

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-15960

(P2015-15960A)

(43) 公開日 平成27年1月29日(2015.1.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/32 (2006.01)	C O 7 K 16/32	4 B O 6 3
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 C O 8 5
審査請求 有 請求項の数 25 O L 外国語出願 (全 97 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-186846 (P2014-186846)	(71) 出願人	506115514
(22) 出願日	平成26年9月12日 (2014. 9. 12)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(62) 分割の表示	特願2010-524150 (P2010-524150)		ティ オブ カリフォルニア
原出願日	平成20年9月4日 (2008. 9. 4)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
(31) 優先権主張番号	60/969, 939		6 0 7 オークランド フランクリン ス
(32) 優先日	平成19年9月4日 (2007. 9. 4)		トリート 1 1 1 1 トウエルフス フロ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ア
		(74) 代理人	100081422
			弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(74) 代理人	100157956
			弁理士 稲井 史生
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 癌のターゲッティングおよび検出のための高親和性抗前立腺幹細胞抗原 (P S C A) 抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌抗原 P S C A (前立腺幹細胞抗原) と結合する、新規高親和性抗体及びその断片の提供。

【解決手段】 ミニボディー、ダイアボディー及び s c F v - F c からなる群から選択される抗原結合タンパク質構築物であって、選択された構築物が、それぞれ、抗 P S C A 抗体の V L ドメイン及び V H ドメインと実質的に同一である V L 及び V H ドメインを有する構築物。該構築物は、癌診断、予後、治療、可視化等に使用し得る。また、P S C A を発現する種々の癌を検出、可視化及び治療する方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミニボディー、ダイアボディー、s c F v および s c F v - F c からなる群から選択される抗原結合タンパク質構築物であって、選択された構築物が、本明細書において A 1 1、A 2 または C 5 と表される、ミニボディーまたは s c F v の V_L および V_H ドメインと実質的に同一である V_L および V_H ドメインを有する構築物。

【請求項 2】

ミニボディー、ダイアボディーおよび s c F v - F c からなる群から選択される抗原結合タンパク質構築物であって、選択された構築物が、それぞれ、抗 P S C A 抗体の V_L ドメインおよび V_H ドメインと実質的に同一である V_L および V_H ドメインを有する構築物

10

【請求項 3】

前記抗 P S C A 抗体が、親和性成熟抗体である、請求項 2 に記載の抗原結合タンパク質構築物。

【請求項 4】

抗 P S C A 抗体の V_L および V_H 鎖可変ドメインが、抗体のヒンジ領域、アミノ酸リンカーおよび免疫グロブリン分子の C_H 3 ドメインと融合しているミニボディーである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項 5】

ダイアボディーである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の構築物。

20

【請求項 6】

抗 P S C A 抗体がヒト化抗体であり、C_H 3 ドメインがヒト免疫グロブリン分子に由来する、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項 7】

ヒンジ領域が、ヒト I g G ヒンジ領域である、請求項 6 に記載の構築物。

【請求項 8】

抗 P S C A 抗体が 2 B 3 である、請求項 2 から 7 のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項 9】

抗原結合タンパク質が、配列番号 1 0 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むミニボディーであり、前記ミニボディーが、抗体 2 B 3 の親和性と同等以上の親和性で P S C A と結合する、請求項 2 に記載の構築物。

30

【請求項 1 0】

前記ミニボディーが、抗体 2 B 3 の親和性を超える親和性で P S C A と結合する、請求項 9 に記載の構築物。

【請求項 1 1】

配列番号 1 0、1 1、1 2 および 1 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載のミニボディー。

【請求項 1 2】

抗 P S C A 抗体が、1 G 8 (A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 2)、2 A 2 (A T C C 番号 H B - 1 2 0 3)、2 H 9 (A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 4)、3 C 5 (A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 6)、3 E 6 (A T C C 番号 H B 1 2 6 1 8)、3 G 3 (A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 5) または 4 A 1 0 (A T C C 番号 H B - 1 2 6 1 7) と表されるモノクローナル抗体である、請求項 2 または 3 に記載の構築物。

40

【請求項 1 3】

ミニボディー、ダイアボディーおよび s c F v - F c からなる群から選択される抗原結合タンパク質構築物であって、選択される構築物が、抗 P S C A 抗体の C D R 領域を含む構築物。

【請求項 1 4】

前記抗 P S C A 抗体が、抗体 2 B 3 の親和性と同等以上の親和性で P S C A と結合する、請求項 1 3 に記載の構築物。

50

【請求項 15】

前記抗 P S C A 抗体が、2 B 3、A 2、A 1 1 または C 5 と表されるものから選択される、請求項 14 に記載の構築物。

【請求項 16】

前記構築物がミニボディーである、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項 17】

治療薬とコンジュゲートしている、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項 18】

治療薬が、細胞傷害性薬剤である、請求項 17 に記載の構築物。

10

【請求項 19】

細胞傷害性薬剤が、リシン、リシン A 鎖、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、エチジウムブロマイド、マイトマイシン、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、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン D、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素 (P E) A、P E 40、アブリン、アルブリン A 鎖、モデクシン A 鎖、 α -サルシン、ゲロニン、ミトゲリン、レトストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、クリシン、クロチン、カリケアマイシン、サパオナリアオフィシナリスインヒビター、マイタンシノイド類およびグルココルチコイドリシンからなる群から選択される、請求項 18 に記載の構築物。

【請求項 20】

治療薬が放射性同位元素である、請求項 18 に記載の構築物。

20

【請求項 21】

放射性同位元素が、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{90}Y および ^{186}Re からなる群から選択される、請求項 20 に記載の構築物。

【請求項 22】

プロドラッグをその活性型に変換できる抗癌薬プロドラッグ活性化酵素と連結している、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項 23】

P S C A が、ヒト P S C A である、請求項 2 に記載の構築物。

【請求項 24】

検出可能マーカーで標識されている、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の構築物。

30

【請求項 25】

マーカーが、放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素である、請求項 24 に記載の構築物。

【請求項 26】

マーカーが ^{124}I である、請求項 25 に記載の構築物。

【請求項 27】

請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の抗 P S C A 抗体をコードするポリヌクレオチド。

40

【請求項 28】

前立腺幹細胞抗原 (P S C A) タンパク質を発現する前立腺癌細胞の増殖を阻害する方法であって、前記癌細胞を、前記癌細胞の増殖を阻害するのに有効な量の、請求項 1 から 23 のいずれか一項に記載の構築物と接触させる工程を含む方法。

【請求項 29】

請求項 28 に記載の方法によって、前立腺癌細胞を死滅させる方法。

【請求項 30】

前記構築物が、配列番号 2 に示す、アミノ酸位置 22 のロイシンで始まり、アミノ酸位置 99 のアラニンで終了する P S C A タンパク質を認識し、結合する、請求項 28 に記載の方法。

50

【請求項 3 1】

前記細胞に、化学療法薬を投与する工程をさらに含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記細胞に、放射線療法を施す工程をさらに含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 3】

請求項 2 8 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法によって、前立腺、膀胱または膵臓癌を患っている患者を処置する方法。

【請求項 3 4】

患者に、ホルモンアブレーション療法またはホルモンアンタゴニスト療法を施す工程を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記接触させる工程が、患者に前記構築物を、静脈内に、腹腔内に、筋肉内に、腫瘍内に、または皮内に投与することを含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記接触させる工程が、構築物を、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌またはその転移癌に直接投与することを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

被験体において癌性細胞を検出する方法であって、請求項 2 4 から 2 6 のいずれか一項に記載の構築物を接触させる工程を含む方法。

【請求項 3 8】

請求項 2 から 1 のいずれか一項に記載の構築物と、医薬上許容される賦形剤、担体または安定剤とを含む医薬組成物。

【請求項 3 9】

凍結乾燥製剤または水溶液である、請求項 3 8 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

被験体における前立腺、膀胱または膵臓癌の処置または検出において使用するための、請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の構築物。

【請求項 4 1】

インビボで癌細胞を画像化する方法であって、

(a) 癌を有すると疑われる哺乳類に、請求項 2 4 から 2 6 のいずれか一項に記載の抗体を投与する工程と、

(b) 磁気共鳴画像法 (MRI)、核磁気共鳴 (NMR)、コンピュータ断層撮影 (CAT) スキャン、冷却電荷結合素子 (CCD) カメラ光学画像化、生物発光光学画像化、ポジトロン放出断層撮影 (PET)、単一光子放射コンピュータ断層撮影法およびマイクロ PET からなる群から選択される方法を用いて前記抗体を検出し、それによって、インビボで癌細胞を画像化する工程とを含む方法。

【請求項 4 2】

前記哺乳類が、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタまたはヒトである、請求項 4 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

該当なし

【0002】

連邦支援の研究または開発下でなされた発明の権利に関する陳述

本発明は、NIH/NCIによって与えられた助成金番号CA092131の政府支援を受けて創出された。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

コンパクトディスクで提出された、「配列表」、表またはコンピュータプログラム表付属

10

20

30

40

50

物についての言及

該当なし

【背景技術】

【0004】

正常ヒト前立腺および膀胱において発現される、前立腺幹細胞抗原（PSCA）細胞表面糖タンパク質は、前立腺癌では過剰発現される（原発腫瘍の40%およびリンパ節および骨髄転移の60～100%）。また、膀胱および膵臓癌腫の移行型癌腫においても高度に発現される。PSCAに特異的な抗PSCAマウスモノクローナル抗体である1G8は、インビボで抗腫瘍ターゲッティング活性を実証した（Gu Z, et al. Cancer Res. 2005; 65: 9495）。この抗体は、ヒトフレームワークにグラフトすることによってヒト化され（トラスツズマブ）、2B3と名づけられた（Olafsen T, et al. J. Immunotherapy 2007; 30: 396）。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、PSCAを発現する腫瘍を標的とし、画像化するための適当な薬力学的特性を有する薬剤の必要性に対処する。感度および特異性を有する、癌を画像化するのに有効な薬剤は、当技術分野では非常に必要とされており、特に初期段階の腫瘍または初期に転移するものは、従来の手段では画像化できない。PSCAは、ほとんどの前立腺、膀胱および膵臓腫瘍によって高度に発現されており、これらの癌の検出、診断、予後および治療において重要な標的である。本発明は、腫瘍画像化およびターゲッティングにとって最適な特徴を有する革新的な構築物を記載する。それらはまた、遺伝子療法、放射能療法の腫瘍ターゲッティングのために使用してもよく、また、それ自体による治療的有用性を有する場合もある。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

発明の概要

本発明は、前立腺およびその他の癌において、高親和性で新規細胞表面マーカーを認識する改変抗体を記載する。これらの遺伝的に改変された抗体断片は、ターゲッティングおよび検出のためのインビボ使用に明確に適合している。

30

【0007】

本発明は、PSCAを発現する腫瘍を標的とし、画像化するための適当な薬力学的特性を有する薬剤の必要性に対処する。感度および特異性を有する、癌を画像化するのに有効な薬剤は、当技術分野では非常に必要とされており、特に初期段階の腫瘍または初期に転移するものは、従来の手段では画像化できない。PSCAは、ほとんどの前立腺、膀胱および膵臓腫瘍によって高度に発現されており、見込みのある標的である。本発明は、腫瘍画像化にとって最適な特徴を有する革新的な分子を記載する。それはまた、遺伝子療法、放射能の腫瘍ターゲッティングにとっても有用であり得、またはそれ自体による治療的有用性を有し得る。

【0008】

40

複数の実施形態がある。例えば、scFvs、ダイアボディー（diabody）、トリアボディー（triabody）、ミニボディー（minibody）およびscFv-Fcなど、種々の改変抗体形式がある。一般に、上記薬剤は、少なくとも、一価結合ではなく、二価を示すべきである。薬剤の全体的な大きさ、形およびドメイン組成は、最終適用に適するよう変えてよい。ヒトにおいて最適ターゲッティングを示す改変断片は、マウスにおいて最適である形式とはわずかに異なり得る。1つの目標はヒト適用であるので、本発明は、抗体可変領域のヒト化セットならびにヒトヒンジおよび定常領域を組み込む。さらなる実施形態は、完全（fully）ヒト可変領域を含む。これらのタンパク質は、微生物細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞培養物およびトランスジェニック動物をはじめ、種々の系において発現させることができる。

50

【0009】

画像化を目的として、 γ またはSPECTカメラまたはPETスキャナーでの検出のために種々の放射性核種を改変抗体と結合してもよい。治療用に、腫瘍へのPSCA標的化デリバリーを行うために、薬物、毒素、サイトカイン、酵素またはその他の治療部分を結合することができる。改変PSCA特異的抗体を、検出（インビトロまたはインビボ）用のナノセンサーまたはデリバリー（インビボ）用のナノ粒子と結合してもよい。また、腫瘍の標的遺伝子療法のために、PSCA抗体断片をウイルスベクターに組み込むこともできる。

【0010】

本発明は、早期診断または転移性疾患の診断において癌を画像化するための満たされていない必要性に対処する。特に、検出およびステージ分類のために前立腺癌を画像化するためのより良好な薬剤の臨床的必要性がある。PSCA抗体断片画像化は、骨転移を画像化することおよび治療に対する応答を評価することによって極めて有用となる；現在利用可能な良好な画像化アプローチはない。膵臓癌の検出は、緊急に必要であり、ハイリスク患者では造影剤が有用であろう。本発明は、前立腺癌、膀胱癌および膵臓癌患者におけるPSCAのインビボターゲティングおよび検出に適合させた高親和性の、高度に特異的な改変抗体を記載する。

【0011】

したがって、第1の態様において、本発明は、PSCAを過剰発現する癌の処置および検出において使用できる、高親和性PSCA抗原結合タンパク質構築物を提供する。いくつかの実施形態では、これらの構築物は、以下にさらに記載されるような、ミニボディー、ダイアボディー、トリアボディー、ScFvまたはScFv-Fcである。一実施形態では、本発明は、選択される構築物が、抗PSCA抗体のV_LドメインおよびV_Hドメインと、それぞれ実質的に同一であるV_LおよびV_Hドメインを有する、ミニボディーダイアボディーおよびscFv-Fcからなる群から選択される、哺乳類PSCAタンパク質（例えば、ヒト、マウス）への指向性を有する抗原結合タンパク質構築物を提供する。例えば、上記構築物は、抗PSCA抗体のV_LおよびV_H鎖可変ドメインが、抗体のヒンジ領域の一部、アミノ酸リンカーおよび免疫グロブリン分子のC_H3ドメインと融合しているミニボディーであり得る。その他の実施形態では、構築物は、ダイアボディーである。

【0012】

構築物が、ミニボディーまたはダイアボディーまたはscFv-Fcである実施形態では、抗PSCA抗体は、ヒト化抗体であり得、C_H3ドメインは、ヒト免疫グロブリン分子に由来する。好ましい実施形態では、抗PSCA抗体は、2B3または1G8である。さらにその他の実施形態では、構築物は、本明細書においてA11、A2またはC5と表されるscFv断片と実質的に同一であるV_HおよびV_Lドメインを有するミニボディーである。なおさらなる実施形態では、構築物は、ヒト免疫グロブリン分子に由来するC_H3ドメインを有する。例えば、構築物は、ヒトIgGヒンジ領域およびヒトC_H3ドメインであるヒンジ領域およびC_H3ドメインを有し得る。

【0013】

いくつかの実施形態では、抗PSCA抗体は、1G8（ATCC番号HB-12612）、2A2（ATCC番号HB-1203）、2H9（ATCC番号HB-12614）、3C5（ATCC番号HB-12616）、3E6（ATCC番号HB12618）、3G3（ATCC番号HB-12615）または4A10（ATCC番号HB-12617）と表されるモノクローナル抗体である。

【0014】

本発明の構築物はまた、治療薬または検出可能なマーカーと連結させてもよい。いくつかの実施形態では、上記治療薬は、細胞傷害性薬剤である。例えば、上記薬剤は、リシン、リシンA鎖、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、エチジウム（ethidium）プロマイド、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド（tenoposide）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシン（anthracin）ジオン、アク

10

20

30

40

50

チノマイシンD、ジフテリア (diphtheria) 毒素、シュードモナス外毒素 (PE) A、PE 40、アブリン、アルブリン (arbrin) A鎖、モデクシン (modeccin) A鎖、 α -サルシン、ゲロニン、ミトゲリン (mitogellin)、レトストリクトシ (retstrictocin)、フェノマイシン (phenomycin)、エノマイシン (enomycin)、クリシン (curicin)、クロチン (crotonin)、カリケアマイシン (calicheamicin)、サパオナリアオフィシナリス (sapaonaria officinalis) インヒビター、マイタンシノイド類またはグルココルチコイドリシンであり得る。その他の実施形態では、治療薬は、放射性同位元素である。放射性同位元素は、例えば、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{90}Y および ^{186}Re からなる群から選択され得る。その他の実施形態では、構築物は、プロドラッグをその活性型に変換できる抗癌薬プロドラッグ活性化酵素と連結している。

10

【0015】

上記の別の好ましい実施形態では、抗PSCA抗体によって標的とされるPSCAは、ヒトPSCAである。

【0016】

別の態様では、本発明は、選択される構築物が、2B3または本明細書においてA11、A2もしくはC5と表されるscFv変異体のV_LおよびV_Hドメインと実質的に同一であるV_LおよびV_Hドメインを有する、ミニボディー、ダイアボディー、scFvおよびscFv-Fcからなる群から選択される抗原結合タンパク質構築物を提供する。その他の実施形態では、本発明の結合構築物は、変異体抗体A11、A2またはC5中に見られる1つまたは複数の突然変異を含み得る。

20

【0017】

さらに別の態様では、本発明は、選択される構築物が、抗PSCA抗体のCDR領域を含む、ミニボディー、ダイアボディー、scFvおよびscFv-Fcからなる群から選択される抗原結合タンパク質構築物を提供する。特定の実施形態では、抗PSCA抗体は、2B3と表される抗体と同等以上の親和性でPSCAと結合する。その他の実施形態では、抗PSCA抗体は、親和性成熟 (affinity matured) 抗体であり得、親和性成熟抗体は、PSCAに対して、親抗体がなすよりも高い親和性を含む。

【0018】

別の態様では、本発明の抗PSCA構築物は、検出可能マーカーで標識される。マーカーは、例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素であり得る。限定するものではないが、 ^{124}I 、 ^{86}Y 、 ^{18}F 、 ^{94}Tc などをはじめ、多数の放射性核種を画像化標識として使用してよい。当業者ならば、本発明における使用に特によく適している、その他の放射性核種を承知しているであろう。

30

【0019】

上記のいずれかのさらなるその他の実施形態では、本発明は、本発明の構築物の医薬組成物を提供する。

【0020】

さらに別の態様では、本発明は、癌細胞 (例えば、前立腺、膀胱、膵臓癌細胞) を、癌細胞の増殖を阻害するのに有効な量の本発明の構築物と接触させる工程を含む、癌 (例えば、前立腺、膵臓または膀胱癌) を有する被験体を治療する方法または前立腺幹細胞抗原 (PSCA) タンパク質を発現する前立腺癌細胞の増殖を阻害する方法を提供する。上記方法は、癌細胞を死滅させ得る。いくつかの実施形態では、構築物は、アミノ酸位置22のロイシンで始まり、アミノ酸位置99のアラニンで終了する以下に示されるPSCタンパク質を認識し、結合する。さらなる実施形態では、上記方法は、化学療法薬、放射線療法を施す工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、被験体はまた、ホルモンアブレーション療法またはホルモンアンタゴニスト療法で処置される。

40

【0021】

上記処置は、静脈内、腹腔内、筋肉内、腫瘍内または皮内によって、患者または被験体に施され得る。いくつかの実施形態では、上記接触させる工程は、構築物を、前立腺癌、

50

膀胱癌、膵臓癌またはその転移癌に直接投与することを含む。

【0022】

別の態様では、本発明は、癌細胞を、検出可能マーカーを保有する構築物と接触させることによって、被験体において癌性細胞を検出する方法を提供する。上記方法は、癌のリスクの高い患者のスクリーニングにおいて、または治療に対する応答をモニターする (monitory) ために、または癌 (例えば、前立腺、膀胱または膵臓癌) の予後を示すために使用してもよい。上記方法は、癌の転移の検出において特に有利である。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】抗PSCAミニボディーの概略図である。ミニボディーをコードする遺伝子は、 V_L - リンカー - V_H - ヒンジ - C_H3 の順に組み立てられ、ヒンジおよび C_H3 ドメインは、ヒトIgG1由来である。上記タンパク質は、80kDaの二量体に自己組織化する。

10

【図2-1】2B3 ScFv変異体タンパク質配列の比較を示す図である。 V_L 配列およびリンカーの一部が上部枠中にあり、リンカーの残りおよび V_H 配列は下部の枠中にある。また、CDRも示されており、野生型配列に下線が引かれている。突然変異は、異なる陰影で強調されている。親のScFv P-2B3配列 (配列番号4) ならびに変異体C5 (配列番号5)、A2 (配列番号6) およびA11 (配列番号7) ScFv配列が示されている。

【図2-2】同上

20

【図3-1】親の2B3ミニボディー (配列番号9) のDNA配列 (配列番号8) および翻訳されたタンパク質配列を示す図である。また、以下のタンパク質セグメントの出発点も示されている: シグナルペプチド (哺乳類分泌の)、軽鎖可変領域 (V_L)、15個のアミノ酸のドメイン間ペプチドリンカー、重鎖可変領域 (V_H)、ヒトIgG1ヒンジ配列および10個のアミノ酸伸長およびヒトIgG1 C_Hj ドメインとそれに続く2つの停止コドン。

【図3-2】同上

【図3-3】同上

【図4】非還元条件での、4つのミニボディー、すなわち、親 (p)、A11、A2およびC5のSDS-PAGE分析を示す図である。矢印は、ミニボディーの予測分子量を示す。

30

【図5】予測される分子サイズにおける均一ピークを示す、A11ミニボディーのサイズ排除HPLCを示す図である。

【図6a】親和性ランキングを示す図である。(A) 競合ELISA結合実験によるランキング: プレートをCEAでコーティングし、ビオチン化された完全な (intact) 抗CEAキメラ抗体をプローブとして使用した。

【図6b】親和性ランキングを示す図である。(B) フローサイトメトリーによるランキング: 各ミニボディーの5pg/mlをPSCA発現細胞とともにインキュベートした。次いで、細胞を、PEコンジュゲートした抗ヒトFcを用いて染色した。

【図7】LAPC-9AD (PSCA陽性ヒト前立腺癌) 異種移植片 (xenograft) を保有するヌードマウスの同時記録マイクロPET/マイクロCTスキャンを示す図である。マウスにI-124放射標識A11ミニボディー変異体を注射し、連続スキャンした。A、B、C; 矢状断面; D、E、F; 冠状断面。A、D; 白色の長方形としてROI (関心領域) を示す、同時記録マイクロPETおよびマイクロCT。B、E; マイクロPET像およびROI。C、F; マイクロPET像のみ。

40

【図8】2B3ミニボディー変異体の生体内分布およびマイクロPET画像化ランキングを示す図である。生体内分布の単位は、γカウンタにおける、注射時間の21または25時間後の、秤量した組織1gあたりの%ID値である。マイクロPET画像化値は、図6に示され、材料および方法に記載されるように、4つのROIの平均値について取得した。

50

【図 9】P S C A データおよび特性のまとめを示す図である。

【図 10】本発明の種々の構築物を示す図である。

【図 11-1】2 B 3 変異体を製造するスキームを示す図である。

【図 11-2】同上

【図 12】種々の構築物のマイクロ P E T 画像化および生体内分布データを示す図である。

【図 13】A 1 1 および親 2 B 3 のマイクロ P E T 画像化および生体内分布結果を示す図である。

【図 14】親 2 B 3 および変異体 A 1 1 抗 P S C A ミニボディーを使用した、膵臓癌 C a p a n - 1 異種移植マウスのマイクロ P E T 画像化および体内分布データを示す図である。

10

【図 15】親 2 B 3 および変異体 A 1 1 抗 P S C A ミニボディーを使用した、膵臓癌 M I A P a C a - 2 異種移植マウスのマイクロ P E T 画像化および体内分布データを示す図である。

【図 16 a - 1】親 2 B 3 および変異体 A 2 抗 P S C A ミニボディーのアミノ酸配列を示す図である。

【図 16 a - 2】変異体 A 1 1 抗 P S C A ミニボディーのアミノ酸配列を示す図である。

【図 16 b】変異体 C 5 抗 P S C A ミニボディーのアミノ酸配列を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

20

発明の詳細な説明

造影剤および治療薬としての完全抗体の開発は、インビボで腫瘍標的に放射性核種を効果的にデリバリーするその能力にもかかわらず、長いクリアランス動態によって妨げられてきた。ここで、本発明者らはまた、ヌードマウスモデルにおける循環からの迅速なクリアランスと併せて、迅速で、高レベルの腫瘍取り込みを示す遺伝的に改変された抗体断片によって、インビボで腫瘍を容易に検出することが可能になることを報告する。

【0025】

2 B 3 抗体は、ヒトフレームワークにグラフトすることによってヒト化され（トラスツズマブ）、命名された（Olafsen T, et al. J. Immunotherapy 2007; 30: 396; この文献の全文を、説明、生物活性および抗体の作製に関して、参照により本明細書に組み込む）。2 B 3 の抗体断片は、P E T 画像化適用のために作製された。これらの抗体断片のうち 1 種、2 B 3 ミニボディーは、マウスモデルにおいて P S C A 発現腫瘍に対して迅速かつ特異的な局在性を示した。しかし、ヒト化は、P S C A に対する完全抗体の親和性を、2 . 6 n M の K d から 1 6 . 7 n M に低減させた。さらに、完全抗体の、抗体断片への再編成も、結合効率に影響を及ぼし得る。S c F v の定量的腫瘍滞留性は親和性ととも高まるが、 10^{-9} M に近い閾値までであるということが示されている（Adams GP, et al. Cancer Res. 2001; 61: 4750）。腫瘍ターゲッティングおよび画像化特性への、ミニボディー親和性の影響に関する刊行されたデータはない。ここで、本発明者らは、3 種の高親和性抗 P S C A S c F v の作製と、それに続く、3 種の高親和性抗 P S C A ミニボディーの作製および特性決定とを記載する。本発明者らは、良好な腫瘍ターゲッティング／画像化適性を有するミニボディー断片を作製した。本発明の構築物に関するいくつかの実施形態では、構築物は、2 B 3 抗体の対応するドメインと同一ではない V_H または V_L ドメインを含むという条件がある。

