

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-518789

(P2005-518789A)

(43) 公表日 平成17年6月30日(2005.6.30)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	4 C O 7 6
A 6 1 K 47/42	A 6 1 K 39/395	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-564202 (P2003-564202)	(71) 出願人	503289746
(86) (22) 出願日	平成15年1月28日 (2003.1.28)		メダレックス, インク.
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月27日 (2004.9.27)		MEDAREX, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/002448		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
(87) 国際公開番号	W02003/064606		8 5 4 0 プリンストン ステイト ロー
(87) 国際公開日	平成15年8月7日 (2003.8.7)		ド 7 0 7
(31) 優先権主張番号	10/059, 989		7 0 7 State Road, Pri
(32) 優先日	平成14年1月28日 (2002.1.28)		nceton, NJ 08540 (U
(33) 優先権主張国	米国 (US)		S)
		(74) 代理人	100127878
			弁理士 遠藤 淳二
		(74) 代理人	100095577
			弁理士 小西 富雅
		(74) 代理人	100100424
			弁理士 中村 知公
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺特異性膜抗原 (PSMA) に対するヒトモノクローナル抗体

(57) 【要約】

P S M A に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体、ならびに関連する抗体を基礎とした組成物および分子を開示する。該ヒト抗体は、V - D - J 組換えおよびアイソタイプスイッチを行うことによって、非ヒトトランスジェニック動物、例えば、ヒトモノクローナル抗体の多数のアイソタイプを産生可能なトランスジェニックマウスにおいて、産生することができる。ヒト抗体、ヒト抗体を産生する非ヒトトランスジェニック動物およびハイブリドームを含む薬学的組成物、ならびに該ヒト抗体を用いた治療方法および診断方法もまた開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3 および F R 4 配列を含むヒト重鎖可変領域と、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3 および F R 4 配列を含むヒト軽鎖可変領域とを含む単離されたヒトモノクローナル抗体であって、

(a) 前記ヒト重鎖可変領域 C D R 3 配列は、配列番号 2 3、2 6、2 9、3 2 および 3 5、ならびにその保存的改変からなる群から選択され、

(b) 前記ヒト軽鎖可変領域 C D R 3 配列は、配列番号 3 8、4 1、4 4、4 7 および 5 0、ならびにその保存的改変からなる群から選択され、

(c) 前記ヒト抗体は、 10^{-8} M 以下の K_D でヒト P S M A に結合し、

(d) 前記ヒト抗体は、抗体依存性細胞性細胞傷害性 (A D C C) アッセイにおいて、P S M A⁺ 腫瘍細胞の溶解を媒介する、
単離されたヒトモノクローナル抗体。

10

【請求項 2】

前記ヒト重鎖可変領域 C D R 2 配列は、配列番号 2 2、2 5、2 8、3 1 および 3 4、ならびにその保存的改変からなる群から選択され、前記ヒト軽鎖可変領域 C D R 2 配列は、配列番号 3 7、4 0、4 3、4 6 および 4 9、ならびにその保存的改変からなる群から選択される、請求項 1 に記載の単離されたヒト抗体。

【請求項 3】

前記ヒト重鎖可変領域 C D R 1 配列は、配列番号 2 1、2 4、2 7、3 0 および 3 3、ならびにその保存的改変からなる群から選択され、前記ヒト軽鎖可変領域 C D R 1 配列は、配列番号 3 6、3 9、4 2、4 5 および 4 8、ならびにその保存的改変からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の単離されたヒト抗体。

20

【請求項 4】

10^{-9} M 以下の K_D でヒト P S M A に結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたヒト抗体。

【請求項 5】

前記ヒト重鎖可変領域 F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列は、ヒト重鎖 V H₅₋₅₁ 生殖細胞系列配列に由来する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の単離されたヒト抗体。

30

【請求項 6】

前記ヒト軽鎖可変領域 F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列は、ヒト軽鎖 L 6 または 0 4 / 0 1 4 生殖細胞系列配列に由来する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離されたヒト抗体。

【請求項 7】

ヒト重鎖可変領域およびヒト軽鎖可変領域を含む、単離されたヒトモノクローナル抗体であって、

(a) 前記ヒト重鎖可変領域は、配列番号 1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、ならびに配列番号 1 1、1 2、1 3、1 4 および 1 5 に少なくとも 8 0 % 相同な配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

40

(b) 前記ヒト軽鎖可変領域は、配列番号 1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、ならびに配列番号 1 6、1 7、1 8、1 9 および 2 0 に少なくとも 8 0 % 相同な配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

(c) 前記ヒト抗体は、 10^{-8} M 以下の K_D でヒト P S M A に結合し、

(d) 前記ヒト抗体は、抗体依存性細胞性細胞傷害性 (A D C C) アッセイにおいて、P S M A⁺ 腫瘍細胞の溶解を媒介する、
単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 8】

前記抗体は、 10^{-9} M 以下の K_D でヒト P S M A に結合する、請求項 7 に記載の単離されたヒト抗体。

50

【請求項 9】

ヒト重鎖 V H₅₋₅₁ 生殖細胞系列配列 (配列番号 54) に由来するヒト重鎖可変領域と、ヒト軽鎖 L 6 (配列番号 55) または 04/014 (配列番号 56) 生殖細胞系列配列に由来するヒト軽鎖可変領域とを含む単離されたヒトモノクローナル抗体であって、

(a) 前記ヒト重鎖可変領域は、配列番号 12 に示されたアミノ酸配列または配列番号 12 に少なくとも 80% 相同な配列を含み、

(b) 前記ヒト軽鎖可変領域は、配列番号 17 に示されたアミノ酸配列または配列番号 17 に少なくとも 80% 相同な配列を含み、

(c) 前記ヒト抗体は、 10^{-9} M 以下の K_D でヒト P S M A に結合し、

(d) 前記ヒト抗体は、抗体依存性細胞性細胞傷害性 (A D C C) アッセイにおいて、P S M A⁺ 腫瘍細胞の溶解を媒介する、
単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 10】

配列番号 11 および配列番号 16 に示されるアミノ酸配列をそれぞれ含む、ヒト重鎖可変領域およびヒト軽鎖可変領域を含む、単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 11】

配列番号 12 および配列番号 17 に示されるアミノ酸配列をそれぞれ含む、ヒト重鎖可変領域およびヒト軽鎖可変領域を含む、単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 12】

配列番号 13 および配列番号 18 に示されるアミノ酸配列をそれぞれ含む、ヒト重鎖可変領域およびヒト軽鎖可変領域を含む、単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 13】

配列番号 14 および配列番号 19 に示されるアミノ酸配列をそれぞれ含む、ヒト重鎖可変領域およびヒト軽鎖可変領域を含む、単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 14】

配列番号 15 および配列番号 20 に示されるアミノ酸配列をそれぞれ含む、ヒト重鎖可変領域およびヒト軽鎖可変領域を含む、単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 15】

P S M A に対する結合において、先行するクレームのいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体と競合する、単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 16】

不死化した細胞に融合させた、ヒト重鎖導入遺伝子または導入染色体およびヒト軽鎖導入遺伝子または導入染色体を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物から得た B 細胞から調製されるハイブリドーマにより産生された、先行する請求項のいずれかに記載の単離されたヒト抗体。

【請求項 17】

膀胱、乳房、大腸、腎臓、卵巣、前立腺、腎細胞、扁平細胞、肺 (非小細胞) ならびに頭部および頸部の腫瘍細胞からなる群から選択される腫瘍細胞に結合する、先行する請求項のいずれかに記載のヒト抗体。

【請求項 18】

ヒト I g G 重鎖およびヒトカッパ軽鎖を含む、先行する請求項のいずれかに記載のヒト抗体。

【請求項 19】

I g G 1 または I g G 3 重鎖を含む、先行する請求項のいずれかに記載のヒト抗体。

【請求項 20】

先行する請求項のいずれかに記載のヒト抗体と、薬学的許容される単体とを含む薬学的組成物。

【請求項 21】

治療薬に結合する、先行する請求項のいずれかに記載のヒト抗体を含む、免疫複合体。

【請求項 22】

前記治療薬は細胞毒である、請求項 2 1 に記載の免疫複合体。

【請求項 2 3】

前記治療薬は放射性同位体である、請求項 2 1 に記載の免疫複合体。

【請求項 2 4】

請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体と、薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物。

【請求項 2 5】

先行する請求項のいずれかに記載のヒト抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項 2 6】

前記核酸分子は、発現ベクターに組み込まれている、請求項 2 5 に記載の単離された核酸分子。 10

【請求項 2 7】

請求項 2 5 または 2 6 に記載の単離された核酸を含む、トランスフェクトマ (transfectoma)。

【請求項 2 8】

ヒト重鎖導入遺伝子または導入染色体と、ヒト軽鎖導入遺伝子または導入染色体とを含むゲノムを有する、先行する請求項のいずれかに記載のヒト抗体を発現する、トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 2 9】

P S M A を発現する細胞の成長を阻害する方法であって、該細胞を、先行する請求項のいずれかに記載の抗体の有効量に接触させ、該細胞の成長を阻害することを含む方法。 20

【請求項 3 0】

P S M A を発現する腫瘍細胞の成長を特徴とする疾患を治療または予防する方法であって、前記疾患を治療または予防するために有効な量の、先行する請求項のいずれかに記載のヒト抗体を、被験体に投与することを含む方法。

【請求項 3 1】

前記疾患は癌である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記癌は、前立腺癌、大腸癌、腎臓の癌腫からなる群から選択される、請求項 3 1 に記載の方法。 30

【請求項 3 3】

前記癌は前立腺癌である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記ヒト抗体は治療薬と結合している、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記治療薬は細胞毒である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記治療薬は放射性同位体である、請求項 3 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本願は、1999 年 7 月 29 日に出願された米国仮特許出願第 60/146,285 号、1999 年 10 月 12 日に出願された米国仮特許出願第 60/158,759 号および 2000 年 3 月 9 日に出願された米国仮特許出願第 60/188,087 号の優先権を主張する 2000 年 7 月 26 日に出願された P C T 国際出願 P C T / U S 00/20247 号の一部係属出願である、2002 年 1 月 28 日に出願された米国実用新案出願第 10/059,989 号の優先権を主張する。これらの出願の内容全体を本明細書中に引用によって援用する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

前立腺癌は、男性における病的状態および死亡の主要な原因の一つである。前立腺癌の治療には、外科手術、ホルモン治療、放射線治療および化学療法がある。転移性前立腺癌 50

の効果的な治療法はほとんどない。したがって、診断用および予後用マーカーとなる遺伝子および/または遺伝子産物、ならびに治療のための標的の同定は重要である。前立腺特異性抗原 (PSA) はこのような癌マーカーの一種で、前立腺癌の臨床診断および病期決定に有用である。しかしながら、PSA は良性前立腺肥大症 (PBH) と、4 ~ 10 ng / ml の範囲内の前立腺炎および前立腺癌を区別することができない。したがって、正確な診断を確定するための細胞学的および組織学的評価が必要である (Barren、R.J.ら、(1998) Prostate 36:181-188)。

【0003】

前立腺特異性膜抗原 (PSMA) は、750 アミノ酸で、トランスフェリンレセプターと54%の相同性を有する約110 kDのII型膜貫通糖蛋白質である。PSMA は、19 アミノ酸細胞内ドメイン、24 アミノ酸膜透過ドメイン、および707 アミノ酸細胞外ドメインを含む、3種類の構造ドメインを有している。PSMA 蛋白質は、ニューロカルボキシペプチダーゼおよび葉酸ヒドラーゼ活性を示し、したがって前立腺成長および分化の神経内分泌調節に関与すると報告されている (Heston、W.D. (1996) Urologe-Ausgabe A. 35:400-407)。PSM' は、PSMA から代替的にスプライスされたもので、細胞質に局在する。

10

【0004】

PSMA は、主に前立腺上皮細胞が発現する。PSMA 発現は、前立腺癌、特に分化が不十分な転移性でホルモン治療抵抗性の癌腫中に増加する (Gregorakis、A.K.ら (1998) Seminars in Urologic Oncology 16:2-12; Silver、D.A. (1997) Clinical Cancer Research 3:81-85)。小腸、唾液腺、十二指腸粘膜、近位尿管および脳などの前立腺以外の組織においても、少量のPSMA 発現が認められている (Silver、D.A. (1997) Clinical Cancer Research 3:81-85)。PSMA 発現は、腎細胞癌腫または大腸癌腫など特定の悪性腫瘍の腫瘍周辺および腫瘍内部分の毛細血管の上皮細胞においても見られるが、正常組織の血管中には見られない。さらに、PSMA の発現は腫瘍血管形成にも関与していると報告されている (Silver、D.A. (1997) Clinical Cancer Research 3:81-85)。

20

【0005】

したがって、PSMA は、前立腺癌およびPSMA 発現を特徴とする他の種々の疾患の、有用な治療標的である。

【発明の概要】

30

【0006】

本発明は、ヒト前立腺特異性膜抗原 (PSMA) に結合する、単離されたヒトモノクローナル抗体、ならびにそのような抗体を単独もしくは追加的治療薬と組み合わせて含有する免疫複合体、二重特異性分子、およびその他の治療用組成物を提供する。特に本発明のヒト抗体は、ヒトPSMA 上の未変性の蛋白質エピトープ (例えば、ヒトPSMA の細胞外ドメイン内に位置するエピトープ) に結合し、ヒトエフェクター細胞、例えば、多形核細胞、単球、マクロファージおよび樹状細胞の存在下で、(例えば、溶解または貪食作用を介して) PSMA を発現する細胞の成長を阻害し、および/または細胞の死滅を媒介する。したがって、該抗体は、PSMA、特に前立腺癌、大腸癌および腎臓の癌腫などのPSMA 発現性の腫瘍および癌を診断、治療、および/または予防するための種々の方法に使用することができる。

40

【0007】

本発明の単離されたヒト抗体は、IgG1 (例えば、IgG1k)、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、およびIgEなどの各種の抗体アイソタイプを含む。その抗体は、全長抗体 (例えば、IgG1もしくはIgG3) であってもよく、または抗原結合部分 (例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、もしくは一本鎖Fvフラグメント) のみを含んでいてもよい。

【0008】

本発明の特定の治療用の抗体は、ヒトモノクローナル抗体 (HuMAb) 4A3、7F12、8A11、8C12、16F9、ならびに、例えば、(a) 配列番号1、3、5、

50

7または9および配列番号2、4、6、8または10にそれぞれ示されているヌクレオチド配列およびそれらの保存的改変をその可変領域に含むヒト重鎖およびヒト軽鎖核酸によってコードされている、および/または(b)配列番号11、12、13、14または15および配列番号16、17、18、19または20にそれぞれ示されているアミノ酸配列およびその保存的改変を含む重鎖および軽鎖可変領域を含む、機能的に等価な抗体を含む。

【0009】

本発明のさらに他の特定のヒト抗体は、ヒト重鎖および軽鎖CDR1領域、ヒト重鎖および軽鎖CDR2領域およびヒト重鎖および軽鎖CDR3領域を有するCDRドメインを含み、

10

(a)ヒト重鎖領域のCDR1、CDR2およびCDR3は、図19(配列番号21~35)に示されているCDR1、CDR2およびCDR3領域のアミノ酸配列、およびそれらの保存的配列改変からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

(b)ヒト軽鎖領域のCDR1、CDR2およびCDR3は、図22および23(配列番号36~50)に示されているCDR1、CDR2およびCDR3領域のアミノ酸配列、およびそれらの保存的配列改変をからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0010】

本発明の他の特定のヒト抗体は、抗体4A3、7F12、8A11、8C12または16F9によって定義されるエピトープに結合し、および/または、PSMAへの結合を、抗体4A3、7F12、8A11、8C12または16F9と競合し、または、抗体4A3、7F12、8A11、8C12または16F9が示す、他の機能的結合特性を持つ、ヒトモノクローナル抗体を含む。そのような抗体としては、例えば、 10^{-7} M以下、例えば、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、 10^{-10} M以下、またはさらにそれ以下(例えば、 10^{-11} M以下)の解離定数(K_D)でPSMAと結合するものが含まれる。そのような抗体はさらに、マウス抗PSMA抗体3C6(ATCCアクセッションナンバーHB12491)と交差反応するが、マウス抗PSMA抗体4D4(ATCCアクセッションナンバーHB12493)または1G9(ATCCアクセッションナンバーHB12495)とは交差反応性を示さない抗体を含む。

20

【0011】

本発明のさらに別の局面において、ヒト抗PSMA抗体は、別の機能的分子、例えば、別のペプチドもしくは蛋白質(例えば、Fab'フラグメント)を誘導体化し、それに結合し、またはそれと共発現する。例えば、本発明の抗体または抗原結合部分は、別の抗体(例えば、二重特異性分子または多重特異性分子を作製するため)、細胞毒、細胞リガンド、または抗原などの一つ以上の他の分子部分に機能的に結合することができる(例えば、化学結合、遺伝子融合、または非共有会合などによる)。したがって、本発明は、その全てが、PSMA発現細胞に結合し、他の分子をその細胞の標的とし、またはPSMAおよび、他の分子または細胞に結合する、多種の抗体抱合体、二重特異性および多重特異性分子、および融合蛋白質を含む。

30

【0012】

別の特定の態様において、本発明は、ヒト抗PSMA抗体(またはそのフラグメントまたはミメティクス)であるPSMAへの少なくとも一つの結合特異性と、Fcレセプター、例えば、ヒトFcRIもしくはヒトFcレセプター、または抗原提示細胞(APC)上の別の抗原への第2の結合特異性とを含む二重および多重特異性分子を含む。第2の結合特異性はまた、ヒト抗体もしくはその部分、または「キメラ」または「ヒト化」抗体もしくはその部分(例えば、元来はヒトである部分を残している非ヒト抗体(例えば、マウス)に由来する可変領域、または少なくとも一つの相補性決定領域(CDR)を有する)などの抗体またはそのフラグメント(例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvまたは一本鎖Fv)であることができる。

40

【0013】

したがって、本発明は、ヒトPSMAおよびFcレセプター、例えば、FcRI(C

50

D 6 4)、F c R I I (C D 3 2) および F c R I I I (C D 1 6) などの F c ガンマレセプター (F c R) のようなヒト I g G レセプターの両方に結合する二重特異性および多重特異性分子を含む。ヒト I g A レセプター (例えば、F c R I) のような他の F c レセプターも標的とすることができる。F c レセプターは、例えば、単球、マクロファージ、または活性化多形核細胞などのエフェクター細胞の表面に位置していることが好ましい。好ましい態様において、二重特異性または多重特異性分子は、レセプターの免疫グロブリン F c (例えば、I g G または I g A) 結合部位とは異なる部位において F c レセプターに結合する。したがって、二重特異性または多重特異性分子の結合は生理学的なレベルの免疫グロブリンにより遮断されない。

【 0 0 1 4 】

10

別の態様において、本発明は、例えば、細胞毒薬剤、酵素活性毒素、もしくはそのフラグメントなどの治療薬、放射性同位体、または小分子抗癌剤と抱合する完全なヒト抗 P S M A 抗体を含む、免疫抱合体、例えば、免疫毒を提供する。

【 0 0 1 5 】

あるいは、本発明のヒト抗体は、治療薬および細胞毒物質とともに共投与することができるが、それらに結合されない。それらは、そのような物質と同時に (例えば、単一組成物として、または別々に) 共投与することができ、または、そのような物質の前後に投与することもできる。そのような物質としては、ドキソルピシン (アドリアマイシン)、シスプラチン、硫酸ブレオマイシン、カルムスチン、クロランブシル、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素およびそれらの組み合わせなどの化学治療用物質が含まれる。本発明のヒト抗体はまた、放射性治療と併用して投与することもできる。

20

【 0 0 1 6 】

別の態様において、本発明は、組成物、例えば、薬学的に許容される担体および少なくとも 1 つのヒト抗 P S M A 抗体、またはその抗原結合部分を含む薬学的および診断的組成物 / キットを提供する。ある態様において、組成物は、好ましくはそのそれぞれが別個のエピトープに結合するヒト抗体またはその抗原結合部分の組み合わせを含む。例えば、エフェクター細胞の存在下で標的細胞の死滅を高効率で媒介するヒトモノクローナル抗体を含む薬学的組成物は、P S M A を発現する細胞の成長を阻害する他のヒトモノクローナル抗体を組み合わせることができる。したがって、その組み合わせは、最大治療利益を提供するように調節した多数の療法を提供する。本発明の少なくとも一種のヒト抗 P S M A 抗体またはその抗原結合部分と、少なくとも一種の本発明の二重特異性または多重特異性分子との組み合わせからなる薬学的組成物などの組成物も、本発明の範囲内である。

30

【 0 0 1 7 】

さらに別の態様において、本発明は、1 以上の本発明のヒト抗体および / または関連する治療用組成物、上記抗体を含有する誘導体などを、P S M A を発現する細胞に接触させる (例えば、被験体に投与する) ことによって、該細胞の増殖および / もしくは成長を阻害する方法、ならびに / または P S M A を発現する細胞の死滅を誘発する方法を提供する。ある特定の態様では、その方法は、in vitro または in vivo において P S M A を発現する細胞と本発明のヒト抗 P S M A 抗体とを、ヒトエフェクター細胞の存在下で接触させることを含む。その方法は、例えば、in vitro または ex vivo において、培養物 (例えば、P S M A を発現する細胞およびエフェクター細胞を含む培養物) 中に用いることができる。例えば、P S M A を発現する細胞およびエフェクター細胞を含有するサンプルを in vitro で培養し、本発明の抗体と組み合わせてもよい。あるいは、その方法を、例えば、in vivo (例えば、治療用または予防用の) プロトコルの一部として被験体に行うこともできる。

40

【 0 0 1 8 】

P S M A が媒介する疾患の in vivo での治療および予防での使用のために、本発明のヒト抗体の治療的に (例えば、P S M A を発現する細胞の成長を阻害、除去または予防するために) 有効な量を、抗体を基礎とした臨床的産物の好適な投与経路において、注射または点滴など当該技術において公知の方法によって、患者 (例えば、ヒト被験体) に投与す

50

る。

【0019】

したがって、本発明のヒト抗体は、P S M Aの発現を特徴とする種々の疾患を治療および/または予防するために、該疾患に罹患している患者に対して該抗体の好適な投与量（あるいは、一連の投与量）を投与することによって、用いることができる。本発明の方法および組成物を用いて治療（例えば、改善）または予防される疾患の例としては、限定されないが、前立腺癌、大腸癌、および腎臓癌腫などの癌があげられる。

【0020】

本発明の特定の態様において、患者は、化学治療用物質、放射線またはFcレセプター、例えば、FcレセプターもしくはFcレセプター、例えば、サイトカインの発現または活性を調節、例えば、増強させる物質を用いてさらに治療することができる。治療中、投与される典型的なサイトカインとしては、顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）、インターフェロン - （I F N - ）、および腫瘍壊死因子（T N F）が含まれる。典型的な治療薬としては、とりわけ、ドキソルピシン（アドリマイシン）、シスプラチン、硫酸ブレオマイシン、カルムスチン、クロランブシルおよびシクロホスファミド、ヒドロキシ尿素などの抗悪性腫瘍薬がある。

10

【0021】

さらに別の態様において、本発明は、例えばP S M A関連疾患を診断するために、P S M AまたはP S M A発現細胞の存在をin vitro またはin vivoで検出する方法を提供する。この方法は、例えば、抗体とP S M Aの間で複合体を形成することが可能な条件下で、検査すべきサンプルと任意に対照サンプルとを、本発明のヒトモノクローナル抗体（またはその抗原結合部分）に接触させることによって実現される。その後、複合体形成を検出する（例えば、E L I S Aを用いて）。二つのサンプル中の複合体形成に統計学的に有意な差が現れれば、検査用サンプル中にP S M Aが存在することが示される。

20

【0022】

さらに別の局面において、本発明は、P S A Mに結合する完全ヒトモノクローナル抗体を発現するトランスジェニックマウス（「H u M A bマウス」とも呼ぶ）のようなトランスジェニック非ヒト動物を提供する。特定の態様において、トランスジェニック非ヒト動物は、本発明の抗P S M A抗体の全てもしくは一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスである。抗P S M A抗体を産生するため、P S M A抗原および/またはP S M Aを発現する細胞の精製製剤または濃縮製剤を用いて、トランスジェニック非ヒト動物を免疫化することができる。好ましくは、トランスジェニック非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスは、P S M Aに対するヒトモノクローナル抗体（例えば、I g G、I g A、および/またはI g M）の多数のアイソタイプを、V - D - J組換えおよびアイソタイプスイッチによって産生することができる。アイソタイプスイッチは、例えば、古典的または非古典的アイソタイプスイッチによって行う。

30

【0023】

したがって、別の態様において、本発明は、上記のようにトランスジェニック非ヒト動物、例えば、抗P S M A抗体を発現するトランスジェニックマウスに由来する単離されたB細胞を提供する。次に、その単離されたB細胞は、不死化した細胞に融合させることによって不死化することができ、ヒト抗P S M A抗体の供給源（例えば、ハイブリドーマ）を作製することができる。そのようなハイブリドーマ（すなわち、ヒト抗P S M A抗体を作製する）もまた本発明の範囲に含まれる。

40

【0024】

ここで例示されているように、ヒト抗P S M A抗体は、該抗体を発現するハイブリドーマから直接的に得ることができる。または、トランスフェクトーマ（transfectoma）（例えば、不死化したC H O細胞またはリンパ性細胞からなるトランスフェクトーマ）のような宿主細胞中にクローニングしたり、組換え的に発現させたりすることができる。したが

50

って、本発明は、ヒト P S M A に結合するヒトモノクローナル抗体を作製する方法を提供する。特定の態様において、該方法は、トランスジェニック非ヒト動物、例えば、既に述べたように（例えば、抗 P S M A 抗体の全てもしくは一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する）トランスジェニックマウスを、P S M A 抗原および/または P S M A を発現する細胞の精製製剤または濃縮製剤を用いて免疫化することを含む。続いて、該動物の B 細胞（例えば、脾臓 B 細胞）を取得し、ミエローマ細胞と融合し、P S M A に対してヒトモノクローナル抗体を分泌する不死のハイブリドーマ細胞を作製する。

【0025】

さらに別の局面において、本発明は、ヒトモノクローナル抗 P S M A 抗体の全てもしくは一部をコードする（例えば、該抗体の少なくとも 1 つの軽鎖および重鎖をコードする）核酸分子、ならびにそのような核酸を含む宿主細胞を組換え発現ベクター、およびそのようなベクターによってトランスフェクトされた宿主を提供する。そのような宿主細胞を培養することによって該抗体を産生する方法もまた本発明に包含される。本発明によって提供される特定の核酸は、配列番号 1、3、5、7 または 9、および配列番号 2、4、6、8 または 10 にそれぞれ示されているヌクレオチド配列を含み、それらはそれぞれヒト抗 P S M A 抗体（H u M A b）4 A 3、7 F 1 2、8 A 1 1、8 C 1 2 および 1 6 F 9 をコードしている。

【0026】

本発明のその他の特徴および利点は、限定されるべきではないが、以下の発明の詳細な説明および前述の特許の請求範囲から明らかとなるであろう。本明細書全体において引用されている全ての引用文献、特許および公開された特許出願を本明細書中に引用によって援用する。

【0027】

発明の詳細な説明

本発明は、前立腺特異性膜抗原（本明細書において、「P S M A」と呼ぶ）の発現を特徴とする疾患を治療および診断するための、新規抗体を基礎とした治療法を提供する。本発明の治療法には、P S M A 上に存在するエピトープに結合する単離されたヒトモノクローナル抗体および/または該抗体を含有する関連組成物を用いる。本明細書において例示されている特定の態様において、そのヒト抗体は、V - D - J 組換えおよびアイソタイプスイッチによって、P S M A に対するヒトモノクローナル抗体（例えば、I g G、I g A、および/または I g E）の多数のアイソタイプを産生することができるトランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物中に産生される。したがって、本発明の各局面には、抗体および抗体フラグメント、およびその薬学的組成物のみならず、モノクローナル抗体を産生する非ヒトトランスジェニック動物、B 細胞およびハイブリドーマが含まれる。本発明の抗体を用いた、P S M A を発現する細胞を検出するため、または *in vitro* あるいは *in vivo* のいずれかにおいて、P S M A を発現する細胞の成長、分化、および/または運動性を阻害するための方法も本発明に包含される。

【0028】

本発明をより理解しやすくするために、まず特定の用語を定義する。定義の追加は発明の詳細な説明全般に記載している。

【0029】

「前立腺特異性膜抗原」、「P S M A」、および「P S M A 抗原」という語は、本明細書において互換可能に用いられ、ヒト P S M A のバリエーション、アイソフォーム、および種ホモログを含む。したがって、いくつかの例においては、本発明のヒト抗体は、ヒト以外の種またはヒト P S M A と構造的に関連する他の蛋白質からの P S M A（例えば、ヒト P S M A ホモログ）と交差反応する。別の例においては、該抗体は、ヒト P S M A に対して完全に特異的であり、種または他のタイプに対する交差反応性を示さない。

【0030】

本明細書で使用されているところの「成長を阻害する」（例えば、細胞について述べる

）という語は、抗 P S M A 抗体と接触させたとき、同細胞を抗 P S M A 抗体に接触させないときに比べて認められる、あらゆる測定可能な細胞の成長の減少を含むことが意図される。例えば、細胞の成長が、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、99 % または 100 % 阻害される。

【0031】

本明細書で用いられるところの「抗体」という用語は、抗体全体およびあらゆる抗原結合フラグメント（すなわち、「抗原結合部分」）またはそれらの一本鎖を含む。「抗体」は、ジスルフィド結合により内部結合した少なくとも二つの重（H）鎖と二つの軽（L）鎖を含む糖蛋白質、またはその抗原結合部分を意味する。各重鎖は、重鎖可変領域（ここでは V_H と略す）および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} の 3 つのドメインからなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ここでは V_L と略す）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、 C_L の 1 ドメインからなる。 V_H および V_L 領域は、さらに亜分類され、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域と、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存された領域が点在している。各 V_H および V_L は 3 つの CDR および 4 つの FR からなり、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3、FR 4 の順に並んでいる。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンと免疫系の各種細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典補体系の第一成分（C1q）を含む宿主組織または因子の結合を媒介してもよい。

