

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5355839号  
(P5355839)

(45) 発行日 平成25年11月27日(2013.11.27)

(24) 登録日 平成25年9月6日(2013.9.6)

|                                 |                  |
|---------------------------------|------------------|
| (51) Int.Cl.                    | F I              |
| <b>C O 7 K 16/28 (2006.01)</b>  | C O 7 K 16/28    |
| <b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b> | A 6 1 K 39/395 C |
| <b>A 6 1 K 51/00 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 39/395 D |
| <b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 39/395 E |
| <b>C O 7 K 14/705 (2006.01)</b> | A 6 1 K 39/395 L |

請求項の数 27 (全 82 頁) 最終頁に続く

|               |                               |           |                     |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2003-537481 (P2003-537481)  | (73) 特許権者 | 504159866           |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年10月23日(2002.10.23)       |           | ピーエスエムエー デベロプメント カン |
| (65) 公表番号     | 特表2005-523683 (P2005-523683A) |           | パニー, エル. エル. シー,    |
| (43) 公表日      | 平成17年8月11日(2005.8.11)         |           | アメリカ合衆国 ニューヨーク 1059 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2002/033944             |           | 1, タリータウン, オールド ソー  |
| (87) 国際公開番号   | W02003/034903                 |           | ミル リバー ロード 777, プロジ |
| (87) 国際公開日    | 平成15年5月1日(2003.5.1)           |           | ェニックス ファーマシューティカルズ  |
| 審査請求日         | 平成17年10月21日(2005.10.21)       | (74) 代理人  | 100078282           |
| 審判番号          | 不服2009-13817 (P2009-13817/J1) |           | 弁理士 山本 秀策           |
| 審判請求日         | 平成21年8月3日(2009.8.3)           | (74) 代理人  | 100062409           |
| (31) 優先権主張番号  | 60/335, 215                   |           | 弁理士 安村 高明           |
| (32) 優先日      | 平成13年10月23日(2001.10.23)       | (74) 代理人  | 100113413           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | 弁理士 森下 夏樹           |
| (31) 優先権主張番号  | 60/362, 747                   |           |                     |
| (32) 優先日      | 平成14年3月7日(2002.3.7)           |           |                     |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | 最終頁に続く              |

(54) 【発明の名称】 P S M A抗体およびタンパク質マルチマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

前立腺特異膜抗原 ( P S M A ) タンパク質ダイマーと選択的に結合し、かつ、P S M A タンパク質モノマーに結合しない単離された抗体またはそれらの抗原結合性フラグメントであって、ここで、該抗体またはそれらの抗原結合フラグメントは、P S M A の細胞外ドメインに特異的に結合し、ここで、該細胞外ドメインのアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸44～750に示される、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 2】

請求項1に記載の単離された抗体またはそれらの抗原結合性フラグメントであって、前記ダイマーを形成するP S M A タンパク質のうちの少なくとも1つが組み換えの可溶性P S M A ( r s P S M A ) ポリペプチドであり、好ましくは、ここで、該r s P S M A ポリペプチドが本質的に配列番号1のアミノ酸44～750からなる、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 3】

請求項1に記載の単離された抗体またはそれらの抗原結合性フラグメントであって、該単離された抗体またはそれらの抗原結合性フラグメントが、P S M A タンパク質ダイマーのフォレートヒドロラーゼ活性を阻害する、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 4】

請求項1～3のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む組成物。

## 【請求項 5】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該単離された抗体は、非ヒト動物を P S M A タンパク質ダイマーを含む調製物で免疫することによって惹起され、ここで、該ダイマーを形成する P S M A タンパク質の各々は、配列番号 1 のアミノ酸 4 4～7 5 0 を含む、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 6】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、生細胞に結合する能力について選択され、ここで、該細胞が好ましくは腫瘍細胞であり、より好ましくは、該腫瘍細胞が前立腺腫瘍細胞であり、最も好ましくは、該腫瘍細胞が L N C a P 細胞である、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

10

## 【請求項 7】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、ここで；

(a) 該抗体が組み換え抗体であるか；および／あるいは、

(b) 該抗体がポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である、

抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 8】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該抗体はヒト化された抗体である、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

20

## 【請求項 9】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該抗体はキメラ抗体である、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 10】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該抗体はヒト抗体である、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 11】

請求項 8～10 のいずれか 1 つに記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該抗体はモノクローナル抗体である、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

30

## 【請求項 12】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該単離された抗原結合性フラグメントは、F a b フラグメント、F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメント、および F v フラグメントからなる群から選択される、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 13】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、コンフォメーションal エピトープに結合する、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

40

## 【請求項 14】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、該抗体またはその抗原結合性フラグメントが、 $1 \times 10^{-9}$  M 以下の結合親和性で、好ましくは、

$1 \times 10^{-10}$  M 以下の結合親和性で、

$1 \times 10^{-11}$  M 以下の結合親和性で、または、

$5 \times 10^{-10}$  M 以下の結合親和性で、

細胞表面 P S M A および／または r s P S M A に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 15】

50

少なくとも1つの治療的部分と結合された請求項1に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって：

(a) 該治療的部分が薬物であり、好ましくは、細胞傷害性薬剤であり、より好ましくは、カリケアマイシン、エスペラマイシン、メトトレキサート、ドキソルビシン、メルファラン、クロラムブシル、ARA-C、ビンデシン、マイトマイシン C、シスプラチナム、エトポシド、ブレオマイシン、5-フルオウラシル、エストラムスチン、ビンクリスチン、パクリタキセル、ドセタキセル、ドラスタチン10、アウリスタチンEおよびアウリスタチンPHE、からなる群から選択される、細胞傷害性薬剤であるか；

(b) 該治療的部分が複製選択的ウイルスであるか；

(c) 該治療的部分が毒素またはそのフラグメントであるか；

(d) 該治療的部分が酵素またはそのフラグメントであるか；

(e) 該治療的部分が免疫刺激剤または免疫調節剤であり、好ましくは、サイトカイン、ケモカインおよびアジュバントからなる群から選択されるか；ならびに／あるいは、

(f) 該治療的部分が抗腫瘍剤であり、該抗腫瘍剤が、細胞傷害性薬剤、腫瘍血管新生に作用する薬剤、またはそれらの組み合わせである、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

#### 【請求項16】

請求項15に記載の少なくとも1つの治療的部分と結合された単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む組成物であって、さらに薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤を含む組成物。

#### 【請求項17】

放射性同位体に結合された請求項1～3のいずれか1項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

#### 【請求項18】

請求項17に記載の放射性同位体に結合された単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって：

(a) 前記放射性同位体が $\alpha$ 線、 $\beta$ 線、および／または、 $\gamma$ 線を放射するか；ならびに／あるいは、

(b) 前記放射性同位体が $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{186}\text{Rh}$ 、 $^{188}\text{Rh}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{224}\text{Ra}$ および $^{223}\text{Ra}$ からなる群から選択される、

抗体またはそれらの抗原結合性フラグメント。

#### 【請求項19】

請求項17に記載の放射性同位体に結合された単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む組成物であって、さらに薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または安定化剤を含む組成物。

#### 【請求項20】

診断、予後またはモニタリングのために前立腺癌を検出するためのキットであって、

請求項1～3のいずれか1項に記載の単離され標識された抗体またはその抗原結合性フラグメント、および該標識を検出するための1つ以上の化合物、を含む、キット。

#### 【請求項21】

請求項20に記載のキットであって、前記標識が、蛍光標識、酵素標識、放射性標識、核磁気共鳴活性標識、発光標識、および発色団標識からなる群から選択される、キット。

#### 【請求項22】

請求項1～3、15または17のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、ここで、該単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントが、凍結乾燥形態でパッケージされたか、あるいは、水性媒体中にパッケージされた、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

#### 【請求項23】

10

20

30

40

50

サンプル中の P S M A ダイマーの存在、または P S M A ダイマーを発現する細胞を検出するための方法であり、以下：

抗体またはその抗原結合性フラグメントと P S M A との間の複合体の形成を可能にするのに十分な時間、該サンプルと、請求項 1 ～ 3 または 1 7 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメントとを接触させる工程、および

該 P S M A - 抗体複合体または該 P S M A - 抗原結合性フラグメント複合体を検出する工程、

を包含し、ここで、該サンプル中の複合体の存在が、P S M A または P S M A を発現する細胞のサンプル中の存在を示す、方法。

#### 【請求項 2 4】

A T C C 寄託番号 P T A - 3 2 6 8 または P T A - 3 2 5 8 を有するハイブリドーマ細胞株。

#### 【請求項 2 5】

請求項 1 5 に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、ここで、前記腫瘍血管新生に作用する薬剤が、チューブリン結合薬剤、または、抗脈管形成剤である、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

#### 【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、ここで、前記チューブリン結合薬剤が、コンプレスタチン A 4、アンギオスタチン、エンドスタチン、または、インターフェロン誘導タンパク質 1 0 である、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

#### 【請求項 2 7】

請求項 2 5 に記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、ここで、前記抗脈管形成剤が、2 M E 2、アンギオスタチン、アンギオザイム、抗 V E G F R h u M A b、A p r a ( C T - 2 5 8 4 )、アビシン、ベネフィン、B M S 2 7 5 2 9 1、カルボキシアミドトリアゾール、C C 4 0 4 7、C C 5 0 1 3、C C 7 0 8 5、C D C 8 0 1、C G P - 4 1 2 5 1 ( P K C 4 1 2 )、C M 1 0 1、コンプレスタチン A - 4 プロドラッグ、E M D 1 2 1 9 7 4、エンドスタチン、フラボピリドール、ゲニステイン ( G C P )、I M - 8 6 2、I m m T h e r、インターロイキン 1 2、イレッサ ( Z D 1 8 3 9 )、マリマスタット、メタスタット ( C o l - 3 )、ネオバスタット、オクトレオチド、ペニシラミン、フォトフリン、フォトポイント、P I - 8 8、プリノマスタット ( A G - 3 3 4 0 )、P T K 7 8 7 ( Z K 2 2 5 8 4 )、R O 3 1 7 4 5 3、ソリマスタット、スクアラミン、S U 1 0 1、S U 5 4 1 6、S U - 6 6 6 8、スラジスタ ( F C E 2 6 6 4 4 )、スラミン (メタレート)、テトラチオモリブデート、サリドマイド、T N P - 4 7 0、または、ビタキシンである、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0 0 0 1】

(関連出願)

本出願は、米国特許法 1 1 9 条下において、米国仮特許出願第 6 0 / 3 3 5 , 2 1 5 号 ( 2 0 0 1 年 1 0 月 2 3 日出願 )、米国仮特許出願第 6 0 / 3 6 2 , 7 4 7 号 ( 2 0 0 2 年 3 月 7 日出願 )、および米国仮特許出願第 6 0 / \_\_\_\_\_ 号 ( 2 0 0 2 年 9 月 2 0 日出願 ) の利益を主張し、これらの各々は本明細書中に参考として援用される。

#### 【0 0 0 2】

(発明の分野)

本発明は、一般に、癌に関連するポリペプチドおよびポリペプチド上のネイティブなエピトープを認識する抗体の分野に関する。特に、本発明は、P S M A の細胞外ドメイン上の構造的エピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメント、マルチマー型の P S M A タンパク質、マルチマーに選択的に結合する抗体、およびこのような抗体またはマルチマーを含む組成物に一部関する。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0003】

(発明の背景)

前立腺癌は、最も有病率の高い癌の型で、そして米国人男性における癌による死の二番目に主要な原因である(1999年における179,000件の症例と37,000件の死亡(Landis, S. H. ら CA Cancer J. Clin. 48:6-29 (1998))と見積もられる)。前立腺癌と診断された男性の数は、老人人口の増加そしてより高い疾患の認識が早期診断を導いた結果として、着実に増加している(Parker ら(1997) CA Cancer J. Clin. 47:5-280)。男性にとって前立腺癌を発症する生涯罹患率(life time risk)は、白人で約5人に1人、アフリカ系米国人で6人に1人である。危険性の高い群は、前立腺癌に陽性の家族歴を持つ集団、またはアフリカ系米国人に代表される。

10

## 【0004】

生涯にわたり、前立腺癌と診断された2/3を超える男性が、この疾患で死ぬ(Wingo ら(1996) CA Cancer J. Clin. 46:113-25)。その上、前立腺癌で死亡しない多くの患者は、疼痛、出血、尿路閉塞のような症状を改善するための継続的な処置を要求する。従って、前立腺癌はまた、苦痛の主な原因であり、そして健康管理出費の増加を示す。

## 【0005】

前立腺癌が局在化し、そして患者の平均余命が10年以上である場合、根治的な前立腺切除は、疾患の根絶のための最高の機会を与える。歴史的には、この手順の欠点は、殆どの癌が、発見された時までには手術の限界を超えて広がってしまったことである。巨大な重度の腫瘍を有する患者が、根治的な前立腺切除によって成功裏に処置されることは、殆どない。

20

## 【0006】

放射線治療はまた、根治的な前立腺切除の代替として、広く使用されてきた。一般に放射線治療によって処置された患者は、より年配でかつより健康状態が悪く、そしてより重度で、より臨床的に進行した腫瘍を有する患者である。特に好ましい手順は、照射領域が処置する組織の容量に従って設計される、3次元の共焦点照射治療を含む外部ビーム療法；超音波の案内を使用し放射性化合物のシードを移植する間隙放射線治療；ならびに外部ビーム療法と間隙放射線治療との組み合わせである。

30

## 【0007】

局部的に進行した疾患を有する患者の治療のために、ホルモン療法が、根治的な前立腺切除または放射線治療の前または後に、利用されてきた。ホルモン療法は、広がった前立腺癌を有する男性を治療する、主な形態である。精巣摘除は、血清テストステロン濃度を減少させる。一方、エストロゲン処置は、同様に有益である。エストロゲン由来のジエチルスチルベストロールは、別の有用なホルモン療法であり、心臓血管の毒性を引き起こす不都合を有する。ゴナトトロピン放出ホルモンアゴニストが投与される場合、テストステロン濃度は、最終的に減少される。抗アンドロゲン剤(フルタミドおよび他の非ステロイド)は、テストステロンの、その細胞間レセプターへの結合をブロックする。その結果、テストステロンの効果をブロックし、血清テストステロン濃度を増加させ、そして患者を性的能力のある状態に保つ(根治的な前立腺切除および放射線治療の後の重要な問題である)。

40

## 【0008】

細胞傷害性化学療法は、前立腺癌の治療において殆ど無効である。このような治療は、その傷害性により、高齢の患者にとって不適當になる。加えて、前立腺癌は、比較的、細胞傷害性薬剤に抵抗性である。

## 【0009】

再発した疾患またはより進行した疾患も、抗アンドロゲン治療を用いて処置される。不運にも、ほぼ全ての腫瘍は、ホルモン抵抗性になり、そして任意の効果的治療の不在下で

50

急速に進行する。

【0010】

従って、患者の正常組織に圧倒的に傷害性というわけではなく、そして前立腺癌細胞を選択的に排除するのに有効な、前立腺癌のための有効な治療法の、必要性が存在する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

(発明の要旨)

本発明は、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) の細胞外ドメインを特異的に結合する抗体およびその抗原結合性フラグメント、このような抗体またはその抗原結合性フラグメントの1つまたは組み合わせを含む組成物、この抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、およびこの抗体またはその抗原結合性フラグメントを癌の診断および処置に使用する方法に関する。

10

【0012】

本発明の1つの局面に従って、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントが、提供される。抗体またはそのフラグメントは、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) の細胞外ドメインに特異的に結合し、そしてPSMA上のその標的エピトープへの第二抗体の特異的結合を競合阻害する。本発明の第二の局面において、第二抗体によって定義される、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) 上のエピトープに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントが、提供される。本発明の上述の局面それぞれにおいて、第二抗体は、以下からなる群より選択される：PSMA 3.7、PSMA 3.8、PSMA 3.9、PSMA 3.11、PSMA 5.4、PSMA 7.1、PSMA 7.3、PSMA 10.3、PSMA 1.8.3、PSMA A3.1.3、PSMA A3.3.1、Abgenix 4.248.2、Abgenix 4.360.3、Abgenix 4.7.1、Abgenix 4.4.1、Abgenix 4.177.3、Abgenix 4.16.1、Abgenix 4.22.3、Abgenix 4.28.3、Abgenix 4.40.2、Abgenix 4.48.3、Abgenix 4.49.1、Abgenix 4.209.3、Abgenix 4.219.3、Abgenix 4.288.1、Abgenix 4.333.1、Abgenix 4.54.1、Abgenix 4.153.1、Abgenix 4.232.3、Abgenix 4.292.3、Abgenix 4.304.1、Abgenix 4.78.1、Abgenix 4.152.1、ならびに (a) 配列番号2~7に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列のコード領域を含む核酸分子にコードされる重鎖、および (b) 配列番号8~13に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列のコード領域を含む核酸分子にコードされる軽鎖を含む抗体。

20

30

【0013】

特定の実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、以下からなる群より選択される：PSMA 3.7、PSMA 3.8、PSMA 3.9、PSMA 3.11、PSMA 5.4、PSMA 7.3、PSMA 10.3、PSMA 1.8.3、PSMA A3.1.3、PSMA A3.3.1、Abgenix 4.248.2、Abgenix 4.360.3、Abgenix 4.7.1、Abgenix 4.4.1、Abgenix 4.177.3、Abgenix 4.16.1、Abgenix 4.22.3、Abgenix 4.28.3、Abgenix 4.40.2、Abgenix 4.48.3、Abgenix 4.49.1、Abgenix 4.209.3、Abgenix 4.219.3、Abgenix 4.288.1、Abgenix 4.333.1、Abgenix 4.54.1、Abgenix 4.153.1、Abgenix 4.232.3、Abgenix 4.292.3、Abgenix 4.304.1、Abgenix 4.78.1、およびAbgenix 4.152.1。他の実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメント

40

50

は、(a) 配列番号 2～7 に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列のコード領域を含む核酸分子にコードされる重鎖、および (b) 配列番号 8～13 に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列のコード領域を含む核酸分子にコードされる軽鎖を含む抗体、ならびにこれらの抗原結合性フラグメントからなる群より選択される。

【0014】

さらなる実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、上述の抗体をコードするヌクレオチド配列と少なくとも約 90% 同一である（好ましくは少なくとも約 95% 同一である、より好ましくは少なくとも約 97% 同一である、なおより好ましくは少なくとも約 98%、そして最も好ましくは少なくとも約 99% 同一である）ヌクレオチド配列を含む核酸分子により、コードされる。

10

【0015】

上述の局面の幾つかの実施形態において、単離された抗体の抗原結合性フラグメントが、提供される。この抗原結合性フラグメントは、(a) 配列番号 14、18、22、26 および 30 に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列のコード領域を含む核酸分子にコードされる重鎖可変領域、ならびに (b) 配列番号 16、20、24、28 および 32 に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列のコード領域を含む核酸分子にコードされる軽鎖可変領域を含む。他の実施形態において、抗原結合性フラグメントは、(a) 配列番号 15、19、23、27 および 31 に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、ならびに (b) 配列番号 17、21、25、29 および 33 に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【0016】

本発明のさらなる実施形態において、上述の抗原結合性フラグメントの CDR を含む、単離された抗体の抗原結合性フラグメントが、提供される。好ましくは、この CDR は、CDR 3 である。

【0017】

本発明の別の局面に従い、前述の単離された抗体または抗原結合性フラグメントをコードする単離された核酸分子を含む発現ベクターが、提供される。これらの発現ベクターにより形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞もまた、提供される。

30

【0018】

特定の実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、（腫瘍細胞または前立腺細胞、好ましくは LNCaP 細胞のような）生細胞に結合する能力により選択される。他の実施形態においては、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、PSMA を発現している細胞の細胞溶解を媒介する。好ましくは、PSMA を発現している細胞の細胞溶解は、エフェクター細胞により媒介されるか、またはエフェクター細胞の存在下で補体媒介される。

【0019】

他の実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、PSMA を発現している細胞の増殖を阻害する。好ましくは、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、PSMA の細胞外ドメインへ結合するために、細胞溶解を必要としない。

40

【0020】

さらなる実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、以下：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、IgE からなる群から選択されるか、あるいは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD または IgE の免疫グロブリン定常ドメインおよび／もしくは可変ドメインを有する。他の実施形態において、抗体は、2重特異的 (bispecific) または多重特異的 (multispecific) 抗体である。

【0021】

50

さらに他の実施形態において、抗体、は組換え抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体もしくはキメラ抗体、またはこれらの混合である。特に好ましい実施形態において、抗体は、ヒト抗体（例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の混合）である。さらに他の実施形態において、抗体は、2重特異的または多重特異的抗体である。

#### 【0022】

好ましい抗原結合性フラグメントとして、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、およびFvフラグメントCDR3が挙げられる。

#### 【0023】

さらなる実施形態において、単離された抗体または抗原結合性フラグメントは、以下からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞株に産生されるモノクローナル抗体である：

PSMA 3.7 (PTA-3257)、PSMA 3.8、PSMA 3.9 (PTA-3258)、PSMA 3.11 (PTA-3269)、PSMA 5.4 (PTA-3268)、PSMA 7.1 (PTA-3292)、PSMA 7.3 (PTA-3293)、PSMA 10.3 (PTA-3247)、PSMA 1.8.3 (PTA-3906)、PSMA A3.1.3 (PTA-3904)、PSMA A3.3.1 (PTA-3905)、Abgenix 4.248.2 (PTA-4427)、Abgenix 4.360.3 (PTA-4428)、Abgenix 4.7.1 (PTA-4429)、Abgenix 4.4.1 (PTA-4556)、Abgenix 4.177.3 (PTA-4557)、Abgenix 4.16.1 (PTA-4357)、Abgenix 4.22.3 (PTA-4358)、Abgenix 4.28.3 (PTA-4359)、Abgenix 4.40.2 (PTA-4360)、Abgenix 4.48.3 (PTA-4361)、Abgenix 4.49.1 (PTA-4362)、Abgenix 4.209.3 (PTA-4365)、Abgenix 4.219.3 (PTA-4366)、Abgenix 4.288.1 (PTA-4367)、Abgenix 4.333.1 (PTA-4368)、Abgenix 4.54.1 (PTA-4363)、Abgenix 4.153.1 (PTA-4388)、Abgenix 4.232.3 (PTA-4389)、Abgenix 4.292.3 (PTA-4390)、Abgenix 4.304.1 (PTA-4391)、Abgenix 4.78.1 (PTA-4652)、およびAbgenix 4.152.1 (PTA-4653)。

#### 【0024】

特定の他の実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、コンフォメーションナルエピトープに結合し、そして／または前立腺特異的膜抗原と共に、細胞内に内在化される。他の実施形態において、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントは、標識（好ましくは以下からなる群から選択される1つ：蛍光標識、酵素標識、放射性標識、核磁気共鳴活性標識、発光標識および発色団標識）に結合される。

#### 【0025】

さらに他の実施形態において、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントは、以下のような、少なくとも1つの治療的部分に結合される：薬物、好ましくは細胞傷害性薬物、複製選択的ウイルス (replication-selective virus)、毒素もしくはこれらのフラグメント、または酵素もしくはそのフラグメント。好ましい細胞傷害性薬物としては、以下が挙げられる：カリケアミシン (calicheamicin)、エスペラミシン (esperamicin)、メトトレキサート、ドキソルビシン、メルファラン、クロラムブシル、ARA-C、ビンデシン、マイトマイシンC、シスプラチン (cis-platinum)、エトポシド、ブレオマイシン、5-フルオロウラシル、エストラムスチン、ピンクリスチン、エトポシド、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル (docetaxel)、ドラスタチン10 (dolastatin 10)、オーリスタチンE (auristatin E) およびオーリスタチンPHE (auristatin PHE)。他の実施形態において、治療的部分は、免疫刺激

剤または免疫調節剤（好ましくは以下からなる群から選択される１つ：サイトカイン、ケモカイン、およびアジュバント）である。

#### 【００２６】

幾つかの実施形態において、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、細胞表面 P S M A および／または r s P S M A に、約  $1 \times 10^{-9}$  M 以下の結合親和性で、特異的に結合する。好ましくは、結合親和性は、約  $1 \times 10^{-10}$  M 以下、より好ましくは結合親和性は、約  $1 \times 10^{-11}$  M 以下である。他の実施形態において、結合親和性は、約  $5 \times 10^{-10}$  M 未満である。

#### 【００２７】

追加の実施形態において、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、約  $1 \times 10^{-10}$  M 未満の  $I C_{50}$  で、P S M A 発現細胞の特異的な細胞殺傷を媒介する。好ましくは  $I C_{50}$  は、約  $1 \times 10^{-11}$  M 未満である。より好ましくは、 $I C_{50}$  は、約  $1 \times 10^{-12}$  M 未満である。他の実施形態において、 $I C_{50}$  は、約  $1.5 \times 10^{-11}$  M 未満である。

#### 【００２８】

さらに他の実施形態において、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントは、放射性同位体に結合される。放射性同位体は、 $\alpha$  放射線、 $\beta$  放射線、または  $\gamma$  放射線を発し得る。好ましくは、放射線同位体は、以下からなる群から選択される： $^{225}Ac$ 、 $^{211}At$ 、 $^{212}Bi$ 、 $^{213}Bi$ 、 $^{186}Rh$ 、 $^{188}Rh$ 、 $^{177}Lu$ 、 $^{90}Y$ 、 $^{131}I$ 、 $^{67}Cu$ 、 $^{125}I$ 、 $^{123}I$ 、 $^{77}Br$ 、 $^{153}Sm$ 、 $^{166}Ho$ 、 $^{64}Cu$ 、 $^{212}Pb$ 、 $^{224}Ra$  および  $^{223}Ra$ 。

#### 【００２９】

本発明の別の局面に従い、以下からなる群から選択される抗体を産生するハイブリドーマ細胞株が、提供される：P S M A 3.7、P S M A 3.8、P S M A 3.9、P S M A 3.11、P S M A 5.4、P S M A 7.1、P S M A 7.3、P S M A 10.3、P S M A 1.8.3、P S M A A3.1.3、P S M A A3.3.1、A b g e n i x 4.248.2、A b g e n i x 4.360.3、A b g e n i x 4.7.1、A b g e n i x 4.4.1、A b g e n i x 4.177.3、A b g e n i x 4.16.1、A b g e n i x 4.22.3、A b g e n i x 4.28.3、A b g e n i x 4.40.2、A b g e n i x 4.48.3、A b g e n i x 4.49.1、A b g e n i x 4.209.3、A b g e n i x 4.219.3、A b g e n i x 4.288.1、A b g e n i x 4.333.1、A b g e n i x 4.54.1、A b g e n i x 4.153.1、A b g e n i x 4.232.3、A b g e n i x 4.292.3、A b g e n i x 4.304.1、A b g e n i x 4.78.1 および A b g e n i x 4.152.1。幾つかの実施形態において、ハイブリドーマ細胞株は、以下からなる群から選択される：P S M A 3.7 (P T A-3257)、P S M A 3.8、P S M A 3.9 (P T A-3258)、P S M A 3.11 (P T A-3269)、P S M A 5.4 (P T A-3268)、P S M A 7.1 (P T A-3292)、P S M A 7.3 (P T A-3293)、P S M A 10.3 (P T A-3247)、P S M A 1.8.3 (P T A-3906)、P S M A A3.1.3 (P T A-3904)、P S M A A3.3.1 (P T A-3905)、A b g e n i x 4.248.2 (P T A-4427)、A b g e n i x 4.360.3 (P T A-4428)、A b g e n i x 4.7.1 (P T A-4429)、A b g e n i x 4.4.1 (P T A-4556)、A b g e n i x 4.177.3 (P T A-4557)、A b g e n i x 4.16.1 (P T A-4357)、A b g e n i x 4.22.3 (P T A-4358)、A b g e n i x 4.28.3 (P T A-4359)、A b g e n i x 4.40.2 (P T A-4360)、A b g e n i x 4.48.3 (P T A-4361)、A b g e n i x 4.49.1 (P T A-4362)、A b g e n i x 4.209.3 (P T A-4365)、A b g e n i x 4.219.3 (P T A-4366)、A b g e n i x 4.288.1 (P T A-4367)、A b g e n i x 4.333.

10

20

30

40

50

1 (PTA-4368)、Abgenix 4.54.1 (PTA-4363)、Abgenix 4.153.1 (PTA-4388)、Abgenix 4.232.3 (PTA-4389)、Abgenix 4.292.3 (PTA-4390)、Abgenix 4.304.1 (PTA-4391)、Abgenix 4.78.1 (PTA-4652)、およびAbgenix 4.152.1 (PTA-4653)。

#### 【0030】

本発明のさらなる局面に従い、上述の抗体またはその抗原結合性フラグメントおよび薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または安定化剤を含む組成物が、提供される。他の組成物は、1つ以上の上述の抗体またはその抗原結合性フラグメントおよび薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または安定化剤の組み合わせを含む。幾つかの実施形態において、この組成物は、以下もまた含む：抗腫瘍剤、免疫刺激剤、免疫調節剤、またはこれらの組み合わせ。好ましい抗腫瘍剤としては、細胞傷害性薬剤、腫瘍新生血管 (neovascu- 10  
lature) に対して作用する薬剤、またはこれらの組み合わせが挙げられる。好ましい免疫調節剤としては、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\gamma$ -インターフェロン、腫瘍壊死因子- $\alpha$ またはこれらの組み合わせが挙げられる。好ましい免疫刺激剤としては、インターロイキン-2、免疫刺激オリゴヌクレオチド、またはこれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【0031】

本発明の別の局面に従い、診断、予後またはモニタリングのための前立腺癌検出キットが、提供される。このキットは、上述の単離された標識抗体またはその抗原結合性フラグメント、および標識を検出するための1つ以上の化合物を含む。好ましくはこの標識は、 20  
以下からなる群から選択される：蛍光標識、酵素標識、放射性標識、核磁気共鳴活性標識、発光標識、および発色団標識。

#### 【0032】

本発明は、別の局面において、凍結乾燥形態でパッケージされるか、または水性媒体にパッケージされた、1つ以上の上述の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。

#### 【0033】

本発明の別の局面において、サンプル中の、PSMA、またはPSMAを発現している細胞の存在を検出する方法が、提供される。この方法は、サンプルを、PSMAの細胞外ドメインと特異的に結合する任意の上述の抗体またはその抗原結合性フラグメントと、抗体またはその抗原結合性フラグメントとPSMAとの間に複合体を形成させるのに十分な時間、接触させる工程、およびPSMA-抗体複合体またはPSMA-抗原結合性フラグメント複合体を検出する工程を包含する。サンプルにおいて複合体が存在することは、PSMAまたはPSMA発現細胞がサンプル中に存在することを表す。 30

#### 【0034】

別の局面において、本発明は、被験体におけるPSMA媒介性疾患の診断のための他の方法を提供する。この方法は、前立腺特異的膜抗原の細胞外ドメインに特異的に結合する、一定量の任意の上述の抗体またはその抗原結合性フラグメントを、PSMA媒介性疾患を有すると疑われる被験体または過去にPSMA媒介性疾患と診断された被験体に、投与 40  
する工程を包含する。この方法はまた、抗体またはその抗原結合性フラグメントとPSMAとの間に複合体を形成させる工程、および標的エピトープに対するPSMA-抗体複合体またはPSMA-抗原結合性フラグメント複合体の形成を検出する工程を包含する。前立腺癌を有すると疑われる被験体または過去に前立腺癌と診断された被験体における複合体の存在は、PSMA媒介性疾患の存在を表す。

#### 【0035】

この方法の特定の実施形態において、PSMA媒介性疾患は、前立腺癌である。他の実施形態において、PSMA媒介性疾患は、以下からなる群から選択されるような非前立腺癌である：移行上皮癌を含む膀胱癌；膵管癌腫を含む膵臓癌；非小細胞肺癌腫を含む肺癌；通常腎細胞癌腫を含む腎臓癌；軟部組織肉腫を含む肉腫；胸癌腫を含む胸癌；多形膠芽 50

腫を含む脳癌；神経内分泌癌腫；結腸癌腫を含む結腸癌；睾丸胚癌腫を含む睾丸癌；および悪性黒色腫を含む黒色腫。

【0036】

上述の方法の好ましい実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、標識される。上述の方法の他の実施形態において、第二抗体が、第一抗体またはその抗原結合性フラグメントを検出するために投与される。

【0037】

本発明のさらなる局面において、P S M A媒介性疾患を有する被験体の予後を評価するための方法が、提供される。この方法は、P S M A媒介性疾患を有すると疑われる被験体または過去にP S M A媒介性疾患と診断された被験体に、有効量の上述の抗体またはその抗原結合性フラグメントを、特許請求の範囲A 1またはB 1に従って投与する工程、抗体またはその抗原結合性フラグメントとP S M Aとの間に複合体を形成させる工程、および標的エピトープに対する複合体の形成を検出する工程を包含する。P S M A媒介性疾患を有すると疑われる被験体または過去にP S M A媒介性疾患と診断された被験体における複合体の量は、予後を表す。

10

【0038】

本発明の別の局面において、P S M A媒介性疾患を有する被験体の処置の有効性を評価するための方法が提供される。この方法は、P S M A媒介性疾患について処置されたと疑われる被験体に、有効量の上述の抗体またはその抗原結合性フラグメントを投与する工程、この抗体またはその抗原結合性フラグメントとP S M Aとの間に複合体を形成させる工程、および標的エピトープに対する複合体の形成を検出する工程を包含する。P S M A媒介性疾患を有すると疑われる被験体または過去にP S M A媒介性疾患と診断された被験体における複合体の量は、処置の有効性を示す。

20

【0039】

本発明のこれらの2つの局面の特定の実施形態において、P S M A媒介性疾患は、前立腺癌である。他の実施形態において、P S M A媒介性疾患は、非前立腺癌である。これらの実施形態において、非前立腺癌は、好ましくは以下からなる群より選択される：移行上皮癌を含む膀胱癌；膵管癌腫を含む膵臓癌；非小細胞肺癌腫を含む肺癌；通常腎細胞癌腫を含む腎臓癌；軟部組織肉腫を含む肉腫；胸癌腫を含む胸癌；多形膠芽腫を含む脳癌；神経内分泌癌腫；結腸癌腫を含む結腸癌；睾丸胚癌腫を含む睾丸癌；および悪性黒色腫を含む黒色腫。さらに他の実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、標識される。さらなる実施形態において、第二抗体が、第一抗体またはその抗原結合性フラグメントを検出するために投与される。

30

【0040】

本発明のまた別の局面に従い、P S M Aを発現している細胞の増殖を阻害する方法が、提供される。この方法は、P S M Aを発現している細胞を、一定量の、P S M A細胞外ドメインに特異的に結合する、P S M Aを発現している細胞の増殖を阻害するのに有効な、少なくとも1つの上述の抗体またはその抗原結合性フラグメントと、接触させる工程を包含する。

【0041】

本発明の他の局面に従い、P S M Aを発現している細胞の細胞溶解を誘導する方法が、提供される。この方法は、P S M Aを発現している細胞を、一定量の、P S M Aの細胞外ドメインに特異的に結合する、P S M Aを発現している細胞の細胞溶解を誘導するのに有効な、少なくとも1つの抗体またはその抗原結合性フラグメントと、接触させる工程を包含する。特定の実施形態において、細胞溶解は、エフェクター細胞の存在下で起こる。他の実施形態において、細胞溶解は補体媒介される。

40

【0042】

本発明のさらに別の局面に従い、P S M A媒介性疾患を処置または予防する方法が、提供される。この方法は、P S M A媒介性疾患を有する被験体へ、有効量の少なくとも1つの上述の抗体またはその抗原結合性フラグメントを投与し、P S M A媒介性疾患を処置ま

50

たは予防する工程を包含する。幾つかの実施形態において、P S M A 媒介性疾患は、前立腺癌または非前立腺癌（本明細書中の他の場所で記載した非前立腺癌を含む）のような癌である。