30

40

【0026】

一実施形態では、本発明は、V_L および V_H ドメインが、2 B 3 において見られるものと実質的に同一である、抗体、ミニボディー、ダイアボディー、s c F v、s c F v - F c などからなる群から選択される抗原結合構築物を提供する。第 2 の実施形態では、抗原結合構築物は、本明細書において A 1 1、A 2 または C 5 と表される抗体変異体において見られる 1 つまたは複数の突然変異を含み得る。第 3 の実施形態では、結合構築物は、配列番号 4 のアミノ酸に対応する残基に、T 5、S 1 0、V 1 5、S 9 1、S 1 2 3、S 1

50

31、N179、T182、I194、A203、G213、Q228およびそれらの組合せからなる群から選択される、少なくとも1つの突然変異を含む。特定の実施形態では、上記少なくとも1つの突然変異は、T5I、S10I、V15M、S91G、Δ123、S131Y、N179Y、T182S、I194M、A203V、E213K、Q228Rおよびそれらの組合せを含む群から選択される、配列番号4中の突然変異に対応する突然変異を含む。その他の実施形態では、本発明の結合構築物は、変異体A11、A2またはC5中に見られるものに対応する突然変異を含む。

【0027】

特定の実施形態では、本発明は、V_LおよびV_Hドメインが、配列番号10中に見られるものと実質的に同一であるミニボディーを提供する。一実施形態では、本発明のミニボディーは、配列番号10のアミノ酸配列を含む。その他の実施形態では、ミニボディーは、配列番号10と実質的に同一であるアミノ酸配列を含み、前記ミニボディーは、配列番号10のミニボディーよりも高い親和性でPSCAと結合する。さらにその他の実施形態では、ミニボディーは、配列番号10のアミノ酸に対応する残基に、T5、S10、V15、S91、S123、S131、N179、T182、I194、A203、G213、Q228およびそれらの組合せを含む群から選択される、1つまたは複数の突然変異を含み得る。さらに別の実施形態では、上記構築物は、配列番号11、12および13から選択される配列を含み得る。

【0028】

一実施形態では、本発明は、選択される構築物が、抗PSCA抗体のCDR領域を含む、ミニボディー、ダイアボディー、scFvおよびscFv-Fcからなる群から選択される抗原結合タンパク質構築物を提供する。一実施形態では、上記結合タンパク質構築物は、抗PSCA抗体に由来するCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2またはCDR-H3から選択される少なくとも1つのCDR領域を含む。さらにその他の実施形態では、タンパク質結合構築物は、3種の軽鎖CDR領域のすべてまたは3種の重鎖CDR領域のすべてを含み得る。一実施形態では、本発明のタンパク質結合構築物は、抗PSCA抗体のCDR領域のすべてを含み得る。特定の実施形態では、抗PSCA抗体は、2B3と表される抗体と同等以上の親和性でPSCAと結合する。その他の実施形態では、抗PSCA抗体は、親和性成熟抗体であり得、上記親和性成熟抗体は、PSCAに対して、親抗体がなすよりも高い親和性を含む。特定の実施形態では、親の抗PSCA抗体は、1G8（ATCC番号HB-12612）、2A2（ATCC番号HB-1203）、2H9（ATCC番号HB-12614）、3C5（ATCC番号HB-12616）、3E6（ATCC番号HB12618）、3G3（ATCC番号HB-12615）、4A10（ATCC番号HB-12617）および2B3からなる群から選択され得る。その他の実施形態では、CDRは、配列番号10、11、12および13中に見られるものから選択され得る。

【0029】

「ミニボディー」とは、ヒンジ領域および免疫グロブリン分子のCH3ドメインと融合している、天然抗体の重鎖可変（VH）および軽鎖可変（VL）鎖ドメインから構成される改変抗体構築物である（図1を参照のこと）。したがって、ミニボディーは、抗原結合領域と、二価分子への組み立てを可能にするCH3ドメインと、ジスルフィド結合による二量化に適応するための抗体ヒンジとを保持し、かつ単一タンパク質鎖中にコードされる、完全（whole）抗体の小型版である。対照的に、天然抗体は、4つの鎖、すなわち、2つの重鎖および2つの軽鎖から構成される。ミニボディーの大きさ、結合価および親和性は、インビボターゲットングに特に適している。細菌または哺乳類細胞における発現は、ミニボディーが単一アミノ酸鎖として産生され得るので単純化されている（米国特許第5,837,821号明細書を参照のこと）。この開示の全文を、特に、ミニボディー、その構造、その作製方法およびその適した医薬製剤に関して、本明細書に参照により組み込む。

【0030】

「ダイアボディー」は、第1のポリペプチド鎖上の軽鎖可変ドメイン（V L）および、それに連結されている重鎖（V H）可変ドメイン（V H－V L）（第1のポリペプチド鎖上のその2つのドメイン間で対形成するには短すぎるペプチドリinkerによって接続されている）を含む第1のポリペプチド鎖と、第2のポリペプチド鎖上の重鎖可変ドメインV Hおよび、それに連結されている軽鎖可変ドメイン（V L）（V L－V H）（第2のポリペプチド鎖上のその2つのドメイン間で対形成するには短すぎるペプチドリinkerによって接続されている）を含む第2のポリペプチド鎖とを含む。その短い結合が、第1および第2のポリペプチド鎖の相補的なドメイン間の鎖の対形成を推し進め、2つの機能的抗原結合部位を有する二量体分子の組み立てを促進する。

【0031】

二重特異性ダイアボディーを構築するためには、異なる抗体（例えば、抗体Aおよび抗体B）のVドメインを融合して、2種の鎖（例えば、V H A－V L B、V H B－V L A）を作製する。各鎖は、抗原との結合において不活性であるが、もう一方の鎖との対形成時に抗体AおよびBの機能的抗原結合部位を再形成する。

【0032】

前立腺、膀胱および膵臓の癌におけるP S C Aおよびその発現は、その全文が参照により組み込まれる米国特許第6,756,036号明細書に開示されている。ヒトP S C A翻訳アミノ酸配列は以下のとおりである：

```
MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNECLQV  
ENCTQLGEQCWTARIRAVGLLTVISKGCSLNCVDDDS  
QDYVVGKKNITCCDTDLNCSGAHALQPAAAILALLPAL  
GLLLWGPGQL
```

（配列番号1）

【0033】

2種以上の核酸またはポリペプチド配列の関連で、用語「実質的に同一である」とは、以下に記載されるデフォルトパラメータを用いてB L A S TまたはB L A S T 2.0配列比較アルゴリズムを使用して、または手作業でのアラインメントおよび目視検査によって測定されるような、比較ウィンドウもしくは指定された領域にわたる最大一致を求めて比較およびアラインされた場合に、参照される配列もしくは部分にわたって、同一であるか、または特定のパーセンテージの同一であるアミノ酸残基もしくはヌクレオチド（すなわち、約80%の同一性、好ましくは、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の同一性）を有する2種以上の配列または部分配列を指す（例えば、N C B I ウェブサイト<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>などを参照のこと）。この定義はまた、欠失および／または付加を有する配列ならびに置換を有するものを含む。配列同一性は、2種の参照されるドメイン間で少なくとも85%、90%、95%、97%であることが好ましい。いくつかの実施形態では、配列の相違は、参照される配列またはドメインについて1、2、3または4または5～12個のアミノ酸だけである。以下に記載されるように、好ましいアルゴリズムは、ギャップなどを説明することができる。同一性は、少なくとも約15個のアミノ酸またはヌクレオチドの長さである領域にわたって存在することが好ましく、15～50個のアミノ酸またはヌクレオチドの長さである領域にわたって存在することがより好ましい。その他の実施形態では、同一性は、少なくとも約50、100、150、200個以上のアミノ酸である領域にわたって存在し得る。

【0034】

配列比較のためには、通常、1つの配列が、それに対して試験配列が比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、試験配列および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて、部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用してもよく、代替パラメータを指定してもよいことが好ましい。次いで、プログラムパラメータに基づいて、配列比較アルゴリズムによって、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを

計算する。

【0035】

本明細書において使用する場合、「比較ウィンドウ」とは、特定の範囲の残基にわたって選択される任意の数の隣接する位置のセグメント（例えば、20～50個、通常、約50～約200個、より通常は、約100～約150個）を参照することを含み、ここで、ある配列は、同数の隣接する位置の参照配列と、最適にアラインされた後に比較され得る。比較のための配列のアラインメントの方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適アラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行（Wisconsin遺伝子ソフトウェアパッケージ、Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIの、GAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA）によって、または手作業でのアラインメントおよび目視検査によって（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)を参照のこと）実施できる。

【0036】

配列同一性および配列類似性パーセントを決定するために適しているアルゴリズムの好ましい例として、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムがあり、これらは、それぞれ、Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1977)およびAltschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)に記載されている。BLASTおよびBLAST 2.0は、本明細書に記載されるパラメータを用いて使用され、本発明の核酸およびタンパク質の配列同一性パーセントを決定する。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、全米バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）を介して公的に入手可能である。このアルゴリズムは、まず、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインした場合に、マッチするか、何らかの正の値の閾値スコアTを満たす、クエリ配列中の長さWの短いワードを同定することによってハイスコアリング配列対（high scoring sequence pair）（HSP）を同定することを含む。Tは、隣接ワードスコア閾値（neighborhood word score threshold）と呼ばれる（Altschul et al., 前掲）。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見出すための検索を開始するための種として作用する。累積アラインメントスコアが増大され得る限り、ワードヒットを各配列に沿って両方向に伸長する。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメータM（マッチする残基の対に対するリワードスコア；常に>0）およびN（ミスマッチする残基に対するペナルティスコア；常に<0）を使用して算出する。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアを算出する。各方向へのワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアが、その最大に達成された値から量Xだけ低下する；累積スコアが、1個または複数の負にスコアリングする残基アラインメントの蓄積のためにゼロ以下になる；または、いずれかの配列の末端に達する時点で停止する。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列に対して）は、デフォルトとして、ワード長（W）11、期待値（E）10、M=5、N=-4および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列に対しては、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、ワード長3および期待値（E）10およびBLOSUM62スコアリングマトリックス（Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)を参照のこと）アラインメント（B）50、期待値（E）10、M=5、N=-4および両鎖の比較を使用する。

【0037】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書において同義的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを意味する。この用語は、1個または複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的化学模倣物であるアミノ酸ポリマ

一、ならびに、天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用する。

【0038】

アミノ酸は、本明細書において、そのよく知られている三文字記号によって、または I U P A C - I U B バイオケミカル命名委員会 (Biochemical Nomenclature Commission) によって推奨される一文字記号のいずれかによって呼ばれ得る。同様に、ヌクレオチドも、その一般に受け入れられた一文字コードによって呼ばれ得る。

【0039】

アミノ酸配列については、当業者ならば、コードされる配列中の単一のアミノ酸または小さなパーセンテージのアミノ酸を変更、付加または欠失する、核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列への個々の置換、欠失または付加は、その改変により、あるアミノ酸が化学的に同様のアミノ酸によって置換される「保存的に改変された変異体」であることを認識するであろう。機能的に同様のアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野で周知である。このような保存的に改変された変異体は、本発明の多型変異体、種間相同体および対立遺伝子に加えて存在し、かつこれらを除外しない。

【0040】

以下の 8 群は、各々、互いに保存的置換であるアミノ酸を含む：1) アラニン (A)、グリシン (G)；2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；4) アルギニン (R)、リシン (K)；5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；7) セリン (S)、トレオニン (T)；および 8) システイン (C)、メチオニン (M) (例えば、Creighton, Proteins (1984) を参照のこと)。

【0041】

「標識」または「検出可能な部分」または「検出可能なマーカー」とは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的またはその他の物理的手段によって検出可能な組成物である。例えば、有用な標識として、 ^{32}P 、蛍光色素、電子密度試薬、酵素 (例えば、E L I S A においてよく用いられる)、ビオチン、ジゴキシゲニンまたはハプテンおよび例えば、ペプチドに放射標識を組み込むことによって検出可能にされ得る、またはペプチドと特異的に反応する抗体を検出するために使用されるタンパク質が挙げられる。

【0042】

「抗体」とは、抗原と特異的に結合し、それを認識する免疫グロブリン遺伝子またはその断片に由来するフレームワーク領域を含むポリペプチドを意味する。認識される免疫グロブリン遺伝子は、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー一定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロンとして分類され、これらは、次いで、免疫グロブリンクラス I g G、I g M、I g A、I g D および I g E をそれぞれ規定する。一般に、抗体の抗原-結合領域は、結合の特異性および親和性において最も重要であろう。

【0043】

1 つの例示的免疫グロブリン (抗体) 構造単位は、四量体を含む。各四量体は、ポリペプチド鎖の 2 つの同一の対からなり、各対は、1 つの「軽」鎖 (約 25 k D) および 1 つの「重」鎖 (約 50 ~ 70 k D) を有する。各鎖の N 末端は、主に抗原認識に関与する、約 100 ~ 110 またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を規定する。用語可変軽鎖 (V_L) および可変重鎖 (V_H) とは、これらの軽鎖および重鎖をそれぞれ意味する。

【0044】

抗体は、例えば、完全免疫グロブリンとして、または種々のペプチダーゼを用いる消化によって生じたいくつかの十分に特性決定された断片として存在する。したがって、例えば、ペプシンは、抗体をヒンジ領域中のジスルフィド結合の下で消化し、ジスルフィド結合によって $V_H - C_H 1$ と接続している軽鎖である F a b の二量体、 $F(a b)'_2$ を生

10

20

30

40

50

成する。 $F(a b)'_2$ は、穏やかな条件下で還元されて、ヒンジ領域中のジスルフィド結合を分解し、それによって、 $F(a b)'_2$ 二量体が $F a b'$ 単量体に変換し得る。 $F a b'$ 単量体は、本質的には、ヒンジ領域の一部を含む $F a b$ である（Fundamental Immunology、Paul編、第3版、1993を参照のこと）。完全抗体の消化の観点から種々の抗体断片が定義されているが、当業者には当然のことながら、そのような断片は、化学的に、または組換えDNA法を使用することによってデノボ合成してもよい。したがって、用語「抗体」とはまた、本明細書において、全抗体の改変によって生じた抗体断片、または組換えDNA法を使用してデノボ合成されたもの（例えば、単鎖Fv）またはファージディスプレイライブラリーを使用して同定されたもの（例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990)を参照のこと）のいずれかを含む。

10

【0045】

本発明の適した抗体または構築物の調製のために、また、本発明に従う使用のために、例えば、組換え、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、当技術分野で公知の多数の技術を使用してよい（特に、ミニボディーおよびダイアボディー設計に関して、その全文が、各々、参照により組み込まれる、米国特許出願公開第20070196274号および同20050163782号明細書を参照のこと）（例えば、Kohler & Milstein, Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., pp. 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988); およびGoding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (第2版、1986)を参照のこと）。注目する抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を、細胞からクローニングしてもよく、例えば、モノクローナル抗体をコードする遺伝子を、ハイブリドーマからクローニングし、組換えモノクローナル抗体を製造するために使用してもよい。モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子ライブラリーはまた、ハイブリドーマまたは形質細胞から作製してもよい。重鎖および軽鎖遺伝子産物の無作為組合せによって、異なる抗原特異性を有する抗体の大きなプールが生じる（例えば、Kuby, Immunology (第3版、1997)を参照のこと）。単鎖抗体または組換え抗体の製造のための技術（米国特許第4,946,778号、同4,816,567号明細書）を適応させて、本発明のポリペプチドに対する抗体を製造してもよい。また、ヒト化またはヒト抗体を発現するために、トランスジェニックマウスまたはその他の哺乳類などのその他の生物を使用してもよい（例えば、米国特許第5,545,807号；同5,545,806号；同5,569,825号；同5,625,126号；同5,633,425号；同5,661,016号明細書、Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); およびLonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)を参照のこと）。あるいは、ファージディスプレイ技術を使用して、選択された抗原と特異的に結合する抗体およびヘテロマー $F a b$ 断片を同定してもよい（例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990); Marks et al., Biotechnology 10: 779-783 (1992)を参照のこと）。抗体はまた、二重特異性にすることができる、すなわち、2種の異なる抗原を認識できる（例えば、国際公開第93/08829号パンフレット、Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655-3659 (1991); およびSuresh et al., Methods in Enzymology 121: 210 (1986)を参照のこと）。抗体はまた、ヘテロコンジュゲート、例えば、2種の共有結合によって結合している抗体または免疫毒素であってもよい（例えば、米国特許第4,676,980号明細書、国際公開第91/00360号；同第92/200373号パンフレット；および欧州特許第03089号明細書を参照のこと）。

20

30

40

【0046】

本発明の抗体は、修飾されている、すなわち、抗体への任意の種類の分子の共有結合によって修飾されている誘導体を含む。例えば、抗体誘導体として、限定するものではない

50

が、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／遮断基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞性リガンドまたはその他のタンパク質との結合などによって改変されている抗体が挙げられる。多数の化学修飾はいずれも、公知の技術、例えば、それだけには限らないが、特異的化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などによって実施してよい。さらに、誘導体は1個以上の非天然アミノ酸を含み得る。

【0047】

非ヒト抗体をヒト化または霊長類化 (primatizing) する方法は、当技術分野で周知である。通常、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からそれに導入された、1個または複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、インポート残基と呼ばれることが多く、これは、通常、インポート可変ドメインから取り込まれる。ヒト化は、本質的に、W i n t e r および共同研究者の方法に従って (例えば、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536 (1988) および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992) を参照のこと)、げっ歯類 C D R または C D R 配列を、ヒト抗体の対応する配列と置換することによって実施してよい。したがって、このようなヒト化抗体は、キメラ抗体であり (米国特許第 4, 8 1 6, 5 6 7 号明細書)、これでは、実質的に、完全ヒト可変ドメイン未満のものが、非ヒト種に由来する対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は、通常、いくつかの C D R 残基およびおそらくはいくつかの F R 残基が、げっ歯類抗体中の類似部位に由来する残基によって置換されているヒト抗体である。

【0048】

「キメラ抗体」とは、(a) 抗原結合部位 (可変領域) が、異なるもしくは変更されたクラス、エフェクター機能および／もしくは種の定常領域、またはキメラ抗体に新規特性を付与する全く異なる分子、例えば、酵素、毒素、ホルモン、増殖因子、薬剤などと結合されるよう、定常領域またはその一部が変更、置換または交換されている、あるいは (b) 可変領域またはその一部が、異なるもしくは変更された抗原特異性を有する可変領域で、変更、置換または交換されている抗体分子である。本発明の、および本発明に従って使用するために好ましい抗体として、ヒト化および／またはキメラモノクローナル抗体が挙げられる。

【0049】

いくつかの実施形態では、抗体は、「エフェクター」部分とコンジュゲートされている。エフェクター部分は、放射性標識または蛍光標識などの標識部分を含めた任意の数の分子であり得、または治療用部分であり得る。一態様では、抗体は、タンパク質の活性を調節する。このようなエフェクター部分として、それだけには限らないが、抗腫瘍薬、毒素、放射性薬剤、サイトカイン、二次抗体または酵素が挙げられる。さらに、本発明は、本発明の抗体が、プロドラッグを細胞傷害性薬剤に変換する酵素と連結している実施形態を提供する。

【0050】

エフェクター部分を、P S C A 陽性細胞、特に、P C S A タンパク質を過剰発現する細胞にターゲティングするために、免疫複合体を使用してもよい。このような相違は、試験サンプルおよび対照サンプルを用いて、ほぼ同様にロードされるゲルのバンドを見ると容易に理解できる。細胞傷害性薬剤の例として、それだけには限らないが、リシン、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、エチジウム (ethidium) プロマイド、マイトマイシン、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、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン D、ジフテリア (diphtheria) 毒素、シュードモナス外毒素 (P E) A、P E 4 0、アブリンおよびグルココルチコイドおよびその他の化学療法薬、ならびに放射性同位元素が挙げられる。適した検出可能なマーカーとして、それだけには限らないが、放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素が挙げられる。

【0051】

いくつかの実施形態では、本発明は、単独で、またはエフェクター部分とコンジュゲートしている場合に、癌（例えば、前立腺、膵臓または膀胱癌）を処置するために全身に使用される抗原結合タンパク質構築物を提供する。リシンなどの毒性物質とコンジュゲートしている P S C A をターゲッティングする構築物ならびにコンジュゲートしていない抗体は、P S C A を保有する癌細胞を天然にターゲッティングする有用な治療薬であり得る。このような構築物は、侵襲性を妨げるのに有用であり得る。

【0052】

さらに、本発明の抗原結合性タンパク質構築物を使用して、癌を処置できる。このような状況では、構築物を治療活性を有する第2のタンパク質または毒性分子の少なくとも1種の機能的に活性な部分と結合する。第2のタンパク質として、それだけには限らないが、酵素、リンホカイン、オンコスタチンまたは毒素を挙げることができる。適した毒素として、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、エチジウム (ethidium) ブロマイド、マイトマイシン、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、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシン D、ジフテリア (diphtheria) 毒素、シュードモナス外毒素 (P E) A、P E 4 0、リシン、アブリン、グルココルチコイドおよび放射性同位元素が挙げられる。

【0053】

治療薬を本発明の構築物とコンジュゲートする技術は、周知である（例えば、「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy」、Reisfeldら(編)中の、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); 「Controlled Drug Delivery」(第2版)、Robinsonら(編)中の、Hells tromら、「Antibodies For Drug Delivery」、pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); 「Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications」、Pincheraら(編)中の、Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、pp. 475-506 (1985); および Thorpe et al., 「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)を参照のこと）。

【0054】

本発明のタンパク質またはペプチドまたは構築物を言及する際の、抗体と「特異的に（または選択的に）結合する」または「特異的に（または選択的に）免疫反応性の」なる語句は、多くはタンパク質およびその他の生物学的物質の不均一な集団中のタンパク質の存在を決定するような結合反応を意味する。したがって、指定されたイムノアッセイ条件下で、指定された抗体は、バックグラウンドの少なくとも2倍、より典型的には、バックグラウンドの10～100倍を超えて特定のタンパク質と結合する。このような条件下での抗体との特異的結合には、構築物が、特定のタンパク質に対するその特異性について選択される必要がある。種々のイムノアッセイ形式を使用して、P S C A と特異的に免疫反応する構築物を選択することができる。例えば、タンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択するために、固相 E L I S A イムノアッセイがルーチン的に使用されている（例えば、特異的免疫反応性を調べるために使用できるイムノアッセイ形式および条件の説明については、Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998)を参照のこと）。

【0055】

本明細書において、「治療上有効な用量または量」とは、投与する目的の効果を生じる用量を意味する。正確な用量および処方、治療の目的に応じて変わり、公知の技術を使用して当業者によって確定可能である（例えば、Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Gennaro, Editor (2003)およびPickar, Dosage Calculations (1999)を参照のこと）。

【0056】

用語「医薬上許容される塩」または「医薬上許容される担体」とは、本明細書に記載さ

10

20

30

40

50

れる化合物上に見られる特定の置換基に応じて、比較的非毒性の酸または塩基を用いて調製される活性化合物の塩を含むものとする。本発明の化合物が、比較酸性の官能基を含む場合は、ニートなまたは適した不活性溶媒中のいずれかで、このような化合物の中間の形態 (neutral form) を、十分な量の所望の塩基と接触させることによって塩基付加塩を得ることができる。医薬上許容される塩基付加塩の例として、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノまたはマグネシウム塩または同様の塩が挙げられる。本発明の化合物が比較塩基性の官能基を含む場合には、ニートなまたは適した不活性溶媒中のいずれかで、このような化合物の中間の形態を、十分な量の所望の酸と接触させることによって、酸付加塩を得ることができる。医薬上許容される酸付加塩の例として、塩酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、一水素炭酸 (monohydrogencarbonic)、リン酸、一水素リン酸 (monohydrogenphosphoric)、二水素リン (dihydrogenphosphoric)、硫酸、一水素硫酸 (monohydrogensulfuric)、ヨウ化水素酸または亜リン酸などのような無機酸からの塩、ならびに酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、乳酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、メタンスルホン酸などのような比較的非毒性の有機酸からの塩が挙げられる。また、アルギン酸 (arginate) などといったアミノ酸の塩およびグルクロン酸またはガラクトン酸 (galactunoric acid) などのような有機酸の塩も含まれる (例えば、Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science 66: 1-19 (1977) を参照のこと)。本発明の特定の具体的な化合物は、化合物が塩基または酸付加塩のいずれかに変換されることを可能にする塩基性および酸性官能基の両方を含有する。当業者に公知のその他の医薬上許容される担体が、本発明に適している。

【0057】

中間の形態の化合物は、塩を塩基または酸と接触させることと、従来法で親化合物を単離することとによって再生され得る。化合物の親の形態は、特定の物理的特性、例えば、極性溶媒における可溶性において、種々の塩の形態とは異なるが、その他の点では、塩は、本発明の目的上、化合物の親の形態と同等である。

【0058】

上記方法は、PSCAを過剰発現する癌、例えば、前立腺、膵臓および膀胱癌の診断、予後および処置において特に適用される。特定の実施形態では、方法は、ホルモン不応性癌または治療抵抗性癌に適用される。特定の実施形態では、方法は転移性癌に適用される。

【0059】

処置は、通常、有効用量で、静脈注射 (IV) などの許容される投与経路による構築物およびその免疫複合体の反復投与を含む。投与量は、当業者によって一般に理解されている種々の因子、例えば、制限するものではないが、癌の種類および癌の重篤度、グレードまたはステージ、使用される薬剤の結合親和性および半減期、所望の定常状態抗体濃度レベル、処置の頻度および本発明の処置法と組み合わせて使用される化学療法薬の影響に応じて変わる。通常の1日用量は、約0.1~100mg/kgの範囲であり得る。1週間あたり10~500mgの範囲の構築物またはその免疫複合体の用量が有効であり得、耐用性良好であるが、さらに高い1週間用量も適当かつ/または耐用性良好であり得る。適当な用量の規定における主要な決定要因は、特定の関連で治療上有効であるのに必要な特定の薬剤の量である。腫瘍阻害または退縮を達成するために反復投与が必要である場合もある。初期負荷用量は、より高いものであってもよい。初期負荷用量は、注入として投与してよい。定期的維持量は、初期用量が耐用性良好であるならば、同様に投与してよい。