10

【0032】

本明細書において用いられるところの、抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」という用語は、抗原（例えば、P S M A）に特異的に結合する能力を保持する抗体の一つ以上のフラグメントを意味する。抗体の抗原結合機能は、全長抗体のフラグメントにより実行されている可能性があることがわかっている。抗体の「抗原結合部分」という語に包含される結合フラグメントの例は、(i) F a b フラグメント、 V_L 、 V_H 、 C_L 、および C_{H1} ドメインからなる一価フラグメント、(ii) $F(a b')_2$ フラグメント、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により結合した二つの F a b フラグメントからなる二価フラグメント、(iii) V_H および C_{H1} ドメインからなる F d フラグメント、(iv) 抗体の片腕の V_L および V_H ドメインからなる F v フラグメント、(v) V_H ドメインからなる d A b フラグメント（Ward ら、(1989) *Nature* 341:544-546）、および (vi) 単離された相補正決定領域（CDR）、を含む。さらに、F v フラグメントの 2 つのドメインである V_L および V_H は別々の遺伝子でコードされているが、組換え法を用いて、 V_L および V_H 領域を対にして一価分子を形成する蛋白質一本鎖に作製できるような合成リンカーにより、 V_L および V_H を結合させることができる（一本鎖 F v (s c F v)）として知られている；例えば Bird ら、(1988) *Science* 242:423-426；および Huston ら、(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 を参照）。そのような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されることが意図されている。このような抗体フラグメントは、当該技術分野において公知の従来技術を用いて得られ、そのフラグメントを使用のためにスクリーニングする方法はインタクト抗体の場合と同じである。

20

30

【0033】

「エピトープ」という用語は、抗体に結合することが可能な蛋白質決定因子を意味する。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面の基からなり、通常特異的な 3 次元構造的特徴、ならびに特異的な電荷的特徴を有している。高次構造エピトープと非高次構造エピトープとは、後者に対する結合はそうではないが、前者に対する結合は変性溶媒中で失われる点において区別される。

40

【0034】

「未変性の高次構造エピトープ」または「未変性の蛋白質エピトープ」は、本明細書において互換可能に用いられており、P S M A 分子の直線状配列の異なる部分からのアミノ酸どうしが 3 次元的空间において近接するときに生じる P S M A 分子の高次構造の折り畳みから得られた蛋白質エピトープを含む。そのような高次構造エピトープは、原形質膜の

50

細胞膜外の側に位置している。

【0035】

「二重特異性分子」という用語は、二種類の異なる結合特異性部分を有する蛋白質、ペプチド、または蛋白質もしくはペプチド複合体などの物質を含むことを意図する。例えば、該分子は、(a)細胞表面抗原、および(b)エフェクター細胞表面上のFcレセプターと結合または相互作用する。「多重特異性分子」または「ヘテロ特異性分子」という用語は、二種類を超える異なる結合特異性部分を有する蛋白質、ペプチド、または蛋白質もしくはペプチド複合体などの物質を含むことを意図する。例えば、該分子は、(a)細胞表面抗原、(b)エフェクター細胞表面上のFcレセプター、および(c)少なくとも一種のその他の成分と結合または相互作用することができる。したがって、本発明は、限定されないが、PSMAなどの細胞表面抗原、およびエフェクター細胞上のFcレセプターのような他の標的に方向付けられた二重特異性、三重特異性、四重特異性、およびその他の多重特異性分子を含む。

10

【0036】

「二重特異性抗体」という語はさらにディアボディ(diabodies)も含む。ディアボディとは、二価、二重特異性の抗体で、 V_H および V_L ドメインがポリペプチド一本鎖上に発現しているが、同一鎖上の2ドメインを対にするには短すぎるリンカーを用いて、それによって、該ドメインを別鎖の相補性ドメインと対にさせ、二箇所の抗原結合部位を作製することができる抗体である(例えば、Holliger, P.,ら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J.,ら、(1994) Structure 2:1121-1123参照)。

20

【0037】

用語「ヒト抗体誘導体」は、あらゆる改変された形態の抗体、例えば、抗体と別の物質または抗体との複合体を意味する。

【0038】

本明細書において用いられるように、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを免疫化することによって、またはヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリをスクリーニングすることによって、ヒト免疫グロブリン配列を用いた系から抗体が得られる場合、ヒト抗体は特定の生殖細胞系列配列に「由来する」。ヒト生殖細胞系列免疫グロブリンに「由来する」ヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖細胞系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較することによるなどして同定することができる。選択されたヒト抗体は、典型的にヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と、アミノ酸配列において少なくとも90%一致し、他の種(例えば、マウス生殖細胞系列配列)の生殖細胞系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較したとき、該ヒト抗体をヒトであるとして同定するアミノ酸残基を含有している。いくつかの例では、ヒト抗体は、アミノ酸配列において少なくとも95%、さらには96%、97%、98%、または99%が、生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に一致する。典型的に、特定の生殖細胞系列免疫グロブリンに由来するヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とわずか10アミノ酸が違うだけである。いくつかの例では、該ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と、わずか5、さらにはわずかに4、3、2もしくは1アミノ酸が違うだけである。

30

40

【0039】

本明細書において用いられる「ヘテロ抗体」という用語は、二つ以上の抗体、抗体結合フラグメント(例えば、Fab)、それらの誘導体、または相互に結合している抗原結合領域で、そのうち少なくとも二つが異なる特異性部分を有するものを意味する。これらの異なる特異性部分には、エフェクター細胞上のFcレセプターへの結合特異部分、および例えば腫瘍細胞などの標的細胞上の抗原またはエピトープへの結合特異性部分が含まれる。本明細書で用いられる「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系列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が意図される。本発明の「ヒト抗体」は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によりコードされていないアミノ酸残基

50

(例えば、*in vitro*における無作為または部位特異的突然変異誘発により導入された突然変異、または*in vivo*における体細胞突然変異による突然変異)を含んでもよい。しかしながら、本明細書において用いられる「ヒト抗体」という用語は、マウスなど他の哺乳動物の生殖細胞系列由来のCDR配列をヒトフレームワーク配列に移植した抗体を含むことは意図されない。

【0040】

本明細書において用いられる「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一分子組成物の抗体分子の調製物を意味する。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープへの単一の結合特異性および親和性を示す。したがって、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系列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、単一の結合特異性を示す抗体のことを意味する。ある態様において、そのヒトモノクローナル抗体は、不死化された細胞に融合させたヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、例えば、トランスジェニックマウスなどのトランスジェニック非ヒト動物から得たB細胞を含むハイブリドーマにより産生される。

10

【0041】

本明細書で用いられる「組換えヒト抗体」という用語は、(a)ヒト免疫グロブリン遺伝子またはそれから作製されたハイブリドーマの、遺伝子導入または染色体導入された動物(例えばマウスなど)から単離した抗体(以下の第I節にさらに詳述する)、(b)抗体を発現するように形質転換された宿主細胞、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、(c)組換え体、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体、および(d)ヒト免疫グロブリン遺伝子配列のDNA配列へのスプライシングに關与するその他の手段により調製、発現、産生または単離された抗体など、遺伝子組換え手段により調製、発現、産生または単離されたすべてのヒト抗体を含むことを意図する。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列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。しかしながら、いくつかの態様において、このような組換えヒト抗体は、*in vitro*における突然変異誘発(またはヒトIg配列を遺伝子導入した動物を用いる場合、*in vivo*体細胞突然変異誘発)を受けることがあり得、よって組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列V_HおよびV_L配列に由来し関連している一方、*in vivo*におけるヒト抗体生殖細胞系列の天然のレパートリには存在しないことがある。

20

30

【0042】

本明細書で用いられる「異種抗体」は、このような抗体を産生するトランスジェニック非ヒト生物に関連して定義される。この用語は、トランスジェニック非ヒト動物を含まない生物で見られるアミノ酸配列またはコード核酸配列と一致し、一般にトランスジェニック非ヒト動物以外の種に由来するアミノ酸配列またはコード核酸配列を有する抗体を意味する。

【0043】

本明細書で用いられる「ヘテロハイブリッド抗体」は、異なる生物起源の軽鎖および重鎖を有する抗体を意味する。例えば、マウス軽鎖に会合しているヒト重鎖を有する抗体は、ヘテロハイブリッド抗体である。ヘテロハイブリッド抗体の例としては、上述したように、キメラ抗体およびヒト化抗体があげられる。

40

【0044】

本明細書で用いられる「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有するその他の抗体を実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以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかしながら、ヒトPSMAのエピトープ、アイソフォーム、またはバリエーションに特異的に結合する単離された抗体は、例えば、他の種(例えば、PSMA種ホモログ)からの他の関連抗原に対して交差反応性を有する。さらに、単離された抗体は、他の細胞性物質および/または化学物質も実質的に含まなくてもよい。本発明のある態様において、

50

異なる特異性を有する「単離された」モノクローナル抗体の組み合わせは、明確な組成に組み合わせられている。

【0045】

本明細書において用いられる「特異的結合」は、所定の抗原に抗体が結合することを意味する。典型的に、抗体は、解離定数 (K_D) 10^{-7} M以下で結合するが、所定の抗原に対しては、所定の抗原または関連性の高い抗原以外の非特異性抗原（例えば、BSA、カゼイン）に結合する場合の K_D の少なくとも2倍低い K_D で結合する。「抗原を認識する抗体」および「抗原特異的抗体」という表現は、本明細書において、「抗原に特異的に結合する抗体」という表現と互換可能に用いられる。

【0046】

本明細書で用いられる Ig G 抗体への「高親和性」という用語は、 K_D が 10^{-8} M以下、より好ましくは 10^{-9} M以下、さらに好ましくは 10^{-10} M以下である抗体、結合親和性が少なくとも約 10^7 M $^{-1}$ 、好ましくは少なくとも約 10^9 M $^{-1}$ 、さらに好ましくは少なくとも約 10^{10} M $^{-1}$ 、 10^{11} M $^{-1}$ 、 10^{12} M $^{-1}$ 以上、または、例えば 10^{13} M $^{-1}$ 以上の抗体について言うのに用いられる。しかしながら、その他の抗体アイソタイプの「高親和性」結合は変化することもある。例えば、Ig M アイソタイプの「高親和性」結合とは、抗体が 10^{-7} M以下、より好ましくは 10^{-8} M以下の K_D で結合することと言う。

【0047】

本明細書で用いられる「 K_{assoc} 」または「 K_a 」という語は、特定の抗体抗原相互作用の会合定数を意味するものと意図され、一方、本明細書で用いられる「 K_{diss} 」または「 K_d 」という語は、特定の抗体抗原相互作用の解離定数を意味するものと意図される。本明細書で用いられる「 K_D 」は、 K_d 対 K_a の比率（すなわち、 K_d / K_a ）から得られる解離定数を意味することが意図されており、分子濃度 (M) として表される。

【0048】

本明細書において用いられる「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によりコードされた抗体クラス（例えば、Ig M または Ig G 1）を意味する。

【0049】

本明細書において用いられる「アイソタイプスイッチ」とは、抗体のクラスまたはアイソタイプが、ある Ig クラスから別の Ig クラスへ変化する現象を意味する。

【0050】

本明細書において用いられる「非スイッチアイソタイプ」とは、アイソタイプスイッチが生じない場合に産生される重鎖のアイソタイプクラスで、非スイッチアイソタイプをコードする CH 遺伝子は、典型的に機能的に再編成された V D J 遺伝子の直下流の第一 CH 遺伝子である。アイソタイプスイッチは、古典的または非古典的アイソタイプスイッチに分類される。古典的アイソタイプスイッチは、導入遺伝子中の少なくとも一つのスイッチ配列領域に関与する組換え事象により生じる。非古典的アイソタイプスイッチは、例えば、ヒト μ およびヒト μ の同種組換えにより生じると考えられる（関連欠失）。導入遺伝子間および/または染色体間組換えなどの代替的な非古典的スイッチのメカニズムは、とりわけアイソタイプスイッチを引き起こすと考えられる。

【0051】

本明細書において用いられる「スイッチ配列」という用語は、スイッチ組換えを担う DNA 配列を意味する。「スイッチドナー」配列、典型的に μ スwitch領域は、スイッチ組換え中に消去される構成領域の 5' 側（すなわち上流）であろう。「スイッチアクセプタ」領域は、消去される構成領域と置換される定常領域（例えば、 μ など）の間にあるであろう。組換えが常に生じる特異的部位は存在しないため、最終的な遺伝子配列は、典型的にその作製物からは予測できないであろう。

【0052】

本明細書において用いられる「グリコシル化パターン」とは、蛋白質、特に免疫グロブリン蛋白質に共有結合する糖ユニットのパターンと定義される。異種抗体のグリコシル化

10

20

30

40

50

パターンは、当業者が異種抗体のグリコシル化パターンが導入遺伝子のC H遺伝子が由来する種よりも非ヒトトランスジェニック動物の種における前記グリコシル化パターンの方が類似しているであろうと認識する場合に、非ヒトトランスジェニック動物種により産生された抗体上に自然に発生するグリコシル化パターンと実質的に同様であると特徴づけることができる。

【0053】

本明細書において用いられるある物質に適用される「自然発生」という用語は、ある物質が自然に見出される可能性があるという事実を意味する。例えば、自然資源から単離され、研究室で人為的に修飾されていない生物（ウィルスも含む）に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、自然発生である。

10

【0054】

本明細書において用いられる「再編成」という用語は、Vセグメントが完全V_HまたはV_Lドメインを基本的にコードしている高次構造中のD-JまたはJセグメントそれぞれの直ぐ近くに位置する場合の重鎖または軽鎖免疫グロブリンの遺伝子座の構成を意味する。再編成免疫グロブリン遺伝子座は、生殖細胞系列DNAとの比較により明らかにすることが可能で、再編成遺伝子座は少なくとも一つの組換え七量体/九量体と相同的な要素を有するであろう。

【0055】

Vセグメントに関連してここに用いられる「未再編成」または「生殖細胞系列構成」という用語は、Vセグメントが直ぐ近くのDまたはJセグメントになるように再結合しない場合の構成を意味する。

20

【0056】

本明細書において用いられる「核酸分子」という用語は、DNA分子またはRNA分子を含むことを意図する。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であってよいが、好ましくは二重鎖DNAである。

【0057】

P S M Aに結合する抗体または抗体部分（例えば、V_H、V_L、C D R 3）をコードする核酸に関連して本明細書において用いられる「単離核酸分子」という用語は、抗体または抗体部分をコードするヌクレオチド配列がP S M A以外の抗原に結合する抗体または抗体部分をコードするその他のヌクレオチド配列を含まず、他の配列がヒトゲノムDNA中の核酸に自然に隣接してもよい、核酸分子を意味することが意図される。ある態様において、ヒト抗P S M Aモノクローナル抗体またはその部分は、4 A 3、7 F 1 2、8 A 1 1、8 C 1 2または1 6 F 9のヌクレオチドまたはアミノ酸配列、ならびに配列番号1、3、5、7または9、および2、4、6、8または10にそれぞれ示される配列をもつ重鎖（V_H）及び軽鎖（V_L）可変領域を含む。

30

【0058】

ここに開示され、クレームされているように、配列番号1～58に示されている配列は、「保存的配列改変」、すなわち、ヌクレオチド配列によってコードされた、またはアミノ酸配列を含む抗体の結合特性に有意に影響を及ぼさない、または変更しないヌクレオチドおよびアミノ酸配列改変を含む。そのような保存的配列改変は、ヌクレオチドおよびアミノ酸の置換、付加および欠失を含む。改変は、当該技術分野において公知の標準的な方法、例えば、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介性突然変異誘発によって、配列番号1～58に導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似する側鎖を有するアミノ酸残基によって置換されたものを含む。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基側鎖（例えば、リジンアルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（

40

50

例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。したがって、ヒト抗 P S M A 抗体の予想される非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基によって置換されることが好ましい。

【 0 0 5 9 】

あるいは、別の態様において、突然変異は、抗 P S M A 抗体コード領域の全てまたは一部に沿って、例えば、飽和突然変異誘発などによって、ランダムに導入することができ、得られた改変された抗 P S M A 抗体を、結合活性に関してスクリーニングすることができる。

【 0 0 6 0 】

したがって、本明細書において開示されている（重鎖および軽鎖可変領域）ヌクレオチド配列によってコードされた、および/または本明細書において開示されている（重鎖および軽鎖可変領域）ヌクレオチド配列を含む抗体（すなわち、配列番号 1 ~ 5 0）は、保存的に改変された類似の配列によってコードされているか、またはそれを含んだ実質的に類似する抗体を含む。本明細書に記載の、配列番号 1 ~ 5 0 に示されるような、部分的（すなわち、重鎖および軽鎖可変領域の）配列を基に、どのようにして上記実質的に類似する抗体を作製することができるかについて以下において説明する。

【 0 0 6 1 】

核酸について、「実質的相同性」という用語は、二つの核酸またはそれを示す配列が、それらを最適に並べて比較したときに、ヌクレオチドの挿入または消去が適切で、ヌクレオチドの少なくとも約 8 0 %、通常は少なくとも約 9 0 % ~ 9 5 %、さらに好ましくはヌクレオチドの少なくとも約 9 8 % ~ 9 9 . 5 % において同一であることを示す。また、実質的相同性があるのは、特定のハイブリダイゼーションの条件下で、そのセグメントがその鎖の相補体とハイブリダイズするような場合である。

【 0 0 6 2 】

2 つの配列の同一性の割合は、その 2 つの配列が共有する同一位置数の関数であり（つまり、相同性の % = 同一位置数 # / 全位置数 # × 1 0 0）、その 2 つの配列の最適アラインメントのために導入が必要なギャップ数および各ギャップの長さを考慮する。配列の比較と 2 つの配列の同一性の割合を決定するために、実施例に後述されるがそれに限定されない数学的アルゴリズムを用いることができる。

【 0 0 6 3 】

二つのヌクレオチド配列間の同一性の割合は、G C G ソフトウェアパッケージの G A P プログラム（<http://www.gcg.com>から入手）を用い、N W S g a p D N A . C M P 行列およびギャップ重量 4 0、5 0、6 0、7 0、または 8 0 および長さ重量 1、2、3、4、5 または 6 を用いて求めることができる。二つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性の割合は、A L I G N プログラム（バージョン 2 . 0）に組み込まれている E. Meyer s および W. Miller（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17（1988））のアルゴリズムを用いて、P A M 1 2 0 重量残基表、ギャップ長ペナルティ 1 2 およびギャップペナルティ 4 を用いて求めることもできる。さらに、二つのアミノ酸配列間の同一性の割合は、G C G ソフトウェアパッケージの G A P プログラム（<http://www.gcg.com>から入手）に組み込まれている Needleman および Wunsch（J. Mol. Biol.（48）:444-453（1970））のアルゴリズムを用い、Blossum 6 2 行列または P A M 2 5 0 行列のいずれか、およびギャップ重量 1 6、1 4、1 2、1 0、8、6 または 4 および長さ重量 1、2、3、4、5 または 6 を用いて求めることができる。

【 0 0 6 4 】

本発明の核酸および蛋白質配列は、例えば、関連配列などを公的データベースから検索するための「クエリー配列」としてさらに用いることができる。このような検索は Altschul ら（1990）J. Mol. Biol. 215:403-10 の N B L A S T および X B L A S T プログラム（バージョン 2 . 0）を用いて行うことができる。B L A S T 核酸検索は、N B L A S T プログラム、スコア = 1 0 0、ワード長 = 1 2 を用いて行い、本発明の核酸分子に相同な核酸配列を得ることができる。B L A S T 蛋白質検索は、X B L A S T プログラム、スコ

10

20

30

40

50

ア = 50、ワード長 = 3を用いて行い、本発明の蛋白質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較のためにギャップの入ったアラインメントを得るために、Altschulら (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17) :3389-3402に記載の G a p p e d B L A S T を使用することもできる。B L A S T プログラムおよび G a p p e d B L A S T プログラムを使用する際に、それぞれのプログラム (X B L A S T および N B L A S T) のデフォルトパラメータを用いることができる。http://www.ncbi.nlm.nih.gov参照。

【0065】

核酸は細胞全体、細胞ライセート中、または部分的に精製した状態または実質的に純粋な状態で存在してよい。核酸が「単離される」または「実質的に純粋な状態である」のは、アルカリ / S D S 処理、C s C l バンド形成、カラムクロマトグラフィ、アガロースゲル電気泳動法およびその他の当該技術分野において公知の標準技術により、その他の細胞成分、または他の夾雑物、例えば、その他の細胞核酸または蛋白質などを取り除いて精製した場合である。F. Ausubelら、ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987) 参照。

10

【0066】

本発明の核酸組成物は、天然配列 (改変された制限部位などは除く) 中にある場合が多いが、c D N A、ゲノム、または混合物のいずれかから得られたものを、遺伝子配列を提供する標準技術に従って突然変異させてよい。配列をコードするために、これらの突然バリエーションがアミノ酸配列に適切に作用してよい。特に、天然 V、J、D、定常、スイッチおよびここに記載のその他のこのような配列に実質的に相同な、またはそれらに由来する D N A 配列を意図する (ここで、「由来する」とは、ある配列が他の配列と同一、または他の配列から変更されたことを示す)。

20

【0067】

核酸が別の核酸配列と機能的な関係に置かれる場合、その核酸は「作用可能に結合」している。例えば、プロモーターまたはエンハンサーがコード配列の転写に作用する場合には、そのプロモーターまたはエンハンサーはそのコード配列に作用可能に結合している。転写抑制配列に関して作用可能に結合するとは、結合している D N A 配列は隣接しており、二つの蛋白質コード領域が結合する必要がある場合には隣接してリーディングフレームの中にあるということの意味する。スイッチ配列の場合には、作用可能に結合するとは配列がスイッチ組換えに影響を与えることができることを示す。

30

【0068】

ここで用いられる「ベクター」とは、それに結合している別の核酸を輸送できる核酸のことを意味することを意図する。ベクターの一種である「プラスミド」は、追加 D N A セグメントをライゲートすることができる、環状二本鎖 D N A ループを意味する。ウィルスベクターは別種のベクターで、追加 D N A セグメントをウィルスゲノムにライゲートすることができる。あるベクターは導入された宿主細胞内で自己複製することができる (例えば、複製の細菌起源を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳類ベクターなど)。その他のベクター (例えば、非エピソード哺乳類ベクターなど) は、宿主細胞に導入されると、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって宿主ゲノムとともに複製される。さらに、いくつかのベクターは、作用可能に結合している位置に遺伝子の発現を方向付けることができる。このようなベクターをここでは「組換え発現ベクター」 (または単に「発現ベクター」) と呼ぶ。一般に、組換え D N A 技術に用いることができる発現ベクターはプラスミドの形状であることが多い。プラスミドはベクターとして用いられることが一般的であることから、本明細書では「プラスミド」および「ベクター」は、互換可能に使用してもよい。しかし、本発明では、等価に機能するウィルスベクター (例えば、複製欠失レトロウィルス、アデノウィルス、およびアデノ関連ウィルス) などのその他の発現ベクターの形状を含むことを意図する。

40

【0069】

ここで用いられる「組換え宿主細胞」 (または単に「宿主細胞」) は、組換え発現ベクターが導入される細胞を意味することを意図する。このような用語は、特定の対象細胞だ

50

けでなく、このような細胞の後代も意味することを意図すると理解されなければならない。突然変異または環境の影響により次世代に特定の変更が生じるため、このような後代は実際には親細胞と同一ではないこともあるが、それでもここに用いられる「宿主細胞」という用語の範囲内に含む。組換え宿主細胞は、例えば、CHO細胞およびリンパ球細胞を含む。

【0070】

本明細書において用いられる「被験体」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含むことを意図する。「非ヒト動物」という用語には、例えば、非ヒト霊長目、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの、哺乳類および非哺乳類などの脊椎動物すべてが含まれる。

10

【0071】

「トランスジェニック非ヒト動物」という語は、1以上のヒト重鎖および/または軽鎖導入遺伝子または導入染色体（動物の天然のゲノムDNAに組み込まれている、もしくは組み込まれていない）を含むゲノムを有し、完全なヒト抗体を発現することができる非ヒト動物を意味する。例えば、トランスジェニックマウスは、ヒト軽鎖導入遺伝子と、ヒト重鎖導入遺伝子またはヒト重鎖導入染色体を持ち、PSMA抗原および/またはPSMAを発現する細胞で免疫化されたとき、マウスがヒト抗PSMA抗体を産生することができる。ヒト重鎖導入遺伝子は、トランスジェニック、例えば、HuMAbマウス、またはヒト重鎖導入遺伝子が染色体外で維持されることができるように、PCT国際公開WO 02/43478号に記載の染色体導入（例えば、KM）マウスのように、マウスの染色体DNAに導入することができる。そのようなトランスジェニックマウスおよび染色体導入マウスは、V-D-J組換えおよびイソタイプスイッチを行うことにより、複数のPSMAに対するヒトモノクローナル抗体（例えば、IgG、IgAおよび/またはIgE）を産生することができる。

20

【0072】

本発明の種々の局面を以下のサブセクションにおいて詳細に説明する。

【0073】

I. PSMAに対するヒト抗体の産生

本発明のモノクローナル抗体（mAb）は、例えば、KohlerおよびMilstein、*Nature* 256: 495（1975）の標準的な体細胞ハイブリダイズ技術など、従来のモノクローナル抗体産生法を含む様々な技術により産生することができる。体細胞ハイブリダイズ法が好ましいが、原理的には、例えば、Bリンパ球のウィルス性または腫瘍性形質転換などの、他のモノクローナル抗体産生技術を用いることができる。

30

【0074】

ハイブリドーマ調製のために好ましい動物系は、マウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ産生は、非常によく確立された手順である。免疫化プロトコルおよび融合用の免疫化脾細胞の単離技術は当該技術分野において公知である。融合のパートナー（例えば、マウスミエローマ細胞）および融合方法も公知である。

【0075】

ある好ましい態様において、PSMAに対するヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくむしろヒト免疫系の一部分を保持するトランスジェニックマウスまたは染色体導入マウスを用いて産生させることができる。トランスジェニックマウスおよび染色体導入マウスを、本明細書において、HuMAbマウスおよびKMマウスとそれぞれ呼び、それらを集合的に本明細書においては「トランスジェニックマウス」と呼んでいる。

40

【0076】

HuMAbマウスは、未再編成のヒト重鎖（ μ および δ ）および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子小座、あわせて、内因性 μ および δ 鎖遺伝子座を不活化する標的化された突然変異を有する（Lonberg, N.ら（1994）*Nature* 368（6474）：856-859）。したがって、当該マウスはマウスIgMまたは δ の発現の低下を示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチおよ

50

び体細胞突然変異を起こし、高親和性ヒト I g G モノクローナルを産生する (Lonberg、N.ら (1994)、前掲; reviewed in Lonberg、N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg、N. and Huszar、D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93、and Harding、F. and Lonberg、N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764: 536-546)。HuMAbマウスの調製は、下記のII、およびTaylor、L.ら、(1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen、J.ら、(1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon ら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 3720-3724; Choi ら (1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen、J.ら (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon ら (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920; Lonbergら、(1994) Nature 368 (6474): 856-859; Lonberg、N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Taylor、L.ら (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg、N. and Huszar、D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93; Harding、F. and Lonberg、N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764: 536-546; Fishwild、D. ら (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851に詳述され、すべての内容はそれらの全体を引用によって本明細書に援用する。さらに、LonbergおよびKay、ならびにGenPharm Internationalに属する米国特許第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,789,650号、第5,877,397号、第5,661,016号、第5,814,318号、第5,874,299号、および第5,770,429号、Suraniらに属する米国特許第5,545,807号、1998年6月11日公表の国際特許出願第W0 98/24884号、1994年11月10日公表の第W0 94/25585号、1993年6月24日公表の第W0 93/1227号、1992年12月23日公表の第W0 92/22645号、1992年3月19日公表の第W0 92/03918号を参照され、そのすべての開示はそれら全体を引用によって援用する。また、実施例2に記載のHCO12トランスジェニックマウスを、ヒト抗PSMA抗体を産生するために用いることができる。

【0077】

免疫化

PSMAに対する完全なヒトモノクローナル抗体を産生するために、Lonberg、N.ら (1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild、D. ら (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 およびPCT国際公開98/24884号に記載の通り、PSMA抗原および/またはPSMAを発現する細胞の精製製剤または濃縮製剤を用いて、HuMAbマウスを免疫化することができる。そのマウスは、初回注射時には生後6～16週であると好ましいであろう。例えば、PSMA抗原の精製製剤または濃縮製剤(5～20μg)(例えば、PSMA発現LNCaP細胞から精製したもの)を腹腔内投与してHuMAbマウスを免疫化することができる。PSMA抗原の精製製剤または濃縮製剤を用いた免疫化が抗体を産生しない場合、マウスを例えば腫瘍細胞系列などのPSMA発現細胞で免疫化し、免疫応答を促進させてもよい。

【0078】

様々な抗原を用いた経験の蓄積から、HuMAbトランスジェニックマウスの免疫応答が最もよいのは、初めに完全フロインドアジュバント中の抗原の腹腔内投与(IP)により免疫化してから、不完全フロインドアジュバント中の抗原を隔週で(合計6回まで)IP免疫化し、次いで、不完全フロインドアジュバント中の抗原を隔週で(合計10回まで)IP/SP免疫化したときであることがわかっている。免疫応答は、眼窩後方を採血して得られた血漿サンプルを、免疫化プロトコルの経過にわたってモニターすることができる。血漿をELISAによってスクリーニングし(後述の通り)、抗PSMAヒト免疫グロブリンの力価が十分なマウスを融合に使用することができる。マウスは、抗原を静脈注射してから3日後に殺し脾臓を摘出する。各抗原について2から3回の融合を行うことが必要であろうと予測される。数匹のマウスを各抗原で免疫化する。例えば、HCO7およびHCO12株のHuMAbマウス合計12匹を免疫化してもよい。

【0079】

PSMAに対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

PSMAに対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するために、

免疫化されたマウスから、脾細胞とリンパ節細胞を単離し、適切な不死化細胞系列、例えば、マウスミエローマ細胞系列に融合することができる。得られたハイブリドーマを、抗原特異性抗体を産生するためにスクリーニングすることができる。例えば、免疫化されたマウスからの脾臓リンパ球の単一細胞懸濁液を、50%PEGとともに、P3X63-Ag8.653非分泌マウス悪性腫瘍細胞(ATCC、CRL 1580)の数の1/6に融合させることができる。細胞を平底のマイクロタイタープレートに約 2×10^5 個播いてから、20%胎性クローン血清、18%“653”調整培地、5%オリゲン(IGEN)、4mM L-グルタミン、1mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、5mM HEPES、0.055mM 2-メルカプトエタノール、50ユニット/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシン、50mg/mlゲンタマイシン、および10⁻⁵X HAT(Sigma; HATは融合後24時間時点で添加する)を含有する特定の培地中で2週間インキュベートする。約2週間後、細胞を、HATをHTに交換した培地で培養する。その後、各ウェルをヒト抗PSMAモノクローナルIgMおよびIgG抗体についてELISAでスクリーニングする。ハイブリドーマの大規模な増殖が生じたら、通常10~14日後に培地を観察する。抗体分泌ハイブリドーマを再び播き、再びスクリーニングを行い、もしヒトIgGがまだ陽性であれば、抗PSMAモノクローナル抗体を限界希釈により少なくとも二回サブクローンしてもよい。その後、組織培養培地中に抗体を少量作製して特徴付けを行うために、安定したサブクローンをin vitroで培養する。