#### 【0043】

本発明のまたさらなる局面において、P S M A 媒介性疾患を処置または予防する方法が、提供される。本方法は、P S M A 媒介性疾患を有する被験体またはP S M A 媒介性疾患を有する危険のある被験体へ、P S M A 媒介性疾患を処置または予防するのに有効な量の、少なくとも1つの上述の抗体またはその抗原結合性フラグメントを投与する工程を包含する。

#### 【0044】

幾つかの実施形態において、P S M A 媒介性疾患は、前立腺癌または非前立腺癌（本明細書中の他の場所で記載した非前立腺癌を含む）のような癌である。

#### 【0045】

他の実施形態において、この方法は、抗体またはその抗原結合性フラグメントの投与前、投与中、または投与後の任意の時に、別の治療剤を投与してP S M A 媒介性疾患を処置または予防する工程も包含する。これらの幾つかの実施形態において、治療薬剤は、ワクチンであり、そして好ましくは被験体をP S M A に対し免疫するワクチンである。

#### 【0046】

なお他の実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、少なくとも1つの治療的部分（好ましくは細胞傷害性薬物、腫瘍新生血管に対して作用する薬物およびこれらの組み合わせ）と結合される。好ましい細胞傷害性薬物は、以下からなる群から選択される：カリケアミシン、エスペラミシン、メトトレキサート、ドキソルビシン、メルファラン、クロラムブシル、A R A - C、ビンデシン、マイトマイシンC、シスプラチン、エトポシド、ブレオマイシン、5-フルオロウラシル、エストラムスチン、ビンクリスチン、エトポシド、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、ドラスタチン10、オーリスタチンEおよびオーリスタチンP H E。

#### 【0047】

他の実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、放射性同位体に結合され、この放射性同位体から発する放射線は、 $\alpha$ 放射線、 $\beta$ 放射線および $\gamma$ 放射線からなる群から選択される。好ましくは、放射性同位体は、以下からなる群から選択される：  
 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{186}\text{Rh}$ 、 $^{188}\text{Rh}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{224}\text{Ra}$ および $^{223}\text{Ra}$ 。

#### 【0048】

本発明は、P S M A の少なくとも1つの酵素活性を調節する方法を提供する。この方法の好ましい実施形態において使用される場合、P S M A の酵素活性を「調節する」とは、酵素活性を増大または阻害することを意味する。従って本発明の特定の局面において、P S M A の酵素活性を阻害する方法が、提供され、本発明の他の局面では、P S M A の酵素活性を増大する方法が、提供される。この文脈における用語「増大する（*enhancing*）」および用語「阻害する」は、P S M A に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントの存在下で、このような抗体またはその抗原結合性フラグメントの非存在下の活性レベルと比較して、P S M A の酵素活性が、増大または阻害されることを示す。P S M A の酵素活性としては、フォレートヒドロラーゼ活性、N-アセチル化 $\alpha$ 結合酸性ジペプチダーゼ（N A A L A D a s e）活性、ジペプチジルジペプチダーゼ I V 活性および $\gamma$ グルタミナルヒドロラーゼ活性が挙げられる。

#### 【0049】

従って別の実施形態において、本発明は、フォレートヒドロラーゼ活性を調節する方法を提供する。これらの方法の特定の実施形態において、活性は阻害され、他の実施形態において、活性は増大される。この方法は、フォレートヒドロラーゼポリペプチドを、一定量の上述の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントと、単離された抗体または

10

20

30

40

50

その抗原結合性フラグメントがフォレートヒドロラーゼ活性を調節する条件下で、接触させる工程を包含する。細胞、細胞ホモジネート、組織、もしくは組織ホモジネートのようなサンプルに含まれるか、または生物に含まれるフォレートヒドロラーゼポリペプチドが、単離され得る。この生物は、好ましくは動物であり、特に好ましくは哺乳動物である。

#### 【0050】

本発明の別の局面において、N-アセチル化 $\alpha$ 結合酸性ジペプチダーゼ（N A A L A D a s e）活性を調節する方法が提供される。これらの方法の特定の実施形態において、活性は阻害され、他の実施形態において、活性は増大される。この方法は、N A A L A D a s e ポリペプチドを、一定量の上述の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントと、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントがN A A L A D a s e 活性を調節する条件下で、接触させる工程を包含する。細胞、細胞ホモジネート、組織、もしくは組織ホモジネートのようなサンプルに含まれるか、または生物に含まれるN A A L A D a s e ポリペプチドが、単離され得る。この生物は、好ましくは動物であり、特に好ましくは哺乳動物である。

10

#### 【0051】

本発明のまた別の局面において、ジペプチジルジペプチダーゼ I V 活性を調節する方法が、提供される。これらの方法の特定の実施形態において、活性は阻害され、他の実施形態において、活性は増大される。この方法は、ジペプチジルジペプチダーゼ I V ポリペプチドを、一定量の上述の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントと、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントがジペプチジルジペプチダーゼ I V 活性を調節する条件下で、接触させる工程を包含する。細胞、細胞ホモジネート、組織、もしくは組織ホモジネートのようなサンプルに含まれるか、または生物に含まれるジペプチジルジペプチダーゼ I V ポリペプチドが、単離され得る。この生物は、好ましくは動物であり、特に好ましくは哺乳動物である。

20

#### 【0052】

本発明のまた別の局面において、 $\gamma$  グルタミナルヒドロラーゼ活性を調節する方法が、提供される。これらの方法の特定の実施形態において、活性は阻害され、他の実施形態において、活性は増大される。この方法は、 $\gamma$  グルタミナルヒドロラーゼポリペプチドを、一定量の上述の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントと、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントが $\gamma$  グルタミナルヒドロラーゼ活性を調節する条件下で、接触させる工程を包含する。細胞、細胞ホモジネート、組織、もしくは組織ホモジネートのようなサンプルに含まれるか、または生物に含まれる $\gamma$  グルタミナルヒドロラーゼポリペプチドが、単離され得る。この生物は、好ましくは動物であり、特に好ましくは哺乳動物である。

30

#### 【0053】

P S M A 発現細胞に少なくとも1つの治療剤を特異的に送達する方法が、本発明の別の局面に従って、提供される。この方法は、少なくとも1つの治療薬剤と結合体化した、有効量の少なくとも1つの上述の抗体またはその抗原結合性フラグメントを投与する工程を、包含する。幾つかの実施形態において、治療剤は、核酸分子、抗腫瘍薬物、毒素もしくはそのフラグメント、酵素もしくはそのフラグメント、複製選択的ウイルス、または免疫刺激剤もしくは免疫調節剤である。好ましい抗腫瘍薬物としては、細胞傷害性薬物、腫瘍新生血管に対して作用する薬物およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましい細胞傷害性薬物としては、以下が挙げられる：カリケアミシン、エスペラミシン、メトトレキサート、ドキソルビシン、メルファラン、クロラムブシル、A R A - C、ビンデシン、マイトマイシンC、シスプラチン、エトポシド、ブレオマイシン、5-フルオロウラシル、エストラムスチン、ビンクリスチン、エトポシド、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、ドラスタチン10、オーリスタチンEおよびオーリスタチンP H E。好ましい免疫刺激剤または免疫調節剤としては、サイトカイン、ケモカイン、およびアジュバントが挙げられた。

40

#### 【0054】

50

本発明のまた別の局面において、P S M A タンパク質マルチマーを選択的に結合する単離された抗体が、提供される。好ましい実施形態において、P S M A タンパク質マルチマーは、ダイマーであり、そして好ましくはこのマルチマーを形成する少なくとも1つのP S M A タンパク質は、組換え可溶性P S M A ( r s P S M A ) ポリペプチドである。好ましくは、r s P S M A ポリペプチドは、本質的に配列番号1のアミノ酸44～750からなる。

#### 【0055】

本発明のさらなる局面において、P S M A タンパク質マルチマーを選択的に結合し、そしてP S M A タンパク質マルチマーの1つ以上の酵素活性を調節する、単離された抗体が、提供される。本発明のこの局面の好ましい実施形態において使用されるように、P S M A マルチマーの酵素活性を「調節する」とは、酵素活性を増大または阻害することを意味する。従って本発明の特定の局面において、P S M A マルチマーの酵素活性を阻害する抗体が、提供され、本発明の他の局面では、P S M A マルチマーの酵素活性を増大する抗体が、提供される。この文脈における用語「増大する」および用語「阻害する」は、P S M A マルチマーを特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントの存在下で、このような抗体またはその抗原結合性フラグメントの非存在下の活性レベルと比較して、P S M A マルチマーの酵素活性が、増大されることまたは阻害されることを示す。幾つかの実施形態において、この酵素活性は、フォレートヒドロラーゼ活性、N A A L A D a s e 活性、ジペプチジルジペプチダーゼI V 活性およびγ グルタミナルヒドロラーゼ活性からなる群から選択される。他の実施形態において、この酵素活性は、P S M A 分子の細胞外ドメインにおいて存在する。さらに他の実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、P S M A の細胞外ドメインに特異的に結合する。

#### 【0056】

さらなる局面において、P S M A タンパク質マルチマーを選択的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントが、提供される。この局面において、単離された抗体は、P S M A タンパク質マルチマーを含む調製物で動物を免疫することにより、作製される。この抗体を作製するのに使用される好ましい調製物としては、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、75%、90%、または95%のP S M A タンパク質マルチマーを有する調製物が挙げられる。好ましくは、P S M A タンパク質マルチマーは、ダイマーである。

#### 【0057】

本発明のさらに別の局面において、1つ以上の上述の単離された抗体、および免疫刺激性分子（例えば、アジュバントおよび／またはサイトカイン）を含む組成物が、提供される。好ましくはまた、免疫刺激性分子は、I L - 2 または免疫刺激性オリゴヌクレオチドである。特定の実施形態において、上述の組成物はまた、薬学的受容可能キャリアを含む。

#### 【0058】

本発明はまた、有効量の上述の単離された抗体または組成物を、このような処置を必要とする被験体に投与する工程を包含する、免疫応答を誘導するための方法を含む。

#### 【0059】

本発明は、別の局面において、P S M A タンパク質マルチマーを選択的に結合しそしてP S M A の少なくとも1つの酵素活性を調節する、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを、提供する。本発明のこの局面の好ましい実施形態において使用されるように、P S M A の酵素活性を「調節する」とは、この酵素活性を増大することまたは阻害することを意味する。従って、本発明の特定の局面において、P S M A の酵素活性を阻害する抗体が、提供され、本発明の他の局面において、P S M A の酵素活性を阻害する抗体が、提供される。この文脈において、用語「増大する」および用語「阻害する」は、P S M A を選択的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントの存在下において、このような抗体または抗原結合性フラグメント非存在下での活性のレベルと比べて、P S M A の酵素活性が増大されることまたは阻害されることを示す。この酵素は、特定の実施形態

において、ヒドロラーゼおよびペプチダーゼからなる群から選択される。好ましいヒドロラーゼとしては、フォレートヒドロラーゼおよび $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼが挙げられる。特定の好ましいPSMA阻害の実施形態において、ヒドロラーゼは、フォレートヒドロラーゼであり、そして抗体は、mAb 5.4またはmAb 3.9である。好ましいペプチダーゼとしては、NAALADaseおよびジペプチジルジペプチダーゼIVが挙げられる。幾つかの実施形態において、この酵素は、癌細胞において活性であり、そして癌細胞においてより正常細胞において低い活性を有し、好ましくは、正常細胞においては活性がない。好ましい実施形態において、この酵素が活性である癌細胞は、前立腺癌細胞である。上述の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント、および薬学的受容可能キャリアを含む組成物も、本発明により提供される。

10

**【0060】**

本発明の別の局面において、単離されたPSMAタンパク質マルチマーを含む組成物が、提供される。好ましくは、PSMAタンパク質マルチマーは、ダイマーである。特定の実施形態において、この組成物は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、75%、90%、または95%のPSMAタンパク質マルチマーを含む。他の実施形態において、PSMAタンパク質マルチマーは、非共有結合的に結合したPSMAタンパク質を含む。PSMAタンパク質は、好ましくは、非変性条件下で非共有結合的に結合される。

**【0061】**

上述の組成物の特定の実施形態において、マルチマーを形成する少なくとも1つのPSMAタンパク質は、組換え体（可溶性PSMA（rsPSMA）ポリペプチド）である。他の実施形態において、PSMAタンパク質マルチマーは、特異的にPSMAを認識するコンフォメーション特異的抗体に、反応性である。好ましくは、ネイティブなコンフォメーションにおいてPSMAタンパク質を含むPSMAタンパク質マルチマーおよび／またはPSMAマルチマーは、酵素的に活性である。好ましい実施形態において、この酵素活性は、フォレートヒドロラーゼ活性、NAALADase活性、ジペプチジルジペプチダーゼIV活性および／または $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼ活性である。

20

**【0062】**

さらに他の実施形態において、上述の組成物はまた、アジュバントおよび／もしくはサイトカインまたは他の免疫刺激性分子を含む。好ましいサイトカインとしては、IL-2、IL-12、IL-18およびGM-CSFが挙げられる。さらなる実施形態において、上述の組成物はまた、薬学的受容可能キャリアを含む。

30

**【0063】**

本発明のさらに別の局面に従い、免疫応答を誘導するための方法が、提供される。この方法は、このような処置を必要とする被験体に、有効量の1つ以上の上述の組成物を投与する工程を包含する。

**【0064】**

さらなる局面において、本発明は、単離された組換え可溶性PSMA（rsPSMA）タンパク質マルチマー、および単離されたrsPSMAタンパク質ダイマーを含む。幾つかの実施形態において、このダイマーは、非共有的に結合したrsPSMAタンパク質を含み、そして好ましくは、rsPSMAタンパク質は、非変性条件下で非共有結合的に結合される。他の実施形態において、単離されたrsPSMAダイマーは、PSMAを特異的に認識するコンフォメーション特異的抗体に反応性である。

40

**【0065】**

特定の好ましい実施形態において、単離されたrsPSMAダイマーは、酵素活性であり、この酵素活性は、フォレートヒドロラーゼ活性、NAALADase活性、ジペプチジルジペプチダーゼIV活性および $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼ活性からなる群から選択される。

**【0066】**

本発明のさらに別の局面において、PSMA酵素の少なくとも1つの酵素活性を調節す

50

る候補薬剤をスクリーニングする方法が、提供される。この方法の好ましい実施形態において使用されるように、P S M Aの酵素活性を「調節する」とは、この酵素活性を増大するまたは阻害することを意味する。従って、本発明の特定の局面において、P S M Aの酵素活性を阻害する候補薬剤をスクリーニングする方法が、提供され、そして本発明の他の局面において、P S M Aの酵素活性を増大する候補薬剤をスクリーニングする方法が、提供される。この文脈における用語「増大する」および用語「阻害する」は、候補薬剤の存在下で、このような薬剤の非存在下の活性レベルと比較して、P S M Aの酵素活性が、増大または阻害されることを示す。この方法は、この候補薬剤を単離されたP S M Aタンパク質マルチマーと混合して反応混合物を形成する工程、その後でP S M A酵素の基質を反応混合物に添加する工程、およびP S M A酵素により基質から形成された産物の量を決定する工程を包含する。コントロールとの比較における、形成された産物の量における変化は、P S M A酵素の少なくとも1つの酵素活性を調節し得る薬剤を表す。コントロールとの比較における、形成された産物の量における減少は、P S M A酵素の少なくとも1つの酵素活性を減少し得る薬剤を表す。コントロールとの比較における、形成された産物の量における増加は、P S M A酵素の少なくとも1つの酵素活性を増大し得る薬剤を表す。幾つかの実施形態において、P S M A酵素は、N A A L A D a s e、フォレートヒドロラーゼ、ジペプチジルジペプチダーゼ I V および  $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼからなる群から選択される。他の実施形態において、P S M A マルチマーは、組換え可溶性 P S M A を含む。さらに他の実施形態において、候補薬剤は、抗体、有機小化合物、またはペプチドからなる群から選択される。

10

20

**【0067】**

本発明の別の局面において、P S M Aの少なくとも1つの酵素活性を調節する候補薬剤が、提供される。酵素薬剤は、上述の方法に従って同定される。従って、本発明の特定の局面において、P S M Aの酵素活性を阻害する候補薬剤が、提供され、そして本発明の他の局面において、P S M Aの酵素活性を増大する候補薬剤が、提供される。特定の実施形態において、この薬剤は、コンビナトリアル抗体ライブラリー、コンビナトリアルタンパク質ライブラリー、または有機小分子ライブラリーから選択される。

**【0068】**

本発明はまた、P S M Aダイマーの解離を促進する化合物を同定する方法を提供する。この方法は、化合物の非存在下でP S M Aダイマーの解離を促進しない条件下でP S M Aダイマーと化合物を接触させる工程、P S M Aモノマーおよび／またはP S M Aダイマーの量を測定する工程；ならびにこの化合物の存在下で測定されたP S M Aモノマーおよび／またはP S M Aダイマーの量をこの化合物の非存在下で観察された測定量と比較する工程を包含する。化合物の存在下で測定されたP S M Aモノマーの量における増加は、この化合物がP S M Aダイマーの解離を促進し得ることを示す。化合物の存在下で測定されたP S M Aダイマーの量における減少は、この化合物がP S M Aダイマーの解離を促進し得ることを示す。P S M AモノマーおよびP S M Aダイマーの量を測定した場合、この方法は、P S M Aモノマー対P S M Aダイマーの比率を計算する工程、この化合物の存在下で得られた比率をこの化合物の非存在下で得られた比率と比較する工程を包含する。このような方法において、この化合物の存在下で測定された比率の増加は、この化合物がP S M Aダイマーの解離を促進し得ることを示す。

30

40

**【0069】**

医薬の調製における、上述の組成物、分子および薬剤の使用も、提供される。好ましい実施形態において、この医薬は、過剰増殖性疾患（癌、ならびに不適当なN A A L A D a s e活性、フォレートヒドロラーゼ活性、ジペプチジルジペプチダーゼ I V 活性および／または $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼ活性の疾患を含む）に関する状態の処置において有用である。

**【0070】**

本発明のこれらおよび他の局面は、本発明の詳細な記載に関連して、さらに詳細に記載される。

50

## 【0071】

(発明の詳細な記載)

本発明は、P S M Aの細胞外ドメイン上のコンフォメーションナルエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメント、このような1つの抗体もしくはその抗原結合性フラグメントまたはこれらの組み合わせを含む組成物、抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、および癌の診断または処置のために抗体またはその抗原結合性フラグメントを使用する方法を提供する。

## 【0072】

前立腺特異的膜抗原(P S M A)は、前立腺組織において発現する100kDのI I型膜糖タンパク質であり、そして初めは7 E 1 1-C 5と命名されるモノクローナル抗体との反応性によって同定された(Horoszewiczら(1987) Anticancer Res. 7:927-935; 米国特許第5,162,504号)。P S M Aは、精製された形状で得られ(Wrightら(1990) Antibody Immunoc conjugates and Radio Pharmaceuticals 3: Abstract 193)、そしてトランスフェリンレセプターと同一の配列を有し(Israeliら(1994) Cancer Res. 54:1807-1811)、かつN A A L D a s e活性を有する(Carterら(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:749-753)、I I型膜貫通タンパク質として特徴付けられた。より重要には、P S M Aは、前立腺癌において増加した量で発現され、そして高められたP S M Aレベルはまた、これらの患者の血清において検出可能である(Horoszewiczら(1987); Rochonら(1994) Prostate 25:219-223; Murphyら(1995) Prostate 26:164-168; およびMurphyら(1995) Anticancer Res. 15:1473-1479)。P S M A発現は、疾患の進行と共に増加し、転移において最高になり、現存する治療法のないホルモン治療抵抗性疾患となる。刺激的な最近のデータは、P S M Aが、膀胱、膵臓、肉腫、黒色腫、肺、および腎臓の腫瘍細胞を含む種々の他の重要な腫瘍の新生血管においても豊富に発現するが、正常な新生血管においては発現しないことを示す。

## 【0073】

本発明の一局は、P S M Aの細胞外ドメインに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供し、ここで、この抗体またはその抗原結合性フラグメントは、P S M A上の標的エピトープへの第二抗体の特異的結合を競合的に阻害し、そしてこの第二抗体は、以下からなる群より選択される:P S M A 3.7、P S M A 3.8、P S M A 3.9、P S M A 3.11、P S M A 5.4、P S M A 7.1、P S M A 7.3、P S M A 10.3、P S M A 1.8.3、P S M A A3.1.3、P S M A A3.3.1、4.248.2、4.360.3、4.7.1、4.4.1、4.177.3、4.16.1、4.22.3、4.28.3、4.40.2、4.48.3、4.49.1、4.209.3、4.219.3、4.288.1、4.333.1、4.54.1、4.153.1、4.232.3、4.292.3、4.304.1、4.78.1、および4.152.1。

## 【0074】

本発明の別の局面は、以下からなる群より選択される抗体により定義されるP S M A上のエピトープに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する:P S M A 3.7、P S M A 3.8、P S M A 3.9、P S M A 3.11、P S M A 5.4、P S M A 7.1、P S M A 7.3、P S M A 10.3、P S M A 1.8.3、P S M A A3.1.3、P S M A A3.3.1、4.248.2、4.360.3、4.7.1、4.4.1、4.177.3、4.16.1、4.22.3、4.28.3、4.40.2、4.48.3、4.49.1、4.209.3、4.219.3、4.288.1、4.333.1、4.54.1、4.153.1、4.232.3、4.292.3、4.304.1、4.78.1、および4.152.1

## 【0075】

特定の実施形態において、これらの抗体は、本明細書中に以下のように参照されるハイブリドーマによって産生される：それぞれ、PSMA 3.7、PSMA 3.8、PSMA 3.9、PSMA 3.11、PSMA 5.4、PSMA 7.1、PSMA 7.3、PSMA 10.3、PSMA 1.8.3、PSMA A3.1.3、PSMA A3.3.1、Abgenix 4.248.2、Abgenix 4.360.3、Abgenix 4.7.1、Abgenix 4.4.1、Abgenix 4.177.3、Abgenix 4.16.1、Abgenix 4.22.3、Abgenix 4.28.3、Abgenix 4.40.2、Abgenix 4.48.3、Abgenix 4.49.1、Abgenix 4.209.3、Abgenix 4.219.3、Abgenix 4.288.1、Abgenix 4.333.1、Abgenix 4.54.1、Abgenix 4.153.1、Abgenix 4.232.3、Abgenix 4.292.3、Abgenix 4.304.1、Abgenix 4.78.1、およびAbgenix 4.152.1。これらのハイブリドーマは、国際寄託当局であるATCCに寄託され、以下の特許寄託指定を与えられた（表1）：

## 【0076】

## 【表1-1】

表1

| 抗体          | ハイブリドーマ／<br>プラスミド            | 特許寄託指定   | 寄託日        |
|-------------|------------------------------|----------|------------|
| PSMA 3.7    | PSMA 3.7                     | PTA-3257 | 2001年4月5日  |
| PSMA 3.9    | PSMA 3.9                     | PTA-3258 | 2001年4月5日  |
| PSMA 3.11   | PSMA 3.11                    | PTA-3269 | 2001年4月10日 |
| PSMA 5.4    | PSMA 5.4                     | PTA-3268 | 2001年4月10日 |
| PSMA 7.1    | PSMA 7.1                     | PTA-3292 | 2001年4月18日 |
| PSMA 7.3    | PSMA 7.3                     | PTA-3293 | 2001年4月18日 |
| PSMA 10.3   | PSMA 10.3                    | PTA-3347 | 2001年5月1日  |
|             | pcDNA内のPSMA<br>10.3HC(配列番号7) | PTA-4413 | 2002年5月29日 |
|             | pcDNA内のPSMA<br>10.3κ(配列番号13) | PTA-4414 | 2002年5月29日 |
| PSMA 1.8.3  | PSMA 1.8.3                   | PTA-3906 | 2001年12月5日 |
| PSMA A3.1.3 | PSMA A3.1.3                  | PTA-3904 | 2001年12月5日 |

## 【0077】

【表 1 - 2】

|                 |                             |          |            |
|-----------------|-----------------------------|----------|------------|
| PSMA A3.3.1     | PSMA A3.3.1                 | PTA-3905 | 2001年12月5日 |
| Abgenix 4.248.2 | Abgenix 4.248.2             | PTA-4427 | 2002年6月4日  |
| Abgenix 4.360.3 | Abgenix 4.360.3             | PTA-4428 | 2002年6月4日  |
| Abgenix 4.7.1   | Abgenix 4.7.1               | PTA-4429 | 2002年6月4日  |
| Abgenix 4.4.1   | Abgenix 4.4.1               | PTA-4556 | 2002年6月18日 |
| Abgenix 4.177.3 | Abgenix 4.177.3             | PTA-4557 | 2002年6月18日 |
| Abgenix 4.16.1  | Abgenix 4.16.1              | PTA-4357 | 2002年5月16日 |
| Abgenix 4.22.3  | Abgenix 4.22.3              | PTA-4358 | 2002年5月16日 |
| Abgenix 4.28.3  | Abgenix 4.28.3              | PTA-4359 | 2002年5月16日 |
| Abgenix 4.40.2  | Abgenix 4.40.2              | PTA-4360 | 2002年5月16日 |
| Abgenix 4.48.3  | Abgenix 4.48.3              | PTA-4361 | 2002年5月16日 |
| Abgenix 4.49.1  | Abgenix 4.49.1              | PTA-4362 | 2002年5月16日 |
| Abgenix 4.209.3 | Abgenix 4.209.3             | PTA-4365 | 2002年5月16日 |
| Abgenix 4.219.3 | Abgenix 4.219.3             | PTA-4366 | 2002年5月16日 |
| Abgenix 4.288.1 | Abgenix 4.288.1             | PTA-4367 | 2002年5月16日 |
| Abgenix 4.333.1 | Abgenix 4.333.1             | PTA-4368 | 2002年5月16日 |
| Abgenix 4.54.1  | Abgenix 4.54.1              | PTA-4363 | 2002年5月16日 |
| Abgenix 4.153.1 | Abgenix 4.153.1             | PTA-4388 | 2002年5月23日 |
| Abgenix 4.232.3 | Abgenix 4.232.3             | PTA-4389 | 2002年5月23日 |
| Abgenix 4.292.3 | Abgenix 4.292.3             | PTA-4390 | 2002年5月23日 |
| Abgenix 4.304.1 | Abgenix 4.304.1             | PTA-4391 | 2002年5月23日 |
| AB-PG1-XG1-006  | AB-PG1-XG1-006<br>重鎖(配列番号2) | PTA-4403 | 2002年5月29日 |
|                 | AB-PG1-XG1-006<br>軽鎖(配列番号8) | PTA-4404 |            |
| AB-PG1-XG1-026  | AB-PG1-XG1-026<br>重鎖(配列番号3) | PTA-4405 | 2002年5月29日 |
|                 | AB-PG1-XG1-026<br>軽鎖(配列番号9) | PTA-4406 |            |
| AB-PG1-XG1-051  | AB-PG1-XG1-051<br>重鎖(配列番号4) | PTA-4407 | 2002年5月29日 |
|                 | AB-PG1-XG1-051              | PTA-4408 |            |

【表 1 - 3】

|                |                                     |          |            |
|----------------|-------------------------------------|----------|------------|
|                | <b>軽鎖(配列番号10)</b>                   |          |            |
| AB-PG1-XG1-069 | AB-PG1-XG1-069<br><b>重鎖(配列番号5)</b>  | PTA-4409 | 2002年5月29日 |
|                | AB-PG1-XG1-069<br><b>軽鎖(配列番号11)</b> | PTA-4410 |            |
| AB-PG1-XG1-077 | AB-PG1-XG1-077<br><b>重鎖(配列番号6)</b>  | PTA-4411 | 2002年5月29日 |
|                | AB-PG1-XG1-077<br><b>軽鎖(配列番号12)</b> | PTA-4412 |            |

本発明の別の局面において、特定の配列を有する抗体が、提供される。具体的には、この抗体は、以下を含む抗体からなる群より選択される：重鎖コード領域または配列番号 2～7 に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列領域を含む核酸分子によりコードされる重鎖、および軽鎖コード領域または配列番号 8～13 に示すヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列領域を含む核酸分子によりコードされる軽鎖。同様に、上述の抗体の抗原結合性フラグメントも、提供される。

## 【0079】

以下の抗体の重鎖および軽鎖をコードするプラスミドも、ATCCに寄託された：PSMA10.3、AB-PG1-XG1-006、AB-PG1-XG1-026、AB-PG1-XG1-051、AB-PG1-XG1-069、AB-PG1-XG1-077。上の表1に示す。本明細書中で使用される場合、寄託されたハイブリドーマまたはプラスミドの名称は、抗体の名前と交換可能に使用され得る。この名称が抗体を言及することが意図される場合、またはこの名称が抗体をコードするプラスミドもしくは抗体を産生するハイブリドーマを言及する場合、当業者に明らかである。さらに、この抗体名称は、表1で示す短縮形の名称であり得る。例えば、抗体AB-PG1-XG1-006は、AB-PG1-XG1-006、PG1-XG1-006、XG1-006、006、などと呼ばれ得る。別の例では、抗体名PSMA 4.232.3は、PSMA 4.232.1、4.232.3、4.232.1、4.232.2などと呼ばれ得る。抗体の名称における全てのバリエーションが、同じ抗体を意味し、そして異なった抗体を意味しないことが意図される。

## 【0080】

重鎖および軽鎖配列の特定の組によりコードされる抗体も、提供される。一実施形態において、コード領域または配列番号2および配列番号8に示す核酸配列領域を含む核酸分子によりコードされる抗体(AB-PG1-XG1-006)が、提供される。別の実施形態において、抗体(AB-PG1-XG1-026)は、コード領域または配列番号3および配列番号9に示すヌクレオチド配列領域を含む核酸分子によりコードされる。なお別の実施形態において、抗体(AB-PG1-XG1-051)は、コード領域または配列番号4および配列番号10に示すヌクレオチド配列領域を含む核酸分子によりコードされる。さらに別の実施形態において、抗体(AB-PG1-XG1-069)は、コード領域または配列番号5および配列番号11に示すヌクレオチド配列領域を含む核酸分子によりコードされる。別の実施形態において、抗体(AB-PG1-XG1-077)は、コード領域または配列番号6および配列番号12に示すヌクレオチド配列領域を含む核酸分子によりコードされる。なお別の実施形態において、抗体(PSMA 10.3)は、コード領域または配列番号7および配列番号13に示すヌクレオチド配列領域を含む核酸分子によりコードされる。

## 【0081】

特に好ましい実施形態において、この抗体は、コード領域または配列番号14、配列番号18、配列番号22、配列番号26および配列番号30に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列領域を含む核酸分子にコードされる重鎖可変領域、ならびにコード領域または配列番号16、配列番号20、配列番号24、配列番号28および配列番号32に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列領域を含む核酸分子にコードされる軽鎖可変領域を含む。本明細書中で使用される場合、「コード領域」は、ポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列領域を言及する；コード領域は、後に開裂するタンパク質の一部（例えば、シグナルペプチド）をコードする領域を含み得る。

10

## 【0082】

当業者は、本発明が、本明細書中に存在するヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を含む、核酸およびポリペプチドを含むことを理解する。幾つかの例においては、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、シグナルペプチドをコードする配列を含み得る。本発明は、シグナルペプチドをコードする配列もしくはシグナルペプチドである配列の一部を有するかまたは有さないこれらそれぞれの配列を含む。

## 【0083】

重鎖および軽鎖の可変配列の特定の組を含む抗体も、提供される。一実施形態において、コード領域または配列番号14および配列番号16に示す核酸配列領域を含む核酸分子にコードされる免疫グロブリン可変配列を含む抗体（AB-PG1-XG1-006）が、提供される。同様に、この抗体は、免疫グロブリン可変配列を含み得、この可変配列は、配列番号15および配列番号17に示すアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、抗体（AB-PG1-XG1-026）は、コード領域もしくは配列番号18および配列番号20に示すヌクレオチド配列領域を含む核酸分子にコードされる免疫グロブリン可変配列を含むか、または配列番号19および配列番号21に示すアミノ酸配列を含む免疫グロブリン可変配列を含む。なお別の実施形態において、抗体（AB-PG1-XG1-051）は、コード領域もしくは配列番号22および配列番号24に示すヌクレオチド配列領域を含む核酸分子にコードされる免疫グロブリン可変配列を含むか、または配列番号23および配列番号25に示すアミノ酸配列を含む免疫グロブリン可変配列を含む。さらに別の実施形態において、抗体（AB-PG1-XG1-069）は、コード領域もしくは配列番号26および配列番号28に示すヌクレオチド配列領域を含む核酸分子にコードされる免疫グロブリン可変配列を含むか、または配列番号27および配列番号29に示すアミノ酸配列を含む免疫グロブリン可変配列を含む。別の実施形態において、抗体（AB-PG1-XG1-077）は、コード領域もしくは配列番号30および配列番号32に示すヌクレオチド配列領域を含む核酸分子にコードされる免疫グロブリン可変配列を含むか、または配列番号31および配列番号33に示すアミノ酸配列を含む免疫グロブリン可変配列を含む。

20

30

## 【0084】

特定の実施形態において、抗体は上述の核酸分子に対し高度に相同である核酸分子にコードされる。好ましくは、この相同核酸分子としては、本明細書中で提供されるヌクレオチド配列と、少なくとも約90%同一であるヌクレオチド配列が挙げられる。より好ましくは、このヌクレオチド配列は、本明細書中で提供されるヌクレオチド配列と、少なくとも約95%同一、少なくとも約97%同一、少なくとも約98%同一、または少なくとも約99%同一である。相同性は、種々の、公に入手可能な、当業者に周知であるソフトウェアツールを使用して、計算され得る。代表的なツールとしては、国立衛生院の国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のウェブサイトから入手し得るBLASTシステムが挙げられる。

40

## 【0085】

高度に相同なヌクレオチド配列を同定する一方法は、核酸ハイブリダイゼーションによるものである。従って、本発明はまた、PSMA結合特性および本明細書中に記載される

50

他の機能特性を有する抗体を含み、この抗体は、高ストリンジェンシー条件下で上述の核酸分子とハイブリダイズする核酸分子にコードされる。関連配列の同定は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）および関連核酸配列のクローニングに適した他の増幅技術を使用して達成され得る。好ましくは、PCRプライマーは、CDRのような、目的の核酸配列部分を増幅するために選択される。

#### 【0086】

本明細書中で使用される場合、用語「高ストリンジェンシー条件」は、よく知られた技術のパラメータを意味する。核酸ハイブリダイゼーションパラメータは、このような方法をまとめた参考文献（例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrookら, eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) または Current Protocols in Molecular Biology F. M. Ausubelら, eds., John Wiley & Sons, Inc., New York) において見出され得る。高ストリンジェンシー条件の一例は、ハイブリダイゼーション緩衝液（3.5×SSC、0.02% フィコール、0.02% ポリビニルピロリドン、0.02% ウシ血清アルブミン、2.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH7)、0.5% SDS、2mM EDTA）における65℃のハイブリダイゼーションである。SSCは、0.15M 塩化ナトリウム/0.015M クエン酸ナトリウム、pH7であり；SDSは、ドデシル硫酸ナトリウムであり；そしてEDTAは、エチレンジアミン四酢酸である。ハイブリダイゼーションの後、核酸を移した膜を、例えば、2×SSCにおいて室温で、そしてそれから0.1~0.5×SSC/0.1×SSCにおいて68℃までの温度で、洗浄する。

#### 【0087】

他の好ましい実施形態において、抗体は、配列番号15、配列番号19、配列番号23、配列番号27および配列番号31に示すアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および配列番号17、配列番号21、配列番号25、配列番号29および配列番号33に示すヌクレオチド配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。本明細書中の他の場所に記載されているように、上述の抗原結合性フラグメントも提供される。

#### 【0088】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、ジスルフィド結合によって互いに結合する少なくとも2つの重鎖（H鎖）および2つの軽鎖（L鎖）を含む糖タンパク質を言及する。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域（本明細書中でHCVRまたはV<sub>H</sub>と略される）および重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3から構成される。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書中でLCVRまたはV<sub>L</sub>と略される）および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C<sub>L</sub>からなる。V<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域は、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変的領域と、その所々に挟まれるより保存的な領域（フレームワーク領域（FR）と呼ばれる）とにさらに細分され得る。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>はそれぞれ、3つのCDRおよび4つのFRで構成され、アミノ末端からカルボキシ末端へ以下の順序で配列される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的成分系の第一成分（C1q）を含む宿主組織または宿主因子への、免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

