

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-500623

(P2009-500623A)

(43) 公表日 平成21年1月8日(2009.1.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 5	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/7034 (2006.01)	A 6 1 K 31/7034	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-520313 (P2008-520313)	(71) 出願人	591011502 ワイス W y e t h アメリカ合衆国07940-0874ニュー ージャージー州 マディソン、ファイブ・ ジラルダ・ファームズ
(86) (22) 出願日	平成18年6月30日 (2006. 6. 30)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成20年3月4日 (2008. 3. 4)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/025736	(74) 代理人	100116311 弁理士 元山 忠行
(87) 国際公開番号	W02007/005690	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(87) 国際公開日	平成19年1月11日 (2007. 1. 11)		
(31) 優先権主張番号	60/695, 419		
(32) 優先日	平成17年7月1日 (2005. 7. 1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的治療薬の薬物動態特性の測定方法

(57) 【要約】

本発明は質量探知技法を用いる標的治療薬の薬物動態特性を測定する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の標的用分子の量および標的用分子 / 薬物のコンジュゲートの量を測定する方法であって、

- (a) 一の表面を含み、そこに一の標的を固定する固体支持体を用意する工程；
- (b) 複数の標的用分子 / 薬物のコンジュゲートを含む試料を用意する工程；
- (c) 該試料を該固体支持体の表面に固定された標的と接触させる工程；
- (d) 該固体支持体の表面での (i) 標的用分子と (i i) 該固体支持体の表面にある標的との第一の結合複合体の形成を検出する；ここで第一の結合複合体の形成は、試料中の標的用分子の量を示す、固体支持体の質量特性にて測定可能な第一の変化をもたらす工程；
- (e) 該第一の結合複合体を標的用分子 / 薬物のコンジュゲートの薬物と特異的に結合する薬物結合剤と接触させる工程；および
- (f) 該固体支持体の表面での (i) 薬物結合剤と (i i) 第一の結合複合体との第二の結合複合体の形成を検出する；ここで第二の結合複合体の形成は、試料中の標的用分子 / 薬物のコンジュゲートの量を示す、固体支持体の質量特性にて測定可能な第二の変化をもたらす工程を含む、方法。

10

【請求項 2】

標的が癌細胞または自己免疫応答に關与する細胞上で発現されるところの、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 3】

癌細胞上で発現される標的が 5 T 4、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 3、ルイス Y、H E R - 2、イムノグロブリン G の I 型 F c 受容体 (F c ガンマ R I)、C D 5 2、上皮増殖因子受容体 (E G F R)、血管内皮増殖因子 (V E G F)、D N A / ヒストン複合体、癌胎児性抗原 (C E A)、C D 4 7、V E G F R 2 (血管内皮増殖因子受容体 2、またはキナーゼ挿入ドメイン含有の受容体、K D R)、上皮細胞接着分子 (E p - C A M)、線維芽細胞活性化蛋白 (F A P)、トレイル受容体 - 1 (D R 4)、プロゲステロン受容体、腫瘍胎児抗原 C A 1 9 . 9 またはフィブリンであるところの、請求項 2 記載の方法。

30

【請求項 4】

標的用分子が抗体であるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

薬物がカリケアミシンであるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

薬物結合剤が抗体であるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

試料が約 5 μ l 以下の容量からなるところの、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

試料が血液試料であるところの、請求項 1 記載の方法。

40

【請求項 9】

試料中の標的用分子 / 薬物のコンジュゲートの量を測定する方法であって、

- (a) 一の表面を含み、そこに第一の結合複合体を固定する固体支持体を用意する；ここで該結合複合体は (i) 標的と (i i) 該標的に結合する標的用分子 / 薬物のコンジュゲートとを含む、工程；
- (b) 標的用分子 / 薬物のコンジュゲートの薬物と特異的に結合する薬物結合剤を固体支持体の表面に固定されている第一の結合複合体と接触させる工程；および
- (c) (i) 薬物結合剤と (i i) 固体支持体の表面にある第一の結合複合体との第二の結合複合体の形成を検出する；ここで該複合体の形成は、試料中の標的用分子 / 薬物のコンジュゲートの量を示す、固体支持体の質量特性にて測定可能な変化をもたらす工程

50

を含む、方法。

【請求項 10】

標的が癌細胞または自己免疫応答に関与する細胞上で発現されるものの、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

癌細胞上で発現される標的が 5 T 4、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 3、ルイス Y、H E R - 2、イムノグロブリン G の I 型 F c 受容体 (F c ガンマ R I)、C D 5 2、上皮増殖因子受容体 (E G F R)、血管内皮増殖因子 (V E G F)、D N A / ヒストン複合体、癌胎児性抗原 (C E A)、C D 4 7、V E G F R 2 (血管内皮増殖因子受容体 2、またはキナーゼ挿入ドメイン含有の受容体、K D R)、上皮細胞接着分子 (E p - C A M)、線維芽細胞活性化蛋白 (F A P)、トレイル受容体 - 1 (D R 4)、プロゲステロン受容体、腫瘍胎児抗原 C A 1 9 . 9 またはフィブリンであるものの、請求項 9 記載の方法。

10

【請求項 12】

標的用分子が抗体であるものの、請求項 9 記載の方法。

【請求項 13】

薬物がカリケアミシンであるものの、請求項 9 記載の方法。

【請求項 14】

薬物結合剤が抗体であるものの、請求項 9 記載の方法。

【請求項 15】

試料が約 5 μ l 以下の容量からなるものの、請求項 9 記載の方法。

20

【請求項 16】

試料が血液試料であるものの、請求項 9 記載の方法。

【請求項 17】

試料中の標的用分子の量が、標的用分子 / 薬物のコンジュゲートが、固体支持体表面に固定された標的に結合した後の、固体支持体の質量特性における変化を測定することにより決定されるものの、請求項 9 記載の方法。

【請求項 18】

標的用分子 / 薬物のコンジュゲートの試料中の標的用分子当たりの薬物の平均負荷量を測定する方法であって、

30

(a) 試料の標的用分子 / 薬物のコンジュゲートが結合する固体支持体を用意する工程 ;

(b) 標的用分子 / 薬物のコンジュゲートの薬物に特異的に結合する薬物結合剤を、固体支持体の表面にある標的用分子 / 薬物のコンジュゲートに結合させた後、固体支持体の質量特性における変化を測定することで、試料中の薬物の量を測定する工程 ; および

(c) 試料中の (b) の薬物の量を標的用分子の量で割ることにより標的用分子 / 薬物のコンジュゲート当たりの薬物の平均量を計算する工程

を含む、方法。

【請求項 19】

標的が癌細胞または自己免疫応答に関与する細胞上で発現されるものの、請求項 18 記載の方法。

40

【請求項 20】

癌細胞上で発現される標的が 5 T 4、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 3、ルイス Y、H E R - 2、イムノグロブリン G の I 型 F c 受容体 (F c ガンマ R I)、C D 5 2、上皮増殖因子受容体 (E G F R)、血管内皮増殖因子 (V E G F)、D N A / ヒストン複合体、癌胎児性抗原 (C E A)、C D 4 7、V E G F R 2 (血管内皮増殖因子受容体 2、またはキナーゼ挿入ドメイン含有の受容体、K D R)、上皮細胞接着分子 (E p - C A M)、線維芽細胞活性化蛋白 (F A P)、トレイル受容体 - 1 (D R 4)、プロゲステロン受容体、腫瘍胎児抗原 C A 1 9 . 9 またはフィブリンであるものの、請求項 18 記載の方法。

50

【請求項 2 1】

標的用分子が抗体であるところの、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 2】

薬物がカリケアミシンであるところの、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 3】

薬物結合剤が抗体であるところの、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 4】

試料が約 5 μ l 以下の容量からなるところの、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 5】

試料が血液試料であるところの、請求項 1 8 記載の方法。

10

【請求項 2 6】

試料中の標的用分子の量が、標的用分子 / 薬物のコンジュゲートの、固体支持体表面に固定された標的への結合後の、固体支持体の質量特性における変化を測定することにより決定されるところの、請求項 1 8 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

2005年7月1日出願された米国仮特許出願番号60/695419の優先権を主張するものであり、その全内容を出典明示により本明細書の一部とする。

20

(発明の分野)

本発明は、一般に、質量探知技法を用いて標的治療薬(例えば、イムノコンジュゲート)の薬物動態特性を測定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

合成および天然巨大分子が癌の治療にて確立された治療薬となっている。抗体がネイクドまたはアンコンジュゲート抗体として、または抗体 / 薬物のコンジュゲートとして投与された場合の、その臨床的効能が証明されている。後者の方法では、所定の標的細胞集団に対して結合特異性を有する抗体と治療薬とをカップリングさせる。モノクローナル抗体とコンジュゲートする治療薬として、サイトトキシン、生物学的反応修飾物質、酵素(例えば、リボヌクレアーゼ)、アポトーシス誘発性蛋白およびペプチド、および放射性同位体が挙げられる。

30

抗体介在の腫瘍細胞への薬物デリバリーは正常な組織でのその吸収を最小とすることにより薬物の効能を増大させる。例えば、Reffら(2002)Cancer Control 9:152-66; Sievers(2000)Cancer Chemother. Pharmacol. 46増補:S18-22; Goldenberg(2001)Crit. Rev. Oncol. Hematol. 39:195-201を参照のこと。MYLOTARG(商標)(ゲムツズマブ・オゾガミシン)はこの原理により作用し、高齢の患者の急性骨髄性白血病の治療にて承認されている、市販の標的免疫治療薬である。Sieversら(1999)Blood 93:3678-3684を参照のこと。この場合、標的用分子はカリケアミシンとコンジュゲートする抗-CD33モノクローナル抗体である。付加的な例として、抗-CD20抗体で放射性標識されている、イブリツモマブ・チウキセタン(ZEVALIN(商標))およびトシツモマブ(BEXXAR(商標))が挙げられる。Dillman, Clin. Exp. Med., 2006, 6(1):1-12を参照のこと。

40

【0003】

新規な抗体標的療法の発達にも拘わらず、その臨床にて好ましい治療指数を付与する生理学的特性は十分に理解されていない。簡単な生化学アッセイ(例えば、抗体とその抗原とのアフィニティ)では必ずしも効能は予測されない。Graff & Wittrup, Cancer Res., 2003, 63(3):1288-1296を参照のこと。循環半減期、組織分散速度お