【0080】

PSMAに対するヒトモノクローナル抗体を産生するトランスフェクトーマの作製
本発明のヒト抗体はまた、例えば、当該技術において公知の組換えDNA技法と遺伝子トランスフェクション法を用いて宿主細胞トランスフェクトーマにおいて産生させることができる(例えば、Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。

【0081】

例えば、抗体、またはその抗体フラグメントを発現させるため、部分的または全長軽鎖および重鎖をコードするDNAを標準的な分子生物学の技法(例えば、PCR増幅、部位特異性突然変誘発)によって得ることができ、発現ベクターに挿入して、遺伝子を転写配列および転写調節配列に作動的に結合することができる。この文脈において、「作動的に結合する」という語は、ベクター内の転写配列および転写調節配列が該抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するというそれらの意図された機能を果たすように抗体遺伝子をベクターにライゲーションすることを意味する。発現ベクターおよび発現調節宿主細胞は、用いられる発現宿主細胞に適合可能に選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別々のベクターに挿入することができる。より典型的には、双方の遺伝子は、同じ発現ベクターに挿入される。該抗体遺伝子は、常法(例えば、抗体遺伝子フラグメントおよびベクター上の相補的制限酵素認識部位のライゲーション、または制限酵素認識部位が存在しない場合は平滑末端ライゲーション)によって発現ベクターに挿入される。本明細書に記載されている抗体の軽鎖および重鎖可変領域を用いて、それらを所望のアイソタイプの重鎖可変および軽鎖可変領域を既にコードしている発現ベクターに、V_Hセグメントがベクター内のC_Hセグメントに作動的に結合され、V_Lセグメントがベクター内のC_Lセグメントに作動的に結合されるように、挿入することによって、全長抗体遺伝子アイソタイプを作製することができる。追加的または代替的に、組換え発現ベクターは、抗体鎖の宿主細胞からの分泌を容易化するシグナルペプチドをコードすることができる。抗体鎖遺伝子は、該シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレーム結合するようにベクターにクローニングされることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド(すなわち、非免疫グロブリン蛋白質からのシグナルペプチド)とすることができる。

【0082】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中の抗体鎖遺伝子の発現を調節する調節配列を保持する。「調節配列」という用語は、プロモーター、エンハンサーおよび、抗体鎖遺伝子の転写および翻訳を調節する他の発現調節エレメント(例え

ば、ポリアデニル化シグナル)を含むことを意図する。そのような調節配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載がある。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞、所望の蛋白質のレベルなどの選択として、そのようなファクターに依存することは、当業者に容易に理解されるであろう。哺乳動物宿主細胞発現のための好ましい調節配列には、哺乳動物細胞における高レベルの蛋白質発現を導くウイルスの要素、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、サルウイルス40(SV40)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP)およびポリオーマなどのプロモーターおよび/またはエンハンサーが含まれる。あるいは、例えば、ユビキチンプロモーターまたはグロブリンプロモーターなどの非ウイルス調節配列を使用してもよい。 10

【0083】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中のベクターの複製(例えば、複製の起源)および選択可能なマーカー遺伝子を調節する配列のような付加的配列を保持してもよい。該選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入される宿主細胞の選択を容易にする(例えば、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号および第5,179,017、全てAxelら、を参照)。例えば、典型的に、選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞上のG418、ハイグロマイシン、メトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する。好ましい選択可能マーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子(dhfr宿主細胞のメトトレキサート選択/増幅における使用のため)およびネオ遺伝子(G418選択のため)が含まれる。 20

【0084】

軽鎖および重鎖を発現させるため、標準的な手法により軽鎖および重鎖をコードする該発現ベクターを宿主細胞にトランスフェクトする。「トランスフェクション」という語の種々の形態は、外因性のDNAを原核生物または真核生物の宿主細胞中に導入するために通常使用される多種多様の技法、例えば、エレクトロポレーション、カルシウムリン酸析出法、DEAEデキストラントランスフェクションなどを包含することを意図する。原核生物または真核生物の宿主細胞のいずれかにおいて本発明の抗体を発現させることが理論的には可能であるが、真核生物細胞、最も好ましくは哺乳動物宿主細胞における抗体の発現が最も好ましい。なぜなら、そのような真核生物の細胞、特に哺乳動物の細胞は、原核生物の細胞においてよりも、適切に折りたたまれた、免疫学的に活性の抗体を構築し、分泌する可能性があるからである。抗体遺伝子の原核生物での発現は、高収率の活性抗体の産生のためには効率的でないことが報告されている(Boss, M. A.およびWood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13)。 30

【0085】

本発明の組換え抗体を発現するための好ましい哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)(dhfr- CHO細胞を含む。UrlaubおよびChasin、(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載され、DBFR選択可能マーカー(例えば、R. J. Kaufman およびP. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621)とともに使用される)、NSOミエローマ細胞、COS細胞およびSP2細胞を含む。特に、NSOミエローマ細胞とともに使用するために、別の好ましい発現系は、GS遺伝子発現系である(PCIT国際公開W087/04462号、W089/01036号および欧州特許第338,841号に記載)。該抗体は、抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞中に導入されるとき、抗体の発現を可能にするのに十分な一定の期間、宿主細胞を宿主細胞中で培養させることによって、より好ましくは、抗体を宿主細胞が成長する培養培地中に分泌することによって産生される。抗体は、標準的な蛋白質精製方法を用いて、培養培地から回収することができる。 40

【0086】

インタクト抗体を発現するための部分的抗体配列の使用

抗体は、主に、6つの重鎖および軽鎖相補性決定領域(CDR)に位置するアミノ酸残 50

基を介して標的抗原と相互作用する。このため、C D R内のアミノ酸配列は、C D R外の配列に比べて、個々の抗体間の多様性が大きくなる。C D R配列は、最も多くの抗体抗原相互作用を担うので、異なる特性を持つ異なる抗体からのフレームワーク配列上に移植された特異的な天然に存在する抗体からのC D R配列を含む発現ベクターを構築することによって、天然に存在する抗体の特異性と類似する組換え抗体を発現することができる（例えば、Riechmann, L.ら、1998、Nature 332:323-327；Jones, P.ら、1986、Nature 321:522-525；およびQueen, C.ら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033参照）。そのようなフレームワーク配列は、生殖細胞系列の抗体遺伝子配列を含む好適なDNAデータベースから入手することができる。これらの生殖細胞系列の配列は、成熟した抗体遺伝子配列とは異なるであろう。なぜなら、それらは、B細胞の成熟中に、V(D)J結合によって形成される、完全に構築された可変遺伝子を含まないであろうからである。生殖細胞系列遺伝子配列はまた、個別の均一に可変領域全体を広がる高親和性の二次的なレパートリー抗体の配列とも異なるであろう。例えば、体細胞成熟は、フレームワーク領域のアミノ酸末端部分では相対的にまれである。例えば、体細胞成熟は、フレーム領域1のアミノ末端部分およびフレームワーク領域4のカルボキシ末端領域では相対的にまれである。さらに、多くの体細胞成熟は、抗体の結合特性を有意に変更しない。この理由から、オリジナルの抗体のものと類似する結合特性を有するインタクトの組換え抗体を作製するために、特定の抗体のDNA配列全体を得る必要はない（1999年3月22日に出願されたPCT/US99/05535号参照。それを本明細書において全ての目的のために引用によって援用する）。C D R領域にまたがる部分的鎖および軽鎖配列は、この目的にとって典型的に十分である。部分的配列は、どの生殖細胞系列の可変および結合遺伝子セグメントが組換え抗体可変遺伝子に寄与するかを決定するために使用される。次いで、生殖細胞系列配列は、可変領域の欠失部分を補充するために使用される。鎖および軽鎖リーダー配列は、蛋白質の成熟中に切断され、最終的な抗体の特性に寄与しない。この理由から、発現構築物のための対応する生殖細胞系列リーダー配列を用いる必要がある。欠失している配列を付加するために、クローニングされたcDNA配列を合成オリゴヌクレオチドとライゲーションまたはPCR増幅によって組み合わせることができる。あるいは、可変領域全体を、短い、重複したオリゴヌクレオチドとして合成することができ、PCR増幅によって組み合わせ、全体の合成可変領域クローンを作製することができる。このプロセスは、欠失または付加または特定の制限部位または特定のコドンの最適化などの特定の利点がある。

【0087】

ハイブリドーマからの鎖および軽鎖転写物のヌクレオチド配列は、天然の配列と同一のアミノ酸コード能力を有する合成V配列を作製するために、合成オリゴヌクレオチドの重複セットを設計するため使用される。合成された鎖およびカッパ鎖配列は、3つの方法によって、天然の配列とは異なるものとして行うことができる。すなわち、繰り返されたヌクレオチド塩基の線を、オリゴヌクレオチド合成およびPCR増幅を促進するように遮断する；最適な翻訳開始部位をKozak'のルール（Kozak、1991、J. Biol. Chem. 266:19867-19870）にしたがって組み込む；およびHindIII部位を翻訳開始部位の上流で処理する。

【0088】

鎖可変領域および軽鎖可変領域の双方において、最適化されたコードおよび対応する非コード鎖配列は、対応する非コードオリゴヌクレオチドの中間点において、30～50のヌクレオチドに適切に分割される。したがって、各鎖において、オリゴヌクレオチドは、150～400ヌクレオチドのセグメントにまたがる重ね合わされる二重鎖セットに構築することができる。次いで、プールをテンプレートとして用いて、150～400ヌクレオチドのPCR増幅産物を作製する。典型的に、単一の可変領域オリゴヌクレオチドセットは、別々に増幅され、2つの重複PCR産物を作製するための2つのプールに分割される。これらの重複産物をその後、PCR増幅によって組み合わせ、完全な可変領域を形成する。鎖または軽鎖定常領域の重複フラグメント（カッパ鎖のBbsI部位、または

ガンマ重鎖の場合はAgeI部位を含む)を、PCR増幅において含み、容易に発現ベクター構築物にクローニングされることが望ましいかもしれない。

【0089】

再構築された重鎖および軽鎖可変領域は、クローニングされたプロモーター、翻訳開始、定常領域、3'非翻訳、ポリアデニル化、および転写終結、発現ベクター構築物を形成するための配列と組み合わせられる。重鎖および軽鎖発現構築物は、単一のベクターに組み合わせ、その後に融合されて双方の鎖を発現する宿主細胞を形成する宿主細胞中に共トランスフェクトし、連続的にトランスフェクトし、または別々にトランスフェクトすることができる。

【0090】

ヒトIgGの発現ベクターの構築に使用するプラスミドについて以下に記載する。PCR増幅されたV重鎖およびVカッパ軽鎖cDNA配列が、完全な重鎖および軽鎖小遺伝子を再構築するために用いられるようにプラスミドを構築した。これらのプラスミドは、完全にヒト、またはキメラIgG₁もしくはIgG₄抗体を発現するために用いることができる。他の重鎖アイソタイプを発現するため、またはラムダ軽鎖を含む抗体を発現するために類似のプラスミドを構築することができる。

【0091】

したがって、本発明の別の局面において、本発明のヒト抗体PSMA抗体4A3、7F12、8A11、8C12または16F9の構造的特徴を用いて、本発明の抗体の少なくとも1つの機能的特性、例えば、PSMAへの結合性を維持する、構造的に関連するヒト抗PSMA抗体を作製することができる。より具体的には、4A3、7F12、8A11、8C12または16F9の1以上のCDR領域を、公知のヒトフレームワーク領域およびCDRと組み換え的に組み合わせ、付加的な、組み換え処理された、本発明のヒト抗PSMA抗体を作製することができる。

【0092】

したがって、別の態様において、本発明は、抗PSMA抗体を調製する方法を提供する。その方法は、(1)少なくとも1つのヒト重鎖CDRは、図19(配列番号21~35)に示されたCDRアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含むヒト重鎖フレームワーク領域およびヒト重鎖CDR;および(2)少なくとも1つのヒト軽鎖CDRは、図22および23(配列番号36~50)に示されたCDRアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含むヒト軽鎖フレームワーク領域およびヒト軽鎖CDR、を含む抗体を調製することを含み、該抗体は、PSMAに結合する抗体を保持する。

【0093】

本発明の抗体がPSMAに結合する能力は、実施例に記載されているような方法(例えば、ELISA法)のような標準的な結合アッセイを用いて決定することができる。

【0094】

抗体重鎖および軽鎖CDR3ドメインは、抗原に対する抗体の結合特異性/親和性において特に重要な役割を果たすことがよく知られているので、上記のように調製される本発明の組み換え抗体は、4A3、7F12、8A11、8C12または16F9の重鎖および軽鎖CDR3を含むことが好ましい。さらに該抗体は、4A3、7F12、8A11、8C12または16F9のCDR2を含むことができる。該抗体は、さらに4A3、7F12、8A11、8C12または16F9のCDR1を含むことができる。したがって、本発明はさらに、(1)および(2)を含み、抗体がPSMAに結合する抗PSMA抗体を提供する:(1)ヒト重鎖フレームワーク領域CDR1、ヒト重鎖CDR2領域およびヒト重鎖CDR3、ここでヒト重鎖CDR3領域は、図19(配列番号23、26、29、32または35)に示される4A3、7F12、8A11、8C12および16F9のCDR3から選択される。(2)ヒト軽鎖フレームワーク領域、ヒト軽鎖CDR1領域、ヒト軽鎖CDR2領域およびヒト軽鎖CDR3領域、ここでヒト軽鎖CDR3領域は、図22および23(配列番号38、41、44、47または50)に示される4A3、7F12、8A11、8C12および16F9のCDR3から選択される。該抗体はさらに、4

10

20

30

40

50

A 3、7 F 1 2、8 A 1 1、8 C 1 2または1 6 F 9の重鎖C D R 2および/または軽鎖C D R 2を含んでもよい。該抗体はさらに、4 A 3、7 F 1 2、8 A 1 1、8 C 1 2または1 6 F 9の重鎖C D R 1および/またはC D R 2を含んでもよい。

【0095】

上記遺伝子操作された抗体のC D R 1、2および/または3は、ここに開示されている4 A 3、7 F 1 2、8 A 1 1、8 C 1 2または1 6 F 9の正確なアミノ酸配列を含む。しかしながら、当業者は、抗体が依然としてP S M Aに効率的に結合している限り、4 A 3、7 F 1 2、8 A 1 1、8 C 1 2または1 6 F 9の正確なC D R 配列から若干逸脱することができることを理解するであろう（例えば、保存的置換）。したがって、別の態様において、遺伝子操作された抗体は、4 A 3、7 F 1 2、8 A 1 1、8 C 1 2または1 6 F 9のC D R の1以上に例えば、90%、95%、98%または99.5%一致する1以上のC D R から構成されてもよい。

10

【0096】

単にP S M A抗体に結合することに加えて、上記のような操作された抗体は、例えば、
(1) ヒトP S M Aを発現する生細胞に結合すること；
(2) 10^{-8} M以下（例えば、 10^{-9} Mもしくは 10^{-9} M以下）の K_D でヒトP S M Aに結合すること；
(3) P S M A上で独特のエピトープに結合すること（併用して用いられたとき、相補性活性をもつモノクローナル抗体が同じエピトープに対する結合に競合する可能性を削除するために）；
(4) in vivoでのP S M A発現腫瘍細胞の成長阻害；および/または
(5) ヒトエフェクター細胞の存在下でP S M Aを発現する細胞の貪食作用および死滅（例えば、A D C Cアッセイにおいて）。

20

などの本発明の機能的特性を保持するように選択することができる。

【0097】

P S M Aに対するヒトモノクローナル抗体の結合の特徴

本発明のヒトモノクローナル抗体は、P S M Aへの結合について、例えば、標準的なE L I S Aによって試験することができる。簡単に説明すると、マイクロタイタープレートに $0.25 \mu\text{g/ml}$ の精製P S M AのP B S溶液でコーティングし、次いで5%ウシ血清アルブミンのP B S溶液でブロッキングする。P S M A免疫化マウスから採取した血漿の希釈溶液を各ウェルに加え、37℃で1~2時間インキュベートする。そのプレートをP B S / T w e e nで洗浄してから、アルカリ性ホスファターゼを結合させたヤギ抗ヒトI g G F c特異性ポリクローナル試薬で、37℃で1時間インキュベートする。洗浄後、該プレートをp N P P基質（ 1mg/ml ）で発色させ、O D 405~650で分析する。最も高い力価を展開したマウスを融合用に用いることが好ましい。

30

【0098】

上述のE L I S Aアッセイは、P S M A免疫原に陽性の反応性を示すハイブリドーマをスクリーニングするために用いることもできる。P S M Aに高い結合力で結合するハイブリドーマをサブクロニングし、さらに特徴づけを行う。- 140℃で保存されるバイアル細胞バンクを5~10個作製し、抗体精製を行うために、親細胞の反応性を保持する（E L I S Aによる）クローンを各ハイブリドーマから選択する。

40

【0099】

ヒト抗P S M A抗体を精製するために、選択されたハイブリドーマをモノクローナル抗体精製用の2リットルスピナーフラスコ中で成長させることができる。上清を濾過し、濃縮してから蛋白質Aセファロースでアフィニティークロマトグラフィー（Pharmacia、Piscataway、NJ）を行うことができる。溶出したI g Gをゲル電気泳動法および高性能液体クロマトグラフィーにかけ、純度を確認するために検査することができる。バッファ溶液をP B Sに交換し、濃度をO D₂₈₀により1.43励起係数を用いて測定することができる。モノクローナル抗体は、分注して-80℃で保存することができる。

【0100】

50

選択されたヒト抗 P S M A モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかどうかを確認するために、各抗体を、市販されている試薬 (Pierce、Rockford、IL) を用いてビオチン化することができる。上述の P S M A コート E L I S A プレートを用いて、非標識モノクローナル抗体とビオチン化モノクローナル抗体を用いた比較研究を行うことができる。ビオチン化 m A b 結合は、ストレップ-アビジン-アルカリ性ホスファターゼプローブで検出することができる。

【 0 1 0 1 】

精製抗体のアイソタイプを決定するために、アイソタイプ E L I S A を行うことができる。マイクロタイタープレートのウェルは、 $10\mu\text{m}/\text{ml}$ の抗ヒト I g で 4 で一晩コーティングすることができる。5 % B S A でブロッキング後、該プレートを室温で 2 時間、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のモノクローナル抗体または精製アイソタイプ対照と反応させる。その後、ウェルは、ヒト I g G 1 またはヒト I g M 特異性アルカリ性ホスファターゼ結合プローブのいずれかと反応させることができる。該プレートを上述のように発色、分析する。

10

【 0 1 0 2 】

モノクローナル抗体と P S M A を発現する生細胞の結合を確認するために、フローサイトメトリーを用いることができる。簡単に説明すると、P S M A を発現する細胞系列 (標準的な成長条件下で成長) を、0.1 % T w e e n 8 0 および 20 % マウス血清を含有する各種濃度のモノクローナル抗体の P B S 溶液と混合し、37 で 1 時間インキュベートする。洗浄後、細胞を、蛍光標識抗ヒト I g G 抗体と、一次抗体染色と同一の条件下で反応させる。サンプルを、光および側方散乱特性を用いて細胞一個ずつをゲート制御する機器 FACSscan で分析することができる。蛍光顕微鏡を用いた代替検定法をフローサイトメトリー検定法に (追加してまたはその代わりに) 用いてよい。細胞の染色は上述の通り正確に行い、蛍光顕微鏡で検査することができる。この方法により個々の細胞の可視化が可能になるが、抗原の濃度により感度が減少しているかもしれない。

20

【 0 1 0 3 】

抗 P S M A ヒト I g G s は、ウェスタンブロット法により P S M A 抗原との反応性をさらに検査することができる。簡単に説明すると、P S M A 発現細胞からの細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけることができる。電気泳動後、分離された抗原をニトロセルロース膜に移し、20 % マウス血清でブロッキングし、検査対象のモノクローナル抗体でプローブする。ヒト I g G 結合を抗ヒト I g G アルカリ性ホスファターゼで検出し、B C I P / N B T 基質タブレット (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) で展開することができる。

30

【 0 1 0 4 】

P S M A に対するヒトモノクローナル抗体の貪食作用および細胞死滅活性

P S M A への特異的結合に加え、ヒトモノクローナル抗 P S M A 抗体を P S M A 発現細胞の貪食作用および細胞死滅の媒介能に関して検査することができる。モノクローナル抗体活性の *in vitro* における検査により、*in vivo* モデルを検査する前の初期スクリーニングを行うことができる。簡単に説明すると、健康なドナーから採取した多形核細胞 (P M N) またはその他のエフェクター細胞を、フィコールハイパックで密度遠心分離してから混入赤血球を細胞溶解して精製することができる。洗浄した P M N を、10 % 熱不活化ウシ胎仔血清を補足した R P M I 中に懸濁し、様々なエフェクター細胞対腫瘍細胞比 (エフェクター細胞 : 腫瘍細胞) で ^{51}Cr 標識 P S M A 発現細胞と混合することができる。その後、各種濃度の精製ヒト抗 P S M A I g G をを加えることができる。無関係のヒト I g G を陰性対照として用いることができる。アッセイは、37 で 0 ~ 120 分間行うことができる。培養上清への ^{51}Cr 放出を測定することにより、サンプルの細胞溶解についてアッセイすることができる。抗 P S M A モノクローナルを互いに組み合わせて、細胞溶解が複数のモノクローナル抗体で促進されるかどうかを検査することもできる。

40

【 0 1 0 5 】

P S M A に結合するヒトモノクローナル抗体を *in vivo* モデル (例えばマウス) において検査し、例えば、腫瘍細胞などの P S M A 発現細胞の貪食作用および細胞死滅の媒介の

50

有効性を調べることもできる。このような抗体は、例えば、以下の基準に基づいて選択されてよいが、それに限定されることを意図しない。

- 1) P S M A 発現生細胞への結合
- 2) P S M A への結合の高親和性
- 3) P S M A 上の固有エピトープへの結合 (相補的活性を有するモノクローナル抗体を組み合わせ使用した場合に同一のエピトープへの結合を競合する可能性を除くため)
- 4) P S M A を発現する細胞のオプソニン化
- 5) ヒトエフェクター細胞存在下における、P S M A を発現する細胞の増殖阻害、貪食作用および / または細胞死滅の媒介

【0106】

本発明の好ましいヒトモノクローナル抗体は、これらの基準の一つ以上、好ましくはすべてに合致する。特定の態様では、ヒトモノクローナル抗体を組み合わせ、二種類以上の抗 P S M A モノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む薬学的組成物として用いる。例えば、異なるが相補的な活性を有するヒト抗 P S M A モノクローナル抗体を一種類の治療法に組み合わせ、望ましい治療または診断効果を達成することができる。この具体例は、エフェクター細胞の存在下で標的細胞の高効率な死滅を媒介する抗 P S M A ヒトモノクローナル抗体と、P S M A を発現する細胞の増殖を阻害する別のヒト抗 P S M A モノクローナル抗体とを組み合わせる組成物であってよいだろう。

【0107】

II. ヒトモノクローナル抗 P S M A 抗体を産生するトランスジェニック非ヒト動物の作製

さらに別の局面において、本発明は、P S M A に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を発現可能な、トランスジェニックマウスまたは染色体導入マウスなどのトランスジェニック非ヒト動物および染色体導入非ヒト動物を提供する。特定の態様において、本発明は、ヒト重鎖導入遺伝子を含むゲノムを有し、P S M A および / または P S M A 発現細胞で免疫化されたとき、ヒト抗 P S M A 抗体を産生する、トランスジェニックマウスまたは染色体導入マウスを提供する。ヒト重鎖導入遺伝子は、ここに詳細に示され、例示されているように、トランスジェニックマウス、例えば、HuMAbマウスの場合と同様、マウスの染色体DNAに導入することができる。あるいは、ヒト重鎖導入遺伝子は、WO 02/43478に記載されているように染色体導入 (例えば、KM) マウスの場合のように、染色体外に維持することもできる。そのようなトランスジェニック動物および染色体導入動物は、V-D-J組換えおよびアイソタイプスイッチを経ることにより P S M A に対するヒトモノクローナル抗体の複数のアイソタイプ (IgG、IgA、および / または IgE) を産生することができる。アイソタイプスイッチは、例えば、古典的または非古典的アイソタイプスイッチにより行われる。

【0108】

異種抗体レパートリーの外来性抗原刺激に応答するトランスジェニック非ヒト動物または染色体導入非ヒト動物の設計には、異種免疫グロブリン導入遺伝子がトランスジェニック動物の機能内にB細胞成長の経路全体に正しく含有されている必要がある。これは、例えば、異種重鎖導入遺伝子のアイソタイプスイッチが含まれる。したがって、導入遺伝子は、アイソタイプスイッチおよび以下の一項目以上を生じるように構築される。その項目は、(1) 高レベルで且つ細胞型特異的発現、(2) 機能的遺伝子再編成、(3) 対立遺伝子排除の活性およびそれに対する応答、(4) 一次レパートリーの十分な発現、(5) シグナル伝達、(6) 体細胞超突然変異、(7) 免疫応答中の導入遺伝子抗体遺伝子座の優性、である。

【0109】

上述の基準の全てが満たされる必要はない。例えば、トランスジェニック動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座が機能的に破壊されている場合の態様では、導入遺伝子是对立遺伝子排除を活性化する必要はない。さらに、導入遺伝子が機能的に再編成された重鎖および / または軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含んでいる場合の態様では、機能的遺伝子再編成

10

20

30

40

50

の基準の二番目の項目は、少なくともすでに再編成されている導入遺伝子に関しては必要ない。分子免疫学の背景については、引用によって本明細書に組み込まれる Fundamental Immunology、第2刷(1989)、Paul William E., ed. Raven Press, N.Y.を参照されたい。

【0110】

いくつかの態様において、本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するために用いるトランスジェニック非ヒト動物または染色体導入非ヒト動物は、トランスジェニック動物の生殖細胞系列中に、再編成の、未再編成の異種免疫グロブリン重鎖および軽鎖導入遺伝子、または再編成および未再編成を組み合わせたものを有する。各重鎖導入遺伝子は、少なくとも一つの C_H 遺伝子を含む。さらに、重鎖導入遺伝子は、トランスジェニック動物のB細胞中の、複数の C_H 遺伝子をコードする異種導入遺伝子のアイソタイプスイッチを支持することが可能な、機能的アイソタイプスイッチ配列を含有している。このようなスイッチ配列は、導入遺伝子 C_H 遺伝子の供給源となる種から得た生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子座に自然発生するものでもよく、または、このようなスイッチ配列は導入遺伝子作製物を受け取る種(トランスジェニック動物)に発生するものに由来してもよい。例えば、トランスジェニックマウスを作製するために用いるヒト導入遺伝子構築物のアイソタイプスイッチ事象は、マウス重鎖遺伝子座に自然に発生するものと同様のスイッチ配列が組み込まれている場合、頻度が高く、それはおそらく、マウススイッチ配列ではマウススイッチリコンビナーゼ酵素系との機能が最適化されていて、ヒトスイッチ配列はそうではないからである。スイッチ配列は、従来のクローニング方法により単離およびクローニングするか、または免疫グロブリンスイッチ領域配列に関連する公表された配列情報(Millsら、Nucl. Acids Res. 15:7305-7316(1991); Siderasら、Intl. Immunol. 1:631-642(1989)、引用によって本明細書に援用する)に基づいて設計された重複合成オリゴヌクレオチドからあらためて合成してもよい。上述の各トランスジェニック動物について、機能的に再編成された異種重鎖および軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子は、トランスジェニック動物のB細胞の有意な割合(少なくとも10%)に認められる。

10

20

【0111】

本発明のトランスジェニック動物を作製するために用いられる導入遺伝子は、少なくとも一つの可変性遺伝子セグメントと、一つの多様性遺伝子セグメントと、一つの結合遺伝子セグメントと、少なくとも一つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含む重鎖導入遺伝子を含む。免疫グロブリン軽鎖導入遺伝子は、少なくとも一つの可変性遺伝子セグメントと、一つの結合遺伝子セグメントと、少なくとも一つの定常領域遺伝子セグメントをコードするDNAを含む。軽鎖および重鎖遺伝子セグメントをコードする遺伝子セグメントは、その遺伝子セグメントがトランスジェニック非ヒト動物を含まない種から得た免疫グロブリン重鎖および軽鎖をコードするDNAに由来する、またはそれらに対応するようなトランスジェニック非ヒト動物とは異種性である。本発明のある局面において、導入遺伝子は、個々の遺伝子セグメントが未再編成である、つまり機能的免疫グロブリン軽鎖または重鎖をコードするように再編成されないように構築される。このような未再編成導入遺伝子はV、D、およびJ遺伝子セグメントの組換えを支持し(機能的再編成)、好ましくは、PSMA抗原に暴露した場合に、得られた再編成免疫グロブリン重鎖中のD領域遺伝子セグメントのすべてまたはその一部がトランスジェニック非ヒト動物内に組み込まれることを支持する。

30

40

【0112】

別の態様において、導入遺伝子は、未再編成の「小遺伝子座」("mini-locus")を含む。このような導入遺伝子は典型的に、C、D、およびJセグメントのかなりの部分、およびV遺伝子セグメントのサブセットを含む。このような導入遺伝子構築物においては、例えば、プロモーター、エンハンサー、クラススイッチ領域、RNAプロセッシングのためのスプライスドナー配列およびスプライスアクセプター配列、および組換えシグナルなどの各種調節配列は、異種DNAに由来する対応する配列を含む。このような調節配列は、本発明に用いられる非ヒト動物の同一種または関連種から得た導入遺伝子に組み込むこと

50

ができる。例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントは、トランスジェニックマウスに用いるための齧歯類免疫グロブリンエンハンサー配列を有する導入遺伝子中に組み込むことができる。また、合成調節配列が哺乳類のゲノム中に自然発生することが知られている機能的DNA配列に相同ではない場合、このような合成調節配列を導入遺伝子に組み込んでもよい。合成調節配列は、例えば、スプライスアクセプター部位またはプロモーター/エンハンサーモチーフの許容配列を特定するなどのコンセンサスルールにしたがって設計される。例えば、小遺伝子座は、自然発生生殖細胞系列Ig遺伝子座と比較して、非必須のDNA部分（例えば介入配列、イントロンまたはその部分）の内部（つまり部分の末端ではない）の欠失を少なくとも一箇所有するゲノム免疫グロブリン遺伝子座を含む。

