷Lym-1の場合より数倍高かった。よって図7および図8により腫瘍の明確な画定が示され、バックグラウンド放射性活性は殆どまたは全くない。

20

30

## 【0065】

更に、修飾Lym-1を使用した場合、注射後5日目に腫瘍の満足し得る視覚化ができた。図10は、図9（7日目の画像）に示すのと同じ動物を5日目にとった画像を示す。理解し得るように、図10に示す5日目の画像は、7日目に無傷Lym-1により生成した画像（図7）より有意に優れていた。試験した全ての動物について結果は同様であった。

## 【0066】

この検討は、修飾抗体断片の使用は腫瘍抗原に対してより大きい比活性を示し、より高い絶対濃度の抗体の腫瘍中での蓄積を可能とすることを示唆するものである。このことは、修飾Lym-1断片の絶対濃度は、注射後7日目で無傷Lym-1濃度の約2倍、5日目でF(ab')<sub>2</sub>断片の約2.5倍であることを示す今回の結果によって確認されている。

40

## 【0067】

修飾Lym-1断片の遥かに速い浄化により、高い腫瘍対バックグラウンド比率に到達するのに必要な時間も有意に減少し、よってこの結果、無傷抗体より少ない時間でより良好な画像が得られる。

## 【0068】

抗体の特異性および活性の改良における本発明の修飾の一般的有用性を示すために、更

50

に別のMAbを修飾した。これらの種々の修飾MAbの試験を実施例15～18に示す。  
(実施例15)

【0069】

モノクローナル抗体B72.3の浄化速度

コルチェル・ディラ、「ヒト乳腫瘍細胞と反応性のモノクローナル抗体のスペクトル」、Proc. Natl. Acad. Sci. 78:3199-3203 (1981) (その開示を参考によりここに取入れる)における方法で、結腸カルシノーマに対するモノクローナル抗体であるB72.3 (IgG1)を取得した。実施例1の方法に従い、平均して1分子当たり1つのPDP基を用いてB72.3MAbを官能化した。

【0070】

実施例3の方法によって修飾B72.3MAbを放射性標識した。実施例10と同様に全体浄化時間を測定した。図11は、これらの全体浄化実験の結果を示すものである。修飾抗体の全体浄化半減期は減少を示し、無傷MAbで約6日のものが修飾抗体については約2.5日となった。F(ab')<sub>2</sub>断片の浄化半減期は、Lym-1断片についてと同様に修飾抗体より速く、約12時間の半減期を有していた。よって結果は、修飾B72.3は、F(ab')<sub>2</sub>断片と無傷抗体の間の中間の浄化半減期を有する点で、修飾Lym-1と同様の挙動であったことを示した。

(実施例16)

【0071】

B72.3の生物分布

ヒトLS174T結腸カルシノーマを担持する胸腺欠損ヌードマウス、各々5匹ずつの2群を用いて、対標識生体内分布の検討を行った。一方の群には無傷I-125標識B72.3を注射し、また他方には修飾I-131標識B72.3を注射した。実験では、同様に腫瘍、血液および種々の器官における生体内分布を比較した。用いた方法は実施例11～13と同様とした。データを表IIIに示し、図11および12にグラフを示す。

【0072】

10

20

【表 3】

表 III

注射後 4 日目のヒト L S 1 7 4 T 結腸カルシノーマ担持ヌードマウス (N = 5)  
における修飾および無傷モノクローナル抗体 B 7 2 . 3 の生物分布

修飾 B 7 2 . 3

| 器 官 | c p m / g 腫瘍<br>c p m / g 器官 | % 投与量 / g   | % 投与量 / 器官  |
|-----|------------------------------|-------------|-------------|
| 血 液 | 6.16 (2.32)*                 | 1.10 (0.45) | —           |
| 皮 膚 | 20.81 (3.92)                 | 0.31 (0.12) | —           |
| 筋 肉 | 61.58 (16.16)                | 0.11 (0.05) | —           |
| 骨   | 65.25 (15.04)                | 0.10 (0.04) | —           |
| 心 臓 | 31.41 (18.44)                | 0.24 (0.11) | 0.03 (0.02) |
| 肺   | 11.89 (3.25)                 | 0.54 (0.18) | 0.14 (0.04) |
| 肝 臓 | 21.61 (10.36)                | 0.33 (0.14) | 0.43 (0.17) |
| 脾 臓 | 37.89 (15.00)                | 0.18 (0.09) | 0.02 (0.01) |
| 膵 臓 | 60.23 (23.73)                | 0.12 (0.06) | 0.02 (0.01) |
| 胃   | 37.74 (9.20)                 | 0.17 (0.05) | 0.04 (0.01) |
| 腸   | 68.31 (28.27)                | 0.10 (0.04) | —           |
| 腎 臓 | 24.56 (10.07)                | 0.29 (0.13) | 0.09 (0.04) |
| 腫 瘍 | —                            | 6.02 (1.33) | 6.45 (1.53) |

無傷 B 7 2 - 3 (対照)

| 器 官 | c p m / g 腫瘍<br>c p m / g 器官 | % 投与量 / g   | % 投与量 / 器官  |
|-----|------------------------------|-------------|-------------|
| 血 液 | 3.43 (1.13)                  | 1.34 (0.60) | —           |
| 皮 膚 | 10.44 (1.80)                 | 0.41 (0.15) | —           |
| 筋 肉 | 31.78 (8.86)                 | 0.14 (0.05) | —           |
| 骨   | 33.36 (9.84)                 | 0.14 (0.06) | —           |
| 心 臓 | 16.57 (8.28)                 | 0.30 (0.14) | 0.04 (0.02) |
| 肺   | 6.42 (1.59)                  | 0.68 (0.28) | 0.18 (0.08) |
| 肝 臓 | 11.85 (4.78)                 | 0.39 (0.16) | 0.52 (0.24) |
| 脾 臓 | 18.94 (5.61)                 | 0.24 (0.12) | 0.02 (0.01) |
| 膵 臓 | 29.80 (9.42)                 | 0.15 (0.05) | 0.02 (0.01) |
| 胃   | 18.88 (3.83)                 | 0.22 (0.04) | 0.05 (0.01) |
| 腸   | 35.61 (13.48)                | 0.13 (0.06) | —           |
| 腎 臓 | 15.20 (6.40)                 | 0.33 (0.18) | 0.11 (0.06) |
| 腫 瘍 | —                            | 4.04 (0.84) | 4.28 (0.78) |