50

よびコンジュゲート分解速度などのインビボでの生物学的パラメーターは、これら分子の治療効能の可能性を比較するにおいてより手助けとなるかもしれない。しかしながら、これらのパラメーターを評価するのに設計された前臨床実験は、典型的には、多くの実験動物およびコンジュゲートを放射線標識する必要があるため、困難である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

臨床的効能を予測する方法に対する要求を満たすために、本発明は、標的治療薬を対象に投与した後の、その薬物動態を特性化するためのプラズモン共鳴アッセイを提供する。本明細書に開示されているアッセイは単一の最小容量の試料中の標的用分子 (targeting molecule) および標的用分子/薬物のコンジュゲートの量を正確かつ再現的に検出する。この測定に基づいて、標的用分子/薬物のコンジュゲートの循環半減期、コンジュゲートの分解速度およびリンカーの安定性を対象中にてモニター観察することができる。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、試料中の標的用分子の量および標的用分子/薬物のコンジュゲートの量を測定する方法を提供する。本発明の代表的な一の実施形態において、該方法は、(a)一の表面を含み、そこに標的を固定する固体支持体を用意し；(b)複数の標的用分子/薬物のコンジュゲートを含む試料を用意し；(c)該試料を該固体支持体の表面に固定された標的と接触させ；(d)該固体支持体の表面での(i)標的用分子と(ii)該固体支持体の表面にある標的との第一の結合複合体の形成を検出する；ここで第一の結合複合体の形成は、試料中の標的用分子の量を示す、固体支持体の質量特性にて測定可能な第一の変化をもたらす；(e)該第一の結合複合体を標的用分子/薬物のコンジュゲートの薬物と特異的に結合する薬物結合剤と接触させ；および(f)該固体支持体の表面での(i)薬物結合剤と(ii)第一の結合複合体との第二の結合複合体の形成を検出する；ここで第二の結合複合体の形成は、試料中の標的用分子/薬物のコンジュゲートの量を示す、固体支持体の質量特性にて測定可能な第二の変化をもたらす工程を含む。

20

【0006】

試料中の標的用分子/薬物のコンジュゲートの量を測定する方法はまた、(a)一の表面を含み、そこに第一の結合複合体を固定する固体支持体を用意する；ここで該結合複合体は(i)標的と(ii)該標的に結合する標的用分子/薬物のコンジュゲートとを含み；(b)標的用分子/薬物のコンジュゲートの薬物と特異的に結合する薬物結合剤を固体支持体の表面に固定されている第一の結合複合体と接触させ；および(c)(i)薬物結合剤と(ii)固体支持体の表面にある第一の結合複合体との第二の結合複合体の形成を検出する；ここで該複合体の形成は、試料中の標的用分子/薬物のコンジュゲートの量を示す、固体支持体の質量特性にて測定可能な変化をもたらす工程を含む。

30

【0007】

本発明のもう一つ別の態様において、標的用分子当たりの薬物の平均負荷量を測定する方法が提供される。例えば、試料中の標的用分子/薬物のコンジュゲートの薬物負荷を測定する方法は、(a)試料の標的用分子/薬物のコンジュゲートが結合する固体支持体を用意し；(b)標的用分子/薬物のコンジュゲートの薬物に特異的に結合する薬物結合剤を、固体支持体の表面にある標的用分子/薬物のコンジュゲートに結合させて、固体支持体の質量特性における変化を測定することで、試料中の薬物の量を測定し；および(c)試料中の(b)の薬物の量を標的用分子の量で割ることにより標的用分子/薬物のコンジュゲート当たりの薬物の平均量を計算する工程を含みうる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明は標的療法用の組成物、すなわち、薬物に直接的または間接的にコンジュゲートした標的用分子を含む試料を特徴付ける方法を提供する。標的用分子/薬物のコンジュゲートを含む試料は、例えば、コンジュゲーションが不完全である、コンジュゲートが

50

分解する等の結果として、ある割合の構成部材（すなわち、コンジュゲートしていない標的用分子および遊離薬物）を含んでいてもよい。一般に、コンジュゲートしていない標的用分子および遊離薬物は、各々、その効能が限定されており、患者に毒性を付与するかもしれない。したがって、標的療法を受ける患者における進展をモニター観察するために、（構成部材よりもむしろ）標的用分子/薬物のコンジュゲートの薬物負荷および濃度が重要である。その開示された方法は、対象に投与された後の、吸収、分布、代謝作用および排泄などの、標的用分子/薬物のコンジュゲートの薬物動態パラメーターを評価するのに用いることができる、測定方法を提供する。

【0009】

従来の方法と比較した場合、当該開示は質量探知技法を用いて不安的な標的用分子/薬物のコンジュゲートを検出することを記載するものである。標的用分子/薬物のコンジュゲートの濃度は血清中および/または標的部位にて正確に測定され、循環半減期、リンカー安定性および標的部位にデリバリーされる薬物の量を評価することができる。単一の少ない容量の試料を用い、同一の試料にて複数の検出工程を連続して行い、標的用分子/薬物のコンジュゲートの薬物の負荷の計算を行うことも可能である。

10

【0010】

I. 標的用分子/薬物のコンジュゲート

当該開示されている方法にて用いることのできる標的用分子として、標的に対して特異的な結合を示す分子が挙げられる。特異結合とは、不均一試料にて優先的な結合をもたらす、2種の分子間のアフィニティをいう。結合は、一般に、少なくとも約 10^{-7} M以上、例えば、少なくとも約 10^{-8} M以上、少なくとも約 10^{-9} M以上、少なくとも約 10^{-11} M以上または少なくとも約 10^{-12} M以上のアフィニティにより特徴付けられる。

20

【0011】

標的用分子はまた、対象に投与した後に、該標的を発現する細胞に選択的に結合するいずれの分子も包含する。「標的」なる語は、対照部位と比較した場合に、標的部位（例えば、細胞または組織）での分子のインピボにおける優先的な移動および/または蓄積をいう。標的部位は、標的を発現する細胞、すなわち、標的用分子または標的用分子/薬物のコンジュゲートの蓄積を意図とする部位を含む。対照部位は、標的の発現を実質的に欠く細胞を含み、従って投与された標的用分子または標的用分子/薬物のコンジュゲートの結合および/または蓄積を実質的に欠く細胞を含む。選択的結合とは、一般に、標的部位にある標的用分子の量が対照部位にある標的用分子の量の約2倍多い、または約5倍多い、あるいは約10倍以上多いような、標的用分子/薬物のコンジュゲートが優先的に局在化していることをいう。

30

【0012】

代表的な標的用分子として、抗体、蛋白、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプチド核酸（PNA）、オリゴヌクレオチド、リガンド、レクチンおよび標的に特異的および/または選択的に結合する他の分子が挙げられる。

【0013】

標的用分子により拘束される標的は、一般に、疾患、疾患に罹りやすい病態、または治療を必要とする状態と関連付けられる。代表的な標的として、抗原、ハプテン、蛋白、ペプチド、受容体、オリゴヌクレオチド、炭水化物、および標的部位の細胞により高レベルで発現される他の分子が挙げられる。標的は、好ましくは、細胞表面に存在するか、あるいはまた標的用分子にアクセス可能である。標的部位は、充実性腫瘍のように局所化されていてもよく、悪性血液疾患のように非局在化されていてもよい。例えば、標的部位は腫瘍関連抗原（TAA）を発現する細胞、他の悪性細胞上で発現される抗原、炎症、アレルギー、自己免疫等に寄与する免疫細胞を含みうる。

40

【0014】

本発明の一の態様において、標的用分子は抗体であり、本発明はイムノコンジュゲート、すなわち、抗体/薬物のコンジュゲートを含む試料の特性化に関する。抗体/薬物のコ

50

ンジュゲートの抗体部分は、例えば、四重構造を有する抗体（例えば、天然に存在する抗体と類似する抗体）、あるいは少なくとも1個の免疫グロブリン軽鎖可変領域または少なくとも1個の免疫グロブリン重鎖領域、もしくはその抗原結合断片（例えば、Fab、修飾Fab、Fab'、F(ab')₂またはFv断片）を有する他の構造物を含む、ある種の抗体を含みうる。また開示されている方法を使用し、キメラ抗体、ヒト化抗体、二量体(diabody)、一本鎖抗体、四価抗体および/または多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）を用いて調製したコンジュゲートを特徴付けてもよい。

【0015】

標的とする抗癌治療薬を調製するのに、扁平上皮/腺肺癌（非小細胞肺癌）、浸潤性乳癌、結腸直腸癌、胃癌、扁平上皮頸部癌、浸潤性子宮内膜腺癌、浸潤性膵臓癌、卵巣癌、扁平上皮膀胱癌および絨毛腫などの充実性腫瘍からの癌細胞に特異的に結合する、腫瘍関連抗原が同定された。悪性血液疾患の標的治療薬のための抗原もまた、例えば、限定されるものではないが、低悪性度/濾胞非ホジキンリンパ腫(NHL)、小リンパ球性NHL、中悪性度/濾胞NHL、中悪性度広範性NHL、高悪性度免疫芽細胞性NHL、高悪性度リンパ球NHL、高悪性度小非分割細胞NHL、巨大病変NHLおよびヴァルデンストレーマクログロブリン血症、慢性白血球白血病、急性骨髄性白血病、急性リンパ芽細胞白血病、慢性リンパ球白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ芽細胞白血病、リンパ球白血病、単球白血病、骨髄性白血病、および前骨髄球性白血病などのリンパ腫および白血病を治療するための有用な薬物の標的である。

10

【0016】

標的治療薬のための抗体/薬物のコンジュゲートを調製するのに用いられる代表的な抗体として、抗-5T4抗体、抗-CD19抗体、抗-CD20抗体（例えば、RITUXAN(商標)、ZEVALIN(商標)、BEXXAR(商標)）、抗-CD22抗体、抗-CD33抗体（例えば、MYLOTARG(商標)）、抗-ルイスY抗体（例えば、Hu3S193、Mthu3S193、AGmthu3S193）、抗-HER-2抗体（例えば、HERCEPTIN(商標)(トラスツズマブ)、MDX-210、OMNITARG(商標)(ペルツズマブ、rhuma2c4)）、抗-CD52抗体（例えば、CAMPATH(商標)）、抗-EGFR抗体（例えば、ERBITUX(商標)(セヴァシズマブ)）、抗-DNA/ヒストン複合抗体（例えば、ch-TNT-1/b）、抗-CEA抗体（例えば、CEA-Cide、YMB-1003）、hLM609、抗-CD47抗体（例えば、6H9）、抗-VEGFR2（またはキナーゼ挿入ドメイン含有の受容体、KDR）抗体（例えば、IMC-1C11）、抗-Ep-CAM抗体（例えば、ING-1）、抗-FAP抗体（例えば、シプロツズマブ）、抗-CD4抗体（例えば、TRAIL-R）、抗-プロゲステロン受容体抗体（例えば、2C5）、抗-CA19.9抗体（例えば、GIVAREX(商標)）、および抗-フィブリン抗体（例えば、MH-1）が挙げられる。

