

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-22273  
(P2009-22273A)

(43) 公開日 平成21年2月5日(2009.2.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B065
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4C085
C07K 1/113 (2006.01)	C07K 1/113	4H045
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	

審査請求 有 請求項の数 32 O L (全 134 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-158796 (P2008-158796)	(71) 出願人	599176263 イムノメディクス、 インコーポレイテッド
(22) 出願日	平成20年6月18日 (2008. 6. 18)		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
(62) 分割の表示	特願2002-579763 (P2002-579763) の分割	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
原出願日	平成14年4月3日 (2002. 4. 3)	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(31) 優先権主張番号	09/823, 746	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成13年4月3日 (2001. 4. 3)	(74) 代理人	100129506 弁理士 小林 智彦
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

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】 (修正有)

【課題】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、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の提供。

【解決手段】 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。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。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

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。

## 【請求項 2】

Mu-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 Mu-9 (cMu-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 Mu-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CSAp MAb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み、ヒト化抗CSAp MAbの軽鎖可変領域のCDRが、RSSQSI VHSNGNTYLEのアミノ酸配列を含むCDR1と、KVS N R F Sのアミノ酸配列を含むCDR2と、FQGS R V P Y Tのアミノ酸配列を含むCDR3とを含み、そしてヒト化抗CSAp MAbの重鎖可変領域の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FRが、ネズミ抗CSAp抗体またはそのフラグメントの対応するFR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MAbに由来する前記アミノ酸が、図10A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10B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Mu-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  $Mu - 9 V_H$ 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 11 B の  $hMu - 9 V_K$ 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 11 A の  $hMu - 9 V_H$ 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  $CSAp$   $MAb$  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  $CSAp$   $MAb$  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 11 A の  $hMu - 9 V_H$ 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  $CSAp$   $MAb$  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  $CSAp$   $MAb$  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 11 B の  $hMu - 9 V_H$ 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、 $Fv$ 、 $F(ab')_2$ 、 $Fab'$  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  $CSAp$  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  $CSAp$   $MAb$  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、 $20 keV \sim 2,000 keV$  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ポソームである、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】**

前記リポ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 2 ~ 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

50

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 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、サボリン、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、トロンボポイエチン、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 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-1

10

20

30

40

50

19、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。

【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CSAp MAb

50

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 6 6】

前記第 2 の M A b またはそのフラグメントが C D 4 0 抗体である、請求項 6 5 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 6 7】

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 6 4 または 6 6 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 6 8】

前記第 2 の M A b ががん腫関連抗体である、請求項 6 5 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 6 9】

前記がん腫関連抗体が、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 および V E G F 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 A 3 3 からなる群から選択される、請求項 6 8 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 7 0】

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 6 8 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 7 1】

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 ~ 2 1 および 5 9 ~ 6 2 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 7 2】

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 2 2、3 7 ~ 4 8 および 6 3 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 7 3】

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 ~ 2 1 および 5 9 ~ 6 2 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 7 4】

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 2 2 ~ 3 6 および 6 3 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 7 5】

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 6 4 ~ 7 0 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 7 6】

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 5 9 ~ 6 3 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、( 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

10

20

30

40

50

することを含む方法。

【請求項 77】

(a) 請求項 1 ~ 63 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 ~ 63 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 ~ 63 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 ~ 63 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 ~ 63 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。

【請求項 78】

請求項 77 に記載される D N A 配列を含む発現ベクター。

【請求項 79】

請求項 77 に記載される D N A 配列を含む宿主細胞。

【請求項 80】

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 17 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 81】

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 80 に記載の送達方法。

【請求項 82】

前記光活性な診断剤が色素原または色素を含む、請求項 81 に記載の送達方法。

【請求項 83】

前記診断剤が、20 k e V ~ 2,000 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 80 に記載の送達方法。

【請求項 84】

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 83 に記載の送達方法。

【請求項 85】

前記放射性核種が、F - 18、M n - 51、M n - 52 m、F e - 52、C o - 55、C u - 62、C u - 64、G a - 68、A s - 72、B r - 75、B r - 76、R b - 82 m、S r - 83、Y - 86、Z r - 89、T c - 94 m、I n - 110、I - 120、I - 124、C r - 51、C o - 57、C o - 58、F e - 59、C u - 67、G a - 67、S e - 75、R u - 97、T c - 99 m、I n - 111、I n - 114 m、I - 123、I - 125、I - 131、Y b - 169、H g - 197 および T l - 201 からなる群から選択される、請求項 83 に記載の送達方法。

【請求項 86】

前記診断剤が造影剤である、請求項 80 に記載の送達方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 87】  
前記造影剤が常磁性イオンである、請求項 86 に記載の送達方法。
- 【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。 10
- 【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 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。 20
- 【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 87 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。 30
- 【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。 40
- 【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 50

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、トロンボポイエチン、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。

10

【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。

【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。

20

【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。

【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 20 keV ~ 10,000 keV 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、1000 keV 未満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 109】

前記放射性核種が 線放射体であり、20 keV ~ 5000 keV 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 110】

前記放射性核種が 線放射体であり、2000 keV ~ 10,000 keV 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】

50

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/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113】

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112に記載の方法。

【請求項114】

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112に記載の方法。

10

【請求項115】

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CSAp MAb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1~70のいずれか一項に記載される、方法。

【請求項116】

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1~70のいずれか一項から選択される少なくとも2つのMAb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117】

請求項1~70のいずれか一項に記載されるものとは異なる第2のMAbまたはそのフラグメントをさらに含む、請求項115に記載の方法。

【請求項118】

前記第2のMAbまたはそのフラグメントがむき出し状態の(naked)MAbまたはそのフラグメントである、請求項117に記載の方法。

30

【請求項119】

前記第2のMAbまたはそのフラグメントが、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およびがん遺伝子産物に対する抗体、抗体A33、およびCD40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117に記載の方法。

【請求項120】

前記第2のMAb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119に記載の方法。

【請求項121】

前記抗CSAp抗体が非経口的に投与される、請求項115に記載の方法。

40

【請求項122】

前記抗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121に記載の方法。

【請求項123】

前記投薬量が反復して投与される、請求項121に記載の方法。

【請求項124】

前記抗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115に記載の方法。

50

## 【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に存在し、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。

## 【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。

## 【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。

## 【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。

## 【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

10

20

30

40

50

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 C S A p 抗体が非経口的に投与される、請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記むき出し状態の抗 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 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記投薬量が反復して投与される、請求項 1 3 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

前記むき出し状態の抗 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 3 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 4 0】

前記キメラ型むき出し状態の抗 C S A p 抗体およびヒトのむき出し状態の抗 C S A p 抗体およびヒト化されたむき出し状態の抗 C S A p 抗体の定常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 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記むき出し状態の抗 C S A p 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 1 3 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 4 2】

前記むき出し状態の抗 C S A p 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 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

前記むき出し状態の抗 C S A p 抗体がむき出し状態の M u - 9 抗体である、請求項 1 3 1 ~ 1 4 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4 4】

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 ~ 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 1 4 5】

前記悪性腫瘍ががん腫である、請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記がん腫が胃腸のがんである、請求項 1 4 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

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 1 4 6 に記載の方法。

40

【請求項 1 4 8】

前記がん腫が卵巣がんである、請求項 1 4 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記インビトロ診断アッセイが、免疫アッセイおよび R T - P C R および免疫組織化学からなる群から選択される、請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記診断アッセイが R T - P C R または免疫アッセイである、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

50

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。

【請求項 153】

前記試料が細胞アリコートまたは組織である、請求項 152 に記載の方法。

【請求項 154】

前記被験体が哺乳動物である、請求項 71 ~ 76 および 80 ~ 153 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 155】

前記被験体がヒトである、請求項 154 に記載の方法。

【請求項 156】

前記被験体がペットである、請求項 154 に記載の方法。

【請求項 157】

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 154 に記載の方法。

【請求項 158】

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 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；

(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）；

をさらに投与すること

を含む方法。

【請求項 159】

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 158 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 160】

前記第1のターゲ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。

10

## 【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。

20

## 【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。

30

## 【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。

40

## 【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、イオセファミン酸、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】

50

前記造影剤が超音波増強剤である、請求項 1 6 9 に記載の方法。

【請求項 1 7 4】

前記超音波増強剤が、ヒト化 M u - 9 抗体またはキメラ化 M u - 9 抗体または完全ヒト M u - 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、請求項 1 7 3 に記載の方法。

【請求項 1 7 5】

前記リポソームがガス充填型である、請求項 1 7 4 に記載の方法。

【請求項 1 7 6】

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 1 7 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 7 7】

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 1 5 8 に記載の方法。

【請求項 1 7 8】

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 1 7 7 に記載の方法。

【請求項 1 7 9】

前記プロドラッグが、エピルビシングルクロニド、C P T - 1 1、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ソルビシングルクロニドからなる群から選択される、請求項 1 7 8 に記載の方法。

20

【請求項 1 8 0】

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 1 7 8 に記載の方法。

【請求項 1 8 1】

前記毒素が、リシン、アプリン、リボヌクレアーゼ ( R N a s e )、D N a s e 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 1 7 8 に記載の方法。

30

【請求項 1 8 2】

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、C O X - 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 1 7 8 に記載の方法。

【請求項 1 8 3】

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、C O X - 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、ドキソルビ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 1 7 8 に記載の方法。

40

【請求項 1 8 4】

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 ( C S F )、インターフェロン ( I F N )、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 1 7 7 に記載の方法。

【請求項 1 8 5】

前記リンホトキシが腫瘍壊死因子 ( T N F ) であり、前記造血性因子がインターロイキ

50

ン ( I L ) 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 - C S F ) または顆粒球マクロファージ - コロニー刺激因子 ( G M - C S F ) 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。

【請求項186】

前記サイトカインが、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 6、I L - 10、I L - 12、I L - 18、インターフェロン - 、T N F - 、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。

10

【請求項188】

前記放射性核種が、P - 32、P - 33、S c - 47、F e - 59、C u - 64、C u - 67、S e - 75、A s - 77、S r - 89、Y - 90、M o - 99、R h - 105、P d - 109、A g - 111、I - 125、I - 131、P r - 142、P r - 143、P m - 149、S m - 153、T b - 161、H o - 166、E r - 169、L u - 177、R e - 186、R e - 188、R e - 189、I r - 194、A u - 198、A u - 199、P b - 211、P b - 212、およびB i - 213、C o - 58、G a - 67、B r - 80m、T c - 99m、R h - 103m、P t - 109、I n - 111、S b - 119、I - 125、H o - 161、O s - 189m、I r - 192、D y - 152、A t - 211、B i - 212、R a - 223、R n - 219、P o - 215、B i - 211、A c - 225、F r - 221、A t - 217、B i - 213、F m - 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。

20

【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G d - 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。

30

【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。

40

【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BNC T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つ以上の光力学的治療剤を含む、請

50

求項 1 5 8 に記載の方法。

【請求項 1 9 9】

前記光力学的治療剤が光増感剤である、請求項 1 9 8 に記載の方法。

【請求項 2 0 0】

前記光増感剤が、ベンゾポルフィリンモノ酸リング A ( B P D - M A )、スズエチオプルプリン ( S n E T 2 )、スルホン化アルミニウムフタロシアニン ( A l S P c ) およびルテチウムテキサフィリン ( L u t e x ) からなる群から選択される、請求項 1 9 9 に記載の方法。

【請求項 2 0 1】

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 M u - 9 抗体またはキメラ M u - 9 抗体またはヒト化 M u - 9 抗体あるいはヒト M u - 9 抗体またはキメラ M u - 9 抗体またはヒト化 M u - 9 抗体のフラグメントである、請求項 1 5 8 に記載の方法。

10

【請求項 2 0 2】

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 M u - 9 抗体またはキメラ M u - 9 抗体またはヒト化 M u - 9 抗体あるいはヒト M u - 9 抗体またはキメラ M u - 9 抗体またはヒト化 M u - 9 抗体のフラグメントである、請求項 1 5 8 に記載の方法。

【請求項 2 0 3】

前記標的組織が腫瘍である、請求項 1 5 8 に記載の方法。

【請求項 2 0 4】

前記腫瘍が結腸特異的抗原 - p ( C S A p ) を産生するか、または結腸特異的抗原 - p ( C S A p ) に関連する、請求項 2 0 3 に記載の方法。

20

【請求項 2 0 5】

前記 M u - 9 抗体またはそのフラグメントが M A b M u - 9 の F v を含む、請求項 1 5 8 に記載の方法。

【請求項 2 0 6】

前記二重特異性抗体が融合タンパク質である、請求項 1 5 8 に記載の方法。

【請求項 2 0 7】

前記融合タンパク質が三価であり、C S A p と反応し得る抗体の F v を含む、請求項 2 0 6 に記載の方法。

30

【請求項 2 0 8】

哺乳動物において C S A p 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 M u - 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 ) 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>

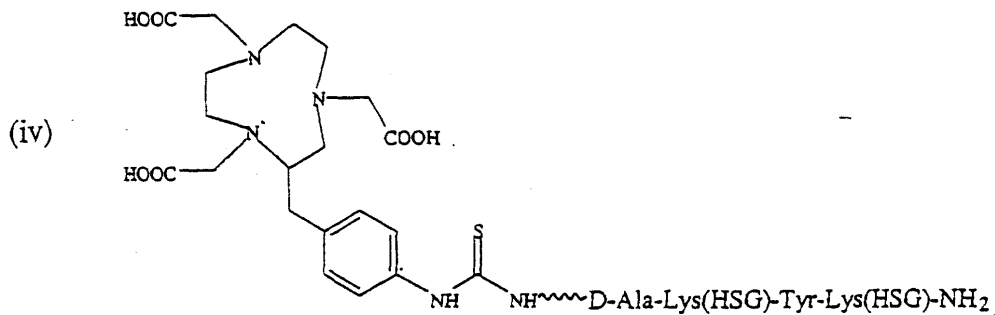
；

( i i ) 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

( i i i ) 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>；

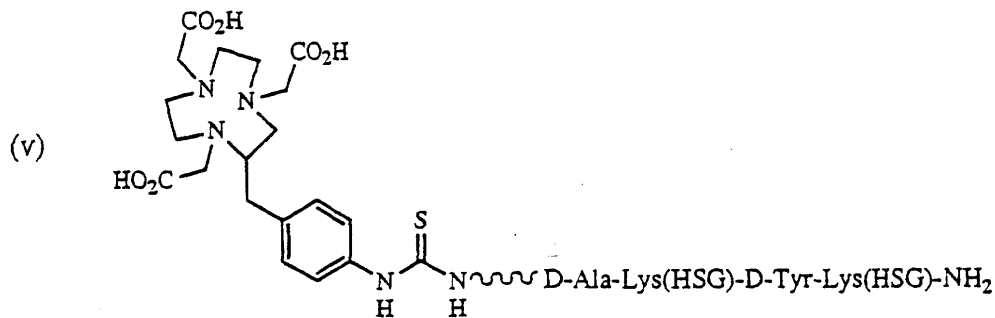
## 【化 1】



10

および

## 【化 2】



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 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；

(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）；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

30

40

50

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：

10

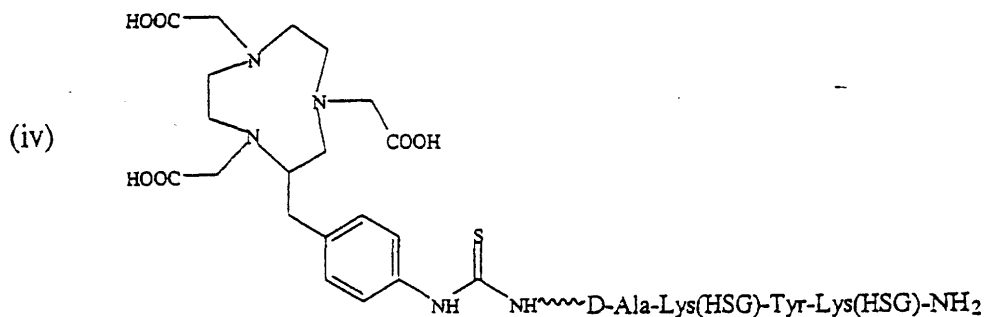
(i) DOTA - Phe - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>

；

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

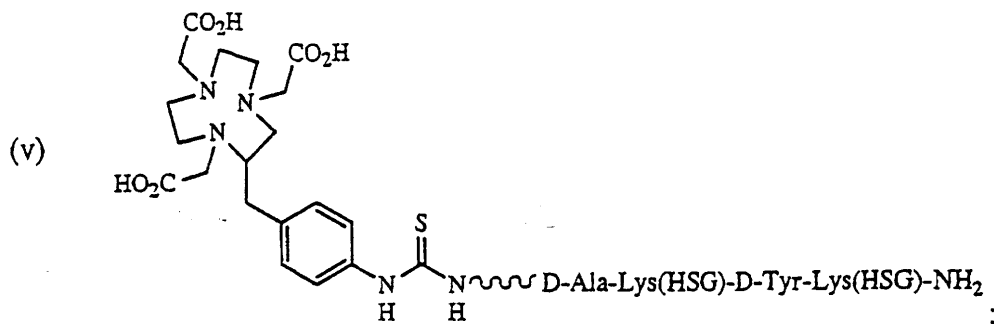
(iii) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub>；

【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。

40

【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。

50

## 【請求項 2 1 3】

C S A p 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 M u - 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：

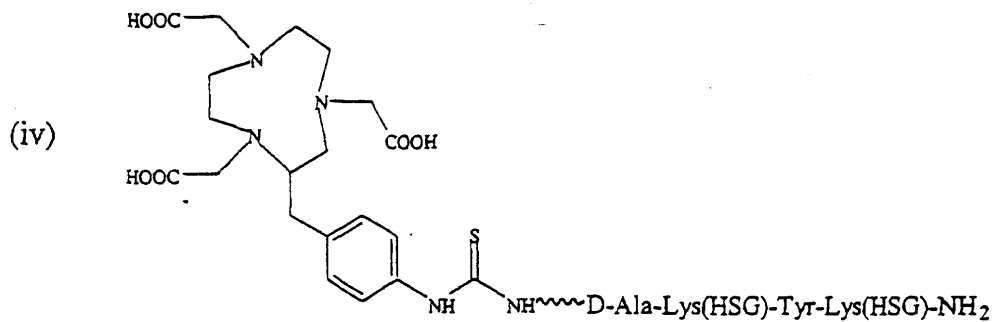
( i ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub>

