

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6181059号
(P6181059)

(45) 発行日 平成29年8月16日(2017.8.16)

(24) 登録日 平成29年7月28日(2017.7.28)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 51/10 (2006.01)

A 6 1 K 51/10 2 0 0

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 Z N A

A 6 1 K 31/18 (2006.01)

A 6 1 K 31/18

A 6 1 K 31/4166 (2006.01)

A 6 1 K 31/4166

A 6 1 K 31/4375 (2006.01)

A 6 1 K 31/4375

請求項の数 14 (全 76 頁)

(21) 出願番号 特願2014-539018 (P2014-539018)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月25日(2012.10.25)
 (65) 公表番号 特表2015-502339 (P2015-502339A)
 (43) 公表日 平成27年1月22日(2015.1.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/061982
 (87) 国際公開番号 W02013/063312
 (87) 国際公開日 平成25年5月2日(2013.5.2)
 審査請求日 平成27年10月26日(2015.10.26)
 (31) 優先権主張番号 61/551,195
 (32) 優先日 平成23年10月25日(2011.10.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 500213834
 メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1 2 7 5
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ソイヤーズ, チャールズ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5, ニューヨーク, イースト 61 エスティー ストリート 40, アpartment 9シー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺がんのための診断薬、予後判定薬、および治療薬としてのフリーP S A抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における腫瘍結合 f P S A または腫瘍内 f P S A の発現または活性の処置前レベルおよび処置後レベルを、前立腺がん治療または処置が有効である可能性の指標とする方法であって、該方法は：

f P S A の触媒クレフト内にあるか、または該触媒クレフトに隣接するエピトープに結合する抗体ポリペプチドの投与を受けた該被験体における腫瘍結合 f P S A または腫瘍内 f P S A の発現または活性の処置前レベルを判定するステップと、

前立腺がん処置または治療を受け、かつ、f P S A の触媒クレフト内にあるか、または該触媒クレフトに隣接するエピトープに結合する抗体ポリペプチドの再投与を受けた該被験体における腫瘍結合 f P S A または腫瘍内 f P S A の発現または活性の処置後レベルを判定するステップと、

腫瘍結合 f P S A または腫瘍内 f P S A の発現または活性の該処置後レベルを該処置前レベルと比較するステップと、

該比較するステップに基づいて、該治療または処置の有効性を判定するステップであって、該比較が i n s i t u の腫瘍結合 f P S A もしくは腫瘍内 f P S A の活性または発現の減少を示す場合に、該治療または処置が有効であると判定される、ステップとを含む方法。

【請求項 2】

前記前立腺がん処置または治療が抗アンドロゲン治療である、請求項 1 に記載の方法。

10

20

【請求項 3】

前記抗体ポリペプチドがポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗体ポリペプチドが検出用実体を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記検出用実体が、ジルコニウム - 89 (^{89}Zr)、ヨウ素 - 124 (^{124}I)、ヨウ素 - 131 (^{131}I)、ヨウ素 - 125 (^{125}I)、ビスマス - 212 (^{212}Bi)、ビスマス - 213 (^{213}Bi)、アスタチン - 221 (^{221}At)、銅 - 67 (^{67}Cu)、銅 - 64 (^{64}Cu)、レニウム - 186 (^{186}Re)、レニウム - 188 (^{188}Re)、リン - 32 (^{32}P)、サマリウム - 153 (^{153}Sm)、ルテチウム - 177 (^{177}Lu)、テクネチウム - 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、ガリウム - 67 (^{67}Ga)、インジウム - 111 (^{111}In)、およびタリウム - 201 (^{201}Tl) からなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記判定するステップが、単一光子放出型コンピュータ断層撮影 (SPECT)、ポジトロン放出断層撮影 (PET)、または磁気共鳴画像法 (MRI) による検出を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記前立腺がん処置または治療が、去勢、RU58642、LG120907、LG105、RD162、MDV3100、BMS-641988、CH5137291、アタル酸、N-ブチルベンゼンスルホンアミド、酢酸シプロテロン、ヒドロキシフルタミド、ピカルタミド、ニルタミド、ペプチドアンタゴニスト、TAK700、ARN-509、カボザンチミブ、イピリムマブ、クスチルセン、BPX-101、アルファラディン、デノスマブ、および Protsvac-VF を含む群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

効果的な処置が、fPSA の発現または活性の前記処置前レベルに対する fPSA の発現または活性の前記処置後レベルの低減によって示される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

悪性疾患と非悪性の骨再形成とを *in vivo* で区別するための、fPSA の触媒クレフト内の、または該触媒クレフトに隣接する少なくとも 1 つのエピトープに特異的に結合する抗体ポリペプチドを含む組成物であって、該組成物は被験体に投与されることを特徴とし、該 fPSA は、腫瘍結合 fPSA もしくは腫瘍内 fPSA である、組成物。

30

【請求項 10】

前記悪性疾患は、骨格転移性疾患である、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記悪性疾患は、骨格前立腺がんである、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

肝臓または骨における転移性前立腺がん疾患を *in vivo* で診断するための、fPSA の触媒クレフト内の、または該触媒クレフトに隣接する少なくとも 1 つのエピトープに特異的に結合する抗体ポリペプチドを含む組成物であって、該組成物は被験体に投与されることを特徴とし、該 fPSA は、腫瘍結合 fPSA もしくは腫瘍内 fPSA である、組成物。

40

【請求項 13】

検出用実体の存在を、被験体特異的なベースライン、または患者の集団に由来するベースラインと比較した、アンドロゲン受容体シグナル伝達に対する前立腺がんに関連する処置の効果の指標とする方法であって、該方法は：

イメージングプロトコールによって、該被験体の肝臓または骨における前立腺がん細胞中の検出用実体の存在を検出するステップ

を含み、fPSA の触媒クレフト内の、または該触媒クレフトに隣接する少なくとも 1

50

つのエピトープに結合する抗体ポリペプチドが該被験体に投与されることを特徴とし、該抗体ポリペプチドが、該検出用実体と複合体化され、該 f P S A は、腫瘍結合 f P S A もしくは腫瘍内 f P S A であり、そして、アンドロゲン受容体シグナル伝達が、*i n v i v o* で画像化される、方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法において使用するための、f P S A の触媒クレフト内にあるか、または該触媒クレフトに隣接するエピトープに結合する抗体ポリペプチドを含む組成物であって、該 f P S A は、腫瘍結合 f P S A もしくは腫瘍内 f P S A である、組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、2011年10月25日に出願された米国仮特許出願第61/551,195号の利益を主張し、この米国仮特許出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

【背景技術】

【0002】

背景

前立腺がんは、男性において最も頻繁に診断されるがんの1つであり、肺がんに次いで最も一般的ながん関連死の原因である。前立腺がんを発症するリスクは、とりわけ50を過ぎた男性に関して、年齢とともに劇的に増大する。過去30年に目立ってきた高齢化する人口および平均余命の延長に伴って、米国における前立腺がんの発病率は、6人の男性に1人に近づいている可能性がある。

20

【0003】

前立腺がんの分子的原因が相当研究されているにもかかわらず、処置することが困難なままである。処置の現在のゴールドスタンダードは、手術、すなわち、一般に前立腺の除去、その後の放射線または化学療法処置である。しかし、これらの方法は、完全に有効ではなく、性機能を回復する個人の機会を損なう。さらに、前立腺がん細胞および転移性前立腺がん細胞は、アンドロゲン受容体の過剰発現、または活性化アンドロゲン受容体シグナル伝達を模倣する他の適応突然変異によって、処置で低減したアンドロゲンレベルを相殺し得る。さらに、現在の方法は、他の組織、例えば、リンパ節および骨に浸潤した転移性前立腺がん細胞を同定および処置するのに不十分である。転移性前立腺がん細胞が出ている前立腺腫瘍と同様に、転移性前立腺がん細胞は、アンドロゲン感受性のままであり、アンドロゲンが存在すると、転移性腫瘍増殖が推進される。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

要旨

本発明の実施形態は、フリー P S A (「f P S A」) に特異的なモノクローナル抗体および抗体ポリペプチドが、腫瘍内 f P S A、または前立腺腫瘍と他の方法で密接に結合した f P S A に結合することができるという意外な発見に基づく。腫瘍結合 f P S A レベルは、腫瘍自体のところでのアンドロゲン受容体シグナル伝達の高度に具体的および定量化可能な尺度をもたらすことができる。したがって、本発明によれば、モノクローナル抗体または抗体ポリペプチドの腫瘍結合 f P S A への結合は、*i n s i t u* でのアンドロゲン受容体シグナル伝達の監視および/または可視化を促進し、抗がん処置の効力の優れた尺度をもたらす。

40

【0005】

f P S A を介して *i n s i t u* でアンドロゲン受容体シグナル伝達を監視すると、慣例的な血清 P S A 試験と比較して劇的に優れた結果がもたらされる。例えば、*i n s i*

50

t uのf P S Aレベルは、前立腺がん特異的であり、本明細書で実証するように、アンドロゲン応答性および治効と直接相関する。したがって、本明細書に開示の本発明の実施形態は、腫瘍結合f P S A発現を測定してP S A発現のアンドロゲン受容体主導変化をより明らかに反映する非侵襲的方法を提供する。さらに、モノクローナル抗体および抗体ポリペプチドは、びまん性疾患を有する患者における転移性病変部を検出することができ、悪性疾患と非悪性疾患を区別することができる。さらに、腫瘍結合f P S Aに対するモノクローナル抗体および抗体ポリペプチドの結合特異性は、前立腺腫瘍または転移部に直接、治療（例えば、化学療法、放射性同位体の送達、または遺伝療法）を標的化する機能を果たすことができる。

【0006】

本発明の実施形態は、前立腺がん処置または治療に対する応答を*in situ*で監視するための方法を提供する。特定の実施形態では、本方法は、フリーP S A（「f P S A」）のエピトープに結合する抗体ポリペプチドを投与するステップと、被験体の腫瘍または組織中のf P S Aの発現または活性の処置前レベルを判定するステップと、被験体に前立腺がん処置または治療を投与するステップと、f P S Aのエピトープに結合する抗体ポリペプチドを再投与するステップと、被験体の腫瘍または組織中のf P S Aの発現または活性の処置後レベルを判定するステップと、腫瘍または組織中のf P S Aの発現または活性の処置後レベルを処置前レベルと比較するステップと、比較するステップに基づいて、*in situ*のf P S A活性または発現の減少によって実証して、治療または処置が有効であるかどうかを判定するステップとを含む。特定の実施形態では、f P S Aのエピトープは、触媒クレフト内にあり、またはこれに隣接する。別の特定の実施形態では、前立腺がん処置または治療は、抗アンドロゲン治療である。

【0007】

ある特定の実施形態では、抗体ポリペプチドは、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態は、投与するステップの前に、抗体ポリペプチドを検出用実体と組み合わせるステップをさらに含む。特定の実施形態では、検出用実体は、ジルコニウム - 89 (^{89}Zr)、ヨウ素 - 124 (^{124}I)、ヨウ素 - 131 (^{131}I)、ヨウ素 - 125 (^{125}I)、ビスマス - 212 (^{212}Bi)、ビスマス - 213 (^{213}Bi)、アスタチン - 221 (^{221}At)、銅 - 67 (^{67}Cu)、銅 - 64 (^{64}Cu)、レニウム - 186 (^{186}Re)、レニウム - 187 (^{187}Re)、リン - 32 (^{32}P)、サマリウム - 153 (^{153}Sm)、ルテチウム - 177 (^{177}Lu)、テクネチウム - 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、ガリウム - 67 (^{67}Ga)、インジウム - 111 (^{111}In)、およびタリウム - 201 (^{201}Tl) からなる群から選択される。

【0008】

いくつかの実施形態では、判定するステップは、単一光子放出型コンピュータ断層撮影 (SPECT)、ポジトロン (Positron) 放出断層撮影 (PET)、または磁気共鳴画像法 (MRI) による検出を含む。

【0009】

特定の実施形態では、前立腺がん処置または治療は、去勢、RU58642、LG120907、LG105、RD162、MDV3100、BMS-641988、CH5137291、アタル酸 (ataric acid)、N-ブチルベンゼンスルホンアミド、酢酸シプロテロン、ヒドロキシフルタミド、ピカルタミド、ニルタミド、ペプチドアンタゴニスト、TAK700、ARN-509 (酢酸アピラテロン)、カボザンチミブ (cabozantinib)、イピリムマブ、クスチルセン、BPX-101、アルファラディン、デノスマブ、およびProtovac-VFを含む群から選択される。本発明の実施形態で使用するための追加の前立腺がん処置としては、塩化ラジウム - 223、カボザンチニブ、およびピカルタミド (カソデックス) がある。ある特定の実施形態では、効果的な処置は、f P S Aの発現または活性の処置前レベルに対するf P S Aの発現または活性の処置後レベルの低減によって示される。

【0010】

本方法の追加の実施形態では、被験体においてアンドロゲン受容体シグナル伝達を *in situ* で監視する方法が提供される。特定の実施形態では、本方法は、P S A の触媒クレフト内の少なくとも1つのエピトープに結合する抗体ポリペプチドを被験体に投与するステップであって、抗体ポリペプチドは、検出用実体と複合体化している、ステップと、イメージングプロトコールによって、前立腺腫瘍またはその転移細胞における検出用実体の存在を検出するステップとを含み、検出用実体の存在は、アンドロゲン受容体シグナル伝達と相関する。特定の実施形態では、アンドロゲン受容体シグナル伝達は、*in vitro* で画像化される。別の実施形態では、アンドロゲン受容体シグナル伝達は、*in vitro* で画像化される。追加の実施形態は、検出用実体の存在を定量化して、f P S A 発現または活性の尺度を判定するステップであって、f P S A 発現の尺度は、アンドロゲン受容体シグナル伝達と定量的に相関する、ステップをさらに含む。特定の実施形態では、イメージングプロトコールは、単一光子放出型コンピュータ断層撮影 (S P E C T)、ポジトロン放出断層撮影 (P E T)、または磁気共鳴画像法 (M R I) を含む群から選択される。

【0011】

本発明のいくつかの実施形態は、被験体における前立腺がんまたはその転移性疾患を処置する方法を提供する。ある特定の実施形態では、本方法は、抗がん剤と組み合わせた、またはコンジュゲートした f P S A に特異的な抗体ポリペプチドを含むターゲティング用実体を被験体に投与するステップを含む。本願全体にわたって論じるように、f P S A は、実質的に腫瘍内にあり、または前立腺がん細胞に結合している。いくつかの実施形態では、f P S A に対して特異的な抗体またはその抗原結合断片は、前立腺がんの医薬処置剤または薬剤の製造において使用される。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、ヒトまたはマウスモノクローナル抗体である。ある特定の実施形態では、抗体は 5 A 1 0 である。例示的な抗がん剤は、光増感剤、核酸、放射線増感剤、放射性同位体、スーパー抗原、プロドラッグ、プロドラッグ活性化酵素、抗脈管形成剤、および抗アンドロゲン治療薬を含む群から選択することができる。いくつかの実施形態では、抗がん剤は、MDV 3 1 0 0、ARN - 5 0 9、およびドキシソルピシンとすることができる。いくつかの実施形態では、抗 f P S A 抗体ポリペプチドは、f P S A の触媒クレフト内の、またはこれに隣接するエピトープに対して特異的である。

【0012】

本発明の追加の実施形態は、f P S A に特異的なモノクローナル抗体またはその断片を含む医薬組成物を提供する。

【0013】

本発明の別の実施形態では、アンドロゲン受容体シグナル伝達を *in situ* で監視するためのキットであって、f P S A に対して特異的な抗体ポリペプチド；f P S A 発現または活性のレベルを検出することができる作用物質；対照；ならびにキットによって組み立てられるアッセイを実行するため、およびそのアッセイに基づいてアンドロゲン受容体シグナル伝達の判定をするための指針を提供する指示を含む、キットが提供される。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

前立腺がん処置または治療に対する応答を *in situ* で監視する方法であって、
f P S A のエピトープに結合する抗体ポリペプチドを投与するステップと、
被験体の腫瘍または組織中の f P S A の発現または活性の処置前レベルを判定するステップと、
該被験体に前立腺がん処置または治療を投与するステップと、
f P S A の該エピトープに結合する該抗体ポリペプチドを再投与するステップと、
該被験体の該腫瘍または組織中の f P S A の発現または活性の処置後レベルを判定するステップと、
該腫瘍または組織中の f P S A の発現または活性の該処置後レベルを該処置前レベルと比較するステップと、

該比較するステップに基づいて、*in situ*のf P S A活性または発現の減少によって実証して、該治療または処置が有効であるかどうかを判定するステップとを含む方法。

(項目2)

f P S Aの前記エピトープが、触媒クレフト内にあり、またはこれに隣接する、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記前立腺がん処置または治療が抗アンドロゲン治療である、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記抗体ポリペプチドがポリクローナル抗体である、項目1に記載の方法。

10

(項目5)

前記投与するステップの前に、前記抗体ポリペプチドを検出用実体と組み合わせるステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目6)

前記検出用実体が、ジルコニウム - 89 (^{89}Zr)、ヨウ素 - 124 (^{124}I)、ヨウ素 - 131 (^{131}I)、ヨウ素 - 125 (^{125}I)、ビスマス - 212 (^{212}Bi)、ビスマス - 213 (^{213}Bi)、アスタチン - 221 (^{221}At)、銅 - 67 (^{67}Cu)、銅 - 64 (^{64}Cu)、レニウム - 186 (^{186}Re)、レニウム - 187 (^{187}Re)、リン - 32 (^{32}P)、サマリウム - 153 (^{153}Sm)、ルテチウム - 177 (^{177}Lu)、テクネチウム - 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、ガリウム - 67 (^{67}Ga)、インジウム - 111 (^{111}In)、およびタリウム - 201 (^{201}Tl) からなる群から選択される、項目5に記載の方法。

20

(項目7)

前記判定するステップが、単一光子放出型コンピュータ断層撮影 (SPECT)、ポジトロン放出断層撮影 (PET)、または磁気共鳴画像法 (MRI) による検出を含む、項目1に記載の方法。

(項目8)

前記前立腺がん処置または治療が、去勢、RU58642、LG120907、LG105、RD162、MDV3100、BMS - 641988、CH5137291、アタル酸、N - ブチルベンゼンスルホンアミド、酢酸シプロテロン、ヒドロキシフルタミド、ピカルタミド、ニルタミド、ペプチドアンタゴニスト、TAK700、ARN - 509、カボザンチミブ、イピリムマブ、クスチルセン、BPX - 101、アルファラディン、デノスマブ、および Protovac - VFを含む群から選択される、項目1に記載の方法。

30

(項目9)

効果的な処置が、f P S Aの発現または活性の前記処置前レベルに対するf P S Aの発現または活性の前記処置後レベルの低減によって示される、項目1に記載の方法。

(項目10)

被験体においてアンドロゲン受容体シグナル伝達を*in situ*で監視する方法であって、

40

P S Aの触媒クレフト内の、またはこれに隣接する少なくとも1つのエピトープに結合する抗体ポリペプチドを該被験体に投与するステップであって、該抗体ポリペプチドは、検出用実体と複合体化している、ステップと、

イメージングプロトコールによって、前立腺腫瘍またはその転移細胞における該検出用実体の存在を検出するステップと

を含み、

該検出用実体の該存在は、アンドロゲン受容体シグナル伝達と関連する方法。

(項目11)

アンドロゲン受容体シグナル伝達が*in vitro*で画像化される、項目10に記載

50

の方法。

(項目 1 2)

アンドロゲン受容体シグナル伝達が *in vivo* で画像化される、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記検出用実体の前記存在を定量化して、f P S A 発現または活性の尺度を判定するステップであって、f P S A 発現の該尺度は、アンドロゲン受容体シグナル伝達と定量的に相関する、ステップをさらに含む、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記イメージングプロトコールが、単一光子放出型コンピュータ断層撮影 (S P E C T)、ポジトロン放出断層撮影 (P E T)、または磁気共鳴画像法 (M R I) を含む群から選択される、項目 1 0 に記載の方法。

10

(項目 1 5)

被験体における前立腺がんまたはその転移性疾患を処置する方法であって、抗アンドロゲン治療薬にコンジュゲートした f P S A に特異的な抗体ポリペプチドを該被験体に投与するステップを含む、方法。

(項目 1 6)

f P S A に特異的なモノクローナル抗体またはその断片を含む、医薬組成物。

(項目 1 7)

アンドロゲン受容体シグナル伝達を *in situ* で監視するためのキットであって、

20

(a) f P S A に対して特異的な抗体ポリペプチド、

(b) f P S A 発現または活性のレベルを検出することができる作用物質、

(c) 対照、ならびに

(d) 該キットによって組み立てられるアッセイを実行するため、およびそのアッセイに基づいてアンドロゲン受容体シグナル伝達の判定をするための指針を提供する指示を含む、キット。

(項目 1 8)

前立腺がん用医薬処置剤の製造における、f P S A に対して特異的な抗体またはその抗原結合断片の使用であって、該抗体またはその抗原結合断片は、抗がん剤と組み合わせられ、またはこれにコンジュゲートされる、使用。

30

(項目 1 9)

前記抗体またはその抗原結合断片がモノクローナル抗体である、項目 1 8 に記載の使用。

(項目 2 0)

前記抗体またはその抗原結合断片がヒトモノクローナル抗体である、項目 1 8 に記載の使用。

(項目 2 1)

前記抗体またはその抗原結合断片がマウスモノクローナル抗体である、項目 1 8 に記載の使用。

(項目 2 2)

前記抗体が 5 A 1 0 である、項目 2 1 に記載の使用。

40

(項目 2 3)

前記抗がん剤が、光増感剤、核酸、放射線増感剤、放射性同位体、スーパー抗原、プロドラッグ、プロドラッグ活性化酵素、抗脈管形成剤、および抗アンドロゲン治療薬を含む群から選択される、項目 1 8 に記載の使用。

(項目 2 4)

前記抗がん剤が、M D V 3 1 0 0、A R N - 5 0 9、およびドキソルビシンからなる群から選択される、項目 2 3 に記載の使用。

(項目 2 5)

前記抗体またはその抗原結合断片が、f P S A の触媒クレフト内の、またはこれに隣接

50

するエピトープに対して特異的である、項目 18 に記載の使用。

(項目 26)

前記 f P S A が、実質的に腫瘍内にあり、または前立腺がん細胞に結合している、項目 18 に記載の使用。

【0014】

図面を一緒に構成する以下に表した図は、例示目的のためだけであり、限定のためではない。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、粗製（灰色）および精製（黒色） $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ の一般的な放射性 I T L C クロマトグラムを表す図である。溶離液は、50 mM の D T P A、p H 7 であった。 $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ は、ベースラインに残り ($R_f = 0.0$)、不純物は、溶媒先端とともに進む ($R_f = 1.0$)。

10

【0016】

【図2】図2は、f P S A に対する $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ の相対的親和性を判定するための競合的結合アッセイを表す図である。f P S A に対する $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ の相対的親和性は、固定化された f P S A で被覆されたウェル中で $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ および多様な濃度の非標識 5 A 10 をインキュベートすることによって求めた。インキュベーション後にウェル中に保持された活性は、 $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ の f P S A への特異的結合として解釈した。D F O および ^{89}Zr が 5 A 10 にコンジュゲートしても f P S A に対する m A b の親和性は変化しないという仮定で計算した理想（理論）値に対して実験値をプロットした。線形回帰を使用して線形性 ($y = x$) からの偏差を求めた。 $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ の 1 つの標本からの代表的なデータが示されている。アッセイは、2 つの独立した濃度範囲の 5 A 10 を使用して二通り行った（合計 $n = 4$ ）。

20

【0017】

【図3】図3は、A R - および f P S A 陽性前立腺がんの複数の前臨床モデルに特異的に局在化する $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ を表す図である。図3 a は、 $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ のピーク腫瘍内取込みが 24 時間で観察されることを示す複数時点における、L N C a P A R 異種移植片を持つインタクトな雄マウスから選択された組織の生体内分布データを表す。経時的に、活性は、血液および心臓によって代表される血液プールから激減し、多くのモノクローナル抗体と同様に、持続的に高い取込みが肝臓内で観察された。図3 b は、 $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ の腫瘍 (T) への局在化、およびマウス肝臓 (L) 内の取込みを示す、L N C a P A R 異種移植片を持つインタクトな雄マウスの代表的な横断 (T r a n s .) P E T スライスおよび冠状 P E T スライスを表す。図3 c は、インタクトな雄マウスにおける、複数の s . c . 前立腺がんモデルおよびいくつかの処置条件での腫瘍結合 $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ を示す生体内分布データを表す。 $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ の L N C a P - A R への局在化は、過剰の非標識 5 A 10 (1 mg の非標識 m A b) との同時注射によって完全に競合された。非特異的放射性トレーサー $^{89}\text{Zr} - \text{I g G}$ は、L N C a P - A R に局在化せず、 $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ は、P C 3、前立腺がんの A R - および P S A ヌルモデルに局在化しなかった。 $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ の C W R 22 R v 1 異種移植片への中程度の局在化が観察され、L N C a P - A R と比較して、このモデルにおける P S A のより低い基本的発現と一致した。すべての条件と比較して $* P < 0.01$ 。P C 3 と比較して $** P < 0.01$ 。図3 d は、L N C a P - A R 腫瘍を持つ去勢マウスに s . c . テストステロンペレットを外科的移植すると、腫瘍結合 $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ が増加する一方、他の臓器内の取込みは未変化であることを表す。生体内分布データは、注射して 24 時間後に取得した。処置なし (N o T x) と比較して $* P < 0.01$ 。エラーバーは、平均からの標準偏差を表す。

30

40

【0018】

【図4】図4は、 $^{89}\text{Zr} - 5\text{A}10$ を注射された L N C a P - A R 異種移植片を持つインタクトな雄マウスの生体内分布プロットを表す図である。担腫瘍マウスを $^{89}\text{Zr} - 5$

50

A 1 0 で処置し、注射後の指定時間に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データは、平均% I D / g $\pm$ 1 標準偏差として報告されている。

【 0 0 1 9 】

【図5】図5は、 ^{89}Zr -5 A 1 0 および過剰の非標識 5 A 1 0 を注射された L N C a P - A R 異種移植片を持つインタクトな雄マウスの生体内分布プロットを表す図である。担腫瘍マウスを ^{89}Zr -5 A 1 0 および過剰の 5 A 1 0 (1 m g / マウス) で同時処置し、注射して 2 4 時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データは、平均% I D / g $\pm$ 1 標準偏差として報告されている。トレーサー単独と比較して、非標識 5 A 1 0 を投与された動物における ^{89}Zr -5 A 1 0 の腫瘍内取込みについて * P < 0 . 0 1。

10

【 0 0 2 0 】

【図6】図6は、 ^{89}Zr -I g G を注射された L N C a P - A R 異種移植片を持つインタクトな雄マウスの生体内分布プロットを表す図である。担腫瘍マウスを ^{89}Zr -I g G で処置し、注射後の指定時間に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データは、平均% I D / g $\pm$ 1 標準偏差として報告されている。

【 0 0 2 1 】

【図7】図7は、 ^{89}Zr -5 A 1 0 を注射された L N C a P - A R、P C 3、または C W R 2 2 R v 1 異種移植片を持つインタクトな雄マウスの生体内分布プロットを表す図である。担腫瘍マウスを ^{89}Zr -5 A 1 0 で処置し、注射して 2 4 時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データは、平均% I D / g $\pm$ 1 標準偏差として報告されている。

20

【 0 0 2 2 】

【図8】図8は、 ^{89}Zr -5 A 1 0 を注射された、皮下テストステロンペレットを有する、または有さない、L N C a P - A R 異種移植片を持つ去勢雄マウスの生体内分布プロットを表す図である。テストステロンペレットの外科的移植または操作なし (T x なし) の 6 日後に、担腫瘍マウスを ^{89}Zr -5 A 1 0 で処置し、注射して 2 4 時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データは、平均% I D / g $\pm$ 1 標準偏差として報告されている。N o T x と比較して、テストステロンに曝露された動物における ^{89}Zr -5 A 1 0 の腫瘍内取込みについて * P < 0 . 0 1。

【 0 0 2 3 】

30

【図9】図9は、 ^{89}Zr -5 A 1 0 を注射された、皮下テストステロンペレットを有する、または有さない、C W R 2 2 R v 1 異種移植片を持つ去勢雄マウスの生体内分布プロットを表す図である。テストステロンペレットの外科的移植または操作なし (N o T x) の 6 日後に、担腫瘍マウスを ^{89}Zr -5 A 1 0 で処置し、注射して 2 4 時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データは、平均 c p m / g $\pm$ 1 標準偏差として報告されている。N o T x と比較して、テストステロンに曝露された動物における ^{89}Zr -5 A 1 0 の腫瘍内取込みについて * P < 0 . 0 5。

【 0 0 2 4 】

【図10】図10は、i n v i v o でアンドロゲン受容体 (「A R」) の薬理的阻害を検出する ^{89}Zr -5 A 1 0 を表す図である。図10 a は、M D V 3 1 0 0 が ^{89}Zr -5 A 1 0 の腫瘍への局在化を阻害することを示す、L N C a P - A R 異種移植片を持つ去勢雄マウスからの生体内分布データを表す。動物を 7 日間、ビヒクル、または指定用量の M D V 3 1 0 0 で処置し、このとき ^{89}Zr -5 A 1 0 を注射し、注射して 2 4 時間の p . i . (2 4 p . i .) に動物を回収し、生体内分布試験を行った。ビヒクルまたは 1 0 m g / k g の M D V 3 1 0 0 と比較して、M D V 3 1 0 0 の 4 0 m g / k g および 8 0 m g / k g の用量について * P < 0 . 0 1。図10 b は、右側腹部に L N C a P - A R 異種移植片を持つインタクトな雄マウスの、s . c . テストステロンペレット、または 7 日間のビヒクルもしくは M D V 3 1 0 0 (8 0 m g / k g) の毎日の経口強制飼養で操作した後、2 4 時間の p . i . に ^{89}Zr -5 A 1 0 で画像化した、代表的な横断 (T r a n s .) P E T および冠状 P E T スライスを表す。腫瘍結合 ^{89}Zr -5 A 1 0 の明らか

40

50

な視覚的差異を群間で見ることができる。矢印は、腫瘍（T）およびマウス肝臓（L）の位置を示す。図10cでは、PET試験からの腫瘍の対象領域の分析により、腫瘍結合⁸⁹Zr-5A10の統計的に有意な変化が示されている。ビヒクルと比較して* $P < 0.01$ 。ビヒクルと比較して $P < 0.05$ 。エラーバーは、平均からの標準偏差を表す。

【0025】

【図11】図11は、ビヒクルまたはMDV3100で処置され、⁸⁹Zr-5A10を注射されたLNCaP-AR異種移植片を持つ去勢雄マウスの生体内分布プロットを表す図である。担腫瘍去勢マウスをビヒクル、または指定用量のMDV3100（毎日の経口強制飼養）で処置した。6日目に、マウスに⁸⁹Zr-5A10を注射し、注射して24時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データは、平均%ID/g ± 1標準偏差として報告されている。ビヒクルに対してMDV3100 40mg/kgおよび80mg/kgについて* $P < 0.01$ 。10mg/kgの用量のMDV3100に対して40mg/kgおよび80mg/kgの用量について $P < 0.05$ 。

【0026】

【図12】図12は、左脛骨にLNCaP-ARを接種したマウスの代表的な生物発光画像を表す図である。インタクトな雄マウスの脛骨にLNCaP-ARを接種し、経過を生物発光によって監視し、腫瘍発生をMRIおよび血清PSA分析によって確認した（本文を参照）。接種して5週間後の担腫瘍マウスのコホートの一般的な画像が示されている。これらの動物は、疾患が確認されていた。

【0027】

【図13】図13は、骨の腫瘍病変を示す代表的なMRIスライスを表す図である。インタクトな雄マウスの脛骨にLNCaP-ARを接種し、腫瘍発生をMRIおよび血清PSA分析で視覚的に確認した。腫瘍塊を示す左後肢（MRIスライスの右側に向いた）のコントラストの領域が赤で囲まれている。

【0028】

【図14】図14は、*in vivo*での骨微小環境において前立腺がんを特異的に標的にする⁸⁹Zr-5A10を表す図である。図14aでは、同時登録した三次元の、ポリウムを与えるPET/CT画像が、⁸⁹Zr-5A10は、インタクトな雄マウスの左脛骨に位置した骨LNCaP-AR移植片に局在化することを示す。青色-緑色の色スケールで与えたPETデータは、右の（正常な）脛骨と比較して、動物の左（担腫瘍）脛骨上により多い量の活性を示す。図14bでは、同時登録したPET/MRI画像が、MRIによって検出された腫瘍関連コントラストとの⁸⁹Zr-5A10からのポジトロン放射の同時局在化を示す。図14cでは、脛骨の骨折を受け、手術して10日後のインタクトな雄マウスにおいて、骨再形成を¹⁸F-NaFで評価した。コントラストの明らかな領域が、PETによって、骨折した脛骨において識別された。最初の画像の2日後に、動物に^{99m}Tc-MDPおよび⁸⁹Zr-5A10を同時注射した。SPECTイメージングは、^{99m}Tc-MDPも、予期したように、治療中の骨の領域に局在化することを示した。対照的に、PETイメージングは、創傷部位で検出可能な⁸⁹Zr-5A10をまったく示さず、現代の臨床的放射性トレーサーと比較して、この試薬の前立腺がんに対する高い特異性を提示した。