20

30

【0017】

本明細書にて使用される場合、薬物とは、例えば、治療剤、結合剤等、ならびにインビボにて活性剤に代謝するプロドラッグなどの、生物学的活性または検出可能な活性を有するいずれの物質をもいう。薬物なる語はまた、薬物誘導体を包含し、ここで薬物は標的分子とコンジュゲートするように官能基導入されている。

40

【0018】

薬物は標的分子と直接的または間接的に結合してもよいが、その結合は薬物部分の治療効果の保存と矛盾のないものである。リンカーは安定していても、あるいは加水分解されるものであってもよく、薬物を抗体に連結させるための適当な技法を利用してよい。例えば、ヒドラジンおよび他の求核物質は、抗体上に天然に存在する炭化水素を酸化することにより生成されるアルデヒドにコンジュゲートされてもよい。ヒドラゾン含有のコンジュゲートは、所望の薬物放出特性を提供する、導入されたカルボニル基で製造され得る。コンジュゲートはまた、一端にジスルフィドを、中間にアルキル鎖を、そして他端にヒドラジン誘導体を有するリンカーで製造することができる。他の代表的なリンカーはチオ

50

ール反応性リンカー、例えばエステル、アミドおよびアセタール/ケタール、およびpH感受性リンカー、例えばカルボン酸基をアミド結合と並列して有する、シス-アコニタートである。リンカーはまた、標的用分子/薬物のコンジュゲートの凝集を制限するために、PEGなどの可溶化剤を包含する。ペプチドリナーもまた、用いることができる。

【0019】

代表的な薬物として、細胞毒性剤、化学療法剤、免疫調節剤、抗血管形成剤、抗増殖剤、アポトーシス促進剤、酵素および生物活性蛋白などの抗癌剤が挙げられる。薬物はまた、免疫調整剤、抗血管形成剤、抗増殖剤またはアポトーシス促進剤をコードする遺伝子などの治療用核酸を含んでいてもよい。これらの薬物の記述は相互に排除するものではなく、かくして治療剤は1種または複数の上記した語を用いて記載され得る。治療剤は医薬上許容される塩、酸または上記した物の誘導体として調製されてもよい。加えて、コンジュゲートは、例えば、リポソームまたはポリマーなどの細胞毒性剤としての補助担体を用いて製造することができる。

10

【0020】

細胞毒性剤なる語は、一般に、細胞の機能を阻害または防止し、および/または細胞の破壊をもたらす薬剤をいう。代表的な細胞毒性剤として、抗生物質、チューブリン重合の阻害剤、DNAに結合し、崩壊させるアルキル化剤、および蛋白合成または蛋白キナーゼ、ホスファターゼ、トポイソメラーゼ、酵素およびサイクリンなどの必須の細胞蛋白の機能を崩壊させる薬剤が挙げられる。例えば、細胞毒性剤として、限定されるものではないが、ドキソルピシン、ダウノルピシン、イダルピシン、アクラルピシン、ゾルピシン、ミトキサントロン、エピルピシン、カルピシン、ノガラマイシン、メノガリル、ピタルピシン、バルルピシン、シタラビン、ゲンシタビン、トリフルリジン、アンシタビン、エノシタビン、アザシチジン、ドキシフルリジン、ペントスタチン、プロキシウリジン、カペシタビン、クラドリビン、デシタビン、フルオキシウリジン、フルダラビン、ゴウゲロチン、プロマイシン、テガフル、チアゾフリン、アドリアマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダカルバジン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ミトキサントロン、プレオマイシン、メクロルエタミン、プレドニゾン、プロカルバジン、メトトレキエート、フルオウラシル、エトポシド、タキソール、タキソールアナログ、シス-プラチンおよびカルボ-プラチンなどのプラチン、ミトマイシン、チオテペ、タキサン、ピンクリスチン、ダウノルピシン、エピルピシン、アクチノマイシン、アウストラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、タモキシフェン、イダルピシン、ドラスタチン/アウリスタチン、ヘミアステルリン、エスペラマイシン、およびマイタンシノイドが挙げられる。

20

30

【0021】

本発明の特定の態様において、開示されている方法を用いて特徴付けられる標的用分子/薬物のコンジュゲートは、カリケアミシン(LL-E33288複合体とも称される)、例えばガンマ-カリケアミシンまたは効能の劣る誘導体、N-アセチルガンマカリケアミシンなどの抗生物質の薬物部分を含む。米国特許第4970198号を参照のこと。標的用分子/薬物の候補物質に用いるのに適するカリケアミシンの付加的な例が米国特許第4671958号;第5053394号;第5037651号;第5079233号;および第5108912号に開示されており、その各々を出典明示により本明細書の一部とする。カリケアミシンのジスルフィドアナログ、例えば、出典明示により本明細書の一部とする米国特許第5606040号および第5770710号に記載されているアナログを用いることもできる。実施例1に記載されているような抗体/カリケアミシンのコンジュゲートを調製するための代表的な方法が米国特許第5712374号;第5714586号;第5773001号;および第5877296号;米国公開番号2004-0082764-A1および2006-0002942-A1;およびPCT公開番号WO2005/089809に記載されており、その各々を出典明示により本明細書の一部とする。

40

【0022】

50

標的分子 / 薬物のコンジュゲートを調製するのに用いることのできる免疫調節剤として、腫瘍でのホルモン作用を遮断する抗ホルモン剤およびサイトカイン産生を抑制し、自己抗原発現をダウンレギュレートするか、またはMHC抗原をマスクする免疫抑制剤が挙げられる。代表的な抗ホルモン剤は、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナブストンおよびトレミフェンを含む抗エストロゲン；およびフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリンなどの抗アンドロゲン；および抗アドレナール剤を包含する。代表的な免疫抑制剤は2-アミノ-6-アリアル-5-置換ピリミジン、アザチオプリン、シクロホスファミド、プロモクリプチン、ダナゾール、ダブゾン、グルタルアルデヒド、MHC抗原およびMHC断片の抗イデオタイプ抗体、シクロスポリンA、グルココルチコステロイドなどのステロイド、サイトカインまたはサイトカイン受容体アンタゴニスト(例えば、抗インターフェロン抗体、抗IL10抗体、抗TNF抗体、抗IL2抗体)、ストレプトキナーゼ、TGF、ラパマイシン、T-細胞受容体、T-細胞受容体断片、およびT細胞受容体抗体を包含する。

10

20

30

40

50

【0023】

代表的な抗血管形成剤は、血管形成の阻害剤、例えば、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、COX-2阻害剤、VEGF阻害剤、bFGF阻害剤、ステロイドホスファターゼ阻害剤(例えば、2-メトキシエストラジオールビス-サルファメート(2-MeOE2bisMATE))、インターロイキン-24、トロンボスポンジン、メタロスポンジン蛋白、クラスIインターロイキン、インターロイキン12、プロタミン、アンジオシタチン、ラミニン、エンドスタチン、およびプロラクチン断片を包含する。

【0024】

抗増殖剤およびアポトーシス促進剤は、PPAR-ガンマの活性化剤(例えば、シクロペンテノンプロスタグランジン(cyPG))、レチノイド、トリテルピノイド(例えば、シクロアルタン、ルパン、ウルサン、オレアナン、フリエデラン、ダンマラン、ククルピタシン、およびリモノイドトリテルペノイド)、EGF受容体の阻害剤(例えば、HER4)、ランパマイシン、CALCIOTRIOL(商標)(1,25-ジヒドロオキシコレカルシフェロール(ビタミンD))、アロマターゼ阻害剤(FEMARA(商標)(レトロゾン))、テロメラーゼ阻害剤、鉄キレーター(例えば、3-アミノピリジン-2-カルボキシアルデヒドチオセミカルバゾン(トリアピン))、アポプチン(ニワトリ貧血ウイルスから由来のウイルス蛋白3-VP3)、Bcl-2およびBcl-X(L)の阻害剤、TNF-アルファ、FASリガンド、TNF関連アポトーシス誘発性リガンド(TRAIL/Apo2L)、TNF-アルファ/FASリガンド/TNF関連アポトーシス誘発性リガンド(TRAIL/Apo2L)のシグナル伝達の活性化剤、およびPI3K-Akt生存経路シグナル伝達の阻害剤(例えば、UCN-01およびゲルダナマイシン)を包含する。

【0025】

代表的な化学療法剤は、チオテパおよびシクロホスファミドなどのアルキル化剤；ブスルファン、インプロサルファンおよびピボサルファンなどのアルキルサルホナート；ベンゾドーパ、カルボクオン、メツレドーパ、およびウレドーパなどのアジイジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロロメラミンを含むエチレンイミンおよびメチルアメルアミン；クロルアンブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフオスファミド、メチオレタミン、メチオレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファルニド、ウラシルマスタード；カルムスチン、クロルオゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレア；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリチェアミシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エビルピ

シン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、ミトマイシン、マイコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、プロマイシン、クエラマイシン、ノドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシンなどの抗生物質；メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)などの抗代謝産物；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサートなどの葉酸アナログ；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリンアナログ；アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモファー、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロキシウリジン、5-EUなどのピリミジンアナログ；カルステロン、ドロモスタノロンプロピオン酸塩、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチイミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗アドレナール；フロリニン酸などの葉酸補助剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラムブシル；ピサントレン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルチン；ジアジクオン；エルフォルニチン；エリプチニウム酢酸塩；エトグルシド；ガリウム硝酸塩；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；ラゾキサラン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2,2',2'-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド(Ara-C)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド(例えば、パクリタキセル(TAXOL(商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology of Princeton, New Jersey)およびドセタキセル(TAXOTERE(商標)、Rhone-Poulenc Rorer of Antony, フランス)；クロランブシル；ゲンシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン、およびカルボプラチンなどの白金アナログ；ピンブラスチン；白金；エトボシド(VP-16)；イフォスファミド；ミトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニボシド；ダウノマイシン；アイニノプテリン；キセローダ；イバンドロナート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)；レチノイン酸；エスペラミシン；およびカペシタピンを包含する。