；

( i i ) 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>；

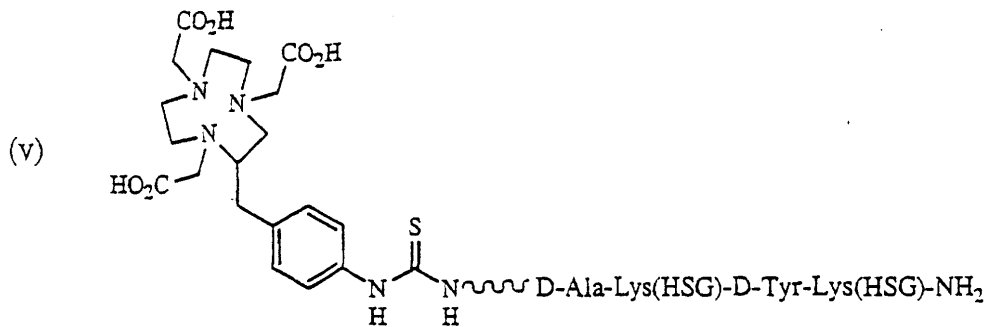
( i i i ) A c - L y s ( H S G ) D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub>；

【化 5】



および

【化 6】



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 1 4】

被験体において C S A p 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 ) C S A p 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 M u - 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 ) 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>

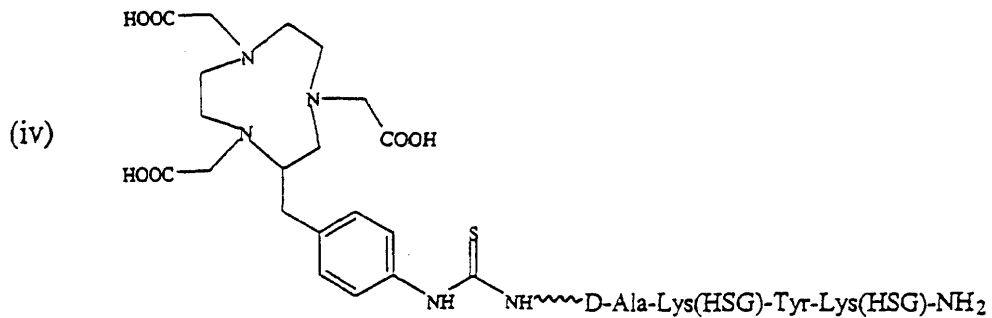
；

( i i ) 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>；

50

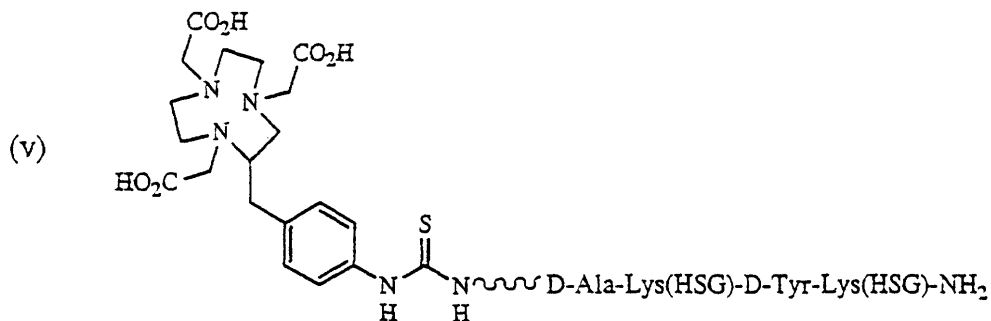
(iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

【化7】



および

【化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、

30

(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

(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>

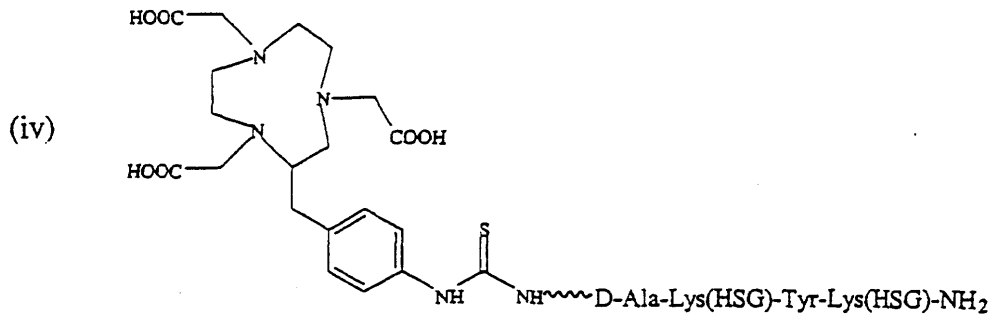
；

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

40

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

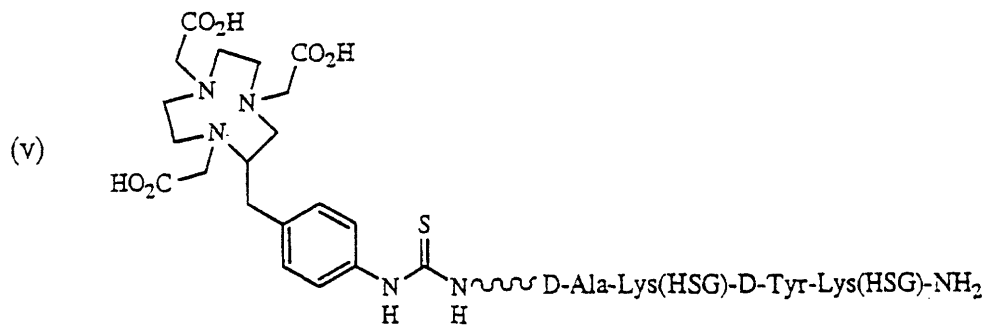
## 【化 9】



10

および

## 【化 10】



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 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

30

(b) 下記のコンジュゲート体：

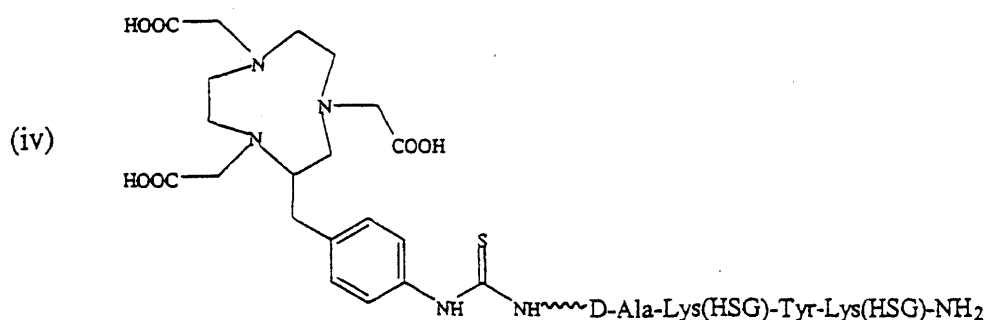
(i) DOTA - Phe - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>

；

(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>；

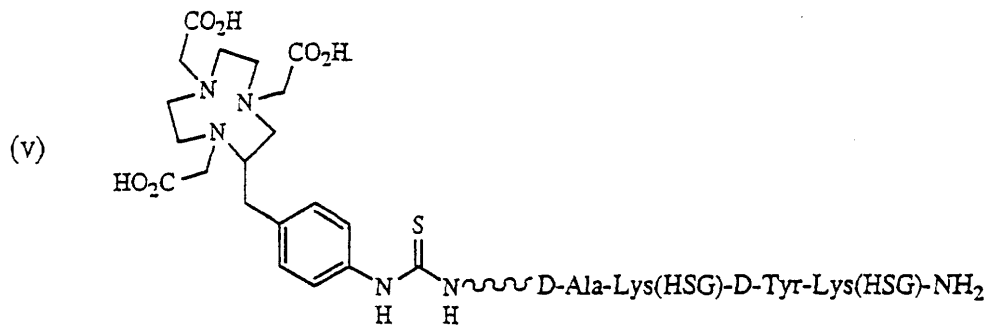
## 【化 11】



50

および

【化 1 2】



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 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  $F(a b)_2$  フラグメントまたは  $F(a b')_2$  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；

20

(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）

30

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；

40

(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、

( 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 2 2 6】

前記診断剤が 2 5 k e V ~ 6 0 0 k e V の 粒子および / または陽電子を放出する、請求項 2 2 5 に記載の方法。

## 【請求項 2 2 7】

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 2 2 5 に記載の方法。

## 【請求項 2 2 8】

前記プロドラッグが、エピルピシングルクロニド、C P T - 1 1、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 2 7 に記載の方法。

## 【請求項 2 2 9】

前記毒素が、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、D N a s e 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

10

20

30

40

50

キシシ、シュードモナスのエキソトキシシ、およびシュードモナスのエンドトキシシからなる群から選択される、請求項 2 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 3 0】

治療用核種をさらに含む、請求項 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 3 1】

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 2 3 0 に記載の方法。

【請求項 2 3 2】

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 2 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 3 3】

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  $^{10}\text{B}$  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、リシシ、アブリシ、リボヌクレアーゼ、DNase I、ブドウ球菌のエンドトキシシ A、アメリカヤマゴボウの抗ウイルス性タンパク質、ゲロニシ、ジフテリアトキシシ、シュードモナスのエキソトキシシ、およびシュードモナスのエンドトキシシからなる群から選択される、請求項 2 3 5 に記載の方法。

【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、ダウノミシシグルクロニドおよびドキシソルピシシ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。

【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、 $^{118}\text{F}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$  および  $^{131}\text{I}$  からなる群から選択される、請求項 2 4 0 に記載の方法。

【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

10

20

30

40

50

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 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 6】

前記光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】

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 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 9】

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 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 5 0】

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 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 5 1】

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 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 5 2】

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 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 5 3】

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 2 5 2 に記載の方法。

【請求項 2 5 4】

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 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 5 5】

前記標的組織が腫瘍である、請求項 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 5 6】

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 2 5 5 に記載の方法。

【請求項 2 5 7】

前記二重特異性抗体が MA b Mu 9 の Fv および MA b 6 7 9 の Fv を含む、請求項 2 5 6 に記載の方法。

【請求項 2 5 8】

10

20

30

40

50

M u 9 および / または 6 7 9 がキメラ化またはヒト化されている、請求項 2 5 7 に記載の方法。

【請求項 2 5 9】

M u 9 および / または 6 7 9 がヒト M u 9 およびヒト 6 7 9 である、請求項 2 5 7 に記載の方法。

【請求項 2 6 0】

前記二重特異性抗体が M u 9 の C D R の 1 つ以上を含む、請求項 2 5 7 に記載の方法。

【請求項 2 6 1】

前記二重特異性抗体が 6 7 9 の C D R の 1 つ以上を含む、請求項 2 5 7 に記載の方法。

【請求項 2 6 2】

前記二重特異性抗体が融合タンパク質である、請求項 2 5 5 に記載の方法。

【請求項 2 6 3】

前記腫瘍ががん胎児性抗原 ( C E A ) を産生する、請求項 2 5 5 に記載の方法。

【請求項 2 6 4】

前記二重特異性抗体が 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、請求項 2 6 3 に記載の方法。

【請求項 2 6 5】

M N 1 4 および / または 6 7 9 がキメラ化またはヒト化されている、請求項 2 6 4 に記載の方法。

【請求項 2 6 6】

M N 1 4 および / または 6 7 9 がヒト M N 1 4 およびヒト 6 7 9 である、請求項 2 6 4 に記載の方法。

【請求項 2 6 7】

前記二重特異性抗体が M N 1 4 の C D R の 1 つ以上を含む、請求項 2 6 4 に記載の方法。

【請求項 2 6 8】

前記二重特異性抗体が 6 7 9 の C D R の 1 つ以上を含む、請求項 2 6 4 に記載の方法。

【請求項 2 6 9】

前記二重特異性抗体が融合タンパク質である、請求項 2 6 4 に記載の方法。

【請求項 2 7 0】

前記融合タンパク質が三価であり、C S A p と反応し得る抗体の F v を含む、請求項 2 6 9 に記載の方法。

【請求項 2 7 1】

前記二重特異性抗体がクラス I I I 抗 C E A 抗体と 6 7 9 の F v とを含む、請求項 2 6 3 に記載の方法。

【請求項 2 7 2】

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 ) 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

10

20

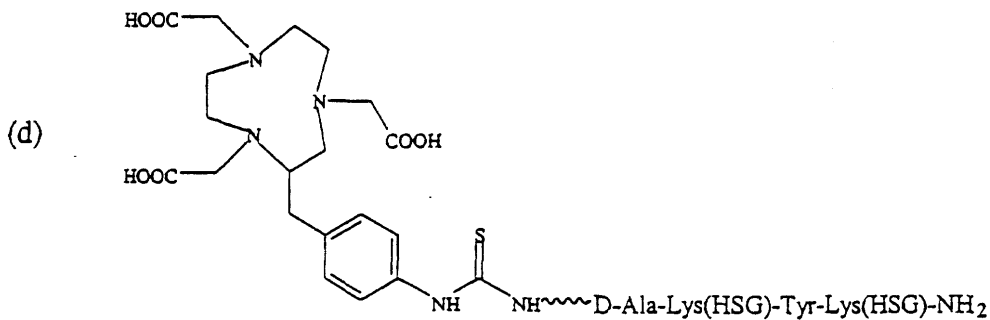
30

40

50

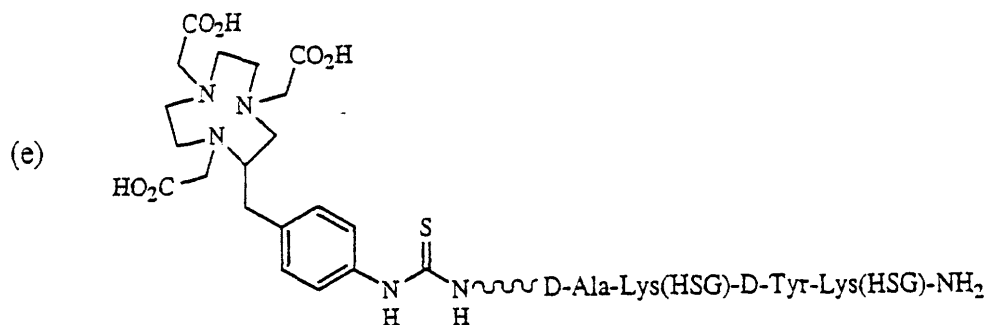
y s ) - N H<sub>2</sub> ;

【化 1 3】



および

【化 1 4】



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 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。

【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。

【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

10

20

30

40

50

、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：

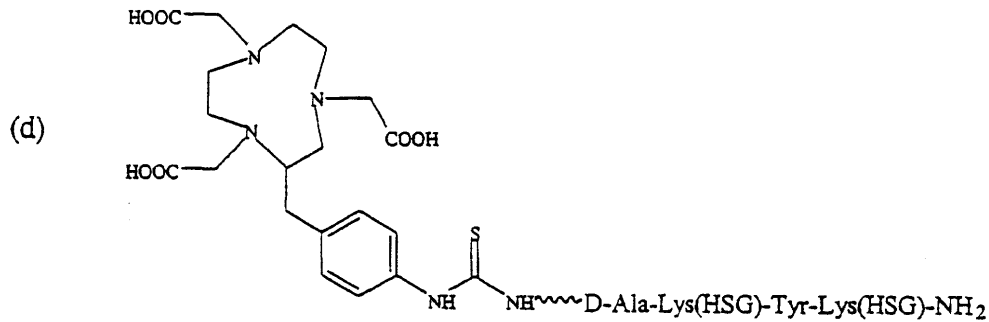
( a ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub>

；

( 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> ；

【化 1 5】

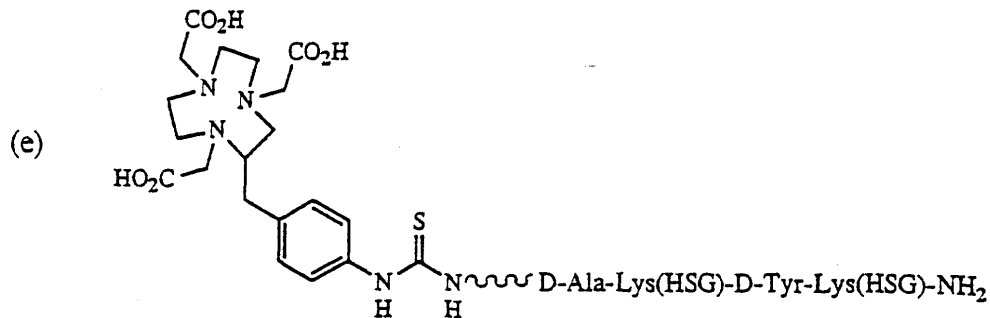


10

20

および

【化 1 6】



30

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 2 7 7】

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

40

；

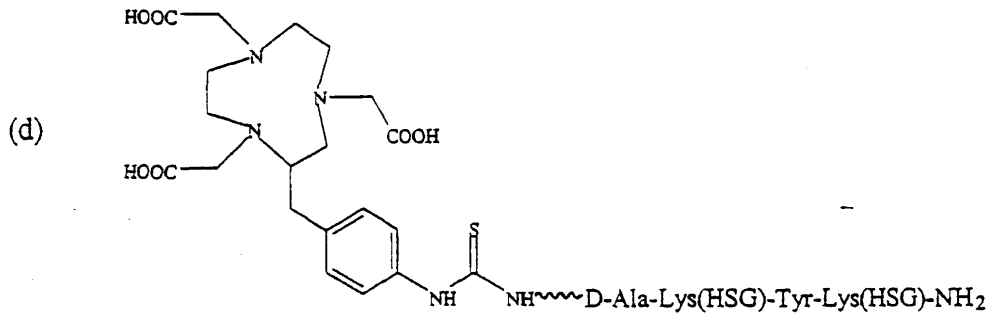
( a ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - D - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub>