#### 【0089】

用語「（抗体の）抗原結合性フラグメント」は、本明細書中で使用される場合、抗原（例えば、PSMA）に特異的に結合する能力を保有する、抗体の1つ以上の部分を意味する。抗体の抗原結合作用は、全長抗体のフラグメントにより実行され得ることが示されている。結合フラグメントの例は、以下を含む用語「（抗体の）抗原結合性フラグメント」

の範囲内に含まれる：(i) Fabフラグメント ( $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$  および  $C_H1$  ドメインからなる1価のフラグメント)；(ii)  $F(ab')_2$  フラグメント (ヒンジ領域においてジスルフィド結合で結合される2つのFabフラグメントを含む2価のフラグメント)；(iii)  $V_H$  および  $C_H1$  ドメインからなるFdフラグメント；(iv) 抗体の単一の腕の  $V_L$  および  $V_H$  ドメインからなるFvフラグメント；(v)  $V_H$  ドメインからなるdAbフラグメント (Wardら, (1989) Nature 341:544-546)；および(vi) 単離された相補性決定領域 (CDR)。さらに、Fvフラグメントの2つのドメインVおよび  $V_H$  は、離れた遺伝子によってコードされているが、これらは、組換え技術を使用して、これらを  $V_L$  領域および  $V_H$  領域の一組が1価の分子を形成するような1つのタンパク質鎖 (単鎖Fv (scFv)) として公知である；例えば、Birdら (1988) Science 242:423-426；およびHoustonら (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照) にさせ得る合成リンカーにより、連結され得る。このような単鎖抗体も、用語「(抗体の) 抗原結合性フラグメント」に含まれることが意図される。これらの抗体フラグメントは、タンパク質分解断片化手順 (本明細書中に参考として援用されるJ. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp98-118 (N. Y. Academic Press 1983) に記載される) および当業者に公知の他の技術のような従来手順を使用して得られる。フラグメントは、インタクトな抗体と同じ様式で有効性について検査される。

10

#### 【0090】

20

「単離された抗体」は、本明細書中で使用される場合、異なった抗原特性を有する他の抗体を本質的に含まない抗体を意味することが意図される (例えば、PSMAに特異的に結合する単離された抗体は、PSMA以外の抗原を特異的に結合する抗体を本質的に含まない)。しかし、エピトープ、PSMAのアイソフォームまたは改変体に特異的に結合する単離された抗体は、他の関連する抗原 (例えば、他の種 (例えば、PSMA種ホモログ) 由来) に対する交叉反応性を有し得る。さらに、単離された抗体は、本質的に他の細胞物質および／または化学物質を含まなくてもよい。本明細書中で使用される場合、「特異的結合」は、所定の抗原に結合する抗体を言及する。典型的には、抗体は、所定の抗原または近縁抗原以外の非特異抗原 (例えば、BSA、カゼイン) への結合親和性より、少なくとも2倍強い親和性をもって結合する。

30

#### 【0091】

本発明の単離された抗体は、以下のような種々の抗体アイソタイプを含む：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、IgE。本明細書中で使用される場合、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス (例えば、IgMまたはIgG1) を言及する。抗体は、全長であり得るか、あるいはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgDもしくはIgEの抗体定常領域および／または可変ドメインのような抗原結合性フラグメントのみを含み得るか、あるいはFabフラグメント、 $F(ab')_2$  フラグメント、およびFvフラグメントで構成され得る。

#### 【0092】

40

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の混合物であり得る。抗体は、当該分野に周知である種々の技術により生産し得る。ポリクローナル抗体を作製する手順は、周知である。例えば、抗PSMAポリクローナル抗体は、最初に免疫前血清を得るために採血したニュージーランド白ウサギに、PSMAタンパク質を皮下的に投与することによって作製し得る。PSMAを、異なる6ヶ所へ1ヶ所あたり総量100  $\mu$ l、典型的には1つ以上の調整剤と共に投与し得る。それからウサギを、最初の注射から2週間後に採血し、6週間ごとに3回、同じ抗原を定期的に追加投与する。血清のサンプルは、それぞれの追加投与から10日後に採取する。好ましくはPSMAを使用したアフィニティクロマトグラフィにより抗体を捕捉して、ポリクローナル抗体を、血清から回収する。ポリクローナル抗体を作製するこ

50

の手順および他の手順は、E. Harlowら編、Antibodies: A Laboratory Manual (1998) (本明細書中において参考として援用される) において開示される。

#### 【0093】

モノクローナル抗体産生は、当該分野に周知である技術により行われ得る。用語「モノクローナル抗体」は、本明細書中で使用されるように、単一の分子組成の抗体分子の調製物を意味する。モノクローナル抗体は、特定のエピトープに対し、単一の結合特異性および親和性を示す。モノクローナル抗体産生の過程は、抗体産生の可能性のある免疫体細胞（特にBリンパ球）を得る工程を包含する。この細胞は、かつてインビボまたはインビトロのどちらかで目的の抗原で免疫されており、B細胞骨髓腫株との融合に適している。

10

#### 【0094】

哺乳類リンパ球を、動物（例えばマウス）のインビボ免疫法により、望ましいタンパク質またはポリペプチドで（例えば、本発明においてはPSMAで）、典型的に免疫する。このような免疫は、数週間までの間隔をあけて、十分な力価の抗体を得るため、必要に応じて繰り返される。一旦免疫されると、動物は、抗体産生リンパ球の供給源として使用し得る。最後の抗体の追加投与の後、この動物を屠殺し、そして脾臓細胞を摘出する。マウスリンパ球は、本明細書中に記載したマウス骨髓腫株との安定した融合の、より高い百分率を与える。これらには、BALB/cマウスが、好ましい。しかし、他のマウス系統、ウサギ、ハムスター、ヒツジ、およびカエルも、抗体産生細胞を調製するための宿主として使用し得る。Goding (in Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., pp. 60-61, Orlando, Fla., Academic Press (1986)) 参照。特に、ゲノム内に挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子を有する（そしてマウス免疫グロブリンを産生し得ない）マウス系統が、望ましい。例としては、Medarex/GenPharm Internationalにより産生されるHuMAbマウス系統、およびAbgenixにより産生されるXenoMouse系統が挙げられる。これらのマウスは、免疫応答において、完全にヒト免疫グロブリン分子を産生する。

20

#### 【0095】

形質芽球分裂期におけるこれらの抗体産生細胞は、優先的に融合する。体細胞は、抗原初回刺激動物のリンパ節、脾臓および末梢血から得られ得、そして選り抜きのリンパ細胞は、大部分は特定の融合系におけるその実験的有効性に依存する。この抗体分泌リンパ球を、次に（マウス）B細胞骨髓腫または細胞培養において無限に複製し得、それにより不死の免疫グロブリン分泌細胞株を産生し得る形質転換細胞と、融合させる。この生じた融合細胞またはハイブリドーマを、培養し、そして生じたコロニーを、望ましいモノクローナル抗体の産生のためにスクリーニングした。このような抗体を産生するコロニーを、クローン化し、インビボまたはインビトロのどちらかで増殖させ、大量の抗体を産生する。このような細胞の融合の理論的根拠および実践的方法論の記載は、KohlerおよびMilstein, Nature 256: 495 (1975) (本明細書中に参考として援用される) において示される。

30

#### 【0096】

あるいは、抗体を産生し得るヒト体細胞（特にBリンパ球）は、骨髓腫細胞株との融合に適する。個体の脾臓生検材料、扁桃生検材料、またはリンパ節生検材料由来のBリンパ球が、使用し得るが、より容易に入手可能な末梢血Bリンパ球が、好ましい。このリンパ球は、診断された前立腺癌腫または別のPSMA発現癌を有する患者由来であり得る。加えて、ヒトB細胞は、Epstein-Barr ウイルス (Coleら (1995) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) により直接に不死化され得る。体細胞ハイブリダイゼーション手順が、好ましいが、原則的に、モノクローナル抗体を産生するための他の技術（B細胞のウイルス形質転換または腫瘍形成形質転換のような）が、使用し得る。

40

50

## 【0097】

ハイブリドーマ産生融合手順における使用に適した骨髓腫細胞株は、好ましくは、非抗体産生であり、高い融合効率および望ましいハイブリドーマの増殖を支持する特定の選択培地においてそれらを増殖不能にする酵素欠損を、有している。融合細胞株の産生に使用され得るこのような骨髓腫の例としては、以下が挙げられる：P3-X63/Ag8、X63-Ag8.653、NS1/1. Ag4. 1、Sp2/0-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG1. 7、S194/5XX0Bul（全てマウス由来）；R210、RCY3、Y3-Ag1. 2. 3、IR983Fおよび4B210（ラット由来）およびU-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2、UC729-6（全てヒト由来）（Goding, in Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., pp. 65-66, Orlando, Fla., Academic Press (1986)；Campbell, in Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier (1984)）。

10

## 【0098】

哺乳類骨髓腫細胞または細胞培養において、無限に複製可能な他の融合相手との融合は、標準かつ周知の技術（例えば、ポリエチレングリコール（「PEG」）または他の融合剤の使用）によって生じる（Milstein and Kohler, Eur. J. Immunol. 6:511 (1976)を参照。これは本明細書中で参考として援用される）。

20

## 【0099】

他の実施形態において、抗体は、組換え抗体であり得る。用語「組換え抗体」は、本明細書中で使用されるように、別の種の免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物（例えばマウス）から単離された抗体、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現された抗体、組換えのコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体、または免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含む任意の他の手法によって調製、発現、作製または単離された抗体のような、組換え手段によって調製、発現、作製または単離された抗体を含むことを意図する。

30

## 【0100】

さらに他の実施形態において、抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体であり得る。本明細書中で使用されるように、用語「キメラ抗体」は、マウス可変領域または超可変領域とヒト定常領域または定常フレームワーク領域および可変フレームワーク領域とを結合する抗体をいう。本明細書中で使用されるように、用語「ヒト化抗体」は、親抗体由来の抗原結合CDRのみをヒトフレームワーク領域と共同して保有する抗体をいう（Walldmann (1991) Science 252:1657参照）。マウス抗体の結合特異性を保有するこのようなキメラ抗体またはヒト化抗体は、本発明に従い、診断、予防または治療の適用のためにインビボで投与された場合に、低減された免疫原性を有することが期待される。

40

## 【0101】

代替の実施形態に従い、本発明のモノクローナル抗体は、二重特異性抗体、または多重特異性抗体の形態に改変され得る。用語「二重特異性抗体」は、（a）細胞表面抗原および（b）効果細胞の表面上のFcレセプターに、結合するかまたはこれらと相互作用する、2つの異なる結合特異性を有する任意の薬剤（例えば、タンパク質、ペプチド、またはタンパク質複合体もしくはペプチド複合体）を含むことを意図する。用語「多重特異性抗体」は、（a）細胞表面抗原、（b）効果細胞の表面上のFcレセプターおよび（c）少なくとも1つの他の成分に、結合するかまたはこれらと相互作用する、2つより多くの異なる結合特異性を有する任意の薬剤（例えば、タンパク質、ペプチド、またはタンパク質

50

複合体もしくはペプチド複合体)を含むことを意図する。従って、本発明は、細胞表面抗原(P S M Aのような)および効果細胞上のF cレセプターに関する、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、および他の多重特異性抗体を含むが、これらに限定されない。用語「二重特異性抗体」は、さらにジアボディー(d i a b o d y)を含む。ジアボディーは、V<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現するが、同じ鎖上で2つのドメインの間で対を形成するには短すぎるリンカーを使用し、それによってそのドメインを他の鎖の相補ドメインと対にさせ、2つの抗原結合部位を作る、二価の二重特異性抗体である(H o l l i g e r, P. ら(1993) P r o c. N a t l . A c a d. S c i. U S A 90:6444-6448; P o i j a k, R. J. ら(1994) S t r u c t u r e 2:1121-1123を参照のこと)。

10

#### 【0102】

二重特異性抗体は、P S M Aの細胞外ドメインに特異的な抗原結合領域および殺腫瘍性または腫瘍阻害活性を有する効果細胞に特異的な抗原結合領域で形成され得る。二重特異性抗体の2つの抗原結合領域は、化学的に連結されるか、または二重特異性抗体を産生するために遺伝的に操作された細胞によって発現され得るかのどちらかである(F a n g e r ら(1995) D r u g N e w s & P e r s p e c. 8(3):133-137を一般的に参照)。殺腫瘍性活性を有する適した効果細胞としては、細胞傷害性T細胞(主としてC D 8<sup>+</sup>細胞)、ナチュラルキラー細胞、などが挙げられるが、これらに限定はされない。本発明に従う有効量の二重特異性抗体を、前立腺癌患者に投与し、そして二重特異性抗体が、P S M Aを抱える一次腫瘍または転移腫瘍の部位で局在化した後の悪性細胞を殺しそして/または悪性細胞の増殖を阻害する。

20

#### 【0103】

特定の実施形態において、抗体はヒト抗体である。用語「ヒト抗体」は、本明細書中で使用されるように、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の可変領域および定常領域を有する抗体を含むことを意図する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列にコードされないアミノ酸残基を含み得る(例えば、ランダムなもしくは部位特異的なインビトロの変異誘発によって、またはインビボの体細胞変異によって誘導された変異)。しかし、用語「ヒト抗体」は、本明細書中で使用されるように、別の哺乳類の種(マウスのような)の生殖細胞系由来であるC D R配列が、ヒトフレームワーク配列上にグラフトされている抗体を含むことを意図しない(本明細書中の「ヒト化抗体」を参照)。P S M Aに関連するヒト抗体は、マウスの系よりむしろヒト免疫系の部分を保有するトランスジェニックマウスを使用して産生される。

30

#### 【0104】

完全なヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子座の大部分についてトランスジェニックのマウスを免疫することによって、調製し得る。例えば、米国特許出願第5, 591, 669号、同第5, 598, 369号、同第5, 545, 806号、同第5, 545, 807号、同第6, 150, 584号、およびこれらの中で引用された参考文献(本明細書中に内容が参考として援用される)を参照。これらの動物は、内因性の(例えばマウスの)抗体の産生において機能的な欠失が存在するように、遺伝的に改変されている。動物は、これらの動物の免疫化が目的の抗原に対する完全なヒト抗体の産生を生じるようなヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含むように、さらに改変される。これらのマウス(例えば、X e n o M o u s e (A b g e n i x)、H u M A b マウス(M e d a r e x / G e n P h a r m))の免疫化に続き、モノクローナル抗体を、標準的ハイブリドーマ技術に従って調製する。これらのモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリンアミノ酸配列を有し、従って、ヒトに投与した場合に、ヒト抗マウス抗体(H A M A)反応を起こさない。

40

#### 【0105】

好ましくは、最初の免疫化においてマウスは6~16週齢である。例えば、P S M A抗原(例えば、組換えP S M AまたはP S M A発現細胞)の精製または富化された調製物を、マウスに腹腔内(I P)的に免疫するために使用するが、当業者に公知の他の免疫法も

50

可能である。PSMA抗原を、アジュバント（例えば、フロイント完全アジュバント）との組み合わせで注射し、そして好ましくは、最初の注射に続き、アジュバント（例えば、フロイント不完全アジュバント）中の抗原で追加免疫する。免疫応答を、例えば眼窩後方（retroorbital）採血により得た血漿サンプルの免疫化プロトコールを通して、モニターする。血漿を、ELISA（以下で記載するように）によりスクリーニングし、そして十分な力価の抗PSMAヒト免疫グロブリンを有するマウスを、融合に使用する。マウスを屠殺および脾臓摘出の3日前に、抗原で静脈に追加免疫する。

#### 【0106】

特定の実施形態において、抗体が、本明細書中において、以下のように呼ばれるハイブリドーマにより産生される：PSMA 3.7 (PTA-3257)、PSMA 3.8、PSMA 3.9 (PTA-3258)、PSMA 3.11 (PTA-3269)、PSMA 5.4 (PTA-3268)、PSMA 7.1 (PTA-3292)、PSMA 7.3 (PTA-3293)、PSMA 10.3 (PTA-3247)、PSMA 1.8.3 (PTA-3906)、PSMA A3.1.3 (PTA-3904)、PSMA A3.3.1 (PTA-3905)、Abgenix 4.248.2 (PTA-4427)、Abgenix 4.360.3 (PTA-4428)、Abgenix 4.7.1 (PTA-4429)、Abgenix 4.4.1 (PTA-4556)、Abgenix 4.177.3 (PTA-4557)、Abgenix 4.16.1 (PTA-4357)、Abgenix 4.22.3 (PTA-4358)、Abgenix 4.28.3 (PTA-4359)、Abgenix 4.40.2 (PTA-4360)、Abgenix 4.48.3 (PTA-4361)、Abgenix 4.49.1 (PTA-4362)、Abgenix 4.209.3 (PTA-4365)、Abgenix 4.219.3 (PTA-4366)、Abgenix 4.288.1 (PTA-4367)、Abgenix 4.333.1 (PTA-4368)、Abgenix 4.54.1 (PTA-4363)、Abgenix 4.153.1 (PTA-4388)、Abgenix 4.232.3 (PTA-4389)、Abgenix 4.292.3 (PTA-4390)、Abgenix 4.304.1 (PTA-4391)、Abgenix 4.78.1 (PTA-4652)、およびAbgenix 4.152.1 (PTA-4653)。これらのハイブリドーマは、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関する、ブダペスト条約の要件に従い、かつこれを満たし、国際寄託当局であるAmerican Type Culture Collection (「ATCC」)に寄託され、上の表1において示した特許寄託指定を与えられた。

#### 【0107】

本発明は、さらに抗PSMA抗体をコードする核酸分子および本明細書中で記載した核酸分子を含むベクターを、提供する。提供されるベクターは、本明細書中で記載する抗体の特異性を有する抗PSMA抗体を産生するための宿主細胞の形質転換またはトランスフェクトに使用し得る。好ましい実施形態において、産生された抗体は、以下の抗体の特異性を有する：AB-PG1-XG1-006、AB-PG1-XG1-026、AB-PG1-XG1-051、AB-PG1-XG1-069、AB-PG1-XG1-077およびPSMA 10.3。一実施形態において、ベクターは、コード領域または図2～図7に示す核酸配列の領域を含む核酸分子にコードされる、上に列挙した抗体の重鎖をコードする、単離された核酸分子を含み得る。別の実施形態において、ベクターは、配列番号8～13に示す抗体の軽鎖をコードする核酸配列を含み得る。さらなる実施形態において、本発明のベクターは、重鎖配列および軽鎖配列を含み得る。さらなる実施形態において、本明細書中で記載した抗体または抗原結合フラグメントを産生するプラスミドが、与えられる。本発明のプラスミドは、以下からなる群より選択されるプラスミドを含む：AB-PG1-XG1-006重鎖（配列番号2）、AB-PG1-XG1-006軽鎖（配列番号8）、AB-PG1-XG1-026重鎖（配列番号3）、AB-PG1-XG1-026軽鎖（配列番号9）、AB-PG1-XG1-051重鎖（配列番号4）、A

B-PG1-XG1-051 軽鎖（配列番号10）、AB-PG1-XG1-069 重鎖（配列番号5）、AB-PG1-XG1-069 軽鎖（配列番号11）、AB-PG1-XG1-077 重鎖（配列番号6）、AB-PG1-XG1-077 軽鎖（配列番号12）、PSMA 10.3 重鎖（配列番号7）、および PSMA 10.3 κ（配列番号13）。

#### 【0108】

単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、好ましくはその PSMA を発現している生細胞を結合する能力により、選択される。PSMA を発現している生細胞へのモノクローナル抗体の結合を実証するため、フローサイトメトリーが、使用され得る。例えば、（標準増殖条件下で増殖した）PSMA 発現細胞株または PSMA を発現している前立腺癌細胞を、0.1% Tween 80 および 20% マウス血清含有の PBS 中で種々の濃度のモノクローナル抗体と混合し、37℃で1時間インキュベートする。洗浄後、細胞を、フルオレセイン標識抗ヒト IgG 二次抗体（ヒト抗 PSMA 抗体を使用した場合）と、1次抗体染色と同じ条件下で反応させる。サンプルを、蛍光活性化セルソーター（FACS）装置で、単独の細胞を通すために、光および側方散乱特性を使用して分析する。蛍光鏡検を使用した代替のアッセイが、（フローサイトメトリアッセイに加えてまたはその代わりに）使用され得る。細胞は、まさに上で記載したように染色され得、蛍光顕微鏡によって試験され得る。この方法は、個々の細胞を可視化させ得るが、抗原の密度に依存して低下した感度を有し得る。

10

#### 【0109】

抗体またはその抗原結合フラグメントの PSMA を発現している生細胞への結合は、細胞の増殖を阻害し得るか、または細胞溶解を媒介し得る。細胞溶解は、補体により媒介され得るか、または効果細胞によって媒介され得る。好ましい実施形態において、細胞溶解は、生きた生物、好ましくは哺乳類において起こり、そして生細胞は、腫瘍細胞である。本発明の抗体が標的にし得る腫瘍の例としては、前立腺、膀胱、膵臓、肺、結腸、腎臓、黒色腫および肉腫のような、PSMA を発現している任意の腫瘍が挙げられる。好ましい実施形態において、腫瘍細胞は、前立腺癌細胞である。

20

#### 【0110】

クロム放出アッセイによる抗体細胞溶解活性のインビトロでの試験が、インビボモデルを試験するのに先立つ最初のスクリーニングを提供し得る。この試験は、標準的クロム放出アッセイを使用して実行され得る。簡潔には、健康なドナー由来の多形核細胞（PMN）、または他の効果細胞を、フィコール水溶性剤密度遠沈法（Ficoll Hypaque density centrifugation）、続いて混入赤血球の溶解により、精製し得る。洗浄した PMN は、10% 熱不活性化ウシ胎仔血清を補充した RPMI 中に懸濁され得、そして種々の効果細胞対腫瘍細胞（効果細胞：腫瘍細胞）の割合において、PSMA を発現している  $^{51}\text{Cr}$  標識細胞と混合され得る。次いで、精製された抗 PSMA IgG は、種々の濃度で添加され得る。無関係な IgG が、ネガティブコントロールとして使用され得る。アッセイは、0~120 分間、37℃で実行され得る。サンプルは、培養上清への  $^{51}\text{Cr}$  放出を測定することによって、細胞溶解についてアッセイされ得る。抗 PSMA モノクローナル抗体も、互いの組み合わせにおいて、細胞溶解は複数のモノクローナル抗体により増大されるか否かを決定するために、試験され得る。

30

40

#### 【0111】

PSMA に結合する抗体も、インビボモデルにおいて（例えばマウスにおいて）PSMA 発現細胞（例えば、腫瘍細胞）の細胞溶解の媒介および細胞の殺傷におけるその有効性を決定するために試験され得る。これらの抗体を、例えば、排他的であることを意図しない以下の診断基準に基づいて、選択し得る：

1) PSMA を発現している生細胞への結合；

2) PSMA への高い結合親和性；

3) PSMA 上の独特なエピトープへの結合（組み合わせにおいて使用した場合に、相補的な活性を有する抗体が同じエピトープへの結合に競合する可能性を排除する）；

50

- 4) P S M A 発現細胞のオプソニン作用；
- 5) 効果細胞存在下での増殖阻害の媒介、P S M A 発現細胞の食作用および／または細胞殺傷；
- 6) N A A L A D a s e、フォレートヒドロラーゼ、ジペプチジルペプチダーゼ I V および／または  $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼの活性の調節（阻害または増大）；
- 7) 効果細胞非存在下での増殖阻害、細胞周期阻止、および／または細胞傷害性；
- 8) P S M A のインターナリゼーション；
- 9) P S M A 上のコンフォメーションエピトープへの結合；
- 10) P S M A を発現しない細胞または組織に対する最小限の交叉反応性；および
- 11) 単量体形態の P S M A よりダイマー形態の P S M A への優先的な結合。

10

**【0112】**

本発明の好ましい抗体は、これらの基準の1つ以上、好ましくは全てを満たす。特定の実施形態において、抗体は、例えば、2つ以上の異なった抗 P S M A 抗体またはその結合フラグメントを含む薬学的組成物のように、組み合わせで使用される。例えば、異なった、しかし相補的な活性を有する抗 P S M A 抗体は、望ましい治療または診断効果を達成するために、単一の治療において組み合わせられ得る。この事例は、効果細胞の存在下において、標的細胞の高度に効果的な殺傷を媒介する抗 P S M A 抗体を、P S M A 発現細胞の増殖を阻害する別の抗 P S M A 抗体と組み合わせる含む組成物である。

**【0113】**

本発明の好ましい局面において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、P S M A 分子の細胞外ドメイン内のコンフォメーションエピトープに結合する。選択されたヒト抗 P S M A 抗体が、コンフォメーションエピトープに結合するか否かを決定するため、それぞれの抗体は、ネイティブなタンパク質（例えば、非変性免疫沈降、細胞表面結合のフローサイトメトリー分析）、および変性タンパク質（例えば、ウェスタンブロット、変性タンパク質の免疫沈降）を使用したアッセイにおいて試験され得る。結果の比較は、抗体が、コンフォメーションエピトープに結合するか否かを示す。ネイティブタンパク質には結合するが変性タンパク質には結合しない抗体は、コンフォメーションエピトープに結合する抗体であり、そして好ましい抗体である。

20

**【0114】**

選択されたヒト抗 P S M A 抗体が、優先的に（すなわち、選択的にかつ／または特異的に）P S M A ダイマーに結合するか否かを決定するため、それぞれの抗体は、ネイティブなダイマー P S M A タンパク質および解離単量体 P S M A タンパク質を使用したアッセイ（例えば、免疫沈降とそれに続くウェスタンブロットティング）において試験され得る。結果の比較は、抗体が、優先的にダイマーまたはモノマーに結合するか否かを示す。P S M A ダイマーに結合するが単量体 P S M A に結合しない抗体は、好ましい抗体である。

30

**【0115】**

好ましい抗体としては、第二抗体のその P S M A 上の標的エピトープへの特異的結合を競合的に阻害する抗体が挙げられる。競合阻害を決定するために、当業者に公知の種々のアッセイが、使用され得る。例えば、実施例4および21に示される交叉競合アッセイは、抗体が別の抗体による P S M A への結合を競合的に阻害するか否かを決定するために使用され得る。これらの実施例は、フローサイトメトリーまたは固相結合分析を使用した細胞ベースの方法を提供する。細胞の表面上に発現されない P S M A 分子に対して交叉競合する抗体の能力を評価する、他の固相におけるアッセイまたは液相におけるアッセイもまた、使用され得る。これらのアッセイは、好ましくは本明細書中で記載される P S M A マルチマーを使用する。

40

**【0116】**

特定の好ましい抗体は、第二抗体のその P S M A 上の標的エピトープへの特異的結合を、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%、競合的に阻害する。阻害は、種々のモル比率または質量比率で評価され得る；例えば競合的結合実験は、第二抗体に対して2倍、3倍、4倍、5倍、

50

7 倍、10 倍以上にモル過剰な、第一抗体によって、実施される。

#### 【0117】

他の好ましい抗体としては、第二抗体によって規定される P S M A 上のエピトープに、特異的に（すなわち選択的に）結合する抗体が挙げられる。エピトープを決定するため、当該分野に公知である標準的エピトープマッピング方法を、使用され得る。例えば、第二抗体を結合する P S M A 抗原のフラグメント（ペプチド）（好ましくは合成ペプチド）を、候補抗体が同じエピトープを結合するか否かを決定するために使用され得る。直鎖状エピトープに対して、規定された長さ（例えば、8 アミノ酸以上）の折り重ねペプチドが、合成される。ペプチドは、好ましくは 1 アミノ酸でオフセットされ、P S M A タンパク質配列のあらゆる 8 アミノ酸のフラグメントを含む一連のペプチドが、調製される。例えば、2 または 3 アミノ酸の、より大きなオフセットを使用するペプチドは、殆ど調製されない。加えて、より長いペプチド（例えば、9 ～、10 ～、11 ～マーのペプチド）が、合成され得る。ペプチドの抗体への結合は、表面プラスモン共鳴（B I A C O R E；実施例 22 参照）および E L I S A アッセイを含む標準的方法論を使用して決定され得る。コンフォメーションエピトープの試験のために、より大きな P S M A フラグメントが、使用され得る。コンフォメーションエピトープを決定するために、質量分析法を使用する他の方法が、記載されており、使用され得る（例えば、B a e r g a - O r t i z ら, P r o t e i n S c i e n c e 11:1300-1308 (2002) およびここで引用された参考文献を参照）。エピトープ決定のためのなお他の方法が、標準的実験室参考研究（例えば、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y, C o l i g a n ら, eds., John Wiley & Sons の、Unit 6.8 (“Phage Display Selection and Analysis of B-cell Epitope”) および Unit 9.8 (“Identification of Antigenic Determinants Using Synthetic Peptide Combinatorial Libraries”)）において、提供される。エピトープは、公知のエピトープ中へ点変異または点欠失を導入すること、次いで、どの変異が抗体の結合を減少させたかを決定するために 1 つ以上の抗体との結合を試験することにより、確認され得る。

#### 【0118】

本発明の一実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、細胞上に発現する P S M A に結合し、P S M A により内在化する。抗体またはその抗原結合性フラグメントが前立腺特異的膜抗原により内在化するメカニズムは、本発明の診療にとって致命的ではない。例えば、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、P S M A の内在化を誘導し得る。あるいは、抗体またはその抗原結合性フラグメントの内在化は、慣用的な P S M A の内在化の結果であり得る。抗体またはその抗原結合性フラグメントは、非改変形態で、単独または他の組成物との組み合わせで、使用され得る。あるいは、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、抗体またはその抗原結合性フラグメントの前立腺特異的膜抗原への結合および前立腺特異的膜抗原との生物学的薬剤の内在化の際に、細胞を殺傷するのに効果的な基質に、結合され得る。

#### 【0119】

本発明のヒト P S M A 抗体は、細胞表面 P S M A および／またはナノモル濃度未満の親和性を有する r s P S M A を特異的に結合する。本発明のヒト P S M A 抗体は、約  $1 \times 10^{-9}$  M 以下、好ましくは約  $1 \times 10^{-10}$  M 以下、より好ましくは  $1 \times 10^{-11}$  M 以下の結合親和性を有する。特定の実施形態において、結合親和性は、約  $5 \times 10^{-10}$  M 未満である。

#### 【0120】

抗体は、検出可能マーカー、抗腫瘍剤または免疫調節物と連結され得る。抗腫瘍剤は、細胞傷害性薬剤および腫瘍新生血管系に対して作用する薬剤を含み得る。検出可能マーカーとしては、例えば、放射性マーカーまたは蛍光マーカーが挙げられる。細胞傷害性薬剤としては、細胞傷害性放射性核種、化学毒素、そしてタンパク質毒素が挙げられる。

## 【0121】

細胞傷害性放射性核種または放射線療法同位体は、好ましくは以下のような $\alpha$ 線放出同位体である： $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{224}\text{Ra}$ または $^{223}\text{Ra}$ 。あるいは、細胞傷害性放射性核種は、以下のような $\beta$ 線放出同位体であり得る： $^{186}\text{Rh}$ 、 $^{188}\text{Rh}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ または $^{166}\text{Ho}$ 。さらに、細胞傷害性放射性核種は、オーグ電子または低エネルギー電子を放出し得、そして $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ または $^{77}\text{Br}$ の同位体を含む。

## 【0122】

適切な化学毒素または化学療法化学療法薬剤としては、カリケラミシンおよびエスペラミシンのようなエネジエン (enedi yne) ファミリーの分子のメンバーが挙げられる。化学毒素はまた、メトトレキサート、ドキソルビシン、メルファラン、クロラムブシル、ARA-C、ビンデシン、マイトマイシンC、シスプラチン、エトポシド、ブレオマイシンおよび5-フルオロウラシルからなる群から選択し得る。本発明の抗PSMA抗体と共役し得る他の抗腫瘍剤は、ドラスタチン (米国特許第6, 034, 065号および第6, 239, 104号) およびその誘導体を含む。特に興味深いものはドラスタチン10 (ドラバリナーバリンドライソロウインードラプロインードラフェニン (dolavalline-valine-dolaisoleuine-dolaproine-dolaphenine)) および誘導体オーリスタチンPHE (ドラバリナーバリンドライソロウインードラプロインードラフェニルアラニン-メチルエステル (dolavalline-valine-dolaisoleuine-dolaproine-phenylalanine-methyl ester)) (Pettit, G. R. ら, Anticancer Drug Des. 13 (4): 243-277 (1998); Woyke, T. ら, Antimicrob. Agents Chemother. 45 (12): 3580-3584 (2001))、およびオーリスタチンEなどである。本発明の組成物および方法においてあまり好ましくない毒素としては、毒性レクチン、植物毒素 (例えば、リシン毒素、アブリン毒素、モデクシン (modeccin) 毒素、ボツリヌス毒素およびジフテリア毒素) が挙げられる。無論、種々の毒素の組み合わせがまた、1抗体分子と結合され得、それによって変動する細胞傷害性と適応する。他の化学療法薬剤は、当業者に公知である。

## 【0123】

本発明のPSMA抗体の毒物結合体形態は、PSMA発現細胞の特異的細胞殺傷を、ピコモル濃度の濃度で媒介する。本発明の毒物結合PSMA抗体は、約 $1 \times 10^{-10}$  M未満 (好ましくは約 $1 \times 10^{-11}$  M未満、より好ましくは約 $1 \times 10^{-12}$  M未満) の濃度において、 $\text{IC}_{50}$ を示す。特定の実施形態において、約 $1.5 \times 10^{-11}$  M未満の濃度において、 $\text{IC}_{50}$ が、達成される。

## 【0124】

腫瘍血管構造に対して作用する薬剤は、コンプレスタチンA4 (combrestatin A4) (Griggsら, Lancet Oncol. 2: 82 (2001))、アンギオスタチン (angiostatin) およびエンドスタチン (Rosen, Oncologist 5: 20 (2000) における概説 (本明細書中に参考として援用される)) のようなチューブリン結合薬剤ならびにインターフェロン誘導タンパク質10 (米国特許第5, 994, 292号) を含む得る。現在の臨床的試行における、多くの抗脈管形成剤も、企図される。現在の臨床的試行における薬剤としては、以下が挙げられる: 2ME2、アンギオスタチン、アンギオザイム (Angiozyme)、抗VEGF RhuMAb、Apra (CT-2584)、アビシン (Avicine)、ベネフィン (Benefin)、BMS275291、カルボキシアミドトリアゾール (Carboxyamidotriazole)、CC4047、CC5013、CC7085、CDC801、CGP-41251 (PKC 412)、CM101、コンプレスタチンA-4プロドラッグ、EMD121974、エンドスタチン、フラボピリドール (Flavop

10

20

30

40

50

iridol)、ゲニステイン(Genistein)(GCP)、緑茶抽出物、IM-862、ImmTher、インターフェロン $\alpha$ 、インターロイキン12、イレッサ(Iressa)(ZD1839)、マリマスタット(Marimastat)、メタスタット(Metastat)(Col-3)、ネオバスタット(Neovastat)、オクトレオチド(Octreotide)、パクリタキセル、ペニシラミン、フォトフリン(Photofrin)、フォトポイント(Photopoint)、PI-88、プリノマスタット(Prinomastat)(AG-3340)、PTK787(ZK22584)、RO317453、ソリマスタット(Solimastat)、スクアラミン、SU101、SU5416、SU-6668、スラジスタ(Suradista)(FCE 26644)、スラミン(メタレート(Metarete))、テトラチオモリブデート、サリドマイド、TNP-470およびビタキシン(Vitaxin)。さらなる抗脈管形成剤は、Kerbel, J. Clin. Oncol. 19(18s):45s-51s(2001)(本明細書中に参考として援用される)によって記載される。抗PSMA抗体との結合に適した免疫調節因子としては、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\gamma$ -インターフェロン、および腫瘍壊死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )が挙げられる。