【0026】

標的用分子とコンジュゲートし、本明細書に開示の方法を用いて特徴付けることのできる付加的な治療剤として、光線力学療法のための感光剤(米国特許公開番号2002/0197262および米国特許第5952329号)；温熱療法のための磁気粒子(米国特許公開番号2003/0032995)；ペプチド、リガンド、細胞接着リガンド等などの結合剤、ホスフェート含有プロドラッグ、チオホスフェート含有プロドラッグ、サルフェート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、 β -ラクタム含有プロドラッグ、置換フェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは置換フェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロチトシンおよび他の5-フルオロウリジンプロドラッグなどのより活性な細胞毒性の無い薬物に変換することができる、プロドラッグが挙げられる。

【0027】

II. 標的用分子/薬物のコンジュゲートの薬物動態

本発明は、標的用分子の薬物ローディングを測定する方法、例えば、コンジュゲーション反応により有効用量、すなわち、所望の生物学的応答を惹起するのに十分な量の標的用分子/薬物のコンジュゲートを含む、レベルの薬物ローディングが得られ、市販されている標的用分子/薬物のコンジュゲートのバッチ間のコンシステンシーが維持されているかどうかを測定する方法を提供する。標的用分子/薬物のコンジュゲートの薬物放出または安定性を評価するために、患者に投与した後で、例えば、該患者より由来の血液試料を用いて薬物ローディングを評価してもよい。

10

20

30

40

50

【0028】

本明細書に開示されるように、標的用分子/薬物のコンジュゲートの量は同じ試料中の (i) 標的用分子の量および (ii) 標的用分子/薬物のコンジュゲートの量を別個に測定して算定してもよい。工程 (i) および (ii) は、各々、副題 I I . A および I I . B にてさらに詳細に記載されている。図 1 も参照のこと。簡単に言えば、該方法は 2 つの連続した反応の測定を含む。第一の反応は、標的用分子/薬物のコンジュゲートを含有する試料を、B I A C O R E (商標) などの質量探知装置上で、該コンジュゲートの標的用分子により認識される固定された標的と接触させた後に共鳴単位の数測定する。この反応は試料中の遊離 (コンジュゲしていない) 標的用分子とコンジュゲした標的用分子の合計に比例する。その後、薬物結合剤を、同じ質量探知装置上に固定された標的と結合した、コンジュゲした標的用分子とコンジュゲしていない標的用分子と接触させて第二の反応を得る。この第二の反応は同じ試料中の標的用分子/薬物のコンジュゲートとして存在する薬物の量と比例する。

10

【0029】

開示されている方法によれば、いずれの適当な質量探知装置を使用してもよい。当該分野にて公知の代表的な技法として、圧電方法、光学的方法、熱光学的方法、表面弾性波 (S A W) 方法、ならびに電気化学的方法、例えば、電位差測定方法、ボルタンメトリー方法、電気伝導測定方法、電流測定方法および電気容量測定方法が挙げられる。

【0030】

利用することができる光学的方法として、内部および外部反射法の両方を含む、反射 - 光学的方法などの質量表面濃度 (または屈折率) を検出する方法、例えば、偏光解析法およびエバネセント波分光法 (E W S) が挙げられる。後者の方法として、プラズモン共鳴 (S P R)、ブルースター角屈折率測定、臨界角屈折率測定、フラストレート全反射 (F T R)、エバネセント波偏光解析法、散乱全内部反射 (S T I R)、光導波路センサー、臨界角分解画像処理、ブルースター角分解画像処理、S P R 角分解画像処理などのエバネセント波に基づく画像処理、ならびにエバネセント蛍光 (T I R F) および燐光に基づく方法が挙げられる。

20

【0031】

例えば、試料中の標的用分子の平衡定数を測定するのに、次の質量探知技法を用いることができる。第一に、一連の濃度 (例えば、0、100、200、300、400、500、600、700、800、900 および 1000 ng/ml) の標的用分子を調製し、それと作動的に関連付けられるセンサーチップを有するバイオセンサーに順次注入する。ここで、センサーチップは対照となるセンシング表面と、標的を固定した少なくとも 1 つのセンシング表面とを有する。定常状態の結合レベルでの相対的反応を各標的用分子の濃度で測定する。バイオセンサーの作動緩衝液中の溶媒添加物が屈折率に大きく影響を及ぼすため、(既知の矯正手段を介して) 修正率を計算して適用し、相対反応を訂正して得た。ついで、各標的用分子の濃度の各々の訂正した相対反応を当業者であれば分かるように数学的に計算し、その標的用分子の平衡定数を測定する。

30

【0032】

本発明の特定の態様において、質量探知技法は表面プラズモン共鳴であり、B I A C O R E (商標) 装置 (B i a c o r e A B、ウプスラ、スウェーデン) を用いて行うことができる。該装置および理論的背景は J o n s s o n ら、B i o T e c h n i q u e s、1991、11:620-627 に記載されている。この技法は結合対の第一の結合パートナーをセンサーチップに固定し、そのセンサーチップを結合対の第二の結合パートナーを含有する試料と接触させ、ついでそのセンサーチップの表面光学特性にて得られる変化を測定することを含む。

40

【0033】

一般に、固体支持体はその固体支持体の上面にヒドロゲルマトリックスコーティングをカップリングさせて含み、そのヒドロゲルマトリックスマトリックスコーティングは複数の官能基を有する。B I A C O R E (商標) 装置を用いる場合、該固体支持体は、センサ

50

ーチップの形態であることが好ましく、そのセンサーチップはヒドロゲルマトリックスと上面の間に自由電子金属が介入している。この目的に適する自由電子金属として、銅、銀、アルミニウムおよび金が挙げられる。

【0034】

本発明の特定の態様において、本発明の方法は、

- (a) 一の表面を含み、そこに標的を固定する固体支持体を用意し；
- (b) 複数の標的用分子／薬物のコンジュゲートを含む試料を用意し；
- (c) 該試料を該固体支持体の表面に固定された標的と接触させ；
- (d) 該固体支持体の表面での (i) 標的用分子と (i i) 該固体支持体の表面にある標的との第一の結合複合体の形成を検出し；ここで第一の結合複合体の形成は、試料中の標的用分子の量を示す、固体支持体の質量特性にて測定可能な第一の変化をもたらす；
- (e) 該第一の結合複合体を抗薬物抗体またはその薬物結合フラグメントと接触させ；および
- (f) 該固体支持体の表面での (i) 抗薬物抗体またはその薬物結合フラグメントと (i i) 第一の結合複合体との第二の結合複合体の形成を検出し；ここで第二の結合複合体の形成は、試料中の標的用分子／薬物のコンジュゲートの量を示す、固体支持体の質量特性にて測定可能な第二の変化をもたらす、工程を含む。

10

【0035】

本発明のもう一つ別の態様において、標的用分子／薬物のコンジュゲートの試料中の抗体当りに負荷された薬物の平均量を測定する方法は、(a) 試料の標的用分子／薬物のコンジュゲートが結合する固体支持体を用意し；

20

(b) 抗薬物抗体またはその薬物結合フラグメントを、固体支持体の表面にある標的用分子／薬物のコンジュゲートに結合させた後、固体支持体の質量特性における変化を測定することで、試料中の薬物の量を測定し；および

(c) (b) の薬物の量を試料中の標的用分子の量で割ることにより標的用分子／薬物のコンジュゲート当たりの薬物の平均量を計算する、工程を含む。患者に投与した後の時間の関数であると考えた場合、該方法は標的用分子／薬物のコンジュゲートの循環半減期およびリンカーの安定性を評価するのに有用である。

【0036】

開示されている方法を用いると、血清試料中の標的用分子／薬物のコンジュゲートは 100 ないし 1000 ng/ml の標的用分子の濃度で検出された。実施例 4 および 5 に記載されるように、標的用分子／薬物のコンジュゲートの PK 値が個々の試料にて再現的に測定された。標的を発現する腫瘍の存在は、その標的に対して特異性を有する標的用分子／薬物のコンジュゲートの循環半減期を減少させたが、異なる特異性を有する標的用分子／薬物のコンジュゲートの循環半減期に対しては何の効果もなかった。図 5 B と 3 B を各々比較すること。循環半減期の減少は適当な標的の存在下での標的用分子／薬物のコンジュゲートの保持に起因している可能性がある。

30

【0037】

IIA. 標的用分子／薬物のコンジュゲートを含む試料中での標的用分子の量の測定方法

本発明は、複数の標的用分子／薬物のコンジュゲートを含む試料中の標的用分子の量を測定する方法を提供する。本発明の特定の態様において、該方法は、(a) 一の表面を含み、そこに標的を固定する固体支持体を用意し；(b) 複数の標的用分子／薬物のコンジュゲートの薬物を含む試料を用意し；(c) 該試料と固体支持体の表面に固定された標的とを接触させ；および (d) (i) 該試料の標的用分子と (i i) 固体支持体の表面にある標的との結合複合体の形成を検出し；ここで該結合複合体の形成は、固体支持体の質量特性にて測定可能な変化をもたらす工程を含む。

40

【0038】

この開示されている方法に従って用いることのできる代表的試料として、標的用分子／薬物のコンジュゲート調製物、すなわち、標的用分子と薬物とのコンジュゲーション反応からなる試料であって、コンジュゲートした標的用分子、コンジュゲートしていない標

50

的分子および遊離薬物を含みうる試料が挙げられる。抗体を対象に投与した後のその対象より得られる試料、例えば、血液、血清または尿の試料を用いてもよい。該試料は少量の液体、例えば約100 μ lより少ない、または約50 μ lより少ない、または約25 μ lより少ない、または約10 μ lより少ない、または約5 μ lより少ない試料を含みうる。試料の容量が多いほど、感度を上げるのに用いることができる。該試料は腫瘍などの組織試料から調製される液体抽出物からなってもよい。例えば、扁平上皮/腺肺癌（非小細胞肺癌）、浸潤性乳癌、結腸直腸癌、胃癌、扁平上皮頸部癌、浸潤性子宮内膜腺癌、浸潤性膵臓癌、卵巣癌、扁平上皮膀胱癌、絨毛腫または他の気管支、胸部、結腸、直腸、胃、頸部、子宮内膜、膵臓、卵巣、絨毛膜および精嚢の癌から試料を調製してもよい。

