

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503768

(P2005-503768A)

(43) 公表日 平成17年2月10日(2005.2.10)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395	L 4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 49/00</b>	A 6 1 K 39/395	M 4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 51/00</b>	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 6 4
<b>C O 7 K 5/107</b>	A 6 1 K 39/395	T 4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 330 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-579763 (P2002-579763)	(71) 出願人	599176263
(86) (22) 出願日	平成14年4月3日 (2002.4.3)		イムノメディクス, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月3日 (2003.10.3)		アメリカ合衆国、07950 ニュー・ジャージー、モリス・ブレインズ、アメリカン・ロード 300
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/010235	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開番号	W02002/082041		弁理士 奥山 尚一
(87) 国際公開日	平成14年10月17日 (2002.10.17)	(74) 代理人	100096769
(31) 優先権主張番号	09/823,746		弁理士 有原 幸一
(32) 優先日	平成13年4月3日 (2001.4.3)	(74) 代理人	100107319
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重特異性抗体とともに使用される新規なペプチド型薬剤の製造および使用

## (57) 【要約】

本発明は、標的組織に対して反応し得る少なくとも1つのアームと、リンカー部分に対して反応し得る少なくとも1つの他のアームとを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントに関する。リンカー部分は、抗体が調製されたハプテンを含む。そのような抗原性リンカーは1つ以上の治療剤または診断剤または酵素にコンジュゲートされる。本発明は、そのような二重特異性の抗体または抗体フラグメントを製造するための構築物および方法、ならびにそれらの使用方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

結腸特異的抗原 - p ムチン ( C S A p ) 抗原に結合するモノクローナル ( M A b ) 抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 2】

M u - 9 エピトープと結合する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 3】

ヒト化されている、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 4】

キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 5】

キメラ M u - 9 ( c M u - 9 ) 抗体またはそのフラグメントである、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 6】

ヒト化されている、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 7】

ヒト化 M u - 9 抗体またはそのフラグメントである、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 8】

ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 9】

ネズミ抗 C S A p M A b の相補性決定領域 ( C D R ) と、ヒト抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域のフレームワーク ( F R ) 領域と、ヒト抗体の軽鎖定常領域および重鎖定常領域とを含み、ヒト化抗 C S A p M A b の軽鎖可変領域の C D R が、R S S Q S I V H S N G N T Y L E のアミノ酸配列を含む C D R 1 と、K V S N R F S のアミノ酸配列を含む C D R 2 と、F Q G S R V P Y T のアミノ酸配列を含む C D R 3 とを含み、そしてヒト化抗 C S A p M A b の重鎖可変領域の C D R が、E Y V I T のアミノ酸配列を含む C D R 1 と、E I Y P G S G S T S Y N E K F K のアミノ酸配列を含む C D R 2 と、E D L のアミノ酸配列を含む C D R 3 とを含み、請求項 3 に記載の抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 10】

前記抗体またはそのフラグメントの軽鎖可変領域および重鎖可変領域の F R が、ネズミ抗 C S A p 抗体またはそのフラグメントの対応する F R に由来する置換された少なくとも 1 つのアミノ酸を含む、請求項 3 に記載の抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 11】

前記ネズミ M A b に由来する前記アミノ酸が、図 10 A のネズミ重鎖可変領域のアミノ酸残基 5、アミノ酸残基 27、アミノ酸残基 30、アミノ酸残基 38、アミノ酸残基 40、アミノ酸残基 48、アミノ酸残基 66、アミノ酸残基 67、アミノ酸残基 74、アミノ酸残基 93、アミノ酸残基 94 およびアミノ酸残基 103 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸である、請求項 10 に記載の抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 12】

前記ネズミアミノ酸が、図 10 B のネズミ軽鎖可変領域のアミノ酸残基 37、アミノ酸残基 58 およびアミノ酸残基 100 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸である、請求項 10 に記載の抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 13】

図 4 の M u - 9 V<sub>K</sub> ヌクレオチド配列を含む、請求項 2 に記載の抗体またはそのフラグメント。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

図 8 の  $\text{Mu} - 9 \text{V}_H$ ヌクレオチド配列を含む、請求項 2 に記載の抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 15】

図 11B の  $\text{hMu} - 9 \text{V}_K$ ヌクレオチド配列を含む、請求項 3 または 6 に記載の抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 16】

図 11A の  $\text{hMu} - 9 \text{V}_H$ ヌクレオチド配列を含む、請求項 3 または 6 に記載の抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 17】

ネズミ抗  $\text{CSAp} \text{MAb}$  の相補性決定領域 (CDR) と、ヒト抗体の重鎖可変領域のフレームワーク領域と、ヒト抗体の重鎖定常領域とを含む CDR グラフトされたヒト化重鎖であって、ヒト化抗  $\text{CSAp} \text{MAb}$  の重鎖定常領域の CDR が、EYVIT のアミノ酸配列を含む CDR1 と、EIYPGSGSTSYNEKFK のアミノ酸配列を含む CDR2 と、EDL のアミノ酸配列を含む CDR3 とを含む、CDR グラフトされたヒト化重鎖。

10

## 【請求項 18】

前記重鎖可変領域が図 11A の  $\text{hMu} - 9 \text{V}_H$ ヌクレオチド配列を含む、請求項 17 に記載の重鎖。

## 【請求項 19】

ネズミ抗  $\text{CSAp} \text{MAb}$  の相補性決定領域 (CDR) と、ヒト抗体の軽鎖可変領域のフレームワーク領域と、ヒト抗体の軽鎖定常領域とを含む CDR グラフトされたヒト化軽鎖であって、ヒト化抗  $\text{CSAp} \text{MAb}$  の軽鎖可変領域の CDR が、RSSQSIVHSNGNTYLE のアミノ酸配列を含む CDR1 と、KVSNRFS のアミノ酸配列を含む CDR2 と、FQGSRVPLYT のアミノ酸配列を含む CDR3 とを含む、CDR グラフトされたヒト化軽鎖。

20

## 【請求項 20】

前記軽鎖可変領域が図 11B の  $\text{hMu} - 9 \text{V}_H$ ヌクレオチド配列を含む、請求項 19 に記載の軽鎖。

## 【請求項 21】

前記フラグメントが、 $F_v$ 、 $F(ab')_2$ 、 $Fab'$  および  $Fab$  からなる群から選択される、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の抗  $\text{CSAp} \text{MAb}$  抗体またはそのフラグメント。

30

## 【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載される抗  $\text{CSAp} \text{MAb}$  またはそのフラグメントあるいはそれらの抗体融合タンパク質またはそのフラグメントを含む抗体成分を含み、前記抗体成分が少なくとも 1 つの診断 / 検出剤または少なくとも 1 つの治療剤に結合している、診断 / 検出用または治療用の免疫コンジュゲート体。

## 【請求項 23】

前記診断 / 検出剤が少なくとも 1 つの光活性な診断 / 検出剤を含む、請求項 22 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

40

## 【請求項 24】

前記光活性な診断剤が色素原または色素を含む、請求項 23 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

## 【請求項 25】

前記診断 / 検出剤が、 $20 \text{keV} \sim 2,000 \text{keV}$  の間のエネルギーを有する放射性核種である、請求項 22 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

## 【請求項 26】

前記放射性核種が線放出同位体または線放出同位体または陽電子放出同位体である、請求項 25 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

50

## 【請求項 27】

前記放射性核種が、F - 18、Mn - 51、Mn - 52m、Fe - 52、Co - 55、Cu - 62、Cu - 64、Ga - 68、As - 72、Br - 75、Br - 76、Rb - 82m、Sr - 83、Y - 86、Zr - 89、Tc - 94m、In - 110、I - 120、I - 124、Cr - 51、Co - 57、Co - 58、Fe - 59、Cu - 67、Ga - 67、Se - 75、Ru - 97、Tc - 99m、In - 111、In - 114m、I - 123、I - 125、I - 131、Yb - 169、Hg - 197およびTl - 201からなる群から選択される、請求項 26 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

## 【請求項 28】

前記診断剤が造影剤である、請求項 22 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

10

## 【請求項 29】

前記造影剤が常磁性イオンである、請求項 28 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

## 【請求項 30】

前記造影剤が超音波増強剤である、請求項 28 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

## 【請求項 31】

前記超音波増強剤が、ヒト化 Mu - 9 またはそのフラグメントにコンジュゲート化されたリボソームである、請求項 30 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

## 【請求項 32】

前記リボソームがガス充填型である、請求項 31 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

20

## 【請求項 33】

前記常磁性イオンが、クロム (III)、マンガン (II)、鉄 (III)、鉄 (II)、コバルト (II)、ニッケル (II)、銅 (II)、ネオジム (III)、サマリウム (III)、イッテルビウム (III)、ガドリニウム (III)、バナジウム (II)、テルビウム (III)、ジスプロシウム (III)、ホルミウム (III) およびエルビウム (III) からなる群から選択される金属を含む、請求項 29 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

## 【請求項 34】

前記造影剤が放射線不透過性化合物である、請求項 28 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

30

## 【請求項 35】

前記放射線不透過性化合物が、ヨウ素化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物およびタリウム化合物からなる群から選択される、請求項 234 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

## 【請求項 36】

手術中または内視鏡的または血管内での腫瘍検出 / 診断において使用される、請求項 22 ~ 27 に記載の診断 / 検出用免疫コンジュゲート体。

## 【請求項 37】

前記治療剤が、放射性核種、ホウ素原子、ガドリニウム原子またはウラン原子、免疫調節因子、サイトカイン、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素阻害剤、光活性な治療剤、細胞傷害性薬物、毒素、血管形成阻害剤、異なる抗体、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 22 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

40

## 【請求項 38】

前記細胞傷害性薬剤が薬物または毒素である、請求項 37 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

## 【請求項 39】

前記薬物が、細胞分裂阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、血管形成阻害剤、アポトーシス剤、アルカロイド剤、COX - 2 阻害剤、および抗生物質、ならびにそれらの組合せか

50

らなる群から選択される、請求項 38 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項 40】

前記薬物が、ナイトロジェンマスタード類、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホナート、ニトロソウレア類、トリアゼン類、葉酸アナログ、アントラサイクリン類、タキサン類、COX-2 阻害剤、ピリミジンアナログ、プリンアナログ、抗生物質、酵素、エピポドフィロトキシン類、白金配位錯体、ピンカアルカロイド、置換ウレア、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、ホルモンアンタゴニスト、酵素阻害剤、エンドスタチン、タキソール類、カンプトテシン類、ドキシソルピシン類およびその誘導体、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 38 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項 41】

前記毒素が、植物毒素および微生物毒素および動物毒素からなる群から選択される、請求項 38 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項 42】

前記毒素が、リシン、アブリン、トキシン、サポリン、リボヌクレアーゼ (RNase)、DNase I、ブドウ球菌のエンドトキシン A、アメリカヤマゴボウの抗ウイルス性タンパク質、ゲロニン、ジフテリアトキシン、シュードモナスのエキソトキシン、およびシュードモナスのエンドトキシンからなる群から選択される、請求項 41 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項 43】

前記免疫調節因子が、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血性因子、コロニー刺激因子 (CSF)、インターフェロン (IFN)、幹細胞増殖因子、エリスロポイエチン、トロンプオイエチン、抗体、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 37 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項 44】

前記リンホトキシンが腫瘍壊死因子 (TNF) であり、前記造血性因子がインターロイキン (IL) であり、前記コロニー刺激因子が顆粒球 - コロニー刺激因子 (G-CSF) または顆粒球マクロファージ - コロニー刺激因子 (GM-CSF) であり、前記インターフェロンがインターフェロン - または または であり、前記幹細胞増殖因子が「S1 因子」と称される、請求項 43 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項 45】

前記サイトカインが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、インターフェロン - 、TNF - 、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 43 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項 46】

前記免疫調節因子が、免疫因子のアゴニストまたはアンタゴニストである抗体である、請求項 37 および 40 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項 47】

前記抗体が CD40 に対するものである、請求項 46 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項 48】

前記放射性核種が、オージェ放射体および線放射体および線放射体からなる群から選択される、請求項 37 に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項 49】

前記放射性核種が、P-32、P-33、Sc-47、Fe-59、Cu-64、Cu-67、Se-75、As-77、Sr-89、Y-90、Mo-99、Rh-105、Pd-109、Ag-111、I-125、I-131、Pr-142、Pr-143、Pm-149、Sm-153、Tb-161、Ho-166、Er-169、Lu-177、Re-186、Re-188、Re-189、Ir-194、Au-198、Au-199、Pb-211、Pb-212、および Bi-213、Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-111

10

20

30

40

50

9、I - 125、Ho - 161、Os - 189m、Ir - 192、Dy - 152、At - 211、Bi - 212、Ra - 223、Rn - 219、Po - 215、Bi - 211、Ac - 225、Fr - 221、At - 217、Bi - 213、Fm - 255、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項37に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項50】

前記ホウ素原子がB - 10である、請求項37に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項51】

前記ガドリニウム原子がGd - 157である、請求項37に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

10

【請求項52】

前記ウラン原子がU - 235である、請求項37に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項53】

前記放射性核種が20keV ~ 10,000keVの間のエネルギーを有する、請求項48に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項54】

前記放射性核種がオージェ放射体であり、1000keV未満のエネルギーを有する、請求項48に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項55】

前記放射性核種が線放射体であり、20keV ~ 5000keVの間のエネルギーを有する、請求項48に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

20

【請求項56】

前記放射性核種が線放射体であり、2000keV ~ 10,000keVの間のエネルギーを有する、請求項48に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項57】

前記光活性な治療剤が色素原または色素である、請求項37に記載の治療用免疫コンジュゲート体。

【請求項58】

前記診断剤または治療剤が炭水化物部分によって前記MAbまたはそのフラグメントに結合している、請求項22に記載の診断用または治療用の免疫コンジュゲート体。

30

【請求項59】

CSAp標的抗原に対する親和性を有する1つ以上の抗原結合部位と、ハプテン分子に対する親和性を有する1つ以上のハプテン結合部位とを含む多価かつ多重特異性の抗体またはそのフラグメント。

【請求項60】

ヒト化されている、請求項59に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項61】

ヒト抗体である、請求項59に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項62】

キメラ化されている、請求項59に記載の抗体またはそのフラグメント。

40

【請求項63】

診断剤または治療剤をさらに含む、請求項59 ~ 62に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項64】

請求項1 ~ 63のいずれか一項に記載される前記MAbまたはそのフラグメントから選択される少なくとも2つの抗CSApMAbまたはそのフラグメントを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメント。

【請求項65】

請求項1 ~ 63のいずれか一項に記載される少なくとも1つの第1の抗CSApMAbまたはそのフラグメントと、請求項1 ~ 63のいずれか一項に記載される該MAbまたは

50

そのフラグメントとは異なる少なくとも1つの第2のMAbまたはそのフラグメントとを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメント。

【請求項66】

前記第2のMAbまたはそのフラグメントがCD40抗体である、請求項65に記載の抗体融合タンパク質またはそのフラグメント。

【請求項67】

前記融合タンパク質またはそのフラグメントにコンジュゲート化された診断剤または治療剤をさらに含む、請求項64または66に記載の抗体融合タンパク質またはそのフラグメント。

【請求項68】

前記第2のMAbががん腫関連抗体である、請求項65に記載の抗体融合タンパク質またはそのフラグメント。

【請求項69】

前記がん腫関連抗体が、CEA、EGP-1、EGP-2、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、PAM-4、KC4、TAG-72、EGFR、HER2/neu、BrE3、Le-Y、A3、KS-1およびVEGFの抗体、他の血管形成抗体、抗壊死抗体、がん遺伝子産物の抗体、および抗体A33からなる群から選択される、請求項68に記載の抗体融合タンパク質またはそのフラグメント。

【請求項70】

前記がん腫関連抗体が、胃腸のがんおよび卵巣のがんからなる群から選択されるがんにおける抗原に結合する、請求項68に記載の抗体融合タンパク質またはそのフラグメント。

【請求項71】

被験体における悪性腫瘍を処置する方法であって、請求項1~21および59~62のいずれかに記載される抗体またはフラグメントの治療有効量を、薬学的に受容可能なビヒクルに配合して前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項72】

被験体における悪性腫瘍を処置する方法であって、請求項22、37~48および63のいずれか一項に記載される免疫コンジュゲート体またはそのフラグメントの治療有効量を、薬学的に受容可能なビヒクルに配合して前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項73】

被験体における悪性腫瘍を診断/検出する方法であって、請求項1~21および59~62のいずれかに記載される抗体またはそのフラグメントの診断有効量を、薬学的に受容可能なビヒクルに配合して前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項74】

被験体における悪性腫瘍を診断/検出する方法であって、請求項22~36および63のいずれかに記載される免疫コンジュゲート体またはそのフラグメントの診断有効量を、薬学的に受容可能なビヒクルに配合して前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項75】

被験体における悪性腫瘍を処置または診断/検出する方法であって、請求項64~70のいずれか一項に記載される融合タンパク質またはそのフラグメントの治療有効量または診断有効量を、薬学的に受容可能なビヒクルに配合して前記被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項76】

被験体における悪性腫瘍を処置または診断/検出する方法であって、(i)処置または診断/検出を必要とする被験体に、請求項59~63のいずれか一項に記載される抗体またはそのフラグメントを投与すること、(ii)結合していないタンパク質の量が被験体の血流から除かれるために十分な時間待つこと、そして(iii)前記抗体の結合部位に結合する、診断剤または治療剤またはその組合せを含むキャリア分子を前記被験体に投与することを含む方法。

【請求項77】

10

20

30

40

50

(a) 請求項 1 ~ 6 3 のいずれか一項に記載される抗 C S A p M A b またはそのフラグメント；

(b) 前記 M A b またはそのフラグメントの少なくとも 2 つを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメント；

(c) 請求項 1 ~ 6 3 のいずれか一項に記載される前記 M A b またはそのフラグメントを含む少なくとも 1 つの第 1 の抗 C S A p M A b またはそのフラグメントと、請求項 1 ~ 6 3 のいずれか一項に記載される該 M A b またはそのフラグメントとは異なる少なくとも 1 つの第 2 の M A b またはそのフラグメントとを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメント；および

(d) 請求項 1 ~ 6 3 のいずれか一項に記載される前記 M A b またはそのフラグメントを含む少なくとも 1 つの第 1 の M A b またはそのフラグメントと、請求項 1 ~ 6 3 のいずれか一項に記載される該 M A b またはそのフラグメントとは異なる少なくとも 1 つの第 2 の M A b またはそのフラグメントとを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメントで、前記第 2 の M A b が、C E A、E G P - 1、E G P - 2、M U C - 1、M U C - 2、M U C - 3、M U C - 4、P A M - 4、K C 4、T A G - 7 2、E G F R、H E R 2 / n e u、B r E 3、L e - Y、A 3、K S - 1、C D 4 0 および V E G F の抗体、および抗体 A 3 3、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される、抗体融合タンパク質またはそのフラグメントからなる群から選択される抗 C S A p M A b またはそのフラグメントをコードする核酸を含む D N A 配列。

10

20

【請求項 7 8】

請求項 7 7 に記載される D N A 配列を含む発現ベクター。

【請求項 7 9】

請求項 7 7 に記載される D N A 配列を含む宿主細胞。

【請求項 8 0】

診断 / 検出剤または治療剤またはその組合せを標的に送達する方法であって、( i ) 請求項 1 7 に記載される免疫コンジュゲート体を含む組成物を提供すること、そして ( i i ) その必要性のある被験体に前記組成物を投与することを含む方法。

【請求項 8 1】

前記診断 / 検出剤が少なくとも光活性な診断剤を含む、請求項 8 0 に記載の送達方法。

30

【請求項 8 2】

前記光活性な診断剤が色素原または色素を含む、請求項 8 1 に記載の送達方法。

【請求項 8 3】

前記診断剤が、2 0 k e V ~ 2 , 0 0 0 k e V の間のエネルギーを有する放射性核種である、請求項 8 0 に記載の送達方法。

【請求項 8 4】

前記放射性核種が 線放出同位体または 線放出同位体または陽電子放出同位体である、請求項 8 3 に記載の送達方法。

【請求項 8 5】

前記放射性核種が、F - 1 8、M n - 5 1、M n - 5 2 m、F e - 5 2、C o - 5 5、C u - 6 2、C u - 6 4、G a - 6 8、A s - 7 2、B r - 7 5、B r - 7 6、R b - 8 2 m、S r - 8 3、Y - 8 6、Z r - 8 9、T c - 9 4 m、I n - 1 1 0、I - 1 2 0、I - 1 2 4、C r - 5 1、C o - 5 7、C o - 5 8、F e - 5 9、C u - 6 7、G a - 6 7、S e - 7 5、R u - 9 7、T c - 9 9 m、I n - 1 1 1、I n - 1 1 4 m、I - 1 2 3、I - 1 2 5、I - 1 3 1、Y b - 1 6 9、H g - 1 9 7 および T l - 2 0 1 からなる群から選択される、請求項 8 3 に記載の送達方法。

40

【請求項 8 6】

前記診断剤が造影剤である、請求項 8 0 に記載の送達方法。

【請求項 8 7】

前記造影剤が常磁性イオンである、請求項 8 6 に記載の送達方法。

50

## 【請求項 88】

前記造影剤が超音波増強剤である、請求項 86 に記載の送達方法。

## 【請求項 89】

前記造影剤が、X線写真またはコンピューター断層撮影法において使用される放射線不透過性化合物である、請求項 86 に記載の送達方法。

## 【請求項 90】

前記放射線不透過性化合物が、ヨウ素化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物およびタリウム化合物からなる群から選択される、請求項 89 に記載の方法。

## 【請求項 91】

前記放射線不透過性化合物が、バリウム、ジアトリゾアート、エチルヨウ化油、クエン酸  
ガリウム、イオカルム酸、ヨーセタム酸、ヨーダミド、ヨージパミド、ヨードキサム酸、  
イオグラミド、イオヘキソール、イオパミドール、イオパノ酸、イオプロセム酸、イオセ  
ファミ酸、イオセル酸、イオスラミドメグルミン、イオセメト酸、イオタスル、イオテト  
ル酸、イオタラム酸、イオトロクス酸、イオキサグル酸、イオクソトリゾ酸、イボダート  
、メグルミン、メトリザミド、メトリゾアート、プロピリオドンおよび塩化タリウムから  
なる群から選択される、請求項 789 に記載の方法。

## 【請求項 92】

前記超音波増強剤が、ヒト化 Mu - 9 またはそのフラグメントを含むリポソームである、  
請求項 88 に記載の送達方法。

## 【請求項 93】

前記リポソームがガス充填型である、請求項 92 に記載の送達方法。

## 【請求項 94】

前記常磁性イオンが、マンガンまたは鉄またはガドリニウムを含む金属である、請求項 8  
7 に記載の送達方法。

## 【請求項 95】

前記治療剤が、放射性核種、免疫調節因子、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、  
酵素阻害剤、光活性な治療剤、細胞傷害性薬剤、およびそれらの組合せからなる群から選  
択される、請求項 80 に記載の送達方法。

## 【請求項 96】

前記細胞傷害性薬剤が薬剤または毒素である、請求項 95 に記載の送達方法。

## 【請求項 97】

前記薬物が、細胞分裂阻止剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗血管形成剤、アポトーシス  
剤、アントラサイクリン剤、アルカロイド剤、COX - 2 阻害剤および抗生物質、ならび  
にそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 96 に記載の送達方法。

## 【請求項 98】

前記薬物が、ナイトロジェンマスタード類、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホナート、  
ニトロソウレア類、トリアゼン類、葉酸アナログ、アントラサイクリン類、タキサン  
類、COX - 2 阻害剤、ピリミジンアナログ、プリンアナログ、抗生物質、酵素、酵素阻  
害剤、エピポドフィロトキシン類、白金配位錯体、ピンカアルカロイド、置換ウレア、メ  
チルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、エンドス  
タチン、タキソール類、カンプトテシン類、ドキシソルピシン類およびその誘導体、ならび  
にそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 96 に記載の送達方法。

## 【請求項 99】

前記毒素が、植物毒素および微生物毒素および動物毒素からなる群から選択される、請求  
項 96 に記載の方法。

## 【請求項 100】

前記毒素が、リシン、アプリン、トキシシン、サポリン、リボヌクレアーゼ (RNase  
)、DNase I、ブドウ球菌のエンドトキシン A、アメリカヤマゴボウの抗ウイルス性  
タンパク質、ゲロニン、ジフテリアトキシン、シュードモナスのエキソトキシン、および  
シュードモナスのエンドトキシンからなる群から選択される、請求項 96 に記載の送達方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 101】

前記免疫調節因子が、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血性因子、コロニー刺激因子(CSF)、インターフェロン(IFN)、幹細胞増殖因子、エリスロポイエチン、トロポポイエチン、抗体、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項95に記載の送達方法。

【請求項 102】

抗CD40抗体またはそのフラグメントである、請求項101に記載の抗体。

【請求項 103】

前記リンホトキシが腫瘍壊死因子(TNF)であり、前記造血性因子がインターロイキン(IL)であり、前記コロニー刺激因子が顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)または顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF)であり、前記インターフェロンがインターフェロン- または または であり、前記幹細胞増殖因子が「S1因子」と称される、請求項101に記載の送達方法。 10

【請求項 104】

前記サイトカインが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、インターフェロン- 、TNF- 、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項101に記載の送達方法。

【請求項 105】

前記放射性核種が、オージェ放射体および 線放射体および 線放射体からなる群から選択される、請求項95に記載の送達方法。 20

【請求項 106】

前記放射性核種が、P-32、P-33、Sc-47、Fe-59、Cu-64、Cu-67、Se-75、As-77、Sr-89、Y-90、Mo-99、Rh-105、Pd-109、Ag-111、I-125、I-131、Pr-142、Pr-143、Pm-149、Sm-153、Tb-161、Ho-166、Er-169、Lu-177、Re-186、Re-188、Re-189、Ir-194、Au-198、Au-199、Pb-211、Pb-212、およびBi-213、Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m、Ir-192、Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213、Fm-255、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項95に記載の送達方法。 30

【請求項 107】

前記放射性核種が20keV~10,000keVの間のエネルギーを有する、請求項105に記載の送達方法。

【請求項 108】

前記放射性核種がオージェ放射体であり、1000keV未満のエネルギーを有する、請求項105に記載の送達方法。

【請求項 109】

前記放射性核種が 線放射体であり、20keV~5000keVの間のエネルギーを有する、請求項105に記載の送達方法。 40

【請求項 110】

前記放射性核種が 線放射体であり、2000keV~10,000keVの間のエネルギーを有する、請求項105に記載の送達方法。

【請求項 111】

前記光活性な治療剤が色素原または色素である、請求項95に記載の送達方法。

【請求項 112】

診断/治療剤または治療剤またはその組合せを標的に送達する方法であって、(i)請求項59~63のいずれか一項に記載される抗体またはそのフラグメントを被験体に投与す 50

ること、( i i ) 結合していないタンパク質の量が被験体の血流から除かれるために十分な時間待つこと、そして( i i i ) 前記抗体の結合部位に結合する、診断/検出剤または治療剤またはその組合せを含むキャリア分子を前記被験体に投与することを含む方法。

【請求項 1 1 3】

前記キャリア分子が、結合しているタンパク質の結合部位の 2 つ以上に結合する、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

前記診断/検出剤または前記治療剤が、同位体、色素、色素原、造影剤、薬物、毒素、サイトカイン、酵素、酵素阻害剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、増殖因子、放射性核種および金属からなる群から選択される、請求項 1 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 1 5】

被験体における悪性腫瘍を処置する方法であって、抗体またはそのフラグメントの治療有効量、あるいは少なくとも 2 つの M A b またはそのフラグメントを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメントの治療有効量を、薬学的に好適な賦形剤に配合して前記被験体に投与する工程を含み、少なくとも 1 つの抗 C S A p M A b またはそのフラグメントあるいは融合タンパク質またはそのフラグメントが請求項 1 ~ 7 0 のいずれか一項に記載される、方法。

【請求項 1 1 6】

被験体における悪性腫瘍を処置する方法であって、請求項 1 ~ 7 0 のいずれか一項から選択される少なくとも 2 つの M A b またはそのフラグメントを含む抗体またはそのフラグメントの治療有効量を、薬学的に好適な賦形剤に配合して前記被験体に投与することを含む、方法。

20

【請求項 1 1 7】

請求項 1 ~ 7 0 のいずれか一項に記載されるものとは異なる第 2 の M a b またはそのフラグメントをさらに含む、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記第 2 の M a b またはそのフラグメントがむき出し状態の ( n a k e d ) M a b またはそのフラグメントである、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記第 2 の M A b またはそのフラグメントが、B r E 3、L e - Y、E G P - 1、E G P - 2、M U C - 1、M U C - 2、M U C - 3、M U C - 4、P A M - 4、K C 4、T A G - 7 2、E G F R、H E R 2 / n e u、A 3、K S - 1、C E A、V E G F およびがん遺伝子産物に対する抗体、抗体 A 3 3、および C D 4 0 または他の免疫調節因子に対する抗体からなる群から選択される、請求項 1 1 7 に記載の方法。

30

【請求項 1 2 0】

前記第 2 の M a b が治療剤または診断/検出剤に免疫コンジュゲート化されている、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記抗 C S A p 抗体が非経口的に投与される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記抗 C S A p 抗体が投薬あたり 2 0 ミリグラム ~ 2 0 0 0 ミリグラムのタンパク質の投薬量で投与される、請求項 1 2 1 に記載の方法。

40

【請求項 1 2 3】

前記投薬量が反復して投与される、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記抗 C S A p 抗体が、ヒトに近い霊長類の抗 C S A p 抗体、ネズミのモノクローナル抗 C S A p 抗体、キメラ抗 C S A p 抗体、ヒト抗 C S A p 抗体、およびヒト化抗 C S A p 抗体からなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記キメラ抗 C S A p 抗体およびヒト抗 C S A p 抗体およびヒト化抗 C S A p 抗体の定常

50

領域およびヒンジ領域がヒト I g G 1 の定常領域およびヒンジ領域を含む、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記抗 C S A p 抗体またはそのフラグメントが、前記悪性腫瘍によって発現される第 2 の腫瘍マーカーと反応し得る第 2 のコンジュゲート化抗体が前記被験体に投与される前に、またはそのような投与と一緒に、またはそのような投与の後に投与される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

抗 C S A p 抗体またはそのフラグメントの第 1 の結合部位が多価かつ多重特異性の融合タンパク質または化学的なコンジュゲート体中存在し、そして第 2 の結合部位が C S A p 以外の腫瘍マーカー物質と反応し得る、請求項 1 1 5 に記載の方法。 10

【請求項 1 2 8】

前記抗 C S A p 抗体またはそのフラグメントが、少なくとも 1 つの治療剤または診断/検出剤の前に、または少なくとも 1 つの治療剤または診断/検出剤と一緒に、または少なくとも 1 つの治療剤または診断/検出剤の後に投与される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記治療剤または診断/検出剤が、前記悪性腫瘍によって発現される腫瘍マーカーをターゲットにする抗体にコンジュゲート化されている、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

被験体における悪性腫瘍を診断または検出する方法であって、請求項 1 ~ 7 0 のいずれか一項に記載される抗 C S A p M A b またはそのフラグメントあるいは融合タンパク質またはそのフラグメントを含む診断/検出用コンジュゲート体の診断有効量を、薬学的に好適な賦形剤に配合して前記被験体に投与することを含み、前記抗 C S A p M A b またはそのフラグメントあるいは融合タンパク質またはそのフラグメントが少なくとも 1 つの診断/検出剤に結合している、方法。 20

【請求項 1 3 1】

被験体におけるがん細胞を処置する方法であって、( i ) 請求項 1 ~ 7 0 のいずれか一項に記載されるむき出し状態の抗 C S A p M A b またはそのフラグメントあるいはむき出し状態の抗体融合タンパク質またはそのフラグメントを含む組成物の治療有効量を前記被験体に投与すること、( i i ) 前記むき出し状態の抗 C S A p M A b またはそのフラグメントあるいはむき出し状態の抗体融合タンパク質またはそのフラグメントを薬学的に好適な賦形剤に配合することを含む、方法。 30

【請求項 1 3 2】

前記組成物が、請求項 1 ~ 2 2、5 9 ~ 6 2 および 6 4 ~ 7 0 のいずれか一項に記載されるものとは異なる第 2 のむき出し状態の抗体またはそのフラグメントをさらに含む、請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記組成物が、請求項 1 ~ 2 2、5 9 ~ 6 2 および 6 4 ~ 7 0 のいずれか一項に記載される第 2 のむき出し状態の抗体またはそのフラグメントをさらに含む、請求項 1 3 1 に記載の方法。 40

【請求項 1 3 4】

前記組成物が、請求項 1 ~ 7 0 のいずれか一項に記載されるものとは異なる第 2 の抗体またはそのフラグメントをさらに含む、請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記第 2 の抗体またはそのフラグメントが、C E A、E G P - 1、E G P - 2、M U C - 1、M U C - 2、M U C - 3、M U C - 4、P A M - 4、K C 4、T A G - 7 2、E G F R、H E R 2 / n e u、B r E 3、L e - Y、A 3、K S - 1、C D 4 0、V E G F および他の血管形成因子ならびにがん遺伝子産物に対する抗体、そして抗体 A 3 3 からなる群から選択される、請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記むき出し状態の抗CSAp抗体が非経口的に投与される、請求項131に記載の方法。

【請求項137】

前記むき出し状態の抗CSAp抗体が投薬あたり20ミリグラム～2000ミリグラムのタンパク質の投薬量で投与される、請求項136に記載の方法。

【請求項138】

前記投薬量が反復して投与される、請求項137に記載の方法。

【請求項139】

前記むき出し状態の抗CSAp抗体が、ヒトに近い霊長類の抗CSAp抗体、ネズミのモノクローナル抗CSAp抗体、キメラ抗CSAp抗体、ヒト抗CSAp抗体、およびヒト化抗CSAp抗体からなる群から選択される、請求項131に記載の方法。 10

【請求項140】

前記キメラ型むき出し状態の抗CSAp抗体およびヒトのむき出し状態の抗CSAp抗体およびヒト化されたむき出し状態の抗CSAp抗体の定常領域およびヒンジ領域がヒトIgG1の定常領域およびヒンジ領域を含む、請求項139に記載の方法。

【請求項141】

前記むき出し状態の抗CSAp抗体が、前記悪性腫瘍によって発現される第2の腫瘍マーカーと反応し得る第2のむき出し状態の抗体が前記被験体に投与される前に、またはそのような投与と一緒に、またはそのような投与の後に投与される、請求項131に記載の方法。 20

【請求項142】

前記むき出し状態の抗CSAp抗体が、治療剤または診断/検出剤の前に、または治療剤または診断/検出剤と一緒に、または治療剤または診断/検出剤の後に投与される、請求項131に記載の方法。

【請求項143】

前記むき出し状態の抗CSAp抗体がむき出し状態のMu-9抗体である、請求項131～142のいずれかに記載の方法。

【請求項144】

被験体における悪性腫瘍を診断または検出する方法であって、(i)請求項1～70のいずれか一項に記載されるむき出し状態の抗CSAp MA bまたはそのフラグメントあるいはむき出し状態の抗体融合タンパク質またはそのフラグメントを含む組成物を用いて、前記被験体から得られた試料についてインビトロ診断アッセイを行うことを含む、方法。 30

【請求項145】

前記悪性腫瘍ががん腫である、請求項144に記載の方法。

【請求項146】

前記がん腫が胃腸のがんである、請求項145に記載の方法。

【請求項147】

前記がん腫が結腸直腸がんまたは膵臓がんである、請求項146に記載の方法。

【請求項148】

前記がん腫が卵巣がんである、請求項145に記載の方法。 40

【請求項149】

前記インビトロ診断アッセイが、免疫アッセイおよびRT-PCRおよび免疫組織化学からなる群から選択される、請求項144に記載の方法。

【請求項150】

前記診断アッセイがRT-PCRまたは免疫アッセイである、請求項149に記載の方法。

【請求項151】

前記試料が体液または組織または細胞集団である、請求項150に記載の方法。

【請求項152】

前記診断アッセイが免疫組織化学または免疫細胞化学である、請求項149に記載の方法 50

。

## 【請求項 1 5 3】

前記試料が細胞アリコートまたは組織である、請求項 1 5 2 に記載の方法。

## 【請求項 1 5 4】

前記被験体が哺乳動物である、請求項 7 1 ~ 7 6 および 8 0 ~ 1 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 5 5】

前記被験体がヒトである、請求項 1 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 5 6】

前記被験体がペットである、請求項 1 5 4 に記載の方法。

10

## 【請求項 1 5 7】

前記被験体が、ウマおよびイヌおよびネコからなる群から選択される、請求項 1 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 5 8】

被験体における疾患組織を処置または同定する方法であって、

( a ) 標的組織と特異的に結合する少なくとも 1 つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも 1 つの他のアームとを有し、標的組織と特異的に結合する前記 1 つのアームが M u - 9 抗体である二重特異性の抗体または抗体フラグメントを前記被験体に投与すること；

( b ) 任意選択的に、クリアリング用組成物を前記被験体に投与し、そして前記組成物により、局在化していない抗体または抗体フラグメントを循環からクリアリングすること；

20

( c ) 前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントの前記少なくとも 1 つの他のアームによって認識され得るエピトープを少なくとも 1 つ含むか、またはそのようなエピトープを少なくとも 1 つ有するキャリア部分と、1 つ以上のコンジュゲート化された治療剤または診断剤とを含む第 1 のターゲッティング可能なコンジュゲート体を前記被験体に投与すること；そして

( d ) 前記治療剤が酵素であるときには、前記被験体に、

( 1 ) プロドラッグ（この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に変換することができる）；または

( 2 ) 前記被験体において解毒されて、毒性がより低い中間体を形成し得る薬物（この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的

30

部位において前記薬物の毒性を増大させることができる）；または

( 3 ) 天然のプロセスによって前記被験体において活性化され、そして毒性がより低い中間体への変換による解毒を受けるプロドラッグ（この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる）；または

( 4 ) 前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントの前記少なくとも 1 つの他のアームによって認識され得るエピトープを少なくとも 1 つ含むか、またはそのようなエピトープを少なくとも 1 つ有するキャリア部分と、プロドラッグとを含む第 2 のターゲッティング可能なコンジュゲート体（この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に変換することができる）；

40

をさらに投与すること

を含む方法。

## 【請求項 1 5 9】

前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体が少なくとも 2 つの H S G ハプテンを含む、請求項 1 5 8 に記載の方法。

## 【請求項 1 6 0】

前記第 1 のターゲッティング可能なコンジュゲート体がプロドラッグを含むときには、前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントの前記少なくとも 1 つの他のアームによって認識され得るエピトープを少なくとも 1 つ含むか、またはそのようなエピトープを少なく

50

とも1つ有するキャリア部分と、前記プロドラッグを薬物に変換することができる酵素、または前記薬物の解毒された中間体を毒性形態に再変換することができる酵素とを含む第2のターゲティング可能なコンジュゲート体を投与することをさらに含む、請求項158に記載の方法。

【請求項161】

前記診断/検出剤が放射性核種である、請求項158に記載の方法。

【請求項162】

前記診断/検出剤が、20keV~2,000keVの間のエネルギーを有する放射性核種である、請求項158に記載の方法。

【請求項163】

前記診断/検出剤が25keV~600keVの粒子および/または陽電子を放出する、請求項161に記載の方法。

【請求項164】

前記診断/検出剤が少なくとも1つの光活性な診断剤を含む、請求項158に記載の方法。

【請求項165】

前記光活性な診断/検出剤が色素原または色素を含む、請求項164に記載の方法。

【請求項166】

前記診断/検出剤が放射線不透過性化合物である、請求項158に記載の方法。

【請求項167】

前記放射性核種が線放出同位体または線放出同位体または陽電子放出同位体である、請求項161に記載の方法。

【請求項168】

前記放射性核種が、F-18、Mn-51、Mn-52m、Fe-52、Co-55、Cu-62、Cu-64、Ga-68、As-72、Br-75、Br-76、Rb-82m、Sr-83、Y-86、Zr-89、Tc-94m、In-110、I-120、I-124、Cr-51、Co-57、Co-58、Fe-59、Cu-67、Ga-67、Se-75、Ru-97、Tc-99m、In-111、In-114m、I-123、I-125、I-131、Yb-169、Hg-197およびTl-201からなる群から選択される、請求項167に記載の方法。

【請求項169】

前記診断/検出剤が造影剤である、請求項158に記載の方法。

【請求項170】

前記造影剤が常磁性イオンである、請求項169に記載の方法。

【請求項171】

前記放射線不透過性化合物が、ヨウ素化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物およびタリウム化合物からなる群から選択される、請求項166に記載の方法。

【請求項172】

前記放射線不透過性化合物が、バリウム、ジアトリゾアート、エチルヨウ化油、クエン酸ガリウム、イオカルム酸、ヨーセタム酸、ヨーダミド、ヨージパミド、ヨードキサム酸、イオグラミド、イオヘキソール、イオパミドール、イオパノ酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセル酸、イオスラミドメグルミン、イオセメト酸、イオタスル、イオテトル酸、イオタラム酸、イオトロクス酸、イオキサグル酸、イオクソトリゾ酸、イボダート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾアート、プロピリオドンおよび塩化タリウムからなる群から選択される、請求項171に記載の方法。

【請求項173】

前記造影剤が超音波増強剤である、請求項169に記載の方法。

【請求項174】

前記超音波増強剤が、ヒト化Mu-9抗体またはキメラ化Mu-9抗体または完全ヒトMu-9抗体またはそれらのフラグメントにコンジュゲート化されているリポソームである

10

20

30

40

50

、請求項 173 に記載の方法。

【請求項 175】

前記リボソームがガス充填型である、請求項 174 に記載の方法。

【請求項 176】

前記常磁性イオンが、マンガンおよび鉄およびガドリニウムからなる群から選択される金属を含む、請求項 170 に記載の方法。

【請求項 177】

前記治療剤が、放射性核種、ホウ素原子、ガドリニウム原子またはウラン原子、免疫調節因子、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素および酵素阻害剤、光活性な治療剤、細胞傷害性薬剤、血管形成阻害剤、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 158 に記載の方法。

10

【請求項 178】

前記細胞傷害性薬剤が薬剤またはプロドラッグまたは毒素である、請求項 177 に記載の方法。

【請求項 179】

前記プロドラッグが、エピルピシングルクロニド、CPT-11、エトポシドグルクロニド、ダウノミシングルクロニドおよびドキシソルピシングルクロニドからなる群から選択される、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 180】

前記毒素が、植物毒素および動物毒素および微生物毒素からなる群から選択される、請求項 178 に記載の方法。

20

【請求項 181】

前記毒素が、リシン、アプリン、リボヌクレアーゼ (RNase)、DNase I、ブドウ球菌のエンドトキシン A、アメリカヤマゴボウの抗ウイルス性タンパク質、ゲロニン、ジフテリアトキシン、シュードモナスのエキソトキシン、およびシュードモナスのエンドトキシンからなる群から選択される、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 182】

前記薬物が、細胞分裂阻止剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、血管形成阻害剤、アポトーシス剤、アルカロイド剤、COX-2 阻害剤、および抗生物質、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 178 に記載の方法。

30

【請求項 183】

前記薬物が、ナイトロジェンマスタード類、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホナート、ニトロソウレア類、トリアゼン類、葉酸アナログ、アントラサイクリン類、タキサン類、COX-2 阻害剤、ピリミジンアナログ、プリンアナログ、抗生物質、酵素、エピポドフィロトキシン類、白金配位錯体、ピンカアルカロイド、置換ウレア、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、エンドスタチン、タキソール類、カンプトテシン類、ドキシソルピシン類およびその誘導体、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 184】

前記免疫調節因子が、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血性因子、コロニー刺激因子 (CSF)、インターフェロン (IFN)、幹細胞増殖因子、エリスロポイエチン、トロンプオイエチン、免疫調節因子に対する抗体アゴニストおよび抗体アンタゴニスト、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 177 に記載の方法。

40

【請求項 185】

前記リンホトキシが腫瘍壊死因子 (TNF) であり、前記造血性因子がインターロイキン (IL) であり、前記コロニー刺激因子が顆粒球 - コロニー刺激因子 (G-CSF) または顆粒球マクロファージ - コロニー刺激因子 (GM-CSF) であり、前記インターフェロンがインターフェロン - または または であり、前記幹細胞増殖因子が「S1 因子」と称される、請求項 184 に記載の方法。

50

## 【請求項186】

前記サイトカインが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、インターフェロン-、TNF-、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項184に記載の方法。

## 【請求項187】

前記放射性核種が、オージェ放射体および線放射体および線放射体からなる群から選択される、請求項177に記載の方法。

## 【請求項188】

前記放射性核種が、P-32、P-33、Sc-47、Fe-59、Cu-64、Cu-67、Se-75、As-77、Sr-89、Y-90、Mo-99、Rh-105、Pd-109、Ag-111、I-125、I-131、Pr-142、Pr-143、Pm-149、Sm-153、Tb-161、Ho-166、Er-169、Lu-177、Re-186、Re-188、Re-189、Ir-194、Au-198、Au-199、Pb-211、Pb-212、およびBi-213、Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m、Ir-192、Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213、Fm-255、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項177に記載の方法。

## 【請求項189】

前記ホウ素原子がB-10である、請求項177に記載の方法。

## 【請求項190】

前記ガドリニウム原子がGd-157である、請求項177に記載の方法。

## 【請求項191】

前記ウラン原子がU-235である、請求項177に記載の方法。

## 【請求項192】

前記放射性核種が20keV~10,000keVの間のエネルギーを有する、請求項187に記載の方法。

## 【請求項193】

前記放射性核種がオージェ放射体であり、1000keV未満のエネルギーを有する、請求項187に記載の方法。

## 【請求項194】

前記放射性核種が線放射体であり、20keV~5000keVの間のエネルギーを有する、請求項187に記載の方法。

## 【請求項195】

前記放射性核種が線放射体であり、2000keV~10,000keVの間のエネルギーを有する、請求項187に記載の方法。

## 【請求項196】

前記ターゲティング可能なコンジュゲート体が、疾患組織を殺傷するために有用な1つ以上の放射性同位体を含む、請求項158に記載の方法。

## 【請求項197】

前記ターゲティング可能なコンジュゲート体が<sup>10</sup>B原子を含み、そして方法が、前記疾患組織に局在化する前記ホウ素原子に放射線照射し、それにより前記疾患組織のBNCTを行う工程をさらに含む、請求項189に記載の方法。

## 【請求項198】

前記ターゲティング可能なコンジュゲート体が1つ以上の光学的治療剤を含む、請求項158に記載の方法。

## 【請求項199】

前記光学的治療剤が光増感剤である、請求項198に記載の方法。

## 【請求項200】

10

20

30

40

50

前記光増感剤が、ベンゾポルフィリンモノ酸リングA (BPD-MA)、スズエチオプル  
プリン (SnET2)、スルホン化アルミニウムフタロシアニン (AlSPc) およびル  
テチウムテキサフィリン (Lutex) からなる群から選択される、請求項199に記載  
の方法。

【請求項201】

標的組織と特異的に結合する前記少なくとも1つのアームがヒトMu-9抗体またはキメ  
ラMu-9抗体またはヒト化Mu-9抗体あるいはヒトMu-9抗体またはキメラMu-  
9抗体またはヒト化Mu-9抗体のフラグメントである、請求項158に記載の方法。

【請求項202】

ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する前記少なくとも1つの他の  
アームがヒトMu-9抗体またはキメラMu-9抗体またはヒト化Mu-9抗体あるいは  
ヒトMu-9抗体またはキメラMu-9抗体またはヒト化Mu-9抗体のフラグメントで  
ある、請求項158に記載の方法。

【請求項203】

前記標的組織が腫瘍である、請求項158に記載の方法。

【請求項204】

前記腫瘍が結腸特異的抗原-p (CSAp) を産生するか、または結腸特異的抗原-p (C  
SAp) に関連する、請求項203に記載の方法。

【請求項205】

前記Mu-9抗体またはそのフラグメントがMAb Mu-9のFvを含む、請求項15  
8に記載の方法。

【請求項206】

前記二重特異性抗体が融合タンパク質である、請求項158に記載の方法。

【請求項207】

前記融合タンパク質が三価であり、CSApと反応し得る抗体のFvを含む、請求項20  
6に記載の方法。

【請求項208】

哺乳動物においてCSApを発現する腫瘍を検出または処置するための方法であって、  
(a) 標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能な  
コンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含み、標的組織と  
特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特  
異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；そして

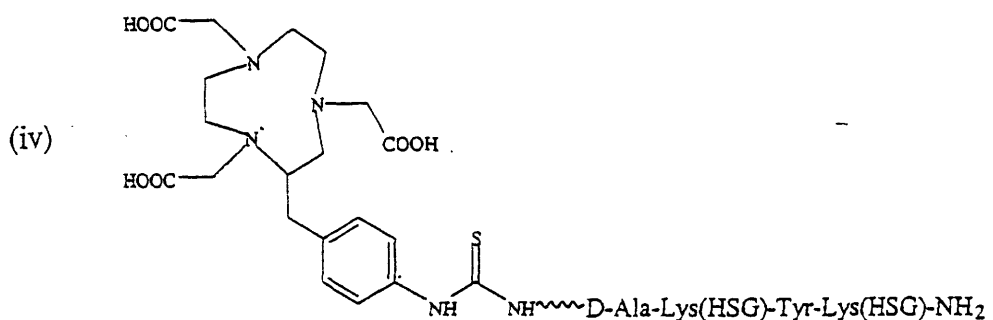
(b) 下記のコンジュゲート体：

(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

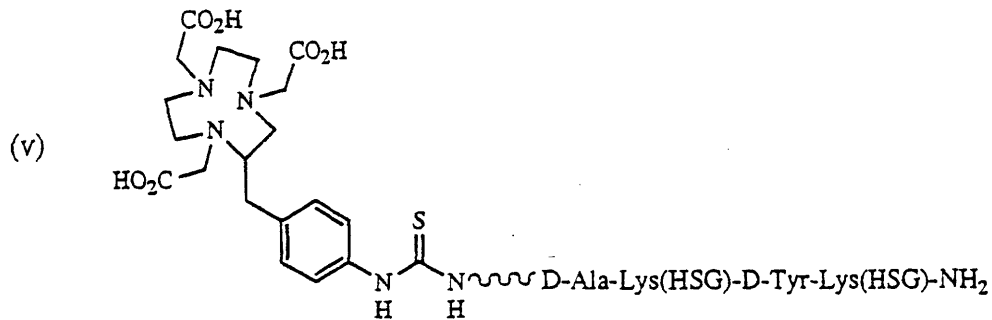
(ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

(iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>；

【化1】



## 【化 2】



10

からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与することを含む方法。

## 【請求項 209】

前記被験体にクリアリング用組成物を投与し、そして前記組成物により、局在化しなかった抗体または抗体フラグメントを循環からクリアリングすることをさらに含む、請求項 208 に記載の方法。

## 【請求項 210】

被験体における疾患組織を処置または同定するために有用なキットであって、

(a) 標的組織と特異的に結合する少なくとも 1 つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも 1 つの他のアームとを有し、標的組織と特異的に結合する前記 1 つのアームが Mu-9 抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメント；

20

(b) 前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントの前記少なくとも 1 つの他のアームによって認識され得るエピトープを少なくとも 1 つ含むか、またはそのようなエピトープを少なくとも 1 つ有するキャリア部分と、1 つ以上のコンジュゲート化された治療剤または診断剤とを含む第 1 のターゲッティング可能なコンジュゲート体；および

(c) 任意選択的に、局在化しなかった抗体および抗体フラグメントを循環からクリアリングするために有用なクリアリング用組成物；そして

(d) 任意選択的に、前記第 1 のターゲッティング可能なコンジュゲート体にコンジュゲート化されている前記治療剤が酵素であるときには、

30

(1) プロドラッグ（この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に変換することができる）；または

(2) 前記被験体において解毒されて、毒性がより低い中間体を形成し得る薬物（この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる）；または

(3) 天然のプロセスによって前記被験体において活性化され、そして毒性がより低い中間体への変換による解毒を受けるプロドラッグ（この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる）；または

40

(4) 前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントの前記少なくとも 1 つの他のアームによって認識され得るエピトープを少なくとも 1 つ含むか、またはそのようなエピトープを少なくとも 1 つ有するキャリア部分と、プロドラッグとを含む第 2 のターゲッティング可能なコンジュゲート体（この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に変換することができる）；

を含むキット。

## 【請求項 211】

前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体が、下記のコンジュゲート体：

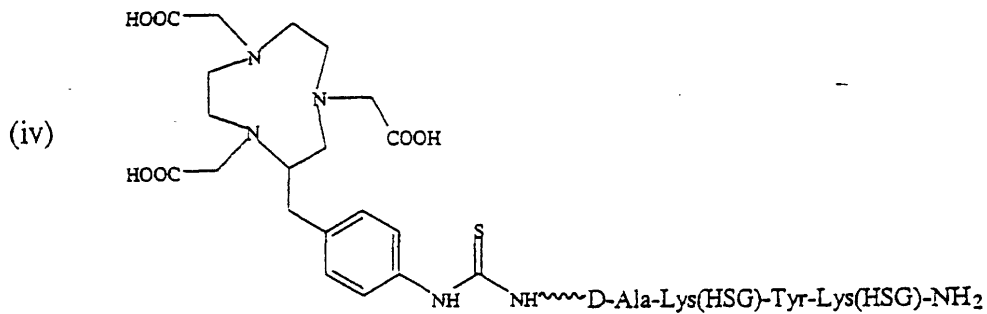
(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

(ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

50

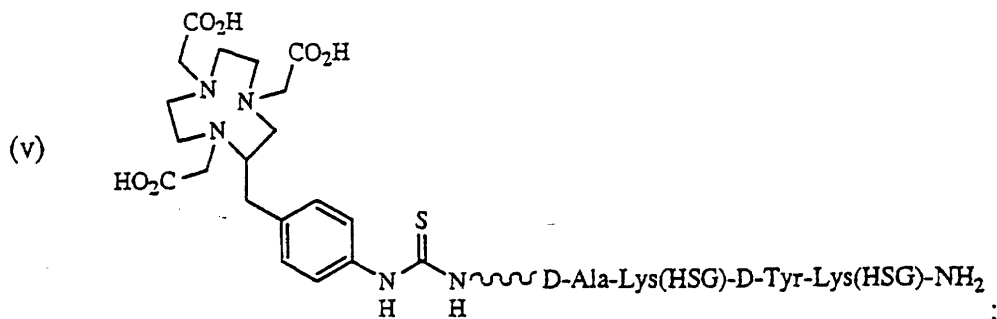
(iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

【化3】



および

【化4】



からなる群から選択される、請求項210に記載のキット。

【請求項212】

ターゲティング可能なコンジュゲート体についてスクリーニングする方法であって、

(a) 前記ターゲティング可能な構築物を、標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアーム、および前記ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームを有し、標的組織と特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントと接触させて、混合物を得ること;

(b) 任意選択的に、前記混合物をインキュベーションすること;そして

(c) 前記混合物を分析すること

を含む方法。

【請求項213】

CSApを発現している哺乳動物内の悪性の組織または細胞を画像化するための方法であって、

(a) 標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含み、標的組織と特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること;そして

(b) 下記のコンジュゲート体:

(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;

(ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;

(iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

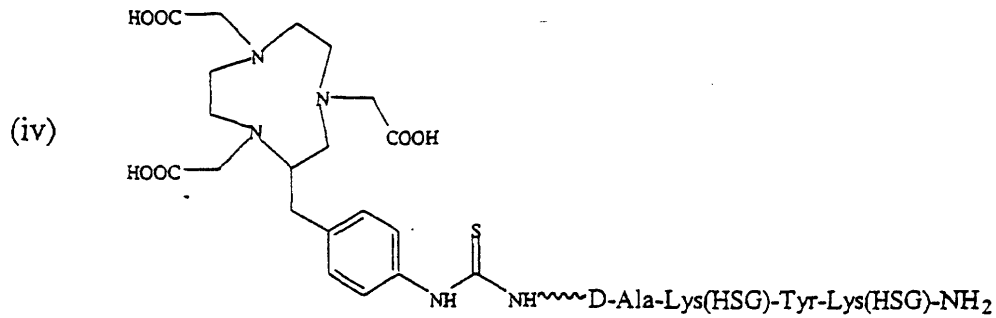
10

20

30

40

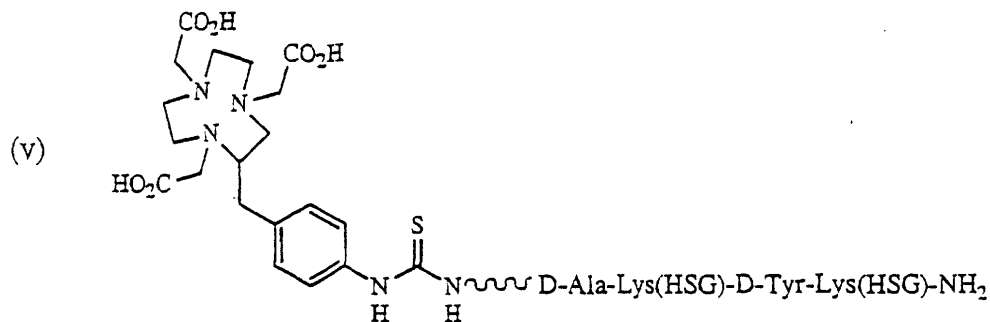
## 【化5】



10

および

## 【化6】



20

からなる群から選択されるターゲティング可能なコンジュゲート体を投与することを含む方法。

## 【請求項214】

被験体においてCSApを発現している疾患組織を手術中に同定/明示する方法であって、

(a) CSApを発現している標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含み、標的組織と特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；そして

30

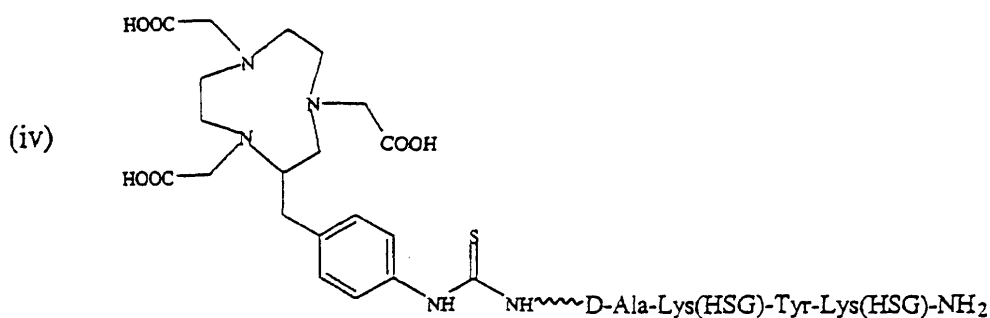
(b) 下記のコンジュゲート体：

(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

(ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

(iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>；

## 【化7】

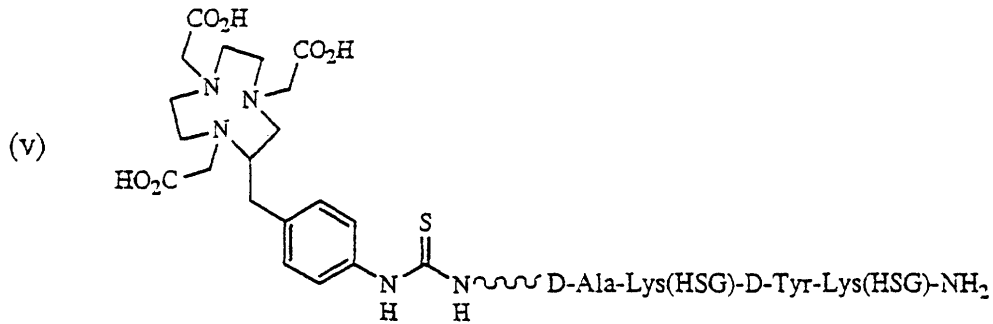


40

および

50

## 【化 8】



10

からなる群から選択されるターゲティング可能なコンジュゲート体を投与することを含む方法。

## 【請求項 215】

被験体においてCSApを発現している疾患組織を内視鏡により同定するための方法であって、

(a) CSApを発現している標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含み、標的組織と特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；そして

20

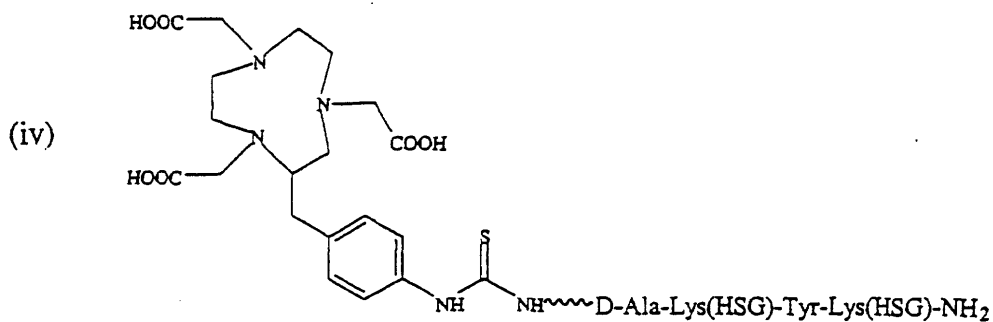
(b) 下記のコンジュゲート体：

(i) DOTA - Phe - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>；

(ii) DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>；

(iii) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub>；

## 【化 9】

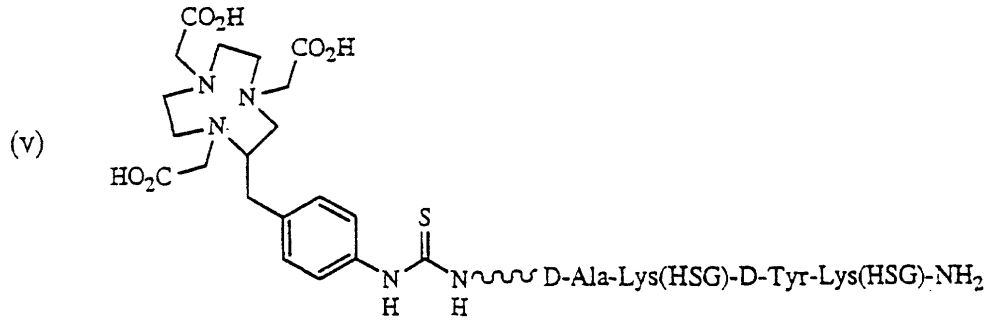


30

および

40

## 【化10】



10

からなる群から選択されるターゲティング可能なコンジュゲート体を投与することを含む方法。

## 【請求項216】

被験体においてCSApを発現している疾患組織を血管内で同定するための方法であって、

(a) CSApを発現している標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含み、標的組織と特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；そして

20

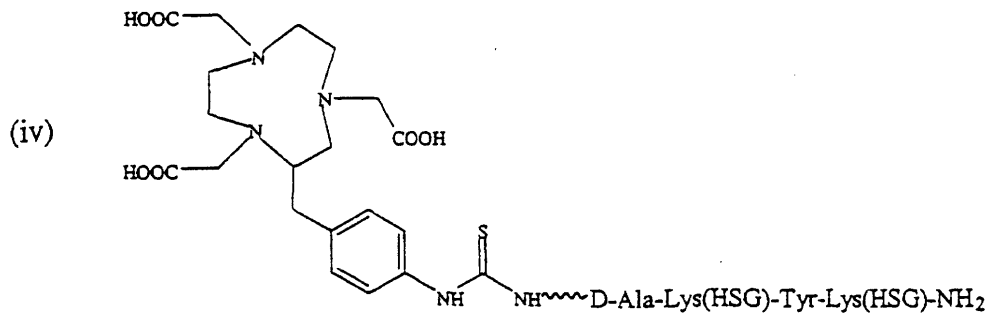
(b) 下記のコンジュゲート体：

(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

(ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

(iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>；

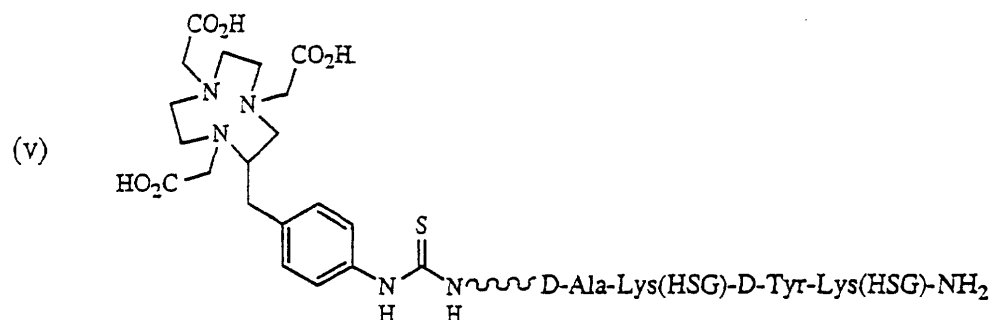
## 【化11】



30

および

## 【化12】



40

からなる群から選択されるターゲティング可能なコンジュゲート体を投与すること

50

を含む方法。

【請求項 2 1 7】

内視鏡手法、腹腔鏡手法、血管内カテーテル手法または手術手法のときに病巣部を検出する方法であって、前記方法は、

( a ) C S A p 抗原に特異的に結合する第 1 の抗体結合部位と、ハプテンに特異的に結合する第 2 の抗体結合部位とを有する二重特異性抗体の F ( a b )<sub>2</sub> フラグメントまたは F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメントを、そのような手法を受けることになっている被験体に注射して、抗体フラグメントを標的部に蓄積させること；

( b ) 任意選択的に、二重特異性フラグメントの大部分が注射後約 2 4 時間以内に循環からクリアリングされないならば、ガラクトシル化された抗イディオタイプクリアリング剤を使用して、ターゲティングされなかった抗体フラグメントをクリアリングし、そして標的部において迅速に局在化し、かつ腎臓を介してクリアリングされる二価の標識されたハプテンを注射すること；

( c ) 最初の注射の 4 8 時間以内に、検出手段を用いて、標的部における蓄積した標識の上昇したレベルを近接範囲検出することによってハプテンの存在を検出し、そして前記手法を行うこと（この場合、前記検出は、造影剤または消去剤が使用されることなく行われる）

を含む方法。

【請求項 2 1 8】

前記ハプテンが診断用放射性同位体または M R I 画像増強剤または蛍光標識で標識される、請求項 2 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1 9】

手術手法、血管内手法、腹腔鏡手法または内視鏡手法のときに病巣部を近接範囲検出するための方法であって、前記方法は、

( a ) そのような手法に対する被験体に、M u - 9 免疫コンジュゲート体またはそのフラグメントの有効量を非経口的に注射すること；

( b ) 注射の 4 8 時間以内に手法を行うこと；

( c ) 前記標識された抗体またはそのフラグメントの存在を検出するための検出手段を用いて近接範囲で被験体の到達内部を走査すること；および

( d ) 該検出手段を用いて、そのような部位における前記標識された抗体またはそのフラグメントの上昇したレベルを検出することによって、前記標識された抗体またはそのフラグメントの蓄積部位を突き止めること

を含む方法。

【請求項 2 2 0】

前記 M u - 9 免疫コンジュゲート体またはそのフラグメントが、2 0 k e V ~ 1 , 0 0 0 k e V のエネルギーで放射線を発する放射性同位体を含む、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 1】

前記放射性同位体が、テクネチウム - 9 9 m、ヨウ素 - 1 2 5、ヨウ素 - 1 3 1、ヨウ素 - 1 2 3、インジウム - 1 1 1、フッ素 - 1 8、ガリウム - 6 8 およびガリウム - 6 7 からなる群から選択される、請求項 2 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2 2】

M u - 9 免疫コンジュゲート体またはそのフラグメントが非同位体薬剤を含む、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

前記非同位体薬剤が光活性な薬剤である、請求項 2 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 2 4】

前記光活性な薬剤が蛍光性薬剤、I M M 1 6 0 オリジナルズである、請求項 2 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 2 5】

被験体における疾患組織を処置または同定する方法であって、

10

20

30

40

50

(a) 標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、少なくとも2つのH S Gハプテンを含むターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントを前記被験体に投与すること；

(b) 任意選択的に、前記被験体にクリアリング用組成物を投与し、そして前記組成物により、局在化しなかった抗体または抗体フラグメントを循環からクリアリングすること；

(c) 少なくとも2つのH S Gハプテンを含むか、または少なくとも2つのH S Gハプテンを有するキャリア部分を含み、かつ診断剤もしくは治療剤および/または1つ以上のキレート化もしくは化学結合した治療剤もしくは診断剤もしくは酵素を含み得るターゲッティング可能なコンジュゲート体を前記被験体に投与すること；そして

(d) 前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体が酵素を含むときには、前記被験体に、

(1) プロドラッグ(この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に変換することができる)；または

(2) 前記被験体において解毒されて、毒性がより低い中間体を形成し得る薬物(この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる)；または

(3) 天然のプロセスによって前記被験体において活性化され、そして毒性がより低い中間体への変換による解毒を受けるプロドラッグ(この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる)

を投与すること

を含む方法。

【請求項226】

前記診断剤が25 keV ~ 600 keVの粒子および/または陽電子を放出する、請求項225に記載の方法。

【請求項227】

前記治療剤が薬物またはプロドラッグまたは毒素である、請求項225に記載の方法。

【請求項228】

前記プロドラッグが、エピルピシグルクロニド、CPT-11、エトポシドグルクロニド、ダウノミシグルクロニドおよびドキソルピシグルクロニドからなる群から選択される、請求項227に記載の方法。

【請求項229】

前記毒素が、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、DNase I、ブドウ球菌のエンドトキシンA、アメリカヤマゴボウの抗ウイルス性タンパク質、ゲロニン、ジフテリアトキシン、シュードモナスのエキソトキシン、およびシュードモナスのエンドトキシンからなる群から選択される、請求項227に記載の方法。

【請求項230】

治療用核種をさらに含む、請求項225に記載の方法。

【請求項231】

前記治療用核種が、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{189}\text{Re}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ および $^{225}\text{Ac}$ からなる群から選択される、請求項230に記載の方法。

【請求項232】

前記診断剤が、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ および $^{131}\text{I}$ からなる群から選択される、請求項226に記載の方法。

【請求項233】

前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体が、疾患組織を殺傷するために有用な1つ

10

20

30

40

50

以上の放射性同位体を含む、請求項 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 3 4】

前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体が<sup>10</sup>B原子を含み、そして方法が、前記疾患組織に局在化する前記ホウ素原子に放射線照射し、それにより前記疾患組織のBNCTを行う工程をさらに含む、請求項 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 3 5】

前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体が1つ以上の毒素を含む、請求項 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 3 6】

前記毒素が、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、DNase I、ブドウ球菌のエンドトキシンA、アメリカヤマゴボウの抗ウイルス性タンパク質、ゲロニン、ジフテリアトキシン、シュードモナスのエキソトキシン、およびシュードモナスのエンドトキシンからなる群から選択される、請求項 2 3 5 に記載の方法。

10

【請求項 2 3 7】

前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体が1つ以上の薬物を含む、請求項 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 3 8】

前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体が1つ以上のプロドラッグを含む、請求項 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 3 9】

前記プロドラッグが、エピルピシングルクロニド、CPT-11、エトポシドグルクロニド、ダウノミシングルクロニドおよびドキシソルピシングルクロニドからなる群から選択される、請求項 2 3 8 に記載の方法。

20

【請求項 2 4 0】

前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体が、疾患組織を検出するために有用な1つ以上の診断剤を含む、請求項 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 1】

前記診断剤が、<sup>118</sup>F、<sup>52</sup>Fe、<sup>62</sup>Cu、<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>67</sup>Ga、<sup>68</sup>Ga、<sup>86</sup>Y、<sup>89</sup>Zr、<sup>94m</sup>Tc、<sup>94</sup>Tc、<sup>99m</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>Iおよび<sup>131</sup>Iからなる群から選択される、請求項 2 4 0 に記載の方法。

30

【請求項 2 4 2】

前記放射性同位体が、陽電子放射断層撮影法(PET)を行うために使用される、請求項 2 4 0 に記載の方法。

【請求項 2 4 3】

前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体が、磁気共鳴画像化(MRI)において使用される1つ以上の画像増強剤を含む、請求項 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 4】

前記増強剤が、MnおよびFeおよびGdからなる群から選択される、請求項 2 4 3 に記載の方法。

【請求項 2 4 5】

前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体が1つ以上の光力学的治療剤を含む、請求項 2 2 5 に記載の方法。

40

【請求項 2 4 6】

前記光力学的治療剤が光増感剤である、請求項 2 4 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 7】

前記光増感剤が、ベンゾポルフィリンモノ酸リングA(BPD-MA)、スズエチオプルプリン(SnET2)、スルホン化アルミニウムフタロシアニン(ALSPC)およびルテチウムテキサフィリン(Lutex)からなる群から選択される、請求項 2 4 6 に記載の方法。

【請求項 2 4 8】

50

標的組織と特異的に結合する前記少なくとも1つのアームがモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体のフラグメントである、請求項225に記載の方法。

【請求項249】

ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する前記少なくとも1つの他のアームがモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体のフラグメントである、請求項225に記載の方法。

【請求項250】

標的組織と特異的に結合する前記少なくとも1つのアームがヒト抗体またはキメラ抗体またはヒト化抗体あるいはヒト抗体またはキメラ抗体またはヒト化抗体のフラグメントである、請求項225に記載の方法。

10

【請求項251】

ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する前記少なくとも1つの他のアームがヒト抗体またはキメラ抗体またはヒト化抗体あるいはヒト抗体またはキメラ抗体またはヒト化抗体のフラグメントである、請求項225に記載の方法。

【請求項252】

前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントが治療用核種をさらに含む、請求項225に記載の方法。

【請求項253】

前記治療用放射性核種が、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{189}\text{Re}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ および $^{225}\text{Ac}$ からなる群から選択される、請求項252に記載の方法。

20

【請求項254】

前記ターゲティング可能なコンジュゲート体が、ドキソルピシン、SN-38、エトポシド、メトトレキサート、6-メルカプトプリンまたはリン酸エトポシドを含む、請求項225に記載の方法。

【請求項255】

前記標的組織が腫瘍である、請求項225に記載の方法。

【請求項256】

前記腫瘍が結腸特異的抗原-p(CSAp)を産生するか、または結腸特異的抗原-p(CSAp)に関連する、請求項255に記載の方法。

30

【請求項257】

前記二重特異性抗体がMAb Mu9のFvおよびMAb 679のFvを含む、請求項256に記載の方法。

【請求項258】

Mu9および/または679がキメラ化またはヒト化されている、請求項257に記載の方法。

【請求項259】

Mu9および/または679がヒトMu9およびヒト679である、請求項257に記載の方法。

40

【請求項260】

前記二重特異性抗体がMu9のCDRの1つ以上を含む、請求項257に記載の方法。

【請求項261】

前記二重特異性抗体が679のCDRの1つ以上を含む、請求項257に記載の方法。

【請求項262】

前記二重特異性抗体が融合タンパク質である、請求項255に記載の方法。

【請求項263】

前記腫瘍ががん胎児性抗原(CEA)を産生する、請求項255に記載の方法。

【請求項264】

前記二重特異性抗体がMAb MN14のFvおよびMAb 679のFvを含む、請求項

50

263に記載の方法。

【請求項265】

MN14および/または679がキメラ化またはヒト化されている、請求項264に記載の方法。

【請求項266】

MN14および/または679がヒトMN14およびヒト679である、請求項264に記載の方法。

【請求項267】

前記二重特異性抗体がMN14のCDRの1つ以上を含む、請求項264に記載の方法。

【請求項268】

前記二重特異性抗体が679のCDRの1つ以上を含む、請求項264に記載の方法。

【請求項269】

前記二重特異性抗体が融合タンパク質である、請求項264に記載の方法。

【請求項270】

前記融合タンパク質が三価であり、CSApと反応し得る抗体のFvを含む、請求項269に記載の方法。

【請求項271】

前記二重特異性抗体がクラスIII抗CEA抗体と679のFvとを含む、請求項263に記載の方法。

【請求項272】

哺乳動物における標的細胞または標的組織または標的病原体を検出または処置するための方法であって、

標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；

この場合、前記少なくとも1つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によって産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができる；そして

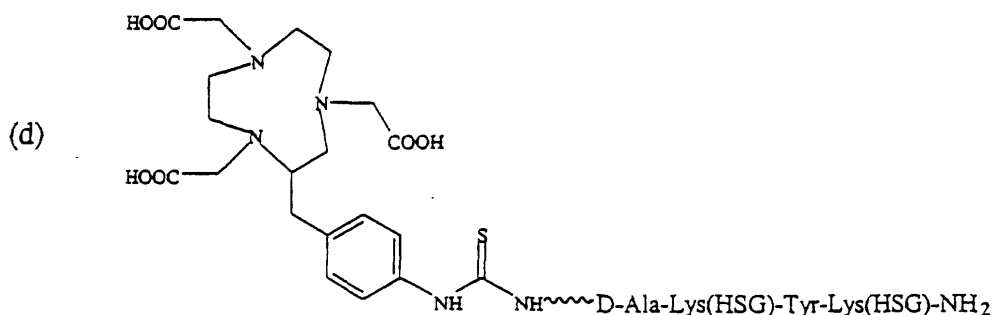
下記のコンジュゲート体：

(a) DOTA - Phe - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>；

(b) DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>；

(c) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub>；

【化13】



および

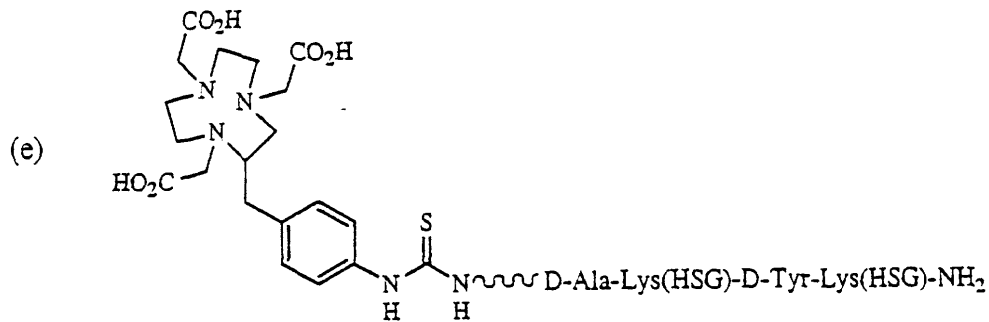
10

20

30

40

## 【化 1 4】



10

からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与することを含む方法。

## 【請求項 2 7 3】

前記病原体が、菌類、ウイルス、寄生虫または細菌である、請求項 2 7 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 7 4】

前記ウイルスが、ヒト免疫不全症ウイルス (HIV)、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、B 型肝炎ウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、ヒト血清パルボ様ウイルス、シミアンウイルス 40、呼吸器合胞体ウイルス、マウス乳腫瘍ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス、エプスタイン - バールウイルス、マウス白血病ウイルス、ムンプスウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、イボウイルスおよびブルータングウイルスからなる群から選択される、請求項 2 7 3 に記載の方法。

20

## 【請求項 2 7 5】

前記細菌が、ストレプトコッカス・アガラクチアエ、レジオネラ・ニューモフィリア、化膿連鎖球菌、大腸菌、淋菌、髄膜炎菌、肺炎球菌、B 型インフルエンザ菌、梅毒トレポネーマ、ライム病スピロヘータ、緑膿菌、らい菌、ウシ流産菌、結核菌および破傷風毒素からなる群から選択される、請求項 2 7 3 に記載の方法。

30

## 【請求項 2 7 6】

被験体における疾患組織を処置または同定する方法であって、標的組織と特異的に結合する少なくとも 1 つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも 1 つの他のアームとを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントを前記被験体に投与すること；

任意選択的に、前記被験体にクリアリング用組成物を投与し、そして前記組成物により、局在化しなかった抗体または抗体フラグメントを循環からクリアリングすること；そして下記のコンジュゲート体：

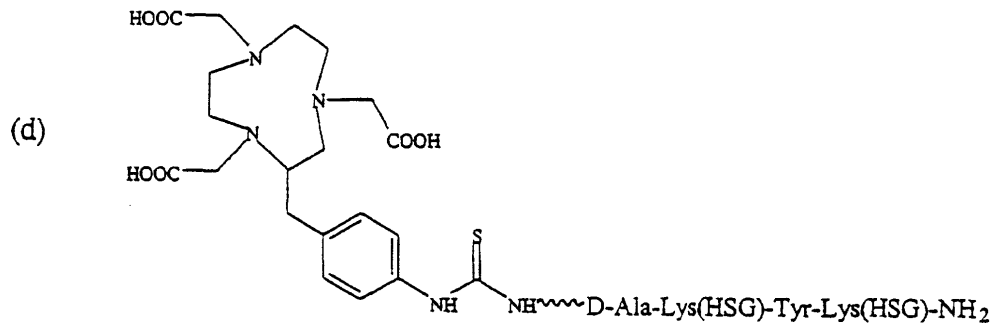
( a ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

( b ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

( c ) A c - L y s ( H S G ) D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub> ;

40

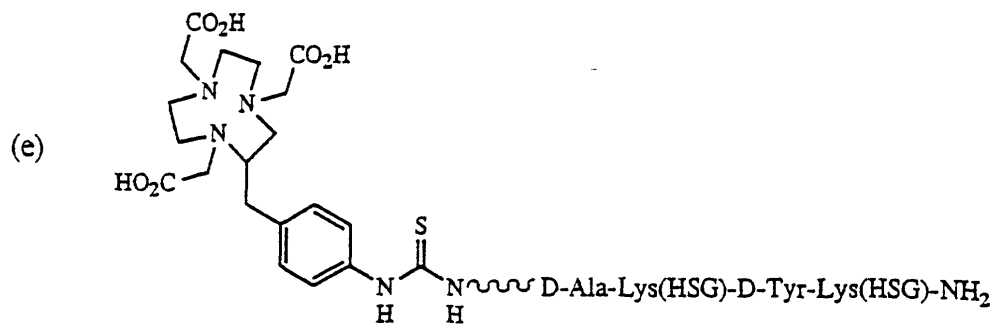
## 【化15】



10

および

## 【化16】



20

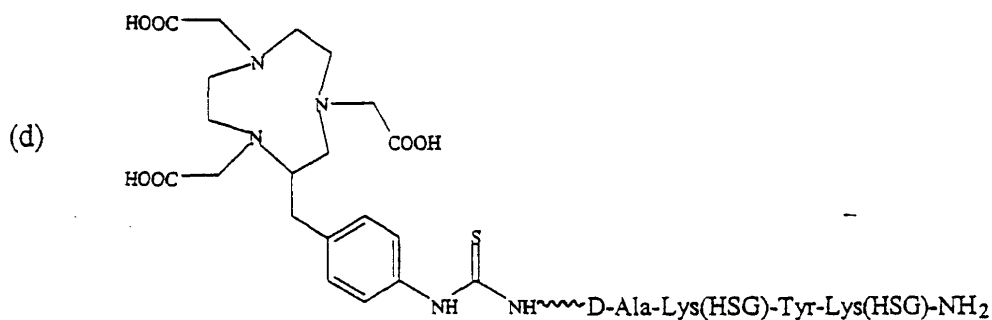
からなる群から選択されるターゲティング可能なコンジュゲート体を前記被験体に投与することを含む方法。

## 【請求項277】

被験体における疾患組織を処置または同定するために有用なキットであって、  
 (a) 標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントで、前記コンジュゲート体が、下記のコンジュゲート体：  
 (a) DOTA - Phe - Lys(HSG) - D - Tyr - Lys(HSG) - NH<sub>2</sub> ;  
 (b) DOTA - Phe - Lys(HSG) - Tyr - Lys(HSG) - NH<sub>2</sub> ;  
 (c) Ac - Lys(HSG) D - Tyr - Lys(HSG) - Lys(Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub> ;

30

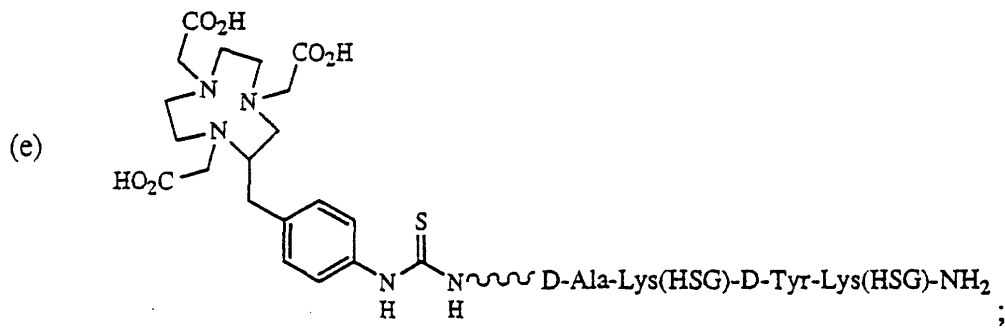
## 【化17】



40

および

## 【化 1 8】



10

からなる群から選択される、二重特異性の抗体または抗体フラグメント；

(b) 前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントの前記少なくとも1つの他のアームによって認識され得るエピトープを少なくとも1つ含むか、またはそのようなエピトープを少なくとも1つ有するキャリア部分と、1つ以上のコンジュゲート化された治療剤または診断剤または酵素とを含むターゲッティング可能なコンジュゲート体；および

(c) 任意選択的に、局在化しなかった抗体または抗体フラグメントを循環からクリアリングするために有用なクリアリング用組成物；そして

(d) 任意選択的に、前記第1のターゲッティング可能なコンジュゲート体が酵素を含むときには、

20

(1) プロドラッグ（この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に変換することができる）；または

(2) 前記被験体において解毒されて、毒性がより低い中間体を形成し得る薬物（この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる）；または

(3) 天然のプロセスによって前記被験体において活性化され、そして毒性がより低い中間体への変換による解毒を受けるプロドラッグ（この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる）

を含むキット。

30

## 【請求項 278】

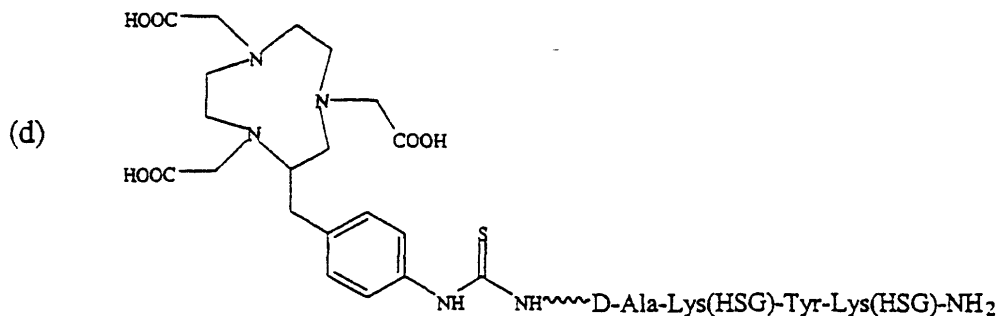
下記のコンジュゲート体：

(a) DOTA - Phe - Lys(HSG) - D - Tyr - Lys(HSG) - NH<sub>2</sub>；

(b) DOTA - Phe - Lys(HSG) - Tyr - Lys(HSG) - NH<sub>2</sub>；

(c) Ac - Lys(HSG) D - Tyr - Lys(HSG) - Lys(Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub>；

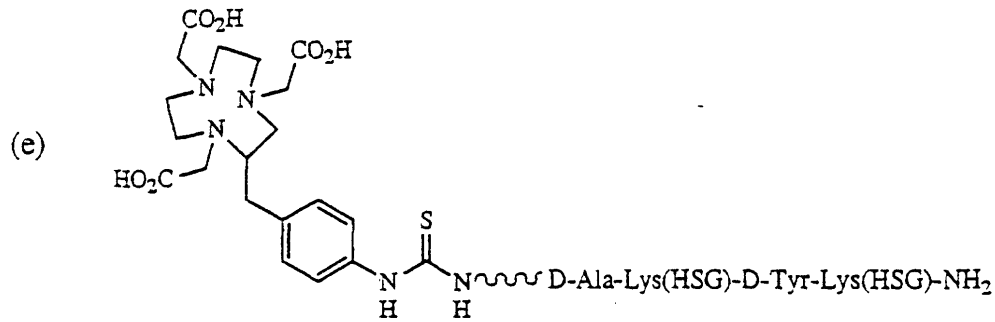
## 【化 1 9】



40

および

【化 2 0】



10

からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体。

【請求項 2 7 9】

ターゲッティング可能なコンジュゲート体についてスクリーニングする方法であって、前記ターゲッティング可能な構築物を、標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアーム、および前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントと接触させて、混合物を得ること；

この場合、前記少なくとも1つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によって産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができる；および

20

任意選択的に、前記混合物をインキュベーションすること；そして

前記混合物を分析すること

を含む方法。

【請求項 2 8 0】

前記分析が、F A B M Sまたは高磁場N M Rまたはサイズ排除H P L Cからなる群から選択される分析方法を含む、請求項 2 7 9に記載の方法。

【請求項 2 8 1】

哺乳動物において正常な組織を画像化するための方法であって、

30

標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；

この場合、前記少なくとも1つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によって産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができる；および

下記のコンジュゲート体：

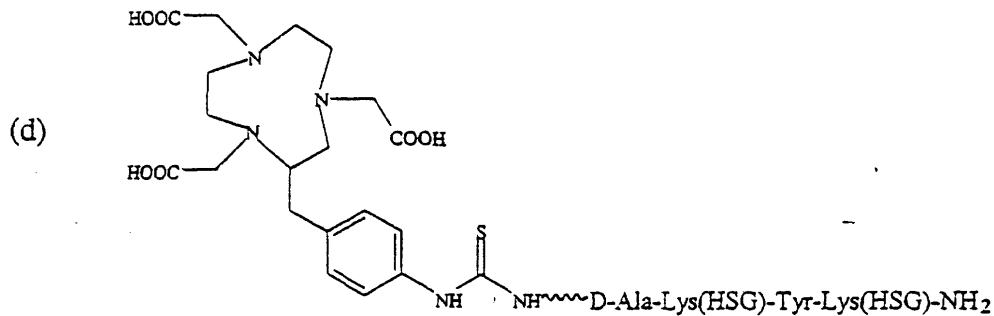
( a ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ；

( b ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ；

40

( c ) A c - L y s ( H S G ) D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub> ；

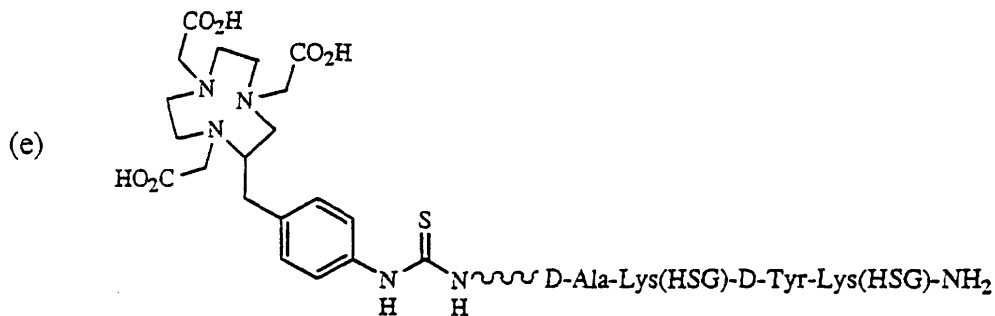
## 【化 2 1】



10

および

## 【化 2 2】



20

からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与することを含む方法。

## 【請求項 2 8 2】

前記正常な組織が、卵巣、胸腺、副甲状腺または脾臓に由来する組織である、請求項 2 8 1 に記載の方法。

## 【請求項 2 8 3】

前記ウイルスが、ヒト免疫不全症ウイルス (HIV)、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、B 型肝炎ウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、ヒト血清パルボ様ウイルス、シミアンウイルス 40、呼吸器合胞体ウイルス、マウス乳腫瘍ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス、エプスタイン - パールウイルス、マウス白血病ウイルス、ムンプスウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、イボウイルスおよびブルータングウイルスからなる群から選択される、請求項 2 8 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 2 8 4】

前記細菌が、ストレプトコッカス・アガラクチアエ、レジオネラ・ニューモフィリア、化膿連鎖球菌、大腸菌、淋菌、髄膜炎菌、肺炎球菌、B 型インフルエンザ菌、梅毒トレポネーマ、ライム病スピロヘータ、緑膿菌、らい菌、ウシ流産菌、結核菌および破傷風毒素からなる群から選択される、請求項 2 8 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 2 8 5】

被験体における疾患組織を手術中に同定する方法であって、標的組織と特異的に結合する少なくとも 1 つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも 1 つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；

この場合、前記少なくとも 1 つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によっ

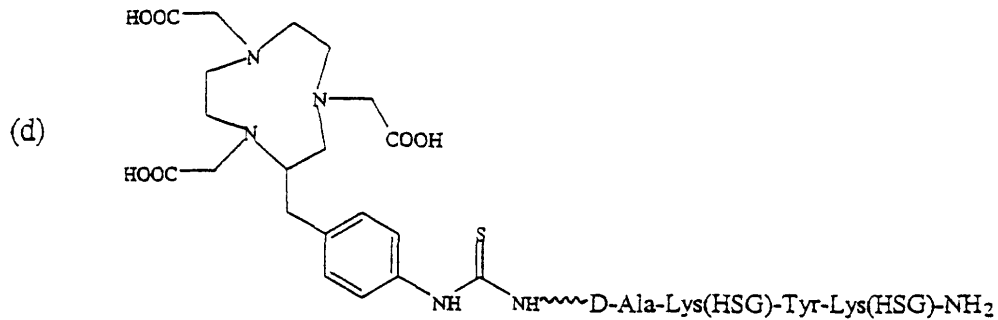
50

て産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができる；および

下記のコンジュゲート体：

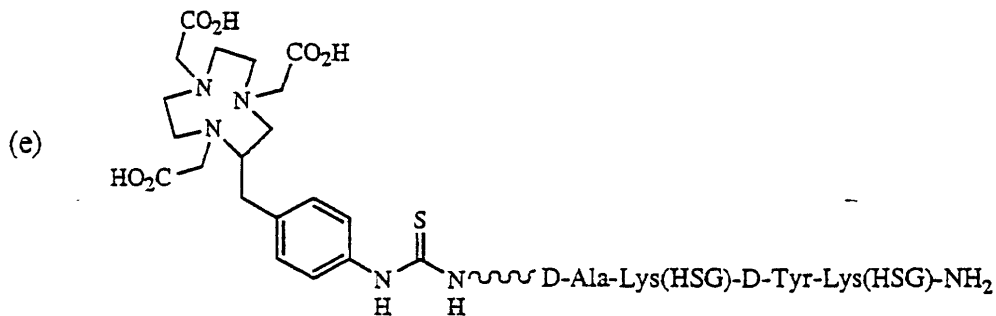
- ( a ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;  
 ( b ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;  
 ( c ) A c - L y s ( H S G ) D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub> ;