；

( 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> ；

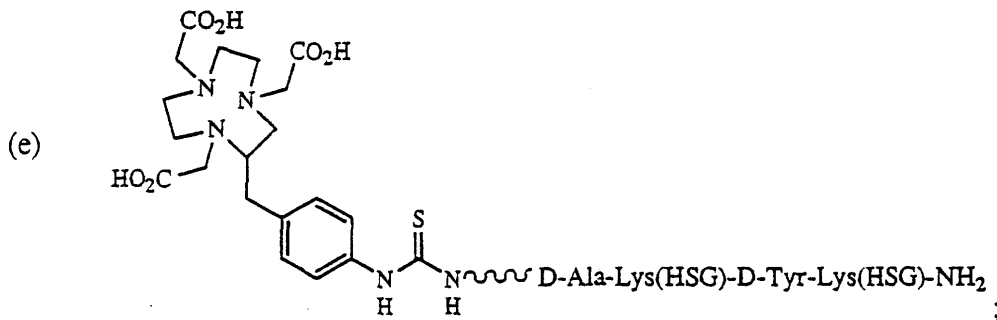
( c ) A c - L y s ( H S G ) D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub> ；

## 【化 1 7】



および

## 【化 1 8】



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、

(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。

## 【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>；

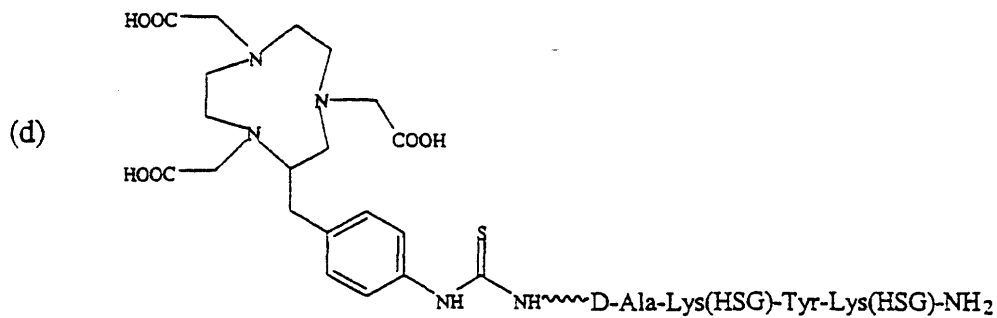
10

20

30

40

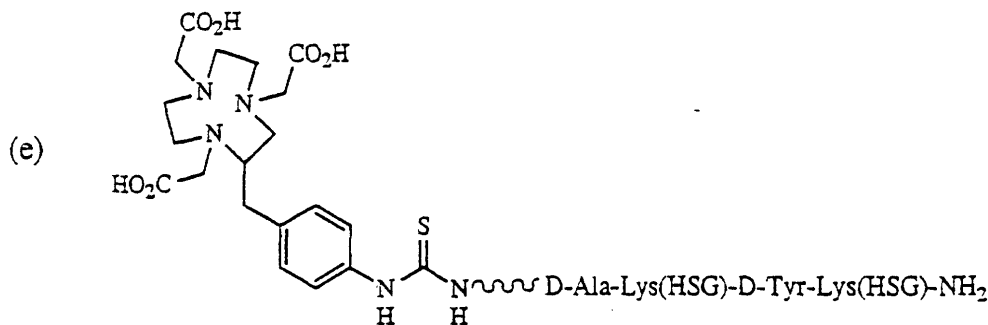
## 【化 1 9】



10

および

## 【化 2 0】



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。

## 【請求項 2 7 9】

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、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。

40

## 【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、

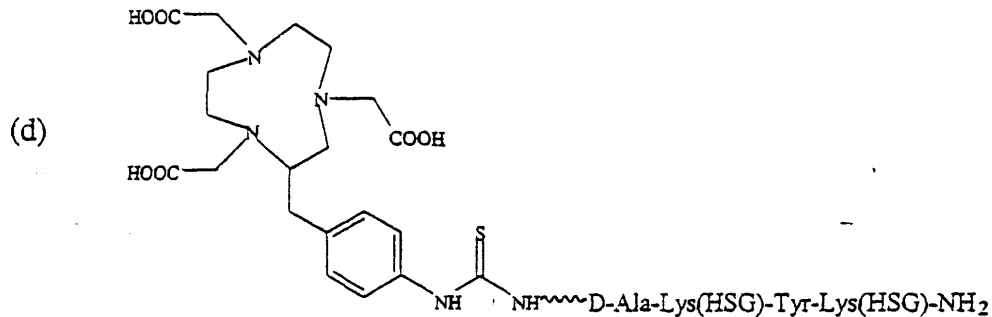
標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；

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

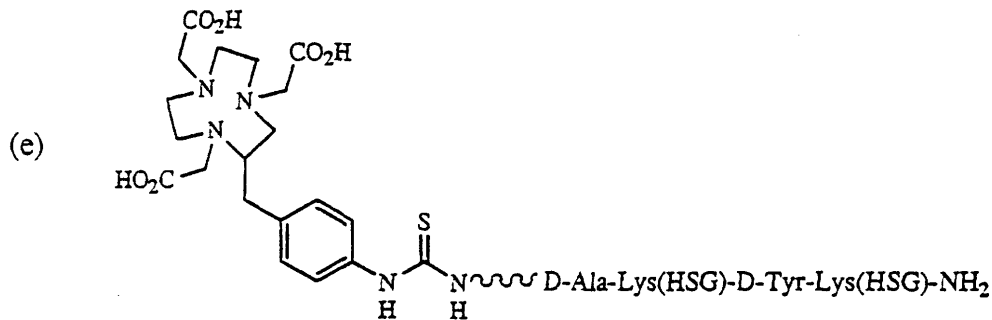
下記のコンジュゲート体：

50

- (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】



および  
 【化 2 2】



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 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 - 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 8 1 に記載の方法。

【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。

【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、

10

20

30

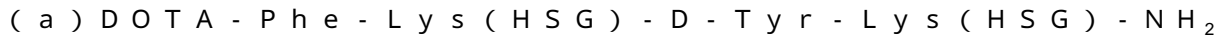
40

50

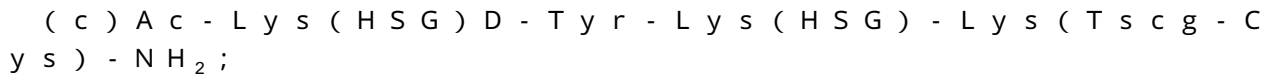
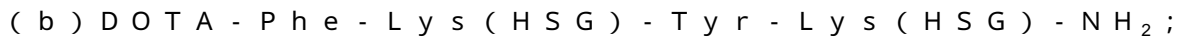
標的組織と特異的に結合する少なくとも1つのアームと、ターゲッティング可能なコンジュゲート体と特異的に結合する少なくとも1つの他のアームとを含む二重特異性の抗体または抗体フラグメントの有効量を投与すること；

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

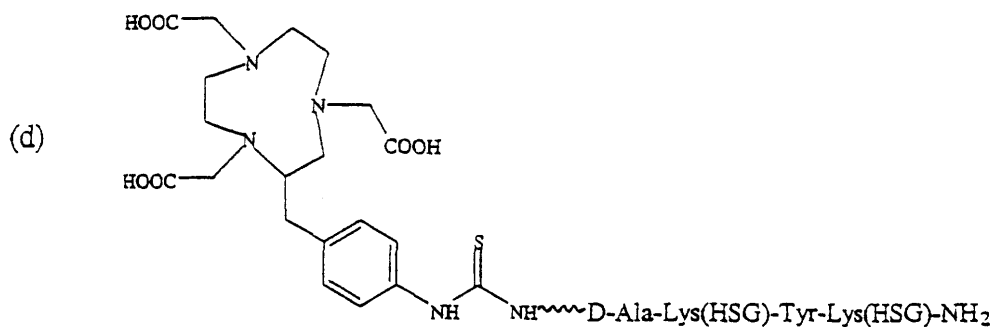
下記のコンジュゲート体：



；

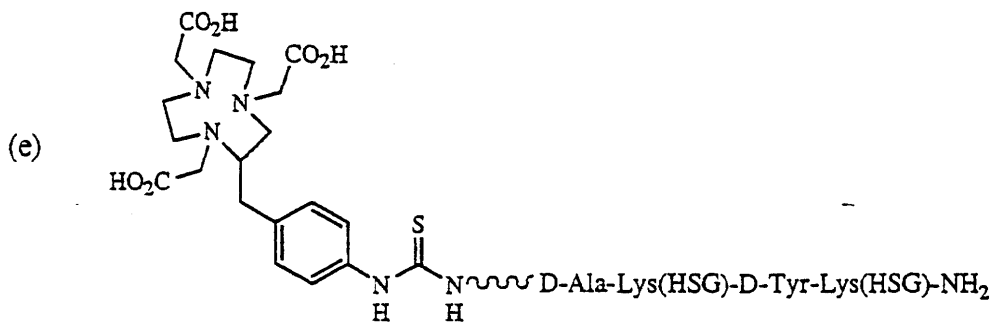


【化23】



および

【化24】



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286】

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：



；

10

20

30

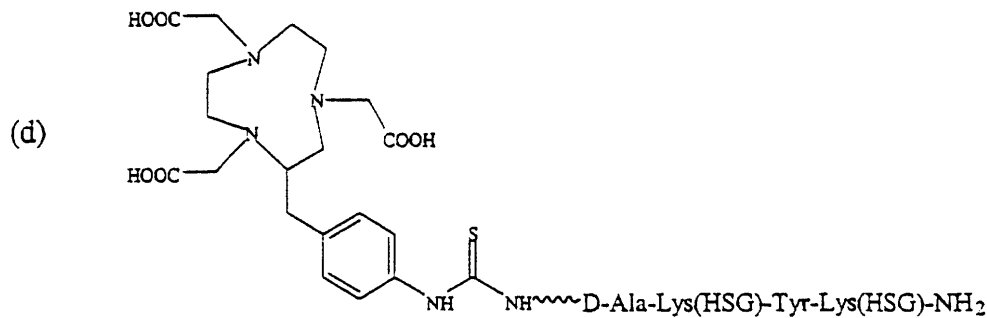
40

50

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

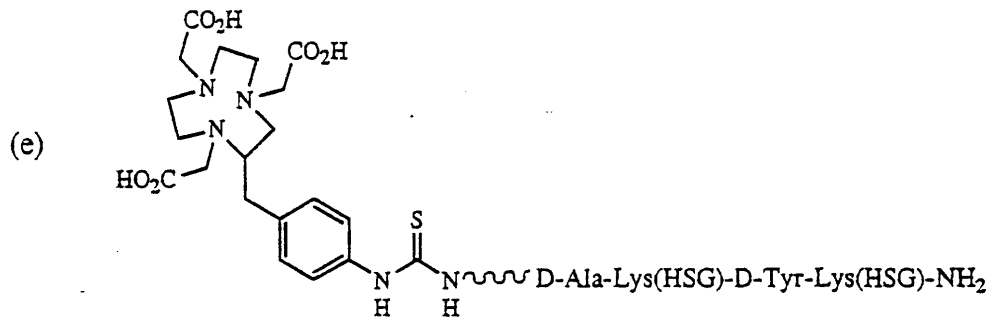
(c) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub> ;

【化 2 5】



および

【化 2 6】



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；

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> ;

；

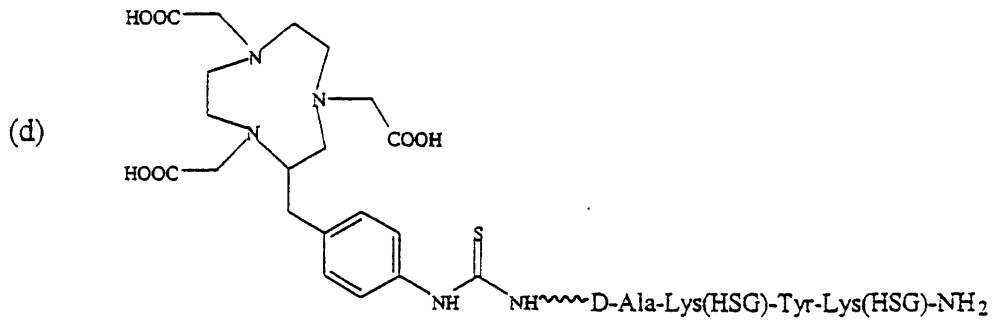
(b) DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub> ;

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

30

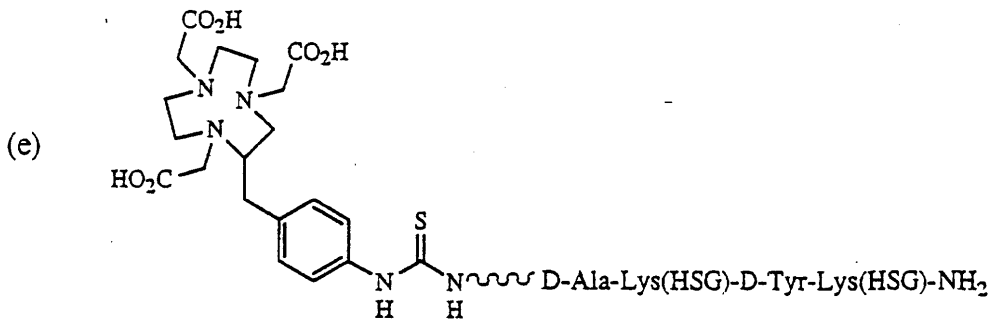
40

## 【化 2 7】



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。

30

## 【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

40

50

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。

#### 【 0 0 0 3 】

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 抗体、特にモノクローナル抗体 ( m A b )、そしてヒト化抗 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 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 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、あるいは少なくとも1つの抗 C S A p m A b またはそのフラグメントと、この抗 C S A p 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に関する。ヒト化抗 C S A p m A b、キメラ抗 C S A p m A b およびヒト抗 C S A p m A b 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 C S A p 抗体、キメラ抗 C S A p 抗体、ヒト抗 C S A p 抗体および抗体融合タンパク質をコードする D N A 配列、ならびにそのような D N A 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 C S A p 抗体、キメラ抗 C S A p 抗体およびヒト抗 C S A p 抗体を作製する方法を提供する。

#### 【 背景技術 】

#### 【 0 0 0 4 】

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 ( b s A b ) の使用が含まれる。この方法論では、b s A b が投与され、その b s A b 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 b s A b 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、b s A b 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。

#### 【 0 0 0 5 】

b s A b 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 b s A b を調製することは実際的ではない。さらに、b s A b / 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 b s A b 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、b s A b 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、b s A b 以外が結合した低分子量ハプテンは、実際には、非

10

20

30

40

50

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。

#### 【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ごんに向かわせる 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(特許文献1))、インジウム-111 (Barbetら、米国特許第5,256,395号(特許文献2))および米国特許第5,274,076号(特許文献3); Goodwinら、J. Nucl. Med. 33:1366~1372(1992)(非特許文献1); および Kranenborgら、Cancer Res (suppl.), 55:5864s~5867s(1995)(非特許文献2) および Cancer (suppl.), 80:2390~2397(1997)(非特許文献3) および ガリウム-68 (Bodenら、Bioconjugate Chem. 6:373~379(1995)(非特許文献4); Schuhmacherら、Cancer Res. 55:115~123(1995)(非特許文献5)) 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。

10

20

30

40

50

## 【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)（非特許文献6）；Goldenberg, DM, 放射免疫療法, Nuclear Medicine Annual 2001, L. Freeman編, Lippincott, William & Wilkins, Philadelphia, 2001, 167頁～206頁（非特許文献7））。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)（非特許文献8）；Goldenberg, Scientific American, Science & Medicine, 1:64 (1994)（非特許文献9）；Baldwinら、米国特許第4,923,922号（特許文献4）および同第4,916,213号（特許文献5）；Young, 米国特許第4,918,163号（特許文献6）；米国特許第5,204,095号（特許文献7）；Irieら、米国特許第5,196,337号（特許文献8）；Hellstromら、米国特許第5,134,075号（特許文献9）および同第5,171,665号（特許文献10）；Thorpeら、米国特許第6,342,221号（特許文献11）；Epsteinら、米国特許第5,965,132号（特許文献12）、同第6,004,554号（特許文献13）、同第6,071,491号（特許文献14）、同第6,017,514号（特許文献15）、同第5,882,626号（特許文献16）および同第5,019,368号（特許文献17）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)（非特許文献10））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曝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)（非特許文献11）、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)（非特許文献12）；Sharkeyら、Cancer, 73(suppl.):864 (1994)（非特許文献13））。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)（非特許文献14））。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。HAMMA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、HAMMA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HAMMA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。

10

【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。

20

【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ティング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。

30

【特許文献1】米国特許第4,863,713号

【特許文献2】Barbetら、米国特許第5,256,395号

【特許文献3】米国特許第5,274,076号

【特許文献4】Baldwinら、米国特許第4,923,922号

【特許文献5】米国特許第4,916,213号

【特許文献6】Young、米国特許第4,918,163号

【特許文献7】米国特許第5,204,095号

【特許文献8】Irieら、米国特許第5,196,337号

【特許文献9】Hellsstromら、米国特許第5,134,075号

【特許文献10】米国特許第5,171,665号

40

【特許文献11】Thorpeら、米国特許第6,342,221号

【特許文献12】Epsteinら、米国特許第5,965,132号

【特許文献13】米国特許第6,004,554号

【特許文献14】米国特許第6,071,491号

【特許文献15】米国特許第6,017,514号

【特許文献16】米国特許第5,882,626号

【特許文献17】米国特許第5,019,368号

【非特許文献1】Goodwinら、J.Nucl.Med.33:1366~1372(1992)