【0029】

【図15】図15は、脛骨中の腫瘍との⁸⁹Zr-5A10の同時整列を示す、同時登録したPET/MRIスライスを表す図である。インタクトな雄マウスの脛骨にLNCaP-ARを接種し、腫瘍発生をMRIおよび血清PSA分析で視覚的に確認した。同時登録したPET/MRI画像は、⁸⁹Zr-5A10を注射して24時間後に取得した。右（正常な）後肢からの画像が比較のために提示されている。

【0030】

【図16】図16は、⁸⁹Zr-5A10（左）および⁸⁹ZrCl₄（右）で処置した骨LNCaP-AR移植片を持つマウスの組織構造および重ねたオートラジオグラフィーを表し、⁸⁹Zr-5A10は、腫瘍組織に局在化し、一方、⁸⁹ZrCl₄は、正常な骨に

局在化することを示す図である。腫瘍組織は、組織診断の目視検査によって区別した（H & E 染色によって画定）。これは、4 倍で、青色で囲まれており、10 倍で、矢印で強調されている。より高い拡大の図のために選択した組織の領域は、黄色で輪郭を描いてある。

【0031】

【図17】図17は、ビヒクルまたはMDV3100で処置され、⁸⁹Zr-J591を注射されたLNCaP-AR異種移植片を持つ去勢雄マウスの生体内分布プロットを表す図である。担腫瘍去勢マウスをビヒクル、または指定用量のMDV3100（毎日の経口強制飼養）で処置した。6日目に、マウスに⁸⁹Zr-J591を注射し、注射して24時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データは、平均% ID/g ± 1 標準偏差として報告されている。

10

【発明を実施するための形態】

【0032】

定義

動物：本明細書において、用語「動物」は、動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、いずれかの性別の、任意の発達段階のヒトを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、任意の発達段階の非ヒト動物を指す。ある特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、および/またはブタ）である。いくつかの実施形態では、動物として、それだけに限らないが、哺乳動物、トリ、爬虫類、両生類、魚、昆虫、および/または虫が挙げられる。ある特定の実施形態では、動物は、HCVによる感染に感受性である。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物、および/またはクローンとすることができる。

20

【0033】

アンタゴニスト：本明細書において、用語「アンタゴニスト」は、i) 例えば、受容体を不活化する別の作用物質の効果を阻害し、減少させ、または低減し、かつ/あるいはii) 1つまたは複数の生物学的イベント、例えば、1つもしくは複数の受容体の活性化、または1つもしくは複数の生物学的経路の刺激を阻害し、減少させ、低減し、または遅延させる作用物質を指す。特定の実施形態では、アンタゴニストは、1つまたは複数のアンドロゲン受容体の活性化および/または活性を阻害する。アンタゴニストは、例えば、小分子、ポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質、金属、および/または受当な阻害活性を示す任意の他の実体を含めた、任意の化学的クラスの作用物質であり得、またはこれらを含むことができる。アンタゴニストは、直接的（この場合、これは、受容体に直接その影響を発揮する）であっても、間接的（この場合、これは、受容体への結合以外、例えば、受容体の発現または翻訳の変更、受容体によって直接活性化されるシグナル伝達経路の変更、受容体のアゴニストの発現、翻訳、または活性の変更によってその影響を発揮する）であってもよい。特定の実施形態では、アンドロゲン受容体アンタゴニストは、小分子アンタゴニスト（例えば、RU58642、LG120907、LG105、RD162、MDV3100、BMS-641988、CH5137291、アタル酸、N-ブチルベンゼンスルホンアミド）、ステロイド化合物（例えば、酢酸シプロテロン）、非ステロイド化合物（例えば、ヒドロキシフルタミド、ピカルタミド、ニルタミド）、ペプチドアンタゴニスト、およびこれらの組合せからなる群から選択することができる。代替としてまたは追加的に、本発明の実施形態で使用するための抗アンドロゲン治療薬としては、それだけに限らないが、TAK700、ARN-509、カボザンチミブ、イピリマブ、クスチルセン、BPX-101、アルファラディン、デノスマブ、Protovac-VF、およびこれらの組合せがある。

30

40

【0034】

抗体ポリペプチド：本明細書において、用語「抗体ポリペプチド」または「抗体」または「その抗原結合断片」は、互換的に使用することができ、エピトープに結合することができるポリペプチド（複数可）を指す。いくつかの実施形態では、抗体ポリペプチドは、

50

全長抗体であり、いくつかの実施形態では、全長未満であるが、少なくとも1つの結合部位（抗体「可変領域」の構造を有する少なくとも1つの、好ましくは少なくとも2つの配列を含む）を含む。いくつかの実施形態では、用語「抗体ポリペプチド」は、免疫グロブリン結合ドメインと相同であり、または大部分は相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質を包含する。特定の実施形態では、「抗体ポリペプチド」は、免疫グロブリン結合ドメインと少なくとも99%の同一性を示す結合ドメインを有するポリペプチドを包含する。いくつかの実施形態では、「抗体ポリペプチド」は、免疫グロブリン（immunoglobulin）結合ドメイン、例えば、参照免疫グロブリン結合ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、または95%の同一性を示す結合ドメインを有する任意のタンパク質である。含まれる「抗体ポリペプチド」は、天然源で見つかる抗体のものと同じのアミノ酸配列を有することができる。本発明による抗体ポリペプチドは、例えば、天然源もしくは抗体ライブラリーからの単離、宿主システム内での、もしくはこれを用いた組換え生産、化学合成など、またはこれらの組合せを含めた任意の利用可能な手段によって調製することができる。抗体ポリペプチドは、モノクローナルまたはポリクローナルとすることができる。抗体ポリペプチドは、ヒトクラス：IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEのいずれも含めた任意の免疫グロブリンクラスのメンバーであり得る。ある特定の実施形態では、抗体は、IgG免疫グロブリンクラスのメンバーであり得る。本明細書において、用語「抗体ポリペプチド」または「抗体の特徴的な部分」は、互換的に使用され、対象とするエピトープに結合するアビリティを有する抗体の任意の誘導体を指す。ある特定の実施形態では、「抗体ポリペプチド」は、全長抗体の特異的結合アビリティの少なくとも1つの重要部分を保持する抗体断片である。抗体断片の例としては、それだけに限らないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dsFvダイアボディ（diabody）、およびFd断片がある。代替としてまたは追加的に、抗体断片は、例えば、ジスルフィド連結によって一緒に連結された複数の鎖を含むことができる。いくつかの実施形態では、抗体ポリペプチドは、ヒト抗体であり得る。いくつかの実施形態では、抗体ポリペプチドは、ヒト化であり得る。ヒト化抗体ポリペプチドは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、または抗体ポリペプチド（Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、もしくは抗体の他の抗原結合性部分配列など）を含み、またはこれらであり得る。一般に、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）に由来する残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラット、またはウサギなどのCDRに由来する残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。特定の実施形態では、本発明によって使用するための抗体ポリペプチド（polypeptides）は、fPSAまたはPSAの特定のエピトープ（例えば、触媒クレフト中）に結合し、いくつかの実施形態では、本発明によって使用するための抗体ポリペプチドは、fPSAまたはPSAの特定のエピトープ（例えば、触媒クレフト内、またはこれに隣接する）に対して特異的である。特定の例示的な抗体は、本明細書に参照により組み込まれている、Stenman UHら、「Summary report of the TD-3 workshop: characterization of 83 antibodies against prostate-specific antigen」、Tumour Biol.、1999年、20巻：1～12頁に開示されている。いくつかの実施形態では、抗体ポリペプチドは、5A10もしくは4G10モノクローナル抗体、またはその抗原結合断片である。

【0035】

およそ：本明細書において、用語「およそ」または「約」は、対象とする1つまたは複数の値に適用する場合、述べた参照値と同様である値を指す。ある特定の実施形態では、用語「およそ」または「約」は、別段の記載のない限り、またはさもなければ脈絡から明白でない限り（このような数値が可能な値の100%を超える場合を除いて）、述べた参照値のいずれかの方向（より大きい、またはより小さい）の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%

10

20

30

40

50

、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満内に入る一連の値を指す。

【0036】

生物学的に活性な：本明細書において、語句「生物学的に活性な」は、生物系（例えば、細胞培養液、生物など）において活性を有する任意の物質の特性を指す。例えば、生物に投与されたとき、その生物に生物学的効果を有する物質は、生物学的に活性であるとみなされる。特定の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドが生物学的に活性である場合、このタンパク質またはポリペプチドの少なくとも1つの生物活性を共有するそのタンパク質またはポリペプチドの部分は、一般に、「生物学的に活性な」部分と呼ばれる。

【0037】

特徴的な部分：本明細書において、物質の「特徴的な部分」という用語は、最も広い意味において、物質全体に対してある程度の配列同一性または構造的同一性を共有するものである。ある特定の実施形態では、特徴的な部分は、インタクトな物質と少なくとも1つの機能的特性を共有する。例えば、タンパク質またはポリペプチドの「特徴的な部分」は、合わせてタンパク質またはポリペプチドの特徴である、アミノ酸の1つの連続ストレッチ、またはアミノ酸の一連の連続ストレッチを含有するものである。いくつかの実施形態では、それぞれのこのような連続ストレッチは一般に、少なくとも2、5、10、15、20、50、またはそれ以上のアミノ酸を含有する。一般に、物質の（例えば、タンパク質、抗体などの）の特徴的な部分は、上記で指定した配列同一性および/または構造的同一性に加えて、関連したインタクトな物質と少なくとも1つの機能的特徴を共有するものであり、エピトープ結合特異性は、一例である。いくつかの実施形態では、特徴的な部分は、生物学的に活性であり得る。

【0038】

併用療法：用語「併用療法」は、本明細書において、疾患を処置するための2種以上の異なる医薬品が、被験体が少なくとも2種の作用物質と同時に曝露されるように、重なったレジメンにおいて投与される局面を指す。いくつかの実施形態では、異なる作用物質は、同時に投与される。いくつかの実施形態では、1つの作用物質の投与は、少なくとも1つの他の作用物質の投与と重なる。いくつかの実施形態では、異なる作用物質は、被験体内で同時に生物学的活性を有するように、順次投与される。

【0039】

検出用実体：用語「検出用実体」は、本明細書において、それが接合されている作用物質（例えば、抗体）の検出を促進する任意の元素、分子、官能基、化合物、その断片、または部分を指す。検出用実体の例としては、それだけに限らないが、様々なリガンド、放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{135}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{64}Cu 、 ^{187}Re 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{89}Zr など）、蛍光色素（具体的な例示的蛍光色素については、以下を参照）、化学発光剤（例えば、アクリジニウム（*acridinium*）エステル、安定化ジオキセタンなど）、生物発光剤、スペクトル的に分解可能な無機蛍光半導体ナノ結晶（すなわち、量子ドット）、金属ナノ粒子（例えば、金、銀、銅、白金など）、ナノクラスター、常磁性金属イオン、酵素（酵素の具体例については、以下を参照）、比色標識（例えば、色素、コロイド金など）、ビオチン、ジオキシゲニン（*dioxigenin*）、ハプテン、および抗血清またはモノクローナル抗体が利用可能であるタンパク質がある。

【0040】

診断情報：本明細書において、診断情報あるいは診断で使用するための情報は、患者が疾患または容態を有するかどうかを判定することおよび/あるいは、疾患または容態を、表現型カテゴリー、または疾患もしくは容態の予後、もしくは疾患もしくは容態の処置（一般の処置もしくは任意の特定の処置）に対する予想される応答に関して有意性を有する任意のカテゴリーに分類することにおいて有用である任意の情報である。同様に、診断は、それだけに限らないが、被験体が疾患もしくは容態（前立腺がんなど）を有する可能性が高いかどうか、被験体に顕在化した疾患もしくは容態の状態、病期、もしくは特徴、腫

10

20

30

40

50

瘍の性質もしくは分類に関する情報、予後に関する情報、および／または適切な処置の選択に有用な情報を含めた、任意のタイプの診断情報を提供することを指す。処置の選択として、特定の治療（例えば、化学療法）剤、もしくは他の処置モダリティ（*modality*）、例えば、手術、放射線などのチョイス、治療を保留するか提供するかについてのチョイス、投薬レジメン（例えば、特定の治療剤または治療剤の組合せの1つまたは複数の投薬の頻度またはレベル）に関するチョイスなどを挙げることができる。

【0041】

剤形：本明細書において、用語「剤形」および「単位剤形」は、被験体に投与されるべき治療用組成物の物理的に不連続な単位を指す。各単位は、所定量の活性材料（例えば、抗fPSA抗体などの治療剤）を含有する。いくつかの実施形態では、所定量は、投薬レ

10

【0042】

投薬レジメン：「投薬レジメン」（または「治療レジメン」）は、その用語を本明細書で使用する場合、一般に時間の期間で区切られて、被験体に個々に投与される一連の単位投薬（一般に1つを超える）である。いくつかの実施形態では、所与の治療剤は、1回または複数の投薬を伴い得る推奨された投薬レジメンを有する。いくつかの実施形態では、投薬レジメンは、同じ長さの時間によって互いに区切られた複数の投薬を含み、いくつかの実施形態では、投薬レジメンは、複数の投薬、および個々の投薬を区切る少なくとも2

20

【0043】

発現：本明細書において、核酸配列の「発現」は、以下のイベント、すなわち、（1）DNA配列からのRNA鋳型の生成（例えば、転写による）、（2）RNA転写物の処理（例えば、スプライシング、エディティング、5'キャップ形成、および／もしくは3'末端形成による）、（3）RNAのポリペプチドもしくはタンパク質への翻訳、ならびに／または（4）ポリペプチドもしくはタンパク質の翻訳後修飾のうちの1つまたは複数

【0044】

フリーPSA：用語「フリーPSA」または「fPSA」は、本明細書において、例えば、アルファ1-抗キモトリプシンなどのプロテアーゼ阻害剤によって結合されておらず、前立腺がん細胞またはその転移性疾患にごく接近しており、またはこれに結合している（すなわち、血清マーカーでない）、任意の形態のPSAまたはPSAの前駆体を指す。

30

【0045】

機能的な：本明細書において、「機能的な」生体分子は、それが特徴付けられる性質および／または活性を呈する形態の生体分子である。生体分子は、2つの機能（すなわち、二機能性）または多くの機能（すなわち、多機能性）を有し得る。

【0046】

遺伝子：本明細書において、用語「遺伝子」は、当技術分野で理解されるその意味を有する。いくつかの実施形態では、用語「遺伝子」は、遺伝子制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）、および／またはイントロン配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、この用語は、タンパク質をコードするのではなく、むしろ機能的なRNA分子、例えば、tRNA、RNAi-誘発因子などをコードする核酸を指す。代替としてまたは追加的に、多くの実施形態では、用語「遺伝子」は、本願において、タンパク質をコードする核酸の部分

40

【0047】

遺伝子産物または発現産物：本明細書において、用語「遺伝子産物」または「発現産物」は、一般に、遺伝子から転写されたRNA（処理前および／もしくは処理後）、または

50

遺伝子から転写されたRNAによってコードされるポリペプチド（修飾前および/もしくは修飾後）を指す。

【0048】

相同性：本明細書において、用語「相同性」は、ポリマー分子同士間、例えば、ポリペプチド分子同士間の全体的な関連性を指す。いくつかの実施形態では、抗体などのポリマー分子は、これらの配列が少なくとも80%、85%、90%、95%、または99%同一である場合、互いに「相同」であるとみなされる。いくつかの実施形態では、ポリマー分子は、これらの配列が少なくとも80%、85%、90%、95%、または99%同様である場合、互いに「相同」であるとみなされる。

【0049】

マーカー：マーカーは、本明細書において、その存在またはレベルが特定の腫瘍またはその転移性疾患の特徴である作用物質を指す。例えば、いくつかの実施形態では、この用語は、特定の腫瘍、腫瘍サブクラス、腫瘍の病期などの特徴である遺伝子発現産物を指す。代替としてまたは追加的に、いくつかの実施形態では、特定のマーカーの存在またはレベルは、例えば、腫瘍の特定のクラスの特徴であり得る特定のシグナル伝達経路の活性（または活性レベル）に相関する。マーカーの存在または非存在の統計的有意性は、特定のマーカーに応じて変化し得る。いくつかの実施形態では、マーカーの検出は、マーカーが、腫瘍が特定のサブクラスのものである高い確率を反映する点で高度に特異的である。このような特異性は、感度を犠牲にして達する場合がある（すなわち、腫瘍が、そのマーカーを発現すると予期される腫瘍であっても、負の結果が起こり得る）。反対に、高い程度の感度を有するマーカーは、より低い感度を有するものより低く特異的である場合がある。本発明によれば、有用なマーカーは、100%の精度で特定のサブクラスの腫瘍を区別する必要はない。

【0050】

患者：本明細書において、用語「患者」または「被験体」は、提供される組成物が、例えば、実験、診断、予防、美容、および/または治療目的で投与される、または投与することができる任意の生物を指す。一般的な患者には、動物（例えば、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、および/またはヒトなど）が含まれる。いくつかの実施形態では、患者はヒトである。いくつかの実施形態では、患者は、1つまたは複数の障害または容態を罹患しているか、またはこれらに感受性である。いくつかの実施形態では、患者は、障害または容態の1つまたは複数の症状を示す。いくつかの実施形態では、患者は、1つまたは複数の障害または容態と診断されたことがある。いくつかの実施形態では、障害または容態は、がんであり、もしくはこれを含み、または1つもしくは複数の腫瘍の存在であり、もしくはこれらを含む。いくつかの実施形態では、このようながんまたは腫瘍は、前立腺のがん、または前立腺の腫瘍であり、またはこれらを含む。いくつかの実施形態では、障害または容態は、転移性前立腺がんである。

【0051】

ペプチド：用語「ペプチド」は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合によって互いに接合された2個以上のアミノ酸を指す。特定の実施形態では、「ペプチド」は、約100アミノ酸未満、約50アミノ酸未満、20アミノ酸未満、または10アミノ酸未満の長さを有するポリペプチドを指す。

【0052】

薬学的に許容される：用語「薬学的に許容される」は、本明細書において、適切な医学的判断の範囲内で、妥当な利益/リスク比に見合って、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴わないで、ヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに適した物質を指す。

【0053】

ポリペプチド：本明細書において、「ポリペプチド」は、一般的に言えば、ペプチド結合によって互いにアタッチした少なくとも2個のアミノ酸のストリングである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、それぞれが少なくとも1つのペプチド結合によって他

10

20

30

40

50

のものにアタッチした少なくとも3～5個のアミノ酸を含み得る。当業者は、ポリペプチドは、任意選択により、それでもなおポリペプチド鎖中に一体化することができる「非天然」アミノ酸または他の実体を時に含むことを察するであろう。

【0054】

予後情報および予兆情報：本明細書において、用語の予後情報および予兆情報は、処置の非存在下または存在下で、疾患または容態の過程の任意の側面を示すのに使用することができる任意の情報を指すのに互換的に使用される。このような情報として、それだけに限らないが、患者の平均余命、患者が、所与の量の時間（例えば、6カ月、1年、5年など）にわたって生存する可能性、患者の疾患が治癒される可能性、患者の疾患が特定の治療に応答する可能性（応答は、様々な方法のいずれでも定義され得る）を挙げることができる。予後情報および予兆情報は、診断情報の広いカテゴリー内に含まれる。

10

【0055】

タンパク質：本明細書において、用語「タンパク質」は、ポリペプチド（すなわち、ペプチド結合によって互いに連結された少なくとも3～5個のアミノ酸のストリング）を指す。タンパク質は、アミノ酸以外の部分を含んでもよく（例えば、糖タンパク質、プロテオグリカンなどであってもよい）、かつ/または他の方法で処理または修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、「タンパク質」は、細胞によって生成され、かつ/または細胞内で活性な完全なポリペプチド（シグナル配列を含む、または含まない）であり得、いくつかの実施形態では、「タンパク質」は、細胞によって生成され、かつ/または細胞内で活性なポリペプチドなどの特徴的な部分であり、またはこれを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、1本超のポリペプチド鎖を含む。例えば、ポリペプチド鎖は、1つまたは複数のジスルフィド結合によって連結され、または他の手段によって会合され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のタンパク質またはポリペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸、もしくは両方を含有することができ、かつ/または当技術分野で公知の様々なアミノ酸修飾または類似体のいずれも含有することができる。有用な修飾としては、例えば、末端アセチル化、アミド化、メチル化などがある。いくつかの実施形態では、タンパク質またはポリペプチドは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、合成アミノ酸、および/またはこれらの組合せを含み得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、抗体、抗体ポリペプチド、抗体断片、これらの生物学的活性部分、および/またはこれらの特徴的な部分であり、またはこれらを含む。

20

30

【0056】

応答：本明細書において、処置に対する応答は、処置の結果して起こる、または処置と相関する被験体の容態の任意の有益な変化を指すことができる。このような変化として、容態の安定化（例えば、処置の非存在下で起こったはずである悪化の防止）、容態の症状の寛解および/または容態の治癒に対する展望の改善などを挙げることができる。これは、被験体の応答を指す場合があり、または腫瘍の応答を指す場合がある。腫瘍または被験体の応答は、臨床基準および客観的基準を含めた多種多様な基準によって測定することができる。応答を評価するための技法としては、それだけに限らないが、臨床検査、ポジトロン放出断層撮影（positron emission tomography）、胸部X線CTスキャン、MRI、超音波、内視鏡検査、腹腔鏡検査、被験体から得られる試料中の腫瘍マーカーの存在もしくはレベル、細胞学的検査、および/または組織診断がある。これらの技法の多くは、腫瘍のサイズを求めようと試み、またはさもなければ総腫瘍量を求めようと試みるものである。処置に対する応答を評価するための方法および指針は、Therasseら、「New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors」、European Organization for Research and Treatment of Cancer、National Cancer Institute of the United States、National Cancer Institute of Canada、J. Natl. Cancer Inst.、2000年、92巻（3号）：205～216頁に論じられている。正

40

50

確な応答基準は、任意の適切な様式で選択することができ、ただし、腫瘍および/または患者の群を比較するとき、比較されるべき群は、反応率を求めるための同じまたは同等の基準に基づいて評価される。当業者は、適切な基準を選択することができるであろう。

【0057】

試料：本明細書において、被験体から得られる試料として、それだけに限らないが、以下のうちのいずれか、またはすべてを挙げることができる：1個または複数の細胞、組織の部分、血液、血清、腹水、尿、唾液、および他の体液、分泌物、または排泄物。用語「試料」は、このような試料を処理することによって由来する任意の材料も含む。由来試料として、試料から抽出され、またはmRNAの増幅もしくは逆転写などの技法に試料を付すことによって得られるヌクレオチド分子またはポリペプチドを挙げることができる。

10

【0058】

特異的結合：本明細書において、用語「特異的結合」または「～に対して特異的な」または「～に特異的な」は、標的実体（例えば、標的タンパク質またはポリペプチド）と結合剤（例えば、提供される抗体などの抗体）との間の相互作用（一般に非共有結合性）を指す。当業者が理解することになるように、相互作用は、これが代替の相互作用の存在下で有利である場合、「特異的」とみなされる。多くの実施形態では、相互作用は一般に、結合分子によって認識される抗原決定基またはエピトープなどの標的分子の特定の構造的フィーチャの存在に依存する。例えば、抗体がエピトープAに対して特異的である場合、フリー標識Aおよびそれに対する抗体の両方を含有する反応物中に、エピトープAを含有するポリペプチドが存在し、またはフリー非標識Aが存在すると、抗体に結合する標識Aの量が低減することになる。特異性は、完全である必要はないことが理解されるべきである。例えば、多数の抗体は、標的分子中に存在するものに加えて、他のエピトープと交差反応することが当技術分野で周知である。このような交差反応性は、抗体が使用される用途に応じて許容される場合がある。特定の実施形態では、fPSAに対して特異的な抗体は、プロテアーゼ阻害剤（例えば、ACT）に結合したPSAと10%未満の交差反応性を有する。当業者は、任意の所与の用途（例えば、標的分子を検出するため、治療目的のためなど）において適切に実施するのに十分な程度の特異性を有する抗体を選択することができるであろう。特異性は、結合分子の標的分子に対する親和性対結合分子の他の標的（例えば、競合相手）に対する親和性などの追加の要因に照らして評価することができる。結合分子が、検出することが望まれている標的分子に対して高い親和性、および非標的分子に対して低い親和性を呈する場合、抗体は、免疫診断目的に関して許容される試薬である可能性が高くなる。結合分子の特異性が1つまたは複数の状況において確立された後、その特異性を必ずしも再評価することなく、他の、好ましくは同様の状況においてこれを使用することができる。

20

30

【0059】

がんの病期：本明細書において、用語「がんの病期」は、がんの増進のレベルの定性的または定量的評価を指す。がんの病期を判定するのに使用される基準としては、それだけに限らないが、腫瘍のサイズ、および転移の程度（例えば、局在的または遠位）がある。

【0060】

実質的に：本明細書において、用語「実質的に」は、対象とする特徴または性質の総合的またはほぼ総合的な程度または度合いを呈する定性的条件を指す。生物学的技術分野の当業者は、生物学的および化学的現象は、まれに、もしあれば、完了まで進み、かつ/もしくは完全性まで進行し、または完全な結果を実現もしくは回避することを理解するであろう。したがって、用語「実質的に」は、多くの生物学的および化学的現象に固有の完全性の潜在的な欠如を取り込むのに本明細書で使用される。

40

【0061】

罹患している：疾患、障害、または容態（前立腺がん）を「罹患している」個体は、疾患、障害、または容態の1つまたは複数の症状を診断されており、かつ/またはこれらを呈する。前立腺腫瘍は、しばしば無症候性である。いくつかの実施形態では、前立腺がんを罹患している個体は、腫瘍を患っているが、前立腺がんのいずれの症状も呈さず、かつ

50

／または前立腺がんと診断されていない。いくつかの実施形態では、前立腺がんを罹患している個体は、前立腺がんを有していない個体と比べて、腫瘍結合または腫瘍内 f P S A または P S A が増加している個体である。

【 0 0 6 2 】

症状が低減されている：本発明によれば、特定の疾患、障害、または容態の 1 つまたは複数の症状が、規模（例えば、強度、重症度など）および／または頻度において低減されているとき、「症状が低減されている」。明確にする目的で、特定の症状の開始の遅延は、その症状の頻度の低減の一形態とみなされる。より小さい腫瘍を有する多くの前立腺がん患者は、症状をまったく有さない。本発明は、症状が排除される場合のみに限定されることは意図されていない。本発明は、1 つまたは複数の症状が、たとえ完全に排除されなくても、低減される（かつ被験体の容態がそれによって「改善される」）ような処置を特に企図する。

10

【 0 0 6 3 】

治療剤：本明細書において、語句「治療剤」は、被験体に投与されたとき、治療効果を有し、かつ／または所望の生物学および／もしくは薬理学的効果を誘発する任意の作用物質を指す。

【 0 0 6 4 】

治療有効量：本明細書において、用語「治療有効量」は、任意の医療に対して適用可能な妥当な利益／リスク比で、処置される被験体に治療効果を付与する治療用タンパク質（例えば、f P S A 抗体）の量を指す。治療効果は、客観的（すなわち、いくつかの試験またはマーカーによって測定可能）であっても、主観的（すなわち、被験体が効果の指摘を与え、または効果を感じる）であってもよい。特に、「治療有効量」は、疾患に関連する症状を寛解し、疾患の開始を防止し、もしくは遅延させ、かつ／または疾患の症状の重症度もしくは頻度を下げるなどによって、所望の疾患もしくは容態を処置、寛解、もしくは防止し、または検出可能な治療効果もしくは防止効果を呈するのに有効な治療用タンパク質または組成物の量を指す。治療有効量は一般に、複数の単位用量を含み得る投薬レジメンにおいて投与される。任意の特定の治療用タンパク質について、治療有効量（および／または有効な投薬レジメン内の適切な単位用量）は、例えば、投与経路、他の医薬品との組合せに応じて変化し得る。また、任意の特定の患者に対する具体的な治療有効量（および／または単位用量）は、処置される障害および障害の重症度；使用される具体的な医薬品の活性；使用される具体的な組成物；患者の年齢、体重、全体的な健康、性別、および食餌；投与の時間；投与経路；ならびに／または使用される具体的な融合タンパク質の排泄率もしくは代謝率；処置の継続時間；ならびに医術において周知である同様の要因を含めた様々な要因に依存し得る。

20

30

【 0 0 6 5 】

処置：本明細書において、用語「処置」（「処置する」または「処置すること」も）は、特定の疾患、障害、および／または容態（例えば、前立腺がん）の 1 つまたは複数の症状、フィーチャ、および／または原因を部分的に、もしくは完全に軽減し、寛解し、よみがえらせ、阻害し、これらの開始を遅延させ、これらの重症度を低減し、かつ／またはこれらの発病率を低減する物質（例えば、抗 f P S A 抗体または A R アンタゴニスト）の任意の投与を指す。このような処置は、関連した疾患、障害、および／もしくは容態の徴候を呈さない被験体ならびに／または疾患、障害、および／もしくは容態のほんの早期の徴候を呈する被験体のものとすることができる。代替としてまたは追加的に、このような処置は、関連した疾患、障害、および／または容態の 1 つまたは複数の確立した徴候を呈する被験体のものとすることができる。いくつかの実施形態では、処置は、関連した疾患、障害、および／または容態を罹患していると診断された患者のものとすることができる。いくつかの実施形態では、処置は、関連した疾患、障害、および／または容態を発生するリスクの増大と統計的に相関する 1 つまたは複数の感受性因子を有すると分かっている被験体のものとすることができる。

40

【 0 0 6 6 】

50

特定の実施形態の詳細な説明

臨床マーカーは、前立腺がんの診断および治効の評価のために頻繁に使用される。前立腺がんの最も普及した臨床マーカーは、前立腺特異的抗原（「PSA」）である。PSAは、セリンプロテアーゼであり、プロテアーゼの組織カリクレインファミリーのメンバーである。これは、前立腺導管上皮および前立腺腺房上皮によって主に生成され、管腔内に分泌され、この場合その機能は、精液凝塊中のセミノジェリンIおよびIIを切断することである。しかし、がんおよびいくつかのより温和な容態とともに、前立腺のアーキテクチャを変化させ、PSAが血管周囲腔内に漏れ、血流中に逃れることを可能にする。

【0067】

PSAは、前立腺組織内で豊富に発現されるが、健康な前立腺を有する男性の血清中でほとんど検出不可能である。上昇したPSAレベルの存在は、前立腺の外傷または疾患を示唆することが多い。血清PSAは、2つの形態、すなわち、浮遊性触媒活性形態、および他のタンパク質と複合体化または結合した形態で存在する。標準的なPSA試験では、両形態の相対的または定性的な量が測定され、それは、PSAの上昇の原因が、前立腺がんであるか、何らかの他の容態であるかを区別するのに役立ち得る。血清PSA試験では、血液中のフリーまたは非複合体化PSA（「fPSA」）と総PSA（フリー+結合PSA）との比が求められる。fPSAと総PSAの比がより低いことは、個体が確かに実際に前立腺がんを有するより高い潜在性を示唆する。10 ng/ml超の総血清PSAレベルも、臨床実践ガイドラインによれば、前立腺がんの50%超の確率を示唆する。4~10 ng/mlの間の血清PSAレベルは、がんが実際に存在するかどうかを検証するために前立腺生検の必要があるという臨床的示唆である。

【0068】

それにもかかわらず、より洗練されたレベルの血清試験でさえ、とりわけ処置の効力の評価に関して、著しい制限を示す。バイオマーカーまたは抗原が処置の焦点（すなわち、腫瘍）からより移動すると、バイオマーカーまたは抗原のレベルの変動が、真に処置の結果であるのか、介入現象によって引き起こされたアーチファクトを代表するのかを評価することがより困難になる。手短に言えば、原因と効果の相関を判定することがより困難である。さらに、すべての血清マーカーは、疾患の起源から離れているので、定量化されたレベルと疾患の重症度または経過との相関が必然的に不完全である。さらに、病期、腫瘍特性、回復の可能性および治療評価に関する情報は一般に、高度なイメージングまたは侵襲性の生検のいずれかを必要とする。どの血清系マーカーも、腫瘍内診断から導出され得る、潜在的なモルフォロジーを含めた、具体的なリアルタイム情報を真に提供することができない。

【0069】

PSAは、前立腺の管腔上皮細胞内で高レベルに発現され、他の組織内に存在しないか、非常に低いレベルで発現される。PSA発現は、アンドロゲン反応性遺伝子制御エレメントを介してアンドロゲンによって増大し、前立腺がんの発生は、アンドロゲン、特にテストステロンによってとりわけ推進される。したがって、アンドロゲン生成組織の除去を含めた、アンドロゲンの効果に対抗する治療（すなわち、抗アンドロゲン治療）は、前立腺がんを処置するための魅力的なターゲットを代表する。伝統的な抗アンドロゲン治療剤は、アンドロゲン受容体に直接働いてアンドロゲンによる活性化を遮断する。