【化 2 3】



および

【化 2 4】



からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与することを含む方法。

【請求項 2 8 6】

被験体における疾患組織を内視鏡により同定する方法であって、

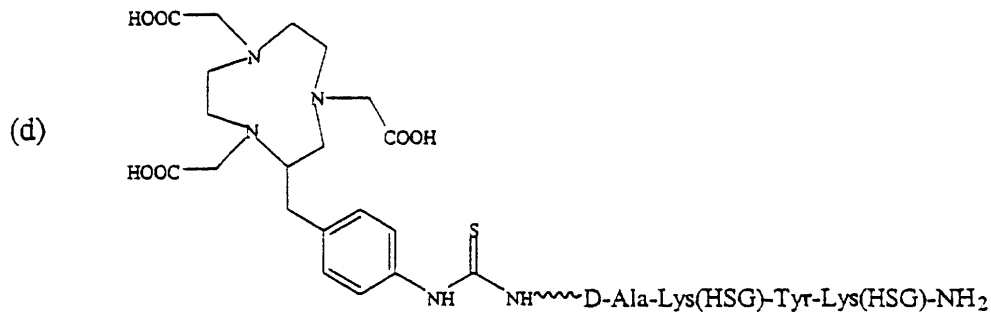
標的組織と特異的に結合する少なくとも 1 つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも 1 つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；

この場合、前記少なくとも 1 つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によって産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができる；および

下記のコンジュゲート体：

- ( a ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;  
 ( b ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;  
 ( c ) A c - L y s ( H S G ) D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub> ;
- 40

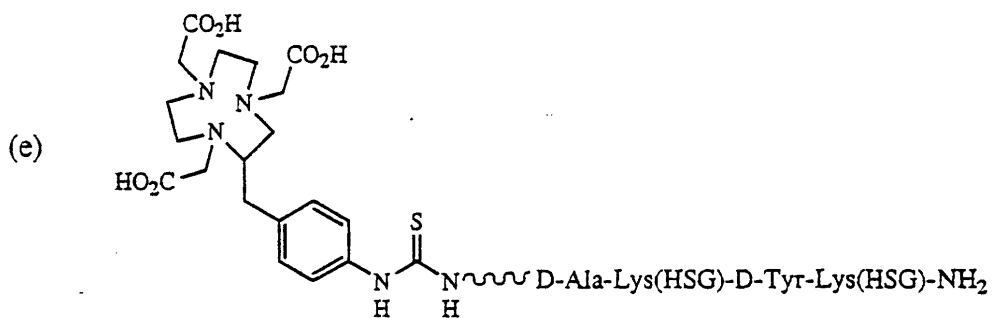
## 【化 2 5】



10

および

## 【化 2 6】



20

からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与することを含む方法。

## 【請求項 2 8 7】

被験体における疾患組織を血管内で同定する方法であって、

標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；

30

この場合、前記少なくとも1つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によって産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができる；および

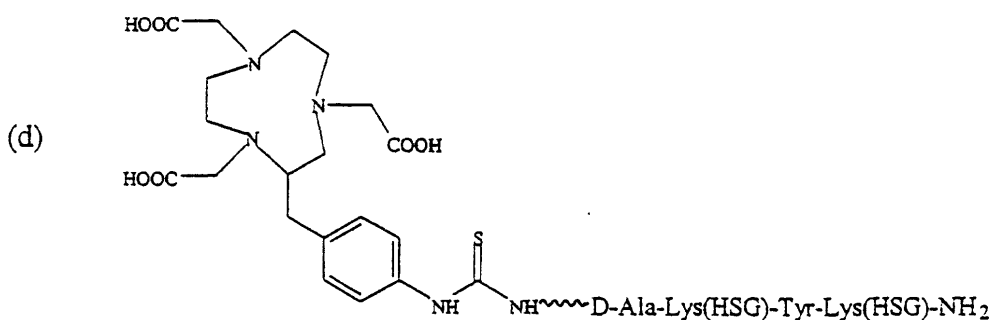
下記のコンジュゲート体：

(a) DOTA - Phe - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>；

(b) DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>；

(c) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub>；

## 【化 2 7】

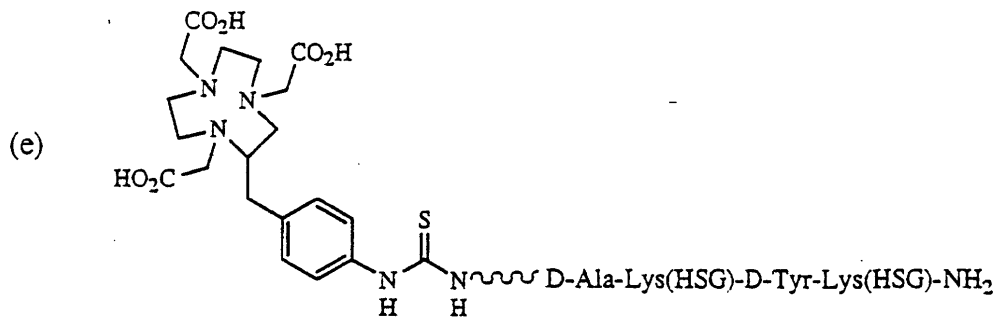


40

50

および

【化 2 8】



からなる群から選択されるターゲティング可能なコンジュゲート体を投与することを含む方法。

【請求項 2 8 8】

前記ターゲティング可能なコンジュゲート体が、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{154}\sim^{158}\text{Gd}$ および $^{175}\text{Lu}$ からなる群から選択される診断剤をさらに含む、請求項 2 7 2、2 7 6、2 7 7、2 7 9、2 8 1、2 8 5、2 8 6 または 2 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8 9】

前記ターゲティング可能なコンジュゲート体が、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{189}\text{Re}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ および $^{225}\text{Ac}$ からなる群から選択される治療用核種をさらに含む、請求項 2 8 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連特許出願のクロスリファレンス)

本出願は米国特許出願第 0 9 / 3 3 7 , 7 5 6 号 ( 1 9 9 9 年 6 月 2 2 日出願 ) ( 参照することにより、その全体を本明細書中に組み込むものとする ) の一部継続出願である。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、例えば、放射免疫療法 ( R A I T ) および化学免疫療法において治療のために使用される免疫学的試薬、ならびに例えば、放射免疫検出 ( R A I D )、超音波検査法および磁気共鳴画像化 ( M R I ) において検出および/または診断のために使用される免疫学的試薬に関する。詳細には、本発明は、むき出し状態の ( n a k e d ) 抗体 ( 非コンジュゲート型 ) および直接的なコンジュゲート化抗体、ならびに標的組織に対して反応し得る少なくとも 1 つのアームと、リンカー部分に対して反応し得る少なくとも 1 つの他のアームとを有する二重特異性抗体 ( b s A b ) および二重特異性抗体フラグメント ( b s F a b ) に関する。さらに、本発明は、特定の免疫原に対して惹起されたモノクローナル抗体 ( これらは、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体およびキメラなモノクローナル抗体である )、ならびに標的組織に対して反応し得る少なくとも 1 つのアームと、リンカー部分に対して反応し得る少なくとも 1 つの他のアームとを有するヒト二重特異性抗体およびヒト化二重特異性抗体およびキメラ二重特異性抗体およびそのような二重特異性抗体フラグメント、そしてそのような抗体および抗体フラグメントをコードする D N A、そしてそのような D N A を発現させるためのベクターに関する。

【0003】

本発明はまた、ヒト化抗 C S A p 抗体およびキメラ抗 C S A p 抗体およびヒト抗 C S A p

10

20

30

40

50

抗体、特にモノクローナル抗体 (mAb)、そしてヒト化抗CSAp抗体およびキメラ抗CSAp抗体およびヒト抗CSAp抗体の治療用および検出/診断用のコンジュゲート体、そしてヒト化抗CSAp抗体およびキメラ抗CSAp抗体およびヒト抗CSAp抗体を使用して、悪性腫瘍を診断/検出または処置する方法に関する。本発明はまた、少なくとも2つの抗CSAp mAbまたはそのフラグメントを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメント、あるいは少なくとも1つの抗CSAp mAbまたはそのフラグメントと、この抗CSAp mAbまたはそのフラグメントとは異なる少なくとも1つの第2のmAbまたはそのフラグメントとを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメントに関する。ヒト化抗CSAp mAb、キメラ抗CSAp mAbおよびヒト抗CSAp mAbまたはそれらのフラグメントあるいはそれらの抗体融合タンパク質またはそのフラグメントは、単独で、または治療用コンジュゲート体として、または他のむき出し状態の抗体もしくは他の治療剤との治療用免疫コンジュゲート体と組み合わせて、または診断/検出用コンジュゲート体として投与することができる。本発明はまた、ヒト化抗CSAp抗体、キメラ抗CSAp抗体、ヒト抗CSAp抗体および抗体融合タンパク質をコードするDNA配列、ならびにそのようなDNA配列を含有するベクターおよび宿主細胞、ならびにヒト化抗CSAp抗体、キメラ抗CSAp抗体およびヒト抗CSAp抗体を作製する方法を提供する。

10

#### 【背景技術】

#### 【0004】

がんの治療および検出/診断に対する方法では、検出/診断剤または治療剤を疾患部位をターゲットすることができる抗体または抗体フラグメントを疾患組織に向かわせることが伴う。現在研究中であるこの方法論に対する1つの方法では、標的疾患組織に対して反応し得る少なくとも1つのアームと、低分子量ハプテンに対して反応し得る少なくとも1つの他のアームとを有する二重特異性のモノクローナル抗体 (bsAb) の使用が含まれる。この方法論では、bsAbが投与され、そのbsAbは標的組織に局在化でき、そして正常な組織からはクリアリングされる。しばらくして、放射標識された低分子量ハプテンが投与されるが、これはbsAbの第2の特異性によって認識されるので、これもまた最初の標的に集まる。同じ技術を使用して、治療用同位体、薬物および毒素を、疾患組織に対して、特に、bsAbがターゲティングされるがんに対して選択的にターゲティングすることができ、または標的抗原を発現している病理学的病変部の改善された診断および検出のために非放射性診断剤をターゲティングすることができる。

20

30

#### 【0005】

bsAbと組み合わせて使用される低分子量ハプテンは特異的な画像化および治療において非常に多数の用途を有しているが、それぞれの可能な適用について個々のbsAbを調製することは実際的ではない。さらに、bsAb/低分子量ハプテンシステムの適用では、いくつかの他の問題と取り組まなければならない。第1に、低分子量ハプテンに結合するbsAbのアームは大きい親和性で結合しなければならない。これは、低分子量ハプテンは、bsAbが結合しないときには生体系から迅速にクリアリングされるように設計されるからである。第2に、bsAb以外が結合した低分子量ハプテンは、実際には、非標的組織による取り込みおよび非標的組織での保持を避けるために、生体系から迅速にクリアリングされる必要がある。第3に、検出剤および/または治療剤は、用いられたbsAbプロトコル内のその適用期間中は低分子量ハプテンとの会合状態を維持しなければならない。

40

#### 【0006】

この方法に関して注目されるのは、適切な二重の特異性を有するAbを使用してキレーターおよび金属キレート錯体をがんに向かわせるbsAbである。使用されるキレーターおよび金属キレート錯体は放射性であることが多く、これらには、コバルト-57 (Goodwinら、米国特許第4,863,713号)、インジウム-111 (Barbetら、米国特許第5,256,395号および米国特許第5,274,076号; Goodwinら、J. Nucl. Med. 33: 1366~1372 (1992)); およびKra

50

nenborgら、Cancer Res (suppl.)、55:5864s~5867s (1995) およびCancer (suppl.)、80:2390~2397 (1997) およびガリウム-68 (Bodenら、Bioconjugate Chem. 6:373~379 (1995); Schuhmacherら、Cancer Res. 55:115~123 (1995)) などの放射性核種が放射免疫画像化のために使用されている。Abがキレーターおよび金属キレート錯体に対して生じたので、その抗体は、それに対する抗体が最初に生じた錯体に対して顕著な特異性を有している。実際、BodenらのbsAbは、キレーターおよび金属キレート錯体のエナンチオマー混合物の単一エナンチオマーに対する特異性を有している。この大きい特異性は、放射免疫療法 (RAIT) に有用なイットリウム-90 およびビスマス-213、そしてMRIに有用なガドリニウムなどの他の核種を、代わりに使用される利用可能な試薬に容易に置き換えることができないという点で、ある意味では不都合であることが証明されている。このため、ヨウ素-131 (非金属) が、I-131 標識されたインジウム-金属-キレート錯体を2番目のターゲティングステップにおいて使用することによってRAIT目的のために採用されている。この方法論に対する別の欠点により、診断的使用または治療的使用のために所望されるすべての薬剤に対して抗体を生じさせることが必要となっている。

#### 【0007】

従って、疾患組織を指向できる免疫学的薬剤で、治療用または診断/検出用の金属キレート錯体あるいは治療用または診断/検出用のキレーターに結合し、またはそれらと会合する後に投与されるリンカー部分と反応し得る免疫学的薬剤が依然として求められている。

#### 【0008】

本発明は、結腸直腸がん、膵臓がんおよび卵巣がんを含む様々ながんに対する組換えにより製造されたキメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体およびヒトモノクローナル抗体に関する。キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体およびヒトモノクローナル抗体は、完全なネズミ抗体よりもヒト抗マウス抗体の産生が少なくなる。さらに、これらの抗体が診断試薬または治療試薬に対して共有結合的にコンジュゲート化されたとき、抗体はその結合特性を保持している。さらに、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体が、IgG<sub>1</sub>の場合と同様に、患者において免疫学的に機能的であり得るヒト定常領域を有するならば、これらはまた、むき出し状態の(すなわち、非コンジュゲート型)抗体としてそのような腫瘍に対して活性にすることができ、そのため、化学療法および放射線などの他の治療様式の抗腫瘍作用もまた強化し得る。

#### 【0009】

結腸直腸がん、膵臓がんおよび卵巣がんは、依然としてがんによる死亡の重要な一因である。しかしながら、従来の化学療法および放射線療法に対するそれらの応答は雑多なものである。さらに、これらの従来の治療形態には、それらの有用性を制限する様々な毒性副作用がある。

#### 【0010】

モノクローナル抗体の使用により、従来の化学療法および放射線療法に対する代替法が提供される。腫瘍特異的モノクローナル抗体および腫瘍関連モノクローナル抗体は、処置治療法において、単独(むき出し状態の抗体治療)で、またはコンジュゲート体として機能し得る。放射性核種または他の細胞傷害性薬剤に対してコンジュゲートされた標的化モノクローナル抗体の使用により、そのような薬剤を腫瘍部位に直接的に送達し、それにより正常な組織が毒性薬剤に曝されることを制限することができるという可能性が提供される (Goldenberg, Semin. Nucl. Med., 19:332 (1989); Goldenberg, DM, 放射免疫療法, Nuclear Medicine Annual 2001, L. Freeman編, Lippincott, William & Wilkins, Philadelphia, 2001, 167頁~206頁)。近年、抗体に基づいた治療の潜在的可能性および腫瘍関連抗原の局在性におけるその正確性が研究室および臨床の両方の研究で明らかにされている(例えば、Thorpe, TIBTECH, 11:42 (1993); Goldenberg, Scientific Am 50

erican、Science & Medicine、1:64(1994); Baldwinら、米国特許第4,923,922号および同第4,916,213号; Young、米国特許第4,918,163号;米国特許第5,204,095号;Irieら、米国特許第5,196,337号;Hellsstromら、米国特許第5,134,075号および同第5,171,665号;Thorpeら、米国特許第6,342,221号;Epsteinら、米国特許第5,965,132号、同第6,004,554号、同第6,071,491号、同第6,017,514号、同第5,882,626号および同第5,019,368号を参照のこと)。腫瘍による抗体取り込みが、注射された総用量のわずかに0.01%~0.001%の範囲と一般には低い(Vaughanら、Brit. J. Radiol.、60:567(1987))ことを理由の一部として、一般に、腫瘍の場所を突き止めるために、腫瘍関連マーカーに対する放射標識された抗体または抗体フラグメントを使用することは、治療のためよりも成功している。腫瘍に対する投薬量を増大させるために放射標識の濃度を増大させることは、健康な組織の放射能被爆をも増大させるので、一般には逆効果である。

#### 【0011】

Mu-9は、結腸特異的抗原-pムチン(CSAP)に対するIgG<sub>1</sub>サブタイプのネズミモノクローナル抗体である。CSAPは、膵臓がんおよび卵巣がんだけでなく、結腸直腸がんにおいて高い割合で存在する腫瘍関連抗原である(Goldら、Cancer Res.、50:6405(1990)、およびそれにおける引用参考文献)。前臨床試験および臨床試験において、この抗体は優れた腫瘍ターゲティング能を示している(Blumenthalら、Int. J. Cancer、22:292(1989);Sharkeyら、Cancer、73(suppl.):864(1994))。Mu-9は、循環に存在しないエピトープを認識するので、腫瘍抗原をターゲティングする他の抗体を上回る利点を有している(Pantら、Cancer、50:919(1982))。循環している抗原は、その抗体により、循環性の免疫複合体が形成され、これにより、腫瘍のターゲティングならびに抗体の薬物動態学および生物分布が変化し得るので、抗体治療の送達を変化させることができる。

#### 【0012】

ほとんどの他の有望な非ヒト抗体の場合のように、ネズミMu-9の臨床的使用は、抗マウス抗体(HAMA)応答のヒトにおける発達によって制限されることがある。これにより、診断/検出および治療における抗体の有用性が制限され得る。これは、潜在的なアナフィラキシー問題のためだけでなく、循環している抗体の大部分が、循環している抗マウス抗体によって複合体形成され、隔離され得るためでもある。HAMAの産生はまた、ネズミ抗体に基づく免疫アッセイの正確性にも影響を及ぼし得る。従って、HAMA応答は、一般に、Mu-9抗体の最大限の診断的可能性および治療的可能性を実現するための潜在的な障害となっている。

#### 【0013】

治療または診断/検出における薬剤使用法としてMu-9抗体の価値を最大限にするために、そして多回および連続的な投与における薬剤使用法および状況でのその有用性を増大させるために、本発明の目的は、Mu-9の抗原結合特異性を保持することによってMu-9に関連するが、投与された被験体において低下したHAMA応答または他の免疫応答を誘発する、マウス-ヒトのキメラmAb(cMu-9)、完全なヒトmAb、およびヒト化mAb(hMu-9)を提供することである。

#### 【0014】

本発明の別の目的は、相補性決定領域(CDR)を含む、cMu-9mAbおよびヒトMu-9mAbおよびhMu-9mAbの軽鎖および重鎖の可変領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を提供することである。

#### 【0015】

本発明のさらなる目的は、治療剤または診断/検出剤を含有する、chMu-9mAbおよびヒトMu-9mAbおよびcMu-9mAbのコンジュゲート体を提供することであ

る。

【0016】

本発明の別の目的は、様々な抗体とCSAp抗体との組合せ、または様々な抗体と他のがん腫ターゲット抗体との組合せを提供することであり、この場合、前記抗体はむき出し状態の免疫グロブリンとして使用することができ、または薬物、毒素、同位体、サイトカイン、酵素、酵素阻害剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニストおよび他の治療増強成分とのコンジュゲート体として使用することができる。

【0017】

本発明のさらに別の目的は、本発明のヒト化MAbおよびキメラMAbおよび完全なヒトMAbを利用する治療法および診断/検出法を提供することである。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0018】

(発明の要約)

本発明は、結腸特異的抗原-pムチン(CSAp)抗原に結合するモノクローナル(MAb)抗体またはそのフラグメントを提供する。好ましくは、本発明のモノクローナル抗体またはそのフラグメントはMu-9エピトープに結合する。さらに好ましくは、本発明のモノクローナル抗体またはそのフラグメントはヒト化され、またはキメラであり、または完全なヒト由来である。

【0019】

本発明はまた、ヒト化Mu-9(hMu-9)モノクローナル抗体(mAb)またはそのフラグメントを提供する。本発明のhMu-9抗体またはフラグメントは非ヒトMu-9抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の相補性決定領域(CDR)を含有しており、それらはヒト抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域のフレームワーク(FR)領域に連結され、そしてフレームワーク(FR)領域は続けてヒト抗体の軽鎖定常領域および重鎖定常領域に連結されている。このヒト化抗体またはフラグメントは、元のMu-9抗体のCSAp抗原特異性を保持しているが、ヒト被験体における免疫原性が小さくなっている。

20

【0020】

別の態様において、本発明は、キメラなMu-9(cMu-9)モノクローナル抗体またはそのフラグメントを提供する。本発明のcMu-9抗体またはフラグメントは非ヒトMu-9抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含有しており、それらはヒト抗体の軽鎖定常領域および重鎖定常領域に連結されている。このキメラ抗体は、元のMu-9抗体のCSAp抗原特異性を保持しているが、ヒト被験体における免疫原性が小さくなっている。

30

【0021】

本発明ではまた、完全なヒトMu-9抗体およびそのフラグメントも考えられる。

【0022】

本発明ではまた、ネズミ抗CSApMAbの相補性決定領域(CDR)と、ヒト抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域のフレームワーク(FR)領域と、ヒト抗体の軽鎖定常領域および重鎖定常領域とを含むヒト化抗体またはそのフラグメントも考えられる。この場合、ヒト化CSApMAbの軽鎖可変領域のCDRは、RSSQSIVHSNGNTYLEのアミノ酸配列を含むCDR1と、KVSNRFSAのアミノ酸配列を含むCDR2と、FQGSRVPTYTのアミノ酸配列を含むCDR3とを含み、そしてヒト化抗CSApMAbの重鎖可変領域のCDRは、EYVITのアミノ酸配列を含むCDR1と、E I Y P G S G S T S Y N E K F Kのアミノ酸配列を含むCDR2と、E D Lのアミノ酸配列を含むCDR3とを含む。

40

【0023】

本発明はさらに、ネズミ抗CSApMAbの相補性決定領域(CDR)と、ヒト抗体の重鎖可変領域のフレームワーク領域と、ヒト抗体の重鎖定常領域とを含むCDRグラフトされたヒト化重鎖を提供する。この場合、ヒト化抗CSApMAbの重鎖可変領域のC

50

D Rは、E Y V I Tのアミノ酸配列を含むC D R 1と、E I Y P G S G S T S Y N E K F Kのアミノ酸配列を含むC D R 2と、E D Lのアミノ酸配列を含むC D R 3とを含む。

【0024】

関連において、本発明は、ネズミ抗C S A p M A bの相補性決定領域(C D R)と、ヒト抗体の軽鎖可変領域のフレームワーク領域と、ヒト抗体の軽鎖定常領域とを含むC D R グラフトされたヒト化軽鎖を提供する。この場合、ヒト化抗C S A p M A bの軽鎖可変領域のC D Rは、R S S Q S I V H S N G N T Y L Eのアミノ酸配列を含むC D R 1と、K V S N R F Sのアミノ酸配列を含むC D R 2と、F Q G S R V P Y Tのアミノ酸配列を含むC D R 3とを含む。

【0025】

本発明はさらに、本明細書中に記載される抗C S A p抗体のいずれか1つの抗C S A p M A bまたはそのフラグメントあるいはそれらの抗体融合タンパク質またはそのフラグメントを含む抗体成分を含む診断/検出用免疫コンジュゲート体に関する。この場合、抗体成分は少なくとも1つの診断/検出剤に結合している。好ましくは、診断/検出用免疫コンジュゲート体は少なくとも1つの光活性な診断/検出剤を含む。より好ましくは、光活性な診断/検出剤は色素原または色素を含む。さらに好ましくは、診断/検出剤は、20 k e V ~ 2 , 0 0 0 k e Vの間のエネルギーを有する放射性核種である。

【0026】

関連において、本発明はさらに、本明細書中に記載される抗C S A p抗体のいずれか1つの抗C S A p M A bまたはそのフラグメントあるいはそれらの抗体融合タンパク質またはそのフラグメントを含む抗体成分を含む治療用免疫コンジュゲート体に関する。この場合、抗体成分は少なくとも1つの治療剤に結合している。好ましい実施形態において、治療剤は、放射性核種、ホウ素原子、ガドリニウム原子またはウラン原子、免疫調節因子、サイトカイン、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素阻害剤、光活性な治療剤、細胞傷害性薬物、毒素、血管形成阻害剤、第2の異なる抗体、およびそれらの組合せである。治療用免疫コンジュゲート体が放射性核種であるとき、そのエネルギーは好ましくは20 k e V ~ 1 0 , 0 0 0 k e Vの間である。

【0027】

本発明はさらに、C S A p 標的抗原に対する親和性を有する1つ以上の抗原結合部位と、ハプテン分子に対する親和性を有する1つ以上のハプテン結合部位とを含む多価かつ多重特異性の抗体またはそのフラグメントを提供する。

【0028】

本発明はまた、本明細書中に記載されるように少なくとも2つの抗C S A p M A bまたはそのフラグメントを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメントに関する。同様に、本発明では、本明細書中に記載されるように少なくとも1つの第1の抗C S A p M A bまたはそのフラグメントと、本発明のそのような抗C S A p抗体とは異なる少なくとも1つの第2のM A bまたはそのフラグメントとを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメントが考えられる。

【0029】

本発明はまた、被験体における悪性腫瘍を処置する方法を提供する。この場合、この方法は、抗C S A p抗体またはそのフラグメントの治療有効量を、薬学的に受容可能なビヒクルに配合して前記被験体に投与する工程を含む。

【0030】

同様に、本発明は、被験体における悪性腫瘍を処置または診断/検出する方法を提供する。この場合、この方法は、( i ) 処置または診断/検出を必要とする被験体に本発明の抗体またはそのフラグメントを投与すること、( i i ) 結合していないタンパク質の量が被験体の血流から除かれるために十分な時間待つこと、そして( i i i ) 抗体の結合部位に結合する、診断剤または治療剤またはその組合せを含むキャリア分子を前記被験体に投与することを含む。

【0031】

10

20

30

40

50

本発明はまた、

( a ) 本明細書中に記載されるような抗 C S A p M A b またはそのフラグメントと、  
( b ) そのような M A b またはそのフラグメントの少なくとも 2 つを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメントと、

( c ) 本発明の抗 C S A p 抗体のいずれか 1 つの前記 M A b またはそのフラグメントを含む少なくとも 1 つの第 1 の抗 C S A p M A b またはそのフラグメントと、本発明のそのような M A b またはそのフラグメントとは異なる少なくとも 1 つの第 2 の M A b またはそのフラグメントとを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメントと、

( d ) 請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載される前記 M A b またはそのフラグメントとを含む少なくとも 1 つの第 1 の M A b またはそのフラグメントと、請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載される M A b またはそのフラグメントとは異なる少なくとも 1 つの第 2 の M A b またはそのフラグメントとを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメントで、前記第 2 の M A b が、C E A、E G P - 1、E G P - 2、M U C - 1、M U C - 2、M U C - 3、M U C - 4、P A M - 4、K C 4、T A G - 7 2、E G F R、H E R 2 / n e u、B r E 3、L e - Y、A 3、K S - 1、C D 4 0 および V E G F の抗体、および抗体 A 3 3、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される、抗体融合タンパク質またはそのフラグメントと

からなる群から選択される抗 C S A p またはそのフラグメントをコードする核酸を含む D N A 配列を提供する。

#### 【 0 0 3 2 】

本発明はまた、診断 / 検出剤または治療剤またはそれらの組合せを標的に送達する方法に関する。この場合、この方法は、( i ) 本発明の抗 C S A p 抗体のいずれか 1 つの抗体またはそのフラグメントを被験体に投与するステップと、( i i ) 結合していないタンパク質の量が被験体の血流から除かれるために十分な時間待つステップと、そして ( i i i ) 前記抗体の結合部位に結合する、診断 / 検出剤または治療剤またはそれらの組合せを含むキャリア分子を前記被験体に投与するステップとを含む。

#### 【 0 0 3 3 】

本明細書中にはまた、被験体における悪性腫瘍を治療する方法であって、抗体またはそのフラグメントの治療有効量、あるいは少なくとも 2 つの M A b またはそのフラグメントを含む抗体融合タンパク質またはそのフラグメントの治療有効量を、薬学的に受容可能な賦形剤に配合して前記被験体に投与するステップを含む方法が記載される。この場合、少なくとも 1 つの抗 C S A p M A b またはそのフラグメントあるいは融合タンパク質またはそのフラグメントは本明細書中に記載される通りである。

#### 【 0 0 3 4 】

本発明はさらに、被験体におけるがん細胞を治療する方法に関する。この場合、この方法は、( i ) 本発明の抗 C S A p 抗体のいずれか 1 つのむき出し状態の抗 C S A p M A b またはそのフラグメントあるいはむき出し状態の抗体融合タンパク質またはそのフラグメントを含む組成物の治療有効量を前記被験体に投与すること、( i i ) むき出し状態の抗 C S A p M A b またはそのフラグメントあるいはむき出し状態の抗体融合タンパク質またはそのフラグメントを薬学的に好適な賦形剤に配合することを含む。

#### 【 0 0 3 5 】

さらなる態様において、本発明は、h M u - 9 またはヒト M u - 9 または c M u - 9 が診断 / 結合剤または治療剤に結合しているコンジュゲート体を提供する。

#### 【 0 0 3 6 】

さらなる態様において、本発明により、非コンジュゲート型 ( むき出し状態 ) の h M u - 9 またはヒト M u - 9 または c M u - 9 が、放射線、化学療法および手術などの他の従来の治療様式ならびに実験的な治療様式と組み合わせ、または他の非 C S A p 抗体を伴うコンジュゲート体と一緒にさえも投与されること、そしてそのよう組合せが治療サイクルにおいて同時であってもよく、または異なるときであってもよいことが規定される。

#### 【 0 0 3 7 】

10

20

30

40

50

さらに別の態様において、本発明は、上記に記載される抗体またはコンジュゲート体の有効量を投与することを含む、悪性腫瘍を診断/検出または処置する方法を提供する。抗体またはコンジュゲート体は薬学的に受容可能なビヒクルに配合することができる。

【0038】

さらなる態様において、本発明は、hMu-9mAbまたはヒトMu-9mAbまたはcMu-9mAbの軽鎖可変領域および重鎖可変領域のCDRのアミノ酸配列をコードするDNA配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。同様に、本発明は、hMu-9mAbまたはヒトMu-9mAbまたはcMu-9mAbの軽鎖可変領域および重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。

10

【0039】

さらに別の態様において、本発明は、Mu-9抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域のCDRのアミノ酸配列を提供する。

【0040】

本発明はまた、なかでも、標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、広範囲の診断的適用および治療的適用における使用のために修飾され得るターゲット可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントを提供しようとするものである。

【0041】

本発明者らは、1つ以上の診断/検出剤または治療剤を運ぶことができる表的なコンジュゲート体に対するbsAbを惹起させることは好都合であることを発見した。この技術を用いることによって、キレーター、金属キレート錯体、治療剤または診断/検出剤の特性を、異なる様々な適用に、それぞれの新しい適用のために新しいbsAbを惹起させることなく合わせるために変化させることができる。さらに、この方法を使用することによって、2つ以上の異なるキレーターまたは金属キレート錯体または治療剤を本発明のbsAbとともに使用することができる。

20

【0042】

本発明では、被験体における疾患組織を処置または同定する方法が提供される。この場合、この方法は、

(A) 標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲット可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを有し、標的組織と特異的に結合するアームがMu-9抗体である二重特異性の抗体または抗体フラグメントを被験体に投与するステップと、

30

(B) 任意選択的に、クリアリング用組成物を被験体に投与し、前記組成物により、局在化していない抗体または抗体フラグメントを循環からクリアリングするステップと

(C) 前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントの前記少なくとも1つの他のアームによって認識され得るエピトープを少なくとも1つ含むか、またはそのようなエピトープを少なくとも1つ有するキャリア部分と、1つ以上のコンジュゲート化された治療剤または診断剤とを含む第1のターゲット可能なコンジュゲート体を被験体に投与ステップと、

40

(D) 前記治療剤が酵素であるときには、被験体に、

1) プロドラッグ(この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に変換することができる)または、

2) 前記被験体において解毒されて、毒性がより低い中間体を形成し得る薬物(この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる)、

3) 天然のプロセスによって前記被験体において活性化され、そして毒性がより低い中間体への変換による解毒を受けるプロドラッグ(この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる)、または

50

4) 前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントの前記少なくとも1つの他のアームによって認識され得るエピトープを少なくとも1つ含むか、またはそのようなエピトープを少なくとも1つ有するキャリア部分と、プロドラッグとを含む第2のターゲッティング可能なコンジュゲート体(この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に変換することができる)

をさらに投与するステップとを含む。

【0043】

本発明はさらに、少なくとも2つのHSGハプテンを含むターゲッティング可能なコンジュゲート体を提供する。

10

【0044】

本明細書中ではまた、哺乳動物においてCSApを発現している腫瘍を検出または処置するための方法が考えられる。この場合、この方法は、

(A) 標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含み、標的組織と特異的に結合する1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与するステップと、

(B) 下記のコンジュゲート体：

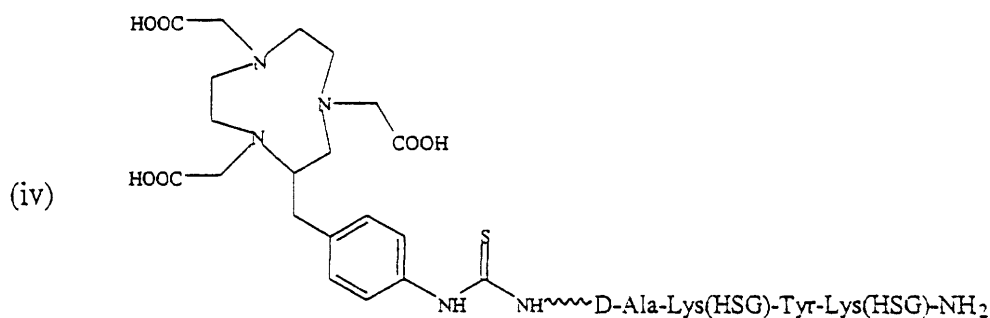
(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

(ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

20

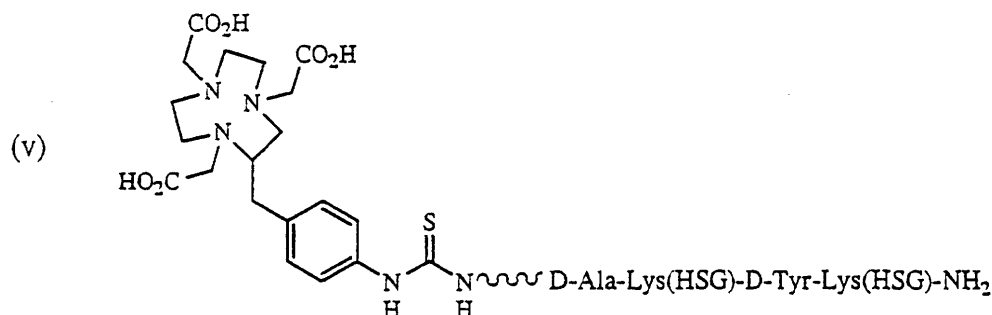
(iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>；

【化1】



および

【化2】



からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与するステップとを含む。

【0045】

この方法は、任意選択的に、クリアリング用組成物を被験体に投与し、そして組成物により、局在化していない抗体または抗体フラグメントを循環からクリアリングすることを含

50

む。

【0046】

さらに、本発明は、被験体における疾患組織を処置または同定するために有用なキットを提供する。この場合、このキットは、

(A) 標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを有し、標的組織と特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントと、

(B) 前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントの前記少なくとも1つの他のアームによって認識され得るエピトープを少なくとも1つ含むか、またはそのようなエピトープを少なくとも1つ有するキャリア部分と、1つ以上のコンジュゲート化された治療剤または診断剤とを含む第1のターゲッティング可能なコンジュゲート体と、

(C) 任意選択的に、局在化しなかった抗体および抗体フラグメントを循環からクリアリングするために有用なクリアリング用組成物と、

(D) 任意選択的に、前記第1のターゲッティング可能なコンジュゲート体にコンジュゲート化されている前記治療剤が酵素であるときには、

(1) プロドラッグ(この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に変換することができる)、

(2) 前記被験体において解毒されて、毒性がより低い中間体を形成し得る薬物(この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的

部位において前記薬物の毒性を増大させることができる)、

(3) 天然のプロセスによって前記被験体において活性化され、そして毒性がより低い中間体への変換による解毒を受けるプロドラッグ(この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる)、または

(4) 前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントの前記少なくとも1つの他のアームによって認識され得るエピトープを少なくとも1つ含むか、またはそのようなエピトープを少なくとも1つ有するキャリア部分と、プロドラッグとを含む第2のターゲッティング可能なコンジュゲート体(この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に変換することができる)

を含む。

【0047】

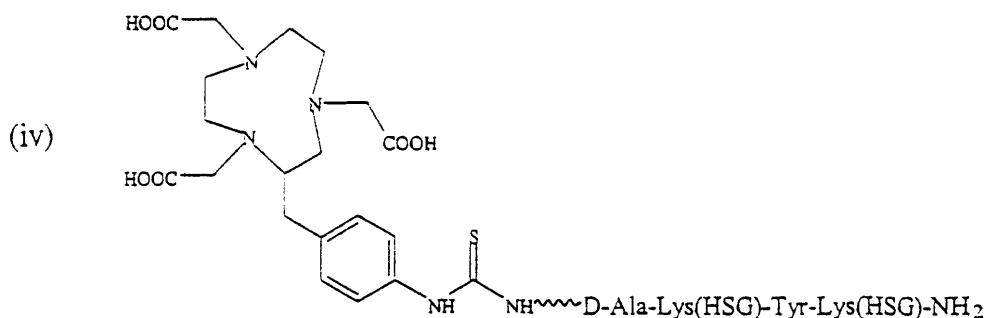
本明細書中に記載されるように、ターゲッティング可能なコンジュゲート体は、

(i) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

(ii) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

(iii) A c - L y s ( H S G ) D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub> ;

【化3】



および

【化4】

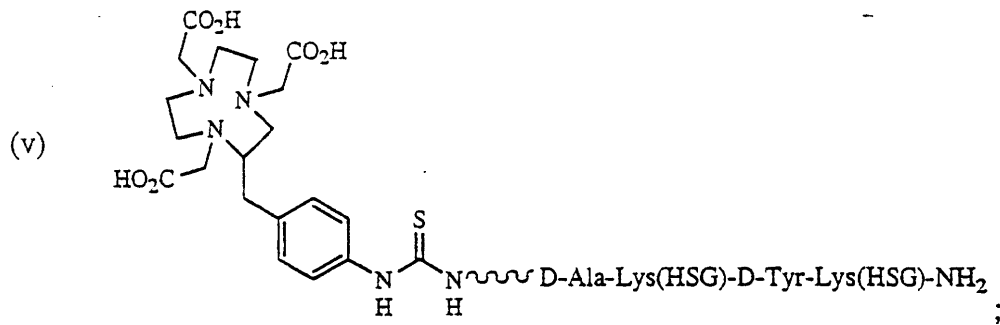
10

20

30

40

50



10

からなるものでよい。

【0048】

本発明はまた、ターゲティング可能なコンジュゲート体についてスクリーニングする方法に関する。この場合、この方法は、

(A) 前記ターゲティング可能な構築物を、標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアーム、および前記ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームを有し、標的組織と特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントと接触させて、混合物を得るステップと、

(B) 任意選択的に、前記混合物をインキュベーションするステップと、

(C) 前記混合物を分析するステップと

を含む。

20

【0049】

本発明はさらに、CSApを発現している哺乳動物内の悪性の組織または細胞を画像化するための方法を提供する。この場合、この方法は、

(A) 標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含み、標的組織と特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与するステップと、

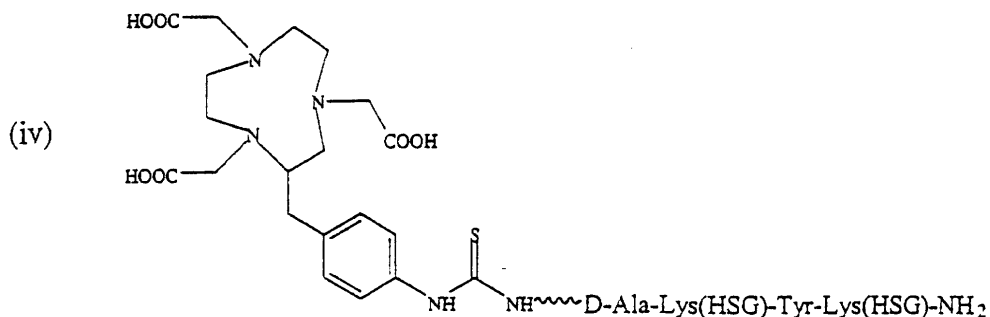
(B) 下記のコンジュゲート体：

(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

(ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>；

(iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>；

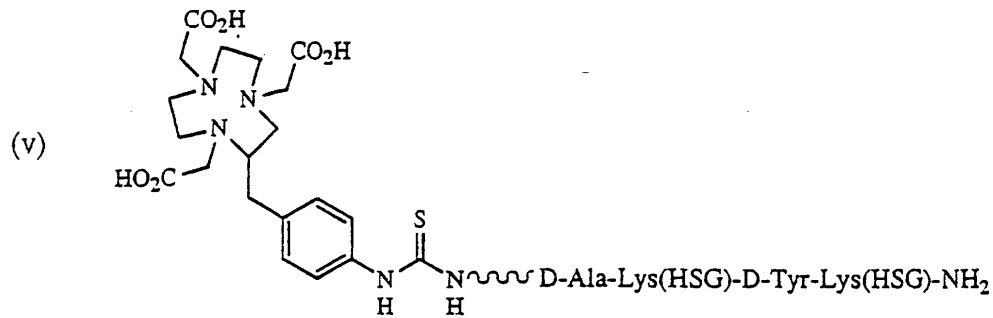
【化5】



40

および

【化6】



10

からなる群から選択されるターゲティング可能なコンジュゲート体を投与するステップとを含む。

## 【0050】

本発明はまた、被験体においてCSApを発現している疾患組織を手術中および内視鏡的および血管内で同定/明示する方法を提供する。この場合、この方法は、検出可能な量のCSAp標識抗体（好ましくは、フラグメントまたはサブフラグメント）を投与し、それにより、ターゲティングされなかった標識抗体またはフラグメントに対するクリアリング剤を必要とすることなく前記標識CSAp抗体/フラグメントの投与48時間以内に、好適なプローブまたは小型カメラによって標識が検出されることを含む。

20

## 【0051】

関連において、本発明は、被験体においてCSApを発現している疾患組織を手術中に同定/明示する方法を提供する。この場合、この方法は、

(A) CSApを発現している標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含み、標的組織と特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与するステップと、

(B) 下記のコンジュゲート体：

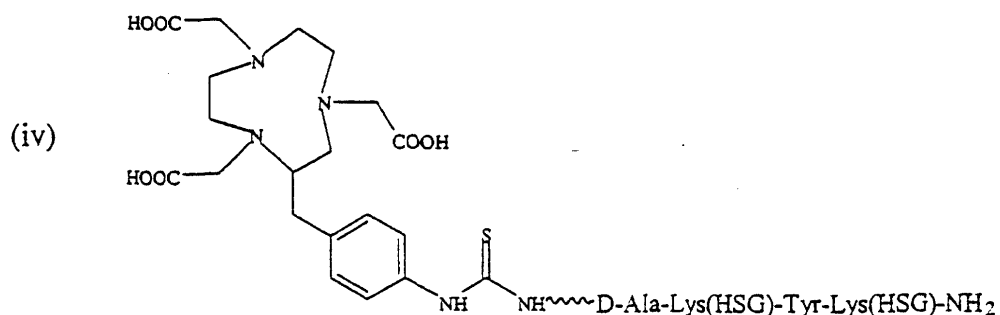
(i) DOTA - Phe - Lys ( H S G ) - D - Tyr - Lys ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

30

(ii) DOTA - Phe - Lys ( H S G ) - Tyr - Lys ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

(iii) Ac - Lys ( H S G ) D - Tyr - Lys ( H S G ) - Lys ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub> ;

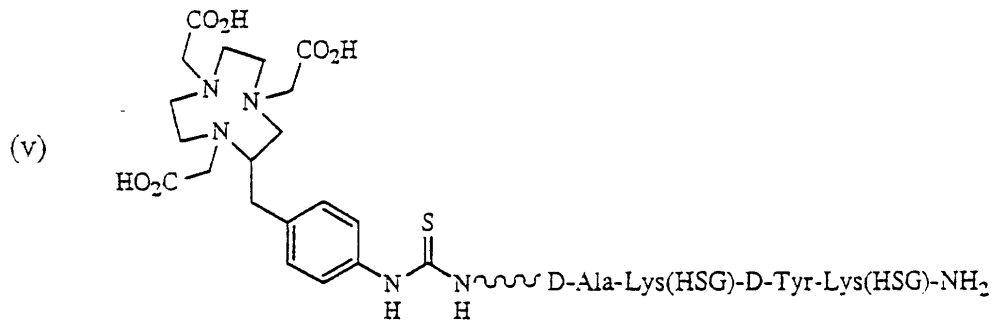
## 【化7】



40

および

## 【化8】



10

からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与するステップとを含む。

【0052】

本発明はさらに、被験体においてCSApを発現している疾患組織を内視鏡により同定するための方法に関する。この場合、この方法は、

(A) CSApを発現している標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含み、標的組織と特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与するステップと、

20

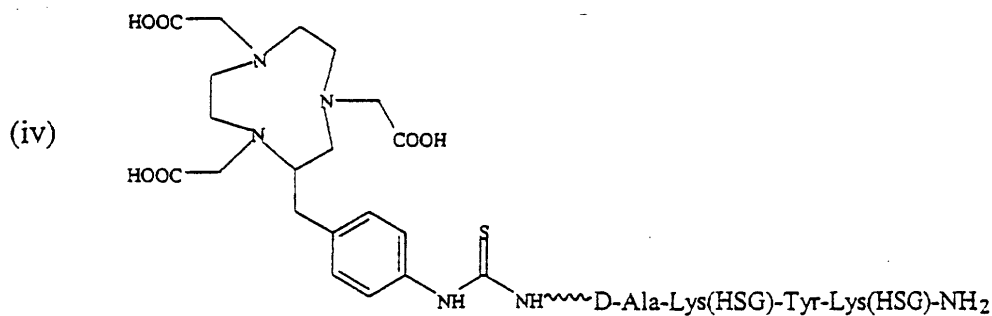
(B) 下記のコンジュゲート体：

(i) DOTA - Phe - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub> ;

(ii) DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub> ;

(iii) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub> ;

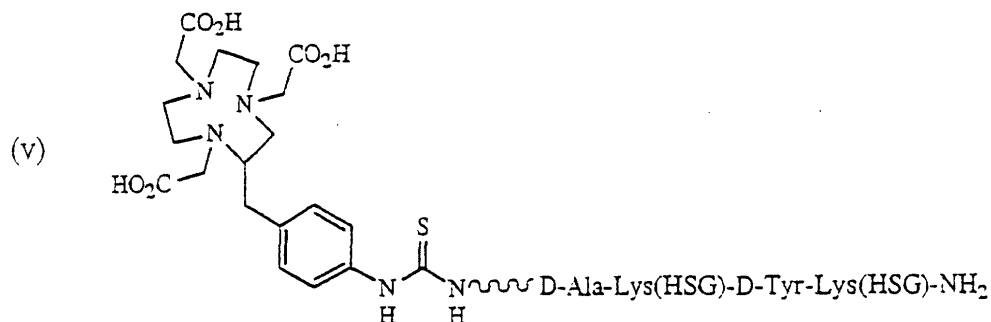
【化9】



30

および

【化10】



40

からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与するステップ

50

と  
を含む。

【0053】

本明細書中にはまた、被験体においてCSApを発現している疾患組織を血管内で同定するための方法が提供される。この場合、この方法は、

(A) CSApを発現している標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含み、標的組織と特異的に結合する前記1つのアームがMu-9抗体またはそのフラグメントである二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；そして

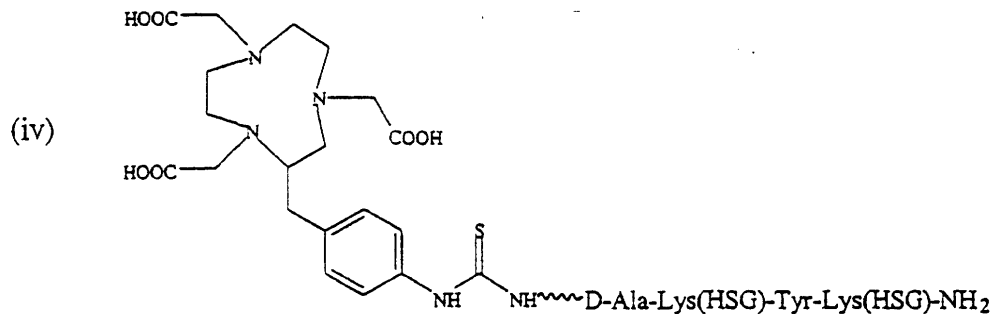
(B) 下記のコンジュゲート体：

(i) DOTA - Phe - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>；

(ii) DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>；

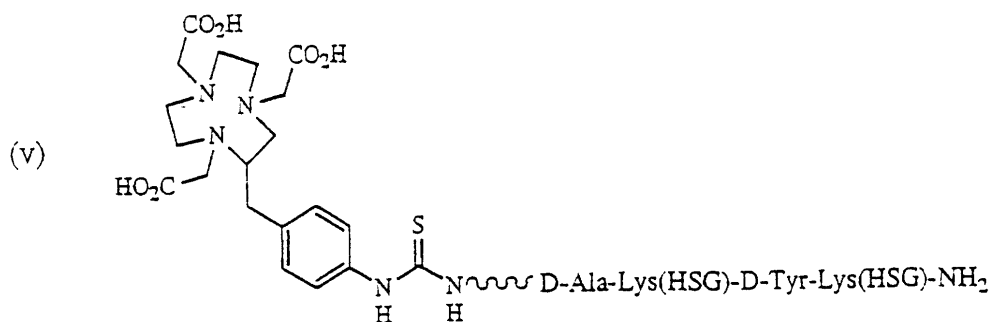
(iii) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub>；

【化11】



および

【化12】



からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与するステップと  
を含む。

【0054】

本発明はまた、内視鏡手法、腹腔鏡手法、血管内カテーテル手法または手術手法のときに病巣部を検出する方法に関する。この場合、この方法は、

(A) CSAp抗原に特異的に結合する第1の抗体結合部位と、ハプテンに特異的に結合する第2の抗体結合部位とを有する二重特異性の抗体またはF(ab)<sub>2</sub>フラグメントまたはF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを、そのような手法を受けることになっている被験体に注射して、抗体フラグメントを標的部位において蓄積させるステップと、

(B) 任意選択的に、二重特異性フラグメントの大部分が注射後約24時間以内に循環からクリアリングされないならば、ガラクトシル化された抗イディオタイプクリアリング剤

10

20

30

40

50

を使用して、ターゲッティングされなかった抗体フラグメントをクリアリングし、そして標的部位において迅速に局在化し、かつ腎臓を介してクリアリングされる二価の標識されたハプテンを注射するステップと、

(C) 最初の注射の48時間以内に、検出手段を用いて、標的部位における蓄積した標識の上昇したレベルを近接範囲検出することによってハプテンの存在を検出し、そして前記手法を行うステップと(この場合、前記検出は、造影剤または消去剤が使用されることなく行われる)

を含む。

【0055】

好ましい実施形態において、ハプテンは診断用放射性同位体またはMRI画像増強剤または蛍光標識で標識される。 10

【0056】

本発明はさらに、手術手法、血管内手法、腹腔鏡手法または内視鏡手法のときに病巣部を近接範囲検出するための方法に関する。この場合、この方法は、

(a) そのような手法に対する被験体に、Mu-9免疫コンジュゲート体またはそのフラグメントの有効量を非経口的に注射するステップと、

(b) 注射の48時間以内に手法を行うステップと、

(c) 前記標識された抗体またはそのフラグメントの存在を検出するための検出手段を用いて近接範囲で被験体の到達内部を走査するステップと、

(d) 該検出手段を用いて、そのような部位における前記標識された抗体またはそのフラグメントの上昇したレベルを検出することによって、前記標識された抗体またはそのフラグメントの蓄積部位の位置を明らかにするステップと 20

を含む。

【0057】

手術中使用および内視鏡使用および血管内使用の上記例において、診断化合物に結合している標識は、前記標識検出のために作製された、小型カメラを含む好適な装置またはプローブによって検出することができる(例えば、線放出同位体が診断/検出用コンジュゲート体であるときには線検出プローブ)(Goldenberg、米国特許第5,716,595号、同第6,096,289号および米国特許出願第09/348,818号を参照のこと、これらはその全体を参照することにより、本明細書中に組み込むものとする)。 30

【0058】

本発明はまた、なかでも、標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、広範囲の診断的適用および治療的適用における使用のために修飾され得るターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントを提供しようとするものである。

【0059】

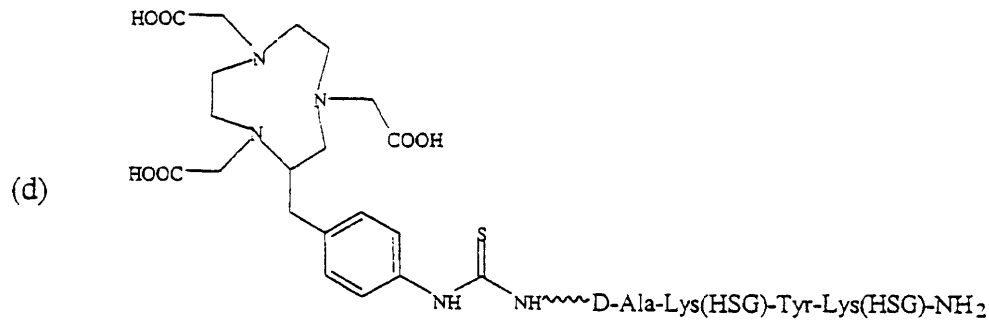
さらに、本発明は、二重特異性抗体と、下記のターゲッティング可能なコンジュゲート体 40

(a) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

(b) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

(c) A c - L y s ( H S G ) D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub> ;

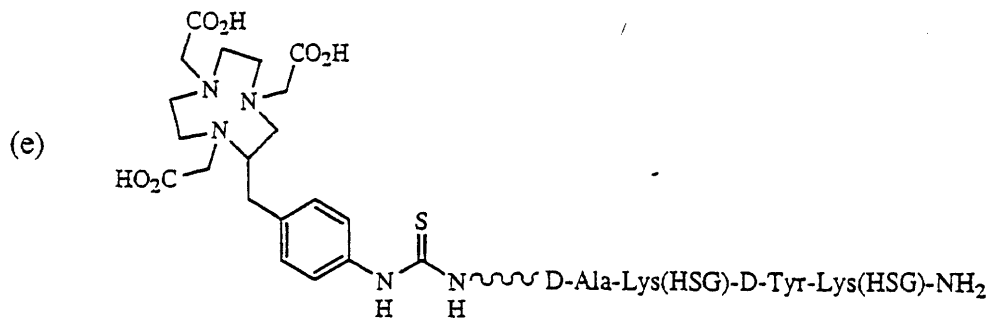
【化13】



10

および

【化14】



20

との組合せを使用する、診断および治療のプレターゲティング方法、ならびに二重特異性抗体の作成方法、およびそのような方法において使用されるキットを提供する。

【0060】

本発明者らは、1つ以上の診断剤または治療剤を運ぶことができるターゲティング可能なコンジュゲート体に対する b s A b を惹起させることは好都合であることを発見した。この技術を用いることによって、キレーター、金属キレート錯体、治療剤または診断剤の特性を、異なる様々な適用に、それぞれの新しい適用のために新しい b s A b を惹起させることなく合わせるために変化させることができる。さらに、この方法を使用することによって、2つ以上の異なるキレーターまたは金属キレート錯体または治療剤を本発明の b s A b とともに使用することができる。

30

【0061】

本発明は、被験体における疾患組織を処置または同定する方法に関する。この場合、この方法は、

(A) 標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、少なくとも2つの H S G ハプテンを含むターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントを前記被験体に投与するステップと、

(B) 任意選択的に、前記被験体にクリアリング用組成物を投与し、そして前記組成物により、局在化しなかった抗体または抗体フラグメントを循環からクリアリングするステップと、

40

(C) 少なくとも2つの H S G ハプテンを含むか、または少なくとも2つの H S G ハプテンを有するキャリア部分を含み、かつ診断用カチオンもしくは治療用カチオン、および/または1つ以上のキレート化もしくは化学結合した治療剤もしくは診断剤もしくは酵素を含んでもよいターゲティング可能なコンジュゲート体を前記被験体に投与するステップと、

(D) 前記ターゲティング可能なコンジュゲート体が酵素を含むときには、前記被験体に、

(1) プロドラッグ(この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に

50

変換することができる)、

(2) 前記被験体において解毒されて、毒性がより低い中間体を形成し得る薬物(この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる)、または

(3) 天然のプロセスによって前記被験体において活性化され、そして毒性がより低い中間体への変換による解毒を受けるプロドラッグ(この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる)

をさらに投与するステップとを含む。

10

【0062】

本発明はさらに、哺乳動物における標的細胞または標的組織または標的病原体を検出または処置するための方法に関する。この場合、この方法は、標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与するステップと、ここで、前記少なくとも1つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によって産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができ、

20

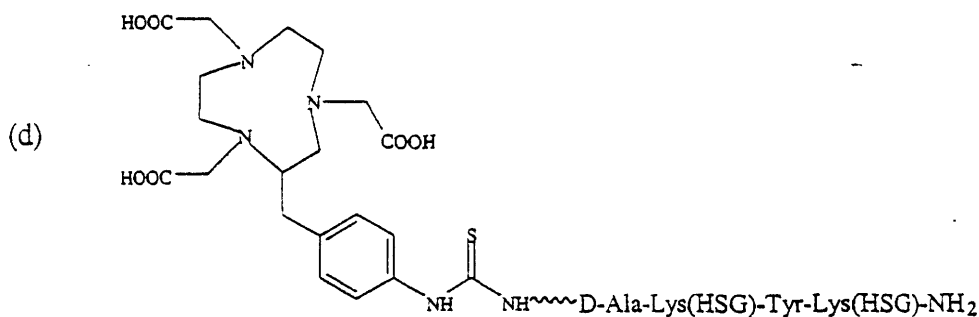
下記のコンジュゲート体：

(a) DOTA - Phe - Lys(HSG) - D - Tyr - Lys(HSG) - NH<sub>2</sub> ;

(b) DOTA - Phe - Lys(HSG) - Tyr - Lys(HSG) - NH<sub>2</sub> ;

(c) Ac - Lys(HSG) D - Tyr - Lys(HSG) - Lys(Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub> ;

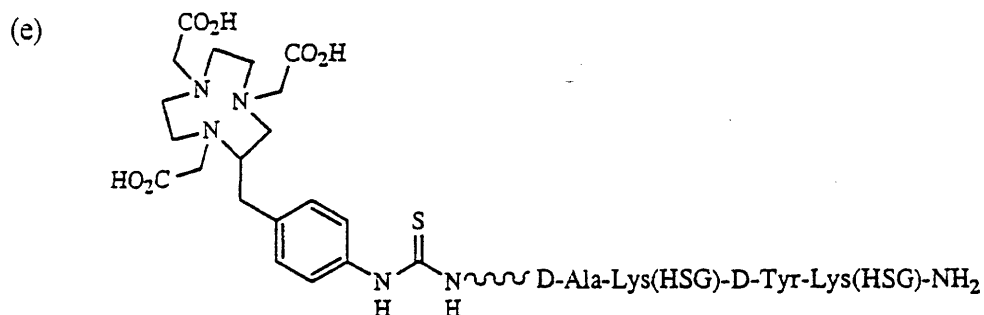
【化15】



30

および

【化16】



40

からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与するステップと

50

を含む。

【0063】

本発明はさらに、被験体における疾患組織を処置または同定する方法に関する。この場合、この方法は、

標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントを前記被験体に投与するステップと、

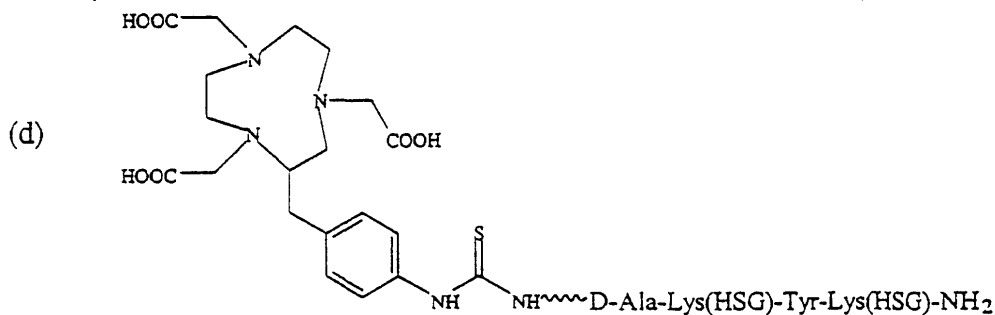
任意選択的に、前記被験体にクリアリング用組成物を投与し、そして前記組成物により、局在化しなかった抗体または抗体フラグメントを循環からクリアリングするステップと、下記のコンジュゲート体：

(a) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

(b) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

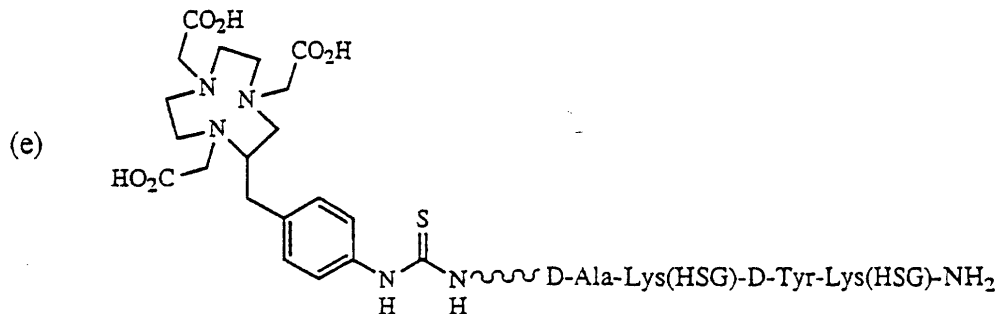
(c) A c - L y s ( H S G ) D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub> ;

【化17】



および

【化18】



からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与するステップと

を含む。

【0064】

本発明はさらに、被験体における疾患組織を処置または同定するために有用なキットに関する。この場合、このキットは、

(A) 標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントで、前記コンジュゲート体が、下記のコンジュゲート体：

(a) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

(b) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;

(c) A c - L y s ( H S G ) D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub> ;

10

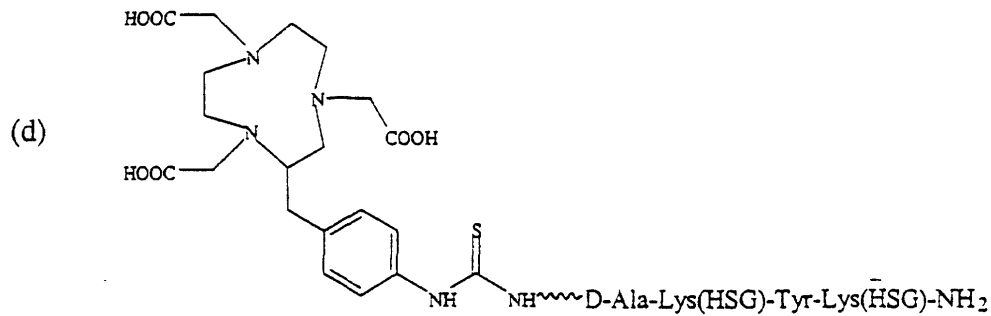
20

30

40

50

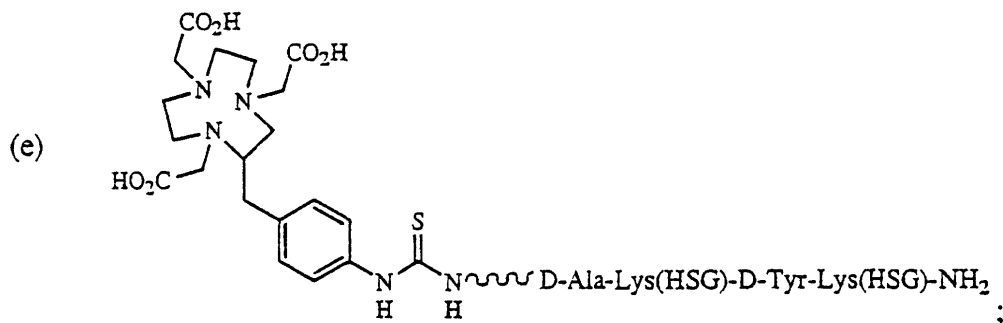
## 【化 1 9】



10

および

## 【化 2 0】



20

からなる群から選択される、二重特異性の抗体または抗体フラグメントと、

(B) 前記二重特異性の抗体または抗体フラグメントの前記少なくとも1つの他のアームによって認識され得るエピトープを少なくとも1つ含むか、またはそのようなエピトープを少なくとも1つ有するキャリア部分と、1つ以上のコンジュゲート化された治療剤または診断剤または酵素とを含むターゲッティング可能なコンジュゲート体と、

(C) 任意選択的に、局在化しなかった抗体または抗体フラグメントを循環からクリアリングするために有用なクリアリング用組成物と、

30

(D) 任意選択的に、前記第1のターゲッティング可能なコンジュゲート体が酵素であるときには、

(1) プロドラッグ(この場合、前記酵素は標的部位において前記プロドラッグを薬物に変換することができる)、

(2) 前記被験体において解毒されて、毒性がより低い中間体を形成し得る薬物(この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる)、または

(3) 天然のプロセスによって前記被験体において活性化され、そして毒性がより低い中間体への変換による解毒を受けるプロドラッグ(この場合、前記酵素は前記解毒された中間体を毒性形態に再変換することができ、従って、標的部位において前記薬物の毒性を増大させることができる)と

40

を含む。

## 【0065】

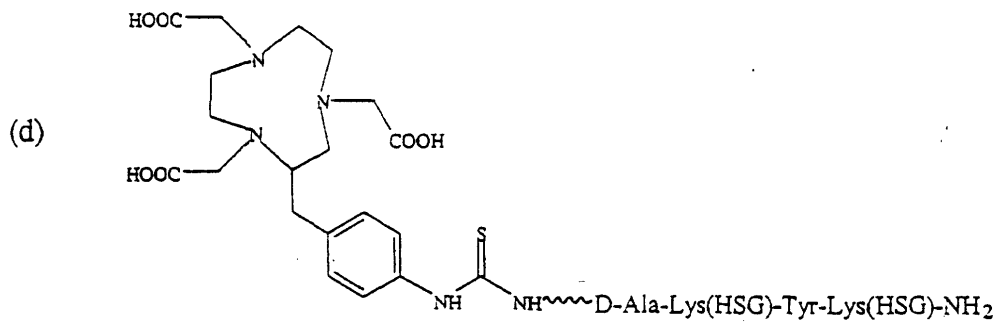
本発明はさらに、

(a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;

(b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;

(c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

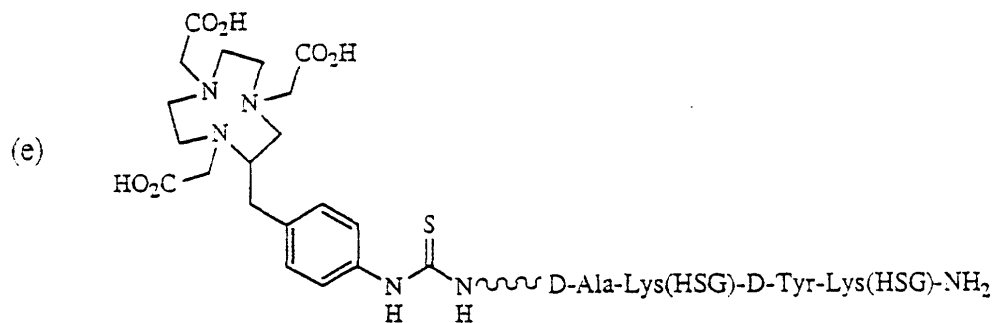
## 【化 2 1】



10

および

【化22】



20

からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体に関する。

【0066】

本発明はさらに、ターゲッティング可能なコンジュゲート体についてスクリーニングする方法に関する。この場合、この方法は、

前記ターゲッティング可能な構築物を、標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアーム、および前記ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントと接触させて、混合物を得ること；

30

この場合、前記少なくとも1つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によって産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができる；および

任意選択的に、前記混合物をインキュベーションすること；そして

前記混合物を分析すること

を含む。

【0067】

本発明はさらに、哺乳動物において正常な組織を画像化するための方法に関する。この場合、この方法は、

40

標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与するステップと、

ここで、前記少なくとも1つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によって産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができ、

下記のコンジュゲート体：

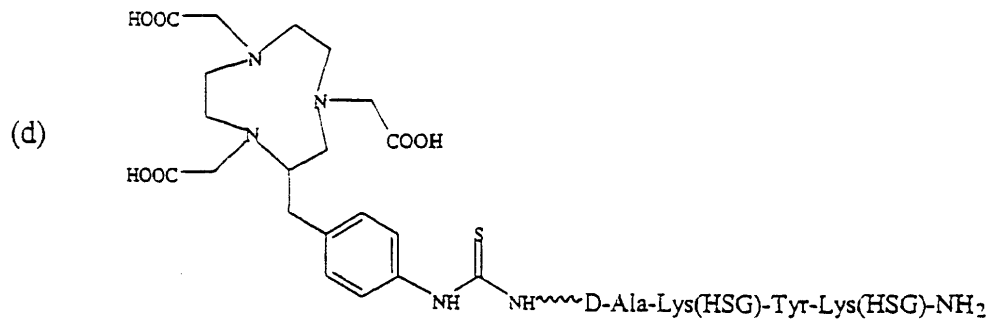
(a)  $\text{DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH}_2$ ；

50

(b) DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub> ;

(c) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub> ;

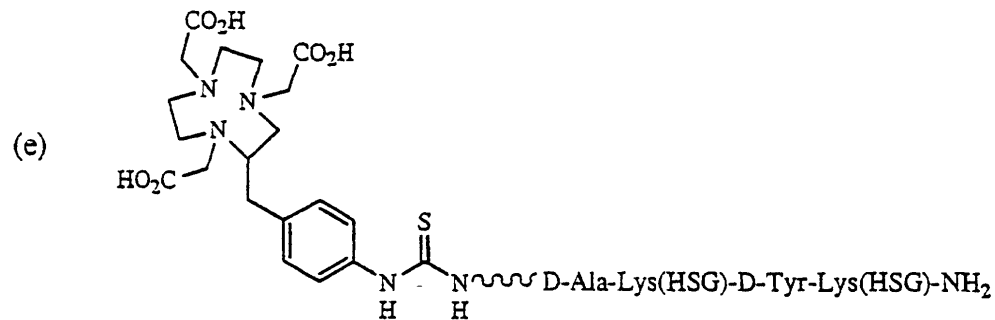
【化23】



10

および

【化24】



20

からなる群から選択されるターゲッティング可能なコンジュゲート体を投与するステップと

30

を含む。

【0068】

本発明はさらに、被験体における疾患組織を手術中に同定する方法に関する。この場合、この方法は、

標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与するステップと、

ここで、前記少なくとも1つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によって産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができ、

40

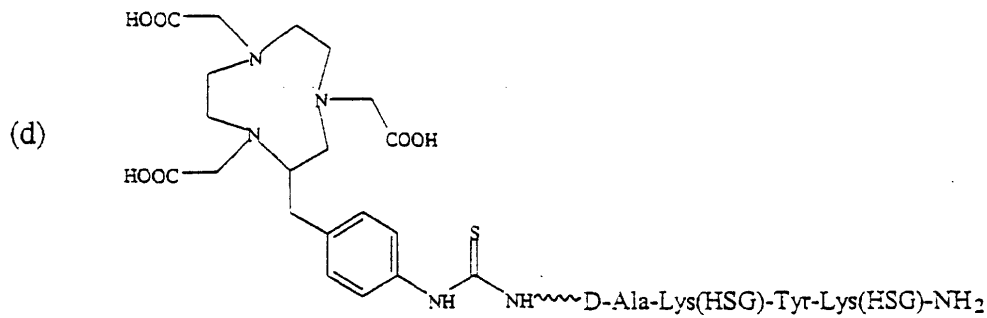
下記のコンジュゲート体：

(a) DOTA - Phe - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub> ;

(b) DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub> ;

(c) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub> ;

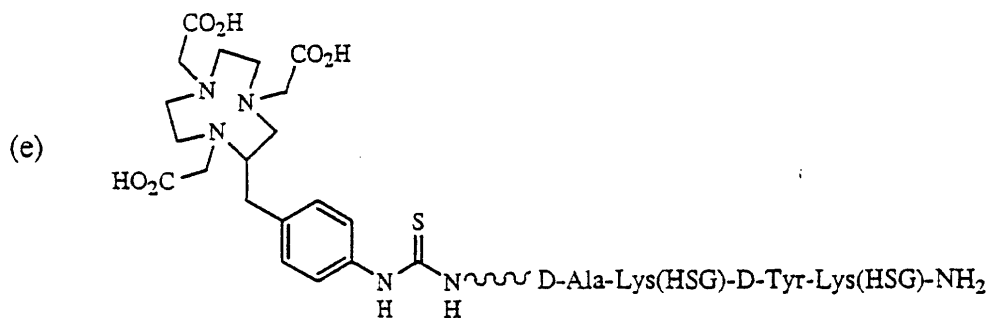
【化25】



10

および

【化26】



20

からなる群から選択されるターゲティング可能なコンジュゲート体を投与するステップとを含む。

【0069】

本発明はさらに、被験体における疾患組織を内視鏡により同定する方法に関する。この場合、この方法は、

30

標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与するステップと、

ここで、前記少なくとも1つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によって産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができ、

下記のコンジュゲート体：

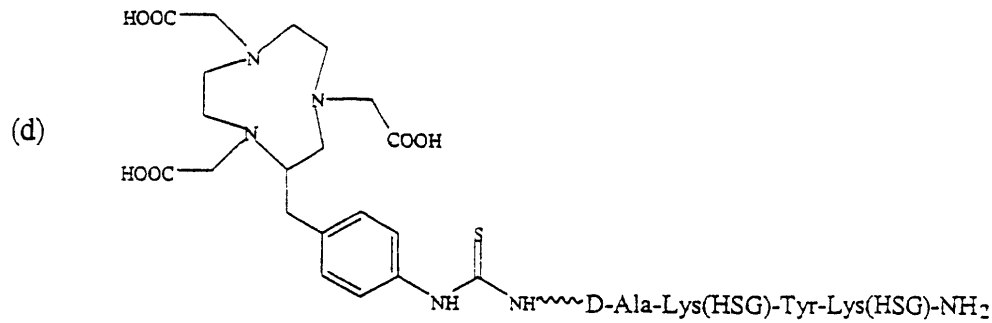
(a) DOTA - Phe - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub> ;

(b) DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub> ;

40

(c) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub> ;

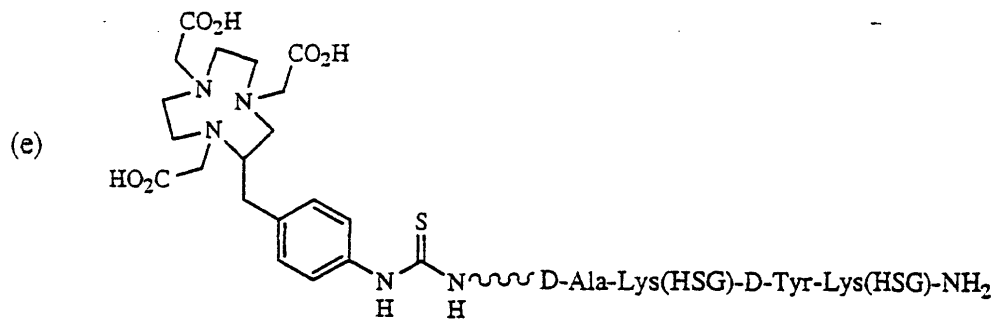
【化27】



10

および

【化28】



20

からなる群から選択されるターゲティング可能なコンジュゲート体を投与するステップと

を含む。

【0070】

本発明はさらに、被験体における疾患組織を血管内で同定する方法に関する。この場合、この方法は、

標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与するステップと、

30

ここで、前記少なくとも1つのアームが、標的細胞または標的組織または標的病原体における相補的な結合性成分に、あるいは標的細胞または標的組織または標的病原体によって産生される分子またはそれらに関連する分子における相補的な結合性成分に結合することができ、

下記のコンジュゲート体：

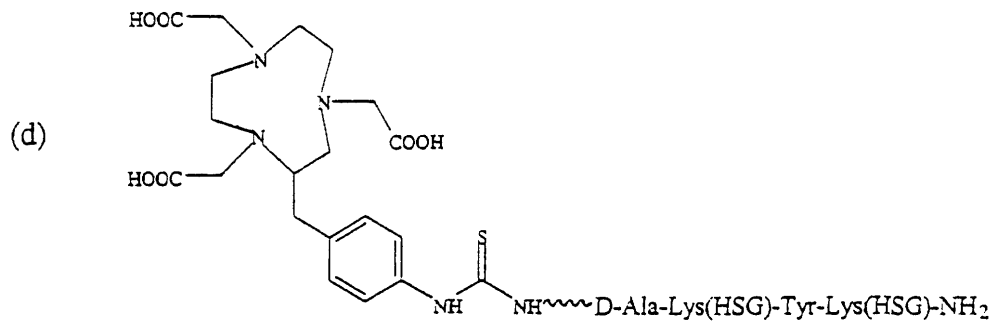
(a) DOTA - Phe - Lys(HSG) - D - Tyr - Lys(HSG) - NH<sub>2</sub> ;

(b) DOTA - Phe - Lys(HSG) - Tyr - Lys(HSG) - NH<sub>2</sub> ;

(c) Ac - Lys(HSG) D - Tyr - Lys(HSG) - Lys(Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub> ;

40

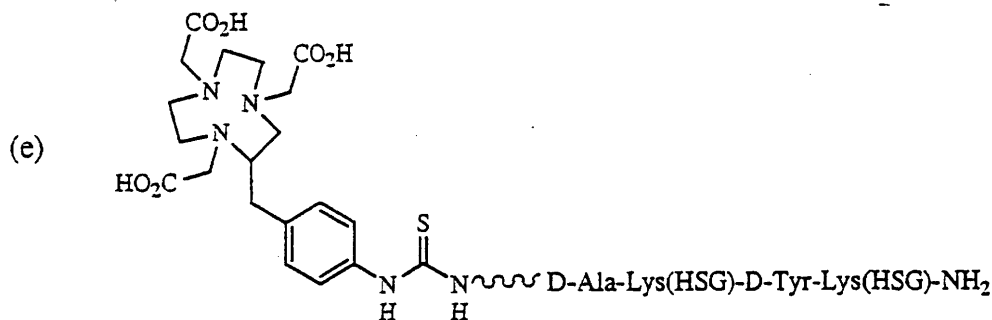
【化29】



10

および

【化30】



20

からなる群から選択されるターゲティング可能なコンジュゲート体を投与するステップと

を含む。

【0071】

本発明のこれらの態様および実施形態ならびに他の態様および実施形態は、下記の説明および添付された請求項を参照することによって明らかになる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0072】

30

I. 概略

本発明は抗体および抗体フラグメントを包含する。抗体フラグメントは、抗体の抗原結合部分であり、例えば、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ などである。抗体フラグメントは、完全な抗体によって認識される同じ抗原に結合する。例えば、抗CD22モノクローナル抗体フラグメントまたは抗CSApモノクローナル抗体フラグメントは、それぞれ、CD22またはCSApのエピトープに結合する。

【0073】

用語「抗体フラグメント」にはまた、特定の抗原に結合して、複合体を形成することによって抗体のように作用する任意の合成タンパク質または遺伝子操作タンパク質も含まれる。例えば、抗体フラグメントには、単離されたフラグメント、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」フラグメント、軽鎖可変領域および重鎖可変領域がペプチドリinkerによってつながれている組換え単鎖ポリペプチド分子（「sFvタンパク質」）、そして「超可変領域」を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識ユニットが含まれる。これらのいわゆる「超可変領域」または「相補性決定領域」（CDR）の3つが軽鎖または重鎖の各可変領域において見出されている。それぞれのCDRは、比較的保存されたフレームワーク領域（FR）によって挟まれている。FRは、可変領域の構造的な一体性を維持すると考えられている。軽鎖のCDRおよび対応する重鎖のCDRにより、抗原結合部位が形成される。CDRの「超可変性」により、抗体の特異性の多様性が説明される。

40

【0074】

本発明でまた、ヒト抗CSAp抗体、キメラ抗CSAp抗体、ヒト化抗CSAp抗体およ

50

びそれらのフラグメントが考えられる。本発明の完全なヒト抗CSAp抗体は、好ましくは、Mu-9抗原に対するものである。ヒト抗体は、例えば、抗原性の刺激負荷にตอบสนองして特定のヒト抗体を産生するように「操作」されている遺伝子組換えマウスから得られる抗体である。この技術では、ヒトの重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座の様々なエレメントが、内因性の重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座のターゲティングされた様々な破壊を含有する胚幹細胞株に由来するマウス系統に導入される。遺伝子組換えマウスは、ヒト抗原に対して特異的なヒト抗体を合成することができ、従って、ヒト抗体を分泌するハイブリドーマを製造するために使用することができる。遺伝子組換えマウスからヒト抗体を得るための様々な方法が、Greenら、Nature Genet. 7: 13 (1994) ; Lonbergら、Nature、368: 856 (1994) ; およびTaylorら、Int. Immun. 6: 579 (1994) によって記載される。完全なヒト抗体はまた、遺伝子トランスフェクション法または染色体トランスフェクション法、ならびにファージディスプレイ技術によって構築することができ、これらはすべて当分野では知られている。例えば、非免疫化ドナーに由来する免疫グロブリンの可変ドメイン遺伝子レパートリーからヒト抗体またはそのフラグメントをインビボで製造することについては、McCaffertyら、Nature、348: 552~553 (1990) を参照のこと。この技術では、抗体可変ドメインの遺伝子が、繊維状バクテリオファージの主コートタンパク質遺伝子または微量コートタンパク質遺伝子のいずれかに読み枠を合わせてクローニングされ、ファージ粒子の表面に機能的な抗体フラグメントとして呈示される。繊維状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含有するので、抗体の機能的性質に基づく選択によりまた、そのような性質を示す抗体をコードする遺伝子の選択がもたらされる。このようにして、ファージはB細胞の性質のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは様々な形式で行うことができ、それらの総説については、例えば、JohnsonおよびChriswell、Current Opinion in Structural Biology、3: 5564~571 (1993) を参照のこと。

#### 【0075】

ヒト抗体はまた、インビトロで活性化されたB細胞によって作製することができる。米国特許第5,567,610号および同第5,229,275号(これらはその全体を参照することによって本明細書に組み込むものとする)を参照のこと。

#### 【0076】

本発明はまた、キメラな抗CSApモノクローナル抗体またはそのフラグメントを提供する。キメラな抗CSAp抗体またはそのフラグメントは非ヒト抗CSAp抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含有しており、これらはヒト抗体の軽鎖定常領域および重鎖定常領域に連結されている。好ましくは、軽鎖可変領域および重鎖可変領域はネズミ抗CSAp抗体に由来する。好ましい実施形態において、抗CSAp抗体はCSAp抗原表面のMu-9エピトープと結合する。従って、Mu-9抗体は、Mu-9エピトープに結合する抗CSAp抗体である。

#### 【0077】

cMu-9の作製方法が下記に詳しく記載される。簡単に記載すると、Mu-9mAbのV領域およびV<sub>H</sub>領域をコードするcDNAが単離され、そしてヒト軽鎖定常領域配列およびヒト1鎖配列の遺伝子をそれぞれ含む哺乳動物発現ベクターに別々に組換え的にサブクローニングされた。哺乳動物細胞をこれらの2つの組換えDNAで同時トランスフェクションすることにより、元のMu-9mAbのように、CSAp抗原に強く結合するcMu-9mAbの発現がもたらされた。

#### 【0078】

好ましい実施形態において、cMu-9抗体の軽鎖可変領域は配列番号 のアミノ酸(図2B)を含み、またはcMu-9抗体の重鎖可変領域は配列番号 のアミノ酸(図2A)を含む。さらに好ましくは、cMu-9抗体の軽鎖可変領域は配列番号 のアミノ酸(図2B)を含み、cMu-9抗体の重鎖可変領域は配列番号 のアミノ酸(図2A)を含む。

## 【0079】

本発明はさらに、ヒト化Mu-9 (hMu-9)モノクローナル抗体 (mAb) またはそのフラグメントを提供する。hMu-9抗体またはフラグメントは非ヒトMu-9抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の相補性決定領域 (CDR) を含有しており、これらはヒト抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域のフレームワーク (FR) 領域に連結され、フレームワーク (FR) 領域は続いてヒト抗体の軽鎖定常領域および重鎖定常領域に連結されている。このヒト化抗体またはフラグメントは、元のMu-9抗体のCSAp抗原特異性を保持しているが、ヒト被験体における免疫原性が小さくなっている。

## 【0080】

hMu-9の作製方法が下記に詳しく記載される。しかし、簡単に記載すると、hMu-9を作製するために、V<sub>H</sub>DNAおよびV<sub>H</sub>DNAのCDRが、上記に記載されるようにhMu-9を哺乳動物細胞において発現するように、ヒトのV<sub>H</sub>領域およびV<sub>H</sub>領域のフレームワーク (FR) 配列にそれぞれ組換え的に連結され、続いて、ヒトの定常領域および1定常領域にそれぞれ連結される。

## 【0081】

本発明の別の実施形態において、hMu-9、すなわち、軽鎖可変領域のCDRは、配列番号のアミノ酸24~34を含むCDR1 (図2B) と、配列番号のアミノ酸50~56を含むCDR2 (図2B) と、配列番号のアミノ酸89~97を含むCDR3 (図2B) とを含み、そして重鎖可変領域のCDRは、配列番号のアミノ酸31~35を含むCDR1 (図2A) と、配列番号のアミノ酸50~64を含むCDR2 (図2A) と、配列番号のアミノ酸95~97を含むCDR3 (図2A) とを含む。

## 【0082】

本発明の他の好ましい実施形態には、配列番号の軽鎖可変領域 (図4B) および/または配列番号の重鎖可変領域 (図4A) を含む抗CSAp抗体フラグメントが含まれる。

## 【0083】

本明細書において、表現「cMu-9」または表現「cMu-9mAb」は、非ヒトV<sub>K</sub>領域および非ヒトV<sub>H</sub>領域をヒトの定常的な軽鎖および重鎖にそれぞれ連結またはサブクローニングすることによって構築されるキメラなモノクローナル抗体を示すことが意図される。表現「hMu-9」または表現「hMu-9mAb」は、cMu-9内の非ヒトFR配列をヒトフレームワーク領域の配列で置換することによる、キメラなモノクローナル抗体のヒト化を示すことが意図される。好ましくは、本発明の抗CSApヒト化抗体およびそのフラグメントは、対応する非ヒト軽鎖フレームワーク領域または非ヒト重鎖フレームワーク領域の少なくとも1つのアミノ酸が保持されているフレームワーク領域配列を含む。好ましくは、ネズミ抗体のFRに由来するアミノ酸が、対応するヒト化抗体の同じ位置において保持されている。

## 【0084】

キメラ抗体は、1つの種に由来する抗体 (好ましくは、齧歯類抗体) の相補性決定基 (CDR) を含む可変ドメインを含有する組換えタンパク質であり、その一方で、抗体分子の定常ドメインはヒト抗体の定常ドメインに由来する。獣医学的適用のためには、キメラ抗体の定常ドメインは、ネコまたはイヌなどの他の種の定常ドメインに由来し得る。

## 【0085】

ヒト化抗体は、1つの種に由来する抗体 (例えば、齧歯類抗体) に由来するCDRが、齧歯類抗体の重鎖可変鎖および軽鎖可変鎖からヒトの重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインに移されている組換えタンパク質である。抗体分子の定常ドメインはヒト抗体の定常ドメインに由来する。

## 【0086】

本発明ではまた、抗CSAp抗体フラグメントが考えられる。抗体フラグメントは、抗体の抗原結合部分であり、例えば、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fabなどである。抗体フラグメントは、完全な抗体のCDRを1つ以上含有しており、完全な抗体によって認識される同じ抗原に結合する。例えば、抗結腸特異的抗原-p (anti-co

lon-specific antigen-p; CSAp)モノクローナル抗体フラグメントは結腸特異的抗原-pのエピトープに結合する。

【0087】

また、本発明は、標的組織に対して反応し得る少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能な構築物に対して反応し得る少なくとも1つの他のアームとを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントを提供する。ターゲッティング可能な構築物は、キャリア部分と、少なくとも2ユニットの認識可能なハプテンとから構成される。認識可能なハプテンの例には、ヒスタミンスクシニルグリシン(HSG)およびフルオレセインイソチオシアナートが含まれるが、これらに限定されない。ターゲッティング可能な構築物は、疾患組織を処置または同定するために有用な様々な薬剤にコンジュゲートすることができる。コンジュゲートされた薬剤の例には、キレーター、金属キレート錯体、薬物、毒素(例えば、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、DNase I、ブドウ球菌のエンドトキシンA、アメリカヤマゴボウの抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリアトキシン、シュドモナスのエキソトキシン、シュドモナスのエンドトキシン)および他のエフェクター分子が含まれるが、これらに限定されない。さらに、プロドラッグを活性化させるために有用な酵素、または薬物の標的特異的な毒性を増大させるために有用な酵素をターゲッティング可能な構築物にコンジュゲートすることができる。従って、ターゲッティング可能な構築物に対して反応し得るbsAbの使用により、様々な治療的適用および診断/検出的適用が、それぞれの適用について新しいbsAbを惹起させることなく可能になる。

【0088】

さらに、本発明には、哺乳動物における標的細胞または標的組織または標的病原体を検出または処置するための方法が含まれる。この場合、この方法は、標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与することを含む。本明細書中で使用される用語「病原体」には、菌類、ウイルス(例えば、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、ヒト血清パルボ様ウイルス、シミアンウイルス40、呼吸器合胞体ウイルス、マウス乳腫瘍ウイルス、水痘带状疱疹ウイルス、 Dengueウイルス、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、エプスタイン-バールウイルス、マウス白血病ウイルス、ムンプスウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、イボウイルスおよびブルータングウイルス)、寄生虫、および細菌(例えば、ストレプトコッカス・アガラクチアエ(*Streptococcus agalactiae*)、レジオネラ・ニューモフィリア(*Legionella pneumophilia*)、化膿連鎖球菌、大腸菌、淋菌、髄膜炎菌、肺炎球菌、B型インフルエンザ菌、梅毒トレポネーマ、ライム病スピロヘータ、緑膿菌、らい菌、ウシ流産菌、結核菌および破傷風毒素)が含まれるが、これらに限定されない。米国特許第5,332,567号を参照のこと。

【0089】

CSAp抗原をターゲッティングしない抗体を本発明において使用することができる。例えば、がん腫に関連する抗原に対する抗体、特に胃腸系のがん腫(結腸、直腸、膵臓の腫瘍)および卵巣がんに関連する他の抗原に対する抗体を、CSAp抗体と組み合わせることができ、そしてCSAp抗体との融合パートナーとしてもまた使用することができる。壊死、血管形成因子、免疫応答因子(例えば、CD40)、ならびにがん遺伝子の産物に関連する細胞内抗原および他の抗原に対する抗体もまた、CSAp抗体と組み合わせ使用することができる。抗壊死抗体が、Epsteinらの米国特許第6,071,491号、同第6,017,514号、同第5,019,368号および同第5,882,626号に記載され、参照することにより本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

## 【0090】

キメラ抗CSAp抗体およびヒト化抗CSAp抗体およびヒト抗CSAp抗体またはそれらのフラグメントと診断試薬または治療試薬との間の免疫コンジュゲート体を、薬学的に受容可能なビヒクル（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences（第18版）、Mack Publishing Co.、Easton、Pa.、1990を参照のこと）に配合して、調製することができる。免疫コンジュゲート体は、抗体成分と治療剤または診断剤とのコンジュゲート体である。ランダム（非特異的）なコンジュゲート化は、結合活性が低下した生成物をもたらすことが多いので、例えば、炭水化物部分を介して、例えば、酸化された炭水化物誘導体などを介して試薬が抗体に部位特異的に結合しているコンジュゲート体を使用することが好ましい。炭水化物部分は、免疫反応性を変化させることなく、部位特異的な変異誘発によって抗体に導入することができる。そのようなコンジュゲート体の製造方法ならびに診断剤および治療剤におけるそれらの使用が、例えば、Shihらの米国特許第5,057,313号；Shihら、Int. J. Cancer、41:832（1988）；およびHansenらの米国特許第5,443,953号に示される（これらの内容は参照することによって本明細書中に組み込まれる）。ポリマーキャリアを使用しない、酸化された炭水化物に対する試薬の直接的な結合が、McKearnらの米国特許第5,156,840号に記載される（これもまた参照することにより組み込まれる）。

10

## 【0091】

広範囲の診断/検出試薬および治療試薬を本発明の抗体に都合よくコンジュゲートすることができる。これらには、種々の種類の化学治療剤、例えば、アントラサイクリン類、抗生物質、アルキル化剤、抗細胞分裂阻止剤、抗血管形成剤、植物アルカロイド、COX阻害剤、代謝拮抗剤など、例えば、ドキソルピシン、CPT-11、オキサリプラチン、メトトレキサート、タキソールおよび他のタキサン類など；蛍光性分子などの検出可能な標識、または重金属もしくは放射性核種などの細胞傷害性薬剤が複合体化され得るキレーター、例えば、DTPAなど；シュードモナスのエキソトキシンなどの毒素、RNAse、ゲロニンなどが含まれるが、これらに限定されない。