10

#### 【0125】

1つ以上の毒素分子の抗PSMA抗体との結合は、多くの化学的メカニズムを含むことが構想され、これらとしては、共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合、および複合体化が挙げられる。抗PSMA免疫毒素の調製に使用される毒素化合物は、当該分野に公知の標準的プロトコールにより、抗体またはそのPSMA結合フラグメントに結合される。

20

#### 【0126】

共有結合は、存在する側鎖の縮合または外架橋分子(external bridging molecule)の取り込みのいずれかによって達成され得る。多くの2価または多価の薬剤が、タンパク質分子の他のタンパク質、ペプチドまたはアミン官能基などとの結合において、有用である。例えば、文献は、カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド、ジアゾベンゼン、およびヘキサメチレンジアミンのような結合薬剤でいっぱいである。この一覧は、当該分野に公知である種々の結合薬剤を網羅することを意図しないが、むしろ、より通常の結合薬剤の例である。

#### 【0127】

好ましい実施形態において、まず抗体の誘導体化を望み得、次いで毒素成分をこの誘導体化産物に結合することが企図される。この様式における使用のために適切な架橋剤としては、例えば、SPDP(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)、およびSMPT、4-スクシンイミジル-オキシカルボニル-メチル-(2-ピリジルジチオ)トルエンが挙げられる。

30

#### 【0128】

さらに、タンパク質毒素は、ハイブリッド免疫毒素融合タンパク質を形成する遺伝的方法により、抗PSMA抗体またはPSMA結合フラグメントに融合され得る。本発明に従って、融合免疫毒素タンパク質を作製するため、抗PSMA抗体、抗PSMA抗体のフラグメント、単鎖抗PSMA抗体、またはタンパク質毒素と連結した抗PSMA抗体のサブユニットをコードする核酸分子が、生成される。このような融合タンパク質は、少なくとも標的薬剤(例えば、抗PSMA抗体サブユニット)および、作動可能に結合する、本発明の毒素を含む。融合タンパク質は、標的薬剤および毒素化合物に作動可能に結合するペプチドスペーサーのような追加のペプチド配列もまた、含み得る(このような追加の配列が標的活性または融合タンパク質の毒素活性に相当に影響しない限り)。2つのタンパク質は、グリシン-セリンスペーサーペプチド、またはペプチドヒンジのように、当該分野で公知であるような、ペプチドリンカーまたはスペーサーにより結合され得る。従って、例えば、抗PSMA抗体またはそのフラグメントのC末端は、タンパク質毒素分子のN末端に融合し、抗PSMA抗体の結合特性を保有する、免疫毒素を形成し得る。他の融合配置は、当業者に公知である。

40

50

【 0 1 3 0 】

20

## 40

本発明の薬学的組成物は、組み合わせ療法（すなわち、他の薬剤と組み合わせられた療法）においても、投与され得る。例えば、組み合わせ療法としては、少なくとも1つの抗腫瘍剤、免疫調節因子、免疫刺激剤、または他の従来療法を含む本発明の組成物が挙げられ得る。この薬剤は、P S M A発現細胞へこの薬剤が指向された標的化のために、本発明のP S M A抗体と、結合されるか、もしくは結合体化されるか、または組換え融合分子として形成され得る。

## 50

への送達のための標的部分として使用され得る。p 5 3 経路標的アデノウイルス変異体 d 1 1 5 2 0, O N Y X - 0 1 5 のような複製可能ウイルスは、選択的に腫瘍細胞を殺傷する (B i e d e r e r, C. ら, J. M o l. M e d. 8 0 ( 3 ) : 1 6 3 - 1 7 5, 2 0 0 2)。

#### 【0134】

本明細書中で使用される場合、「薬学的受容可能キャリア」または「生理学的受容可能キャリア」としては、任意および全ての塩、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤または吸収遅延剤などが挙げられ、これらは、生理学的に適合性である。好ましくは、このキャリアは、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄、または表皮の投与（例えば、注射または輸液による）に適する。投与の経路に依存して、活性化合物（すなわち、抗体）は、化合物を不活性化し得る酸および他の自然条件の作用から化合物を保護するために物質内にコートされ投与され得る。

10

#### 【0135】

投与される場合、本発明の薬学的調製物は、薬学的受容可能量および薬学的受容可能組成物において、適用される。用語「薬学的受容可能」は、活性成分の生物学的活性の有効性に干渉しない、非毒性物質を意味する。このような調製物は、塩、緩衝剤、保存薬、適合性キャリア、および任意の他の治療剤（アジュバント、ケモカインおよびサイトカインを含む補充免疫増強剤）を、慣用的に含み得る。医薬中で使用される場合、塩は薬学的に受容可能であるべきである。しかし、薬学的受容不可能な塩は、その薬学的受容可能塩の調製に都合よく使用され得、本発明の範囲から除外されない。

20

#### 【0136】

塩は、親化合物の望ましい生物学的活性を保有し、任意の所望されない毒物学的効果を与えない（例えば、B e r g e, S. M. ら (1977) J. P h a r m. S c i. 6 6 : 1 - 1 9 を参照のこと）。このような塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、非毒性無機酸（例えば、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸など）由来の塩、および非毒性有機酸（例えば、脂肪族モノカルボン酸および脂肪族ジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族スルホン酸および芳香族スルホン酸など）由来の塩が挙げられる。塩基付加塩としては、アルカリ土類金属（例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなど）由来の塩、および非毒性有機アミン（例えば、N, N' - ジベンジルエチレンジアミン、N - メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなど）由来の塩が挙げられる。

30

#### 【0137】

抗 P S M A 抗体組成物は、所望の場合、薬学的受容可能キャリアと組み合わせられ得る。本明細書中で使用される場合、用語「薬学的受容可能キャリア」は、人に投与するのに適する、1つ以上の適合した固体または液体充填剤、賦形剤またはカプセル化物質を意味する。用語「キャリア」は、有機成分または無機成分、天然のまたは合成の、活性成分が適用を促進するために組み合わせられる、成分を意味する。薬学的組成物の構成要素もまた、望ましい薬学的効能を実質的に損なう相互作用のないような様式において、本発明の分子と一緒に混合され得、そして互いに混合され得る。

40

#### 【0138】

薬学的組成物は、以下を含む適した緩衝剤を含み得る：塩中の酢酸；塩中のクエン酸；塩中のホウ酸；および塩中のリン酸。

#### 【0139】

薬学的組成物は、必要に応じて、適切な保存薬（例えば、塩化ベンザルコニウム；クロロブタノール；パラベンおよびチメロサル）もまた、含み得る。

#### 【0140】

薬学的組成物は、単回投薬形態中に都合よく存在し得、そして薬学分野に周知の任意の方法によって調製され得る。全ての方法は、1つ以上の付属の成分を構成する活性薬剤を、キャリアと一緒に送達する工程を包含する。一般に、組成物は、活性化合物が液体キャ

50

リア、微細に分割された固体キャリア、またはその両方と一緒に一様かつ密接に送達されることにより調製され、次いで、必要な場合、産物を成形する。

#### 【0141】

非経口投与に適した組成物は、抗PSMA抗体の水性または非水性の無菌調製物を都合よく含み、これは、好ましくは受容者の血液と等張である。この調製物は、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を使用した、公知の方法に従って処方され得る。無菌の注射可能な調製物はまた、非毒性の非経口受容可能賦形薬または溶媒中の無菌の注射可能な溶液または懸濁液（例えば、1，3-ブタンジオール中の溶液）であり得る。受容可能ビヒクルおよび溶媒において、水、リンガー液、および等張塩化ナトリウム水溶液が、使用され得る。さらに、無菌の不揮発性油は、従来、溶媒または懸濁媒体として使用される。この目的について、任意のブランドの不揮発性油（合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む）が、使用され得る。さらに、オレイン酸のような脂肪酸が、注射可能な調製物において使用され得る。経口投与、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与などに適したキャリア処方物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PAにおいて、見出され得る。

10

#### 【0142】

活性化化合物は、急速な放出から化合物を保護するキャリアと共に調製され得る（例えば移植片、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化された送達系を含む放出制御処方物）。生分解性の、生物適合性のポリマー（例えば、エチレンビニルアセテート、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）が、使用され得る。このような処方物の調製のための多くの方法は、特許化されているか、または、一般に当業者に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978)を参照。

20

#### 【0143】

本発明の治療は、注射を含む、任意の従来経路または時間をかけた漸次の輸液によって投与され得る。投与は、例えば、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、管腔内（intracavity）、腫瘍内、または経皮膚であり得る。抗体が治療に使用される場合、好ましい投与経路としては、静脈内経路および肺のエアロゾルによる経路が挙げられる。抗体を含むエアロゾル送達系の調製のための技術は、当業者に周知である。一般に、このような系は、抗体の生物学的特性（例えば、パレート結合能力）（例えば、SciarrasおよびCutie, "Aerosols", in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition (1990) pp. 1694-1712を参照。これは、本明細書中で参考として援用される）を有意に損なわない構成要素を、利用するべきである。当業者は、抗体エアロゾルを産生するための種々のパラメータおよび条件を、過度の実験に頼ることなく、容易に決定し得る。

30

#### 【0144】

本発明の組成物は、有効量において投与される。「有効量」は、単独で、またはさらなる用量と共に、抗PSMA抗体組成物の、望ましい応答（例えば、被験体における例えば悪性疾患の処置）を産生する量である。この応答は、疾患の進行を時間的に遅らせることのみを含み得るが、より好ましくは、永遠に疾患の進行を停止することを含む。この応答を、慣用的方法によってモニターし得る。疾患または症状の処置への望ましい応答はまた、疾患または症状の発症を遅らせること、または発症を防ぐことでさえあり得る。

40

#### 【0145】

このような量は、無論、処置される特定の状態、状態の重篤度、年齢、身体状態、身長および体重を含む個々の患者のパラメータ、処置の期間、（もしあれば）同時治療の性質、特定の投与経路などの、保健医師の知見および専門技術の範囲内の因子に依存する。これらの因子は、当業者に周知であり、そしてただの慣用的実験だけで取り込まれ得る。一

50

般的に、個々の構成要素またはそれらの組み合わせの最高用量（妥当な医療判断に従った安全な最高の用量）が使用されることが好ましい。当業者に理解されることであるが、患者は医学的理由、心理学的理由または事実上任意の他の理由により、より低用量または耐えられる用量を主張し得る。

#### 【0146】

上述の方法において使用される薬学的組成物は、好ましくは無菌であり、有効量の抗PSMA抗体を、患者への投与に適した質量単位または容量単位において望ましい応答を生成するために含有する。応答は、例えば、抗PSMA抗体組成物の生理学的効果（腫瘍の後退または疾患症状の減少のような効果）の決定により、測定され得る。他のアッセイは、当業者に公知であり、そして応答レベルの測定のために使用され得る。

10

#### 【0147】

被験体に投与される抗PSMA抗体の用量は、異なったパラメータに従って（特に、使用された投与の様式および被験体の状態に従って）選択され得る。他の因子としては、望ましい処置期間が挙げられる。適用された最初の用量において、被験体における応答が不十分である場合、より高い用量（または異なった、より局在化した送達経路による、効果的に高い用量）が、患者の許容限界の範囲で使用され得る。

#### 【0148】

一般に、用量は、約 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ から約 $100,000\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲に及び得る。組成物に基づき、用量は、連続的ポンプなどにより連続的に送達され得、または定期的間隔において送達され得る。多用量の特定の組成物の望ましい時間間隔は、当業者により、過度の実験なしで決定され得る。用量、投与計画、投与部位、投与様式などを上述の記載から変更する場合の、抗PSMA抗体組成物の投与のための他のプロトコルは、当業者に公知である。

20

#### 【0149】

一般に、本発明の抗PSMA抗体により送達される放射性核種の用量は、約 $0.01\text{mCi}/\text{kg}$ から約 $10\text{mCi}/\text{kg}$ までの範囲に及び得る。好ましくは、放射性核種の用量は、約 $0.1\text{mCi}/\text{kg}$ から約 $1.0\text{mCi}/\text{kg}$ までの範囲に及ぶ。与えられた同位体の最適用量は、当業者に周知の単純な慣用的力価測定実験により、実験的に決定され得る。

#### 【0150】

抗PSMA抗体組成物のヒト以外の哺乳類への投与（例えば、試験目的または獣医学的治療目的の投与）は、上で記載した条件と実質的に同じ条件下で実行される。

30

#### 【0151】

本発明のこの組成物（PSMAに対する抗体またはこれらの誘導体／結合体）は、インビトロおよびインビボでの診断および治療での有用性を有する。例えば、これらの分子は、種々の障害を処置、予防または診断するために、培養細胞（例えば、インビトロもしくはエキソビボ）または被験体（例えば、インビボ）に投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「被験体」は、ヒトおよび非ヒト動物を含むことを意図する。好ましい被験体としては、PSMA発現（代表的には、異常なPSMA発現（例えば、過剰発現））により特徴付けられる障害を有するヒト患者が挙げられる。

40

#### 【0152】

本発明の一局面は、生物学的サンプル（例えば、組織学または細胞学の標本、生検など）において、癌性細胞またはその部分を検出する方法（特に、悪性腫瘍を正常組織および非悪性腫瘍から区別する方法）に関連する。この方法は、このような細胞のPSMAの細胞外ドメインに結合する、抗体またはその抗原結合性フラグメント、プローブ、またはリガンド（例えば、抗PSMA抗体）を提供する工程を包含する。抗PSMA抗体を、抗PSMA抗体が細胞または細胞の部分へと結合した際に、細胞または細胞の部分（例えば、このような癌性細胞から放出されるPSMAまたはそのフラグメント）の検出を可能にする標識に、結合させる。生物学的サンプルを、抗PSMA抗体を生物学的サンプルにおける任意の細胞またはその部分のPSMAの細胞外ドメインに結合させることに効果的な条

50

件下で、標識抗 P S M A 抗体に接触させる。生物学的サンプルにおける任意の細胞または細胞の部分の存在は、この標識の検出によって検出される。1つの好ましい形態において、抗 P S M A 抗体と生物学的サンプルとの間の接触は、生きている哺乳類において実行される。この接触は、抗 P S M A 抗体を生物学的サンプルにおける任意の細胞または細胞の部分の P S M A へ結合させる条件下での、抗 P S M A 抗体の哺乳類への投与を含む。さらに、このような投与は、当業者に公知の任意の適した方法により、実行され得る。

#### 【0153】

さらに、本発明の抗 P S M A 抗体は、ヒトの組織、細胞および体液の標本を試験するために、免疫蛍光技術 ( i m m u n o f l u o r e s c e n c e   t e c h n i q u e ) において使用され得る。典型的なプロトコールにおいて、凍結非固定組織生検サンプルのクリオスタット切片または細胞学的塗抹を含むスライドガラスを、風乾し、ホルマリン固定またはアセトン固定し、そしてモノクローナル抗体調製物と共に湿潤チャンバ中で室温でインキュベートする。それからスライドガラスを、洗浄し、前述のモノクローナル抗体に対する二次抗体調製物と共にさらにインキュベートする。使用されるモノクローナル抗体がマウス脾臓リンパ球とマウス骨髄腫細胞株との融合物に由来する場合、通常、二次抗体は、任意の型の抗マウス免疫グロブリンである。この二次抗体は、特定の波長の蛍光を発する化合物（例えばローダミンまたはフルオレセインイソチオシアネート）によりタグ化される。次いで、サンプルにおける染色のパターンおよび強度は、蛍光顕微鏡法によって決定され、随意に写真によって記録される。

#### 【0154】

また別の代替法として、コンピューター増強蛍光画像分析またはフローサイトメトリーが、本発明の抗 P S M A 抗体を使用して組織標本または剥離細胞（すなわち、腫瘍の吸引生検からの1細胞調製物）を試験するために、使用され得る。本発明の抗 P S M A 抗体は、生きている腫瘍細胞（すなわち、前立腺腫瘍の吸引生検からの1細胞調製物）のコンピューター増強蛍光画像分析機またはフローサイトメーターによる定量において、特に有用である。本発明の抗体は、良性前立腺腫瘍を悪性前立腺腫瘍と識別するようなアッセイにおいて特に有用である。なぜなら、抗 P S M A 抗体が結合する P S M A タンパク質は、良性前立腺腫瘍と比較して増加した量で悪性腫瘍によって発現されるからである。P S M A 陽性細胞集団の百分率は、単独でまたはこれらの細胞の他の特質（例えば、これらの細胞の D N A 倍数性）の決定に関連して、疾患進行の初期指標の提供により、非常に有用な予後情報をさらに提供し得る。

#### 【0155】

また別の代替の実施形態において、本発明の抗体は、他の公知の抗体との組み合わせにおいて、癌の悪性表現型に関するさらなる情報を提供するために使用され得る。

#### 【0156】

本発明の方法は、癌性細胞またはその部分の存在に関連した疾患に関して、患者の疾患をスクリーニングするために使用され得る。あるいは、本発明の方法は、特に、このような疾患が、患者の特定の生物学的物質に局在する場合、この疾患の再発を同定するために使用され得る。例えば、前立腺窩における前立腺疾患の再発は、根治的な前立腺切除後に遭遇され得る。本発明の方法を使用して、この再発を、哺乳類への短期放射性標識抗体の投与およびその後の直腸標識検出（例えば、直腸横断検出プローブ ( t r a n s r e c t a l   d e t e c t o r   p r o b e ) を用いる）によって検出し得る。

#### 【0157】

あるいは、接触工程を、例えば、体液における P S M A の存在を検出するために、血清もしくは尿または他の体液（精液、前立腺液、射精された精液などが挙げられるが、これらに限定はされない）のサンプルにおいて、実行し得る。接触が、血清または尿のサンプルにおいて実行される場合、P S M A 以外には血液内を循環する抗原を実質的に認識しない生物学的薬剤が、好ましい。インタクトな細胞は、P S M A を細胞外環境に排出も分泌もしないため、血清、尿または他の体液における P S M A の検出は、一般に、細胞が溶解または脱落していることを示す。従って、本発明の生物学的薬剤および方法は、血清、尿

または他の体液における P S M A レベルをモニターすることによって、癌処置プロトコルの有効性を決定するために使用され得る。

【0158】

本発明による癌性細胞の検出方法の特に好ましい実施形態において、抗 P S M A 抗体またはその抗原結合性フラグメントは、このような細胞の前立腺特異的膜抗原に結合して内在化される。さらに、生物学的薬剤は、前立腺特異的膜抗原への生物学的薬剤の結合および内在化の際に、細胞またはその部分を検出させるのに効果的な標識に結合する。

【0159】

癌性細胞を検出するのに適した生物学的薬剤としては、抗 P S M A 抗体（例えば、モノクローナルまたはポリクローナル抗体）が挙げられる。さらに、抗体フラグメント、半抗体（half-antibody）、ハイブリッド誘導体、プローブ、および他の分子構築物が、利用され得る。これらの生物学的薬剤（抗体、その抗原結合性フラグメント、プローブ、またはリガンド）は、癌性細胞における前立腺特異的膜抗原またはその部分の細胞外ドメインに結合する。結果として、この生物学的薬剤は、固定された細胞またはそうでなければ細胞内抗原性ドメインが細胞外環境に露出される細胞のみにしか結合しないのではない。従って、生物学的薬剤の結合は、これらの細胞が固定されているかまたは固定されていないか、生存性かまたは壊死性かに拘わらず、前立腺細胞の存在する領域に集中する。さらにまたはあるいは、これらの生物学的薬剤は、正常細胞、良性増殖性細胞、およびずっと高い度合いで、癌性細胞において、前立腺特異的膜抗原またはその部分に結合し、そしてこれによって内在化される。

【0160】

抗体またはその抗原結合性フラグメントは、癌のインビボ治療において、利用され得る。抗体は、単独で、または結合体が投与されて局在化された後に悪性細胞もしくは悪性組織を殺傷しそして／もしくはこれらの増殖を阻害する化合物に対して直接的もしくはリンカー経由のどちらかで共有結合されて使用され得る。抗体が単独で使用される場合、抗体は、補体結合または抗体依存性細胞傷害性による腫瘍の破壊を仲介し得る。あるいは、抗体は、化学療法薬物との組み合わせで投与されて、相乗治療効果を生じ得る（Basly a および Mendelsohn (1994) Breast Cancer Res. and Treatment 29:127-138)。種々の異なった型の物質（放射性金属同位体および放射性非金属同位体、化学療法薬物、毒素など、上で記載した、当該分野に公知の物質）が、治療用途のために、抗体に直接的に結合され得る（例えば、Vitt a および Uhr (1985) Annu. Rev. Immunol. 3:197 を参照のこと）。

【0161】

本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、また、補体と共に投与され得る。従って、抗体またはその抗原結合性フラグメントおよび血清または補体を含む組成物は、本発明の範囲内に存在する。これらの組成物は、補体が、ヒト抗体またはその抗原結合性フラグメントと近位に存在することにおいて、有利である。あるいは、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントおよび補体または血清は、別々に投与され得る。

【0162】

抗体は、免疫応答を誘導または増強する1つ以上の免疫刺激剤（例えば、IL-2）および、免疫刺激性オリゴヌクレオチド（例えば、CpGモチーフを含む）と共に投与され得る。好ましい免疫刺激剤は、抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を仲介するナチュラルキラー（NK）細胞のように、免疫系の特定のアームを刺激する。

【0163】

本明細書中で記載した P S M A ダイマーのような抗原は、免疫応答を誘導または増強するために、1つ以上のアジュバントと共に投与され得る。アジュバントは、免疫応答を増強する物質である。多くの種類のアジュバントが、当該分野に周知である。アジュバントの特定の例としては、以下が挙げられる：モノホスホリルリポド A（MPL, Smith Kline Beecham）；QS21（Smith Kline Beecham）を

含むサポニン；免疫刺激性オリゴヌクレオチド（例えば、Kreigら、Nature 374:546-9 (1995)に記載されるCpGオリゴヌクレオチド）；不完全フロイントアジュバント；完全フロイントアジュバント；モンタニド（montanide）；ビタミンEおよび生分解可能な油（スクアレンおよび／またはトコフェロール、クイルA（Quil A）、Ribidex、CRL-1005、L-121）から調製される種々の油中水型乳剤およびこれらの組み合わせ。

#### 【0164】

被験体のPSMAマルチマー抗原への免疫応答を刺激する他の薬剤も、被験体に投与され得る。例えば、サイトカインも、そのリンパ球調節特性の結果として、ワクチン接種プロトコルにおいて有用である。このような目的に有用な多くのサイトカインは、当業者に公知である。このようなサイトカインとしては、以下が挙げられる：インターロイキン-2（IL-2）；IL-4；IL-5；IL-12（これらは、ワクチンの保護効果を増強することが示されてきた（例えば、Science 268:1432-1434 (1995)を参照））；GM-CSF；IL-15；IL-18；これらの組み合わせなど。従って、サイトカインは、免疫応答を高めるために、抗体、抗原、ケモカインおよび／またはアジュバントと共に投与され得る。

10

#### 【0165】

免疫応答を高めるために有用なケモカインとしては、SLC、ELC、MIP3 $\alpha$ 、MIP3 $\beta$ 、IP-10、MIG、およびこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定はされない。

20

#### 【0166】

本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、他の治療的処置様式と共に使用され得る。このような他の処置としては、外科、放射線照射、凍結外科、熱療法、ホルモン処置、化学療法、ワクチン、および他の免疫治療が挙げられる。

#### 【0167】

予防のための抗体またはその抗原結合性フラグメントを使用する工程を包含する方法も、本発明に含まれる。例えば、これらの物質は、癌の発生または進行を防ぐためまたは遅らせるために、使用され得る。

#### 【0168】

本発明の癌治療の使用は、多くの利益を有する。本発明に従う抗PSMA抗体またはその抗原結合性フラグメントは、優先的に前立腺癌細胞を標的にするため、他の組織は標的にされることを免れる。結果として、このような生物学的薬剤による処置は、とりわけ高齢の患者にとって、より安全である。本発明に従う処置は、特に効果的であることが期待される。何故なら、この処置は高レベルの抗PSMA抗体またはその抗原結合性フラグメントを、前立腺癌転移物が優勢である骨髄およびリンパ節に、直接導くからである。さらに、前立腺癌の腫瘍部位は、大きさが小さい傾向にあり、従って、細胞障害剤により容易に破壊される傾向にある。本発明に従う処置を、血清前立腺特異的抗原および／または患者の癌の病理学的特徴（病期、グリーソン評点、閏節包外浸潤、精液浸潤、小疱浸潤または神経周囲の浸潤、リンパ節に含まれる陽性縁（positive margin）などが挙げられる）のような臨床的パラメータにより、効果的にモニターし得る。あるいは、これらのパラメータは、このような処置がいつ使用されるべきかを示すために使用され得る。

30

40

#### 【0169】

本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントは生細胞に結合するので、これらの生物学的薬剤を使用した治療方法は、溶解細胞を標的にする治療法より、もっとずっと効果的である。同じ理由により、生きている正常細胞、良性増殖性細胞、または癌性細胞の局在を決定する、診断方法および画像化方法は、本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントの使用により、はるかに改善される。さらに、生細胞と死細胞とを区別する能力は、特に、特定の処置レジメンの有効性をモニターするために、有利であり得る。

#### 【0170】

50

本発明の組成物および使用説明書を含むキットも、本発明の範囲内にある。このキットは、少なくとも1つの追加の（補体のような）試薬、または1つ以上の追加の本発明の抗体（例えば、P S M A 抗原のエピトープに結合する相補的活性を有する抗体で、第一抗体と異なっている抗体）を、さらに含み得る。他のキットは、本明細書中の下で記載する、P S M A マルチマーを含み得る。

#### 【0171】

本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントを含むキットは、上で記載した免疫組織学的方法、免疫細胞学的方法および免疫血清学的方法による、癌のインビトロでの診断、予後および／またはモニタリングのために調製され得る。キットの構成要素は、水性媒質中または凍結乾燥形態のどちらかで梱包され得る。抗体またはその抗原結合性フラグメントが、（酵素または放射性金属イオンのような）標識部分の結合した結合体の形態で、キットにおいて使用される場合、このような結合体の構成要素は、完全に結合体化した形態、中間体の形態、またはキットの使用者により結合体とされるべき別々の部分のいずれかにおいて供給され得る。

10

#### 【0172】

キットは、試験管、バイアル、フラスコ、瓶、シリンジなどのような、1つ以上の容器手段または一連の容器手段を密閉した状態で受けるために区画分けされるキャリアを含み得る。第一のこの容器または一連の容器手段は、1つ以上の抗 P S M A 抗体またはその抗原結合性フラグメントまたは P S M A を、含み得る。第二の容器手段または一連の容器手段は、一次抗 P S M A 抗体（またはそのフラグメント）に結合し得る、標識またはリンカー標識中間体を含み得る。

20

#### 【0173】

インビボにおける腫瘍の局在化および治療方法における使用のための、他の化合物または物質と結合化された、抗 P S M A 抗体またはその抗原結合性フラグメントを含むキットが、調製され得る。キットの構成要素は、水性媒質中または凍結乾燥形態のどちらかで梱包され得る。抗体またはその抗原結合性フラグメントが、キットにおいて、標識または治療的部分（例えば、放射性金属イオンまたは治療薬物部分）が結合されている結合体の形態で使用される場合、このような結合体の構成要素は、完全な結合体化形態、中間体の形態、またはキットの使用者により結合されるべき別々の部分のいずれかにおいて供給され得る。

30

#### 【0174】

本発明の一局面（P S M A の少なくとも1つの酵素活性を調節する方法）において、P S M A の酵素活性は、インビトロまたはインビボにおける、以下からなる群から選択される：N-アセチル化 $\alpha$ 結合酸性ジペプチダーゼ（N A A L A D a s e）、フォレートヒドロラーゼ、ジペプチジルジペプチダーゼ I V、および $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼの活性、またはこれらの組み合わせ。調節は、P S M A の少なくとも1つの酵素活性の増強または阻害であり得る。

#### 【0175】

好ましい実施形態において、本発明は、P S M A の少なくとも1つの酵素活性を阻害するための方法を提供する。この活性は、インビトロまたはインビボにおける以下からなる群から選択される：N-アセチル化 $\alpha$ 結合酸性ジペプチダーゼ（N A A L A D a s e）、フォレートヒドロラーゼ、ジペプチジルジペプチダーゼ I V、および $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼの活性、またはこれらの組み合わせ。この方法は、N A A L A D a s e、フォレートヒドロラーゼ、ジペプチジルジペプチダーゼ I V、および／または $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼを、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントが N A A L A D a s e、フォレートヒドロラーゼ、ジペプチジルジペプチダーゼ I V、または $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼの活性を阻害する条件下で、一定量の単離された本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントと接触させる工程を包含する。

40

#### 【0176】

N A A L A D a s e の組織レベルは、組織を界面活性剤で可溶化し、均質化し、不溶物

50

質を遠心分離によってペレットにし、残留上清におけるN A A L A D a s e活性を測定することによって決定され得る。同様に、体液におけるN A A L A D a s e活性も、細胞物質を遠心分離によって最初にペレットとする工程、および上清についてN A A L A D a s e活性の典型的な酵素アッセイを行う工程により、測定され得る。N A A L A D a s e酵素アッセイは、F r i e d e n ( 1 9 5 9 ) J . B i o l . C h e m . , 2 3 4 : 2 8 9 1により、記載されている。このアッセイにおいて、N A A L A D a s e酵素の反応産物は、グルタミン酸である。これは、この酵素が触媒したN-アセチルアスパルチルグルタメートの切断 (N-アセチルアスパラギン酸およびグルタミン酸を生じる) に由来する。グルタミン酸は、N A D ( P ) <sup>+</sup>要求工程において、グルタメートデヒドロゲナーゼにより触媒される反応において、2-オキシグルタレートおよびN A D ( P ) Hを生じる。反応の進行は、N A D ( P ) <sup>+</sup>のN A D ( P ) Hへの変換による340nmでの吸光度の変化により、容易かつ簡便に測定され得る。

10

**【0177】**

P S M Aのフォレートヒドロラーゼ活性を、H e s t o n他により記載された酵素アッセイ (例えば、C l i n . C a n c e r R e s . 2 ( 9 ) : 1 4 4 5 - 5 1 ( 1 9 9 6 ) ; U r o l o g y 4 9 ( 3 A S u p p l ) : 1 0 4 - 1 2 ( 1 9 9 7 ) ) を行うことにより、測定し得る。P S M Aのようなフォレートヒドロラーゼは、ポリグルタメート化フォレートからγ-連結グルタメートを除去する。フォレートヒドロラーゼ活性を、メトトレキサートトリ-γグルタメート (M T X G l u 3 )、メトトレキサートジ-γグルタメート (M T X G l u 2 ) およびプテロイルペンタグルタメート (P t e G l u 5 ) のような基質を使用して、例えばキャピラリー電気泳動 (C l i n . C a n c e r R e s . 2 ( 9 ) : 1 4 4 5 - 5 1 ( 1 9 9 6 ) を参照) を使用して、測定し得る。P S M Aのポリグルタメート化基質との、時間を定めたインキュベーションに続けて、加水分解産物の分離と検出を行う。

20

**【0178】**

本発明は、選択的にP S M Aマルチマーに結合する、単離された抗体またはその結合フラグメントも、含む。本明細書中で使用される場合、特に抗P S M A抗体および結合フラグメントによるP S M Aマルチマーの結合に関して、「選択的結合」は、抗体がP S M Aタンパク質モノマーよりも優先的にP S M Aタンパク質マルチマーに (例えば、より高いアビディティおよび/またはより高い結合親和性で) 結合することを意味する。好ましい実施形態において、本発明の抗体は、P S M Aタンパク質マルチマーに対し、この抗体がP S M Aモノマーに対して示すよりも、1. 1倍、1. 2倍、1. 3倍、1. 4倍、1. 5倍、1. 6倍、1. 7倍、1. 8倍、1. 9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、7倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、70倍、100倍、200倍、300倍、500倍、1000倍またはそれより高いアビディティおよび/または結合親和性で結合する。好ましくは、抗体は、P S M Aタンパク質マルチマーを選択的に結合し、P S M Aタンパク質モノマーは結合しない。すなわち、本質的に専らP S M Aタンパク質マルチマーにだけ結合する。最も好ましくは、抗体は、選択的にP S M Aタンパク質ダイマーを結合する。

30

**【0179】**

選択的にP S M Aタンパク質マルチマーを結合する単離された抗体または結合フラグメントは、幾つかの実施形態において、P S M Aタンパク質マルチマーの酵素活性を制御し得る。このような一実施形態において、抗体は、少なくとも一酵素活性 (N A A L A D a s e活性、フォレートヒドロラーゼ活性、ジペプチジルジペプチダーゼI V活性、γ-グルタミルヒドロラーゼ活性、またはこれらの組み合わせ) を阻害する。別の実施形態において、抗体は、少なくとも一酵素活性 (N A A L A D a s e活性、フォレートヒドロラーゼ活性、ジペプチジルジペプチダーゼI V活性、γ-グルタミルヒドロラーゼ活性、またはこれらの組み合わせ) を増大する。

40

**【0180】**

P S M Aタンパク質マルチマーは、本明細書中で使用される場合、少なくとも2つのP

50

SMAタンパク質またはそのフラグメントのタンパク質複合体である。PSMAタンパク質マルチマーは、全長PSMAタンパク質（例えば、配列番号1）、組換え可溶性PSMA（rsPSMA、例えば、配列番号1のアミノ酸44～750）およびマルチマーを形成する上述のPSMAのフラグメント（すなわち、ダイマーおよび／またはより高重合のPSMAマルチマーの形成に要求されるタンパク質ドメインを保有する）の種々の組み合わせから、構成され得る。好ましい実施形態において、マルチマーを形成する少なくとも1つのPSMAタンパク質は、組換え体の、可溶性PSMA（rsPSMA）ポリペプチドである。好ましいPSMAタンパク質マルチマーはダイマーであり、特に組換え可溶性PSMAタンパク質から形成されるダイマーである。特に好ましい実施形態は、rsPSMAホモダイマーである。

10

#### 【0181】

本明細書中で言及されるPSMAタンパク質マルチマーは、ネイティブのコンフォメーションを呈すると考えられ、好ましくは、このようなコンフォメーションを有する。特定の実施形態において、PSMAタンパク質は、非共有的に互いに結合し、PSMAタンパク質マルチマーを形成する。例えば、下の実施例で記載されるように、PSMAタンパク質は、非変性条件下で非共有的に結合し、ダイマーを形成することが発見された。

#### 【0182】

PSMAタンパク質マルチマーは、PSMAの活性を保有し得、望ましくは保有する。PSMA活性は、フォレートヒドロラーゼ活性、NAALADase活性、ジペプチジルジペプチダーゼIV活性およびγ-グルタミルヒドロラーゼ活性のような、酵素活性であり得る。マルチマーのPSMA活性を試験するための方法は、当業者に周知であり（Prostate Cancer: Biology, Genetics, and the New Therapeutics, L. W. K. Chung, W. B. IssacsおよびJ. W. Simons (eds.) Humana Press, Totowa, NJ (2000) pp. 307-326においてO'Keefeらにより論評される）、そのうちの幾つかは、本明細書中の下の実施例において記載される。

20

#### 【0183】

特定の局面において、本発明は、1つ以上の単離された、本明細書中に記載するPSMAタンパク質マルチマー（PSMAタンパク質ダイマーのようなマルチマー）を含む組成物も、含む。好ましい実施形態において、PSMAタンパク質マルチマー組成物は、PSMAタンパク質マルチマーを、少なくとも約10%含む。他の実施形態において、PSMAタンパク質マルチマー組成物は、PSMAタンパク質マルチマーを、少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または99.5%含む。好ましい実施形態において、PSMAタンパク質マルチマー組成物は、本質的に純粋なタンパク質マルチマーを含み、本質的にPSMAモノマーを含まない。特定百分率のリストは、示される百分率の間の全ての示されていない百分率を推定により含むことが、理解される。