【0039】

I I B . 標的分子/薬物のコンジュゲートを含む試料中の薬物の量の測定方法

試料中の薬物の量を測定する場合、標的分子/薬物のコンジュゲートを質量センサーチップに結合させ、標的分子/薬物のコンジュゲートの薬物の部分に特異的に結合する薬物結合剤を用いてコンジュゲートを検出する。薬物結合剤は抗薬物抗体またはその薬物結合フラグメントを含みうる。付加的な代表的結合剤として、蛋白、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプチド核酸(PNA)、リガンド、または本明細書に記載されるように薬物の部分と特異的に結合するいずれか他の分子が挙げられる。

【0040】

例えば、該方法は、(a)一の表面を含み、そこに第一の結合複合体を固定する固体支持体を用意する；ここで該結合複合体は(i)本明細書に記載の標的と(ii)該標的に結合する標的分子/薬物のコンジュゲートとを含み；

(b)抗薬物抗体またはその薬物結合フラグメントを固体支持体の表面に固定されている第一の結合複合体と接触させ；および(c)(i)抗薬物抗体またはその薬物結合フラグメントと(ii)固体支持体の表面にある第一の結合複合体との第二の結合複合体の形成を検出する；ここで該複合体の形成は、試料中の標的分子/薬物のコンジュゲートの量を示す、固体支持体の質量特性にて測定可能な変化をもたらす、工程からなる。

【0041】

別法として、該方法は、(a)一の表面を含み、そこに抗薬物抗体またはその薬物結合フラグメントを固定する固体支持体を用意し；(b)標的分子/薬物のコンジュゲートを含む試料を固体支持体の表面に固定されている抗薬物抗体または薬物結合フラグメントと接触させ；および(c)試料中の標的分子/薬物のコンジュゲートの量を示す、固体支持体の質量特性にて測定可能な変化を検出する、工程からなる。

【0042】

標的分子/薬物のコンジュゲートの薬物の部分を検出するのに用いられる抗体は特異的結合を示す、すなわち、薬物が他の抗原を含有する試料中に存在する場合に、その薬物に優先的に結合する、いずれの抗体であってもよい。該抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってもよい。オフレートの高い抗薬物抗体が最も感度が高い。オフレートが中程度の抗薬物抗体を用いる場合、バックグラウンド補正を行い、感度を落として標的分子/薬物のコンジュゲートを定量してもよい。

【0043】

抗薬物抗体の調製および特徴付ける方法は当該分野にて周知である。例えば、Harlow & Lane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988を参照のこと。抗体表示ライブラリーを生成およびスクリーニングするのに有用な付加的な技法および試薬は、例えば、米国特許第5223409号およびPCT国際出願公開WO92/18619、WO91/17271、WO92/20791、WO92/15679、WO93/01288、WO92/01047、WO92/09690、およびWO90/02809にて見ることができる。

【0044】

簡単に言えば、ポリクローナル抗体は動物を本明細書に記載の薬物を含む免疫原で検疫

10

20

30

40

50

処理し、その免疫処理した動物から抗血清を集めることにより調製される。抗血清の産生には広範囲にわたる動物種、例えば、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ヤギおよびロバを用いることができる。

【0045】

当該分野にて周知であるように、免疫原は、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）および血清アルブミン（例えば、BSA）などの担体とカップリングし、免疫原性が改良されていてもよい。免疫原を担体のポリペプチドとコンジュゲートさせる技法は当該分野にて周知であり、グルタルアルデヒド、m-マレイミドベンコイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミドおよびビス-ピアゾ化ベンジジンを含む。免疫原の免疫原性はまた、アジュバント、例えば、完全フロイントアジュバント、不完全

10

【0046】

ポリクローナル抗体の産生に用いられる免疫原の量は、免疫原の特性、免疫処理に用いられる動物、および投与形路（例えば、皮下、筋肉内、皮内、静脈内または腹腔内）に応じて変化する。ポリクローナル抗体の産生は、免疫処理後の種々の時点で、免疫処理した動物の血液をサンプリングすることによりモニター観察される。所望の抗体力価が得られた場合、その免疫処理した動物を出血させて血清を単離かつ貯蔵する。

【0047】

開示されている方法に用いられる抗薬物モノクローナル抗体は、米国特許第4196265号に記載されている方法などの周知の方法を用いることを介して容易に調製され得る。例えば、マウスまたはラットを薬物で免疫応答を得るのに十分な時間免疫処理し、ついでその免疫処理した動物から由来の脾臓細胞を不死化骨髄腫細胞と融合させる。例えば、ヌクレオチドのデノボ合成を遮断する試薬（例えば、アミノプテリン、メトトレキサートおよびアザセリン）を培地に添加することで、融合細胞を融合していない親細胞の混合物より分離する。個々のハイブリドーマを培養し、上澄を薬物免疫原との反応性について試験する。選択されたクローンをモノクローナル抗体の供給源として永久的に増殖させることもできる。

20

【0048】

具体的な例を介して、本明細書に記載の抗薬物抗体を産生するには、標的用分子/薬物のコンジュゲートの薬物を含む、約1-200 μ gの抗原をマウスに腹腔内注射する。薬物を完全フロイントアジュバントなどのアジュバントと組み合わせて注射することで、Bリンパ球細胞を刺激して増殖させる。必要ならば、第二の用量の不完全フロイントアジュバントを混合した薬物を注射してマウスを追加免疫処理に付す。第二の注射を行った後2ないし3週間に、マウスを尾部から出血させ、免疫沈降により血清の力価を測定する。適当な力価が得られるまで追加免疫処理および力価測定の間を繰り返す。マウスの脾臓を摘出し、脾臓リンパ球を単離し、細胞融合に適する条件下で骨髄腫細胞を脾臓リンパ球と一緒にする。融合条件として、例えば、ポリエチレングリコールの配合が挙げられる。HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）などの分離培地にて培養することにより、融合細胞を融合していない骨髄腫細胞より分離する。得られたハイブリドーマを抗薬物抗体の産生についてスクリーニングに付す。選択されたクローンを高容量にて培養し、適量の抗体を得る。抗体は、当該分野にて知られているように、アフィニティクロマトグラフィーまたは他の方法により精製されてもよい。

30

40

【0049】

（実施例）

以下の実施例を用いて本発明の態様を説明する。以下の実施例の特定の態様は、本発明を実施するにおいて十分であるように本願発明者らにより見出され、かつ熟考された技法および操作の点から記載されている。これらの実施例は発明者らの実験室での標準的な実施を示している。本発明の開示および当該分野の一般的技術レベルの観点から、当業者であれば、以下の実施例が単なる例示であって、本発明の範囲を逸脱することなく、多くの

50

変形、修飾および変更を行い得ることを認識するであろう。

【0050】

実施例 1

抗体 / カリケアミシンのコンジュゲートの調製

ゲムツズマブ・オゾガミシンおよびイノツズマブ・オゾガミシンは、各々、抗 - CD 3 3 および抗 - CD 2 2 抗体、h P 6 7 . 6 および G 5 / 4 4 のカリケアミシンコンジュゲートである。ゲムツズマブ・オゾガミシンは市販されている薬物 M Y L O T A R G (商標) の一般名であり、h P 6 7 . 6 - A c B u t - C a l i c h D M H とも言われている。抗 - CD 2 2 / カリケアミシンのコンジュゲートであり、G 5 / 4 4 - A c B u t - C a l i c h D M H としても知られているイノツゾマブ・オゾガミシンは、現在、フェーズ I の臨床試験の最中である。これらのコンジュゲートを得るために、h P 6 7 . 6 および G 5 / 4 4 を酸不安定な 4 - (4 ' - アセチルフェノキシ) ブタン酸 (A c B u t) リンカーを用いて N - アセチルガンマカリケアミシジメチルヒドラジンに連結させた。h P 6 7 . 6 1 m g 当たり約 3 5 μ g のカリケアミシンおよび G 5 / 4 4 1 m g 当たり約 7 3 μ g のカリケアミシンの密度で抗体を負荷した。同様に、抗 - ルイス Y / カリケアミシンおよび抗 - 5 T 4 / カリケアミシンのコンジュゲートを調製し、開示されているアッセイに使用した。

10

【0051】

実施例 2

抗体 / カリケアミシンのコンジュゲートの投与

ラモス細胞株 (C R L - 1 9 2 3) をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A T C C) より得た。ラモスはヒト B - 細胞リンパ腫より誘導される CD 2 2 ⁺、CD 3 3 ⁻ 細胞株である。該細胞を 1 0 m M H E P E S、1 m M ピルビン酸ナトリウム、0 . 2 % (w / v) グルコース、1 0 0 U / m l ペニシリン G ナトリウム、1 0 0 μ g / m l ストレプトマイシンスルフェートおよび 1 0 % (v / v) ウシ胎児血清を補足した R P M I 1 6 4 0 の懸濁培養液に維持した。

20

【0052】

1 6 週齢の B a l b / ヌードマウス (C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s、ウィルミントン、マサチューセッツ州) に 4 0 0 ラドのガンマ線を照射した。ラモス細胞 (1 0 ⁷ / 2 0 0 μ l) を各マウスの右側に注射した。8 日後、腫瘍の大きさが約 0 . 5 c m ³ (± s = 0 . 1 6) の 1 0 匹のマウスを選択した。4 つの処理群 : (1) h P 6 7 . 6 - A c B u t - C a l i c h D M H で処理した腫瘍担持のマウス、(2) h P 6 7 . 6 - A c B u t - C a l i c h D M H で処理した腫瘍のないマウス、(3) G 5 / 4 4 - A c B u t - C a l i c h D M H で処理した腫瘍担持のマウス、および (4) G 5 / 4 4 - A c B u t - C a l i c h D M H で処理した腫瘍のないマウスを作製した。抗体 / カリケアミシンのコンジュゲートを投与する 2 日前に、5 μ l の試料を各マウスより採血した。1 5 0 μ l の単回用量の抗体 / カリケアミシンのコンジュゲート (マウス当たり 3 μ g のカリケアミシン) を外側尾静脈に注射した。その 2 4 時間、4 8 時間、7 2 時間および 9 6 時間後に正確に 5 μ l の試料を採血した。少容量の再現可能な試料を得るのに、尾静脈を可視化できるようになるまで、マウスを熱ランプの下に置いた。尾を 7 0 % イソプロピルアルコールで消毒し、外側尾静脈を針で破った。ついで、得られた血液の液滴を 5 μ l の吸引容量に予めセットしたマイクロピペッター (D r u m m o n d o f B r o o m a l l、ペンシルベニア州) に固定したキャピラリーを用いて吸引した。この血液試料を 1 9 5 μ l の以下の混合物 : 0 . 0 1 M H E P E S (p H 7 . 4)、0 . 1 5 M N a C l、3 m M E D T A、0 . 0 0 5 % サルファクタント P 2 0 (H B S - E P バッファー、B i a c o r e より入手可能、ウブサラ、スウェーデン) を含有する試験管に直ちに移した。