\* 平均 (標準偏差)

## 【0073】

表 I I I に示したように、無傷 B 7 2 . 3 抗体では注射後 4 日目で 1 . 3 4 % I D / g の血液活性、および表 I I I に示すように腫瘍において 4 . 0 4 % の活性を有していた。無傷 B 7 2 . 3 と比較し、修飾 B 7 2 . 3 では 4 日目で低い血液活性 ( 1 . 1 % I D / g ) および高い腫瘍活性 ( 6 . 0 2 % I D / g ) を有していた。

## 【0074】

図 1 3 からわかるように、より迅速に浄化される抗体について予期される通り、全ての

10

20

30

40

50

種々の器官の活性は、腎臓を除いて修飾 B 7 2 . 3 に関して高かった。よって、図 1 4 に示すように、修飾 B 7 2 . 3 についての腫瘍対器官比率は、無傷 B 7 2 . 3 についての対応する比率より有意に高かった。腫瘍部位での修飾抗体のより高い活性のため、腫瘍対器官比率は腎臓に関してさえも改良されていた。

(実施例 1 7)

#### 【0075】

##### 腫瘍担持マウスにおける B 7 2 . 3 の画像形成

修飾 B 7 2 . 3 を注射した L S 1 7 4 T 腫瘍担持マウスの画像分析により、注射後の腫瘍／全体抗体分布の評価が与えられた。図 1 4 は、注射後 1 日目の免疫シントグラフを示すものである。画像は明確な腫瘍の画定を示し、バックグラウンド放射活性を殆ど有していない。図 1 5 は、注射後 4 日目の免疫シントグラフを示すものである。4 日目で腫瘍は明確に認められ、動物の血液プールに残留する放射性活性は殆どなかった。全ての動物について結果は同様であった。

10

#### 【0076】

よって、修飾 B 7 2 . 3 は、B 7 2 . 3 と反応性の腫瘍に注射後短時間以内に高品質の免疫シントグラフを得るのに非常に有用であると認められた。

#### 【0077】

T N T - 1 は、ヒトガンに対するその選択的結合のための標的として壊死性腫瘍を利用する I g G<sub>2a</sub> モノクローナル抗体である。実施例 1 と同様に平均して 1 分子当たり 1 つの P D P 基を用いてこの抗体を修飾し、実施例 1 8 に示すように全体保持時間を分析した。

20

(実施例 1 8)

#### 【0078】

##### モノクローナル抗体 T N T - 1 の使用

エプステインら、「ヒトガンにおける壊死性病巣の検出のための新しい方法」、C a n c e r R e s . 4 8 : 5 8 4 2 - 5 8 4 8 ( 1 9 8 8 ) ( その開示を参考によりここに取入れる ) における方法で、T N T - 1 を取得した。実施例 3 の方法によって T N T - 1 M A b を放射性標識した。実施例 1 0 と同様にして全体浄化時間を測定した。図 1 6 は、これらの全体浄化実験の結果を示すものである。修飾 T N T - 1 M A b は、無傷 T N T - 1 と比較して全体浄化半減期の減少、および T N T - 1 の F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片と比較して全体浄化半減期の増加を示した。

30

#### 【0079】

よって、修飾 T N T - 1 は他の修飾抗体と同様の挙動であった。したがって、修飾 T N T - 1 M A b の有用性は、試験した他の修飾抗体と同等であると期待される。

#### 【0080】

よって、本発明の方法を使用するあらゆる抗体の修飾は、腫瘍の画像形成を改良できると考えられる。本発明の方法を使用してあらゆる所望の種類の組織の画像を生成するためには、その種類の組織に対する抗体を最初に取得しなければならない。ポリクローナル抗体は、当業者に公知たり得る従来の技術で得ることができる。また、モノクローナル抗体は、同様に当業者に公知たり得るものとして、これらの抗体により与えられる増加した特異性を得るために調製することができる。その後抗体をヘテロ 2 官能価試薬と化学的に接合させる。接合の後、適切な標識を修飾抗体に適用する。

40

#### 【0081】

前記の実施例は、 $\gamma$  線放射の放射性核種からなる標識の画像形成を活用するものであるが、多くの他の種類の標識および画像形成装置を、本発明の範囲内に企図する。例えば、従来の X 線を使用し、バリウム、セシウムまたはヨウ素のような放射性不透明の材料を画像形成することができる。M R I 画像形成技術を使用し、常磁性または超磁性粒子を標識として使用して抗体の位置の画像を生成することができる。更に、テクニシウム ( technetium ) を標識として使用することができる。これらの代替的な標識は、従来の方法を用いて修飾抗体に接合させることができる。

#### 【0082】

50



標識した抗体は、薬学的に許容し得る賦形剤、キャリアまたは基剤とともに、対象に標識を投与するための薬学的組成物に含有させることができる。適切な賦形剤、キャリアまたは基剤には、塩類溶液、リン酸緩衝塩類溶液、グリセリン、炭酸カルシウム等が包含される。その後これらの組成物を、局所注射、静脈注射、または低減したシグナル強度が要求される場合や、口腔内での組織の画像形成が望まれる場合は、経口投与のようなあらゆる種類の手段を用いて導入する。しかしながら、好ましくは、抗体に対する標的組織の露呈を最大にするために投与は全身性注射によるものとする。