【0070】

PSAは、前立腺がん用の完全な血清マーカーから遠い。これが、いくつかのより温和な容態に起因して血清中に存在し得るという事実は、偽陽性結果のリスクを有意に上昇させる。前立腺炎、感染、および良性前立腺肥大症（「BPH」）はすべて、血清PSAのレベルを増大させ得る。言い換えれば、前立腺がんに対して実際に特異的である血清PSAの形態はまったくない。さらに、血清PSAレベルは、疾患および治療有効性と不完全に相関する。例えば、PSAレベルが処置の過程後に半減されるという事実は、体内の癌性細胞の数が半減されることと相関せず、それを示唆しない。血清中でPSAを検出するアビリティは、発現だけでなく、循環内への分泌およびリークも必要とし、これらは、

10

20

30

40

50

十分に理解されていない2つのプロセスである。腫瘍生成 P S A の非常に小さいパーセンテージのみが、血管周囲腔内に分泌され、血清循環への律速段階は未確定であるという事実から、追加の困難が生じる。

【 0 0 7 1 】

標準的な血清総 P S A 試験も、早期腫瘍の大部分を検出するための感度および特異性を欠き、前立腺がん由来転移性腫瘍の検出に対して完全に不十分である。例えば、骨は、前立腺がんにおける転移拡散の最も一般的な部位であるが、ほとんどの検出技術（例えば、 ^{99m}Tc -MDP、 ^{18}F -NaFなどの核医学技術）は、転移性疾患を直接画像化するのではなく、むしろ近傍の正常な骨の修復を標的にするので、特徴付けるのがとりわけ難しい。したがって、既存の技術は、悪性疾患と非悪性疾患を区別することができない。さらに、抗アンドロゲン治療に対する応答は、効率的に評価することができず、その理由は、腫瘍誘導骨溶解の修復は、臨床反応を数カ月から数年遅らせ得るためである。

10

【 0 0 7 2 】

本発明の実施形態は、腫瘍結合または腫瘍内 f P S A を介したアンドロゲン受容体（「A R」）シグナル伝達の抗体ベース監視および定量化、ならびに治療用途（a p p l i c a t i o n s）のための腫瘍内 f P S A の抗体ベースターゲティングに引き寄せられている。本明細書に開示の発明は、触媒クレフト P S A に対して特異的な抗体および抗体ポリペプチドは、腫瘍結合および腫瘍内 f P S A を含めた f P S A に選択的に結合するという、かつ優先的に本明細書で最初に開示した意外な発見によって部分的に促進されている。触媒クレフト特異的な抗体の、i n s i t u で腫瘍における f P S A に結合するアビリティーは、多数の診断用途および治療用途を可能にする。例えば、腫瘍結合 f P S A に定量的に結合する標識抗体は、P S A の血清レベルによって間接的にではなく、i n s i t u で抗アンドロゲン治療に対する応答を直接監視することができる。処置に成功すると、A R シグナル伝達が低減し（例えば、受容体の活性化を遮断する医薬化合物によって）、それは、標識抗体のシグナルの検出可能な減少に反映され得る。本発明の実施形態は、アンドロゲン受容体を遮断し、またはアポトーシスを引き起こす任意の治療（例えば、化学療法）、および A R レベルを直接または間接的に低減する任意の処置（すなわち、s i R N A）に適用可能であることが当業者に明らかとなるであろう。

20

【 0 0 7 3 】

さらに、本明細書に開示の方法は、びまん性前立腺疾患、すなわち、前立腺由来がん細胞が体の他の臓器または組織に転移した転移性疾患を診断および処置するアビリティーを有する。上記に論じたように、転移性前立腺がんの検出、監視、および処置は、特に困難であることが判明している。転移リンパ節の外科的切除は、例えば、存在し得るがん性細胞のすべてを除去することにしばしば失敗し、再発の確率を大いに増大させる。さらに、骨転移の監視の現在の方法は、腫瘍を直接画像化するのではなく、近傍の正常な骨の修復を画像化し、ほとんどのスキャンは、悪性疾患と非悪性疾患（すなわち、骨再形成をもたらす他の疾患）を区別することができないことを意味するので、完全に不十分である。

30

【 0 0 7 4 】

血清中の P S A は、大部分は血清プロテアーゼ阻害剤アルファ1 - 抗キモトリプシン（A C T）に共有結合的にアタッチしており、複合体化 P S A（「c P S A」）と呼ばれる。かなり軽微な部分が非複合体化 f P S A として存在する。しかし、はるかに大きい比率の f P S A が前立腺腫瘍にごく接近して、または腫瘍内にさえ結合していることが発見された。f P S A は、異なる分子形態の活性および不活性 P S A を含有する。本明細書で定義する f P S A のサブフォームには、B P S A および p r o - P S A（「p P S A」）が含まれる。B P S A は、天然成熟 P S A と同一であるが、L y s 1 8 2 および L y s 1 4 5 で2つの内部ペプチド結合切断を有する。これは、前立腺の内側部分、または「転移ゾーン」内の結節性過形成に結合しており、一方、がんは一般に、外側部分、または「周辺ゾーン」内に発達する。B P S A は、前立腺転移ゾーン内で増加させられ、病的 B P H と結合している。p P S A は、前立腺腫瘍自体に結合している。まとめると、これらの形態は、高度に疾患特異的な f P S A の個々の形態を代表する。

40

50

【 0 0 7 5 】

前立腺がんおよびびまん性疾患の評価および処置における f P S A の能力は、分子イメージングと併せて使用されるとき、特に明白である。腫瘍学における分子イメージングは、ヒト腫瘍生物学において基本的な重要分子および分子ベースイベントの非侵襲性イメージングである。これは、適切な治療経過、病期分類、再発、および治療に対する応答を示唆する検出、鑑別診断、腫瘍生物学検査に関する以前に入手不可能であった情報を提供することができる。核医学技法は特に、それ自体分子イメージングに役立つ。放射能検出器を介して、生体分子放射性トレーサーを使用して、腫瘍、がん性細胞、および分化正常組織のリアルタイム生化学を検出し、それによってヒトの腫瘍および組織についての定性的または定量的生化学的または機能的情報を提供することができる。

10

【 0 0 7 6 】

分子イメージングの進歩は、モノクローナル抗体技術の開発および改善によって促進されている。がん標的医薬品に関するこれらの認識された潜在性に加えて、モノクローナル抗体は、画像診断の疾患特異的造影剤として使用することができる。例えば、ポジトロン放出断層撮影 (「 P E T 」) カメラの高い感度および解像度をモノクローナル抗体の特異性と組み合わせることによって、免疫 - P E T、すなわち、P E T のモノクローナル抗体との組合せは、診断上の腫瘍特徴付けを改善するための魅力的な新規の選択肢である。しかし、本明細書に開示の概念は、いずれの単一のイメージング技術にも基づいていないことが察されるであろう。実際に、これは、ヒトの腫瘍および組織についての定性的または定量的生化学的または機能的情報を推測するためのほとんど任意のイメージングパラメータの使用に適合できる多彩な技術である。本開示が包含する分子イメージング法としては、 γ カメライメージング、単一光子放射型コンピュータ断層撮影、ポジトロン放出断層撮影、磁気共鳴分光法、磁気共鳴画像法、光学イメージング (巨視的スペクトルイメージング)、および超音波がある。

20

【 0 0 7 7 】

免疫 - P E T は、*i n v i v o*での包括的な免疫組織化学的染色と等価であり、その目的のために、モノクローナル抗体は、ポジトロンエミッターで標識されて、P E T カメラでの可視化を可能にしなければならない。しかし、非腫瘍特異的、代謝的トレーサーの 18 -フルオロ - 2 - デオキシ - D - グルコース (18 F D G) が、すべての P E T イメージング手順の 90% 超で現在使用されている、既存の P E T トレーサーに加えて、新世代のモノクローナル抗体ベースイメージングプローブまたは新規放射性トレーサーの開発の必要性が残っている。

30

【 0 0 7 8 】

放射性トレーサーを慎重に操作して腫瘍において成功を収めることは難しいことが判明しており、診療所において新規放射性トレーサーの高い損耗率をもたらしている。放射性トレーサーの標的は、使用のその潜在的な状況を必然的に形づくり (すなわち、検出、応答インジケーター)、候補は、がんの上方制御を指摘する前臨床的証拠に基づいて選択されることが多い。この点において、標的上方制御の病理学的機構を完全に察知することなく、患者における新規放射性トレーサーを適切に評価することは難しい場合がある。

【 0 0 7 9 】

40

本発明の特定の実施形態は、前立腺特異的なアンドロゲン受容体制御遺伝子発現の変化、および得られる翻訳生成物を、腫瘍結合 f P S A に特異的な適切に標識された抗体に由来する新規放射性トレーサーを用いて非侵襲的に測定することができることを実証することによって、この点において成功を収めた。本明細書に開示の放射性トレーサーは、アンドロゲン受容体依存様式で前立腺がん細胞に対して高度に特異的であり、f P S A 発現のアンドロゲン制御上昇を検出することができ、腫瘍内アンドロゲン受容体シグナル伝達を反映するこれらのアピリティーを実証する。当業者に公知のイメージング技術と併せて、本明細書に開示の新規放射性トレーサーは、アンドロゲン受容体の薬理的阻害に応答した f P S A 合成の変化を介して、アンドロゲン受容体シグナル伝達の *i n s i t u*での定量化を可能にする。さらに、放射性トレーサーは、骨内の転移性前立腺がん腫瘍に対し

50

てユニークな特異性を有し、真の骨格前立腺がん病変と骨再形成を明確に区別することができる。

【 0 0 8 0 】

本発明の実施形態のアンドロゲン受容体シグナル伝達を監視および画像化するアビリティは、広範囲の診断法で適用可能である。本発明の実施形態は、前立腺がん、ならびに前立腺がん細胞の転移 (m e t a s t a s i s) に関係する診断情報、ならびに予後情報および予兆情報を提供することができる。先述したように、腫瘍関連アンドロゲン受容体シグナル伝達を監視するアビリティは、特に抗アンドロゲン処置が使用される場合、治療有効性の極めて正確な測定を促進する。この能力において、本発明の実施形態は、がん性細胞が、細胞をアンドロゲン受容体シグナル伝達に対して無応答性にする適応突然変異をいつ発生させたかを示唆することができる。さらに、本発明の実施形態を使用して、がんの病期を評価し、かつ/または処置の起こりそうな転帰に対する情報を提供することができる。本発明の実施形態は、治療の所与の過程が成功するかどうかを予測することもできる。例えば、ベースライン参照と比べたアンドロゲン受容体シグナル伝達のレベルの上昇は、抗アンドロゲン処置の特に積極的な過程を示唆し得る。

【 0 0 8 1 】

本明細書に開示の抗 f P S A 抗体および抗体ポリペプチドの腫瘍結合および腫瘍内特異性により、抗アンドロゲン処置および抗がん処置の f P S A を発現および/またはディスプレイする細胞への標的化が可能になることも察される。腫瘍結合 f P S A 抗体は、放射性元素、細胞傷害性核酸類似体、アポトーシス誘発因子、および細胞の特定の集団への正確な送達から利益を得ることができる現在公知の、または後に開発される潜在的に任意の治療とカップリングすることができる。血清中の A C T によって遮断される P S A の触媒クレフトに単に結合することによって、本明細書に開示の f P S A 抗体および抗体ポリペプチドは、前立腺特異的腫瘍および前立腺がん細胞 (例えば、前立腺がん由来転移性骨疾患) に治療を直接標的にするアビリティを有する。いずれの特定の理論によっても束縛されることなく、f P S A は、タンパク質分解的に活性な内在性膜タンパク質として一過性に存在し、次いで、触媒クレフト特異的抗体による認識を妨げる細胞外結合タンパク質 (例えば、A C T) によって隔離される前に、細胞周囲空間内に一過性に存在すると考えられる。

【 0 0 8 2 】

本発明の実施形態および本明細書に開示の方法は、f P S A、特に腫瘍結合 f P S A に特異的に結合することができる、現在公知の、または後に発見される任意の抗体を含むことができる。上述したように、本発明は、f P S A に特異的に結合することができる抗体断片および抗体の特徴的な部分 (例えば、5 A 1 0) も包含する。選択された抗体および抗体断片は、個々に、または組合せて使用することができる。組合せて使用する場合、選択された抗体および抗体断片は、同時に、または順次使用することができる。本発明の抗体および抗体断片は、投与後およそ約 1 2 ~ 4 8 時間の間に、特定の実施形態では、投与後 2 0 ~ 3 0 以内にピーク腫瘍結合を示す。具体的な実施形態では、ピーク腫瘍結合活性は、投与後およそ約 2 4 時間に観察される。

【 0 0 8 3 】

本発明のいくつかの実施形態は、P S A が複合体化していない (例えば、A C T または他のタンパク質によって結合されていない) ときアクセス可能であるだけである P S A エピトープに特異的に結合することができるモノクローナルおよびポリクローナル抗体 (またはその特徴的な断片) を利用する。本発明の実施形態で使用するための抗体は、任意の種、例えば、ヒト、マウス、ウサギなどに由来し得る。上述したように、触媒クレフト内、またはその近傍 (例えば、それに隣接する) エピトープのアクセシビリティは、f P S A (特に、腫瘍内または細胞結合 f P S A) と血清 P S A との間の重要な際立った特徴の通りである。本発明のいくつかの実施形態では、エピトープは、触媒クレフト内にある。本発明のいくつかの実施形態では、エピトープは、触媒クレフトに隣接する。本発明の実施形態で使用するための 1 つのこのような抗体は、5 A 1 0、すなわち、f P S A の触媒

クレフトに隣接するエピトープを特異的に認識するマウスモノクローナル抗体である。5A10は、精漿PSAに対して産生された。そのエピトープは、ACTと複合体化したほとんどアクセスできないPSAである。例えば、Lilja, H.ら、Clin. Chem., 1991年、37巻: 1618~1625頁を参照。本発明のいくつかの実施形態では、抗体は4G10である。

【0084】

いくつかの実施形態では、本発明で使用するための抗体は、いわゆるカリクレインループの一部を形成するfPSA中のアミノ酸80~91を含む線状エピトープに結合することができる。いくつかの実施形態では、抗体は、fPSA配列SWGSEPC(PSA中のアミノ酸204~210)に結合する。このSWG部位は、fPSAに対して特異的なMAbのエピトープの一部を形成する。アミノ酸204~207(SWGS)は、グループの反対側上の領域80~91と逆のPSAの活性部位残基を含有するグループのエッジを形成する。いくつかの実施形態では、抗体は、アミノ酸204~207に隣接して位置したfPSA配列HPQKV(PSA中のアミノ酸164~168)に結合し、fPSAに対して特異的なモノクローナル抗体のエピトープの一部を形成することができる。いくつかの実施形態では、抗体は、fPSA中のアミノ酸164~168の領域内で結合する。特定の実施形態では、アミノ酸164~168の領域内で結合する抗体は、5A10である。いくつかの実施形態では、抗体は、fPSAの3つの異なるコンフォメーションループ(conformational loop)、すなわち、アミノ酸80~91、164~168、および204~207の少なくとも1つ上の残基に特異的に結合する。Leinonen, J.ら、Clin. Chem., 2002年、48巻(12号): 2208~2216頁を参照。

【0085】

追加のfPSA - 特異的抗体を開発することは、以下で直ちに論じる公開されたPSAエピトープ特徴付け/構造分析および方法に基づいて、当業者の能力の範囲内である。例示的なPSAエピトープ特徴付けは、Lilja, H.ら、Clin. Chem., 1991年、37巻: 1618~1625頁; Pettersson, K.ら、Clin. Chem., 1995年、41巻: 1480~1488頁; Pironen, T., Protein Sci., 1998年、7巻: 259~269頁; およびMenez, R., J. Mol. Biol., 2008年、376巻(4号): 1021~1033頁; Leinonen, J.ら、Clin. Chem., 2002年、48巻(12号): 2208~2216頁、およびVilloutreix B.O.ら、Protein Sci., 1994年、3巻: 2033~2044頁に記載されており、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

ヒト化抗体およびペニヤ化抗体

【0086】

本発明の実施形態で使用するためのモノクローナル抗体は、当業者に周知の慣例的な手段によって開発することができる。しかし、ハイブリドーマ技術は、一例である。例えば、G. KohlerおよびC. Milstein、Nature、1975年、256巻: 495~497頁を参照。モノクローナル抗体、およびこれらを生成する細胞系を生成するためのプロトコールは、当技術分野で周知である。例えば、Gerhardら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1978年、75巻: 1510頁; Monoclonal Antibodies (R. Kennett, T. McKearn, & K. Bechtol編、1980年); Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas (G. Hamerling, U. Hammerling, & J. Kearney編、1981年); Kozborら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1982年、79巻: 6651頁; Jonakら、Hybridoma、1983年、2巻: 124頁; Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines (R. Kennett, K. Bechtol, & T.

McKearn編、1983年)；およびShulmanら、Nature、1982年、276巻：269～270頁を参照。

【0087】

ある特定の実施形態では、特に治療目的で抗fPSA抗体を使用する場合、ヒト化抗体またはベニヤ抗体を使用していずれの潜在的な免疫原性反応も低減することができる。一般に、ヒト化抗体またはベニヤ抗体は、ヒトレシピエントにおける非ヒト抗体の治療用途の継続時間および有効性を制限する望まれない免疫応答を最小限にする。

【0088】

非ヒト抗体に由来する抗原結合部分を含むヒト化抗体を調製するためのいくつかの方法が、当技術分野で記載されている。特に、げっ歯類可変領域、およびヒト定常ドメインに融合したこれらの関連した相補性決定領域(CDR)を有する抗体が記載されている(例えば、Winterら、Nature、1991年、349巻：293頁；Lobuglioら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、1989年、86巻：4220頁；Shawら、J. Immunol.、1987年、138巻：4534頁；およびBrownら、Cancer Res.、1987年、47巻：3577頁を参照)。適切なヒト抗体定常ドメインと融合する前に、ヒト支持フレームワーク領域(FR)内に移植されたげっ歯類CDR(例えば、Riechmannら、Nature、1988年、332巻：323頁；Verhoeyenら、Science、1988年、239巻：1534頁；およびJonesら、Nature、1986年、321巻：522頁を参照)、および組換えでベニヤ化されたげっ歯類FRによって支持されたげっ歯類CDRも記載されている(例えば、EPO特許公開第519,596号を参照)。

【0089】

完全ヒト抗体は、ヒト患者の治療処置にとって特に望ましい。このような抗体は、内在性免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を発現することができないが、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを使用して生成することができる(例えば、LonbergおよびHuszar、Int. Rev. Immunol.、1995年、13巻：65～93頁、ならびに米国特許第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；および同第5,661,016号を参照)。

【0090】

完全ヒト抗体またはこれらの抗原結合断片は、ヒト抗体ライブラリーから同定および単離することもできる。例えば、理論的な多様なヒト抗体(10^{12} の異なる抗体)、またはこれらの物理的に実現可能なサブポーションを包含するポリヌクレオチドライブラリーの発現産物は、触媒クレフトの全体および/または抗原部分を用いてスクリーニングして、新規の相互作用する抗体または断片を同定することができる。例示的なライブラリーとしては、免疫された個体からのファージディスプレイライブラリー(例えば、Barbasら、J. Mol. Biol.、1993年、230巻：812～823頁を参照)、生殖系列配列のライブラリー(Griffithsら、EMBO J.、1994年、13巻：3245～3260頁)、またはナイーブB細胞レパートリー(Vaughanら、Nature Biotech.、1996年、14巻：309～314頁)がある。特定の実施形態では、前立腺がんを罹患しているドナーに由来するライブラリーを使用することができる。このようなライブラリーでは、PSA抗原を刺激すると、B細胞内のmRNA産生が増大し、それは、PSA結合しやすい重鎖および軽鎖可変遺伝子の単離に寄与する。

【0091】

生殖系列抗体遺伝子セグメント(VH、DH、およびJH、またはVk/λ、およびJk/λ)が、完全なVH鎖およびVL鎖をコードする遺伝子を再構成するように、in vitroでクローン化およびコンビナトリアルに配列された合成ライブラリー(例えば、Winter、FEB S Letters、1998年、430巻：92～94頁)も使用することができる。例えば、de Kruifら、J. Mol. Biol.、1

995年、248巻：97～105頁；Griffithsら、EMBO J.、1994年、13巻：3245～3260頁；HoogenboomおよびWinter、J. Mol. Biol.、1992年、227巻：381～388頁；およびNissimら、EMBO J.、1994年、13巻：692～698頁を参照。足場として1つまたは複数の抗体フレームワークを選択し、CDRループ内の配列をランダム化することによって生成される半合成ライブラリーも使用することができる。特定の(Particular)ライブラリーは、重鎖および/または軽鎖の完全または部分的にランダム化されたCDR3超可変領域を有することができる(例えば、Hulsら、Nat. Biotech.、1999年、17巻：276～281頁；Knappikら(J. Mol. Biol.、2000年、296巻：57～86頁を参照)。一般に、Fuh, G. Expert. Opin. Biol. Ther.、2007年、7巻(1号)：73～87頁；Kimら、Mol. Cells、2005年、20巻(1号)：17～29頁を参照。ファージ、酵母、E. coli、およびリボソームディスプレイ技術、ライブラリースクリーニングに使用することができる。

【0092】

抗fPSA抗体のベニヤ化バージョンも、本発明の方法において使用することができる。ベニヤリングのプロセスでは、天然FRタンパク質折り畳み構造の実質的にすべてを保持する抗原結合部分を含む抗体を提供するために、例えば、マウス重鎖または軽鎖可変領域に由来するRF残基をヒトFR残基と選択的に置き換える。ベニヤリング技法は、抗原結合特性が、抗原会合表面内の重鎖および軽鎖CDRセットの構造および相対的配置によって主に決定されるという理解に基づく(例えば、Daviesら、Ann. Rev. Biochem.、1990年、59巻：439頁を参照)。したがって、抗原会合特異性は、CDR構造、互いのこれらの相互作用、および可変領域ドメインの残りとのこれらの相互作用が、慎重に維持される場合のみ、ヒト化抗体内で保存され得る。ベニヤリング技法を使用することによって、免疫系が容易に遭遇する外部(例えば、溶媒アクセス可能な)FR残基が、ヒト残基と選択的に置き換えられて、弱免疫原性、または実質的に非免疫原性のベニヤ化表面を含むハイブリッド分子がもたらされる。

診断用途

【0093】

いくつかの実施形態では、提供される抗体は、診断用途に使用される。本明細書に開示の抗体の腫瘍結合fPSA特異性によって、診断アッセイを使用して、血清PSAによる間接的とは対照的に、腫瘍の実際の位置で、in situでのアンドロゲン受容体シグナル伝達に対する様々な治療の効果を監視することができる。例えば、PSA遺伝子産物の生成は、アンドロゲン受容体(「AR」)によって正に制御される。ARは、細胞質内の男性ホルモンの結合によって活性化される核内受容体である。活性化ARは、核内に場所を移し、そこでこれらは、標的遺伝子の制御領域内のアンドロゲン応答エレメントに結合することができる。したがって、アンドロゲンレベルまたはAR活性化を遮断または低減する前立腺がん処置は、fPSAなどのアンドロゲン制御遺伝子産物の対応する減少に反映される。本発明者らのいくつかの実施形態では、in situでこの効果を監視する。

【0094】

診断用途も、例えば、肝臓、リンパ節、または骨における転移性前立腺がん疾患の存在または非存在を検出することができてよい。一般に、本明細書に提供されるfPSA特異的抗体を、任意の前立腺がん関連処置(例えば、抗アンドロゲン処置)の前、間、または後に投与して、被験体特異的なベースライン、または患者の集団に由来するベースラインと比べた、アンドロゲン受容体シグナル伝達に対する処置の効果を評価することができる。特定の実施形態では、集団由来ベースラインは、前立腺がんを罹患していない患者または被験体の群におけるfPSA発現または活性のアンドロゲン受容体シグナル伝達レベルの平均値または中央値を含むことができる。

【0095】

ある特定の実施形態では、結合は、以下のセクションで論じる、提供される抗体に検出用実体を付加することによって検出することができる。ある特定の実施形態では、本発明の検出技法は、陰性対照を含むことになり、それにより、対照試料（例えば、正常な非がん性組織からの）に試験を適用することができ、その結果、それによって得られるシグナルを、試験される試料から得られるシグナルと比較することができる。

【0096】

本発明の実施形態で使用するための特定の診断技法としては、それだけに限らないが、酵素結合免疫吸着アッセイ（「ELISA」）、ポジトロン放出断層撮影、ウエスタンブロッティング、免疫組織化学検査、および磁気（magnetic）共鳴画像法がある。

10

検出用実体

【0097】

いくつかの実施形態では、抗fPSA特異的抗体は、検出用途のために、およびこれとともに使用される。本明細書に記載の提供される抗体に加えて、少なくとも1つの検出用実体を含む、本明細書に記載の多機能性剤を使用することができる。

【0098】

検出用実体は、対象とする組織、例えば、前立腺がん細胞または骨内でfPSAに結合した後、fPSA抗体または抗体ポリペプチドの検出を可能にする任意の実体とすることができる。多種多様な検出可能な剤のいずれも、提供される抗体の多機能抗体薬中の検出用実体（例えば、標識化部分）として使用することができる。検出用実体は、直接的に検出可能であっても、間接的に検出可能であってもよい。検出用実体の例としては、それだけに限らないが、様々なリガンド、放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{135}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{64}Cu 、 ^{187}Re 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{89}Zr など）、蛍光色素（具体的な例示的蛍光色素については、以下を参照）、化学発光剤（例えば、アクリジニウムエステル、安定化ジオキセタンなど）、生物発光剤、スペクトル的に分解可能な無機蛍光半導体ナノ結晶（すなわち、量子ドット）、金属ナノ粒子（例えば、金、銀、銅、白金など）、ナノクラスター、常磁性金属イオン、酵素（酵素の具体例については、以下を参照）、比色標識（例えば、色素、コロイド金など）、ビオチン、ジオキシゲニン、ハプテン、および抗血清またはモノクローナル抗体が利用可能であるタンパク質がある。

20

30

【0099】

ある特定の実施形態では、検出用実体は、蛍光標識を含む。多種多様な化学構造および物理的特性の多数の公知の蛍光標識部分が本発明で使用するのに適している。適当な蛍光色素としては、それだけに限らないが、フルオレセインおよびフルオレセイン色素（例えば、フルオレセインイソチオシアニンまたはFITC、ナフトフルオレセイン、4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン、βカルボキシフルオレセインまたはFAMなど）、カルボシアニン、メロシアニン、スチリル色素、オキソノール色素、フィコエリトリン、エリトロシン、エオシン、ローダミン色素（例えば、カルボキシテトラメチル-ローダミンまたはTAMRA、カルボキシローダミン6G、カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、リサミンローダミンB、ローダミン6G、ローダミングリーン、ローダミンレッド、テトラメチルローダミン（TMR）など）、クマリンおよびクマリン色素（例えば、メトキシクマリン、ジアルキルアミノクマリン、ヒドロキシクマリン、アミノメチルクマリン（AMCA）など）、オレゴングリーン色素（例えば、オレゴングリーン488、オレゴングリーン500、オレゴングリーン514など）、テキサスレッド、テキサスレッド-X、Spectrum Red（商標）、Spectrum Green（商標）、シアニン色素（例えば、Cy-3（商標）、Cy-5（商標）、Cy-3.5（商標）、Cy-5.5（商標）など）、アレキサフルオル色素（例えば、アレキサフルオル350、アレキサフルオル488、アレキサフルオル532、アレキサフルオル546、アレキサフルオル568、アレキサフルオル594、アレキサフルオル633、アレキサフルオル660、アレキサフルオル680など）、BODIPY色素（例えば、

40

50

BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR、BODIPY TR、BODIPY530/550、BODIPY558/568、BODIPY564/570、BODIPY576/589、BODIPY581/591、BODIPY630/650、BODIPY650/665など)、IRDyes(例えば、IRD40、IRD700、IRD800など)などがある。適当な蛍光色素、ならびにタンパク質およびペプチドなどの他の化学実体に蛍光色素をカップリングするための方法のさらなる例については、例えば、「The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products」、9111版、Molecular Probes, Inc.、Eugene、ORを参照。

【0100】

10

蛍光標識剤の好都合な性質としては、高モル吸収係数、高蛍光量子収率、および光安定性がある。ある特定の実施形態では、標識フルオロフォアは望ましくは、スペクトルの紫外範囲(すなわち、400nm未満)ではなく、可視(すなわち、400~750nmの間)で吸収波長および発光波長を呈することが望ましい。

【0101】

ある特定の実施形態では、検出用実体は、酵素を含む。適当な酵素の例としては、それだけに限らないが、ELISAで使用されるもの、例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼなどがある。他の例には、 β -グルクロニダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼなどが含まれる。酵素は、リンカー基、例えば、カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒドなどを使用して、ターゲティング用実体(例えば、クロトキシシン部分)にコンジュゲートすることができる。適当なリンカーのより詳細な説明は、本明細書の他で提供する。

20

【0102】

ある特定の実施形態では、検出用実体は、単一光子放出型コンピュータ断層撮影(SPECT)またはポジトロン放出断層撮影(PET)によって検出可能である放射性同位体を含む。PETの高分解能で定量的なイメージングは、本発明のある特定の実施形態に特に適している。このような放射性核種の例としては、それだけに限らないが、ジルコニウム-89(^{89}Zr)、ヨウ素-124(^{124}I)、ヨウ素-131(^{131}I)、ヨウ素-125(^{125}I)、ビスマス-212(^{212}Bi)、ビスマス-213(^{213}Bi)、アスタチン-221(^{221}At)、銅-67(^{67}Cu)、銅-64(^{64}Cu)、レニウム-186(^{186}Re)、レニウム-187(^{187}Re)、リン-32(^{32}P)、サマリウム-153(^{153}Sm)、ルテチウム-177(^{177}Lu)、テクネチウム-99m($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、ガリウム-67(^{67}Ga)、インジウム-111(^{111}In)、およびタリウム-201(^{201}Tl)がある。 ^{89}Zr -標識モノクローナル抗体の生成および使用のための特定の手順は、本明細書に参照により組み込まれている、Verel, I.ら、「 ^{89}Zr -Immuno-PET: Comprehensive Procedures for the Production of ^{89}Zr -Labeled Monoclonal Antibodies」、J. Nucl. Med.、2003年;44巻:1271~1281頁に開示されている。

30

40

【0103】

ある特定の実施形態では、標識部分は、ガンマカメラによって検出可能な放射性同位体を含む。このような放射性同位体の例としては、それだけに限らないが、ヨウ素-131(^{131}I)、およびテクネチウム-99m($^{99\text{m}}\text{Tc}$)がある。

【0104】

ある特定の実施形態では、検出用実体は、磁気共鳴画像法(MRI)において良好なコントラストエンハンサーである常磁性金属イオンを含む。このような常磁性金属イオンの例としては、それだけに限らないが、ガドリニウムIII(Gd^{3+})、クロムIII(Cr^{3+})、ジスプロシウムIII(Dy^{3+})、鉄III(Fe^{3+})、マンガンII

50

(Mn^{2+})、およびイッテルビウムIII(Yb^{3+})がある。ある特定の実施形態では、検出用実体は、ガドリニウムIII(Gd^{3+})を含む。ガドリニウムは、MRI用にFDAに認可された造影剤であり、これは、異常な組織内に蓄積し、磁気共鳴画像上でこれらの異常な範囲を非常に明るく(強調)させる。ガドリニウムは、体の異なる範囲、特に、脳内の正常組織と異常組織との間の大きいコントラストをもたらすことが公知である。

【0105】

ある特定の実施形態では、標識部分は、核磁気共鳴分光法(MRS)によって検出可能な、安定な常磁性同位体を含む。適当な安定な常磁性同位体の例としては、それだけに限らないが、炭素-13(^{13}C)およびフッ素-19(^{19}F)がある。

10

医薬組成物

【0106】

本発明は、1種または複数の提供される抗体、これらの断片または特徴的な部分を含む組成物も提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、少なくとも1種の抗体、および少なくとも1種の薬学的に許容される賦形剤を提供する。このような医薬組成物は、1種または複数の追加の治療的または生物学的に活性な物質を任意選択により含み、かつ/またはこれらと併用して投与することができる。いくつかの実施形態では、医学、または薬剤の製造において有用な医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態では、提供される医薬組成物は、前立腺がんおよびその転移の処置または防止において、予防剤(すなわち、ワクチン)として有用である。いくつかの実施形態では、提供される医薬組成物は、例えば、アンドロゲン受容体シグナル伝達を遮断する細胞毒性薬または化合物を特異的に標的にすることができるビヒクルとして、例えば、前立腺がんを罹患している個体における治療用途に有用である。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、診断用途および治療用途において同時に有用である。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、ヒトに投与するために製剤化される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書に定義される抗がん剤と組み合わせた、またはこれにコンジュゲートした抗fPSA抗体を含む。