【0060】

構築物の直接投与もまた可能であり、特定の関連では利点を有し得る。例えば、膀胱癌腫の治療には、薬剤を、膀胱中に直接注射してもよい。

【0061】

別の実施形態では、本発明は、本発明の抗体およびその断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。一実施形態では、本発明は、本発明の抗体また

はその断片をコードする発現ベクターを提供する。別の実施形態では、本発明は、遺伝子療法において、またはインビボ投与において使用するための本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0062】

「核酸」とは、一本鎖または二本鎖いずれかの形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそれらのポリマーならびにそれらの相補体を指す。この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、参照ヌクレオチドと同様に代謝される、合成である、天然に生じる、天然に生じない、既知ヌクレオチド類似体または修飾された基本骨格残基または結合を含有する核酸を包含する。このような類似体の例として、制限するものではないが、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、メチルホスホネート、キラルーメチルホスホネート、2-Ο-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸（PNA）が挙げられる。

10

【0063】

特に断りのない限り、特定の核酸配列も、その保存的に改変された変異体（例えば、縮重コドン置換）および相補配列、ならびに明示的に示される配列を暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（またはすべての）コドンの第3の位置が、混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を作製することによって達成され得る（Batzer et al., Nucleic Acids Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)）。用語「核酸」は、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドと同義的に使用される。

20

【0064】

投与方法および製剤方法

構築物は、静脈内投与などの公知の方法を踏まえて、例えば、ボラスとして、または一定時間にわたる持続注入によって、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内（intracerebrospinal）、皮下、関節内、滑液包内、くも膜下腔内、経口、局所または吸入経路によって被験体に投与される。静脈内または皮下投与が好ましい。投与は、局所であっても、全身であってもよい。

【0065】

投与のための組成物は、医薬上許容される担体、好ましくは、水性担体に溶解した本明細書に記載される薬剤を含むことが多い。種々の水性担体、例えば、緩衝生理食塩水などを使用してよい。これらの溶液は、無菌であり、通常、望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、従来の、周知の滅菌技術によって滅菌してよい。組成物は、生理学的条件に近づけるために、必要に応じて、例えば、pH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム塩などの医薬上許容される補助物質を含有し得る。これらの製剤中の活性薬剤の濃度は、広く変化し得、選択される特定の投与様式および患者の要求に従って、液量、粘度、体重などに主に基づいて選択される。

30

【0066】

したがって、静脈内投与用の通常の医薬組成物は、薬剤に従って変わる。非経口的に投与可能な組成物の実際の調製方法は、当業者に公知であるか、明らかであり、「Remington's Pharmaceutical Science」、第15版、Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980)などの刊行物に、より詳細に記載されている。

40

【0067】

本医薬組成物は、投与方法に応じて種々の単位投与形で投与してよい。例えば、経口投与に適した単位投与形として、それだけには限らないが、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤およびロゼンジ剤が挙げられる。構築物は、経口投与される場合には、消化から保護されるべきであると認識される。これは、通常、分子を組成物と複合体形成し、それらを酸性および酵素的加水分解に対して耐性にすることによって、または分子を適切に耐性の担体、例えば、リポソームまたは保護バリアにパッケージングすることのいずれかによって達

50

成される。薬剤を消化から保護する手段は、当技術分野で周知である。

【0068】

医薬製剤、特に、本発明とともに使用するための構築物および免疫複合体および阻害剤は、所望の純度を有する構築物を、所望の医薬上許容される担体、賦形剤または安定剤と混合することによって調製できる。そのような製剤は、凍結乾燥製剤または水溶液であり得る。許容される担体、賦形剤または安定剤は、使用される投与量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。許容される担体、賦形剤または安定剤は、酢酸、リン酸、クエン酸およびその他の有機酸；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）、保存料低分子量ポリペプチド；血清アルブミンもしくはゼラチンなどのタンパク質またはポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；およびアミノ酸、単糖類、二糖類およびその他の炭水化物、例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン；キレート化剤；ならびにイオン性および非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート）；塩形成性対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；および／または非イオン性界面活性剤であり得る。構築物は、0.5～200mg/mlの間または10～50mg/mlの間の濃度で製剤してよい。

【0069】

上記製剤はまた、さらなる活性化合物、例えば、化学療法薬、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、増殖阻害剤および抗ホルモン剤を提供し得る。有効成分はまた、持続放出製剤（例えば、固体疎水性ポリマー（例えば、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド）の半透性マトリックスとして調製してもよい。抗体およびイムノコンジュゲートはまた、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合によって調製されたマイクロカプセル中に、例えば、コロイド薬物デリバリーシステム（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）において、またはマクロエマルジョンにおいて、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル中に、およびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に封入してもよい。

【0070】

上記組成物は、治療的処置または予防的処置のために投与してもよい。治療的適用では、組成物を、疾患（例えば、癌）を患っている患者に、「治療上有効な用量」で投与する。この用途のために有効な量は、疾患の重篤度および患者の健康の全身状態に応じて変わる。患者に必要とされ、耐容される投与量および頻度に応じて、単回または複数回投与の組成物を投与してもよい。本発明の目的上、「患者」または「被験体」とは、ヒトおよびその他の動物、特に、哺乳類の両方を含む。したがって、方法は、ヒトの処置および獣医適用の両方に適用できる。好ましい実施形態では、患者は哺乳類、好ましくは、霊長類であり、最も好ましい実施形態では、患者はヒトである。その他の公知の癌治療を、本発明の方法と組み合わせて使用してもよい。例えば、本発明に従って使用するための組成物を使用して、細胞をターゲティングするか、または5FU、ビンブラスチン、アクチノマイシンD、シスプラチン、メトトレキサートなどといったその他の癌治療薬に対して感作させてもよい。

【0071】

その他の実施形態では、本発明の方法は、その他の癌治療（例えば、前立腺全摘除術）、放射線療法（外部ビームまたは近接照射療法）、ホルモン治療（例えば、精巣摘出術、テストステロン産生を抑制するためのLHRH-類似体治療、抗アンドロゲン療法）または化学療法と一緒に実施してよい。前立腺全摘除術は、前立腺全体およびいくつかの周囲組織の除去を含む。この治療は、癌が組織を越えて広がっていないと考えられる場合によく使用される。放射線療法は、まだ前立腺に限定されているか、隣接する組織に広がっている前立腺癌を治療するためによく使用される。疾患がより進行性である場合には、腫瘍の大きさを減少させるために放射線を使用する場合もある。ホルモン療法は、前立腺癌が前立腺を越えて広がった、または再発した患者に使用されることが多い。ホルモン療法の

目的は、男性ホルモン、アンドロゲンのレベルを低下させ、それによって、前立腺癌を収縮させるか、より低速で増殖させる。黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニストは、テストステロンの産生を減少させる。これらの薬剤は、毎月、またはそれより長い間隔で注射してもよい。2種のこのような類似体として、ロイプロリドおよびゴセレリンがある。抗アンドロゲン（例えば、フルタミド、ビカルタミドおよびニルタミド）も使用してよい。全アンドロゲン遮断とは、精巣摘出術またはLHRH類似体と組み合わせた抗アンドロゲンの使用を意味し、s組合せが呼ばれる。化学療法は、前立腺癌が前立腺の外側に広がっており、ホルモン療法が失敗している患者にとっての選択肢である。癌細胞のすべてを破壊することは期待されないが、腫瘍増殖を低速にし、疼痛を低減し得る。ホルモン療法を用いる処置後に回復または継続して増殖し、広がった前立腺癌を治療するのに使用されるいくつかの化学療法薬として、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、エストラムスチン、エトポシド、ミトキサントロン、ビンブラスチンおよびパクリタキセルが挙げられる。癌細胞が化学療法に対して耐性になる可能性を低減するために、2種以上の薬剤を一緒に投与することも多い。小さい細胞癌腫は、ホルモン療法よりも化学療法に反応する可能性がより高い、稀な種類の前立腺癌である。

10

【0072】

併用投与は、別個の製剤または単一の医薬製剤を使用する同時投与、および両（またはすべての）活性薬剤がその生物活性を同時に発揮する期間があることが好ましい、いずれかの順序での逐次投与を意図する。

【0073】

選択した化合物を単独またはその他の適した成分と組み合わせて、吸入によって投与されるようエアゾール製剤に製造してもよい（すなわち、それらを「霧状にし」てもよい）。エアゾール製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などといった加圧された許容される噴霧剤中に入れてもよい。

20

【0074】

非経口投与、例えば、関節内（関節中）、静脈内、筋肉内、腫瘍内、皮内、腹腔内および皮下経路による投与などに適した製剤として、抗酸化剤、バッファー、静菌薬、および製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質、を含み得る水性および非水性の等張性滅菌注射溶液、ならびに、懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤および保存料、を含み得る水性および非水性の滅菌懸濁液が挙げられる。本発明の実施では、組成物を、例えば、静脈内注入によって、経口的に、局所的に、腹腔内に、膀胱内にまたはくも膜下腔内に投与してよい。非経口投与、経口投与および静脈内投与は、好ましい投与方法である。化合物の製剤は、アンプルおよびバイアルなどの単位用量または複数回用量密閉容器中にて提供してもよい。

30

【0075】

注射溶液および懸濁液は、先に記載した種類の滅菌散剤、顆粒剤および錠剤から調製できる。また、エキソピボ治療のために核酸によって形質導入された細胞を、上記のように静脈内に、または非経口的に投与してもよい。

【0076】

医薬品は、単位投与形であることが好ましい。このような形態では、製剤は、適当な量の活性成分を含有する単位用量に細分割される。単位投与形は、パッケージされた製剤、個別量の製剤を含有するパッケージ、例えば、バイアルまたはアンプル中のパッケージングされた錠剤、カプセル剤および散剤であり得る。また、単位投与形は、カプセル剤、錠剤、カシェ剤またはロゼンジ剤自体であり得、または、パッケージングされた形態の適当な数のこれらのいずれかであり得る。組成物は、必要に応じて、その他の適合する治療薬も含み得る。

40

【0077】

好ましい医薬品は、1種または複数の本発明の構築物を、所望により、持続放出製剤中で、1種または複数の化学療法薬または免疫療法薬と組み合わせてデリバリーする。構築物は、その他の細胞傷害性癌治療、例えば、化学療法、放射線療法、免疫療法およびホル

50

モン療法に対する腫瘍細胞の感受性を増大させる感作剤として治療的に投与してもよい。

【0078】

癌の処置のための治療的使用では、本発明の製薬法において使用される構築物は、1日、約0.001mg/kg～約1000mg/kgの初期投与量で投与される。約0.01mg/kg～約500mg/kgまたは約0.1mg/kg～約200mg/kgまたは約1mg/kg～約100mg/kgまたは約10mg/kg～約50mg/kgの1日用量範囲を使用してよい。しかし、投与量は、患者の必要条件、治療されている状態の重篤度および使用されている化合物に応じて変わり得る。例えば、投与量は、特定の患者において診断された癌の種類およびステージを考慮して経験的に決定することができる。本発明との関連で、患者に投与される用量は、患者において長い時間をかけて、有益な治療反応を達成するのに十分でなくてはならない。特定の状況にわたる適切な投与量の決定は、医師の技術の範囲内にある。通常、処置は、化合物の最適用量より少ない、より少量の投与量を用いて開始される。したがって、投与量を、状況下で最適な効果が達せられるまで少しずつ増やして増大する。便宜上、総1日投与量を、必要に応じて、分割し、1日の間に部分で投与してもよい。

10

【0079】

本発明に従って使用するための医薬品は、通常、ヒトおよび非ヒト哺乳類を含めた哺乳類にデリバリーされる。本方法を使用して処置される非ヒト哺乳類として、家畜化動物（すなわち、イヌ、ネコ、マウス、げっ歯類およびウサギ目）および農業用動物（ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ）が挙げられる。

20

【0080】

腫瘍画像化法

特定の実施形態では、本発明は、本発明の抗体の投与によって、インビボで癌細胞または腫瘍を画像化する方法を提供する。一実施形態では、本発明は、インビボで癌細胞を画像化する方法を提供し、この方法は、哺乳類に標識された抗PSCA抗体を投与することおよびインビボで抗体を画像化することを含む。本発明の方法を使用して、哺乳類、例えば、限定するものではないが、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ヒトなどにおいて癌細胞を画像化することができる。

【0081】

インビボ画像化法は、当技術分野で周知であり、限定するものではないが、磁気共鳴画像法（MRI）、核磁気共鳴（NMR）（R. Weissleder, 1999, Radiology 212: 609-14）、コンピュータ断層撮影（CAT）スキャン、冷却電荷結合素子（CCD）カメラ光学画像化（Honigman, et al., 2001 Mol. Ther. 4: 239-249）、生物発光光学画像化（P R Contag, et al., 1998 Nat. Med. 4: 245-247）、ポジトロン放出断層撮影（PET）（M E Phelps, 1991 Neurochemical Research 16: 929-994; J G Tjuvajev, et al., 1998 Cancer Res 58: 4333-4341）、単一光子放射コンピュータ断層撮影法（J G. Tjuvajev, et al., 1996 Cancer Res. 45: 4087-4095）、マイクロPET（McVeigh, 2006, Circ. Res. 98: 879-86に概説される）などが挙げられる。

30

【実施例】

【0082】

以下の実施例は、特許請求される本発明を、制限するのではなく例示するために提示する。

40

【0083】

〔実施例1〕

本実施例は、突然変異体scFv酵母ディスプレイライブラリーの構築およびPSCA結合親和性が改善されたScFv突然変異体の選択を記載する。

【0084】

ライブラリーの構築において使用されるオリゴヌクレオチドおよびベクターとして、以下が挙げられる；ギャップ5' : 5'-TTAAGCTTCTGCAGGCTAGTG-3'（配列番号2）；ギャップ3' : 5'-GAGACCGAGGAGAGGGTTAGG-3'（配列番号3）；pYD2内側NcoI-N

50

o t 1 制限部位 (Razai A, et al. J Mol Biol. 2005; 35 1: 1 58)。

【0085】

まず、2 B 3 S c F v 遺伝子を、N c o I - N o t 1 制限部位を使用して酵母ディスプレイベクター p Y D 2 (Razai A, et al. J Mol. Biol. 2005; 351: 158) にクローニングした。正しい配列を有する細菌クローンを増幅し、Q I A p r e p S p i n M i n i p r e p を用いて D N A を抽出した。以下のとおりにエラープロード P C R を使用して 2 B 3 S c f v 遺伝子にランダム突然変異を導入した：2 B 3 S c F v 遺伝子を、1 0 0 m M M n C l 2 の存在下で T a q を用いる 2 0 サイクルの P C R に供し、ランダム突然変異を作製した。P C R 産物をアガロースゲルに流し、Q I A q u i c k ゲル抽出を使用して精製した。精製した P C R 産物を、ブルーフリーディング D N A ポリメラーゼを使用して 3 5 サイクルの間再度増幅させた。ギャップ 5 ' およびギャップ 3 ' プライマーを用いて両 P C R を実施した。増幅した 2 B 3 F v 遺伝子を、再度アガロースゲルに流し、Q I A q u i c k ゲル抽出を使用して精製した。突然変異した s c F v 遺伝子および N c o I - N o t 1 消化した p Y D 2 を使用して、ギャップ修復によって L i A c 処理 E B Y 1 0 0 細胞を形質転換した。得られた遺伝子レパートリーを、ギャップ修復を使用して p Y D 2 にクローニングして 5.9×10^5 個の形質転換体のライブラリーを作製した。形質転換混合物を S D - C A A で培養し、継代培養した。ライブラリーの大きさは、形質転換混合物の段階希釈を S D - C A A プレートにプレーティングすることによって決定した。

【0086】

選択のために、S G - C A A 培地およびゼオシンにおいて、2 0 ° C で 2 4 時間培養することによって、s c F v ディスプレイを誘導した。第 1 ラウンドの選択のために、2 0 0 0 万個の酵母 (ライブラリーサイズの 3 0 倍を超える) を洗浄し、F A C S バッファー (リン酸緩衝生理食塩水 (p H 7. 4)、0. 5 % ウシ血清アルブミン) に再懸濁し、これに 2 0 0 n M の P S C A ヒト γ 1 融合タンパク質を加え、室温で 1 時間インキュベートした。ラウンド 2、3 および 4 のソーティングのために使用した P S C A ヒト γ 1 の濃度は、それぞれ、5 n M、2 n M および 1 n M であった。細胞を、二次抗体とともに 4 ° C で 3 0 分間インキュベートし、F A C S バッファーで 1 回洗浄し、2 0 0 ~ 5 0 0 μ l の F A C S バッファーに再懸濁し、F A C S A r i a でソートした。通常、1 % の P S C A 結合集団にゲートをかけて収集した。収集した細胞を S D - C A A 培地で増殖させ、S G - C A A において誘導した後、次のソーティングのラウンドに使用した。4 回目のラウンドから 2 0 個の酵母クローンをフローサイトメトリーによって分析した。強力な染色を示すこれらのクローンのうち 8 個を選択し (A 2、A 4、A 8、A 9、A 1 1、A 1 2、B 5 および C 5)、その D N A を配列決定した。A 2、A 4、A 8、A 9、A 1 2、B 5 タンパク質配列を 1 0 の突然変異に関して同定した。A 1 1 が 6 つの突然変異を有し、C 5 は 4 つの突然変異を有していた。親の 2 B 3 S c F v と、A 2、A 1 1 および C 5 のタンパク質配列比較が、図 2 に示されている。

【0087】

[実施例 2]

この実施例は、突然変異体 2 B 3 s c F v のミニボディーへの再編成を記載する。

【0088】

親 2 B 3 ミニボディー p E E 1 2 構築物 (図 2) を基本骨格として使用して、野生型 S c F v 挿入断片が、3 種の 2 B 3 S c F v 親和性変異体の各々で置換されている 3 種の 2 B 3 ミニボディー親和性変異体を作製した。図 1 に親 2 B 3 ミニボディー構築物が示されている。手短には、V_L および V_H 領域を、1 5 残基長の G l y - S e r リッチリンカーと V_L - V_H 方向にて融合させた。この S c F v を、上流にてシグナルペプチドと、および下流にて 1 0 残基の G l y S e r ペプチドリッカーを含む ヒト I g G 1 ヒンジを介して ヒト I g G 1 C_H 3 ドメインと隣接させる。最終産物を、発現の P E E 1 2 ベクターにクローニングした (Lonza Biologics, Slough, UK)。このベクターは、h C M V プロモーターおよび選択のためのグルタミンシンセターゼ遺伝子を含む (Bebbington et al., B

biotechnology (N Y). 1992; 10: 169)。親 2 B 3 ミニボディー p E E 1 2 構築物をバックボーンとして使用して、3 種の 2 B 3 ミニボディー親和性変異体を作製した。親 p E E 1 2 D N A を X b a I および X h o I 制限部位で消化し、3 種の 2 B 3 S c F v 親和性変異体の各々で置換された親 2 B 3 S c F v 挿入断片を除去した。伸長 P C R によって、p E E 1 2 へのサブクローニングのために X b a I - X h o I 制限部位を 2 B 3 S c F v 親和性変異体の末端に加えた。

【0089】

〔実施例 3〕

この実施例では、抗 P S C A ミニボディーの発現、選択および精製を記載する。

【0090】

合計 2×10^6 個の N S 0 マウス骨髄腫細胞を、記載されるように (Yazaki PJ, et al. J Immunol Methods. 2001; 253: 195)、 $10 \mu\text{g}$ の直線化 (S a l I で切断した) ベクター D N A を用い、エレクトロポレーションによってトランスフェクトし、グルタミン欠乏培地で選択した。クローンを E L I S A によって発現についてスクリーニングし、それによって、所望のタンパク質をやぎ抗ヒト I g G (F c 特異的) によって獲得し、アルカリホスファターゼ (A P) コンジュゲートやぎ抗ヒト I g G (F c 特異的) によって検出した (両方とも、Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA 製)。最大に産生するクローンを増殖させ、最終培養に移した。

【0091】

可溶性ミニボディーを、分取 P o r o s 5 0 A カラム (Applied Biosystems, Foster City, CA) を備え、インライン U V モニターを備えた T h e r m a l S e p a r a t i o n s P r o d u c t s H P L C を使用して、タンパク質 L クロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製し、S D S - P A G E で分析した (図 3)。4 種のミニボディーが同様の結果を示した。すべてのミニボディーが、非還元条件下で約 95 k D a の分子量種として移動し、すべて良好な純度を示した。さらに、A 1 1 ミニボディーは、校正されたサイズ排除カラムで実施した場合に、予想されるとおり 29.5 分で溶出した (図 4)。上清を $10 \times 50 \text{ mm}$ カラムにロードし、0.1 M グリシン p H 2.5 を使用して溶出し、2 M T r i s - H C l p H 8 を用いて p H を直ちに中性にした。次いで、精製されたタンパク質を、分子多孔質メンブレンチューブ (m w c o : 30,000) を使用して P B S に対して透析し、V i v a s c i e n c e V i v a s p i n 20 (m w c o : 30,000) を用いて濃縮した。最終タンパク質濃度は、親のマウス抗体を標準として使用し、280 nm での U V 吸光度を測定することによって求めた。

【0092】

この実施例は、抗 P S C A ミニボディーの生化学的特性決定を記載する。

〔実施例 4〕

【0093】

大きさおよび組成：精製したタンパク質を、非還元条件下で S D S - P A G E によって分析した (図 3)。天然の構造的大きさを、サイズ排除カラム (S u p e r d e x 75) (Pharmacia) によって決定した。

【0094】

競合 E L I S A およびフローサイトメトリーによって 4 種のミニボディーの順位を決定した (図 5)。競合 E L I S A によって測定される相対的親和性は、3 種の親和性変異体のすべてが、親よりも高い親和性を有し、親と比較して、A 2、A 1 1 および C 5 それぞれについて、4.4 倍、3.0 倍および 1.9 倍改善されたことを示した。フローサイトメトリーデータもまた、細胞表面に発現された P S C A をターゲッティングした場合に、同じ順序での 4 種のミニボディーの順位付けをもたらした。結論として、4 種のミニボディーの親和性順位は以下のとおりであった：A 2 > A 1 1 > C 5 > 親。

【0095】

競合 E L I S A : ミニボディーの P S C A 相対的結合親和性を、マイクロタイタープレートウェルを精製 P S C A - F c でコーティングした競合 E L I S A によって決定した (

10

20

30

40

50

Olafsen T, et al. J. Immunotherapy 2007: 30: 396)。

【0096】

フローサイトメトリー：細胞PSCA結合活性を評価するために実施した。PSCAを用いて安定にトランスフェクトされたEBV形質転換B細胞リンパ腫細胞株を使用した。手短には、細胞 5×10^5 個を、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のミニボディー $100 \mu\text{l}$ とともに氷上で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、1:100希釈したヤギ抗hFcPEコンジュゲート抗体を用いて染色した。

【0097】

放射性ヨウ素化：先に記載されたように、精製したミニボディーを、Advanced Nuclide Technologies、Indianapolis、INによって提供された陽電子放出同位元素 ^{124}I (0.02 M NaOH 中ヨウ化ナトリウム；放射性核種純度 $>99\%$)を用いて放射性ヨウ素化した(Kenanova, Olafsen et al., Cancer Res. 65: 622, 2005)。免疫反応は、放射性ヨウ素化したミニボディーを、過剰量のSKW-PSCA⁺細胞とともに室温で1時間インキュベートし、細胞を遠心分離し、対照と比較して上清中に存在する放射能をカウントすることによってアッセイした。

【0098】

[実施例5]

この実施例は、抗PSCAミニボディーのマイクロPET画像化および生体内分布研究を記載する。

【0099】

すべての動物研究は、カリフォルニア大学、ロサンジェルス校の学長の(Chancellor's)動物研究委員会(Animal Research Committee)によって承認されたプロトコール下で実施した。異種移植片は、7~8週齢の雄のヌードマウス(Charles River Laboratories、Wilmington、MA)において肩の領域に 2×10^6 個のLAPC-PAD細胞を皮下注射接種することによって確立した。14日後、腫瘍質量が $100 \sim 300 \text{ mg}$ の範囲である時点で、 $100 \mu\text{Ci}$ の同位元素 ^{124}I ($30 \sim 50 \mu\text{g}$ のタンパク質)を各動物の尾静脈中に注射した。マウスをP4マイクロPETスキャナー(Concorde Microsystems, Inc.、Knoxville、TN)を使用して画像化した。画像化を可能にするために、2%イソフルランを使用してマウスを麻酔し、マイクロPETスキャナーの長軸に沿って腹臥位におき、画像化した。獲得時間は、10分とし(1ベッド位置)、フィルタ補正逆投影再構築アルゴリズムを使用して画像を再構築した。画像がディスプレイされ、目的の領域(ROI)が図6に示すように描かれ、AMIDE(Loening and Gambhir, Molecular Imaging 2: 131, 2003)によって定量化された。スキャン後、腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓、肺および血液を摘出し、秤量し、ウェルカウンター(Cobra II AutoGamma、Packard、IL)でカウントした。バックグラウンド、クロスオーバーおよび減衰補正を実施した。結果は、組織1グラム当たりの注射した用量のパーセンテージとして算出した($\% \text{ ID}/\text{g}$)。

【0100】

腫瘍ターゲッティングおよびマイクロPET画像化効率を評価するために、 ^{124}I 標識ミニボディーを、右肩にLAPC-9AD腫瘍を保持するヌードマウスに注射した。21時間および/または25時間に全身マイクロ(mico)PETおよびCTスキャンを実施し、その後、動物を屠殺し、 γ カウンターを使用して種々の組織における活性を定量化した。マイクロPET画像化を定量化するために、腫瘍において4種の3次元ROIを描き、腫瘍周辺の軟組織中の4種のその他のROIが図6に提示されている。ROI位置および大きさは、CT画像情報を基にした。体内分布および画像化定量化の両方とも、バックグラウンドに対する腫瘍シグナルの比として表される。A11ミニボディーは、3種の親和性変異体を比較した実験において最良の体内分布および画像化データを示した(図7A)。したがって、3種の親和性変異体ミニボディーの、親和性順位(図5)およびインビボ腫瘍ターゲッティング/画像化順位(図7A)は異なっており、このことは、本発明者のモデルでは、インビボ腫瘍ターゲッティング/画像化有効性は、単に、トレーサーの

、その標的に対する固有の親和性に依存するものではないということを示唆する。P S C A に対して最良の親和性を有する A 2 は、最良のインビボ腫瘍ターゲッティング／画像化結果を示さなかった。この不一致についての 1 つの可能性ある説明は、A 2 は、V_L C D R 2 中にアスパラギンのチロシンへの置換を有し、この新しいチロシンのヨウ素化が、P S C A との結合に影響を及ぼし得るということである。第 2 の実験では、A 1 1 ミニボディーを、そのインビボ腫瘍ターゲッティング／画像化効率について親のミニボディーと比較した。A 1 1 は、腫瘍ターゲッティングにおける 2 0 % の増大 (n = 3) およびマイクロ P E T 腫瘍画像化における 1 4 1 % の増大 (n = 2) を示した (図 7 B)。

【0101】

〔実施例 6〕

10

この実施例は、抗 P S C A ミニボディーを使用した種々の膵臓癌腫瘍の画像化を記載する。

【0102】

親和性成熟抗 P S C A ミニボディーのターゲッティングおよび画像化能力を評価するために、¹²⁴I 標識したミニボディー (親の 2 B 3 および変異体 A 1 1) を、低レベルの標的 P S C A 抗原を発現する腫瘍を保持する胸腺欠損ヌードマウスに注射した。手短には、ヒト C a p a n - 1 (図 1 4) またはヒト M I A P a C a - 2 (図 1 5) 膵臓腫瘍 (pancreatic tumors) のいずれかを保持する異種移植マウスに、2 0 0 または 3 0 0 μ g いずれかの標識された抗 P S C A ミニボディーを注射した。先と同様に全身マイクロ (micro) P E T および C T スキャンを実施し、組織放射能を測定した。同様に、実施例 5 にお

20

けるとおりに、マイクロ P E T 画像化の定量化ならびに R O I 位置および大きさを決定した。

【0103】

図 1 4 および 1 5 において見ることにできるように、変異体 A 1 1 抗 P S C A マイクロボディーは、親の 2 B 3 ミニボディーと比較して、筋肉に対する腫瘍の特異性の比についての改善を一貫して示した。インビボ特異性のほぼ 2 倍の増大は、これらの変異体ミニボディーが、既存の抗 P S C A 抗体よりも、治療的ターゲッティングおよび腫瘍画像化における使用に、より良好に適合することを示唆する。特に、C a p a n - 1 および H P A F - 1 1 における腫瘍取り込み (示されていないデータ) は、およそ 2 % であり、M I A P a C a - 2 腫瘍では 1 % 未満であり、このことは特異的取り込みを示唆するものである。

30

【0104】

関連技術：

1) Sundaresan, G., Yazaki, P. J., Shively, J. E., Finn, R. D., Larson, S. M., Raubitschek, A. A., Williams, L. E., Chatziioannou, A. F., Gambhir, S. S., and Wu, A. M. (2003) Iodine-124 labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow highcontrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. J. Nucl. Med., 44: 1962-1969.