30

#### 【0184】

ポリペプチド、タンパク質またはそれらのフラグメントに関して本明細書中で使用される場合、「単離された」は、そのネイティブな環境から引き離され、同定または使用に十分な量で存在することを意味する。タンパク質またはポリペプチドを言及する場合、「単離された」は、例えば以下を意味する：（i）発現クローニングにより選択的に産生された、または（ii）クロマトグラフィーまたは電気泳動により精製された。単離されたタンパク質またはポリペプチドは、本質的に純粋であり得るが、純粋である必要はない。用語「本質的に純粋」は、タンパク質またはポリペプチドが、自然界またはインビボ系において見い出され得る他の基質を、その意図される使用に対し実際の適切な範囲で、本質的に含有しないことを、意味する。本質的に純粋なポリペプチドは、当該分野に周知の技術により、産生される。単離されたタンパク質は、薬学的調製において、薬学的受容可能キャリアと混合され得るため、このタンパク質は、調製物の重量の小さな割合だけをなし得る。それでもなお、タンパク質は、生きている系において結合され得る物質（すなわち

40

50

他のタンパク質) から引き離され、単離される。

【0185】

P S M A タンパク質のフラグメントは、好ましくは、P S M A タンパク質の異なった機能的能力を保有するフラグメントである。フラグメントに保有され得る機能的能力としては、他のP S M A 分子の結合によるダイマーおよびより高重合のマルチマーの形成、抗体との相互作用、他のポリペプチドまたはそのフラグメントとの相互作用、および酵素活性が挙げられる。他のP S M A タンパク質フラグメント(例えば、配列番号1の他の組換え可溶フラグメント)は、その機能的特性に従って、選択され得る。例えば、当業者は、P S M A フラグメントを組換え的に調製し得、これらのフラグメントを、下に例示する方法に従って試験し得る。

10

【0186】

P S M A ポリペプチドの改変は、典型的にP S M A ポリペプチドをコードする核酸に対してなされ、そして、欠失、点変異、切断、アミノ酸置換、およびアミノ酸または非アミノ酸部分の追加を含み得る。あるいは、改変は、ペプチドに対して直接行われる(開裂、リンカー分子の追加、ビオチンのような検出部分の追加、脂肪酸の追加などによる)。改変は、全P S M A アミノ酸配列またはその一部を含む融合タンパク質も、含む。

【0187】

一般に、改変P S M A ポリペプチドは、その生理学的活性に関わらないポリペプチドの特性を特異的に変えるために改変されたポリペプチドを、含む。例えば、システイン残基は、望まないジスルフィド結合を防ぐために、置換または欠失され得る。同様に、特定の

20

【0188】

改変は、P S M A ポリペプチドをコードする核酸分子を変えることにより、簡便に調製される。P S M A ポリペプチドをコードする核酸の改変は、好ましくはコード配列のアミノ酸読み取り枠を保存し、そして好ましくは、ハイブリダイズして二次構造(ヘアピンまたはループのような、改変ポリペプチドの発現に有害な構造)を形成しやすい領域を、核酸において作製しない。

【0189】

改変は、アミノ酸置換、またはP S M A ポリペプチドをコードする核酸における選択された部位のランダム変異誘発による改変から選択される。それから、改変P S M A ポリペプチドは、発現され、1つ以上の活性(例えば、抗体結合、酵素活性、マルチマー安定性)を試験されて、どの変異が望ましい特性を有する改変ポリペプチドを提供するかを決定され得る。さらなる改変は、ポリペプチドのアミノ酸配列としては活性を示さないが、特定の宿主において好ましい翻訳のコドンを提供する、改変P S M A ポリペプチド(または非改変P S M A ポリペプチド)を提供し得る。例えばE. C o l i において、好ましい核酸の翻訳のコドンは、当業者に周知である。また他の変異は、ポリペプチドの発現を増大させるP S M A コード配列またはc D N A クロンの非コード領域を提供する。改変P S M A ポリペプチドの活性は、改変P S M A ポリペプチドをコードする遺伝子を、細菌発現

30

40

【0190】

当業者はまた、保存的アミノ酸置換がP S M A ポリペプチドにおいて作られ、P S M A ポリペプチドとの機能的な等価物(すなわち、P S M A ポリペプチドの機能的能力を保有する改変P S M A ポリペプチド)を提供し得ることを理解する。本明細書中で使用されるように、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸置換がなされたタンパク質の、相対的な電荷や大きさの特性を変えないアミノ酸置換を意味する。改変P S M A ポリペプチドは、ポ

50

リペプチド配列を変える、当業者に公知の方法（このような技術をまとめる参考文献（例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrookら, eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) または Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelら, eds., John Wiley & Sons, Inc., New York) において、見出し得る）に従って、調製され得る。模範的なPSMAポリペプチド機能的等価物は、配列番号1または組換え可溶性PSMAポリペプチドのようなそのフラグメント（配列番号1のアミノ酸44～750）の保存的アミノ酸置換を含む。アミノ酸の保存的置換は、以下の群の範囲内のアミノ酸の間に作られる置換を含む：（a）M、I、L、V；（b）F、Y、W；（c）K、R、H；（d）A、G；（e）S、T；（f）Q、N；および（g）E、D。

10

#### 【0191】

PSMAポリペプチドにおける保存的アミノ酸置換は、典型的には、PSMAポリペプチドをコードする核酸の交換により作られる。このような置換は、当業者に公知の種々の方法により、作られ得る。例えば、アミノ酸置換はPCR関連変異、部位関連変異誘発、またはPSMAポリペプチドをコードする遺伝子の化学的合成により、作られ得る。アミノ酸置換がPSMAポリペプチドの小さなフラグメントに合わせて作られた場合、置換は、ペプチドの直接合成により、作られ得る。PSMAポリペプチドのフラグメントの機能的等価物の活性は、変えられたPSMAポリペプチドをコードする遺伝子を細菌発現ベクター内または哺乳類発現ベクター内にクローン化し、そのベクターを適切な宿主細胞に導入し、変更されたPSMAポリペプチドを発現させそして本明細書中に開示するPSMAポリペプチドの機能的能力を試験することによって試験され得る。

20

#### 【0192】

本明細書中に記載するPSMAタンパク質マルチマーは、多くの用途を有し、幾つかは本明細書中に記載される。マルチマーは、PSMA酵素活性またはPSMAマルチマー形成（multimerization）を調節する化合物を試験するために有効である。マルチマーは、PSMAを選択的に結合する抗体（コンフォメーションエピトープに選択的な抗体、PSMAモノマーではなくPSMAマルチマー結合に選択的な抗体、およびPSMA酵素活性を選択的に調節する抗体）を単離するために使用され得る。マルチマーは、特にダイマーのPSMAは、ワクチン組成物として、PSMAへの免疫応答を誘導または増加するためにも、使用され得る。

30

#### 【0193】

PSMAの酵素活性を選択的に調節する薬剤は、少なくとも1つのPSMAの酵素活性を阻害または増大する薬剤（NAALADase活性、フォレートヒドロラーゼ活性、ジペプチジルジペプチダーゼIV活性、 $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼ活性、またはこれらの組み合わせのような薬剤）を含む。

#### 【0194】

少なくとも1つのPSMA酵素の酵素活性を調節する薬剤の候補をスクリーニングする方法が、本発明に従って提供される。この方法は、候補薬剤を単離されたPSMAタンパク質マルチマーと混合して反応混合物を形成する工程、これによってPSMA酵素を候補薬剤と接触させる工程を、包含し得る。この方法は、PSMA酵素の基質を反応混合物に添加する工程、およびPSMA酵素により基質から形成された産物の量を決定する工程も、包含する。このような方法は、化合物の自動化された、高処理スクリーニング（high-throughput screening of compound）に適応し得る。コントロールとの比較における、形成された産物量の減少は、PSMA酵素の少なくとも1つの酵素活性を阻害し得る薬剤を示す。コントロールとの比較における、形成された産物量の増加は、PSMA酵素の少なくとも1つの酵素活性を増大し得る薬剤を示す。PSMA酵素は、NAALADase、フォレートヒドロラーゼ、ジペプチジルジペプチ

40

50

ダーゼ I V、および／またはγ-グルタミルヒドロラーゼであり得る。P S M A 酵素は、好ましくは組換え可溶性 P S M A を含む P S M A マルチマーであり、最も好ましくは、ネイティブなコンフォメーションにおいて非共有的に結合された P S M A のダイマーである。

#### 【0195】

反応混合物は、候補薬剤を含む。候補薬剤は、好ましくは、抗体、有機低分子化合物、またはペプチドであり、従って、コンビナトリアル抗体ライブラリー、コンビナトリアルタンパク質ライブラリー、または有機低分子ライブラリーから選択され得る。典型的に、複数の反応混合物が、異なった薬剤濃度で、種々の濃度に対する異なった反応を得るために、平行でアッセイを実行される。典型的には、これらの濃度のうち1つが、ネガティブコントロール（すなわち、薬剤濃度0またはアッセイ検出限界以下の薬剤濃度）を供する。

10

#### 【0196】

候補薬剤は、多数の化学的クラスを含むが、典型的には、有機化合物、タンパク質または抗体（および抗原に結合するそのフラグメント）である。幾つかの好ましい実施形態において、候補薬剤は、有機低分子化合物であり、すなわち、50より大きく約2500未満、好ましくは約1000未満、より好ましくは、約500未満の分子量を有する。候補薬剤は、ポリペプチドおよび／または核酸との構造的相互作用に不可欠な、機能的化学的基を含む。典型的には、アミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基、またはカルボキシル基、好ましくは、少なくとも2つの機能的化学的基、およびより好ましくは少なくとも3つの機能的化学的基を、含む。候補薬剤としては、1つ以上の上で同定された機能的基で置換された、環式炭素構造またはヘテロ環式炭素構造、および／または芳香族構造またはポリ芳香族構造が、挙げられ得る。候補薬剤は、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロール、イソプレノイド、プリン、ピリミジン、上記の誘導体または構造的類似体、またはこれらの組み合わせなどの、生物分子（*biomolecule*）であり得る。

20

#### 【0197】

候補薬剤は、合成または天然化合物のライブラリーを含む、広い種類に渡る供給源から得られる。例えば、広い種類の有機化合物および生物分子のランダム合成および直接合成のための、以下に挙げられる多数の手段が、利用可能である：無作為化オリゴヌクレオチド、合成有機コンビナトリアルライブラリー、ランダムまたは非ランダムペプチドのファージディスプレイライブラリー、タンパク質または抗体のコンビナトリアルライブラリー、などの発現。あるいは、細菌性、真菌性、植物および動物抽出物の形状の天然化合物のライブラリーが、入手し得るか、または容易に産生される。さらに、天然ライブラリーまたは合成的に産生されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的、および生化学的手法を通じて、容易に改変され得る。さらに、公知の薬剤は、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化、などの直接のまたはランダムな化学的改変に供され得、その薬剤の構造的類似性が生成される。

30

#### 【0198】

種々の他の試薬も、混合物に含まれ得る。これらとしては、塩、緩衝液、中性タンパク質（例えば、アルブミン）、界面活性剤など、最適なタンパク質-タンパク質結合および／またはタンパク質-薬剤結合を促進するために使用される試薬が、挙げられる。さらにこのような試薬はまた、反応組成物の非特異またはバックグラウンドの相互作用を減少させ得る。アッセイの効率を改善する他の試薬（プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤など）も、使用し得る。

40

#### 【0199】

上記の反応物質の混合物を、候補薬剤が P S M A 酵素と相互作用する条件下で、インキュベートする。組成物の添加の順序、インキュベーション温度、インキュベーション時間、および他のアッセイパラメータは、容易に決定され得る。このような実験は、アッセイの基本組成ではなく、単にアッセイの最適化を含むのみである。インキュベーション温度は、典型的には4℃と40℃との間である。インキュベーション時間は、好ましくは、迅

50

速な高処理スクリーニングを促進するために最小化され、典型的には0.1時間と10時間との間である。

#### 【0200】

インキュベーション後、PSMA酵素活性の存在または非存在を、使用者に利用可能な任意の簡便な方法により、検出する。例えば、反応混合物は、PSMA酵素の基質を含み得る。好ましい基質および／またはPSMA酵素の作用による産物を、検出し得る。基質は、通常、検出可能標識を含むか、または検出可能標識に結合される。直接検出を提供する標識（例えば、放射能、発光、光学密度、または電子密度など）または間接検出を提供する標識（例えば、FLAGエピトープのようなエピトープタグ、西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素タグ）のような、広い種類の標識が使用し得る。標識は、基質に結合され得るか、または基質に組み込まれ得る。

10

#### 【0201】

標識の性質または他のアッセイ構成要素に依存して、標識を検出するために、種々の方法が使用し得る。例えば、標識は、基質に結合している時に検出され得、または基質からの分離の後に検出され得る。標識は、光学または電子密度、放射性放出、非放射性エネルギー転移などを通じて直接検出され得、または抗体共役、ストレプトアビジン-ビオチン共役などを通じて間接に検出され得る。種々標識の検出方法は、当該分野で周知である。

#### 【実施例】

#### 【0202】

（材料と方法）

20

DNA構造物。全ての選択されたPSMA構造物を、Dr. W. D. W. Hestonにより提供されたヒトPSMAクローンp55A（Israeliら、Cancer Res. 53:227-230（1993））から得た。この構成物を、哺乳類細胞においての高レベル発現および分泌のため、発現ベクターPPI4（Trkolaら、Nature 384:184-187（1996））へサブクローニングした。組換え可溶性PSMA（rsPSMA）は、PSMAの細胞外ドメイン全体と一致する（配列番号1（GenBank protein加入番号AAA60209）のアミノ酸44～750）。

#### 【0203】

pcDNAプラスミド構造物：抗PSMA抗体10.3、006、026、051、069および077をコードする核酸分子を、プラスミドpcDNAにクローン化した。クローニングプロトコルを、図10に示す。可変領域増幅に使用したプライマー（配列番号：33～36、センスおよびアンチセンス）も、示す。抗PSMA抗体006、026、051、069、077および10.3のためのプラスミド構造物は、抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列（配列番号：2～7；それぞれPTA-4403、PTA-4405、PTA-4407、PTA-4409、PTA-4411、PTA-4413）または抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列（配列番号：8～13；それぞれPTA-4404、PTA-4406、PTA-4408、PTA-4410、PTA-4412、PTA-4414）を含む。プラスミド地図を、図11～図22に示す。

30

#### 【0204】

ウェスタンブロット。細胞を、1mM EDTA、1% NP-40、1% Triton X-100、および5mg/ml アプロチニンを含有するPBS中で溶解し、細胞の残屑を、4℃で3000gで30分間の遠心分離により、除去した。溶解産物を、事前に5～20%勾配ゲル上で分離し、ニトロセルロース膜にトランスファーした。得られたブロットを、事前に5% 乳、0.02% SDSおよび0.1% Triton X-100を含有するPBS中でブロックし、MAB544一次抗体（Maine Biotechnologies）（2mg/mlの濃度）と共にインキュベートした。3回の洗浄の後、ブロットを、ヤギ抗マウスHRP結合二次抗体（0.2mg/mlの濃度）と共にインキュベートした。ブロットを、Renaissance chemiluminescence system（Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA）を使用して、可視化した。

40

50

## 【0205】

ELISA。細胞を、1mM EDTA、1% NP-40、1% Triton X-100、および5mg/ml アプロチニンを含有するPBS中で溶解した。得られた細胞膜を、96ウェルプレート上にプレートし、滅菌フード中で一晩乾燥させた。それからプレートを、事前にカゼインおよびTween-20を含有するPBSでブロックし、マウス血清またはハイブリドーマ上清を添加した（精製MAB544 (Maine Biotechnologies) または標準として7E11 (Cytogen) を使用した）。PBS中で洗浄した後、アルカリホスファターゼ結合二次抗体（サブクラス特異的）を、インキュベートし、その後PBSで洗浄した。それから、405nmの波長の比色定量検出のために、pNPP基質を加えた。

10

## 【0206】

フローサイトメトリー。野生型3T3細胞またはPSMA発現3T3細胞（条件ごとに $10^6$ 細胞）を、0.1%  $\text{NaN}_3$  を含有するPBS中で洗浄した。それから、抗体または血清を加え（PBS中1:100希釈）、そして氷上で30分間インキュベートした。PBS+0.1%  $\text{NaN}_3$  中で洗浄後、細胞を、抗マウスIgG+IgM (Calbiotech) と共に、氷上で30分間インキュベートした。細胞を、再びPBS+0.1%  $\text{NaN}_3$  中で洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。

## 【0207】

(実施例1)

(PSMA上のコンフォメーションナルエピトープに対する一群のモノクローナル抗体 (mAbs) の生成)

20

治療のための有力な候補を代表する一群の抗PSMA mAbを、作製した。簡潔には、mAbを以下のように生成した：BALB/cマウスを、およそ3週間の間隔で、組換えPSMAで皮下的に免疫した。計4回の注射の後マウスを屠殺し、そして脾臓細胞を、ハイブリドーマを作製するための標準的技術を使用して、骨髓腫細胞株と融合させた。個々のハイブリドーマ上清を、ELISAにより、LNCaPヒト前立腺腫瘍細胞または全長ヒトPSMAを発現するように操作された3T3細胞（3T3-PSMA細胞）のいずれかに由来のPSMAとの反応性について、スクリーニングした。陽性クローンを、完全な3T3-PSMA細胞およびLNCaP細胞との特異的反応性について、フローサイトメトリーにより、二次的にスクリーニングし、これにより、ネイティブの細胞表面PSMAを認識し、従って、最大の治療可能性を有する抗体を選択した。

30

## 【0208】

ヒト抗体を産生する能力を有するマウス (Xenomouse、Abgenix; Mendezら, Nature Genetics 15:146 (1997)) を、週に1回または2回、 $5 \times 10^6$  LNCaP細胞（ミョウバンまたはTitermax Gold (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) で補強した）で、皮下的に免疫した。動物を、10 $\mu$ gの組換えPSMAタンパク質（タンパク質G磁気微小ビーズ (Miltényi Biotech, Auburn, CA) 上で免疫親和性捕捉した）で、2回追加免疫した。PSMA mAb 3.11を、捕捉のために使用した。脾臓細胞を、NSO骨髓腫細胞と融合させ、生じたハイブリドーマを、上のようにフローサイトメトリーによってスクリーニングし、PSMAの細胞外部分と反応性である抗体を産生するクローンを検出した。あるクローン（10.3 (PTA-3347)）が、このような抗体を産生した。

40

## 【0209】

これらの方法は、細胞表面PSMA上のコンフォメーション特異的エピトープだけに反応するmAbを、高い割合で生じさせた。図1に示すように、幾つかのmAb (mAb 3.7、mAb 3.9、mAb 3.11、mAb 5.4およびmAb 10.3) は、生きたPSMA発現細胞に特異的に結合する（しかし、全てではない (mAb 3.12)）。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株において発現された組換え可溶PSMAタンパク質を使用して、さらに、これらのmAbが、PSMAの細胞外領域にお

50

けるエピトープに結合することを証明した。3 T 3 - P S M A 細胞溶解産物由来のネイティブ P S M A を免疫沈降する能力についても、m A b を、試験した。フローサイトメトリ（図 1）において陽性の m A b は、免疫沈降（図 2）においても効果的である一方、m A b 3. 1 2 は無反応であった。図 3 は、P S M A コンフォメーションを認識する幾つかの P S M A 抗体による、非変性の全長 P S M A および組換え可溶 P S M A の認識を示す。これは、これらの方法が、ネイティブ P S M A を効果的に認識する m A b の優勢をもたらすことをさらに確認する。

#### 【0 2 1 0】

m A b を、変性 P S M A への反応性について、ウェスタンブロット分析により、試験した（図 4）。示した細胞およびサンプル（コントロール：3 T 3 細胞、P S M A 陰性ヒト前立腺細胞株 P C - 3 および D U 1 4 5、擬上清；P S M A 陽性サンプル：P S M A 発現 3 T 3 細胞、P S M A 陽性ヒト前立腺細胞株 L N C a P、r s P S M A 陽性上清）由来の溶解産物を、S D S - P A G E により分析し、電気ブロット（e l e c t r o b l o t）し、そして抗 P S M A m A b 3. 1 および抗 P S M A m A b 3. 1 2（それぞれ、A T C C 特許寄託指定 P T A - 3 6 3 9 および P T A - 3 6 4 0）とプローブ結合させた。平行に試験した 4 つの m A b（3. 7、3. 8、3. 9、3. 1 1）は、全長 r s P S M A タンパク質または分泌 r s P S M A タンパク質のどちらにも反応性を示さなかった。7 E 1 1 m A b は、全長 r s P S M A を免疫沈降したが、分泌 r s P S M A は沈降しなかった。

#### 【0 2 1 1】

フローサイトメトリーおよび免疫沈降に反応性の m A b（m A b 3. 7、m A b 3. 9、m A b 3. 1 1、m A b 5. 4 および m A b 1 0. 3）は、全て、ウェスタンブロット分析において無反応だった。これは、m A b は直鎖エピトープを認識しないことを示す。まとめると、このデータは、これらの 5 つの m A b が、P S M A の細胞外ドメインに存在するコンフォメーション特異的エピトープを認識することを、強く示唆する。コンフォメーションエピトープに対する m A b は、代表的に、抗原についての最大の親和性および特異性を有するため、それらは、治療のための好ましい候補を代表する。

#### 【0 2 1 2】

特定の抗 P S M A 抗体の反応性を、表 2 に記載する：

#### 【0 2 1 3】

## 【表 2 - 1】

表2: 抗PSMA抗体の特徴

| mAb  | 反応性   |               |    |       | エピトープ                       |
|------|-------|---------------|----|-------|-----------------------------|
|      | ELISA | フロー<br>サイトメトリ | IP | ウェスタン |                             |
| 3.1  | +     | +             | +  | +     | 直鎖状、細胞外、<br>ネイティブPSMA上に露出   |
| 3.7  | +     | +             | +  | -     | コンフォメーションル、細胞外              |
| 3.8  | +     | +             | +  | -     | コンフォメーションル、細胞外              |
| 3.9  | +     | +             | +  | -     | コンフォメーションル、細胞外              |
| 3.11 | +     | +             | +  | -     | コンフォメーションル、細胞外              |
| 3.12 | +     | -             | -  | +     | 直鎖状、細胞外、<br>ネイティブPSMA上に露出せず |
| 5.4  | +     | +             | +  | -     | コンフォメーションル、細胞外              |
| 7.1  | +     | -             | -  | +     | 直鎖状、細胞外、                    |

## 【 0 2 1 4】

## 【表 2 - 2】

|        |   |   |   |   |                 |
|--------|---|---|---|---|-----------------|
|        |   |   |   |   | ネイティブPSMA上に露出せず |
| 7.3    | + | + | + | - | コンフォメーションル、細胞外  |
| 10.3   | + | + | + | - | コンフォメーションル、細胞外  |
| 1.8.3  | + | + |   | - | 細胞外             |
| A3.1.3 | + | + |   | - | 細胞外             |
| A3.3.1 | + | + |   | - | 細胞外             |

これらのmAbは、主にマウスIgG2aアイソタイプ、マウスIgG2bアイソタイプおよびヒトIgG1アイソタイプ（強力なエフェクター機能を仲介するアイソタイプ）であることを、ELISAにより決定した。多くの抗PSMA mAbが、何年にもわたって記載され、治療能力を評価されてきた（例えば、Liu, H. ら Cancer Res. 57:3629-3634 (1997); Chang, S. S. ら Cancer Res. 59:3192-3198 (1999); Murphy, G. P. ら J Urology 160:2396-2401 (1998) を参照のこと）が、PSMAの酵素活性を阻害したmAbはなく、PSMA上のコンフォメーションル抗原決定基を認識したmAbは殆どなかった。

## 【 0 2 1 5】

（実施例 2）

（抗PSMA mAbの産生）

これらのmAbの治療能力を正確かつ量的に査定するため、mAbを、広範囲のインビトロおよびインビボでの特徴付けに適する量および質で、産生させる。簡潔には、mAb分泌ハイブリドーマを、ローラー瓶（roller bottle）内で、ウシIgGを除去した10% FBS（Life Technologies）を加えたDMEM/F12培地中で培養する。培養の産生期の間、週に2回の培地交換により、細胞を、約5×

10<sup>6</sup>細胞／mlに保つ。回収した培地を0.22ミクロンフィルターを通した濾過により浄化し、そして精製まで-95℃で保存した。約25mg／Lの平均抗体発現レベルを与えるには、精製における損失を許容するため、抗体それぞれにおよそ3Lのローラー瓶上清が必要である。

#### 【0216】

与えられたハイブリドーマ由来の培養上清を、プールし、プロテインAセファロースアフィニティカラム (Protein A Sepharose affinity column) 上にロードする。マウスIgG2a抗体、マウスIgG2b抗体およびヒトIgG1抗体は、直接ロードするが、マウスIgG1抗体を含む上清は、結合を促進するため、ローディングの前に、pH8.5および1M NaClに調整する。カラムの洗浄後、mAbを、低pH緩衝液で、1M Tris pH8.0を使用した画分に溶出する。溶出ピーク画分をプールし、PBS緩衝液に対して透析し、5mg／mLに濃縮し、そして滅菌アリコートにおいて-95℃で保存する。全ての精製手順を、内毒素非含有緩衝液および衛生化クロマトグラフィーカラムを使用して実行する。精製mAbを、還元および非還元SDS-PAGEにより純度について試験し、ELISAによりPSMA結合親和性について試験し、そしてlimulusアメーバ様細胞溶解産物アッセイ (amebocyte lysate assay) により内毒素レベルについて試験する。これらの手順は、慣用的に、「動物グレード」抗体を、>95%の純度で、および<0.5内毒素単位／タンパク質mgで、生じる。

#### 【0217】

(実施例3)

(インビトロにおける非標識mAbの治療能力の評価)

精製mAbを、治療学的に関連した特徴 (親和性、特異性、酵素阻害活性およびエフェクター機能を含む) について、一連のアッセイにおいて試験する。理想的な産物候補は、ナノモル濃度以下の濃度で、PSMAに結合してPSMA活性を阻害し、そしてFc関連エフェクター機能を通して、強力な細胞殺傷を媒介する。

#### 【0218】

最初に、PSMAの細胞表面形態および分泌形態についてのmAbの親和性を、それぞれフローサイトメトリーおよびELISAによって測定する。フローサイトメトリーアッセイにおいて、種々の量のmAbを、FACS緩衝液 (1% FBSおよび0.1% NaN<sub>3</sub>を含有するPBS) 中の5×10<sup>5</sup> 3T3-PSMA細胞と共に2時間インキュベートし、結合を飽和させる。細胞を洗浄し、フローサイトメトリーによる結合mAbの検出のため、マウスIgGに対するフィコエリトリン (phycoerythrin) 結合ヤギ抗体 (ICN/Cappel) と、共にインキュベートする。特異的結合は、親3T3細胞で観察される蛍光強度の減算により、算出される。

#### 【0219】

ELISAのために、CHO細胞由来組換え可溶PSMAタンパク質 (rsPSMA, Progenics, Tarrytown, NY) を、50mM炭酸緩衝液 (pH9.4) 中で1μg／mlに希釈し、そして96ウェルImmulon IIマイクロタイタープレート上を100μl／ウェルで、一晚4℃でコートする。それから、プレートを、5% BSA含有PBS緩衝液で2時間ブロックする。mAbを、ELISA緩衝液 (2% BSA、1% FBSおよび0.5% Tween 20を含有するPBS緩衝液) において、濃度の範囲で、室温で二時間加えた。プレートを洗浄し、マウスIgGに対する西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗体を、室温で1時間加える。再びプレートを洗浄し、そして、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン ジヒドロクロリド (TMB) 基質 (Pierce, Rockford, IL) を、ELISAプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を使用した450nmにおける比色定量の読み出しのために加える。

#### 【0220】

(実施例4)

## (mAb 交叉競合結合アッセイ)

与えられた群のmAbが、PSMA上の別個のエピトープを認識するか、あるいは重複したエピトープを認識するかを同定するため、交叉競合結合アッセイを行う(Liu, H. ら Cancer Res 57:3629-3634 (1997))。このフローサイトメトリアッセイにおいて、ビオチン化試験mAbを、種々の濃度の非標識競合mAbの存在下および非存在下で、上に記載したように、3T3-PSMA細胞と共にインキュベートする。洗浄工程に続き、結合ビオチン化mAbの量を決定するために、フィコエリトリン結合ストレプトアビジンを加える。阻害の百分率は、非関連特異性のアイソタイプ適合mAb存在下で観察される阻害に対して(0%阻害)および過剰の非標識試験mAbを使用して観察される阻害に対して(100%阻害)、規定される。

10

## 【0221】

## (実施例5)

## (PSMA酵素活性におけるmAbの効果)

PSMAは、フォレートヒドロラーゼおよびN-アセチル化 $\alpha$ 結合酸性ジペプチダーゼ(NALADase)の両方の酵素活性(腫瘍細胞の増殖と悪性化に影響し得る)を保有することが示されている(Heston, W. D. W. Prostate: Basic and Clinical Aspects (R. K. Naz, ed.). CRC Press, New York: 219-243 (1997))。上で記載したmAbの幾つか(mAb 3.9、mAb 5.4およびmAb 7.3)およびmAb J591(ATCC#HB-12126)を、PSMA酵素活性を測定するための以前記載したアッセイを使用して、フォレートヒドロラーゼ調節活性について試験した(Pinto, J. T. ら Clinical Cancer Res 2:1445-1451 (1996))。

20

## 【0222】

簡潔には、フォレートヒドロラーゼ活性を、以下のように測定した。50  $\mu$ M メトトレキサートジ- $\gamma$ グルタメートおよび10  $\mu$ g/ml rsPSMA(抗PSMA mAbまたは非関連mAbと事前に混合したもの)を、100  $\mu$ lの容量のpH4.5酢酸緩衝液中で2時間、37°Cでインキュベートした。Spectra Phoresis 1000(Thermo Separation, San Jose, CA)上のキャピラリー電気泳動による、遊離のメトトレキサートのモノーおよびジ- $\gamma$ グルタメート形状の分離に先立ち、反応を、5分間の煮沸により停止した。種々のメトトレキサート誘導体を、その保持時間および300nmにおける吸光度に基づき、定量した。

30

## 【0223】

このデータは、mAb 5.4が、精製rsPSMAタンパク質の酵素活性およびC4-2細胞の溶解産物における酵素活性を、強力にブロックすることを示す。C4-2は、内在性PSMAを発現するLNaCP細胞株(ヒト前立腺癌株)のアンドロゲン非依存性誘導体である。C4-2細胞株に関するより詳説は、O'Keefe D. S. ら Prostate 45:149-157 (2000)において見出され得る。図7および図8は、rsPSMAの2つの産生ロット(rsPSMA#7およびrsPSMA#8)についての結果を提供する。C4-2細胞溶解産物についての結果を、図9に示す。これらの図は、4つの抗体(mAb 3.9、mAb 5.4、mAb 7.3およびmAb J591)のフォレートヒドロラーゼの酵素活性における効果を、rsPSMAの2つの産生ロット中およびC4-2細胞溶解産物中に存在するフォレートヒドロラーゼによる、メトトレキサートジ- $\gamma$ グルタメート(MTXGlu2)からのグルタメートの切断の速度によって、図示する。mAb 5.4の阻害効果に加え、mAb 3.9も、フォレートヒドロラーゼ活性を阻害することが見出された。

40

## 【0224】

NALADase活性アッセイのために、rsPSMAタンパク質を、種々の量の抗PSMA mAbまたはコントロールmAbと共に、50mM Tris(pH7.4)、1mM CoCl<sub>2</sub>中で、10分間37°Cでインキュベートし、その後、50  $\mu$ lの0

50

． 6  $\mu$ M N-アセチルアスパルチル [  $^3$ H ] グルタメートを添加する。15分後、反応を、1mlの100mM  $\text{NaPO}_4$ の添加により、停止させる。開裂されたグルタメートを、イオン交換クロマトグラフィーにより基質から分離し、シンチレーション計数により検出する。それぞれの測定を、3連で行う。

#### 【0225】

(実施例6)

(免疫組織化学による正常ヒト組織および悪性のヒト組織との反応性)

抗PSMA mAbを、免疫組織化学により、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ方法 (Silver, D. A. ら, Clin Cancer Res 3: 81-85 (1997)) を使用して、正常ヒト組織および悪性のヒト組織との反応性について、試験する。凍結組織またはパラフィン包埋組織を、使用し得る。パラフィン包埋組織切片を、脱パラフィンし、そして1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  との15分間のインキュベーションにより、内在性ペルオキシダーゼ活性を、ブロックする。切片を、2% PBS-BSA (Sigma Chemical, St Louis, MO) 中の1:10希釈ウマ血清で、30分ブロックし、その後、2% PBS-BSA中の2  $\mu$ g/ml 抗PSMA mAbと一晩インキュベーションする。洗浄後、切片をビオチン化二次抗体と共にインキュベートし、洗浄し、そしてアビジン: ビオチンペルオキシダーゼ複合体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (PBS中1:25希釈) と共に30分間インキュベートする。洗浄後、切片を、0.05% ジアミノベンジジンテトラクロライド、0.01%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、および0.5% Triton X-100を含有するPBSにおける液浸により可視化する。ネガティブコントロール切片を、非関連特異性のアイソタイプ適合mAbと共にインキュベートする。ポジティブコントロールとして、7E11 (Cytogen, Princeton, NJ) (よく特徴付けられた抗PSMA mAb) を使用する。

#### 【0226】

(実施例7)

(抗体依存性細胞性細胞傷害性 (ADCC))

ADCCアッセイにおいて、mAbを、連続希釈し、 $^{51}\text{Cr}$  標識3T3-PSMA細胞またはヒトPSMAを発現するように操作されたヒト前立腺PC-3細胞 (PC-3-PSMA細胞) と合わせる。NKエフェクター細胞を、NK微小ビーズ (Miltenyi Biotec) を使用して、リンパ節または脾臓から精製する。血清、NKエフェクター細胞、および $^{51}\text{Cr}$  荷標的細胞 ( $^{51}\text{Cr}$ -loaded target cell) を、エフェクター細胞: 標的細胞が10:1、20:1、および40:1であるような比率で、共インキュベーションする。これをそれぞれの条件について、3連で行う。細胞を4~5時間、37°Cでインキュベートし、その後、上清を回収し、 $\gamma$  計数により $^{51}\text{Cr}$  放出の測定を行う。特異的溶解の百分率は、アイソタイプ適合非特異的mAbの存在下で観察される阻害に対して (0%溶解) および10%のドデシル硫酸ナトリウムを使用して観察される阻害に対して (100%溶解)、決定される。

#### 【0227】

(実施例8)

(補体媒介溶解 (CML))

CMLのために、 $^{51}\text{Cr}$  荷3T3-PSMA細胞またはPC-3-PSMA細胞を、標的細胞として供する。mAbの連続希釈を、ウサギ補体および標的細胞と、4~5時間37°Cで共インキュベートし、それぞれの条件を3連で行う。次に、上清を、回収し、そして $\gamma$  カウンターで計数する。特異的溶解を、以前にASCCアッセイデータについて行ったように、電算処理する。

#### 【0228】

(実施例9)

(抗増殖効果)

これらの抗体の抗増殖効果を試験するため、抗PSMA mAbを、連続希釈し、LN

10

20

30

40

50

CaP、PC-3-PSMAおよび親PC-3細胞と共に、対数増殖期において、インキュベートする。4時間、24時間、および72時間の間隔で、細胞を、除去し、そして密度および生存率（トリパンプルー染色およびWST-1アッセイ（Roche Biochemicals）により）について、分析する。

#### 【0229】

（実施例10）

（キレート化および放射性標識手順の最適化）

上の実施例において記載した手順を使用して同定した最も有望なmAbを、動物における評価の前の標識後に、生化学的および生物学的な安定性および活性について最適化する。インビトロ実験における成功は、非標識のまたは同様に標識したアイソタイプコントロールmAbよりも>10倍低い濃度で、PSMA発現腫瘍細胞を特異的に殺傷する、放射性標識mAbの同定として、定義される。