20

## 【0092】

治療剤は、抗体成分とは別個に、もしくは抗体成分と同時に、もしくは抗体成分と連続して投与されるか、または抗体成分（すなわち、抗体もしくは抗体フラグメント）もしくはサブフラグメントにコンジュゲート化される、疾患の処置において有用な分子または原子である。治療剤の例には、抗体、抗体フラグメント、薬物、毒素、酵素、酵素阻害剤、ヌクレアーゼ、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、免疫調節因子、キレーター、ホウ素化合物、ウラン原子、光活性な薬剤または色素、および放射性核種が含まれる。粒子放出によって実質的に崩壊する、治療剤における放射性核種には、P-32、P-33、Sc-47、Fe-59、Cu-64、Cu-67、Se-75、As-77、Sr-89、Y-90、Mo-99、Rh-105、Pd-109、Ag-111、I-125、I-131、Pr-142、Pr-143、Pm-149、Sm-153、Tb-161、Ho-166、Er-169、Lu-177、Re-186、Re-188、Re-189、Ir-194、Au-198、Au-199、Pb-211、Pb-212およびBi-213が含まれるが、これらに限定されない。有用な粒子放出核種の最大崩壊エネルギーは、好ましくは20keV~5,000keVであり、より好ましくは100keV~4,000keVであり、最も好ましくは500keV~2,500keVである。オージェ放出粒子を伴って実質的に崩壊する放射性核種もまた好ましい。例えば、Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189mおよびIr-192。有用なオージェ粒子放出核種の崩壊エネルギーは、好ましくは1,000keV未満であり、より好ましくは100keV未満であり、最も好ましくは70keV未満である。

30

40

粒子の生成を伴って実質的に崩壊する放射性核種もまた好ましい。そのような放射性核種には、Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、P

50

o - 2 1 5、Bi - 2 1 1、Ac - 2 2 5、Fr - 2 2 1、At - 2 1 7、Bi - 2 1 3、Fm - 2 5 5 が含まれるが、これらに限定されない。有用な 粒子放出放射性核種の崩壊エネルギーは、好ましくは 2, 0 0 0 k e V ~ 1 0, 0 0 0 k e V であり、より好ましくは 3, 0 0 0 k e V ~ 8, 0 0 0 k e V であり、最も好ましくは 4, 0 0 0 k e V ~ 7, 0 0 0 k e V である。

#### 【0093】

酵素もまた有用な治療剤である。例えば、ホスファート含有プロドラッグと組み合わせて使用されるアルカリホスファターゼ（米国特許第 4, 9 7 5, 2 7 8 号）；スルファート含有プロドラッグと組み合わせて使用されるアリアルスルファターゼ（米国特許第 5, 2 7 0, 1 9 6 号）；ペプチドに基づくプロドラッグと組み合わせて使用されるペプチダーゼおよびプロテアーゼ、例えば、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、ズブチリシン、カルボキシペプチダーゼ（米国特許第 5, 6 6 0, 8 2 9 号、同第 5, 5 8 7, 1 6 1 号、同第 5, 4 0 5, 9 9 0 号）およびカテプシン類（カテプシン B および L を含む）；D - アミノ酸修飾プロドラッグと組み合わせて使用される D - アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグと組み合わせて使用される - ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼなどの炭水化物切断酵素（米国特許第 5, 5 6 1, 1 1 9 号、同第 5, 6 4 6, 2 9 8 号）； - ラクタム含有プロドラッグと組み合わせて使用される - ラクタマーゼ；フェノキシアセトアミド基またはフェニルアセトアミド基によりそのアミノ窒素が誘導体化された薬物と組み合わせて使用されるペニシリンアミダーゼ、例えば、ペニシリン V アミダーゼ（米国特許第 4, 9 7 5, 2 7 8 号）またはペニシリン G アミダーゼ など；および 5 - フルオロシトシンに基づくプロドラッグ（米国特許第 4, 9 7 5, 2 7 8 号）と組み合わせて使用されるシトシンデアミナーゼ（米国特許第 5, 3 3 8, 6 7 8 号、同第 5, 5 4 5, 5 4 8 号）が、本発明のための好適な治療剤である。

10

20

#### 【0094】

混合療法における使用または抗体に対するコンジュゲート体形成のために好適な抗血管形成剤（または血管形成阻害剤）には、アンギオスタチン、エンドスタチン、バスクロスタチン、カンスタチンおよびマスピンが含まれる。

#### 【0095】

他の有用な治療剤には、金属（光力学的治療の一部としての金属など）および核種（中性子捕獲法に基づく治療において有益な核種など）が含まれる。具体的には、亜鉛、アルミニウム、ガリウム、ルテチウムおよびパラジウムが光力学的治療のために有用であり、B - 1 0、G d - 1 5 7 および U - 2 3 5 が中性子捕獲治療のために有用である。

30

#### 【0096】

診断 / 検出剤は、抗体成分（すなわち、抗体または抗体フラグメント）またはサブフラグメントにコンジュゲートされて投与され、そして疾患関連抗原を含む細胞を突き止めることによって疾患を診断 / 検出することにおいて有用である分子または原子である。有用な診断 / 検出剤には、放射性同位体、色素（ビオチン - ストレプアビジン複合体に関する場合など）、放射線不透過性物質（例えば、ヨウ素化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物およびタリウム化合物など）、造影剤、蛍光性の化合物または分子、および磁気共鳴画像化（MRI）用の増強剤（例えば、常磁性イオン）が含まれるが、これらに限定されない。米国特許第 6, 3 3 1, 1 7 5 号には、MRI 技術および MRI 増強剤にコンジュゲート化された抗体の調製が記載されており、この文献はその開示内容全体を参照することにより本明細書に組み込まれる。好ましくは、診断剤は、核画像化、手術中検出および内視鏡検出のための放射性同位体、磁気共鳴画像化または超音波検査において使用される増強剤、X 線写真およびコンピューター断層撮影法のための放射線不透過性薬剤および造影剤、透視検査法（内視鏡透視検査法を含む）のための蛍光性化合物からなる群から選択される。抗体にコンジュゲート化されるか、または二重特異性のプレターゲッティング方法において使用される蛍光性薬剤および放射性薬剤は、G o l d e n b e r g の米国特許第 5, 7 1 6, 5 9 5 号、同第 6, 0 9 6, 2 8 9 号および米国特許出願第 0 9 / 3 4 8, 8 1 8 号（これらの文献はその開示内容全体が参照することにより本明細書中に組み込ま

40

50

れる)に開示されるように、特に、線放射体、線放射体および陽電子放射体を用いて、疾患に冒された組織または細胞塊(悪性腫瘍など)に関連するターゲティングされた抗原を、内視鏡により、または手術中に、または血管内で検出するために特に有用である。陽電子放射断層撮影法に有用な放射性核種には、F - 18、Mn - 51、Mn - 52m、Fe - 52、Co - 55、Cu - 62、Cu - 64、Ga - 68、As - 72、Br - 75、Br - 76、Rb - 82m、Sr - 83、Y - 86、Zr - 89、Tc - 94m、In - 110、I - 120およびI - 124が含まれるが、これらに限定されない。有用な陽電子放出放射性核種の総崩壊エネルギーは、好ましくは2,000keV未満であり、より好ましくは1,000keV未満であり、最も好ましくは700keV未満である。線検出を利用する診断剤として有用な放射性核種には、Cr - 51、Co - 57、Co - 58、Fe - 59、Cu - 67、Ga - 67、Se - 75、Ru - 97、Tc - 99m、In - 111、In - 114m、I - 123、I - 125、I - 131、Yb - 169、Hg - 197およびTl - 201が含まれるが、これらに限定されない。有用な線放出放射性核種の崩壊エネルギーは、好ましくは20keV~2000keVであり、より好ましくは60keV~600keVであり、最も好ましくは100keV~300keVである。

10

#### 【0097】

本発明のために好適な常磁性イオンには、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)およびエルビウム(III)が含まれ、ガドリニウムが特に好ましい。X線画像化などの他の関連で有用なイオンには、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)および特にビスマス(III)が含まれるが、これらに限定されない。蛍光標識には、ローダミン、フルオレセインおよびレノグラフィンが含まれる。ローダミンおよびフルオレセインは、多くの場合、イソチオシアナート中間体を介して連結される。

20

#### 【0098】

金属は診断剤においてもまた有用であり、これには、磁気共鳴画像化技術のための金属が含まれる。これらの金属には、ガドリニウム、マンガン、鉄、クロム、銅、コバルト、ニッケル、ジスプロシウム、レニウム、ユーロピウム、テルビウム、ホルミウムおよびネオジムが含まれるが、これらに限定されない。抗体成分を放射性金属または常磁性イオンとともに負荷するためには、抗体を、そのようなイオンと結合するための多数のキレート化基が結合している長いテールを有する試薬と反応させることが必要となることがある。そのようなテールは、キレート化基(例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、ポルフィリン類、ポリアミン、クラウンエーテル、ビスチオセミカルバゾン、ポリオキシム、およびこの目的のために有用であることが知られている同様な基など)が結合し得るペンダント基を有するポリリシンまたは多糖類または他の誘導体化鎖もしくは誘導化可能な鎖などのポリマーであり得る。様々なキレートが、標準的な化学反応を使用してペプチド抗原にカップリングさせられる。キレートは、通常、免疫反応性の最小限の喪失ならびに最小限の凝集および/または内部架橋で分子に対する結合の形成を可能にする基によって抗体に連結される。キレートを抗体にコンジュゲート化するための、より珍しい他の方法および試薬が、米国特許第4,824,659号(Hawthorne)(発明の名称:「Antibody Conjugates」、1989年4月25日発行)に開示される(その開示はその全体を参照することにより本明細書中に組み込むものとする)。特に有用な金属-キレートの組合せには、20keV~2,000keVの一般的なエネルギー範囲にある診断用同位体とともに使用される2-ベンジル-DTPAならびにそのモノメチルアナログおよびシクロヘキシルアナログが含まれる。マンガン、鉄およびガドリニウムなどの非放射性的な金属と錯体形成するとき、同じようなキレートは、本発明の抗体と一緒に使用されたときにはMRIのために有用である。大環状キレート、例えば、NOTA、DOTAおよびTETAなどは、様々な金

30

40

50

属および放射性金属に関して有用であり、最も詳細には、ガリウム、イットリウムおよび銅の放射性核種に関してそれぞれ有用である。そのような金属-キレート錯体は、目的とする金属に対して環サイズを調節することによって非常に安定にすることができる。他の環型キレート、例えば、R A I T用の<sup>223</sup>Raなどの安定に結合する核種に関して注目されている大環状ポリエーテルなども本発明によって包含される。

#### 【0099】

放射線不透過性物質および造影物質は、X線写真およびコンピューター断層撮影法を増強するために使用され、これには、ヨウ素化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物、タリウム化合物などが含まれる。具体的な化合物には、バリウム、ジアトリゾアート、エチルヨウ化油、クエン酸ガリウム、イオカルム酸、ヨーセタム酸、ヨーダミド、ヨーシパミド、ヨードキサム酸、イオグラミド、イオヘキソール、イオパミドール、イオパノ酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセル酸、イオスラミドメグルミン、イオセメト酸、イオタスル、イオテトル酸、イオタラム酸、イオトロクス酸、イオキサグル酸、イオクソトリゾ酸、イボダート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾアート、プロピリオドンおよび塩化タリウムが含まれる。

10

#### 【0100】

本明細書中で使用される用語「被験体」は任意の動物（すなわち、脊椎動物および無脊椎動物）を示し、これには、ヒトおよび他の霊長類、齧歯類（例えば、マウス、ラットおよびモルモット）、ウサギ目（例えば、ウサギ）、ウシ類（例えば、ウシ）、ヒツジ類（例えば、ヒツジ）、ヤギ類（例えば、ヤギ）、ブタ類（例えば、ブタ）、ウマ類（例えば、ウマ）、イヌ類（例えば、イヌ）、ネコ類（例えば、ネコ）、家禽（例えば、ニワトリ、七面鳥、アヒル、ガチョウ、他のキジ目鳥類など）、ならびに野生動物または非飼育動物（有蹄類（例えば、シカ）、クマ、魚類、ウサギ目、齧歯類、鳥類などのような動物を含むが、これらに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない。この用語は特定の年齢または性に限定されることが意図されない。従って、成体および新生児の被験体ならびに胎児が、雄性または雌性のいずれでもあっても、この用語によって包含される。

20

#### 【0101】

##### II. 抗体の調製

モノクローナル抗体(MAb)は特定の抗原に対する抗体の均質な集団であり、抗体は1種類の抗原結合部位のみを含んでおり、抗原性決定基における1つのエピトープのみに結合する。特定の抗原に対する齧歯類モノクローナル抗体を、当業者に知られている様々な方法によって得ることができる。例えば、KohlerおよびMilstein、Nature、256:495(1975);およびColiganら(編)、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、第1巻、2.5.1頁~2.6.7頁(John Wiley & Sons、1991)[以下、「Coligan」]を参照のこと。簡単に記載すると、モノクローナル抗体は、抗原を含む組成物をマウスに注射し、血清サンプルを採取することにより抗体産生の存在を確認し、Bリンパ球を得るために脾臓を取り出し、ハイブリドーマを産生するためにBリンパ球をミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマをクローニングし、抗原に対する抗体を産生する陽性クローンを選択し、抗原に対する抗体を産生するクローンを培養し、その後、ハイブリドーマ培養物から抗体を単離することによって得ることができる。

30

40

#### 【0102】

MAbは、様々な十分に確立された技術によってハイブリドーマ培養物から単離および精製することができる。そのような単離技術には、プロテインAセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーが含まれる。例えば、Coligan、2.7.1頁~2.7.12頁および2.9.1頁~2.9.3頁を参照のこと。また、Bainesら、「Purification of Immunoglobulin G(IgG)」、METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY、第10巻、79頁~104頁(The Humana Press, Inc.、1992)も参照のこと。

50

## 【0103】

ペプチド骨格に対するAbが、Ab製造について広く知られている方法によって作製される。例えば、(ペプチド)<sub>n</sub>-KLH(この場合、KLHはキーホールリンペットヘモシアニンであり、およびn=1~30である)などの免疫原の完全フロイントアジュバントにおける注射、続く、不完全フロイントアジュバントに懸濁された同じ免疫原の免疫適格動物に対する2回続けた注射が行われた後、脾臓細胞が、抗原のi.v.追加免疫の3日後に集められる。その後、集められた脾臓細胞をSp2/0-Ag14ミエローマ細胞と融合し、そして得られたクローンの培養上清が、直接結合ELISAを使用して抗ペプチド反応性について分析される。作製されたAbの細かい特異性を、元の免疫原のペプチドフラグメントを使用することによって分析することができる。これらのフラグメントは、

10

## 【0104】

本発明において使用される抗体は、マーカー物質としての細胞表面または細胞内の様々な腫瘍関連抗原に対して特異的である。これらのマーカーは、細胞質、核または様々なオルガネラもしくは細胞より小さい構造体においてであっても、あるいは腫瘍に栄養を与える血管または腫瘍血管系によって作られた血管の内皮の一部としてさえも、腫瘍によって産生される物質であり得るか、あるいは腫瘍部位または腫瘍細胞表面または腫瘍細胞内に蓄積する物質であり得る。そのような腫瘍関連マーカーの中には、Herberman、「がんの免疫診断」、Fleisher編、「The Clinical Biochemistry of Cancer」、347頁(American Association of Clinical Chemists、1979);および米国特許第4,150,149号、同第4,361,544号および同第4,444,744号に開示されるマーカーが含まれる。

20

## 【0105】

腫瘍関連マーカーは、腫瘍胎児性抗原、胎盤抗原、がんウイルス関連抗原または腫瘍ウイルス関連抗原、組織関連抗原、器官関連抗原、異所性ホルモンおよび正常な抗原またはその変化体を含む多数のカテゴリーに、Herberman(上掲)によって分類されている。場合により、腫瘍関連マーカーのサブユニット(例えば、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)の-サブユニットまたはがん胎児性抗原(CEA)の領域)が、より大きい腫瘍特異性を有する抗体を惹起させるために都合よく使用され、これらは、米国特許第4,361,644号および同第4,444,744号に開示されるように、非腫瘍物質に対する交差反応性が非常に低下した抗体の産生を刺激する。

30

## 【0106】

注目される別のマーカーは膜貫通活性化因子またはCAML相互作用因子(TACI)である。Yuら、Nat. Immunol.、1:252~256(2000)を参照のこと。簡単に記載すると、TACIは、B細胞の悪性腫瘍(例えば、リンパ腫)に対するマーカーである。さらに、TACIおよびB細胞成熟化抗原(BCMA)が、腫瘍壊死因子ホモログ、増殖誘導リガンド(APRIL)によって結合することが知られている。APRILは一次B細胞および一次T細胞のインビトロでの増殖を刺激し、そしてB細胞をインビボで蓄積させることにより脾臓重量を増大させる。APRILはまた、受容体結合についてTALL-I(これもまたBlySまたはBAFFと呼ばれる)と競合する。可溶性のBCMAおよびTACIは、APRILの結合を特異的に妨げ、一次B細胞のAPRIL刺激された増殖を阻止する。BCMA-Fcはまた、マウスにおいてキーホールリンペットヘモシアニンおよびニューモバクスに対する抗体の産生を阻害する。このことは、BCMAおよび/またはTACIを介したAPRILおよび/またはTALL-Iのシグ

40

50

ナル伝達が、体液性免疫を生じさせるためには必要であることを示している。従って、A P R I L - T A L L - I および B C M A - T A C I により、B細胞機能およびT細胞機能の刺激に關与する2リガンド-2受容体経路が形成される。

【0107】

免疫原に対する抗体を最初に惹起させた後、抗体を配列決定し、続いて、組換え技術によって調製することができる。ネズミ抗体および抗体フラグメントのヒト化およびキメラ化は当業者に広く知られている。例えば、ヒト化モノクローナル抗体が、マウス免疫グロブリンの重鎖可変部および軽鎖可変部に由来するマウス相補性決定領域をヒト可変ドメインに移し、その後、ネズミ対応体のフレームワーク領域においてヒト残基に置換することによって製造される。好ましい実施形態において、ヒト化抗C S A p抗体またはそのフラグメントのフレームワーク領域におけるいくつかのヒト残基がそのネズミ対応体によって置換される。2つの異なるヒト抗体に由来するフレームワーク配列の組合せがV<sub>H</sub>のために使用されることもまた好ましい。さらに好ましくは、そのような2つのヒト抗体はE U およびN E W Mである。抗体分子の定常ドメインはヒト抗体の定常ドメインに由来する。ヒト化モノクローナル抗体に由来する抗体成分の使用により、ネズミ定常領域の免疫原性に關連する潜在的な問題が回避される。

10

【0108】

ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有する遺伝子組換えマウスから回収することができる。マウスの体液性免疫系は、内因性の免疫グロブリン遺伝子を不活性化し、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することによってヒト化される。ヒト免疫グロブリン遺伝子座は非常に複雑であり、そしてまとめた場合にはヒトゲノムのほぼ0.2%を占める非常に多数の異なるセグメントを含む。遺伝子組換えマウスにより、十分な抗体レパートリーが産生され得ることを確実にするためには、ヒトの重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座の大きな割合をマウスのゲノムに導入しなければならない。これは、ヒトの重鎖免疫グロブリン遺伝子座または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座のいずれかを生殖系列配置で含有する酵母人工染色体(Y A C)の形成によって始まる段階的プロセスにおいて達成される。それぞれの挿入物はサイズが約1 M bであるので、Y A C構築物は、免疫グロブリン遺伝子座の重複フラグメントの相同的組換えを必要とする。2つのY A C(重鎖遺伝子座を含有するY A Cおよび軽鎖遺伝子座を含有するY A C)が、Y A C含有酵母のスフェロプラストをマウス胚幹細胞と融合することによってマウスに別々に導入される。その後、胚幹細胞クローンはマウスの胚盤胞に顕微注入される。得られるキメラなオスを、その生殖系列によってY A Cを伝えるその能力についてスクリーニングして、ネズミ抗体の産生ができないマウスと交配させる。これらの2つの遺伝子組換え系統、すなわち、ヒト重鎖遺伝子座を含有する一方と、ヒト軽鎖遺伝子座を含有するもう一方とを交配することにより、免疫化に应答してヒト抗体を産生する子孫が得られる。

20

30

【0109】

再配置されていないヒト免疫グロブリン遺伝子はまた、マイクロセル媒介染色体移入(M M C T)によってマウス胚幹細胞に導入することができる。T o m i z u k a ら、N a t u r e G e n e t i c s、16:133(1997)を参照のこと。この方法論では、ヒト染色体を含有するマイクロセルがマウス胚幹細胞と融合させられる。移入された染色体は安定に保持され、そして成体キメラ体は正しい組織特異的発現を示す。

40

【0110】

代わりとして、本発明の抗体または抗体フラグメントは、コンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーから単離されたヒト抗体フラグメントに由来し得る。例えば、B a r b a s ら、M E T H O D S : A C o m p a n i o n t o M e t h o d s i n E n z y m o l o g y、2:119(1991);およびW i n t e r ら、A n n . R e v . I m m u n o l . 12:433(1994)を参照のこと(これらは参照することにより本明細書に組み込まれる)。B細胞の不死化によってモノクローナル抗体を作製することに関連する困難の多くは、ファージディスプレイを使用して大腸菌において抗体フラグメントを操作および発現することによって克服することができる。高親和性のモノクローナル抗

50

体の回収を確実にするために、コンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーは大きいレパートリーサイズを含有しなければならない。典型的な方法では、逆転写酵素を使用してcDNAを合成するために、免疫化されたマウスのリンパ球または脾臓細胞から得られたmRNAが使用される。重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子がPCRによって別々に増幅され、ファージクローニングベクターに連結される。2つの異なるライブラリーが作製される。すなわち、1つが重鎖遺伝子を含有し、1つが軽鎖遺伝子を含有する。ファージDNAをそれぞれのライブラリーから単離し、そして重鎖配列および軽鎖配列を一緒に連結し、パッケージングして、コンビナトリアルライブラリーが得られる。それぞれのファージが重鎖cDNAおよび軽鎖cDNAのランダムな対を含有しており、大腸菌に感染したとき、感染細胞において抗体鎖の発現を行わせる。目的とする抗原を認識する抗体を確認するために、ファージライブラリーは平板に播種され、そしてプラークに存在する抗体分子がフィルターに転写される。フィルターは、放射標識された抗原とインキュベーションされ、その後、過剰な非結合リガンドを除くために洗浄される。オートラジオグラムにおける放射能スポットにより、その抗原と結合する抗体を含有するプラークが同定される。ヒト免疫グロブリンのファージライブラリーを作製するために有用なクローニングベクターおよび発現ベクターは、例えば、STRATAGENE Cloning Systems (La Jolla, CA) から得ることができる。

10

## 【0111】

ネズミ免疫グロブリン可変ドメインをクローニングするための一般的な技術が、例えば、Orlandiら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、86:3833 (1989)の刊行物によって記載される(この文献はその開示内容全体を参照することにより本明細書に組み込まれる)。キメラ抗体を構築するための様々な技術が当業者には広く知られている。一例として、Leungら、Hybridoma、13:469(1994)には、LL2モノクローナル抗体(抗CD22抗体)のV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>H</sub>ドメインをコードするDNA配列を、それぞれ、ヒトの定常領域ドメインおよびIgG<sub>1</sub>定常領域ドメインと組み合わせることによってLL2キメラを製造する方法が記載される。この刊行物にはまた、LL2の軽鎖可変領域および重鎖可変領域(それぞれ、V<sub>H</sub>およびV<sub>H</sub>)のヌクレオチド配列が示されている。ヒト化MAbを製造するための技術が、例えば、Jonesら、Nature、321:522(1986); Riechmanら、Nature、332:323(1988); Verhoeyenら、Science、239:1534(1988); Carterら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、89:4285(1992); Sandhu、Crit. Rev. Biotech.、12:437(1992); および Singerら、J. Immun.、150:2844(1993)によって記載される(これらの文献はそれぞれが本明細書に参照することにより組み込まれる)。

20

30

## 【0112】

キメラ抗体は、齧歯類抗体などの1つの動物種に由来するCDRを含む可変ドメインを含有する組換えタンパク質であり、その一方で、抗体分子の残り、すなわち、定常ドメインはヒト抗体に由来する。従って、キメラなモノクローナル抗体はまた、キメラMAbの可変領域におけるネズミFRの配列を1つ以上の異なるヒトFRで置換することによってヒト化することができる。具体的には、マウスのCDRが、マウス免疫グロブリンの重鎖可変領域および軽鎖可変領域からヒト抗体の対応する可変ドメインの中に移される。マウスのCDRをヒトFR内に単に移すことは抗体親和性の低下またはその喪失さえも生じさせることが多いので、さらなる改変が、ネズミ抗体の元の親和性を回復するためには必要であると考えられる。これは、そのエピトープに対する良好な結合親和性を有する抗体を得るためにFR領域内の1つ以上のヒト残基をそのネズミ対応体で置換することによって達成することができる。例えば、Tempestら、Biotechnology、9:266(1991); および Verhoeyenら、Science、239:1534(1988)を参照のこと。さらに、特定のエピトープに対するヒト化MAbおよびキメラMAbおよびヒトMAbの親和性はCDRの変異誘発によって増大させることができ、そ

40

50

の結果、より少ない量の抗体が、変異誘発前のより低い親和性のMAbのより大きい量と同じくらいの効果を有するようにすることができる。例えば、国際公開WO0029584A1を参照のこと。

#### 【0113】

本発明の抗体を製造するための別の方法は、遺伝子組換え家畜の乳汁中に産生させることによるものである。例えば、Colman, A., Biochem. Soc. Symp., 63:141~147 (1998); 米国特許第5,827,690号を参照のこと(これらの文献はともにその開示内容全体が参照することにより本明細書に組み込まれる)。対になった免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAセグメントをそれぞれ含有する2つのDNA構築物が調製される。これらのDNAセグメントは、  
 10 乳腺上皮細胞において優先的に発現するプロモーター配列を含有する発現ベクターにクローニングされる。例には、ウサギ、ウシおよびヒツジのカゼイン遺伝子、ウシ - ラクトグロブリン遺伝子、ヒツジ - ラクトグロブリン遺伝子ならびにマウス乳漿酸性タンパク質遺伝子に由来するプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、挿入されたフラグメントは、乳腺特異的遺伝子に由来する同族のゲノム配列がその3'側で接する。これにより、ポリアデニル化部位および転写物安定化配列が提供される。これらの発現カセットは哺乳動物受精卵の前核に同時注入され、その後、受精卵を、移植されるメスの子宮に着床させ、妊娠させる。出生後、子孫は、サザン分析によって両方の導入遺伝子の存在についてスクリーニングされる。抗体が存在するためには、重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子の両方が、同じ細胞において同時に発現しなければならない。遺伝子組換え体のメスから得られた乳汁が、  
 20 当分野で知られている標準的な免疫学的方法を使用して抗体または抗体フラグメントの存在および機能性について分析される。抗体は、当分野で知られている標準的な方法を使用して乳汁から精製することができる。

#### 【0114】

#### キメラ抗CSAp抗体、ヒト化抗CSAp抗体およびヒト抗CSAp抗体の調製

本発明ではまた、結腸直腸がんおよび卵巣がんによって発現されるがん腫関連抗体を含む様々ながん腫関連抗体などの他のヒト抗体または再操作(例えば、キメラ化、ヒト化)された抗体と組み合わせて使用されるヒト抗CSApモノクローナル抗体およびヒト化抗CSApモノクローナル抗体およびキメラ抗CSApモノクローナル抗体が考えられる。好ましい実施形態において、CEA、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、PAM-  
 30 4、KC4、BrE3、Le-Y(例えば、B3抗体)、EGFR、EGP-1、RS5(GA733抗原標的、例えば、EGP-2、17-1A、KS1-4およびEp-CA Mの抗体などについて)、TAG-72、A33抗体決定基、KS-1、A3およびHER2/neuに対する抗体が、ヒト化抗CSAp抗体またはキメラ抗CSAp抗体またはヒト抗CSAp抗体との混合療法のために使用される。例えば、Mendezら、Nature Genetics、15:146~156(1997); 米国特許第5,633,425号を参照のこと(これらの文献はその開示内容全体を参照することにより組み込まれる)。BrE3抗体が、Couto, J., Christian, R., Peterson, J.およびCeriani, R., Cancer Res., 1995, 55(suppl. 23): 5973s~5977sに記載される。EGP-1抗体が米国仮特  
 40 許出願第60/360,229号に記載され、EGP-2抗体のいくつかは、本明細書の最後で言及される参考文献におけるBirbenerらおよびStaiברらおよびSchwartzbergらにおいて言及されている。KS-1抗体がKodaraらにおいて言及され、A33抗体がRitterらにおいて言及され、Le(y)抗体B3がDiCarloらに記載され、A3抗体がTordssonらに記載される(これらはすべて、本明細書の最後で言及される参考文献に列記されている)。好ましくは、胃腸がんおよび卵巣がんのマーカー抗原または受容体に対する抗体は、CSAp抗体と組合せた使用に、特にMu-9抗体と組合せた使用に十分に適している。好ましい実施形態において、胃腸がんは結腸直腸がんである。

#### 【0115】

10

20

30

40

50

マーカーまたはがん遺伝子の産物に対する抗体、あるいはVEGFなどの血管形成因子に対する抗体もまた有用である。VEGF抗体が、Thorpeら、米国特許第6,342,221号、同第5,965,132号および同第6,004,554号に記載される(これらの文献は、参照することによりその開示内容全体を本明細書に組み込まれる)。ある種の免疫応答調節因子に対する抗体(CD40に対する抗体など)が、本明細書の最後で言及される参考文献に列記されるTodrykらおよびTurnerらに記載される。混合療法のために好適な他の抗体には、Epsteinら(下記)に記載されるような抗壊死抗体が含まれる。

#### 【0116】

本発明において使用される細胞株および培養培地には、Mu-9ハイブリドーマ細胞およびSp2/0-Ag14ミエローマ細胞(ATCC、Rockville、MD)が含まれる。Mu-9を産生するモノクローナルハイブリドーマは、結腸特異的抗原-p(CS Ap)で免疫化されたマウスから得られた脾臓をSP2/0Ag14と融合することによって得られた。これらの細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)(Hyclone Laboratories、Logan、UT)および抗生物質が補充されたハイブリドーマ無血清培地(HSFM)(Life Technologies、Grand Island、NY)(完全培地)において培養することができる。あるいは、細胞は、10%FCSおよび75g/mlのゲンタマイシンを含有する10%FCS(Gibco/BRL、Gaithersburg、Mass.)補充のダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(完全HSFM)において、または示された場合には、抗生物質のみを含有するHSFMにおいて培養することができる。形質転換体の選択を、500ユニット/mlのヒゲロマイシン(Calbiochem、San Diego、CA)を含有する完全HSFMにおいて行うことができる。すべての細胞株は、好ましくは、5%CO<sub>2</sub>において37で維持される。

#### 【0117】

V 遺伝子セグメントおよびV<sub>H</sub>遺伝子セグメントの取得  
V 遺伝子セグメントおよびV<sub>H</sub>遺伝子セグメントの単離を、当分野で広く知られているいくつかの手段によって達成することができる。2つのそのような手段には、PCRクローニングおよびcDNAライブラリースクリーニングが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0118】

様々なPCRクローニング技術が当分野では広く知られている。しかし、簡単に記載すると、V 遺伝子フラグメントおよびV<sub>H</sub>遺伝子フラグメントのPCRクローニングは下記のように達成することができる。ポリA mRNAを、Fast Track mRNA単離キット(Invitrogen、San Diego、CA)などの市販のキットを使用してMu-9ハイブリドーマ細胞株から単離することができる。その後、第1鎖cDNAを、cDNAサイクルキット(Invitrogen)を使用してポリA mRNAから逆転写することができる。このプロセスにおいて、ポリA mRNAはネズミIgG CH1特異的プライマーまたはネズミCk特異的プライマーにアニーリングされる。そのようなプライマーの例には、それぞれ、CH1B(5'-ACAGTCACTGAGCTGG-3')およびCk3-BH1(5'-GCCGGATCCTGACTGGATGGTGGGAAGATGGATACA-3')が含まれる。第1鎖cDNAは、Orlandiらにより記載されるように、PCRによってV<sub>H</sub>配列およびV 配列を増幅するためのテンプレートとして使用することができる。V 領域については、VK1Back(5'-GACATTCAAGCTGACCCAGTCTCCA-3')およびIgGKC3'(5'-CTCACTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGG-3')などのプライマー対を使用することができる。V<sub>H</sub>領域については、VH1Back(5'-AGGT(C/G)(A/C)A(A/G)CTGCAG(C/G)AGTC(A/T)GG-3')およびCH1Bなどのプライマー対を使用することができる。増幅後、V フラグメントおよびV<sub>H</sub>フラグメントをゲル精製して、ジデオキシターミネーシ

ョン法による配列分析のためのT Aクローニングベクター (Invitrogen)などのクローニングベクターにクローニングすることができる。免疫グロブリン起源であることが確認された配列は、その後、Leungらによって記載される方法を使用してキメラな発現ベクターを構築するために使用することができる。

#### 【0119】

PCRクローニングによってV<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよびV<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを単離することに対する好ましい代替の方法として、cDNAライブラリースクリーニングを利用することができる。cDNAスクリーニング法もまた当分野では広く知られている。しかし、簡単に記載すると、cDNAライブラリーを、pSPORTベクター (Life Technologies)において、ネズミMu-9ハイブリドーマ細胞から抽出されたmRNAから構築することができる。第1鎖cDNAを、Mu-9ハイブリドーマから得られたポリA RNAをオリゴdTプライマー-NotIアダプター (Life Technologies)で伸長させることによって合成することができる。第2鎖の合成およびSalIアダプターの結合を行った後、cDNAプールをcDNAサイズ分画カラムによってサイズ分画することができる。分画されたcDNAは、その後、pSPORTベクターに連結され、続いて大腸菌DH5に形質転換することができる。その後、ライブラリーを平板に播種して、フィルターに転写し、増幅することができる。

10

#### 【0120】

cDNAライブラリーのスクリーニングは、重鎖および軽鎖に対して特異的な標識されたプローブとのハイブリダイゼーションによって達成することができる。例えば、重鎖に対するMUCH-1 (5' - AGACTGCAGGAGAGCTGGGAAGGTGTGCAC - 3') および軽鎖に対するMUCK-1 (5' - GAAGCACACGACTGAGGCACCTCCAGATGT - 3') などの[32-P]標識プローブ。最初のスクリーニングで陽性であるクローンを二連の平板に移し、同じプローブを用いてもう一度スクリーニングすることができる。

20

#### 【0121】

RNA単離、cDNA合成および増幅を下記のように行うことができる。総細胞RNAを、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版)、Cold Spring Harbor Press、1989) (この文献は参照することにより本明細書に組み込まれる) に従って、合計で約10<sup>7</sup>個の細胞を使用してMu-9ハイブリドーマ細胞株から調製することができる。第1鎖cDNAを、SuperScript増幅システム (Gibco/BRL、Gaithersburg、Md.) を使用することなどによって、従来のように総RNAから逆転写することができる。簡単に記載すると、20μlの反応容量において、50ngのランダムヘキサプライマーを、2μlの10X合成緩衝液 [200mMのTris-HCl (pH8.4)、500mMのKCl、25mMのMgCl<sub>2</sub>、1mg/mlのBSA]、1μlの10mM dNTP混合物、2μlの0.1M DTTおよび200ユニットのSuperScript逆転写酵素の存在下で、5μgのRNAにアニーリングすることができる。伸長工程は、最初、室温で10分間進められ、続いて42℃で50分間のインキュベーションが可能である。反応は、反応混合物を90℃で5分間加熱することによって停止させることができる。

30

40

#### 【0122】

スクリーニング用プローブの合成および標識化は、周知の手段によって達成することができる。用いられる検出システムに依存して、プローブの標識化は異なる。この目的のために多くのキットが市販されている。オリゴヌクレオチドを32-Pで標識する1つの方法には、[-32P]ATP (Amersham Arlington Heights、IL) およびT4ポリヌクレオチドキナーゼ (New England Biolabs、Beverly、MA) の使用、続くカラム精製が含まれる。

#### 【0123】

キメラな抗CSA p抗体の調製

50

一般に、キメラな抗CSAp MA bを調製するために、CSAp抗体のV<sub>H</sub>鎖およびV鎖を、上記に記載される方法などの方法によって得ることができ、そしてPCRによって増幅することができる。好ましい実施形態において、キメラな抗CSAp抗体はMu-9抗体である。VのPCR産物を、Leungら(Hybridoma、13:469~476(1994))によって記載されるように、pBR327に基づく段階化ベクター(VKpBR)にサブクローニングすることができる。V<sub>H</sub>のPCR産物は、pBluescriptに基づく類似する段階化ベクター(VHpBS)にサブクローニングすることができる。V配列含有フラグメントおよびV<sub>H</sub>配列含有フラグメントを、プロモーター配列およびシグナルペプチド配列と一緒に、これらの段階化ベクターから、HindIIIおよびBamHIの制限エンドヌクレアーゼを使用して切り出すことができる。Vフラグメント(約600bp)は哺乳動物発現ベクター(例えば、pKh)に従来のようにサブクローニングすることができる。pKhは、ヒト定常領域のゲノム配列、Igエンハンサー、エンハンサーおよびヒグロマイシン耐性遺伝子を含むpSVhyg型の発現ベクターである。同様に、約800bpのV<sub>H</sub>フラグメントは、ヒトIgG1定常領域のゲノム配列、Igエンハンサーおよびキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(gpt)遺伝子を有するpSVgpt型の発現ベクターであるpG1gにサブクローニングすることができる。これらの2つのプラスミドは、エレクトロポレーションによってSp2/0-Ag14細胞などの哺乳動物細胞に同時トランスフェクションすることができ、そしてヒグロマイシン耐性について選択することができる。選択を生き延びたクローンは拡大培養され、上清液がcMu-9mAbの産生についてELISA法によってモニターされる。約1~10×10<sup>6</sup>細胞のトランスフェクション効率が望まれる。0.10μg/ml~2.5μg/mlの抗体発現レベルをこのシステムにより期待することができる。

#### 【0124】

あるいは、V発現カセットおよびV<sub>H</sub>発現カセットを、改変された段階化ベクターのVKpBR2およびVHpBS2において組み立てることができ、これらの発現カセットは、Sp2/0-Ag14細胞における発現について、Gillesら、J. Immunol. Methods、125:191(1989); Losmanら、Clin. Cancer Res.、5:3101(1999); およびLosmanら、Cancer、80:2660(1997)に記載されるように、XbaI/BamHIフラグメントおよびXhoI/BamHIフラグメントとしてそれぞれ切り出され、単一の発現ベクター(pdHL2など)にサブクローニングすることができる。本発明において有用な別のベクターは、Barnesら、Cytotechnology、32:109~123(2000)に記載されるようなGSベクターであり、これは好ましくはNS0細胞株およびCHO細胞において発現する。他の適切な哺乳動物発現システムが、Wernerら、Arzneim-Forsch./Drug Res.、48(II)、第8号、870~880(1998)に記載される。

#### 【0125】

V配列およびV<sub>H</sub>配列は、Orlandiら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86:3833(1989))(これは参照することにより本明細書に組み込まれる)により記載されるようにPCRによって増幅することができる。Vk配列は、CK3BHおよびV5-3のプライマー(Leungら、BioTechniques、15:286(1993)、この文献は参照することにより本明細書に組み込まれる)を使用して増幅することができ、一方、V<sub>H</sub>配列は、ネズミIgGのCH1領域にアニーリングするプライマーCH1Bと、プライマーVHIBACK(Orlandiら、1989、上記)とを使用して増幅することができる。10μlの第1鎖cDNA産物、9μlの10XPCR緩衝液[500mMのKCl、100mMのTris-HCl(pH8.3)、15mMのMgCl<sub>2</sub>、および0.01%(w/v)のゼラチン](Perkin Elmer Cetus、Norwalk、Conn.)を含むPCR反応混合物を30サイクルのPCRに供することができる。それぞれのPCRサイクルは、好ましく

は、94 で1分間の変性、50 で1.5分間のアニーリング、および72 で1.5分間の重合化からなる。増幅されたV<sub>k</sub>フラグメントおよびV<sub>H</sub>フラグメントは2%アガロース(BioRad、Richmond、Calif.)で精製することができる。

#### 【0126】

ヒト化抗CSAp抗体の調製

好ましい実施形態において、ヒト化抗CSAp抗体はヒト化Mu-9抗体である。hMu-9V<sub>H</sub>ドメインおよびhMu-9V<sub>H</sub>ドメインに対する配列が設計されると、CDRグラフト化を、テンプレートとしての長い合成DNAオリゴヌクレオチドと、プライマーとしての短いオリゴヌクレオチドとをPCR反応において使用する遺伝子合成によって達成することができる。ほとんどの場合、V<sub>H</sub>ドメインまたはV<sub>H</sub>ドメインをコードするDNAは約350bpの長さである。コドン縮重性を利用することによって、1つしか存在しない制限部位を、コードされるアミノ酸を変化させることなく、V<sub>H</sub>遺伝子DNA配列の中央部に近い領域に容易に導入することができる。例えば、hMu-9V<sub>H</sub>ドメインについてはDNAヌクレオチド位132~137(アミノ酸位44~46)において、最初に設計されたアミノ酸配列を維持しながら、1つしか存在しないXbaI部位を挿入することができる(図11Aの配列を参照のこと)。XbaI部位の上流側および下流側の2つの長い非重複性の一本鎖DNAオリゴヌクレオチド(約150bp)を、自動化されたオリゴヌクレオチド合成機(Cyclone Plus DNA合成機、Milligen-Bioscience)によって作製することができる。全長DNAオリゴヌクレオチドの収率は低いことが予想され得るので、全長DNAオリゴヌクレオチドは、PCR反応において2対の両端オリゴヌクレオチドによって増幅することができる。これらのプライマーは、その後の配列組み立ておよびサブクロニングを容易にするために必要な制限部位を伴って設計することができる。オリゴヌクレオチドに対するプライマーは、得られるPCR産物がXbaIにおいて読み枠を合わせて連結されて、hMu-9V<sub>H</sub>ドメインをコードする全長のDNA配列を得ることができるよう、重複する配列をXbaI部位において含有しなければならない。XbaI部位におけるオリゴに対するPCR産物の連結、および段階化ベクター(VHpbS)のPstII/BstEII部位へのそれらのサブクロニングは、1回の3-フラグメント連結工程で完了させることができる。VHpbSへの正しい配列のサブクロニングは、制限消化分析によって最初に分析することができる。続いて、Sangerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、74、5463(1977)に従った配列決定反応によって確認することができる。

#### 【0127】

Igプロモーター、リーダー配列およびhMu-9V<sub>H</sub>配列を含有するHindIII/BamHIフラグメントを段階化ベクターから切り出して、ヒトIgG定常領域のゲノム配列、Igエンハンサーおよびgpt選択マーカ含有するpSVgpt型ベクターのpG1gにおける対応する部位にサブクロニングし、これにより最終的な発現ベクターhMu-9pG1gを形成させることができる。類似する方法を、hMu-9V<sub>H</sub>配列を構築するために用いることができる。長いオリゴヌクレオチドに対するPCR産物を連結するために選ばれた制限部位は、この場合にはNruIであり得る。

#### 【0128】

Igプロモーター、リーダー配列およびhMu-9V<sub>H</sub>配列を含有するDNA配列を、HindIII/BamHIを用いた処理によって段階化ベクターVKpBRから切り出すことができ、その後、ヒト鎖定常領域のゲノム配列、ヒグロマイシン選択マーカ、Igエンハンサーおよびエンハンサーを含有するpSVhyg型ベクターのpKhの対応する部位にサブクロニングし、これにより最終的な発現ベクターhMu-9pKhを形成させることができる。

#### 【0129】

これらの2つのプラスミドは、適切な細胞に、例えば、メラノーマSp2/0-Ag14に同時トランスフェクションし、コロニーをヒグロマイシン耐性について選択することができ、そして上清液を、下記に記載されるように、例えば、ELISAアッセイによって

hMu-9抗体の産生についてモニターすることができる。あるいは、V発現カセットおよびVH発現カセットを、改変された段階化ベクターのVKpBR2およびVHpBS2において組み立てることができ、これらの発現カセットは、Sp2/0-Ag14細胞における発現について、Gillesら、J. Immunol. Methods、125:191(1989); Losmanら、Clin. Cancer Res.、5:3101(1999); およびLosmanら、Cancer、80:2660(1997)に記載されるように、XbaI/BamHIフラグメントおよびXhoI/BamHIフラグメントとしてそれぞれ切り出され、単一の発現ベクター(pdHL2など)にサブクローニングすることができる。本発明において有用な別のベクターは、Barnesら、Cytotechnology、32:109~123(2000)に記載されるようなGSベクターであり、これは好ましくはNS0細胞株およびCHO細胞において発現する。他の適切な哺乳動物発現システムが、Wernerら、Arzneim-Forsch./Drug Res.、48(II)、第8号、870~880(1998)に記載される。

10

20

30

40

50

#### 【0130】

トランスフェクションおよびELISAによる抗体分泌クローンに対するアッセイを下記のように行うことができる。約10 $\mu$ gのhMu-9pKh(軽鎖発現ベクター)および20 $\mu$ gのhMu-9pG1g(重鎖発現ベクター)を、Coら、J. Immunol.、148:1149(1992)(この文献は参照することにより本明細書に組み込まれる)に従って5 $\times$ 10<sup>6</sup>個のSP2/0ミエローマ細胞をエレクトロポレーション(BioRad、Richmond、Calif.)によりトランスフェクションするために使用することができる。トランスフェクション後、細胞を完全HSFM培地(GIBCO、Gaithersburg、Md.)において、37 $^{\circ}$ Cおよび5%CO<sub>2</sub>で、96ウエルマイクロタイタープレートで生育させることができる。選抜プロセスを、500 $\mu$ g/mlのヒグロマイシンの最終濃度でヒグロマイシン選択培地(Calbiochem、San Diego、Calif.)を加えることによって2日後に開始することができる。コロニーが、典型的には、エレクトロポレーションの2週間後~3週間後に出現する。その後、培養物をさらなる分析のために拡大することができる。

#### 【0131】

クローンのスクリーニングおよび抗体の単離

キメラな重鎖またはヒト化された重鎖の分泌について陽性であるトランスフェクターマコロニーをELISAアッセイによって同定することができる。簡単に記載すると、トランスフェクターマ培養物に由来する上清サンプル(100 $\mu$ l)を、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント特異的抗体のヤギ抗ヒト(GAH)-IgG(Jackson ImmunoResearch、West Grove、Pa.)で予備コーティングされたELISAマイクロタイタープレートに三連で加える。プレートを室温で1時間インキュベーションする。非結合のタンパク質を、洗浄緩衝液(0.05%ポリソルベート20を含有するPBS)で3回洗浄することによって除く。Fcフラグメント特異的抗体の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲート化GAH-IgG(Jackson ImmunoResearch、West Grove、Pa.)をウエルに加える(10<sup>4</sup>倍希釈された抗体ストック液の100 $\mu$ l、これには、非コンジュゲート化抗体が1.0 $\mu$ g/mlの最終濃度で補充された)。1時間のインキュベーションの後、プレートを典型的には3回洗浄する。反応溶液[100 $\mu$ l、167 $\mu$ gのオルトフェニレンジアミン(OPD)(Sigma、St. Louis、Mo.)、0.025%過酸化水素をPBSに含有する]をウエルに加える。色を暗所で30分間発色させる。反応を、50 $\mu$ lの4N HCl溶液を各ウエルに添加することによって停止させ、その後、490nmにおける吸光度を自動化ELISA読み取り装置(Bio-Tek instruments、Winooski、Vt.)で測定する。結合したキメラ抗体が、その後、非関連のキメラ抗体標準品(Scotgen, Ltd.(Edinburgh、スコットランド)から入手可能)に対して求められる。

## 【0132】

抗体は下記のように培養培地から単離することができる。トランスフェクターマの培養を無血清培地に順応させる。キメラ抗体を製造するために、細胞を、H S F Mを使用してローラーボトルにおいて500ml培養物として生育させる。培養物を遠心分離し、上清を0.2ミクロンのメンブランでろ過する。ろ過された培地をプロテインAカラム(1×3cm)に1ml/分の流速で通す。その後、樹脂は約10カラム容量のPBSで洗浄され、そしてプロテインAに結合した抗体が、10mMのEDTAを含有する0.1Mグリシン緩衝液(pH3.5)でカラムから溶出される。1.0mlの画分が、10μlの3M Tris(pH8.6)を含有するチューブに集められ、タンパク質濃度が280/260nmにおける吸光度から決定される。ピーク画分がまとめられ、PBSに対して透析され、そして抗体が、例えば、Centricon30(Amicon、Beverly、Mass.)を用いて濃縮される。抗体濃度が、前記のように、ELISAによって測定され、その濃度が、PBSを使用して約1mg/mlに調節される。アジ化ナトリウム(0.01%(w/v))が、好都合には、保存剤としてサンプルに添加される。

10

## 【0133】

キメラ抗CSAp抗体またはヒト化抗CSAp抗体またはヒト抗CSAp抗体の親和性は、下記に例示されるように、直接的な結合アッセイまたは競合的結合アッセイを使用して評価することができる。

## 【0134】

組換え抗体の改変/最適化

ヒト化は抗体親和性の低下または喪失さえも生じさせることがあるので、元の親和性を回復するためには、さらなる改変が必要であると考えられる(例えば、Tempestra、Bio/Technology、9:266(1991);Verhoevenら、Science、239:1534(1988)を参照のこと、これらの文献は参照することにより本明細書に組み込まれる)。cMu-9は、そのネズミ対応体の結合親和性に匹敵し得る結合親和性を示すことが知られているので、hMu-9の最初の形態における不完全な設計体を(それらが存在する場合には)、cMu-9の軽鎖および重鎖を混ぜ、ヒト化形態の軽鎖および重鎖に一致させることによって同定することができる。好ましくは、フレームワーク領域内のいくつかのヒト残基がそれらのネズミ対応体によって置換される。同様に好ましくは、2つの異なるヒト抗体(例えば、EUおよびNEWM)に由来するフレームワーク配列の組合せがV<sub>H</sub>のために使用される。例えば、FR1~3をEUに由来させることができ、FR4をNEWMに由来させることができる。

20

30

## 【0135】

他の改変、例えば、Asn結合型グリコシル化部位を、オリゴヌクレオチド誘導による従来の部位特異的変異誘発によってキメラMu-9抗体またはヒトMu-9抗体またはヒト化Mu-9抗体に導入することができる。オリゴヌクレオチド誘導の変異誘発に関する詳細なプロトコルおよびクローニングされたDNAの変異誘発に対する関連技術は広く知られている。例えば、上記のSambrookらおよびAusubelらを参照のこと。

## 【0136】

例えば、AsnをhMu-9V<sub>H</sub>の18位(図4B)に導入するために、コドン18をArgに対するCGAからAACに変えることができる。これを達成するために、抗体軽鎖配列を含有する一本鎖DNAテンプレートが、少数のウラシルをチミジンの代わりに含有する一本鎖DNA分子を得るために好適な大腸菌株(例えば、dut<sup>-</sup>、ung<sup>-</sup>)から調製される。そのようなDNAテンプレートは、M13クローニングによって、またはSP6プロモーターを使用するインビトロ転写によって得ることができる。例えば、Ausubelら編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(John Wiley & Sons、NY、1987)を参照のこと。変異配列を含有するオリゴヌクレオチドが従来のように合成され、これを一本鎖テンプレートにアニリングし、生成物をT4DNAポリメラーゼおよびT4DNAリガーゼで処理して、二本鎖DNA分子が得られる。野生型大腸菌(dut<sup>+</sup>、ung<sup>+</sup>)細胞をこの二本鎖D

40

50

NAで形質転換することにより、変異DNAの効率的な回収がもたらされる。

【0137】

あるいは、Asn結合型グリコシル化部位は、プライマーとして所望の変異を含有するオリゴヌクレオチドとVk鎖に対する可変領域のDNAクローンとを使用して、または目的とする抗体を産生する細胞からのRNAをテンプレートとして使用することによって抗体軽鎖に導入することができる。Huse、ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL GUIDE (Boerrebaeck編、W.H. Freeman & Co.、103頁~120頁、1992)もまた参照のこと。部位特異的変異誘発を、例えば、TRANSFORMER(商標)キット(Clonetech、Palo Alto、Calif.)を製造者の説明書に従って使用して行うことができる。

10

【0138】

あるいは、グリコシル化部位は、共通的にプライマー伸長するオリゴヌクレオチドを用いて抗体鎖を合成することによって導入することができる。この場合、1つのそのようなオリゴヌクレオチドが所望の変異を含有する。例えば、Uhlmann、Gene、71:29(1988); Wosnickら、Gene、60:115(1988); Ausubelら(上記)を参照のこと(これらの文献は参照することにより本明細書に組み込まれる)。

【0139】

上記の一般的な記載は、抗体の軽鎖の18位にAsnグリコシル化部位を導入することを示しているが、Asn結合型グリコシル化部位を、軽鎖内において、または重鎖可変領域内においてさえも、そのどこにでも導入することは可能であることが当業者には理解される。

20

【0140】

抗体結合親和性の測定

そのようにして単離された、単離されたネズミMu-9抗体、ヒトMu-9抗体、ヒト化Mu-9抗体およびキメラMu-9抗体の比較され得る結合親和性を直接的な放射免疫アッセイによって測定することができる。Mu-9は、クロラミンT法を使用して<sup>131</sup>Iまたは<sup>125</sup>Iで標識することができる(例えば、Greenwoodら、Biochem. J.、89:123(1963)を参照のこと、この文献は、参照することにより本明細書に組み込まれる)。ヨウ素化された抗体の比活性は、典型的には、約10μCi/μgに調節される。非標識抗体および標識抗体は、反応培地(1%ウマ血清および100μg/mlのゲンタマイシンが補充されたHSFM)を使用して適切な濃度に希釈される。標識抗体および非標識抗体の両方の適切な濃度が100μlの総容量で反応チューブに一緒に加えられる。GW-39腫瘍細胞の培養物がサンプル採取され、細胞濃度が測定される。培養物を遠心分離し、集められた細胞を反応培地で1回洗浄し、その後、細胞は反応培地に約10<sup>7</sup>細胞/mlの最終濃度に再懸濁される。すべての手順は4の冷所で行われる。細胞懸濁物(100μl)が反応チューブに加えられる。反応は、細胞を再懸濁するために反応チューブを定期的に穏やかに振とうしながら4で2時間行われる。反応期間後、5mlの洗浄緩衝液(1%BSAを含有するPBS)が各チューブに加えられる。懸濁物を遠心分離して、細胞ペレットを別の5mlの洗浄緩衝液でもう1回洗浄する。遠心分離後、細胞ペレットに残っている残留放射能の量がカウンター(Minax、Packard Instruments、Sterling、Va.)で測定される。

30

40

【0141】

III. 抗体フラグメントの製造

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントを知られている様々な技術によって作製することができる。抗体フラグメントは抗体の抗原結合部分であり、例えば、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、sFvなどである。他の抗体フラグメントには、抗体分子のペプシン消化によって生じ得るF(ab')<sub>2</sub>フラグメント、およびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって作製され得るFab'フラグメントが含まれるが、これらに限定されない。あるいは、Fab'発現ライブラリーを、所望す

50

る特異性を有するモノクローナル Fab' フラグメントの迅速かつ容易な同定を可能にするために構築することができる (Huseら、1989、Science、246:1274~1281)。本発明には、様々な抗体および抗体フラグメントが含まれる。

#### 【0142】

単鎖 Fv 分子 (scFv) は VL ドメインおよび VH ドメインを含む。VL ドメインおよび VH ドメインは会合して、標的結合部位を形成する。これらの 2 つのドメインはさらに、ペプチドリンカー (L) によって共有結合的に連結される。scFv 分子は、VL ドメインが scFv 分子の N 末端部分である場合には VL-L-VH として、または VH ドメインが scFv 分子の N 末端部分である場合には VH-L-VL として、そのいずれかで示される。scFv 分子の作製方法および好適なペプチドリンカーの設計方法が、米国特許第 4,704,692 号、米国特許第 4,946,778 号; R. Raag および M. Whitlow、「単鎖 Fv」、FASEB、第 9 巻:73~80 (1995); および R. E. Bird および B. W. Walker、「単鎖抗体可変領域」、TIBTECH、第 9 巻:132~137 (1991) に記載される。これらの参考文献は参照することにより本明細書中に組み込まれる。

#### 【0143】

高親和性の scFv を得るために、大きいレパートリーを有する scFv ライブラリーを、すべての知られている  $V_H$  遺伝子ファミリーおよび  $V_L$  遺伝子ファミリーおよび  $V$  遺伝子ファミリーに対応する PCR プライマーを使用して非免疫化ヒトドナーから  $V$  遺伝子を単離することによって構築することができる。例えば、Vaughnら、Nat. Biotechnol.、14:309~314 (1996) を参照のこと。増幅後、 $V$  プールおよび  $V_L$  プールは一緒にされて、1 つのプールにされる。これらのフラグメントはファージミドベクターに連結される。その後、scFv リンカー ( $Gly_4-Ser$ )<sub>3</sub> が  $V_L$  フラグメントの上流においてファージミド内に連結される。 $V_H$  フラグメントおよびリンカー- $V_L$  フラグメントが増幅され、 $J_H$  領域で組み立てられる。得られる  $V_H$ -リンカー- $V_L$  フラグメントがファージミドベクター内に連結される。ファージミドライブラリーは、上記に記載されるようにフィルターを使用して、または免疫チューブ (Nunc; Maxisorp) を使用してパンニングすることができる。類似する結果を、免疫化されたウサギのリンパ球または脾臓細胞からコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーを構築することによって、そして P. pastoris において scFv 構築物を発現させることによって達成することができる。例えば、Ridderら、Biotechnology、13:255~260 (1995) を参照のこと。さらには、適切な scFv を単離した後、結合親和性がより大きく、かつ解離速度がより遅い抗体フラグメントを、CDR3 変異誘発および鎖シャッフリングなどの親和性成熟化プロセスによって得ることができる。例えば、Jacksonら、Br. J. Cancer、78:181~188 (1998); Osbournら、Immunotechnology、2:181~196 (1996) を参照のこと。

#### 【0144】

抗体フラグメントは、全長の抗体をタンパク質分解的に加水分解することによって、またはフラグメントをコードする DNA を大腸菌もしくは別の宿主で発現させることによって調製することができる。抗体フラグメントは、全長の抗体を従来の方法によりペプシン消化またはパイン消化することによって得ることができる。例えば、抗体フラグメントは、 $F(ab')_2$  として示される 5S フラグメントを得るためにペプシンで抗体を酵素切断することによって製造することができる。このフラグメントはさらに、3.5S の Fab' 一価フラグメントを製造するために、チオール還元剤と、任意選択的にジスルフィド架橋の切断から生じるスルフィドリル基に対する遮断基とを使用して切断することができる。あるいは、パインを使用する酵素切断により、直接、2 つの一価 Fab フラグメントおよび 1 つの Fc フラグメントが得られる。これらの方法は、例えば、Goldenberger、米国特許第 4,036,945 号および同第 4,331,647 号ならびにそれらに含まれる参考文献に記載される (そのような特許は、参照することによりその全体を

本明細書中に組み込むものとする)。また、Nisonoffら、Arch. Biochem. Biophys., 89:230(1960); Porter, Biochem. J., 73:119(1959); Edelmanら、METHODS IN ENZYMOLOGY、第1巻、422頁(Academic Press、1967); Coligan、2.8.1頁~2.8.10頁および2.10頁~2.10.4頁も参照のこと。

#### 【0145】

抗体フラグメントの別の形態は、単一の相補性決定領域(CDR)をコードするペプチドである。CDRは、抗体が結合するエピトープに対して構造が相補的であり、かつ可変領域の残りよりも変化が大きい、抗体の可変領域のセグメントである。従って、CDRは超可変領域と呼ばれることがある。可変領域は3つのCDRを含む。CDRペプチドは、目的とする抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。そのような遺伝子は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して、抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成することによって調製される。例えば、Larrickら、Methods: A Companion to Methods in Enzymology、2:106(1991); Courtenay-Luck、「モノクローナル抗体の遺伝子操作」、MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION(Ritterら(編)、166頁~179頁、Cambridge University Press、1995); およびWardら、「抗体の遺伝子操作および発現」、MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS(Birchら(編)、137頁~185頁、Wiley-Liss, Inc.、1995)を参照のこと。

#### 【0146】

完全な抗体によって認識される抗原にフラグメントが結合する限り、抗体を切断する他の方法、例えば、一価の軽鎖-重鎖フラグメントを形成させるための重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、あるいは他の酵素的または化学的または遺伝学的な技術などもまた使用することができる。

#### 【0147】

#### 二重特異性抗体の調製

様々なbsAbを当分野で知られている様々な技術によって調製することができる。例えば、抗CEA Abまたは抗CSAp Abおよび抗ペプチドAbとともに、ペプシンでそれらのそれぞれのF(ab')<sub>2</sub>に個々に消化される。抗CEA-Ab-F(ab')<sub>2</sub>または抗CSAp-Ab-F(ab')<sub>2</sub>はシステインで還元されて、Fab'の単量体ユニットが生じ、これはさらに架橋剤ビス(マレイミド)ヘキサンと反応して、Fab'-マレイミド体をもたらす。抗ペプチドAb-F(ab')<sub>2</sub>はシステインで還元され、そして精製され、回収された抗ペプチドFab'-SHは抗CEA-Fab'-マレイミドまたは抗CSAp-Fab'-マレイミドとそれぞれ反応して、Fab' x Fab'の二重特異性Abをもたらす。あるいは、抗ペプチドFab'-SHフラグメントは、F(ab')<sub>2</sub> x Fab'構築物を得るために抗CEAF(ab')<sub>2</sub>または抗CSApF(ab')<sub>2</sub>とそれぞれカップリングさせることができ、あるいはIgG x Fab'の二重特異性構築物を得るために抗CEAまたはMu-9IgGとカップリングさせることができる。1つの実施形態において、IgG x Fab'構築物を、過ヨウ素酸酸化され、続いて市販のヒドラジド-マレイミド架橋剤との反応によって活性化されている抗CEAまたはMu-9IgGの重鎖炭水化物に抗ペプチドFab'のチオール基を結合することによって部位特異的な様式で調製することができる。使用される成分Abは、知られている技術によってキメラ化またはヒト化することができる。キメラ抗体は、齧歯類抗体に由来する可変ドメインおよび相補性決定領域とを含有する組換えタンパク質であり、同時に、抗体分子の残りがヒト抗体に由来する。ヒト化抗体は、モノクローナル抗体のネズミ相補性決定領域がネズミ免疫グロブリンの重鎖可変部および軽鎖可変部からヒト可変ドメインの中

に移されている組換えタンパク質である。

【0148】

様々な組換え法を、二重特異性の抗体および抗体フラグメントを製造するために使用することができる。例えば、二重特異性の抗体および抗体フラグメントを遺伝子組換え家畜の乳汁中に産生させることができる。例えば、Colman, A., Biochem. Soc. Symp., 63:141~147, 1998; 米国特許第5,827,690号を参照のこと。対になった免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAセグメントをそれぞれ含有する2つのDNA構築物が調製される。これらのフラグメントは、乳腺上皮細胞において優先的に発現するプロモーター配列を含有する発現ベクターにクローニングされる。例には、ウサギ、ウシおよびヒツジのカゼイン遺伝子、ウシ - ラクトグロブリン遺伝子、ヒツジ - ラクトグロブリン遺伝子ならびにマウス乳漿酸性タンパク質遺伝子に由来するプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、挿入されたフラグメントは、乳腺特異的遺伝子に由来する同族のゲノム配列がその3'側で接する。これにより、ポリアデニル化部位および転写物安定化配列が提供される。これらの発現カセットは哺乳動物受精卵の前核に同時注入され、その後、受精卵を、移植されるメスの子宮に着床させ、妊娠させる。出生後、子孫は、サザン分析によって両方の導入遺伝子の存在についてスクリーニングされる。抗体が存在するためには、重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子の両方が、同じ細胞において同時に発現しなければならない。遺伝子組換え体のメスから得られた乳汁が、当分野で知られている標準的な免疫学的方法を使用して、抗体または抗体フラグメントの存在および機能性について分析される。抗体は、当分野で知られている標準的な方法を使用して乳汁から精製することができる。

【0149】

キメラAbは、マウスの軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインをコードするcDNAフラグメントを、ヒト抗体に由来するCドメインをコードするフラグメントに連結することによって構築される。Cドメインは抗原との結合に寄与しないので、キメラ抗体は、元のマウスAbと同じ抗原特異性を保持しているが、配列がヒト抗体に一層近いものになっている。しかし、キメラAbは一部のマウス配列を依然として含有しており、依然として免疫原性であり得る。ヒト化Abは、抗原を認識するために必要なそのようなマウスアミノ酸のみを含有する。この製造物は、マウスの相補性決定領域に由来するアミノ酸をヒト抗体のフレームワーク内に組み立てることによって構築される。

【0150】

bsAbを製造するための他の最近の方法では、より共通的な免疫グロブリンイソ型よりも強く架橋するようにさらなるシステイン残基を有する操作された組換えAbが含まれる。例えば、FitzGeraldら、Protein Eng., 10(10):1221~1225, 1997を参照のこと。別の方法は、必要とされる二重の特異性を有する2つ以上の異なる単鎖抗体または抗体フラグメントのセグメントを連結している組換え融合タンパク質を操作することである。例えば、Colomaら、Nature Biotech., 15:159~163, 1997を参照のこと。様々な二重特異性の融合タンパク質を、分子操作を使用して製造することができる。1つの形態において、二重特異性の融合タンパク質は一価であり、例えば、1つの抗原に対して1つの結合部位を有するscFvと、別の抗原に対して1つの結合部位を有するFabフラグメントとからなる。別の形態では、二重特異性の融合タンパク質は二価であり、例えば、1つの抗原に対して2つの結合部位を有するIgGと、別の抗原に対して2つの結合部位を有する2つのscFvとからなる。

【0151】

機能的な二重特異性の単鎖抗体(bscAb)(これもまた二重特異性抗体(diabody)と呼ばれる)を、組換え法を使用して哺乳動物細胞において産生させることができる。例えば、Mackら、Proc. Natl. Acad. Sci., 92:7021~7025, 1995を参照のこと。例えば、bscAbが、組換え法を使用して、グリシン-セリンリンカーを介して2つの単鎖Fvフラグメントを連結することによって製造さ

れる。目的とする2つの抗体のV軽鎖(V<sub>L</sub>)ドメインおよびV重鎖(V<sub>H</sub>)ドメインが、標準的なPCR法を使用して単離される。その後、それぞれのハイブリドーマから得られたV<sub>L</sub>cDNAおよびV<sub>H</sub>cDNAが、単鎖フラグメントを得るために、2段階の融合PCRで連結される。最初のPCR工程により、(Gly<sub>4</sub>-Ser<sub>1</sub>)<sub>3</sub>リンカーが導入され、2番目の工程により、V<sub>L</sub>アンプリコンおよびV<sub>H</sub>アンプリコンが連結される。その後、それぞれの単鎖分子が細菌発現ベクターにクローニングされる。増幅後、単鎖分子の一方が切り出され、目的とする第2の単鎖分子を含有するもう一方のベクターにサブクローニングされる。得られるbscAbフラグメントが真核生物発現ベクターにサブクローニングされる。機能的なタンパク質の発現を、ベクターをチャイニーズハムスター卵巣細胞にトランスフェクションすることによって得ることができる。二重特異性の融合タンパク質が類似する様式で調製される。二重特異性の単鎖抗体および二重特異性の融合タンパク質は本発明の範囲に含まれる。大腸菌および酵母において製造される、二重特異性抗体および三重特異性抗体(triobody)および四重特異性抗体(tetrabody)の二重特異性融合タンパク質が、米国仮特許出願第60/345,641号、同第60/328,835号および同第60/342,103号に記載される(これらの文献は参照することにより本明細書中に組み込まれる)。

10

## 【0152】

2つ以上の異なる単鎖抗体または抗体フラグメントを連結している二重特異性の融合タンパク質が類似する様式で製造される。

## 【0153】

多量のbscAbおよび融合タンパク質を、大腸菌発現システムを使用して製造することができる。例えば、Zhenpingら、Biotechnology、14:192~196、1996を参照のこと。機能的なbscAbを、2つの「クロスオーバー」scFvフラグメントを大腸菌において同時発現させることにより製造することができる。この場合、そのような2つのフラグメントに対するV<sub>L</sub>ドメインおよびV<sub>H</sub>ドメインは異なるポリペプチド鎖上に存在している。目的とする2つの抗体のV軽鎖(V<sub>L</sub>)ドメインおよびV重鎖(V<sub>H</sub>)ドメインが、標準的なPCR法を使用して単離される。その後、目的とする第1の抗体のV<sub>L</sub>ドメインのC末端が第2の抗体のV<sub>H</sub>ドメインのN末端にリンカーを介して連結されるように、これらのcDNAが細菌発現ベクターに連結される。同様に、目的とする第2の抗体のV<sub>L</sub>ドメインのC末端が第1の抗体のV<sub>H</sub>ドメインのN末端にリンカーを介して連結される。得られるニシストロン性オペロンが、強力なプロモーター(例えば、リン酸塩の飢餓により誘導可能な大腸菌アルカリホスファターゼプロモーター)の転写制御下に置かれる。あるいは、単鎖融合構築物は、lacプロモーターと、2%グリセリンおよび1%トリトンX-100からなる培地とを使用して大腸菌において発現させることに成功している。例えば、Yangら、Appl. Environ. Microbiol.、64:2869~2874、1998を参照のこと。大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIのシグナル配列が、ペプチドを細胞周辺腔に向かわせるために使用される。分泌後、2つのペプチド鎖は会合して、両方の抗原結合特異性を有する非共有結合によるヘテロダイマーを形成する。bscAbは、当分野で知られている標準的な手法を使用して、例えば、ブドウ球菌プロテインAクロマトグラフィーを使用して精製される。

20

30

40

## 【0154】

機能的なbscAbおよび融合タンパク質はまた、遺伝子組換え家畜の乳汁中に産生させることができる。例えば、Colman, A., Biochem. Soc. Symp., 63:141~147、1998;米国特許第5,827,690号を参照のこと。上記に記載されるようにして得られるbscAbフラグメントは、乳腺上皮細胞において優先的に発現するプロモーター配列を含有する発現ベクターにクローニングされる。例には、ウサギ、ウシおよびヒツジのカゼイン遺伝子、ウシ-ラクトグロブリン遺伝子、ヒツジ-ラクトグロブリン遺伝子ならびにマウス乳漿酸性タンパク質遺伝子に由来するプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、挿入されたbscAbは、乳腺特異的遺伝子に由来する同族のゲノム配列がその3'側で接する。これにより、ポリア

50

デニル化部位および転写物安定化配列が提供される。その後、発現カセットが哺乳動物受精卵の前核に同時注入され、その後、受精卵を、移植されるメスの子宮に着床させ、妊娠させる。出生後、子孫は、導入されたDNAの存在についてサザン分析によりスクリーニングされる。遺伝子組換え体のメスから得られた乳汁が、当分野で知られている標準的な免疫学的方法を使用してb s c A bの存在および機能性について分析される。b s c A bは、当分野で知られている標準的な方法を使用して乳汁から精製することができる。乳汁におけるb s c A bの遺伝子組換え製造は、多量のb s c A bを得るための効率的な方法を提供する。

#### 【0155】

機能的なb s c A bおよび融合タンパク質はまた、遺伝子組換え植物において製造することができる。例えば、Fiedlerら、*Biotech.*、13:1090~1093、1995; Fiedlerら、*Immunotechnology*、3:205~216、1997を参照のこと。そのような製造により、低コスト、大規模生産および安定かつ長期間の貯蔵を含むいくつかの利点を提供される。上記に記載されるようにして得られたb s c A bフラグメントは、プロモーター配列を含有し、かつ小胞体にタンパク質を向かわせるためのシグナルペプチド配列をコードする発現ベクターにクローニングされる。発現産物を植物内の特定の位置に向かわせることを可能にする様々なプロモーターを利用することができる。例えば、タバコ植物における遍在的な発現を、強力なカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターを使用することによって達成することができ、これに対して、器官特異的な発現が種子特異的なレグミンB4プロモーターによって達成される。発現カセットが、当分野で知られている標準的な方法に従って形質転換される。形質転換はサザン分析によって確認される。遺伝子組換え植物は、当分野で知られている標準的な免疫学的方法を使用してb s c A bの存在および機能性について分析される。b s c A bは、当分野で知られている標準的な方法を使用して植物組織から精製することができる。

10

20

#### 【0156】

さらに、遺伝子組換え植物はb s c A bおよび融合タンパク質の長期間の貯蔵を容易にする。機能的に活性なs c F vタンパク質が、室温で1週間貯蔵された後のタバコの葉から抽出されている。同様に、室温で1年間貯蔵された遺伝子組換えタバコの種子は、s c F vタンパク質またはその抗原結合活性の喪失を全く示していない。

30

#### 【0157】

機能的なb s c A bおよび融合タンパク質はまた、昆虫細胞において製造することができる。例えば、Mahiouzら、*J. Immunol. Methods*、212:149~160(1998)を参照のこと。昆虫に基づく発現システムにより、多量の均一かつ正しく折り置かれたb s c A bを製造する手段が提供される。バキュロウイルスが、昆虫細胞のために広く使用されている発現ベクターであり、組換え抗体分子への適用に成功している。例えば、Miller, L. K.、*Ann. Rev. Microbiol.*、42:177(1988); Beiら、*J. Immunol. Methods*、186:245(1995)を参照のこと。あるいは、誘導可能な発現システムを、b s c A b構築物を誘導可能なプロモーターの転写制御下に含有する安定な昆虫細胞株を作製することによって利用することができる。例えば、Mahiouzら、*J. Immunol. Methods*、212:149~160(1998)を参照のこと。上記に記載されるようにして得られたb s c A bフラグメントは、ショウジョウバエ(*Drosophila*)メタロチオネインプロモーター配列およびヒトHLA-A2リーダー配列を含有する発現ベクターにクローニングされる。その後、構築物はキイロショウジョウバエ(*D. melanogaster*)SC-2細胞にトランスフェクションされる。発現が、銅または亜鉛またはカドミウムの上昇した量に細胞を曝すことによって誘導される。b s c A bの存在および機能性が、当分野で知られている標準的な免疫学的方法を使用して測定される。精製されたb s c A bが、当分野で知られている標準的な方法を使用して得られる。

40

#### 【0158】

50

本発明の好ましい二重特異性抗体は、M A b M u 9 の F v および M A b 6 7 9 の F v を含む抗体、または M A b M N 1 4 の F v および M A b 6 7 9 の F v を含む抗体、ならびにそれらのヒト対応体またはキメラ化対応体またはヒト化対応体である。従って、抗 C S A p 抗体フラグメントもまた本発明では考えられる。好ましくは、抗 C S A p 抗体フラグメントは M u - 9 抗体フラグメントである。M N 1 4 ならびにそのキメラ化対応体およびヒト化対応体が米国特許第 5 , 8 7 4 , 5 4 0 号に開示される。M u 9 または 6 7 9 の C D R の 1 つ以上を含む二重特異性の抗体もまた好ましい。抗体はまた、クラス I I I 抗 C E A 抗体と 6 7 9 の F v とを含む融合タンパク質または二重特異性の抗体であり得る。様々なクラス I I I 抗体 (クラス I I I 抗 C E A を含む) が米国特許第 4 , 8 1 8 , 7 0 9 号で詳しく議論されている。

10

## 【 0 1 5 9 】

I V . 処置および診断 / 検出のための抗体

処置および診断 / 検出のためのヒト化抗 C S A p 抗体およびキメラ抗 C S A p 抗体およびヒト抗 C S A p 抗体

本発明では、ヒト化抗 C S A p 抗体、キメラ抗 C S A p 抗体、ヒト抗 C S A p 抗体およびそれらのフラグメントの治療法および診断法における使用が考えられる。好ましくは、キメラ抗 C S A p 抗体、ヒト化抗 C S A p 抗体、ヒト抗 C S A p 抗体およびそれらのフラグメントは、キメラ M u - 9 抗体、ヒト化 M u - 9 抗体またはヒト M u - 9 抗体である。さらに好ましくは、本発明のキメラ M u - 9 抗体、ヒト化 M u - 9 抗体、ヒト M u - 9 抗体およびそれらのフラグメントは、悪性腫瘍を処置するための方法において使用される。例えば、本発明における特に注目される悪性腫瘍は、胃腸系のがん、より好ましくは、結腸および直腸のがん、膵臓のがん、ならびに卵巣がんである。

20

## 【 0 1 6 0 】

処置用の組成物は、少なくとも 1 つのむき出し状態のヒト化抗 C S A p 抗体またはキメラ抗 C S A p 抗体またはヒト抗 C S A p 抗体またはそれらのフラグメントを、単独で、または他の抗 C S A p 抗体もしくはその抗体フラグメント (他の抗 C S A p ヒト化抗体または抗 C S A p キメラ抗体または抗 C S A p ヒト抗体など) との組合せで含有する。本発明ではまた、少なくとも 1 つのむき出し状態のヒト化抗 C S A p 抗体またはキメラ抗 C S A p 抗体またはヒト抗 C S A p 抗体またはそれらのフラグメントを、抗 C S A p 抗体でない他の抗体またはその抗体フラグメントとの組合せで用いる処置が考えられ、それにより、これらの他の抗体を非コンジュゲート型 (むき出し状態) で投与することができ、または治療化合物とのコンジュゲート型で投与することができる。例えば、混合療法のために好適な他の抗体には、がん腫関連抗体およびそのフラグメント、例えば、C E A 、 E G P - 1 、 G a 7 3 3 抗原標的 (例えば、E G P - 2 、 1 7 - 1 A 、 K S 1 - 4 および E p - C A M の抗体などについて)、M U C 1 ~ M U C - 4 、 P A M - 4 、 K C 4 、 T A G - 7 2 、 E G F R 、 H E R 2 / n e u 、 B r E 3 、 L e - Y 、 K S - 1 および A 3 に対する抗体、抗壊死抗体、および A 3 3 抗体決定基などが含まれるが、これらに限定されない。好適な抗体にはまた、がん遺伝子マーカーもしくはがん遺伝子産物に対してターゲットィングされる抗体、または腫瘍 - 血管系マーカー (例えば、血管形成因子、V E G F) に対する抗体、およびある種の免疫応答調節因子に対する抗体 (C D 4 0 に対する抗体など) を挙げることができる。さらに、処置は、少なくとも 1 つのヒト化抗 C S A p 免疫コンジュゲート体またはキメラ抗 C S A p 免疫コンジュゲート体またはヒト抗 C S A p 免疫コンジュゲート体またはそれらのフラグメントを、単独で、あるいは他の抗 C S A p 抗体またはその抗体フラグメント (他の抗 C S A p ヒト化抗体または抗 C S A p キメラ抗体または抗 C S A p ヒト抗体など) との組合せで用いて行うことができる。さらに好ましくは、処置用の組成物は、少なくとも 1 つのヒト化抗 C S A p 免疫コンジュゲート体またはキメラ抗 C S A p 免疫コンジュゲート体またはヒト抗 C S A p 免疫コンジュゲート体またはそれらのフラグメントを、抗 C S A p 抗体でない他の抗体または抗体フラグメントと組み合わせて含有することができ、この場合、これらはむき出し状態または治療剤に対するコンジュゲート型のいずれかである。

30

40

50

## 【0161】

同様に、コンジュゲート型およびむき出し状態の抗CSApヒト化抗体または抗CSApキメラ抗体または抗CSApヒト抗体は単独で使用することができ、あるいは本明細書中に記載される様々な診断剤または治療剤とともに、しかし非コンジュゲート型で投与することができる。また、むき出し状態の抗体、あるいは同じまたは異なるエピトープまたは抗原に対するコンジュゲート化抗体もまた、本発明の抗体の1つ以上と組み合わせることができる。

## 【0162】

従って、本発明では、ヒト化Mu-9抗体、キメラMu-9抗体、ヒトMu-9抗体およびそれらのフラグメントを単独またはむき出し状態の抗体として投与すること、あるいは多モード治療として投与されるそのような抗体およびそれらのフラグメントの投与が考えられる。本発明の多モード治療はさらに、むき出し状態の抗体もしくは融合タンパク質の形態で、または免疫コンジュゲート体として他の抗体を投与することにより補われる、むき出し状態のCSAp抗体またはコンジュゲート化CSAp抗体を用いた免疫療法が含まれる。例えば、ヒト化Mu-9抗体、キメラMu-9抗体またはヒトMu-9抗体を、他のむき出し状態のヒト化Mu-9抗体、むき出し状態のキメラMu-9抗体またはむき出し状態のヒトMu-9抗体と、あるいはヒト化Mu-9免疫コンジュゲート体、キメラMu-9免疫コンジュゲート体またはヒトMu-9免疫コンジュゲート体（同位体、1つ以上の化学療法剤、サイトカイン、酵素、酵素阻害剤、ホルモンまたはホルモンアンタゴニスト、金属、毒素またはそれらの組合せに対してコンジュゲート化されたヒト化Mu-9抗体またはキメラMu-9抗体またはヒトMu-9抗体など）と組み合わせることができる。ヒト化Mu-9抗体またはキメラMu-9抗体またはヒトMu-9抗体と毒素との融合タンパク質もまた本発明において使用することができる。多くの異なる抗体組合せを、むき出し状態の抗体として、あるいは一部がむき出し状態であるので、一部が治療剤または免疫調節因子とのコンジュゲート型として、あるいは別の治療剤（細胞傷害性薬剤など）または放射線との単なる組合せで、そのいずれかで組み立てることができる。

## 【0163】

処置用の組成物は、少なくとも1つのヒト化モノクローナル抗CSAp抗体またはキメラモノクローナル抗CSAp抗体またはヒトモノクローナル抗CSAp抗体またはそれらのフラグメントを、単独で、または他の抗体およびそのフラグメント（他のむき出し状態もしくはコンジュゲート型のヒト化抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、融合タンパク質など）もしくは治療剤との組合せで含有する。特に、完全なヒト抗体を用いた混合療法もまた考えられ、そして上記に示されるような方法によってもたらされる。

## 【0164】

むき出し状態の抗体、あるいは同じまたは異なるエピトープまたは抗原に対するコンジュゲート化抗体、およびそれらのフラグメントもまた、本発明の抗体またはそのフラグメントの1つ以上と組み合わせることができる。例えば、ヒト化されたむき出し状態のMu-9抗体またはキメラ型のむき出し状態のMu-9抗体またはヒトのむき出し状態のMu-9抗体を別のむき出し状態のヒト化Mu-9抗体またはむき出し状態のキメラMu-9抗体またはむき出し状態のヒトMu-9抗体と組み合わせることができる、あるいはヒト化されたむき出し状態のMu-9抗体またはキメラ型のむき出し状態のMu-9抗体またはヒトのむき出し状態のMu-9抗体をMu-9免疫コンジュゲート体と組み合わせることができる、あるいはむき出し状態のMu-9抗体を異なる抗体放射性コンジュゲート体と組み合わせることができる、あるいは異なるむき出し状態の抗体を、同位体にコンジュゲート化されたか、または1つ以上の化学療法剤、サイトカイン、毒素、酵素、酵素阻害剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニストもしくはそれらの組合せにコンジュゲート化されたヒト化Mu-9抗体またはキメラMu-9抗体またはヒトMu-9抗体と組み合わせることができる。ヒト化Mu-9抗体またはキメラMu-9抗体またはヒトMu-9抗体と毒素または免疫調節因子との融合タンパク質もまた本発明において使用することができる。少なくとも2つの異なる抗原をターゲティングする多くの異なる抗体組合せを、むき出し状態

10

20

30

40

50

の抗体として、あるいは一部がむき出し状態で、一部が治療剤または免疫調節因子とのコンジュゲート型として、あるいは別の治療剤（細胞傷害性薬剤など）または放射線との単なる組合せで、そのいずれかで組み立てることができる。

**【0165】**

本発明の多モード治療にはさら、結腸直腸がんまたは卵巣がんによって発現される抗原に対する抗体を、むき出し状態の抗体、融合タンパク質、免疫コンジュゲート体およびそれらのフラグメントの形態で投与することにより補われる、むき出し状態のMu-9抗体またはそのフラグメントを用いた免疫療法が含まれる。好ましい実施形態において、多モード治療用の抗体またはそのフラグメントには、CEA、EGP-1、EGP-2、TAG-72、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、KC4、PAM-4、EGFR、BrE3、Le-Y、KS-1およびA3に対する抗体、A33抗体およびHER2/neu抗体およびそれらのフラグメント、ならびに血管形成因子（例えば、VEGF）に対する抗体、またはがん遺伝子マーカーもしくはがん遺伝子産物に対する抗体、ならびに免疫調節因子（例えば、CD40）に対する抗体が含まれるが、これらに限定されない。これらの抗体には、これらの抗原性決定基上の少なくとも1つのエピトープを認識するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体またはヒト化抗体およびそれらのフラグメントが含まれる。

10

**【0166】**

多モード治療の別の形態において、被験体には、むき出し状態の抗体もしくはそのフラグメントおよび/または免疫コンジュゲート体もしくはそのフラグメントが標準的ながん化学療法と一緒に与えられる。ホリニン酸と組み合わせた5-フルオロウラシルは、それだけで、またはイリノテカン（CPT-11）との組合せで、結腸直腸がんを処置するために使用される治療法である。混合化学療法による他の好適な治療法が当業者に広く知られている。例えば、オキサリプラチンを、単独で、またはこれらの他の薬物との組合せで用いた混合化学療法。卵巣がんでは、さらに別の化学療法剤、例えば、タキサン類および白金剤、チオ-TEPAおよび他のアルキル化剤（例えば、クロラムブチル）、ならびにゲムシタピンおよび他のより最近の種類の細胞傷害性薬物のいずれかの化学療法剤が好まれることがある。好ましい多モード治療において、化学療法薬物およびサイトカインの2つは、本発明による抗体または免疫コンジュゲート体または融合タンパク質と同時に投与される。サイトカイン、化学療法薬物、および抗体または免疫コンジュゲート体は、任意の順序で、または一緒に投与することができる。