【0105】

2) Olafsen, T., Gu, Z., Sherman, M. A., Leyton, J. V., Witkosky, M. E., Shively, J. E., Raubitschek, A. A., Morrison, S. L., Wu, A. M. and Reiter, R. E. (2007) Targeting, imaging, and therapy using a humanized anti-prostate stem cell antigen (PSCA) antibody. J. Immunotherapy 30: 396-405.

40

【0106】

3) Leyton, J. V., Olafsen, T., Sherman, M. A., Reiter, R. E., and Wu, A. M. Anti-prostate stem cell antigen (PSCA) antibody fragments for PET imaging of prostate cancer (abstract). Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 21 : 391, 2006

。

【0107】

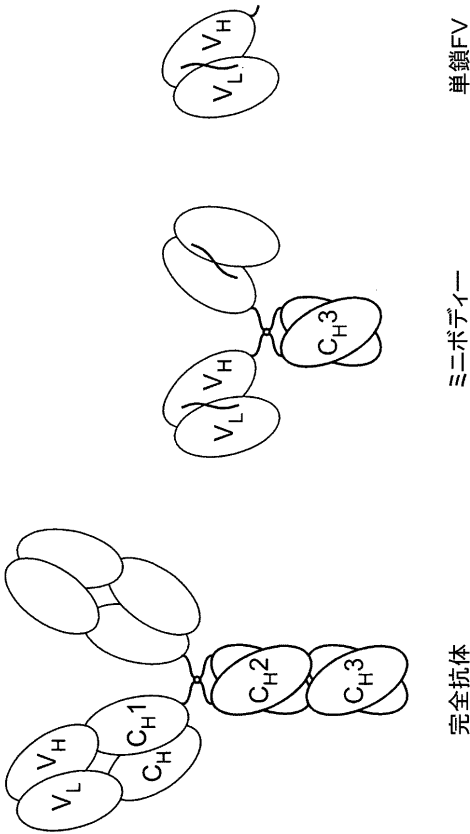
本明細書に記載される実施例および実施形態は単に例示を目的とすること、およびそれ

50

らを踏まえた種々の改変または変法が当業者に示唆されるであろうこと、そしてそれらも本出願の精神および範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれるべきであることを理解されたい。本明細書に引用される、すべての刊行物、特許および特許出願は、これにより、本開示内容と対応する範囲について、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるものとする。

【 図 1 】

Fig. 1



【 図 2 - 1 】

Fig. 2 (シート 1)

1	10	20	30	40	50	60	
P-2B3	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVRF	IHWYQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSR					
			CDR-L1		CDR-L2		
1. C5	DIQLIQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVRF	IHWYQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSR					
P-2B3	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVRF	IHWYQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSR					
2. A2	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVRF	IHWYQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSR					
P-2B3	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVRF	IHWYQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSR					
3. A11	DIQLTQSPSTLSASMGDRVTITCSASSSVRF	IHWYQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSR					
P-2B3	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVRF	IHWYQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSR					
			CDR-L3				
P-2B3	FSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQOMWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG						
1. C5	FSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQOMWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG						
P-2B3	FSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQOMWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG						
2. A2	FSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQOMWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG						
P-2B3	FSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQOMWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG						
3. A11	FSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQOMWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG						
P-2B3	FSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQOMWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG						

Fig. 3 (シート 2)

ggcggctcggagggtggcgagctcagaggttcagctggtgagagctcgggggtggcctt
G G S G G G S S E V Q L V E S G G L
 V_H
gtcagaccaggggctcactccgtttgtctcgcgagcttctggcttcaacattaaagac
V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D
tactatatacactgggtgcgtcagggccctgtgtaagggcctggaatgggttgatggatt
Y Y I H W V R Q A P G K G L E W V A W I
gatcctgagaatgtgacactgaattgtcccgaagttccaggccgtgccactataaagc
D P E N G D T E F V P K F Q G R A T I S
gatcctgagaatgtgacactgaattgtcccgaagttccaggccgtgccactataaagc
A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T
gccgtctattattgtaaacgggggttctgggtcaagggaacccctggtcacctgtctcg
A V Y Y C K T G G F W G Q G T L V T V S
agcagagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgcgcgaggtagctct
S E P K S C D K T H T C P P C G G G S S
伸長
ヘンジ

Fig. 3 (シート 3)

ggcgggtgatccggcgagcccgagaaaccacaggtgtacaccctgccccatcccg
G G S G G Q P R E P Q V Y T L P S R
 C_H7
gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaggcttctatccagc
D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S
gacatcgccgtggagtggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccagcct
D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
cccgtgctggactccgacggctctctctctctacagcaagctcacctggacaagagc
P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S
aggtggcagcagggaacgtcttctctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccac
R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H
tacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgatag
Y T Q K S L S L S P G K -

Fig. 2 (シート 2)

【 図 2 - 2 】

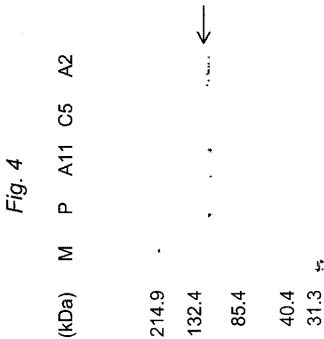
130 * 140 * 150 * 160 * 170 * 180 * 190
P-2B3 GGSSEVLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFINIKDYYIHWRQAPGKGLEWAWIDPENGDTFEFVPKFQG
CDR-H1
130 * 140 * 150 * 160 * 170 * 180 * 190
1. C5 GGSSEVLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFINIKDYYIHWRQAPGKGLEWAWIDPENGDTFEFVPKFQG
P-2B3 GGSSEVLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFINIKDYYIHWRQAPGKGLEWAWIDPENGDTFEFVPKFQG
CDR-H2
130 * 140 * 150 * 160 * 170 * 180 * 190
2. A2 GG-SEVLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFINIKDYYIHWRQAPGKGLEWAWIDPENGDTFEFVPKFQG
P-2B3 GGSSEVLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFINIKDYYIHWRQAPGKGLEWAWIDPENGDTFEFVPKFQG
CDR-H1
130 * 140 * 150 * 160 * 170 * 180 * 190
3. A11 GGSSEVLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFINIKDYYIHWRQAPGKGLEWAWIDPENGDTFEFVPKFQG
P-2B3 GGSSEVLVESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFINIKDYYIHWRQAPGKGLEWAWIDPENGDTFEFVPKFQG
CDR-H2
130 * 140 * 150 * 160 * 170 * 180 * 190
P-2B3 RATISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCKTGGFGGGLTVTVSSAAAG (配列番号: 4)
CDR-H3
1. C5 RATISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCKTGGFGGGLTVTVSSAAAG (配列番号: 5)
P-2B3 RATISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCKTGGFGGGLTVTVSSAAAG (配列番号: 4)
2. A2 RATISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCKTGGFGGGLTVTVSSAAAG (配列番号: 6)
P-2B3 RATISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCKTGGFGGGLTVTVSSAAAG (配列番号: 4)
3. A11 RATISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCKTGGFGGGLTVTVSSAAAG (配列番号: 7)
P-2B3 RATISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCKTGGFGGGLTVTVSSAAAG (配列番号: 4)

Fig. 3 (シート 1)

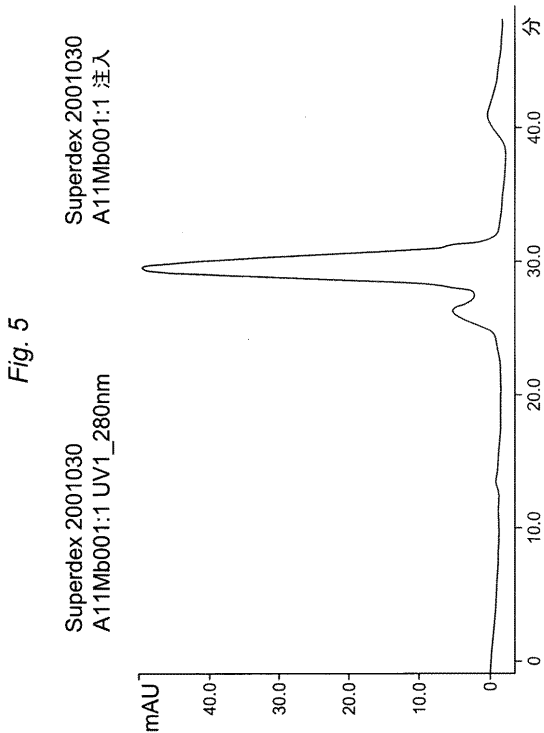
【 図 3 - 1 】

tctagagccgccaccatggagacagacacactcctcgtctatgggtgctgctgctctggtt
S R A A T M E T D T L L L W V L L L W V
シグナルペプチド
ccaggtccaccggtagacattcagctgacccaatctccaagctcttggcgcctctgtg
P G S T G D I Q L T Q S P S S L S A S V
ggggatagggtcaccatcaccctgcagtcgagttcaagtgtaagattcattcactggtac
G D R V T I T C S A S S V R F I H W Y
cagcagaaaccaggaagctcccaagactcatctatgatcacatccaactggcttct
Q Q K P G K A P K R L I Y D T S K L A S
ggcgtcccttctaggttcagtggtccgggtctgggacagactcaccctcaccattagc
G V P S R P S G S G S G T D F T L T I S
agtctgcagccggaagatttcgccacctattactgtcagcagtgagtagtagccattc
S L Q P E D F A T Y Y C Q Q W S S P F
acgttcggacaggggaccaggtggagataaaagcagtagtagcggtggtcccgga
T F G Q G T K V E I K G S T S G G G S G
リンカー

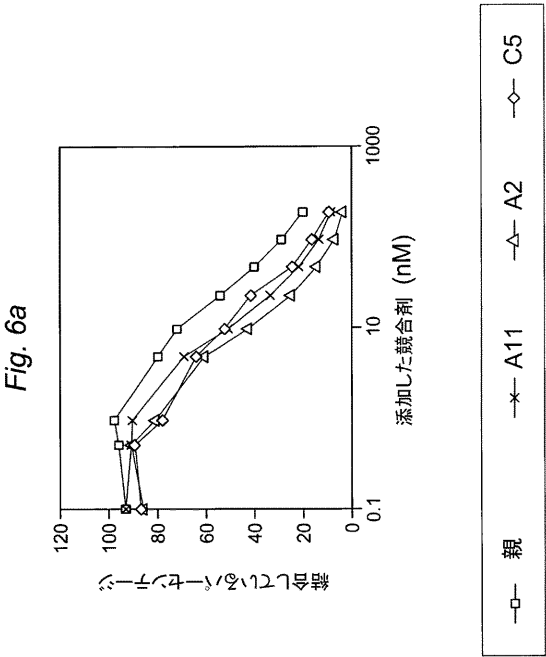
【 図 4 】



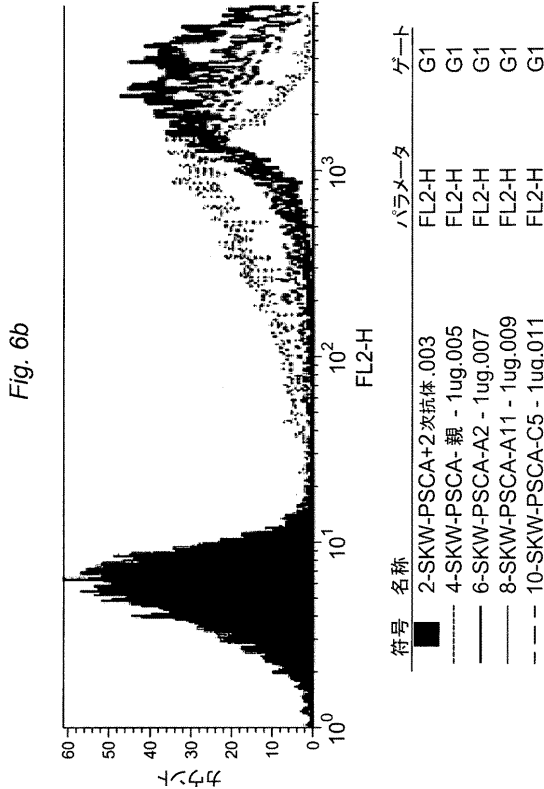
【 図 5 】



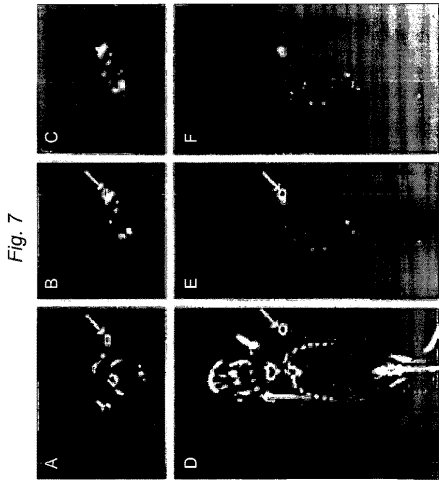
【 図 6 a 】



【 図 6 b 】



【図 7】



【図 8】

Fig. 8

	腫瘍／血液 生体内分布	腫瘍／バックグラウンド マイクロPET
A2	0.67	2.9
A11	1.08	8.5
C5	0.73	2.9

	腫瘍／血液 生体内分布	腫瘍／バックグラウンド マイクロPET
親	0.88	2.4
A11	1.11	5.8

【図 9】

Fig. 9
前立腺幹細胞抗原 (PSCA)



前立腺および膀胱において発現された
123アミノ酸GPI結合細胞表面タンパク質

前立腺癌 (40%局在、60~100%転移
性癌)、膀胱および膵臓癌において過剰発
現される

生物学的に活性な
マウス抗PSCA抗体 (1G8)

1G8抗PSCA抗体を用いて染色した
グリゾン (Gleason) 4前立腺癌
R. Reiter et al., PNAS 1998
Saffran et al., PNAS 2000
Z Gu et al., Oncogene 2000

【図 10】

Fig. 10
抗PSCA抗体および抗体断片



1) 1G8: マウスモノクローナル抗体 (150 kDa)
(Gu Z, et al., Oncogene 2000)

2) 2B3: ヒト化 1G8
(Olafsen T, et al. Immunother 2007)

3) 2B3 抗体断片:

- ScVF: 28kDa

- ダイアボディー: 55kDa

- ミニボディー: 80kDa

- ScFv-Fc: 110kDa

2B3親 (P) ミニボディーは、
良好な腫瘍ターゲティングを示した



Fig. 16a (シート 1)

2B3親和性の種々のタンパク質配列

2B3親ミニボディー配列	2B3 A2ミニボディー配列
DIQLTQSPSSLSASVGDRTVTITCSASSSVRFIHW YQKPGKAPKRLIYDTSKLAGVPSRFSGSGG TDFTLTISLQPEDFATYYCQWSSSPFTFGGT KVEIKGSTGGGGGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNIKDYYIHWRQAPGK GLEWAWIDPENGDTFVPKFGGRATISADTSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCKTGGFWGGTLV TVSSEPKSCDKTHTCPPCGGSGGGSGGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK (配列番号 : 10)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTVTITCSASSSVRFIHW YQKPGKAPKRLIYDTSKLAGVPSRFSGSGG TDFTLTISLQPEDFATYYCQWSSSPFTFGGT TKVEIKGSTGGGGGGGGSGGGS-EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDYYIHWRQAPG KGLEWAWIDPEYGDSEFVPKFGGRATMSADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCKTGGFWGRGT LVTVSSEPKSCDKTHTCPPCGGSGGGSGGQPP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (配列番号 : 11)

Fig. 14

Capan-1異種移植片のPET画像化

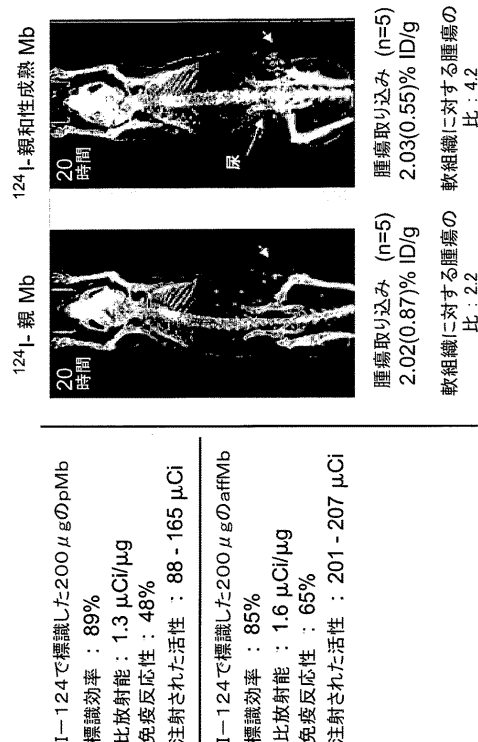


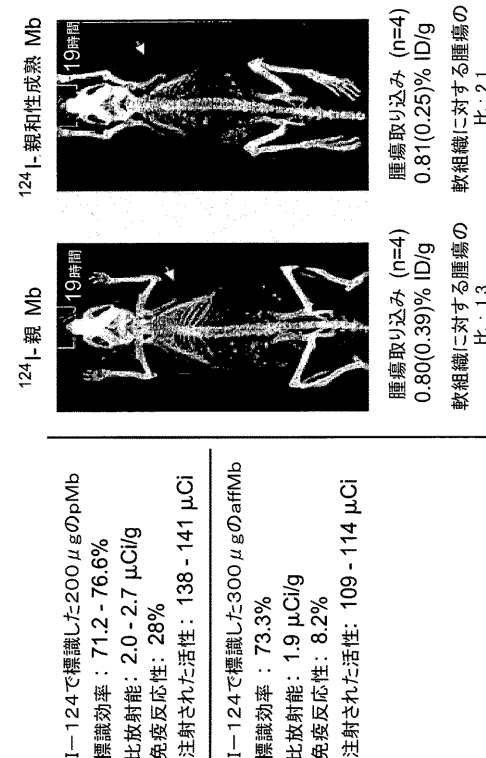
Fig. 16a (シート 2)

2B3 A11 ミニボディー配列

DIQLTQSPSTLSASMGDRVTITCSASSSVRFIHW
YQKPGKAPKRLIYDTSKLAGVPSRFSGSGG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQWSSSPFTFGQ
TKVEIKGSTGGGGGGGGSGGSEVQLVEYGG
GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDYYIHWRQAPG
KGLEWAWIDPENGDTFVPKFGGRATMSADT
SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCKTGGFWGGT
LVTVSSEPKSCDKTHTCPPCGGSGGGSGGQPP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK (配列番号 : 12)

Fig. 15

MIA PaCa-2異種移植片のPET画像化



【図 16 b】

Fig. 16b

2B3 C5 ミニボディー配列

DIQLIQSPSSLASVGDRTITCSASSSVRFIHW
 YQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGGSG
 TDFTLTISLQPEDFATYYCQWSSSPFTFGGT
 KVEIKGSTGGSGGGGGSGSSEVQLVESGGG
 LVQPGGSLRLSCAASGFNIKDYIHWVRQAPGK
 GLEWVAWIDPENGDTFVVKFQGRATISADTSK
 NTVYLQMNSLRAKDTAVYYCKTGGFWGQGLV
 TVSSEPKSCDKTHTCPPCGGSGGGSGGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVVFSCSMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK (配列番号 : 13)

【配列表】

2015015960000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成26年10月14日(2014.10.14)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

【図 1】抗 P S C A ミニボディーの概略図である。ミニボディーをコードする遺伝子は、 V_L —リンカー— V_H —ヒンジ— C_H3 の順に組み立てられ、ヒンジおよび C_H3 ドメインは、ヒト Ig G 1 由来である。上記タンパク質は、80 kDa の二量体に自己組織化する。

【図 2-1】2B3 S c F v 変異体タンパク質配列の比較を示す図である。 V_L 配列およびリンカーの一部が上部枠中にあり、リンカーの残りおよび V_H 配列は下部の枠中にある。また、C D R も示されており、野生型配列に下線が引かれている。突然変異は、異なる陰影で強調されている。親の S c F v P-2B3 配列（配列番号 4）ならびに変異体 C 5（配列番号 5）、A 2（配列番号 6）および A 1 1（配列番号 7）S c F v 配列が示されている。

【図 2-2】同上

【図 3-1】親の 2B3 ミニボディー（配列番号 9）の DNA 配列（配列番号 8）および翻訳されたタンパク質配列を示す図である。また、以下のタンパク質セグメントの出発点も示されている：シグナルペプチド（哺乳類分泌の）、軽鎖可変領域（ V_L ）、15 個のアミノ酸のドメイン間ペプチドリリンカー、重鎖可変領域（ V_H ）、ヒト Ig G 1 ヒンジ配

列および10個のアミノ酸伸長およびヒト IgG1CHj ドメインとそれに続く2つの停止コドン。

【図3-2】同上

【図3-3】同上

【図4】非還元条件での、4つのミニボディー、すなわち、親(p)、A11、A2およびC5のSDS-PAGE分析を示す図である。矢印は、ミニボディーの予測分子量を示す。

【図5】予測される分子サイズにおける均一ピークを示す、A11ミニボディーのサイズ排除HPLCを示す図である。

【図6a】親和性ランキングを示す図である。(A)競合ELISA結合実験によるランキング：プレートをCEAでコーティングし、ビオチン化された完全な(intact)抗CEAキメラ抗体をプローブとして使用した。

【図6b】親和性ランキングを示す図である。(B)フローサイトメトリーによるランキング：各ミニボディーの5pg/mlをPSCA発現細胞とともにインキュベートした。次いで、細胞を、PEコンジュゲートした抗ヒトFcを用いて染色した。

【図7】LAPC-9AD(PSCA陽性ヒト前立腺癌)異種移植片(xenograft)を保有するヌードマウスの同時記録マイクロPET/マイクロCTスキャンを示す図である。マウスにI-124放射標識A11ミニボディー変異体を注射し、連続スキャンした。A、B、C；矢状断面；D、E、F；冠状断面。A、D；白色の長方形としてROI(関心領域)を示す、同時記録マイクロPETおよびマイクロCT。B、E；マイクロPET像およびROI。C、F；マイクロPET像のみ。

【図8】2B3ミニボディー変異体の生体内分布およびマイクロPET画像化ランキングを示す図である。生体内分布の単位は、γカウンターにおける、注射時間の21または25時間後の、秤量した組織1gあたりの%ID値である。マイクロPET画像化値は、図6に示され、材料および方法に記載されるように、4つのROIの平均値について取得した。

【図9】PSCAデータおよび特性のまとめを示す図である。

【図10】本発明の種々の構築物を示す図である。

【図11-1】2B3変異体を製造するスキームを示す図である。

【図11-2】同上

【図12】種々の構築物のマイクロPET画像化および生体内分布データを示す図である。

【図13】A11および親2B3のマイクロPET画像化および生体内分布結果を示す図である。

【図14】親2B3および変異体A11抗PSCAミニボディーを使用した、膵臓癌Capan-1異種移植マウスのマイクロPET画像化および体内分布データを示す図である。

【図15】親2B3および変異体A11抗PSCAミニボディーを使用した、膵臓癌MIPaCa-2異種移植マウスのマイクロPET画像化および体内分布データを示す図である。

【図16a-1】親2B3(配列番号10)および変異体A2(配列番号11)抗PSCAミニボディーのアミノ酸配列を示す図である。

【図16a-2】変異体A11抗PSCAミニボディーのアミノ酸配列(配列番号12)を示す図である。

【図16b】変異体C5抗PSCAミニボディーのアミノ酸配列(配列番号13)を示す図である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