20

【0107】

例えば、医薬組成物は、滅菌注射用形態(例えば、皮下注射または静脈内注入に適した形態)で提供することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、注射に適した液体剤形で提供される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、任意選択により真空下で粉末(例えば、凍結乾燥および/または滅菌された)として提供され、これらは、注射の前に水性希釈剤(例えば、水、緩衝液、塩溶液など)で再構成される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、水、塩化ナトリウム溶液、酢酸ナトリウム溶液、ベンジルアルコール溶液、リン酸緩衝食塩水などで希釈および/または再構成される。いくつかの実施形態では、粉末は、水性希釈剤で穏やかに混合されるべきである(例えば、振盪されない)。

30

【0108】

いくつかの実施形態では、提供される医薬組成物は、1種または複数の薬学的に許容される賦形剤(例えば、防腐剤、不活性希釈剤、分散剤、表面活性剤、および/または乳化剤、緩衝剤など)を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1種または複数の防腐剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、防腐剤をまったく含まない。

40

【0109】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、冷蔵および/または凍結することができる形態で提供される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、冷蔵および/または凍結することができない形態で提供される。いくつかの実施形態では、再構成された溶液および/または液体剤形は、再構成後のある特定の時間(例えば、2時間、12時間、24時間、2日、5日、7日、10日、2週間、1カ月、2カ月、またはそれ以上)貯蔵することができる。いくつかの実施形態では、指定時間より長く抗体組成物を貯蔵すると、抗体が分解する。

【0110】

50

液体剤形および／または再構成された溶液は、投与する前に粒子状物質および／または変色を含む場合がある。いくつかの実施形態では、溶液は、変色し、もしくは曇っている場合、および／または濾過後に粒子状物質が残る場合、使用されるべきでない。

【0111】

本明細書に記載の医薬組成物は、薬理の技術分野で公知の、または今後開発される任意の方法によって調製することができる。いくつかの実施形態では、このような調製方法は、活性成分を、1種または複数の賦形剤および／または1種または複数の他の副成分と会合させるステップと、次いで、必要であり、かつ／または望ましい場合、所望の単回または複数回用量ユニット内に生成物を成形および／または包装するステップとを含む。

【0112】

本発明による医薬組成物は、バルクで、1つの単回単位用量として、かつ／または複数の単回単位用量として調製、包装、および／または販売することができる。本明細書において、「単位用量」は、所定の量の活性成分、例えば、抗fPSA抗体および抗アンドロゲン治療薬を含む医薬組成物の別個の量である。活性成分の量は一般に、被験体に投与される用量および／またはこのような用量の好都合な画分、例えば、このような用量の1/2または1/3などに等しい。

【0113】

本発明による医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤、および／または任意の追加成分の相対量は、治療される被験体の素性、サイズ、および／もしくは容態に応じて、かつ／または組成物が投与される経路に応じて変化し得る。例として、組成物は、0.1%～100%(w/w)の間の活性成分を含むことができる。

【0114】

本発明の医薬組成物は、望まれる特定の剤形に適している場合、本明細書において、溶媒、分散媒質、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散助剤もしくは懸濁助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤もしくは乳化剤、防腐剤、固体バインダー、滑剤などであり得、またはこれらを含むことができる、薬学的に許容される賦形剤をさらに含むことができる。Remington's The Science and Practice of Pharmacy、21版、A. R. Gennaro、(Lippincott, Williams & Wilkins、Baltimore、MD、2006年)には、医薬組成物の製剤化に使用される様々な賦形剤、およびこれらを調製するための公知の技法が開示されている。任意の慣例的な賦形剤媒体が、任意の望ましくない生物学的効果を生じること、または医薬組成物の任意の他のコンポーネント(複数可)と有害な様式で他に相互作用することなどによって、1つの物質またはその誘導体と不適合である場合を除いて、その使用は、本発明の範囲内であることが企図されている。

一般のコンジュゲート

【0115】

本明細書に記載の多機能性剤は、それぞれが少なくとも1つの機能を有する複数の実体を含む(例えば、化学療法剤にコンジュゲートしたfPSAの触媒クレフト内またはその付近のエピトープに対して特異的なモノクローナル抗体)。企図された多機能性剤のある特定の実施形態は、ターゲティング用実体、ならびに以下の実体、すなわち、検出用実体、治療用実体、および診断用実体の少なくとも1種を含む。いくつかの実施形態では、抗fPSA抗体を含む多機能性剤は、ターゲティング用実体および治療用実体を含有するが、検出用実体を含有しない。いくつかの実施形態では、抗fPSA抗体を含む多機能性剤は、ターゲティング用実体および検出用実体を含有するが、治療用実体を含有しない。いくつかの実施形態では、本発明の多機能性剤は、ターゲティング用実体、治療用実体、および検出用実体を含有する。いくつかの実施形態では、一作用物質の実体は、互いにコンジュゲートすることができる。多機能性剤を形成するための様々な実体のコンジュゲーションは、コンジュゲーションの特定のモードに制限されない。例えば、2つの実体は、互いに直接的に、共有結合的にコンジュゲートすることができる。あるいは、2つの実体は、リンカー実体を介してなど、互いに間接的にコンジュゲートすることができる

10

20

30

40

50

。いくつかの実施形態では、多機能性剤は、作用物質内で異なるタイプのコンジュゲーションを含むことができ、その結果、作用物質のいくつかの実体は、直接的なコンジュゲーションを介してコンジュゲートされ、一方、作用物質の他の実体は、1種または複数のリンカーを介して間接的にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、本発明の多機能性剤は、単一タイプのリンカー実体を含む。他の実施形態では、本発明の多機能性剤は、1つを超えるタイプのリンカー実体を含む。いくつかの実施形態では、多機能性剤は、単一タイプであるが、様々な長さのリンカー実体を含む。

【0116】

いくつかの実施形態では、多機能性剤に含有される実体間またはこれらの中で共有結合性会合がある。当業者が察することになるように、部分は、直接または間接的に（例えば、以下に記載されるリンカーによって）互いにアタッチされ得る。

【0117】

いくつかの実施形態では、多機能性剤の1つの実体（ターゲッティング用実体など）および第2実体が互いに直接的に、共有結合的に連結されている場合、このような直接的な共有結合性コンジュゲーションは、連結（例えば、リンカーまたは連結実体）、例えば、アミド、エステル、炭素-炭素、ジスルフィド、カルバメート、エーテル、チオエーテル、尿素、アミン、またはカーボネート連結などによるものであり得る。共有結合性コンジュゲーションは、多機能性剤の第1実体および/または第2実体上に存在する官能基を利用することによって実現することができる。あるいは、非重要アミノ酸を、連結目的で有用な基（アミノ、カルボキシ、またはスルフヒドリルなど）を導入することになる別のアミノ酸によって置き換えることができる。あるいは、追加のアミノ酸を、多機能性剤の実体の少なくとも1つに付加して、カップリング目的で有用な基（アミノ、カルボキシ、またはスルフヒドリルなど）を導入することができる。部分を一緒にアタッチするのに使用され得る適当な官能基としては、それだけに限らないが、アミン、無水物、ヒドロキシル基、カルボキシ基、チオールなどがある。カルボジイミドなどの活性化剤を使用して直接的な連結を形成することができる。多種多様な活性化剤が当技術分野で公知であり、1つの実体を第2実体にコンジュゲートするのに適している。

【0118】

他の実施形態では、本発明が採用する多機能性剤の実体は、リンカー基を介して互いに間接的に、共有結合的に連結される。このようなリンカー基は、リンカーまたは連結実体と呼ばれる場合もある。これは、ホモ機能性剤およびヘテロ機能性剤を含めた、当技術分野で周知である任意の数の安定な二機能性剤を使用することによって達成され得る（このような剤の例については、例えば、Pierce Catalog and Handbookを参照）。二機能性リンカーの使用は、活性化剤の使用と、前者が得られるコンジュゲート（作用物質）中に存在する連結部分をもたらし、一方、後者が反応に関与する2つの部分間の直接的なカップリングをもたらず点で異なる。二機能性リンカーの役割は、このリンカーがなければ不活性な2つの部分間で反応させることであり得る。代替としてまたは追加的に、反応生成物の一部となる二機能性リンカーは、これが抗fPSA抗体にある程度の立体構造的な柔軟性を付与するように選択することができる（例えば、二機能性リンカーは、いくつかの原子を含有するまっすぐなアルキル鎖、例えば、2~10の間の炭素原子を含有するまっすぐなアルキル鎖を含む）。代替としてまたは追加的に、二機能性リンカーは、提供される抗体と治療剤との間に形成される連結が、切断可能である、例えば、加水分解性であるように選択することができる（このようなリンカーの例については、例えば、そのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第5,773,001号、同第5,739,116号、および同第5,877,296号を参照）。このようなリンカーは、例えば、ターゲッティング剤（例えば、提供されるfPSA特異的抗体）などのある特定の実体および/または治療用実体のより高い活性が、コンジュゲートの加水分解後に観察される場合、使用することができる。実体が多機能性剤から切断され得る例示的な機構としては、リソソーム（ヒドラゾン、アセタール、およびcis-アコニテート様アミド）の酸性pH中での加水分解、リソソーム酵素（

10

20

30

40

50

カテプシン (c a p t h e p s i n s) および他のリソソーム酵素) によるペプチド切断、およびジスルフィドの還元がある。このような実体が多機能性剤から切断される別の機構には、細胞外または細胞内での生理的 pH での加水分解が含まれる。この機構は、1 つの実体を別の実体にカップリングするのに使用される架橋剤が、ポリデキストランなどの生分解性 / 生体内分解性コンポーネントであるとき当てはまる。

【 0 1 1 9 】

例えば、ヒドラゾン含有多機能性剤は、所望の放出特性をもたらすカルボニル基を導入して作製することができる。多機能性剤は、一端にジスルフィド基および他端にヒドラジン誘導体を有するアルキル鎖を含むリンカーを用いて作製することもできる。ヒドラゾン以外の官能基を含有するリンカーも、リソソーム酸性環境中で切断される潜在性を有する。例えば、多機能性剤は、細胞内で切断可能なヒドラゾン以外の基、例えば、エステル、アミド、およびアセタール / ケタールなどを含有するチオール反応性リンカーから作製することができる。

10

【 0 1 2 0 】

pH 感受性リンカーのクラスの別の例は、アミド基に並置されたカルボン酸基を有するシス - アコニテートである。カルボン酸は、酸性リソソーム中でアミド加水分解を加速する。いくつかの他のタイプの構造で同様のタイプの加水分解速度加速を実現するリンカーも使用することができる。

【 0 1 2 1 】

抗 f P S A 抗体のコンジュゲートに対する別の潜在的な放出法は、リソソーム酵素によるペプチドの酵素加水分解である。一例では、提供される抗体がアミド結合を介してパラ - アミノベンジルアルコールにアタッチされ、次いでベンジルアルコールと治療剤との間でカルバメートまたはカーボネートが作製される。ペプチドが切断されると、アミノベンジルカルバメートまたはカーボネートが崩壊し、治療剤が放出される。別の例では、カルバメートの代わりにリンカーの崩壊によってフェノールを切断することができる。別のバリエーションでは、パラ - メルカプトベンジルカルバメートまたはカーボネートの崩壊を開始するために、ジスルフィド還元が使用される。

20

【 0 1 2 2 】

本明細書に提供される多機能性剤の連結実体として使用することができる有用なリンカーとしては、限定することなく、ポリエチレングリコール、エチレングリコールのコポリマー、ポリプロピレングリコール、プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリ - 1, 3 - ジオキソラン、ポリ - 1, 3, 6 - トリオキサン、エチレン / 無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸、デキストラン n - ビニルピロリドン、ポリ n - ビニルピロリドン、プロピレングリコールホモポリマー、プロピレンオキシドポリマー、エチレンオキシドポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール、直鎖状または分枝状グリコシル化鎖、ポリアセタール、長鎖脂肪酸、長鎖疎水性脂肪族基がある。

30

【 0 1 2 3 】

本発明のいくつかの実施形態は、少なくとも 1 つの非共有結合的に会合した実体を含む多機能性剤を利用する。非共有結合性相互作用の例としては、それだけに限らないが、疎水性相互作用、静電相互作用、双極子相互作用、ファンデルワールス相互作用、および水素結合がある。結合、相互作用、またはカップリングの性質に関係なく、第 1 実体と第 2 実体との間の会合は、いくつかの実施形態では、選択的、特異的で、十分強く、その結果、作用物質内に含有される第 2 実体は、標的への、かつ標的の内への輸送 / 送達の前または間に第 1 実体から解離しない。したがって、多機能性剤の複数の実体の中の会合は、当業者に公知の任意の化学的、生化学的、酵素的、または遺伝的カップリングを使用して実現することができる。

40

治療用コンジュゲート

【 0 1 2 4 】

本明細書に記載するように、抗 f P S A 抗体は、前立腺がんに関する治療的有用性を有

50

する多機能性剤の一部を含むことができる。本開示の脈絡における治療的有用性の例としては、限定することなく、ターゲティングに関連した有用性（例えば、f P S A 特異的モノクローナル抗体）、治療効果（例えば、細胞傷害効果、および/または細胞静止作用、抗増殖作用、抗血管新生効果、症状の低減など）に関連した有用性、ならびに診断、検出、または標識に関連する有用性などがある。

【0125】

ターゲティング用実体は、対象とする標的と特異的に相互作用することによって作用部位に影響し、もしくは作用部位をコントロールし、または対象とする標的に対する親和性を有する作用物質内に含有され得る分子構造体である。一例として、標的は、細胞表面、例えば、ある特定の細胞型、組織などに存在する分子または分子複合体であり得る。本発明のいくつかの実施形態では、標的は、腫瘍結合または腫瘍内 f P S A であり、ターゲティング用実体は、抗 f P S A 抗体である。本明細書に開示の抗 f P S A ターゲティング用実体は、非複合体化 P S A 内でのみ利用可能なエピトープに対するこれらの親和性によって、f P S A と特異的または優先的に相互作用することができる。治療剤などの作用物質のためにターゲティング部分を使用することは、当技術分野で公知である。本願の脈絡では、原発性または転移性前立腺がん細胞が標的である。すなわち、分子レベルで、標的は、これが、接触すると特異的または優先的に抗 f P S A 抗体に結合することができるような、前立腺 (prostate) が細胞上に存在する（例えば、優先的に発現される）分子または細胞構成要素である。本発明の抗 f P S A 抗体は、これらの標的（例えば、前立腺がん細胞の f P S A ）に対して特異性を発揮し、標的に局在化および結合することができる。いくつかの実施形態では、抗 f P S A 抗体ターゲティング用実体は、前立腺がん細胞に局在化し、ある時間にわたってこれらの会合を保持する。いくつかの実施形態では、f P S A 標的は、腫瘍内および/または内在性膜タンパク質である。

【0126】

いくつかの実施形態では、抗 f P S A 抗体は、1種または複数の抗がん剤にコンジュゲートした f P S A 特異的抗体またはその抗原結合断片から本質的な f P S A ターゲティング用実体を含む多機能性剤である。したがって、このような実施形態では、多機能性剤は、抗体コンジュゲートである。前立腺がんの診断または評価、その処置、およびその薬剤の製造に使用することができる抗 f P S A 抗体の有用なコンジュゲートの限定されない実施形態を以下に示す。

【0127】

いくつかの実施形態では、抗 f P S A 抗体は、治療（例えば、抗がん）剤として有用である核酸分子にコンジュゲートされている。様々な化学型および構造形態の核酸が、このような戦略に適していることができる。これらとしては、非限定例によって、一本鎖 (ssDNA) および二本鎖 (dsDNA) を含めた DNA ; それだけに限らないが、ssRNA、dsRNA、tRNA、mRNA、rRNA、酵素的 RNA を含めた RNA ; RNA : DNA ハイブリッド、三本鎖 DNA（例えば、短いオリゴヌクレオチドと会合した dsDNA）などがある。

【0128】

いくつかの実施形態では、核酸剤は、約 5 ~ 2000 ヌクレオチドの間の長さである。いくつかの実施形態では、核酸剤は、少なくとも約 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、またはそれ以上のヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、核酸剤は、約 2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、900、800、700、600、500、450、400、350、300、250、200、150、100、50、45、40、35、30、25、20 未満、またはそれ以下のヌクレオチドの長さである。

【0129】

いくつかの実施形態では、核酸剤は、転写を制御するプロモーターおよび／または他の配列を含む。このような実施形態は、例えば、アンドロゲン応答エレメント（例えば、P S A アンドロゲン応答エレメント A G C A C T T G C T G T T C T（配列番号 1））に対応し、それによって活性化 A R に結合するデコイとして機能し得る、ヌクレオチド配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、核酸剤は、複製起点および／または複製を制御する他の配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸剤は、プロモーターおよび／または複製起点を含まない。

【 0 1 3 0 】

本発明の実践において使用するのに適した核酸抗がん剤は、腫瘍形成および細胞増殖または細胞形質転換に関連した遺伝子（例えば、細胞分裂を刺激するタンパク質をコードするプロトオンコジーン）、血管新生遺伝子／抗血管新生遺伝子、腫瘍抑制遺伝子（細胞分裂を抑制するタンパク質をコードする）、腫瘍増殖および／または腫瘍遊走に関連したタンパク質をコードする遺伝子、ならびに自殺遺伝子（アポトーシスまたは他の形態の細胞死を誘導する）、特に、急速に分裂する細胞内で最も活性である自殺遺伝子を標的にする作用物質を含む。

【 0 1 3 1 】

腫瘍形成および／または細胞形質転換に関連した遺伝子の例としては、アンドロゲン受容体遺伝子、M L L 融合遺伝子、B C R - A B L、T E L - A M L 1、E W S - F L I 1、T L S - F U S、P A X 3 - F K H R、B c 1 - 2、A M L 1 - E T O、A M L 1 - M T G 8、R a s、F o s P D G F、R E T、A P C、N F - 1、R b、p 5 3、M D M 2 など；多剤耐性遺伝子などの過剰発現遺伝子；サイクリン；β - カテニン；テロメラーゼ遺伝子；c - m y c、n - m y c、B c 1 - 2、E r b - B 1、および E r b - B 2；ならびに突然変異遺伝子、例えば、R a s、M o s、R a f、および M e t などがある。腫瘍抑制遺伝子の例としては、それだけに限らないが、p 5 3、p 2 1、R B 1、W T 1、N F 1、V H L、A P C、D A P キナーゼ、p 1 6、A R F、ニューロフィブロミン、および P T E N がある。抗がん治療で有用な核酸剤によって標的にされ得る遺伝子の例としては、腫瘍遊走に関連したタンパク質をコードする遺伝子、例えば、インテグリン、セレクチン、およびメタロプロテイナーゼなど；新しい血管の形成を促進するタンパク質をコードする抗血管新生遺伝子、例えば、血管内皮増殖因子（V E G F）または V E G F r など；血管新生を阻害するタンパク質をコードする抗血管新生遺伝子、例えば、エンドスタチン、アンギオスタチン、および V E G F - R 2 など；ならびにタンパク質、例えば、インターロイキン、インターフェロン、線維芽細胞増殖因子（α - F G F および（β - F G F）、インスリン様成長因子（例えば、I G F - 1 および I G F - 2）、血小板由来成長因子（P D G F）、腫瘍壊死因子（T N F）、トランスフォーミング増殖因子（例えば、T G F - α および T G F - β）、上皮増殖因子（E G F）、ケラチノサイト成長因子（K G F）、幹細胞因子およびその受容体 c - K i t（S C F / c - K i t）リガンド、C D 4 0 L / C D 4 0、V L A - 4 / V C A M - 1、I C A M - 1 / L F A - 1、ヒアルリン（h y a l u r i n）/ C D 4 4などをコードする遺伝子などがある。

【 0 1 3 2 】

抗 f P S A 抗体とのコンジュゲーションに適した核酸剤としては、例えば、抗がん剤または他の治療剤、プローブ、プライマーなどとしての使用を含めた、様々な使用のいずれも有することができる。核酸剤は、酵素活性（例えば、リボザイム活性）、遺伝子発現阻害活性（例えば、アンチセンス剤もしくは s i R N A 剤などとして）、および／または他の活性を有することができる。核酸剤は、それ自体活性であり得、または活性核酸剤を送達する（例えば、送達される核酸の複製および／または転写によって）ベクターであり得る。本明細書の目的に関して、このようなベクター核酸は、これらが治療活性剤をコードし、または他の方法で送達する場合、これらがそれ自体治療活性を有していなくても、「治療剤」とみなされる。

【 0 1 3 3 】

ある特定の実施形態では、抗 f P S A 抗体のコンジュゲートは、アンチセンス化合物を

10

20

30

40

50

含み、またはコードする核酸治療剤を含む。用語「アンチセンス化合物またはアンチセンス剤」、「アンチセンスオリゴマー」、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」、および「アンチセンスオリゴヌクレオチド類似体」は、互換的に本明細書で使用され、アンチセンス化合物をワトソン-クリック塩基対合によってRNA内の標的配列にハイブリダイズさせて、標的配列内でRNAオリゴマーヘテロ二本鎖を形成する、ヌクレオチド塩基およびサブユニット間バックボーン(subunit-to-subunit backbone)の配列を指す。オリゴマーは、標的配列内で正確な配列相補性、または近い相補性を有する場合がある。このようなアンチセンスオリゴマーは、標的配列を含有するmRNAの翻訳を遮断もしくは阻害し、または遺伝子転写を阻害することができる。アンチセンスオリゴマーは、二本鎖または一本鎖配列に結合することができる。

10

【0134】

本発明の実践で使用するのに適したアンチセンスオリゴヌクレオチドの例としては、例えば、以下の総説で述べられているものがある：R. A. Stahelら、Lung Cancer、2003年、41巻：S81～S88頁；K. F. Piroллоら、Pharmacol. Ther.、2003年、99巻：55～77頁；A. C. StephensおよびR. P. Rivers、Curr. Opin. Mol. Ther.、2003年、5巻：118～122頁；N. M. DeanおよびC. F. Bennett、Oncogene、2003年、22巻：9087～9096頁；N. Schiavoneら、Curr. Pharm. Des.、2004年、10巻：769～784頁；L. Vidalら、Eur. J. Cancer、2005年、41巻：2812～2818頁；T. Aboul-Fadl、Curr. Med. Chem.、2005年、12巻：2193～2214頁；M. E. GleaveおよびB. P. Monia、Nat. Rev. Cancer、2005年、5巻：468～479頁；Y. S. Cho-Chung、Curr. Pharm. Des.、2005年、11巻：2811～2823頁；E. Rayburnら、Lett. Drug Design & Discov.、2005年、2巻：1～18頁；E. R. Rayburnら、Expert Opin. Emerg. Drugs、2006年、11巻：337～352頁；I. TammおよびM. Wagner、Mol. Biotechnol.、2006年、33巻：221～238頁（これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている）。

20

30

【0135】

適当なアンチセンスオリゴヌクレオチドの例としては、EZ N-4176、AR mRNAを下方制御する核酸ベースアンチセンスオリゴヌクレオチド(Zhang, Y.ら、Mol. Cancer Therapeutics、2011年、10巻：2309頁)；LNCaP前立腺(prostate)腫瘍細胞の細胞増殖を阻害するARオリゴデオキシヌクレオチド(Eder, I. E.ら、Nature、2000年、7巻(7号)：997～1008頁)；およびオブリメルセンナトリウム(G31239としても公知、Genta, Inc.、Berkeley Heights, NJによって開発された)、bc1-2 mRNAの開始コドン領域を標的にしたホスホロチオエートオリゴマーがある。Bc1-2は、アポトーシスの強力な阻害剤であり、濾胞性リンパ腫、乳がん、大腸がん、前立腺がん、および中悪性度/高悪性度リンパ腫を含めた多くのがんで過剰発現される(C. A. Steinら、Semin. Oncol.、2005年、32巻：563～573頁；S. R. Frankel、Semin. Oncol.、2003年、30巻：300～304頁)。他の適当なアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、cAMP依存プロテインキナーゼA(PKA)に向けられた混合バックボーンオリゴヌクレオチドであるGEM-231(HYB0165、Hybridon, Inc.、Cambridge, MA)(S. Goelら、Clin. Cancer Res.、2003年、9巻：4069～4076頁)；アフィニタク(ISIS 3521またはアブリノカルセン、ISIS pharmaceuticals, Inc.、Carlsbad, CA)、PKCアルファのアンチセンス阻害剤；OGX-011(ISIS 1

40

50

12989、Isis Pharmaceuticals, Inc.)、クラステリンに対する2'-メトキシエチル修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド、細胞周期、組織リモデリング、脂質輸送、および細胞死の制御に関係づけられ、乳房、前立腺、および大腸のがん内で過剰発現される糖タンパク質；ISIS5132 (Isis 112989、Isis Pharmaceuticals, Inc.)、c-raf-1 mRNAの3'-非翻訳(untranslated)領域の配列に相補的なホスホロチオエートオリゴヌクレオチド(S. P. Henryら、Anticancer Drug Des.、1997年、12巻：409~420頁；B. P. Moniaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1996年、93巻：15481~15484頁；C. M. Rudinら、Clin. Cancer Res.、2001年、7巻：1214~1220頁)；ISIS2503 (Isis Pharmaceuticals, Inc.)、ヒトH-ras mRNA発現のホスホロチオエートオリゴヌクレオチドアンチセンス阻害剤(J. Kurreck、Eur. J. Biochem.、2003年、270巻：1628~1644頁)；GEM640 (AEG35156、Aegera Therapeutics Inc. およびHybridon, Inc.) などのアポトーシス経路の相当な部分を遮断するアポトーシスタンパク質のX連鎖阻害剤(XIAP)を標的にし、またはサバイピンを標的にするオリゴヌクレオチド、ISIS23722 (Isis Pharmaceuticals, Inc.) などのアポトーシスタンパク質の阻害剤(IAP)、2'-O-メトキシエチルキメラオリゴヌクレオチド；DNAメチルトランスフェラーゼを標的にするMG98；ならびにGTI-2040 (Lorus Therapeutics, Inc.、Toronto、カナダ)、ヒトリボヌクレオチド還元酵素のR2小サブユニットコンポーネントのmRNA内のコード領域に相補的な20-merオリゴヌクレオチドがある。

【0136】

他の適当なアンチセンスオリゴヌクレオチドには、Her-2/neu、c-Myc、c-Myc、およびc-Rafに対して開発されているアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる(例えば、A. Biroccioら、Oncogene、2003年、22巻：6579~6588頁；Y. Leeら、Cancer Res.、2003年、63巻：2802~2811頁；B. Luら、Cancer Res.、2004年、64巻：2840~2845頁；K. F. Pirolloら、Pharmacol. Ther.、2003年、99巻：55~77頁；およびA. Raitら、Ann. N. Y. Acad. Sci.、2003年、1002巻：78~89頁を参照)。

【0137】

ある特定の実施形態では、抗fPSA抗体のコンジュゲートは、干渉RNA分子を含み、またはコードする核酸抗がん剤を含む。用語「干渉RNA」および「干渉RNA分子」は、互換的に本明細書で使用され、例えば、RNA干渉(RNAi)を媒介することによって、遺伝子発現を阻害もしくは下方制御し、または配列特異的様式で遺伝子をサイレンスすることができるRNA分子を指す。RNA干渉(RNAi)は、相補的な標的一本鎖mRNAの分解および対応する翻訳配列の「サイレンシング」を誘導する二本鎖RNA(dsRNA)によって誘発される、進化的に保存された配列特異的な機構である(McManusおよびSharp、2002年、Nature Rev. Genet.、2002年、3巻：737頁)。RNAiは、より長いdsRNA鎖を、長さが約21~23ヌクレオチドの生物学的に活性な「低分子干渉RNA」(siRNA)配列にする酵素的切断によって機能する(Elbashirら、Genes Dev.、2001年、15巻：188頁)。RNA干渉は、がんの治療の有望な手法として台頭してきている。

【0138】

本発明の実践で使用するのに適した干渉RNAは、任意のいくつかの形態で提供することができる。例えば、干渉RNAは、単離低分子干渉RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、またはショートヘアピンRNA(shRNA)の1種または複数として提供することができる。

【0139】

本発明で使用するのに適した干渉RNA分子の例としては、例えば、以下の総説で引用されたiRNAがある：O. Milhavetら、Pharmacol. Rev.、2003年、55巻：629～648頁；F. Bira、Curr. Gene Ther.、2003年、3巻：411～417頁；P.Y. Luら、Curr. Opin. Mol. Ther.、2003年、5巻：225～234頁；I. Friedrichら、Semin. Cancer Biol.、2004年、14巻：223～230頁；M. Izquierdo、Cancer Gene Ther.、2005年、12巻：217～227頁；P.Y. Luら、Adv. Genet.、2005年、54巻：117～142頁；G.R. Devi、Cancer Gene Ther.、2006年、13巻：819～829頁；M.A. Behlke、Mol. Ther.、2006年、13巻：644～670頁；およびL.N. Putralら、Drug News Perspect.、2006年、19巻：317～324頁（これらのそれぞれの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている）。

10

【0140】

適当な干渉RNA分子の他の例としては、それだけに限らないが、p53干渉RNA（例えば、T.R. Brummelkampら、Science、2002年、296巻：550～553頁；M.T. Hemmanら、Nat. Genet.、2003年、33巻：396～400頁）；オンコジーンを標的にする干渉RNA、例えば、Raf-1（T.F. Louら、Oligonucleotides、2003年、13巻：313～324頁）、K-Ras（T.R. Brummelkampら、Cancer Cell、2002年、2巻：243～247頁）、およびerbB-2（G. Yangら、J. Biol. Chem.、2004年、279巻：4339～4345頁）などがある。

20

【0141】

ある特定の実施形態では、抗fPSA抗体のコンジュゲートは、リボザイムである核酸治療剤を含む。本明細書において、用語「リボザイム」は、標的特異的マーカー（marker）中の他のRNA分子を切断することができる触媒RNA分子を指す。リボザイムは、対象とする遺伝子の任意の望ましくない生成物の発現を下方制御するのに使用することができる。本発明の実践で使用する事ができるリボザイムの例としては、それだけに

30

【0142】

ある特定の実施形態では、抗fPSA抗体のコンジュゲート内の実体または部分は、光線力学的治療（PDT）で使用される光増感剤を含む。PDTでは、患者に光増感剤を局所投与または全身投与した後、処置される組織または臓器内で光増感剤によって吸収される光での照射が続く。光増感剤によって光が吸収されると、細胞に有害な反応種（例えば、ラジカル）が生成される。最大の効力のために、光増感剤は一般に、投与に適した形態であり、正常組織に対してある程度の選択性を多くの場合伴って、標的部位での細胞内在化を容易に起こすことができる形態でもある。

【0143】

光増感剤が結合した抗fPSA抗体のコンジュゲートは、PDTにおける新規送達システムとして使用することができる。光増感剤凝集を低減することに加えて、本発明による光増感剤の送達は、光増感剤の標的組織／臓器に対する特異性の増大、および細胞内在化などの他の利点を呈する。

40

【0144】

本発明で使用するのに適した光増感剤として、PDTにおいて有用な光増感特性を有する様々な合成分子および天然に存在する分子のいずれも挙げられる。ある特定の実施形態では、光増感剤の吸収スペクトルは、可視範囲内、一般に350nm～1200nmの間、好ましくは、400nm～900nmの間、例えば、600nm～900nmの間である。本発明による毒素にカップリングすることができる適当な光増感剤としては、それだ

50

けに限らないが、ポルフィリンおよびポルフィリン誘導体（例えば、クロリン、バクテリオクロリン、イソバクテリオクロリン、フタロシアニン、およびナフタロシアニン）；金属ポルフィリン、金属フタロシアニン、アンゲリシン、カルコゲナビリリウム（*chalcogenapyrillium*）色素、クロロフィル、クマリン、アロキサジンおよびリボフラビンなどのフラビンおよび関連化合物、フラレーン、フェオホルビド、ピロフェオホルビド、シアニン（例えば、メロシアニン540）、フェオフィチン、サフィリン、テキサフィリン、プルプリン、ポルフィセン、フェノチアジニウム、メチレンブルー誘導体、ナフタルイミド、ナイルブルー誘導体、キノン、ペリレンキノン（例えば、ヒペリシン、ヒポクレリン、およびセルコスポリン）、ソラレン、キノン、レチノイド、ローダミン、チオフェン、ベルジン、キサンテン色素（例えば、エオシン、エリトロシン、ローズベンガル）、ポルフィリンの二量体形態およびオリゴマー形態、ならびに5-アミノレブリン酸などのプロドラッグ（*R. W. Redmond*および*J. N. Gamlin, Photochem. Photobiol.*、1999年、70巻：391～475頁）がある。

【0145】

本発明で使用するのに適した例示的な光増感剤としては、米国特許第5,171,741号、同第5,171,749号、同第5,173,504号、同第5,308,608号、同第5,405,957号、同第5,512,675号、同第5,726,304号、同第5,831,088号、同第5,929,105号、および同第5,880,145号に記載されたものがある（これらのそれぞれの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている）。