【非特許文献2】Kranenborgら、Cancer Res(suppl.)、5

50

5 : 5 8 6 4 s ~ 5 8 6 7 s ( 1 9 9 5 )

【非特許文献3】Cancer (suppl.)、80 : 2390 ~ 2397 (1997)

【非特許文献4】Boden̄、Bioconjugate Chem. 6 : 373 ~ 379 (1995)

【非特許文献5】Schuhmacher̄、Cancer Res. 55 : 115 ~ 123 (1995)

【非特許文献6】Goldenberg、Semin. Nucl. Med.、19 : 332 (1989)

【非特許文献7】Goldenberg, DM、放射免疫療法、Nuclear Medicine Annual 2001、L. Freeman編、Lippincott, William & Wilkins、Philadelphia、2001、167頁 ~ 206頁

10

【非特許文献8】Thorpe、TIBTECH、11 : 42 (1993)

【非特許文献9】Goldenberg、Scientific American、Science & Medicine、1 : 64 (1994)

【非特許文献10】Vaughan̄、Brit. J. Radiol.、60 : 567 (1987)

【非特許文献11】Gold̄、Cancer Res.、50 : 6405 (1990)

【非特許文献12】Blumenthal̄、Int. J. Cancer、22 : 292 (1989)

20

【非特許文献13】Sharkeȳ、Cancer、73 (suppl.) : 864 (1994)

【非特許文献14】Pant̄、Cancer、50 : 919 (1982)

【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。

30

【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。

40

【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。

【0021】

50

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CSAp MA b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CSAp MA bの軽鎖可変領域のCDRは、RSSQSIVHSNGNTYLEのアミノ酸配列を含むCDR1と、KVS N R F Sのアミノ酸配列を含むCDR2と、FQGS R V P Y Tのアミノ酸配列を含むCDR3とを含み、そしてヒト化抗CSAp MA bの重鎖可変領域のCDRは、EYVITのアミノ酸配列を含むCDR1と、EIYPGSGSTSYNEKF K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。

10

【0023】

本発明はさらに、ネズミ抗CSAp MA b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CSAp MA bの重鎖可変領域のCDRは、EYVITのアミノ酸配列を含むCDR1と、EIYPGSGSTSYNEKF K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。

【0024】

関連において、本発明は、ネズミ抗CSAp MA b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を提供する。この場合、ヒト化抗CSAp MA bの軽鎖可変領域のCDRは、RSSQSIVHSNGNTYLEのアミノ酸配列を含むCDR1と、KVS N R F Sのアミノ酸配列を含むCDR2と、FQGS R V P Y Tのアミノ酸配列を含むCDR3とを含む。

20

【0025】

本発明はさらに、本明細書中に記載される抗CSAp抗体のいずれか1つの抗CSAp MA 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、20keV~2,000keVの間のエネルギーを有する放射性核種である。

30

【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CSAp抗体のいずれか1つの抗CSAp MA 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20keV~10,000keVの間である。

40

【0027】

本発明はさらに、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CSAp MA 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CSAp M

50

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。

【 0 0 2 9 】

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ピヒクルに配合して前記被験体に投与する工程を含む。

【 0 0 3 0 】

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。

10

【 0 0 3 1 】

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、

20

( 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

30

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。

40

【 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

50

法は、(i)本発明の抗CSAp抗体のいずれか1つのむき出し状態の抗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の治療有効量を前記被験体に投与すること、(ii)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薬学的に好適な賦形剤に配合することを含む。

【0035】

さらなる態様において、本発明は、hMu-9またはヒトMu-9またはcMu-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。

【0036】

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hMu-9またはヒトMu-9またはcMu-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て、または他の非CSAp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、そしてそのような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。

10

【0037】

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ピ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-9 mA bまたはヒトMu-9 mA bまたはcMu-9 mA b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-9 mA bまたはヒトMu-9 mA bまたはcMu-9 mA b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。

20

【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。

30

【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。

40

【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、

(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

50

(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被験体に投与ステップと、

(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

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。

#### 【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：

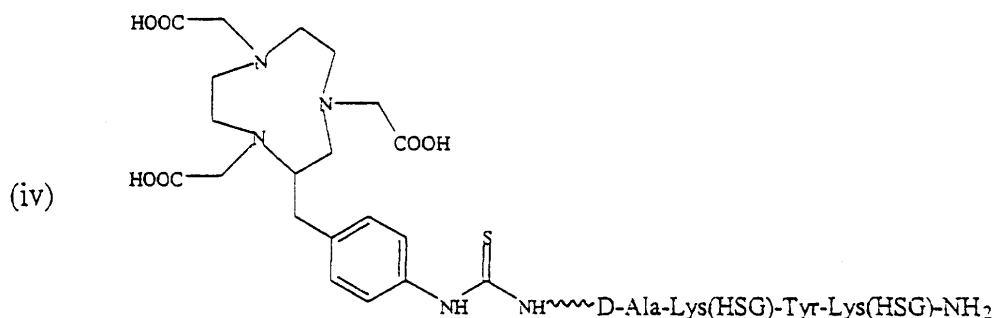
(i) DOTA - Phe - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>

；

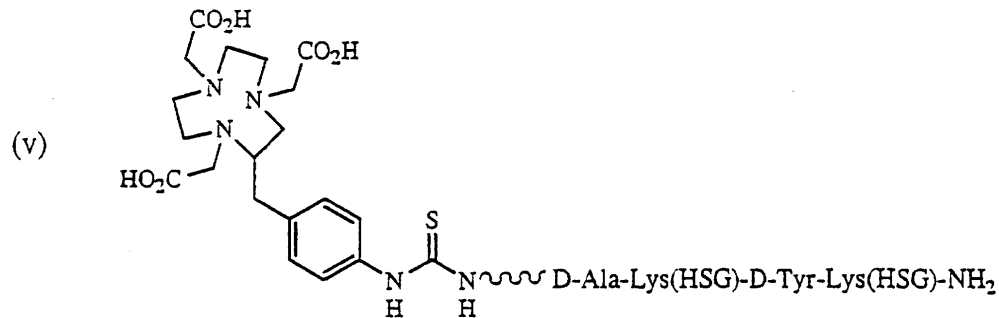
(ii) DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>；

(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ステップを含む。

## 【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、

20

(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、

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

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。

## 【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、

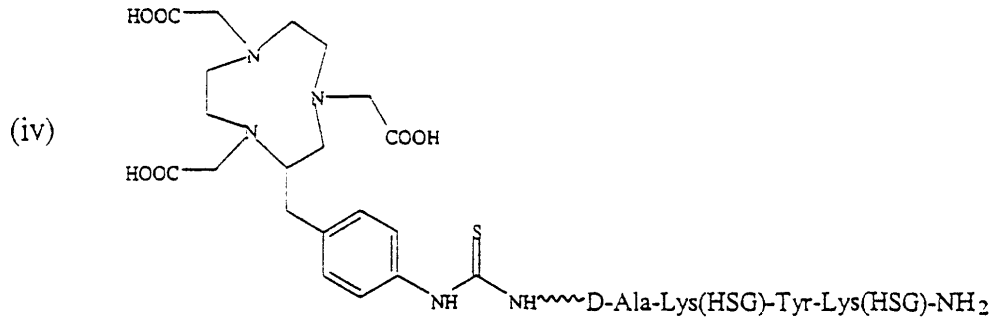
(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>

50

;

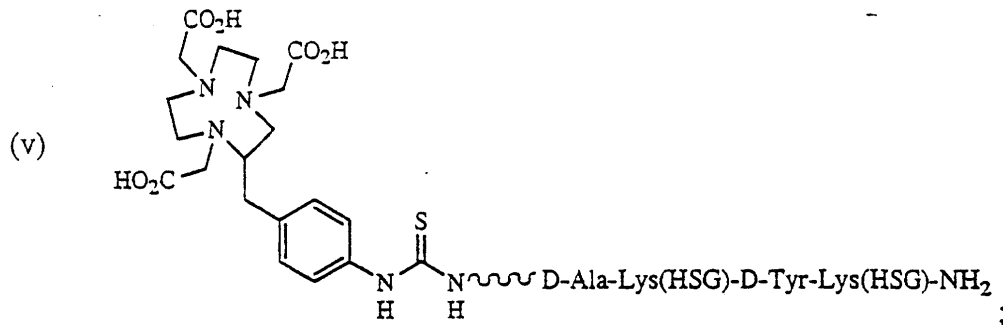
( i i ) D O T A - P h e - L y s ( H S G ) - T y r - L y s ( H S G ) - N H <sub>2</sub> ;( i i i ) A c - L y s ( H S G ) D - T y r - L y s ( H S G ) - L y s ( T s c g - C y s ) - N H <sub>2</sub> ;

【化3】



および

【化4】



からなるものでよい。

【0048】

本発明はまた、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、

30

(A) 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。

【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、

40

(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ステップと、

(B) 下記のコンジュゲート体：

( 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>

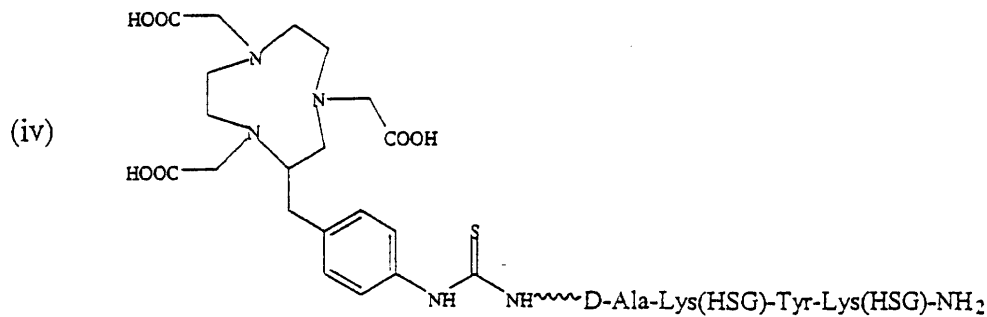
;

( i i ) 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> ;

50

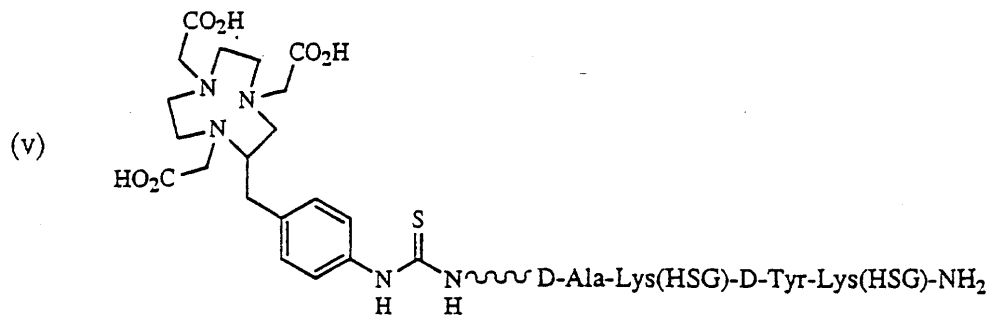
(iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>;

【化5】



および

【化6】



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。

30

【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、

40

(B) 下記のコンジュゲート体：

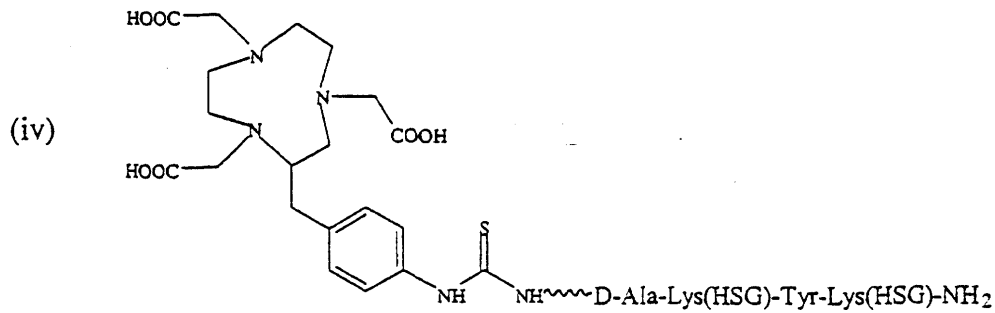
(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>

；

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

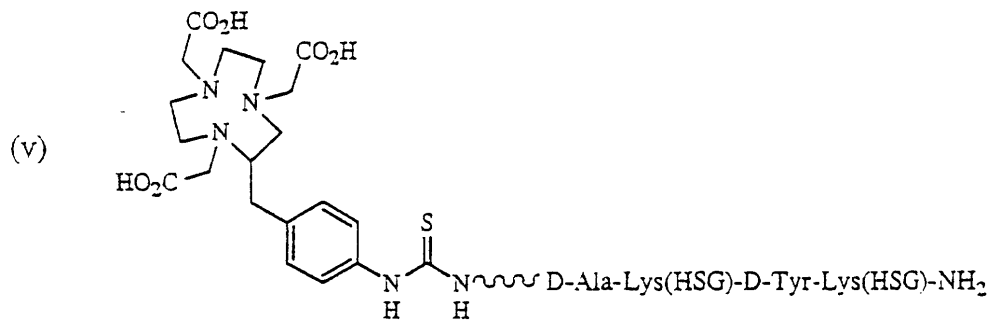
(iii) Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>；

## 【化7】



および

## 【化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、

30

(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>

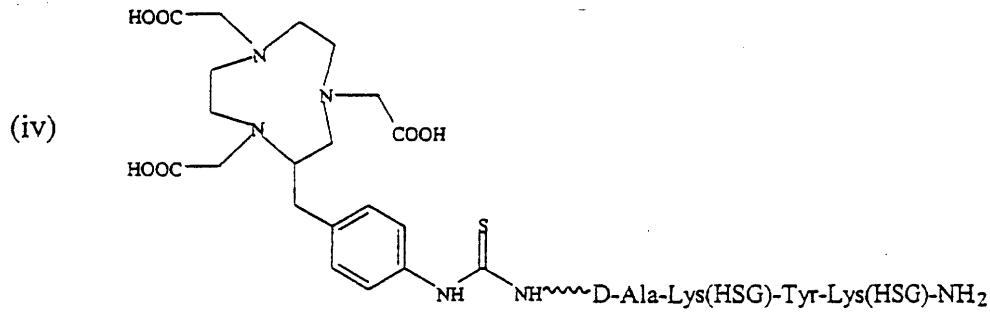
；

(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> ；

40

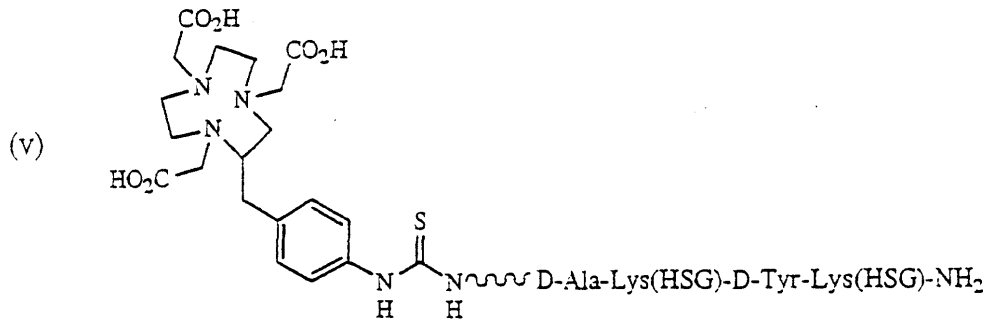
## 【化 9】



10

および

## 【化 10】



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。

## 【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>

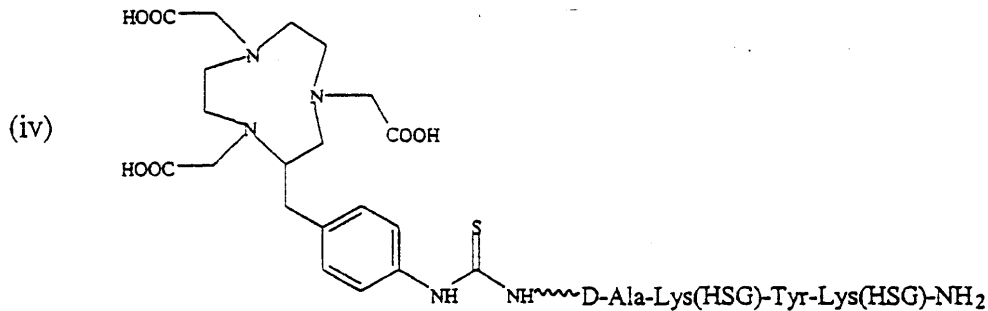
；

(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>；

40

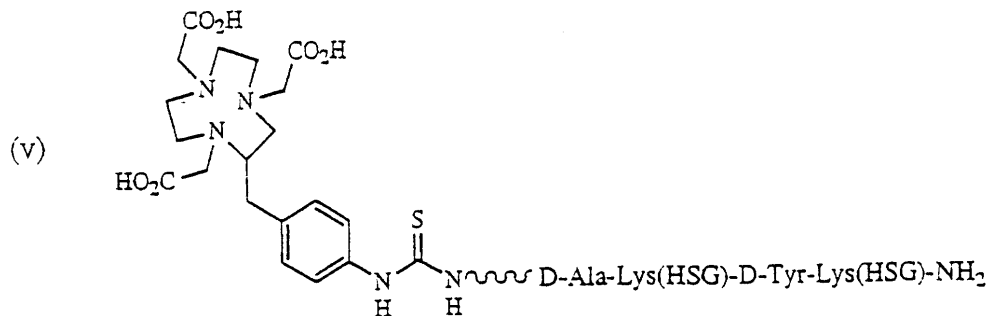
## 【化 1 1】



10

および

## 【化 1 2】



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。

## 【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) 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の抗体または 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位において蓄積させるステップと、

30

(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 4 8 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)