前立腺幹細胞抗原（P S C A；配列番号 1）に特異的に結合する抗原結合タンパク質であって、

a) 配列番号 4 の V L および V H ドメインと少なくとも 95% 同一であり、T 5、S 10、V 15、S 91、S 123、S 131、N 179、T 182、I 194、A 203、E 213、Q 228 およびその組み合わせからなる群から選択される配列番号 4 のアミノ酸に対応する残基において少なくとも 1 つの変異を含む V L および V H ドメイン、ここに、該抗原結合タンパク質は、P S C A に対し、配列番号 4 よりも大きい親和性を有する、または

b) 配列番号 10 の V L および V H ドメインと少なくとも 95% 同一であり、T 5、S 10、V 15、S 91、S 123、S 131、N 179、T 182、I 194、A 203、E 213、Q 228 およびその組み合わせからなる群から選択される配列番号 10 のアミノ酸に対応する残基において 1 以上の変異を含む V L および V H ドメイン、ここに、該抗原結合タンパク質は、P S C A に対し、配列番号 10 よりも大きい親和性を有する、を含むタンパク質。

【請求項 2】

少なくとも 1 つの変異または 1 以上の変異が、T 5 I、S 10 I、V 15 M、S 91 G、Δ 123、S 131 Y、N 179 Y、T 182 S、I 194 M、A 203 V、E 213 K、Q 228 R およびその組み合わせからなる群から選択される配列番号 4 または 10 における変異に対応する変異を含む、請求項 1 記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3】

V H および V L ドメインが、

(a) S 10 I、V 15 M、S 91 G、S 131 Y および I 194 M、

(b) S 91 G、Δ 123、N 179 Y、T 182 S、I 194 M および Q 228 R、または

(c) T 5 I、A 203 V および E 213 K

に対応する変異を含む、請求項 1 または 2 記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 4】

ミニボディー、ダイアボディー、s c F v、または s c F v - F c である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 5】

抗原結合タンパク質の配列が、

a) 配列番号 5 の配列、

b) 配列番号 6 の配列、

c) 配列番号 7 の配列、

d) 配列番号 11 の配列、

e) 配列番号 12 の配列、または

f) 配列番号 13 の配列

を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 6】

a) 治療薬とコンジュゲートしているか、または

b) 検出可能マーカーで標識されている、

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 7】

治療薬が細胞傷害性薬、放射性同位元素またはプロドラッグである、請求項 6 記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 8】

細胞傷害性薬剤が、リシン、リシン A 鎖、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソー

ル、エチジウムブロマイド、マイトマイシン、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、ジヒドロキシアントラシンジオン、アクチノマイシンD、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素（PE）A、PE 40、アブリン、アルブリンA鎖、モデクシンA鎖、 α -サルシン、ゲロニン、ミトゲリン、レトストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、クリシン、クロチン、カリケアマイシン、サパオナリアオフシナリスインヒビター、マイタンシノイド類およびグルココルチコイドリシンからなる群から選択される、請求項7記載の抗原結合タンパク質。

【請求項9】

放射性同位元素が、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{124}I 、 ^{111}In 、 ^{90}Y および ^{186}Re からなる群から選択される、請求項7記載の抗原結合タンパク質。

【請求項10】

検出可能マーカーが、放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、金属キレート剤、酵素、および ^{124}I からなる群から選択される、請求項6記載の抗原結合タンパク質。

【請求項11】

請求項1～5のいずれか1項記載の抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項12】

インビボで非ヒト哺乳動物における癌細胞を画像化する方法であって、請求項1～6のいずれか1項記載の抗原結合タンパク質を対象に投与し、該抗原結合タンパク質を検出し、それにより、インビボで癌細胞を画像化することを含む方法。

【請求項13】

抗原結合タンパク質が磁気共鳴画像法（MRI）、核磁気共鳴（NMR）、コンピュータ断層撮影（CAT）スキャン、冷却電荷結合素子（CCD）カメラ光学画像化、生物発光光学画像化、ポジトロン放出断層撮影（PET）、単一光子放射コンピュータ断層撮影法、またはマイクロPETによって検出される、請求項12記載の方法。

【請求項14】

前立腺幹細胞抗原（PSCA）タンパク質を発現する前立腺癌細胞の増殖を阻害する方法であって、前記癌細胞を、前記癌細胞の増殖を阻害するのに有効な量の請求項1～5のいずれか1項記載の抗原結合タンパク質と接触させることを含む方法において使用するための、請求項1～5のいずれか1項記載の抗原結合タンパク質。

【請求項15】

（a）該方法が前立腺癌細胞を死滅させるための方法であり、

（b）該抗原結合タンパク質が、アミノ酸位置22のロイシンで始まり、アミノ酸位置99のアラニンで終了する配列番号2に示されるPSCAタンパク質を認識および結合し、

（c）該方法が、該細胞に化学療法薬を投与することをさらに含み、または

（d）該方法が、該細胞に放射線療法を施すことをさらに含む、
請求項14記載の使用のための抗原結合タンパク質。

【請求項16】

該方法が前立腺、膀胱または膵臓癌に罹患している患者を処置するための方法である、
請求項14または15記載の使用のための抗原結合タンパク質。

【請求項17】

該方法がホルモンアレーション療法またはホルモンアンタゴニスト療法を患者に施すことを含む、請求項16記載の使用のための抗原結合タンパク質。

【請求項18】

（a）該抗原結合タンパク質を患者に静脈内、腹腔内、筋内、腫瘍内または皮内投与するか、または

（b）該抗原結合タンパク質を直接、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、またはその転移中に投与する

ことを含む、請求項 17 記載の使用のための抗原結合タンパク質。

【請求項 19】

癌細胞を検出する方法において使用するための、請求項 6 記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 20】

対象における前立腺、膀胱または膵臓癌の処置または検出において使用するための、請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 21】

請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の抗原結合タンパク質と、医薬上許容される賦形剤、担体または安定剤とを含む医薬組成物。

【請求項 22】

凍結乾燥製剤または水溶液である、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

V L ドメインが、配列番号 5、6、7、11、12 または 13 の少なくとも 1 つの V L ドメインを含む、請求項 1 記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 24】

V H ドメインが、配列番号 5、6、7、11、12 または 13 の少なくとも 1 つの V H ドメインを含む、請求項 1 記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 25】

V L ドメインが、配列番号 5、6、7、11、12 または 13 の少なくとも 1 つの V L ドメインを含む、請求項 24 記載の抗原結合タンパク質。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2－2

【補正方法】変更

【補正の内容】

Fig. 2 (シート 2)

[illegible]

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00			4 C 1 8 8
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00			4 H 0 4 5
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00		C	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02		A	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 49/00		A	
G 0 1 T 1/161 (2006.01)	A 6 1 K 49/02		C	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/574		D	
	G 0 1 T 1/161		D	
	C 1 2 P 21/08			

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 アンナ・エム・ウー

アメリカ合衆国 9 1 4 0 3 カリフォルニア州 シャーマン・オークス、サットン・ストリート 1 4 9 1 9 番

(72)発明者 ロバート・イー・リーター

アメリカ合衆国 9 0 0 2 4 カリフォルニア州 ロサンジェルス、キナード・アベニュー 1 0 5 1 1 番

(72)発明者 エリック・ジェイ・レピン

アメリカ合衆国 9 0 0 9 5 カリフォルニア州 ロサンジェルス、ウエストウッド・プラザ 7 0 0 番

(72)発明者 ジェイムズ・ディ・マークス

アメリカ合衆国 9 4 7 0 7 カリフォルニア州 ケンジントン、アードモア・ロード 1 0 7 番

(72)発明者 チョウ・ユ

アメリカ合衆国 9 4 1 2 2 カリフォルニア州 サンフランシスコ、カーカム・ストリート 2 5 2 7 番

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA12 BA54 CA07 DA02 DA12 FA02 GA14 HA03 HA08

4B063 QA19 QQ08 QR48 QR66 QS36 QX02

4B064 AG27 CA06 CA10 CA19 DA05 DA14

4C084 AA19 MA02 NA14 ZB05 ZB09 ZB26 ZC75

4C085 AA14 BB01 BB36 BB41 BB42 BB43 BB44 DD62 EE01 EE03

GG01 HH03 HH07 HH11 HH13 KA04 KA27 KA28 KA29 KB07

KB10 KB11 KB18 KB82 LL18

4C188 EE02 FF07 KK15 KK32

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA28 EA51 FA74

【外国語明細書】

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

**HIGH AFFINITY ANTI-PROSTATE STEM CELL ANTIGEN (PSCA)
ANTIBODIES FOR CANCER TARGETING AND DETECTION**

CROSS-REFERENCES TO RELATED APPLICATIONS

[0001] NOT APPLICABLE

STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER
FEDERALLY SPONSORED RESEARCH OR DEVELOPMENT

[0002] This invention was made with Government support of Grant No. CA092131, awarded by the NIH/NCI. The Government has certain rights in this invention.

REFERENCE TO A "SEQUENCE LISTING," A TABLE, OR A COMPUTER
PROGRAM LISTING APPENDIX SUBMITTED ON A COMPACT DISK.

[0003] NOT APPLICABLE

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0004] Prostate stem cell antigen (PSCA) a cell surface glycoprotein expressed in normal human prostate and bladder is over-expressed in prostate cancers (40% of primary tumors and 60-100% of lymph node and bone marrow metastases). It is also highly expressed in transitional carcinomas of the bladder and pancreatic carcinoma. 1G8, an anti-PSCA mouse monoclonal antibody specific for PSCA demonstrated anti-tumor targeting activity in vivo (Gu Z, et al. Cancer Res. 2005; 65:9495). This antibody was humanized by grafting on a human framework (Trastuzumab) and named 2B3 (Olafsen T, et al. J. Immunotherapy 2007; 30:396).

[0005] The invention addresses the need for agents that have appropriate pharmacodynamic properties to target and image tumors that express PSCA. There is a tremendous need in the field for effective agents to image cancers with sensitivity and specificity, particularly early stage tumors or ones with early metastasis not imageable by traditional means. As PSCA is highly expressed by most prostate, bladder and pancreatic tumors, it is an important target in the detection, diagnosis, prognosis, and treatment of these cancers. The current invention describes an innovative constructs with optimal characteristics for tumor imaging and

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

targeting. They may also be used for tumor targeting of gene therapy, radioactivity therapy, and may have therapeutic utility by themselves.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0006] This invention describes engineered antibodies that recognize a novel cell surface marker in prostate and other cancers with high affinity. These genetically engineered antibody fragments are tailored specifically for in vivo use for targeting and detection.

[0007] The invention addresses the need for agents that have appropriate pharmacodynamic properties to target and image tumors that express PSCA. There is a tremendous need in the field for effective agents to image cancers with sensitivity and specificity, particularly early stage tumors or ones with early metastasis not imageable by traditional means. PSCA is highly expressed by most prostate, bladder and pancreatic tumors and is a promising target. The current invention describes an innovative molecule with optimal characteristics for tumor imaging. It may also be useful for tumor targeting of gene therapy, radioactivity or may have therapeutic utility by itself.

[0008] There are multiple embodiments. For instance, there are a variety of engineered antibody formats, such as scFvs, diabodies, triabodies, minibodies, and scFv-Fc. In general, the agent should at least demonstrate bivalent, as opposed to monovalent binding. The overall size, shape, and domain composition of the agent can be varied to suit the final application. Engineered fragments that exhibit optimal targeting in humans may be slightly different from formats that are optimal in mice. Since one goal is human application, the invention incorporates a humanized set of antibody variable regions, as well as human hinge and constant regions. Additional embodiments would include fully human variable regions. The proteins can be expressed in a variety of systems, including microbial, insect cells, mammalian cell culture and transgenic animals.

[0009] For imaging purposes, a variety of radionuclides can be attached to the engineered antibodies for detection with gamma or SPECT cameras, or PET scanners. For therapy one can attach drugs, toxins, cytokines, enzymes, or other therapeutic moieties for PSCA-targeted delivery to tumors. The engineered PSCA-specific antibodies can be coupled to nanosensors for detection (in vitro or in vivo) or nanoparticles for delivery (in vivo). One can also incorporate the PSCA antibody fragments into viral vectors for targeted gene therapy of tumors.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0010] The invention addresses the unmet need for imaging of cancer, in early diagnosis or diagnosis of metastatic disease. In particular, there is a critical need for better agents for imaging prostate cancer for detection and staging. PSCA antibody fragment imaging will be very useful for imaging bone metastases and assessing response to treatment; there are no good imaging approaches currently available. Detection of pancreatic cancer is a critical need, and an imaging agent would be useful in high-risk patients. The invention describes high-affinity, highly specific engineered antibodies tailored for in vivo targeting and detection of PSCA in prostate cancer, bladder cancer, and pancreatic cancer patients.

[0011] Accordingly, in a first aspect, the invention provides high affinity PSCA antigen binding protein constructs which can be used in the treatment and detection of cancers which overexpress PSCA. In some embodiments, these constructs are minibodies, diabodies, triabodies, ScFv, or ScFv-Fc as described further below. In one embodiment, the invention provides an antigen binding protein construct directed toward a mammalian PSCA protein (e.g., human, murine) selected from the group consisting of a minibody, a diabody, and scFv-Fc wherein the selected construct has V_L and V_H domains that are substantially identical, respectively, to the V_L domain and the V_H domain of an anti-PSCA antibody. For example, the construct can be a minibody in which the V_L and V_H chain variable domains of the anti-PSCA antibody are fused to part of the hinge region of an antibody, an amino acid linker and the C_H3 domain of an immunoglobulin molecule. In other embodiments, the construct is a diabody.

[0012] In embodiments, where the construct is a minibody or diabody or scFv-Fc, the anti-PSCA antibody can be a humanized antibody and the C_H3 domain is from a human immunoglobulin molecule. In preferred embodiments, the anti-PSCA antibody is 2B3 or 1G8. In yet other embodiments, the construct is a minibody having V_H and V_L domains substantially identical to an scFv fragment designated herein as A11, A2, or C5. In still further embodiments, the construct has a C_H3 domain is from a human immunoglobulin molecule. For instance, the construct may have a hinge region and C_H3 domain are the human IgG hinge region and human C_H3 domain.

[0013] In some embodiments, the anti-PSCA antibody is a monoclonal antibody designated 1G8 (ATCC No. HB-12612), 2A2 (ATCC No. HB-1203), 2H9 (ATCC No. HB-12614), 3C5 (ATCC No. HB-12616), 3E6 (ATCC No. HB12618), 3G3 (ATCC No. HB-12615), or 4A10 (ATCC No. HB-12617).

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0014] The constructs according to the invention can also be linked to therapeutic agents or detectable markers. In some embodiments, the therapeutic agent is a cytotoxic agent. For instance, the agent can be ricin, ricin A-chain, doxorubicin, daunorubicin, taxol, ethidium bromide, mitomycin, etoposide, teniposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin D, diphtheria toxin, *Pseudomonas* exotoxin (PE) A, PE40, abrin, arbrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, gelonin mitogellin, retstrictocin, phenomycin, enomycin, curicin, crotin, calicheamicin, saponaria officinalis inhibitor, maytansinoids, or glucocorticoidricin. In other embodiments, the therapeutic agent is a radioactive isotope. The radioactive isotope can be selected, for instance, from the group consisting of ^{212}Bi , ^{131}I , ^{111}In , ^{90}Y and ^{186}Re . In other embodiments the construct is linked to an anti-cancer pro-drug activating enzyme capable of converting a pro-drug to its active form.

[0015] In another preferred embodiments of the above, the PSCA targeted by the anti-PSCA antibody is human PSCA.

[0016] In another aspect, the invention provides an antigen binding protein construct selected from the group consisting of a minibody, a diabody, scFv and scFv-Fc wherein the selected construct has V_L and V_H domains that are substantially identical to the V_L and V_H domains of 2B3 or an scFv variant designated herein as A11, A2, or C5. In other embodiments, the binding constructs of the present invention may comprise one or more mutations found in the variant antibodies A11, A2, or C5.

[0017] In yet another aspect, the present invention provides an antigen binding protein construct selected from the group consisting of a minibody, a diabody, scFv and scFv-Fc wherein the selected construct comprises CDR regions of an anti-PSCA antibody. In certain embodiments, the anti-PSCA antibody will bind to PSCA with an affinity equal to or greater than the antibody designated 2B3. In other embodiments, the anti-PSCA antibody may be an affinity matured antibody, wherein the affinity matured antibody comprises a higher affinity for PSCA than does the parental antibody.

[0018] In another aspect, the anti-PSCA construct according to the invention is labeled with a detectable marker. The marker can be for instance, a radioisotope, a fluorescent compound, a bioluminescent compound, chemiluminescent compound, a metal chelator or an enzyme. Many radionuclides may be used as imaging labels, including without limitation, ^{124}I , ^{86}Y , ^{18}F , ^{94}Tc , and the like. One of skill in the art will know of other radionuclides particularly well suited for use in the present invention.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0019] In further other embodiments of any of the above, the invention provides a pharmaceutical composition of the constructs according to the invention.

[0020] In another aspect still, the invention provides methods for treating a subject having cancer (e.g., prostate, pancreatic or bladder cancer), or inhibiting the growth of a prostate cancer cell expressing a Prostate Stem Cell Antigen (PSCA) protein comprising contacting the cancer cell (e.g., prostate, bladder, pancreatic cancer cell, with a construct according to the invention in an amount effective to inhibit the growth of the cancer cell. The method can kill the cancer cell. In some embodiments, the construct recognizes and binds the PSCA protein as shown below beginning with leucine at amino acid position 22 and ending with alanine at amino acid position 99. In additional embodiments, the method further comprises administering to a chemotherapeutic drug, radiation therapy. In some embodiments, the subject is also treated with hormone ablation therapy or hormone antagonist therapy.

[0021] The treatments may be given to the patient or subject by intravenously, intraperitoneally, intramuscularly, intratumorally, or intradermally. In some embodiments, the contacting comprises administering the construct directly into a prostate cancer, a bladder cancer, a pancreatic cancer or a metastasis thereof.

[0022] In another aspect, the invention provides methods of detecting a cancerous cell in a subject by contacting the cancer cell with a construct which bears a detectable marker. The methods can be used in screening patients at increased risk of cancer or to monitor response to therapy or to develop a prognosis for the cancer (e.g., prostate, bladder, or pancreatic cancers). The methods are particularly advantageous in detecting metastases of the cancer.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0023] **Figure 1:** Schematic overview of anti-PSCA minibody. A gene encoding the minibody is assembled in the order V_L -linker- V_H -hinge- C_H3 , with the hinge and C_H3 domains derived from human IgG1. The protein self assembles into 80-kDa dimers.

[0024] **Figure 2:** Comparison of 2B3 ScFv variant protein sequences. The V_L sequence and part of the linker are in the top frame, the rest of the linker and V_H sequences are in the lower frame. Also indicated are the CDRs: underlined wild type sequence. The mutations are highlighted in different shading. The parental ScFv P-2B3 sequence (SEQ ID NO:4) and variant C5 (SEQ ID NO:5), A2 (SEQ ID NO:6), and A11 (SEQ ID NO:7) ScFv sequences are shown.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0025] **Figure 3:** DNA sequence (SEQ ID NO:8) and translated protein sequence of the parental 2B3 minibody (SEQ ID NO:9). Also indicated are the starting points of the following protein segments: signal peptide (for mammalian secretion), light chain variable region (V_L), the 15 amino acid interdomain peptide linker, heavy chain variable region (V_H), human IgG1 hinge sequence and 10 amino acid extension, and the human IgG1 CH1 domain followed by two stop codons.

[0026] **Figure 4:** SDS-PAGE analysis of the four minibodies in non-reducing conditions: parental (p), A11, A2 and C5. The arrow indicates the expected molecular weight of a minibody.

[0027] **Figure 5:** Size-exclusion HPLC of A11 minibody showing homogenous peak at expected molecular size.

[0028] **Figure 6:** Affinity ranking. (A) by Competitive ELISA binding assay: Plates were coated with CEA and biotinylated intact, chimeric anti-CEA antibody was used as probe. (B) by flow cytometry: 5pg/ml of each minibody was incubated with PSCA expressing cells. Cells were then stained with anti Human Fc PE conjugated.

[0029] **Figure 7:** Co-registered microPET/microCT scan of a nude mouse bearing LAPC-9AD (PSCA-positive human prostate cancer) xenografts. The mouse was injected with 1-124 radiolabeled A11 minibody variant and scanned serially. A, B, C; sagittal sections; D, E, F; coronal sections. A, D; coregistered microPET and microCT, showing ROI (region of interest) as a white rectangle. B, E; microPET images and ROI C, F; microPET images only.

[0030] **Figure 8:** Biodistribution and microPET Imaging ranking of the 2B3 minibody variants. Biodistribution unit is a %ID/g values of weighed tissues in γ -counter after 21 or 25 hours injection time. MicroPET Imaging values were obtained on the average values of 4 ROIs as shown in figure 6 and described in the materials and methods.

[0031] **Figure 9:** Summary of PSCA data and properties.

[0032] **Figure 10:** Depictions of various constructs according to the invention.

[0033] **Figure 11:** Schema for producing 2B3 variants.

[0034] **Figure 12:** MicroPET imaging and biodistribution data for various constructs.

[0035] **Figure 13:** MicroPET imaging and biodistribution results for A11 and parent 2B3.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0036] **Figure 14:** MicroPET imaging and biodistribution data for pancreatic cancer Capan-1 xenographic mice using parental 2B3 and variant A11 anti-PSCA minibodies.

[0037] **Figure 15:** MicroPET imaging and biodistribution data for pancreatic cancer MIA PaCa-2 xenographic mice using parental 2B3 and variant A11 anti-PSCA minibodies.

[0038] **Figure 16:** Amino acid sequences of parental 2B3 and variant A2, A11, and C5 anti-PSCA minibodies.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0039] Prolonged clearance kinetics have hampered the development of intact antibodies as imaging and therapeutic agents, despite their ability to effectively deliver radionuclides to tumor targets *in vivo*. Here, we also report genetically engineered antibody fragments which display rapid, high-level tumor uptake coupled with rapid clearance from the circulation in a nude mouse model to allow ready detection of tumors *in vivo*.

[0040] The 2B3 antibody was humanized by grafting on a human framework (Trastuzumab) and named (Olafsen T, et al. J. Immunotherapy 2007; 30:396; which is incorporated by reference in its entirety with respect to the description, biological activity, and making of the antibody). Antibody fragments of 2B3 have been generated for PET imaging application. One of these antibody fragments, the 2B3 minibody has demonstrated rapid and specific localization to PSCA-expressing tumors in a murine model. However, humanization has decreased the affinity of the intact antibody for PSCA from a K_d of 2.6 nM to 16.7 nM. In addition, reformatting of intact antibody into antibody fragments can also affect the binding efficiency. It has been shown that quantitative tumor retention of ScFvs increases with affinity but only to a threshold close to 10⁻⁹ M (Adams GP, et al. Cancer Res. 2001;61:4750). There are no published data on the effect of minibody affinity on tumor targeting and imaging properties. Here, we describe the generation of three high affinity anti-PSCA ScFvs, and the subsequent generation and characterization of three high affinity anti-PSCA minibodies. We generated minibody fragments with better tumor targeting/imaging aptitude. In some embodiments, with the regard to the constructs of the invention, there is a proviso that the construct comprises a V_H or V_L domain that is not identical to a corresponding domain or the 2B3 antibody.

[0041] In one embodiment, the present invention provides antigen binding constructs selected from the group consisting of an antibody, a minibody, a diabody, an scFv, an scFv-

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

Fc, and the like, wherein the V_L and V_H domains are substantially identical to those found in 2B3. In a second embodiment, the antigen binding construct may comprise one or more mutations found in an antibody variant designated herein as A11, A2, or C5. In a third embodiment, the binding construct comprises at least one mutation at a residue corresponding to an amino acid of SEQ ID NO:4 selected from the group consisting of T5, S10, V15, S91, S123, S131, N179, T182, I194, A203, G213, Q228, and a combination thereof. In certain embodiments, the at least one mutation comprises a mutation corresponding to a mutation in SEQ ID NO:4 selected from the group comprising T5I, S10I, V15M, S91G, Δ123, S131Y, N179Y, T182S, I194M, A203V, E213K, Q228R, and a combination thereof. In other embodiments, the binding constructs of the invention comprise mutations corresponding to those found in variants A11, A2, or C5.

[0042] In a certain embodiment, the present invention provides a minibody wherein the V_L and V_H domains are substantially identical to those found in SEQ ID NO:10. In one embodiment, a minibody of the present invention comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO:10. In other embodiments, the minibody comprises an amino acid sequence that is substantially identical to SEQ ID NO:10, wherein said minibody binds to PSCA with a higher affinity than a minibody of SEQ ID NO:10. In yet other embodiments, the minibody may comprise one or more mutations at a residue corresponding to an amino acid of SEQ ID NO:10 selected from the group comprising T5, S10, V15, S91, S123, S131, N179, T182, I194, A203, G213, Q228, and a combination thereof. In yet another embodiment, the construct may comprise a sequence selected from SEQ ID NOS:11, 12, and 13.

[0043] In one embodiment, the invention provides an antigen binding protein construct selected from the group consisting of a minibody, a diabody, scFv and scFv-Fc wherein the selected construct comprises CDR regions of an anti-PSCA antibody. In one embodiment, the binding protein construct will comprise at least one CDR region selected from a CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, or CDR-H3 from an anti-PSCA antibody. In yet other embodiments, the protein binding construct may comprise all 3 light chain CDR regions or all three heavy chain CDR regions. In one embodiment, the protein binding constructs of the present invention may comprise all of the CDR regions of an anti-PSCA antibody. In certain embodiments, the anti-PSCA antibody will bind to PSCA with an affinity equal to or greater than the antibody designated 2B3. In other embodiments, the anti-PSCA antibody may be an affinity matured antibody, wherein the affinity matured antibody comprises a higher affinity for PSCA than does the parental antibody. In particular embodiments, the

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

parental anti-PSCA antibody may be selected from the group consisting of 1G8 (ATCC No. HB-12612), 2A2 (ATCC No. HB-1203), 2H9 (ATCC No. HB-12614), 3C5 (ATCC No. HB-12616), 3E6 (ATCC No. HB12618), 3G3 (ATCC No. HB-12615), 4A10 (ATCC No. HB-12617), and 2B3. In other embodiments, the CDRs may be selected from those found in SEQ ID NOS:10, 11, 12, and 13.