#### 【0083】

本発明により1つ以上のPDP基の付加によって抗体を修飾し、これらの修飾抗体を免疫治療薬品に組込んだ場合、有意に改良された結果が与えられると考えられる。この種の治療薬品は、一般に1以上の生物学的に活性な分子と組合わさった腫瘍または他の疾患組織に対して特異的な抗体を含む。この種の薬品中で機能する適切な生物学的に活性な分子には、毒素、例えばジフテリア毒素（リシン）A鎖、または当業者により公知のあらゆる種類の植物毒素、放射性核種、例えばイットリウムの放射活性アイソトープ、ヨウ素、リン、および他の一般に使用される放射性治療薬品、薬物、例えばメトトレキセート、5-フルオロウラシルまたはアドリマイシン、キレート（EDTAおよびEGTAを含む）、cis-プラチナおよび他の毒性有機金属薬品、及びあらゆる他の治療薬品が挙げられる。

#### 【0084】

従来、有効な免疫治療は未だ十分に実現されていなかった。本発明の修飾抗体の増加した活性および特異性により、その標的組織に対する十分な活性および特異性を有する免疫治療薬品が提供され、従来の免疫治療薬品の欠陥を克服できると考えられる。よって、対象に対して適切な免疫治療薬品を注射した場合、対象の健全な組織に有意に影響を与えることなく、標的疾患組織を殺傷することができる。

#### 【0085】

これらの免疫治療薬品の使用では、特定の望ましくない種類の組織に特異的な抗体を最初に取得しなければならない。所望の抗体が利用可能でない場合、当業者に公知たり得るように、抗原を生物に注射し、哺乳動物から血清を取得することにより、適切な生物中で抗体を生成することができる。あるいは、また好ましくは、当業者に公知の方法でモノクローナル抗体を生成することができる。その後抗体をヘテロ2官能価試薬と化学的に接合する。接合の後、前記した治療薬品のような生物学的に活性な薬品との接合により、得られた修飾抗体を更に修飾する。次に、抗体と、薬学的に許容し得るキャリア、賦形剤または基剤を含有する薬学的組成物とを組合せる。この種の薬学的に許容し得るキャリア、賦形剤または基剤としては、全身性注射のための通常の塩類溶液、グリセリン、炭酸カルシウムが包含される。こうして組成物は、哺乳動物のような患者へ導入できるものとなる。

#### 【0086】

その後あらゆる公知の投与経路を介して抗体を対象に導入する。例えば、組成物を、全身性注射、患部組織への局所注射により導入することができ、外部の患部組織に局所塗布することができ、また低減したシグナル強度が要求される場合、や口腔内の組織の治療が所望される場合は経口的に摂取することができる。

#### 【0087】

抗体を含む生物学的に活性な薬品の投与量は、毒素に対する標的組織の感受性、患部組織の量、投与の経路、抗体の親和力、浄化速度及びその他の因子に依存している。しかしながら、代表的な投与量は、一般に体重1kg当たり1μg～1mgの範囲とすることができ、大半の用途で、投与量は好ましくは5～200μg/kgとし得る。

#### 【0088】

以下の実施例は、マウス中のラージ腫瘍に対して有効な免疫治療を示すものである。  
(実施例19)

#### 【0089】

マウス中のラージ腫瘍の処置

10

20

30

40

50

PDP修飾Lym-1を実施例1のように取得する。その後、修飾した抗体を処理して平均して抗体1分子当たり1つのリシンA鎖に導入する。無傷Lym-1およびF(ab')<sub>2</sub>断片を同様に毒素と組合せる。

#### 【0090】

25匹のマウスを5つの群に分割する。群Iは、8週間の間、週に1回リシン-PDP修飾Lym-1のリン酸緩衝塩類溶液(PBS)溶液の腹腔内注射(10 μg/kg全体重)を受けるものとする。群IIは、等量のリシン-無傷Lym-1の注射を受けるものとする。群IVは、等量のリシン-Lym-1のF(ab')<sub>2</sub>断片の注射を受けるものとする。群IIIは、等量の未接合リシンの注射を受容けるものとする。群Vは、PBS単独の注射を受けるものとする。

10

#### 【0091】

8週間後、実施例14の方法を使用して全ての生存マウスの免疫シントグラフィを行う。群Iのマウスでは、他の群のいずれと比較しても低減した腫瘍の様子が視覚化されて示される。生存する群IIおよび群IIIのマウスは幾分かの改良を示すが、群Iのマウス程劇的ではない。群IVのマウスは病気が重くなるか死亡する。

#### 【0092】

すなわち、実施例19は、本発明の修飾抗体を使用した腫瘍の1つの特定の処置を示している。実施例19は、本発明のPDP修飾抗体を使用する場合に達成される優れた結果を示す。また、マウスあるいは他の哺乳動物(例えばヒト)の他の腫瘍または疾患組織に特異的な他の抗体の使用に置き換えた場合も、これらの特異的腫瘍または疾患組織を処置する際に、同様に有効な結果が得られると考えられる。更に、他の公知の毒素に置き換えても同様の有効な結果が与えられると考えられる。実施例20は、ヒトの膵臓ガンに対して有効な類似する治療を使用した例を示すものである。

20

(実施例20)

#### 【0093】

##### ヒト膵臓ガンの処置

ヒト膵臓腫瘍に認められる抗原に特異的なモノクローナル抗体を取得する。実施例1と同様に、平均して抗体1分子当たり1つのPDP基の接合によりこの抗体を修飾する。実施例19でリシンについて記載したように、その後メトトレキセートをこれらの修飾抗体に接合させる。

30

#### 【0094】

2つの群の10人の膵臓ガン患者を治療する。第1の群は、従来の治療と組合せて週間基準で20 μg/kg全体重の薬物-PDP-MAbの静脈注射を受けるものとする。第2の群は、対照として従来の治療と組合せてPBSの注射を受けるものとする。10週間後、生存する患者の免疫シントグラフィを行う。