40

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 M R I 画像増強剤または蛍光標識で標識される。

## 【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、M u - 9 免疫コンジュゲート体またはそのフ

50

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

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)。

10

【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。

20

【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：

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

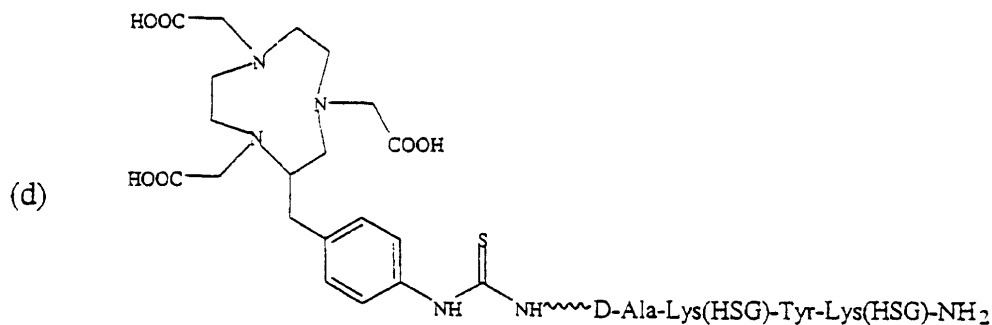
；

(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> ；

30

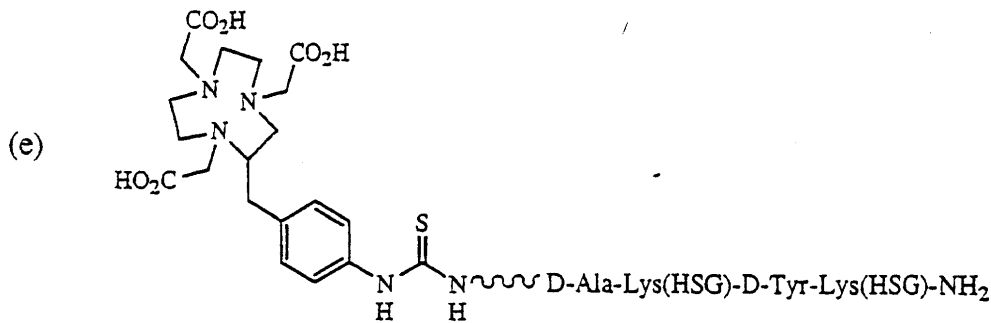
【化13】



40

および

## 【化 1 4】



10

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。

20

## 【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、

30

(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変換することができる)、

40

(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。

## 【0062】

50

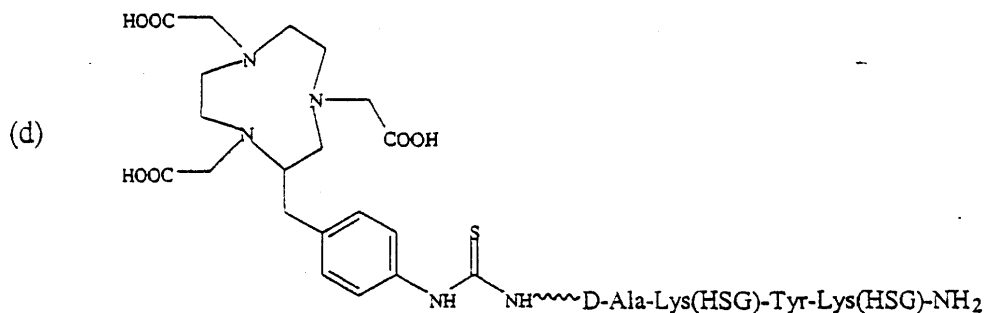
本発明はさらに、哺乳動物における標的細胞または標的組織または標的病原体を検出または処置するための方法に関する。この場合、この方法は、

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、

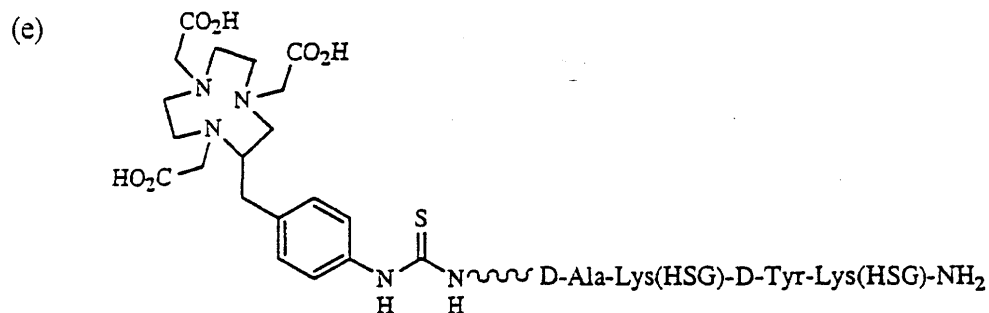
下記のコンジュゲート体：

- (a) 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15】



および

【化16】



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。

【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、

、

10

20

30

40

50

下記のコンジュゲート体：

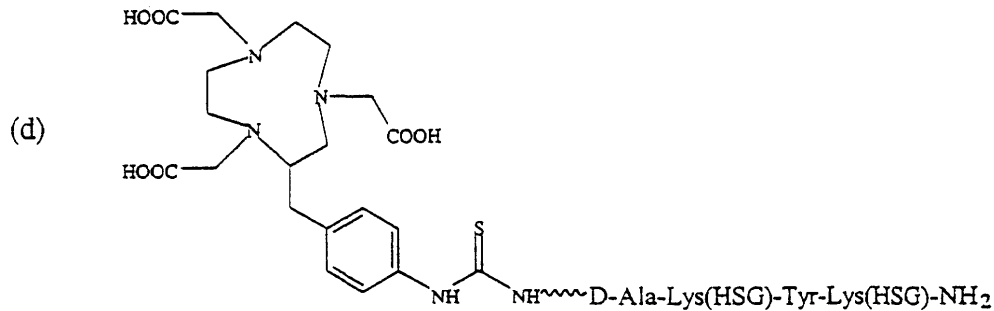
(a) DOTA - Phe - Lys (HSG) - D - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub>

；

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

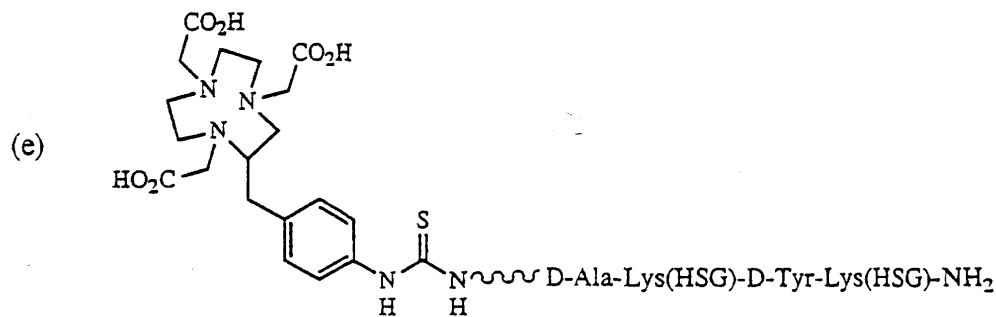
(c) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub>；

【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。

30

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

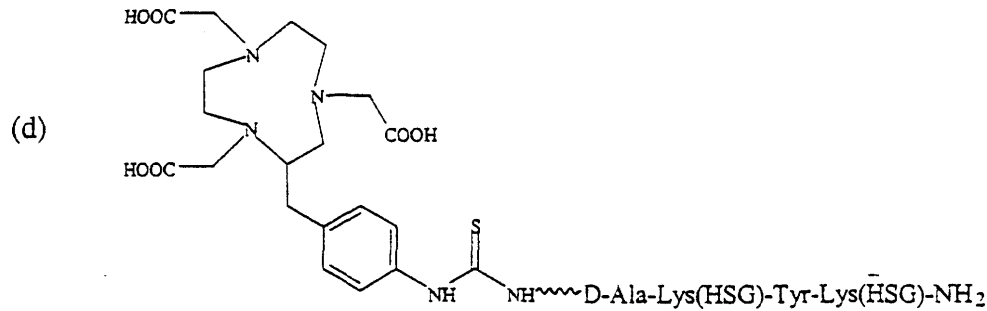
40

；

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

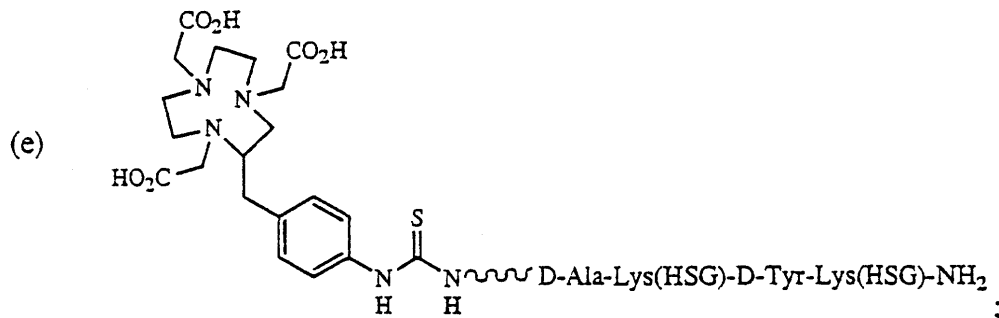
(c) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub>；

## 【化19】



および

## 【化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、

(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

を含む。

## 【0065】

本発明はさらに、

(a) DOTA - 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) DOTA - 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> ;

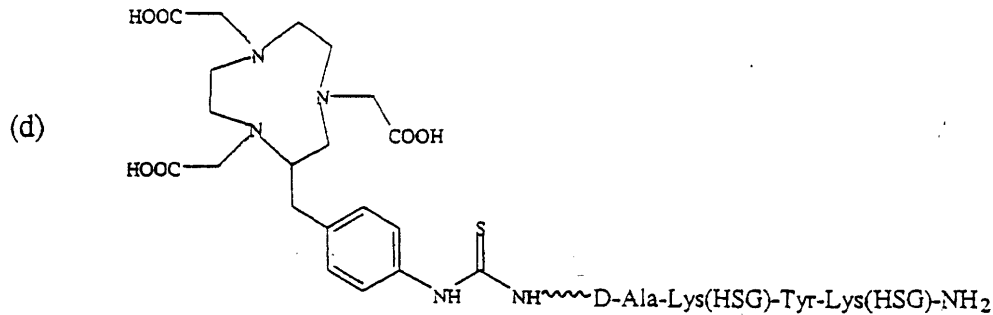
10

20

30

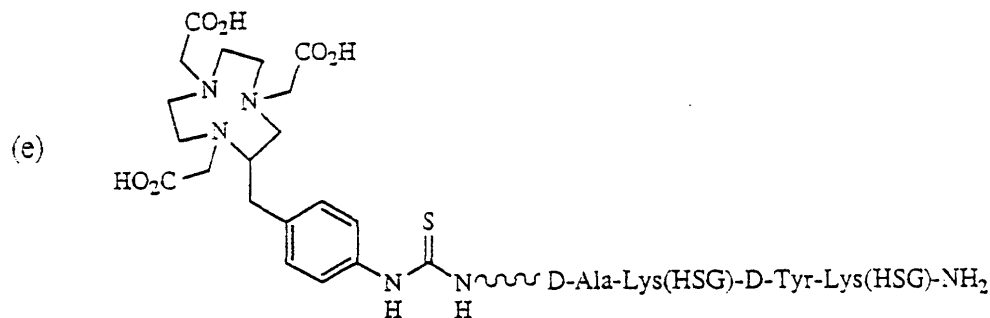
40

## 【化 2 1】



および

## 【化 2 2】



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に関する。

## 【0066】

本発明はさらに、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、

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：

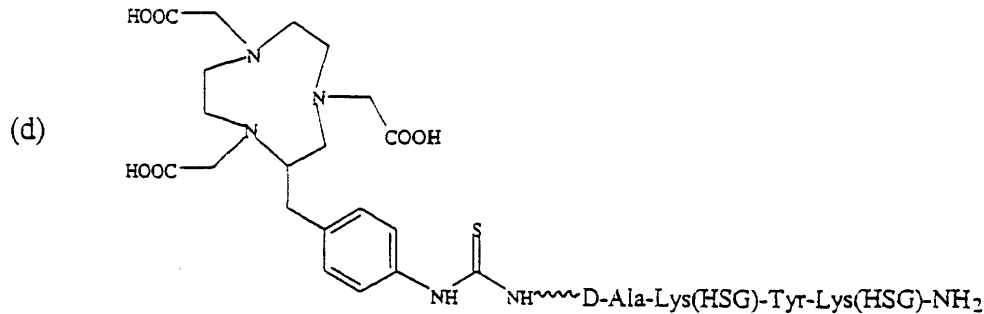
(a) DOTA - Phe - Lys ( H S G ) - D - Tyr - Lys ( H S G ) - N H <sub>2</sub>

50

;

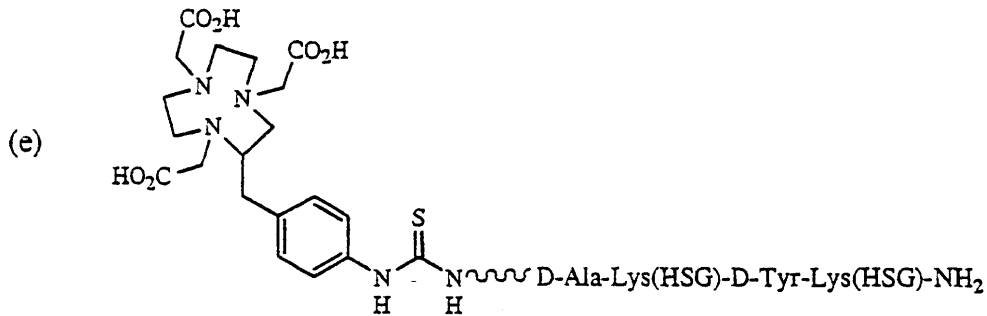
(b) DOTA - Phe - Lys (HSG) - Tyr - Lys (HSG) - NH<sub>2</sub> ;(c) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub> ;

【化23】



および

【化24】



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。

【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、

下記のコンジュゲート体：

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

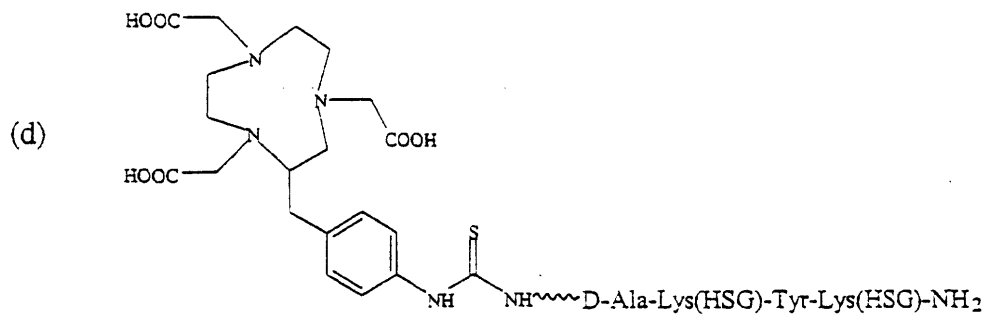
;

(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

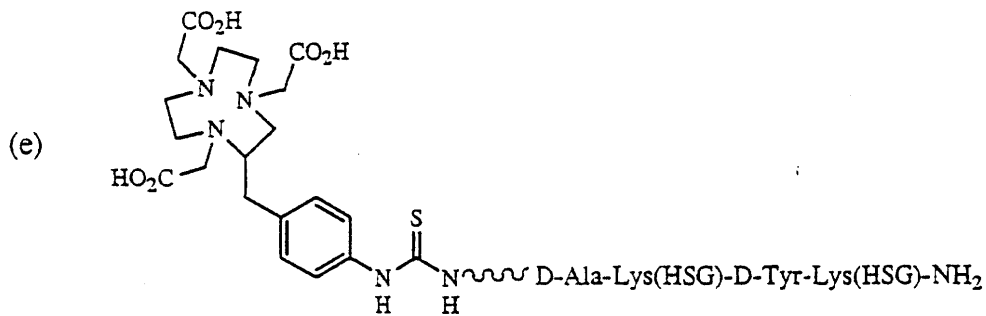
40

## 【化 2 5】



および

## 【化 2 6】



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、

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>

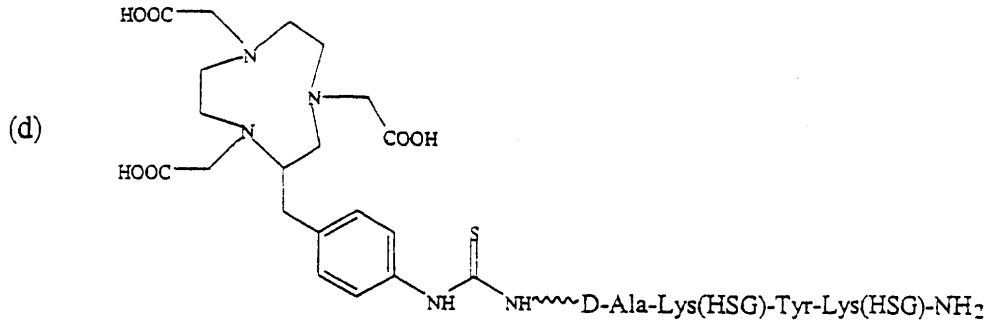
;

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

40

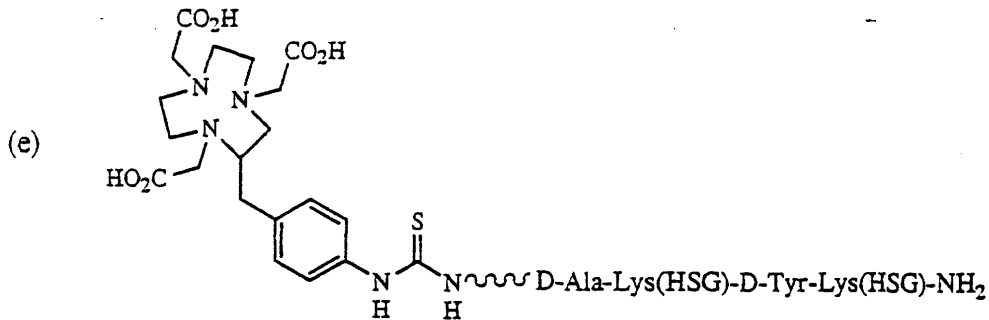
(c) Ac - Lys (HSG) D - Tyr - Lys (HSG) - Lys (Tscg - Cys) - NH<sub>2</sub> ;