【0113】

本発明の好ましい態様において、PSMAに対するヒト抗体を産生するために用いられるトランスジェニック動物または染色体導入動物は、W098/24884号の実施例5、6、8または14に記載の軽鎖導入遺伝子の一コピーを有する動物と交配させた、W098/24884号の実施例12に記載の導入遺伝子（例えば、pHC1またはpHC2）の複製を少なくとも1個、典型的には2～10個、時に25～50個またはそれ以上、およびW098/24884号の実施例10に記載のJ_H欠損動物と交配した子孫を含有する（W098/24884号の内容は、本明細書において引用によって援用する）。動物は、三種類のこれら形質のそれぞれについてホモ接合性になるように交配される。このような動物は、以下の遺伝子型、すなわち、ヒト重鎖未再編成小遺伝子座の1コピー（染色体のハプロイド1セットごとに）（W098/24884号の実施例12に記載）、再編成したヒトK軽鎖構築物の1コピー（染色体のハ
20
プロイド1セットごとに）（W098/24884号の実施例14に記載）、機能的J_Hセグメント全体を除去する内因性マウス重鎖遺伝子座それぞれの欠損（W098/24884号の実施例10に記載）を含む。このような動物をJ_Hセグメントの欠失についてホモ接合のマウスと交配し（W098/24884号の実施例10）、J_H欠失についてホモ接合でヒト重鎖および軽鎖作製物についてヘミ接合である子孫を産生する。得られた動物は、抗原を注射し、これら抗体に対するヒトモノクローナル抗体を産生するために用いる。

【0114】

このような動物から単離したB細胞は、各遺伝子を1コピーずつしか有していないため、ヒト重鎖および軽鎖に関して単一特異性である。さらに、W098/24884号の実施例9および12に記載の通りに導入されたJ_H領域にわたる欠損により、内因性マウス重鎖遺伝子のコピーは両方とも非機能的であるために、そのB細胞はヒトまたはマウス重鎖に関して単一特異性であろう。さらに、有意な割合のB細胞は、再編成したヒト軽鎖遺伝子の複製の発現が有意な割合のB細胞中の内因性マウスおよびラムダ遺伝子の再編成を対立遺伝子的およびアイソタイプの的に排除するために、ヒトまたはマウス軽鎖に関して単一特異性であろう。

【0115】

好ましいトランスジェニック動物または染色体導入動物、例えば、マウスは、理想的にはネイティブマウスにかなり類似する、重要なレパートリの免疫グロブリン産生を示すであろう。したがって、例えば、内因性Ig遺伝子が不活化している態様では、全免疫グロブリンレベルは、約0.1～10mg/mlの血清、好ましくは0.5～5mg/ml、
40
理想的には少なくとも約1.0mg/mlの範囲であろう。IgGからIgMへのスイッチに作用することができる導入遺伝子がトランスジェニックマウスに導入された場合、生体マウスでは、血清IgGとIgMの比は、好ましくは約10:1である。IgG対IgMの比は、未成熟マウスでははるかに低い。一般に、約10%をこえる、好ましくは40%～80%の脾臓およびリンパ節B細胞が、ヒトIgG蛋白質のみを発現する。

【0116】

レパートリは、ネイティブのマウスに見られるレパートリに、通常少なくとも約10%、好ましくは25～50%以上似ていることが望ましい。主にマウスゲノムに導入された異なるV、J、およびD領域の数により、一般に、少なくとも約1000種類、好ましくは10⁴～10⁶種類以上の異なる免疫グロブリン（理想的にはIgG）が産生されるで
50

10

20

30

40

50

あろう。このような免疫グロブリンは、典型的に、例えば、ブドウ球菌蛋白質 A などの抗原性の高い蛋白質のおよそ半数以上を認識するであろう。典型的に、免疫グロブリンは少なくとも約 10^{-7} M^{-1} 、好ましくは少なくとも約 10^{-9} M^{-1} 、さらに好ましくは少なくとも約 10^{-10} M^{-1} 、 10^{-11} M^{-1} 、または 10^{-12} M^{-1} 以上、例えば、 10^{-13} M^{-1} 以上のあらかじめ選択された抗原への親和性を示すであろう。

【0117】

ある態様において、あらかじめ決められた抗原型に対する抗体の応答で表される V 遺伝子の選択を制限する、あらかじめ決定されたレパートリを有するマウスを作製することが好ましいこともある。あらかじめ決められたレパートリを有する重鎖導入遺伝子は、例えば、ヒトにおけるあらかじめ決められた抗原型に対する抗体応答に優先的に用いられるヒト V_H 遺伝子を含んでよい。また、様々な理由から、決められたレパートリから排除される可能性がある V_H 遺伝子もある（例えば、あらかじめ決められた抗原への高親和性 V 領域をコードする確率が低い、体細胞突然変異および親和性の尖鋭化の傾向が低い、または特定のヒトに対して免疫原性である、など）。したがって、各種重鎖または軽鎖遺伝子セグメントを有する導入遺伝子を再編成する前に、このような遺伝子セグメントは、例えば、ハイブリダイゼーションまたは DNA シーケンシングなどにより、トランスジェニック動物以外の生物種からのものであると容易に同定されてもよい。

10

【0118】

上述したように、トランスジェニック非ヒト動物および染色体導入非ヒト動物、例えばマウスは、上述したように P S M A 抗原および/または P S M A 発現細胞の精製製剤または組換え製剤で免疫化することができる。または、そのトランスジェニック動物は、ヒト P S M A をコードする DNA で免疫化することができる。その後、その動物は、導入遺伝子内スイッチ組換え（シス-スイッチ）を経てクラススイッチし、P S M A に反応性のある免疫グロブリンを発現する B 細胞を産生するであろう。重鎖および軽鎖ポリペプチドが体細胞突然変異および V 領域組換え接合により誘導された配列、ならびに生殖細胞系列がコードする配列を含んでもよいヒト導入遺伝子配列によりコードされている場合には、免疫グロブリンはヒト配列抗体であってもよく（「ヒト配列抗体」とも呼ぶ）、これらのヒト抗体は、体細胞突然変異および V - J および V - D - J 組換え接合の結果他の非生殖細胞系列配列が存在するとしても、ヒト V_L または V_H 遺伝子セグメントおよびヒト J_L または J_H セグメントによりコードされたポリペプチド配列と実質的に同一であると言えることができる。各抗体鎖の変領域は、典型的に少なくとも 80 % がヒト生殖細胞 V、J 遺伝子セグメントにより、および重鎖の場合には D 遺伝子セグメントによりコードされ、頻繁に少なくとも 85 % の変領域が導入遺伝子上に現れるヒト生殖細胞系列配列によりコードされ、しばしば変領域配列の 90 または 95 % 以上が導入遺伝子上に現れるヒト生殖細胞配列によりコードされる。しかしながら、非生殖細胞系列配列は体細胞突然変異および V J および V D J 接合により導入されるために、ヒト配列抗体はマウスの生殖細胞系列中のヒト導入遺伝子に見られるヒト V、D、または J 遺伝子セグメントによりコードされていないいくつかの変領域配列を有することが多い（定常領域配列では頻度が少ない）であろう。典型的に、このような非生殖細胞系列配列（または個々のヌクレオチドの位置）は C D R 内または近傍、または体細胞突然変異がクラス形成することが知られている領域にクラス形成しているであろう。

20

30

40

【0119】

ヒト配列 鎖（ 1、 2、 3、または 4 など）およびヒト配列軽鎖（ など）を含むヒト抗体が産生されるようにアイソタイプスイッチすることにより、あらかじめ決められた抗原に結合するヒト配列抗体が産生されることがある。このようにアイソタイプスイッチしたヒト配列抗体は、一般に可変領域中、しばしば特に二次（または後続）抗原チャレンジ後におこる親和性突然変異および抗原による B 細胞選択の結果生じる、C D R の約 10 残基中または内に、一つ以上の体細胞突然変異を含有することが多い。この高親和性ヒト配列抗体は、 10^{-7} M 以下、例えば、 10^{-8} M 以下、 10^{-9} M 以下、 10^{-10} M 以下、あるいはさらにそれ以下の K_D を有することがある。

50

【0120】

本発明の別の局面は、上記のトランスジェニック非ヒト動物および染色体導入非ヒト動物に由来するB細胞に関連する。該B細胞は、P S M Aに高親和性（例えば、 K_D が 10^{-7} M以下）で結合するヒトモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマを産生するために用いることができる。したがって、本発明の別の態様は、 10^{-7} M以下、例えば、 10^{-8} M以下、 10^{-9} M以下、 10^{-10} M以下、あるいはさらにそれ以下の K_D を有するヒト抗体を産生するハイブリドーマを提供する。該抗体は、（1）ヒト V_L 遺伝子セグメントおよびヒト J_L セグメントによりコードされたポリペプチド配列に実質的に同一のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域と、（2） C_L 遺伝子セグメントによりコードされたポリペプチド配列に実質的に同一のポリペプチド配列を有する軽鎖定常領域とからなるヒト配列軽鎖、ならびに（1）ヒト V_H 遺伝子セグメント、任意でD領域、およびヒト J_H セグメントによりコードされるポリペプチド配列に実質的に同一なポリペプチド配列を有する重鎖可変領域と、（2） C_H 遺伝子セグメントによりコードされたポリペプチド配列に実質的に同一なポリペプチド配列を有する定常領域とからなるヒト配列重鎖を含む。

10

【0121】

P S M Aに対する高親和性ヒトモノクローナル抗体の成長は、組み込まれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスのヒト可変領域遺伝子セグメントのレパートリを拡大する方法であって、前記の組み込まれたヒト免疫グロブリン中に存在しないV領域遺伝子セグメントを含むV遺伝子導入遺伝子をゲノムに導入することを含む方法により、促進される。V領域導入遺伝子は、ヒトゲノムに自然発生していることもあり、またはV遺伝子セグメントを適切でない状態が削除された状態で含んでいる別々の組換え法によりスプライスされた状態であることもある。ヒト V_H または V_L （V）遺伝子セグメントアレイの一部を含む酵母菌人工染色体であることが多い。少なくとも5つ以上の機能的V遺伝子セグメントがY A C上に含有されていることが多い。この変種では、マウスが、V領域導入遺伝子およびヒトIg導入遺伝子上にコードされたC領域に存在するV領域遺伝子セグメントによりコードされた可変領域配列を含む免疫グロブリン鎖を発現する場合に、Vレパートリ拡大法により産生されたトランスジェニックマウスを作製することができる。Vレパートリ拡大法を用いて、少なくとも5つの異なるV遺伝子を有するトランスジェニックマウスを作製すること、同様に少なくとも約24個以上のV遺伝子を有するマウスを作製することができる。V遺伝子セグメントのいくつかは機能していない場合もあり（例えば、擬遺伝子など）、これらのセグメントは、必要に応じて、当業者が使用することができる組換え法により保持し、または選択的に消去してよい。

20

30

【0122】

マウス生殖細胞系列を、JおよびC遺伝子セグメントを含有するヒトIg導入遺伝子上に実質的には存在しない、拡大Vセグメントレパートリを有する機能性Y A Cを有するように操作してしまえば、その形質は、拡大Vセグメントレパートリを有する機能性Y A Cが異なるヒトIg導入遺伝子を有するマウス生殖細胞系列において育つような背景など、他の遺伝的背景に伝播および育てることができる。拡大Vセグメントレパートリを有する多数の機能性Y A Cは、ヒトIg導入遺伝子（または多数のヒトIg導入遺伝子）と作用する生殖細胞系列において育てられるとがある。ここではY A C導入遺伝子と呼ばれているが、ゲノムに組み込まれた場合のこのような導入遺伝子は、酵母菌における自己複製に必要な配列などの酵母菌配列を実質的に欠損していることがあり、このような配列は場合により、必要のない酵母菌に複製した後（すなわち、マウスES細胞またはマウスプロト接合体に導入する前）に遺伝子操作（例えば、制限酵素消化およびパルスフィールドゲル電気泳動、またはその他の適切な方法など）で除去してよい。ヒト配列免疫グロブリン発現の形質を伝播する方法は、ヒトIg導入遺伝子を有するトランスジェニックマウスと、任意に拡大Vセグメントレパートリを有する機能性Y A Cも有するトランスジェニックマウスを交配させることも含む。 V_H および V_L 遺伝子セグメントは、両方ともY A C上に存

40

50

在してもよい。そのトランスジェニックマウスは、ヒトIg導入遺伝子および/または他のヒトリンパ球蛋白質をコードする導入遺伝子を含む他のヒト導入遺伝子を内包する背景を含む、望ましい背景に施行者によって育てられてもよい。本発明は、拡大V領域レパートリYAC導入遺伝子を有するトランスジェニックマウスにより産生される高親和性ヒト配列免疫グロブリンも提供する。本発明のトランスジェニック動物の好ましい態様は前述したが、4つのカテゴリに分類されているその他の態様が意図される。

I. 未再編成の重鎖および再編成した軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含むトランスジェニック動物；

II. 未再編成の重鎖および未再編成の軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含むトランスジェニック動物；

III. 再編成した重鎖および未再編成の軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含むトランスジェニック動物；および

IV. 再編成した重鎖および再編成した軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含むトランスジェニック動物。

10

【0123】

トランスジェニック動物のこのようなカテゴリのうち、好ましい優先順位は、内因性軽鎖遺伝子（または少なくともK遺伝子）が相同性組換え（またはその他の方法）によりノックアウトされている場合にはII>I>III>IVであり、内因性軽鎖遺伝子がノックアウトされておらず、対立遺伝子排除に支配されているはずの場合にはI>II>III>IVである。

20

【0124】

III. PSMAに結合する二重特異性/多重特異性分子

本発明のさらに別の態様において、PSMAに対するヒトモノクローナル抗体、またはその抗原結合部分は、例えば別のペプチドまたは蛋白質（例えば、Fab'フラグメント）などの別の機能的分子を誘導体化またはそれらに結合し、複数の結合部位または標的エピトープに結合する二重特異性または多重特異性分子を作製することができる。例えば、本発明の抗体または抗原結合部分は、別の抗体、抗体フラグメント、ペプチド、または結合ミメティクスなどの一つ以上の他の結合分子に機能的に結合する（例えば、化学結合、遺伝子融合、または非共有会合などによる）ことができる。

30

【0125】

したがって、本発明は、少なくとも一つのPSMAへの第一の結合特異性部分と、第二の標的エピトープへの第二の結合特異性部分を含む二重および多重特異性分子を含む。本発明の特定の態様において、第二標的エピトープは、例えば、ヒトFcRI(CD64)またはヒトFc(CD89)レセプターなどのFcレセプターである。したがって、本発明は、FcR、Fc、またはFcRを発現するエフェクター細胞（例えば、単球、マクロファージ、または多形核細胞(PMN)）と、PSMAを発現する標的細胞との両方に結合することができる二重特異性または多重特異性分子を含む。これらの二重特異性および多重特異性分子は、PSMA発現細胞を標的としてエフェクター細胞と結合し、本発明のヒトモノクローナル抗体のように、PSMA発現細胞の貪食作用、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、サイトカイン放出または超酸化物アニオンの産生などのFcレセプター媒介エフェクター細胞の活性を誘発する。

40

【0126】

本発明の二重特異性および多重特異性分子は、抗Fc結合特異性部分および抗PSMA結合特異性部分に加え、第三の結合特異性部分もさらに含んでもよい。ある態様において、第三の結合特異性部分は、例えば、細胞毒性活性に関与し、そのため標的細胞に対する免疫応答を増加させる表面蛋白質に結合する分子などの抗増殖因子(EF)部分である。「抗増殖因子部分」は、抗体、機能的抗体フラグメント、または例えば、抗原またはレセプターなどの所与の分子に結合するリガンドであってもよく、したがってその結果、Fcレセプターまたは標的細胞抗原の結合決定因子の効果を増強する。「抗増殖因子部分」は、Fcレセプターまたは標的細胞抗原に結合することができる。あるいは、抗増殖因子部

50

分は、第一および第二の結合特異性部分が結合する部分とは異なるものと結合することができる。例えば、抗増殖因子部分は、細胞毒性T細胞（例えば、CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1またはその他の標的細胞に対する免疫応答を上昇させるその他の免疫細胞を介して）に結合することができる。

【0127】

ある態様において、本発明の二重特異性および多重特異性分子は、結合特異性部分として、少なくとも一つの抗体、または例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、または一本鎖Fvを含む抗体フラグメントを含む。その抗体は、1990年8月7日発行のLadnerらの米国特許第4,946,778号（その内容を引用によって明確に援用する）に記載の、軽鎖または重鎖二量体、またはFvまたは一本鎖構築物などそのあらゆる最小のフラグメントであってもよい。

10

【0128】

ある態様において、本発明の二重特異性および多重特異性分子は、エフェクター細胞の表面上に存在するFcRまたはFcRへの結合特異性部分、およびPSMAなどの標的細胞抗原への第二の結合特異性部分を含む。

【0129】

ある態様において、Fcレセプターへの結合特異性はヒトモノクローナル抗体により提供され、その結合はヒト免疫グロブリンG（IgG）により遮断されない。ここで用いられる「IgGレセプター」とは、染色体1番の上にある8つの鎖遺伝子のうちのいずれかを意味する。これらの遺伝子は、FcRI（CD64）、FcRII（CD32）、およびFcRIII（CD16）という三種類のFcレセプターのクラスに分類される、合計12種類の膜貫通型または可溶性レセプターアイソフォームをコードしている。ある好ましい態様において、Fcレセプターは、ヒト高親和性FcRIである。ヒトFcRIは72kDaの分子で、単量体IgG（ $10^8 \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ ）に高親和性を示す。

20

【0130】

このような好ましいモノクローナル抗体の産生および特徴は、FangerらによるPCT出願W088/00052号および米国特許第4,954,617号に記載されている。その教示を引用により本明細書において完全に援用する。このような抗体は、レセプターのFc結合部位とは異なる部位にあるFcRI、FcRII、またはFcRIIIのエピトープに結合し、したがって、その結合は生理学的レベルのIgGでは実質的に遮断されない。本発明に有用な特異的抗FcRI抗体は、mAb22、mAb32、mAb44、mAb62およびmAb197である。mAb32を産生するハイブリドーマは、アメリカンタイプカルチャーコレクションからATCCアクセッションナンバーHB9469として入手することができる。別の態様において、抗Fcレセプター抗体は、ヒト化形態のモノクローナル抗体22（H22）である。H22抗体の産生および特徴づけはGraziano, R.F.ら（1995）J. Immunol 155（10）：4996-5002およびPCT/US93/10384に記載されている。H22抗体産生細胞系列は、アメリカンタイプカルチャーコレクションに1992年11月4日に指定HA022CL1として委託され、アクセッションナンバーCRL11177を有している。

30

40

【0131】

さらに他の好ましい態様において、Fcレセプターへの結合特異性部分は、例えば、Fc-アルファレセプター（FcRI（CD89））などのヒトIgAレセプターに結合する抗体により提供され、その結合は好ましくはヒト免疫グロブリンAにより遮断されない。用語「IgAレセプター」は、染色体19番上に位置する遺伝子（FcRI）の遺伝子産物を含むことが意図される。この遺伝子は代替的にスプライスされた55～110kDaの膜貫通アイソフォームを数種コードすることが知られている。FcRI（CD89）は単球/マクロファージ、好酸性および好中性顆粒球上に構成的に発現するが、非エフェクター細胞群には発現しない。FcRIは、IgA1およびIgA2の両方に対して中程度の親和性（ $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ）を有し、G-CSFまたはGM-CSFな

50

どのサイトカインに接触すると増加する (Morton, H.C.ら (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440)。I g A リガンド結合ドメイン外で F c R I と結合する、A 3、A 5 9、A 6 2 および A 7 7 として同定される 4 種類の F c R I 特異性モノクローナル抗体について記載されている (Monteiro, R.C.ら、1992, J. Immunol. 148:1764)。

【0132】

F c R I および F c R I は、本発明に用いられる好ましいトリガーレセプターである。なぜならそれらは (1) 例えば、単球、PMN、マクロファージおよび樹状細胞などの免疫エフェクター細胞上に主に発現し、(2) 広範に発現し (例えば、細胞 1 個につき 5,000 ~ 100,000 個) (3) 細胞毒性活性の媒介物 (例えば、ADCC、貪食作用など) であり、(4) それらが標的として結合する自己抗原を含む抗原の抗原提示の促進を媒介するためである。

10

【0133】

他の態様において、本発明の二重特異性および多重特異性分子は、PSMA などの標的細胞抗原と結合するなどの認識を行う結合特異性部分をさらに含む。好ましい態様において、その結合特異性部分は、本発明のヒトモノクローナル抗体によって提供される。

【0134】

本明細書において用いられる「エフェクター細胞特異性抗体」とは、エフェクター細胞の F c レセプターに結合する抗体または機能的抗体フラグメントを意味する。本発明に用いる好ましい抗体は、内因性免疫グロブリンが結合しない部位のエフェクター細胞の F c レセプターに結合する。

20

【0135】

本明細書において用いられる「エフェクター細胞」という用語には、免疫応答の認識および活性化段階に対して、免疫応答のエフェクター段階に關与する免疫細胞を意味する。例示的な免疫細胞は、リンパ球 (例えば、細胞溶解性 T 細胞 (CTL) を含む B 細胞および T 細胞など)、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、好中球、多形核細胞、顆粒球、マスト細胞、および好塩基球などの骨髓性およびリンパ性起源の細胞が含まれる。いくつかのエフェクター細胞は、特異的 F c レセプターを発現し、特異的免疫機能を行う。好ましい態様において、エフェクター細胞は抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用 (ADCC) を誘発することができ、例えば、ADCC を誘発することができる好中球などである。例えば、F c R を発現する単球、マクロファージは、特定の標的細胞の死滅、および免疫系の他の成分への抗原提示、または抗原を提示する細胞への結合に關与する。他の態様において、エフェクター細胞は、標的抗原、標的細胞、または微生物を貪食することができる。エフェクター細胞上の特定の F c R の発現は、サイトカインなどの体液性因子により調節することができる。例えば、F c R I の発現は、インターフェロンガンマ (INF -) によりアップレギュレーションされることがわかっている。この発現の促進により、標的に対する F c R I 含有細胞の細胞毒性活性が上昇する。エフェクター細胞は、標的抗原または標的細胞を貪食または溶解することができる。

30

【0136】

「標的細胞」とは、本発明の組成物 (例えば、ヒトモノクローナル抗体、二重特異性または多重特異性分子) の標的となる可能性がある、被験体 (例えば、ヒトまたは動物) 中の望ましくないあらゆる細胞を意味する。好ましい態様において、標的細胞は、PSMA を発現、または過剰発現する細胞である。PSMA を発現する細胞には、典型的に、膀胱、乳房、大腸、腎臓、卵巣、前立腺、腎細胞、扁平細胞、肺 (非小細胞) などの腫瘍細胞、ならびに頭部および頸部の腫瘍細胞が含まれる。他の標的細胞としては、滑液細胞が含まれる。

40

【0137】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本発明の二重特異性または多重特異性分子に用いてもよいその他の抗体として、マウス、キメラ、およびヒト化モノクローナル抗体がある。

【0138】

50

キメラマウス-ヒトモノクローナル抗体（すなわちキメラ抗体）は、当該技術分野において公知の組換えDNA技術により作製することができる。例えば、マウス（またはその他の種）のモノクローナル抗体分子のFc定常領域をコードする遺伝子を制限酵素で消化してマウスFcをコードする領域を除去し、ヒトFc定常領域をコードする遺伝子の等価部分に置換する（Robinsonら、国際特許公報第PCT/US86/02269号；Akiraら、欧州特許出願第184,187号；Taniguchi, M., 欧州特許出願第171,496号；Morrisonら、欧州特許出願第173,494号；Neubergerら、国際出願第W0 86/01533号；Cabillyら、米国特許第4,816,567号；Cabillyら、欧州特許出願第125,023号；Betterら（1988 Science 240:1041-1043）；Liuら（1987）PNAS 84:3439-3443；Liuら、1987、J. Immunol. 139:3521-3526；Sunら（1987）PNAS 84:214-218；Nishimura ら、1987、Canc. Res. 47:999-1005；Wood ら（1985）Nature 314:446-449；およびShawら、1988、J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559参照）。

【0139】

キメラ抗体は、抗原結合に直接関与していないFv可変領域の配列をヒトFv可変領域の等価配列に置換して、さらにヒト化することができる。ヒト化キメラ抗体の一般的な考察は、Morrison, S. L., 1985, Science 229:1202-1207およびO'iらによる1986、BioTechniques 4:214により提供されている。その方法には、少なくとも一つの重鎖または軽鎖から得た免疫グロブリンFv可変領域のすべてまたは一部をコードする核酸配列を、単離、操作、および発現することが含まれる。このような核酸の供給源は、当業者に公知で、例えば、抗GP1I_bIII₂抗体産生ハイブリドーマ、7E3から得られたものでよい。その後、キメラ抗体をコードする組換えDNAまたはそのフラグメントを適切な発現ベクターにクローニングすることができる。また、適切なヒト化抗体は、米国特許第5,225,539号；Jones ら、1986 Nature 321:552-525；Verhoeyanら、1988 Science 239:1534；およびBeidler ら、1988 J. Immunol. 141:4053-4060に記載のCDR置換により作製することもできる。

【0140】

特定のヒト抗体のCDRはすべて非ヒトCDRの少なくとも一部と置換してよく、またはCDRの一部のみを非ヒトCDRと置換してもよい。ヒト化抗体がFcレセプターに結合するのに必要な数のCDRを置換するだけでよい。

【0141】

抗体をヒト化するには、ヒト抗体のCDRの少なくとも一部分を非ヒト抗体由来のCDRと置換することができる、いずれかの方法を用いればよい。Winterは、本発明のヒト化抗体を調製するために用いることができる方法を説明しており（英国特許出願第GB 2188638A号、1987年3月26日出願）、その内容を引用により本明細書において援用する。ヒトCDRは、Humanized Antibodies to Fc Receptors for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytesと題された国際出願第W0 94/10332号に記載のオリゴヌクレオチド部位特異的突然変異誘発を用いて、非ヒトCDRと置換してもよい。

【0142】

特定のアミノ酸が置換、欠失または付加されたキメラまたはヒト化抗体もまた、本発明の範囲内である。特に、好ましいヒト化抗体は、抗原への結合性を改善するためにフレームワーク領域のアミノ酸を置換する。例えば、マウスCDRを有するヒト化抗体の場合、ヒトフレームワーク領域にあるアミノ酸をマウス抗体の対応する位置にあるアミノ酸に置換することができる。このような置換は、場合によってヒト化抗体の抗原への結合を改善することが知られている。アミノ酸が付加、欠失、または置換された抗体を、ここでは改変抗体または変更抗体と呼ぶ。

【0143】

改変抗体という用語は、例えば、抗体の一部を欠失、付加または置換することにより改変されたモノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体などの抗体を含むことも意図される。例えば、抗体は、定常領域を除去して、例えば、抗体の半減期（血清半減期など）、親和性または安定性を増加させるような定常領域に置換することにより改変すること

ができる。どのような改変も、二重特異性および多重特異性分子が F c R に特異的な抗原結合領域を少なくとも一つ有し、少なくとも一つのエフェクター機能を誘発する限り、本発明の範囲内である。

【0144】

本発明の二重特異性および多重特異性分子は、化学的技術 (D. M. Kranz ら、(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807などを参照)、「ポリドーマ」技術 (米国特許第 4,474,893号を解釈のために参照)、または組換え DNA 技術を用いて作製することができる。

【0145】

特に、本発明の二重特異性および多重特異性分子は、当該技術分野において公知で、本明細書において提供される例に記載される方法を用いて、例えば、抗 F c R および抗 P S M A 結合特異性部分などの要素結合特異性部分を結合することによって調製することができる。例えば、二重特異性および多重特異性分子の各結合特異性部分を別々に作製し、互いに結合することができる。結合特異性部分が蛋白質またはペプチドの場合、様々な結合または架橋剤を共有結合的な結合に用いることができる。架橋剤の例としては、蛋白質 A、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオ酢酸 (S A T A)、5,5-ジチオビス(2-ニトロベンゼン酸) (D T N B)、o-フェニレンジマレイミド (o P D M)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピン酸塩 (S P D P)、およびスルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩 (スルホ-S M C C) が含まれる (例えば、Karpovsky ら、(1984) J. Exp. Med. 160:1686 ; Liu, MA ら、(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照)。その他の方法としては、Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132) ; Brennan ら (Science (1985) 229:81-83) および Glennie ら (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375) が含まれる。好ましい結合剤は、S A T A およびスルホ-S M C C であり、いずれも Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) から入手できる。

【0146】

結合特異性部分が抗体 (例えば、二つのヒト化抗体) である場合は、二つの重鎖の C 末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介してそれらを結合することができる。特に好ましい態様においては、1 個の奇数個のスルフヒドリル残基を有するように、結合前にヒンジ領域を修飾することが好ましい。

【0147】

あるいは、いずれの結合特異性部分も同一ベクターにコードされて、同一の宿主細胞に発現および構築することができる。この方法は、二重特異性および多重特異性分子が m A b x m A b、m A b x F a b、F a b x F (a b')₂ またはリガンド x F a b 融合蛋白質である場合に、特に有用である。例えば、二重特異性分子などの本発明の二重特異性および多重特異性分子は、一本鎖二重特異性抗体、一つの一本鎖結合抗体および結合決定因子を含む一本鎖二重特異性分子、または二つの結合決定因子を含む一本鎖二重特異性分子などの一本鎖分子であってもよい。二重特異性および多重特異性分子は、一本鎖分子であってもよく、または少なくとも二つの一本鎖分子を含んでいてもよい。二重特異性および多重特異性分子の調製方法は、例えば、米国特許第 5,260,203号 ; 米国特許第 5,455,030号 ; 米国特許第 4,881,175号 ; 米国特許第 5,132,405号 ; 米国特許第 5,091,513号 ; 米国特許第 5,476,786号 ; 米国特許第 5,013,653号 ; 米国特許第 5,258,498号 ; および米国特許第 5,482,858号に記載されている。

【0148】

二重特異性および多重特異性分子のそれぞれの特異的標的への結合は、酸素結合免疫吸着検査法 (E L I S A)、放射性免疫測定法 (R I A)、F A C S 分析、生物学的検定法 (例えば、成長阻害)、またはウェスタンブロット法により確認することができる。これら各検定法は一般に、目的とする複合体に特異的な標識試薬 (例えば、抗体) を用いた、目的の蛋白質-抗体複合体の存在を検出する。例えば、F c R-抗体複合体は、例えば酵素結合抗体または抗体-F c R 複合体を認識し特異的に結合する抗体フラグメントなどを

用いて検出することができる。また、複合体はその他の各種免疫検定法のいずれかを用いて検出することができる。例えば、抗体を放射性標識し、放射性免疫測定法（RIA）を用いることができる（例えば、引用により本明細書において援用されるWeintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照）。放射性同位体は線カウンタ—またはシンチレーションカウンタを用いた方法、またはオートラジオグラフィにより検出することができる。

【0149】

IV. 抗体抱合体 / 免疫毒素

別の局面において、本発明は、細胞毒素、薬物または放射性同位体などの治療部分に結合したヒト抗PSMAモノクローナル抗体、またはそのフラグメントを特徴とする。細胞毒素と結合する場合、これらの抗体複合体を「免疫毒素」という。細胞毒素、または細胞毒性物質には、細胞に有害な（例えば、細胞を殺す）物質がいずれも含まれる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、ミトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノール、ピューロマイシン、およびそれらの類似体またはホモログが含まれる。治療剤には、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）アルカリ化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロトスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ミトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラシクリン類（例えば、ダウノルピシン（以前はダウノマイシン）およびドキソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、および有糸分裂阻害剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が含まれる。本発明の抗体に抱合され得る治療的細胞毒の他の例としては、カリケアマイシン、デュオカルマイシンが含まれる。