#### 【0095】

免疫シントグラフィによると、第1の群で画像化された腫瘍の平均的大きさは、対照群と比較して低減していた。

#### 【0096】

よって前記した実施例は、ヒトにおける免疫治療での修飾抗体の有用性を示すものである。

40

#### 【0097】

前記したように、本発明の1つの好適な形態では、修飾抗体を薬学的組成物に処方する。よって、免疫治療のための薬物と接合したPDP修飾抗体を、細胞毒性的に有効な量の本発明の修飾抗体-毒素接合体を有する注射組成物に混和することができる。以下は、ヒトのB細胞リンパ腫に対して有効な、細胞毒性的に有効な組成物の例である。

(実施例21)

#### 【0098】

##### ヒトのB細胞リンパ腫に対して有効な薬学的組成物

実施例18の修飾放射性標識Lym-1 : 10 mg/ml

50

リン酸緩衝塩類溶液（0.9%）：残部

【0099】

更に、放射性標識修飾MAbを、免疫シントグラフィにおけるその特異的抗原を視覚化するのに有効な組成物に処方することができる。以下はこの種の組成物の1つの例である。

（実施例22）

【0100】

結腸カルシノーマの免疫シントグラフィで有効な薬学的組成物

実施例15の修飾放射性標識B72.3：10mg/ml

リン酸緩衝塩類溶液（0.9%）：残部

10

【0101】

ある種の機械的または化学的変形は、当業者に対してそれを示唆し得ることが理解されよう。前記した実施例および詳細な説明は例示として与えたものとして明確に理解すべきであり、この発明の精神および範囲は添付する請求の範囲によってのみ限定される。

【図面の簡単な説明】

【0102】

【図1】図1は、F(ab')およびF(ab')<sub>2</sub>断片を製造する方法で起こると考えられる変化の図による表示を示す。

【図2】図2は、胸腺欠損ヌードマウスにおける放射性標識MAbLym-1の異なる調製物の全体保持量を示す。

20

【図3】図3は、注射後7日目のヒトリンパ腫担持ヌードマウスにおけるMAbLym-1および修飾Lym-1の注射投与量/グラムを%として、その生体内分布を示す。

【図4】図4は、注射後7日目のヒトリンパ腫担持ヌードマウスにおけるMAbLym-1および修飾Lym-1の腫瘍/器官比率の生体内分布を示す。

【図5】図5は、注射後5日目のヒトリンパ腫担持ヌードマウスにおけるMAbLym-1 F(ab')<sub>2</sub>および修飾Lym-1の注射投与量/グラムを%として、その生体内分布を示す。

【図6】図6は、注射後5日のヒトリンパ腫担持ヌードマウスにおけるMAbLym-1 F(ab')<sub>2</sub>および修飾Lym-1の腫瘍/器官比率として、生体内分布を示す。

【図7】図7は、I-131標識無傷Lym-1の注射後7日目に得られた画像を示す。

30

【図8】図8は、I-131標識修飾Lym-1の注射後7日目に得られた画像を示す。

【図9】図9は、I-131標識修飾Lym-1の注射後7日目に得られた画像を示す。

【図10】図10は、I-131標識修飾Lym-1の注射後5日目に得られた画像を示す。

【図11】図11は、胸腺欠損ヌードマウスにおける放射性標識モノクローナル抗体B72.3の異なる調製物の全体保持量を示す。

【図12】図12は、注射後4日目のLS174T結腸カルシノーマ担持ヌードマウスにおけるMAbB72.3および修飾B72.3の注射投与量/グラムを%として、その生体内分布を示す。

【図13】図13は、注射後4日のLS174T結腸カルシノーマ担持ヌードマウスにおけるMAbB72.3および修飾B72.3の腫瘍/器官比率として生体内分布を示す。

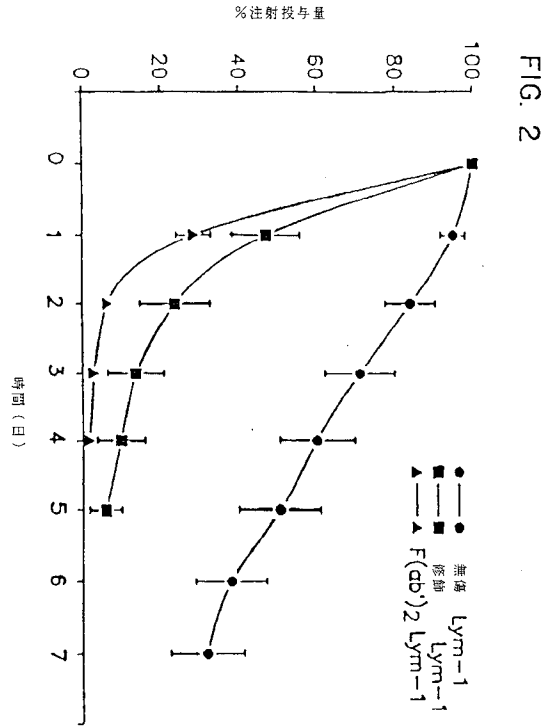
40

【図14】図14は、I-131標識修飾B72.3の注射後1日目に得られた画像を示す。

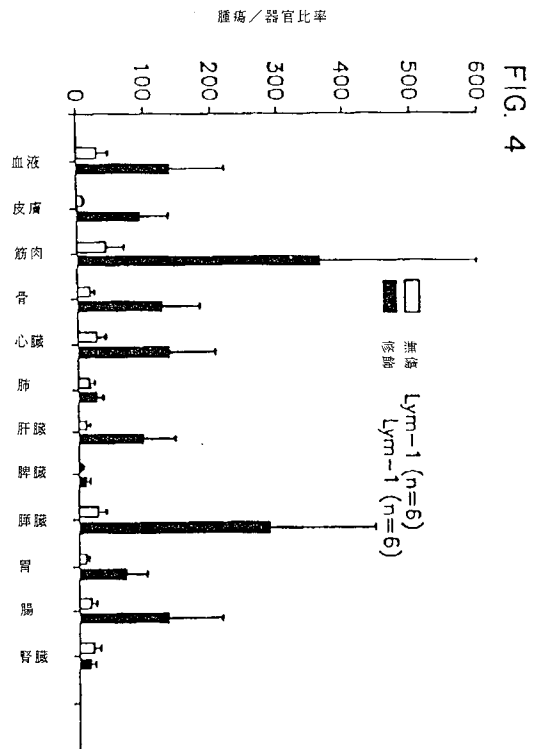
【図15】図15は、I-131標識修飾B72.3の注射後4日目に得られた画像を示す。