30

40

【0053】

実施例 3

プラズモン共鳴サンドウィッチ検出アッセイ

50

プラズモン共鳴サンドウィッチ検出アッセイを開発し、血清試料中の(1)標的用分子および標的用分子/薬物のコンジュゲートの試料中での量、および(2)同じ試料中の標的用分子/薬物のコンジュゲートに存する薬物の量を測定した。この方法の原理を図1にて説明する。該アッセイは標的用分子/薬物のコンジュゲートのクリアランスを評価することができる。該方法はすべてのコンジュゲート分子にある薬物の減少とコンジュゲートしていない抗体のフラクションの生成を判別するものではない。

【0054】

本明細書に記載の分析は、抗体/カリケアミシンのコンジュゲートを用い、BIACORE(商標)装置(Biacore International AB、ウプサラ、スウェーデン)で行った。この装置の検出システムは、バイオセンサーチップでのマクロ分子の相互作用により引き起こされる屈折率の変化を測定することに基づく。例えば、Johnenら、J. Immunol. Methods、1993、160(2):191-198; Karisonら、J. Immunol. Methods、1991、145(1-2):229-240を参照のこと。

10

【0055】

CM5バイオセンサーチップの表面に、抗原を4000-9000共鳴単位/フローセルの密度で固定した。該チップをカップリング試薬1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド-HCl/N-ヒドロキシスクシンイミドにより5 μ l/分の流速で6分間活性化させ、つづいて抗原を添加した。該チップを10mM酢酸ナトリウム溶液(pH4.0-4.5)中50 μ g/mlの蛋白と5 μ l/分の流速で6分間接触させることでリス-BSA抗原を負荷させた。該チップを10mM酢酸ナトリウム溶液(pH5)中0.1mg/mlの蛋白と2 μ l/分の流速で30分間接触させることで、CD33またはCD22FcをCM5チップに共有結合させた。ついで、該チップを300mM NaCl含有のHBS-EPで洗浄した。

20

【0056】

抗原をCM5チップに固定させた後、各抗体の較正曲線を確認した。一の代表的結果として、図2A-2Bは、標準試料の濃度と、抗-CD33/カリケアミシンのコンジュゲート、hP67.6-AcBut-CalichDMHの結合した共鳴単位の数との相関関係を示す。相関係数が約1.0であれば、抗体の全体数および抗体に結合したカリケアミシンの数を正確に決定することが可能である。較正曲線を用いて、抗体/薬物のコンジュゲートの抗体部分の血清濃度を測定した。

30

【0057】

その後、チップと、抗カリケアミシン抗体とを接触させることにより、血清試料中に存在するカリケアミシンの量もまた測定した。図2Bでの第二の反応が不在であることで分かるように、コンジュゲートしていない抗体は、同じ濃度で、抗カリケアミシン抗体と反応しない。この結果は、カリケアミシンの抗体上での存在についての第二の反応の特異性を証明する。

【0058】

コンジュゲートがCD33に独力で結合した後の反応(hP67.6-AcBut-CalichDMH)、つづいて第二の反応(hP67.6-AcBut-CalichDMH+抗カリケアミシン)は、0と500ng/mlの間のコンジュゲートの濃度範囲で直線状にあった(各々、 $r^2 = 0.9996$ および $r^2 = 0.9994$)。これらの反応の違い(すなわち、抗カリケアミシンの結合に寄与しうる共鳴単位)もまた、この範囲内で直線状であった($r^2 = 0.0047$)。0-1000ng/mlの濃度範囲を用いた場合、これら関数の二次式の回帰係数は0.99よりも大きかった。濃度関数としてプロットした共鳴単位の二次式を用いて内挿することにより、0と1000ng/mlの間の抗体/薬物のコンジュゲートを含有する試料中の抗体/薬物のコンジュゲートの濃度を正確に測定することが可能である。

40

【0059】

同様にして、(1)共鳴単位とG5/44抗-CD22抗体およびG5/44-AcB

50

ut - Calich DMHの濃度との間の関係(図4を参照のこと);および(2)共鳴単位とG193抗ルイスY抗体およびCMD193、そのカリケアミシンのコンジュゲートの濃度との間の関係を示す較正曲線を確立した。これらの関係もまた、0と1000 ng/mlの間の濃度範囲の二次式により最良で記載された($r^2 > 0.99$)。

【0060】

実施例4

抗CD33/カリケアミシンのコンジュゲートの薬物動態学的特性

hP67.6 - AcBut - Calich DMHの薬物動態学的特性を腫瘍担持および腫瘍不含マウスにて測定した。一群5匹のマウスを用いた。腫瘍担持マウスは平均体重が19g(標準偏差=1g)であり、平均容量が528 mm³(標準偏差=102 mm³)の異種移植されたラモス腫瘍を有した。腫瘍不含マウスは平均体重が20g(標準偏差=1g)であった。

【0061】

図3Aは単回用量の抗体/薬物のコンジュゲートを静脈内注射した後の種々の時点でのヌードマウスの血漿中でのhP67.6 - AcBut - Calich DMHの濃度を示す。3 μgの用量のカリケアミシンを各マウスに投与した。抗体の用量をμg/体重kgとして示す。45%の正常なヘマトクリット値で修正して、血漿中の抗体/薬物のコンジュゲートの濃度を計算し、抗体/薬物のコンジュゲートが細胞フラクシオンに結合していないと仮定した。抗体1mg当たり35 μgのカリケアミシンを有する、86 μgの抗体/薬物のコンジュゲートとして提供される、3 μgのカリケアミシンを1.5 mlの容量の血液(20gのマウスのおよその血液容量)に投与する。したがって、理論的には最大濃度として105 μg/mlを予想するであろう。血液試料を5 μlとして、20分後に実験的に測定した抗体/薬物のコンジュゲートの濃度は約80 μg/mlであった。

【0062】

各マウスに投与した抗体/薬物のコンジュゲートの量は動物の実際の体重に応じて変化した。体重1kg当たり抗体/薬物のコンジュゲートを4.1ないし4.5 mgの範囲内で、投与した用量は血漿中の該コンジュゲートの最大濃度に正比例しなかった。加えて、そのデータは用量変数が循環半減期の変化に關与することを示さなかった。例外的に、高循環半減期が1kg当たり5mgの抗体/薬物のコンジュゲートの用量を投与された一匹のマウスにて観察された。

【0063】

カリケアミシンにコンジュゲートしたhP67.6の量はコンジュゲートしていない抗体と比べて循環半減期は短かった。このことが図3Cに示されており、これは一貫してhP67.6 - AcBut - Calich DMHの抗体部分のフラクシオン(反応1)としてコンジュゲートしたカリケアミシン(反応2)の濃度が減少することを示す。抗体に結合したカリケアミシン全体の再現性のある減少はCD22⁺ラモス腫瘍の存在により影響を受けなかった。

【0064】

実施例5

抗CD22/カリケアミシンのコンジュゲートの薬物動態学的特性

G5/44 - AcBut - Calich DMHの薬物動態学的特性を腫瘍担持および腫瘍不含マウスにて測定した。3匹の腫瘍担持マウスは平均体重が19g(標準偏差=1g)であり、平均容量が1276 mm³(標準偏差=398 mm³)の異種移植されたラモス腫瘍を有した。6匹の腫瘍不含マウスは平均体重が20g(標準偏差=1g)であった。抗CD22/カリケアミシンのコンジュゲートの投与および表面プラズモン共鳴アッセイを実施例2、3および4に記載されるように行った。

【0065】

共鳴単位とG5/44抗体およびG5/44 - AcBut - Calich DMHのコンジュゲートの濃度との間の関係を示す較正曲線を図4に示す。これらの関係は、0と1000 ng/mlの間の濃度範囲の二次式により最良で記載された($r^2 > 0.99$)。図4

を参照のこと。コンジュゲートしていないh P 6 7 . 6 に関しては、遊離カリケアミシンに対する応答はコンジュゲートしていないG 5 / 4 4 では観察されなかった。

【 0 0 6 6 】

図 5 A は、腫瘍担持および非腫瘍担持のマウスの血漿中での、G 5 / 4 4 - A c B u t - C a l i c h D M H の抗体部分の濃度の減少を示す。G 5 / 4 4 - A c B u t - C a l i c h D M H の抗体部分の濃度 (図 5 A) およびG 5 / 4 4 に結合したカリケアミシンの量 (図 5 B) は腫瘍担持マウスにてより早く減少した。このことはG 5 / 4 4 - A c B u t - C a l i c h D M H の循環半減期の減少に反映された。表 I を参照のこと。C D 2 2 標的を発現する腫瘍の存在は血漿からのコンジュゲートの移動を促進した。時間の関数としてのカリケアミシン濃度の減少は腫瘍担持マウスおよび非腫瘍担持マウス (図 5 C) と同じであり、このことは腫瘍の存在がカリケアミシンのコンジュゲートの抗体部分からの放出に影響を与えないことを示す。

10

【 0 0 6 7 】

【表 1】

		- 腫瘍	+ 腫瘍
AB	² T	55 ± 18 *	39 ± 21
	AUC	2,251 ± 406	997 ± 241
	CL	0.0012 ± 0.0002	0.0025 ± 0.0007
	Vss	5 ± 2	7 ± 4
CM	² T	29 ± 5.8	22.4 ± 6.3
	AUC	1,236 ± 233	681 ± 164
	CL	0.002 ± 0.000	0.004 ± 0.001
	Vss	4.6 ± 1.2	5.2 ± 0.9

20

A B = 抗体部分、C M = 抗体に結合したカリケアミシン、²T = 血漿半減期 (時間)、A U C = 曲線下面積 (h * μ g / m l)、C L = クリアランス (m l / 分 / k g)、V s s = 容量分布 (m l / k g)