## 【化 2 7】



および

## 【化 2 8】



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。

## 【 0 0 7 0】

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、

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) 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>

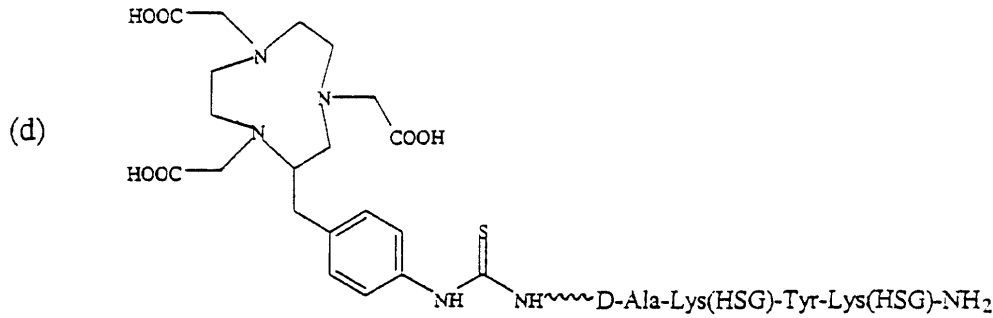
；

(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> ；

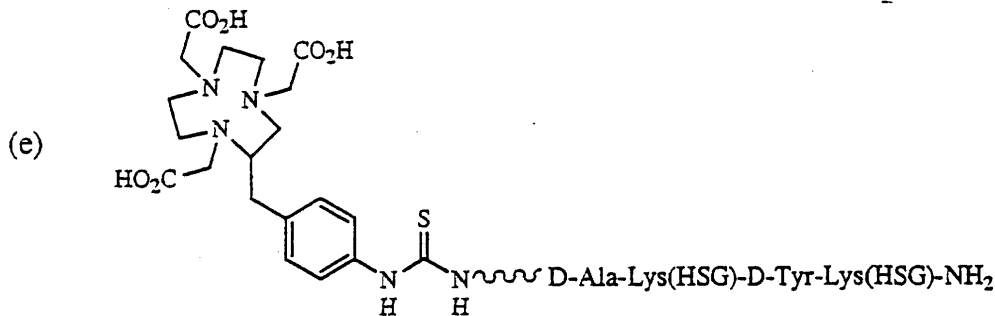
【化 2 9】



10

および

【化 3 0】



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】

30

【0072】

## 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')<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ナー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】

50

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応答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 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Vk領域および非ヒトVH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

10

20

30

40

50

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-colon-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、アプリン、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。

10

20

【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、ヒト血清バルボ様ウイルス、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、 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-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)、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。

30

40

【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、そしてCSAp抗体に対する融合パートナーとして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,

50

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。

【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

20

【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。

30

【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

40

50

。 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、Po - 215、Bi - 211、Ac - 225、Fr - 221、At - 217、Bi - 213、Fm - 255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2,000 keV ~ 10,000 keVであり、より好ましくは3,000 keV ~ 8,000 keVであり、最も好ましくは4,000 keV ~ 7,000 keV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4,975,278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5,270,196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5,660,829号、同第5,587,161号、同第5,405,990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5,561,119号、同第5,646,298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4,975,278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4,975,278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5,338,678号、同第5,545,548号）が、本発明のための好適な治療剤である。

#### 【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学的治療のために有用であり、B - 10、Gd - 157およびU - 235が中性子捕獲治療のために有用である。

#### 【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-ストレプト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6,331,175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

10

20

30

40

50

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(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。有用な陽電子放射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。有用な線放射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の金属と錯体形成すると

30

40

50

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TEETAなどは、様々な金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、RAIT用の $^{223}\text{Ra}$ 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、ヨーシバミド、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、イポダート、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)」、METHOD

50

S I N M O L E C U L A R B I O L O G Y、第 10 巻、79 頁 ~ 104 頁 (The Humana Press, Inc., 1992) も参照のこと。

【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、自動化されたペプチド合成機を使用して容易に調製することができる。Ab 製造のために、酵素欠損ハイブリドーマが、融合細胞株の選択を可能にするために単離される。この技術もまた、リンカーを含むキレートの 1 つまたは複数 (例えば、In (III) - DTPA キレート) に対する抗体を惹起させるために使用することができる。In (III) - ジ DTPA に対するモノクローナルマウス抗体が知られている (Barbet、上掲の '395 号特許)。

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

30

【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  $\beta$ -サブユニットまたはがん胎児性抗原 (CEA) の  $\beta$  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。

【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。Yura、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

40

50

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、APRIL-TALL-IおよびBCMA-TACI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CSAp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EUおよびNEWM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関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(YAC)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1Mbであるので、YAC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YAC(重鎖遺伝子座を含有するYACおよび軽鎖遺伝子座を含有するYAC)が、YAC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YAC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、免疫化に応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(MMCT)によってマウス胚幹細胞に導入することができる。Tomizukaら、Nature Genetics、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、Barbasら、METHODS: A Companion to Methods in Enzymology、2:119(1991);およびWinterら、Ann. Rev. Immunol. 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

50

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>L</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); Riechmann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

40

50

(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なることができる。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、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。

#### 【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-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-CAM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】

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。

10

【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(CSAp)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のヒグロマイシン(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。

20

【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。

30

【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'-GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA-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

40

50

(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<sub>H</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のTA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りの方法として、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<sup>+</sup>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。

#### 【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。

#### 【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°C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°C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。

#### 【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CSAp抗体の調製

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<sub>L</sub>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<sub>L</sub>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<sub>L</sub>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<sub>L</sub>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。

10

20

## 【0124】

あるいは、V<sub>L</sub>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。

30

40

## 【0125】

V<sub>L</sub>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V<sub>L</sub>5-3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](Perki

50

n Elmer Cetus、Norwalk、Conn.)を含有する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ー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PstI/BstEII部位へのそれらのサブクローニングは、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ーニングは、制限消化分析によって最初に分析することができ、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選択マーカを含有するpSVgpt型ベクターのpG1gにおける対応する部位にサブクローニングし、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ーニングし、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-Ag1

10

20

30

40

50

4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

#### 【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<sup>o</sup>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。

20

30

#### 【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4NHCl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

40

50

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、HSFM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。

20

【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、Tempestrā、Bio/Technology、9:266(1991); Verhoeyen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。

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。

40

【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

50

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DNA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)。

20

#### 【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。

#### 【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と一緒に加えられる。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

50

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<sub>H</sub> 遺伝子ファミリーおよび V<sub>L</sub> 遺伝子ファミリーに対して 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<sub>H</sub> プールおよび V<sub>L</sub> 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<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub> が V<sub>L</sub> 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<sub>H</sub> フラグメントおよび リンカー-V<sub>L</sub> フラグメントが増幅され、J<sub>H</sub> 領域で組み立てられる。得られる V<sub>H</sub>-リンカー-V<sub>L</sub> 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')<sub>2</sub> 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、Golden

berg、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。

10

20

#### 【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。

30

#### 【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はともに、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)ヘキサんと反応して、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

40

50

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。

10

20

【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。

30

【0150】

b s Ab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。

40

【0151】

機能的な二重特異性の単鎖抗体(b s c Ab)(これもまた二重特異性抗体(d i a b o d y)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

50

~7025、1995を参照のこと。例えば、b s c A b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b s c A b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(tri antibody)および四重特異性抗体(tetra body)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。

20

## 【0153】

多量のb s c A b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b s c A b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。b s c A b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。

30

40

## 【0154】

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b s c A b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

50

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 b s c A b 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。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。

10

## 【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。

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畳まれた 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

40

50

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。

【0158】

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

【0159】

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

【0160】

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ティングされる抗体、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

30

40

50

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。

【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抗体または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

10

20

30

40

50

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- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ アンタゴニスト、カルシウムイオノホア、カルシウムフラックス誘導剤、ならびにそれらの誘導体およびプロドラッグが含まれるが、これらに限定されない。シトシンアラビノシド、アミノプテリンなどの代謝拮抗剤；アントラサイクリン類；ピンカアルカロイドおよび他のアルカロイド；抗生物質、デメコルチン；エトポシド；ミトラマイシン；および他の抗腫瘍アルキル化剤もまた、本発明の抗体との使用のために考えられる。

40

【0168】

さらに、本発明の治療用組成物は、CSA分子上の異なる非遮蔽エピトープに対するむき出し状態のモノクローナルMu-9抗体またはそのフラグメントの混合物またはハイ

50

ブリッド分子を含有することができる。従って、本発明では、少なくとも2つのCSAp エピトープと結合するモノクローナルMu-9抗体またはそのフラグメントの混合物を含む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

20

#### 【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。

30

#### 【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、細胞分裂阻害剤、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、ドキソルビシン、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ン）などが含まれる。様々な好適な化学療法剤が、REMI NGTON'S PHARMA CEUTICAL SCIENCES（第19版）（Mac k Publi shing Co.、1995）に、そしてGOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMA COLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS（第7版）（Mac Millan Publi shing 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

40

50

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。

【0172】

さらに、DTPA、DOTA、TETAまたはNOTAなどのキレーター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 den 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）；Peligrin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。

【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）、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

10

20

30

40

50

激因子 ( G - C S F ) および顆粒球マクロファージ - コロニー刺激因子 ( G M - C S F ) 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 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、I L - 2、I L - 6、I L - 10、I L - 12、I L - 18、インターフェロン - 、T N F - などが含まれる。あるいは、被験体には、むき出し状態の M u - 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 M u - 9 抗体が投与される前に、またはむき出し状態の M u - 9 抗体の投与と同時に、またはむき出し状態の M u - 9 抗体が投与された後に投与することができる。M u - 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、C D 40 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 C S A p または抗 C S A p / 非 C S A p 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。M u - 9 抗体はまた、免疫調節抗体 ( C D 40 に対する抗体など ) と組み合わせて使用ことができ、または融合タンパク質として、免疫調節抗体 ( C D 40 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。

#### 【 0 1 7 5 】

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 - D T P A 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 0 9 / 9 2 1 , 2 9 0 号 ( 2 0 0 1 年 1 0 月 1 0 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が含まれる。

#### 【 0 1 7 6 】

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ー成分が含まれる。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、M n - 51、M n - 52 m、F e - 52、C o - 55、C u - 62、C u - 64、G a - 68、A s - 72、B r - 75、B r - 76、R b - 82 m、S r - 83、Y - 86、Z r - 89、T c - 94 m、I n - 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 , 0 0 0 k e V 未満であり、より好ましくは 1 , 0 0 0 k e V 未満であり、最も好ましくは 7 0 0 k e V 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

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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はなく、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。

40

【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。

50

## 【0182】

b s A b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ぬ。すなわち、b s A bを構築物に加えることができ、逆に、構築物をb s A b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。ターゲッ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。

## 【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。

## 【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。

## 【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-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。

## 【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

10

20

30

40

50

ターゲティング剤は2つの異なる s c F v を有しており、1つの s c F v 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 s c F v 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

20

30

40

50

#### 【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。知られている治療剤または診断剤の任意の組合せを使用して、抗体および抗体融合タンパク質を標識することができる。mAbコンジュゲート体の抗体成分の結合特異性、治療剤または診断剤の効力、および抗体のFc部分のエフェクター活性は、コンジュゲート体の標準的な試験によって決定することができる。

#### 【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 MA bまたはそのフラグメントと、抗CSAp MA bでない少なくとも1つの第2のMA b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MA b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A33などである。さらに、抗体融合タンパク質の抗体の1つ以上に2つ以上の治療剤または診断/検出剤を結合させることができる。さらに、これらの治療剤は同じである必要はなく、異なる治療剤にすることができる。例えば、薬物と放射性同位体とを同じ融合タンパク質に結合させることができる。特に、IgGを<sup>131</sup>Iで放射標識し、かつ薬物に結合させることができる。<sup>131</sup>IはIgGのチロシンに取り込まれ、薬物はIgGリシンの-アミノ基に結合する。治療剤および診断剤の両方はまた、還元されたSH基および炭水化物側鎖にも結合させることができる。

## 【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(SPDP)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); Upešlacis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。

10

20

## 【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。

30

## 【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。

40

## 【0195】

## V. 抗体に対してターゲッティング可能な構築物

ターゲッティング可能な構築物は多様な構造が可能であるが、ターゲッ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なく、bsAbターゲッティング方法の中で使用されたときには迅速なインピ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ピ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

50

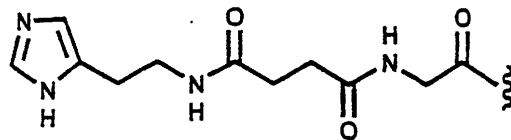
的には、多くの有機成分の固有の疎水性を補うための親水性キレート化剤の使用によることによって達成される。また、反対の溶解特性を有するターゲティング可能な構築物のサブユニット、例えば、様々なアミノ酸を含み、そのうちのいくつかが疎水性のアミノ酸であり、いくつかは親水性のアミノ酸であるペプチドを選択することもできる。ペプチドの他に、炭水化物を使用することができる。

【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、チロシルリジン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:

10

20



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トイドから構築される骨格構造などが考えられる。

30

【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キングされる。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。

40

【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

50

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、迅速なインピ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。

10

#### 【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、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{12}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 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。

20

#### 【0203】

配位子が、ハード塩基とキレート化する官能基、例えば、カルボキシレ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状キレーターが、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。

30

40

#### 【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

50

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、ペプチドハブテンを、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、<sup>99m</sup>Tc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。

10

## 【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。

20

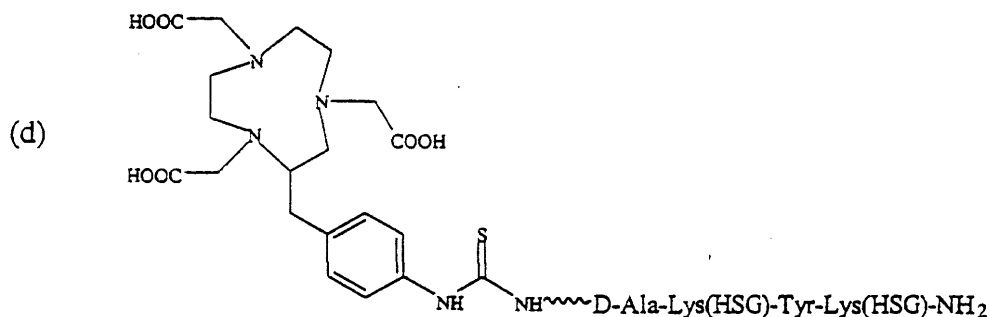
## 【0206】

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> ;

30

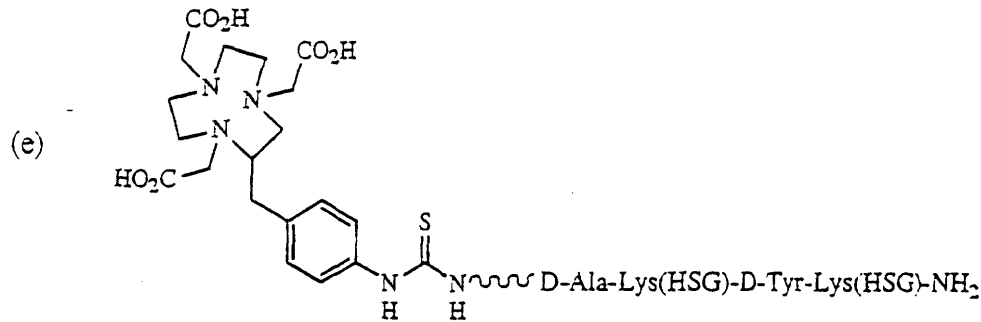
## 【化32】



40

および

## 【化 3 3】



10

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、 $^{68}\text{Ga}$  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  $\text{Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH}_2$  の合成は、ペプチド合成機において、Rinkアミド樹脂に  $\text{Alloc-Lys(Fmoc)-OH}$  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、 $\text{Fmoc-Cys(Trt)-OH}$  および  $\text{TscG}$  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。 $\text{Alloc-Lys(Tscg-Cys(Trt))rink}$  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。 $(\text{Lys(Alloc)-D-Tyr-Lys(Alloc)-Lys(Tscg-Cys(Trt))})rink$  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  $\text{N-トリチル-HSG-OH}$  で処理した。Karacayら、Bioconjugate Chem., 11: 842 ~ 854 (2000) を参照のこと。 $\text{Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH}_2$  の合成ならびに  $\text{DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH}_2$  および  $\text{DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH}_2$  の合成は、下記に、より詳細に記載される。

20

30

## 【0208】

金属キレートの調製

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  $^{111}\text{InCl}_3$  が存在するときでさえ、 $99\text{m-Tc(V)}$  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  $\text{Na } 99\text{m-TcO}_4$  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。 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{213}\text{Bi}$  などの他のソフト酸のカチオン、ならびに  $\text{Mn}$ 、 $\text{Co}$ 、 $\text{Ni}$ 、 $\text{Pb}$ 、 $\text{Cu}$ 、 $\text{Cd}$ 、 $\text{Au}$ 、 $\text{Fe}$ 、 $\text{Ag}$  (一価)、 $\text{Zn}$  および  $\text{Hg}$  の二価または三価のカチオン、特に  $^{64}\text{Cu}$  および  $^{67}\text{Cu}$  などは、そのうちのいくつかは放射性免

40

50

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 μg/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<sub>3</sub>(P(Ph<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)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)<sub>2</sub>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。