【0146】

ある特定の実施形態では、抗fPSA特異的抗体のコンジュゲートは、放射線増感剤を含む。本明細書において、用語「放射線増感剤」は、腫瘍細胞を放射線療法により感受性にする分子、化合物、または作用物質を指す。放射線療法を受けている患者に放射線増感剤を投与すると、一般に、放射線療法の効果が増強される。ターゲッティング用実体（例えば、腫瘍内fPSAを標的にすることができる抗fPSA抗体）に放射線増感剤をカップリングすることの利点は、放射線増感剤（*radiosensitize*）が、標的細胞にのみ影響することである。使用の容易さのために、放射線増感剤はまた、これが全身投与されても、標的細胞を見つけることができるべきである。しかし、現在利用可能な放射線増感剤は一般に、腫瘍に対して選択的でなく、哺乳動物の体内に拡散によって分布される。本発明のfPSA抗体コンジュゲートは、放射線増感剤に関する新規送達システムとして使用することができる。

【0147】

様々な放射線増感剤が当技術分野で公知である。本発明で使用するのに適した放射線増感剤の例としては、それだけに限らないが、パクリタキセル（*TAXOL*（登録商標））、カルボプラチン、シスプラチン、およびオキサリプラチン（*Amorino*ら、*Radiat. Oncol. Invest.*、1999年、7巻：343～352頁；*Choy, Oncology*、1999年、13巻：22～38頁；*Safran*ら、*Cancer Invest.*、2001年、19巻：1～7頁；*Dionet*ら、*Anticancer Res.*、2002年、22巻：721～725頁；*Cividalli*ら、*Radiat. Oncol. Biol. Phys.*、2002年、52巻：1092～1098頁）；ゲムシタピン（*Gemzar*（登録商標））（*Choy, Oncology*、2000年、14巻：7～14頁；*Mornex*および*Girard, Annals of Oncology*、2006年、17巻：1743～1747頁）；エタニダゾール（*Nitrolmidazole*（登録商標））（*Inanami*ら、*Int. J. Radiat. Biol.*、2002年、78巻：267～274頁）；ミソニダゾール（*Tamulevicius*ら、*Br. J. Radiology*、1981年、54巻：318～324頁；*Palcic*ら、*Radiat. Res.*、1984年、100巻：340～347頁）、チラパザミン（*Masunaga*ら、*Br*

10

20

30

40

50

. J. Radiol., 2006年、79巻:991~998頁; Rischinら、J. Clin. Oncol., 2001年、19巻:535~542頁; Shulmanら、Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1999年、44巻:349~353頁); ならびに核酸ベース誘導体、例えば、5-フルオロデオキシウリジンなどのハロゲン化プリンまたはピリミジン (Buchholzら、Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1995年、32巻:1053~1058頁)がある。

【0148】

ある特定の実施形態では、抗fPSA抗体のコンジュゲートは、放射性同位体を含む。適当な放射性同位体の例としては、任意の α -、 β -、または γ -エミッターがあり、これらは、腫瘍部位に局在化すると、細胞を破壊する (S. E. Order, 「Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy、R. W. Baldwinら (編)、Academic Press、1985年)。このような放射性同位体の例としては、それだけに限らないが、ヨウ素-131 (^{131}I)、ヨウ素-125 (^{125}I)、ビスマス-212 (^{212}Bi)、ビスマス-213 (^{213}Bi)、アスタチン-211 (^{211}At)、レニウム-186 (^{186}Re)、レニウム-188 (^{188}Re)、リン-32 (^{32}P)、イットリウム-90 (^{90}Y)、サマリウム-153 (^{153}Sm)、およびルテチウム-177 (^{177}Lu)がある。

【0149】

ある特定の実施形態では、抗fPSA抗体のコンジュゲートは、スーパー抗原またはその生物学的活性部分を含む。スーパー抗原は、T細胞集団の大部分を活性化することにおいて極めて効率的である細菌タンパク質およびウイルスタンパク質の群を構成する。スーパー抗原は、処理されることなく主要組織適合複合体 (MHC) に直接結合する。実際に、スーパー抗原は、MHCクラスII分子上の抗原結合溝の未処理の外側に結合し、それによって、慣例的なペプチド結合部位中の多型のほとんどを回避する。

【0150】

スーパー抗原ベース腫瘍治療手法は、固形腫瘍を処置するために開発されている。この手法では、ターゲッティング部分 (例えば、抗fPSA抗体またはその抗原結合断片) は、スーパー抗原にコンジュゲートされ、標的化スーパー抗原をもたらす。抗体または抗体断片が腫瘍関連抗原を認識する場合、細胞に結合した標的化スーパー抗原は、スーパー抗原依存細胞媒介性細胞傷害によって、スーパー抗原活性化細胞傷害性T細胞を誘発して腫瘍細胞を直接殺すことができる (例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれている、Sogaardら、(1996年)「Antibody-targeted superantigens in cancer immunotherapy」、Immunotechnology、2巻(3号):151~162頁を参照)。

【0151】

本発明の実施形態で使用するためのスーパー抗原の例としては、野生型ブドウ球菌エンテロトキシンA (SEA) (それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれているGiantonioら、J. Clin. Oncol., 1997年、15巻:1994~2007頁; Alpaughら、Clin. Cancer Res., 1998年、4巻:1903~1914頁; Chengら、J. Clin. Oncol., 2004年、22巻:602~609頁); エンテロトキシン遺伝子クラスター (egc) のブドウ球菌スーパー抗原 (その内容全体が参照により本明細書に組み込まれている、Termanら、Clin. Chest Med., 2006年、27巻:321~324頁)、およびブドウ球菌エンテロトキシンB (SEB) (その内容全体が参照により本明細書に組み込まれている、Peraboら、Int. J. Cancer, 2005

年、115巻：591～598頁）との融合タンパク質がある。スーパー抗原、またはその生物学的活性部分は、抗fPSA抗体に結合して、抗体およびスーパー抗原を含むコンジュゲートを形成することができる。本発明で使用するのに適したスーパー抗原の追加の例としては、それだけに限らないが、ブドウ球菌エンテロトキシンE（SEE）、*Streptococcus pyogenes* 外毒素（SPE）、*Staphylococcus aureus* 毒素性ショック症候群毒素（TSST-1）、連鎖球菌分裂促進性外毒素（SME）、および連鎖球菌スーパー抗原（SSA）がある。

【0152】

ある特定の実施形態では、抗fPSA抗体のコンジュゲートは、指向性酵素プロドラッグ治療で使用する事ができる。指向性酵素プロドラッグ治療手法では、指向性／標的化酵素およびプロドラッグが被験体に投与され、標的化酵素が被験体の体の部分に特異的に局在化され、そこでこれがプロドラッグを活性薬剤に変換する。プロドラッグは、1ステップで（標的化酵素によって）、または1つを超えるステップで活性薬剤に変換され得る。例えば、プロドラッグは、標的化酵素によって活性薬剤の前駆体に変換され得る。次いで、前駆体は、例えば、被験体に投与される1種もしくは複数の追加の標的化酵素、1種もしくは複数の非標的化酵素、被験体内に、もしくは被験体内の標的部位に天然に存在する1種もしくは複数の酵素（例えば、プロテアーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、もしくはポリメラーゼ）の酵素活性によって、被験体に投与される作用物質によって、かつ／または酵素的に触媒されない化学過程（例えば、酸化、加水分解、異性化、エピマー化など）によって活性薬剤に変換され得る。

【0153】

本発明のいくつかの実施形態は、抗体-指向性酵素プロドラッグ治療（ADEPT）を利用し、ここで抗fPSA抗体（antibody）は、酵素に連結され、被験体に注射され、酵素の腫瘍結合または転移性（metastatic）fPSAへの選択的結合をもたらす。上記に論じたように、本明細書に開示の抗fPSA抗体（例えば、5A10）は、腫瘍内fPSAと血清PSAとを十分に判別することができる。引き続いて、プロドラッグが被験体に投与される。プロドラッグは、前立腺がん細胞内または近傍のみで、酵素によってその活性体に変換される。選択性は、抗fPSA抗体の特異性によって、かつ前立腺がんの酵素レベルと正常組織の酵素レベルとの間に大きな差があるまでプロドラッグ投与を遅延させることによって実現される。前立腺がん細胞は、プロドラッグ活性化酵素をコードする遺伝子で標的化することもできる。この手法は、ウイルス-指向性酵素プロドラッグ治療（VDEPT）、またはより一般に、GDEPT（遺伝子-指向性酵素プロドラッグ治療）と呼ばれており、研究室システムにおいて良好な結果を示している。指向性酵素プロドラッグ治療の他のバージョンとしては、PDEPT（ポリマー-指向性酵素プロドラッグ治療）、LEAPT（レクチン指向性酵素活性化プロドラッグ治療）、およびCDEPT（クロストリジウム指向性酵素プロドラッグ治療）がある。

【0154】

本発明で使用するのに適した酵素／プロドラッグ／活性薬剤の組合せの非限定例は、例えば、Bagshawら、*Current Opinions in Immunology*、1999年、11巻：579～583頁；Wilman、「*Prodrugs in Cancer Therapy*」、*Biochemical Society Transactions*、14巻：375～382頁、615th Meeting、Belfast、1986年；Stellaら、「*Prodrugs: A Chemical Approach To Targeted Drug Delivery*」, in「*Directed Drug Delivery*」、Borchardtら（編）、247～267頁（Humana Press、1985年）に記載されている。酵素／プロドラッグ／活性抗がん剤の組合せの非限定例は、例えば、Rooseboomら、*Pharmacol. Reviews*、2004年、56巻：53～102頁に記載されている。

【0155】

プロドラッグ活性化酵素の例としては、それだけに限らないが、ニトロ還元酵素、チトクロム P 4 5 0、プリン - スクレオシドホスホリラーゼ、チミジンキナーゼ、アルカリホスファターゼ、 β - グルクロニダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ペニシリンアミダーゼ、 β - ラクターゼ、シトシンデアミナーゼ、およびメチオニン γ - リアーゼがある。

【 0 1 5 6 】

プロドラッグ活性化酵素によるプロドラッグの活性化によって *in vivo* で形成され得る抗がん剤の例としては、それだけに限らないが、5 - (アジリジン - 1 - イル) - 4 - ヒドロキシル - アミノ - 2 - ニトロ - ベンズアミド、イソホスホルアミドマスタード、ホスホルアミドマスタード、2 - フルオロアデニン、6 - メチルプリン、ガンシクロビル - ミリン酸スクレオチド、エトポシド、マイトマイシン C、p - [N , N - ビス (2 - クロロエチル) アミノ] フェノール (P O M)、ドキシソルピシン、オキサゾリジノン、9 - アミノカンプトテシン、マスタード、メトトレキセート、安息香酸マスタード、アドリアマイシン、ダウノマイシン、カルミノマイシン、ブレオマイシン、エスペラマイシン、メルファラン、パリトキシシン、4 - デスアセチルピンブラスチン - 3 - カルボン酸ヒドラジド、フェニレンジアミンマスタード、4 ' - カルボキシフタラト (1 , 2 - シクロヘキサン - ジアミン) 白金、タキソール、5 - フルオロウラシル、メチルセレノール、および二フッ化カルボノチオン酸 (*carbonothionic difluoride*) がある。

【 0 1 5 7 】

ある特定の実施形態では、治療 (例えば、抗がん) 剤は、1 種または複数の抗 f P S A 抗体および抗脈管形成剤のコンジュゲートを含む。本発明で使用するのに適した抗脈管形成剤は、血管新生のプロセス、または既存の血管から発達することによって新しい血管が形成するプロセスを遮断、阻害、減速、または低減する任意の分子、化合物、または因子を含む。このような分子、化合物、または因子は、(1) 元の血管の膜の溶解、(2) 内皮細胞の移動および増殖、ならびに (3) 移動細胞による新しい血管系の形成のステップを含めた (それだけに限らないが)、血管新生に関与するステップのいずれかを遮断、阻害、減速、または低減することによって血管新生を遮断することができる。

【 0 1 5 8 】

抗脈管形成剤の例としては、それだけに限らないが、ベバシズマブ (A V A S T I N (登録商標))、セレコキシブ (C E L E B R E X (登録商標))、エンドスタチン、サリドマイド、E M D 1 2 1 9 7 4 (シレンギチド)、T N P - 4 7 0、スクアラミン、コンプレタスタチン A 4、インターフェロン - α 、抗 V E G F 抗体、S U 5 4 1 6、S U 6 6 6 8、P T K 7 8 7 / 2 K 2 2 5 8 4、マリミスタール (M a r i m i s t a l)、A G 3 3 4 0、C O L - 3、ネオバスタット、および B M S - 2 7 5 2 9 1 がある。

【 0 1 5 9 】

いくつかの実施形態では、治療剤は、1 種または複数の抗 f P S A 抗体、およびアンドロゲン受容体 (「A R」) アンタゴニストなどの抗アンドロゲン治療薬のコンジュゲートを含む。本発明のこれらの実施形態および他の実施形態で使用するための A R アンタゴニストとしては、小分子アンタゴニスト (例えば、R U 5 8 6 4 2、L G 1 2 0 9 0 7、L G 1 0 5、R D 1 6 2、M D V 3 1 0 0、B M S - 6 4 1 9 8 8、C H 5 1 3 7 2 9 1、アタル酸、N - ブチルベンゼンスルホンアミド)、ステロイド化合物 (例えば、酢酸シプロテロン)、非ステロイド化合物 (例えば、ヒドロキシフルタミド、ピカルタミド、ニルタミド)、およびペプチドアンタゴニストがある。本発明の実施形態で使用するための他の抗アンドロゲン治療薬には、T A K 7 0 0、A R N - 5 0 9、カボザンチミブ、イピリムマブ、クスチルセン、B P X - 1 0 1、アルファラディン、デノスマブ、および P r o t s v a c - V F が含まれる。

【 0 1 6 0 】

本発明の特定の実施形態で使用するための追加の前立腺がん治療剤 (*a g e n s t*) としては、塩化ラジウム - 2 2 3、カボザンチニブ、抗 O X 4 0 抗体、およびピカルタミド (カソデックス) がある。

投与

【0161】

本発明の f P S A モノクローナル抗体および/または抗体ポリペプチド、ならびに本発明の医薬組成物は、任意の適切な経路およびレジメンによって投与することができる。いくつかの実施形態では、経路またはレジメンは、正の治療上の利益に相関しているものである。

【0162】

いくつかの実施形態では、投与される正確な量は、医術において周知の1つまたは複数の要因に応じて、被験体によって変化し得る。このような要因として、例えば、被験体の種、年齢、一般的な容態、投与される特定の組成物、その投与モード、活性のそのモード、前立腺がんの重症度；使用される具体的な f P S A 抗体の活性；投与される具体的な医薬組成物；投与後の組成物の半減期；被験体の年齢、体重、全体的な健康、性別、および食餌；使用される具体的な化合物の投与の時間、投与経路、および排泄率；処置の継続時間；使用される具体的な化合物と組み合わせ、または同時に使用される薬剤などの1つまたは複数を挙げることができる。医薬組成物は、投与の容易さ、および投与量の均一性のために単位剤形 (dosage unit form) で製剤化することができる。しかし、本発明の組成物の総一日使用量は、適切な医学的判断の範囲内で主治医によって決定されることになることが理解されるであろう。

【0163】

本発明の組成物は、当業者が察することになるように、任意の経路によって投与することができる。いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、経口 (P O)、静脈内 (I V)、筋肉内 (I M)、動脈内、髄内、クモ膜下、皮下 (S Q)、脳室内、経皮、皮膚間 (interdermal)、皮内、直腸 (P R)、膣、腹腔内 (I P)、胃内 (I G)、局部的な (例えば、粉末、軟膏、クリーム、ゲル、ローション剤、および/もしくは滴剤による)、粘膜、鼻腔内、頬側、経腸、硝子体、舌下によって；気管内点滴注入、気管支点滴注入、および/もしくは吸入によって；経口スプレー、経鼻スプレー、および/もしくはエアロゾルとして、かつ/または門脈カテーテルによって投与される。

【0164】

具体的な実施形態では、本発明による f P S A 抗体および/またはこれらの医薬組成物は、静脈内に、例えば、静脈内注入によって投与することができる。具体的な実施形態では、本発明による f P S A 抗体および/またはこれらの医薬組成物は、筋肉内注射によって投与することができる。具体的な実施形態では、本発明による f P S A 抗体および/またはこれらの医薬組成物は、前立腺内 (intraprostate) 注射によって投与することができる。具体的な実施形態では、本発明による f P S A 抗体および/またはこれらの医薬組成物は、皮下注射によって投与することができる。具体的な実施形態では、本発明による f P S A 抗体および/またはこれらの医薬組成物は、門脈カテーテルを介して投与することができる。しかし、本発明は、薬物送達の科学の可能性のある進歩を考慮した任意の適切な経路による、本発明による f P S A 抗体および/またはこれらの医薬組成物の送達を包含する。

【0165】

ある特定の実施形態では、本発明による f P S A 抗体および/またはこれらの医薬組成物は、所望の治療効果を得るために、1日当たり、被験体の体重 1 k g 当たり、約 0 . 0 0 1 m g ~ 約 1 0 0 m g、約 0 . 0 1 m g ~ 約 5 0 m g、約 0 . 1 m g ~ 約 4 0 m g、約 0 . 5 m g ~ 約 3 0 m g、約 0 . 0 1 m g ~ 約 1 0 m g、約 0 . 1 m g ~ 約 1 0 m g、または約 1 m g ~ 約 2 5 m g 送達するのに十分な投与量レベルで投与することができる。所望の投与量は、1日3回超、1日3回、1日2回、1日1回、1日おき、3日毎、1週間毎、2週間毎、3週間毎、4週間毎、2カ月毎、6カ月毎、または12カ月毎に送達することができる。ある特定の実施形態では、所望の投与量は、複数の投与 (例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、13回、14回、またはそれ以上の投与) を使用して送達することができる。

予防的用途

【0166】

いくつかの実施形態では、本発明による f P S A 抗体は、予防的用途に利用することができる。いくつかの実施形態では、予防的用途は、前立腺がん、および/または前立腺がん感受性であり、かつ/もしくはその症状を示す個体における任意の他の f P S A 関連容態の防止、これらの進行の阻害、および/またはこれらの開始の遅延のためのシステムおよび方法を伴う。

併用療法

【0167】

本発明による f P S A 抗体およびこれらの治療的に活性なコンジュゲート、ならびに/またはこれらの医薬組成物は、併用療法で使用して診断ならびに/または処置を支援することができることが察されるであろう。「併用で」は、作用物質が、同時に投与され、かつ/または一緒に送達用に製剤化されなければならないことを暗示するように意図されていないが、これらの送達方法は、本発明の範囲内である。組成物は、1種または複数の他の所望の治療剤または医療と同時に、これらの前またはこれらに引き続いて投与することができる。併用で利用される治療活性剤は、単一の組成物中で一緒に投与しても、異なる組成物中で別個に投与してもよいことが察されるであろう。一般に、各作用物質は、その作用物質について決定された用量および/または時間スケジュールで投与されることになる。

【0168】

特定の実施形態では、本明細書に開示の f P S A 特異的抗体は、抗がん剤または抗アンドロゲン治療の前に、後に、またはこれらと併せて投与される。抗アンドロゲン治療としては、手術（例えば、去勢）、化学療法、放射線療法、およびアンドロゲン受容体（「AR」）アンタゴニストがある。本発明のこれらの実施形態および他の実施形態で使用するための AR アンタゴニストとしては、小分子アンタゴニスト（例えば、RU58642、LG120907、LG105、RD162、MDV3100、BMS-641988、CH5137291、アタル酸、N-ブチルベンゼンスルホンアミド）、ステロイド化合物（例えば、酢酸シプロテロン）、非ステロイド化合物（例えば、ヒドロキシフルタミド、ピカルタミド、ニルタミド）、およびペプチドアンタゴニストがある。本発明の実施形態で使用するための他の抗アンドロゲン治療には、TAK700、ARN-509（アピラテロン）、カボザンチミブ、イピリムマブ、クスチルセン、BPX-101、アルファラディン、デノスマブ、および Protovac-VF が含まれる。本発明の特定の実施形態で使用するための追加の前立腺がん治療剤としては、塩化ラジウム-223、カボザンチニブ、抗 OX40 抗体、およびピカルタミド（カソデックス）がある。

【0169】

併用レジメンで使用するための治療（例えば、治療剤または手順）の特定の組合せは、所望の治療剤および/または手順の適合性、ならびに実現されるべき所望の治療効果を考慮することになる。本明細書に開示の抗 f P S A 抗体の医薬組成物は、併用療法（例えば、併用化学療法の治療）で使用することができ、すなわち、医薬組成物を、1種または複数の他の所望の治療剤および/または化学療法手順と同時に、これらの前に、またはこれらに引き続いて投与することができることも察されるであろう。

【0170】

抗 f P S A 抗体、またはこれらの薬学的に許容される組成物は、原発性または転移性前立腺がんを処置するために化学療法剤と併用して投与することができる。いくつかの実施形態では、活性成分は、化学療法剤、例えば、それだけに限らないが、アドリアマイシン、デキサメタゾン、ピンクリスチン、シクロホスファミド、フルオロウラシル、トポテカン、タキソール、インターフェロン、白金誘導体、タキサン（例えば、パクリタキセル）、ピンカアルカロイド（例えば、ピンブラスチン）、アントラサイクリン（例えば、ドキソルピシン）、エピポドフィロトキシン（例えば、エトポシド）、シスプラチン、メトトレキセート、アクチノマイシン D、アクチノマイシン D、ドラスタチン 10、コルヒチン

、エメチン、トリメトレキセート、メトプリン、シクロスポリン、ダウノルビシン、テニポシド、アンホテリシン、アルキル化剤（例えば、クロランブシル）、5 - フルオロウラシル、カンプトテシン（*campthothecin*）、シスプラチン、メトロニダゾール、イマチニブ、Gleevec（商標）、スニチニブ、およびSutent（登録商標）、ならびにこれらの組合せなどである。

【0171】

ある特定の実施形態では、抗fPSA抗体、これらのコンジュゲート、またはこれらの薬学的に許容される組成物は、アバレリクス、アルデスロイキン、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アロプリノール、アルトレタミン、アミホスチン、アナストロゾール、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、アザシチジン、BCGライブ、ベバシズマブ（*Bevacuzimab*）、アバスチン、フルオロウラシル、ベキサロテン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カルステロン、カベシタピン、カンプトテシン、カルボプラチン、カルムスチン、セレコキシブ、セツキシマブ、クロランブシル、シスプラチン、クラドリピン、クロファラビン、シクロホスファミド、シタラピン、ダクチノマイシン、ダルベポエチン α 、ダウノルビシン、デニロイキン、デクスラゾキサン、ドセタキセル、ドキシソルピシン（中性）、ドキシソルピシン塩酸塩、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピルピシン、エボエチン α 、エルロチニブ、エストラムスチン、リン酸エトポシド、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルダラビン、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲムシタピン、ゲムツズマブ、酢酸ゴセレリン、酢酸ヒストレリン、ヒドロキシウレア、イブリツモマブ、イダルビシン、イホスファミド、メシル酸イマチニブ、インターフェロン α -2a、インターフェロン α -2b、イリノテカン、レナリドミド、レトロゾール、ロイコボリン、酢酸ロイプロリド、レバミソール、ロムスチン、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、6-MP、メスナ、メトトレキセート、メトキサレン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロン、ネララビン、ノフェツモマブ、オブレルベキン、オキサリプラチン、パクリタキセル、パリフェルミン、パミドロネート、ペガデマラーゼ、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、ペメトレキセドニナトリウム、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ポリフィマーナトリウム、プロカルバジン、キナクリン、ラスブリカーゼ、リツキシマブ、サルグラモスチム、ソラフェニブ、ストレプトゾシン、スニチニブマレエート、タルク、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、VM-26、テストラクトン、チオグアニン、6-TG、チオテパ、トボテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、ATRA、ウラシルマスタード、バルルビシン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ピノレルピン、ゾレドロネート、またはゾレドロンの任意の1種または複数から選択される抗増殖剤または化学療法剤と併用して投与される。

【0172】

併用レジメンで使用するための治療（例えば、ドキシソルピシン、ARN-509、およびfPSAに対する治療抗体など）の特定の組合せは、一般に、所望の治療剤および/または手順の適合性、ならびに実現されるべき所望の治療効果を考慮することになる。使用される治療および/または化学療法剤は、同じ障害に対する所望の効果を實現することができ（例えば、本発明の抗原を、別の化学療法剤と同時に投与することができる）、または異なる効果を實現することができることも察されるであろう。使用される治療は、同じ目的に対する所望の効果を實現することができ（例えば、前立腺がんを処置し、防止し、かつ/もしくはその開始を遅延させるのに有用なfPSA特異的抗体を、前立腺がんを処置し、防止し、かつ/もしくはその開始を遅延させるのに有用な別の作用物質と同時に投与することができる）、または異なる効果（例えば、任意の有害作用のコントロール）を實現することができることも察されるであろう。本発明は、医薬組成物の生物学的利用能を改善し、これらの代謝を低減および/もしくは修正し、これらの排泄を阻害し、かつ/または体内でのこれらの分布を修正することができる作用物質と併用した医薬組成物の送達を包含する。

【0173】

特定の実施形態では、抗 f P S A 抗体は、A R N - 5 0 9 (アピラテロン) および / またはドキシソルピシンと併用して投与され、またはこれらにコンジュゲートされる。本発明のこのような実施形態で使用するための追加の前立腺がん治療剤としては、塩化ラジウム - 2 2 3、カボザンチニブ、抗 O X 4 0 抗体、およびピカルタミド (カソデックス) がある。

【 0 1 7 4 】

いくつかの実施形態では、併用して利用される作用物質は、これらが個々に利用されるレベルを超えないレベルで利用されることになる。いくつかの実施形態では、併用で利用されるレベルは、個々に利用されるものより低いことになる。

【 0 1 7 5 】

いくつかの実施形態では、併用療法では、単一エピトープ (例えば、単一立体構造エピトープ) に向けられた複数の抗体を投与することができる。いくつかの実施形態では、併用療法では、別個のエピトープを認識する複数の抗体を含むことができる。

キット

【 0 1 7 6 】

本発明は、本発明による方法を便利および / または有効に実行するための様々なキットを提供する。キットは一般に、本発明による 1 種または複数の f P S A 特異的 (s p e c i f i c) 抗体または抗体ポリペプチド (例えば、5 A 1 0) を含む。いくつかの実施形態では、キットは、異なる目的 (例えば、診断、処置、および / または予防) のために使用される一連の異なる f P S A 特異的抗体を含む。一般にキットは、ユーザーが被験体 (複数可) に複数の投与を実施し、かつ / または複数の実験を実施することが可能になるのに十分な量の f P S A 特異的抗体を含むことになる。いくつかの実施形態では、キットは、購入者が指定した 1 種または複数の f P S A 特異的抗体が供給されており、またはこれらを含む。

【 0 1 7 7 】

ある特定の実施形態では、本発明によって使用するためのキットは、1 種または複数の参照試料 ; 指示 (例えば、試料を処理するため、検査を実施するため、結果を解釈するため、f P S A 特異的抗体を可溶化するため、f P S A 特異的抗体を貯蔵するためなど) ; 緩衝液 ; および / または検査を実施するのに必要な他の試薬を含むことができる。ある特定の実施形態では、キットは、抗体のパネルを含むことができる。キットの他のコンポーネントとして、細胞、細胞培地、組織、および / または組織培地を挙げることができる。

【 0 1 7 8 】

いくつかの実施形態では、キットは、f P S A 特異的抗体を含む医薬組成物のいくつかの単位投与量を含む。調剤を投与することができる処置スケジュールの日 / 時間を指定する、数字、文字、および / もしくは他の印の形態で、かつ / またはカレンダーインサートを伴ったメモリーエイドを提供することができる。調剤が毎日服用されるキットを提供するために、医薬組成物の調剤と同様の形態または別個の形態でのプラセボ調剤および / またはカルシウム栄養補助食品を含めることができる。

【 0 1 7 9 】

キットは、ある特定の個々のコンポーネントまたは試薬を別個に収容することができるように、1 つまたは複数の容器またはコンテナを含むことができる。キットは、商業販売用にかなり厳重に閉じ込めた状態で個々のコンテナを同封するための手段、例えば、指示、発泡スチロールなどの包装材などを同封することができるプラスチック箱を含むことができる。

【 0 1 8 0 】

いくつかの実施形態では、キットは、前立腺がんを罹患している被験体および / またはそれに感受性の被験体の処置、診断、および / または予防において使用される。いくつかの実施形態では、このようなキットは、(i) 少なくとも 1 種の f P S A 特異的抗体 ; (i i) 被験体に少なくとも 1 種の f P S A 特異的抗体を投与するためのシリンジ、針、アプリケーションターなど ; ならびに (i i i) 使用するための指示を含む。

【0181】

本発明のこれらの態様および他の態様は、以下の実施例を考慮するとさらに正当に評価されるであろう。これらの実施例は、本発明のある特定の実施形態を例示するように意図されているが、特許請求の範囲によって定義されるその範囲を限定するように意図されていない。

【実施例】

【0182】

一般的な詳細

すべての化学物質は、別段の記載のない限り、Sigma Aldrich (St. Louis, MO) から購入し、さらに精製することなく使用した。fPSA特異的5A10モノクローナル抗体は、Turku大学、フィンランドから購入し、さらに精製することなく使用した。水(25℃で18.2 MΩ・cm超、Milli-Q、Millipore、Billerica, MA)は、1.0 mL/分未満の流量で、キレックス樹脂の10 cmカラム(Bio-Rad Laboratories、Hercules, CA)を通過させることによって精製した。すべての計測器は、以前に報告された慣例的な品質管理手順に従って較正および維持した。放射能は、 ^{89}Zr について465の較正係数を用いてCapintec CRC-15R Dose Calibrator (Capintec、Ramsey, NJ)を使用することによって測定した。放射能を正確に定量化するために、 ^{89}Zr (909 keVの放射)について800~1000 keVの動的エネルギーウィンドウを使用して、較正されたPerkin Elmer (Waltham, MA) Automatic Wizard² Gamma Counterで1分間、実験試料をカウントした。 ^{89}Zr -放射標識反応は、シリカゲル含浸ガラス繊維インスタント薄層クロマトグラフィー(ITLC-SG)ペーパー(Pall Corp.、East Hills, NY)を使用することによって監視し、Win-Scan Radio-TLCソフトウェアバージョン2.2を使用して、Bioscan Autochanger 1000 (Bioscan Inc.、Washington, DC)にカップリングした放射性TLCプレートリーダー(Bioscan System 200 Imaging Scannerで分析した。溶媒系は、水中のジエチレントリアミン5酢酸(DTPA、50 mM、pH 7)およびリン酸緩衝食塩水(PBS)を含んでいた。MDV3100は、MSKCCのOrganic Synthesis Core Facilityが調製したものであり、さらに精製することなく、DMSO中で再構成した。テストステロンペレットは、Innovative Res. of Americaから購入した。

(実施例1)

 ^{89}Zr -標識モノクローナルfPSA抗体の生成
タンパク質コンジュゲーション

【0183】

免疫-PETのための放射標識モノクローナル抗体に対する以前の研究；例えば、本明細書に参照により組み込まれている、Holland, J. P.ら、 ^{89}Zr -DFO-J591 for immunoPET of prostate-specific membrane antigen expression in vivo、J Nucl Med.、2010年、51巻(8号)、1293~1300頁から導かれた手順を使用して、モノクローナル抗体5A10およびマウスIgG₁をデスフェリオキサミンB(DFO; Calbiochem、Spring Valley, CA)にコンジュゲートし、 ^{89}Zr -オキサレートで放射標識して ^{89}Zr -5A10を得た。標識抗体の純度は、放射性ITLCによって評価した。図1は、粗製(赤色)および精製(青色) ^{89}Zr -5A10の一般的な放射性ITLCを例示する。溶離液は、50 mMのDTPA、pH 7であった。 ^{89}Zr -5A10は、ベースラインに残り($R_f = 0.0$)、不純物は、溶媒先端とともに進む($R_f = 1.0$)。

タンパク質へのDFOのコンジュゲーション

【0184】

DFOを以下のようにタンパク質にコンジュゲートした。5A10を遠心分離機バイアル(3mg/mL、1mL)に加え、1.0Mおよび0.1Mの Na_2CO_3 (水溶液)のアリコートを使用することによってpHを9.5~10.0に調整した。次いで、4当量の $[\text{Fe}(\text{N-succDFO-TFP})]$ を添加し、自動ピペットを使用して溶液を穏やかに混合した。反応を、攪拌することなく室温で1時間進行させた後、0.25Mの H_2SO_4 (水溶液)のアリコート10 μL 未満を徐々に添加することによって、pHを3.9~4.2に調整した。次いで、 $[\text{Fe}(\text{N-succDFO-TFP})]$ に対して10倍超過剰のエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩($\text{EDTA}^{2-} \cdot 2\text{Na}^+$ (水溶液)、キレックス100樹脂処理した脱イオン水中0.0674mol/dm³)を添加した。反応物を水浴中で、38℃で1時間インキュベートし、この時間の間に、溶液が透明な黄色から無色に変化した。サイズ排除クロマトグラフィー(セファデックスG-25M、PD-10カラム、30kDa超、GE Healthcare; デッドボリウム=2.5mL、単離タンパク質の1.8mLの全体積に対して、滅菌生理食塩水200 μL の画分で溶出)によって、DFOコンジュゲート5A10を精製した。DFO-マウスIgGを同じ手順を使用して調製した。