10

#### 【0230】

好ましい $\alpha$ 線放射同位体および $\beta$ 線放射同位体が、全て放射性金属であるため、それぞれのmAbを、まず適切な金属キレート剤と結合体化させる。有望なインビボの安定性データおよびヒトの臨床試験における証明された使用に基づき、二官能性のキレート剤であるC-官能化トランスシクロヘキシルジエチレントリアミンペンタ酢酸（C-functionalized trans cyclohexyldiethylenetriaminepentaacetic acid）（p-SCN-CHX-A"-DTPA）が、 $^{90}\text{Y}$ または $^{213}\text{Bi}$ のどちらかを抗体に結合させるために、好ましい薬剤である（Brechtel, M. W. ら J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1169-1170 (1991)）。このキレートの形態は、以前、Memorial Sloan Kettering Cancer Centerにおいて進行中の試験で、ヒトにおいて70用量より多くで試験されている（McDevitt, M. R. ら, J. Nucl. Med. 40:1722-1727 (1999)）。 $^{225}\text{Ac}$ のために、我々の初期の研究は、p-SCN-Bz-HEHA（1, 4, 7, 10, 13, 16-ヘキサザシクロオクタデカン-N', N'', N''', N''', N''', N'''-ヘキサ酢酸）と呼ばれる新規の二官能性キレート剤を試験する（Deal, K. A. ら J. Med. Chem. 42:2988-2992 (1999)）。目的は、抗体結合体化およびキレート化比率を、収量および活性の標識を最大にする一方で、インビボ利用のために適した安定性を保持するように最適化することである。さらなるキレート剤も、N. I. Hおよび他の供給源から入手可能になるため、使用し得る。

20

30

#### 【0231】

最初に、抗体を、大モル過剰のEDTAとの、pH=5でのインキュベーションにより、金属非含有にする。EDTA、および抗体調製物から除かれた任意の金属を、連続的な緩衝液交換／透析を経由して除去し、pH=5緩衝液を結合緩衝液と置換する（Nikula, T. K. ら Nucl. Med. Biol. 22:387-390 (1995)）。最適なキレート剤対抗体の比率を生じるが、免疫反応性を残す条件は、HEPES緩衝液（pH8.5）中の、抗体に対して40倍モル過剰のキレート剤を使用する初期条件に関して、キレート剤：抗体比率、反応時間、温度、および／または緩衝化系を系統的に多様化することにより、同定される。抗体あたりのキレート結合数は、確立された分光光度方法（Pipin, C. G. ら, Bioconjugate Chemistry 3:342-345 (1992)）を使用して、決定される。

40

#### 【0232】

$^{90}\text{Y}$ および $^{225}\text{Ac}$ 構築物については、標識効率を、直接測定する。 $^{213}\text{Bi}$ については、初期抗体構築物を、 $^{111}\text{In}$ を使用して、キレート効率について試験し、この $^{111}\text{In}$ は、 $^{213}\text{Bi}$ と同様のキレート化学的性質を有するが、より長い半減期（ $t_{1/2}=3$ 日）、即時利用可能性、および追跡可能 $\gamma$ 線放射の有利性を有する。 $^{111}\text{In}$ を使用して一旦最適化されると、 $^{213}\text{Bi}$ について、標識効率が決定される。

#### 【0233】

50

放射性標識mAbを、1% HSAを可動相として使用するBioRad 10DG塩除去カラムを通して精製し、そして、即時薄層液体クロマトグラフィー (ITLC) および／または高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、放射性核種の組み込み率を決定するために評価する (Zamora, P. O. ら, Biotechniques 16: 306-311 (1994))。ITLCおよびHPLCは、純度の確立手段および低分子量の放射化学的不純度 (すなわち、キレート化金属、コロイド、および遊離金属) の割合の同定手段を提供する。それぞれの可動相についての複製ITLC片を、展開し、乾燥させ、そして0.5マークの $R_f$ で切断し、そして $\gamma$ カウンターにおいて計数する。HPLC系は、オンラインのUV吸収検出器および放射能検出器の両方を備える。HPLC溶出プロファイルは、放射能とタンパク質および低分子量種とを、溶出時間の関数として、直接的に相関させる。TSK SW3000<sub>XL</sub> カラム (TosoHaas, Montgomeryville, PA) を、使用し、タンパク質分子量標準の範囲を使用して計算する。

10

#### 【0234】

(実施例11：放射性標識したmAbの親和性および免疫反応性)

いったん放射性標識した構築物を得、精製し、そして生化学的純度および放射化学的純度をアッセイするならば、生物学的活性が決定される。放射性構築物 (radioconstruct) の結合活性を、以前に記載されたような (Scheinberg, D. A. ら Leukemia 3: 440~445 (1991)) 全LNCaPおよび3T3-P SMA細胞および／または膜分画を使用して得られた結合データのスキッチャード分析によって実行する。

20

#### 【0235】

キレート：抗体モル比と生物学的活性とを相関させるために、合成構築物の免疫反応性を評価する。簡単には、2 ngの標識したmAbを3T3-P SMA細胞上で発現するような約25倍の過剰のP SMAと共に培養する。0°Cでの30分の培養後、細胞を遠心分離によって回収し、そして未結合のmAbを含む上清を、さらに0°Cで30分間新鮮な3T3-P SMA細胞に添加する。両セットの細胞を遠心分離し、そして2回冷PBSで洗浄する。細胞ペレット、上清および洗浄分画を、放射能について計数する。免疫反応性を、細胞ペレットにおける放射能を細胞ペレット、上清および洗浄分画における総放射能で割った量として定義する。

30

#### 【0236】

(実施例12：mAbの内在化)

放射性標識したmAbの活性を、その内在率によって有意に調節し得る。細胞表面抗体抗原複合体の内在化を、 $^{111}\text{In}$ 放射性標識した抗体構築物 (Caron, P. C. ら, Cancer Res 52: 6761~6767, 1992) を使用して測定する。簡単には、 $5 \times 10^5$ の3T3-P SMA細胞を様々な時間で37°Cで $^{111}\text{In}$ 放射性標識した抗体と共に培養する。細胞をPBSで洗浄し、そして細胞表面に結合した放射性標識構築物を1 mlの50 mMグリシン/150 mM NaCl (pH=2.8) で除去する。総細胞関連放射能および酸耐性 (内在化した) 放射能を、内在化の速度を確認するために $\gamma$ 計数によって決定する。P SMAを発現しない親の3T3細胞を、非特異的な結合を決定するためのコントロールとして使用する。他の群 (Smith-Jones P. M. ら, Cancer Res 60: 5237~5243, 2000) による以前の結果を基にして、1つ以上のmAb構築物との結合後のP SMAの有意な内在化を予想する。

40

#### 【0237】

(実施例13：インビトロ細胞傷害性研究)

いったん放射性免疫結合体の免疫反応性が確立されたならば、 $\alpha$ 標識したmAbのインビトロ細胞傷害性の評価にとりかかった。およそ50,000の標的細胞 (LNCaPまたは3T3-P SMA細胞のいずれか) を96ウェルプレート中で処理し、そして24~96時間後に分析した。 $^{225}\text{Ac}$ 標識した構築物 (または $^{213}\text{Bi}$ ) に起因する細胞

50

死の定量化は、生存細胞による $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みを決定 (N i k u l a, T. K. ら J. Nucl. Med. 40:166~176, 1999) によって達成した。特異性を、コントロール細胞 (P S M A 陰性ヒト前立腺細胞株 P C - 3 および D U - 1 4 5、ならびにコントロール 3 T 3 細胞)、過剰な非標識抗体でのブロック、およびコントロール放射性結合体の使用によって決定した。

#### 【0238】

次いで、抗体結合体濃度、特異的活性、および曝露時間の細胞傷害性効果を評価した。細胞傷害性を、1 M H C l (100%細胞死) および培地 (バックグラウンド細胞死) で見出されるものに関して示した。L D<sub>50</sub> 値を、細胞に結合した $^{225}\text{Ac}$ 原子数の関数として細胞生存力をプロットすることによって計算した (M c D e v i t t, M. R. ら (1998) Eur. J. Nucl. Med. 25:1341~1351 (1998))。

#### 【0239】

L N C a P - F G C 細胞の多細胞球を確立し、そしてインビトロで最小限の疾患を根絶するための放射性免疫治療 (R I T) の可能性を調査するために使用した。これらの3次元の球は、単層培養よりもより正確に組織構造を模倣し、従って固形腫瘍のより適切なモデル (O' Connor, K. C. Pharm. Res. 16:486~493, 1999) を提供する。L N C a P - F G C は、本来の L N C a P 細胞株のうちの急速に成長するクローンであり、そしてこの細胞を、液体重畳技術 (l i q u i d o v e r l a y t e c h n i q u e) を使用して200~600  $\mu\text{m}$  のサイズまで成長させた (B a l l a n g r u d, A. M. ら Clin. Cancer Res. 5:3171s~3176s, 1999)。より大きい球では、細胞の内部塊が壊死性になる一方で、外部縁は増殖性腫瘍細胞からなる。抗体の貫入性を、共焦点顕微鏡によって測定し、そして事前の結果は、抗 P S M A 抗体が40~50  $\mu\text{m}$  の深さまで貫入すべきであることを示唆した (B a l l a n g r u d, A. M. ら 第7回 Conference on Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy of Cancer, Princeton NJ, 1998)。L N C a P 標的細胞に対する $^{225}\text{Ac}$ -3.9のインビトロ細胞傷害性を、図23中で示す。生存可能な P S M A + L N C a P 細胞のパーセンテージを、放射性結合体の活性の関数としてプロットした。非標識抗体の100倍過剰量の添加を、特異性のについてのコントロールとして使用した。

#### 【0240】

(実施例14: ヒト前立腺癌のマウス異種移植片モデルにおける、非標識 m A b および放射性標識した m A b のインビボの効力の評価)

前述のアッセイにおいて試験に成功した抗体は、それらが治療用途に関して有用であることを示唆する有意な特異性および機能的特性を証明する。これらの放射性標識した m A b 構築物および「裸の」 m A b 構築物のうちで最も有望なものを、前立腺癌の最も利用可能なマウスモデルにおいて評価する。この研究では、確立された異種移植片モデルを使用し、L N C a P ヒト前立腺腫瘍細胞株を免疫無防備状態にあるヌードマウスに注射し、そして固形腫瘍を形成させ (E l l i s, W. J. ら Clin Cancer Res 2:1039~1048 (1996))、次いでこの固形腫瘍を、放射性標識および非標識の抗 P S M A m A b 構築物の両方で処置する。フォローオン研究でもまた、マウス異種移植片モデル、C W R 2 2 (ヒト前立腺癌の多くの重要な生物学的特徴を再産生する) を利用する。

#### 【0241】

(L N C a P 腫瘍細胞異種移植片モデル)

高親和性および高特異性を示す構築物を、生体分布分析および薬物動態分析のために、L N C a P 腫瘍細胞異種移植片インビボモデル内へ取り込む。その好都合なキレート化学、放射能の半減期および追跡可能な $\gamma$ 放出に起因して、 $^{111}\text{In}$ 標識された抗 P S M A 抗体をこれらの研究のために使用する。 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{177}\text{Lu}$  および  $^{90}\text{Y}$  (治療的に関心のある核種である) の半減期に適切のように、時間点を評価する。標識

された放射性構築物（1～5  $\mu\text{g}$ ）をヌードマウス（正常および腫瘍を有する）に静脈注射し、そしてこのマウスを、注射から5分後、15分後、30分後、60分後、2時間後、4時間後、18時間後、および24時間後に屠殺する。血液および主要な器官を動物から取り出し、重量を測定し、そして組織1グラムあたりに注射されたパーセント放射能を決定する（Nikula, T. K. ら, J. Nucl. Med. 40:166～176, 1999）。過剰な非標識構築物の前注射によって、特異性を扱う。肉眼で見える腫瘍の容量および動物の生存率を実験の間中記録する。

#### 【0242】

正常マウスおよび腫瘍を有するマウスに静脈内注射または腹腔内注射を介して投与する場合、投薬量範囲研究をまた、構築物の傷害性を決定するために実行する。これらの動物を、研究過程の間の傷害性副作用に関して、血液化学および理学的検査によって慣用的に試験する。さらなる評価のための血液および体組織を回収するために、研究の間および最後に、動物を屠殺する。以前のデータは、250  $\mu\text{Ci}$  /マウスの最大限近くまで許容された投薬量を証明し、そして総投薬量はそのレベル未満で維持される。

10

#### 【0243】

いったん静脈内の生体分布および傷害性を証明するならば、腫瘍の放射線治療を評価する。抗腫瘍活性を評価するために、5頭のマウスの群に、1  $\mu\text{g}$  未満の放射性標識された抗PSMA mAb構築物を腫瘍チャレンジ前およびチャレンジ後の両方で注射する。抗原陰性（RAJIまたはRAMOS）異種移植片腫瘍もまた、コントロールとして使用する。他のコントロールは、（1）非標識の抗PSMA mAb単独での処置および（2）過剰な非標識抗PSMA mAb前処置の後、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ および／または $^{90}\text{Y}$ 標識した抗PSMAで処置し、特異的な標的化をブロックする処置、を含む。

20

#### 【0244】

腫瘍を有するマウスの群に、非標識の抗PSMA mAb（等モル濃度で）および放射性標識した抗PSMAのいくつかの用量レベルまたは同様に標識したアイソタイプコントロール抗体を注射した。腫瘍成長に対する効果を、経時的に評価する。治療群の間の統計的違いを、分散分析（ANOVA）法を使用して決定し、そして動物の生存を Kaplan-Meier プロットを使用して示す。 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ および／または $^{90}\text{Y}$ 標識した抗PSMA構築物の効能は、インビトロで得られたデータと相関係数する。これらの実験の成功を、放射性標識したアイソタイプコントロールmAbと比較した場合、有意（ $p < 0.05$ ）に寿命を増加させそして／または腫瘍容量を減少させる能力として定義する。

30

#### 【0245】

さらに、この腫瘍モデルを、放射性標識した抗体の注射前に非標識抗体とともに前投薬することが、放射性標識した抗体の腫瘍への送達を改善するか否かを試験するために使用する。5～100  $\mu\text{g}$  の非標識抗体の事前の単回の注射のありまたはなしで、腫瘍を有するマウスに1  $\mu\text{g}$  未満の放射性標識した抗PSMA抗体を注射する。数日後、腫瘍、正常組織、および血液における放射能分布の評価のために動物を屠殺する。非標識抗体との前投薬が、放射性標識した抗体の腫瘍への送達および標的化を改善する場合、このアプローチを応用し、そして傷害性および治療研究において最適化する。

40

#### 【0246】

全生存に加えて、腫瘍移植後（1日目 対 3日目 対 7日目）の注射のタイミングの役割、投薬量（3～4用量レベルを使用する用量反応曲線）の役割、スケジュール（1回 対 1日あたりの注射で分割した複数回）の役割および処置（非標識抗PSMAで前処置し、標的化をブロックする）の特異性を試験する。

#### 【0247】

放射性標識した抗体の最大限許容用量、抗体活性、最適の投薬スケジュール（1回または複数回の注射）、および腫瘍サイズへの効果を扱うために、これらのインビボ研究を設計する。この研究の首尾よく完了によって、前立腺癌のPSMA標的化 $\alpha$ 粒子放射性免疫

50

治療 (RIT) の実行可能性を決定が可能にされ、そして臨床的な発達に入るために最適な<sup>213</sup>Biおよび／または<sup>225</sup>Ac標識した構築物を同定される。

#### 【0248】

(CWR22マウス異種移植片モデル)

非標識形態、毒素標識した形態および／または放射性同位元素標識した形態において最も有望な抗PSMA mAbsを、CWR22ヒト前立腺癌異種移植片マウスモデルにおいて試験する (Wainstein, M. A. ら, Cancer Res 54: 6049~6052 (1994); Nagabhushan, M. ら Cancer Res 56: 3042~3046 (1996); Pretlow, T. G. ら J Natl Cancer Inst 85: 394~398 (1993))。このモデルは、アンドロゲン依存性、血清中のPSAの測定レベルと腫瘍サイズとの間の関係、およびPSMAの高レベル発現を含むヒトの状態における多くの特徴を有する。アンドロゲンの中止に引き続いて、PSAレベルは、検出限界レベル近くまで減少し、そして腫瘍容量が減少する。後に、腫瘍は、アンドロゲン非依存性の新生物として再成長し、初期にはPSA中での上昇によって、そして後には測定可能な腫瘍成長によって顕在化する。アンドロゲン中止後、腫瘍は、種々の時間で再成長する。

#### 【0249】

4週齢~6週齢のヌード無胸腺BALB/c雌マウスを、国立癌研究所 (National Cancer Institute) -フレドリック癌センター (Frederick Cancer Center) から得、そして加圧して換気したケージングにおいて維持する。多くの側面で免疫不全である一方、これらのマウスは、ADCCおよびCMLの野生型レベルを媒介する。確立された腫瘍由来の細かく切り刻まれた腫瘍組織を再構成された基底膜と共に無胸腺マウスの側部の皮下組織へ注射することによって、CWR22腫瘍株を、動物において増殖させる (Matrigel, Collaborative Research, Bedford, MA)。血清アンドロゲンレベルを維持するために、腫瘍を受け入れる前に、マウスに12.5mgの徐放性テストロンステロンペレット (Innovative Research of America, Sarasota, FL) を経皮投与する。接種から3~4週間後に、およそ1.5×1.0×1.0cmの腫瘍を測定する。アンドロゲンをペントバルビタール麻酔および徐放性テストロンステロンペレットの除去下での外科的去勢によって除去する。腫瘍サイズを、高さ、幅および深さのカリパス測定によって決定する。PSA値を、尾採血後、マウスの血清についてTandem-R PSA免疫放射性測定アッセイ (Hybritech, San Diego, CA) を使用して測定する。

#### 【0250】

抗腫瘍活性を評価するために、5匹のマウス群に抗PSMA mAbまたは類似のアイソタイプコントロールmAbを、5~100μgからの投薬量で注射する。単回用量 対1日あたりの分割した注射で複数回、をスケジュールする効果をまた、試験する。肉眼で見える腫瘍容量および動物の生存率を、実験の全体を通して記録する。治療群との間の統計学的差異を、分散分析 (ANOVA) 方法を使用して決定し、そして動物の生存を、 $p < 0.05$ の差異として規定した成功例の、カプラン-マイヤープロットを使用して示す。同様に、「裸」のmAbの効果を<sup>90</sup>Y、<sup>177</sup>Lu、<sup>213</sup>Biおよび／または<sup>225</sup>Ac標識化抗PSMA構築物で見出されるものと比較する。

#### 【0251】

mAbの最大耐性用量、抗体の活性、最適投薬量および投薬スケジュール (1回または複数回に分割した注射)、ならびに腫瘍サイズにおける処置の効果にとりかかるために、これらのインビボ研究を設計する。本研究の首尾よい完了によって、前立腺癌のPSMA標的化免疫治療の実行可能性および臨床的発達に入るための最適構築物の同定を決定し得る。

#### 【0252】

(実施例15: ネイティブPSMAタンパク質コンフォメーションの研究)

(LNCaPおよび3T3細胞の細胞表面からのPSMAの抽出)

LNCaPおよび3T3細胞を、コンフルエントまでT150細胞培養フラスコにおいて増殖させ、細胞解離液(Mediatech, Herndon, VA)を使用して剥離し、そして15mlの円錐形チューブに移した。この細胞を、PBSで2回洗浄し、そして2mlのM-Per<sup>TM</sup>哺乳動物タンパク質抽出試薬(Pierce, Rockford, IL)で再懸濁した。10分間4°Cでインキュベートした後、細胞破片および不溶性の凝集塊を15,000rpmで30分間4°Cでの遠心分離によって除去した。上清を低温バイアルに移し、そしてさらなる使用まで-80°Cで保存した。

#### 【0253】

(組み換え、可溶性PSMA(rsPSMA)の産生および精製)

PSMAの細胞外ドメイン(全長タンパク質(配列番号1)のアミノ酸44~750)を、DXB11チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株(rsPSMA発現ベクターで安定にトランスフェクトした)から分泌されたタンパク質として回収した。この細胞を、タンパク質を含まない培地中でCelligen Plus 2.2L Packed Bed Bioreactor(New Brunswick Scientific, Edison, NJ)において増殖させた。Bioreactorを、灌流モードで運転し、そして上清を、4°Cに維持された回収バック内に無菌的に回収した。プロテアーゼインヒビター、アプロチニンを回収した上清(-90°Cでの保存前に25倍に濃縮した)に添加した。精製のために、この濃縮物を解凍し、そしてコンカナバリンAレクチンアフィニティークロマトグラフィーおよびブチルセファロース疎水的相互作用クロマトグラフィーの引き続く工程を使用して精製した。精製したタンパク質を、10mMリン酸カリウム(pH7.0)に対して透析した。精製したrsPSMAタンパク質はダイマーであり、そして公開された手順(Pintoら, Clinical Cancer Research 2:1445, 1996)に従って試験される場合、フォレートヒドロラーゼ活性を有し、そしてコンフォメーション特異的モノクローナル抗体のパネルの各々と反応し、これはrsPSMAがネイティブコンフォメーションを採用することを示す。

#### 【0254】

(異なるPSMAタンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)およびウエスタンブロッティング)

各個々のPAGE分析のために、15μlの各細胞溶解物および5μlの精製したrsPSMAを使用した。

#### 【0255】

SDS-PAGEを、標準的な手順を使用して実行した。サンプルをLaemmliサンプル緩衝液(還元剤ジチオトレイトール[DTT]を含むまたは含まない)の存在下で5分間煮沸することで調製した。次いで、サンプルを、4~15%Tris-グリシゲル(BioRad, Hercules, CA)に適用した。1時間200Vでの泳動後、タンパク質をニトロセルロース(BioRad)上に移し、そしてウエスタンブロッティングによって分析した。

#### 【0256】

異なるPSMAタンパク質のオリゴマーの性質を、ブルーネイティブPAGE(BN-PAGE)を使用して分析した。各サンプルを、ゲル上にロードする前に、等量の2×BN-PAGEサンプル緩衝液(0.1M MOPS/0.1M Tris/40%グリセロール/0.1%クマシーG-250)で希釈した。BN-PAGEを、4~12%Bis Trisゲル(Invitrogen, Carlsbad, CA)および泳動緩衝液として50mM MOPS/50mM Tris(pH7.7)を使用して実行した。クマシーブルーは、タンパク質をニトロセルロースに移す間に、結合したタンパク質との干渉を避けるために、カソード緩衝液から除外した。2.5時間の125Vでの泳動に引き続いて、タンパク質をニトロセルロース膜(BioRad)に移し、そしてウエスタンブロッティングによって分析した。

#### 【0257】

ウエスタンブロッティングを以下のように実行した：転移に続いて、ニトロセルロース膜を、PBS／0.1% Triton X-100／0.02% SDS中の5%ミルク（これは、後に続く洗浄および抗体インキュベート工程に関してもまた使用される）でブロックした。PSMAタンパク質を、1次抗体として抗PSMA mAb 3.1または3.9（Progenics Pharmaceuticals）および2次抗体としてHRP標識化抗マウスIgGを使用し、そして1時間室温でインキュベートすることで検出した。膜を、化学発光（NEN Plus, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA）を使用して比色定量的に現像した。

#### 【0258】

（結果）

全長PSMAおよび組み換えの可溶性PSMA（rsPSMA）の両方が、約100 kDaの分子量を有して還元性SDS-PAGEおよび非還元性SDS-PAGE上を移動する（図5）。全長PSMAについての結果は、以前の観察（Israeliら，米国特許第5,538,866号；Murphyら，米国特許第6,158,508号；Israeliら，Cancer Research 54:1807,1994；Troyerら，Int. J. Cancer 62:552,1995；Troyerら，The Prostate 30:233,1997；Grauerら，Cancer Research 58:4787,1998）と一致する。これらの報告の各々において、全長のPSMAは、報告（米国特許第6,158,508号；Troyerら，1995；Troyerら，1997）のサブセットにおいて観察される重要でない180~200 kDaのバンド（代表的には総PSMAタンパク質の5%未満）を伴って、100~120 kDaの主要なバンドとして移動した。Troyerら（1995）は、SDS界面活性剤の濃度の増加で粉砕され得るPSMAダイマーと非共有結合的に関連するとして、180~200 kDaの種について記載する。

#### 【0259】

rsPSMAは、全長PSMAに存在するアミノ酸の94%（750のうちの707）を含み、そして2つのタンパク質は、予想されるように、この分析において明らかに分離されない。

#### 【0260】

SDS-PAGEは、変性したタンパク質のみの分析を可能にする。ネイティブな状態におけるネイティブなタンパク質を試験するために、ブルーネイティブPAGE（BN-PAGE）のような他の技術を実行しなければならない。BN-PAGEを、タンパク質のネイティブな分子量およびその非共有結合的な複合体（Schaeggerおよびv. Jagow, Anal Biochem. 199:223~231,1991；Schaeggerら，Anal. Biochem. 217:220~230,1994）を決定するために使用する。色素クマシーブルーG-250は、ほとんどのタンパク質の表面上の疎水性ドメインに結合し、可溶性を増強し、そしてネイティブタンパク質に関して電荷シフト（タンパク質の等電点に関係なくpH7.5での正極方向への移動を生じる）を導入する。BN-PAGE中でのタンパク質の移動速度は多少変更するが、タンパク質の分子質量を、ゲル中に存在するアクリルアミド勾配の孔サイズの減少に起因して、それぞれ移動の終点によって決定し得る。

#### 【0261】

BN-PAGEで分析した場合、全長PSMA（LNCaPまたは3T3細胞から抽出される）および精製されたrsPSMAは、約190 kDaの分子量を有して移動する（図6）。全長PSMAに関してこの驚くべき観察は、細胞表面PSMAの優勢な形態が、ダイマーと非共有結合に結合に関連することを示す。この予想外の結果は、以前の報告（米国特許第6,158,508号；Troyerら 1995；Troyerら，1997）（PSMAダイマーがSDS-PAGE分析における重要でない種を示す）のものとは対比され得る。おそらく、非共有結合的なPSMAダイマーを、変性界面活性剤SDSの存在下での煮沸によって大部分を解離させる。

## 【0262】

さらに、精製した r s P S M A タンパク質についての結果は、r s P S M A に存在しないこのダイマーが、膜貫通セグメントまたは細胞内セグメントにおけるアミノ酸に加えて、またはこれらを除いて、細胞外アミノ酸間の相互作用を介して安定化されることを示す。

## 【0263】

(実施例 16 : P S M A マルチマーの解離)

P S M A は、推定の亜鉛メタロプロテアーゼ (metalloprotease) であり、そして亜鉛結合に関係するアミノ酸の部位特異的変異誘発は、酵素活性の著しい消失を生じる (Speno ら, Molecular Pharmacology, 55:179, 1999)。これらのアミノ酸としては、His-377、Asp-387、Glu-425、Asp-453 および His-553 が挙げられる。エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) は、 $Zn^{2+}$  および他の 2 価陽イオンに対する強キレート剤であり、従って P S M A から  $Zn^{2+}$  または他の同等な 2 価陽イオンを除去する可能性を有する。本発明者らは、EDTA 処理が P S M A ホモダイマーにモノマーサブユニットへの解離を引き起こさせることを決定づける。類似の結果が、エチレングリコールビス ( $\beta$ -アミノエチルエーテル) (EGTA) のような類似のキレート特性を有する他の薬剤について予測され得る。

## 【0264】

精製した r s P S M A タンパク質を、10mMEDTA を含むかまたは含まないで、16 時間 4℃ でインキュベートし、次いで BN-PAGE によって分析した。これらの条件下で、r s P S M A が、EDTA の非存在下でダイマーのままであったのに対して、EDTA 処理したタンパク質は、モノマーであった。P S M A ダイマーのモノマーへの解離は、本質的に完了したが、所望される場合、任意の残存ダイマータンパク質を、ゲル濾過、超遠心分離または当業者に周知の他のサイズベースの分離方法によって除去し得る。

## 【0265】

(実施例 17 : P S M A 解離の促進物を同定するための方法)

以下の工程を包含する方法を使用して P S M A ダイマーの解離を促進する能力について、化合物をスクリーニングする：

(a) P S M A ダイマーと化合物とを、この化合物の非存在下で P S M A ダイマーの解離を促進させない条件下で、接触させる工程；

(b) P S M A モノマーの量を測定する工程；および

(c) この化合物の存在下で測定した P S M A モノマーの量とこの化合物の非存在下で観察した P S M A モノマーの量とを比較する工程。

## 【0266】

化合物の存在下で測定した P S M A モノマーの量の増加は、この化合物が P S M A ダイマーの解離を促進し得ることを示す。

## 【0267】

さらなる実施形態において、以下の工程を包含する方法を使用して P S M A ダイマーの解離を促進する能力について、化合物をスクリーニングする：

(a) P S M A ダイマーと化合物とを、この化合物の非存在下で、P S M A ダイマーの解離を促進させない条件下で、接触させる工程；

(b) P S M A ダイマーの量を測定する工程；および

(c) この化合物の存在下で測定された P S M A ダイマーの量とこの化合物の非存在下で観察した P S M A ダイマーの量とを比較する工程。

## 【0268】

化合物の存在下で測定した P S M A ダイマーの量の減少は、この化合物が P S M A ダイマーの解離を促進し得ることを示す。

## 【0269】

さらなる実施形態において、以下の工程を包含する方法を使用して、P S M A ダイマー

10

20

30

40

50

の解離を促進する能力について、化合物をスクリーニングする：

(a) P S M Aダイマーと化合物とを、この化合物の非存在下で、P S M Aダイマーの解離を促進させない条件下で、接触させる工程；

(b) P S M AモノマーおよびP S M Aダイマーの量を測定する工程；

(c) P S M Aモノマー 対 P S M Aダイマーの比を計算する工程；および

(d) (c) で得た比とこの化合物の非存在下で得た比とを比較する工程。

#### 【0270】

この化合物の存在下で測定した比の増加は、この化合物がP S M Aダイマーの解離を促進し得ることを示す。

#### 【0271】

(実施例18：細胞表面へのP S M A結合研究)

(フローサイトメトリー)

親の3 T 3細胞またはP S M A発現3 T 3細胞(1条件あたり $2 \times 10^5$ 細胞)を、P B S中で洗浄し、そして非特異的な結合部位をブロックするためにヤギ血清(10% v/v)を含むP B Sとともに20分間氷上でインキュベートした。抗P S M Aモノクローナル抗体(上清中の未精製形態または精製したmAb)を、 $100 \mu\text{l}$  P B S中の細胞に段階希釈して添加し、そして氷上で30分間インキュベートした。コントロールの抗ヒトI g G(C a l t a g, B u r l i n g a m e, C A)を、バックグラウンド結合を確立するために使用した。P B S中での2回の洗浄後、細胞を、抗ヒトI g G(B D P h a r m i n g e n, S a n D i e g o, C A)とともに30分間氷上でインキュベートした。細胞を、P B S中で2回洗浄し、 $250 \mu\text{l}$ のP B Sにおいて再懸濁し、そしてF A C S c a n装置(B e c t o n D i c k i n s o n, F r a n k l i n L a k e s, N J)およびC e l l Q u e s t ソフトウェアを使用するフローサイトメトリーによって分析した。生存細胞を、前方散乱パラメータおよび側方散乱パラメータによってゲートし、そして結合を、平均蛍光強度(M F I)レベルのヒストグラムプロットを使用して定量化した。

#### 【0272】

抗P S M A m A b s X G-006(P T A-4403およびP T A-4404、重鎖プラスミドおよび軽鎖プラスミド)、X G-051(P T A-4407およびP T A-4408)、4.40.1(P T A-4360；4.40、4.40.1および4.40.2は、ハイブリドーマをサブクロニングする異なる段階を示す、同じ抗体である)、4.49.1、4.292.1(P T A-4390)および4.304.1は、細胞表面P S M Aに強く結合することが見出された(図24)。

#### 【0273】

(最大結合)

フローサイトメトリーデータ(平均蛍光強度 対 抗体濃度)を移し、そしてE x c e l ソフトウェア(M i c r o s o f t, R e d m o n d, W A)を使用してプロットした。少なくとも3回の測定の典型的な実験からの結果を、図25A~25Cに示す。結合を、E x c e l 中のF o r e c a s t 機能を使用して、50%有効濃度(E C 5 0)の計算によって比較した。E C 5 0値は、最大値の半分の結合に必要とされる抗体濃度を示す。

#### 【0274】

抗P S M A m A b 10.3(P S M A 10.3)およびX G-006が、3 T 3-P S M A細胞に結合し、そして3 T 3細胞に結合しないことを見出した(図25A)。抗体(26mM)を細胞に添加し、これをフローサイトメトリーによって分析した。抗P S M A m A bを含むX G-006、4.304.1、X G-026(P T A-4405およびP T A-4406)および4.49.1の培養上清の段階希釈を使用する細胞表面P S M Aへの結合をまた、証明した(図25B)。精製した抗P S M A m A b X G-006および10.3の段階希釈を使用する細胞表面P S M Aへの結合を、図25Cによって示す。

#### 【0275】

## (実施例19：毒素標識した抗体の細胞傷害性)

PSMA-3T3、LNCaP、および／またはC4-2細胞（ならびに、PSMAを発現しないコントロール細胞株3T3およびPC3）を、96ウェルマイクロプレート（Falcon）中で2,500細胞／100μL／ウェルでプレートし、そして一晩37℃で5%CO<sub>2</sub>存在下でインキュベートした。PSMA3T3（および3T3）ならびにLNCaP（およびC4-2およびPC3）のために使用する培地は、それぞれ2mM L-グルタミン、10% FBS、および1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含むDMEMまたはRPMI 1640であった。培地中の50ng（50μLにおける）のMab-ZapまたはHum-ZAP（Advanced Targeting Systems, San Diego, CA）を各ウェルに添加した。Mab-ZapおよびHum-Zapは、サポリン（saporin）（植物Saponaria officinalisの種子由来の植物リボソーム不活性化タンパク質（RIP）のうちで最も効力のある）に共有結合したヤギ抗マウスIgG抗体またはヤギ抗ヒトIgG抗体である。サポリンはアポトーシスによる細胞死を誘導する（Bergamaschi, G., Perfetti, V., Tonon, L., Novella, A., Lucotti, C., Danova, M., Glennie, M. J., Merlini, G., Cazzola, M. Saporin, a ribosome-inactivating protein used to prepare immunotoxins, induces cell death via apoptosis. Br J Haematol 93, 789~94. (1996)）。このMab-Zapは、適切な1次抗体の非存在下で細胞と結合しなかったまたは細胞内に内在しなかった。

## 【0276】

マウス3.9、5.4、mJ591（ATCC#HB-12126）およびヒト006、4.40、4.304抗PSMA抗体（ならびにコントロールIgG抗体）を、合計量を200μLにもってくるために3通りで、異なる濃度でプレートに添加した。内在化する前にPSMA抗体へのMab-ZapまたはHum-Zapの結合を最大限にするために、このプレートを氷上で少なくとも30分間冷たく維持した。このプレートを2日間インキュベートし、次いで培地を交換し、そしてさらに2日間インキュベートした。4日間のインキュベーション後、培地を抜き取り、そして10%Alamar Blue（20μL, Bioscience, Camarillo, CA）を含む新鮮培地を各ウェルに添加し、そして2時間インキュベートした。CytoFlourプレートリーダーを、96ウェルプレートにおける蛍光を530nmの励起波長および590nmの発光波長で測定するために使用した。毒素の内在化は、抗PSMA抗体によって媒介された。細胞殺傷を、C4-2細胞に関しては図26において、PSMA-3T3細胞に関しては図27において例示した。

## 【0277】

ヒト4.304抗PSMA抗体を、サポリン（Wrennら, Brain Res. 740:175~184, 1996）と直接結合させ、そしてその細胞傷害性を、上述されるような類似のプロトコールを使用して証明した（図28を参照のこと）。

## 【0278】

## (実施例20：免疫反応性)

PSMA-3T3、LNCaPおよびC4-2を、PSMA発現細胞株として使用し、そして3T3を、PSMAを発現しないコントロール細胞株として使用した。この細胞を、本アッセイにおける非特異的な結合を減少させるために、10%ヤギ血清を用いて氷上でブロックした。