20

30

**【0167】**

様々な他の化学療法剤を、混合処置のために、または免疫コンジュゲート体を作製するために使用することができる。そのような化学療法剤には、アドリアマイシン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、カルミノマイシン、ダウノマイシン、ドキシソルピシン、タモキシフェン、タキソール、タキソテレ、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピノレルピン、エトポシド（VP-16）、5-フルオロウラシル（5FU）、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、チオテパ、メトトレキサート、カンプトテシン、アクチノマイシン-D、マイトマイシンC、シスプラチン（CDDP）、アミノプテリン、コンプレタスタチン類、ネオマイシン、ポドフィロトキシン類、TNF- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 、 $\iota$ 、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$ 、 $\nu$ 、 $\xi$ 、 $\omicron$ 、 $\pi$ 、 $\rho$ 、 $\sigma$ 、 $\tau$ 、 $\upsilon$ 、 $\phi$ 、 $\chi$ 、 $\psi$ 、 $\omega$ 、 $\omega_1$ 、 $\omega_2$ 、 $\omega_3$ 、 $\omega_4$ 、 $\omega_5$ 、 $\omega_6$ 、 $\omega_7$ 、 $\omega_8$ 、 $\omega_9$ 、 $\omega_{10}$ 、 $\omega_{11}$ 、 $\omega_{12}$ 、 $\omega_{13}$ 、 $\omega_{14}$ 、 $\omega_{15}$ 、 $\omega_{16}$ 、 $\omega_{17}$ 、 $\omega_{18}$ 、 $\omega_{19}$ 、 $\omega_{20}$ 、 $\omega_{21}$ 、 $\omega_{22}$ 、 $\omega_{23}$ 、 $\omega_{24}$ 、 $\omega_{25}$ 、 $\omega_{26}$ 、 $\omega_{27}$ 、 $\omega_{28}$ 、 $\omega_{29}$ 、 $\omega_{30}$ 、 $\omega_{31}$ 、 $\omega_{32}$ 、 $\omega_{33}$ 、 $\omega_{34}$ 、 $\omega_{35}$ 、 $\omega_{36}$ 、 $\omega_{37}$ 、 $\omega_{38}$ 、 $\omega_{39}$ 、 $\omega_{40}$ 、 $\omega_{41}$ 、 $\omega_{42}$ 、 $\omega_{43}$ 、 $\omega_{44}$ 、 $\omega_{45}$ 、 $\omega_{46}$ 、 $\omega_{47}$ 、 $\omega_{48}$ 、 $\omega_{49}$ 、 $\omega_{50}$ 、 $\omega_{51}$ 、 $\omega_{52}$ 、 $\omega_{53}$ 、 $\omega_{54}$ 、 $\omega_{55}$ 、 $\omega_{56}$ 、 $\omega_{57}$ 、 $\omega_{58}$ 、 $\omega_{59}$ 、 $\omega_{60}$ 、 $\omega_{61}$ 、 $\omega_{62}$ 、 $\omega_{63}$ 、 $\omega_{64}$ 、 $\omega_{65}$ 、 $\omega_{66}$ 、 $\omega_{67}$ 、 $\omega_{68}$ 、 $\omega_{69}$ 、 $\omega_{70}$ 、 $\omega_{71}$ 、 $\omega_{72}$ 、 $\omega_{73}$ 、 $\omega_{74}$ 、 $\omega_{75}$ 、 $\omega_{76}$ 、 $\omega_{77}$ 、 $\omega_{78}$ 、 $\omega_{79}$ 、 $\omega_{80}$ 、 $\omega_{81}$ 、 $\omega_{82}$ 、 $\omega_{83}$ 、 $\omega_{84}$ 、 $\omega_{85}$ 、 $\omega_{86}$ 、 $\omega_{87}$ 、 $\omega_{88}$ 、 $\omega_{89}$ 、 $\omega_{90}$ 、 $\omega_{91}$ 、 $\omega_{92}$ 、 $\omega_{93}$ 、 $\omega_{94}$ 、 $\omega_{95}$ 、 $\omega_{96}$ 、 $\omega_{97}$ 、 $\omega_{98}$ 、 $\omega_{99}$ 、 $\omega_{100}$ 、 $\omega_{101}$ 、 $\omega_{102}$ 、 $\omega_{103}$ 、 $\omega_{104}$ 、 $\omega_{105}$ 、 $\omega_{106}$ 、 $\omega_{107}$ 、 $\omega_{108}$ 、 $\omega_{109}$ 、 $\omega_{110}$ 、 $\omega_{111}$ 、 $\omega_{112}$ 、 $\omega_{113}$ 、 $\omega_{114}$ 、 $\omega_{115}$ 、 $\omega_{116}$ 、 $\omega_{117}$ 、 $\omega_{118}$ 、 $\omega_{119}$ 、 $\omega_{120}$ 、 $\omega_{121}$ 、 $\omega_{122}$ 、 $\omega_{123}$ 、 $\omega_{124}$ 、 $\omega_{125}$ 、 $\omega_{126}$ 、 $\omega_{127}$ 、 $\omega_{128}$ 、 $\omega_{129}$ 、 $\omega_{130}$ 、 $\omega_{131}$ 、 $\omega_{132}$ 、 $\omega_{133}$ 、 $\omega_{134}$ 、 $\omega_{135}$ 、 $\omega_{136}$ 、 $\omega_{137}$ 、 $\omega_{138}$ 、 $\omega_{139}$ 、 $\omega_{140}$ 、 $\omega_{141}$ 、 $\omega_{142}$ 、 $\omega_{143}$ 、 $\omega_{144}$ 、 $\omega_{145}$ 、 $\omega_{146}$ 、 $\omega_{147}$ 、 $\omega_{148}$ 、 $\omega_{149}$ 、 $\omega_{150}$ 、 $\omega_{151}$ 、 $\omega_{152}$ 、 $\omega_{153}$ 、 $\omega_{154}$ 、 $\omega_{155}$ 、 $\omega_{156}$ 、 $\omega_{157}$ 、 $\omega_{158}$ 、 $\omega_{159}$ 、 $\omega_{160}$ 、 $\omega_{161}$ 、 $\omega_{162}$ 、 $\omega_{163}$ 、 $\omega_{164}$ 、 $\omega_{165}$ 、 $\omega_{166}$ 、 $\omega_{167}$ 、 $\omega_{168}$ 、 $\omega_{169}$ 、 $\omega_{170}$ 、 $\omega_{171}$ 、 $\omega_{172}$ 、 $\omega_{173}$ 、 $\omega_{174}$ 、 $\omega_{175}$ 、 $\omega_{176}$ 、 $\omega_{177}$ 、 $\omega_{178}$ 、 $\omega_{179}$ 、 $\omega_{180}$ 、 $\omega_{181}$ 、 $\omega_{182}$ 、 $\omega_{183}$ 、 $\omega_{184}$ 、 $\omega_{185}$ 、 $\omega_{186}$ 、 $\omega_{187}$ 、 $\omega_{188}$ 、 $\omega_{189}$ 、 $\omega_{190}$ 、 $\omega_{191}$ 、 $\omega_{192}$ 、 $\omega_{193}$ 、 $\omega_{194}$ 、 $\omega_{195}$ 、 $\omega_{196}$ 、 $\omega_{197}$ 、 $\omega_{198}$ 、 $\omega_{199}$ 、 $\omega_{200}$ 、 $\omega_{201}$ 、 $\omega_{202}$ 、 $\omega_{203}$ 、 $\omega_{204}$ 、 $\omega_{205}$ 、 $\omega_{206}$ 、 $\omega_{207}$ 、 $\omega_{208}$ 、 $\omega_{209}$ 、 $\omega_{210}$ 、 $\omega_{211}$ 、 $\omega_{212}$ 、 $\omega_{213}$ 、 $\omega_{214}$ 、 $\omega_{215}$ 、 $\omega_{216}$ 、 $\omega_{217}$ 、 $\omega_{218}$ 、 $\omega_{219}$ 、 $\omega_{220}$ 、 $\omega_{221}$ 、 $\omega_{222}$ 、 $\omega_{223}$ 、 $\omega_{224}$ 、 $\omega_{225}$ 、 $\omega_{226}$ 、 $\omega_{227}$ 、 $\omega_{228}$ 、 $\omega_{229}$ 、 $\omega_{230}$ 、 $\omega_{231}$ 、 $\omega_{232}$ 、 $\omega_{233}$ 、 $\omega_{234}$ 、 $\omega_{235}$ 、 $\omega_{236}$ 、 $\omega_{237}$ 、 $\omega_{238}$ 、 $\omega_{239}$ 、 $\omega_{240}$ 、 $\omega_{241}$ 、 $\omega_{242}$ 、 $\omega_{243}$ 、 $\omega_{244}$ 、 $\omega_{245}$ 、 $\omega_{246}$ 、 $\omega_{247}$ 、 $\omega_{248}$ 、 $\omega_{249}$ 、 $\omega_{250}$ 、 $\omega_{251}$ 、 $\omega_{252}$ 、 $\omega_{253}$ 、 $\omega_{254}$ 、 $\omega_{255}$ 、 $\omega_{256}$ 、 $\omega_{257}$ 、 $\omega_{258}$ 、 $\omega_{259}$ 、 $\omega_{260}$ 、 $\omega_{261}$ 、 $\omega_{262}$ 、 $\omega_{263}$ 、 $\omega_{264}$ 、 $\omega_{265}$ 、 $\omega_{266}$ 、 $\omega_{267}$ 、 $\omega_{268}$ 、 $\omega_{269}$ 、 $\omega_{270}$ 、 $\omega_{271}$ 、 $\omega_{272}$ 、 $\omega_{273}$ 、 $\omega_{274}$ 、 $\omega_{275}$ 、 $\omega_{276}$ 、 $\omega_{277}$ 、 $\omega_{278}$ 、 $\omega_{279}$ 、 $\omega_{280}$ 、 $\omega_{281}$ 、 $\omega_{282}$ 、 $\omega_{283}$ 、 $\omega_{284}$ 、 $\omega_{285}$ 、 $\omega_{286}$ 、 $\omega_{287}$ 、 $\omega_{288}$ 、 $\omega_{289}$ 、 $\omega_{290}$ 、 $\omega_{291}$ 、 $\omega_{292}$ 、 $\omega_{293}$ 、 $\omega_{294}$ 、 $\omega_{295}$ 、 $\omega_{296}$ 、 $\omega_{297}$ 、 $\omega_{298}$ 、 $\omega_{299}$ 、 $\omega_{300}$ 、 $\omega_{301}$ 、 $\omega_{302}$ 、 $\omega_{303}$ 、 $\omega_{304}$ 、 $\omega_{305}$ 、 $\omega_{306}$ 、 $\omega_{307}$ 、 $\omega_{308}$ 、 $\omega_{309}$ 、 $\omega_{310}$ 、 $\omega_{311}$ 、 $\omega_{312}$ 、 $\omega_{313}$ 、 $\omega_{314}$ 、 $\omega_{315}$ 、 $\omega_{316}$ 、 $\omega_{317}$ 、 $\omega_{318}$ 、 $\omega_{319}$ 、 $\omega_{320}$ 、 $\omega_{321}$ 、 $\omega_{322}$ 、 $\omega_{323}$ 、 $\omega_{324}$ 、 $\omega_{325}$ 、 $\omega_{326}$ 、 $\omega_{327}$ 、 $\omega_{328}$ 、 $\omega_{329}$ 、 $\omega_{330}$ 、 $\omega_{331}$ 、 $\omega_{332}$ 、 $\omega_{333}$ 、 $\omega_{334}$ 、 $\omega_{335}$ 、 $\omega_{336}$ 、 $\omega_{337}$ 、 $\omega_{338}$ 、 $\omega_{339}$ 、 $\omega_{340}$ 、 $\omega_{341}$ 、 $\omega_{342}$ 、 $\omega_{343}$ 、 $\omega_{344}$ 、 $\omega_{345}$ 、 $\omega_{346}$ 、 $\omega_{347}$ 、 $\omega_{348}$ 、 $\omega_{349}$ 、 $\omega_{350}$ 、 $\omega_{351}$ 、 $\omega_{352}$ 、 $\omega_{353}$ 、 $\omega_{354}$ 、 $\omega_{355}$ 、 $\omega_{356}$ 、 $\omega_{357}$ 、 $\omega_{358}$ 、 $\omega_{359}$ 、 $\omega_{360}$ 、 $\omega_{361}$ 、 $\omega_{362}$ 、 $\omega_{363}$ 、 $\omega_{364}$ 、 $\omega_{365}$ 、 $\omega_{366}$ 、 $\omega_{367}$ 、 $\omega_{368}$ 、 $\omega_{369}$ 、 $\omega_{370}$ 、 $\omega_{371}$ 、 $\omega_{372}$ 、 $\omega_{373}$ 、 $\omega_{374}$ 、 $\omega_{375}$ 、 $\omega_{376}$ 、 $\omega_{377}$ 、 $\omega_{378}$ 、 $\omega_{379}$ 、 $\omega_{380}$ 、 $\omega_{381}$ 、 $\omega_{382}$ 、 $\omega_{383}$ 、 $\omega_{384}$ 、 $\omega_{385}$ 、 $\omega_{386}$ 、 $\omega_{387}$ 、 $\omega_{388}$ 、 $\omega_{389}$ 、 $\omega_{390}$ 、 $\omega_{391}$ 、 $\omega_{392}$ 、 $\omega_{393}$ 、 $\omega_{394}$ 、 $\omega_{395}$ 、 $\omega_{396}$ 、 $\omega_{397}$ 、 $\omega_{398}$ 、 $\omega_{399}$ 、 $\omega_{400}$ 、 $\omega_{401}$ 、 $\omega_{402}$ 、 $\omega_{403}$ 、 $\omega_{404}$ 、 $\omega_{405}$ 、 $\omega_{406}$ 、 $\omega_{407}$ 、 $\omega_{408}$ 、 $\omega_{409}$ 、 $\omega_{410}$ 、 $\omega_{411}$ 、 $\omega_{412}$ 、 $\omega_{413}$ 、 $\omega_{414}$ 、 $\omega_{415}$ 、 $\omega_{416}$ 、 $\omega_{417}$ 、 $\omega_{418}$ 、 $\omega_{419}$ 、 $\omega_{420}$ 、 $\omega_{421}$ 、 $\omega_{422}$ 、 $\omega_{423}$ 、 $\omega_{424}$ 、 $\omega_{425}$ 、 $\omega_{426}$ 、 $\omega_{427}$ 、 $\omega_{428}$ 、 $\omega_{429}$ 、 $\omega_{430}$ 、 $\omega_{431}$ 、 $\omega_{432}$ 、 $\omega_{433}$ 、 $\omega_{434}$ 、 $\omega_{435}$ 、 $\omega_{436}$ 、 $\omega_{437}$ 、 $\omega_{438}$ 、 $\omega_{439}$ 、 $\omega_{440}$ 、 $\omega_{441}$ 、 $\omega_{442}$ 、 $\omega_{443}$ 、 $\omega_{444}$ 、 $\omega_{445}$ 、 $\omega_{446}$ 、 $\omega_{447}$ 、 $\omega_{448}$ 、 $\omega_{449}$ 、 $\omega_{450}$ 、 $\omega_{451}$ 、 $\omega_{452}$ 、 $\omega_{453}$ 、 $\omega_{454}$ 、 $\omega_{455}$ 、 $\omega_{456}$ 、 $\omega_{457}$ 、 $\omega_{458}$ 、 $\omega_{459}$ 、 $\omega_{460}$ 、 $\omega_{461}$ 、 $\omega_{462}$ 、 $\omega_{463}$ 、 $\omega_{464}$ 、 $\omega_{465}$ 、 $\omega_{466}$ 、 $\omega_{467}$ 、 $\omega_{468}$ 、 $\omega_{469}$ 、 $\omega_{470}$ 、 $\omega_{471}$ 、 $\omega_{472}$ 、 $\omega_{473}$ 、 $\omega_{474}$ 、 $\omega_{475}$ 、 $\omega_{476}$ 、 $\omega_{477}$ 、 $\omega_{478}$ 、 $\omega_{479}$ 、 $\omega_{480}$ 、 $\omega_{481}$ 、 $\omega_{482}$ 、 $\omega_{483}$ 、 $\omega_{484}$ 、 $\omega_{485}$ 、 $\omega_{486}$ 、 $\omega_{487}$ 、 $\omega_{488}$ 、 $\omega_{489}$ 、 $\omega_{490}$ 、 $\omega_{491}$ 、 $\omega_{492}$ 、 $\omega_{493}$ 、 $\omega_{494}$ 、 $\omega_{495}$ 、 $\omega_{496}$ 、 $\omega_{497}$ 、 $\omega_{498}$ 、 $\omega_{499}$ 、 $\omega_{500}$ 、 $\omega_{501}$ 、 $\omega_{502}$ 、 $\omega_{503}$ 、 $\omega_{504}$ 、 $\omega_{505}$ 、 $\omega_{506}$ 、 $\omega_{507}$ 、 $\omega_{508}$ 、 $\omega_{509}$ 、 $\omega_{510}$ 、 $\omega_{511}$ 、 $\omega_{512}$ 、 $\omega_{513}$ 、 $\omega_{514}$ 、 $\omega_{515}$ 、 $\omega_{516}$ 、 $\omega_{517}$ 、 $\omega_{518}$ 、 $\omega_{519}$ 、 $\omega_{520}$ 、 $\omega_{521}$ 、 $\omega_{522}$ 、 $\omega_{523}$ 、 $\omega_{524}$ 、 $\omega_{525}$ 、 $\omega_{526}$ 、 $\omega_{527}$ 、 $\omega_{528}$ 、 $\omega_{529}$ 、 $\omega_{530}$ 、 $\omega_{531}$ 、 $\omega_{532}$ 、 $\omega_{533}$ 、 $\omega_{534}$ 、 $\omega_{535}$ 、 $\omega_{536}$ 、 $\omega_{537}$ 、 $\omega_{538}$ 、 $\omega_{539}$ 、 $\omega_{540}$ 、 $\omega_{541}$ 、 $\omega_{542}$ 、 $\omega_{543}$ 、 $\omega_{544}$ 、 $\omega_{545}$ 、 $\omega_{546}$ 、 $\omega_{547}$ 、 $\omega_{548}$ 、 $\omega_{549}$ 、 $\omega_{550}$ 、 $\omega_{551}$ 、 $\omega_{552}$ 、 $\omega_{553}$ 、 $\omega_{554}$ 、 $\omega_{555}$ 、 $\omega_{556}$ 、 $\omega_{557}$ 、 $\omega_{558}$ 、 $\omega_{559}$ 、 $\omega_{560}$ 、 $\omega_{561}$ 、 $\omega_{562}$ 、 $\omega_{563}$ 、 $\omega_{564}$ 、 $\omega_{565}$ 、 $\omega_{566}$ 、 $\omega_{567}$ 、 $\omega_{568}$ 、 $\omega_{569}$ 、 $\omega_{570}$ 、 $\omega_{571}$ 、 $\omega_{572}$ 、 $\omega_{573}$ 、 $\omega_{574}$ 、 $\omega_{575}$ 、 $\omega_{576}$ 、 $\omega_{577}$ 、 $\omega_{578}$ 、 $\omega_{579}$ 、 $\omega_{580}$ 、 $\omega_{581}$ 、 $\omega_{582}$ 、 $\omega_{583}$ 、 $\omega_{584}$ 、 $\omega_{585}$ 、 $\omega_{586}$ 、 $\omega_{587}$ 、 $\omega_{588}$ 、 $\omega_{589}$ 、 $\omega_{590}$ 、 $\omega_{591}$ 、 $\omega_{592}$ 、 $\omega_{593}$ 、 $\omega_{594}$ 、 $\omega_{595}$ 、 $\omega_{596}$ 、 $\omega_{597}$ 、 $\omega_{598}$ 、 $\omega_{599}$ 、 $\omega_{600}$ 、 $\omega_{601}$ 、 $\omega_{602}$ 、 $\omega_{603}$ 、 $\omega_{604}$ 、 $\omega_{605}$ 、 $\omega_{606}$ 、 $\omega_{607}$ 、 $\omega_{608}$ 、 $\omega_{609}$ 、 $\omega_{610}$ 、 $\omega_{611}$ 、 $\omega_{612}$ 、 $\omega_{613}$ 、 $\omega_{614}$ 、 $\omega_{615}$ 、 $\omega_{616}$ 、 $\omega_{617}$ 、 $\omega_{618}$ 、 $\omega_{619}$ 、 $\omega_{620}$ 、 $\omega_{621}$ 、 $\omega_{622}$ 、 $\omega_{623}$ 、 $\omega_{624}$ 、 $\omega_{625}$ 、 $\omega_{626}$ 、 $\omega_{627}$ 、 $\omega_{628}$ 、 $\omega_{629}$ 、 $\omega_{630}$ 、 $\omega_{631}$ 、 $\omega_{632}$ 、 $\omega_{633}$ 、 $\omega_{634}$ 、 $\omega_{635}$ 、 $\omega_{636}$ 、 $\omega_{637}$ 、 $\omega_{638}$ 、 $\omega_{639}$ 、 $\omega_{640}$ 、 $\omega_{641}$ 、 $\omega_{642}$ 、 $\omega_{643}$ 、 $\omega_{644}$ 、 $\omega_{645}$ 、 $\omega_{646}$ 、 $\omega_{647}$ 、 $\omega_{648}$ 、 $\omega_{649}$ 、 $\omega_{650}$ 、 $\omega_{651}$ 、 $\omega_{652}$ 、 $\omega_{653}$ 、 $\omega_{654}$ 、 $\omega_{655}$ 、 $\omega_{656}$ 、 $\omega_{657}$ 、 $\omega_{658}$ 、 $\omega_{659}$ 、 $\omega_{660}$ 、 $\omega_{661}$ 、 $\omega_{662}$ 、 $\omega_{663}$ 、 $\omega_{664}$ 、 $\omega_{665}$ 、 $\omega_{666}$ 、 $\omega_{667}$ 、 $\omega_{668}$ 、 $\omega_{669}$ 、 $\omega_{670}$ 、 $\omega_{671}$ 、 $\omega_{672}$ 、 $\omega_{673}$ 、 $\omega_{674}$ 、 $\omega_{675}$ 、 $\omega_{676}$ 、 $\omega_{677}$ 、 $\omega_{678}$ 、 $\omega_{679}$ 、 $\omega_{680}$ 、 $\omega_{681}$ 、 $\omega_{682}$ 、 $\omega_{683}$ 、 $\omega_{684}$ 、 $\omega_{685}$ 、 $\omega_{686}$ 、 $\omega_{687}$ 、 $\omega_{688}$ 、 $\omega_{689}$ 、 $\omega_{690}$ 、 $\omega_{691}$ 、 $\omega_{692}$ 、 $\omega_{693}$ 、 $\omega_{694}$ 、 $\omega_{695}$ 、 $\omega_{696}$ 、 $\omega_{697}$ 、 $\omega_{698}$ 、 $\omega_{699}$ 、 $\omega_{700}$ 、 $\omega_{701}$ 、 $\omega_{702}$ 、 $\omega_{703}$ 、 $\omega_{704}$ 、 $\omega_{705}$ 、 $\omega_{706}$ 、 $\omega_{707}$ 、 $\omega_{708}$ 、 $\omega_{709}$ 、 $\omega_{710}$ 、 $\omega_{711}$ 、 $\omega_{712}$ 、 $\omega_{713}$ 、 $\omega_{714}$ 、 $\omega_{715}$ 、 $\omega_{716}$ 、 $\omega_{717}$ 、 $\omega_{718}$ 、 $\omega_{719}$ 、 $\omega_{720}$ 、 $\omega_{721}$ 、 $\omega_{722}$ 、 $\omega_{723}$ 、 $\omega_{724}$ 、 $\omega_{725}$ 、 $\omega_{726}$ 、 $\omega_{727}$ 、 $\omega_{728}$ 、 $\omega_{729}$ 、 $\omega_{730}$ 、 $\omega_{731}$ 、 $\omega_{732}$ 、 $\omega_{733}$ 、 $\omega_{734}$ 、 $\omega_{735}$ 、 $\omega_{736}$ 、 $\omega_{737}$ 、 $\omega_{738}$ 、 $\omega_{739}$ 、 $\omega_{740}$ 、 $\omega_{741}$ 、 $\omega_{742}$ 、 $\omega_{743}$ 、 $\omega_{744}$ 、 $\omega_{745}$ 、 $\omega_{746}$ 、 $\omega_{747}$ 、 $\omega_{748}$ 、 $\omega_{749}$ 、 $\omega_{750}$ 、 $\omega_{751}$ 、 $\omega_{752}$ 、 $\omega_{753}$ 、 $\omega_{754}$ 、 $\omega_{755}$ 、 $\omega_{756}$ 、 $\omega_{757}$ 、 $\omega_{758}$ 、 $\omega_{759}$ 、 $\omega_{760}$ 、 $\omega_{761}$ 、 $\omega_{762}$ 、 $\omega_{763}$ 、 $\omega_{764}$ 、 $\omega_{765}$ 、 $\omega_{766}$ 、 $\omega_{767}$ 、 $\omega_{768}$ 、 $\omega_{769}$ 、 $\omega_{770}$ 、 $\omega_{771}$ 、 $\omega_{772}$ 、 $\omega_{773}$ 、 $\omega_{774}$ 、 $\omega_{775}$ 、 $\omega_{776}$ 、 $\omega_{777}$ 、 $\omega_{778}$ 、 $\omega_{779}$ 、 $\omega_{780}$ 、 $\omega_{781}$ 、 $\omega_{782}$ 、 $\omega_{783}$ 、 $\omega_{784}$ 、 $\omega_{785}$ 、 $\omega_{786}$ 、 $\omega_{787}$ 、 $\omega_{788}$ 、 $\omega_{789}$ 、 $\omega_{790}$ 、 $\omega_{791}$ 、 $\omega_{792}$ 、 $\omega_{793}$ 、 $\omega_{794}$ 、 $\omega_{795}$ 、 $\omega_{796}$ 、 $\omega_{797}$ 、 $\omega_{798}$ 、 $\omega_{799}$ 、 $\omega_{800}$ 、 $\omega_{801}$ 、 $\omega_{802}$ 、 $\omega_{803}$ 、 $\omega_{804}$ 、 $\omega_{805}$ 、 $\omega_{806}$ 、 $\omega_{807}$ 、 $\omega_{808}$ 、 $\omega_{809}$ 、 $\omega_{810}$ 、 $\omega_{811}$ 、 $\omega_{812}$ 、 $\omega_{813}$ 、 $\omega_{814}$ 、 $\omega_{815}$ 、 $\omega_{816}$ 、 $\omega_{817}$ 、 $\omega_{818}$ 、 $\omega_{819}$ 、 $\omega_{820}$ 、 $\omega_{821}$ 、 $\omega_{822}$ 、 $\omega_{823}$ 、 $\omega_{824}$ 、 $\omega_{825}$ 、 $\omega_{826}$ 、 $\omega_{827}$ 、 $\omega_{828}$ 、 $\omega_{829}$ 、 $\omega_{830}$ 、 $\omega_{831}$ 、 $\omega_{832}$ 、 $\omega_{833}$ 、 $\omega_{834}$ 、 $\omega_{835}$ 、 $\omega_{836}$ 、 $\omega_{837}$ 、 $\omega_{838}$ 、 $\omega_{839}$ 、 $\omega_{840}$ 、 $\omega_{841}$ 、 $\omega_{842}$ 、 $\omega_{843}$ 、 $\omega_{844}$ 、 $\omega_{845}$ 、 $\omega_{846}$ 、 $\omega_{847}$ 、 $\omega_{848}$ 、 $\omega_{849}$ 、 $\omega_{850}$ 、 $\omega_{851}$ 、 $\omega_{852}$ 、 $\omega_{853}$ 、 $\omega_{854}$ 、 $\omega_{855}$ 、 $\omega_{856}$ 、 $\omega_{857}$ 、 $\omega_{858}$ 、 $\omega_{859}$ 、 $\omega_{860}$ 、 $\omega_{861}$ 、 $\omega_{862}$ 、 $\omega_{863}$ 、 $\omega_{864}$ 、 $\omega_{865}$ 、 $\omega_{866}$ 、 $\omega_{867}$ 、 $\omega_{868}$ 、 $\omega_{869}$ 、 $\omega_{870}$ 、 $\omega_{871}$ 、 $\omega_{872}$ 、 $\omega_{873}$ 、 $\omega_{874}$ 、 $\omega_{875}$ 、 $\omega_{876}$ 、 $\omega_{877}$ 、 $\omega_{878}$ 、 $\omega_{879}$ 、 $\omega_{880}$ 、 $\omega_{881}$ 、 $\omega_{882}$ 、 $\omega_{883}$ 、 $\omega_{884}$ 、 $\omega_{885}$ 、 $\omega_{886}$ 、 $\omega_{887}$ 、 $\omega_{888}$ 、 $\omega_{889}$ 、 $\omega_{890}$ 、 $\omega_{891}$ 、 $\omega_{892}$ 、 $\omega_{893}$ 、 $\omega_{894}$ 、 $\omega_{895}$ 、 $\omega_{896}$ 、 $\omega_{897}$ 、 $\omega_{898}$ 、 $\omega_{899}$ 、 $\omega_{900}$ 、 $\omega_{901}$ 、 $\omega_{902}$ 、 $\omega_{903}$ 、 $\omega_{904}$ 、 $\omega_{905}$ 、 $\omega_{906}$ 、 $\omega_{907}$ 、 $\omega_{908}$ 、 $\omega_{909}$ 、 $\omega_{910}$ 、 $\omega_{911}$ 、 $\omega_{912}$ 、 $\omega_{913}$ 、 $\omega_{914}$ 、 $\omega_{915}$ 、 $\omega_{916}$ 、 $\omega_{917}$ 、 $\omega_{918}$ 、 $\omega_{919}$ 、 $\omega_{920$

治療用組成物が考えられる。さらに、本明細書中に記載される治療用組成物は、様々なCDR配列を有するMu-9抗体およびそのフラグメントの混合物を含有することができる。

【0169】

むき出し状態の抗体による治療

むき出し状態のキメラ抗CSAp抗体、むき出し状態のヒト化抗CSAp抗体、むき出し状態のヒト抗CSAp抗体またはそれらのフラグメントの治療有効量を薬学的に受容可能な賦形剤に配合することができる。むき出し状態のMu-9抗体の効力はまた、むき出し状態の抗体を、1つ以上の他のむき出し状態の抗体（腫瘍関連抗原に対する抗体、または同様に免疫調節因子（CD40抗原もしくはリガンドなど）に対するアゴニスト抗体もしくはアンタゴニスト抗体など）により、Mu-9の1つ以上の免疫コンジュゲート体により、CSAp以外の腫瘍関連抗原に対する抗体の免疫コンジュゲート体で、治療剤（薬物、毒素、サイトカイン、免疫調節因子、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素阻害剤、治療用放射性核種などを含む）とコンジュゲート化された免疫コンジュゲート体の1つ以上より、1つ以上の治療剤（薬物、毒素、サイトカイン、免疫調節因子、ホルモン、酵素、酵素阻害剤、治療用放射性核種などを含む）により補うことによって高めることができ、これらは、Mu-9抗体と同時に、またはMu-9抗体と連続して、または処方された投薬法に従ってMu-9抗体とともに投与される。

10

【0170】

ヒト化抗CSAp免疫コンジュゲート体、キメラ抗CSAp免疫コンジュゲート体およびヒト抗CSAp免疫コンジュゲート体

あるいは、本発明のMu-9抗体またはそのフラグメントのコンジュゲート体を投与することができる。治療のために、これらのコンジュゲート体は、好ましくは、細胞傷害性薬剤を含有する。より好ましくは、細胞傷害性薬剤は毒素である。本明細書中に記載される免疫コンジュゲート体は、抗体成分と、治療剤または診断剤とを含む分子であり、これには、診断剤または治療剤を有し得るペプチドも含まれる。免疫コンジュゲート体は抗体成分の免疫反応性を保持している。すなわち、抗体部分は、同族の抗原と結合する能力が、コンジュゲート化の後で、コンジュゲート化前とほぼ同じであるか、またはわずかに低下している。

20

【0171】

非常に様々な診断/検出試薬および治療試薬を本発明の抗体およびそのフラグメントに都合よくコンジュゲート化することができる。本明細書中に示される治療剤は、上記に記載されるようにむき出し状態の抗体とともに別個に投与するためにもまた有用であるそのような薬剤である。治療剤には、例えば、ピンカアルカロイドおよび他のアルカロイド、アントラサイクリン類、エピドフィロトキシシン類、タキサン類、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗生物質、Cox-2阻害剤、細胞分裂阻止剤、抗血管形成剤およびアポトーシス剤などの化学療法薬物が含まれ、特に、ドキシソルピシン、メトトレキサート、タキソール、CPT-11、カンプトテカン類、そしてこれらのクラスおよび他のクラスの抗がん剤に由来する化学療法薬物などが含まれる。免疫コンジュゲート体および抗体融合タンパク質を調製するための他の有用ながん化学療法薬物には、ナイトロジェンマスタード類、アルキルスルホナート、ニトロソウレア類、トリアゼン類、葉酸アナログ、COX-2阻害剤、ピリミジンアナログ、プリンアナログ、白金配位錯体、ホルモン、毒素（例えば、RNAse、シュードモナスのエキソトキシシン）などが含まれる。様々な好適な化学療法剤が、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES（第19版）（MacK Publishing Co.、1995）に、そしてGOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS（第7版）（MacMillan Publishing Co.、1985）に、ならびにこれらの刊行物の改訂版に記載されている。他の好適な化学療法剤（実験中の薬物など）が当業者には知られている。

30

40

【0172】

50

さらに、DTPA、DOTA、TETAまたはNOTAなどのキレート剤あるいは好適なペプチドに対して、検出可能な標識（蛍光性分子など）または細胞傷害性薬剤（重金属もしくは放射性核種など）をコンジュゲート化することができる。例えば、治療的に有用な免疫コンジュゲート体を、光活性な薬剤または色素を抗体複合物にコンジュゲート化することによって得ることができる。蛍光性組成物（蛍光色素など）および他の色素原または色素（可視光に対する感受性を有するポルフィリン類など）を、好適な光を病変部に誘導することによって病変部を検出し、処置するために使用することができる。治療では、これは、光放射線または光線療法または光力学的治療と呼ばれている（Jorira（編）、PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES（Libreria Progetto、1985）；van de 10  
 n Bergh、Chem. Britain、22：430（1986））。さらに、様々なモノクローナル抗体が、光線療法を達成するために光活性化型色素とカップリングされている。Mewら、J. Immunol.、130：1473（1983）；同上、Cancer Res.、45：4380（1985）；Oseroffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83：8744（1986）；同上、Photochem. Photobiol.、46：83（1987）；Hasanら、Prog. Clin. Biol. Res.、288：471（1989）；Tatsutaら、Lasers Surg. Med.、9：422（1989）；Pelegriら、Cancer、67：2529（1991）。しかし、これらのより初期の研究では、内視鏡治療適用の使用、特に、抗体フラグメントまたはサブフラグメントの使用を伴う内視鏡治療適用の使用は含まれていなかった。従って、本発明では、光活性な薬剤または色素を含む免疫コンジュゲート体の治療的使用が考えられる。 20

#### 【0173】

毒素（シュードモナスのエキソトキシンなど）もまた、免疫コンジュゲート体の治療剤部分に対して複合体化することができ、または免疫コンジュゲート体の治療剤部分にすることができる。例えば、毒素は、本発明のMu-9抗体と複合体化することができ、またはMu-9抗体のコンジュゲート体のむき出し状態のMu-9と組み合わせて使用されるときには、本発明において使用されるそれ以外の非CSAp抗体に対してもまた複合体化することができる。そのようなコンジュゲート体または他の融合タンパク質を調製する際に好適に用いられる他の毒素には、リシン、アプリン、リボヌクレアーゼ（RNase）、 30  
 DNase I、ブドウ球菌のエンドトキシンA、アメリカヤマゴボウの抗ウイルス性タンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナスのエキソトキシン、およびシュードモナスのエンドトキシンが含まれる。例えば、Pastanら、Cell、47：641（1986）；およびGoldenberg、CA-A Cancer Journal for Clinicians、44：43（1994）を参照のこと。本発明における使用のために好適なさらなる毒素が当業者には知られており、米国特許第6,077,499号に開示される（この文献は、その全体を参照することにより本明細書に組み込むものとする）。これらは、例えば、動物供給源、植物供給源および微生物供給源に由来し得る。

#### 【0174】

免疫調節因子（サイトカインなど）もまた、抗CSAp免疫コンジュゲート体の治療剤部分にコンジュゲート化することができ、または抗CSAp免疫コンジュゲート体の治療剤部分にすることができる、または本発明のキメラ抗CSAp抗体もしくはヒト化抗CSAp抗体もしくはヒト抗CSAp抗体にコンジュゲート化されずに投与することができる。本明細書中で使用される用語「免疫調節因子」には、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リン 40  
 ホトキシン（腫瘍壊死因子（TNF）など）、および造血性因子（インターロイキン類（例えば、インターロイキン-1（IL-1）、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12およびIL-18）、コロニー刺激因子（例えば、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）および顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子（GM-CSF）など）、インターフェロン類（例えば、インターフェロン- および および ）、「S 1 50

因子」と称される幹細胞増殖因子、エリスロポイエチンおよびトロンボポイエチンなど)が含まれる。好適な免疫調節因子部分の例には、IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、インターフェロン、TNFなどが含まれる。あるいは、被験体には、むき出し状態のMu-9抗体および別個に投与されるサイトカインを与えることができ、この場合、サイトカインは、むき出し状態のMu-9抗体が投与される前に、またはむき出し状態のMu-9抗体の投与と同時に、またはむき出し状態のMu-9抗体が投与された後に投与することができる。Mu-9抗体はまた、免疫調節因子にコンジュゲート化することができる。免疫調節因子はまた、異なる抗原に結合する1つ以上の抗体からなるハイブリッド抗体にコンジュゲート化することができる。そのような抗原もまた免疫調節因子であってもよい。例えば、CD40または他の免疫調節因子を、抗体の組合せが投与される前に、または抗体の組合せが投与された後に、抗CSApまたは抗CSAp/非CSAp抗体組合せのいずれかとの組合せと一緒に投与することができる。Mu-9抗体はまた、免疫調節抗体(CD40に対する抗体など)と組み合わせで使用ことができ、または融合タンパク質として、免疫調節抗体(CD40に対する抗体など)にコンジュゲート化することができる。

10

## 【0175】

さらに、本発明には、被験体における悪性腫瘍を診断または検出する方法が含まれる。診断/検出は、診断用コンジュゲート体の診断有効量を、薬学的に受容可能な賦形剤に配合して投与し、そして前記標識を検出することによって達成することができる。例えば、放射性薬剤および非放射性薬剤を診断剤として使用することができる。好適な非放射性的診断剤は、磁気共鳴画像化のために好適な造影剤、X線写真またはコンピューター断層撮影法のための放射線不透過性化合物、あるいは超音波検査のために好適な造影剤である。磁気画像化剤には、例えば、マンガン、鉄およびガドリニウムなどの非放射性的金属が含まれ、これらは、本発明の抗体と一緒に使用されたときには、2-ベンジル-DTPAならびにそのモノメチルアナログおよびシクロヘキシルアナログを含む様々な金属-キレート組合せにより複合体化する。米国特許出願第09/921,290号(2001年10月10日出願)を参照のこと(この文献は参照することによりその全体を本明細書に組み込むものとする)。好ましい実施形態において、造影剤は超音波増強剤である。さらに好ましくは、超音波増強剤はリポソームである。放射線不透過性物質および造影剤物質は、X線写真およびコンピューター断層撮影法を強化するために使用され、これらには、ヨウ素化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物およびタリウム化合物などが含まれる。具体的な化合物には、バリウム、ジアトリゾアート、エチルヨウ化油、クエン酸ガリウム、イオカルム酸、ヨーセタム酸、ヨーダミド、ヨーヅパミド、ヨードキサム酸、イオグラミド、イオヘキソール、イオパミドール、イオパノ酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセル酸、イオスラミドメグルミン、イオセメト酸、イオタスル、イオテトル酸、イオタラム酸、イオトロクス酸、イオキサグル酸、イオクソトリゾ酸、イボダート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾアート、プロピリオドンおよび塩化タリウムが含まれる。

20

30

## 【0176】

さらに、放射標識された抗体または免疫コンジュゲート体は、診断的画像化のために有用な線放出放射性同位体または陽電子放出体を含むことができる。診断/検出剤の例には、様々な標識、放射性核種、キレーター、色素、造影剤、蛍光性化合物、色素原および他のマーカ成分が含まれる。陽電子放出断層撮影法のために有用な放射性核種には、F-18、Mn-51、Mn-52m、Fe-52、Co-55、Cu-62、Cu-64、Ga-68、As-72、Br-75、Br-76、Rb-82m、Sr-83、Y-86、Zr-89、Tc-94m、In-110、I-120およびI-124が含まれるが、これらに限定されない。有用な陽電子放出放射性核種の総崩壊エネルギーは、好ましくは2,000keV未満であり、より好ましくは1,000keV未満であり、最も好ましくは700keV未満である。線検出を利用する診断剤として有用な放射性核種には、Cr-51、Co-57、Co-58、Fe-59、Cu-67、Ga-67、Se-75、Ru-97、Tc-99m、In-111、In-114m、I-123、I-

40

50

125、I-131、Yb-169、Hg-197およびTl-201が含まれるが、これらに限定されない。有用な線放出放射性核種の崩壊エネルギーは、好ましくは20 keV~2000 keVであり、より好ましくは60 keV~600 keVであり、最も好ましくは100 keV~300 keVである。

【0177】

さらに、疾患組織を処置するために好適な放射性核種には、P-32、P-33、Sc-47、Fe-59、Cu-64、Cu-67、Se-75、As-77、Sr-89、Y-90、Mo-99、Rh-105、Pd-109、Ag-111、I-125、I-131、Pr-142、Pr-143、Pm-149、Sm-153、Tb-161、Ho-166、Er-169、Lu-177、Re-186、Re-188、Re-189、Ir-194、Au-198、Au-199、Pb-211、Pb-212、およびBi-213、Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m、Ir-192、Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213およびFm-255が含まれるが、これらに限定されない。

【0178】

好適な診断画像化同位体は、通常、20 keV~2,000 keVの範囲であり、一方、好適な治療用放射性核種は、通常、20 keV~10,000 keVの範囲である。例えば、「Labeling Targeting Agents with Gallium-68」と題する米国特許出願（発明者：G.L.GriffithsおよびW.J.McBride）を参照のこと（米国仮特許出願第60/342,104号）。これは、画像化目的のために、<sup>18</sup>F、<sup>68</sup>Ga、<sup>94m</sup>Tcなどの陽電子放射体を開示しており、参照することによりその開示内容全体が組み込まれる。

【0179】

二重特異性抗体による治療

本発明にはまた、米国特許第6,096,289号（これは参照することにより本明細書中に組み込まれる）に記載されるように手術中および血管内および内視鏡での腫瘍および病変部の検出および生検および治療における、上記に議論されたリンカー部分により結合しているbsAbおよび治療剤の使用が包含される。

【0180】

本発明の抗体および抗体フラグメントは、治療目的または画像化目的のためだけでなく、インビトロでの研究を行う際の助けとしてもまた用いることができる。例えば、本発明のbsAbは、ターゲッティング可能な構築物が1つ以上のbsAbと安定な複合体を形成し得るとどうかを確認するためにインビトロで使用することができる。そのようなアッセイは、bsAbとの安定な複合体を形成するターゲッティング可能な構築物を当業者が同定することを助ける。これにより、その後、当業者は、治療剤および/または画像化剤として優れていると考えられるターゲッティング可能な構築物を同定することができる。

【0181】

アッセイは、好都合には、問題としているターゲッティング可能な構築物を少なくとも2モル当量のbsAbと一緒にすることによって行われる。インキュベーション後、構築物がbsAbに結合したか否かを明らかにするために、混合物がサイズ排除HPLCによって分析される。あるいは、アッセイは、様々なbsAbの溶液が標準的な96ウエルプレートに置かれる標準的なコンビナトリアル法を使用して行われる。それぞれのウエルには、ターゲッティング可能な構築物（1つまたは複数）の溶液が加えられる。インキュベーションおよび分析を行った後、どの構築物（1つまたは複数）がどのbsAb（1つまたは複数）に最もよく結合しているかを容易に決定することができる。

【0182】

bsAbをターゲッティング可能な構築物に加える順序は重要でないことを理解しなければならない。すなわち、bsAbを構築物に加えることができ、逆に、構築物をbsAb

に加えることができる。同様に、b s A bまたは構築物のどちらも溶液中に存在させる必要はない。すなわち、b s A bまたは構築物は、どちらが最も便利であるとしても、溶液またはそのままのいずれかで加えることができる。最後に、結合に対する分析方法は、結合が確立されている限り、重要ではない。従って、サイズ排除HPLCとともに、またはその代わりに、FABMS、高磁場NMRまたは他の適切な方法（これらに限定されない）を含む標準的な分析方法を使用して結合について分析することができる。

#### 【0183】

本発明は、標的化された細胞マーカーと特異的に結合する少なくとも1つの結合領域と、ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他の結合領域とを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントを提供する。ターゲティング可能なコンジュゲート体は、二重特異性の抗体または抗体フラグメントの少なくとも1つの結合領域によって認識されるエピトープを少なくとも1つ含むか、またはそのようなエピトープを少なくとも1つ有するキャリア部分を含む。

10

#### 【0184】

例えば、本明細書中に記載される、混合療法において使用される抗CSAp抗体およびそのフラグメント、ならびに異なる特異性を有する他の抗体およびそのフラグメントもまた、多重特異性の抗体（これは、CSApエピトープまたは抗原に対する少なくとも1つの結合部位と、CSApにおける別のエピトープまたは別の抗原に対する少なくとも1つの結合部位とを含む）および多価の抗体（これは、同じエピトープまたは抗原に対する多数の結合部位を含む）として作製することができる。

20

#### 【0185】

様々な組換え法を、上記に記載されるように、二重特異性の抗体および抗体フラグメントを製造するために使用することができる。

#### 【0186】

好ましい実施形態において、多価抗体はMu-9抗体である。Mu-9多価抗体もまた本発明では考えられる。この多価抗体は、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを結合させることによって構築される。第1のポリペプチドは、好ましくは免疫グロブリンの軽鎖可変領域ドメインである第1の免疫グロブリン様ドメインに共有結合的に連結された第1の単鎖Fv分子を含む。第2のポリペプチドは、好ましくは免疫グロブリンの重鎖可変領域ドメインである第2の免疫グロブリン様ドメインに共有結合的に連結された第2の単鎖Fv分子を含む。第1の単鎖Fv分子および第2の単鎖Fv分子のそれぞれが標的結合部位を形成し、そして第1の免疫グロブリン様ドメインおよび第2の免疫グロブリン様ドメインが会合して、第3の標的結合部位を形成する。

30

#### 【0187】

VL-L-VH形態（この場合、Lはリンカーである）を有する単鎖Fv分子は、VH-L-L-VL形態を有する別の単鎖Fv分子と会合して、二価のダイマーを形成することができる。この場合、第1のscFvのVLドメインおよび第2のscFv分子のVHドメインは会合して、1つの標的結合部位を形成し、その一方で、第1のscFvのVHドメインおよび第2のscFvのVLドメインは会合して、それとは異なる標的結合部位を形成する。

40

#### 【0188】

本発明の別の実施形態は、3つの結合部位を形成させるために非共有結合的に結合させた2つの異種ポリペプチド鎖を含むMu-9の二重特異性かつ三価の抗体であり、この場合、そのうちの2つが1つの標的に対して親和性を有しており、もう1つが、診断剤および/または治療剤のために作製され、かつ診断剤および/または治療剤に対するキャリアに結合され得るハプテンに対して親和性を有している。好ましくは、結合性タンパク質は2つのCSAp結合部位と、1つの他の抗原結合部位とを有する。二重特異性かつ三価のターゲティング剤は2つの異なるscFvを有しており、1つのscFvが、ある抗体に由来する2つのV<sub>H</sub>ドメインを、別の抗体のV<sub>L</sub>ドメインに短いリンカーにより連結されて含有し、そして第2のscFvが、第1の抗体に由来する2つのV<sub>L</sub>ドメインを、それ以

50

外の抗体のV<sub>H</sub>ドメインに短いリンカーにより連結されて含有する。多価かつ多重特異性の薬剤をV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインから作製する方法により、1つのV<sub>H</sub>鎖を1つのV<sub>L</sub>鎖と非共有結合的に結合させることによって多価および多重特異性の任意の薬剤が製造され得るような様式で、宿主生物においてDNAプラスミドから合成された個々の鎖が完全にV<sub>H</sub>ドメインから構成され(V<sub>H</sub>鎖)、または完全にV<sub>L</sub>ドメインから構成される(V<sub>L</sub>鎖)ことが規定される。例えば、三価かつ三重特異性の薬剤を形成させる場合、V<sub>H</sub>鎖は、特異性が異なる抗体にそれぞれが由来する3つのV<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列から、様々な長さのペプチドリinkerにより連結されて構成され、そしてV<sub>L</sub>鎖は、V<sub>H</sub>鎖のために使用されるリンカーと類似するペプチドリinkerにより連結された相補的なV<sub>L</sub>ドメインから構成される。抗体のV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインは逆平行様式で会合するので、本発明における好ましい方法は、V<sub>H</sub>鎖内のV<sub>H</sub>ドメインとは逆の順序で配置されたV<sub>L</sub>ドメインをV<sub>L</sub>鎖に有する。

10

## 【0189】

本発明の二重特異性の抗体およびそのフラグメントは、プレターゲティング方法において有用であり、2つの治療剤または2つの診断/検出剤を被験体に送達するための好ましい方法を提供する。米国特許出願第09/382,186号には、二重特異性の抗体を使用するプレターゲティング方法が開示される。この場合、二重特異性の抗体は<sup>125</sup>Iで標識されて、被験体に送達され、その後、<sup>99m</sup>Tcで標識された二価ペプチドが送達されている。この送達により、<sup>131</sup>Iおよび<sup>99m</sup>Tcに対する優れた腫瘍/正常組織比が得られている。従って、このことは2つの診断用放射性同位体の有用性を示している。知られて

20

## 【0190】

ヒト化Mu-9免疫コンジュゲート体、キメラMu-9免疫コンジュゲート体およびヒトMu-9免疫コンジュゲート体の調製

本発明の抗CSAp抗体もしくはそのフラグメントまたは抗体融合タンパク質もしくはそのフラグメントはいずれも、1つ以上の治療剤または診断剤とコンジュゲート化することができる。一般に、1つの治療剤または診断剤がそれぞれの抗体または抗体フラグメントに結合させられるが、2つ以上の治療剤または診断剤を同じ抗体または抗体フラグメントに結合させることができる。本発明の抗体融合タンパク質は2つ以上の抗体またはそのフラグメントを含み、この融合タンパク質を構成する抗体のそれぞれが治療剤または診断剤を含有することができる。すなわち、抗体融合タンパク質またはそのフラグメントは、少なくとも1つの第1の抗CSAp MAbまたはそのフラグメントと、抗CSAp MAbでない少なくとも1つの第2のMAbまたはそのフラグメントとを含むことができる。好ましくは、第2のMAbはがん腫関連抗体であり、例えば、CEA、EGP-1、EGP-2、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、PAM-4、KC4、TAG-72、EGFR、HER2/neu、BrE3、Le-Y、A3およびKS-1に対する抗体、VEGF抗体および他の血管形成抗体、がん遺伝子抗体、抗壊死抗体、または抗体A3

30

40

## 【0191】

同様に好ましくは、本発明の抗体融合タンパク質は少なくとも2つの抗CSApモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む。これらは、CSAp抗原の異なるエピトープ

50

に対し得るか、または異なるヒト免疫グロブリン骨格配列（もしくはIgG）の異なるエピトープに対し得る。

【0192】

治療剤または診断剤を、還元された抗体成分のヒンジ領域において、ジスルフィド結合の形成によって結合させることができる。代わりとして、そのようなペプチドを、N-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)などのヘテロ二官能性の架橋剤を使用して抗体成分に結合させることができる。Yuら、Int. J. Cancer、56:244(1994)。そのようなコンジュゲート化に対する一般的な技術が当分野では広く知られている。例えば、Wong、CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING(CRC Press、1991)；Upeslaciisら、「化学的方法による抗体の修飾」、MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS、Birchら(編)、187頁~230頁(Wiley-Liss, Inc.、1995)；Price、「合成ペプチドに由来する抗体の製造および特徴づけ」、MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION、Ritterら(編)、60頁~84頁(Cambridge University Press、1995)を参照のこと。あるいは、治療剤または診断剤は、抗体のFc領域における炭水化物部分を介してコンジュゲート化することができる。炭水化物基は、チオール基に結合する同じペプチドの負荷量を増大させるために使用することができ、または異なるペプチドと結合させるために使用することができる。

【0193】

抗体の炭水化物部分を介してペプチドを抗体成分にコンジュゲート化するための様々な方法が当業者には広く知られている。例えば、Shihら、Int. J. Cancer、41:832(1988)；Shihら、Int. J. Cancer、46:1101(1990)；およびShihら、米国特許第5,057,313号を参照のこと(これらはすべて参照することによりその開示内容全体が組み込まれる)。一般的な方法は、酸化された炭水化物部分を有する抗体成分を、少なくとも1つのフリーアミン官能基を有し、かつ複数のペプチドが負荷されるキャリアポリマーと反応させることを伴う。この反応により、最初にシッフ塩基(イミン)結合が生じ、これは、最終的なコンジュゲート体を形成させるための二級アミンへの還元によって安定化させることができる。

【0194】

Fc領域は、免疫コンジュゲート体の抗体成分として使用される抗体が抗体フラグメントである場合には存在しない。しかしながら、炭水化物部分を全長抗体または抗体フラグメントの軽鎖可変領域に導入することは可能である。例えば、Leungら、J. Immunol.、154:5919(1995)；Hansenら、米国特許第5,443,953号(1995)；Leungら、米国特許第6,254,868号を参照のこと(これらの文献はすべてその開示内容全体が参照することにより組み込まれる)。操作された炭水化物部分は、治療剤または診断剤を結合させるために使用される。

【0195】

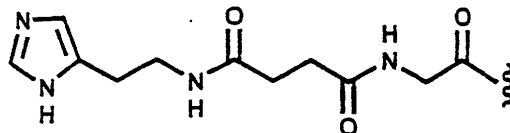
V. 抗体に対してターゲティング可能な構築物  
ターゲティング可能な構築物は多様な構造が可能であるが、ターゲティング可能な構築物は、十分な免疫応答を誘発するための免疫を誘発させることを避けるためだけではなく、bsAbターゲティング方法の中で使用されたときには迅速なインビボでのクリアランスのためにも選択される。疎水性の薬剤は、強い免疫応答を誘発することにおいて最も適しており、これに対して、親水性の薬剤は迅速なインビボでのクリアランスのために好ましく、従って、疎水性と親水性とのバランスを確立する必要がある。これは、部分的には、多くの有機成分の固有の疎水性を補うための親水性キレート化剤の使用によることによって達成される。また、反対の溶解特性を有するターゲティング可能な構築物のサブユニット、例えば、様々なアミノ酸を含み、そのうちのいくつかは疎水性のアミノ酸で

あり、いくつかが親水性のアミノ酸であるペプチドを選択することもできる。ペプチドの他に、炭水化物を使用することができる。

【0196】

キレート化剤などの他の成分にもカップリングされるならば、2個も少数のアミノ酸残基を有するペプチドを使用することができ、好ましくは、2残基～10残基のペプチドを使用することができる。リンカーは、低分子量のコンジュゲート体であり、キレート内の金属イオンを含む分子量が、好ましくは50,000ダルトン未満であり、好都合には約20,000ダルトン未満または約10,000ダルトン未満または約5,000ダルトン未満である低分子量のコンジュゲート体が望ましい。例えば、知られているペプチドDTPA-Tyr-Lys(DTPA)-OH(式中、DTPAはジエチレントリアミン五酢酸である)は、この分子のインジウム-DTPA部分に対する抗体を製造するために使用されている。しかし、インジウム以外を含有する分子および適切なスクリーニング工程の使用によって、チロシルリシンジペプチドに対する新しいAbを作製することができる。より通常的には、抗原性ペプチドは4個以上の残基を有する。例えば、ペプチドDOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>、この場合、DOTAは1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン四酢酸であり、HSGは、下記の式：

【化31】



のヒスタミンスクシニルグリシル基である。

【0197】

非金属含有ペプチドを免疫原として使用することができ、得られるAbをPhe-Lys-Tyr-Lys骨格に対する反応性についてスクリーニングすることができる。

【0198】

本発明ではまた、最終的なbsAb/リンカーシステムとともに使用されたとき、リンカー成分を認識するbsAbのアームが完全に特異的であることを確実にするために、骨格構造中に非天然アミノ酸(例えば、D-アミノ酸)を組み込むことが考えられる。本発明ではさらに、他の骨格構造、例えば、非天然アミノ酸およびペプチドから構築される骨格構造などが考えられる。

【0199】

免疫原として使用されるペプチドは、固相担体技術ならびに反復した直交型脱保護およびカップリングの標準的な技術を使用する自動化されたペプチド合成機で都合よく合成される。ペプチド中のフリーアミノ基は、キレートへのコンジュゲート化のために後で使用されることになるが、アセチル基などの標準的な保護基で都合よくブロックされる。そのような保護基は当業者に知られている。GreeneおよびWuts、Protective Groups in Organic Synthesis、1999(John Wiley and Sons、N.Y.)を参照のこと。ペプチドが、bsAbシステム内において後で使用されるために調製されるとき、カルボキシペプチダーゼ活性をインビボで阻害するために、ペプチドは好都合には樹脂から切断されて、対応するC末端アミドが得られる。

【0200】

免疫原の様々なハプテンには、免疫原性の認識成分、例えば、化学的ハプテンが含まれる。化学的ハプテン(好ましくは、HSGハプテン)を使用することにより、抗体に対するリンカーの高い特異性が示される。これは、HSGハプテンに対して惹起される様々な抗体が知られており、そしてそれらを適切な二重特異性抗体の中に容易に組み込むことができるからである。従って、結合しているハプテンによりリンカーを結合することは、抗体または抗体フラグメントに対して非常に特異的になると考えられる。

## 【0201】

## キレート成分

リンカー成分における親水性キレート成分の存在は、迅速なインビボでのクリアランスを確実にすることに役立つ。親水性に加えて、様々なキレーターがその金属結合特性のために選ばれ、そしてそれらは思い通りに変えられる。これは、bsAbエピトープがペプチドの一部であるリンカー、またはbsAbエピトープがキレートでない化学的ハプテンであるリンカーについては少なくとも、金属キレート錯体の認識はもはや問題でないからである。

## 【0202】

特に有用な金属キレートの組み合わせには、放射線画像化およびRAITのために、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ および $^{225}\text{Ac}$ とともに使用される場合の2-ベンジル-DTPAならびにそのモノメチルアナログおよびシクロヘキシルアナログが含まれる。Mn、FeおよびGdなどの非放射性の金属と錯体を形成するとき、これらの同じキレーターは、本発明のbsAbとともに使用されるときにはMRIのために使用することができる。NOTA(1,4,7-トリアザ-シクロノナン-N,N',N"-三酢酸)、DOTAおよびTETA(p-プロモアセトアミドベンジルテトラエチルアミン四酢酸)などの大環状キレーターは、様々な金属および放射性金属に関して、より具体的には、それぞれ、Ga、YおよびCuの放射性核種に関して有用である。

## 【0203】

配位子が、ハード塩基とキレート化する官能基、例えば、カルボキシラート基またはアミン基などを含むDTPA型キレーターおよびDOTA型キレーターは、ハード酸カチオンと、特に、IIa族およびIIIa族の金属カチオンとキレート化するために最も効果的である。そのような金属-キレート錯体は、目的とする金属に合うように環サイズを調節することにより非常に安定化させることができる。大環状ポリエーテルなどの他の環型キレーターが、RAITのための $^{223}\text{Ra}$ などの安定に結合する核種に対して注目されている。ポルフィリンキレーターは非常に多くの放射性金属とともに使用することができ、また、bsAbにより導かれる免疫光線療法のためのいくつかの非放射性の金属複合体としても有用である。2種類以上のキレーターを、多数の金属イオン(例えば、非放射性のイオン)、診断用放射性核種および/または治療用放射性核種と結合させるためにキャリアにコンジュゲート化することができる。特に有用な治療用放射性核種には、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{189}\text{Re}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ および $^{225}\text{Ac}$ が含まれるが、これらに限定されない。特に有用な診断用放射性核種には、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{154}\sim^{158}\text{Gd}$ および $^{175}\text{Lu}$ が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0204】

米国特許第5,753,206号に開示されるキレーターなどの様々なキレーター、特に、チオセミカルバゾニルグリオキシルシステイン(Tscg-Cys)キレーターおよびチオセミカルバジニルアセチルシステイン(Tsca-Cys)キレーターは、ソフト塩基配位子(特にイオウまたはリンを含有する配位子)に対して強固に結合する、Tc、Re、Biおよび他の遷移金属(ランタニドおよびアクチニド)のソフト酸カチオンと結合させるために都合よく使用される。ペプチドに対して2種類以上のキレーターを連結すること、例えば、In(III)カチオンについては、例えば、DTPAまたは類似するキレーターを連結し、Tcカチオンについては、チオール含有キレーター、例えば、Tscg-Cys)を連結することは有用であり得る。ジDTPAハプテンに対する様々な抗体が知られており(Barbet、上掲の'395号特許)、それらは、bsAbを得るためにターゲティング抗体に容易にカップリングされるので、ペプチドハプテンを、放射性同位体をターゲティングするためのプレターゲティングプロトコルにおいて、放射

10

20

30

40

50

性同位体と結合させるための非放射性的ジDTPAキレーターおよび別のキレーターとともに使用することが可能である。そのようなペプチドの一例として、Ac-Lys(DTPA)-Tyr-Lys(DTPA)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>がある。このペプチドは、In(III)を事前に負荷させ、その後、99mTcカチオンで標識化することができる。この場合、In(III)イオンがDTPAによって優先的にキレート化され、そしてTcカチオンがチオール含有Tscg-Cysに優先的に結合する。NOTA、DOTA、TETAなどの他のハード酸キレーターはDTPA基の代わりに使用することができ、従って、それらに対して特異的なMabを、抗ジDTPA Mabを作製するために使用される技術に類似する技術を使用して製造することができる。

【0205】

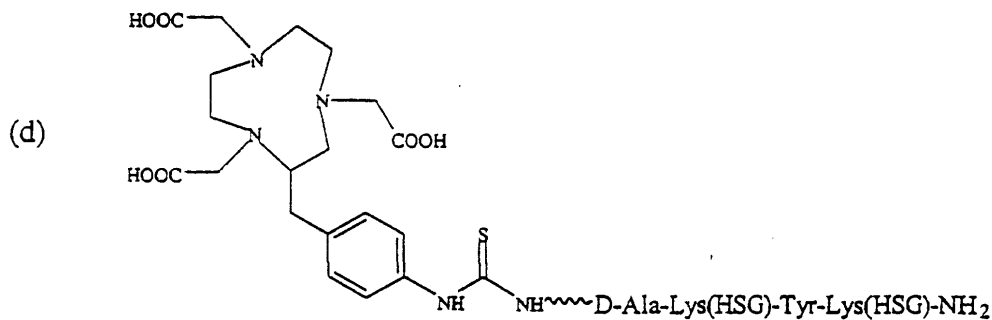
カチオンの種々のサイズ、キレート環の幾何構造およびカチオンの好ましい錯体イオン構造により、2つの異なるハード酸カチオンまたはソフト酸カチオンに優先的に結合させるために、2つの異なるハード酸キレーターまたはソフト酸キレーターが、例えば、種々のキレート環サイズを有するリンカーに組み込まれ得ることが理解される。これにより、2つの異なる金属（そのうちの1つまたは両方が放射性であり得るか、あるいはMRI増強のために有用であり得る）を、事前にターゲティングされたbsAbによって最後には捕捉されるリンカーに組み込むことが可能になる。

【0206】

好ましいキレーターには、NOTA、DOTAおよびTscgならびにそれらの組み合わせが含まれる。これらのキレーターは、下記の構築物において例示されるようなキレーター-ペプチドコンジュゲート体モチーフの中に組み込まれている。

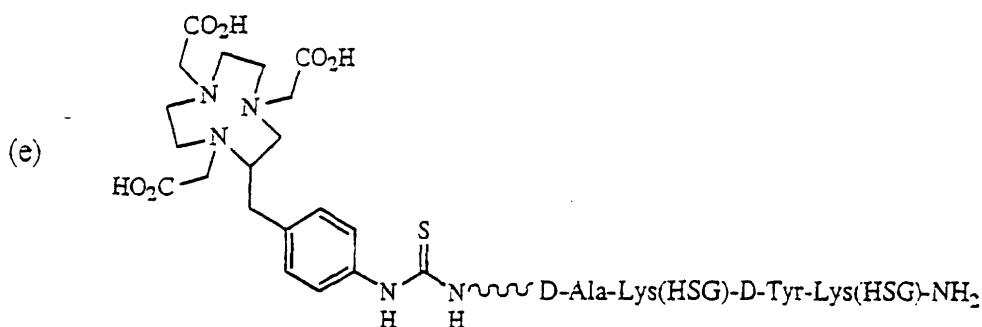
- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub> ;  
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub> ;  
 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub> ;

【化32】



および

【化33】



上記のキレーター-ペプチドコンジュゲート体(d)および(e)は、<sup>68</sup>Gaと結合することが示されており、従って、陽電子放射断層撮影法(PET)の適用において有用であ

る。

【0207】

キレーターは、より詳しく下記の実施例で議論される標準的な化学反応を使用して、リンカー成分にカップリングされる。簡単に記載すると、ペプチド  $Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH_2$  の合成は、ペプチド合成機において、Rinkアミド樹脂に  $Alloc-Lys(Fmoc)-OH$  を最初に結合させることによって達成された。本明細書中で使用される保護基の略語「Alloc」および「Fmoc」はアリルオキシカルボニル基およびフルオレニルメチルオキシカルボニル基を示す。その後、 $Fmoc-Cys(Trt)-OH$  および  $TscG$  が、標準的な  $Fmoc$  自動化合成プロトコルを使用してリシンの側鎖に付加されて、下記のペプチドが得られた。  $Alloc-Lys(Tscg-Cys(Trt))rink$  樹脂。その後、Alloc基が除去された。その後、ペプチド合成を合成機で続けて、下記のペプチドを作製した。  $(Lys(Alloc)-D-Tyr-Lys(Alloc)-Lys(Tscg-Cys(Trt))-)rink$  樹脂。続いて、N末端のアシル化および側鎖Alloc保護基の除去が行われた。その後、カイザー試験を使用して樹脂をアミンについて試験して、陰性の試験結果が得られるまで、得られたペプチドを活性化  $N$ -トリチル- $HSG-OH$  で処理した。Karacayら、*Bioconjugate Chem.*、11:842~854(2000)を参照のこと。  $Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH_2$  の合成ならびに  $DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH_2$  および  $DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH_2$  の合成は、下記に、より詳細に記載される。

【0208】

金属キレーターの調製

キレーター-ペプチドコンジュゲート体は固体として長期間貯蔵することができる。それらは、金属結合反応のための単位量に計量することができ、そして固体、水溶液または半水性溶液、あるいは凍結溶液または凍結乾燥調製物として、そのいずれかで単位量として貯蔵することができる。それらは、広く知られている手順によって標識することができる。典型的には、ハード酸カチオンが好都合な塩の溶液として導入され、ハード酸キレーターおよび場合によってはソフト酸キレーターによって取り込まれる。しかし、ソフト酸カチオンを後で添加することにより、ソフト酸キレーターによるその結合がもたらされ、これにより、その中でキレート化され得る任意のハード酸カチオンが置換される。例えば、過剰量の非放射性  $^{111}InCl_3$  が存在するときでさえ、 $99m-Tc(V)$  グルコヘプトン酸塩を用いた標識化、または塩化第一スズおよび  $Na99m-TcO_4$  によるインサイチューで作製される  $Tc$  カチオンを用いた標識化が、ソフト酸キレーターに対して定量的に進行する。 $^{186}Re$ 、 $^{188}Re$ 、 $^{213}Bi$  などの他のソフト酸のカチオン、ならびに  $Mn$ 、 $Co$ 、 $Ni$ 、 $Pb$ 、 $Cu$ 、 $Cd$ 、 $Au$ 、 $Fe$ 、 $Ag$  (一価)、 $Zn$  および  $Hg$  の二価または三価のカチオン、特に  $^{64}Cu$  および  $^{67}Cu$  などは、そのうちのいくつかは放射性免疫診断または放射性免疫療法のために有用であるので、類似する方法によってリンカーペプチドに負荷することができる。 $Re$  カチオンはまた、過レニウム酸塩および第一スズイオンからインサイチューで生成させることができ、あるいは事前に還元されたグルコヘプトン酸レニウムまたは他のトランスキレーターを使用することができる。過レニウム酸塩の還元には、 $Tc$  を還元するために必要とされるよりも多くの第一スズイオン(典型的には、 $200\mu g/mL$  を越える最終濃度)が必要であるので、より高いレベルの第一スズイオンにより、壊れやすいジスルフィド結合、例えば、ジスルフィド環化ペプチドに存在するジスルフィド結合などが還元されないことを保証するために十分な注意を払う必要がある。レニウムを用いた放射標識化のとき、 $Tc-99m$  で使用されるのと同様の手順が使用される。 $Tscg-Cys$ -配位子の  $ReO$  金属錯体を調製するための好ましい方法は、ペプチドを  $ReOCl_3(P(Ph_3))_2$  と反応させることによるものである。しかし、 $ReO$  (エチレンジアミン) $_2$  などの他の還元された化学種を使用することもまた可能である。

10

20

30

40

50

## 【0209】

## V I . 投与方法

本明細書中下記に示される議論の多くは、疾患組織を処置することに関連して、本発明の二重特異性抗体およびターゲッティング可能な構築物の使用に集中していることに留意しなければならない。しかし、本発明では、米国特許第6,126,916号、同第6,077,499号、同第6,010,680号、同第5,776,095号、同第5,776,094号、同第5,776,093号、同第5,772,981号、同第5,753,206号、同第5,746,996号、同第5,697,902号、同第5,328,679号、同第5,128,119号、同第5,101,827号および同第4,735,210号に記載される方法を使用して正常な組織および器官を処置および/または画像化することにおいて本発明の二重特異性抗体およびターゲッティング可能な構築物を使用することが考えられる。本明細書中で使用される用語「組織」は、卵巣、胸腺、副甲状腺または脾臓に由来する組織（これらに限定されない）を含む様々な組織を示す。

10

## 【0210】

b s A b、および上記で議論されたリンカー成分と結合する治療剤の投与は、リンカー成分と結合する治療剤の投与に先立って、そのかなり前にb s A bを投与することによって行なうことができる。試薬の量および時期は、当業者によって容易に設定することができ、用いられる試薬の特有の性質に依存する。b s A b - F ( a b ' )<sub>2</sub>誘導体が最初に投与される場合、リンカー成分を投与する前に24時間~72時間の待機時間が適切であると考えられる。I g G - F a b ' b s A bコンジュゲート体が最初のターゲッティングベクターである場合、リンカー成分を投与する前に、より長い待機期間が、3日~10日の範囲内で指示される。

20

## 【0211】

本明細書中で使用される用語「治療剤」には、薬物、プロドラッグおよび/または毒素が含まれるが、これらに限定されない。用語「薬物」、用語「プロドラッグ」および用語「毒素」は、本明細書中を通して定義されている。診断剤は、より多くの場合には、存在する疾患の種類を決定するために使用され、一方、検出剤は、より多くの場合には、位置決定および診断のために使用される。しかし、本明細書中に記載されるように、診断剤の用語はまた、検出剤を示すためにも使用することができる。

30

## 【0212】

b s A bを疾患組織にターゲッティングするために十分な時間が経過した後、診断/検出剤が投与される。診断/検出剤の投与に続き、画像化を行うことができる。適切な波長の光を構造部に送達し、その後、光を集めて、様々な構造部を直接的または間接的に調べることによって、腫瘍を体腔内において検出することができる。非イオン化放射線が送達され、これらの構造部から再捕獲され得る限り、任意の身体部位における病変部を調べることができる。例えば、高分解能かつ非侵襲性の画像化技術であるPETを、ヒト疾患を視覚化するために、本発明の抗体とともに使用することができる。PETでは、陽電子消滅崩壊のときに生じる511keVの線光子が検出される。

## 【0213】

本発明では、一般に、25keV~600keVの線粒子および/または陽電子を放出する診断剤の使用が考えられる。そのような薬剤の例には、<sup>18</sup>F、<sup>52</sup>Fe、<sup>62</sup>Cu、<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>67</sup>Ga、<sup>68</sup>Ga、<sup>86</sup>Y、<sup>89</sup>Zr、<sup>94m</sup>Tc、<sup>94</sup>Tc、<sup>99m</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>154</sup>~<sup>158</sup>Gdおよび<sup>175</sup>Luが含まれるが、これらに限定されない。

40

## 【0214】

本発明の抗体または抗体フラグメントは、米国特許第6,096,289号、同第4,331,647号、同第4,818,709号、同第4,348,376号、同第4,361,544号、同第4,444,744号および同第5,851,527号で議論されるように、光学的療法(PDT)の方法において使用することができる。

## 【0215】

50

PDTでは、光増感剤（例えば、ジヘマトポルフィリンエーテルなどのヘマトポルフィリン誘導体）が被験体に投与される。抗腫瘍活性は、光（例えば、630nm）の使用により開始される。様々な代わりの光増感剤を利用することができ、これには、皮膚が日光によって光感作されることが少ない、より長い波長で有用なものが含まれる。そのような光増感剤の例には、ベンゾポルフィリンモノ酸リングA（BPD-MA）、スズエチオプルプリン（SnET2）、スルホン化アルミニウムフタロシアニン（ALSPc）およびルテチウムテキサフィリン（Lutex）が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0216】

さらに、PDTでは、診断剤が、例えば全身注射によって注射され、そしてレーザーにより誘導される蛍光を内視鏡によって使用して、光活性化された薬剤が蓄積しているがん部位を検出することができる。例えば、これは、初期肺腫瘍の蛍光気管支鏡検査による明示化に適用されている。Doironら、Chest、76:32(1979)。別の例において、抗体および抗体フラグメントを単光子放射において使用することができる。例えば、Tc-99mで標識された診断剤を、本発明の抗体または抗体フラグメントの投与後に被験体に投与することができる。その後、被験体は、単光子放射コンピューター断層撮影画像をもたらし、病変部位または腫瘍部位を明確に示すがγ線カメラを用いて走査される。

#### 【0217】

治療上有用な免疫コンジュゲート体は、光活性な薬剤または色素を抗体複合物にコンジュゲート化することによって得ることができる。蛍光性および他の色素原、または色素（例えば、可視光に対する感受性を有するポルフィリン類）が、好適な光を病変部に誘導することによって、病変部を検出し、かつ病変部を処置するために使用されている。治療において、これは光放射線または光線療法または光力学的治療と呼ばれている（Joriら（編）、Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases（Libreria Progetto、1985）；van den Bergh、Chem. Britain、22:430(1986)。さらに、モノクローナル抗体が、光線療法を達成するために光活性化色素とカップリングされている。Mewら、J. Immunol.、130:1473(1983)；同上、Cancer Res.、45:4380(1985)；Oseroffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83:8744(1986)；同上、Photochem. Photobiol.、46:83(1987)；Hasanら、Prog. Clin. Biol. Res.、288:471(1989)；Tatsutaら、Lasers Surg. Med. 9:422(1989)；Pelegrinら、Cancer 67:2529(1991)。しかし、これらのより初期の研究では、内視鏡治療適用の使用、特に、抗体フラグメントまたはサブフラグメントの使用を伴う内視鏡治療適用の使用は含まれていなかった。従って、本発明では、光活性な薬剤または色素を含む免疫コンジュゲート体の治療的使用が考えられる。

#### 【0218】

リンカー成分はまた、標的部位においてプロドラッグを活性化することができる酵素に対して、または身体の解毒化経路を制御することによって通常の治療剤の効力を改善することができる酵素に対してコンジュゲート化することができる。bsAbの投与後、リンカー成分にコンジュゲート化されている酵素、すなわち、bsAbの第2のアームによって認識される低分子量ハプテンが投与される。酵素が標的部位に予備的にターゲティングされた後、標的部位において作用することが知られている細胞傷害性薬物が注射される。この薬物は、哺乳類の通常の解毒化プロセスにより解毒される薬物であり得る。例えば、薬物は、肝臓において、潜在的に毒性がより少ないグルクロニドに変換され得る。その後、解毒された中間体は、標的部位において予備的にターゲティングされた酵素によってそのより毒性の形態に再び変換され得る。あるいは、投与されたプロドラッグは、予備的にターゲティングされた酵素によって活性な薬物に変換され得る。予備的にターゲティングされた酵素により、処置の効力が、解毒された薬物を再利用することによって改善

10

20

30

40

50

される。この方法は、任意の酵素 - 薬物対を用いた使用のために取り入れることができる。

#### 【0219】

抗がん治療のために有用ないくつかの細胞傷害性薬物は血清中で比較的不溶性である。いくつかのそのような薬物は非コンジュゲート化形態で極めて毒性であり、それらの毒性はプロドラッグへの変換によってかなり軽減される。溶解性が悪い薬物をより可溶性のコンジュゲート体（例えば、グルクロニド、親水性酸のエステルまたは親水性アミンのアミド）に変換することにより、血清の水相におけるその溶解性、ならびに静脈、動脈または毛細管の細胞壁を通過するその能力、および腫瘍が浸る間質液に到達するその能力が改善される。プロドラッグの切断により、溶解性がより低い薬物が標的部に蓄積する。プロドラッグから薬物へのそのような変換の多数の例が、Hansenの米国特許第5,851,527号に開示されている。

10

#### 【0220】

芳香族または脂環式のアルコール、チオール、フェノールおよびアミンなどのある種の毒性物質が肝臓においてグルクロニドに変換されることは、それらを解毒化して、より容易に尿中に排出させるという身体の方法である。そのような基質に変換され得る抗腫瘍薬物の1つのタイプが、エピルピシン、すなわち、ドキソルピシン（アドリアマイシン）の4-エピマーであり、これはアントラサイクリングリコシドであり、ヒト-D-グルクロニダーゼに対する基質であることが示されている（例えば、Arcamone、Cancer Res.、45:5995（1985）を参照のこと）。極性がより少ない基を含む他のアナログは、親油性がより大きいことが予想され、そのような方法に対して有望性が大きくなっている。芳香族または脂環式のアルコール基またはチオール基またはアミン基を含む他の薬物または毒素は、そのようなコンジュゲート体を形成させるための候補である。これらの薬物またはそれらの他のプロドラッグ形態は、本発明の部位特異的な増強法に対する好適な候補である。

20

#### 【0221】

プロドラッグCPT-11（イリノテカン）は、インビボでカルボキシルエステラーゼによって、活性な代謝産物SN-38に変換される。従って、本発明の1つの応用は、腫瘍およびハプテン（例えば、ジDTPA）に対してターゲティングされたbsAbを使用し、その後、ジDTPA-カルボキシルエステラーゼコンジュゲート体を注射することである。好適な腫瘍対バックグラウンド局在化比が一旦達成されると、CPT-11が投与され、そして腫瘍に局在化したカルボキシルエステラーゼは、腫瘍においてCPT-11をSN-38に変換するために役立つ。その溶解性が悪いために、活性なSN-38は腫瘍の近くに留まり、その結果として、ターゲティングされている抗原について陰性である近接した腫瘍細胞に対して一定の作用をもたらす。このことは、本方法のさらなる利点である。修飾形態の様々なカルボキシルエステラーゼが記載されており、それらは本発明の範囲内である。例えば、Potterら、Cancer Res. 58:2646~2651（1998）；およびPotterら、Cancer Res. 58:3627~3632（1998）を参照のこと。

30

#### 【0222】

エトポシドは、そのグルクロニドが形成されることによって大部分が解毒される広く使用されているがん薬物であり、本発明の範囲内である。例えば、Handeら、Cancer Res.、48:1829~1834（1988）を参照のこと。様々なグルクロニドコンジュゲート体を細胞傷害性薬物から調製することができ、これらは、mAb-グルクロニダーゼコンジュゲート体によって予備的にターゲティングされる腫瘍に対する治療剤として注射することができる。例えば、Wangら、Cancer Res.、52:4484~4491（1992）を参照のこと。従って、そのようなコンジュゲート体はまた、本明細書中に記載されるプレターゲティング方法とともに使用することができる。同様に、ダウノマイシンおよびドキソルピシンの誘導体に基づく設計されたプロドラッグが、カルボキシルエステラーゼおよびグルクロニダーゼとの使用について記載されて

40

50

いる。例えば、Bakinaら、J. Med. Chem., 40: 4013~4018 (1997)を参照のこと。本発明において使用することができるプロドラッグ/酵素対の他の例には、フェノールマスタード類のヒドロキシ誘導体のグルクロニドプロドラッグおよび - グルクロニダーゼ; フェノールマスタード類またはCPT-11およびカルボキシペプチダーゼ; メトトレキサートで置換された アミノ酸およびカルボキシペプチダーゼA; 6-メルカプトプリンそしてドキシソルピシンなどの薬物のペニシリンコンジュゲート体またはセファロスポリンコンジュゲート体および - ラクタマーゼ; リン酸エトポシドおよびアルカリホスタファーゼが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0223】

標的部位においてプロドラッグを活性化することができる酵素、または身体の解毒化経路を制御することによって通常の治療剤の効力を高めることができる酵素を、代わりに、ハプテンにコンジュゲート化することができる。酵素-ハプテンコンジュゲート体は、予備的にターゲティングするbsAbを投与した後で被験体に投与され、酵素-ハプテンコンジュゲート体を標的部位に向かわせる。酵素が標的部位において局在化した後、標的部位において作用することが知られている細胞傷害性薬物、または予備的にターゲティングされた酵素によってインサイチューで薬物に変換されるそのプロドラッグ形態が注射される。上記で議論されたように、薬物は、哺乳類の通常解毒化プロセスを使用して解毒されて、毒性がより低い中間体(最も一般的には、グルクロニド)を形成する薬物である。解毒された中間体(例えば、グルクロニド)は、予備的にターゲティングされた酵素によってそのより毒性のある形態に再変換され、従って、増強された細胞毒性を標的部位において有する。これにより、薬物の再利用がもたらされる。同様に、投与されたプロドラッグを、正常な生物学的プロセスを介して活性な薬物に変換することができる。予備的にターゲティングされた酵素により、処置の効力が、解毒された薬物を再利用することによって改善される。この方法は、任意の酵素-薬物対を用いた使用のために取り入れることができる。

10

20

#### 【0224】

本発明ではさらに、ホウ素中性子捕獲治療(BNCT)プロトコルに関連して、本発明のbsAbおよび診断剤の使用が考えられる。BNCTは、腫瘍に局在化した<sup>10</sup>B原子に中性子照射することによって腫瘍細胞にイオン化放射線を送達するために設計された2元システムである。BNCTは、安定な同位体に、すなわち、同位体濃縮された<sup>10</sup>B(19.8%の天然存在量で存在)に熱中性子が照射されて、<sup>10</sup>B粒子および<sup>7</sup>Li原子核が生じるときに起こる核反応に基づいている。これらの粒子は、ほぼ細胞1個分の直径の行路長を有しており、これにより、比例した大きいエネルギー転移がもたらされる。この核反応で生じるほんの一握りの短い1.7MeVの<sup>10</sup>B粒子のみが、細胞の核をターゲティングし、かつ細胞の核を破壊するために十分である。がんのBNCTによる成功には、高濃度の<sup>10</sup>Bを腫瘍部位において局在化させ、同時に、非標的器官を本質的にはホウ素非含有状態にするための方法が必要である。BNCTのためにプレターゲティングbsAbを使用して被験体における腫瘍を処置するための組成物および方法が、同時係属中の米国特許出願第09/205,243号に記載されており、本発明の目的のために容易に変更することができる。

30

40

#### 【0225】

標的部位における抗原に対して特異的な少なくとも1つの結合部位と、抗体-酵素コンジュゲート体の酵素成分に対して特異的な少なくとも1つの他の結合部位とを有する二重特異性の抗体または抗体フラグメントが、本発明の方法において使用され得ることにまた留意しなければならない。そのような抗体は注射前に酵素と結合させることができ、それにより、酵素を抗体に共有結合的にコンジュゲート化しなければならないことを回避することができる。あるいは、そのような抗体は注射され、標的部位に局在化させることができ、そして、ターゲティングされなかった抗体が哺乳類の循環系から実質的にクリアリングされた後、局在化した抗体または抗体フラグメントのところに十分な量の酵素が到達し、それに結合して、抗体-酵素コンジュゲート体をインサイチューで形成させることを

50

可能にする量およびそのような経路によって酵素を注射することができる。

【0226】

本発明ではまた、米国特許出願第09/911,610号に記載されるように少なくとも3つの異なる標的結合部位を有する多価の標的結合タンパク質の使用が考えられることにもまた留意しなければならない。様々な多価の抗体が、化学的リンカーを介して数個のFab様フラグメントを架橋することによって作製されている。米国特許第5,262,524号、同第5,091,542号; Landsdorffら、Euro. J. Immunol.、16:679~83(1986)を参照のこと。多価の抗体はまた、数個の単鎖Fv分子(scFv)を共有結合的に連結して、単一のポリペプチドを形成することによって作製されている。米国特許第5,892,020号を参照のこと。基本的にはscFv分子の集合体である多価の抗体が、米国特許第6,025,165号および同第5,837,242号に開示されている。3つのscFv分子を含む三価の標的結合性タンパク質が、Krottら、Protein Engineering、10(4):423~433(1997)に記載されている。

10

【0227】

bsAbの服用とリンカー成分の服用との間で投与されるクリアリング剤を使用することができる。本発明者らは、新しい機構による作用を有するクリアリング剤、すなわち、bsAbの疾患ターゲティングアームに対してターゲティングされたグリコシル化抗イディオタイプFab'フラグメントが本発明とともに使用され得ることを発見している。抗CEA(MN14Ab)x抗ペプチドbsAbが投与され、疾患標的においてその最大限まで蓄積させられる。残留するbsAbをクリアリングするために、MN-14に対する抗イディオタイプAb(WI2と呼ばれる)が、好ましくはグリコシル化Fab'フラグメントとして投与される。クリアリング剤は一価の様式でbsAbに結合し、同時に、結合しているグリコシル残基により、完全な複合体を肝臓に向かわせ、肝臓において迅速な代謝が行われる。その後、リンカー成分と結合する治療剤が被験体に投与される。bsAbのMN-14アームに対するWI2Abは高い親和性を有しており、そのクリアランス機構は他の開示された機構とは異なる(Goodwinら(同上)を参照のこと)。これは、WI2-Fab'が一価の成分であるため、架橋を含まないからである。あるいは、抗CSAp(Mu-9抗体)x抗ペプチドbsAbが投与され、疾患標的においてその最大限まで蓄積させられる。

20

30

【0228】

VII. 薬学的に好適な賦形剤

被験体に送達されるヒト化抗CSAp抗体またはキメラ抗CSAp抗体またはヒト抗CSAp抗体およびそれらのフラグメントは、抗体単独、免疫コンジュゲート体、融合タンパク質から構成され得るか、あるいは1つ以上の薬学的に好適な賦形剤、1つ以上のさらなる成分、またはこれらのいくつかの組み合わせを含むことができる。好ましくは、抗CSAp抗体はMu-9抗体である。

【0229】

本発明のMu-9免疫結合物、むき出し状態の抗体、融合タンパク質およびそれらのフラグメントは、薬学的に有用な組成物を調製するための知られている様々な方法に従って配合することができ、それにより、免疫コンジュゲート体またはむき出し状態の抗体が薬学的に好適な賦形剤との混合物において一緒にされる。滅菌されたリン酸塩緩衝化生理的食塩水は、薬学的に好適な賦形剤の一例である。他の好適な賦形剤が当業者に広く知られている。例えば、Anselら、PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS(第5版)(Lea&Febiger、1990); およびGennaro(編)、REMITTINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(第18版)(Mack Publishing Company、1990); およびそれらの改訂版を参照のこと。

40

【0230】

本発明の免疫コンジュゲート体、むき出し状態の抗体、融合タンパク質およびそれらのフ

50

ラグメントは、例えば、ボーラス注射または連続注入による静脈内投与のために配合することができる。注入用の配合物は、保存剤が添加されている単位投薬形態で（例えば、アンプルまたは多回用量容器において）提供することができる。組成物は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクルにおける懸濁物または溶液またはエマルションのような形態を取ることができ、そして懸濁剤、安定化剤および/または分散剤などの配合剤を含有することができる。あるいは、有効成分は、好適なビヒクル、例えば、滅菌されたパイロジェン非含有水を用いて使用前に構成される粉末形態にすることができる。

#### 【0231】

さらなる薬学的方法を、治療用または診断用のコンジュゲート体またはむき出し状態の抗体の作用の持続期間を制御するために用いることができる。制御放出調製物を、免疫コンジュゲート体またはむき出し状態の抗体を複合体化または吸着するためのポリマーの使用によって調製することができる。例えば、生体適合性ポリマーには、ポリ(エチレン-c o -ビニル酢酸)のマトリクス、およびステアリン酸二量体とセバシン酸とのポリ無水物コポリマーのマトリクスが含まれる。Sherwoodら、Bio/Technology、10:1446(1992)。そのようなマトリクスからの免疫コンジュゲート体または抗体の放出速度は、免疫コンジュゲート体または抗体の分子量、マトリクス内の免疫コンジュゲート体または抗体の量、そして分散粒子のサイズに依存する。Saltzmanら、Biophys.J.、55:163(1989); Sherwoodら、同上。他の固体投薬形態が、Anselら、PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS(第5版)(Lea & Febiger、1990); およびGennaro(編)、REMGINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(第18版)(Mack Publishing Company、1990); およびそれらの改訂版に記載されている

10

20

#### 【0232】

免疫コンジュゲート体、抗体融合タンパク質またはネイクド抗体はまた、哺乳類の皮下に投与することができ、または他の非経口経路によってさえも投与することができる。さらに、投与は、連続的な注入によって、あるいは単回または多数回のボーラスによって行うことができる。一般に、ヒトに対する投与された免疫コンジュゲート体または融合タンパク質またはむき出し状態の抗体の投薬量は、患者の年齢、体重、身長、性別、全身の医学的状态および過去の病歴のような要因に依存して変化する。典型的には、単回の静脈内注入として約1mg/kg~20mg/kgの範囲の免疫コンジュゲート体または抗体融合タンパク質またはむき出し状態の抗体の投薬量が被投与体に与えられることが望ましいが、より低い投薬量またはより高い投薬量もまた、状況に応じて投与することができる。この投薬は、必要とされる場合には、例えば、1週間に1回で4週間~10週間にわたって、好ましくは1週間に1回で8週間にわたって、より好ましくは1週間に1回で4週間にわたって繰り返すことができる。投薬はまた、より少ない頻度で、例えば、1週間毎に数ヶ月間にわたって行うことができる。投薬は、様々な非経口経路により、用量およびスケジュールを適切に調節して行うことができる。

30

#### 【0233】

治療目的のために、免疫コンジュゲート体または融合タンパク質またはむき出し状態の抗体およびそれらのフラグメントは治療有効量で被験体に投与される。本発明に対する好適な被験体は哺乳類であり、好ましくはヒトであるが、イヌ、ネコまたはウマなどの非ヒト哺乳類もまた考えられる。抗体調製物は、投与される量が生理学的に意味を有する場合、「治療有効量」で投与されると言われる。薬剤は、薬剤が存在することにより、投与を受けた哺乳類の生理機能において検出可能な変化がもたらされる場合、生理学的に意味を有する。

40

#### 【0234】

診断目的のために、免疫コンジュゲート体または融合タンパク質またはむき出し状態の抗体およびそれらのフラグメントは診断有効量で被験体に投与される。抗体調製物は、投与される量が、通常の場合には宿主に対する薬理学的作用を何ら伴うことなく、被験体にお

50

ける健康状態、悪性腫瘍、疾患または障害を診断または検出するために一般には十分である場合、「診断有効量」で投与されると言われる。

#### 【0235】

##### V I I I . 発現ベクター

本発明にはまた、キメラ抗 C S A p 抗体またはヒト化抗 C S A p 抗体またはヒト抗 C S A p 抗体および融合タンパク質およびそれらのフラグメントをコードする核酸が包含される。そのような核酸を含む発現ベクターもまた本発明に含まれる。ヒト化 M u - 9 抗体またはキメラ M u - 9 抗体またはヒト M u - 9 抗体をコードする D N A 配列を組換え操作して、核酸の複製をもたらす様々な知られている宿主ベクターに入れることができる。これらのベクターは、送達される細胞における核酸の転写または翻訳またはその両方を行わせるために必要なエレメントを含有させるために、知られている方法を使用して設計することができる。知られている方法論を、適切な転写/翻訳制御シグナルとともに機能的に連結されているタンパク質コード配列を有する発現構築物を作製するために使用することができる。これらの方法には、インビトロでの組換え D N A 技術および合成技術が含まれる。例えば、S a m b r o o k ら、1989、M O L E C U L A R C L O N I N G : A L A B O R A T O R Y M A N U A L、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y ( N e w Y o r k ) ; A u s u b e l ら、1997、C U R R E N T P R O T O C O L S I N M O L E C U L A R B I O L O G Y、J o h n W i l e y & S o n s ( N e w Y o r k ) を参照のこと。また、本発明では、ベクターに関連しないポリヌクレオチドの送達も提供される。

10

20

#### 【0236】

本発明における使用のために好適なベクターはウイルス性または非ウイルス性であり得る。ウイルスベクターの具体的な例には、アデノウイルスベクター、A A V ベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レンチウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターが含まれる。非ウイルス性ベクターの例には、プラスミドがある。好ましい実施形態において、ベクターはプラスミドである。

#### 【0237】

本明細書中に記載されるように、発現ベクターは、宿主細胞において発現される遺伝子を含むポリヌクレオチドである。典型的には、遺伝子発現は、構成的プロモーターまたは誘導的プロモーターを含むいくつかの調節エレメント、組織特異的調節エレメントおよびエンハンサーの制御下に置かれる。そのような遺伝子は、調節エレメントに「機能的に連結されている」と言われる。

30

#### 【0238】

好ましくは、本発明の発現ベクターは、重鎖および軽鎖の可変領域および定常領域の両方を含むヒト化 M u - 9 抗体またはキメラ M u - 9 抗体またはヒト M u - 9 抗体をコードする D N A 配列を含む。しかし、2つの発現ベクターを使用することもでき、この場合、一方の発現ベクターが重鎖の可変領域および定常領域を含み、もう一方の発現ベクターが軽鎖の可変領域および定常領域を含む。さらに好ましくは、発現ベクターはさらに、プロモーター、分泌シグナルペプチドをコードする D N A 配列、ヒト I g G 1 重鎖定常領域をコードするゲノム配列、I g エンハンサーエレメント、および選択マーカーをコードする少なくとも1つの D N A 配列を含む。

40

#### 【0239】

下記に記載される代表的な実施形態は、単に本発明を例示するために使用されるだけである。当業者は、本発明の物質の様々な変化が、請求される発明の広範な包括的範囲に含まれることを理解する。本明細書中で言及されるすべての参考文献の内容は、参照することにより組み込まれる。

##### I X . 実施例

#### 【実施例1】

#### 【0240】

A c - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s -

50

) - NH<sub>2</sub> (IMP 243) の合成

このペプチドは、D - チロシンが L - チロシンの代わりに使用されたこと、および N - トリチル - HSG - OH が DTPA の代わりに使用されたことを除いて、Karacayら、Bioconjugate Chem.、11: 842 ~ 854 (2000) により記載されるように合成された。N - トリチル - HSG - OH の最終的なカップリングは、樹脂上のペプチドに対して 10 倍過剰量の N - トリチル - HSG - OH を使用して行なわれた。N - トリチル - HSG - OH (NMP において 0.28 M) は、(HSG に対して) 1 当量の N - ヒドロキシベンゾトリアゾール、1 当量のベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシ - トリス - (ジメチルアミノ) ホスホニウム・ヘキサフルオロホスファート (BOP)、および 2 当量のジイソプロピルエチルアミンを使用して活性化された。活性化された基質を樹脂と室温で 15 時間混合した。

【実施例 2】

【0241】

IMP 243 を含む Tc - 99m キット配合物

22.093 g のヒドロキシプロピル - シクロデキストリン、0.45 g の 2, 4 - ジヒドロキシ安息香酸、0.257 g の酢酸ナトリウム塩、および 10.889 g の D - グルコヘプトン酸ナトリウム塩を、170 mL の窒素脱気された水に溶解させて含有する配合緩衝液を調製した。溶液を、数滴の 1 M NaOH で pH 5.3 に調節し、その後、220 mL の総容量にさらに希釈した。第一スズ緩衝液を、0.2 mL の SnCl<sub>2</sub> (200 mg/mL) を 3.8 mL の配合緩衝液で希釈することによって調製した。ペプチド Ac - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub> (0.0026 g) を 78 mL の緩衝液に溶解し、0.52 mL の第一スズ緩衝液と混合した。その後、ペプチド溶液を 0.22 mL の Millex GV フィルターでろ過し、1.5 mL ずつ小分けして 3 mL の凍結乾燥バイアルに入れた。満たされたバイアルを直ちに凍結し、凍結乾燥して、真空下にて縁ひだキャップで密閉した。

【0242】

1.5 mL の生理的食塩水における過テクネチウム酸塩溶液 (27 mCi) をキットに加えた。キットを室温で 10 分間インキュベーションし、沸騰水浴で 25 分間加熱した。キットは使用前に室温に冷却された。

【実施例 3】

【0243】

二重特異性抗体の腫瘍プレターゲティングによって治療 / 画像化用放射性同位体を腫瘍に運ぶためのペプチド

DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub> (IMP 237) を、二重特異性抗体の腫瘍プレターゲティングによって腫瘍に<sup>90</sup>Y または<sup>177</sup>Lu などの治療用放射性同位体を送達するために合成した。この二重特異性抗体は、腫瘍表面の抗原に結合する部分が 1 つと、HSG ペプチドに結合する別の部分の 1 つとから構成される。HSG ペプチドと結合する抗体は 679 である。このシステムはまた、<sup>111</sup>In - 111 などの画像化用同位体を送達するためにも使用することができる。

【0244】

IMP 237 の合成

IMP 237 は、下記の保護アミノ酸をその順に用いてペプチド骨格を組み立てるために、Fmoc に基づく標準的な固相ペプチド合成を使用して Sieber アミド樹脂 (Nova - Biochem) 上で合成された。Fmoc - Lys (Alloc) - OH、Fmoc - Tyr (But) - OH、Fmoc - Lys (Alloc) - OH、Fmoc - Phe - OH (これらの試薬は Advanced Chemtech から得られた)、トリ - t - ブチル DOTA (Macrocyclics)。その後、側面リシンの側鎖を、Danglesら、J. Org. Chem.、52: 4984 ~ 4993 (1987) の方法によって Pd [P (Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> で脱保護した。その後、HSG 配位子を、アミノ酸を結合させるために使用された BOP / HBTU 二重カップリング手法を使用してトリチル HSG

10

20

30

40

50

(合成は下記に記載される)として加えた。ペプチドを樹脂から切断して、保護基をTFAでの処理によって除去した。ペプチドをHPLCによって精製して、0.6079gのペプチドが1.823gのFmoc-Lys(Alloc)-Tyr(But)-Lys(Alloc)-NH-Sieberアミド樹脂から得られた。

#### 【0245】

N-トリチル-HSG-OHの合成

グリシン-t-ブチルエステル塩酸塩(15.263g、 $9.1 \times 10^{-2}$ モル)および19.760gの $\text{Na}_2\text{CO}_3$ を混合して、50mLの $\text{H}_2\text{O}$ に懸濁し、氷浴で冷却した。その後、無水コハク酸(9.142g、 $9.14 \times 10^{-2}$ モル)を反応液に添え、反応液を室温にゆっくり加温して、18時間攪拌した。クエン酸(39.911g)を50mLの $\text{H}_2\text{O}$ に溶解して、反応溶液にゆっくり加え、その後、150mLのEtOAcで2回抽出した。有機抽出液を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥し、ろ過し、濃縮して、25.709gの白色固体が得られた。

10

#### 【0246】

粗生成物(25.709g)を125mLのジオキサンに溶解し、室温の水浴で冷却して、11.244gのN-ヒドロキシスクシンイミドと混合した。ジイソプロピルカルボジイミド(15.0mL)を反応液に加え、1時間攪拌した。その後、ヒスタミン二塩酸塩(18.402g、 $1.00 \times 10^{-1}$ モル)を100mLのDMFおよび35mLのジイソプロピルエチルアミンに溶解した。このヒスタミン混合液を反応液に加え、室温で21時間攪拌した。反応を100mLの水で停止させ、ろ過して沈澱物を除いた。溶媒を高真空下においてロータリーエバポレーターで除去した。粗生成物を300mLのジクロロメタンに溶解して、100mLの飽和 $\text{NaHCO}_3$ で抽出した。有機層を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥し、濃縮して、34.19gの粗生成物が黄色オイルとして得られた。

20

#### 【0247】

粗生成物(34.19g)を50mLのクロロホルムに溶解し、31mLのジイソプロピルエチルアミンと混合した。トリフェニルメチルクロリド(25.415g)を50mLのクロロホルムに溶解し、氷浴で冷却された反応液に攪拌しながら滴下して加えた。反応液を45分間攪拌し、その後、100mLの $\text{H}_2\text{O}$ で停止させた。層を分離し、有機溶液を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥し、濃縮して、緑色のゴムが得られた。このゴムを100mLの $\text{Et}_2\text{O}$ とともに粉碎して、黄色の沈澱物を形成させ、これを50mLの $\text{Et}_2\text{O}$ で3回洗浄した。固体を真空乾燥して、30.641g(59.5%の総収率)のN-トリチル-HSG-t-ブチルエステルが得られた。

30

#### 【0248】

N-トリチル-HSG-t-ブチルエステル(20.620g、 $3.64 \times 10^{-2}$ モル)を30mLのクロロホルムおよび35mLの氷酢酸からなる溶液に溶解した。反応液を氷浴で冷却し、15mLの $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ を反応液にゆっくり加えた。反応液を室温にゆっくり加温し、5時間混合した。反応を、200mLの1M  $\text{NaOH}$ に注ぐことによって停止させ、生成物を200mLのクロロホルムで抽出した。有機層を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥し、濃縮して、不純物を含むゴムを得た。これを100mLの $\text{Et}_2\text{O}$ とともに粉碎し、沈澱物を形成させた。不純物を含む沈澱物を400mLの0.5Mリン酸緩衝液(pH7.5)に注ぎ、200mLのEtOAcで2回抽出した。水層を1M  $\text{HCl}$ でpH3.5に酸性化して、200mLのクロロホルムで2回抽出した。沈澱物が得られ、これをろ過によって集めた(8.58g)。沈澱物は、以前のサンプルとのHPLCでの比較により、所望の生成物であった(ESMS MH+511)。