【0150】

本発明のヒト抗体はまた、放射性ヨウ素などの放射性同位体に結合して、PSMA関連疾患（例えば、腫瘍）の治療用または診断用の、細胞毒性または非細胞毒性の放射性医薬品を作製することもできる。

【0151】

本発明の抗体複合体は、所与の生物学的応答を変更するために用いることもでき、その薬物部分を従来の化学療法薬剤に限定して解釈しない。例えば、その薬物部分は望ましい生物学的活性を処理する蛋白質またはポリペプチドであってよい。このような蛋白質には、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌エンドトキシン、またはジフテリアトキシンなどの酵素的に活性な毒素、またはその活性フラグメント、腫瘍壊死因子またはインターフェロンなどの蛋白質、または例えば、リンホカイン類、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、またはその他の成長因子が含まれてもよい。

【0152】

このような治療部分を抗体に結合させる技術は公知で、例えばArnonら、"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら（eds.）pp. 243-56（Alan R. Liss, Inc. 1985）； Hellstromら、"Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery（第2版）、Robinsonら（eds.），pp. 623-53（Marcel Dekker, Inc. 1987）； Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal

al Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera ら (eds.)、pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin ら (eds.)、pp. 303-16 (Academic Press 1985) および Thorpe ら、"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982) を参照されたい。

【0153】

V. 薬学的組成物

別の局面において、本発明は、組成物、例えば、本発明のヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分の一つまたはその組み合わせを含有する薬学的組成物を、薬学的に許容される担体とともに調剤した組成物を提供する。そのような組成物には、本発明のヒト抗体の1つまたは(例えば、2つ以上)の組み合わせが含まれる。

10

【0154】

ある態様において、本発明は、ヒトPSMA上の異なるエピトープに結合し、例えば、薬学的組成物として相補的な活性を有するヒト抗PSMA抗体の組み合わせを含む治療用組成物を提供する。例えば、エフェクター細胞の存在下で標的細胞の高効率な死滅を媒介するヒトモノクローナル抗体は、PSMAを発現する細胞の成長を阻害する別のヒトモノクローナル抗体と組み合わせることができる。

【0155】

別の態様において、治療用組成物は、免疫複合体または本発明の二重特異性(もしくは多重特異性)分子の1以上の組み合わせを含む。

20

【0156】

本発明の薬学的組成物は、併用療法として、つまり他の薬剤と組み合わせて投与することもできる。例えば、併用療法には、本発明の組成物と少なくとも一つの抗腫瘍薬またはその他の従来療法を組み合わせた療法も含むことができる。

【0157】

本明細書において用いられる「薬学的に許容される担体」には、生理学的に適合の溶媒、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。好ましくは、担体は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、脊髄投与、または表皮投与(例えば、注射または点滴による)に好適である。投与経路によっては、活性化合物、つまり抗体、二重特異性および多重特異性分子は、酸の作用またはその化合物が不活化するであろう自然条件からその化合物を保護する物質でコーティングされていてもよい。

30

【0158】

「薬学的に許容される塩」とは、親化合物の望ましい生物学的活性を保持し、望ましくない毒性作用を付与しない塩を意味する(例えば、Berge, S.M ら (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照)。このような塩類の例には、酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。酸付加塩には、塩酸塩、硝酸塩、リン酸塩、硫酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、および亜リン酸塩などの無毒性無機酸から誘導された塩、および脂肪族一および二カルボン酸、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、ならびに脂肪族および芳香族スルホン酸などの無毒性有機酸から誘導した塩が含まれる。塩基付加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、およびカルシウムなどのアルカリ土類金属から誘導した塩、およびN,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、塩化プロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、およびプロカインなどの無毒性有機アミンから誘導した塩が含まれる。

40

【0159】

本発明の組成物は、当該技術において公知の各種の方法により投与することができる。当業者に認識されるように、投与経路および/またはモードは、望まれる結果によって変化するであろう。活性化合物は、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル送達システムを含む制御放出製剤などの、速放性から化合物を保護するであろう担体とともに

50

に調製することができる。エチレンビニル酢酸、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性、生適合性ポリマーを用いることができる。このような製剤の調製方法の多くは、特許化されているか、または当業者に一般的に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978参照。

【0160】

本発明の化合物を特定の投与経路で投与するために、その化合物の不活化を防ぐための物質でその化合物を被覆する、またはそのような物質を併用投与する必要があることがある。例えば、その化合物を被験体に投与する際に、例えば、リポソームまたは希釈剤などの適切な担体に入れてよい。薬学的に許容される希釈剤には、食塩水、およびバッファ水溶液が含まれる。リポソームには水中油中水C G Fエマルジョンおよび従来のリポソームが含まれる (Strejan ら (1984) J. Neuroimmunol. 7:27)。

10

【0161】

薬学的に許容される担体には、滅菌水溶液または懸濁液、滅菌注射可能水溶液または分散液を即時調剤するための滅菌粉末が含まれる。このような媒質および薬剤を薬学的に活性化物質に使用することは、当該技術分野に公知である。従来の媒質または薬剤が活性化化合物に不適合でない限り、本発明の薬学的組成物にそれらを用いることが意図される。補足活性化化合物がその組成物中に組み込まれてもよい。

【0162】

治療用組成物は、典型的に、製造および保存の条件下で、滅菌状態で安定でなければならない。その組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高薬物濃度に適したその他の整った構造物として調剤することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの適切な混合物などを含む溶媒または分散液媒質であってもよい。例えば、レクチンなどのコーティング剤の使用、分散液の場合は必要な粒子サイズの維持、および界面活性剤の使用などにより、適切な流動性を維持することができる。多くの場合、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムなどの等張剤が組成物に含まれることが好ましいであろう。例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンなどの吸収を遅延させる薬剤をに含ませることにより、注射可能組成物の吸収を遅延させることが可能になる。

20

30

【0163】

滅菌注射可能溶液は、必要量の活性化化合物を上記の成分の一種またはそれらを組み合わせた適切な溶媒に混合し、その後必要に応じて滅菌マイクロ濾過を行って調製することができる。一般的に、分散液は、基本的な分散媒および上記の成分のうち必要なその他の成分を含有する滅菌担体に活性化化合物を混合して調製する。滅菌注射可能溶液の調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、乾燥または冷凍乾燥 (凍結乾燥) で、それにより、活性成分にあらかじめ滅菌濾過済みの溶液の望ましい成分を加えた粉末を得る。

【0164】

投与計画は、望ましい応答 (例えば、治療応答) が最適化されるように調節される。例えば、単回ボラスで投与してもよく、経時的に数回に分けて投与してもよく、治療状況の緊急性に応じて投与量を減少または増加させてもよい。特に、投与を簡易にし、投与量を一定にするために、非経口成分を投与単位剤形に調剤すると有利である。ここで用いられる投与単位剤形とは、治療される被験体に適切な一回投与量を物理的に分散させた単位を意味し、各単位に、望ましい治療効果を生じるように計算されたあらかじめ決められた量の活性化化合物を必要な薬学的担体と合わせて含有している。本発明の投与単位剤形の規格は、(a) 活性化化合物に固有の特徴および実現すべき特定の治療効果、(b) 個人における治療感受性の活性化化合物を調合する技術に特有の限界により支配され、またそれに直接依存する。

40

【0165】

薬学的に許容される酸化防止剤の例には、(1) アスコルビン酸、塩酸システイン、重

50

硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウムおよび硫酸ナトリウムなどの水溶性酸化防止剤、(2) アスコルビン酸パルミテート、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、およびアルファトコフェロールなどの油溶性酸化防止剤、および(3) クエン酸、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、およびリン酸などの金属キレート剤が含まれる。

【0166】

治療用組成物については、本発明の製剤には、経口、経鼻、局所(頬側および舌下を含む)、直腸内、腔内、および/または非経口投与に適したものが含まれる。その製剤は、便利な単位投与剤形で与えられてよく、薬学分野に知られるいずれかの方法により調製すればよい。担体物質と組み合わせて単回投与剤形にすることができる活性成分の量は、治療される被験体により、および特定の投与モードにより変わるであろう。担体物質と組み合わせて単回投与剤形にすることができる活性成分の量は、一般に治療効果を生じる組成物の量であろう。一般に、この量は、100%中、約0.01%~約99%、好ましくは約0.1%~約70%、最も好ましくは約1%~約30%の範囲の活性成分であろう。

10

【0167】

腔内投与に適する本発明の製剤には、ベッサリー、タンポン、クリーム、ジェル、ペースト、フォーム、またはスプレー製剤が含まれ、それらは当該技術分野において適切であるとして知られる担体を有する。本発明の組成物の局所または経皮投与用の投与剤形には、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ジェル、液体、パッチ、および吸入剤が含まれる。活性化化合物は滅菌条件下で、薬学的に許容される担体、および必要に応じて保存剤、緩衝剤、または噴射剤と混合してよい。

20

【0168】

ここで用いられる「非経口投与」および「非経口的に投与する」という文言は、経腸および局所投与以外の、通常注射による投与方法を意味し、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、クモ膜下内、嚢内、眼窩内、心内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射または点滴を含む。

【0169】

本発明の薬学的組成物に用いられてよい適切な水性および非水性担体の例には、水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、およびポリエチレングリコールなど)、およびそれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが含まれる。例えば、レクチンなどのコーティング剤の使用、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持、および表面活性剤の使用によって、適切な流動性を維持することができる。

30

【0170】

これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントも含有してよい。微生物の存在の防止は、上述の滅菌処置、および例えば、パラベン、クロロブタノール、およびソルビン酸フェノールなどの種々の抗細菌および抗真菌剤の含有により確実にされ得る。糖および塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含有することも望ましいと考えられる。さらに、注射可能医薬品剤形は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収遅延剤を含有することにより、吸収を遅延させてもよい。

40

【0171】

本発明の化合物が医薬品としてヒトおよび動物に投与される場合、その化合物は単体で、または例えば活性成分を0.01%~99.5%(さらに好ましくは0.1%~90%)含有し薬学的に許容される担体と組み合わせた薬学的組成物として投与することができる。

【0172】

選択された投与経路にかかわらず、適切に水和された状態で用いられてよい本発明の組成物および/または本発明の薬学的組成物は、当業者に公知の従来の方法により薬学的に許容の投与剤形に調剤される。

【0173】

50

本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の投与レベルは、特定の患者、組成、および投与法に対する望ましい治療応答を実現するのに効果的で患者に毒性でないような、活性成分の量を得るために変化させてもよい。投与レベルの選択は、本発明に使用された特定の組成物、またはエステル、塩、またはそのアミドの活性、投与経路、投与時期、使用された特定の化合物の排出速度、治療期間、用いられた特定の組成物と併用したその他の薬物、化合物および/または物質、治療される患者の年齢、性別、体重、症状、一般的な健康状態、および既往歴、および医療分野で公知の同様の因子を含む、各種薬物動力学的因子に依存するであろう。

【0174】

当該技術分野の通常の技量を有する医師または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効な量を、容易に決定し処方することができる。例えば、医師または獣医師は、薬学的組成物に使用される本発明の化合物の投与を、望ましい治療効果を得るために必要な量よりも少量から開始し、望ましい効果が得られるまで投与量を次第に増加させることもできる。一般に、本発明の組成物の好適な一日投与量は、治療効果を生じるために有効な最低投与量である化合物の量である。このような有効な投与量は、一般に上述した因子に依存するであろう。投与は、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下であることが好ましく、好ましくは標的部位の近傍に投与する。必要であれば、治療用組成物の効果的一日投与量を、一日に2、3、4、5、6回以上の小投与量に、場合によっては単位投与剤形に分け適切な時間間隔をあけて投与してもよい。本発明の化合物は、単体で投与することもできるが、化合物は薬学的製剤（組成物）として投与することが好ましい。

10

20

【0175】

治療用組成物は当該技術分野において公知の医療用装置により投与することができる。例えば、好ましい態様において、本発明の治療用組成物は、米国特許第5,399,163号；第5,383,851号；第5,312,335号；第5,064,413号；第4,941,880号；第4,790,824号；または第4,596,556号に開示される装置などの無針皮下注射装置で投与することができる。本発明に有用な公知のインプラントまたはモジュールの例には、米国特許第4,487,603号に開示された制御された速度で投薬するための埋込可能なマイクロ注入ポンプ、米国特許第4,486,194号に開示された治療用経皮投薬装置、米国特許第4,447,233号に開示された正確な注入速度で薬物送達する医療用注入ポンプ、米国特許第4,447,224号に開示された連続薬物送達用の埋込可能可変フロー注入装置、米国特許第4,439,196号に開示された複数のチャンバ区画を有する浸透圧薬物送達システム、および米国特許第4,475,196号に開示された浸透圧薬物送達システムが含まれる。これらの特許を引用により本明細書に編入する。その他の同様のインプラント、送達システム、およびモジュールが数多く当業者に公知である。

30

【0176】

いくつかの態様において、本発明のヒトモノクローナル抗体は、*in vivo*における適切な分布を確実にするように調剤することができる。例えば、血液脳関門（BBB）は、親水性の高い化合物を多量に排除する。本発明の治療用化合物が（必要に応じて）BBBを確実に通り抜けるためには、それらは、例えばリポソーム状に調剤することができる。リポソームの製造方法については、例えば、米国特許第4,522,811号、第5,374,548号、および第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または臓器へ選択的に送達される1以上の部分を含み、従って標的を定めた薬物送達を促進する（例えば、V.V. Rande (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685参照）。標的用部分の例としては、葉酸またはピオチン（例えば、Lowらの米国特許第5,416,016号参照）、マンノシド（Umezawaら (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）、抗体（P.G. Bloemanら (1995) FEB S Lett. 357:140；M. Owaisら (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）、界面活性蛋白質Aレセプター（Briscoeら (1995) Am. J. Physiol. 1233:134）、本発明の製剤を含んでいる可能性のある異なる種、ならびに本発明の分子の成分、p120（Schreierら (1994) J. Biol. Chem. 269:9090）が含まれ、さらにK. Keinänen；M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123；J.J. Killian；I.J. Fidler (1994) Immunomethods

40

50

4:273も参照されたい。本発明のある態様において、本発明の治療用化合物はリポソーム中に調剤され、さらに好ましい態様において、リポソームには標的部分が含まれる。最も好ましい態様において、リポソーム中の治療用化合物は、腫瘍または感染の近傍部位へのボラス注射により送達される。組成物は注射器で注入しやすい程度に流動的でなければならない。製造および保存の条件下で安定でなければならない、また、細菌および真菌などの微生物の汚染から保護されていなければならない。

【0177】

「治療的に有効な投与量」は、未治療の被験体と比較して、腫瘍の成長を好ましくは少なくとも約20%、さらに好ましくは少なくとも約40%、よりさらに好ましくは少なくとも約60%、さらにより好ましくは少なくとも約80%阻害する。化合物の癌阻害能は、ヒト腫瘍における有効性を予測できる動物モデル系において調べることができる。あるいは、組成物のこの特性は、化合物の阻害能、つまりin vitroにおける阻害を、熟練した施行者に知られる検定法により検査することによって調べることができる。治療的に有効な量の治療用化合物を用いると腫瘍サイズを減少させるか、そうでなければ被験体の症状を改善することができる。当業者はこのような量を、被験体の大きさ、被験体の症状の重篤度、および特定の組成物または投与経路などの要因に基づいて決定することができる。

10

【0178】

組成物は滅菌され、組成物が注射器により送達可能な程度に流動的でなければならない。その担体は、水に加えて、等張緩衝食塩水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体状ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物であってもよい。例えば、レクチンなどのコーティング剤の使用、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持、および表面活性剤の使用などにより、適切な流動性を保つことができる。多くの場合、例えば、糖類、マンニトールまたはソルビトールなどのポリアルコール類、および塩化ナトリウムなどの等張剤が組成物に含まれることが好ましい。例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチンなどの吸収を遅延する薬剤を組成物に含有することにより、注射可能組成物の長時間吸収を生じさせることができる。

20

【0179】

活性化合物が上述のように適切に保護される場合、その化合物は例えば、不活性希釈剤または投与可能な食用担体とともに経口投与してよい。

30

【0180】

VI. 本発明の使用および方法

本発明のヒトモノクローナル抗PSMA抗体および関連する誘導体/複合体および組成物は、in vivo およびin vitroにおける診断用および治療用の有用性がある。例えば、これらの分子は、例えば、in vitroまたはex vivoにおいて、培養液中の細胞に投与することができる。あるいは、例えば、in vivoにおいて被験体に投与し、各種のPSMA関連疾患の治療、予防、または診断をすることができる。ここで用いられる「被験体」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含むことを意図する。好ましい被験体には、PSMAの発現、一般に異常発現（例えば、過剰発現）を特徴とする疾患を有するヒト患者が含まれる。したがって、本発明の方法および組成物は、例えば、前立腺癌、大腸癌および腎臓の癌腫を含むPSMAを発現する腫瘍細胞の存在を特徴とする疾患などの、腫瘍発生疾患を有する被験体の治療に用いることができる。本発明の「非ヒト動物」という用語には、非ヒト霊長目、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの、哺乳類および非哺乳類などの脊椎動物すべてが含まれる。

40

【0181】

好ましい態様において、本発明は、被験体において前立腺癌を治療するための方法であって、被験体に本発明の抗PSMA抗体の1つを投与することを含む方法を提供する。別の態様において、その抗PSMA抗体は、抗体が、例えば、放射性物質または細胞毒素と結合する複合体として投与される。さらに別の態様において、該抗PSMA抗体は、抗FcRIまたは抗Fcと結合する二重特異性分子として投与される。

50

【0182】

本発明のヒト抗体は、治療または診断用途に関する結合活性について、まず *in vitro* において検査することができる。例えば、本発明の組成物は、以下の実施例に記載の E L I S A およびフローサイトメトリーを用いて検査することができる。さらに、P S M A 発現細胞の細胞溶解を含むエフェクター媒介エフェクター細胞活性を少なくとも一つ誘発するこれらの分子の活性を検定することができる。エフェクター細胞媒介貪食作用の検定用のプロトコルを以下の実施例に記載する。

【0183】

本発明のヒト抗体にはまた、P S M A 関連疾患の治療および診断におけるさらなる有用性がある。例えば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異性または二重特異性分子を用いて、例えば、P S M A 発現細胞のオプソニン化、ヒトエフェクター細胞の存在下での P S M A 発現細胞の貪食作用または細胞溶解の媒介、または P S M A 発現細胞の成長阻害といった生物学的活性を一つ以上、*in vivo* または *in vitro* において明らかにすることができる。

10

【0184】

本発明の抗体および組成物を投与するための好適な方法は、当該技術分野において公知である。好適な投与量も当該技術分野の技量の範囲内で決定することができ、そしてそれは被験体の年齢および体重、および用いられる特定の薬剤に依存するだろう。

【0185】

本発明のヒト抗 P S M A 抗体はまた、他の治療薬、例えば、化学治療用物質と一緒に共投与することができる。または、他の公知の治療、例えば、放射線治療などの抗癌治療とあわせて共投与することができる。そのような治療薬としては、とりわけ、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、シスプラチン、硫酸ブレオマイシン、カルムスチン、クロランブシル、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素などの抗癌性腫瘍薬が含まれ、それらは、それら自身、患者に対して毒性もしくは亜毒性となるレベルでのみ有効である。シスプラチンは、4週間毎に1回、 100 mg/m^2 の投与量で静脈内投与され、アドリアマイシンは、21日毎に1回、 $60\sim75\text{ mg/m}^2$ の投与量で静脈内投与される。本発明のヒト抗 P S M A 抗体またはその抗原結合フラグメントは、化学治療用物質と共投与することによって、細胞毒性効果をヒト腫瘍細胞にもたらし、異なる機序で作用する2つの抗癌剤を提供する。そのような共投与は、薬剤抵抗性の発達によって生じる問題を解決することができ、または抗体と反応性を示さないそれらの腫瘍細胞の抗原特性に変化をもたらす。

20

30

【0186】

本発明のヒト抗体、多重特異性または二重特異性分子などに結合したエフェクター細胞などの標的特異性エフェクター細胞は、治療薬として用いることもできる。標的化のためのエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球または単球などのヒト白血球であってもよい。その他の細胞としては、好酸球、ナチュラルキラー細胞、およびその他の I g G または I g A レセプターを有する細胞が含まれる。必要であれば、エフェクター細胞は治療される被験体から採取することもできる。標的特異性エフェクター細胞は、生理学的に許容される溶液中の細胞の懸濁液として投与することができる。投与される細胞数は約 $10^8\sim10^9$ 個とすることができるが、治療目的により変化するであろう。一般に、その量であれば、例えば、P S M A を発現する腫瘍細胞などの標的細胞に局在化するのに十分であり、貪食作用などにより細胞死滅を引き起こすのに効果的であろう。投与経路も変えることができる。

40

【0187】

標的特異性エフェクター細胞による治療は、標的細胞の除去のための他の技術と併用して行うことができる。例えば、本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子）および/またはこれらの組成物に保護されたエフェクター細胞を用いた抗腫瘍療法は、化学療法と併用することができる。さらに、併用免疫療法は、二つの異なる細胞毒性エフェクター群を腫瘍細胞拒絶に向かわせるように用いることができる。例えば、抗 F c ガンマ R I または抗 C D 3 に結合した抗 P S M A 抗体を I g G または I g A レセ

50

ブター特異性結合剤と組み合わせてもよい。

【0188】

本発明の二重特異性および多重特異性分子は、細胞表面上のレセプターのキャップまたは排除などにより、エフェクター細胞上のFcRまたはFcRレベルを調節するために用いることもできる。抗Fcレセプターの混合物もこの目的のために用いることができる。

【0189】

補体を結合するIgG1、-2、もしくは-3、またはIgMの部分などの補体結合部位を有する本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子）は、補体の存在下においても用いることができる。ある態様において、本発明の結合剤および適切なエフェクター細胞による標的細胞を含む細胞集団のex vivo治療には、補体または補体含有血清を加えて補足することができる。本発明の結合剤でコーティングされた標的細胞の貪食作用は、補体蛋白質の結合により向上することができる。別の態様において、本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子）でコーティングされた標的細胞は、補体により溶解することもできる。さらに別の態様において、本発明の組成物は、補体を活性化しない。

【0190】

本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子）は、補体とともに投与することもできる。したがって、ヒト抗体、多重特異性または二重特異性分子、および血清または補体を含む組成物は本発明の範囲内である。これらの組成物は、補体がヒト抗体、多重特異性または二重特異性分子の近傍に位置する点で有用である。あるいは、本発明のヒト抗体、多重特異性または二重特異性分子、および補体または血清を、別々に投与することもできる。

【0191】

また、本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子）を含むキットおよび使用説明書も本発明の範囲内である。そのキットはさらに、補体などの少なくとも一つ、または本発明のさらなるヒト抗体（例えば、第1のヒト抗体とは別のPSMA抗原中のエピトープに結合する相補的活性を有するヒト抗体）を1つ以上含むことができる。

【0192】

その他の態様において、被験体は、例えば、被験体をサイトカインで治療することにより、FcまたはFcレセプターの発現または活性を調節、例えば、促進または阻害する物質を用いて、さらに治療することができる。多重特異性分子での治療中に投与する好ましいサイトカインには、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン-（IFN-）、および腫瘍壊死因子（TNF）が含まれる。

【0193】

本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異性および二重特異性分子）は、FcRまたはPSMAを発現する細胞を標的とするため、例えば、このような細胞を標識するためなどに用いることもできる。このような使用のために、結合剤を、検出され得る分子に結合することができる。したがって、本発明は、FcRまたはPSMAなどのFcレセプターを発現する細胞をex vivoまたはin vitroにおいて局在化する方法を提供する。検出可能標識は、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素共因子などがあげられる。

【0194】

本発明の抗体は、サンプルを（例えば、対照サンプルとともに）抗体とPSMAとの複合体の形成を可能にするような条件下でヒトモノクローナル抗体と接触させることによって、サンプル中におけるPSMA抗原の存在を検出するために、またはサンプル中におけるPSMA抗原の量を測定するために用いることができる。その後複合体形成が検出され、そしてサンプルと対照サンプルの複合体形成の差異によりサンプル中のPSMA抗原の

10

20

30

40

50

存在が示される。

【0195】

さらに別の態様において、本発明は、*in vivo*または*in vitro*で、Fc発現細胞の存在を検出する、またはその量を定量するための方法を提供する。その方法は、(i)被験体に、検出可能マーカーに結合されている、本発明の組成物(例えば、多重特異性もしくは二重特異性分子)またはそのフラグメントを投与すること；(ii)該被験体に対して、前記検出可能マーカーを検出するための手段を施してFc発現細胞を含有する領域を同定することを含む。

【0196】

本発明は以下の実施例においてさらに具体化されるが、本発明をさらに限定するものと解釈されてはならない。本願全体に引用されるすべての数値、およびすべての引用文献、特許および特許出願公報の内容を引用によって本明細書中に援用する。

実施例

【0197】

方法と材料

P S M A 特異的モノクローナル抗体のためのスクリーニングアッセイ P S M A - H u M A b を、固相 E L I S A を基礎としたアッセイを用いて検出した。L N C a P 細胞からの免疫親和性精製 P S M A、または P S M A 由来のフラグメントを含有する、細菌的に発現した融合蛋白質を Maxi-Sorp (Nunc、Rochester、NY) 96 ウェルプレート上にコーティングし、4 で一晩インキュベートした。該プレートを P B S - 0.2 % T w e e n - 20 で洗浄し、5 % B S A の P B S 溶液を用いて室温で1時間ブロッキングした。ハイブリドーマ培養液からの 50 μ l の上清を、P S M A でコーティングしたウェルに添加し、該プレートを室温で2時間インキュベートした。該プレートを上記のように洗浄し、50 μ l の 1 : 1000 希釈したウサギ抗ヒト I g G の重鎖および軽鎖 (ICN、Costa Mesa、CA) を各ウェルに添加した。室温で1時間インキュベートした後、該プレートを上記のように洗浄し、50 μ l の 1 : 2000 希釈した H R P 結合プロテイン A (Sigma、St. Louis、MO) を各ウェルに添加した。室温で1時間インキュベートした後、該プレートを上記のように洗浄し、100 μ l の、A B T S (500 m l の 0.1 M クエン酸中、150 m g の 2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸、p H 4.35) / H₂O₂ (A B T S 溶液 10 m l につき 10 μ l の 30 % H₂O₂) 色素源 / 基質溶液を各ウェルに添加した。5 分間のインキュベーション後、100 μ l の停止溶液 (S D S / ジメチルホルムアミド) を添加することによって該反応を止め、マイクロプレートリーダーにおいて、405 n m における球光度を読み取った。高い A⁴⁰⁵ 値を持つ上清を産生するハイブリドーマ細胞を、限界希釈によってクローニングし、さらなる分析を行った。

【0198】

抗体蛋白質の単離： 1 ~ 5 % の Fetalclone (Hyclone、Logan、UT) を含有する R P M I - 1640 培地を用いて、Cellmax バイオリアクター (Cellco、Laguna Hills、CA) からモノクローナル抗体を単離した。プロテイン A-アガロースカラム上、クロマトグラフィーを製造元の仕様書 (KPL、Gaithersburg、MD) に基づいて行うことによって、モノクローナル抗体を精製した。

【0199】

L N C a P 細胞膜の調製： L N C a P 細胞をプラスチック皿から掻き落とし、P B S 中で十分に洗浄し、10 容積の脱イオン水中に再懸濁させ、Dounce ホモジナイザーを用いて、3 ストロークで均質化した。15000 x g で 45 分遠心分離することによって膜画分を単離した。Pierce (Rockford、IL) B C A キットを用いて、膜ペレットの蛋白質濃度を測定した。

【0200】

熱変性実験： L N C a P 細胞から得た免疫親和性精製 P S M A のアリコート (P B S 中で 40 μ m / m l) を 10 分間沸騰させて熱変性し、氷上冷却した。これと、熱変性していない同一のアリコートを P B S で 1 : 4 希釈し、96 ウェル Maxi-Sorp プレート (Nun 50

c) のウェルに添加して、4 で一晩コーティングした。コーティング後、全てのプレートを5% BSAのPBS溶液で1時間ブロッキングし、PBSで洗浄し、上記のように、指示された一次抗体を用いた標準的なサンドイッチELISAを行った。

【0201】

ウェスタンブロット分析： PSMA含有画分をSDS-PAGEにかけ、PVDF膜に転写し、ウェスタンブロット分析を行った。そのブロットを一晩、5%脱脂乳を含有するTBSでブロッキングし、精製抗体のTBS溶液（濃度5 µg/ml）で1時間インキュベートした。そのブロットを0.5% Tween 20）を含有するTBS（TBS-T）で5回洗浄し、LumiGLO化学発光基質キット（KPL、Gaithersburg、MD）で展開し、X線フィルムに露光して可視化した。

10

【0202】

免疫沈降研究： 1% NP-40を含有するPBSをLNCaP細胞に添加し、1時間インキュベートし、遠心分離にかけて粒状物質を除去することによって、LNCaP細胞の界面活性剤ライセートを調製した。ライセート1 mlあたり150 µgの無関係のヒトIgG₁を添加し、室温で1時間インキュベートし、その後ライセート1 mlあたり150 µlの充填されたプロテインGセファロースビーズを添加することによって、ライセートを予め精製した。遠心分離後、上清画分を用いてビーズを除去した。予め精製しておいた、それぞれ100 µlのアリコートに5 µgの抗体蛋白質と混合し、4で一晩インキュベートした。終了後、20 µlの充填されたプロテインGセファロースビーズを各チューブに添加し、該チューブを4で1時間インキュベートした。溶解緩衝液を用いて十分に洗浄した後、50 µlのLaemmliサンプル緩衝液（Bio-Rad）を各サンプルに添加し、チューブを95で10分間加熱した。そのチューブを2分間遠心分離にかけ、各サンプルを25 µlずつSDS-PAGEゲル上におき、175ボルトで60分間電気泳動を行った。電気泳動したサンプルを、マウス抗PSMA抗体4D8（5 µg/ml）を用いて、ウェスタンブロットを行うためにPVDF膜上にエレクトロブロットし、上記のように展開した。