## 【0279】

少量（1~5ng）の標識したmAbを、1000万個の細胞の細胞ペレットに添加し、そして穏やかに混合しながら0℃（氷上）でインキュベートした。1時間のインキュベーション後、細胞を遠心分離によって回収し、そして未結合のmAbを含む上清を、新鮮な細胞ペレットに移してさらに1時間0℃で培養した。両セットの細胞を遠心分離して、

そして2回冷PBSで洗浄した。この細胞ペレット、上清および洗浄分画を放射能について計数した。免疫反応性を細胞ペレットにおける放射能の量を細胞ペレット、上清および洗浄分画における総放射能で割って定義する。これらのデータを以下の表3に示す。

【0280】

【表3】

表3. PSMA発現細胞に対するIn-111放射性標識した抗体の免疫反応

| 放射性同位元素標識したmAb | 免疫反応性 (%)       | 細胞株            |
|----------------|-----------------|----------------|
| In-111 4.304   | 92.6 (1.4)      | PSMA-3T3 (3T3) |
|                | 92.6            | PSMA-3T3       |
|                | 91.4 (1.7)      | PSMA-3T3 (3T3) |
|                | 89.1            | LNCaP          |
|                | 92.4            | C4-2           |
| 平均 =           | 91.6 ± 1.5      |                |
| In-111 4.40    | 87.7 (0.5)      | PSMA-3T3 (3T3) |
|                | 86.8            | PSMA-3T3       |
|                | 89.4 (1.5)      | PSMA-3T3 (3T3) |
|                | 88.0 ± 1.3      |                |
| In-111 mJ591   | 58.5            | PSMA-3T3       |
|                | 54.9 (1.1)      | PSMA-3T3 (3T3) |
|                | 平均 = 56.7 ± 2.5 |                |
| In-111 3.9     | 88              | LNCaP          |
|                | 87              | C4-2           |
|                | 89 (2)          | PSMA-3T3 (3T3) |
|                | 95.3 (0.5)      | PSMA-3T3 (3T3) |
|                | 88.6            | PSMA-3T3       |
|                | 84.8            | C4-2           |
|                | 89.3            | PSMA-3T3       |
|                | 平均 = 88.6 ± 3.2 |                |

抗体4.40、4.304およびmJ591を、二官能性のキレートCHX-A<sup>+</sup>-DTPAに結合体化し、そして抗体3.9をC-DOTAに結合体化した。

【0281】

(実施例21: 結合エピトープを同定するための競合結合アッセイ)

mAbの所定の群がPSMA上の異なったエピトープまたは重複エピトープを認識するか否かを同定するために、競合結合アッセイを、In-111放射性標識した抗体を用いて実行した。2 × 10<sup>5</sup>細胞(100 μL)のPSMA-3T3を96ウェルマイクロプレートでプレーティングし、そして抗体4.40、4.304およびmJ591(100 μL)を異なる濃度(段階希釈)で添加した。この細胞を0°Cで30分間インキュベートした。20 μLのIn-111放射性標識したCHX-A<sup>+</sup>-DTPA抗体構築物を各ウェルに添加した。競合結合のための氷上での2時間のインキュベート後、この細胞を5回冷PBSを使用して洗浄した。In-111が結合した抗体を含むこの細胞を、マイクロプレートから試験チューブに回収し、そしてγ計数器で計数した。

## 【0282】

図29に詳細に示した結果は、mJ591が、PSMA-3T3細胞に結合するIn-111 4.40をブロックし、そしてIn-111 4.304をブロックしなかったことを示す。さらに、4.40および4.304は、互いにブロックしなかった。非改変抗体4.304およびmJ591をまた、In-111放射性標識したmJ591と競合させるために使用した。ヒト4.304は、PSMA-3T3への結合のためにIn-111 mJ591と競合しなかった(図30)。

(実施例22: Biacore 3000を使用する結合親和性)

抗体の動態および親和性を測定するために、粗上清中の抗体、精製した形態の抗体および二官能性のキレートで変性した形態の抗体を、Biacore 3000機器(Biacore Inc., Piscataway, NJ)を使用して分析した。Biacore 3000は、十分に自動化された表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance)(SPR)ベースのバイオセンサーシステム(タグまたは生物分子学的相互作用に関する化合物の標識を必要としないアッセイ形式から、リアルタイムの動態データを提供するために設計される)である。これは、粗上清をスクリーニングするための理想である。

## 【0283】

ストレプトアビジンで被膜されたセンサーチップ(SAチップ、Biacore)を、ビオチン化された抗ヒトIgG抗体(Sigma, St. Louis, MO)を補足するために使用した。センサーチップの表面全体を、調節液(1M NaCl、50mM NaOH)の5回注入で調節し、そして0.005%ポリソルベート20を含むPBS緩衝剤で平衡化した。ビオチン化された抗ヒトIgG抗体(Sigma)の2~3000共鳴ユニット(RU)をSAチップ上に固定し、引き続いて再生緩衝剤(グリシン-HCl(pH2.2))を注入した。上清中の抗体を、PBS緩衝液中に2μg/mLまで希釈し、そして1つの抗ヒトIgGフローセル(flow cell)上で補足した一方で、アイソタイプにマッチしたコントロールヒト抗体(Sigma)を同様に第2のフローセル上で補足した。PBS緩衝液における異なる濃度でのrsPSMAを、30μL/分で「関連段階」においては3分間、引き続く「解離段階」においては10分間、細胞にわたって流した。SPRをモニターし、そして時間の関数として示した。1つの濃度でのそれぞれの抗体について、チップを再生し、そして平衡化した。100nM~6.25nMの異なる濃度のrsPSMAの関連段階および解離段階における抗体PRGX1-XG-006の分析の例を、図31に示す。結合の熱力学速度定数および動力学的速度定数を、Biacore Evaluationソフトウェアを使用して計数した。例えば、上清中のXG-006抗体のrsPSMAに対する親和性は、 $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の $K_a$ および $6.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の $K_d$ を有する $4.92 \times 10^{-10} \text{ M}$ であることを決定した。粗上清中のいくつかのヒトPSMA抗体、精製した形態のヒトPSMA抗体、および二官能性のキレート剤で変性したヒトPSMA抗体に関する選択的なデータを、比較のために表4に列挙する。

## 【0284】

In-111放射性標識した抗体の結合活性を、PSMA発現細胞(LNCaP, C4.2, PSMA-3T3およびコントロールとしての親3T3)を使用して得た結合データのスキッチャード分析によって決定した。この実験手順およびデータ分析方法は、前に記載されている(Scheinberg, D. A. ら Leukemia 3:440~445(1991))。

## 【0285】

【表 4】

表 4.  $I n-111$  放射性標識したスキッチャード分析して使用して決定された、粗上清中の抗体、精製された形態、二官能性のキレートで改変された形態の動力学的速度定数および  $KD$

| 抗体                | $Ka (M^{-1}, s^{-1})$ | $Kd (s^{-1})$ | $KD (M^{-1})$ | Avg $KD$ |
|-------------------|-----------------------|---------------|---------------|----------|
| 006 上清            | 1.30E+05              | 6.40E-05      | 4.92E-10      | 4.92E-10 |
| 精製 006-1          | 2.94E+05              | 1.37E-04      | 4.66E-10      |          |
| 精製 006-2          | 2.26E+05              | 1.27E-04      | 5.62E-10      | 5.14E-10 |
| 4.40 上清           | 2.10E+05              | 1.25E-04      | 5.95E-10      | 5.95E-10 |
| 精製 4.40-1         | 2.54E+05              | 1.52E-04      | 5.98E-10      |          |
| 精製 4.40-2         | 2.43E+05              | 2.37E-04      | 9.75E-10      | 7.87E-10 |
| CHX-4.40-1        | 2.57E+05              | 1.60E-04      | 6.23E-10      |          |
| CHX-4.40-2        | 2.47E+05              | 1.55E-04      | 6.28E-10      | 6.25E-10 |
| IN-111CHX-4.40-1  |                       |               | 4.44E-09      |          |
| IN-111CHX-4.40-2  |                       |               | 4.95E-09      | 4.70E-09 |
| 4.304 上清          | 1.40E+05              | 1.25E-04      | 8.93E-10      | 8.93E-10 |
| 精製 4.304-1        | 8.31E+04              | 1.20E-04      | 1.44E-09      |          |
| 精製 4.304-2        | 1.06E+05              | 6.33E-05      | 5.97E-10      | 1.02E-09 |
| CHX-4.304-1       | 6.19E+04              | 1.21E-04      | 1.95E-09      |          |
| CHX-4.304-2       | 6.79E+04              | 1.49E-04      | 2.19E-09      | 2.07E-09 |
| IN-111CHX-4.304-1 |                       |               | 9.63E-09      |          |
| IN-111CHX-4.304-2 |                       |               | 5.97E-09      | 7.80E-09 |
| 10.3 上清           | 1.90E+05              | 3.63E-04      | 1.91E-09      | 1.91E-09 |
| 精製 10.3-1         | 3.28E+05              | 6.32E-05      | 1.93E-10      |          |
| 精製 10.3-2         | 2.96E+05              | 6.43E-05      | 2.17E-10      | 2.05E-10 |

十分なヒト抗体 4.40.1、4.49.1、051 および 006 とマウス抗体 3.9 との比較を、Biacore で実行した。比較のためのそれぞれの抗体について、応答を 100 RU に規格化した。これらの抗体について時間 対 応答差異のグラフを、図 32 に示す。これらの抗体について結合の親和性は、それぞれ 6.1、6.7、5.8、4.8 および  $13.7 \times 10^{-10} M$  であると決定された。

## 【0286】

(実施例 23: インビトロおよびインビボ研究のための細胞株の特徴付け)

$I n-111$  標識した抗 PSMA 抗体 3.9 を使用するスキッチャード分析から生じる結果を、図 33 に示す。トランスフェクトされたマウス 3T3 細胞は、1 細胞あたり 100 万個より多い PSMA のコピーを発現し、LNCAP 細胞 (アンドロゲン依存性ヒト前立腺癌細胞株) は、64 万個のコピーを発現する一方で、C4-2 細胞 (アンドロゲン非依存性) は、1 細胞あたり 25 万個のコピーを発現する。細胞表面 PSMA に対する親和性 3.9 は、PSMA-3T3 に関しては 6.4 nM、LNCAP に関しては 4.0 nM、および C4-2 に関しては 3.3 nM (4.6 nM がこれらのデータの平均である) である。

## 【0287】

ヒト抗 PSMA 抗体についての粗上清の分析の要旨を、以下表 5 において与える。

## 【0288】

【表 5】

表 5 : 抗 P S M A モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 の 特 徴

| 上清            | Ab Conc<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |                 | 3 T 3 - P S M A へ の 結 合 ( F A C S ) |             |             | C4.2<br>FACS | 抗 P S M A<br>ウエスタン  | Biacore 研究                       |                                    |                                 |
|---------------|---------------------------------|-----------------|-------------------------------------|-------------|-------------|--------------|---------------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
|               | PGNX                            | 溶解産物<br>EIA     | PGNX<br>FACS                        | AVG<br>最大結合 | AVG<br>EC50 |              |                     | KD, M-1<br>( $\times 10^{-10}$ ) | Ka,<br>M-1s-1<br>( $\times 10^6$ ) | Kd, s-1<br>( $\times 10^{-5}$ ) |
| PRGX1-XG1-026 | 4.7                             | ND <sup>1</sup> | ND                                  | 148         | 2.4         | ND           | Conf. <sup>2</sup>  | 2.0                              | 1.5                                | 2.9                             |
| 4.4.1         | 4.7                             | 0.08            | 7                                   | 8           | ND          | 5.2          | Conf.               | 4.2                              | 2.3                                | 9.7                             |
| PRGX1-XG1-006 | 1.8                             | 0.39            | 114                                 | 183         | 3.4         | 9.5          | Conf.               | 4.8                              | 1.3                                | 6.4                             |
| PRGX1-XG1-051 | 3.5                             | 0.48            | 83                                  | 202         | 2.0         | 9.9          | Conf.               | 5.8                              | 1.4                                | 8.2                             |
| 4.40.1        | 4.3                             | 0.33            | 53                                  | 163         | 2.3         | 10.8         | Conf.               | 6.1                              | 2.1                                | 12.5                            |
| 4.49.1        | 2.6                             | 0.36            | 362                                 | 162         | 0.9         | 16.2         | Conf.               | 6.7                              | 3.1                                | 20.7                            |
| 4.292.1       | 2.7                             | 0.18            | 75                                  | 195         | 6.0         | 9.2          | Conf.               | 6.8                              | 1.2                                | 8.5                             |
| 4.304.1       | 4.1                             | 0.39            | 92                                  | 184         | 9.1         | 8.4          | Conf.               | 8.7                              | 1.4                                | 12.5                            |
| 4.232.1       | 2.4                             | 0.49            | 97                                  | 138         | 2.7         | 6.0          | Linear <sup>3</sup> | 9.4                              | 1.5                                | 13.8                            |
| 4.153.1       | 5.9                             | 0.29            | 279                                 | 182         | 5.3         | 14.8         | Conf.               | 9.5                              | 1.2                                | 11.8                            |
| 4.333.1       | 2.9                             | 0.18            | 82                                  | 168         | 3.1         | 6.6          | Conf.               | 11                               | 0.7                                | 8.5                             |
| PRGX1-XG1-077 | 3.9                             | 0.45            | 392                                 | 227         | 6.0         | 12.4         | Conf.               | 16                               | 0.6                                | 10.4                            |
| 10.3          | 8.5                             | 1.06            | ND                                  | ND          | ND          | ND           | ND                  | 19                               | 1.9                                | 36.4                            |
| 純粋 10.3       |                                 | 0.44            | 130                                 | 181         | 7.5         | ND           | Conf.               | ND                               |                                    |                                 |
| 4.22.1        | 2.8                             | 0.08            | 7                                   | ND          | ND          | 4.7          | ND                  | 20                               | 1.7                                | 33                              |
| 4.248.1       | 3.5                             | 0.37            | 7                                   | ND          | ND          | 4.1          | Conf.               | 27                               | 1.0                                | 28                              |
| 4.54.1        | 10                              | 0.14            | 267                                 | 162         | 3.9         | 13.6         | ND                  | 30                               | 1.9                                | 56                              |
| 4.7.1         | 5                               | 0.23            | 156                                 | 141         | 1.6         | 10.2         | Conf.               | 32                               | 1.7                                | 56                              |
| 4.78.1        | 5.3                             | 0.00            | 205                                 | 118         | 1.0         | 7.9          | Conf.               | 53                               | 2.4                                | 125                             |
| 4.48.1        | 4.9                             | 0.06            | 14                                  | ND          | ND          | 7.7          | ND                  | 62                               | 0.9                                | 59                              |
| 4.209.1       | 3.5                             | 0.22            | 60                                  | ND          | ND          | 6.7          | ND                  | 142                              | 0.9                                | 125                             |
| 4.177.1       | 1.1                             | 0.15            | 236                                 | 174         | 2.4         | 10.6         | ND                  | 155                              | 0.6                                | 93                              |
| 4.152.1       | 3.4                             | 0.38            | 81                                  | 85          | 4.0         | 7.5          | ND                  | 163                              | 0.8                                | 126                             |
| 4.28.1        | 4.2                             | 0.04            | 112                                 | 155         | 4.2         | 11.3         | ND                  | 167                              | 1.2                                | 192                             |
| 4.16.1        | 5.3                             | 0.00            | 8                                   | ND          | ND          | 7.8          | ND                  | 177                              | 1.8                                | 313                             |
| 4.360.1       | 1.5                             | 0.02            | 112                                 | 130         | 2.2         | 7.9          | ND                  | 197                              | 1.0                                | 201                             |
| 4.288.1       | 15.4                            | 0.02            | 67                                  | 141         | 4.1         | 6.5          | ND                  | 198                              | 1.3                                | 257                             |
| 4.219.2       | 0.5                             | 0.34            | 69                                  | ND          | ND          | 5.9          | ND                  | ND                               |                                    |                                 |
| PRGX1-XG1-069 | 6.5                             | ND              | ND                                  | 71          | 7.9         | ND           | ND                  | 未結合                              |                                    |                                 |
| マウス 3.9       |                                 |                 |                                     |             |             |              |                     | 13.7                             | 0.7                                | 9.7                             |
| コントロール        |                                 |                 |                                     |             |             |              |                     | 6.34                             | 2.24                               | 14.2                            |

<sup>1</sup> ND=決定されていない<sup>2</sup> conf.=立体配座エピトープ<sup>3</sup> linear=線状のエピトープ

(実施例 2 4 : 放射性標識した抗体の細胞傷害性)

A c - 2 2 5 標識した抗 P S M A 抗体のインビトロでの細胞傷害性を、実施例 1 9 において使用したものと類似の方法論を使用して決定した。前立腺癌細胞 ( $2 \times 10^4$  細胞/mL の濃度での  $100 \mu\text{L}$  の C 4 - 2、L N C a P、および P C 3 細胞) を、9 6 ウェルマイクロプレートの分離ウェル中に配置した。一晚のインキュベート後、この細胞を、異なる濃度の A c - 2 2 5 標識したヒト抗 P S M A 4 . 4 0 抗体を用いて 4 日にわたって処理した。細胞の細胞傷害性を、Alamar Blue (Biosource International, Camarillo, CA) を使用して定量した。

## 【0289】

図34は、細胞生存 対  $Ac-225$  活性濃度のプロットを示す。 $PSMA$  発現細胞 ( $C4-2$  および  $LNCaP$ ) についての  $EC50$  は、 $2\text{ nCi/mL}$  未満であった。しかし、 $EC50$  は、細胞表面に  $PSMA$  を発現していない  $PC3$  細胞については  $420\text{ nCi/mL}$  であった。それゆえ、 $Ac-225$  標識したヒト抗  $PSMA$  4.40 抗体は、 $PSMA$  発現前立腺癌細胞 ( $C4-2$  および  $LNCaP$ ) 対 コントロール細胞 ( $PC3$ ) の殺傷において、200 倍より高い選択力を示す。

## 【0290】

(実施例25： $Lu-177$  標識した抗体を用いるインビボ放射性免疫治療)

国立癌センター由来の無胸腺症ヌードマウスに、経皮的に  $2 \times 10^6$   $PSMA-3T3$  細胞を移植した。測定可能な腫瘍が移植後7日目に出現した後、マウスを単一の  $250\text{ }\mu\text{Ci}$  用量のヒト抗  $PSMA$  抗体 4.40 または  $Lu-177$  (University of Missouri Research Reactor) で標識した 4.304 のいずれかの注射によって処置するか、もしくはコントロールとして緩衝剤のみを注射した。個々の動物の腫瘍サイズを、電子カリパスを使用して測定した。図35は、経時的にそれぞれの群における平均腫瘍サイズのプロットを示す。腫瘍の成長は、引き続いて、コントロール群と比較して  $Lu-177$  抗体処置した群において減少した。

## 【0291】

(実施例26： $rsPSMA$  ダイマー調製物での免疫)

(免疫)

$BALB/c$  マウスに、0日目、7日目、14日目、および42日目に  $5\text{ }\mu\text{g}$  の臨床的  $rsPSMA$  ロット番号 4019-C001 (75%ダイマー/25%モノマー) または  $5\text{ }\mu\text{g}$  の  $rsPSMA$  バッチ番号 TD045-003 ラン (run) 1/ピーク2 (100%モノマー) のいずれかの皮下注射によって免疫し、そして、単回用量あたり  $50\text{ }\mu\text{g}$  のアルヒドロゲル (alhydrogel) で補強した。血清を4回目の免疫から10日後に採取し、そして酵素結合免疫測定法 (EIA) およびフローサイトメトリーによって分析した。

## 【0292】

(EIA)

$rsPSMA$  ロット番号 4019-C001 または  $rsPSMA$  バッチ番号 TD045-003 ラン 1/ピーク2 を、96 ウェルマイクロタイタープレートに受動的に吸着させた。プレート上に残存した結合部位を、 $PBS$ /カゼイン/Tween 20 緩衝液でブロックした。段階希釈したマウス血清またはコントロールを添加し、そして結合した抗体を、アルカリホスファターゼに結合体化したヤギ抗マウス  $IgG$  抗体を使用して検出した。このEIAを、結合した抗  $PSMA$  抗体の量と正比例する色素変化を産生する基質  $pNPP$  で発色させた。吸光度を、 $620\text{ nm}$  の補正を有する  $405\text{ nm}$  で読み込んだ。抗体価を、吸光度を0.1に補正したブランクを生じるマウス血清の最も高い希釈として定義した。公知の抗  $PSMA$  価を有する免疫マウス血清または抗  $PSMA$  反応性を有さない正常マウス血清を、コントロールとして使用した。

## 【0293】

(フローサイトメトリー分析)

$PSMA-3T3$  細胞を、 $200\text{ }\mu\text{L}$  の免疫血清とともに0.1%アジ化ナトリウムを含む  $PBS$  中での1/50の希釈で氷上で30分間インキュベートした。公知の抗  $PSMA$  価を有する免疫マウス血清または抗  $PSMA$  反応性を有さない正常マウス血清を、コントロールとして使用した。この細胞を、0.1%アジ化ナトリウムを含む  $PBS$  で2回洗浄し、そして30分間氷上でFITC結合体化ヤギ抗マウス  $IgG$  とともにインキュベートした。細胞を1回洗浄し、0.1%アジ化ナトリウムを含む  $PBS$  中で再懸濁し、そしてFACScaliber (Becton Dickinson) でフローサイトメトリー分析に供した。

## 【0294】

(結果)

r s P S M A ロット番号 4 0 1 9 - C 0 0 1 を免疫した 5 / 5 マウスは、E I A によって抗 P S M A 抗体応答を示した。抗体価は、r s P S M A ロット番号 4 0 1 9 - C 0 0 1 ( 7 5 % ダイマー / 2 5 % モノマー ) で被膜したアッセイプレートおよび r s P S M A バッチ番号 T D 0 4 5 - 0 0 3 ラン 1 / ピーク 2 ( 1 0 0 % モノマー ) で被膜したアッセイプレートについては類似していた。この群に関する中間の応答は、1 / 6 4 0 0 であった。

【0295】

r s P S M A バッチ番号 T D 4 5 - 0 0 3 ラン 1 / ピーク 2 で免疫した 4 / 5 マウスは、E I A によって抗 P S M A 抗体応答を示した。1 頭のマウスは陰性であった。抗体価は、r s P S M A ロット番号 4 0 1 9 - C 0 0 1 ( 7 5 % ダイマー / 2 5 % モノマー ) で被膜したアッセイプレートおよび r s P S M A バッチ番号 T D 0 4 5 - 0 0 3 ラン 1 / ピーク 2 ( 1 0 0 % モノマー ) で被膜したアッセイプレートについては類似していた。この群に関する中間の応答は、1 / 6 4 0 0 であった。

【0296】

E I A 分析の結果を、表 6 に提供する。

【0297】

【表 6】

表 6 : r s P S M A 5  $\mu$  g / 用量および 5 0  $\mu$  g / 用量アルヒドロゲルを 4 回ワクチン投与したマウスにおける抗 P S M A 抗体応答の特異性

| マウス ID 番号 | 免疫原           | E I A 価 対<br>ロット 4019-C001 | E I A 価 対<br>バッチ TD045-003<br>ラン 1 / ピーク 2 | 中間 RFI 対<br>PSMA-3T3<br>細胞 |
|-----------|---------------|----------------------------|--------------------------------------------|----------------------------|
| ABIM151   | 4019-C001ダイマー | 1/3200                     | 1/3200                                     | 84                         |
| ABIM152   | 4019-C001ダイマー | 1/3200                     | 1/3200                                     | 41                         |
| ABIM153   | 4019-C001ダイマー | 1/25600                    | 1/25600                                    | 76                         |
| ABIM154   | 4019-C001ダイマー | 1/12800                    | 1/12800                                    | 63                         |
| ABIM155   | 4019-C001ダイマー | 1/6400                     | 1/6400                                     | 74                         |
| ABIM156   | モノマー          | 1/1600                     | 1/1600                                     | 5                          |
| ABIM157   | モノマー          | 1/6400                     | 1/12800                                    | 8                          |
| ABIM158   | モノマー          | 0                          | 0                                          | 6                          |
| ABIM159   | モノマー          | 1/6400                     | 1/6400                                     | 6                          |
| ABIM160   | モノマー          | 1/6400                     | 1/6400                                     | 12                         |

図 3 6 に示すように、r s P S M A ( ロット番号 4 0 1 9 - C 0 0 1 ) のダイマー調製物を免疫したマウス血清中の抗 P S M A 抗体は、P S M A - 3 T 3 細胞への強い結合を示した。r s P S M A ( バッチ番号 T D 0 4 5 - 0 0 3 ラン 1 / ピーク 2 ) の 1 0 0 % モノマー調製物で免疫したマウスの血清中の抗 P S M A 抗体は、P S M A - 3 T 3 細胞への結合を示さなかった。

【0298】

本発明は、例示の目的のために詳細に示されているが、このような詳細が、目的およびバリエーションが、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく当業者によってなされ得るためだけであることが理解される。

【0299】

この出願を通して引用される全参考文献、特許および公開された特許出願の内容は、本明細書中で参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【0300】

【図 1】図 1 は、フローサイトメトリーにより決定された m A b の P S M A 反応性を示す

。抗P S M A m A b ( 3 . 7、3 . 9、3 . 1 1、3 . 1 2、5 . 4、および1 0 . 3 ) を、親3 T 3細胞(黒線で示す)または細胞表面P S M Aを発現するように設計した3 T 3細胞(3 T 3 - P S M A ; 灰色線)のどちらかと共にインキュベートした。

【図2】図2は、m A bによるP S M Aの免疫沈降のデジタル画像を示す。3 T 3 - P S M A細胞または親3 T 3細胞由来の溶解産物を、それぞれm A bと共にインキュベートし、それからタンパク質A / Gアガロースビーズを使用して沈降させた。洗浄の後、タンパク質をポリアクリルアミドゲル上で分離し、ニトロセルロース膜上にブロットし、そしてM A B 5 4 4抗P S M A m A bを使用して可視化した。

【図3】図3は、P S M Aコンフォメーションを認識する幾つかのP S M A抗体による、非変性P S M Aの認識を示す。

10

【図4】図4は、2つのP S M A抗体による変性P S M Aの認識を示すウェスタンブロットのデジタル画像であり、そしてP S M Aコンフォメーションを認識する抗体は、変性P S M Aを認識しないことを示す。

【図5】図5は、ポリアクリルアミドゲルのデジタル画像であり、還元および非還元のS D S - P A G Eによる、精製された組換え体(可溶性P S M A ( r s P S M A ) )、および3 T 3細胞由来の全長P S M A ( 3 T 3 P S M A ) またはL S C a P細胞( L N C a P P S M A ) の分析を示す。

【図6】図6は、ポリアクリルアミドゲルのデジタル画像であり、精製された組換え体(可溶性P S M A ( 精製 r s P S M A ) )、および3 T 3細胞由来の全長P S M A ( 3 T 3 P S M A ) またはL S C a P細胞( L N C a P P S M A ) の、B l u e N a t i v e P A G E分析を示す。

20

【図7】図7は、フォレートヒドロラーゼの酵素活性に対する4つの抗体( m A b 3 . 9、m A b 5 . 4、m A b 7 . 3およびm A b J 5 9 1 ) の効果を、0 . 0 0 0 2 μ g の r s P S M A # 7中に存在するフォレートヒドロラーゼによる、メトトレキサート2 - γ グルタメートからのグルタメートの開裂比率の測定を通して、示す。

【図8】図8は、フォレートヒドロラーゼの酵素活性に対する4つの抗体( m A b 3 . 9、m A b 5 . 4、m A b 7 . 3およびm A b J 5 9 1 ) の効果を、0 . 0 0 0 2 μ g の r s P S M A # 8中に存在するフォレートヒドロラーゼによる、メトトレキサート2 - γ グルタメートからのグルタメートの開裂比率の測定を通して、示す。

【図9】図9は、フォレートヒドロラーゼの酵素活性に対する4つの抗体( m A b 3 . 9、m A b 5 . 4、m A b 7 . 3およびm A b J 5 9 1 ) の効果を、C 4 - 2細胞溶解産物中に存在するフォレートヒドロラーゼによる、メトトレキサート2 - γ グルタメートからのグルタメートの開裂比率の測定を通して、示す。

30

【図10】図10は、p c D N A内へのI g G 1抗体クローニングのためのクローニングプロトコールを描く。

【図11】図11は、抗体A B - P G 1 - X G 1 - 0 0 6の重鎖をコードする核酸分子のプラスミドマップを、提供する。

【図12】図12は、抗体A B - P G 1 - X G 1 - 0 2 6の重鎖をコードする核酸分子のプラスミドマップを、提供する。

【図13】図13は、抗体A B - P G 1 - X G 1 - 0 5 1の重鎖をコードする核酸分子のプラスミドマップを、提供する。

40

【図14】図14は、抗体A B - P G 1 - X G 1 - 0 6 9の重鎖をコードする核酸分子のプラスミドマップを、提供する。

【図15】図15は、抗体A B - P G 1 - X G 1 - 0 7 7の重鎖をコードする核酸分子のプラスミドマップを、提供する。

【図16】図16は、抗体P S M A 1 0 . 3の重鎖をコードする核酸分子のプラスミドマップを、提供する。

【図17】図17は、抗体A B - P G 1 - X G 1 - 0 0 6の軽鎖をコードする核酸分子のプラスミドマップを、提供する。

【図18】図18は、抗体A B - P G 1 - X G 1 - 0 2 6の軽鎖をコードする核酸分子の

50

プラスミドマップを、提供する。

【図19】図19は、抗体AB-PG1-XG1-051の軽鎖をコードする核酸分子のプラスミドマップを、提供する。

【図20】図20は、抗体AB-PG1-XG1-069の軽鎖をコードする核酸分子のプラスミドマップを、提供する。

【図21】図21は、抗体AB-PG1-XG1-077の軽鎖をコードする核酸分子のプラスミドマップを、提供する。

【図22】図22は、抗体PSMA 10.3の軽鎖をコードする核酸分子のプラスミドマップを、提供する。

【図23】図23は、LNCaP標的細胞における<sup>225</sup>Ac-3.9の細胞傷害性を描く。 10

【図24】図24は、抗PSMAモノクローナル抗体XG-006、XG-051、4.40.1、4.49.1、4.292.1および4.304.1を、親3T3細胞（黒の棒グラフ）または細胞表面ヒトPSMAを発現するように設計された3T3細胞（灰色の棒グラフ）のいずれかと共にインキュベートし、フローサイトメトリーによって分析した、抗PSMAモノクローナル抗体の反応性を図示する。

【図25A】図25は、抗PSMA Abの結合を図示する。図25Aは、抗PSMA Abは3T3-PSMA細胞に結合するが3T3細胞には結合しないことを示す。少なくとも10回の測定から代表的な1実験を、示す。

【図25B】図25は、抗PSMA Abの結合を図示する。図25Bは、抗PSMA mAb含有の培養上清の連続の希釈物を使用した、細胞表面PSMAへの結合が、起こったことを図示する。5回の測定から代表的な1実験を、示す。 20

【図25C】図25は、抗PSMA Abの結合を図示する。図25Cは、精製された抗PSMA mAb、XG-006および10.3の連続の希釈物を使用した、細胞表面PSMAへの結合を図示する。代表的な1実験を示す。

【図26】図26は、C4-2前立腺癌細胞上のマウス抗PSMA抗体の、免疫毒細胞傷害性を図示する。コントロール抗体としてのSJ25C-1は、マウス抗CD19 IgGである。5.4、3.9、およびmJ591抗体のLD50 (M)は、それぞれ $2.27 \times 10^{-11}$ 、 $2.29 \times 10^{-11}$ 、および $8.82 \times 10^{-11}$ であった。

【図27】図27は、PSMA-3T3細胞上のマウス抗PSMA抗体の、免疫毒細胞傷害性を図示する。コントロール抗体としてのSJ25C-1は、マウス抗CD19 IgGである。5.4、3.9、およびmJ591抗体のLD50 (M)は、それぞれ $1.64 \times 10^{-11}$ 、 $1.96 \times 10^{-11}$ 、および $8.90 \times 10^{-11}$ であった。 30

【図28】図28は、PSMA-3T3上のサポリン (saporin) と直接結合するヒト4.304抗PSMA抗体の細胞傷害性を提供する。サポリンと直接結合した4.304抗PSMA抗体のLD50は、 $1.48 \times 10^{-11}$ であった。

【図29】図29は、In-111放射線標識された4.40および4.304抗PSMA抗体との競合に使用された、未改変の4.304、4.40、mJ591抗PSMA抗体の競合アッセイの結果を、図示する。

【図30】図30は、In-111放射線標識されたmJ591抗PSMA抗体との競合に使用された、未改変の4.304、mJ591抗PSMA抗体の競合アッセイの結果を、図示する。 40

【図31】図31は、100 nMから6.25 nMまでの異なったrsPSMA濃度での、結合期および解離期における、PRGX1-XG-006抗体の分析を示す。

【図32】図32は、Biacore分析を使用して行った、完全なヒト抗PSMA抗体4.40.1、4.49.1、051および006ならびにマウス抗PSMA抗体3.9の比較の結果を示す。

【図33】図33は、In-111標識抗PSMA抗体3.9を使用した、PSMA-3T3、LNCaPおよびC4-2細胞株の、スキャッチャード分析の結果を提供する。

【図34】図34は、前立腺癌細胞上のAc-225標識ヒト抗PSMA抗体4.40の 50

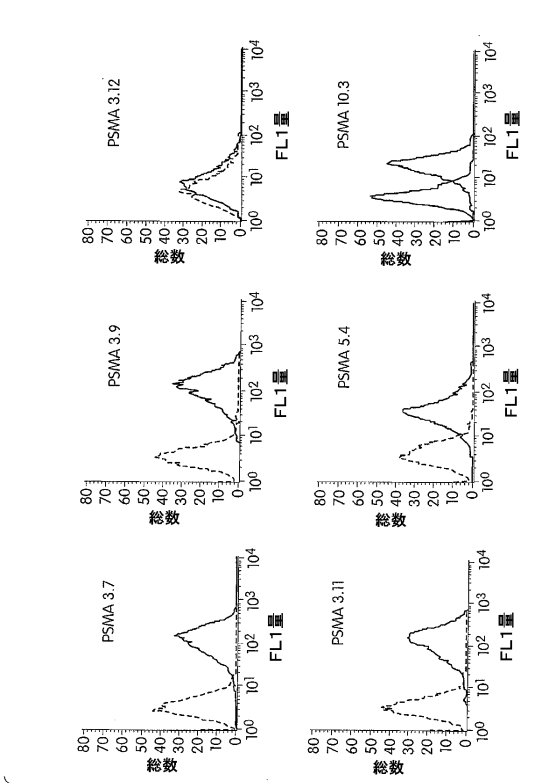
インビトロ細胞傷害性を示す。

【図35】図35は、Lu-177標識ヒト抗PSMA抗体によるインビボ放射線免疫療法の結果を示す。

【図36】図36は、抗PSMA抗血清のPSMA-3T3細胞への結合のフローサイトメトリデータを示す一連のグラフである。rsPSMAダイマー調製物によって免疫されたマウス由来の抗血清(ABIM151、ABIM152、ABIM153、ABIM154およびABIM155)は、PSMA発現細胞への強い結合を示す。rsPSMAモノマー調製物によって免疫されたマウス由来の抗血清(ABIM156、ABIM157、ABIM158、ABIM159およびABIM160)は、PSMA発現細胞への僅かな結合を示すかまたは全く結合を示さない。