#### 【0209】

##### VI. 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。

#### 【0210】

bsAb、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bsAb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る。用いられる試薬の特有の性質に依存する。bsAb-F(ab')<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。IgG-Fab'bsAb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。

#### 【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。

#### 【0212】

bsAb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

10

20

30

40

50

滅崩壊のときに生じる 5 1 1 k e V の 線光子が検出される。

【 0 2 1 3 】

本発明では、一般に、2 5 k e V ~ 6 0 0 k e V 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、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{154} \sim ^{158}\text{Gd}$ および $^{175}\text{Lu}$ が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 2 1 4 】

本発明の抗体または抗体フラグメントは、米国特許第 6 , 0 9 6 , 2 8 9 号、同第 4 , 3 3 1 , 6 4 7 号、同第 4 , 8 1 8 , 7 0 9 号、同第 4 , 3 4 8 , 3 7 6 号、同第 4 , 3 6 1 , 5 4 4 号、同第 4 , 4 4 4 , 7 4 4 号および同第 5 , 8 5 1 , 5 2 7 号で議論されるように、光学的療法 ( P D T ) の方法において使用することができる。

10

【 0 2 1 5 】

P D T 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、6 3 0 n m ) の使用により開始される。様々な代替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 ( B P D - M A ) 、スズエチオプルプリン ( S n E T 2 ) 、スルホン化アルミニウムフタロシアニン ( A l S P c ) およびルテチウムテキサフィリン ( L u t e x ) が含まれるが、これらに限定されない。

20

【 0 2 1 6 】

さらに、P D T 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す、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。

30

【 0 2 1 7 】

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学的治療と呼ばれている ( J o r i ら ( 編 ) 、 P h o t o d y n a m i c T h e r a p y o f T u m o r s a n d O t h e r D i s e a s e s ( L i b r e r i a P r o g e t t o , 1 9 8 5 ) ; v a n d e n B e r g h , C h e m . B r i t a i n , 2 2 : 4 3 0 ( 1 9 8 6 ) ) 。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 . I m m u n o l . , 1 3 0 : 1 4 7 3 ( 1 9 8 3 ) ; 同上、C a n c e r R e s . , 4 5 : 4 3 8 0 ( 1 9 8 5 ) ; O s e r o f f ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 3 : 8 7 4 4 ( 1 9 8 6 ) ; 同上、P h o t o c h e m . P h o t o b i o l . , 4 6 : 8 3 ( 1 9 8 7 ) ; H a s a n ら、P r o g . C l i n . B i o l . R e s . , 2 8 8 : 4 7 1 ( 1 9 8 9 ) ; T a t s u t a ら、L a s e r s S u r g . M e d . 9 : 4 2 2 ( 1 9 8 9 ) ; P e l e g r i n ら、C a n c e r 6 7 : 2 5 2 9 ( 1 9 9 1 ) 。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。

40

50

## 【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。b s A b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、b s A b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ッティングされた後、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ッ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、予備的にターゲッティングされた酵素によって活性化された薬物に変換され得る。予備的にターゲッ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

## 【0219】

抗がん治療のために有用なくつき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位に蓄積する。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。

20

## 【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、ドキシソルピシン（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。

30

## 【0221】

プロドラッグCPT-11（イリノテカン）は、インピボでカルボキシルエステラーゼによって、活性化代謝産物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）に対してターゲッティングされたb s A b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、活性化SN-38は腫瘍の近くに留まり、その結果として、ターゲッ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~

40

50

2651 (1998); および Potterら、Cancer Res. 58: 3627 ~ 3632 (1998) を参照のこと。

【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ビシンの誘導体に基づく設計されたプロドラッグが、カルボキシエステル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ソルビ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sporin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。

10

20

【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。

30

【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、 $\alpha$ 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1.7 MeVの $\alpha$ 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

40

50

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改変することができる。

#### 【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も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。

10

#### 【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。

20

#### 【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。

30

40

#### 【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。

50

## 【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)、REMI NGTON'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。

10

## 【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ラグメントは、例えば、ボ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、滅菌されたバ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。

20

## 【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)、REMI NGTON'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

30

## 【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ト抗体はまた、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

40

50

ケジュールを適切に調節して行うことができる。

【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をもたらされる場合、生理学的に意味を有する。

【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CSAp抗体またはヒト化抗CSAp抗体またはヒト抗CSAp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Mu-9抗体またはキメラMu-9抗体またはヒトMu-9抗体をコードするDNA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、インピトロでの組換えDNA技術および合成技術が含まれる。例えば、Sambrookら、1989、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratory (New York); Ausubelら、1997、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons (New York)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。

【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、AAV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。

【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Mu-9抗体またはキメラMu-9抗体またはヒトMu-9抗体をコードするDNA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

10

20

30

40

50

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DNA配列、ヒトIgG1重鎖定常領域をコードするゲノム配列、Ig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DNA配列を含む。

#### 【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。

#### 【0240】

#### IX. 実施例

##### [実施例1]

Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>(IMP243)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0.28M)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。

#### 【0241】

##### [実施例2]

IMP243を含むTc-99mキット配合物

22.093gのヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、0.45gの2,4-ジヒドロキシ安息香酸、0.257gの酢酸ナトリウム塩、および10.889gのD-グルコヘプトン酸ナトリウム塩を、170mL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1M NaOHでpH5.3に調節し、その後、220mLの総容量にさらに希釈した。第一スズ緩衝溶液を、0.2mLのSnCl<sub>2</sub>(200mg/mL)を3.8mL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>(0.0026g)を78mLの緩衝溶液に溶解し、0.52mLの第一スズ緩衝液と混合した。その後、ペプチド溶液を0.22mのMilllex GVフィルターでろ過し、1.5mLずつ小分けして3mL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】

1.5mLの生理的食塩水における過テクネチウム酸塩溶液(27mCi)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。

#### 【0243】

##### [実施例3]

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>(IMP237)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

10

20

30

40

50

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、 $^{111}\text{In}$ -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】

##### IMP237の合成

IMP237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(Aloc)-OH、Fmoc-Tyr(But)-OH、Fmoc-Lys(Aloc)-OH、Fmoc-Phe-OH(これらの試薬はAdvanced Chemtechから得られた)、トリチル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(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(Aloc)-Tyr(But)-Lys(Aloc)-NH-Sieberアミド樹脂から得られた。

10

#### 【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Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を混合して、50mLのH<sub>2</sub>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H<sub>2</sub>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Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、ろ過し、濃縮して、25.709gの白色固体が得られた。

20

#### 【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NaHCO<sub>3</sub>で抽出した。有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>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。

30

#### 【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H<sub>2</sub>Oで停止させた。層を分離し、有機溶液をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>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Et<sub>2</sub>Oとともに粉砕して、黄色の沈澱物を形成させ、これを50mLのEt<sub>2</sub>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。

40

#### 【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BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>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 NaOHに注ぐことによ

50

て停止させ、生成物を200 mL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100 mL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400 mLの0.5 Mリン酸緩衝液(pH 7.5)に注ぎ、200 mLの $\text{EtOAc}$ で2回抽出した。水層を1 M  $\text{HCl}$ でpH 3.5に酸性化して、200 mL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(8.58 g)。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)。

#### 【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、0.25 M  $\text{NH}_4\text{OAc}/10\% \text{HPCD}$ 緩衝液に溶解した。溶液を0.22  $\mu\text{m}$ 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緑ひだキャップで密封された。

10

#### 【0250】

$^{90}\text{Y}$ (約400  $\mu\text{Ci}/\text{キット}$ )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。

20

#### 【0251】

##### $^{111}\text{In}$ を用いた標識

$^{111}\text{In}$ (約300  $\mu\text{Ci}/\text{キット}$ )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 $2.56 \times 10^{-5}$  M  $\text{In}$ 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。

30

40

#### 【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。

#### 【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

50

の腫瘍対非腫瘍比が表 2 に示される。

【 0 2 5 4 】

【表 1】

hMN-14×m679 注射後 24 時間における  $^{111}\text{In}$  標識ペプチドによる  
プレターゲットイング (%注射量/g 組織)

組織	$^{111}\text{In}$ IMP 237 の 3 時間後	$^{111}\text{In}$ IMP 237 の 24 時間後	$^{111}\text{In}$ 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

20

【 0 2 5 5 】

【表 2】

hMN-14×m679 注射後 24 時間における  $^{111}\text{In}$  標識ペプチドによる  
プレターゲットイング (腫瘍/非腫瘍組織比)

組織	$^{111}\text{In}$ IMP 237 の 3 時間後	$^{111}\text{In}$ IMP 237 の 24 時間後	$^{111}\text{In}$ 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

40

【 0 2 5 6 】

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 (0.0019 g) を 587 μl の 0.5 M NH<sub>4</sub>Cl (pH 5.5) に溶解した。1.7 μL 量のペプチド溶液を 165 μl の 0.5 M NH<sub>4</sub>Cl (pH 5.5) で希釈した。10 μL の  $^{111}\text{In}$  (1.8 mCi) 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。

50

## 【0257】

標識ペプチドを、Waters 8 x 100 mm 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% TFA / 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% TFA 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 HPLC プロファイルは、 $^{111}\text{In} - \text{IMP} 241$  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、HPLC 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、HPLC 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。

## 【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。

## 【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 (HPLC 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 Balb/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 HPLC 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。

## 【0262】

## 結論

ペプチド骨格内の Tyr を D - Tyr 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

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 mMu9 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 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。

## 【0264】

mMu9 x m679 を用いて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 3 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 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】

10

20

30

40

50

【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

10

20

【 0 2 6 7 】

【表 5】

$^{111}\text{In}$  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

30

40

50

## 【0268】

## [実施例4]

## 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、1g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、1Mの最終濃度において、42°Cで60分間、1lのRNAse阻害剤(10U/l)、4.0lの5×逆転写酵素緩衝液(500mMのTris-HCl(pH8.2)、200mMのKCl、50mMのMgCl<sub>2</sub>および2.5mMのスペルミジン)、1lの100mM dNTP、1lの80mMピロリン酸ナトリウム、および5U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VK配列を増幅した。VK領域は、VK1BACK(5'-GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCA3')およびIgKC3'(5'-CTCACTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGG3')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。10lの第1鎖cDNA産物、10lの10×PCR緩衝液(15mMのMgCl<sub>2</sub>、500mMのKCl、100mMのTris-HCl(pH8.3)および0.01%(w/v)のゼラチン)、1Mの各プライマー、16lのdNTP混合物、および5U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°Cで1分間の変性、45°Cで1分間のアニーリングおよび72°Cで1分間の重合の5サイクルと、94°Cで1分間の変性、55°Cで1分間のアニーリングおよび72°Cで1分間の重合の25サイクルとの組合せ)。増幅されたVkフラグメントおよびVH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TA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。

## 【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>H</sub>(MU9V<sub>H</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>H</sub>1から構築されたキメラMu-9(cMu-9-1)は、CSA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。

## 【0270】

## [実施例5]

## 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 (100g/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、0.5N NaOH / 1.5M NaClで5分間、1M Tris-HCl (pH 8.0) で5分間、0.1M Tris-HCl (pH 7.5) / 2xSSCで5分間、そして最後に2xSSCで5分間~10分間、連続して処理した。DNAを、80°C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、6xSSC、5x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100g/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°C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MUCH-1 (5'-AGACTGCAGGAGAGCTGGGAAGGTGTGCAC3') およびマウス軽鎖に対して特異的なMUCK-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、0.2xSSC、0.1%SDSにおいて、37°Cで10分間の4回の洗浄、42°Cで15分間の2回の洗浄、そして50°Cで15分間の1回の洗浄が行われた。2xSSCにおける最後の洗浄の後、湿ったフィルターをKodak XAR-5フィルム (Rochester、NY) に70°C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、VHCDR3Mu9 (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、VKCDR1Mu9およびVKCDR3Mu9 (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>L</sub>-1のCDR1コード配列およびCDR3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。

#### 【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、VHCDR3Mu9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。VHCDR3Mu9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Mu9VH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、Mu9Vk1特異的プローブのVKCDR1Mu9およびVKCDR3Mu9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Mu9Vk1と同一であることが明らかにされた。Mu9Vk1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-9V<sub>1</sub>とは異なり、Mu-9V<sub>2</sub> (その配列が図1Bに開示される) と呼ばれるVkドメインを有する軽鎖配列をコードしていた。VHおよびVk2から構築され、Sp2/0細胞において発現されたキメラMu-9 (cM

u - 9 - 2 ) は、マウス M u - 9 の結合親和性に匹敵する結合親和性を C S A p 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 ) 。

【 0 2 7 3 】

[ 実施例 6 ]

c D N A 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 3 9 2 D N A / R N A 合成機 ( A p p l i e d B i o s y s t e m s ) で合成し、次いで P D 1 0 カラム ( P h a r m a c i a B i o t e c h ) で精製した。精製されたオリゴヌクレオチドを、T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ ( N e w E n g l a n d B i o l a b s , B e v e r l y , M A ) を使用して [ - <sup>32</sup>P ] A T P ( A m e r s h a m , A r l i n g t o n H e i g h t s , I L ) で標識した。2 0 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。5 0 p m o l のオリゴヌクレオチド、6 0 C i の [ - <sup>32</sup>P ] A T P ( 6 0 0 0 C i / m m o l ) 、および 2 l の 1 0 x キナーゼ緩衝液 ( N e w E n g l a n d B i o l a b s ) 。反応混合物を 3 7 °C で 1 時間インキュベーションして、反応を 2 0 l の 0 . 1 M E D T A で停止させた。取り込まれなかった [ - <sup>32</sup>P ] A T P を T E - 1 0 C h r o m a s p i n カラム ( C l o n e t e c h , P a l o A l t o , C A ) 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 1 0 <sup>6</sup> c p m / m l で使用された。

10

【 0 2 7 4 】

[ 実施例 7 ]

S P 2 / 0 細胞のトランスフェクション

M u - 9 について推定される V H 配列および V H 配列を、L e u n g r a ( 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 ( p K h または p K h \* ) および重鎖発現ベクター ( p G 1 g ) にサブクローニングした。p K h \* は、X h o I / P a c I リンカーが 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 H 2 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 1 0 g および約 3 0 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 9 6 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、5 0 0 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 % ~ 2 0 % の勾配ゲルでの S D S - P A G E によって分析した。

30

【 0 2 7 5 】

[ 実施例 8 ]

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 - 3 9 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 時間一晩放置した。翌日、非特異的な結合を、1 % B S A および 0 . 0 5 % ツイン 2 0 を含有するリン酸塩緩衝化生理的食塩水 ( P B S ) でブロッキングした。キメラ抗体上清 ( 1 0 0 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 . 0 5 % ツイン 2 0 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

40

50

ImmunoResearch、West Grove PA)と、そしてFc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IgG (Jackson ImmunoResearch)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 $\mu$ lのOPD基質溶液(10mgのオルトフェニレンジアミン二塩酸塩(Sigma、St. Louis、MO)を含む25mlの0.32 $\times$ PBSおよび0.12% $H_2O_2$ )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 $\mu$ lの4N  $H_2SO_4$ で停止させ、そして490nmにおける吸光度をDynatechプレート読み取り装置(Dynatech Labs、Sussex、英国)で測定した。

【0276】

図5(a)に示されるように、CSAp抗原に対するcMu-9(cMu-9-2)の直接的な結合が生じた。cMu-9-2の結合プロファイルは、事実上、ネズミMu-9の結合プロファイ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、cMu-9-2の免疫反応性はマウスMu-9の免疫反応性に匹敵することが明らかにされた。cMu-9の機能的なV およびVHのDNA配列およびアミノ酸配列がそれぞれ図2Aおよび2Bに示される。

【0277】

[実施例9]

競合的結合アッセイ

ネズミMu-9 IgGを西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(Sigma)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Mu-9を、最初に、CSAp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 $\mu$ g/ml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Mu-9を様々な濃度のネズミMu-9またはキメラMu-9のいずれか(0~50 $\mu$ g/ml)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。

【0279】

[実施例10]

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

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 VHおよびWOL 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(Quら、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。

10

20

30

40

50

## 【0280】

## [実施例11]

## 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'-AGGTCTCTGTTTTACCCAGGTAATAACATACTCAGTGAAGGTGTATCCAGAAGCCTTGCAAGGAGACCTTCACTGAGCTCCAGGCTTTTTTCACCTCAGCTCC-3'。

## 【0282】

オリゴHの配列はhMu9VHドメインのnt147~nt325に対応する。

5'-GATTTATCCTGGAAAGTGGTAGTACTTCTCAATGAAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACAATCACTGCTGACAAATCCACTAACACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGTTCTATTTCTGTACAAGAGAGGATCTTGGGGGCCAAGGGTCTCTGGTCAACCG-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'-GTGCAGCTGCAGCAGTCAAGGAGCTGAGGTG-3')およびオリゴ15(5'-ACTCTAGACCCTGTCCAGGTCTCTGTTTTTACCCAGGTAATAACATA-3')、ならびに5ユニットのTaqDNA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°Cで1分間の変性、50°Cで1.5分間のアニーリングおよび72°C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'-GGTCTAGAGTGGATTGGAGA

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 - 3 ' ) およびオリゴ17 ( 5 ' - T G A A G A G A C G G T G A C C A G A G A C C C T T G G C C C C C A A G A T C C T C T C T T G T A C A G A A A T A G A A C G C - 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 ( C T G C A G ) をその5'末端に、そしてXbaI制限部位 ( T C T A G A ) 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BstEII制限部位 ( G G T C A C C ) 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PstIおよびBstEIIで事前に消化されたVHpBSベクター ( Leungら、Hybridoma、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、13:469 ( 1994 ) ) に連結して、hMu9VHpG1gが得られた。

10

20

## 【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テンプレートは、nt21~nt150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 ( 130mer ) :

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

と、hMu9Vドメインのnt151~nt300に対応するオリゴK ( 150mer )

30

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

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

40

オリゴ19 5' - A G A T C A G G A G C C T T G G A G C C T G G C C T G G T T T C T G C A - 3'

オリゴ20 5' - T A C C T G C A G A A A C C A G G C C A G G C T C C A A G G C T C C T G A T C T A C A A A G T T T C C A A C C G - 3'

オリゴ21 5' - T T A A T C T C C A C C T T G G T C C C C C T C C G A A C G T G T A C G G A A C A C G T G A A C C T T G A A A G C A G T A A T A C A - 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 ( C A G C T G ) であり、Bフラ

50

グメントの3'末端制限部位がBglIII (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。

【0287】

[実施例12]

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。

10

【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。

20

【0289】

[実施例13]

<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値の上昇を示し始め、30ng/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3cm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、25mCi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50mg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15ng/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8ng/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値は約5~8ng/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、300m

30

40

50

g / m<sup>2</sup>の1週間用量で、イリノテカン ( C P T - 1 1 ) の治療クールと同時に受けることが予定されている。

【 0 2 9 0 】

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。

【 0 2 9 1 】

## 【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.

Radioimmunodetection 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., 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. 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

## 【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.

10

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.