[0044] A "minibody" is an engineered antibody construct comprised of the variable heavy (VH) and variable light (VL) chain domains of a native antibody fused to the hinge region and to the CH3 domain of the immunoglobulin molecule (see, Figure 1). Minibodies are thus small versions of whole antibodies encoded in a single protein chain which retain the antigen binding region, and the CH3 domain which to permit assembly into a bivalent molecule and the antibody hinge to accommodate dimerization by disulfide linkages. In contrast, native antibodies are comprised of four chains, two heavy and two light. The size, valency and affinity of the minibody is particularly suited for in vivo targeting. Expression in bacterial or mammalian cells is simplified because minibodies can be produced as single amino acid chains (see, U.S. Patent No. 5,837,821) which is incorporated by reference herein in its entirety and particularly with reference to minibodies, their structure, ways of making them, and their suitable pharmaceutical formulations.

[0045] A 'diabody' comprises a first polypeptide chain which comprises a heavy (VH) chain variable domain connected to a light chain variable domain (VL) on the first polypeptide chain (VH-VL) connected by a peptide linker that is too short to allow pairing between the two domains on the first polypeptide chain and a second polypeptide chain comprising a light chain variable domain (VL) linked to a heavy chain variable domain VH on the second polypeptide chain (VL-VH) connected by a peptide linker that is too short to allow pairing between the two domains on the second polypeptide chain. The short linkages force chain pairing between the complementary domains of the first and the second polypeptide chains and promotes the assembly of a dimeric molecule with two functional antigen binding sites.

[0046] To construct bispecific diabodies the V-domains of different antibodies (e.g., antibody A and antibody B) are fused to create the two chains (e.g., VHA-VLB, VHB-VLA). Each chain is inactive in binding to antigen, but recreates the functional antigen binding sites of antibodies A and B on pairing with the other chain.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0047] PSCA and its expression in cancer of the prostate, bladder, and pancreas is disclosed in U.S. Patent No. 6,756,036 which is incorporated by reference in its entirety. The human PSCA translated amino acid sequence is:

```

MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQV
ENCTQLGEQCWTARIRAVGLLTVISKGCSLNCVDDS
QDYVVGKKNITCCDLDLCNASGAHALQAAAILALLPAL
GLLLWGPGQL

```

(SEQ ID NO:1)

[0048] The terms “substantially identical” in the context of two or more nucleic acids or polypeptide sequences, refer to two or more sequences or subsequences that are the same or have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same (i.e., about 80% identity, preferably at least 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or higher identity) over the referenced sequences or portions, when compared and aligned for maximum correspondence over a comparison window or designated region) as measured using a BLAST or BLAST 2.0 sequence comparison algorithms with default parameters described below, or by manual alignment and visual inspection (*see, e.g.*, NCBI web site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> or the like). The definition also includes sequences that have deletions and/or additions, as well as those that have substitutions. Preferably, the sequence identity is at least 85%, 90%, 95% 97% between two referenced domains. In some embodiments, the difference in sequence is just by one, two, three or four, or from five to 12, amino acids as to referenced sequence or domain. As described below, the preferred algorithms can account for gaps and the like. Preferably, identity exists over a region that is at least about 15 amino acids or nucleotides in length, or more preferably over a region that is 15-50 amino acids or nucleotides in length. In other embodiments, the identity may exist over a region that is at least about 50, 100, 150, 200, or more amino acids.

[0049] For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are entered into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. Preferably, default

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

program parameters can be used, or alternative parameters can be designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identities for the test sequences relative to the reference sequence, based on the program parameters.

[0050] A “comparison window”, as used herein, includes reference to a segment of any one of the number of contiguous positions selected over a specified range of residues (e.g., 20 to 50, usually about 50 to about 200, more usually about 100 to about 150) in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned. Methods of alignment of sequences for comparison are well-known in the art. Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, e.g., by the local homology algorithm of Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by manual alignment and visual inspection (*see, e.g., Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds. 1995 supplement)).

[0051] A preferred example of algorithm that is suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) and Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectively. BLAST and BLAST 2.0 are used, with the parameters described herein, to determine percent sequence identity for the nucleic acids and proteins of the invention. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score threshold (Altschul *et al.*, *supra*). These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs containing them. The word hits are extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Cumulative scores are calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always > 0) and N (penalty score for mismatching residues; always < 0). For amino acid sequences, a scoring matrix is used to calculate the cumulative score. Extension of the

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T, and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a wordlength (W) of 11, an expectation (E) of 10, M=5, N=-4 and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a wordlength of 3, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4, and a comparison of both strands.

[0052] The terms “polypeptide,” “peptide” and “protein” are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical mimetic of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers and non-naturally occurring amino acid polymer.

[0053] Amino acids may be referred to herein by either their commonly known three letter symbols or by the one-letter symbols recommended by the IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Nucleotides, likewise, may be referred to by their commonly accepted single-letter codes.

[0054] As to amino acid sequences, one of skill will recognize that individual substitutions, deletions or additions to a nucleic acid, peptide, polypeptide, or protein sequence which alters, adds or deletes a single amino acid or a small percentage of amino acids in the encoded sequence is a “conservatively modified variant” where the alteration results in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid. Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are well known in the art. Such conservatively modified variants are in addition to and do not exclude polymorphic variants, interspecies homologs, and alleles of the invention.

[0055] The following eight groups each contain amino acids that are conservative substitutions for one another: 1) Alanine (A), Glycine (G); 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E); 3) Asparagine (N), Glutamine (Q); 4) Arginine (R), Lysine (K); 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V); 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

(W); 7) Serine (S), Threonine (T); and 8) Cysteine (C), Methionine (M) (*see, e.g., Creighton, Proteins* (1984)).

[0056] A "label" or a "detectable moiety" or "detectable marker" is a composition detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, chemical, or other physical means. For example, useful labels include ^{32}P , fluorescent dyes, electron-dense reagents, enzymes (e.g., as commonly used in an ELISA), biotin, digoxigenin, or haptens and proteins which can be made detectable, e.g., by incorporating a radiolabel into the peptide or used to detect antibodies specifically reactive with the peptide.

[0057] "Antibody" refers to a polypeptide comprising a framework region from an immunoglobulin gene or fragments thereof that specifically binds and recognizes an antigen. The recognized immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon, and mu constant region genes, as well as the myriad immunoglobulin variable region genes. Light chains are classified as either kappa or lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, which in turn define the immunoglobulin classes, IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively. Typically, the antigen-binding region of an antibody will be most critical in specificity and affinity of binding.

[0058] An exemplary immunoglobulin (antibody) structural unit comprises a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kD) and one "heavy" chain (about 50-70 kD). The N-terminus of each chain defines a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The terms variable light chain (V_L) and variable heavy chain (V_H) refer to these light and heavy chains respectively.

[0059] Antibodies exist, e.g., as intact immunoglobulins or as a number of well-characterized fragments produced by digestion with various peptidases. Thus, for example, pepsin digests an antibody below the disulfide linkages in the hinge region to produce F(ab)'_2 , a dimer of Fab which itself is a light chain joined to $V_H\text{-CH1}$ by a disulfide bond. The F(ab)'_2 may be reduced under mild conditions to break the disulfide linkage in the hinge region, thereby converting the F(ab)'_2 dimer into an Fab' monomer. The Fab' monomer is essentially Fab with part of the hinge region (*see Fundamental Immunology* (Paul ed., 3d ed. 1993). While various antibody fragments are defined in terms of the digestion of an intact antibody, one of skill will appreciate that such fragments may be synthesized *de novo* either chemically or by using recombinant DNA methodology. Thus, the term antibody, as used

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

herein, also includes antibody fragments either produced by the modification of whole antibodies, or those synthesized *de novo* using recombinant DNA methodologies (e.g., single chain Fv) or those identified using phage display libraries (*see, e.g., McCafferty et al., Nature* 348:552-554 (1990))

[0060] For preparation of suitable antibodies or constructs of the invention and for use according to the invention, e.g., recombinant, monoclonal, or polyclonal antibodies, many techniques known in the art can be used (*see, U.S. Patent Application Publication No. 20070196274 and U.S. Patent Application Publication No. 20050163782, which are each incorporated by reference in their entireties, particularly with respect to minibody and diabody design (see, e.g., Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., pp. 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988); and Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed. 1986)). The genes encoding the heavy and light chains of an antibody of interest can be cloned from a cell, e.g., the genes encoding a monoclonal antibody can be cloned from a hybridoma and used to produce a recombinant monoclonal antibody. Gene libraries encoding heavy and light chains of monoclonal antibodies can also be made from hybridoma or plasma cells. Random combinations of the heavy and light chain gene products generate a large pool of antibodies with different antigenic specificity (see, e.g., Kuby, Immunology (3rd ed. 1997)). Techniques for the production of single chain antibodies or recombinant antibodies (U.S. Patent 4,946,778, U.S. Patent No. 4,816,567) can be adapted to produce antibodies to polypeptides of this invention. Also, transgenic mice, or other organisms such as other mammals, may be used to express humanized or human antibodies (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); and Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)). Alternatively, phage display technology can be used to identify antibodies and heteromeric Fab fragments that specifically bind to selected antigens (see, e.g., McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Marks et al., Biotechnology 10:779-783 (1992)). Antibodies can also be made bispecific, i.e., able to recognize two different antigens (see, e.g., WO 93/08829, Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991); and Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)).*

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

Antibodies can also be heteroconjugates, e.g., two covalently joined antibodies, or immunotoxins (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 4,676,980, WO 91/00360; WO 92/200373; and EP 03089).

[0061] The antibodies of the invention include derivatives that are modified, i.e., by the covalent attachment of any type of molecule to the antibody. For example, the antibody derivatives include, without limitation, antibodies that have been modified by glycosylation, acetylation, pegylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand or other protein, and the like. Any of numerous chemical modifications may be carried out by known techniques, including, but not limited to specific chemical cleavage, acetylation, formylation, metabolic synthesis of tunicamycin, etc. Additionally, the derivative may contain one or more non-natural amino acids.

[0062] Methods for humanizing or primatizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as import residues, which are typically taken from an import variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (*see, e.g.*, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988) and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)), by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such humanized antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

[0063] A "chimeric antibody" is an antibody molecule in which (a) the constant region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged so that the antigen binding site (variable region) is linked to a constant region of a different or altered class, effector function and/or species, or an entirely different molecule which confers new properties to the chimeric antibody, e.g., an enzyme, toxin, hormone, growth factor, drug, etc.; or (b) the variable region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged with a variable region having a

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

different or altered antigen specificity. The preferred antibodies of, and for use according to the invention include humanized and/or chimeric monoclonal antibodies.

[0064] In some embodiments, the antibody is conjugated to an "effector" moiety. The effector moiety can be any number of molecules, including labeling moieties such as radioactive labels or fluorescent labels, or can be a therapeutic moiety. In one aspect the antibody modulates the activity of the protein. Such effector moieties include, but are not limited to, an anti-tumor drug, a toxin, a radioactive agent, a cytokine, a second antibody or an enzyme. Further, the invention provides an embodiment wherein the antibody of the invention is linked to an enzyme that converts a prodrug into a cytotoxic agent.

[0065] The immunoconjugate can be used for targeting the effector moiety to a PSCA-positive cell, particularly cells, which overexpress the PSCA protein. Such differences can be readily apparent when viewing the bands of gels with approximately similarly loaded with test and controls samples.. Examples of cytotoxic agents include, but are not limited to ricin, doxorubicin, daunorubicin, taxol, ethidium bromide, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin D, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, abrin, and glucocorticoid and other chemotherapeutic agents, as well as radioisotopes. Suitable detectable markers include, but are not limited to, a radioisotope, a fluorescent compound, a bioluminescent compound, chemiluminescent compound, a metal chelator or an enzyme.

[0066] In some embodiments, the invention provides antigen binding protein constructs used to systemically to treat cancer (e.g., prostate, pancreatic or bladder cancer) alone or when conjugated with an effector moiety. PSCA-targeting constructs conjugated with toxic agents, such as ricin, as well as unconjugated antibodies can be useful therapeutic agents naturally targeted to PSCA bearing cancer cells. Such constructs can be useful in blocking invasiveness

[0067] Additionally, the antigen-binding protein constructs of the invention can be used to treat cancer. In such a situation, the construct is joined to at least a functionally active portion of a second protein or toxic molecule having therapeutic activity. The second protein can include, but is not limited to, an enzyme, lymphokine, oncostatin or toxin. Suitable toxins include doxorubicin, daunorubicin, taxol, ethidium bromide, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin D,

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, ricin, abrin, glucocorticoid and radioisotopes.

[0068] Techniques for conjugating therapeutic agents to constructs according to the invention are well known (see, e.g., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery" in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)).

[0069] The phrase "specifically (or selectively) binds" to an antibody or "specifically (or selectively) immunoreactive with," when referring to a protein or peptide or construct according to the invention, refers to a binding reaction that is determinative of the presence of the protein, often in a heterogeneous population of proteins and other biologics. Thus, under designated immunoassay conditions, the specified antibodies bind to a particular protein at least two times the background and more typically more than 10 to 100 times background. Specific binding to an antibody under such conditions requires a construct be selected for its specificity for a particular protein. A variety of immunoassay formats may be used to select constructs specifically immunoreactive with PSCA. For example, solid-phase ELISA immunoassays are routinely used to select antibodies specifically immunoreactive with a protein (see, e.g., Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998) for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity).

[0070] By "therapeutically effective dose or amount" herein is meant a dose that produces effects for which it is administered. The exact dose and formulation will depend on the purpose of the treatment, and will be ascertainable by one skilled in the art using known techniques (see, e.g., Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, Gennaro, Editor (2003), and Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0071] The term "pharmaceutically acceptable salts" or "pharmaceutically acceptable carrier" is meant to include salts of the active compounds which are prepared with relatively nontoxic acids or bases, depending on the particular substituents found on the compounds described herein. When compounds of the present invention contain relatively acidic functionalities, base addition salts can be obtained by contacting the neutral form of such compounds with a sufficient amount of the desired base, either neat or in a suitable inert solvent. Examples of pharmaceutically acceptable base addition salts include sodium, potassium, calcium, ammonium, organic amino, or magnesium salt, or a similar salt. When compounds of the present invention contain relatively basic functionalities, acid addition salts can be obtained by contacting the neutral form of such compounds with a sufficient amount of the desired acid, either neat or in a suitable inert solvent. Examples of pharmaceutically acceptable acid addition salts include those derived from inorganic acids like hydrochloric, hydrobromic, nitric, carbonic, monohydrogencarbonic, phosphoric, monohydrogenphosphoric, dihydrogenphosphoric, sulfuric, monohydrogensulfuric, hydriodic, or phosphorous acids and the like, as well as the salts derived from relatively nontoxic organic acids like acetic, propionic, isobutyric, maleic, malonic, benzoic, succinic, suberic, fumaric, lactic, mandelic, phthalic, benzenesulfonic, p-tolylsulfonic, citric, tartaric, methanesulfonic, and the like. Also included are salts of amino acids such as arginate and the like, and salts of organic acids like glucuronic or galactunoric acids and the like (*see, e.g., Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science* 66:1-19 (1977)). Certain specific compounds of the present invention contain both basic and acidic functionalities that allow the compounds to be converted into either base or acid addition salts. Other pharmaceutically acceptable carriers known to those of skill in the art are suitable for the present invention.

[0072] The neutral forms of the compounds may be regenerated by contacting the salt with a base or acid and isolating the parent compound in the conventional manner. The parent form of the compound differs from the various salt forms in certain physical properties, such as solubility in polar solvents, but otherwise the salts are equivalent to the parent form of the compound for the purposes of the present invention.

[0073] The methods find particular application in the diagnosis, prognosis and treatment of cancers which overexpress PSCA, for example, prostate, pancreatic and bladder cancers. In certain embodiments the methods are applied to hormone refractory or therapy resistant cancers. In certain embodiments the methods are applied to metastatic cancers.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0074] Treatment will generally involve the repeated administration of the constructs and their immunoconjugates via an acceptable route of administration such as intravenous injection (IV), at an effective dose. Dosages will depend upon various factors generally appreciated by those of skill in the art, including without limitation the type of cancer and the severity, grade, or stage of the cancer, the binding affinity and half life of the agents used, the desired steady-state antibody concentration level, frequency of treatment, and the influence of chemotherapeutic agents used in combination with the treatment method of the invention. Typical daily doses may range from about 0.1 to 100 mg/kg. Doses in the range of 10-500 mg of the constructs or their immunoconjugates per week may be effective and well tolerated, although even higher weekly doses may be appropriate and/or well tolerated. The principal determining factor in defining the appropriate dose is the amount of a particular agent necessary to be therapeutically effective in a particular context. Repeated administrations may be required in order to achieve tumor inhibition or regression. Initial loading doses may be higher. The initial loading dose may be administered as an infusion. Periodic maintenance doses may be administered similarly, provided the initial dose is well tolerated.

[0075] Direct administration of the constructs is also possible and may have advantages in certain contexts. For example, for the treatment of bladder carcinoma, the agents may be injected directly into the bladder.

[0076] In another embodiment, the invention provides polynucleotides comprising a nucleotide sequence encoding an antibody of the invention and fragments thereof. In one embodiment, the present invention provides an expression vector encoding for an antibody or fragment thereof of the present invention. In another embodiment, the present invention provides polynucleotides encoding an antibody of the present invention for use in gene therapy or *in vivo* administration.

[0077] "Nucleic acid" refers to deoxyribonucleotides or ribonucleotides and polymers thereof in either single- or double-stranded form, and complements thereof. The term encompasses nucleic acids containing known nucleotide analogs or modified backbone residues or linkages, which are synthetic, naturally occurring, and non-naturally occurring, which have similar binding properties as the reference nucleic acid, and which are metabolized in a manner similar to the reference nucleotides. Examples of such analogs

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

include, without limitation, phosphorothioates, phosphoramidates, methyl phosphonates, chiral-methyl phosphonates, 2-O-methyl ribonucleotides, peptide-nucleic acids (PNAs).

[0078] Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof (e.g., degenerate codon substitutions) and complementary sequences, as well as the sequence explicitly indicated. Specifically, degenerate codon substitutions may be achieved by generating sequences in which the third position of one or more selected (or all) codons is substituted with mixed-base and/or deoxyinosine residues (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). The term nucleic acid is used interchangeably with gene, cDNA, mRNA, oligonucleotide, and polynucleotide.

Methods of Administration and Formulation

[0079] The constructs are administered to a subject in accord with known methods, such as intravenous administration, e.g., as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes. Intravenous or subcutaneous administration is preferred. The administration may be local or systemic.

[0080] The compositions for administration will commonly comprise an agent as described herein dissolved in a pharmaceutically acceptable carrier, preferably an aqueous carrier. A variety of aqueous carriers can be used, e.g., buffered saline and the like. These solutions are sterile and generally free of undesirable matter. These compositions may be sterilized by conventional, well known sterilization techniques. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions such as pH adjusting and buffering agents, toxicity adjusting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, sodium lactate and the like. The concentration of active agent in these formulations can vary widely, and will be selected primarily based on fluid volumes, viscosities, body weight and the like in accordance with the particular mode of administration selected and the patient's needs.

[0081] Thus, a typical pharmaceutical composition for intravenous administration will vary according to the agent. Actual methods for preparing parenterally administrable compositions will be known or apparent to those skilled in the art and are described in more

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

detail in such publications as Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

[0189] The pharmaceutical compositions can be administered in a variety of unit dosage forms depending upon the method of administration. For example, unit dosage forms suitable for oral administration include, but are not limited to, powder, tablets, pills, capsules and lozenges. It is recognized that constructs when administered orally, should be protected from digestion. This is typically accomplished either by complexing the molecules with a composition to render them resistant to acidic and enzymatic hydrolysis, or by packaging the molecules in an appropriately resistant carrier, such as a liposome or a protection barrier. Means of protecting agents from digestion are well known in the art.

[0082] Pharmaceutical formulations, particularly, constructs and immunoconjugates and inhibitors for use with the present invention can be prepared by mixing a construct having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers. Such formulations can be lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations used. Acceptable carriers, excipients or stabilizers can be acetate, phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants (e.g., ascorbic acid) preservatives low molecular weight polypeptides; proteins, such as serum albumin or gelatin, or hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; and amino acids, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents; and ionic and non-ionic surfactants (e.g., polysorbate); salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g. Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants. The construct can be formulated at a concentration of between 0.5 - 200 mg/ml, or between 10-50 mg/ml.

[0083] The formulation may also provide additional active compounds, including, chemotherapeutic agents, cytotoxic agents, cytokines, growth inhibitory agent, and anti-hormonal agent. The active ingredients may also prepared as sustained-release preparations (e.g., semi-permeable matrices of solid hydrophobic polymers (e.g., polyesters, hydrogels (for example, poly (2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly (vinylalcohol)), polylactides. The antibodies and immunoconjugates may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin microcapsules and poly- (methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes,

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions.

[0084] The compositions can be administered for therapeutic or prophylactic treatments. In therapeutic applications, compositions are administered to a patient suffering from a disease (e.g., cancer) in a "therapeutically effective dose." Amounts effective for this use will depend upon the severity of the disease and the general state of the patient's health. Single or multiple administrations of the compositions may be administered depending on the dosage and frequency as required and tolerated by the patient. A "patient" or "subject" for the purposes of the present invention includes both humans and other animals, particularly mammals. Thus the methods are applicable to both human therapy and veterinary applications. In the preferred embodiment the patient is a mammal, preferably a primate, and in the most preferred embodiment the patient is human. Other known cancer therapies can be used in combination with the methods of the invention. For example, the compositions for use according to the invention may also be used to target or sensitize a cell to other cancer therapeutic agents such as 5FU, vinblastine, actinomycin D, cisplatin, methotrexate, and the like.

[0085] In other embodiments, the methods of the invention may be practiced together with other cancer therapies (e.g, radical prostatectomy), radiation therapy (external beam or brachytherapy), hormone therapy (e.g., orchiectomy, LHRH-analog therapy to suppress testosterone production, anti-androgen therapy), or chemotherapy. Radical prostatectomy involves removal of the entire prostate gland plus some surrounding tissue. This treatment is used commonly when the cancer is thought not to have spread beyond the tissue. Radiation therapy is commonly used to treat prostate cancer that is still confined to the prostate gland, or has spread to nearby tissue. If the disease is more advanced, radiation may be used to reduce the size of the tumor. Hormone therapy is often used for patients whose prostate cancer has spread beyond the prostate or has recurred. The objective of hormone therapy is to lower levels of the male hormones, androgens and thereby cause the prostate cancer to shrink or grow more slowly. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists decrease the production of testosterone. These agents may be injected either monthly or longer. Two such analogs are leuprolide and goserelin. Anti-androgens (e.g., flutamide, bicalutamide, and nilutamide) may also be used. Total androgen blockade refers to the use of anti-androgens in combination with orchiectomy or LHRH analogs, the combination is called. Chemotherapy is an option for patients whose prostate cancer has spread outside of

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

the prostate gland and for whom hormone therapy has failed. It is not expected to destroy all of the cancer cells, but it may slow tumor growth and reduce pain. Some of the chemotherapy drugs used in treating prostate cancer that has returned or continued to grow and spread after treatment with hormonal therapy include doxorubicin (Adriamycin), estramustine, etoposide, mitoxantrone, vinblastine, and paclitaxel. Two or more drugs are often given together to reduce the likelihood of the cancer cells becoming resistant to chemotherapy. Small cell carcinoma is a rare type of prostate cancer that is more likely to respond to chemotherapy than to hormonal therapy.

[0086] The combined administrations contemplates co-administration, using separate formulations or a single pharmaceutical formulation, and consecutive administration in either order, wherein preferably there is a time period while both (or all) active agents simultaneously exert their biological activities.

[0087] The compound of choice, alone or in combination with other suitable components, can be made into aerosol formulations (i.e., they can be "nebulized") to be administered via inhalation. Aerosol formulations can be placed into pressurized acceptable propellants, such as dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen, and the like.

[0088] Formulations suitable for parenteral administration, such as, for example, by intraarticular (in the joints), intravenous, intramuscular, intratumoral, intradermal, intraperitoneal, and subcutaneous routes, include aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain antioxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives. In the practice of this invention, compositions can be administered, for example, by intravenous infusion, orally, topically, intraperitoneally, intravesically or intrathecally. Parenteral administration, oral administration, and intravenous administration are the preferred methods of administration. The formulations of compounds can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampules and vials.

[0089] Injection solutions and suspensions can be prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind previously described. Cells transduced by nucleic acids for *ex vivo* therapy can also be administered intravenously or parenterally as described above.

[0090] The pharmaceutical preparation is preferably in unit dosage form. In such form the preparation is subdivided into unit doses containing appropriate quantities of the active

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

component. The unit dosage form can be a packaged preparation, the package containing discrete quantities of preparation, such as packeted tablets, capsules, and powders in vials or ampoules. Also, the unit dosage form can be a capsule, tablet, cachet, or lozenge itself, or it can be the appropriate number of any of these in packaged form. The composition can, if desired, also contain other compatible therapeutic agents.

[0091] Preferred pharmaceutical preparations deliver one or more constructs according to the invention, optionally in combination with one or more chemotherapeutic agents or immunotherapeutic agents, in a sustained release formulation. The construct may be administered therapeutically as a sensitizing agent that increases the susceptibility of tumor cells to other cytotoxic cancer therapies, including chemotherapy, radiation therapy, immunotherapy and hormonal therapy.

[0092] In therapeutic use for the treatment of cancer, the constructs utilized in the pharmaceutical method of the invention are administered at the initial dosage of about 0.001 mg/kg to about 1000 mg/kg daily. A daily dose range of about 0.01 mg/kg to about 500 mg/kg, or about 0.1 mg/kg to about 200 mg/kg, or about 1 mg/kg to about 100 mg/kg, or about 10 mg/kg to about 50 mg/kg, can be used. The dosages, however, may be varied depending upon the requirements of the patient, the severity of the condition being treated, and the compound being employed. For example, dosages can be empirically determined considering the type and stage of cancer diagnosed in a particular patient. The dose administered to a patient, in the context of the present invention should be sufficient to effect a beneficial therapeutic response in the patient over time. Determination of the proper dosage for a particular situation is within the skill of the practitioner. Generally, treatment is initiated with smaller dosages which are less than the optimum dose of the compound. Thereafter, the dosage is increased by small increments until the optimum effect under circumstances is reached. For convenience, the total daily dosage may be divided and administered in portions during the day, if desired.

[0093] The pharmaceutical preparations for use according to the invention are typically delivered to a mammal, including humans and non-human mammals. Non-human mammals treated using the present methods include domesticated animals (*i.e.*, canine, feline, murine, rodentia, and lagomorpha) and agricultural animals (bovine, equine, ovine, porcine).