放射標識

【0185】

ジルコニウム-89(Zr-89)は、以前に報告された方法に従って、EBCO TR19/9可変ビームエネルギーサイクロトロン(Ebco Industries Inc.、Richmond、British Columbia、カナダ)で、 $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ 核変換反応を介して生成した。 ^{89}Zr -オキサレートは、195~497MBq/ μg (5.27~13.31mCi/ μg)の有効比活性を伴って、99.9%超の高い放射性核種純度および放射化学的純度(RCP)で単離した。

【0186】

^{89}Zr -5A10および ^{89}Zr -IgGは、それぞれDFOコンジュゲート5A10およびIgGとの ^{89}Zr -オキサレートの複合体化反応によって調製した。一般的な放射標識反応は、 ^{89}Zr でモノクローナル抗体を標識するのに使用された、以前に報告された方法に従って行った。一例として、 ^{89}Zr -5A10を生成するのに使用される一般的な条件を提示する。同じ方法を、 ^{89}Zr -IgGを生成するのに使用した。簡単に言えば、1.0Mのシュウ酸(250 μL)中の ^{89}Zr -オキサレート(429MBq、[11.6mCi])を、1.0Mの Na_2CO_3 (水溶液)でpH7.1~7.7に調整した。注意事項：酸中和により、 CO_2 (ガス)が放出されるので、微量遠心機バイアルから放射能がまったく漏れないことを保証するように注意を払うべきである。 CO_2 発生が止まった後、DFOコンジュゲート5A10(500 μL 、2.0mg/mL[タンパク質1.0mg]、滅菌生理食塩水中)を添加し、ピペットで吸引することによって反応物を穏やかに混合した。反応物を室温で1~2時間の間にわたってインキュベートし、複合体化の進行を、ITLC(DTPA、50mM、pH7)によって時間に対して監視した。2時間後、粗製物の放射標識収率およびRCPは、一般に80~90%超であった。スピン-カラム遠心分離(4mLの全体積、30kDa超の粒子を保持、Amicon Ultra-4、Millipore、Billerica、MA; 滅菌生理食塩水4 $\times$ 3mLで洗浄)を使用することによって、 ^{89}Zr -5A10を精製した。最終的な ^{89}Zr -5A10(製剤：pH5.5~6.0; 500 μL 未満; 滅菌生理食塩水)の放射化学的純度(RCP)は、ITLCおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって測定した。ITLC実験では、 ^{89}Zr -5A10、 ^{89}Zr -IgG、および ^{89}Zr -DFOは、ベースライン($R_f=0.0$)に残り、一方、 $^{89}\text{Zr}^{4+}$ (水溶液)イオンおよび複合体 ^{89}Zr -DTPAは、溶媒先端とともに溶出する($R_f=1.0$)。精製 ^{89}Zr -5A10の最終的な放射化学的収率は、一般に70%超であり、生成物を滅菌生理食塩水中で製剤化し、RCPは、99%超($n=5$)であり、タンパク質の比活性は、195.0 $\pm$ 8.0MBq/mg(5.27 $\pm$ 0.2mCi/mg)であった。図1

は、粗製および精製（製剤化） ^{89}Zr -5A10の一般的な放射性ITLCクロマトグラムを示す。

キレート数

【0187】

5A10またはIgGにコンジュゲートしたアクセス可能なDFOキレートの数は、当業者に公知の方法（例えば、Holland, J. P.ら、Measuring the pharmacokinetic effects of a novel Hsp90 inhibitor on HER2/neu expression in mice using ^{89}Zr -DFO-trastuzumab、PLOS ONE、2010年、5巻（1号）、e8859頁；Anderson, C. J.ら、Preparation, biodistribution and dosimetry of copper-64-labeled anti-colorectal carcinoma monoclonal antibody fragments 1A3-F(ab')₂, J. Nucl. Med., 1995年、36巻（5号）、850～858頁）に従って、放射測定同位体希釈アッセイ（radiometric isotopic dilution assay）によって測定した。原液から、 ^{89}Zr -クロリドのアリコート（5 μL 、370 kBq [10 μCi]、pH 7.7～8.1、1.0 Mの Na_2CO_3 を使用して調整したpH）を、非放射性 ZrCl_4 （水溶液）（50 μL の画分；1000～0.5 pmol、pH 7.7～8.1）の1：2連続希釈液を含有する12の溶液に添加した。混合物を30秒間ボルテックスした後、5A10のアリコート（1.36 mg/mL、mAb 6.8 μg 、0.045 nmol；滅菌生理食塩水）5 μL を添加した。反応物を室温で2時間インキュベートした後、DTPA（20 μL 、50 mM、pH 7）でクエンチした。対照実験により、DFOコンジュゲートタンパク質への ^{89}Zr 複合体化が2時間未満以内に完了することを確認した。複合体化の程度は、ITLCストリップ（DTPA、50 mM）を展開し、ベースラインおよび溶媒先端での活性をカウントすることによって評価した。 ^{89}Zr -放射標識タンパク質（A_b）の画分を、添加した非放射性 ZrCl_4 の量に対してプロットした。キレートの数は、タンパク質の50%のみが標識された ZrCl_4 の濃度を測定し、2の係数を乗じ、次いで反応物中に存在するタンパク質のモルで除すことによって計算した。同位体希釈アッセイにより、タンパク質分子1個当たり平均で2～3のアクセス可能なキレートが、それぞれ5A10およびIgG₁について明らかになった。

^{89}Zr -標識5A10の親和性試験

【0188】

fPSAに対する ^{89}Zr -5A10の親和性を判定するために、競合結合アッセイを行った。fPSAに対する ^{89}Zr -5A10の相対的親和性を、固定化fPSAで被覆されたウェル中で、 ^{89}Zr -5A10および多様な濃度の非標識5A10をインキュベートすることによって判定した。捕捉mAbは、低蛍光Maxisorpストリップ（Nunc、Roskilde、デンマーク）を使用することによる物理的吸着によって、マイクロタイタープレート上に固定化した。0.2 mol/Lの NaH_2PO_4 緩衝液を含有する緩衝液100 L中のmAb H117 1 μg で、35 で一晩ウェルを被覆した。被覆済みウェルをDELFIA洗浄液で2回洗浄し、次いでジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）処理BSA（1 g/L）、ソルビトール（60 g/L）、Germa11 II（1 g/L）、および50 mmolの NaH_2PO_4 を含有する溶液300 μL で、室温（RT）で3時間飽和させた。飽和させた後、ウェルを吸引し、乾燥させ、使用するまで乾燥剤を含む密封ビニール袋中で、4 で貯蔵した。

【0189】

^{89}Zr -5A10のフレッシュな試料を使用して、以前に準備したプレートからの各ウェルに、DELFIAアッセイ緩衝液100 μL 中のfPSAの溶液（25 μL 、47.7 ng/mL）を添加することによって、親和性アッセイを行った。室温で1時間インキュベートした後、溶液を吸引し、ウェルをアッセイ緩衝液で2回洗浄した。 ^{89}Zr -

5 A 1 0 2 0 μ g、および非標識 5 A 1 0 0.0、0.002、0.02、0.2、0.5、1、2、4、6、8、または 10 μ g を含有するアッセイ緩衝液のアリコート 200 μ L を添加することで結合アッセイを開始した。すべての反応は、二通りに行った。反応物をゆっくり振盪しながら 2 時間インキュベートし、このときウェルを吸引し、DELFIA 洗浄液で 4 回すすいだ。結合活性を NaI (Tl) - ウェルカウンター (Perkin Elmer 2480 Automatic Gamma Counter) で判定した。

【0190】

インキュベーション後にウェル中に保持された活性は、fPSA への ^{89}Zr -5A10 の特異的結合と解釈した。DFO および ^{89}Zr が 5A10 にコンジュゲートしても、fPSA に対する mAb の親和性はまったく変化しないという仮定で計算した理想 (理論) 値に対して実験値をプロットした。線形回帰を使用して線形性 ($y = x$) からの偏差を求めた。 ^{89}Zr -5A10 の 1 つの調製からの代表的なデータを示す。アッセイは、5A10 の 2 つの独立した濃度範囲 (合計 $n = 4$) を使用して二通りに行った。図 2 中に提示した結果は、 ^{89}Zr -DFO が 5A10 にバイオコンジュゲートしても、精製 fPSA に対する親和性はまったく喪失せず、 ^{89}Zr -5A10 は、fPSA に対して特異的なままであることを実証する。

(実施例 2)

in vivo での ^{89}Zr -5A10 結合

【0191】

記載されているように (Chen, C.D. ら、Molecular Determinants of Resistance to Androgen Therapy、Nat. Med.、2004 年、10 巻: 33~39 頁)、野生型アンドロゲン受容体を過剰発現する親前立腺がん細胞に由来する PSA 陽性ヒト前立腺がんモデルである、LNCaP-AR の皮下 (s.c.) 異種移植片を接種されたインタクトな雄マウスに ^{89}Zr -5A10 を投与することによって、in vivo 試験を行った。すべての動物実験は、施設内動物管理使用委員会 (IACUC) 指針および実験動物の管理と使用に関する指針に従って行った。雄 CB-17SCID マウス (生後 6~8 週) を Taconic Farms Inc. (Hudson, NY) から得、培地の再構成基底膜との 1:1 v/v 混合物 (BD Matrigel (商標)、Collaborative Biomedical Products Inc., Bedford, MA) の細胞懸濁液 200 μ L 中の 1.0×10^6 細胞を皮下 (s.c.) 注射することによって、右側腹部に LNCaP-AR、22Rv1、および PC3 腫瘍を接種した。3~7 週間の期間の後、触知可能な腫瘍 ($50 \sim 250 \text{ mm}^3$) が発達した。外科的去勢およびペレット移植を、イソフルランを用いた麻酔下で公知のプロトコールに従って実施した。以前に報告された方法 (Holland, J.P. ら、Measuring the pharmacokinetic effects of a novel Hsp90 inhibitor on HER2/neu expression in mice using ^{89}Zr -DFO-trastuzumab、PLOS ONE、2010 年、5 巻 (1 号)、e8859 頁) に従って、外側ノギス測定によって腫瘍体積 (V / mm^3) を推定した。

【0192】

組織を注射後 (p.i.) の複数時点で回収して、放射性トレーサー生体内分布の動態を求めた (図 3a)。生体内分布試験を行って、ヒト前立腺がん異種移植片モデル内の ^{89}Zr -5A10 の取込みを評価した。マウスを加熱ランプで 5 分穏やかに加温した後、 ^{89}Zr -5A10 ($1.11 \sim 1.85 \text{ MBq}$ 、 $[30 \sim 50 \mu\text{Ci}]$ 、タンパク質 5.7~9.5 μ g、注射用滅菌生理食塩水 200 μ L 中) を静脈内 (i.v.) 尾静脈注射 ($t = 0$ 時間) を介して投与した。動物 (1 群当たり $n = 4 \sim 5$) を、注射して 1、4、12、24、48、72、96、および 120 時間後に CO_2 (ガス) 室息によって安楽死させ、16 の組織 (腫瘍を含む) を取り出し、水ですすぎ、空気中で 5 分間乾燥させ

、秤量し、 ^{89}Zr - 放射能の蓄積について γ カウンターでカウントした。各動物内に注射した ^{89}Zr - 5 A 1 0 製剤の質量を測定し、公知の活性および質量の標準的なシリンジと比較することによってカウント (1 分当たりのカウント [c . p . m .]) の総数を求めるのに使用した。カウントデータをバックグラウンド補正および減衰補正し、各試料についての 1 グラム当たりの注射用量のパーセンテージの単位で測定した組織取込み (% I D / g) を、注射した活性の総量に対して正規化することによって計算した。

【 0 1 9 3 】

ピーク腫瘍関連活性が注射しておよそ 2 4 時間後に観察され (1 9 . 5 9 $\pm$ 4 . 9 % I D / g) 、ほとんど例外なく、わずかな ^{89}Zr - 5 A 1 0 蓄積が宿主組織内で観察された (図 3 a ; 図 4) 。図 4 に示したように、担腫瘍マウスを ^{89}Zr - 5 A 1 0 で処置し、注射後の指定時間に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データを平均 % I D / g $\pm$ 1 標準偏差として報告する。表 1 は、右肩に皮下 L N C a P - A R 腫瘍を持つインタクトな雄 S C I D マウス内に i . v . 投与した後の複数時点における ^{89}Zr - 5 A 1 0 の e x v i v o 生体内分布データ (n = 4) を示す。データを平均 % I D / g $\pm$ 1 標準偏差 (S . D .) として表現する。腫瘍対組織比および組織対筋肉比の誤差を、標準偏差の幾何平均として計算する。

【表 1】

表1

器官	120時間						
	4時間(n=4)	12時間(n=4)	24時間(n=4)	48時間(n=4)	72時間(n=4)	96時間(n=4)	(n=4)
	13.49 ±	12.28 ±					
血液	1.74	5.93	6.67 ± 3.08	5.44 ± 2.85	3.16 ± 0.14	4.44 ± 2.55	3.39 ± 2.09
前立腺	1.56 ± 0.48	1.40 ± 0.74	3.95 ± 2.82	0.73 ± 0.49	0.57	0.86 ± 0.50	5.23 ± 8.82
膀胱	3.88 ± 2.55	0.63 ± 0.37	1.59 ± 1.87	1.75 ± 2.07	0.38 ± 0.25	1.87 ± 1.86	1.19 ± 1.35
心臓	4.93 ± 1.58	4.06 ± 1.54	2.74 ± 2.83	1.69 ± 0.95	1.24 ± 0.49	1.37 ± 0.66	2.36 ± 2.19
肺	5.94 ± 1.63	5.00 ± 1.61	3.79 ± 2.05	3.19 ± 1.52	1.46 ± 0.23	1.52 ± 0.66	1.71 ± 0.95
	23.20 ±	19.61 ±	24.56 ±	21.30 ±	15.40 ±	14.16 ±	13.28 ±
肝臓	3.55	4.00	4.91	4.58	1.47	3.79	5.96
	13.42 ±					9.19 ±	
脾臓	2.71	6.80 ± 1.46	8.90 ± 4.19	7.28 ± 3.00	6.15 ± 3.37	10.99	4.01 ± 2.46
胃	1.49 ± 1.49	0.83 ± 0.30	0.75 ± 0.11	0.64 ± 0.30	0.51 ± 0.04	0.70 ± 0.41	0.54 ± 0.33
小腸	0.97 ± 0.27	0.83 ± 0.21	1.07 ± 0.22	0.53 ± 0.08	0.90 ± 0.57	0.56 ± 0.19	0.49 ± 0.05
大腸	1.07 ± 0.30	2.01 ± 1.77	1.14 ± 1.04	3.93 ± 6.85	0.59 ± 0.35	0.62 ± 0.19	0.45 ± 0.16
腎臓	3.98 ± 1.08	2.57 ± 0.51	3.74 ± 3.43	3.81 ± 2.72	1.90 ± 0.66	1.71 ± 0.41	2.33 ± 1.87
筋肉	0.59 ± 0.15	0.59 ± 0.14	0.86 ± 0.66	0.80 ± 0.79	0.28 ± 0.02	0.41 ± 0.09	0.45 ± 0.24
骨	3.06 ± 1.82	2.58 ± 2.07	2.63 ± 2.28	1.94 ± 0.40	1.76 ± 1.30	2.94 ± 3.23	3.39 ± 2.33
			19.59 ±	12.38 ±			
腫瘍	2.34 ± 0.84	5.13 ± 3.95	4.99	5.63	5.99 ± 1.57	6.10 ± 3.99	6.74 ± 7.36
腫瘍対組織比							
血液	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.4	2.9 ± 1.5	2.3 ± 1.6	1.9 ± 0.5	1.4 ± 1.2	2.0 ± 2.5
前立腺	1.5 ± 0.7	3.7 ± 3.4	4.9 ± 3.8	17.0 ± 13.8	10.5	7.1 ± 6.2	1.3 ± 2.6
膀胱	0.6 ± 0.3	8.2 ± 8.9	12.3 ± 4.5	7.1 ± 4.5	15.9 ± 5.9	3.3 ± 3.0	5.7 ± 8.8
心臓	0.5 ± 0.4	1.3 ± 1.2	7.1 ± 8.6	7.3 ± 9.3	4.8 ± 3.5	4.5 ± 5.3	2.9 ± 4.5
肺	0.4 ± 0.2	1.0 ± 0.9	5.2 ± 5.5	3.9 ± 2.8	4.1 ± 1.9	4.0 ± 3.3	3.9 ± 5.7
肝臓	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.8 ± 0.5	0.6 ± 0.4	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.6
脾臓	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.6	2.2 ± 0.7	1.7 ± 0.9	1.0 ± 0.3	0.7 ± 0.5	1.7 ± 2.0
胃	1.6 ± 0.7	6.2 ± 5.0	25.9 ± 13.9	19.3 ± 11.8	11.7 ± 7.1	8.7 ± 11.9	12.6 ± 15.8
小腸	2.4 ± 2.6	6.2 ± 5.3	18.2 ± 5.4	23.5 ± 15.5	6.7 ± 1.8	10.9 ± 9.6	13.7 ± 17.2
大腸	2.2 ± 1.0	2.6 ± 2.1	17.1 ± 5.6	3.1 ± 1.5	10.2 ± 7.1	9.9 ± 7.3	15.0 ± 16.5
腎臓	0.6 ± 0.3	2.0 ± 2.3	5.2 ± 4.9	3.2 ± 5.8	3.2 ± 2.0	3.6 ± 2.6	2.9 ± 3.3
筋肉	4.0 ± 1.8	8.8 ± 7.0	22.8 ± 21.7	15.5 ± 13.1	21.5 ± 9.3	15.0 ± 10.5	15.0 ± 20.3
骨	0.8 ± 0.3	2.0 ± 1.6	7.4 ± 6.1	6.4 ± 7.0	3.4 ± 0.9	2.1 ± 1.4	2.0 ± 2.4
組織対筋肉比							
前立腺	2.6 ± 1.1	2.4 ± 1.4	4.6 ± 4.9	0.9 ± 1.1	2.1	2.1 ± 1.3	11.6 ± 20.6
膀胱	6.6 ± 4.6	1.1 ± 0.7	1.9 ± 2.6	2.2 ± 3.4	1.4 ± 0.9	4.6 ± 4.7	2.6 ± 3.3
心臓	8.3 ± 3.4	6.9 ± 3.1	3.2 ± 4.1	2.1 ± 2.4	4.4 ± 1.8	3.4 ± 1.8	5.3 ± 5.6
肺	10.0 ± 3.8	8.5 ± 3.4	4.4 ± 4.2	4.0 ± 4.4	5.2 ± 0.9	3.8 ± 1.9	3.8 ± 2.9
肝臓	39.2 ± 11.8	33.5 ± 10.6	28.7 ± 22.9	26.9 ± 27.1	55.3 ± 7.1	34.9 ± 12.3	29.5 ± 20.7
脾臓	22.7 ± 7.5	11.6 ± 3.7	10.4 ± 9.4	9.1 ± 9.8	22.1 ± 12.3	22.6 ± 27.6	8.9 ± 7.3
胃	2.5 ± 2.6	1.4 ± 0.6	0.9 ± 0.7	0.8 ± 0.9	1.8 ± 0.2	1.7 ± 1.1	1.2 ± 1.0
小腸	1.6 ± 0.6	1.4 ± 0.5	1.3 ± 1.0	0.7 ± 0.7	3.2 ± 2.1	1.4 ± 0.6	1.1 ± 0.6
大腸	1.8 ± 0.7	3.4 ± 3.1	1.3 ± 1.6	4.9 ± 9.9	2.1 ± 1.3	1.5 ± 0.6	1.0 ± 0.6
腎臓	6.7 ± 2.5	4.4 ± 1.4	4.9 ± 5.2	4.8 ± 5.8	6.8 ± 2.4	4.2 ± 1.4	5.2 ± 5.0
骨	5.2 ± 3.4	4.4 ± 3.7	3.1 ± 3.6	2.4 ± 2.5	6.3 ± 4.7	7.2 ± 8.1	7.5 ± 6.6
腫瘍	4.0 ± 1.7	8.8 ± 7.1	22.8 ± 18.6	15.5 ± 16.9	21.5 ± 5.9	15.0 ± 10.4	15.0 ± 18.2

表2は、⁸⁹Zr-5A10を注射された、LNCaP-AR腫瘍を持つインタクトな雄マウスにおける、ELISAを介した腫瘍組織由来のPSA発現レベルの分析を示す。マウスに⁸⁹Zr-5A10を注射し、注射後の指定時点で屠殺し、PSA分析を行った。腫瘍組織を外科的に切り取った。fPSAおよび総PSA(「tPSA」)をPSA指向性ELISAで求め、値を総タンパク質濃度に対して正規化した。fPSA濃度を平均ng/mlとして報告し(a)、総PSA(「tPSA」)濃度をng/mLとして報告し(b)、総タンパク質濃度をng/mgとして報告する(c)。血清および腫瘍組織中のPSA検出のために、ELISAを以下の通り行った。製造者の推奨に従って、二重標識免疫蛍光アッセイ(DELFIAProstatus(商標)、フリーPSA(PSA Free)/総PSA;Perkin-Elmer Life Sciences)でfPSAおよびtPSAを測定した。このアッセイでは、等モル様式でfPSAおよび複合体化PSA(cPSA)を測定し⁸、fPSAに対するPSA-ACTの交差反応性は、0.2%未満であった⁹。検出の下限は、tPSAについて0.05μg/L(2.32μg/LでCV=5.0%)であり、fPSAについて0.04μg/L(0.25μg/LでCV=5.9%)であった。検出のために、Perkin-Elmer Life Sciences製1235自動イムノアッセイシステムを使用した。cPSA濃度は、tPSAからfPSAを減ずることによって計算した。

【表 2】

表2

マウス#	注記	平均 fPSA ^a	平均 tPSA ^b	f/t PSA 比	総タン パク質 ^c	fPSA/t タンパク 質	tPSA/t タンパク 質
1.00	4時間	171.81	239.75	0.72	6.20	27.72	38.68
2.00		134.54	175.90	0.76	5.35	25.14	32.88
3.00		355.69	537.93	0.66	6.65	53.48	80.88
5.00	12時間	282.14	420.15	0.67	6.30	44.75	66.64
6.00		28.22	37.33	0.76	5.03	5.61	7.42
7.00		114.51	147.79	0.77	4.92	23.29	30.06
8.00		87.30	113.79	0.77	6.24	13.98	18.23
9.00	24時間	158.19	212.62	0.74	6.15	25.74	34.60
10.00		96.50	125.22	0.77	5.43	17.78	23.07
11.00		106.40	146.10	0.73	6.21	17.13	23.52
12.00		264.55	355.14	0.74	6.10	43.38	58.23
13.00	48時間	252.67	339.09	0.75	5.54	45.64	61.25
14.00		337.09	494.87	0.68	6.25	53.94	79.19
15.00		80. ⁸⁹	99.39	0.81	5.80	13.94	17.13
16.00		237.97	365.96	0.65	5.83	40.83	62.78
17.00	72時間	178. ⁸⁹	253.99	0.70	5.96	30.03	42.64
18.00		324.82	477.48	0.68	6.71	48.43	71.19
19.00		140.96	229.85	0.61	6.57	21.44	34.96
20.00		248.42	326.42	0.76	5.20	47.80	62.81
21.00	96時間	228.56	329.97	0.69	5.61	40.76	58.85
22.00		171.25	225.05	0.76	5.31	32.27	42.41
23.00		55.37	71.39	0.78	5.01	11.05	14.25
24.00		115.80	159.40	0.73	5.90	19.62	27.01
27.00		56.49	68.26	0.83	3.59	15.75	19.03
28.00		71.14	94.26	0.75	6.04	11.78	15.61

【0195】

PET試験では、生体内分布データを支持する、腫瘍におけるコントラストの領域が示された(図3b)。図3bは、⁸⁹Zr-5A10の腫瘍(T)への局在化、およびマウス肝臓(L)内の取込みを示す、LNCaP AR異種移植片を持つインタクトな雄マウスの代表的な横断(Trans.)PETスライスおよび冠状PETスライスを提供する。PETイメージング実験は、microPET Focus 120スキャナー(Concorde Microsystems)で行った。繰り返し試験(n=4)において、マウスに、⁸⁹Zr-5A10(10.4~12.6MBq、[280~340μCi]、タンパク質53.1~64.5μg、注射用滅菌生理食塩水200μL中)の製剤をi.v.尾静脈注射(t=0時間)を介して投与した。PET画像を記録するおよそ5分前

10

20

30

40

50

に、1～2%のイソフルラン（Baxter Healthcare、Deerfield、IL）/酸素ガス混合物の吸入によってマウスを麻酔し、スキャナーベッド上に置いた。PET画像は、注射後1～120時間の間の様々な時点で記録した。リスト-モードデータは、350～750keVの γ 線エネルギーウィンドウ、および6nsのコインシデンスタイミングウィンドウを使用して10～30分の間に取得した。すべての静的画像について、スキャン時間を調整して、最低2000万の一致イベントが記録されるのを保証した。フーリエリビニングによってデータを選別して2次元ヒストグラムにし、横断画像をフィルタ補正逆投影（FBP）によって再構築して $128 \times 128 \times 63$ （ $0.72 \times 0.72 \times 1.3$ mm）のマトリックスにした。 ^{89}Zr の再構築された空間分解能は、視野（FOV）の中心で1.9mmの半値全幅（FWHM）であった。画像データを正規化してPETの応答の不均一性、デッドタイムカウントロス、ボジトロン分岐比、および注射の時間に対する物理的崩壊を補正したが、減衰、散乱、または部分的ボリューム平均化の補正はまったく適用しなかった。マウスについての経験的に求められるシステム校正係数（ $[\text{mCi}/\text{mL}] / [\text{cps}/\text{ボクセル}]$ の単位での）を使用して、ボクセルカウント率を活性濃度に変換した。次いで得られた画像データを投与された活性に対して正規化して、%ID/gの観点から画像をパラメータ化した。手作業で描いた2次元対象領域（ROI）または3次元対象ボリューム（VOI）を使用して、様々な組織における最大および平均%ID/g（注射の時間に対して補正した崩壊）を求めた。ASIPRO VM（商標）ソフトウェア（Concorde Microsystems）を使用して画像を分析した。

【0196】

^{89}Zr -5A10取込みを競うために100倍過剰の非標識5A10を使用して、 ^{89}Zr -5A10とLNCaP-ARとの生物相互作用の特異性を確認した（図3c、図5、表3、および表4）。担腫瘍マウスを ^{89}Zr -5A10および過剰の5A10（1mg/マウス）で同時処置し、注射して24時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。図3cは、インタクトな雄マウスにおける、複数のs.c.PCaモデルおよびいくつかの処置条件での腫瘍結合 ^{89}Zr -5A10を示す生体内分布データを提供する。 ^{89}Zr -5A10のLNCaP-ARへの局在化は、過剰の非標識5A10（1mgの非標識mAb）との同時注射によって完全に競合された。非特異的放射性トレーサー ^{89}Zr -IgGは、LNCaP-ARに局在化せず、 ^{89}Zr -5A10は、PC3、前立腺がんのAR-およびPSAヌルモデルに局在化しなかった。 ^{89}Zr -5A10のCWR22Rv1異種移植片への中程度の局在化が観察され、LNCaP-ARと比較して、このモデルにおけるPSAのより低い基本的発現と一致した。すべての条件と比較して $*P < 0.01$ 。PC3と比較して $^{**}P < 0.01$ 。表3は、過剰の非標識5A10で同時注射された、LNCaP-AR腫瘍を持つインタクトなマウスにおける ^{89}Zr -5A10取込みの生体内分布データを示す。右肩に皮下LNCaP-AR腫瘍を持つインタクトな雄SCIDマウス内にi.v.投与、および5A10 1mgの同時注射をした後の複数時点における ^{89}Zr -5A10のex vivo生体内分布データ（ $n = 4$ ）。データは、平均%ID/g $\pm$ 1標準偏差（S.D.）として表現する。比の誤差は、標準偏差の幾何平均として計算する。

【表 3】

表3

器官	生体内分布		腫瘍対組織比		組織対筋肉比	
	シャム	ブロック	シャム	ブロック	シャム	ブロック
	24時間(n=4)	24時間(n=4)	24時間(n=4)	24時間(n=4)	24時間(n=4)	24時間(n=4)
血液	6.67 ± 3.0	17.0 ± 13.4	2.9 ± 1.5	0.2 ± 0.2		
膀胱	1.59 ± 1.8	0.93 ± 0.3	12.3 ± 14.9	4.4 ± 2	1.9 ± 2.6	0.6 ± 0.7
心臓	2.74 ± 2.8	2.03 ± 0.7	7.1 ± 7.6	2.0 ± 0.9	3.2 ± 4.1	1.3 ± 1.5
肺	3.79 ± 2.0	3.47 ± 1.7	5.2 ± 3.1	1.2 ± 0.6	4.4 ± 4.2	2.2 ± 2.7
肝臓	24.56 ± 4.9	24.0 ± 2.3	0.8 ± 0.3	0.2 ± 0	28.7 ± 22.9	15.4 ± 16.7
		11.43 ±				
脾臓	8.90 ± 4.1	4.51	2.2 ± 1.2	0.4 ± 0.2	10.4 ± 9.4	7.3 ± 8.4
胃	0.75 ± 0.11	0.86 ± 0.2	25.9 ± 7.7	4.8 ± 1	0.9 ± 0.7	0.6 ± 0.6
小腸	1.07 ± 0.2	1.04 ± 0.2	18.2 ± 6.0	4.0 ± 1	1.3 ± 1.0	0.7 ± 0.7
大腸	1.14 ± 1.04	1.00 ± 0.2	17.1 ± 16.2	1.3 ± 0.4	1.3 ± 1.6	0.6 ± 0.7
腎臓	3.74 ± 3.4	3.26 ± 0.7	5.2 ± 5.0	2.7 ± 3	4.4 ± 5.2	2.1 ± 2.3
筋肉	0.86 ± 0.6	1.56 ± 1.6	22.8 ± 18	3.2 ± 1		
骨	2.63 ± 2.2	1.27 ± 0.3	7.4 ± 6	1.0 ± 0.3	3.1 ± 3.4	1.0 ± 1.5
腫瘍	19.54 ± 4.9	4.12 ± 0.9			22.8 ± 26.5	0.8 ± 0.9

10

20

【0197】

表4は、LNCaP-AR異種移植片を持ち、⁸⁹Zr-5A10および過剰の非標識5A10を同時注射されたインタクトな雄マウス内のPSAの腫瘍測定を含有する。マウスに⁸⁹Zr-5A10および過剰の非標識5A10(1mg)を注射し、注射後の指定時点で屠殺し、PSA分析を行った。腫瘍組織を外科的に切り取った。fPSAおよびtPSAを、PSA指向性ELISA(上記の通り)を用いて求め、値を総タンパク質濃度に対して正規化した。^afPSA濃度をng/mlとして報告し、^b総PSA濃度をng/mlとして報告し、^c総タンパク質濃度をng/mgとして報告する。略語：fPSA、フリーPSA(fPSA)；tPSA、総PSA。

30

【表 4】

表4

マウス #	試料	fPSA ^a	tPSA ^b	f/t PSA 比	tタンパク質 ^c	fPSA/tタンパク質	tPSA/tタンパク質
1.0	腫瘍	10.1	250.4	0.0	5.2	1.9	47.8
2.0	腫瘍	9.7	220.6	0.0	6.1	1.6	36.2
3.0	腫瘍	15.7	613.0	0.0	6.2	2.5	98.1
4.0	腫瘍	11.5	483.4	0.0	6.1	1.9	78.9

40

【0198】

さらに、24時間のp.i.において、LNCaP-AR内に、非特異的放射性トレーサー⁸⁹Zr-標識マウスIgGのわずかな取込みがあった(図3c、図6、表5、およ

50

び表 6)。図 6 は、 ^{89}Zr -5A10 を注射された、LNCaP-AR、PC3、または CWR22Rv1 異種移植片を持つインタクトな雄マウスの生体内分布プロットを示す。担腫瘍マウスを ^{89}Zr -5A10 で処置し、注射して 24 時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データを平均 $\% \text{ID} / \text{g} \pm 1$ 標準偏差として報告する。表 5 は、LNCaP-AR 腫瘍を持つインタクトなマウス内の ^{89}Zr -IgG 取込みについての生体内分布データを示す。右肩に皮下 LNCaP-AR 腫瘍を持つインタクトな雄 SCID マウス内に i.v. 投与した後の複数時点における ^{89}Zr -IgG の ex vivo 生体内分布データ ($n = 4$)。データを平均 $\% \text{ID} / \text{g} \pm 1$ 標準偏差 (S.D.) として表現する。比の誤差を標準偏差の幾何平均として計算する。