20

【0203】

フローサイトメトリー： 組織培養フラスコからLNCaP細胞およびPC-3細胞を新たに収集し、単一の細胞懸濁液を調製した。LNCaP細胞懸濁液を一次抗体で直接染色するか、または、1%パラフォルムアルデヒドのPBS溶液で固定化した後染色した。約100万個の細胞を、0.5% BSAおよび50~200 µg/mlの一次抗体を含有するPBS中に再懸濁させ、氷上で約30分間インキュベートした。その細胞を0.1% BSA、0.01% NaN₃を含有するPBSで2回洗浄し、100 µlの1:100希釈したFITC結合型ヤギ抗ヒトIgG（Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA）中に懸濁させ、氷上でさらに30分間インキュベートした。その細胞を再び2回洗浄し、0.5 mlの洗浄緩衝液中に懸濁させ、FACSCaliburサイトメーター（Becton-Dickinson、San Jose、CA）上で、CellQuest 取得ソフトウェアを用いて、蛍光染色の分析を行った。

30

【0204】

モノクローナル抗体のFITC標識化： 精製モノクローナル抗体を0.3 Mカルボン酸ナトリウム緩衝液、pH 9.5に対して十分に透析した。蛍光イソチオシアネート（FITC）ストック溶液を、1 mgの固体FITCを1 mlのDMSO中に溶解することによって調製した。ストックFITCを、抗体蛋白質1 mgにつきFITC 50 µgになるように、定期的に混合しながら滴下して加えた。添加後、その溶液を室温で1~3時間、暗所にてインキュベートした。FITC標識抗体を、PBS中で平衡化させたセファデックスG-10カラム上でゲル濾過して単離した。

40

【0205】

4A3および7F12のDOTA標識： 5 mgの4A3および7F12抗体蛋白質を、DOTAの4つのカルボン酸基のうちの1つを直接結合によって抗体蛋白質のアミノ基に結合させることによって、DOTA標識した。DOTA（テトラアザシクロデカンテトラ酸性酸）は、放射性核種を錯体化するために用いることができる一般的なキレート剤

50

である。約 1.5 ml の PBS 中の蛋白質をまず、遠心分離器内で M_r 25,000 のカットオフで、5 × 4 ml の 1% DTPA (ジエチレントリアミノ酸性酸)、pH 5 を用いて、24 時間かけて洗浄した。その後、同じ手順を用いて抗体緩衝液を 0.1 M リン酸塩、pH 7.0 に変えた。DOTA の活性エステルを、30 mg の DOTA (0.072 mmol) を 0.4 ml の水に溶解することによって作製し、NaOH を用いて pH を 7.3 に調整した。その後、10 mg の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを添加し、その混合物を 1 時間氷上冷却し、抗体溶液に添加し、4 で一晩撹拌した。得られた DOTA 抗体抱合体を過剰 DOTA から分離し、他の反応物を 0.3 M NH_4OAc で繰り返し洗浄し、遠心濃縮した。

【0206】

抗体阻害の研究： 約 100 万個の LNCaP 細胞をまず 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の精製 4A3、7F12、8A11、8C12、16F9 または無関係のヒト IgG₁ 抗体の PBS 溶液で 1 時間氷上で処理した。洗浄後、その細胞を 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の FITC 結合ヒトまたはマウス抗 PSMA モノクローナル抗体で 1 時間、氷上でインキュベートした。洗浄後、その細胞を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヨウ化プロピジウムで染色し、FACsCalibur サイトメーターと CellQuest ソフトウェアでフローサイトメトリーによって分析した。

【0207】

LNCaP 細胞腫瘍を保有するヌードマウスにおける ^{125}I 標識 HuMAb の体内分布： LNCaP 細胞、50% Matrigel (Becton-Dickinson) 2 × 10⁶ 中 (総容量 150 μl) をヌードマウスに皮下注射した。腫瘍の大きさが直径約 0.5 cm になったとき、該動物を ^{125}I 標識抗体で、尾部の静脈から 100 μg の抗体 (5 ~ 35 μCi の ^{125}I を含有する) を静脈内投与することにより in vivo 標識した。時間のポイント (time points) を変えた後、該動物を殺し、個別の正常臓器および組織ならびに腫瘍組織に存在する ^{125}I 標識の濃度を測定した。

【0208】

1 mg の抗体蛋白質を 1 ~ 1.5 μCi の ^{125}I で、Iodobeads (Pierce) を用いて、製造元の指示にしたがってヨード処理した。

【0209】

^{125}I 標識 HuMAb の内在化： LNCaP 細胞を 6 ウェルプレートに播き、ほぼコンフルエントに到達させた。その後培地を除去し、ウェルを PBS で洗浄し、付着していない細胞を除去した。その後該細胞を ^{125}I 標識 HuMAb、または合計容量 1.5 ml で 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で新鮮な培地中に存在する無関係のヒト IgG にマッチするアイソタイプで標識し、37 で 10 分間、インキュベータ中でインキュベートした。終了後、培地を除去し、その細胞を十分に PBS で洗浄し、未結合の標識抗体を除去し、1.5 ml の培養培地を添加し、プレートを 37 のインキュベータに戻し、所望の時間インキュベートした。インキュベーションの 0 (培養培地を添加直後)、4、18 および 28 時間後、培養培地を除去し、遠心分離にかけ、付着していない細胞を除去した。その上清画分を氷上冷却し、100% TCA を添加することによって TCA 析出させ、最終的な TCA 濃度を 10% とした。10 分間氷上でインキュベートした後、該画分を 10 分間 1000 × g で遠心分離にかけ、上清を除去した。TCA 可溶性および不溶性画分の双方に存在する放射活性をガンマカウンターで定量した。TCA 析出用の培地の除去後、ウェル中に付着している細胞を、トリプシンを用いて放出させ、計数用のチューブ中におき、あわせて、1 ml の 0.1 N NaOH 洗浄を行った。細胞に結合している放射活性もガンマカウンターで定量した。もともと細胞に結合していた細胞総数の、内在化し、処理され、および TCA 可溶性画分に分散している細胞に対する比率をプロットした。

【0210】

精製抗体蛋白質 0.5 mg を、上述したように、1 mCi の ^{125}I を用いてヨード処理した。各抗体の標識は、0.4 ~ 1.6 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 抗体蛋白質であった。

【0211】

HuMAb の ADCC および CDC スクリーニング： ADCC および CDC 試験は、

10

20

30

40

50

標的細胞として L N C a P 細胞を用いた 4 時間の ^{51}Cr 放出アッセイとした。アッセイは、96 ウェルプレート中で、1 ウェルにつき 2500 の標的を 3 部ずつ用いて、エフェクターを標的細胞に対する比率（エフェクター：標的比）100：1で行った。エフェクター細胞は、1 オスおよび 1 メスドナーから単離した P B M C とした。C D C アッセイのために、最終濃度 1：200 の新鮮なヒト血漿を補足源として用いた。

【0212】

I H C による H u M A b の組織交差反応性スクリーニング： まず、サイトメトリー後、アセトンを用いて 10 分間処理することによって、または、染色後 10 % 中性緩衝ホルマリンを用いて 10 秒間処理することによって、固定化された凍結組織切片上で、固定化された濃度の精製した未結合のヒトモノクローナル抗体（ $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を用い、また、

10

【0213】

これらの結果に基づいて、サイトメトリー時、アセトンで 10 分間固定化した後、ヒト凍結切片上で、次いで、染色直前に 10 秒間 10 % 中性緩衝ホルマリン中で組織スクリーニングを行った。 $1.5\text{mg}/\text{ml}$ の過剰担体 I g G を含有する $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で一次抗体を用いて染色を行い、その後 $7.5\mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチン化されたヤギ抗ヒト I g G 二次抗体を用いて染色を行った。熱凝集性のウサギ I g G（ $1\text{mg}/\text{ml}$ ）、5 % 規定ヤギ血清、および 1 % B S A が、該切片の蛋白質ブロックに含まれていた。

20

【実施例 1】

【0214】

抗 P S M A ヒト抗体を産生するための C m u 標的マウスの作製

C M D 標的ベクターの構築： プラスミド p I C E m u は、m u 遺伝子全般を範囲とするマウス I g 重鎖遺伝子座の E c o R I / X h o I フラグメントを含有しており、それは B a l b / C ゲノムラムダファージライブラリーから得た（Marcu ら、Cell 22: 187, 1980）。このゲノムフラグメントをプラスミド p I C E M I 9 H の X h o I / E c o R I 部位にサブクローニングした（Marsh ら；Gene 32, 481-485, 1984）。p I C E m u に含まれる重鎖配列は、m u イントロンエンハンサーの 3' 側にちょうど位置する E c o R I 部位の下流から、m u 遺伝子の膜貫通エクソンの最後部の下流約 1 k b に位置する X h o I 部

30

【0215】

標的ベクターを以下のように構築した。 1.3k b の H i n d I I I / S m a I フラグメントを p I C E m u から切り出し、H i n d I I I / S m a I 消化 p Bluescript（Stratagene、La Jolla、CA）にサブクローニングした。この p I C E m u フラグメントは、C m u 1 の 5' 側約 1 k b に位置する H i n d I I I 部位から C u m 1 内に位置する S m a I 部位までを範囲とする。得られたプラスミドを S m a I / S p e I で消化して、C m u 1 の 3' 側の S m a I 部位から C m u エキソン最後部の直下流に位置する X b a I 部位を範囲とする p I C E m u の S m a I / X b a I フラグメント約 4 k b を挿入した。得られたプラスミド p T A R 1 を S m a I 部位で直線化し、n e o 発現カセットを挿入した。このカセットは、マウスホスホグリセリン酸キナーゼ（p g k）プロモーター（X b a I / T a q I フラグメント、Adra ら（1987）Gene 60: 65-74）の転写調節下にあり、p g k ポリアデニル化部位（P v u I I / H i n d I I I フラグメント、Boer ら（1990）Biochemical Genetics 28: 299-308）を有する新規遺伝子から成る。プラスミド p K J 1（Tybul ewicz ら（1991）Cell 65: 1153-1163に記載）からこのカセットを得、そこからその n e o カセットを E c o R I / H i n d I I I フラグメントとして切り出して、E c o R I / H i n d I I I 消化 p G E M - 7 Z f（+）にサブクローニングして p G E M - 7（K J 1）を作製した。n e o カセットを E c o R I / S a l I 消化により p G E M - 7 から切り出し、末端を平滑化して、ゲノム C m u 配列とは反対側に位置するプラスミド p T A

40

50

R 1 の S m a I 部位にサブクロニングした。得られたプラスミドを N o t I で直線化し、Mansourら (1988) Nature 336: 348-352に記載されているように単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ (t k) カセットを挿入し、相同性組換え体を有する E S クローンを富化した。このカセットは、Tybulewiczら (1991) Cell 65: 1153-1163の記述の通り、マウス p g k プロモーターとポリアデニル化部位に挟まれた t k 遺伝子のコード配列からなる。得られた C M D 標的化ベクターの合計約 5 . 3 k b が重鎖遺伝子座に相同であり、n e o 発現カセットを第一 C m u エキシソンの固有 S m a I 部位に挿入した突然変異 m u 遺伝子を作製するように設計されている。標的ベクターを、プラスミド配列内を切断する、P v u I で直線化し、その後それを E S 細胞に電気穿孔した。

【 0 2 1 6 】

標的 E S 細胞の作製および分析 A B - 1 E S 細胞 (McMahon, A. P. および Bradley, A., (1990) Cell 62: 1073-1085) は、有糸分裂が不活性の S N L 7 6 / 7 細胞支持細胞層上で成長した (同上)。基本的には (Robertson, E. J. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 71-112) に記載の通りである。直線化した C M D 標的ベクターを、Hastyら (Hasty, P. R. ら (1991) Nature 350: 243-246) に記載されている方法により、AB-1細胞に電気穿孔した。電気穿孔された細胞を、100 mm 皿に $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞 / 皿の密度で播いた。24時間後、G 4 1 8 (活性成分 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$) および F I A U ($5 \times 10^{-7} \text{ M}$) を培地に加えて、薬物耐性クローンを 8 ~ 9 日間かけて成長させた。クローンを採取し、トリプシン処理し、2分してさらに成長させた。次に各クローンから誘導した細胞の半分を冷凍し、残りの半分をベクター配列と標的配列の相同性組換えについて分析した。

【 0 2 1 7 】

D N A 分析をサザンブロットハイブリダイゼーションにより行った。D N A を Lairdら (Laird, P. W. ら (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4293) が記載の通りクローンから単離した。単離されたゲノム D N A を S p e I で消化し、m u イントロンエンハンサーと m u スイッチ領域の間の配列にハイブリダイズする、915 b p の S a c I フラグメント、プローブ A でプローブした (図 1)。プローブ A は、野生型遺伝子座から 9 . 9 k b の S p e I フラグメントを検出し、C M D 標的ベクターと相同的に組み換えられた m u 遺伝子座から診断用 7 . 6 k b バンドを検出する (n e o 発現カセットは、S p e I 部位を有する)。サザンブロット分析によりスクリーニングされた 1132 G 4 1 8 および F I A U 耐性クローンのうち、3つが m u 遺伝子座における相同組換えを示す 7 . 6 k b の S p e I バンドを示した。これら3つのクローンを酵素 B g l I、B s t X I、および E c o R I でさらに消化し、ベクターが m u 遺伝子に相同的に組み込まれたことを確認した。プローブ A とハイブリダイズしたとき、B g l I、B s t X I、および E c o R I で消化された野生型 D N A のサザンブロットはそれぞれ 15 . 7、7 . 3、および 12 . 5 k b のフラグメントを産生した。一方、標的 m u 対立遺伝子の存在は、それぞれ 7 . 7、6 . 6、および 14 . 3 k b のフラグメントにより示される。S p e I 消化物により検出された3陽性クローンはすべて、新規カセットが C m u 1 エキシソンに挿入されたことを示す所定の B g l I、B s t X I、および E c o R I m p 制限フラグメントを示した。

【 0 2 1 8 】

突然変異 m u 遺伝子を有するマウスの作製: 三種類の標的 E S クローン、指定番号 264、272、および 408 を解凍し、Bradley (Bradley, A. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach. (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 113-151) による記述の通り、C 5 7 B L / 6 J 未分化胚芽細胞に注射した。注射された未分化胚芽細胞を偽妊娠メスの子宮に移し、挿入 E S 細胞に由来する細胞と宿主未分化胚芽細胞の混合を示すキメラマウスを作製した。キメラへの E S 細胞の寄与の程度は、E S 細胞系列に由来する被覆のネズミ色の呈色を黒色 C 5 7 B L / 6 J をバックグラウンドとして視覚的に推測することができる。クローン 272 および 408 は、キメラの割合が低いもの (つまりネズミ色の着色の割合が低い) しか生じなかったが、ク

10

20

30

40

50

ローン264では、キメラの割合が高いオスが生じた。このようなキメラをC57BL/6Jメスと交配させると、ネズミ色の仔が作製され、ES細胞ゲノムが生殖細胞系列に伝播することが示された。標的mu遺伝子のスクリーニングを、尾部生検で得たBg1I消化DNAのサザンブロット分析により行った(ES細胞DNAの分析について上述の通り)。ネズミ色仔の約50%が15.7kbの野生型バンドに加えて7.7kbハイブリダイズBg1Iバンドを示しており、標的mu遺伝子の生殖細胞系列伝播が立証された。

【0219】

トランスジェニックマウスのmu遺伝子の機能的不活性化についての分析：neoカセットのCmu1への挿入が、Ig重鎖遺伝子を不活化しているかどうかを調べるために、クローン264キメラを、JH遺伝子セグメントを消去することにより重鎖発現を不活化するJHD突然変異にホモ接合性のマウスと交配させた(Chenら、(1993) Immunol. 5: 647-656)。ネズミ色仔が4匹誕生した。これらの動物が生後1ヶ月の時点で、それらから血清を採取し、マウスIgMの存在をELISAにより検定した。4匹の仔のうち2匹にIgMが完全に欠損していた(表1参照)。尾部生検で採取したDNAのサザンブロット分析は、Bg1I消化およびプローブAとのハイブリダイズ(図1参照)、およびStuI消化と475bpのEcoRI/StuIフラグメントとのハイブリダイズ(同上)により行い、マウス仔4匹の遺伝子型別を行ったところ、血清IgMを発現しなかった動物は、重鎖遺伝子座の一つの対立遺伝子がJHD突然変異を有しており、もう一つの対立遺伝子がCmu1突然変異を有している動物であることが明らかになった。JHD突然変異についてヘテロ接合性のマウスは、野生型レベルの血清Ig値を示す。このデータは、Cmu1突然変異はmu遺伝子の発現を不活化することを示すものである。

【0220】

【表1】

TABLE 1

マウス	血清 IgM ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Ig H 鎖遺伝子型
42	<0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	<0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129xBL6F1	153	+/+
JHD	<0.002	JHD/JHD

【0221】

表1はELISAで測定した血清IgMレベルで、CMDおよびJHD突然変異の両方を持つマウス(CMD/JHD)、JHD突然変異についてヘテロ接合性のマウス(+ / JHD)、野生型(129Sv x C57BL/6J)F1マウス(+ / +)、およびJHD突然変異についてホモ接合性のB細胞欠乏マウス(JHD/JHD)についてを示す。

【実施例2】

【0222】

抗PSMAヒト抗体産生用のHCO12トランスジェニックマウスの作製
HCO12ヒト重鎖導入遺伝子：HCO12導入遺伝子は、pHC2の80kbインサート(Taylorら、1994、Int. Immunol.、6: 579-591)およびpVx6の25kbインサートを同時注入して作製した。プラスミドpVx6は下記の通りに構築した。

【0223】

生殖細胞系ヒトV_H 1 - 18 (DP - 14) 遺伝子とともに約2.5 kbの5'側隣接ゲノム配列および5 kbの3'側隣接ゲノム配列を含む8.5 kb HindIII/SalI DNAフラグメントをプラスミドベクターpSP72 (Promega, Madison, WI) にサブクローニングし、プラスミドp343.7.16を作製した。生殖細胞系ヒトV_H 5 - 51 (DP - 73) 遺伝子とともに約5 kbの5'側隣接ゲノム配列および1 kbの3'側隣接ゲノム配列を含む7 kb BamHI/HindIII DNAフラグメントをpBR322ベースのプラスミドクローニングベクターpGP1f (Taylorら, 1992, Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295) にサブクローニングし、プラスミドp251fを作製した。pGP1f、pGP1kに由来する新規クローニングベクターをEcoRV/BamHIで消化し、生殖細胞系ヒトV_H 3 - 23 (DP47) 遺伝子とともに約4 kbの5'側隣接ゲノム配列および5 kbの3'側隣接ゲノム配列を含む10 kb EcoRV/BamHI DNAとライゲートした。得られたプラスミドp112.2RR.7をBamHI/SalIで消化し、p251fの7 kbの精製BamHI/SalIインサートとライゲートした。得られたプラスミド、pVx4をXhoIで消化し、p343.7.16の8.5 kbのXhoI/SalIインサートとライゲートした。

10

【0224】

他の2つのV遺伝子と同一方向にあるV_H 1 - 18 遺伝子を用いてクローンを得た。pVx6と称されたこのクローンを、その後NotIで消化し、Hoganら (B. Hoganら, Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 第2版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY) により記述されたように、精製した26 kbのインサートを(pHC2の精製した80 kbのNotIインサートとともに、1:1のモル比で)、半日目の前核(C57BL/6J x DBA/2J) F2胚へ同時注入した。Vx6およびHC2の両方から得た配列を含むトランスジェニックマウスの独立3系列は、注入胚から成長したマウスから確立された。これらの系列を、(HCO12)14881、(HCO12)15083、および(HCO12)15087と称する。3系列それぞれを実施例1に記載のCMD突然変異、JKD突然変異(Chenら, 1993, EMBO J. 12: 811-820)、および(KCo5)9272導入遺伝子(Fishwildら, 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851)を含むマウスと交配させた。得られたマウスは、破壊された内因性マウス重鎖およびk軽鎖遺伝子座についてホモ接合性の背景をもつヒト免疫グロブリン重鎖およびk軽鎖導入遺伝子を発現する。

20

30

【実施例3】

【0225】

P SMAに対するヒトモノクローナル抗体の作製および二重特異性

抗原：抗原(Northwest Biotherapeutics, Inc)は、LNCaP細胞(Cat#CRL-1740; American Type Culture Collection, Rockville, MD)から単離された(1)細胞膜および(2)精製蛋白質(P SMA)の2つの形状で提供された。精製抗原(1.05 mg/ml)を用いて、1回の免疫化および最終的な尾部の追加免疫を行った。モノクローナル抗体7E11.C5は、Cytogen, Inc, Princeton, NJから入手した。

【0226】

可溶性P SMAおよびLNCaP細胞からの膜を、フロイント完全アジュバントまたはフロイント不完全アジュバントのいずれかと混合した(CFAおよびIFA)。マウスに0.2 ccの調製された抗原を腹腔内注射した。無菌PBS中の可溶性P SMAで尾の静脈を最終的な免疫化を行った。

40

【0227】

トランスジェニックマウス：マウスをフィルターケージに収容し、免疫化、出血および融合の日において良好な身体的条件であることを調べた。(CMD)++ ; (HCO12)15087+ ; (JKD)++ ; (KCo5)9272+ 遺伝子型のオスマウスID #17018によってハイブリドーマ4A3、7F12、8A11、8C12および16F9を産生した。個々の導入遺伝子の名称を括弧に記載し、それに続いて、ランダムに統

50

合された導入遺伝子を記載している。++や+といった記号は、同型接合または異型接合を示すが、マウスは通常、ランダムに組み込まれたIg導入遺伝子について同型接合と異型接合とを区別することができないPCRベースのアッセイを利用してスクリーニングされるので、+という指示記号は、実際にこれらの要素が均質なマウスに付与してもよい。

【0228】

免疫化の手順： 免疫化のスケジュールを表2に示す。マウス#17018を112日目に融合し、それを、遺伝子型HC07およびHC012からの10匹のマウスコホート中に含めた。全ての免疫化は、腹腔内注射によって行った。融合の3日前と2日前に、IVで追加免疫を行った。

【0229】

【表2】

TABLE 2

活性化の日	免疫化：アジュバント、抗原	出血および力価*
1日目	CFA, 膜	
13日目	IFA, PSMA (~50μg)	
27日目	IFA, 膜	
38日目		力価
40日目	IFA, PSMA (~50μg)	
48日目		力価
55日目	IFA, PSMA (50μg)	
62日目		力価
70日目	IFA, 膜	
80日目		力価
84日目	IFA, 膜	
94日目		力価
	融合の3日前と2日前に、IVで追加免疫。 融合は112日目に行った。	

*力価については、表3参照

【0230】

ハイブリドーマの調製： 融合には、P3 X63 ag8.653ミエローマ細胞系列 (ATCC CRL 1580, lot F-15183) を用いた。オリジナルのATCCバイアルを解凍し、培養液中で伸長させた。凍結させたバイアルからのストック種子をこの伸長物から調製した。細胞を培養液中に3~6ヶ月維持し、週2回動かした。P388D1 (ATCC TIB-63 FL) を200mLに伸長し、消耗させた。上清を回転し、濾過し、ハイブリドーマ追加用の培地として使用した。新たなバイアルを解凍してから、該細胞系列を3~6ヶ月経過させた。

【0231】

高グルコースDMEM： 10% FBSおよびPenicillin-Streptomycin (Gibco, #11 K1763) を含有する (Mediatech Cellgro, # 1001233) を使用してP388D1細胞およびミエローマ細胞を培養した。更なる培地補足をハイブリドーマ成長培地に追加した。

【0232】

マウス番号#17018から得た脾臓は、正常の大きさであり、 1.78×10^8 個の生存可能な細胞を産出した。脾細胞を融合した。

【0233】

ヒトIgG、抗体をスクリーニングするための最初のELISAを融合の7～10日後に行った。その後ヒトIgG、陽性ウェルを可溶性PSMAでコーティングしたELISAプレート上でスクリーニングした。次いで抗原陽性ハイブリドーマを24ウェルプレート、最終的には組織培養フラスコに移した。PSMA特異性ハイブリドーマを限定希釈によりサブクロニングし、モノクローナルであることを確認した。細胞をDMEM、50%FBSおよび10%DMSO(Sigma、D2650)中で凍結することによって、抗原陽性ハイブリドーマを発達プロセスのいくつかの段階で保存した。

【0234】

マウス#17018の力価を下記の表に示す。力価は、Hu-抗原特異性である。免疫化を繰り返した後、抗原に対する反応は、強固な反応レベルを示していた。そのマウスを融合

10

【0235】

【表3】

TABLE 3

日	力価
38日目	100
48日目	50
62日目	50
80日目	1600
94日目	3200

20

【0236】

融合の結果、38Hu-、ハイブリドーマを得、それらを抗原上で再びスクリーニングした。抗原上でのスクリーニング(ELISAベース)後、5つの抗原特異性ハイブリドーマを同定した。これらを抗原上で再び試験し、5つ全てのクローンが標的4A3、7F12、8A11、8C12および16F9に対して陽性であることを確認した。これらの5つのハイブリドーマの上清をさらに調べた。未変性形態の、PSMAに結合したこれら5つのクローンからの抗体は、LNCaP上で発現した。5つの抗体は全て、1、アイソタイプである。

30

【0237】

14A8×8C12と称された二重特異性分子は、ヒト抗CD89抗体14A8または14A8と称された抗体14A8のサブクローンからのvFab₂フラグメントと、ヒト抗PSMA抗体8C12との、標準の架橋方法を用い、ジスルフィド結合を介した化学的抱合によって作製された(図6)。

【実施例4】

40

【0238】

ヒト抗PSMA抗体の結合特性

固相ELISA研究： 全長PSMAおよび、PSMA蛋白質の細菌によって発現された融合蛋白質含有部分に対する反応性(固相ELISA)を比較することによって、抗PSMA特異性抗体を調べた。HuMAb 4A3、7F12、8A11、8C12および16F9は、精製PSMAとは反応したが、PSMA配列(結果は示さず)の一部を含有する融合蛋白質のいずれとも反応性を示さなかった。対照的に、HuMAb 11C10は、全長PSMAおよびPSMAアミノ酸1～173配列を含有する融合部分の双方と強い反応性を示した(図1)。11C10抗体の、より低いレベルの結合はまた、アミノ酸134～437 PSMAフラグメントに対しても観察された。

50

【0239】

ヒト抗PSMA特異性抗体の結合特性も、LNCaP細胞およびPC3細胞に由来する細胞膜画分を用いた固相ELISAによって研究した。膜画分を96穴ウェルプレート中で連続希釈し、空気乾燥した。そのプレートを5%BSAでブロッキングし、5 μ g/ml抗体のPBS溶液で1時間処理し、その後、標準ELISA法を用いて検出を行った。

【0240】

図2に示した結果から、HuMAb 4A3、7F12、8A11、8C12および16F9が、全抗原濃度範囲で、LNCaP細胞膜に対して高い特異性を示していることがわかる。PC3細胞膜に対しては、バックグラウンド以上の抗体の結合はほとんど、もしくは全くみられない。二重特異性分子14.1x8C12も、PSMA発現LNCaP細胞およびCD89発現U937細胞への結合能について、同様のアッセイを用いて試験した。二重特異性分子は、LNCaP細胞およびU937細胞の両方に容量依存的に結合する。

10

【0241】

未変性のPSMAおよび細菌的に発現されたPSMA融合蛋白質フラグメントを用いたELISAの結果によれば、11C10を除く全てのHuMAbは、未変性の高次構造中に存在するPSMAに特異性を示した。この観察を確認するために、未変性の、および熱変性されたPSMAに対する抗体の結合を試験して、蛋白質高次構造が結合特異性に及ぼす重要性を求めた。図3は、未変性の、および熱変性されたPSMAを用いた固相ELISAの結果を示す。蛋白質のN末端から最初の6つのアミノ酸からなるエピトープに対して特異的な、マウス抗PSMAモノクローナル抗体7E11を陽性対照として用いた。その結果、熱変性は、7E11の結合に影響を及ぼさないことがわかる。これは、直線状配列エピトープの認識に矛盾しない。これらの結果とは対照的に、抗体4A3、7F12、8A11、8C12および16F9は全て、未変性の精製PSMAに強く結合していた。しかしながら、PSMAの熱変性は、実際には抗体結合を破壊しており、未変性の蛋白質高次構造が抗体の結合にとって必要であることを示している。この結果と一致して、抗体4A3、7F12、8A11、8C12および16F9は、ウェスタンブロット解析（結果は示さず）でPSMAを検出する際には無効であった。

20

【0242】

したがって、HuMAb 4A3、7F12、8A11、8C12および16F9は、直線状アミノ酸配列エピトープを認識しないが、その代わり、高次構造的エピトープ、すなわち、直線状配列の異なる部分からのアミノ酸が三次元空間に近接して現れたときに生じるPSMA分子の高次構造的折り畳みからの未変性の蛋白質エピトープと結合する。そのような高次構造的エピトープは、原形質膜の細胞外側に位置している。

30

【0243】

LNCaP細胞からのPSMAの免疫沈降： 抗体4A3、7F12、8A11、8C12および16F9の結合特異性を、LNCaP細胞の1%NP-40界面活性ライセートから誘導された蛋白質の免疫沈降によって研究した。該ライセートを抗体で処理した後、プロテインGセファローズビーズを添加した。該ビーズを十分に洗浄し、結合している免疫複合体を、マウス直線状PSMA配列エピトープ特異性抗体4D8を用いた、SDS

40

ゲル電気泳動法およびウェスタンブロットにかけた。その結果を図4に示す。レーン1は、LNCaP細胞ライセートに存在するPSMAおよびPSM'（N末端からの最初の57アミノ酸が欠失している代替スプライスバリエーション）のウェスタンブロットの反応性を示す。レーン2は、アイソタイプがマッチする（IgG₁）無関係のヒト抗体を用いた免疫沈降の結果を示す。レーン3から7は、抗体4A3、7F12、8A11、8C12、および16F9をそれぞれ用いた免疫沈降の結果を示す。それぞれの場合において、PSMAおよびPSM'の両方に一致する濃いバンドは、蛋白質の細胞外ドメインに存在する蛋白質エピトープに結合するということを示している。

【0244】

生LNCaPで発現するPSMAへのHuMAbの結合： 生存可能および生存不能（

50

固定された) L N C a P 細胞に結合する抗体を、無関係のヒト I g G を対照として用いたフローサイトメトリーによって調べた。生存可能な細胞は、ヨウ化プロピジウム陰性細胞群である。一次抗体処理の前に、固定された細胞を 1 % パラホルムアルデヒドの P B S 溶液で処理した。抗体 4 A 3、7 F 1 2、8 A 1 1、8 C 1 2 および 1 6 F 9 の、生 L N C a P 細胞および固定された L N C a P 細胞の双方に対する強力な結合が観察された。P C 3 細胞と一緒に用いたとき、または無関係のヒト抗体にマッチするアイソタイプを L N C a P 細胞と一緒に用いたとき、陰性染色が観察された。