Methods of Tumor Imaging

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0094] In certain embodiments, the present invention provides methods of imaging cancer cells or tumors *in vivo* through administration of antibodies of the invention. In one embodiment, the present invention provides a method of imaging a cancer cell *in vivo*, the method comprising administering a labeled anti-PSCA antibody to a mammal and imaging the antibody *in vivo*. The methods of the present invention may be used to image a cancer cell in mammal, including without limitation, a mouse, rat, hamster, rabbit, pig, human, and the like.

[0095] Methods of *in vivo* imaging are well known in the art and include without limitation, magnetic resonance imaging (MRI), nuclear magnetic resonance (NMR) (R. Weissleder, 1999, Radiology 212:609-14), computerized axial tomography (CAT) scan, cooled charged coupled device (CCD) camera optical imaging (Honigman, et al., 2001 Mol. Ther. 4:239-249), bioluminescent optical imaging (P R Contag, et al., 1998 Nat. Med. 4:245-247), position emission tomography (PET) (M E Phelps, 1991 Neurochemical Research 16:929-994; J G Tjuvajev, et al., 1998 Cancer Res 58:4333-4341), single photon emission computed tomography (J G. Tjuvajev, et al., 1996 Cancer Res. 45:4087-4095), microPET (reviewed in McVeigh, 2006, Circ. Res. 98:879-86), and the like.

Examples

[0096] The following examples are offered to illustrate, but not limit, the claimed invention.

[0097] Example 1

[0098] This example describes the construction of a mutant scFv yeast display library and the selection of ScFv mutants with improved PSCA binding affinity.

[0099] Oligonucleotides and vectors used in the construction of the library include; Gap 5': 5'-TTAAGCTTCTGCAGGCTAGTG-3' (SEQ ID NO:2); Gap 3': 5'-GAGACCGAGGAGAGGGTTAGG-3' (SEQ ID NO:3); pYD2 inside the NcoI-NotI restriction sites (Razai A, et al. J Mol Biol. 2005; 351 : 158).

[0100] 2B3 ScFv gene was first cloned into the yeast display vector pYD2 (Razai A, et al. J Mol. Biol. 2005; 351:158) using NcoI-NotI restriction sites. A bacterial clone with the correct sequence was amplified and DNA extracted with QIAprep Spin Miniprep. Random mutations were introduced into the 2B3 Scfv gene using error prone PCR as follows: 2B3 ScFv gene was subject to 20 cycles of PCR with Taq in the presence of 100mM MnCl₂ to

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

generate random mutations. The PCR product was run on an agarose gel and purified using QIAquick gel extraction. The purified PCR product was re-amplified using a proof reading DNA polymerase for 35 cycles. Both PCRs were carried out with the Gap5' and Gap3' primers. The amplified 2B3 Fv gene was again run on an agarose gel and purified using QIAquick gel extraction. Mutated scFv genes and NcoI-NotI digested pYD2 were used to transform LiAc-treated EBY 100 cells by gap repair. The resulting gene repertoire was cloned into pYD2 using gap repair to create a library of 5.9×10^5 transformants. Transformation mixes were cultured and sub-cultured in SD-CAA. Library size was determined by plating serial dilutions of the transformation mixture on SD-CAA plates.

[0101] For selection, scFv display was induced by culturing in SG-CAA media plus zeocin for 24 hours at 20°C. For the first round of selection 20 million yeast (more than 30 times the library size) were washed and resuspended in FACS buffer (phosphate-buffered saline (pH 7.4), 0.5% bovine serum albumin) to which 200 nM of PSCA human Gamma 1 fusion protein was added and incubated for 1 hour at room temperature. The concentrations of PSCA human Gamma 1 used for round 2, 3 and 4 of sorting were 5 nM, 2 nM and 1nM respectively. Cells were incubated for 30 minutes with secondary antibodies at 4°C, washed once with FACS buffer, resuspended in 200-500 µl of FACS buffer and sorted on a FACSAria. Typically 1% of the PSCA binding population was gated for collection. Collected cells were grown in SD-CAA media and used for the next round of sorting after induction in SG-CAA. Twenty yeast clones from the fourth round of sorting were analyzed by flow cytometry. Eight of these clones showing strong staining were selected (A2, A4, A8, A9, A11, A12, B5 and C5) and their DNA sequenced. A2, A4, A8, A9, A12, B5 protein sequences were identical with 10 mutations, A11 had 6 mutations and C5 had 4 mutations. Protein sequence comparisons of the parental 2B3 ScFv with A2, A11 and C5 are shown in Figure 2.

[0102] Example 2

[0103] This example describes the reformatting of mutant 2B3 scFv's into minibodies.

[0104] The parental 2B3 minibody pEE12 construct (Figure 2) was used as a backbone to generate the three 2B3 minibody affinity variants where the wild type ScFv insert was replaced by each of the three 2B3 ScFv affinity variants. The parental 2B3 minibody construct is presented in Figure 1. Briefly, V_L and V_H regions were fused with a 15 residue long Gly-Ser rich linker in the V_L-V_H orientation. This ScFv is flanked by a signal peptide upstream and the human IgG1C_H3 domain via the human IgG1 hinge including a 10 residue

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

GlySer peptide linker downstream. The final product was cloned into the PEE 12 vector of expression (Lonza Biologics, Slough, UK). This vector contains the hCMV promoter and the glutamine synthetase gene for selection (Bebbington et al., Biotechnology (N Y). 1992; 10: 169). The parental 2B3 minibody pEE12 construct was used as a backbone to generate the three 2B3 minibody affinity variants. The parental pEE12 DNA was digested with Xba I and Xho I restriction sites to remove the parental 2B3 ScFv insert that was replaced by each of the three 2B3 ScFv affinity variants. Xba I- Xho I restriction sites were added at the extremities of 2B3 ScFv affinity variants for sub-cloning in pEE12, by extension PCR.

[0105] Example 3

[0106] This example describes the expression, selection, and purification of anti-PSCA minibodies.

[0107] A total of 2×10^6 NS0 mouse myeloma cells were transfected with 10ug of linearized (cut with *SaII*) vector DNA by electroporation and selected in glutamine-deficient media as described (Yazaki PJ, et al. J Immunol Methods. 2001 ;253: 195). Clones were screened for expression by ELISA, whereby the desired protein was captured by goat anti-human IgG (Fc specific) and detected by alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-human IgG (Fc specific) (both from Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove,PA). The highest producing clones were expanded and brought to terminal culture.

[0108] Soluble minibodies were purified from cell culture supernatants by Protein L chromatography using a Thermal Separations Products HPLC with an in-line UV monitor, equipped with a preparative Poros 50 A column (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analyzed on SDS-PAGE (Figure 3). The four minibodies showed similar results. All the minibodies migrated as molecular weight species of ~95 kDa under non-reducing conditions and all showed good purity. In addition, the A11 minibody eluted at 29.5 minutes as expected when run on a calibrated size exclusion column (Figure 4).. Supernatants were loaded onto a 10x50 mm column and eluted using 0.1 M glycine pH 2.5, the pH was immediately neutralized with 2M Tris-HCl pH 8. The purified proteins were then dialyzed against PBS using a molecular porous membrane tubing (mwco: 30,000) and concentrated with a Vivascience Vivaspin 20 (mwco: 30,000). Final protein concentrations were determined by measuring UV absorbance at 280 nm, using the parental murine antibody as the standard.

[0109] Example 4

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0110] This example describes the biochemical characterization of anti-PSCA minibodies.

[0111] Size and composition: Purified proteins were analyzed by SDS-PAGE (Figure 3) under non-reducing conditions. Native structural size was determined by size exclusion columns (Superdex 75) (Pharmacia).

[0112] The ranking of the four minibodies was determined by competition ELISA and flow cytometry (figure 5). The relative affinity as measured by competition ELISA indicated that all three affinity variants had higher affinity than the parental, with an improvement of 4.4x, 3.0x and 1.9x for A2, A11 and C5 respectively compared to the parental. Flow cytometry data also resulted in ranking the four minibodies in the same order when targeting PSCA expressed at the cell surface. In conclusion, the affinity ranking of the four minibodies was: A2>A11>C5>parental.

[0113] Competition ELISA: PSCA relative binding affinity for the minibodies was determined by competition ELISA in which microtiter plate wells were coated with purified PSCA-Fc (Olafsen T, et al. J. Immunotherapy 2007: 30:396).

[0114] Flow Cytometry : was conducted to assess cellular PSCA binding activity. An EBV transformed B-cell lymphoma cell line stably transfected with PSCA were used. Briefly, cells 5×10^5 were incubated for 30 min on ice with 100 μ l of minibody at 2 μ g/ml concentration. Cells were washed and stained with goat anti-hFc PE conjugated antibody at 1:100 dilution.

[0115] Radioiodination: Purified minibodies were radioiodinated with the positron emitting isotope ^{124}I (sodium iodide in 0.02 M NaOH; radionuclide purity >99%) provided by Advanced Nuclide Technologies, Indianapolis, IN as previously described (Kenanova, Olafsen et al., Cancer Res. 65:622,2005). Immunoreactivity was assayed by incubating radioiodinated-minibody with an excess amount of SKW-PSCA⁺ cells for an hour at room temperature, centrifugating the cells, and counting radioactivity present into the supernatant compared to the control.

[0116] Example 5

[0117] This example describes MicroPET imaging and biodistribution studies of anti-PSCA minibodies.

[0118] All animal studies were conducted under protocols approved by the Chancellor's Animal Research Committee at the University of California, Los Angeles. Xenografts were

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

established in 7- to 8-week-old male nude mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) by s.c. inoculation of 2×10^6 LAPCP AD cells in the shoulder region. After 14 days, when tumor masses were in the range of 100 to 300 mg, 100 μ Ci of isotope ^{124}I (30-50 μ g protein) was injected into the tail vein of each animal. Mice were imaged using a P4 microPET scanner (Concorde Microsystems, Inc., Knoxville, TN). To enable imaging, mice were anesthetized using 2% isoflurane, positioned in a prone position along the long axis of the microPET scanner and imaged. Acquisition time was 10 minutes (1 bed position), and images were reconstructed using a filtered backprojection reconstruction algorithm. Images were displayed and regions of interest (ROI) were drawn as described in figure 6 and quantified using AMIDE (Loening and Gambhir, Molecular Imaging 2: 131, 2003). After scanning, tumors, liver, spleen, kidney, lung, and blood were excised, weighed and counted in a well counter (Cobra II AutoGamma, Packard, IL). Background, crossover, and decay corrections were done. Results were calculated as percentage of injected dose per gram of tissue (% ID/g).

[0119] To evaluate tumor targeting and microPET imaging efficiency, ^{124}I -labeled minibodies were injected into Nude mice bearing LAPC-9AD tumors on the right shoulder. Wholebody microPET and CT scans were performed at 21h and/or 25h, after which the animals were sacrificed, and activity in various tissues quantified using a gamma counter. To quantify microPET imaging, four 3-dimensional ROIs were drawn in the tumors and four other ROI in soft tissues around the tumor as presented in figure 6. The ROI position and size were based on CT image information. Both biodistribution and imaging quantification are presented as a ratio of tumor signal to background. A11 minibody gave the best biodistribution and imaging data in an experiment that compared the three affinity variant (Figure 7A). Thus the affinity ranking (Figure 5) and *in vivo* tumor targeting/imaging ranking (Figure 7A) of the three affinity variant minibodies are different, suggesting that in our model *in vivo* tumor targeting/imaging effectiveness is not solely dependant on the inherent affinity of the tracer to its target. A2 which has the best affinity to PSCA did not give the best *in vivo* tumor targeting/imaging results. One possible explanation for this discordance is that A2 has a substitution of an asparagine into a tyrosine in V_L CDR2, and that iodination of this new tyrosine could affect the binding to PSCA. In a second experiment A11 minibody was compared to the parental minibody for their *in vivo* tumor targeting/imaging effectiveness. A11 showed a 20% increase in tumor targeting (n=3) and a 141 % increase in microPET tumor imaging (n=2) (figure 7B).

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0120] Example 6

[0121] This example describes the imaging of various pancreatic cancer tumors using anti-PSCA minibodies.

[0122] In order to evaluate the targeting and imaging potential of affinity matured anti-PSCA minibodies, ¹²⁴I-labeled minibodies (parental 2B3 and variant A11) were injected into athymic nude mice bearing tumors that express low levels of target PSCA antigen. Briefly, xenographic mice bearing either human Capan-1 (Figure 14) or human MIA PaCa-2 (Figure 15) pancreatic tumors were injected with either 200 or 300 µg of labeled anti-PSCA minibody. Wholebody microPET and CT scans were performed as before, and tissue radioactivity was determined. Similarly, quantification of microPET imaging and ROI position and size were determined as in example 5.

[0123] As can be seen in Figures 14 and 15, variant A11 anti-PSCA minibodies consistently demonstrated improved tumor to muscle specificity ratios as compared to parental 2B3 minibodies. The nearly 2-fold enhancement in *in vivo* specificity suggests that these variant minibodies are better suited for use in therapeutic targeting and tumor imaging than existing anti-PSCA antibodies. Notably, tumor uptake in Capan-1 and HPAF-11 (data not shown) was roughly 2% and less than 1% in MIA PaCa-2 tumors, suggesting specific uptake.

[0124] Related art:

[0125] 1) Sundaresan, G., Yazaki, P.J., Shively, J.E., Finn, R.D., Larson, S.M., Raubitschek, A.A., Williams, L.E., Chatzioannou, A.F., Gambhir, S.S., and Wu, A.M. (2003) Iodine-124 labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow highcontrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J. Nucl. Med.*, 44:1962-1969.

[0126] 2) Olafsen, T., Gu, Z., Sherman, M.A., Leyton, J.V., Witkosky, M.E., Shively, J.E., Raubitschek, A.A., Morrison, S.L., Wu, A.M. and Reiter, R.E. (2007) Targeting, imaging, and therapy using a humanized anti-prostate stem cell antigen (PSCA) antibody. *J. Immunotherapy* 30:396-405.

[0127] 3) Leyton, J.V., Olafsen, T., Sherman, M.A., Reiter, R.E., and Wu, A.M. Anti-prostate stem cell antigen (PSCA) antibody fragments for PET imaging of prostate cancer (abstract). *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 21 :391, 2006.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

[0128] It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes to the extent consistent with the present disclosure.

P226877Sequence Listing.txt
SEQUENCE LISTING

<110> The Regents of the University of California
 <120> High Affinity Anti-Prostate Stem Cell Antigen (PSCA)
 Antibodies for Cancer Targeting and Detection
 <130> P226877
 <140> PGT/US08/075291
 <141> 2008-09-04
 <150> US 60/969,939
 <151> 2007-09-04
 <160> 13
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> human prostate stem cell antigen (PSCA)
 <400> 1
 Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln
 1 5 10 15
 Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn
 20 25 30
 Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys
 35 40 45
 Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys
 50 55 60
 Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly
 65 70 75 80
 Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly
 85 90 95
 Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala
 100 105 110
 Leu Gly Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu
 115 120

<210> 2

P226877Sequence Listing.txt

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
 Gap 5' for construction of mutant scFv yeast
 display vector pYD2 library

 <400> 2
 ttaagcttct gcaggctagt g 21

 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
 Gap 3' for construction of mutant scFv yeast
 display vector pYD2 library

 <400> 3
 gagaccgagg agagggttag g 21

 <210> 4
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:humanized mouse
 monoclonal anti-PSCA 168 antibody (Trastuzumab,
 2B3) parental P-2B3 wild type scFv

 <400> 4
 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Phe Ile
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Ser Pro Phe Thr
 85 90 95

P226877Sequence Listing.txt

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp
 145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Trp Ile Asp
 165 170 175

Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Phe Val Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala
 180 185 190

Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Thr Gly Gly
 210 215 220

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Gly
 225 230 235

<210> 5

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:humanized mouse
 monoclonal anti-PSGA 1G8 antibody (Trastuzumab,
 2B3) affinity variant mutant C5 scFv

<400> 5

Asp Ile Gln Leu Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Phe Ile
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Ser Pro Phe Thr

P226877Sequence Listing.txt

	85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Gly	100	105	110
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Glu Val Gln Leu	115	120	125
Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu	130	135	140
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp	145	150	155
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Trp Ile Asp	165	170	175
Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Phe Val Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala	180	185	190
Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn	195	200	205
Ser Leu Arg Ala Lys Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Thr Gly Gly	210	215	220
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Gly	225	230	235

<210> 6

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:humanized mouse
monoclonal anti-PSCA 168 antibody (Trastuzumab,
2B3) affinity variant mutant A2 scFv

<400> 6

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Phe Ile	20	25	30	
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr	35	40	45	
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser	50	55	60	
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu	65	70	75	80

P226877Sequence Listing.txt

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Gly Ser Ser Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 115 120 125
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 130 135 140

 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val
 145 150 155 160
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Trp Ile Asp Pro
 165 170 175
 Glu Tyr Gly Asp Ser Glu Phe Val Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr
 180 185 190
 Met Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 195 200 205
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Thr Gly Gly Phe
 210 215 220
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Gly
 225 230 235

<210> 7
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:humanized mouse
 monoclonal anti-PSCA 168 antibody (Trastuzumab,
 2B3) affinity variant mutant A11 scFv

<400> 7
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Met Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Phe Ile
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

P226877Sequence Listing.txt

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Gly Ser Ser Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Glu Val Gln Leu
115 120 125

Val Glu Tyr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp
145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Trp Ile Asp
165 170 175

Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Phe Val Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala
180 185 190

Thr Met Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn
195 200 205

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Thr Gly Gly
210 215 220

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Gly
225 230 235

<210> 8
<211> 1182
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:humanized mouse
monoclonal anti-PSCA 168 antibody (Trastuzumab,
2B3) parental 2B3 wild type minibody coding
sequence with signal peptide

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1179)
<223> parental 2B3 minibody with signal peptide

<400> 8
tct aga gcc gcc acc atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gtg ctg 48
Ser Arg Ala Ala Thr Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu
1 5 10 15

P226877Sequence Listing.txt

ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc acc ggt gac att cag ctg acc caa tct	96
Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser	
20 25 30	
cca agc tct ttg tcc gcc tct gtg ggg gat agg gtc acc atc acc tgc	144
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys	
35 40 45	
agt gcc agt tca agt gta aga ttc att cac tgg tac cag cag aaa cca	192
Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
50 55 60	
gga aaa gct ccc aaa aga ctc atc tat gac aca tcc aaa ctg gct tct	240
Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser	
65 70 75 80	
ggc gtc cct tct agg ttc agt ggc tcc ggg tct ggg aca gac ttc acc	288
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
85 90 95	
ctc acc att agc agt ctg cag ccg gaa gat ttc gcc acc tat tac tgt	336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys	
100 105 110	
cag cag tgg agt agt agc cca ttc acg ttc gga cag ggg acc aag gtg	384
Gln Gln Trp Ser Ser Ser Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val	
115 120 125	
gag ata aaa ggc agt act agc ggc ggt ggc tcc gga ggc ggc tcc gga	432
Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly	
130 135 140	
ggt ggc ggc agc tca gag gtt cag ctg gtg gag tct ggg ggt ggc ctt	480
Gly Gly Gly Ser Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu	
145 150 155 160	
gtg cag cca ggg ggc tca ctc cgt ttg tcc tgc gca gct tct ggc ttc	528
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe	
165 170 175	
aac att aaa gac tac tat ata cac tgg gtg cgt cag gcc cct ggt aag	576
Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys	
180 185 190	
ggc ctg gaa tgg gtt gca tgg att gat cct gag aat ggt gac act gaa	624
Gly Leu Glu Trp Val Ala Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu	
195 200 205	
ttt gtc ccg aag ttc cag ggc cgt gcc act ata agc gca gac aca tcc	672
Phe Val Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser	
210 215 220	
aaa aac aca gcc tac ctg cag atg aac agc ctg cgt gct gag gac act	720
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr	
225 230 235 240	

P226877Sequence Listing.txt

gcc gtc tat tat tgt aaa acg ggg ggg ttc tgg ggt caa gga acc ctg	768
Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Thr Gly Gly Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu	
245 250 255	
gtc acc gtc tcg agc gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc	816
Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys	
260 265 270	
cca ccg tgc ggc gga ggt agc tct ggc ggt gga tcc ggc ggg cag ccc	864
Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro	
275 280 285	
cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc	912
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr	
290 295 300	
aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc	960
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	
305 310 315 320	
gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac	1008
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
325 330 335	
aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac	1056
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
340 345 350	
agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc	1104
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	
355 360 365	
tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag	1152
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys	
370 375 380	
agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga tag	1182
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
385 390	
<210> 9	
<211> 392	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:humanized mouse	
monoclonal anti-PSCA 168 antibody (Trastuzumab,	
2B3) parental 2B3 wild type minibody with signal peptide	
<400> 9	
Ser Arg Ala Ala Thr Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu	
1 5 10 15	

P226877Sequence Listing.txt

Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
 20 25 30

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 35 40 45

Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Gln Gln Trp Ser Ser Ser Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 115 120 125

Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 145 150 155 160

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 165 170 175

Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 180 185 190

Gly Leu Glu Trp Val Ala Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu
 195 200 205

Phe Val Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 210 215 220

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 225 230 235 240

Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Thr Gly Gly Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 245 250 255

Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 260 265 270

Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro
 275 280 285

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 290 295 300

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

P226877Sequence Listing.txt

305		310		315		320
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
				325		
						330
						335
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
			340			
						345
						350
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
		355				
						360
						365
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
	370					375
						380
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
385					390	Lys

<210> 10
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:humanized mouse
 monoclonal anti-PSCA 168 antibody (Trastuzumab,
 2B3) parental 2B3 wild type minibody

<400> 10

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	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Arg	Phe	Ile
			20					25					30		
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr
		35					40					45			
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu
	65				70					75				80	
Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Ser	Pro	Phe	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
		100					105					110			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Val	Gln	Leu
		115				120						125			
Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu
	130					135					140				

P226877Sequence Listing.txt

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Trp Ile Asp
 165 170 175
 Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Phe Val Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala
 180 185 190
 Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Thr Gly Gly
 210 215 220
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 260 265 270
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 275 280 285
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 290 295 300
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 305 310 315 320
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 325 330 335
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 340 345 350
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 11
 <211> 366
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: anti-PSCA
 minibody affinity variant A2

<400> 11
 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	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Arg	Phe	Ile		
			20				25						30				
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr		
			35				40				45						
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser		
			50				55				60						
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu		
			65	70						75				80			
Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Gly	Ser	Ser	Pro	Phe	Thr		
			85						90				95				
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly		
			100				105				110						
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val		
			115				120				125						
Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser		
			130	135						140							
Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Ile	His	Trp	Val		
			145	150						155				160			
Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Trp	Ile	Asp	Pro		
			165						170				175				
Glu	Tyr	Gly	Asp	Ser	Glu	Phe	Val	Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Ala	Thr		
			180				185				190						
Met	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser		
			195				200				205						
Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Thr	Gly	Gly	Phe		
			210	215						220							
Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys		
			225	230						235				240			
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly		
			245						250				255				
Gly	Ser	Gly	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro		
			260				265				270						
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val		
			275				280				285						
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly		
			290	295						300							
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp		

<400> 12
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Met Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Phe Ile
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Gly Ser Ser Pro Phe Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Val Gln Leu
115 120 125
Val Glu Tyr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
130 135 140
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp
145 150 155 160
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Trp Ile Asp
165 170 175
Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Phe Val Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala
180 185 190

P226877Sequence Listing.txt

Thr Met Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Thr Gly Gly
 210 215 220
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 260 265 270
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 275 280 285
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 290 295 300
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 305 310 315 320
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 325 330 335
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 340 345 350
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 13
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:anti-PSCA
 minibody affinity variant G5

<400> 13
 Asp Ile Gln Leu Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Arg Phe Ile
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

P226877Sequence Listing.txt

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Ser Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Trp Ile Asp
 165 170 175
 Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Phe Val Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala
 180 185 190
 Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Arg Ala Lys Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Thr Gly Gly
 210 215 220
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 260 265 270
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 275 280 285
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 290 295 300
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 305 310 315 320
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 325 330 335
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 340 345 350
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360 365

P226877Sequence Listing.txt

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. An antigen binding protein construct selected from the group
2 consisting of a minibody, a diabody, scFv and scFv-Fc wherein the selected construct has V_L
3 and V_H domains that are substantially identical to the V_L and V_H domains of a minibody or
4 scFv designated herein as A11, A2, or C5.
- 1 2. An antigen binding protein construct selected from the group
2 consisting of a minibody, a diabody, and a scFv-Fc, wherein the selected construct has V_L
3 and V_H domains that are substantially identical, respectively, to the V_L domain and the V_H
4 domain of an anti-PSCA antibody.
- 1 3. The antigen binding protein construct of claim 2, wherein said anti-
2 PSCA antibody is an affinity matured antibody.
- 1 4. The construct of any one of claims 1 to 3, wherein the construct is a
2 minibody in which the V_L and V_H chain variable domains of the anti-PSCA antibody are
3 fused to the hinge region of an antibody, an amino acid linker and the C_H3 domain of an
4 immunoglobulin molecule.
- 1 5. The construct of any one of claims 1 to 3, wherein the construct is a
2 diabody.
- 1 6. The construct of any one of claims 1 to 5, wherein the anti-PSCA
2 antibody is a humanized antibody and the C_H3 domain is from a human immunoglobulin
3 molecule.
- 1 7. The construct of claim 6, wherein the hinge region is a human IgG
2 hinge region.
- 1 8. The construct of any one of claims 2 to 7, wherein the anti-PSCA
2 antibody is 2B3.
- 1 9. The construct of claim 2, wherein the antigen binding protein is a
2 minibody comprising an amino acid sequence with at least 95% sequence identity to SEQ ID
3 NO:10, wherein said minibody binds to PSCA with an affinity equal to or greater than that of
4 antibody 2B3.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