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 8 】

【 図 1 】 サンドウィッチ検出方法のセンサーグラムを示す。該曲線の第 1 相 (矢印 1 と 2 の間) にて、抗体 / カリケアミシンのコンジュゲートの試料を固定された抗原上を走らせた。第 2 相 (矢印 3 と 4 の間) を抗カリケアミシンを添加することで開始させた。反応 1 は試料中の抗体の濃度に比例した質量付加を示し、反応 2 は抗体 / カリケアミシンのコンジュゲート中のカリケアミシンの量に比例する。R U は共鳴単位であり ; 灰色の円は洗浄期間を示す。

40

【 図 2 A 】 抗体または抗体 / 薬物のコンジュゲートの量と、標準試料の濃度との相関関係を示す。h P 6 7 . 6 - A c B u t - C a l i c h D M H の所定の各濃度 (n g / m l) について、時間の関数としての共鳴単位を示すセンサーグラムを示す。

【 図 2 B 】 抗体または抗体 / 薬物のコンジュゲートの量と、標準試料の濃度との相関関係を示す。h P 6 7 . 6 - A c B u t - C a l i c h D M H + 抗カリケアミシン抗体 (黒色丸)、h P 6 7 . 6 - A c B u t - C a l i c h D M H と も (灰色丸) および抗カリケアミシン抗体 (中抜き丸) の濃度の関数としての共鳴単位を示す棒グラフを示す。

【 図 3 A 】 実施例 3 および 4 に記載されるサンドウィッチ検出方法を用いて測定した h P 6 7 . 6 - A c B u t - C a l i c h D M H の血漿中濃度を示す。各動物にカリケアミシンの全用量が 3 μ g の抗体 / 薬物のコンジュゲートを投与した。m g / k g で表された用量の抗体 / 薬物のコンジュゲートを用いる。実線 : C D 2 2 陽性ラモス腫瘍を担持するマ

50

ウス；破線：腫瘍のないマウス。該図3Aは反応1、すなわち、hP67.6およびhP67.6-AcBut-CalichDMHのCM5チップ上に固定されたCD33抗原との結合を示す。

【図3B】実施例3および4に記載されるサンドウィッチ検出方法を用いて測定したhP67.6-AcBut-CalichDMHの血漿中濃度を示す。各動物にカリケアミシンの全用量が3 μ gの抗体/薬物のコンジュゲートを投与した。mg/kgで表された用量の抗体/薬物のコンジュゲートを用いる。実線：CD22陽性ラモス腫瘍を担持するマウス；破線：腫瘍のないマウス。該図3Bは反応2、すなわち、抗カリケアミシンのCM5チップ上に固定されたCD33に既に結合したhP67.6-AcBut-CalichDMHとの結合を示す。

10

【図3C】実施例3および4に記載されるサンドウィッチ検出方法を用いて測定したhP67.6-AcBut-CalichDMHの血漿中濃度を示す。各動物にカリケアミシンの全用量が3 μ gの抗体/薬物のコンジュゲートを投与した。mg/kgで表された用量の抗体/薬物のコンジュゲートを用いる。実線：CD22陽性ラモス腫瘍を担持するマウス；破線：腫瘍のないマウス。該図3Cは反応2の反応1に対する比率を示す。抗体/薬物のコンジュゲートの抗体部分の濃度のフラクションとして抗体/薬物のコンジュゲートの濃度の減少は、コンジュゲートしていない抗体と比べてコンジュゲートした抗体のクリアランスが優先的であることを示す。

【図4】G5/44-AcBut-CalichDMH（イノツズマブ・オゾガミシン）+抗カリケアミシン抗体（黒色丸）、G5/44-AcBut-CalichDMH（灰色丸）、および抗カリケアミシン抗体（中抜き丸）の濃度の関数としての共鳴単位を示す棒グラフである。

20

【図5A】実施例3および5に記載されるサンドウィッチ検出方法を用いて測定したG5/44-AcBut-CalichDMHの血漿中濃度を示す。抗体1mg当たり72 μ gのカリケアミシンをG5/44抗CD22抗体に負荷し、各動物にカリケアミシンの全用量が3 μ gの抗体/薬物のコンジュゲートを投与した。実線：CD22陽性ラモス腫瘍を担持するマウス；破線：腫瘍のないマウス。該図5Aは反応1、すなわち、G5/44およびG5/44-AcBut-CalichDMHのCM5チップ上に固定されたCD22抗原との結合を示す。

【図5B】実施例3および5に記載されるサンドウィッチ検出方法を用いて測定したG5/44-AcBut-CalichDMHの血漿中濃度を示す。抗体1mg当たり72 μ gのカリケアミシンをG5/44抗CD22抗体に負荷し、各動物にカリケアミシンの全用量が3 μ gの抗体/薬物のコンジュゲートを投与した。実線：CD22陽性ラモス腫瘍を担持するマウス；破線：腫瘍のないマウス。該図3Bは反応2、すなわち、抗カリケアミシンのCM5チップ上に固定されたCD22に既に結合したG5/44-AcBut-CalichDMHとの結合を示す。CD22陽性ラモス腫瘍の存在（実線）は血漿中のG5/44抗体およびG5/44-AcBut-CalichDMHのコンジュゲートの平均濃度を減少させた。

30

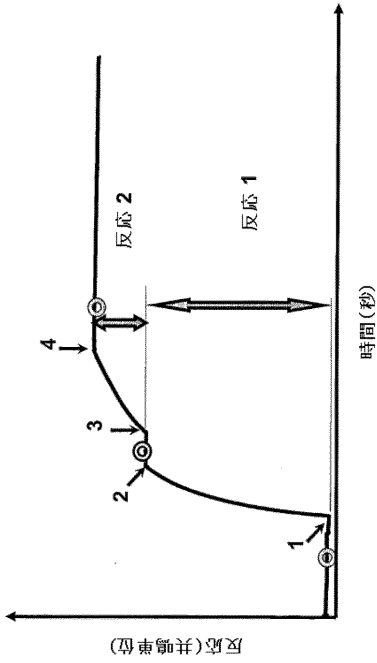
【図5C】実施例3および5に記載されるサンドウィッチ検出方法を用いて測定したG5/44-AcBut-CalichDMHの血漿中濃度を示す。抗体1mg当たり72 μ gのカリケアミシンをG5/44抗CD22抗体に負荷し、各動物にカリケアミシンの全用量が3 μ gの抗体/薬物のコンジュゲートを投与した。実線：CD22陽性ラモス腫瘍を担持するマウス；破線：腫瘍のないマウス。該図3Cは反応2の反応1に対する比率を示す。抗体/薬物のコンジュゲートの抗体部分の濃度のフラクションとして抗体/薬物のコンジュゲートの濃度の減少は、コンジュゲートしていない抗体と比べてコンジュゲートした抗体のクリアランスが優先的であることを示す。カリケアミシンの抗体からの除去はCD22陽性ラモス腫瘍の存在により影響を受けなかった。

40

【 図 1 】

[1/10]

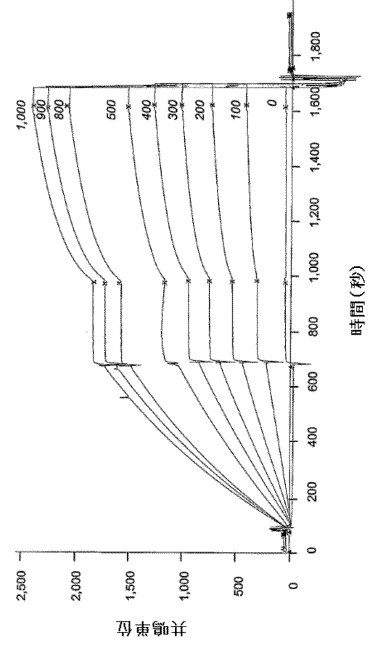
FIG. 1



【 図 2 A 】

[2/10]

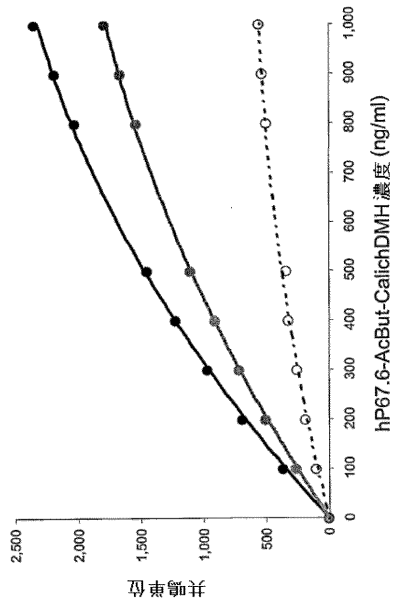
FIG. 2A



【 図 2 B 】

[3/10]

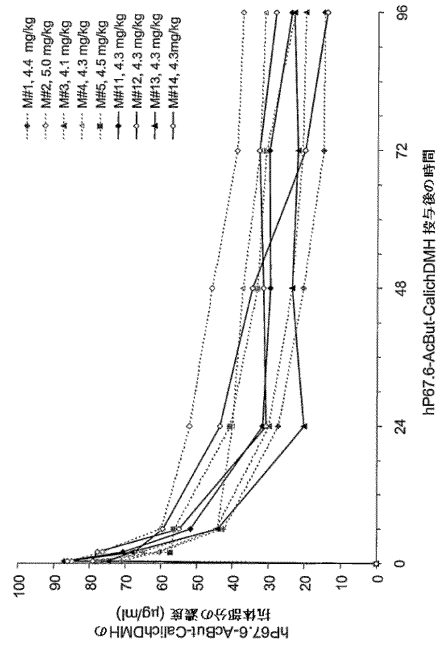
FIG. 2B



【 図 3 A 】

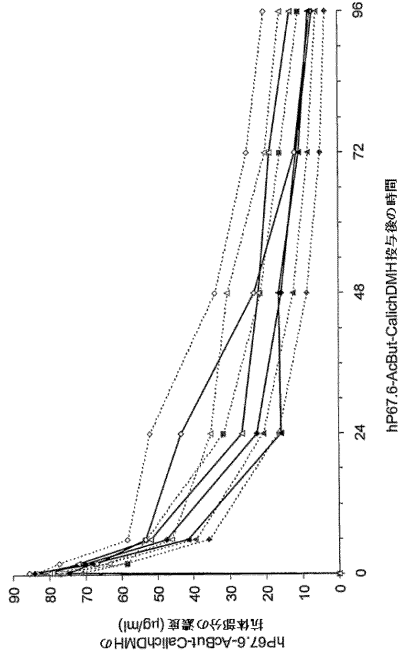
[4/10]