40

#### 【0249】

放射標識

$^{90}\text{Y}$ キット調製物

DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)- $\text{NH}_2$ を、 $9 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $18 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $35 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $70 \mu\text{g}/\text{mL}$ および $140 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、0.25M  $\text{NH}_4\text{OAc}/10\%$  HPCD緩衝液に溶解した。溶液を $0.22 \mu\text{m}$

50

のMillex GVフィルターで滅菌ろ過して、酸洗浄された凍結乾燥バイアルに1 mLずつ小分けして入れた。満たされたバイアルを充填時に直ちに凍結して、凍結乾燥した。凍結乾燥サイクルが完了したとき、バイアルを真空下で密封し、凍結乾燥機から取り出すときに縁ひだキャップで密封された。

【0250】

$^{90}\text{Y}$  (約400  $\mu\text{Ci}$ /キット)を脱イオン水で1 mLに希釈して、凍結乾燥されたキットに加えた。キットを沸騰水浴で15分間加熱して、バイアルを室温に冷却し、標識されたペプチドを逆相HPLCによって評価した(HPLC条件: Waters Nova-Pak C-18、8 x 100 mm RCMカラム、100% (0.1% TFA /  $\text{H}_2\text{O}$ ) から100% (90%  $\text{CH}_3\text{CN}$ 、0.1% TFA、10%  $\text{H}_2\text{O}$ ) までの直線勾配を用いて3 mL / 分で溶出)。HPLC分析により、この配合物を用いた完全な標識化のために必要とされるペプチドの最低濃度は35  $\mu\text{g} / \text{mL}$ であることが明らかにされた。逆相HPLC図により、 $^{90}\text{Y}$  標識ペプチドの鋭いピークが示された。標識ペプチドは、サイズ排除HPLCにより、過剰量の679 IgGと混合されたとき、完全に結合した。

10

【0251】

$^{111}\text{In}$ を用いた標識

$^{111}\text{In}$  (約300  $\mu\text{Ci}$ /キット)を脱イオン水で0.5 mLに希釈して、凍結乾燥されたキットに添加した。キットを沸騰水浴で15分間加熱して、バイアルを冷却し、0.5 M 酢酸緩衝液における $2.56 \times 10^{-5}\text{M}$   $^{111}\text{In}$ の0.5 mLを加え、キットを再び沸騰水浴で15分間加熱した。標識されたペプチドのバイアルを室温に冷却して、逆相HPLCによって評価した(HPLC条件: Waters Nova-Pak C-18、8 x 100 mm RCMカラム、100% (0.1% TFA /  $\text{H}_2\text{O}$ ) から100% (90%  $\text{CH}_3\text{CN}$ 、0.1% TFA、10%  $\text{H}_2\text{O}$ ) までの直線勾配を用いて3 mL / 分で溶出)。HPLC分析により、この配合物を用いた標識化(4.7%の遊離 $^{111}\text{In}$ )のために必要とされるペプチドの最低濃度は35  $\mu\text{g} / \text{mL}$ であることが明らかになった。逆相HPLC図により、 $^{111}\text{In}$  標識ペプチドの鋭いピークが示された。標識ペプチドは、サイズ排除HPLCにより、過剰量の679 IgGと混合されたとき、完全に結合した。

20

【0252】

インビボ研究

GW-39 ヒト結腸異種移植片腫瘍(100 mg ~ 500 mg)を有するヌードマウスに二重特異性抗体hMN-14 x m679 ( $1.5 \times 10^{-10}$  モル)を注射した。抗体は、 $^{111}\text{In}$  標識ペプチド(8.8  $\mu\text{Ci}$ 、 $1.5 \times 10^{-11}$  モル)が注射される24時間前からクリアリングされた。動物は、注射の3時間後、24時間後、48時間後に屠殺された。

30

【0253】

hMN-14 x m679で予備的にターゲティングされたマウスにおけるペプチドの生体分布研究の結果が表1に示される。このプレターゲティング研究におけるペプチドの腫瘍対非腫瘍比が表2に示される。

【0254】

【表1】

40

hMN-14×m679注射後24時間における<sup>111</sup>In標識ペプチドによる  
プレターゲティング (%注射量/g組織)

組織	<sup>111</sup> In IMP 237 の 3時間後	<sup>111</sup> In IMP 237 の 24時間後	<sup>111</sup> In IMP 237 の 48時間後
GW-39	7.25 ± 2.79	8.38 ± 1.70	5.39 ± 1.46
肝臓	0.58 ± 0.13	0.62 ± 0.09	0.61 ± 0.16
脾臓	0.50 ± 0.14	0.71 ± 0.16	0.57 ± 0.15
腎臓	3.59 ± 0.75	2.24 ± 0.40	1.27 ± 0.33
肺	1.19 ± 0.26	0.44 ± 0.10	0.22 ± 0.06
血液	2.42 ± 0.61	0.73 ± 0.17	0.17 ± 0.06
胃	0.18 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.02
小腸	0.65 ± 0.74	0.18 ± 0.03	0.11 ± 0.02
大腸	0.30 ± 0.07	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.03

10

【0255】

【表2】

20

hMN-14×m679注射後24時間における<sup>111</sup>In標識ペプチドによる  
プレターゲティング (腫瘍/非腫瘍組織比)

組織	<sup>111</sup> In IMP 237 の 3時間後	<sup>111</sup> In IMP 237 の 24時間後	<sup>111</sup> In IMP 237 の 48時間後
肝臓	12.6 ± 4.44	13.6 ± 2.83	8.88 ± 1.78
脾臓	15.1 ± 6.32	12.1 ± 2.86	9.50 ± 1.62
腎臓	2.04 ± 0.74	3.84 ± 1.04	4.25 ± 0.19
肺	6.11 ± 1.96	19.6 ± 5.91	25.4 ± 6.00
血液	3.04 ± 1.13	11.9 ± 3.20	31.9 ± 4.79
胃	40.5 ± 16.5	104. ± 39.6	83.3 ± 16.5
小腸	18.9 ± 12.6	47.5 ± 10.3	49.5 ± 7.83
大腸	25.2 ± 10.6	50.1 ± 16.7	43.7 ± 9.35

30

DOTA-Phe-Lys (HSG) - Tyr-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP 237) およびDOTA-Phe-Lys (HSG) -D-Tyr-Lys (HSG) -NH<sub>2</sub> (IMP 241) の血清安定性

【0256】

40

ペプチドの標識およびHPLC分析

IMP 237およびIMP 241のペプチドを、Karacayら、Bioconjugate Chem.、11:842~854(2000)によって記載される手順に従って標識した。ペプチドIMP 241(0.0019g)を587μlの0.5M NH<sub>4</sub>Cl(pH5.5)に溶解した。1.7μL量のペプチド溶液を165μlの0.5M NH<sub>4</sub>Cl(pH5.5)で希釈した。10μLの<sup>111</sup>In(1.8mCi)をペプチド溶液に加えて、混合物を沸騰水浴で30分間加熱した。

【0257】

標識ペプチドを、Waters 8×100mmラジアルパック、nova-pak C18 RCMカートリッジカラムを使用してHPLCによって分析した。カラムは、0.1% T

50

F A / 水の 100% で開始し、90% アセトニトリルおよび 10% 水における 0.1% T F A の 100% に向かう 10 分間の直線勾配を用いて 3 mL / 分で溶出された。この標識化では、約 6% の遊離  $^{111}\text{In}$  が存在し、これはカラムの空隙容量 (1.6 分) において現れた。また、いくつかの  $^{111}\text{In}$  標識ピークが 5 分および 6.6 分 ~ 8 分で認められた。 $^{111}\text{In}$  標識ペプチドは単一ピークとして 8.8 分に溶出された。 $^{111}\text{In} - \text{IMP} 237$  の H P L C プロフィールは、 $^{111}\text{In} - \text{IMP} 241$  とほぼ同一であった。

#### 【0258】

##### 血清安定性

$^{111}\text{In} - \text{IMP} 241$  の一部 (30  $\mu\text{L}$ ) を 300  $\mu\text{L}$  の新鮮なマウス血清に入れ、37 のインキュベーターの中に置いた。ペプチドを、H P L C によって上記に記載されるようにモニターした。 $^{111}\text{In} - \text{IMP} 237$  の一部 (24  $\mu\text{L}$ ) を 230  $\mu\text{L}$  の新鮮なマウス血清に入れ、37 のインキュベーターの中に置いた。ペプチドを、H P L C によって上記に記載されるようにモニターした。分析により、 $^{111}\text{In} - \text{IMP} 241$  は、マウス血清中において 37 で 22 時間加熱された後ではわずかに (約 5%) 分解し得ることが示された。 $^{111}\text{In} - \text{IMP} 237$  は、37 で 22 時間のインキュベーションの後では約 70% が保持時間のより短いピークに変換された。

10

#### 【0259】

##### 結論

IMP 241 ペプチド中の D - チロシンは、IMP 237 と比較した場合、マウス血清中におけるペプチドの分解を遅らせる。

20

#### 【0260】

##### IMP 237 と IMP 241 とのインビボ安定性の比較

$^{111}\text{In} - \text{IMP} 237$  および  $^{111}\text{In} - \text{IMP} 241$  のインビボでの安定性を、30 分および 60 分においてマウスから得られた尿サンプルを (H P L C により) 試験することによって比較した。IMP 241 および IMP 237 のペプチドは、上記に記載されたように  $^{111}\text{In} - 111$  で標識された。

#### 【0261】

標識ペプチドを B a l b / c マウスに注射し、ペプチド注射の 30 分後および 60 分後にマウスを屠殺した (1 時点あたり 1 匹のマウスを使用した)。添付された H P L C 図により、 $^{111}\text{In} - \text{IMP} 241$  はそのままの形で排出され、一方、 $^{111}\text{In} - \text{IMP} 237$  は新しい  $^{111}\text{In}$  標識ペプチドにほぼ完全に代謝されたことが示される。

30

#### 【0262】

##### 結論

ペプチド骨格内の T y r を D - T y r で置換することにより、インビボにおけるペプチドの代謝が最小限に抑えられた。

#### 【0263】

##### さらなるインビボ研究

G W - 39 ヒト結腸異種移植片腫瘍 (100 mg ~ 500 mg) を有するヌードマウスに二重特異性抗体 m M u 9 x m 6 7 9 ( $1.5 \times 10^{-10}$  モル) を注射した。抗体は、 $^{111}\text{In}$  標識ペプチド (8.8  $\mu\text{Ci}$ 、 $1.5 \times 10^{-11}$  モル) が注射される 48 時間前からクリアリングされた。動物は、注入の 3 時間後、24 時間後、48 時間後に屠殺された。

40

#### 【0264】

m M U 9 x m 6 7 9 を用いて予備的にターゲッティングされたマウスにおけるペプチドの生体分布研究の結果が表 3 に示される。このプレターゲッティング研究におけるペプチドの腫瘍対非腫瘍比が表 4 に示される。表 5 のデータは、二重特異性抗体で前処理されなかったマウスにおけるペプチドの生体分布を示している。

#### 【0265】

#### 【表 3】

mMU 9 × m 6 7 9 注射後 4 8 時間における  $^{111}\text{In}$  標識ペプチドによるプレ  
ターゲティング  
(% 注射量 / g 組織)

組織	$^{111}\text{In}$ ペプチドの3時間後		$^{111}\text{In}$ ペプチドの24時間後		$^{111}\text{In}$ ペプチドの48時間後	
	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241
GW-39	18.3 ± 7.17	26.7 ± 14.1	16.7 ± 8.22	14.8 ± 4.56	12.9 ± 1.10	12.3 ± 2.11
肝臓	0.41 ± 0.10	0.66 ± 0.34	0.32 ± 0.08	0.32 ± 0.09	0.28 ± 0.09	0.32 ± 0.21
脾臓	0.34 ± 0.12	0.63 ± 0.38	0.34 ± 0.12	0.25 ± 0.07	0.28 ± 0.07	0.31 ± 0.22
腎臓	3.62 ± 0.71	4.28 ± 0.77	2.51 ± 0.54	2.34 ± 0.70	1.78 ± 0.38	1.17 ± 0.43
肺	0.61 ± 0.15	1.03 ± 0.65	0.22 ± 0.07	0.21 ± 0.07	0.12 ± 0.04	0.14 ± 0.08
血液	1.16 ± 0.48	1.78 ± 1.49	0.21 ± 0.13	0.15 ± 0.05	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0.09
胃	0.12 ± 0.04	0.21 ± 0.09	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.02
小腸	0.23 ± 0.04	0.50 ± 0.27	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.06	0.11 ± 0.08	0.07 ± 0.06
大腸	0.34 ± 0.16	0.38 ± 0.15	0.15 ± 0.07	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.07	0.09 ± 0.05

10

20

【 0 2 6 6 】

【 表 4 】

mMU 9 × m 6 7 9 注入後 4 8 時間における  $^{111}\text{In}$  標識ペプチドによるプレ  
ターゲティング  
(腫瘍 / 非腫瘍組織比)

組織	$^{111}\text{In}$ ペプチドの3時間後		$^{111}\text{In}$ ペプチドの24時間後		$^{111}\text{In}$ ペプチドの48時間後	
	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241
肝臓	45.6 ± 17.8	41.8 ± 19.6	49.8 ± 16.6	47.1 ± 8.68	49.1 ± 13.6	45.1 ± 13.9
脾臓	56.8 ± 23.8	43.5 ± 9.77	47.4 ± 14.7	59.6 ± 13.0	47.5 ± 10.6	50.2 ± 19.0
腎臓	5.13 ± 2.18	6.05 ± 2.41	6.43 ± 2.24	6.58 ± 2.42	7.43 ± 1.02	11.2 ± 2.61
肺	30.5 ± 10.6	28.4 ± 12.8	76.4 ± 34.1	72.7 ± 21.9	115. ± 36.6	102. ± 37.1
血液	18.6 ± 12.0	19.0 ± 11.8	86.9 ± 36.2	108. ± 41.0	187. ± 76.3	181. ± 86.6
胃	156. ± 86.1	126. ± 49.6	303. ± 95.9	328. ± 96.7	344. ± 101.	456. ± 193.
小腸	80.7 ± 29.0	59.0 ± 31.0	143. ± 60.7	193. ± 83.7	153. ± 67.7	217. ± 73.5
大腸	56.3 ± 19.7	78.6 ± 54.4	116. ± 36.9	155. ± 42.4	133. ± 47.6	153. ± 43.1

30

40

50

【 0 2 6 7 】

【 表 5 】

<sup>111</sup>I n 標識ペプチド単独の生体分布

組織	In-111-ペプチドの 30分後		In-111-ペプチドの 3時間後		In-111-ペプチドの 24時間後	
	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241
GW-39	2.99 ± 1.11	2.73 ± 0.37	0.17 ± 0.05	0.31 ± 0.12	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.08
肝臓	0.48 ± 0.06	0.50 ± 0.09	0.15 ± 0.02	1.07 ± 1.61	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.04
脾臓	0.42 ± 0.08	0.43 ± 0.22	0.09 ± 0.04	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.02	0.08 ± 0.03
腎臓	5.85 ± 0.37	7.31 ± 0.53	3.55 ± 0.44	3.21 ± 0.45	2.18 ± 0.24	2.61 ± 0.51
肺	1.26 ± 0.24	1.12 ± 0.26	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.06	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.06
血液	1.62 ± 0.34	1.59 ± 0.29	0.12 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00
胃	0.59 ± 0.32	0.52 ± 0.16	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.04
小腸	0.55 ± 0.13	2.52 ± 3.73	0.09 ± 0.01	0.17 ± 0.08	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01
大腸	0.33 ± 0.05	0.30 ± 0.07	0.33 ± 0.15	0.32 ± 0.14	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.03

10

20

【 実施例 4 】

【 0 2 6 8 】

Mu - 9 可変領域の PCR クローニング

ポリ A mRNA を、Fast Track mRNA 単離キット (Invitrogen、San Diego、CA) を使用して Mu - 9 ハイブリドーマ細胞株 ( $3 \times 10^7$  細胞) から単離した。第 1 鎖 cDNA を、cDNA サイクルキット (Invitrogen) を使用してポリ A mRNA から逆転写した。簡単に記載すると、1 g のポリ A mRNA を、ネズミ IgG CH1 特異的プライマーの CH1B (5' ACAGTCACTGAGCTGG3') またはネズミ Ck 特異的プライマーの Ck3 - BH1 (5' GCCGGATCCTCACTGGATGGTGGGAAGATGGATACA3') に対して、1 M の最終濃度において、42 °C で 60 分間、1 l の RNAse 阻害剤 (10 U/l)、4.0 l の 5x 逆転写酵素緩衝液 (500 mM の Tris - HCl (pH 8.2)、200 mM の KCl、50 mM の MgCl<sub>2</sub> および 2.5 mM の スペルミジン)、1 l の 100 mM dNTP、1 l の 80 mM ピロリン酸ナトリウム、および 5 U の AMV 逆転写酵素の存在下でアニーリングした。その後、RNA - cDNA のハイブリッドを 95 °C で 2 分間変性した。その後、第 1 鎖 cDNA をテンプレートとして使用して、Orlandi ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1989、86: 3833 により記載されるように PCR によって VH 配列および V<sub>H</sub> 配列を増幅した。VH 領域は、VK1BACK (5' - GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA3') および IgKC3' (5' - CTC ACTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGG3') のプライマーを使用して増幅された。VH 領域は、VH1BACK (5' AGGT(C/G)(A/C)A(A/G)CTGCAG(C/G)AGTC(A/T)GG3') および CH1B のプライマーを使用して増幅された。好ましい実施形態において、VH 領域は、図 8 に矢下線によって示されるプライマーを使用して増幅される。101

30

40

50

の第1鎖 cDNA 産物、10 l の 10 × PCR 緩衝液 (15 mM の MgCl<sub>2</sub>、500 mM の KCl、100 mM の Tris-HCl (pH 8.3) および 0.01% (w/v) のゼラチン)、1 M の各プライマー、16 l の dNTP 混合物、および 5 U の AmpliTaq DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer、Applied Biosystems Division、Foster City、CA) を含有する PCR 反応混合物を 30 サイクルの PCR に付した (94 で 1 分間の変性、45 で 1 分間のアニーリングおよび 72 で 1 分間の重合の 5 サイクルと、94 で 1 分間の変性、55 で 1 分間のアニーリングおよび 72 で 1 分間の重合の 25 サイクルとの組合せ)。増幅された V<sub>k</sub> フラグメントおよび V<sub>H</sub> フラグメントをゲル精製して、ジデオキシターミネーション法による配列分析のために T<sub>A</sub> クローニングベクター (Invitrogen) にクローニングした。その後、免疫グロブリン起源であることが確認された配列を、Leung ら、Hybridoma、1994、13:469 により記載された方法を使用してキメラな発現ベクターを構築するために使用した。

10

## 【0269】

多数のクローンのヌクレオチド配列を決定することにより、1つの V<sub>κ</sub> (Mu9V<sub>κ</sub> 1) 配列および 1つの V<sub>H</sub> (Mu9V<sub>H</sub>) 配列が単離されたことが確認された (図 8)。この RT-PCR 法によってクローニングされた V<sub>H</sub> および V<sub>κ</sub> 1 から構築されたキメラ Mu-9 (cMu-9-1) は、CSA p 抗原に対する結合を何ら示さなかった。このことは、RT-PCR クローニング手法によって見逃されたかもしれない他の「機能的な」V 領域配列が存在する可能性を示唆していた。

20

## 【実施例 5】

## 【0270】

cDNA ライブラリースクリーニングによる Mu-9 可変領域のクローニング  
cDNA ライブラリーを pSPORT ベクター (Life Technologies) においてネズミ Mu-9 ハイブリドーマから構築した。第1鎖 cDNA を、マウス Mu-9 ハイブリドーマ由来のポリA mRNA をオリゴdT プライマー-NotI アダプター (Life Technologies) と対形成させることによって合成した。第2鎖の合成および SalI アダプターの結合を行った後、cDNA プールを cDNA サイズ分画カラムによりサイズ分画した。分画された cDNA を pSPORT ベクターに連結し、その後、大腸菌 DH5 に形質転換した。ライブラリーを LB-amp (100 g/ml) 平板に置床し、コロニーを Nytran フィルター (Schleicher and Schuell、Keene、NH) に転写して、LB-クローラムフェニコール平板において増幅した。増幅されたコロニーを、0.5 N NaOH / 1.5 M NaCl で 5 分間、1 M Tris-HCl (pH 8.0) で 5 分間、0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) / 2 × SSC で 5 分間、そして最後に 2 × SSC で 5 分間 ~ 10 分間、連続して処理した。DNA を、80 で 30 分間のベーキング処理によってフィルターに固定化した。フィルターを、6 × SSC、5 × デンハルト (0.1% フィコール、0.1% ポリビニルピロリドンおよび 0.1% ウシ血清アルブミン)、0.5% SDS、0.05% ピロリン酸ナトリウム、および 100 g/ml ニシン精子 DNA (Life Technologies) を含有するプレハイブリダイゼーション緩衝液において 50 で 2 時間インキュベーションした。<sup>32</sup>P で標識されたプローブ (マウス重鎖に対して特異的な MUC<sub>H</sub>-1 (5' - AGACTGCAGGAGAGCTGGGAAGGTGTGCAC3') およびマウス軽鎖に対して特異的な MUC<sub>k</sub>-1 (5' - GAAGCACACGACTGAGGCACCTCCAGATGT3')) との 10<sup>6</sup> cpm/ml でのハイブリダイゼーションを、10% (w/v) デキストラン硫酸 (Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ) が補充されたプレハイブリダイゼーション溶液においてそれぞれのその融解温度 (T<sub>m</sub>) で一晩行なった。フィルター上の放射能が、ガイガーカウンターで測定したときに一定になるまで、フィルターは、0.2 × SSC、0.1% SDS において、37 で 10 分間の 4 回の洗浄、42 で 15 分間の 2 回の洗浄、そして 50 で 15 分間の 1 回の洗浄が行われた。2 × SSC における最後の洗浄の後、湿ったフ

30

40

50

フィルターをKodak XAR-5フィルム(Rochester, NY)に70で感光させた。最初のスクリーニングで陽性であったクローンを二連のLB-amp平板に移した。二連のNytranフィルターを、上記に記載されたのと同じプローブにハイブリダイゼーションさせた。両方のフィルターにおいて明確にハイブリダイゼーションするクローンのみを、さらなるスクリーニングのために選び出した。3次スクリーニングのために、MUCH-1陽性コロニーを、VHC DR3 Mu9(実施例4においてRT-PCRによってクローニングされたV<sub>H</sub>配列に対して特異的)を用いて二連でスクリーニングし、そしてMUCk-1陽性コロニーを、VKC DR1 Mu9およびVKC DR3 Mu9(実施例4におけるRT-PCRによってクローニングされたV<sub>H</sub>-1のC DR1コード配列およびC DR3コード配列に対して特異的)を用いてスクリーニングした。

10

## 【0271】

MUCH-1に関して陽性であることが確認された全クローン(25個)はまた、VHC DR3 Mu9に関して陽性であった。このことは、1つのタイプの重鎖配列のみがこれらのハイブリドーマでは発現していたことを示している。VHC DR3 Mu9と明確にハイブリダイゼーションした10個のクローンを配列決定して、これらが、RT-PCRによってクローニングされたMu9 V<sub>H</sub>と同一であることが見出された。その配列が図1Aに開示される。

## 【0272】

一次および二次の両方のスクリーニングでMUCk-1に対して陽性であった34個のクローンのうち、14個のみが、Mu9 V<sub>k</sub>1特異的プローブのVKC DR1 Mu9およびVKC DR3 Mu9にハイブリダイゼーションした。配列分析により、これらのクローンはMu9 V<sub>k</sub>1と同一であることが明らかにされた。Mu9 V<sub>k</sub>1特異的プローブに対して陰性であった残る20個のクローンのうち、8個がDNA配列決定に付された。これらのクローンのうちの7個が、Mu-9 V<sub>H</sub>1とは異なり、Mu-9 V<sub>H</sub>2(その配列が図1Bに開示される)と呼ばれるV<sub>k</sub>ドメインを有する軽鎖配列をコードしていた。V<sub>H</sub>およびV<sub>k</sub>2から構築され、Sp2/0細胞において発現されたキメラMu-9(c Mu-9-2)は、マウスMu-9の結合親和性に匹敵する結合親和性をCSAp抗原に対して示した(詳細については、実施例8~9を参照のこと)。

20

## 【実施例6】

## 【0273】

cDNAライブラリースクリーニングのためのプローブの標識  
 様々なオリゴヌクレオチドを自動化された392 DNA/RNA合成機(Applied Biosystems)で合成し、次いでPD10カラム(Pharmacia Biotech)で精製した。精製されたオリゴヌクレオチドを、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(New England Biolabs, Beverly, MA)を使用して[<sup>-32</sup>P]ATP(Amersham, Arlington Heights, IL)で標識した。20 lの最終容量に含まれる典型的な反応混合物は下記の通りであった。50 p molのオリゴヌクレオチド、60 Ciの[<sup>-32</sup>P]ATP(6000 Ci/mmol)、および2 lの10 xキナーゼ緩衝液(New England Biolabs)。反応混合物を37で1時間インキュベーションして、反応を20 lの0.1 M EDTAで停止させた。取り込まれなかった[<sup>-32</sup>P]ATPをTE-10 Chromaspinカラム(Clontech, Palo Alto, CA)で標識オリゴヌクレオチドから分離した。標識されたプローブは、ハイブリダイゼーションのために10<sup>6</sup> cpm/mで使用された。

30

40

## 【実施例7】

## 【0274】

SP2/0細胞のトランスフェクション  
 Mu-9について推定されるV<sub>H</sub>配列およびV<sub>H</sub>配列を、Leungら(上掲)によって記載されるように、それぞれ軽鎖発現ベクター(pKhまたはpKh<sup>\*</sup>)および重鎖発現ベクター(pG1g)にサブクローニングした。pKh<sup>\*</sup>は、XhoI/PacIリンカ

50

ーが p K h の B s t X I 部位に導入されていることを除いて、本質的には p K h と同一である。c D N A スクリーニングによって得られた M u - 9 V<sub>2</sub> は、内部に B s t X I 部位を含んでいたため、p K h にサブクローニングされ、これは、その後、トランスフェクションのために X h o I または P a c I のいずれかで線状化することができる。

約 10 g および約 30 g の線状化された軽鎖発現ベクター ( M u - 9 - 1 p K h または M u - 9 - 2 p K h ) および重鎖発現ベクター ( M u - 9 p G 1 g ) をエレクトロポレーションによって S P 2 / 0 細胞に同時トランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞を 96 ウェル細胞培養プレートで完全培地において 2 日間増殖させ、その後、500 U / m l の最終濃度でヒグロマイシンを添加することによって選択した。典型的には、コロニーがエレクトロポレーションの 2 週間後 ~ 3 週間後に現れ始め、コロニーは酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) によって抗体分泌についてアッセイされた。キメラ抗体をプロテイン A - セファロース 4 B カラムでのアフィニティークロマトグラフィーによって培養上清から精製した。精製された抗体 ( 5 μ g ) を、還元条件のもとで 4 % ~ 20 % の勾配ゲルでの S D S - P A G E によって分析した。

10

#### 【実施例 8】

##### 【0275】

M u - 9 の直接的な結合アッセイ

E L I S A マイクロタイタープレートを、セファロース 4 B - C L カラムから溶出された G W - 39 腫瘍抽出物 (これは C S A p 抗原を含有する) の空隙容量画分でコーティングし、4 時間で一晩放置した。翌日、非特異的な結合を、1 % B S A および 0.05 % ツイン 20 を含有するリン酸塩緩衝化生理的食塩水 ( P B S ) でブロックした。キメラ抗体上清 ( 100 μ l ) または精製された抗体 ( 0 ~ 1 μ g / m l ) を加えて、室温で 1 時間インキュベーションした。結合していないタンパク質を、洗浄緩衝液 ( 0.05 % ツイン 20 を含有する P B S ) で 6 回洗浄することによって除去した。精製されたネズミ M u - 9 タンパク質を標準品として使用した。結合した抗体を、F c フラグメントに特異的な抗体であるペルオキシダーゼコンジュゲート化ヤギ抗ヒト I g G ( J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h , W e s t G r o v e P A ) と、そして F c フラグメントに特異的な抗体であるペルオキシダーゼコンジュゲート化ヤギ抗マウス I g G ( J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h ) と反応させた。プレートを洗浄緩衝液で 6 回洗浄した後、100 μ l の O P D 基質溶液 ( 10 m g のオルトフェニレンジアミン二塩酸塩 ( S i g m a , S t . L o u i s , M O ) を含む 25 m l の 0.32 x P B S および 0.12 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ) を各ウェルに加えた。色を暗所で 1 時間発色させ、反応を 50 μ l の 4 N H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub> で停止させ、そして 490 n m における吸光度を D y n a t e c h プレート読み取り装置 ( D y n a t e c h L a b s , S u s s e x , 英国 ) で測定した。

20

30

##### 【0276】

図 5 ( a ) に示されるように、C S A p 抗原に対する c M u - 9 ( c M u - 9 - 2 ) の直接的な結合が生じた。c M u - 9 - 2 の結合プロフィールは、事実上、ネズミ M u - 9 の結合プロフィールに重ね合わせることが可能であった。これらのデータにより、c M u - 9 - 2 の免疫反応性はマウス M u - 9 の免疫反応性に匹敵することが明らかにされた。c M u - 9 の機能的な V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> の D N A 配列およびアミノ酸配列がそれぞれ図 2 A および 2 B に示される。

40

#### 【実施例 9】

##### 【0277】

競合的結合アッセイ

ネズミ M u - 9 I g G を西洋ワサビペルオキシダーゼ ( H R P ) ( S i g m a ) とコンジュゲート化した。ペルオキシダーゼコンジュゲート化 M u - 9 を、最初に、C S A p 抗原でコーティングされたマイクロウェル表面における結合について試験して、最適濃度が 0.2 μ g / m l であることを決定した。ペルオキシダーゼコンジュゲート化 M u - 9 を様々な濃度のネズミ M u - 9 またはキメラ M u - 9 のいずれか ( 0 ~ 50 μ g / m l ) と混合し、その後、抗原コーティングされたウェルに加えた。競合する抗体の存在下における

50

抗原に対するペルオキシダーゼコンジュゲート化Mu-9の結合を、上記に記載されたように、基質を加えた後、490nmで測定した。

【0278】

図5(b)には、競合的結合アッセイの結果が示される。ネズミMu-9およびcMu-9-2は、同程度によく、CSAp抗原に対するHRPコンジュゲート化Mu-9の結合と競合した。これらのデータにより、cMu-9-2の免疫反応性がマウスMu-9の免疫反応性に匹敵することが明らかにされた。

【実施例10】

【0279】

Mu9モノクローナル抗体をヒト化するためのヒトのフレームワークおよび配列設計の選択 10

Mu9の可変(V)領域フレームワーク(FR)配列をKababデータベースにおけるヒト抗体の配列と比較することによって、Mu-9のVHおよびVのFRが、それぞれ、ヒト抗体EUのVHおよびヒト抗体WOLのVのFRに対して最も大きい配列相同性を示すことが見出された。図3Aおよび図3Bでは、Mu9のVHおよびVのアミノ酸配列がアラインメントされ、対応するヒト配列と比較される。従って、EUのVHおよびWOLのVのFRが、Mu-9のVHおよびVに対するCDRがグラフト化されるヒトのフレームワークとしてそれぞれ選択された。しかし、EUのFR4配列ではなく、NEWMのFR4配列がMu9重鎖のヒト化のために使用された(図3A)。推定されるCDRに近いMu9のFRにおけるいくつかのアミノ酸残基が、以前に記載された指針(Qura、Clin.Cancer Rec., 5:3095s~3100s(1999))に基づいて、hMu9において維持された。これらの残基は、VのL37、V58およびQ100(図3B)、ならびにVHのY27、T30、K38、R40、I48、K66、A67、K74、T93、R94およびG103(図3A)である。その後、hMu-9のVHおよびVの遺伝子配列を設計した。それらの遺伝子配列が、それぞれ、図4Aおよび図4Bにアミノ酸配列とともに示される。

【実施例11】

【0280】

ヒト化V遺伝子のPCR/遺伝子合成

Leungら(Leungら、1994)によって記載されるような方法が、長いオリゴヌクレオチド合成およびPCRの組合わせを使用して、設計されたhMu-9のV遺伝子およびVH遺伝子を構築するために使用された。それぞれの可変鎖は、5'側半分および3'側半分(それぞれ、「A」および「B」として表される)の2つ部分に分けて構築された。各半分は、Taqポリメラーゼを使用して、一本鎖の合成オリゴヌクレオチドテンプレートを2つの短い両端プライマーによりPCR増幅することによって得られた。増幅されたフラグメントを、Invitrogen(Carlsbad、CA)から得られたpCR4-TAクローニングベクターに最初にクローニングし、そしてDNA配列決定に付した。テンプレートおよびプライマー対を下記に示す。

テンプレート	プライマー	PCR産物
オリゴG	オリゴ14 / オリゴ15	hMu9VHA
オリゴH	オリゴ16 / オリゴ17	hMu9VHB
オリゴJ	オリゴ18 / オリゴ19	hMu9VKA
オリゴK	オリゴ20 / オリゴ21	hMu9VKB

【0281】

重鎖

hMu9VH配列の全長DNAを構築するために、オリゴG(102mer)およびオリゴH(179mer)を自動化されたRNA/DNA合成機(Applied Biosystems)で合成した。オリゴGの配列は、nt19~nt120に対して相補的なhMu9VHドメインのマイナス鎖に対応する。

5' - A G G T C T C T G T T T A C C C A G G T A A T A A C A T A C T C A G T G 50

A A G G T G T A T C C A G A A G C C T T G C A G G A G A C C T T C A C T G A G C  
T C C C A G G C T T T T T C A C C T C A G C T C C - 3'。

【0282】

オリゴHの配列はhMu9VHドメインのnt147~nt325に対応する。

5' - G A T T T A T C C T G G A A G T G G T A G T A C T T C C T A C A A T G A A  
A A G T T C A A G G G C A A G G C C A C A A T C A C T G C T G A C A A A T C C A  
C T A A C A C A G C C T A C A T G G A G C T C A G C A G C C T G A G A T C T G A  
G G A C A C T G C G T T C T A T T T C T G T A C A A G A G A G G A T C T T G G G  
G G C C A A G G G T C T C T G G T C A C C G - 3'。

【0283】

オリゴGおよびオリゴHを担体から切断し、濃水酸化アンモニウムでの処理によって脱保護した。サンプルを真空乾燥して、100lの水に再懸濁した後、不完全なオリゴマー(100mer未満)を、ChromaSpin-100カラム(Clontech、Palo Alto、CA)に通した遠心分離によって除去した。合成副産物を除去するためにChromaSpin-30カラムを使用したことを除いて、すべての両端プライマーを同様に調製した。1lのChromaSpinカラム精製されたオリゴGを、10lの10xPCR緩衝液[500mMのKCl、100mMのTris-HCl(pH8.3)、15mMのMgCl<sub>2</sub>、および0.01%(w/v)のゼラチン](Perkin Elmer Cetus、Norwalk、CT)、250Mの各dNTP、200nMのオリゴ14(5'-GTGCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCTGAGGTG  
-3')およびオリゴ15(5'-ACTCTAGACCCTGTCCAGGTCTCT  
GTTTTACCCAGGTAATAACATA-3')、ならびに5ユニットのTaq  
DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer Cetus)を含有する100lの反  
応容量でPCR増幅した。この反応混合物を、94で1分間の変性、50で1.5分  
間のアニーリングおよび72で1.5分間の重合からなる30サイクルのPCR反応に  
付した。オリゴHを、オリゴ16(5'-GGTCTAGAGTGGATTGGAGAG  
ATTTATCCTGGAAGTGGTAGTACTT-3')およびオリゴ17(5'  
-TGAAGAGACGGTGACCAGAGACCCTTGGCCCCCAAGATC  
CTCTCTTGTACAGAAATAGAACGC-3')のプライマー対によって同  
様の条件のもとでPCR増幅した。得られたPCRフラグメントのVHAおよびVHBを  
2%アガロース(BioRad、Richmond、CA)で精製した。1つしか存在し  
ない制限部位が、DNA連結による結合を容易にするために各フラグメントの両端におい  
て設計された。増幅されたVHAフラグメントは、PstI制限部位(CTGCAG)を  
その5'末端に、そしてXbaI制限部位(TCTAGA)をその3'末端に含有してい  
た。増幅されたVHBフラグメントは、XbaI制限部位をその5'末端に、そしてBst  
EII制限部位(GGTACC)をその3'末端に含有していた。全長VH鎖の組み  
立てを、適切な5'酵素および3'酵素での各フラグメントの制限酵素消化、そしてPst  
IおよびBstEIIで事前に消化されたVHpBSベクター(Leungら、Hyb  
ridoma、13:469(1994))への連結によって達成した。得られた連結産  
物は、AフラグメントをPstI部位に連結されて、BフラグメントをBstEII部位  
に連結され、そしてAフラグメントおよびBフラグメントがXbaI部位において結合し  
て含有している(図4A)。正しいオープンリーディングフレームがDNA配列決定によ  
って確認されたとき、プロモーターおよび分泌シグナルペプチドをコードする配列ととも  
に完全なVH遺伝子配列をHindIII~BamHIフラグメントとしてVHpBSか  
ら取り出し、VHpG1g発現ベクター(Leungら、Hybridoma、13:4  
69(1994))に連結して、hMu9VHpG1gが得られた。

【0284】

軽鎖

Vを構築する場合、合成された長いオリゴヌクレオチドプレートは、nt21~nt  
150に対して相補的なhMu9Vドメインのマイナス鎖に対応するオリゴJ(130m

10

20

30

40

50

er) :

5' - CCTTGGAGCCTGGCCTGGTTTCTGCAGGTACCAATTC  
 AAATAGGTGTTGCCATTACTATGCACAATGCTCTGACTAG  
 ACCTGCAAGACAGAGTGGCTCGCTCTCCAGGACTGAGGGA  
 CAGGGTGCCTGGG - 3'

と、hMu9Vドメインのnt151~nt300に対応するオリゴK(150mer)  
 :

5' - CTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCCGGAG  
 TCCAGACAGGTTCAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGATTT  
 CACACTTACTATCAGCAGACTGGAGCCTGAGGATTTTGTCT  
 GTGTATTACTGCTTTC AAGGTTCACGTGTTCCG - 3' 10

とであった。

#### 【0285】

これらのオリゴを、下記に示されるようなそれぞれのそのプライマー対によってPCR増幅した。

オリゴ18 5' - GATATCCAGCTGACCCAAATCCCCAGGCACCC  
 TGTCCCTCAGTCCTGGAG - 3'

オリゴ19 5' - AGATCAGGAGCCTTGGAGCCTGGCCTGGTTT  
 CTGCA - 3'

オリゴ20 5' - TACCTGCAGAAACCAGGCCAGGCCTCCAAGGC  
 TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCG - 3' 20

オリゴ21 5' - TTAATCTCCACCTTGGTCCCCCTCCGAACG  
 TGTACGGAACACGTGAACCTTGA AAGCAGTAATAACA - 3'

#### 【0286】

VHに対して行なわれた方法と同じ構築方法がVに対して行われたが、下記の改変を伴った。Aフラグメントの5'末端制限部位がPvuII(CAGCTG)であり、Bフラグメントの3'末端制限部位がBglII(AGATCT)であった。これらのフラグメントは、VkpBRベクターに連結されたとき、共通するPstI部位(CTGCA G)において結合して、全長V配列(図4B)をもたらし、そしてDNA配列決定によって確認された。組み立てられたV遺伝子はHindIII~BamHI制限フラグメントとして 30  
 軽鎖発現ベクターにサブクローニングされて、hMu9VkpKhが得られた。

#### 【実施例12】

#### 【0287】

hMu9に関するトランスフェクション、発現および結合活性アッセイ

hMu9に関する発現方法および結合活性アッセイ方法は、cMu9について記載された方法と同じであった。約10gおよび約30gの線状化されたhMu9VkpKhおよびhMu9VHpG1gをエレクトロポレーションによってSP2/0細胞に同時トランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞を96ウェル細胞培養プレートで完全培地において2日間増殖させ、その後、500U/mlの最終濃度でヒグロマイシンを添加することによって選択した。典型的には、コロニーがエレクトロポレーションの2週間後~3週間後に現れ始め、コロニーを酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって抗体分泌についてアッセイした。キメラ抗体をプロテインA-セファロース4Bカラムでのアフィニティークロマトグラフィーによって培養上清から精製した。精製された抗体(5μg)を、還元条件のもとで4%~20%の勾配ゲルでのSDS-PAGEによって分析した。 40

#### 【0288】

直接的な結合アッセイにより、精製されたhMu-9がCSAp抗原に結合することが明らかにされた。hMu-9の結合親和性を、実施例6に記載されたような競合的結合アッセイにおいて比較した。図13には、競合的結合アッセイの結果が示される。hMu-9またはマウスMu-9は、同程度によく、CSAp抗原に対するHRPコンジュゲート化 50

Mu - 9 の結合と競合した。これらのデータにより、hMu - 9 の免疫反応性がマウス Mu - 9 の免疫反応性に匹敵することが明らかにされた。

【実施例 13】

【0289】

<sup>90</sup>Y 標識されたヒト化 Mu - 9 抗体による患者の治療

3 年前に切除され、そのときに放射線治療が施され、その後、5 - フルオロウラシル / ホニリン酸の化学療法が施されたデューク C 直腸がんの病歴を有する 62 歳の男性が、6 ヶ月前からその血漿 CEA 価の上昇を示し始め、30 ng / mL のレベルに達した。この患者は、腫瘍学者の診察を年に 2 回受けているので、この結果を聞いて知り、再発の疑いがあるために様々な診断手法を受けた。コンピューター断層撮影法により、2 つの転移が肝臓に存在することが見出された。1 つは直径が 3 cm で、右葉に存在し、もう 1 つは少し小さく、左葉内で、葉間間膜の近くに存在した。患者は、化学療法を受けないことを選択したので、その後、患者には、25 mCi のヒト化 Mu - 9 抗体コンジュゲート化<sup>90</sup>Y が、2 時間にわたる静脈内点滴によって 50 mg のタンパク質量で投与されて投薬された。その後、この治療は 1 ヶ月後に繰り返された。患者は、最後の治療点滴が行われた 2 週間後 ~ 4 週間後に測定されたとき、白血球および血小板の低下が認められたが、治療後 8 週間目の評価では回復していた。治療後 3 ヶ月でのコンピューター断層撮影法の知見により、右肝葉の大きな腫瘍転移は 40 % の縮小が明らかにされ、そして左葉の腫瘍では、それよりも小さい減少が明らかにされた。この時点で、患者の血中 CEA は 15 ng / mL に低下していた。6 ヶ月間の経過観察で、患者の腫瘍病変部は、2 倍 (two - diameter) CT 測定では約 70 % 減少しており、患者の血漿 CEA は 8 ng / mL であり、そして患者の全身状態は良好で、治療に関連する明らかな毒性または有害な事象は全くなかった。患者は、現在、治療後 9 ヶ月であり、肝臓転移物の大きさには変化が全くなく、血清 CEA 価は約 5 ~ 8 ng / mL で安定している。患者は、3 ヶ月毎に経過観察されており、その結果、疾患が増大し始めた場合には、この放射免疫療法別のクールを受け、続いてむき出し状態の Mu - 9 抗体の 1 クールを、6 週間にわたって毎週 1 回、300 mg / m<sup>2</sup> の 1 週間用量で、イリノテカン (CPT - 11) の治療クールと同時に受けることが予定されている。

10

20

【0290】

X . 参考文献

引用されたすべての参考文献、ならびに本明細書中に引用された参考文献により引用される参考文献は、参照することにより本明細書にその開示内容全体が組み込まれる。注目されるさらなる参考文献ならびにそれに引用される参考文献には下記が含まれ、それらは参照することによりその開示内容全体が本明細書中に組み込まれる。

30

【0291】

【表 6 A】

Bamias, A., and Epenetos, A.A. Two-step strategies for the diagnosis and treatment of cancer with bioconjugates. *Antibody, Immunoconjugates, Radiopharm.* 1992; 5: 385-395.

Barbet, J., Peltier, P., Bardet, S., Vuillez, JP., Bachelot, I., Denet, S., Olivier, P., Lecia, F., Corcuff, B., Huglo, D., Proye, C., Rouvier, E., Meyer, P., Chatal, J.F.

Radioimmuno-detection of medullary thyroid carcinoma using indium-111 bivalent hapten and anti-CEA x anti-DTPA-indium bispecific antibody. *J.Nucl.Med.* 1998; 39:1172-1178. 10

Bos, ES., Kuijpers, WHA., Meesters-Winters, M., Pham, DT., deHaan, AS., van Doormalen, Am., Kaspers, F.M., van Boeckel, CAA and Gougeon-Bertrand, F. In vitro evaluation of DNA-DNA hybridization as a two-step approach in radioimmunotherapy of cancer. *Cancer Res.* 1994; 54:3479-3486.

Carr *et al.*, WO00/34317. 20

Di Carlo, A., Mariano, A., D'Alessandro, V., Belli, G., Romano, G., Macchia, V. Evaluation of epidermal growth factor receptor, carcinoembryonic antigen and Lewis carbohydrate antigens in human colorectal and liver neoplasias. *Oncol. Rep.* 2001; 8:387-392.

Epstein *et al.* U.S. Patents No. 5,019,368; 5,882,626; 6,017,514; and the patents and references cited therein. 30

Gautherot, E., Bouhou, J., LeDoussal, J-M., Manetti, C., Martin, M., Rouvier, E., Barbet, J. Therapy for colon carcinoma xenografts with bi-specific antibody-targeted, iodine-131-labeled bivalent hapten. *Cancer suppl.* 1997; 80: 2618-2623.

Gautherot, E., Bouhou, J., Loucif, E., Manetti, C., Martin, M., LeDoussal, J.M., Rouvier, E., Barbet, J. Radioimmunotherapy of LS174T colon carcinoma in nude mice using an iodine-131-labeled bivalent hapten combined with an anti-CEA x anti-indium-DTPA bi-specific antibody. *J.Nucl. Med. Suppl.* 1997; 38: 7p. 40

【 0 2 9 2 】

【 表 6 B 】

Goodwin, D.A., Meares, C.F., McCall, M.J., McTigue, M., Chaovapong, W. Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens. *J.Nucl.Med.* 1988; 29:226-234.

Greenwood, F.C. and Hunter, W.M. The preparation of I-131 labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem.* 1963; 89:114-123.

Hawkins, G.A., McCabe, R.P., Kim, C.-H., Subramanian, R., Bredehorst, R., McCullers, G.A., Vogel, C.-W., Hanna, M.G.Jr., and Pomata, N. Delivery of radionuclides to pretargeted monoclonal antibodies using dihydrofolate reductase and methotrexate in an affinity system. *Cancer Res.* 1993; 53: 2368-2373. Infusa, H., Adachi, T., Kiyokawa, T., Nakatani, Y., et al., Ley glycolipid-recognizing monoclonal antibody inhibits procoagulant activity and metastasis of human adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.*, 2001; 19:941-946.

10

Koda, K., Glassy, M.C., McKnight, M.E., Yasutomi, J., Saito, N., Dan, M., Nakajima, N. Immunotherapy for recurrent colorectal cancers with human monoclonal antibody SK-1. *Anticancer Res.* 2001; 21:621-627.

20

Kranenborg, M.h., Boerman, O.C., Oosterwijk-Wakka, j., weijert, M., Corstens, F., Oosterwijk, E. Development and characterization of anti-renal cell carcinoma x antichelate bi-specific monoclonal antibodies for two-phase targeting of renal cell carcinoma. *Cancer Res.(suppl)* 1995; 55: 5864s-5867s.

30

Losman M.J., Qu Z., Krishnan I.S., Wang J., Hansen H.J., Goldenberg D.M., Leung S.O. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5(10 Suppl.):3101s-3105s.

Maeta, M. Saito, H. Oka, S., Tsujitani, S., Ikeguchi, M., Kaibara, N. Mutated p53 in tumors, mutant p53 and p53-specific antibodies in the circulation in patients with gastric cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2000; 19:489-95.

40

Penefsky, H.S. A centrifuged column procedure for the measurement of ligand binding by beef heart F1. Part G. *Methods Enzymol.* 1979; 56:527-530.

【 0 2 9 3 】

【 表 6 C 】

Ritter, G., Cohen, L.S., Williams, C., Jr., Richards, E.C., Old, L.J., Welt S. Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res.* 2001; 61:6851-6859.

Schuhmacher, J., Klivenyi, G., Matys, R., Stadler, M., Regiert, T., Hauser, H., Doll, J., Maier-Borst, W., Zoller, M. Multistep tumor targeting in nude mice using bi-specific antibodies and a gallium chelate suitable for immunocintigraphy with positron emission tomography. *Cancer Res.* 1995; 55, 115-123. 10

Schwartzberg, L.S. Clinical experience with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal carcinoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2001; 40:17-24.

Sharkey, R.M., Karacay, Griffiths, G.L., Behr, T.M., Blumenthal, R.D., Mattes, M.J., Hansen, H.J., Goldenberg. Development of a streptavidin-anti-carcinoembryonic antigen antibody, radiolabeled biotin pretargeting method for radioimmunotherapy of colorectal cancer. Studies in a human colon cancer xenograft model. *Bioconjugate Chem* 1997; 8:595-604. 20

Staib, L., Birebent, B., Somasundaram, R., Purev, E., Braumuller, H., et al. Immunogenicity of recombinant GA733-2E antigen (CO17-1A, EGP, Dsi-4, KSA, Ep-CAM) in gastro-intestinal carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 2001; 92:79-87.

Stickney, D.R., Anderson, L.D., Slater, J.B., Ahlem, C.N., Kirk, G.A., Schweighardt, S.A and Frincke, J.M. Bifunctional antibody: a binary radiopharmaceutical delivery system for imaging colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1991;51: 6650-6655. 30

Thorpe et al., U.S. Patents No. 6,342,221; 6,004,554; and patents and references cited therein.

Todryk, S.M., Turr, A.L., Green, M.H., Smallwood, J.A., Halanek, N., Dalglish, A.G., Glennie, M.J. CD40 ligation for immunotherapy of solid tumours. *J. Immunol Methods* 2001; 248:139-147. 40

【 0 2 9 4 】

【 表 6 D 】

Tordsson, J., Lavasani, S., Ohlsson, L., Karlstrom, P., Svedberg, H., Abrahmsen, L., Brodin, T. A3—a novel colon and pancreatic cancer reactive antibody from a primate phage library selected using intact tumour cells. *Int. J. Cancer* 2000; 87:559-568.

Turner, J.G., Rakhmievich, A.L. Burdelya, L., Neal, Z., Imboden, M., Sondel, P.M., Yu, H. Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells. *J. Immunol.* 2001; 166:89-94. *Res.* 1991;51: 6650-6655.

10

【図面の簡単な説明】

【0295】

【図1】5' - R A C Eによって得られ、DNA配列決定によって決定されたネズミ679V<sub>k</sub>のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。対応するDNA配列によってコードされるアミノ酸配列がヌクレオチド配列の下に一字記号として示される。ヌクレオチド残基およびアミノ酸残基には連続して番号が付けられ、右側に示される。CDR領域におけるアミノ酸残基は太字で示され、下線が付けられている。

20

【図2】RT-PCRによって得られ、DNA配列決定によって決定されたネズミ679V<sub>H</sub>のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。対応するDNA配列によってコードされるアミノ酸配列がヌクレオチド配列の下に一字記号として示される。ヌクレオチド残基およびアミノ酸残基には連続して番号が付けられ、右側に示される。CDR領域におけるアミノ酸残基は太字で示され、下線が付けられている。

【図3】MAb679の単鎖Fvフラグメント(scFv)のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。対応するDNA配列によってコードされるアミノ酸配列がヌクレオチド配列の下に一字記号として示される。ヌクレオチド残基およびアミノ酸残基には連続して番号が付けられ、右側に示される。CDR領域におけるアミノ酸残基は太字で示され、下線が付けられている。VとV<sub>H</sub>との間の連結として作用するアミノ酸残基もまた下線が付けられ、示されている。

30

【図4】cDNAスクリーニングによって得られた機能的なMu-9VのDNA配列およびアミノ酸配列を示す。対応するDNA配列によってコードされるアミノ酸残基がヌクレオチド配列の下に一字記号として示される。ヌクレオチド残基およびアミノ酸残基の両方には連続して番号が付けられ、右側に示される。CDR領域におけるアミノ酸残基は太字で示され、下線が付けられている。

【図5】RT-PCRによって得られたMu-9V<sub>H</sub>のDNA配列およびアミノ酸コード配列を示す。V<sub>H</sub>コード配列のみが示される。対応するDNA配列によってコードされるアミノ酸配列がヌクレオチド配列の下に一字記号として示される。ヌクレオチド残基およびアミノ酸残基の両方には連続して番号が付けられ、右側に示される。CDR領域におけるアミノ酸残基は太字で示され、下線が付けられている。

40

【図6】実施例11に記載されるように長いオリゴヌクレオチド合成およびPCRの組合せによって作製されるようなヒト化Mu-9(hMu-9)軽鎖可変領域をコードするDNA配列を示す。このDNAによってコードされるアミノ酸残基が一字記号として示され、対応するコドンの下に示される。CDR領域におけるアミノ酸残基は太字で示され、下線が付けられている。

【図7】実施例11に記載されるように長いオリゴヌクレオチド合成およびPCRの組合せによって作製されるようなhMu-9重鎖可変領域のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。このDNAによってコードされるアミノ酸残基が一字記号として示され、対応するコドンの下に示される。CDR領域におけるアミノ酸残基は太字で示され、下線が付け

50

られている。

【図8】RT-PCRによって得られたMu-9VHのDNA配列およびアミノ酸配列を示す。矢下線が付けられた配列は5'末端側のPCRプライマー配列を表す。VH領域は、VH1BACK(5'AGGT(C/G)(A/C)A(A/G)CTGCAG(C/G)AGTC(A/T)GG3')およびCH1Bのプライマーを使用して増幅された。対応するDNA配列によってコードされるアミノ酸配列がヌクレオチド配列の下に一字記号として示される。ヌクレオチド配列の番号付けが右側に示される。CDR領域におけるアミノ酸残基は太字で示され、下線が付けられている。KabatatのIg分子番号付けが、アミノ酸残基の上の番号付けにより示されるようにアミノ酸残基に対して使用される。文字のみにより番号付けされた残基は、Kabatatの番号付けスキームによって規定される挿入残基であり、前の数字と同じ先行する数字を有する。例えば、図8における残基82、残基82A、残基82Bおよび残基82Cは、それぞれ、82、A、BおよびCとして示される。

10

【図9】Sp2/0細胞において発現させたキメラMu-9(cMu-9)の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。図9Aには、cMu-9VHのDNA配列およびアミノ酸配列が示される。図9Bには、cMu-9Vの二本鎖DNA配列およびアミノ酸配列が示される。対応するDNA配列によってコードされるアミノ酸配列が一字記号として示される。CDR領域におけるアミノ酸残基は太字で示され、下線が付けられている。ヌクレオチド配列の番号付けが右側に示される。アミノ酸残基の番号付けは、図8における番号付けと同じである。cMu9を構築するために使用された制限部位は下線が付けられ、示されている。

20

【図10】ヒト抗体ならびにMu-9およびhMu-9の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列のアラインメントを示す。図10Aには、ヒト抗体のEU(FR1~3)およびNEWM(FR4)とMu-9およびhMu-9とのVHアミノ酸配列アラインメントが示され、図10Bには、ヒト抗体WOLとMu-9およびhMu-9とのVアミノ酸配列アラインメントが示される。ドットは、Mu-9内の残基がこれらのヒト抗体における対応する残基と同一であることを示す。四角で囲まれた領域はCDR領域を表す。hMu-9のN末端残基およびC末端残基の両方(下線部)は、使用された設定ベクトルによって固定され、ヒト抗体と比較されていない。KabatatのIg分子番号スキームが、図8の場合のように残基に番号を付けるために使用される。

30

【図11】Sp2/0細胞において発現させたhMu-9の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。図11Aには、hMu-9VHのDNA配列およびアミノ酸配列が示される。図11Bには、hMu-9VのDNA配列およびアミノ酸配列が示される。ヌクレオチド配列の番号付けが右側に示される。対応するDNA配列によってコードされるアミノ酸配列が一字記号として示される。CDR領域におけるアミノ酸残基は太字で示され、下線が付けられている。KabatatのIg分子番号付けスキームが、図8の場合のようにアミノ酸残基に対して使用される。

【図12】競合的結合アッセイにおけるmMu-9およびhMu-9の比較を示す。様々な濃度の競合Abを、抗原被覆ウエルに対する一定量のHRP-mMu-9の結合と競合させるために使用した。hMu-9は、mMu-9の阻止活性と匹敵し得る阻止活性を示した。mMu-9およびcMu-9の比較はKrishnanら(Cancer、80:2667~2674(1997))に見出すことができる。

40

【 3 】

GACATGTGATGTCACAAATCTCCATCCCTGGCTGTGTCCACGAGAGAGGTCACTATGAGCTGCAGAAATCCAGTCCAGAGTCTGTC 30  
 D I V M S Q S P S L A V S P G E K V T M T C K S S Q S L F 30

AKCAGTAGACCCGAAAGACTACTTGGTGGTACCCAGGAAACAGGSGAGTCTCTAAACTTCTGATCTTCTGGGCACTACTGGS 180  
 N R E T R K N Y L G W Y Q K P G Q S P K L L I Y W A S F 60  
 VK CDR1

GAATCTGGGATCCCTGATCGCTTCAAGGCACTGGATCTGGGACAGATTCACTCAACATCAAGTGTGCTGAGAGACTGGCA 270  
 E S G V P D R F T G S G T D F T L T I N S V Q S E D L A 90

GTTTATCTGCAACAGCTTATCTGTGCACTGGGACCAACTGGGCTGGGACAGCTGGAAGAGAGGCTGGGATCAGAGGC 360  
 V Y Y C T Q V Y L C I F G A G I K L E L K R G G G G S G 120  
 VK CDR3

GGAGCTCCGGAGCGGTGGAGTGAAGTGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGG 450  
 G S G G G S E V Q L Q E S G D L V K P G G S L K L S C 150  
 リンカー

GGAGCTCTGATCACTTTCAGTATTCACAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGG 540  
 A A S G P T P S I Y T M S N L R Q T P E K R L E M V A T L E S 180  
 VH CDR1

GGTATGTGATGACATCTATCCAGACAGTGTGAAGGTCGATTCACCTCTCCAGAGACATCCAGAAACACACTATATCTGCAA 630  
 G D G D I Y Y P D S V K G R F T I S R D N A K N N L Y L Q 210  
 VH CDR2

ATGAACATCTAAGTCTGGGACAGCGCTCTGATTAATCTGCAAGGCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAGTCTGGGAG 720  
 M N S L R S A D T A L Y Y C A R V R L G D W D F D V W G Q G 240  
 VH CDR3

ACCAGGCTCACCGCTCTCA 741  
 T T V T V S S 247

FIG. 3

【 1 2 】

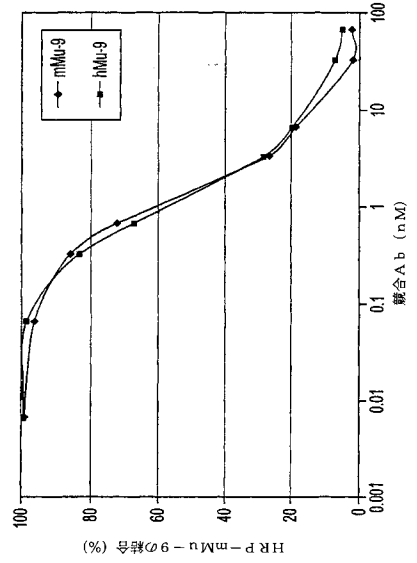


FIG. 12

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/082041 A2

(51) International Patent Classification: G01N (74) Agents: MAEBIUS, Stephen, B. et al.; Foley & Lardner, 3000 K Street, N.W., Suite 500, Washington, DC 20007-5109 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/10235

(22) International Filing Date: 3 April 2002 (03.04.2002) (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/823,746 3 April 2001 (03.04.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNOMEDICS, INC. [US/US]; 300 American Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).

(74) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): HANSEN, Hans, J. [US/US]; 6014 Angler Drive, Picayune, MS 39466 (US). GRIFFITHS, Gary, L. [US/US]; 36 Edgehill Avenue, Morristown, NJ 07960 (US). LEUNG, Shut-on [US/US]; 31 Alexandria Road, Morris Township, NJ 07960 (US). MCBRIDE, William, J. [US/US]; 767 Springfield #6, Summit, NJ 07901 (US). QU, Zhengxing [CN/US]; 15 Sycamore Way, Warren, NJ 07950 (US). GOLDENBERG, David, M. [US/US]; 330 Pleasant Valley Road, Mendham, NJ 07945 (US).

Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PRODUCTION AND USE OF NOVEL PEPTIDE-BASED AGENTS FOR USE WITH BI-SPECIFIC ANTIBODIES

```

GACATTTGTAAGTACAAATCTCCATCTCCCTGGCTGTTTCACAGGAGGAGAGGCTCACTATGACCTCCAACTCCAGAGTCTGTGTC 30
D I Y M S Q S P S S L A V S P G E K V T M T C E S S Q S L Y 30

AACGTTGAACTCGAAGGAGCTACTTGGSTTGTACGAGGAGAAACGAGGAGCTGCTTAACTTCTGTGTACTTGGGATCTACTGCG 180
N S R T T R E K N Y L G W Y Q Q K P G Q S P K I L L I Y N A S T R 60
CDR1 CDR2

GATCTGGAGTCCCTCCAGGCGAGTCCATCTGGACAGATTTTCACCTCCACCGACACAGTGTGCAATGTTGAGGACTTGCA 270
E S G V P D R P T G S G S G T D P T L T I N S V Q S E D L R 30

GTTTACTGCACTCAAGTTPATATCTGTGCACTTGTGCTGAGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG 339
V Y Y C T Q V Y Y L C A F G A S T K L E L K E R 113
CDR3

```

(57) Abstract: The present invention relates to a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that is reactive against a targeted tissue and at least one other arm that is reactive against a linker moiety. The linker moiety encompasses a hapten to which antibodies have been prepared. The antigenic linker is conjugated to one or more therapeutic or diagnostic agents or enzymes. The invention provides constructs and methods for producing the bi-specific antibodies or antibody fragments, as well as methods for using them.

WO 02/082041 A2

WO 02/082041

PCT/US02/10235

1

**PRODUCTION AND USE OF NOVEL PEPTIDE-BASED AGENTS  
FOR USE WITH BI-SPECIFIC ANTIBODIES**

**CROSS-REFERENCE TO RELATED PATENT APPLICATIONS**

This application is a Continuation in part of US Application 09/337,756, filed 06/22/1999, incorporated herein by reference in its entirety.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

**1. Field of the Invention**

5 The invention relates to immunological reagents for therapeutic use, for example, in radioimmunotherapy (RAIT) and chemoimmunotherapy, and detection and/or diagnostic uses, for example, in radioimmunodetection (RAID), ultrasonography, and magnetic resonance imaging (MRI). In particular, the invention relates to naked antibodies (unconjugated) and directly-conjugated antibodies, as well as bi-specific antibodies (bsAbs) and bi-specific antibody fragments (bsFabs) which have at least one 10 arm which is reactive against a targeted tissue and at least one other arm which is reactive against a linker moiety. Further, the invention relates to monoclonal antibodies that have been raised against specific immunogens, being human, humanized and chimeric monoclonal antibodies, as well as human, humanized and chimeric bi-specific antibodies and antibody fragments having at least one arm which is reactive 15 against a targeted tissue and at least one other arm which is reactive against a linker moiety, DNAs that encode such antibodies and antibody fragments, and vectors for expressing the DNAs.

The present invention also relates to humanized, chimeric and human anti-CSAp 20 antibodies, particularly monoclonal antibodies (mAbs), therapeutic and detection/diagnostic conjugates of humanized, chimeric and human anti-CSAp antibodies and methods of diagnosing/detection or treating a malignancy using humanized, chimeric and human anti-CSAp antibodies. The present invention also

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

2

relates to antibody fusion proteins or fragments thereof comprising at least two anti-CSAp mAbs or fragments thereof or at least one anti-CSAp mAb or fragment thereof and at least one second mAb or fragment thereof, other than the anti-CSAp mAb or fragment thereof. The humanized, chimeric and human anti-CSAp mAbs, fragments thereof, antibody fusion proteins thereof, or fragments thereof may be administered alone, as a therapeutic conjugate or in combination with a therapeutic immunoconjugate, with other naked antibodies, or with other therapeutic agents or as a diagnostic/detection conjugate. The present invention also provides DNA sequences encoding humanized, chimeric and human anti-CSAp antibodies, and antibody fusion proteins, vectors and host cells containing the DNA sequences, and methods of making the humanized, chimeric and human anti-CSAp antibodies.

## 2. Related Art

An approach to cancer therapy and detection/diagnosis involves directing antibodies or antibody fragments to disease tissues, wherein the antibody or antibody fragment can target a detection/diagnostic agent or therapeutic agent to the disease site. One approach to this methodology that has been under investigation involves the use of bi-specific monoclonal antibodies (bsAbs) having at least one arm that is reactive against a targeted diseased tissue and at least one other arm that is reactive against a low molecular weight hapten. In this methodology, a bsAb is administered and allowed to localize to target, and to clear normal tissue. Some time later, a radiolabeled low molecular weight hapten is given, which being recognized by the second specificity of the bsAb, also localizes to the original target. The same technology can be used to target therapeutic isotopes, drugs and toxins selectively to diseased tissues, particularly cancers against which the bsAb is targeted, or non-radioactive diagnostic agents for improved diagnosis and detection of pathological lesions expressing the target antigen.

Although low MW haptens used in combination with bsAbs possess a large number of specific imaging and therapy uses, it is impractical to prepare individual bsAbs for each possible application. Further, the application of a bsAb/low MW hapten system has to contend with several other issues. First, the arm of the bsAb that binds to the

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

3

low MW hapten must bind with high affinity, since a low MW hapten is designed to clear the living system rapidly, when not bound by bsAb. Second, the non-bsAb-bound low MW hapten actually needs to clear the living system rapidly to avoid non-target tissue uptake and retention. Third, the detection and/or therapy agent must remain associated with the low MW hapten throughout its application within the bsAb protocol employed.

Of interest with this approach are bsAbs that direct chelators and metal chelate complexes to cancers using Abs of appropriate dual specificity. The chelators and metal chelate complexes used are often radioactive, using radionuclides such as cobalt-57 (Goodwin *et al.*, U.S. Patent No. 4,863,713), indium-111 (Barbet *et al.*, U.S. Patent No. 5,256,395 and U.S. Patent No. 5,274,076, Goodwin *et al.*, *J. Nucl. Med.* 33:1366-1372 (1992), and Krancnorg *et al. Cancer Res (suppl.)* 55:5864s-5867s (1995) and *Cancer (suppl.)* 80:2390-2397 (1997)) and gallium-68 (Boden *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 6:373-379, (1995) and Schuhmacher *et al. Cancer Res.* 55:115-123 (1995)) for radioimmuno-imaging. Because the Abs were raised against the chelators and metal chelate complexes, they have remarkable specificity for the complex against which they were originally raised. Indeed, the bsAbs of Boden *et al.* have specificity for single enantiomers of enantiomeric mixtures of chelators and metal-chelate complexes. This great specificity has proven to be a disadvantage in one respect, in that other nuclides such as yttrium-90 and bismuth-213, useful for radioimmunotherapy (RAIT), and gadolinium, useful for MRI, cannot be readily substituted into available reagents for alternative uses. As a result, iodine-131, a non-metal, has been adopted for RAIT purposes by using an I-131-labeled indium-metal-chelate complex in the second targeting step. A second disadvantage to this methodology requires that antibodies be raised against every agent desired for diagnostic or therapeutic use.

Thus, there is a continuing need for an immunological agent which can be directed to diseased tissue and is reactive with a subsequently administered linker moiety which is

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

4

bonded to or associated with a therapeutic or diagnostic/detection metal chelate complex or a therapeutic or diagnostic/detection chelator.

The present invention relates to recombinantly produced chimeric, humanized and human monoclonal antibodies directed against cancers, including colorectal, pancreatic, and ovarian cancers. Chimeric, humanized and human monoclonal antibodies cause less production of human anti-mouse antibodies than completely murine antibodies. Additionally, when the antibodies are covalently conjugated to a diagnostic or therapeutic reagent, they retain their binding characteristics. Further, if the human, humanized or chimeric antibodies have human constant regions that can be immunologically functional in patients, such as is the case for IgG<sub>1</sub>, then these can also be active against such tumors as naked, or unconjugated, antibodies, and as such may also potentiate the antitumor effects of other therapeutic modalities, such as chemotherapy and radiation.

Colorectal, pancreatic, and ovarian cancers remain important contributors to cancer mortality. Their response to traditional chemotherapy and radiation therapy is mixed, however. Furthermore, these conventional forms of therapy have toxic side effects that limit their utility.

The use of monoclonal antibodies offers an alternative to traditional chemotherapy and radiation therapy. Tumor-specific and tumor-associated monoclonal antibodies can function alone (naked antibody therapy) or as conjugates in treatment regimes. The use of targeting monoclonal antibodies conjugated to radionuclides or other cytotoxic agents offers the possibility of delivering such agents directly to the tumor site, thereby limiting the exposure of normal tissues to toxic agents (Goldenberg, *Semin. Nucl. Med.*, 19: 332 (1989); Goldenberg, DM, *Radioimmunotherapy, in: Nuclear Medicine Annual 2001*, L. Freeman, ed., Lippincott, William & Wilkins, Philadelphia, 2001, pp.167-206). In recent years, the potential of antibody-based therapy and its accuracy in the localization of tumor-associated antigens have been demonstrated both in the laboratory and clinical studies (see, e.g., Thorpe, *TBTECH*, 11: 42 (1993);

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

5

Goldenberg, *Scientific American, Science & Medicine*, 1: 64 (1994); Baldwin et al., U.S. Pat. Nos. 4,923,922 and 4,916,213; Young, U.S. Pat. No. 4,918,163; U.S. Pat. No. 5,204,095; Irie et al., U.S. Pat. No. 5,196,337; Hellstrom et al., U.S. Pat. Nos. 5,134,075 and 5,171,665; Thorpe et al., U.S. Pat. No. 6, 342,221, and Epstein et al., 5 U.S. Pat. Nos. 5,965,132, 6,004,554, 6,071,491, 6,017,514, 5,882,626 and 5,019,368. In general, the use of radiolabeled antibodies or antibody fragments against tumor-associated markers for localization of tumors has been more successful than for therapy, in part because antibody uptake by the tumor is generally low, ranging from only 0.01% to 0.001% of the total dose injected (Vaughan et al., *Brit. J. Radiol.*, 60: 10 567 (1987)). Increasing the concentration of the radiolabel to increase the dosage to the tumor is generally counterproductive, as this also increases exposure of healthy tissue to radioactivity.

Mu-9 is a murine monoclonal antibody of the IgG<sub>1</sub> subtype, directed against the colon-specific antigen-p mucin (CSAp). CSAp is a tumor-associated antigen that is present in 15 a high percentage of colorectal, as well as pancreatic and ovarian cancers. (Gold et al., *Cancer Res.*, 50: 6405 (1990), and references cited therein). In pre-clinical and clinical testing, the antibody has shown excellent tumor targeting ability (Blumenthal et al., *Int. J. Cancer*, 22: 292 (1989); Sharkey et al., *Cancer*, 73(suppl): 864 (1994)). Mu-9 has an advantage over other antibodies that target tumor antigens because it 20 recognizes an epitope which is not present in the circulation (Pant et al., *Cancer*, 50: 919 (1982)). Circulating antigen can alter the delivery of antibody therapy because the antibody forms circulating immune complexes, which in turn could affect tumor targeting and antibody pharmacokinetics and biodistribution.

As with most other promising non-human antibodies, the clinical use of murine Mu-9 25 may be limited by the development in humans of an anti-mouse antibody (HAMA) responses. This can limit the diagnostic/detection and therapeutic usefulness of the antibodies, not only because of the potential anaphylactic problem, but also because a major portion of the circulating antibody may be complexed to and sequestered by the circulating anti-mouse antibodies. The production of HAMA may also affect the

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

6

accuracy of murine antibody-based immunoassays. Thus, HAMA responses in general pose a potential obstacle to realizing the full diagnostic and therapeutic potential of the Mu-9 antibody.

In order to maximize the value of the Mu-9 antibody as a therapeutic or diagnostic/detection modality and to increase its utility in multiple and continuous administration modalities and settings, an object of this invention is to provide a mouse-human chimeric mAb (cMu-9), a fully human, and a humanized mAb (hMu-9) that relate to Mu-9 by retaining the antigen-binding specificity of Mu-9, but that elicit reduced HAMA or other immune responses in a subject receiving the same.

10 Another object of this invention is to provide DNA sequences that encode the amino acid sequences of the variable regions of the light and heavy chains of the cMu-9, human Mu-9, and hMu-9 mAbs, including the complementarity-determining regions (CDRs).

15 A further object of this invention is to provide conjugates of the hMu-9, human Mu-9, and cMu-9 mAbs containing therapeutic or diagnostic/detection modalities.

Another object of this invention is to provide combinations of antibodies with CSAp antibody or antibodies with other carcinoma-targeting antibodies, wherein said antibodies can be used as naked immunoglobulins or as conjugates with drugs, toxins, isotopes, cytokines, enzymes, enzyme-inhibitors, hormones, hormone antagonists, and other therapy-enhancing moieties.

20 Yet another object of this invention is to provide methods of therapy and diagnosis/detection that utilize the humanized, chimeric and fully human MAbs of the invention.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

25 The present invention provides a monoclonal (MAb) antibody or fragment thereof that binds to a colon-specific antigen-p mucin (CSAp) antigen. Preferably, the monoclonal

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

7

PCT/US02/10235

antibody or fragment thereof binds the Mu-9 epitope. Still preferred, the monoclonal antibody or fragment thereof is humanized, chimerized or fully human.

The invention also provides a humanized Mu-9 (hMu-9) monoclonal antibody (mAb) or a fragment thereof. The hMu-9 antibody or fragment contains the complementarity-determining regions (CDRs) of the light and heavy chain variable regions of a non-human Mu-9 antibody, which are joined to the framework (FR) regions of the light and heavy chain variable regions of a human antibody, which are subsequently joined to the light and heavy chain constant regions of a human antibody. This humanized antibody or fragment retains the CSAP antigen specificity of the parental Mu-9 antibody, but is less immunogenic in a human subject.

In another aspect, the invention provides a chimeric Mu-9 (cMu-9) monoclonal antibody or fragment thereof. The cMu-9 antibody or fragment contains the light and heavy chain variable regions of a non-human Mu-9 antibody, which are joined to the light and heavy chain constant regions of a human antibody. This chimeric antibody retains the CSAP antigen specificity of the parental Mu-9 antibody, but is less immunogenic in a human subject.

Also contemplated in the present invention is a fully human Mu-9 antibody and fragments thereof.

Also contemplated in the present invention is a humanized antibody or fragment thereof comprising the complementarity-determining regions (CDRs) of a murine anti-CSAP MAb and the framework (FR) regions of the light and heavy chain variable regions of a human antibody and the light and heavy chain constant regions of a human antibody, wherein the CDRs of the light chain variable region of the humanized anti-CSAP MAb comprises CDR1 comprising an amino acid sequence of RSSQSIVHSNGNTYLE; CDR2 comprising an amino acid sequence of KVSNRFS and CDR3 comprising an amino acid sequence of FQGSRVPT; and the CDRs of the heavy chain variable region of the humanized anti-CSAP MAb comprises CDR1 comprising an amino acid

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

8

sequence of EYVIT; CDR2 comprising an amino acid sequence of EIYPGSGSTSYNEKFK and CDR3 comprising an amino acid sequence of EDL.

The present invention further provides a CDR-grafted humanized heavy chain comprising the complementarity determining regions (CDRs) of a murine anti-CSAp MAb and the framework region of the heavy chain variable region of a human antibody and the heavy chain constant region of a human antibody, wherein the CDRs of the heavy chain variable region of the humanized anti-CSAp MAb comprises CDR1 comprising an amino acid sequence of EYVIT; CDR2 comprising an amino acid sequence of EIYPGSGSTSYNEKFK and CDR3 comprising an amino acid sequence of EDL.

In a related vein, the present invention provides a CDR-grafted humanized light chain comprising the complementarity determining regions (CDRs) of a murine anti-CSAp MAb and the framework region of the light chain variable region of a human antibody and the light chain constant region of a human antibody, wherein the CDRs of the light chain variable region of the humanized anti-CSAp MAb comprises CDR1 comprising an amino acid sequence of RSSQSIVHSGNTYLE; CDR2 comprising an amino acid sequence of KYSNRFS and CDR3 comprising an amino acid sequence of FQGSRVPYT.

The invention further relates to a diagnostic/detection immunoconjugate comprising an antibody component comprising an anti-CSAp MAb or fragment thereof or an antibody fusion protein or fragment thereof of any one of anti-CSAp antibodies described herein, wherein the antibody component is bound to at least one diagnostic/detection agent. Preferably, the diagnostic/detection immunoconjugate comprises at least one photoactive diagnostic/detection agent. More preferably, the photoactive diagnostic/detection agent comprises a chromagen or dye. Still preferred, the diagnostic/detection agent is a radionuclide with an energy between 20 and 2,000 keV.

In a related vein, the invention further provides a therapeutic immunoconjugate comprising an antibody component comprising an anti-CSAp MAb or fragment thereof

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

9

or an antibody fusion protein or fragment thereof of any one of anti-CSAp antibodies described herein, wherein the antibody component is bound to at least one therapeutic agent. In a preferred embodiment, the therapeutic agent is a radionuclide, boron, gadolinium or uranium atoms, an immunomodulator, a cytokine, a hormone, a hormone antagonist, an enzyme, an enzyme inhibitor, a photoactive therapeutic agent, a cytotoxic drug, a toxin, an angiogenesis inhibitor, a second, different antibody, and a combination thereof. When the therapeutic immunoconjugate is a radionuclide, the energy is preferably between 20 and 10,000 keV.

The invention further provides multivalent, multispecific antibody or fragment thereof comprising one or more antigen binding sites having affinity toward a CSAp target antigen and one or more hapten binding sites having affinity towards hapten molecules.

The invention also relates to an antibody fusion protein or fragment thereof comprising at least two anti-CSAp MAb or fragments thereof, as described herein. Similarly, the invention contemplates an antibody fusion protein or fragment thereof that comprises at least one first anti-CSAp MAb or fragment thereof, as described herein, and at least one second MAb or fragment thereof, other than the anti-CSAp antibodies of the present invention.

The invention also provides a method of treating a malignancy in a subject, comprising the step of administering to said subject a therapeutically effective amount of an anti-CSAp antibody or fragment thereof, formulated in a pharmaceutically acceptable vehicle.

Similarly, the present invention provides for a method of treating or diagnosing/detecting a malignancy in a subject, comprising (i) administering to a subject in need thereof the antibody or fragments thereof of the present invention; (ii) waiting a sufficient amount of time for an amount of the non-binding protein to clear the subject's bloodstream; and (iii) administering to said subject a carrier molecule comprising a diagnostic agent, a therapeutic agent, or a combination thereof, that binds to a binding site of the antibody.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

10

The invention also provides for a DNA sequence comprising a nucleic acid encoding a anti-CSAp MAb or fragment thereof selected from the group consisting

- (a) an anti-CSAp MAb or fragment thereof as described herein;
- (b) an antibody fusion protein or fragment thereof comprising at least two of  
5 the MAbs or fragments thereof;
- (c) an antibody fusion protein or fragment thereof comprising at least one first anti-CSAp MAb or fragment thereof comprising said MAb or fragment thereof of any one of the anti-CSAp antibodies of the present invention and at least one second MAb or fragment thereof, other than the MAb or fragment thereof of the present  
10 invention; and
- (d) an antibody fusion protein or fragment thereof comprising at least one first MAb or fragment thereof comprising said MAb or fragment thereof of any one of claims 1-47 and at least one second MAb or fragment thereof, other than the MAb or fragment thereof of any one of claims 1-47 wherein said second MAb is selected from  
15 the group consisting of CEA, EGP-1, EGP-2, MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, KS-1, CD40, VEGF antibody, and the antibody A33, and a combination thereof.

The invention also relates to a method of delivering a diagnostic/detection agent, a therapeutic agent, or a combination thereof to a target, comprising: (i) administering  
20 to a subject the antibody or fragments thereof of any one the anti-CSAp antibodies of the present invention; (ii) waiting a sufficient amount of time for an amount of the non-binding protein to clear the subject's blood stream; and (iii) administering to said subject a carrier molecule comprising a diagnostic/detection agent, a therapeutic agent, or a combination thereof, that binds to a binding site of said antibody.

25 Described herein is also a method of treating a malignancy in a subject comprising administering to said subject a therapeutically effective amount of an antibody or fragment thereof or an antibody fusion protein or fragment thereof comprising at least

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

11

two MABs or fragments thereof, wherein at least one anti-CSAp MAB or fragment thereof or fusion proteins or fragments thereof as described herein, formulated in a pharmaceutically suitable excipient.

5 The present invention further relates to a method of treating a cancer cell in a subject comprising (i) administering to said subject a therapeutically effective amount of a composition comprising a naked anti-CSAp MAB or fragment thereof or a naked antibody fusion protein or fragment thereof of any one of the anti-CSAp antibodies of the present invention (ii) formulating the naked CSAp MAB or fragment thereof or antibody fusion protein or fragment thereof in a pharmaceutically suitable excipient.

10 In an additional aspect, the invention provides conjugates in which the hMu-9, human Mu-9, or cMu-9 is bonded to a diagnostic/detection or therapeutic reagent.

In a further aspect, the invention provides that unconjugated (naked) hMu-9, human Mu-9, or cMu-9 is administered in combination with other traditional as well as experimental therapy modalities, such as radiation, chemotherapy and surgery, or even with conjugates involving other, non-CSAp antibodies, and that the combination(s) may be simultaneously or at different times in the therapy cycle.

15 In still another aspect, the invention provides methods of diagnosing/detecting or treating a malignancy that include administering an effective amount of the aforementioned antibodies or conjugates. The antibodies or conjugates may be formulated in a pharmaceutically acceptable vehicle.

In a further aspect, the invention provides isolated polynucleotides that comprise DNA sequences encoding the amino acid sequences of the CDRs of the light and heavy chain variable regions of the hMu-9, human Mu-9, or cMu-9 mAbs. Similarly, the invention provides isolated polynucleotides that comprise DNA sequences encoding the amino acid sequence of the light and heavy chain variable regions of the hMu-9, human Mu-9, or cMu-9 mAbs.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

12

In yet another aspect, the invention provides amino acid sequences of the CDRs of the light and heavy chain variable regions of a Mu-9 antibody.

The present invention also seeks to provide *inter alia* a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least  
5 one other arm that specifically binds a targetable conjugate that can be modified for use in a wide variety of diagnostic and therapeutic applications.

The present inventors have discovered that it is advantageous to raise bsAbs against a targetable conjugate that is capable of carrying one or more diagnostic/detection or therapeutic agents. By utilizing this technique, the characteristics of the chelator, metal  
10 chelate complex, therapeutic agent or diagnostic/detection agent can be varied to accommodate differing applications, without raising new bsAbs for each new application. Further, by using this approach, two or more distinct chelators, metal chelate complexes or therapeutic agents can be used with the inventive bsAb.

Provided in the present invention is a method of treating or identifying diseased tissues  
15 in a subject, comprising:

- (A) administering to a subject a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein the arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody;
- 20 (B) optionally, administering to the subject a clearing composition, and allowing said composition to clear non-localized antibodies or antibody fragments from circulation;
- (C) administering to the subject a first targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognizable by said at  
25 least one other arm of said bi-specific antibody or antibody fragment, and one or more conjugated therapeutic or diagnostic agents; and

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

13

(D) when said therapeutic agent is an enzyme, further administering to the subject

- 1) a prodrug, when said enzyme is capable of converting said prodrug to a drug at the target site; or
- 5 2) a drug which is capable of being detoxified in said subject to form an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconverting said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or
- 10 3) a prodrug which is activated in said subject through natural processes and is subject to detoxification by conversion to an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconverting said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or
- 15 4) a second targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognizable by said at least one other arm of said bi-specific antibody or antibody fragment, and a prodrug, when said enzyme is capable of converting said prodrug to a drug at the target site.

The invention further provides a targetable conjugate that comprises at least two HSG haptens.

Also contemplated herein is a method for detecting or treating tumors expressing CSAP in a mammal, comprising:

- (A) administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein the one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof; and
- 25 (B) administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

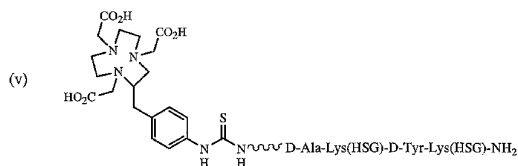
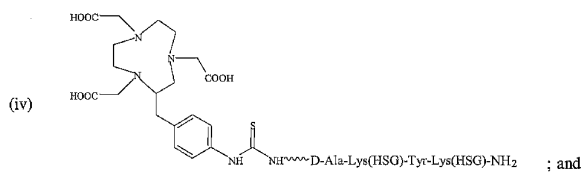
**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

14

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
(ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
(iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



- 5 This method optionally comprises administering to the subject a clearing composition, and allowing the composition to clear non-localized antibodies or antibody fragments from circulation.

Further, the invention provides a kit useful for treating or identifying diseased tissues in a subject comprising:

- 10 (A) a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein said one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof;

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

15

- (B) a first targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognizable by said at least one other arm of said bi-specific antibody or antibody fragment, and one or more conjugated therapeutic or diagnostic agents; and
- 5 (C) optionally, a clearing composition useful for clearing non-localized antibodies and antibody fragments; and
- (D) optionally, when the therapeutic agent conjugated to said first targetable conjugate is an enzyme,
- 1) a prodrug, when said enzyme is capable of converting said
- 10 prodrug to a drug at the target site; or
- 2) a drug which is capable of being detoxified in said subject to form an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or
- 15 3) a prodrug which is activated in said subject through natural processes and is subject to detoxification by conversion to an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or
- 20 4) a second targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognizable by said at least one other arm of said bi-specific antibody or antibody fragment, and a prodrug, when said enzyme is capable of converting said prodrug to a drug at the target site.

As described herein, the targetable conjugate may consist of:

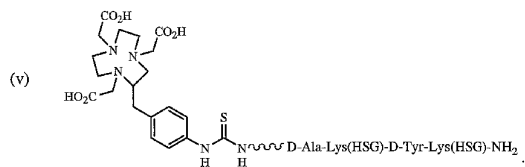
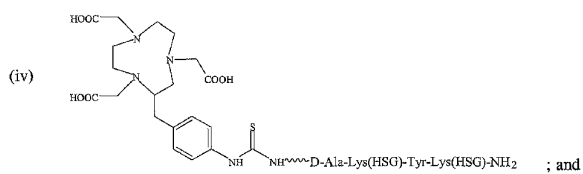
**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

16

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(TsCG-Cys)-NH<sub>2</sub>;



The invention also relates to a method of screening for a targetable conjugate  
 5 comprising:

- (A) contacting the targetable construct with a bi-specific antibody or  
 antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and  
 at least one other arm that specifically binds said targetable conjugate to give a  
 mixture, wherein the one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9  
 10 antibody or fragment thereof; and
- (B) optionally incubating said mixture; and
- (C) analyzing said mixture.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

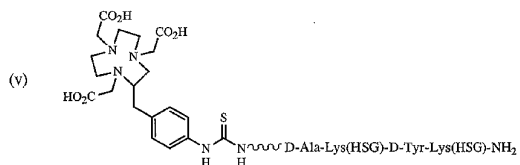
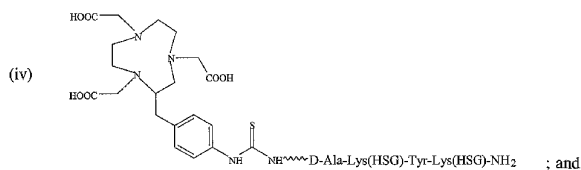
WO 02/082041

PCT/US02/10235

17

The invention further provides a method for imaging malignant tissue or cells in a mammal expressing CSAp, comprising:

- (A) administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein the one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof; and
- (B) administering a targetable conjugate selected from the group consisting of
- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- 10 (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



The invention also provides a method of intraoperatively, endoscopically and intravascularly identifying/disclosing diseased tissues expressing CSAp in a subject,

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

18

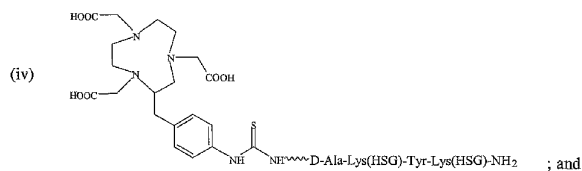
comprising the administration of a detectable amount of a CSAp-labeled antibody, preferably a fragment or subfragment, whereby the label is detected by a suitable probe or miniature camera within 48 hours of said labeled CSAp antibody/fragment administration, without the need of a clearing agent for non-targeted, labeled antibody or fragment.

In a related vein, the invention provides a method of intraoperatively identifying/disclosing diseased tissues expressing CSAp, in a subject, comprising:

(A) administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue expressing CSAp and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein the one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof; and

(B) administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

- 15 (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

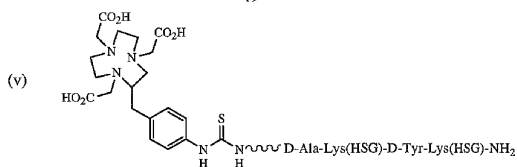


**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

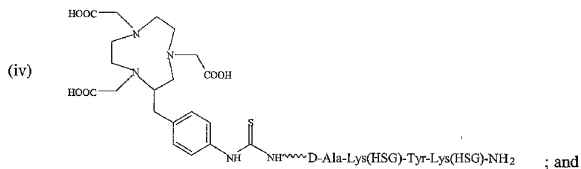
PCT/US02/10235

19



The invention further relates to a method for the endoscopic identification of diseased tissues expressing CSAP, in a subject, comprising:

- (A) administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue expressing CSAP and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate wherein the one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof; and
- (B) administering a targetable conjugate selected from the group consisting of
- 10 (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

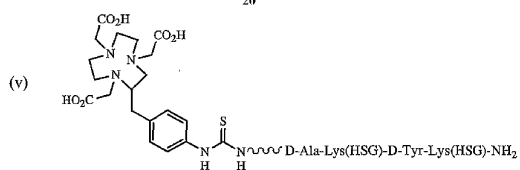


**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

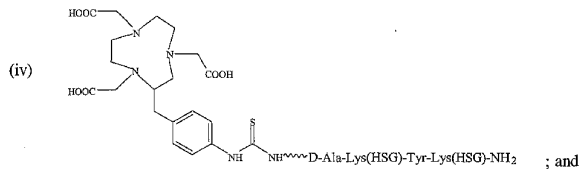
PCT/US02/10235

20



Also provided herein is a method for the intravascular identification of diseased tissues expressing CSAp, in a subject, comprising:

- (A) administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue expressing CSAp and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate wherein the one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof; and
- (B) administering a targetable conjugate selected from the group consisting of
- 10 (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

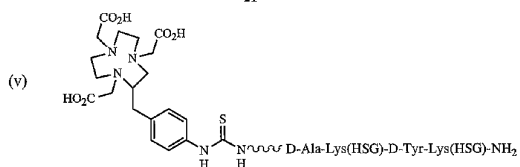


**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

21

PCT/US02/10235



The invention also relates to a method of detection of lesions during an endoscopic, laparoscopic, intravascular catheter, or surgical procedure, wherein the method comprises:

- (a) injecting a subject who is to undergo such a procedure with a bispecific antibody F(ab)<sub>2</sub> or F(ab')<sub>2</sub> fragment, wherein the bispecific antibody or fragment has a first antibody binding site which specifically binds to a CSAp antigen, and has a second antibody binding site which specifically binds to a hapten, and permitting the antibody fragment to accrete at target sites;
- (b) optionally clearing non-targeted antibody fragments using a galactosylated anti-idiotypic clearing agent if the bispecific fragment is not largely cleared from circulation within about 24 hours of injection, and injecting a bivalent labeled hapten, which quickly localizes at the target site and clears through the kidneys;
- (c) detecting the presence of the hapten by close-range detection of elevated levels of accreted label at the target sites with detection means, within 48 hours of the first injection, and conducting said procedure, wherein said detection is performed without the use of a contrast agent or subtraction agent.

In a preferred embodiment, the hapten is labeled with a diagnostic radioisotope, a MRI image enhancing agent or a fluorescent label.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

22

The invention further relates to a method for close-range lesion detection, during an operative, intravascular, laparoscopic, or endoscopic procedure, wherein the method comprises:

- 5 (a) injecting a subject to such a procedure parenterally with an effective amount of a Mu-9 immunoconjugate or fragment thereof,
- (b) conducting the procedure within 48 hours of the injection;
- (c) scanning the accessed interior of the subject at close range with a detection means for detecting the presence of said labeled antibody or fragment thereof; and
- 10 (d) locating the sites of accretion of said labeled antibody or fragment thereof by detecting elevated levels of said labeled antibody or fragment thereof at such sites with the detection means.

In the above examples of intraoperative, endoscopic and intravascular uses, the label attached to the diagnostic compound is capable of being detected by a suitable  
15 instrument or probe, including miniature cameras, which are made for said label detection (e.g., a gamma-detecting probe when a gamma-emitting isotope is the diagnostic/detection conjugate) (see Goldenberg, US Patents U.S. Pat. Nos. 5,716,595, 6,096,289 and U.S. Application Serial No. 09/348,818, incorporated herein by reference in their entirety.

20 The present invention also seeks to provide *inter alia* a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate that can be modified for use in a wide variety of diagnostic and therapeutic applications.