【表 5 - 1】

表5

組織	4時間(n=4)	12時間(n=4)	24時間(n=4)	48時間(n=4)	72時間(n=4)	96時間(n=4)	120時間 (n=4)
	37.55 ±	36.17 ±	24.96 ±	23.71 ±	21.54 ±	17.39 ±	16.04 ±
血液	16.43	5.68	8.14	3.79	2.64	4.42	4.89
前立腺	3.25 ± 0.57	2.76 ± 0.25	1.66 ± 0.86	1.49 ± 0.72	1.31 ± 1.24	1.01 ± 0.69	2.51
	10.16 ±	12.53 ±					
膀胱	2.45	2.73	7.73 ± 3.12	5.95 ± 0.67	5.69 ± 0.35	5.68 ± 1.51	3.52 ± 1.40
	12.35 ±	17.64 ±					
心臓	3.43	3.76	8.51 ± 3.46	9.98 ± 2.73	9.88 ± 3.32	7.23 ± 3.39	4.60 ± 1.77
	23.73 ±	23.12 ±	17.88 ±	21.73 ±	25.09 ±	15.91 ±	18.10 ±
肺	6.35	5.80	3.77	6.01	5.59	4.64	7.46
	12.86 ±	13.26 ±	10.15 ±	11.07 ±	13.16 ±		
肝臓	2.86	2.36	2.75	2.04	4.74	8.21 ± 2.04	8.87 ± 2.29
脾臓	1.76 ± 0.21	1.92 ± 1.18	1.30 ± 0.41	0.99 ± 0.18	0.89 ± 0.32	0.73 ± 0.30	0.66 ± 0.24
胃	3.83 ± 0.71	1.64 ± 0.13	1.57 ± 0.26	1.13 ± 0.16	1.10 ± 0.21	0.74 ± 0.32	0.77 ± 0.22
小腸	3.77 ± 0.98	2.00 ± 0.69	2.04 ± 0.76	1.31 ± 0.31	1.21 ± 0.40	0.98 ± 0.31	0.94 ± 0.37
	10.44 ±	11.76 ±					
大腸	1.20	0.84	9.79 ± 2.07	9.43 ± 1.79	9.18 ± 1.63	7.41 ± 2.30	6.70 ± 3.16
腎臓	1.66 ± 0.42	1.37 ± 0.18	1.26 ± 0.28	1.08 ± 0.09	0.97 ± 0.10	0.65 ± 0.18	0.50 ± 0.35
筋肉	3.55 ± 1.40	3.94 ± 0.85	2.74 ± 1.25	2.53 ± 0.41	2.94 ± 0.39	2.06 ± 1.75	1.89 ± 0.56
骨	5.74 ± 1.43	7.04 ± 2.45	4.80 ± 1.31	3.52 ± 1.13	3.45 ± 1.37	3.56 ± 1.44	3.65 ± 1.16
腫瘍	3.05 ± 1.68	2.55 ± 0.24	2.49 ± 1.14	2.52 ± 0.61	1.89 ± 1.12	0.59 ± 0.36	0.09 ± 0.08
腫瘍対組織比							
血液	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
前立腺	1.8 ± 0.4	2.5 ± 0.3	2.9 ± 1.6	2.4 ± 1.2	2.6 ± 2.6	3.5 ± 2.5	1.5
膀胱	1.9 ± 1.1	2.8 ± 0.3	1.9 ± 1.0	1.4 ± 0.4	1.8 ± 1.3	6.1 ± 3.9	42.5 ± 19.1
心臓	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	1.0 ± 1.0
肺	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.8 ± 0.4
肝臓	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
脾臓	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2
胃	3.3 ± 0.5	3. ± 2.3	3.7 ± 1.4	3.6 ± 1.0	3.9 ± 2.0	4.9 ± 2.2	5.6 ± 2.3
小腸	1.5 ± 0.3	4.3 ± 0.4	3.1 ± 0.7	3.1 ± 0.8	3.1 ± 1.3	4.8 ± 2.3	5.0 ± 2.4
大腸	1.5 ± 0.4	3.5 ± 1.2	2.4 ± 1.0	2.7 ± 0.8	2.8 ± 1.4	3.6 ± 1.3	3.9 ± 1.7
腎臓	3.5 ± 0.9	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3
筋肉	1.6 ± 0.7	5.2 ± 0.7	3.8 ± 1.1	3.3 ± 0.7	3.6 ± 1.3	5.5 ± 1.9	7.3 ± 4.2
骨	1.66 ± 0.42	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.9	1.4 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.7 ± 1.5	1.9 ± 1.5
組織対筋肉比							
前立腺	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.3	1.3 ± 0.7	1.4 ± 0.7	1.4 ± 1.3	1.6 ± 1.2	5
膀胱	3.5 ± 1.2	5.2 ± 1.9	3.8 ± 1.3	3.3 ± 1.1	3.6 ± 1.5	5.5 ± 2.7	7.3 ± 5.6
心臓	1.8 ± 1.1	1.9 ± 0.3	2.0 ± 1.0	2.3 ± 0.6	2.0 ± 1.2	0.9 ± 0.6	0.2 ± 0.2
肺	6.1 ± 2.1	9.2 ± 2.3	6.2 ± 2.8	5.5 ± 0.8	5.9 ± 0.7	8.7 ± 3.4	7.1 ± 5.7
肝臓	7.4 ± 2.8	12.9 ± 3.2	6.8 ± 3.1	9.2 ± 2.6	10.2 ± 3.6	11.1 ± 6.1	9.2 ± 7.3
脾臓	14.3 ± 5.2	16.9 ± 4.8	14.2 ± 4.4	20.1 ± 5.8	25.9 ± 6.4	24.5 ± 9.9	36.2 ± 29.4
胃	7.7 ± 2.6	9.7 ± 2.2	8.1 ± 2.8	10.3 ± 2.1	13.6 ± 5.1	12.7 ± 4.7	17.7 ± 13.2
小腸	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.9	1.0 ± 0.4	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.1 ± 0.6	1.3 ± 1.0

10

20

30

40

【表 5 - 2】

大腸	2.3 ± 0.7	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.6	1.5 ± 1.1
腎臓	2.3 ± 0.8	1.5 ± 0.5	1.6 ± 0.7	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.4	1.5 ± 0.6	1.9 ± 1.5
骨	6.3 ± 1.7	8.6 ± 1.3	7.8 ± 2.4	8.7 ± 1.8	9.5 ± 2.0	11.4 ± 4.8	13.4 ± 11.3
腫瘍	2.1 ± 1.0	2.9 ± 0.7	2.2 ± 1.1	2.3 ± 0.4	3.0 ± 0.5	3.2 ± 2.8	3.8 ± 2.9

【 0 1 9 9 】

表 6 は、L N C a P - A R 腫瘍を持ち、^{8 9} Z r - I g G を注射されたインタクトなマウスにおける E L I S A を介した P S A 発現レベルの腫瘍分析を示す。マウスに ^{8 9} Z r - I g G を注射し、注射後の指定時点で屠殺し、P S A 分析を行った。腫瘍組織を外科的に切り取った。f P S A および t P S A を、P S A 指向性 E L I S A (上記の通り) を用いて求め、腫瘍内 P S A の場合は、値を総タンパク質濃度に対して正規化した。^a f P S A 濃度を n g / m l としして報告し、^b 総 P S A 濃度を n g / m l としして報告し、^c 総タンパク質濃度を n g / m g としして報告する。略語：f P S A、フリー P S A；t P S A、総 P S A。

【表 6】

表6

マウス	注記	fPSA ^a	tPSA ^b	f/t PSA比	総タンパク質 ^c	fPSA/tタンパク質	tPSA/tタンパク質
1	4時間	132.6	180.2	74%	5.6	23.7	32.2
2		71.2	94.0	76%	4.8	14.7	19.4
3		114.6	155.5	74%	6.7	17.1	23.2
4		61.4	78.5	78%	5.4	11.3	14.5
5	12時間	174.2	250.4	70%	6.9	25.1	36.1
6		59.3	79.1	75%	4.7	12.6	16.8
7		161.7	232.2	70%	6.3	25.6	36.8
8		259.8	369.5	70%	7.1	36.6	52.1
9	24時間	105.2	140.0	75%	6.2	16.9	22.5
10		147.4	214.9	69%	6.9	21.4	31.3
11		141.3	199.3	71%	6.1	23.2	32.7
12		115.9	155.2	75%	5.5	21.2	28.4
13	48時間	55.5	75.8	73%	5.9	9.4	12.8
14		73.1	87.0	84%	6.3	11.5	13.7
15		39.4	47.4	83%	3.7	10.7	12.8
16		40.9	53.1	77%	4.5	9.1	11.8
17	72時間	110.9	152.9	73%	6.2	17.9	24.6
18		114.5	145.2	79%	6.7	17.2	21.8
19		203.3	277.8	73%	7.2	28.1	38.4
20		93.5	124.8	75%	7.2	13.0	17.3
21	96時間	22.6	30.7	74%	3.1	7.4	10.0
22		116.4	147.7	79%	7.4	15.8	20.0
23		95.8	123.4	78%	6.6	14.5	18.7
24		189.4	251.8	75%	6.8	28.0	37.2
25	120時間	101.9	135.3	75%	6.6	15.3	20.4
26		87.0	112.5	77%	5.9	14.8	19.1
27		214.4	304.4	70%	7.5	28.7	40.7
28		132.0	179.4	74%	6.2	21.2	28.7
29	注射せず	217.9	303.8	72%	7.7	28.2	39.3
30	注射せず	157.2	215.3	73%	7.1	22.0	30.1
31	注射せず	183.0	239.7	76%	6.0	30.5	39.9
32	注射せず	49.7	63.0	79%	4.3	11.6	14.7

【 0 2 0 0 】

予期したように、P C 3 異種移植片、ヒト P C a の A R - および P S A 陰性モデルは、24 時間の p . i . において、 ^{89}Zr -5 A 1 0 に対するわずかなアビディティを示した（図 3 c、図 7、および表 7）。図 7 において、担腫瘍マウスを ^{89}Zr -5 A 1 0 で処置し、注射して 24 時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データを平均 % I D / g $\pm$ 1 標準偏差として報告する。

【 0 2 0 1 】

表 7 は、P C 3 腫瘍を持つインタクトな雄マウス内の ^{89}Zr -5 A 1 0 取込みについての生体内分布データを示す。皮下 P C 3 腫瘍を有するインタクトな雄マウス（n = 4）内の ^{89}Zr -5 A 1 0 取込みについての e x v i v o 生体内分布データ。データは、i . v . 投与して 24 時間後に取得した。データを平均 % I D / g $\pm$ 1 標準偏差（S . D .）として表現する。比の誤差を標準偏差の幾何平均として計算する。

【表 7】

表 7

生体内分布		腫瘍対組織比		組織対筋肉比	
器官	24時間(n=4)	器官	24時間	器官	24時間
			(n=4)		(n=4)
血液	25.86 $\pm$ 5.5	血液	0.1 $\pm$ 0.1	前立腺	0.8 $\pm$ 0.5
前立腺	1.71 $\pm$ 0.8	前立腺	1.7 $\pm$ 1.3	膀胱	1.5 $\pm$ 0.9
膀胱	2.99 $\pm$ 1.5	膀胱	0.8 $\pm$ 0.6	心臓	1.8 $\pm$ 0.7
心臓	3.68 $\pm$ 0.2	心臓	0.4 $\pm$ 0.2	肺	3.4 $\pm$ 1.4
肺	7.00 $\pm$ 0.9	肺	0.3 $\pm$ 0.1	肝臓	5.1 $\pm$ 2.8
肝臓	10.43 $\pm$ 4.2	肝臓	0.3 $\pm$ 0.2	脾臓	5.3 $\pm$ 2.4
脾臓	10.90 $\pm$ 2.7	脾臓	0.4 $\pm$ 0.2	胃	3.3 $\pm$ 1.3
胃	6.83 $\pm$ 0.9	胃	1.8 $\pm$ 1.0	小腸	0.8 $\pm$ 0.4
小腸	1.64 $\pm$ 0.3	小腸	2.0 $\pm$ 1.1	大腸	0.7 $\pm$ 0.4
大腸	1.50 $\pm$ 0.5	大腸	1.3 $\pm$ 0.8	腎臓	1.1 $\pm$ 0.5
腎臓	2.28 $\pm$ 0.6	腎臓	0.5 $\pm$ 0.3	骨	3.0 $\pm$ 1.3
筋肉	6.18 $\pm$ 1.3	筋肉	1.5 $\pm$ 0.8	腫瘍	1.3 $\pm$ 0.6
骨	2.04 $\pm$ 0.7	骨	1.1 $\pm$ 0.7		
腫瘍	2.68 $\pm$ 0.5				

【 0 2 0 2 】

最後に、s . c . C W R 2 2 R v 1 異種移植片は、 ^{89}Zr -5 A 1 0、別の A R - および P S A 陽性 P C a モデルに貪欲であった（図 3 c、図 7、および表 8）。表 8 は、C W R 2 2 R v 1 腫瘍を持つインタクトな雄マウス内の ^{89}Zr -5 A 1 0 取込みについての生体内分布データを提供する。皮下 C W R 2 2 R v 1 腫瘍を持つインタクトな雄マウス（n = 4）内の ^{89}Zr -5 A 1 0 取込みについての e x v i v o 生体内分布データ。データは、i . v . 投与して 24 時間後に取得した。データを平均 % I D / g $\pm$ 1 標準偏差（S . D .）として表現する。比の誤差を標準偏差の幾何平均として計算する。

【表 8】

表8

生体内分布		腫瘍対組織比		組織対筋肉比	
器官	24時間(n=4)	器官	24時間(n=4)	器官	24時間(n=4)
血液	2.53 ± 0.9	血液	3.4 ± 1.5	膀胱	4.6 ± 4.0
膀胱	2.94 ± 2.1	膀胱	2.9 ± 2.2	心臓	3.2 ± 1.5
心臓	2.05 ± 0.1	心臓	4.2 ± 1.0	肺	4.8 ± 2.6
肺	3.06 ± 0.8	肺	2.8 ± 1.0	肝臓	41.2 ± 21.2
肝臓	26.11 ± 5.7	肝臓	0.3 ± 0.1	脾臓	50.2 ± 24.1
脾臓	31.84 ± 3.6	脾臓	0.3 ± 0.1	胃	1.0 ± 0.9
胃	0.64 ± 0.5	胃	13.3 ± 10.7	小腸	1.1 ± 0.8
小腸	0.67 ± 0.4	小腸	12.7 ± 8.4	大腸	1.1 ± 1.1
大腸	0.72 ± 0.6	大腸	11.9 ± 11	腎臓	22.8 ± 10.8
腎臓	14.44 ± 1.3	腎臓	0.6 ± 0.2	骨	9.5 ± 0.7
筋肉	0.63 ± 0.3	筋肉	13.5 ± 7.1	腫瘍	13.5 ± 7.1
骨	6.01 ± 0.3	骨	1.4 ± 0.4		
腫瘍	8.59 ± 2.0				

(実施例 3)

f P S A 発現のアンドロゲン制御上昇 (A n d r o g e n - R e g u l a t e d E l e v a t i o n - R e g u l a t e d E l e v a t i o n) の ^{89}Zr -5 A 1 0 検出【0203】

以下の実施例は、 ^{89}Zr -5 A 1 0 が f P S A 発現のアンドロゲン制御上昇を検出することができることを実証する。去勢雄マウスに L N C a P - A R を接種し、腫瘍形成後、動物に操作をまったく行わないか、またはテストステロンペレットを s . c . に外科的に移植した。 ^{89}Zr -5 A 1 0 を、操作して7日後に投与し、生体内分布試験を24時間の p . i . に行った。 ^{89}Zr -5 A 1 0 局在化は、対照と比較して、テストステロンに曝露された L N C a P - A R 異種移植片内で有意により高かった(図3d、図8、および表9)。図8は、 ^{89}Zr -5 A 1 0 を注射された、皮下テストステロンペレットを有する、または有さない L N C a P - A R 異種移植片を持つ去勢雄マウスの生体内分布プロットを示す。テストステロンペレットの外科的移植または操作なし (N o T x) の6日後に、担腫瘍マウスを ^{89}Zr -5 A 1 0 で処置し、注射して24時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データを平均 % I D / g ± 1 標準偏差として報告する。N o T x と比較して、テストステロンに曝露された動物における ^{89}Zr -5 A 1 0 の腫瘍内取込みについて * P < 0 . 0 1 。表9に示したように、L N C a P - A R 腫瘍を持つ去勢雄マウス内の ^{89}Zr -5 A 1 0 生体内分布取込みは、アンドロゲン処置で有意に上昇した。L N C a P - A R 異種移植片を持つ去勢雄マウス内の ^{89}Zr -5 A 1 0 の取込みを示す e x v i v o 生体内分布データ。動物 (n = 4) に操作をしない (N o T x) か、または皮下テストステロンペレット (T e s t .) を投与した。7日後、動物に ^{89}Zr -5 A 1 0 を注射し、生体内分布データを、放射性トレーサーを i . v . 投与して24時間後に取得した。データを平均 % I D / g ± 1 標準偏差 (S . D .) として表現する。比の誤差を標準偏差の幾何平均として計算する。

【表 9】

表9

器官	生体内分布		腫瘍対組織比		組織対筋肉比	
	<i>No Tx</i>	<i>Test.</i>	<i>No Tx</i>	<i>Test.</i>	<i>No Tx</i>	<i>Test.</i>
	24時間(n=4)	24時間(n=4)	24時間(n=4)	24時間(n=4)	24時間(n=4)	24時間(n=4)
血液	9.85 ± 7.36	4.57 ± 1.78	2.3 ± 1.9	7.7 ± 4.2		
膀胱	1.22 ± 0.87	1.75 ± 0.78	18.7 ± 9.6	20.2 ± 10.7	1.5 ± 1.2	2.2 ± 1.3
心臓	4.41 ± 1.59	3.57 ± 1.03	5.2 ± 4.1	9.9 ± 5.7	5.5 ± 2.9	4.5 ± 2.2
肺	8.83 ± 2.13	6.63 ± 2.07	2.6 ± 1.3	5.3 ± 2.5	11.0 ± 5.1	8.3 ± 4.2
	59.08 ±	40.79 ±				
肝臓	27.03	14.15	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.4	73.7 ± 44.3	51.3 ± 27.3
脾臓	19.36 ± 2.12	12.19 ± 4.09	1.2 ± 0.7	2.9 ± 1.5	24.2 ± 9.8	15.3 ± 8.0
胃	1.14 ± 0.27	0.68 ± 0.85	20.0 ± 7.6	52.2 ± 26.2	1.4 ± 0.6	0.9 ± 1.1
小腸	1.31 ± 0.44	0.83 ± 0.18	17.4 ± 7.5	42.5 ± 55.6	1.6 ± 0.8	1.0 ± 0.5
大腸	2.49 ± 0.97	1.00 ± 0.17	9.2 ± 4.6	35.5 ± 15.4	3.1 ± 1.7	1.3 ± 0.5
腎臓	8.32 ± 1.90	4.79 ± 0.96	2.7 ± 1.5	7.4 ± 3.0	10.4 ± 4.7	6.0 ± 2.7
筋肉	0.80 ± 0.31	0.79 ± 0.32	28.4 ± 12.2	44.5 ± 18.8		
骨	3.16 ± 1.42	2.65 ± 0.76	7.2 ± 3.8	13.3 ± 7.3	3.9 ± 2.3	2.2 ± 1.3
		35.33 ±				
腫瘍	22.75 ± 8.28	13.15			28.4 ± 15.1	44.5 ± 24.4

10

20

【 0 2 0 4 】

予期されたように、腫瘍内 P S A レベルも増大した（表 1 0）。表 1 0 は、操作されていないか、または皮下テストステロンペレットを投与されている L N C a P - A R 異種移植片を持つ去勢雄マウス内の腫瘍内 P S A 濃度を提供する。L N C a P - A R 異種移植片を持つ去勢雄マウスに処置をせず（V E H #）、または皮下テストステロンペレットを投与し（T E S T #）、操作して 6 日後に、^{8 9} Z r - 5 A 1 0 を注射した。注射して 2 4 時間後に、マウスを屠殺して、P S A 分析を行った。腫瘍組織を外科的に切り取った。f P S A および t P S A を、P S A 指向性 E L I S A（上記の通り）を用いて求め、腫瘍内 P S A の場合では、値を総タンパク質濃度に対して正規化した。^a f P S A 濃度を n g / m l として報告し、^b 総 P S A 濃度を n g / m l として報告し、^c 総タンパク質濃度を n g / m g として報告する。略語：f P S A、フリー P S A；t P S A、総 P S A。

30

【表 10】

表10

マウス	fPSA	tPSA	f/t PSA比	総タンパク質	fPSA/tタンパク質	tPSA/tタンパク質
VEH1	91.37	139.75	0.65	8.31	10.99	16.81
VEH2	96.19	125.86	0.76	6.86	14.03	18.36
VEH3	285.18	419.60	0.68	7.68	37.15	54.66
VEH4	159.43	198.58	0.80	8.38	19.02	23.69
TEST2	566.42	2765.37	0.20	8.51	66.60	325.14
TEST3	147.77	183.28	0.81	6.51	22.69	28.14
TEST4	424.31	707.52	0.60	8.23	51.56	85.98
TEST5	384.89	551.47	0.70	5.88	65.44	93.77

10

20

【0205】

同様の結果がCWR22Rv1異種移植片で観察された(図8、表11、および表12)。図8において、テストステロンペレットの外科的移植または操作なし(N o T x)の6日後に、担腫瘍マウスを^{8 9}Zr-5A10で処置し、注射して24時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データを平均c p m / g + 1標準偏差として報告する。N o T xと比較して、テストステロンに曝露された動物における^{8 9}Zr-5A10の腫瘍内取込みについて* P < 0 . 0 5。表11は、CWR22Rv1異種移植片を持つ去勢雄マウス内の^{8 9}Zr-5A10の取込みを示すe x v i v o生体内分布データを提供する。^{8 9}Zr-5A10を投与する7日前に、動物(n = 4)に操作をしないか(N o T x)、または皮下テストステロンペレットを投与した(T e s t .)。生体内分布データは、放射性トレーサーをi . v .投与して24時間後に取得した。データを平均% I D / g ± 1標準偏差(S . D .)として表現する。比の誤差を標準偏差の幾何平均として計算する。

30

【表 1 1】

表11

器官	生体内分布		腫瘍対組織比		組織対筋肉比	
	<i>No Tx</i>	<i>Test.</i>	<i>No Tx</i>	<i>Test.</i>	<i>No Tx</i>	<i>Test.</i>
	24時間	24時間	24時間	24時間	24時間	24時間
	(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=4)	(n=4)
	7.35 ±	6.04 ±				
血液	0.35	0.59	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	15.4 ± 1.8	18.3 ± 3.8
	7.18 ±	8.97 ±				
前立腺	0.42	1.29	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	4.5 ± 1.8	7.0 ± 1.0
	1.62 ±					
膀胱	0.55	5.84 ± 3.3	1.3 ± 0.7	0.6 ± 0.0	3.5 ± 1.2	11.9 ± 7.0
	2.19 ±	1.86 ±				
心臓	0.38	0.42	1.0 ± 0.5	1.9 ± 1.0	4.7 ± 0.9	3.8 ± 1.0
	2.09 ±	1.83 ±				
肺	0.16	0.15	1.0 ± 0.4	1.9 ± 0.4	4.5 ± 0.6	3.7 ± 0.6
	5.28 ±	5.70 ±				
肝臓	1.21	1.17	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1	11.3 ± 2.8	11.6 ± 2.9
	4.12 ±	4.34 ±				
脾臓	0.77	1.49	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.2	8.8 ± 1.9	8.9 ± 3.3
	0.48 ±	0.35 ±				
胃	0.06	0.11	4.4 ± 1.8	9.6 ± 3.3	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.2
	0.63 ±	0.35 ±				
小腸	0.03	0.09	3.4 ± 1.3	9.8 ± 3.0	1.3 ± 0.2	0.7 ± 0.2
	0.54 ±	0.45 ±				
大腸	0.05	0.09	3.9 ± 1.5	7.5 ± 2.1	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.2
	2.16 ±	1.40 ±				
腎臓	0.23	0.08	1.0 ± 0.4	2.5 ± 0.5	4.6 ± 0.7	2.9 ± 0.4
	0.46 ±	0.49 ±				
筋肉	0.04	0.07	4.5 ± 1.8	7.0 ± 0.5	2.8 ± 1.0	2.9 ± 1.5
	1.31 ±	1.39 ±				
骨	0.46	0.69	1.6 ± 0.6	2.5 ± 0.4		
	2.10 ±	3.44 ±				
腫瘍	0.78	0.09				

【0206】

表12は、⁸⁹Zr-5A10を注射された、22Rv1腫瘍を持つ去勢雄マウスにおけるELISAを介したPSA発現レベルの腫瘍分析を提供する。22Rv1R異種移植片を持つ去勢雄マウスに処置をせず(VEH#)、または皮下テストステロンペレットを投与し(TEST#)、操作して6日後に、⁸⁹Zr-5A10を注射した。注射して24時間後に、マウスを屠殺して、PSA分析を行った。腫瘍組織を外科的に切り取った。f PSAおよびt PSAを、PSA指向性ELISA(上記の通り)を用いて求め、値を総タンパク質濃度に対して正規化した。^a f PSA濃度をng/mlとして報告し、^b 総

P S A濃度を n g / m Lとして報告し、^c 総タンパク質濃度を n g / m gとして報告する。
略語：f P S A、フリーP S A；t P S A、総P S A。

【表 1 2】

表12

マウス	fPSA ^a	tPSA ^b	総タンパク質 ^c	fPSA/tタンパク質	tPSA/tタンパク質
VEH 1	4.83	13.93	5.88	0.82	2.44
VEH 2	7.37	22.91	8.47	0.87	2.62
VEH 3	10.87	20.84	7.74	1.40	2.62
VEH 4	4.32	16.12	8.38	0.52	1.93
VEH 5	10.0	27.42	7.94	1.27	3.41
TEST 1	32.9	67.20	7.86	4.19	8.37
TEST 2	31.0	69.52	8.62	3.60	8.12
TEST 4	26.8	71.43	9.47	2.84	7.50
TEST 5	29.8	61.42	8.67	3.44	6.78

【0207】

まとめると、これらの結果は、⁸⁹Zr-5A10が腫瘍内ARシグナル伝達を忠実に反映することができることを示した。

(実施例4)

⁸⁹Zr-5A10を用いたin vivoでのアンドロゲン受容体シグナル伝達のin vivo定量化

【0208】

以下の実施例では、f P S A特異的モノクローナル抗体の、in vivoでのアンドロゲン受容体シグナル伝達を定量化する能力を実証した。この特定の実施例では、臨床活性がLNCaP-ARモデルにおける応答と相関する抗アンドロゲンMDV3100を使用して、⁸⁹Zr5A10 PETを用いてin vivoでARの薬理的阻害を定量化した。

【0209】

動物に投与されたときの最終DMSO濃度が5%であるように、DMSO中にMDV3100を溶解させた。ビヒクルの配合は、1%のカルボキシメチルセルロース、0.1%のTween-80、および5%のDMSOである。MDV3100またはビヒクルを、強制飼養を介して毎日投与した。以前に報告された方法(Holland, J. P.ら、Measuring the pharmacokinetic effects of a novel Hsp90 inhibitor on HER2/neu expression in mice using ⁸⁹Zr-DFO-trastuzumab、PLOS ONE、2010年、5巻(1号)、e8859頁)に従って、外側ノギス測定によって腫瘍体積(V/mm³)を推定した。

【 0 2 1 0 】

去勢雄マウスに s . c . L N C a P A R 異種移植片を接種し、担腫瘍マウスをランダム化して、ビヒクル、または 1 0 、 4 0 、 もしくは 8 0 m g / k g の M D V 3 1 0 0 を毎日経口強制飼養される群にした。処置を開始して 7 日後に、 ^{89}Zr -5 A 1 0 を投与し、生体内分布試験を 2 4 時間の p . i . に行った (図 1 0 a 、 図 1 1 、 および表 1 3) 。 図 1 0 a において、L N C a P - A R 異種移植片を持つ去勢雄マウスからの生体内分布データは、M D V 3 1 0 0 は、 ^{89}Zr -5 A 1 0 の腫瘍への局在化を阻害することを示す。ビヒクル、または指定用量の M D V 3 1 0 0 で 7 日間動物を処置し、このとき ^{89}Zr -5 A 1 0 を注射し、2 4 時間の p . i . に動物を回収し、生体内分布試験を行った。ビヒクルまたは 1 0 m g / k g の M D V 3 1 0 0 と比較して 4 0 m g / k g および 8 0 m g / k g の用量について * P < 0 . 0 1 。 図 1 1 、 すなわち、ビヒクルまたは M D V 3 1 0 0 で処置され、 ^{89}Zr -5 A 1 0 を注射された L N C a P - A R 異種移植片を持つ去勢雄マウスの生体内分布プロットは、M D V 3 1 0 0 が用量依存的様式で前立腺がんへの ^{89}Zr -5 A 1 0 局在化を阻害することを同様に示す。担腫瘍去勢マウスを、ビヒクル、または指定用量の M D V 3 1 0 0 (毎日の経口強制飼養) で処置した。6 日目に、マウスに ^{89}Zr -5 A 1 0 を注射し、注射して 2 4 時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データを平均 % I D / g $\pm$ 1 標準偏差として報告する。ビヒクルに対する M D V 3 1 0 0 4 0 m g / k g および 8 0 m g / k g について * P < 0 . 0 1 。 1 0 m g / k g の用量の M D V 3 1 0 0 に対する 4 0 m g / k g および 8 0 m g / k g の用量について P < 0 . 0 5 。 表 1 3 は、L N C a P - A R 異種移植片を持つ去勢雄マウスにおける ^{89}Zr -5 A 1 0 の取込みを示す e x v i v o 生体内分布データを示す。毎日の経口強制飼養を介して、ビヒクル、または指定用量の M D V 3 1 0 0 (M D V) で動物 (n = 4) を処置した。6 日目に、 ^{89}Zr -5 A 1 0 を i . v . 投与した。生体内分布データは、放射性トレーサーを i . v . 投与して 2 4 時間後に取得した。

10

20

【表 1 3】

表13

組織	ピヒクル	MDV (10 mg/kg)	MDV (40 mg/kg)	MDV (80 mg/kg)
	24時間(n=4)	24時間(n=4)	24時間(n=4)	24時間(n=4)
血液	9.85 ± 7.36	5.70 ± 1.17	4.08 ± 2.25	4.13 ± 2.49
膀胱	1.22 ± 0.87	1.14 ± 0.53	0.50 ± 0.22	0.94 ± 0.17
心臓	4.41 ± 1.59	6.21 ± 1.87	3.52 ± 0.64	3.32 ± 1.14
肺	8.83 ± 2.13	9.80 ± 3.28	6.37 ± 2.41	7.31 ± 1.60
肝臓	59.08 ± 27.03	46.95 ± 12.13	37.21 ± 0.67	28.66 ± 7.94
脾臓	19.36 ± 2.12	18.08 ± 4.45	14.18 ± 4.03	13.05 ± 5.66
胃	1.14 ± 0.27	0.31 ± 0.03	0.53 ± 0.33	0.69 ± 0.31
小腸	1.31 ± 0.44	0.99 ± 0.29	0.98 ± 0.41	0.99 ± 0.15
大腸	2.49 ± 0.97	0.89 ± 0.17	0.67 ± 0.18	0.99 ± 0.39
腎臓	8.32 ± 1.90	9.44 ± 2.17	9.32 ± 1.17	7.95 ± 0.96
筋肉	0.80 ± 0.31	0.65 ± 0.31	0.47 ± 0.29	0.58 ± 0.35
骨	3.16 ± 1.42	1.91 ± 0.42	3.13 ± 0.69	2.31 ± 1.39
腫瘍	22.75 ± 8.28	14.12 ± 8.0	4.57 ± 1.78	3.19 ± 1.4
腫瘍対組織比				
血液	2.3 ± 1.9	2.5 ± 1.5	1.1 ± 0.8	0.8 ± 0.6
膀胱	18.7 ± 9.6	12.4 ± 9.9	9.1 ± 5.0	3.4 ± 2.1
心臓	5.2 ± 4.1	2.3 ± 1.7	1.3 ± 0.8	1.0 ± 0.5
肺	2.6 ± 1.3	1.4 ± 0.9	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.2
肝臓	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
脾臓	1.2 ± 0.7	0.8 ± 0.5	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1
胃	20.0 ± 7.6	45.7 ± 28.2	8.6 ± 4.2	4.6 ± 2.9
小腸	17.4 ± 7.5	14.3 ± 8.2	4.7 ± 3.4	3.2 ± 2.0
大腸	9.2 ± 4.6	15.9 ± 10.2	6.8 ± 3.9	3.2 ± 1.5
腎臓	2.7 ± 1.5	1.5 ± 0.9	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2
筋肉	28.4 ± 12.2	21.8 ± 13.4	9.7 ± 4.0	5.5 ± 2.5
骨	7.2 ± 3.8	7.4 ± 5.5	1.5 ± 1.1	1.4 ± 1.0
組織対筋肉比				
膀胱	1.5 ± 1.2	21.8 ± 16.1	9.7 ± 7.0	5.5 ± 4.1
心臓	5.5 ± 2.9	1.8 ± 1.2	1.1 ± 0.8	1.6 ± 1.0
肺	11.0 ± 5.1	9.6 ± 5.4	7.5 ± 4.8	5.7 ± 4.0
肝臓	73.7 ± 44.3	15.2 ± 8.8	13.6 ± 9.7	12.6 ± 8.0
脾臓	24.2 ± 9.8	72.6 ± 39.1	79.2 ± 48.3	49.4 ± 32.6
胃	1.4 ± 0.6	28.0 ± 14.9	30.2 ± 20.3	22.5 ± 16.6
小腸	1.6 ± 0.8	0.5 ± 0.2	1.1 ± 1.0	1.2 ± 0.9
大腸	3.1 ± 1.7	1.5 ± 0.9	2.1 ± 1.5	1.7 ± 1.0
腎臓	10.4 ± 4.7	1.4 ± 0.7	1.4 ± 1.0	1.7 ± 1.2
骨	3.9 ± 2.3	14.6 ± 7.7	19.8 ± 12.4	13.4 ± 8.4
腫瘍	28.4 ± 15.1	3.0 ± 1.5	6.7 ± 4.3	4.0 ± 3.4