FIG. 3A



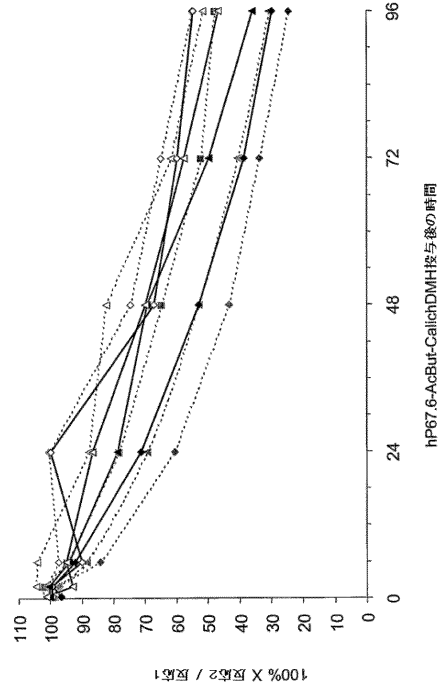
【 図 3 B 】

[5/10]
FIG. 3B



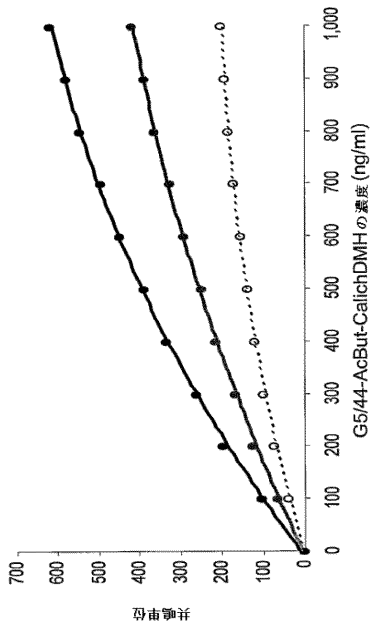
【 図 3 C 】

[6/10]
FIG. 3C



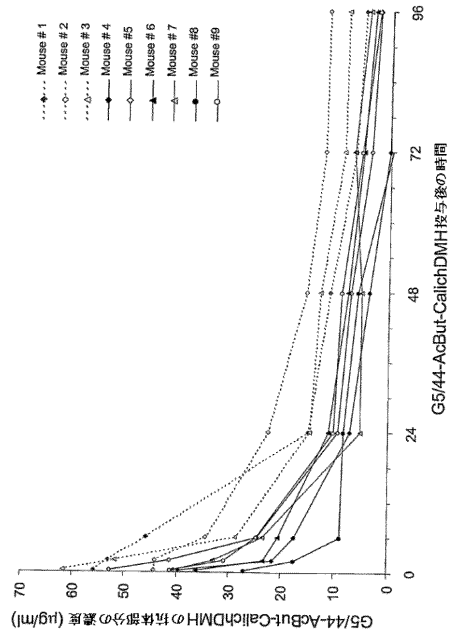
【 図 4 】

[7/10]
FIG. 4



【 図 5 A 】

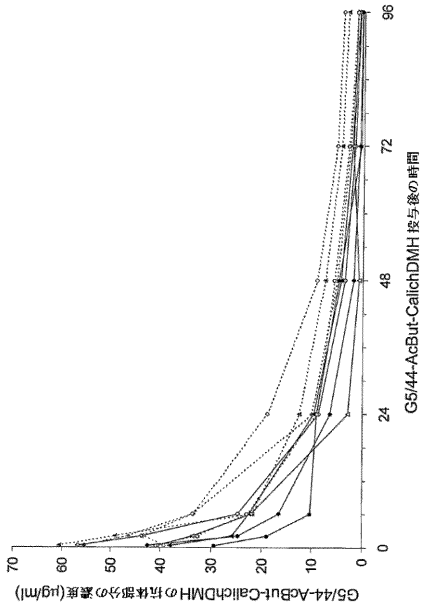
[8/10]
FIG. 5A



【 図 5 B 】

[9/10]

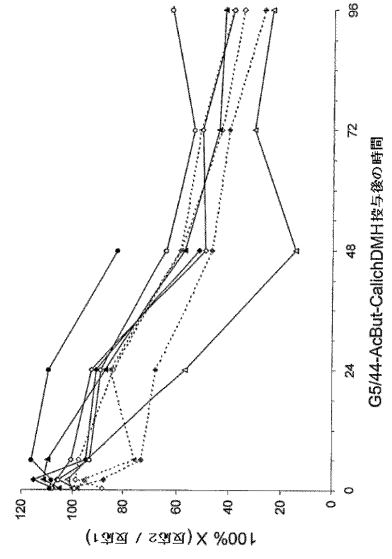
FIG. 5B



【 図 5 C 】

[10/10]

FIG. 5C



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/025736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 G01N21/55		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/005890 A2 (UNIV ARIZONA [US]; BEAUDOIN STEPHEN P [US]; BOOKSH KARL S [US]; KHAIRA) 23 January 2003 (2003-01-23) Abstract; p.18, l. 28-30.	1-26
Y	WO 03/092623 A2 (WYETH CORP [US]; KUNZ ARTHUR [US]; MORAN JUSTIN KEITH [US]; RUBINO JOS) 13 November 2003 (2003-11-13) Abstract; example 5.	1-26
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
13 November 2006		12/12/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer LOPEZ GARCIA, F

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2006/025736

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BOGHAERT E R ET AL: "ANTIBODY-TARGETED CHEMOTHERAPY WITH THE CALICHEAMICIN CONJUGATE HU3S193-N-ACETYL GAMMA CALICHEAMICIN DIMETHYL HYDRAZIDE TARGETS LEWISY AND ELIMINATES LEWSIY - POSITIVE HUMAN CARCINOMA CELLS AND XENOGRAFTS" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 10, no. 13, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 4538-4549, XP008060140 ISSN: 1078-0432 Abstract; p. 4540; col. 1, "Plasmon resonance analysis (BIAcore)"; Fig. 1; Fig. 2.	1-26
X	JOHNE B ET AL: "Epitope mapping and binding kinetics of monoclonal antibodies studied by real time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. 2 APR 1993, vol. 160, no. 2, 2 April 1993 (1993-04-02), pages 191-198, XP002405676 ISSN: 0022-1759 Abstract; p. 193, col. 1; Fig. 2A	1,4,6-8, 12,14, 15,17, 18,21, 23,24,26
X	VAREIRO MARGARIDA M L M ET AL: "Surface plasmon fluorescence measurements of human chorionic gonadotrophin: role of antibody orientation in obtaining enhanced sensitivity and limit of detection." ANALYTICAL CHEMISTRY. 15 APR 2005, vol. 77, no. 8, 15 April 2005 (2005-04-15), pages 2426-2431, XP002405677 ISSN: 0003-2700 Abstract; Fig .2.	1,4,6-8, 12,14, 15,17, 18,21, 23,24,26
Y	DIJOSEPH J F ET AL: "ANTIBODY-TARGETED CHEMOTHERAPY WITH CMC-544: A CD22-TARGETED IMMUNOCONJUGATE OF CALICHEAMICIN FOR THE TREATMENT OF B-LYMPHOID MALIGNANCIES" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 103, no. 5, March 2004 (2004-03), pages 1807-1814, XP008060153 ISSN: 0006-4971 Abstract; p. 1809, col. 1, "Pharmacokinetics of CMC-544 in tumour-bearing and nontumor bearing mice".	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/025736

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03005890	A2	23-01-2003	CA 2453141 A1 23-01-2003
			EP 1411816 A2 28-04-2004
			JP 2005512021 T 28-04-2005
WO 03092623	A2	13-11-2003	AU 2003231293 A1 17-11-2003
			BR 0309868 A 18-10-2005
			CA 2483552 A1 13-11-2003
			CN 1665532 A 07-09-2005
			EP 1507556 A2 23-02-2005
			JP 2005524700 T 18-08-2005
			MX PA04010792 A 07-03-2005

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 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02		
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/574		Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		N
		G 0 1 N 33/53		S

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

(72) 発明者 ニティン・ケイ・ダムル

アメリカ合衆国 0 7 4 5 8 ニュージャージー州アッパー・サドル・リバー、スティーブソン・レイン 5 3 番

(72) 発明者 キラン・カンドク

アメリカ合衆国 1 0 9 5 4 ニューヨーク州ナユエット、イースト・アリソン・アベニュー 1 2 0 番

(72) 発明者 アーウィン・アール・ボガート

アメリカ合衆国 1 0 9 5 0 ニューヨーク州モンロー、ラDRAM・ロード 9 3 番

F ターム(参考) 4C076 AA12 AA95 BB11 CC27 EE41 EE59 FF68 FF70 GG41
4C086 AA10 EA08 MA02 MA05 NA10 NA13 NA14 ZB26 ZB27

专利名称(译)	测量靶治疗剂的药代动力学性质的方法		
公开(公告)号	JP2009500623A	公开(公告)日	2009-01-08
申请号	JP2008520313	申请日	2006-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯		
[标]发明人	ニティンケイダムル キランカンドク アーウィンアールボガート		
发明人	ニティン・ケイ・ダムル キラン・カンドク アーウィン・アール・ボガート		
IPC分类号	G01N33/543 A61K31/7034 A61K47/48 A61K47/42 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N21/553 G01N33/54373 G01N33/94		
FI分类号	G01N33/543.595 A61K31/7034 A61K47/48 A61K47/42 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/574.Z G01N33/53.N G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4C076/AA12 4C076/AA95 4C076/BB11 4C076/CC27 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF68 4C076/FF70 4C076/GG41 4C086/AA10 4C086/EA08 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA10 4C086/NA13 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB27		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	60/695419 2005-07-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用质量检测技术测量靶治疗剂的药代动力学性质的方法。

		- 腫瘍	+ 腫瘍
AB	² T	55 ± 18 *	39 ± 21
	AUC	2,251 ± 406	997 ± 241
	CL	0.0012 ± 0.0002	0.0025 ± 0.0007
	V _{ss}	5 ± 2	7 ± 4
CM	² T	29 ± 5.8	22.4 ± 6.3
	AUC	1,236 ± 233	681 ± 164
	CL	0.002 ± 0.000	0.004 ± 0.001
	V _{ss}	4.6 ± 1.2	5.2 ± 0.9