【図16】図16は、胸腺欠損ヌードマウスにおける放射性標識MAbTNT-1の異なる調製物の全体保持量を示す。

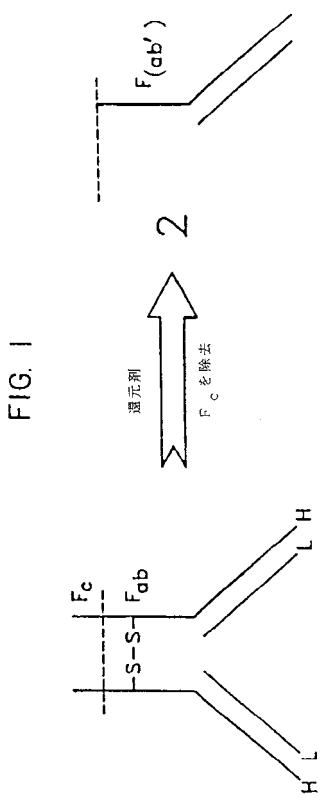
【図 2】



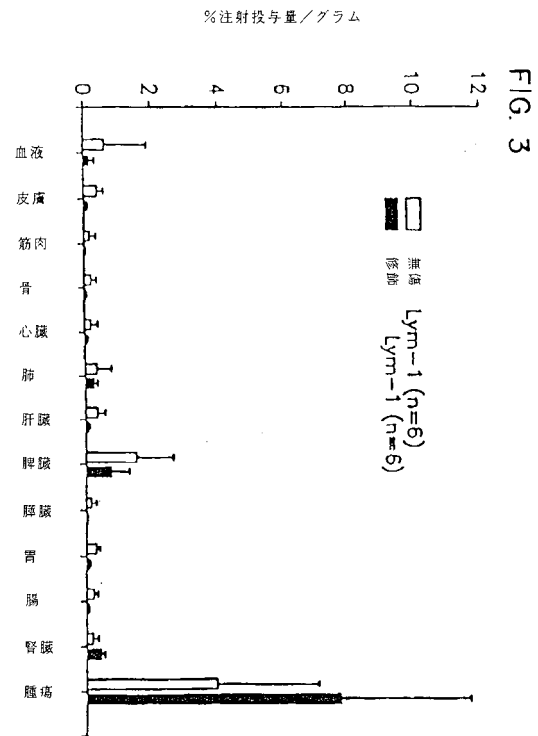
【図 4】



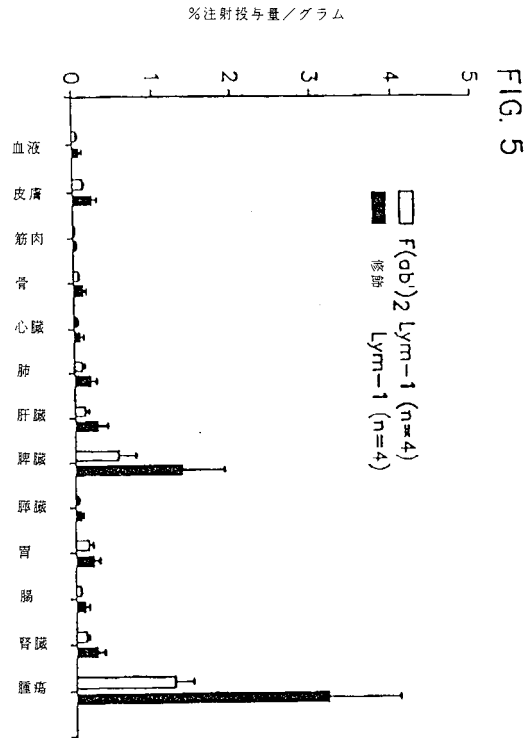
【図 1】



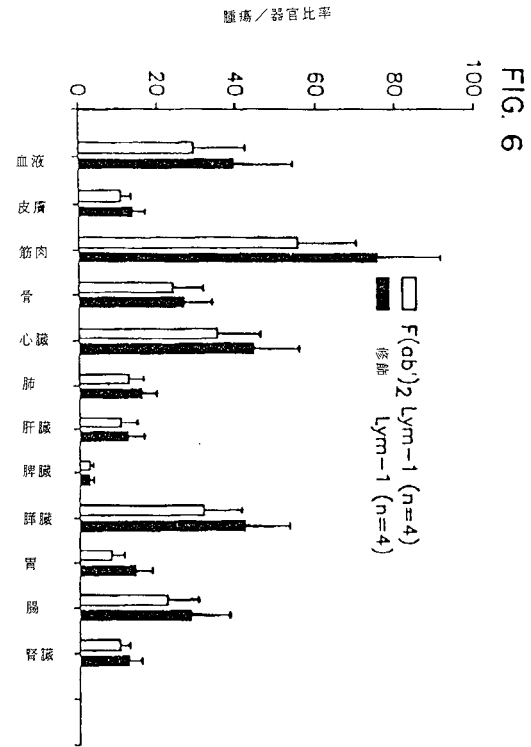
【図 3】



【図 5】

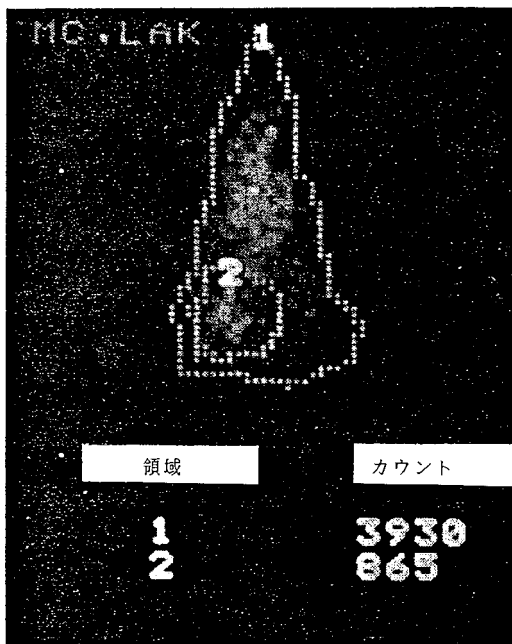


【図 6】



【図 7】

FIG. 7

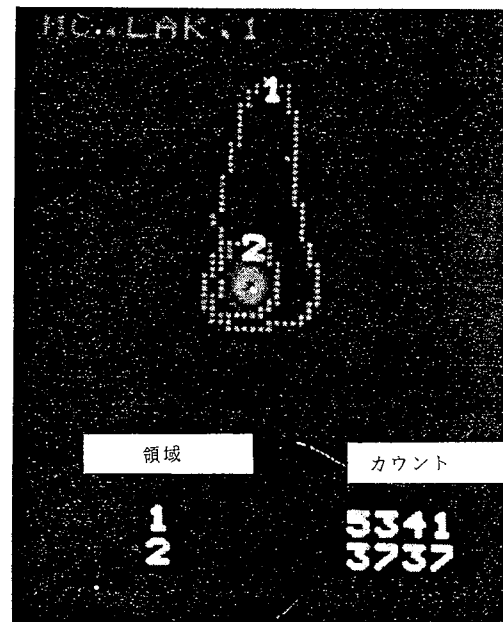


I-131 標識無傷 Lym-1 の注射後 7 日に得られた画像

領域 1 : マウス全体、領域 2 : ラージ腫瘍

【図 8】

FIG. 8

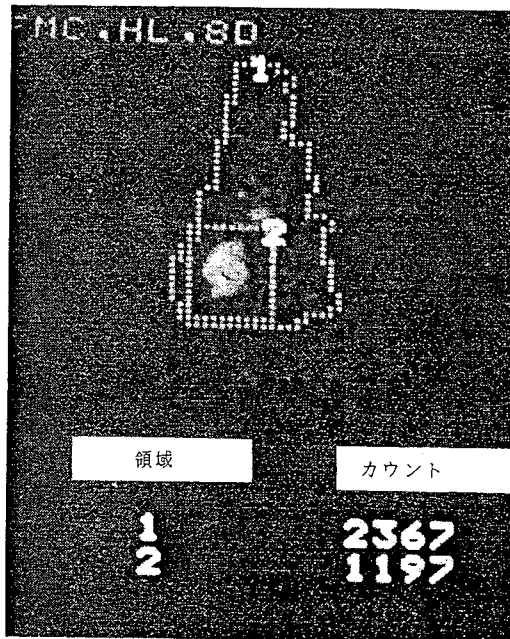


I-131 標識修飾 Lym-1 の注射後 7 日に得られた画像

領域 1 : マウス全体、領域 2 : ラージ腫瘍

【図 9】

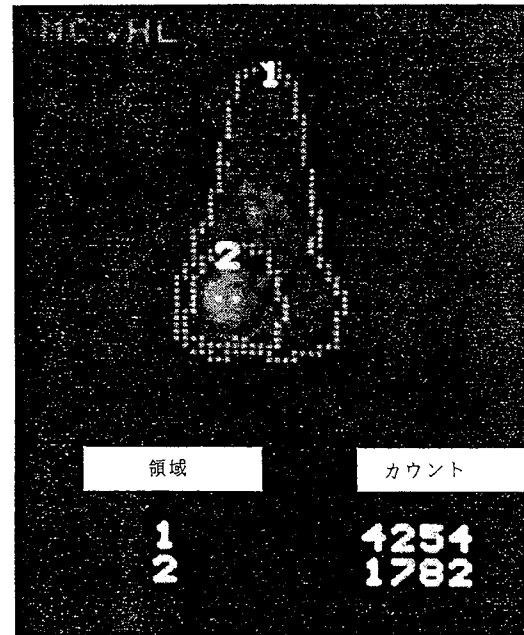
FIG. 9



I-131 標識修飾 Lym-1 の注射後 7 日に得られた画像  
 領域 1: マウス全体、領域 2: ラージ腫瘍

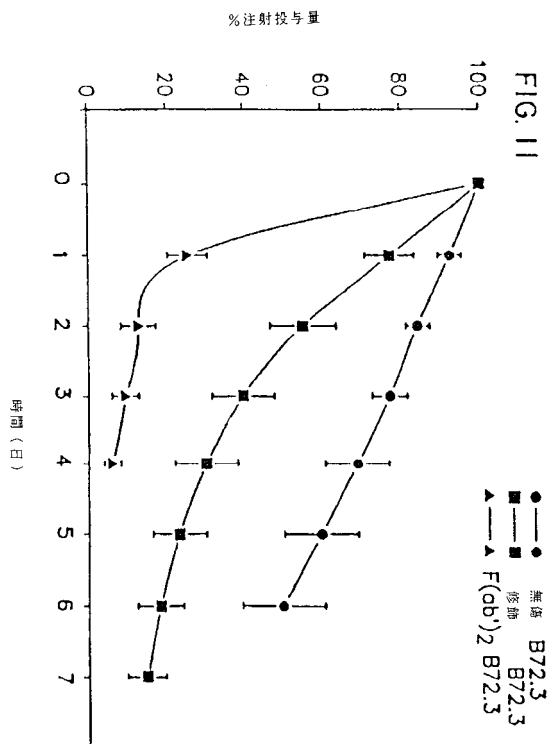
【図 10】

FIG. 10

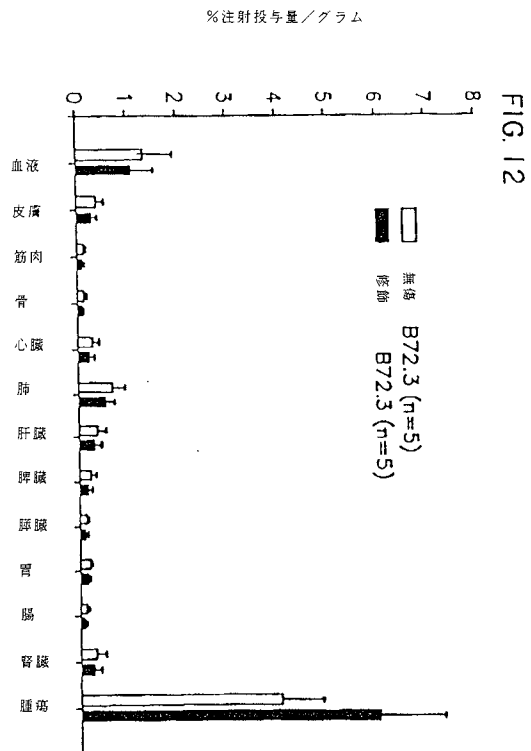


I-131 標識修飾 Lym-1 の注射後 5 日に得られた画像  
 領域 1: マウス全体、領域 2: ラージ腫瘍

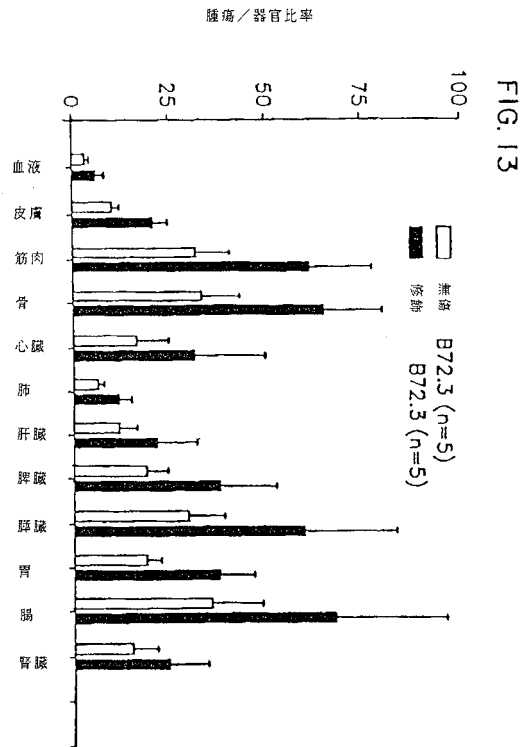
【図 11】



【図 12】

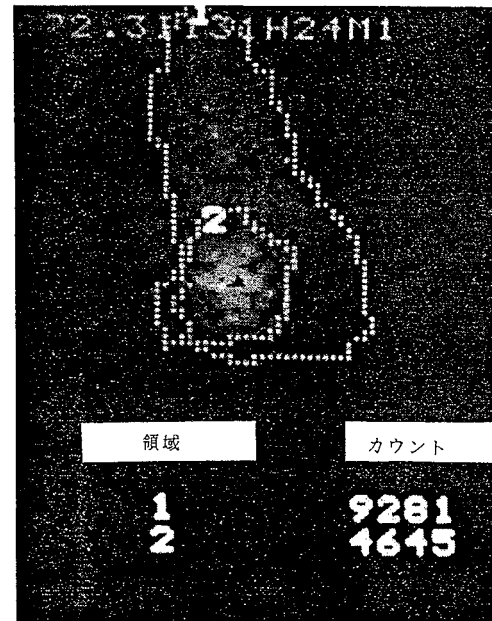


【図 13】



【図 14】

FIG. 14

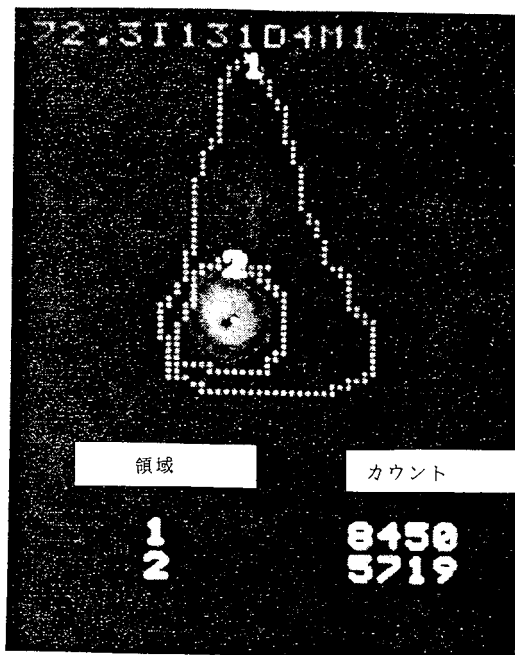


I-131 標識修飾 B72.3 の注射後 1 日に得られた画像

領域 1 : マウス全体、領域 2 : LS174T 腫瘍

【図 15】

FIG. 15

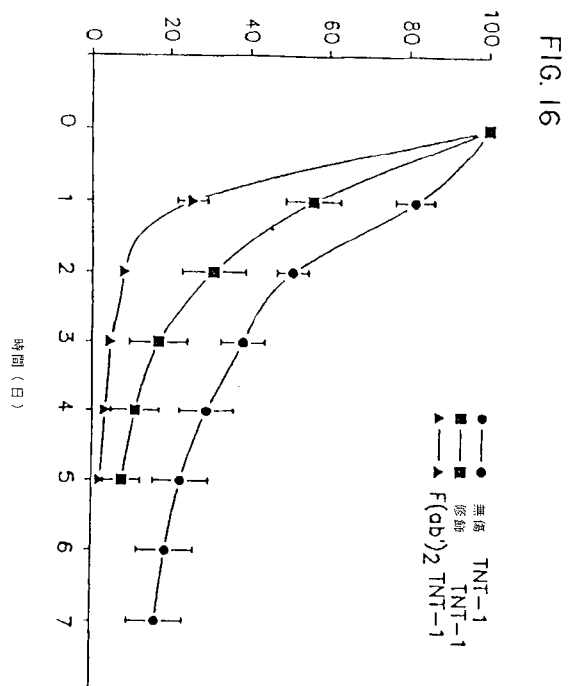


I-131 標識修飾 B72.3 の注射後 4 日に得られた画像

領域 1 : マウス全体、領域 2 : LS174T 腫瘍

【図 16】

%注射投与量



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 35/02

(72)発明者 カウリー, レスリー, エー.  
アメリカ合衆国, 91765, カリフォルニア, ダイヤモンド バー, クーガス クリーク  
ロード 23959番地

(72)発明者 エプスタイン, アラン, エル.  