【0 2 1 1】

予期されたように、各用量のMDV 3100は、ARシグナル伝達およびfPSA合成を阻害した(表14)。表14は、抗アンドロゲンで処置された、LNCaP-AR腫瘍を持つ去勢雄マウスにおけるELISAを介したPSA発現レベルの腫瘍分析に関するデ

10

20

30

40

50

ータを提供する。LNCaP-AR異種移植片を持つ去勢雄マウスに、ビヒクル(VEH#)、10mg/kg(MDV10#)、40mg/kg(MDV40#)、または80mg/kg(MDV80#)を毎日経口強制飼養した。操作して6日後に、マウスに⁸⁹Zr-5A10を注射した。注射して24時間後に、マウスを屠殺し、PSA分析を行った。腫瘍組織を外科的に切り取った。fPSAおよびtPSAを、PSA指向性ELISA(上記の通り)を用いて求め、腫瘍内PSAの場合では、値を総タンパク質濃度に対して正規化した。^a fPSA濃度をng/mlとして報告し、^b 総PSA濃度をng/mLとして報告し、^c 総タンパク質濃度をng/mgとして報告する。略語：fPSA、フリーPSA；tPSA、総PSA。

【表14】

10

表14

マウス	fPSA ^a	tPSA ^b	f/t PSA比	総タンパク質 ^c	fPSA/tタンパク質	tPSA/tタンパク質
VEH1	91.37	139.75	0.65	8.31	10.99	16.81
VEH2	96.19	125.86	0.76	6.86	14.03	18.36
VEH3	285.18	419.60	0.68	7.68	37.15	54.66
VEH4	159.43	198.58	0.80	8.38	19.02	23.69
MDV10 1	474.40	690.48	0.69	9.20	51.57	75.06
MDV10 2	19.12	26.21	0.73	5.82	3.29	4.50
MDV10 4	48.98	86.72	0.56	6.92	7.07	12.52
MDV10 5	3.96	6.64	0.60	4.50	0.88	1.48
MDV40 1	71.24	79.60	0.89	6.13	11.61	12.98
MDV40 3	43.25	51.09	0.85	7.04	6.14	7.25
MDV40 4	98.26	122.15	0.80	6.50	15.13	18.81
MDV80 3	5.97	10.55	0.57	5.05	1.18	2.09
MDV80 4	77.83	112.53	0.69	7.52	10.34	14.96
MDV80 5	57.31	97.80	0.59	5.74	9.99	17.05

20

30

40

【0212】

50

したがって、腫瘍結合⁸⁹Zr-5A10は、40 mg/kgおよび80 mg/kgの用量のMDV3100によって有意に減少した(図10a)。

【0213】

注目すべきことに、本発明者らは、ビヒクルまたは80 mg/kgのMDV3100を毎日経口強制飼養される動物の群間で、PETによる腫瘍結合⁸⁹Zr-5A10の統計的变化も観察した(図10bおよび図10c、表16)。図10bは、右側腹部にLNCaP-AR異種移植片を持つインタクトな雄マウスの、s.c.テストステロンペレット、または7日間のビヒクルもしくはMDV3100(80 mg/kg)の毎日の経口強制飼養で操作した後、24時間のp.i.に⁸⁹Zr-5A10で画像化した、代表的な横断(Trans.)PETおよび冠状PETスライスを示す。腫瘍結合⁸⁹Zr-5A10の明らかな視覚的差異を群間で見るができる。矢印は、腫瘍(T)およびマウス肝臓(L)の位置を示す。図10cにおいて、PET試験からの腫瘍の対象領域の分析は、腫瘍結合⁸⁹Zr-5A10の統計的に有意な変化を示す。ビヒクルと比較して* $P < 0.01$ 。ビヒクルと比較して $P < 0.05$ 。エラーバーは、平均からの標準偏差を表す。表16は、皮下LNCaP-AR腫瘍の対象領域の分析から求めたSUV_{mean}値のリストを提供する。

【表16】

表16

MDV (80		
ビヒクル	mg/kg)	テストステロン
24時間(n=4)	24時間(n=4)	24時間(n=3)
2.54 ± 0.8	8.62 ± 1.2	19.28 ± 8.0
2.89 ± 0.6	5.25 ± 1.2	19.75 ± 7.5
2.09 ± 0.93	7.16 ± 0.8	12.07 ± 5.0
3.23 ± 1.4	8.54 ± 1.6	

【0214】

さらに、腫瘍結合⁸⁹Zr-5A10の有意な増加が、s.c.テストステロンペレットを投与されているマウスの別々の処置アームにおいて観察された。

【0215】

まとめると、これらの結果は、⁸⁹Zr-5A10の、腫瘍内ARシグナル伝達の薬理的に誘発される変化を測定するアビリティを強調する。

(実施例5)

⁸⁹Zr-5A10は、骨格前立腺がん病変を区別することができる

【0216】

上記に論じたように、慣例的な前立腺がん診断の重要な限界は、真の骨格転移性疾患と、転移性疾患と無関係であるか、または分析が邪魔される程度に処理からの時間が離れている近傍の骨再形成とを区別することができないことである。本実施例では、fPSAモノクローナル抗体は、真の骨格前立腺がん病変を区別するアビリティを有することが実証された。

【0217】

以下の通り、インタクトな雄マウスの左後肢の脛骨にLNCaP-ARを注射することによって、骨腫瘍を設けた。手術の前に、去勢雄SCIDマウスをケタミンで麻酔し、左後肢に切開を行った。骨錐を使用して脛骨を穿刺し、 1×10^5 細胞(22Rv1またはLNCaP-AR)を骨髓中に注射した。穿刺部を骨ろうで閉じ、切開を縫合し、動物に対症用量のカルプロフェン(5 mg/kg)を、手術後3日間、毎日1回投与した。腫瘍発達を生物発光イメージングで追跡し、MRIで確認した。骨折モデルを、細胞の注射および骨ろうの塗布を除いて骨腫瘍モデルと同様に準備した。

【0218】

腫瘍発達は、7週間後にMRIによって確認した(図12および図13)。図12は、左脛骨にLNCaP-ARを接種されたマウスの代表的な生物発光画像を示す。インタクトな雄マウスの脛骨にLNCaP-ARを接種し、進行を生物発光によって監視し、腫瘍発達をMRIおよび血清PSA分析によって確認した。接種して5週間後の担腫瘍マウスのコホートの一般的な画像が示されている。これらの動物は、疾患および陽性生物発光が確認されていた。

【0219】

マウスの磁気共鳴画像は、200MHzで稼働し、400mT/m ID 12cmの傾斜磁場コイルを備えたBruker 4.7T Biospecスキャナー(Bruker Biospin MRI GmbH, Ettlingen, ドイツ)で取得した。IDが32mmである特注の直交バードケージ共振器を、RFの励起および取得に使用した(Stark Contrast MRI Coils Research Inc., Erlangen, ドイツ)。酸素および1%のイソフルランガスでマウスを麻酔した。動物の呼吸は、小動物生理学的モニタリングシステム(SA Instruments, Inc., Stony Brook, New York)を使用することによって監視した。動物を適所配置するために、3つのオルソゴナル方向に沿ったT2重みづけスカウト画像を最初に取得した。T2重みづけ高速スピンエコーRAREシーケンス(緩和増強による急速撮像)を使用して、スライス厚が0.8mmであり、FOVが117×133μmの空間分解能を伴った30mm×34mmである、軸方向のマウス骨盤画像を取得した。以下の取得パラメータ、すなわち、TR=4.5秒、TE=40ms、RARE因子8、および20分の収集時間を使用した。

【0220】

図13は、骨の腫瘍浸潤を示す代表的なMRIスライスを提示する。インタクトな雄マウスの脛骨にLNCaP-ARを接種し、腫瘍発達をMRIおよび血清PSA分析で視覚的に確認した。腫瘍塊を示す左後肢(MRIスライスの右側に向いた)のコントラストの領域が赤で囲まれている。

【0221】

PET/CT試験により、反対側の肢と比較して、担腫瘍後肢における高コントラストが示された(図14a)。PET/CT試験について、コンピュータ断層撮影(CT)画像は、軸方向8.5cm×横断方向5.0cmのFOVを有する小動物Siemens/CTI microCAT II(Siemens Medical Solutions, Malvern, PA)スキャナーで取得した。同時登録したPET/CT画像を、以前に報告された方法に従って、マトリックスに記録およびマッピングした。図14aでは、同時登録した三次元ボリュームを与えるPET/CT画像が、 ^{89}Zr 5A10は、インタクトな雄マウスの左脛骨に位置した骨LNCaP-AR移植片に局在化することを示す。青色-緑色の色スケールで与えたPETデータは、右の(正常な)脛骨と比較して、動物の左(担腫瘍)脛骨上により多い量の活性を示す。

【0222】

この観察と一致して、同時登録したPET/MRI画像は、脛骨におけるPETおよびMRIコントラストの整列を示した。(図14bおよび図15)。図14bでは、同時登録したPET/MRI画像が、MRIによって検出された腫瘍関連コントラストとの ^{89}Zr -5A10からのポジトロン放射の同時局在化を示す。図15は、脛骨中の腫瘍との ^{89}Zr -5A10の同時整列を示す、同時登録したPET/MRIスライスを示す。インタクトな雄マウスの脛骨にLNCaP-ARを接種し、腫瘍発生をMRIおよび血清PSA分析で視覚的に確認した。同時登録したPET/MRI画像は、 ^{89}Zr -5A10を注射して24時間後に取得した。右(正常な)後肢からの画像が比較のために提示されている。

【0223】

外科的に切り取った脛骨の死後オートラジオグラフィーは、 ^{89}Zr -5A10からの

10

20

30

40

50

ポジトロン放射が、組織診断によって画定された、LNCaP-AR病変部のトポグラフィーと同時整列することを示した(図16)。手順は、以下の通り行った。マウスを屠殺した後、腫瘍を含む脛骨を外科的に切り取り、OCT(Miles Inc.、Elkhart、IN)中に包埋し、クライオモールド内のドライアイス上でスナップ凍結させた。10枚の連続した厚さ5 μ mの組織切片のセットを、Microm HM500クリオスタットミクロトーム(Microm International、Walldorf、ドイツ)を使用して切断し、ポリ-L-リシン被覆ガラス顕微鏡スライド上に配列した。組織切片を、10%のホスフェート緩衝ホルマリン中で5分間固定し、2回洗浄し、空気乾燥させ、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)で染色した。染色した組織切片を、Fuji film BAS-MS2325イメージングプレート(Fuji Photo Film Co、東京、日本)に対するフィルムカセット内に置いて、デジタルオートラジオグラム(DAR)を取得した。⁸⁹ZrClまたは⁸⁹Zr-5A10を注射して約168時間後に、スライドを48時間曝露した。50 μ mのピクセル寸法を有するデジタル画像を生成するFuji film BAS-1800IIバイオイメージングアナライザー(Fuji Photo Film Co、東京、日本)によって、曝露した蛍光体プレートを読み取った。デジタル画像は、モーター駆動ステージ(Prior Scientific Inc、Rockland、MA)を備えたOlympus BX60 System Microscope(Olympus America Inc、Melville、NY)で得た。引き続いて、H&E画像を、DARデータと同じ解像度を取得した。剛体平面変換(rigid planar transform)を使用して、DAR画像をH&E画像に手作業で整列させた。

【0224】

図16では、⁸⁹Zr-5A10(左)および⁸⁹ZrCl(右)で処置した骨LNCaP-AR移植片を持つマウスの組織構造および重ねたオートラジオグラフィーは、⁸⁹Zr-5A10は、腫瘍組織に局在化し、一方、⁸⁹ZrClは、正常な骨に局在化することを示す。腫瘍組織は、組織診断の目視検査によって区別した(H&E染色によって画定)。これは、4倍で、青色で囲まれており、10倍で、矢印で強調されている。より高い拡大の図のために選択した組織の領域は、黄色で輪郭を描いてある。

【0225】

⁸⁹Zr-5A10が骨再形成と交差反応しないことをさらに確認するために、右後肢の脛骨の穿刺によってマウスの別々のコホート内で骨折を外科的に誘導した。¹⁸FNaFおよび^{99m}Tc-MDPはともに、修復部位に容易に局在化した一方、⁸⁹Zr-5A10は局在化しなかった(図14c)。図14cでは、脛骨の骨折を受け、手術して10日後のインタクトな雄マウスにおいて、骨再形成を¹⁸F-NaFで評価した。コントラストの明らかな領域が、PETによって、骨折した脛骨において識別された。最初の画像の2日後に、動物に^{99m}Tc-MDPおよび⁸⁹Zr-5A10を同時注射した。SPECTイメージングは、^{99m}Tc-MDPも、予期したように、治癒している骨の領域に局在化することを示した。対照的に、PETイメージングは、創傷部位で検出可能な⁸⁹Zr-5A10をまったく示さず、現代の臨床的放射性トレーサーと比較して、この試薬のPCaに対する高い特異性を提示した。

【0226】

まとめると、これらの結果は、骨内の前立腺がん由来腫瘍に対する⁸⁹Zr-5A10のユニークな特異性を強調した。

(実施例6)

要約および比較データ

【0227】

アンドロゲン受容体制御前立腺特異的遺伝子産物であるPSAの発現の変化は、fPSAに対して特異的なモノクローナル抗体に連結した新規放射性トレーサーで非侵襲的に測定することができることが実証された。アンドロゲン受容体シグナル伝達の定量化の適性を支持して、⁸⁹Zr-5A10は、複数のアンドロゲン受容体陽性前立腺がんモデルお

よび P S A 陽性前立腺がんモデルに容易に局在化し、前立腺がんの臨床的に有効な異種移植片モデルにおいて、抗アンドロゲン治療によって誘導される f P S A 合成の低下を定量的に測定した。^{8 9} Z r 5 A 1 0 は、骨のスキャンで、がんによって誘導される変化を模写する非悪性骨格病理ではなく、前立腺がん細胞を特異的に標的にするので、本発明の放射性トレーサーは、より正確な病期分類およびより良好な処置選択の機会を提供する。この点において、本発明の実施形態は、腫瘍生物学の我々の理解を改善するために、異種疾患における個々の病変部を試験する前例のない機会を提供する。

【 0 2 2 8 】

発現がアンドロゲン受容体シグナル伝達によって抑制される細胞表面タンパク質である前立腺特異的膜抗原 (P S M A) の変化は、アンドロゲン受容体シグナル伝達のイメージング用非侵襲性マーカーとして機能を果たすこともできることが以前に報告されている。しかし、P S M A 発現は、前立腺特異的でなく、アンドロゲン受容体指向性治療の P S M A 発現に対する臨床的インパクトは公知でない。また、L N C a P - A R 異種移植片の形式比較により、^{8 9} Z r - 5 A 1 0 P E T は、まったく同様に標識された P S M A に対するモノクローナル抗体 (^{8 9} Z r - J 5 9 1) より説得力のある治療後の腫瘍局在化の変化をもたらすことが示された (図 1 7)。図 1 7 は、ビヒクルまたは M D V 3 1 0 0 で処置され、^{8 9} Z r - J 5 9 1 を注射された L N C a P - A R 異種移植片を持つ去勢雄マウスの生体内分布プロットである。担腫瘍去勢マウスをビヒクル、または指定用量の M D V 3 1 0 0 (毎日の経口強制飼養) で処置した。6 日目に、マウスに ^{8 9} Z r - J 5 9 1 を注射し、注射して 2 4 時間後に屠殺し、血液および組織を回収し、生体内分布試験を行った。データは、平均 % I D / g ± 1 標準偏差として報告されている。図 1 7 で明らかに分かるように、P M S A に対するモノクローナル抗体は、治療後の腫瘍局在化のいずれの統計的に有意な差異も実証することができず、それによって、本発明の実施形態の優れた予期しない結果を実証する。

均等物および範囲

【 0 2 2 9 】

当業者は、本明細書に記載の本発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識することになり、またはこれらを、単なる日常の実験を使用して確認することができるであろう。本発明の範囲は、上記記述を限定するように意図されていない。同様に、当業者は、前述したことは、本発明の単にある特定の好適な実施形態を代表することを容易に察するであろう。上述した手順および組成物に対する様々な変更および改変を、以下の特許請求の範囲で示される本発明の趣旨または範囲から逸脱することなく行うことができる。

【 0 2 3 0 】

特許請求の範囲において、「 a 」、「 a n 」、および「 t h e 」などの冠詞は、反対の指示がない限り、またはさもなければ脈絡から明白でない限り、1 つまたは 1 つを超える、を意味し得る。したがって、例えば、「 a n a n t i b o d y 」への言及は、複数のこのような抗体を含み、「 t h e c e l l 」への言及は、当業者に公知の 1 つまたは複数の細胞への言及を含む、などである。群の 1 つまたは複数のメンバー間に「または」を含む請求項または記述は、反対の指示がない限り、またはさもなければ脈絡から明白でない限り、1 つ、1 つを超える、またはすべての群メンバーが、所与の生成物またはプロセス中に存在し、使用され、またはさもなければこれらに関連する場合、満たされるとみなされる。本発明は、群の正確に 1 つのメンバーが、所与の生成物またはプロセス中に存在し、使用され、またはさもなければこれらに関連する実施形態を含む。本発明は、1 つを超える、またはすべての群メンバーが、所与の生成物またはプロセス中に存在し、使用され、またはさもなければこれらに関連する実施形態を含む。さらに、本発明は、列挙した請求項の 1 つまたは複数からの 1 つまたは複数の限定事項、要素、条項、記述用語などが別の請求項中に導入されるすべてのバリエーション、組合せ、および並び換えを包含することが理解されるべきである。例えば、別の請求項に従属している任意の請求項は、同じ基本請求項に従属している任意の他の請求項に見つかる 1 つまたは複数の限定事項を含むように改変することができる。さらに、請求項により組成物が列挙されている場合、別段

の指定のない限り、または矛盾もしくは不一致が生じることが当業者に明白でない限り、本明細書に開示の目的のいずれか1つのためのその組成物を使用する方法が含まれ、本明細書に開示の作製方法または当技術分野で公知の他の方法のいずれかに従ってその組成物を作製する方法が含まれる。

【0231】

要素が、例えば、マーカッシュ群形式でリストとして提示されている場合、要素の各亜群も開示されており、任意の要素（複数可）をその群から除去することができることが理解されるべきである。一般に、本発明または本発明の態様が、特定の要素、フィーチャなどを含むように言及されている場合、本発明のある特定の実施形態または本発明の態様は、そのような要素、フィーチャなどからなり、またはこれらから本質的になることが理解されるべきである。単純にする目的で、これらの実施形態は、本明細書で、この通りの言葉で具体的に示されていない。用語「含む（comprising）」は、オープンであることが意図され、追加の要素またはステップを含めることを可能にすることに留意されたい。

10

【0232】

範囲が与えられている場合、終点は含まれている。さらに、別段の指定のない限り、または脈絡および当業者の理解から別段に明白でない限り、範囲として表現されている値は、脈絡により別段に明確に要求されない限り、その範囲の下限の単位の1/10まで、本発明の異なる実施形態において、述べた範囲（the state ranges）内の任意の具体的な値またはサブ範囲を想定することができることが理解されるべきである。

20

【0233】

さらに、先行技術の中に入る本発明の任意の特定の実施形態は、特許請求の範囲の任意の1つまたは複数から明示的に除外され得ることが理解されるべきである。そのような実施形態は、当業者に公知であると考えられるので、これらは、除外することが本明細書で明示的に示されていなくても除外され得る。本発明の組成物の任意の特定の実施形態は、先行技術の存在に関係しているか否かを問わず、任意の理由で任意の1つまたは複数の請求項から除外され得る。

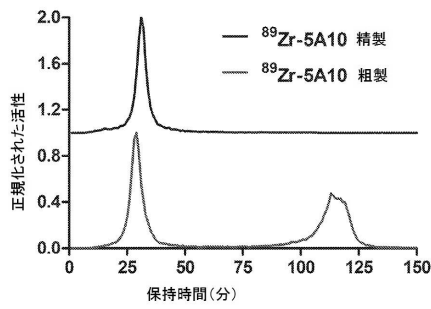
【0234】

上記および本文全体にわたって論じた刊行物は、もっぱら本願の出願日前のこれらの開示について提供されている。本明細書のいずれも、本発明者らが、事前開示によってそのような開示に先行する権利を与えられていないことを承認するように解釈されるべきでない。

30

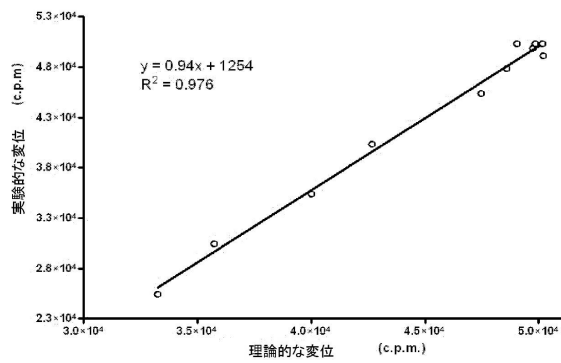
【図 1】

Fig. 1



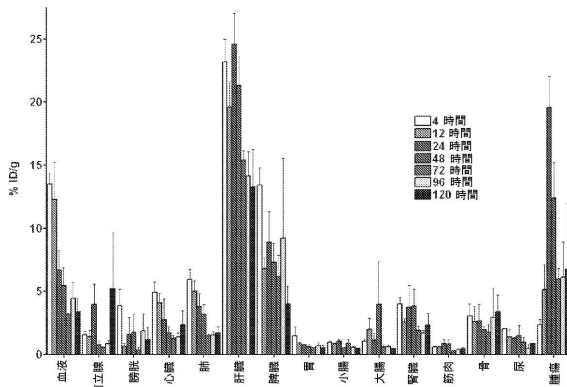
【図 2】

Fig. 2



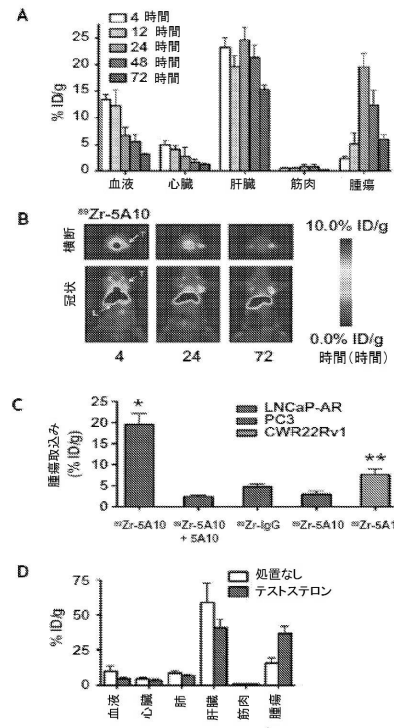
【図 4】

Fig. 4



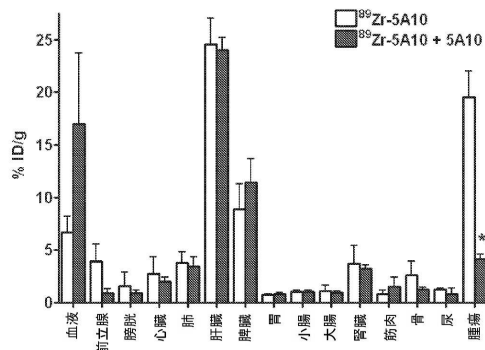
【図 3】

Fig. 3



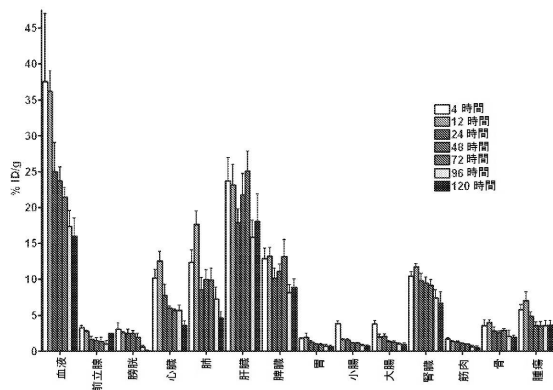
【図 5】

Fig. 5



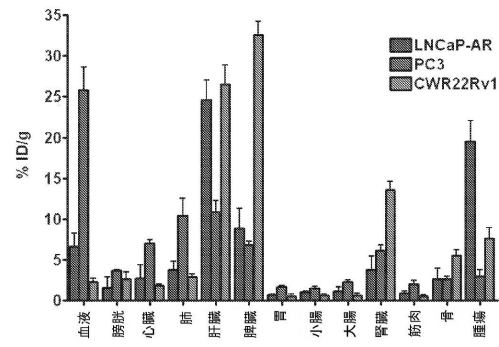
【図 6】

Fig. 6



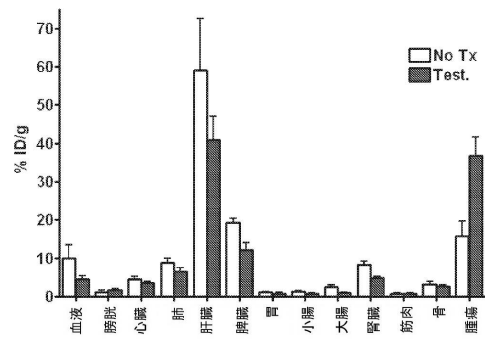
【図 7】

Fig. 7



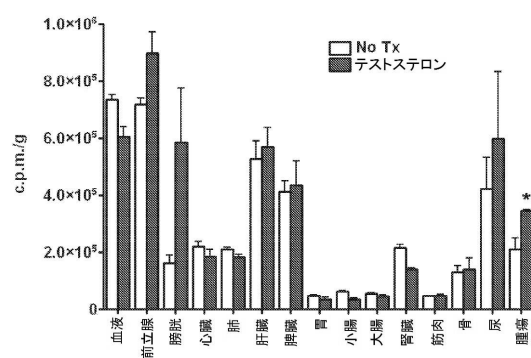
【図 8】

Fig. 8



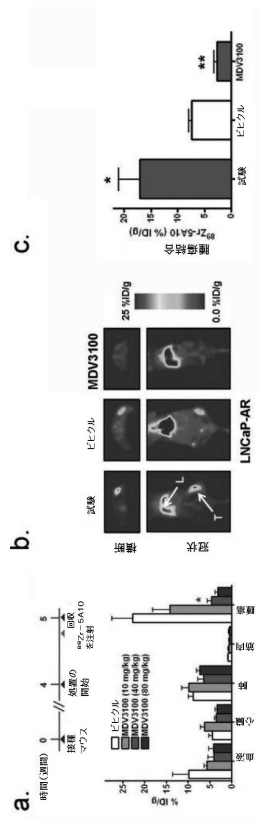
【図 9】

Fig. 9



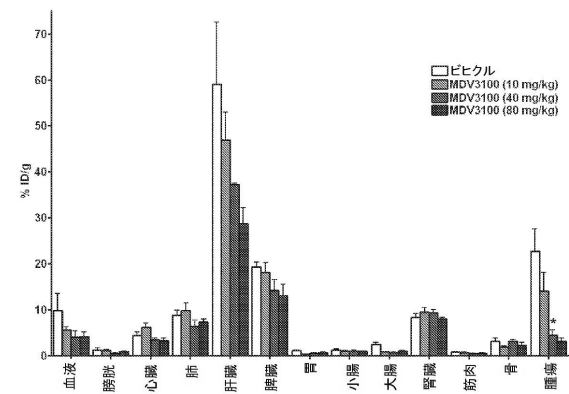
【図 10】

Fig. 10



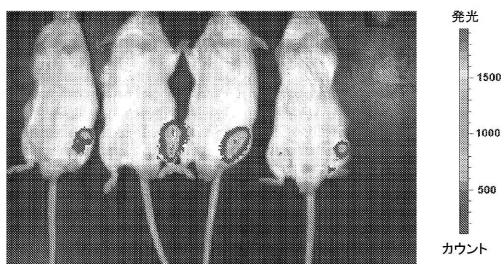
【図 11】

Fig. 11



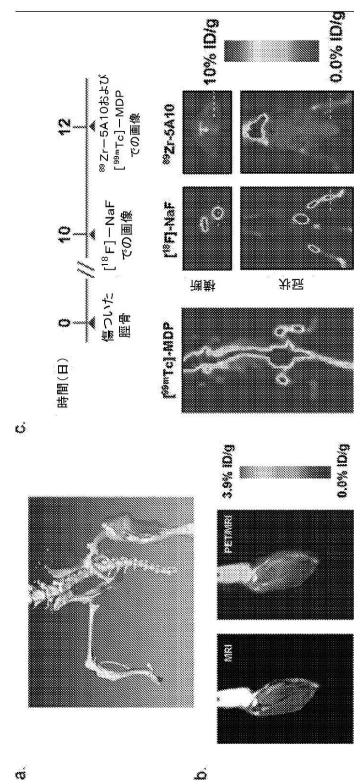
【図 12】

Fig. 12



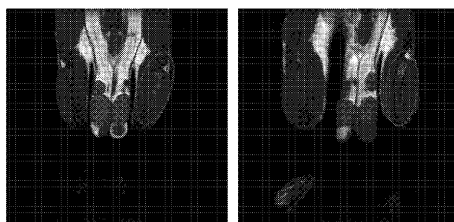
【図 14】

Fig. 14



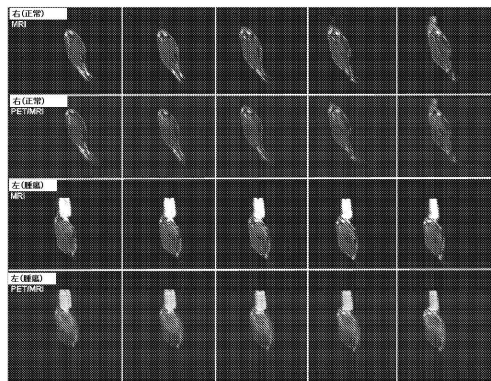
【図 13】

Fig. 13



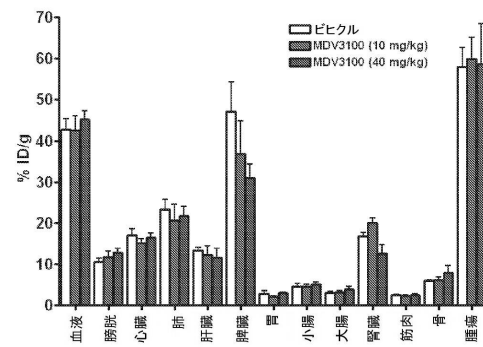
【図 15】

Fig. 15



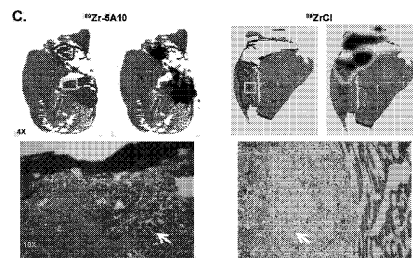
【図 17】

Fig. 17



【図 16】

Fig. 16



【配列表】

0006181059000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 アルマート, デイビッド
アメリカ合衆国 ニューヨーク 11249, ブルックリン, ケント アベニュー 175,
アパートメント 416
- (72)発明者 ルイス, ジェイソン
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, イースト 68ティーエイチ
ストリート 245, アpartment 3エー
- (72)発明者 エバンス, マイケル
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10028, ニューヨーク, イースト エンド アベニュー
48, アpartment 4シー
- (72)発明者 リジャ, ハンス
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275
, メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター 気付

審査官 小堀 麻子

- (56)参考文献 Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1999年, Vol.229, p.27-32
Clin Chem, 1995年, Vol.41, No.10, p.1480-1488
Eur Urol, 1999年, Vol.36, No.2, p.116-122

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 51/00

A61K 39/00

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)