Further, the invention provides pre-targeting methods of diagnosis and therapy using  
25 the combination of bi-specific antibody and the targetable conjugates:

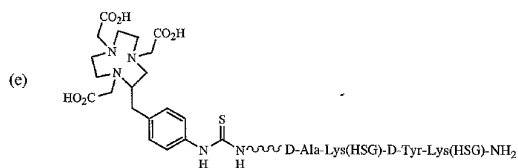
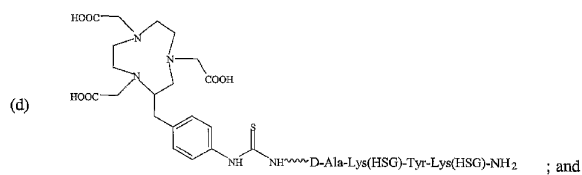
**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

23

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tsog-Cys)-NH<sub>2</sub>;



5 as well as methods of making the bi-specifics, and kits for use in such methods.

The present inventors have discovered that it is advantageous to raise bsAbs against a targetable conjugate that is capable of carrying one or more diagnostic or therapeutic agents. By utilizing this technique, the characteristics of the chelator, metal chelate complex, therapeutic agent or diagnostic agent can be varied to accommodate differing

10 applications, without raising new bsAbs for each new application. Further, by using this approach, two or more distinct chelators, metal chelate complexes or therapeutic agents can be used with the inventive bsAb.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

24

The invention relates to a method of treating or identifying diseased tissues in a subject, comprising:

- (A) administering to said subject a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate comprising at least two HSG haptens;
- 5 (B) optionally, administering to said subject a clearing composition, and allowing said composition to clear non-localized antibodies or antibody fragments from circulation;
- (C) administering to said subject a targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least two HSG haptens and may comprise a diagnostic or therapeutic cation, and/or one or more chelated or chemically bound therapeutic or diagnostic agents, or enzymes; and
- 10 (D) when said targetable conjugate comprises an enzyme, further administering to said subject
- 15 1) a prodrug, when said enzyme is capable of converting said prodrug to a drug at the target site; or
- 2) a drug which is capable of being detoxified in said subject to form an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or
- 20 3) a prodrug which is activated in said subject through natural processes and is subject to detoxification by conversion to an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site.
- 25 The invention further relates to a method for detecting or treating target cells, tissues or pathogens in a mammal, comprising:

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

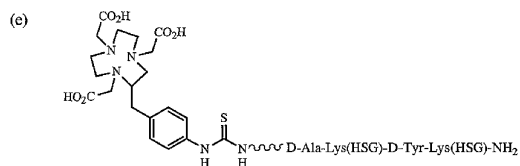
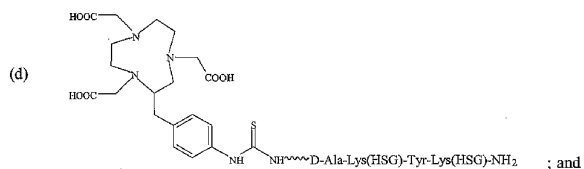
25

administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate;

- wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or associated therewith; and

administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 10 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



The invention further relates to a method of treating or identifying diseased tissues in a subject, comprising:

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

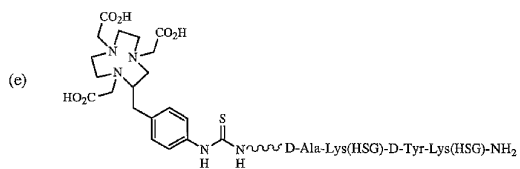
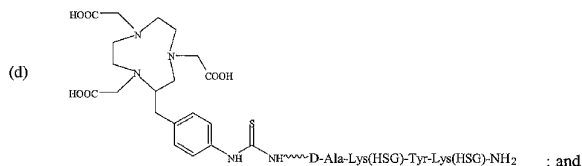
26

administering to said subject a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate;

optionally, administering to said subject a clearing composition, and allowing  
5 said composition to clear non-localized antibodies or antibody fragments from circulation; and

administering to said subject a targetable conjugate selected from the group consisting of:

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- 10 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tsacg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



The invention further relates to a kit useful for treating or identifying diseased tissues in a subject comprising:

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

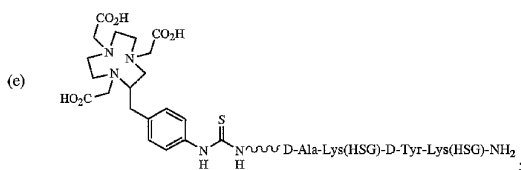
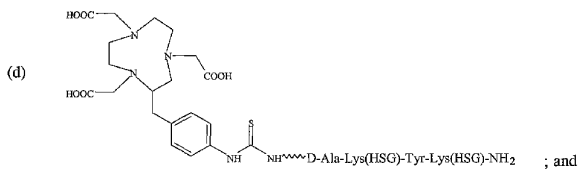
WO 02/082041

PCT/US02/10235

27

(A) a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein said conjugate is selected from the group consisting of

- 5 (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(TsCG-Cys)-NH<sub>2</sub>;



(B) a targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognizable by said at least one other arm of said bi-specific antibody or antibody fragment, and one or more conjugated therapeutic or diagnostic agents, or enzymes; and

10

(C) optionally, a clearing composition useful for clearing non-localized antibodies and antibody fragments; and

(D) optionally, when said first targetable conjugate comprises an enzyme,

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

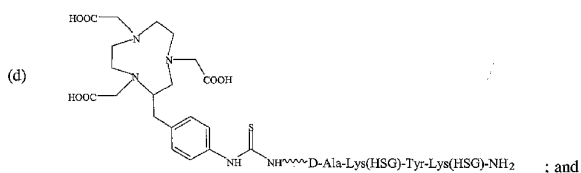
PCT/US02/10235

28

- 1) a prodrug, when said enzyme is capable of converting said prodrug to a drug at the target site; or
- 2) a drug which is capable of being detoxified in said subject to form an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvert-  
5 said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or
- 3) a prodrug which is activated in said subject through natural processes and is subject to detoxification by conversion to an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvert-  
10 said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site.

The invention further relates to a targetable conjugate selected from the group consisting of:

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 15 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

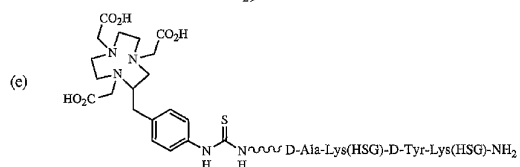


**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

29



The invention further relates to a method of screening for a targetable conjugate comprising:

- contacting said targetable construct with a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds said targetable conjugate to give a mixture;
- 5 wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or associated therewith; and
- optionally incubating said mixture; and
- 10 analyzing said mixture.

The invention further relates to a method for imaging normal tissue in a mammal, comprising:

- administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one
- 15 other arm that specifically binds a targetable conjugate;
- wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or associated therewith; and
- administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

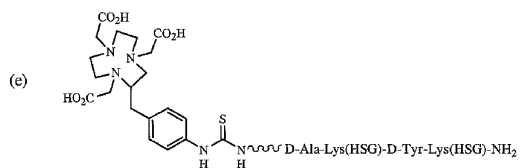
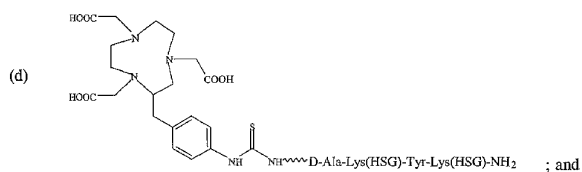
**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

30

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



- 5 The invention further relates to a method of intraoperatively identifying diseased tissues, in a subject, comprising:
- administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate;
- 10 wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or associated therewith; and
- administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

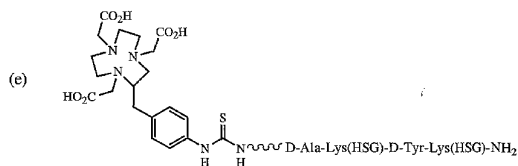
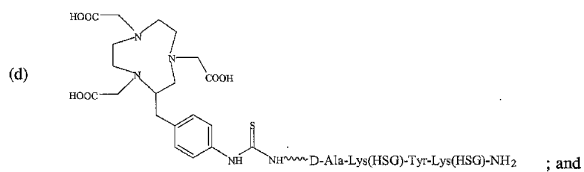
**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

31

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



5 The invention further relates to a method for the endoscopic identification of diseased tissues, in a subject, comprising:

administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate;

10 wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or associated therewith; and

administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

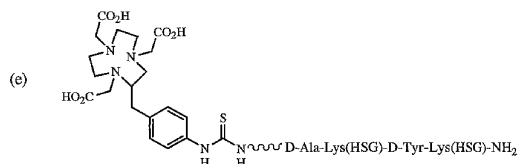
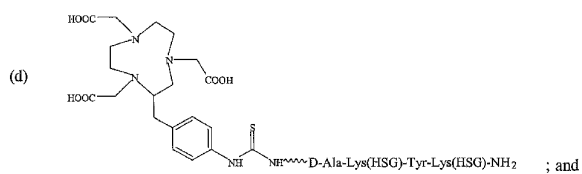
**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

32

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



The invention further relates to a method for the intravascular identification of diseased  
 5 tissues, in a subject, comprising:

administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment  
 comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one  
 other arm that specifically binds a targetable conjugate;

10 wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding  
 moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or  
 associated therewith; and

administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

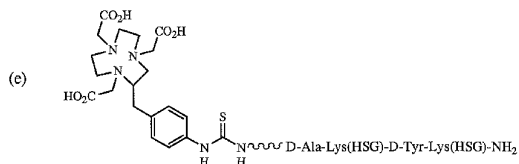
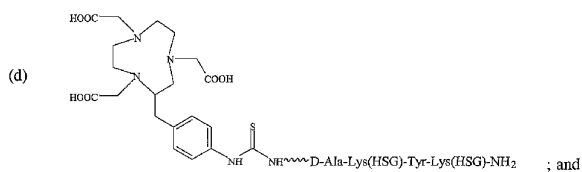
**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

33

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Ts<sub>scg</sub>-Cys)-NH<sub>2</sub>;



These and other aspects and embodiments of the invention will become apparent by  
 5 reference to the following specification and appended claims.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

*Figure 1* shows the DNA and amino acid sequences of the murine 679 V<sub>k</sub> obtained by  
 5'-RACE and determined by DNA sequencing. Amino acid sequences encoded by the  
 corresponding DNA sequences are given as one letter codes below the nucleotide  
 10 sequence. The nucleotide and amino acid residues are numbered sequentially and  
 indicated on the right side. The amino acid residues in the CDR regions are shown in  
 bold and underlined.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

34

*Figure 2* shows the DNA and amino acid sequences of the murine 679 V<sub>H</sub> obtained by RT-PCR and determined by DNA sequencing. Amino acid sequences encoded by the corresponding DNA sequences are given as one letter codes below the nucleotide sequence. The nucleotide and amino acid residues are numbered sequentially and indicated on the right side. The amino acid residues in the CDR regions are shown in bold and underlined.

*Figure 3* shows the DNA and amino acid sequences of a single chain Fv fragment (scFv) of the MAb 679. Amino acid sequences encoded by the corresponding DNA sequences are given as one letter codes below the nucleotide sequence. The nucleotide and amino acid residues are numbered sequentially and indicated on the right side. The amino acid residues in the CDR regions are shown in bold and underlined. The amino acid residues serving as the linkage between the V and V<sub>H</sub> are also underlined and indicated.

*Figure 4* shows the DNA and amino acid sequences of the functional Mu-9V obtained by cDNA screening. Amino acid residues encoded by the corresponding DNA sequences are given as one letter codes below the nucleotide sequence. Both nucleotide and amino acid residues are numbered sequentially and indicated on the right side. The amino acid residues in the CDR regions are shown in bold and underlined.

*Figure 5* shows the DNA and amino acid coding sequences of the Mu-9V<sub>H</sub> obtained by RT-PCR. Only the V<sub>H</sub> coding sequence is shown. Amino acid sequences encoded by the corresponding DNA sequences are given as one letter codes below the nucleotide sequence. Both nucleotide and amino acid residues are numbered sequentially and indicated on the right side. The amino acid residues in the CDR regions are shown in bold and underlined.

*Figure 6* shows the DNA sequence coding for the humanized Mu-9 (hMu-9) light chain variable region as generated by a combination of long oligonucleotide synthesis and PCR as described in Example 11. The amino acid residues encoded by the DNA are

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

35

given as one letter codes and shown under the corresponding codons. The amino acid residues in the CDR regions are shown in bold and underlined.

*Figure 7* shows the DNA and amino acid sequences of the hMu-9 heavy chain variable region as generated by a combination of long oligonucleotide synthesis and PCR as described in Example 11. The amino acid residues encoded by the DNA are given as one letter codes and shown under the corresponding codons. The amino acid residues in the CDR regions are shown in bold and underlined.

*Figure 8* shows the DNA and amino acid sequences of the Mu-9VH obtained by RT-PCR. The sequence arrow-underlined represents the 5'-end PCR primer sequence. The VH region was amplified using primers VH1BACK (5' AGG T(C/G)(A/C) A(A/G)C TGC AG(C/G) AGT C(A/T)G G 3') and CH1B. Amino acid sequences encoded by the corresponding DNA sequences are given as one letter codes below the nucleotide sequence. Numbering of the nucleotide sequence is on the right side. The amino acid residues in the CDR regions are shown in bold and underlined. Kabat's Ig molecule numbering is used for amino acid residues as shown by the numbering above the amino acid residues. The residues numbered with a letter only are the insertion residues defined by Kabat numbering scheme and have the same preceding digits as the previous one. For example, residues 82, 82A, 82B, and 82C in Figure 8 are indicated as 82, A, B, and C, respectively.

*Figure 9* shows the DNA and amino acid sequences of the chimeric Mu-9 (cMu-9) heavy and light chain variable regions expressed in Sp2/0 cells. Figure 9A shows the DNA and amino acid sequences of the cMu-9VH. Figure 9B shows the double-stranded DNA and amino acid sequences of the cMu-9V. Amino acid sequences encoded by the corresponding DNA sequences are given as one letter codes. The amino acid residues in the CDR regions are shown in bold and underlined. Numbering of the nucleotide sequence is on the right side. The numbering of amino acids is same as that in Figure 8. The restriction sites used for constructing the cMu9 are underlined and indicated.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

36

Figure 10 shows the alignment of the amino acid sequences of heavy and light chain variable regions of a human antibody, Mu-9 and hMu-9. Figure 10A shows the VH amino acid sequence alignment of the human antibody EU (FR1-3) and NEWM (FR4) with Mu-9 and hMu-9 and Figure 10B shows the V amino acid sequence alignment of the human antibody WOL with Mu-9 and hMu-9. Dots indicate the residues in Mu-9 that are identical to the corresponding residues in the human antibodies. Boxed regions represent the CDR regions. Both N- and C-terminal residues (underlined) of hMu-9 are fixed by the staging vectors used and not compared with the human antibodies. Kabat's Ig molecule number scheme is used to number the residues as in Fig. 8.

Figure 11 shows the DNA and amino acid sequences of the hMu-9 heavy and light chain variable regions expressed in Sp2/O cells. Figure 11A shows the DNA and amino acid sequences of the hMu-9VH. Figure 11B shows the DNA and amino acid sequences of the hMu-9VK. Numbering of the nucleotide sequence is on the right side. Amino acid sequences encoded by the corresponding DNA sequences are given as one letter codes. The amino acid residues in the CDR regions are shown in bold and underlined. Kabat's Ig molecule numbering scheme is used for amino acid residues as in Fig. 8.

Figure 12 shows a comparison of mMmu-9 and hMu-9 in competitive binding assays. Varying concentrations of competing Abs were used to compete with the binding of a constant amount of HRP-mMu-9 to the antigen coated wells. hMu-9 showed comparable blocking activity as that of mMmu-9. A comparison of mMmu-9 and cMu-9 can be found in Krishnan et al. (Cancer, 80:2667-2674 (1997)).

#### DETAILED DESCRIPTION

##### I. Overview

The present invention encompasses antibodies and antibody fragments. The antibody fragments are antigen binding portions of an antibody, such as F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, and the like. The antibody fragments bind to the same antigen that is recognized

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

37

by the intact antibody. For example, an anti-CD22 or anti-CSAp monoclonal antibody fragment binds to an epitope of CD22 or CSAp, respectively.

The term "antibody fragment" also includes any synthetic or genetically engineered protein that acts like an antibody by binding to a specific antigen to form a complex.

- 5 For example, antibody fragments include isolated fragments, "Fv" fragments, consisting of the variable regions of the heavy and light chains, recombinant single chain polypeptide molecules in which light and heavy chain variable regions are connected by a peptide linker ("sFv proteins"), and minimal recognition units consisting of the amino acid residues that mimic the "hypervariable region." Three of
- 10 these so-called "hypervariable" regions or "complementarity-determining regions" (CDR) are found in each variable region of the light or heavy chain. Each CDR is flanked by relatively conserved framework regions (FR). The FR are thought to maintain the structural integrity of the variable region. The CDRs of a light chain and the CDRs of a corresponding heavy chain form the antigen-binding site. The
- 15 "hypervariability" of the CDRs accounts for the diversity of specificity of antibodies.

Also contemplated in the present invention are human, chimeric and humanized anti-CSAp antibodies and fragments thereof. The fully human anti-CSAp antibody of the present invention is preferably against the Mu-9 antigen. A human antibody is an antibody obtained, for example, from transgenic mice that have been "engineered" to

20 produce specific human antibodies in response to antigenic challenge. In this technique, elements of the human heavy and light chain locus are introduced into strains of mice derived from embryonic stem cell lines that contain targeted disruptions of the endogenous heavy chain and light chain loci. The transgenic mice can synthesize human antibodies specific for human antigens, and the mice can be used to

25 produce human antibody-secreting hybridomas. Methods for obtaining human antibodies from transgenic mice are described by Green *et al.*, *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856 (1994), and Taylor *et al.*, *Int. Immun.* 6:579 (1994). A fully human antibody also can be constructed by genetic or chromosomal transfection methods, as well as phage display technology, all of which are known in

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

38

the art. See for example, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990) for the production of human antibodies and fragments thereof *in vitro*, from immunoglobulin variable domain gene repertoires from unimmunized donors. In this technique, antibody variable domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. In this way, the phage mimics some of the properties of the B cell. Phage display can be performed in a variety of formats, for their review, see e.g. Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:5564-571 (1993).

Human antibodies may also be generated by *in vitro* activated B cells. See U.S. Patent Nos. 5,567,610 and 5,229,275, which are incorporated in their entirety by reference.

15 The present invention also provides a chimeric anti-CSAp monoclonal antibody or fragment thereof. The chimeric anti-CSAp antibody or fragment contains a light and heavy chain variable region of a non-human anti-CSAp antibody, which are joined to the light and heavy chain constant regions of a human antibody. Preferably, the light and heavy chain variable regions come from a murine anti-CSAp antibody. In a preferred embodiment, the anti-CSAp antibody binds a Mu-9 epitope on the CSAP antigen. Accordingly, a Mu-9 antibody is an anti-CSAp antibody that binds to the Mu-9 epitope.

The process for making cMu-9 is described in detail below. Briefly, cDNAs encoding the V<sub>K</sub> and V<sub>H</sub> regions of the Mu-9 mAb have been isolated and separately recombinantly subcloned into mammalian expression vectors that contain the genes a human κ light chain constant region sequence and a human γ1 chain sequence, respectively. Cotransfection of mammalian cells with these two recombinant DNAs

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

39

resulted in expression of a cMu-9 mAb that, like the parent Mu-9 mAb, bound avidly to the CSAp antigen.

In a preferred embodiment, the light chain variable region of the cMu-9 antibody comprises the amino acids of SEQ. ID NO: (figure 2B) or the heavy chain variable region of the cMu-9 antibody comprises the amino acids of SEQ. ID NO: (figure 2A).  
5 Still preferred, the light chain variable region of the cMu-9 antibody comprises the amino acids of SEQ. ID NO: (figure 2B) and the heavy chain variable region of the cMu-9 antibody comprises the amino acids of SEQ. ID NO: (figure 2A).

The present invention further provides a humanized Mu-9 (hMu-9) monoclonal antibody (mAb) or a fragment thereof. The hMu-9 antibody or fragment contains the  
10 complementarity-determining regions (CDRs) of the light and heavy chain variable regions of a non-human Mu-9 antibody, which are joined to the framework (FR) regions of the light and heavy chain variable regions of a human antibody, which are subsequently joined to the light and heavy chain constant regions of a human antibody.  
15 This humanized antibody or fragment retains the CSAp antigen specificity of the parental Mu-9 antibody, but is less immunogenic in a human subject.

Methods for making hMu-9 are described in detail below. Briefly, however, to make hMu-9, the CDRs of the  $V_{\kappa}$  and  $V_{\text{H}}$  DNAs have been recombinantly linked to the framework (FR) sequences of the human  $V_{\kappa}$  and  $V_{\text{H}}$  regions, respectively, which are  
20 subsequently linked, respectively, to the human kappa and  $\gamma 1$  constant regions, so as to express in mammalian cells as described above hMu-9.

In another embodiment of the present invention, hMu-9, the CDRs of the light chain variable region comprise CDR1 comprising amino acids 24 to 34 of SEQ ID NO: (figure 2B), CDR2 comprising amino acids 50 to 56 of SEQ ID NO: (figure 2B), and  
25 CDR3 comprising amino acids 89 to 97 of SEQ ID NO: (figure 2B); and the CDRs of the heavy chain variable region comprise CDR1 comprising amino acids 31 to 35 of SEQ ID NO: (figure 2A), CDR2 comprising amino acids 50 to 64 of SEQ ID NO: (figure 2A), and CDR3 comprising amino acids 95 to 97 of SEQ ID NO: (figure 2A).

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

40

Other preferred embodiments of the invention include anti-CSAp antibody fragments comprising the light chain variable region of SEQ ID NO: (figure 4B) and/or the heavy chain variable region of SEQ ID NO: (figure 4A).

- In this specification, the expressions "cMu-9" or "cMu-9 mAb" are intended to refer to the chimeric monoclonal antibody constructed by joining or subcloning the non-human Vk and VH regions to the human constant light and heavy chains, respectively. The expressions "hMu-9" or "hMu-9 mAb" are intended to refer to the humanization of the chimeric monoclonal antibody by replacing the non-human FR sequences in cMu-9 with that of human framework regions. Preferably, the anti-CSAp humanized antibodies and fragments thereof of the present invention comprise framework region sequences where at least one amino acid of the corresponding non-human light or heavy chain framework regions is retained. Preferably, an amino acid from the murine antibody FR is retained in the same position of the corresponding humanized antibody.
- A chimeric antibody is a recombinant protein that contains the variable domains including the complementarity determining regions (CDRs) of an antibody derived from one species, preferably a rodent antibody, while the constant domains of the antibody molecule is derived from those of a human antibody. For veterinary applications, the constant domains of the chimeric antibody may be derived from that of other species, such as a cat or dog.
- A humanized antibody is a recombinant protein in which the CDRs from an antibody from one species; e.g., a rodent antibody, is transferred from the heavy and light variable chains of the rodent antibody into human heavy and light variable domains. The constant domains of the antibody molecule is derived from those of a human antibody.
- The present invention also contemplates anti-CSAp antibody fragments. The antibody fragments are antigen binding portions of an antibody, such as F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, and the like. The antibody fragments contain one or more CDRs of the intact antibody and bind to the same antigen that is recognized by the intact antibody. For

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

41

example, an anti-colon-specific antigen-p (CSAp) monoclonal antibody fragment binds to an epitope of colon-specific antigen-p.

Also, the present invention provides a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that is reactive against a targeted tissue and at least one other arm that is reactive against a targetable construct. The targetable construct is comprised of a carrier portion and at least 2 units of a recognizable hapten. Examples of recognizable haptens include, but are not limited to, histamine succinyl glycine(HSG) and fluorescein isothiocyanate. The targetable construct may be conjugated to a variety of agents useful for treating or identifying diseased tissue. Examples of conjugated agents include, but are not limited to, chelators, metal chelate complexes, drugs, toxins (e.g., ricin, abrin, ribonuclease, DNase I, *Staphylococcal* enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtherin toxin, *Pseudomonas* exotoxin, *Pseudomonas* endotoxin) and other effector molecules. Additionally, enzymes useful for activating a prodrug or increasing the target-specific toxicity of a drug can be conjugated to the targetable construct. Thus, the use of bsAb which are reactive to a targetable construct allows a variety of therapeutic and diagnostic/detection applications to be performed without raising new bsAb for each application.

Additionally, the present invention encompasses a method for detecting or treating target cells, tissues or pathogens in a mammal, comprising administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate. As used herein, the term "pathogen" includes, but is not limited to fungi, viruses (e.g., human immunodeficiency virus (HIV), herpes virus, cytomegalovirus, rabies virus, influenza virus, hepatitis B virus, Sendai virus, feline leukemia virus, Reo virus, polio virus, human serum parvo-like virus, simian virus 40, respiratory syncytial virus, mouse mammary tumor virus, Varicella-Zoster virus, Dengue virus, rubella virus, measles virus, adenovirus, human T-cell leukemia viruses, Epstein-Barr virus, murine leukemia virus, mumps virus, vesicular stomatitis virus, Sindbis virus, lymphocytic choriomeningitis virus, wart virus and blue tongue virus),

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

42

parasites and bacteria (e.g., *Streptococcus agalactiae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Hemophilis influenzae B*, *Treponema pallidum*, Lyme disease spirochetes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*,  
5 *Mycobacterium tuberculosis* and Tetanus toxin). See U.S. Patent No. 5,332,567.

Antibodies that do not target the CSAP antigen can be used in this invention. For example, antibodies against other antigens associated with carcinomas, particularly carcinomas of the gastrointestinal system (colon, rectum, pancreas tumors) and ovarian cancer, can be combined with CSAP antibodies and also used as fusion partners with  
10 CSAP antibodies. Antibodies against intracellular and other antigens associated with necrosis, angiogenesis factors, immune response factors (e.g., CD40), as well as products of oncogenes, may also be used in combination with CSAP antibodies and as fusion partners for CSAP antibodies. Anti-necrosis antibodies are described in Epstein et al., U.S. Pat. Nos. 6,071,491, 6,017,514, 5,019,368 and 5,882,626, and are  
15 incorporated by reference.

Immunoconjugates between chimeric, humanized and human anti-CSAP antibodies or fragments thereof and a diagnostic or therapeutic reagent, formulated in pharmaceutically acceptable vehicles (see, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990) can be prepared. An  
20 immunoconjugate is a conjugate of an antibody component with a therapeutic or diagnostic agent. As random (non-specific) conjugation often results in products with reduced binding activity, it is preferred to use conjugates in which the reagent is site-specifically bound to the antibody through, for example, carbohydrate moieties, such as through oxidized carbohydrate derivatives. Carbohydrate moieties can be introduced  
25 into an antibody by site-specific mutagenesis without altering the immunoreactivity. Methods for the production of such conjugates and their use in diagnostics and therapeutics are provided, for example in Shih et al., U.S. Pat. No. 5,057,313; Shih et al., Int. J. Cancer 41: 832 (1988); and Hansen et al., U.S. Pat. No. 5,443,953, the contents of which are incorporated herein by reference. Direct linkage of the reagent

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

43

to oxidized carbohydrate without the use of a polymeric carrier is described in McKearn et al., U.S. Pat. No. 5,156, 840, which is also incorporated by reference.

A wide variety of diagnostic/detection and therapeutic reagents can be advantageously conjugated to the antibodies of the invention. These include, but are not limited to, 5 different classes of chemotherapeutic agents, such as anthracyclines, antibiotics, alkylating agents, anti-mitotic agents, anti-angiogenesis agents, plant alkaloids, COX-inhibitors, antimetabolites e.g., doxorubicin, CPT-11, oxaliplatin, methotrexate, taxol and other taxanes, and the like; chelators, such as DTPA, to which detectable labels 10 such as fluorescent molecules or cytotoxic agents, such as heavy metals or radionuclides can be complexed; and toxins such as Pseudomonas exotoxin, RNase, gelonin, and the like.

A therapeutic agent is a molecule or atom which is administered separately, concurrently or sequentially with an antibody moiety or conjugated to an antibody moiety, i.e., antibody or antibody fragment, or a subfragment, and is useful in the 15 treatment of a disease. Examples of therapeutic agents include antibodies, antibody fragments, drugs, toxins, enzymes, enzyme-inhibitors, nucleases, hormones, hormone antagonists, immunomodulators, chelators, boron compounds, uranium atoms, photoactive agents or dyes and radionuclides. Radionuclides in therapeutic agents, which substantially decay by beta-particle emission include, but are not limited to: P- 20 32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212, and Bi-213. Maximum decay energies of useful beta-particle-emitting nuclides are preferably 20-5,000 keV, more preferably 100-4,000 keV, and most preferably 500- 25 2,500 keV. Also preferred are radionuclides that substantially decay with Auger-emitting particles. For example, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m and Ir-192. Decay energies of useful Auger-particle-emitting nuclides are preferably < 1,000 keV, more preferably < 100 keV, and most preferably < 70 keV. Also preferred are radionuclides that substantially

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

44

decay with generation of alpha-particles. Such radionuclides include, but are not limited to: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 and Fr-225. Decay energies of useful alpha-particle-emitting radionuclides are preferably 2,000-10,000 keV, more preferably 3,000-8,000 keV, and most preferably 4,000-7,000 keV.

Enzymes are also useful therapeutic agents. For example, alkaline phosphatase for use in combination with phosphate-containing prodrugs (U.S. Pat. No. 4,975,278); arylsulfatase for use in combination with sulfate-containing prodrugs (U.S. Pat. No. 5,270,196); peptidases and proteases, such as serratia protease, thermolysin, subtilisin, carboxypeptidase (U.S. Pat. Nos. 5,660,829; 5,587,161; 5,405,990) and cathepsins (including cathepsin B and L), for use in combination with peptide-based prodrugs; D-alanylcarboxypeptidases for use in combination with D-amino acid-modified prodrugs; carbohydrate-cleaving enzymes such as beta-galactosidase and neuraminidase for use in combination with glycosylated prodrugs (U.S. Pat. Nos. 5,561,119; 5,646,298); beta-lactamase for use in combination with beta-lactam-containing prodrugs; penicillin amidases, such as penicillin V amidase (U.S. Pat. No. 4,975,278) or penicillin G amidase, for use in combination with drugs derivatized at their amino nitrogens with phenoxyacetamide or phenylacetamide groups; and cytosine deaminase (U.S. Pat. Nos. 5,338,678; 5,545,548) for use in combination with 5-fluorocytosine-based prodrugs (U.S. Pat. No. 4,975,278) are suitable therapeutic agents for the present invention.

Anti-angiogenic agents (or angiogenesis inhibitors) suitable for use in combination therapy or for conjugating to antibodies include angiostatin, endostatin, vasculostatin, canstatin and maspin.

Other useful therapeutic agents include metals, such as those as part of a photodynamic therapy, and nuclides, such as those valuable in therapies based on neutron capture procedures. Specifically, zinc, aluminum, gallium, lutetium and palladium are useful for photodynamic therapy and B-10, Gd-157 and U-235 are useful for neutron capture therapy.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

45

A diagnostic/detection agent is a molecule or atom which is administered conjugated to an antibody moiety, i.e., antibody or antibody fragment, or subfragment, and is useful in diagnosing/detecting a disease by locating the cells containing the disease-associated antigen. Useful diagnostic/detection agents include, but are not limited to,

5 radioisotopes, dyes (such as with the biotin-streptavidin complex), radiopaque materials (e.g., iodine, barium, gallium, and thallium compounds and the like), contrast agents, fluorescent compounds or molecules and enhancing agents (e.g., paramagnetic ions) for magnetic resonance imaging (MRI). U.S. Patent No. 6,331,175 describes MRI

10 technique and the preparation of antibodies conjugated to a MRI enhancing agent and is incorporated in its entirety by reference. Preferably, the diagnostic agents are selected from the group consisting of radioisotopes for nuclear imaging, intraoperative and endoscopic detection, enhancing agents for use in magnetic resonance imaging or in ultrasonography, radiopaque and contrast agents for X-rays and computed tomography, and fluorescent compounds for fluoroscopy, including endoscopic fluoroscopy.

15 Fluorescent and radioactive agents conjugated to antibodies or used in bispecific, pretargeting methods, are particularly useful for endoscopic, intraoperative or intravascular detection of the targeted antigens associated with diseased tissues or clusters of cells, such as malignant tumors, as disclosed in Goldenberg U.S. Pat. Nos. 5,716,595, 6,096,289 and U.S. Application Serial No. 09/348,818, incorporated

20 herein by reference in their entirety, particularly with gamma-, beta-, and positron-emitters. Radionuclides useful for positron emission tomography include, but are not limited to: F-18, Mn-51, Mn-52m, Fe-52, Co-55, Cu-62, Cu-64, Ga-68, As-72, Br-75, Br-76, Rb-82m, Sr-83, Y-86, Zr-89, Tc-94m, In-110, I-120, and I-124. Total decay energies of useful positron-emitting radionuclides are preferably < 2,000 keV,

25 more preferably under 1,000 keV, and most preferably < 700 keV. Radionuclides useful as diagnostic agents utilizing gamma-ray detection include, but are not limited to: Cr-51, Co-57, Co-58, Fe-59, Cu-67, Ga-67, Se-75, Ru-97, Tc-99m, In-111, In-114m, I-123, I-125, I-131, Yb-169, Hg-197, and Tl-201. Decay energies of useful gamma-ray emitting radionuclides are preferably 20-2000 keV, more preferably 60-600

30 keV, and most preferably 100-300 keV.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

46

Paramagnetic ions suitable for the present invention include chromium (III), manganese (II), iron (III), iron (II), cobalt (II), nickel (II), copper (II), neodymium (III), samarium (III), ytterbium (III), gadolinium (III), vanadium (II), terbium (III), dysprosium (III), holmium (III) and erbium (III), with gadolinium being particularly preferred.

Ions useful in other contexts, such as X-ray imaging, include but are not limited to lanthanum (III), gold (III), lead (II), and especially bismuth (III). Fluorescent labels include rhodamine, fluorescein and renographin. Rhodamine and fluorescein are often linked via an isothiocyanate intermediate.

10 Metals are also useful in diagnostic agents, including those for magnetic resonance imaging techniques. These metals include, but are not limited to: Gadolinium, manganese, iron, chromium, copper, cobalt, nickel, dysprosium, rhenium, europium, terbium, holmium and neodymium. In order to load an antibody component with radioactive metals or paramagnetic ions, it may be necessary to react it with a reagent  
15 having a long tail to which are attached a multiplicity of chelating groups for binding the ions. Such a tail can be a polymer such as a polylysine, polysaccharide, or other derivatized or derivatizable chain having pendant groups to which can be bound chelating groups such as, *e.g.*, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), porphyrins, polyamines, crown ethers, bis-  
20 thiosemicarbazones, polyoximes, and like groups known to be useful for this purpose. Chelates are coupled to the peptide antigens using standard chemistries. The chelate is normally linked to the antibody by a group which enables formation of a bond to the molecule with minimal loss of immunoreactivity and minimal aggregation and/or internal cross-linking. Other, more unusual, methods and reagents for conjugating  
25 chelates to antibodies are disclosed in U.S. Patent 4,824,659 to Hawthorne, entitled "Antibody Conjugates," issued April 25, 1989, the disclosure of which is incorporated herein in its entirety by reference. Particularly useful metal-chelate combinations include 2-benzyl-DTPA and its monomethyl and cyclohexyl analogs, used with diagnostic isotopes in the general energy range of 20 to 2,000 keV. The same chelates,

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

47

when complexed with non-radioactive metals, such as manganese, iron and gadolinium are useful for MRI, when used along with the antibodies of the invention. Macrocyclic chelates such as NOTA, DOTA, and TETA are of use with a variety of metals and radiometals, most particularly with radionuclides of gallium, yttrium and copper, respectively. Such metal-chelate complexes can be made very stable by tailoring the ring size to the metal of interest. Other ring-type chelates such as macrocyclic polyethers, which are of interest for stably binding nuclides, such as <sup>223</sup>Ra for RAIT are encompassed by the invention.

Radiopaque and contrast materials are used for enhancing X-rays and computed tomography, and include iodine compounds, barium compounds, gallium compounds, thallium compounds, etc. Specific compounds include barium, diatrizoate, ethiodized oil, gallium citrate, iocarmic acid, iocetamic acid, iodamide, iodipamide, iodoxamic acid, iogulamide, iohexol, iopamidol, iopanoic acid, ioprocemic acid, iosefamic acid, isoseric acid, iosulamide meglumine, iosemetic acid, iotasul, iotetric acid, iothalamic acid, iotroxic acid, ioxaglic acid, ioxtrizoic acid, ipodate, meglumine, metrizamide, metrizoate, propylidone, and thallos chloride.

As used herein, the term "subject" refers to any animal (i.e., vertebrates and invertebrates) including, but not limited to humans and other primates, rodents (e.g., mice, rats, and guinea pigs), lagamorphs (e.g., rabbits), bovines (e.g., cattle), ovines (e.g., sheep), caprines (e.g., goats), porcines (e.g., swine), equines (e.g., horses), canines (e.g., dogs), felines (e.g., cats), domestic fowl (e.g., chickens, turkeys, ducks, geese, other gallinaceous birds, etc.), as well as feral or wild animals, including, but not limited to, such animals as ungulates (e.g., deer), bear, fish, lagamorphs, rodents, birds, etc. It is not intended that the term be limited to a particular age or sex. Thus, adult and newborn subjects, as well as fetuses, whether male or female, are encompassed by the term.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

## II. Preparation of Antibodies

Monoclonal antibodies (MAbs) are a homogeneous population of antibodies to a particular antigen and the antibody comprises only one type of antigen binding site and binds to only one epitope on an antigenic determinant. Rodent monoclonal antibodies to specific antigens may be obtained by methods known to those skilled in the art. See, 5 for example, Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975), and Coligan *et al.* (eds.), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, VOL. 1, pages 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) [hereinafter "Coligan"]. Briefly, monoclonal antibodies can be obtained by injecting mice with a composition comprising an antigen, verifying the 10 presence of antibody production by removing a serum sample, removing the spleen to obtain B-lymphocytes, fusing the B-lymphocytes with myeloma cells to produce hybridomas, cloning the hybridomas, selecting positive clones which produce antibodies to the antigen, culturing the clones that produce antibodies to the antigen, and isolating the antibodies from the hybridoma cultures.

15 MAbs can be isolated and purified from hybridoma cultures by a variety of well-established techniques. Such isolation techniques include affinity chromatography with Protein-A Sepharose, size-exclusion chromatography, and ion-exchange chromatography. See, for example, Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 and pages 2.9.1-2.9.3. Also, see Baines *et al.*, "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in 20 *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, VOL. 10, pages 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).

Abs to peptide backbones are generated by well-known methods for Ab production. For example, injection of an immunogen, such as (peptide)<sub>n</sub>-KLH, wherein KLH is keyhole limpet hemocyanin, and n=1-30, in complete Freund's adjuvant, followed by 25 two subsequent injections of the same immunogen suspended in incomplete Freund's adjuvant into immunocompetent animals, is followed three days after an i.v. boost of antigen, by spleen cell harvesting. Harvested spleen cells are then fused with Sp2/0-Ag14 myeloma cells and culture supernatants of the resulting clones analyzed for anti-

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

49

peptide reactivity using a direct-binding ELISA. Fine specificity of generated Abs can be analyzed for by using peptide fragments of the original immunogen. These fragments can be prepared readily using an automated peptide synthesizer. For Ab production, enzyme-deficient hybridomas are isolated to enable selection of fused cell lines. This technique also can be used to raise antibodies to one or more of the chelates comprising the linker, e.g., In(III)-DTPA chelates. Monoclonal mouse antibodies to an In(III)-di-DTPA are known (Barbet '395 *supra*).

The antibodies used in the present invention are specific to a variety of cell surface or intracellular tumor-associated antigens as marker substances. These markers may be substances produced by the tumor or may be substances which accumulate at a tumor site, on tumor cell surfaces or within tumor cells, whether in the cytoplasm, the nucleus or in various organelles or sub-cellular structures, or even as part of the endothelium of vessels nourishing tumors or elaborated by the tumor vasculature. Among such tumor-associated markers are those disclosed by Herberman, "Immunodiagnosis of Cancer," in Fleisher ed., "The Clinical Biochemistry of Cancer," page 347 (American Association of Clinical Chemists, 1979) and in U.S. Patent Nos. 4,150,149; 4,361,544; and 4,444,744.

Tumor-associated markers have been categorized by Herberman, *supra*, in a number of categories including oncofetal antigens, placental antigens, oncogenic or tumor virus associated antigens, tissue associated antigens, organ associated antigens, ectopic hormones and normal antigens or variants thereof. Occasionally, a sub-unit of a tumor-associated marker is advantageously used to raise antibodies having higher tumor-specificity, e.g., the beta-subunit of human chorionic gonadotropin (HCG) or the gamma region of carcino embryonic antigen (CEA), which stimulate the production of antibodies having a greatly reduced cross-reactivity to non-tumor substances as disclosed in U.S. Patent Nos. 4,361,644 and 4,444,744.

Another marker of interest is transmembrane activator and CAML-interactor (TACI). See Yu *et al. Nat. Immunol. 1:252-256 (2000)*. Briefly, TACI is a marker for B-cell

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

50

malignancies (e.g., lymphoma). Further it is known that TACI and B cell maturation antigen (BCMA) are bound by the tumor necrosis factor homolog a proliferation-inducing ligand (APRIL). APRIL stimulates *in vitro* proliferation of primary B and T cells and increases spleen weight due to accumulation of B cells *in vivo*. APRIL also competes with TALL-I (also called BLyS or BAFF) for receptor binding. Soluble BCMA and TACI specifically prevent binding of APRIL and block APRIL-stimulated proliferation of primary B cells. BCMA-Fc also inhibits production of antibodies against keyhole limpet hemocyanin and Pneumovax in mice, indicating that APRIL and/or TALL-I signaling via BCMA and/or TACI are required for generation of humoral immunity. Thus, APRIL-TALL-I and BCMA-TACI form a two ligand-two receptor pathway involved in stimulation of B and T cell function.

After the initial raising of antibodies to the immunogen, the antibodies can be sequenced and subsequently prepared by recombinant techniques. Humanization and chimerization of murine antibodies and antibody fragments are well known to those skilled in the art. For example, humanized monoclonal antibodies are produced by transferring mouse complementary determining regions from heavy and light variable chains of the mouse immunoglobulin into a human variable domain, and then, substituting human residues in the framework regions of the murine counterparts. In a preferred embodiment, some human residues in the framework regions of the humanized anti-CSAp antibody or fragments thereof are replaced by their murine counterparts. It is also preferred that a combination of framework sequences from 2 different human antibodies are used for V<sub>H</sub>. Still preferred, the two human antibodies are EU and NEWM. The constant domains of the antibody molecule is derived from those of a human antibody. The use of antibody components derived from humanized monoclonal antibodies obviates potential problems associated with the immunogenicity of murine constant regions.

A human antibody can be recovered from a transgenic mouse possessing human immunoglobulin loci. The mouse humoral immune system is humanized by inactivating the endogenous immunoglobulin genes and introducing human

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

51

immunoglobulin loci. The human immunoglobulin loci are exceedingly complex and comprise a large number of discrete segments which together occupy almost 0.2% of the human genome. To ensure that transgenic mice are capable of producing adequate repertoires of antibodies, large portions of human heavy- and light-chain loci must be introduced into the mouse genome. This is accomplished in a stepwise process beginning with the formation of yeast artificial chromosomes (YACs) containing either human heavy- or light-chain immunoglobulin loci in germline configuration. Since each insert is approximately 1 Mb in size, YAC construction requires homologous recombination of overlapping fragments of the immunoglobulin loci. The two YACs, one containing the heavy-chain loci and one containing the light-chain loci, are introduced separately into mice via fusion of YAC-containing yeast spheroblasts with mouse embryonic stem cells. Embryonic stem cell clones are then microinjected into mouse blastocysts. Resulting chimeric males are screened for their ability to transmit the YAC through their germline and are bred with mice deficient in murine antibody production. Breeding the two transgenic strains, one containing the human heavy-chain loci and the other containing the human light-chain loci, creates progeny which produce human antibodies in response to immunization.

Unrearranged human immunoglobulin genes also can be introduced into mouse embryonic stem cells via microcell-mediated chromosome transfer (MMCT). See, e.g., Tomizuka *et al.*, *Nature Genetics*, 16: 133 (1997). In this methodology microcells containing human chromosomes are fused with mouse embryonic stem cells. Transferred chromosomes are stably retained, and adult chimeras exhibit proper tissue-specific expression.

As an alternative, an antibody or antibody fragment of the present invention may be derived from human antibody fragments isolated from a combinatorial immunoglobulin library. See, e.g., Barbas *et al.*, *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 2: 119 (1991), and Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 12: 433 (1994), which are incorporated by reference. Many of the difficulties associated with generating monoclonal antibodies by B-cell immortalization can be overcome by engineering and

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

52

expressing antibody fragments in *E. coli*, using phage display. To ensure the recovery of high affinity, monoclonal antibodies a combinatorial immunoglobulin library must contain a large repertoire size. A typical strategy utilizes mRNA obtained from lymphocytes or spleen cells of immunized mice to synthesize cDNA using reverse transcriptase. The heavy- and light-chain genes are amplified separately by PCR and ligated into phage cloning vectors. Two different libraries are produced, one containing the heavy-chain genes and one containing the light-chain genes. Phage DNA is isolated from each library, and the heavy- and light-chain sequences are ligated together and packaged to form a combinatorial library. Each phage contains a random pair of heavy- and light-chain cDNAs and upon infection of *E. coli* directs the expression of the antibody chains in infected cells. To identify an antibody that recognizes the antigen of interest, the phage library is plated, and the antibody molecules present in the plaques are transferred to filters. The filters are incubated with radioactively labeled antigen and then washed to remove excess unbound ligand. A radioactive spot on the autoradiogram identifies a plaque that contains an antibody that binds the antigen. Cloning and expression vectors that are useful for producing a human immunoglobulin phage library can be obtained, for example, from STRATAGENE Cloning Systems (La Jolla, CA).

General techniques for cloning murine immunoglobulin variable domains are described, for example, by the publication of Orlandi *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 3833 (1989), which is incorporated by reference in its entirety. Techniques for constructing chimeric antibodies are well known to those of skill in the art. As an example, Leung *et al.*, *Hybridoma* 13:469 (1994), describe how they produced an LL2 chimera by combining DNA sequences encoding the V<sub>k</sub> and V<sub>H</sub> domains of LL2 monoclonal antibody, an anti-CD22 antibody, with respective human κ and IgG<sub>1</sub> constant region domains. This publication also provides the nucleotide sequences of the LL2 light and heavy chain variable regions, V<sub>k</sub> and V<sub>H</sub>, respectively. Techniques for producing humanized MAb are described, for example, by Jones *et al.*, *Nature* 321: 522 (1986), Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323 (1988), Verhoeyen *et al.*, *Science*

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

53

239: 1534 (1988), Carter *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89: 4285 (1992), Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437 (1992), and Singer *et al.*, *J. Immun.* 150: 2844 (1993), each of which is hereby incorporated by reference.

A chimeric antibody is a recombinant protein that contains the variable domains including the CDRs derived from one species of animal, such as a rodent antibody, while the remainder of the antibody molecule; i.e., the constant domains, is derived from a human antibody. Accordingly, a chimeric monoclonal antibody can also be humanized by replacing the sequences of the murine FR in the variable domains of the chimeric MAb with one or more different human FR. Specifically, mouse CDRs are transferred from heavy and light variable chains of the mouse immunoglobulin into the corresponding variable domains of a human antibody. As simply transferring mouse CDRs into human FRs often results in a reduction or even loss of antibody affinity, additional modification might be required in order to restore the original affinity of the murine antibody. This can be accomplished by the replacement of one or more some human residues in the FR regions with their murine counterparts to obtain an antibody that possesses good binding affinity to its epitope. See, for example, Tempest *et al.*, *Biotechnology* 9:266 (1991) and Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534 (1988). Further, the affinity of humanized, chimeric and human MAbs to a specific epitope can be increased by mutagenesis of the CDRs, so that a lower dose of antibody may be as effective as a higher dose of a lower affinity MAb prior to mutagenesis. See for example, WO0029584A1

Another method for producing the antibodies of the present invention is by production in the milk of transgenic livestock. See, e.g., Colman, A., *Biochem. Soc. Symp.*, 63: 141-147, 1998; U.S. Patent 5,827,690, both of which are incorporated in their entirety by reference. Two DNA constructs are prepared which contain, respectively, DNA segments encoding paired immunoglobulin heavy and light chains. The DNA segments are cloned into expression vectors which contain a promoter sequence that is preferentially expressed in mammary epithelial cells. Examples include, but are not limited to, promoters from rabbit, cow and sheep casein genes, the cow  $\alpha$ -lactoglobulin

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

54

gene, the sheep  $\beta$ -lactoglobulin gene and the mouse whey acid protein gene. Preferably, the inserted fragment is flanked on its 3' side by cognate genomic sequences from a mammary-specific gene. This provides a polyadenylation site and transcript-stabilizing sequences. The expression cassettes are coinjected into the pronuclei of fertilized, mammalian eggs, which are then implanted into the uterus of a recipient female and allowed to gestate. After birth, the progeny are screened for the presence of both transgenes by Southern analysis. In order for the antibody to be present, both heavy and light chain genes must be expressed concurrently in the same cell. Milk from transgenic females is analyzed for the presence and functionality of the antibody or antibody fragment using standard immunological methods known in the art. The antibody can be purified from the milk using standard methods known in the art.

Preparation of chimeric, humanized and human anti-CSAp antibodies

Also contemplated in the present invention are human, humanized and chimeric anti-CSAp monoclonal antibodies used in combination with other human or reengineered (e.g., chimerized, humanized) antibodies, such as carcinoma associated antibodies including those expressed by colorectal and ovarian carcinomas. In a preferred embodiment, antibodies against CEA, MUC1, MUC2, MUC3, MUC 4, PAM-4, KC4, BrE3, Le-Y (e.g., B3 antibody), EGFR, EGP-1, RS5 (GA733 antigen target, such as for antibodies EGP-2, 17-1A, KS1-4, Ep-CAM), TAG-72, the A33 antibody-determinant, KS-1, A3 and HER2/neu are used for combination therapy with humanized, chimeric or human anti-CSAp antibodies. See, e.g., Mendez *et al.*, *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997); U.S. Patent No. 5,633,425, which are incorporated in their entirety by reference. The BrE3 antibody is described in Couto, J, Christian, R, Peterson, J, and Ceriani, R., *Cancer Res.* 1995;55 (Suppl.23):5973s-5977s. The EGP-1 antibody is described in U.S. Provisional Application No. 60/360,229, some of the EGP-2 antibodies are cited in Birbenet *et al.*, in Staib *et al.*; and Schwartzberg in the references cited at the end of this application. The KS -1 antibody is cited in Koda *et al.*; the A33 antibody is cited in Ritter *et al.* at end; Le(y) antibody B3 described in Di

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

55

Carlo et al; A3 antibody is described in Tordsson et al., all listed in the references cited at the end of this application. Preferably, antibodies against marker antigens or receptors of gastrointestinal and ovarian carcinomas are well suited for use in combination with CSAp antibodies, and in particular with the Mu-9 antibodies. In a preferred embodiment, a gastrointestinal cancer is a colorectal cancer.

Also of use are antibodies against markers or products of oncogenes, or antibodies against angiogenesis factors, such as VEGF. VEGF antibodies are described in Thorpe et al., U.S. Pat. Nos. 6,342,221, 5,965,132 and 6,004,554, and are incorporated by reference in their entirety. Antibodies against certain immune response modulators, such as antibodies to CD40, are described in Todryk et al. and Turner et al., listed in the references cited at the end of this application. Other antibodies suitable for combination therapy include anti-necrosis antibodies as described in Epstein et al. (*infra*).

Cell lines and culture media used in the present invention include Mu-9 hybridoma cells and Sp2/0-Ag14 myeloma cells (ATCC, Rockville, MD). The monoclonal hybridoma producing Mu-9 was obtained by fusing the spleen from a mouse that had been immunized with colon-specific antigen-p (CSAp) with SP2/0Ag14. These cells may be cultured in Hybridoma serum-free media (HSFM) (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT) and antibiotics (complete media). Alternatively, they may be cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FCS (Gibco/BRL, Gaithersburg, Mass.) containing 10% of FCS and 75 g/ml gentamicin (complete HSFM) or, where indicated, in HSFM containing only antibiotics. Selection of the transfectomas may be carried out in complete HSFM containing 500 units/ml of hygromycin (Calbiochem, San Diego, CA). All cell lines are preferably maintained at 37° C in 5% CO<sub>2</sub>.

*Obtaining V<sub>K</sub> and V<sub>H</sub> Gene Segments*

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

56

Isolation of the  $V_{\kappa}$  and  $V_{\text{H}}$  gene segments can be accomplished by several means that are well-known in the art. Two such means include, but are not limited to, PCR cloning and cDNA library screening.

PCR cloning techniques are well-known in the art. In brief, however, PCR cloning of  $V_{\kappa}$  and  $V_{\text{H}}$  gene fragments may be accomplished as follows. Poly A mRNA may be isolated from a Mu-9 hybridoma cell line using commercially available kits such as the Fast Track mRNA Isolation kit (Invitrogen, San Diego, CA). The first strand cDNA may then be reverse transcribed from poly A mRNA using a cDNA cycle kit (Invitrogen). In this process, poly A mRNA is annealed to a murine IgG CH1-specific primer or a murine C $\kappa$ -specific primer. Examples of such primers include CH1B (5' - ACA GTC ACT GAG CTG G - 3') and C $\kappa$ 3-BH1 (5' - GCC GGA TCC TGA CTG GAT GGT GGG AAG ATG GAT ACA - 3'), respectively. The first strand cDNA may be used as templates to amplify the  $V_{\text{H}}$  and  $V_{\kappa}$  sequences by PCR, as described by Orlandi *et al.* For the  $V_{\kappa}$  region, a primer pair such as VK1Back (5' - GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA - 3') and IgGKC3' (5' - CTC ACT GGA TGG TGG GAA GAT GGA TAC AGT TGG - 3') may be used. For the  $V_{\text{H}}$  region, a primer pair such as VH1Back (5' - AGG T(C/G)(A/C) A(A/G)C TGC AG(C/G) AGT C(A/T)G G - 3') and CH1B may be used. After amplification, the  $V_{\kappa}$  and  $V_{\text{H}}$  fragments may then be gel-purified and cloned into a cloning vector such as the TA cloning vector (Invitrogen) for sequence analyses by the dideoxytermination method. Sequences confirmed to be of immunoglobulin origin may then be used to construct chimeric expression vectors using methods described by Leung *et al.*

As a preferred alternative to isolating the  $V_{\kappa}$  and  $V_{\text{H}}$  gene segments by PCR cloning, cDNA library screening may be utilized. cDNA screening methods also are well known in the art. In brief, however, a cDNA library may be constructed from the mRNA extracted from the murine Mu-9 hybridoma cells in pSPORT vector (Life Technologies). The first strand cDNA may be synthesized by priming poly A RNA from Mu-9 hybridoma with an oligo dT primer-NotI adaptor (Life Technologies). After the second strand synthesis and attachment of SalI adaptors, the cDNA pool may

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

57

be size fractionated through a cDNA size fractionation column. Fractionated cDNA may then be ligated to pSPORT vector and subsequently transformed into *Escherichia coli* DH5. A library may then be plated, transferred to filters, and amplified.

- Screening of the cDNA library may be accomplished by hybridization with labeled probes specific for the heavy and light chains. For example [32-P]-labeled probes such as MUCH-1 (5' - AGA CTG CAG GAG AGC TGG GAA GGT GTG CAC - 3') for heavy chain and MUCK-1 (5' - GAA GCA CAC GAC TGA GGC ACC TCC AGA TGT - 3') for light chain. Clones that are positive on a first screening may be transferred to duplicate plates and screened a second time with the same probes.
- 10 RNA isolation, cDNA synthesis, and amplification can be carried out as follows. Total cell RNA can be prepared from a Mu-9 hybridoma cell line, using a total of about  $10^7$  cells, according to Sambrook et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second ed., Cold Spring Harbor Press, 1989), which is incorporated by reference. First strand cDNA can be reverse transcribed from total RNA conventionally, such as
- 15 by using the SuperScript preamplification system (Gibco/BRL., Gaithersburg, Md.). Briefly, in a reaction volume of 20  $\mu$ l, 50 ng of random hexamer primers can be annealed to 5  $\mu$ g of RNAs in the presence of 2  $\mu$ l of 10X synthesis buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA], 1  $\mu$ l of 10 mM dNTP mix, 2  $\mu$ l of 0.1 M DTT, and 200 units of SuperScript reverse transcriptase.
- 20 The elongation step is initially allowed to proceed at room temperature for 10 min followed by incubation at 42° C. for 50 min. The reaction can be terminated by heating the reaction mixture at 90° C. for 5 min.

- Synthesizing and labeling the screening probes can be accomplished by well-known means. Depending on the detection systems utilized, probe labeling will vary. Many
- 25 kits for this purpose are commercially available. One method for 32-P labeling of oligonucleotides includes the use of with [ -32P]ATP (Amersham Arlington Heights, IL) and T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Beverly, MA), followed by column purification.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

58

*Preparation of a chimeric anti-CSAp antibody*

In general, to prepare chimeric anti-CSAp MAb, V<sub>H</sub> and V<sub>K</sub> chains of a CSAP antibody may be obtained by methods such as those described above and amplified by PCR. In a preferred embodiment, the chimeric anti-CSAp antibody is a Mu-9 antibody. The V<sub>K</sub> PCR products may be subcloned into a pBR327 based staging vector (VKpBR), as described by Leung et al. (*Hybridoma*, 13:469-476 (1994)). The V<sub>H</sub> PCR products may be subcloned into a similar pBluescript-based staging vector (VHpBS). The fragments containing the V<sub>K</sub> and V<sub>H</sub> sequences, along with the promoter and signal peptide sequences, can be excised from the staging vectors using HindIII and BamHI restriction endonucleases. The V<sub>K</sub> fragments (about 600 bp) can be subcloned into a mammalian expression vector (for example, pKh) conventionally. pKh is a pSVhyg-based expression vector containing the genomic sequence of the human kappa constant region, an Ig enhancer, a kappa enhancer and the hygromycin-resistant gene. Similarly, the about 800 bp V<sub>H</sub> fragments can be subcloned into pG1g, a pSVgpt-based expression vector carrying the genomic sequence of the human IgG1 constant region, an Ig enhancer and the xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (gpt) gene. The two plasmids may be co-transfected into mammalian cells, such as Sp2/0-Ag14 cells, by electroporation and selected for hygromycin resistance. Colonies surviving selection are expanded, and supernatant fluids monitored for production of cMu-9 mAb by an ELISA method. A transfection efficiency of about 1-10 x 10<sup>6</sup> cells is desirable. An antibody expression level of between 0.10 and 2.5 μg/ml can be expected with this system.

Alternately, the V and VH expression cassettes can be assembled in the modified staging vectors, VKpBR2 and VHpBS2, excised as XbaI/BamHI and XhoI/BamHI fragments, respectively, and subcloned into a single expression vector, such as pdHL2, as described by Gilles et al. (*J. Immunol. Methods* 125:191 (1989)), Losman et al., (*Clin. Cancer Res.* 5:3101 (1999)) and in Losman et al., (*Cancer*, 80:2660 (1997)) for the expression in Sp2/0-Ag14 cells. Another vector that is useful in the present invention is the GS vector, as described in Barnes et al., (*Cytotechnology* 32:109-123 (2000)),

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

59

which is preferably expressed in the NS0 cell line and CHO cells. Other appropriate mammalian expression systems are described in Werner *et al.*, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 48(II), Nr. 8, 870-880 (1998).

The  $V_{\kappa}$  and  $V_{\text{H}}$  sequences can be amplified by PCR as described by Orlandi *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 86: 3833 (1989)) which is incorporated by reference.  $V_{\kappa}$  sequences may be amplified using the primers CK3BH and  $V_{\kappa}5-3$  (Leung *et al.*, *BioTechniques*, 15: 286 (1993), which is incorporated by reference), while  $V_{\text{H}}$  sequences can be amplified using the primer CH1B which anneals to the CH1 region of murine IgG, and VHBACK (Orlandi *et al.*, 1989 above). The PCR reaction mixtures containing 10  $\mu\text{l}$  of the first strand cDNA product, 9  $\mu\text{l}$  of 10X PCR buffer [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.01% (w/v) gelatin] (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn.), can be subjected to 30 cycles of PCR. Each PCR cycle preferably consists of denaturation at 94° C. for 1 min, annealing at 50° C. for 1.5 min, and polymerization at 72° C. for 1.5 min. Amplified  $V_{\kappa}$  and  $V_{\text{H}}$  fragments can be purified on 2% agarose (BioRad, Richmond, Calif.).

*Preparation of a humanized anti-CSAp antibody*

In a preferred embodiment, the humanized anti-CSAp antibody is a humanized Mu-9 antibody. Once the sequences for the hMu-9 $V_{\kappa}$  and  $V_{\text{H}}$  domains are designed, CDR engrafting can be accomplished by gene synthesis using long synthetic DNA oligonucleotides as templates and short oligonucleotides as primers in a PCR reaction. In most cases, the DNA encoding the  $V_{\kappa}$  or  $V_{\text{H}}$  domain will be approximately 350 bp long. By taking advantage of codon degeneracy, a unique restriction site may easily be introduced, without changing the encoded amino acids, at regions close to the middle of the V gene DNA sequence. For example, at DNA nucleotide positions 132-137 (amino acid positions 44-46) for the hMu-9  $V_{\text{H}}$  domain, a unique XbaI site can be introduced while maintaining the originally designed amino acid sequence (see the sequence in Figure 11A). Two long non-overlapping single-stranded DNA oligonucleotides (~ 150 bp) upstream and downstream of the XbaI site can be

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

60

generated by automated DNA oligonucleotide synthesizer (Cyclone Plus DNA Synthesizer, Milligen-Bioscience). As the yields of full length DNA oligonucleotides may be expected to be low, they can be amplified by two pairs of flanking oligonucleotides in a PCR reaction. The primers can be designed with the necessary restriction sites to facilitate subsequent sequence assembly and subcloning. Primers for the oligonucleotides should contain overlapping sequence at the XbaI site so that the resultant PCR products can be joined in-frame at the XbaI site to form a full length DNA sequence encoding the hMu-9 VH domain. The ligation of the PCR products for the oligos at the XbaI site and their subcloning into the PstII/BstEII sites of the staging vector, VHpBS, can be completed in a single three-fragment ligation step. The subcloning of the correct sequence into VHpBS can be first analyzed by restriction digestion analysis and subsequently confirmed by sequencing reaction according to Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 5463 (1977).

The HindIII/BamHI fragment containing the Ig promoter, leader sequence and the hMu-9 V<sub>H</sub> sequence can be excised from the staging vector and subcloned to the corresponding sites in a pSVgpt-based vector, pG1g, which contains the genomic sequence of the human IgG constant region, an Ig enhancer and a gpt selection marker, forming the final expression vector, hMu-9pG1g. Similar strategies can be employed for the construction of the hMu-9 V<sub>K</sub> sequence. The restriction site chosen for the ligation of the PCR products for the long oligonucleotides can be NruI in this case.

The DNA sequence containing the Ig promoter, leader sequence and the hMu-9 V<sub>K</sub> sequence can be excised from the staging vector VKpBR by treatment with BamHI/HindIII, and can be subcloned into the corresponding sites of a pSVhyg-based vector, pKh, which contains the genomic sequence of human kappa chain constant regions, a hygromycin selection marker, an Ig and a kappa enhancer, forming the final expression vector, hMu-9pKh.

The two plasmids can be co-transfected into an appropriate cell, e.g., myeloma Sp2/0-Ag14, colonies selected for hygromycin resistance, and supernatant fluids monitored

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

61

- for production of hMu-9 antibodies by, for example, an ELISA assay, as described below. Alternately, the V and VH expression cassettes can be assembled in the modified staging vectors, VKpBR2 and VHpBS2, excised as XbaI/BamHI and XhoI/BamHI fragments, respectively, and subcloned into a single expression vector, such as pdHL2, as described by Gilles *et al.* *J. Immunol. Methods* 125:191 (1989), 5  
Losman *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 5:3101 (1999) and in Losman *et al.*, *Cancer*, 80:2660 (1997) for the expression in Sp2/0-Ag14 cells. Another vector that is useful in the present invention is the GS vector, as described in Barnes *et al.*, *Cytotechnology* 32:109-123 (2000), which is preferably expressed in the NS0 cell line and CHO cells.
- 10 Other appropriate mammalian expression systems are described in Werner *et al.*, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 48(II), Nr. 8, 870-880 (1998).

- Transfection, and assay for antibody secreting clones by ELISA, can be carried out as follows. About 10  $\mu$ g of hMu-9pKh (light chain expression vector) and 20  $\mu$ g of hMu-9pG1g (heavy chain expression vector) can be used for the transfection of  $5 \times 10^6$
- 15 SP2/0 myeloma cells by electroporation (BioRad, Richmond, Calif.) according to Co et al., *J. Immunol.*, 148: 1149 (1992) which is incorporated by reference. Following transfection, cells may be grown in 96-well microtiter plates in complete HSFM medium (GIBCO, Gaithersburg, Md.) at 37° C., 5% CO<sub>2</sub>. The selection process can be initiated after two days by the addition of hygromycin selection medium
- 20 (Calbiochem, San Diego, Calif.) at a final concentration of 500  $\mu$ g/ml of hygromycin. Colonies typically emerge 2-3 weeks post-electroporation. The cultures can then be expanded for further analysis.

#### *Screening the Clones and Isolating Antibodies*

- Transfectoma clones that are positive for the secretion of chimeric or humanized heavy chain can be identified by ELISA assay. Briefly, supernatant samples (100  $\mu$ l) from
- 25 transfectoma cultures are added in triplicate to ELISA microtiter plates precoated with goat anti-human (GAH)-IgG, F(ab')<sub>2</sub> fragment-specific antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa.). Plates are incubated for 1 h at room temperature.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

62

Unbound proteins are removed by washing three times with wash buffer (PBS containing 0.05% polysorbate 20). Horseradish peroxidase (HRP) conjugated GAH-IgG, Fc fragment-specific antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa.) are added to the wells, (100  $\mu$ l of antibody stock diluted  $\times 10^4$ , supplemented with the unconjugated antibody to a final concentration of 1.0  $\mu$ g/ml). Following an incubation of 1 h, the plates are washed, typically three times. A reaction solution, [100  $\mu$ l, containing 167  $\mu$ g of orthophenylene-diamine (OPD) (Sigma, St. Louis, Mo.), 0.025% hydrogen peroxide in PBS], is added to the wells. Color is allowed to develop in the dark for 30 minutes. The reaction is stopped by the addition of 50  $\mu$ l of 4 N HCl solution into each well before measuring absorbance at 490 nm in an automated ELISA reader (Bio-Tek instruments, Winooski, Vt.). Bound chimeric antibodies are then determined relative to an irrelevant chimeric antibody standard (obtainable from Scotgen, Ltd., Edinburg, Scotland).

Antibodies can be isolated from cell culture media as follows. Transfectoma cultures are adapted to serum-free medium. For production of chimeric antibody, cells are grown as a 500 ml culture in roller bottles using HSFM. Cultures are centrifuged and the supernatant filtered through a 0.2 micron membrane. The filtered medium is passed through a protein A column (1 x 3 cm) at a flow rate of 1 ml/min. The resin is then washed with about 10 column volumes of PBS and protein A-bound antibody is eluted from the column with 0.1 M glycine buffer (pH 3.5) containing 10 mM EDTA. Fractions of 1.0 ml are collected in tubes containing 10  $\mu$ l of 3 M Tris (pH 8.6), and protein concentrations determined from the absorbancies at 280/260 nm. Peak fractions are pooled, dialyzed against PBS, and the antibody concentrated, for example, with the Centricon 30 (Amicon, Beverly, Mass.). The antibody concentration is determined by ELISA, as before, and its concentration adjusted to about 1 mg/ml using PBS. Sodium azide, 0.01% (w/v), is conveniently added to the sample as preservative.

The affinity of a chimeric, humanized or human anti-CSAp antibody may be evaluated using a direct binding assay or a competitive binding assay, as exemplified below.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

63

*Modifying/Optimizing the Recombinant Antibodies*

As humanization sometimes results in a reduction or even loss of antibody affinity, additional modification might be required in order to restore the original affinity (See, for example, Tempest et al., *Bio/Technology* 9: 266 (1991); Verhoeyen et al., *Science* 239: 1534 (1988)), which are incorporated by reference. Knowing that cMu-9 exhibits a binding affinity comparable to that of its murine counterpart, defective designs, if any, in the original version of hMu-9 can be identified by mixing and matching the light and heavy chains of cMu-9 to those of the humanized version. Preferably, some human residues in the framework regions are replaced by their murine counterparts. Also preferred, a combination of framework sequences from 2 different human antibodies, such as EU and NEWM are used for V<sub>H</sub>. For example, FR1-3 can come from EU and FR 4 from NEWM.

Other modifications, such as Asn-linked glycosylation sites, can be introduced into a chimerical, human, or humanized Mu-9 antibody by conventional oligonucleotide directed site-specific mutagenesis. Detailed protocols for oligonucleotide-directed mutagenesis and related techniques for mutagenesis of cloned DNA are well-known. For example, see Sambrook *et al.* and Ausubel *et al.* above.

For example, to introduce an Asn in position 18 of hMu-9 V<sub>K</sub> (figure 4B), one may alter codon 18 from CGA for Arg to AAC. To accomplish this, a single stranded DNA template containing the antibody light chain sequence is prepared from a suitable strain of *E. coli* (e.g., dut<sup>-</sup> ung<sup>-</sup>) in order to obtain a single strand DNA molecule containing a small number of uracils in place of thymidine. Such a DNA template can be obtained by M13 cloning or by in vitro transcription using a SP6 promoter. See, for example, Ausubel et al., eds., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley & Sons, NY, 1987. An oligonucleotide containing the mutated sequence is synthesized conventionally, annealed to the single-stranded template and the product treated with T4 DNA polymerase and T4 DNA ligase to produce a double-stranded DNA molecule. Transformation of wild type *E. coli* (dut<sup>+</sup>,

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

64

ung<sup>+</sup>) cells with the double-stranded DNA provides an efficient recovery of mutated DNA.

Alternatively, an Asn-linked glycosylation site can be introduced into an antibody light chain using an oligonucleotide containing the desired mutation as the primer and DNA clones of the variable regions for the Vk chain, or by using RNA from cells that produce the antibody of interest as a template. Also see, Huse, in ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL GUIDE, Boerrebaeck, ed., W. H. Freeman & Co., pp. 103-120, 1992. Site-directed mutagenesis can be performed, for example, using the TRANSFORMER™ kit (Clontech, Palo Alto, Calif.) according to the manufacturer's instructions.

Alternatively, a glycosylation site can be introduced by synthesizing an antibody chain with mutually priming oligonucleotides, one such containing the desired mutation. See, for example, Uhlmann, Gene 71: 29 (1988); Wosnick et al., Gene 60: 115 (1988); Ausubel et al., above, which are incorporated by reference.

15 Although the general description above referred to the introduction of an Asn glycosylation site in position 18 of the light chain of an antibody, it will occur to the skilled artisan that it is possible to introduce Asn-linked glycosylation sites elsewhere in the light chain, or even in the heavy chain variable region.

*Determining Antibody Binding Affinity*

20 Comparative binding affinities of the isolated murine, human, humanized and chimeric Mu-9 antibodies thus isolated may be determined by direct radioimmunoassay. Mu-9 can be labeled with <sup>125</sup>I or <sup>131</sup>I using the chloramine T method (see, for example, Greenwood et al., Biochem. J., 89: 123 (1963) which is incorporated by reference). The specific activity of the iodinated antibody is typically adjusted to about 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

25 Unlabeled and labeled antibodies are diluted to the appropriate concentrations using reaction medium (HSFM supplemented with 1% horse serum and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin). The appropriate concentrations of both labeled and unlabeled antibodies

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

65

are added together to the reaction tubes in a total volume of 100  $\mu$ l. A culture of GW-39 tumor cells is sampled and the cell concentration determined. The culture is centrifuged and the collected cells washed once in reaction medium followed by resuspension in reaction medium to a final concentration of about  $10^7$  cells/ml. All  
5 procedures are carried out in the cold at 4° C. The cell suspension, 100  $\mu$ l, is added to the reaction tubes. The reaction is carried out at 4° C. for 2 h with periodic gentle shaking of the reaction tubes to resuspend the cells. Following the reaction period, 5 ml of wash buffer (PBS containing 1% BSA) is added to each tube. The suspension is centrifuged and the cell pellet washed a second time with another 5 ml of wash buffer.  
10 Following centrifugation, the amount of remaining radioactivity remaining in the cell pellet is determined in a gamma counter (Minaxi, Packard Instruments, Sterling, Va.).

### III. Production of Antibody Fragments

Antibody fragments which recognize specific epitopes can be generated by known techniques. The antibody fragments are antigen binding portions of an antibody, such  
15 as F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, sFv and the like. Other antibody fragments include, but are not limited to: the F(ab')<sub>2</sub> fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab' fragments, which can be generated by reducing disulfide bridges of the F(ab')<sub>2</sub> fragments. Alternatively, Fab' expression libraries can be constructed (Huse *et al.*, 1989, *Science*, 246:1274-1281) to allow rapid  
20 and easy identification of monoclonal Fab' fragments with the desired specificity. The present invention encompasses antibodies and antibody fragments.

A single chain Fv molecule (scFv) comprises a VL domain and a VH domain. The VL and VH domains associate to form a target binding site. These two domains are further covalently linked by a peptide linker (L). A scFv molecule is denoted as either  
25 VL-L-VH if the VL domain is the N-terminal part of the scFv molecule, or as VH-L-VL if the VH domain is the N-terminal part of the scFv molecule. Methods for making scFv molecules and designing suitable peptide linkers are described in US Patent No. 4,704,692, US Patent No. 4,946,778, R. Raag and M. Whitlow, "Single

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

66

*Chain Fvs.*" FASEB Vol 9:73-80 (1995) and R.E. Bird and B.W. Walker, "Single Chain Antibody Variable Regions," TIBTECH, Vol 9: 132-137 (1991). These references are incorporated herein by reference.

To obtain high-affinity scFv, an scFv library with a large repertoire can be constructed  
5 by isolating V-genes from non-immunized human donors using PCR primers  
corresponding to all known V<sub>H</sub>, V<sub>κ</sub> and V<sub>λ</sub> gene families. See, e.g., Vaughn *et al.*,  
*Nat. Biotechnol.*, 14: 309-314 (1996). Following amplification, the V<sub>κ</sub> and V<sub>λ</sub> pools  
are combined to form one pool. These fragments are ligated into a phagemid vector.  
The scFv linker, (Gly<sub>4</sub>, -Ser)<sub>n</sub>, is then ligated into the phagemid upstream of the V<sub>L</sub>  
10 fragment. The V<sub>H</sub> and linker-V<sub>L</sub> fragments are amplified and assembled on the J<sub>H</sub>  
region. The resulting V<sub>H</sub>-linker-V<sub>L</sub> fragments are ligated into a phagemid vector. The  
phagemid library can be panned using filters, as described above, or using  
immunotubes (Nunc; Maxisorp). Similar results can be achieved by constructing a  
combinatorial immunoglobulin library from lymphocytes or spleen cells of immunized  
15 rabbits and by expressing the scFv constructs in *P. pastoris*. See, e.g., Ridder *et al.*,  
*Biotechnology*, 13: 255-260 (1995). Additionally, following isolation of an appropriate  
scFv, antibody fragments with higher binding affinities and slower dissociation rates  
can be obtained through affinity maturation processes such as CDR3 mutagenesis and  
chain shuffling. See, e.g., Jackson *et al.*, *Br. J. Cancer*, 78: 181-188 (1998); Osbourn  
20 *et al.*, *Immunotechnology*, 2: 181-196 (1996).

An antibody fragment can be prepared by proteolytic hydrolysis of the full length  
antibody or by expression in *E. coli* or another host of the DNA coding for the  
fragment. An antibody fragment can be obtained by pepsin or papain digestion of full  
length antibodies by conventional methods. For example, an antibody fragment can be  
25 produced by enzymatic cleavage of antibodies with pepsin to provide a 5S fragment  
denoted F(ab')<sub>2</sub>. This fragment can be further cleaved using a thiol reducing agent, and  
optionally a blocking group for the sulfhydryl groups resulting from cleavage of  
disulfide linkages, to produce 3.5S Fab' monovalent fragments. Alternatively, an  
enzymatic cleavage using papain produces two monovalent Fab fragments and an Fc

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

67

fragment directly. These methods are described, for example, by Goldenberg, U.S. Patent Nos. 4,036,945 and 4,331,647 and references contained therein, which patents are incorporated herein in their entireties by reference. Also, see Nisonoff *et al.*, *Arch Biochem. Biophys.* 89: 230 (1960); Porter, *Biochem. J.* 73: 119 (1959), Edelman *et al.*, in *METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1*, page 422 (Academic Press 1967), and Coligan at pages 2.8.1-2.8.10 and 2.10.-2.10.4.

Another form of an antibody fragment is a peptide coding for a single complementarity-determining region (CDR). A CDR is a segment of the variable region of an antibody that is complementary in structure to the epitope to which the antibody binds and is more variable than the rest of the variable region. Accordingly, a CDR is sometimes referred to as hypervariable region. A variable region comprises three CDRs. CDR peptides can be obtained by constructing genes encoding the CDR of an antibody of interest. Such genes are prepared, for example, by using the polymerase chain reaction to synthesize the variable region from RNA of antibody-producing cells. See, for example, Larrick *et al.*, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2: 106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION*, Ritter *et al.* (eds.), pages 166-179 (Cambridge University Press 1995); and Ward *et al.*, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS*, Birch *et al.*, (eds.), pages 137-185 (Wiley-Liss, Inc. 1995).

Other methods of cleaving antibodies, such as separation of heavy chains to form monovalent light-heavy chain fragments, further cleavage of fragments, or other enzymatic, chemical or genetic techniques may also be used, so long as the fragments bind to the antigen that is recognized by the intact antibody.

#### Preparation of a Bispecific Antibody

The bsAbs can be prepared by techniques known in the art, for example, an anti-CEA or anti-CSAp Ab and an anti-peptide Ab are both separately digested with pepsin to

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

68

their respective  $F(ab')_2$ s. The anti-CEA-Ab- $F(ab')_2$  or anti-CSAp-Ab- $F(ab')_2$  is reduced with cysteine to generate Fab' monomeric units which are further reacted with the cross-linker bis(maleimido) hexane to produce Fab'-maleimide moieties. The anti-peptide Ab- $F(ab')_2$  is reduced with cysteine and the purified, recovered anti-peptide Fab'-SH reacted with the anti-CEA-Fab'-maleimide or anti-CSAp-Fab'-maleimide, respectively, to generate the Fab' x Fab' bi-specific Ab. Alternatively, the anti-peptide Fab'-SH fragment may be coupled with the anti-CEA  $F(ab')_2$  or anti-CSAp  $F(ab')_2$ , respectively, to generate a  $F(ab')_2$  x Fab' construct, or with anti-CEA or Mu-9 IgG to generate an IgG x Fab' bi-specific construct. In one embodiment, the IgG x Fab' construct can be prepared in a site-specific manner by attaching the antipeptide Fab' thiol group to anti-CEA or Mu-9 IgG heavy-chain carbohydrate which has been periodate-oxidized, and subsequently activated by reaction with a commercially available hydrazide-maleimide cross-linker. The component Abs used can be chimerized or humanized by known techniques. A chimeric antibody is a recombinant protein that contains the variable domains and complementary determining regions derived from a rodent antibody, while the remainder of the antibody molecule is derived from a human antibody. Humanized antibodies are recombinant proteins in which murine complementarity determining regions of a monoclonal antibody have been transferred from heavy and light variable chains of the murine immunoglobulin into a human variable domain.

A variety of recombinant methods can be used to produce bi-specific antibodies and antibody fragments. For example, bi-specific antibodies and antibody fragments can be produced in the milk of transgenic livestock. See, e.g., Colman, A., *Biochem. Soc. Symp.*, 63: 141-147, 1998; U.S. Patent No. 5,827,690. Two DNA constructs are prepared which contain, respectively, DNA segments encoding paired immunoglobulin heavy and light chains. The fragments are cloned into expression vectors which contain a promoter sequence that is preferentially expressed in mammary epithelial cells. Examples include, but are not limited to, promoters from rabbit, cow and sheep casein genes, the cow  $\alpha$ -lactoglobulin gene, the sheep  $\beta$ -lactoglobulin gene and the mouse whey acid protein gene. Preferably, the inserted fragment is flanked on its 3'

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

69

side by cognate genomic sequences from a mammary-specific gene. This provides a polyadenylation site and transcript-stabilizing sequences. The expression cassettes are coinjected into the pronuclei of fertilized, mammalian eggs, which are then implanted into the uterus of a recipient female and allowed to gestate. After birth, the progeny are screened for the presence of both transgenes by Southern analysis. In order for the antibody to be present, both heavy and light chain genes must be expressed concurrently in the same cell. Milk from transgenic females is analyzed for the presence and functionality of the antibody or antibody fragment using standard immunological methods known in the art. The antibody can be purified from the milk using standard methods known in the art.

A chimeric Ab is constructed by ligating the cDNA fragment encoding the mouse light variable and heavy variable domains to fragment encoding the C domains from a human antibody. Because the C domains do not contribute to antigen binding, the chimeric antibody will retain the same antigen specificity as the original mouse Ab but will be closer to human antibodies in sequence. Chimeric Abs still contain some mouse sequences, however, and may still be immunogenic. A humanized Ab contains only those mouse amino acids necessary to recognize the antigen. This product is constructed by building into a human antibody framework the amino acids from mouse complementarity determining regions.

Other recent methods for producing bsAbs include engineered recombinant Abs which have additional cysteine residues so that they crosslink more strongly than the more common immunoglobulin isotypes. See, e.g., FitzGerald *et al.*, *Protein Eng.* 10(10):1221-1225, 1997. Another approach is to engineer recombinant fusion proteins linking two or more different single-chain antibody or antibody fragment segments with the needed dual specificities. See, e.g., Coloma *et al.*, *Nature Biotech.* 15:159-163, 1997. A variety of bi-specific fusion proteins can be produced using molecular engineering. In one form, the bi-specific fusion protein is monovalent, consisting of, for example, a scFv with a single binding site for one antigen and a Fab fragment with a single binding site for a second antigen. In another form, the bi-specific fusion

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

70

protein is divalent, consisting of, for example, an IgG with two binding sites for one antigen and two scFv with two binding sites for a second antigen.

- Functional bi-specific single-chain antibodies (bscAb), also called diabodies, can be produced in mammalian cells using recombinant methods. See, e.g., Mack *et al.*,  
5 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 7021-7025, 1995. For example, bscAb are produced by joining two single-chain Fv fragments via a glycine-serine linker using recombinant methods. The V light-chain (V<sub>L</sub>) and V heavy-chain (V<sub>H</sub>) domains of two antibodies of interest are isolated using standard PCR methods. The V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> cDNA's obtained from each hybridoma are then joined to form a single-chain fragment in a two-step  
10 fusion PCR. The first PCR step introduces the (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub> linker, and the second step joins the V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> amplicons. Each single chain molecule is then cloned into a bacterial expression vector. Following amplification, one of the single-chain molecules is excised and sub-cloned into the other vector, containing the second single-chain molecule of interest. The resulting bscAb fragment is subcloned into an eukaryotic  
15 expression vector. Functional protein expression can be obtained by transfecting the vector into chinese hamster ovary cells. Bi-specific fusion proteins are prepared in a similar manner. Bi-specific single-chain antibodies and bi-specific fusion proteins are included within the scope of the present invention. Diabody, triabody and tetrabody bispecific fusion proteins produced in E.coli and yeast are described in U.S.  
20 Provisional Application No. 60/345,641, 60/328,835 and 60/342,103, and are incorporated herein by reference.

Bi-specific fusion proteins linking two or more different single-chain antibodies or antibody fragments are produced in similar manner.

- Large quantities of bscAb and fusion proteins can be produced using *Escherichia coli*  
25 expression systems. See, e.g., Zhenping *et al.*, *Biotechnology*, 14: 192-196, 1996. A functional bscAb can be produced by the coexpression in *E. coli* of two "cross-over" scFv fragments in which the V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains for the two fragments are present on different polypeptide chains. The V light-chain (V<sub>L</sub>) and V heavy-chain (V<sub>H</sub>) domains

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

71

of two antibodies of interest are isolated using standard PCR methods. The cDNA's are then ligated into a bacterial expression vector such that C-terminus of the V<sub>L</sub> domain of the first antibody of interest is ligated via a linker to the N-terminus of the V<sub>H</sub> domain of the second antibody. Similarly, the C-terminus of the V<sub>L</sub> domain of the second antibody of interest is ligated via a linker to the N-terminus of the V<sub>H</sub> domain of the first antibody. The resulting dicistronic operon is placed under transcriptional control of a strong promoter, e.g., the *E. coli* alkaline phosphatase promoter which is inducible by phosphate starvation. Alternatively, single-chain fusion constructs have successfully been expressed in *E. coli* using the *lac* promoter and a medium consisting of 2% glycine and 1% Triton X-100. See, e.g., Yang *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2869-2874, 1998. An *E. coli*, heat-stable, enterotoxin II signal sequence is used to direct the peptides to the periplasmic space. After secretion, the two peptide chains associate to form a non-covalent heterodimer which possesses both antigen binding specificities. The bscAb is purified using standard procedures known in the art, e.g., Staphylococcal protein A chromatography.

Functional bscAb and fusion proteins also can be produced in the milk of transgenic livestock. See, e.g., Colman, A., *Biochem. Soc. Symp.*, 63: 141-147, 1998; U.S. Patent No. 5,827,690. The bscAb fragment, obtained as described above, is cloned into an expression vector containing a promoter sequence that is preferentially expressed in mammary epithelial cells. Examples include, but are not limited to, promoters from rabbit, cow and sheep casein genes, the cow  $\alpha$ -lactoglobulin gene, the sheep  $\beta$ -lactoglobulin gene and the mouse whey acid protein gene. Preferably, the inserted bscAb is flanked on its 3' side by cognate genomic sequences from a mammary-specific gene. This provides a polyadenylation site and transcript-stabilizing sequences. The expression cassette is then injected into the pronuclei of fertilized, mammalian eggs, which are then implanted into the uterus of a recipient female and allowed to gestate. After birth, the progeny are screened for the presence of the introduced DNA by Southern analysis. Milk from transgenic females is analyzed for the presence and functionality of the bscAb using standard immunological methods known in the art. The bscAb can be purified from the milk using standard methods

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

72

known in the art. Transgenic production of bscAb in milk provides an efficient method for obtaining large quantities of bscAb.

- Functional bscAb and fusion proteins also can be produced in transgenic plants. See, e.g., Fiedler *et al.*, *Biotech.*, 13: 1090-1093, 1995; Fiedler *et al.*, *Immunotechnology*, 3: 205-216, 1997. Such production offers several advantages including low cost, large scale output and stable, long term storage. The bscAb fragment, obtained as described above, is cloned into an expression vector containing a promoter sequence and encoding a signal peptide sequence, to direct the protein to the endoplasmic reticulum. A variety of promoters can be utilized, allowing the practitioner to direct the expression product to particular locations within the plant. For example, ubiquitous expression in tobacco plants can be achieved by using the strong cauliflower mosaic virus 35S promoter, while organ specific expression is achieved via the seed specific legumin B4 promoter. The expression cassette is transformed according to standard methods known in the art. Transformation is verified by Southern analysis.
- 15 Transgenic plants are analyzed for the presence and functionality of the bscAb using standard immunological methods known in the art. The bscAb can be purified from the plant tissues using standard methods known in the art.

- 20 Additionally, transgenic plants facilitate long term storage of bscAb and fusion proteins. Functionally active scFv proteins have been extracted from tobacco leaves after a week of storage at room temperature. Similarly, transgenic tobacco seeds stored for 1 year at room temperature show no loss of scFv protein or its antigen binding activity.

- Functional bscAb and fusion proteins also can be produced in insect cells. See, e.g., Mahiouz *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 212: 149-160 (1998). Insect-based expression systems provide a means of producing large quantities of homogenous and properly folded bscAb. The baculovirus is a widely used expression vector for insect cells and has been successfully applied to recombinant antibody molecules. See, e.g., Miller, L.K., *Ann. Rev. Microbiol.*, 42: 177 (1988); Bei *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 186:

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

73

245 (1995). Alternatively, an inducible expression system can be utilized by generating a stable insect cell line containing the bscAb construct under the transcriptional control of an inducible promoter. See, e.g., Mahiouz *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 212: 149-160 (1998). The bscAb fragment, obtained as described above, is cloned into an expression vector containing the *Drosophila* metallothionein promoter and the human HLA-A2 leader sequence. The construct is then transfected into *D. melanogaster* SC-2 cells. Expression is induced by exposing the cells to elevated amounts of copper, zinc or cadmium. The presence and functionality of the bscAb is determined using standard immunological methods known in the art. Purified bscAb is obtained using standard methods known in the art.

Preferred bispecific antibodies of the instant invention are those which incorporate the Fv of MAb Mu9 and the Fv of MAb 679 or the Fv of MAb MN14 and the Fv of MAb 679, and their human, chimerized or humanized counterparts. Accordingly, anti-CSAp antibody fragments are also contemplated in the present invention. Preferably, the anti-CSAp antibody fragment is a Mu-9 antibody fragment. The MN14, as well as its chimerized and humanized counterparts, are disclosed in U.S. Patent No. 5,874,540. Also preferred are bispecific antibodies which incorporate one or more of the CDRs of Mu9 or 679. The antibody can also be a fusion protein or a bispecific antibody that incorporates a Class III anti-CEA antibody and the Fv of 679. Class III antibodies, including Class III anti-CEA are discussed in detail in U.S. Patent No. 4,818,709.

#### IV. Antibodies for Treatment and Diagnosis/Detection

##### Humanized, chimeric and human anti-CSAp antibodies for treatment and diagnosis/detection

25 Contemplated in the present invention is the use of humanized, chimeric and human anti-CSAp antibodies and fragments thereof in therapeutic and diagnostic methods. Preferably, the chimeric, humanized and human anti-CSAp antibodies and fragments thereof are chimeric, humanized or human Mu-9 antibodies. Still preferred, the

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

74

PCT/US02/10235

chimeric, humanized and human Mu-9 antibodies and fragments thereof of the present invention are used in methods for treating malignancies. For example, a malignancy of particular interest in this patent is a cancer of the gastrointestinal system, more preferably of the colon and rectum, pancreas, as well as ovarian cancer.

- 5 The compositions for treatment contain at least one naked humanized, chimeric or human anti-CSAp antibody or fragment thereof alone or in combination with other anti-CSAp antibodies or antibody fragments thereof, such as other anti-CSAp humanized, chimeric or human antibodies. The present invention also contemplates treatment with
- 10 thereof in combination with other antibodies or antibody fragments thereof that are not anti-CSAp antibodies, whereby these other antibodies can be administered unconjugated (naked) or conjugated with a therapeutic compound. For example, other antibodies suitable for combination therapy include, but are not limited to, carcinoma-associated antibodies and fragments thereof such as antibodies against CEA, EGP-1, Ga 733 antigen target, such as for antibodies EGP-2, 17-1A, KS1-4 and Ep-CAM,
- 15 MUC1 to MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, KS-1, A3, anti-necrosis antibodies, and the A33 antibody determinant. Suitable antibodies could also include those targeted against oncogene markers or products, or antibodies against tumor-vasculature markers, such as the angiogenesis factor, VEGF, and
- 20 antibodies against certain immune response modulators such as antibodies to CD40. Additionally, treatment can be effected with at least one humanized, chimeric or human anti-CSAp immunoconjugate or fragment thereof alone or in combination with other anti-CSAp antibodies or antibody fragments thereof, such as other anti-CSAp humanized, chimeric or human antibodies. Still preferred, compositions for treatment
- 25 can contain at least one humanized, chimeric or human anti-CSAp immunoconjugate or fragment thereof in combination with other antibodies or antibody fragments thereof that are not anti-CSAp antibodies, these being either naked or conjugated to a therapeutic agent.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

75

Similarly, conjugated and naked anti-CSAp humanized, chimeric or human antibodies may be used alone or may be administered with, but unconjugated to, the various diagnostic or therapeutic agents described herein. Also, naked or conjugated antibodies to the same or different epitope or antigen may be also combined with one  
5 or more of the antibodies of the present invention.

Accordingly, the present invention contemplates the administration of humanized, chimeric and human Mu-9 antibodies and fragments thereof alone, as a naked antibody, or administered as a multimodal therapy. Multimodal therapies of the present invention further include immunotherapy with naked or conjugated CSAp antibodies  
10 supplemented with administration of other antibodies in the form of naked antibodies, fusion proteins, or as immunoconjugates. For example, a humanized, chimeric or human Mu-9 antibody may be combined with another naked humanized, naked chimeric or naked human Mu-9 antibody, or a humanized, chimeric or human Mu-9 antibody immunoconjugate, such as a humanized, chimeric or human Mu-9 antibody  
15 conjugated to an isotope, one or more chemotherapeutic agents, cytokines, enzymes, enzyme-inhibitors, hormones or hormone antagonists, metals, toxins or a combination thereof. A fusion protein of a humanized, chimeric or human Mu-9 antibody and a toxin or may also be used in this invention. Many different antibody combinations may be constructed, either as naked antibodies or as partly naked and partly conjugated with  
20 a therapeutic agent or immunomodulator, or merely in combination with another therapeutic agents, such as a cytotoxic drug or with radiation.

The compositions for treatment contain at least one humanized, chimeric or human monoclonal CSAp antibody or fragment thereof alone or in combination with other antibodies and fragments thereof, such as other naked or conjugated humanized,  
25 chimeric, or human antibodies, fusion proteins, or therapeutic agents. In particular, combination therapy with a fully human antibody is also contemplated and is produced by the methods as set forth above.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

76

PCT/US02/10235

Naked or conjugated antibodies and fragments thereof to the same or different epitope or antigen may be also combined with one or more of the antibodies or fragments thereof of the present invention. For example, a humanized, chimeric or human naked Mu-9 antibody may be combined with another naked humanized, naked chimeric or naked human Mu-9 antibody, a humanized, chimeric or human naked Mu-9 antibody may be combined with a Mu-9 immunoconjugate, a naked Mu-9 antibody may be combined with a different antibody radioconjugate or an different naked antibody may be combined with a humanized, chimeric or human Mu-9 antibody conjugated to an isotope, or to one or more chemotherapeutic agents, cytokines, toxins, enzymes, enzyme inhibitors, hormones, hormone antagonists, or a combination thereof. A fusion protein of a humanized, chimeric or human Mu-9 antibody and a toxin or immunomodulator may also be used in this invention. Many different antibody combinations, targeting at least two different antigens may be constructed, either as naked antibodies or as partly naked and partly conjugated with a therapeutic agent or immunomodulator, or merely in combination with another therapeutic agents, such as a cytotoxic drug or with radiation.