- 1 10. The construct of claim 9, wherein said minibody binds to PSCA with
2 an affinity greater than that of antibody 2B3.
- 1 11. The minibody of claim 9, wherein said minibody comprises an amino
2 acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS:10, 11, 12, and 13.
- 1 12. The construct of claim 2 or 3, wherein the anti-PSCA antibody is a
2 monoclonal antibody designated 1G8 (ATCC No. HB-12612), 2A2 (ATCC No. HB-1203),
3 2H9 (ATCC No. HB-12614), 3C5 (ATCC No. HB-12616), 3E6 (ATCC No. HB12618), 3G3
4 (ATCC No. HB-12615), or 4A10 (ATCC No. HB-12617).
- 1 13. An antigen binding protein construct selected from the group
2 consisting of a minibody, a diabody, and a scFv-Fc, wherein the selected construct comprises
3 CDR regions of an anti-PSCA antibody.
- 1 14. The construct of claim 13, wherein said anti-PSCA antibody binds to
2 PSCA with an affinity equal to or greater than that of antibody 2B3.
- 1 15. The construct of claim 14, wherein said anti-PSCA antibody is selected
2 from those designated 2B3, A2, A11, or C5.
- 1 16. The construct of any one of claims 13 to 15, wherein said construct is a
2 minibody.
- 1 17. The construct of any one of claims 1 to 16, wherein the construct is
2 conjugated to a therapeutic agent.
- 1 18. The construct of claim 17, wherein the therapeutic agent is a cytotoxic
2 agent.
- 1 19. The construct of claim 18, wherein the cytotoxic agent is selected from
2 a group consisting of ricin, ricin A-chain, doxorubicin, daunorubicin, taxol, ethiduin
3 bromide, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy
4 anthracin dione, actinomycin D, diptheria toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, abrin,
5 arbrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, gelonin mitogellin, retstrictocin,
6 phenomycin, enomycin, curicin, crotin, calicheamicin, sapaonaria officinalis inhibitor,
7 maytansinoids, and glucocorticoidricin.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

- 1 20. The construct of claim 18, wherein the therapeutic agent is a
2 radioactive isotope.
- 1 21. The construct of claim 20, wherein the radioactive isotope is selected
2 from the group consisting of ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹¹¹In, ⁹⁰Y and ¹⁸⁶Re.
- 1 22. The construct of any one of claims 1 to 16, wherein the construct is
2 linked to an anti-cancer pro-drug activating enzyme capable of converting a pro-drug to its
3 active form.
- 1 23. The construct of claim 2, wherein the PSCA is human PSCA.
- 1 24. The construct of any one of claims 1 to 16, wherein the construct is
2 labeled with a detectable marker.
- 1 25. The construct according to claim 24, wherein the marker is a
2 radioisotope, a fluorescent compound, a bioluminescent compound, chemiluminescent
3 compound, a metal chelator or an enzyme.
- 1 26. The construct of claim 25, wherein the marker is ¹²⁴I.
- 1 27. A polynucleotide encoding an anti-PSCA antibody of any one of
2 claims 1 to 25.
- 1 28. A method for inhibiting the growth of a prostate cancer cell expressing
2 a Prostate Stem Cell Antigen (PSCA) protein comprising contacting the cancer cell with a
3 construct of any one of claims 1 to 23, in an amount effective to inhibit the growth of the
4 cancer cell.
- 1 29. A method for killing a prostate cancer cell by the method of claim 28.
- 1 30. The method of claim 28, wherein the construct recognizes and binds
2 the PSCA protein as shown in SEQ ID NO:2 beginning with leucine at amino acid position
3 22 and ending with alanine at amino acid position 99.
- 1 31. The method of claim 28, further comprising administering to the cell a
2 chemotherapeutic drug.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

- 1 32. The method of claim 28 further comprising administering radiation
2 therapy to the cell.
- 1 33. A method for treating a patient suffering from a prostate, bladder, or
2 pancreatic cancer by the method of any one of claims 28 to 32.
- 1 34. The method of claim 33, comprising administering to the patient
2 hormone ablation therapy or hormone antagonist therapy.
- 1 35. The method of claim 34, wherein the contacting comprises
2 administering the construct to the patient intravenously, intraperitoneally, intramuscularly,
3 intratumorally, or intradermally.
- 1 36. The method of claim 35, wherein the contacting comprises
2 administering the construct directly into a prostate cancer, a bladder cancer, a pancreatic
3 cancer or a metastasis thereof.
- 1 37. A method of detecting a cancerous cell in a subject, said method
2 comprising contacting a construct of any one of claims 24 to 26.
- 1 38. A pharmaceutical composition comprising a construct of any one of
2 claims 2 to 1, and pharmaceutically acceptable excipient, carrier, or stabilizer.
- 1 39. The composition of claim 38, wherein the composition is a lyophilized
2 formulations or aqueous solution.
- 1 40. A construct of any one of claims 1 to 23, for use in treating or
2 detecting a prostate, bladder, or pancreatic cancer in a subject.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

- 1 41. A method of imaging a cancer cell *in vivo*, comprising the steps of:
- 2 (a) administering to a mammal suspected of having cancer an antibody of any
- 3 one of claims 24 to 26; and
- 4 (b) detecting said antibody with a method selected from the group consisting
- 5 of magnetic resonance imaging (MRI), nuclear magnetic resonance (NMR), computerized
- 6 axial tomography (CAT) scan, cooled charged coupled device (CCD) camera optical
- 7 imaging, bioluminescent optical imaging, position emission tomography (PET), single photon
- 8 emission computed tomography, and microPET, thereby imaging a cancer cell *in vivo*.
- 1 42. The method of claim 41, wherein said mammal is a mouse, rat, .
- 2 hamster, rabbit, pig, or human.

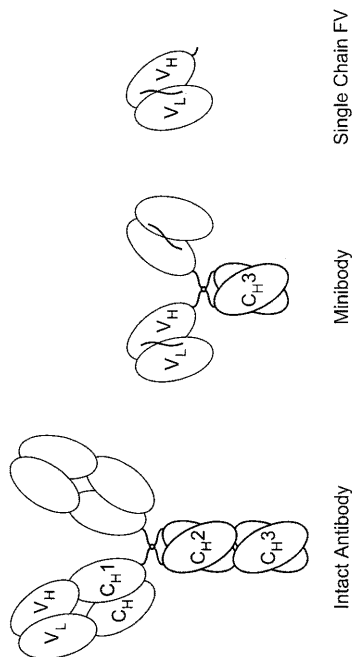
Abstract: The present invention provides novel high affinity antibodies and fragments thereof that bind to the cancer antigen PSMA. The antibodies of the present invention may be used for cancer diagnosis, prognosis, treatment, visualization, and the like. The present invention also provides methods for the detection, visualization, and treatment of various cancers expressing PSMA.

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

1/23

Fig. 1



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

2/23

PCT/US2008/075291

Fig. 2 (sheet 1)

	1	10	20	30	40	50	60	
P-2B3	DIQLTQSPSSLSASVGDVRVITTCSSASSVRFIHWYQKPKAPKRLIYDTSKLASGVPSR							CDR-L1
								CDR-L2
1. C5	DIQLTQSPSSLSASVGDVRVITTCSSASSVRFIHWYQKPKAPKRLIYDTSKLASGVPSR							
P-2B3	DIQLTQSPSSLSASVGDVRVITTCSSASSVRFIHWYQKPKAPKRLIYDTSKLASGVPSR							
2. A2	DIQLTQSPSSLSASVGDVRVITTCSSASSVRFIHWYQKPKAPKRLIYDTSKLASGVPSR							
P-2B3	DIQLTQSPSSLSASVGDVRVITTCSSASSVRFIHWYQKPKAPKRLIYDTSKLASGVPSR							
3. A11	DIQLTQSPSSLSASVGDVRVITTCSSASSVRFIHWYQKPKAPKRLIYDTSKLASGVPSR							
P-2B3	DIQLTQSPSSLSASVGDVRVITTCSSASSVRFIHWYQKPKAPKRLIYDTSKLASGVPSR							
								CDR-L3
P-2B3	FSGSGGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG							
1. C5	FSGSGGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG							
P-2B3	FSGSGGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG							
2. A2	FSGSGGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG							
P-2B3	FSGSGGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG							
3. A11	FSGSGGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG							
P-2B3	FSGSGGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQWSSSPFTFGQGTKEIKGSTSGGSGGSGG							

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 2 (sheet 2)

[illegible]

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 3 (sheet 1)

tctagaccgccaccatggagacagacacactcctgtatgggtgctgctctcgtgggt
 S R A A P T M E T D T L L L W V L L L W V
signa1 peptide
 ccaggttcaccggtagacattcagtcgaccacatccaagctctttgctcgctctgtg
 P G S T G D I Q L T Q S P S L S A S V
 gggtatgggtcaccatcacttcgctcagtcgagtgaaattcattcactggctac
 G D R V T I T C S A S S V R F I H W Y
 cagcagaacacaggaaaagctccaaaagactcctatgacatccaaactggcttct
 Q Q K P G K A P K R L I Y D T S K L A S
 ggctcctcttaggttcagttggctcgggtcggacagacttcacccctcaccattagc
 G V P S R P S G S G S G T D F T L T I S
 agtctgacgcgaagatttcgccacctattactgacgagtgagtagtagccatttc
 S L Q P E D F A T Y Y C Q Q W S S S P F
 agcttcgacaggggaccagaagtggagataaaaggcagctactagcgcggtggtctcggga
 T F G Q G T K V E I K G S T S G G S G
linker

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 3 (sheet 2)

ggcggtccgaggtggcggcagctcagaggttcagctgtggagctcggggtggcgctt
G G S G G G G S S E V Q L V E S G G G L
 V_H
gtgcagccagggtcactccgttcttcgcagccttcgtcttcaacattaaagac
V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D
tactatatacactgggtgcgcagggcccttgtaagggcctggaatgggttgcatggatt
Y Y I H W V R Q A P G K G L E W V A W I
gatctcgaagaatggtagacactgaatttcccgaggttcacagggccgtgcactataagc
D P E N G D T E F V P Q G R A T A I S
gatctcgagaatggtagcactgaatttgcgcaggttcagggccgtgcactataaagc
A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T
ggcgctattattgtaaacgggggttctcggggtcaaggaaacctgggtcacccgtctcg
A V Y Y C K T G G F W G Q G T L V T V S
agcgagcccaaatctgtgacaaaaactcacatgccccaccgtgcgcgaggtagctct
S E P K S C D K T H T C P C G G S
hinge *extension*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 3 (sheet 3)

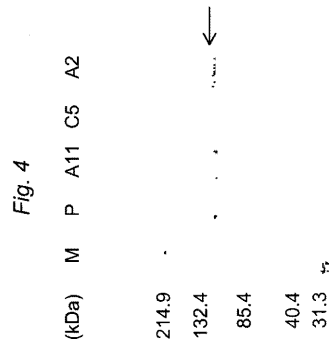
ggcggtggtatccggcgagccccgagaaccacagtgatcaccttgcgcccatccgg
G G S G G G G G P Q R E P Q V Y T L P P S R
^{CHJ}
gatgatgtagaccagaacacagctgacgtgctggtcaaggcttctatccagc
D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S
gacatccgctggtaggagagcaatggcagccggagaaacaactacagaccacgct
D I A V E W W G G A G S N G G P E N N Y K T T P
ccggtgctgagctcgacggctctcttctctctacagcagctcacggtggacaagc
P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S
aggttggcgagcagggaacgtcttctatgctcgtgatgcatgaggtctctgcacaaccac
R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H
tacacgcagaagcctctcctctcctccgggtaaatgatag
Y T O K S L S L S P G K - -

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

7/23

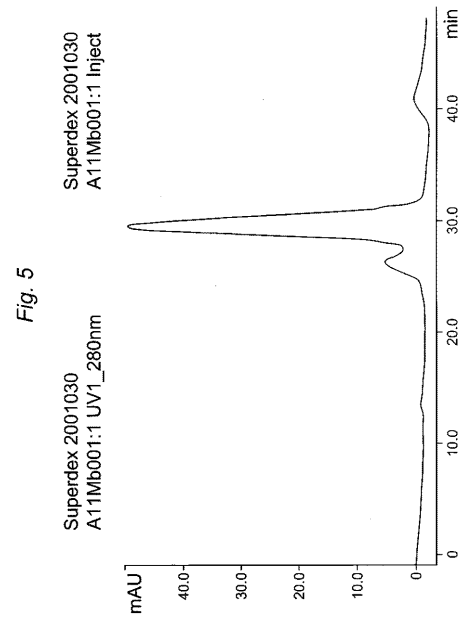


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

8/23

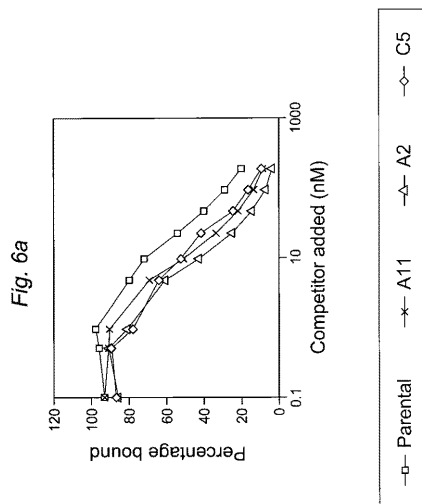


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

9/23

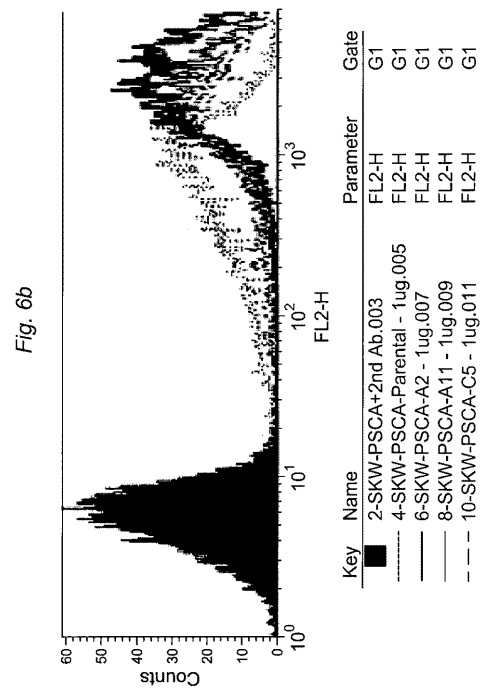


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

10/23

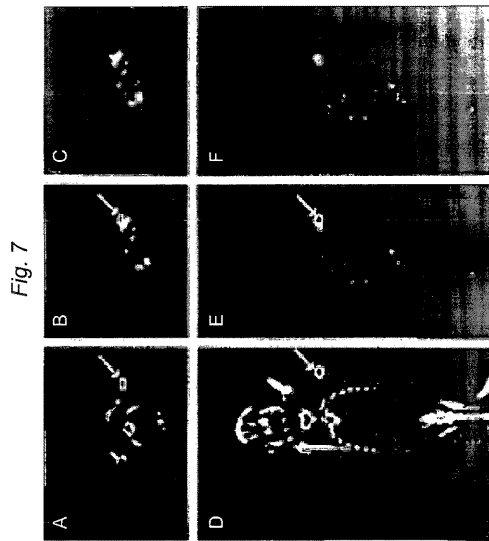


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

11/23

PCT/US2008/075291

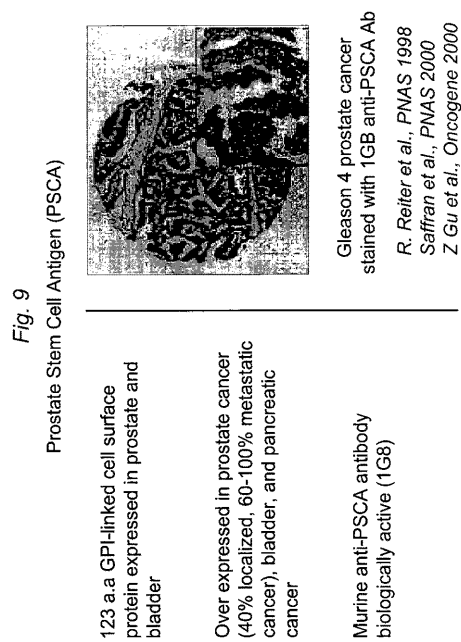


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

13/23

PCT/US2008/075291



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

12/23

PCT/US2008/075291

Fig. 8

	Tumor/blood Biodistribution	Tumor/background MicroPET
A2	0.67	2.9
A11	1.08	8.5
C5	0.73	2.9

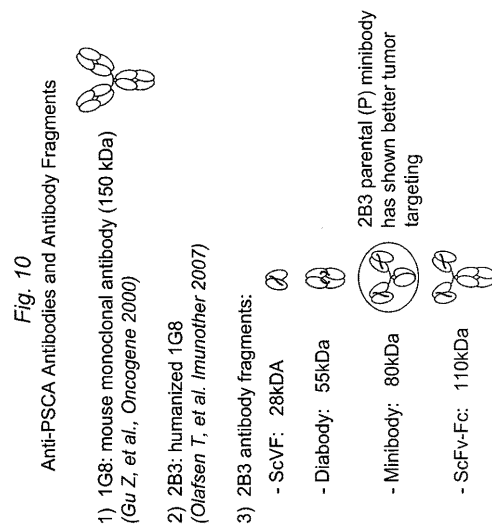
	Tumor/blood Biodistribution	Tumor/background MicroPET
Parental A11	0.88	2.4
	1.11	5.8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

14/23

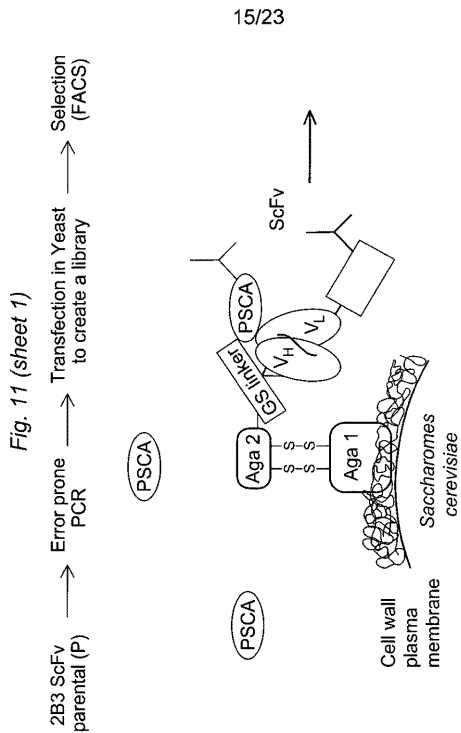
PCT/US2008/075291



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

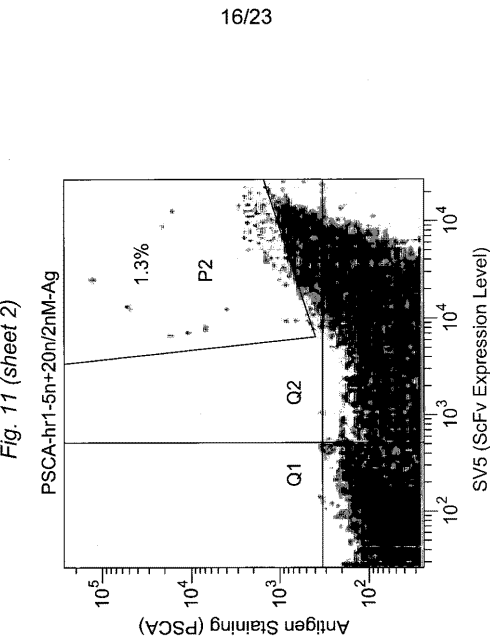
PCT/US2008/075291



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

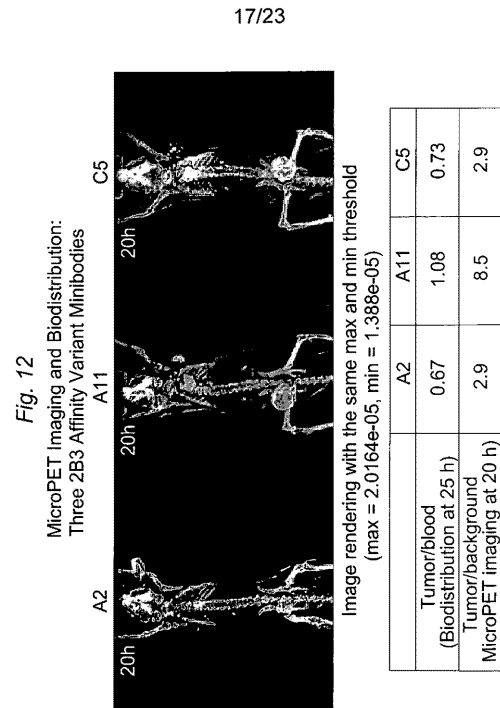
PCT/US2008/075291



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

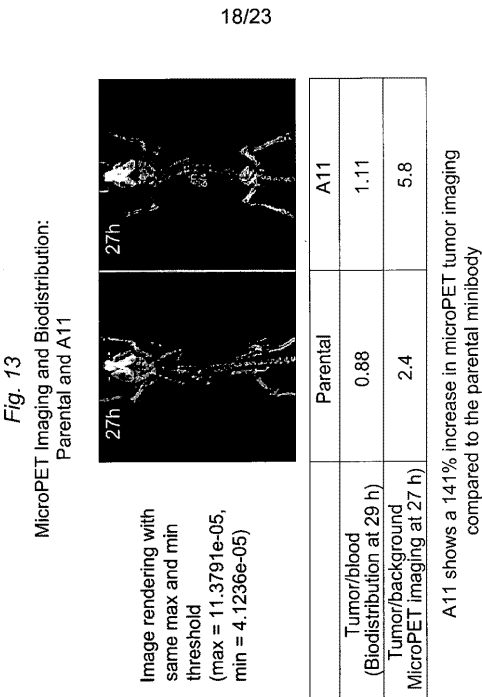
PCT/US2008/075291



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

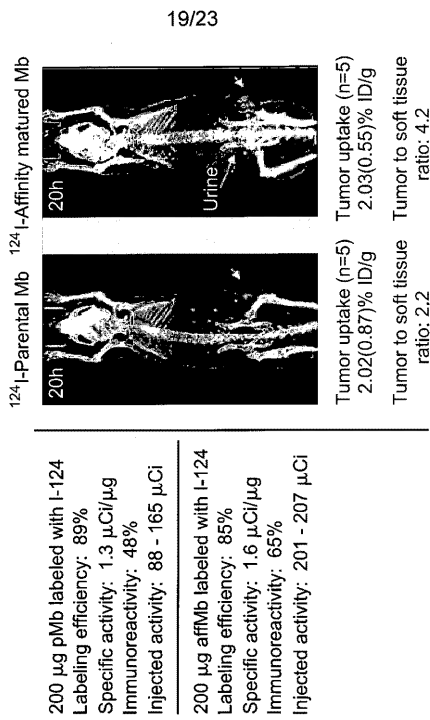


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

Fig. 14
PET Imaging of Capan-1 Xenografts



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

21/23

Fig. 16a (sheet 1)
2B3 affinity Various Protein Sequences

2B3 parental minibody sequence
DIQLTQSPSSLSASVGRVITTCSSASSVRFTHW
YQOKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQWSSPFTFGGG
KVEIKGSTSGGGSGGGSGGGSEVQLVEYGG
LVQPGGSLRLSCAASGFTNIDKYTHHWRAAPG
GLEWAWIDPEYGVDFVVKFQGRATISADTSK
NTAYLQIMSLRAEDTAVYCKTGDFWGGTLV
TVSSEPKSCDKHTCPPCGGSGGGSGGGGP
POVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VMEVNSGQPEPNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSK
VQKSRWQGGNIVFSCSVMIHEALHNHYTQSKL
SLSPGK (SEQ ID NO:10)

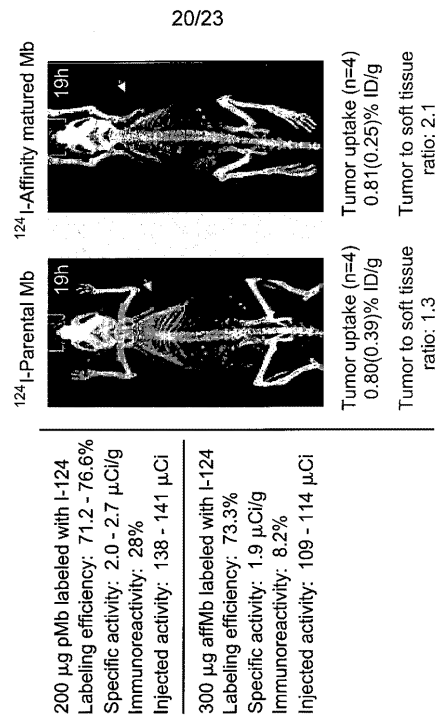
2B3 A2 minibody sequence
DIQLTQSPSSLSASVGRVITTCSSASSVRFTHW
YQOKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQWSSPFTFGGG
KVEIKGSTSGGGSGGGSGGGSEVQLVEYGG
LVQPGGSLRLSCAASGFTNIDKYTHHWRAAPG
GLEWAWIDPEYGVDFVVKFQGRATISADTSK
NTAYLQIMSLRAEDTAVYCKTGDFWGGTLV
TVSSEPKSCDKHTCPPCGGSGGGSGGGGP
POVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VMEVNSGQPEPNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSK
LTVDKSRWQGGNIVFSCSVMIHEALHNHYTQSKL
SLSPGK (SEQ ID NO:11)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

Fig. 15
PET Imaging of MIA PaCa-2 Xenografts



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2009/032949

PCT/US2008/075291

22/23

Fig. 16a (sheet 2)

2B3 A11 minibody sequence
DIQLTQSPSTLSASNGDRVITTCSSASSVRFTHW
YQOKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQWSSPFTFGGG
TKVEIKGSTSGGGSGGGSGGGSEVQLVEYGG
GLVQPGGSLRLSCAASGFTNIDKYTHHWRAAPG
GLEWAWIDPEYGVDFVVKFQGRATISADTSK
SKITAYLQIMSLRAEDTAVYCKTGDFWGGTLV
LTVSSEPKSCDKHTCPPCGGSGGGSGGGGP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEVNSGQPEPNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSK
LTVDKSRWQGGNIVFSCSVMIHEALHNHYTQSKL
SLSPGK (SEQ ID NO:12)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 16b

2B3 C5 minibody sequence
DIQLIQSPSSLASVDRVTITCSASSVRFIHW
YQOKPKGPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSG
TDFTLTISSLOPEDFATYYCQIMSSPFTFGGT
KVEIKGSTSGGGGGGGGGSEYQLVESGGG
LVOPGSLRLSCAASGFNIKDYIHWVRQAPGK
GLEWVAWIDPENGDTFVVPKQGRATISADTSK
NTVYLQIMSLRAKDTAVYYCKTGGFWGGTLV
TVSSEPKSCDKHTCPPCGGGGGGGGGGOPRE
POVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRHQGGWVFSCSVIHEALHNHYTQKSLSL
SPGK (SEQ ID NO:13)