20

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.

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.

## 【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.

30

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.

Thorpe et al., U.S. Patents No. 6,342,221; 6,004,554; and patents and references cited therein.

40

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.

## 【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文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。Kabata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、Kabata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9A】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。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文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9B】Sp2/0細胞において発現させたキメラMu-9(cMu-9)の軽鎖可変領域のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。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文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。

【図10A】ヒト抗体ならびにMu-9およびhMu-9の重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。Kabata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10B】ヒト抗体ならびにMu-9およびhMu-9の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10Bには、ヒト抗体WOLとMu-9およびhMu-9とのVA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。Kabata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。

40

【図11A】Sp2/0細胞において発現させたhMu-9の重鎖可変領域の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。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文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。Kabata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11B】Sp2/0細胞において発現させたhMu-9の軽鎖可変領域のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。図11Bには、hMu-9VのDNA配列およびアミノ酸

50





【 7 】

GTCCAGCTGCGCCTGCGAGCTGAGTGGTGAAGAAGCCTGGGAGCTGCGAGGCTCCCTGCGAAGGCTTCTGCGATACACCTTCACTGAG 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 F T E 30  
 TAAGTTATACCTGGGTAAACAGAGACCTGGACAGGCTTAGAGTGGATGAGAGATTTTCCTGCGAAGTGGTACTTCCCTACATF 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 F S Y N 60  
 CDR1  
 GAAAGTTCAAGGCGACGCTCACTGCTGACAAATCCCTACACAGCCTTACATGAGCTTCAGCAGCCTTGAAGATCTGAGGAGACT 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  
 GGGTCTATTTCTGTACAAGAGAGATTTGGGGCCAGGGTCTCTGGTCAACCTCTTCA 333  
 A F Y F C T R E D L G G Q G S L V T V S S 111  
 CDR3

FIG. 7

【 9 A 】

CAGETCCAACTGCGAGCTCAGGACTGAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGATGCTCCCTGCGAGGCTTCTGCGATACACCTTCACT 90  
 I 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 30  
 GAGTATCTTATACCTGGGTAAACAGAGAACTGGACAGGCTTAGAGTGGATTTTCCTGGAAGTGGTACTTCCCTAC 180  
 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 50 52 A  
 CDR1  
 AAGTAAAGTTCAAGGGCAGCCNCTGACTGCGAGCAGATCTCCACACAGCCTTACATGACCTCAGACCTCAGACGCTGAGCAGCTGAGGAC 270  
 60 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  
 TCTGGGTTCTATTTCTGTACAAGAGAGATTTGGGGCCAGGGACTCTGGTCAACCTCTTCA 336  
 RstEII  
 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

FIG. 9A

【 8 】

AGTTCAGCTGCGAGGCTCAGCCTCAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGATGCTCCGAGGCTTCTGCGATACACCTTCACT 89  
 2 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 30  
 GAGTATGTTTACTCTGGTAAACAGAGAACTGGACAGGCTTAGAGTGGATTTTCCTGGAAGTGGTACTTCCCTAC 179  
 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 50 52 A  
 CDR1  
 AATGAAAGTTCAAGGGCAGCCCACTGACTGCGAGCAANTCTCCACACAGGCTTACATGACCTCAGCAGCCTGAGCAGCCTGAGGAC 269  
 60 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  
 TCTGGGTTCTATTTCTGTACAAGAGAGATTTGGGGCCAGGGACTCTGGTCAACCTCTTCA 335  
 S A V Y F C T R E D L G G Q G T L V T V S S 110 113  
 CDR3

FIG. 8

【 9 B 】

GACATCTGCGAGCCCAACTCCACTCCCTGCTGAGTCTGGAGATCAAGCTCCACTCTGCGAGATCTAGTGTAGAGATTTTC 90  
 1 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  
 CHRTAIVGGGACACACTTATTTAGATGGTACTTGGCAAAACCGAGCCTTCCAAAGCTCCGTGATCTACAAGATTTCCACCCGATTT 180  
 D E 30 40 50  
 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  
 CDR2  
 TCTGGGGTCCGAGCAGGTTCAGTGGCACTGATCAGGACAGATTTCAAGTCAAGTCAAGGCTGAGGCTGAGGATCTGGGACTT 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  
 TATTAAGTCTTCAAGGTTCAAGTCTGCTGATCAGCTTCCGATCAGCTTCCGAGGAGGAGCAGGCTGAGATCAAAAGT 339  
 90 100 108 108  
 Y Y C P Q G S P V P Y T F G G G T K L E I K R  
 CDR3

FIG. 9B

【 1 0 A】

1 EVVLVQSGAEVKKPKGSSVKYCKKASGGTFTSRSAIIWVROA 30 40  
 -VOLQE..P..V..A..M..R..R..Y..T..EYV..T..K..R  
 hMu9VH QVQLQ.....Y..T..EYV..T..K..R

50 52A 60 70  
 FCQGLEWNGGIVPMFPPNYAKQFQGRVTTITADESTNTAY  
 T.....I..E..Y..G..S..S..T..S..N..E..K..K..L..K..S.....  
 hMu9VH .....I..E..Y..G..S..S..T..S..N..E..K..K.....K.....

80 82ABC 90 100 110  
 MELSLRSEDIAFYFCAGGYGIYSPEEYNGGLVTVS  
 hMu9VH .....T..S..V..T..REDL-----  
 .....T..REDL-----

NEWNVH 103 110 113  
 WCQGSLLIVVSS  
 hMu9VH G.....T..TVSS  
 G.....TVSS

FIG. 10A

【 1 0 B】

1 EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSQRASQS---VSSGYLGM 20 27A B C D E 30  
 Mu9Vh AVLM..T..LS..PV..L..DO..SI..S..I..VHSNGNT..E..  
 hMu9Vh DIQL.....S..I..VHSNGNT..E..

40 50 60 70  
 YQKPGQAPRLIIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTI  
 hMu9Vh .....S..K.....KV..N..FS..V.....T.....VR.  
 hMu9Vh .....KV..N..FS..V.....T.....VR.

80 90 100 108  
 SRLPEDEFAVYCYQYGSIGRTFCQGTKVEIKR  
 Mu9Vh ..V..A..LGL...F..GSRVPI...G...LEIK-  
 hMu9Vh .....F..GSRVPI...G...LEIK-

FIG. 10B

【 1 1 A】

1 CAGGTCCAACTGCGAGTCAAGAGTGAAGGCTGGAGCTCAGTGAAGTCTCTCGAAGGCTCTGATACACTTCAC 30 90  
 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

40 50 52 A 52 A  
 GAGTATGTTATACCTGGFTAAACAGAGACCTGGR.CAGGGCTTAGAGTGGATTTGAGAGATTTATCCTGGAGTGTGATCTTCCTAC 180  
 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 CDR2

60 70 80 82 A B C 270  
 AATGAAAGTTCAGGGCCAGGCGAATGCTGACATCTGACAAATCCACTAACACAGGCTACATGAGGCTCAGCGCTGAGATCTGAGGAC

90 103 110 113 336  
 ACTCGCTTATTCTTACAGAGAGATCTGGGGCCAGGGTCTCTGTCACCGTCTCTCTCA  
 T A F Y C T R E D L G G Q G S L V T V S S  
 CDR3

BstEII  
 ACTCGCTTATTCTTACAGAGAGATCTGGGGCCAGGGTCTCTGTCACCGTCTCTCTCA

FIG. 11A

【 1 1 B】

1 GACATCCAGTGAACCCATCCCCAGGSCCCCTGCTCCCTCAGTCTTGAGAGGAGCCACTCTGTCTTGACGGCTAGTCAGAGATTTG 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 27 A B C

30 40 50 52 A B C 180  
 CAVPACTAATGGCAACACTTATTAGATGGTACTTCGAGAACACAGGCCAGGCTCCAGGCTCTGATCTCAGAGTTCCACCGATTT  
 D E 30 40 50 52 A B C 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  
 CDR1 CDR2

60 70 80 270  
 TCCGAGTCCAGAGGTTCAAGTCTGATCAGAGGACAGATTTACACTTACTATCAGCAGACTGAGCTGAGATTTGCTGTG  
 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

90 100 108 336  
 TAITACTGCTTCCAGGTTCCAGTTCCTGATACAGTTCCGAGGGGGACCAAGGTGAGATCAAGGT  
 Y Y C F Q G S R V P Y T F G G G T K V E I K R  
 CDR3

BgIII/BclI  
 TAITACTGCTTCCAGGTTCCAGTTCCTGATACAGTTCCGAGGGGGACCAAGGTGAGATCAAGGT

FIG. 11B

【 図 1 2 】

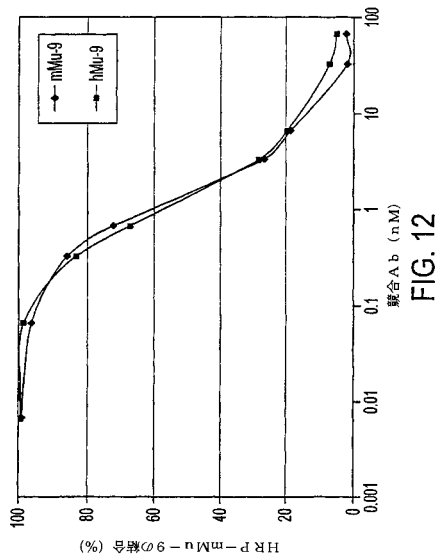


FIG. 12

## 【 配列表 】

2009022273000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成20年7月16日(2008.7.16)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

## 【 請求項 1 】

配列番号 29 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、配列番号 30 に記載のアミノ酸配列からなる CDR2 及び配列番号 31 に記載のアミノ酸配列からなる CDR3 を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 32 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、配列番号 33 に記載のアミノ酸配列からなる CDR2 及び E D L のアミノ酸配列からなる CDR3 を含む重鎖可変領域からなるモノクローナル抗体の結腸特異的抗原 - p ムチン ( C S A p ) 抗原への結合を阻害する、C A S p へ結合するヒト化若しくはキメラ化モノクローナル抗体またはその免役反応性フラグメント。

## 【 請求項 2 】

前記モノクローナル抗体が、配列番号 29 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、配列番号 30 に記載のアミノ酸配列からなる CDR2 及び配列番号 31 に記載のアミノ酸配列からなる CDR3 を含む軽鎖可変領域、並びに配列番号 32 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、配列番号 33 に記載のアミノ酸配列からなる CDR2 及び E D L のアミノ酸配列からなる CDR3 を含む重鎖可変領域からなるモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載のヒト化若しくはキメラ化モノクローナル抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 3】

前記モノクローナル抗体が、配列番号 27 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域からなるモノクローナル抗体である、請求項 1 または 2 に記載のヒト化モノクローナル抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 4】

前記モノクローナル抗体が、配列番号 23 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域からなるモノクローナル抗体である、請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載のヒト化モノクローナル抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 5】

前記フラグメントが、Fv、F(ab)<sub>2</sub>、Fab' 及び Fab からなる群から選択される、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のフラグメント。

## 【請求項 6】

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、請求項 1 乃至 5 のいずれか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】

前記診断 / 検出剤が、少なくとも 1 つの光活性な診断 / 検出剤からなる、請求項 6 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】

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 6 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】

前記放射性核種が、線放出同位体、線放出同位体または陽電子放出同位体である、請求項 8 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 10】

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 及び Tl-201 からなる群から選択される、請求項 9 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 11】

前記診断剤が、造影剤、常磁性イオンまたは超音波増強剤である、請求項 6 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 12】

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)、ネオジウム(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) 及びエルビウム(III) からなる群から選択される金属からなる、請求項 11 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 13】

前記治療剤が、放射性核種、ホウ素原子、ガドリニウム原子、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、及び異なる抗体、並びにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 6 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 14】

前記治療剤が、薬物または毒素である、請求項 6 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 15】

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、及び抗生物質、並びにそれらの組合せからなる

群から選択される、請求項 1 4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 1 6】

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、エピボドフィロトキシン類、白金配位錯体、ピンカルカロイド、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及びその誘導体、並びにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 4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 1 7】

前記毒素が、リシン、アブリン、トキシン、サボリン、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、及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 1 4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 1 8】

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)、エリスロポイエチン、トロンプオイエチン、及び抗体、並びにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 3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 1 9】

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 - 、若しくは であり、前記幹細胞増殖因子が「S 1 因子」と称される因子である、請求項 1 8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 2 0】

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 - 、及びTNF-、並びにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 8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 2 1】

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 1 3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 2 2】

前記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がCD40に対する抗体である、請求項 2 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 2 3】

前記放射性核種が、オージェ放射体、線放射体及び線放射体からなる群から選択される、請求項 1 3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 2 4】

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、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、及びFm-255、並びにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 3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 2 5】

前記光活性な治療剤が、色素原または色素である、請求項 1 3 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 2 6】

前記診断剤または治療剤が、炭水化物部分によって該モノクローナル抗体またはそのフラグメントに結合している、請求項 6 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 2 7】

少なくとも 2 つの請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の C A S p へ結合するモノクローナル抗体またはそのフラグメントからなる抗体融合タンパク質。

【請求項 2 8】

少なくとも 1 つの請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の C A S p へ結合する第 1 のモノクローナル抗体またはそのフラグメント、並びに該第 1 のモノクローナル抗体若しくはそのフラグメントとは異なる少なくとも 1 つの第 2 のモノクローナル抗体またはその免役反応性フラグメントからなる抗体融合タンパク質。

【請求項 2 9】

前記融合タンパク質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 2 7 に記載の抗体融合タンパク質。

【請求項 3 0】

前記第 2 のモノクローナル抗体が、がん腫関連抗原に結合する抗体である、請求項 2 8 に記載の抗体融合タンパク質。

【請求項 3 1】

前記第 2 のモノクローナル抗体が、CEA、EGP-1、EGP-2、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、PAM-4 が結合する抗原、KC4 が結合する抗原、TAG-72、EGFR、HER2/neu、BrE3、Le-Y、A 3、KS-1 若しくは VEGF に結合する抗体、血管形成抗体、抗壊死抗体、がん遺伝子産物の抗体、及び抗体 A33 からなる群から選択される、請求項 3 0 に記載の抗体融合タンパク質。

【請求項 3 2】

前記がん腫関連抗原が、胃腸のがんまたは卵巣のがんにおける抗原である、請求項 3 0 に記載の抗体融合タンパク質。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 49/02	Z
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
	G 0 1 N 33/577	B

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(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・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) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA44 BA53 BA61 CA04 CA07 CA09 CA20  
 DA02 EA04 GA14 GA18 HA03 HA11 HA13 HA14 HA15 HA20  
 4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA90X AA90Y AA93Y AB01 AC14 BA03  
 BA16 BD14 CA24 CA25 CA43 CA44 CA46  
 4C085 AA14 AA16 AA25 AA26 AA27 BB01 CC23 EE01 GG01 HH03  
 JJ05 KA04 KA28 KA29 KB82 LL18  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA50 BA70 BA71 BA72 CA40  
 DA75 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26

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="#">JP2009022273A</a>	公开(公告)日	2009-02-05
申请号	JP2008158796	申请日	2008-06-18
[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	C12N15/09 C07K16/18 C07K19/00 C07K11/113 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N1/15 A61K39/395 A61P35/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61K51/00 G01N33/574 G01N33/577 G01R33/28 A61B5/055 A61K49/00 A61K51/08 A61K51/10 C07K5/107 C07K5/11 C07K16/28 C07K16/30 C07K16/44 C07K16/46 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/50		
CPC分类号	C07K16/468 A61K47/6863 A61K47/6899 A61K51/1048 A61K51/1063 A61K2039/505 B82Y5/00 C07K16/18 C07K16/30 C07K16/3007 C07K16/3046 C07K16/44 C07K2317/12 C07K2317/13 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/55 C07K2317/622 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C07K19/00 C07K11/113 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N1/15 A61K39/395.L A61K39/395.T A61P35/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61K49/02.Z G01N33/574.A G01N33/577.B A61K49/02.B A61K49/02.C A61K49/18 A61K51/00 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/08.200 A61K51/10.200 A61K51/12.200 C07K16/46 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA44 4B024/BA53 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA14 4B024/GA18 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA15 4B024/HA20 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA03 4B065/BA16 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/BB01 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/HH03 4C085/JJ05 4C085/KA04 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KB82 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA50 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 渡边真一 井上隆一		
优先权	09/823746 2001-04-03 US		

## 摘要(译)

放射免疫疗法 ( RAIT ) 和化学免疫疗法以及放射免疫探测 ( RAID ) , 超声检查和磁共振成像 ( MRI ) 的检测中使用的免疫学试剂。 /或提供用于诊断的免疫试剂。 一种双特异性抗体或抗体片段, 其具有至少一个能够与靶组织反应的臂和至少另一个能够与接头部分反应的臂。 接头部分包含从其制备抗体的半抗原。 此类抗原接头与一种或多种治疗剂或诊断剂或酶缀合。 用于产生这种双特异性抗体或抗体片段的构建体和方法, 以及它们的使用方法。 [选择图]无