Multimodal therapies of the present invention further include immunotherapy with naked Mu-9 antibodies or fragments thereof supplemented with administration of antibodies against antigens expressed by colorectal or ovarian carcinomas in the form of naked antibodies, fusion proteins, immunoconjugates, and fragments thereof. In a preferred embodiment, antibodies or fragments thereof for multimodal therapy include, but are not limited to, antibodies against CEA, EGP-1, EGP-2, TAG-72, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, KC4, PAM-4, EGFR, BrE3, Le-Y, KS-1, A3, the A33 antibody and HER2/neu antibodies and fragments thereof, as well as antibodies against angiogenesis factors (e.g., VEGF) or antibodies against oncogene markers or products, as well as antibodies against immunomodulators, (e.g., CD40). These antibodies include polyclonal, monoclonal, chimeric, human or humanized antibodies and fragments thereof that recognize at least one epitope on these antigenic determinants.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

77

In another form of multimodal therapy, subjects receive naked antibodies or fragments thereof, and/or immunoconjugates or fragments thereof, in conjunction with standard cancer chemotherapy. 5-fluorouracil in combination with folinic acid, alone or in combination with irinotecan (CPT-11), is a regimen used to treat colorectal cancer.

- 5 Other suitable combination chemotherapeutic regimens are well known, such as with oxaliplatin alone, or in combination with these other drugs, to those of skill in the art. In ovarian cancer, still other chemotherapeutic agents may be preferred, such as any one of the taxanes and platinum agents, Thio-TEPA and other alkylating agents (e.g., chlorambucil), as well as gemcitabine and other more recent classes of cytotoxic drugs.
- 10 In a preferred multimodal therapy, both chemotherapeutic drugs and cytokines are co-administered with an antibody, immunoconjugate or fusion protein according to the present invention. The cytokines, chemotherapeutic drugs and antibody or immunoconjugate can be administered in any order, or together.

- A variety of other chemotherapeutic agents may be used in for combination treatment or for making immunoconjugates. Such chemotherapeutic agents include, but are not
- 15 limited to, adriamycin, dactinomycin, mitomycin, carminomycin, daunomycin, doxorubicin, tamoxifen, taxol, taxotere, vincristine, vinblastine, vinorelbine, etoposide (VP-16), 5-fluorouracil (5FU), cytosine arabinoside, cyclophosphamide, thiotepa, methotrexate, camptothecin, actinomycin-D, mitomycin C, cisplatin (CDDP),
- 20 aminopterin, combretastatin(s), neomycin, podophyllotoxin(s), TNF- $\alpha$ ,  $\alpha\beta$  antagonists, calcium ionophores, calcium-flux inducing agents and derivatives and prodrugs thereof. Anti-metabolites such as cytosine arabinoside, aminopterin; anthracyclines; vinca alkaloids and other alkaloids; antibiotics, demecolcine; etoposide; mithramycin; and other anti-tumor alkylating agents are also contemplated for use with
- 25 the antibodies of the present invention.

In addition, a therapeutic composition of the present invention can contain a mixture or hybrid molecules of monoclonal naked Mu-9 antibodies or their fragments directed to different, non-blocking epitopes on the CSAP molecule. Accordingly, the present invention contemplates therapeutic compositions comprising a mixture of monoclonal

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

78

Mu-9 antibodies or their fragments that bind at least two CSAP epitopes. Additionally, the therapeutic composition described herein may contain a mixture of Mu-9 antibodies and fragments thereof with varying CDR sequences.

*Naked antibody therapy*

- 5 A therapeutically effective amount of the naked chimeric, humanized or human anti-CSAP antibodies, or their fragments can be formulated in a pharmaceutically acceptable excipient. The efficacy of the naked Mu-9 antibodies can also be enhanced by supplementing naked antibodies with one or more other naked antibodies (such as against tumor-associated antigens, or also agonist or antagonist antibodies to
- 10 immunomodulators, such as CD40 antigen or ligand), with one or more immunoconjugates of Mu-9, with one or more immunoconjugates of the antibodies against tumor-associated antigens other than CSAP, and conjugated with therapeutic agents, including drugs, toxins, cytokines, immunomodulators, hormones, hormone antagonists, enzymes, enzyme inhibitors, therapeutic radionuclides, etc., with one or
- 15 more therapeutic agents, including drugs, toxins, cytokines, immunomodulators, hormones, enzymes, enzyme inhibitors, therapeutic radionuclides, etc., administered concurrently or sequentially or according to a prescribed dosing regimen, with the Mu-9 antibodies.

*Humanized, chimeric and human anti-CSAP immunoconjugates*

- 20 Alternatively, conjugates of the Mu-9 antibodies or fragments thereof of the present invention may be administered. For therapy, these conjugates preferably contain a cytotoxic agent. More preferably, the cytotoxic agent is a toxin. An immunoconjugate, as described herein, is a molecule comprising an antibody component and a therapeutic or diagnostic agent, including a peptide which may bear the diagnostic
- 25 or therapeutic agent. An immunoconjugate retains the immunoreactivity of the antibody component, i.e., the antibody moiety has about the same or slightly reduced ability to bind the cognate antigen after conjugation as before conjugation.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**



WO 02/082041

PCT/US02/10235

80

photoactivated dyes for achieving phototherapy. Mew *et al.*, *J. Immunol.* 130:1473 (1983); *idem.*, *Cancer Res.* 45:4380 (1985); Oseroff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8744 (1986); *idem.*, *Photochem. Photobiol.* 46:83 (1987); Hasan *et al.*, *Prog. Clin. Biol. Res.* 288:471 (1989); Tatsuta *et al.*, *Lasers Surg. Med.* 9:422 (1989); Pelegrin *et al.*, *Cancer* 67:2529 (1991). However, these earlier studies did not include use of  
5 endoscopic therapy applications, especially with the use of antibody fragments or subfragments. Thus, the present invention contemplates the therapeutic use of immunoconjugates comprising photoactive agents or dyes.

A toxin, such as *Pseudomonas* exotoxin, may also be complexed to or form the  
10 therapeutic agent portion of an immunoconjugate. For example, the toxin may be complexed with a Mu-9 antibody of the present invention, or when used in combination with the naked Mu-9 antibody of conjugates of the Mu-9 antibody, also complexed to the other, non-CSAp antibodies used in the present invention. Other toxins suitably employed in the preparation of such conjugates or other fusion proteins, include ricin,  
15 abrin, ribonuclease (RNase), DNase I, *Staphylococcal* enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtherin toxin, *Pseudomonas* exotoxin, and *Pseudomonas* endotoxin. See, for example, Pastan *et al.*, *Cell* 47:641 (1986), and Goldenberg, *CA - A Cancer Journal for Clinicians* 44:43 (1994). Additional toxins suitable for use in the present invention are known to those of skill in the art and are disclosed in U.S. Patent  
20 6,077,499, which is incorporated in its entirety by reference. These can be derived, for example, from animal, plant and microbial sources.

An immunomodulator, such as a cytokine may also be conjugated to, or form the therapeutic agent portion of the anti-CSAp immunoconjugate, or be administered unconjugated to the chimeric, humanized or human anti-CSAp antibodies of the present  
25 invention. As used herein, the term "immunomodulator" includes cytokines, stem cell growth factors, lymphotoxins, such as tumor necrosis factor (TNF), and hematopoietic factors, such as interleukins (*e.g.*, interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12 and IL-18), colony stimulating factors (*e.g.*, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)), interferons

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

81

(*e.g.*, interferons- $\alpha$ , - $\beta$  and - $\gamma$ ), the stem cell growth factor designated "S1 factor," erythropoietin and thrombopoietin. Examples of suitable immunomodulator moieties include IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and the like.

Alternatively, subjects can receive naked Mu-9 antibodies and a separately

- 5 administered cytokine, which can be administered before, concurrently or after administration of the naked Mu-9 antibodies. The Mu-9 antibody may also be conjugated to the immunomodulator. The immunomodulator may also be conjugated to a hybrid antibody consisting of one or more antibodies binding to different antigens. Such an antigen may also be an immunomodulator. For example, CD40 or other
- 10 immunomodulators may be administered in combination with the anti-CSAp or anti-CSAp/non-CSAp antibody combination either together, before or after the antibody combinations are administered. The Mu-9 antibody may also be used in combination with, or conjugated to, as a fusion protein, an immunomodulating antibody, such as against CD40.

- 15 Furthermore, the present invention includes methods of diagnosing or detecting a malignancy in a subject. Diagnosis/detection may be accomplished by administering a diagnostically effective amount of a diagnostic conjugate, formulated in a pharmaceutically acceptable excipient, and detecting said label. For example, radioactive and non-radioactive agents can be used as diagnostic agents. A suitable
- 20 non-radioactive diagnostic agent is a contrast agent suitable for magnetic resonance imaging, a radiopaque compound for X-rays or computed tomography, or a contrast agent suitable for ultrasound. Magnetic imaging agents include, for example, non-radioactive metals, such as manganese, iron and gadolinium, complexed with metal-chelate combinations that include 2-benzyl-DTPA and its monomethyl and cyclohexyl
- 25 analogs, when used along with the antibodies of the invention. See U.S. Serial No. 09/921,290 filed on October 10, 2001, which is incorporated in its entirety by reference. In a preferred embodiment, the contrast agent is an ultrasound enhancing agent. Still preferred, the ultrasound enhancing agent is a liposome. Radiopaque and contrast materials are used for enhancing X-rays and computed tomography, and
- 30 include iodine compounds, barium compounds, gallium compounds, thallium

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

82

compounds, etc. Specific compounds include barium, diatrizoate, ethiodized oil, gallium citrate, iocarmic acid, iocetamic acid, iodamide, iodipamide, iodoxamic acid, iogulamide, iohexol, iopamidol, iopanoic acid, ioprocemic acid, iosefamic acid, isoseric acid, iosulamide meglumine, iosemetic acid, iotasul, iotetric acid, iothalamic acid, 5 iotroxic acid, ioxaglic acid, ioxotrizoic acid, ipodate, meglumine, metrizamide, metrizoate, propylidone, and thallos chloride.

Furthermore, a radiolabeled antibody or immunoconjugate may comprise a  $\gamma$ -emitting radioisotope or a positron-emitter useful for diagnostic imaging. Examples of diagnostic/detection agents include diverse labels, radionuclides, chelators, dyes, 10 contrast agents, fluorescent compounds, chromagens, and other marker moieties. Radionuclides useful for positron emission tomography include, but are not limited to: F-18, Mn-51, Mn-52m, Fe-52, Co-55, Cu-62, Cu-64, Ga-68, As-72, Br-75, Br-76, Rb-82m, Sr-83, Y-86, Zr-89, Tc-94m, In-110, I-120, and I-124. Total decay energies of useful positron-emitting radionuclides are preferably < 2,000 keV, more preferably 15 under 1,000 keV, and most preferably < 700 keV. Radionuclides useful as diagnostic agents utilizing gamma-ray detection include, but are not limited to: Cr-51, Co-57, Co-58, Fe-59, Cu-67, Ga-67, Se-75, Ru-97, Tc-99m, In-111, In-114m, I-123, I-125, I-131, Yb-169, Hg-197, and Tl-201. Decay energies of useful gamma-ray emitting radionuclides are preferably 20-2000 keV, more preferably 60-600 keV, and most 20 preferably 100-300 keV.

Additionally, radionuclides suitable for treating a diseased tissue include, but are not limited to, P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, 25 Pb-212, and Bi-213, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m, Ir-192, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 and Fm-255.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

83

Suitable diagnostic imaging isotopes are usually in the range of 20 to 2,000 keV, while suitable therapeutic radionuclides are usually in the range of 20 to 10,000 keV. See for example, U.S. Patent Application entitled "Labeling Targeting Agents with Gallium-68" - Inventors G.L. Griffiths and W.J. McBride, (U.S. Provisional Application No. 60/342,104), which discloses positron emitters, such as  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ , and the like, for imaging purposes and which is incorporated in its entirety by reference.

*Bispecific antibody therapy*

The present invention also encompasses the use of the bsAb and a therapeutic agent associated with the linker moieties discussed above in intraoperative, intravascular, and endoscopic tumor and lesion detection, biopsy and therapy as described in U.S. Patent No. 6,096,289, and incorporated herein by reference.

The antibodies and antibody fragments of the present invention can be employed not only for therapeutic or imaging purposes, but also as aids in performing research *in vitro*. For example, the bsAbs of the present invention can be used *in vitro* to ascertain if a targetable construct can form a stable complex with one or more bsAbs. Such an assay would aid the skilled artisan in identifying targetable constructs which form stable complexes with bsAbs. This would, in turn, allow the skilled artisan to identify targetable constructs which are likely to be superior as therapeutic and/or imaging agents.

The assay is advantageously performed by combining the targetable construct in question with at least two molar equivalents of a bsAb. Following incubation, the mixture is analyzed by size-exclusion HPLC to determine whether or not the construct has bound to the bsAb. Alternatively, the assay is performed using standard combinatorial methods wherein solutions of various bsAbs are deposited in a standard 96 well plate. To each well, is added solutions of targetable construct(s). Following incubation and analysis, one can readily determine which construct(s) bind(s) best to which bsAb(s).

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

84

It should be understood that the order of addition of the bsAb to the targetable construct is not crucial; that is, the bsAb may be added to the construct and vice versa. Likewise, neither the bsAb nor the construct needs to be in solution; that is, they may be added either in solution or neat, whichever is most convenient. Lastly, the method of analysis for binding is not crucial as long as binding is established. Thus, one may analyze for binding using standard analytical methods including, but not limited to, FABMS, high-field NMR or other appropriate method in conjunction with, or in place of, size exclusion HPLC.

The present invention provides a bispecific antibody or antibody fragment having at least a binding region that specifically binds a targeted cell marker and at least one other binding region that specifically binds a targetable conjugate. The targetable conjugate comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognized by at least one binding region of the bispecific antibody or antibody fragment.

For example, the anti-CSAp antibodies and fragments thereof, as well as other antibodies with different specificities and fragments thereof, for use in combination therapy, described herein, can also be made as multispecific antibodies (comprising at least one binding site to a CSAp epitope or antigen and at least one binding site to another epitope on CSAp or another antigen) and multivalent antibodies (comprising multiple binding sites to the same epitope or antigen).

A variety of recombinant methods can be used to produce bispecific antibodies and antibody fragments as described above.

In a preferred embodiment, the multivalent antibody is a Mu-9 antibody. A Mu-9 multivalent antibody is also contemplated in the present invention. This multivalent antibody is constructed by association of a first and a second polypeptide. The first polypeptide comprises a first single chain Fv molecule covalently linked to a first immunoglobulin-like domain which preferably is an immunoglobulin light chain variable region domain. The second polypeptide comprises a second single chain Fv

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

85

molecule covalently linked to a second immunoglobulin-like domain which preferably is an immunoglobulin heavy chain variable region domain. Each of the first and second single chain Fv molecules forms a target binding site, and the first and second immunoglobulin-like domains associate to form a third target binding site.

- 5 A single chain Fv molecule with the VL-L-VH configuration, wherein L is a linker, may associate with another single chain Fv molecule with the VH-L-VL configuration to form a bivalent dimer. In this case, the VL domain of the first scFv and the VH domain of the second scFv molecule associate to form one target binding site, while the VH domain of the first scFv and the VL domain of the second scFv associate to form  
10 the other target binding site.

- Another embodiment of the present invention is a Mu-9 bispecific, trivalent antibody comprising two heterologous polypeptide chains associated non-covalently to form three binding sites, two of which have affinity for one target and a third which has affinity for a hapten that can be made and attached to a carrier for a diagnostic and/or  
15 therapeutic agent. Preferably, the binding protein has two CSAp binding sites and one other antigen binding site. The bispecific, trivalent targeting agents have two different scFvs, one scFv contains two V<sub>H</sub> domains from one antibody connected by a short linker to the V<sub>L</sub> domain of another antibody and the second scFv contains two V<sub>L</sub> domains from the first antibody connected by a short linker to the V<sub>H</sub> domain of the  
20 other antibody. The methods for generating multivalent, multispecific agents from V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains provide that individual chains synthesized from a DNA plasmid in a host organism are composed entirely of V<sub>H</sub> domains (the V<sub>H</sub>-chain) or entirely of V<sub>L</sub> domains (the V<sub>L</sub>-chain) in such a way that any agent of multivalency and multispecificity can be produced by non-covalent association of one V<sub>H</sub>-chain with one  
25 V<sub>L</sub>-chain. For example, forming a trivalent, trispecific agent, the V<sub>H</sub>-chain will consist of the amino acid sequences of three V<sub>H</sub> domains, each from an antibody of different specificity, joined by peptide linkers of variable lengths, and the V<sub>L</sub>-chain will consist of complementary V<sub>L</sub> domains, joined by peptide linkers similar to those used for the V<sub>H</sub>-chain. Since the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains of antibodies associate in an anti-parallel

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

86

fashion, the preferred method in this invention has the V<sub>L</sub> domains in the V<sub>L</sub>-chain arranged in the reverse order of the V<sub>H</sub> domains in the V<sub>H</sub>-chain.

Bispecific antibodies and fragments thereof of the present invention are useful in pretargeting methods and provide a preferred way to deliver two therapeutic agents or two diagnostic/detection agents to a subject. U.S. Serial No. 09/382,186 discloses a method of pretargeting using a bispecific antibody, in which the bispecific antibody is labeled with <sup>125</sup>I and delivered to a subject, followed by a divalent peptide labeled with <sup>99m</sup>Tc. The delivery results in excellent tumor/normal tissue ratios for <sup>125</sup>I and <sup>99m</sup>Tc, thus showing the utility of two diagnostic radioisotopes. Any combination of known therapeutic agents or diagnostic agents can be used to label the antibodies and antibody fusion proteins. The binding specificity of the antibody component of the mAb conjugate, the efficacy of the therapeutic agent or diagnostic agent and the effector activity of the Fc portion of the antibody can be determined by standard testing of the conjugates.

15        Preparation of humanized, chimeric and human Mu-9 immunoconjugates

Any of the anti-CSAp antibodies or fragments thereof or antibody fusion proteins or fragments thereof of the present invention can be conjugated with one or more therapeutic or diagnostic agents. Generally, one therapeutic or diagnostic agent is attached to each antibody or antibody fragment but more than one therapeutic agent or diagnostic agent can be attached to the same antibody or antibody fragment. The antibody fusion proteins of the present invention comprise two or more antibodies or fragments thereof and each of the antibodies that compose this fusion protein can contain a therapeutic agent or diagnostic agent. In other words, the antibody fusion protein or fragment thereof can comprise at least one first anti-CSAp MAb or fragment thereof and at least one second MAb or fragment thereof that is not an anti-CSAp MAb. Preferably, the second MAb is a carcinoma-associated antibody, such as an antibody against CEA, EGP-1, EGP-2, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, KS-1, VEGF and other

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

87

- angiogenesis antibodies, oncogene antibodies, anti-necrosis antibodies, or the antibody A33. Additionally, one or more of the antibodies of the antibody fusion protein can have more than one therapeutic or diagnostic/detection agent attached. Further, the therapeutic agents do not need to be the same but can be different therapeutic agents;
- 5 for example, one can attach a drug and a radioisotope to the same fusion protein. Particularly, an IgG can be radiolabeled with  $^{125}\text{I}$  and attached to a drug. The  $^{125}\text{I}$  can be incorporated into the tyrosine of the IgG and the drug attached to the epsilon amino group of the IgG lysines. Both therapeutic and diagnostic agents also can be attached to reduced SH groups and to the carbohydrate side chains.
- 10 Also preferred, the antibody fusion protein of the present invention comprises at least two anti-CSAp monoclonal antibodies or fragments thereof, and these may be to different epitopes of the CSAP antigen or of different human immunoglobulin backbone sequences (or IgGs).
- A therapeutic or diagnostic agent can be attached at the hinge region of a reduced
- 15 antibody component via disulfide bond formation. As an alternative, such peptides can be attached to the antibody component using a heterobifunctional cross-linker, such as *N*-succinyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP). Yu *et al.*, *Int. J. Cancer* 56: 244 (1994). General techniques for such conjugation are well-known in the art. See, for example, Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-
- 20 LINKING (CRC Press 1991); Upešlacis *et al.*, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch *et al.* (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in
- 25 MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter *et al.* (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995). Alternatively, the therapeutic or diagnostic agent can be conjugated via a carbohydrate moiety in the Fc region of the antibody. The carbohydrate group can be used to increase the loading of the same peptide that is bound to a thiol group, or the carbohydrate moiety can be used to bind a different peptide.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

88

- Methods for conjugating peptides to antibody components via an antibody carbohydrate moiety are well-known to those of skill in the art. See, for example, Shih *et al.*, *Int. J. Cancer* 41: 832 (1988); Shih *et al.*, *Int. J. Cancer* 46: 1101 (1990); and Shih *et al.*, U.S. Patent No. 5,057,313, all of which are incorporated in their entirety by reference.
- 5 The general method involves reacting an antibody component having an oxidized carbohydrate portion with a carrier polymer that has at least one free amine function and that is loaded with a plurality of peptide. This reaction results in an initial Schiff base (imine) linkage, which can be stabilized by reduction to a secondary amine to form the final conjugate.
- 10 The Fc region is absent if the antibody used as the antibody component of the immunoconjugate is an antibody fragment. However, it is possible to introduce a carbohydrate moiety into the light chain variable region of a full length antibody or antibody fragment. See, for example, Leung *et al.*, *J. Immunol.* 154: 5919 (1995); Hansen *et al.*, U.S. Patent No. 5,443,953 (1995), Leung *et al.*, U.S. patent No.
- 15 6,254,868, all of which are incorporated in their entirety by reference. The engineered carbohydrate moiety is used to attach the therapeutic or diagnostic agent.

#### V. Constructs Targetable to Antibodies

- The targetable construct can be of diverse structure, but is selected not only to avoid eliciting an immune elicit sufficient immune responses, but also for rapid *in vivo*
- 20 clearance when used within the bsAb targeting method. Hydrophobic agents are best at eliciting strong immune responses, whereas hydrophilic agents are preferred for rapid *in vivo* clearance, thus, a balance between hydrophobic and hydrophilic needs to be established. This is accomplished, in part, by relying on the use of hydrophilic chelating agents to offset the inherent hydrophobicity of many organic moieties. Also,
- 25 subunits of the targetable construct may be chosen which have opposite solution properties, for example, peptides, which contain amino acids, some of which are hydrophobic and some of which are hydrophilic. Aside from peptides, carbohydrates may be used.

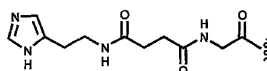
**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

89

Peptides having as few as two amino-acid residues may be used, preferably two to ten residues, if also coupled to other moieties such as chelating agents. The linker should be a low molecular weight conjugate, preferably having a molecular weight of less than 50,000 daltons, and advantageously less than about 20,000 daltons, 10,000 daltons or 5,000 daltons, including the metal ions in the chelates. For instance, the known peptide DTPA-Tyr-Lys(DTPA)-OH (wherein DTPA is diethylenetriaminepentaacetic acid) has been used to generate antibodies against the indium-DTPA portion of the molecule. However, by use of the non-indium-containing molecule, and appropriate screening steps, new Abs against the tyrosyl-lysine dipeptide can be made. More usually, the antigenic peptide will have four or more residues, such as the peptide DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>, wherein DOTA is 1,4,7,10-tetraazacyclododecanetetraacetic acid and HSG is the histamine succinyl glyceryl group of the formula:



The non-metal-containing peptide may be used as an immunogen, with resultant Abs screened for reactivity against the Phe-Lys-Tyr-Lys backbone.

The invention also contemplates the incorporation of unnatural amino acids, e.g., D-amino acids, into the backbone structure to ensure that, when used with the final bsAb/linker system, the arm of the bsAb which recognizes the linker moiety is completely specific. The invention further contemplates other backbone structures such as those constructed from non-natural amino acids and peptoids.

The peptides to be used as immunogens are synthesized conveniently on an automated peptide synthesizer using a solid-phase support and standard techniques of repetitive orthogonal deprotection and coupling. Free amino groups in the peptide, that are to be used later for chelate conjugation, are advantageously blocked with standard protecting groups such as an acetyl group. Such protecting groups will be known to the skilled artisan. See Greene and Wuts *Protective Groups in Organic Synthesis*, 1999 (John

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

90

Wiley and Sons, N.Y.). When the peptides are prepared for later use within the bsAb system, they are advantageously cleaved from the resins to generate the corresponding C-terminal amides, in order to inhibit *in vivo* carboxypeptidase activity.

The haptens of the immunogen comprise an immunogenic recognition moiety, for example, a chemical hapten. Using a chemical hapten, preferably the HSG hapten, high specificity of the linker for the antibody is exhibited. This occurs because antibodies raised to the HSG hapten are known and can be easily incorporated into the appropriate bispecific antibody. Thus, binding of the linker with the attached hapten would be highly specific for the antibody or antibody fragment.

#### 10 Chelate Moiety

The presence of hydrophilic chelate moieties on the linker moieties helps to ensure rapid *in vivo* clearance. In addition to hydrophilicity, chelators are chosen for their metal-binding properties, and are changed at will since, at least for those linkers whose bsAb epitope is part of the peptide or is a non-chelate chemical hapten, recognition of the metal-chelate complex is no longer an issue.

Particularly useful metal-chelate combinations include 2-benzyl-DTPA and its monomethyl and cyclohexyl analogs, used with  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ , and  $^{225}\text{Ac}$  for radio-imaging and RAIT. The same chelators, when complexed with non-radioactive metals, such as Mn, Fe and Gd can be used for MRI, when used along with the bsAbs of the invention. Macrocyclic chelators such as NOTA (1,4,7-triaza-cyclononane- $\text{N}$ , $\text{N}'$ , $\text{N}''$ -triacetic acid), DOTA, and TETA (p-bromoacetamido-benzyl-tetraethylaminetetraacetic acid) are of use with a variety of metals and radiometals, most particularly with radionuclides of Ga, Y and Cu, respectively.

25 DTPA and DOTA-type chelators, where the ligand includes hard base chelating functions such as carboxylate or amine groups, are most effective for chelating hard acid cations, especially Group IIa and Group IIIa metal cations. Such metal-chelate

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

91

- complexes can be made very stable by tailoring the ring size to the metal of interest. Other ring-type chelators such as macrocyclic polyethers are of interest for stably binding nuclides such as  $^{223}\text{Ra}$  for RAIT. Porphyrin chelators may be used with numerous radiometals, and are also useful as certain cold metal complexes for bsAb-directed immuno-phototherapy. More than one type of chelator may be conjugated to a carrier to bind multiple metal ions, *e.g.*, cold ions, diagnostic radionuclides and/or therapeutic radionuclides. Particularly useful therapeutic radionuclides include, but are not limited to  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{189}\text{Re}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{223}\text{Ra}$  and  $^{225}\text{Ac}$ .
- 10 Particularly useful diagnostic radionuclides include, but are not limited to,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{94}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{154}\text{Gd}$  and  $^{175}\text{Lu}$ .

- Chelators such as those disclosed in U.S. Patent 5,753,206, especially thiosemi-carbonylglyoxylcysteine (Tscg-Cys) and thiosemicarbazinyl-acetylcysteine (TscA-Cys) chelators are advantageously used to bind soft acid cations of Tc, Re, Bi and other transition metals, lanthanides and actinides that are tightly bound to soft base ligands, especially sulfur- or phosphorus-containing ligands. It can be useful to link more than one type of chelator to a peptide, *e.g.*, a DTPA or similar chelator for, say In(III) cations, and a thiol-containing chelator, *e.g.*, Tscg-Cys, for Tc cations. Because antibodies to a di-DTPA hapten are known (Barbet '395, *supra*) and are readily coupled to a targeting antibody to form a bsAb, it is possible to use a peptide hapten with cold diDTPA chelator and another chelator for binding a radioisotope, in a pretargeting protocol, for targeting the radioisotope. One example of such a peptide is Ac-Lys(DTPA)-Tyr-Lys(DTPA)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>. This peptide can be preloaded with In(III) and then labeled with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  cations, the In(III) ions being preferentially chelated by the DTPA and the Tc cations binding preferentially to the thiol-containing Tscg-Cys. Other hard acid chelators such as NOTA, DOTA, TETA and the like can be substituted for the DTPA groups, and Mabs specific to them can be produced using analogous techniques to those used to generate the anti-di-DTPA Mab.
- 15  
20  
25

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/082041

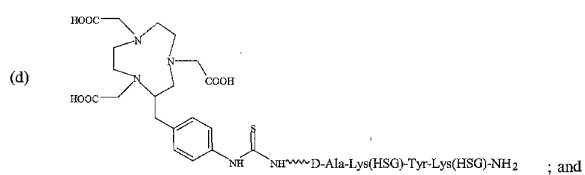
PCT/US02/10235

92

It will be appreciated that two different hard acid or soft acid chelators can be incorporated into the linker, e.g., with different chelate ring sizes, to bind preferentially to two different hard acid or soft acid cations, due to the differing sizes of the cations, the geometries of the chelate rings and the preferred complex ion structures of the cations. This will permit two different metals, one or both of which may be radioactive or useful for MRI enhancement, to be incorporated into a linker for eventual capture by a pretargeted bsAb.

Preferred chelators include NOTA, DOTA and Tscg and combinations thereof. These chelators have been incorporated into a chelator-peptide conjugate motif as exemplified in the following constructs:

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

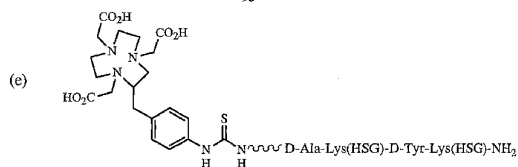


**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

93



The chelator-peptide conjugates (d) and (e), above, has been shown to bind  $^{68}\text{Ga}$  and is thus useful in positron emission tomography (PET) applications.

Chelators are coupled to the linker moieties using standard chemistries which are discussed more fully in the working Examples below. Briefly, the synthesis of the peptide Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub> was accomplished by first attaching Aloc-Lys(Fmoc)-OH to a Rink amide resin on the peptide synthesizer. The protecting group abbreviations "Aloc" and "Fmoc" used herein refer to the groups allyloxycarbonyl and fluorenylmethyloxy carbonyl. The Fmoc-Cys(Trt)-OH and TscG were then added to the side chain of the lysine using standard Fmoc automated synthesis protocols to form the following peptide: Aloc-Lys(Tscg-Cys(Trt))-rink resin. The Aloc group was then removed. The peptide synthesis was then continued on the synthesizer to make the following peptide: (Lys(Aloc)-D-Tyr-Lys(Aloc)-Lys(Tscg-Cys(Trt))-rink resin. Following N-terminus acylation, and removal of the side chain Aloc protecting groups. The resulting peptide was then treated with activated N-trityl-HSG-OH until the resin gave a negative test for amines using the Kaiser test. See Karacay *et al. Bioconjugate Chem.* 11:842-854 (2000). The synthesis of Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>, as well as the syntheses of DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>; and DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub> are described in greater detail below.

20 Preparation of Metal Chelates

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

94

Chelator-peptide conjugates may be stored for long periods as solids. They may be metered into unit doses for metal-binding reactions, and stored as unit doses either as solids, aqueous or semi-aqueous solutions, frozen solutions or lyophilized preparations. They may be labeled by well-known procedures. Typically, a hard acid cation is introduced as a solution of a convenient salt, and is taken up by the hard acid chelator and possibly by the soft acid chelator. However, later addition of soft acid cations leads to binding thereof by the soft acid chelator, displacing any hard acid cations which may be chelated therein. For example, even in the presence of an excess of cold  $^{111}\text{InCl}_3$ , labeling with  $^{99\text{m}}\text{Tc(V)}$  glucoheptonate or with Tc cations generated *in situ* with stannous chloride and  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  proceeds quantitatively on the soft acid chelator. Other soft acid cations such as  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  and divalent or trivalent cations of Mn, Co, Ni, Pb, Cu, Cd, Au, Fe, Ag (monovalent), Zn and Hg, especially  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{67}\text{Cu}$ , and the like, some of which are useful for radioimmunodiagnosis or radioimmunotherapy, can be loaded onto the linker peptide by analogous methods. Re cations also can be generated *in situ* from perrhenate and stannous ions or a prereduced rhenium glucoheptonate or other transchelator can be used. Because reduction of perrhenate requires more stannous ion (typically above 200  $\mu\text{g/mL}$  final concentration) than is needed for the reduction of Tc, extra care needs to be taken to ensure that the higher levels of stannous ion do not reduce sensitive disulfide bonds such as those present in disulfide-cyclized peptides. During radiolabeling with rhenium, similar procedures are used as are used with the Tc-99m. A preferred method for the preparation of ReO metal complexes of the Tscg-Cys- ligands is by reacting the peptide with  $\text{ReOCl}_3(\text{P}(\text{Ph}_3)_2)$  but it is also possible to use other reduced species such as  $\text{ReO}(\text{ethylenediamine})_2$ .

## 25 VI. Methods of Administration

It should be noted that much of the discussion presented herein below focuses on the use of the inventive bispecific antibodies and targetable constructs in the context of treating diseased tissue. The invention contemplates, however, the use of the inventive bispecific antibodies and targetable constructs in treating and/or imaging normal tissue

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

95

and organs using the methods described in U.S. Patent Nos. 6,126,916; 6,077,499; 6,010,680; 5,776,095; 5,776,094; 5,776,093; 5,772,981; 5,753,206; 5,746,996; 5,697,902; 5,328,679; 5,128,119; 5,101,827; and 4,735,210. As used herein, the term "tissue" refers to tissues, including but not limited to, tissues from the ovary, thymus, parathyroid or spleen.

The administration of a bsAb and a therapeutic agent associated with the linker moieties discussed above may be conducted by administering the bsAb at some time prior to administration of the therapeutic agent which is associated with the linker moiety. The doses and timing of the reagents can be readily devised by a skilled artisan, and are dependent on the specific nature of the reagents employed. If a bsAb-F(ab')<sub>2</sub> derivative is given first, then a waiting time of 24-72 hr before administration of the linker moiety would be appropriate. If an IgG-Fab' bsAb conjugate is the primary targeting vector, then a longer waiting period before administration of the linker moiety would be indicated, in the range of 3-10 days.

As used herein, the term "therapeutic agent" includes, but is not limited to a drug, prodrug and/or toxin. The terms "drug," "prodrug," and "toxin" are defined throughout the specification. A diagnostic agent is more often used to determine the kind of disease present, while a detection agent is more often used for localization and diagnosis. However, as described herein, the term diagnostic agent can also be used to refer to a detection agent.

After sufficient time has passed for the bsAb to target to the diseased tissue, the diagnostic/detection agent is administered. Subsequent to administration of the diagnostic/detection agent, imaging can be performed. Tumors can be detected in body cavities by means of directly or indirectly viewing various structures to which light of the appropriate wavelength is delivered and then collected. Lesions at any body site can be viewed so long as nonionizing radiation can be delivered and recaptured from these structures. For example, PET which is a high resolution, non-invasive, imaging technique can be used with the inventive antibodies for the visualization of human

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

96

disease. In PET, 511 keV gamma photons produced during positron annihilation decay are detected.

The invention generally contemplates the use of diagnostic agents which emit 25-600 keV gamma particles and/or positrons. Examples of such agents include, but are not limited to  $^{18}\text{F}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{94}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{154-158}\text{Gd}$  and  $^{175}\text{Lu}$ .

The present antibodies or antibody fragments can be used in a method of photodynamic therapy (PDT) as discussed in U.S. Patent Nos. 6,096,289; 4,331,647; 4,818,709; 4,348,376; 4,361,544; 4,444,744; 5,851,527.

10 In PDT, a photosensitizer, e.g., a hematoporphyrin derivative such as dihematoporphyrin ether, is administered to a subject. Anti-tumor activity is initiated by the use of light, e.g., 630 nm. Alternate photosensitizers can be utilized, including those useful at longer wavelengths, where skin is less photosensitized by the sun. Examples of such photosensitizers include, but are not limited to, benzoporphyrin  
15 monoacid ring A (BPD-MA), tin etiopurpurin (SnET2), sulfonated aluminum phthalocyanine (AlSPc) and lutetium texaphyrin (Lutex).

Additionally, in PDT, a diagnostic agent is injected, for example, systemically, and laser-induced fluorescence can be used by endoscopes to detect sites of cancer which have accreted the light-activated agent. For example, this has been applied to  
20 fluorescence bronchoscopic disclosure of early lung tumors. Doiron *et al. Chest* 76:32 (1979). In another example, the antibodies and antibody fragments can be used in single photon emission. For example, a Tc-99m-labeled diagnostic agent can be administered to a subject following administration of the inventive antibodies or antibody fragments. The subject is then scanned with a gamma camera which produces  
25 single-photon emission computed tomographic images and defines the lesion or tumor site.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

97

Therapeutically useful immunoconjugates can be obtained by conjugating photoactive agents or dyes to an antibody composite. Fluorescent and other chromogens, or dyes, such as porphyrins sensitive to visible light, have been used to detect and to treat lesions by directing the suitable light to the lesion. In therapy, this has been termed

5 photoradiation, phototherapy, or photodynamic therapy (Jori *et al.* (eds.), *Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases* (Libreria Progetto 1985); van den Bergh, *Chem. Britain* 22:430 (1986)). Moreover, monoclonal antibodies have been coupled with photoactivated dyes for achieving phototherapy. Mew *et al.*, *J. Immunol.* 130:1473 (1983); *idem.*, *Cancer Res.* 45:4380 (1985); Oseroff *et al.*, *Proc.*

10 *Natl. Acad. Sci. USA* 83:8744 (1986); *idem.*, *Photochem. Photobiol.* 46:83 (1987); Hasan *et al.*, *Prog. Clin. Biol. Res.* 288:471 (1989); Tatsuta *et al.*, *Lasers Surg. Med.* 9:422 (1989); Pelegrin *et al.*, *Cancer* 67:2529 (1991). However, these earlier studies did not include use of endoscopic therapy applications, especially with the use of antibody fragments or subfragments. Thus, the present invention contemplates the

15 therapeutic use of immunoconjugates comprising photoactive agents or dyes.

The linker moiety may also be conjugated to an enzyme capable of activating a prodrug at the target site or improving the efficacy of a normal therapeutic by controlling the body's detoxification pathways. Following administration of the bsAb, an enzyme conjugated to the linker moiety, a low MW hapten recognized by the second arm of the

20 bsAb, is administered. After the enzyme is pretargeted to the target site, a cytotoxic drug is injected, which is known to act at the target site. The drug may be one which is detoxified by the mammal's ordinary detoxification processes. For example, the drug may be converted into the potentially less toxic glucuronide in the liver. The detoxified intermediate can then be reconverted to its more toxic form by the

25 pretargeted enzyme at the target site. Alternatively, an administered prodrug can be converted to an active drug by the pretargeted enzyme. The pretargeted enzyme improves the efficacy of the treatment by recycling the detoxified drug. This approach can be adopted for use with any enzyme-drug pair.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

98

- Certain cytotoxic drugs that are useful for anticancer therapy are relatively insoluble in serum. Some are also quite toxic in an unconjugated form, and their toxicity is considerably reduced by conversion to prodrugs. Conversion of a poorly soluble drug to a more soluble conjugate, *e.g.*, a glucuronide, an ester of a hydrophilic acid or an amide of a hydrophilic amine, will improve its solubility in the aqueous phase of serum and its ability to pass through venous, arterial or capillary cell walls and to reach the interstitial fluid bathing the tumor. Cleavage of the prodrug deposits the less soluble drug at the target site. Many examples of such prodrug-to-drug conversions are disclosed in Hansen U.S. Patent No. 5,851,527.
- 10 Conversion of certain toxic substances such as aromatic or alicyclic alcohols, thiols, phenols and amines to glucuronides in the liver is the body's method of detoxifying them and making them more easily excreted in the urine. One type of antitumor drug that can be converted to such a substrate is epirubicin, a 4-epimer of doxorubicin (Adriamycin), which is an anthracycline glycoside and has been shown to be a
- 15 substrate for human beta-D-glucuronidase See, *e.g.*, Arcamone *Cancer Res.* 45:5995 (1985). Other analogues with fewer polar groups are expected to be more lipophilic and show greater promise for such an approach. Other drugs or toxins with aromatic or alicyclic alcohol, thiol or amine groups are candidates for such conjugate formation. These drugs, or other prodrug forms thereof, are suitable candidates for the site-
- 20 specific enhancement methods of the present invention.
- The prodrug CPT-11 (irinotecan) is converted *in vivo* by carboxylesterase to the active metabolite SN-38. One application of the invention, therefore, is to use a bsAb targeted against a tumor and a hapten (*e.g.* di-DTPA) followed by injection of a di-DTPA-carboxylesterase conjugate. Once a suitable tumor-to-background localization
- 25 ratio has been achieved, the CPT-11 is given and the tumor-localized carboxylesterase serves to convert CPT-11 to SN-38 at the tumor. Due to its poor solubility, the active SN-38 will remain in the vicinity of the tumor and, consequently, will exert an effect on adjacent tumor cells that are negative for the antigen being targeted. This is a further advantage of the method. Modified forms of carboxylesterases have been

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

99

described and are within the scope of the invention. See, e.g., Potter *et al.*, *Cancer Res.* 58:2646-2651 (1998) and Potter *et al.*, *Cancer Res.* 58:3627-3632 (1998).

Etoposide is a widely used cancer drug that is detoxified to a major extent by formation of its glucuronide and is within the scope of the invention. See, e.g., Hande *et al.* *Cancer Res.* 48:1829-1834 (1988). Glucuronide conjugates can be prepared from cytotoxic drugs and can be injected as therapeutics for tumors pre-targeted with mAb-glucuronidase conjugates. See, e.g., Wang *et al.* *Cancer Res.* 52:4484-4491 (1992). Accordingly, such conjugates also can be used with the pre-targeting approach described here. Similarly, designed prodrugs based on derivatives of daunomycin and doxorubicin have been described for use with carboxylesterases and glucuronidases. See, e.g., Bakina *et al.* *J. Med. Chem.* 40:4013-4018 (1997). Other examples of prodrug/enzyme pairs that can be used within the present invention include, but are not limited to, glucuronide prodrugs of hydroxy derivatives of phenol mustards and beta-glucuronidase; phenol mustards or CPT-11 and carboxypeptidase; methotrexate-substituted alpha-amino acids and carboxypeptidase A; penicillin or cephalosporin conjugates of drugs such as 6-mercaptopurine and doxorubicin and beta-lactamase; etoposide phosphate and alkaline phosphatase.

The enzyme capable of activating a prodrug at the target site or improving the efficacy of a normal therapeutic by controlling the body's detoxification pathways may alternatively be conjugated to the hapten. The enzyme-hapten conjugate is administered to the subject following administration of the pre-targeting bsAb and is directed to the target site. After the enzyme is localized at the target site, a cytotoxic drug is injected, which is known to act at the target site, or a prodrug form thereof which is converted to the drug *in situ* by the pretargeted enzyme. As discussed above, the drug is one which is detoxified to form an intermediate of lower toxicity, most commonly a glucuronide, using the mammal's ordinary detoxification processes. The detoxified intermediate, e.g., the glucuronide, is reconverted to its more toxic form by the pretargeted enzyme and thus has enhanced cytotoxicity at the target site. This results in a recycling of the drug. Similarly, an administered prodrug can be converted to an

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

100

active drug through normal biological processes. The pretargeted enzyme improves the efficacy of the treatment by recycling the detoxified drug. This approach can be adopted for use with any enzyme-drug pair.

- The invention further contemplates the use of the inventive bsAb and the diagnostic agent(s) in the context of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) protocols. BNCT is a binary system designed to deliver ionizing radiation to tumor cells by neutron irradiation of tumor-localized  $^{10}\text{B}$  atoms. BNCT is based on the nuclear reaction which occurs when a stable isotope, isotopically enriched  $^{10}\text{B}$  (present in 19.8% natural abundance), is irradiated with thermal neutrons to produce an alpha particle and a  $^7\text{Li}$  nucleus. These particles have a path length of about one cell diameter, resulting in high linear energy transfer. Just a few of the short-range 1.7 MeV alpha particles produced in this nuclear reaction are sufficient to target the cell nucleus and destroy it. Success with BNCT of cancer requires methods for localizing a high concentration of  $^{10}\text{B}$  at tumor sites, while leaving non-target organs essentially boron-free.
- 15 Compositions and methods for treating tumors in subjects using pre-targeting bsAb for BNCT are described in co-pending Patent Appl. Serial No. 09/205,243 and can easily be modified for the purposes of the present invention.

- It should also be noted that a bispecific antibody or antibody fragment can be used in the present method, with at least one binding site specific to an antigen at a target site and at least one other binding site specific to the enzyme component of the antibody-enzyme conjugate. Such an antibody can bind the enzyme prior to injection, thereby obviating the need to covalently conjugate the enzyme to the antibody, or it can be injected and localized at the target site and, after non-targeted antibody has substantially cleared from the circulatory system of the mammal, enzyme can be
- 25 injected in an amount and by a route which enables a sufficient amount of the enzyme to reach a localized antibody or antibody fragment and bind to it to form the antibody-enzyme conjugate *in situ*.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

101

It should also be noted that the invention also contemplates the use of multivalent target binding proteins which have at least three different target binding sites as described in Patent Appl. Serial No. 09/911,610. Multivalent antibodies have been made by cross-linking several Fab-like fragments via chemical linkers. See U.S. Patent Nos. 5,262,524; 5,091,542 and Landsdorp *et al.* *Euro. J. Immunol.* 16: 679-83 (1986).

5 Multivalent antibodies also have been made by covalently linking several single chain Fv molecules (scFv) to form a single polypeptide. See U.S. Patent No. 5,892,020. A multivalent antibody which is basically an aggregate of scFv molecules has been disclosed in U.S. Patent Nos. 6,025,165 and 5,837,242. A trivalent target binding

10 protein comprising three scFv molecules has been described in Krott *et al.* *Protein Engineering* 10(4): 423-433 (1997).

A clearing agent may be used which is given between doses of the bsAb and the linker moiety. The present inventors have discovered that a clearing agent of novel mechanistic action may be used with the invention, namely a glycosylated anti-idiotypic

15 Fab' fragment targeted against the disease targeting arm(s) of the bsAb. Anti-CEA (MN 14 Ab) x anti-peptide bsAb is given and allowed to accrete in disease targets to its maximum extent. To clear residual bsAb, an anti-idiotypic Ab to MN-14, termed W12, is given, preferably as a glycosylated Fab' fragment. The clearing agent binds to the bsAb in a monovalent manner, while its appended glycosyl residues direct the

20 entire complex to the liver, where rapid metabolism takes place. Then the therapeutic which is associated with the linker moiety is given to the subject. The W12 Ab to the MN-14 arm of the bsAb has a high affinity and the clearance mechanism differs from other disclosed mechanisms (see Goodwin *et al.*, *ibid*), as it does not involve cross-linking, because the W12-Fab' is a monovalent moiety. Alternatively, an anti-CSAp

25 (Mu-9 antibody) x anti-peptide bsAb is given and allowed to accrete in disease targets to its maximum extent.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

102

**VII. Pharmaceutically suitable excipient**

The humanized, chimeric or human anti-CSAp antibodies and fragments thereof to be delivered to a subject can consist of the antibody alone, immunoconjugate, fusion protein, or can comprise one or more pharmaceutically suitable excipients, one or more  
5 additional ingredients, or some combination of these. Preferably, the anti-CSAp antibody is a Mu-9 antibody.

The Mu-9 immunoconjugate, naked antibody, fusion protein, and fragments thereof of the present invention can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby the immunoconjugate or naked  
10 antibody is combined in a mixture with a pharmaceutically suitable excipient. Sterile phosphate-buffered saline is one example of a pharmaceutically suitable excipient. Other suitable excipients are well-known to those in the art. See, for example, Ansel *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), and Gennaro (ed.), REMINGTON'S  
15 PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990), and revised editions thereof.

The immunoconjugate, naked antibody, fusion protein, and fragments thereof of the present invention can be formulated for intravenous administration via, for example, bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection can be presented in  
20 unit dosage form, e.g., in ampules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions can take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and can contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient can be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.  
25

Additional pharmaceutical methods may be employed to control the duration of action of the therapeutic or diagnostic conjugate or naked antibody. Control release preparations can be prepared through the use of polymers to complex or adsorb the

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

103

immunoconjugate or naked antibody. For example, biocompatible polymers include matrices of poly(ethylene-co-vinyl acetate) and matrices of a polyanhydride copolymer of a stearic acid dimer and sebacic acid. Sherwood *et al.*, *Bio/Technology* 10: 1446 (1992). The rate of release of an immunoconjugate or antibody from such a matrix depends upon the molecular weight of the immunoconjugate or antibody, the amount of immunoconjugate, antibody within the matrix, and the size of dispersed particles. Saltzman *et al.*, *Biophys. J.* 55: 163 (1989); Sherwood *et al.*, *supra*. Other solid dosage forms are described in Ansel *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), and Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990), and revised editions thereof.

The immunoconjugate, antibody fusion proteins, or naked antibody may also be administered to a mammal subcutaneously or even by other parenteral routes. Moreover, the administration may be by continuous infusion or by single or multiple boluses. In general, the dosage of an administered immunoconjugate, fusion protein or naked antibody for humans will vary depending upon such factors as the patient's age, weight, height, sex, general medical condition and previous medical history. Typically, it is desirable to provide the recipient with a dosage of immunoconjugate, antibody fusion protein or naked antibody that is in the range of from about 1mg/kg to 20 mg/kg as a single intravenous infusion, although a lower or higher dosage also may be administered as circumstances dictate. This dosage may be repeated as needed, for example, once per week for 4-10 weeks, preferably once per week for 8 weeks, and more preferably, once per week for 4 weeks. It may also be given less frequently, such as every other week for several months. The dosage may be given through various parenteral routes, with appropriate adjustment of the dose and schedule.

For purposes of therapy, the immunoconjugate, fusion protein, or naked antibody, and fragments thereof are administered to a subject in a therapeutically effective amount. A suitable subject for the present invention is a mammal, preferably a human but a non-human mammal such as a dog, cat or horse is also contemplated. An antibody

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

104

preparation is said to be administered in a "therapeutically effective amount" if the amount administered is physiologically significant. An agent is physiologically significant if its presence results in a detectable change in the physiology of a recipient mammal.

- 5 For diagnostic purposes, the immunoconjugate, fusion protein, or naked antibody, and fragments thereof are administered to a subject in a diagnostically effective amount. An antibody preparation is said to be administered in a "diagnostically effective amount" if the amount administered is generally sufficient to diagnose or detect a condition, malignancy, disease or disorder in a subject, usually without any  
10 pharmacological effects on the host.

#### VIII. Expression vectors

- The present invention also embraces nucleic acids that encode chimeric, humanized or human anti-CSAp antibodies, fusion proteins and fragments thereof. Expression vectors that comprise such nucleic acids also are included in the invention. The DNA  
15 sequence encoding a humanized, chimeric or human Mu-9 antibody can be recombinantly engineered into a variety of known host vectors that provide for replication of the nucleic acid. These vectors can be designed, using known methods, to contain the elements necessary for directing transcription, translation, or both, of the nucleic acid in a cell to which it is delivered. Known methodology can be used to  
20 generate expression constructs that have a protein-coding sequence operably linked with appropriate transcriptional/translational control signals. These methods include in vitro recombinant DNA techniques and synthetic techniques. For example, see Sambrook *et al.*, 1989, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (New York); Ausubel *et al.*, 1997, CURRENT  
25 PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (New York). Also provided for in this invention is the delivery of a polynucleotide not associated with a vector.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

105

PCT/US02/10235

Vectors suitable for use in the instant invention can be viral or non-viral. Particular examples of viral vectors include adenovirus, AAV, herpes simplex virus, lentivirus, and retrovirus vectors. An example of a non-viral vector is a plasmid. In a preferred embodiment, the vector is a plasmid.

- 5 An expression vector, as described herein, is a polynucleotide comprising a gene that is expressed in a host cell. Typically, gene expression is placed under the control of certain regulatory elements, including constitutive or inducible promoters, tissue-specific regulatory elements, and enhancers. Such a gene is said to be "operably linked to" the regulatory elements.
- 10 Preferably, the expression vector of the instant invention comprises the DNA sequence encoding a humanized, chimeric or human Mu-9 antibody, which includes both the heavy and the light chain variable and constant regions. However, two expression vectors may be used, with one comprising the heavy chain variable and constant regions and the other comprising the light chain variable and constant regions. Still
- 15 preferred, the expression vector further comprises a promoter, a DNA sequence encoding a secretion signal peptide, a genomic sequence encoding a human IgG1 heavy chain constant region, an Ig enhancer element and at least one DNA sequence encoding a selection marker.

\* \* \*

- 20 The representative embodiments described below are simply used to illustrate the invention. Those skilled in these arts will recognize that variations of the present materials fall within the broad generic scope of the claimed invention. The contents of all references mentioned herein are incorporated by reference.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

106

PCT/US02/10235

**IX. Examples****Example 1. Synthesis of Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub> (IMP 243)**

The peptide was synthesized as described by Karacay *et. al. Bioconjugate Chem.*

- 5 11:842-854 (2000) except D-tyrosine was used in place of the L-tyrosine and the N-trityl-HSG-OH was used in place of the DTPA. The final coupling of the N-trityl-HSG-OH was carried out using a ten fold excess of N-trityl-HSG-OH relative to the peptide on the resin. The N-trityl-HSG-OH (0.28 M in NMP) was activated using one equivalent (relative to HSG) of N-hydroxybenzotriazole, one equivalent of
- 10 benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) and two equivalents of diisopropylethylamine. The activated substrate was mixed with the resin for 15 hr at room temperature.

**Example 2. Tc-99m Kit Formulation Comprising IMP 243**

- A formulation buffer was prepared which contained 22.093 g hydroxypropyl-β-cyclodextrin, 0.45 g 2,4-dihydroxybenzoic acid, 0.257 g acetic acid sodium salt, and
- 15 10.889 g α-D-glucoheptonic acid sodium salt dissolved in 170 mL nitrogen degassed water. The solution was adjusted to pH 5.3 with a few drops of 1 M NaOH then further diluted to a total volume of 220 mL. A stannous buffer solution was prepared by diluting 0.2 mL of SnCl<sub>2</sub> (200 mg/mL) with 3.8 mL of the formulation buffer. The
- 20 peptide Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub> (0.0026g), was dissolved in 78 mL of the buffer solution and mixed with 0.52 mL of the stannous buffer. The peptide solution was then filtered through a 0.22 μm Millex GV filter in 1.5 mL aliquots into 3 mL lyophilization vials. The filled vials were frozen immediately, lyophilized and crimp sealed under vacuum.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

107

Pertechnetate solution (27 mCi) in 1.5 mL of saline was added to the kit. The kit was incubated at room temperature for 10 min and heated in a boiling water bath for 25 min. The kit was cooled to room temperature before use.

5 **Example 3. Peptides for Carrying Therapeutic/Imaging Radioisotopes to Tumors via Bispecific Antibody Tumor Pretargeting**

DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub> (IMP 237) was synthesized to deliver therapeutic radioisotopes such as <sup>90</sup>Y or <sup>177</sup>Lu to tumors via bispecific antibody tumor pretargeting. The bispecific antibody is composed of one portion which binds to an antigen on the tumor and another portion which binds to the HSG peptide. The  
10 antibody which binds the HSG peptide is 679. This system can also be used to deliver imaging isotopes such as <sup>111</sup>In-111.

**Synthesis of IMP 237**

IMP 237 was synthesized on Sieber Amide resin (Nova-Biochem) using standard Fmoc based solid phase peptide synthesis to assemble the peptide backbone with the  
15 following protected amino acids, in order: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Tyr(But)-OH, Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Phe-OH, (Reagents from Advanced Chemtech) tri-*t*-butyl DOTA (Macrocyclics). The side lysine side chains were then deprotected with Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> by the method of Dangles *et al. J. Org. Chem.* 52:4984-4993 (1987). The HSG ligands were then added as Trityl HSG (synthesis described below) using the  
20 BOP/HBTU double coupling procedure used to attach the amino acids. The peptide was cleaved from the resin and the protecting groups were removed by treatment with TFA. The peptide was purified by HPLC to afford 0.6079 g of peptide from 1.823 g of Fmoc-Lys(Aloc)-Tyr(But)-Lys(Aloc)-NH-Sieber amide resin.

**Synthesis of N-Trityl-HSG-OH**

25 Glycine *t*-butyl ester hydrochloride (15.263 g, 9.1 x 10<sup>-2</sup> mol) and 19.760 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> were mixed, then suspended in 50 mL H<sub>2</sub>O and cooled in an ice bath. Succinic

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

108

anhydride (9.142 g,  $9.14 \times 10^{-2}$  mol) was then added to the reaction solution which was allowed to warm slowly to room temperature and stir for 18 hr. Citric acid (39.911 g) was dissolved in 50 mL H<sub>2</sub>O and slowly added to the reaction solution and then extracted with 2 x 150 mL EtOAc. The organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
5 filtered and concentrated to afford 25.709 g of a white solid.

The crude product (25.709 g) was dissolved in 125 mL dioxane, cooled in a room temperature water bath and mixed with 11.244 g of N-hydroxysuccinimide. Diisopropylcarbodiimide 15.0 mL was added to the reaction solution which was allowed to stir for one hour. Histamine dihydrochloride (18.402 g,  $1.00 \times 10^{-1}$  mol)  
10 was then dissolved in 100 mL DMF and 35 mL diisopropylethylamine. The histamine mixture was added to the reaction solution which was stirred at room temperature for 21 hr. The reaction was quenched with 100 mL water and filtered to remove a precipitate. The solvents were removed under hi-vacuum on the rotary evaporator. The crude product was dissolved in 300 mL dichloromethane and extracted with 100  
15 mL saturated NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to afford 34.19 g of crude product as a yellow oil.

The crude product (34.19 g) was dissolved in 50 mL chloroform and mixed with 31 mL diisopropylethylamine. Triphenylmethyl chloride (25.415g) was dissolved in 50 mL chloroform and added dropwise to the stirred reaction solution which was cooled in  
20 an ice bath. The reaction was stirred for 45 min and then quenched with 100 mL H<sub>2</sub>O. The layers were separated and the organic solution was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to form a green gum. The gum was triturated with 100 mL Et<sub>2</sub>O to form a yellow precipitate which was washed with 3 x 50 mL portions of Et<sub>2</sub>O. The solid  
25 was vacuum dried to afford 30.641 g (59.5 % overall yield) of N-trityl-HSG-t-butyl ester.

N-trityl-HSG-t-butyl ester (20.620 g,  $3.64 \times 10^{-3}$  mol) was dissolved in a solution of 30 mL chloroform and 35 mL glacial acetic acid. The reaction was cooled in an ice bath and 15 mL of BF<sub>3</sub>•Et<sub>2</sub>O was slowly added to the reaction solution. The reaction was

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

109

allowed to warm slowly to room temperature and mix for 5 hr. The reaction was quenched by pouring into 200 mL 1M NaOH and the product was extracted with 200 mL chloroform. The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated to afford a crude gum which was triturated with 100 mL  $\text{Et}_2\text{O}$  to form a precipitate. The crude precipitate was poured into 400 mL 0.5 M pH 7.5 phosphate buffer and extracted with 2 x 200 mL  $\text{EtOAc}$ . The aqueous layer was acidified to pH 3.5 with 1 M HCl and extracted with 2 x 200 mL chloroform. A precipitate formed and was collected by filtration (8.58 g). The precipitate was the desired product by HPLC comparison to a previous sample (ESMS MH+ 511).

#### 10 Radiolabeling

##### *<sup>90</sup>Y Kit Preparation*

DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub> was dissolved in 0.25 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ / 10 % HPCD buffer at concentrations of 9, 18, 35, 70 and 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The solutions were sterile filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  Millex GV filter in one mL aliquots into acid washed lyophilization vials. The filled vials were frozen immediately on filling and lyophilized. When the lyophilization cycle was complete the vials were sealed under vacuum and crimp sealed upon removal from the lyophilizer.

The <sup>90</sup>Y (~ 400  $\mu\text{Ci}/\text{kit}$ ) was diluted to 1mL in deionized water and added to the lyophilized kits. The kits were heated in a boiling water bath for 15 min, the vials were cooled to room temperature and the labeled peptides were evaluated by reverse phase HPLC (HPLC conditions: Waters Nova-Pak C-18, 8x100 mm RCM column eluted at 3 mL/min with a linear gradient from 100 % (0.1 % TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ) to 100 % (90 %  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0.1 % TFA, 10 %  $\text{H}_2\text{O}$ )). The HPLC analysis revealed that the minimum concentration of peptide needed for complete labeling, with this formulation, was 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The reverse phase HPLC trace showed a sharp <sup>90</sup>Y labeled peptide peak. The labeled peptide was completely bound when mixed with excess 679 IgG by size exclusion HPLC.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

110

PCT/US02/10235

**Labeling with <sup>111</sup>In**

The <sup>111</sup>In (~300 µCi/kit) was diluted to 0.5 mL in deionized water and added to the lyophilized kits. The kits were heated in a boiling water bath for 15 min, the vials were cooled and 0.5 mL of 2.56 x 10<sup>-5</sup> M In in 0.5 M acetate buffer was added and the kits were again heated in the boiling water bath for 15 min. The labeled peptide vials were cooled to room temperature and evaluated by reverse phase HPLC (HPLC conditions: Waters Nova-Pak C-18, 8x100 mm RCM column eluted at 3 mL/min with a linear gradient from 100 % (0.1 % TFA in H<sub>2</sub>O) to 100 % (90 % CH<sub>3</sub>CN, 0.1 % TFA, 10 % H<sub>2</sub>O)). The HPLC analysis revealed that the minimum concentration of peptide needed for labeling (4.7 % loose <sup>111</sup>In), with this formulation, was 35 µg/mL. The reverse phase HPLC trace showed a sharp <sup>111</sup>In labeled peptide peak. The labeled peptide was completely bound when mixed with excess 679 IgG by size exclusion HPLC.

**In-Vivo Studies**

15 Nude mice bearing GW-39 human colonic xenograft tumors (100-500 mg) were injected with the bispecific antibody hMN-14 x m679 (1.5 x 10<sup>-10</sup> mol). The antibody was allowed to clear for 24 hr before the <sup>111</sup>In labeled peptide (8.8 µCi, 1.5 x 10<sup>-11</sup> mol) was injected. The animals were sacrificed at 3, 24, 48 hr post injection.

20 The results of the biodistribution studies of the peptide in the mice pretargeted with hMN-14 x m679 are shown in Table 1. The tumor to non-tumor ratios of the peptides in the pretargeting study are shown in Table 2.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

111

PCT/US02/10235

**Table 1**

Pretargeting With  $^{111}\text{In}$  Labeled Peptide 24 hr After Injection of hMN-14 x m679  
% Injected/g Tissue

Tissue	3 hr After $^{111}\text{In}$ IMP 237	24 hr After $^{111}\text{In}$ IMP 237	48 hr After $^{111}\text{In}$ IMP 237
GW-39	7.25 ± 2.79	8.38 ± 1.70	5.39 ± 1.46
Liver	0.58 ± 0.13	0.62 ± 0.09	0.61 ± 0.16
Spleen	0.50 ± 0.14	0.71 ± 0.16	0.57 ± 0.15
Kidney	3.59 ± 0.75	2.24 ± 0.40	1.27 ± 0.33
Lungs	1.19 ± 0.26	0.44 ± 0.10	0.22 ± 0.06
Blood	2.42 ± 0.61	0.73 ± 0.17	0.17 ± 0.06
Stomach	0.18 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.02
Sm. Int.	0.65 ± 0.74	0.18 ± 0.03	0.11 ± 0.02
Lg. Int.	0.30 ± 0.07	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.03

5

**Table 2**

Pretargeting With  $^{111}\text{In}$  Labeled Peptides 24 hr After Injection of hMN-14 x m679  
Tumor/Non-Tumor Tissue Ratios

Tissue	3 hr After $^{111}\text{In}$ IMP 237	24 hr After $^{111}\text{In}$ IMP 237	48 hr After $^{111}\text{In}$ IMP 237
Liver	12.6 ± 4.44	13.6 ± 2.83	8.88 ± 1.78
Spleen	15.1 ± 6.32	12.1 ± 2.86	9.50 ± 1.62
Kidney	2.04 ± 0.74	3.84 ± 1.04	4.25 ± 0.19
Lungs	6.11 ± 1.96	19.6 ± 5.91	25.4 ± 6.00
Blood	3.04 ± 1.13	11.9 ± 3.20	31.9 ± 4.79
Stomach	40.5 ± 16.5	104. ± 39.6	83.3 ± 16.5
Sm. Int.	18.9 ± 12.6	47.5 ± 10.3	49.5 ± 7.83
Lg. Int.	25.2 ± 10.6	50.1 ± 16.7	43.7 ± 9.35

Serum Stability of DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub> (IMP 237) and DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub> (IMP 241)

10

**Peptide Labeling and HPLC Analysis**

The peptides, IMP 237 and IMP 241, were labeled according to the procedure described by Karacay *et. al. Bioconjugate Chem. 11:842-854* (2000). The peptide, IMP 241 (0.0019 g), was dissolved in 587  $\mu\text{l}$  0.5 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH 5.5. A 1.7  $\mu\text{L}$  aliquot of the peptide solution was diluted with 165  $\mu\text{l}$  0.5 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH 5.5. The  $^{111}\text{In}$  (1.8 mCi) in 10  $\mu\text{L}$  was added to the peptide solution and the mixture was heated in a boiling water bath for 30 min.

15

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

112

The labeled peptide was analyzed by HPLC using a Waters 8x100 mm radial-pak, nova-pak C-18 RCM cartridge column. The column was eluted at 3 mL/min with a linear gradient which started with 100 % of 0.1 % TFA in water and went to 100 % of 0.1 % TFA in 90% acetonitrile and 10 % water over 10 min. There was about 6% loose <sup>111</sup>In in this labeling which came out at the void volume of the column (1.6 min). There were also some <sup>111</sup>In labeled peaks at 5 min and 6.6 to 8 min. The <sup>111</sup>In labeled peptide was eluted at 8.8 min as a single peak. The HPLC profile of <sup>111</sup>In IMP 237 was nearly identical to <sup>111</sup>In IMP 241.

#### *Serum Stability*

- 10 An aliquot (30  $\mu$ L) of <sup>111</sup>In IMP 241 was placed in 300  $\mu$ L of fresh mouse serum and placed in a 37° C incubator. The peptide was monitored as described above by HPLC. An aliquot (24  $\mu$ L) of <sup>111</sup>In IMP 237 was placed in 230  $\mu$ L of fresh mouse serum and placed in a 37° C incubator. The peptide was monitored as described above by HPLC. The analysis showed that the <sup>111</sup>In IMP 241 may have decomposed slightly (~ 5%) after heating 22 hr in mouse serum at 37° C. The <sup>111</sup>In IMP 237 was about 70 % converted to the shorter retention time peak after incubation for 22 hr at 37° C.

#### *Conclusion*

The D-tyrosine in the IMP 241 peptide slows the decomposition of the peptide in mouse serum compared to IMP 237.

#### 20 *In Vivo Stability of IMP 237 and IMP 241 Compared*

The *in vivo* stabilities of <sup>111</sup>In IMP 237 and <sup>111</sup>In IMP 241 were compared by examining (by HPLC) urine samples from mice at 30 and 60 min. The peptides, IMP 241 and IMP 237, were <sup>111</sup>In-111 labeled as described above.

- 25 The labeled peptides were injected into Balb/c mice which were sacrificed at 30 min and 60 min post injection of the peptides using one mouse per time point. The attached

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

113

HPLC traces indicate that  $^{111}\text{In}$  IMP 241 was excreted intact while  $^{111}\text{In}$  IMP 237 was almost completely metabolized to a new  $^{111}\text{In}$  labeled peptide.

#### *Conclusion*

The replacement of Tyr with D-Tyr in the peptide backbone minimized metabolism of the peptide in-vivo.

#### *Additional In Vivo Studies*

Nude mice bearing GW-39 human colonic xenograft tumors (100-500 mg) were injected with the bispecific antibody mMu9 x m679 ( $1.5 \times 10^{-10}$  mol). The antibody was allowed to clear for 48 hr before the  $^{111}\text{In}$  labeled peptides ( $8.8 \mu\text{Ci}$ ,  $1.5 \times 10^{-11}$  mol) were injected. The animals were sacrificed at 3, 24, 48 hr post injection.

The results of the biodistribution studies of the peptides in the mice pretargeted with mMU9 x m679 are shown in Table 3. The tumor to non-tumor ratios of the peptides in the pretargeting study are shown in Table 4. The data in Table 5 shows the biodistribution of the peptides in mice that were not pretreated with the bispecific antibody.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

114

Table 3

Pretargeting With <sup>111</sup>In Labeled Peptides 48 hr After Injection of mMU9 x m679  
% Injected/g Tissue

Tissue	3 hr After <sup>111</sup> In Peptide		24 hr After <sup>111</sup> In Peptide		48 hr After <sup>111</sup> In Peptide	
	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241
GW-39	18.3 ± 7.17	26.7 ± 14.1	16.7 ± 8.22	14.8 ± 4.56	12.9 ± 1.10	12.3 ± 2.11
Liver	0.41 ± 0.10	0.66 ± 0.34	0.32 ± 0.08	0.32 ± 0.09	0.28 ± 0.09	0.32 ± 0.21
Spleen	0.34 ± 0.12	0.63 ± 0.38	0.34 ± 0.12	0.25 ± 0.07	0.28 ± 0.07	0.31 ± 0.22
Kidney	3.62 ± 0.71	4.28 ± 0.77	2.51 ± 0.54	2.34 ± 0.70	1.78 ± 0.38	1.17 ± 0.43
Lungs	0.61 ± 0.15	1.03 ± 0.65	0.22 ± 0.07	0.21 ± 0.07	0.12 ± 0.04	0.14 ± 0.08
Blood	1.16 ± 0.48	1.78 ± 1.49	0.21 ± 0.13	0.15 ± 0.05	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0.09
Stomach	0.12 ± 0.04	0.21 ± 0.09	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.02
Sm. Int.	0.23 ± 0.04	0.50 ± 0.27	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.06	0.11 ± 0.08	0.07 ± 0.06
Lg. Int.	0.34 ± 0.16	0.38 ± 0.15	0.15 ± 0.07	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.07	0.09 ± 0.05

Table 4

5 Pretargeting With <sup>111</sup>In Labeled Peptides 48 hr After Injection of mMU9 x m679  
Tumor/Non-Tumor Tissue Ratios

Tissue	3 hr After <sup>111</sup> In Peptide		24 hr After <sup>111</sup> In Peptide		48 hr After <sup>111</sup> In Peptide	
	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241
Liver	45.6 ± 17.8	41.8 ± 19.6	49.8 ± 16.6	47.1 ± 8.68	49.1 ± 13.6	45.1 ± 13.9
Spleen	56.8 ± 23.8	43.5 ± 9.77	47.4 ± 14.7	59.6 ± 13.0	47.5 ± 10.6	50.2 ± 19.0
Kidney	5.13 ± 2.18	6.05 ± 2.41	6.43 ± 2.24	6.58 ± 2.42	7.43 ± 1.02	11.2 ± 2.61
Lungs	30.5 ± 10.6	28.4 ± 12.8	76.4 ± 34.1	72.7 ± 21.9	115. ± 36.6	102. ± 37.1
Blood	18.6 ± 12.0	19.0 ± 11.8	86.9 ± 36.2	108. ± 41.0	187. ± 76.3	181. ± 86.6
Stomach	156. ± 86.1	126. ± 49.6	303. ± 95.9	328. ± 96.7	344. ± 101.	456. ± 193.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/082041

PCT/US02/10235

115

Tissue	3 hr After <sup>111</sup> In Peptide		24 hr After <sup>111</sup> In Peptide		48 hr After <sup>111</sup> In Peptide	
Sm. Int.	80.7 ± 29.0	59.0 ± 31.0	143. ± 60.7	193. ± 83.7	153. ± 67.7	217. ± 73.5
Lg. Int.	56.3 ± 19.7	78.6 ± 54.4	116. ± 36.9	155. ± 42.4	133. ± 47.6	153. ± 43.1

Table 5

Biodistribution of <sup>111</sup>In Labeled Peptides Alone

Tissue	30 min After In-111 Peptide		3 hr After In-111 Peptide		24 hr After In-111 Peptide	
	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241
GW-39	2.99 ± 1.11	2.73 ± 0.37	0.17 ± 0.05	0.31 ± 0.12	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.08
Liver	0.48 ± 0.06	0.50 ± 0.09	0.15 ± 0.02	1.07 ± 1.61	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.04
Spleen	0.42 ± 0.08	0.43 ± 0.22	0.09 ± 0.04	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.02	0.08 ± 0.03
Kidney	5.85 ± 0.37	7.31 ± 0.53	3.55 ± 0.44	3.21 ± 0.45	2.18 ± 0.24	2.61 ± 0.51
Lungs	1.26 ± 0.24	1.12 ± 0.26	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.06	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.06
Blood	1.62 ± 0.34	1.59 ± 0.29	0.12 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00
Stomach	0.59 ± 0.32	0.52 ± 0.16	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.04
Sm. Int.	0.55 ± 0.13	2.52 ± 3.73	0.09 ± 0.01	0.17 ± 0.08	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Lg. Int.	0.33 ± 0.05	0.30 ± 0.07	0.33 ± 0.15	0.32 ± 0.14	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.03

## Example 4. PCR Cloning of the Mu-9 Variable Regions

- Poly A mRNA was isolated from Mu-9 hybridoma cell line (  $3 \times 10^7$  cells) using the
- 5 Fast Track mRNA Isolation kit (Invitrogen, San Diego, CA). The first strand cDNA was reverse transcribed from poly A mRNA using the cDNA cycle kit (Invitrogen). Briefly, 1  $\mu$ g of poly A mRNA was annealed to murine IgG CH1-specific primer, CH1B (5' ACA GTC ACT GAG CTG G 3'), or murine Ck-specific primer, Ck3-BH1 (5' GCC GGA TCC TCA CTG GAT GGT GGG AAG ATG GAT ACA 3'), at a final
- 10 concentration of 1  $\mu$ M at 42  $^{\circ}$ C for 60 minutes in the presence of 1  $\mu$ l of RNase inhibitor (10 U/  $\mu$ l), 4.0  $\mu$ l of 5x reverse transcriptase buffer (500 mM Tris-HCL, pH 8.2, 200

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/082041

PCT/US02/10235

116

mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2.5 mM spermidine), 1 μl of 100 mM dNTPs, 1 μl of 80 mM sodium pyrophosphate, and 5 U of AMV reverse transcriptase. The RNA-cDNA hybrids were then denatured at 95 °C for 2 minutes. The first strand cDNAs were then used as templates to amplify the V<sub>H</sub> and V<sub>κ</sub> sequences by PCR as described by

5 Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86: 3833. The V<sub>κ</sub> region was amplified using primers VK1BACK (5'-GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA 3') and IgKC3' (5'-CTC ACT GGA TGG TGG GAA GAT GGA TAC AGT TGG 3'). The V<sub>H</sub> region was amplified using primers VH1BACK (5' AGG T(C/G)(A/C) A(A/G)C TGC AG(C/G) AGT C(A/T)G G 3') and CH1B. In a preferred embodiment,

10 the V<sub>H</sub> region is amplified using the primer indicated by the arrow underline in figure 8. The PCR reaction mixtures containing 10 μl of the first strand cDNA product, 10 μl of 10x PCR buffer (15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, and 0.01% (w/v) gelatin), 1 μM of each primer, 16 μl of dNTPs, and 5 U of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA) were

15 subjected to 30 cycles of PCR (denaturation at 94 °C for 1 minute, annealing at 45 °C for 1 minute and polymerization at 72 °C for 1 minute for 5 cycles, combined with denaturation at 94 °C for 1 minute, annealing at 55 °C for 1 minute, and polymerization at 72 °C for 1 minute for 25 cycles). The amplified V<sub>κ</sub> and V<sub>H</sub> fragments were gel-purified and cloned into the TA cloning vector (Invitrogen) for

20 sequence analyses by the dideoxytermination method. Sequences confirmed to be of immunoglobulin origin were then used to construct chimeric expression vectors using methods described by Leung et al., Hybridoma 1994, 13: 469.

Nucleotide sequencing of multiple clones confirmed the isolation of one V<sub>κ</sub> (MU9V<sub>κ</sub>1) and one V<sub>H</sub> (Mu9 V<sub>H</sub>) sequence (Figure 8). The chimeric Mu-9 (cMu-9-1) constructed

25 from the V<sub>H</sub> and V<sub>κ</sub>1 cloned by this RT-PCR method did not demonstrate any binding to CSAP antigen, suggesting the possible existence of other "functional" V-region sequence(s) that might be overlooked by RT-PCR cloning procedures.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

117

**Example 5. Cloning the Mu-9 Variable Regions by cDNA Library Screening**

The cDNA library was constructed from the murine Mu-9 hybridoma in pSPORT vector (Life Technologies). The first strand cDNA was synthesized by pairing poly A mRNA from murine Mu-9 hybridoma with an oligo dT primer-NotI adaptor (Life Technologies). After the second strand synthesis and attachment of Sall adaptors, the cDNA pool was size fractionated through a cDNA size fractionation column. The fractionated cDNA was ligated to pSPORT vector and then transformed into *Escherichia coli* DH5. The library was plated onto LB-amp (100 g/ml) plates, colonies transferred to Nytran filters (Schleicher and Schuell, Keene, NH), and then amplified on LB-chloramphenicol plates. The amplified colonies were treated successively with 0.5 N NaOH/1.5 M NaCl for 5 minutes; 1 M Tris-HCl, pH 8.0, for 5 minutes; 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5/2x SSC for 5 minutes; and finally with 2x SSC for 5-10 minutes. The DNA was immobilized on the filters by baking at 80 C for 30 minutes. The filters were incubated in prehybridization buffer containing 6x SSC, 5X Denhardt's (0.1% Ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, and 0.1% bovine serum albumin), 0.5% SDS, 0.05% sodium pyrophosphate, and 100 g/ml herring sperm DNA (Life Technologies) for 2 hours at 50 C. Hybridization with the <sup>32</sup>P-labeled probes (MUCH-1 (5'-AGA CTG CAG GAG AGC TGG GAA GGT GTG CAC 3') specific for murine heavy chain and MUCK-1 (5'-GAA GCA CAC GAC TGA GGC ACC TCC AGA TGT 3') specific for murine light chain) at 10<sup>6</sup> cpm/ml was done overnight at their respective Tms in the prehybridization solution supplemented with 10% (w/v) dextran sulfate (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The filters were washed four times in 0.2x SSC, 0.1% SDS at 37 C for 10 minutes, twice at 42 C for 15 minutes, and once at 50 C for 15 minutes until the radioactivities on the filters were constant as determined with a Geiger counter. After a final rinse in 2x SSC, the wet filters were exposed to Kodak XAR-5 film (Rochester, NY) at 70 C. The clones that were positive on the first screening were transferred to duplicate LB-amp plates. Duplicate Nytran filters were hybridized to the same probes as described above. Only clones that positively hybridized on both the filters were picked for further screening. For the tertiary screening, MUCH-1- positive colonies were screened in duplicate with

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

118

VHCDR3Mu9 (specific for the V<sub>H</sub> sequenced cloned by RT-PCR in Example 4) and MUCk-1-positive colonies were screened with VKCDR1Mu9 and VKCDR3Mu9 (specific for the CDR1 and CDR3 coding sequences of V<sub>K</sub>-1 cloned by RT-PCR in Example 4).

- 5 All clones (25) that were confirmed to be positive with MUCH-1 were also positive with VHCDR3Mu9, indicating that there was only one type of heavy chain sequence expressed in the hybridoma. Ten clones that positively hybridized with the VHCDR3Mu9 were sequenced and found to be identical to the RT-PCR cloned Mu9VH, the sequence of which is disclosed in Figure 1A.
- 10 Of the 34 clones that were positive for MUCk-1 in both primary and secondary screenings only 14 hybridized to the Mu9V<sub>K</sub>1-specific probes, VKCDR1Mu9 and VKCDR3Mu9. Sequence analyses revealed that these clones were identical to the Mu9V<sub>K</sub>1. Of the remaining 20 clones that were negative for the Mu9V<sub>K</sub>1-specific probes, 8 were subjected to DNA sequencing. Seven of these clones encoded a kappa
- 15 light chain sequence with a V<sub>K</sub> domain that was different from Mu-9 V<sub>K</sub>1 and designated as Mu-9 V<sub>K</sub>2, the sequence of which is disclosed in Figure 1B. The chimeric Mu-9 (cMu-9-2) constructed from the V<sub>H</sub> and V<sub>K</sub>2 and expressed in Sp2/0 cells showed comparable binding affinity to CSAP antigen as that of murine Mu-9 (see Example 8-9 for details).

20 **Example 6. Probe Labeling for cDNA Library Screening**

- Oligonucleotides were synthesized on an automated 392 DNA/RNA synthesized (Applied Biosystems) and then purified on a PD 10 column (Pharmacia Biotech). The purified oligonucleotides were labeled with [<sup>32</sup>P]ATP (Amersham, Arlington Heights, IL) using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Beverly, MA). A typical
- 25 reaction mixture contained in a final volume of 20 μl was as follows: 50 pmol oligonucleotide, 60 Ci of [<sup>32</sup>P]ATP (6000 Ci/mmol), and 2 μl of 10x kinase buffer (New England Biolabs). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 1 hour, and

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

119

the reaction was terminated with 20  $\mu$ l of 0.1 M EDTA. The unincorporated [ $^{32}$ P]ATP was separated from the labeled oligonucleotide on a TE-10 Chromaspin column (Clontech, Palo Alto, CA). The labeled probe was used at  $10^6$  cpm/ml. for hybridization.

#### 5 Example 7. Transfection of SP2/0 Cells

The putative V $\kappa$  and V $\lambda$  sequences for Mu-9 were subcloned into the light (pKh or pKh\*) and heavy chain (pG1g) expression vectors, respectively, as describe by Leung et al., supra. pKh\* is essentially identical to the pKh, except that it has a XhoI/PacI linker introduced into the BstXI site of the pKh. Mu-9 V $\kappa$ 2 obtained by cDNA  
10 screening contained an internal BstXI site, it was subcloned into pKh\*, which could then be linearized with either XhoI or PacI for transfection.

Approximately 10 and 30  $\mu$ g of linearized light (Mu-9-1pKh or Mu-9-2pKh\*) and heavy (Mu-9pG1g) chain expression vectors were cotransfected into SP2/0 cells by electroporation. Transfected cells were grown in 96-well cell culture plates in  
15 complete medium for 2 days and then selected by the addition of hygromycin at a final concentration of 500 U/ml. Typically, the colonies began to emerge 2-3 weeks after electroporation and were assayed for antibody secretion by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The chimeric antibodies were purified from the culture supernatant by affinity chromatography on Protein A-Sepharose 4B column.  
20 The purified antibodies (5- $\mu$ g) were analyzed by SDS-PAGE on a 4-20% gradient gel under reducing conditions.

#### Example 8. Mu-9 Direct Binding Assay

ELISA microtiter plates were coated with a void volume fraction of GW-39 tumor extracts (which contains the CSAP antigen) eluted from a Sepharose 4B-CL column and  
25 left overnight at 4  $^{\circ}$ C. The next day, the nonspecific binding was blocked with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% BSA and 0.05% Tween 20. Chimeric

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

120

antibody supernatant (100  $\mu$ l) or purified antibody (0-1  $\mu$ g/ml) was added and incubated at room temperature for 1 hour. Unbound proteins were removed by washing six times with wash buffer (PBS containing 0.05% Tween 20). Purified murine Mu-9 protein was used as the standard. The bound antibodies were allowed to  
5 react with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG, Fc fragment-specific (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA) and peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG, Fc fragment-specific antibodies (Jackson ImmunoResearch). After washing the plate six times with wash buffer, 100  $\mu$ l of OPD substrate solution (10 mg of orthophenylenediamine dihydrochloride (Sigma, St. Louis, MO) in 25 ml of 0.32x PBS  
10 and 0.12%  $H_2O_2$ ) was added to each well. The color was developed in the dark for 1 hour, the reaction was stopped with 50  $\mu$ l of 4N  $H_2SO_4$ , and the absorbance at 490 nm was measured in a Dynatech plate reader (Dynatech Labs, Sussex, UK).

Direct binding of a cMu-9 (cMu-9-2) to CSAP antigen occurred, as shown in Figure 5(a). The binding profile of cMu-9-2 was virtually superimposable on that of the  
15 murine Mu-9. These data demonstrated that the immunoreactivity of cMu-9-2 is comparable to that of murine Mu-9. The DNA and amino acid sequences of the functional cMu-9 V<sub>K</sub> and V<sub>H</sub> are shown in Figure 2A and 2B, respectively.

#### Example 9. Competitive Binding Assay

Murine Mu-9 IgG was conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Sigma). The  
20 peroxidase-conjugated Mu-9 was first tested for binding on microwells coated with CSAP antigen, and the optimum concentration was determined to be 0.2  $\mu$ g/ml. Peroxidase-conjugated Mu-9 was mixed with various concentrations of either murine or chimeric Mu-9 (0-50  $\mu$ g/ml) before addition to the antigen-coated wells. Binding of  
25 the peroxidase-conjugated Mu-9 to the antigen in the presence of the competing antibodies was measured at 490 nm after the addition of the substrate as described earlier.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

121

Figure 5(b) displays the results of the competitive binding assay. Murine Mu-9 and cMu-9-2 competed equally well with the binding of HRP-conjugated Mu-9 to the CSAP antigen. These data demonstrated that the immunoreactivity of cMu-9-2 is comparable to that of murine Mu-9.

5 **Example 10. Choice of human frameworks and sequence design for the humanization of Mu9 monoclonal antibody.**

By comparing the variable (V) region framework (FR) sequences of Mu9 to that of human antibodies in the Kabat data base, the FRs of Mu-9 VH and V $\kappa$  were found to exhibit the highest degree of sequence homology to that of the human antibodies, EU  
10 VH and WOL V, respectively. In Figures 3A and 3B, the amino acid sequences of the Mu9VH and V $\kappa$  are aligned and compared with the corresponding human sequences. Therefore, the FRs of EU VH and WOL V were selected as the human frameworks onto which the CDRs for Mu-9VH and V were grafted, respectively. The  
15 FR4 sequence of NEWM, however, rather than that of EU, was used for the humanization of Mu9 heavy chain (Figure 3A). A few amino acid residues in Mu9 FRs that are close to the putative CDRs were maintained in hMu9 based on the guideline described previously (Qu et al., Clin. Cancer Rec. 5:3095s-3100s (1999)). These residues are L37, V58 and Q100 of V (Figure 3B) and Y27, T30, K38, R40, I48, K66, A67, K74, T93, R94 and G103 of VH (Figure 3A). The gene sequences of  
20 hMu-9VH and V were then designed and shown with the amino acid sequences in Figure 4A and 4B, respectively.

**Example 11. PCR/gene synthesis of the humanized V genes.**

The strategy as described by Leung et al. (Leung et al., 1994) was used to construct the designed hMu-9 V $\kappa$  and VH genes using a combination of long oligonucleotide  
25 syntheses and PCR. Each variable chain was constructed in two parts, a 5'- and 3'-half, designated as "A" and "B," respectively. Each half was produced by PCR amplification of a single strand synthetic oligonucleotide template with two short

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

122

flanking primers, using Taq polymerase. The amplified fragments were first cloned into the pCR4 TA cloning vector from Invitrogen (Carlsbad, CA) and subjected to DNA sequencing. The templates and primer pairs are listed as follows:

	Template	Primers	PCR product
5	Oligo G	Oligo14/Oligo 15	hMu9VHA
	Oligo H	Oligo 16/Oligo 17	hMu9VHB
	Oligo J	Oligo 18/Oligo 19	hMu9VkA
	Oligo K	Oligo 20/Oligo 21	hMu9VkB

Heavy chain

- 10 For constructing the full-length DNA of the hMu9VH sequence, Oligo G (102 mer) and H (179 mer) were synthesized on an automated RNA/DNA synthesizer (Applied Biosystems). Oligo G sequence represents the minus strand of hMu9VH domain complementary to nt 19 to 120:

5'- AGGTCCTCTGT TTTACCCAGG TAATAACATA CTCAGTGAAG  
15 GTGTATCCAG AAGCCTTGCA GGAGACCTTC ACTGAGCTCC CAGGCTTTTT  
CACCTCAGCT CC -3'

Oligo H sequence represents the nt 147 to 325 of hMu9VH domain:

5'- GATTTATCCT GGAAGTGGTA GTAATCCTA CAATGAAAAG  
TTCAAGGGCA AGGCCACAAT CACTGCTGAC AAATCCACTA ACACAGCCTA  
20 CATGGAGCTC AGCAGCCTGA GATCTGAGGA CACTGCGTTC TATTTCTGTA  
CAAGAGAGGA TCTTGGGGGC CAAGGTCTC TGGTCACCG-3'

- Oligo G and H were cleaved from the support and deprotected by treatment with concentrated ammonium hydroxide. After samples were vacuum-tried and resuspended in 100  $\mu$ l of water, incomplete oligomers (less than 100-mer) were removed by  
25 centrifugation through a ChromaSpin-100 column (Clontech, Palo Alto, CA). All flanking primers were prepared similarly, except ChromaSpin-30 columns were used to

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

123

remove synthesis by-products. 1  $\mu$ l of ChromaSpin column purified Oligo G was PCR amplified in a reaction volume of 100  $\mu$ l containing 10  $\mu$ l of 10X PCR buffer [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.01% (w/v) gelatin] (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT), 250  $\mu$ M of each dNTP, 200 nM of Oligo14 (5'-GTGCAGCTGC AGCAGTCAGG AGCTGAGGTG-3') and Oligo 15 (5'-ACTCTAGACC CTGTCCAGGT CTCTGTTTTC CCCAGGTAAT AACATA-3'), and 5 units of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus). This reaction mixture was subjected to 30 cycles of PCR reaction consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1.5 min, and polymerization at 72°C for 1.5 min. Oligo H was PCR-amplified by the primer pair Oligo 16 (5'-GGTCTAGAGT GGATTGGAGA GATTATCCT GGAAGTGGTA GTACTT-3') and Oligo 17 (5'-TGAAGAGACG GTGACCAGAG ACCCTGGCC CCCAAGATCC TCTCTGTAC AGAAATAGAA CGC-3') under similar condition. Resulting PCR fragments, VHA and VHB were purified on 2% agarose (BioRad, Richmond, CA). Unique restriction sites were designed at the ends of each fragment to facilitate joining through DNA ligation. The amplified VHA fragment contained a PstI restriction site, CTGCAG, at its 5'-end and a XbaI restriction site, TCTAGA, at the 3'-end. The amplified VHB fragment contained a XbaI restriction site at its 5'-end and a BstEII restriction site, GGTCACC, at the 3'-end. Assembly of the full-length VH chain was accomplished by restriction enzyme digestion of each fragment with the appropriate 5'- and 3'-enzymes and ligation into the VHpBS vector (Leung et al., Hybridoma, 13:469 (1994)) previously digested with PstI and BstEII. The resulting ligated product contains the A fragment ligated to the PstI site, the B fragment to the BstEII site, and the A and B fragments joined together at the XbaI site (Figure 4A). Upon confirmation of a correct open reading frame by DNA sequencing, the intact VH gene sequence along with the promoter and the secretion signal peptide coding sequence was removed from VHpBS as a HindIII to BamHI fragment and ligated into the VHpG1g expression vector (Leung et al., Hybridoma, 13:469 (1994)), resulting in hMu9VHpG1g.

*Light chain*

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

124

For the construction of V , the long oligonucleotide templates synthesized were Oligo J (130 mer) representing the minus strand of hMu9V domain complementary to nt 21 to 150:

5'-CCTTGGAGCC TGGCCTGGTT TCTGCAGGTA CCATTCTAAA  
5 TAGGTGTTGC CATTACTATG CACAATGCTC TGA CTAGACC TGCAAGACAG  
AGTGGCTCGC TCTCCAGGAC TGAGGGACAG GGTGCCTGGG-3'

and Oligo K (150 mer) representing the nt 151 to 300 of hMu9V domain:

5'-CTCCTGATCT ACAAAGTTTC CAACCGATT TCCGGAGTCC  
CAGACAGGTT CAGTGGCTCT GGATCAGGGA CAGATTTCAC ACTTACTATC  
10 AGCAGACTGG AGCCTGAGGA TTTTGCTGTG TATTACTGCT TTCAAGGTTT  
ACGTGTTCCG-3'

These oligos were PCR-amplified by their respective primer pairs as listed:

Oligo 18 5'-GATATCCAGC TGACCCAATC CCCAGGCACC  
CTGTCCCTCA GTCCTGGAG-3'

15 Oligo 19 5'-AGATCAGGAG CCTTGGAGCC TGGCCTGGTT  
TCTGCA-3'

Oligo 20 5'-TACCTGCAGA AACCAGGCCA GGCTCCAAGG  
CTCCTGATCT ACAAAGTTTC CAACCG-3'

Oligo 21 5'-TTAATCTCCA CCTTGGTCCC CCCTCCGAAC  
20 GTGTACGGAA CACGTGAACC TTGAAAGCAG TAATACA-3'

The same construction method as done for VH was carried out for V , with the following modifications: the 5'-end restriction site of the A fragments was PvuII

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

125

(CAGCTG) and the 3'-end restriction site of B fragments was BglII (AGATCT).

These fragments were joined together upon ligation into the VKpBR vector at a common PstI site (CTGCAG), resulting in full-length V sequence (Figure 4B) and confirmed by DNA sequencing. The assembled V gene was subcloned as HindIII-BamHI restriction fragment into the light expression vector, resulting in hMu9VKpKh.

**Example 12. Transfection, expression and binding activity assays for hMu9.**

The methods for expression and binding activity assays for hMu9 were same as described for cMu9. Approximately 10 and 30 µg of linearized hMu9VKpKh and hMu9VHpG1g were co-transfected into SP2/0 cells by electroporation. Transfected cells were grown in 96-well cell culture plates in complete medium for 2 days and then selected by the addition of hygromycin at a final concentration of 500 U/ml.