アメリカ合衆国, 91011, カリフォルニア, ラ カナダ, ヒラード アベニュー 51  
28番地

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 欧州特許出願公開第00350230 (EP, A1)  
欧州特許出願公開第00384624 (EP, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 0 7 K 1 6 / 0 0  
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5  
A 6 1 K 4 5 / 0 0  
A 6 1 K 5 1 / 0 0  
A 6 1 P 3 5 / 0 2  
B I O S I S (D I A L O G)  
M E D L I N E (S T N)  
W P I D S (S T N)



|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 改良抗体，具有可控的清洁时间                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP3936339B2</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 公开(公告)日 | 2007-06-27 |
| 申请号            | JP2004013610                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 申请日     | 2004-01-21 |
| [标]申请(专利权)人(译) | TECHNI的Klong公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Tekunikuron公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 百富勤制药公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |         |            |
| [标]发明人         | カウリーレスリーエー<br>エプスタインアランエル                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 发明人            | カウリー, レスリー, エー.<br>エプスタイン, アラン, エル.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K51/00 A61P35/02 G01N33/532 A61K47/48 A61K51/10<br>A61P35/00 A61P37/00 C07K16/18 C07K16/30                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| CPC分类号         | A61K47/68 A61K47/6889 A61K51/10 A61K51/1063 A61K51/1069 A61K2121/00 A61K2123/00 A61P35/00<br>A61P35/02 A61P37/00 C07K16/00 C07K16/30 C07K16/3046 C07K16/3061                                                                                                                                                                                          |         |            |
| FI分类号          | C07K16/00 A61K39/395.C A61K39/395.L A61K45/00 A61K49/02.A A61P35/02 A61K39/395.E A61K39/395.T<br>A61K49/02.C A61K51/00 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/08.200 A61K51/10.200 A61P35/00<br>A61P37/00 C07K16/18 G01N33/532.A                                                                                                                          |         |            |
| F-TERM分类号      | 4C084/AA17 4C084/ZB07 4C084/ZB072 4C084/ZB26 4C084/ZB262 4C084/ZB27 4C084/ZB272 4C085/AA13<br>4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/AA22 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/BB01 4C085/CC21 4C085/DD51<br>4C085/EE01 4C085/HH03 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA29 4C085/KB18 4C085/KB82 4C085/LL18<br>4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 |         |            |
| 代理人(译)         | 川口义行<br>远山 勉                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| 优先权            | 07/579375 1990-09-07 US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |         |            |