【 0 2 4 5 】

比較によれば、生存可能細胞および固定化細胞および無関係のマウス抗体対照の同じ調製物を用いた、マウス直線状エピトープ特異性抗体を用いた場合の抗体結合の結果から、生細胞に対する結合が有意に低いことが示された。固定化細胞に対する結合はより高かったが、しかしながら、直線状エピトープ抗体は、無関係のヒト I g G₁ 抗体を対照として用いたときに観察された高次構造 H u M A b で観察された結合に対するいかなる条件においても比較不能であった。マウスまたはヒトの、立体的または直線状エピトープの結合は、P S M A 陰性 P C 3 細胞を用いた実験では検出されなかった(結果は示さず)。

10

【 0 2 4 6 】

したがって、H u M A b は、生 L N C a P 細胞に対して強力な結合性を示し、マウス高次構造抗体 3 C 6 が結合したものに関連するエピトープに結合する。

【 0 2 4 7 】

抗体の結合の競合の F A C S 分析: 抗体の結合の競合に関する研究を、各抗体が結合するのは P S M A 上の類似のエピトープか、または異なるエピトープかを調べるために行った。この実験では、フローサイトメトリーによる分析を行う前に、L N C a P 細胞をまず無関係のヒト I g G₁ か P S M A 特異性 H u M A b のいずれかで処理し、十分に洗浄し、F I T C 標識された個別の H u M A b で標識付けした。無標識 H u M A b が F I T C 標識された H u M A b の結合を阻止する能力を調べた。無関係のヒト I g G₁ で前処理した細胞を用いた場合、F I T C 標識抗体への強力な結合が認められた。対照的に、抗 P S M A 特異性 H u M A b で前処理した場合は、各ケースにおいて実質的に F I T C 標識された抗体の結合に対する実質的な障害が起こっていた。総合すれば、このデータから 7 F 1 2 および 1 6 F 9 の、他の H u M A b への競合的な結合挙動が最も類似していることがわかる。抗体の対を変えることで、結合障害の程度においてわずかのばらつきが認められる。例えば、8 C 1 2 は、4 A 3、8 A 1 1 および 8 C 1 2 結合を効率的に障害するが、7 F 1 2 に対してはあまり効果を示さない。全般的に見て、僅かに異なるが、接近して分散している高次構造エピトープがこれらの抗体によって認識される。

20

30

【 0 2 4 8 】

マウス P S M A 高次構造抗体に対する H u M A b 結合の競合: 1 G 9、3 C 6、および 4 D 4 と称されたマウス P S M A 特異性抗体を開発した。それらは、蛋白質高次構造エピトープをも指向するものである。抗体の競合の研究は、フローサイトメトリーによって測定されるように、抗体 1 G 9、3 C 6、および 4 D 4 を用いて行われ、H u M A b がマウス抗体と共通するエピトープを認識するかどうかを測定した。無標識 H u M A b が F I T C 標識 1 G 9、3 C 6 および 4 D 4 の結合をブロックすることができるかどうかを試験した。L N C a P 細胞を H u M A b で前処理した後、F I T C マウス 4 D 4 および 1 G 9 で標識したところ、明らかな障害をほとんど、あるいは全く生じなかった。対照的に、H u M A b 4 A 3、7 F 1 2、8 A 1 1、8 C 1 2 および 1 6 F 9 による、F I T C - 3 C 6 の有意な障害が認められ、3 C 6 によって認識されるように、エピトープと類似のまたは接近して分布するエピトープにそれぞれ結合することが示されている。

40

【 0 2 4 9 】

L N C a P 細胞上での P S M A への高次構造 H u M A b の結合親和性: P S M A H u M A b は、P S M A の未変性の高次構造に高度に感受性を示す。親和性定数を求めるための精製 P S M A を用いた数多くの実験から、信頼できる、または再現可能な結果は得られていない。生存可能な L N C a P 細胞において発現される未変性の P S M A からのいく

50

つかの親和性結合の情報を得るために実験を行った。各抗体の、未変性 P S M A に対する結合親和性を試験するために、過剰の F I T C 標識二次抗体を持つ固定数 (1×10^6) の L N C a P 細胞について、一次抗体濃度を变化させたフローサイトメトリーアッセイを用いた。表 4 のデータは、細胞標識強度における最大シフトの半値をもたらすのに必要な抗体濃度として表された結果を示す。これらの結果から、最も高い結合親和性が、抗体 4 A 3、7 F 1 2 および 1 6 F 9 を用いたときに認められることが証明された。抗体 8 C 1 2 が約 3 倍低い結合親和性を有し、次いで、抗体 8 A 1 1 が高親和性抗体より約 2 0 倍低い結合親和性を有している。

【 0 2 5 0 】

【 表 4 】

TABLE 4

抗体	最大シフトの1/2に必要な抗体 (μ /ml)
7F12	7
4A3	9
16F9	10
8C12	28
8A11	195

【 実施例 5 】

【 0 2 5 1 】

ヒト抗 P S M A 抗体の A D C C および C D C 活性および二重特異性

I . ヒト抗 P S M A 抗体の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) 活性 抗 P S M A H u M A b が抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) または補体依存性細胞傷害 (C D C) を媒介する能力を、二人のドナーからの P B M C を用いた実験において、上記実施例に記載の高次構造抗体について試験した。図 5 A および B に示した結果は、各 H u M A b について強い A D C C を示している。各 H u M A b は、陽性対照としてのハーセプチンと類似の力価を持ち、類似の反応性を有している (図 5 B) 。 C D C 活性はいずれの H u M A b についても認められなかった (データは示さず) 。

【 0 2 5 2 】

I I . ヒト抗 P S M A 二重特異性抗体の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) の活性 : 二重特異性分子 1 4 A 8 \times 8 C 1 2 (図 6 に示す) およびモノクローナル抗体 8 C 1 2 を、標識された P S M A 発現腫瘍細胞の多形核細胞媒介性の A D C C 死滅について試験した。

【 0 2 5 3 】

特に、単核細胞 (単球および好中球) ならびに全血を健康なドナーから単離し、二重特異性分子 1 4 A 8 \times 8 C 1 2 の存在下で 51 C r 標識された P S M A 発現腫瘍細胞とインキュベートした。約 4 時間後、ウェルの培養液上清を収集して 51 C r の放出量をガンマ線カウンタで測定した。パーセント比溶解率は、 (実験的 C P M - 標的漏出 C P M) / (界面活性溶解 C P M - 標的漏出 C P M) \times 1 0 0 % という式で求めた。図 7 A、8 A、および 9 A に示す結果から、対照抗体と比較して、1 4 A 8 \times 8 C 1 2 が、それぞれ単球、好中球、全血による、投与量依存的な腫瘍細胞溶解を媒介していることが示される。

【 0 2 5 4 】

また、単核細胞および全血も、二重特異性分子 1 4 A 8 \times 8 C 1 2 またはモノクローナル抗体 8 C 1 2 (図 7 B、7 C、8 B、および 9 B) のいずれかの存在下で、 51 C r 標

10

20

30

40

50

識された L N C a P 腫瘍細胞とインキュベートした。L N C a P 細胞を、単細胞および全血とともに各種濃度の二重特異性またはモノクローナル抗体とインキュベートする前に、 37°C で 1 時間、 100mCi の ^{51}Cr で標識した ($5\%\text{CO}_2$)。16 時間インキュベーションを行った後、上清を収集して上述のように放射活性について分析した。

【0255】

単球誘発 A D C C : 図 7 A に示すように、二重特異性分子 $14\text{A}8 \times 8\text{C}12$ は、単球による P S M A 発現腫瘍細胞の細胞死滅を投与量依存的に媒介した。さらに $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の $14\text{A}8\text{Fab}'_2$ を加えたところ、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の二重特異性分子 $14\text{A}8 \times 8\text{C}12$ による腫瘍細胞の A D C C を完全に阻止したことから、標的細胞の死滅はエフェクター細胞上の C D 8 9 のみにより媒介されたことが証明された。図 7 B に示すように、二重特異性分子 $14\text{A}8 \times 8\text{C}12$ およびモノクローナル抗体 $8\text{C}12$ も、単球による L N C a P 腫瘍細胞の投与量依存的な細胞溶解を媒介した。さらに、 $\text{H}22\text{F}(\text{ab})'_2$ (ヒト化抗 F c R I) との場合と比較して、過剰の $14\text{A}8\text{F}(\text{ab})'_2$ を加えた場合、二重特異性分子 $14\text{A}8 \times 8\text{C}12$ による腫瘍細胞の A D C C を完全に阻害したことから、標的細胞の死滅は C D 8 9 を介して媒介されることが証明された (図 7 C 参照)。

10

【0256】

好中球誘発 A D C C : 図 8 A に示すように、二重特異性分子 $14\text{A}8 \times 8\text{C}12$ は、好中球による P S M A 発現腫瘍細胞の細胞死滅を投与量依存的に媒介した。さらに $25\mu\text{g}/\text{ml}$ の $14\text{A}8\text{Fab}'_2$ を加えたところ、二重特異性分子による腫瘍細胞の A D C C を有意に阻止したことから、標的細胞の死滅はエフェクター細胞上の C D 8 9 のみにより媒介されたことを証明された。図 8 B に示すように、二重特異性分子 $14\text{A}8 \times 8\text{C}12$ も、好中球による L N C a P 腫瘍細胞の投与量依存的な細胞溶解を媒介した。さらに、 $\text{H}22\text{F}(\text{ab})'_2$ (ヒト化抗 F c R I) の場合と比較して、過剰の $14\text{A}8\text{F}(\text{ab})'_2$ を加えた場合、二重特異性分子 $14\text{A}8 \times 8\text{C}12$ による腫瘍細胞の A D C C を完全に阻害したことから、標的細胞の死滅は C D 8 9 を介して媒介されることが証明された。

20

【0257】

全血誘発 A D C C : 図 9 A に示すように、二重特異性分子 $14\text{A}8 \times 8\text{C}12$ は、全血による P S M A 発現腫瘍細胞の細胞死滅を投与量依存的に媒介した。さらに $25\mu\text{g}/\text{ml}$ の $14\text{A}8\text{Fab}'_2$ を加えたところ、二重特異性分子による腫瘍細胞の A D C C を有意に阻止したことから、ここでも、標的細胞の死滅はエフェクター細胞上の C D 8 9 のみにより媒介されていることが証明された。同様に、図 9 B に示すように、二重特異性分子 $14\text{A}8 \times 8\text{C}12$ も全血による L N C a P 腫瘍細胞の投与量依存的な細胞溶解を媒介した。さらに、 $\text{H}22\text{F}(\text{ab})'_2$ (ヒト化抗 F c R I) の場合と比較して、過剰の $14\text{A}8\text{F}(\text{ab})'_2$ を加えた場合、二重特異性分子 $14\text{A}8 \times 8\text{C}12$ による腫瘍細胞の A D C C を完全に阻害したことから、標的細胞の死滅は C D 8 9 を介して媒介されることが証明された。

30

【0258】

I I I . ヒト抗 P S M A 抗体および二重特異性抗体はヒトエフェクター細胞の存在下で P S M A 発現腫瘍細胞の貪食作用および死滅を媒介する : 二重特異性分子 $14\text{A}8 \times 8\text{C}12$ およびモノクローナル抗体 $8\text{C}12$ が、標識された P S M A 発現腫瘍細胞 (L N C a P 細胞) 単独で、および過剰 $14\text{A}8$ (ヒト抗 F c R) Fab'_2 抗体または対照としての過剰 $\text{H}22$ (ヒト化抗 F c R I) Fab'_2 抗体の存在下における貪食作用を媒介する能力について試験した。

40

【0259】

簡単に説明すると、単球由来マクロファージ (M D M) による L N C a P 細胞の二重特異性媒介性の貪食作用を、Munnら (1990) J. Exp. Med. 172:231-237により記載の方法を改変した方法により試験した。正常な成人を供給源とするロイコパック (A B I) から精製した単球を、 24 ウェルプレート ($1 \times 10^6/\text{ml}$) において、 $10\%\text{FBS}$ および $10\text{ng}/\text{ml}$ の M - C S F を補足したマクロファージ無血清培地 (Gibco, Grand Islan

50

d、NY)で7~12日間、分化させた。LNCaP細胞を親油性赤色蛍光染色剤、PKH26 (Sigma、St. Louis、MO)で標識した。標識したLNCaP細胞を二重特異性抗体(または対照抗体)の非存在下または存在下でMDMを含有するウェルに加え、37℃で5~24時間(5%CO₂)インキュベートした。MDMおよび未貪食LNCaP細胞をトリプシンで回収し、FITC標識抗CD33 mAb(251)および抗CD14 mAb(AML-2-23)で氷上(4℃)で1時間染色した。細胞を洗浄し、FACSscanを用いて二色蛍光により分析した。パーセント貪食率は、二重陽性標的細胞数(MDMにより取り入れられたもの)/全標的細胞数×100%で求めた。

【0260】

図10に示すように、二重特異性分子14A8×8C12は、腫瘍細胞の特異的貪食作用の増加を投与量依存的に媒介した。14A8 Fab'₂を加えたところ、二重特異性分子による腫瘍細胞の貪食作用を有意に阻止し、ここでも標的とされた貪食作用が、エフェクター細胞に結合するCD89により特異的に媒介されることが示された。同様に、図11に示すように、二重特異性分子14A8×8C12およびモノクローナル抗体8C12も、LNCaP細胞の貪食作用を投与量依存的に媒介した。図12から、14A8×8C12が媒介するLNCaP腫瘍細胞の貪食作用は、H22F(ab)₂(ヒト化抗FcRI)の場合と比較して、過剰14A8F(ab)₂を加えることにより阻害されたことから、CD89を介して媒介されていたことがわかる(図12、挿入図参照)。

【0261】

前述の実施例は、PSMAに高親和性で特異的に反応するヒトモノクローナル抗体の作製および二重特異性を説明している。これらの抗体および二重特異性は、直線状アミノ酸配列により決定されるエピトープよりも、分子の細胞外ドメインに存在する未変性高次構造蛋白質エピトープを認識する。さらに、ヒト抗PSMA抗体およびその二重特異性分子は、エフェクター細胞の存在下において、高レベルのPSMAを発現するヒト腫瘍細胞に対する細胞死滅および貪食作用を媒介する。

【実施例6】

【0262】

ヌードマウスにおけるLNCaP細胞腫瘍に対する¹²⁵I標識ヒト抗PSMA抗体の体内分布

LNCaP細胞腫瘍を保有するヌードマウスにおける¹²⁵I標識HuMAbの体内分布を、下記の標識抗体の正常組織および腫瘍組織への時間依存的取り込みによって調べた。2つのHuMAbs、4A3および7F12についての結果を得た。まず、結合親和性研究および適切な抗体蛋白質の取得可能性に基づいて抗体7F12を用いた。しかしながら、続く実験では、7F12のヨード処理が実際にはこの抗体が抗原に結合する能力を失わせることを証明している。したがって、有用なデータは、4A3からのみ得られた。4A3の結果を図13に示す。それは、標識抗体は、最初は血液中および高度に血管新生化した組織に優先的に存在することを示している。これは、24時間後、腫瘍取り込みが起こり、腫瘍の標識が正常組織に対して最高になった(正常組織と比較して2倍以上の標識化された組織が認められる)とき減少する。したがって、腫瘍に対する有意な体内分布が起こる。取り込み後の経時的な腫瘍標識の広がり、部分的に、循環抗体のレベルの減少および標識抗体蛋白質フラグメントからの放出とともに抗体に結合する抗体内在化の関数でもある。

【実施例7】

【0263】

LNCaP細胞による、¹²⁵I標識ヒト抗PSMA抗体の内在化の分析

TCA可溶性¹²⁵I数への培養上清の時間依存性放出を分析することによって、¹²⁵I標識HuMAb蛋白質の内在化をモニターした。ヨード処理した抗体で表面が標識された、LNCaP細胞を37℃でインキュベートし、その培養上清を除去し、TCAを析出させ、そして上清画分中に存在する¹²⁵I標識の量を図14に示された時間において測定した。その結果は、ヨード処理した抗体4A3、16F9および8A11がゼロ時点

10

20

30

40

50

で、効果的に L N C a P 細胞を標識し、該細胞へ効率的に内在化し、分解され、そして蛋白質画分が培養上清中に放出されたことを示している。これらの抗体のそれぞれでの 18 時間のインキュベーション後、もともと結合していた抗体の約 50% を T C A 可溶性画分中で回収した。

【0264】

ヨード処理された H u M A b 7 F 1 2 および 8 C 1 2 について、異なる細胞結合および内在化の結果が得られた。特に、有意に低い合計 L N C a P 細胞標識を、ヨード処理した 7 F 1 2 および 8 C 1 2 抗体を用いて見出した。それは、ヨード処理が標識抗体の抗原への結合に影響を持つかもしれないことを示唆している。この仮説を試験するために、固定化した未変性の精製 L N C a P 細胞 P S M A およびヨード処理した H u M A b を用いて、固相結合アッセイを行った。図 15 に示された結果から、陽性対照ヨード処理 4 A 3 抗体の P S M A への結合が確認された。また、ヨード処理が 7 F 1 2 および 8 C 1 2 の双方の抗体が抗原に結合することをできなくすることが証明された。したがって、抗体 7 F 1 2 および 8 C 1 2 の内在化率は、¹²⁵I 標識 7 F 1 2 および 8 C 1 2 抗体では調べることはできない。

10

【実施例 8】

【0265】

H u M A b 4 A 3 および 7 F 1 2 の D O T A 標識の P S M A への結合に及ぼす影響
抗体を D O T A 標識し、それが抗体の抗原への結合に及ぼす影響を E L I S A によって試験した。D O T A (テトラアザシクロデカンテトラ酸性酸) は、放射性核種を錯体化するために用いることができる一般的なキレート剤である。図 16 に示した結果は、D O T A 標識抗体は、高い抗原結合能力を維持しており、それがこれらの抗体が放射性金属のキレートを形成するのに有用であることが示された。

20

【実施例 9】

【0266】

ヒト抗 P S M A 抗体の正常および悪性ヒト組織への結合の、免疫組織化学による組織反応性

P S M A に存在する高次構造エピトープに特異的な 5 つの H u M A b の結合の免疫組織化学的分析を、正常および悪性ヒト組織の凍結切片を用いた交差反応性スクリーニングに適用した。各組織型の単一標本から得られた結果から、前立腺内皮および非前立腺悪性病変または正常組織の腫瘍血管内皮に対する強力な結合が証明された。前立腺癌内の血管内皮に染色は観察されなかった。非腫瘍性組織からの腺性上皮の変化する活性、脳組織の潜在的な交差反応性、および空腸および肝臓のクッパー細胞のリンパ球の染色を含む、他のより弱い反応性が観察された。これらの「正常」組織のいくつかは、隣接するもしくは近接する腫瘍からの強い腫瘍血管染色を示す、同じドナーから得られたとすれば、得られた非前立腺染色結果については疑問がある。リンパ球染色は、原発腫瘍からの抗原の取り込みによるのかもしれない。他の組織およびエレメントは、これらの抗体に関しては陰性であった。調べた 5 つの H u M A b の間の I H C を介しての組織反応性には有意差はなかった。

30

【実施例 10】

【0267】

結合親和性

抗 P S M A H u M A b の結合親和性を、L N C a P を用いた、一連のチューブの細胞に対して H u M A b を希釈した、フローサイトメトリーによって測定した。結合した抗体の量を、飽和量に存在する F I T C 標識二次抗体を用いて測定した。最大シフト (シフトは、飽和 H u M A b を用いて認められた) の 1/2 に必要な抗体蛋白質の量として分析された量であるデータを以下に示す。

【0268】

40

【表 5】

TABLE 5

抗体	最大シフト1/2に必要な抗体 (μml)
7F12	7
4A3	9
16F9	10
8C12	28
8A11	195

10

【0269】

HuMAb 4A3および7F12の更なる親和性の研究は、放射性標識抗体 (^{125}I -DOTA-標識抗体) および固定数のLNCaP細胞への結合を利用した。その得られた抗体結合データを用いてスキャッチャード分析を行った。両抗体 (4A3および7F12) の結果から、類似する親和性定数 $K_D = 0.5 \pm 0.1 \text{ nM}$ すなわち 10^{-10} M が示された。

【実施例11】

20

【0270】

V領域クローニング

mRNA単離およびcDNA合成キット (Invitrogen、Carlsbad、CA) を用いて、抗PSMAハイブリドーマからポリA⁺ mRNAおよび第1鎖cDNAを調製した。4A3、7F12および8C12のV領域を、ヒトV_H およびV_L (またはV_H) シグナル配列に対応する5'末端プライマーのパネルを利用したポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅した。8A11および16F9のV領域は、フレームワーク1内の成熟V領域配列の5'末端に結合するプライマーを使用して増幅した。3' V_H およびV_L のPCRプライマーはそれぞれ以下の配列、すなわち、TGCCAGGGGGGAAGACCGATGG (配列番号57) およびCGGGGAAGATGAAGACAGATG (配列番号58) を含有していた。配列中の潜在的なPCR誘発性の変化をモニターするためにPCR、クローニングおよび配列を行った。

30

【0271】

結語

これまでに述べた実施例は、ヒトPSMA上の高次構造エピトープに特異性を示す5つの完全長ヒトモノクローナル抗体、ならびに該抗体を含有する治療用二重特異性物質の作製について説明した。5つの抗体は全て、未変性の、変性されていないPSMAに対して高い抗原特異性および反応性を有していた。該抗体は、PSMA発現細胞に効率的に内在化し、強力な抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) 活性を有し、動物モデルにおいてPSMAを発現する腫瘍へ体内分布し、ヒト組織の免疫組織化学的研究においても類似の性能をもつ。これらの結果は、本発明のPSMAに対する完全ヒトモノクローナル抗体およびそのフラグメントおよび二重特異性分子が、PSMA関連疾患の診断および治療に有用であろう、という考察を支持するものである。

40

【0272】

等価物 当業者であれば、ごく通常の実験を用いるのみで、ここに説明した本発明の特定の実施例の等価物を数多く認識し、または確認できることであろう。このような等価物は、上述の請求の範囲の包含するところである。

【0273】

引用による援用 全ての特許、係属中の特許出願および本明細書において引用されている他の文献を引用によってその全体を援用する。

50

【図面の簡単な説明】

【0274】

【図1】図1は、HuMAb 11C10と、全長PSMAおよびアミノ酸1～173、134～437および438～750に対応するPSMAフラグメントを含有する細菌的に発現した融合蛋白質との反応性（固相ELISA）を示す棒グラフである。このアッセイは、マウス7E11抗体を対照として用いて行った。

【図2】図2は、ヒト抗PSMAモノクローナル抗体と、ヒト前立腺腺癌のLNCaP細胞およびPC3細胞からの膜画分との反応性（固相ELISA）を示すグラフである。405nmにおけるバックグラウンド吸収は0.05であった。

【図3】図3は、単離されたPSMAの熱変性が抗体の結合に及ぼす影響を示す棒グラフである。熱変性を行った、および熱変性を行っていない精製PSMAを96ウェルプレート上にコーティングし、指示された抗体で処理した。結合した抗体をELISAによって検出した。

【図4】図4は、HuMAbを使用した、LNCaP細胞の界面活性剤ライセートからのPSMAの免疫沈降を示す。免疫沈降した蛋白質は、SDSゲル電気泳動によって分離し、PVD膜上にプロットし、マウス抗PSMA 4D8抗体でプローブした（レーン2～7）。レーン1は、LNCaP細胞ライセートの全体を示す。レーン2～7は、下記の抗体、すなわち、無関係のヒトIgG1、4A3、7F12、8A11、8C12および16F9をそれぞれ用いた免疫沈降を示す。PSMAおよびPSM'の位置を矢印で示している。

【図5】図5は、二人のドナー（パネルAおよびB）からのPBMC'とともにLNCaP細胞標的を用いたHuMAb 4A3、7F12、8A11、8C12および16F9の抗体依存性細胞性傷害（ADCC）反応を測定したグラフを示す。それぞれE:Tの比率は100:1とした。

【図6】図6は、CD89（Fc R）およびPSMAに結合する完全ヒト二重特異性分子、14A8×8C12を示す。この分子は、抗PSMA Fab'抗体フラグメント（ヒトモノクローナル抗PSMA抗体、8C12に由来）に、ジスルフィド結合によって化学的に結合した抗CD89 Fab'抗体フラグメント（ヒトモノクローナル抗CD89抗体、14A8に由来）を含有している。

【図7】図7のパネルAは、図6に示した14A8×8C12二重特異性分子を介した、PSMA発現細胞の単球媒介抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を、二重特異性分子濃度の関数で示すグラフである。結果は、阻害因子を添加しない、50μg/mlのフリーの抗FcR R（14A8）F（ab'）2および50μg/mlのフリーの抗Fc R I（H22）F（ab'）2を用いた比細胞溶解率で測定した。パネルBは、二重特異性分子14A8×8C12およびモノクローナル抗体8C12を介した、LNCaP細胞の単球媒介抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を示すグラフで、エフェクター：標的比が100:1である場合を示すグラフである。パネルCは、阻害因子が存在しない場合の、または過剰量の（14A8）F（ab'）2もしくはH22F（ab'）2の存在下での14A8×8C12二重特異性分子を介した、LNCaP細胞の単球媒介抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を示すグラフで、エフェクター：標的比が100:1である場合を示すグラフである。

【図8】図8のパネルAは、図6に示した14A8×8C12二重特異性分子を介した、PSMA発現細胞の好中球媒介抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を、二重特異性分子濃度の関数で示すグラフである。結果は、阻害因子を添加しない、25μg/mlのフリーの抗FcR R（14A8）F（ab'）2および25μg/mlのフリーの抗Fc R I（H22）F（ab'）2を用いた比細胞溶解率で測定した。パネルBは、阻害因子が存在しない場合の、または過剰量の（14A8）F（ab'）2もしくはH22F（ab'）2の存在下での、14A8×8C12二重特異性分子を介した、LNCaP細胞の単球媒介抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を示すグラフで、エフェクター：標的比が200:1である場合を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 9】図 9 のパネル A は、図 6 に示した 1 4 A 8 × 8 C 1 2 二重特異性分子を介した、P S M A 発現細胞の全血媒介抗体依存性細胞傷害性 (A D C C) を、二重特異性分子濃度の関数で示すグラフである。結果は、阻害因子を添加しない、2 5 μ g / m l のフリーの抗 F c R R (1 4 A 8) F (a b ') 2 および 2 5 μ g / m l のフリーの抗 F c R I (H 2 2) F (a b ') 2 を用いた比細胞溶解率で測定した。パネル B は、阻害因子が存在しない場合の、または過剰量の 1 4 A 8 F (a b ') 2 もしくは H 2 2 F (a b ') 2 の存在下での 1 4 A 8 × 8 C 1 2 二重特異性分子を介した L N C a P 細胞の全血媒介抗体依存性細胞傷害性 (A D C C) を示すグラフである。

【図 1 0】図 1 0 は、単球由来マクロファージ (M D M) (丸) による P S M A 発現 (L N C a P) 細胞の二重特異性分子 (1 4 A 8 × 8 C 1 2) 媒介貪食作用を示すグラフである。結果は、阻害因子としての過剰の 1 4 A 8 抗体 (正方形) および対照としての H 2 2 抗体 (菱形) の存在下または不存在下の両方における貪食作用の割合を測定した。

【図 1 1】図 1 1 は、単球由来マクロファージ (M D M) による L N C a P 腫瘍細胞の二重特異性分子 (1 4 A 8 × 8 C 1 2) 媒介貪食作用および抗体 (8 C 1 2) 媒介貪食作用を示すグラフである。

【図 1 2】図 1 2 は、単球由来マクロファージ (M D M) (丸) による L N C a P 腫瘍細胞の二重特異性分子 (1 4 A 8 × 8 C 1 2) 媒介貪食作用を示すグラフである。挿入図は、過剰 1 4 A 8 F (a b ') 2 または H 2 2 F (a b ') 2 の存在下で 1 4 A 8 × 8 C 1 2 二重特異性分子 (1 μ g / m l) が媒介する貪食作用を示すグラフである。

【図 1 3】図 1 3 は、L N C a P 細胞腫瘍を持つヌードマウスにおける ^{1 2 5} I - 4 A 3 の体内移動を示す棒グラフである。動物に対して 1 0 0 μ g の ^{1 2 5} I - 4 A 3 を尾部静脈から注射し、注射の 0 . 2 5 および 2 4 時間後、動物を殺した。核組織内に存在する放射活性量を測定した。このデータは、それぞれの時間において 2 つの動物から得られた結果を示している。

【図 1 4】図 1 4 は、^{1 2 5} I - 標識 H u M A b の、培養液中の L N C a P 細胞による細胞内在化および処理を示すグラフである。L N C a P 細胞をヨード処理した抗体で標識し、十分に洗浄し、T C A 可溶性製造物に内在化し、変換された標識に結合している細胞表面の量を、指示された時間に測定した。結果は、ヨード処理後、抗原結合性を維持している 3 つの H u M A b、ならびに陰性対照として無関係のヒト I g G₁ について示している。

【図 1 5】図 1 5 は、^{1 2 5} I でのヨード処理が、いくつかの抗 P S M A H u M A b の抗原結合能力に及ぼす効果を示すグラフである。この結果は、固定化された未変性の精製 L N C a P P S M A に結合した ^{1 2 5} I 標識 H u M A b の量を、抗体の希釈因子の関数で示す。

【図 1 6】図 1 6 は、D O T A 標識がいくつかの抗 P S M A H u M A b の抗原結合能力に及ぼす影響を示すグラフを含む。この結果は、D O T A 標識 H u M A b、または P S M A に結合した抱合していない抗体の量を、E L I S A によって測定することによって、抗体の量の滴定の関数で示す (単位: μ g / m l)。

【図 1 7】図 1 7 A および B は、各 H u M A b 4 A 3、7 F 1 2、8 C 1 2、8 A 1 1、および 1 6 F 9 からの V_H および V_L 領域のヌクレオチド配列をそれぞれ示す。

【図 1 8】図 1 8 は、H u M A b 4 A 3、7 F 1 2、8 A 1 1、8 C 1 2、1 6 F 9 の重鎖 V 領域のヌクレオチド配列と、対応する鎖 V 領域の生殖細胞系列ヌクレオチド配列との配列比較である。

【図 1 9】図 1 9 は、H u M A b 4 A 3、7 F 1 2、8 A 1 1、8 C 1 2、1 6 F 9 の重鎖 V 領域のアミノ酸配列と、対応する鎖 V 領域の生殖細胞系列アミノ酸配列との配列比較である。

【図 2 0】図 2 0 は、H u M A b 4 A 3、7 F 1 2、8 C 1 2 の軽 () 鎖 V 領域のヌクレオチド配列と、対応する鎖 V 領域の生殖細胞系列ヌクレオチド配列の配列比較である。

【図 2 1】図 2 1 は、H u M A b 8 A 1 1、1 6 F 9 の軽 () 鎖 V 領域のヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド配列と、対応する鎖V領域の生殖細胞系列ヌクレオチド配列の配列比較である。

【図22】図22は、HuMAb 4A3、7F12、8C12の軽()鎖V領域のアミノ酸配列と、対応する鎖V領域の生殖細胞系列アミノ酸配列との配列比較である。

【図23】図23は、HuMAb 8A11、16F9の軽()鎖V領域のアミノ酸配列と、対応する鎖V領域の生殖細胞系列アミノ酸配列との配列比較である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Medarex, Inc. et al.