Typically, the colonies began to emerge 2-3 weeks after electroporation and were assayed for antibody secretion by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The chimeric antibodies were purified from the culture supernatant by affinity chromatography on Protein A-Sepharose 4B column. The purified antibodies (5 µg) were analyzed by SDS-PAGE on a 4-20% gradient gel under reducing conditions.

Direct binding assay showed that the purified hMu-9 bound to CSAP antigen. The binding affinity of hMu-9 was compared in a competitive binding assay as described in Example 6. Figure 13 displays the results of the competitive binding assay. hMu-9 or murine Mu-9 competed equally well with the binding of HRP-conjugated Mu-9 to the CSAP antigen. These data demonstrated that the immunoreactivity of hMu-9 is comparable to that of murine Mu-9.

**Example 13. Therapy of a Patient with <sup>90</sup>Y-labeled Humanized Mu-9 Antibody**

A 62-year-old man, with a history of Dukes' C rectal carcinoma that was resected 3 years earlier, at which time radiation therapy followed by 5-fluorouracil/folinic acid chemotherapy were given, began showing a rise in his plasma CEA titer over the last 6

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

126

months, reaching a level of 30 ng/mL. The patient, who was seeing his oncologist twice annually, learned of this result and underwent various diagnostic procedures because of a suspected recurrence. It was found, by computed tomography, that there were two metastases present in his liver, one being 3 cm in diameter in his right lobe, and the other being somewhat smaller in the left lobe, close to the interlobe ligament. The patient opted not to undergo chemotherapy, and was then given a dose of 25 mCi <sup>90</sup>Y conjugated to the humanized Mu-9 antibody, given at a protein dose of 50 mg by intravenous infusion over a period of 2 hours. This therapy was then repeated one month later. The patients had a drop of his white blood cells and platelets, measured 2-4 weeks after the last therapy infusion, but recuperated at the 8-week post-therapy evaluation. The computed tomography findings at 3 months post-therapy revealed a 40% shrinkage of the major tumor metastasis of the right liver lobe, and a lesser reduction in the left-lobe tumor. At this time, the patient's blood CEA dropped to 15 ng/mL. At the 6-month follow-up, his tumor lesions had been reduced, in two-diameter CT-measurements, by about 70 percent, his plasma CEA was at 8 ng/mL, and his general condition was fine, with no apparent toxicity or adverse events related to the therapy. The patient is now 9 months post-therapy with no change in the size of his liver metastases and a stable serum CEA titer at about 5-8 ng/mL. He is being followed every 3 months, so that if the disease begins to grow, he is scheduled to receive another course of this radioimmunotherapy, followed by a course of naked Mu-9 antibody, at a weekly dose of 300 mg/m<sup>2</sup>, once weekly for 6 weeks, concomitantly with a therapy course of irinotecan (CPT-11).

#### X. References

All references cited, as well as references cited by the references cited herein, are hereby incorporated herein by reference in their entireties.

Additional references of interest, as well as references cited therein, include the following, and are hereby incorporated herein by reference in their entireties:

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

127

- Bamias, A., and Epenetos, A.A. Two-step strategies for the diagnosis and treatment of cancer with bioconjugates. *Antibody, Immunoconjugates, Radiopharm.* 1992; 5: 385-395.
- Barbet, J., Peltier, P., Bardet, S., Vuillez, JP., Bachelot, I., Denet, S., Olivier, P.,  
5 Lecia, F., Corcuff, B., Huglo, D., Proye, C., Rouvier, E., Meyer, P., Chatal, J.F.  
Radioimmuno-detection of medullary thyroid carcinoma using indium-111 bivalent  
haptens and anti-CEA x anti-DTPA-indium bispecific antibody. *J.Nucl.Med.* 1998;  
39:1172-1178.
- Bos, ES., Kuijpers, WHA., Meesters-Winters, M., Pham, DT., deHaan, AS., van  
10 Doormalen, Am., Kasperson, F.M., vanBoeckel, CAA and Gougeon-Bertrand, F. In  
vitro evaluation of DNA-DNA hybridization as a two-step approach in  
radioimmunotherapy of cancer. *Cancer Res.* 1994; 54:3479-3486.
- Carr *et al.*, WO00/34317.
- Di Carlo, A., Mariano, A., D'Alessandro, V., Belli, G., Romano, G., Macchia, V.  
15 Evaluation of epidermal growth factor receptor, carcinoembryonic antigen and Lewis  
carbohydrate antigens in human colorectal and liver neoplasias. *Oncol. Rep.* 2001;  
8:387-392.
- Epstein *et al.* U.S. Patents No. 5,019,368; 5,882,626; 6,017,514; and the patents and  
references cited therein.
- 20 Gautherot, E., Bouhou, J., LeDoussal, J-M., Manetti, C., Martin, M., Rouvier, E.,  
Barbet, J. Therapy for colon carcinoma xenografts with bi-specific antibody-targeted,  
iodine-131-labeled bivalent haptens. *Cancer suppl.* 1997; 80: 2618-2623.
- Gautherot, E., Bouhou, J., Loucif, E., Manetti, C., Martin, M., LeDoussal, J.M.,  
Rouvier, E., Barbet, J. Radioimmunotherapy of LS174T colon carcinoma in nude mice  
25 using an iodine-131-labeled bivalent haptens combined with an anti-CEA x anti-indium-  
DTPA bi-specific antibody. *J.Nucl. Med. Suppl.* 1997; 38: 7p.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

128

PCT/US02/10235

- Goodwin, D.A., Meares, C.F., McCall, M.J., McTigue, M., Chaovapong, W. Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens. *J.Nucl.Med.* 1988; 29:226-234.
- Greenwood, F.C. and Hunter, W.M. The preparation of I-131 labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem.* 1963; 89:114-123.
- Hawkins, G.A., McCabe, R.P., Kim, C.-H., Subramanian, R., Bredehorst, R., McCullers, G.A., Vogel, C.-W., Hanna, M.G.Jr., and Pomata, N. Delivery of radionuclides to pretargeted monoclonal antibodies using dihydrofolate reductase and methotrexate in an affinity system. *Cancer Res.* 1993; 53: 2368-2373. Infusa, H., Adachi, T., Kiyokawa, T., Nakatani, Y., et al., Ley glycolipid-recognizing monoclonal antibody inhibits procoagulant activity and metastasis of human adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.*, 2001; 19:941-946.
- Koda, K., Glassy, M.C., McKnight, M.E., Yasutomi, J., Saito, N., Dan, M., Nakajima, N. Immunotherapy for recurrent colorectal cancers with human monoclonal antibody SK-1. *Anticancer Res.* 2001; 21:621-627.
- Kranenborg, M.h., Boerman, O.C., Oosterwijk-Wakka, j., weijert, M., Corstens, F., Oosterwijk, E. Development and characterization of anti-renal cell carcinoma x antichelate bi-specific monoclonal antibodies for two-phase targeting of renal cell carcinoma. *Cancer Res. (suppl)* 1995; 55: 5864s-5867s.
- Losman M.J., Qu Z., Krishnan I.S., Wang J., Hansen H.J., Goldenberg D.M., Leung S.O. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5(10 Suppl.):3101s-3105s.
- Maeta, M., Saito, H., Oka, S., Tsujitani, S., Ikeguchi, M., Kaibara, N. Mutated p53 in tumors, mutant p53 and p53-specific antibodies in the circulation in patients with gastric cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2000; 19:489-95.
- Penefsky, H.S. A centrifuged column procedure for the measurement of ligand binding by beef heart F1. Part G. *Methods Enzymol.* 1979; 56:527-530.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

129

- Ritter, G., Cohen, L.S., Williams, C., Jr., Richards, E.C., Old, L.J., Welt S.  
Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res.* 2001; 61:6851-6859.
- 5 Schuhmacher, J., Klivenyi, G., Matys, R., Stadler, M., Regiert, T., Hauser, H., Doll, J., Maier-Borst, W., Zoller, M. Multistep tumor targeting in nude mice using bi-specific antibodies and a gallium chelate suitable for immunocintigraphy with positron emission tomography. *Cancer Res.* 1995; 55, 115-123.
- Schwartzberg, L.S. Clinical experience with edrecolomab: a monoclonal antibody  
10 therapy for colorectal carcinoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2001; 40:17-24.
- Sharkey, R.M., Karacay, Griffiths, G.L., Behr, T.M., Blumenthal, R.D.,  
Mattes, M.J., Hansen, H.J., Goldenberg. Development of a streptavidin-anti-carcinoembryonic antigen antibody, radiolabeled biotin pretargeting method for radioimmunotherapy of colorectal cancer. Studies in a human colon cancer xenograft  
15 model. *Bioconjugate Chem* 1997; 8:595-604.
- Staib, L., Birebent, B., Somasundaram, R., Purev, E., Braumuller, H., et al.  
Immunogenicity of recombinant GA733-2E antigen (CO17-1A, EGP, Dsi-4, KSA, Ep-CAM) in gastro-intestinal carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 2001; 92:79-87.
- Stickney, D.R., Anderson, L.D., Slater, J.B., Ahlem, C.N., Kirk, G.A., Schweighardt,  
20 SA and Frincke, J.M. Bifunctional antibody: a binary radiopharmaceutical delivery system for imaging colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1991; 51: 6650-6655.
- Thorpe et al., U.S. Patents No. 6,342,221; 6,004,554; and patents and references cited therein.
- Todryk, S.M., Turr, A.L., Green, M.H., Smallwood, J.A., Halanek, N., Dalgleish,  
25 A.G., Glennie, M.J. CD40 ligation for immunotherapy of solid tumours. *J. Immunol Methods* 2001; 248:139-147.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

130

Tordsson, J., Lavasani, S., Ohlsson, L., Karlstrom, P., Svedberg, H., Abrahmsen, L., Brodin, T. A3—a novel colon and pancreatic cancer reactive antibody from a primate phage library selected using intact tumour cells. *Int. J. Cancer* 2000; 87:559-568.

- Turner, J.G., Rakhmilevich, A.L. Burdelya, L., Neal, Z., Imboden, M., Sondel, P.M., Yu, H. Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells. *J. Immunol.* 2001; 166:89-94. *Res.* 1991;51: 6650-6655.
- 5

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

131

What is Claimed is:

1. A monoclonal (MAb) antibody or fragment thereof that binds to a colon-specific antigen-p mucin (CSAp) antigen.
2. The monoclonal antibody or fragment thereof of claim 1, wherein said antibody or fragment thereof binds the Mu-9 epitope.
3. The monoclonal antibody or fragment thereof of claim 1, wherein said antibody or fragment thereof is humanized.
4. The monoclonal antibody or fragment thereof of claim 1, wherein said antibody or fragment thereof is a chimeric antibody or fragment thereof.
5. The monoclonal antibody or fragment thereof of claim 2, wherein said antibody or fragment thereof is a chimeric Mu-9 (cMu-9) antibody or fragment thereof.
6. The monoclonal antibody or fragment thereof of claim 2, wherein said antibody or fragment thereof is humanized.
7. The monoclonal antibody or fragment thereof of claim 2, wherein said antibody or fragment thereof is a humanized Mu-9 antibody or fragment thereof.
8. The monoclonal antibody or fragment thereof of claim 2, wherein said antibody or fragment thereof is a human antibody or fragment thereof.
9. The antibody or fragment thereof of claim 3, comprising the complementarity-determining regions (CDRs) of a murine anti-CSAp MAb and the framework (FR) regions of the light and heavy chain variable regions of a human antibody and the light

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

132

PCT/US02/10235

and heavy chain constant regions of a human antibody, wherein the CDRs of the light chain variable region of the humanized anti-CSAp MAb comprises CDR1 comprising an amino acid sequence of RSSQSIVHSNGNTYLE; CDR2 comprising an amino acid sequence of KVSNRFS and CDR3 comprising an amino acid sequence of FQGSRVPYT; and the CDRs of the heavy chain variable region of the humanized anti-CSAp MAb comprises CDR1 comprising an amino acid sequence of EYVIT; CDR2 comprising an amino acid sequence of EIYPGSGSTSYNEKFK and CDR3 comprising an amino acid sequence of EDL.

10. The antibody or fragment thereof of claim 3, wherein the FRs of the light and heavy chain variable regions of said antibody or fragment thereof comprise at least one amino acid substituted from the corresponding FRs of the murine anti-CSAp antibody or fragment thereof.

11. The antibody or fragment thereof of claim 10, wherein said amino acid from said murine MAb is at least one amino acid selected from the group consisting of amino acid residue 5, 27, 30, 38, 40, 48, 66, 67, 74, 93, 94 and 103 of the murine heavy chain variable region of Fig. 10A.

12. The antibody or fragment thereof of claim 10, wherein said murine amino acids are at least one amino acid selected from the group consisting of amino acid residue 37, 58 and 100 of the murine light chain variable region Fig. 10B.

13. The antibody or fragment thereof of claim 2, wherein said antibody or fragment thereof comprises the Mu-9 V<sub>K</sub> nucleotide sequence of figure 4.

14. The antibody or fragment thereof of claim 2, wherein said antibody or fragment thereof comprises the Mu-9 V<sub>H</sub> nucleotide sequence of figure 8.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

133

PCT/US02/10235

15. The antibody or fragment thereof of claim 3 or 6, wherein said antibody or fragment thereof comprises a hMu-9 V<sub>K</sub> nucleotide sequence of figure 11B.
16. The antibody or fragment thereof of claim 3 or 6, wherein said antibody or fragment thereof comprises a hMu-9 V<sub>H</sub> nucleotide sequence of figure 11A.
17. A CDR-grafted humanized heavy chain comprising the complementarity determining regions (CDRs) of a murine anti-CSAp MAb and the framework region of the heavy chain variable region of a human antibody and the heavy chain constant region of a human antibody, wherein the CDRs of the heavy chain variable region of the humanized anti-CSAp MAb comprises CDR1 comprising an amino acid sequence of EYVIT; CDR2 comprising an amino acid sequence of EIYPGSGSTSYNEKFK and CDR3 comprising an amino acid sequence of EDL.
18. The heavy chain of claim 17, wherein said heavy chain variable region comprises a hMu-9 V<sub>H</sub> nucleotide sequence of figure 11A.
19. A CDR-grafted humanized light chain comprising the complementarity determining regions (CDRs) of a murine anti-CSAp MAb and the framework region of the light chain variable region of a human antibody and the light chain constant region of a human antibody, wherein the CDRs of the light chain variable region of the humanized anti-CSAp MAb comprises CDR1 comprising an amino acid sequence of RSSQSIVHSNGNTYLE; CDR2 comprising an amino acid sequence of KVSNRFS and CDR3 comprising an amino acid sequence of FQGSRVPYT.
20. The light chain of claim 19, wherein said light chain variable region comprises a hMu-9 V<sub>H</sub> nucleotide sequence of figure 11B.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

134

21. The anti-CSAp antibodies or fragment thereof of any one of claims 1-20, wherein said fragment is selected from the group consisting of Fv, F(ab')<sub>2</sub>, Fab' and Fab.
22. A diagnostic/detection or therapeutic immunoconjugate comprising an antibody component comprising an anti-CSAp MAb or fragment thereof or an antibody fusion protein or fragment thereof of any one of claims 1-21, wherein said antibody component is bound to at least one diagnostic/detection agent or at least one therapeutic agent.
23. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 22, wherein said diagnostic/detection agent comprises at least one photoactive diagnostic/detection agent.
24. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 23, wherein said photoactive diagnostic agent comprises a chromagen or dye.
25. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 22, wherein said diagnostic/detection agent is a radionuclide with an energy between 20 and 2,000 keV.
26. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 25, wherein said radionuclide is a gamma-, beta- or a positron-emitting isotope.
27. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 26, wherein said radionuclide is selected from the group consisting of F-18, Mn-51, Mn-52m, Fe-52, Co-55, Cu-62, Cu-64, Ga-68, As-72, Br-75, Br-76, Rb-82m, Sr-83, Y-86, Zr-89, Tc-94m, In-110, I-120, I-124, Cr-51, Co-57, Co-58, Fe-59, Cu-67, Ga-67, Se-75, Ru-97, Tc-99m, In-111, In-114m, I-123, I-125, I-131, Yb-169, Hg-197, and Tl-201.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

135

28. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 22, wherein said diagnostic agent is a contrast agent.
29. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 28, wherein said contrast agent is a paramagnetic ion.
30. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 28, wherein said contrast agent is an ultrasound-enhancing agent.
31. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 30, wherein said ultrasound enhancing agent is a liposome that is conjugated to a humanized Mu-9 or fragment thereof.
32. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 31, wherein said liposome is gas filled.
33. A diagnostic/detection immunoconjugate of claim 29, wherein said paramagnetic ion comprises a metal selected from the group consisting of chromium (III), manganese (II), iron (III), iron (II), cobalt (II), nickel (II), copper (II), neodymium (III), samarium (III), ytterbium (III), gadolinium (III), vanadium (II), terbium (III), dysprosium (III), holmium (III) and erbium (III).
34. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 28, wherein said contrast agent is a radiopaque compound.
35. The diagnostic/detection immunoconjugate of claim 234, wherein said radiopaque compound is selected from the group consisting of iodine compounds, barium compounds, gallium compounds and thallium compounds.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

136

PCT/US02/10235

36. The diagnostic/detection immunoconjugate of claims 22-27, wherein said immunoconjugate is used in intraoperative, endoscopic, or intravascular tumor detection/diagnosis.
37. The therapeutic immunoconjugate of claim 22, wherein said therapeutic agent is selected from the group consisting of a radionuclide, boron, gadolinium or uranium atoms, an immunomodulator, a cytokine, a hormone, a hormone antagonist, an enzyme, an enzyme inhibitor, a photoactive therapeutic agent, a cytotoxic drug, a toxin, an angiogenesis inhibitor, a different antibody and a combination thereof.
38. A therapeutic immunoconjugate of claim 37, wherein said cytotoxic agent is a drug or a toxin.
39. A therapeutic immunoconjugate of claim 38, wherein said drug is selected from the group consisting of antimitotic, alkylating, antimetabolite, angiogenesis-inhibiting, apoptotic, alkaloid, COX-2-inhibiting and antibiotic agents and combinations thereof.
40. A therapeutic immunoconjugate of claim 38, wherein said drug is selected from the group consisting of nitrogen mustards, ethylenimine derivatives, alkyl sulfonates, nitrosoureas, triazenes, folic acid analogs, anthracyclines, taxanes, COX-2 inhibitors, pyrimidine analogs, purine analogs, antibiotics, enzymes, epipodophyllotoxins, platinum coordination complexes, vinca alkaloids, substituted ureas, methyl hydrazine derivatives, adrenocortical suppressants, hormone antagonists, enzyme inhibitors, endostatin, taxols, camptothecins, doxorubicins and their analogs, and a combination thereof.
41. A therapeutic immunoconjugate of claim 38, wherein said toxin is selected from the group consisting of plant, microbial, and animal toxins.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

137

PCT/US02/10235

42. A therapeutic immunoconjugate of claim 41, wherein said toxin is selected from the group consisting of ricin, abrin, alpha toxin, saporin, ribonuclease (RNase), DNase I, *Staphylococcal* enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtherin toxin, *Pseudomonas* exotoxin, and *Pseudomonas* endotoxin.

43. A therapeutic immunoconjugate of claim 37, wherein said immunomodulator is selected from the group consisting of a cytokine, a stem cell growth factor, a lymphotoxin, a hematopoietic factor, a colony stimulating factor (CSF), an interferon (IFN), a stem cell growth factor, erythropoietin, thrombopoietin, an antibody and a combination thereof.

44. A therapeutic immunoconjugate of claim 43, wherein said lymphotoxin is tumor necrosis factor (TNF), said hematopoietic factor is an interleukin (IL), said colony stimulating factor is granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) or granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), said interferon is interferons- $\alpha$ , - $\beta$  or - $\gamma$ , and said stem cell growth factor is designated "S1 factor."

45. A therapeutic immunoconjugate of claim 43, wherein said cytokine is selected from the group consisting of IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and a combination thereof.

46. A therapeutic immunoconjugate of claim 37 and 40, wherein said immunomodulator is an antibody that is an agonist or antagonist of an immune factor.

47. A therapeutic immunoconjugate of claim 46, wherein the antibody is against CD40.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

138

PCT/US02/10235

48. The therapeutic immunoconjugate of claim 37, wherein said radionuclide is selected from the group consisting of an Auger emitter, a beta-emitter and an alpha-emitter.
49. A therapeutic immunoconjugate of claim 37, wherein said radionuclide is selected from the group consisting of P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212, and Bi-213, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m, Ir-192, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Fm-255 and combinations thereof.
50. The therapeutic immunoconjugate of claim 37, wherein said Boron atom is B-10.
51. The therapeutic immunoconjugate of claim 37, wherein said Gadolinium atom is Gd-157.
52. The therapeutic immunoconjugate of claim 37, wherein said Uranium atom is U-235.
53. A therapeutic immunoconjugate of claim 48, wherein said radionuclide has an energy between 20 and 10,000 keV.
54. A therapeutic immunoconjugate of claim 48, wherein said radionuclide is an Auger emitter and has an energy of less than 1000 keV.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

139

PCT/US02/10235

55. A therapeutic immunoconjugate of claim 48, wherein said radionuclide is a  $\beta$  emitter and has an energy between 20 and 5000 keV.
56. A therapeutic immunoconjugate of claim 48, wherein said radionuclide is an  $\alpha$  emitter and has an energy between 2000 and 10,000 keV.
57. A therapeutic immunoconjugate of claim 37, wherein said photoactive therapeutic agent is a chromogen or dye.
58. The diagnostic or therapeutic immunoconjugate according to claim 22, wherein said diagnostic or therapeutic agent is bound to said MAb or fragment thereof by means of a carbohydrate moiety.
59. A multivalent, multispecific antibody or fragment thereof comprising one or more antigen binding sites having affinity toward a CSAp target antigen and one or more hapten binding sites having affinity towards hapten molecules.
60. The antibody or fragment thereof of claim 59, wherein said antibody or fragment thereof is humanized.
61. The antibody or fragment thereof of claim 59, wherein said antibody or fragment thereof is a human antibody.
62. The antibody or fragment thereof of claim 59, wherein said antibody or fragment thereof is chimerized.
63. The antibody or fragment thereof of claim 59-62, further comprising a diagnostic or therapeutic agent.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

140

64. An antibody fusion protein or fragment thereof comprising at least two anti-CSAp MABs or fragments thereof, wherein said MABs or fragments thereof are selected from said MAB or fragment thereof of any one of claims 1-63.
65. An antibody fusion protein or fragment thereof comprising at least one first anti-CSAp MAB or fragment thereof of any one of claims 1-63 and at least one second MAB or fragment thereof, other than the MAB or fragment thereof of any one of claims 1-63.
66. The antibody fusion protein or fragment thereof of claim 65, wherein said second MAB or fragment thereof is a CD40 antibody.
67. The antibody fusion protein or fragment thereof of claim 64 or 66, further comprising a diagnostic or therapeutic agent conjugated to said fusion protein or fragment thereof.
68. The antibody fusion protein or fragment thereof of claim 65, wherein said second MAB is a carcinoma-associated antibody.
69. The antibody fusion protein or fragment thereof of claim 68 wherein said carcinoma-associated antibody is selected from the group consisting of CEA, EGP-1, EGP-2, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, KS-1, VEGF, other angiogenesis antibodies, anti-necrosis antibodies, oncogene-product antibodies, and the antibody A33.
70. The antibody fusion protein or fragment thereof of claim 68, wherein said carcinoma-associated antibody binds to an antigen on a cancer selected from the group of gastrointestinal cancers and cancers of the ovary.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

141

71. A method of treating a malignancy in a subject, comprising the step of administering to said subject a therapeutically effective amount of an antibody or fragment according to any of claims 1-21 and 59-62, formulated in a pharmaceutically acceptable vehicle.
72. A method of treating a malignancy in a subject, comprising the step of administering to said subject a therapeutically effective amount of an immunoconjugate or fragment thereof of any one of claims 22, 37-48 and 63, formulated in a pharmaceutically acceptable vehicle.
73. A method of diagnosing/detecting a malignancy in a subject, comprising the step of administering to said subject a diagnostically effective amount of an antibody or fragment thereof according to any of claims 1-21 and 59-62, formulated in a pharmaceutically acceptable vehicle.
74. A method of diagnosing/treating a malignancy in a subject, comprising the step of administering to said subject a diagnostically effective amount of an immunoconjugate or fragment thereof according to any of claims 22-36, and 63, formulated in a pharmaceutically acceptable vehicle.
75. A method of treating or diagnosing/detecting a malignancy in a subject, comprising the step of administering to said subject a therapeutically or diagnostically effective amount of a fusion protein or fragment thereof of any one of claims 64-70, formulated in a pharmaceutically acceptable vehicle.
76. A method of treating or diagnosing/detecting a malignancy in a subject, comprising (i) administering to a subject in need thereof the antibody or fragments thereof of any one of claims 59-63; (ii) waiting a sufficient amount of time for an amount of the non-binding protein to clear the subject's bloodstream; and (iii) administering to said subject a carrier molecule comprising a diagnostic agent, a

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

142

therapeutic agent, or a combination thereof, that binds to a binding site of said antibody.

77. A DNA sequence comprising a nucleic acid encoding a anti-CSAp MAb or fragment thereof selected from the group consisting

- (a) an anti-CSAp MAb or fragment thereof of any one of claims 1-63;
- (b) an antibody fusion protein or fragment thereof comprising at least two of said MAbs or fragments thereof;
- (c) an antibody fusion protein or fragment thereof comprising at least one first anti-CSAp MAb or fragment thereof comprising said MAb or fragment thereof of any one of claims 1-63 and at least one second MAb or fragment thereof, other than the MAb or fragment thereof of any one of claims 1-63; and
- (d) an antibody fusion protein or fragment thereof comprising at least one first MAb or fragment thereof comprising said MAb or fragment thereof of any one of claims 1-63 and at least one second MAb or fragment thereof, other than the MAb or fragment thereof of any one of claims 1-63 wherein said second MAb is selected from the group consisting of CEA, EGP-1, EGP-2, MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, KS-1, CD40, VEGF antibody, and the antibody A33, and a combination thereof.

78. An expression vector comprising the DNA sequence of claim 77.

79. A host cell comprising the DNA sequence of claim 77.

80. A method of delivering a diagnostic/detection or therapeutic agent, or a combination thereof, to a target comprising (i) providing a composition that comprises

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

143

the immunoconjugate of claim 17 and (ii) administering to a subject in need thereof said composition.

81. The method of delivering of claim 80, wherein said diagnostic/detection agent comprises at least photoactive diagnostic agent.

82. The method of delivering of claim 81, wherein said photoactive diagnostic agent comprises a chromagen or dye.

83. The method of delivering of claim 80, wherein said diagnostic agent is a radionuclide with an energy between 20 and 2,000 keV.

84. The method of delivering of claim 83, wherein said radionuclide is a gamma-, beta- or a positron-emitting isotope.

85. The method of delivering of claim 83, wherein said radionuclide is selected from the group consisting of F-18, Mn-51, Mn-52m, Fe-52, Co-55, Cu-62, Cu-64, Ga-68, As-72, Br-75, Br-76, Rb-82m, Sr-83, Y-86, Zr-89, Tc-94m, In-110, I-120, I-124, Cr-51, Co-57, Co-58, Fe-59, Cu-67, Ga-67, Se-75, Ru-97, Tc-99m, In-111, In-114m, I-123, I-125, I-131, Yb-169, Hg-197, and Tl-201.

86. The method of delivering of claim 80, wherein said diagnostic agent is a contrast agent.

87. The method of delivering of claim 86, wherein said contrast agent is a paramagnetic ion.

88. The method of delivering of claim 86, wherein said contrast agent is an ultrasound enhancing agent.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

144

PCT/US02/10235

89. The method of delivering of claim 86, wherein said contrast agent is a radiopaque compound used in X-rays or computed tomography.
90. The method of claim 89, wherein said radiopaque compound is selected from the group consisting of iodine compounds, barium compounds, gallium compounds and thallium compounds.
91. The method of claim 789, wherein said radiopaque compound is selected from the group consisting of barium, diatrizoate, ethiodized oil, gallium citrate, iocarmic acid, iocetamic acid, iodamide, iodipamide, iodoxamic acid, iogulamide, iohexol, iopamidol, iopanoic acid, ioprocemic acid, iosefamic acid, ioseric acid, iosulamide meglumine, iosemctic acid, iotasul, iotetric acid, iothalamic acid, iotroxic acid, ioxaglic acid, ioxotrizoic acid, ipodate, meglumine, metrizamide, metrizoate, propyliodone, and thallos chloride.
92. The method of delivering of claim 88, wherein said ultrasound enhancing agent is a liposome that comprises a humanized Mu-9 or fragment thereof.
93. The method of delivering of claim 92, wherein said liposome is gas-filled.
94. The method of delivering of claim 87, wherein said paramagnetic ion is a metal comprising manganese, iron or gadolinium.
95. The method of delivering of claim 80, wherein said therapeutic agent is selected from the group consisting of a radionuclide, an immunomodulator, a hormone, a hormone antagonist, an enzyme, an enzyme inhibitor, a photoactive therapeutic agent, a cytotoxic agent, and a combination thereof.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

145

96. The method of delivering of claim 95, wherein said cytotoxic agent is a drug or a toxin.
97. The method of delivering of claim 96, wherein said drug is selected from the group consisting of antimitotic, alkylating, antimetabolite, antiangiogenic, apoptotic, anthracyclines, alkaloid, COX-2-inhibitor and antibiotic agents, and combinations thereof.
98. The method of delivering of claim 96, wherein said drug is selected from the group consisting of nitrogen mustards, ethylenimine derivatives, alkyl sulfonates, nitrosoureas, triazenes, folic acid analogs, anthracyclines, taxanes, COX-2 inhibitors, pyrimidine analogs, purine analogs, antibiotics, enzymes, enzyme inhibitors, epipodophyllotoxins, platinum coordination complexes, vinca alkaloids, substituted ureas, methyl hydrazine derivatives, adrenocortical suppressants, hormones, hormone antagonists, endostatin, taxols, camptothecins, doxorubicins and their analogs, and a combination thereof.
99. The method of claim 96, wherein said toxin is selected from the group consisting of plant, microbial and animal toxin.
100. The method of delivering of claim 96, wherein said toxin is selected from the group consisting of ricin, abrin, alpha toxin, saporin, ribonuclease (RNase), DNase I, *Staphylococcal* enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtherin toxin, *Pseudomonas* exotoxin, and *Pseudomonas* endotoxin.
101. The method of delivering of claim 95, wherein said immunomodulator is selected from the group consisting of a cytokine, a stem cell growth factor, a lymphotoxin, a hematopoietic factor, a colony stimulating factor (CSF), an interferon (IFN), a stem cell growth factor, erythropoietin, thrombopoietin, an antibody, and a combination thereof.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

146

102. The antibody of claim 101, wherein said antibody is an anti-CD40 antibody or fragment thereof.

103. The method of delivering of claim 101, wherein said lymphotoxin is tumor necrosis factor (TNF), said hematopoietic factor is an interleukin (IL), said colony stimulating factor is granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) or granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), said interferon is interferons- $\alpha$ , - $\beta$  or - $\gamma$ , and said stem cell growth factor is designated "S1 factor."

104. The method of delivering of claim 101, wherein said cytokine is selected from the group consisting of IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and a combination thereof.

105. The method of delivering of claim 95, wherein said radionuclide is selected from the group consisting of an Auger emitter, a  $\beta$  emitter and an  $\alpha$  emitter.

106. The method of delivering of claim 95, wherein said radionuclide is selected from the group consisting of P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212, and Bi-213, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m, Ir-192, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Fm-255 and combinations thereof.

107. The method of delivering of claim 105, wherein said radionuclide has an energy between 20 and 10,000 keV.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

147

108. The method of delivering of claim 105, wherein said radionuclide is an Auger emitter and has an energy of less than 1000 keV.

109. The method of delivering of claim 105, wherein said radionuclide is a  $\beta$  emitter and has an energy between 20 and 5000 keV.

110. The method of delivering of claim 105, wherein said radionuclide is an  $\alpha$  emitter and has an energy between 2000 and 10,000 keV.

111. The method of delivering of claim 95, wherein said photoactive therapeutic agent is a chromogen or dye.

112. A method of delivering a diagnostic/detection agent, a therapeutic agent, or a combination thereof to a target, comprising: (i) administering to a subject the antibody or fragments thereof of any one of claims 59-63; (ii) waiting a sufficient amount of time for an amount of the non-binding protein to clear the subject's blood stream; and (iii) administering to said subject a carrier molecule comprising a diagnostic/detection agent, a therapeutic agent, or a combination thereof, that binds to a binding site of said antibody.

113. The method of claim 112, wherein said carrier molecule binds to more than one binding site of the binding protein.

114. The method of claim 112, wherein said diagnostic/detection agent or said therapeutic agent is selected from the group comprising isotopes, dyes, chromagens, contrast agents, drugs, toxins, cytokines, enzymes, enzyme inhibitors, hormones, hormone antagonists, growth factors, radionuclides, and metals.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

148

115. A method of treating a malignancy in a subject comprising administering to said subject a therapeutically effective amount of an antibody or fragment thereof or an antibody fusion protein or fragment thereof comprising at least two MAbs or fragments thereof, wherein at least one anti-CSAp MAb or fragment thereof or fusion proteins or fragments thereof are any one of claims 1-70 formulated in a pharmaceutically suitable excipient.

116. A method of treating a malignancy in a subject comprising administering to said subject a therapeutically effective amount of an antibody or fragment thereof comprising at least two MAbs or fragments thereof, wherein said MAbs are selected from any one of claims 1-70, and formulated in a pharmaceutically suitable excipient.

117. The method of claim 115, further comprising a second Mab or fragment thereof not in any one of claims 1-70.

118. The method of claim 117, wherein said second Mab or fragment thereof is a naked Mab or fragment thereof.

119. The method of claim 117, wherein said second MAb or fragment thereof is selected from the group consisting of antibodies against BrE3, Le-Y, EGP-1, EGP-2, MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, A3, KS-1, CEA, VEGF, oncogene products, the antibody A33, and an antibody to CD40 or another immunomodulator.

120. The method of claim 119, wherein said second MAb is immunoconjugated to a therapeutic or diagnostic/detection agent.

121. The method of claim 115, wherein said anti-CSAp antibody is administered parenterally.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

149

PCT/US02/10235

122. The method of claim 121, wherein said anti-CSAp antibody is administered in a dosage of 20 to 2000 milligrams protein per dose.

123. The method of claim 121, wherein said dosage is repeatedly administered.

124. The method of claim 115, wherein said anti-CSAp antibody is selected from the group consisting of a subhuman primate anti-CSAp antibody, murine monoclonal anti-CSAp antibody, chimeric anti-CSAp antibody, human anti-CSAp antibody, and humanized anti-CSAp antibody.

125. The method of claim 124, wherein said chimeric, human and humanized anti-CSAp antibody constant and hinge regions comprise constant and hinge regions of a human IgG1.

126. The method of claim 115, wherein said anti-CSAp antibody or fragment thereof is administered before, in conjunction with, or after a second conjugated antibody reactive with a second tumor marker expressed by said malignancy is administered to said subject.

127. The method of claim 115, wherein a first binding site of the anti-CSAp antibody or fragment thereof is present in a multivalent, multispecific fusion protein or chemical conjugate and a second binding site is reactive with a tumor marker substance other than CSAp.

128. The method of claim 115, wherein said anti-CSAp antibody or fragment thereof is administered before, concurrently, or after at least one therapeutic or diagnostic/detection agent.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

150

129. The method of claim 128, wherein said therapeutic or diagnostic/detection agent is conjugated to an antibody that targets a tumor marker that is expressed by said malignancy.

130. A method of diagnosing or detecting a malignancy in a subject comprising administering to said subject a diagnostically effective amount of a diagnostic/detecting conjugate comprising an anti-CSAp MAb or fragment thereof or a fusion protein or fragment thereof of any one of claims 1-70, wherein said anti-CSAp MAb or fragment thereof or fusion protein or fragment thereof is bound to at least one diagnostic/detection agent, formulated in a pharmaceutically suitable excipient.

131. A method of treating a cancer cell in a subject comprising (i) administering to said subject a therapeutically effective amount of a composition comprising a naked anti-CSAp MAb or fragment thereof or a naked antibody fusion protein or fragment thereof of any one of claims 1-70, (ii) formulating said naked CSAp MAb or fragment thereof or antibody fusion protein or fragment thereof in a pharmaceutically suitable excipient.

132. The method of claim 131, wherein said composition further comprises a second naked antibody or fragment thereof not in any one of claims 1-22, 59-62 and 64-70.

133. The method of claim 131, wherein said composition further comprises a second naked antibody or fragment thereof of any one of claims 1-22, 59-62 and 64-70.

134. The method of claim 131, wherein said composition further comprises a second antibody or fragment thereof not in any one of claims 1-70.

135. The method of claim 132, wherein said second antibody or fragment thereof is selected from the group consisting of antibodies to CEA, EGP-1, EGP-2, MUC-1,

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

151

MUC-2, MUC-3, MUC-4, PAM-4, KC4, TAG-72, EGFR, HER2/neu, BrE3, Le-Y, A3, KS-1, CD40, VEGF and other angiogenesis factors, oncogene products, and the antibody A33.

136. The method of claim 131, wherein said naked anti-CSAp antibody is administered parenterally.

137. The method of claim 136, wherein said naked anti-CSAp antibody is administered in a dosage of 20 to 2000 milligrams protein per dose.

138. The method of claim 137, wherein said dosage is repeatedly administered.

139. The method of claim 131, wherein said naked anti-CSAp antibody is selected from the group consisting of subhuman primate anti-CSAp antibody, murine monoclonal anti-CSAp antibody, chimeric anti-CSAp antibody, human anti-CSAp antibody, and humanized anti-CSAp antibody.

140. The method of claim 139, wherein said chimeric, human and humanized naked anti-CSAp antibody constant and hinge regions comprise constant and hinge regions of a human IgG1.

141. The method of claim 131, wherein said naked anti-CSAp antibody is administered before, in conjunction with, or after a second naked antibody reactive with a second tumor marker expressed by said malignancy is administered to said subject.

142. The method of claim 131, wherein said naked anti-CSAp antibody is administered before, concurrently or after a therapeutic or diagnostic/detection agent.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

152

143. The method of any of claims 131-142 wherein said naked anti-CSAp antibody is a naked Mu-9 antibody.

144. A method of diagnosing or detecting a malignancy in a subject comprising (i) performing an in vitro diagnosis assay on a specimen from said subject with a composition comprising a naked anti-CSAp MAb or fragment thereof or a naked antibody fusion protein or fragment thereof of any one of claims 1-70.

145. The method of claim 144, wherein said malignancy is a carcinoma.

146. The method of claim 145, wherein said carcinoma is a gastrointestinal cancer.

147. The method of claim 146, wherein said carcinoma is colorectal or pancreatic cancer.

148. The method of claim 145, wherein said carcinoma is ovarian cancer.

149. The method of claim 144, wherein said in vitro diagnosis assay is selected from the group consisting of immunoassays, RT-PCR and immunohistochemistry.

150. The method of claim 149, wherein said diagnosis assay is RT-PCR or immunoassays.

151. The method of claim 150, wherein said specimen is body fluid or a tissue or cell population.

152. The method of claim 149, wherein said diagnostic assay is immunohistochemistry or immunocytochemistry.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

153

153. The method of claim 152, wherein said specimen is a cell aliquot or a tissue.
154. The method of any one of claims 71-76 and 80-153 wherein said subject is a mammal.
155. The method of 154, wherein said subject is a human.
156. The method of 154, wherein said subject is a domestic pet.
157. The method of 154, wherein said subject is selected from the group consisting of a horse, dog, and cat.
158. A method of treating or identifying diseased tissues in a subject, comprising:
- (a) administering to said subject a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein said one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody;
  - (b) optionally, administering to said subject a clearing composition, and allowing said composition to clear non-localized antibodies or antibody fragments from circulation;
  - (c) administering to said subject a first targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognizable by said at least one other arm of said bi-specific antibody or antibody fragment, and one or more conjugated therapeutic or diagnostic agents; and
  - (d) when said therapeutic agent is an enzyme, further administering to said subject

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

154

- (1) a prodrug, when said enzyme is capable of converting said prodrug to a drug at the target site; or
- (2) a drug which is capable of being detoxified in said subject to form an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or
- (3) a prodrug which is activated in said subject through natural processes and is subject to detoxification by conversion to an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or
- (4) a second targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognizable by said at least one other arm of said bi-specific antibody or antibody fragment, and a prodrug, when said enzyme is capable of converting said prodrug to a drug at the target site.

159. The method of claim 158, wherein said targetable conjugate comprises at least two HSG haptens.

160. The method of claim 158, further comprising, when said first targetable conjugate comprises a prodrug, administering a second targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognizable by said at least one other arm of said bi-specific antibody or antibody fragment, and an enzyme capable of converting said prodrug to a drug or of reconvertng a detoxified intermediate of said drug to a toxic form.

161. The method of claim 158, wherein said diagnostic/detection agent is a radionuclide.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

155

162. The method of claim 158, wherein said diagnostic/detection agent is a radionuclide with an energy between 20 and 2,000 keV.
163. The method of claim 161, wherein said diagnostic/detection agent emits 25-600 keV gamma particles and/or positrons.
164. The method of claim 158, wherein said diagnostic/detection agent comprises at least one photoactive diagnostic agent.
165. The method of claim 164, wherein said photoactive diagnostic/detection agent comprises a chromagen or dye.
166. The method of claim 158, wherein said diagnostic/detection agent is a radiopaque compound.
167. The method of claim 161, wherein said radionuclide is a gamma-, beta- or a positron-emitting isotope.
168. The method of claim 167, wherein said radionuclide is selected from the group consisting of F-18, Mn-51, Mn-52m, Fe-52, Co-55, Cu-62, Cu-64, Ga-68, As-72, Br-75, Br-76, Rb-82m, Sr-83, Y-86, Zr-89, Tc-94m, In-110, I-120, I-124, Cr-51, Co-57, Co-58, Fe-59, Cu-67, Ga-67, Se-75, Ru-97, Tc-99m, In-111, In-114m, I-123, I-125, I-131, Yb-169, Hg-197, and Tl-201.
169. The method of claim 158, wherein said diagnostic/detection agent is a contrast agent.
170. The method of claim 169, wherein said contrast agent is a paramagnetic ion.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

156

171. The method of claim 166, wherein said radiopaque compound is selected from the group consisting of iodine compounds, barium compounds, gallium compounds and thallium compounds.

172. The method of claim 171, wherein said radiopaque compound is selected from the group consisting of barium, diatrizoate, ethiodized oil, gallium citrate, iocarmic acid, iocetamic acid, iodamide, iodipamide, iodoxamic acid, iogulamide, iohexol, iopamidol, iopanoic acid, ioprocemic acid, iosefamic acid, ioseric acid, iosulamide meglumine, iosemetic acid, iotasul, iotetric acid, iothalamic acid, iotroxic acid, ioxaglic acid, ioxotrizoic acid, ipodate, meglumine, metrizamide, metrizoate, propylidone, and thallos chloride.

173. The method of claim 169, wherein said contrast agent is an ultrasound enhancing agent.

174. The method of claim 173, wherein said ultrasound enhancing agent is a liposome that is conjugated humanized, chimerized, or fully human Mu-9 antibody or fragment thereof.

175. The method of claim 174, wherein said liposome is gas filled.

176. A method of claim 170, wherein said paramagnetic ion comprises a metal selected from the group consisting of manganese, iron and gadolinium.

177. The method of claim 158, wherein said therapeutic agent is selected from the group consisting of a radionuclide, boron, gadolinium or uranium atoms, an immunomodulator, a hormone, a hormone antagonist, an enzyme, and enzyme inhibitor, a photoactive therapeutic agent, a cytotoxic agent, an angiogenesis inhibitor, and a combination thereof.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

157

178. The method of claim 177, wherein said cytotoxic agent is a drug, prodrug or a toxin.

179. The method of claim 178, wherein said prodrug is selected from the group consisting of epirubicin glucuronide, CPT-11, etoposide glucuronide, daunomicin glucuronide and doxorubicin glucuronide.

180. The method of claim 178, wherein said toxin is selected from the group consisting of a plant toxin, an animal toxin and a microbial toxin.

181. The method of claim 178, wherein said toxin is selected from the group consisting of ricin, abrin, ribonuclease (RNase), DNase I, *Staphylococcal* enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtherin toxin, *Pseudomonas* exotoxin, and *Pseudomonas* endotoxin.

182. The method of claim 178, wherein said drug is selected from the group consisting of antimetabolic, alkylating, antimetabolite, angiogenesis-inhibiting, apoptotic, alkaloid, COX-2-inhibiting and antibiotic agents and combinations thereof.

183. The method of claim 178, wherein said drug is selected from the group consisting of nitrogen mustards, ethylenimine derivatives, alkyl sulfonates, nitrosoureas, triazines, folic acid analogs, anthracyclines, taxanes, COX-2 inhibitors, pyrimidine analogs, purine analogs, antibiotics, enzymes, epipodophyllotoxins, platinum coordination complexes, vinca alkaloids, substituted ureas, methyl hydrazine derivatives, adrenocortical suppressants, hormones, hormone antagonists, endostatin, taxols, camptothecins, doxorubicin and their analogs, and a combination thereof.

184. The method of claim 177, wherein said immunomodulator is selected from the group consisting of a cytokine, a stem cell growth factor, a lymphotoxin, a

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

158

hematopoietic factor, a colony stimulating factor (CSF), an interferon (IFN), a stem cell growth factor, erythropoietin, thrombopoietin, an antibody agonist or antagonist to an immunomodulator, and a combination thereof.

185. The method of claim 184, wherein said lymphotoxin is tumor necrosis factor (TNF), said hematopoietic factor is an interleukin (IL), said colony stimulating factor is granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) or granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), said interferon is interferons- $\alpha$ , - $\beta$  or - $\gamma$ , and said stem cell growth factor is designated "S1 factor."

186. The method of claim 184, wherein said cytokine is selected from the group consisting of IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and a combination thereof.

187. The method of claim 177, wherein said radionuclide is selected from the group consisting of an Auger emitter, a  $\beta$  emitter and an  $\alpha$  emitter.

188. The method of claim 177, wherein said radionuclide is selected from the group consisting of P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212, and Bi-213, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m, Ir-192, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Fm-255 and combinations thereof.

189. The method of claim 177, wherein said Boron atom is B-10.

190. The method of claim 177, wherein said Gadolinium atom is Gd-157.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

159

PCT/US02/10235

191. The method of claim 177, wherein said Uranium atom is U-235.
192. The method of claim 187, wherein said radionuclide has an energy between 20 and 10,000 keV.
193. The method of claim 187, wherein said radionuclide is an Auger emitter and has an energy of less than 1000 keV.
194. The method of claim 187, wherein said radionuclide is a  $\beta$  emitter and has an energy between 20 and 5000 keV.
195. The method of claim 187, wherein said radionuclide is an  $\alpha$  emitter and has an energy between 2000 and 10,000 keV.
196. The method of claim 158, wherein said targetable conjugate comprises one or more radioactive isotopes useful for killing diseased tissue.
197. The method of claim 189, wherein said targetable conjugate comprises  $^{10}\text{B}$  atoms, and said method further comprises the step of irradiating said boron atoms localized at said diseased tissue, thereby effecting BNCT of said diseased tissue.
198. The method of claim 158, wherein the targetable conjugate comprises one or more agents for photodynamic therapy.
199. The method of claim 198, wherein said agent for photodynamic therapy is a photosensitizer.
200. The method of claim 199, wherein said photosensitizer is selected from the group consisting of benzoporphyrin monoacid ring A (BPD-MA), tin etiopurpurin

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

160

(SnET2), sulfonated aluminum phthalocyanine (AlSPc) and lutetium texaphyrin (Lutex).

201. The method of claim 158, wherein said at least one arm that specifically binds a targeted tissue is a human, chimeric or humanized Mu-9 antibody or a fragment of a human, chimeric or humanized Mu-9 antibody.

202. The method of claim 158, wherein said at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate is a human, chimeric or humanized Mu-9 antibody or a fragment of a human, chimeric or humanized Mu-9 antibody.

203. The method of claim 158, wherein said targeted tissue is a tumor.

204. The method of claim 203, wherein said tumor produces or is associated with colon-specific antigen-p (CSAp)

205. The method of claim 158, wherein said Mu-9 antibody or fragment thereof comprises the Fv of MAb Mu-9.

206. The method of claim 158, wherein said bispecific antibody is a fusion protein.

207. The method of claim 206, wherein the fusion protein is trivalent, and incorporates the Fv of an antibody reactive with CSAp.

208. A method for detecting or treating tumors expressing CSAp in a mammal, comprising:

(a) administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

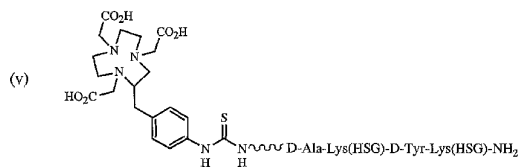
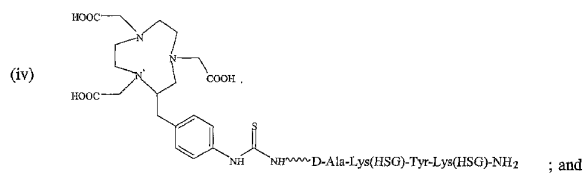
PCT/US02/10235

161

least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein said one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof; and

(b) administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



209. A method of claim 208, further comprising administering to said subject a clearing composition, and allowing said composition to clear non-localized antibodies or antibody fragments from circulation.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

210. A kit useful for treating or identifying diseased tissues in a subject comprising:

(a) a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein said one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof;

(b) a first targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognizable by said at least one other arm of said bi-specific antibody or antibody fragment, and one or more conjugated therapeutic or diagnostic agents; and

(c) optionally, a clearing composition useful for clearing non-localized antibodies and antibody fragments; and

(d) optionally, when said therapeutic agent conjugated to said first targetable conjugate is an enzyme,

(1) a prodrug, when said enzyme is capable of converting said prodrug to a drug at the target site; or

(2) a drug which is capable of being detoxified in said subject to form an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or

(3) a prodrug which is activated in said subject through natural processes and is subject to detoxification by conversion to an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or

(4) a second targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognizable by said at least one other

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

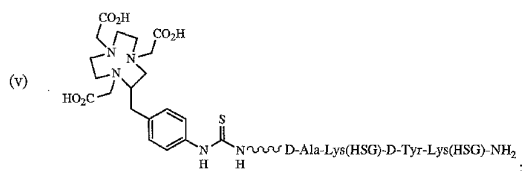
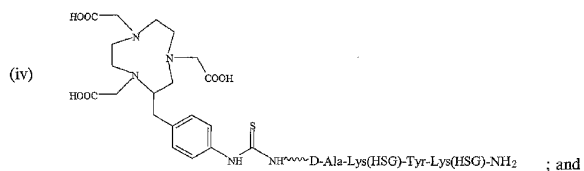
163

PCT/US02/10235

arm of said bi-specific antibody or antibody fragment, and a prodrug, when said enzyme is capable of converting said prodrug to a drug at the target site.

211. The kit of claim 210, wherein said targetable conjugate is selected from the group consisting of:

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



212. A method of screening for a targetable conjugate comprising:

- (a) contacting said targetable construct with a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

164

PCT/US02/10235

at least one other arm that specifically binds said targetable conjugate to give a mixture, wherein said one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof; and

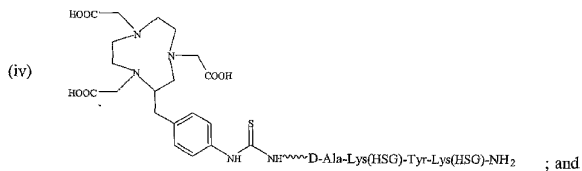
- (b) optionally incubating said mixture; and
- (c) analyzing said mixture.

213. A method for imaging malignant tissue or cells in a mammal expressing CSAp, comprising:

(a) administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein said one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof; and

(b) administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

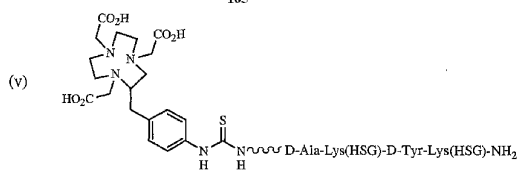


**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

165

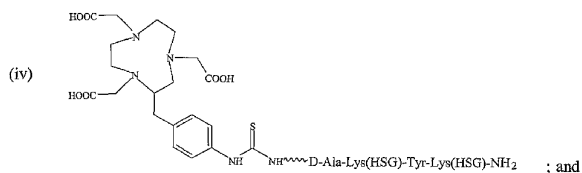


214. A method of intraoperatively identifying/disclosing diseased tissues expressing CSAp, in a subject, comprising:

(a) administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue expressing CSAp and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein said one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof; and

(b) administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

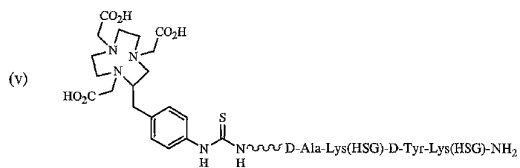


**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

166

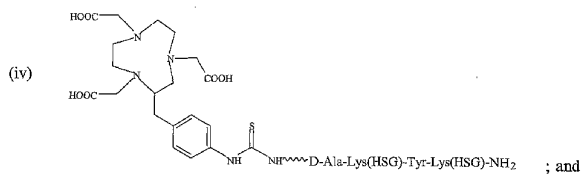


215. A method for the endoscopic identification of diseased tissues expressing CSAP, in a subject, comprising:

(a) administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue expressing CSAP and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate wherein said one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof; and

(b) administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

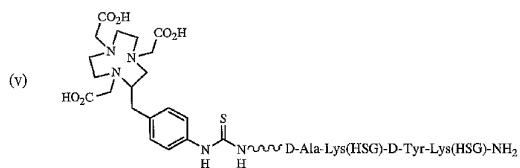


**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

167

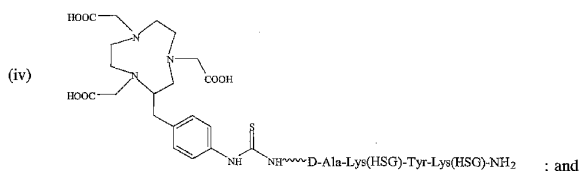


216. A method for the intravascular identification of diseased tissues expressing CSAP, in a subject, comprising:

(a) administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue expressing CSAP and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate wherein said one arm that specifically binds a targeted tissue is a Mu-9 antibody or fragment thereof; and

(b) administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

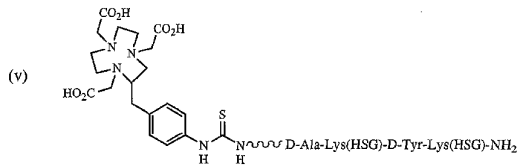


**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

168

PCT/US02/10235



217. A method of detection of lesions during an endoscopic, laparoscopic, intravascular catheter, or surgical procedure, wherein the method comprises:

- (a) injecting a subject who is to undergo such a procedure with a bispecific antibody F(ab)<sub>2</sub> or F(ab')<sub>2</sub> fragment, wherein the bispecific antibody or fragment has a first antibody binding site which specifically binds to a CSAP antigen, and has a second antibody binding site which specifically binds to a hapten, and permitting the antibody fragment to accrete at target sites;
- (b) optionally clearing non-targeted antibody fragments using a galactosylated anti-idiotypic clearing agent if the bispecific fragment is not largely cleared from circulation within about 24 hours of injection, and injecting a bivalent labeled hapten, which quickly localizes at the target site and clears through the kidneys;
- (c) detecting the presence of the hapten by close-range detection of elevated levels of accreted label at the target sites with detection means, within 48 hours of the first injection, and conducting said procedure, wherein said detection is performed without the use of a contrast agent or subtraction agent.

218. The method of claim 217, wherein said hapten is labeled with a diagnostic radioisotope, a MRI image-enhancing agent or a fluorescent label.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

169

PCT/US02/10235

219. A method for close-range lesion detection, during an operative, intravascular, laparoscopic, or endoscopic procedure, wherein the method comprises:

- (a) injecting a subject to such a procedure parenterally with an effective amount of a Mu-9 immunoconjugate or fragment thereof,
- (b) conducting the procedure within 48 hours of the injection;
- (c) scanning the accessed interior of the subject at close range with a detection means for detecting the presence of said labeled antibody or fragment thereof; and
- (d) locating the sites of accretion of said labeled antibody or fragment thereof by detecting elevated levels of said labeled antibody or fragment thereof at such sites with the detection means.

220. The method of claim 219, wherein said Mu-9 immunoconjugate or fragment thereof comprises a radioisotope that emits at an energy of 20-1,000 keV.

221. The method of claim 220, wherein the radioisotope is selected from the group consisting of technetium-99m, iodine-125, iodine-131, iodine-123, indium-111, fluorine-18, gallium 68 and gallium-67.

222. The method of claim 219, wherein Mu-9 immunoconjugate or fragment thereof comprises a non-isotopic agent.

223. The method of claim 222, wherein said non-isotopic agent is a photoactive agent.

224. The method of claim 222, wherein said photoactive agent is a fluorescent agent.

IMM 160 originals

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

170

225. A method of treating or identifying diseased tissues in a subject, comprising:

(a) administering to said subject a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate comprising at least two HSG haptens;

(b) optionally, administering to said subject a clearing composition, and allowing said composition to clear non-localized antibodies or antibody fragments from circulation;

(c) administering to said subject a targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least two HSG haptens and may comprise a diagnostic or therapeutic cation, and/or one or more chelated or chemically bound therapeutic or diagnostic agents, or enzymes; and

(d) when said targetable conjugate comprises an enzyme, further administering to said subject

(1) a prodrug, when said enzyme is capable of converting said prodrug to a drug at the target site; or

(2) a drug which is capable of being detoxified in said subject to form an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or

(3) a prodrug which is activated in said subject through natural processes and is subject to detoxification by conversion to an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site.

226. The method of claim 225, wherein said diagnostic agent emits 25-600 keV gamma particles and/or positrons.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

171

227. The method of claim 225, wherein said therapeutic agent is a drug, prodrug or toxin.

228. The method of claim 227, wherein said prodrug is selected from the group consisting of epirubicin glucuronide, CPT-11, etoposide glucuronide, daunomicin glucuronide and doxorubicin glucuronide.

229. The method of claim 227, wherein said toxin is selected from the group consisting of ricin, abrin, ribonuclease, DNase I, *Staphylococcal* enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtherin toxin, *Pseudomonas* exotoxin, and *Pseudomonas* endotoxin.

230. The method of claim 225 further comprising a therapeutic nuclide.

231. The method of claim 230, wherein said therapeutic nuclide is selected from the group consisting of  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{189}\text{Re}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{223}\text{Ra}$  and  $^{225}\text{Ac}$ .

232. The method of claim 226, wherein said diagnostic agent is selected from the group consisting of  $^{18}\text{F}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{94m}\text{Tc}$ ,  $^{94}\text{Tc}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ , and  $^{131}\text{I}$ .

233. The method of claim 225, wherein said targetable conjugate comprises one or more radioactive isotopes useful for killing diseased tissue.

234. The method of claim 225, wherein said targetable conjugate comprises  $^{10}\text{B}$  atoms, and said method further comprises the step of irradiating said boron atoms localized at said diseased tissue, thereby effecting BNCT of said diseased tissue.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

172

235. The method of claim 225, wherein said targetable conjugate comprises one or more toxins.

236. The method of claim 235, wherein said toxin is selected from the group consisting of selected from the group consisting of ricin, abrin, ribonuclease, DNase I, *Staphylococcal* enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtherin toxin, *Pseudomonas* exotoxin, and *Pseudomonas* endotoxin.

237. The method of claim 225, wherein said targetable conjugate comprises one or more drugs.

238. The method of claim 225, wherein said targetable conjugate comprises one or more prodrugs.

239. The method of claim 238, wherein said prodrug is selected from the group consisting of epirubicin glucuronide, CPT-11, etoposide glucuronide, daunomicin glucuronide and doxorubicin glucuronide.

240. The method of claim 225, wherein said targetable conjugate comprises one or more diagnostic agents useful for detecting diseased tissue.

241. The method of claim 240, wherein the diagnostic agent is selected from the group consisting of  $^{118}\text{F}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{94}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ , and  $^{131}\text{I}$ .

242. The method of claim 240, wherein said radioactive isotope is used to perform positron-emission tomography (PET).

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

173

243. The method of claim 225, wherein said targetable conjugate comprises one or more image enhancing agents for use in magnetic resonance imaging (MRI).
244. The method of claim 243, wherein said enhancing agent is selected from the group consisting of Mn, Fe and Gd.
245. The method of claim 225, wherein the targetable conjugate comprises one or more agents for photodynamic therapy.
246. The method of claim 245, wherein said agent for photodynamic therapy is a photosensitizer.
247. The method of claim 246, wherein said photosensitizer is selected from the group consisting of benzoporphyrin monoacid ring A (BPD-MA), tin etiopurpurin (SnET2), sulfonated aluminum phthalocyanine (AlSPc) and lutetium texaphyrin (Lutex).
248. The method of claim 225, wherein said at least one arm that specifically binds a targeted tissue is a monoclonal antibody or a fragment of a monoclonal antibody.
249. The method of claim 225, wherein said at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate is a monoclonal antibody or a fragment of a monoclonal antibody.
250. The method of claim 225, wherein said at least one arm that specifically binds a targeted tissue is a human, chimeric or humanized antibody or a fragment of a human, chimeric or humanized antibody.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

174

251. The method of claim 225, wherein said at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate is a human, chimeric or humanized antibody or a fragment of a human, chimeric or humanized antibody.
252. The method of claim 225, wherein said bi-specific antibody or antibody fragment further comprises a therapeutic nuclide.
253. The method of claim 252, wherein said therapeutic radionuclide is selected from the group consisting of  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{189}\text{Re}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{At}$ ,  $^{223}\text{Ra}$  and  $^{225}\text{Ac}$ .
254. The method of claim 225, wherein said targetable conjugate comprises doxorubicin, SN-38, etoposide, methotrexate, 6-mercaptopurine or etoposide phosphate.
255. The method of claim 225, wherein said targeted tissue is a tumor.
256. The method of claim 255, wherein said tumor produces or is associated with colon-specific antigen-p (CSAp)
257. The method of claim 256, wherein the bispecific antibody comprises the Fv of MAb Mu9 and the Fv of MAb 679.
258. The method of claim 257, wherein Mu9 and/or 679 are chimerized or humanized.
259. The of claim 257, wherein Mu9 and/or 679 are human Mu9 and 679.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

175

260. The method of claim 257, wherein the bispecific antibody comprises one or more of the CDRs of Mu9.
261. The method of claim 257, wherein the bispecific antibody comprises one or more of the CDRs of 679.
262. The method of claim 255, wherein the bispecific antibody is a fusion protein.
263. The method of claim 255, wherein the tumor produces carcinoembryonic antigen (CEA).
264. The method of claim 263, wherein the bispecific antibody comprises the Fv of MAb MN14 and the Fv of MAb 679.
265. The method of claim 264, wherein MN14, and/or 679 are chimerized or humanized.
266. The method of claim 264, wherein MN14, and/or 679 are human MN14 and 679.
267. The method of claim 264, wherein the bispecific antibody comprises one or more of the CDRs of MN14.
268. The method of claim 264, wherein the bispecific antibody comprises one or more of the CDRs of 679.
269. The method of claim 264, wherein the bispecific antibody is a fusion protein.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

176

270. The method of claim 269, wherein the fusion protein is trivalent, and incorporates the Fv of an antibody reactive with CSAp.

271. The method of claim 263, wherein the bispecific antibody incorporates a Class III anti-CEA antibody and the Fv of 679.

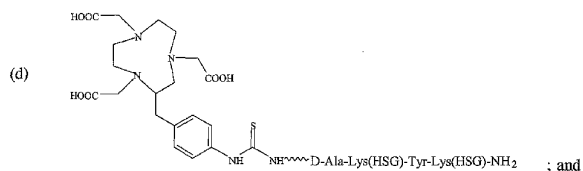
272. A method for detecting or treating target cells, tissues or pathogens in a mammal, comprising:

administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate;

wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or associated therewith; and

administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (c) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tsseg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**



WO 02/082041

178

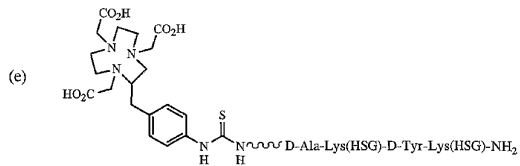
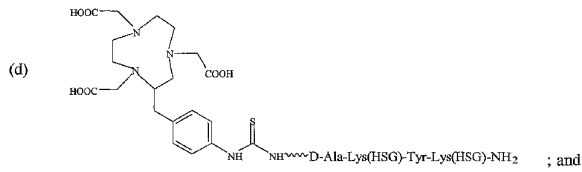
PCT/US02/10235

administering to said subject a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate;

optionally, administering to said subject a clearing composition, and allowing said composition to clear non-localized antibodies or antibody fragments from circulation; and

administering to said subject a targetable conjugate selected from the group consisting of:

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



277. A kit useful for treating or identifying diseased tissues in a subject comprising:

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

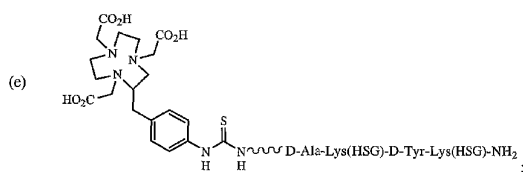
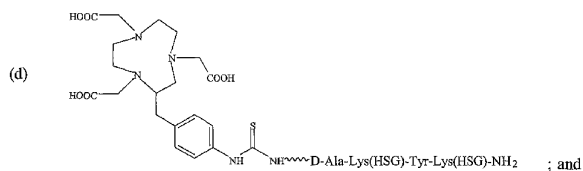
WO 02/082041

179

PCT/US02/10235

(a) a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate, wherein said conjugate is selected from the group consisting of

- (i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (ii) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (iii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



(b) a targetable conjugate which comprises a carrier portion which comprises or bears at least one epitope recognizable by said at least one other arm of said bi-specific antibody or antibody fragment, and one or more conjugated therapeutic or diagnostic agents, or enzymes; and

(c) optionally, a clearing composition useful for clearing non-localized antibodies and antibody fragments; and

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

180

(d) optionally, when said first targetable conjugate comprises an enzyme,

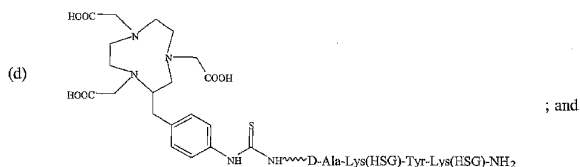
(1) a prodrug, when said enzyme is capable of converting said prodrug to a drug at the target site; or

(2) a drug which is capable of being detoxified in said subject to form an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site, or

(3) a prodrug which is activated in said subject through natural processes and is subject to detoxification by conversion to an intermediate of lower toxicity, when said enzyme is capable of reconvertng said detoxified intermediate to a toxic form, and, therefore, of increasing the toxicity of said drug at the target site.

278. A targetable conjugate selected from the group consisting of:

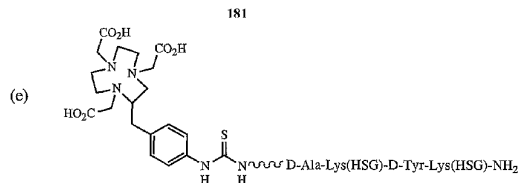
- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235



279. A method of screening for a targetable conjugate comprising:

contacting said targetable construct with a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds said targetable conjugate to give a mixture;

wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or associated therewith; and

optionally incubating said mixture; and

analyzing said mixture.

280. The method of claim 279, wherein said analysis comprises an analytical method selected from the group consisting of FAB/MS, high-field NMR or size-exclusion HPLC.

281. A method for imaging normal tissue in a mammal, comprising:

administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate;

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

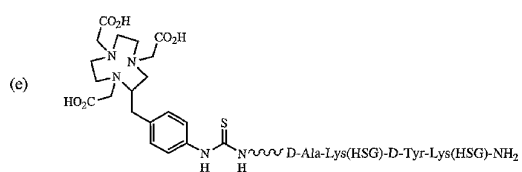
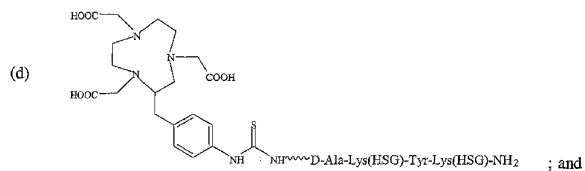
PCT/US02/10235

182

wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or associated therewith; and

administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;



282. The method of claim 281, wherein said normal tissue is tissue from the ovary, thymus, parathyroid or spleen.

283. The method of claim 281, wherein said virus is selected from the group consisting of human immunodeficiency virus (HIV), herpes virus, cytomegalovirus, rabies virus, influenza virus, hepatitis B virus, Sendai virus, feline leukemia virus, Reo

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

183

PCT/US02/10235

virus, polio virus, human serum parvo-like virus, simian virus 40, respiratory syncytial virus, mouse mammary tumor virus, Varicella-Zoster virus, Dengue virus, rubella virus, measles virus, adenovirus, human T-cell leukemia viruses, Epstein-Barr virus, murine leukemia virus, mumps virus, vesicular stomatitis virus, Sindbis virus, lymphocytic choriomeningitis virus, wart virus and blue tongue virus.

284. The method of claim 281, wherein said bacterium is selected from the group consisting of *Streptococcus agalactiae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus*, *Hemophilis influenzae B*, *Treponema pallidum*, Lyme disease spirochetes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* and Tetanus toxin.

285. A method of intraoperatively identifying diseased tissues, in a subject, comprising:

administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate;

wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or associated therewith; and

administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

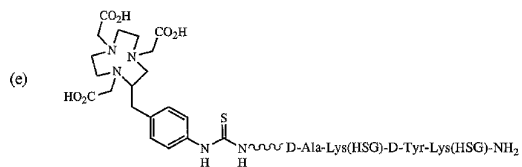
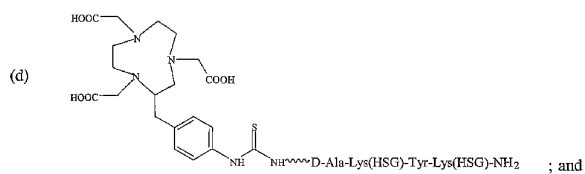
- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

184



286. A method for the endoscopic identification of diseased tissues, in a subject, comprising:

administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate;

wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or associated therewith; and

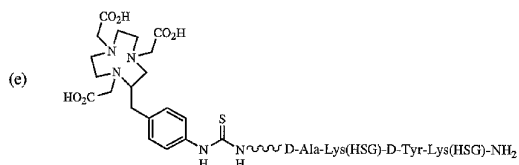
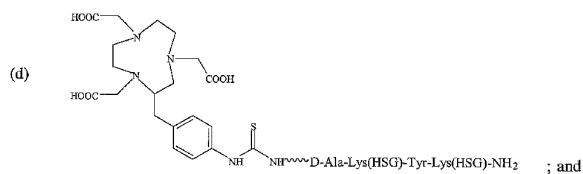
administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

- 185
- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(TsCG-Cys)-NH<sub>2</sub>;



287. A method for the intravascular identification of diseased tissues, in a subject, comprising:

administering an effective amount of a bispecific antibody or antibody fragment comprising at least one arm that specifically binds a targeted tissue and at least one other arm that specifically binds a targetable conjugate;

wherein said at least one arm is capable of binding to a complementary binding moiety on the target cells, tissues or pathogen or on a molecule produced by or associated therewith; and

administering a targetable conjugate selected from the group consisting of

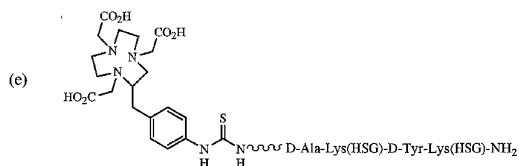
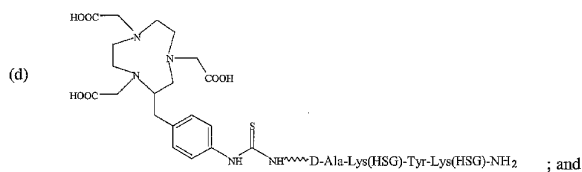
**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

WO 02/082041

PCT/US02/10235

186

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;  
 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tsog-Cys)-NH<sub>2</sub>;



288. The method of any one of claims 272, 276, 277, 279, 281, 285, 286, or 287 wherein said targetable conjugate further comprises a diagnostic agent selected from the group consisting of <sup>18</sup>F, <sup>52</sup>Fe, <sup>62</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>86</sup>Y, <sup>89</sup>Zr, <sup>94m</sup>Tc, <sup>94</sup>Tc, <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>154-158</sup>Gd and <sup>175</sup>Lu.

289. The method of claim 288, wherein said targetable conjugate further comprises a therapeutic nuclide selected from the group consisting of <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>47</sup>Sc, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>Ag, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>142</sup>Pr, <sup>153</sup>Sm, <sup>161</sup>Tb, <sup>166</sup>Dy, <sup>166</sup>Ho, <sup>177</sup>Lu, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>189</sup>Re, <sup>212</sup>Pb, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>211</sup>At, <sup>223</sup>Ra and <sup>225</sup>Ac.

**SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)**

GACATTGATGTCAGCAATCTCCATCCCTGGCTGTGTTCACACAGGAGAGAGGTCACCTATGACCTGCAATCCAGTCAGAGTCTGTTC 90  
 D I V M S Q S P S S L A V S P G E K V T M T C K S S Q S L F 30  
 AACCTAGAACCCGAAAGAACTATTGGGTGGTACCCAGCAGAAACCCAGGGCAGTCTCTAAACTTCTGATCTACTGGGCATCTACTCGG 180  
 N S R T R K N Y L G W Y Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R 60  
 CDR1  
 GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCGAGTGGATCTGGGACAGATTTCTCTCACCATCAACAGTGTGCGAGTCTGAGACCTGGCA 270  
 E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I N S V Q S E D L A  
 GTTTATTACTGCACCTCAGTTTATTATCTGTGCGACGTTTCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG 339  
 V Y C T Q V Y Y L C T F G A G T K L E L K R 113  
 CDR3

FIG. 1

GTCCAACTGCGAGGAGTCAAGGGGAGACTTAGTGAAGCCCTGGAGGGTCCCTCGAAGACTCTCTGTCAGCCCTGGATTCACTTCAGTATT 90  
 V Q L Q E S G G D L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S I 30  
 TACACCAATGCTTGGCTTGGCCAGACTCGGAAAGAGGGCTGGAGTGGTCCGAAACCCTGAGTGGTGAATGACATCTACTATCCA 180  
 Y T M S W L R Q T P E K R L E W V A T L S G D G D D I Y Y P 60  
 CDR1  
 GACAGTGTGAAGGTCGATTCACCAATCCAGAGACATCCCAAGAACCTATATCTGCAAAATGACATCTAAGTCTGGCCACAG 270  
 D S V K G R F T I S R D N A K N N L Y L Q M N S L R S A D T 90  
 GCCTGTATTACTGTGCAAGGGTGGACTTGGGACTTGGACTTCGATGCTGGGGCCAGGGACACCGGTTCCCTCCTCA 354  
 A L Y Y C A R V R L G D W D F D V W G P G T T V S V S S 118  
 CDR3

FIG. 2

WO 02/082041

PCT/US02/10235

3/15

GACATTCGATGACAAATCCATCCCTGGTGTGTCACACGAGAGAGTCACTATGACCTTGCAATCCAGTCAAGATCTCTTC  
 90  
 D I V M S Q S P S S I A V S P G E K V T M T C K S S Q S L F 30  
 AACAGTAAACCGAAGAACTACTTGGGTTGTFACGACGAGAAACCGAGGCACTCCCTAACTTCGATGATCTGGCATCTACTGG 180  
 N B R I R K N Y L G W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y H A S T P 60  
 VK CDR1  
 VK CDR2  
 GNATCTGGGTCCTGATGCTTCACAGCAGTGGGATCTGGGACAGATTTCACTTCACATFCAACAGTGTGCGATCTGAGACCTGGCA 270  
 E S G V P D R F T G S G S G I D F T L I I N S V Q S E D L A 90  
 GTTATTACTCACTCAAGTTTATCTGTGACACTTCGGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGAGGAGTCCGGATCAGGAGCC 360  
 V Y Y C T Q V Y K L C I F G A G I K L E L K R S G G S G Q 120  
 VK CDR3  
 Linker  
 GGAGCTCCGAGGCGGTGGAGTGGAGTGGAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGCTTATGATGAGCCTGGAGGTCCTGAAACTCTCTCTGT 450  
 G G S G G G S E V Q L Q E S G D L V K P G G S L K L S C 150  
 Linker  
 GCAGCCTCGGATTCATTTCACTTATTAACCAATGCTTGGCTTCGCCAGACTCCCGGAAAGAGGCTGGAGTGGCGCAACCCGAGT 540  
 A A S G P T F S I Y T M S W L R Q T P E K R L E W V A T L S 180  
 VH CDR1  
 GGTGATGTTGATGACATCTACTATCCAGACAGTGTGAGGTCGATCACCACTCCAGAGACAATGCCAAGACCACTATATCTGCAA 630  
 G D G D I Y Y P D S V K G R F T I S R D N A K N N L Y L Q 210  
 VH CDR2  
 ATGAAACAGTCTAAGGCTTCGGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGGGTGGGACTTGGGGACTTGGATGTCGGGGCCAGGG 720  
 M N S L R S A D T A L Y Y C A R V R L G D W D F D V W G Q 240  
 VH CDR3  
 ACCACGGTCAACGGTCTCTCA 741  
 T T V T V S S 247

FIG. 3

GCTGTTTGATGACCCAAACUCCGACTCCCTCCGCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGGCAGATCTAGTCAGAGCATTTTC 90  
 A V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V 30  
 CATAGTATGGCAACACCTATTAGATGGTACTGCGAGAAACCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCACCCGATTT 180  
H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F 60  
 CDR1  
 TCTGGGTCCGACACAGTTCCATGTCGGCCCTGGATCAGGGACAGATTTCACATCGGATCAGCAGATCGAGGCTGAGGATCTGGGACTT 270  
 S G V P D R F S G T G S G T D F T V R I S R V E A E D L G L  
 TATTACTGCTTCAAGGTTTCACTGTTCCGTACACGTTTCGGGGGACCAACGCTGGAAATAAA 336  
 Y Y C F Q G S R V P Y I F G G G T K L E I K 112  
 CDR3

FIG. 4

FTGCAGCTGCAGAGATCAGGACCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTTCA GFGAAGATCTCTGCGAGGCTTCTGCGATACACCTTCACTGAG 90  
 V Q L Q E S G P E L V K P G A S V K M S C R A S G Y T F T E 30  
 TATGTTTACCTGGGTAAACAGAGAACTGGACAGGCTTGGATGGAGATTTATCTCTGGAAATGTTAGTCTTCTTCAAT 180  
 Y V I T W V K Q R T G Q G L E W I G E I Y P G S G S T S Y N 60  
 CDR1  
 GAAAGTTCAAGGCGAAGCCACACTGACTGCGAGACAAATCTCCACACAGCCCTTACATCGACCTCCAGCAGCTGACATCTGAGGACTCT 240  
 E K F K G K A T L T A D K S S N T A Y M H L S S L T S E D S  
 GCGTCTATTCTGTACAGAGAGATCTGGGGCCCAAGGACTCTGTCTCTTCA 333  
 A V Y P C T R E D L G G Q G T L V T V S S 111  
 CDR3

FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

GATATCCAGCTGACCCAAATCCAGGCACCCCTGCTCCCTCAGTCCCTGGAGAGGAGCCACTCTGTCTTGGCAGGCTTAGTCAGAGCAATTGTG 90  
 D I Q L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R S S Q S I V 30  
 CATAGTATGGCAACACCTATTAGATGGTACTGTGCGAACCAGGCCAGGCTCCAGGCTTCTGATCTACAAAGTTTCCCAACCGATT 180  
 H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q A P R L L I Y K V S N R F 60  
 CDR1  
 TCCCGAGTCCCGAGACAGGTTCAATGGCTCTGGATCAGGGACAGATTTCACACTTACTATACAGCAGACTGGAGCCTGAGGATTTGCTGTG 270  
 S G V P D R F S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V 90  
 TATTACTGCTTTCAGGTTCACTGTTCCTGTAACAGTTCCGGAGGGGGGACCAAGGTGGAGATC 333  
 Y Y C F Q G S R V P Y T F G G G T K V E I 113  
 CDR3

FIG. 6

GTGGAGCTGCGAGCTCAGGAGTGGTGAATAAAGAGCTGGAGCTCAGTCAAGGTCCTCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGAG 90  
 V Q L Q Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y T P L E 30  
 TATCTTATTACCTGGGTAAACAGAGACTGGACAGGCTCTAGAGTGGATTTCCTGGAAATTTATCTGGAAATGGTGTAGTACTTCTTACAAT 180  
 Y V I T W V K Q R P G Q G L E W I G E I Y P G S G S T S Y N 60  
 CDR1  
 GAAAAGTTCAAGGCGAAGCCCAATCTGCTGACAAATCCCTAACACAGCCCTACATGGGCTTCAGCGCTGAGATCTGAGGACACT 270  
 E K F K G K A T I T A D K S T N T A Y M E L S S L R S E D T 90  
 GCCTTCTATTCTGTACAAGAGAGGATCTTGGGGCCCAAGGTCCTGTGTACACCGTCTCTTCA 333  
 A F Y P C T R E D L G G Q G S L V T V S S 111  
 CDR3

FIG. 7



Est I  
 CAGGTCCAACTCGAGGAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAGCCCTGGGGCTTCAGTCAAGATGTCCTCGCAGGGGTTCTGGATACACCTTCAC T 90  
 1 10 20 30  
 Q V Q L Q E S G P E L V K P G A S V K M S C R A S G Y T F T  
 GAGTATGTTATTACTCTGGGTAAAACAGAGAACTGGACAGGGGCTTGGATGGAGATTATTCCTGGAGCTGTGATGTTCTTCAC 180  
 40 50 52 A  
 E Y V I T W V K Q R T G Q G L E W I G E I Y P G S G S T S Y  
 CDR1  
 AATGAAAGTTCAGGGCCACACTGACTGGCAGACAAATCTCCACACAGCCTTACATGACCTCGCAGCCCTGACATCTGGAGC 270  
 60 70 80 82 A B C  
 N E K F K G K A T L T A D K S S N T A Y M H L S S L T S E D  
 Est II  
 TCTCGGTCTATTTCTGTACAAGAGGATCTTGGGGCCAGGGACTCTGGTCAACCGTCTCCCA 336  
 90 97 103 110 113  
 S A V Y F C T R E D L G G Q G T L V T V S S  
 CDR3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 9A

10/15

PvuII  
 1 GACATCCGCGAGACCCAACTCCACTCCCTGCTGTCAGCTTGGAGATCAAGCCGTCATCTCTGCGAATCTAGTCAGAGCAATTGTC 90  
 10 D I Q L T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V 27 A B C  
 20  
 30 CATAGTATGGCAACACCTATTTAGATGGTACTGCGAGAAACCCAGCCCGTCTCCAAAGCTCCGATCTCAAAAGTTTCCCAACCGATTT 180  
 40 D E H S N G M T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F 50  
 60 TCTGGGGTCCGACACAGGTTCACTGGCACTGGATCAGGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGACTT 270  
 70 S G V P D R F S G T G S G T D F T V R I S R V E A E D L G L 80  
 90 TATTACTGCTTTCAGGTTCACTGTTCCGTCACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGGATCAAGCT 339  
 100 Y Y C F Q G S R V P Y T F G G G T K L E I K R 108  
 110 CDR3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 9B

	10	20	30	40
EUVH	PVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSKASGGTFSRS	AIIMV	RQA	
Mu9VH	-VOLQE..P..V..A..M..R..Y..TEYV.T..K.R			
hMu9VH	QVQLQ.....Y..TEYV.T..K.R			
	50 52A	60	70	
EUVH	PGQGLEWMG	GIVPMF	GGPPNYAQK	FQGRVTITADES
Mu9VH	T.....I.E.Y.GS.STS.NE..K.KA.L..K.S....			
hMu9VH	.....I.E.Y.GS.STS.NE..K.KA.....K.....			
	80 82ABC	90	100	110
EUVH	MELSSLRSEDTAFYFCAGGYGYSPE	YNGGLV	TVVS	
Mu9VH	.H...T...S.V...TREDL----			
hMu9VH	.....TREDL----			
	103	110	113	
NEWMVH	WGQGLVTVSS			
Mu9VH	G...T...TVSS			
hMu9VH	G.....TVSS			

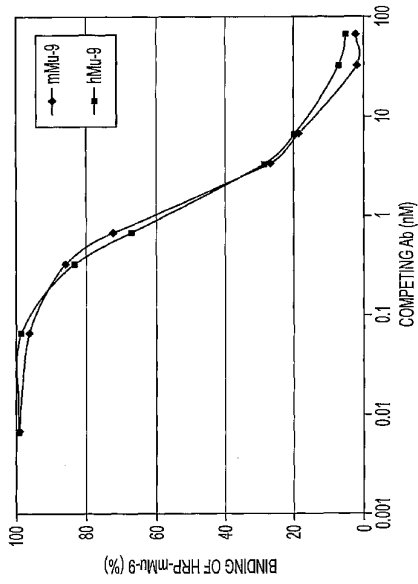
FIG. 10A



PstI  
 CAGGTCCAACTGGCAGCTCAGGAGCTGAGGTCGAAAAGCTGGGAGCTCAGTCAAGGTCCTCTGCAAGGCTTCGGATACACCTTCACT 90  
 1 10 20 30  
 Q V Q L Q Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y T F T  
 GAGTATGTTTATCCTGGGTAAAACAGAGACCTGGACAGGGTCTAGAGTGGAGATTTATCTGTGGAGTGGTAGTACTTCTCTAC 180  
 40 50 52 A  
 E Y V I T W V K Q R P G Q G L E W I G E I Y P G S G S T S Y  
 CDR1  
 RATGAAAGTCAAGGGCCACCAATCACCTGCTGACAAATCCCTACACAGCCTACAGGCTCAGCAGCCCTGAGATCTGAGGAC 270  
 60 70 80 82 A B C  
 N E K F K G K A T I T A D K S T N T A Y M E L S S L R S E R D  
 BstRII  
 ACTGCGTCTATTTCTGTACAGAGAGGATCTTGGGGCCAGGGTCTCTGGTCAACCGTCTCTCA 336  
 90 97 103 110 113  
 T A F Y F C T R E D L G G Q G S L V T V S S  
 CDR3

FIG. 11A





## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
17 October 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/082041 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 39/395, C07K 16/00, 16/30
- (21) International Application Number: PCT/US02/10235
- (22) International Filing Date: 3 April 2002 (03.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/823,745 3 April 2001 (03.04.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNOMEDICS, INC. [US/US]; 300 American Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).
- (72) Inventors; and  
 (75) Inventors/Applicants (for US only): HANSEN, Hans, J. [US/US]; 6014 Angler Drive, Piquette, MS 39466 (US).  
 GRIFFITHS, Garry, L. [US/US]; 36 Edgemoor Avenue, Morristown, NJ 07960 (US).  
 LEUNG, Shut-on [US/US]; 31 Alexandria Road, Morris Township, NJ 07960 (US).  
 MCBRIDE, William, J. [US/US]; 767 Springfield #6, Summit, NJ 07901 (US).  
 QU, Zhengxing [CN/US]; 15 Sycamore Way, Warren, NJ 07950 (US).  
 GOLDENBERG, David, M. [US/US]; 330 Pleasant Valley Road, Mendham, NJ 07945 (US).
- (74) Agents: MAEBIUS, Stephen, B. et al.; Foley & Lardner, 3000 K Street, N.W., Suite 500, Washington, DC 20007-5109 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
 — with international search report  
 — before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report:  
 12 September 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/082041 A3

(54) Title: PRODUCTION AND USE OF NOVEL PEPTIDE-BASED AGENTS FOR USE WITH BI-SPECIFIC ANTIBODIES

(57) Abstract: The present invention relates to a bi-specific antibody or antibody fragment having at least one arm that is reactive against a targeted tissue and at least one other arm that is reactive against a linker moiety. The linker moiety encompasses a hapten to which antibodies have been prepared. The antigenic linker is conjugated to one or more therapeutic or diagnostic agents or enzymes. The invention provides constructs and methods for producing the bi-specific antibodies or antibody fragments, as well as methods for using them.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PC/PUS02/10235
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/00, 16/30 US CL : 424/1.49, 1.53, 133.1, 136.1, 174.1, 178.1, 179.1; 530/387.3, 388.8, 388.85 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/1.49, 1.53, 133.1, 136.1, 174.1, 178.1, 179.1; 530/387.3, 388.8, 388.85  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN: FILE HCAPLUS FOR STRUCTURES CONTAINING LYS-TYR-LYS AND HSG		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	US 5,274,076 A (BARBET et al) 28 December 1993. See column 1, lines 15-56; column 2, lines 29-62; column 3, line 17; column 5, line 55; column 10, lines 7-9.	225-255 -----
Y		159, 262-263
X ---	WO 99/66951 A2 (IMMUNOMEDICS, INC.) 29 December 1999. See page 4, line 1- page 5, line 31; page 17, line 20; page 36, line 17; page 45, lines 8-17.	279 -----
Y		86-111, 158, 160-207, 210, 219-224, 262-263
X ---	US 6,096,289 A (GOLDENBERG) 01 August 2000. See column 6, line 63; column 8, line 14; column 11, line 49; column 12, line 26; column 12, line 62; column 13, line 28; column 15, lines 11-48; column 16, lines 29-50; column 18, lines 3-13 and 30-57; column 19, lines 11-30.	1-9, 14-19, 59-63, 76, 80-85, 112-114 -----
Y		86-111, 158-207, 210, 219-224
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
*E* earlier application or patent published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 19 March 2003 (19.03.2003)	Date of mailing of the international search report 14 JUL 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer David A Saunders, PhD Telephone No. 703-308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/10235
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos. : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos. : because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claim Nos. : 20-58, 64-75, 77-79, 115-157 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 5/11	A 6 1 K 49/00	A 4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/18	A 6 1 K 49/00	C 4 C 0 9 6
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 5/107	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 5/11	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/19	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 1/21	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 N 1/19	
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 1/21	
G 0 1 N 33/574	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 R 33/28	G 0 1 N 33/574	A
// A 6 1 B 5/055	G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 49/02	B
	A 6 1 K 49/02	C
	G 0 1 N 24/02	B
	A 6 1 B 5/05	3 8 3
	C 1 2 P 21/08	

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

- (72) 発明者 ハンセン, ハンス・ジェイ  
アメリカ合衆国ミシシッピ州 3 9 4 6 6, ピカユーン, アングラール・ドライヴ 6 0 1 4
- (72) 発明者 グリフィス, ゲイリー・エル  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 9 6 0, モリスタウン, エッジヒル・アヴェニュー 3 6
- (72) 発明者 リュン, シュイ オン  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 9 6 0, モリス・タウンシップ, アレクサンドリア・ロード 3 1
- (72) 発明者 マクブライド, ウィリアム・ジェイ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 9 0 1, サミット, スプリングフィールド 7 6 7, # 6
- (72) 発明者 クー, ツェンシン  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 9 5 0, ウォレン, シカモア・ウェイ 1 5
- (72) 発明者 ゴールデンバーグ, デイヴィッド・エム  
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 9 4 5, メンダム, プレザント・ヴァリー・ロード 3 3  
0

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB50 BB51 DA13 FB02  
4B024 AA01 AA12 BA31 BA53 CA04 CA07 DA02 EA04 GA14 HA15  
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ42 QR32 QR62 QS25 QS33 QS34  
4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA05 DA14  
4B065 AA90X AA90Y AA91Y AA92X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08

	CA24	CA25	CA44	CA46						
4C085	AA14	AA16	AA21	AA27	HH01	HH03	HH07	HH09	KA04	KA05
	KA28	KA29	KA36	KB07	KB08	KB09	KB11	KB19	LL01	LL18
4C096	AA11	AB41	AD19	FC14						
4H045	AA11	BA13	BA50	CA40	DA76	EA28	EA51	FA72	FA74	

专利名称(译)	生产和使用与双特异性抗体一起使用的新型肽类药物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005503768A</a>	公开(公告)日	2005-02-10
申请号	JP2002579763	申请日	2002-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	免疫梅迪库斯公司		
[标]发明人	ハンセンハンスジェイ グリフィスゲイリーエル リュンシュイオン マクブライドウィリアムジェイ クーツェンシン ゴールデンバーグデイヴィッドエム		
发明人	ハンセン,ハンス・ジェイ グリフィス,ゲイリー・エル リュン,シュイ・オン マクブライド,ウィリアム・ジェイ クー,ツェンシン ゴールデンバーグ,デイヴィッド・エム		
IPC分类号	G01R33/28 A61B5/055 A61K39/395 A61K49/00 A61K51/00 A61K51/08 A61K51/10 C07K5/107 C07K5/11 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/30 C07K16/44 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	A61K47/6863 A61K47/6899 A61K51/1048 A61K51/1063 A61K2039/505 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 B82Y5/00 C07K16/18 C07K16/30 C07K16/3007 C07K16/3046 C07K16/44 C07K16/468 C07K2317/12 C07K2317/13 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/55 C07K2317/622 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.L A61K39/395.M A61K39/395.N A61K39/395.T A61K49/00.A A61K49/00.C C07K5/107 C07K5/11 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/50.P G01N33/574.A G01N33/577.B C12N5/00.A A61K49/02.B A61K49/02.C G01N24/02.B A61B5/05.383 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/DA13 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA31 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA14 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA91Y 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA21 4C085/AA27 4C085/HH01 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH09 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KA36 4C085/KB07 4C085/KB08 4C085/KB09 4C085/KB11 4C085/KB19 4C085/LL01 4C085/LL18 4C096/AA11 4C096/AB41 4C096/AD19 4C096/FC14 4H045/AA11 4H045/BA13 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	09/823746 2001-04-03 US		
其他公开文献	JP2005503768A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本公开涉及双特异性抗体或抗体片段，其具有至少一个对靶组织具有反应性的臂和至少一个对接头部分具有反应性的臂。接头部分包括已制备抗体的半抗原。抗原接头与一种或多种治疗剂或诊断剂或酶缀合。本公开内容提供了用于产生双特异性抗体或抗体片段的构建体和方法，以及使用它们的方法。