| 其他公开文献         | JP2004210793A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |

#### 摘要(译)

(经修改) 要解决的问题: 提供修饰的抗体片段, 其能够使较大的抗体浓度在肿瘤中积累并且具有相对快速的血池清洁时间并且显示出针对肿瘤抗原的更高比活性。 解决方案: 通过化学缀合修饰的修饰抗体与异双功能试剂如SPDP。这些修饰抗体在制备用于诊断和治疗癌症和其他哺乳动物疾病的组合物中的用途。这些诊断用途包括免疫荧光摄影术。修饰的抗体可以进一步与标记的或生物活性分子缀合, 并用于这种类型的诊断和治疗。 【选择图】 无

| 器 官 | c p m / g 腫瘍<br>c p m / g 器官 | % 投与量 / g   | % 投与量 / 器官  |
|-----|------------------------------|-------------|-------------|
| 血 液 | 30.72 (17.74)                | 0.64 (1.26) | —           |
| 皮 膚 | 8.83 (3.05)                  | 0.41 (0.20) | —           |
| 筋 肉 | 44.39 (26.16)                | 0.15 (0.21) | —           |
| 骨   | 19.49 (6.08)                 | 0.21 (0.18) | —           |
| 心 臟 | 28.79 (13.76)                | 0.19 (0.22) | 0.02 (0.02) |
| 肺   | 16.98 (8.22)                 | 0.36 (0.46) | 0.07 (0.01) |
| 肝 臟 | 11.84 (5.95)                 | 0.37 (0.25) | 0.59 (0.46) |
| 脾 臟 | 3.93 (3.74)                  | 1.52 (1.14) | 0.06 (0.03) |
| 胰 臟 | 29.35 (12.88)                | 0.16 (0.17) | 0.02 (0.02) |
| 胃   | 11.00 (4.55)                 | 0.32 (0.11) | 0.07 (0.03) |
| 腸   | 18.06 (8.79)                 | 0.23 (0.13) | —           |
| 腎 臟 | 22.44 (10.61)                | 0.20 (0.17) | 0.06 (0.05) |
| 腫 瘍 | —                            | 3.92 (3.11) | 1.02 (0.27) |