<120> HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES TO PROSTATE
SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN (PSMA)

10

<130> MXI-163CPPC

<150> 10/059989

<151> 2002-01-28

<150> PCT/US00/20247

<151> 2000-07-26

<150> 60/146285

<151> 1999-07-29

<150> 60/158759

<151> 1999-10-12

20

<150> 60/188087

<151> 2000-03-09

<160> 58

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaggtgcagt tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaagatc 60
tctctgtaagg gttctggata cagttttacc agctactgga tgggctgggc gcgccagatg 120
occggaag gcttgagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
agccgctcct tccaaggcca ggccaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgttc ggccgctaata 300
tcttctcact ggtacttcga tctctggggc cgtggcaccg tggtcactgt ctctca 357

30

<210> 2

<211> 325

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctgggtcca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcaccaaca gggccactgg catccagcc 180
aggttcagtg gcagtggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctcatgta cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caaac 325

40

<210> 3

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3
 caggtgcagc tgcaggagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tctgttaagg gttctggata tagttttacc agcttctgga tcggctgggc gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtggg gtagcctgaa ggccctggac accgccatgt attactgtgc gaccgctaac 300
 tctcttttct ggaatttcga tctctggggc cgtggcacc cgtgcaactgt ctctca 357

<210> 4
 <211> 325
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctcatgta cacttttggc 300
 caggggacca agctggagat caaac 325

10

<210> 5
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaacgc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tctgttaagg gctctggata cacttttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcccgagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctct tccaaggcca ggtcaccctc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtggg acagcctgaa gacctcggac accgccatgt attactgtgc gaccgctaac 300
 cctcttatt ggtatttcga tctctggggc cgtggcacc cgtgcaactgt ctctca 357

20

<210> 6
 <211> 325
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcgact ggctcatgta cacttttggc 300
 caggggacca agctggagat caaac 325

30

<210> 7
 <211> 341
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 agtctggagc agaggtgaaa acgcccgggg agtctctgaa gatctcctgt aagggtctgt 60
 gatacacctt taccactac tggatcggtt ggtgcccga gatgcccgg aaaggccgg 120
 agtggatggg gatcatctat cctggtgact ctgataccag atacagcccg tcttccaag 180
 gccaggctac ctctcagcc gacaagtcca tcagaccgc ctacctgag tggagcagcc 240
 tgaagacctc ggacaccgcc atgtattact gtgcgaccgc taacctctct tatttgtatt 300
 tcgatctctg gggccgtggc accctggtca ctgtctctc a 341

40

<210> 8
 <211> 302
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagcgtcacc atcacttgcc gggtagtca 60
 gggcattagc agttatttaa attggtatcg gcagaaacca gggaaagttc ctaagctcct 120
 gatctatagt gcatccaatt tgcaacctgg agtcccatct cggttcagtg gcagtggatc 180
 tgggacagat ttcactctca ctatcaacag cctgcagcct gaagatggtg caacttatta 240
 cggtaacgga acttacaatg ccccatcac tttcgccctt gggaccaaag tggatatcaa 300
 ac 302

<210> 9
 <211> 341
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 agtctggagc agaactgaaa aagcccgagg agtctctgaa gatctcctgt aagggttctg 60
 gatacagttt taccaactac tggatcggct gggcgcgcca gatgcccgga aaaggcctgg 120
 agtggatggg gatcatctat cctggtgact ctgataccag atacagtcctg tccttccaag 180
 gccaggtcac catctctgcc gacaagtccg tcagcaccgc ctacctgcag tggaaacagtc 240
 tgaaggcctc ggacaccgcc atgtattact gtgcgaccgc taactcctct ttctggaact 300
 tcatctctctg gggccgtggc acctggttca ctgtctctctc a 341

<210> 10
 <211> 302
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc atcacttgcc gggtagtca 60
 gggcattagc agttatttaa attggtatcg gcagaaacca gggaaagttc ctaagctcct 120
 gatgtatagt gcatccaatt tgcaatctgg agtcccatct cggttcagtg gcagtggatc 180
 tgggacagat ttcactctca ctatcagcag cctgcagcct gaagatggtg caacttatta 240
 cggtaacgga acttacaatg ccccatcac tttcgccctt gggaccaaag tggatatcaa 300
 ac 302

<210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Ala Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Ala Ala Asn Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

10

20

30

40

115

<210> 12
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Phe
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Ala Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Ala Asn Ser Ser Phe Trp Asn Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 13
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Thr Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Thr Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Ala Asn Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

30

<210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Ser Gly Ala Glu Val Lys Thr Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys
 1 5 10 15
 Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg

40


```

      20      25      30
Gln Met Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly
      35      40      45
Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Phe
      50      55      60
Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu
      65      70      75      80
Lys Thr Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Asn Pro Ser
      85      90      95
Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
      100      105      110
Ser

```

10

```

<210> 15
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 15
Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys
1      5      10      15
Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp Ile Gly Trp Ala Arg
      20      25      30
Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly
      35      40      45
Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile
      50      55      60
Ser Ala Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu
      65      70      75      80
Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Thr Ala Asn Ser Ser
      85      90      95
Phe Trp Asn Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
      100      105      110
Ser

```

20

```

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 16
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
      20      25      30
Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
      35      40      45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
      65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met
      85      90      95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100      105

```

30

<210> 17
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 18
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asp Trp Leu Met
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

20

<210> 19
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 19
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys
 1 5 10 15
 Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys
 20 25 30
 Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 50 55 60
 Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr

40

```

65          70          75          80
Gly Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
          85          90          95
Val Asp Ile Lys
          100

```

```
<210> 20
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```

<400> 20
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 1          5          10
Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys
 20          25          30
Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln
 35          40          45
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 50          55          60
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr
 65          70          75
Gly Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 85          90          95
Val Asp Ile Lys
 100

```

```
<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 21
Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

```
<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 22
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
  1               5               10              15
Gly
```

```
<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 23
Ala Asn Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Ser Phe Trp Ile Gly
1 5

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 25
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Ala Asn Ser Phe Trp Asn Phe Asp Leu
1 5

20

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 28
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Ala Asn Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

10

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 32

Ala Asn Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

30

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 35

40

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Ala Asn Ser Ser Phe Trp Asn Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 38
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

30

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 41

40

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

10

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 44
Gln Gln Arg Ser Asp Trp Leu Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

30

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 47

40

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr
 1 5

<210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

10

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
 1 5

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 50
 Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe Thr
 1 5

<210> 51
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

30

40

<210> 52
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
 85 90

10

<210> 53
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Gly Gln Arg Thr Tyr Asn Ala Pro Phe
 85 90 95
 Thr Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100

20

<210> 54
 <211> 343
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<400> 54
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatctctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtggg gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gatactggta 300
 cttegatctc tggggccgtg gcaccctggg cactgtctcc tca 343

<210> 55
 <211> 283
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

40

```

<400> 55
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggtcctt catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggc 283

```

```

<210> 56
<211> 322
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 56
gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc ggggtgagtc gggcatttag agttatttaa attggtatcg gcagaaacca 120
gggaaagtgc ctaagctcct gatctatagt gcatccaatt tgcaatctgg agtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ctatcagcag cctgcagcct 240
gaagatgttg caacttatta cggtaacggt acttacaatg ccccatcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa ac 322

```

10

```

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 57
tgccaggggg aagaccgatg g 21

```

```

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

20

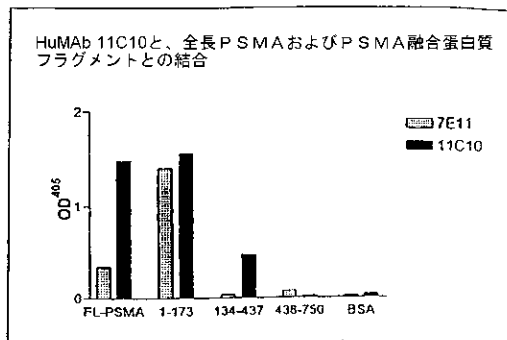
```

<400> 58
cgggaagatg aagacagatg 20

```

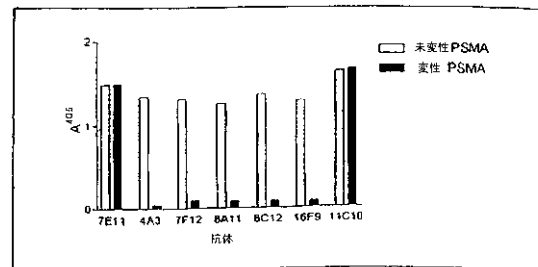
【図 1】

Figure 1



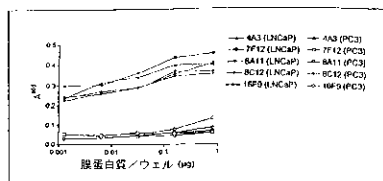
【図 3】

Figure 3



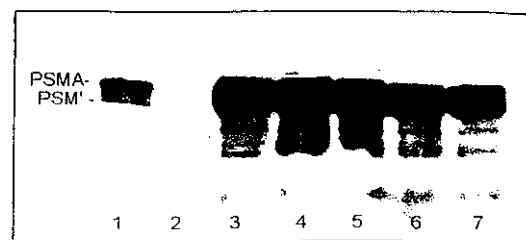
【図 2】

Figure 2



【図 4】

Figure 4



【図 5】

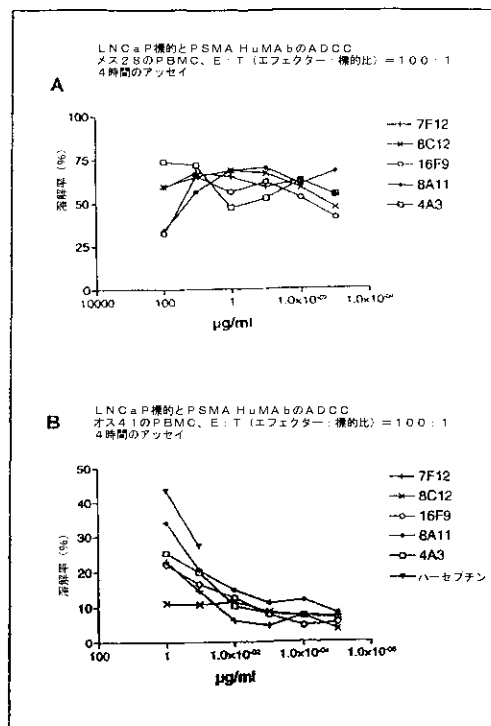


Figure 5

【図 6】

全長ヒト抗 PSMA 二価特異性抗体

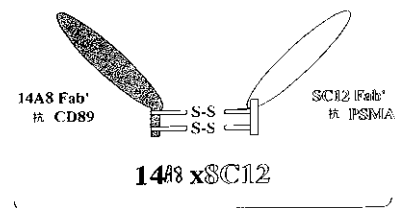


Figure 6

【図 7 A】

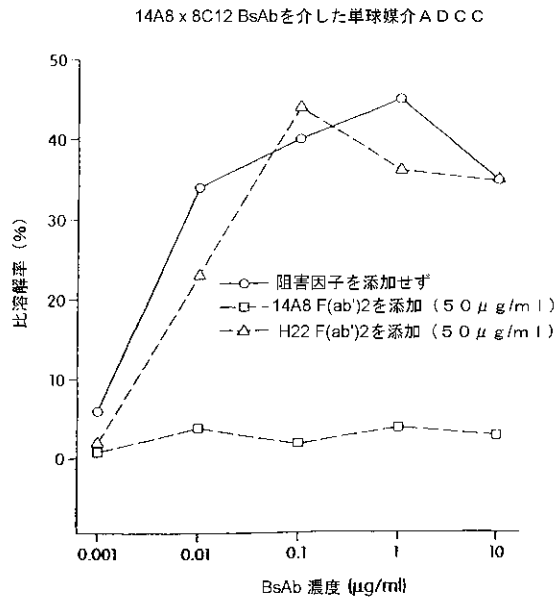


Figure 7A

【図 7 B】

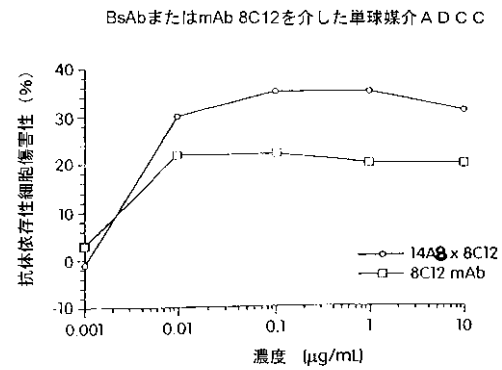


Figure 7B

【図 7 C】

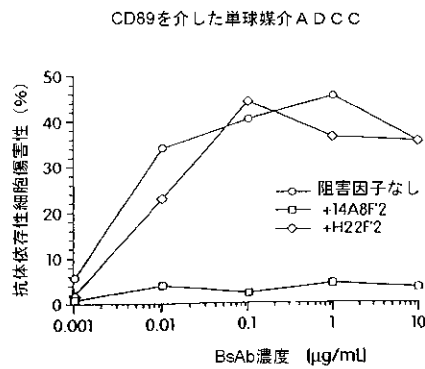


Figure 7C

【図 8 A】

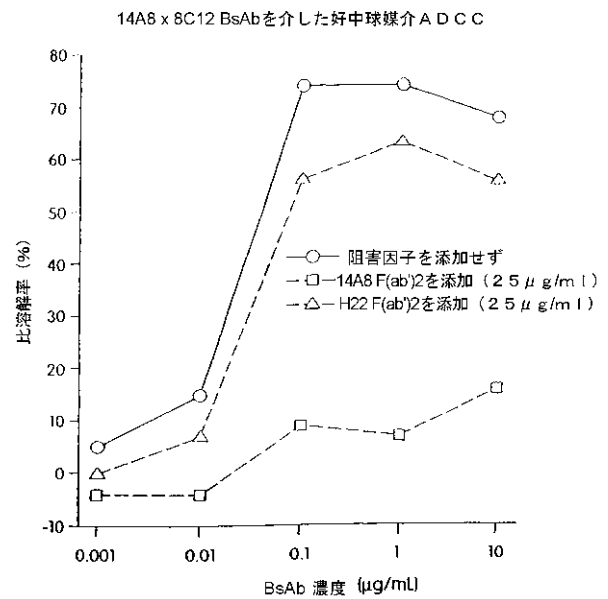
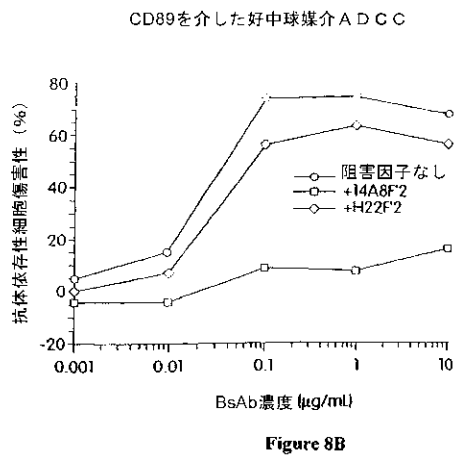
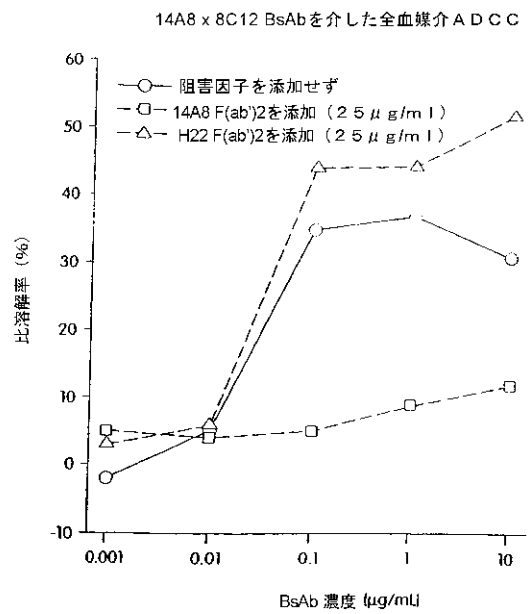


Figure 8A

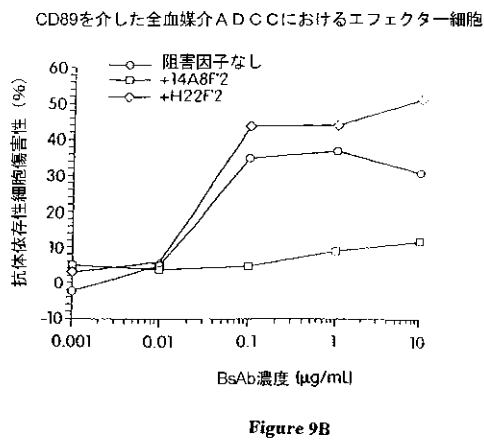
【図 8 B】



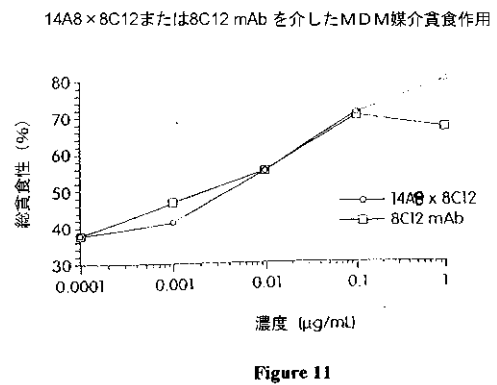
【図 9 A】



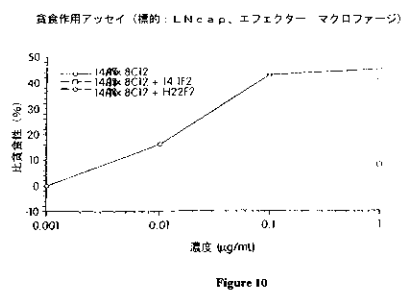
【図 9 B】



【図 1 1】



【図 1 0】



【図 12】

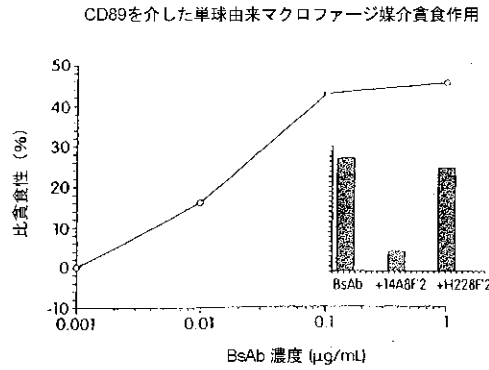


Figure 12

【図 13】

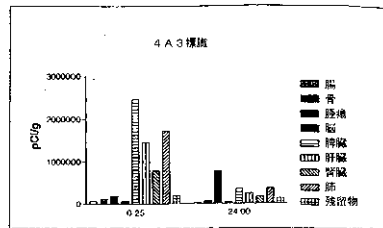


Figure 13

【図 15】

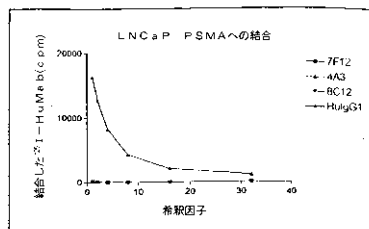


Figure 15

【図 16】

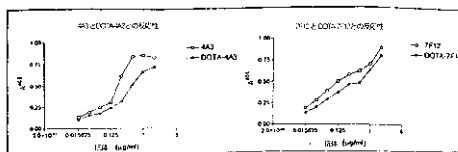


Figure 16

【図 14】

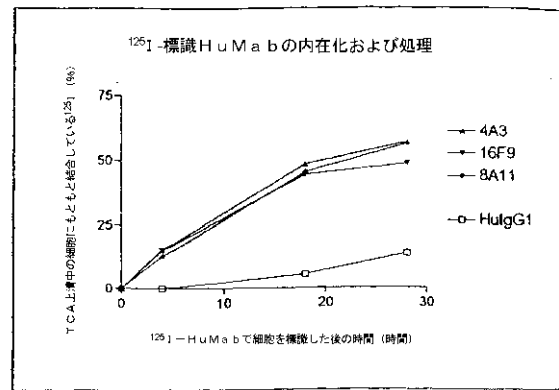


Figure 14

【図 17A】

Figure 17A

4A3 VH

GAGGTGCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAG
ATCTCCTGTAAGGGTCTGGATACAGTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGCGCGC
CAGATGCCCGGAAAGGCCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGAT
ACCAGATACAGCCCGTCTCTCCAAGGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACAGTCCATC
AGCACCGCTACCTGCAGTGGAGCAGCTGAAGGCCCTCGGACACCGCATGTATTAC
TGTTCGGCGCTAATTCTCTCAGTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTG
GTCACTGTCTCTCA

4A3 VK

GAAATTTGTGTTGACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
ACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTAGCCTGGTCCACACAG
AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCTCATCTATGATGATCAACAGGGCCACTGGC
ATCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACAGCGTAGCAACTGGCTC
ATGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

7F12 VH

CAGGTGCAGTGCAGAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAG
ATCTCCTGTAAGGGTCTGGATATAGTTTACCAGCTCTGGATCGGCTGGGCGCGC
CAGATGCCCGGAAAGGCCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGAT
ACCAGATACAGCCCGTCTCTCCAAGGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACAGTCCATC
AGCACCGCTACCTGCAGTGGAGTGGGTGAAGGCCCTCGGACACCGCATGTATTAC
TGTTCGGCGCTAATTCTCTTCTGGAAATTTGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTG
GTCACTGTCTCTCA

7F12 VK

GAAATTTGTGTTGACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
ACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTAGCCTGGTACCAACAG
AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCTCATCTATGATGATCAACAGGGCCACTGGC
ATCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACAGCGTAGCAACTGGCTC
ATGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

8C12 VH

GAGGTGCAGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAG
ATCTCCTGTAAGGGTCTGGATACAGTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGCGCGC
CAGATGCCCGGAAAGGCCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATCCTGGTGACTCTGAT
ACCAGATACAGCCCGTCTCTCCAAGGCCAGGTCAACATCTCAGCCGACAGTCCATC
AGCACCGCTACCTGCAGTGGAGCAGCTGAAGGCCCTCGGACACCGCATGTATTAC
TGTTCGGCGCTAACCCTCTTATTGGTATTTGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTG
GTCACTGTCTCTCA

【 2 1 】

Figure 21

04/014 VK
 8A11: GAC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC CTC TCT CCA TCT CTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GTG AGT
 16P9:

CDR1
 V 144814 : CAG GAC ATT AGC AGT TAT TTA AAT TCG TAT CCG CAG AAA CCA GCG AAA GTT CCT AAG CTC CTG ATC TAT ACT GCA TCC
 8A11:
 16P9:

CDR2
 V 144814 : AAT TTG CAA TCT GGA GTC CCA TCT CCG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GCG ACA GAT TTC ACT ATC AGC ACC CTG
 8A11:
 16P9:

CDR3
 V 144814 : CAG GGT GAA GAT GTT GCA ACT TAC TAC GGT CAA CCG ACT TAC AAT GCG CAG TTT ACT TTC GCG CCT GCG ACC AAA CTG
 8A11:
 16P9:

V 144814 : GAT ATC AAA C
 8A11:
 16P9:

【 2 2 】

Figure 22

CDR1
 L6 : E V L T G S P A T L S L S G E R A T L S C F A S G V S T L A
 4A3:
 7P12:
 8C12:

CDR2
 L6 : H V Q K F G Q A P L L Y D A S R R A T G I P A P S G S G S
 4A3:
 7P12:
 8C12:

CDR3
 L6 : G T D F T I T I S S L E P I D F A V Y Y C
 4A3:
 7P12:
 8C12:

CDR4
 L6 : Q R S N W
 4A3:
 7P12:
 8C12:

【 2 3 】

Figure 23

VX 04/014
 8A11: D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R V S Q G I S S Y L N
 16P9:

CDR2
 014 : W Y R Q K P G K V P K L L I Y S A S N L Q S G V P S R F S G S G S
 8A11:
 16P9:

CDR3
 014 : G T D F T I T I S S L Q F E D V A T Y G Q R T Y N A P F T
 8A11:
 16P9:

T K V D I K

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/02448
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/42; 39/395; C07K 14/00, 16/00 US CL : 424/133.1, 142.1, 174.1; 530/350, 387.3, 387.7, 388.15, 388.8 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/133.1, 142.1, 174.1; 530/350, 387.3, 387.7, 388.15, 388.8 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GREEN, L.L. et al. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. J. Immunol. Methods. 1999, Vol. 231, pages 11-23, see entire document.	1-3, 7, 8, and 10
Y	GONG, M.C. et al. Prostate-specific membrane antigen (PMSA)-specific monoclonal antibodies in the treatment of prostate and other cancers. Cancer Metastasis Rev. 1999, Vol. 18, No. 4, pages 483-490, see entire document.	1-3, 7, 8, and 10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 24 September 2004 (24.09.2004)		Date of mailing of the international search report 07 DEC 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Stephen L. Rawlings, Ph.D.</i> Telephone No. (571) 272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/02448

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claim Nos.: 4-6 and 15-36
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Please See Continuation Sheet

Remark on Protest
☐
☐

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/02448

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-3, 7, 8, and 10, insofar as the claims are drawn to a monoclonal antibody comprising at least the CDR3 of the heavy chain variable region of SEQ ID NO: 11 and at least the CDR3 of the light chain variable region of SEQ ID NO: 16, or comprising heavy and light chain variable regions having at least 80% homology to SEQ ID NO: 11 and SEQ ID NO: 16, respectively, wherein said antibody binds human PSMA and is capable of mediating ADCC.

Group II, claim(s) 1-3, 7-9, and 11, insofar as the claims are drawn to a monoclonal antibody comprising at least the CDR3 of the heavy chain variable region of SEQ ID NO: 12 and at least the CDR3 of the light chain variable region of SEQ ID NO: 17, or comprising heavy and light chain variable regions having at least 80% homology to SEQ ID NO: 12 and SEQ ID NO: 17, respectively, or comprising a human heavy and light chain variable region derived from SEQ ID NO: 54 and SEQ ID NOs: 55 or 56, respectively, wherein said antibody binds human PSMA and is capable of mediating ADCC.

Group III, claim(s) 1-3, 7, 8, and 12, insofar as the claims are drawn to a monoclonal antibody comprising at least the CDR3 of the heavy chain variable region of SEQ ID NO: 13 and at least the CDR3 of the light chain variable region of SEQ ID NO: 18, or comprising heavy and light chain variable regions having at least 80% homology to SEQ ID NO: 13 and SEQ ID NO: 18, respectively, wherein said antibody binds human PSMA and is capable of mediating ADCC.

Group IV, claim(s) 1-3, 7, 8, and 13, insofar as the claims are drawn to a monoclonal antibody comprising at least the CDR3 of the heavy chain variable region of SEQ ID NO: 14 and at least the CDR3 of the light chain variable region of SEQ ID NO: 19, or comprising heavy and light chain variable regions having at least 80% homology to SEQ ID NO: 14 and SEQ ID NO: 19, respectively, wherein said antibody binds human PSMA and is capable of mediating ADCC.

Group V, claim(s) 1-3, 7, 8, and 14, insofar as the claims are drawn to a monoclonal antibody comprising at least the CDR3 of the heavy chain variable region of SEQ ID NO: 15 and at least the CDR3 of the light chain variable region of SEQ ID NO: 20, or comprising heavy and light chain variable regions having at least 80% homology to SEQ ID NO: 15 and SEQ ID NO: 20, respectively, wherein said antibody binds human PSMA and is capable of mediating ADCC.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of group I is monoclonal antibody 4A3 having heavy and light chain variable regions encoded by SEQ ID NOs: 1 and 2, respectively, or a derivative thereof.

The special technical feature of group II is monoclonal antibody 7F12 having heavy and light chain variable regions encoded by SEQ ID NOs: 3 and 4, respectively, or a derivative thereof.

The special technical feature of group III is monoclonal antibody 8A11 having heavy and light chain variable regions encoded by SEQ ID NOs: 5 and 6, respectively, or a derivative thereof.

The special technical feature of group IV is monoclonal antibody 8C12 having heavy and light chain variable regions encoded by SEQ ID NOs: 7 and 8, respectively, or a derivative thereof.

The special technical feature of group V is monoclonal antibody 16F9 having heavy and light chain variable regions encoded by SEQ ID NOs: 9 and 10, respectively, or a derivative thereof.

Accordingly, groups I-V do not share the same or corresponding special technical feature so as to form a single general inventive concept under PCT Rules 13.1 and 13.2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/02448

Continuation of Box II Item 4:

1-3, 7, 8, and 10, insofar as the claims are drawn to a monoclonal antibody comprising at least the CDR3 of the heavy chain variable region of SEQ ID NO: 11 and at least the CDR3 of the light chain variable region of SEQ ID NO: 16, or comprising heavy and light chain variable regions having at least 80% homology to SEQ ID NO: 11 and SEQ ID NO: 16, respectively.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

GENSEQ, GENEMBL, ISSUED PATENTS, SWISS PROTEIN, SPITREMBL, MEDLINE, WEST: SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 16; human monoclonal antibody; prostate-specific membrane antigen (PMSA); ADCC; high-affinity.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 51/00	A 6 1 K 47/42	4 H 0 4 5
A 6 1 P 13/08	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 P 13/10	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/40	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 1 2 N 5/10	C 0 7 K 16/40	
C 1 2 N 15/02	C 1 2 N 15/00	C
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 43/00	
	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 デオ, ヤシュワント, エム.
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 8 1 6 イースト ブランズウィック コートランド
ドライブ 3 5

(72)発明者 グラチアーノ, ロバート
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 8 2 5 フレンチタウン キングスリッジ ロード
2 6

(72)発明者 ハドソン, デブラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 5 0 リバーモア タスカニー サークル 2 3 8 0

(72)発明者 ホルムズ, エリック, エイチ.
アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 0 2 1 ボセル エスイー 2 1 2 ストリート 4 1 1 6

(72)発明者 チノ, ウィリアム, ティー.
アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 0 5 2 レッドモンド エヌイー 1 0 6 ストリート 1
6 1 1 5

(72)発明者 ブラック, アメリア
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 0 3 5 ロス ガトス カピストラーノ プレイス 1
2 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA11 BA44 CA04 CA12 DA02 EA04 GA11 HA01
HA12 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA05 DA14
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 CA25 CA44 CA46
4C076 AA12 BB01 BB11 CC27 EE59
4C084 AA17 MA02 MA05 MA16 MA52 MA55 MA66 NA14 ZA81 ZB26
ZC75
4C085 AA14 AA33 CC03 EE01 EE03
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 DA89 EA20 EA28 EA51
FA72 FA74