10

【図1】



【図2】

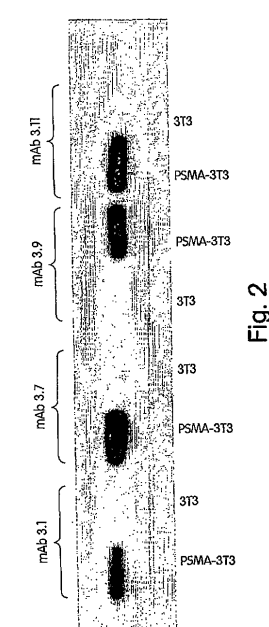


Fig. 2

【図 4】

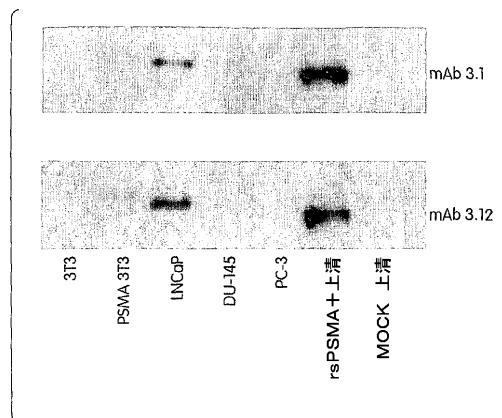


Fig. 4

【图 6】

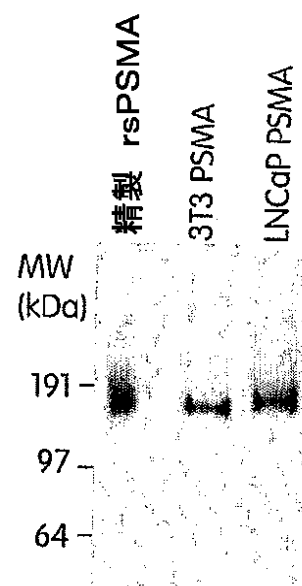
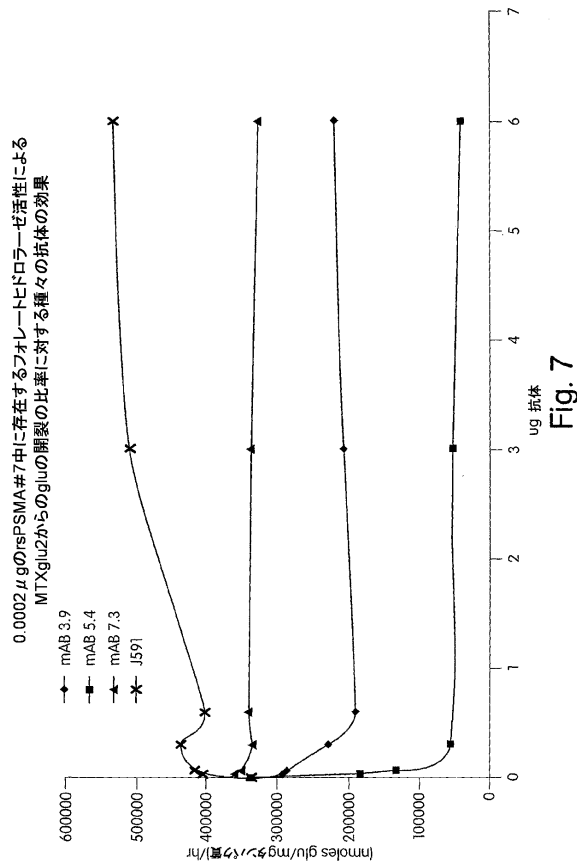


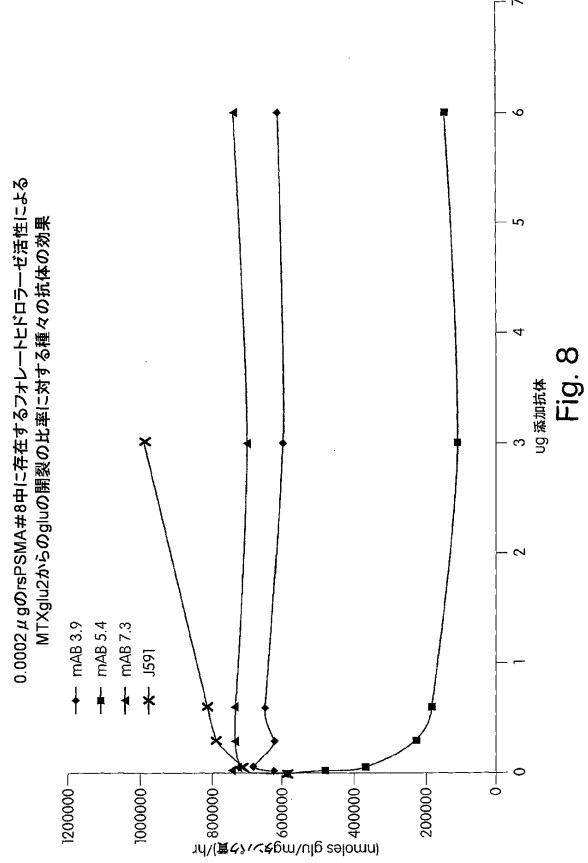
Fig. 6

Fig. 5

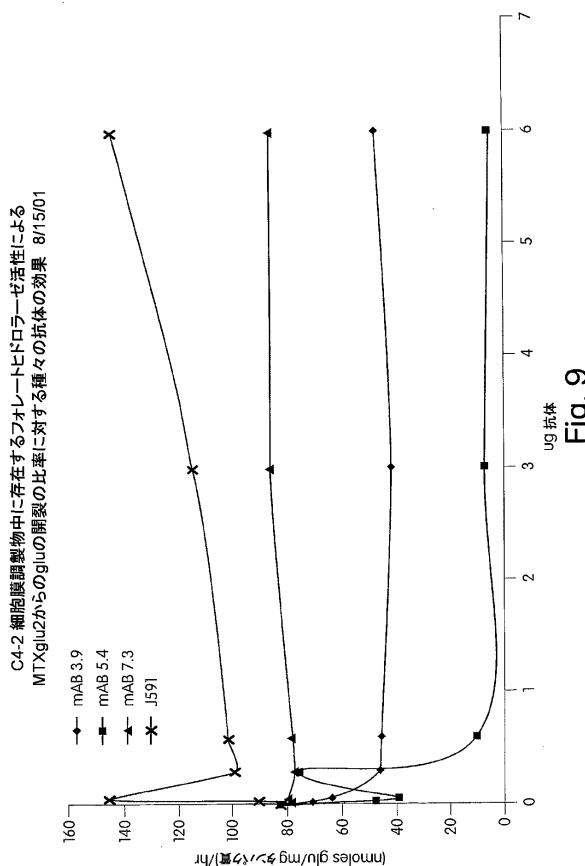
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【図 10】

## pcDNA へのヒト IgG1 クローニング

## pcDNA-huG1 および pcDNA-huIgG1 構成物

|         | PCR 産物                             | ベクター            |
|---------|------------------------------------|-----------------|
| Ck センス  | 5' XbaI HindIII BamHI NheI 3'      | 5' NheI NotI 3' |
| アンチセンス  | EcoRI NotI                         | (pcDNA.neo)     |
| Cy1 センス | 5' XbaI KpnI HindIII BamHI NheI 3' | 5' NheI/PmeI 3' |
| アンチセンス  | EcoRI XhoI PmeI                    | (pcDNA Hygro)   |

## pcDNA-Ab (V-C カセット) 構成物

|         | PCR 産物                    | ベクター             |
|---------|---------------------------|------------------|
| Vk センス  | BglII または BamHI (必要な場合) * | 5' BamHI NheI 3' |
| アンチセンス  | NheI                      | (pcDNA-huCK)     |
| Vy1 センス | BglII または BamHI (必要な場合) * | 5' BamHI NheI 3' |
| アンチセンス  | XbaI                      | (pcDNA-huIgG1)   |

\*BamHI プライマーは、V 領域が内蔵性 Bgl II 部位を有する場合に使用される

ヒト IgG クローニング～pcDNA 由来の V-C カセットを「産生物」ベクターへ

|      | pcDNA 由来の挿入部分                                                                    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------|
| IgX  | 5' HindIII または BamHI (代替のセンスプライマーを使用した場合)<br>3' EcoRI, NotI, XhoI, XbaI または PmeI |
| IgG1 | 5' KpnI, HindIII または BamHI (代替のセンスプライマーを使用した場合)<br>3' EcoRI*, XhoI または PmeI      |

\* ヒゲロマイシン抵抗遺伝子中に存在する第二の EcoR I 部位

## V 領域増幅に使用したプライマー

Vk-センス:  
5' GAAGATCT  ATG + 20-23 bp リーダー配列 3'  
BglII Kozak  
Vk アンチセンス(逆方向/相補):  
5' AACTA GCT AGC AGT TCC AGA TTT CAA CTG CTC ATC AGA T 3'  
S A T G S K L Q E D S (aa. 23-13 Ck)  
NheI

Nhe I のクローニング部位は A S をコードする～従ってクローニングによるアミノ酸置換はない。

Vy-センス:  
5' GAAGATCT  ATG + 17-23bp リーダー配列 3'  
BglII Kozak  
Vy アンチセンス(逆方向/相補):  
5' GC TCT AGA GGG TGC CAG GGG GAA GAC CGA T 3'  
(R) S P A L P F V S (aa. 14-7 Cy1)  
XbaI

## こちらへクローニング

5' CG GCT AGC  
S (A)

Xba I /Nhe I (TCT AGC) のクローニング部位連結は、S S をコードする～従って、クローニングによるアミノ酸置換はない。

Fig. 10

【図 1 1】

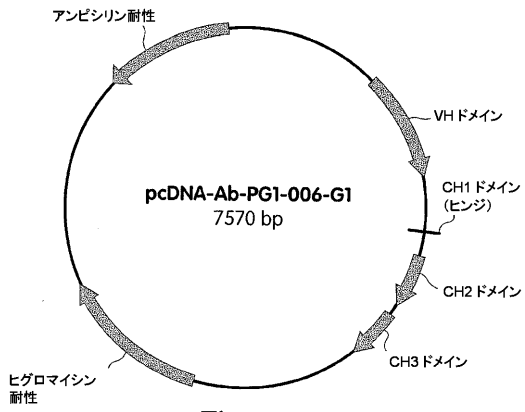


Fig. 11

【図 1 2】

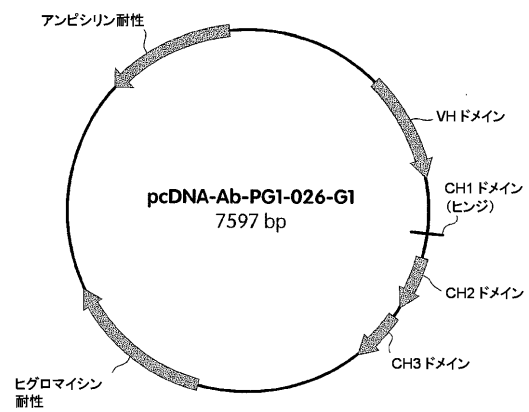


Fig. 12

【図 1 3】

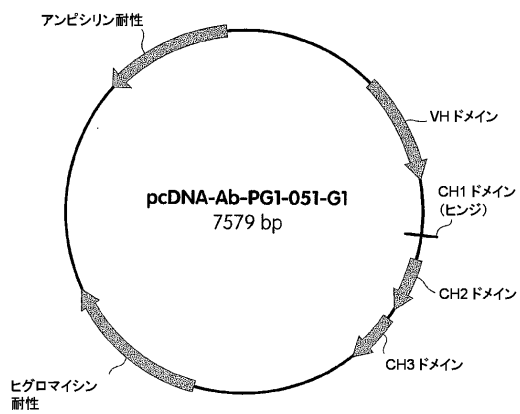


Fig. 13

【図 1 4】

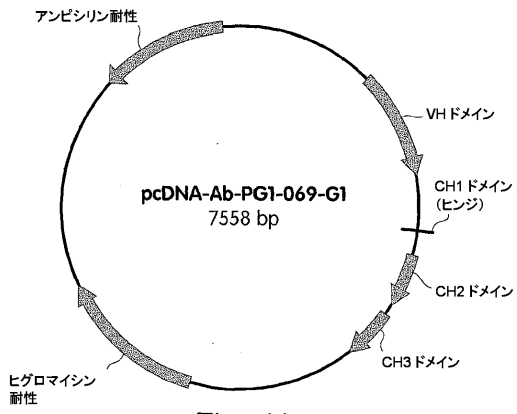


Fig. 14

【図 15】

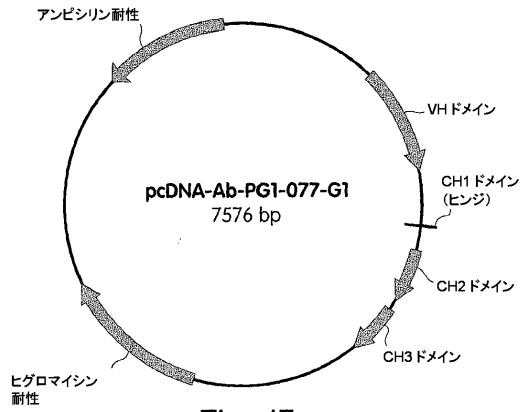


Fig. 15

【図 16】

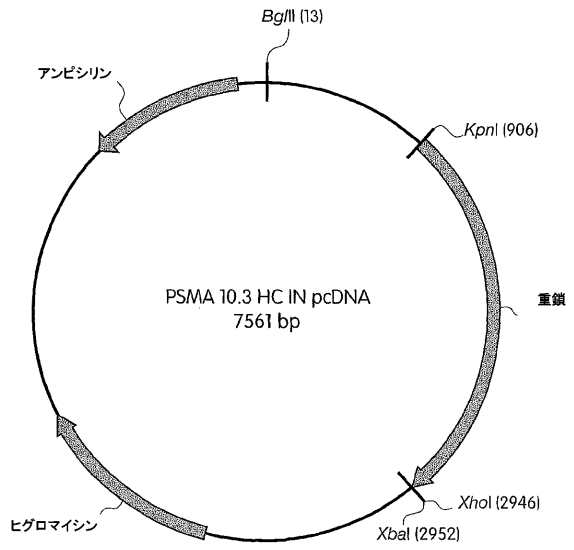


Fig. 16

【図 17】

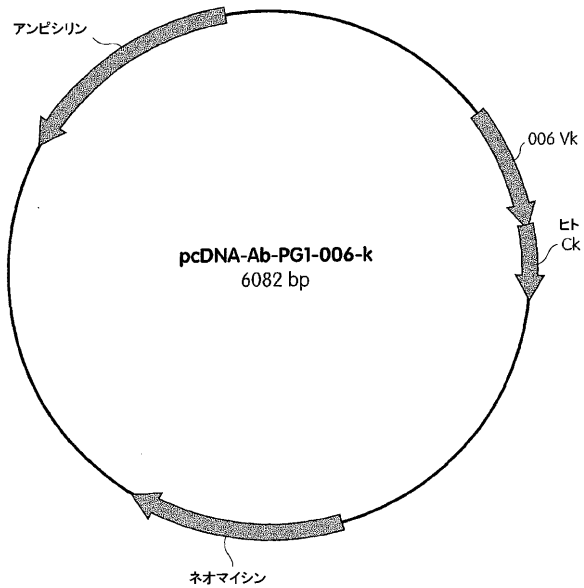


Fig. 17

【図 18】

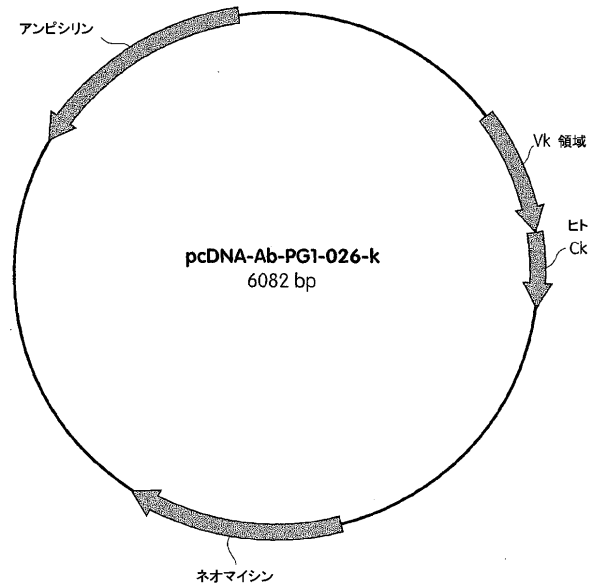


Fig. 18

【図 19】

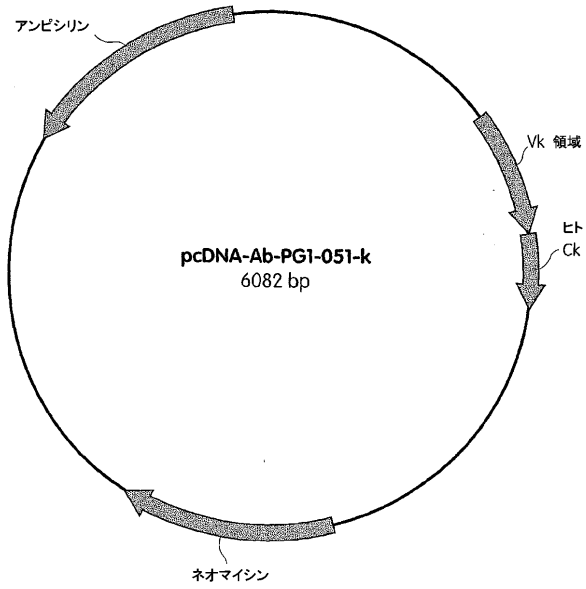


Fig. 19

【図 20】

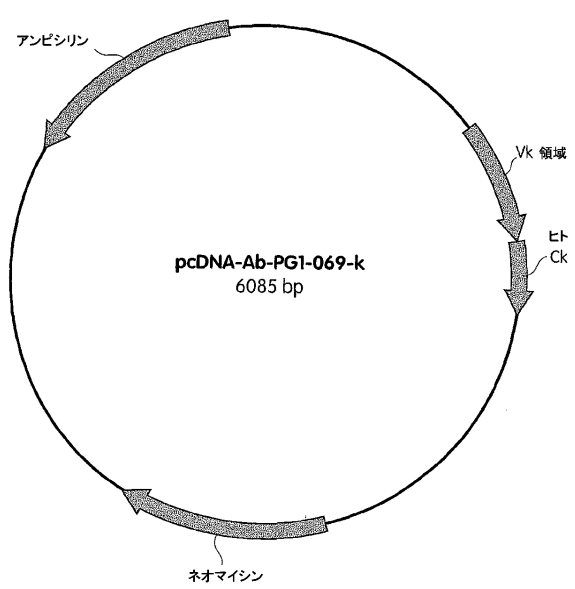


Fig. 20

【図 21】

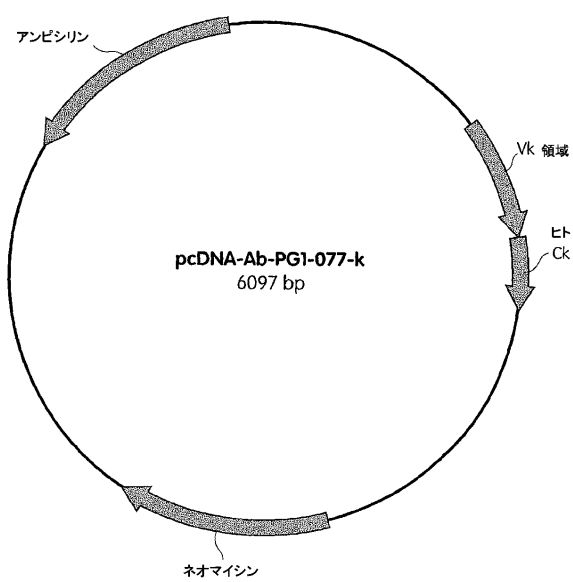


Fig. 21

【図 22】

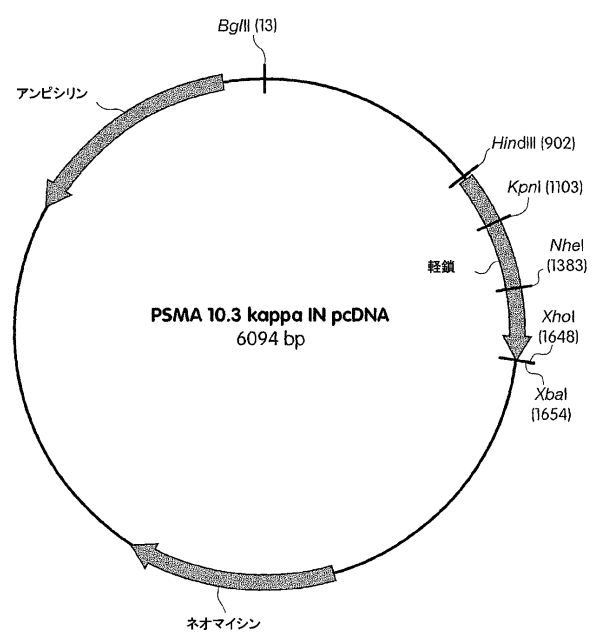


Fig. 22

【図 2 3】

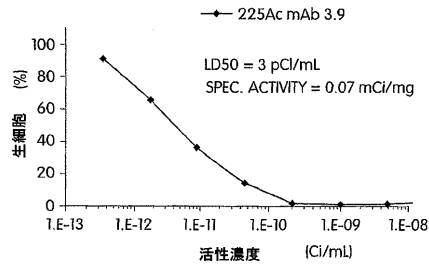


Fig. 23

【図 2 4】

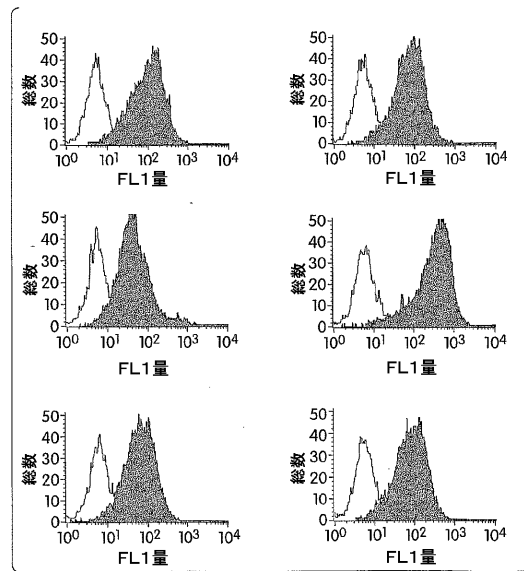


Fig. 24

【図 2 5 A】

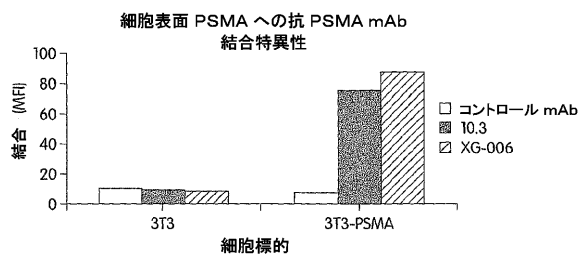


Fig. 25A

【図 2 5 C】

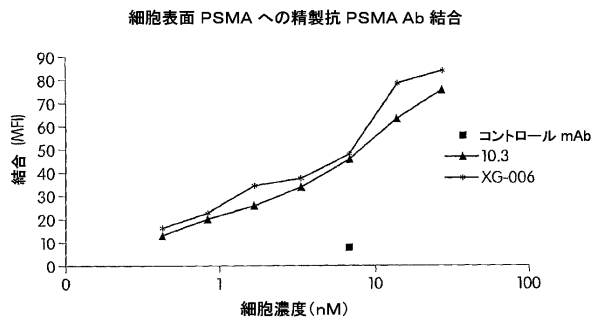


Fig. 25C

【図 2 5 B】

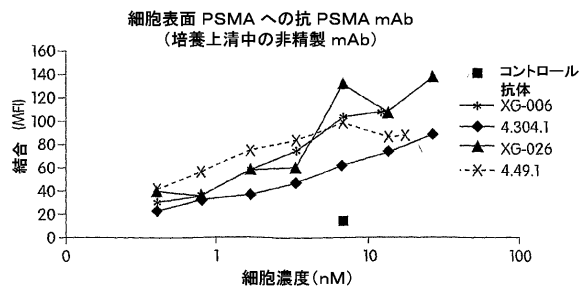


Fig. 25B

【図 26】

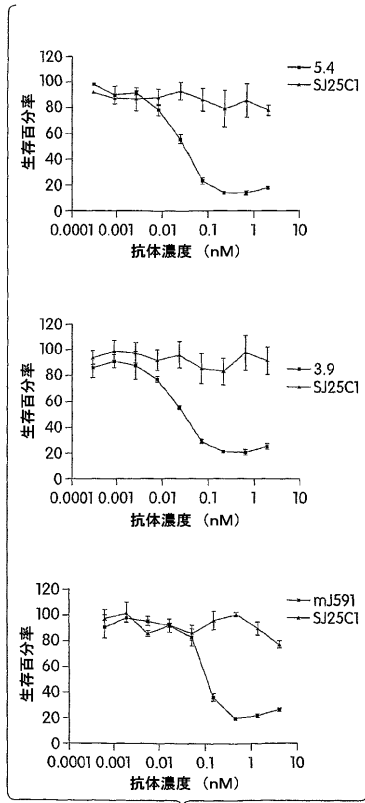


Fig. 26

【図 27】

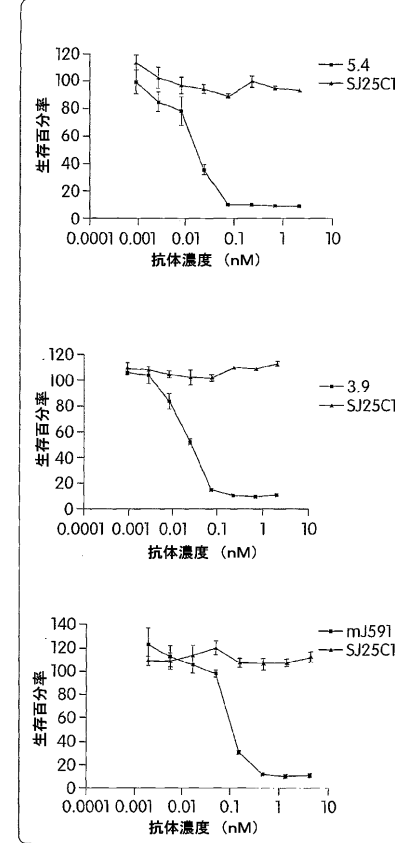


Fig. 27

【図 28】

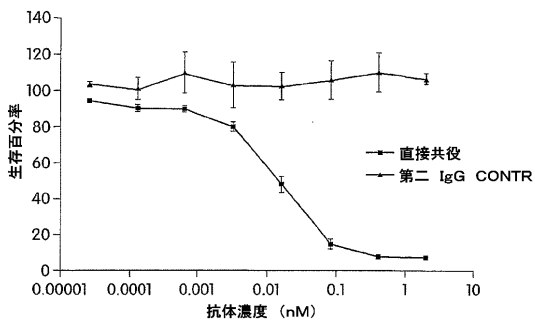


Fig. 28

【図 30】

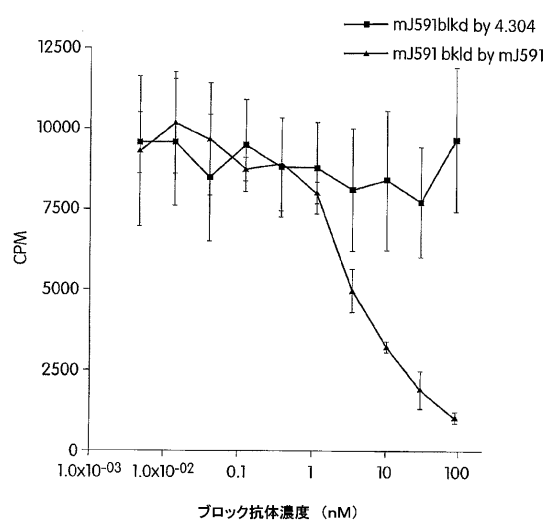


Fig. 30

【図 29】

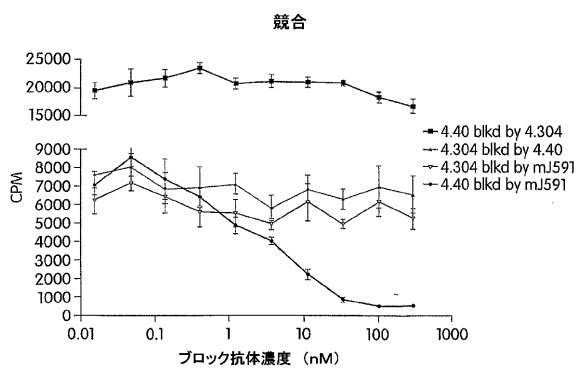


Fig. 29

【図 3 1】

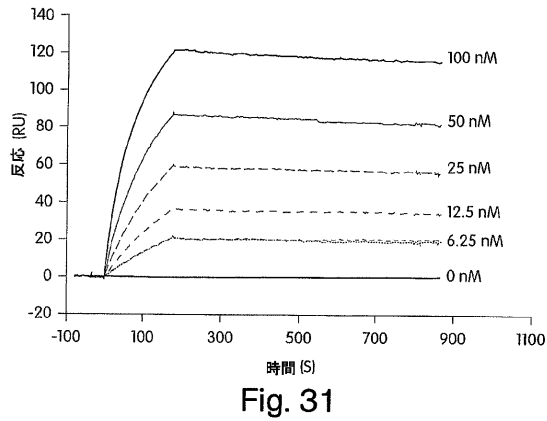


Fig. 31

【図 3 3】

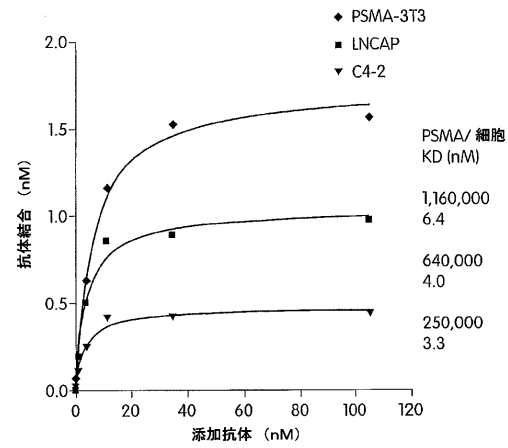


Fig. 33

【図 3 2】

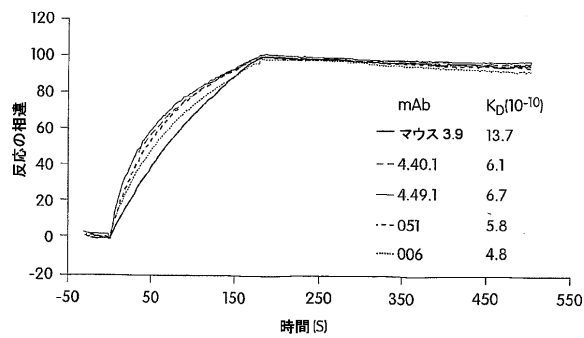


Fig. 32

【図 3 4】

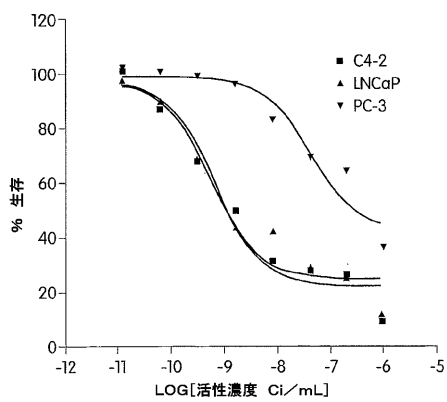


Fig. 34

【図 3 5】

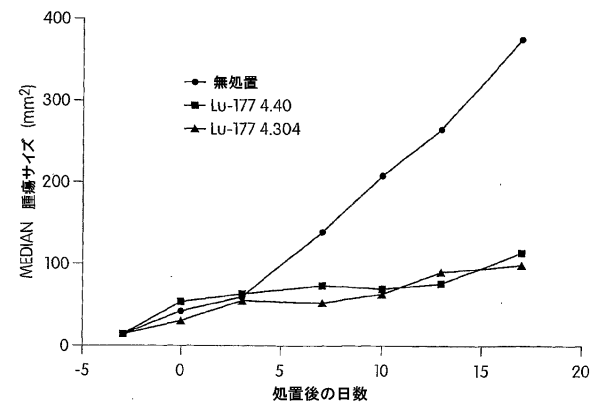


Fig. 35

【図 3 6】

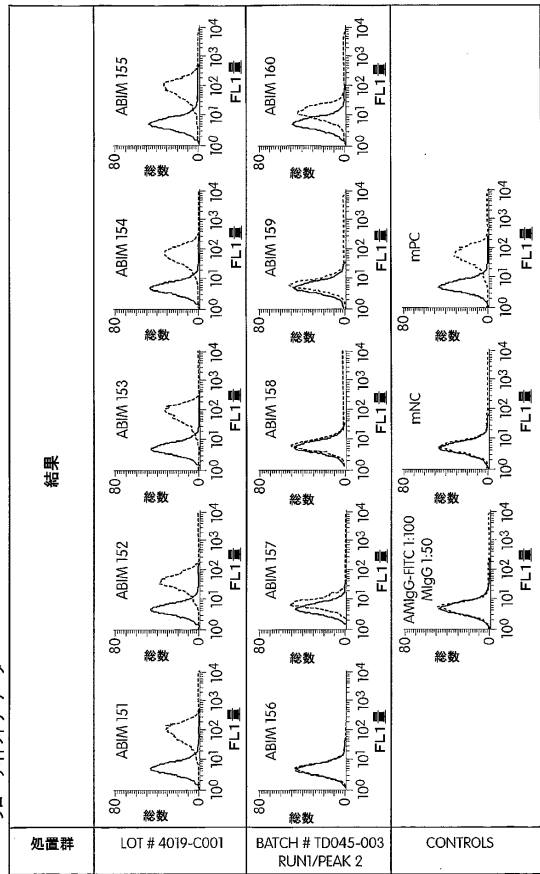


Fig. 36

【配列表】

0005355839000001.xml

フロントページの続き

|                         |                |         |
|-------------------------|----------------|---------|
| (51)Int.Cl.             |                | F I     |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)  | A 6 1 K 39/395 | N       |
| C 1 2 N 15/02 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | T       |
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01)  | A 6 1 K 49/02  |         |
|                         | A 6 1 P 35/00  |         |
|                         | C 0 7 K 14/705 |         |
|                         | C 1 2 N 5/00   | 1 0 2   |
|                         | C 1 2 N 15/00  | Z N A C |
|                         | C 1 2 Q 1/02   |         |

(31)優先権主張番号 60/412,618

(32)優先日 平成14年9月20日(2002.9.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-3268

微生物の受託番号 ATCC PTA-3258

(72)発明者 マドン, ポール ジェイ.  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 8 3, スカーズデール, フォックス ミドー ロード  
1 9 1

(72)発明者 ドノバン, ジェラルド ピー.  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 2 1, ニュー ヨーク, イースト 6 3アールディー  
ストリート 4 3 0, アpartment 5エル

(72)発明者 オルソン, ウィリアム シー.  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 6 2, オッシニング, ファウン コート 2 1

(72)発明者 シュールク, ノーバート  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 9 5 6, ニュー シティ, リッジ ロード 1 0 1

(72)発明者 ガードナー, ジェーソン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 0 2, アーズリー, ブランブル ブルック ロード  
2 4

(72)発明者 マ, ダンシー  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 4 6, ミルウッド, グレンウッド ロード 4 9

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 植原 克典

審判官 富永 みどり

(56)参考文献 国際公開第01/09192 (WO, A1)

Proceedings of the American Association for  
Cancer Research Annual Meeting (2001 Mar.) V  
ol. 42, p. 818 (Session#4389)  
Hybridoma (2000 Jun.) Vol. 19, No. 3, p. 249-257

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-90

C07K14/00-19/00

PUBMED

BIOSIS  
WPIDS  
MEDLINE  
SWISSPROT  
PIR  
GENESEQ  
DDBJ  
EMBL  
GENBANK